

T. C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELEKTROKİMYASAL DNA BİYSENSÖRLERİ İLE
VİTAMİN D RESEPTÖR GENİNDEKİ
POLİMORFİZMLERİN SAPTANMASI

Analitik Kimya (Eczacılık) Programı
Yüksek Lisans Tezi

Biyomühendis
Nilay ALADAĞ

Danışman
Prof. Dr. M. E. Şengün ÖZSÖZ

İZMİR
2008

T. C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ELEKTROKİMYASAL DNA BİYSENSÖRLERİ İLE
VİTAMİN D RESEPTÖR GENİNDEKİ
POLİMORFİZMLERİN SAPTANMASI

Analitik Kimya (Eczacılık) Programı
Yüksek Lisans Tezi

Biyomühendis
Nilay ALADAĞ

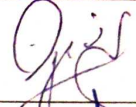
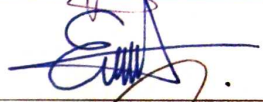
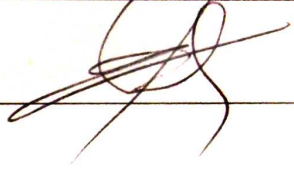
Danışman
Prof. Dr. M. E. Şengün ÖZSÖZ

İZMİR
2008

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. M. E. Şengün ÖZSÖZ (Danışman)	
Üye :Doç. Dr. Emrah KILINÇ	
Üye :Doç Dr. Bahattin Tanyolaç	

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 11 Eylül 2008

ÖNSÖZ

Bu tezin gerçekleştirilmesi sırasında bilgisinden ve deneyiminden yararlandığım ilgisini ve desteğini eksik etmeyen değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Şengün ÖZSÖZ'e,

Tezin deney ve de yazım aşamasında yönlendirme ve desteğiyle her zaman yanımda olan Dr. Dilşat (ÖZKAN) ARIKSOYSAL'a

Çalışmam süresince dostluklarını ve desteklerini esirgemeyen, çalışmalarımı keyifli hale getiren Yasemin MARABA başta olmak üzere, yüksek lisans arkadaşlarım Buket MERİÇ ve Seda ÇAVDAR'a,

Son olarak maddi ve manevi her yönden bana hayatım boyunca destek olan annem Neriman ALADAĞ, babam Atilla ALADAĞ ve biricik kardeşim Aylin ALADAĞ'a ve başarımda katkısı olan herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 2008

Biyomühendis

Nilay ALADAĞ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
GİRİŞ	1

BÖLÜM I

GENEL BİLGİLER

1.1. BİYOSENSÖRLER	8
1.1.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu	8
1.1.1.1. Algılama Kısım (Biyomolekül).....	9
1.1.1.2. Çevirici Kısım	10
1.1.1.3. Elektronik Kısım	10
1.1.2. Biyosensörlerin Uygulama Alanları.....	10
1.1.3. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler	11
1.1.4. Biyosensör Geliştirilmesinde Kullanılan Biyolojik Bileşenler	13
1.1.4.1. Nükleik Asitler	14
1.1.4.1.1. DNA'nın Moleküler Yapısı.....	15
1.1.4.1.2. DNA Replikasyonu	19
1.1.4.1.3. Denatürasyon ve Renatürasyon.....	21
1.1.4.1.4. DNA Hibridizasyonu	23
1.1.4.1.4.1. Hibridizasyon yöntemleri.....	24
1.1.4.1.4.1.1. Southern Blot	24
1.1.4.1.4.1.2. Northern Blot	25

1.1.4.1.4.1.3. Dot Blot.....	25
1.1.4.1.4.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR).....	25
1.1.4.1.5. Polimorfizm	29
1.1.4.1.5.1. Polimorfizm Analizleri	30
1.1.4.1.5.2. Vitamin D Reseptörü (VDR) ve VDR Polimorfizmleri.....	31
1.1.5. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri.....	36
1.1.5.1. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile DNA Dizi Algılama Yöntemleri.....	39
1.1.5.1.1. İndikatöre Dayalı DNA Dizi Algılama Yöntemleri	39
1.1.5.1.1.1. İnterkalatör Madde ile DNA Dizi Algılama Yöntemi.....	40
1.1.5.1.1.2. DNA Bazlarının En Az Biriyle Etkileşen Bir İndikatör ile DNA Dizi Algılama Yöntemi	41
1.1.5.1.2. İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemleri	42
1.1.5.1.3. Nanopartikülle İşaretleme Dayalı DNA Dizi Algılama Yöntemleri.....	44
1.1.5.2. DNA Biyosensörlerinin Kullanım Alanları	45
1.2. ELEKTROKİMYA	48
1.2.1. Elektrokimyasal Olaylarda Kütle Taşınım Yolları	50
1.2.2. Voltametri	50
1.2.2.1. Voltametrik Cihazlar.....	51
1.2.2.2. Voltametride Kullanılan Bazı Önemli Tanımlamalar	54
1.2.2.3. Voltametrik Akımlar	60
1.2.2.4. Voltametride Kullanılan Uyarma Sinyalleri	61
1.2.2.4.1. Uyarma Sinyalinin Çeşidine Göre Voltametrik Yöntemler	61
1.2.2.4.1.1. Dönüşümlü Voltametri.....	61

1.2.2.4.1.2. Diferansiyel Darbe Voltametrisi	64
1.2.2.4.1.3. Doğrusal Taramalı Voltametri	65
1.2.2.4.1.4. Kare Dalga Voltametrisi	66

BÖLÜM II

GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan cihazlar	67
2.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	68
2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	68
2.4. Kullanılan DNA dizileri.....	71
2.5. DNA dizilerinin hazırlanışı	72
2.6. Deney düzeneğinin ve elektrotların hazırlanışı.....	73
2.7. Kullanılan yöntem	74
2.6.1. Elektrot yüzeyine prob tutuklanması	76
2.6.1.1. Adsorbsiyon ile prob tutturma	76
2.6.1.2. Kovalent bağlama ile prob tutturma.....	76
2.6.2. Hibridizasyon	77
2.6.2.1. Sentetik hedeflerle hibridizasyon	77
2.6.2.2. Gerçek PCR örnekleri ile hibridizasyon	77
2.6.3. MDB ile etkileşim	78
2.6.4. Elektrokimyasal Ölçüm.....	78

BÖLÜM III

BULGULAR

3.1. Sentetik dizilerle hibridizasyon ve biyosensör özgünlüğünün tayini.....	79
3.2. MDB konsantrasyonu ve MDB ile etkileşim sürelerinin etkisi	80
3.3. Prob tutturma yöntemlerinin etkisi	81
3.4. Prob tutturma ve hibridizasyon sürelerinin etkisi	83
3.5. Uygun prob konsantrasyonunun bulunması.....	85
3.6. Uygun hedef konsantrasyonunun bulunması	86
3.7. Yıkama süresinin biyosensör seçimliliğine etkisi	88
3.8. PCR ürünleri ile gerçekleştirilen hibridizasyon çalışması	89

BÖLÜM IV

TARTIŞMA	92
-----------------------	-----------

BÖLÜM V

SONUÇ ve ÖNERİLER.....	97
-------------------------------	-----------

BÖLÜM VI

ÖZET.....	99
SUMMARY	101

BÖLÜM VII

YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	103
ÖZGEÇMİŞ.....	123

KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
ACB	asetat tampon çözeltisi
BOD	biyolojik oksijen gereksinimi
C	Sitozin
cDNA	komplementer DNA
CPE	karbon pastası elektrodu
cRNA	komplementer RNA
CV	dönüşümlü voltametri
DCE	damlayan civa elektrodu
DGGE	denatüre gradiyent jel elektroforezi (denaturing gradient gel electrophoresis)
DHPLC	denature yüksek-performans sıvı kromatografi (denaturing high-performance liquid chromatography)
DNA	deoksiribonükleik asit
dNTP	deoksinükleotid trifosfatlar
DPV	diferansiyel darbe voltametrisi
dsDNA	çift sarmal DNA (double strand DNA)
EDC	Etil karbodiimid 1-etil -3-dietil aminopropil karbodiimid hidroklorür
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
G	Guanin
GOD	glukoz oksidaz

GPES	genel amaçlı elektrokimyasal sistem (General Purpose Electrochemical System)
H	hibrit
I	inozin
MB	metilen mavisi
MDB	Meldola Mavisi
MM	tek bazı eşleşmemiş DNA, mis-match
mRNA	mesajcı RNA
MTP	Hastalıklı Prob Dizisi (Mutant-type probe)
MTT	Hastalıklı Hedef Dizisi (Mutant-type target)
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NHS	N-Hidroksisüksinimid
OLA	oligonükleotit bağlama (oligonucleotide ligation assay)
P	prob
PBS	fosfat tampon çözeltisi
PCR	polimeraz zincir reaksiyonu
PGE	kalem grafit elektrot
Pol III	DNA polimeraz III
RFLP	restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonükleik asit
rRNA	ribozomal RNA
RXR	retinoid X reseptör
SAM	kendi kendine toplanan düzenli elektrot yüzeyi tabakaları (self-assembly multilayers)

-SH	tiyol grubu
SNP	tek nokta polimorfizmi (single nucleotide polymorphism)
SPR	yüzey plazmon rezonans (surface plasmon resonance)
SSC	Saline-Sodium Citrate tampon çözeltisi
ssDNA	tek sarmal DNA, prob (single strand DNA)
STR	kısa ard arda tekrar dizileri (Short Tandem Repeats)
T	Timin
TBS	Tris-HCl tampon çözeltisi
TE	Tris-HCl ve EDTA tampon çözeltisi
tRNA	taşıyıcı RNA
TSB	tek sarmallı DNA bağlayan proteinler
U	Urasil
UTR	çevrilmemiş kısım (untranslated region)
UVB	Ultraviyole B
VDR	Vitamin D reseptörü
VNTR	değişen sayılarda ard arda tekrarlar (Variable Number of Tandem Repeats)
WTP	Sağlıklı Prob Dizisi (Wild-type probe)
WTT	Sağlıklı Hedef Dizisi (Wild-type target)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi	9
Şekil 2: DNA'nın moleküler yapısı	16
Şekil 3: DNA'daki dört bazın moleküler yapısı	18
Şekil 4: DNA çift sarmalının yarı-korunumlu replikasyonu	19
Şekil 5: DNA Replikasyonu	20
Şekil 6: DNA'nın denatürasyonu ve renatürasyonu	22
Şekil 7: DNA hibridizasyonu	23
Şekil 8: PCR aşamaları	27
Şekil 9: PCR ile kalıp DNA'nın çoğaltılması.....	28
Şekil 10: Vitamin D metabolizması.....	32
Şekil 11: VDR'nin hedef dokudaki etki mekanizması	34
Şekil 12: VDR geninin exon-intron yapısı ve bilinen polimorfizmlerin pozisyonu...	35
Şekil 13: Bir DNA biyosensörünün şematik gösterimi	37
Şekil 14: DNA biyosensörlerinde değişik yüzeye prob bağlama yöntemleri.....	38
Şekil 15: Bazı hibridizasyon indikatörlerinin kimyasal yapıları	40
Şekil 16: İnterkatör bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması.....	41
Şekil 17: DNA bazlarından biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması	42
Şekil 18: Guanin bazının yükseltgenmesine dayalı indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi.....	43
Şekil 19: Guanin ve inozinin kimyasal yapıları.....	43
Şekil 20: İnozinli prob ilkesine dayalı indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi.....	44
Şekil 21: Nanopartikülle işaretlemeye dayalı DNA dizi algılama yöntemi (1).....	45

Şekil 22: Nanopartikülle işaretlemeye dayalı DNA dizi algılama yöntemi (2).....	45
Şekil 23: Elektroanalitik tekniklerin sınıflandırılması.....	49
Şekil 24: Kütle taşınım olaylarının şematik gösterimi	50
Şekil 25: Üçlü elektrot sistemi.....	51
Şekil 26: Kalem grafit elektrodun şematik olarak gösterimi	53
Şekil 27: Doğrusal taramalı voltammogram eğrisi.....	57
Şekil 28: Elektrot yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabaka.....	59
Şekil 29: Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri.....	61
Şekil 30: Dönüşümlü voltametrde kullanılan uyarılma sinyali	62
Şekil 31: Pik potansiyellerini ve akımlarını gösteren klasik bir dönüşümlü voltamogram	63
Şekil 32: A) Analog cihazlarda diferansiyel darbe voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali, B) Diferansiyel darbe voltametrisine ait bir voltamogram.....	65
Şekil 33: Deney düzeneği ve PGE'nin hazırlanışı.....	73
Şekil 34: Hibridizasyon indikatörü olarak MDB'nin kullanıldığı, VDR genindeki Apa I polimorfizminin elektrokimyasal olarak saptanması	75
Şekil 35: PGE yüzeyinde gerçekleşen EDC/NHS modifikasyonu	77
Şekil 36: Sentetik diziler kullanılarak, elektrot yüzeylerindeki MDB sinyallerine ait diferansiyel darbe voltammogramları ve histogramları	79
Şekil 37: MDB konsantrasyonu ve MDB etkileşim sürelerine ait kalibrasyon eğrileri	81
Şekil 38: Farklı prob tutturma yöntemleri kullanılarak elde edilen MDB sinyallerine ilişkin histogramlar	82
Şekil 39: Prob tutturma ve hibridizasyon sürelerinin etkilerinin incelenmesine ait histogramlar.....	84

Şekil 40: Sabit derişimdeki ($7 \mu\text{g mL}^{-1}$) hedef dizi (MTT) ve tek bazı hedeften farklı olan dizi (WTT) ile artan derişimdeki prob dizi (MTP) arasında gerçekleştirilen hibridizasyon aşamasından sonra MDB etkileşimi sonucunda elde edilen MDB sinyalleri.....	85
Şekil 41: Sabit derişimdeki ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) prob dizi (MTP) ile artan derişimdeki hedef dizi (MTT) ve tek bazı hedeften farklı olan dizi (WTT) arasında gerçekleştirilen hibridizasyon aşamasından sonra MDB etkileşimi sonucunda elde edilen MDB sinyalleri.....	87
Şekil 42: Yıkama sürelerinin biyosensör seçimliliğine etkisini gösteren histogramlar.....	88
Şekil 43: PCR rnleri kullanılarak, elektrot yüzeylerindeki MDB sinyallerine ait diferansiyel darbe voltammogramları ve histogramları	90

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Biyosensörlerin uygulama alanları	10
Tablo 2: DNA ve RNA arasındaki farklar	15
Tablo 3: Çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddeler ve bunların sağlandığı firmalar	68
Tablo 4: VDR Apa I polimorfizmini içeren PCR ürünü baz dizilim haritası	71
Tablo 5: Çalışmada kullanılan sentetik prob ve hedef dizileri.....	72
Tablo 6: Deneysel basamaklar ve süreleri.....	74
Tablo 7: Farklı prob tutturma yöntemlerinin alınan MDB sinyallerine etkisi	82

GİRİŞ

Analitik Kimya’da oldukça yaygın kullanım alanı bulan elektrokimyasal sensörlerin (elektrokimyasal algılayıcı sistemler) tanımı IUPAC tarafından “Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlar” olarak yapılmıştır [13].

Elektrokimyasal sensörlerin yapılarına enzim, hücre, doku, antikor, nükleik asit vb. biyolojik maddeler eklendiği zaman “**biyosensör**” adını almaktadır.

Biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanını içine alan multidisipliner sistemlerdir.

Biyosensör teknolojisi alanındaki ilk çalışmalar enzim sensörleriyle başlamıştır. 1962 yılında Clark ve Lyons elektrokimyasal sensörlere, membran içine yerleştirilen enzim çeviriciler ekleyerek, glukozoksidaz (GOD) enzimini O₂ elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başarmışlar ve ilk kez enzim elektrot terimi kullanılmışlardır[21].



Clark ve Lyons'un geliştirdiği bu ilk biyosensör, membran diyalizatör, reaksiyon bölgesi ve çeviriciden oluşmaktadır. Bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözünmüş oksijen elektrot etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada O₂ harcanır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O₂ tüketimi durur. O₂ elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş O₂ ölçülür. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan O₂ olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı hesaplanır [21].

Guilbault ve Montalvo amperometrik elektrotların yanı sıra potansiyometrik elektrotların da kullanılabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada, amonyum seçici sıvı membran elektrot üzerine üreaz tutuklanarak bir üre sensörü geliştirilmiştir [45].

Yaklaşık 50 yıl önce Emil Palecek'in nükleik asitlerin elektroaktivitesini keşfedişinden [106] 40 yıl sonra Joseph Wang ve ekibinin DNA (deoksiribonükleik asit) hibridizasyonu biyosensörünü geliştirmeleri [134] bu alanda yapılan en önemli çalışmalardır.

Biyosensörlerde biyokomponent olarak enzimler yanında doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, antikorlar ve nükleik asitler de kullanılabilmekte olup ölçüm tekniğine göre amperometrik, potansiyometrik, termal, piezoelektrik veya optik sensörler olarak adlandırılırlar [118].

Biyosensörlerin, klinik, teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, biyoreaktörler, kalite kontrol, tarım ve veterinerlik, bakteriyel ve viral teşhis, ilaç üretimi, endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda yaygın olarak kullanımı söz konusudur [97].

İnsan genom projesi ile 30.000 dolayında genin dizilimi belirlenerek, genom üzerinde ortalama her 2000–2500 nükleotitte bir bireyler arasında farklanmaya neden olan tek nokta mutasyonlarının (SNP, single nucleotide polymorphism) bulunduğu ortaya konmuştur. Ayrıca insan genomunun tüm genlerinin haritalanmasının ve diğer tüm varyasyonların baz diziliminin yakın gelecekte belirlenmesinin mümkün olduğu ortaya çıkmıştır. Bu projeye paralel olarak, kişiden kişiye değişen ve yaklaşık her 1.000 bazda bir meydana gelen genetik yapı ve farklılıkların %90'ını oluşturan SNP'lerin de haritalanmasına çalışılmaktadır. Ayrıca bu proje ile artık birçok hastalık “genetik hastalık” olarak tanımlanmakta ve bu hastalıkların tanısına yönelik “genetik testler” geliştirilebilmektedir [53]. Buna ek olarak DNA dizilerinde meydana gelen bu mutasyonlar, kimyasallar ve ilaçlar gibi çevresel etkenlere kişilerin verdiği yanıtı etkilemektedir. Bu nedenle SNP'leri belirleyecek yöntemlerin bulunması, biyomedikal araştırmalarda ve farmakolojik ürünlerin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır.

DNA tayini moleküler biyoloji, klinik tanımlama, tarım, adli tıp ve patojenlerin belirlenmesinde oldukça geniş uygulama alanlarına sahiptir. DNA biyosensörlerin geliştirilmesi bu cihazların analizlerde spesifik, güvenilir, hızlı ve etkili cevap verebilme yeteneklerinden dolayı oldukça günceldir. Bilim dünyası yüksek kalitede, gittikçe küçülen ileri teknoloji ürünleri ile moleküler düzeyde DNA dizi analizi yapma noktasına ulaşmıştır.

Spesifik gen dizilimlerinin belirlenmesi için kullanılan geleneksel yöntemler hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve çeşitli kimyasal yöntemler temeline dayanır. Bu yöntemlerden bazıları analizde çeşitli radyoaktif boya kullanımı gerektirmektedir. Örneğin PCR'ın jel elektroforezi aşamasında oldukça zararlı olan etidyum bromür maddesinin kullanımı ve analizde eğitimli personele

olan ihtiyaç ise yöntemin sakıncaları arasında yer almaktadır. Enzimatik işaretlemeye dayalı klasik tayin metodlarının ise enzim içerikleri nedeniyle uygulamalarda yüksek kararlılık gösterememesi ve düşük hassasiyete sahip olmaları gibi negatif özellikleri bulunmaktadır [76].

Dideoksi nükleotitler kullanılarak PCR ile çoğaltılan DNA parçasının sekanslanması da son yıllarda ilgi gösterilen bir tekniktir [116]. Fakat sekansın okunması işlemi zaman alıcı, hem de çok pahalı bir işlemdir.

Günümüzde halen birçok araştırma laboratuvarında kullanılan ve DNA hibridizasyonuna dayalı bir analiz yöntemi olan “Southern blot” tekniğinde radyoaktif madde ile işaretli probalar kullanılması nedeniyle DNA’da hasar oluşumu, radyoaktif maddeyi kullanabilecek uzman gereksinimi ve uzun süren tayinin her aşamasında farklı malzeme ve cihaza olan ihtiyaç nedeniyle bazı sakıncaları bulunmaktadır.

Bu pahalı, zaman alıcı teknikler uzmanlık ve oldukça zaman alan örnek hazırlama süreçleri gerektirmektedir. Bu gibi zorlukların üstesinden gelebilmek için pek çok araştırmacı fiziksel bir çevirici (optik, piezoelektrik ya da elektrokimyasal) ile birleştirilmiş uygun destek üzerine DNA immobilizasyonu temeline dayanan DNA biyosensörü (genosensörler) hazırlamışlardır. Bu DNA biyosensörleri dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde [91, 140] veya bu DNA yüzeyi ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinogen maddeler, ilaçlar, vb.) tayinine[10] ait sensör geliştirilmesine dayanan çalışmalara literatürde son zamanlarda sık sık rastlanmaktadır. Bu biyosensörlerin taşınabilir olmaları, kullanılan klasik yöntemlere göre hızlı, seçici, kolay kullanılabilir olmaları gibi birçok yararları bulunmaktadır.

Araştırmanın Konusu ve Amaçları:

SNP'ler avantaj ve dezavantajlara sahip birçok yöntemle tespit edilebilmektedirler [37, 155]. PCR (polimeraz zincir reaksiyonu), Restriksiyon enzim kesimi, denatüre gradiyent jel elektroforezi (DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis), denature yüksek-performans sıvı kromatografi (DHPLC, denaturing high-performance liquid chromatography), primer ekstansiyonu ve oligonükleotit bağlama (OLA, oligonucleotide ligation assay) gibi birçok mutasyon tanımlama tekniği sekans değişikliklerini saptamada kullanılmaktadır [130]. Tüm bu kullanılan yöntemlerin uzmanlık gerektirmesi, zaman alıcı ve pahalı olması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu gibi zorlukların üstesinden gelebilmek için pek çok araştırmacı fiziksel bir çevirici (optik, piezoelektrik ya da elektrokimyasal) ile birleştirilmiş uygun destek üzerine DNA immobilizasyonu temeline dayanan DNA biyosensörü (genosensörler) hazırlamışlardır [37, 155]. Bu cihazların genetik hastalık ve diğer biyolojik analizlerde pahalı olmayan bir şekilde, spesifik, güvenilir, hızlı ve etkili cevap verebilme yeteneklerinden dolayı kullanımları gün geçtikçe artmaktadır.

Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25-dihidroxyvitamin D₃ (1,25 [OH]₂ D₃) bir steroid hormondur ve nükleer hormon reseptörü aracılığıyla nükleer transkripsiyon regülatörü olarak görev yapar [2]. Vitamin D endokrin sistemi immun yanıtın oluşmasında, kemik metabolizmasında ve hücre çoğalması ve farklılaşmasında yardımcı rol oynamaktadır [3, 70]. Bu nedenle, bu endokrin sistemde görülen bir mutasyon diyabet, kanser, osteoartrit, tüberküloz ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığa neden olabilmektedir [46, 124].

Bu polimorfizmin tanımlanmasına yönelik kullanılmakta olan yöntem, RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemidir [2, 127, 153]. Bu yöntemde bir allel Apa I gibi restriksiyon enzimini tanıyan bir bölge içeriyorsa, diğer allel

içermiyorsa bu iki allel farklı uzunluklarda fragment verirler. Bu pahalı, zaman alıcı teknik uzmanlık ve oldukça zaman alan örnek hazırlama süreçleri gerektirmektedir. Bu güne kadar, Vitamin D reseptör (VDR) geninin 3' ucunda belirlenen, Apa I, Bsm I ve Taq I en çok çalışılan kesim parçacığı uzunluk polimorfizmleridir [127]. VDR'deki Apa I polimorfizmi Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkları içeren hastalıklara sebep olurken buna ek olarak paratiroid yanıtı da etkilemektedir [2, 23, 153].

Elektrokimyasal olarak DNA hibridizasyonun algılanması indikatörlü ve indikatörsüz olmak üzere iki yöntemle tayin edilir [37, 59, 78, 87, 101]. Bunlardan ilkinde metilen mavisi gibi organik boyalardan [34, 59, 103], epirubisin gibi antikanserojen ajanlardan [38], ruthenium bipyridine [7, 31] ve cobalt phenanthroline gibi metal kompleksler [32, 35] gibi redoks aktif moleküllerden yararlanılır. Bu redoks molekülleri tek sarmal ve çift sarmal DNA ile farklı şekilde etkileşerek prob ve hedef dizinin hibridizasyonunun algılanmasını mümkün kılar. Diğer yöntem ise DNA bazlarından en elektroaktif olan Guanin bazının 1.0 V'da verdiği yükseltgenme sinyalinin tek sarmal ve çift sarmal DNA'da farklılaşmasından yola çıkılarak yapılan tayindir [48, 104].

Wong ve Gooding tek nokta mutasyonunun tayinine yönelik elektron transferine dayalı hibridizasyon biyosensörünü altın elektrot ve antraknon-2,6-disülfonik asit interkalatörü kullanarak geliştirmişlerdir [149]. Kelley ve arkadaşları ise nokta mutasyonu içeren dizilerin analizini metilen mavisi ve ferrisiyanür aracılığı ile yapmışlardır [61]. Benzer şekilde Özkan ve arkadaşları metilen mavisini ve peptik nükleik asitleri kullanarak tek nokta mutasyonlarını içeren DNA dizilerini tespit edebilmişlerdir [101].

Çalışmamızda, yapmış olduğumuz ön çalışmalara göre yöntem olarak indikatöre dayalı hibridizasyon algılama yönteminin kullanılması uygun bulunup, indikatör olarak Meldola Mavisi (MDB)'nden yararlanılmıştır. MDB benzen türevi bir bileşik olup, NADH'ın belirlenmesinde geniş ölçüde kullanılan bir elektrokimyasal mediyatördür ve charge transfer mediyatörü olarak da kullanılmaktadır [12, 85, 129]. Reid ve ark. tarafından MDB'nin interkalasyon mekanizması açıklanmış [111] ve MDB'nin interkalatör olarak kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır [57, 62, 67]. MDB'nin kansorejen nitelikte olmaması, ucuz ve kolay bulunabilir bir madde olması, PCR'ın jel elektroforezi aşamasında kullanılan oldukça zararlı olan etidyum bromür maddesine göre avantajlı olmasını sağlamaktadır [57, 67].

Çalışmamız, sentetik ve gerçek hasta örnek DNA dizileri kullanılarak çift sarmal, tek sarmal ve tek bazı eşleşmeyen DNA dizilerin MDB ile etkileşimleri sonucu elde edilen MDB indirgenme sinyalinin diferansiyel darbe voltametri (DPV) yöntemi ile ölçülmesine dayanmaktadır. Bu ölçüm sistemi kullanılarak VDR geni üzerindeki Apa I polimorfizmi tespit edilmiştir. Literatürde bu mutasyonun elektrokimyasal biyosensörle tayinine yönelik kayda rastlanmamıştır. Yöntemimizin kolay uygulanabilir, ucuz ve hızlı cevap veren bir sistem olması nedeniyle klasik yöntemlere güçlü bir alternatif yöntem olması ve bu konuda çalışma yapacak araştırmacılara kaynak oluşturması tez çalışmalarının amaçları arasındadır.

BÖLÜM I

GENEL BİLGİLER

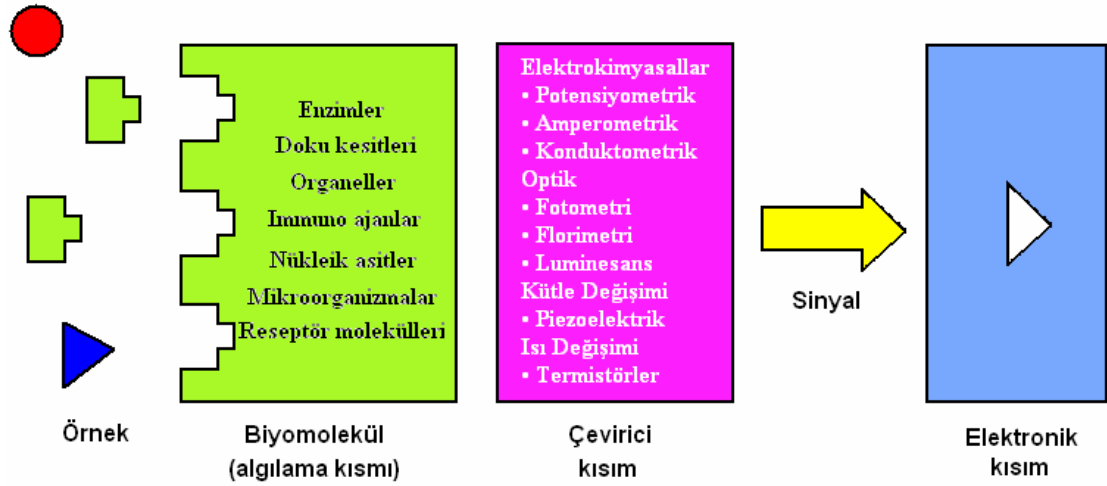
1.1. BİYOSENSÖRLER

Biyosensörler, biyolojik kaynaklı bir tanıma yüzeyi ile bir fizikokimyasal çevirici sistemden oluşan analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir tanım ise; biri biyokimyasal, diğeri ise elektrokimyasal özellikte, birbirini içine geçmiş iki çeviriciden oluşan algılayıcı cihazlardır [24].

Bir biyosensörün amacı, bir veya bir grup analitin (analiz edilecek madde) miktarıyla orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali üretmektir.

1.1.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Biyosensör sistemleri, seçici tanıma mekanizmasına sahip **biyomolekül (algılama kısmı)**, bu biyomolekülün incelenecek maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen **çevirici kısım** ve **elektronik kısım** olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır [97].



Şekil 1: Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi

1.1.1.1. Algılama Kısım (Biyomolekül)

Biyosensör sistemini oluşturan bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren, biyomolekül kısmıdır. Bu kısım sayesinde biyosensör, kendi spesifik olduğu hedef analiti tanıyarak etkileşime girer. Enzimler, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler sensörlerde biyomolekül olarak kullanılırlar. Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler [42], antikorlar [131, 69] ve nükleik asitlerdir [22, 88, 133, 135, 143].

Mikroorganizmalar genellikle biyolojik oksijen gereksinimi (BOD), toksisite ve mutajenite testlerinde kullanılırken [20], enzimler metabolitlerin, antikorlar ve nükleik asitler ise makromoleküllerin ve patojen mikroorganizmaların tayininde başarı ile kullanılırlar

1.1.1.2. Çevirici Kısım

Çevirici kısım, reseptörlerin biyolojik reaksiyonunu ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Çevirici kısım, biyokimyasal reaksiyonun özelliğine göre kullanılır. Çevirici kısım, elektrokimyasal (potansiyometrik, voltametrik yöntemlere dayalı ve alan etkili-ISFET, chem FET), optik (surface plasmon resonance, floresans, yansıma, luminesans, kırılma indeksi), elektriksel (yüzey etkinliği-MOS, elektrolit iletkenliği), kütle duyarlı (piezoelektrik), manyetik (paramanyetik), termal (reaksiyon ısısı, adsorbsiyon ısısı) sisteme dayalı olabilir [18, 22, 24, 74, 114, 115].

1.1.1.3. Elektronik Kısım

Çevirici kısmın elektrik sinyali üretmesi için gerekli osilatör, fark devresi, işlemsel yükselteç devresi, besleme devresi, analog-digital dönüştürücü vb. elektronik kısımdan oluşmaktadır.

1.1.2. Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma ve birçok endüstriyel alanda çok önemli rol oynarlar [113].

Tablo 1: Biyosensörlerin uygulama alanları

-
- ★ Klinik diyagnostik, biyomedikal sektör
 - ★ Proses kontrolü: Biyoreaktör kontrol ve analitiği, Gıda üretim ve analizi
 - ★ Tarla tarımı, bağ – bahçe tarımı ve veterinerlik
 - ★ Bakteriyel ve viral diyagnostik

- ★ İlaç analizi
 - ★ Endüstriyel atık su kontrolü
 - ★ Çevre koruma ve kirlilik kontrolü
 - ★ Maden işletmelerinde toksik gaz analizleri
 - ★ Askeri uygulamalar
-

Günümüzde, diabet hastalarında glikoz ölçümünde ve kandaki pek çok biyolojik bileşenin *in vivo* tayininde, çevreyle ilgili olarak toprak, hava ve sudaki pestisit ve mikotoksin gibi toksiklerin tayinlerinde, patojen tayinlerinde, organofosfatların tayin ve tespitinde, ilaç sanayinde, gıda endüstrisinde, kimyasal ve biyolojik silahların algılanmasında kullanılmak üzere biyosensörler geliştirilmektedir [52, 73, 75, 77, 82]. Biyosensörler en fazla biyomedikal sektörde uygulama imkânı bulmuşlardır.

1.1.3. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler

Seçicilik: İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi olan seçicilik özelliğidir. Bu da biyosensörlerdeki biyomolekül kısmı ile ilgili bir durumdur. Biyomolekülün spesifik olması girişim yapabilecek türleri içeren karmaşık içerikli ölçüm ortamlarında ön işlem yapılmaksızın analize imkan verir.

Kararlılık: Kararlılık kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Biyolojik molekülün kararlı olması ise çok sayıda analize imkân vereceği için biyosensörün ekonomik olmasına zemin hazırlar. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam O₂ konsantrasyonu gibi fiziksel parametrelerden olabildiğince az etkilenmesi istenir. Bu

özellik fiziksel koşulların değişebildiği laboratuvar dışı koşul ve ortamlarda da güvenilir analizlerin yapılabilmesine imkân verir.

Yüksek Duyarlılık: Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması, ideal biyosensörlerin özelliklerindendir. Duyarlılık, biyolojik sistemlerden gelen unsurlar kullanıldığı için genelde çoğu klasik yöntemden daha iyidir.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensör için, biyosensör cevaplarının doğru ve tekrarlanabilir olması büyük önem taşır. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün uygulamalarının o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

Kullanım Ömrü: Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör, biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametreleri de etkilemektedir.

Basitlik ve Ucuzluk: Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar, daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da ucuzlaştırılmıştır. Ayrıca ölçüm ünitesinin ucuz ve taşınabilir olması değişik alanlarda yaygın kullanımına imkân verir.

Kalibrasyon Gereksinmesi: İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planladığı gibi değildir, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı: Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir konsantrasyon değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır,

elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

Hızlı Cevap Zamanı: Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır. Cevap zamanının kısa olması ise genelde biyosensörlerin tercihli olarak kullanımlarına yol açan en önemli faktörlerden biridir.

Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir. Küçük ve biyoyumlu sistemlerin özellikle *in vivo* ölçümlere uyarlamada önemli üstünlükleri vardır [47].

1.1.4. Biyosensör Geliştirilmesinde Kullanılan Biyolojik Bileşenler:

Biyosensör yüzeylerin hazırlanmasında antikor, enzim, mikroorganizma, nükleik asit, hücre, doku parçaları gibi birçok biyolojik bileşen kullanılır. Enzimlerin kullanılması, uygun sıcaklık ve pH koşullarına bağlı olduğundan ve enzimlerin kararlılıklarının düşük olması nedeniyle zordur. Ayrıca enzimin biyosensöre tutuklanmasının ve tutuklama sonrasında kararlılığını sürdürmesinin de zorluğu tasarımı yapılacak biyosensörde dikkate alınması gereken en önemli unsurlardır[71]. Doku parçaları canlı tutulmaları, beslenmeleri ve atıklarının uzaklaştırılması gereksinimi nedeniyle biyosensörlere spesifik olarak immobilize edilmeleri zordur. Bu biyolojik materyallerden antikorlar ve nükleik asitler nispeten uygulama kolaylığı olan moleküllerdir. Antikorlar özellikle günümüzde, yüzey plazmon rezonans

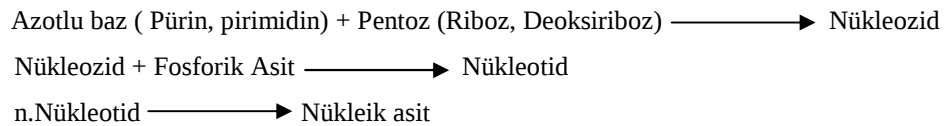
(surface plasmon resonance, SPR) sistemlerinde tanıma katmanı olarak kullanılmaktadır. Çip yüzeyine tutturulmuş antikorlar ilgili antijenle etkileşirler ve bu özgün etkileşim optik sisteme dayalı olarak ölçülür ve tespit edilir.

Bu bölümde, çalışmamızda biyolojik bileşen olarak kullanılan nükleik asitler hakkında genel bilgiler verilmiştir.

1.1.4.1. Nükleik Asitler

Nükleik asitler, birçok nükleotidin birleşmesi ile meydana gelen genetik bilginin depolanması ve ifade edilmesinden sorumlu moleküllerdir.

İki nükleotidin birleşmesi, bir nükleotidin fosforik asit grubunun diğer nükleotidin pentoz grubu ile birleşerek su çıkması yolu ile olur. İki nükleotid arasında bir fosfat ester bağı meydana gelir. Nükleotidler 3'-5' fosfodiester bağları ile polimerize olarak polinükleotidleri oluştururlar. Böylece yüzlerce nükleotid ünitesi bir araya gelerek nükleik asit denen polimeri meydana getirirler [20, 109].



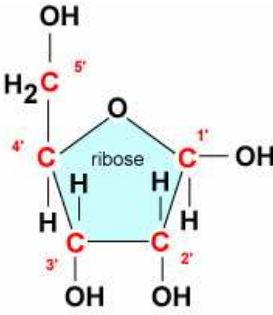
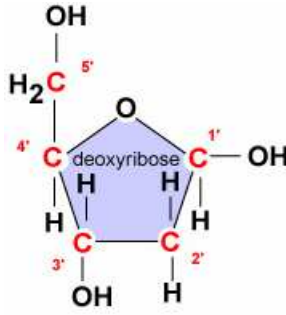
Makromoleküler yapıda şeker ve fosfat birimleri fosfodiester bağı ile birbirine bağlanarak molekülün ana omurgasını oluşturur. Azotlu bazlar ise iki omurgayı bir arada tutmaktadır. Kısacası nükleik asitler birçok yapısal ünitenin bir düzen içinde bir araya gelmesi ile ortaya çıkmıştır.

Kimyasal olarak birbirinden farklı iki değişik nükleik asit vardır: deoksiribonükleik asit(DNA) ve ribonükleik asit(RNA). Her iki nükleik asit de nükleotidlerin polimerize olması ile meydana gelmektedir. Ribonükleotidlerin

polimerizasyonu RNA oluşumuna yol açarken, deoksiribonükleotidlerin polimerizasyonu sonucu da DNA oluşur [20, 109].

DNA ve RNA arasındaki farklar aşağıdaki Tablo 2’de özetlenmiştir:

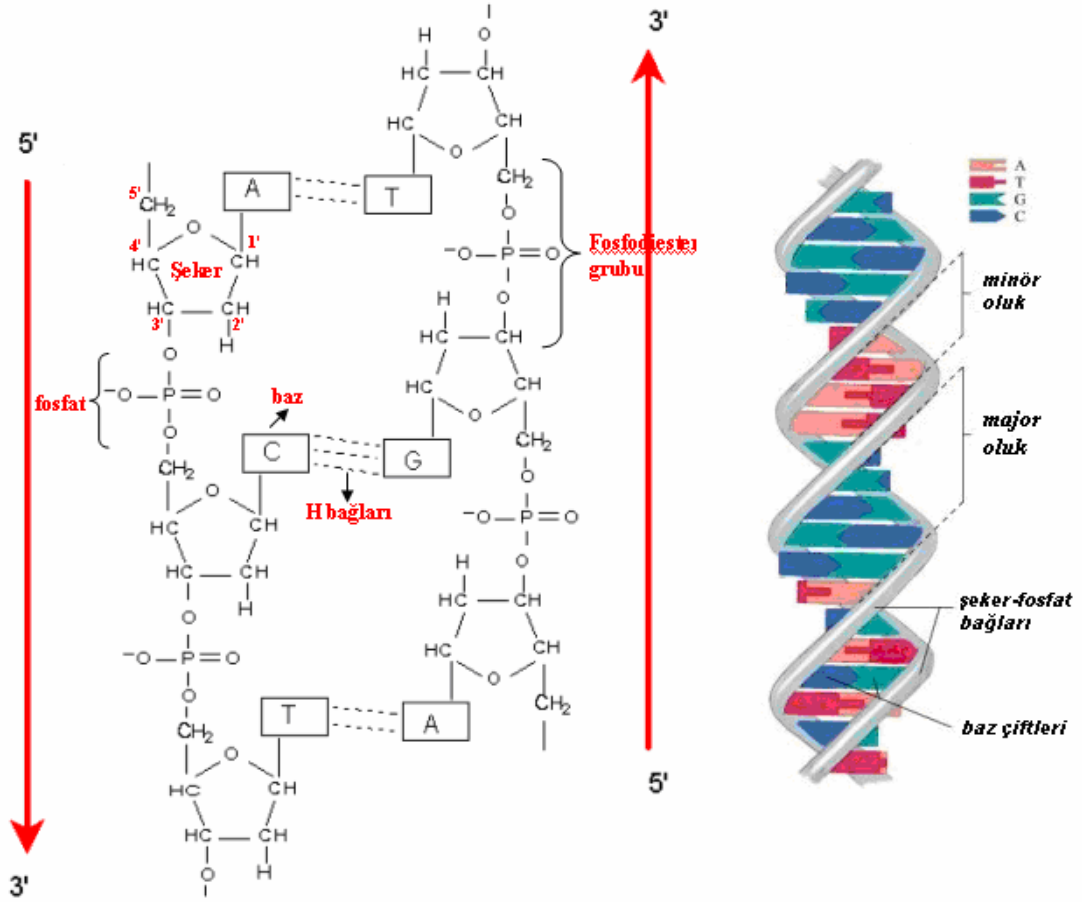
Tablo 2: DNA ve RNA arasındaki farklar

	RNA	DNA
		
Şeker birimleri	Riboz	Deoksi-riboz
Azotlu bazlar	A, G, C, U	A, G, C, T
Sarmal yapı	Tek sarmal	Çift sarmal
Türler	tRNA, mRNA, rRNA	Nükleer, mitokondrial ve plazmit DNA’ları

1.1.4.1.1. DNA’nın Moleküler Yapısı

DNA molekülü, heliks (=sarmal) şeklinde kıvrılmış, iki kollu merdiven şeklindedir. Kollarını, yani merdivenin kenarlarını, şeker (deoksiriboz) ve fosfat molekülleri meydana getirir. Deoksiriboz ile fosfat grupları ester bağlarıyla birbirlerine bağlanmıştır. Kovalent ester bağları veya fosfodiester bağları olarak da bilinen bu bağlar son derece kuvvetlidir. Fosfodiester bağlarının varlığı DNA

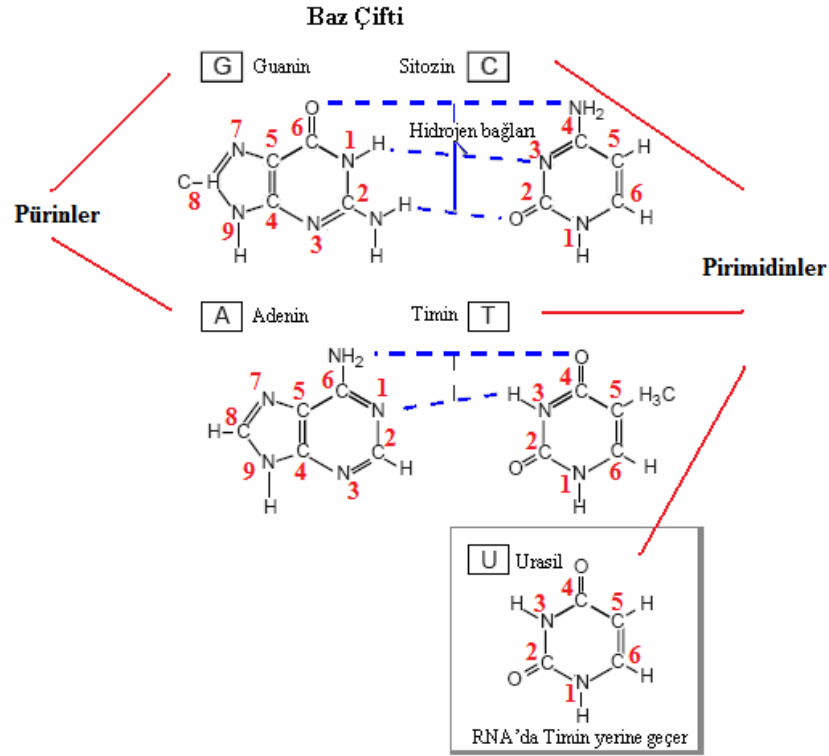
molekölünün tek zincirli yapı halinde iken bile dayanıklı ve stabil yapıda olmasını sağlar. Pürinin 9 nolu pozisyonundaki veya pirimidinin 1 nolu pozisyonundaki azot atomu, şekerin 1 nolu pozisyonundaki karbon atomuna bağlanır (N-glikozidik bağ) [20, 42, 109].



Şekil 2: DNA'nın moleküler yapısı

DNA heliksinin en sık rastlanan şekli “B” şeklidir. Burada zincirlerin hidrofilik deoksiriboz fosfat ana iskeleti molekülün dış kısmında bulunur. Hidrofobik bazlar ise içe doğru, heliks eksenine dik olarak yerleşmişlerdir. Heliksteki bu yerleşim düzeni sarmallar arasında bir tane geniş(majör), bir tane de dar (minör) oluk ortaya çıkarır.

Dört çeşit nükleotid vardır. Bunlar taşıdıkları bazlara göre isimlendirilirler (Adenin, Guanin, Sitozin, Timin). İki polinükleotid zincirdeki bu nükleotidler karşılıklı olarak birbirlerine hidrojen bağları ile bağlanmıştır. Hidrojen bağları daima bir pürin(A,G) ile bir pirimidin (T,C) bazı arasından meydana gelir. A-T baz çiftinde 2 hidrojen bağı, G-C baz çiftleri arasında ise 3 hidrojen bağı bulunmaktadır. Hidrojen bağlarının özelleşmesi; anahtar kilit modelini andıran, uygun nükleotid moleküllerinin karşılıklı gelerek birbirlerine yine uygun sayıda hidrojen bağları ile bağlanmasını sağlar. Aslında bu tür bir eşleşme rastlantı değil bazların stereo-kimyasal yapılarına bağlı bir zorunluluktan kaynaklanmaktadır. Sarmalın kararlılığı ise bazların kendilerine ait hidrofobik özellikten kaynaklanan çekim güçleri vasıtasıyla sağlanmaktadır. Bu özellik molekülün dış kısmının sıvı ortam ile ilişkisini sağlar ve bazların bir arada tutulmasını devam ettirir. Kısacası, sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Bu bağ fosfor bağları kadar kuvvetli olmadığı için pH değişikliği, sıcaklık, basınç gibi faktörlerde kolaylıkla birbirlerinden ayrılabilir. DNA'nın kendi kopyasını yapması ve gen anlatımı, nükleotidler arasındaki hidrojen bağlarının ayrılması ile gerçekleşmektedir [20, 42, 109].



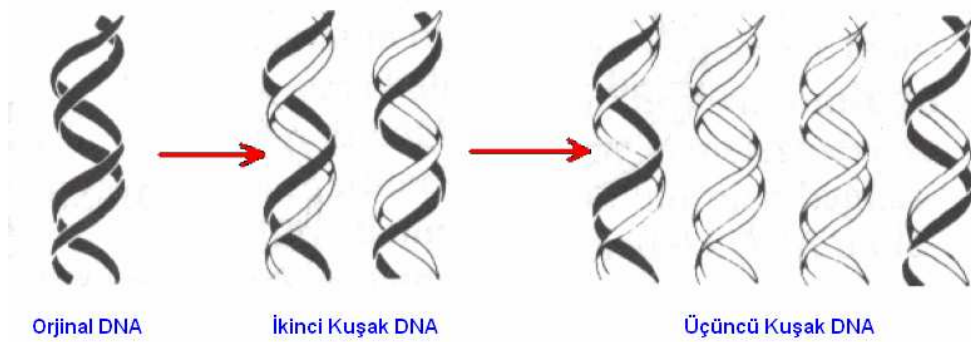
Şekil 3: DNA'daki dört bazın moleküler yapısı

Nükleotidlerin yapısı bazik olmasına karşın omurgadaki PO_4 (fosfat) grubunun varlığı polinükleotid zincirlerin asit özellikte olmalarına yol açar ve nükleik asit terimi de bu özellikten kaynaklanır. Ayrıca fosfat negatif (-) değerli olduğundan DNA molekülü de bu nedenle negatif yük kazanmaktadır.

DNA çift sarmalının dikkate değer ve önemli bir özelliği, molekülü oluşturan zincirlerin birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilmesi ve yeniden birleşebilmesidir. Protein sentezi ve DNA replikasyonu (kendi kopyasını oluşturması) bu özellik sayesinde meydana gelebilir. DNA'nın iki zinciri, birbirine sadece H bağları ve hidrofobik etkileşimlerle bağlı olmaları nedeni ile nükleotidleri arasındaki kovalent bağlardaki herhangi bir kopma olmaksızın çözülebilir (denatürasyon). Aynı şekilde çözülmüş molekülün zincirleri tamamlayıcı bazları arasında H bağlarının oluşumu ile birleşip sarmal yapıyı yeniden oluşturabilir (renatürasyon) [20, 42, 109].

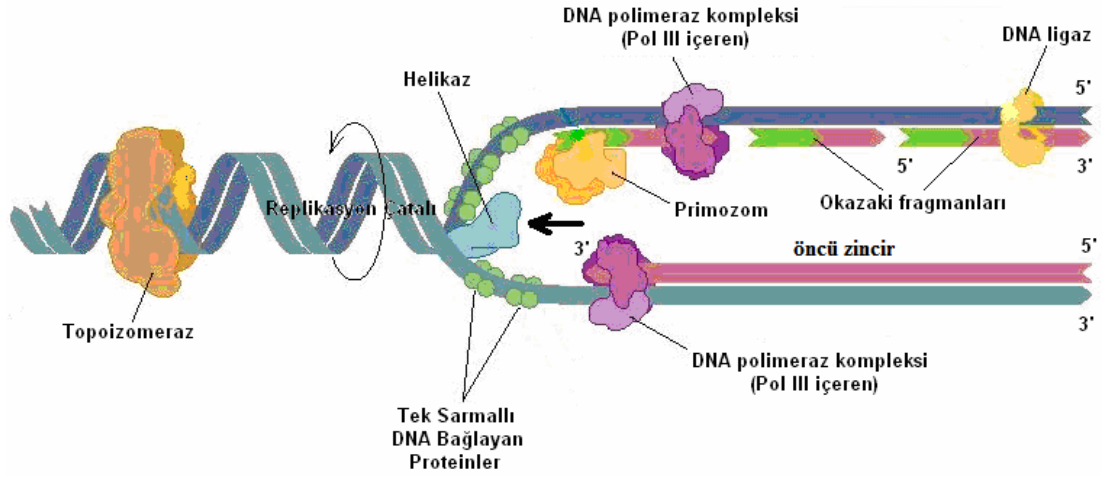
1.1.4.1.2. DNA Replikasyonu

DNA çift sarmalını oluşturan polinükleotit zincirleri birbirinden ayrıldığında, bunların her biri sentezlenecek yeni sarmal için kalıp vazifesi görür. Yeni zincirler kalıp DNA'nın komplementeri olarak sentezlenir. Böylece yeni oluşan çift sarmallarda bir eski(ebeveyninden gelen), bir de yeni sentezlenmiş zincir bulunur. Bu olaya **semi konservatif(yarı-korunumlu) replikasyon** denir.



Şekil 4: DNA çift sarmalının yarı-korunumlu replikasyonu

DNA polimerazlar sadece tek zincirli DNA'yı kalıp olarak kabul ettiği için en azından ufak bir bölgede DNA çift sarmal yapısının açılması gerekir. DNA kısmi açılım uzantısını arttıran ya da azaltan enzimlere **topoizomerazlar** denilir. Bu enzimler, özellikle replikasyon ve DNA paketlenmesi gibi işlemlerde önemli rol oynarlar. Prokaryotik organizmalarda DNA replikasyonu “replikasyon orijini” adı verilen belirli bir nükleotit dizesinin bulunduğu tek noktadan başlar. Ökaryotlarda ise replikasyon, DNA heliksi boyunca, birçok orijinde birden başlar. Bu birimler çoğunlukla tekrarlayan AT baz çiftleri şeklindedir. Orijinlerdeki nükleotit dizelerinin benzerliklerinden dolayı da bunlara “**konsensüs dizeleri**” adı verilmektedir. Ökaryotik DNA çok uzun olduğu için replikasyonun aynı anda çok sayıda orijinde devam etmesi, replikasyonun hızının artmasını sağlar.



Şekil 5: DNA Replikasyonu

Replikasyonun başladığı orijinden itibaren DNA çift sarmallı ters yönde dönerek açılınca “V” şekilli bir yapı meydana gelir. DNA sentezinin gerçekleştiği bu bölgeye “**replikasyon çatalı**” denir. Replikasyon ilerledikçe DNA molekülü boyunca replikasyon çatalı da ilerler. Replikasyon çatalında sarmalların birbirinden ayrılmasını sağlayan birçok protein vardır. “**DNA helikaz**” replikasyon çatalına bağlanarak çift sarmallı bölgeye doğru ilerleyip sarmalın açılmasını sağlayan enzimdir. DNA helikazın açtığı bölgedeki tek sarmal DNA, **tek sarmallı DNA bağlayan proteinler (TSB)** tarafından işgal edilerek sarmalın tekrar kapanması ve nükleazların etkisiyle parçalanması önlenmiş olur.

Prokaryotik ve ökaryotik DNA polimerazlar, uzamakta olan yeni zincirin 3’ ucuna, her seferinde birer tane deoksiribonükleotit eklerler. Takılan her nükleotit, kalıp zincirdeki baz dizesine komplementerdir. $5' \rightarrow 3'$ yönünde sentez aktivitesi olan **DNA polimeraz III**, yeni zincirin sentezinden sorumlu enzimdir. DNA polimeraz III sahip olduğu $3' \rightarrow 5'$ ekzonükleaz aktivitesi yardımıyla yeni sentezlenen DNA’ya yanlış nükleotitin eklenmesine engel olur. Zincire her nükleotit

eklenişinde bunu kalıptaki nükleotide komplementer olup olmadığını kontrol eder. Eğer yanlış nükleotit bağlanmışsa uzaklaştırır ve doğru olanı ekler.

DNA replikasyonu sırasında çift sarmalın 3' → 5' kolunda yeni DNA sentezi kesintisiz devam ederken, diğer kolda sentezin gerçekleşmesi için çok sayıda **RNA primerlerine** ihtiyaç vardır. RNA nükleotitlerini birbirine ekleyerek primer sentezini gerçekleştiren enzime **Primaz**, bu enzimle birlikte görev yapan komplekse ise **Primozum** adı verilir. DNA polimeraz III primerin 3' ucuna komplementer nükleotitler ekleyerek sentezin yeni bir primere kadar devam etmesini sağlar. Replikasyon çatalı ilerledikçe primerlerle birlikte sentezlenen yeni polinükleotitlere ise **Okazaki fragmanları** adı verilir.

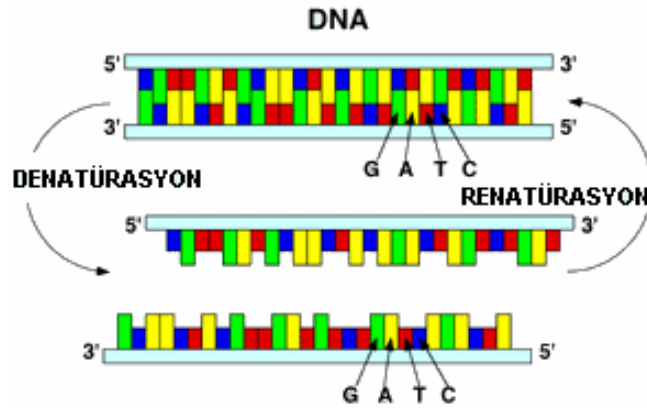
Okazaki fragmanlarındaki RNA primerlerinin uzaklaştırılarak, yerinin DNA molekülleri ile doldurulması işlemi **DNA polimeraz I** tarafından gerçekleştirilir. DNA polimeraz I sadece 5' → 3' ve 3' → 5' ekzonükleaz aktivitelere de sahiptir. Bu sayede primerdeki RNA molekülleri DNA ile değiştirilebilmektedir.

DNA polimeraz III tarafından sentezlenen fragmanların 5' fosfat grubu ile **DNA polimeraz I** tarafından değiştirilen nükleotitlerin 3'-OH grubu arasındaki boşluklar ise **DNA ligaz** enzimi tarafından doldurulur. Böylece her seferinde bir mol ATP harcanarak, DNA parçaları birleştirilmiş olur [20, 42, 109].

1.1.4.1.3. Denatürasyon ve Renatürasyon

İki polinükleotid zincirdeki nükleotidler karşılıklı olarak birbirlerine hidrojen bağları ile bağlanmıştır. Hidrojen bağları daima bir pürin(A,G) ile bir pirimidin (T,C) bazı arasından meydana gelir. A-T baz çiftinde 2 hidrojen bağı, G-C baz çiftleri arasında ise 3 hidrojen bağı bulunmaktadır. Hidrojen bağlarının özelleşmesi; anahtar

kilit modelini andıran, uygun nükleotid moleküllerinin karşılıklı gelerek birbirlerine yine uygun sayıda hidrojen bağları ile bağlanmasını sağlar. Bu bağ fosfor bağları kadar kuvvetli olmadığı için pH değişikliği, sıcaklık, basınç gibi faktörlerde kolaylıkla birbirlerinden ayrılabilir. Protein sentezi ve DNA replikasyonu (kendi kopyasını oluşturması) bu özellik sayesinde meydana gelebilir. DNA'nın iki zinciri, birbirine sadece H bağları ve hidrofobik etkileşimlerle bağlı olmaları nedeniyle, nükleotidleri arasındaki kovalent bağlardaki herhangi bir kopma olmaksızın çözülebilir (denatürasyon). Aynı şekilde çözülmüş molekülün zincirleri tamamlayıcı bazları arasında H bağlarının oluşumu ile birleşip sarmal yapıyı yeniden oluşturabilir (renatürasyon).

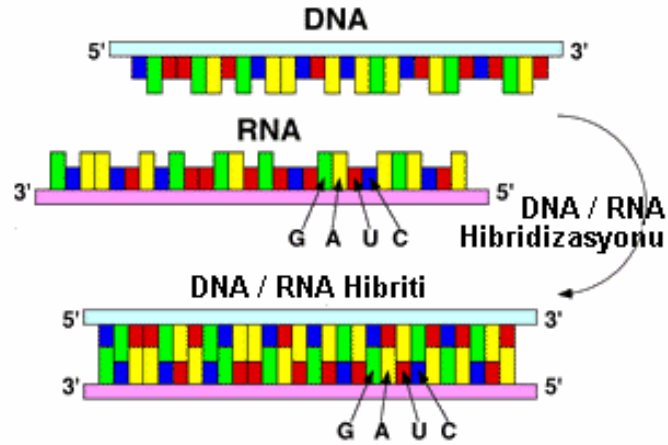


Şekil 6: DNA'nın denatürasyonu ve renatürasyonu

Birbirine komplementer olmayan tek iplikler birleşemezler. Bu nükleik asitlerin ayırt edilmesinde önemli bir yöntemin temelini oluşturmaktadır: kökeni bilinen bir tek iplik ile diğer ipliklerden hangisinin bağlanacağı saptanabilir (hibridizasyon). DNA'nın komplementer parçalarının hibridizasyonu, genlerin analizinde önemli bir ilkedir [20, 42, 109].

1.1.4.1.4. DNA Hibridizasyonu

DNA hibritleşmesi; birbirine eşlenik iki adet tek sarmal nükleik asit dizisinin çift sarmallı tek bir yapı haline gelmesi işlemidir.



Şekil 7: DNA hibridizasyonu

Yapay olarak çoğaltılmış ve DNA problemleri olarak hazırlanmış olan spesifik DNA fragmentlerinin niteliği araştırılacak olan hedef DNA molekülü ile birleştirilmesi işlemine "**hibridizasyon**" denir.

Nükleotitlerin, normal şartlar altında kendilerine karşılık gelen eşlerine bağlanma özellikleri vardır. DNA'da, Guanin ile Sitozin ve Adenin ile Timin birbirine komplementerdir. Bu yüzden birbirine tamamen komplementer iki adet tek sarmal nükleik asit dizisi kolaylıkla birbirine bağlanır. İki dizilimdeki tek nükleotit farklılığı bile bu bağlanmayı zorlaştırır [20, 42, 109].

1.1.4.1.4.1. Hibridizasyon yöntemleri

Günümüzde laboratuarlarda kullanılan çeşitli yöntemlerle, hücre ya da mikroorganizmalardaki spesifik özelliklerden sorumlu bir genin veya DNA segmentinin varlığı ya da yokluğu ortaya çıkarılabilir. Günümüzde en çok kullanılan hibridizasyon yöntemleri şunlardır:

1. Southern blot
2. Northern blot
3. Dot blot
4. PCR

1.1.4.1.3.1.1. Southern Blot

Southern blot, Edwin Southern tarafından geliştirilmiş moleküler genetikte kullanılan hibridizasyon yöntemlerinden biridir.

Bu yöntemde izole edilen DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve belirli sayı ve uzunlukta DNA fragmentlerinin oluşumu sağlanır. Agaroz jel elektroforez yöntemi ile jel üzerinde büyüklüklerine göre birbirinden ayrılan bu fragmentler önce yüksek pH ile denatüre edilip blot yöntemi ile nitroselüloz filtre üzerine geçirilir. ^{32}P (ya da başka bir radyoaktif olmayan nükleotit analogu) ile işaretli denatüre edilmiş ve incelenecek bölgeye özgü prob, filtre üzerinde tutulan fragmentler ile uygun koşullar sağlanarak hibridize edilir. Sonra filtre üzerine bir röntgen filmi konularak otoradyografi işlemi gerçekleştirilir. Prob yalnızca kendisine tümleyici bazları içeren DNA fragmenti ile hibridize olacak ve otoradyogram sonucu bu bandın üzerinde gözlenebilecektir.

1.1.4.1.3.1.2. Northern Blot

Bu teknik Southern blot'a çok benzer, ancak bu yöntemde DNA yerine mRNA veya virüs RNA'sı kullanılarak işlem yürütülür. Prob olarak, RNA'ya eşlenik olan işaretli ^{32}P cDNA veya cRNA'dan yararlanılır. Testin yapılışı ve değerlendirilmesi Southern blot hibridizasyonunda olduğu gibi, filtre üzerine bir röntgen filmi konularak otoradyografisi gerçekleştirilir. Filtre üzerinde RNA-DNA ya da RNA-RNA hibridizasyonu gerçekleştirilir.

1.1.4.1.3.1.3. Dot Blot

Bu yöntemde, genom segmentleri hibridizasyon öncesi moleküler ağırlıkları ya da büyüklüklerine göre elektroforetik ayırtırmaya tabi tutulmazlar. DNA ya da RNA izole edilir, konsantre edilip denatüre edilir. Bu aşamadan sonra süspansiyon naylon filtreye emdirilir ve ısıtılarak tespit edilir. Sonra uygun işaretli prob ile hibridize edilerek otoradyografide değerlendirilir. Dot blot teknolojisinin radyoaktif prob kullanılmadığı zaman çok daha hızlı ve elverişli şartlarda uygulanabildiği bilinmektedir.

1.1.4.1.3.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR)

DNA'nın istenilen bir parçasının *in vitro* koşullarda primer denilen 15-20 nükleotidlik bir oligonükleotid dizisi kullanılarak, sıcaklığa dayanıklı enzim yardımı ile çoğaltılmasıdır.

PCR yöntemi hücre içinde gerçekleşen doğal replikasyonun bir tüp içinde taklit edilmesi esasına dayanmaktadır.

PCR ile DNA'nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımında çoğaltılacak olan **kalıp DNA**; bu DNA'da çoğaltılması planlanan bölgedeki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan **primerler**; enzim olarak **Taq Polimeraz**; sentezde kullanılacak **deoksinükleotid trifosfatlar(dNTP)**; polimerazın çalışması için **tampon** görevi yapacak maddeler bulunmalıdır [20, 42, 109, 110].

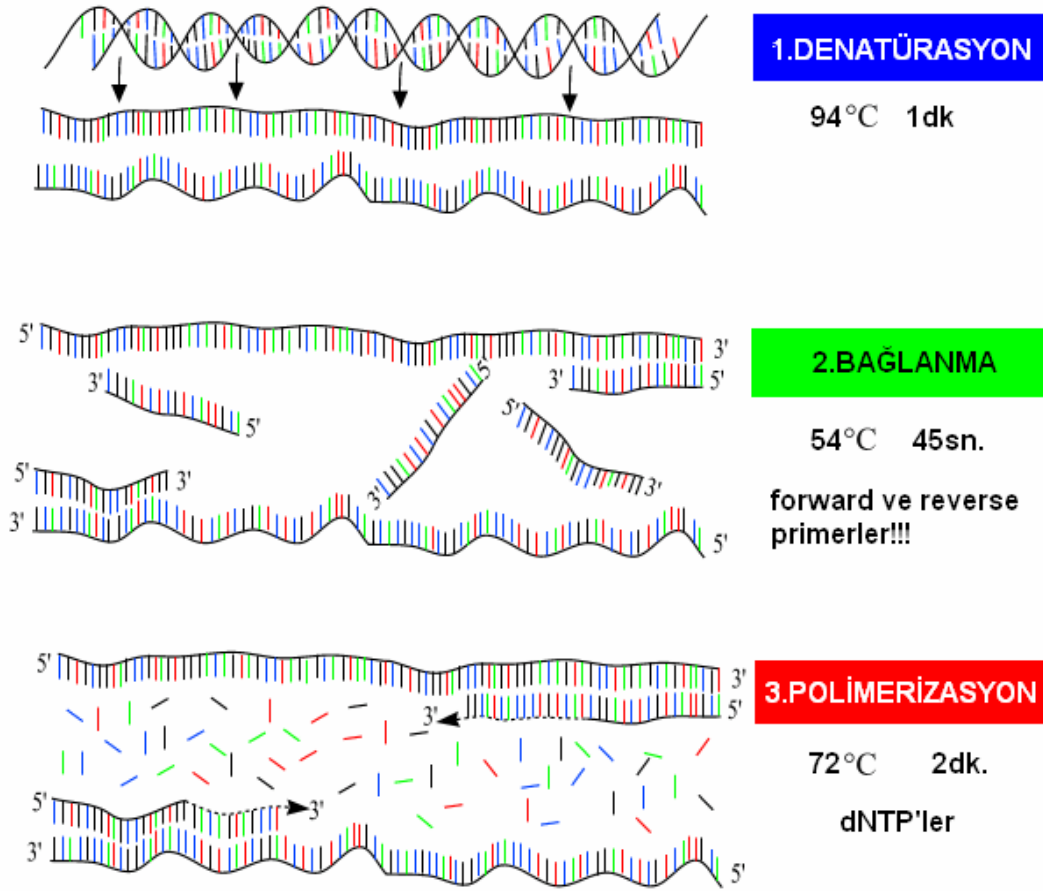
PCR başlıca 3 aşamada gerçekleştirilir :

1. Hedef DNA'nın denatürasyonu: Bütün gerekli materyaller çok küçük miktarlarda mikrofüj (Ependorf, vs.) tüplerine konduktan sonra özel bir aletin (Thermal cycler) gözlerine yerleştirilir. Alet otomatik olarak ısıyı 95°C'ye yükselterek bu ısıda hedef DNA'ların denatürasyonu (nukleik asitin iki iplikçiğinin birbirlerinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi) sağlanır. Bu işlem için, materyalin türüne göre değişmek üzere 3-5 dakika kadar bir süre yeterli olmaktadır.

2. Primerlerin bağlanması: Ayarlanmış olan süre sona erdikten sonra, alet ısıyı, 50-52°C ye indirerek ortamda bulunan iki tür primerin, her birinin komplementeri olduğu tek iplikçik hedef DNA üzerindeki spesifik sekanslara bağlanması gerçekleştirilir. Şöyle ki, primerlerden biri kendine ait 5'-terminusu ile hedef DNA'lardan birinin 3'-ucu ile ve diğer primerler de, ikinci tek iplikçik DNA'nın, antiparalel olan diğer ucunda bulunan 3'-ucuna bağlanarak, DNA polimerazın çalışma yönüne uygun olarak (5'-3') bağlanırlar. Bu işlemlerin tamamlanması da yaklaşık yine 3-5 dakika kadar devam eder.

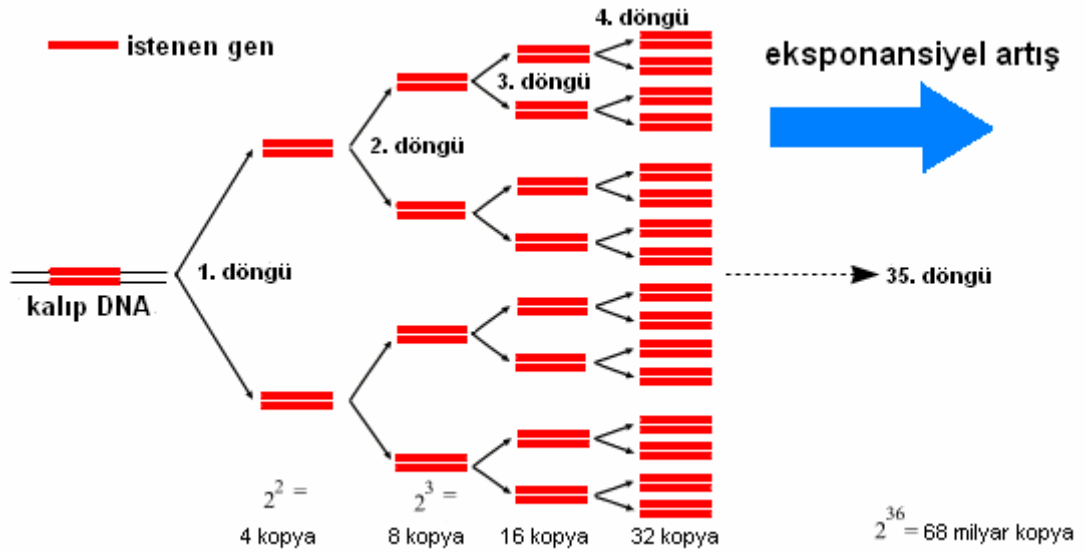
3. Polimerizasyon: Bu bağlanma süresi bitince aletin ısısı hemen 70- 72°C'ye çıkarak, tüpler içinde bulunan ve ısıya dayanıklı olan Taq polimeraz enzimi, 5-3 yönünde olmak üzere, ortamdaki nukleotidleri kullanarak, primerlerin 3'-terminusuna nukleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir.

Polimerizasyon reaksiyonunda, hedef DNA'nın tek iplikçik sekansları kalıp görevi görür. Bu süre de yaklaşık 3-5 dakika sürmektedir.



Şekil 8: PCR aşamaları

Böylece, PCR'ın 3 aşamadan oluşan ve yaklaşık olarak 10–15 dakika kadar devam eden birinci amplifikasyon aşaması, tekrar ısının 95°C'ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25–30 kez tekrarlanması durumunda tek bir hedef DNA segmenti, 2^n formülüne göre, yaklaşık 33,6 milyon çoğaltılmış olur.



Şekil 9: PCR ile kalıp DNA'nın çoğaltılması

Reaksiyon tüplerinde bulunan amplifikasyon ürünleri, buradan direkt olarak **agarose jel elektroforezine** (veya PAGE) tatbik edilir. Bu ortamda, ürünler molekül ağırlıklarına göre bir separasyona tabi tutulurlar. Bu işlem sonunda, jel, **Ethidium bromide** solüsyonuna daldırılarak, oluşan bantlar görülür hale getirilir. Meydana gelen bantlar, bilinen kontrol bantlarla karşılaştırılarak bir değerlendirme yapılır. Çok basit ve aynı zamanda kolay olmasına karşın bu tekniğin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlardan biri, boyama tekniğinin sekans spesitesi zayıftır. Çünkü istenmeyen veya ilgisi olmayan DNA'lar da amplifiye olabileceğinden bunlar bant analizleri ile belirlenememektedirler. Her ne kadar, kontrol setler kullanılsa bile yine de böyle sorunlar ortaya çıkmaktadır.

PCR yaygın olarak tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında kalıtsal hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, babalık testi ve DNA hesaplaması gibi değişik konularda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [20, 42, 109, 110].

1.1.4.1.5. Polimorfizm

Toplumlarda normal kişilerde genomik DNA'nın tek baz çiftlik pozisyonunda farklı sekans alternatiflerinin (allel) bulunmasıdır. Toplumda % 1'den daha sık gözlenen DNA varyasyonlarıdır.

a. Protein polimorfizmi (Kan grubu antijenleri (ABO))

b. DNA polimorfizmi

DNA polimorfizmleri; Mendel kurallarına göre aktarılır. Genlerin protein kodlayan ve kodlamayan bölgelerinde meydana gelebilir. Mutant gen içinde veya yakınında oluşan polimorfizm mutant genin gelecek kuşaklara geçişini gösterir.

DNA polimorfizm tipleri:

- Tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism (SNP); Restriction fragment length polymorphism(RFLP);
- Minisatellite (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR);
- Microsatellite (Short Tandem Repeats, STR)

Polimorfizm analizleri birçok alanda kullanılmaktadır: adli tıp, hastalık tanısı, doğum öncesi (prenatal) tanı, genetik haritalama (Linkage Analysis), farmakogenetik (kişiye özgü tedavi), immunogenetik, nutrigenetik.

Son yıllarda özellikle kompleks hastalıkların ve gen-gen, gen-çevre etkileşimlerinin çalışılması SNP değişikliklerinin sadece hastalıklara genetik yatkınlıkların saptanmasında bir markır olarak rol görmediğini bazı SNP 'lerin bizzat fonksiyona katıldıklarını göstermiştir. Fonksiyonel SNP değişiklikleri olarak adlandırılan bu farklılıklar özellikle ilaç metabolizması, farmakokinetik ve farmakodinamik etkiler, genetik kimliğe göre ilaç hazırlama, birey için güven aralığı

tanımlama ve ilaç kombinasyonlarının genetik yapı ile etkileşimi gibi bir dizi ilginç soruyu gündeme getirmiştir [43, 61, 130].

1.1.4.1.5.1. Polimorfizm Analizleri

Tek nükleotid polimorfizmleri (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP), genomik DNA'nın bir popülasyonun normal bireyleri arasında farklılık gösterdiği tek baz-çifti değişiklikleridir. Çoğunlukla her iki allelde de meydana gelir. İnsanlarda her 1000 bazda bir görülme sıklığı vardır, etnik ve coğrafi farklılıklar gösterirler.

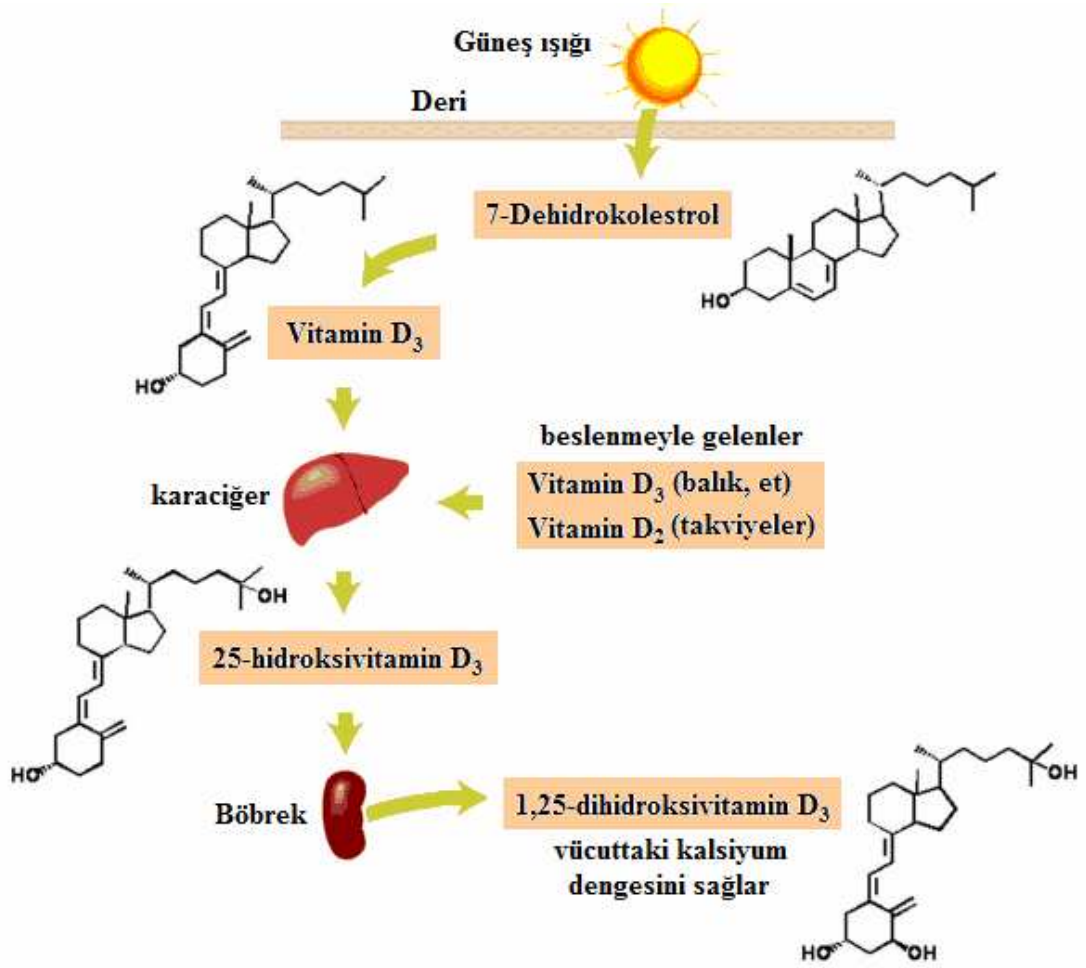
İnsan genomunda bugüne kadar bulunan milyonlarca SNP insan genetiği araştırmalarında anahtar bir fonksiyon üstlenmiştir. Polimorfizm farklı kalıtım kalıplarının veya genomun farklı segmentlerinin birbirinden ayırt edilebilmesi açısından bir genetik marker gibi görev yapmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı polimorfizmlerden; ebeveynlik testlerinde, suçluların tespit edilmesinde, organ nakilleri için gerekli olan doku tiplerinde, yetişkin bireylerin diyabet ve kanser gibi toplumda sık görülen hastalıklara yatkınlıklarının düşük veya yüksek risk altında olduğunu belirtmekte, genetik hastalıkların heterozigot taşıyıcılarının tespitinde, bir kromozomun özel bir bölgesindeki bir genin bağlantı analizi ile haritalanmasında yararlanılmaktadır [72, 117].

SNPler birçok durumda, hücre metabolizması için önemli olan olaylarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer alırlar. Bazı durumda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır [27].

Polimorfizm analizi, geleneksel olarak polimeraz zincir reaksiyonu bağlantılı restriksiyon fragment polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi ile yapılmaktadır. Bu yöntem, polimorfizmi ortaya çıkaran baz değişiminin bir restriksiyon enzimi için yeni bir kesim yeri ortaya çıkarması veya mevcut olan bir kesim yerini ortadan kaldırmasına bağlı olarak, polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan fragmentin enzim kesimi sonucunda normal durum ile polimorfik allel arasında uzunluk farklılıklarının (veya polimorfizminin) izlenmesi esasına dayanır. Yöntem, birden fazla ara aşama içermesi, bazı restriksiyon enzimleri ile ilgili sorunların ortaya çıkması gibi dezavantajlara sahiptir. Son zamanlarda, floresan maddelerle işaretli probalar kullanılarak, polimeraz zincir reaksiyonunda DNA amplifikasyonunun floresan ölçümü sayesinde eş-zamanlı olarak izlenebildiği polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri (“real-time fluorescence PCR”) sıkça kullanılmaktadır. Ayrıca LightCycler floresan PCR yöntemi nükleik asit miktarının kantitatif analizine olanak sağlaması yanında bilinen mutasyonların (veya polimorfizmlerin) analizini de gerçekleştirebilmektedir [27].

1.1.4.1.5.2. Vitamin D Reseptörü (VDR) ve VDR Polimorfizmleri

Kalsiferol olarak da bilinen Vitamin D, kanda fosfor ve kalsiyumun normal seviyede tutulmasına yardım eden bir hormon öncüsüdür. Vitamin D besinlerle alınmakla birlikte çoğunlukla deride sentezlenir. Vitamin D her ne kadar deride sentezlenebiliyorsa da bu işlem güneş ışığından gelen ultraviyole radyasyona bağlıdır. Güneş ışığında bulunan 290–315 nm dalga boyu uzunluğundaki Ultraviyole B (UVB) ışınları insan derisindeki vitamin D₃ öncüsünün yapımından sorumludur (Şekil 10) [44, 51, 81].



Şekil 10: Vitamin D metabolizması

Vitamin D, deride 7-dehidrokolesterolün fotolitik kırılması ve takiben termal izomerizasyonu ile üretilir. Daha sonra, serumda bulunan Vitamin D bağlayan protein ile karaciğere taşınır. Burada Vitamin D'nin dolaşımdaki başlıca metaboliti olan 25-hidroksivitamin D₃'e dönüştürülür. Aktif hale gelmesi için son adım ise, çoğunlukla böbrekte gerçekleşen 1- α -hidroksilasyondur. Böylelikle vitamin D'nin hormonal şekli olan 1,25-dihidroksivitamin D₃ oluşur [28, 44].

Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D₃ (1,25 [OH]₂ D₃) bir steroid hormondur ve nükleer hormon reseptörü aracılığıyla nükleer transkripsiyon regülatörü olarak görev yapar [2]. Vitamin D endokrin sistemi immun yanıtın

oluşmasında, beyinde, kalsiyum ve fosfat metabolizmasında, kemik metabolizmasında ve hücre çoğalması ve farklılaşmasında yardımcı rol oynamaktadır [3, 70].

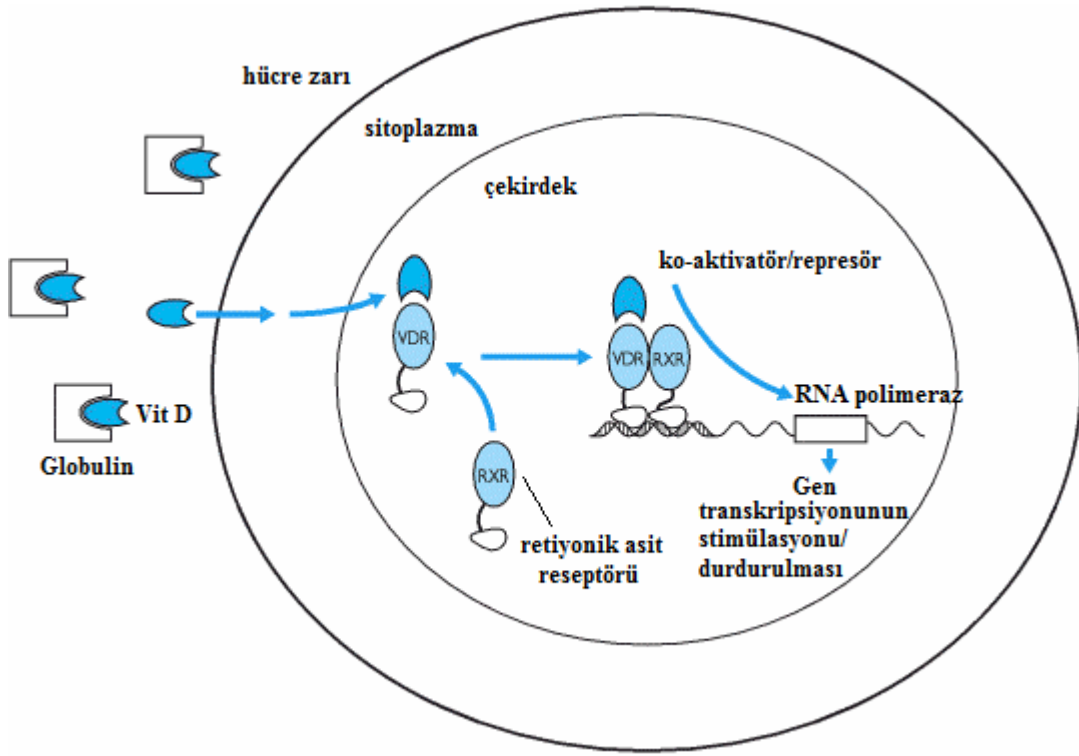
Vitamin D'nin glukoz homeostazında aldığı görev ile ilgili olarak, insanlarda ve hayvanlarda Vitamin D eksikliğinin, yetersiz insülin salgılanmasına neden olduğu ve Vitamin D takviyesi ile bu durumun normale döndüğü gösterilmiştir [9, 99].

Abe ve arkadaşlarının 1981 yılında yaptıkları çalışmada, Vitamin D'nin çeşitli insan lösemi hücre soylarında klonal proliferasyonu inhibe ettiği, normal ve lösemik myeloid öncülerin daha olgun, ve daha az agresif fenotiplere farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir [1]. Ayrıca Vitamin D apoptozu da düzenleyerek hücre çoğalmasında etkin bir rol oynar [128]. Bu çalışmalar bize Vitamin D'nin hücre çoğalmasının düzenlenmesinde görev aldığını göstermektedir.

Vitamin D'nin kas fonksiyonları üzerinde de etkileri görülmektedir. Vitamin D eksikliğinde, iskelet kası zayıflıkları ve atrofi oluşmaktadır [8]. Her ne kadar bu etki düşük Ca^{+2} miktarının bir sonucu gibi gözükse de Vitamin D Reseptörü (VDR) geni çıkarılmış farelerde normal olmayan kas gelişimi bu durumun Vitamin D ile ilişkili olduğunu göstermektedir [29].

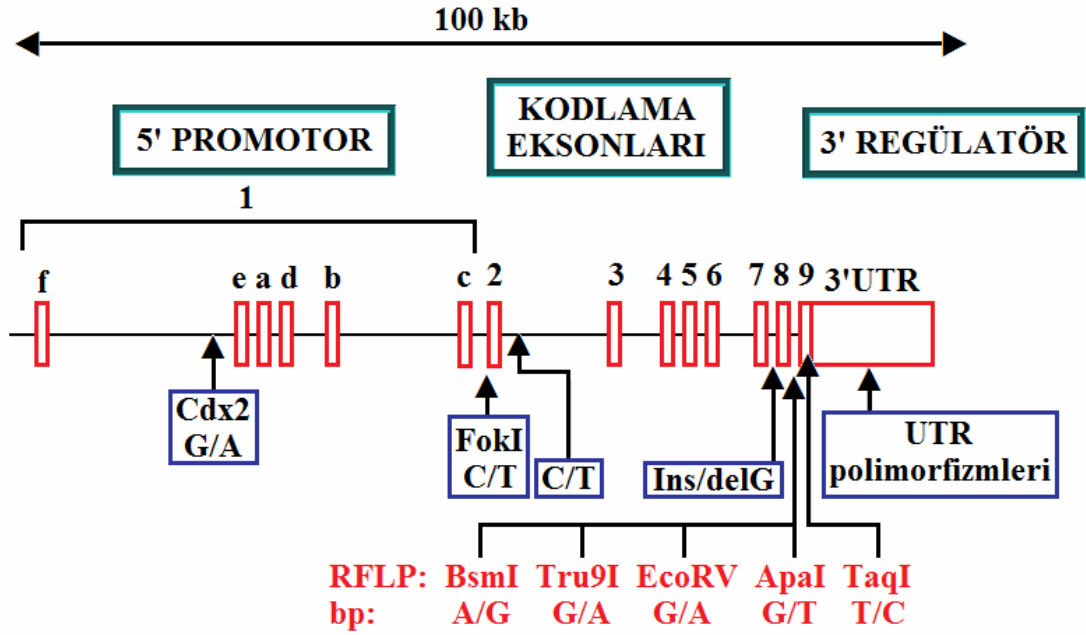
Bu nedenle, bu endokrin sistemde görülen bir mutasyon diyabet, kanser, osteoartrit, tüberküloz ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığa neden olabilmektedir [46, 124].

Gezen-Ak ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada VDR geninin ligand bağlayıcı bölge polimorfizmleri ile Alzheimer Hastalığı arasında bir ilişki olduğunu saptamışlardır [2].



Şekil 11: VDR'nin hedef dokudaki etki mekanizması

Kalsitriol Reseptörü olarak da bilinen Vitamin D Reseptörü, steroid hormonlar içinde nükleer reseptör süperaillesine üyedir ve ligandla aktive olan bir transkripsiyon faktörü gibi görev yapar. Genellikle sitoplazmada bulunur ve seçici olarak Vitamin D ile bağlanıp nukleusa hareket eder. Ligandla bağlanması sonucunda VDR'de yapısal değişiklik meydana gelir ve retinoid X reseptör (RXR) ile heterodimer oluşturur. Burada, Vitamin D reseptörü ile etkileşen proteinlerin katılımı ile belirli genlerin transkripsiyonunu regüle ederler [80].



Şekil 12: VDR geninin exon-intron yapısı ve bilinen polimorfizmlerin pozisyonu

VDR geni, kromozom 12'de yerleşik olup 8 intron ve 9 eksondan oluşmaktadır. VDR geni üzerindeki çalışmalarda proteine çevrimlenmeyen 3' bölgesinde (UTR =untranslated region) polimorfizmler bildirilmiştir [49]. Bu güne kadar, VDR geninin 3' ucunda belirlenen, Apa I, Bsm I ve Taq I en çok çalışılan kesim parçacığı uzunluk polimorfizmleridir [127]. Apa I ve Taq I restriksiyon enzimleri ile karakterize edilmiştir. Apa I ve Taq I ekson 9'da yer almaktadır. Bölgelere adını veren restriksiyon enzimleri ile polimorfizm analizi yapılmıştır. Taq I polimorfizmi kodon 352'de T-C nükleotid değişimine, Apa I polimorfizmi ise kodon 358'de G-T nükleotid değişimine neden olmaktadır [49]. Vitamin D reseptöründeki Apa I polimorfizmi Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkları içeren hastalıklara sebep olurken buna ek olarak paratiroid yanıtı da etkilemektedir [2, 23, 153].

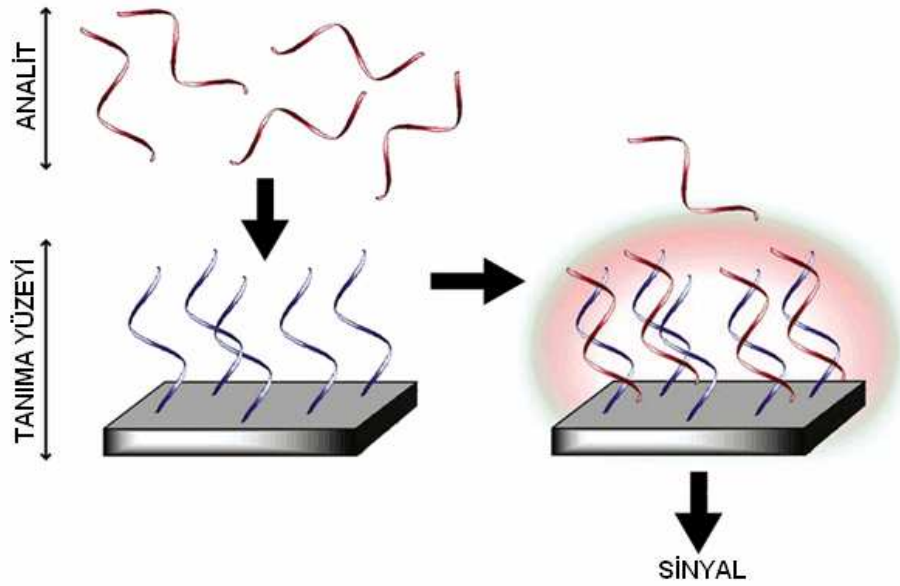
Bu polimorfizmin tanımlanmasına yönelik kullanılmakta olan yöntem, RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemidir [2, 127, 153]. Bu yöntemde bir allel Apa I gibi restriksiyon enzimini tanıyan bir bölge içeriyorsa, diğer allel içermiyorsa bu iki allel farklı uzunluklarda fragment verirler. Bu pahalı, zaman alıcı teknik uzmanlık ve oldukça zaman alan örnek hazırlama süreçleri gerektirmektedir.

Tez kapsamında VDR’de görülen ApaI polimorfizminin tespitine yönelik geliştirilen yöntemimizin kolay uygulanabilir, ucuz ve hızlı cevap veren bir sistem olması nedeniyle kullanılan bu klasik yöntemlere güçlü bir alternatif yöntem olacağı ve bu konuda çalışma yapacak araştırmacılara kaynak oluşturacağı düşünülmektedir.

1.1.5. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri

Tanıma yüzeyi olarak DNA’nın kullanıldığı biyosensörlere **DNA biyosensörleri** adı verilir [63, 92, 107, 144]. DNA biyosensörleri, bir çevirim sistemi ile DNA probundan oluşur. DNA biyosensörlerinin esası, DNA bazlarının hibridizasyonuna dayanır [55, 146]. DNA tanıma yüzeyleri, dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde [91, 140] veya bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojen maddeler, ilaçlar, vb.) tayininde kullanılabilir [10].

Tüm bu DNA hibridizasyonu veya DNA’da meydana gelen polimorfizmlerin belirlenmesinde kullanılan klasik yöntemlere alternatif bir yöntem olarak, DNA biyosensörlerinin yüksek hassasiyetli, küçültülebilir olmaları, taşınabilir ve tek kullanımlık modellerinin tasarlanabilmesi, ucuz olmaları, düşük miktarda güç ve ürün gereksinimleri olması gibi avantajlarının olması nedeniyle günümüzde DNA biyosensörlerinin kullanımı oldukça artmıştır [15, 32, 61].



Şekil 13: Bir DNA biyosensörünün şematik gösterimi

Çevirici sistemler optik, elektrokimyasal ya da kütleye duyarlı(piezoelektrik) olabilmektedir.

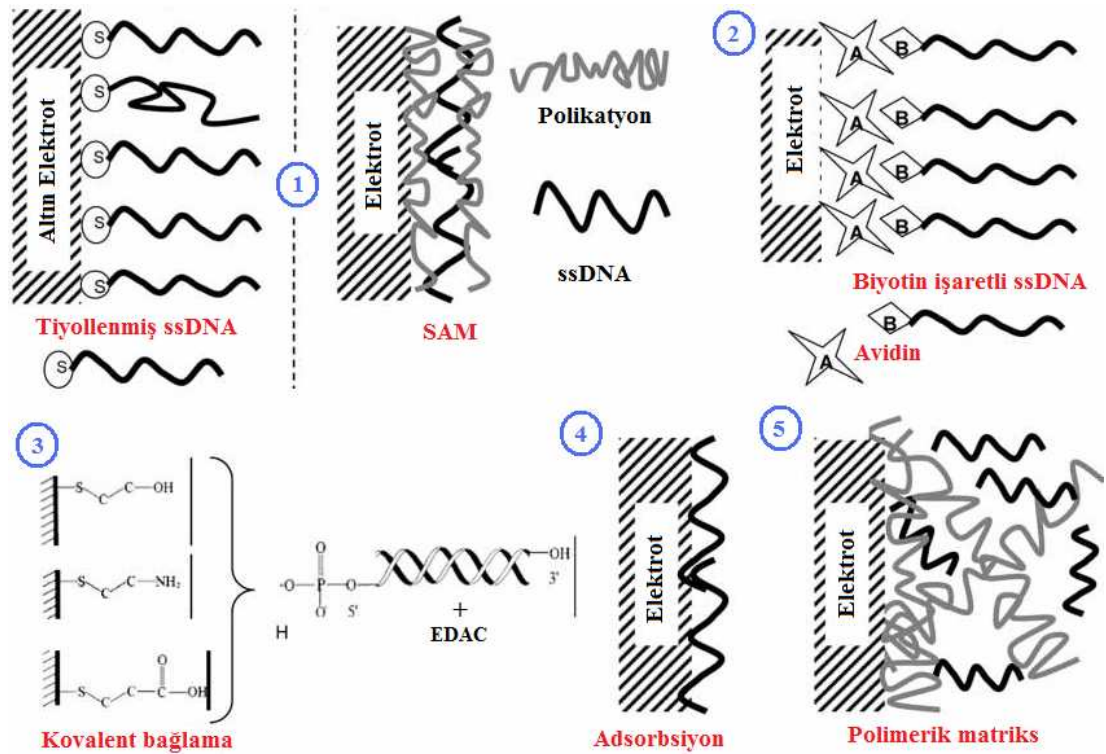
Spektrofotometrik yöntemlerin esası, hedef diziye tutturulan bir maddenin, hibrit oluşumundan önceki ve sonraki absorbans ölçümüne dayanmaktadır. Elektrokimyasal yöntemlerin esası ise, prob ile etkileştiği zaman farklı, hibrit ile etkileştiği zaman farklı sinyal veren bir maddenin indirgenme veya yükseltgenme sinyalinin veya madde kullanmaksızın doğrudan DNA sinyalinin (guanin bazına ait olan yükseltgenme sinyalinin) ölçülmesine dayanmaktadır. Kütleye duyarlı sistemlerde ise hibridizasyon öncesi ve sonrası değişen frekans üzerinden tayinler gerçekleştirilir.

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri, aranan hedefin baz dizisinin karşılığı olan 20–40 baz gibi kısa bir baz dizimine sahip olan sentetik tek sarmallı DNA (ssDNA) oligomerin (veya “prob“ olarak isimlendirilir), elektrot yüzeyine

bağlanmasına dayanmaktadır. Hedefi içeren bir örnek çözeltisine sensörün uygulanması ile elektrot yüzeyinde hibrit oluşur.

Nükleik asitin elektrot yüzeyine bağlanmasında aşağıdaki yöntemlerden yararlanılabilmektedir [112]:

1. Tiyollenmiş veya düz oligonükleotid dizilerinin SAM (self-assembly multilayers) ile altın yüzeyine tutunması,
2. Avidin muamele edilmiş yüzeye biotinlenmiş oligonükleotidlerin bağlanması,
3. Kovalent ajanlar kullanılarak oligonükleotidlerin kovalent yolla yüzeye bağlanması,
4. Adsorbsiyonla oligonükleotidlerin yüzeye bağlanması,
5. Polimerik matriksler aracılığıyla yüzeye bağlanma



Şekil 14: DNA biyosensörlerinde değişik yüzeye prob bağlama yöntemleri

Elektrokimyasal ölçümlerde elektrot yüzeyinde oluşan hibrit iki yöntemle tayin edilir; bunlardan ilki bir elektroaktif indikatör aracılığıyla (örneğin bir redoks-aktif katyonik metal kompleksi) yapılan tayindir. Bu yöntemde yüzeyinde hibrit oluşan elektrot, indikatörü içeren çözeltiye daldırılır ve indikatörün hibrite bağlanma düzeyi belirlenir [30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 54, 57, 64, 83, 86, 150, 151]. Diğer yöntem ise DNA bazlarından en elektroaktif olan Guanin bazının 1,0 V'da verdiği yükseltgenme sinyalinin farklılanmasından yola çıkılarak yapılan tayindir [4, 11, 39, 56, 65, 66, 102, 136, 137, 138, 139, 151].

1.1.5.1. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile DNA Dizi Algılama Yöntemleri

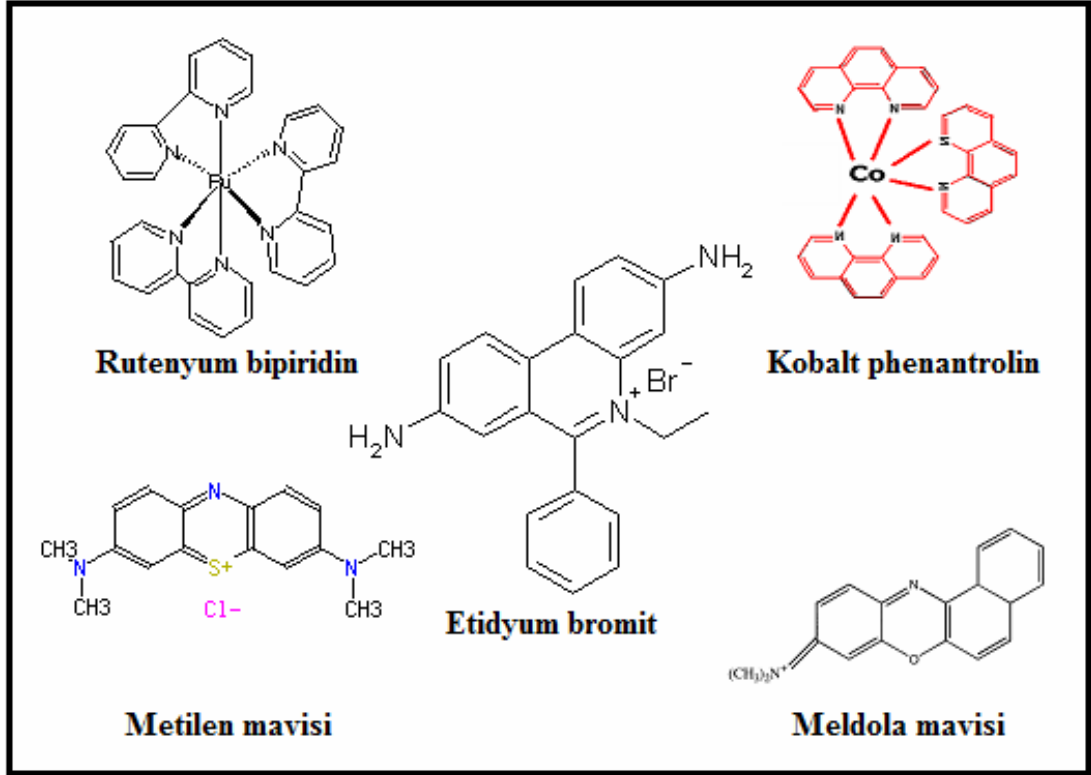
1.1.5.1.1. İndikatöre Dayalı DNA Dizi Algılama Yöntemleri:

İndikatöre dayalı DNA dizi algılanması, ya DNA'ya interkale olabilen (metal kompleksleri, antibiyotikler) [7, 16, 17, 26, 31, 79, 150] veya DNA dizisindeki bazlarla özgün olarak etkileşen (MB, Ru(bpy)₃³⁺, vb.) elektroaktif maddeler (indikatör) ile tayin edilebilmektedir [31, 33, 34, 40, 57, 121, 123, 148]. Elektrokimyasal çeviriciler, hibridizasyon olayını analitik sinyale çevirmede etkin bir şekilde kullanılmaktadır.

Elektrot yüzeyinde oluşan hibrit ile etkileşen indikatörün neden olduğu artan veya azalan elektrokimyasal yanıt hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır [96, 100, 101, 148, 150, 151].

Elektroaktif bir maddenin indikatör olarak kullanılabilmesi için ssDNA ve dsDNA ile etkileşimi sonucu alınan yanıtlar arasında anlamlı bir fark olması gerekmektedir. Meldola Mavisi (MDB) [57, 67], Ru(II) [7, 31, 123, 151], Co(III)

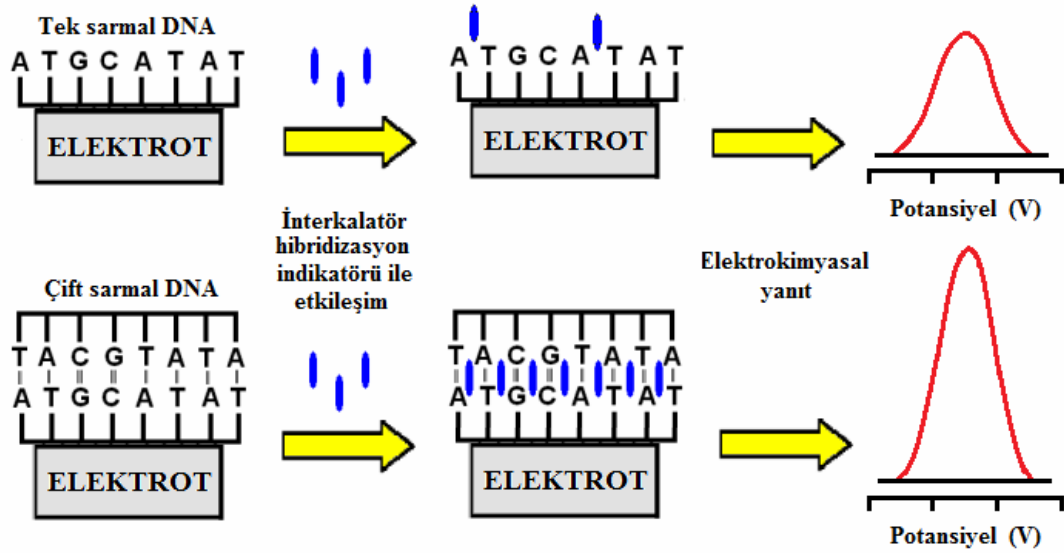
[16, 17], Os(II), Os(IV) [26, 87, 123]' ün 1,10-fenantrolin ve 2,2'-piridin klatları [16] hibridizasyon indikatörü olarak sıklıkla kullanılan maddelerdir.



Şekil 15: Bazı hibridizasyon indikatörlerinin kimyasal yapıları

1.1.5.1.1.1. İnterkalatör Madde ile DNA Dizi Algılama Yöntemi:

İnterkalasyon; bir maddenin DNA çift sarmalı arasına girip birikmesidir. Bu durumda; Şekil 16'da gözlendiği gibi; maddenin birikmesinden dolayı çift sarmal DNA (dsDNA) ile etkileşimden sonra alınan madde sinyali tek sarmal DNA (ssDNA) ile etkileşimden sonra alınan madde sinyaline göre oldukça yüksektir [14, 122, 123, 141].

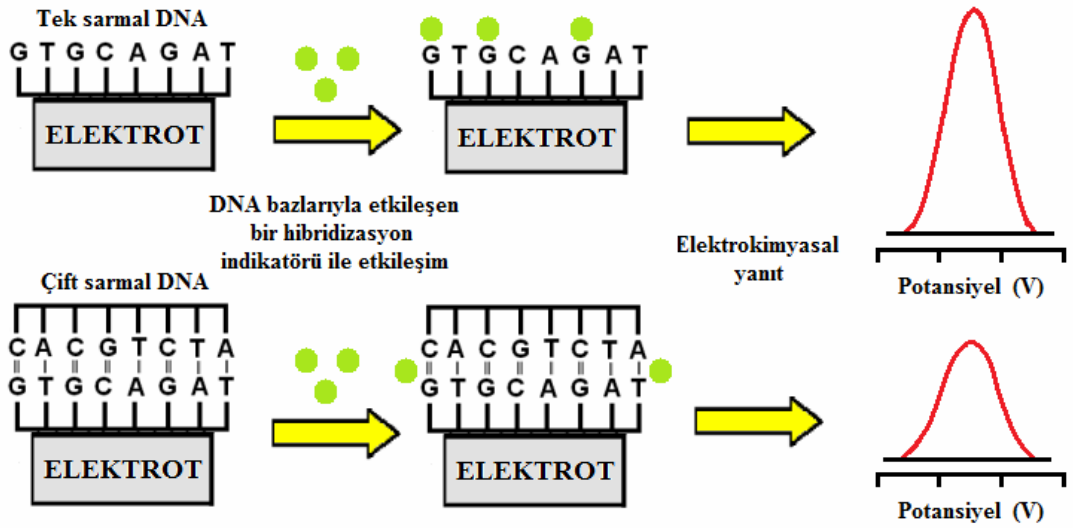


Şekil 16: İnterkalatör bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması

Çalışmamızda indikatöre dayalı hibridizasyon algılama yöntemi kullanılmış olup, indikatör olarak interkalatör özellikteki MDB'den yararlanılmıştır.

1.1.5.1.1.2. DNA Bazlarının En Az Biriyle Etkileşen Bir İndikatör ile DNA Dizi Algılama Yöntemi:

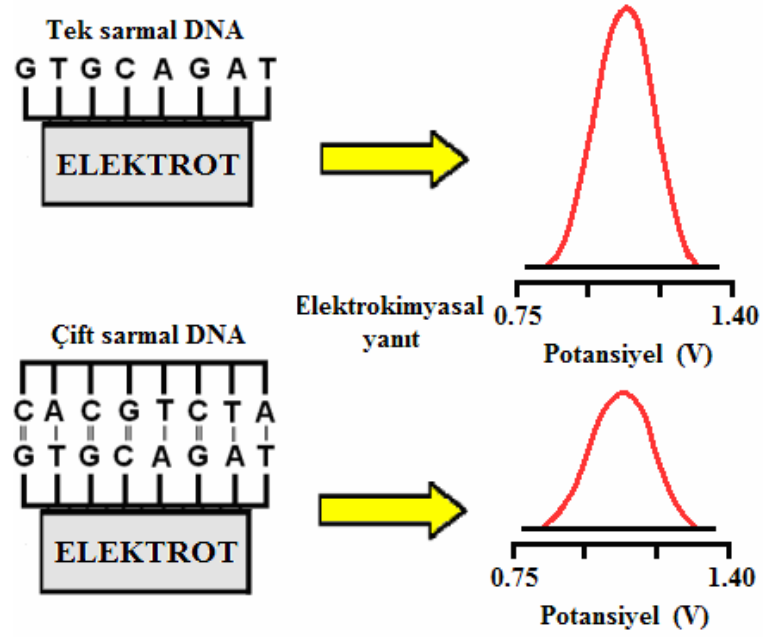
Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan madde DNA'nın bazlarından biriyle (özellikle Guanin) etkileşiyor olabilir. Bu durumda; Şekil 17'de görüldüğü gibi; tek sarmal DNA (ssDNA)'da bazlar açıkta olduğundan dolayı alınan madde sinyali, hibridizasyondan sonra oluşan çift sarmal DNA (dsDNA)'da bazlar kapalı olduğundan dolayı alınan madde sinyaline oranla oldukça yüksektir [15, 17, 31, 32, 33, 56, 59, 66, 90, 100, 101, 103, 151, 154].



Şekil 17: DNA bazlarından biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması

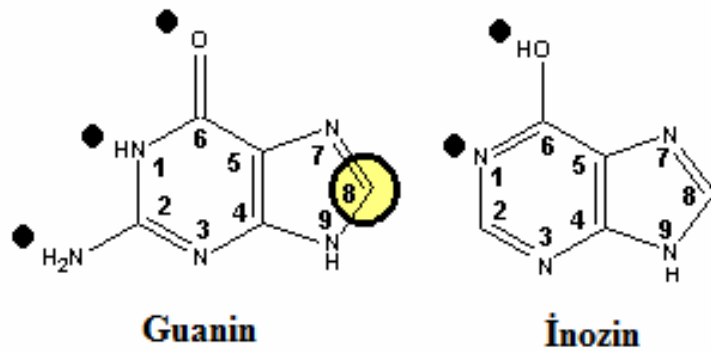
1.1.5.1.2. İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemleri:

DNA'daki en elektroaktif ve kararlı yanıt veren baz guanin bazıdır ve yaklaşık +1,0V civarında yükseltgenir. Elektrot yüzeyine tutturulan tek sarmal DNA dizisindeki guaninler açık olduğu için yükseltgenme sinyali yüksek, hibridizasyondan sonra ise sitozinle aralarında oluşturdukları hidrojen bağı köprüleri nedeniyle yükseltgenmesi kısmen kapalı duruma gelir ve bu nedenle tek sarmala göre daha düşük sinyal verir [58, 83, 137, 145].



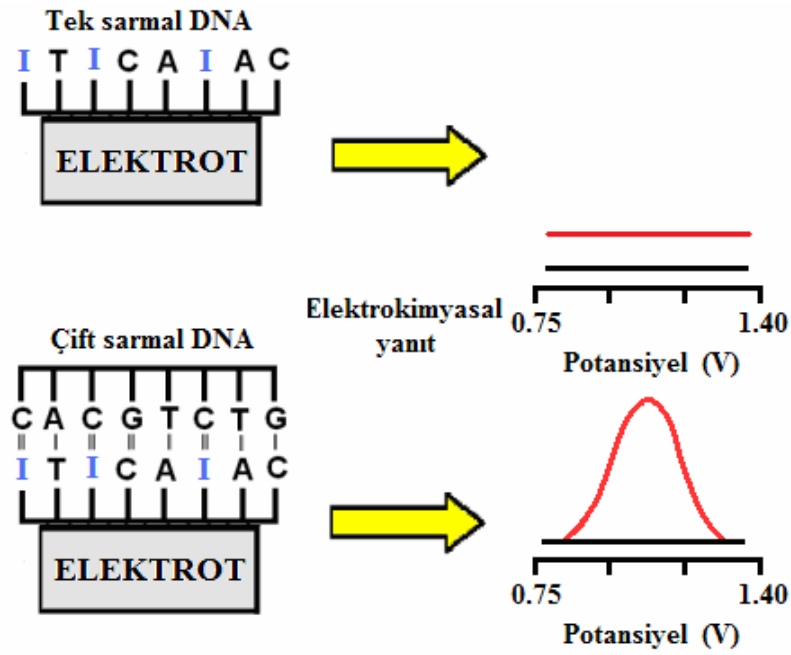
Şekil 18: Guanin bazının yükseltgenmesine dayalı indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi

Diğer bir tayin yöntemi ise EVET/HAYIR SİSTEMİ adı verilen ve tek sarmal DNA(prob) dizisinden bulunan guanin bazları yerine bir guanin analogu olan inozinlerin sentezlettirilmesidir.



Şekil 19: Guanin ve inozinin kimyasal yapıları

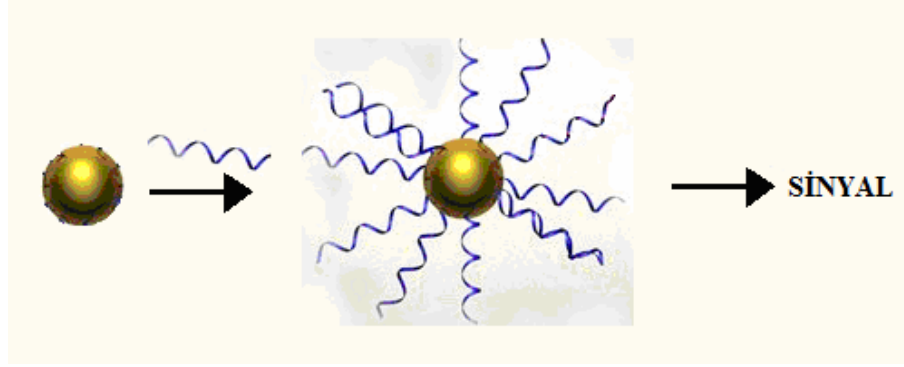
İnozin guanine yapıca benzemesine ve sitozinle ikili bağ oluşturmaya rağmen herhangi bir yükseltgenme sinyali vermemektedir. Bu nedenle elektrot yüzeyinde tek sarmal DNA dizisi varken +1,0V'da herhangi bir yükseltgenme sinyali alınmazken, hibridizasyondan sonra hedef diziden gelen guaninlerden dolayı bir yükseltgenme sinyali gözlenir.



Şekil 20: İnozinli prob ilkesine dayalı indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi

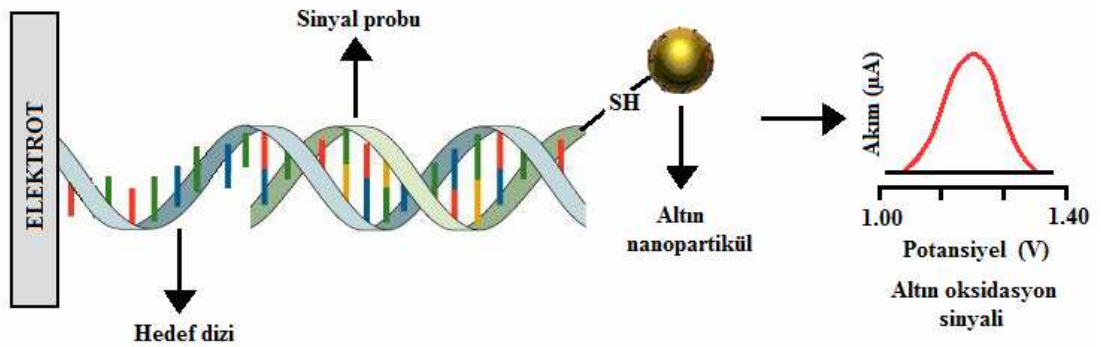
1.1.5.1.3. Nanopartikülle İşaretleme Dayalı DNA Dizi Algılama Yöntemleri:

Bu yöntemde elektrokimyasal olarak tayinde genellikle metalik nanopartikülün tayini esas olarak alınmıştır [147]. Bu amaçla özellikle altın nanopartiküllerden yararlanılmaktadır ve genellikle nanopartikül yüzeyi oligonükleotidlerle kaplanarak tayinler gerçekleştirilmektedir [35, 50, 95, 98] .



Şekil 21: Nanopartikülle işaretlemeye dayalı DNA dizi algılama yöntemi (1)

Özsöz ve arkadaşları tek kullanımlık kalem elektrot yüzeyinde hibridizasyonla bağlanan altın işaretli probun altın grubunun yükseltgenmesine dayalı tayinler yapmışlardır [105].



Şekil 22: Nanopartikülle işaretlemeye dayalı DNA dizi algılama yöntemi (2)

1.1.5.2. DNA Biyosensörlerinin Kullanım Alanları:

DNA biyosensörleri günümüzde kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların tanısında, gıdayı ve çevreyi tehdit eden mikroorganizma tayinlerinde, biyolojik ve kimyasal silahların tayininde oldukça sık kullanılır hale gelmiştir.

Kan, serum, doku, hücre vb. gibi biyolojik materyallerden belirli bir hastalık, mutasyon gibi kalıtsal bir davranışı simgeleyen özgün DNA dizilerinin saptanma çalışmaları, son yıllarda tıp ve diğer bilimlerde önem kazanmış ve bu çalışmalar bakteri, virüs, parazit ve mantar kökenli hastalıklar ve pek çok kalıtsal hastalıklara neden olan mutasyonların saptanmasında kullanılmaya başlanmıştır.

Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörleri, kalıtsal ve infeksiyon hastalıkların tanısında bilinen rutin analiz yöntemlerine göre alternatif olarak daha hızlı, ucuz ve kolay bir yöntemdir.

Elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle K. Millan ve arkadaşları tarafından, kistik fibrozis'e ait DNA dizileri kullanılarak bu hastalığın tayini yapılmıştır [93]. Bu tekniği kullanarak, J. Wang ve arkadaşları E. coli, [142]'e ait DNA dizilerini tayin etmişlerdir. S. Mikkelsen'in 1994 yılında yapmış olduğu, kalıtsal hastalıkların dizi seçici DNA biyosensörleriyle tayin projesi, Amerika Birleşik Devletleri tarafından korumaya alınmıştır (A.B.D. Patent No: 5.312.527-05/17/1994).

Meric ve arkadaşları, Hepatit B ve TT Virüsüne ait gen dizilerinin, bir hibridizasyon indikatörü yardımıyla tayinini gerçek hasta örnekleri kullanılarak gerçekleştirmişlerdir [90]. Ozkan ve arkadaşları, kanın pıhtılaşma faktörlerinden biri olan Faktör V'e ait gen dizisinin mutasyonuna yönelik çalışmalarında herhangi bir hibridizasyon indikatörü kullanmaksızın hastalık tayinini gerçekleştirmişlerdir [102].

Çevre sağlığını tehdit eden özellikle doğal su kaynaklarında vs çeşitli bulaşıcı hastalıklara yol açan mikroorganizmaların tanınması için geliştirilen biyosensörlerinin tasarımı da nükleik asit hibridizasyonuna dayalıdır. Mikroorganizmaya ait bilinen bir DNA dizisinin, karşılık gelen hedef diziyle bilinmeyen bir DNA örneği içersinde oluşturduğu baz çiftinin biyokimyasal yapısı

bu olayı mümkün kılmaktadır. Fiziksel sinyal çeviricilerin yüksek duyarlılığı ve DNA hibridizasyonunun yüksek seçiciliği, elektrokimyasal biyosensörleri çevre analizlerinin vazgeçilmez bir parçası kılmaktadır [133].

Ozsoz ve ark. çevre sağlığını tehdit eden sulardaki Cyanobacteria sınıfından Microcystis mikroorganizmalarının tayinini Microcystis spp. mikroorganizmalarının 16S ribozomal DNA (rDNA)daki baz polimorfizmine dayalı 17 bazlı tek zincirli (ss) oligonükleotit olan probu karbon pastası elektrodu (CPE) yüzeyine tutturarak ve hibridizasyon indikatörü olarak MB kullanarak Microcystin spp. mikroorganizmasına ilişkin oligonükleotitlerin voltametrik tayinini gerçekleştirmişlerdir.

DNA'nın bazı kimyasal maddelerle ve tepkimelerle (ilaç, çevresel atıklar, radyasyon vs.) etkileşmesi ve geliştirilen yeni yöntemlerle bunun incelenmesi ; yeni ilaç tasarımı, çevresel atık analizleri, çeşitli kimyasal ve biyolojik silahların tayinine yönelik yeni yöntem geliştirme açısından önemlidir.

Son yıllarda eşitli ülkelerin biyolojik silah amaçlı kullandığı, genetik olarak modifikasyona uğramış mikroorganizmalar, elektrot yüzeyine tutturulan ve o mikroorganizmayı temsil eden prob dizi ile hibridizasyonu sonucu, modifiye edilmiş ve doğal olarak bulunan mikroorganizmaya ait alınan sinyal farklılaşmasından yola çıkılarak tespit edilebilir [84, 89].

Günümüzde kimyasal silah amaçlı kullanılan özellikle organofosfat bileşimine sahip pek çok madde, DNA'ya oldukça önemli hasar vermektedir. Bunları biyosensör teknolojisine dayanarak DNA'ya verdiği hasardan yola çıkarak ya da direkt enzim teknolojisi yöntemleriyle saptamak mümkündür. Bu konuda Simonian ve arkadaşları, organofosfatlı savaş ajanları ve pestisit tayinini optik biyosensöre

dayalı olarak [119], Wang ve arkadaşları, nitroaromatik patlayıcılar ve organofosfatlı sinir gazlarının tayinini tek kanal mikroçip sisteminde flow injection yöntemini kullanarak [132], Tusarova ve arkadaşları, organofosfatlı kimyasal savaş ajanlarını asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonuna dayanarak [126] yine benzer bir yöntem ile enzimbiyosensörü kullanarak Mionetto ve arkadaşları organik çözeltilerde asetilkolin esterazdan yola çıkarak pestisit tayinini [94] gerçekleştirmişlerdir.

1.2. ELEKTROKİMYA

Maddelerin elektriksel davranışlarını ve elektrik enerjisi ile kimyasal tepkimeler arasındaki ilişkileri inceleyen bilim dalına **elektrokimya**, maddelerin elektrokimyasal özelliklerini analiz amacıyla kullanılan yöntemlere de **elektroanalitik yöntemler** adı verilir [125].

Elektrokimyasal tepkimelerde, yükseltgenme(elektron verme) - indirgenme (elektron alma) reaksiyonları söz konusudur ve elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede gerçekleşir.

Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi için, incelenecek maddeyi içeren ve elektriksel iletkenliği sağlayan bir çözelti(tampon çözelti), maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrot sistemi (genellikle üçlü elektrot sistemi) ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir çevirim sistemi (transducer) gereklidir.

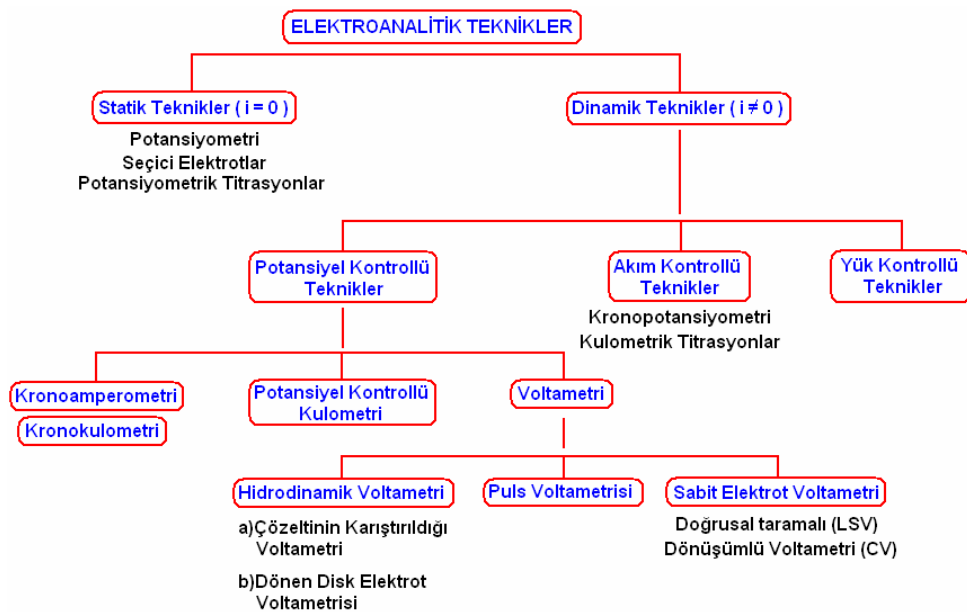
Elektroanalitik yöntemlerin avantajlarını sıralayacak olursak;

- Hızlı ve tekrar edilebilirlikleri yüksektir,
- Kullanılan cihazlar diğer yöntemlerde kullanılan cihazlara göre daha ucuzdur,

- Analizi yapılacak maddenin çok düşük tayin sınırlarına kadar ulaşılabilir,
- Elde edilen elektrokimyasal ölçümler çoğu kez bir elementin ya da molekülün özel bir yükseltgenme basamağı için spesifikler [120].

Bütün elektrokimyasal tekniklerde, elektrot-çözelti sistemine bir elektriksel etki yapılarak sistemin verdiği cevap ölçülür. Hemen hemen bütün elektrokimyasal tekniklerde potansiyel, akım ve zaman parametreleri bulunur ve bu parametrelere tekniğin adında yer verilir. Mesela, voltametri, kronoamperometri, kronokulometri gibi adlandırmalarda sırasıyla potansiyel-akım, zaman-akım ve zaman-yük parametrelerinden teknik hakkında kabaca bilgi edinilebilir.

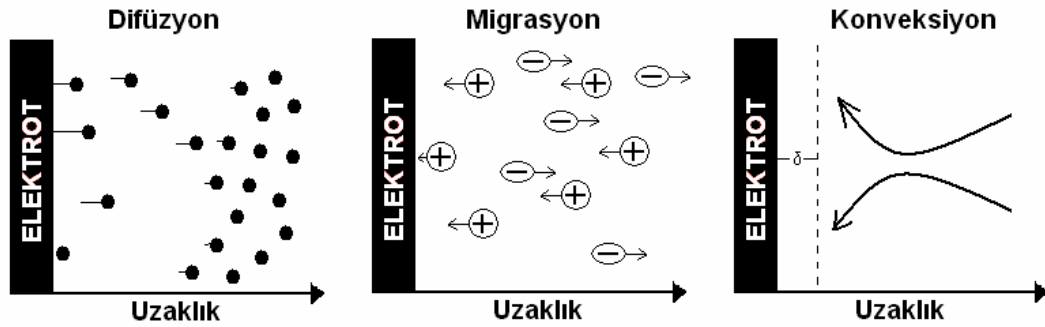
Elektroanalitik metotların çok çeşitli sınıflandırma yolları vardır. En yaygın kabul görmüş olan sınıflandırma metodu Şekil’de görüldüğü gibi genelde net akımın sıfır olduğu denge durumundaki statik metotlar ve denge durumundan uzakta net akımın gözlemlendiği dinamik metotlar olmak üzere ikiye ayrılır. Dinamik metotlar çoğunlukla ya potansiyel kontrollü ya da akım kontrollüdür [6].



Şekil 23: Elektroanalitik tekniklerin sınıflandırılması

1.2.1. Elektrokimyasal Olaylarda Kütle Taşınım Yolları

Bir elektrolitteki herhangi bir taneciğin bir yerden başka bir yere taşınabilmesi için, o taneciğe bir kuvvetin etkimesi gerekir. Bu kuvvet kimyasal, elektriksel yada mekanik bir kuvvet olabilir. Derişim farkından kaynaklanan kimyasal kuvvetin oluşturduğu taşınmaya **difüzyon**, elektriksel kuvvetlerin neden olduğu taşınmaya **göç(migrasyon)**, karıştırma ve elektrodun dönmesi gibi mekanik kuvvetlerin neden olduğu taşınmaya da **yığınsal taşınma(konveksiyon)** denir [6, 120, 125].



Şekil 24: Kütle taşınım olaylarının şematik gösterimi

1.2.2. Voltametri

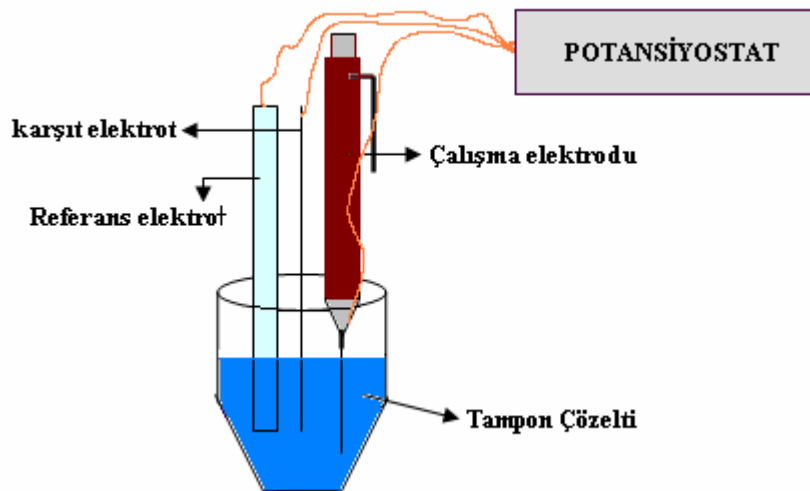
Voltametri, elektrot potansiyelinin değiştirilmesi ile elektrolitik hücreden geçen akımın değişmesine dayanan elektroanalitik metotların genel adıdır. Voltametri Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında bulunan voltametrinin özel bir tipi olan polarografiden geliştirilmiştir. Voltametrinin önemli bir dalı olan **polarografi**, diğer voltametri tiplerinden çalışma elektrodu olarak bir damlayan cıva elektrodu (DCE) kullanılması bakımından farklılık gösterir.

Voltametri, çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme-indirgenme olaylarının, yüzeylerdeki adsorpsiyon olaylarının ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerindeki elektron aktarım mekanizmalarının temel çalışmalarını kapsayan ve çok başvurulan duyarlı ve güvenilir bir yöntem durumuna gelmiştir.

Voltametrde, bir çalışma elektrodu içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin dayandığı karakteristik bir akım cevabı oluşturur. Uygulanan potansiyele karşı akım grafiğine de **voltamogram** adı verilir [6, 120, 125, 152].

1.2.2.1. Voltametrik Cihazlar

Voltametrik analizde kullanılacak cihazlar, elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır [6, 120, 125, 152].

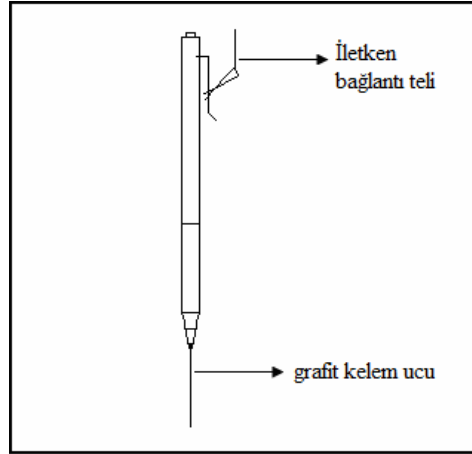


Şekil 25: Üçlü elektrot sistemi

Çalışma elektrodu: Yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği ve zamanla potansiyeli analit konsantrasyonundaki değişimlerle beklenen şekilde değişen elektrottur. Çok çeşitli tür ve şekilde çalışma elektrot kullanılır. Bunlar civa, platin, altın, camısı karbon vb. elektrotlardır. Genel olarak, kullanılan çalışma elektrotları polarizasyonu arttırmak için yüzey alanları küçük tutulur.

Çalışma elektrodunun yapımında kullanılan iletken malzeme, platin ya da altın gibi inert bir metal; karbon, pirolitik grafit ya da camısı karbon; kalay oksit ya da indiyum oksit gibi yarı-iletken veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metal olabilir. Bu tür elektrotların kullanıldığı potansiyel aralığının tespiti çok önemlidir. Özellikle de bu potansiyel aralığı, sulu çözeltilerde sadece elektrot malzemesine değil, aynı zamanda bu elektrotların daldırıldığı çözeltinin bileşimine bağlı olarak da değişir. Pozitif potansiyel sınırları genellikle moleküler oksijen verecek şekilde, suyun yükseltgenmesi sonunda oluşan büyük akımlarca belirlenir. Negatif potansiyel sınırları yine suyun indirgenmesi sonunda oluşan hidrojenden kaynaklanır.

Çalışmamızda oldukça kolay hazırlanması, tek kullanımlık ve ucuz olması nedeniyle kalem grafit elektrot çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır [60, 138]. Yapılan çalışmalarda bu elektrotlarla alınan sonuçların daha tekrarlanabilir olduğu ve daha düşük tayin sınırlarına ulaşılabilirdiği gözlenmiştir.



Şekil 26: Kalem grafit elektrodun şematik olarak gösterimi.

Referans elektrot : Analit çözeltisinin bileşiminden bağımsız sabit bir elektrot potansiyeline sahip bir yarı hücredir ve anot olarak ele alınır. Elektrik direnci çok büyük olduğu için hemen hemen hiç akım geçmez. Referans elektrot genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrottur.

Bir referans elektrot, kolay hazırlanabilmeli, potansiyelin sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olmalı, belli bir akım aralığında tersinir davranmalı, yani içinden küçük akımlar geçtiğinde bile gerilimi sabit kalmalıdır. Polarize edilemeyen bir elektrot olmalı, potansiyeli zamanla değişmemeli, doğru ve tekrarlanabilen bir potansiyel değeri hızlı bir şekilde okunmalıdır [6, 120, 125, 152].

Çalışmamızda Ag/AgCl referans elektrodu kullanıldığı için aşağıda bu referans elektrotla ilgili bilgi verilmiştir.

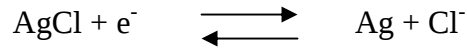
- **Gümüş–gümüş klorür referans elektrot**

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

göre daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilmesidir. Aynı zamanda gümüş iyonları civa (I) iyonlarına göre daha az sayıda analitle reaksiyona girerler.

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

Oluşan tepkime şu şekildedir;



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

Karşıt elektrot: Bu elektrot çalışma elektroduyla bir çift oluşturur onu elektronlarla besler, ayrıca ortamda oluşabilecek istenmeyen akımların üzerinden geçmesine izin verir. Sinyal kaynağından çıkan elektriğin çözeltiden geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlamaktadır. Karşıt elektrotta genellikle helezon şeklinde bir platin tel veya bir civa havuzudur.

Çalışmamızda platin tel karşıt elektrot olarak kullanılmıştır.

Tampon çözelti: Elektriksel iletkenliği sağlar.

Potansiyostat: Çalışma elektrodunun potansiyelini sabit tutar.

1.2.2.2. Voltametrinde Kullanılan Bazı Önemli Tanımlamalar:

Voltametrinde akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma **katodik akım**, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise **anodik akım** adı verilir. Geleneksel olarak, katodik akımlar daima pozitif, anodik akımlar ise negatif işaretlerle gösterilir.

Bir voltammogramı niteleyen üç temel büyüklük **artık akım**, **sınır(limit akım)** ve **yarı dalga potansiyelidir** [6, 120, 125, 152].

Belli bir potansiyelden sonra akımın sabit kaldığı bir plato bölgesine ulaşılır. Bu akıma **sınır akımı**, i_s adı verilir. Bu akım elektrot yüzeyinde elektroetkin türün derişiminin sıfıra gittiği andaki akım değeridir ve potansiyelden hemen hemen bağımsızdır.

Sınır akımı, analitin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızındaki sınırlamadan kaynaklanır. Sınır akımları genellikle analitin derişimi ile doğru orantılıdır.

$$i_s = k \cdot C_A$$

Burada, C_A analit derişimi ve k ise bir sabittir.

Bu akımın büyüklüğü elektroetkin maddenin derişimine ve elektrot yüzeyine kütle taşınım hızına bağlıdır. Kütle taşınımı daha öncede belirtildiği gibi göç, difüzyon ve konveksiyon olayları ile gerçekleşir. Ayrıca elektrot tepkimesine eşlik eden kimyasal tepkime hızları, adsorpsiyon ve desorpsiyon hızları gibi olaylar da kütle taşınım hızında etkin olabilmektedir. Bu olayların tümü gerçekleşiyorsa, her birinin sınır akımda katkısı olacaktır. Eğer taşınım olaylarından yalnızca biri sınır akımı belirlemede egemense, sınır akım bu olayın adıyla anılır. *Göç akımı, difüzyon akımı, adsorpsiyon akımı, kinetik akım gibi.*

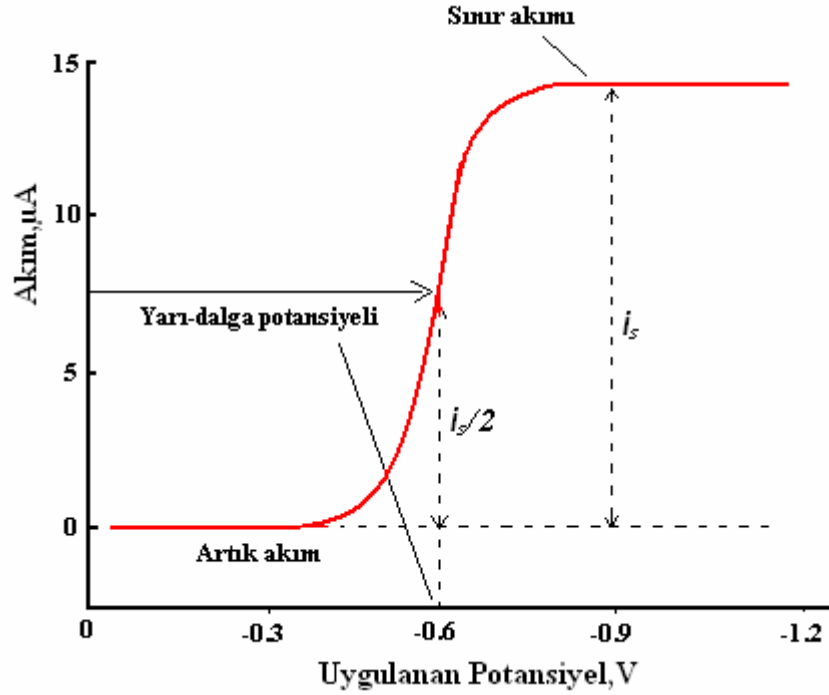
Çalışma ortamına; elektroetkin olmayan ve derişimi elektroetkin iyonun derişiminin 50–100 katı olacak şekilde bir elektrot katılırsa kütle taşınımını büyük oranda bu elektrolit üstleneceğinden elektroetkin iyonun göç akımı yok sayılacak düzeye indirgenebilir. Bu görevi yüklenen elektroetkin olmayan elektrolite **destek elektrolit** denir.

Destek elektrolit yalnızca göçü üstlenmekle kalmaz, aynı zamanda elektrokimyasal pilin iletkenliğini de sağlar. Direnci düşürdüğü için ohmik düşmeden kaynaklanan sorunları da azaltır. Sakıncası ise, içerebileceği elektroetkin safsızlıklar nedeni ile artık akımı arttırma olasılığıdır. Bu nedenle destek elektrolitler olabildiğince saf olmalıdır.

Elektrot üzerinde henüz reaksiyon olmadığı zaman küçük de olsa bir akım gözlenir. Bu akıma **artık akım** denir. Artık akımın büyüklüğü yöntemin duyarlılığını belirler. Bu akım giderildiği veya en aza indirildiği oranda duyarlılık artar. Duyarlılık arttırma doğrusal tarama dışındaki kimi özel tekniklerle olasıdır(darbe, diferansiyel darbe, kare dalga, alternatif akım voltametreleri gibi).

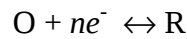
Sınır akımı ile artık akım arasındaki yükseklik dalga yüksekliğidir. Dalga yüksekliği, elektroaktif maddenin konsantrasyonu ile doğrusal olarak artar.

Yarı dalga potansiye ; sınır akımının yarısına ($i_s/2$) karşılık gelen potansiyel değeridir ve $E_{1/2}$ ile gösterilir. Genellikle derişimden bağımsız olan bu değer elektroetkin maddenin türüne ve ortama bağlı sabit bir değerdir. Bu nedenle türleri nitelemede kullanılan bir büyüklüktür. Ayrıca, standart yarı hücre potansiyeli ile yakından ilişkilidir [6, 120, 125, 152].



Şekil 27: Doğrusal taramalı voltammogram eğrisi

Çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonları olurken diğerinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir. Bu reaksiyonlarda;



O ve R'nin, sırasıyla, redoks çiftinin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade ettiği tepkime ile gösterilmektedir. Termodinamik kurallarla kontrol edilen sistemlerde, elektrot potansiyeli, elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişiminin $[C_O(0,t)$ ve $C_R(0,t)]$, **NERNST Denklemine** göre saptanmasında kullanılabilir.

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

E^0 = Redoks tepkimesi için standart potansiyel

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

T = Sıcaklık ($^{\circ}\text{K}$)

n = Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

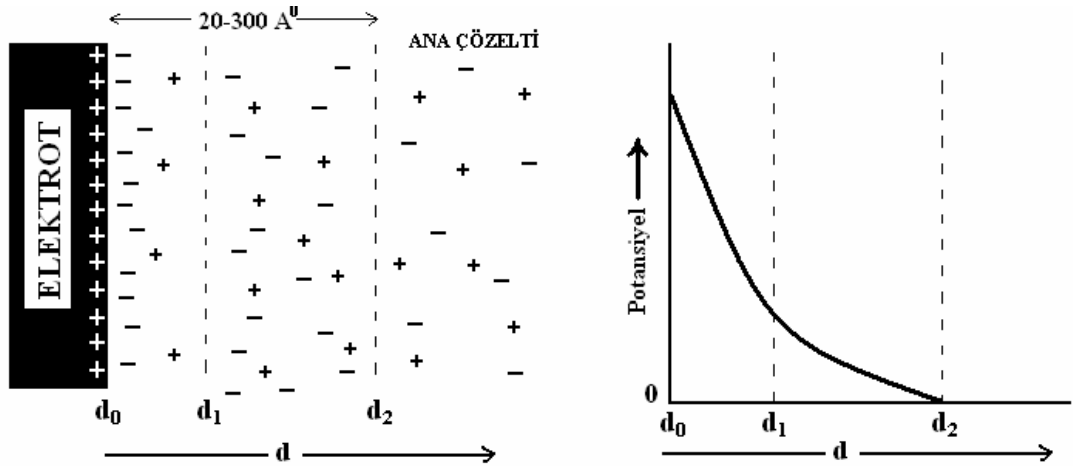
F = Faraday sabiti (96,487 coulombs)

Elektrot çözelti ara yüzeyinden akım iki tip işlemle iletilir. Birincisinde, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonu olurken diğerinde indirgenme reaksiyonu olur, bu sırada elektronların doğrudan aktarımı ile akım iletilir. Bu tip işlemlere, bir elektrottaki kimyasal reaksiyon miktarının geçen akımla orantılı olduğunu ifade eden Faraday yasalarına uygun olması nedeniyle **Faradayik işlemler** adı verilir, bu şekilde oluşan akımlara **Faradayik akımlar** denir. *Kısacası; bir elektrokimyasal hücrede elektrot/çözelti ara yüzeyi boyunca bir yükseltgenme/indirgenme işlemiyle taşınan akımdır. Reaksiyondan (analiz edilecek maddeden) kaynaklanan akımdır.*

Analizlenecek madde ve ürünlerin konsantrasyonları yalnızca elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak ve Nerst tabakası içinde değişir.

Faradayik olmayan akım (kapasitif akım) (i_c) : elektrot/çözelti ara yüzeyindeki yüklü bir çift tabakada oluşan bir yükleme akımıdır. Bir elektrotun bir elektrolit çözeltisine daldırılması ve negatif yükle yüklenmesi ile çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin ara yüzeyin iki tarafında birikmesi ile bu bölgede bir elektriksel çift tabaka oluşur. Oluşan bu çift tabaka, bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek ve indirgenecek madde olmasa dahi bir akım

oluşur. Bu akım reaksiyona bağlı değildir; sistemden kaynaklanır ki bu akıma kapasitif akım denir. Ne kadar düşük olursa o kadar doğru ölçüm yapılır.



Şekil 28: Elektrot yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabaka

Örneğin ilk önce elektroda pozitif bir potansiyel uygulandığında, elektroda bitişik çözeltinin yapısını dikkate alalım. Potansiyel, uygulandıktan hemen sonra eğer elektrodun yüzeyinde reaksiyona girebilecek aktif bir tür yoksa hızlı bir şekilde sıfıra düşen anlık bir akım dalgası oluşacaktır. Bu akım her iki elektrodun da yüzeyinde bir negatif yük fazlalığı (veya eksikliği) yaratan bir yükleme akımıdır. Fakat iyonik hareketliliğin bir sonucu olarak elektrotlara bitişik olan çözelti tabakalarında derhal bir zıt yüklenme oluşur. Bu etkileşim şekilde görülmektedir. Metal elektrodun yüzeyinde uygulanan pozitif potansiyelin bir sonucu olarak oluşan pozitif yük fazlalığı gösterilmektedir. Yüklü çözelti tabakası iki kısımdan oluşmaktadır: (1) bir yoğun iç tabaka (d_0 'dan d_1 'e), bu tabakada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça potansiyel mesafe ile doğrusal ilişkili olarak azalır ve (2) bir difüze tabaka (d_1 'den d_2 'ye), burada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça ortaya çıkan potansiyel üstel olarak

azalır. Elektrot yüzeyindeki ye yüzeye bitişik çözeltideki bu yük topluluğu bir **elektrikse çift tabaka** olarak adlandırılır [6, 120, 125, 152].

Toplam akım(i)=faradayik akım(i_f)+kapasitif akım(i_c) olduğundan kapasitif akım azalırsa duyarlılık artar.

Genellikle $10^{-3}M$ ve üstünde kapasitif akım faradayik akımdan küçüktür ve çalışılabilir. $10^{-4}M$ da kısmen iyi sonuç alınır. 10^{-5} ve üzerinde kapasitif akım faradayik akımdan çok büyük olacağı için çalışılmaz.

1.2.2.3. Voltametrik Akımlar:

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

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

şeklinde bir ifade ile verileceği gösterilebilir. Burada:

I = Amper cinsinden akımı,

N = Analitin molü başına elektronların mol sayısını,

F = Faraday sabiti (96487 Coulomb / mol elektron),

A = cm^2 cinsinden elektrot yüzey alanını,

$D_A = A'$ nın cm^2s^{-1} cinsinden difüzyon katsayısını,

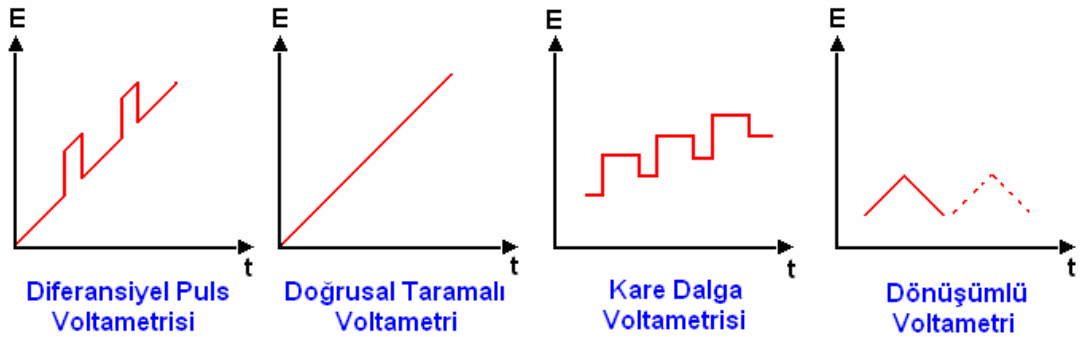
$C_A = mol/cm^3$ cinsinden A'nın konsantrasyonunu göstermektedir.

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

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

1.2.2.4. Voltametrde Kullanılan Uyarma Sinyalleri:

Voltametrde, bir mikroelettrot içeren elektrokimyasal hücreye değıştirilebilir bir potansiyel uyarılma sinyali uygulanır. Bu uyarılma sinyali yönteminin dayandığı karakteristik bir akım cevabı oluşturur. Voltametrde en çok kullanılan dört uyarma sinyali şekli’de verildiği gibi doğrusal taramalı, diferansiyel darbe, kare dalga ve üçgen dalgadır [6, 120, 125, 152].



Şekil 29: Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

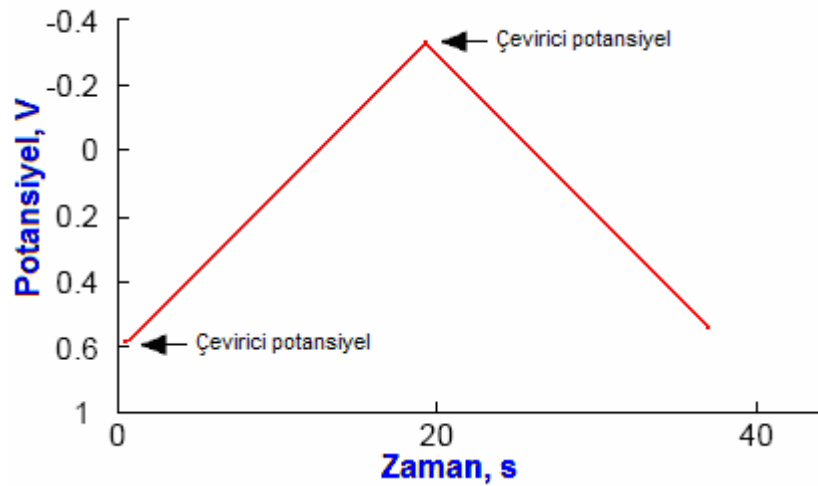
1.2.2.4.1. Uyarma Sinyalinin Çeşidine Göre Voltametrik Yöntemler

1.2.2.4.1.1. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri (CV) , sürekli değışen potansiyel değerlerine karşı belirli bir aralıkta, karıştırılmayan ortamda çalışma elektrodunun verdiği akım cevabı

olarak tanımlanabilir. Elektrokimyasal bir analizde elektroaktif maddenin yükseltgenme – indirgenme tepkime mekanizmalarının aydınlatılmasında ve elektrokimyasal bir analize başlamadan önce sistemdeki maddelerin elektriksel davranışlarının saptanmasında sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Fakat miktar tayinine dayalı analizlerde kullanım alanları daha sınırlıdır.

Çalışılan potansiyel aralığı, verilen bir deney için bir veya daha fazla analitin yükseltgenme veya indirgenmenin meydana geldiği potansiyel aralığıdır buna çevirici potansiyeller de denilir.

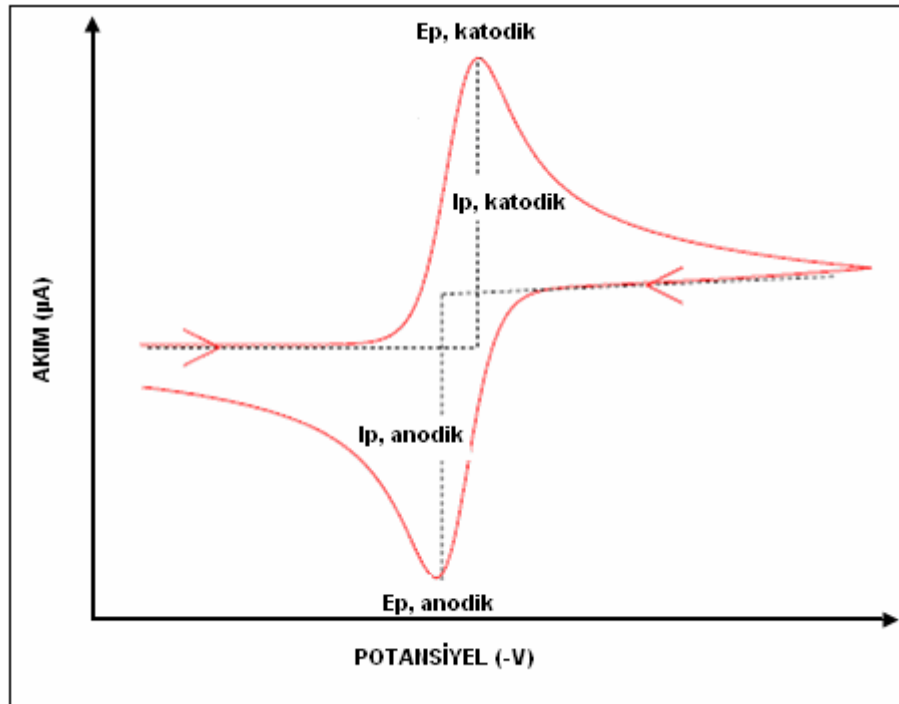


Şekil 30: Dönüşümlü voltametrde kullanılan uyarılma sinyali

Şekilde gösterildiği gibi potansiyel doğrusal olarak değiştirilir daha sonra tarama yönü tersine çevrilir ve orijinal değerine geri döner (üçgen dalga şekilli potansiyel). Başlangıç taramasının yönü numunenin bileşimine bağlı olarak negatif ya da pozitif olabilir.

Bu yöntemde, örnek çözeltisine potansiyel uygulandığında, elektrot yüzeyi uygulanan potansiyele göre pozitif ya da negatif bir karakter gösterir ve çevresindeki

çözeltiden elektron alır ya da çözeltiye elektron verir bu da ölçülebilir bir akım oluşmasına neden olur. Çalışma ortamında karıştırma yapılmadığı için elektron transferi elektrot yüzeyi ve çevresinde olur, bu nedenle elektrot çevresindeki bileşen miktarı zamanla azalır sonuç olarak oluşan akımda zamanla bir pik yapar ve azalmaya başlar bu pikler indirgenme ve yükseltgenme pikleridir.



Şekil 31: Pik potansiyellerini ve akımlarını gösteren klasik bir dönüşümlü voltamogram

Bir dönüşümlü voltamogramın en önemli parametreleri katodik pik potansiyeli E_{pc} , anodik pik potansiyeli E_{pa} , katodik pik akımı I_{pc} ve anodik pik akım I_{pa} 'dır.

Tersinir bir elektrokimyasal tepkimede analite ait pik akımı aşağıdaki eşitlikle bulunur.

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

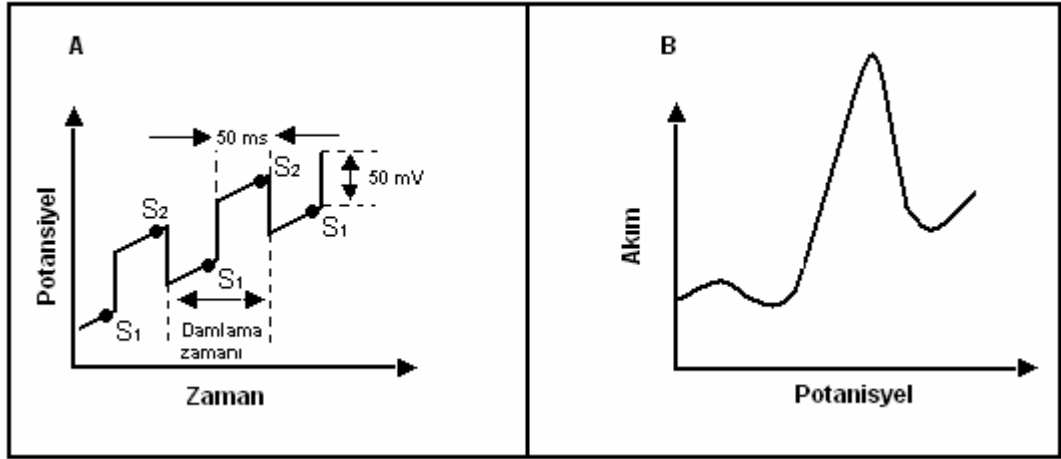
i_p analite ait pik akımı, n transver edilen elektron sayısı, A elektrot yüzey alanı(cm^2), D türlere ait difizyon katsayısı(cm^2/s), C türlerin çözelti içerisindeki derişimleri(mM), v ise tarama hızıdır(V/s).

Tersinir bir reaksiyon için anodik ve katodik pik akımları mutlak değeri olarak yaklaşık olarak eşittir.

Dönüşümlü voltametrde analitin duyarlılık sınırı 10^{-5} M'dır. Dönüşümlü voltametri rutin kantitatif analizlerde kullanılmadığı halde, özellikle organik ve metal organik sistemlerde yükseltgenme - indirgenme işlemlerin mekanizma ve hız çalışmaları için önemli bir araçtır. Bu yöntem, normal olarak elektrokimyasal olarak belirtilebilen bir sistemin araştırılması için seçilen ilk yöntemdir [6, 120, 125, 152].

1.2.2.4.1.2. Diferansiyel Darbe Voltametrisi

Diferansiyel darbe voltametrisinde uyarma sinyalleri; doğrusal bir tarama esnasında periyodik darbelerin oluşturulmasıyla gerçekleştirilir. Bu yöntemle, yarı – dalga potansiyelleri arasında yaklaşık 0,05 V fark olan maddelerin bile pik maksimumları elde edilebilmektedir. Duyarlılık sınırı $10^{-7} - 10^{-8}$ M'dır. Duyarlılığın yüksek olmasının nedeni; ölçümün, faradayik akımın en yüksek, kapasitif akımın en düşük olduğu anda yapılmasından kaynaklanır.



Şekil 32: A) Analog cihazlarda diferansiyel darbe voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali, **B)** Diferansiyel darbe voltametrisine ait bir voltamogram

DPV tekniğinde, doğrusal bir tarama sırasında çalışma elektroduna periyodik darbeler uygulanır. Darbe uygulamadan önce ve sonra olmak üzere iki kez akım ölçülür. Darbe başına elde edilen akımdaki fark uygulanan potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen diferansiyel darbe voltamogramı yüksekliği analizi yapılan maddelerin derişimi ile orantılı akım piklerinden oluşmaktadır [6, 120, 125, 152].

1.2.2.4.1.3. Doğrusal Taramalı Voltametri

Bu yöntemde uyarma sinyali; doğru akım potansiyelinin zamanla doğrusal bir şekilde artırılmasıyla elde edilir. Uygulanan bu potansiyel sonrasında analizlenen maddeye özgü akım cevapları potansiyelin bir fonksiyonu olarak voltamogramlarda incelenir. Doğrusal taramalı voltametri, iyi pik maksimumları elde edebilmek için yarı – dalga potansiyel farkı en az 0,2 V civarında olmalıdır [6, 120, 125, 152].

1.2.2.4.1.4. Kare Dalga Voltametrisi

Son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir darbe polarografi tekniğidir. Voltamogramın tamamı 10 milisaniyeden daha az bir sürede yapılır. Ölçüm son derece hızlı yapıldığı için analizin kesinliğini artırmak için birkaç voltametrik taramanın ortalaması alınarak kesinlik artırılabilir. Kare dalga voltametrisinin tayin sınırları 10^{-7} ile 10^{-8} arasındadır [6, 120, 125, 152].

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan cihazlar

Tez çalışmaları sırasında kullanılan tüm cihaz, donanım ve yazılımlar şunlardır;

- Potansiyostat - μ -AUTOLAB tip II (Eco Chemie, Hollanda)
- Yazılım programı (software) - GPES 4.9
- Referans elektrot - Ag/AgCl
- Yardımcı elektrot - Platin tel
- Çalışma elektrodu - Kalem grafit elektrot (PGE)(Rotring T 0,5, Tombo HB

model 0.5mm)

- Terazı - Sartorius-Analytic A-200
- Ses titreşimli temizleyici - Ultrasonic LC 30 H
- pH-metre - Schott-Mainz CG 710
- Manyetik karıştırıcı - Elektro-mag ve ARE 2-Velp
- Isıtıcı - Techne-512 Thermal Cycler

2.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Tez çalışmaları sırasında kullanılan tüm kimyasal maddeler ve sağlandığı firmalar Tablo 3'te belirtilmiştir:

Tablo 3: Çalışma sırasında kullanılan kimyasal maddeler

ve bunların sağlandığı firmalar

MADDE ADI	FİRMA
Asetik Asit (%99–100)	Merck
Hidroklorik asit (%37)	Merck
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Di potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	Riedel-de Haen
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Riedel-de Haen
Trizma hidroklorik asit (Trizma-HCl)	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma
N–Hidroksisüksinimid (NHS)	Sigma
Etil karbodiimid 1-etil -3-dietil aminopropil karbodiimid hidroklorür (EDC)	Sigma
tri–Sodyum sitrat dihidrat	Merck
Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA)	Merck
Meldola Mavisi (MDB)	Merck

2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Tampon çözeltilerinin hazırlanmasında 18 Mega-ohm'luk ultra saf su kullanılmıştır. Tamponlar hazırlık sonrasında plastik şişelerde, buzdolabında $+4^{\circ}C$ 'de saklanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltilerinin pH'larını istenilen değerine getirilebilmesi, hazırlanan 0,1N'lik NaOH veya 0,1N'lik HCl çözeltilerinin ve pH metre cihazını kullanımıyla gerçekleştirilmiştir.

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

Ölçümler sırasında kullanılan 0,05M fosfat tampon çözeltisi litresinde 1,36 g (0,01 mol) KH_2PO_4 ve 6,96 g (0,04 mol) K_2HPO_4 içermektedir. Hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 7,4 olmaktadır. Gerekliyse pH, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle pH metre ile 7,4'e ayarlanır. Daha sonra NaCl derişimi 0,02 M olacak şekilde 1,168 g NaCl* eklenir.

0,50 M asetat tampon çözeltisinin(ACB) hazırlanışı (pH: 4,8):

Kullanılan 0,50 M asetat tampon çözeltisi litresinde 0,5 M glasiyel asetik asit içermektedir. Çözeltinin pH'sının 4,8 değerine ayarlanması, 0,1N NaOH ve / veya 0,1N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir. Daha sonra NaCl derişimi 0,02 M olacak şekilde 1,168 g NaCl eklenir.

0,02 M Tris-HCl tampon çözeltisinin(TBS) hazırlanışı (pH:7,0):

Kullanılan 0,02M Tris HCl tampon çözeltisi litresinde 3,152g (0,02 mol) Trizma HCl içermektedir. Ayrıca, çözeltiye NaCl derişimi 0,02 M olacak şekilde 1,168 g NaCl eklenir. Çözeltinin pH'sının 7,0 değerine ayarlanması, 0,1N NaOH ve / veya 0,1N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

* Çözeltilerde kullanılan NaCl Na^+ iyonları sayesinde DNA üzerindeki negatif yüklü fosfat gruplarını bloke ederek DNA molekülünün nötr olmasını sağlar ve yüklerden doğabilecek negatif etkiyi engeller.

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

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

Saline-Sodium Citrate(SSC) tampon çözeltisinin hazırlanışı (20X, pH 7,0):

Kullanılan 20X'lik SSC tampon çözeltisi litresinde 175,3 g (3,0 M) NaCl ve 294,10 g (0,3 M) tri-sodyum sitrat dihidrat içermektedir. Çözeltinin pH'sının 7,0 değerine ayarlanması, 0,1N NaOH ve / veya 0,1N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

1,0 mM Meldola Mavisi(MDB) çözeltisinin hazırlanışı:

Taze olarak kullanılan 1mM MDB çözeltisi 10 mL'sinde 3,8 mg MDB içermektedir ve 0,02 M NaCl içeren 0,02 M Tris-HCl tampon çözeltisi (pH:7,0) içerisinde hazırlanmıştır.

Kovalent bağlama çözeltisinin hazırlanışı

Kullanılan kovalent bağlama çözeltisi, 8mM NHS ve 5mM EDC olacak şekilde litresinde 0,921g NHS ve 0,959g EDC içermektedir. Bu çözeltinin hazırlanmasında ultra saf su kullanılmıştır.

2.4. Kullanılan DNA dizileri

Tablo 4: VDR Apa I polimorfizmini içeren PCR ürünü baz dizilim haritası

5'- AGC ATG GAC AGG GAG CAA GGC CAG GCA GGG ACA GGG CCA
GGT GCG CCC ATG GAA GGA CCT AGG TCT GGA TCC TAA ATG CAC
GGA GAA GTC ACT GGA GGG CTT TGG GGC CAG GCA GTG GTA TCA
CCG GTC AGC AGT CAT AGA GGG GTG GCC TAG GGG GTG CTG CCG
TTG AGT GTC TGT GTG GGT GGG GGG TGG TGG GAT TGA GCA GTG
AGG GGC CCA G CT GAG AGC TCC TGT GCC TTC TTC TCT ATC C -3'

Yukarıdaki tabloda gösterilen bölge tayini yapılan hedef bölgedir. Haritanın her iki ucundaki italik karakterlerle belirtilen parçalar PCR yöntemiyle DNA çoğaltma işlemi için kullanılan primer dizileri göstermektedir. Koyu harflerle gösterilen bölge ise VDR Apa I polimorfizmini içeren hedef bölge olarak seçilmiştir. VDR Apa I polimorfizminde, bu koyu harflerle belirtilen bölgedeki altı çizili Guanin bazı Timin bazına dönüşmektedir. Bu koyu harflerle belirtilen hedef bölgenin komplementeri olan diziler prob olarak seçilmiştir.

Tablo 5: Çalışmada kullanılan sentetik prob ve hedef dizileri

<u>Sağlıklı Hedef Dizisi (WTT - Wild-type target)</u>
5'-ATT GAG CAG TGA <u>GG</u> GCC CAG- 3'
<u>Sağlıklı Prob Dizisi (WTP - Wild-type probe)</u>
5'-CTG GGC <u>CC</u> TCA CTG CTC AAT- 3'
<u>Hastalıklı Hedef Dizisi (MTT- Mutant-type target)</u>
5'-ATT GAG CAG TGA <u>GT</u> GCC CAG- 3'
<u>Hastalıklı Probe Dizisi (MTP- Mutant-type probe)</u>
5'-CTG GGC <u>CA</u> C TCA CTG CTC AAT- 3'

Çalışmada kullanılan tüm sentetik diziler liyofilize toz halinde TIB MOLBIOL(Berlin, Almanya)'dan sağlandı. Ayrıca PCR ile çoğaltılmış DNA örnekleri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlandı.

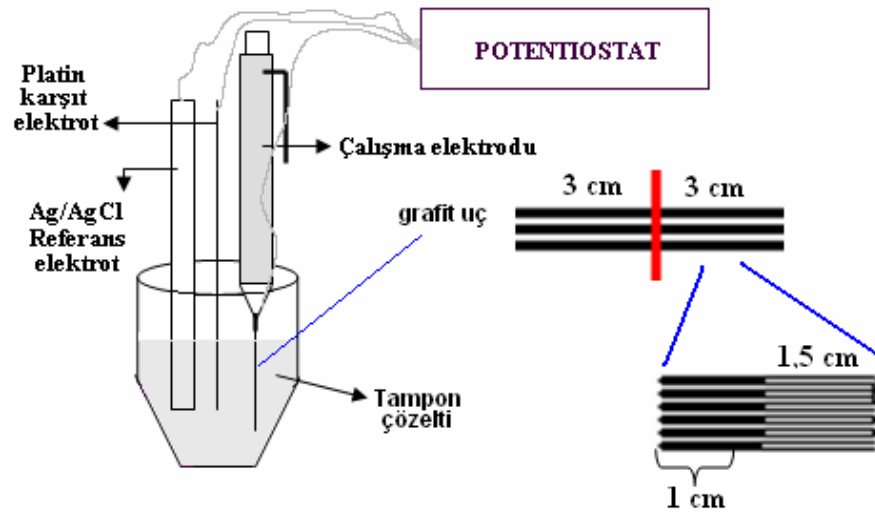
2.5. DNA dizilerinin hazırlanışı

Çalışmada kullanılan prob ve hedef dizi stok çözeltileri 1000 µg/mL derişiminde olacak şekilde 0,01 M / L Tris-HCl ve 1 mM / L EDTA içeren TE çözeltisi (pH: 8,0) ile hazırlandı ve 30 µL'lik hacimlerde sterilize edilmiş PCR tüplerine paylaştırılarak -20°C'de saklandı.

Bu oligonükleotidlerin seyreltik çözeltileri, probolar 0,05 M fosfat tamponu(PBS) (pH:7,4) içerisinde, hedefler ise 5X SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodyum sitrat dihidrat, pH 7.00) tampon çözeltisi içerisinde hazırlandı.

2.6. Deney düzeneğinin ve elektrotların hazırlanışı

DPV tekniğinden yararlanılarak yapılan bu çalışmada, potansiyostat cihazı olarak μ -AUTOLAB tip II (Eco Chemie, Hollanda) ve yazılım programı olarak GPES 4.9 kullanılmıştır. Üçlü elektrot sistemi olarak ise, kalem grafit elektrot çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrot ve platin de karşıt elektrot olarak kullanılmıştır. Her bir elektrot sisteme metal bağlantılarla bağlanmış ve bu üçlü elektrot sistemin daldırıldığı ölçüm çözeltisinin hacmi 3 mL olacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 33: Deney düzeneği ve PGE'nin hazırlanışı

Çalışmamızda çalışma elektrodu olarak kullanılan, kalem grafit elektrotun (Rotring Rotring T 0,5 kalem, Tombo HB model 0.5mm uç) 6 cm olan grafit uçları deneysel koşullara uygun olması açısından 3 cm boyunda kesildi. Bu 3cm'nin 1,5 cm'lik kısmı işaretlenerek, 1 cm'lik kısmı çözelti içine daldırılacak şekilde sisteme yerleştirildi. Her bir deneme için farklı grafit yüzeyler oluşturularak tek kullanımlık elektrot sistemi sağlanmış oldu.

2.7. Kullanılan yöntem

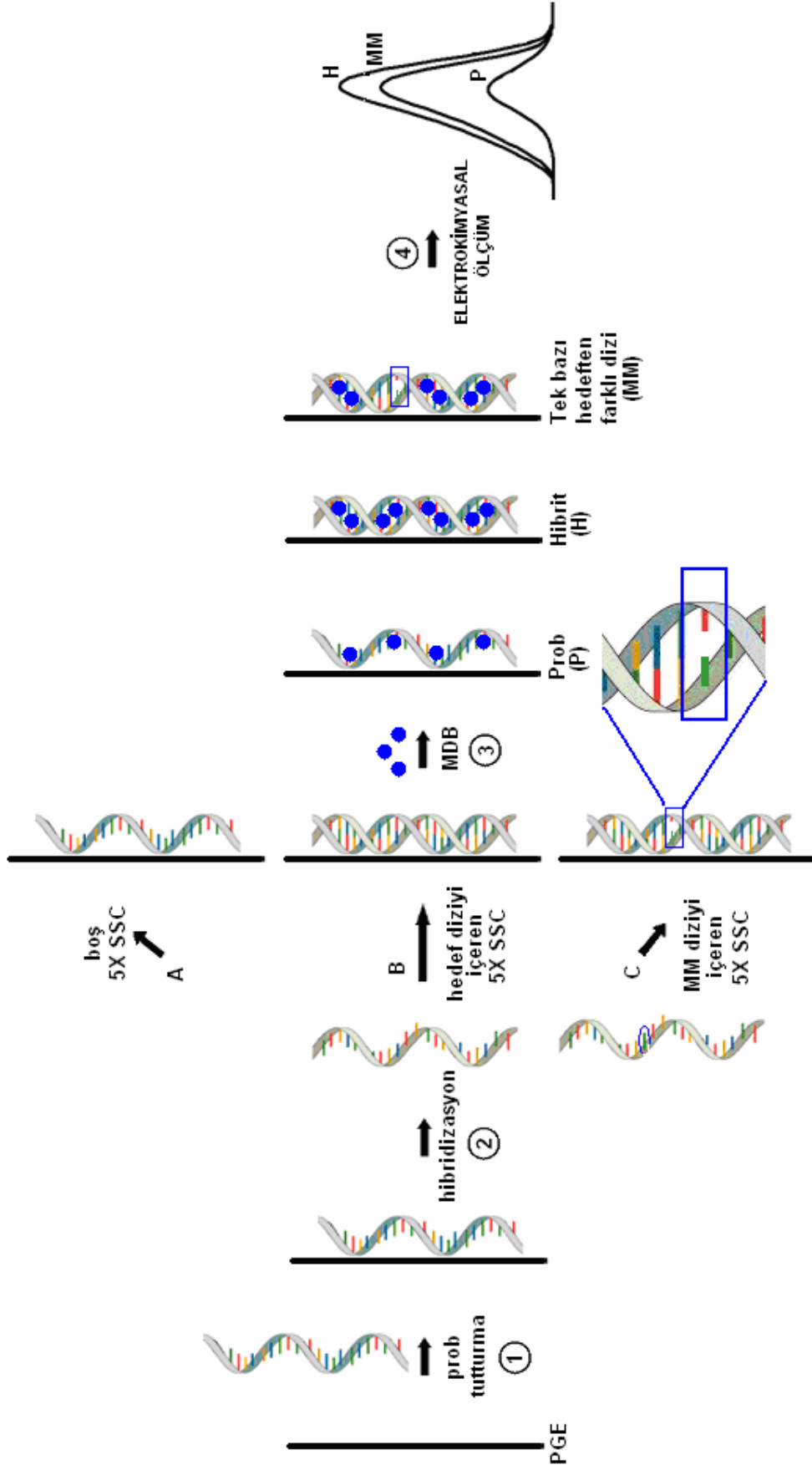
Çalışmada kullanılacak yöntemin seçilmesinde daha önce yapılmış olan elektrokimyasal biyosensör tasarımlarında kullanılan yöntemler değerlendirildi [57, 67]. Yapmış olduğumuz ön çalışmalara göre yöntem olarak indikatöre dayalı hibridizasyon algılama yönteminin kullanılması uygun bulunup, indikatör olarak Meldola Mavisi (MDB)'nden yararlanılmıştır.

Şekil 34, hibridizasyon indikatörü olarak Meldola Mavisinin kullanıldığı VDR genindeki Apa I polimorfizminin elektrokimyasal olarak saptanmasını özetlemektedir. Bunlar sırasıyla, elektrot yüzeyine prob tutturulması, hibridizasyon, MDB ile etkileşim ve elektrokimyasal ölçüm olmak üzere dört ana basamakta toplanmıştır. Yönteme ait basamaklarda uygulanan işlemler hakkında ayrıntılı bilgi ilerleyen bölümlerde verilmiştir.

Deneysel basamaklar ve süreleri aşağıdaki Tablo 6'da özetlenmiştir:

Tablo 6: Deneysel basamaklar ve süreleri

BASAMAK	SÜRE
PGE aktivasyonu	60 saniye
Prob tutturma (adsorbsiyon)	30 dakika
Yıkama	1 saniye
Hibridizasyon	30 dakika
Yıkama	20 saniye
MDB etkileşimi	5 dakika
Yıkama	10 saniye
Ölçüm	60 saniye
TOPLAM	≅ 65 dakika



Şekil 34: Hibridizasyon indikatörü olarak MDB'nin kullandığı, VDR genindeki Apa I polimorfizminin elektrokimyasal olarak saptanması

2.6.1. Elektrot yüzeyine prob tutturulması

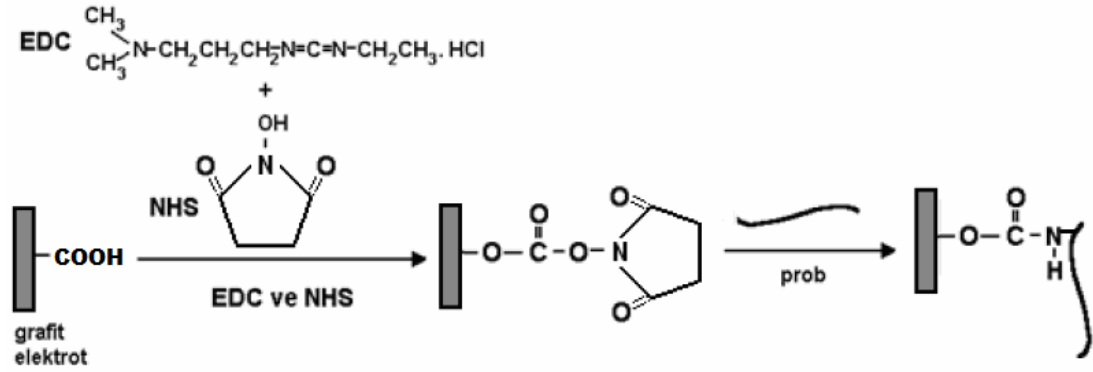
2.6.1.1. Adsorbsiyon ile prob tutturma

Tüm elektrot yüzeyleri deney öncesinde 0.5 M asetat tampon çözeltisi (pH: 4.8) içine daldırılarak 60 saniye süreyle +1.4 V gerilim uygulandı. Böylece elektrokimyasal olarak elektrot yüzeyinin aktivasyon işlemi gerçekleşti.

Fosfat tampon çözeltisi (pH: 7.4) içerisinde $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde sağlıklı ve mutasyonlu türlerle hazırlanan ve 100'er μL olacak şekilde PCR tüplerine dağıtılan prob çözeltileri içerisine, aktive edilmiş elektrotlar 30 dakika süreyle daldırılarak yüzeye adsorbsiyon yoluyla prob tutturulması sağlanmıştır. Bağlanmadan sonra, yüzey bir kez boş fosfat tampon çözeltisi (pH: 7.4) içerisine daldırılıp çıkarılarak elektrot yüzeyine bağlanmayan prob dizilerinin yüzeyden uzaklaştırılması sağlanmıştır.

2.6.1.2. Kovalent bağlama ile prob tutturma

Çalışılacak olan elektrotlar, deney öncesinde, taze olarak hazırlanmış olan kovalent ajanları içeren (5 mM EDC ve 8 mM NHS) çözeltisi içerisinde 1 saat süreyle bekletilmiştir. 1 saat sonunda kovalent ajanlı elektrotlar, PBS çözeltisinde (pH: 7.4) $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde sağlıklı ve mutasyonlu türlerle hazırlanan ve 100'er μL olacak şekilde PCR tüplerine dağıtılan prob çözeltileri içerisine 30 dakika süreyle daldırılarak yüzeye prob bağlanması sağlanmıştır. Bağlanmadan sonra, yüzey bir kez boş fosfat tampon çözeltisi (pH: 7.4) içerisine daldırılıp çıkarılarak elektrot yüzeyine bağlanmayan prob dizilerinin yüzeyden uzaklaştırılması sağlanmıştır.



Şekil 35: PGE yüzeyinde gerçekleşen EDC/NHS modifikasyonu

2.6.2. Hibridizasyon

2.6.2.1. Sentetik hedeflerle hibridizasyon:

Prob bağlanmış elektrotlar, 100'er μL olacak şekilde PCR tüplerine dağıtılan, 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ derişiminde sentetik sağlıklı ve hastalıklı (tek bazı hedeftan farklı dizi, mis-match, MM) hedef dizileri içeren hibridizasyon tamponlarında (5X SSC, pH: 7,0) 30 dakika süreyle bekletilerek hibridizasyon işlemi gerçekleştirildi.

2.6.2.2. Gerçek PCR örnekleri ile hibridizasyon:

PCR ile çoğaltılmış sağlıklı ve hastalıklı DNA örnekleri 1:40 oranında hibridizasyon tamponu (5X SSC, pH: 7,0) ile seyreltilerek, PCR tüplerine aktarılmış ve 95°C 'de 5 dakika süreyle ısıtıcı (thermal-cycler) içerisinde bekletilerek çift sarmal olan PCR örneklerinin tek sarmal hale gelmesi yani denatürasyonları sağlanmıştır. Daha sonra ise bu tek sarmal hale gelen örneklerin tekrar çift sarmal hale gelmesini önlemek için 1 dakika süreyle buz şokuna maruz bırakılmışlardır. Denatürasyondan hemen sonra ise prob bağlanmış elektrotlar, bu denatüre edilmiş DNA örneklerinin

içeren çözeltiler içerisinde 30 dakika süreyle daldırılarak hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

2.6.3. MDB ile etkileşim

Hibridizasyon işleminden sonra elektrotlar, yüzeye spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için 20 saniye süreyle karıştırılmalı olarak 2X SSC (pH: 7,0) içerisinde yıkanmıştır. Yıkanan elektrotlar, içerisinde 20 mM MDB içeren TBS (pH 7.00) çözeltisi içerisinde 5 dakika süreyle karıştırılmalı olarak MDB'e maruz bırakılmışlardır. MDB ile etkileşen elektrot yüzeyleri, daha sonra karışan ortamda 10 saniye süreyle boş TBS (pH 7.00) çözeltisi içerisinde yıkanmışlardır.

2.6.4. Elektrokimyasal Ölçüm

DPV tekniği kullanılarak MDB'nin indirgenme sinyalini ölçebilmek amacıyla boş TBS (pH 7.00) çözeltisi içerisinde, +0.2 V'dan -0.35 V'a kadar, 50 mV amplitütte ve 8 mV adım potansiyeli uygulanarak elektrot yüzeyinde prob, hibrit ve mis-match dizileri varken görülen MDB indirgenme sinyalleri ölçüldü. Elde edilen ham eğriler potansiyostattaki GPES yazılım sistemi kullanılarak "baseline correction" işleminden geçirilerek her bir örneğe ait pik yükseklikleri değerlendirilmiştir.

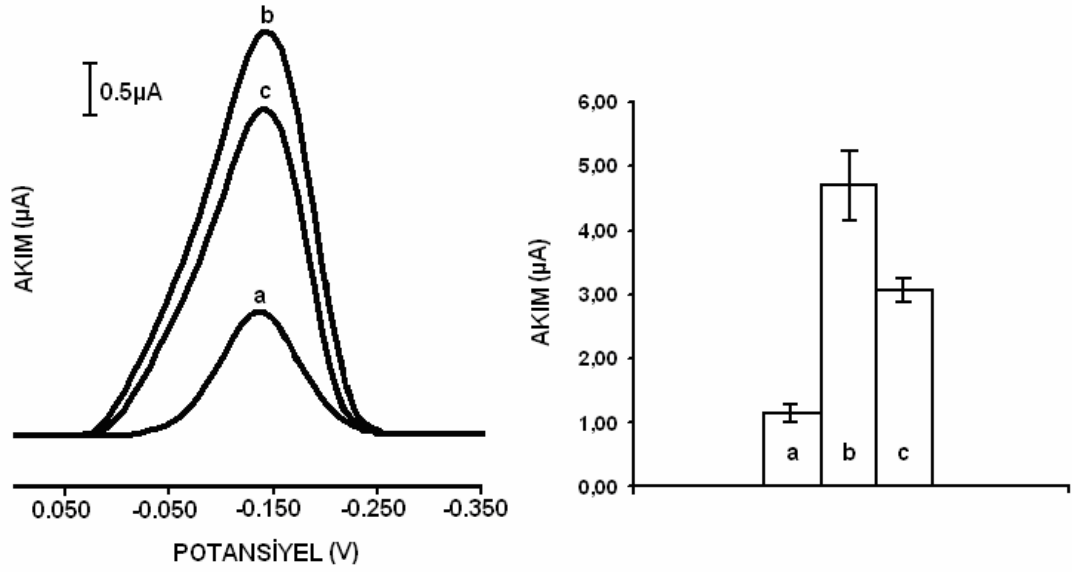
BÖLÜM III

BULGULAR

Bu çalışmada her bir ölçüm üç kez tekrarlanarak elde edilen sonuçlar grafik ve voltammogramlarda gösterilmiştir.

3.1. Sentetik dizilerle hibridizasyon ve biyosensör özgünlüğünün tayini:

Geliştirilen biyosensör sistemiyle hibridizasyon tayinleri ilk olarak sentetik diziler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla elektrot yüzeyine hastalıklı prob dizisi (MTP) tutturulup, bu dizinin tam karşılığı olan hedef dizi (MTT) ve tek bazı hedeften farklı olan dizi (WTT) ile hibridizasyonu sağlandı. Daha sonra, bu elektrot yüzeyleriyle MDB etkileşimi sağlanıp bunlara ait MDB sinyalleri incelendi. MDB sinyali yaklaşık olarak $-0.130 \text{ V} \pm 0.005$ arasında gözlemlendi. Reid ve arkadaşlarının daha öncede açıkladığı MDB'nin interkalasyon mekanizmasına uygun olarak [111], MDB'nin dsDNA arasına birikmesi nedeniyle, dsDNA'da (H) gözlenen MDB sinyali, ssDNA (P) ve tek bazı eşleşmemiş DNA'dan (MM) daha fazla gözlemlenmesi beklenmiş ve istenilen sonuç elde edilmiştir (Şekil 36). Bu sonuç, ayrıca bize, geliştirmiş olduğumuz biyosensörün seçimli şekilde hedefine bağlandığını göstermektedir.

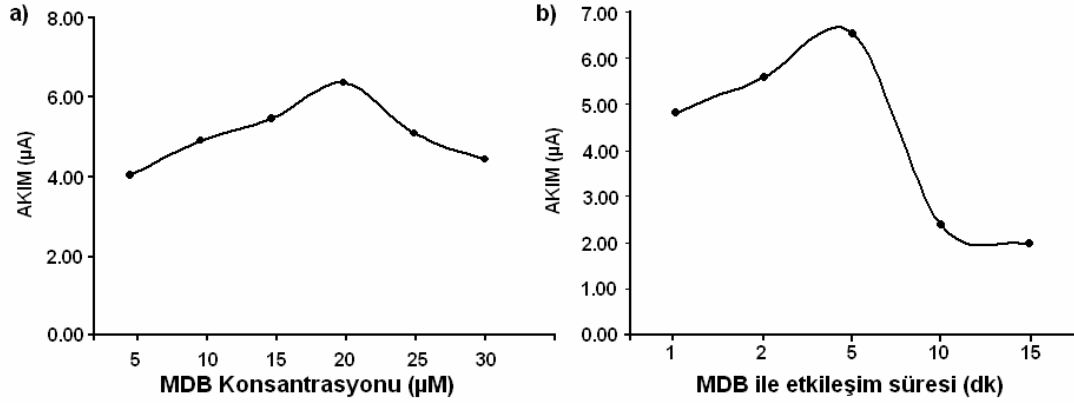


Şekil 36: Sentetik diziler kullanılarak, elektrot yüzeylerindeki MDB sinyallerine ait diferansiyel darbe voltammogramları ve histogramları; (a) Yüzeyde sadece prob varken, (b) prob-hedef hibridizasyonu sonrasındaki, (c) prob ile tek bazı hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen MDB indirgenme sinyalleri. DeneySEL aşamalar: 1 dk +1.4 V'da ABS içerisinde PGE yüzey aktivasyonu; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MTP içeren PBS içerisinde adsorbsiyon yolu ile 30 dk prob tutturma; 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MTT ve WTT içeren 5X SSC içerisinde 30 dk hibridizasyon; 20 μM MDB içeren TBS ile 5 dk MDB etkileşimi; TBS'de ölçüm.

3.2. MDB konsantrasyonu ve MDB ile etkileşim sürelerinin etkisi:

En uygun analitik performansın bulunması amacıyla, yüzeye herhangi bir dsDNA'nın tutunması sağlanarak, daha sonra bu elektrotların değişik MDB konsantrasyonları (5 – 30 μM) ve etkileşim süreleri (1 – 15 dk) ile MDB ile etkileşimleri sağlanmıştır. 20 μM MDB konsantrasyonu ve 5 dk etkileşim süresinde sistemin doygunluğa ulaştığı görülmüştür (Şekil 37) ve bu nedenle çalışma için bu

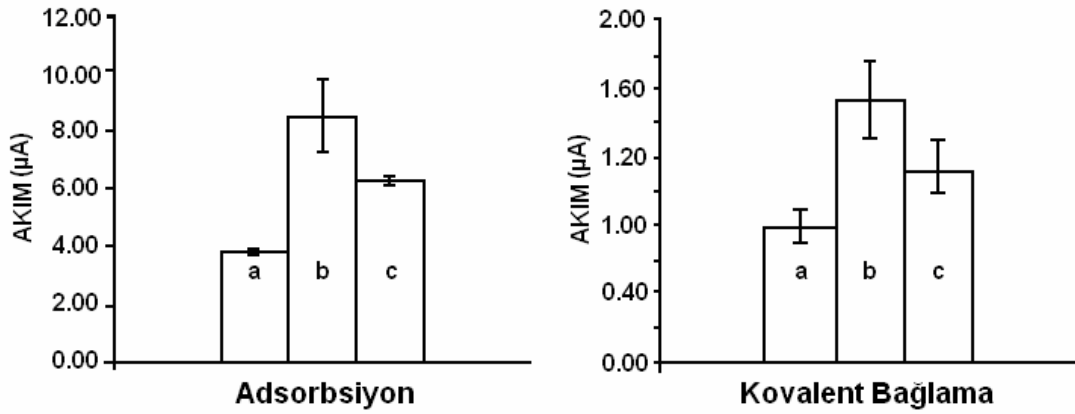
konsantrasyon ve süre optimum olarak seçilmiştir ve bundan sonraki çalışmalar bu koşullar altında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 37: MDB konsantrasyonu ve MDB etkileşim sürelerine ait kalibrasyon eğrileri

3.3. Prob tutturma yöntemlerinin etkisi:

Çalışmada kullanılacak olan ve en önemli basamaklardan biri olan uygun prob tutturma tekniğinin saptanabilmesi için, herhangi bir işaret içermeyen tek sarmal sentetik prob (MTP) dizisi, adsorbsiyon ve kovalent tutturma yöntemleri kullanılarak PGE yüzeyine iki farklı şekilde tutturulmuştur. Bu basamaktan sonra ise, PGE yüzeyine tutturulan dizinin tam karşılığı olan hedef dizi (MTT) ve tek bazı hedeften farklı olan dizi (WTT) ile hibridizasyonu sağlandı. Daha sonra, bu elektrot yüzeyleriyle MDB etkileşimi sağlanıp bunlara ait MDB sinyalleri incelendi. Ardışık olarak yapılan üç ölçümden sonra elde edilen ölçümlerin ortalaması ve ilgili hata çubukları Şekil 38’de ve Tablo 7’de gösterilmiştir.



Şekil 38: Farklı prob tutturma yöntemleri kullanılarak elde edilen MDB sinyallerine ilişkin histogramlar; (a) Yüzeyde sadece prob varken, (b) prob-hedef hibridizasyonu sonrasındaki, (c) prob ile tek bazı hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen MDB indirgenme sinyalleri. Deneysel aşamalar: elektrot yüzeyine prob tutturulması ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ MTP); $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ MTT ve WTT içeren 5X SSC içerisinde 30 dk hibridizasyon; $20 \mu\text{M}$ MDB içeren TBS ile 5 dk MDB etkileşimi; TBS’de ölçüm.

Tablo 7: Farklı prob tutturma yöntemlerinin alınan MDB sinyallerine etkisi

	MDB sinyali (µA)		
	Prob	Hibrit	MM
adsorbsiyon	3,87	8,51	6,32
kovalent tutturma	0,79	1,53	1,14

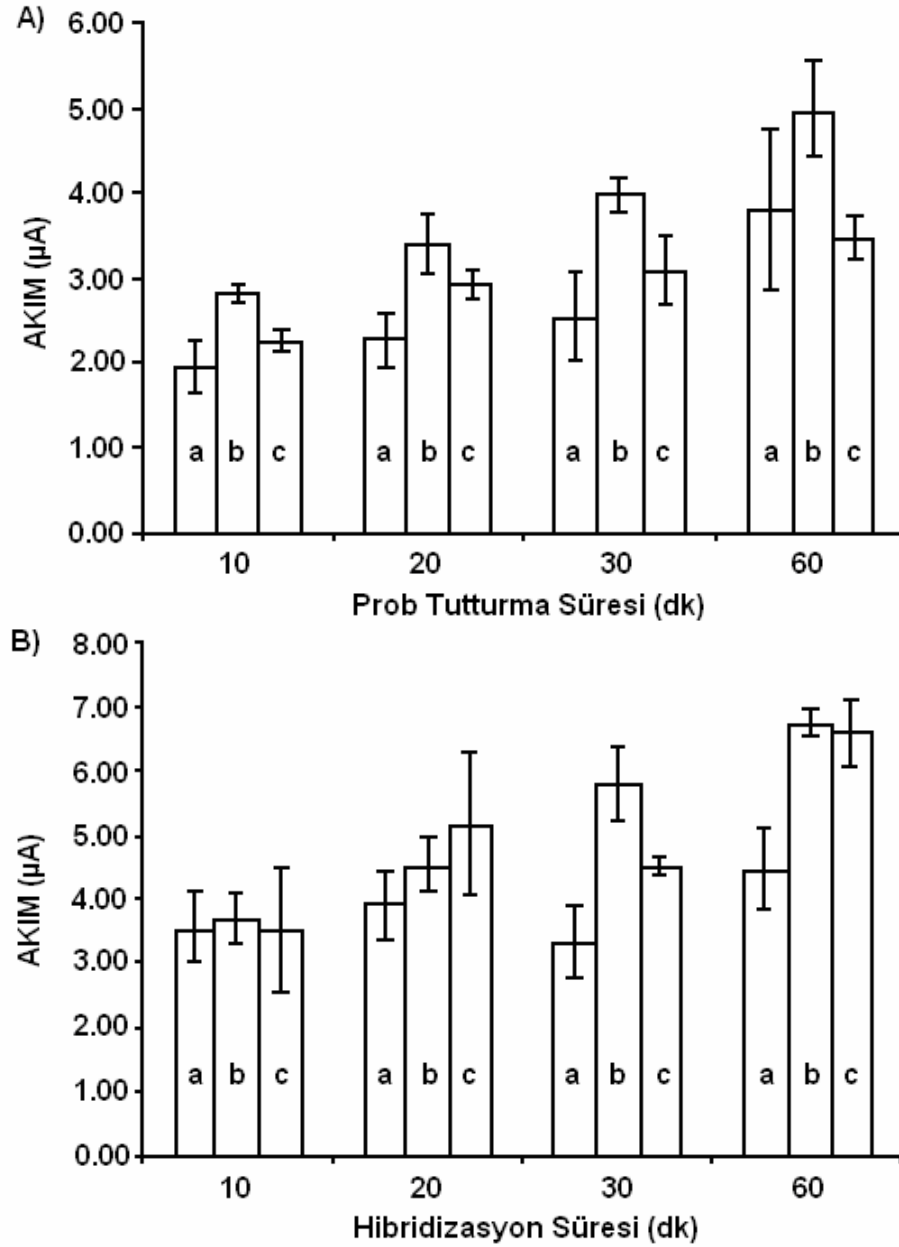
Yapılan bu çalışma sonucunda adsorbsiyon ve kovalent yolla prob tutturma yöntemlerinin her ikisinin de hedef ve tek bazı hedeften farklı olan dizileri iyi bir şekilde ayırdığı gözlemlenmiştir. Ancak adsorbsiyon ile tutturma yönteminin kullanıldığı denemede elde edilen MDB sinyallerinin, kovalent yolla ile tutturmanın kullanıldığı denemede elde edilenlere göre yaklaşık 5 kat daha fazla olduğu

gözlemlendi. Bu yüzden çalışmamızda, NHS ve EDC gibi herhangi bir kimyasal ajanın kullanılmadığı adsorbsiyon ile prob tutturma yönteminin kullanılmasına karar verildi.

3.4. Prob tutturma ve hibridizasyon sürelerinin etkisi:

Uygun prob tutturma ve hibridizasyon sürelerinin saptanacağı bu çalışmada sentetik DNA dizileri kullanılarak prob (MTP) ile bu dizinin tam karşılığı olan hedef dizi (MTT) ve tek bazı hedeften farklı olan dizi (WTT) ile arasındaki hibridizasyonundan sonraki MDB etkileşimi sonucunda elde edilen MDB sinyalleri incelenmiştir. Prob tutturma süresinin saptandığı çalışmada hibridizasyon süresi 30 dakika olacak şekilde sabit tutulup, prob tutturma süresi 10–60 dakika arasında değiştirilirken, hibridizasyon süresinin saptandığı çalışmada ise prob tutturma süresi 30 dakika olacak şekilde sabit tutulup, hibridizasyon süresi 10–60 dakika arasında değiştirilmiştir.

Çalışmada, prob dizinin tam karşılığı olan diziyle verdiği MDB sinyalinin olduğunca yüksek, tek bazı hedeften farklı dizi ile verdiği sinyalin ise mümkün olduğu kadar probtan alınan sinyale en yakın sinyal olması esas alınmış ve buna göre en uygun prob tutturma ve hibridizasyon sürelerinin 30 dakika olduğu tespit edilmiştir (Şekil 39).

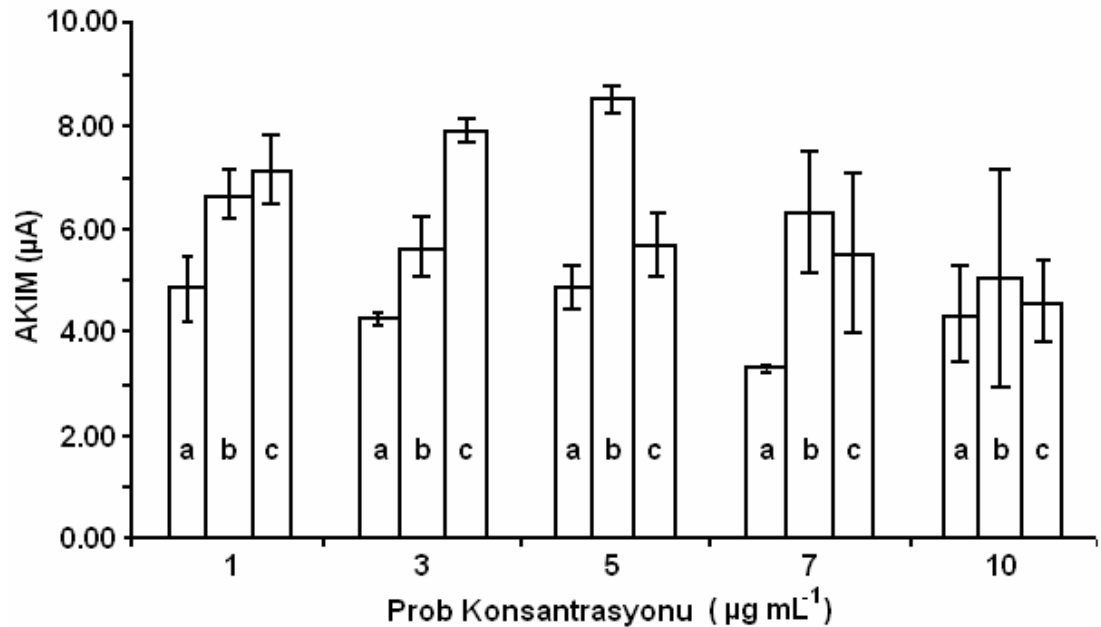


Şekil 39: Prob tutturma ve hibridizasyon sürelerinin etkilerinin incelenmesine ait histogramlar; (a) Yüzeyde sadece prob varken, (b) prob-hedef hibridizasyonu sonrasında, (c) prob ile tek bazı hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen MDB indirgenme sinyalleri. Deneysel aşamalar: 1 dk +1.4 V'da ABS içerisinde PGE yüzey aktivasyonu; $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ MTP içeren PBS içerisinde adsorbsiyon yolu ile prob tutturma; $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ MTT ve WTT içeren 5X SSC içerisinde hibridizasyon; $20 \mu\text{M}$ MDB içeren TBS ile 5 dk MDB etkileşimi; TBS'de ölçüm.

3.5. Uygun prob konsantrasyonunun bulunması:

Çalışmada, prob dizinin (MTP) tam karşılığı olan hedef dizinin (MTT) ve tek bazı hedeften farklı olan dizinin (WTT) konsantrasyonları $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak sabit tutulurken, prob dizinin konsantrasyonu $1 - 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonları arasında arttırılmıştır. Bu diziler arasındaki hibridizasyon aşamasından sonra MDB etkileşimi sonucunda elde edilen MDB sinyalleri Şekil 40'da görülmektedir.

Çalışmada, prob dizinin tam karşılığı olan diziyle verdiği MDB sinyalinin olduğunca yüksek, tek bazı hedeften farklı dizi ile verdiği sinyalin ise mümkün olduğu kadar probtan alınan sinyale en yakın sinyal olması esas alınmış ve buna göre en uygun prob konsantrasyonunun $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ olduğu tespit edilmiştir. Belli bir derişimden sonra sinyaldeki azalmanın nedeni ise yüzeyin doygunluğa erişmesinden kaynaklanmaktadır.



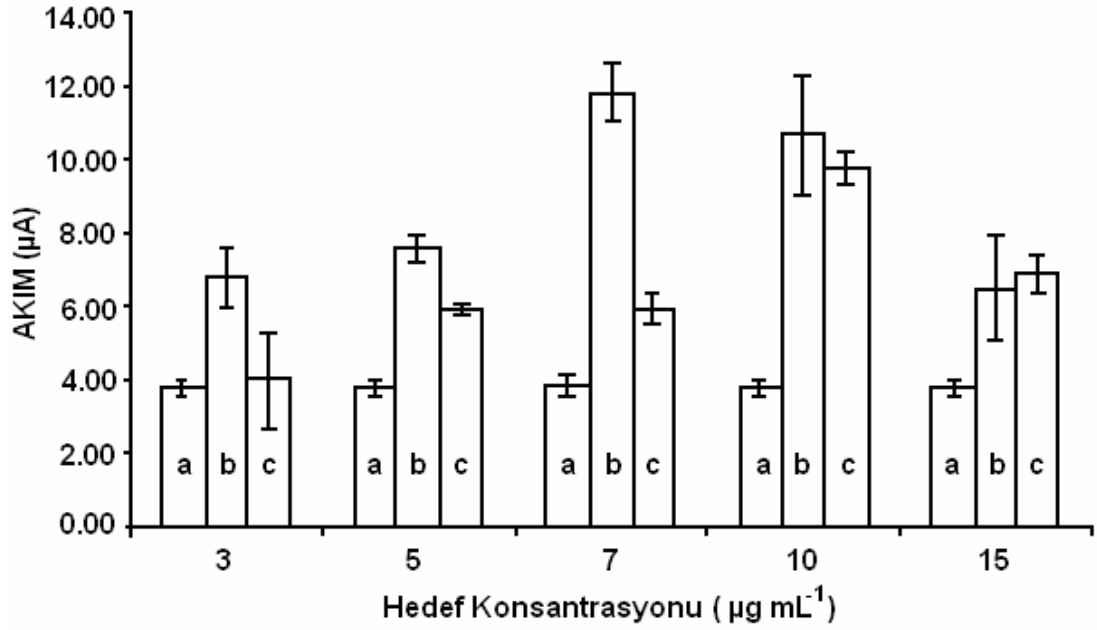
Şekil 40: Sabit derişimdeki ($7 \mu\text{g mL}^{-1}$) hedef dizi (MTT) ve tek bazı hedeften farklı olan dizi (WTT) ile artan derişimdeki prob dizi (MTP) arasında gerçekleştirilen

hibridizasyon aşamasından sonra MDB etkileşimi sonucunda elde edilen MDB sinyalleri; (a) Yüzeyde sadece prob varken, (b) prob-hedef hibridizasyonu sonrasındaki, (c) prob ile tek bazı hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen MDB indirgenme sinyalleri. Deneysel aşamalar: 1 dk +1.4 V'da ABS içerisinde PGE yüzey aktivasyonu; 1 – 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MTP içeren PBS içerisinde adsorbsiyon yolu ile prob tutturma; 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ MTT ve WTT içeren 5X SSC içerisinde hibridizasyon; 20 μM MDB içeren TBS ile 5 dk MDB etkileşimi; TBS'de ölçüm.

3.6. Uygun hedef konsantrasyonun bulunması:

Çalışmada, prob dizinin (MTP) konsantrasyonu 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olarak sabit tutulurken, prob dizinin tam karşılığı olan hedef dizinin (MTT) ve tek bazı hedeften farklı olan dizinin (WTT) konsantrasyonları 3 – 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonları arasında arttırılmıştır. Bu diziler arasındaki hibridizasyon aşamasından sonra MDB etkileşimi sonucunda elde edilen MDB sinyalleri Şekil 41'de görülmektedir.

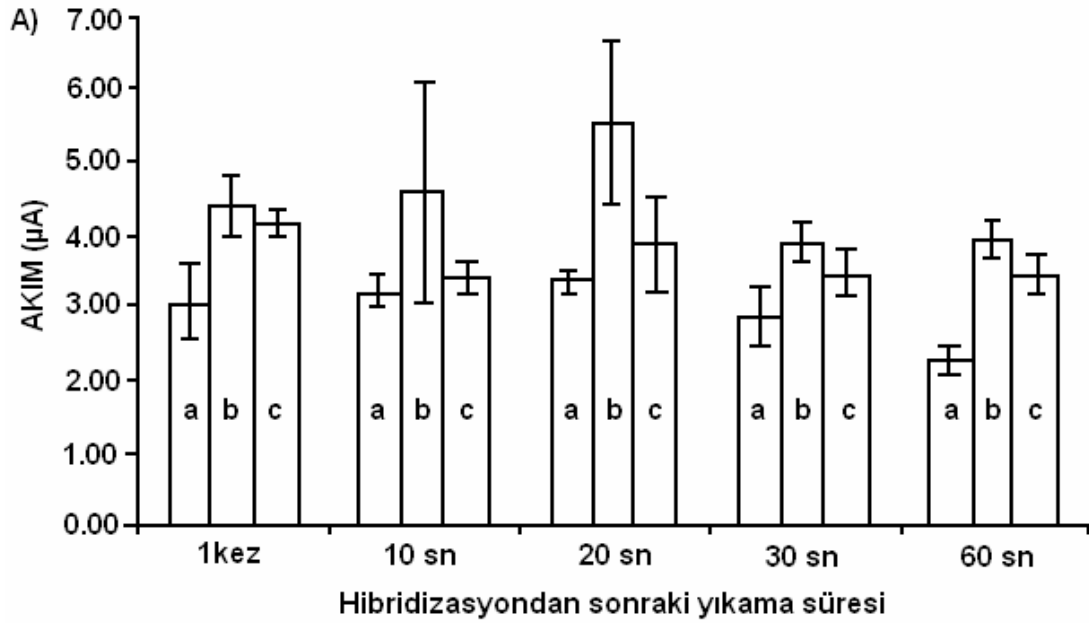
Çalışmada, prob dizinin tam karşılığı olan diziyle verdiği MDB sinyalinin olduğunca yüksek, tek bazı hedeften farklı dizi ile verdiği sinyalin ise mümkün olduğu kadar probtan alınan sinyale en yakın sinyal olması esas alınmış ve buna göre en uygun hedef konsantrasyonunun 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ olduğu tespit edilmiştir.

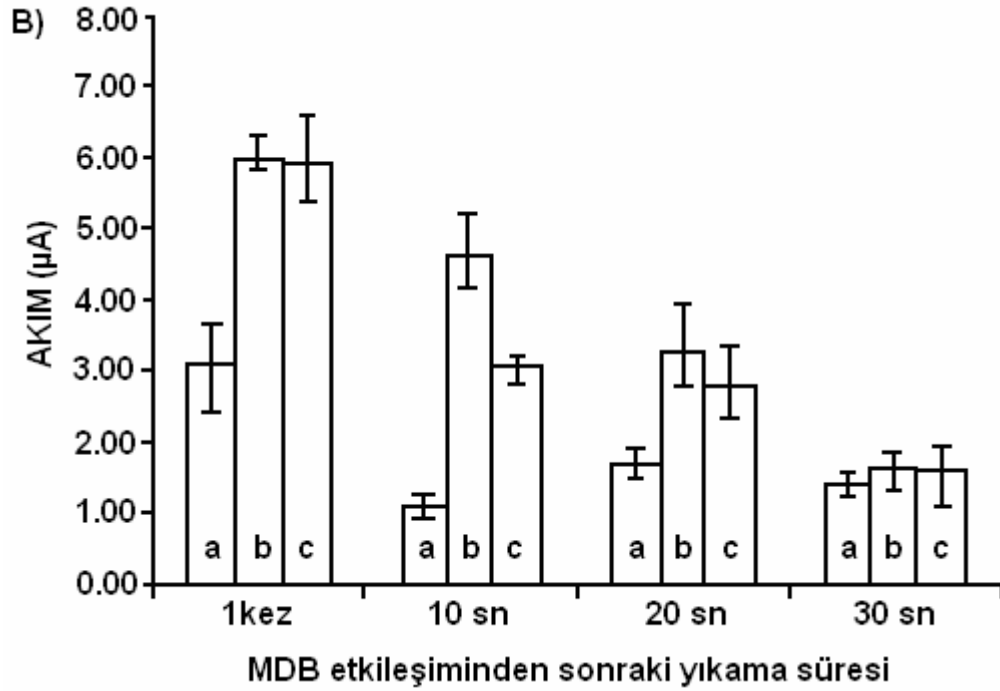


Şekil 41: Sabit derişimdeki ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) prob dizi (MTP) ile artan derişimdeki hedef dizi (MTT) ve tek bazı hedeften farklı olan dizi (WTT) arasında gerçekleştirilen hibridizasyon aşamasından sonra MDB etkileşimi sonucunda elde edilen MDB sinyalleri; (a) Yüzeyde sadece prob varken, (b) prob-hedef hibridizasyonu sonrasındaki, (c) prob ile tek bazı hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen MDB indirgenme sinyalleri. Deneysel aşamalar: 1 dk $+1.4 \text{ V}$ 'da ABS içerisinde PGE yüzey aktivasyonu; $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ MTP içeren PBS içerisinde adsorbsiyon yolu ile prob tutturma; $3\text{-}15 \mu\text{g mL}^{-1}$ MTT ve WTT içeren 5X SSC içerisinde hibridizasyon; $20 \mu\text{M}$ MDB içeren TBS ile 5 dk MDB etkileşimi; TBS'de ölçüm.

3.7.Yıkama süresinin biyosensör seçimliliğine etkisi:

Çalışmada spesifik olmayan bağlanmaların azaltılması ve biyosensör seçimliliğini arttırmak amacıyla hibridizasyondan ve MDB etkileşimden sonraki yıkama aşamalarına ait yıkama süreleri değerlendirildi. Buna göre diğer çalışmaların sonuçlarını değerlendirirken göz önünde bulundurduğumuz, prob dizinin tam karşılığı olan diziyle verdiği MDB sinyalinin mümkün olduğunca yüksek, tek bazı hedeften farklı dizi ile verdiği sinyalin ise mümkün olduğu kadar probtan alınan sinyale en yakın sinyal olması beklentisince en uygun yıkama sürelerinin hibridizasyondan sonraki yıkama aşaması için 20 saniye, MDB etkileşiminden sonraki yıkama aşaması için ise 10 saniye olduğu görülmüştür (Şekil 42 A-B).



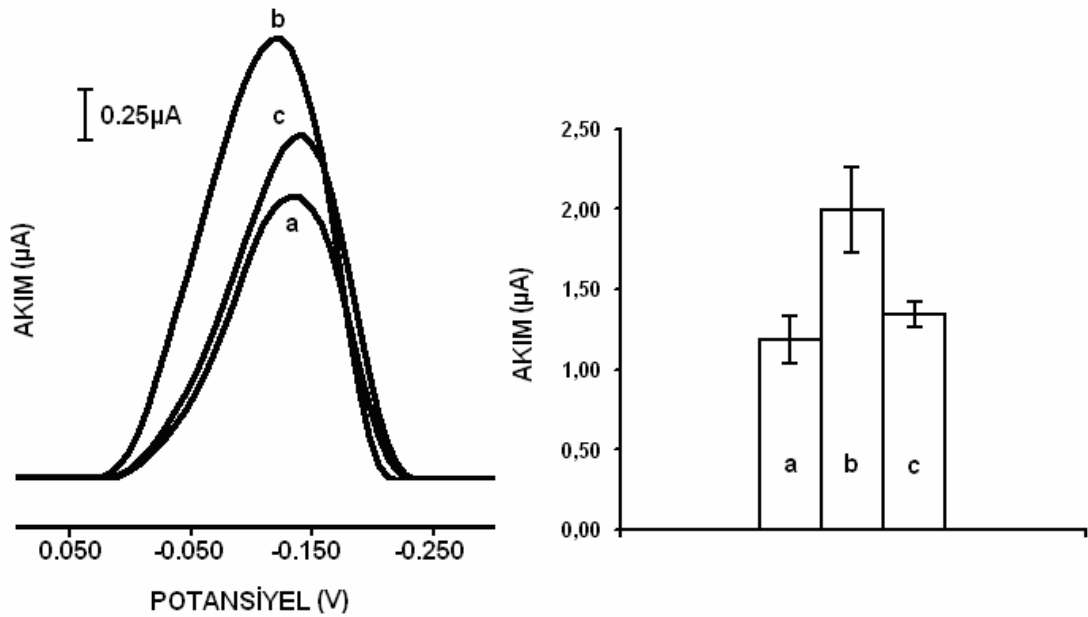


Şekil 42: Yıkama sürelerinin biyosensör seçiciliğine etkisini gösteren histogramlar; (a) Yüzeyde sadece prob varken, (b) prob-hedef hibridizasyonu sonrasındaki, (c) prob ile tek bazı hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen MDB indirgenme sinyalleri. Deneysel aşamalar: 1 dk +1.4 V'da ABS içerisinde PGE yüzey aktivasyonu; $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ MTP içeren PBS içerisinde adsorbsiyon yolu ile prob tutturma; $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ MTT ve WTT içeren 5X SSC içerisinde hibridizasyon; $20 \mu\text{M}$ MDB içeren TBS ile 5 dk MDB etkileşimi; TBS'de ölçüm.

3.8. PCR ürünleri ile gerçekleştirilen hibridizasyon çalışması:

Geliştirilen biyosensör sistemiyle optimizasyon tayinleri sentetik diziler kullanılarak gerçekleştirildi ve daha sonra sentetik dizilerle çalışılarak elde edilen bu koşullar gerçek PCR ürünleri üzerinde denendi. Bu amaçla elektrot yüzeyine sentetik olan hastalıklı prob dizisi (MTP) tutturulup, bu dizinin tam karşılığı olan yani hasta olduğu bilinen hedef (MTT) ve sağlıklı olduğu bilinen tek bazı hedeften farklı olan(WTT) gerçek PCR örneklerinin 95°C 'de 5 dakika süreyle ısıtıcı (thermal-

cycler) içerisinde denatürasyonları yapıldıktan sonra ile hibridizasyonları sağlanmıştır. Daha sonra, bu elektrot yüzeyleriyle MDB etkileşimi sağlanıp bunlara ait MDB sinyalleri incelenmiştir. Daha öncede elde ettiğimiz sonuçlara ve MDB'nin interkalasyon mekanizmasına uygun olarak, MDB'nin dsDNA arasına birikmesi nedeniyle, dsDNA'da (H) gözlenen MDB sinyali, ssDNA (P) ve tek bazı eşleşmemiş DNA'dan (MM) daha fazla gözlemlenmesi beklenmiş ve istenilen sonuç elde edilmiştir. Bu sonuç, ayrıca bize, geliştirmiş olduğumuz biyosensörün seçimliliği hakkında da bilgi edinmemizi sağlamış gerçek hasta örnekleriyle de çalışmanın uygun olduğunu göstermiştir.



Şekil 43: PCR ürünleri kullanılarak, elektrot yüzeylerindeki MDB sinyallerine ait diferansiyel darbe voltammogramları ve histogramları; (a) Yüzeyde sadece prob varken, (b) prob-hedef hibridizasyonu sonrasındaki, (c) prob ile tek bazı hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen MDB indirgenme sinyalleri. DeneySEL aşamalar: 1 dk +1.4 V'da ABS içerisinde PGE yüzey aktivasyonu; 5 µg mL⁻¹ MTP içeren PBS içerisinde adsorbsiyon yolu ile 30 dk prob tutturma; PCR

örneklerinin 5X SSC içerisinde 1:40 oranında seyreltilerek denatürasyonlarının sağlanması ve 30 dk hibridizasyon; 20 μ M MDB içeren TBS ile 5 dk MDB etkileşimi; TBS’de ölçüm.

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

SNPler birçok durumda, hücre metabolizması için önemli olan olaylarda (DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, sinyal iletimi vb.) rol alan genlerin kritik pozisyonlarında yer alırlar. Bazı durumda genin kodladığı proteinin fonksiyonu ya da enzim aktivitesi bu değişikliklerden önemli ölçüde etkilenebilir. Hücre metabolizması için kritik önem taşıyan proteinlerin fonksiyonun bozulması çeşitli hastalıklara yol açmakta veya bazı hastalıklar için riski artırmaktadır.

Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25 [OH]₂ D₃) bir steroid hormondur ve nükleer hormon reseptörü aracılığıyla nükleer transkripsiyon regülatörü olarak görev yapar [2]. Vitamin D endokrin sistemi immun yanıtın oluşmasında, glukoz homeostazında, kalsiyum ve fosfat metabolizmasında, kemik metabolizmasında ve hücre çoğalması ve farklılaşmasında yardımcı rol oynamaktadır [3, 70]. Bu nedenle, bu endokrin sistemde görülen bir mutasyon diyabet, kanser, *Alzheimer*, osteoartrit, tüberküloz ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığa neden olabilmektedir [2, 46, 124].

Bu güne kadar, VDR geninin 3' ucunda belirlenen, Apa I, Bsm I ve Taq I en çok çalışılan kesim parçacığı uzunluk polimorfizmleridir [127].

Tez kapsamında Apa I polimorfizminin tanımlanmasına yönelik literatürlerde genelde kullanılmakta olan yöntem, RFLP (restriction fragment length

polymorphism) yöntemidir [2, 127, 153]. Yöntem, birden fazla ara aşama içermesi, bazı restriksiyon enzimleri ile ilgili sorunların ortaya çıkması gibi dezavantajlara sahiptir. Son zamanlarda, floresan maddelerle işaretli problemler kullanılarak, polimeraz zincir reaksiyonunda DNA amplifikasyonunun floresan ölçümü sayesinde eş-zamanlı olarak izlenebildiği polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri (“real-time fluorescence PCR”) sıkça kullanılmaktadır.

LightCycler floresan PCR yöntemi ile de nükleik asit miktarının kantitatif analizi gerçekleştirilebildiği gibi bilinen mutasyonların (veya polimorfizmlerin) analizi de gerçekleştirebilmektedir. LightCycler floresan PCR yöntemi alışılmış polimeraz zincir reaksiyonunu floresan ölçüm sistemi ile kombine ederek, DNA amplifikasyonunun eş-zamanlı izlenmesini sağlamaktadır. Ancak, bu pahalı, zaman alıcı teknikler uzmanlık ve oldukça zaman alan örnek hazırlama süreçleri gerektirmektedir [49].

Çalışmamızda, tek nokta polimorfizminin saptanmasına yönelik olarak yapmış olduğumuz ön çalışmalarda guanine dayalı yani indikatörsüz bir ayırımın mümkün olmadığı görülmüş ve yöntem olarak indikatöre dayalı hibridizasyon algılama yönteminin kullanılması uygun bulunup, indikatör olarak Meldola Mavisi (MDB)’nden yararlanılmıştır.

Tez çalışmamızda VDR’de görülen Apa I tek nokta polimorfizminin tayinine yönelik geliştirilen biyosensör sistemiyle hibridizasyon tayinleri ve uygun çalışma koşulları ilk olarak sentetik diziler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla elektrot yüzeyine hastalıklı prob dizisi tutturulmuş, bu dizinin tam karşılığı olan hedef dizi ve tek bazı hedeften farklı olan dizi ile hibridizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra, bu elektrot yüzeyleriyle MDB etkileşimi sağlanıp bunlara ait $-0.130 \text{ V} \pm 0.005$ arasında MDB sinyalleri incelendi. MDB’nin dsDNA arasına birikmesi nedeniyle [111],

dsDNA'da gözlenen MDB sinyalinin, ssDNA ve tek bazı eşleşmemiş DNA'dan daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, ayrıca bize, geliştirmiş olduğumuz biyosensörün seçimli şekilde hedefine bağlandığını ve polimorfizm tayinin mümkün olduğunu göstermiştir. Ayrıca tayinde kullanılan DPV tekniği, potansiyometrik sıyırma analizi ve kare dalga voltametrisi gibi diğer elektrokimyasal tayin teknikleri ile karşılaştırıldığında daha düşük tayin sınırına sahip analiz sağlamıştır [108].

En uygun analitik performansın bulunması amacıyla, yüzeye herhangi bir dsDNA'nın tutunması sağlanarak, daha sonra bu elektrotların değişik MDB konsantrasyonları (5 – 30 μ M) ve etkileşim süreleri (1 – 15 dk) ile MDB ile etkileşimleri sağlanmıştır. 20 μ M MDB konsantrasyonu ve 5 dakika etkileşim süresinin uygun olduğu görülmüştür. 20 μ M derişimden sonra görülen MDB sinyalindeki düşmenin yüzeydeki sterik etkiden kaynaklandığı, 5 dakikadan sonra görülen MDB sinyalindeki düşmenin de MDB'nin belli bir zamandan sonra bozulabileceğinden düşünülmektedir.

Çalışmanın en önemli basamağını oluşturan uygun prob tutturma tekniğinin seçiminde, herhangi bir işaret içermeyen tek sarmal sentetik prob dizisi, adsorbsiyon ve kovalent tutturma yöntemleri kullanılarak PGE yüzeyine iki farklı şekilde tutturulmuştur. Bu basamaktan sonra ise, çalışmanın genelinde uygulanan hibridizasyon ve MDB ile etkileşim basamakları aynen uygulanmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda adsorbsiyon ve kovalent yolla prob tutturma yöntemlerinin her ikisinin de hedef ve tek bazı hedeften farklı olan dizileri iyi bir şekilde ayırdığı gözlemlenmiştir. Ancak adsorbsiyon ile tutturma yönteminin kullanıldığı denemede elde edilen MDB sinyallerinin, kovalent yolla ile tutturmanın kullanıldığı denemede elde edilenlere göre yaklaşık 5 kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bunun da nedeninin elektrot yüzeyinin herhangi bir ajanla kaplı olmaması nedeniyle iletimi

daha kolay sağladığı düşünülmektedir. Bu yüzden çalışmamızda, NHS ve EDC gibi herhangi bir kimyasal ajanın kullanılmadığı adsorbsiyon ile prob tutturma yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

Çalışmada kullanılacak en uygun prob tutturma ve hibridizasyon sürelerinin, prob ve hedef konsantrasyonlarının, hibridizasyondan ve MDB ile etkileşimden sonraki yıkama sürelerinin tayinlerinde dsDNA'da gözlenen MDB sinyalinin, ssDNA ve tek bazı eşleşmemiş DNA'dan daha fazla olması esas alınmıştır ve mümkün olan en iyi ayırımın sağlandığı koşullar en iyi tayin koşulları olarak belirlenmiştir. Buna göre en uygun prob tutturma ve hibridizasyon süresi 30 dakika, en uygun prob konsantrasyonu $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve en uygun hedef konsantrasyonu $7 \mu\text{g mL}^{-1}$, en uygun yıkama sürelerinin hibridizasyondan sonraki yıkama aşaması için 20 saniye, MDB etkileşiminden sonraki yıkama aşaması için ise 10 saniye olduğu görülmüştür. Prob tutturma ve hibridizasyon sürelerinin artmasıyla dsDNA'da, ssDNA ve tek bazı eşleşmemiş DNA'da gözlenen MDB sinyallerinin birbirine yaklaştığı gözlenmiştir ve nedeninin de zamanla dizilerin elektrot yüzeyinde katlanabileceği ve istenmeyen bağlanmaların olabileceği düşünülmüştür. Yıkama sürelerindeki artışla da sinyallerdeki düşüşün nedeni elektrot yüzeyindeki DNA'ların veya biriken MDB'nin yüzeyden uzaklaşabileceği olarak düşünülmüştür.

Oluşturduğumuz biyosensörün ve bulduğumuz uygun koşulların gerçek hasta örnekleriyle de çalışmamıza uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla sentetik dizilerle çalışılarak elde edilen uygun koşullar gerçek PCR ürünleri üzerinde de denenmiştir. Daha öncede elde ettiğimiz sonuçlara paralel olarak sonuçlar elde edilmiştir.

Literatürde VDR'de görülen ApaI polimorfizminin elektrokimyasal biyosensörle tayinine yönelik kayıda rastlanmamıştır. Yöntemimizin kolay

uygulanabilir, ucuz ve hızlı cevap veren bir sistem olması nedeniyle klasik yöntemlere güçlü bir alternatif yöntem olması ve bu konuda çalışma yapacak araştırmacılara oluşturacağı düşünülmektedir.

Tek nokta polimorfizminin tayinine yönelik olarak Kelley ve arkadaşlarının elektrot olarak altın elektrot ve hibridizasyon indikatörü olarak da metilern mavisini kullandıkları çalışma [61] ile karşılaştırıldığında çalışmamızda son derece kullanımı kolay, tekrarlanabilir sonuçlar veren, ucuz ve fabrikasyona uygun bir elektrot yüzeyi olarak kalem grafit elektrodunun kullanılması nedeniyle daha ekonomiktir. Benzer şekilde Wong ve Gooding tek nokta mutasyonu tayinini altın elektrot ve antraknon-2,6-disülfonik asit interkalatörü kullanarak gerçekleştirmişlerdir [149].

Yine tek nokta polimorfizminin tayinine yönelik olarak Özkan ve arkadaşları altın elektrot, metilen mavisini ve peptik nükleik asitleri kullanarak, Herman ve arkadaşları ise yine altın elektrot, rutenyum kompleksi ve peptik nükleik asitleri kullanarak tek nokta mutasyonlarını içeren DNA dizilerini tespit edebilmişlerdir [68, 101, 121]. Bu tür altın elektrotların, peptik nükleik asitlerin veya işaretli dizilerin kullanıldığı çalışmalara kıyasla yöntemimizde bu tür herhangi bir dizinin kullanılmaması kullandığımız yöntemin oldukça ekonomik olmasını sağlamıştır.

Ozsoz ve arkadaşları kanın pıhtılaşma faktörlerinden biri olan Faktör V'e ait gen dizisinde görülen tek nokta mutasyonunun tayininde altın nanopartiküller kullanarak ve problemleri elektrot yüzeyine kovalent olarak tutturmak amacıyla amin gruplu diziler kullanılması ve kovalent bağlama ajanlarından yararlanılması sistemlerinin daha pahalı bir sistem olmasını gerektirmiştir [105].

BÖLÜM V

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında VDR’de görülen ApaI polimorfizminin tayinine yönelik olarak tasarlanmış olduğumuz biyosensör gerek sentetik dizilerle gerekse PCR örnekleriyle ayırt edici yanıtlar vermiştir.

İlk kez elektrokimyasal DNA biyosensörü kullanılarak bu tek nokta polimorfizminin tayini yapılmıştır. Tayinde, sentetik ve gerçek hasta örnek DNA dizileri kullanılarak çift sarmal, tek sarmal ve tek bazı eşleşmeyen DNA dizilerin MDB ile etkileşimleri sonucu elde edilen MDB indirgenme sinyalinin diferansiyel darbe yöntemi ile ölçülmesine dayanmaktadır. Bu ölçüm sistemi kullanılarak Vitamin D reseptör geni üzerindeki Apa I polimorfizmi yaklaşık 65 dakikada tespit edilebilmiştir.

Elektrot olarak kalem grafit elektrodunun kullanılması ve bu elektrodun kolay kullanılabilirliği, yenilenebilirliği, ucuzluğu ve tayinin kısa sürede hassas ve seçimli şekilde cevap vermesi çalışmanın diğer yararları arasında yer almaktadır.

Geliştirilen bu biyosensör sisteminin VDR’de veya her hangi bir gen üzerinde görülen tek nokta polimorfizmlerinin saptanmasında kullanılabileceği önerilebilir.

Biyosensör teknolojileri, çeşitli alanlarda pek çok bilim alanındaki bilgi birikimini gelişmeler paralelinde ve gereksinimler doğrultusunda kullanarak çok hızlı

bir şekilde ilerlemektedir. Biyosensörlerin klasik tayin yöntemlerine nazaran çoğu zaman spesifik ve duyarlı sonuçların pratik ve kısa sürede alınmasını sağlamaları, tekrar kullanılabilir ya da düşük maliyetle tek kullanımlık şekilde seri olarak üretilibilmeleri ve bu türlerin çoğu zaman kullanırken özel deneyim gerektirmemeleri onları gelecek vaat eden biyoanalitik sistemler olarak ön planda tutmaktadır.

Sonuç olarak tez kapsamında belirtilen amaçlar gerçekleştirilmiştir. VDR polimorfizmlerinin elektrokimyasal biyosensörlerle tayinine yönelik başka bir çalışmaya yapılan kaynak taranmasında rastlanmadığından, bu konuda ilk olan bu çalışmanın diğer çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Klasik yöntemlere güçlü bir alternatif yöntem olması nedeniyle bu sistemin gelecekte fabrikasyona dönüştürülebilmesi için sanayi desteğine gereksinim olacaktır.

BÖLÜM VI

ÖZET

ELEKTROKİMYASAL DNA BİYOSENSÖRLERİ İLE VİTAMİN D RESEPTÖR GENİNDEKİ POLİMORFİZMLERİN SAPTANMASI

Vitamin D endokrin sistemi immun yanıtın oluşmasında, kalsiyum ve fosfat metabolizmasında, kemik metabolizmasında ve hücre çoğalması ve farklılaşmasında yardımcı rol oynamaktadır [3, 70]. Bu nedenle, bu endokrin sistemde görülen bir mutasyon diyabet, kanser, osteoartrit, tüberküloz ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığa neden olabilmektedir [46, 124].

Bu güne kadar, Vitamin D reseptör (VDR) geninin 3' ucunda belirlenen, Apa I, Bsm I ve Taq I en çok çalışılan kesim parçacığı uzunluk polimorfizmleridir [127]. VDR'deki Apa I polimorfizmi Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkları içeren hastalıklara sebep olurken buna ek olarak paratiroid yanıtı da etkilemektedir [2, 23, 153].

Bu polimorfizmin tanımlanmasına yönelik kullanılmakta olan yöntem, RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemidir [2, 127, 153].

Çalışmada, vitamin D reseptöründe görülen Apa I tek nokta polimorfizminin elektrokimyasal olarak tayinine yönelik hibridizasyona dayalı yenilenebilir bir

biyosensör geliştirilmiştir. Biyosensör, Apa I polimorfizmine ait 21 bazlık sentetik tek sarmal (prob) dizilerin ve PCR ürünü dizilerinin biyosensör yüzeyine bağlanmasına ve bu oligonükleotidlerin tam karşılığı ve tek bazı hedeften farklı olan dizilerle kalem grafit üzerindeki hibridizasyonuna dayanmaktadır. Elektrokimyasal hibridizasyon indikatörü olarak çift sarmal DNA arasına interkale olan Meldola Mavisi (MDB) kullanılmıştır. dsDNA, ssDNA ve SNP içeren dizinin tayini DPV tekniği kullanılarak MDB'nin $-0.130 \text{ V} \pm 0.005$ 'daki voltametrik indirgenme sinyalinin değişiminin ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışmada MDB sinyalini etkileyen prob ve hedef konsantrasyonu, hibridizasyon, bağlanma ve yıkama zamanı gibi birçok parametreyi inceledik.

Çalışmamızda, geliştirmiş olduğumuz elektrokimyasal DNA biyosensörü VDR'deki Apa I polimorfizminin saptanmasına yönelik hızlı ve güvenilir sonuçlar vermiştir. Literatürde bu mutasyonun elektrokimyasal biyosensörle tayinine yönelik kayıta rastlanmamıştır.

Yenilenebilir karbon grafit elektrodu, kolay kullanımı ve taşınabilirliğinden dolayı mikroarray teknolojisi için önemli bir özellik taşır. Ayrıca bu elektrotlar sonuçlarının tekrarlabilirliği açısından da güvenilirlerdir.

Hibridizasyon indikatörü olarak MDB'nin kullanımı, PCR sonrasında jel elektroforezi sırasında kullanılan etidyum bromür gibi toksik kimyasalların kullanımını uzaklaştırır. VDR'deki Apa I polimorfizminin sekanslamayla tayinine kıyasla daha ucuz alternatif bir yöntemdir. MDB'nin elektriksel aktivitesi ve DNA interkalatörü davranışı dsDNA, ssDNA ve SNP içeren dsDNA'nın birbirlerinden ayrımını mümkün kılmıştır.

ABSTRACT

DETECTION OF POLYMORPHISMS IN THE VITAMIN D RECEPTOR GENE WITH AN ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSOR

The vitamin D endocrine system helps to modulate the immune response, calcium and phosphate metabolism, bone metabolism, and regulation of cell proliferation and differentiation [3, 70]. Thus, mutations in this endocrine system give rise to several diseases, including diabetes, cancer, osteoarthritis, tuberculosis, and cardiovascular disease [46, 124].

So far, three adjacent restriction fragment length polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene have been studied the most often: Bsm I, Apa I, and Taq I [127]. The Apa I polymorphism in the VDR gene is known to be involved in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, and it may affect the parathyroid response [2, 23, 153].

A convenient method for detecting polymorphisms is restriction fragment length polymorphism (RFLP) [2, 127, 153].

In this study, a hybridization-based disposable electrochemical DNA biosensor for the electrochemical detection of an Apa I single nucleotide polymorphism (SNP) in the vitamin D receptor gene was developed. The biosensor is based on the immobilization of the 21-base single-stranded oligonucleotides (probe) and PCR

amplicons related to the Apa I polymorphism sequences, and hybridization of these oligonucleotides to their perfectly complementary target sequences and to target sequences containing single mismatches on a pencil graphite electrode (PGE). An electroactive Meldola's Blue (MDB), which intercalates between the base pairs in a hybrid duplex, was used as an electrochemical indicator. The discrimination of dsDNA, ssDNA, DNA containing a single mismatch was achieved by measuring changes in the voltammetric reduction signal of MDB at $-0.130 \text{ V} \pm 0.005$ using DPV. We investigated several factors affecting the MDB signal, such as probe concentration, target concentration, hybridization time, accumulation time, and washing time.

In this study, an electrochemical DNA biosensor is described that offers fast and reliable results for the detection of the Apa I polymorphism in the vitamin D receptor. In literature, this is the first study demonstrating the electrochemical detection of the Apa I polymorphism in the VDR gene.

The use of disposable carbon graphite electrodes has important advantages for microarray technology due to its ease-of-use and portability. These electrodes also improve the reproducibility of the results.

The use of MDB as the hybridization indicator eliminates the need for toxic chemicals such as ethidium bromide, which is normally used in the gel electrophoresis step after PCR amplification, and it is a low-cost alternative to sequencing for the detection of the Apa I polymorphism in the VDR gene. Because of its electrical activity and its behavior as a DNA intercalator, MDB gives electrical signals that differ depending on whether it is binding to dsDNA, ssDNA, and dsDNA with a single mismatch. These differences are robust enough that the signals can easily be separated from one another.

BÖLÜM VII

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Abe, E., et al., (1981). Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃., *Proc Natl Acad Sci USA*, 78(8): 4990-4994.(1)
2. Ak, D.G., Dursun, E., Ertan, T., Hanagasi, H., Gürvit, H., Emre, M., Eker, E., Ozturk, M., Engin, F., Yilmazer, S., (2007). Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Alzheimer's Disease, *Tohoku J. Exp. Med.* 212: 275. (2)
3. Ak, D.G., Kahraman, H., Dursun, E., Duman, B.S., Erensoy, N., Alagol, F., Tanakol, R., Yilmazer, S., (2005). Polymorphisms at the ligand binding site of the vitamin D receptor gene and osteomalacia, *Dis. Markers* 21: 191. (3)
4. Ariksoysal, D.O., Karadeniz, H., Erdem, A., Sengonul, A., Sayiner, A.A., Ozsoz, M. (2005). Label-free electrochemical hybridization genosensor for the detection of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance, *Anal. Chem.*, 77 (15): 4908-4917. (4)
5. Ariksoysal, D.O., Tezcanlı, B., Kosova, B., Ozsoz, M., (2008). Design of electrochemical biosensor systems for the detection of specific DNA sequences in PCR-amplified nucleic acids related to the catechol-O-methyltransferase val1

08/158Met polymorphism based on intrinsic guanine signal, *Anal. Chem.*, **80**(8), 2774-2779.

6. Bard, A. J., Faulkner L. R., (1980). *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Canada. (6)
7. Barton, J.K., Goldberg, J.M., Kumar, C.V., Turro, N.J., (1986). Binding modes and base specificity of tris (phenantroline) ruthenium (II) enantiomers with nucleic acids tuning the stereoselectivity, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**: 2081-2088. (7)
8. Boland, R., (1986). Role of vitamin D in skeletal muscle function, *Endocr Rev*, **7**(4): 434-448.(8)
9. Boucher, B.J., et al., (1995). Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in east London Asians, *Diabetologia*, **38**(10): 1239-1245.(9)
10. Brett, A.M.O., Macedo, T.R.A., Raimundo, D., Marques, M.H., Serrano, S.H.P. (1998). Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, **13**: 861-867. (10)
11. Brett. A.M.O., Piedade, J.A.P., Serrano, S.H.P., (2000). Electrochemical oxidation of 8-oxoguanine, *Electroanal.*, **12**, 969-973. (11)
12. Buch-Rasmussen, B. Olsen, J. Kulys, K. Bechgaard, J. Christensen, J. Wang, M. Ozsoz, F. Colin, O. Garcia, (1992). Patent WO 92/07263, Application on Use of Benzene Derivatives as Charge Transfer Mediators, International Publication. (12)
13. Camman, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B. (1991). Chemical Sensors and Biosensors-Principles and Applications, *Angew. Chem. Int. De.Engl.*, **30**: 516-539. (13)

14. Carmichael, W. W., (1988). In *Marine Toxins and Venoms, Handbook of Natural Toxins* (Ed: A. T. Tu), Dekker, New York, 3: 121-147. (14)
15. Carpinì, G., Lucarelli, F., Marrazza, G., Mascini, M. (2004). Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2): 167-175. (15)
16. Carter, M.T. and Bard, A. J. (1987). Voltammetric studies of the interaction of tris (1,10-phenanthroline) cobalt (III) with DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 7528-7530. (16)
17. Carter, M.T., Rodriguez, M., Bard, A.J., (1989). Voltammetric studies of interaction of metal chelates with DNA 2. tris chelated complexes of Cobalt (III) and Iron (II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine, *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 8901-8911. (17)
18. Castillo, J., Gaspar, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Domeanu, S.A., Ryabov, A.D., Csoregi, E., (2004). Biosensors for life quality-Design, Development and applications, *Sensors and Actuators B*, 102: 179-194. (18)
19. Champe, P.C., Harvey, R.A., (1997). *Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevi*, 2. baskı, İstanbul, 343-375. (19)
20. Chen, D., Cao, Y., Liu, B., Kong, J., (2002). A BOD biosensor based on a microorganism immobilized on an Al₂O₃ sol-gel matrix, *Anal. Bioanal. Chem.*, 372(5-6):737-9. (20)
21. Clark, L. C., Lyons, C., (1962). Electrode System for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery, *Ann. NY Acad. Sci.* 102: 29-45. (21)

22. Collings, A.F., Caruso, F., (1997). Biosensors: recent advances, *Reports in Progress in Physics*, 60: 1397-1445.(22)
23. Correa, P., Rastad, J., Schwarz, P., Westin, G., Kindmark, A., Lundgren, E., Åkerstro, G.R., Carling, T., (1999). The vitamin D receptor (VDR) start codon polymorphism in primary hyperparathyroidism and parathyroid VDR messenger ribonucleic acid levels, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 1690. (23)
24. Coulet, P. R. (1991). What is a Biosensor?, Chapter 1; Biosensor principles and applications, Editörler; L.J.Blum, P.R. Coulet, Marcel Dekker Inc., New York, 1-6.(24)
25. D'Orazio, P., (2003). Biosensors in Clinical Chemistry, *Clinica Chimica Acta*, 334: 41-69. (25)
26. Del Pozo, M.V., Alonso, C., Pariente, F., Lorenzo, E. (2005). Electrochemical DNA sensing using osmium complexes as hybridization indicators, *Biosens. Bioelectron.* 20 (8): 1549-1558. (26)
27. Deligezer, U., Akışık, E. E., Dalay, N., (2004). Gen Polimorfizm Analizinde LightCycler Floresan PCR Tekniğinin Kullanılması: Myeloid Lösemili Çocuk ve Yetişkin Hastalarda MTHFR C677T Gen Polimorfizm Dağılımının Belirlenmesi, *Türk Onkoloji Dergisi, Cilt 19, Sayı 4.* (27)
28. Dusso, A.S., Brown, A.J., Slatopolsky, E., (2005). Vitamin D, *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(1): F8-28. (28)
29. Endo, I., et al., (2003). Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors, *Endocrinology*, 144(12): 5138-5144.(29)

30. Erdem A, Meriç B., Kerman K., Dalbastı T., Ozsoz M. (1999). Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor, *Electroanal.*, 11: 1372-1376. (30)
31. Erdem A., Kerman K., Meric B., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz M, (2002). DNA biosensor for microcystis spp. Sequence detection by using methylene blue and ruthenium complexes as hybridisation labels, *Turk. J. Chem.* 26: 851-862. (31)
32. Erdem A., Kerman K., Meriç B., Akarca U.S., Ozsoz M. (1999). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Electroanal.*, 11: 586-588. (32)
33. Erdem A., Kerman K., Meriç B., Akarca U.S., Ozsoz M. (2000). Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Anal. Chim. Acta*, 422: 139-149. (33)
34. Erdem A., Kerman K., Meriç B., Ozsoz, M. (2001). Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator, *Electroanal.*, 13(3), 219-223. (34)
35. Erdem, A, Meric, B., Kerman, K., Dalbasti, T., Ozsoz, M., (1999). Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor, *Electroanal.*, 11 (18): 1372-1376. (35)
36. Erdem, A., Ariksoysal, D.O., Karadeniz, H., Kara, P., Sengonul, A., Sayiner, A.A., Ozsoz, M., (2005). Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology, *Elect. Com.*, 7 (8): 815-820. (36)
37. Erdem, A., Kerman, K., Ozkan, D., Tugrul, B., Topcuoglu, N., Ekren, H., Taylan, M., Ozsoz, M., (2003). Electrochemical Genosensor Based on Colloidal

Gold Nanoparticles for the Detection of Factor V Leiden Mutation Using Disposable Pencil Graphite Electrodes, *Anal. Chem.* 75: 2181. (37)

38. Erdem, A., Ozsoz, M., (2001). Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA, *Anal. Chim. Acta* 437: 107. (38)

39. Floch, F.Le., Ho, H.-A., Harding-Lepage, P., Leclerc, M., (2005). New ferrocene-functionalized cationic polythiophene for label-free electrochemical DNA detection, NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech 2005 Technical Proceedings, 374-375. (39)

40. Fojta, M., Havran, L., Fulneckova, J., Kubicaova, T., (2000). Adsorptive transfer stripping AC voltammetry DNA complexes with intercalators, *Electroanal.*, 12: 926-934. (40)

41. Gözükar, E.M., (2000). Biyokimya I ve II, Nobel Tıp Yayınları, 4. baskı, İstanbul. (41)

42. Gorton, L., Csöregi, E., Dominguez, E., Emneus, J., Jonsson-Pettersson, G., Makro-Varga, G., Persson, B., (1991). Selective detection in flow analysis based on the combination of immobilized enzymes and chemically modified electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 250: 203-248.(42)

43. Gray, I.C., Campbell, D.A., Spurr, N.K., (2000). Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics, *Hum. Mol. Gen.*, 9(16): 2403-2408.(43)

44. Grundberg, E., (2006). Genetic Variability in Human Bone Phenotypes, The Vitamin D Receptor Gene and the Estrogen Receptor- α Cofactor RIZ Gene, Acta Universitatis Upsaliensis, Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine 135: 29-32. (44)

45. Guilbault, G.G, Montalvo, J., (1969). A urea specific enzyme electrode, *J. Am.Chem. Soc.*, 91, 2164. (45)
46. Guy, M., Lowe, L.C., Watt, D.B., Mansi, J.L., Peckitt, C., Bliss, J., Wilson, R.G., Thomas, V., Colston, K.W., (2004). Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Breast Cancer Risk, *Clin. Cancer Res.* 10: 5472. (46)
47. Hall, E.A.H., (1990). Biosensors, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere; s.3-30.(47)
48. Heng, L. Y., Chou, A., Yu, J., Chen, Y., Gooding, J. J., (2005). Demonstration of the advantages of using bamboo-like nanotubesfor electrochemical biosensor applications compared with singlewalled carbon nanotubes, *Electrochem. Commun.* 7: 1457. (48)
49. Hennig J.W.B., Parkhill J.M., Chapple L.C., Heasman P.A., Taylor J.J., (1999). Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized Early-Onset periodontal diseases, *J. Periodontol.*, 70 (9): 1032-1038.(49)
50. Herne, T.M., Tarlov, M.J., (1997). Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 8916-8920. (50)
51. Holick, M.F., MacLaughlin, J.A., Doppelt, S.H., (2001). Regulation of cutaneous previtamin D₃ photosynthesis in man: skin pigment is not an essential regulator, *Science*, 211 (4482): 590-593. (51)
52. <http://en.wikipedia.org/wiki/Biosensor>(52)
53. Human Genome Project Information,
http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml(53)

54. Johnston, D.H., Glasgow, K.C., Thorp, H.H. (1995). Electrochemical measurement of the solvent accessibility of nucleobases using electron transfer between DNA and Metal complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 8933-8938. (54)
55. Kara, P., Erdem, A., Girousi, S., Ozsoz, M. (2005). Electrochemical detection of enzyme labeled DNA based on disposable pencil graphite electrode, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 38 (1): 191-195. (55)
56. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002). Label free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes, *Electroanal.*, 14 (23), 1-6. (56)
57. Kara, P., Meric, B., Zeytinoglu, A., Ozsoz, M., (2004). Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes simplex Type I and Type II viruses from PCR amplified real samples, *Anal. Chim. Acta* 518 (1-2): 69-76. (57)
58. Kara, P., Ozkan, D., Erdem, A., Kerman, K., Pehlivan, S., Ozkinay, F., Unuvar, D., Itirli G., Ozsoz, M., (2003). Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology, *Clin. Chim. Acta*, 336(1-2): 57-64. (58)
59. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z., Ozsoz, M., (2002). Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA, *Electrochem. Commun.*, 4: 705-709 (59)
60. Karadeniz, H., Gulmez, B., Sahinci, F., Erdem, A., Irem Kaya, G., Unver, N., Kivcak, B., Ozsoz, M. (2003). Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33: 295-302. (60)

61. Kelley, S.O., Boon, E.M., Barton, J.K., Jackson, N.M., Hill, M.G., (1999). Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA, *Nucl. Acids Res.*, 27: 4830-4837.(61)
62. Kerman, K., Matsubara, Y., Morita, Y., Takamura, Y., Tamiya, E., (2004). Peptide nucleic acid modified magnetic beads for intercalator based electrochemical detection of DNA hybridization, *Sci. Tech. Adv. Mat.* 5: 351. (62)
63. Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara, P., Erdem, A., Ozsoz M., (2001). Electrochemical DNA biosensor for the determination of Benzo[a]pyrene - DNA adducts, *Anal. Chim. Acta.*,450: 45-52. (63)
64. Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara, P., Jelen F., Karadeniz H., Ozkan Z., Ozsoz M., (2004). DNA Sensing On Mercury And Carbon Electrodes By Using Meldola Blue As The Electrochemically Active Intercalator, *Turk. J. Chem.*, 28: 1-11. (64)
65. Kerman, K., Morita, Y., Takamura, Y., Ozsoz, M., Tamiya, E. (2004). DNA-directed attachment of carbon nanotubes for enhanced label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Electroanal.*,16 (20):1667-1672. (65)
66. Kerman, K., Morita, Y., Takamura, Y., Tamiya, E. (2003). Label-free electrochemical detection of DNA hybridization on gold electrode, *Electrochem. Commun.*, 5 (10): 887-891. (66)
67. Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Karadeniz, H., Ozkan, Z., Erdem, A., Jelen, F., Ozsoz, M., (2004). Electrochemical Detection of Specific DNA Sequences From PCR Amplicons on Carbon and Mercury Electrodes Using Meldola's Blue as an Intercalator, *Turk J Chem.* 28: 523. (67)

68. Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, B., Gooding, J.J., Ozsoz M., (2002). Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, *Anal. Chim. Acta* 462: 39–47. (68)
69. Killard, A.J., Smyth, M.R., Grennan, K., Micheli, L., Palleschi, G., (2000). Rapid antibody biosensor assays for environmental analysis, *Biochemical Society Transactions*, 28-2: 81-84.(69)
70. Kim, H.S., Newcomb, P.A., Ulrich, C.M., Keener, C.L., Bigler, J., Farin, F.M., Bostick, R.M., Potter, J.D., (2001). Vitamin D Receptor Polymorphism and the Risk of Colorectal Adenomas, *Biomar. Prev.* 10 : 869. (70)
71. Klibanov, A.M., (1979). Enzyme stabilization by immobilization, *Anal. Biochem.*, 93: 1-24. (71)
72. Kruglyak, L., (1997). The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies, *Nat. Genet.*, 17(1): 21-24.(72)
73. Lin, T.Y., Hu, C.H., Chou, T.C., (2004). Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 75-81. (73)
74. Lowe, C.R., (1999). Chemoselective Biosensors, *Current Opinion in Chemical Biology*, 3: 106-111.(74)
75. Lucarelli, F., Marazza, G., Palchetti, I., Cesaretti, S., Mascici, M., (2002). Coupling of an indicator-free electrochemical DNA biosensor with polymerase chain reaction for the detection of DNA sequences related to the apolipoprotein E, *Anal. Chim. Acta*, 469: 93-99. (75)

76. Lucarelli, F., Marrazza, G., Turner A.P.F., Mascini, M., (2004), Carbon and gold electrochemical transducers for DNA hybridization sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 515-530.(76)
77. Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G., Mascini, M., (2002). Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples, *Talanta*, 56: 949-957. (77)
78. Lucarelli, F., Tombelli, S., Minunni, M., Marrazza, G., Mascini, M., (2008). Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection, *Anal. Chim. Acta* 609: 139. (78)
79. Lukasova, E., Jelen, F. and Palecek, E. (1982). Electrochemistry of dum-Nucleic acid complexes: A probe for single-stranded and distorted double-stranded regions in DNA, *Gen. Physiol., Biophys.*, 1: 53-70. (79)
80. MacDonald, P.N., et al., (2001). Vitamin D receptor and nuclear receptor coactivators: crucial interactions in vitamin D-mediated transcription, *Steroids*, 66(3-5): 171-6.(80)
81. MacLaughlin, J.A., Anderson, R.R., Holick, M.F., (1982). Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin, *Science*, 216(4549): 1001-1003. (81)
82. Marazza, G., Chianella, I., Macsini, M., Anichini, M., (2000). Detection of human apolipoprotein E genotypes with DNA electrochemical biosensor coupled with PCR, *Clin. Chim.*, 46: 31-37. (82)
83. Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E. (1998). Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C, *Biophys Chem.*, 75: 87-95. (83)

84. Mariotti, E., Minunni, M., Macsini, M., (2002). Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection, *Anal. Chim. Acta*, 453(2): 165-172. (84)
85. Mariotti, M.P., Riccardi, C.S., Fertoni, F.L., Yamanaka, H., (2006). Strategies for Developing NADH Detector Based on Meldola Blue in Different Immobilization Methods: A Comparative Study, *J. Braz. Chem. Soc.* 17: 689. (85)
86. Maruyama, K., Mishima, Y., Minagawa, K., Motonaka, J. (2001). Electrochemical and DNA-binding properties of dipyrrophenazine complexes of osmium(II) , *Journal of Electroanal. Chem.* 510 (1-2): 96-102. (86)
87. Mascini, M., Palchetti, I., Marrazza, G., (2001). DNA electrochemical biosensors, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369: 15. (87)
88. McGown, L.B., Joseph, M.J., Pitner, J.B., Vonk, G.P. ve Linn, C.P., (1995). The Nucleic acid ligand: A new tool for molecular recognition, *Anal. Chem.*, 67: 663 A-668 A. (88)
89. Meric, B., Kerman, K., Maraza, G., Palchetti, I., Macsini, M., Ozsoz, M., (2004). Disposable genosensor, a new tool for the detection of NOS-terminator, a genetic element present in GMOs, *Food Control*, 15(8): 621-626. (89)
90. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erensoy, S., Akarca, U.S., Mascini, M., Ozsoz, M., (2002). Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue, *Talanta*, 56 (5): 939-947. (90)
91. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz, M., (2002). Indicator-free DNA biosensor based on adenine and guanine signals, *Electroanalysis*, 14(18): 1245-1250. (91)

92. Mikkelsen S.R., (1996). Electrochemical Biosensor for DNA sequence Detection A Review, *Electroanalysis*, 8(1): 15-19. (92)
93. Millan, K.M., Saraullo, A., Mikkelsen, S.R., (1994). Voltammetric DNA Biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode, *Anal. Chem.*, 66: 2943-2948. (93)
94. Mionetto N., Marty L., Karube I., (1994). Acetylcholine esterase in organic solvents for the detection of pesticides: Biosensor applications, *Biosensors&Bioelectronics*, 9:463-470. (94)
95. Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., Mucic R.C., Storhoff J.J., (1996). A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials, *Nature*, 382: 607-9. (95)
96. Motti, C., Dainese, E., Mascini, M., Minnuni, M., De Santis, P., Cozzani, I., (2000). The use of biotechnology in agriculture and the methods for the detection of genetically modified organisms (GMOS) in food, *Italian J. Biochem.*, 49: 64-72. (96)
97. Mutlu, M., (2002). Biyosensörler, *Bilim ve Teknik Dergisi, Yeni Ufuklara, Temmuz 2002*, 17 (97)
98. Niemeyer, C.M., (2001). Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science, *Angew Chem. Int. Ed.*, 40:4128-4158. (98)
99. Norman, A.W., et al., (1980). Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin, *Science*, 209(4458): 823-825.(99)
100. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002). Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, *Anal. Chim. Acta* 462 (1): 39-47. (100)

101. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Ozsoz, M. (2002). Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes, *Electrochem. Commun.*, 4 (10): 796-802. (101)
102. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Hassmann, J., Ozsoz, M., (2002). Allele specific genotype detection of FactorV Leiden mutation, from polymerase chain reaction amplicons based on label free electrochemical genosensor, *Anal. Chem.*, 74: 5931-5936. (102)
103. Ozkan, D., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Jelen, F., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002). DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label, *Bioelectrochem.*, 58(1): 119-126. (103)
104. Ozkan, D., Karadeniz, H., Erdem, A., Mascini, M., Ozsoz, M., (2004). Interaction of Mitomycin C with DNA by Electrochemical DNA Biosensor Based on Guanine Signal, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35: 905. (104)
105. Ozsoz, M., Erdem, A., Kerman, K., Ozkan, D., Tugrul, B., Topcuoglu, N., Erken, H., Taylan, M., (2003). Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of Factor V leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes, *Anal. Chem.*, 75: 2181-2187.(105)
106. Palecek, E., (1960). Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid, *Nature*, 188: 656-658.(106)
107. Palecek, E., (1988). New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 20: 179-194. (107)

108. Palecek, E., Fojta, M., (1994). Differential pulse voltammetric determination of RNA at the picomole level in the presence of DNA and nucleic acid component, *Anal. Chem.* 66: 1566-71.(108)
109. Passarge, E., (2000). Renkli Genetik Atlası, Editörler Güven Lüleci, Meral Sakızlı, Özgül Alper, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 34–39, 44–47, 72–73 (109)
110. Polimeraz Zincir Reaksiyonu, mart 2005, <http://www.gazete.itu.edu.tr/mart/4genetik.pdf>(110)
111. Reid, G.D., Whittaker, D.J., Day, M.A., Turton, D.A., Kayser, V., Kelly, J.M., Beddard, G.S., (2002). Femtosecond Electron-Transfer Reactions in Mono- and Polynucleotides and in DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 124: 5518. (111)
112. Rivas, G.A., Pedano, M.L., Ferreyra, N.F., (2005). Electrochemical DNA Biosensors: Electrochemical Biosensors for Sequence-Specific DNA Detection, *Analytical Letters*, 38: 2653–2703. (112)
113. Rodriguez-Mozaz, S., et al., (2004). Biosensors for environmental applications:Future development trends, *Pure Appl. Chem.*, 76 (4): 723–752. (113)
114. Rogers, K.R., Macsini, M., (1998). Biosensors for Field Analytical Monitoring, *Field Analytical Chemistry and Technology*, 2: 317-331.(114)
115. Sadik, O.A., Wanekaya, A.K., Andreescu, S., (2004). Advances in analytical technologies for environmental protection and public safety, *Journal of Environmental Monitoring*, 6:513-522.(115)
116. Sequencing, [http://www.supamac.com/ education/](http://www.supamac.com/education/)(116)
117. Shen, P., Buchholz, M., Sung, R., Roxas, A., Franco, C., Yang, W.H., Jagadeesan, R., Davis, K., Oefner P.J., (2002). Population genetic implications from

DNA polymorphism in random human genomic sequences, *Hum. Mutat.*, 20(3): 209-217. (117)

118. Shin, J. H., Yoon, S. Y., Yoon, I.J., Choi, S.H., Lee, S.D., Nam, H., and Cha, G.S., (1998). Potentiometric Biosensors Using Immobilized Enzyme Layers Mixed With Hydrophilic Polyurethane, *Sensors and Actuators B*, 50, 19-26. (118)

119. Simonian A.L, Good T.A., Wang S.S., Wild J.R., (2004). Nanoparticle based optical biosensor for the direct detection of organophosphate chemical warfare agents and pesticides, *Anal. Chim. Acta article in press*. (119)

120. Skoog, D.A., West, D.A., Holler, F.J., (1996). Analitik Kimyanın Temelleri, Çeviri editörleri: Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, Bilim Yayıncılık, 4. baskı, 303-495. (120)

121. Steichen, M., Decrem, Y., Godfroid, E, Herman, C.B., (2006). Electrochemical DNA hybridization detection using peptide nucleic acids and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ on gold electrodes, *Biosensors and Bioelectronics article in press*. (121)

122. Takeuchi, K.J., Thompson, M.S., Pipes, D.W., Meyer T.J., (1984). Redox and spectral properties of monooxo polypyridyl complexes of ruthenium and osmium in Aqueous media, *Inorg. Chem.*, 23: 1845-1851. (122)

123. Takeuchi, K.J., Thompson, M.S., Pipes, D.W., Meyer, T. J. (1984). Redox and spectral properties of monooxo polypyridyl complexes of ruthenium and osmium in Aqueous media, *Inorg. Chem.*, 23: 1845-1851. (123)

124. Taverna, M.J., Selam, J.L., Slama, G., (2005). Association between a Protein Polymorphism in the Start Codon of the Vitamin D Receptor Gene and Severe Diabetic Retinopathy in C-Peptide-Negative Type 1 Diabetes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 4803. (124)

125. Tural, H., Gökçel, İ., Ertaş, N., (2003). Enstrümental Analiz I, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No:186. (125)
126. Tusarova I., Halamek E., Kobliha Zbynek, (1999). Study on reactivation of enzyme inhibitor complexes by oximes using acetylcholine esterase inhibited by organophosphate chemical warfare agents, *Enzyme and Microbial Technology*, 25:400-403. (126)
127. Uitterlinden, A.G., Fang, Y., Meurs, J.B.J., Pols, H.A.P., Leeuwen, J.P.T.M., (2004), Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms, *Gene*, 338: 143. (127)
128. Van Etten E., Mathieu C., (2005). Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts, *J. Steroid Biochem Mol Biol.*, 97: 93-101.(128)
129. Vasilescu, A., Andreescu, S., Bala, C., Litescu, S. C., Noguer, T., Marty, J.L., (2003). Screen-printed electrodes with electropolymerized Meldola Blue as versatile detectors in biosensors, *Biosen. Bioelectron.* 18: 781. (129)
130. Vignal, A., Milan, D., Sancristobal, M., Eggen, A., (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics, *Genet. Sel. Evol.* 34: 275. (130)
131. Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R. ve Mosbach, K. (1993). Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature*, 361: 645–647. (131)
132. Wang J., Pumera M., Chatrathi M.P., Escarpa A., Musameh M., (2002). Single channel microchip for fast screening and detailed of nitroaromatic explosives or organophosphate nerve agents, *Anal. Chem.*, 74: 1187-1191. (132)

133. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P.A.M., Dontha, N., (1996). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus, *Anal. Chem.*, 68: 2629-2634. (133)
134. Wang, J., Cai, X., Tian, B., Shiraishi, H., (1996). Microfabricated thick-film electrochemical sensor for nucleic acid determination, *Analyst* 121: 965-970.(134)
135. Wang, J., Grant, D.H., Ozsoz, M., Cai, X., Tian, B., Fernandes, J.R., (1997). Adsorptive potentiometric stripping analysis of nucleic acids at mercury electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 349: 77- 79. (135)
136. Wang, J., Kawde, A.N., (2001). Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Anal. Chim. Acta*, 431(2): 219-224. (136)
137. Wang, J., Kawde, A.N., (2002). Amplified label-free electrical detection of DNA hybridisation, *Analyst*, 127(3):383-386. (137)
138. Wang, J., Kawde, A.N., Erdem, A., Salasar, M., (2001). Magnetic beads based label free electrochemical detection of DNA hybridisation, *Analyst*, 120: 2020-2024. (138)
139. Wang, J., Kawde, A.N., Musameh, M., (2003). Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes for amplified label-free electrochemical detection of DNA hybridisation, *Analyst*, 128(7): 912-916. (139)
140. Wang, J., Nielsen, P., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Ozsoz, M., Beglieter, A., Mowat, M., (1997). Mismatch sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance, *Anal. Chem.*, 69: 5200-5202. (140)

141. Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D.H., Chicarro, M., Fernandes, J. R. and Palecek, E., (1998). Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface, *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, 45: 33 – 40. (141)
142. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., (1997). Screen-printed electrochemical hybridization biosensor for the detection of DNA sequences from the Escherichia coli pathogen, *Electroanal.*, 9(5): 395-398. (142)
143. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Shiraishi, H., Luo, D., Valera, F. S., (1997). Sequence-specific electrochemical biosensing of M. tuberculosis DNA, *Anal. Chim. Acta*, 337: 41-48. (143)
144. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Jiang, M., Paz, J.L.L., Waymire, R., Nielsen, T.W., Getts, R.C., (1998). Adsorption and detection of DNA dendrimers at carbon electrodes, *Electroanalysis*, 10(8): 553-556. (144)
145. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R., (1998). Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 375: 197-203. (145)
146. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F.S., Dontha, N., (1996). DNA-modified electrode for the detection of aromatic amines, *Anal. Chem.*, 68, 4365-4369. (146)
147. Wang, J., Xu, D., Kawde, A., Polsky, R., (2001). Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization, *Anal. Chem.*, 73: 5576-5581. (147)

148. Wei, M.-Y., Guo, L.-H., Chen, H., (2006). Determination of surface-immobilized double-stranded DNA using a metallointercalator and catalytic voltammetry, *Microchim. Acta* 155 (3-4): 409-414. (148)
149. Wong, E.L.S., Gooding, J.J., (2003). Electronic detection of target nucleic acids by a 2,6-disulfonic acid anthraquinone intercalator, *Anal. Chem.*, 75: 3845-3852. (149)
150. Wong, E.L.S., Gooding, J.J., (2006). Charge transfer through DNA: A selective electrochemical DNA biosensor, *Anal. Chem.*, 78 (7): 2138-2144. (150)
151. Wong, E.L.S., Mearns, F.J., Gooding, J.J., (2005). Further development of an electrochemical DNA hybridization biosensor based on long-range electron transfer, *Sensors Actuat.*, 111: 515-521. (151)
152. Yıldız, A., Genç, Ö., (1993). Enstrümental Analiz, Hacettepe Yayınları A-64: 289-384. (152)
153. Yokoyama, K., Shigematsu, T., Tsukada, T., Ogura, Y., Takemoto, F., Hara, S., Yamada, A., Kawaguchi, Y., Hosoya, T., (1998). Apa I polymorphism in the vitamin D receptor gene may affect the parathyroid response in Japanese with end-stage renal disease, *Kidney Int.* 53: 454. (153)
154. Zhang, Y., Hu, N., (2006). Cyclic voltammetric detection of chemical DNA damage induced by styrene oxide in natural dsDNA layer-by-layer films using methylene blue as electroactive probe, *Electrochem. Commun.*, 9 (1): 35-41. (154)
155. Zhong, X., Reynolds, R., Kidd, J.R., Kidd, K.K., Jenison, R., Marlar, R.A., Ward, D.C., (2003). Single-nucleotide polymorphism genotyping on optical thin-film biosensor chips, *PNAS* 100: 11559. (155)

ÖZGEÇMİŞ

Nilay ALADAĞ

Doğum Tarihi : 03.08.1983

Doğum Yeri : İzmir

Uyruğu : T.C.

Medeni Hali : Bekar

Eğitim Durumu :

2001 – 2006 **Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü(İzmir) - Lisans Eğitimi**

2006 – 2008 **Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.B.D. (İzmir) - Yüksek Lisans Eğitimi**

Lisans Bitirme Tezi Konusu:

Aspergillus niger'den Katı Kültür Fermentasyonu ile Sitrik Asit Üretiminin Optimum Koşullarının Belirlenmesi (Uygulamalı)

Yüksek Lisans Bitirme Tezi Konusu:

Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri İle Vitamin D Reseptör Genindeki Polimorfizmlerin Saptanması

Yaptığı Çalışmalar:

- **Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü 3. Biyomühendislik Günlerinde Poster Sunumu (2006) - Lisans Bitirme Tezi Poster Sunumu**

- **Label-Free Electrochemical Hybridization Genosensor For The Detection And Discrimination of Influenza Type A And Type B Viruses** - BioNano-II ITÜ – MOBGAM 23 – 25 Mayıs 07 – Poster Sunumu
- **The Electrochemical Detection of Gold Nanoparticles Behaviors Using DNA Biosensor Technology** - NanoTR-III 11-14 Haziran 07 Bilkent Üniversitesi – Poster Sunumu
- **Electrochemical DNA Biosensor** - 21. Ulusal Kimya Kongresi 23-27 Ağustos 07 İnönü Üniversitesi - Çalıştay
- **Detecting DNA Hybridization Based On Electro-Active Intercalators** - XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 28-31 Ekim 07 Antalya – Poster Sunumu
- **Influenza Tip A ve Tip B Virüslerinin Tespiti ve Ayırt Edilmesine Yönelik Elektrokimyasal Biyosensör Tasarımı** - Inno-Venture 2007 Proje Pazarı 13-14 Aralık 07 AKM, İzmir – Proje Sunumu

Katıldığı Kurslar:

2005 – 2006	<u>T.C M.E.B. Özel Akademik Batı Dilleri Eğitim Kurumu</u> - İngilizce Dil Kursu (16 ay)
2005	<u>Ege Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM)</u> - Gıdalarda Biyoteknoloji Uygulamaları Sempozyumu - Adli Bilimlerde Güncel Gelişmeler Sempozyumu - XII. International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED'05)

2004

Kırmacı Mühendislik ve Danışmanlık Tic. Ltd. Şti.

- HACCP:Hazard Analysis and Critical Control Point
Eğitimi

- Temel Kalibrasyon Eğitimi

- TSE EN ISO:9001 – 2000 Kalite Yönetim Sistemi

Temel Eğitimi

2004

Ege Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma**Merkezi (EBİLTEM)**

- Protein Teknikleri ve Proteomik Kursu

- Biyoenerji 2004 Sempozyumu