

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA TEKNOLOJİSİ BİLİM DALI**

**GDO TESPİTİNE YÖNELİK DNA-İNORGANİK HİBRİT TEMELLİ
NANOMALZEMELERİN SİNYAL PLATFORMU OLARAK
GELİŞTİRİLMESİ, MODELLENMESİ VE OPTİMİZASYONU**

Ayşenur YARDIM

**Danışman
Doç. Dr. İlker POLATOĞLU**



MANİSA-2021

Ayşenur
YARDIM

GDO TESTİTİNE YÖNELİK DNA-İNORGANİK HİBRİT TEMELLİ
NANOMALZEMELERİN SİNYAL PLATFORMU OLARAK GELİŞTİRİLMESİ,
MODELENMESİ VE OPTİMİZASYONU

2021

Tez Sırtı Örneği

TEZ ONAYI

Ayşenur YARDIM tarafından hazırlanan “GDO Tespitine Yönelik Dna-İnorganik Hibrit Temelli Nanomalzemelerin Sinyal Platformu Olarak Geliştirilmesi, Modellenmesi Ve Optimizasyonu ” adlı tez çalışması 12/08/2021 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak savunulmuş ve oybirliği ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

Danışman **Doç. Dr. İlker POLATOĞLU**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Dr. Öğr. Üyesi Erdal EROĞLU**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Levent AYDIN**
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Yücel KOÇYİĞİT**
Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi **Dr. Öğr. Üyesi Volkan KILIÇ**
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Ayşenur YARDIM



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLO DİZİNİ	VII
TEŞEKKÜR	VIII
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMA (GDO)	2
2.1.1. GDO TESPİT YAKLAŞIMLARI	3
2.1.1.1. PROTEİN TEMELLİ ANALİZ YÖNTEMLERİ	4
2.1.1.2. DNA TEMELLİ ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	7
2.2. BİYOSENSÖR.....	9
2.2.1. DNA BİYOSENSÖRLERİ.....	10
2.2.2. AMAÇ VE HEDEFLER	16
2.3. MODELLEME VE OPTİMİZASYON.....	18
3. DENEYSEL KISIM	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar	23
3.2. Yöntemler.....	26
3.2.1. Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması	26
3.2.2. Manyetit Nanotanciklerinin Modifikasyonu.....	26
3.2.3. Manyetit Çapraz Bağlı İnvertaz Agregatlarının (MCLIA) Hazırlanması.....	28
3.2.4. MCLIA'nın Fonksiyonel Hale Getirilmesi.....	29
3.2.5. Nükleotit Sekansını Tanımlayabilen Özgün DNA Dizisinin Belirlenmesi, Prob DNA ve Eşlenik Olmayan DNA Sekanslarının Dizaynı.....	30
3.2.6. Tiyoil Aktif Prob DNA'ların Elde Edilmesi.....	30
3.2.7. DNA-İnorganik Hibrit Temelli Nanomalzemenin (DIN) Sinyal Platformu Olarak Geliştirilmesi.....	31
3.2.8. MCLIA Yapısının ve Geliştirilen Sinyal Platformunun (DIN) Analitik Performansının Test Edilmesi	32
3.3. Deneyisel Dizayn, Modelleme ve Optimizasyon	36
3.4. Karakterizasyon Çalışmaları	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	42
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları	42
4.1.1. SEM-EDX Sonuçları	42
4.1.2. FTIR analizi	46
4.1.3. VSM Analizi.....	47
4.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi	48
4.2. Deneyisel Çalışmalar.....	51
4.2.1. MCLIA Yapısının Analitik Performansının Glikoz Metrede Test Edilmesi	51
4.2.2. Ağır metallerin MCLIA Yapısını İnhibe Etme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	54

4.2.3. İnhibe olan MCLIA* Yapısının Reaktivasyonu	55
4.2.4. MCLIA* Yapısının Glikoz Metrede Sükrozu Algılama Performansı, Tekrar Kullanılabilirliği ve Depolama Kararlılığı	57
4.2.5. MCLIA Yapısı İçin Optimum Yapısal ve Deneysel Parametre Değerlerinin Belirlenmesi.....	58
4.2.6. Sinyal Platformunundan (DIN) Glikoz metrede Sinyal Eldesi.....	69
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	76
EKLER.....	84
EK A.1 MCLIA Aktivitesi İçin Nöro-Regresyon Modelleri	84
ÖZGEÇMİŞ	89



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

ANN	Yapay Sinir Ağları
CaMV	<i>Karnabahar mozaik virüsü</i>
DIN	DNA-inorganik hibrit temelli nanomalzeme
DNA	Deoksiribonükleik asit
FDT	Sonlu Fark Tekniği
GDO	Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GOx	Glikozoksidaz
H₂O₂	Hidrojen peroksit
Hc	Artık mıknatıslanma
K_m	En Yüksek Reaksiyon Hızının Yarisının Elde Edildiği Substrat Konsantrasyonu
MA	Yüzeyleri aktif manyetit nanotanecekleri
MCLIA	Manyetit Çapraz Bağlı İnvertaz Agregatları
Mr	Yeniden mıknatıslanma
P-35S	35S promotörü
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGM	Kişisel Glikoz Metreler
QCM	Kuvars Kristal Mikro Teraziler
RA	Regresyon Analizi
RCA	Rolling Circle Amplification (Yuvarlanmalı Çember Büyütme)
RNA	Ribonükleik asit
RSM	Yanıt Yüzeyi Metodolojisi
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Sinyal^a	Tüm tekrarlardan elde edilen veri seti
Sinyal^b	Standart sapmanın minimum seviyede olmasını sağlayan veri seti
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
Str-Bio	Streptavidin-Biyotin etkileşimi
TBE	Tris-Borat-EDTA tampon
T-nos	Nopalin sentaz terminatörü
V_{max}	En Yüksek Reaksiyon Hızı
MNM	Geliştirilmiş Nelder- Mead Algoritması

MDE	Geliştirilmiş Diferansiyel Evrim Algoritması
MSA	Geliştirilmiş Benzetilmiş Tavlama Algoritması
MRS	Geliştirilmiş Rastgele Arama Algoritması

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
dk	Dakika
dL	Desilitre
emu/g	Kütle manyetizasyonu
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
Oe	Manyetik alan kuvveti
RPM	Dakikada çalkalama hızı
U	Enzim Birimi
v/v	Hacim/hacim
w/v	Kütle /hacim
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
Σ	Toplam
Rcf	Göreceli santrifüj kuvveti

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Promotör, trans ve terminatör genlerden oluşan GDO gen kasetinin şematik diyagramı	7
Şekil 2.2 Biyosensörlerin temel elementleri ve bu elementlere göre katagorize edilmesi	10
Şekil 2.3 Deneysel hedeflerin gerçekleştirilme basamakları	17
Şekil 3.1. (a) Manyetit nanotaneciklerinin ultrasonik çalkalamalı su banyosundaki, (b) kurutma sonrası elde edilmiş yüzeyleri aktif manyetit nanotanecikleri (MA).....	28
Şekil 3.2. Manyetit çapraz bağlı invertaz agregatlarının (MCLIA) çalkalamalı su banyosundaki hazırlanışı	29
Şekil 3.3. MCLIA yapısı ve bu yapının maleimid grubu ile fonksiyonel hale getirilmesi.....	29
Şekil 3.4. CaMV 35S promotörünün nükleotit sekansı (NCBI referans numarası: S51061.1) ve seçilen hedef gen bölgesi	30
Şekil 3.5. Tiyol aktif prob DNA'ların tasarımı	31
Şekil 3.6. DNA-inorganik hibrit temelli nanomalzemenin (DIN) sinyal platformu olarak geliştirilmesi	32
Şekil 3.7. MCLIA yapısı ve geliştirilen sinyal platformunun (DIN) analitik performansının glikoz metrede test edilmesi	33
Şekil 3.8. DIN ve DINH arasındaki inhibisyon oranlarının Akış 1'e göre tespit edilmesi	35
Şekil 3.9. DIN ve DINH arasındaki inhibisyon oranlarının Akış 2'ye göre tespit edilmesi	36
Şekil 4.1. A) Manyetit nanotaneciği ve B) MA yapısına ait tane boyut analizi C) Manyetit nanotaneciği ve D) MA yapısına ait SEM görüntüleri	42
Şekil 4.2. (a) Manyetit nanotaneciği, (b) MA, (c) MCLIA*, (d) MCLIA* yapısının Ag ⁺ ile muamele edilmiş hali ve (e) DIN yapısına ait SEM görüntüleri	43
Şekil 4.3. (a) Manyetit nanotaneciği, (b) MA, (c) MCLIA*, (d) MCLIA* yapısının Ag ⁺ ile muamele edilmiş hali ve (e) DIN yapısına ait EDX analiz sonuçları	45

Şekil 4.4. Manyetit nanotaneceği ve MA yapısına ait FTIR spektrumu.....	46
Şekil 4.5. Manyetit nanoparçacıkların, MA ve MCLIA'nın oda sıcaklığında manyetizasyon eğrileri	47
Şekil 4.6. Agaroz jel elektroforezi.	49
Şekil 4.7. Kontrol grubu ve DIN yapısına tutunmayan Prob DNA'ların agaroz jel görüntüleri	50
Şekil 4.8. (a) Ag^+ konsantrasyonuna bağlı MCLIA yapısındaki enzim inhibisyon oranı, (b) MCLIA yapısının Ag^+ tespit etme performansı	55
Şekil 4.9. MCLIA* yapısının Ag^+ ile inhibisyonu sonrası β -merkaptan etanol ile aktive edilmesi sonucu tekrar kullanılabilirliği.....	56
Şekil 4.10. MCLIA* yapısının glikoz metrede sükrözü algılama performansı ..	57
Şekil 4.11. MCLIA* yapısının tekrar kullanımı (100 mM sükröz ortamında) sayısına bağlı olarak göreceli aktivitesinde meydana gelen değişim grafiği	58
Şekil 4.12. L, SON, SOSinTN ve FOLN aday modellerinin uyumluluk kabiliyet grafikleri.....	63
Şekil 4.13. SON amaç fonksiyonunun her iki veri seti için uygulanan sınır değerleri sonucunda verdiği 3 boyutlu çıktılar.....	65
Şekil 4.14. DIN yapılarının gümüş iyon konsantrasyonlarına bağlı inhibisyon oranları ve gümüş iyonu tutma kapasiteleri	70

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Protein bazlı tespit yaklaşımlarına ait bazı çalışmalar ve onların avantaj ve dezavantajları	6
Tablo 2.2. GDO tespitine yönelik geliştirilen DNA temelli biyosensörler.....	13
Tablo 2.3. MDE, MNM, MRS ve MSA optimizasyon algoritmaları için ilgili seçenekler.....	22
Tablo 3.1. Temin edilen sarflar ve deneysel çalışmalardaki kullanım amaçları.	23
Tablo 3.2. Temin edilen cihazlar ve deneysel çalışmalardaki kullanım amaçları	25
Tablo 3.3. Hedef, prob, modifiyeli prob ve eşlenik olmayan DNA gen dizilimleri.....	30
Tablo 3.4. MCLIA tasarımı için kullanılan parametrelerin (bağımsız değişkenler) değer aralıkları.....	37
Tablo 3.5. Doğrusal, ikinci dereceden, trigonometrik, logaritmik ve rasyonel formları dahil olmak üzere çoklu regresyon modeli türleri	38
Tablo 4.1. MCLIA için belirlenen yapısal ve deneysel parametre değerlerine karşılık glikoz metreden elde edilen sinyaller (mg/dl).....	52
Tablo 4.2. En yüksek sinyallerin elde edildiği runlar için hazırlanan MCLIA yapılarının 6 kullanım sonrası göreceli aktiviteleri (%).....	53
Tablo 4.3. Bazı ağır metallerin (30 µM) invertaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri	54
Tablo 4.4. ANOVA sonuçları	59
Tablo 4.5. ANOVA için geliştirilen modellerin yeteneği	60
Tablo 4.6. MCLIA aktivitesi için Nöro-regresyon modellerinin deneysel verileri temsil edebilme performansı ve sınırlılık açısından sonuçları	62
Tablo 4.7. Optimizasyon senaryoları ve bu senaryoların gerçekleştirilmesi sonucu üretilen sinyal değerleri	68
Tablo 4.8. Geliştirilen sinyal platformunun hedef DNA sekansını algılama performansı	72

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesi ile lisansüstü öğrenim hayatımın tüm zorlu aşamalarında maddi manevi her yönden yardımcı olan, tecrübeleri ile beni aydınlatan ve kendisini tanımaktan büyük onur duyduğum Sayın danışman hocam Doç. Dr. İlker POLATOĞLU' na,

Çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerine ek olarak gerekli ekipmanları ve programları benimle paylaşan ve aynı zamanda eleştirileriyle tezime katkıda bulunan ve beyin fırtınalarımızın yanında yaptığımız hoş sohbetler ile hayatıma dokunan saygı değer jüri üyelerim olan Doç. Dr. Levet AYDIN ve Dr. Öğr. Üyesi Erdal EROĞLU'na,

119Z380 numaralı projenin finansal destekçisi olan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna ve bu proje kapsamında STAR Bursiyeri olarak hem proje çalışmalarına hemde bu stresli süreç de manevi olarak verdiği destekten dolayı Fatma Işık ÇELİKESİR arkadaşşıma,

Son olarak hayatım boyunca beni koşulsuz destekleyen, bana olan güven ve inançlarını esirgemeyerek ve hep yanımda olan canım aileme ve Erdi ÖNVER'e yürekten teşekkür ederim.

Ayşenur YARDIM
Manisa, 2021

ÖZET

Yüksek Lisans

GDO Tespitine Yönelik DNA-İnorganik Hibrit Temelli Nanomalzemelerin Sinyal Platformu Olarak Geliştirilmesi, Modellenmesi Ve Optimizasyonu

Ayşenur YARDIM

**Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. İlker Polatoğlu

DNA sekanslarının bir biyoreseptör olarak DNA temelli biyosensör tasarımında kullanılması geleneksel yöntemlerle yapılan çeşitli analizlerin yerini alabilecek alternatiftir. Düşük maliyetli ve kolay ulaşılabilir bir biyosensör olan kişisel glikoz metrelerin glikoz dışındaki çeşitli analitleri de dolaylı yoldan nicel olarak algılayabilmesi, bu tür analizlerin daha hızlı ve pratik bir şekilde yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Kan şekeri dışında enzimatik ürünü glikoz olan sükrozun invertaz enzimi ile hidrolize olduğu reaksiyonlarında kişisel glikoz metre ile tespit edilmesi mümkündür. Bunu sağlamak için DNA sekansları ve invertaz enziminin uygun bir platformda bir araya getirilmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda CaMV 35S promotörünün model hedef sekans olarak tercih edilmesi ile GDO miktarının pratik bir şekilde kişisel bir glikoz metre ile tespit edilmesini sağlayacak DNA-inorganik hibrit temelli nanomalzemeler (DIN) ile oluşturulan yeni bir sinyal platformunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak manyetit çapraz bağlı invertaz agregatları (MCLIA) hazırlanmış ve bu agregatlara prob DNA'lar tutturularak DIN geliştirilmiştir. Çalışma kapsamında matematiksel modelleme ve optimizasyon çalışmaları sonucunda en ideal yapısal parametre değerleri enzim/MA kombinasyonu: 0.624 U/mg, glutaraldehit miktarı: %5 ve deneysel parametre değerleri ortam pH'sı: 5, ortam sıcaklığı: 50 °C ve reaksiyon süresi: 45 dk olarak bulunmuştur. Sinyal platformunun sukrozu tespit etmeye yönelik kinetik parametreleri (V_{max} ve K_m değerleri) sırası ile 6625 mg/dl ve 226 mM olarak bulunmuştur. Ayrıca DIN yapısının bileşenleri farklı teknikler kullanılarak karakterize edilmiş ve bu şekilde yapı bileşenlerinin birbirleriyle olan etkileşimleri belirlenmiştir. GDO'yu tespit etme mekanizması inhibisyon temelli olan DIN yapısı hedef sekans ile hibritleştirildikten sonra(DINH) her iki yapı gümüş iyonları ile inkübe edilerek tek ve çift zincir DNA sekanslarının gümüş ile etkileşimlerine dayalı inhibisyon farkı glikoz metre kullanılarak ölçülmüştür. 2 farklı akış ve 3 farklı senaryo ile gerçekleştirilen deneysel çalışmalar sonucunda DIN yapısına hedef DNA bağlanması ile sinyal değerlerinde %20 ile %55 arasında değişen oranlarda inhibisyon farkı tespit edilmiştir. DIN yapısı sinyal platformu niteliğinde olduğundan geliştirilen bu yapı ile farklı amaçlara yönelik (virüs, patojen, genetik hastalıklar, kanser tanısı vb) çalışmalar yapmakta mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Kişisel glikoz metre, GDO tespiti, Manyetit çapraz bağlı invertaz agregatı, DNA-inorganik hibrit temelli nanomalzeme

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Development, Modeling and Optimization of DNA-Inorganic Hybrid Based Nanomaterials as Signal Platform for GMO Detection

Ayşenur YARDIM

**Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Food Engineering**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İlker Polatoğlu

The use of DNA sequences as a bioreceptor in the design of DNA-based biosensors is a viable alternative to traditional methods for a variety of analyses. Personal glucose meters, which are low-cost and easily accessible biosensors, can indirectly detect a variety of analytes other than glucose, allowing for rapid and more practical analysis. It is possible to use a personal glucose meter to detect sucrose, whose enzymatic product is glucose other than blood sugar when it is hydrolyzed with the invertase enzyme. DNA sequences and the invertase enzyme must be brought together on a suitable platform to accomplish this. It is hoped that by using the CaMV 35S promoter as the model target sequence, a new signaling platform based on DNA-inorganic hybrid-based nanomaterials (DIN) will be developed to determine the GMO amount practically with a personal glucose meter. Magnetite cross-linked invertase aggregates (MCLIA) were prepared for this purpose, and DIN was created by attaching probe DNAs to these aggregates. As a result of mathematical modeling and optimization research studies within the scope of the study, the most ideal structural parameter values are enzyme/MA combination: 0.624 U/mg, glutaraldehyde amount: 5% and experimental parameter values are the pH of reactions: 5, reaction temperature: 50 °C, and reaction time: 45 min. The signal platform's kinetic parameters (V_{max} and K_m values) for detecting sucrose were determined to be 6625 mg/dl and 226 mM, respectively. Furthermore, the components of the DIN structure were characterized using various techniques, and the interactions of the structural components with each other were determined as a result. After the DIN structure was hybridized with the target sequence (DINH), both structures were incubated with silver ions, and the inhibition difference based on the interactions of single and double-strand DNA sequences with silver was measured using a glucose meter. As a result of the experimental studies with two different flows and three different scenarios, inhibition rates ranging from 20% to 55% in signal values were detected with target DNA binding to the DIN structure. Because the DIN structure is a signal platform, it can be used in future experiments for a variety of purposes (virus, pathogen, genetic diseases, cancer diagnosis, and so on).

Keywords: Personal glucose meter, GMO detection, Magnetite cross linked enzyme agregate, DNA-inorganic hybrid-based nanomaterials

1. GİRİŞ

Riboz/deoksiriboz şekeri, fosfat ve azotlu bazdan oluşan nükleotitlerin fosfodiester bağıyla birbirine bağlanmasından meydana gelen polimerik yapıdaki nükleik asitler, canlıların genetik bilgilerinin şifrelendiği moleküller olarak bilinirler [1]. Nükleik asit (DNA, RNA) sekanslarının tespit edilmesi genellikle patojen analizi, genetik hastalıkların teşhisi ve adli tıp testlerinde kullanılmaktadır. Bu amaca yönelik olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), gerçek zamanlı PCR (RT-PCR), yuvarlanmalı çember büyütme (rolling circle Amplification “RCA”), DNA mikrodizisi, southern blot, DNA nanoteknolojisi ile geliştirilen biyo-analizler gibi farklı yöntemler geliştirilmiştir [2–4]. Bu yöntemler hassas ve doğru sonuç verse de karmaşık ekipmana, pahalı kimyasalların tedarikine ve uzman personele ihtiyaç duyan zaman alıcı yöntemlerdir. PCR, RT-PCR ve RCA gibi enzim kullanılarak gerçekleştirilen bu yöntemlerde enzimin stabilitesi ve aktivitesi için optimum şartlar ya da DNA mikrodizisinden elde edilen veri karmaşası gibi çeşitli sınırlamalar da ortaya çıkmaktadır. Nükleotit sekanslarının nanoboyuttaki yapılar içerisinde kendiliğinden birleşebilme kabiliyeti, kararlılığı, işlevselliğinin ayarlanabilmesi ve baz eşleşmelerinin tasarlanabilirliği gibi kıymetli özelliklere sahip olması, bunların bir biyo algılama molekülü olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır [5–7]. Geleneksel yöntemlerin bahsedilen dezavantajları da göz önüne alındığında, nükleotit sekanslarının bir biyoalgılama molekülü olarak DNA temelli biyosensörlerin tasarımında kullanılması, çeşitli analitlerin (enzim, DNA, miRNA, kokain, protein, metal iyonları vb.) tespitinde hızlı, güvenilir, daha ucuz ve kullanımı kolay biyoalgılama platformlarının geliştirilmesi için iyi bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMA (GDO)

Binlerce yıl önce hücrenin temel yapısı olan nükleik asitlerin varlığını bilmeden bitki ve hayvan yetiştiren çiftçiler en güçlü hayvanları çiftleştirerek en verimli bitkilerin tohumlarını çaprazlayarak ve onların tohumlarını saklayarak bitki ve hayvanlarda en çok istedikleri özellikleri korumayı veya iyileştirmeyi başarmışlardır. Aslında bu çiftçiler farkında olmadan genetik manipülasyon ya da modifikasyon adı verilen süreci gerçekleştirerek bitkiler ve hayvanlar üzerinde gen aktarımı ve seçimini sağlamışlardır. Böylece tüm mahsul ve evcilleştirilmiş hayvan türleri, insanlar tarafından seçilerek doğada var olan baskın türlere göre "genetiği değiştirilmiş" olarak kabul edilebilirler [8, 9].

İnsanoğlunun yüzyıllardan beri devam ettirdiği gen seçimi konusundaki ilerleyişi, modern zamanlarda gelişen teknoloji ile doğal yollar (çiftleşme ve / veya doğal rekombinasyon yoluyla) haricinde gerçekleştirmesi oldukça yaygınlaşmıştır. Bu konudaki çalışmaların hızlanması özellikle "rekombinant DNA teknolojisinin" ortaya çıkmasını ve hızla gelişmesini sağlamıştır. Günümüzde bilinçli olarak yapılan gen seçme sürecinde "transgen" olarak adlandırılan belirli bir geni, farklı cinslere, ailelere ait türler arasında, "gen dönüşümü" adı verilen bir süreçle her zamankinden hızlı ve hassas bir şekilde transfer etmek mümkün kılınmıştır [8].

İnsan dışındaki canlı türlerinin sahip oldukları genetik materyallerde doğal yollar haricinde farklılıkların gözlemlendiği organizmalara genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) denir. GDO'lu ürünler ise canlı organizmaların istenilen önemli özellikleri (zorlu şartlara dayanıklılık, yüksek verimlilik gibi) fenotipte sergilemesi için gen teknolojisinin kullanımı ile bir organizmadan başka bir organizmaya gen transferi sayesinde elde edilmektedir [10]. Genetik modifikasyon yapısına bakılırsa istenilen gen kasetinin organizmaya yerleştirilmesiyle veya hedef DNA dizilerinde delesyon ya da nokta mutasyonları gibi yollar gözlenebilir. Gen kaseti temel elementleri promotör, istenen gen (transgen) ve terminatörden oluşmaktadır. Bu yapıda yer alan promotör genler transkripsiyonun başlamasından sorumlu iken terminatör genler ise promotör genlerin transkripsiyonu durdurmakta görevlidir.

Ayrıca kasetin ortasında yer alan transgen ise transkripsiyon ile fonksiyonel protein yapısı oluşturmada görev alır. Promotör bölge olarak *karnabakar mozaik virüsü* (CaMV) 35S promotörü (P-35S) ve terminatör bölge olarak ise *Agrobacterium tumefaciens* kaynaklı nopalin sentaz terminatörü (T-nos) GDO taraması için sıklıkla hedeflenen transgenik elementlerdir [3].

GDO ve GDO'lu ürünlerin avantajları veya dezavantajları konusunda net yargılara ulaşılamadığı için farklı görüşler oluşmuştur. Genetiği değiştirilmiş organizma teknolojisi kullanılarak, i) yüksek verim, ii) yüksek kalite, iii) hastalıklara ve haşerelere karşı direnç, iv) herbisit direnci, v) stres direnci gibi aranan özelliklere sahip yeni ürün çeşitlerinin yetiştirilmesine olanak sağlanmıştır. Böylece tarladaki mahsulün verimi artırılırken, ürünlerin duyuşal özelliklerinin iyileştirilmesi sağlanmıştır. Aynı zamanda bu özelliklere ek olarak pestisit ve gübre bağımlılığı azaltılabilir, böylece maliyetler azalırken çevre dostu bir sürecin gerçekleşmesi mümkün kılınır [11]. Özellikle alternatif gıda kaynakları olarak gösterilen GDO'lu ürünlerin analiz edilmesi, bu gıdaların insan sağlığı üzerindeki olası yan etkilerinin araştırılması, biyoçeşitlilik üzerindeki etkilerinin ortaya konması ve GDO kullanımının ticari açıdan ekonomide dışa bağımlılık oluşturması yönünden önem arz etmektedir [12]. Bu doğrultuda GDO'lu ürünlerin kullanımı ile ilgili çeşitli düzenlemeler yapılarak GDO miktarlarının yasal sınırlar (%0,9) içerisinde tutulması sağlanmaktadır. Etiketleme sistemi kullanılarak bu tür gıdaların tüketim tercihleri son kullanıcının bilgisine sunulmaktadır fakat bu gereksinim, yetersiz analizlerden dolayı çok az ürün etiketinde bulunmaktadır. Bu noktada kilit bir faktör olan GDO izlenebilirliğini kontrol edebilmek adına gıda/yem gibi örneklerde hassas GDO analizi için dolaylı veya doğrudan olarak sınıflandırılan çeşitli stratejiler geliştirilmiştir.

2.1.1. GDO TESPİT YAKLAŞIMLARI

Günümüzde GDO'ların analitik yöntemlerle tespit edilmesi aktarılan gen sekansları (doğrudan) veya bu sekansların ürünü olan proteinleri (dolaylı) temel almak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır [13].

2.1.1.1. PROTEİN TEMELLİ ANALİZ YÖNTEMLERİ

İlk katagori transgenler aracılığıyla kodlanan proteinlerin saptanmasına ve nicelenmesine izin veren moleküler tekniklerdir ve immünoanalizleri yani antijen-antikor özel etkileşimine dayanan immünolojik testleri içermektedir. Bu protein bazlı tespit yaklaşımları, Tablo 2.1’de de görüldüğü üzere birçok farklı immünolojik test formatlarına sahiptir. Bu format seçimleri ise hedef proteinlere ve uygulamaya bağlı olarak yapılmaktadır. İmmünolojik testler, immüno stript testi, enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), immüno-polimeraz zincir reaksiyonu (IPCR) ve western blot analizini içermektedir [14–16].

Protein temelli analizlerler sıklıkla kullanılan ELISA yöntemi ilk olarak incelendiğinde, ELISA’da, tespit edilecek analite sahip sıvı faz ve bu sıvı fazın içinde yer alan belirli bileşenlerini tutmak için ise fiziksel olarak immobilize edilmiş bir katı faz yer almaktadır. Bu iki faz arasındaki etkileşim (spektrofotometre ile ölçülmektedir. ELISA yönteminde, niteliksel yani pozitif ya da negatif sonuçlardan söz edilebilirken aynı zamanda niceleyici olarak yani standartlar serisi aracılığıyla bilinmeyen analit miktarı ölçülebilmektedir [17–19]. Her ne kadar yüksek düzeyde özgüllüğe sahip olsa da ELISA'nın bazı dezavantajları söz konusudur. Ürün çok fazla işlem görmüşse protein yapısı değişmiş olursa veya antikor bağlanma bölgeleri hasar görürse, antikor-antijen bağlanmasında azalma olabilir ve bu da analizin doğruluğunu etkileyebilir [20]. Diğer bir sorun ise test sırasında antikorların, yakından ilişkili proteinler (Cry1Ab ve Cry1Ac) ile çapraz reaksiyonun gözlenmesidir [18]. Ayrıca bu teknoloji, tek bir reaksiyonla çoklu transgenik proteinlerin nicel analizi için elverişli değildir.

Protein temelli ikinci analiz yöntemi olarak immüno stript testleri incelendiğinde ise herhangi bir ekipmana ihtiyaç duymadan membran üzerine konumlandırılan iki korumalı bölge içerecek şekilde tasarlanmış basit şeritler kullanılarak analizlerin gerçekleştirildiği görülmektedir. Test üzerindeki korumalı bölgelerde antitadiler sabitlenmektedir. Birinci korumalı bölgede transgen proteinin bağlanması gözlemlenirken diğer korumalı bölge ise kromojenik reaksiyon için standart renk maddesinin bağlanmasını sağlamaktadır. Böylece sıvı faz örneklerle daldırılan test şeridi, örnek içindeki analitlerin kapiler etki ile bu korumalı bölgelere hareket etmesiyle nitel sonuçlar elde edilir. Özel bir cihaza veya eğitime gerek

duyulmayan bu teknoloji hızlı görsel bir platform olsa da bazen zayıf sinyal elde edilmesi durumunda güvenilirlik okumalara neden olabilmektedir [19, 21–24].

Protein temelli analizlerin üçüncüsü olan immüno-PCR (IPCR) yöntemi, saptama antikorunun geleneksel bir enzim yerine kısa raportör DNA dizilerine bağlı olması dışında, sandviç ELISA'ya benzemektedir. Dolayısıyla bir ELISA yöntemini bir immüno-PCR testine dönüştürmek için tasarıma antikor-oligonükleotit konjugatı eklenmesi yeterli olacaktır. Ancak, yüksek maliyet, zaman alıcı ve pahalı aletlerin gerekliliği gibi bazı sınırlamalar nedeniyle, bu teknik transgenik tespit için rutin olarak kullanılmamaktadır [14, 25, 26]

Protein temelli analizlerin sonuncusu olan Western blot yöntemi ile analiz edilecek örneğin içerdiği transgenik proteinin belirlenmiş bir eşik değerinin altında veya üstünde olup olmadığı kantitatif sonuçlar elde edilmesiyle sağlanmaktadır. Bu yöntemin, rutin testlerde sürekli olarak kullanılması açısından düşünüldüğünde kullanım bulunmamaktadır. Fakat araştırma çalışmalarında bu yöntem birkaç kez yapıldığı için araştırma uygulamaları için daha uygun ve kullanışlıdır.[19, 27].

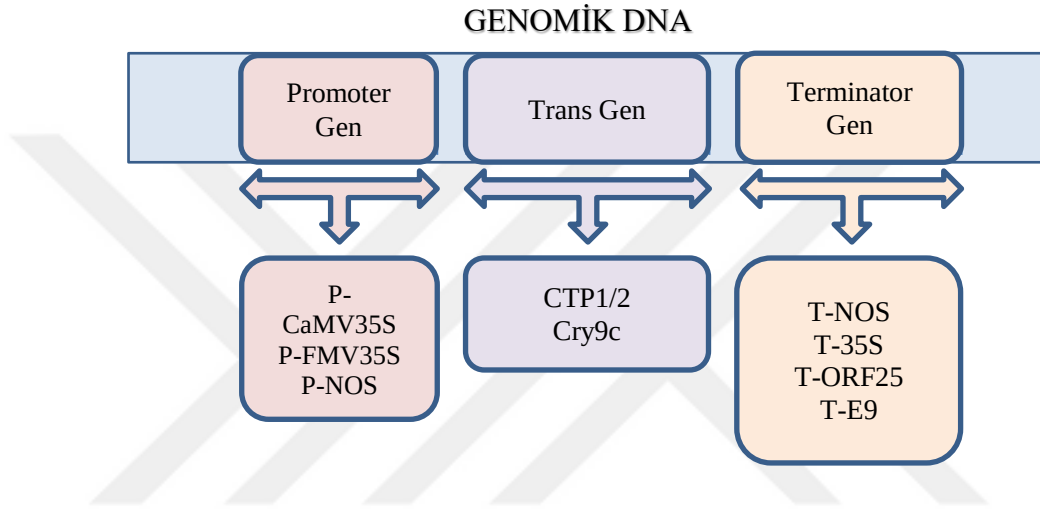
Uygulanmakta olan protein temelli bu stratejilerin, Tablo 2.1’de de özetlenen dezavantajlarında dolayı özgüllüğü ve duyarlılığı değişebilir. Diğer bir ihtimal ise genetik modifikasyonun protein düzeyinde gerçekleşmemesidir ve bu durumda protein bazlı analiz stratejileri uygulanamamaktadır.

Tablo 2.1 Protein bazlı tespit yaklaşımlarına ait bazı çalışmalar ve onların avantaj ve dezavantajları

Test Yöntem	Avantaj	Dezavantaj	Hedef	Örnek	Tespit Limiti	Kaynak
ELISA	✓ Yüksek verim sağlar. ✓ Yüksek hacimli laboratuvar analizleri için idealdir. ✓ PCR yöntemlerden daha hızlı ve daha ucuzdur.	✓ İlişkili proteinler ile çapraz reaksiyona girebilir. ✓ Protein yapısı değiştirilirse veya antikor bağlanma bölgeleri hasar görürse analizin doğruluğu etkilenmektedir. ✓ Tek bir reaksiyonla çoklu transgenik proteinlerin nicel analizi için elverişli değildir.	Cry1 toksinleri	Saf proteinler	15 ng/ml	[28]
			Cry1Ab	Yaprak ve pirinç	0.008 µg/ml	[29]
			Cry1Ab	Su	2.1 ng/l	[30]
			Cry1Ab	Saf proteinler	1 ng/ml	[26]
			Cry1F	Pirinç, buğday, mısır	0.18 ng/ml	[31]
			Cry1Ie	Mısır	0.27–0.51 ng/ml	[32]
Immuno-PCR	✓ Karmaşık biyolojik matrisler ve küçük miktarlarda numuneler mevcut olduğunda yaygın olarak kullanılır. ✓ Saptama hassasiyeti yüksektir.	✓ DNA saptama yöntemlerinden daha az hassastır. ✓ Yüksek maliyet, zaman alıcı ve pahalı aletlerin gerekliliği gibi bazı sınırlamalar nedeniyle, rutin olarak kullanılmamaktadır.	Cry1Ac	Saf Cry1Ac proteini	Mikroplaka için: 21.6 ng, Boncuk bazlı yapı: 432 ng	[33]
			p35S tNOS	Alerjenler, GDO'lu patojenik bakteriler ve mantarlar	Alerjenler için: 1,3–5,3 µg/ g patojen kültürleri için: 6–13 CFU/ ml	[34]
Immuno Strip	✓ Ekonomik ve kullanıcı dostudur ✓ Görsel niteleyici, tek adımlı, hızlı sonuçlar verir.	✓ Transgenik proteinin tam miktarını vermez. ✓ Zayıf test performansı sebebiyle tartışmalı okumalara yol açabilir.	Cry1A, Cry3Bb, Cry1F, T25-PAT/pat, Cry34,	Mısır tanesi	%0,1 ile %0,5 (800'lük bir havuzda 1-4 çekirdek)	[35]
			Vip-S proteini	Yaprak numunesi ekstraktları	100 ng/ml	[36]
			Cry1Ac	Pamuk tohumları	-	[23]

2.1.1.2. DNA TEMELLİ ANALİZ YÖTEMLERİ

Protein temelli analiz süreçlerinin sahip olduğu sorunların üstesinden gelmek için ikinci katagori olan DNA bazlı stratejiler kullanılarak doğrudan organizmaya dışarıdan aktarılan DNA sekanslarının varlığı araştırılmaktadır. Aktarılan DNA sekansları, gen kasetinde bulunan promotör, transgen ve terminatör geni olmak üzere Şekil 2.1’deki gibi üç seviyede sınıflandırılabilir.



Şekil 2.1. Promotör, transgen ve terminatör genlerden oluşan GDO gen kasetinin şematik diyagramı

DNA temelli tespit metodları arasında biyosensörler, mikrodizilimler ve farklı şekillerde modifiye edilmiş PCR’lar yer almaktadır. Günümüzde spesifik bir DNA sekansının saptanması için sıklıkla tercih edilen teknik polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR). Bu ölçüm ile GDO içeren ürünler nitel veya nicel olarak analiz edilebilmektedir. Bu teknikte DNA milyarlarca kez kopyalanarak çoğaltılır. Transgenik DNA dizisini tamamlayabilen kısa DNA parçaları (primerler) kullanılmaktadır. DNA sentezini katalize eden DNA polimeraz enzimi şablon olarak primerleri kullanıp yeni DNA sentezinin gerçekleşmesini sağlar ve böylece amplifikasyon gerçekleşmektedir. Primerler transgenik DNA dizisine özgü olduğundan ve DNA bu süreçte milyarlarca kat amplifiye edildiğinden, PCR oldukça hassas ve spesifik bir GDO tespit yöntemidir. Fakat herhangi bir kontaminasyon sonucu iz miktarda kontaminant çoğaltılmak istenen hedef DNA olarak

algılanabilmekte ve bu durum yanlış sonuçların elde edilmesine neden olmaktadır. Ayrıca, bu teknoloji pahalı olmakla birlikte elde edilen verilerin analizi ve yorumlanması için karmaşık cihazlar ve yetkin bir analist gerektirmektedir [3, 15, 37–40].

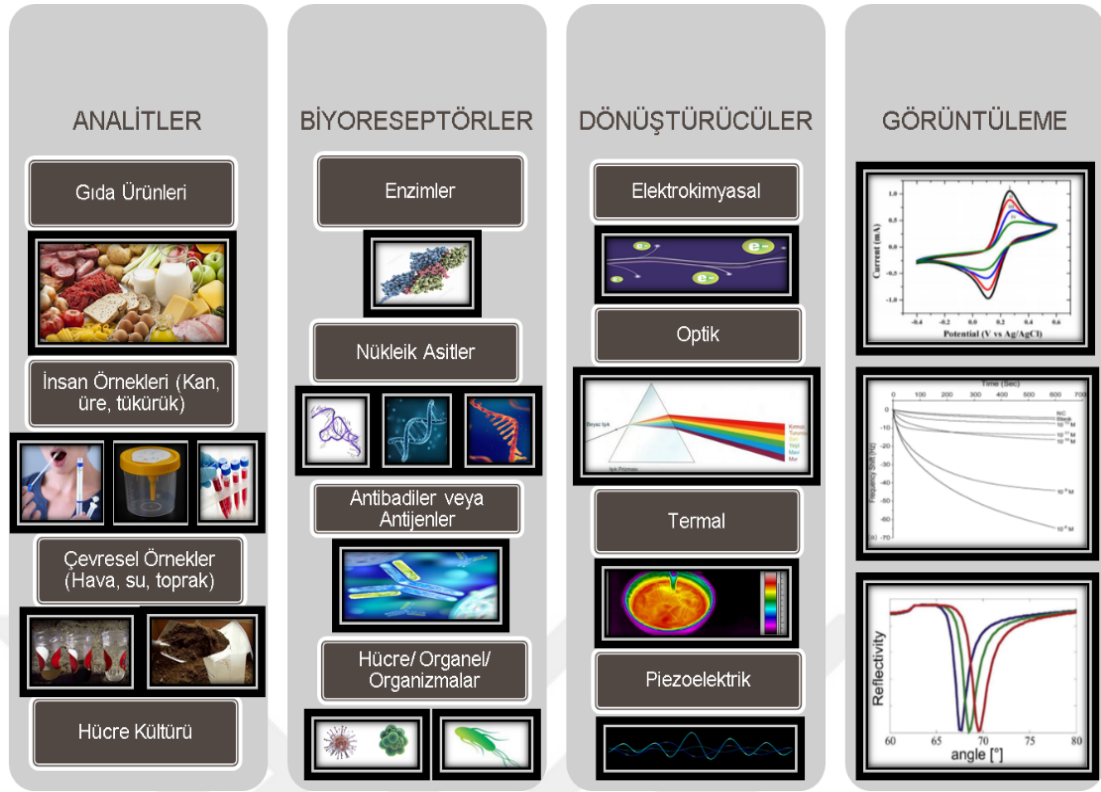
Mikrodiziler, aynı anda birden farklı bölgenin tanımlanmasına izin veren basit bir prensibe sahiptir. DNA/RNA ipliklerinin eşsiz özellikleri (kendiliğinden birleşebilme kabiliyeti, baz eşleşmelerinin tasarlanabilirliği vb.) sayesinde reaksiyon ortamında yer alan tamamlayıcı dizilerle eşlenmesiyle prob DNA'nın bağlanma kapasitesini temel almaktadır. Mikrodizi sentezi aşamalarına bakılacak olursa bilinen oligonükleotid problemleri, belirli bir destek üzerinde ve istenen konumlarda tutturulurlar. Daha sonra hedef bölgeler çoğaltılmakta ve bu hedef parçalarının etiketlenmesi sağlanmaktadır. Etiketli hedeflerin, tutturulmuş tamamlayıcı dizilere bağlanmasını sağlamak için diziler belirli süre hibritleştirilmek üzere inkübe edilmektedir. Bağlanmayan hedefler yıkama ile uzaklaştırılır ve son aşamada ise mikrodizi tarayıcı aracılığıyla kurutulmuş örneklerin sahip olduğu dizinin görüntüsü alınmaktadır. Görüntü elde edilen noktasal parlaklıklar, her bir prob DNA'ya bağlı hedef DNA anlamına gelir. Bu yöntem, kısa sürede tek bir analizle birçok gen ile tarama yapılabilmesi, fazla örnek sayısına sahipken de çalışılabilir olması ve yüksek doğrulukta sonuçların elde edilmesi açısından oldukça önemlidir. Kısacası bu teknikle gerçek zamanlı PCR'nin sahip olduğu bazı sınırlamaların aşıldığı ortadadır. Öte yandan görüntüleme amacıyla içerdikleri floresans etiketli problemlerin pahalı olması bu yöntemin tercih edilmesini kısıtlanmaktadır [15, 41].

Geleneksel yöntemlerin bahsedilen dezavantajları göz önüne alındığında, nükleotit sekanslarının bir biyoalgılama molekülü olarak DNA temelli biyosensörlerin tasarımında kullanılması, çeşitli analitlerin (enzim, DNA, miRNA, kokain, protein, metal iyonları vb.) tespitinde hızlı, güvenilir, daha ucuz ve kullanımı kolay biyoalgılama platformlarının geliştirilmesi için iyi bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.2. BİYOSENSÖR

Sensörler, dönüştürücülü aktif bir algılama materyali içeren cihazlardır [42]. Biyosensör, Şekil 2.2’de gösterildiği gibi iç yapısında aktif bir algılama materyali olarak biyotanıma elemanının bulunmasıyla sensörden farklıdır. Biyosensör, özellikle bir analit ile etkileşime girebilen ve ölçülebilen fiziksel, kimyasal veya elektriksel sinyaller üretebilen, immobilize edilmiş bir biyolojik materyali (enzim, antikor, nükleik asit, hormon vb.) içeren analitik bir araçtır. Biyosensörlerin temel elementleri, bir reseptör, dönüştürücü ve işlemci olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Biyosensörler genellikle transdüksiyon yöntemi ve biyolojik materyal açısından kategorize edilir. Biyoreseptörlerin immobilizasyonu (adsorpsiyon, çapraz bağlama veya kovalent bağlama vb.) hazırlanan tanımlama katmanı amaca uygun bir dönüştürücü ile entegre edilmektedir. Uygun dönüştürücülerin seçimi ise ölçüm parametrelerine dayanmaktadır. Şekil 2.2’de görüldüğü üzere dönüştürücü çeşitleri 4 ana amaç doğrultusunda elektrokimyasal, piezoelektrik, termal veya optik olarak gruplandırılır. Öte yandan belirlenen transdüksiyon yöntemine ek olarak biyosensörler kullanılan biyolojik materyale (nükleik asit, protein, immünolojik (antijen-antibadi), enzim, aptamer veya hücre temelli) göre de gruplara ayrılabilirler [9, 43–47].

Alışılmış DNA tabanlı analitik teknikler bir dizi adım, iyi seviyede bilgi, çokça tecrübe, zaman ve pahalı aletler gerektirir. Bunun aksine biyosensörler hızlı, basit ve ekonomiktir. Ayrıca laboratuvar koşulları dışında karmaşık alet olanaklarının bulunmadığı ortamlarda da kullanılabilirler. Yaşanan gelişmeler sayesinde üstün fiziksel, kimyasal ve biyolojik aktiviteleri düşünüldüğünde nükleik asitler (DNA, RNA), çeşitli biyosensörler aracılığıyla analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.2 Biyosensörlerin temel elementleri ve bu elementlere göre katagorize edilmesi

2.2. 1. DNA BİYONSENSÖRLERİ

Tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde ve birçok virüste bulunan DNA genetik bilginin aktarılmasını sağlayan taşıyıcılardır ve birçok biyolojik sürecin gerçekleşmesinde önemli roller oynarlar. **Hedef DNA**, istenen belli birkaç bazın yanyana gelmesi sonucunda oluşan oligonükleotilerdir, **Prob DNA** ise belirlenen hedef DNA ile arasında Watson-Crick baz eşleştirmesinin gerçekleşmesini sağlayan oligonükleotilerdir. Prob ve hedef DNA 'lar arasında **hibridizasyon** olarak adlandırılan bir biyolojik süreç gerçekleşir ve bu süreçte, tek zincirli olan eşlenik prob DNA ile hedef DNA arasında etkileşim gerçekleşerek çift sarmallı tek bir yapı oluşur ve böylece, hedef DNA 'nın tanımlanması gözlenmektedir [48].

DNA biyosensörleri, biyoreseptör olarak immobilize edilmiş DNA yapılarının kullanılmasıyla geliştirilmektedir. Bu biyosensörler, içerdikleri prob DNA 'larının biyolojik veya kimyasal türler için özel bir reseptör görevini üstlenmesiyle hibridizasyona dayanan bir algılama prensibine sahiptirler [11, 49–52].

Biyoalgılama molekülü DNA olarak geliştirilen biyosensörler, DNA içeren sistemin fizikokimyasal özelliklerinde biyokimyasal reaksiyonun neden olduğu değişiklikleri elektrokimyasal [53–58], optik [39, 59] ve piezoelektrik dönüştürücüler aracılığı ile ölçmektedir [11, 60].

Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde dönüştürücü, biyoreseptör ile temas halinde olan bir elektrottur. Bu elektrotlar, platin, altın, karbon bazlı malzemeler (pirolitik grafit, camsı karbon, karbon macunu, bor katkılı elmas ve son zamanlarda karbon nanotüpler ve grafen), indiyum gibi özelleştirilmeye uygun çok çeşitli malzemeler kullanılarak veya kompozit adı verilen farklı içerikleri birleştiren malzemelerle tasarlanmaktadır. Bu biyosensörler ölçülen elektriksel büyüklüğü bağlı olarak, voltammetrik, potansiyometrik, kondüktometrik-impedimetrik gibi alt gruplara ayrılabilir [13, 54, 57, 58, 61–63].

Optik DNA biyosensörlerinde biyoalgılama süreci, sistemin sahip olduğu optik özelliklerin, analit ve biyoreseptör tabakasının etkileşiminin bir sonucu olarak değişmesiyle dönüştürücü tarafından algılanmasına dayanmaktadır. Bu biyoalgılama ile absorpsiyon, floresan, lüminesans veya kırılma gibi çeşitli optiksel özelliklerdeki değişiklikler tespit edilebilmektedir. Bu değişiklikler, optik fiberler aracılığıyla, genellikle bir fototüp veya bir fotoçoğaltıcı olan algılama sistemine yayılmaktadır. Optik DNA biyosensörü farklı fiber konfigürasyonlarına sahiptirler ve böylece dayandıkları algılama ilkelerine göre absorbans, floresan, kemo/elektro/biyolüminesans olarak sınıflandırılabilirler. Bu teknolojinin yüksek seçicilik ve hassasiyetine ek olarak farklı dalga boylarının kullanılmasıyla çoklu algılama olasılığı bu biyosensörlerin tercih edilebilirliğini arttırmaktadır [63, 64, 71, 67].

Piezoelektrik DNA biyosensörler, piezoelektrik kristalin yüzeyinde yer alan DNA'ların etkileşimleri aracılığıyla piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki değişimi temel alınarak ölçümler yapmaktadırlar. Piezoelektrik malzemelere kuvarslar, lityum tantalitler ve kurşun zirkonat titanatlar örnek verilebilirler. Kuvars kristal mikro teraziler (QCM), biyoalgılama için en çok tercih edilen cihazlardır. DNA'lar genellikle altın yüzey üzerine sabitlenmektedirler. Hibridizasyon işleminden

sonra k t lede bir artış ve rezonans frekansında bir azalma meydana gelmektedir. Etkileşim sonucu gerçekleşen rezonans frekansındaki değişiklikler ile k t le birikimi arasında doğrusal bir ilişki vardır ve böylece frekans kaymaları  l   lerek k t le yükü ile ilişkilendirilmektedir. Böylece bu teknoloji ile biyoalgılama olayları gerçek zamanlı olarak seçici ve etiketsiz olarak gerçekleşmektedir. [66–70].

DNA biyosensörleri geliştirilirken genellikle ilk aşama olarak hibridizasyon yoluyla hedef DNA'yı tanımak için tek iplikli prob DNA'nın transdüser yüzeyine bağlanması gerçekleştirilmektedir. Hibritleşme süreci sonrasında algılama işlemleri doğrudan olarak eşleşmiş DNA takibiyle Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) , kuvars kristal mikro terazisi (QCM), yüzey empedans  l   mleri ve n kleobazların elektrokimyasal oksidasyonu ile yapılabilir. Dolaylı algılama sürecinde n kleobazların metal komplekslerine katalitik aktivitesi, floresan veya elektroaktif moleküllerin çift sarmal içine interkalasyonu veya hedef ya da prob DNA'nın elektroaktif bir tür (florofofor veya enzimler) ile etiketlenmesi yoluyla gerçekleştirilebilir. Bu y temlerle kullanılmak üzere hedef DNA'nın bir kısmı için tamamlayıcı olan ikinci bir etiketli probun geliştirilmesiyle bu ikincil probun kullanımı sonucunda sandviç tipi olarak bilinen analizler gerçekleştirilmektedir. Tablo 2.2, GDO tespitine yönelik geliştirilen DNA temelli biyosensörler çalışmalarını özetlemektedir.

Tablo 2.2 GDO tespitine yönelik geliştirilen DNA temelli biyosensörler

Tür	Hedef	Elektrot türü	Örnek	İmmobilizasyon	Tespit yöntemi	LOD (pM)	Lineer aralık (pM-nM)	Kaynak
ELEKTROKİMYASAL	35S	Altın	Sentetik DNA ve soya fasulyesi ekstrakt örneği	Au-S	DPV	0.060	0.10 0.50	[56]
	MIR162	Modifiye edilmiş GCE	Mısır örnekleri	Au-S	DPV	2.52×10^{-6}	0.01 -10	[57]
	35S	Modifiye edilmiş SPCE	Sentetik DNA	Au-S	DPV	13×10^{-6}	0.04-0,0011	[71]
	MON810	Modifiye karbon iyonik sıvı elektrot	Sentetik DNA ve mısır örneği	Elektrostatik	DPV	4.52	0.1- 1000	[58]
OPTİK	GTS 40-3-2	Karboksimetile dekstran matrisi modifiyeli yüzey	Soya fasulyesi örnekleri	Str-Bio	SPR	20	-	[65]
	Cry1Ab ve Cry1Ac	Cam Slayt	Pirinç örnekleri	Çapraz bağlama	SERS	-	-	[64]
	Bt-176	SA sensör çipi	Referans malzemeleri	Str-Bio	SPR	-	-	[72]
	35S	Altın sensör çipi	Sentetik DNA ve referans materyali	SAM	SPR	-	-	[68]
PİEZOELEKTRİK	35 S	QCM kuvars üzerine altın yüzey	Amplifikasyon olmayan ve olan gerçek örnekler	Str-Bio	QCM	-	-	[69]
	35S and NOS	Altın sensör çipi	Sentetik DNA ve referans malzeme	Str-Bio	SPR	-	-	[67]
	Cry1Ab	QCM kuvars üzerine altın yüzey	Amplifikasyonlu referans materyali ve gerçek örnekler	Str-Bio	QCM	-	-	[66]
	35 S	QCM kuvars üzerine altın yüzey	Amplifikasyonlu sentetik DNA ve gerçek örnekler	Kovalent bağ	QCM	$5,2 \times 10^{-5}$	-	[70]

Çalışma amaçlarına göre biyosensörlerin tek bir bazda mutasyonu algılayabilmesi ve aynı zamanda PCR gibi amplifikasyon gerektiren durumlardan kaçınmak için eser miktarda kopyayı tespit edebilecek kadar hassas olması gerekir. Son yıllarda biyosensörlerin geliştirilmesinde bu analitik performans özelliklerine ek olarak en çok aranan özelliklerin başında taşınabilirlik ve basitlik gelmektedir. Bu anlamda enzimatik reaksiyon sonucu ölçüm alabilen glikoz metre tabanlı cihazlar başarılı bir şekilde evde veya sahada taşınabilir hale getirilmiştir [73, 74]. Kişisel glikoz metrelerin (PGM) çalışma prensibine basitçe bakıldığında, cihaz için tasarlanan biyosensör kit yüzeyinin, kan şekeri içerisinde bulunan glikozu glikonik asit ve hidrojen peroksit'e (H_2O_2) parçalayan glikozoksidaz (GOx) enzimi ile kaplı olduğu anlaşılmaktadır. Bu etkileşim sonucu oluşan H_2O_2 'in indirgenmesi ile ortama elektronlar salınır. Sabit bir potansiyelde elektrot tarafından algılanan bu elektronlar kandaki glikoz konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak akım elde edilmesini sağlar [75, 76]. PGM'de sinyal elde edilmesini sağlayan analitin glikoz olması enzimatik ürünü glikoz olan herhangi bir molekülün saptanmasını mümkün kılmaktadır. Literatürde bu konu ile ilgili bazı önemli çalışmalara (uyuşturucu, biyolojik kofaktörler, hastalık belirteçleri, nükleotit sekansları, toksik metal iyonları, protein biyobelirteci) rastlanmaktadır [77–79]. Bu yaklaşımla gerçekleştirilen sinyal platformları tıbbi teşhis, gıda güvenliği ve çevresel atık analizlerinde devrim niteliğinde olmuştur [73, 77]. Kendine özgü tasarımları olan bu çalışmaların hepsinde invertaz enzimi kullanılmıştır. Bunun temel nedeni ise bu enzim substratı olan şükrozu parçalayarak glikoza çevirmesi ve glikozunda PGM striplerinde yer alan enzimlerin substratı olmasıdır. Bu çalışmalarda özetle invertaz enzimi DNA konjugatları ile bir araya getirilmiş ve böylece çeşitli nükleotit sekanslarının tespitine yönelik PGM'de sinyal elde edilmesi için farklı tasarımlarda platformlar geliştirilmiştir.

PGM ile geliştirilen bu sinyal platformlarının performansını etkileyecek önemli parametrelerden diğeri ise ölçüm için gerekli olan glikozun enzimatik olarak üretilmesini sağlayacak olan enzimin (invertaz enzimi) sinyal platformuna bağlanma mekanizmasıdır. Enzimlerin herhangi bir destek malzemeye fiziksel yöntemlere tutturulması yapıdan salınmasına neden olduğu gibi kimyasal yöntemlerle tutturulması enzim yapısında konformasyon değişikliğine ve böylece aktivite kaybına sebep olabilir [80]. Bu nedenle çapraz bağlı enzim agregatları (CLEA'lar) gibi taşıyıcı içermeyen immobilizasyon yöntemlerine olan

ilgi artmıştır [81]. Fakat bu yapıları santrifüjleme veya filtrasyon ile reaksiyon ortamından ayırmak büyük bir kısıtlamadır. Bu nedenle, manyetit çapraz bağlı enzim agregatları (MCLEA) geliştirmiştir [82]. Bu yapının içerdiği manyetit özelliği, yapıya tutturulan herhangi bir molekül için uygun mikroçevreyi sağlarken aynı zamanda bu sinyal yapısının reaksiyon ortamından bir mıkknatis vasıtası ile kolayca ayrılabilmesini mümkün kılmaktadır.

Tasarlanan sinyal platformu ile hedef DNA'ların tespit edilmesinde Ag^+ 'nin DNA ile olan etkileşim mekanizmaları temel alınmıştır. Literatürde gümüş iyonlarının DNA ile kuvvetli bir bağ oluşturarak DNA'da yapısal değişikliğe neden olduğunu ortaya koyan çok sayıda çalışma mevcuttur. Metal iyonları difüzyon modda veya lokalize modda DNA'ya bağlanabilir. Difüzyon bağlanma, metal iyonları ile negatif yüklü DNA zincirleri arasındaki elektrostatik çekim yoluyla meydana gelir [83–85]. Çünkü nükleik asitler güçlü bir şekilde negatif yüklüdür ve bu nedenle çözeltide bulunan iyonlar ile elektrostatik etkileşimlere girerler [86]. Lokalize bağlanmada ise, metal iyonları DNA yapısı ile doğrudan temas halindedir. Böyle bir bağlanmanın, DNA da önemli bir konformasyonel değişikliğine neden olabileceği bildirilmiştir. Bu iyonların tercihen DNA bazlarındaki nitrojen atomlarına bağlandıkları ve özellikle GC baz çiftinin nitrojen atomları ile güçlü bir şekilde etkileşime girerek DNA yapısını etkiledikleri bildirilmektedir [117, 118]. Volkov vd. (2017) gümüş iyonlarının tercihen olarak DNA bazlarındaki nitrojen atomlarına bağlandıklarını ifade etmiştir [89]. Daune vd. (1966) ise DNA bazlarının Ag^+ ve nitrojen atomları arasında güçlü ancak tersine çevrilebilir bir kompleks oluşturduğunu ve baz reaktivitesinin DNA uzunluğu ve guanin-sitozin (GC) içeriğine göre büyük ölçüde değiştiğini ortaya koymuştur [90]. Ag^+ 'nin DNA bazlarındaki nitrojen atomları, özellikle GC çiftlerinin nitrojen atomları ile güçlü bir şekilde etkileşime girdiğini gösteren başka çalışmalarda bulunmaktadır [121, 122]. Bunların yanı sıra literatürde tek iplik DNA (ssDNA) ve çift iplik DNA (dsDNA)'nin yapısal farklılıklarından dolayı yüzey yüklerinin ve termodinamiksel özelliklerinin farklı olduğu bildirilmiştir [93]. Zheng vd., (2014), Ag^+ 'nin ssDNA'daki sitozine kuvvetli bağlanma isteği bulunduğunu ve ortamdaki Ag^+ konsantrasyonunun ssDNA'nın fiziksel özelliklerini önemli ölçüde değiştiren bir parametre olduğunu ifade etmiştir [94]. Ayrıca, Topyaka ve Çetin (2019) yaptıkları bir çalışmada ssDNA ile dsDNA'nın ortamdaki Ag^+ tutma kapasitelerinin farklı olduklarını deneysel olarak ortaya koymuşlardır [83]. dsDNA'nın ssDNA'ya göre daha fazla negatif yüke sahip olduğu ve bu sebeple elektrostatik etkileşimle de daha fazla Ag^+ tuttuğu sonucuna varmışlardır. Tüm bu bilgiler ışığında inkübasyon ortamındaki Ag^+ 'nin DNA'ya olan tutunma isteğinin;

i) DNA'nın yüzey yükü (ssDNA ve dsDNA için farklı),
ii) Sekansdaki bazların (Adenin-guanin, sitozin ve timin) çeşidi,
iii) DNA zincir uzunluğu,
iv) ssDNA'daki sitozin içeriği,
v) dsDNA'daki GC içeriği,
vi) Ortamındaki Ag^+ konsantrasyonu gibi parametrelere göre değişiklik gösterdiği anlaşılmaktadır. Dolayısı ile Ag^+ 'nın tek iplik prob DNA'ya ve bu prob DNA'nın hedef DNA ile oluşturduğu hibrit yapıya bağlanma miktarları ve böylelikle DIN yapısındaki enzimi inhibe etme oranları farklı olmaktadır.

2.2.2 AMAÇ VE HEDEFLER

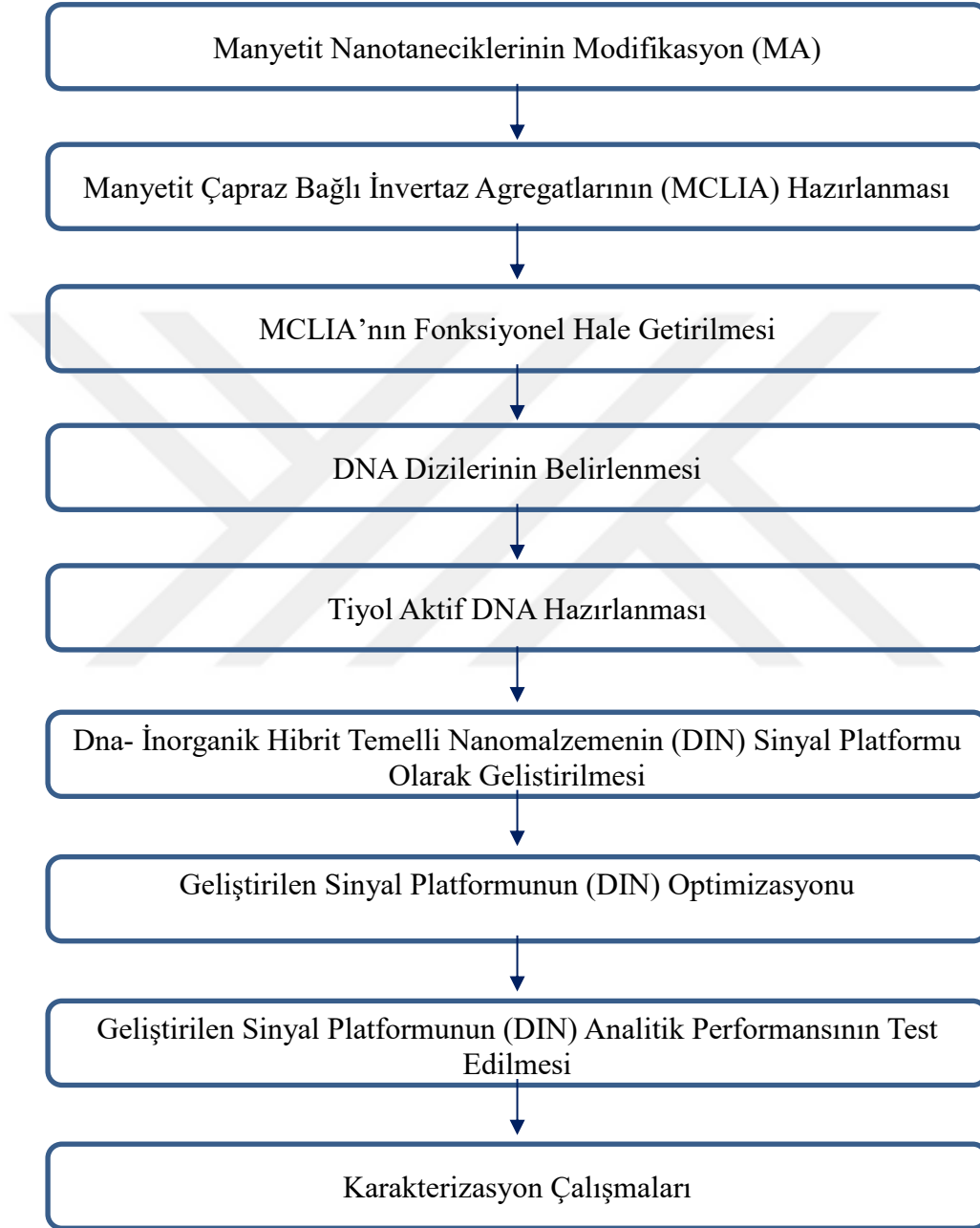
Amaca uygun farklı tasarımların yapılması ve farklı nükleotit sekanslarının geliştirilen platformlarda tespit edilmesi yapılan her çalışmayı bu anlamda özgün kılmaktadır. Fakat sınırlı sayıdaki bu çalışmalara ait prosedürlerin çoğu daha detaylı incelediğinde, hedef tanıma ve sinyal üretimi için çoklu adımlar kullanıldığı anlaşılmıştır. Bu durum DNA tespiti sırasında hata oranının artmasına sebep olabilmektedir [95]. Bu açıdan daha az işlem basamağı ile geliştirilen sinyal platformları elde edilen sinyalin güvenilirliği, tekrar üretilebilirliği ve analitik performansı açısından önem arz etmektedir.

Nükleotit sekanslarının tespitinde PGM ile tayin yapabilen DNA-inorganik hibrit temelli nanomalzemelerin (DIN) sinyal platformu olarak geliştirilmesini amaçlanan bu çalışmada literatürden farklı olarak sinyal platformu geliştirilirken;

- İnvertaz enziminin manyetik çapraz bağlı agregatlar (MCLIA) olarak hazırlanması,
- İnvertaz enziminin ağır metaller ile etkileşime girmesi sonucu inhibisyon gerçekleşmesi ve bu inhibisyonun sebep olduğu aktivite değişiminin PGM'de okunabilir olması,
- MCLIA yapısının prob DNA içermesi,
- Geliştirilen sinyal platformunun ağır metal tutma kapasitesinin hedef varlığında ağır metal tutma kapasitesinden farklı olması,

gibi durumlar yapılan bu çalışmanın kendine özgün bir tasarım olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

Bu çalışmanın amacı DIN yapısını sinyal platformu olarak geliştirmek ve bu platformun PGM’de nükleotid sekans analizi için kullanılabilirliğini model bir nükleotit sekans (CaMV 35S promotörü) ile çalışarak göstermektir. Bu çalışma kapsamında ulaşılması gereken hedefler akış şemasında (Şekil 2.3) belirtildiği gibidir.



Şekil 2.3. Deneysel hedeflerin gerçekleştirilme basamakları

2.3. MODELLEME VE OPTİMİZASYON

Matematiksel modelleme, matematiksel tekniklerin kullanılmasıyla gerçek yaşamda karşılaşılan ve matematiksel konuların dışında bir probleme ışık tutmak için kullanılmaktadır. Matematiksel modelleme, mühendislik tasarım problemleri göz önünde bulundurulduğunda bir fenomenin gözlemlenmesi, fenomen içindeki ilişkilerin ortaya konması, matematiksel analizlerin gerçekleştirilerek sonuçların elde edilmesi ve geliştirilen modelin yorumlanması süreçlerini kapsamaktadır [96].

Herhangi bir problem için modelleme ve optimizasyon çalışmaları yapabilmek adına kesin bilgi veren tasarım değişkenlerini belirlemek gereklidir. Daha sonra bu probleme yönelik süreçler bulmak, mevcut süreçler hakkında daha fazla bilgi edinmek ve bunları mükemmel bir performans sergileyecek şekilde optimize etmek için Deney Tasarımı (DOE) yapılmaktadır [85, 86]. DOE’de yer alan istatistiksel yöntemler, çoğaltma, rastgeleleştirme ve engelleme ilkelerini temel almaktadır. Çoğaltma, sonucun daha doğru olması ve aynı zamanda deneysel hatayı azaltması için deneyin tekrarıdır. Deneylerin yürütülme sırasının rastgele atanması ise rastgeleleştirme ilkesi ile gerçekleştirilir. Engelleme ilkesi ile bilinen sistematik yanlılık etkisini ortadan kaldırmayı ve ana etkilerin gözlenmesini amaçlanmaktadır [99]. Bu ilke doğrultusunda tasarım, Box Banken, Taguchi, General Factorial, D-Optimal vb. gibi alternatif yöntemlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Bahsi geçen yöntemlerin kendilerine has özellikleri sebebiyle çalışmada yer alan tüm faktörleri, faktörlerin seviyeleri ve yanıtların sayısı belirtilmelidir. Böylece her yöntem belirtilen özel test koşullarıyla ürettiği önerilerini sunmaktadır. DOE sonucunda elde edilen öneriler doğrultusunda amaca uygun çıktılar üretilir ve tasarım değişkenleri ve çıktılar aracılığıyla problemin amaç fonksiyonu olarak adlandırılan matematiksel model geliştirilir ve tanımlanır. Bu tanımlama sürecinde genellikle regresyon analizi (RA), yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM), sonlu fark tekniği (FDT) ve yapay sinir ağları (ANN) gibi modelleme araçları kullanarak matematiksel modeller oluşturulur [99].

Regresyon yaklaşımı, farklı ifadelerde yer alan bağımsız değişkenlerdeki ayarlamalar ile bağımlı değişkendeki değişiklikleri incelemeyi mümkün kılmaktadır. Böylece değişkenler arası ilişki nedensel olarak bulunmakta ve modelleme için kullanılmaktadır. Bu teknik ile bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki doğrusal ilişki veya doğrusal olmayan ilişki incelenmektedir.

Biyolojik sinir ağlarını ilham alan ANN'ler, giriş ve çıkış parametreleri arasındaki eşlemeleri öğrenme yeteneğine sahip doğrusal olmayan modellerden yararlanır. ANN, bir giriş katmanından (deneysel verileri girilmesini sağlamak için), bir çıkış katmanından (ANN yanıtını üretilmesi için) ve aralarında bir veya daha fazla gizli katmandan (doğrusal olmayan etkinin gözlenmesi için) oluşur. RSMise gerekli olan ancak minimum sayıda deney tasarımı yapılarak tüm değişkenlerin düzenli varyasyonu aracılığıyla birden fazla parametreyi optimize etmede kullanılmaktadır [100]. Öte yandan modelleme aşamasında, ANN ile tahminlerin doğruluğunu artırmak için regresyon analizinin güçlü yanlarını birleştiren Nöro-regresyon yaklaşımına sahip olan hibrit bir modelleme teknik kullanılır. Bu yöntemde verilerin yüzde 80'inin eğitim, yüzde 15'inin test ve yüzde 5'inin de doğrulama için kullanılması amaçlanarak veriler üç gruba ayrılır. Eğitim, test ve doğrulama verilerini ayırdıktan sonra fenomeni tanımlamak için doğrusal olmayan trigonometrik, logaritmik ve polinom fonksiyonlarını içeren tekli ve çoklu regresyon modelleri tercih edilir [101]. Burada eğitim sürecinin amacı, her bir regresyon modeli için verilen katsayıları değiştirerek tahmin edilen ve deneysel veriler arasındaki hatayı en aza indirmektir. Ardından, uygulanan test aşamasıyla regresyon modeli tutarsızlıklarının etkisini en aza indirerek tahmine dayalı sonuçlara ulaşılmaktadır. Bu test sürecinin gerçekleştirilmesi, aday modellerin tahmin yeteneklerinin anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. Daha sonra test aşamasını başarıyla geçen modellerin güvenilirliğini ortaya çıkarmak için model fonksiyonlarına doğrulama işlemi uygulanır. Böylece kesin, doğru, spesifik, tutarlı, geçerli ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi garanti edilmektedir [88, 89]. Bu doğrultuda elde edilen $R^2_{\text{eğitim}}$, $R^2_{\text{eğitim ayarlı}}$, R^2_{test} ve $R^2_{\text{validasyon}}$ değerleri, modellerin deneysel sonuçlara ne kadar yakın olduğunu ifade eder. Diğer bir deyişle modelleme, fiziksel fenomeni mümkün olduğu kadar gerçeğe uygun olarak tanımlama sürecini kapsar.

Biyosensör platformları, hem biyolojik hemde mühendislik problemleri içermektedir. Biyosensör sistemlerinin sahip oldukları sinerjik etkileşimler sebebiyle bu platformlar stokastik sistemler olarak kabul edilebilir ve biyosensör sistemlerinde karar verme yaklaşımlarındaki

problemleri çözüme kavuşturmak amacıyla stokastik optimizasyon yöntemlerinin kullanılması uygundur. Stokastik optimizasyon, bir veya daha fazla giriş parametresi rastgele değişkenlere bağlı olduğunda istatistiksel veya matematiksel bir fonksiyonun değerini en aza indirmeye veya en üst düzeye çıkarmaya dayanan süreçtir [99].

Biyosensör tasarım problemlerindeki özgünlük, bu tasarımlar için klasik optimizasyon teknikleri kullanılmasını engellemektedir. Bu durumlarda, genetik algoritmalar (GA), parçacık sürüsü (PS) ve benzetilmiş tavlama (SA) gibi stokastik optimizasyon yöntemleri tercih edilir. Stokastik tekniklerin doğası gereği ve çözüm güvenilirliği farklı olan birden fazla yöntemin kullanılması nedeniyle kesin cevaplar bulunamamaktadır.

En zorlu matematiksel optimizasyon problemleri aşağıdaki kriterlere sahiptir;

- (1) Çoklu doğrusal olmayan amaç fonksiyonları
- (2) Birçok yerel ekstremum noktasına sahip amaç fonksiyonlar
- (3) Tasarım değişkenlerinin ayrık/tamsayı-sürekli yapılarının bir arada olması
- (4) Doğrusal Olmayan Kısıtlar

Bu çalışmada bahsedilen optimizasyon senaryoları, tüm öğeler tarafından sağlanan zorluğu içerir. Optimizasyon problemlerini çözmek için dört farklı fenomenolojik tabanlı optimizasyon algoritması kullanılmaktadır;

- i) Geliştirilmiş Nelder- Mead Algoritması (MNM),
- ii) Geliştirilmiş Diferansiyel Evrim Algoritması (MDE),
- iii) Geliştirilmiş Benzetilmiş Tavlama Algoritması (MSA) ve
- iv) Geliştirilmiş Rastgele Arama Algoritması (MRS).

Geliştirilmiş Diferansiyel Evrim Algoritması (MDE), genetik algoritmaya dayanan karmaşık problemlere alternatif cevaplar sunan yinelemeli bir optimizasyon yöntemidir. Bu yöntem popülasyon tabanlı tamamen türevsiz stokastik yaklaşımla problemin tüm kısıtlamalarını en iyi şekilde analiz etmektir. Bu algoritma, her yinelemede bir çözüm kümesini dikkate alır. MDE'yi kullanmak, amaç fonksiyonunun global optimumunu bulmayı garanti etmese de bunun için etkilidir [88, 90, 92].

Geliştirilmiş Nelder- Mead Algoritması (MNM), kısıtsız optimizasyon problemleri için tasarlanmış ve türev içermeyen bir doğrudan arama optimizasyon tekniğidir. Çok sayıda yerel minimum noktası olmayan problemler için uygundur. Yansıma, genişleme, büzülme gibi parametrelerin kullanılmasıyla NM alternatifleri kontrol edilir. Birkaç iterasyonda elde edilebilecek yeterli sonuçlar üretirler. Her yinelemede, algoritma bir veya iki fonksiyon değerlendirmesi ister ve her değerlendirme işlem yükü çok fazla veya zaman alıcı olduğundan pratikte çok nadir tercih edilir [87, 88].

Geliştirilmiş Rastgele Arama Algoritması (MRS) stokastik tekniğe dayanan ve iterasyon sayısına bağlı olarak optimum sonuca ulaşan bir algoritmadır. Rastgele arama yöntemi, optimum sonuca ulaşana kadar arama alanı içinde rastgele noktaları hesaplayarak uygunluğunu kontrol etmek için bir ön arama noktasından veya noktalar kümesinden başlar. MRS algoritması ile büyük ölçekli problemlerin çözülmesinde kullanılan sürekli, ayrık alanlar veya bunların karışımını içeren dışbükey olmayan, türevlenemeyen amaç fonksiyonları için global optimuma ulaşmak mümkündür [100].

Geliştirilmiş Benzetilmiş Tavlama Algoritması (MSA) yüksek bir sıcaklığa ısıtılan ve yavaş soğumaya izin veren bir metal nesne ile ilgili tavlamanın fiziksel sürecini temel alan bir yöntemidir. Eritme işlemi sırasında, malzeme daha düşük bir enerji durumuna yerleşen atomik yapı sayesinde daha tok bir malzeme haline gelir. Optimizasyon problemlerinde SA algoritması tavlama işlemi sayesinde daha iyi bir global optimuma ulaşabilir, yapının yerel minimumdan uzaklaşmasını sağlar. SA kullanarak karma tamsayı, ayrık veya sürekli optimizasyon problemlerini çözmek mümkündür [88, 92].

Bu çalışmada doğrusal-doğrusal olmayan ve aynı zamanda kısıtsız-kısıtlı problemleri çözmek için tam sayısal optimizasyon yapmayı sağlayan komutlar koleksiyonuna sahip 'Wolfram Mathematica' yazılımı kullanılmıştır. Matematik, denklemler, integraller, matrisler, diziler, fonksiyonlar, vektörler ile matematiksel işlemler birkaç basit Wolfram Dili talimatı ile yapılabilir. Wolfram Mathematica, matematikteki yetenekleri ile tamamen kısa sürede cevap vermektedir. Bu bağlamda, Mathematica'da yer alan sayısal global optimizasyon yöntemlerinde NMinimize ve NMaximize komutları kullanılmaktadır. Böylece hem biyolojideki hemde mühendislikteki karmaşık problemleri ve bunların belirli karakteristik

özelliklerini yazılımda yer alan algoritmaları kullanarak optimize etmektedir. Stokastik arama süreçlerinin doğal davranışı, algoritmaların sağlamlığını, güvenilirliğini ve hassasiyetini gerçekleştirmenin çok önemli olmasına yol açar. Biyosensör problemlerinde stokastik optimizasyon yöntemlerinin kullanımı literatürde kısıtlı olarak mevcuttur. Bu çalışmada ise farklı stokastik optimizasyon algoritmaları ile de farklı test fonksiyonları için global minimumu veya maksimumu bulma kapasitesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Seçeneklerin doğru ayarlanmasında kullanılan algoritmaların ilgili parametreleri Tablo 2.3'te listelenmiştir. Ayrıca farklı optimizasyon senaryoları tanımlanarak sistem davranışlarının gerçekçiliği de deneysel olarak gözler önüne serilmiştir.

Tablo 2.3. MDE, MNM, MRS ve MSA optimizasyon algoritmaları için ilgili seçenekler.

Seçenekler	MDE	MN M	MRS	MS A
Çapraz kesirler	0.5	—	—	—
Rastgele Tohum	1	5	0	2
Ölçekleme faktörü	0.6	—	—	—
Tolerans	0.001	0.001	0.001	0.001
Temas oranı	—	0.5	—	—
Genişletme oranı	—	2.0	—	—
Yansıma oranı	—	1.0	—	—
Büzülme oranı	—	0.5	—	—
Seviye yinelemeleri	—	—	—	50
Pertürbasyon ölçeği	—	—	—	1.0
Ceza Fonksiyonu	—	—	Otomatik	—
Arama Noktaları	—	—	2	—
Yöntem	—	—	İç nokta	—

MNM: Değiştirilmiş Nelder- Mead Algoritması, MDE: Değiştirilmiş Diferansiyel Evrim Algoritması, MSA: Değiştirilmiş Benzetilmiş Tavlama Algoritması, MRS: Değiştirilmiş Rastgele Arama Algoritması

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Deneyisel çalışmalarda kullanılan sarflar ve bunların kullanım amaçları Tablo 3.1’de özetlenmiştir. Bütün sulu çözeltiler ultrasaf su (18,2 MΩ) kullanılarak hazırlanmıştır.

Tablo 3.1. Temin edilen sarflar ve deneyisel çalışmalardaki kullanım amaçları

MALZEMELER	KULLANIM AMACI
	Sigma-Aldrich
Grade VII invertaz enzimi (<i>S. cerevisiae</i>)	Sükrozun glikoza parçalanması
Manyetit nanotaneği (Fe_3O_4 , <50nm),	Enzimin tutturulduğu ve reaksiyon ortamından kolayca ayrılabilen nanotanecek
Amonyum sulfat ($\geq 99,9$)	Enzim agregatlarının oluşturulması ve nanotanecekli yapıya çöktürülmesi
Metanol ($\geq 99,7$ GC)	Silanizasyon tepkime solventi ve yıkama Çözeltisi
(3-Aminopropil) Trietoksisilan (APTES) (≥ 98)	Manyetit nanotaneğinin amin grubu ile modifiye edilmesi
Sülfosüksinimidil-4- (N-maleimidometil) - sikloheksan-2-karboksilat (sulfo-SMCC)	Enzim agregatları ile modifiye edilmiş manyetit nanotaneceklerinin maleimid grubu ile fonksiyonelleştirilmesi
Tris (2-karboksietil) fosfin (TCEP),	Tiyol Modifiyeli DNA’nın aktifleştirilmesi
NaCl ($\geq 99,8$)	Tampon A çözeltisinin hazırlanması
DNAaz, RNAaz içermeyen su	DNA’ların çözündürülmesi ve seyreltilmesi
Agaroz (low EEO)	DNA varlığının elektroforez ile tespiti
Tris base ($> 99,8$)	TBE elektroforez tamponunun hazırlanması

Etidium Bromide (EtBr)	DNA'nın agaroz jelde gözlenmesi
Loading buffer	DNA'ların agaroz jele yüklenmesi
Boric asit ($\geq 99,5$)	TBE elektroforez tamponunun hazırlanması
Zn(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O (%98)	İnvertaz inhibitörü
EDTA (%99-101)	TBE elektroforez tamponunun hazırlanması ve invertaz enziminin reaktif edilmesi
Merck	
Glutaraldehit (%25)	Enzim agregatlarının modifiye edilmiş manyetit nanotaneğine çapraz bağlanması
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O) ($\geq 99,5$)	Tampon Çözeltilerinin hazırlanması
Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O) (%99-102)	Tampon Çözeltilerinin hazırlanması
Tween-20	Tampon A çözeltisinin hazırlanması
AgNO ₃ (yüksek saflıkta)	Enzim inhibitörü
Ni(NO ₃) ₂	Enzim inhibitörü
CuSO ₄	Enzim inhibitörü
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	Enzim inhibitörü
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Enzim inhibitörü
Zn(NO ₃) ₂	Enzim inhibitörü
Sükroz	Parçalanma ürünü glikoz olan invertaz enziminin substratı
Amikon 10K	Tiyol Modifiyeli Prob DNA'ların saflaştırılması
Chem Cruz	
β-Merkapta etanol	İnvertaz enziminin reaktif edilmesi
Eurofins	
Tiyol modifiyeli prob DNA	Maleimid grubu ile fonksiyonelleştirilmiş enzime tuturulacak 35S promotörünün eşleniği olan DNA dizisi
Hedef DNA	35S promotörüne ait 20 baz uzunluğundaki DNA dizisi
ABP Biosciences	

iQuant ssDNA analiz kiti (1-200 ng)	DNA miktar tayinin yapılması
--	------------------------------

Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar ve bunların kullanım amaçları Tablo 3.2’ de özetlenmiştir.

Tablo 3.2. Temin edilen cihazlar ve deneysel çalışmalardaki kullanım amaçları

CİHAZLAR	KULLANIM AMACI
Taramalı elektron mikroskobu (ZEISS)	DİN yapısının elde edilme aşamalarındaki numune morfolojilerinin incelemesi.
Fourier Dönüşümlü infraret spektroskopisi (Pelkin Elmer spectrum II FTIR)	DİN yapısının elde edilme aşamalarındaki numune bileşenlerinin birbirleri ile olan etkileşimlerinin tespit edilmesi.
Agaroz elektroforez sistemi (Biorad Sub-Cell GT)	DNA’ların MCLIA yapısına tutunduklarının ve hibritleşme olup olmadığının ortaya konması
Örnek Titreşimli Manyetometre (ADE EV-9)	Toz halindeki yapıların manyetik özelliklerini karakterize edilmesi
Qubit 3 fluorometre (Thermo Fisher)	DNA miktar analizi
pH metre (WTW multi 9310)	Ortam proton konsantrasyonunun belirlenmesi
Çalkalamalı ultrasonik su banyosu (DT 1028 F Sonorex Bandelin)	Manyetit nanotanecik yüzeylerinin aktifleştirilmesi
Mikro santrifüj (Scilogex D3024)	Tiyol modifiyeli DNA’ların santrifügasyonla yıkanması ve saflaştırılması
Vakumlu Fırın (Nüve Ev 018)	Toz numunelerin kurutulması
Çalkalamalı su banyosu (NÜVE ST 30)	Manyetit çapraz bağlı invertaz enzim agregatlarının (MCLIA) hazırlanması
Vorteks (Scilogex MX-S)	Homojen karışımların elde edilmesi
Yarı mikro analitik terazi (Shimadzu AP225WD Dual Range)	Hassas tartımların yapılabilmesi
Ultra derin dondurucu (DAIHAN unifreez U400)	Çözündürülmüş DNA’ların saklanması
Glikoz metre cihazı ve stripleri (Accucheck Active)	Enzim içeren yapılardan sinyal elde edilmesi
Mikropipetler (Brand)	Hasas ve mikro hacimlerle çalışma imkanı

3.2. Yöntemler

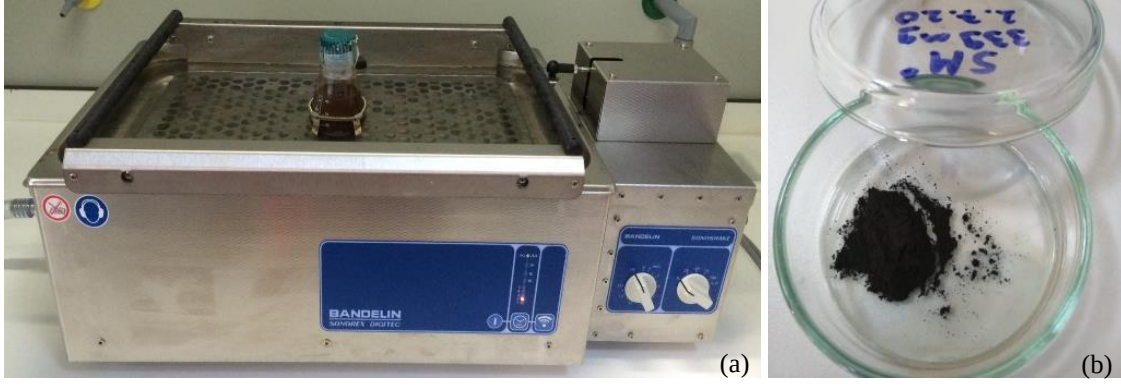
3.2.1 Gerekli Olan Çözeltilerin Hazırlanması

- ✓ **Sodyum fosfat tamponu (PBS):** ultra saf su ile pH 5, 6,5 ve 8 olacak şekilde 50 mM ve pH 5,5 olacak şekilde 1 M olarak hazırlanmıştır.
- ✓ **Enzim çözeltisi:** 50 mM pH 6,5 PBS tamponu ile 0,2, 0,6 ve 1 U/μl olacak şekilde hazırlanmıştır.
- ✓ **Doygun amonyum sülfat çözeltisi:** ultra saf su ile 0,77 g/ml olacak şekilde hazırlanmıştır.
- ✓ **Ağır metal çözeltileri:** 5-500 μM olacak şekilde 50 mM (pH:5-6) PBS tamponu ve ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır.
- ✓ **TCEP çözeltisi:** DNase -RNase içermeyen su ile 30 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.
- ✓ **Tampon A:** 0,1 M NaCl ve %0,05 tween20 içeren 100 mM pH 7,3 PBS tamponu ile hazırlanmıştır.
- ✓ **Yıkama Çözeltisi 1:** 2 mg/ml BSA içeren Tampon A çözeltisi ile hazırlanmıştır.
- ✓ **Yıkama Çözeltisi 2:** 0,1 M NaCl içeren 100 mM pH 7,3 PBS tamponu ile hazırlanmıştır (Tween 20 içermeyen Tampon A çözeltisi).
- ✓ **Yıkama Çözeltisi 3:** 2 mg/ml BSA içeren ultra saf su ile hazırlanmıştır

- ✓ **Stok Hedef DNA Çözeltileri:** DNase -RNase içermeyen su ile 100 µM olacak şekilde stok hazırlanmış ve bu stok **Tampon A** veya **Tween 20 içermeyen Tampon A çözeltisi** ile seyreltilmiştir.
- ✓ **Stok Tiyoil Modifiyeli DNA Çözeltisi:** bir kısmı DNase -RNase içermeyen su ile bir kısımda **Tween 20 içermeyen Tampon A çözeltisi** ile 1 mM olacak şekilde stok hazırlanmış ve bu stok **Tween 20 içermeyen Tampon A çözeltisi** ile seyreltilmiştir.
- ✓ **Sulfo-SMCC çözeltisi:** **Tween 20 içermeyen Tampon A çözeltisi** ile 0.087 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır.
- ✓ **Sükroz çözeltileri:** 2-700 mM pH 5, 6, 6,5 ve 8 olan PBS tamponları ile 100 mM olacak şekilde hazırlanmıştır.
- ✓ **10 x TBE elektroforez tamponu:** 89 mM Tris base ve 89 mM borik asit içeren 600 ml ultra saf su ile hazırlanmıştır. Üzerine 0,5 M pH 8 EDTA içeren 40 ml ultra saf su eklenmiş ve toplam hacim ultra saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır.
- ✓ **EtBr çözeltisi:** ultra saf su ile 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.2 Manyetit Nanotaneciklerinin Modifikasyonu

Silanizasyon tepkimesi olarak adlandırılan bu aşamada 15 mL ultra saf su, 3,75 mL APTES ve 93,75 mL metanol bir erlende karıştırılarak içerisine 0,75 g manyetit tozu (Fe_3O_4) ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım 65 °C' de 35kHz sabit frekansa sahip ultrasonik ortamda 220 çalkalama/dk hızında 6 saat süreyle Şekil 3.1'de gösterildiği gibi mekanik olarak karıştırılmıştır.



Şekil 3.1. (a) Manyetit nanotaneceklerinin ultrasonik çalkalamalı su banyosundaki reaksiyonu, (b) kurutma sonrası elde edilmiş yüzeyleri aktif manyetit nanotanecekler (MA).

Elde edilen çamurumsu yapı manyetik dekantasyon ile üç kez art arda su ve metanol kullanılarak yıkandıktan sonra -0,7 bar vakum altında oda sıcaklığında kurutularak yüzeyleri aktif hale getirilmiş manyetit nanotanecekleri (MA) elde edilmiştir.

3.2.3. Manyetit Çapraz Bağlı İnvertaz Agregatlarının (MCLIA) Hazırlanması

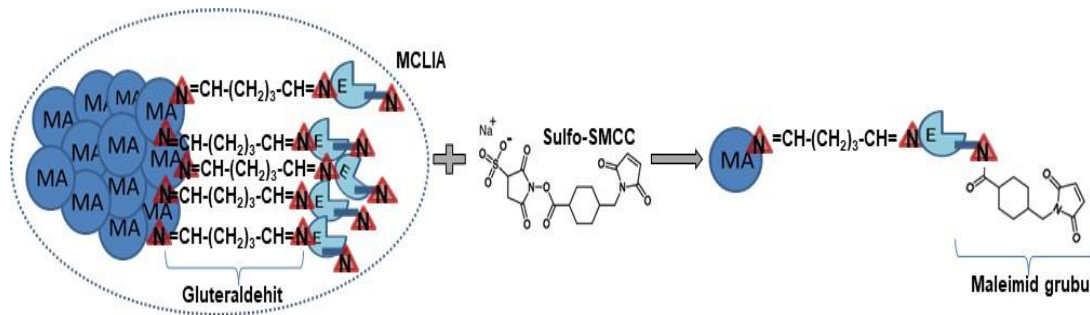
Bu aşamada deneysel tasarım doğrultusunda elde edilen çalışma setleri için öncelikle invertaz enzimi 0,2, 0,6 ve 1 U/μl olacak şekilde 50 mM, pH 6,5 fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra 100 μl hazırlanan enzim çözeltisine 1 mg MA ilave edilmiş ve bu karışım 30 °C'de 250 çalkalama/dk hızında 15 dk boyunca su banyosunda çalkalanarak enzim ile MA' ın etkileşime geçmesi sağlanmıştır. Hazırlanan doymuş amonyum sülfat çözeltisinden 0,5 ml enzim-manyetit karışımına eklenmiştir. Bu karışım 4 °C'de 250 çalkalama/dk hızında 30 dk boyunca mekanik olarak karıştırılıp enzim agregatlarının manyetit nanotanecek yüzeylerine çöktürülmesi sağlanmıştır. Daha sonra ortama, konsantrasyonu %1, 3 ve 5 olacak şekilde çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit eklenerek elde edilen karışım 30 °C' de 250 RPM' de 3 saat boyunca Şekil 3.2'te gösterildiği gibi mekanik olarak karıştırılmıştır. Süre sonunda elde edilen yapının yüzeyine tutunamayan enzimlerin uzaklaştırılması için yapı 250 çalkalama/dk hızında 30 dk boyunca her 5 dk bir taze yenilenen pH: 6,5 PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Tüm bu işlemler sonunda her bir tüpte 1 mg olarak elde edilen manyetit çapraz bağlı invertaz enzim agregatları (MCLIA) kullanılmak üzere 4 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2. Manyetit çapraz bağlı invertaz agregatlarının (MCLIA) çalkalamalı su banyosundaki hazırlanışı

3.2.4. MCLIA'nın Fonksiyonel Hale Getirilmesi

Elde edilen MCLIA yapısına daha sonra hazırlanacak olan tiyol aktif prob DNA'larının tutturulması için yapı maleimid grubu ile fonksiyonel hale getirilmiştir. Bu amaç için 1 mg MCLIA 300 µl sülfo-SMCC çözeltisi ile bir araya getirilerek oda sıcaklığında 220 çalkalama/dk hızında her 15 dakikada bir 5 dakika boyunca vortekslenerek toplamada 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Etkileşime girmeyen sülfo-SMCC'yi yapıdan uzaklaştırmak için karışım manyetik dekantasyon ile katı sıvı faz ayrımı yapılarak yıkama çözeltisi 2 ile 10 kez yıkanmıştır. İşlem sonunda MCLIA, Şekil 3.3 'te gösterildiği gibi maleimid grubu ile fonksiyonel hale getirilmiştir.



Şekil 3.3. MCLIA yapısı ve bu yapının maleimid grubu ile fonksiyonel hale getirilmesi

3.2.5. Nükleotit Sekansını Tanımlayabilen Özgün DNA Dizisinin Belirlenmesi, Prob DNA ve Eşlenik Olmayan DNA Sekanslarının Dizayını

Amaç doğrultusunda GDO'ların içerdiği CaMV 35S promotörü hedef nükleotit sekansı olarak belirlenmiştir. İlk olarak hedef gen bölgesi olan CaMV 35S promotörüne ait nükleotit sekansından Şekil 3.4'te gösterildiği gibi 20 baz uzunluğundaki DNA dizisi seçilmiştir. Seçilen bu sekansın eşlenik dizisi (prop DNA) 3' uçundan tiyol grubu içerecek şekilde ticari bir firmadan temin edilmiştir.

ORIGIN

```
1 tccactgacg taagggatga cgcaaatcc cactatcctt cgcaagaccc ttctctata
61 taaggaagtt catttcattt ggagaggaca cgctgaaatc accagtctct ctctacaaat
121 ctatctctct ctattttctc cataataatg tgtgagtagt tcccagataa gggaattagg
181 gttcttatag ggtttcgctc acgtgttgag
```

Şekil 3.4. CaMV 35S prömotörünün nükleotit sekansı (NCBI referans numarası: S51061.1) ve seçilen hedef gen bölgesi

CaMV 35S promotöründen seçilen nükleotit sekansı (hedef DNA), prob DNA, modifiyeli prob DNA ve eşlenik olmayan DNA gen dizilimleri Tablo 3.3'te verilmiştir.

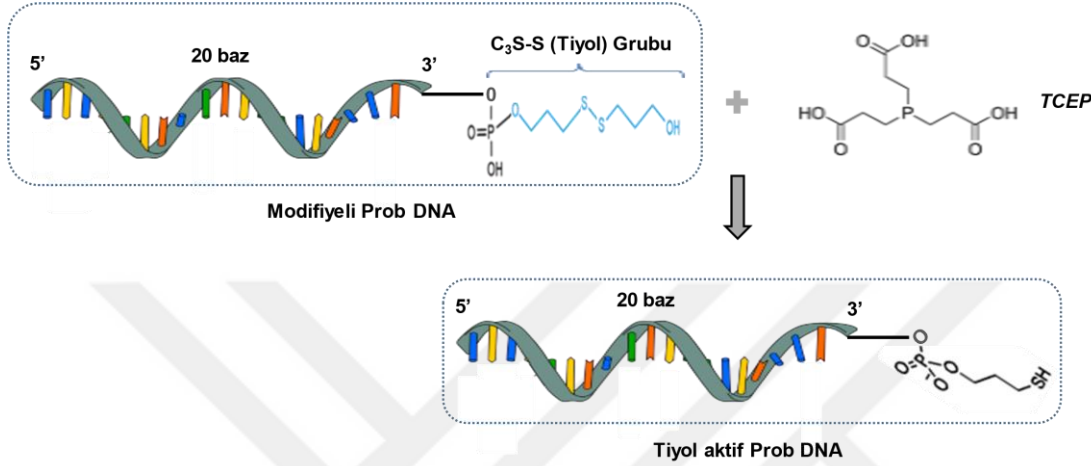
Tablo 3.3. Hedef, prob, modifiyeli prob ve eşlenik olmayan DNA gen dizilimleri

Hedef DNA	5'-CGC ACA ATC CCA CTA TCC TT-3'
Prob DNA	5'- AA GGA TAG TGG GAT TGT GCG-3'
Tiyol grubu ile modifiyeli prob DNA	5'- AA GGA TAG TGG GAT TGT GCG A6/ Tiyol-3'
Eşlenik olmayan DNA	5'-GCG TGT TAG GGT GAT AGG AA-3'

3.2.6. Tiyol Aktif Prob DNA'ların Elde Edilmesi

Bu iş paketinde tiyol grubu ile modifiye edilmiş prob DNA'ları maleimid grubu ile fonksiyonel hale getirilmiş MCLIA yapısına bağlayabilmek için, tiyol modifiyeli prob DNA'lar

TCEP ile aktif hale getirilmiştir. Bu amaca yönelik olarak 25 µl 1 mM tiyol modifiyeli prob DNA, 1,667 µl 1 M pH 5,5 PBS ve 1,667 µl 30 mM TCEP bir araya getirilmiş ve bu karışım 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda reaksiyona girmemiş olan fazla TCEP'i ortamdan uzaklaştırmak amacıyla karışıma yıkama çözeltisi 2 eklenmiş ve mikro santrifüjde 14.000 rcf hızında döndürülerek 8 defa yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonunda Şekil 3.5'te gösterildiği gibi tiyol aktif prob DNA'lar elde edilmiştir.



Şekil 3.5. Tiyol aktif prob DNA'ların tasarımı

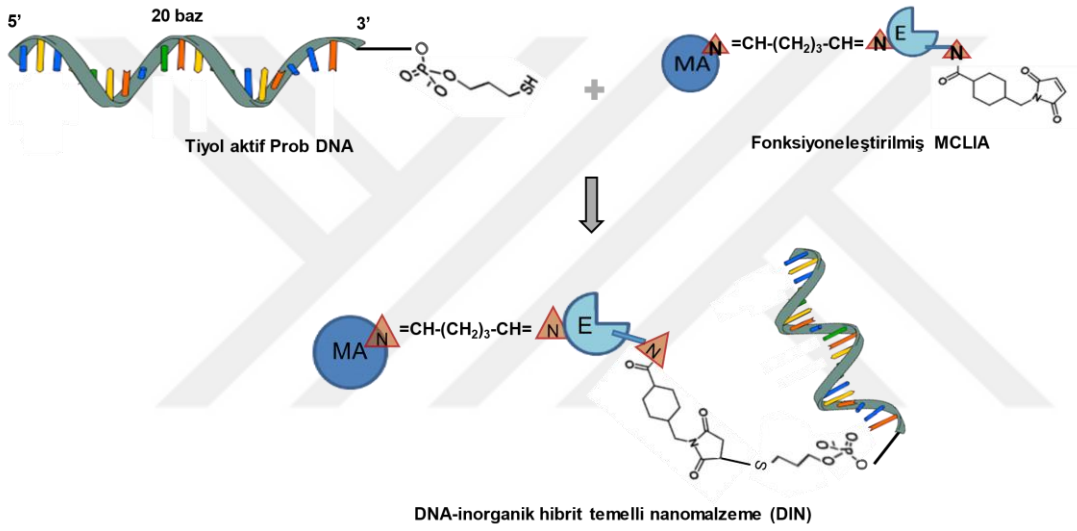
3.2.7. DNA-İnorganik Hibrit Temelli Nanomalzemenin (DIN) Sinyal Platformu Olarak Geliştirilmesi

Bu iş paketinde yıkama çözeltisi 2 ile stoktan seyreltilmiş 100 µl hacminde ve farklı konsantrasyondaki tiyol aktif prob DNA'lar, MCLIA (1 mg) ile bir araya getirilerek oda sıcaklığında 100 çalkalama/dk hızında 1 saat boyunca reaksiyona tabi tutulmuş ve süre sonunda karışım yıkama çözeltisi 2 eşliğinde 3 kez yıkanarak yapıya tutunmayan prob DNA'lar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Böylece Şekil 3.6' da gösterildiği gibi DNA-inorganik hibrit temelli nanomalzeme (DIN) GDO'nun tespit edilmesi için bir sinyal platformu olarak geliştirilmiştir.

MCLIA* yapısını maleimid grubu ile fonksiyonel hale getirdikten sonra maksimum tutunma miktarını belirlemek için farklı konsantrasyonlarda tiyol aktif prob DNA'lar hazırlanarak 0,1 ml olacak şekilde bu yapıya eklenmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 100 çalkalama/dk hızında 1 saat inkübe edilerek prob DNA'ların tutturulma süreci gerçekleştirilmiş ve bu tutturma işlemi Qubit cihazı ile doğrulanmıştır. Bu doğrultuda 1 mg'lık maleimid grubu

ile fonksiyonelleştirilmiş MCLIA*'nın maksimum prob tutma kapasitesini anlayabilmek için 100-800-1000-1500 ng/0,1 ml olacak şekilde stok tiyol aktif prob DNA çözeltileri hazırlanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda 15000 ng/ml olarak Qubit ile ayarlanan stok prob çözeltisinin eklendiği örneklerden inkübasyon sonrası elde edilen sıvı faz yine Qubit ile ölçülmüş ve cihazda okunan değerler Denklem 1'de verildiği gibi hesaplanmıştır.

$$\text{Tutunma miktarı} \left(\frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right) = Q_{\text{stok}} - Q_{\text{kalan sıvı faz}} \quad (\text{Denklem 1})$$

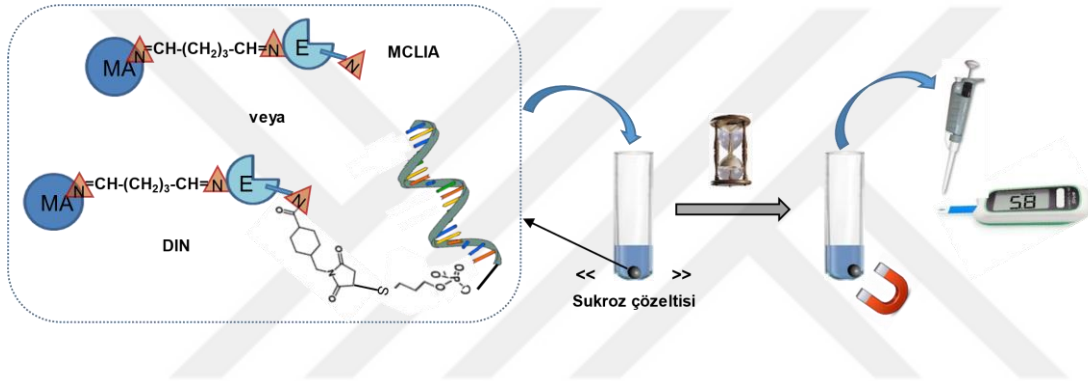


Şekil 3.6. DNA-inorganik hibrit temelli nanomalzemenin (DIN) sinyal platformu olarak geliştirilmesi

3.2.8. MCLIA Yapısının ve Geliştirilen Sinyal Platformunun (DIN) Analitik Performansının Test Edilmesi

MCLIA yapısının sü krozu hidrolize edebilme performansı diğer bir değişle yapıya bağlanan enzimin aktivitesi glikoz metre cihazı ile tespit edilmiştir. Analiz için içerisinde 1 mg MCLIA bulunan cam tüplere 200 µl, pH'sı 5, 6,5 ve 8 olan 100 mM sü kroz çözeltisi eklenmiştir. Bu ortam 20, 35 ve 50 °C'de 250 çalkalama/dk hızında 15, 30 ve 45 dk boyunca reaksiyona tabi

tutulmuştur. Süre sonunda reaksiyon ortamından 6 µl sıvı alınarak Şekil 3.7’de gösterildiği gibi glikoz metre stribine damlatılmış ve sinyal değerleri (mg/dl) kaydedilmiştir. Gerekğinde reaksiyon çözeltisi 5 kat seyreltilerek ölçümler alınmıştır. Yapısal ve deneysel parametreler dikkate alınarak hazırlanan MCLIA yapılarından glikoz metrede en yüksek sonucu veren yapı (MCLIA*) maleimid grubu ile fonksiyonel hale getirilmiş ve yine akabinde bu yapıya tiyol aktif prob DNA’lar tutturularak sinyal platformu (DIN) geliştirilmiştir. MCLIA* yapısında bulunan invertaz enziminin bu işlemlerden ne kadar etkilendiğini anlamak için elde edilen bu nihai yapılar 200 µl, pH’sı 5 olan 100 mM sükröz çözeltisi ile 50 °C’de 250 çalkalama/dk hızında 45 dk boyunca reaksiyona tabi tutularak Şekil 3.7’de gösterildiği gibi aktivite performans testi yapılmıştır.



Şekil 3.7. MCLIA yapısı ve geliştirilen sinyal platformunun (DIN) analitik performansının glikoz metrede test edilmesi.

MCLIA* yapısının kinetik parametreleri (V_{max} , K_m), tekrar kullanılabilirliği, tekrar üretilebilirliği, ve 4 °C’deki depolama kararlılığı da glikoz metreden alınan sinyallerle tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra invertaz enzimini inhibe etme potansiyeli bulunan bazı ağır metallerin (Ag^+ , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} ve Zn^{2+}) enzimi inhibe etme oranlarını araştırmak için bazı deneyler tasarlanmıştır [106–109]. Bu amaç için glikoz metrede yüksek sinyalin elde edildiği MCLIA örnekleri (1 mg), içerisinde ayrı ayrı 30 µM, $AgNO_3$, $Ni(NO_3)_2$, $CuSO_4$, $Co(NO_3)_2$, $MgSO_4$ ve $Zn(NO_3)_2$ bulunan 50 mM pH 5 PBS içerisinde oda sıcaklığında 220 çalkalama/dk hızında 15 dk süre ile reaksiyona tabi tutulmuştur. Bu işlem sonrasında 3 kez pH 6,5 PBS ile yıkama yapılmıştır. İnhibisyon öncesi ve sonrasında MCLIA örnekleri 200 µl, pH’sı 5 olan 100 mM sükröz çözeltisi içerisinde 35 °C’de 250 çalkalama/dk hızında 45 dk boyunca

reaksiyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda reaksiyon ortamından 6 µl sıvı örnek alınarak glikoz metre stribine damlatılmış ve sinyal değerleri (mg/dl) kaydedilmiştir. İnhibisyon oranları ise Denklem 2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon(\%)} = \left[\frac{(\text{Sinyal}_{\text{inkübasyon öncesi}} - \text{Sinyal}_{\text{inkübasyon sonrası}})}{\text{Sinyal}_{\text{inkübasyon öncesi}}} \right] * 100$$

(Denklem 2)

Ayrıca en fazla inhibisyona sebep olan ağır metal kullanımı sonrasında enzim reaktivasyonu ile MCLIA* yapısının tekrar kullanılabilirliğini test etmek için bu yapı öncelikle 100 µM ağır metal içeren ve içermeyen 200 µl, pH'sı 5 olan 100 µM süktroz içerisinde 50 °C'de 250 çalkalama/dk hızında 45 dk reaksiyona tabi tutulmuştur [109]. Süre sonunda reaksiyon ortamından 6 µl sıvı alınarak glikoz metre stribine damlatılmış ve sinyal değerleri (mg/dl) kaydedilmiştir. Bu işlem sonrasında 3 kez pH 6,5 PBS ile yıkama yapılmış ve akabinde etkileşim sonucu inhibe olan invertaz enzimini tekrar aktive edebilmek için MCLIA* yapısı 500 µl 10 mM β-merkaptan etanol ve 500 µl 10 mM EDTA ile ayrı ayrı olacak şekilde 50 °C'de 250 çalkalama/dk hızında 45 dk reaksiyona tabi tutulmuştur. Bu işlem sonrasında tekrar 3 kez pH 6,5 PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra MCLIA* yapısı 200 µl, pH'sı 5 olan PBS içerisinde 50 °C'de 250 çalkalama/dk hızında 45 dk boyunca reaksiyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda reaksiyon ortamından 6 µl sıvı örnek alınarak glikoz metre stribine damlatılmış ve sinyal değerleri (mg/dl) kaydedilmiş ve yine Denklem 2 kullanılarak inhibisyon oranları hesaplanmıştır.

Maksimum prob yüklenmiş DIN ile çalışma yapmak yapının doğrusal çalışma aralığının geniş olmasını sağlamaktadır. Böylece hazırlanan DIN yapısına moleküler ağırlıkları oranınca Qubit ile ayarlanarak hazırlanan hedef stok (10754 ng/ml) DNA'dan 0,1 ml eklenerek 1 saat süre ile hibritleştirilmesi sağlanmıştır. Süre sonunda dekantasyon sonrası elde edilen sıvı faz Qubit ile ölçülmüştür. Tutunma oranı Denklem 1'in kullanılmasıyla hesaplanmıştır. Böylece yapının tespit edebileceği maksimum hedef miktarı belirlenmiştir.

Sinyal platformunun GDO'yu tespit etme performansının test edilmesi sırasında 2 farklı deneysel süreç (akış) izlenmiştir. Şekil 3.8'den anlaşılacağı gibi Akış 1'de optimizasyon sonucu belirlenen senaryolar ile önerilen tasarımlar eşliğinde belirlenen miktarlarda prob DNA

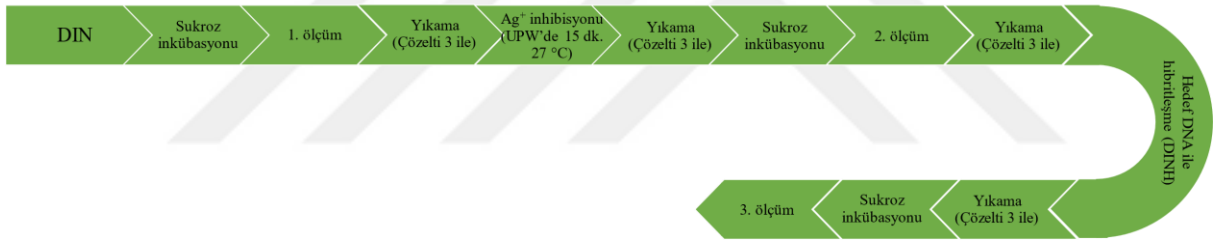
konsantrasyonları ile geliştirilen DIN'ların bir kısmı direkt kullanılmak üzere ayrılırken diğer DIN'lar, moleküler ağırlıkları oranınca hedef DNA sekansını içeren 100 µl yıkama çözeltisi 2 veya tampon A ile oda sıcaklığında 100 çalkalama/dk hızında 1 saat boyunca inkübasyona tabi tutulmuş ve süre sonunda yıkama çözeltisi 2 ile 3 kez yıkanarak yapıya tutunmayan hedef DNA'lar ortamdan uzaklaştırılmıştır. İnkübasyon sonucunda hibritleşmiş DNA içeren DIN yapıları (DINH) elde edilmiştir. Şekil 3.7'de gösterildiği gibi her iki yapıya ayrı ayrı 200 µl pH:6 PBS ile hazırlanmış 100 mM'lık süktroz çözeltisi eklenmesiyle tasarım önerilerinde yer alan sıcaklık ve sürede DIN ve DINH'lar reaksiyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda reaksiyon ortamından 6 µl sıvı alınarak glikoz metre stribine damlatılmış ve sinyal değerleri (mg/dl) kaydedilmiştir. Bu işlem sonrasında 3 kez yıkama çözeltisi 2 ile yıkama yapılmış, akabinde DIN ve DINH'lar deneysel olarak inhibisyona sebep olan ağır metal çözeltisi ile oda sıcaklığında 100 çalkalama/dk hızında 15 dk süre ile inkübe edilmiş ve süre sonunda bu yapılar 3 kez yıkama tamponu 2 ile yıkanmıştır. Bu işlemler 200 µl, 100 mM süktroz çözeltisi içerisinde 250 çalkalama/dk hızında reaksiyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda reaksiyon ortamından 6 µl sıvı örnek alınarak glikoz metre stribine damlatılmış ve sinyal değerleri (mg/dl) kaydedilmiştir. DIN'ların ve DINH'ların inhibisyon oranları her yapı için kendi ölçümleri temel alınarak bağımsız hesaplanmıştır. Hedef DNA'nın varlığında oluşan DINH ve DIN'ların farklı gümüş tutma kapasitesine sahip olmaları nedeniyle elde edilen sinyal değerlerindeki farklar araştırılmıştır.



Şekil 3.8. DIN ve DINH arasındaki inhibisyon oranlarının Akış 1'e göre tespit edilmesi

Akış 2'de ise optimizasyon sonucu belirlenen senaryolar ile önerilen tasarımlar eşliğinde belirlenen miktarlarda prob DNA konsantrasyonları ile geliştirilen DIN'lar üzerinde tüm basamakların uygulanmasıyla GDO tespit performansı incelenmiştir (Şekil 3.9). Bu amaç için hazırlanan DIN'lar senaryolar doğrultusunda 200 µl, 100 mM süktroz çözeltisi içerisinde 250 çalkalama/dk hızında reaksiyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda reaksiyon ortamından 6 µl sıvı örnek alınarak glikoz metre stribine damlatılmış ve sinyal değerleri (mg/dl) kaydedilmiştir. Bu işlem sonrasında 3 kez yıkama çözeltisi 3 ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra ise inhibisyona sebep olan ağır metal çözeltisi ile 27°C'de 100 çalkalama/dk hızında 15 dk süre ile inkübe edilmiş ve süre sonunda bu yapılar 3 kez yıkama çözeltisi 3 ile yıkanmıştır. 2. süktroz ölçümü

için senaryolarda belirtilen koşullar doğrultusunda yapıların 200 µl, 100 mM süktroz çözeltisi içerisinde 250 çalkalama/dk hızında reaksiyona tabi tutulması sağlanmıştır. Süre sonunda reaksiyon ortamından alınan 6 µl sıvı örnek alınarak glikoz metre stribine damlatılmış ve sinyal değerleri (mg/dl) kaydedilmiştir. İnhibe edilmiş DIN yapıları tekrar 3 kez yıkama çözeltisi 3 ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra inhibe olmuş DIN hedef DNA içeren 100 µl yıkama çözeltisi 2 oda sıcaklığında 100 çalkalama/dk hızında 1 saat boyunca reaksiyona tabi tutulmuş ve süre sonunda yapı yıkama çözeltisi 3 ile yıkanarak (3 kez) yapıya tutunmayan hedef DNA'lar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Son basamak olarak ise elde edilen DINH'lar senaryolarda verilen deneysel parametreler eşliğinde 200 µl, 100 mM süktroz çözeltisi içerisinde 250 çalkalama/dk hızında reaksiyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda elde edilen reaksiyon sıvısından 6 µl alınarak glikoz metre stribine damlatılmış ve sinyal değerleri (mg/dl) kaydedilmiştir. Böylece DIN ile başlayan ve inhibe olmuş yapının hibritleşmesi ile son bulan süreç sonucunda elde edilen DINH'nın gümüş tutma kabiliyetlerinin farklı olması temelinde glikoz metrenin verdiği ilk ve son sinyal değerlerinin farkı incelenmiştir.



Şekil 3.9. DIN ve DINH arasındaki inhibisyon oranlarının Akış 2'ye göre tespit edilmesi

3.3. Deneysel Tasarım, Modelleme ve Optimizasyon

Tasarlanan platformdan en kuvvetli sinyallerin alınması amacı ile MCLIA'ların elde edilmesi aşamasında yapısal ve deneysel parametreler (Tablo 3.3) kullanılmıştır. Bu parametreler 5 bağımsız değişken(enzim/M. gluteraldehit, pH, sıcaklık ve reaksiyon süresi) ve 3 farklı seviye (minimum, orta, maksimum) olacak şekilde dikkate alınarak Design Expert programında deneysel tasarım yapılmıştır.

Tablo 3.4. MCLIA tasarımı için kullanılan parametrelerin (bağımsız değişkenler) değer aralıkları

Parametre Türü	Bağımsız Değişkenler	Semboller	Aralıklar
Yapısal	Enzim/M (U/mg)	X ₁	20 – 60 - 100
	Gluteraldehit (%)	X ₂	1- 3 - 5
Deneysel	pH	X ₃	5 - 6.5 - 8
	Sıcaklık (°C)	X ₄	20 - 35 - 50
	Reaksiyon süresi (dk)	X ₅	15 – 30 - 45

Bu süreçte D-optimal tekniği, bağımsız değişkenlere bağlı olarak maksimum enzim aktivitesi için en iyi tasarımı oluşturmak üzere seçilmiştir. Daha sonra elde edilen her deney seti minimum 3, maksimum 7 tekrar olarak çalışılmış ve her bir deney seti için 1 bağımlı değişken (enzim aktivitesi) üretilmiştir. Her run için tüm tekrarlardan elde edilen ortalama veriler alınarak oluşturulan bağımlı değişken “Sinyal^a” olarak kodlanmıştır. Minimum standart sapmayı sağlayan 3 veri seçilerek oluşturulan ikinci bağımlı değişken ise “Sinyal^b” olarak kodlanmıştır. Bir sonraki basamakta ise belirlenen 5 faktör ve 3 seviye ile Design Expert programı tarafından faktörlerin hem istatistiksel anlamlılığını (F değeri) hem de anlamlılık düzeyini (p-değeri) ortaya koymak için her iki bağımlı değişken için ANOVA tablosu yapılmıştır. Daha sonra ise, Mathematica programı aracılığıyla deneysel veriler modellenmiş ve modelleme sürecinde regresyon analizinin ve Yapay Sinir Ağı'nın (YSA) faydalarını birleştiren bir hibrit yaklaşım uygulanmıştır. Bu yaklaşımda, veriler üç katagoriye ayrılmış, böylece verilerin yüzde 80'i eğitim için, yüzde 15'i test için ve yüzde 5'i doğrulama için kullanılmıştır. Eğitim sürecinin amacı, regresyon modellerini ve Tablo 3.5'te verilen katsayıları değiştirerek tahmin edilen değerler ile deneysel değerler arasındaki hatayı en aza indirmektir. R²eğitim, R²test ve R²doğrulama açılarından Sinyal^a ve Sinyal^b veri setleri için 14 farklı aday model fonksiyonu oluşturulmuştur.

Tablo 3.5. Doğrusal, ikinci dereceden, trigonometrik, logaritmik ve rasyonel formları dahil olmak üzere çoklu regresyon modeli türleri

Model Adı	Kısaltma	Formül
Çoklu doğrusal	L	$Y = \sum_{i=1}^5 (a_i x_i) + c_1$
Çoklu doğrusal rasyonel	LR	$Y = \frac{\sum_{i=1}^5 (a_i x_i) + c_1}{\sum_{j=1}^5 (b_j x_j)} + c_2$
İkinci dereceden çoklu doğrusal olmayan	SON	$Y = \sum_{k=1}^5 \sum_{j=1}^5 (a_j x_j x_k) + \sum_{i=1}^5 (a_i x_i) + c_3$
İkinci dereceden çoklu doğrusal olmayan rasyonel	SONR	$Y = \frac{\sum_{k=1}^5 \sum_{l=1}^5 (a_l x_l x_k) + \sum_{i=1}^5 (a_i x_i) + c_1}{\sum_{m=1}^5 \sum_{n=1}^5 (a_n x_n x_m) + \sum_{j=1}^5 (a_j x_j)} + c_4$
Üçüncü dereceden çoklu doğrusal olmayan	TON	$Y = \sum_{l=1}^5 \sum_{m=1}^5 \sum_{p=1}^5 (\beta_l x_l x_m x_p) + \sum_{k=1}^5 \sum_{j=1}^5 (a_j x_j x_k) + \sum_{i=1}^5 (a_i x_i) + c_5$
Üçüncü dereceden çoklu doğrusal olmayan rasyonel	TONR	$Y = \frac{\sum_{l=1}^5 \sum_{m=1}^5 \sum_{p=1}^5 (\beta_l x_l x_m x_p) + \sum_{k=1}^5 \sum_{j=1}^5 (a_j x_j x_k) + \sum_{i=1}^5 (a_i x_i) + c_1}{\sum_{h=1}^5 \sum_{g=1}^5 \sum_{f=1}^5 (\beta_h x_h x_g x_f) + \sum_{d=1}^5 \sum_{s=1}^5 (a_s x_s x_d) + \sum_{r=1}^5 (a_r x_r)} + c_6$
Sinüs trigonometrik çoklu doğrusal olmayan	SinTN	$Y = \sum_{i=1}^5 (a_i \sin[x_i]) + c_7$
İkinci dereceden sinüs trigonometrik çoklu doğrusal	SOSinTN	$Y = \sum_{k=1}^5 \sum_{j=1}^5 (a_j \sin[x_j x_k]) + \sum_{i=1}^5 (a_i \sin[x_i]) + c_8$

İkinci dereceden trigonometrik çoklu doğrusal olmayan	SOTN	$Y = \sum_{i=1}^5(a_i \sin[x_i] + a_i \cos[x_i]) + \sum_{j=1}^5(\beta_j \sin^2[x_j] + \mu_j \cos^2[x_j]) + c_9$
Birinci dereceden trigonometrik çoklu doğrusal olmayan	FOTN	$Y = \sum_{i=1}^5(a_i \sin[x_i] + a_i \cos[x_i]) + c_{10}$
Birinci dereceden logaritmik çoklu doğrusal olmayan	FOLN	$Y = \sum_{i=1}^5(a_i \log[x_i]) + c_{11}$
Birinci dereceden logaritmik çoklu doğrusal olmayan rasyonel	FOLNR	$Y = \frac{\sum_{i=1}^5(a_i \log[x_i]) + c_1}{\sum_{j=1}^5(\beta_j \log[x_j])} + c_{12}$
İkinci dereceden logaritmik çoklu doğrusal olmayan	SOLN	$Y = \sum_{k=1}^5 \sum_{j=1}^5(a_j \log[x_j x_k]) + \sum_{i=1}^5(a_i \log[x_i]) + c_{13}$
Üçüncü dereceden logaritmik çoklu doğrusal olmayan	TOLN	$Y = \sum_{l=1}^5 \sum_{m=1}^5 \sum_{p=1}^5(\beta_l \log[x_l x_m x_p]) + \sum_{k=1}^5 \sum_{j=1}^5(a_j \log[x_j x_k]) + \sum_{i=1}^5(a_i \log[x_i]) + c_{14}$

Öte yandan oluşturulan aday modellerin gerçekçi olup olmadığını ortaya koyabilmek için aday modellerin sınırları (max ve min) da test edilmiştir. Tüm bu çalışmalara ek olarak, oluşturulan ANOVA tabloları ve matematiksel modeller birbirleri ile kıyaslanarak veri seçmenin uygulanabilir olup olmadığı tartışılmıştır. Ayrıca modelleme sürecinde sadece R^2 değerlerinin yorumlanmasıyla kalınmayıp aday modellerin uyumluluk açısından incelenmesi ile gerçekçi bir işlevsel yapının elde edilmesini sağlanmıştır. Bu amaç için belirlenen kriterlere uyan alternatif aday modellerinin iki veri setinin kullanılması doğrultusunda uyumluluk grafikleri oluşturulmuştur ve kararlılığı kontrol edilerek fiziksel sınırlar dâhilinde değer üreten fonksiyon amaç fonksiyonu olarak seçilmiştir. Seçilen en iyi aday model her iki veri seti için modellerin sınırlandırıldığını gösteren 3 boyutlu görsellerle de desteklenmiştir.

Bu şekilde MCLIA yapı bileşenlerinin ve reaksiyon ortam koşullarının optimum değerleri belirlenmiştir. Ayrıca geliştirilen diğer MCLIA yapıları için seyreltme faktörlerinin neden olduğu hataları ortadan kaldırmak ve aynı zamanda laboratuvarı uygun çalışma koşulları doğrultusunda sistemi kısıtlayarak yüksek sinyal üretebilme amacıyla farklı optimizasyon çalışmaları da gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda farklı senaryolar üretilmiş ve bu senaryo koşulları ile deneysel çalışmalar gerçekleştirilerek sistemin modelleme ve optimizasyon çalışmalarının gerçekçiliği ortaya konmuştur.

3.4. Karakterizasyon Çalışmaları

Elde edilen DNA-inorganik hibrit temelli nanomalzemelerin özelliklerini, yapılarını, biçimlerini ve bileşenlerinin birbirleri ile olan etkileşimlerini incelemek için bunlar çeşitli yöntemlerle karakterize edilmiştir.

1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM): DIN yapısının elde edilme aşamalarındaki numune bileşenlerinin morfolojisini incelemek için kullanılmıştır.
2. Enerji Dağılımlı x ışını Spektroskopisi (EDX): DIN yapısının elde edilme aşamalarındaki numune bileşenlerinin kimyasal kompozisyonlarını belirlemek için kullanılmıştır.
3. Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR): MCLIA yapısındaki bileşenlerin birbirleri ile olan etkileşimlerini tespit etmek için kullanılmıştır.

4. Örnek Titreşimli Manyetometre (VSM): Elde edilen toz yapıların manyetik özelliklerini karakterize etmek için kullanılmıştır.
5. Agaroz Jel Elektroforez: DIN yapısının oluşup oluşmadığını belirlemek amacı ile bu yapılardan elde edilen sıvı faz, tiyol modifiyeli prob DNA ile karşılaştırılmalı olarak agaroz jelde yürütülmüştür.

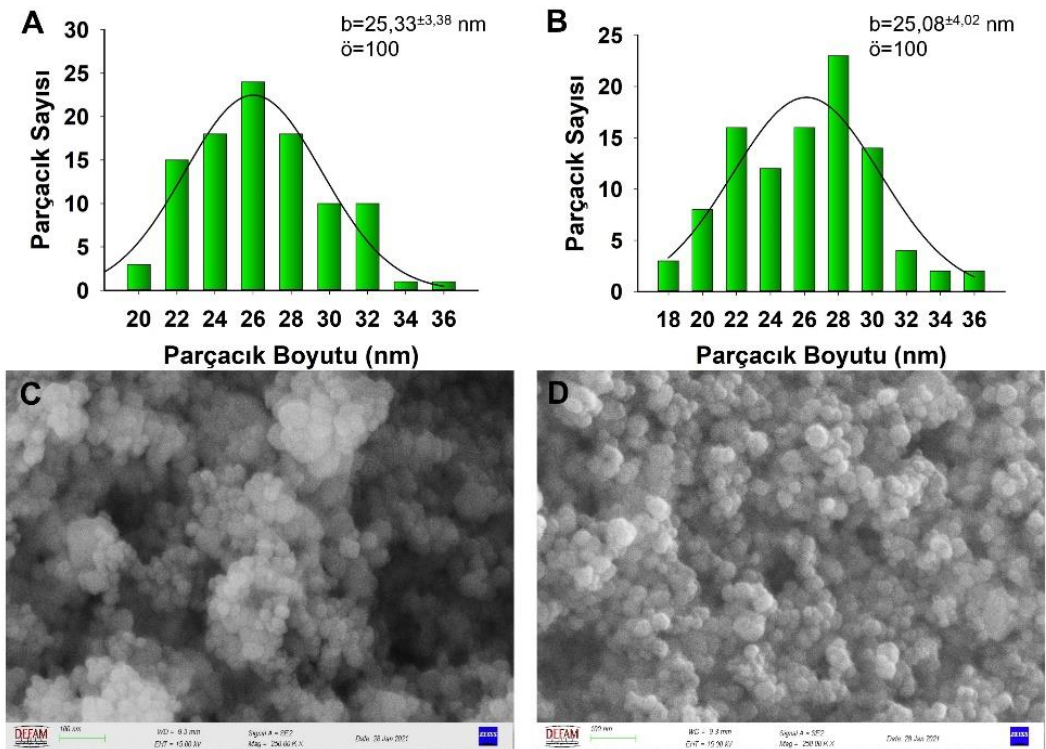


4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1.Karakterizasyon çalışmaları

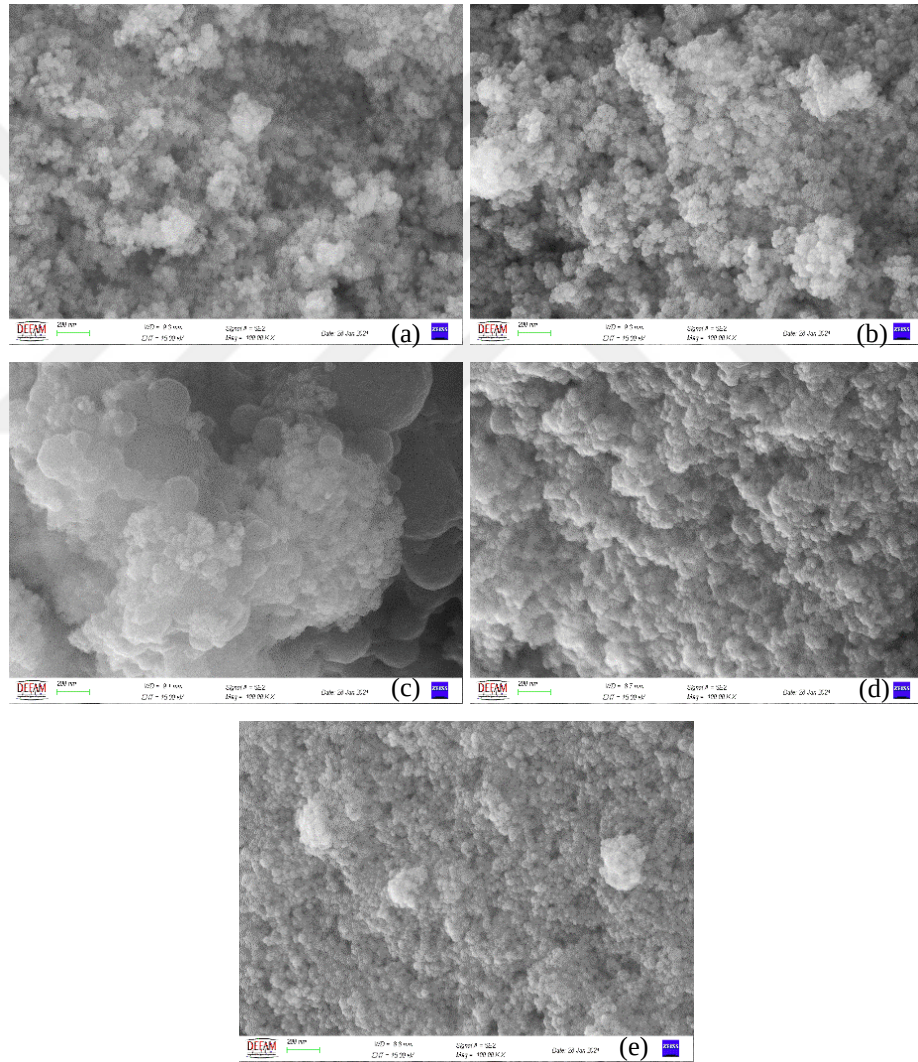
4.1.1. SEM ve EDX analizi

Manyetit nanotaneceği, MA, MCLIA*, MCLIA* yapısının Ag^+ ile muamele edilmiş hali ve DIN yapısının morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir. Ayrıca Şekil 4.1’ deki SEM görüntüleri üzerinde rastgele seçilen en az 200 farklı nanoparçacığın boyutu ImageJ programı kullanılarak ölçülmüş ve ölçümlerin ortalaması alınarak nanoparçacıkların boyutları belirlenmiştir. Fotoğraflar üzerinde ImageJ programı ile yapılan ölçümlere bağlı olarak Manyetit nanotaneceği ve MA yapılarının ortalama boyutları sırasıyla $25,33 \pm 3,38$ nm ve $25,08 \pm 4,02$ nm olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre manyetit nanotaneceklerinin amin grubu ile modifiye edilmesi sonrasındaki tanecek boyutlarında kayda değer bir değişim gözlenmediği ortaya konmuştur.



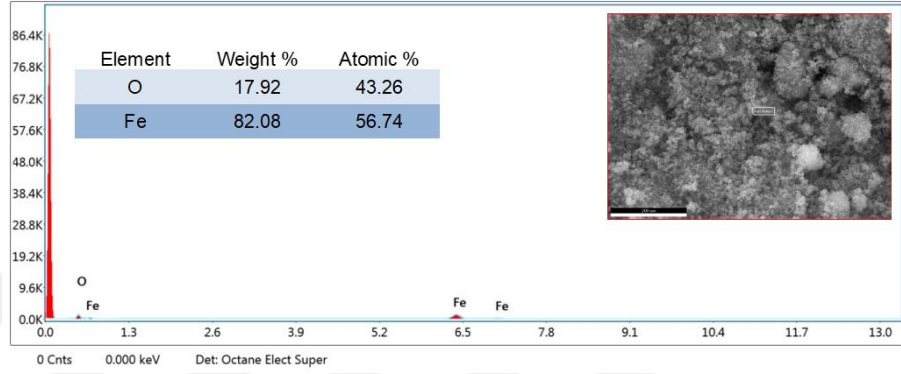
Şekil 4.1. A) Manyetit nanotaneceği ve B) MA yapısına ait tane boyut analizi C) Manyetit nanotaneceği ve D) MA yapısına ait SEM görüntüleri

Nanotanecikler amin ile modifiye edildikten sonra bu yüzeylere invertaz enzimlerinin çapraz bağlanması ile oluşturulan agregatların (MCLIA*) morfolojileri Şekil 4.2 c’de görüldüğü gibi tamamen değişmiş, nanotanecik boyutları büyük topaklar haline gelmiştir. MCLIA* yapısının Ag^+ iyonları ile muamele edilmesinden sonra ise bu topakçıklar küçülerek daha homojen bir görünüm sergilemişlerdir (Şekil 4.2 d). MCLIA* yapısına tiyol aktif prob DNA’ların bağlanması ile geliştirilen sinyal platformunda (DIN) Şekil 4.2 c’den tamamen farklı olarak yüzeyleri kaplanmış nanotanecikli yapılar ortaya çıkmıştır (Şekil 4.2 e).

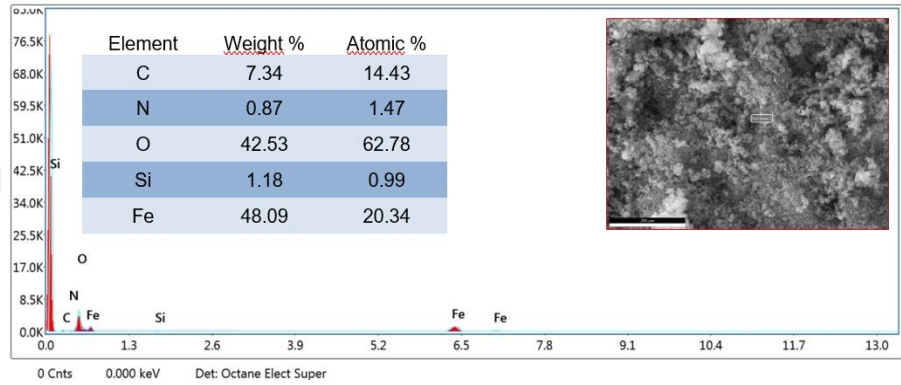


Şekil 4.2. (a) Manyetit nanotaneciği, (b) MA, (c) MCLIA*, (d) MCLIA* yapısının Ag^+ ile muamele edilmiş hali ve (e) DIN yapısına ait SEM görüntüleri

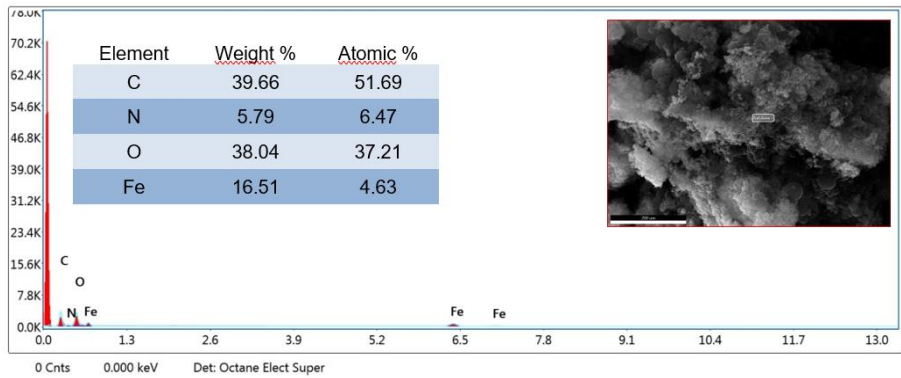
Elde edilen bu yapıların SEM görüntüleri dışında kimyasal kompozisyonları hakkında bilgi edinmek için ayrıca Şekil 4.3'te gösterildiği gibi EDX analizi de yapılmıştır. Fe ve O elementlerinden oluşan manyetit nanotaneciğinin (Şekil 4.3 a) amin grubu ile modifiye edilmesinde sonra MA yapısında C, N ve Si elementlerinin de bulunması (Şekil 4.3 b) bu yapının APTES ile modifiye edilebildiğinin bir göstergesidir.



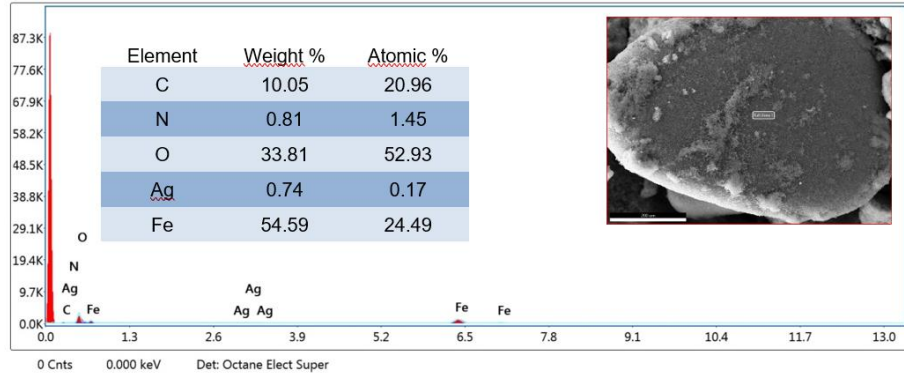
(a)



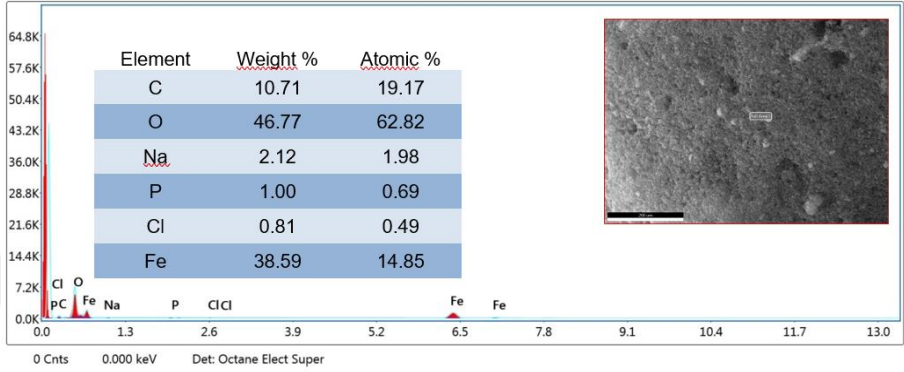
(b)



(c)



(d)



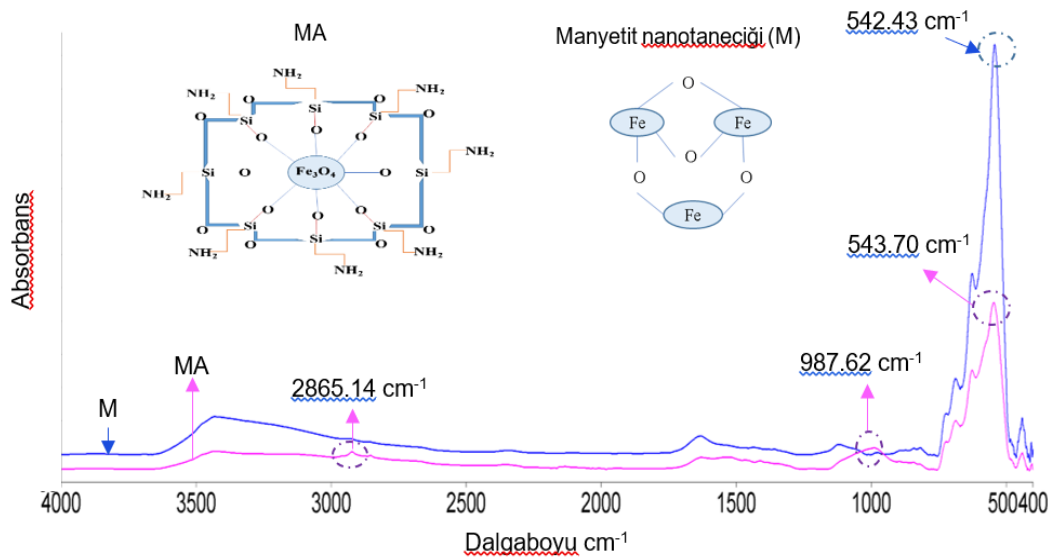
(e)

Şekil 4.3. (a) Manyetit nanotaneceği, (b) MA, (c) MCLIA*, (d) MCLIA* yapısının Ag^+ ile muamele edilmiş hali ve (e) DIN yapısına ait EDX analiz sonuçları

MA yapısına invertaz enziminin bağlanması ile elde edilen MCLIA* yapısındaki C ve N element oranlarının artması yapısında C ve N bulunduran enzimin bu yapıya bağlandığını ifade etmektedir. Enzim inhibisyonunu sağlayan Ag^+ 'un MCLIA* yapısı ile olan etkileşimi incelendiğinde iz miktarda Ag elementine rastlanarak C ve N element oranlarının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum yapıda bulunan enzimin Ag^+ tarafından etkilendiğini göstermektedir. Sinyal platformunun (DIN) EDX analizine bakıldığında yapıda Na, Cl, ve P elementlerine rastlanmıştır. Na ve Cl elementlerinin prob DNA'ların çözündürüldüğü Tampon A içerisinde bulunan 0.1 M NaCl'den dolayı yapıda bulunduğu, P element varlığının ise DNA'nın yapısında bulunan fosfodiester bağlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum tiyol aktif prob DNA'ların MCLIA* yapısına tutunduğunu da ortaya koymaktadır.

4.1.2. FTIR analizi

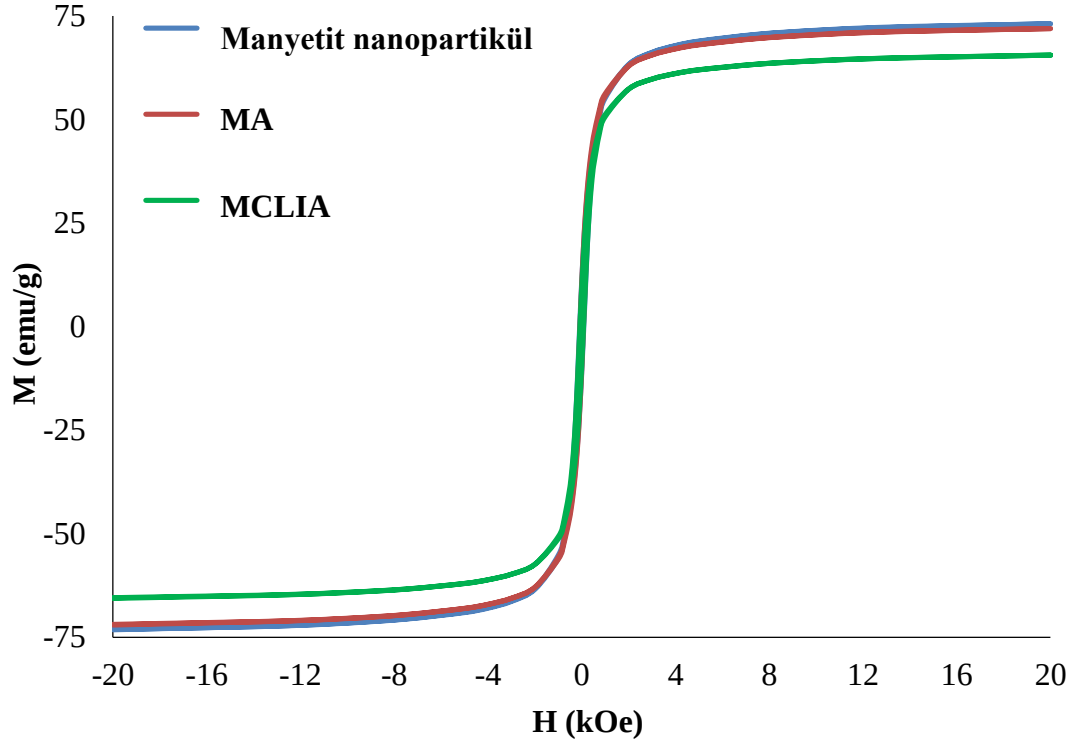
MCLIA* yapısındaki bileşenlerin (manyetit nanotaneciği ve amin grubu) birbirleri ile olan etkileşimlerini tespit etmek için Şekil 4.4'te gösterildiği gibi manyetit nanotaneciği ve MA yapısının FTIR spektrumu alınmıştır. 360 ve 700 cm^{-1} arasındaki dalga boyundaki karakteristik pikler, Fe-O fonksiyonel gruplarının titreşimini göstermektedir [110]. Literatür verileriyle paralel olan 542 cm^{-1} 'deki güçlü absorpsiyon bandı, manyetit nanopartiküldeki Fe-O gruplarının varlığını temsil etmektedir [111–114]. Silanlama sonrası bu pik şiddetinin azaldığı görülmektedir. APTES silanlama ajanının manyetit partikül yüzeylerine adsorpsiyonu Si – O – Si gruplarına atanan 988 cm^{-1} 'deki band ile de doğrulanmıştır [115,116]. Ayrıca, 2865 cm^{-1} 'de küçük bir tepe noktası, 2922 cm^{-1} ile 2850 cm^{-1} arasındaki dalga boyunda gözlenen aminopropil grubundaki CH_2 bağlarının gerilme titreşimlerine atfedilmiştir [117,118].



Şekil 4.4. Manyetit nanotaneciği ve MA yapısına ait FTIR spektrumu

4.1.3 VSM Analizi

Manyetit nanopartiküller, MA ve MCLIA için oda sıcaklığında manyetik alana karşı mıknatıslanma grafiği Şekil 4,5'te gösterilmiştir.



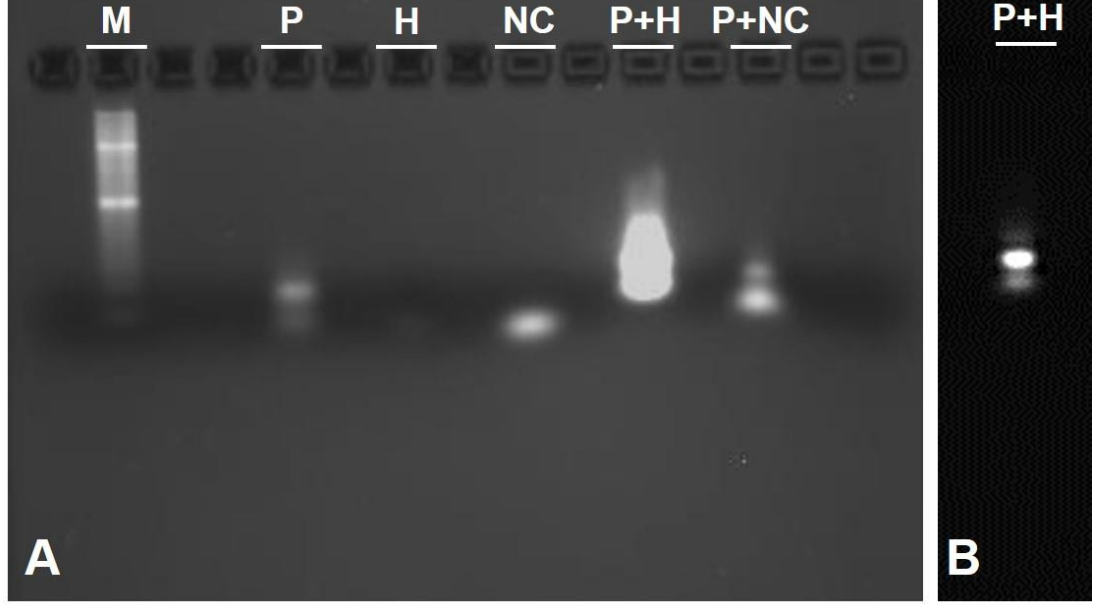
Şekil 4.5. Manyetit nanoparçacıkların, MA ve MCLIA'nın oda sıcaklığında manyetizasyon eğrileri

Süperparamanyetizma, manyetik taşıyıcılar için gerekli olan önemli bir özelliktir [119]. İdeal olarak, süperparamanyetik bir malzemede yeniden mıknatıslanmanın (M_r) ve artık mıknatıslanmanın (H_c) sıfır olması beklenir. Manyetit nanoparçacık için M_r ve H_c değerleri, yeterince iyi süperparamanyetik davranışa sahip saf manyetitinkine benzer şekilde sırasıyla 10,97 emu/g ve 87,14 Oe olarak bulundu. Modifikasyon (MA) ve enzim immobilizasyonu (MCLIA) sonrasında M_r (sırasıyla 10,22 ve 9,34 emu/g) ve H_c (sırasıyla 71,37 ve 76,41 Oe) değerlerinde önemli bir değişiklik gözlenmedi. Bu, manyetit nanopartiküllerin süperparamanyetik davranışlarını koruduğunu ortaya koymaktadır. Öte yandan, manyetit nanoparçacık, MA ve MCLIA'nın doygunluk manyetizasyonu (M_s) sırasıyla 72,50, 71,36 ve 64,96

emu/g olarak bulundu. Ms değerleri yığın manyetit değerinden (92emu/g) daha düşük olduğu için bu durum bu yapıların süperparamanyetik davranışının bir başka göstergesidir [120]. MCLIA'daki Ms değerindeki hafif bir düşüş, muhtemelen manyetit nanoparçacığının enzim agregatları ile konformasyonundan kaynaklanmaktadır. Ms değerleri karşılaştırıldığında özellikle MA (yaklaşık %98) ve MCLIA'da (yaklaşık %90) manyetit nanoparçacık içeriği çok yüksektir.

4.1.4 Agaroz Jel Elektrofrez

Seçilmiş DNA sekanslarını doğrulamak amacıyla alikot edilen DNA stok çözeltilerinden (prob, eşlenik olmayan ve 1 saat hibridizasyonları sağlanan prob-hedef, prob-eşlenik olmayan DNA çözeltilerinden) 3 farklı DNA çeşidinin herbiri ayrı ayrı 1 µg içerecek şekilde örnekler hazırlanmış ve agaroz jel elektrofrez tekniği ile gözlenen ışıma yoğunluğuna göre DNA'ların davranışları hakkında bilgiler elde edilmiştir. Diğer bir işlem ise DNA problemlerinin MCLIA* yapısına bağlanıp bağlanmadığını doğrulamak için gerçekleştirilmiştir. Bu amaçlar için Agaroz jel (%2, 5 kütle/hacim) 1X Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu içerisinde hazırlanmış ve mikrodalga fırında tutularak çözölen jel solüsyonuna etidyum bromid (0, 5 µg/ml) boyası eklenerek elektrofrez kabına dökölmüştür. İlk olarak DNA'ların doğru seçilip temin sürecinin doğrulanması için jel katılaştıktan sonra üzerinde bulunan gözeneklere yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler (1 µg prob, 1 µg eşlenik olmayan tek zincirli DNA'lar ve 1 µg prob DNA ayrı ayrı olacak şekilde hem 1 µg hedef DNA hemde eşlenik olmayan DNA'nın hibritleşmiş hali) yüklenmiş ve 1X TBE tamponu içerisinde 80 volt akımda 32 dakika elektrofrez işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra UV altında jelin görüntüsü çekilmiş ve Şekil 4.6'da ışıma yoğunluğuna göre jele yüklenen DNA'lar için hakkında yorumlar geliştirilmiştir.

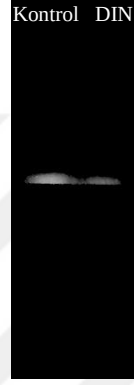


Şekil 4.6. Agaroz jel elektroforezi. M: marker; P: prob; H: hedef; NC: eşlenik olmayan iplik; P+H: prob ve hedef inkübasyonu; P+NC: probe ve eşlenik olmayan ipliklerin inkübasyonu.

Agaroz jel elektroforezi sonuçlarına göre prob ile hibrit DNA'lar arasında hibridizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği açıkça görülmektedir. Prob, hibrit ve eşlenik olmayan tek iplikli DNA parçaları jel üzerinde daha düşük moleküler kütlede bantlar oluştururken, hibritleşen çift iplikli DNA daha yüksek moleküler kütlede bant sergilemiştir. Şekil 4.6 A'da yüksek UV uygulama süresinden dolayı aşırı parlak ve sürüntü şeklinde gözlenen hibrit DNA (P+H), UV'ye daha az süre ile maruz bırakıldığında çok net olarak görüntülenmiştir (Şekil 4.6 B). Diğer yandan, probun eşlenik olmayan tek iplikli DNA (P+NC) ile hibritleşmediği de jelde görülmektedir (Şekil 4.6 A). Prob DNA yüklenen kuyuda iki farklı bantın gözlenmesi, 1 saat gibi uzun sayılabilecek inkübasyon süresi sırasında prob DNA'lar arası spesifik olmayan etkileşimlerden kaynaklanmış olabileceği yorumu yapılmaktadır. Ancak Prob ve hedef DNA'lar inkübe edildiğinde termodinamik olarak prob DNA'ların daha elverişli olan hedef DNA ile spesifik eşleşme yapmayı tercih ettiği görülmektedir (Şekil 4.6 B).

DNA problemlerinin MCLIA* yapısına bağlanıp bağlanmadığını doğrulamak için ise yine aynı koşullarda jel hazırlanıp dökülmüştür. Jel katılaştıktan sonra üzerinde bulunan gözeneklere yükleme tamponu ile karıştırılan örnekler (kontrol grubu olarak

20 µl 200 ng prob DNA ve 900 ng prob DNA tutturulmuş 20 µl MCLIA* süpernatantı) yüklenmiş ve 1X TBE tamponu içerisinde 100 volt akımda 45 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra UV altında jelin görüntüsü çekilmiş ve ışınma yoğunluğuna göre jele yüklenen DNA konsantrasyonları hakkında yorum yapılmıştır. Şekil 4.7’de görüldüğü gibi Agaroze jel elektroforezinde süpernatant örneğinin gözlendiği bandın yoğunluğu kontrol grubuna (200 ng prob DNA) kıyasla belirgin şekilde çok daha azdır. Bu sonuca göre tiyol aktif DNA problemlerinin çoğunun MCLIA* yapısına bağlandığı ve sinyal platformunun elde edildiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.7. Kontrol grubu ve DIN yapısına tutunmayan Prob DNA’ların agaroz jel görüntüleri

4.2. Deneysel Çalışmalar

4.2.1 MCLIA Yapısının Analitik Performansının Glikoz Metrede Test Edilmesi

MCLIA için belirlenen 2 adet yapısal ve 3 adet deneysel olmak üzere toplamda 5 adet parametre dikkate alınarak Design Expert programının verdiği 51 adet deneysel tasarım (run) en az 3 tekrar olacak şekilde çalışılmıştır (Tablo 4.1). Her bir run için her seferinde MCLIA yapıları yeniden hazırlanmış ve bu runların en az 3 kez tekrar çalışması ile glikoz metre cihazından elde edilen ortalamalar, Tablo 4.1'deki satırlarda verilen sinyal değerleri olarak kaydedilmiştir. Tüm runlar için birbirine en yakın 3 tekrardan elde edilen sinyal değerlerine ait standart sapmaların %1,3 ile %11,7 arasında olması MCLIA yapılarının tekrar üretilebilir olduğunun açık bir göstergesidir. Tablo 4.1'ya bakıldığında 64 ile 1565 mg/dl aralıklarında birbirinden farklı birçok değerin elde edildiği görülmektedir. Düşük sinyal değerleri yüksek pH (8) ve düşük sıcaklıklarda (20 °C) elde edilirken (örneğin run 4, 12, 19, 25 ve 33), yüksek sinyal değerleri düşük pH (5) ve yüksek sıcaklıklarda (50 °C) elde edilmiştir (örneğin run 1, 8, 10, 22, 44 ve 48) [121,122]. pH değerinin 8 olması diğer parametre değerlerinin maksimum olması durumunda dahi enzimin aktivitesini düşürmektedir (örneğin run 11, 17, 45 ve 50). Diğer bir parametre olan reaksiyon süresi arttığında enzim aktivitesinde bariz artışlar gözlemlenmiştir. Örneğin run 2 ile run 6 kıyaslandığında glutaraldehit miktarı, run 7 ile run 35 ve run 2 ile run 3 kıyaslandığında enzim/MA miktarı, run 49 ile run 51 kıyaslandığında ise her ikisi azaldığı halde reaksiyon süresi arttığından sinyal değerlerinde yükselme meydana gelmiştir. Ayrıca run 30 ile 31 kıyaslandığında enzim/MA miktarı azaldığı ve glutaraldehit miktarında hafif bir artış olduğu ve run 43 ile run 24 kıyaslandığında enzim/MA miktarında hafif bir artış olduğu halde inkubasyon süresi arttığından glikoz metreden elde edilen sinyal değerlerinde kayda değer artışlar gözlemlenmiştir. Diğer yandan pH değerinin 5 ve sıcaklığın 50 °C olması durumunda 15 dk'lık bir reaksiyon süresi bile yüksek sinyal değerlerinin elde edilmesi için yeterli olmaktadır (örneğin run 44 ve 48). Genele bakıldığında enzim/MA ve glutaraldehit miktarının diğer parametrelere göre enzim aktivitesi üzerinde daha az etkili olduğu anlaşılmaktadır (örneğin run 10, 13 ve 44).

Tablo 4.1. MCLIA için belirlenen yapısal ve deneysel parametre değerlerine karşılık glikoz metreden elde edilen sinyaller (mg/dl)

Run	Enzim/MA	Glutaraldehit	pH	Sıcaklık	İnkubasyon	Sinyal ^a	Sinyal ^b
1	0,6	5	5	50	30	1473 ^{±41}	1473 ^{±41}
2	0,6	5	5	35	15	715 ^{±120}	717 ^{±63}
3	0,2	5	5	35	45	1260 ^{±153}	1185 ^{±39}
4	0,2	1	8	20	45	236 ^{±90}	215 ^{±4}
5	0,6	1	6,5	50	15	874 ^{±163}	793 ^{±51}
6	0,6	1	5	35	45	1357 ^{±28}	1357 ^{±28}
7	0,6	3	8	50	15	328 ^{±56}	300 ^{±17}
8	0,6	3	5	50	45	1565 ^{±48}	1565 ^{±48}
9	1	1	5	35	15	855 ^{±111}	805 ^{±60}
10	0,2	1	5	50	45	1308 ^{±298}	1447 ^{±131}
11	0,6	1	8	50	45	501 ^{±44}	501 ^{±44}
12	0,2	3	8	20	30	179 ^{±53}	204 ^{±23}
13	0,2	3	5	35	30	1274 ^{±173}	1345 ^{±121}
14	0,6	1	5	20	15	234 ^{±97}	185 ^{±10}
15	1	3	6,5	50	15	938 ^{±171}	860 ^{±90}
16	1	5	5	35	30	1053 ^{±126}	1007 ^{±107}
17	1	5	8	50	30	634 ^{±150}	533 ^{±11}
18	0,6	1	6,5	20	30	529 ^{±111}	476 ^{±38}
19	1	1	8	20	15	127 ^{±27}	134 ^{±11}
20	0,6	3	6,5	35	15	704 ^{±109}	650 ^{±25}
21	0,6	3	5	20	30	550 ^{±75}	642 ^{±55}
22	1	3	5	50	30	1543 ^{±42}	1543 ^{±42}
23	0,2	3	6,5	20	45	536 ^{±78}	482 ^{±34}
24	1	5	6,5	20	45	974 ^{±212}	1113 ^{±130}
25	0,6	3	8	20	45	431 ^{±144}	380 ^{±41}
26	1	3	8	35	30	806 ^{±188}	688 ^{±51}
27	1	1	5	20	30	423 ^{±45}	423 ^{±45}
28	0,2	1	8	35	15	165 ^{±14}	165 ^{±14}
29	0,2	1	6,5	20	15	124 ^{±1}	124 ^{±1}
30	0,6	5	5	20	45	891 ^{±160}	985 ^{±78}
31	1	3	5	20	15	226 ^{±31}	242 ^{±7}
32	0,2	1	8	50	30	353 ^{±75}	315 ^{±5}
33	0,2	5	8	20	15	92 ^{±50}	64 ^{±5}
34	1	3	6,5	20	30	527 ^{±109}	455 ^{±36}
35	0,2	3	8	50	45	591 ^{±118}	590 ^{±43}
36	1	1	6,5	50	30	1344 ^{±221}	1447 ^{±100}
37	0,6	5	6,5	35	45	1498 ^{±106}	1498 ^{±106}
38	0,2	5	6,5	50	45	1343 ^{±127}	1343 ^{±127}
39	0,2	5	6,5	35	30	966 ^{±254}	902 ^{±101}
40	0,6	3	6,5	50	30	1200 ^{±88}	1200 ^{±88}
41	0,2	5	5	20	30	330 ^{±55}	292 ^{±24}
42	1	3	5	35	45	1371 ^{±209}	1510 ^{±82}
43	0,6	5	6,5	20	15	178 ^{±68}	119 ^{±11}
44	0,2	3	5	50	15	1211 ^{±212}	1348 ^{±127}
45	1	5	8	35	45	764 ^{±207}	660 ^{±8}
46	0,6	1	8	35	30	522 ^{±109}	450 ^{±37}
47	1	1	6,5	20	45	772 ^{±153}	897 ^{±62}
48	1	5	5	50	15	1450 ^{±102}	1450 ^{±102}
49	1	5	6,5	35	15	738 ^{±200}	638 ^{±36}
50	1	3	8	50	45	676 ^{±190}	650 ^{±47}
51	0,2	1	6,5	35	45	956 ^{±198}	1120 ^{±104}

Her bir sıcaklık değeri için en yüksek sinyallerin elde edildiği runlar Tablo 4.2'ye aktarılarak bu runlar için hazırlanan MCLIA yapılarının 6 kullanım sonrası göreceli aktiviteleri birbirleri ile kıyaslanmış ve en optimum olanına karar verilmeye çalışılmıştır. Bu tabloya göre 20 °C de çalışılan runların (run 24 ve run 30) sinyal değerleri ve göreceli aktiviteleri diğerlerine nazaran düşük çıkmıştır. En yüksek sinyal değerleri run 8, run 22 ve run 42 için hazırlanan MCLIA yapılarından elde edilmiştir. Bu runların göreceli aktivitelerine bakıldığında run 22 ve run 42'nin 6 kullanımdan sonra aktivite kaybetmediği anlaşılmıştır. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde run 42 oda sıcaklığına yakın olması ve dolayısı ile çalışma kolaylığı sağlayacağından tercih edilmiştir. Buna göre en uygun parametre değerleri enzim/MA miktarı: 1 u/mg, glutaraldehit konsatrasyonu: %3, pH:5, sıcaklık: 35 °C ve inkubasyon zamanı 45 dk. olarak belirlenmiştir. Ağır metallerle yapılan enzim inhibisyon çalışmaları, run 42 ye ait yapısal parametre değerleri dikkate alınarak hazırlanan MCLIA'ların run 42'ye ait deneysel parametre değerlerindeki reaksiyon ortamında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.2. En yüksek sinyallerin elde edildiği runlar için hazırlanan MCLIA yapılarının 6 kullanım sonrası göreceli aktiviteleri (%)

Run	Enzim/MA (U/mg)	Glutaraldehit (%)	pH	Sıcaklık (°C)	İnkubasyon zamanı (dk.)	Sinyal değeri (mg/dl)	Göreceli aktivite (%)
1	0,6	5	5	50	30	1473 ^{±42}	97,7 ^{±2,6}
6	0,6	1	5	35	45	1357 ^{±29}	105 ^{±8,6}
8	0,6	3	5	50	45	1565 ^{±48}	89 ^{±3,6}
10	0,2	1	5	50	45	1447 ^{±131}	100 ^{±8,0}
13	0,2	3	5	35	30	1345 ^{±121}	84,8 ^{±6,8}
22	1	3	5	50	30	1543 ^{±43}	102 ^{±4,2}
24	1	5	6,5	20	45	1113 ^{±131}	76,9 ^{±5,5}
30	0,6	5	5	20	45	985 ^{±78}	84,8 ^{±6,4}
36	1	1	6,5	50	30	1447 ^{±101}	79,3 ^{±3,1}
37	0,6	5	6,5	35	45	1498 ^{±107}	83 ^{±4,1}
38	0,2	5	6,5	50	45	1343 ^{±127}	83,7 ^{±2,2}
42	1	3	5	35	45	1510 ^{±83}	104 ^{±3,1}
44	0,2	3	5	50	15	1348 ^{±128}	79,9 ^{±1,4}
48	1	5	5	50	15	1450 ^{±102}	79,8 ^{±3,9}

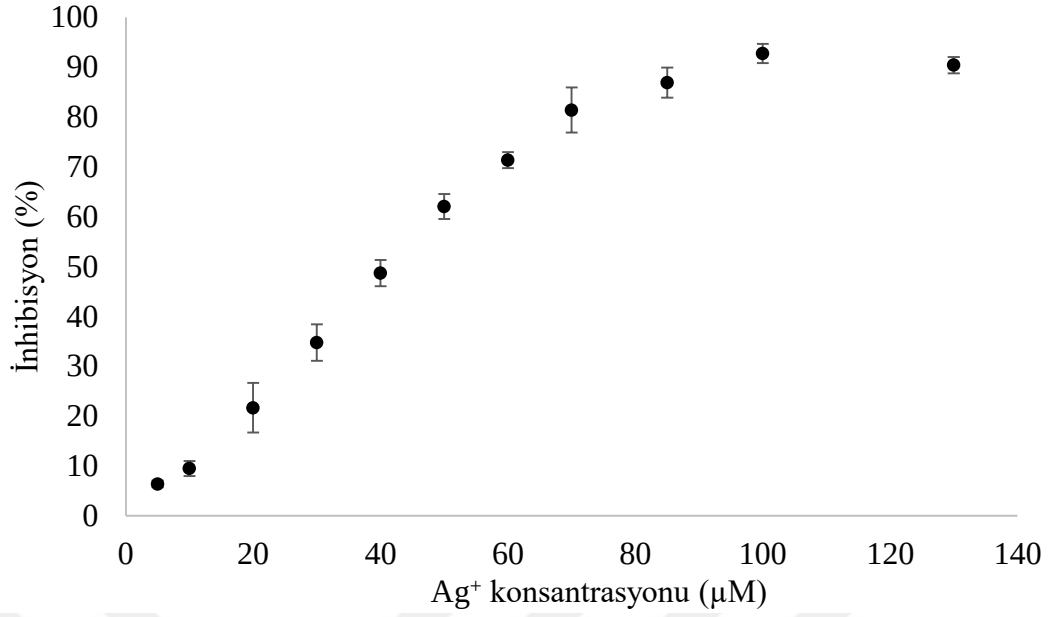
4.2.2 Ağır metallerin MCLIA Yapısını İnhibe Etme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Çalışmanın kapsamında geliştirilen sinyal platformunun hedef DNA'yı tespit etme prensibi enzim inhibisyonuna dayanmaktadır. Bu sebeple bazı ağır metallerin DIN yapısında bulunan invertaz enzimini inhibe etme potansiyelleri araştırılmış ve en yüksek inhibisyona sahip olan ağır metal tespit edilmiştir. 30 μM ağır metal içeren reaksiyon ortamı ile yapılan inhibisyon çalışmalarına göre MCLIA yapısındaki invertaz enzimini en çok inhibe eden ağır metalin Ag^+ (% 34,8 inhibisyon) olduğu anlaşılmıştır. Tablo 4.3'te gösterildiği gibi Ag^+ metalini sırası ile Mg^{2+} (%11,6 inhibisyon) ve Co^{2+} (%5,8 inhibisyon) takip etmekte ve diğerlerinde bu oran daha da azalmaktadır.

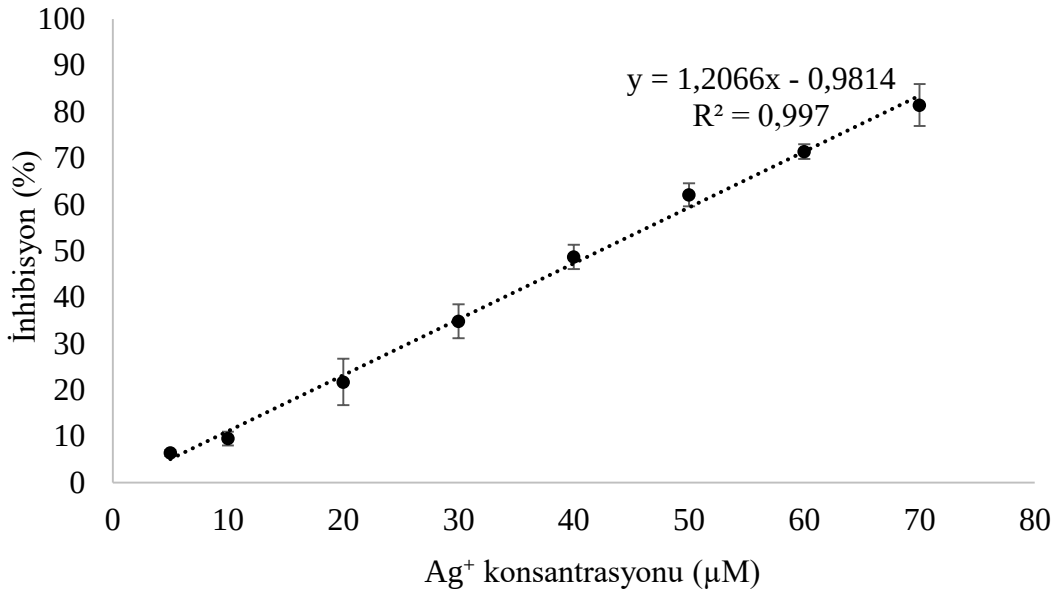
Tablo 4.3. Bazı ağır metallerin (30 μM) invertaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri

Ağır Metaller	Ag^+	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Co^{2+}	Mg^{2+}	Zn^{2+}
% İnhibisyon	34,8 $\pm 3,7$	2,3 $\pm 1,7$	4,2 $\pm 1,4$	5,8 $\pm 1,9$	11,6 ± 1	5,1 $\pm 0,8$

Bu sebeple gümüş iyonlarının MCLIA yapısındaki enzimi inhibe etme performansı farklı Ag^+ konsantrasyonları ile çalışılarak Şekil 4.8a'da gösterildiği gibi bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiş ve bu sayede enzimi en yüksek seviyede inhibe edecek Ag^+ miktarı belirlenmiştir. Ag^+ konsantrasyonundaki artış ile enzim inhibisyonu artmış ve 100 μM Ag^+ konsantrasyonunda inhibisyon oranı doyumluğa ulaşarak %92,8'e belirlenmiştir.. Ayrıca Şekil 4.8b'de görüldüğü gibi MCLIA yapısının gümüş iyonlarını en düşük seviyede tespit etme limiti: 4,6 μM , doğrusal aralığı: %99,7 R^2 oranı ile 5-70 μM ve hassasiyeti: 1,2 inhibisyon oranı/ μM olarak bulunmuştur. Şekil 4.8b'den IC_{50} değeri (MCLIA yapısındaki enzim aktivitesini %50 inhibe eden gümüş iyonu konsantrasyonu) 42,3 μM olarak hesaplanmıştır.



(a)



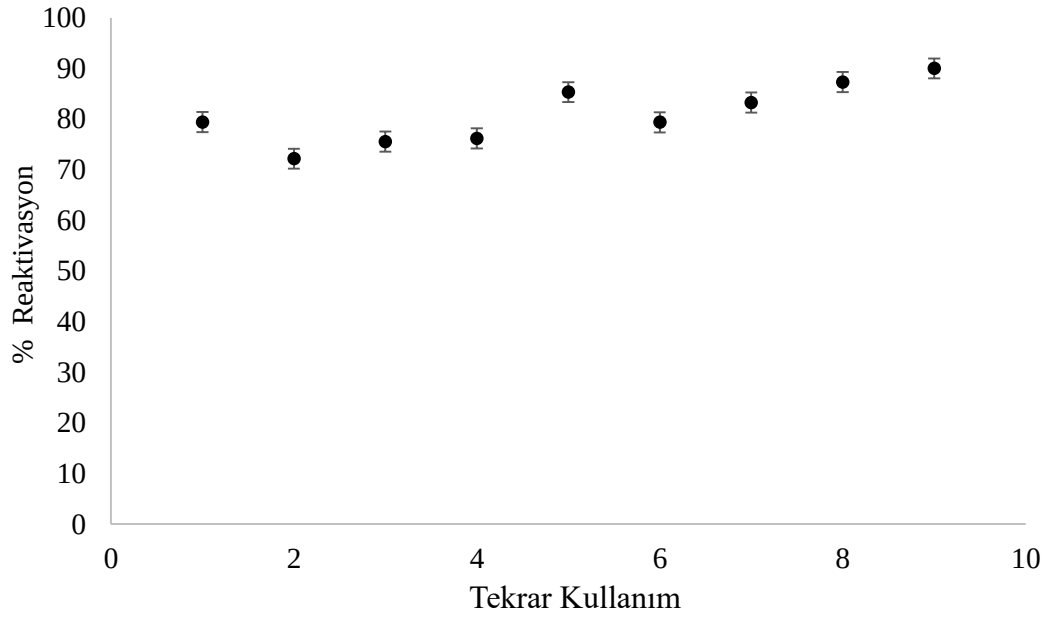
(b)

Şekil 4.8. (a) Ag⁺ konsantrasyonuna bağlı MCLIA yapısındaki enzim inhibisyon oranı, (b) MCLIA yapısının Ag⁺ tespit etme performansı

4.2.3. İnhibe olan MCLIA* Yapısının Reaktivasyonu

İnhibe olan yapının tekrar aktive edilebilmesi için inhibisyonundan sonra MCLIA* yapısı ayrı ayrı olacak şekilde 10 mM EDTA ve 10 mM β-merkaptan etanol ortamında metot kısmında bahsedilen reaktivasyon prosedürüne bağlı olarak inkübe edilmiş ve en uygun reaktivasyon ajanı belirlenmiştir. Yapılan çalışmanın sonucuna göre %98,4 oranında inhibe edilen enzim EDTA ile %45,9 oranında tekrar aktive

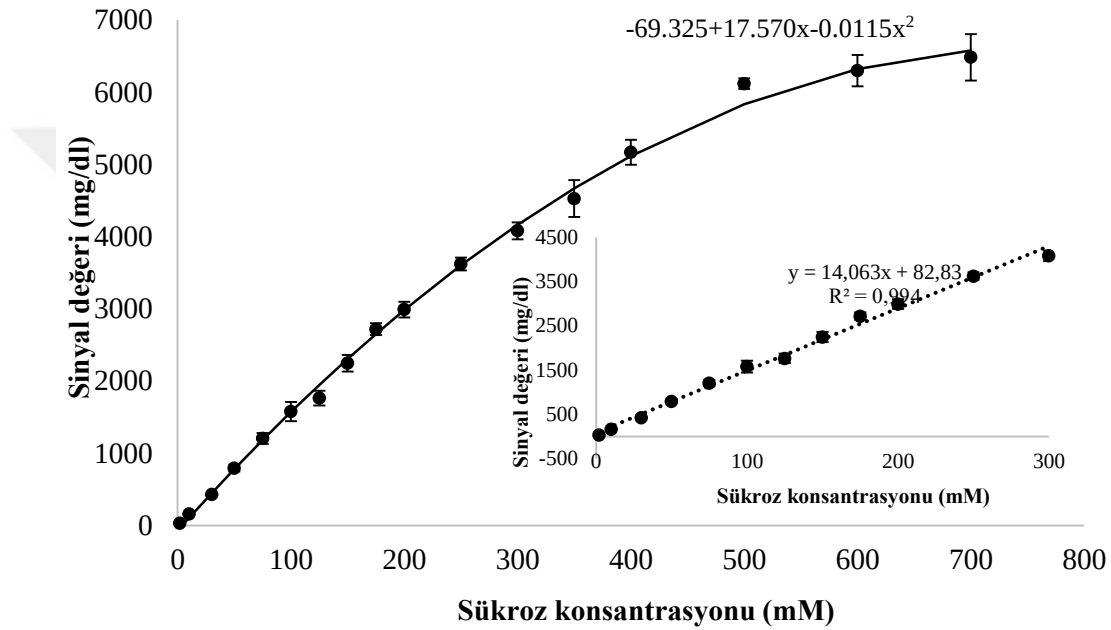
edilebilmişken, %100 oranında inhibe edilen enzim β -merkaptan etanol ile %79,4 oranında tekrar aktive edilmiştir. Bu sebeple MCLIA* yapısında bulunan enzimin inhibisyonundan sonra tekrar kullanılabilmesi için β -merkaptan etanol ile reaktif edilmesine karar verilmiştir. Yapının enzimin inhibisyonundan sonra kaç kez reaktif edilerek kullanılabilceğini araştırmak için metot kısmında bahsedilen deneyler yapılmıştır. Reaktivasyon oranı her kullanım için kendisinden bir önceki kullanımın sinyal değeri baz alınarak hesaplanmıştır. 9 kez inhibisyon ve ardından β -merkaptan etanol ile aktivasyon yapılarak elde edilen deneysel sonuçlar Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre MCLIA* yapısı Ag^+ ile inhibe edildikten sonra β -merkaptan etanol ile %72 - %90 arasında değişen oranlarda tekrar aktive edilerek kullanılabilir. Ayrıca 9. kez inhibisyon sonrasındaki reaktivasyon oranı %90 olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.9. MCLIA* yapısının Ag^+ ile inhibisyonu sonrası β -merkaptan etanol ile aktive edilmesi sonucu tekrar kullanılabilirliği

4.2.4. MCLIA* Yapısının Glikoz Metrede Sükrozu Algılama Performansı, Tekrar Kullanılabilirliği ve Depolama Kararlılığı

Elde edilen MCLIA* yapısının sükrozu algılama performansını test edebilmek için yapı farklı sükroz konsantrasyonlarında (2-700 mM) optimum deneysel parametreler doğrultusunda metot kısmında bahsedilen prosedüre göre reaksiyona tabi tutularak aşağıdaki grafik (Şekil 4.10) elde edilmiştir.

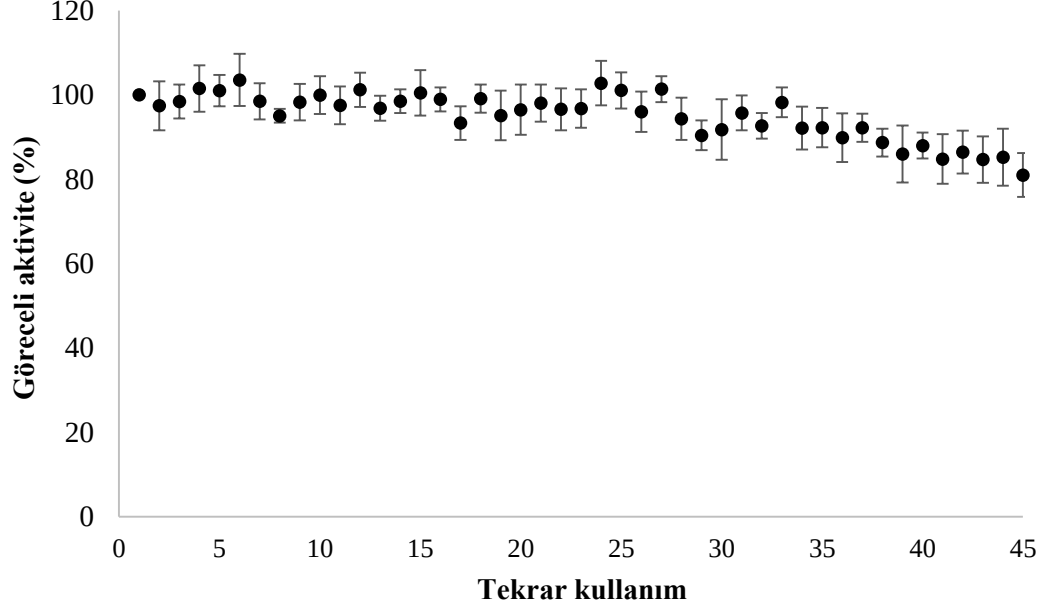


Şekil 4.10. MCLIA* yapısının glikoz metrede sükrozu algılama performansı

MCLIA* yapısının sükrozu en düşük seviyede tespit etme limiti: 0.85 mM, doğrusal aralığı: %99,4 R^2 değeri ile 2-300 mM ve hassasiyeti: 14,063 mg/dl mM^{-1} olarak bulunmuştur. Deneylerin genelinde kullanılan 100 mM'lık sükroz konsantrasyonunun doğrusal aralık içerisinde olduğu bu grafikten anlaşılmaktadır. Kinetik parametrelerin hesaplanması için elde edilen veriler, 2. dereceden doğrusal olmayan bir denkleme uydurulmuş (%97,6 korelasyon) ve buradan V_{max} ve K_m değerleri sırası ile 6625 mg/dl ve 226 mM olarak bulunmuştur.

Ayrıca MCLIA* yapısının tekrar kullanımını belirlemek için bu yapı 45 kez arka arkaya 100 mM'lık sükroz ile optimum deneysel parametre koşullarında reaksiyona tabi tutulmuştur. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi 27 kullanıma kadar yapıya bağlı olan invertaz enzim aktivitesinde ciddi bir azalma tespit edilmemiş 45. kullanın

sonrası enzim aktivitesi 81 ± 5.2 olarak kaydedilmiştir. Bunun yanı sıra bu yapının aynı deneysel koşullarda 2 ay süre ile 4 °C’ deki depolama kararlılığı incelenmiş ve 2 ay sonunda aktivitenin 84.5 ± 5.3 olarak kendini muhafaza ettiği ortaya konmuştur. Bu sonuçlar hem tekrar kullanım hem de depolama kararlılığı açısından yapının yüksek stabilite de elde edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.11. MCLIA* yapısının tekrar kullanımı (100 mM süktroz ortamında) sayısına bağlı olarak göreceli aktivitesinde meydana gelen değişim grafiği.

4.2.5.MCLIA Yapısı İçin Optimum Yapısal ve Deneysel Parametre Değerlerinin Belirlenmesi

Her ne kadar Tablo 4.1’den ve Tablo 4.2’den bazı çıkarımlar yapılsa da MCLIA yapısı, birden fazla faktörün sinerjik etkilerini incelemeyi içerdiği için bu çıkarımlarla yapılan yorumlar sistemi tanımlamada yanıltıcı olabilir bu sebeple hangi parametrenin ve parametreler arası etkileşimlerin daha etkili olduğunu anlamak için ANOVA tablosu yapılmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. ANOVA sonuçları

Kaynak	Sinyal ^a			Sinyal ^b		
	Ortalama kareler değeri	F değeri	P değeri	Ortalama kareler değeri	F değeri	P değeri
Model	4.768E+05	35.16	< 0.0001	5.221E+05	21.62	< 0.0001
x ₁	1.531E+05	11.29	0.0021	1.189E+05	4.93	0.0342
x ₂	77913.86	5.75	0.0230	25786.02	1.07	0.3097
x ₃	2.238E+06	165.06	< 0.0001	2.965E+06	122.81	< 0.0001
x ₄	3.041E+06	224.23	< 0.0001	3.089E+06	127.96	< 0.0001
x ₅	1.394E+06	102.80	< 0.0001	1.706E+06	70.64	< 0.0001
x ₁ x ₂	19185.78	1.41	0.2436	13239.34	0.5483	0.4648
x ₁ x ₃	27.49	0.0020	0.9644	311.12	0.0129	0.9104
x ₁ x ₄	117.28	0.0086	0.9265	6332.67	0.2623	0.6123
x ₁ x ₅	3356.96	0.2476	0.6224	43113.38	1.79	0.1915
x ₂ x ₃	8539.04	0.6297	0.4337	1154.39	0.0478	0.8284
x ₂ x ₄	2990.47	0.2205	0.6420	273.89	0.0113	0.9159
x ₂ x ₅	49169.43	3.63	0.0665	20569.51	0.8519	0.3634
x ₃ x ₄	6.654E+05	49.07	< 0.0001	7.048E+05	29.19	< 0.0001
x ₃ x ₅	18351.90	1.35	0.2539	32909.86	1.36	0.2522
x ₄ x ₅	38689.42	2.85	0.1016	47039.48	1.95	0.1730
x ₁ ²	9662.31	0.7125	0.4053	94.26	0.0039	0.9506
x ₂ ²	0.0215	1.587E-06	0.9990	873.36	0.0362	0.8504
x ₃ ²	2.583E+05	19.05	0.0001	2.879E+05	11.92	0.0017
x ₄ ²	2.347E+05	17.31	0.0002	1.506E+05	6.24	0.0182
x ₅ ²	33104.37	2.44	0.1287	10086.92	0.4178	0.5230

x₁: Enzim/M; x₂: glutraldehit; x₃: pH; x₄: sıcaklık; x₅: reaksiyon süresi

Tablo 4.4'te Sinyal^a ve Sinyal^b veri setlerinin kullanılmasıyla oluşturulan modellerin istatistiksel anlamlılık ve varyans analizi (ANOVA) sonuçları görülmektedir. Modellerin istatistiksel önemi F ve p değerlerinin incelenmesi sonucu anlaşılmıştır. Kul'un da belirttiği gibi, faktörlerin p değeri 0,05'ten küçükse, faktörlerin istatistiksel olarak %95'i anlamlıdır. Ancak p değeri 0,0001 olan ve yüksek dereceden %99,99 istatistiksel anlamlılığa sahip faktörler tercih edilir [123]. Sonuç olarak Model Sinyal^a 'nın F değeri 35.16 bulunurken p değeri <0.0001 olarak bulunmuş ve modelin anlamlı olduğu doğrulanmıştır. Faktörlerin F ve p değerleri incelendiğinde pH, sıcaklık ve reaksiyon süresinin yüksek derecede anlamlı olduğu görülmüştür. Bu üç faktör incelendiğinde F değeri 224.23 olduğundan en önemli parametrenin sıcaklık

olduğu belirlenmiştir. Faktörlerin ikili durumunun etkisi, p değeri <0,0001 ve F değeri 49,07 olduğundan pH-sıcaklık kombinasyonunun tek anlamlı kombinasyon olduğunu göstermiştir. ANOVA analizinden elde edilen sonuçlar, tasarımda sıcaklık ve pH'ın önemini ortaya koymaktadır. Model Sinyal^b'nin ANOVA sonuçları incelendiğinde, <0,0001 olan p değeri ile modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu anlaşılmıştır. Model Sinyal^a 'da olduğu gibi, pH, sıcaklık ve reaksiyon süresi bu modelde benzer istatistiksel öneme sahiptir (<0,0001). Ayrıca faktörlerin F değerlerine bakıldığında yine en yüksek öneme sahip faktör olan F değeri sıcaklık (127,96) olarak bulunmuştur. Faktörlerin ikili kombinasyonları incelendiğinde ise yalnızca istatistiksel önemi olan tek faktör kombinasyonunun sıcaklık-pH (<0,0001) olduğu sonucuna varılmıştır. Tablo 4.5 incelendiğinde ise model Sinyal^a'nın standart sapmasının daha az olması aynı fonksiyonel yapıya sahip olan bu iki modelden model Sinyal^a'nın fit etme performansının daha iyi olduğunun açık bir kanıtıdır. Beklendiği gibi model Sinyal^a'nın R² değerinin yüksek çıkması da yine uyum yeteneğinin daha iyi olduğu sonucunu desteklemektedir. İyi bir veri ve model ilişkisi için ön şartlardan bir diğeri ise R² ve ayarlanmış R² farkının küçük olmasıdır. R² farklarının büyümesi önerilen modelin aynı fonksiyonel yapıda daha fazla veri ile beslenme ihtiyacını ortaya çıkartmaktadır. Ayarlanmış R² değerleri açısından bu iki model değerlendirildiğinde, model Sinyal^a'ya ait bu farkın model Sinyal^b'den daha küçük olması bu açıdan da, model Sinyal^a'nın tercih edilme sebeplerinden bir tanesi olarak da kabul görülmüştür.

Tablo 4.5. ANOVA için geliştirilen modellerin yeteneği

	Standart sapma	Ortalama	R ²	Ayarlanmış R ²
Sinyal^a	116,45	778,24	0,9591	0,9318
Sinyal^b	155,39	774,25	0,9351	0,8919

Öte yandan optimum parametre değerlerinin belirlenmesi için elde edilen Sinyal^a ve Sinyal^b değerleri kullanılarak matematiksel modelleme yapılmıştır. Klasik “one variable at a time” (biri hariç tüm değişken değerlerini sabit tutarak optimizasyon yapmak) metodu yerine bu çalışmada sistematik bir modelleme ve optimizasyon süreci işletilmiştir. Modelleme sürecinde, modelin ürettiği tahminleri test etmek için regresyon analizi ve Yapay Sinir Ağının (ANN) birleştirilmesi ile elde edilen hibrit bir

yaklaşım kullanılmıştır [89]. Yani sadece bir tane R^2 değeri ile değil 3 farklı R^2 değeri ile deneysel verileri temsil eden en doğru model tespit edilmiştir. Ayrıca modelin gerçekçi olup olmadığını ortaya koyabilmek için aday modellerin sınırlarının (max ve min) test edilmesi de önem arz etmektedir. Bu çalışmada glikoz metreden elde edilen sinyal değerleri maksimize edilmeye çalışıldığı için en yüksek $R^2_{\text{eğitim}}$, R^2_{test} ve $R^2_{\text{doğrulama}}$ değerlerine sahip maksimum değeri makul sınırlar içinde olan fonksiyon en ideal model fonksiyon olarak tercih edilecektir. Bu amaca yönelik olarak deneysel veriler doğrusal, doğrusal olmayan, ikinci dereceden, üçüncü dereceden, trigonometrik, logaritmik ve rasyonel formlarını içeren fonksiyonlar ile Tablo 4.6’da özetlendiği gibi modellenmiştir. Aday fonksiyonlarından elde edilen model denklemler Ek A.1’de verilmiştir. Bu tabloda tüm tekrarlardan elde edilen veri seti (Sinyal^a) için kullanılan modeller “1”, standart sapmanın minimum seviyede olmasını sağlayan veri seti (Sinyal^b) için kullanılan modeller “2” ile kodlanmıştır. Tablo 4.6 dikkate alınarak aday modellerin eğitim, test katsayıları ve sınırlılık açısından uygunlukları incelenmiş ve aşağıdaki çıkarımlar yapılmıştır:

i) Aday modellerin çoğunun $R^2_{\text{eğitim}}$ ‘i açısından uygun olduğu gözlemlenmiştir. Fakat kullanılan modelleme seçeneklerinde $R^2_{\text{eğitim}}$ için kabul görülen değerin ($\geq 0,95$) altında olması sebebiyle TONR₂, FOLNR₂, SinTN₂, SinTN₁, FOLN₂ modelleri tercih edilmemiştir.

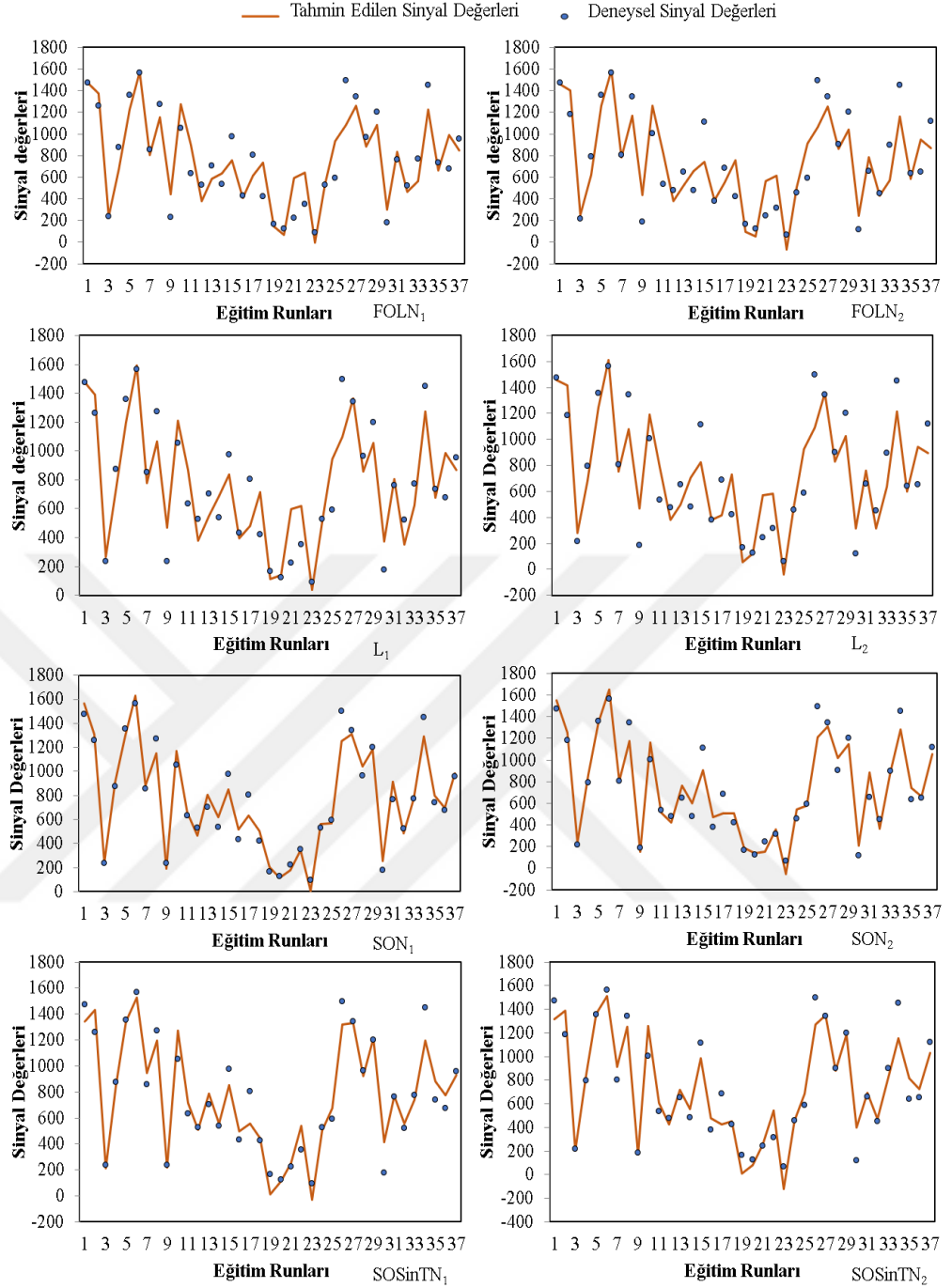
ii) R^2_{test} ‘i açısından bakıldığında ise katsayıları ($<0,70$) düşük olan LR₂, SONR₁, SONR₂, TON₁, TON₂, SOTN₁, SOTN₂, FOTN₁, FOTN₂, SOLN₂, TOLN₁, TOLN₂, TONR₁ modellerinin tutarsız olmaları ve tahmin yeteneklerinin eksik olması sebebi ile bu aday modellerin amaç fonksiyonu olarak nitelendirilmesi uygun değildir.

iii) Geriye kalan 10 aday model arasından amaç fonksiyonun belirlenmesine yönelik modellerin sürekli olarak anlamlı değerler üretebildiğini test edebilmek için $R^2_{\text{doğrulama}}$ değerleri incelenmiştir. Bu doğrultuda $R^2_{\text{doğrulama}}$ değerleri ($>0,80$) diğer yedi modelden yüksek olan 2 aday model (SON₁, SON₂) ön plana çıkmaktadır. Bu sonuca göre her bir veri seti için aynı aday model fonksiyon amaç fonksiyon olarak belirlenmiştir. Dolayısı ile veri seçmenin ya da tüm verileri kullanmanın sistem için sonuçları değiştirmede kanısına varılmıştır.

Tablo 4.6. MCLIA aktivitesi için Nöro-regresyon modellerinin deneysel verileri temsil edebilme performansı ve sınırlılık açısından sonuçları

Aday Modeller	R ² eğitim	R ² test	R ² doğrulama	Maksimum	Minimum
L ₁	0,95	0,,79	0,46	1716,52	-174,42
L ₂	0,95	0,74	0,59	1715,01	-221,49
LR ₁	0,96	0,77	0,33	1632,39	-99,78
LR ₂	0,97	0,30	0,01	1689,1	12,63
SON ₁	0,99	0,92	0,88	1677,71	-173,99
SON ₂	0,98	0,78	0,88	1688,23	-257,59
SONR ₁	0,98	-36,25	-12,36	5,85x10 ¹⁴	190,93
SONR ₂	0,99	-0,96	0,63	1,99x10 ¹⁴	70,08
TON ₁	1,00	0,26	0,34	1940,76	-373,00
TON ₂	1,00	-0,07	0,64	1985,79	-584,88
SinTN ₁	0,91	0,69	0,13	1617,59	9,17
SinTN ₂	0,88	0,61	0,23	1596,68	-16,81
SOSinTN ₁	0,98	0,89	0,50	2059,5	-1528,08
SOSinTN ₂	0,97	0,78	0,44	1865,3	-1867,56
SOTN ₁	1,00	0,61	0,87	2363,77	-523,35
SOTN ₂	1,00	0,60	0,80	2402,89	-554,17
FOTN ₁	0,97	0,69	0,66	2039,2	-555,28
FOTN ₂	0,96	0,63	0,77	2038,13	-626,24
FOLN ₁	0,96	0,80	0,46	1655,79	-198,19
FOLN ₂	0,94	0,74	0,58	1649,5	-234,53
SOLN ₁	0,99	0,82	0,77	1635,5	-236,12
SOLN ₂	0,98	0,59	0,75	1632,49	-482,84
TOLN ₁	1,00	0,43	-3,62	3399,1	-1077,61
TOLN ₂	1,00	0,35	-3,62	3629,05	-1292,4
FOLNR ₁	0,96	0,81	0,48	1623,17	-112,08
FOLNR ₂	0,86	-1,13	-2,48	1,42x10 ⁹	-9,15x10 ⁸
TONR ₁	1,00	-2,98	-4,39	1,57x10 ¹³	-4,87x10 ¹⁰
TONR ₂	0,67	-1,21	-17,84	4,91x10 ¹⁰	-7,48x10 ⁹

Modellerin uyumluluk açısından incelenmediği durumlarda gerçekçi bir işlevsel yapı elde etmek mümkün değildir. Bu dezavantajın üstesinden gelmek için alternatif fonksiyonel yapılar olarak L, SON, SOSinTN ve FOLN modellerinin iki veri setinin kullanılmasıyla benzer performans gösterdikleri düşünülmüş ve bu doğrultuda uyumluluk grafiği oluşturulmuş (Şekil 4.12) ve kararlılığı kontrol edilerek fiziksel sınırlar dâhilinde değer üreten fonksiyon amaç fonksiyonun belirlenmesine katkıda bulunmuştur.

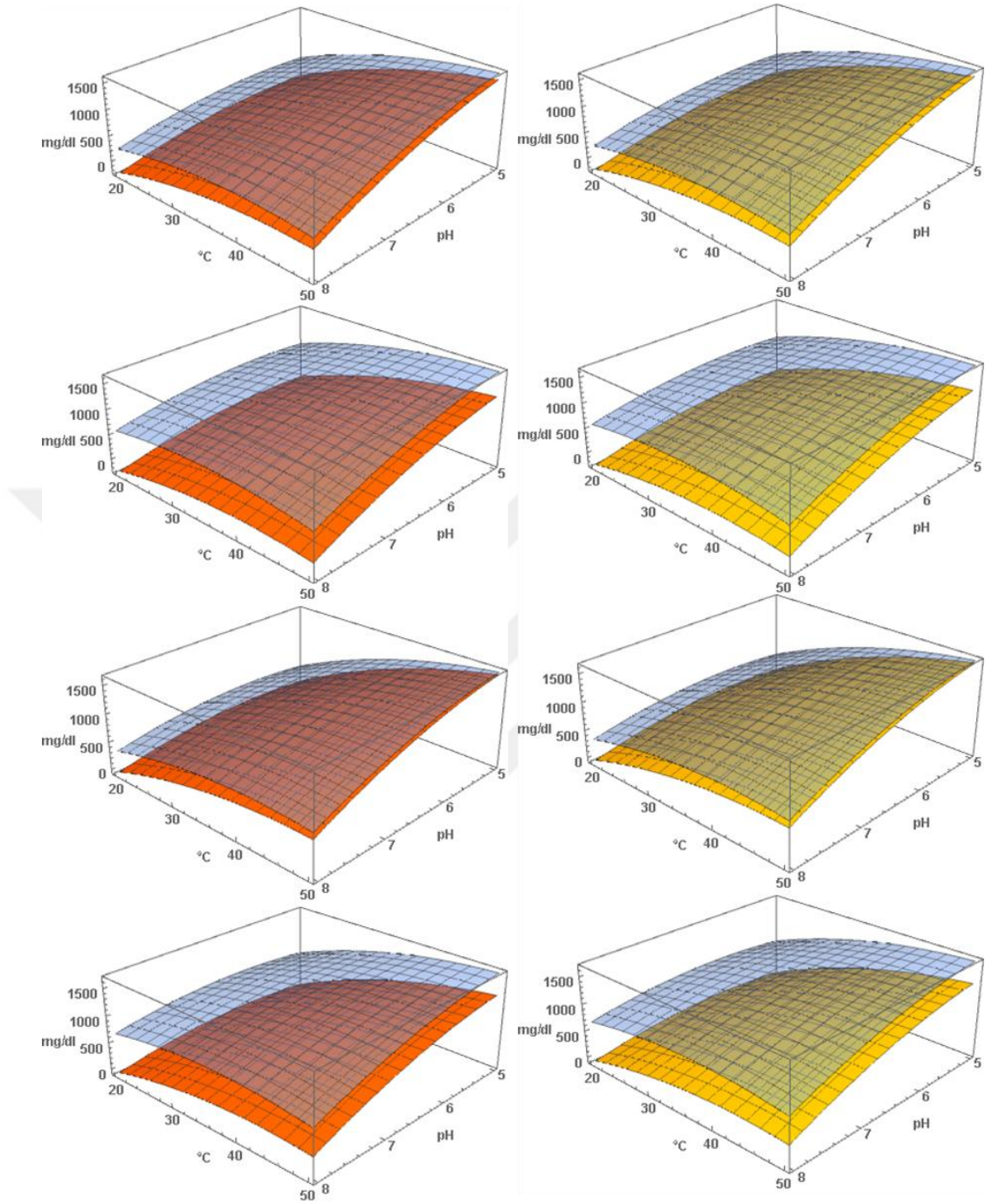


Şekil 4.12. L, SON, SOSinTN ve FOLN aday modellerinin uyumluluk kabiliyet grafikleri

Şekil 4.12’de yer alan grafiklere bakılarak modellerin hangisinin kullanılan veriler için tahmin yeteneğinin yetersiz kaldığı ve aynı zamanda sapmaların hangi verilerde gözlemlendiği hakkında bilgilere ulaşılabilir. L, FOLN ve SOSinTN aday modellerine bakıldığında her iki veri seti için uyumluluk kabiliyetleri birçok eğitim runları için düşük olduğu gözlemlenmiştir. SON modelinin tahminde zorlandığı belirli

runlar bulanmasına rağmen incelenen diğer 3 aday modellere nazaran daha uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Aktivite değerlerinin özellikle 1000 mg/dl üzerinde olduğunda durumlarda bu modelin her iki veri seti için yüksek tahmin yeteneği ile gerçek verilerle başarılı bir şekilde uyum gösterdiği anlaşılmaktadır. SON₁ ve SON₂ modelleri incelendiğinde her ikisi için glutaraldehit miktarının minimum (1%) veya sıcaklığın maksimum (50 derece) olduğu runlarda modellerin tahmin kapasitelerinin güçlendiği ortaya çıkmıştır. Minimum glutaraldehit kullanıldığı durumlarda enzimin kendi doğal kompozisyonunu daha çok koruyarak yapıya bağlandıkları, maksimum sıcaklık koşullarında ise kinetik enerjinin artması sebebi ile enzimin yüksek aktivite değerlerine ulaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Her iki durumda da yapı daha kararlı davrandığından SON modeli de kararlı yapılara daha yüksek bir uyum göstermiştir.

Bu sonuçlara ek olarak seçilen en iyi aday model olan SON her iki veri seti için modellerin sınırlandırıldığını gösteren 3 boyutlu çizimle de desteklenmiştir. Şekil 4.13'te verilen 3 boyutlu grafiklere baktığımızda aslında veri seçiminin yapılması ile sistemin belirli sınırlamalarda desenlerinin herhangi bir şekilde değişmediği tekrar açıkça ortaya konmuştur. Şöyle ki grafiklere bakıldığında enzim/Ma miktarı, glutaraldehit miktarı, sıcaklık, pH ve reaksiyon süresi için minimum ve maksimum olmak üzere 2 seviye çalışılmıştır. Burada enzim/Ma miktarı x_1 ile gösterilirken x_1 değerleri sırası ile $x_1=0,2$ ve $x_1=1$, glutaraldehit miktarı x_2 ile ifade edilip x_2 değerleri sırası ile $x_2=1$ ve $x_2=5$ olarak sabit tutulmuş ve son olarak x_5 reaksiyon süresini ifade edilirken x_5 değerleri $x_5=15$ ve $x_5=45$ olarak sırası ile sabit tutularak aktivite üzerinde etkisi daha önemli olan ve x_3 ve x_4 ile ifade edilen sıcaklık ve pH parametrelerindeki değişim incelenmiştir. Şekillere bakıldığında katı katman turuncu renkte olup 15 dk reaksiyon süresini ifade ederken şeffaf katman mavi renkte olup 45 dk reaksiyon süresini ifade eder. Sarı ve mavi renklerinin kullanıldığı grafik Sinyal^a verileri kullanılması ile oluşturulan SON₁ modeli için elde edilmişken turuncu ve mavi renklerin kullanıldığı grafik Sinyal^b verileri ile oluşturulmuş SON₂ modelini temsil etmektedir. Şekil 4.13'te yer alan 1. satırdaki çıktı $x_1 = 0,2$; $x_2 = 1$ değerlerinin sabitlenmesiyle, 2. satırdaki çıktının ise x_1 ve x_2 değerlerinin her ikisinin de 1 değeriyle sabitlenmesiyle, 3. satırdaki çıktılar 0,2 ve 5 değerlerinin sırasıyla x_1 ve x_2 değişkenlerine atanmasıyla, 4. satırdaki çıktılar ise sırasıyla her iki parametrenin maksimum noktaları olan 1 ve 5 değerlerinin sabitlenmesiyle elde edilmiştir.



Şekil 4.13. SON amaç fonksiyonunun her iki veri seti için uygulanan sınır değerleri sonucunda verdiği 3 boyutlu çıktıları

Bu doğrultuda pH değerinin 5 ve sıcaklığın 50 olduğu veri setlerinde aktivitenin en yüksek olduğu gözlemlenirken bunun tam tersi durum olan pH değerinin 8 olması ve sıcaklığın 20 derece olması grafiklerden de anlaşılabileceği gibi enzim aktivitesinde ciddi bir düşüşe sebep olmaktadır. Her iki model grafiği de

incelendiğinde, 3 boyutlu çıktı değerlerinin tanımlanan giriş aralıklarında fiziksel sınırlar içinde olduğuna dikkat edilmeli ve sonuç olarak elde edilen bu modellerin gerçekçi olduğu bir kez daha anlaşılmıştır.

Özetle Tablo 4.6'ya bakıldığında 3. sırada olan (2. dereceden çoklu doğrusal olmayan) denklem $0,99 R^2_{\text{eğitim}}$, $0,92 R^2_{\text{test}}$, $0,88 R^2_{\text{doğrulama}}$ ve 1678 max değerleri ile deneysel verilerimizi temsil eden en uygun fonksiyon olarak seçilmiştir. Daha sonra farklı optimizasyon stratejisi ve dört farklı doğrudan arama yaklaşımı bu model fonksiyon üzerinde kullanılarak optimum yapısal (enzim/MA kombinasyonu (U/mg), glutaraldehit miktarı (%)) ve deneysel (ortam pH'sı, ortam sıcaklığı ve inkübasyon süresi) parametre değerleri belirlenmiştir. Optimizasyon sonuçlarına göre en ideal yapısal parametre değerleri enzim/MA kombinasyonu: 0,624 U/mg, glutaraldehit miktarı: %5 ve deneysel parametre değerleri için ortam pH'sı: 5, ortam sıcaklığı: 50 °C ve reaksiyon süresi: 45 dk olarak bulunmuştur. Bu yapısal parametre değerleri kullanılarak geliştirilen MCLIA, optimum deneysel parametre değerlerinde çalışıldığında glikoz metreden optimizasyon sonucuna çok yakın olan bir sinyal değeri (1653^{+84} mg/dl) elde edilmiştir. Bu sonuç yapılan optimizasyonun güvenilir olduğunun da bir ifadesidir. Bundan sonra yapılan tüm deneysel çalışmalar bu parametre değerleri dikkate alınarak elde edilen ve MCLIA* olarak kodlanan yapı ile gerçekleştirilmiştir. Sinyal platformu yine bu yapısal parametreler doğrultusunda hazırlanan yapının üzerine prob DNA'ların tutturulması ile elde edilmiştir. Fakat sonraki deney aşamalarında bazı deneysel kısıtlamalar doğrultusunda farklı optimizasyon senaryolarının gerekliliği ortaya çıkmıştır. 1. senaryoya bakıldığında sıcaklığın 21°C ve sükröz reaksiyon süresinin de 5 dakika seçilmesi çalışma kolaylığı sağlarken önerilen tasarım ile kısa sürede diğer yapısal parametreler doğrultusunda hazırlanan MCLIA yapıları ile yüksek sinyal değeri okumayı amaçlamaktadır. Fakat Tablo 4.7'e bakıldığında deneysel olarak elde edilen sinyal değerleri doğrultusunda bu senaryo koşullarının sağlanmasına rağmen modelin belirlenen koşullarda sistemi tam olarak temsil edemediği kanısına varılmıştır. Bunun nedeni ise modellerme sürecinde model eğitimi belirlenen çalışma sınırları ile gerçekleştirilmemiştir. Fakat bu senaryoda reaksiyon süresi 5 dk olarak istenince eğitim sürecinin dışında bir kısıtlama olduğu için model sonucunda elde edilen teorik sinyal değeri ile deneysel sinyal değeri birbirinden farklı çıkmıştır. Özetle senaryo 1'de yer alan deneysel kısıtlamalar sebebiyle bu aralıkta model eğitilmediği için bu senaryo sistemi tam olarak ifade

edememiştir. Senaryo 1 dışında geliştirilen senaryolar (2-3-4) ise DIN yapısının hazırlanma aşamalarında gerçekleşen işlemler sonucunda enzim aktivitesinde azalmaların olabileceği öngörüsü ile bu senaryolardaki parametre değerlerinin kısıtlamaları, sinyal değerlerinde en fazla 2 kat seyreltme yapılabilecek şekilde olmasına dikkat edilerek yapılmıştır. Bu durumun temel nedeni ise seyreltme faktörü arttıkça hata payı ve veri setlerinin standart sapmaları artmaktadır. Belirtilen amaçlar doğrultusunda üretilen senaryolar ile farklı tasarım önerileri elde edilmiş ve bu tasarımlarla geliştirilen MCLIA yapılardan elde edilen sinyal değerleri (teorik sinyal değeri) Tablo 4.7’de belirtilmiştir. Senaryo 2 için önerilen tasarım deneysel olarakda gerçekleştirilmiştir. Senaryoda yapılan kısıtlamalar modelin eğitildiği çalışma aralıklarında olduğu için elde edilen deneysel sinyal değerleri amaç fonksiyonuyla gerçekleştirilen optimizasyon işlemleri sonucunda elde edilen teorik sinyal değerleriyle yakın çıkmaktadır. Bu da yapılan modelleme ve optimizasyon işlemlerinin gerçek sistemi karşılayabildiğini göstermektedir.

Tablo 4.7. Optimizasyon senaryoları ve bu senaryoların gerçekleştirilmesi sonucu üretilen sinyal değerleri

Senaryo Numarası	Kısıtlar	Önerilen Tasarım	Optimizasyon algoritmaları	Teorik Sinyal Değeri	Deneysel Sinyal Değeri	DIN Sinyal Değeri
1	0,2 < x ₁ < 1, 1 < x ₂ < 5, 5 < x ₃ < 8, x ₄ = 21, x ₅ = 5	x ₁ = 0,46 x ₂ = 4,43 x ₃ = 6,001 x ₄ = 21 x ₅ = 5	MDE	88,13	161,6 ^{±30,14}	-
			MRS			
			MSA			
			MNM			
2	x ₁ = 0,624 x ₂ = 5 x ₃ = 6 x ₄ = 28 x ₅ = 31	x ₁ = 0,624 x ₂ = 5 x ₃ = 6 x ₄ = 28 x ₅ = 31	MDE	938,72	1022 ^{±45,25}	891,71 ^{±64,77(a)}
			MRS			
			MSA			
			MNM			
3	x ₁ = 0,624 x ₂ = 5 x ₃ = 6 x ₄ = 27 x ₅ = 26	x ₁ = 0,624 x ₂ = 5 x ₃ = 6 x ₄ = 27 x ₅ = 26	MDE	817	-	486,50 ^{±9(b)}
			MRS			
			MSA			
			MNM			
4	x ₁ = 0,624 x ₂ = 5 x ₃ = 6 x ₄ = 27 x ₅ = 28	x ₁ = 0,624 x ₂ = 5 x ₃ = 6 x ₄ = 27 x ₅ = 28	MDE	851,24	-	526,42 ^{±48,95(c)} 571,45 ^{±37,5 (d)}
			MRS			
			MSA			
			MNM			

(a) MCLIA yapısına ≤ 700 ng prob DNA tutturulduğunda (Tampon A ile yıkanan), (b) MCLIA yapısına ≤ 1500 ng prob DNA tutturulduğunda (Tampon A ile yıkanan),

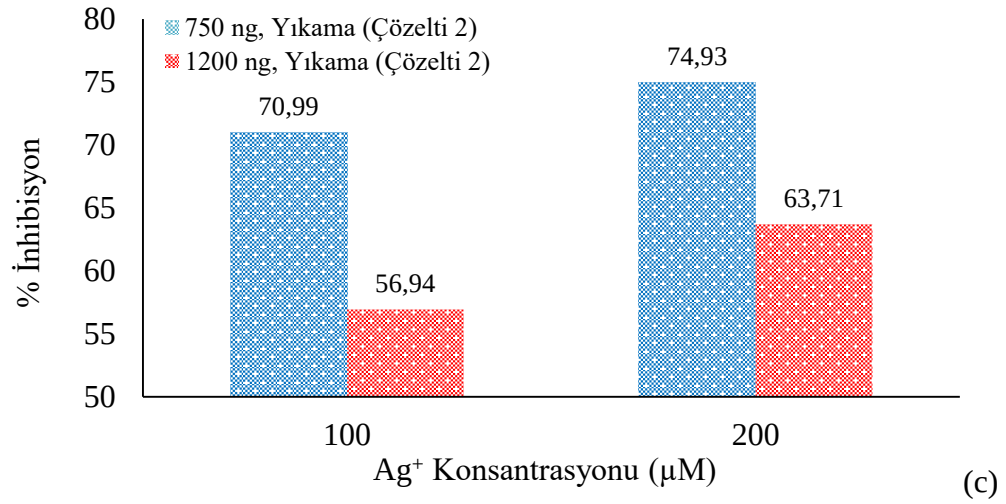
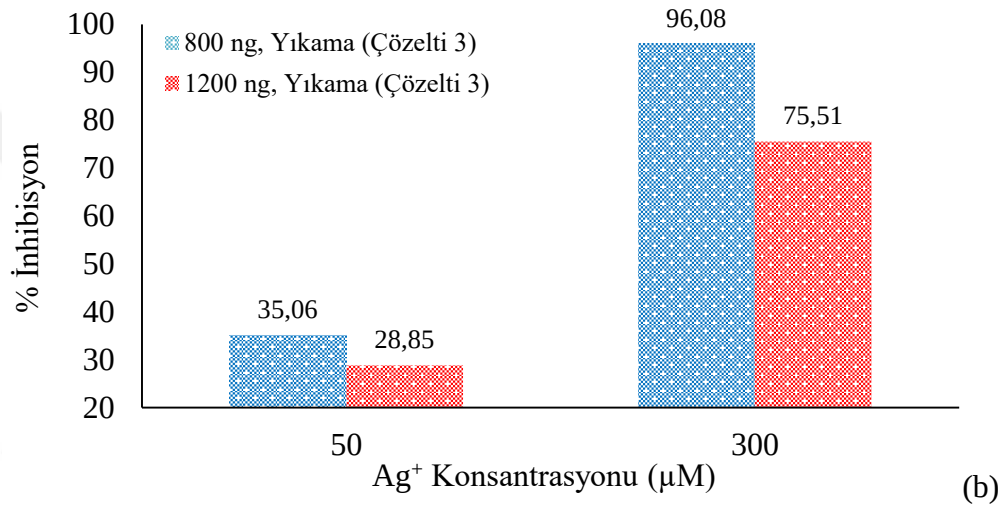
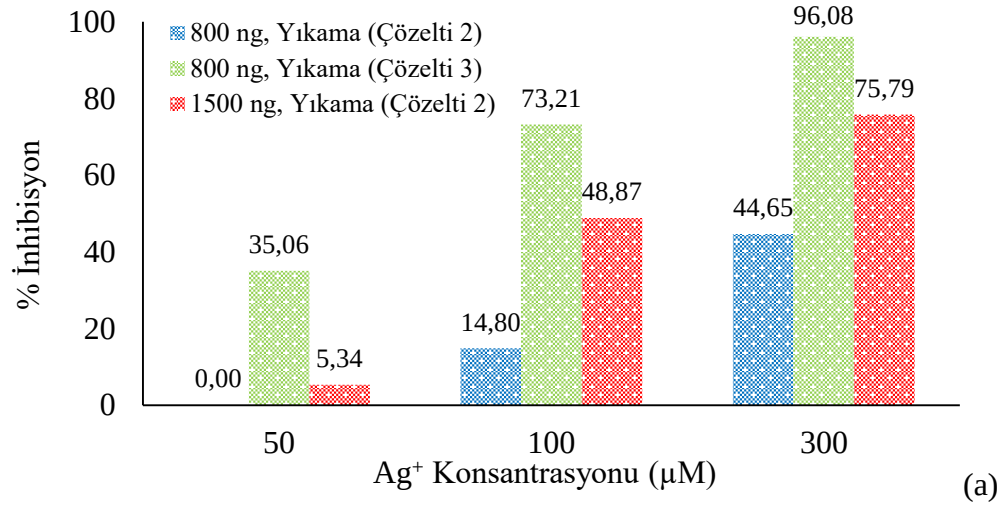
(c) MCLIA yapısına ≤ 1200 ng prob DNA tutturulduğunda (yıkama çözeltisi 1), (d) MCLIA yapısına ≤ 1200 ng prob DNA tutturulduğunda (Tampon A ile yıkanan)

4.2.6. Sinyal Platformunun (DIN) Glikoz metrede Sinyal Eldesi

Başarılı optimizasyon süreci sonunda elde edilen MCLIA yapılarının bir sonraki aşaması ise bu yapılara prob DNA'nın tutturulması sağlanarak sinyal platformu geliştirilmesidir. Bu doğrultuda senaryo 2 ile üretilen MCLIA yapılarına 100 ng'dan 700 ng prob DNA'nın yüklenmesiyle elde edilen aktivite değerleri $891.71^{\pm 64.77}$ mg/ dl olarak elde edilmiştir. Yani 700 ng'a kadar prob DNA yüklenmesi aktivitede yaklaşık olarak %12 azalma gözlemlenmesine sebep olmuştur. Fakat amaç doğrultusunda bu azalma incelendiğinde, sinyal değerleri göreceli aktivite olarak hesaplandığı için MCLIA yapıları üretildikten sonra problemlerin bağlanması ile oluşan DIN ve hibritleşmesi sonunda elde edilen DINH'ların ilk ölçüm aktivitesindeki azalmaların 500-600 mg/dl' nin altına düşmedikçe sinyal mekanizması için bir sorun teşkil etmeyeceği düşünülmektedir. Dolayısı ile senaryo 2 baz alınarak teorik elde edilen sinyal değeri göz önünde bulundurularak senaryo 3 ve 4 kullanılması ile elde edilecek DIN'ların hedef DNA konsantrasyonlarının tespit edilme sürecinde kullanılabilir olduğu düşünülerek bu doğrultuda çalışmanın amacına uygun deneysel tasarımlar ve süreçler gerçekleştirilmiştir.

1 mg'lık maleimid grubu ile fonksiyonelleştirilmiş MCLIA*'nın maksimum prob tutma kapasitesini $11597^{\pm 173}$ ng/ml olarak elde edilmiştir. Maksimum Prob yüklenmiş DIN ile hibritleşen maksimum hedef DNA miktarı ise $8339,5^{\pm 47.83}$ ng/ml olarak hesaplanmıştır. Böylece yapının tespit edebileceği maksimum hedef miktarı belirlenmiştir.

Çalışma, hibridizasyona bağlı olarak gerçekleşen inhibisyon mekanizmasına dayanan tespit yöntemi içerdiği için bir sonraki adımda ise DIN yapısının gümüş çözeltisi ile muamele edilmesinin ardından elde edilen sinyal değerindeki fark incelenmiştir. Bu amaç için hazırlanan fonksiyonelleştirilmiş MCLIA*'e 8 ve 15 µg/µl prob DNA'nın tutturulması sonucunda geliştirilen DIN yapıları 50, 100 ve 300 µM gümüş çözeltisi ile 15 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda inhibisyon oranı denklem 2 kullanılarak hesaplanmıştır. Şekil 4.14 elde edilen DIN yapılarının farklı gümüş konsantrasyonlarındaki %inhibisyona oranını ve buna bağlı olarak gümüş tutma kapasitelerini göstermektedir.



Şekil 4.14. DIN yapılarının gümüş iyon konsantrasyonlarına bağlı inhibisyon oranları ve gümüş iyonu tutma kapasiteleri

Şekil 4.14 (a)'ya bakıldığında tüm DIN yapıları için gümüş konsantrasyonu arttıkça inhibisyon oranının arttığı görülmektedir. 800 ng prob DNA ile geliştirilen DIN yapılarının yıkama çözeltisi 3 ile yıkanması inhibisyonu dikkate değer bir şekilde arttırmıştır. Bunun sebebi BSA'nın gümüş iyonları ile etkileşime geçerek gümüş nanotancikleri oluşturmasıdır [124]. Ayrıca maleimid grubu ile fonksiyonel hale getirilmiş MCLIA* 100 µM gümüş iyonu konsantrasyonunda $99,37^{+1,1}$ oranında inhibe olurken bu yapıya prob DNA tuturulmasından sonra elde edilen DIN yapısının aynı gümüş iyonu konsantrasyonunda daha az oranda inhibe olması prob DNA'ların gümüş iyonlarını tuttuklarının bir ifadesidir. Şekil 4.14 (a) 'da görüldüğü gibi DIN yapısının 300 µM gümüş iyonu konsantrasyonunda bile %45 ve %76 gibi inhibisyon oranlarına sahip olması bu durumu desteklemektedir. Diğer yandan prob DNA konsantrasyonunun artması Şekil 4.14 (b) ve (c)'de görüldüğü gibi inhibisyon oranını azaltmaktadır. Bu durum artan DNA konsantrasyonlarının daha fazla gümüş iyonu tutması sonucu enzimin daha az inhibe olmasından kaynaklanmaktadır.

Çalışmanın amacı doğrultusunda DIN'ların hedef DNA sekansı ile hibritleştirilmesine bağlı olarak DIN yapısındaki enzim inhibisyon oranının farklılık göstermesi beklenmiştir. Bu amaç 3 farklı senaryo (senaryo 2, 3 ve 4) ve 2 farklı deneysel süreç (akış 1 ve 2) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.8 geliştirilen sinyal platformunun hedef DNA sekansını algılama performansını sergilemektedir. Hibridizasyon için kullanılan Hedef DNA konsantrasyonları prob DNA'lar ile molar biriminden en az birebir eşleşecek miktarlarda hazırlanmıştır. DIN yapısı hedef DNA ile hibritleştirildikten sonra inhibisyon oran farkının prob DNA ve gümüş iyon konsantrasyonuna bağlı olarak senaryolar ve deneysel süreçlerden (akışlardan) bağımsız bir şekilde %20 ile %55 oranında değiştiği görülmektedir. Tabloda yer alan inhibisyon oranları incelendiğinde gümüş inkübasyonu sonrasında DINH yapısındaki hibritleşmiş DNA'ların DIN yapısındaki prob DNA'dan daha fazla gümüş tuttuğunu ve bu durumda yapıdaki enzimlerin daha az gümüş ile etkileşmesini sağlayarak enzim aktivitesinde artış olduğunu ortaya koymaktadır.

Tablo 4.8. Geliştirilen sinyal platformunun hedef DNA sekansını algılama performansı

Yapı	Prob DNA miktarı (ng /1µl)	Hedef DNA miktarı (ng /1µl)	Gümüş miktarı (µM)	İnhibisyon Oranı (%)	Senaryo	Yıkama (Çözelti 1)*
Akış 1						
DIN	5	-	300	87,38	2	-
DINH	5	5	300	38,16		
DIN	12,5	-	300	90,35	2	-
DINH	12,5	8,98	300	67,80		+
DIN	15	-	100	31,18	3	-
DINH	15	10,75	100	10,32		
DIN	7,5	-	100	70,98	4	-
DINH [#]	7,5	5,38	100	28,06		+
DIN	12	-	300	75,51	4	+
DINH	12	8,6	300	55,77		+
DIN	15	-	100	66,91	4	-
DINH [#]	15	10,75	100	22,27		+
DIN	15	-	200	91,94	4	-
DINH [#]	15	10,75	200	56,10		+
Yapı	Prob DNA miktarı (ng /1µl)	Hedef DNA miktarı (ng /1µl)	Gümüş miktarı (µM)	İnhibisyon Oranı (%)	Senaryo	Yıkama (Çözelti 3)
Akış 2						
DIN	8	-	200	73,21	4	+
DINH	8	5,74	200	20,18		
DIN	8	-	300	100	4	+
DINH	8	5,74	300	70,12		
DIN	12	-	300	94,86 ^{±1,63}	4	+
DINH	12	8,6	300	39,12 ^{±6,97}		
DIN	12	-	400	97,47 ^{±2,32}	4	+
DINH	12	8,6	400	65,52 ^{±6,24}		

* Çözelti 1 ile yapılan yıkamalar DIN için prob DNA tuturulduktan sonra DINH için hedef DNA tuturulduktan sonra gerçekleştirilmiştir.

[#] hedef DNA çözeltileri stoktan Tampon A ile seyreltilmiştir.

5. SONUÇ

1. ImageJ programı ile ölçülen MA yapılarının ortalama tanecik boyutları $25,08^{\pm 4,02}$ nm olarak hesaplanmıştır.
2. EDX sonuçları DIN elde edilme sürecindeki aşamalarda tüm yapıların hedeflendiği gibi üretildiğini kanıtlanmıştır.
3. İnvertaz enzimi agregatları, MA yüzeyine çöktürülerek MCLIA yapıları başarılı bir şekilde elde edilmiştir.
4. FTIR sonucu doğrultusunda silanizasyon işleminin doğru bir şekilde gerçekleştiği ve MA tozlarının yüzeyinin modifiye edilmiş olduğu açıkça görülmektedir.
5. VSM sonuçları ise MA ve MCLIA'nın süperparamanyetik özelliklerini devam ettirdiğini ortaya koymuştur.
6. Elektroforez sonuçlarına göreyol aktif DNA problemlerinin çoğunun fonksiyonelleştirilmiş MCLIA* yapısına bağlandığı ve böylece sinyal platformunun elde edildiği anlaşılmıştır.
7. Sinyal^a veri setleri her run için ayrı ayrı yapılan tüm deneysel tekrardan üretilirken Sinyal^b veri setleri standart sapmaları indirgemek için en yakın 3 tekrarın seçilmesi doğrultusunda elde edilmiştir.
8. Sinyal^b veri setleri incelendiğinde standart sapmaların %1,3 ile %11,7 arasında olması MCLIA yapılarının tekrar üretilebilir olduğunun açık bir göstergesidir.
9. Deneysel dizayn ile elde edilen runlar doğrultusunda göreceli aktiviteler baz alınarak run 42'nin uygun bulunmasıyla yapılan inhibitör çalışmaları sonucunda invertaz enzimini en çok inhibe eden ağır metalin Ag⁺ olduğu anlaşılmıştır.
10. MCLIA yapısının gümüş iyonlarını 4,6 µM LOD değeri, % 99,7 R² değeri ile 5-70 µM doğrusal aralıkta, 1,2 inhibisyon oranı/µM hassasiyet ve 42,3 µM IC₅₀ değeri ile algıladığı olarak bulunmuştur olarak hesaplanmıştır.
11. Sinyal^a ve Sinyal^b veri setlerindeki faktörler incelendiğinde pH, sıcaklık ve reaksiyon süresinin yüksek derecede anlamlı olduğu görülmüştür. Faktörlerin ikili durumunun etkisine bakıldığında tek anlamlı kombinasyonun pH-sıcaklık kombinasyonu olduğu anlaşılmıştır.
12. ANOVA yapılar Model Sinyal^a 'nın ve Model Sinyal^b'nin anlamlı olduğu doğrulanmıştır. Fakat ayarlanmış R², tahmin edilen R², standart sapma, R²

- değerleri açısından değerlendirildiğinde model Sinyal^a'nın tercih edilmesini uygun görmüştür.
13. MCLIA aktivitesi için 14 aday Nöro-regresyon modelleri üretilmiştir. Her iki sinyal için 3 farklı R^2 değeri ile 2 farklı veri setini temsil eden en doğru model olarak SONtercih edilmiştir. Bu model gerçekçilik ve runlar için yüksek bir uyum göstermiştir.
 14. Matematiksel modelleme sonucunda veri seçmenin ya da tüm verileri kullanmanın sistem için sonuçları değiştirmedığı sonucuna varılmıştır.
 15. Birbirinden farklı amaçlar doğrultusunda 4 adet senaryo tanımlanarak optimizasyon gerçekleştirilmiştir.
 16. Optimizasyon sonuçlarına göre en ideal yapısal parametre değerleri enzim/MA kombinasyonu: 0,624 U/mg, glutaraldehit miktarı: %5 ve deneysel parametre değerleri için ortam pH'sı: 5, ortam sıcaklığı: 50 °C ve reaksiyon süresi: 45 dk olarak bulunmuştur.
 17. Optimum değerler çalışıldığında glikoz metreden optimizasyon sonucuna çok yakın olan $1653^{\pm 84}$ mg/dl sinyal değeri elde edilmiş ve optimizasyonun güvenilir ve doğru bir şekilde yapıldığı ortaya konmuştur.
 18. MCLIA* yapısının sukrozu en düşük seviyede tespit etme limiti: 0,85 mM, doğrusal aralığı: % 99,4 R^2 değeri ile 2-300 mM, hassasiyeti: 14,063 mg/dl mM^{-1} ve $V_{\max}$ ve K_m değerleri sırası ile 6625 mg/dl ve 226 mM olarak bulunmuştur.
 19. MCLIA* yapısının sukrozu en düşük seviyede tespit etme limiti: 0,85 mM, doğrusal aralığı: %99,4 R^2 değeri ile 2-300 mM ve hassasiyeti: 14,063 mg/dl mM^{-1} olarak bulunmuştur.
 20. $V_{\max}$ ve K_m değerleri sırası ile 6625 mg/dl ve 226 mM olarak bulunmuştur.
 21. 27 kullanıma kadar yapıya bağlı olan invertaz enzim aktivitesinde ciddi bir azalma tespit edilmemiş 45. kullanım sonrası enzim aktivitesi $\%81^{\pm 5,2}$ olarak kaydedilmiştir.
 22. MCLIA* için 2 ay süre ile 4 °C' deki depolama kararlılığı incelenmiş ve 2 ay sonunda aktivitenin $\%84,5^{\pm 5,3}$ olarak kendini muhafaza ettiği ortaya konmuştur.

23. Prob DNA'nın maksimum tutunma miktarı 11597^{+173} ng/ml olarak elde edilmiştir. Maksimum prob tutturulmuş DIN yapısı ise maksimum $8339,5^{+47.83}$ ng/ ml hedef tespit edebilmektedir.
24. Tüm DIN yapıları için gümüş konsantrasyonu arttıkça inhibisyon oranının arttığı görülmüştür.
25. Prob DNA konsantrasyonunun artması ile inhibisyon oranını azaldığı sonucuna varılmıştır.
26. DIN yapısı hedef DNA ile hibritleştirildikten sonra inhibisyon oran farkının prob DNA ve gümüş iyon konsantrasyonuna bağlı olarak senaryolar ve deneysel süreçlerden (akışlardan) bağımsız bir şekilde %20 ile %55 oranında değiştiği görülmüştür.
27. DINH yapısındaki hibritleşmiş DNA'ların DIN yapısındaki prob DNA'dan daha fazla gümüş tuttuğunu ve bu durumda yapıdaki enzimlerin daha az gümüş ile etkileşmesini sağlayarak enzim aktivitesinde artış olduğunu ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

- [1] M. Scofield, Nucleic Acids, in: XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, Elsevier, 2007: pp. 1–15. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60059-5>.
- [2] Y. Xiang, Y. Lu, Using Commercially Available Personal Glucose Meters for Portable Quantification of DNA, *Analytical Chemistry*. 84 (2012) 1975–1980. <https://doi.org/10.1021/ac203014s>.
- [3] P. Safaei, E.M. Aghaee, G.J. Khaniki, S.A.K. Afshari, S. Rezaie, A simple and accurate PCR method for detection of genetically modified rice, *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 2019. <https://doi.org/10.1007/s40201-019-00401-x>.
- [4] S.-M. Taghizadeh, M.B. Ghoshoon, A. Berenjian, Y. Ghasemi, A. Dehshahri, A. Ebrahimezhad, Impacts of Magnetic Immobilization on the Recombinant Proteins Structure Produced in *Pichia pastoris* System, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00286-4>.
- [5] N.C. Seeman, Nanomaterials Based on DNA, *Annual Review of Biochemistry*. 79 (2010) 65–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060308-102244>.
- [6] K.B. Riaz Ahmed, A.M. Nagy, R.P. Brown, Q. Zhang, S.G. Malghan, P.L. Goering, Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies, *Toxicology in Vitro*. 38 (2017) 179–192. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.10.012>.
- [7] Y. Zhang, A. McMullen, L.-L. Pontani, X. He, R. Sha, N.C. Seeman, J. Brujic, P.M. Chaikin, Sequential self-assembly of DNA functionalized droplets, *Nature Communications*. 8 (2017) 21. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00070-0>.
- [8] C. Qian, R. Wang, H. Wu, J. Ping, J. Wu, Recent advances in emerging DNA-based methods for genetically modified organisms (GMOs) rapid detection, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 109 (2018) 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.021>.
- [9] M. Sánchez-Paniagua López, C.L. Manzanares-Palenzuela, B. López-Ruiz, Biosensors for GMO Testing: Nearly 25 Years of Research, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 48 (2018) 391–405. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1442708>.
- [10] F. Kıran, Ö. Osmanağaoğlu, GIDALARDA GENETİK YAPISI DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN (GDO) BELİRLENMESİ DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS (GMOs) IN FOOD, 36 (2011) 295–302.
- [11] M.A. Arugula, Y. Zhang, A.L. Simonian, Biosensors as 21st century technology for detecting genetically modified organisms in food and feed, *Analytical Chemistry*. 86 (2014) 119–129. <https://doi.org/10.1021/ac402898j>.
- [12] D. Aslan, M. Şengelen, Ankara Tabip Odası., Farklı boyutlarıyla genetiği değiştirilmiş organizmalar, 2010.
- [13] Y. Kourkoutas, N. Chorianopoulos, A. Nisiotou, V.P. Valdramidis, K.A.G. Karatzas, Application of Innovative Technologies for Improved Food Quality and Safety, *BioMed Research International*. 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/9160375>.
- [14] P. Herman, I.V.J. Taverniers, M. Fraiture, P. Herman, I. Taverniers, M. De Loose, D. Deforce, N.H. Roosens, Current and New Approaches in GMO Detection : Challenges and Solutions Current and New Approaches in GMO Detection :, *BioMed Research International*. 2015 (2015).
- [15] I.B. Salisu, A.A. Shahid, A. Yaqoob, A.S. Olawale, A.B. Amin, M. Sunusi, Detection of Genetically Modified Organisms Through Genomics Approaches, Elsevier, 2021. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22706-6>.
- [16] S.E.O. Mahgoub, L.M.L. Nollet, eds., Testing and Analysis of GMO-containing Foods and Feed, CRC Press, Boca Raton, Florida : CRC Press, [2019], 2019. <https://doi.org/10.1201/9781315178592>.
- [17] G.D. Grothaus, M. Bandla, T. Currier, R. Giroux, G.R. Jenkins, M. Lipp, G. Shan, J.W. Stave, V. Pantella, Immunoassay as an analytical tool in agricultural biotechnology., *Journal of AOAC International*. 89 (n.d.) 913–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16915826>.

- [18] G. Shan, S.K. Embrey, B.W. Schafer, A highly specific enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Cry1Ac insecticidal crystal protein in transgenic widestrike cotton, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (2007) 5974–5979. <https://doi.org/10.1021/jf070664t>.
- [19] M. Kamle, P. Kumar, J.K. Patra, V.K. Bajpai, Current perspectives on genetically modified crops and detection methods, *3 Biotech*. 7 (2017) 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0809-3>.
- [20] G.M. Clapper, L. Kurman, in *Grain Products and*, (2011) 241–256.
- [21] I.H. Alsohaimi, Analytical detection methods for diagnosis of COVID-19: developed methods and their performance, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 35 (2021) 196–207. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1865838>.
- [22] R. Kubina, A. Dziedzic, Molecular and serological tests for COVID-19. A comparative review of SARS-CoV-2 coronavirus laboratory and point-of-care diagnostics, *Diagnostics*. 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/diagnostics10060434>.
- [23] M. Irfan, M. Asif, A. Bashir, K.A. Malik, Establishment of Dipstick Development Technology for Detection of Cry1Ac in Transgenic Plants, *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*. 2 (2017) 2783–2797. <https://doi.org/10.22161/ijeab/2.6.3>.
- [24] M.J. Kim, B. Lim, Y.K. Jeong, Y.W. Cho, Y.H. Choa, Surface modification of magnetite nanoparticles for immobilization with lysozyme, *Journal of Ceramic Processing Research*. 8 (2007) 293–295.
- [25] R. Kumar, A quantitative immunopolymerase chain reaction method for detection of vegetative insecticidal protein in genetically modified crops, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59 (2011) 10448–10453. <https://doi.org/10.1021/jf202453v>.
- [26] R. Kumar, A real-time immuno-PCR assay for the detection of transgenic Cry1Ab protein, *European Food Research and Technology*. 234 (2012) 101–108. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1618-2>.
- [27] A. Okumuş, Mısır Bitkisinde GD Analizi Teknolojisi Technology of GD-Analysis in the Corn Plan, 5 (2012) 25–28.
- [28] S. Dong, C. Zhang, X. Zhang, Y. Liu, J. Zhong, Y. Xie, C. Xu, Y. Ding, L. Zhang, X. Liu, Production and Characterization of Monoclonal Antibody Broadly Recognizing Cry1 Toxins by Use of Designed Polypeptide as Hapten, *Analytical Chemistry*. 88 (2016) 7023–7032. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00429>.
- [29] X. Zhang, C. Xu, C. Zhang, Y. Liu, Y. Xie, X. Liu, Established a new double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ab toxin based single-chain variable fragments from a naïve mouse phage displayed library, *Toxicon*. 81 (2014) 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.01.010>.
- [30] K.E. Strain, S.A. Whiting, M.J. Lydy, Laboratory and field validation of a Cry1Ab protein quantitation method for water, *Talanta*. 128 (2014) 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.036>.
- [31] C. Xu, C. Zhang, J. Zhong, H. Hu, S. Luo, X. Liu, X. Zhang, Y. Liu, X. Liu, Construction of an Immunized Rabbit Phage Display Library for Selecting High Activity against *Bacillus thuringiensis* Cry1F Toxin Single-Chain Antibodies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65 (2017) 6016–6022. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01985>.
- [32] Y. Zhang, W. Zhang, Y. Liu, J. Wang, G. Wang, Y. Liu, Development of monoclonal antibody-based sensitive ELISA for the determination of Cry1Ie protein in transgenic plant, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 408 (2016) 8231–8239. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9938-5>.
- [33] R.C. Allen, S. Rogelj, S.E. Cordova, T.L. Kieft, An immuno-PCR method for detecting *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin, *Journal of Immunological Methods*. 308 (2006) 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.10.006>.
- [34] S. Santiago-Felipe, L.A. Tortajada-Genaro, R. Puchades, A. Maquieira, Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis, *Analytica Chimica Acta*. 811 (2014) 81–87.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.12.017>.

- [35] envirologix company, No Title, (2021). <https://www.envirologix.com/>.
- [36] R. Kumar, C.K. Singh, S. Kamle, R.P. Sinha, R.K. Bhatnagar, D.N. Kachru, Development of nanocolloidal gold based immunochromatographic assay for rapid detection of transgenic vegetative insecticidal protein in genetically modified crops, *Food Chemistry*. 122 (2010) 1298–1303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.086>.
- [37] C. Qian, R. Wang, H. Wu, J. Ping, J. Wu, Recent advances in emerging DNA-based methods for genetically modified organisms (GMOs) rapid detection, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 109 (2018) 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.021>.
- [38] Ö. Çakır, S. Meriç, Ş. Ari, Detection of Genetically Modified Organisms in Feed, Genetically Modified Organisms in Food: Production, Safety, Regulation and Public Health. 20 (2015) 207–222. <https://doi.org/10.1016/B978012802259700019-1>.
- [39] D.P. Kalogianni, T. Koraki, T.K. Christopoulos, P.C. Ioannou, Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms, *Biosensors and Bioelectronics*. 21 (2006) 1069–1076. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.04.016>.
- [40] D. Morisset, D. Stebih, K. Cankar, J. Zel, K. Gruden, Alternative DNA amplification methods to PCR and their application in GMO detection: A review, *European Food Research and Technology*. 227 (2008) 1287–1297. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0850-x>.
- [41] A. Sassolas, B.D. Leca-Bouvier, L.J. Blum, DNA Biosensors and Microarrays, *Chemical Reviews*. 108 (2008) 109–139. <https://doi.org/10.1021/cr0684467>.
- [42] T.H.S. Dhahi, U.D.A. Bin Hashim, N.M. Ahmed, A. Mat Taib, A review on the electrochemical sensors and biosensors composed of nanogaps as sensing material, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*. 12 (2010) 1857–1862. <https://doi.org/10.3390/s8010290>.
- [43] M. Asal, Ö. Özen, M. Şahinler, İ. Polatoğlu, Recent Developments in Enzyme, DNA and Immuno-Based Biosensors, *Sensors*. 18 (2018) 1924. <https://doi.org/10.3390/s18061924>.
- [44] J.P. Chambers, B.P. Arulanandam, L.L. Matta, A. Weis, J.J. Valdes, Biosensor recognition elements, (2002) 1–12.
- [45] P. Mehrotra, Biosensors and their applications - A review, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 6 (2016) 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>.
- [46] S. Malhotra, A. Verma, N. Tyagi, V. Kumar, Biosensors: Principle, Types and Applications, (2017) 2395–4396.
- [47] A. Koyun, E. Ahlatcolu, Y. Koca, Biosensors and Their Principles, A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones. (2012). <https://doi.org/10.5772/48824>.
- [48] Richard R. Sinden, DNA Structure and Function, Elsevier, 1994. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02451-9>.
- [49] K. V, DNA Biosensors-A Review, *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*. 07 (2017) 1–5. <https://doi.org/10.4172/2155-9538.1000222>.
- [50] M. Sánchez-Paniagua López, C.L. Manzanares-Palenzuela, B. López-Ruiz, Biosensors for GMO Testing: Nearly 25 Years of Research, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 48 (2018) 391–405. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1442708>.
- [51] L. Huang, L. Zheng, Y. Chen, F. Xue, L. Cheng, S.B. Adeloju, W. Chen, A novel GMO biosensor for rapid ultrasensitive and simultaneous detection of multiple DNA components in GMO products, *Biosensors and Bioelectronics*. 66 (2015) 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.005>.
- [52] D. Zhu, J. Liu, Y. Tang, D. Xing, A reusable DNA biosensor for the detection of genetically modified organism using magnetic bead-based electrochemiluminescence, *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 149 (2010) 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.05.047>.
- [53] L. Zuo, Q. Qu, L. Li, X. Ran, J. Gui, Q. Wang, X. Cui, C. Jiang, Electrochemical DNA Biosensor Based on Magnetite/Multiwalled Carbon Nanotubes/Chitosan Nanocomposite for *Bacillus Cereus* Detection of Potential Marker for Gold Prospecting, *Electroanalysis*. 30 (2018) 910–920. <https://doi.org/10.1002/elan.201700801>.

- [54] F. Ribeiro Teles, D. França dos Prazeres, J. De Lima-Filho, Electrochemical Detection of a Dengue-related Oligonucleotide Sequence Using Ferrocenium as a Hybridization Indicator, *Sensors*. 7 (2007) 2510–2518. <https://doi.org/10.3390/s7112510>.
- [55] S.-Z.Z. Mousavian, M. Safarian, T. Sany, S.-B. Pasdar, Z. Rezayi, Advancement in Electrochemical DNA Biosensors for GMO Detection: A Review Study, *J Nutrition Fasting Health*. 6 (2018) 168–173. <https://doi.org/10.22038/JNFH.2018.34319.1138>.
- [56] F. Zhan, X. Liao, F. Gao, W. Qiu, Q. Wang, Electroactive crown ester-Cu²⁺ complex with in-situ modification at molecular beacon probe serving as a facile electrochemical DNA biosensor for the detection of CaMV 35s, *Biosensors and Bioelectronics*. 92 (2017) 589–595. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.10.055>.
- [57] F. Liu, K. Li, Y. Zhang, J. Ding, T. Wen, X. Pei, Y. Yan, W. Ji, J. Liu, X. Zhang, L. Li, An electrochemical DNA biosensor based on nitrogen-doped graphene nanosheets decorated with gold nanoparticles for genetically modified maize detection, *Microchimica Acta*. 187 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04511-4>.
- [58] W. Sun, Y. Lu, Y. Wu, Y. Zhang, P. Wang, Y. Chen, G. Li, Electrochemical sensor for transgenic maize MON810 sequence with electrostatic adsorption DNA on electrochemical reduced graphene modified electrode, *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 202 (2014) 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.072>.
- [59] L.M. Lechuga, Chapter 5 Optical biosensors, *Comprehensive Analytical Chemistry*. 44 (2005) 209–250. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(05\)44005-2](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(05)44005-2).
- [60] K. V, DNA Biosensors-A Review, *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*. 07 (2017). <https://doi.org/10.4172/2155-9538.1000222>.
- [61] P. Markoulatos, N. Siafakas, A. Papathoma, E. Nerantzis, B. Betzios, V. Dourtoglou, M. Moncany, Qualitative and quantitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food, *Food Reviews International*. 20 (2004) 275–296. <https://doi.org/10.1081/FRI-200029418>.
- [62] L. Yang, X. Li, S. Yan, M. Wang, P. Liu, Y. Dong, C. Zhang, Single-walled carbon nanotubes–carboxyl-functionalized graphene oxide-based electrochemical DNA biosensor for thermolabile hemolysin gene detection, *Analytical Methods*. 7 (2015) 5303–5310. <https://doi.org/10.1039/C5AY01062D>.
- [63] Q. Zheng, H. Wu, Z. Shen, W. Gao, Y. Yu, Y. Ma, W. Guang, Q. Guo, R. Yan, J. Wang, K. Ding, An electrochemical DNA sensor based on polyaniline/graphene: high sensitivity to DNA sequences in a wide range, *The Analyst*. 140 (2015) 6660–6670. <https://doi.org/10.1039/C5AN01088H>.
- [64] K. Chen, H. Han, Z. Luo, Y. Wang, X. Wang, A practicable detection system for genetically modified rice by SERS-barcoded nanosensors, *Biosensors and Bioelectronics*. 34 (2012) 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.01.029>.
- [65] A. Plácido, F. Ferreira-Da-Silva, J.R.S.A. Leite, N. de-Los-Santos-Álvarez, C. Delerue-Matos, A convenient renewable surface plasmon resonance chip for relative quantification of genetically modified soybean in food and feed, *PLoS ONE*. 15 (2020). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229659>.
- [66] M. Passamano, M. Pighini, QCM DNA-sensor for GMOs detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 118 (2006) 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.04.012>.
- [67] M. Minunni, S. Tombelli, S. Pratesi, M. Mascini, P. Piatti, P. Bogani, M. Buiatti, A PIEZOELECTRIC AFFINITY BIOSENSOR FOR GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS (GMOs) DETECTION, *Analytical Letters*. 34 (2001) 825–840. <https://doi.org/10.1081/AL-100103595>.
- [68] Z. Zhao, Y. Chen, W. Xu, M. Ma, Surface Plasmon Resonance Detection of Transgenic Cry1Ac Cotton (*Gossypium* spp.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (2013) 2964–2969. <https://doi.org/10.1021/jf3050439>.
- [69] M. Minunni, S. Tombelli, J. Fonti, M.M. Spiriti, M. Mascini, P. Bogani, M. Buiatti, Detection of Fragmented Genomic DNA by PCR-Free Piezoelectric Sensing Using a Denaturation Approach, *Journal of the American Chemical Society*. 127 (2005) 7966–7967. <https://doi.org/10.1021/ja051345q>.

- [70] İ. Karamollaoğlu, H.A. Öktem, M. Mutlu, QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs), *Biochemical Engineering Journal*. 44 (2009) 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.11.011>.
- [71] Z. Aghili, N. Nasirizadeh, A. Divsalar, S. Shoeibi, P. Yaghmaei, A nanobiosensor composed of Exfoliated Graphene Oxide and Gold Nano-Urchins, for detection of GMO products, *Biosensors and Bioelectronics*. 95 (2017) 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.02.054>.
- [72] G. Feriotto, S. Gardenghi, N. Bianchi, R. Gambari, Quantitation of Bt-176 Maize Genomic Sequences by Surface Plasmon Resonance-Based Biospecific Interaction Analysis of Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (2003) 4640–4646. <https://doi.org/10.1021/jf0341013>.
- [73] L. Yan, Z. Zhu, Y. Zou, Y. Huang, D. Liu, S. Jia, D. Xu, M. Wu, Y. Zhou, S. Zhou, C.J. Yang, Target-Responsive “Sweet” Hydrogel with Glucometer Readout for Portable and Quantitative Detection of Non-Glucose Targets, *Journal of the American Chemical Society*. 135 (2013) 3748–3751. <https://doi.org/10.1021/ja3114714>.
- [74] Y. Jia, F. Sun, N. Na, J. Ouyang, Detection of p53 DNA using commercially available personal glucose meters based on rolling circle amplification coupled with nicking enzyme signal amplification, *Analytica Chimica Acta*. 1060 (2019) 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.01.061>.
- [75] E.-H. Yoo, S.-Y. Lee, Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice, *Sensors*. 10 (2010) 4558–4576. <https://doi.org/10.3390/s100504558>.
- [76] K. Tonyushkina, J.H. Nichols, Glucose Meters: A Review of Technical Challenges to Obtaining Accurate Results, *Journal of Diabetes Science and Technology*. 3 (2009) 971–980. <https://doi.org/10.1177/193229680900300446>.
- [77] Y. Xiang, Y. Lu, Using personal glucose meters and functional, 3 (2011) 697–703. <https://doi.org/10.1038/nchem.1092>.
- [78] T. Lan, Y. Xiang, Y. Lu, Detection of Protein Biomarker Using a Blood Glucose Meter, in: *Mobile Health Technologies: Methods and Protocols*, 2015: pp. 99–109. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2172-0_7.
- [79] T. Wu, Y. Yang, Y. Cao, Y. Song, L. Xu, X. Zhang, S. Wang, Bioinspired DNA-Inorganic Hybrid Nanoflowers Combined with a Personal Glucose Meter for On-Site Detection of MiRNA, (2018). <https://doi.org/10.1021/acsami.8b15917>.
- [80] S. Velasco-Lozano, F. López-Gallego, J.C. Mateos-Díaz, E. Favela-Torres, Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review, *Biocatalysis*. 1 (2016). <https://doi.org/10.1515/boca-2015-0012>.
- [81] L. Cao, L. van Langen, R.A. Sheldon, Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?, *Current Opinion in Biotechnology*. 14 (2003) 387–394. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00096-X).
- [82] S. Talekar, V. Ghodake, T. Ghotage, P. Rathod, P. Deshmukh, S. Nadar, M. Mulla, M. Ladole, Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase, *Bioresource Technology*. 123 (2012) 542–547. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.044>.
- [83] S.N. Topkaya, A.E. Cetin, Investigation of Metal Ion Effect on Specific DNA Sequences and DNA Hybridization, *Electroanalysis*. 32 (2020) 112–118. <https://doi.org/10.1002/elan.201900391>.
- [84] G.-Y. Li, R.-L. Guan, L.-N. Ji, H. Chao, DNA condensation induced by metal complexes, *Coordination Chemistry Reviews*. 281 (2014) 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.09.005>.
- [85] J.-L. Jia, B. Xi, S.-Y. Ran, Direct Evidence of Divalent Manganese Ion-Induced DNA Condensation at Room Temperature, *Macromolecular Chemistry and Physics*. 217 (2016) 1629–1635. <https://doi.org/10.1002/macp.201600123>.
- [86] D.R. Jacobson, O.A. Saleh, Counting the ions surrounding nucleic acids, *Nucleic Acids Research*. (2016) gkw1305. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1305>.
- [87] W.-Y. Jiang, S.-Y. Ran, Two-stage DNA compaction induced by silver ions suggests a cooperative binding mechanism, *The Journal of Chemical Physics*. 148 (2018) 205102.

<https://doi.org/10.1063/1.5025348>.

- [88] W. Zhou, R. Saran, J. Liu, Metal Sensing by DNA, *Chemical Reviews*. 117 (2017) 8272–8325. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00063>.
- [89] I.L. Volkov, A. Smirnova, A.A. Makarova, Z. V. Reveguk, R.R. Ramazanov, D.Y. Usachov, V.K. Adamchuk, A.I. Kononov, DNA with Ionic, Atomic, and Clustered Silver: An XPS Study, *Journal of Physical Chemistry B*. 121 (2017) 2400–2406. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b11218>.
- [90] M. Daune, C.A. Dekker, H.K. Schachman, Complexes of silver ion with natural and synthetic polynucleotides, *Biopolymers*. 4 (1966) 51–76. <https://doi.org/10.1002/bip.1966.360040107>.
- [91] D.A. Maksimov, V.A. Pomogaev, A.I. Kononov, Excitation spectra of Ag⁺–DNA bases complexes: A benchmark study, *Chemical Physics Letters*. 673 (2017) 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2017.01.074>.
- [92] M. Fortino, T. Marino, N. Russo, Theoretical Study of Silver-Ion-Mediated Base Pairs: The Case of C–Ag–C and C–Ag–A Systems, *The Journal of Physical Chemistry A*. 119 (2015) 5153–5157. <https://doi.org/10.1021/jp5096739>.
- [93] J. Ambia-Garrido, A. Vainrub, B.M. Pettitt, A model for structure and thermodynamics of ssDNA and dsDNA near a surface: A coarse grained approach, *Computer Physics Communications*. 181 (2010) 2001–2007. <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2010.08.029>.
- [94] Y. Zheng, C. Yang, F. Yang, X. Yang, Real-time study of interactions between cytosine-cytosine pairs in DNA oligonucleotides and silver ions using dual polarization interferometry, *Analytical Chemistry*. 86 (2014) 3849–3855. <https://doi.org/10.1021/ac403992r>.
- [95] Y. Shan, Y. Zhang, W. Kang, B. Wang, J. Li, X. Wu, S. Wang, F. Liu, Quantitative and selective DNA detection with portable personal glucose meter using loop-based DNA competitive hybridization strategy, *Sensors and Actuators B: Chemical*. 282 (2019) 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.062>.
- [96] T.R. Lakshmanan, International Institute for Applied Systems Analysis, *The Professional Geographer*. 35 (1983) 354–354. <https://doi.org/10.1111/j.0033-0124.1983.00354.x>.
- [97] V. Kumar, A. Bhalla, A.S. Rathore, Design of experiments applications in bioprocessing: Concepts and approach, *Biotechnology Progress*. 30 (2014) 86–99. <https://doi.org/10.1002/btpr.1821>.
- [98] G.L. Andrews, R.A. Dean, A.M. Hawkrigde, D.C. Muddiman, Improving proteome coverage on a LTQ-orbitrap using design of experiments, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 22 (2011) 773–783. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0075-2>.
- [99] L. Aydin, H.S. Artem, S. Oterkus, *Designing Engineering Structures Using Stochastic Optimization Methods*, CRC Press, 2020. <https://doi.org/10.1201/9780429289576>.
- [100] S. Ozturk, L. Aydin, E. Celik, A comprehensive study on slicing processes optimization of silicon ingot for photovoltaic applications, *Solar Energy*. 161 (2018) 109–124. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2017.12.040>.
- [101] İ. Polatoğlu, L. Aydın, B.Ç. Nevruz, S. Özer, A Novel Approach for the Optimal Design of a Biosensor, *Analytical Letters*. 53 (2020) 1428–1445. <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1709075>.
- [102] İ. Polatoğlu, L. Aydın, A new design strategy with stochastic optimization on the preparation of magnetite cross-linked tyrosinase aggregates (MCLTA), *Process Biochemistry*. 99 (2020) 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.019>.
- [103] İ. Polatoğlu, L. Aydın, B.Ç. Nevruz, S. Özer, A Novel Approach for the Optimal Design of a Biosensor, *Analytical Letters*. 53 (2020) 1428–1445. <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1709075>.
- [104] M.Y. ÖZSAĞLAM, M. ÇUNKAŞ, Particle Swarm Optimization Algorithm for Solving Optimization Problems, *Politeknik Dergisi*. 11 (2008) 299–305. <http://dergipark.gov.tr/politeknik/issue/33033/367241>.
- [105] M. Akçair, M. Savran, L. Aydın, O. Ayakdaş, Optimum design of anti-buckling behavior of graphite / epoxy laminated composites by differential evolution and simulated annealing method To cite this article Akçair M , Savran M , Aydın L , Ayakdaş O , Öztürk S ,

Küçükdoğan N . Optimum design of anti- O, (2019).

- [106] D. Bagal-Kestwal, M.S. Karve, B. Kakade, V.K. Pillai, Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of heavy metal ions in aqueous system: Application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's sensitivity, *Biosensors and Bioelectronics*. 24 (2008) 657–664. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.06.027>.
- [107] H. Hargono, B. Jos, A. Abdullah, T. Riyanto, Inhibition effect of Ca^{2+} ions on sucrose hydrolysis using invertase, *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*. 14 (2019) 646–653. <https://doi.org/10.9767/bcrec.14.3.4437.646-653>.
- [108] C. Sirisatesuwon, B. Ninchan, K. Siroth, Effects of Inhibitors on Kinetic Properties of Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*, *Sugar Tech*. 22 (2020) 274–283. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00757-2>.
- [109] O.O. Soldatkin, I.S. Kucherenko, V.M. Pyeshkova, A.L. Kukla, N. Jaffrezic-Renault, A.V. El'skaya, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions, *Bioelectrochemistry*. 83 (2012) 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2011.08.001>.
- [110] B.K. Sodipo, A.A. Aziz, A sonochemical approach to the direct surface functionalization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with (3-aminopropyl)triethoxysilane, *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 5 (2014) 1472–1476. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.160>.
- [111] A.K. Bordbar, A.A. Rastegari, R. Amiri, E. Ranjbakhsh, M. Abbasi, A.R. Khosropour, Characterization of Modified Magnetite Nanoparticles for Albumin Immobilization, *Biotechnology Research International*. 2014 (2014) 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/705068>.
- [112] S. Sundar, R. Mariappan, S. Piraman, Synthesis and characterization of amine modified magnetite nanoparticles as carriers of curcumin-anticancer drug, *Powder Technology*. 266 (2014) 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.06.033>.
- [113] S. D., C.B.N. K., P.N. K., M.R. M., R. kumar G., S. B., K. G., A.B. A., Structural Characterization and Dielectric Studies of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, *Journal of the Korean Ceramic Society*. 55 (2018) 230–238. <https://doi.org/10.4191/kcers.2018.55.3.02>.
- [114] D. Leo, V. Alfredo, R. Villegas, E. Hernandez, S. Perez, L. Angelica, H. Ayala, B. Landeros, Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles for photocatalysis of nitrobenzene, (2020) 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2019.12.004>.
- [115] M. Yamaura, R.. Camilo, L.. Sampaio, M.. Macêdo, M. Nakamura, H.. Toma, Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 279 (2004) 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2004.01.094>.
- [116] F. Hosseini, M. Sadjadi, N. Farhadyar, Fe_3O_4 nanoparticles modified with APTES as the carrier for (+)-(S)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl) propanoic acid (Naproxen) and (RS) 2-(3-benzoylphenyl)-propionic acid (Ketoprofen) drug, *Oriental Journal of Chemistry*. 30 (2014) 1609–1618. <https://doi.org/10.13005/ojc/300420>.
- [117] K. Can, M. Ozmen, M. Ersoz, Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 71 (2009) 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.01.021>.
- [118] B. Saif, C. Wang, D. Chuan, S. Shuang, Synthesis and Characterization of Fe_3O_4 Coated on APTES as Carriers for Morin-Anticancer Drug, (2015) 267–275.
- [119] G. Li, Y. Jiang, K. Huang, P. Ding, J. Chen, Preparation and properties of magnetic Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles, *Journal of Alloys and Compounds*. 466 (2008) 451–456. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2007.11.100>.
- [120] W.M. Daoush, Co-Precipitation and Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles for Potential Biomedical Applications, *Journal of Nanomedicine Research*. 5 (2017) 3–8. <https://doi.org/10.15406/jnmr.2017.05.00118>.
- [121] G.M. Matei, S. Matei, A. Matei, Invertase Production by Fungi , Characterization of Enzyme Activity and Kinetic Parameters, (2017). <https://doi.org/10.37358/RC.17.10.5856>.
- [122] K. Uzun, E. Çevik, M. Şenel, H. Sözeri, A. Baykal, M.F. Abasıyanık, M.S. Toprak, Covalent

immobilization of invertase on PAMAM-dendrimer modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research*. 12 (2010) 3057–3067.
<https://doi.org/10.1007/s11051-010-9902-9>.

- [123] S. Kul, INTERPRETATION OF STATISTICAL RESULTS: WHAT IS P VALUE AND CONFIDENCE INTERVAL?, *Plevra Bulteni*. 8 (2014) 11–13.
<https://doi.org/10.5152/pb.2014.003>.

- [124] A. Gebregeorgis, C. Bhan, O. Wilson, D. Raghavan, Characterization of Silver/Bovine Serum Albumin (Ag/BSA) nanoparticles structure: Morphological, compositional, and interaction studies, *Journal of Colloid and Interface Science*. 389 (2013) 31–41.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.08.041>.



EK A.1 MCLIA aktivitesi için Nöro-regresyon modelleri

$$L_1 = 830.064 + 50.3331 x_1 + 53.135 x_2 - 208.596 x_3 + 18.9825 x_4 + 14.7622 x_5$$

$$L_2 = 918.878 + 26.2342 x_1 + 46.1078 x_2 - 226.271 x_3 + 18.4608 x_4 + 16.6149 x_5$$

$$LR_1 = (-42132 + 2027.78 x_1 + 4980.45 x_2 - 6269.19 x_3 + 2416.52 x_4 + 1941.2 x_5) / (-63.8351 + 2.06076 x_1 + 1.00003 x_2 + 16.1832 x_3 + 0.748839 x_4 + 0.846378 x_5)$$

$$LR_2 = (-4935.92 - 1489.63 x_1 + 1203.44 x_2 - 1984.68 x_3 + 465.586 x_4 + 488.622 x_5) / (-12.32 - 0.942096 x_1 + 0.525003 x_2 + 3.30602 x_3 + 0.107971 x_4 + 0.229403 x_5)$$

$$SON_1 = -4461.7 + 122.102 x_1 - 184.754 x_1^2 - 52.9484 x_2 - 20.2175 x_1 x_2 - 4.04187 x_2^2 + 811.216 x_3 + 35.064 x_1 x_3 + 13.1836 x_2 x_3 - 58.8619 x_3^2 + 140.941 x_4 - 5.07544 x_1 x_4 + 0.823764 x_2 x_4 - 8.50537 x_3 x_4 - 0.786239 x_4^2 + 27.5217 x_5 + 6.40291 x_1 x_5 + 0.31422 x_2 x_5 - 0.0969396 x_3 x_5 - 0.278492 x_4 x_5 - 0.149504 x_5^2$$

$$SON_2 = -4587.58 - 232.841 x_1 + 34.6164 x_1^2 - 40.3138 x_2 + 0.761917 x_1 x_2 - 5.08397 x_2^2 + 924.794 x_3 + 17.7616 x_1 x_3 + 13.4188 x_2 x_3 - 70.7352 x_3^2 + 146.117 x_4 - 10.4453 x_1 x_4 + 0.94667 x_2 x_4 - 8.73983 x_3 x_4 - 0.775304 x_4^2 + 14.2704 x_5 + 15.0974 x_1 x_5 - 0.714991 x_2 x_5 + 0.776805 x_3 x_5 - 0.303074 x_4 x_5 - 0.0171969 x_5^2$$

$$SONR_1 = (143698. + 1.02517(10^6) x_1 + 294633. x_1^2 + 1.19671*10^6 x_2 + 1.21226*10^6 x_1 x_2 + 1.58394*10^6 x_2^2 + 6.23056*10^6 x_3 + 8.36748*10^6 x_1 x_3 + 1.46615*10^7 x_2 x_3 + 1.08428*10^7 x_3^2 + 1.92111*10^7 x_4 + 2.64507*10^7 x_1 x_4 + 6.48655*10^7 x_2 x_4 + 1.73261*10^8 x_3 x_4 + 4.75075*10^7 x_4^2 + 2.05416*10^7 x_5 + 3.93082*10^7 x_1 x_5 - 1.16101*10^7 x_2 x_5 + 1.559*10^8 x_3 x_5 - 6.02943*10^7 x_4 x_5 - 2.25517*10^7 x_5^2) / (5.44129*10^7 + 8.3731*10^7 x_1 + 1.92841*10^6 x_1^2 + 1.83055*10^7 x_2 - 577977. x_1 x_2 - 261745. x_2^2 - 2.95072*10^7 x_3 - 1.54785*10^7 x_1 x_3 - 2.30077*10^6 x_2 x_3 + 7.91345*10^6 x_3^2 - 1.98631*10^6 x_4 - 692080. x_1 x_4 - 76237.5 x_2 x_4 + 555963. x_3 x_4 + 18665.3 x_4^2 + 719542. x_5 + 1.00622*10^6 x_1 x_5 + 32974.3 x_2 x_5 - 1.27192*10^6 x_3 x_5 - 10551.2 x_4 x_5 + 41592.3 x_5^2)$$

$$TON_1 = -17.1068 - 1544.99 x_1 - 1386.72 x_1^2 - 822.543 x_1^3 - 244.237 x_2 + 1086.64 x_1 x_2 - 189.874 x_1^2 x_2 - 28.0518 x_2^2 - 72.5835 x_1 x_2^2 + 0.785269 x_2^3 - 76.4996 x_3 - 89.0139 x_1 x_3 + 565.981 x_1^2 x_3 + 47.6023 x_2 x_3 - 82.1181 x_1 x_2 x_3 + 18.2321 x_2^2 x_3 - 5.57344 x_3^2 - 18.7137 x_1 x_3^2 - 7.54899 x_2 x_3^2 + 1.58633 x_3^3 + 26.904 x_4 - 3.75821 x_1 x_4 + 42.6866 x_1^2 x_4 + 1.07767 x_2 x_4 - 1.49159 x_1 x_2 x_4 - 1.96761 x_2^2 x_4 + 2.56357 x_3 x_4 + 6.59581 x_1 x_3 x_4 - 0.507546 x_2 x_3 x_4 - 0.679314 x_3^2 x_4 + 0.446826 x_4^2 - 0.515176 x_1 x_4^2 + 0.182303 x_2 x_4^2 - 0.0261485 x_3 x_4^2 - 0.00219663 x_4^3 + 7.21396 x_5 + 90.386 x_1 x_5 - 62.2336 x_1^2 x_5 - 5.98477 x_2 x_5 + 4.31667 x_1 x_2 x_5 - 0.634127 x_2^2 x_5 + 3.598 x_3 x_5 - 7.38977 x_1 x_3 x_5 - 0.201046 x_2 x_3 x_5 - 0.48452 x_3^2 x_5 + 1.06006 x_4 x_5 - 1.57655 x_1 x_4 x_5 + 0.169045 x_2 x_4 x_5 + 0.142462 x_3 x_4 x_5 - 0.0394191 x_4^2 x_5 - 0.12295 x_5^2 + 1.12467 x_1 x_5^2 + 0.0988074 x_2 x_5^2 + 0.0132233 x_3 x_5^2 + 0.00263237 x_4 x_5^2 - 0.0120278 x_5^3$$

$$TON_2 = 228.684 - 1828.33 x_1 - 1262.41 x_1^2 - 159.433 x_1^3 - 309.32 x_2 + 1360.87 x_1 x_2 - 282.886 x_1^2 x_2 - 27.8749 x_2^2 - 88.3112 x_1 x_2^2 + 4.5973 x_2^3 - 87.7087 x_3 - 148.278 x_1 x_3 + 502.241 x_1^2 x_3 + 52.5202 x_2 x_3 - 117.935 x_1 x_2 x_3 + 21.1939 x_2^2 x_3 - 8.34032 x_3^2 - 10.0919 x_1 x_3^2 - 8.337 x_2 x_3^2 + 1.67437 x_3^3 + 30.1866 x_4 - 34.1294 x_1 x_4 + 44.1165 x_1^2 x_4 + 0.365616 x_2 x_4 - 0.0121932 x_1 x_2 x_4 - 2.9458 x_2^2 x_4 + 3.88638 x_3 x_4 + 11.0736 x_1 x_3 x_4 - 0.61134 x_2 x_3 x_4 - 0.7642 x_3^2 x_4 + 0.421244 x_4^2 - 0.511372 x_1 x_4^2 + 0.280811 x_2 x_4^2 - 0.0286174 x_3 x_4^2 - 0.00464629 x_4^3 + 3.34791 x_5 + 100.485 x_1 x_5 - 81.6225 x_1^2 x_5 - 7.36722 x_2 x_5 + 9.30897 x_1 x_2 x_5 - 1.0818 x_2^2 x_5 + 3.78474 x_3 x_5 - 6.11864 x_1 x_3 x_5 - 0.216193 x_2 x_3 x_5 - 0.769298 x_3^2 x_5 + 1.30012 x_4 x_5 - 2.07347 x_1 x_4 x_5 + 0.199697 x_2$$

$$x_4 x_5 + 0.145426 x_3 x_4 x_5 - 0.0392859 x_4^2 x_5 - 0.187401 x_5^2 + 1.28143 x_1 x_5^2 + 0.0951948 x_2 x_5^2 + 0.0559736 x_3 x_5^2 - 0.00224629 x_4 x_5^2 - 0.0105107 x_5^3$$

$$\begin{aligned} \text{TONR}_1 = & (0.964372 + 2.80824 x_1 + 2.72115 x_1^2 + 0.959558 x_1^3 + 3.24818 x_2 + 4.46749 x_1 x_2 + 2.09027 x_1^2 x_2 + 6.19991 x_2^2 + 1.02663 x_1 x_2^2 + 3.03124 x_2^3 + 2.60355 x_3 + 5.99134 x_1 x_3 + 2.47507 x_1^2 x_3 + 31.1378 x_2 x_3 + 6.06365 x_1 x_2 x_3 + 35.7418 x_2^2 x_3 + 10.2372 x_3^2 + 9.60737 x_1 x_3^2 + 69.3722 x_2 x_3^2 + 12.9015 x_3^3 - 0.608254 x_4 - 5.60345 x_1 x_4 - 1.30836 x_1^2 x_4 + 45.7863 x_2 x_4 - 17.9312 x_1 x_2 x_4 + 59.824 x_2^2 x_4 + 49.4449 x_3 x_4 + 10.3781 x_1 x_3 x_4 + 523.163 x_2 x_3 x_4 + 263.702 x_3^2 x_4 - 40.5946 x_4^2 - 103.049 x_1 x_4^2 + 111.501 x_2 x_4^2 + 303.983 x_3 x_4^2 - 371.435 x_4^3 + 2.60839 x_5 + 6.90062 x_1 x_5 - 0.494101 x_1^2 x_5 + 48.1688 x_2 x_5 + 0.552804 x_1 x_2 x_5 + 45.3181 x_2^2 x_5 + 115.453 x_3 x_5 + 97.3568 x_1 x_3 x_5 + 506.565 x_2 x_3 x_5 + 313.911 x_3^2 x_5 + 76.3831 x_4 x_5 - 34.6942 x_1 x_4 x_5 + 495.081 x_2 x_4 x_5 + 2121.19 x_3 x_4 x_5 - 578.309 x_4^2 x_5 + 97.9205 x_5^2 + 69.0273 x_1 x_5^2 + 186.68 x_2 x_5^2 + 1037.93 x_3 x_5^2 + 643.729 x_4 x_5^2 + 336.423 x_5^3) / (18.9219 + 66.4876 x_1 + 103.342 x_1^2 + 16.7292 x_1^3 + 153.347 x_2 + 168.462 x_1 x_2 + 350.888 x_1^2 x_2 + 233.758 x_2^2 + 883.84 x_1 x_2^2 + 116.367 x_2^3 + 433.738 x_3 + 291.307 x_1 x_3 + 334.009 x_1^2 x_3 - 279.888 x_2 x_3 + 2170.41 x_1 x_2 x_3 + 1579.97 x_2^2 x_3 + 548.75 x_3^2 - 719.155 x_1 x_3^2 - 477.719 x_2 x_3^2 - 115.38 x_3^3 + 1624.78 x_4 + 210.909 x_1 x_4 + 1128.75 x_1^2 x_4 - 1326.24 x_2 x_4 - 2878.33 x_1 x_2 x_4 + 199.017 x_2^2 x_4 + 479.95 x_3 x_4 - 464.807 x_1 x_3 x_4 + 405.24 x_2 x_3 x_4 - 499.18 x_3^2 x_4 - 475.158 x_4^2 - 43.0619 x_1 x_4^2 + 10.855 x_2 x_4^2 + 17.6435 x_3 x_4^2 + 6.26111 x_4^3 + 1327.52 x_5 + 848.882 x_1 x_5 + 3002.93 x_1^2 x_5 + 1660.68 x_2 x_5 + 2349.34 x_1 x_2 x_5 - 810.413 x_2^2 x_5 - 4941.1 x_3 x_5 - 940.296 x_1 x_3 x_5 - 671.692 x_2 x_3 x_5 + 851.48 x_3^2 x_5 + 353.965 x_4 x_5 + 331.436 x_1 x_4 x_5 + 14.2394 x_2 x_4 x_5 + 24.3503 x_3 x_4 x_5 - 11.7787 x_4^2 x_5 + 135.71 x_5^2 - 154.976 x_1 x_5^2 + 77.4139 x_2 x_5^2 - 63.7895 x_3 x_5^2 - 1.30262 x_4 x_5^2 + 3.9702 x_5^3) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{TONR}_2 = & (156292. + 769378 x_1 + 546993 x_1^2 + 49506.5 x_1^3 + 5.66644 \cdot 10^6 x_2 + 1.46051 \cdot 10^7 x_1 x_2 + 2.99155 \cdot 10^6 x_1^2 x_2 + 2.47424 \cdot 10^7 x_2^2 + 1.65403 \cdot 10^7 x_1 x_2^2 + 1.26059 \cdot 10^7 x_2^3 + 9.08869 \cdot 10^6 x_3 + 2.12895 \cdot 10^7 x_1 x_3 + 4.018 \cdot 10^6 x_1^2 x_3 + 1.41167 \cdot 10^8 x_2 x_3 + 9.26865 \cdot 10^7 x_1 x_2 x_3 + 1.53427 \cdot 10^8 x_2^2 x_3 + 5.92712 \cdot 10^7 x_3^2 + 3.68166 \cdot 10^7 x_1 x_3^2 + 2.23977 \cdot 10^8 x_2 x_3^2 + 4.33296 \cdot 10^7 x_3^3 + 3.66266 \cdot 10^7 x_4 + 7.09545 \cdot 10^7 x_1 x_4 + 1.14591 \cdot 10^7 x_1^2 x_4 + 6.92872 \cdot 10^8 x_2 x_4 + 4.34645 \cdot 10^8 x_1 x_2 x_4 + 7.96979 \cdot 10^8 x_2^2 x_4 + 9.56704 \cdot 10^8 x_3 x_4 + 5.1744 \cdot 10^8 x_1 x_3 x_4 + 4.29621 \cdot 10^9 x_2 x_3 x_4 + 1.57731 \cdot 10^9 x_3^2 x_4 + 1.07406 \cdot 10^9 x_4^2 + 4.56496 \cdot 10^8 x_1 x_4^2 + 5.75206 \cdot 10^9 x_2 x_4^2 + 7.05672 \cdot 10^9 x_3 x_4^2 + 3.96072 \cdot 10^9 x_4^3 + 5.42866 \cdot 10^7 x_5 + 1.33346 \cdot 10^8 x_1 x_5 + 2.6069 \cdot 10^7 x_1^2 x_5 + 7.70036 \cdot 10^8 x_2 x_5 + 4.96364 \cdot 10^8 x_1 x_2 x_5 + 8.22268 \cdot 10^8 x_2^2 x_5 + 1.36884 \cdot 10^9 x_3 x_5 + 8.75651 \cdot 10^8 x_1 x_3 x_5 + 4.78555 \cdot 10^9 x_2 x_3 x_5 + 2.18413 \cdot 10^9 x_3^2 x_5 + 6.13889 \cdot 10^9 x_4 x_5 + 3.56023 \cdot 10^9 x_1 x_4 x_5 + 2.41287 \cdot 10^{10} x_2 x_4 x_5 + 3.83533 \cdot 10^{10} x_3 x_4 x_5 + 4.82907 \cdot 10^{10} x_4^2 x_5 + 2.12777 \cdot 10^9 x_5^2 + 1.37572 \cdot 10^9 x_1 x_5^2 + 7.13314 \cdot 10^9 x_2 x_5^2 + 1.32667 \cdot 10^{10} x_3 x_5^2 + 6.1447 \cdot 10^{10} x_4 x_5^2 + 9.51382 \cdot 10^9 x_5^3) / (2.41539 \cdot 10^6 + 3.54807 \cdot 10^7 x_1 + 4.75351 \cdot 10^7 x_1^2 + 6.16995 \cdot 10^6 x_1^3 + 2.54547 \cdot 10^7 x_2 + 1.16074 \cdot 10^8 x_1 x_2 + 5.07707 \cdot 10^7 x_1^2 x_2 - 1.81319 \cdot 10^8 x_2^2 - 1.12869 \cdot 10^8 x_1 x_2^2 - 2.10139 \cdot 10^8 x_2^3 + 1.14771 \cdot 10^8 x_3 + 6.07162 \cdot 10^8 x_1 x_3 + 2.10501 \cdot 10^8 x_1^2 x_3 + 8.87762 \cdot 10^7 x_2 x_3 + 3.28091 \cdot 10^8 x_1 x_2 x_3 - 2.34512 \cdot 10^9 x_2^2 x_3 + 9.53972 \cdot 10^8 x_3^2 + 6.71224 \cdot 10^8 x_1 x_3^2 + 2.82294 \cdot 10^8 x_2 x_3^2 + 1.10728 \cdot 10^9 x_3^3 + 3.87596 \cdot 10^8 x_4 + 3.00709 \cdot 10^9 x_1 x_4 + 1.05073 \cdot 10^9 x_1^2 x_4 + 2.56535 \cdot 10^9 x_2 x_4 + 1.42105 \cdot 10^9 x_1 x_2 x_4 - 1.00762 \cdot 10^{10} x_2^2 x_4 + 7.24112 \cdot 10^9 x_3 x_4 + 1.00599 \cdot 10^{10} x_1 x_3 x_4 - 4.08779 \cdot 10^9 x_2 x_3 x_4 + 1.97497 \cdot 10^{10} x_3^2 x_4 + 5.37527 \cdot 10^9 x_4^2 + 2.17211 \cdot 10^{10} x_1 x_4^2 + 5.25128 \cdot 10^{10} x_2 x_4^2 + 3.88058 \cdot 10^9 x_3 x_4^2 - 1.32843 \cdot 10^9 x_4^3 + 8.64638 \cdot 10^7 x_5 + 1.32915 \cdot 10^9 x_1 x_5 + 7.13315 \cdot 10^8 x_1^2 x_5 + 1.12191 \cdot 10^9 x_2 x_5 - 2.54131 \cdot 10^9 x_1 x_2 x_5 - 8.98733 \cdot 10^9 x_2^2 x_5 + 1.24617 \cdot 10^9 x_3 x_5 + 2.40274 \cdot 10^9 x_1 x_3 x_5 - 1.33244 \cdot 10^{10} x_2 x_3 x_5 + 1.38404 \cdot 10^{10} x_3^2 x_5 - 1.02945 \cdot 10^{10} x_4 x_5^2) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& x_5 - 1.339 \cdot 10^{10} x_1 x_4 x_5 - 7.80824 \cdot 10^{10} x_2 x_4 x_5 - 1.33158 \cdot 10^{10} x_3 x_4 x_5 - 2.88709 \cdot 10^9 x_4^2 x_5 - 2.74307 \cdot 10^9 x_5^2 - 1.04993 \cdot 10^{10} x_1 x_5^2 + 2.83867 \cdot 10^{10} x_2 x_5^2 + 2.97816 \cdot 10^9 x_3 x_5^2 + 7.20762 \cdot 10^9 x_4 x_5^2 - 2.29673 \cdot 10^9 x_5^3) \\
& \mathbf{SinTN}_1 = 800.209 + 35.1549 \sin[x_1] - 137.056 \sin[x_2] - 248.836 \sin[x_3] - 385.948 \sin[x_4] + 26.1794 \sin[x_5] \\
& \mathbf{SinTN}_2 = 96.86 - 2.63645 \sin[x_1] - 125.008 \sin[x_2] - 270.295 \sin[x_3] - 373.621 \sin[x_4] + 42.5269 \sin[x_5] \\
& \mathbf{SOSinTN}_1 = 177.822 + 1008.1 \sin[x_1] - 738.826 \sin[x_1]^2 - 49.2434 \sin[x_2] + 12.3748 \sin[x_1] \sin[x_2] - 5.70599 \sin[x_2]^2 - 289.473 \sin[x_3] + 7.86005 \sin[x_1] \sin[x_3] - 33.9001 \sin[x_2] \sin[x_3] - 236.844 \sin[x_3]^2 - 54.6897 \sin[x_4] + 183.449 \sin[x_1] \sin[x_4] + 60.4481 \sin[x_2] \sin[x_4] + 254.808 \sin[x_3] \sin[x_4] - 1017.74 \sin[x_4]^2 + 278.626 \sin[x_5] - 60.8518 \sin[x_1] \sin[x_5] - 86.9449 \sin[x_2] \sin[x_5] - 6.05116 \sin[x_3] \sin[x_5] + 102.66 \sin[x_4] \sin[x_5] + 1106.97 \sin[x_5]^2 \\
& \mathbf{SOSinTN}_2 = 156.721 + 726.872 \sin[x_1] - 470.989 \sin[x_1]^2 + 26.3226 \sin[x_2] - 59.3028 \sin[x_1] \sin[x_2] + 19.2319 \sin[x_2]^2 - 309.549 \sin[x_3] - 18.7499 \sin[x_1] \sin[x_3] - 47.2463 \sin[x_2] \sin[x_3] - 278.07 \sin[x_3]^2 - 106.163 \sin[x_4] + 366.185 \sin[x_1] \sin[x_4] + 32.1623 \sin[x_2] \sin[x_4] + 273.479 \sin[x_3] \sin[x_4] - 1139.56 \sin[x_4]^2 + 324.376 \sin[x_5] - 70.3496 \sin[x_1] \sin[x_5] - 97.7536 \sin[x_2] \sin[x_5] + 20.9806 \sin[x_3] \sin[x_5] + 152.303 \sin[x_4] \sin[x_5] + 1238.58 \sin[x_5]^2 \\
& \mathbf{FOTN}_1 = -596.17 + 1090.81 \cos[x_1] - 2.44947 \cos[x_2] + 208.802 \cos[x_3] + 92.3545 \cos[x_4] + 350.857 \cos[x_5] + 860.253 \sin[x_1] - 110.002 \sin[x_2] - 254.222 \sin[x_3] - 444.361 \sin[x_4] + 41.4186 \sin[x_5] \\
& \mathbf{FOTN}_2 = -237.77 + 753.625 \cos[x_1] + 5.9588 \cos[x_2] + 243.631 \cos[x_3] + 102.432 \cos[x_4] + 390.185 \cos[x_5] + 608.502 \sin[x_1] - 89.8494 \sin[x_2] - 277.328 \sin[x_3] - 441.769 \sin[x_4] + 58.8856 \sin[x_5] \\
& \mathbf{SOTN}_1 = 68.1684 + 91.8516 \cos[x_1] + 103.735 \cos[x_1]^2 - 62.6574 \cos[x_2] - 83.9162 \cos[x_1] \cos[x_2] + 131.296 \cos[x_2]^2 + 86.7995 \cos[x_3] + 45.4186 \cos[x_1] \cos[x_3] + 133.5 \cos[x_2] \cos[x_3] + 72.3992 \cos[x_3]^2 + 53.9677 \cos[x_4] + 58.6641 \cos[x_1] \cos[x_4] - 0.292059 \cos[x_2] \cos[x_4] - 63.3434 \cos[x_3] \cos[x_4] + 139.916 \cos[x_4]^2 + 59.5111 \cos[x_5] + 119.168 \cos[x_1] \cos[x_5] + 53.6194 \cos[x_2] \cos[x_5] + 161.093 \cos[x_3] \cos[x_5] - 212.572 \cos[x_4] \cos[x_5] + 97.9569 \cos[x_5]^2 + 95.6009 \sin[x_1] + 191.83 \cos[x_1] \sin[x_1] + 51.1776 \cos[x_2] \sin[x_1] + 306.19 \cos[x_3] \sin[x_1] + 17.0181 \cos[x_4] \sin[x_1] + 144.293 \cos[x_5] \sin[x_1] + 87.8262 \sin[x_1]^2 - 9.97392 \sin[x_2] - 20.1453 \cos[x_1] \sin[x_2] - 60.4652 \cos[x_2] \sin[x_2] - 65.1107 \cos[x_3] \sin[x_2] - 120.032 \cos[x_4] \sin[x_2] - 127.665 \cos[x_5] \sin[x_2] + 23.6297 \sin[x_1] \sin[x_2] + 55.8644 \sin[x_2]^2 - 61.9063 \sin[x_3] - 85.9518 \cos[x_1] \sin[x_3] - 13.4055 \cos[x_2] \sin[x_3] - 145.629 \cos[x_3] \sin[x_3] - 85.652 \cos[x_4] \sin[x_3] - 105.294 \cos[x_5] \sin[x_3] - 105.865 \sin[x_1] \sin[x_3] - 18.3618 \sin[x_2] \sin[x_3] + 76.937 \sin[x_3]^2 - 89.5823 \sin[x_4] - 106.891 \cos[x_1] \sin[x_4] + 37.9987 \cos[x_2] \sin[x_4] - 61.7623 \cos[x_3] \sin[x_4] - 88.9339 \cos[x_4] \sin[x_4] + 121.02 \cos[x_5] \sin[x_4] - 318.148 \sin[x_1] \sin[x_4] + 113.133 \sin[x_2] \sin[x_4] + 204.999 \sin[x_3] \sin[x_4] - 5.00315 \sin[x_4]^2 - 1.64633 \sin[x_5] - 76.268 \cos[x_1] \sin[x_5] + 67.6006 \cos[x_2] \sin[x_5] + 8.33606 \cos[x_3] \sin[x_5] + 17.8117 \cos[x_4] \sin[x_5] + 40.2488 \cos[x_5] \sin[x_5] + 126.816 \sin[x_1] \sin[x_5] - 48.6991 \sin[x_2] \sin[x_5] - 30.9881 \sin[x_3] \sin[x_5] - 3.58065 \sin[x_4] \sin[x_5] + 99.2301 \sin[x_5]^2 \\
& \mathbf{SOTN}_2 = 68.8446 + 88.2173 \cos[x_1] + 101.889 \cos[x_1]^2 - 64.2667 \cos[x_2] - 98.1228 \cos[x_1] \cos[x_2] + 135.061 \cos[x_2]^2 + 97.947 \cos[x_3] + 44.1848 \cos[x_1] \cos[x_3] + 173.349 \cos[x_2] \cos[x_3] + 81.5993 \cos[x_3]^2 + 61.9274 \cos[x_4] + 57.9455 \cos[x_1] \cos[x_4] - 33.7663 \cos[x_2] \cos[x_4] - 116.047 \cos[x_3] \cos[x_4] + 142.019 \cos[x_4]^2 + 58.7107 \cos[x_5] + 106.548 \cos[x_1] \cos[x_5] + 89.8178 \cos[x_2] \cos[x_5] + 194.394 \cos[x_3] \cos[x_5] - 201.366 \cos[x_4] \cos[x_5] + 98.5138 \cos[x_5]^2 + 81.9726 \sin[x_1] +
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& 125.723 \cos[x_1] \sin[x_1] + 42.0851 \cos[x_2] \sin[x_1] + 306.69 \cos[x_3] \sin[x_1] + 43.9488 \\
& \cos[x_4] \sin[x_1] + 208.592 \cos[x_5] \sin[x_1] + 95.2762 \sin[x_1]^2 - 5.10015 \sin[x_2] + \\
& 4.21913 \cos[x_1] \sin[x_2] - 51.6848 \cos[x_2] \sin[x_2] - 19.6593 \cos[x_3] \sin[x_2] - 150.853 \\
& \cos[x_4] \sin[x_2] - 137.162 \cos[x_5] \sin[x_2] - 17.8711 \sin[x_1] \sin[x_2] + 54.7651 \sin[x_2]^2 - \\
& 71.5816 \sin[x_3] - 71.7857 \cos[x_1] \sin[x_3] - 10.6759 \cos[x_2] \sin[x_3] - 125.746 \cos[x_3] \\
& \sin[x_3] - 89.6628 \cos[x_4] \sin[x_3] - 104.895 \cos[x_5] \sin[x_3] - 172.327 \sin[x_1] \sin[x_3] \\
& - 12.9503 \sin[x_2] \sin[x_3] + 71.8442 \sin[x_3]^2 - 89.7214 \sin[x_4] - 144.986 \cos[x_1] \\
& \sin[x_4] + 60.892 \cos[x_2] \sin[x_4] - 65.5589 \cos[x_3] \sin[x_4] - 103. \cos[x_4] \sin[x_4] + \\
& 129.274 \cos[x_5] \sin[x_4] - 256.683 \sin[x_1] \sin[x_4] + 100.611 \sin[x_2] \sin[x_4] + 203.087 \\
& \sin[x_3] \sin[x_4] - 6.42729 \sin[x_4]^2 - 2.81595 \sin[x_5] - 92.7887 \cos[x_1] \sin[x_5] + \\
& 104.597 \cos[x_2] \sin[x_5] + 31.4045 \cos[x_3] \sin[x_5] + 22.199 \cos[x_4] \sin[x_5] + 37.8888 \\
& \cos[x_5] \sin[x_5] + 152.969 \sin[x_1] \sin[x_5] - 76.1723 \sin[x_2] \sin[x_5] - 7.1561 \sin[x_3] \\
& \sin[x_5] + 37.187 \sin[x_4] \sin[x_5] + 100.309 \sin[x_5]^2 \\
\mathbf{FOLN}_1 = & -399.753 + 37.3099 \log[x_1] + 121.536 \log[x_2] - 1276.1 \log[x_3] + 615.608 \\
& \log[x_4] + 395.484 \log[x_5] \\
\mathbf{FOLN}_2 = & -296.745 + 21.2414 \log[x_1] + 104.718 \log[x_2] - 1385.46 \log[x_3] + 594.401 \\
& \log[x_4] + 441.913 \log[x_5] \\
\mathbf{FOLNR}_1 = & (-239400. + 4631.94 \log[x_1] + 12069.4 \log[x_2] - 43825.2 \log[x_3] + \\
& 61850.6 \log[x_4] + 52274.3 \log[x_5])/(-144.702 + 2.52328 \log[x_1] + 3.02449 \log[x_2] \\
& + 88.3907 \log[x_3] + 0.567588 \log[x_4] + 23.1275 \log[x_5]) \\
\mathbf{FOLNR}_2 = & (1084.34 + 35391.9 \log[x_1] - 36562.4 \log[x_2] + 36432.3 \log[x_3] - \\
& 3184.54 \log[x_4] - 3075.95 \log[x_5])/(25.6971 + 48.6234 \log[x_1] - 48.7148 \log[x_2] + \\
& 15.338 \log[x_3] + 0.952896 \log[x_4] + 2.81696 \log[x_5]) \\
\mathbf{SOLN}_1 = & -28818. - 599.578 \log[x_1] - 56.6058 \log[x_1]^2 - 318.009 \log[x_2] - 30.991 \\
& \log[x_1] \log[x_2] + 35.9272 \log[x_2]^2 + 15325.2 \log[x_3] + 165.621 \log[x_1] \log[x_3] + \\
& 151.274 \log[x_2] \log[x_3] - 3228.6 \log[x_3]^2 + 8461.13 \log[x_4] - 98.5496 \log[x_1] \\
& \log[x_4] + 42.938 \log[x_2] \log[x_4] - 1724.06 \log[x_3] \log[x_4] - 560.971 \log[x_4]^2 + \\
& 117.503 \log[x_5] + 177.728 \log[x_1] \log[x_5] - 31.3277 \log[x_2] \log[x_5] + 385.356 \\
& \log[x_3] \log[x_5] - 231.928 \log[x_4] \log[x_5] + 72.3395 \log[x_5]^2 \\
\mathbf{SOLN}_2 = & -28095.8 - 791.13 \log[x_1] - 11.7163 \log[x_1]^2 + 77.9759 \log[x_2] - 10.0897 \\
& \log[x_1] \log[x_2] + 26.961 \log[x_2]^2 + 16663.4 \log[x_3] + 161.138 \log[x_1] \log[x_3] + \\
& 136.921 \log[x_2] \log[x_3] - 3928.73 \log[x_3]^2 + 8277.72 \log[x_4] - 181.419 \log[x_1] \\
& \log[x_4] + 21.6698 \log[x_2] \log[x_4] - 1741.28 \log[x_3] \log[x_4] - 511.822 \log[x_4]^2 - \\
& 1003.3 \log[x_5] + 328.085 \log[x_1] \log[x_5] - 116.754 \log[x_2] \log[x_5] + 705.623 \\
& \log[x_3] \log[x_5] - 269.465 \log[x_4] \log[x_5] + 207.626 \log[x_5]^2 \\
\mathbf{TOLN}_1 = & -12509.1 - 14318.1 \log[x_1] - 755.684 \log[x_1]^2 + 2553.39 \log[x_1]^3 - 2364.6 \\
& \log[x_2] + 5039.31 \log[x_1] \log[x_2] - 661.664 \log[x_1]^2 \log[x_2] - 867.654 \log[x_2]^2 - \\
& 256.48 \log[x_1] \log[x_2]^2 - 188.773 \log[x_2]^3 - 2884.98 \log[x_3] + 4902.47 \log[x_1] \\
& \log[x_3] + 2621.32 \log[x_1]^2 \log[x_3] + 5088.64 \log[x_2] \log[x_3] - 2569.58 \log[x_1] \\
& \log[x_2] \log[x_3] + 1509.46 \log[x_2]^2 \log[x_3] - 128.729 \log[x_3]^2 - 2709.3 \log[x_1] \\
& \log[x_3]^2 - 3661.06 \log[x_2] \log[x_3]^2 + 331.768 \log[x_3]^3 + 1263.07 \log[x_4] + 1317.86 \\
& \log[x_1] \log[x_4] + 680.263 \log[x_1]^2 \log[x_4] + 2671.2 \log[x_2] \log[x_4] + 81.0376 \\
& \log[x_1] \log[x_2] \log[x_4] - 788.438 \log[x_2]^2 \log[x_4] + 274.725 \log[x_3] \log[x_4] + \\
& 2309.52 \log[x_1] \log[x_3] \log[x_4] + 426.674 \log[x_2] \log[x_3] \log[x_4] - 215.443 \\
& \log[x_3]^2 \log[x_4] + 742.144 \log[x_4]^2 - 220.492 \log[x_1] \log[x_4]^2 - 348.821 \log[x_2] \\
& \log[x_4]^2 - 125.469 \log[x_3] \log[x_4]^2 + 53.5201 \log[x_4]^3 + 1398.58 \log[x_5] + 1614.89 \\
& \log[x_1] \log[x_5] - 172.192 \log[x_1]^2 \log[x_5] - 2758.12 \log[x_2] \log[x_5] - 357.987 \\
& \log[x_1] \log[x_2] \log[x_5] + 375.539 \log[x_2]^2 \log[x_5] + 1034.6 \log[x_3] \log[x_5] + \\
& 1272.47 \log[x_1] \log[x_3] \log[x_5] + 961.448 \log[x_2] \log[x_3] \log[x_5] - 77.4749 \\
& \log[x_3]^2 \log[x_5] + 473.206 \log[x_4] \log[x_5] - 879.121 \log[x_1] \log[x_4] \log[x_5] -
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& 28.2306 \text{ Log}[x_2] \text{ Log}[x_4] \text{ Log}[x_5] + 356.607 \text{ Log}[x_3] \text{ Log}[x_4] \text{ Log}[x_5] - 426.854 \\
& \text{Log}[x_4]^2 \text{ Log}[x_5] + 542.959 \text{ Log}[x_5]^2 - 207.856 \text{ Log}[x_1] \text{ Log}[x_5]^2 + 92.2824 \text{ Log}[x_2] \\
& \text{Log}[x_5]^2 - 202.612 \text{ Log}[x_3] \text{ Log}[x_5]^2 + 45.2575 \text{ Log}[x_4] \text{ Log}[x_5]^2 - 118.259 \text{ Log}[x_5]^3 \\
& \mathbf{TOLN_2} = -10659.1 - 13366.2 \text{ Log}[x_1] - 600.541 \text{ Log}[x_1]^2 + 2296.98 \text{ Log}[x_1]^3 - 2382.78 \\
& \text{Log}[x_2] + 5825.32 \text{ Log}[x_1] \text{ Log}[x_2] - 820.742 \text{ Log}[x_1]^2 \text{ Log}[x_2] - 762.758 \text{ Log}[x_2]^2 - \\
& 242.415 \text{ Log}[x_1] \text{ Log}[x_2]^2 - 63.0441 \text{ Log}[x_2]^3 - 3194.26 \text{ Log}[x_3] + 4835.76 \text{ Log}[x_1] \\
& \text{Log}[x_3] + 2614.11 \text{ Log}[x_1]^2 \text{ Log}[x_3] + 5236.06 \text{ Log}[x_2] \text{ Log}[x_3] - 3217.97 \text{ Log}[x_1] \\
& \text{Log}[x_2] \text{ Log}[x_3] + 1686.42 \text{ Log}[x_2]^2 \text{ Log}[x_3] - 424.278 \text{ Log}[x_3]^2 - 2760.99 \text{ Log}[x_1] \\
& \text{Log}[x_3]^2 - 3821.03 \text{ Log}[x_2] \text{ Log}[x_3]^2 + 375.04 \text{ Log}[x_3]^3 + 1250.99 \text{ Log}[x_4] + 972.925 \\
& \text{Log}[x_1] \text{ Log}[x_4] + 722.108 \text{ Log}[x_1]^2 \text{ Log}[x_4] + 2105.24 \text{ Log}[x_2] \text{ Log}[x_4] + 34.1951 \\
& \text{Log}[x_1] \text{ Log}[x_2] \text{ Log}[x_4] - 1081.94 \text{ Log}[x_2]^2 \text{ Log}[x_4] + 247.75 \text{ Log}[x_3] \text{ Log}[x_4] + \\
& 2454.28 \text{ Log}[x_1] \text{ Log}[x_3] \text{ Log}[x_4] + 384.34 \text{ Log}[x_2] \text{ Log}[x_3] \text{ Log}[x_4] - 163.781 \\
& \text{Log}[x_3]^2 \text{ Log}[x_4] + 669.879 \text{ Log}[x_4]^2 - 307.554 \text{ Log}[x_1] \text{ Log}[x_4]^2 - 141.355 \text{ Log}[x_2] \\
& \text{Log}[x_4]^2 - 72.9854 \text{ Log}[x_3] \text{ Log}[x_4]^2 + 37.1156 \text{ Log}[x_4]^3 + 1262.73 \text{ Log}[x_5] + 1407.01 \\
& \text{Log}[x_1] \text{ Log}[x_5] - 360.373 \text{ Log}[x_1]^2 \text{ Log}[x_5] - 2131.01 \text{ Log}[x_2] \text{ Log}[x_5] - 262.218 \\
& \text{Log}[x_1] \text{ Log}[x_2] \text{ Log}[x_5] + 472.034 \text{ Log}[x_2]^2 \text{ Log}[x_5] + 922.268 \text{ Log}[x_3] \text{ Log}[x_5] + \\
& 1466.86 \text{ Log}[x_1] \text{ Log}[x_3] \text{ Log}[x_5] + 923.517 \text{ Log}[x_2] \text{ Log}[x_3] \text{ Log}[x_5] - 81.4652 \\
& \text{Log}[x_3]^2 \text{ Log}[x_5] + 420.42 \text{ Log}[x_4] \text{ Log}[x_5] - 701.957 \text{ Log}[x_1] \text{ Log}[x_4] \text{ Log}[x_5] - \\
& 131.866 \text{ Log}[x_2] \text{ Log}[x_4] \text{ Log}[x_5] + 345.252 \text{ Log}[x_3] \text{ Log}[x_4] \text{ Log}[x_5] - 386.747 \\
& \text{Log}[x_4]^2 \text{ Log}[x_5] + 486.097 \text{ Log}[x_5]^2 - 371.149 \text{ Log}[x_1] \text{ Log}[x_5]^2 + 40.1092 \text{ Log}[x_2] \\
& \text{Log}[x_5]^2 - 135.961 \text{ Log}[x_3] \text{ Log}[x_5]^2 + 3.07782 \text{ Log}[x_4] \text{ Log}[x_5]^2 - 97.4025 \text{ Log}[x_5]
\end{aligned}$$