

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İLAÇ-DNA ETKİLEŞİMİ VE DNA ANALİZLERİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL SENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Analitik Kimya Programı
Yüksek Lisans Tezi

Eczacı
Ayfer TURAN

Danışman
Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN

İzmir
2009

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı Soyadı

İmza

Danışman : Prof.Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN

Üye : Prof.Dr. M.E. Şengün ÖZSÖZ

Üye : Prof.Dr. Ayfer YALÇIN

Yüksek lisans Tezinin kabul edildiği tarih:.....

ÖNSÖZ

Çalışmalarımdaki değerli katkılarından dolayı başta, danışmanım Sayın *Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN* olmak üzere, Analitik Kimya Anabilim dalı başkanı Sayın *Prof. Dr. M. Şengün ÖZSÖZ* ve Anabilim Dalındaki diğer Öğretim Üyelerine teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında sağladıkları maddi ve manevi destek için, bursiyeri olduğum *TÜBİTAK-1001 Araştırma projesi bursu kapsamında TÜBİTAK kurumuna*, araştırma desteği için *Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA)* ve *Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığına* teşekkür ederim.

Lisans ve lisansüstü çalışmalarım sırasında bana destek olan tüm değerli arkadaşlarıma ve ayrıca bana her zaman, her konuda destek olan ve yardımlarını esirgemeyen başta eşim olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İzmir

Ecz. Ayfer TURAN

3 Ağustos 2009

İÇİNDEKİLER

I. BÖLÜM.....	1
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER	6
1. ELEKTROKİMYA	6
1.1. Elektrokimyasal tabakalar.....	6
1.2. Elektrokimyasal tabakaların elektriksel olarak incelenmesi	8
1.3. Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları	8
1.4. Voltametri ve esasları	9
1.4.1. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri	10
1.4.2. Voltametrik cihazlar	10
1.4.3. Voltametrizde kullanılan referans (karşılaştırma) elektrotları	12
1.4.4. Voltametrizde kullanılan çalışma elektrotları	13
1.4.4.1. Karbon elektrotlar.....	14
1.4.5. Voltamogramlar.....	16
1.4.6. Voltametrik akımlar.....	17
1.4.7. Elektrokimyasal bir olayda faradayik işlemler.....	18
1.4.8. Polarografi.....	18
1.4.9. Voltametrik teknikler	19
1.4.9.1. Dönüşümlü Voltametri	19
1.4.9.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi ve Polarografisi	20
1.4.10. Puls polarografisinin uygulamaları.....	21

2. BİYOSENSÖR.....	21
2.1. Biyosensör Çeşitleri.....	22
2.2. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler.....	22
2.3. Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapıları.....	24
2.3.1. Nükleik asitler ve DNA.....	24
2.3.1.1. DNA ile ilgili bazı terimlerin tanımlamaları.....	27
2.3.1.1.1. DNA baz dizilerinin yazılımı ile ilgili temel bilgiler.....	27
2.3.1.1.2. İnterkalasyon.....	28
2.3.1.1.3. Nükleik asit (DNA) hibridizasyonu.....	29
2.4. DNA biyosensörleri (Genosensörler).....	29
2.4.1. İlaç-DNA ekileşmesinin elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile algılanması.....	30
2.4.2. DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal biyosensörler ile algılanması.....	32
3. NANOTEKNOLOJİ.	34
3.1. Karbon nanotüpler	36
3.1.1. Karbon nanotüplere dayalı elektrokimyasal sensörler.....	37
4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	38
5. DNA çip teknolojisi.....	39
II. BÖLÜM.....	43
GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
2.1. Kullanılan cihazlar.....	43
2.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	43

2.2.1. Daunorubisin (DNR) hakkında genel bilgi.....	44
2.2.2. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	45
2.2.2.1. Oligonükleotit çözeltilerinin hazırlanışı.....	45
2.2.2.1.1. SWCNT-PGE sistemine dayalı deneylerde kullanılan oligonükleotit dizileri.....	45
2.2.2.2. Tampon çözeltilerin hazırlanışı.	46
2.3. Kullanılan yöntem.....	47
2.3.1. Kullanılan elektrotun hazırlanışı.....	47
2.4. Tek duvarlı karbon nanotüplere (SWCNT) dayalı elektrokimyasal sensörlerin tasarımı ve uygulamaları	48
2.4.1. SWCNT ile modifiye edilmiş tek kullanımlık grafit elektrotların hazırlanması	48
2.4.2. PGE ve SWCNT-PGE yüzeylerinin elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu.....	48
2.4.3. SWCNT yüzeyine DNA immobilizasyonu	49
2.4.3.1. CNT modifikasyonu öncesinde kullanılan grafit elektrotların yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisinin incelenmesi.....	49
2.4.3.2. CNT konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesi	50
2.4.3.3. DNA konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesi	50
2.4.4. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarla ilaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak voltametrik değişimi üzerinden algılanması.....	50
2.4.4.1. DNA immobilize edilmiş PGE / SWCNT-PGE'lerle DNR-DNA etkileşmesinin DNR ve guanin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesi.....	50

2.4.5. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarda HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal olarak voltametrik yöntemle algılanmasına yönelik çalışma.....	51
2.4.5.1. SWCNT-PGE yüzeyine amino ile işaretlenmiş kısa DNA dizisinin tutturulması ve DNA'nın elektrokimyasal tayini.....	52
2.4.5.2. SWCNT-PGE yüzeyine tutturulan amino ile işaretlenmiş DNA prob konsantrasyon değişiminin guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesi.....	52
2.4.5.3. Hibridizasyon zamanının guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesi	53
2.4.5.4. CNT-PGE yüzeyinde HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayinine yönelik çalışmalar.....	53
2.4.5.5. Hedef DNA konsantrasyonundaki değişimin hibridizasyon yanıtına olan etkisinin incelenmesi.....	53
III. BÖLÜM.....	54
BULGULAR	54
3.1. Tek duvarlı karbon nanotüplere (SWCNT) dayalı elektrokimyasal sensörlerin tasarımı ve uygulamalarına ilişkin bulgular	54
3.1.1. SWCNT ile modifiye edilmiş tek kullanımlık grafit elektrotların hazırlanması ve PGE / SWCNT-PGE yüzeylerinin elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonuna ilişkin bulgular.....	54
3.1.2. SWCNT yüzeyine DNA immobilizasyonuna ilişkin bulgular.....	57

3.1.2.1. CNT modifikasyonu öncesinde kullanılan grafit elektrotların yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular.....	57
3.1.2.2. CNT konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular.....	59
3.1.2.3. DNA konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular	60
3.2. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarla ilaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak voltametrik yöntemle algılanmasına ilişkin bulgular.....	61
3.2.1. DNA immobilize edilmiş PGE / SWCNT-PGE'lerle DNR-DNA etkileşmesinin DNR ve guanin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular.....	61
3.3. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarda HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal olarak voltametrik yöntemle algılanmasına ilişkin bulgular.....	63
3.3.1. SWCNT-PGE yüzeyine amino ile işaretlenmiş kısa DNA dizisinin tutturulması ve DNA'nın elektrokimyasal tayinine ilişkin bulgular.....	64
3.3.2. SWCNT-PGE yüzeyine tutturulan amino ile işaretlenmiş DNA prob konsantrasyon değişiminin guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular	65
3.3.3. Hibridizasyon zamanının guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular	67
3.3.4. CNT-PGE yüzeyinde HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayinine yönelik çalışmalarda elde edilen bulgular.....	67

3.3.5. Hedef DNA konsantrasyonundaki değişimin hibridizasyon yanıtına olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular	68
IV. BÖLÜM	70
TARTIŞMA.....	70
4.1. Tek duvarlı karbon nanotüplere (CNT) dayalı elektrokimyasal sensörlerin tasarımı ve uygulamalarına ilişkin bulgular ile ilgili tartışma	70
4.1.1. SWCNT ile modifiye edilmiş tek kullanımlık grafit elektrotların hazırlanması ve PGE / SWCNT-PGE yüzeylerinin elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonuna ilişkin bulgular ile ilgili tartışma	70
4.1.2. SWCNT yüzeyine DNA immobilizasyonuna ilişkin bulgular ile ilgili tartışma	70
4.1.2.1. CNT modifikasyonu öncesinde kullanılan grafit elektrotların yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma.....	70
4.1.2.2. CNT konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma	71
4.1.2.3. DNA konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma	72
4.2. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarla ilaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak voltametrik yöntemle algılanmasına ilişkin bulgular ile ilgili tartışma	72
4.2.1. DNA immobilize edilmiş PGE / SWCNT-PGE'lerle DNR-DNA etkileşmesinin DNR ve guanin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular ile ilgili tartışma.....	72

4.3. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarla HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal olarak voltametrik yöntemle algılanmasına ilişkin bulgular ile ilgili tartışma	74
4.3.1. SWCNT-PGE yüzeyine amino ile işaretlenmiş kısa DNA dizisinin tutturulması ve DNA'nın elektrokimyasal tayinine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma.....	74
4.3.2. SWCNT-PGE yüzeyine tutturulan amino ile işaretlenmiş DNA prob konsantrasyon değişiminin guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular ile ilgili tartışma	75
4.3.3. Hibridizasyon zamanının guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular ile ilgili tartışma	75
4.3.4. CNT-PGE yüzeyinde HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayinine yönelik çalışmalarda elde edilen bulgular ile ilgili tartışma.....	76
4.3.5. Hedef DNA konsantrasyonundaki değişimin hibridizasyon yanıtına olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma	77
V. BÖLÜM	78
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
VI. BÖLÜM	82
ÖZET.....	82
ABSTRACT.....	84
VII. BÖLÜM	86
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	86
Ecz. Ayfer (ÇALIŞKAN) TURAN'ın Özgeçmişi.....	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Elektrot yüzeyindeki tabakaların şematik olarak gösterilmesi.....	7
Şekil 2: Voltametri de kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri.....	10
Şekil 3: Üçlü elektrot sisteminin şematize edilmesi a) Karbon pastası elektrodu (CPE) b) Perde baskılı karbon (grafit) elektrot (SPCE) c) Kalem grafit elektrot (PGE).....	11
Şema 1: Biyosensör yapısının şematize edilmesi.....	22
Şekil 4: DNA çift sarmal yapısı.....	26
Şekil 5: Daunorubisin molekülünün çift sarmal DNA baz çiftleri arasına yerleşmesi (interkalasyon).....	28
Şekil 6: Nükleik asit hibridizasyonu.....	29
Şekil 7: Karbon nanotüpler (CNT); (A) tek duvarlı ve (B) çok duvarlı.....	37
Şekil 8: Taramalı elektron mikroskopunun (SEM) şematik görünüşü	39
Şekil 9: <i>Affimetrix</i> firmasına ait mikroçip görünümü	41
Şekil 10: Hızlandırma potansiyeli 30,0 KV ve 400 µm, 50 µm and 2 µm gibi farklı çözünürlük değerlerinde alınmış SEM görüntüleri; PGE (a,c,e) ve SWCNT modifiye edilmiş PGE (b,d,f).....	56
Şekil 11: Yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisi: (A) yüzeyi aktive edilmemiş PGE ve (B) Yüzeyi aktive edilmiş PGE ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar; 100 µg/ml dsDNA varlığında (a) PGE, (b) CNT-PGE ile ölçülen guanin sinyalleri, (c) elektrot yüzeyinde sadece CNT varken (DNA yokken, kontrol deneyi) ve (d) CNT ve DNA yokken (kontrol deneyi).....	57

- Şekil 12:** Yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisi: **(A)** yüzeyi aktive edilmemiş PGE ve **(B)** Yüzeyi aktive edilmiş PGE ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren histogramlar; 100 µg/ml dsDNA varlığında **(a)** PGE, **(b)** CNT-PGE ile ölçülen guanin sinyalleri.....58
- Şekil 13:** CNT konsantrasyonunun yanıtı olan etkisi: PGE yüzeyine farklı konsantrasyonlardaki CNT'nin modifikasyonu ve 100 µg/ml dsDNA'nın elektrot yüzeyine immobilizasyonu sonucunda ölçülen guanin sinyallerini gösteren histogramlar.....59
- Şekil 14:** DNA konsantrasyonunun yanıtı olan etkisi: **(A)** PGE ve **(B)** CNT-PGE yüzeyine farklı konsantrasyonlardaki DNA'nın immobilizasyonu sonrasında ölçülen guanin sinyallerini gösteren grafikler.....60
- Şekil 15:** 5 µM DNR'nin 50 µg/mL dsDNA ile elektrot yüzeyinde etkileşimi öncesi ve sonrasında ölçülen sinyalleri gösteren voltamogramlar: **(A)** PGE ve **(B)** SWCNT-PGE. Etkileşim öncesinde **(a)** ortamda sadece DNA varken ölçülen guanin sinyali, **(b)** sadece DNR varken ölçülen DNR sinyali, ve etkileşim sonrasında ölçülen **(c)** DNR ve guanin sinyalleri.....62
- Şekil 16:** 5 µM DNR'nin 50 µg/mL dsDNA ile elektrot yüzeyinde etkileşimi öncesi ve sonrasında ölçülen sinyalleri gösteren histogramlar: **(A)** PGE ve **(B)** SWCNT-PGE. Etkileşim öncesinde ölçülen **(a₁)** guanin sinyali, **(b₁)** DNR sinyali, ve etkileşim sonrasında ölçülen **(a₂)** guanin sinyali, **(b₂)** DNR sinyali.....63
- Şekil 17:** **(a)** Kovalent bağlanma çözeltisi varlığında ve DNA yokluğunda SWCNT-PGE ile elde edilen sinyal **(b)** sadece ABS (kontrol).....64

Şekil 18: (a) Yüzeyine 100 µg/mL amino işaretli DNA prob immobilize edilmiş PGE ile ölçülen guanin sinyali, (b) Yüzeyine 100 µg/mL amino işaretli DNA prob immobilize edilmiş SWCNT-PGE ile ölçülen guanin sinyali, ve (c) sadece ABS sinyali (kontrol).....65

Şekil 19: (a) 10 (b) 20, (c) 50, (d) 100 (e) 150 µg/mL gibi farklı konsantrasyonlarda amino işaretli DNA prob dizisi kullanılarak DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B)...66

Şekil 20: Hibridizasyon varlığında ölçülen guanin sinyallerini gösteren DPV tekniği kullanılarak elde edilen voltamogramlar, (a) sadece HBV prob varlığında ölçülen sinyal; (b) HBV prob ile hedef dizinin hibridizasyonu; (c) HBV prob ile rastgele dizinin (NC) hibridizasyonu, ve (d) HBV prob ile hedef ve MM içeren (1:1) karışım örneğinde hedef ile hibridizasyonu sonucunda ölçülen sinyaller..68

Şekil 21: Hedef DNA konsantrasyon değişiminin yanıtı olan etkisi: (A) HBV DNA Hibridizasyon varlığında CNT-PGE ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar, ve (B) kalibrasyon eğrisi.....69

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo-1: Son yıllarda elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanılarak bazı DNA hedefli maddelerin ve antikanser ilaçların DNA ile etkileşmelerinin elektrokimyasal tayini.....31

Tablo-2: : Son yıllarda dizi seçimli DNA hibridizasyonunun tayininde kullanılan bazı elektrokimyasal sensörler.....33

BÖLÜM I

GİRİŞ

Genetik materyal görevini üstlenen nükleik asitlerin yapı ve özellikleri, hücrede meydana gelen genetik olayların moleküler düzeydeki görevini belirlemektedir. 1860'lı yıllarda Gregor Mendel'in kendi yetiştirdiği bezelyeler üzerine yaptığı çalışmalarla genetik biliminin temeli atılmaya başlanmıştır. 1950'li yıllara gelindiğinde, Watson ve Crick isimli iki araştırmacının deoksiribonükleik asitin (DNA) yapısını keşfetmesi günümüzdeki gen teknolojilerine yön veren bir dönüm noktası olmuştur (30). DNA üzerindeki belirli genlerin izole edilip, bu genlerin kesilip biçildiği ve yeniden yapılandırıldığı genetik mühendisliği uygulamaları 1970'lerde başlamış, 1980'lerde ise gen tedavisi gündeme gelmiş ve günümüzün genom araştırmaları için daha ileri bir motivasyon oluşturmuştur. Polinükleotit bir zincir üzerindeki bazların dizilim sırasına DNA dizilimi denmektedir. Bu dizilim bir organizmanın oluşması için genetik emirlerin verilmesinden sorumludur ve o organizmanın kendine özgü tüm karakterlerini (dış görünüşü, metabolizması, karakteri ve davranışları, hastalıklarla savaşma gücü, yetenekleri, vb.) belirlemektedir.

Günümüzde DNA analizleri için kullanılan klasik metotlarla yapılan tayinlerde genellikle genlerin doğrudan baz dizisi analizi veya DNA hibridizasyonun tespiti yapılmaktadır. Fakat bu yöntemlerde kullanılan maddelerin toksik olması, maliyetinin yüksek olması, zaman alıcı olması, kullanımının zor olması gibi nedenlerle (125), kullanılan klasik yöntemlere alternatif olarak özellikle DNA'nın nitel ve nicel analizlerine yönelik geliştirilen elektrokimyasal DNA biyosensörlerine ait uygulamaların sayısı, son yıllarda oldukça artmıştır (36,43,44,46,47,69,70,108,132,133,136,138,145).

Elektrokimyasal sensörlerin yapılarına enzim, doku, hücre, nükleik asit, antikor gibi biyolojik maddelerin ilave edilmesiyle **Biyosensörler** hazırlanmıştır (127). *Biyo* ve *sensör* kelimelerinden oluşan biyosensör sistemi, seçici tanıma mekanizmasına sahip biyoajan, bu biyoajanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen çevirici ve elektronik kısım olmak üzere üç ana bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenlerden biri olan ve biyosensör tasarımında mutlaka olması gereken biyolojik ajan, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli olup tersinir bir şekilde onunla etkileşime girer ve bu etkileşim sonucunda çok duyarlı, çok seçici çoğu zamanda çok daha hızlı ölçümleri biyosensörlerle yapabilmek mümkündür. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri klinik, çevresel tanı veya adli olgulara ait DNA hibridizasyonu tanısında ölçülebilir bir analitiksel sinyalin elde edilmesine olanak sağlar.

DNA'nın nitel ve nicel analizini yapma amacına yönelik tasarlanan (9-11, 16-18,64,104,105,140) biyosensörlerde tanıma yüzey katmanı olarak DNA kullanılmasına artan bir ilgi bulunmaktadır (17-20,26,34,88,95, 107,115,125,148). Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanılarak ilaç, toksik madde, kimyasal ajanlar gibi maddelerle DNA 'nın etkileşmesi, DNA hibridizasyonunun çeşitli elektroaktif indikatör maddeler kullanılarak ve indikatörsüz hibridizasyon tayini sonrasında kalıtsal olarak taşınan hastalıkların tanısı hızlı, basit ve ucuz yoldan teşhis edilebilmektedir (9-11,16-20,26,50,64,88,95,104,105,107,125,140,148).

Çalışmanın konusu ve amaçları:

Multidisipliner bir bilim dalı olan nanoteknolojinin uygulamaları, özellikle son yıllarda bilim ve teknoloji alanında kaydedilen gelişmeler sayesinde hızla yaygınlaşmaktadır. Nanomalzemelere dayalı yeni sensörlerin tasarımı ve uygulamalarında, nanoteknoloji önemli avantajlar sağlamıştır (34,68,73,110,115,116,128,137,138).

Nanopartikül, nanotüp ve nanokablolar, nanoteknoloji ile üretilen gelişmiş fizikokimyasal özelliklere sahip nanomalzemelerdir. Bu nanomalzemeler biyomoleküler algılamaya yönelik elektrokimyasal sensörlerin daha seçici ve daha duyarlı bir şekilde geliştirilebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (2,14,21,34,44,47,53,55,57,70,76,84,89,91,94,97,103,120,124,155,156,162).

Nükleik asitlerin çeşitli yöntemlerle nanomalzemelerin yüzeyine tutturularak elektrokimyasal sensör teknolojisinin geliştirilmesi ve bu sensörlerin ilaç-DNA etkileşimi ve DNA hibridizasyonu analizlerine yönelik uygulamalarının sayısı, giderek artmaktadır (1,4,15,27,36,46,54,68,103,123,142-145,150-152,159,163).

Nanopartiküllere dayalı elektrokimyasal DNA analizlerine bakıldığında zaman, kadmiyum sülfür nanopartikülleri (144), altın nanopartikülleri (103) ve gümüş nanopartiküllerin (70) başarıyla kullanıldıkları görülmüştür.

Karbon nanotüplere dayalı sensörler ile DNA analizlerine yönelik çalışmalarda, yüksek duyarlılığın elde edildiği saptanmıştır. Çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) modifiye perde baskılı elektrot (SPE) ile tek sarmal DNA (ssDNA) ve maya tRNA'sının elektrokimyasal tayini, Ye ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (160). Meme kanseri mutasyonu-1 (BRCA 1) DNA geninin elektrokimyasal tayini, Wang ve arkadaşları tarafından (146), MWCNT

modifiye edilmiş camı karbon elektrot (GCE) kullanılarak, 100 fmol gibi düşük bir tayin sınırı ile gerçekleştirilmiştir.

Yüksek duyarlılığın yanında düşük maliyete de sahip olan MWCNT modifiye edilmiş tek kullanımlık kalem grafit elektrot (MWCNT-PGE) tasarımı, literatürde ilk defa Erdem ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (44). Elektrokimyasal DNA analizi ile birlikte dizi seçimli DNA hibridizasyonu herhangi bir indikatör kullanılmadan, guanin sinyalindeki değişim izlenerek yapılan bu çalışmada başarıyla tayin edilmiştir.

Çalışmamızın ilk bölümünde kalem grafit elektrotların (PGE) tek duvarlı ve karboksil gruplarınca zengin karbon nanotüpler (SWCNT) ile modifikasyonu ve geliştirilen bu elektrotların (SWCNT-PGE) DNA analizlerine yönelik optimizasyonu gerçekleştirildi. SWCNT varlığında ve yokluğunda hazırlanan tek kullanımlık kalem grafit elektrotların mikroskopik karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi. Daha sonra SWCNT-PGE yüzeylerine DNA immobilizasyonu sonucunda elektrokimyasal davranışları, diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak guanin yükseltgenme sinyallerindeki değişim ölçülerek incelendi. CNT konsantrasyonu, DNA konsantrasyonu ve yüzey aktivasyon işleminin yanıtı etkisi araştırıldı. Ayrıca, antikanser bir ilaç olan Daunorubisin (DNR)'nin DNA ile interkalasyon sonucu etkileşimi (23,49,52,118) öncesinde ve sonrasında, aynı voltametrik skalada hem DNR hem de guaninin yükseltgenme sinyalleri PGE ve CNT-PGE kullanılarak ölçüldü ve tayin sınırı, tekrarlanabilirlik gibi deneysel parametreler incelendi.

Çalışmamızın ikinci bölümünde, geliştirilen karbon nanotüp modifiye grafit elektrotlar (SWCNT-PGE) kullanılarak DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayini herhangi bir elektroaktif indikatör kullanılmaksızın gerçekleştirildi. Elektrot

yüzeyine optimum konsantrasyondaki DNA'nın immobilizasyonu incelemek için, amino ile işaretlenmiş DNA prob konsantrasyon farklılığının yanıt üzerindeki etkisi araştırıldı. Çalışmamızda karbon nanotüplere dayalı geliştirilmiş elektrokimyasal sensör teknolojisinin dizi seçimli DNA hibridizasyonuna yönelik bir uygulamasını göstermek amacıyla, Hepatit B virüsünü (HBV) temsil eden spesifik kısa DNA dizileri (oligonükleotitler) kullanıldı. SWCNT-PGE yüzeyinde gerçekleştirilen HBV DNA hibridizasyonunun tayini, HBV prob ile hedef dizi arasındaki hibridizasyon sonucunda guanin yükseltgenme sinyalinin, DPV tekniği ile ölçülmesiyle gerçekleştirildi. Ayrıca, tayin sınırı, seçimlilik ve tekrarlanabilirlik gibi deneysel parametreler incelendi.

Tez çalışmamızda ilaç-DNA etkileşimi ve DNA analizleri için karbon nanotüplere dayalı elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesi, tek kullanımlık grafit elektrotlarla, çift sarmal DNA (dsDNA) ve kısa DNA dizileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda karbon nanotüplere dayalı tek kullanımlık sensörlerin daha düşük maliyetle birlikte kolay uygulanabilirliğinin yanı sıra, diğer komplike ve zaman alıcı sensör yüzey modifikasyon işlemlerini elimine edip, daha duyarlı sonuçların güvenilir ve seçimli bir şekilde geliştirilen sensör teknolojisi ile elektrokimyasal algılanması amaçlanmaktadır.

Nanoteknolojiye dayalı geliştirilen sensör teknolojisinin ilaç ve DNA analizlerine yönelik kullanımının yanısıra, gelecekte bazı toksik ajanlarla birlikte, protein gibi biyomoleküllerin analizlerinde uygulanabilecek ve DNA hedefli elektroaktif moleküllerin hibridizasyon tayininde indikatör olarak kullanılabilirliğini belirleyecek model bir sensör teknolojisi olması hedeflenmektedir.

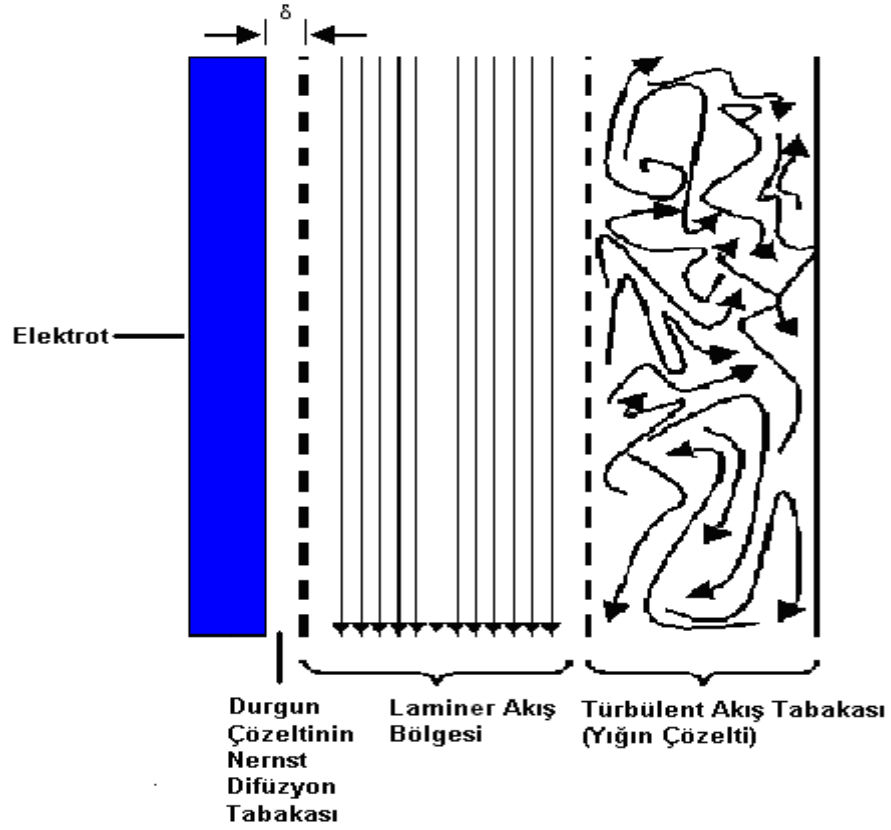
GENEL BİLGİLER

1. ELEKTROKİMYA

Maddenin elektrik enerjisiyle etkileşmesi sonucu ortaya çıkan kimyasal dönüşümlerle fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalına elektrokimya denir (33). Elektrokimyasal tepkimeler, redoks yani yükseltgenme-indirgenme türü tepkimeleridir. Elektrokimyasal olaylar, elektrokimyasal hücre denilen bir düzende gerçekleştirilir. Elektrokimyasal hücre, incelenen maddeyi içeren bir çözelti ya da erimiş tuz, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrotlar ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir dış devreden oluşur.

1.1. Elektrokimyasal Tabakalar

Elektrokimyasal ölçümler sırasında, elektrot döndürüldüğünde ya da elektrot üzerinden bir çözelti aktarıldığında elektrot yüzeyi ile analit sıvısı arasında elektrodun kendisine bitişik olan çözelti tabakasındaki bir türe elektron vermesinden yada o tabakadan elektron almasından dolayı heterojen tabakalar meydana gelmektedir. Karıştırmanın etkisini anlamak için küçük düzlemsel bir elektrot içeren, karıştırılan bir çözeltide sıvı akışının nasıl geliştiğini iyi kavramak gerekir. Şekil 1’de karıştırılan bir sistemdeki heterojen tabakaların bileşimi görülmektedir.



Şekil 1: Elektrot yüzeyindeki tabakaların şematik olarak gösterilmesi.

1. Türbülent akış: Elektrottan uzak çözelti yığnında gözlenir ve sıvı hareketinin düzenli bir akış modeli yoktur.

2. Laminer akış: Laminer akışta sıvı tabakaları elektrot yüzeyine paralel bir yönde birbiri üzerine kayarlar.

3. Nernst difüzyon tabakası: Eğer akma ya da dönme hızı belli bir değerde değişmez tutulursa, karışmayan ve difüzyonla taşımının gerçekleştiği bu katmanın kalınlığı (δ), Nernst'e göre sabit kalır ve **Nernst difüzyon katmanı kalınlığı** adını alır. Elektrot yüzeyinden δ cm uzakta, laminer akımının hızı sıvı ile elektrot arasındaki sürtünmeden dolayı sıfıra yaklaşır ve bunun sonucunda da elektrot çevresindeki ince, durgun bir çözelti tabakası oluşur. Genellikle bu çözelti tabakası, $10^{-2} - 10^{-3}$ cm kalınlığında olabilir.

1.2. Elektrokimyasal Tabakaların Elektriksel Olarak İncelenmesi

Elektroliz olayında devreden yalnızca faradayik akım geçmez. Bu akımla birlikte devreden sığasal (kapasitif) akımda geçer. Bunun nedeni, elektrot çözeltiye daldırıldığında, doymamış yüzey kuvvetleri nedeniyle, elektrot yüzeyinin çözeltideki iyonları ve polar çözgen molekülleri adsorplamasıdır. Zıt yüklü iyonlarda bunların karşısına dizilerek bir tabaka oluşturur. Elektrot yüzeyindeki ve yüzeye bitişik çözeltideki bu yük topluluğuna elektriksel çift tabaka denir.

1.3. Elektrokimyasal Bir Olayda Kütle Aktarım Yolları

Bir elektrolitteki herhangi bir taneciğin bir yerden başka bir yere taşınabilmesi için, o taneciğe bir kuvvetin etki etmesi gerekir. Bu kuvvet kimyasal, elektriksel ya da mekanik bir kuvvet olabilir (32). Bir elektrokimyasal hücrenin çalışması sırasında maddenin elektrot yüzeyine aktarım yolları, üç şekilde gerçekleşmektedir (33). Bu kütle aktarım yolları:

1- Elektriksel göç (MİGRASYON): Elektriksel alan altında iyonlar, bu alandan kaynaklanan kuvvet etkisiyle hareket ederler. Bu hareket, dışarıdan elektriksel alan uygulandığında olduğu gibi, çözeltide herhangi bir nedenle yük dengeliği bozulduğunda da oluşabilir. Elektrotlara dışarıdan bir gerilim uygulandığında, bu kuvvet anyonları anoda, katyonları da katoda doğru sürükler. Bu tür taşınmaya Elektriksel göç (migrasyon) denir (32).

2- Karıştırma (KONVEKSİYON): Karıştırma ve elektrodun dönmesi gibi mekanik kuvvetlerin neden olduğu kütle aktarım yoludur (32).

3- Difüzyon: Derişim farkından kaynaklanan kimyasal kuvvetin oluşturduğu kütle aktarım yoludur (32). Deneysel koşullara bağlı olarak bunlardan bir tanesi veya birkaçı kütle aktarımına katkıda bulunabilir.

1.4. Voltametri ve esasları (3,31,33)

Voltametri, bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik yöntemlere verilen isimdir. Uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine **voltamogram** denir. Genel olarak, voltametride kullanılan çalışma elektrotları, polarizasyonu arttırmak için, yüzey alanları çoğunlukla bir kaç milimetre kare veya daha küçük olan mikroelektrotlardır.

Voltametri yönteminde hücreye alanı çok küçük olan bir mikro çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasına uygulanan ve değeri zamanla değiştirilen gerilime karşı, hücrede çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasındaki akım ölçülür. Herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektroda uygulanabilecek gerilim aralığının sınırları, kullanılan çalışma elektrodunun ve kullanılan çözücü ve elektrolit türlerine bağlıdır.

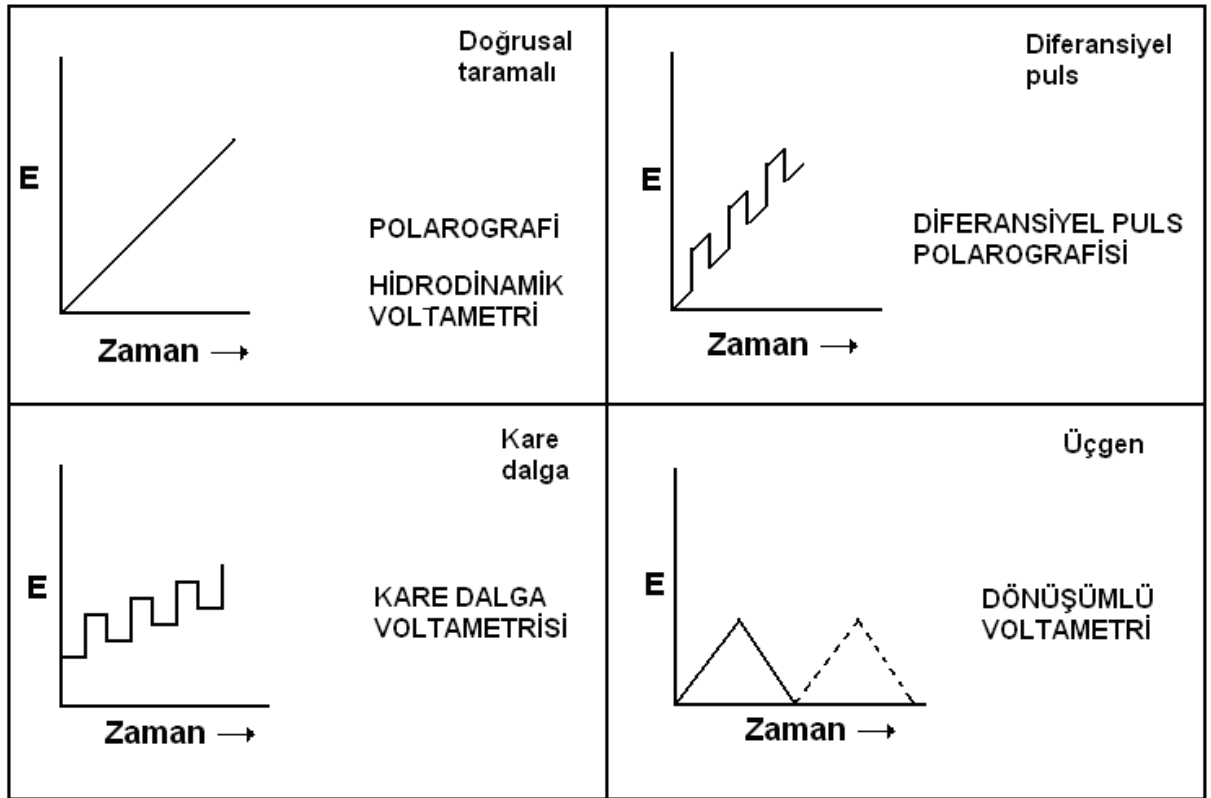
Voltametri, 1920'lerin başında Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından geliştirilen ve voltametrinin özel bir tipi olan polarografi tekniğine dayanarak geliştirilmiştir. Voltametrinin önemli bir kolu olan polarografi yönteminde çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodun (DCE) kullanılmaktadır. Polarografi bu yönüyle diğer voltametrik tekniklerden farklılık göstermektedir.

Voltametri analitik olmayan amaçlar için de oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak inorganik, fiziko ve biyokimyasal tarafından çeşitli ortamlarda oluşan yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması ve kimyasal

olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması verilebilir.

1.4.1. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri: (3,31)

Bir mikroelettrot içeren elektrokimyasal hücreye değıştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin dayandığı karakteristik bir akım cevabı oluşturur. Voltametrizde en çok kullanılan dört uyarma sinyalinin şekli, şekil 2’de verilmiştir. Bunlar; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır.



Şekil 2: Voltametrizde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

1.4.2. Voltametrik Cihazlar

Voltametrik analizde kullanılacak cihazlar, elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır.

1.4.3. Voltametrde Kullanılan Referans (Karşılaştırma) Elektrotları

(3,31,33,48,112,125)

Referans elektrotların potansiyeli elektrokimyasal çalışmalar sırasında dış ortamdan etkilenmez. İdeal bir referans elektrot; tersinirdir ve Nernst eşitliğine uyar, zamanla değişmeyen bir potansiyeli vardır, ufak bir akıma maruz kaldıktan sonra orijinal potansiyeline döner ve sıcaklık değişimi ile ufak bir histerisis gösterir.

Elektrokimyada ilk olarak Standart Hidrojen Elektrot (SHE) referans elektrot olarak kullanılmıştır. Ayrıca Hidrojen gaz elektrotlar, eskiden beri elektrokimyasal çalışmalarda sadece referans elektrotlar olarak değil, aynı zamanda pH tayinlerinde indikatör elektrotlar olarak da yaygın biçimde kullanılmıştır.

Referans elektrotların çeşitleri :

➤ Kalomel Referans Elektrot: Kalomel (Hg_2Cl_2) ile temasta olan civadan oluşan karışım ayrıca bilinen derişimde potasyum klorür (KCl) içerir.

Bu elektrodun hazırlanışı kolaydır ve potansiyeli, klorür iyonlarının aktifliğine bağlıdır.

İçersinde doygun KCl çözeltisi bulunan Doygun Kalomel Elektrot (DKE)'un Standart Hidrojen elektroduna (SHE) göre 25°C de potansiyeli +0,244 V'dur. Diğer kalomel elektrotlarla kıyaslandığında, sıcaklık katsayısı daha büyüktür, ayrıca sıcaklık değiştiğinde potansiyelinin yeni bir değere ulaşması çok yavaştır. Bunun nedeni ise potasyum klorür ile kalomelin çözünürlük dengesinin yeniden kurulmasının zaman almasıdır.

➤ Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrot: En yaygın kullanılan referans elektrotlardan biri olan gümüş-gümüş klorür referans elektrot, gümüş klorür ile

doyurulmuş potasyum klorür çözeltisine gümüş elektrodun daldırılmasıyla elde edilir.

Doygun KCl çözeltisi kullanıldığı zaman standart hidrojen elektroduna göre potansiyeli, +0,222 V dur.

➤ Civa-Civa(1)Sülfat Referans Elektrot: Doygun kalomel elektroda benzemeyen bu elektrodun potansiyeli, sülfat iyonlarının aktifliği ile tayin edilir.

Bir referans elektrot;

- Kolay hazırlanabilme,
- Potansiyelin sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olma,
- Belli bir akım aralığında tersinir davranma, yani içinden küçük akımlar geçtiğinde bile gerilimi sabit kalma,
- Polarize edilemeyen bir elektrot olma,
- Potansiyeli zamanla değişmeme,
- Doğru ve tekrarlanabilen bir potansiyel değeri hızlı bir şekilde okuma özelliklerine sahip olmalıdır.

1.4.4. Voltametrinde Kullanılan Çalışma Elektrotları

Çalışma elektrodu platin ya da altın gibi inert bir metal; karbon, pirolitik grafit ya da camsı karbon; kalay oksit ya da indiyum oksit gibi yarı-iletken veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metalden yapılmış olabilir.

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

Kullanılan çalışma ortamına göre çalışma elektrotları için seçilen potansiyel aralıkları ; karbon elektrodu için, 1 M HClO₄ ortamında, (+0.2 V) ile (+1.8 V) aralığı ile, 0,1 M KCl ortamında (-1.0 V) ile (+1.2 V) aralığıdır. Civa elektrodu için ise 1 M H₂SO₄ çalışma ortamında, (-0.8 V) ile (+0.4 V) aralığı ve 1 M KCl çalışma ortamında, (-1.6 V) ile (+0.2 V) aralığıdır.

1.4.4.1. Karbon Elektrotlar

Geniş bir potansiyel aralığında çalışma yapılmasına imkan sağlaması ve maliyetlerinin çok az olmasından dolayı elektrokimyasal analizlerde sıkça kullanılmaktadırlar. Fakat, karbonun yüksek bir yüzey aktivitesine sahip olmasından dolayı organik bileşikler tarafından kolayca kirletilebilmektedir. Hidrojen, hidroksil ve karboksil grupları ve hatta kinonlar ile karbon yüzeyinde bağlar oluşabilmektedir. Bu fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle karbon yüzeyine birçok değişik madde tutturulabilir.

Karbon elektrotların çeşitleri:

➤ Karbon Pastası Elektrodu (CPE):

Grafit tozunda bulunan karbon molekülleri düzlemsel ve aromatik halkalar halinde dizilmişlerdir. Bu tabakalar zayıf π bağları ile birbirine bağlanmıştır ve aralarında hızlı bir elektron alışverişi olabilmektedir.

CPE, yüzey yenilenmesinin kolay olması, ucuz olması, düşük artık akımlar oluşturması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bağlayıcı madde olarak, Nujol (mineral yağ), parafin yağı, silikon yağı ve bromonaftalen kullanılmaktadır. Elektrot aktivitesine pasta bileşiminin büyük etkisi vardır. Bağlayıcı organik sıvı oranı arttıkça, elektron transfer hızı azalmaktadır. Yeterli miktarda organik çözügen içeren çözeltilerde kullanıldığı zaman, karbon pastasının çözeltide dağılması CPE'nin en önemli dezavantajıdır.

➤ **Camsı Karbon Elektrot (GCE) :**

Camsı karbon, fenol / formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin 1000⁰C - 3000⁰C arasında basınç altında karbonizasyona uğratılması ile elde edilir.

GCE, ticari olarak elektrot üretimine uygun olmamasına rağmen, çok iyi mekanik ve elektriksel özelliklere sahip olması ve geniş bir potansiyel aralığı olması, kimyasal tepkimelere girmemesi ve genellikle tekrarlanabilir yüzeyler sağlaması nedeniyle sıkça kullanılmaktadır. Kolayca kırılabilen ve sert bir madde olması dolayısıyla, karbon pastası elektrotlarına göre elektrokimyasal yanıt özellikleri yüzeyin çok daha pürüzsüz ve düzgün olması nedeniyle daha iyidir. Bunun yanısıra GCE yüzeyinin fiziksel dayanıklılığı daha yüksektir.

➤ **Perde baskılı karbon(grafit) elektrotlar(SCPE):**

Son yıllarda tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar çok yaygın şekilde kullanım alanı bulmuştur. Özellikle biyosensör teknolojisinin geleceği olan DNA mikroçip teknolojisine uygulanabilirliği açısından oldukça başarılı sonuçlar veren bu elektrotlar geleceğin elektrotları olarak gösterilmektedir (83,86).

Elektrokimya alanında çok önemli olan karbon elektrotlarının tüm çeşitlerinde yüzeylerinin düzgün bir şekilde hazırlanması gereklidir.

➤ **Kalem Grafit Elektrot (PGE):**

Kalem grafit elektrotların tekrarlanabilirliğinin daha iyi olması, daha düşük tayin sınırı, ucuz ve tek kullanımlık olması sebebiyle kullanımları gün geçtikçe artmaktadır (72,145).

1.4.5. Voltamogramlar

Uygulanan gerilime karşı ölçülen akım arasında çizilen eğrilere *voltamogram* denir. Doğrusal taramalı voltamogramlar *sigmoidal* (S şekilli) görünümündedir. Bunlar voltametrik dalga olarak bilinir. Dik artıştan sonra akım sabit kalır bu sabit akıma *sınır akımı*, i_s , denir. Çünkü akım, analizlenecek maddenin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızıyla sınırlıdır. Sınır akımları analizi yapılacak madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Aralarındaki bağlantı $i_s = k C_A$ şeklinde yazılabilir. Bu denklemde;

C_A analit konsantrasyonu ve k ise bir sabittir. Kantitatif doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye dayanır.

Sınır akımının yarısına eşit olan akıma karşılık gelen potansiyele *yarı-dalga potansiyeli* denir ve $E_{1/2}$ ile gösterilir ve derişimden bağımsızdır.

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

1-Kapasitif akım (i_c) : Bir elektrodun bir elektrolit çözeltisine daldırılması ve negatif yükle yüklenmesiyle 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 veya 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. Kapasitif akım fon akımının oluşmasına neden olan etkenlerden biridir.

2-Faradayik akım (i_f): Çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonları olurken diğerinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir, bu sırada elektrotların doğrudan aktarımı ile akım iletilir. Bu şekilde oluşan akımlara faradayik akım denir.

$i = i_f + i_c$ olduğundan i_c azalırsa duyarlılık artar.

Genellikle 10^{-3} M ve üstünde; $i_c < i_f$ dir ve çalışılabilir. 10^{-4} M da kısmen iyi sonuç alınır. 10^{-5} M ve üstünde ; $i_c \gg i_f$ olduğu için çalışılamaz.

1.4.6. Voltametrik Akımlar

Voltametrde uygulanan gerilimin belli bir değerinde devreden geçen 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, akım

$$i = nFAD_A \left(\frac{\partial C_A}{\partial X} \right) \quad \text{şeklinde ifade edilir.}$$

i = Amper cinsinden akımı,

n = Analitin molü başına elektronların mol sayısını,

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

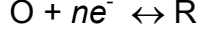
A = cm^2 cinsinden elektrot yüzey alanını,

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

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

1.4.7. Elektrokimyasal Bir Olayda Faradayik İşlemler

Elektrot çözelti ara yüzeyinden akım iki tip işlemle iletilir. Birincisinde, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonları olurken diğerinde indirgenme reaksiyonu olur. Bu tip işlemlere faradayik işlemler adı verilir. Bu reaksiyonlarda;



O ve R'nin, sırasıyla, redoks çiftinin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade ettiği tepkime ile gösterilmektedir. Çözeltideki elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişimi [C_O ve C_R] ile ölçülen gerilim arasındaki ilişki;

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

şeklinde ifade edilen Nernst denkleminde göre belirlenir.

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 (96487 coulombs)

1.4.8. Polarografi (3,31-33)

Polarize elektrot olarak damlayan cıvanın kullanıldığı voltametrik bir yöntem olan polarografi ilk bulunan ve uygulanan voltametri tipidir. Bu yöntemle oluşturulan akım potansiyel eğrilerine polarogram denir. Destek elektrolite ait polarogramın incelenmesi ile, ortamda analizlenecek madde yokken bile hücrede *artık akım* adı verilen küçük bir akımın oluştuğunu gösterir.

Akımın büyüklüğü analizlenecek maddenin elektrot yüzeyine taşınma hızı ile sınırlı olduğu zaman sınır akımları gözlenir. Ancak polarografideki kütle aktarım yolu yalnızca difüzyondur. Bu nedenle polarografik sınır akımlarına,

genellikle *difüzyon akımları* denir ve i_d ile gösterilir. Bu, difüzyon akımı ile artık akımlar arasındaki farktır. Difüzyon akımı analizlenecek madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Artık akımların oluşma sebeplerinden biri olarak safsızlıkların indirgenmesi ve bu safsızlıkların içinde az miktarda çözünmüş oksijen, destek elektrolit olarak kullanılan tuzdaki safsızlıklar ve kullanılan sudan gelen ağır metal iyonları sayılabilir.

Polarografik yöntemlerde doğruluk ve duyarlık, faradayik olmayan artık akımın büyüklüğüne bağlıdır ve doğruluk artık akımın etkisini gidermek için yapılan bir düzeltme ile tayin edilebilir.

1.4.9. Voltametrik Teknikler

1.4.9.1. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri hızlı taramalı voltametriye benzer, fakat burada potansiyel tarama işlemi döngüseldir. Potansiyel E_1 değerinden E_2 değerine belli bir hızla tarandıktan sonra, taramanın yönü tersine çevrilerek çoğunlukla aynı hızla E_1 değerine ulaşılır. Dönüşümlü voltametri ile durgun sistemde ve üçlü elektrot sistemiyle çalışılır. Burada hızı difüzyon tayin eder. Analitin yükseltgenmesi ve indirgenmesi voltamogramda gözlenebilmektedir. Başlangıç taramanın yönü, numune bileşimine bağlı olarak negatif yada pozitif yönde olabilir. Genel olarak çevrim süresi 1 ms veya daha kısa süreden 100 s veya daha uzun süre aralığındadır. Dönüşümlü voltamogramların ayrıntılı incelenmesiyle, bir sistemin hangi gerilimlerde ve kaç adımda indirgenip yükseltgendiğini, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığını, elektrot tepkimesinin bir çözelti tepkimesi ile el ele gidip gitmediğini, indirgenme ya da

yükseltgenme ürünlerinin kararlı olup olmadığını, elektrot tepkimesinde rol alan maddelerin yüzeye tutunup tutunmadıklarını kolayca anlamak mümkündür.

1.4.9.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi ve Polarografisi

Normal puls voltametrisinde pulsun sonunda saptanan akım az da olsa sığasal bileşen içerir. Bu bileşenin ölçülen akımdaki payını daha da azaltmak ve seçimliliği arttırmak için pulsun başında ve sonundaki akımları ölçüp, farklarını alma yoluna gidilmiştir. Bu teknikle çalışan yönteme **diferansiyel puls voltametrisi** denir (32).

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

Tersinir bir reaksiyonda pik potansiyeli yarı reaksiyonun standart potansiyeline yaklaşık eşittir.

Doğru akım ve normal puls polarografilerinde yan yana analizler için, genelde yarı dalga potansiyelleri arasındaki farkın 120-240 mV olması gerekirken, diferansiyel puls polarografisinde bu farkın, alternatif akım polarografisinde olduğu gibi, 30-60 mV olması yeterlidir. Bu teknik normal puls tekniğinden daha duyarlı olup, duyarlılığı 10^{-7} - 10^{-8} M düzeyindedir ve seçimliliği de yüksektir. Diferansiyel puls polarografisinin yüksek duyarlılığı iki şekilde açıklanabilir. Birincisi, faradayik akımın artması, ikincisi de faradayik olmayan yükleme akımının azalmasıdır.

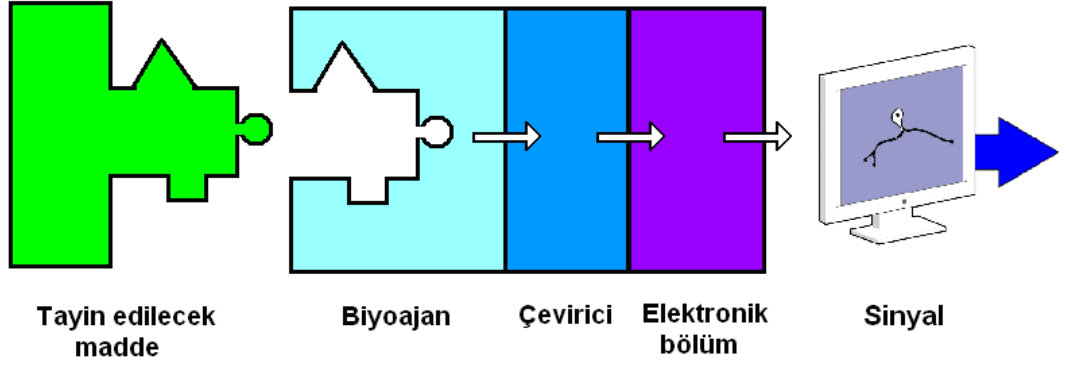
1.4.10. Puls Polarografisinin Uygulamaları:

Puls yöntemleri günümüzde kullanım kolaylığı, yüksek duyarlılığı ve seçiciliğinden dolayı, çoğu klasik yöntemin yerini almıştır. Puls yöntemleri kantitatif uygulamalarda, genellikle pik yüksekliklerinin analizlenecek madde konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildiği kalibrasyon eğrileri çizilmesi çalışmalarında kullanılır.

Biyosensörler elektrokimyanın uygulama alanlarından biri olarak günümüzde yerini almıştır.

2. BİYOSENSÖR

Biyosensörler bir biyolojik örnek içindeki kimyasal bir ajanın miktarı ve/veya aktivitesine seçici ve tersinir olarak cevap veren analitik cihazlardır. Bir biyosensör sistemi, seçici tanıma mekanizmasına sahip biyoajan, bu biyoajanın incelenen maddeyle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen çevirici ve elektronik kısım olmak üzere üç ana bileşenden oluşmaktadır (25,127). (**Şema 1**).



Şema 1: Biyosensör yapısının şematize edilmesi

2.1. Biyosensör Çeşitleri

BİYOSENSÖRLER



2.2. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler (56)

İdeal bir biyosensör aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır.

Seçicilik: Seçicilik, ideal bir biyosensörde bulunması gereken en önemli özelliklerden biridir. Biyosensör yeterli ölçüde seçici değilse bu eksikliği ortadan kaldırmak için başka uzun işlemlerin ilave edilmesi gerekmektedir.

Tekrarlanabilirlik: Aynı deneysel koşullarda, ard arda yapılan ölçümlerde, elektrodun birbirine çok yakın değerleri okuması istenir. Bu durum teorik olarak

mümkün gibi gözükse de, pratikte pek mümkün olmamaktadır. Bu nedenle yapılan deneysel çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün uygulamalarının o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

Kararlılık: İdeal bir biyosensörde elektrot kararlılığının yüksek olması istenir. Kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, ısı, nem, pH, ortamdaki oksijen konsantrasyonu gibi parametreler elektrot kararlılığını etkilemektedir.

Kullanım ömrü: Biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalma biyosensörün kullanım ömrünü azaltmaktadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametreleri de etkilemektedir.

Kalibrasyon gereksinmesi: Teorikte ideal bir biyosensörün kalibrasyona hiç gerek duymaması ya da en az kalibrasyona ihtiyaç duyması beklenir. Ama bu pratikte sağlanamamıştır. Biyosensörler kullanıldıkları sürece sık aralıklarla kalibrasyonları yapılmalıdır.

Yüksek duyarlılık: Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması, ideal biyosensörlerin özelliklerindendir.

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

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

Hızlı cevap zamanı: Akım-zaman grafiğine bakarak biyosensör elektrodunun cevap zamanı anlaşılmaktadır. Eğer, elde edilen eğride basamakların şekli

basık ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır.

Hızlı geriye dönme zamanı: Örneğin amperometrik çalışmalarda, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. İlk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa, ikinci örnekte aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

Basitlik ve ucuzluk: İdeal biyosensörlerin kullanımı rahat, tasarımları basit ve ucuzdur.

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

2.3. Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapıları:

2.3.1. Nükleik Asitler ve DNA : (13,28-30,114)

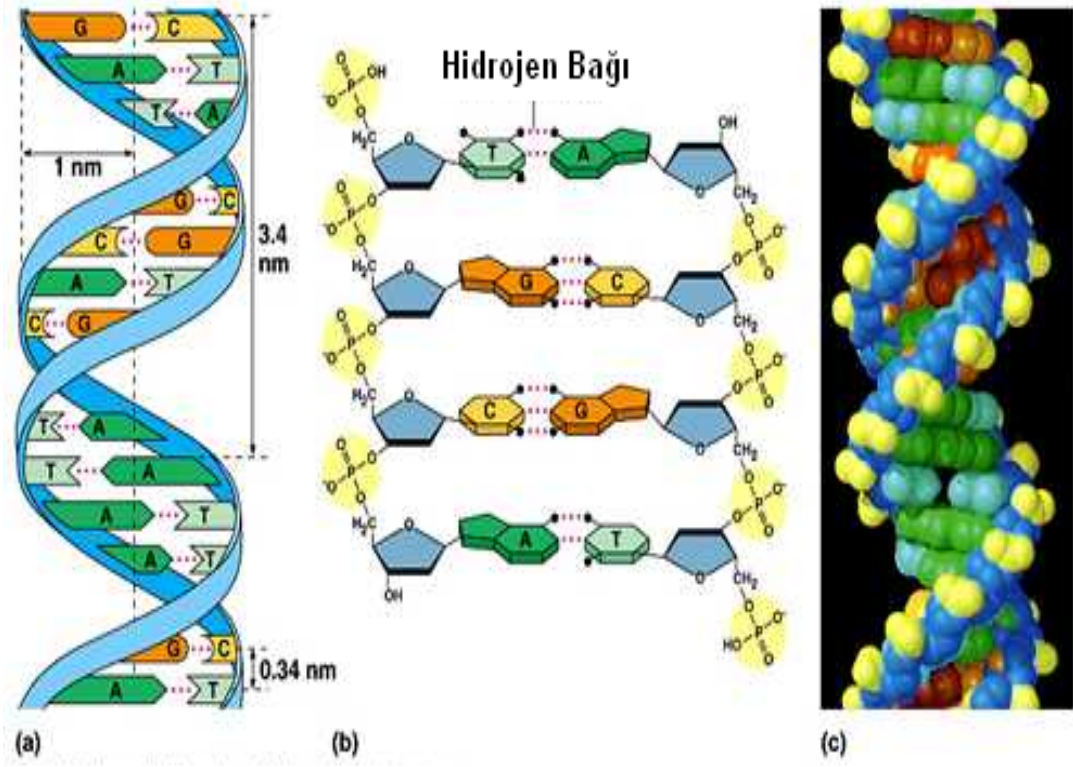
Organizmanın genetik bilgisini içeren ve kalıtımda rol oynayan organik bir molekül olan DNA'nın yapısını Watson ve Crick adlı araştırmacılar 1953 yılında hazırladıkları modeller üzerine açıklamaya çalışmışlardır. Buna göre DNA molekülü, sarmal şeklinde kıvrılmış, iki kollu bir ip merdivenine benzemektedir. Merdivenin kenarları, şeker (deoksiriboz) ve fosfat moleküllerinden meydana gelmiştir. Şeker ve fosfat grupları birbirlerine ester bağlarıyla bağlanmıştır. DNA'nın bütün nükleotitlerinde şeker ve fosfor grupları aynıdır. Nükleotitlerin farklılığı taşıdıkları bazlardan kaynaklanır. Nükleotitler taşıdıkları azotlu bazlara göre adlandırılırlar. Bu bazlar iki gruptur. Pürin bazları (adenin ve guanin); pirimidin bazları (sitozin ve timin)'dir ve bu bazlar birbirlerine hidrojen bağlarıyla bağlıdır. Adenin timin ile, sitozin ise guanin ile bağ yapar. Adenin ile timin

arasında çift hidrojen bağı, sitozin ile guanin arasında ise üç hidrojen bağı bulunmaktadır. Pürin ve pirimidin bazları, yandaki şekerlere (Riboz), glikozidik bağlarla bağlanmıştır. Çift sarmal şeklindeki molekülün bir zinciri 5' → 3' yönüne doğru, diğeri ise 3' → 5' yönüne doğru olduğu için ters yönde paraleldir. Heliks içinde, iki zincirin arasındaki üç boyutlu sistemdeki ilişki, büyük oluk (majör) ve küçük oluk (minör) oluşturmak şeklindedir. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmalın iç kısmında, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısımda yer aldığı için sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir.

Baz, şeker ve fosfat kombinasyonu, çekirdek asitlerinin temel birimleri olan nükleotidler meydana getirmiştir. DNA'nın kendini kopyalaması ve gen aktarımı, nükleotidler arasındaki hidrojen bağlarının ayrılması ile gerçekleşmektedir. Nükleotidler birbirlerine fosfat bağlarıyla bağlanarak polinükleotid adı verilen yapıları oluştururlar. Molekül içerisindeki nükleotid bağlarını parçalayan nükleaz enzimlerine *endonükleaz*, iki uçtan parçalayanlara ise *ekzonükleaz* adı verilmektedir.

DNA'nın iki görevi vardır. Bunlardan birincisi hücre bölünmesinin hazırlıkları sırasında kendini kopyalamasıdır. Kromozomların ikiye bölünmesi sırasında DNA molekülü kendisinin bir kopyasını yapar, buna *duplikasyon* denir. DNA'nın kendini eşlemesi esnasında, iki sarmal ipliği bir arada tutan hidrojen bağları bir fermuar gibi açılır ve açıkta kalan pürin ve pirimidin nükleotitlerin uçları, hücrede önceden sentezlenmiş nükleotitlerle tamamlanır. Böylece birbirinin aynı olan iki DNA meydana gelmiş olur. İkinci görevi ise, kendinde toplanmış olan bilgiyi RNA'ya (Ribonükleik asit) aktarmasıdır. Bu işleme *transkripsiyon* denir. Bu işlem sonucunda RNA'da toplanan bilgi ribozomlarda protein, enzim gibi maddelerin sentezinde kullanılır.

DNA ısıtıldığında, sarmal yapısı bozularak ikiye ayrılır bu olaya *denatürasyon* denir. Uygun şartlar sağlandığı takdirde çift zincirli DNA tekrar oluşabilir, bu işleme de *renatürasyon* denir.



Şekil 4: DNA çift sarmal yapısı

2.3.1.1. DNA İle İlgili Bazı Terimlerin Tanımlamaları

2.3.1.1.1. DNA Baz Dizilerinin Yazılımı İle İlgili Temel Bilgiler: (28)

Oligonükleotit: Birden fazla nükleotidin yan yana gelmesiyle oluşur.

Dinükleotitler; İki nükleotidin yan yana gelmesiyle oluşur

Trinükleotitler; üç nükleotidin yan yana gelmesiyle oluşur.

Tekrarlayan oligonükleotidler: Polimer içindeki tekrarlayan oligonükleotidler, tekrarlayan tek bir bazı, tekrarlayan iki bazı ve ya üç bazı ifade eder. Tekrarlayan mononükleotide poly (A), dinükleotide poly (AT), trinükleotide poly (GAT) örnek verilebilir.

Çift sarmal tekrarlayan polimerler: Nokta ile ayrılarak ifade edilen baz çiftlerinden oluşan ve 5' → 3' polaritesine sahip polimerlerdir.

Örneğin, mononükleotit gösterilişine, **poly(A).poly(T)** (veya **poly(Da).poly(Dt)** şeklinde gösterilebilir), dinükleotid'e **poly(AT).poly(AT)**, trinükleotid'e **poly (GAT). Poly (ATC)** örnek verilebilir.

Baz çifti: Birbirinin karşılığı olan iki bazı ifade eder ve gösterilirken nokta ile ayrılır. Örneğin, A.T veya G.C baz çiftleri gibi.

Prob: Baz dizisi belli olan oligonükleotit.

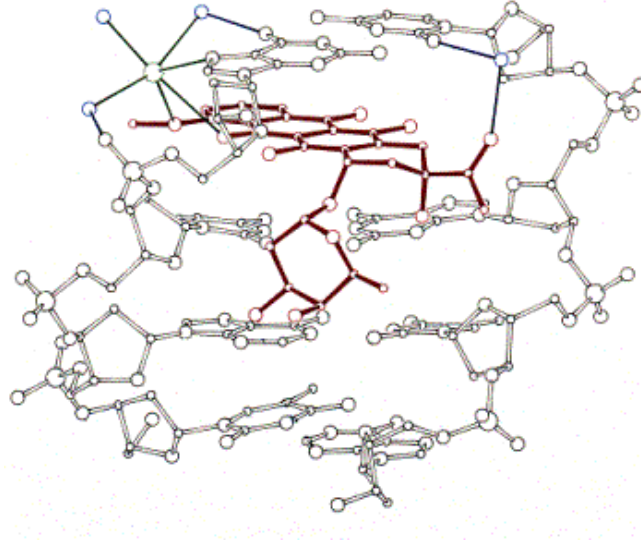
Hedef dizi (Target): Prob dizisinin tam karşılığı olan oligonükleotit.

Yanlış eşleşen dizi (Mismatch-MM): Bir bazı veya birden fazla bazı hedef dizisiden farklı olan oligonükleotit.

Rastgele dizi (Non complementary-NC): Hedef dizisiden tamamen farklı baz dizilimine sahip oligonükleotit.

2.3.1.1.2. İnterkalasyon

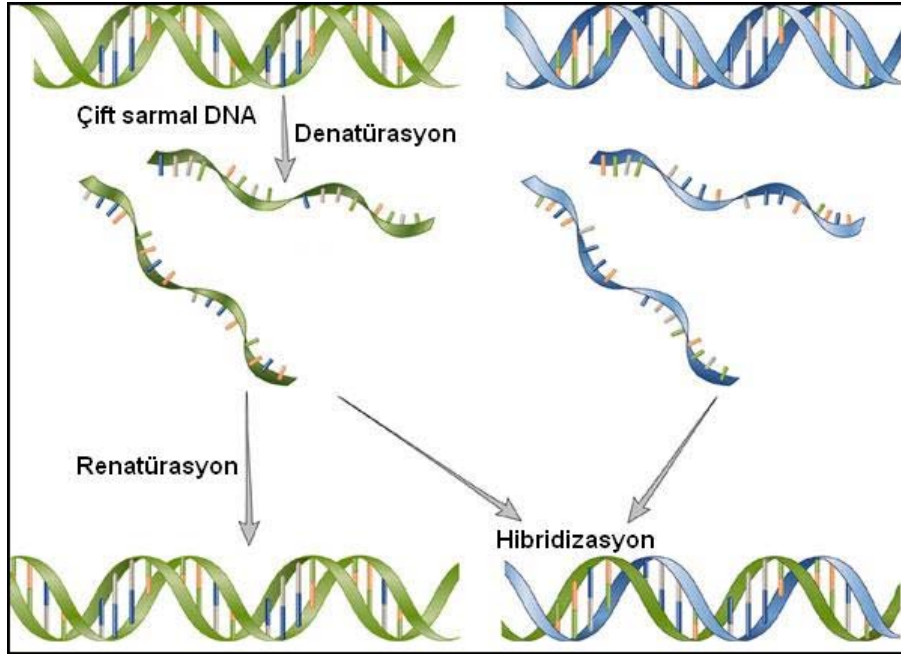
DNA baz çiftleri arasına, düzlemsel bir halka sistemine sahip olan bazı maddelerin yerleşerek güçlü bir şekilde bağlanması olayına interkalasyon denir (8,49). İnterkalasyon, DNA' da zincir kırılmasına yol açarak ve DNA senteziyle DNA' ya bağımlı RNA sentezini bozmaktadır. İnterkalasyona neden olan moleküller, Topoizomeraz (II) enzimini inhibe ederler. Bu etkileşim olayı, maddenin yapısına bağlı olarak, dönüşümlü ya da dönüşümsüz şekilde gerçekleşmektedir (149).



Şekil 5: Daunorubisin molekülünün çift sarmal DNA baz çiftleri arasına yerleşmesi (interkalasyon).

2.3.1.1.3. Nükleik Asit (DNA) Hibridizasyonu:

Baz çiftlerinin hibridizasyon şartlarına bağlı olarak kararlı çift sarmallı tek bir yapı haline gelmesine Nükleik asit hibridizasyonu denir (7).



Şekil 6: Nükleik asit hibridizasyonu.

2.4. DNA BİYOSENSÖRLERİ (GENOSENSÖRLER)

Analitik Kimya alanında, biyosensör tasarımında kullanılan DNA tanıma yüzeyleri, yeni ve ilgi çekici bir konudur (37,38,77,78,89,106,113,122,126,135). Bu tür tanıma yüzeyleri, bilinen elektrokimyasal biyosensörlere yeni boyutlar kazandırmakta olup, gelecekte hasta başında veya doktor gözetimindeki analizlerde önemli bir rol oynayacaktır (135).

DNA biyosensörleri (genosensörler) tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlerdir (95,96,105,111,131,134,139). Bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinogen maddeler, ilaçlar, vb.)

taininde (13,41,42) ya da dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (75,100,140,154,165) DNA tanıma yüzeyleri kullanılabilmektedir.

2.4.1. İlaç - DNA Etkileşiminin Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile algılanması:

Günümüzde ilaç-DNA etkileşiminin tayini, başarılı bir şekilde elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir **(Tablo-1)**. İlaç-DNA etkileşmesi sonucunda DNA'nın bir bazında ya da ilacın sinyalinde meydana gelen değişiklikler izlenerek ilaç-DNA etkileşim türü hakkında bilgi edinilebilmektedir (79,92,98). Bu etkileşim türleri; elektrostatik bağlanma, çapraz bağlanma ve interkalasyonla etkileşmedir.

İlaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal biyosensörlerle algılanmasında ;

1. DNA'nın bazları olan guanin veya adenin sinyalindeki değişim üzerinden,
2. DNA ile etkileşen ilacın kendi sinyalinde meydana gelen artma veya azalma ile hassas bir tayin yapılabilmektedir.

Kullanılan yöntem kolay ve düşük maliyetli olup, hızlı ve seçimli bir şekilde, DNA ile etkileşme türü incelenen ve ilaç olarak hedeflenen maddenin az miktarlarında çalışmayı mümkün kılmaktadır (12,24,41,42,64,69,87,93,99, 102,117,147,153).

Tablo-1: Son yıllarda elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanılarak bazı DNA hedefli maddelerin ve antikanser ilaçların DNA ile etkileşmelerinin elektrokimyasal tayini.

İlaç	Elektro kimyasal yöntem	İlaç sinyali	DNA sinyali	Kullanılan elektrot	Kaynak
Epirubisin	CV, DPV	İlaç sinyalinde azalma	-	CPE	42
Bitkisel ilaç Emodin	CV, DPV	İlacın indirgenme sinyalinde azalma	-	GCE	153
Taksol	DPV, CV, EIS	-	Guanin yükseltgenme sinyalinde azalma	AuE	93
Mitomisin C	DPV	-	Guanin ve adenin yükseltgenme Sinyalinde azalma	PGE	69
	SWV, DPV	İlaç sinyalinde azalma	Guanin yükseltgenme sinyalinde azalma	CSPE,CPE	102
	CV	Asitle aktive edilmiş ilacın sinyalinde azalma	Guanin yükseltgenme sinyalinde azalma	HMDE	87
Siprofloksasin	DPV	-	Guanin yükseltgenme sinyalinde azalma	GCE	99
Daunorubisin	CPSA	İlaç sinyalinde azalma	Guanin yükseltgenme sinyalinde azalma	CPE	147
	CV	İlaç sinyalinde azalma	-	R-GCE	24
cis-DDP and cis-BAFDP	DPV	-	Guanin ve adenin yükseltgenme sinyalinde azalma	PGE	41
Ekinomisin	CV	İlacın indirgenme sinyalinde azalma	-	HMDE	64
Mitoksantron	DPV, SWV	-	Guanin ve adenin yükseltgenme sinyalinde azalma	GCE	12
	DPV, CV	İlaç sinyalinde azalma	-	CPE	35

- CV** : Dönüşümlü voltametri
DPV : Diferansiyel puls voltametrisi
EIS : Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
SWV : Kare dalga voltametrisi
CPSA : Kronopotansiyometrik sıyırma analizi
CPE : Karbon pastası elektrot
GCE : Camı karbon elektrot
AuE : Altın elektrot
PGE : Kalem grafit elektrot
CSPE : Perde baskılı karbon elektrot
HMDE : Asılı civa damla elektrodu
R-GCE : Dönen camı karbon elektrot

2.4.2. DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal biyosensörler ile algılanması:

İnsan, virüs ve bakteri DNA'sının baz dizilimlerinin aydınlatılmasıyla pek çok katılımsal hastalığa sebep olan mutasyonlar artık saptanabilmektedir. Diziye özgü DNA biyosensörleri, bir çevirim sistemi ile beraber DNA probundan oluşmuştur. Tek sarmal kısa oligonükleotit içeren ve aranan hedefin baz dizisinin karşılığı olan proplar çözelti içerisinde kendisine seçimli bağlanacak kısmı seçerler ve hibritleşirler (60). Bu bağlanmanın tasarımı yapılan biyosensörlerle kısa sürede ve yüksek duyarlılıkta algılanması mümkün olmaktadır.

Günümüzde dizi seçimli DNA hibridizasyonunun başarılı bir şekilde elektrokimyasal sensörler kullanılarak gerçekleştirilebildiği görülmektedir (**Tablo-2**). DNA hibridizasyon tayini için tasarımı yapılacak biyosensörlerin hedefteki tek bazdaki farklılığı yakalamaya imkan verecek şekilde seçimliliğe ve düşük tayin sınırına sahip olması gerekmektedir. DNA biyosensörleri kullanılarak gerçekleştirilen elektrokimyasal ölçümlerde hibritin olduğu elektrot, bir elektroaktif indikatör ile etkileştirilir ve indikatörün hibrite bağlanma düzeyi belirlenir. Hibridizasyon oluşumundan sonra bu hibritle etkileşen indikatörün neden olduğu artan veya azalan elektrokimyasal yanıt, hibridizasyon tayinine yönelik bir sinyal olarak kabul edilir (74,83,141,158). Ayrıca çeşitli analizlerde DNA'nın elektroaktif bazlarından hareketle indikatörsüz tayinler de yapılabilmektedir (46,82).

Tablo-2: : Son yıllarda dizi seçimli DNA hibridizasyonunun tayininde kullanılan bazı elektrokimyasal sensörler

Tayin edilen DNA dizisi	İndikatör	Elektrokimyasal yöntem	Kullanılan elektrot	Sinyal	Kaynaklar
HBV	Kobalt fenantrolin, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$	DPV	CPE	$[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ sinyali	39
	Metilen mavisi (MB)	DPV	CPE	MB sinyali	40
	Metilen mavisi (MB)	DPV	C-CPE	MB sinyali	85
	-	DPV	PGE	Guanin ve adenin sinyali	36
	Ferrosenyum hekzaflüorofosfat (FcPF_6)	CV	AuE	(FcPF_6) sinyali	161
	-	DPV	PGE	Guanin sinyali	67
	di(2,2'-bipiridin) Osmium (III) $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^+$	CV	AuE	$[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^+$ sinyali	65
Faktör V Leiden mutasyonu	-	DPV	PGE	Guanin sinyali	103
Salmonella spp.	-	DPV	GEC	Guanin sinyali	45
	-	DPV	GEC ve m-GEC	Guanin sinyali	46
BRCA1	-	PSA	H-CPE PGE	Guanin sinyali	142 145
	Enzimatik yöntemde kullanılan sübstrat, α -naftil fosfat	DPV, SWV	SPE	α -naftol sinyali	150

- CV** : Dönüşümlü voltametri
DPV : Diferansiyel puls voltametrisi
PSA : Potansiyometrik sıyırma analizi
SWV : Kare dalga voltametrisi
CPE : Karbon pastası elektrot
C-CPE : Kitosan modifiye karbon pastası elektrot
H-CPE : Isıtılmış karbon pastası elektrot
PGE : Kalem grafit elektrot
AuE : Altın elektrot
GEC : Grafit epoksi kompozit
m-GEC : Magneto grafit epoksi kompozit
SPE : Perde baskılı elektrot

3. NANOTEKNOLOJİ

Nanometre ölçeğinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması, kontrolü ile nanometre boyutlarda fonksiyonel malzemelerin, araçların ve sistemlerin geliştirilmesi ve üretilmesine dayalı teknoloji “nanoteknoloji” olarak adlandırılmıştır.

Richard Feynman'ın 1959'da Amerikan Fizik Cemiyetinde yaptığı konuşması nanoteknolojinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Feynman **“Aşağıda Daha Çok Yer Var”- “There’s Plenty of Room at the Bottom”** başlıklı bu konuşmasında nanoteknolojiye dayalı olaylara değinmiştir.

Nanopartiküller günümüzün en son teknolojisini oluşturmaktadır. Ancak nanopartiküller şu anda var olan teknolojilere göre daha iyi ölçüm performansı, kullanım kolaylığı ve daha ucuz fiyat olanakları sağladığı zaman biyoölçümler için geçerli olacaktır. Ayrıca, nanopartiküller daha geniş üretim hacmi ve dağıtım kapasitesine ulaşılabilirdiğinde ve geniş kitleler tarafından ticari olarak eldesi mümkün olduğunda biyoölçümler için rutin olarak kullanılabilir hale gelecektir (115).

Nanoteknoloji milimetrenin milyonda biri kadar küçük yapılarına kadar inerek maddelere yeni sentez özellikleri kazandıran bir teknolojidir. Yakın bir zaman içinde dünyadaki sanayi alanlarına ve insan hayatının neredeyse her yönüne yön vereceği düşünülen nanoteknoloji, bu ölçekte ölçme, tahmin etme, izleme ve yapım faaliyetlerinde bulunmayı ve bu ölçeğin bazı temel özelliklerinden yararlanma kabiliyetini de ifade eder. Nano, teknik bir ölçü birimidir. Herhangi birimin milyarda biri anlamına gelmektedir. Nanoteknoloji moleküler kimya, uygulamalı fizik, kimya mühendisliği, biyoteknoloji mühendisliği, mekanik mühendisliği, madde bilimi, elektrik mühendisliği,

endüstri mühendisliği gibi birçok alanı birleştiren uygulamalı bilim ve teknoloji dalıdır.

Nanoteknolojinin uygulama amaçları:

- Nano ölçekli malzemelerin üretimi ve analizi,
- Nano boyuttaki yapıların fiziksel özelliklerinin araştırılması ve anlaşılması,
- Nano duyarlılıkta aletlerin geliştirilmesi,
- Makroskopik dünya ile nanoskopik dünya arasındaki bağı kurulabilmesi için uygun tekniklerin bulunması ve geliştirilmesi.

Nanoteknolojinin Kullanım Alanları

- Sağlık alanında: Mikro-nano cerrahide(özellikle göz ve beyin cerrahisi), Hücre, doku ve moleküler (DNA gibi) hasar belirlenmesi ve onarımında, diagnostik kitlerde,
- Endüstriyel alanda: Mikromakineler, mikropompalar, mikrosensörlerin geliştirilmesinde, optoelektronik elemanların imali ve bir araya getirilmesinde, nano boyutlu kaplamalarda, monolayer katalizörlerle tepkimelerin kontrolünde, nano boyutlu elemanlar arası bağlantılarda, cip ve CD üretiminde,
- Bilimsel araştırma alanında: Yüzey karakterizasyonu ve modifikasyonunda, mikroorganizmaların taşınmasında, DNA modifikasyonunda,
- İlaç endüstrisinde: kontrollü ilaç denetiminde,
- Araba, uçak, ve uzay araçları ile çok az enerji tüketimi ile daha uzun ve güvenli yolculukların yapılabilmesinde,
- Kozmetik sanayisinde, bronzlaşmayı önleyici kremlerin imalinde,
- Koruyucu kaplamalarda,

- Gıdaların paketlenmesinde: Gıdaların daha taze ve daha uzun süre dayanıklı kalmasının sağlanmasında,
- Hücre onarım robotlarının yapımında,
- Güneş enerjisini depolamada,
- Polietilen üretiminde zincir yapısı değişimi ile çelikten sağlam taşıyıcı halat üretiminde,
- Güneş pillerinde,
- Kirlenmeyen ve ıslanmayan giysilerin imalinde,
- Nanolitografi,
- Atık maddelerin geri dönüşümünde nanoteknoloji uygulama alanı bulunmaktadır.

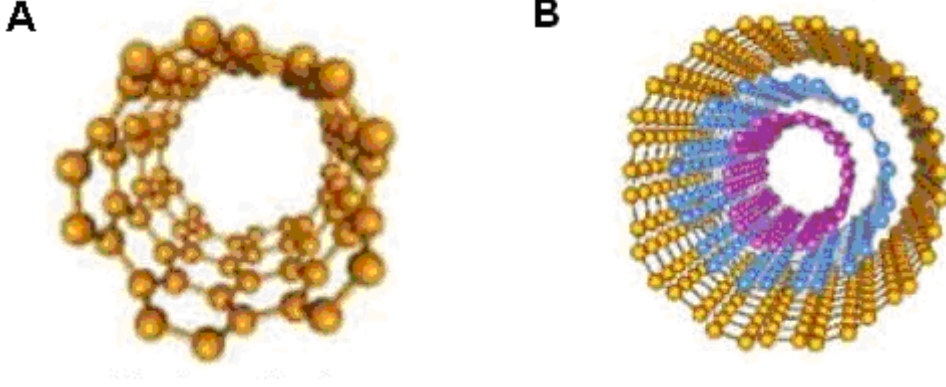
3.1. Karbon nanotüpler

Nanoteknolojiye dayalı geliştirilen en önemli malzemelerden biri, karbon nanotüplerdir. 1991 yılında Lijima tarafından bulunan karbon nanotüpler (CNT) (80), ilk olarak hekzagonal sistemde bazal düzlemlerde C-C bağlarının oluşturulması (grafen yapısı) ve daha sonra bu bağların yuvarlatılıp silindirik şekil elde edilmesiyle oluşurlar. CNT silindirlerden oluşan fulleren tipi yapılardır. Fulleren 60 C atomundan oluşan küresel yapılardır ve CNT için bir ara üründür. İlk olarak fulleren oluşturulur. Daha sonra fulleren buharlaştırılır ve CNT elde edilir. Fullerenler, graphenelere ayrışır ve buradan farklı özellikte CNT'ler üretilir (128).

Çeşitli karbon nanotüp üretim teknikleri kullanılmaktadır. Ark buharlaştırma tekniği, kesikli lazer buharlaştırma tekniği ve kimyasal buhar biriktirme tekniği bu teknikler içinde en önemli olanlarıdır.

CNT'ler üstün elektronik ve mekanik özelliklere sahip nano yapılardır. Geometrik yapılarına bağlı olarak yarı-iletken ve iletken özellik göstermekte olup oldukça esnek ve çelikten daha sağlamdırlar.

CNT'ler fiziksel yapılarına göre iki şekilde sınıflandırılırlar; **(A)** Tek duvarlı CNT'ler (SWCNT) ve **(B)** Çok duvarlı CNT'ler (MWCNT).



Şekil 7: Karbon nanotüpler (CNT); **(A)** tek duvarlı ve **(B)** çok duvarlı.

3.1.1 Karbon Nanotüplere Dayalı Elektrokimyasal Sensörler:

Son 10 yılda, nanopartiküller, karbon nanotüpler ve diğer nanomalzemelere dayalı sensörlere artan bir ilgi bulunmaktadır (1,6,21,44,47,54,55,66,68,76,81,91,110,116,123,124,156,157,159).

İlaç, protein, DNA gibi spesifik moleküllerin analizlerine yönelik tasarımılanan karbon nanotüp modifiye sensörlere bakıldığı zaman, daha duyarlı analizlerin yapılabildiği görülmüştür (51,58,59,63,121,146,160).

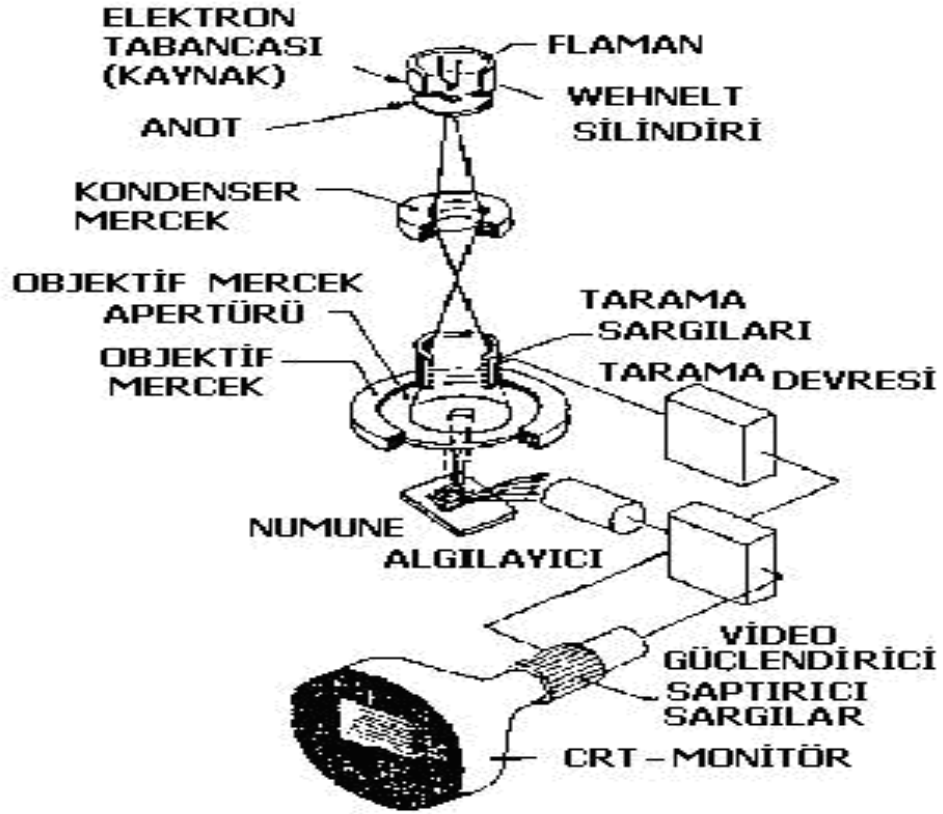
Fluorokinolon grubu antibiyotik olan norfloksasin'in doğrusal tarama voltametri tekniği ile 50 nM tayin sınırındaki analizi, Nafyon filmle kaplanmış ve MWCNT modifiye edilmiş GCE kullanılarak gerçekleştirilmiştir (63). MWCNT modifiye perde baskılı elektrot (SPE) ile tek sarmal DNA (ssDNA) ve maya tRNA'sının elektrokimyasal tayini, Ye ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (160). Wang ve arkadaşları tarafından (146), BRCA1 DNA

geninin elektrokimyasal tayini, MWCNT modifiye edilmiş camı karbon elektrot (GCE) kullanılarak, 100 fmol gibi düşük bir tayin sınırı ile gerçekleştirilmiştir. Yüksek duyarlılığın yanında düşük maliyete de sahip olan MWCNT modifiye edilmiş tek kullanımlık kalem grafit elektrot (MWCNT-PGE) tasarımı, literatürde ilk defa Erdem ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (44). Elektrokimyasal DNA analizi ile birlikte dizi seçimli DNA hibridizasyonu herhangi bir indikatör kullanılmadan, guanin sinyalindeki değişim izlenerek yapılan bu çalışmada başarıyla tayin edilmiştir.

4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM), Manfred von Ardenne öncülüğünde 1930'lu yıllarda geliştirilmiştir. Taramalı Elektron Mikroskobunda görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir. En sık kullanıldığı biçimiyle, yüzeyden yayılan ikincil elektronlarla yapılan ölçüm, özellikle yüzeyin engebeli (topografik) yapısıyla ilişkili bir görüntü oluşturur (62).

Taramalı Elektron Mikroskobu, optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemi olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8: Taramalı elektron mikroskobunun (SEM) şematik görünüşü.

5. DNA çip teknolojisi:

Çipler elektronik endüstrisinde yıllardır kullanılan küçük cihazlardır. Biyoçip teknolojisi de bundan yola çıkarak geliştirilen bir teknolojidir. Mikroçip (mikroarray) teknolojisi ile küçük destek materyalleri; cam mikroskop slaytları, silikon çipler ya da naylon membranlar üzerinde DNA, cDNA, ya da oligonükleotit, protein vb. analizinin yapılabilmektedir.

Mikrofabrikasyon, mm veya μm gibi oldukça küçük boyutlarda fiziksel nesneler oluşturmak için uygulanan bir yöntemdir. Mikro ve nanoteknolojinin gelişmesiyle biyomedikal arenaya uygulanması, yeni teşhis ve tedavi edici sistemlerin geliştirilmesinde oldukça büyük potansiyele sahiptir. Bu teknolojinin gelişmesiyle hastalık ve risk şartlarının erken tanımlanması, daha az zarar ve

daha kısa sürede iyileşme zamanının sağlanması ve daha düşük fiyatla daha kabul edilebilir sağlık-bakım sağlanması mümkün olacaktır.

Bu sistemler klasik imalat teknikleri kullanılarak üretilen cihazlarla karşılaştırıldığında önemli avantajlara sahiptirler (101,129,130,164). Bunlar;

1) Daha küçük boyutsal yapıda olmaları (mikroboyut) buna bağlı olarak yüzey alanı / hacim oranının artması,

2) Aynı ve bitişik sübstrat üzerinde duyarlılığı, sinyal şartlarını ve aktivasyon fonksiyonlarını birleştirme yeteneğine sahip olmaları yani elektronik veya elektriksel bileşenlerin sistem üzerinde birleştirilebilmesi,

3) Yüzlercesinin bir cihaz kadar kolay yapılabilmesi ve bu seri fabrikasyondan dolayı daha ucuz olmaları,

4) Süper fonksiyonlar sağlamaları (duyarlık, çözümleme gibi),

5) Geometrik olarak kontrol edilebilmeleri,

6) Küçük miktarlarda örnek hacmine sahip olmaları,

7) Yüksek kalitede üretilmeleri olarak sayılabilir.

Tıp ve biyoloji alanları ile nanoteknolojinin entegrasyonu moleküler tanı ve tedavi alanlarındaki beklentileri de beraberinde getirmiştir. Nanoteknoloji ile çok az bir örnekle DNA analizleri yapmak mümkün olacaktır. Ayrıca bu teknolojinin ilerlemesiyle birlikte hastalıklara daha erkenden ve daha hızlı tanı koymak amaçlanmaktadır.

Üç tip mikroçip bulunmaktadır. Bunlar; 1. Spotlu mikroçipler, 2. Genotip mikroçipleri, 3. Oligonükleotid mikroçipleridir. Oligonükleotid mikroçiplerinde problemler sekansı bilinen ya da tahmin edilen mRNA'lara uygun olacak şekilde tasarımlanır. Bu tasarımların bazılarını, Affymetrix, GE Healthcare gibi firmalar aracılığıyla temin etmek mümkündür (61). Çipteki her bir geni temsil etmek

üzere genellikle 25-70 nükleotid uzunluğunda oligonükleotidler kullanılır. Daha küçük boyutlarda prob bağlama etkinliği daha düşük olmaktadır. Bununla birlikte, küçük oligonükleotidlerin özgüllüğü daha fazladır. 70 nükleotitten daha uzun olanlarda ise sinyalde çok küçük bir artış için olmaktadır. Oligonükleotidler her seferinde yeniden sentezlendiği cDNA'larda olduğu gibi başka sekanslardan kontaminasyon söz konusu değildir.

Biyochip teknolojisinin ilk ticari ürünü GeneChip® ticari adlı Affymetrix firmasının (Santa Clara, ABD) Lipshutz ve arkadaşlarının çalışması üzerine kurulan bir DNA çipidir (61).



Şekil 9: Affimetrix firmasına ait mikroçip görünümü

DNA çipleri ile genomik araştırmalar kapsamındaki çalışmaların hemen hemen hepsini yapmak mümkündür. DNA'da genleri ve bunların dizilimleri bulunabilir. Özellikle kriminolojik çalışmalarda çok hızlı olarak DNA testi ile suçlu belirlemesi yapılabilir. Hastalık durumunda ortaya çıkabilecek mutasyonları izleyip, hastalık tanısını koyup, gen ekspresyon profilinin zamanla nasıl

değiştiiğine bakıp hastalığın gelişmesi/gerilemesi izlenebilir. Yeni ilaç adaylarının olası toksik etkilerini çok hızlı bir şekilde izleyip eliminasyonları çok kolaylıkla yapılabilir. DNA hedefli potansiyel ilaçların etkileşim mekanizmaları çip üzerinde izlenebilir.

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar

Deneyler ve ölçümler sırasında kullanılan tüm cihaz ve donanımlar:

Terazi (Mettler Toledo AB204-S)

Ses titreşimli temizleyici (Bandelin Sonorex)

pH-metre (Orion 420A)

Manyetik karıştırıcı (Biosan MS 3000)

Vorteks (Biosan V1)

Potansiyostat (AUTOLAB 302, GPES 4,9 yazılımlı, Eco Chemie)

Ag/AgCl referans elektrot (BAS)

Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı)

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Daunorubisin (DNR) (Sigma)

Karboksil gruplarıyla zenginleştirilmiş tek duvarlı karbon nanotüpler
(SWCNT) (Sigma-Aldrich)

Asetik asit (%99-100) (Merck)

Hidroklorik asit (%37) (Merck)

Sodyum Hidroksit (Merck)

Dipotasyummonohidrojenfosfat (Riedel-de Haen)

Potasyumdihidrojenfosfat (Riedel-de Haen)

Tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorür (Sigma)

Sodyum klorür (Sigma)

EDTA disodyum tuzu (Sigma)

N-Hidroksisüksinimit (NHS) (Sigma)

Etilkarbodiimit (1-etil-3-dietil aminopropil karbodiimid hidroklorür) (EDC)

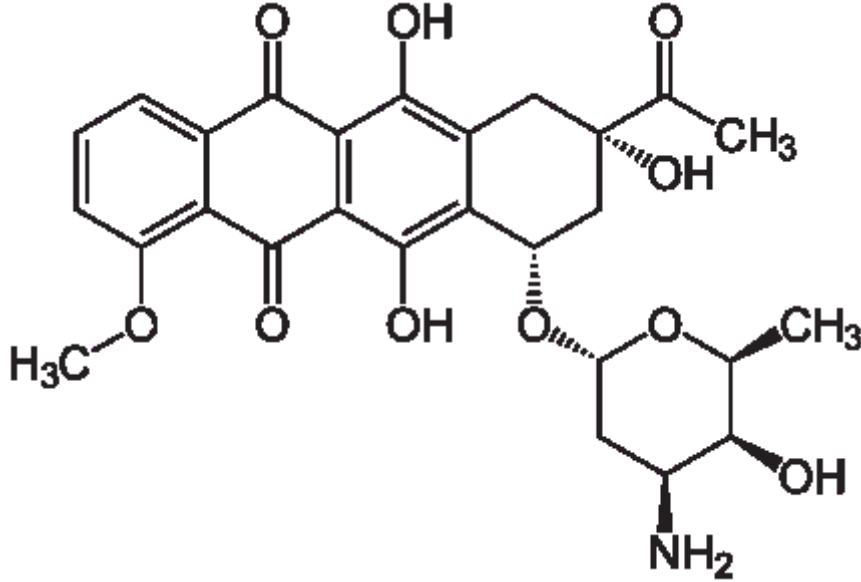
(Sigma)

Balık sperminden elde edilen DNA [fish sperm DNA; fsDNA]

Tüm çalışmalarda ultra saf su kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında ($25,0 \pm 0,5$) °C' de gerçekleştirildi.

2.2.1. Daunorubisin (DNR) Hakkında Genel Bilgi:

Açık kimyasal formül:



Kapalı Kimyasal formül: $C_{27}H_{29}NO_{10}$

Kimyasal adlandırma: (8S,10S)-8-asetil-10-[(2S,4S,5S,6S)-4-amino-5-hidroksi-6-metil-oksan-2-il]oksi-6,8,11-trihidroksi-1-metoksi-9,10-dihidro-7H-tetrasen-5,12-dion

Molekül ağırlığı: 527.52 g/mol

Diğer isimleri: Daunomisin

Farmakolojik Özellikleri: Daunorubisin Streptomyces peucetius'tan elde edilen glikozid yapıda antrasiklin grubu antineoplastik bir ilaçtır. Etki mekanizması, DNA bazının çiftleri arasına yerleşerek yani interkale olarak

DNA'ya güçlü bir şekilde bağlanma şeklindedir (5,23,49,52,118,119,147). İnterkalasyon DNA sentezini ve DNA'ya bağlı RNA sentezini bozarak DNA'da zincir kırılmasına yol açar (49).

2.2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

2.2.2.1. Oligonükleotit Çözeltilerinin Hazırlanışı:

Çalışmalarımızda kullanılan oligonükleotit dizileri TIB Molbiol (Almanya) firmasından liyofilize toz halinde temin edildi.

2.2.2.1.1.SWCNT-PGE Sistemine Dayalı Deneylerde Kullanılan Oligonükleotit Dizileri:

Amino ile işaretlenmiş prob:

5'- NH₂-(CH₂)₆ -gAg ggT gTC TgA Agg Agg ggg- 3'

HBV prob: (Hepatit B virüsünü (HBV) temsil eden kısa DNA dizisi)

5' -NH₂-(CH₂)₆ -AAT ACC ACA TCA TCC ATA TA- 3'

Hedef:

5' -TAT ATg gAT gAT gTg gTA TT- 3'

Tek bazı farklı hedef dizi (MM):

5' -TAT cTg gAT gAT gTg gTA TT- 3'

Rastgele dizi (NC):

5' -AAT ACC TgT ATT CCT CgC CTg TC- 3'

Tüm oligonükleotit stok çözeltileri Tris-EDTA tampon çözeltisi pH 8,0 ile 1000 µg/mL konsantrasyonunda hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı.

Bu çalışmada kullanılan Hepatit B virüsünü (HBV) temsil eden prob dizisi daha önce yapılan çalışmalarda (36,44,47) belirtildiği gibi HBV'yi temsil eden gen haritasından seçildi ve prob dizisinde guanin bazının olmaması indikatörsüz hibridizasyon tayini açısından çalışmaya önemli bir avantaj kazandırdı. Prob

dizisinin elektrot yüzeyine daha düzgün bir şekilde bağlanması ve hibridizasyonun sterik açıdan daha verimli bir şekilde gerçekleşmesi amacıyla, çalışmamızda amino hekzil ile işaretlenmiş kısa DNA prob dizileri kullanıldı.

2.2.2.2. Tampon Çözeltilerin Hazırlanışı:

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

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

Ölçümler sırasında kullanılan 0,05 M fosfat tampon çözeltisi litresinde 1,36 g (0,01 mol) KH_2PO_4 , 6,96 g (0,04 mol) K_2HPO_4 ve 1,168 g NaCl (0,02 mol) içermektedir. Hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 7,4 olmaktadır. Çözeltinin pH'sı gerekliyse, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle pHmetre ile 7,4'e ayarlandı. Daha sonra stok olarak hazırlanan 0.05 M fosfat tampon çözeltisinin seyreltilmesiyle 5 mM fosfat tampon çözeltisi hazırlandı.

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

Kullanılan 0,50 M asetat tampon çözeltisi litresinde 0,2722 g sodyum asetat trihidrat, 0,1154 mL asetik asit ve 1,168 g NaCl (0,02 mol) içermektedir. Çözeltinin pH'sının 4,8 değerine ayarlanması, 0,1 N NaOH ve/veya 0,1 N HCl ilavesiyle, pHmetre ile ölçülerek gerçekleştirildi.

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

Kullanılan 0,02 M Tris HCl tampon çözeltisi litresinde 3,152 g Trizma HCl ve 1,168 g NaCl (0,02 mol) içermektedir. Çözeltinin pH'sının 7,0 değerine ayarlanması, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle, pHmetre ile ölçülerek gerçekleştirildi.

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

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

2.3. Kullanılan Yöntem:

Kullanılan elektrotların aktivasyonu ve elektrot yüzeyine DNA ve/veya oligonükleotitlerin tutturulması, DNA materyalinin madde ile elektrot yüzeyinde incelenen madde ile etkileşmesine ve hibridizasyon işlemlerine ilişkin basamaklarda, mevcut literatürlerde (37,41,42,44,69) rapor edilen yol izlenildi.

2.3.1. Kullanılan Elektrotun Hazırlanışı:

Tek kullanımlık grafit elektrot (PGE):

Çalışmada kullanılan kalem grafit elektrot, Tombo kalem uçlarının 3.0 cm boyutunda kesilmesiyle hazırlandı (145). Elektrokimyasal hücre içerisinde 1.0 cm kalacak şekilde kalem içerisine yerleştirildi.

2.4. Tek duvarlı karbon nanotüplere (SWCNT) dayalı elektrokimyasal sensörlerin tasarımı ve uygulamaları:

Karboksil gruplarıyla zenginleştirilmiş tek duvarlı karbon nanotüpler (SWCNT; çapı 4-5 nm; boyu 500-1500 nm olan tek duvarlı karbon nanotüpler) çalışmamızda kullanıldı.

Deneyler en az üç kere tekrarlandı ve ortalama değerler hata çubukları ile histogramlarda gösterildi. Tüm deneyler oda sıcaklığında yapıldı.

2.4.1. SWCNT ile modifiye edilmiş tek kullanımlık grafit elektrotların hazırlanması:

Elektrot hazırlanması:

Ucuz ve kolay elde edilebilir olması, ve ayrıca DNA çip teknolojisine daha yatkın olması sebebiyle çalışmalarımızda, tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) kullanıldı. Grafit uç olarak Tombo® kalem ucu kullanıldı.

Yüzey aktivasyon işleminin sensörün yanıtına olan etkisini incelemek amacıyla, PGE'nin elektrokimyasal yüzey aktivasyonu, 30 s süreyle +1.40 V uygulanarak ABS içinde yapıldı.

Elektrot yüzeyine CNT modifikasyonu:

Farklı konsantrasyonlardaki CNT çözeltisi, belirli miktar CNT'nin dimetil formamid (DMF) çözeltisi ile 1 saat süreyle karıştırılması ile hazırlandı. Daha sonra PGE'ler, hazırlanan CNT çözeltisi içersinde 1 saat süreyle bekletildi.

2.4.2. PGE ve SWCNT-PGE yüzeylerinin elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonu:

PGE ve SWCNT-PGE yüzeylerinin mikroskobik karakterizasyonu alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu (hızlandırma potansiyel aralığı 10 – 30 KV) (FE-SEM; Quanta 400 FEI, Japan) ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi

(ODTU) Merkezi Araştırma Laboratuvarında uzman personel tarafından gerçekleştirildi.

2.4.3. SWCNT yüzeyine DNA immobilizasyonu:

İmmobilizasyon işlemi:

CNT modifiye edilmiş PGE'ler, 100 µg/mL fsDNA çözeltisini içeren viyallere daldırıldı ve pasif adsorbsiyon yöntemine göre (37,44,72), bu viyaller içinde 60 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra PGE'ler, 10 saniye boyunca ABS ile yıkandı.

Voltametrik Ölçüm:

Üçlü elektrot sistemi elektrokimyasal hücre içine daldırıldı ve daha sonra voltametrik ölçüm gerçekleştirildi. Guaninin yükseltgenme sinyalleri, DPV tekniği ile 30 mV/s tarama hızıyla, 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, ABS içersinde ölçüldü.

SWCNT modifiye grafit sensörün tasarımında optimum deneysel koşulların sağlanması amacıyla; grafit elektrodun aktivasyonu, CNT konsantrasyonu, DNA konsantrasyonu gibi deneysel parametrelerdeki farklılığın sensörün yanıtına olan etkisi incelendi.

2.4.3.1. CNT modifikasyonu öncesinde kullanılan grafit elektrotların yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisinin incelenmesi:

Yüzeyi aktive edilmiş ve yüzeyi aktive edilmemiş PGE yüzeylerine CNT modifiye edildi. İmmobilizasyon işlemi ve voltametrik ölçümü yöntem 2.4.3.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Yüzey aktivasyon işlemi, yöntem 2.4.1.'de anlatıldığı gibi yapıldı.

2.4.3.2. CNT konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesi:

Bu çalışmada 1000 µg/mL'den 10000 µg/mL'ye kadar değişen CNT konsantrasyonlarda hazırlanan CNT-PGE'ler kullanıldı. İmmobilizasyon işlemi ve voltametrik ölçümü yöntem **2.4.3.'de** anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

2.4.3.3. DNA konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesi:

CNT modifiye edilmiş PGE'ler yöntem **2.4.3.'de** anlatıldığı gibi immobilize edildi ve voltametrik ölçümü gerçekleştirildi. DNA konsantrasyonu 10 µg/mL'den 250 µg/mL'ye arttırıldı ve bu konsantrasyon değişiminin yanıtı olan etkisi incelendi.

Yukarıda anlatılan aynı deneysel şemalar, ayrıca ortamda DNA yokken CNT varlığında veya CNT yokken DNA varlığında hazırlanan kontrol örnekleriyle tekrarlandı.

2.4.4. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarla ilaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak voltametrik değişimi üzerinden algılanması:

2.4.4.1. DNA immobilize edilmiş PGE / SWCNT-PGE'lerle DNR-DNA etkileşmesinin DNR ve guanin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesi:

Öncelikle, DNR-DNA etkileşiminin PGE yüzeyinde elektrokimyasal algılanmasına yönelik çalışmalarda yapıldı. Optimum deneysel koşulların sağlanması amacıyla; DNA konsantrasyonu, DNR konsantrasyonu ve etkileşim süresi deneysel parametrelerdeki farklılığın sensörün yanıtına olan etkisi incelendi.

Yöntem **2.4.3.'de** anlatıldığı gibi immobilize edilen CNT modifiye edilmiş grafit elektrotlar, 5 µM antikanser ilaç olan Daunorubisin (DNR) içeren viyallere

daldırıldı. DNA sensörleri, 30 dakika süreyle DNR çözelti içerisinde bekletildi. Daha sonra PGE'ler, 10 saniye boyunca PBS ile yıkandı. Voltametrik ölçüm, üçlü elektrot sistemi kullanılarak, yukarıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi. DNR ve guaninin yükseltgenme sinyalleri aynı voltametrik skala içerisinde ölçüldü. Aynı deneysel şema, ortamda DNA yokken veya CNT yokken tekrarlandı. Bu çalışmalar, DNR-DNA etkileşmesinin optimize olduğu koşullarda gerçekleştirildi.

2.4.5. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarda HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal olarak voltametrik yöntemle algılanmasına yönelik çalışma:

Bu çalışmada **2.2.2.1.1'de** belirtilen oligonükleotit dizileri kullanıldı. Çalışma ortamı olarak ABS kullanıldı.

CNT-PGE yüzeyine HBV DNA prob immobilizasyonu:

SWCNT-PGE'ler, 1 saat süreyle 100 µg/mL amino işaretli HBV prob içeren viyallere daldırıldı ve daha sonra elektrotlar, ABS ile 5 saniye süreyle yıkandı.

Prob immobilize edilmiş CNT-PGE yüzeyinde DNA hibridizasyonu:

Prob immobilizasyon işlemi takiben elektrotlar, 200 µg/mL hedefi veya rastgele diziyi (NC) içeren çözelti içersine daldırıldı ve 1 saat süreyle hibridizasyon işlemi için bekletildi. Hibridizasyon basamağından sonra, elektrotlar 5 saniye süreyle TBS çözeltisi ile yıkanarak, ABS çözeltisi içersine daldırıldı ve voltametrik ölçüm gerçekleştirildi.

Voltametrik ölçüm:

Üçlü elektrot sistemi elektrokimyasal hücre içine daldırıldı ve daha sonra voltametrik ölçüm gerçekleştirildi. Guanin'in yükseltgenme sinyalleri, DPV tekniği ile 30 mV/s tarama hızıyla, 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, ABS içerisinde ölçüldü.

Yüzeyine SWCNT modifiye edilmiş hibridizasyon sensörünün tasarımında optimum deneysel koşulların sağlanması amacıyla; prob DNA konsantrasyonu, hibridizasyon zamanı, hedef DNA konsantrasyonu gibi deneysel parametrelerdeki farklılığın sensörün yanıtına olan etkisi incelendi.

2.4.5.1. SWCNT-PGE yüzeyine amino ile işaretlenmiş kısa DNA dizisinin tutturulması ve DNA'nın elektrokimyasal tayini:

Karboksil gruplarıyla zenginleştirilmiş SWCNT-PGE yüzeyine amino işaretli kısa DNA dizisinin doğrudan ya da kovalent bağlayıcı ajan kullanılarak bağlanmasını belirlemek amacıyla, SWCNT-PGE elektrotlar taze hazırlanmış kovalent bağlanma çözeltisi (8 mM NHS ve 5mM EDC olacak şekilde litresinde 0,921 g NHS ve 0,959 g EDC içeren ve PBS ile hazırlanan çözelti; EDC-NHS) içersinde 1 saat süreyle bekletildi. Daha sonra elektrot PBS çözeltisi ile 10 saniye boyunca yıkandı ve voltametrik ölçüm gerçekleştirildi.

2.4.5.2. SWCNT-PGE yüzeyine tutturulan amino ile işaretlenmiş DNA prob konsantrasyon değişiminin guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesi:

Yöntem **2.4.1'de** belirtildiği gibi hazırlanan SWCNT-PGE'ler, amino ile işaretlenmiş ve 13 guanin içeren DNA prob çözeltisi içersine daldırıldı. Daha sonra elektrotlar, ABS ile 5 saniye boyunca yıkandı ve elektrokimyasal ölçüm gerçekleştirildi. Ortamdaki DNA prob miktarı, 10 µg/mL'den 150 µg/mL'ye artırıldı ve bu konsantrasyon değişiminin yanıtı olan etkisi incelendi.

2.4.5.3. Hibridizasyon zamanının guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesi:

CNT-PGE yüzeyinde HBV prob ile hedefi arasında gerçekleşen hibridizasyon basamağında, 15 dakika ile 1 saat arasında değişen farklı hibridizasyon süreleri uygulandı ve guanin sinyalleri ölçüldü (gösterilmedi).

2.4.5.4. CNT-PGE yüzeyinde HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayinine yönelik çalışmalar:

Yöntem **2.4.5'deki** gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi ve seçimlilik incelendi. Yüzeyine HBV DNA prob immobilize edilmiş SWCNT-PGE'nin, hedef, rastgele dizi (NC) ve karışım çözeltisine (hedef ve tek bazı hedeften farklı olan dizi (MM)'yi (1:1) oranında içeren çözeltiye) daldırıldı ve hibridizasyon basamağını takiben guanin sinyalleri ölçüldü.

2.4.5.5. Hedef DNA konsantrasyonundaki değişimin hibridizasyon yanıtına olan etkisinin incelenmesi:

Yöntem **2.4.5'deki** gibi aynı koşullarda gerçekleştirildi. Ortamdaki hedef DNA konsantrasyonu 25 µg/mL'den 200 µg/mL'ye artırıldı ve bu konsantrasyon değişiminin yanıtı olan etkisi incelendi.

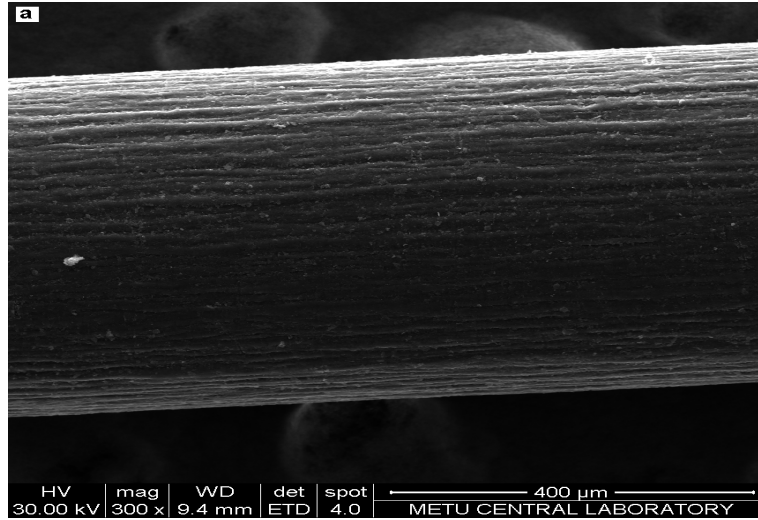
BÖLÜM III

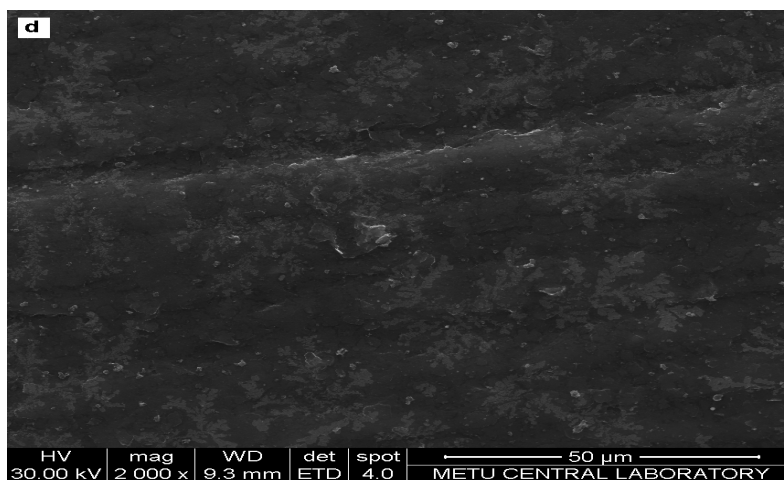
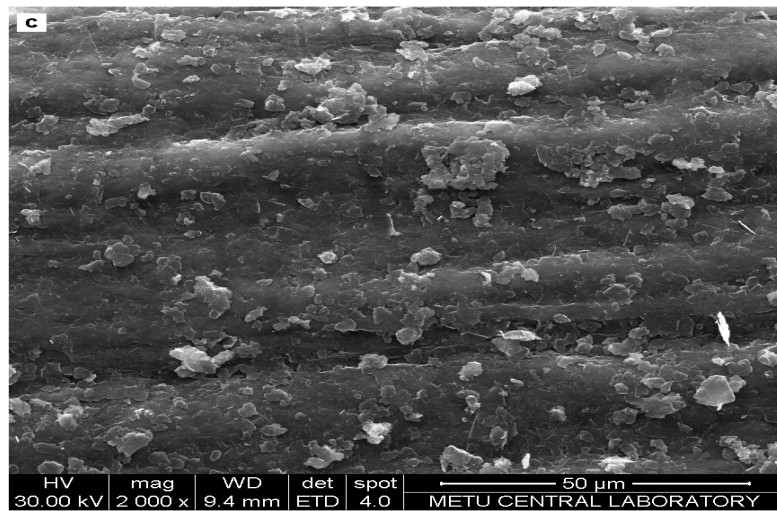
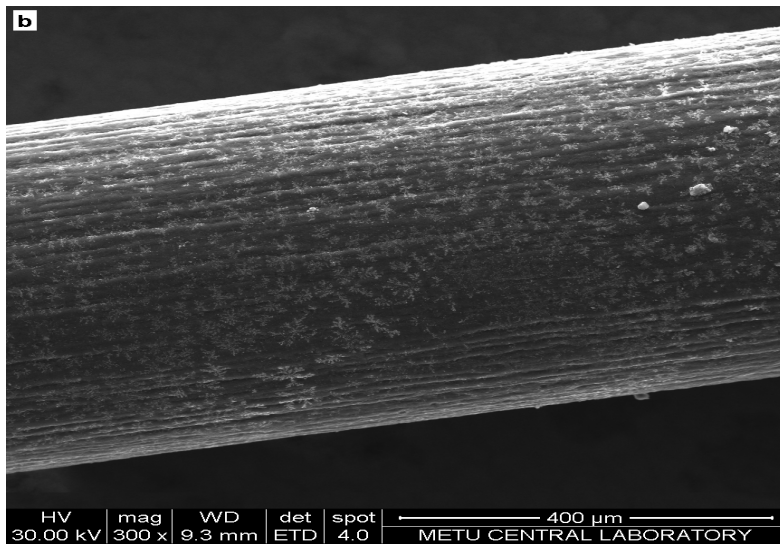
BULGULAR

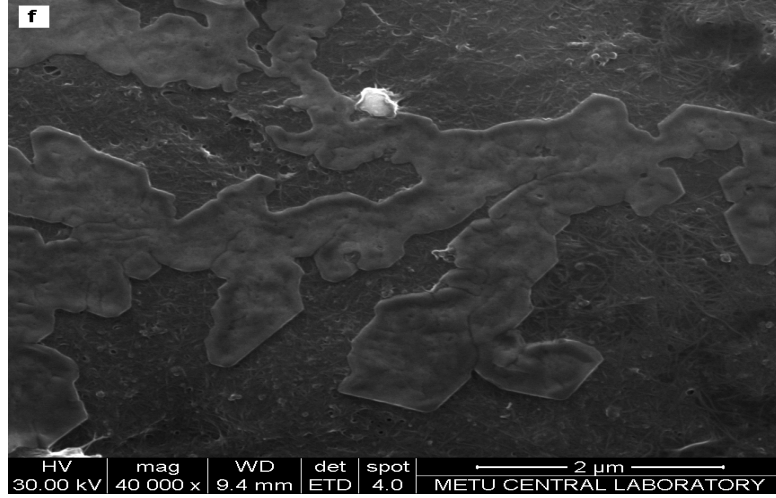
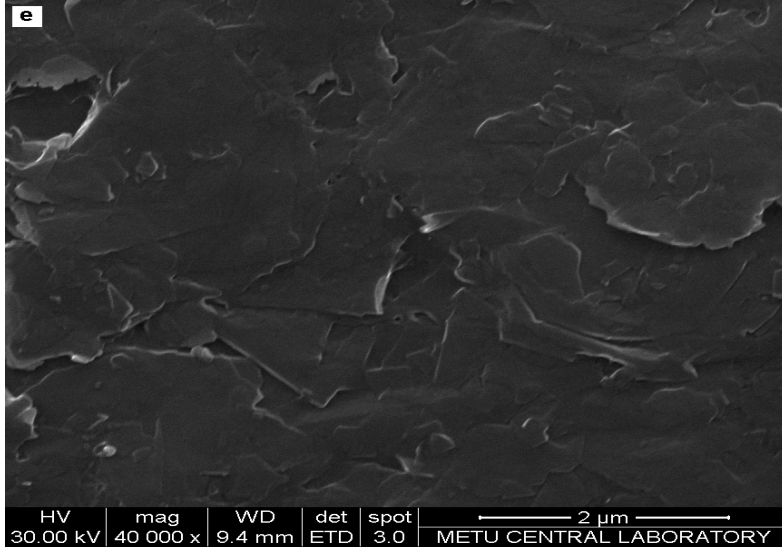
3.1. Tek duvarlı karbon nanotüplere (SWCNT) dayalı elektrokimyasal sensörlerin tasarımı ve uygulamalarına ilişkin bulgular:

3.1.1. SWCNT ile modifiye edilmiş tek kullanımlık grafit elektrotların hazırlanması ve PGE / SWCNT-PGE yüzeylerinin elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonuna ilişkin bulgular:

Yöntem, **2.4.1** ve **2.4.2**'de anlatıldığı gibi yapıldı. PGE ve SWCNT-PGE yüzeylerinin SEM ile karakterizasyonunda elde edilen görüntüler, şekil 10'da gösterildi.







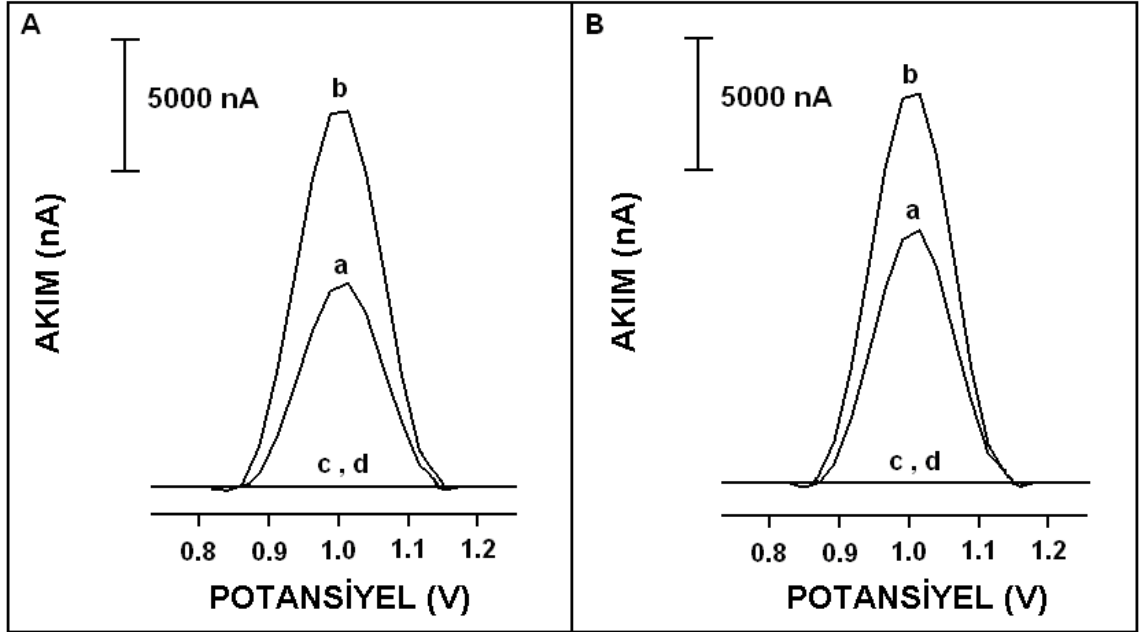
Şekil 10: Hızlandırma potansiyeli 30,0 KV ve 400 μm , 50 μm ve 2 μm gibi farklı çözünürlük değerlerinde alınmış SEM görüntüleri; PGE (a,c,e) ve SWCNT modifiye edilmiş PGE (b,d,f).

3.1.2. SWCNT yüzeyine DNA immobilizasyonuna ilişkin bulgular:

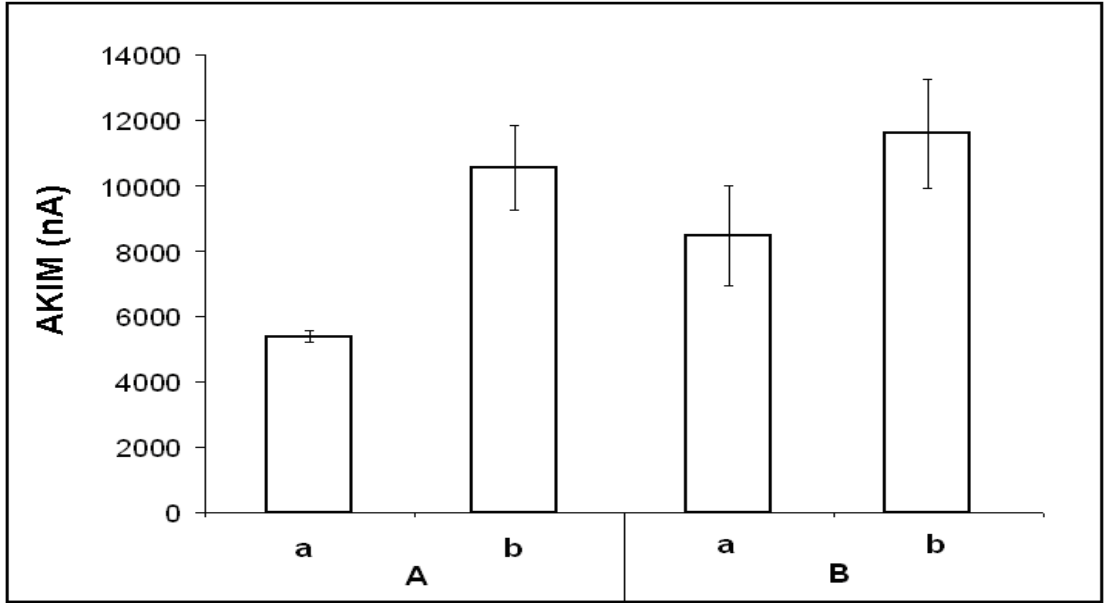
Yöntem, 2.4.3'de anlatıldığı gibi yapıldı.

3.1.2.1. CNT modifikasyonu öncesinde kullanılan grafit elektrotların yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem 2.4.3.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. CNT modifikasyonu öncesinde kullanılan grafit elektrotların yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisi incelendi. Yüzeyine DNA immobilize edilmiş SWCNT-PGE'ler ile ölçülen guanin sinyalleri, yüzeyine DNA immobilize edilmiş CNT modifiye edilmemiş PGE'larda ölçülen sinyaller ile kıyaslandı. Elde edilen voltamogram ve histogram sırasıyla, şekil 11 ve şekil 12 'da gösterildi.



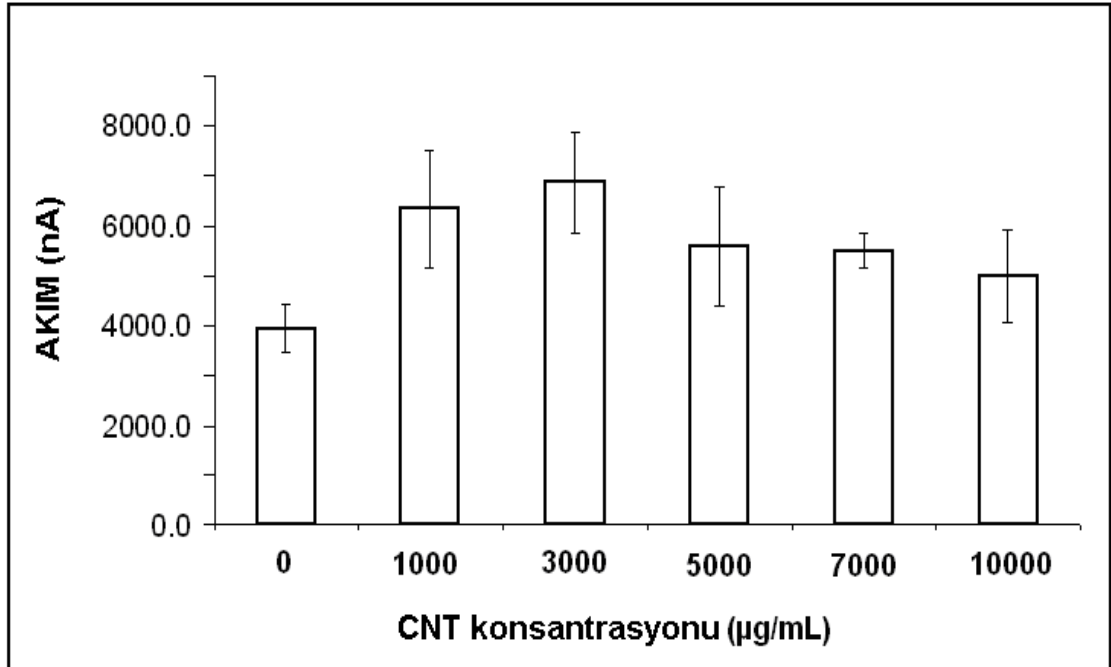
Şekil 11: Yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisi: **(A)** yüzeyi aktive edilmemiş PGE ve **(B)** Yüzeyi aktive edilmiş PGE ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar; 100 µg/ml dsDNA varlığında **(a)** PGE, **(b)** CNT-PGE ile ölçülen guanin sinyalleri, **(c)** elektrot yüzeyinde sadece CNT varken (DNA yokken, kontrol deneyi) ve **(d)** CNT ve DNA yokken (kontrol deneyi).



Şekil 12: Yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisi: **(A)** yüzeyi aktive edilmemiş PGE ve **(B)** Yüzeyi aktive edilmiş PGE ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren histogramlar; 100 µg/ml dsDNA varlığında **(a)** PGE, **(b)** CNT-PGE ile ölçülen guanin sinyalleri.

3.1.2.2. CNT konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:

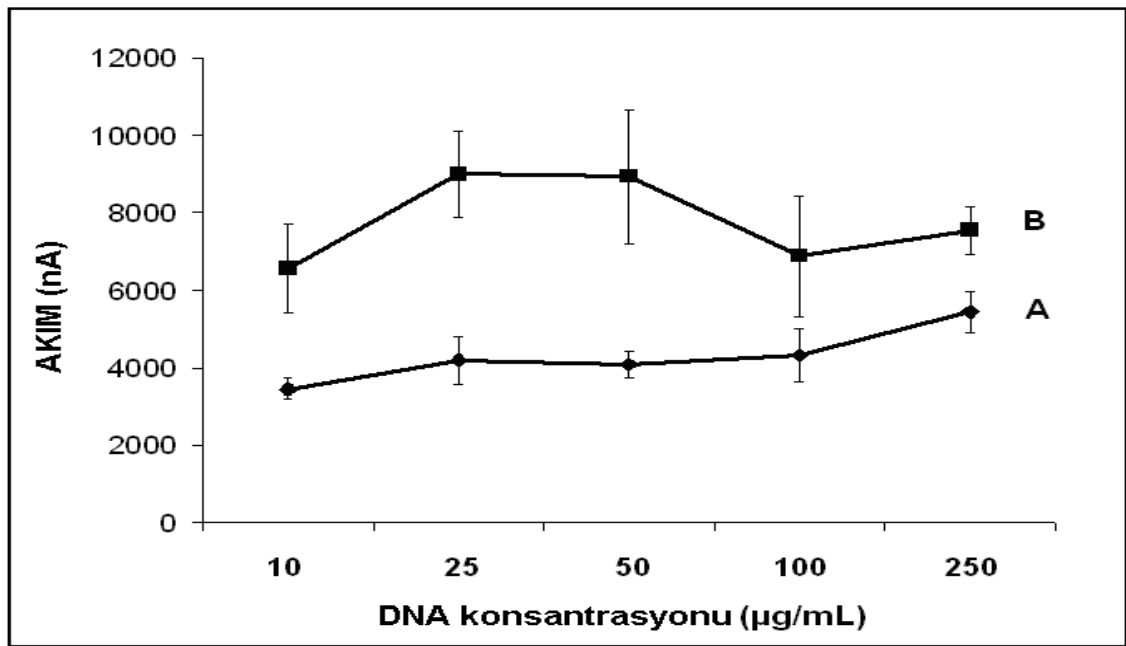
Yöntem **2.4.3.2’de** anlatıldığı gibi yapıldı. Farklı CNT konsantrasyonlarında hazırlanmış CNT-PGE’lerin yüzeyine 100 µg/ml dsDNA immobilize edildikten sonra ölçülen sinyaller kıyaslandı. Elde edilen histogram, şekil 13’de gösterildi.



Şekil 13: CNT konsantrasyonunun yanıtı olan etkisi: PGE yüzeyine farklı konsantrasyonlardaki CNT’nin modifikasyonu ve 100 µg/ml dsDNA’nın elektrot yüzeyine immobilizasyonu sonucunda ölçülen guanin sinyallerini gösteren histogramlar.

3.1.2.3. DNA konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem **2.4.3.3'de** anlatıldığı gibi yapıldı. Yüzeylerine farklı konsantrasyonlarda dsDNA immobilize edilmiş CNT-PGE'ler ile ölçülen sinyaller kıyaslandı. Elde edilen grafikler, şekil 14'de gösterildi.



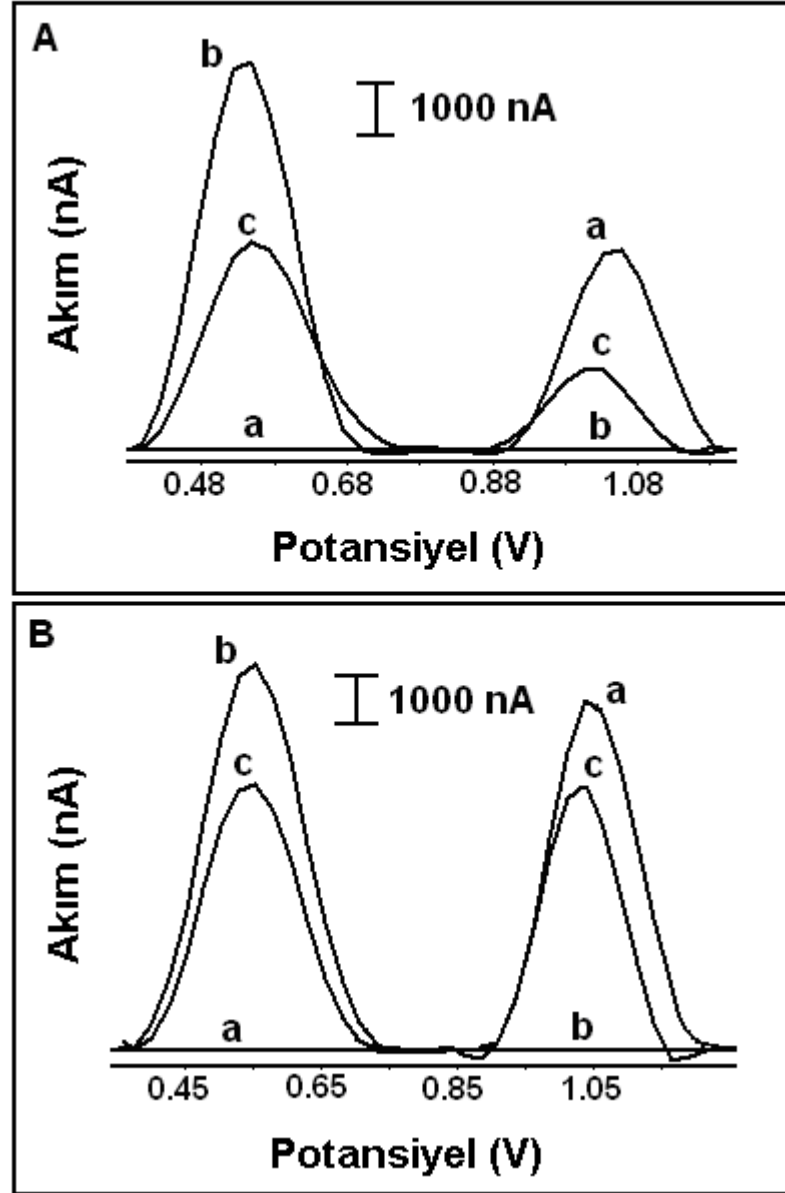
Şekil 14: DNA konsantrasyonunun yanıtı olan etkisi: **(A)** PGE ve **(B)** CNT-PGE yüzeyine farklı konsantrasyonlardaki DNA'nın immobilizasyonu sonrasında ölçülen guanin sinyallerini gösteren grafikler.

3.2. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarla ilaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak voltametrik yöntemle algılanmasına ilişkin bulgular:

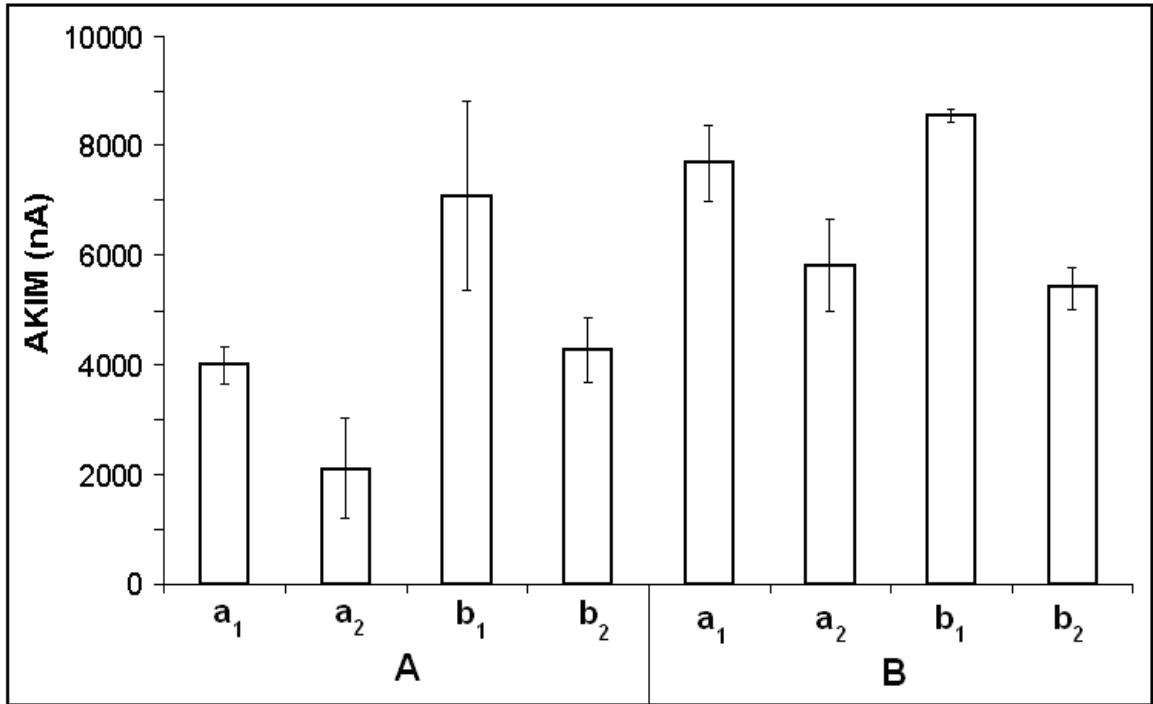
3.2.1. DNA immobilize edilmiş PGE / SWCNT-PGE'lerle DNR-DNA etkileşmesinin DNR ve guanin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular:

Daunorubisin (DNR)-DNA etkileşiminin algılanmasına yönelik çalışmalar, PGE ve CNT-PGE ile gerçekleştirildi ve yöntem, **2.4.4.1'de** anlatıldığı gibi yapıldı. Öncelikle DNR ve DNA etkileşimi, farklı DNA ve DNR konsantrasyonlarında, PGE kullanılarak ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerindeki değişim üzerinden araştırıldı (gösterilmedi). Optimum koşulların 5 μ M DNR 'nin 50 μ g/mL dsDNA ile 30 dakika etkileşim süresi sonrasında elde edildiği saptandı.

DNR-DNA etkileşimi öncesi ve sonrasında PGE ve CNT-PGE kullanılarak ölçülen sinyalleri gösteren voltamogram ve histogram sırasıyla, şekil 15 ve 16'da gösterildi.



Şekil 15: 5 μ M DNR'nin 50 μ g/mL dsDNA ile elektrot yüzeyinde etkileşimi öncesi ve sonrasında ölçülen sinyalleri gösteren voltamogramlar: **(A)** PGE ve **(B)** SWCNT-PGE. Etkileşim öncesinde **(a)** ortamda sadece DNA varken ölçülen guanin sinyali, **(b)** sadece DNR varken ölçülen DNR sinyali, ve etkileşim sonrasında ölçülen **(c)** DNR ve guanin sinyalleri.



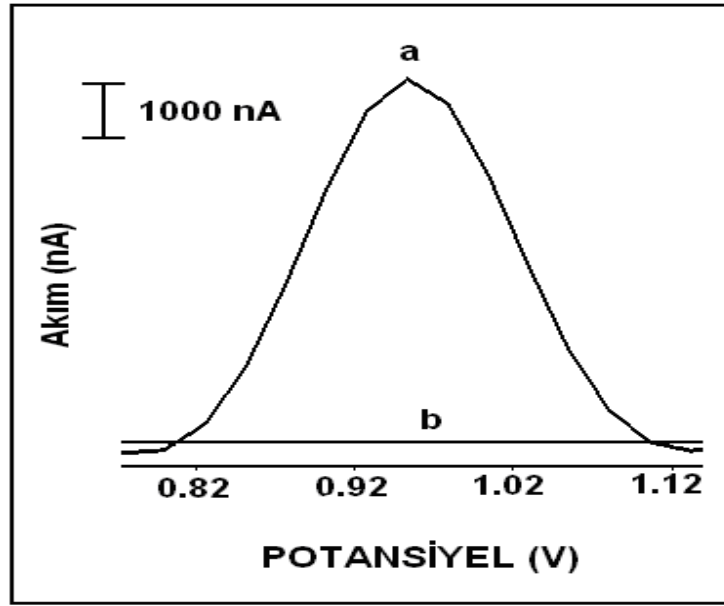
Şekil 16: 5 μ M DNR'nin 50 μ g/mL dsDNA ile elektrot yüzeyinde etkileşimi öncesi ve sonrasında ölçülen sinyalleri gösteren histogramlar: **(A)** PGE ve **(B)** SWCNT-PGE. Etkileşim öncesinde ölçülen (**a₁**) guanin sinyali, (**b₁**) DNR sinyali, ve etkileşim sonrasında ölçülen (**a₂**) guanin sinyali, (**b₂**) DNR sinyali.

3.3. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarda HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal olarak voltametrik yöntemle algılanmasına ilişkin bulgular:

Yöntem **2.4.5'de** anlatıldığı gibi yapıldı. Öncelikle, SWCNT modifiye edilmiş hibridizasyon sensörünün tasarımında optimum deneysel koşulların sağlanması amacıyla; prob DNA konsantrasyonu, hibridizasyon zamanı, hedef DNA konsantrasyonu gibi deneysel parametrelerdeki farklılığın sensörün yanıtına olan etkisi incelendi.

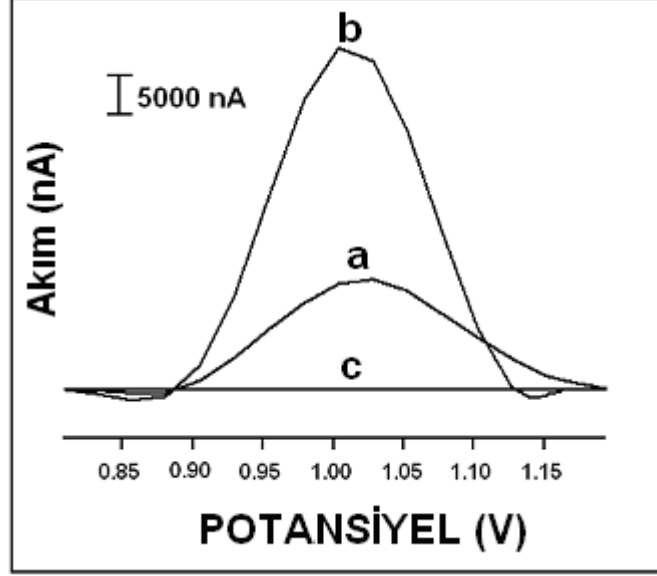
3.3.1. SWCNT-PGE yüzeyine amino ile işaretlenmiş kısa DNA dizisinin tutturulması ve DNA'nın elektrokimyasal tayinine ilişkin bulgular:

Amino işaretli ve 13 guanin içeren kısa DNA dizisinin SWCNT-PGE yüzeyine doğrudan ya da kovalent bağlanma çözeltisi yardımıyla tutturulmasına karar vermek amacıyla, yöntem **2.4.5.1.'de** anlatıldığı gibi yapıldı ve sadece kovalent bağlanma çözeltisi varlığında elde edilen voltamogram şekil 17'de gösterildi.



Şekil 17: (a) Kovalent bağlanma çözeltisi varlığında ve DNA yokluğunda SWCNT-PGE ile elde edilen sinyal (b) sadece ABS (kontrol).

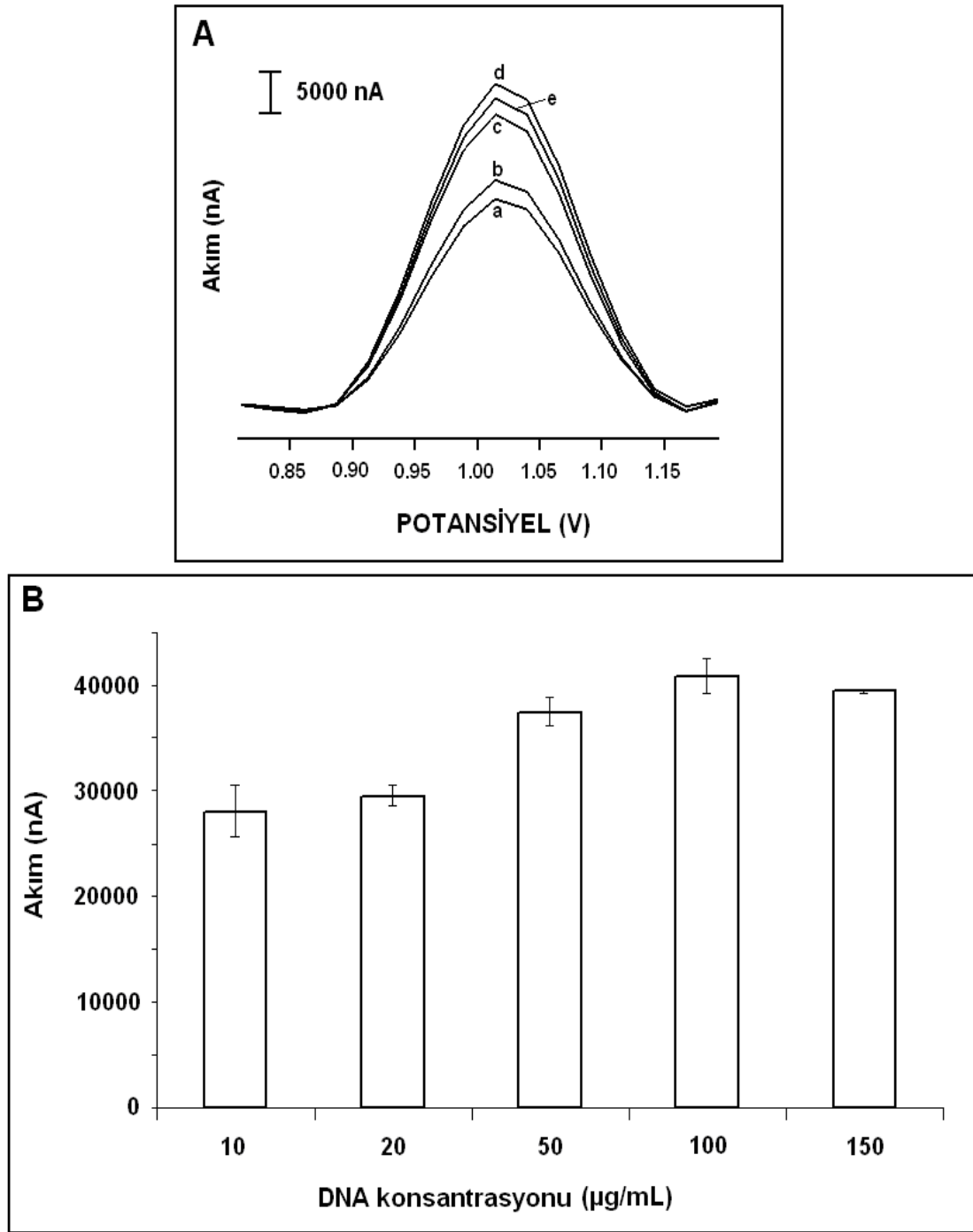
Amino işaretli kısa DNA dizisinin karboksil gruplarla zenginleştirilmiş SWCNT-PGE yüzeyine doğrudan tutturulmasıyla elde edilen voltamogram şekil 18'de gösterildi.



Şekil 18: (a) Yüzeyine 100 $\mu\text{g/mL}$ amino işaretli DNA prob immobilize edilmiş PGE ile ölçülen guanin sinyali, (b) Yüzeyine 100 $\mu\text{g/mL}$ amino işaretli DNA prob immobilize edilmiş SWCNT-PGE ile ölçülen guanin sinyali, ve (c) sadece ABS sinyali (kontrol).

3.3.2. SWCNT-PGE yüzeyine tutturulan amino ile işaretlenmiş DNA prob konsantrasyon değişiminin guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular:

Yöntem 2.4.5.2.'de anlatıldığı gibi yapıldı. Optimum prob konsantrasyonu tayini için yapılan çalışmada, 13 guanin içeren amino ile işaretlenmiş kısa DNA dizisi kullanıldı. Farklı prob konsantrasyonlarında elde edilen guanin yükseltgenme sinyalleri incelendi ve elde edilen voltamogram ve histogram şekil 19A ve 19B'de gösterildi.



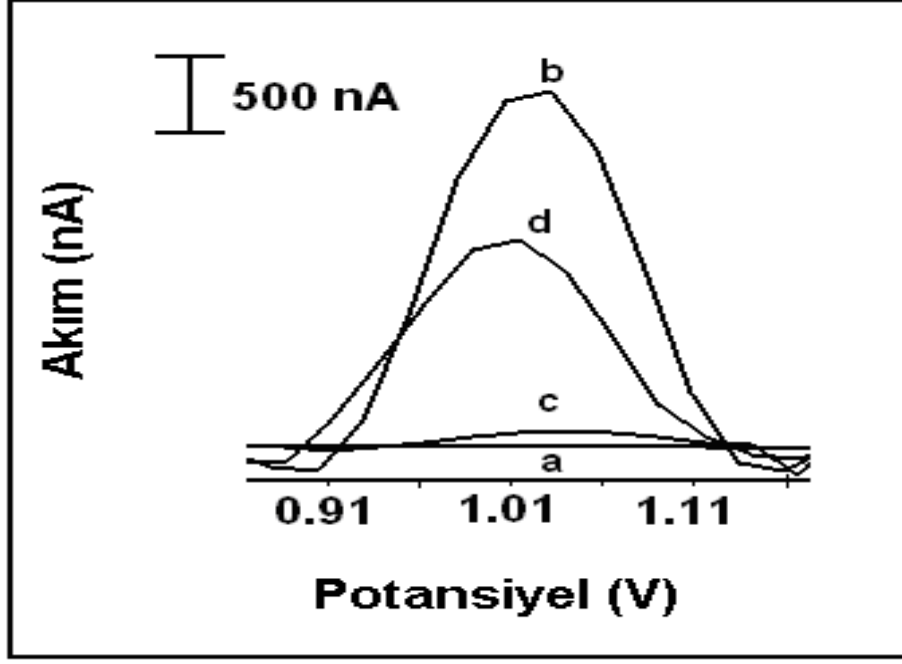
Şekil 19: (a) 10 (b) 20, (c) 50, (d) 100 (e) 150 $\mu\text{g/mL}$ gibi farklı konsantrasyonlarda amino işaretli DNA prob dizisi kullanılarak DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) ve histogramlar (B).

3.3.3. Hibridizasyon zamanının guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular:

Yöntem **2.4.5.3'de** anlatıldığı gibi yapıldı. CNT-PGE yüzeyinde HBV prob ile hedefi arasında gerçekleşen hibridizasyon basamağında, 15 dakika ile 1 saat arasında değişen farklı hibridizasyon süreleri uygulandı ve guanin sinyalleri ölçüldü (gösterilmedi). Tekrarlanabilirliği iyi olan en yüksek sonuçlar 1 saatlik hibridizasyon süresinde gözlemlendi.

3.3.4. CNT-PGE yüzeyinde HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayinine yönelik çalışmalarda elde edilen bulgular:

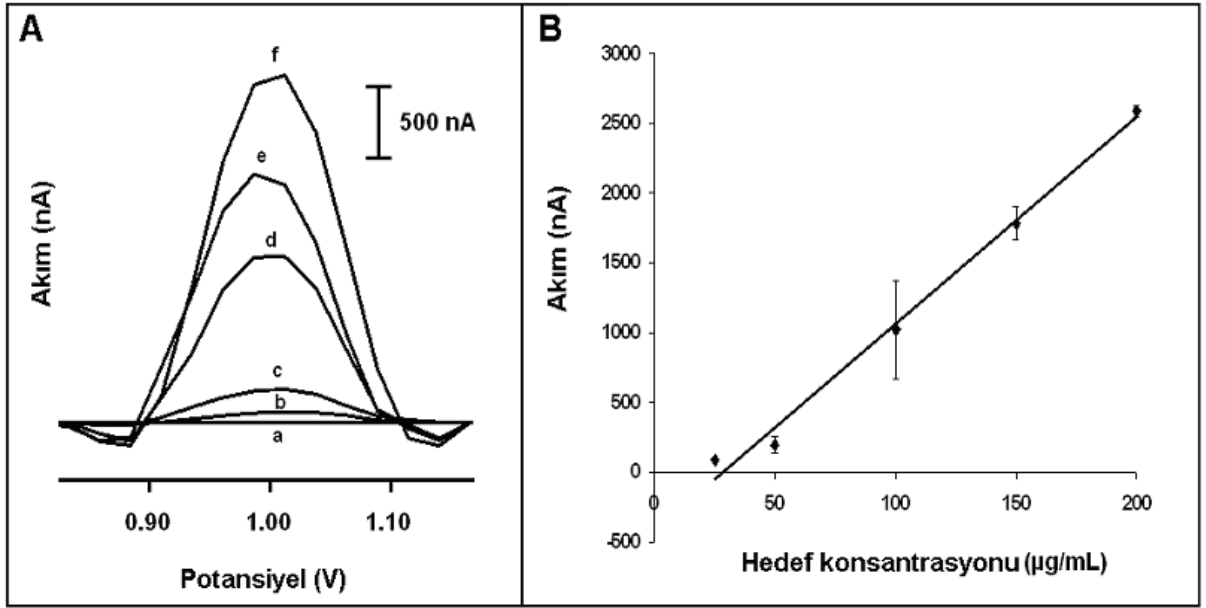
Yöntem **2.4.5.4'de** anlatıldığı gibi yapıldı. SWCNT-PGE yüzeyine tutturulmuş HBV prob ile hedef, veya NC, veya hedef ve MM içeren (1:1) karışım örneği arasında gerçekleşen hibridizasyonun tayini için, +1,0 V civarında gözlenen guanine ait yükseltgenme sinyalleri, voltamogram şekil 20'de gösterildi.



Şekil 20: Hibridizasyon varlığında ölçülen guanin sinyallerini gösteren DPV tekniği kullanılarak elde edilen voltamogramlar, **(a)** sadece HBV prob varlığında ölçülen sinyal; **(b)** HBV prob ile hedef dizinin hibridizasyonu; **(c)** HBV prob ile rastgele dizinin (NC) hibridizasyonu, ve **(d)** HBV prob ile hedef ve MM içeren (1:1) karışım örneğinde hedef ile hibridizasyonu sonucunda ölçülen sinyaller.

3.3.5. Hedef DNA konsantrasyonundaki değişimin hibridizasyon yanıtına olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular:

Yöntem **2.4.5.5'de** anlatıldığı gibi yapıldı. SWCNT-PGE yüzeyinde DNA hibridizasyon tayininde, ortamdaki hedef DNA konsantrasyonunun 25-200 $\mu\text{g/ml}$ aralığında arttırılarak, hedef DNA konsantrasyon değişiminin yanıtı olan etkisi incelendi. Elde edilen voltamogramlar ve kalibrasyon eğrisi, sırasıyla şekil 21'de gösterildi.



Şekil 21: Hedef DNA konsantrasyon değişiminin yanıtı olan etkisi: **(A)** HBV DNA Hibridizasyon varlığında CNT-PGE ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar, ve **(B)** kalibrasyon eğrisi. Hedef DNA konsantrasyonları; **(a)** 0, **(b)** 25, **(c)** 50, **(d)** 100, **(e)** 150, **(f)** 200 µg/mL.

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

4.1. Tek duvarlı karbon nanotüplere (CNT) dayalı elektrokimyasal sensörlerin tasarımı ve uygulamalarına ilişkin bulgular ile ilgili tartışma:

4.1.1. SWCNT ile modifiye edilmiş tek kullanımlık grafit elektrotların hazırlanması ve PGE / SWCNT-PGE yüzeylerinin elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyonuna ilişkin bulgular ile ilgili tartışma:

PGE ve yüzeyine SWCNT modifiye edilmiş PGE (SWCNT-PGE) elektrotlarının SEM ile karakterizasyonunda elde edilen görüntüler, Şekil 10'da gösterildi. 400 µm'den 2 µm'ye kadar değişen çözünürlük aralığında elde edilen görüntüler incelendiğinde, yüzeyine SWCNT modifiye edilmiş PGE (SWCNT-PGE) elektrot yüzeyinin homojen bir şekilde CNT ile kaplandığı görüldü. SWCNT-PGE elektrotların 2 µm çözünürlükte elde edilen SEM görüntüleri (şekil 10-f), yüzeyinde CNT modifikasyonu içermeyen elektrotların aynı çözünürlükte elde edilen görüntüler ile kıyaslandığında (şekil 10-e), elektrodun yüzeyinin tamamen karbon nanotüpler ile kaplanabildiğine karar verildi.

4.1.2. SWCNT yüzeyine DNA immobilizasyonuna ilişkin bulgular ile ilgili tartışma:

4.1.2.1. CNT modifikasyonu öncesinde kullanılan grafit elektrotların yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma:

Grafit elektrotların (PGE) yüzeyine CNT modifikasyonu öncesinde yapılan yüzey aktivasyonu işleminin elektrodun yanıtına etkisi incelendi. Elde edilen sonuçlar CNT ile modifiye edilmemiş elektrotların sonuçları ile kıyaslandığında

(şekil 11 ve 12), yüzey aktivasyonu yapılmış elektrotlarla ölçülen guanin sinyallerinde % 37, yüzey aktivasyonu yapılmamış elektrotlarla ölçülen guanin sinyallerinde ise % 95 oranında bir artış gözlemlendiği saptandı. Her iki grup elektrotla yapılan tekrarlanabilirlik çalışmasında (n=3), sırasıyla % bağıl standart sapma değerleri, % 12 ve % 14 olarak hesaplandı. Çalışmalarımızda kullanılan karbon nanotüplerin yüzeylerinde aktive edilmiş karboksil gruplarının mevcut olması sebebiyle, çalışmamızda yüzeyi aktive edilmemiş PGE'lerin tercih edilmesi, daha duyarlı ve daha tekrarlanabilir sonuçlar vermesi sebebiyle uygun görüldü. Çünkü, potansiyel kontrollü aktivasyon işlemi sonucunda PGE yüzeyinde karboksil ($-\text{COOH}$) gruplarının oluşması ve dolayısıyla, bir sonraki aşamada karboksil gruplarıyla zenginleştirilmiş CNT'nin elektrot yüzeyine verimli bağlanamaması muhtemeldir. Ayrıca kontrol amacıyla yapılan deneylerin sonuçlarına bakıldığında, ortamda CNT ve DNA yokluğunda, ya da sadece CNT varlığında, DPV tekniği kullanılarak DNA'nın elektroaktif bazı olan guanine ait ölçülen pik potansiyelinde, yani +1.0 V'da herhangi bir sinyalin gözlenmediği saptandı (şekil 11-c).

4.1.2.2. CNT konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma:

Şekil 13'de verilen histogramda, farklı konsantrasyonlarda CNT modifiye edilmiş elektrotlarda ölçülen guanin yükseltgenme sinyalleri gösterildi. CNT konsantrasyonundaki değişimin guanin sinyali üzerine etkisi incelendiğinde, 3000 $\mu\text{g/mL}$ CNT konsantrasyon değerine kadar guanin sinyalinde aşamalı şekilde bir artış olduğu, daha sonra artışın azalarak sabit kaldığı gözlemlendi. Dolayısıyla, optimum CNT konsantrasyonunun 3000 $\mu\text{g/mL}$ olduğuna karar verildi.

4.1.2.3. DNA konsantrasyonunun yanıtı olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma:

Şekil 14’de verilen histogramda, farklı konsantrasyonlarda DNA modifiye edilmiş PGE ve CNT modifiye edilmiş PGE’lerde ölçülen guanin yükseltgenme sinyalleri gösterildi. DNA konsantrasyonundaki değişimin her iki gruptaki elektrotlarla ölçülen guanin sinyali üzerine etkisi incelendiğinde, 25 µg/mL fsDNA konsantrasyon değerine kadar guanin sinyalinde aşamalı şekilde bir artış olduğu, daha sonra bu artışın giderek azaldığı ve sabit kaldığı gözlemlendi. Optimum çift sarmal DNA konsantrasyonunun 25 µg/mL olduğuna karar verildi.

4.2. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarla ilaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak voltametrik yöntemle algılanmasına ilişkin bulgular ile ilgili tartışma:

4.2.1. DNA immobilize edilmiş PGE / SWCNT-PGE’lerle DNR-DNA etkileşmesinin DNR ve guanin yükseltgenme sinyallerine olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular ile ilgili tartışma:

Şekil 15’de verilen DNR-DNA etkileşimi öncesi ve sonrasında ölçülen sinyalleri gösteren voltamogramlar incelendiğinde, DNR ve guanine ait yükseltgenme sinyallerinin sırasıyla, +0.55 V and +1.00 V’da ölçüldüğü görüldü. Grafit elektrodun yüzeyinin CNT modifikasyonu sonrasında ilaç ve nükleik asitlere geniş bir bağlanma yüzeyi sağladığı ve bu nedenle, CNT modifikasyonu olmayan elektrotlarla elde edilen sinyallere kıyasla, DNR ve guanin sinyallerinde sırasıyla % 21 ve % 92 oranında bir artış gözlemlendiği saptandı. Örneğin, DNR-DNA etkileşimi öncesinde PGE ve SWCNT-PGE elektrotlar için, 5 µM DNR konsantrasyonunda hesaplanan tayin sınırı (S/N=3) sırasıyla, 156 nM ve 125

nM iken, bu değerler etkileşim sonrasında DNA-PGE ve DNA-SWCNT-PGE elektrotlar için, sırasıyla, 278 nM ve 184 nM değerlerine yükseldiği görüldü.

Şekil 16'da DNR-DNA etkileşimi sonucunda sinyal değişimlerini gösteren histogram incelendiğinde, etkileşim sonrasında, DNR ve guanin sinyallerinde daha fazla bir azalmanın (sırasıyla, % 40 ve % 47 oranında) daha az tekrarlanabilir bir şekilde CNT modifiye edilmemiş elektrotlar ile saptandığı belirlendi. DNR-DNA etkileşiminin PGE, SWCNT-PGE ve diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak tayin edilmesine yönelik sonuçlar incelendiğinde (şekil 15 ve 16), karbon pastası elektrodu, dönen camı karbon elektrot gibi farklı elektrotlar ile sabit akımlı kronopotansiyometrik sıyırma ve dönüşümlü voltametri tekniklerini (24,147) kullanarak DNR-DNA etkileşiminin elektrokimyasal olarak incelendiği çalışmaların sonuçlarına paralel olduğu gözlemlendi. DNR ve guanin sinyallerindeki bu azalma, literatürdeki diğer çalışmaların sonuçlarına benzer olarak (24,69,147), DNR'nin çift sarmal DNA ile interkalasyonla etkileşiminin bir sonucu olup, bu molekülün yapısındaki yükseltgenmeye uygun grupların etkileşim sonrasında, redoks reaksiyonu için kısmen mevcut olması şeklinde açıklanabilir. Chu ve arkadaşları (24) tarafından yapılan etkileşim çalışmasında, 28-1000 µg/mL DNA konsantrasyon aralığında, DNR için güvenilirliği yüksek olan tayin sınırı aralığı 4,5-690,0 µM olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise ilaç-DNA etkileşiminin PGE ve SWCNT-PGE kullanılarak yapılan elektrokimyasal tayininde, 50 µg/mL DNA ile DNR için nanomolar seviyesinde daha düşük tayin sınırına tekrarlanabilir sonuçlarla ulaşılabildiği görülmektedir.

Literatürde çok duvarlı karbon nanotüp (22) ve tek duvarlı karbon nanotüp (51) modifiye camı karbon elektrotlarla (sırasıyla, MWCNT-GCE ve SWCNT-

GCE) yapılan çalışmalarıyla kıyaslandığında, çalışmamızda tek kullanımlık grafit elektrot kullanılmış olması, CNT modifiye elektrot hazırlanma aşamasının daha hızlı ve kolay olması, ayrıca MWCNT-GCE kullanılarak yapılan diğer bir çalışmaya kıyasla (44) daha az DNA materyali kullanılarak daha kısa sürede sonuç vermesi sensörümüze üstünlük kazandırmıştır.

4.3. DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarla HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal olarak voltametrik yöntemle algılanmasına ilişkin bulgular ile ilgili tartışma:

4.3.1. SWCNT-PGE yüzeyine amino ile işaretlenmiş kısa DNA dizisinin tutturulması ve DNA'nın elektrokimyasal tayinine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma:

DNA'nın SWCNT yüzeyine kovalent bağlayıcı ajan yardımıyla tutturulabilmesi araştırıldığında, ortamda henüz DNA yokken kovalent bağlanma çözeltisine ait +0,959 V civarında gözlenen yaklaşık 6900 nA civarında yüksek bir sinyal gözlemlendi (şekil 17-a). SWCNT yüzeyinde kovalent bağlama çözeltisinde gözlenen sinyal ile DNA'dan gelen guanin sinyalinin pik potansiyellerinin çakışması sebebiyle, amino işaretli DNA'nın elektrot yüzeyine tutturulması aşamasında ekstra bir kovalent bağlayıcı ajan kullanılmamasına karar verildi.

13 guanin bazı içeren amino ile işaretlenmiş kısa DNA dizisi, karboksil grupları ile zenginleştirilmiş olan SWCNT modifiye elektrot yüzeyine herhangi bir kovalent bağlayıcı ajan kullanılmaksızın tutturuldu ve guanin sinyali ölçüldü (şekil 18-a).

4.3.2. SWCNT-PGE yüzeyine tutturulan amino ile işaretlenmiş DNA prob konsantrasyon değişiminin guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular ile ilgili tartışma:

DNA immobilize edilmiş CNT modifiye grafit elektrotlarda HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal olarak voltametrik yöntemle algılanmasına yönelik çalışmalar, optimum deneysel koşullarda yapıldı.

Şekil 19'da gösterilen voltamogramda, farklı prob konsantrasyonlarında elde edilen guanin sinyalleri incelendiğinde, 100 µg/mL prob konsantrasyon değerine kadar guanin sinyalinde aşamalı şekilde bir artış olduğu, daha sonra artışın azalarak sabit kaldığı gözlemlendi ve optimum prob konsantrasyonunun 100 µg/mL olduğuna karar verildi.

Ayrıca bu çalışmada DNA'nın elektrokimyasal algılanmasına yönelik SWCNT modifiye elektrotlar kullanılarak, diğer nanomalzemelere dayalı elektrotlara (15,44,53,146,156) kıyasla, tekrarlanabilirliği daha iyi sonuçlar elde edildi. Karbon nanotüpler ile kaplı tek kullanımlık elektrotlarla daha tekrarlanabilir ve daha yüksek duyarlılığa sahip sonuçların elde edilmesi sonucunda, bu elektrotların dizi seçimli DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayininde kullanılmasına oldukça elverişli olduğuna karar verildi.

4.3.3. Hibridizasyon zamanının guanin yükseltgenme sinyaline olan etkisinin incelenmesinde elde edilen bulgular ile ilgili tartışma:

Hibridizasyon varlığında tekrarlanabilirliği en iyi olan sonuçlar, 1 saatlik hibridizasyon süresinde gözlemlendiği için seçimlilik çalışması ve artan hedef konsantrasyonlarında elde edilen sinyal kıyaslamaları için optimum hibridizasyon süresi olarak 1 saat kullanıldı.

4.3.4.CNT-PGE yüzeyinde HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayinine yönelik çalışmalarda elde edilen bulgular ile ilgili tartışma:

SWCNT-PGE yüzeyine tutturulmuş HBV prob ile hedef veya NC veya hedef ve MM içeren (1:1) karışım örneği arasında gerçekleşen hibridizasyonun tayini için, +1,0 V civarında gözlenen guanine ait yükseltgenme sinyalleri voltamogram şekil 20'de gösterildi. HBV'yi temsil eden prob dizisinin guanin bazı içermemesi nedeniyle, sadece prob içeren örnekte alınan ölçümde, +1,0 V'da guanin yükseltgenme sinyali gözlenmedi (şekil 20-a). Dolayısıyla, HBV prob dizisinin guanin bazı içermemesine bağlı olarak guanin bazının sentetik analogu ve pahalı bir işaretleyici olan inosin bazının prob dizisinde yer almaması, geliştirilen sensör teknolojisine avantaj getirmiştir. Çalışmada kullanılan temsili DNA dizisi HBV probun inosin veya metal nanopartikül gibi diğer ajanlarla işaretlenmesine gerek kalmadan (103,142,145,151) indikatörsüz sistemde duyarlı bir şekilde DNA hibridizasyon tayinini mümkün kılacak daha hızlı bir sensör teknolojisi geliştirildi. Ayrıca karbon nanotüplere dayalı sensör teknolojisi ile, $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, metilen mavisi, ekinomisin gibi ekstra hibridizasyon indikatörleri (40,65,71,95,161) kullanılmaksızın yüksek duyarlılıkta DNA hibridizasyonunun tayin edilebileceği bu çalışmada gösterilmiştir.

Yüzeyine amino ile işaretlenmiş HBV prob immobilize edilmiş SWCNT-PGE ile hibridizasyon seçimliliği araştırıldığında, ortamda hedef dizi yerine NC içeren ortamda, prob sinyaline yakın bir sinyal gözlemlendi (şekil 20-c). Prob ile karışım çözeltisindeki hedefin hibridizasyonunda elde edilen sinyal, hibrit sinyali (şekil 20-b) ile kıyaslandığında, yaklaşık % 40 oranında daha düşük guanin

sinyali gözlemlendi (şekil 20-d). Böylece SWCNT-PGE'ye dayalı HBV sensörü ile hedef DNA dizisinin seçicilikle algılanabildiği elektrokimyasal olarak gösterildi.

4.3.5. Hedef DNA konsantrasyonundaki değişimin hibridizasyon yanıtına olan etkisinin incelenmesine ilişkin bulgular ile ilgili tartışma:

Farklı hedef konsantrasyonlarında SWCNT-PGE yüzeyinde gerçekleşen HBV hibridizasyona ait ölçülen guanin sinyalleri ve kalibrasyon eğrisi, şekil 21'de gösterildi. 25 - 200 µg/mL hedef konsantrasyonları arasında ve 1 saat hibridizasyon süresi sonrasında ölçülen guanin sinyallerinde düzgün bir artış gözlemlendi. Hedef dizi konsantrasyonu 200 µg/mL 'den daha yüksek bir konsantrasyona arttırıldığı zaman, elektrot yüzeyindeki HBV prob ile target arasında verimli bir hibridizasyon olayının gerçekleşemediği ve bu yüzden sinyalde bir artışın gözlenmediği saptandı (gösterilmedi).

Şekil 21'de gösterilen ve doğrusal olan kalibrasyon eğrisinden ($y=14.805x-419.96$ ve $R^2=0.9916$), tayin sınırı 210 nM olarak bulundu (90).

Çalışmamızda HBV DNA'nın SWCNT-PGE sensörüyle tayinine ilişkin sonuçlar, literatürde mevcut çalışmaların sonuçları ile kıyaslandığında (39,40,47), herhangi bir elektroaktif indikatör kullanılmaksızın, daha kısa sürede, daha düşük tayin sınırında, seçimli ve güvenilir bir şekilde, elektrokimyasal DNA hibridizasyon analizlerinin geliştirilen sensörlerle yapılabileceği gösterildi.

BÖLÜM V

SONUÇ ve ÖNERİLER

CNT modifiye edilmiş tek kullanımlık PGE yüzeyine pasif adsorbsiyon yöntemiyle DNA immobilizasyonu ve elektrokimyasal tayininin basit ve hızlı bir şekilde yapılabilmesi, DNA analizlerinin daha duyarlı bir şekilde ve tekrarlanabilir sonuçlar elde ederek gerçekleştirilmesini mümkün kılmaktadır.

DNA analizlerine yönelik sensör teknolojisine dayalı çalışmalarımızın birinci bölümünde, kalem grafit elektrotların (PGE) tek duvarlı ve karboksil gruplarınca zengin karbon nanotüpler (SWCNT) ile modifikasyonu ve geliştirilen bu elektrotların (SWCNT-PGE) DNA analizlerine yönelik optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. SWCNT varlığında ve yokluğunda hazırlanan tek kullanımlık kalem grafit elektrotların mikroskobik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) tekniği ile, elektrokimyasal davranışları ise diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak incelenmiştir. SWCNT-PGE yüzeyine immobilize edilmiş DNA'nın elektrokimyasal tayini, DNA'nın elektroaktif bazı olan guaninin yükseltgenme sinyalinin DPV tekniği ile ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, CNT konsantrasyonu, DNA konsantrasyonundaki değişimin ve yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisi araştırılmış ve karbon nanotüplere dayalı geliştirilen sensör teknolojisi ile daha tekrarlanabilir ve daha duyarlı sonuçlar elde edilmiştir. Literatürde çok duvarlı karbon nanotüp (22) ve tek duvarlı karbon nanotüp (51) modifiye camı karbon elektrotlarla (sırasıyla, MWCNT-GCE ve SWCNT-GCE) yapılan çalışmalarla kıyaslandığında, çalışmamızda tek kullanımlık grafit elektrot kullanılmış olması, CNT modifiye elektrot hazırlanma aşamasının daha hızlı ve kolay olması, ayrıca MWCNT-GCE kullanılarak yapılan diğer bir çalışmaya

kıyasla (44) daha az DNA materyali kullanılarak daha kısa sürede sonuç vermesi sensörümüze üstünlük kazandırmıştır.

Geliştirilen SWCNT-PGE ve PGE kullanılarak, antikanser bir ilaç olan Daunorubisin (DNR)'nin DNA ile interkalasyonu öncesinde ve sonrasında, aynı voltametrik skalada hem DNR hem de guaninin yükseltgenme sinyalleri ölçülmüş ve DNR'nin DNA ile etkileşmesi sonucunda her iki sinyalde de azalma görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, karbon pastası elektrodu ve dönen camı karbon elektrot gibi farklı elektrotlar ile sabit akımlı kronopotansiyometrik sıyırma ve dönüşümlü voltametri tekniklerini kullanarak (24,147), DNR-DNA etkileşiminin elektrokimyasal olarak incelendiği çalışmaların sonuçlarına paraleldir. DNR ve guanin sinyallerindeki bu azalma, literatürdeki diğer çalışmaların sonuçlarına benzer olarak (24,69,147), DNR'nin çift sarmal DNA ile interkalasyonla etkileşiminin bir sonucu olup, bu molekülün yapısındaki yükseltgenmeye uygun grupların etkileşim sonrasında, redoks reaksiyonu için kısmen mevcut olması şeklinde açıklanabilir.

Chu ve arkadaşları (24) tarafından yapılan etkileşim çalışmasında, 28-1000 µg/mL DNA konsantrasyon aralığında, DNR için güvenilirliği yüksek olan tayin sınırı aralığı 4,5-690 µM olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda ilaç-DNA etkileşiminin PGE ve SWCNT-PGE kullanılarak yapılan elektrokimyasal tayininde, 50 µg/mL DNA ile DNR için nanomolar seviyesinde daha düşük tayin sınırına tekrarlanabilir sonuçlarla ulaşılmıştır.

Karbon nanotüpler kullanılarak geliştirilen elektrokimyasal sensörlerin DNA analizi ve ilaç-DNA etkileşimi sonuçlarına bakıldığında, geliştirilen bu sensörün diğer komplike ve zaman alıcı yüzey modifikasyonlarını elimine edebileceği ve dolayısıyla daha duyarlı, güvenilir ve seçimli bir şekilde DNA analizinin

elektrokimyasal tanımlamasına olanak verebileceği görülmüştür. Ayrıca, tasarımılanan CNT-PGE elektrotların sadece ilaç ve DNA analizlerinde değil, yüksek duyarlılıkta toksik ajan ve diğer bazı biyomoleküllerin analizlerinde de güvenle kullanılabileceği öngörülebilmektedir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde, geliştirilen karbon nanotüp modifiye grafit elektrotlar (SWCNT-PGE) kullanılarak DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayini, herhangi bir elektroaktif indikatör kullanılmaksızın gerçekleştirilmiştir. Elektrot yüzeyine optimum konsantrasyondaki DNA'nın immobilizasyonu incelemek için, amino ile işaretlenmiş DNA prob konsantrasyon farklılığının yanıt üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Dizi seçimli DNA hibridizasyonunun karbon nanotüplere dayalı elektrokimyasal sensör teknolojisine yönelik bir uygulamasını göstermek amacıyla, Hepatit B virüsünü (HBV) temsil eden spesifik kısa DNA dizileri (oligonükleotitler) kullanılmıştır. SWCNT-PGE yüzeyinde gerçekleştirilen HBV DNA hibridizasyonunun tayini, HBV prob ile hedef dizi arasındaki hibridizasyon sonucunda guanin yükseltgenme sinyalinin, DPV tekniği ile ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, farklı konsantrasyonlardaki DNA probun yanıtı etkisi ve hibridizasyon süresi değişkenliği ile tayin sınırı ve tekrarlanabilirlik gibi deneysel parametreler incelenmiştir. DNA hibridizasyonunun seçimliliği, rastgele dizi (NC) ve bir bazı hedeften farklı dizilerin (MM) kullanılmasıyla araştırılmıştır. HBV prob dizisinin guanin bazı içermemesine bağlı olarak guanin bazının sentetik analogu ve pahalı bir işaretleyici olan inosin bazının prob dizisinde yer almaması, geliştirilen sensör teknolojisine avantaj getirmiştir. Böylece kullandığımız HBV probun inosin veya metal nanopartikül gibi diğer ajanlarla işaretlenmesine gerek kalmadan (103,142,145,151) indikatörsüz sistemde duyarlı bir şekilde DNA

hibridizasyon tayinini mümkün kılan daha hızlı bir sensör teknolojisi, çalışmamızda geliştirilmiştir. Örneğin, çok duvarlı karbon nanotüplere dayalı perde baskılı elektrotlarla yapılan indikatörsüz HBV DNA analizine (68) kıyasla, çalışmamızda geliştirilen SWCNT-PGE'ye dayalı sensör teknolojisinin çok daha az bir maliyetle hazırlanabileceği de saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada, karbon nanotüplere dayalı sensör teknolojisi ile, $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, metilen mavisi, ekinomisin gibi ekstra hibridizasyon indikatörleri (40,65,71,95,161) kullanılmaksızın yüksek duyarlılıkta DNA hibridizasyonun tayin edilebileceği de gösterilmiştir.

Karbon nanotüpler kullanılarak geliştirilen tek kullanımlık elektrokimyasal sensörlerin daha duyarlı, güvenilir ve seçimli bir şekilde DNA analizinin elektrokimyasal tanımlamasını olanaklı kıldığı görülmüştür.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile aynı zamanda gelecekte DNA'ya hedefli yeni bileşiklerin DNA ile etkileşim türünü, elektrokimyasal sensör teknolojisi ile belirleyebilmek amaçlanmaktadır. Böylece, nanomalzemeler kullanılarak geliştirilen sensörlerin daha küçük boyutlarda tasarımlanabilmesi, DNA çip teknolojisine uyarlanabilmesi, düşük maliyetli, hızlı ve daha duyarlı bir şekilde yanıt verebilecek çip tasarımlarına yönelik sensörlerin geliştirilebileceği de ümit edilmektedir.

Sonuç olarak, tek duvarlı karbon nanotüpler kullanılarak geliştirilen elektrokimyasal sensörlerin ilaç-DNA etkileşimi ve dizi seçimli DNA hibridizasyonu tayinine yönelik sonuçlarına bakıldığında, geliştirilen bu sensörlerin diğer komplike ve zaman alıcı yüzey modifikasyonlarını elimine edebileceği ve dolayısıyla daha duyarlı, güvenilir ve seçimli bir şekilde DNA analizlerine imkan verebileceği görülmüştür.

BÖLÜM VI

ÖZET

İlaç-DNA Etkileşimi ve DNA Analizleri İçin Elektrokimyasal Sensörlerin Geliştirilmesi

Son yıllarda kullanımı oldukça yaygınlaşmış olan elektrokimyasal sensör teknolojisinde, nanoteknolojiye dayalı malzemelerin kullanımına artan bir ilgi bulunmaktadır.

Çalışmamızın ilk bölümünde, kalem grafit elektrotların (PGE) tek duvarlı ve karboksil gruplarınca zengin karbon nanotüpler (SWCNT) ile modifikasyonu ve geliştirilen bu elektrotların (SWCNT-PGE) DNA analizlerine yönelik optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. SWCNT varlığında ve yokluğunda hazırlanan tek kullanımlık kalem grafit elektrotların mikroskobik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) tekniği ile, elektrokimyasal davranışları ise diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak incelenmiştir. SWCNT ve DNA konsantrasyonundaki değişim ile elektrot yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkisi araştırılmıştır. Antikanser bir ilaç olan Daunorubisin (DNR)'nin DNA ile etkileşmesi, DPV tekniği ile PGE ve SWCNT-PGE kullanılarak elektrokimyasal olarak incelenmiş ve tayin sınırı, tekrarlanabilirlik gibi deneysel parametrelerde araştırılmıştır.

Çalışmamızın ikinci bölümünde, Hepatit B virüsüne (HBV) dayalı DNA hibridizasyonunun indikatörsüz tayini, SWCNT-PGE ve DPV tekniği kullanılarak, guanin sinyalinin ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. DNA prob konsantrasyonu ve hibridizasyon süresi farklılığının yanıtı olan etkisi, tayin sınırı, tekrarlanabilirlik gibi deneysel parametreler incelenmiştir. Hibridizasyondaki seçicilik, rastgele dizi (NC) ve bir bazı hedeften farklı dizilerin (MM) kullanılmasıyla araştırılmıştır.

CNT modifiye edilmiş tek kullanımlık PGE yüzeyine pasif adsorbsiyon yöntemiyle DNA immobilizasyonu ve elektrokimyasal tayininin basit ve hızlı bir şekilde yapılabilmesi, DNA analizlerinin daha duyarlı bir şekilde ve tekrarlanabilir sonuçlar elde ederek gerçekleştirilmesini mümkün kılmaktadır. İlaç-DNA etkileşimi ve dizi seçimli DNA hibridizasyonu analiz sonuçlarına bakıldığında, karbon nanotüpler kullanılarak geliştirilen tek kullanımlık sensörlerin daha düşük maliyetle birlikte kolay uygulanabilirliğinin yanı sıra, daha duyarlı sonuçların seçimli bir şekilde elektrokimyasal olarak algılanmasına imkan verebileceği görülmüştür.

ABSTRACT

The Development of Electrochemical Sensors for

Drug-DNA Interaction and DNA Analysis

There has been a growing interest to use the materials based on nanotechnology in electrochemical sensor technology that has been commonly used in recent years.

In the first part of our study, the modification of pencil graphite electrode (PGE) by carboxylated single walled carbon nanotubes (SWCNT) and the optimization of these electrodes was performed for DNA analysis. In the absence and presence of SWCNT, the microscopic characterization of disposable pencil graphite electrodes was investigated by scanning electron microscopy (SEM), and their electrochemical behaviours were studied by using differential pulse voltammetry (DPV) technique. The effect of the changes at the concentration of SWCNT and DNA was examined besides the pretreatment procedure for electrode surface. The interaction of the anticancer drug Daunorubicin (DNR) with DNA was investigated electrochemically by using DPV technique with PGE and SWCNT, and the experimental parameters, such as; detection limit, reproducibility were also explored.

In the second part of our study, the detection of DNA hybridization related to Hepatitis B virus (HBV) was performed measuring the guanine signal by using SWCNT-PGE and DPV technique. The experimental parameters, such as; the effect of different DNA probe concentration and hybridization time to the response, detection limit, reproducibility were studied. The selectivity in hybridization was explored by using non-complementary (NC) and single-base mismatch (MM) sequences.

Since DNA immobilization onto the surface of CNT modified single-use PGE by passive adsorption and its electrochemical detection can be performed easily and quickly, it is possible to carry out DNA analysis by obtaining reproducible results in higher sensitivity. When examining into the analysis of the results for drug-DNA interaction and sequence specific DNA hybridization, it has been found that single-use sensors developed by using carbon nanotubes could enable to detect electrochemically the more sensitive results in a good selectivity, besides their being lower cost and easy application.

BÖLÜM VII

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Agüi, L., Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J. M. (2008). Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry A review, *Analytica Chimica Acta*, 622: 11–47.
2. Alwarappan, S., Erdem, A., Liu, C., Li, C.Z. (2009). Probing the Electrochemical Properties of Graphene Nanosheets for Biosensing Applications, *J. Phys. Chem. C*, 113 (20): 8853–8857.
3. Analitik Kimyanın Temelleri, Skoog, D. A., West, D. A., Holler, F. J., Çeviri editörleri; Kılıç E., Köseoğlu, F. (1996). Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 303-495.
4. Authier, L., Grossiord, C., Brossier, P., Limoges, B. (2001). Gold Nanoparticle-Based Quantitative Electrochemical Detection of Amplified Human Cytomegalovirus DNA Using Disposable Microband Electrodes, *Anal. Chem.*, 73: 4450-4456.
5. Barthwal, R., Sharma, U., Srivastava, N., Jain, M., Awasthi, P., Kaur, M., Barthwal, S.K., Govil, G. (2006). Structure of daunomycin complexed to d-TGATCA by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41: 27–39.
6. Bauer, L.A., Birenbaum, N.S., Meyer, G.J. (2004). Biological applications of high aspect ratio nanoparticles, *J. Mater. Chem.*, 14: 517-526.
7. Bej, A.K. (1996). Chapter 1: Nucleic acid hybridizations: principles and strategies, *Nucleic acid analysis: Principles and Bioapplications*; Ed. Dangler, C.A., Wiley-Liss, Inc., s. 1-29.

8. Bertino, J. R. (1992). Antineoplastic Drugs, *Textbook of Pharmacology*, Smith, C. M. and Reynard, A. M., *Section IX - Cancer Chemotherapy*; W. B. Saunders Company, USA; 957-958.
9. Brabec, V. (1983). Conformational changes in DNA induced by its adsorption at negatively charged surfaces - The effects of base composition in DNA and the chemical nature of the adsorbent, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11: 245-255.
10. Brabec, V., Dryhurst, G. (1978). Electrochemical behaviour of natural and biosynthetic polynucleotides at the pyrolytic graphite electrode a new probe for studies of polynucleotide structure and reactions, *Electroanal. Chem.*, 89: 161-173.
11. Brabec, V., Koudelka, J. (1980). Oxidation of deoxyribonucleic acid at carbon electrodes. The effect of the quality of the deoxyribonucleic acid sample, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 7: 793-805.
12. Brett, A. M. Oliveira, 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.
13. Brett, A.M. Oliveira, Serrano, S.H.P., Gutz, I., La-Scalea, M.A., Cruz, M.L. (1997). Voltammetric behaviour of nitroimidazoles at a DNA-biosensor, *Electroanalysis*, 9: 1132-1137.
14. Cai, H., Cao, X., Jiang, Y., He, P., Fang, Y. (2003). Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection, *Anal. Bioanal. Chem.*, 375(2): 287-293.

15. Cai, H., Xu, Y., Zhu, N., He, P., Fang, Y. (2002). An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label, *Analyst*, 127: 803-808.
16. Cai, X., Rivas, G., Farias, P. A. M., Shiraishi, H., Wang, J., Fojta, M., Palecek, E. (1996). Trace measurements of plasmid DNAs by adsorptive stripping potentiometry at carbon paste electrodes, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 40: 41-47.
17. Cai, X., Rivas, G., Farias, P. A. M., Shiraishi, H., Wang, J., Palecek, E. (1996). Evaluation of different carbon electrodes for adsorptive stripping analysis of nucleic acids, *Electroanalysis*, 8 (8-9): 753-758.
18. Cai, X., Rivas, G., Shirashi, H., Farias, P., Wang, J., Tomschik, M., Jelen, F., Palecek, E. (1997). Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces, *Anal. Chim. Acta*, 344: 65-76.
19. Carter, M. T., 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.
20. Carter, M. T., Rodriguez, M., Bard, A. J. (1989). Voltammetric studies of the 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.
21. Chen, R. J., Zhang, Y., Wang, D., Dai H. (2001). Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization, *J. Amer. Chem. Soc.*, 123: 3838-3839.

22. Cheng G., Zhao, J., Tu, Y., He, P., Fang, Y. (2005). A sensitive DNA electrochemical biosensor based on magnetite with a glassy carbon electrode modified by multi-walled carbon nanotubes in polypyrrole, *Analytica Chimica Acta* 533: 11–16.
23. Cheng, G.F., Qu, H.Y., Zhang, D.M. , Zhang, J.D., He, P.G., Fang, Y.Z. (2002). Spectroelectrochemical study of the interaction between antitumor drug daunomycin and DNA in the presence of antioxidants, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29: 361-369.
24. Chu, X., Shen, G.-L., Jiang, J.-H., Kang, T.-F., Xiong, B., Yu, R.-Q. (1998). Voltammetric studies of the interaction of daunomycin anticancer drug with DNA and analytical applications, *Anal. Chim. Acta*, 373: 29-38.
25. 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.
26. Deforce, D. L. D., Ryniers, F. P. K., Van den Eeckhout, E. G., Lemiere, F. Esmans, E.L. (1996). Analysis of DNA adducts in DNA hydrolysates by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 68: 3575-3584.
27. Dequaire, M., Degrand, C., Limoges, B. (2000). An Electrochemical Metalloimmunoassay Based on a Colloidal Gold Label, *Anal. Chem.*, 72: 5521-5528.
28. Dervan, P. B. (1986). Design of Sequence-specific DNA-binding molecules, *Science*, 232: 464-471.

- 29.Dervan, P.B. (1998). Sequence specific recognition of double helical DNA. A synthetic approach, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2: Ed. Eckstein,F. and Lilley, D.M.J., Springer-Verlag, Berlin, s.49-64.
- 30.DNA structure and Function; Chapter 1- Introduction to the Structure, properties, and reactions od DNA; Editör, R. R. Sinden, Academic Press, California, 1994, s. 1-57.
- 31.Enstrümantal Analiz İlkeleri, Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., Çeviri editörleri; Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H. (1998). Bilim Yayıncılık, 5. Baskı, s. 563-670.
- 32.Enstrümantal Analiz I Elektroanalitik Yöntemler, Tural, H., Gökçel, H. İ., Ertaş, F. N., (2006). Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi Yayın No: 186, 2. Baskı, s. 131-206.
- 33.Enstrümantal Analiz, Yıldız, A., Genç, Ö. (1993)., Hacettepe Yayınları, A-64, s. 289-384.
- 34.Erdem, A. (2007). A review: Nanomaterial-based electrochemical DNA sensing strategies, *Talanta*, 74: 318-325.
- 35.Erdem, A., Ozsoz, M. (2001). Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA, *Turk. J. Chem*, 25: 469-475.
- 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, *Electrochem. Commun.*, 7: 815-820.

37. Erdem, A., in *Comprehensive Analytical Chemistry* (Ed: D.Barcelo), Vol. 49, *Electrochemical Sensor Analysis* (Eds: S. Alegret, A. Merkoci) Elsevier, Amsterdam 2007, ch. 19, pp. 403-411.
38. Erdem, A., Karadeniz, H., Mayer, G., Famulok, M., Caliskan, A. (2009). Electrochemical Sensing of Aptamer-Protein Interactions Using a Magnetic Particle Assay and Single-Use Sensor Technology, *Electroanalysis*, 21 (11): 1278-1284.
39. 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.
40. 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.
41. Erdem, A., Kosmider, B., Osiecka, R., Zyner, E., Ochocki, J., Ozsoz, M. (2005). Electrochemical genosensing of the interaction between the potential chemotherapeutic agent, *cis*-bis(3-aminoflavone) dichloroplatinum(II) and DNA in comparison with *cis*-DDP, *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 38: 645-652.
42. Erdem, A., Ozsoz, M. (2001). Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA, *Anal. Chim. Acta*, 437: 107-114.
43. Erdem, A., Ozsoz, M., (2002). A review: Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interactions, *Electroanal.*, 14(14): 965-974.

44. Erdem, A., Papakonstantinou, P., Murphy, H. (2006). Direct DNA Hybridization at Disposable Graphite Electrodes Modified with Carbon Nanotubes, *Anal. Chem.*, 78: 6656-6659.
45. Erdem, A., Pividori, Del Valle, M., Alegret, S. (2004). Rigid carbon composites: a new transducing material for label-free electrochemical genosensing, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 567: 29-37.
46. Erdem, A., Pividori, M. I., Lermo, A., Bonanni, A., del Valle, M., Alegret, S. (2006). Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 114: 591-598.
47. Erdem, A., Sayar, F., Karadeniz, H., Guven, G., Ozsoz, M., Piskin, E. (2007). Development of Streptavidin Carrying Magnetic Nanoparticles and Their Applications in Electrochemical Nucleic Acid Sensor Systems, *Electroanal.*, 19: 798-804.
48. Evans; A. (1991). Potentiometry and ISE , ACOL, London, s.106-198.
49. Farmakoloji - İlaç uygulamalarında temel kavramlar, (1992). 63.Bölüm: Antikanser İlaçlar, Dökmeci, İ. (Ed), Nobel Tıp Kitabevleri, s. 819-848.
50. Firedman, T., Brown, D.M. (1978). Base specific reactions useful for DNA sequencing: methylene blue – sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxidemodification of thymine, *Nucl. Acids Res.*, 5: 615-623.
51. Goyal, R.N., Singh, S.P. (2008). Simultaneous voltammetric determination of dopamine and adenosine using a single walled carbon nanotube – Modified glassy carbon electrode, *CARBON*, 46: 1556-1562.

52. Guo, D., Wua, C., Jiang, H., Li, Q. Wanga, X., Chen, B. (2008). Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 93: 119–126.
53. Guo, M., Chen, J., Liu, D., Nie, L., Yao, S. (2004). Electrochemical characteristics of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes, *Bioelectrochem.*, 62: 29-35.
54. Guo, M., Chen, J., Liu, D., Nie, L., Yao, S. (2004). Electrostatic assembly of calf thymus DNA on multi-walled carbon nanotube modified gold electrode and its interaction with chlorpromazine hydrochloride, *Electrochim. Acta*, 49: 2637-2643.
55. Hahm, J., Lieber, C. M. (2004). Direct Ultrasensitive Electrical Detection of DNA and DNA Sequence Variations Using Nanowire Nanosensors, *Nano Lett.*, 4: 51-54.
56. Hall, E. A. H.(1990). Biosensors, Ch.1: Biosensors in context, *Open University Press*, İngiltere; s. 3-30.
57. Hassena, W.M., Chaixa, C., Abdelghanib, A., Bessueillea, F., Leonarda, D., Jaffrezic-Renault, N. (2008). An impedimetric DNA sensor based on functionalized magnetic nanoparticles for HIV and HBV detection *Sensors and Actuators B* 134: 755–760.
58. He, J., Lin, X., Pan, J. (2005). Multi-wall carbon nanotube paste electrode for adsorptive stripping determination of quercetin: a comparison with graphite paste electrode via voltammetry and chronopotentiometry, *Electroanalysis* 17: 1681–1686.

59. He, P., Wang, Z., Zhang, L., Yang, W. (2009). Development of a label-free electrochemical immunosensor based on carbon nanotube for rapid determination of clenbuterol, *Food Chemistry*, 112: 707–714.
60. Herne, T.M., Tarlov, M.J. (1997). Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 8916-8920.
61. <http://www.affymetrix.com/products/arrays>
62. <http://www.mos.org/sln/SEM&TEM/>
63. Huang, K.J., Liu, X., Xie, W.Z., Yuan, H.X. (2008). Electrochemical behavior and voltammetric determination of norfloxacin at glassy carbon electrode modified with multi walled carbon nanotubes/Nafion, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 64: 269–274.
64. Jelen, F., Erdem, A., Palecek, E. (2002). Cyclic voltammetry of Echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode, *Bioelectrochem.*, 55: 165-167.
65. Ju, H.X., Ye, Y.K., Zhao, J.H., Zhu, Y.L. (2003). Hybridization biosensor using di(2,20-bipyridine)osmium (III) as electrochemical indicator for detection of polymerase chain reaction product of hepatitis B virus DNA, *Analytical Biochemistry*, 313: 255–261.
66. Kalogianni, D.P., Koraki, T., Christopoulos, T.K., Ioannou, P.C. (2006). Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms, *Biosens. and Bioelectron.*, 21(7): 1069-1076.
67. Kara, P., Cavdar, S., Meric, B., Erensoy, S., Ozsoz, M. (2007). Electrochemical probe DNA design in PCR amplicon sequence for the optimum detection of microbiological diseases, *Bioelectrochemistry*, 71: 204–210.

68. Karadeniz H., Erdem, A., Caliskan A. (2008). Electrochemical Monitoring of DNA Hybridization by Multiwalled Carbon Nanotube Based Screen Printed Electrodes. *Electroanalysis*, 20(17): 1932-1938.
69. Karadeniz, H., Alparslan, L., Erdem, A., Karasulu, E. (2007). Electrochemical investigation of interaction between mitomycin C and DNA in a novel drug-delivery system, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45: 322–326.
70. Karadeniz, H., Erdem, A., Caliskan, A., Pereira, C.M., Pereira, E.M., Ribiero, J.A. (2007). Electrochemical sensing of silver tags labelled DNA immobilized onto disposable graphite electrodes, *Electrochem. Commun.*, 9: 2167-2173.
71. Karadeniz, H., Erdem, A., Kuralay, F., Jelen, F. (2009). Indicator-based and indicator-free magnetic assays connected with disposable electrochemical nucleic acid sensor system, *Talanta*, 78: 187–192.
72. 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. Pharm. and Biomed. Anal.*, 33: 295-302.
73. Katz, E., Willner, I., Wang, J. (2004). Electroanalytical and Bioelectroanalytical Systems Based on Metal and Semiconductor Nanoparticles, *Electroanal.*, 16: 19-44.
74. 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.

75. 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.
76. Koehne, J.E., Chen, H., Cassell, A.M., Ye, Q., Han, J., Meyyappan, M., Li, J. (2004). Miniaturized Multiplex Label-Free Electronic Chip for Rapid Nucleic Acid Analysis Based on Carbon Nanotube Nanoelectrode Arrays *Clin. Chem.*, 50: 1886-1893.
77. Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S. Ozyoruk, H. Yıldız, A. (2009). Characterization of redox polymer based electrode and electrochemical behavior for DNA detection, *Analytica Chimica Acta* , 643, (1-2): 83-89.
78. Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S. Ozyoruk, H. Yıldız, A. (2009). Poly(vinylferrocenium) coated disposable pencil graphite electrode for DNA hybridization, *Electrochemistry Communications*, 11(6): 1242-1246.
79. Levison, P.R., Dennis, J.W., Jones, K.D., Philpott, R.W., Taylor, S L., Grimm, V. (1998). New approaches in the binding of DNA for clinical applications, *Clin. Chem.*, 44: 2060-2061.
80. Lijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354: 56.
81. Liu, J.X., Zhou, W.J., Gong, J.L., Tang, L., Zhang, Y., Yu, H.Y., Wang, B., Xu, X.M., Zeng, G.M. (2008). An electrochemical sensor for detection of laccase activities from *Penicillium simplicissimum* in compost based on carbon nanotubes modified glassy carbon electrode *Bioresource Technology*, 99: 8748–8751.

82. Lucarelli, F., Marrazza, G., Palchetti, I., Cesaretti, S., Mascini, 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.
83. 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.
84. Luo, X. L., Morrin, A., Killard, A. J., Smyth, M. R. (2006). Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors, *Electroanal.*, 18: 319-326.
85. Mandong, G., Yanqing, L., Hongxia, G., Xiaoqin, W., Lifang, F. (2007). Electrochemical detection of short sequences related to the hepatitis B virus using MB on chitosan-modified CPE, *Bioelectrochemistry*, 70: 245–249.
86. Marazza, G., Chianella, I., Macsini, M. (1999). Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring *Anal. Chim. Acta*, 387: 297-307.
87. Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E. (1998). Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C, *Biophysical Chemistry*, 75: 87-95.
88. Mascini, M. (2001). Affinity electrochemical biosensors for the pollution control, *Pure Appl. Chem.*, 73(1): 23-30.

89. Mathur, S., Erdem, A., Cavellius, C., Barth, S., Altmayer, J. (2009). Amplified electrochemical DNA-sensing of nanostructured metal oxide films deposited on disposable graphite electrodes functionalized by chemical vapor deposition, *Sensors And Actuators B: Chemical*, 136 (2): 432-437.
90. Mc Creery, R. (1990). *Electroanalytical Chemistry*, Bard, A.J., Dekker, M. (Ed). New York, s. 221-374.
91. Mc Farland, A.D., Van Duyne, R.P. (2003). Single Silver Nanoparticles as Real-Time Optical Sensors with Zeptomole Sensitivity, *Nano. Lett.*, 3: 1057-1062.
92. 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.
93. Mehdinia, A., Kazemi, S. H., Bathaie, S.Z., Alizadeh, A., Shamsipur, M., Mousavi, M.F. (2008). Electrochemical studies of DNA immobilization onto the azide-terminated monolayers and its interaction with taxol, *Analytical Biochemistry*, 375: 331–338.
94. Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Pérez, B., Vale, M., Alegret, S. (2005). New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes, *Trends Anal. Chem.*, 24: 826-838.
95. Mikkelsen, S.R. (1996). Electrochemical biosensors for DNA sequence detection- a review, *Electroanal.*, 8 (1): 15-19.
96. Modern Drug Discovery (1999). Milestones of antisense oligonucleotide therapeutics, J.F. Ryan (Ed), Washington DC, 1-2: s. 68.

97. Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A., Lin, Y. (2002). Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes, *Electrochem. Commun.*, 4: 743-746.
98. Müller, W., Crothers, D. M. (1975). Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids, *Eur. J. Biochem.*, 54: 267-277.
99. Nawaz, H., Rauf, S., Akhtar, K., Khalid, A.M. (2006). Electrochemical DNA biosensor for the study of ciprofloxacin–DNA interaction, *Analytical Biochemistry*, 354: 28–34.
100. Niu, S., Zhao, M., Hu, L., Zhang, Z. (2008). Carbon nanotube-enhanced DNA biosensor for DNA hybridization detection using rutin-Mn as electrochemical indicator, *Sensors and Actuators B*, 135(1): 200-205.
101. Orive, G., Gascón, A.R., Hernández, R.M., Domínguez-Gil, A., Pedraz, J.L. (2004). Techniques: New approaches to the delivery of biopharmaceuticals, *Trends Pharmacol. Sci*, 25(7): 382-387.
102. Ozkan, D., Karadeniz, H., Erdem, A., Macsini, M., Ozsoz, M. (2004). Electrochemical genosensor for Mitomycin C–DNA interaction based on guanine signal, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35: 905–912.
103. 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.

104. Palecek, E. (1988). Adsorptive transfer stripping voltammetry: determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface, *Anal. Biochem.*, 170: 421-431.
105. Palecek, E. (1988). New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 20: 179-194.
106. Palecek, E. (1995). Nucleic acids: electrochemical and immunochemical methods, *Encyclopedia of Analytical Science* (Alan Townshend (Ed)), London, *Academic press*, 6: s. 3600-3609.
107. Palecek, E. (1996). From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid Modified Electrodes, *Electroanal.*, 8 (1): 7-14.
108. Palecek, E., Fojta, M. (2001). DNA hybridization and Damage *Anal.Chem.*, 73: 75A-83A.
109. Palecek, E., Fojta, M., Jelen, F., Vetterl, V., (2002). *Bioelectrochemistry*, 9: 365-429.
110. Patolsky, F., Lieber, C.M. (2005). Nanowire nanosensors, *Materials Today*, 8(4): 20-28.
111. Paz, M.M., Das, A., Tomasz, M. (1999). Mitomycin C linked to DNA minor groove binding and cross-linking properties and *in vitro* antitumor activity, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, 7: 2713-2726.
112. Pietrzyk, D.J.; Frank, C.W. (1979). Analytical Chemistry, 2.Baskı, *Academic press*: s. 226-239.
113. Pividori, M. I., Merkoçi, A., Alegret, S. (2000). Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 15: 291-303.

114. Plambeck, J.A., Lown, J.W. (1984). Electrochemical Studies of antitumor antibiotics: V. An electrochemical method of measurement of the binding of Doxorubicin and Daunorubicin derivatives to DNA, *J. Electrochem. Soc.*, 131 (11): 2556-2563.
115. Portakal, O. (2008). Biyolojik Ölçümler ve Nanopartiküller, *Türk J Biochem*, 33(1): 35–38.
116. Pumera, M., Sanchez, S., Ichinose, I., Tang, J. (2007). Electrochemical nanobiosensors, *Sensors and Actuators B Chem.*, 123: 1195-1205.
117. Querioz, M.R.P., Castanheira E.M.S., Carvalho, M.S.D., Abreu, A.S., Ferreira, P.M.T., Karadeniz, H., Erdem, A. (2008). New tetracyclic heteroaromatic compounds based on dehydroamino acids: photophysical and electrochemical studies of interaction with DNA, *Tetrahedron*, 2: 382-391.
118. Radhika, K., Maha Z.F. (2008). Oxidative DNA damage following photoexcitation of daunomycin: Direct role of oxygen, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 198: 200–204.
119. Rauf, S., Gooding, J.J., Akhtar, K., Ghauri, M.A., Rahman, M., Anwar, M.A., Khalid, A.M. (2005). Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37: 205–217.
120. Ravindran, S., Chaudhary, S., Colburn, B., Ozkan, M., Ozkan, C.S. (2003). Covalent Coupling of Quantum Dots to Multiwalled Carbon Nanotubes for Electronic Device Applications. *Nano. Lett.*, 3: 447-453.

121. Rezaei, B., Damiri, S. (2008). Voltammetric behavior of multi-walled carbon nanotubes modified electrode-hexacyanoferrate(II) electrocatalyst system as a sensor for determination of captopril, *Sensors and Actuators B* 134: 324–331.
122. Richardson, C. L., Springfield, G. E. S., Intercalation inhibition assay for compounds that interact with DNA or RNA, *Amerikan patent no*; 4,257,774 / 24 Mart 1981).
123. Rivas, G. A., Rubianes, M. D., Rodriguez, M.C., Ferreyra N. F., Luque, G. L., Pedano, M. L., Miscoria, S. A., Parrado C. (2007). A review: Carbon nanotubes for electrochemical biosensing, *Talanta*, 74: 291–307.
124. Salem, A.K., Chao, J., Leong, K.W., Searson, P.C. (2004). Receptor-Mediated Self-Assembly of Multi-Component Magnetic Nanowires, *Adv. Mater.*, 16: 268-271.
125. Service, R. F. (1998). New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science*, 282: 396-399.
126. Teles, F.R.R., Fonseca, L.P. (2008). Trends in DNA biosensors, *Talanta*, 77: 606–623.
127. Turner, A. P. F. (1987). Biosensors: Fundamentals and Applications, Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S. (Ed); *Oxford University Press*, Oxford, sayfa v-vii.
128. Vaseashta, A. In Nanostructured Materials Based Next Generation Devices and Sensors, Nanostructured and Advanced Materials (Eds: A. Vaseashta, D. Dimova-Malinovska, J. M. Marshall), Springer, Heidelberg 2005, p. 1.

129. Voldman, J., Gray, M.L. Schimdt, M.A. (1999). Microfabrication in biology and medicine, *Biomed. Eng.*, 01: 401-425.
130. Voskerician, G., Shive, M.S., Shawgo, R.S., Recum, H.V., Anderson, J.M, Cima, M.J., Langer, R. (2003). Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices, *Biomaterials*, 24:1959-1967.
131. Wang J. (2002). Electrochemical DNA biosensors. *Electroanalytical methods for biological materials*, p. 27–41.
132. Wang J. (2002). Electrochemical nucleic acid biosensors, *Anal. Chim. Acta*, 469: 63-71.
133. Wang J., Liu G. D., Jan M. R. (2004). Ultrasensitive Electrical Biosensing of Proteins and DNA: Carbon-Nanotube Derived Amplification of the Recognition and Transduction Events *J. Am. Chem. Soc.* 126: 3010-3011.
134. Wang, A.H.J. (1987). Interactions between antitumor drugs and DNA, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, (Ed; Eckstein, F., Lilley, D.M.J., Springer-Verlag Berlin Heidelberg - Germany) 1: s. 52-69.
135. Wang, J. (1997). DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A Review, *Anal. Chim. Acta* , 347: 1-9.
136. Wang, J. (2000). SURVEY AND SUMMARY: From DNA biosensors to gene chips, *Nucl. Acids Res.*, 28: 3011-3016.
137. Wang, J. (2005). Nanomaterial-Based Amplified Transduction of Biomolecular Interactions, *Small*, 1(11): 1036-1043.
138. Wang, J. (2005). Nanomaterial-based electrochemical biosensors, *Analyst*, 130: 421-426.

139. Wang, J. (2003). Nanoparticle-based electrochemical DNA detection
Anal. Chim. Acta, 500: 247-257.
140. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H. (1996). Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes, *Anal. Chim. Acta*, 326: 141-147.
141. Wang, J., Fernandes, J.R., Kubota, L.T. (1998). Polishable and renewable DNA hybridization biosensors, *Anal. Chem.*, 70: 3699-3702.
142. Wang, J., Flechsig, G.-U., Erdem, A., Korbut, O., Grundler, P. (2004). Label-free DNA Hybridization Based on Coupling of a Heated Carbon Paste Electrode with Magnetic Separations, *Electroanal.*, 16: 928-931.
143. Wang, J., Guodong, L., Merkoci, A. (2003). Particle-based detection of DNA hybridization using electrochemical stripping measurements of an iron tracer, *Anal. Chim. Acta*, 482: 149-155.
144. Wang, J., Guodong, L., Polsky, R., Merkoci, A. (2002). Electrochemical stripping detection of DNA hybridization based on cadmium sulfide nanoparticle tags, *Electrochem. Commun.*, 4: 722-726.
145. Wang, J., Kawde, A. N. , Erdem, A., Salazar, M. (2001). Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 126: 2020-2024.
146. Wang, J., Kawde, A.N., Musameh, M., (2003). Carbon-Nanotube-Modified Glassy Carbon Electrodes for Amplified Label-Free Electrochemical Detection of DNA Hybridization, *Analyst*, 128: 912-916.

147. Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D. H., Chicharro, M., Fernandes, J., Palecek, E. (1998). Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 45: 33-40.
148. 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, *Electroanal.*, 10(8): 553-556.
149. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F. S., Dontha, N., Farias, P. A. M., Shiraishi, H. (1996). DNA Biosensor for the detection of hydrazines, *Anal. Chem.*, 68: 2251-2254.
150. Wang, J., Xu, D., Erdem, A., Polsky, R., Salazar, M. A. (2002). Genomagnetic electrochemical assays of DNA hybridization, *Talanta*, 56: 931-938.
151. Wang, J., Xu, D., Kawde, A.-N., Polsky, R. (2001). Metal Nanoparticle-Based Electrochemical Stripping Potentiometric Detection of DNA Hybridization, *Anal. Chem.* 73: 5576-5581.
152. Wang, J., Xu, D., Polsky, R. (2002). Magnetically-Induced Solid-State Electrochemical Detection of DNA Hybridization, *J. Amer. Chem. Soc.* 124: 4208-4209.
153. Wang, L., Lin, L., Ye, B. (2006). Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42: 625–629.

154. Wei, X., Hao, Q., Zhou, Q., Wu, J., Lu, L., Wang, X., Yang, X. (2008). Interaction between promethazine hydrochloride and DNA and its application in electrochemical detection of DNA hybridization, *Electrochimica Acta*, 53: 7338–7343.
155. Wildgoose, G.G., Banks, C.E., Leventis, H.C., Compton, R.G. (2006). *Microchim. Acta*, 152: 187-193.
156. Wu, K., Fei, J., Bai, W., Hu, S. (2003). Direct electrochemistry of DNA, guanine and adenine at a nanostructured film-modified electrode, *Anal. Bioanal. Chem.*, 376: 205-209.
157. Xiao, F., Zhao, F., Li, J., Liu, L., Zeng, B. (2008). Characterization of hydrophobic ionic liquid-carbon nanotubes–gold nanoparticles composite film coated electrode and the simultaneous voltammetric determination of guanine and adenine, *Electrochimica Acta*, 53: 7781–7788.
158. Yan, F., Erdem, A., Meric, B., Kerman, K., Ozsoz, M. Sadik, O.A. (2001). Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to *Microcystis* species, *Electrochemistry Communications*, 3: 224-228.
159. Yang, Y., Wang, Z., Yang, M., Li, J., Zheng, F., Shen, G., Yu, R. (2007). Electrical detection of deoxyribonucleic acid hybridization based on carbon-nanotubes/nano zirconium dioxide/chitosan-modified electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 584: 268-274.
160. Ye, Y., Ju, H. (2005). Rapid Detection of ssDNA and RNA Using Multi-Walled Carbon Nanotube Modified Screen-Printed Electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 735-741.

161. Ye, Y.K., Zhao, J.H., Yan, F., Zhu, Y.L., Ju, H.X. (2003). Electrochemical behavior and detection of hepatitis B virus DNA PCR production at gold electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 18: 1501-1508.
162. Zhang, L., Webster, T.J. (2009). Review Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration, *Nano Today*, 4: 66-80
163. Zhu, N., Zhang, A., Wang, Q., He, P., Fang, Y. (2004). Lead Sulfide Nanoparticle as Oligonucleotides Labels for Electrochemical Stripping Detection of DNA Hybridization, *Electroanal.*, 16: 577-582.
164. Ziaie, B., Baldi, A., Lei, M., Gu, Y., Siegel, R.A. (2004). Hard and soft micromachining for BioMEMS: review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 56:145-172.
165. Zuo, S.H., Zhang, L.F., Yuan, H.H., Lan, M.B., Lawrance, G.A., We, G. (2009). Electrochemical detection of DNA hybridization by using a zirconia modified renewable carbon paste electrode. *Bioelectrochemistry*, 74(2): 223-226.

Ecz. Ayfer (ÇALIŞKAN) TURAN' ın Özgeçmişi

Doğum Tarihi: 30-04-1980

Doğum Yeri: Samsun

Yabancı Dil: İngilizce (iyi)

Medeni durumu: Evli

Eğitim:

- *İlk öğrenimi: Merkez İlkokulu (1987-1992) (Seydişehir/KONYA)*
- *Orta ve lise öğrenimi: İzmir Kemalpaşa Lisesi (1992-1997)*

Lisans Eğitimi:

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Eylül 2001 – Eylül 2006).

Yüksek Lisans Eğitimi:

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans programı (Ekim 2006-).

Aldığı Burslar:

* TÜBİTAK-1001 Araştırma projesi bursu (bursiyer araştırmacı), Ekim 2006 - Eylül 2008

Görevli Olduğu Proje Çalışmaları:

- Nanomalzemelere dayalı elektrokimyasal sensörlerin tasarımı ve biyomoleküler algılamaya yönelik uygulamaları (TÜBİTAK projesi- Proje No: 106S181);
Bursiyer araştırmacı, 2006- 2008.

YAYINLAR

SCI'ce taranan dergilerde yayımlanan uluslararası araştırma makaleleri :

1. HAKAN KARADENİZ, ARZUM ERDEM, **AYFER CALISKAN**, CARLOS M. PEREIRA, ELISA M. PEREIRA, JOSE A. RIBERIO, "Electrochemical Sensing of Silver Tags Labelled DNA immobilized onto Disposable Graphite Electrodes", **Electrochemical Communications**, 9, 2007, 2167-2173.
2. HAKAN KARADENİZ, ARZUM ERDEM, **AYFER CALISKAN**, "Electrochemical Monitoring of DNA Hybridization by Multiwalled Carbon Nanotube Based Screen Printed Electrodes", **Electroanalysis**, 20(17), 2008, 1932 – 1938.

3. ARZUM ERDEM, HAKAN KARADENİZ, GUNTER MAYER, MICHAEL FAMULOK, **AYFER CALISKAN**, “Electrochemical Sensing of Aptamer-Protein Interactions Using a Magnetic Particle Assay and Single-Use Sensor Technology”, *Electroanalysis*, 21(11), 2009, 1278-1284.

Diğer indekslerce taranan dergilerde yayımlanan uluslararası araştırma makaleleri:

1. ARZUM ERDEM, HAKAN KARADENİZ, **AYFER ÇALISKAN**, ASHOK VASEASHTA, “Electrochemical DNA Sensor Technology for Monitoring of Drug–DNA Interactions”, **NANO: Brief Reports and Reviews**, 3(4), 2008, 229–232.

Bildiriler

1. ARZUM ERDEM, HAKAN KARADENİZ, **AYFER ÇALIŞKAN**, “Nanomalzemelere Dayalı Elektrokimyasal DNA Biyosensör Teknolojisi“, **Proje Pazarı 2007, Ege Üniversitesi Bilim–Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM), İzmir, posterli bildiri.**
2. HAKAN KARADENİZ, **AYFER ÇALIŞKAN**, ARZUM ERDEM, “Electrochemical Monitoring of Metal Nanoparticle Labeled DNA and DNA Hybridization by Disposable Sensor Technology”, **NanoTRIV, 09-13 Haziran 2008, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, sözlü bildiri.**
3. ARZUM ERDEM, HAKAN KARADENİZ, AYFER ÇALIŞKAN, “DNA Analizlerine Yönelik Tek Kullanımlık Elektrokimyasal Sensör Teknolojisinin Geliştirilmesi” **IV. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, 4-7 Mayıs 2008 Muğla Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Muğla.**

Katıldığı toplantılar ve kurslar

1. Ege Üniversitesi Bilim Teknolojisi Topluluğu (EBİLTET) tarafından Ege Üniversitesi Bilim Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM) desteği ile düzenlenen “Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu” , **Ege Üniversitesi Kültür Sanat Evi, 07 Mart 2008.**
2. Hücre Kültürü Çalıştayı, **Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 17 Şubat 2009.**