

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

MANYETİK PARTİKÜLLERE DAYALI DİZİ
SEÇİMLİ NÜKLEİK ASİT HİBRİDİZASYONUNUN
ELEKTROKİMYASAL SENSÖRLERLE TAYİNİ

Cansu ALTAY KÜÇÜK

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN

İkinci Danışmanı : Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 06/05/2016

Bornova-İZMİR

2016

Cansu ALTAY KÜÇÜK tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Manyetik Partiküllere Dayalı Dizi Seçimli Nükleik Asit Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Sensörlerle Tayini**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 06/05/2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday **oybirliği/oyçokluğu** ile **başarılı/başarısız** bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

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

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Sinan AKGÖL

.....

Üye : Prof. Dr. Nalan TÜZMEN

.....

Üye : Prof. Dr. Fatma YURT ONARAN

.....

Üye : Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Manyetik Partiküllere Dayalı Dizi Seçimli Nükleik Asit Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Sensörlerle Tayini**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06 / 05 / 2016

İmza

Cansu ALTAY KÜÇÜK

ÖZET**MANYETİK PARTİKÜLLERE DAYALI DİZİ SEÇİMLİ NÜKLEİK ASİT HİBRİDİZASYONUNUN ELEKTROKİMYASAL SENSÖRLERLE TAYİNİ****ALTAY KÜÇÜK, Cansu**

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışmanı: Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

Nisan 2016, 87 sayfa

Nükleik asitler organizmanın bütün genetik bilgilerini depolar ve yeni nesillere aktarır. Temel hayat olaylarından hücrenin üremesi, protein ve enzim sentezi de nükleik asitler tarafından yönetilir. Bu üstün özellikleri, nükleik asitleri birçok alanda olduğu gibi analitik kimyada da önemli bir araştırma konusu haline getirmektedir. Gelecekte nükleik asit analizine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (genosensörlerin) tıp alanında birçok hastalığın analizinde önemli bir yere sahip olacağı düşünülmektedir. Ayrıca son dönemlerde bu analizlere yönelik olarak, biyoteknoloji alanında manyetik partiküller kullanılarak dizi seçimli nükleik asit hibridizasyonunun tayinine yönelik çalışmaların sayısı giderek artmaktadır.

Çalışmamızda, manyetik nanopartikül yüzeyinde dizi seçimli nükleik asit hibridizasyonunun en seçimli ve en etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi, ardından dizi seçimli DNA hibridizasyonunun voltametrik yöntemle dayalı tayini için tek kullanımlık elektrokimyasal sensör teknolojisinin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Bu kapsamda, amino işaretli manyetik nanopartikül sentezi yapıldıktan sonra, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile mikroskopik ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile spektroskopik karakterizasyonları yapılmıştır. Ayrıca, manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliği, elektron spin rezonans (ESR) spektrometresi ile gösterilmiştir. Çalışma boyunca nanopartiküllerin dağıtılıp, saklanacağı uygun tampon çözeltisinin araştırılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Böylece nanopartiküllerin daha stabil kaldığı çözelti ortamı araştırılıp, çalışmalara belirlenen tampon çözeltisinde devam edilmiştir.

Çalışmamızın ikinci bölümde, seçilen tampon çözelti ortamında dağıtılan amino işaretli manyetik nanopartikül yüzeyinde DNA hibridizasyon analizlerine yönelik optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Manyetik nanopartikül yüzeyine immobilize edilen Hepatit B virüsünü (HBV) temsil eden prob DNA konsantrasyonu, hibridizasyon için hedef DNA konsantrasyonu, hibridizasyon için en verimli hibridizasyon süresi ve diğer DNA dizilerine karşı seçimlilik incelenmiştir. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleşen DNA hibriti, alkali muamele sonucu partikül yüzeyinden koparılıp, tek kullanımlık kalem grafit elektrot yüzeyine (PGE) immobilize edilmiştir. Yüzeyine DNA immobilize edilmiş PGE' lerin elektrokimyasal davranışı, diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniğiyle kullanılarak guanin yükseltgenme sinyalindeki değişim ölçülerek incelenmiştir.

Sonuç olarak, tez çalışmamızda manyetik nanopartiküllere dayalı geliştirilen elektrokimyasal sensör teknolojisi ile dizi seçimli HBV DNA hibridizasyon analizi, duyarlı, seçimli ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirildi.

Anahtar sözcükler: Manyetik nanopartikül, tek kullanımlık grafit elektrot, elektrokimyasal sensör, diferansiyel puls voltametrisi, HBV DNA.

ABSTRACT**DETECTION of SEQUENCE-SELECTIVE NUCLEIC ACID
HYBRIDIZATION BASED ON MAGNETIC PARTICLES BY
ELECTROCHEMICAL SENSORS**

ALTAY KÜÇÜK, Cansu

MSc in Biomedical Technologies

Supervisor: Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN

Co-Supervisor: Prof. Dr. Sinan AKGÖL

April 2016, 87 pages

Nucleic acids store genetic information of an organism and all transfers to the new generations. Nucleic acids also administer basic life events such as the cell growth, the synthesis of proteins and enzymes. Recognition surfaces of nucleic acid have become more interesting with each passing day for the analytical chemistry. Electrochemical DNA biosensors based on nucleic acid analysis is thought to play a crucial role in the analyzes to be made at the bedside in a doctor's supervision in the future. In the field of biotechnology, studies based DNA analyzes with using magnetic particles and detection of sequence specific nucleic acid hybridization with electrochemical sensor have increased in recent years.

In our study, realization of sequence-selective nucleic acid hybridization the most selective and effective at surface of magnetic nanoparticles and after detection based voltammetric method of DNA hybridization with disposable electrochemical sensor technology have been aimed.

After synthesis of amino link magnetic nanoparticles, microscopic characterization with scanning electron microscopy (SEM) and spectroscopic characterization with Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) have been made. Moreover, the magnetic property of the magnetic nanoparticles has been shown with electron spin resonance (ESR) spectrometer. Throughout our study, studies of the store buffer solution has been investigated. So that the the buffer solution which nanoparticles remain more stable has been investigated, and then studies were continued this buffer solution.

In the second part of this study, optimization studies have carried out onto the surface of amino linked magnetic nanoparticles distributed in chosen buffer solution for the analysis of DNA hybridization. The DNA probe representing to the Hepatitis B virus (HBV) concentration, target DNA concentration, the most productive hybridization time and the selection versus other DNA sequences have been researched. After the DNA hybrid detached from the surface of the particle with alkaline treatment, hybrid have been immobilized surface of disposable pencil graphite electrode (PGE). The electrochemical behavior of the DNA was immobilized on the surface of PGE has been investigated with using differential pulse voltammetry (DPV) technique by the measuring signal change of guanine oxidation.

Consequently, the analysis of sequence-selective HBV DNA hybridization has been performed in a good reproducibility with sensitivity and selectivity by using this electrochemical sensor technology based on magnetic nanoparticles.

Keywords: Magnetic nanoparticle, disposable graphite electrode, electrochemical sensor, differential pulse voltammetry, HBV DNA.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, yanında çalışmaktan onur duyduğum, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her zaman desteğini en yakından hissettiğim, her zaman bana yol göstermek için yanımda olan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN'a,

Tez çalışmamın manyetik partikül sentez ve karakterizasyon aşamasında destek veren ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sinan AKGÖL'e,

Yüksek lisansın ders aşamasında bursiyeri olduğum 111T073 no'lu TÜBİTAK projesi kapsamında *TÜBİTAK kurumuna* ve tez çalışmalarına 13/FBE/010 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan *Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığına*,

Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı ve Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nde sayın Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN ve sayın Prof. Dr. Sinan AKGÖL'ün yürütücülüğünde yaptığım deneysel çalışmalarım sırasında katkılarından dolayı her iki hocamın ekibinde yer alan öğrencilerine,

Lise, üniversite, yüksek lisans derken on yılı beraber omuz omuza, her anı birbirmize destek olarak, iyi kötü her şeyi paylaşarak geçirdiğim kardeşim Zeynep ÖNDER'e, İzmir' in bana en güzel hediyesi, en büyük desteklerimden Tolga KÜÇÜK'e, tanıdığım en temiz, en güzel kalpli desteğim dostum Burcu ÖZDAMAR'a,

Hayatımdaki her başarımda şüphesiz en büyük katkı ve desteği olan, beni her zaman motive eden annem Sevim ALTAY'a, babam Tayyar ALTAY'a, ablam Cahide ALTAY'a ve kardeşim Aziz Can ALTAY'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Cansu ALTAY KÜÇÜK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Elektrokimya.....	5
2.1.1 Elektrokimyasal tabakalar	5
2.1.2 Elektrokimyasal tabakaların elektriksel olarak incelenmesi.....	7
2.1.3 Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları	7
2.1.4 Voltametri ve esasları	7
2.2 Biyosensör	19
2.2.1 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler.....	21
2.2.2 Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapılar	23
2.2.3 Elektrokimyasal DNA biyosensörleri.....	26
2.3 Manyetik Nanopartiküller.....	29
2.4 Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi (ESR).....	33
2.5 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM).....	35
2.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	37
2.7 DNA Çip Teknolojisi.....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1 Kullanılan Cihazlar	43
3.2 Kullanılan Kimyasal Çözeltiler	44
3.2.1 Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....	45
3.3 Kullanılan Yöntem.....	47
3.4 Kullanılan Elektrotların Hazırlanışı.....	47
3.5 Kullanılan Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi	48
3.5.1 Manyetik nanopartiküllerin karakterizasyonu	49
3.5.2 Farklı çözelti ortamlarının manyetik nanopartiküllere etkisi.....	50
3.6 Manyetik Nanopartiküllere Dayalı Elektrokimyasal DNA Hibridizasyon Tayini.....	51
3.6.1 Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonu	51
3.6.2 Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayini.....	52
3.6.3 Manyetik nanopartikül yüzeyine immobilize edilen prob konsantrasyondaki değişimin hibridizasyon varlığında elde edilen yanıta etkisinin incelenmesi	54
3.6.4 Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına HBV hedef dizi konsantrasyondaki değişimin etkisinin incelenmesi.....	54
3.6.5 Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına hibridizasyon süresindeki değişimin etkisinin incelenmesi	54

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.6.6 Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonunda seçimlilik incelenmesi.....	54
3.6.7 Manyetik nanopartikül stabilitesinin incelenmesi	55
4. BULGULAR.....	56
4.1 Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Elde Edilen Bulgular.....	56
4.1.1 Manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliğinin incelenmesinde elde edilen bulgular.....	56
4.1.2 Manyetik nanopartiküllerin mikroskopik karakterizasyonunda elde edilen bulgular	57
4.1.3 Manyetik nanopartiküllerin spektroskopik karakterizasyonunda elde edilen bulgular	58
4.2 Farklı Çözelti Ortamlarındaki Manyetik Nanopartiküllerle Hazırlanan Örneklerde Elde Edilen Bulgular	58
4.3 Manyetik Nanopartikül Yüzeyinde Gerçekleştirilen DNA Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Bulgular	60
4.3.1 Manyetik nanopartikül yüzeyine immobilize edilen prob konsantrasyondaki değişimin hibridizasyon varlığında elde edilen yanıtta etkisine yönelik bulgular.....	60
4.3.2 Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına HBV hedef dizi konsantrasyondaki değişimin etkisine yönelik bulgular.....	62
4.3.3 Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına hibridizasyon süresindeki değişimin etkisine yönelik bulgular	63

İÇİNDEKİLER(devam)

Sayfa

4.3.4	Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonunda HBV hedef DNA için tayin sınırı incelenmesine yönelik bulgular.....	64
4.3.5	Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonunda seçimlilik incelenmesine yönelik bulgular.....	64
4.3.6	Manyetik nanopartiküllerin stabilitesinin incelenmesine yönelik bulgular	65
5.	TARTIŞMA.....	67
5.1	Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Elde Edilen Bulgular İle İlgili Tartışma.....	67
5.1.1	Manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliğinin incelenmesinde elde edilen bulgular ile ilgili tartışma.....	67
5.1.2	Manyetik nanopartiküllerin mikroskopik karakterizasyonunda elde edilen bulgular ile ilgili tartışma.....	67
5.1.3	Manyetik nanopartiküllerin spektroskopik karakterizasyonunda elde edilen bulgular ile ilgili tartışma.....	68
5.2	Farklı Çözelti Ortamlarındaki Manyetik Nanopartiküllerle Hazırlanan Örneklerle Elde Edilen Bulgular İle İlgili Tartışma	68
5.3	Manyetik Nanopartikül Yüzeyinde Gerçekleştirilen DNA Hibridizasyonunda Elde Edilen Bulgular İle İlgili Tartışma	69
5.3.1	Manyetik nanopartikül yüzeyine immobilize edilen prob konsantrasyondaki değişimin hibridizasyon varlığında elde edilen yanıtı etkisine yönelik bulgular ile ilgili tartışma	69

İÇİNDEKİLER(devam)

Sayfa

5.3.2 Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına HBV hedef dizi konsantrasyondaki değişimin etkisine yönelik bulgular ile ilgili tartışma	70
5.3.3 Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına hibridizasyon süresindeki değişimin etkisine yönelik bulgular ile ilgili tartışma	70
5.3.4 Manyetik nanopartikül yüzeyinde DNA hibridizasyonunda HBV hedef DNA için tayin sınırı incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma.....	71
5.3.5 Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonunda seçimlilik incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma	72
5.3.6 Manyetik nanopartiküllerin stabilitesinin incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma.....	73
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	77
ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Elektrot yüzeyindeki tabakaların şematik olarak gösterilmesi	6
2.2. Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri	9
2.3. Üçlü elektrot sisteminin şematize edilmesi	9
2.4. Karbon pastası elektrodu (CPE)	13
2.5. Camı karbon elektrot (GCE)	13
2.6. Perde baskılı karbon (grafit) elektrodu (SPCE).....	14
2.7. Kalem grafit elektrodu (PGE) ve grafit yüzeyin yapısı.	15
2.8. Altın elektrot (AuE)	15
2.9. Diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali.	18
2.10. Biyosensör yapısının şematize edilmesi	20
2.11. DNA bazlarının eşleşmesi.	23
2.12. DNA bazları arasındaki bağlar	24
2.6. Nükleik asit hibridizasyonu.	26
2.74. Çalışmamızda kullanılan manyetik nanopartiküllerin gösterimi	31
2.85. Taramalı elektron mikroskopunun şematik gösterimi.	36
2.96. FTIR analiz prosesi.	38
2.17. Affimetrix firmasına ait mikroarray görünümü	40
3.10. Manyetik nanopartiküllerin sentez basamakları	49
3.2. Manyetik nanopartikül yüzeyinde dizi seçimli DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayinin şematik gösterimi	53
4.11. Manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu	56
4.12. Manyetik nanopartiküllerin çözelti ortamından mıknatıs yardımıyla ayrımı	56

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

Şekil	Sayfa
4.3. Manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüsü	57
4.4. Manyetik nanopartiküllerin EDX analizi elementel yüzde grafiği.....	57
4.5. Manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumu	58
4.6. Farklı çözelti ortamlarında hazırlanan manyetik nanopartiküller yüzeyine DNA immobilizasyonu sonrasında, partikül sentezinin 1. gününde elde edilen guanin yükseltme sinyallerini gösteren (A) voltamogram; (a) PBwS tamponunun, (b) PBG tamponunun, (c) PBTw tamponunun kontrolü, (d) PBwS tamponunda hazırlanan nano-MP-NH ₂ , (e) PBG tamponunda hazırlanan nano-MP-NH ₂ , (f) PBTw tamponunda hazırlanan nano-MP-NH ₂ kullanılarak elde edilen guanin sinyalleri. Farklı tampon çözeltilerinde hazırlanan nano-MP-NH ₂ ler yüzeyine DNA immobilizasyonu sonrasında partikül sentezinin 1., 7., 14. günlerinde elde edilen guanin yükseltme sinyallerini gösteren (B) histogram.	59
4.7. Farklı konsantrasyonlarda probun HBV hedef diziyile hibridizasyon öncesi ve sonrası ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren (A) voltamogram, (B) histogram (n=3). (a) hibridizasyon yokluğunda sadece partiküllerle hazırlanan örnek kontrol deneyi, (b) hibridizasyon öncesinde sadece 100 µg/mL prob varlığında, farklı prob konsantrasyonlarda 100 µg/mL HBV hedef dizi ile hibridizasyonda ölçülen sinyaller; (c) 25 µg/mL SH-HBV prob, (d) 50 µg/mL SH-HBV prob, (e) 75 µg/mL SH-HBV prob, (f) 100 µg/mL SH-HBV prob, (g) 125 µg/mL SH-HBV prob.	61

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

Şekil	Sayfa
4.8. 100 µg/mL SH-HBV probun farklı konsantrasyonlardaki HBV hedef diziyle hibridizasyon sonrası ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren (A) voltamogram, (B) histogram (n=3). (a) hibridizasyon yokluğunda manyetik nanopartikülle hazırlanan örneklerle kontrol deneyi, 100 µg/mL SH-HBV prob ile farklı HBV hedef konsantrasyonda; (b) 25 µg/mL, (c) 50 µg/mL, (d) 75 µg/mL, (e) 100 µg/mL, (f) 125 µg/mL HBV hedef hibridizasyonu sonrası ölçülen guanin yükseltgenme sinyalleri.....	62
4.9. 100 µg/mL SH-HBV prob ile 100 µg/mL HBV hedef dizisinin farklı hibridizasyon sürelerinde hibridizasyonu sonrasında guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren (A) voltamogram, (B) histogram. (a) 5 dakika, (b) 15 dakika, (c) 30 dakika, (d) 60 dakika hibridizasyon sonrası guanin yükseltgenme sinyalleri.	63
4.10. 5-25 µg/mL konsantrasyon aralığında HBV hedef dizi ile 100 µg/mL SH-HBV prob hibridizasyonu sonrası ölçülen guanin yükseltgenme sinyaline dayalı kalibrasyon grafiği.....	64
4.11. 100 µg/mL SH-HBV prob ile farklı DNA dizileri arasında olası hibridizasyon sonrası guanin yükseltgenme sinyallerindeki % değişimi gösteren histogram (n=3). 100 µg/mL SH-HBV prob ile (a) 100 µg/mL MM dizi, (b) 100 µg/mL hedef dizi ve MM (1:1) karışım çözeltisi, (c) 100 µg/mL NC dizi, (d) 100 µg/mL hedef dizi ve NC (1:1) karışım çözeltisi hibridizasyonu sonrası guanin yükseltgenme sinyalindeki % değişimler.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)ŞekilSayfa

- 4.12. Manyetik nanopartikül sentezinin 1., 4., 7., 14., 21., 28. günlerinde,
DNA immobilizasyonu sonrasında ölçülen guanin yükseltme
sinyallerini gösteren histogram (n=3). 66



ÇİZELGELER DİZİNİÇizelgeSayfa

2.1.	Manyetik partiküllere dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile yapılmış çalışmalara örnekler	32
5.1.	HBV DNA tayini için gerçekleştirilmiş elektrokimyasal çalışmalara örnekler ve sonuçların karşılaştırılması	71
5.2.	28 gün boyunca farklı zaman dilimlerinde alınan ölçümler sonucunda guanin yükseltgenme sinyalinde hesaplanan % azalış değerleri	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

μg	mikrogram
ng	nanogram
μL	mikrolitre
mL	mililitre
μM	mikromolar

Kısaltmalar

PGE	Kalem grafit elektrot
CPE	Karbon pasta elektrot
SPE	Perde baskılı elektrot
GCE	Camsı karbon elektrot
AuE	Altın Elektrot
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
CV	Dönüşümlü voltametri
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
ESR	Elektron spin rezonans spektroskopisi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar**

HBV Hepatit B virüsünü temsil eden kısa DNA dizisi

MP-NH₂ Amino işaretli manyetik nanopartikül



1.GİRİŞ

Nükleik asitler, bütün canlı hücrelerde ve virüslerde bulunan, nükleotid adı verilen yapıtaşlarından oluşmuş polimerlerdir. Nükleik asitlerin başlıca işlevi genetik bilgiyi depolamak ve aktarımını sağlamaktır. Temel hayat olaylarından hücrenin üremesi, protein ve enzim sentezi de nükleik asitler tarafından yönetilir. Nükleik asitler, yapılarına göre yapısında “deoksiriboz” şekeri taşıyan deoksiribonükleik asit (DNA) ve yapısında “riboz” şekeri taşıyan ribonükleik asit (RNA) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. DNA molekülü çift sarmal şekilde kıvrılmış merdivene benzer bir yapıdadır. Merdivenin kenarlarını şeker ve fosfat molekülleri, basamaklarını da organik bazlar oluşturur. Karşılıklı yer alan nükleotid zincirinde guanin sitozinin karşına gelip üç hidrojen bağı, adenin de timinin karşısına gelip iki hidrojen bağı ile bağlanır. (Palecek, 1988; 1995; Bej, 1996; Erdem, 2007a; Karadeniz et al., 2011; Muti et al., 2011; Yumak et al., 2011).

DNA molekülleri hücre bölüneceği zaman kendini eşler. Böylece genetik bilgilerin hücreden hücreye aktarılması sağlanır. Nükleik asit hibridizasyonu, birbirleriyle eşlenik iki ayrı tek sarmal nükleik asit dizisinin, baz çiftlerinin sarmalın merkezinde birleşerek çift sarmallı daha kararlı tek bir dupleks molekülü oluşturma işlemidir (Palecek, 1988; 1995; Bej, 1996; Erdem, 2007a; Nelson and Cox, 2008).

Karaciğere doğrudan saldırarak hasar veren Hepatit B virüsü (HBV), "karaciğer iltihaplanması"na neden olan halk arasında sarılık olarak bir virüstdür. Çift DNA içermekte olan HBV; 40-45 nm boyutlarında olan bir virüstdür. Dünyadaki en yaygın karaciğer enfeksiyonu olup, kan yolu ve cinsel yolla bulaşmaktadır. Daha sık kan yoluyla bulaşmaktadır. Kuluçka süresi 2-6 ay arası değişen bir hastalıktır. Ülkemizde taşıyıcılık oranı %3 ile %7 arasındadır.

Hepatit B virüsü, siroz, karaciğer kanseri, karaciğer yetersizliği, fulminan hepatit hastalığı (1 ay gibi çok kısa sürede karaciğer yetersizliğine götüren ölümcül bir hastalık tipi.), hepatit D hastalığı gibi kötü sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir.

Belirtiler her kişide değişiklik göstermekle beraber virüs vücuda girdikten bir süre sonra hastada aşırı halsizlik ve yorgunluk hissi, deride ve göz akında sararma, iştah kaybı, hafif ateş, karın ağrısı, uykuya meyil, idrar renginde

koyulaşma yapabilmektedir. Virüs vücuda çeşitli yollardan girip, karaciğerde hücreler içine yerleşmektedir. Virüsün, vücuda bulaştıktan sonra;

- Vücutta hiç koruyucu antikor oluşmazsa, iltihap ve buna bağlı bulgular oluşturma ve kronikleşme,
- Vücutta yeteri kadar koruyucu antikor oluşmazsa sessizce vücutta kalıp taşıyıcı olma,
- Kişinin bağışıklık sistemi güçlü ise, oluşan koruyucu antikorlar tarafından tamamen ortadan kaldırılma gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır.

Bu sonuçlar, kişinin sosyoekonomik, sağlık, beslenme düzeni gibi birçok durumuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

Hepatit B hastalığı akut ve kronik seyir gösteren bir hastalıktır. 4-8 hafta olarak tanımlanan akut formunda, hastalık hiç hissedilmeden iyileşebildiği gibi, birkaç hafta devam eden hafif belirtilerle iyileşebilmektedir. 6 aydan fazla sürede hastalığın kronikleşmesi ile ortaya çıkabilecek sonuçlar açısından hastanın takip edilmesi gerekmektedir. Çünkü kronikleşmiş hepatit B hastalığı siroz veya karaciğer kanserine sebep olabilmektedir.

Bu hastalığın kronikleşmesi durumunda en riskli grup küçük yaştaki çocuklardır. Doğum sırasında, bebeğe bulaşan hepatit B nin kronikleşme olasılığı % 90 dır. Ayrıca, 1 ile 5 yaşları arasında da hepatitin kronikleşme olasılığı %30 dur. Bu olasılık ancak 5 yaşından sonra % 7 ye kadar gerilemektedir.

Nükleik asitler üstün özellikleri sebebiyle, birçok alanda olduğu gibi analitik kimyada da ‘nükleik asitlerden oluşan tanıma yüzeyleri’ konusuyla önemli bir araştırma konusu haline getirmektedir. Gelecekte nükleik asit analizine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (genosensörlerin) tıp alanında birçok hastalığın analizinde önemli bir yere sahip olacağı düşünülmektedir.

Günümüzde kullanılmakta olan klasik metotlarla yapılan tayinler genellikle genlerin doğrudan baz dizisi analizi veya DNA hibridizasyonun tespiti yapılmaktadır. Bu yöntemlerin bazılarında radyoaktif boyar maddeler ve bazılarında yüksek maliyet ve uzun zaman alıcı bir yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde kullanılan maddelerin toksik olması, kullanımlarının güç ve zaman alıcı olması, yüksek maliyete sahip

olmaları ve radyasyona maruz kalınması gibi nedenlerle önemli sakıncalar doğurmaktadır (Service, 1998). Bu sebeplerden dolayı son dönemlerde, bilinen klasik yöntemlere alternatif olacak elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımı gündeme gelmiş ve DNA'nın nitel ve nicel analizlerine yönelik geliştirilen elektrokimyasal DNA biyosensörlerine ait uygulamaların sayısı, son yıllarda oldukça artmıştır (Ben-Yoav et al., 2012; Çalışkan et al., 2009; Du et al., 2009; Erdem et al., 2010; 2012a; 2012b; Gao et al., 2013; Karadeniz et al., 2011; Liu, M. et al., 2012; Liu, X. et al., 2011; Muti et al., 2010; 2011; 2012; Sheng-Zhen et al., 2012; Tichoniuk et al., 2010; Yumak et al., 2011; Zuo et al., 2009).

Manyetik nanopartiküllerde boyut ve yüzey etkileri, manyetik nanopartiküllerin manyetik davranışlarını belirlemektedir. Şekli, yüzey yapısı, bileşimi ve bunların sonucu oluşan nanopartikülün manyetik özellikleri farklılık göstermektedir. Belirli çap boyutuna sahip manyetik nanopartiküller sıvı ortamda mıknatıs yardımıyla manyetik olarak ayrılmaya elverişlidirler. Mıknatısın manyetik etkisi uzaklaştırıldığında ise manyetik nanopartiküllerin tekrar çözelti içerisine dağılmaları mümkündür (Jiang et al., 2011; Yamaura et al., 2004). Manyetik duyarlılığı yüksek olan bu nanopartiküller, biyoteknoloji alanındaki çalışmalarda oldukça fazla yer almaktadır. Manyetik nanopartiküller kullanılarak DNA analizlerinin yapılmasına ve dizi seçimli nükleik asit hibridizasyonunun tayinine yönelik çalışmaların sayısı son dönemlerde giderek artmaktadır (Berti et al., 2009; Erdem et al., 2005; 2007b; 2013a; 2013b; Geng et al., 2011; Hassen et al., 2008; Karadeniz et al., 2009; Laschi et al., 2009; Loaiza et al., 2011; Palecek et al., 2002a; 2007; Smerkova et al., 2013; Wang et al., 2001; 2002b; 2003a; 2003b; 2004; Yang et al., 2013).

Çalışmamızda, manyetik nanopartikül yüzeyinde dizi seçimli nükleik asit hibridizasyonunun en seçimli ve en etkin bir şekilde gerçekleştirilmesi, ardından dizi seçimli hibridizasyonun voltametrik yöntemle dayalı tayini için tek kullanımlık elektrokimyasal sensör teknolojisinin geliştirilmesi hedeflendi. Bunun için çalışmamıza, malzeme biliminin ürettiği ve güncel uygulamalar olarak literatürde karşımıza çıkan manyetik nanopartiküllerin elektrokimyasal sensör teknolojilerine getirdiği avantajlar kullanılarak; (a) boyutları küçültülerek hassasiyetleri artırılmış olan malzemelere dayalı elektrokimyasal sensör teknolojilerinin tasarım ve uygulamalarını göstermek ve (b) multidisipliner alanda araştırma yapacak araştırmacılara kaynak oluşturacak bir çalışma hedeflenerek, amino işaretli manyetik nanopartikülü sentezi yapılarak başlandı. Silanizasyon işlemi sonunda uçlarına amino grupları bağlanan manyetik nanopartiküllerin,

taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile mikroskopik ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile spektroskopik karakterizasyonları yapılarak, nanopartikül sentezinin sonuçları aydınlatılmaya çalışıldı. Ayrıca, manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliği, elektron spin rezonans (ESR) spektrometresi ile gösterildi. Çalışma boyunca nanopartiküllerin dağıtılıp, saklanacağı tampon çözeltinin araştırılmasına yönelik çalışmalar yapıldı. Böylece manyetik nanopartiküllerin daha stabil kaldığı çözelti ortamı araştırılıp, çalışmalara belirlenen tampon çözeltisinde devam edildi.

Çalışmamızın ikinci bölümde, uygun çözelti ortamında hazırlanan amino işaretli manyetik nanopartikül (PBTw-nano-MP-NH₂) yüzeyinde HBV DNA hibridizasyon analizlerine yönelik optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Manyetik nanopartikül yüzeyine immobilize edilen hepatit B virüsünü temsil eden tiyol işaretli prob DNA dizisinin konsantrasyonu, hibridizasyon için hedef DNA dizisinin konsantrasyonu, hibridizasyon için en verimli hibridizasyon süresi ve elde edilen yüzeyin seçimliliği incelendi. Bu çalışmalarla, manyetik nanopartikül yüzeyine immobilize prob DNA dizisinin en yüksek kararlılıkla bağlanması, sonrasında da kendi hedef dizisiyle yüksek seçimlilikle hibrit oluşturulması hedeflendi. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleşen DNA hibriti, alkali muamele sonucu partikül yüzeyinden koparılıp, tek kullanımlık kalem grafit elektrot yüzeyine (PGE) immobilize edildi. Yüzeyine DNA immobilize edilmiş PGE'lerin elektrokimyasal davranışı, diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniğiyle kullanılarak guanin yükseltgenme sinyali ölçüldü.

Çalışmamızda kullandığımız PBTw-nano-MP-NH₂'lerin çalışmamız boyunca stabilitesini kontrol etmek amacıyla belirli aralıklarla (1., 4., 7., 14., 21., 28. günlerde) manyetik nanopartikül yüzeyine tiyol işaretli 12 guanin bazlı DNA dizisi tutturuldu. Daha sonra prob dizisi manyetik nanopartikül yüzeyinden koparılıp, PGE yüzeyine immobilize edildi ve DPV tekniği kullanılarak guanin yükseltgenme sinyalleri ölçüldü. Guanin yükseltgenme sinyallerindeki değişime göre manyetik nanopartikül stabilitesi yorumlandı.

Sonuç olarak, manyetik nanopartiküllere dayalı elektrokimyasal DNA analizlerinde tek kullanımlık kalem grafit elektrotların kullanılmasıyla, duyarlılığı ve seçimliliği yüksek, aynı zamanda kolay hazırlanabilen ve hızlı yanıt verme özelliğine sahip elektrokimyasal sensörlerin geliştirilmesi ve dizi seçimli nükleik asit analizlerine uygulanması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Elektrokimya

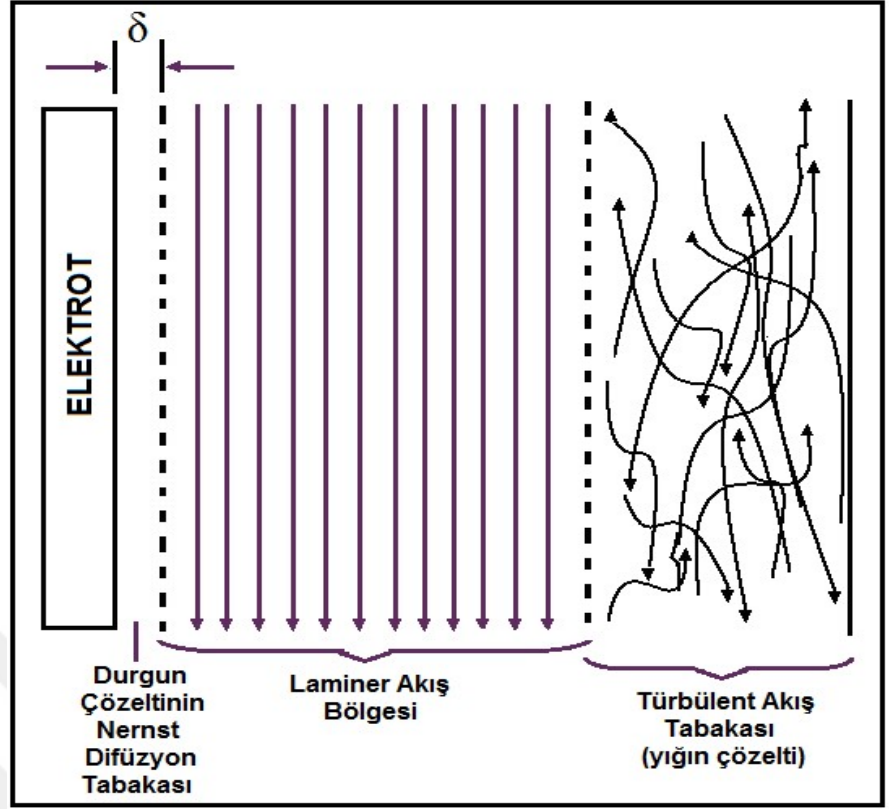
Maddenin elektrik enerjisi ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalı, elektrokimya olarak tanımlanır (Skoog et al., 1996). Elektrokimyasal tepkimeler, yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir, elektron transferi söz konusudur ve elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede yürütülür. İndirgenme (REDüksiyon) – yükseltgenme (OKSidasyon); REDOKS reaksiyonları olarak kısaltılmaktadır. İndirgen, elektron vericisi, yükseltgen ise elektron alıcısıdır.

Son yıllarda, elektrokimyaya dayalı yöntemler, diğer yöntemlere bakıldığında daha ucuz olması, uygulanabilirlik açısından pratik olması, duyarlı ve seçimli sonuçları daha kısa sürede vermesi gibi özellikleriyle ön plana çıkmaktadır. Ayrıca, elektroanalitik teknikler çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilirler.

Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi için, incelenen maddeyi içeren bir çözelti, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrot sistemi ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir çevirim sistemi gereklidir. Çözelti olarak elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla tampon çözelti kullanılır. Çeşitli elektrolitik yöntemler ile doğru akım (DC), diferansiyel puls (DPV), dönüşümlü voltametri (CV) vb. de belirli potansiyel aralığında tarama yapılarak meydana gelen akım şiddeti ölçülür. Akım, difüzyona bağlı olarak oluştuğundan dolayı burada ölçülen difüzyon akımıdır. Difüzyon, elektrot yüzeyinin yakınındaki difüzyon tabakasında oluşur ve akımın şiddeti, difüzyon hızı ile doğru orantılıdır.

2.1.1. Elektrokimyasal tabakalar

Elektrokimyasal ölçümler sırasında, elektrot yüzeyi ile analit sıvısı arasında elektrodun kendisine bitişik olan çözelti tabakasındaki bir türe elektron vermesinden ya da o tabakadan elektron almasından dolayı heterojen tabakalar meydana gelmektedir. Genel olarak karıştırılan sistemlerdeki heterojen tabakaların bileşimi Şekil 2.1 de görülmektedir.



Şekil 2.1. Elektrot yüzeyindeki tabakaların şematik olarak gösterilmesi.

Türbülent akış tabakası: Sıvı hareketinin düzenli bir akış modeli olmayan bu tabaka, elektrottan uzak çözelti yığımında gözlenir.

Laminer akış bölgesi: Yüzeye yaklaştığında oluşan laminer akışta sıvı tabakaları elektrot yüzeyine paralel bir yönde birbiri üzerinde kayarlar.

Nernst difüzyon tabakası: Akma ya da dönme hızı belli bir değerde sabit tutulduğunda, karışmayan ve difüzyonla taşımanın gerçekleştiği bir 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.

2.1.2. Elektrokimyasal tabakaların elektriksel olarak incelenmesi

Elektroliz olayında devreden faradayik akım ile 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 (Wang, 2006; Skoog et al., 1996).

2.1.3. Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları

Kimyasal, elektriksel ya da mekanik bir kuvvet etki etmesiyle, elektrolitteki bir tanecik bir yerden başka bir yere taşınabilir. (Tural vd., 2003).

Bir elektrokimyasal hücrenin çalışması sırasında da, maddenin elektrot yüzeyine aktarım yolları üç şekilde gerçekleşmektedir (Wang, 2006; Yıldız ve Genç, 1993):

a) Elektriksel göç (Migrasyon): Elektriksel alan altında iyonlar, bu alandan kaynaklanan kuvvet etkisiyle hareket ederler.

b) Karıştırma (Konveksiyon): Karıştırma veya elektrotun dönmesi gibi mekanik kuvvetler sonucunda oluşan kütle aktarım yoludur.

c) Difüzyon: Elektrot yüzeyindeki sıvı filmi ile çözelti arasındaki konsantrasyon farklarından kaynaklanan bir kütle aktarım yoludur.

2.1.4. Voltametri ve esasları (Wang, 2006; Skoog et al., 1996; Yıldız ve Genç, 1993)

Voltametri, bir indikatör veya çalışma elektrotu polarize olduğunda, akımın uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanılarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik yöntemlere verilen isimdir. Uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine voltamogram denir.

Voltametrik ölçüm sisteminde, çalışma elektrodu, referans (karşılaştırma) elektrodu ve yardımcı (karşı) elektrodu olmak üzere üç elektrot bulunmaktadır.

Akım, çalışma ve yardımcı elektrotlar arasında akar; çalışma ve referans elektrotlar arasındaki voltaj kaydedilir.

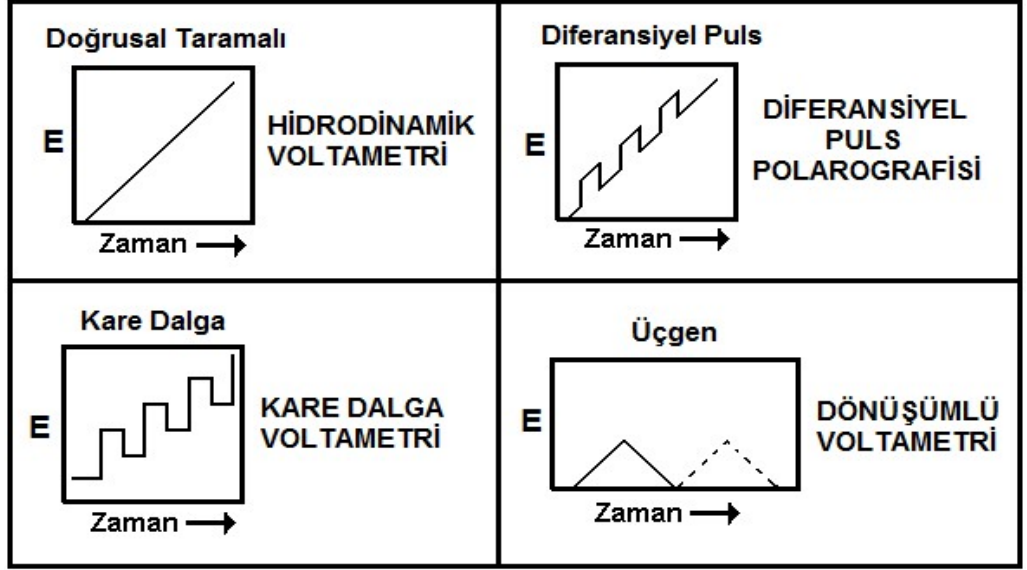
Çalışma elektrodu, yüzeyinde analizlenecek maddenin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur. Voltametrde kullanılan bu elektrotların hem kimyasal hem de elektrokimyasal özellikleri çok önemlidir. Bu nedenle voltametrde sınırlı sayıda polarlanabilen soy metal elektrotlar, çeşitli karbon elektrotlar ve modifiye elektrotlar kullanılır. Polarizasyonu arttırmak için voltametrde kullanılan çalışma elektrotları, birkaç milimetre kare ya da daha küçük olan mikroeletrotlardır. Referans elektrot olarak ikinci sınıf metal-metal iyonu elektrotları kullanılır. En çok olarak Ag/AgCl referans elektrot veya doygun kalomel elektrot (DKE) kullanılmaktadır. Diğer bir elektrot olan yardımcı elektrot olarak, platin, grafit, tantal ya da tungsten tel çubuklar gibi soy metal kullanılır. Bu elektrotun çalışma elektrotunda oluşan reaksiyona ve ölçme etkisi yoktur. Bu çalışma elektrotuyla bir çift oluşturur, onu elektronla besler, ayrıca ortamda oluşabilecek istenmeyen akımların üzerinden geçmesine izin verir.

Bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelerken, kullanılan çalışma elektrodun, kullanılan çözücünün ve elektrolitin türüne bağlı olarak elektroda uygulanabilecek gerilim aralığının sınırları belirlenmektedir.

2.1.4.1. Voltametrde kullanılan uyarma sinyalleri

Elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyelde sinyaller uygulanır. Bu uyarma sinyalleri, karakteristik akım cevaplarını oluşturur (Wang, 2006; Skoog et al., 1996).

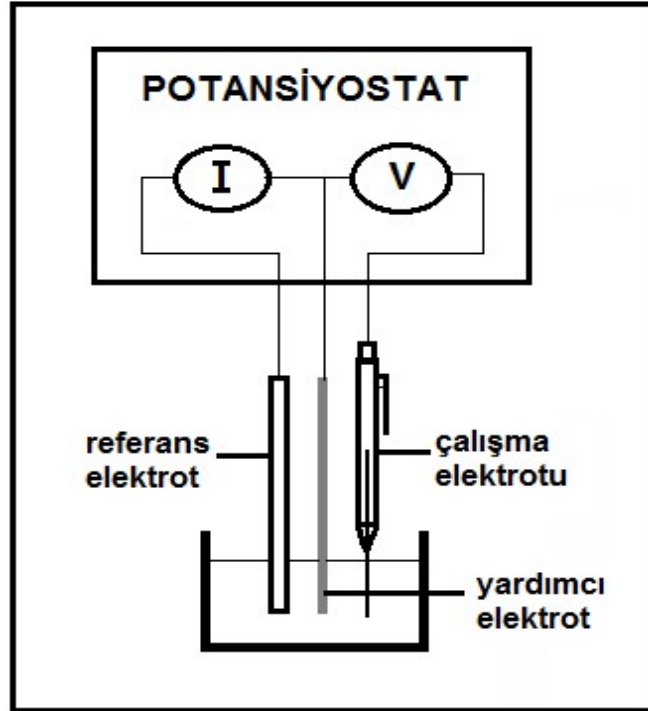
Voltametrde en çok kullanılan doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalga olarak dört uyarma sinyalinin şekli, şekil 2.2 de verilmiştir.



Şekil 2.2. Voltametri de kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri.

2.1.4.2. Voltametrik Cihazlar (Wang, 2006; Skoog et al., 1996; Yıldız ve Genç, 1993)

Voltametrik cihazlar, elektrokimyasal hücre, analit ve reaktif olmayan destek elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan oluşmaktadır.



Şekil 2.3. Üçlü elektrot sisteminin şematize edilmesi.

1. Çalışma elektrotu (indikatör elektrot): Yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur. Analit reaksiyonun meydana geldiği ve zamanla potansiyeli analit konsantrasyonundaki değişimlerle bağlı olarak değişen elektrottur.

2. Referans elektrot (Karşılaştırma elektrot): Analit çözeltisinin özelliklerinden bağımsız olup sabit elektrot potansiyeline sahip yarı hücredir. Ayrıca anot olarak ele alınır. Genel olarak Ag/AgCl referans elektrot veya doygun kalomel elektrot (DKE) referans elektrot olarak kullanılmaktadır. Referans elektrotu içeren kontrol devresinin elektrik direnci çok büyüktür ($> 10^{11} \Omega$), bu nedenle devreden neredeyse hiç akım geçmez. İdeal bir referans elektrot, tersinirdir, Nernst eşitliğine uyar, küçük akım şiddetlerinde polarlanmaz, potansiyeli deney süresince sabit kalır ve sıcaklık değişimlerinde küçük bir değişim gösterir.

3. Yardımcı elektrot (karşıt elektrot): Sinyal kaynağından çıkan elektriğin çözeltiden geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlamaktadır. Bu elektrotun, çalışma elektrotunda oluşan reaksiyona ve ölçüme etkisi yoktur. Çalışma elektrotu ile bir çift oluşturur, onu elektronlarla besler, ayrıca ortamda oluşabilecek istenmeyen akımların üzerinden geçmesine izin verir.

2.1.4.3. Voltametrizde kullanılan referans elektrotları

Elektroanalitik uygulamalarda, potansiyeli bilinen, sabit olan ve ortamdaki çözeltinin bileşiminden etkilenmeyen elektrotlardır (Skoog et al., 1996; Evans, 1991; Pietrzyk and Frank, 1979; Yıldız ve Genç, 1993).

Elektrokimyada ilk referans elektrot olarak Standart Hidrojen Elektrot (SHE) kullanılmıştır. Fakat hazırlanması zor bir elektrot olduğu için kullanımı çok yaygın değildir.

Kullanılan referans elektrot çeşitleri şunlardır;

Kalomel Referans Elektrot ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$): Kalomel (Hg_2Cl_2) ve metalik cıvadan oluşan bir karışım ile KCl çözeltisinden oluşur. Elektrodun potansiyeli, klorür iyonlarının aktifliğine bağlıdır. Hazırlanışının kolay olması sebebiyle Doygun Kalomel Elektrot (DKE), analitik kimyacıların çok kullandıkları bir elektrottur. Potansiyeli, Standart Hidrojen elektrotuna (SHE) göre 25°C de $+ 0,244 \text{ V}$ olarak

bulunmuştur. Molar ve desimolar tip kalomel elektrotlara göre sıcaklık katsayısı bir miktar daha yüksektir.

Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrot: Gümüş telin, elektrolitik yolla AgCl ile kaplanıp klorür iyonu içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla elde edilen gümüş-gümüş klorür referans elektrot en yaygın kullanılan referans elektrotlardan biridir. Doygun KCl çözeltisi kullanıldığı zaman standart hidrojen elektrotuna göre potansiyeli, + 0,222 V dur.

Civa-Civa(1)Sülfat Referans Elektrot: Bu elektrot, doymuş kalomel elektrota benzemektedir. Potansiyeli, sülfat iyonlarının aktifliği ile belirlenir.

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

2.1.4.4. Voltametri de kullanılan çalışma elektrotları

Çalışma elektrotları olarak kullanılan materyaller, voltametrik analizlerin sonuçlarının verimliliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Çoğunlukla voltametri çalışmalarında, altın gibi inert bir metal, karbon, camı karbon, kalay oksit ya da indiyum oksit gibi yarı-iletken veya civa filmi ile kaplanmış bir metalden yapılmış çalışma elektrotları kullanılmaktadır. Çalışma elektrotu, analiz sonuçlarına bu kadar etki ettiği için çalışma elektrodun da çeşitli özellikler aranmaktadır. Bu özelliklerin başında, tekrarlanabilir sonuç verme özelliği ve yüksek sinyal/gürültü oranını sağlanması yer almaktadır. Biyosensör tasarımları sırasında çalışma elektrodu için, kullanımına uygun potansiyel aralığı, elektrik iletkenliği, tekrarlanabilir yüzey elde edilmesinin kolaylığı, mekanik özellikleri, maliyeti, ulaşılabilirliği ve toksisitesi de incelenmektedir.

Çalışma elektrotları için uygun potansiyel aralığı tespitinin yapılması büyük önem taşımaktadır. Bazı analizlerde sadece elektrodun potansiyel aralığının belirlenmesi yeterli olmaz. Sulu çözeltilerde yapılan çalışmalarda, elektrot malzemesinin yanı sıra elektrotların daldırıldığı çözeltinin bileşimi de incelenip buna bağlı olarak potansiyel aralığı belirlenmelidir. Pozitif potansiyel sınırları genellikle moleküler oksijen verecek şekilde, suyun yükseltgenmesi sonunda

oluşan büyük akımlarca belirlenir. Negatif potansiyel sınırları yine suyun indirgenmesi sonunda oluşan hidrojenden kaynaklanır.

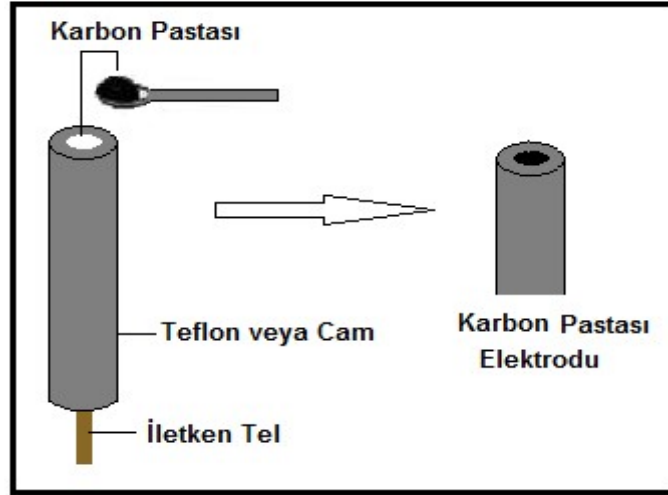
Kullanılan iki çalışma ortamına göre karbon ve civa çalışma elektrotları için seçilen potansiyel aralıkları şu şekilde belirlenmiştir; 1 M HClO_4 ortamında karbon elektrot için + 0,2 V ile + 1,8 V aralığı, civa elektrot için - 0,8 V ile + 0,4 V aralığı belirlenmiş olup, 0,1 M KCl ortamında karbon elektrot - 1,0 V ile + 1,2 V aralığı, civa elektrot için - 1,6 V ile + 0,2 V aralığıdır.

Karbon Elektrotlar

Karbon elektrotlar, elektrokimyasal analizlerde katı elektrotlar arasında en yaygın kullanımına sahip elektrotlardır. Çünkü analizler sırasında, ucuzluk, geniş potansiyel aralığı, çeşitli algılama ve tayinlere uyarlanabilirlik, düşük zemin akımı, kimyasal inertlik gibi avantaj sağlayan birçok özelliği bulunmaktadır. Fakat bu özelliklerin yanı sıra, karbonun yüksek bir yüzey aktivitesi vardır. Bu sebeple, organik bileşikler tarafından kolayca kirletilebilmesi dezavantaj olarak görülmektedir. Organik bileşiklerde bulunan hidrojen, hidroksil ve karboksil grupları ve hatta kinonlar karbon yüzeyinde bağ oluşturup, karbon yüzeyine birçok değişik madde tutturulabilmesine ortam yaratmaktadır. Yapılan çalışmalarda kullanılan karbon elektrot materyalleri, camsı karbon (glassy carbon), karbon pastası, karbon fiber, karbon filmler, karbon kompozit (grafit epoksi, ... vb.) olarak sıralanabilir.

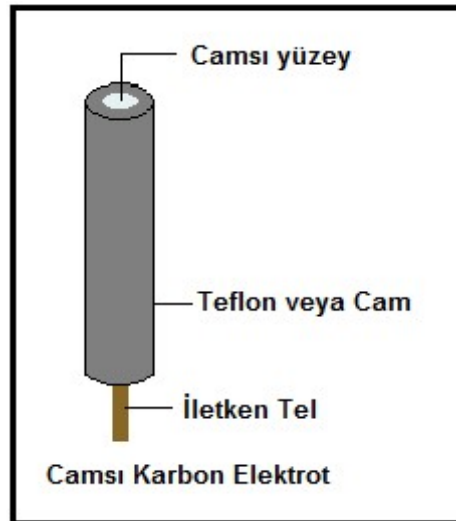
Karbon elektrot çeşitleri;

Karbon Pastası Elektrotu (CPE): Çeşitli oranlarda grafit tozu ile mineral yağın (nujol, parafin yağı, silikon yağı ve bromonaftalen) karıştırılarak karbon pastası oluşturulur. Elde edilen karbon pastası, 3 mm çapında içerisinden iletken tel geçirilmiş cam boru içine yerleştirilerek elektrot hazırlanmış olur. Karbon pastası elektrodu, düşük maliyetli, yüzeyinin kolay temizlenebilmesi ve düşük zemin akımına sahip olması sebebiyle çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir çalışma elektrodudur. Fakat hazırlanan karbon pastasının, organik çözgen içeren çözeltilerde dağılma durumu çok önemli bir dezavantaj olup, bu elektrodun çalışma alanını kısıtlamaktadır.



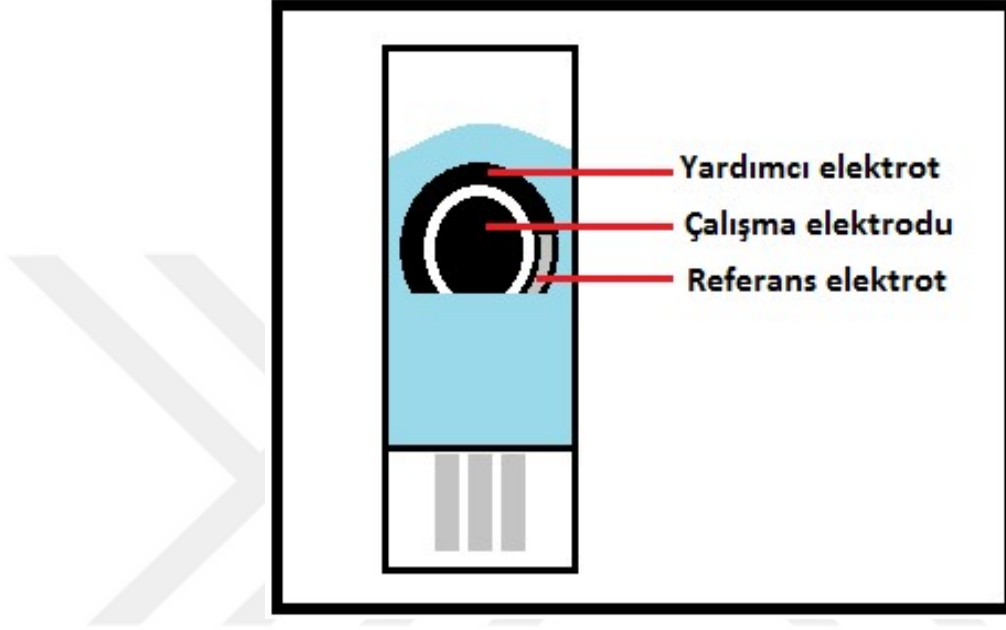
Şekil 2.4. Karbon pastası elektrodu (CPE).

Camsı Karbon Elektrotlar (GCE): Fenol / formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin 1000 °C – 3000 °C arasında basınç altında karbonizasyona uğratılmasıyla camsı karbon elektrot elde edilmektedir. Kimyasal tepkimelere girmemesi, geniş potansiyel aralığı olması, yüzeyinin fiziksel dayanıklılığının yüksek olması, çok iyi elektriksel ve mekanik özelliklerinin olması camsı karbon elektrodun tercih sebepleridir. Ayrıca karbon pastası elektrodu ile karşılaştırıldığında camsı karbon elektrodunun elektrokimyasal yanıt özellikleri yüzey özelliklerinden dolayı daha iyidir. Fakat bu elektrodun da dezavantajı ticari elektrot üretimine uygun olmamasıdır.



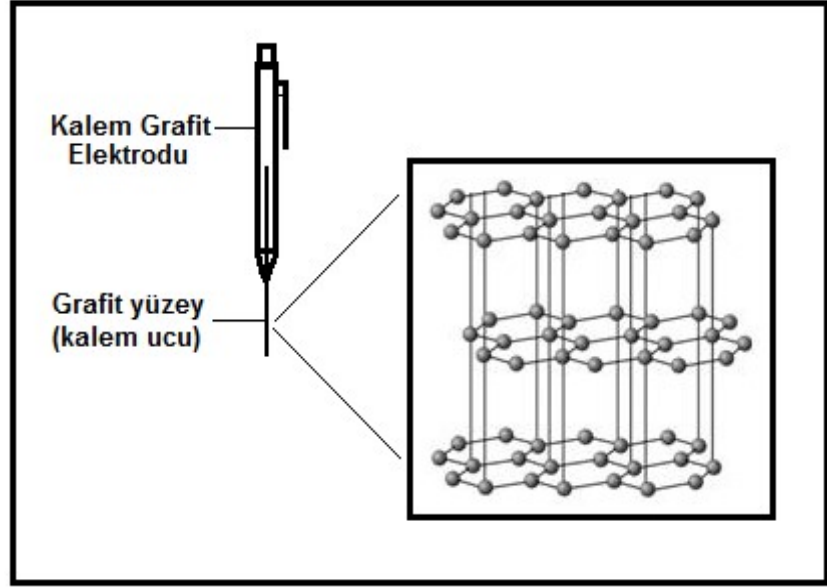
Şekil 2.5. Camsı karbon elektrot (GCE).

Perde Baskılı Karbon (grafit) Elektrotlar (SPCE): Son yıllarda özellikle biyosensör teknolojisinde tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar çok yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Biyosensör teknolojisinde DNA mikroçip teknolojisine uyarlanabilirliği açısından başarılı sonuçlar vermesi nedeniyle gelecekte bu elektrotlara daha da fazla yer verileceği ön görülmektedir (Carpini et al., 2004; Karadeniz et al., 2008; Rohrbach et al., 2012).



Şekil 2.6. Perde baskılı karbon (grafit) elektrodu (SPCE).

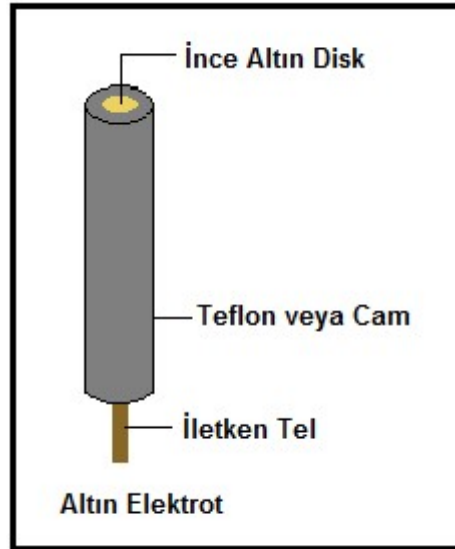
Kalem Grafit Elektrotlar (PGE): Tek kullanımlık olması ve kolay yenilenebilen yüzey sağlaması kalem grafit elektrodu, diğer karbon elektrotlara kıyasla daha üstün olduğunu göstermektedir. Son yıllardaki çalışmalarda daha çok tercih edilmektedir. Düşük tayin sınırı, ucuzluk ve tekrarlanabilirliğinin iyi olması gibi özellikleri sebebiyle kalem grafit elektrodun kullanılmasını arttırmaktadır.



Şekil 2.7. Kalem grafit elektrodu (PGE) ve grafit yüzeyin yapısı.

Metal elektrotlar

Yüksek elektron transfer kinetiklerine ve geniş bir potansiyel aralığına sahip olması nedeniyle metal elektrotlar tercih edilmektedir. Platin ve altın elektrot metal elektrot tipleridir.



Şekil 2.8. Altın elektrot (AuE).

2.1.4.5. Voltametrik akımlar

Elektrot sistemine gerilim uygulandığında kapasitif akım ve Faradayik akım olmak üzere iki çeşit akım oluşur (Wang, 2006; Skoog et al., 1996).

a) Kapasitif akım (i_c) : Bir elektrotun bir elektrolit çözeltisine daldırılması ve negatif yükü 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 duyar ölçüm yapılır. Kapasitif akım fon akımın oluşmasına neden olan etkenlerden biridir.

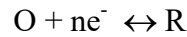
b) Faradayik akım (i_f): Reaksiyondan kaynaklanan (analiz edilecek maddeden) akımdır.

$i = i_f + i_c$ 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 çalışamaz.

2.1.4.6. Elektrokimyasal bir olayda faradayik işlemler

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



O ve R'nin, sırasıyla, redoks çiftinin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade ettiği tepkime ile gösterilmektedir. Termodinamik kurallarla kontrol edilen sistemlerde, elektrot potansiyeli, elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişiminin $[C_o(0,t)$ ve $C_R(0,t)]$, Nernst denkleminde göre saptanmasında kullanılabilir (Wang, 2006; Skoog et al., 1996).

$$E = E^0 - \frac{R.T}{n.F} \ln \frac{C_R (0,t)}{C_0 (0,t)}$$

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

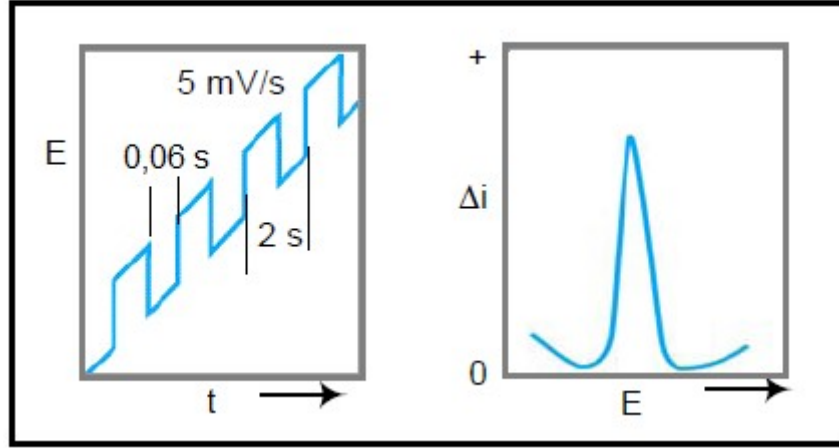
F = Faraday sabiti (96487 Coulombs)

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

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

2.1.4.7. Diferansiyel puls voltametri (DPV) (Wang, 2006; Skoog et al., 1996; Yıldız ve Genç, 1993; Tural vd., 2003)

Diferansiyel puls voltametri tekniğinde, yavaşça yükselen bir DC sinyali üzerine yükseklikleri sabit voltaj pulslarının biniştirilmesi ile oluşan uyarıcı sinyal kullanılmaktadır. Akım, pulstan hemen önce ve pulsun sonuna doğru iki kere ölçülerek bunların farkı sinyal olarak kaydedilmektedir. Bu ölçüm sayesinde, normal puls voltametrisinde pulsun sonunda saptanan akımdaki sığasal bileşeni azaltmak ve seçiciliği arttırmak amaçlanmaktadır. Bu teknikte, puls genliğinin ve potansiyelin iyi seçilmesiyle duyarlılık arttırılabilmektedir. Bir çok durumda 50 mV kadar bir potansiyel farklı olan maddeler için bile birbirinden farklı konumlarda pik maksimumları elde edilebilmektedir. Diferansiyel puls tekniğinin avantajı, akımın örneklendiği noktalarda kapasitif akımın minimum olmasıdır. Bu nedenle sinyal/gürültü oranı iyileştirilmiş olup, 10^{-7} – 10^{-8} M derişimlerin tayinine imkân vermektedir.



Şekil 2.9. Diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali.

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.

Bu tekniğin yüksek duyarlılığı, fardayik akımın artması ve faradayik olmayan yükleme akımının azalması olmak üzere iki şekilde açıklanmaktadır. Faradaik akımdaki artışı açıklamak için potansiyelin aniden 20-100 mV arttırılmasıyla bir elektrodun çevresindeki yüzeyde meydana gelen olayları incelemek gerekir. Bu yüzeydeki reaktif taneciklerin konsantrasyonu yeni potansiyelin gerektirdiği seviyeye düşecek şekilde akımda büyük dalgalanmalar meydana gelir. Denge konsantrasyonuna ulaşılırken akım azalarak, sadece difüzyona karşı koyacak bir seviyeye iner; bu "difüzyon-kontrollü akım" dır. Klasik voltametride başlangıç akımında dalgalanma görülmez, çünkü ölçme zaman skalası ani akımın yaşam süresine kıyasla oldukça uzundur. Puls voltametride ise akım, dalgalanma tümüyle kesilmeden önce ölçülür. Bu durumda, ölçülen akımda hem difüzyon kontrollü akım, hem de yüzey tabakasındaki konsantrasyonu Nernst denkleminin gerektirdiği seviyeye düşüren akım bulunur.

Elektroda ek potansiyel pulsu verildiğinde, aynı zamanda, faradaik olmayan akım dalgalanması da olur ve elektrot üzerindeki yük artar. Bu akım zamanla eksponensiyel olarak azalarak, yüzey değişikliğinin en az olduğu zaman sıfıra düşer. Sadece bu anda ölçülen akımda artık akım yoktur ve sinyal/gürültü oranı büyüktür; sonuçta yüksek hassasiyet elde edilir.

Kullanım kolaylığı, yüksek duyarlılığı ve seçiciliği özelliklerinden dolayı puls yöntemleri günümüzde çoğu klasik yöntemin yerini almıştır. Puls yöntemleri kantitatif uygulamalarda, genellikle pik yüksekliklerinin analizlenecek madde konsantrasyonuna karşı grafik geçirildiği kalibrasyon eğrileri çizilmesi çalışmalarında kullanılmaktadır.

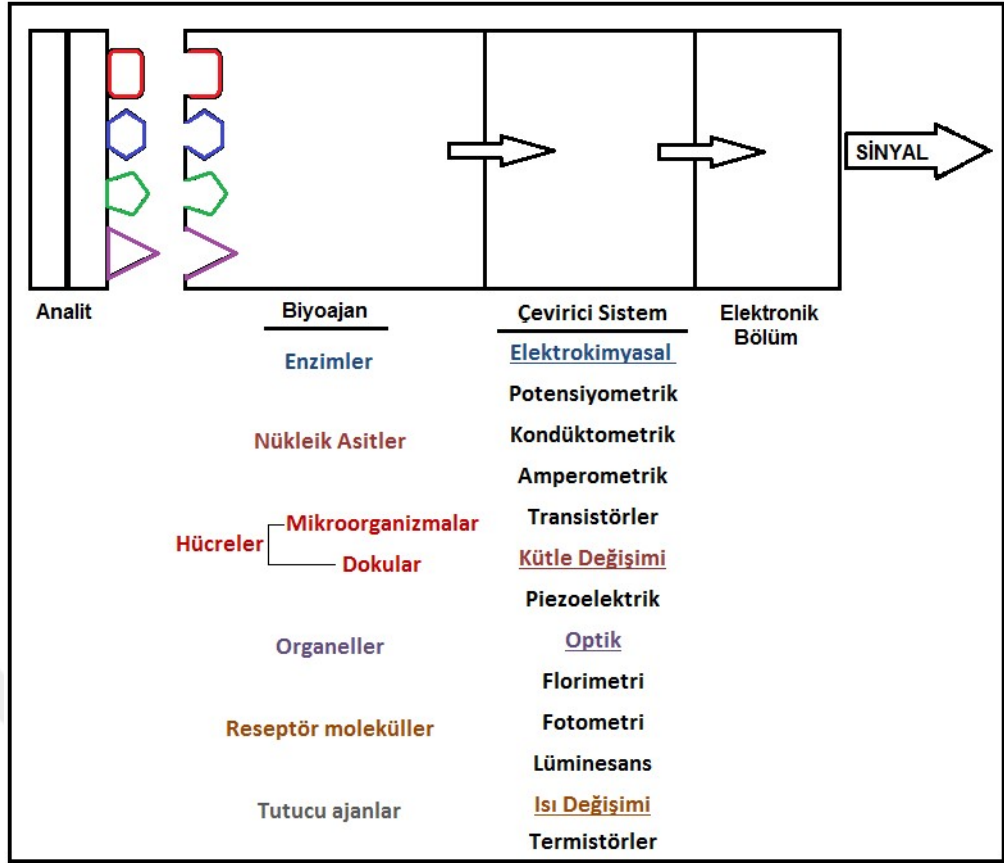
2.2. Biyosensör

Biyosensörler (biyo-alıcılar, biyolojik dedektörler), biyolojik kaynaklı bir tanıma yüzeyini ve fizikokimyasal çevirici sisteminden oluşan, biyolojik moleküller kullanılarak diğer molekülleri, direkt veya indirekt olarak saptayabilen cihazlardır. Diğer bir tanımla, biyoaktif materyaller içeren ve biyolojik ortamlarda bulunan çeşitli maddelerin analizi için kullanılan analitik cihazlardır.

1950 li yılların ortalarında L.C. Clark'ın bir ameliyat sırasında kanın O_2 miktarını bir elektrot ile izlemesiyle birlikte biyosensörlerin tarihi başlamış oldu. Daha sonra 1962 yılında Clark ve Lyons, glikoz oksidaz (GOD) enzimini O_2 elektrodu ile kombine ederek kanın glikoz düzeyini ölçmeyi başarmışlardır. Bu şekilde yeni bir analitik sistem oluşturuldu. Bu sistem bir yandan enzimin yüksek spesifikliğini bir yandan da elektrodun tayin duyarlılığını birleştirerek, geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur.

Bir biyosensör sistemi, üç ana bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler; seçici tanıma mekanizmasına sahip biyoajan, fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen çevirici ve elektronik kısımdır (Coulet, 1991; Turner, 1987).

Biyosensörlerin ürettiği sinyal, biyoajanın seçiciliği ve analitin konsantrasyonuyla orantılı olarak değişmektedir. Bu sinyal proton konsantrasyonundaki değişimden, amonyak veya oksijen gibi gazların salınması ya da yükseltgenmesinden, ışık emisyonundan, absorbsiyon ya da reflektanstan, ısı emisyonundan, kütle değişimi ve bunun gibi değişimlerden kaynaklanmaktadır (Lei, 2006). Sinyal, çevirici sistemler yardımıyla elektrokimyasal, termal, akım, sıcaklık değişimi, potansiyel, optik olarak ya da piezo elektrik anlamda kütle artışıyla ölçülebilir forma dönüştürülmektedir. Ölçülen sinyal daha sonra başka analizler için güçlendirilebilir, işlenebilir veya depolanabilir.



Şekil 2.10. Biyosensör yapısının şematize edilmesi.

Biyosensör endüstrisi her geçen gün gelişmekte olup, pazar olarak medikal, çevre, gıda ve askeri alanları içeren dört temel bölüme sahip olduğu belirtilmektedir. Biyosensörler, klinik teşhis, tıbbi uygulamalar, süreç denetleme, biyoreaktörler, kalite kontrol, tarım ve veterinerlik, bakteriyel ve viral teşhis, ilaç üretimi endüstriyel atık su denetimi, madencilik, askeri savunma sanayi gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde en çok tercih edilen analit ayırma teknikleri olarak, ince tabaka kromatografisi (TLC), sıvı kromatografisi (LC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılmaktadır. Ayırma işlemi gerçekleştirildikten sonra floresans ölçümü, UV absorpsiyonu, kütle spektrofotometrisi ya da amperometrik tayin yöntemleri kullanılarak analiz yapılmaktadır. Biyosensörlerde bu analiz yöntemleri içinde yer almaktadır. Biyosensörlerin uygun hassasiyeti, doğrusallığı göstermesi, yüksek spesifikliği, renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon aralığında doğrudan ölçüme olanak sağlaması gibi üstünlükleri diğer tekniklere göre daha fazla avantaj sağlamaktadır (Telefoncu, 1999). Ayrıca biyosensörler basit kullanıma, hıza, düşük maliyete sahip ve çoğaltılabilir analitik

cihazlardır. Ayrıca seçicilik özelliği, analiz sırasında örnek ön hazırlığına ve fazla miktarda örneğe gerek duymadan kompleks karışımlarda gerçek zamanlı analiz için yüksek spesifiklikte cihazların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

Kompleks maddelerin rasyonel ve ucuz bir şekilde tayinini sağlayan biyosensörler, ekonomik ve toplumsal ağırlık kazanmaktadırlar. Bu nedenle, son zamanlarda biyosensörlerin önemi biyoçip teknolojisindeki gelişmelere bağlı olarak her geçen gün artmaktadır.

İn vivo uygulamalar için biyouygunluk sorunları, diğer maddelerle oluşan spesifik olmayan adsorbsiyonlar, sensörlerin sterilize edilebilirlikleri, biyoreseptörlerin, antibadilerin ve enzimlerin uzun süreli stabilizasyonundaki sorunlar, enzim bazlı sensörlerde immobilizasyon sorunları, gıdalardaki diğer bileşenlerin oluşturduğu girişimin azaltılmasındaki problemler, sensörlerin küçültülmesindeki problemler gibi sorunlar biyosensörlerin ticari olarak üretilmesine engel teşkil eden bazı etkenler arasında yer almaktadır.

2.2.1. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler (Hall, 1990)

Seçicilik: İdeal bir biyosensör için en önemli özelliklerden biri seçicilik özelliğidir. Bu özelliği yeterli olmayan biyosensör için, bu eksiği gidermek uzun işlemler yapılması gerekmektedir.

Kullanım ömrü: Biyosensörün kullanım ömrünün azalmasını etkileyen etki biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bununla birlikte, biyosensörün kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametreleri de etkilemektedir.

Tekrarlanabilirlik: Analiz sırasında ard arda yapılan ölçümlerde aynı koşullar sağladığında hemen hemen aynı değerlerin bulunması istenir. Çalışmalar sırasında bunun çok mümkün olmaması dikkate alınarak, yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi incelenir. Ard arda yapılan ölçüm sonuçlarında tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün uygulamalarının da o kadar iyi olduğu somucuna varılabilir.

Kalibrasyon gereksinmesi: İdeal bir biyosensörün kullanım süresince teorikte hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi

beklenir. Fakat bu özellik, pratikte farklılık göstermektedir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

Kararlılık: İdeal biyosensör için, elektrot kararlılığının yüksek olması gerekmektedir. Kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, pH, ısı, nem, ortamdaki oksijen konsantrasyonu gibi parametrelerde kararlılık özelliğini etkilemektedir.

Yüksek duyarlılık: Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması gerekmektedir.

Yeterli düzeyde tayin sınırı: Tasarlanan biyosensörün tayin sınırı, elektrot yüzeyinin büyüklüğüne, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesine, immobilize edilen madde miktarına bağlı olarak belirli bir konsantrasyon değerinin altında olması gerekmektedir.

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

Hızlı cevap zamanı: Ölçümlerden elde edilen akım-zaman eğrilerine bakılarak bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı anlaşılmaktadır. Elde edilen eğride basamakların şekli basık ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi bir durum olduğunda ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır.

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

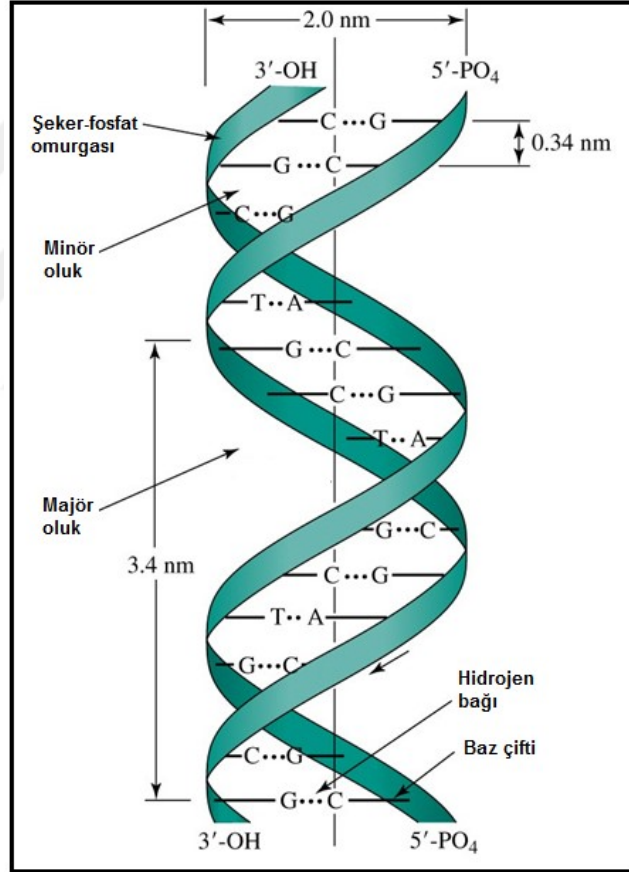
Basitlik ve ucuzluk: Kullanımı rahat ve kolay, tasarımı basit ve ucuz biyosensörler ideal biyosensörlerdir. İlk biyosensörlerde karmaşık ve pahalı yapıların, daha sonra basitleştirilmesi ve mümkün olduğunca da ucuzlaştırılması için çalışmalar yapılmıştır.

Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Biyosensör tasarımı sırasında dikkat edilmesi gereken özelliklerden elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi oldukça önemlidir.

2.2.2. Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapılar

2.2.2.1. Nükleik asit ve DNA (Boyer, 2006; Nelson and Cox, 2008)

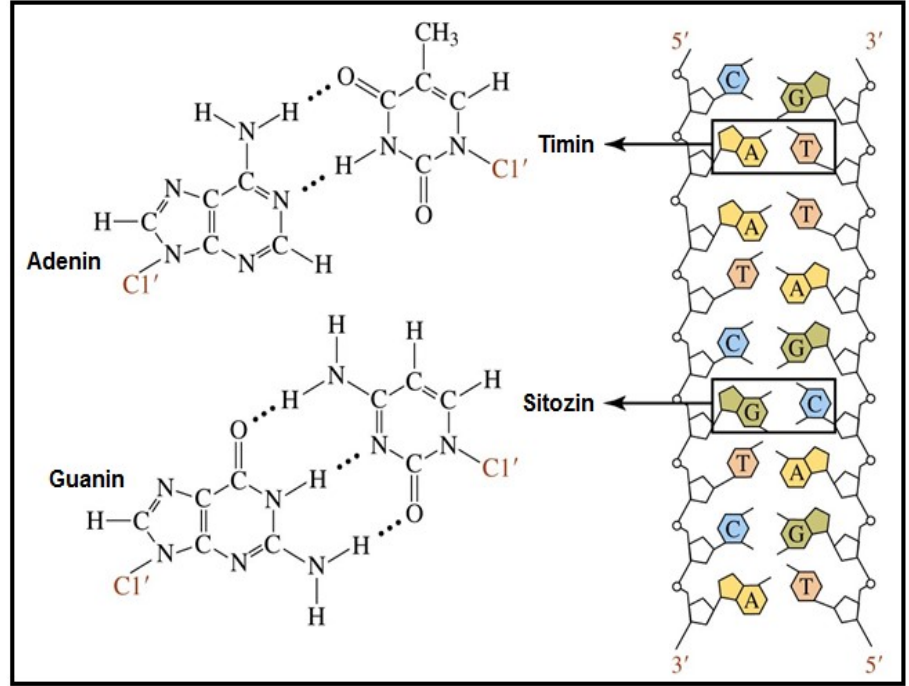
Nükleik asitlerin primer yapısı, ardı ardına dizilmiş nükleotitlerin birbirine fosfat grubu köprüleriyle kovalent olarak bağlanarak oluşmaktadır. Bağlanma sırasında fosfat grubu, nükleotitlerden birinin 5'-hidroksil grubuyla bunu izleyen nükleotidin 3'-hidroksil grubu arasında fosfodiester bağı oluşturur. Sonuç olarak, nükleik asitlerin kovalent yapıdaki omurgası, birbirini izleyen fosfat ve pentoz gruplarından oluşurken, azot içeren baz grupları ise bu omurgaya düzenli aralıklarla bağlanmış yan grup görünümündedir.



Şekil 2.11. DNA bazlarının eşleşmesi (Boyer, 2006).

DNA (Deoksiribonükleik asit) yapısının aydınlatabilmek amacıyla Rosalind Franklin ve Maurice Wilkins güçlü bir yöntem olan X-ışını kırınımı yöntemini DNA iplikçilerinin analizinde kullanmış ve 1950 yılının başlarında DNA'nın karakteristik bir X-ışınları kırınımı örneği gösterdiğini bulmuşlardır. Bu örneklerden anlaşılan ise DNA molekülünün heliks yapıda olduğu ve uzun eksen

boyunca düzenli tekrarlanan iki yapı gösterdiğiidir. Bunlardan biri 0,34 nm, diğeri ise 3,4 nm uzunluğundadır. Bundan sonraki problem DNA' nın üç boyutlu yapısını, sadece X-ışını kırınımı değil, Chargaff tarafından A ile T ve G ile C baz eşitliği kuralını ve diğerkimyasal özellikleri kullanarak çözümlmek olmuştur. 1953 yılında James D. Watson ve Francis Crick, DNA' nın üç boyutlu yapı modelini tüm mevcut verileri kullanarak önermiştir. DNA aynı eksen üzerine sağa dönüşümlü olarak birbirini sarılmış iki iplikçikten oluşmuştur. Birbirini izleyen deoksiriboz ve fosfat gruplarının hidrofilik omurgası dış yüzde olup, yapıyı çevreleyen suyla ilişkilidir. Her bir iplikçiğin pürin ve pirimidin bazıları çift sarmalın iç tarafına yığılmıştır. Ayrıca hemen hemen düzlemsel ve hidrofilik olan halkasal yapılar birbirine çok yakın ve uzun eksene dil pozisyonundadır. DNA'daki iki iplikçiliğin karşılığıyla eşlenerek dengelenmesi sonucu sarmalın yüzeyinde majör oluk ve minör oluk oluşur. İplikçiklerden biri üzerindeki nükleotit bazı aynı düzlemde diğeri iplikçiğin bazıyla eşleşir. Watson ve Crick' in önerdiği G' nin ve C ile A' nın T ile eşleşmesi, Chargaff kurallarına da uyumludur. Bu eşleşmelerdeki en önemli konu G ve C arasında üç ($G \equiv C$ ile sembolize edilen), A ve T arasında sadece iki hidrojen bağı ($A = T$ ile sembolize edilen) olduğudur. $G \equiv C$ baz çiftinin, $A = T$ baz çiftine oranı yükseldikçe eşleşmiş DNA iplikçikleri birbirinden daha zor ayrılır. Bazların bu düzen dışında eşleşmesi çift sarmal yapıyı kararsız hale getirir.



Şekil 2.12. DNA bazları arasındaki bağlar (Boyer, 2006).

Nükleotitlerin hücre metabolizmasında çok farklı görevleri vardır. Bunların başlıcaları metabolik işlemlerde kullanılan enerji; hücrelerin hormonlara ve diğer hücre dışı uyarılara karşı yanıtında ana kimyasal bağlantı ve metabolik araürünlerin ve enzim kofaktörlerinin yapısal bileşenleri olmasıdır. En son ve şüphesiz ki en önemlisi ise genetik bilginin depo edildiği moleküller olan deoksiribonükleik asit ve ribonükleik asit gibi nükleik asitlerin yapı taşları olmalarıdır. Her proteinin ve sonucunda her biyomolekül ve hücre bileşeninin yapısı hücrenin nükleik asitinin nükleotit dizisinde programlanmış olan bilginin ürünüdür. Genetik bilginin bir genden diğer bir gene geçişi ve depo edilme yeteneği yaşam için önemlidir.

2.2.2.2. DNA ile ilgili bazı terimlerin tanımlamaları (Dervan, 1986; Bej, 1996; Nelson and Cox, 2008)

Dinükleotit; iki nükleotidin yan yana gelmesiyle oluşmaktadır.

Trinükleotit; üç nükleotidin yan yana gelmesiyle oluşmaktadır.

Oligonükleotit; birden fazla nükleotidin yan yana gelmesiyle oluşmaktadır.

Tekrarlayan oligonükleotidler; polimer içindeki tekrarlayan tek bir bazı, tekrarlayan iki bazı veya üç bazı ifade etmektedir. 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)**, dinükleotid'e **poly(AT).poly(AT)**, trinükleotid'e **poly (GAT).poly (ATC)** örnek verilebilir.

Baz çifti; birbirlerinin karşılığı olan iki bazı ifade etmektedir. Örnek olarak, A.T veya G.C baz çiftleri verilir.

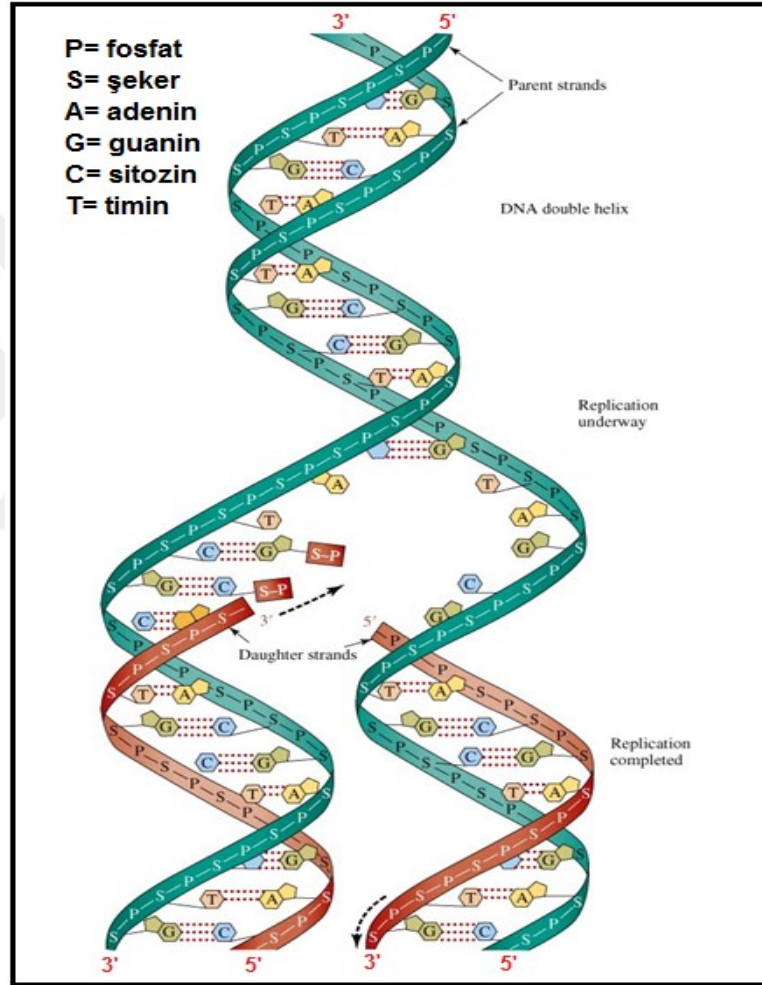
Prob; baz dizisi tam olarak belli olan oligonükleotittir.

Hedef dizi (Target); prob dizisinin tamamen karşılığı olan oligonükleotittir.

Yanlış eşleşen dizi (Mismatch-MM); hedef dizisinden bir bazı veya birden fazla bazı farklı olan oligonükleotittir.

Rastgele dizi (Non complementary-NC); hedef dizisinden tamamen farklı bir baz dizilimine sahip olan oligonükleotittir.

Nükleik Asit (DNA) Hibridizasyonu; özel hibridizasyon koşulları altında baz çiftlerinin kararlı bir dupleks molekülü oluşturması olayıdır.



Şekil 2.13. Nükleik asit hibridizasyonu (Boyer, 2006).

2.2.3. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri

Analitik Kimya çalışmalarında son zamanlarda konu olarak özellikle biyosensör tasarımında kullanılan dizi tanıma yüzeyleri yer almaktadır (Wang et al., 1997c). Bu çalışmalarla, tanıma yüzeyleri sayesinde bilinen elektrokimyasal biyosensörler geliştirilip yeni boyutlar kazanacaktır. Bununla birlikte, gelecekte

bazı hastalıkların analizlerinde önemli bir role sahip olacaktır (Wang et al., 1997b).

DNA molekülünün tanıma yüzeyi olarak kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörleri ve genosensörler adı verilmektedir (Palecek, 1988; Mikkelsen, 1996). Bazı kalıtsal hastalıkların teşhisinde, mutasyon analizlerinde, ilaç etki mekanizmalarının aydınlatılmasında, klinik araştırmalarında, adli tıpta, çevre ile ilgili araştırmalarda, toksik madde tayini analizleri gibi çok geniş bir alanda DNA molekülü ile diğer maddeler arasındaki etkileşim araştırılmaktadır (Wang et al., 1997a; Brett et al., 1998; Meriç et al., 2002).

Bir hastalığın, kalıtsal bir davranışın, bakterinin ve virüslerinin tanınmasını, bunları belirten bir prob DNA dizisiyle hedef dizinin oluşturduğu çift sarmalın biyokimyasal yapısının incelenmesiyle mümkün kılınmaktadır (Mikkelsen, 1996). Bu olayı ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştüren çeviricinin yüksek duyarlılığı ve hibridizasyonun yüksek seçiciliği elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin çevre analizlerinde, DNA-ilâç etkileşim tayinlerinde ve bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların tanısında kullanımını gerektirmektedir.

Hibridizasyon tayinlerinde çeşitli immünokimyasal ve voltametrik metodlar kullanılmaktadır. Çalışma sırasında analite göre metoda karar verilmektedir. Birkaç örneğin çalışıldığı durumda daha hızlı yanıt vermesi nedeniyle voltametrik yöntemler tercih edilmektedir. Büyük miktarda bir seri benzer örnek analizlendiğinde, iyi bir otomasyona sahip EIA gibi immünokimyasal tekniklerin kullanılması daha uygun olmaktadır. Nükleik asit analizlerinde kullanılan voltametrik tekniklerde, biyokimyasal yöntemlerle izole edilmiş ve optik metotlar için gerekli olan saflıkta DNA ve RNA kullanılır. Elektrokimyasal yöntemlerden dönüşümlü voltametrde mikrogram seviyesinde, diferansiyel puls voltametrisinde ise nanogram seviyesine örneğe ihtiyaç duyulmaktadır. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile analizde temel prensip; çoğunlukla sensör-örnek matriks arayüzünde meydana gelen etkileşimler nedeniyle, akım veya potansiyelde meydana gelen değişikliklere dayanmaktadır.

Yüzeyde hibridizasyon tekniği ile tipik bir elektrokimyasal DNA sensörü; a) prob tutturulması (immobilizasyon), b) hedef dizi hibridizasyonu, c) işaretli veya işaretsiz tekniklerin kullanımıyla tayin olmak üzere 3 şekilde tasarımı yapılır.

Çözelti fazında hibridizasyon tekniği ile tipik bir elektrokimyasal DNA sensörü; a) prob ve hedef dizinin uygun tampon ortamında karıştırılması ile hibridizasyon, b) hibrit yapının elektroda tutturulması, c) işaretli veya işaretsiz teknikler ile tayin olmak üzere 3 şekilde tasarımı yapılır.

Diziye özgün DNA biyosensörleri, bir çevirim sistemi ile beraber DNA probundan oluşmaktadır. DNA biyosensörlerinin esas, DNA bazlarının hibridizasyonuna dayanır (Erdem et al., 2000; 2001).

Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde, analizi yapılmak istene hedef baz dizisinin tam karşılığı olan kısa 20-40 baz dizisi olan sentetik tek sarmallı DNA (ssDNA) oligomer (prob olarak isimlendirilir), elektrot yüzeyine bağlanır. Hedefi içeren bir örnek çözeltisine sensörün uygulanması ile prob bağlı elektrot yüzeyinde hibrit oluşur.

İki yöntem ile elektrokimyasal ölçümlerde elektrot yüzeyinde oluşan hibrit tayin edilir. Bunlardan biri elektroaktif indikatör kullanılması ile (örneğin bir redoks-aktif katyonik metal kompleksi) yapılan tayindir. Bu yöntemde indikatörü içeren bir çözeltiye, yüzeyinde hibrit oluşan elektrot daldırılır ve indikatörün hibrite bağlanma düzeyi belirlenir (Erdem et al., 1999b; 2002; 2003; Kara et al., 2002a; 2002b). Diğer bir yöntem de DNA bazlarından en elektroaktif olan guanin bazının 1.0 V' da verdiği yükseltgenme sinyali gözlenerek yapılan tayindir (Wang and Kawde, 2002; Meriç et al., 2002; Kara et al., 2003).

Günümüzde dizi seçimli DNA hibridizasyonu başarılı bir şekilde elektrokimyasal biyosensörler kullanılarak gerçekleştirilebildiği görülmektedir. Elektrokimyasal DNA biyosensörlerin uygulama alanları her geçen gün artmaktadır. Buna yönelmesinin temel sebepleri olarak, DNA' nın redoks tepkimesi tersinmez olması, DNA molekülüne ait akımların zor ölçülmesi gösterilebilir. Çünkü bu sebeplere dayanarak, düşük potansiyellerde tersinir elektrot tepkimeleri veren elektroaktif DNA problemlerinin hazırlanmasının gerekli olduğu fark edilmiştir. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile çok daha hızlı ve direk olarak DNA hibridizasyonlarının tayini yapılabilmektedir. Bu elektrokimyasal tanı yöntemi ile taşınabilir ve kolay kullanılabilir biyosensörler elde edilmiştir. Geliştirilen bu biyosensörler yüksek seçicilik ve düşük tayin sınırı özelliklerine olanak sağlamaktadır. Ayrıca elektrokimyasal DNA biyosensörleri, çok farklı çeşitli örnekler içerisinde kendi hedef DNA analizini yapabilme, hedef baz dizisindeki tek baz farklılığını bile ayırt edebilme

özellikleriyle DNA hibridizasyonu tayininde üstünlük göstermektedir. Ucuz maliyette, kısa sürede ve yüksek duyarlılıkta DNA tayinleri sağlamaktadır.

2.3. Manyetik Nanopartiküller

Nanoteknoloji çok hızlı bir şekilde gelişmekte olan araştırma alanlarının başında gelmektedir. Nanoteknoloji, mevcut teknolojilerin küçültülerek daha ileri düzeyde duyarlı sistemlerin oluşmasına imkan vermektedir. Bu yolla, daha iyi yapılmış, daha uzun süre dayanan, daha temiz, güvenli ve akıllı ürünleri evde, iletişimde, ulaşımda, tarım, tıp, kimya, fizik, biyoteknoloji ve endüstrinin her alanında kullanmak mümkündür.

Nanomalzemelerin yükselişi disiplinler arası çalışmaların sonucudur. Özellikle tıp ve biyoteknolojik alanlarda kullanılmak üzere çeşitli özelliklerde nanoboyutlarda nanomalzemeler sentezlenmeye başlanmıştır. Nanoboyutlu malzemeler üzerine gerçekleştirilen çalışmalar son yıllarda tek başına önemli bir alan olma doğrultusunda büyük bir gelişme göstermektedir. Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar; nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar veya nano ince filmler gibi farklı sınıflara ayrılmaktadır. Bu konu üzerine ilginin yoğunlaşmasının temel sebebi maddelerin belli boyut aralığında hacimsel yapılarından farklı olarak olağandışı özellikler ve işlevsellik sergilemeleridir (Goldstain, 1997; Rao et al., 2005).

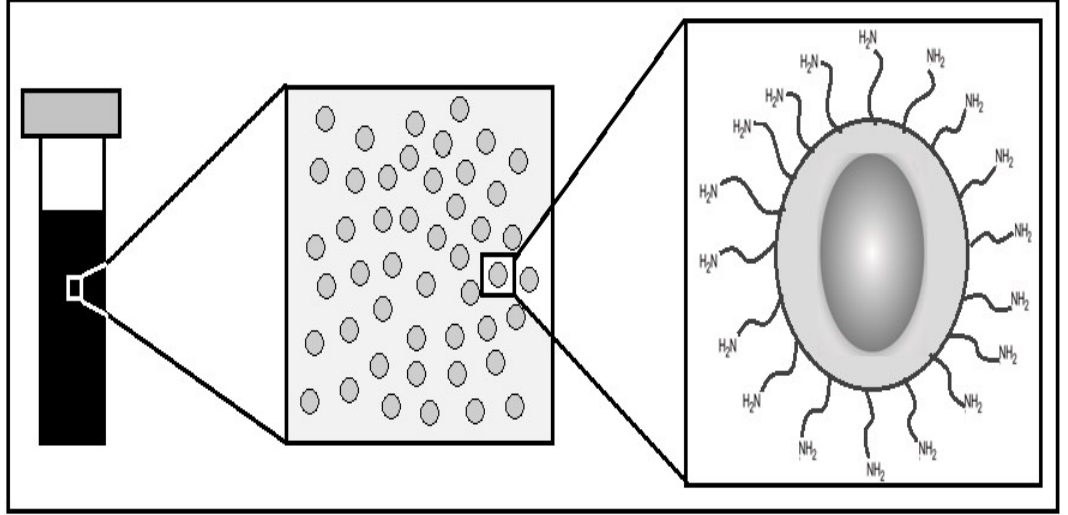
Boyutları 1-100 nm arasında değişen ve manyetik özellik gösteren kolloidal yapılar olarak tanımlanan manyetik nanopartiküller, nanoboyutlu malzemelerin dolayısıyla nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır (Rao et al., 2005; Miller et al., 2004). Bu nanopartiküller diğer ticari malzemelerden genelde farklı ve üstün kabul edilen özellikler göstermektedir. Sıkça belirtilen özelliklerinin çekiciliğinin günümüzde bilinen nedenleri ise; kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranı olarak ön plana çıkmaktadır (Liveri, 2006). Nanopartikül sentezi bu yapıların sergiledikleri olağandışı özellikler sebebiyle manyetik kayıt cihazları, ilaç taşıyıcıları ve özel teşhis aletleri gibi birçok biyoteknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasının yolunu açmıştır. Bunların yanı sıra, malzemelerin nanoboyut seviyesinde kontrolü nanotaşıyıcılar, sensörler, nanomakineler ve yüksek yoğunluklu veri depolama hücreleri gibi kendine özgü işlevselliğe sahip minyatürleştirilmiş aygıtların gerçekleştirilmesine izin vermektedir (Goldstain, 1997; Rao et al., 2005; Miller et al., 2004; Liveri, 2006).

Açıkça görülmektedir ki, nanoyapılı malzemelerin ve cihazların tasarlanması, üretimini ve işlevsel olarak kullanımını kapsayan nanoteknoloji alanındaki yeni gelişmeler için vazgeçilemez ilk adım nanopartiküllerin üretimidir.

Biyoteknolojide manyetik nanopartiküller, manyetik ayırma işlemi için kullanılmaktadır. Manyetik ayırma proteinleri ya da diğer biyomolekülleri yakalamak için kullanılan hızlı ve basit bir metottur. Bu işlem için, dış manyetik alan uygulandığında hemen mıknatıslanan ve manyetik alan kaldırıldığında hemen tekrar dispers olabilen süperparamanyetik nanopartiküller kullanılmaktadır.

İlaç sektöründe de manyetik nanopartiküller, ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır. Manyetik nanopartiküllere tutturulmuş ilaç dokuya enjekte edilerek bu parçacıkların rehberliğinde istenilen bölgeye dışarıdan manyetik alan uygulanarak taşınır. Terapi tamamlanana kadar parçacıklar burada tutulur ve terapi tamamlanınca uzaklaştırılır.

Dizi seçimli nükleik asit hibridizasyonu, enzimle işaretli (Palecek et al., 2002b; Wang et al., 2002b) ve herhangi bir işaretleme olmadığı sistemlerde (Erdem et al., 2006a; Wang et al., 2001) ya da metal nanopartiküllerle kombine tasarlanmış manyetik nanopartiküllere dayalı elektrokimyasal biyosensörler (Liang et al., 2007; Pita et al., 2008; Sole et al., 2001; Son et al., 2007; Wang et al., 2004) ile etkin manyetik ayırma sayesinde ve düşük tayin sınırları içerisinde farklı ölçüm yöntemleri uygulanarak analiz edilebilmektedir. Enzimle işaretli sistemlere örnek bir çalışma olarak Wang ve arkadaşları tarafından, göğüs kanserindeki mutasyon geninin streptavidin-alkalen fosfataz enzimine dayalı biyomanyetik yöntem ile tayin edilmesi verilebilir (Wang et al., 2002b). Wang ve arkadaşlarının diğer bir çalışmada da, hiç bir işaretleme yapmadan manyetik nanopartiküllere dayalı bir yöntemle göğüs kanseri genindeki mutasyonun elektrokimyasal tayinine yönelik bir sensör geliştirilmiştir (Wang et al., 2001). Liang ve arkadaşlarının çalışmada, amino gruplarıyla modifiye silika kaplı manyetik nanopartiküller kullanılarak, Raman spektroskopisi yöntemiyle HIV tayini gerçekleştirilmiştir (Liang et al., 2007). Pita ve arkadaşlarının çalışmada, altın kaplı manyetik nanopartiküller kullanılarak, PNA ve DNA hibridizasyonuna dayalı biyosensör geliştirilmiştir (Pita et al., 2008).



Şekil 2.14. Çalışmamızda kullanılan manyetik nanopartiküllerin gösterimi.

Etkin ayırma ve düşük tayin sınırı avantajı sağlayan manyetik nanopartiküllerle modifiye edilmiş elektrokimyasal biyosensörlerinin kullanımı son yıllarda oldukça artış göstermektedir (Berti et al., 2009; Erdem et al., 2005; 2007b; 2013a; 2013b, 2014, Geng et al., 2011; Hassen et al., 2008; Karadeniz et al., 2009; Laschi et al., 2009; Loaiza et al., 2011; Palecek et al., 2002a; 2007; Smerkova et al., 2013; Wang et al., 2001; 2002b; 2003a; 2003b; 2004; Yang et al., 2013). Bu çalışmalarda kullanılan manyetik nanopartiküller, paramanyetik özellik taşımaktadır. Bu sayede manyetik partiküller bulundukları sıvı fazdan mıknatıs yardımıyla kolayca ayrılabilmekte ve mıknatıs çözeltiden uzaklaştırıldığında da, manyetik partiküller sıvı faz içinde tekrar kolayca dağılabilmektedir.

Geniş bir yüzey alanına sahip olması ve farklı elektronik özelliğinin olması manyetik nanopartiküllerin, her yeni teknolojik sistemlere uygulanıp kullanılabilirliği arttırılmaktadır. Bu partiküller, aynı zamanda kimyasal ligandlar ve biyomoleküllerle geniş oranda kolayca modifiye edilebilmektedir. İşte bu özelliklerle manyetik nanopartiküllerin nano boyutlarda olması ve çeşitli cihazlara uygulanabilmesinin kolaylığı ile birleştirildiğinde, kimyasal ve biyokimyasal alandaki önemli uygulamalar için manyetik nanopartiküller çok uygun hale getirmektedir.

Aşağıdaki çizelge 2.1 de elektrokimyasal yöntemlerle manyetik partiküllere dayalı nükleik asit hibridizasyon tayinine yönelik çalışmaların bazıları yer almaktadır.

Çizelge 2.1. Manyetik partiküllere dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile yapılmış çalışmalara örnek.

Manyetik Partikül	Analit	Yöntem	Kaynak
streptavidin modifiye MP	biotin işaretli HBV ve HIV DNA	CV ve EIS	(Hassen et al., 2008)
altın modifiye MP	biotin işaretli DNA	CSV	(Wang et al., 2003b)
silika modifiye MP	S.aureus ve E.coli PCR	SWV	(Smerkova et al., 2013)
streptavidin modifiye MP	microRNA	LSV	(Erdem et al., 2013)
MPC-S	DNA ve RNA	CSV	(Palecek et al., 2002a)
streptavidin modifiye MP	biotin işaretli DNA, PNA ve LNA	CV ve Kronoamperometri	(Laschi et al., 2009)
gümüş modifiye nanopartikül	amino işaretli DNA	ASV	(Yang et al., 2013)
aljinik asit modifiye CoMP	amino işaretli E.coli DNA	DPV	(Geng et al., 2011)
altın modifiye MP	tiyol işaretli DNA	SWV	(Loaiza et al., 2011)
streptavidin modifiye MP	biotin işaretli DNA	Kronopotansiyometri	(Wang et al., 2001)
streptavidin modifiye MP	biotin işaretli DNA	DPV	(Wang et al., 2002b)

streptavidin modifiye MP	biotin işaretli DNA	Kronopotansiyometri	(Wang et al., 2004)
streptavidin modifiye MP	biotin işaretli HBV PCR	DPV	(Erdem et al., 2005)
streptavidin modifiye MP	ECHI ve DNA	DPV	(Karadeniz et al., 2009)
streptavidin modifiye MP	biotin işaretli PCR	Kronoamperometri	(Berti et al., 2009)
streptavidin modifiye MP	biotin işaretli HBV	DPV	(Erdem et al., 2007b)

MP: Manyetik partikül, **DPV:** Diferansiyel puls voltametri, **CV:** Dönüşümlü voltametri, **EIS:** Elektrokimyasal empedans spektroskopisi, **CSV:** Katodik sıyrma voltametrisi, **ASV:** Anodik sıyrma voltametrisi, **LSV:** Doğrusal taramalı voltametri, **SWV:** Kare dalga voltametrisi.

2.4. Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi (ESR) (Sarıkaya, 2008)

Elektron spin rezonans spektrometresi, moleküllerdeki ortaklaşmamış elektron spinlerinin dışarıdan uygulanan manyetik alan ile rezonansa getirilmesinden geliştirilmiştir.

Maddenin manyetik özellikleri, maddeyi oluşturan atomik birimlerin manyetizmasına ve bu atomik birimlerin kendi aralarındaki etkileşmeye bağlıdır. Atoma sürekli manyetik momenti, çekirdek ve elektronlar kazandırır. Atomun toplam manyetik momentini, elektron ve çekirdek manyetik momentlerinin toplamı oluşturur. Manyetik rezonans, statik manyetik alan uygulayarak bu manyetik momentlerle bağlantılı enerji düzeyleri yaratıp bunlar arasında geçişler oluşturma esasına dayanır. Elektron spin rezonans, elektron ve çekirdeğin atoma kazandırdığı manyetik momentlerin enerji düzeyleri arasındaki geçişleri inceleyen bir spektrometredir. ESR spektroskopisinde mikrodalgalar kullanılmaktadır. Üzerine, frekansı sabit tutulan yönlendirilmiş mikrodalgalar gönderilen örnek, güçlü bir mıknatısın kutupları arasına yerleştirildikten sonra rezonans ortaya çıkana dek manyetik akı yoğunluğu yükseltilmektedir. Rezonans olayı olduğu sıralarda, enerji kaybı çok küçük olduğu için fark edilebilir durumdadır ve bu

durumda incelenen örnek ile ilgili yapılar veriler elde edilir. Rezonans koşulu sağlandığında ESR uygun bir spin sisteminin soğurduğu enerjiyi gözlemler.

Ortaklanmamış bir elektronun spin hareketlerinden dolayı manyetik akı yoğunluğu B olan bir manyetik alandaki enerjisi ve farklı yönlerdeki spin hareketleri nedeniyle manyetik alanda yarılan enerji düzeyleri arasındaki fark için sırayla;

$$E = g\mu_B m_s B \quad (\mu_B = \text{Bohr magnetonu}, m_s = \pm 1/2)$$

$$\Delta E = h\nu_s = hc/\lambda_s = (1/2)g\mu_B B - (-1/2)g\mu_B B = g\mu_B B \quad \text{eşitliği yazılır.}$$

Spinleri farklı yönlerde olan elektronların manyetik alandaki spin enerjileri ve bu enerjiler arasındaki farkın manyetik akı yoğunluğu ile değişimi gözlenmektedir. Ters spinli elektronların enerji düzeyleri arasındaki geçişler ESR spektrumunda bir pik olarak ortaya çıkmaktadır. ESR spektrumunda ortaya çıkan birden fazla pik elektron ve çekirdek spin manyetik momentlerinin etkileşmesinden ortaya çıkan enerji yarılmaları arasındaki geçişlerden kaynaklanmaktadır.

ESR spektrometresi, 10" magnet, X ve Q bantlarında çalışır. Standart X bant kavitesi ile birlikte kullanılan helyum kryostatları mevcuttur. Bu kryostatlar sayesinde, 4 K ile oda sıcaklığı arasındaki değerlerde ölçüm yapılabilir. Düşük sıcaklık deneylerinde kullanılabilir.

ESR spektrometresi;

- Radikalik reaksiyonların kinetiğinde,
- Tek kristallerde kristal alanları ve farmasotiklerin incelenmesinde,
- Düşük sıcaklıklarda yeniden birleşimde,
- Canlı dokularda ve akışkanlardaki serbest radikallerde,
- Polimer özelliklerin belirlenmesinde,
- Serbest radikallerin korozyon sırasındaki davranışlarında,

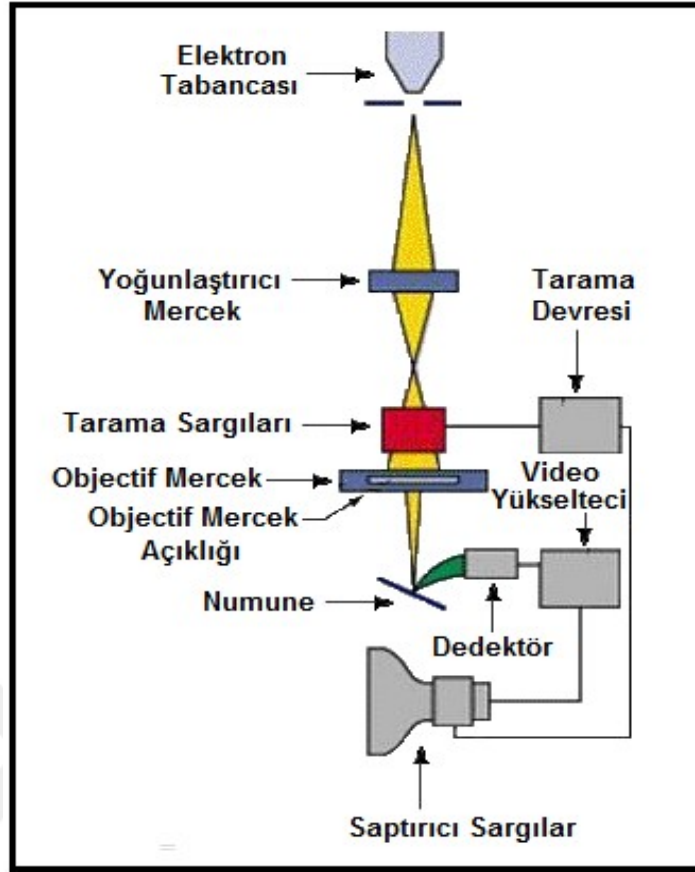
- Arkeolojik yaş tayininde,
- Kaza dozimetresinde,
- Işınlanmış gıdaların tespitinde,
- Radyasyonun etkileri ve zararları araştırılması gibi uygulamalarda kullanılmaktadır.

2.5. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) (Flegler et al., 1993)

İnsanlar etrafındaki her şeyi görebilme yeteneğine sahip değildir. Çünkü insan gözü belli bir uzaklığa kadar ve belli boyutlarda olan ayrıntıları görebilmektedir. Birçok bilim alanında yapılan araştırmalar sırasında ayrıntılı inceleme için sadece insan gözünün görebilme yeteneği yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle çeşitli mercekler kullanılarak, daha küçük ayrıntıların incelenmesine olanak sağlayan optik cihazlar geliştirilmiştir. Gelişen teknolojiyle, her geçen gün ortaya çıkan gereksinimleri karşılamak adına optik cihazlar üzerinde de birçok yenilik yapıp bu cihazlar geliştirilmiştir. Bu sayede yüksek derecelerde büyütme ve üzerinde analizler yapılabilen elektronik ve optik sistemlerin birlikte kullanıldığı cihazlar üretilmiştir.

Geliştirip tasarlanan elektronik-optik sistemlerden biri olan taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope-SEM), bu amaçla araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Taramalı Elektron Mikroskobu, birçok araştırma çalışmasında kullanıldığı gibi, sanayinin bazı alanlarında hata analizlerinde, biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal uygulamalarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. 1965 yılında ilk olarak kullanıma başlanan SEM, birçok teknik gelişmeler yapılarak son halini almıştır.

Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) görüntü, birkaç aşamadan sonra elde edilmektedir. İlk olarak, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronlar, numune üzerinde odaklanır. Elektronlar demet halinde numune yüzeyinde taratılır ve bu tarama işlemi sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan etkiler algılayıcılarda toplanır. Son sistemlerde algılayıcılardan gelen sinyaller, dijital sinyallere çevrilerek bilgisayar monitörüne verilmesiyle görüntü elde edilir.



Şekil 2.15. Taramalı elektron mikroskobunun şematik gösterimi (Flegler et al., 1993).

SEM, optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemi olmak üzere şekil 2.15 de gösterildiği gibi üç temel kısımdan oluşmaktadır. Optik kolon kısmında; elektron demetinin kaynağı olan elektron tabancası, elektronları numuneye doğru hızlandırmak için yüksek gerilimin uygulandığı anot plakası, ince elektron demeti elde etmek için yoğunlaştırıcı mercekler, demeti numune üzerinde odaklamak için objektif merceği, bu merceğe bağlı çeşitli çapta apatürler ve elektron demetinin numune yüzeyini taraması için tarama bobinleri yer almaktadır. Mercek sistemleri elektromanyetik alan ile elektron demetini inceltmekte veya numune üzerine odaklamaktadır. Tüm optik kolon ve numune 10^{-4} Pa gibi bir vakumda tutulmaktadır. Görüntü sisteminde, elektron demeti ile numune girişimi sonucunda oluşan çeşitli elektron ve ışımaları toplayan dedektörler, bunların sinyal çoğaltıcıları ve numune yüzeyinde elektron demetini görüntü ekranıyla senkronize tarayan manyetik bobinler bulunmaktadır.

Yüksek enerjili demet elektronları numune atomlarının dış yörünge elektronları ile elastik olmayan girişimi sonucunda düşük enerjili Auger elektronları oluşur. Bu elektronlar numune yüzeyi hakkında bilgi taşır ve Auger

Spektroskopisinin çalışma prensibini oluşturur. Yine yörünge elektronları ile olan girişimler sonucunda yörüngelerinden atılan veya enerjisi azalan demet elektronları numune yüzeyine doğru hareket ederek yüzeyde toplanırlar. Bu elektronlar ikincil elektron (seconder electrons) olarak tanımlanır. İkincil elektronlar numune odasında bulunan sintilatörde toplanarak ikincil elektron görüntüsü sinyaline çevrilir. İkincil elektronlar numune yüzeyinin 10 nm veya daha düşük derinlikten geldiği için numunenin yüksek çözünürlüğe sahip topografik görüntüsünün elde edilmesinde kullanılır.

2.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) (Skoog and West, 1981)

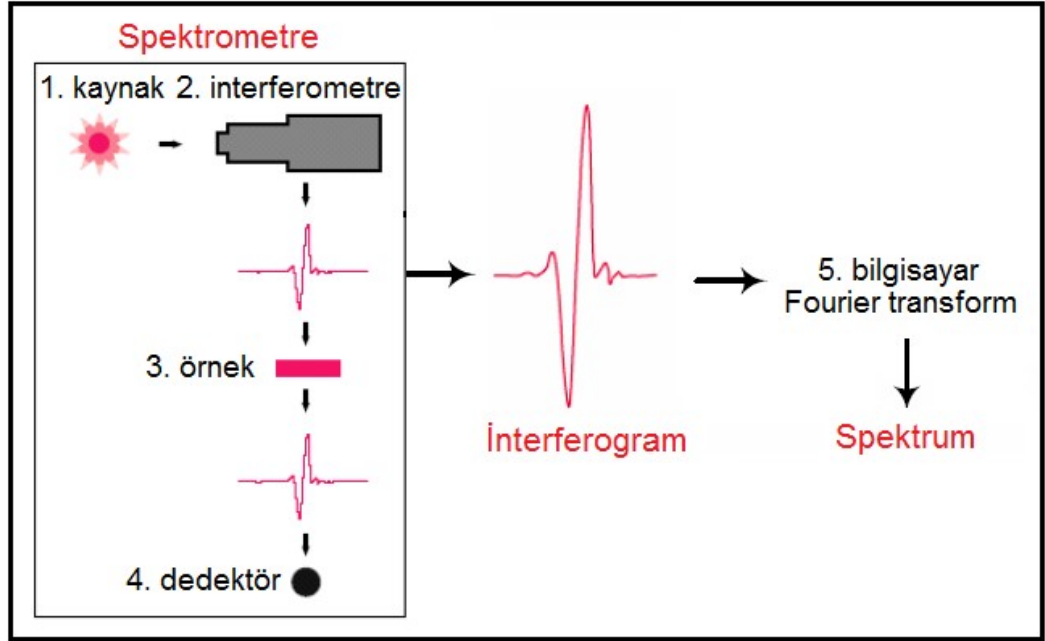
Fransız matematikçisi Sean Fourier'in geliştirdiği ve Fourier transformasyon (dönüşüm) olarak adlandırılan bir matematiksel işleme göre, bir dalga hareketi basit sinüs veya kosinüslü ifadelerin toplamı ile tanımlanmaktadır.

$$y = A (\sin 2 \pi vt + 1/3 \sin 6 \pi vt + 1/3 \sin 10 \pi vt + \dots + 1/n \sin 2 n \pi vt)$$

Fourier dönüşümüne bakıldığında karışık olsa da, bilgisayarlarla kolay bir şekilde çözülen rutin işlemler haline getirilmiştir. Çoklu cihazların çoğunda sinyal çözme işlemi "Fourier transform" a dayanır ve bu nedenle Fourier transform cihazlar denir. Fourier transform cihazları, optik spektroskopi olduğu gibi nükleer manyetik rezonans, kütle ve mikrodalga spektroskopileri ve bazı elektroanalitik ölçmeler için de kullanılmaktadır.

İlk olarak 1950'li yıllarında kendi alanlarında yaptıkları çalışmalar sırasında astronomlar tarafından Fourier transform spektroskopisi geliştirilmiştir. Fourier tekniğiyle, kaynaklardan aldıkları çok zayıf sinyalleri çevresel gürültülerden ayrılması sağlanabilmiştir. Fourier transform spektroskopinin ilk kimyasal uygulamaları, on yıl kadar sonra uzak infrared bölgede yapılabilmektedir. 1960'lı yılların sonunda uzak infrared ($10\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) ve orta infrared bölgelerde çalışabilen cihazlar yapılmıştır.

Bir örneğin analiz prosesi şekil 2.16 da gösterildi.



Şekil 2.16. FTIR analiz prosesi.

Siyah-cisim kaynaktan çıkan infrared ışın demeti, enerjiyi kontrol eden bir yarıktan geçerek, spektral kodlamanın yapıldığı interferometreye girmektedir. Oluşan interferogram sinyali, örneğin özelliklerine göre geçirilmek yada yansıtılmak üzere örneğin olduğu bölüme yönlendirilmektedir. Burada enerji, örnek tarafından absorblanmaktadır. Örneğin olduğu bölümden çıkarak, son ölçüm için demet dedektörden geçmektedir. Fourier transformasyonun gerçekleştirildiği kısım da ise, ölçülen sinyal sayısallaştırılıp, bilgisayara gönderilmektedir. Elde edilen IR spektrumu sonuç olarak kaydedilmektedir.

Bazı çalışmalarda düşük ışın enerjisi sorunu olmasına rağmen, Fourier transform spektroskopinde sorunsuz spektrumlar alınarak, başarılı sonuçlar elde edilmesi sağlanır. FTIR'ın önemli avantajları şu şekilde sıranabilir:

Hızlılık: Bu cihazlarda hızlılık özelliği, Fellgett avantajı olarak da tanımlanmaktadır. FTIR ile yapılan ölçme işlemi, tüm frekanslar aynı anda ölçüldüğünden sadece saniyeler içinde tamamlanmaktadır. Bu sistemin Fellgett avantajı, prizma veya gratingli cihazlardaki sinyal / gürültü oranlarını önemli derecede düzenlemektedir.

Hassasiyet: Kullanılan dedektörlerin çok daha hassas olması sebebiyle cihazın hassasiyeti oldukça yüksektir. İnterferometrenin optik sistemi, yüksek enerjili ışın geçmesine olanak vermektedir. Bu sayede gürültü seviyesinin düşmesi sağlanıp,

dedektöre ulaşan yüksek enerji hassasiyeti artırılır. Hızlı tarama yapılması sebebiyle sinyal/gürültü oranı yükseltileceğinden, ayrıca bir gürültü düzenlemesi de elde edilmiş olur.

Mekanik Basitlik: Parçaların takıp çıkarma işleminin en az düzeye düşürmesi sebebiyle sistem mekanik basitliğe sahiptir. Sisteme bakıldığında tek hareketli parça hareketli aynadır.

İç Kalibrasyon: Dışarıdan IR kalibrasyon işlemine gerek duyulmayıp, sistemin kalibrasyonu kendi kendine yapılmaktadır. FTIR enstrümanlarda, iç dalga boyu kalibrasyon standardı olarak HeNe lazerler kullanılmaktadır.

Fourier transform cihazlarının ve ayrıca bakımlarının çok pahalı olması bu cihazın dezavantajı olarak görülmektedir.

2.7. DNA Çip Teknolojisi (Schena et al., 1995)

Bir çip üzerinde genler veya RNA, protein gibi yapıları arasındaki ilişkinin aynı anda araştırabilmesi ve ayrıca nükleik asitlerin çalışma prensibinin anlaşılabilmesi mikroçip teknoloji ile sağlanabilmektedir. Mikroçip teknolojisi ile ilgili araştırmalara, moleküler tanı yöntemlerinde mikrofabrikasyon teknolojisinin geliştirilmesi sonucunda başlanmıştır. Bu teknolojilere insan genom projesinin tamamlanıp eklenmesiyle, mikroçip teknolojisi ile ilgili çalışmalar da hız kazanmıştır. Tıp alanında, sağlık ekibinin kolaylıkla kullanabileceği, küçük boyutlarda, hasta başında DNA analizlerinin gerçekleştirileceği yeni cihazların tasarımları, ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde başlatılmıştır. Son yıllarda birçok ülkede, DNA çipleri üzerinde araştırmalar yoğunluk kazanmaktadır. Gelecekte birçok alanda umut vaad eden bu teknoloji, nanoteknolojik gelişmelerle birleştirilerek çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Mikroarray teknolojisi, genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için geliştirilen son yıllarda sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu teknolojiye, DNA'ların çipler, küçük cam slayd veya naylon membran üzerinde hibridizasyonu gerçekleştirilmektedir. Şuan için kullanımda, naylon membran üzerine sentezlenen cDNA mikrodizilimleri, cam üzerine sentezlenen cDNA mikrodizilimleri ve oligonükleotide dizilimler (DNA çipleri) olmak üzere üç farklı çeşit mikroarray bulunmaktadır. cDNA mikroarrayleri, sabitlenmiş kısa cDNA dizilerini içermektedir. Bu mikroarrayler, cam üzerine ışık etkisiyle

aktifleşen kimyasal kullanılarak direkt olarak veya UV maskelemesi tekniği kullanılarak sentezlenmektedir. Oligonükleotit mikroarrayler, Affimetrix firması tarafından geliştirildiği için Affimetrix veya DNA çipleri olarak adlandırılmaktadır. DNA çipleri, fotolitografi tekniği kullanılarak cam slayd veya silikon yüzeyler üzerine sentezlenen oligolardan (mRNA ve/veya cDNA) oluşmaktadır.



Şekil 2.17. Affimetrix firmasına ait mikroarray görünümü (Affymetrix, 2016).

Mikroarray teknolojisi, gen ifade profillerinin çıkarılması, DNA dizi analizi, erimsel çalışmalar, mutasyon analizleri, polimorfizm analizleri, potansiyel terapötik ajanların bulunması, geliştirilmesi, optimizasyonu ve klinik değerlendirmesi gibi çalışma alanlarında kullanılmaktadır.

Mikroarray tekniği, yoğun olarak gen farklılıklarının ölçülmesinde kullanılmaktadır. Genomik DNA'dan transkripsiyona uğrayan genlerin tamamı gen olarak tanımlanmaktadır. Gen ekspresyon profili sayesinde bir hücrenin fenotipi ve fonksiyonu belirlenmektedir. Hücrenin bulunduğu şartlara göre gen ekspresyon hızla değişebilmektedir. Bu düzeydeki değişimler takip edildiğinde, bu genlerin kodladığı proteinlerin fonksiyonları hakkında önemli bilgiler edinilebilmektedir. Bazı fizyolojik ve patolojik süreçlerde gen ekspresyonlarındaki değişimi incelemek amacıyla mikroarrayler kullanılmaktadır.

DNA mikroarray teknolojisi günümüz hastalıklarından kanser hastalığına neden olan gen dizileri hakkında geniş kapsamlı incelemeler yapılmasına olanak sağlamaktadır. Kanser hücrelerindeki gen ekspresyon farklılaşmasının karakterize edilmesinde kullanılmaktadır. Örneğin, insandaki sağlıklı bir dokunun

hücrelerindeki gen, kanserli doku genleri ile karşılaştırılabilmektedir. Bu sayede, kanser hastalığının ortaya çıkmasında rol oynayan gen dizileri hakkında bilgi edinmeyi sağlamaktadır. Ayrıca, kanser hastalığının tedavisinde, kanser hücrelerinin sınıflandırılması sağlamaktadır.

Mikroarray teknolojisinin avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Gen ifadesi modellerinin genel görüntüsü elde edilebilmektedir.
- Belirli bir ortamda belli bir hücre türü için gen ifadesi profili belirlenebilmekte ve bu belirlenen profil farklı çevre koşullarında farklı hücre tiplerinin gen ifadesi profilleriyle bu sayede karşılaştırılabilmektedir.
- Çok pratik bir şekilde binlerce genin analizi kısa bir sürede yapılabilmektedir.
- Analizler sırasında oluşabilecek insan kaynaklı hataların ortadan kaldırılmasını sağlayan otomasyon sistem özelliğine sahip bir teknoloji ürünüdür.

Bilim adamlarının büyük ilgisi çeken, her geçen gün daha fazla araştırma da yer alması beklenen Mikroarray'lerin birçok avantajının olması yanı sıra bazı problemlere de sahiptir. Mikroarray teknolojisinin dezavantajları da aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- Bazı durumlarda, yapılan çalışmalar sonucunda mikroarray'den elde edilen veriler klasik gen ekspresyon analiz yöntemleriyle karşılaştırılmalıdır. Çünkü yapılan çalışmalarda deney düzeneği nükleik asit hibridizasyon yöntemine dayanmakta ve yüksek oranda benzerlik gösteren DNA dizilerinde bazı problemler ortaya çıkmaktadır.
- Yapılan bütün mikroarray deneyleri aynı hassasiyette olmamaktadır.
- Ekspresyonda yapılan küçük değişiklikler, analiz sırasında fark edilemeyecek kadar küçük boyuttadır.

- Yapılan araştırmalar sırasında farklı çipler kullanılması durumunda, deneyler birbiriyle karşılaştırıldığında ortaya çıkan farklılıklar karşısında bazı zorluklar yaşanmaktadır.
- Optimizasyon ve standardizasyon sırasında ortaya bazı sorunlar çıkmaktadır.
- Yeni ve geliştirilmekte olan bu teknolojiye, bir deneyden elde edilen sonuçları her yönüyle değerlendirebilecek biyoinformatik programları henüz geliştirilememiştir.

Bu dezavantajları ortadan kaldırıp, bu teknolojiyi geliştirmek adına bazı yeni kuruluşlar oluşturulup Mikroarray'lerin sorunsuz bir şekilde kullanılması amaçlanmaktadır. Ayrıca, bir yandan da araştırmalarda mikroarray ile çalışmalardan elde edilen sonuçların geçerliliği, tekrarlanabilirliği ve hayatta uygulanabilirliği konusunda geliştirme çalışmaları hızla devam etmektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar

Deneyler ve ölçümler sırasında kullanılan tüm cihazlar ve donanımlar

Terazi (Mettler Toledo AB204-S)

Ses titreşimli temizleyici (Bandelin Sonorex)

Autoclave (HICLAVE, HG-50)

Karıştırıcı (Ika Labortechnik, KS125 basic)

Etüv (Memmert)

pH-metre (Orion 420-A)

Biyomanyetik ayırma platformu (Sigris MCB-1200)

Vorteks (Velp scientifica)

Faraday kafesi

Potansiyostat (μ AUTOLAB, GPES 4,9 yazılımlı; Eco Chemie)

Kalem grafit elektrot (Tombo, Japonya)

Ag/AgCl referans elektrot (BAS)

Platin tel (yardımcı elektrot olarak kullanıldı.)

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR, Perkin Elmer)

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM, Quanta 250 S FEG)

3.2. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

Asetik asit (% 99-100) (Sigma Aldrich)

Sodyum hidroksit (Sigma Aldrich)

Sodyum klorür (Merck)

Potasyum dihidrojen fosfat (Merck)

Dipotasyum hidrojen fosfat (Merck)

Etanol (Merck)

N-hidroksisüksinimit (% 98) (Sigma-Aldrich)

Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA,% 99) (Sigma Aldrich)

Tris(hidroksimetil)aminomethan hidroklorit (Tris-HCl) (Merck)

D-Glukoz (Sigma-Aldrich)

(3-aminopropil)trioksisilan (APTES, % 98) (Sigma-Aldrich)

Manyetik partikül (MB, Fe_3O_4) (Sigma Aldrich)

Glisin (Sigma-Aldrich)

Polioksietilen sorbitan monolorat (Tween-20) (Sigma)

Tiyol işaretli HBV prob DNA (hepatit B virüsünü temsil eden kısa DNA dizisi) (20 baz)

HBV hedef DNA dizisi

Tek bazı hedef diziden farklı olan HBV DNA dizisi

Rastgele HBV DNA dizisi

Tiyol işaretli 12 guanin bazlı prob dizisi

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

3.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

3.2.1.1. Oligonükleotit çözeltilerinin hazırlanışı

Çalışmalarımızda kullanılan oligonükleotit dizileri TIB Molbiol (Almanya) firmasından liyofilize toz halinde temin edildi. Stok çözeltiler Tris-EDTA (pH=8,0) ile tamponu 500 µg/mL konsantrasyonunda hazırlandı.

Kullanılan diziler;

Tiyol işaretli HBV prob DNA dizisi:

5’-SH-C₆-AAT ACC ACA TCA TCC ATA TA-3’

HBV hedef DNA dizisi:

5’-TAT ATG GAT GAT GTG GTA TT-3’

Tek bazı hedef diziden farklı HBV DNA dizisi (MM):

5’-TAT C TG GAT GAT GTG GTA TT-3’

Rastgele HBV DNA dizisi (NC):

5’-ATC TCC TGC AGC CCT CGC TC-3’

Tiyol işaretli 12 guanin bazlı prob dizisi;

5’-SH-C₆-AGG GTG TCT GAA GGA GGG GG-3’

Bu çalışmada kullanılan Hepatit B virüsünü (HBV) temsil eden kısa DNA dizileri daha önce yapılan çalışmalarda (Erdem et al., 1999a; Erdem et al., 2000; Erdem et al., 2005; Muti et al., 2012) belirtildiği gibi HBV’yi temsil eden gen

haritasından seçildi. Prob dizisinin amino işaretli manyetik partikül yüzeyine daha efektif bir şekilde bağlanması amacıyla, çalışmamızda tiyol grubu ile işaretlenmiş kısa DNA prob dizileri kullanıldı (Medley et al., 2011).

3.2.1.2. Tampon çözeltilerin hazırlanması

Tüm tampon çözeltiler ultra saf su ile hazırlanıp, cam şişelerde buzdolabında saklandı.

10 mM Tris-EDTA tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 8,0):

1 litre Tris-EDTA tampon çözeltisi, 1,576 g Tris-HCl ve 0,372 g EDTA içermektedir. pH 8,0 değerine 1 N NaOH ilavesi ile, pH-metre ile ölçülerek ayarlandı.

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

Ölçümler sırasında kullanılan 0,5 M asetat tampon çözeltisinin 1 litresi, 28,9 mL derişik asetik asit ve 1,168 g NaCl içermektedir. pH değerinin 4,8 olması için 1 N NaOH ilavesi yapılarak pH metre ile ayarlandı.

50 mM fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (PBS, pH 7,4):

1 litre 50 mM fosfat tampon çözeltisi, 1,36 g KH_2PO_4 , 6,96 g K_2HPO_4 ve 1,168 g NaCl içermektedir. Hazırlanan çözeltinin 7,4 pH değerine ayarlanması için gerekirse 1 N NaOH ile pH ayarlaması yapıldı.

N-hidroksisüksinimit tampon çözeltisinin hazırlanışı (NHS):

1 mL 50 mM PBS (pH=7,4) çözeltisi içerisinde, 0,05 M NHS çözeltisi hazırlandı. 1 mL NHS çözeltisi 5,52 mg NHS içermektedir.

0,5 M Glukoz çözeltisinin hazırlanışı:

100 mL 10 mM NaOH çözeltisi içerisinde, 0,5 M glukoz çözeltisi hazırlandı. 100 mL 0,5 M glukoz çözeltisi, 9,91 g glukoz içermektedir.

(3-aminopropil)trioksisilan çözeltisinin hazırlanışı (APTES):

200 mL etanol içerisine 40 µL APTES eklenerek çözelti hazırlandı.

10 mM fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (PBwS, pH 7,0):

1 litre 10 mM fosfat çözeltisi, 1,74 g K_2HPO_4 içermektedir. Hazırlanan çözeltinin 7,0 pH değerine ayarlanması için gerekirse 1 N NaOH veya 1 N HCl ile pH ayarlaması yapıldı.

Fosfat-glisin tampon çözeltisinin hazırlanışı (PBG):

10 mM fosfat çözeltisi içerisinde % 0,2 lik glisin tamponu hazırlandı. 100 mL fosfat-glisin tampon çözeltisi, 0,15 g glisin içermektedir.

Fosfat-tween 20 tampon çözeltisinin hazırlanışı (PBTw):

10 mM fosfat çözeltisi içerisinde % 0,2 lik tween 20 tamponu hazırlandı. 100 mL fosfat-tween 20 tampon çözeltisi, 0,2 mL tween 20 içermektedir.

3.3. Kullanılan Yöntem

Çalışma sırasında, amino işaretli manyetik nanopartikül (nano-MP-NH₂) sentez basamakları (Jiang et al., 2011; Yamaura et al., 2004; Morales et al., 2010), sentezlenen manyetik nanopartikül yüzeyinde DNA hibridizasyon işlem basamakları (Medley et al., 2011; Karadeniz et al., 2009; Erdem et al., 2007b; Erdem et al., 2006b; Erdem et al., 2005; Wang et al., 2004; Wang et al., 2002b; Wang et al., 2001) ve bu hibridin aktivasyonu yapılmış tek kullanımlık kalem grafit elektrotların yüzeyine tutturulma basamakları (Erdem et al., 2005; Erdem et al., 2006b; Erdem et al., 2007b; Wang et al., 2001; Wang et al., 2002b; Wang et al., 2004) mevcut literatürlerden belirlenen yöntemlere göre gerçekleştirildi.

3.4. Kullanılan Elektrotların Hazırlanışı

Çalışmada kullanılan tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar, 0,5 Tombo HB kalem uçları 3 cm olacak şekilde kesilerek hazırlandı. Ölçüm sırasında ucun 1 cm lik kısmı elektrokimyasal hücre içerisinde kalacak şekilde kalem içine

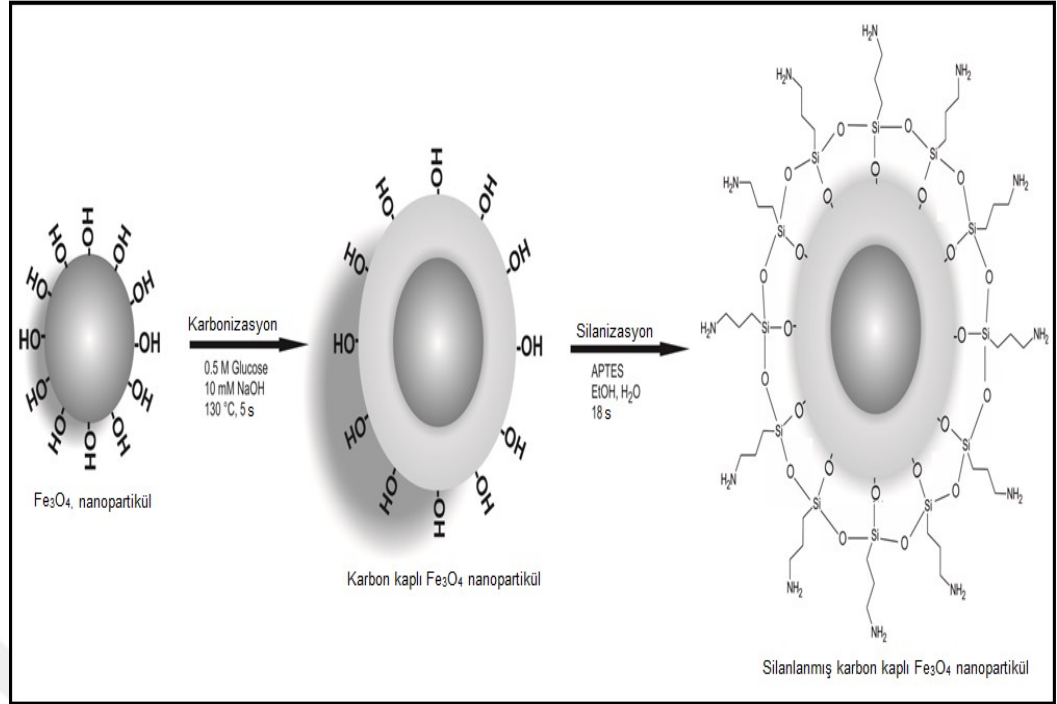
yerleştirildi (Wang et al., 2000; Wang et al., 2001; Özsöz et al., 2003; Karadeniz et al., 2009; Erdem et al., 2009;).

Çalışma elektrotu olarak kullanılan kalem grafit elektrotlar, 0,05 M ABS çözeltisinde, + 1,4 V, 30 saniye boyunca uygulayarak aktive edilerek kullanıldı (Erdem et al., 2009; Erdem et al., 2007b; Erdem et al., 2005; Karadeniz et al., 2007; Wang et al., 2001).

3.5. Kullanılan Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi

Manyetik nanopartikül yüzeyinde DNA hibridizasyonu için ilk önce aşağıdaki prosedür uygulanarak amino işaretli manyetik nanopartikül (nano-MP-NH₂) sentezi gerçekleştirildi:

0,1 g Fe₃O₄, 3.2.1.2. de hazırlanışı anlatılan 40 mL 0,5 M glukoz çözeltisi içerisinde dağıtıldı. Fe₃O₄' ün glukoz çözeltisinde daha iyi dağıtılmasını sağlamak için, 15 dakika ses titreşimli temizleyici cihaz ile sonike edildi. 0,5 M glukoz çözeltisi içerisinde iyice dağıtılan Fe₃O₄, karamelizasyon basamağı, 5 saat boyunca 130 °C' de autoclave cihazında bekletilerek gerçekleştirildi. Karamelizasyon basamağı sonunda, nanopartiküller çözelti fazından mıknatıs yardımıyla ayrıldı. Nanopartiküller saf su ile 3 kere yıkandı. Her yıkama basamağında, nanopartiküller saf su içerisinde iyice dağıtılıp yıkanması sağlandı. Yıkama işleminden sonra mıknatıs ile yıkama çözeltileri ayrılıp atıldı. Yıkama basamağından sonra nanopartiküller, 3.2.1.2 de hazırlanışı anlatılan 200 mL APTES çözeltisi içerisinde dağıtıldı. 15 dakika ses titreşimli temizleyici cihaz ile sonike edildi. Nanopartiküllerin iyice dağıtılması sağlandı. Bir gece boyunca APTES çözeltisi içerisinde orbital karıştırıcı cihaz ile karıştırarak silanizasyon işleminin gerçekleşmesi sağlandı. APTES çözeltisiyle karıştırılmasıyla uçlarına amino grubu bağlanan manyetik nanopartiküllerin, son olarak yıkama basamağı gerçekleştirildi. İlk önce mıknatıs ile APTES çözeltisinden ayrılan amino işaretli manyetik nanopartiküller (nano-MP-NH₂), 100 mL etanol ile yıkandı. Nanopartiküllerin etanol içerisinde daha iyi dağılmasını sağlamak için 15 dakika ses titreşimli temizleyici cihaz ile sonike edildi. Daha sonra nanopartiküller, mıknatıs yardımıyla yıkama çözeltisinden ayrılıp, nanopartiküller 2.kez saf su ile yıkandı. Aynı işlemler uygulandı. Son olarak nanopartiküller tekrardan etanol ile yıkandı.



Şekil 3.1. Manyetik nanopartiküllerin sentez basamakları.

3.5.1. Manyetik nanopartiküllerin karakterizasyonu

3.5.1.1. Manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliğinin incelenmesi

Yöntem 3.5 de anlatıldığı gibi sentezi gerçekleştirilen amino işaretli manyetik nanopartiküller, manyetik özelliğinin incelenmesi için, bir gece boyunca 40 °C de etüvde bekletildi. Bu sayede nanopartiküllerin nem içermemesi, tamamen kuruması sağlandı. Manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliği, elektron spin rezonans (ESR) temeline dayalı olarak ESR spektrometresi ile Hacettepe Üniversitesi'nde Sn. Prof. Dr. Sinan Akgöl ve ekibi tarafından yapıldı.

3.5.1.2. Manyetik nanopartiküllerin mikroskopik karakterizasyonu

Yöntem 3.5 de anlatıldığı gibi sentezi gerçekleştirilen amino işaretli manyetik nanopartiküller, mikroskopik karakterizasyonunun gerçekleştirilebilmesi için, bir gece boyunca 40 °C de etüvde bekletildi. Bu sayede nanopartiküllerin nem içermemesi, tamamen kuruması sağlandı. Manyetik nanopartiküllerin mikroskopik karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile İzmir Yüksek Teknoloji Üniversitesi'nde Sn. Prof. Dr. Sinan Akgöl ve ekibi tarafından yapıldı.

Bir plaka üzerine belli miktarda örnek alınarak, örneğin iletkenliğini arttırmak için 1 dakika boyunca örnek altın ile kaplandı. Ölçüme hazırlanan örnekler farklı boyutlarda büyütülerek görüntüler alındı. Ayrıca manyetik nanopartikül içindeki elementlerin yüzdelarını belirleyebilmek için yarı kantitatif olarak enerji dağılımlı X-ışınları analizi (EDX) yapıldı.

3.5.1.3. Manyetik nanopartiküllerin spektroskopik karakterizasyonu

Yöntem 3.5 de anlatıldığı gibi sentezi gerçekleştirilen amino işaretli manyetik nanopartiküller, spektroskopik karakterizasyonunun gerçekleştirilebilmesi için, bir gece boyunca 40 °C de etüvde bekletildi. Bu sayede nanopartiküllerin nem içermemesi, tamamen kuruması sağlandı. Manyetik nanopartiküllerin spektroskopik karakterizasyonu, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile Ege Üniversitesi, Kimya Bölüm'ünde Sn. Prof. Dr. Sinan Akgöl ve ekibi tarafından yapıldı.

FTIR için, manyetik nanopartikül örneği, kuru KBr ile % 1 oranında iyice karıştırıldıktan sonra bir preste birkaç tonluk basınç uygulanarak 0,5 mm kalınlığında ve 1 cm çapında bir tablet haline getirildi. KBr' ün infrared bölgesinde absorpsiyonu olmadığı için kullanıldı. Hazırlanan tablet cihaza yerleştirilip ölçüm alındı.

3.5.2. Farklı çözelti ortamlarının manyetik nanopartiküllere etkisi

Yöntem 3.5 deki koşullarda amino işaretli nanopartiküllerin (nano-MP-NH₂) sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen nanopartiküller, 3.2.1.2 de hazırlanışı açıklanan fosfat tamponu (PBwS), fosfat-glisin tamponu (PBG) ve fosfat-tween 20 tamponu (PBTw) gibi farklı tamponlarda dağıtılarak nanopartiküllerin stabilitesine olan etkisi incelendi. Bunun için aşağıdaki prosedür uygulanarak 1.gün, 7.gün ve 14.gün için nanopartiküllerin stabilitesi araştırıldı:

PBwS / PBG / PBTw tamponunda hazırlanan nano-MP-NH₂, ependorf tüpüne transfer edildi ve 90 µL PBS (pH 7,4) çözeltisi içerisinde 5 dakika boyunca karıştırılmalı ortamda 2 kez yıkandı. Yıkama çözeltisi manyetik platform sayesinde ortamdan uzaklaştırıldı. nano-MP-NH₂' leri 50 µL NHS çözeltisi ile 15 dakika boyunca karıştırarak aktivasyonları gerçekleştirildi. Aktivasyon basamağından sonra 90 µL PBS (pH 7,4) ile 5 dakika boyunca karıştırılmalı ortamda 2 kez yıkandı. 30 µL PBS (pH 7,4)'de hazırlanan 100 µg/mL tiyol ile

işaretili 12 G prob dizisi nano-MP-NH₂ örneklerine ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırılarak nano-MP-NH₂ yüzeyine tutturuldu. Ardından 90 µL PBS (pH 7,4) ile 5 dakika boyunca 2 kez yıkandı. Yıkama çözeltisi manyetik platform sayesinde ortamdan uzaklaştırıldı. Alkali muamelesi için örnekler 25 µL 0,05 M NaOH çözeltisine transfer edildi ve 5 dakika boyunca karıştırıldı. Her bir örnek (25 µL), 85 µL ABS (pH 4,8) içeren viyal içine transfer edildi ve viyaller vorteks ile karıştırıldı. Toplam hacmi 110 µL olan örnek 1 dakika boyunca vorteksle karıştırıldıktan sonra aktivasyonu yapılmış PGE'ler kullanılarak örneklerin pasif adsorpsiyon yöntemi ile elektrot yüzeyine 15 dakika boyunca immobilizasyonu gerçekleştirildi. Elektrotlar, daha sonra 5 saniye boyunca ABS (pH 4,8) ile yıkandı. DPV tekniği ile ölçüm için, yıkanan elektrotlar ABS (pH 4,8) içeren elektrokimyasal hücrede üçlü elektrot sistemine yerleştirildi. Tiyol işaretili 12 G prob tutturulmasından sonrası guanin bazının yükseltgenme sinyali, +0,40 V ile +1,40 V arasında, 50 mV/s hızıyla 50 mV' luk puls genliğinde DPV tekniğiyle tarama yapılarak ölçüldü.

3.6. Manyetik Nanopartiküllere Dayalı Elektrokimyasal DNA Hibridizasyon Tayini

PBTw de hazırlanan nano-MP-NH₂ yüzeyinde 3.2.1.1 de belirtilen HBV DNA dizileri kullanılarak, PBS (pH= 7,4) tampon çözelti ortamında hibridizasyon gerçekleştirildi. DPV tekniğiyle elektrokimyasal ölçümler gerçekleştirildi.

3.6.1. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonu

PBTw de hazırlanan nano-MP-NH₂ yüzeyinde DNA hibridizasyonu, biyomanyetik ayırma platformu (Sigris MCB-1200) kullanılarak aşağıdaki prosedür uygulanarak gerçekleştirildi (Medley et al., 2011; Karadeniz et al., 2009; Erdem et al., 2007b; Erdem et al., 2006b; Erdem et al., 2005; Wang et al., 2004; Wang et al., 2002b; Wang et al., 2001).

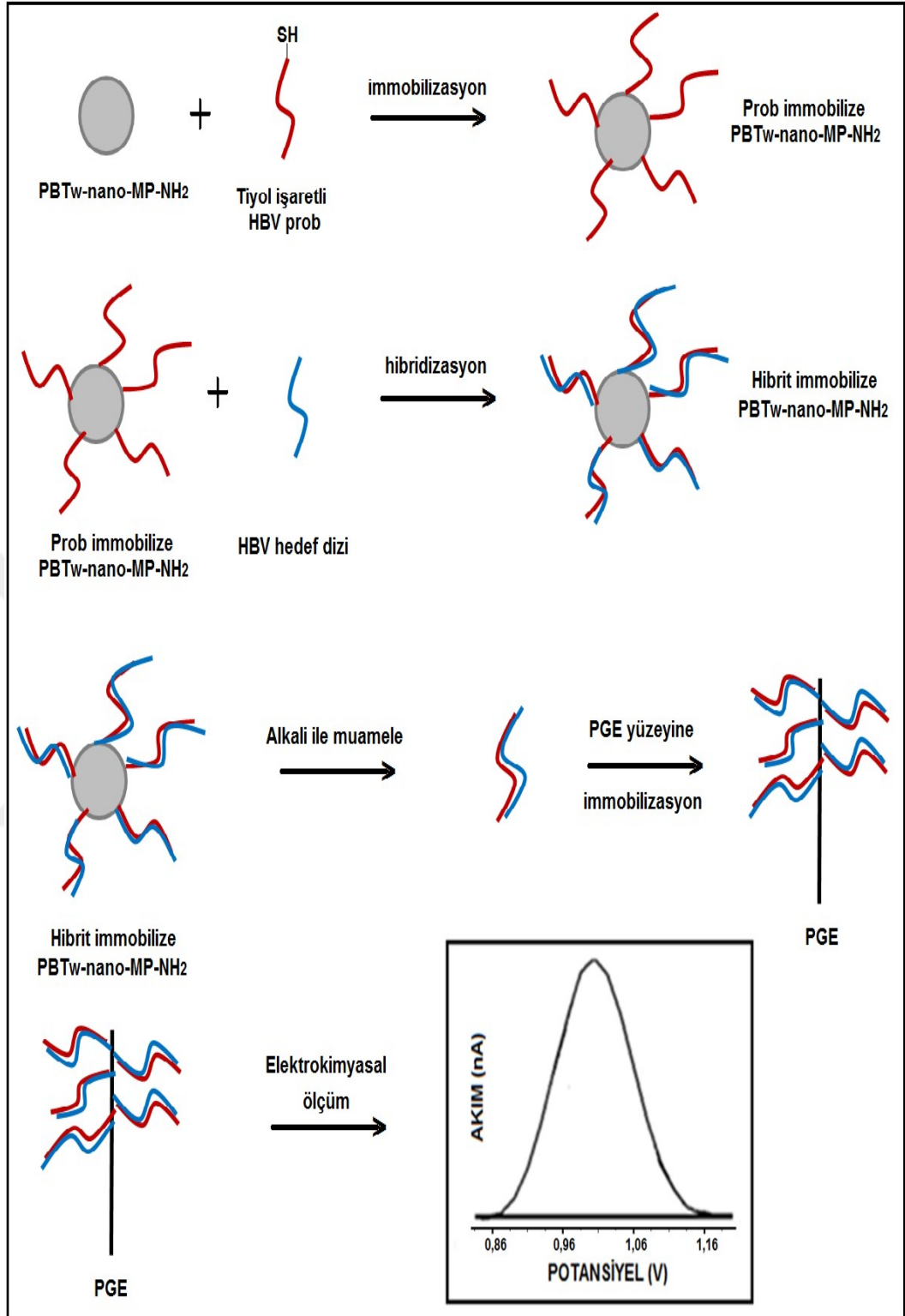
Nano-MP-NH₂, ependorf tüpünde 90 µL PBS (pH 7,4) çözeltisi içerisinde 5 dakika boyunca karıştırmalı ortamda 2 kez yıkandı. Yıkama çözeltisi manyetik platform sayesinde ortamdan uzaklaştırıldı. nano-MP-NH₂' ler, 50 µL NHS çözeltisi ile 15 dakika boyunca karıştırarak aktivasyonları gerçekleştirildi. Aktivasyon basamağından sonra 90 µL PBS (pH 7,4) ile 5 dakika boyunca karıştırmalı ortamda 2 kez yıkandı. 30 µL PBS (pH 7,4)'de hazırlanan 100 µg/mL tiyol ile işaretili HBV prob dizisi nano-MP-NH₂ örneklerine ilave edildi ve oda

sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırılarak nano-MP-NH₂ yüzeyine tutturuldu. Ardından 90 µL PBS (pH 7,4) ile 5 dakika boyunca 2 kez yıkandı. Yıkama çözeltisi manyetik platform sayesinde ortamdan uzaklaştırıldı. 30 µL PBS (pH 7,4) içerisinde hazırlanan 100 µg/µL HBV hedef DNA dizisi prob tutturulan MB-NH₂ örneklerine ilave edildi ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karıştırmalı ortamda hibridizasyon gerçekleştirildi. Ardından örnekler 90 µL PBS (pH 7,4) ile 5 dakika boyunca 2 kez yıkandı. Alkali muamelesi için örnekler 25 µL 0,05 M NaOH çözeltisine transfer edildi ve 5 dakika boyunca karıştırıldı. Her bir örnek (25 µL), 85 µL ABS (pH 4,8) içeren viyal içine transfer edildi ve viyaller vorteks ile karıştırıldı. Toplam hacmi 110 µL olan örnek 1 dakika boyunca vorteksle karıştırıldıktan sonra aktivasyonu yapılmış PGE'ler kullanılarak örneklerin pasif adsorpsiyon yöntemi ile elektrot yüzeyine 15 dakika boyunca immobilizasyonu gerçekleştirildi. Elektrotlar, daha sonra 5 saniye boyunca ABS (pH 4,8) ile yıkandı. DPV tekniği ile ölçüm için, yıkanan elektrotlar ABS (pH 4,8) içeren elektrokimyasal hücrede üçlü elektrot sistemine yerleştirildi.

3.6.2. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayini

3.6.1 de anlatılan prosedür uygulandı. Hibridizasyon tayini için, +1,037 V da gözlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyali incelendi.

Tiyol işaretli HBV prob ve HBV hedef dizi hibridizasyonu sonrası guanin bazının yükseltgenme sinyali, +0,40 V ile +1,40 V arasında, 50 mV/s hızıyla 50 mV' luk puls genliğinde DPV tekniğiyle tarama yapılarak ölçüldü.



Şekil 3.2. Manyetik nanopartikül yüzeyinde dizi seçimli DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayinin şematik gösterimi.

3.6.3. Manyetik nanopartikül yüzeyine immobilize edilen prob konsantrasyondaki değişimin hibridizasyon varlığında elde edilen yanıtına etkisinin incelenmesi

Bu çalışmada, 3.6.1 de anlatılan yöntemde PBTw tamponunda hazırlanan nano-MP-NH₂ yüzeyine tiyol işaretli HBV prob dizisini tutturma basamağında, 25 µg/mL ile 125 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda tiyol işaretli HBV prob dizileri kullanıldı. Daha sonraki hibridizasyon basamakları belirtildiği gibi uygulandı. Bu değişen konsantrasyon aralığının yanıtı etkisi incelendi.

3.6.4. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına HBV hedef dizi konsantrasyondaki değişimin etkisinin incelenmesi

Bu çalışmada, 3.6.1 de anlatılan yöntemde PBTw tamponunda hazırlanan nano-MP-NH₂ yüzeyinde hibridizasyon basamağı sırasında, 25 µg/mL ile 125 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda HBV hedef DNA dizisi kullanılarak, yanıtı etkisi incelendi.

3.6.5. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına hibridizasyon süresindeki değişimin etkisinin incelenmesi

Bu çalışmada, 3.6.1 de anlatılan yöntemde PBTw tamponunda hazırlanan nano-MP-NH₂ yüzeyinde hibridizasyon süresi, 5 dakika ile 60 dakika arasında değişen sürelerde çalışılarak yanıtı etkisi incelendi.

3.6.6. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonunda seçicilik incelenmesi

Bu çalışmada, 3.6.1 de anlatılan yöntemde hibridizasyon basamağında, rastgele dizi (NC), hedef ile rastgele dizi (NC) 1:1 karışımı, tek bazı hedef diziden farklı dizi, hedef dizi ile tek bazı hedef diziden farklı dizi (MM) 1:1 karışımı kullanılarak, tiyol işaretli HBV prob dizi ile hibridizasyon gerçekleştirildi. Hibridizasyon tayini için guanin bazının yükseltgenme sinyali incelendi.

3.6.7. Manyetik nanopartikül stabilitesinin incelenmesi

Bu çalışmada, PBTw tamponunda hazırlanan nano-MP-NH₂' lerin stabilitesinin incelenmesi için 1., 4., 7., 14., 21., 28. günlerde sentezlenen manyetik nanopartiküllerle ilgili prosedür izlenerek çalışma gerçekleştirildi.

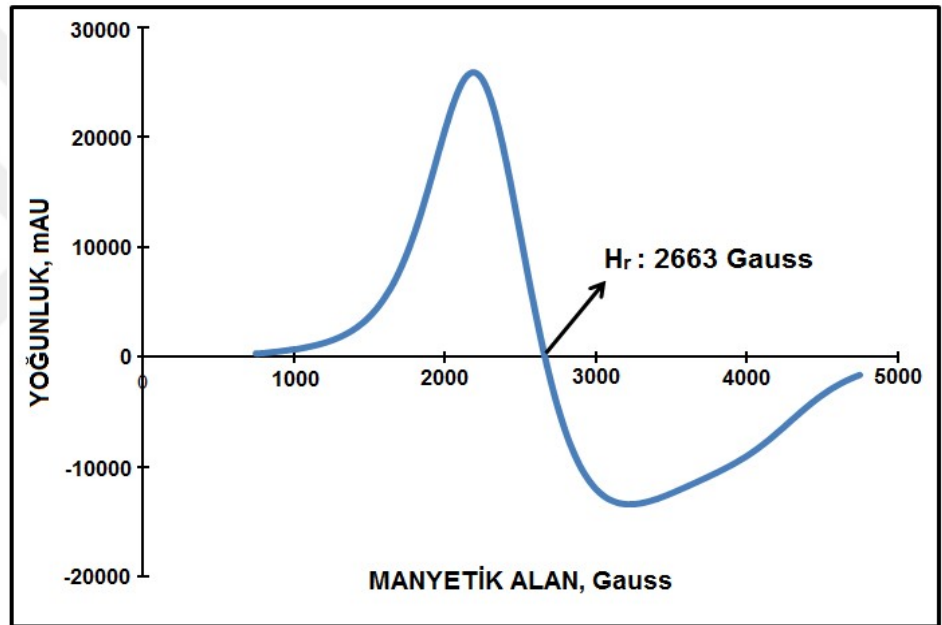
Nano-MP-NH₂, ependorf tüpünde 90 µL PBS (pH 7,4) çözeltisi içerisinde 5 dakika boyunca karıştırmalı ortamda 2 kez yıkandı. Yıkama çözeltisi manyetik platform sayesinde ortamdan uzaklaştırıldı. nano-MP-NH₂'ler, 50 µL NHS çözeltisi ile 15 dakika boyunca karıştırarak aktivasyonları gerçekleştirildi. Aktivasyon basamağından sonra 90 µL PBS (pH 7,4) ile 5 dakika boyunca karıştırmalı ortamda 2 kez yıkandı. 30 µL PBS (pH 7,4)'de hazırlanan 100 µg/mL tiyol ile işaretli 12 G prob dizisi nano-MP-NH₂ örneklerine ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırılarak nano-MP-NH₂ yüzeyine tutturuldu. Ardından 90 µL PBS (pH 7,4) ile 5 dakika boyunca 2 kez yıkandı. Yıkama çözeltisi manyetik platform sayesinde ortamdan uzaklaştırıldı. Alkali muamelesi için örnekler 25 µL 0,05 M NaOH çözeltisine transfer edildi ve 5 dakika boyunca karıştırıldı. Her bir örnek (25 µL), 85 µL ABS (pH 4,8) içeren viyal içine transfer edildi ve viyaller vorteks ile karıştırıldı. Toplam hacmi 110 µL olan örnek 1 dakika boyunca vorteksle karıştırıldıktan sonra aktivasyonu yapılmış PGE'ler kullanılarak örneklerin pasif adsorpsiyon yöntemi ile elektrot yüzeyine 15 dakika boyunca immobilizasyonu gerçekleştirildi. Elektrotlar, daha sonra 5 saniye boyunca ABS (pH 4,8) ile yıkandı. DPV tekniği ile ölçüm için, yıkanan elektrotlar ABS (pH 4,8) içeren elektrokimyasal hücrede üçlü elektrot sistemine yerleştirildi. Tiyol işaretli 12 G prob tutturulmasından sonrası guanin bazının yükseltgenme sinyali, +0,40 V ile +1,40 V arasında, 50 mV/s hızıyla 50 mV' luk puls genliğinde DPV tekniğiyle tarama yapılarak ölçüldü.

4. BULGULAR

4.1. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Elde Edilen Bulgular

4.1.1. Manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliğinin incelenmesinde elde edilen bulgular

Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliği ESR spektrometresi ile incelendi. Yoğunluğa karşı manyetik alan spektrumu şekil 4.1 de gösterildi. Ayrıca hazırlanan manyetik nanopartiküllerin çözelti ortamından mıknatıs yardımı ile ayrımı şekil 4.2 de gösterildi.



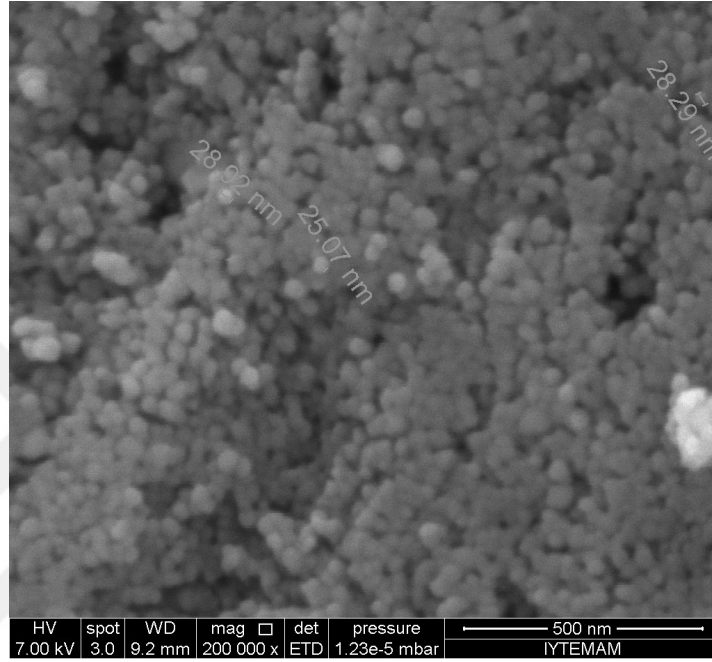
Şekil 4.1. Manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu.



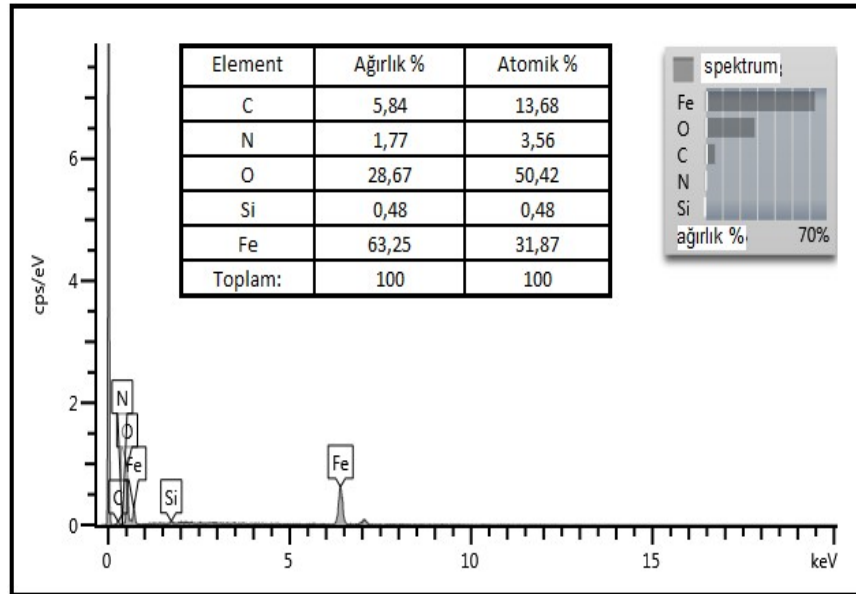
Şekil 4.2. Manyetik nanopartiküllerin çözelti ortamından mıknatıs yardımıyla ayrımı.

4.1.2. Manyetik nanopartiküllerin mikroskopik karakterizasyonunda elde edilen bulgular

Manyetik nanopartiküllerin mikroskopik karakterizasyonunda SEM cihazı kullanılarak elde edilen görüntü şekil 4.3 de ve EDX analizi sonucu elde edilen element yüzde grafiği şekil 4.4 de gösterildi.



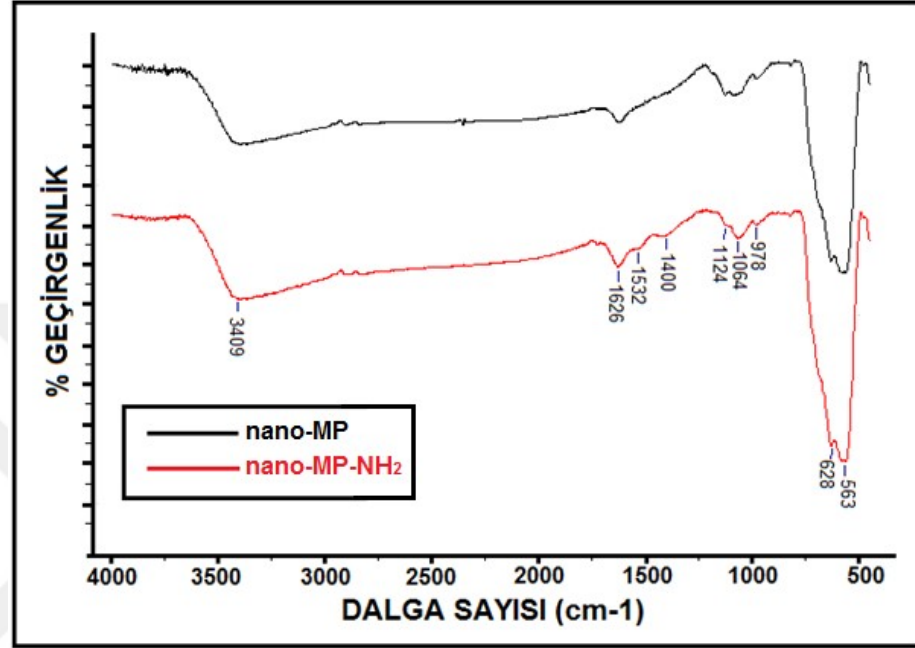
Şekil 4.3. Manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüsü (20000 büyütme).



Şekil 4.4. Manyetik nanopartiküllerin EDX analizi elementel yüzde grafiği.

4.1.3. Manyetik nanopartiküllerin spektroskopik karakterizasyonunda elde edilen bulgular

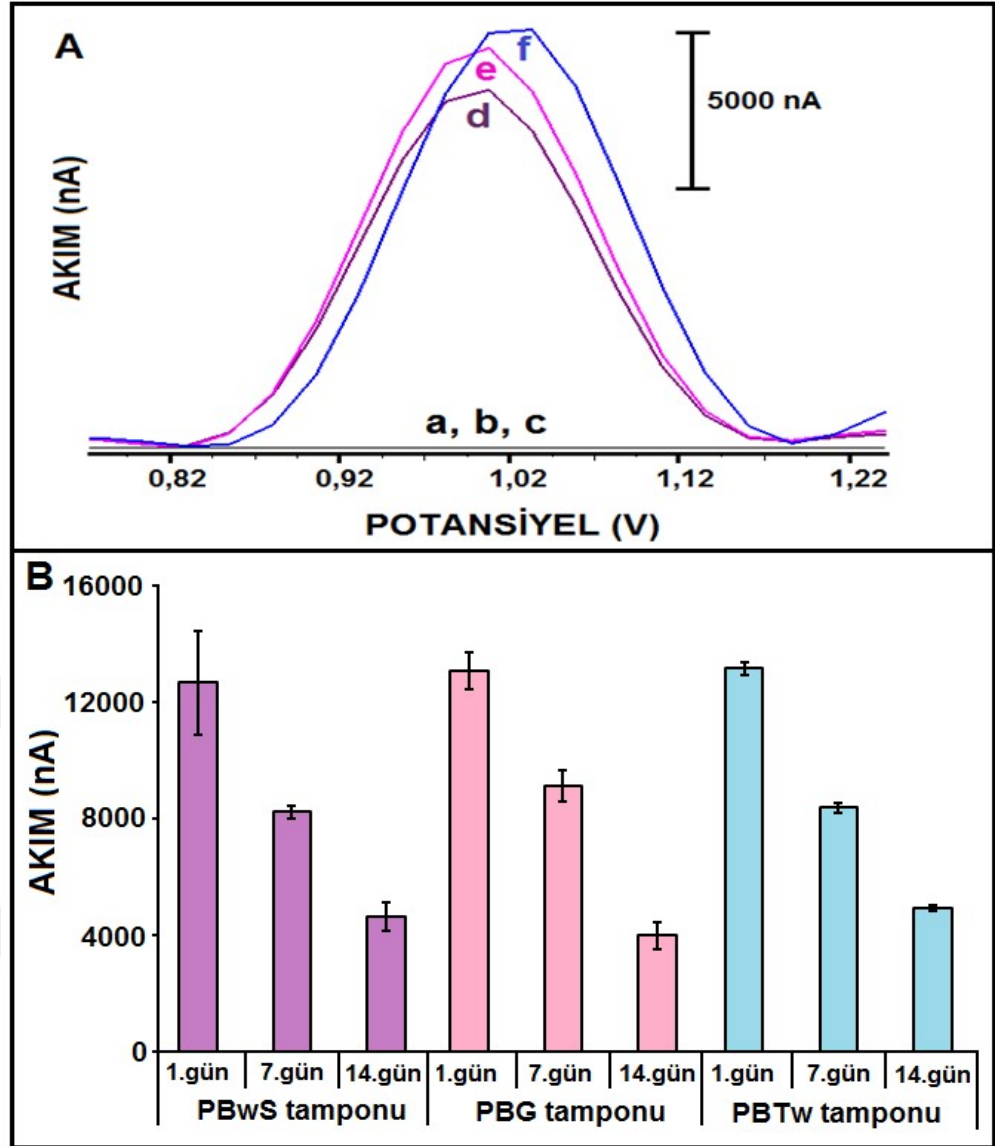
Manyetik nanopartiküllerin spektroskopik karakterizasyonu FTIR cihazı kullanılarak yapıldı. Elde edilen sonuçlar şekil 4.5 de gösterildi.



Şekil 4.5. Manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumu.

4.2. Farklı Çözelti Ortamlarındaki Manyetik Nanopartiküllerle Hazırlanan Örneklerde Elde Edilen Bulgular

PBwS, PBG ve PBTw tamponlarında hazırlanan nano-MP-NH₂ ler kullanılarak partikül yüzeyine, partikül sentezinin 1., 7., 14. günlerinde SH-12 G prob tutturuldu. 1. gün elde edilen + 1,012 V daki guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren voltamogramlar şekil 4.6.A da ve 1., 7. ve 14. günlerde elde edilen + 1,012 V daki guanin sinyallerindeki değişimi gösteren histogramlar şekil 4.6.B de gösterildi.



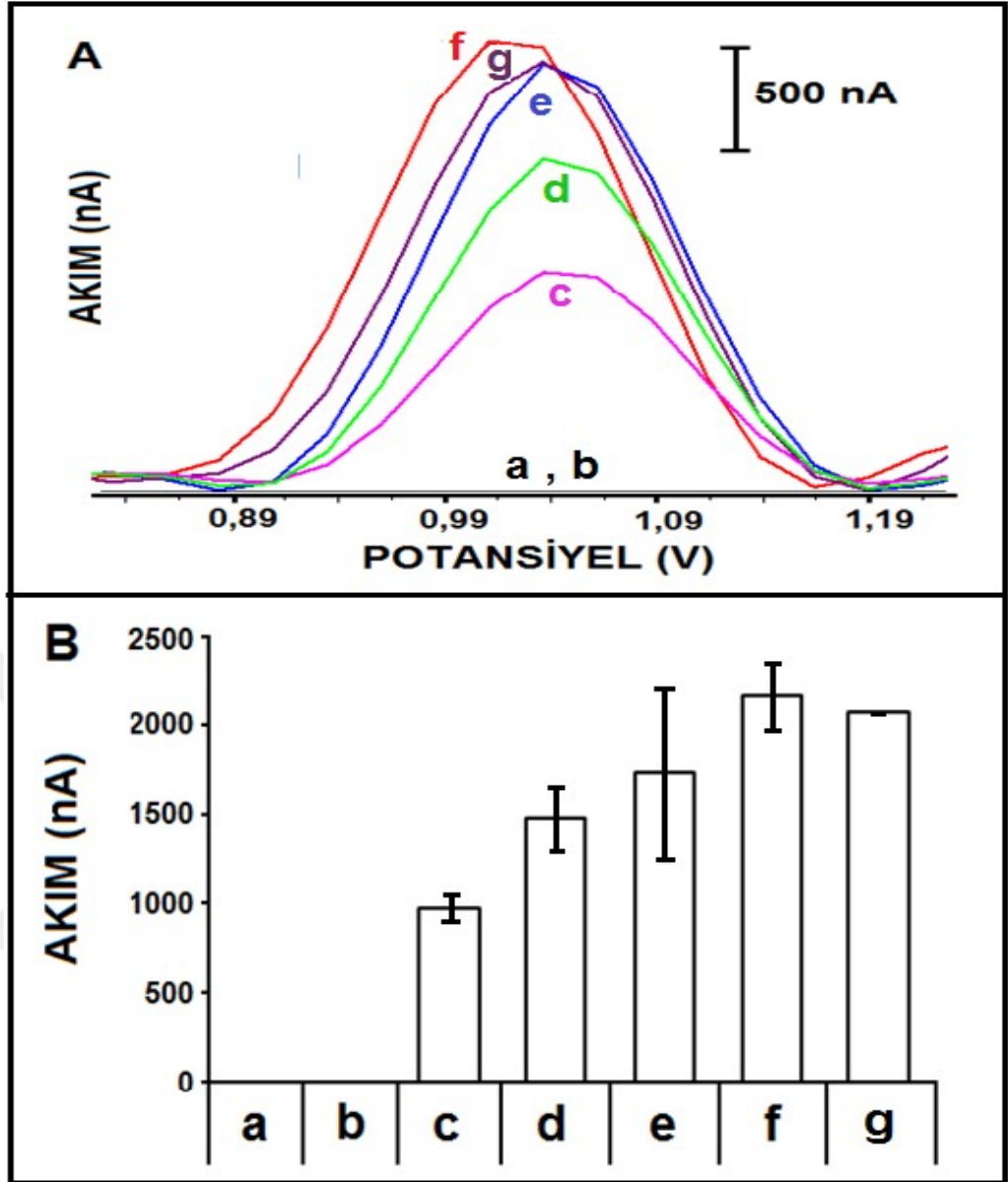
Şekil 4.6. Farklı çözelti ortamlarında hazırlanan manyetik nanopartiküller yüzeyine DNA immobilizasyonu sonrasında, partikül sentezinin 1. gününde elde edilen guanin yükseltme sinyallerini gösteren **(A)** voltamogram; **(a)** PBwS tamponunun, **(b)** PBG tamponunun, **(c)** PBTw tamponunun kontrolü, **(d)** PBwS tamponunda hazırlanan nano-MP-NH₂, **(e)** PBG tamponunda hazırlanan nano-MP-NH₂, **(f)** PBTw tamponunda hazırlanan nano-MP-NH₂ kullanılarak elde edilen guanin sinyalleri. Farklı tampon çözeltilerinde hazırlanan nano-MP-NH₂ ler yüzeyine DNA immobilizasyonu sonrasında partikül sentezinin 1., 7., 14. günlerinde elde edilen guanin yükseltme sinyallerini gösteren **(B)** histogram (n=3).

4.3. Manyetik Nanopartikül Yüzeyinde Gerçekleştirilen DNA Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Tayinine Yönelik Bulgular

4.3.1. Manyetik nanopartikül yüzeyine immobilize edilen prob konsantrasyondaki değişimin hibridizasyon varlığında elde edilen yanıt etkisine yönelik bulgular

HBV hedef dizi konsantrasyonu sabit tutularak, tiyol işaretli HBV prob dizi konsantrasyonu 25-125 µg/mL aralığında değiştirilerek çalışma gerçekleştirildi. Hibridizasyon varlığında + 1,037 V da ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren voltamogramlar şekil 4.7.A da ve histogramlar şekil 4.7.B de gösterildi.

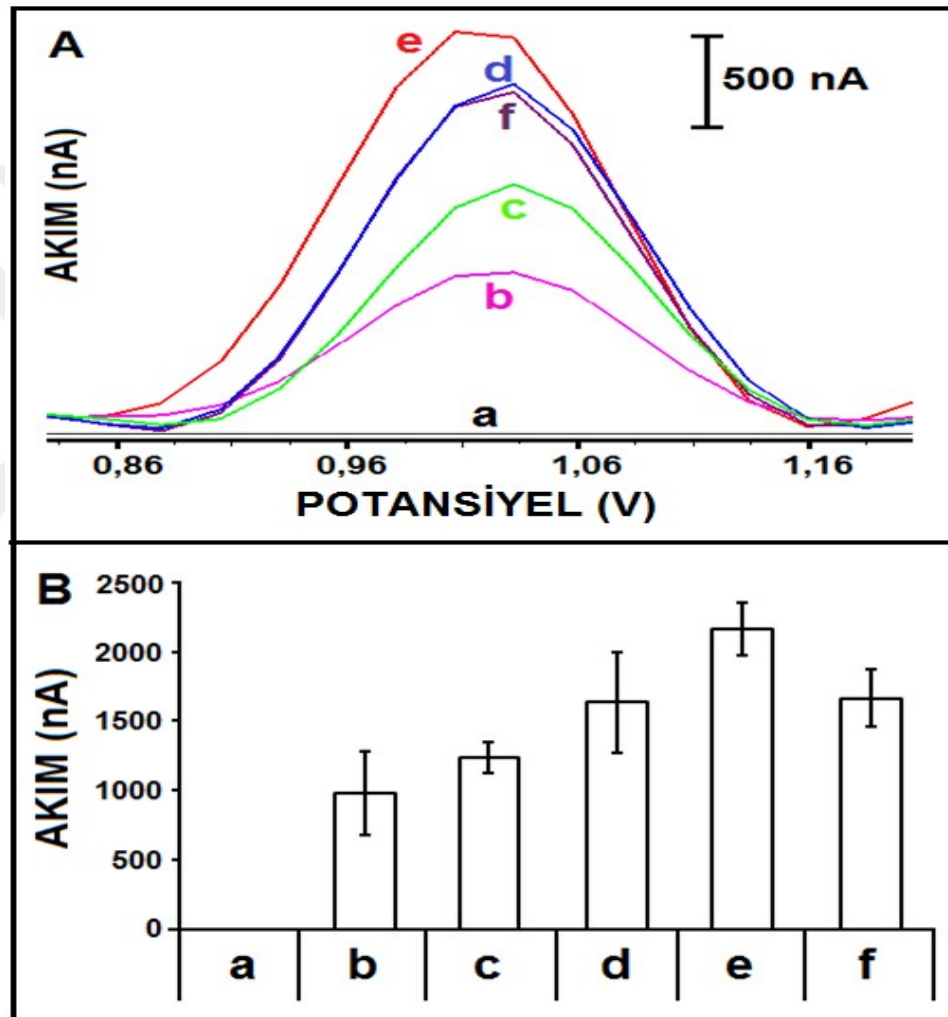




Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda probun HBV hedef dizisiyle hibridizasyon öncesi ve sonrası ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren (A) voltamogram, (B) histogram (n=3). (a) hibridizasyon yokluğunda sadece partiküllerle hazırlanan örneklerle kontrol deneyi, (b) hibridizasyon öncesinde sadece 100 µg/mL prob varlığında, farklı prob konsantrasyonlarında 100 µg/mL HBV hedef dizisi ile hibridizasyonda ölçülen sinyaller; (c) 25 µg/mL SH-HBV prob, (d) 50 µg/mL SH-HBV prob, (e) 75 µg/mL SH-HBV prob, (f) 100 µg/mL SH-HBV prob, (g) 125 µg/mL SH-HBV prob.

4.3.2. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına HBV hedef dizi konsantrasyondaki değişimin etkisine yönelik bulgular

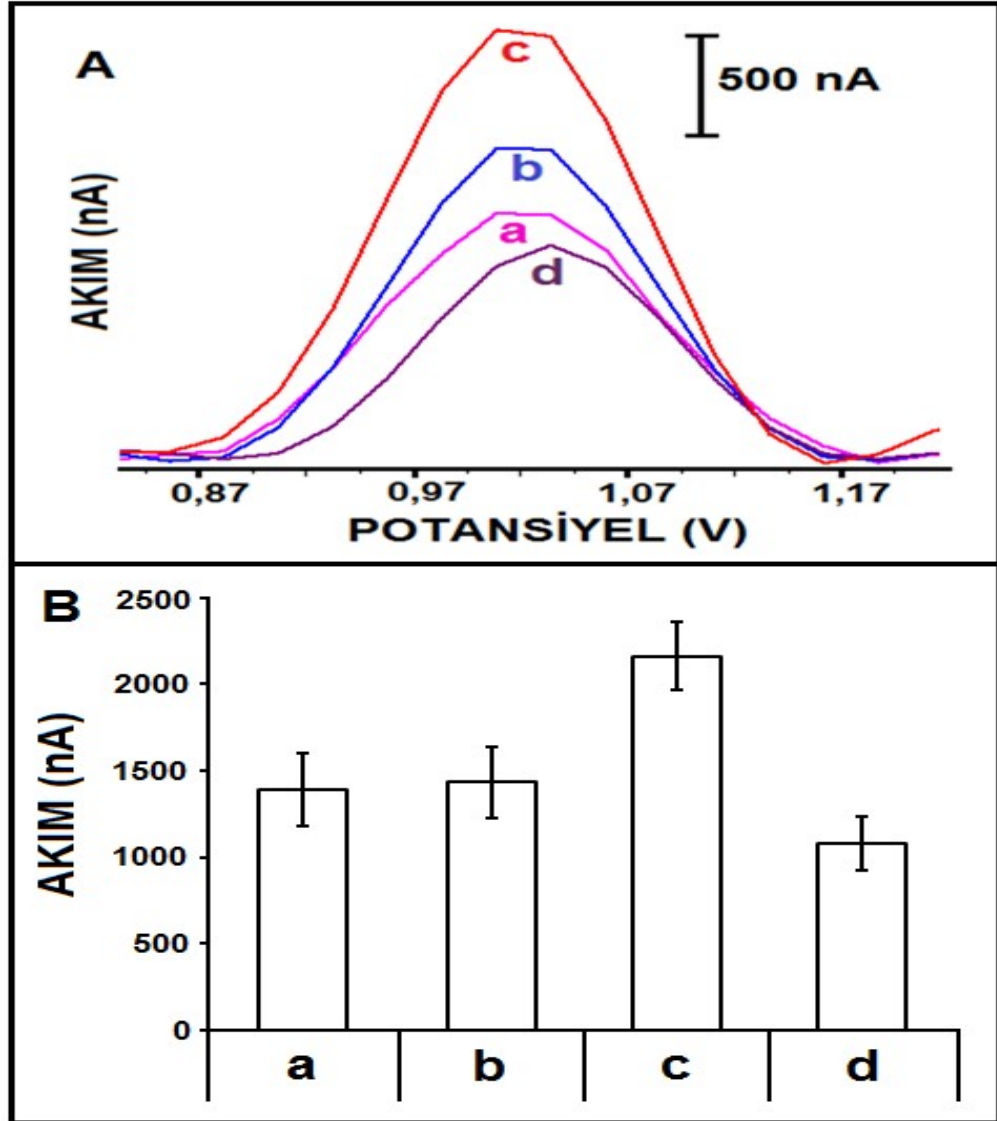
Optimum HBV prob konsantrasyonda farklı HBV hedef dizi konsantrasyon aralığında (25-125 $\mu\text{g/mL}$) çalışılarak, hibridizasyon sonrası ölçülen + 1,037 V'daki guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren voltamogramlar şekil 4.8.A'da ve histogramlar şekil 4.8.B'de gösterildi.



Şekil 4.8. 100 $\mu\text{g/mL}$ SH-HBV probun farklı konsantrasyonlardaki HBV hedef dizisiyle hibridizasyon sonrası ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren (A) voltamogram, (B) histogram (n=3). (a) hibridizasyon yokluğunda manyetik nanopartikülle hazırlanan örneklerle kontrol deneyi, 100 $\mu\text{g/mL}$ SH-HBV prob ile farklı HBV hedef konsantrasyonda; (b) 25 $\mu\text{g/mL}$, (c) 50 $\mu\text{g/mL}$, (d) 75 $\mu\text{g/mL}$, (e) 100 $\mu\text{g/mL}$, (f) 125 $\mu\text{g/mL}$ HBV hedef hibridizasyonu sonrası ölçülen guanin yükseltgenme sinyalleri.

4.3.3. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına hibridizasyon süresindeki değişimin etkisine yönelik bulgular

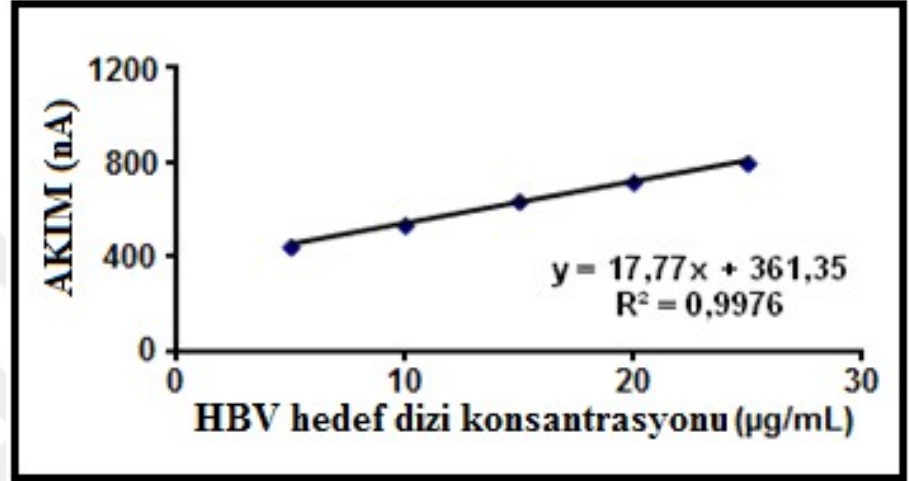
100 $\mu\text{g/mL}$ SH-HBV prob ile 100 $\mu\text{g/mL}$ HBV hedef dizi hibridizasyonu, 5 ile 60 dakika aralığında farklı hibridizasyon sürelerinde gerçekleştirildi. Hibridizasyon süresinin + 1,037 V da ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren voltamogramlar şekil 4.9.A ve histogramlar şekil 4.9.B de gösterildi.



Şekil 4.9. 100 $\mu\text{g/mL}$ SH-HBV prob ile 100 $\mu\text{g/mL}$ HBV hedef dizisinin farklı hibridizasyon sürelerinde hibridizasyonu sonrasında guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren (A) voltamogram, (B) histogram (n=3). (a) 5 dakika, (b) 15 dakika, (c) 30 dakika, (d) 60 dakika hibridizasyon sonrası guanin yükseltgenme sinyalleri.

4.3.4. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonunda HBV hedef DNA için tayin sınırı incelenmesine yönelik bulgular

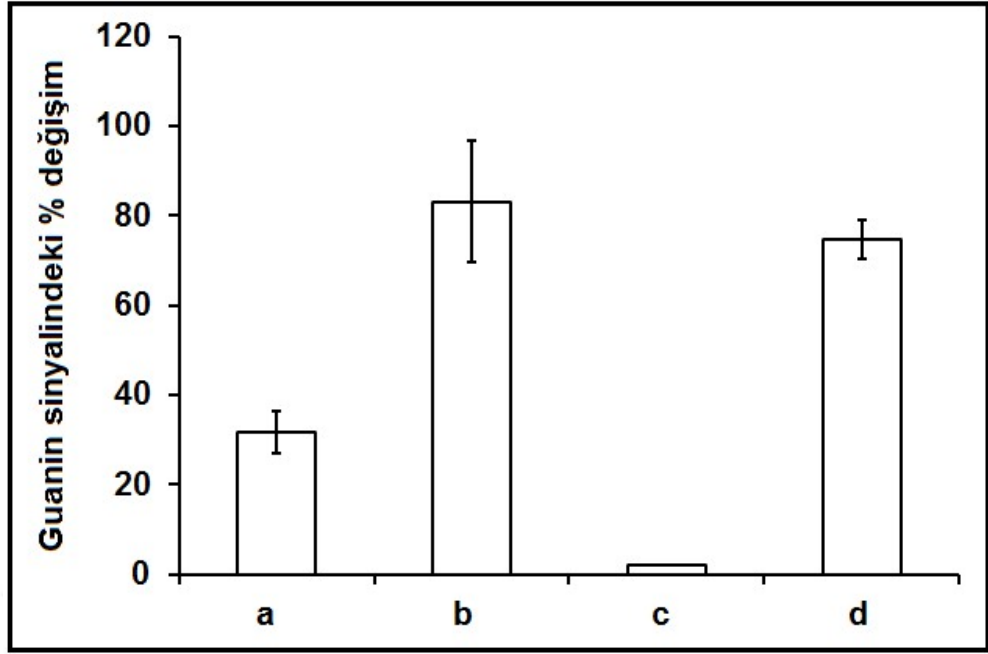
Optimum bulunan konsantrasyondaki SH-HBV prob ile 5-25 µg/mL HBV hedef dizi hibridizasyon sonrası ölçülen + 1,037 V daki guanin yükseltgenme sinyallerine dayalı kalibrasyon eğrisi şekil 4.10 da gösterildi.



Şekil 4.10. 5-25 µg/mL konsantrasyon aralığında HBV hedef dizi ile 100 µg/mL SH-HBV prob hibridizasyonu sonrası ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerine dayalı kalibrasyon grafiği.

4.3.5. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonunda seçicilik incelenmesine yönelik bulgular

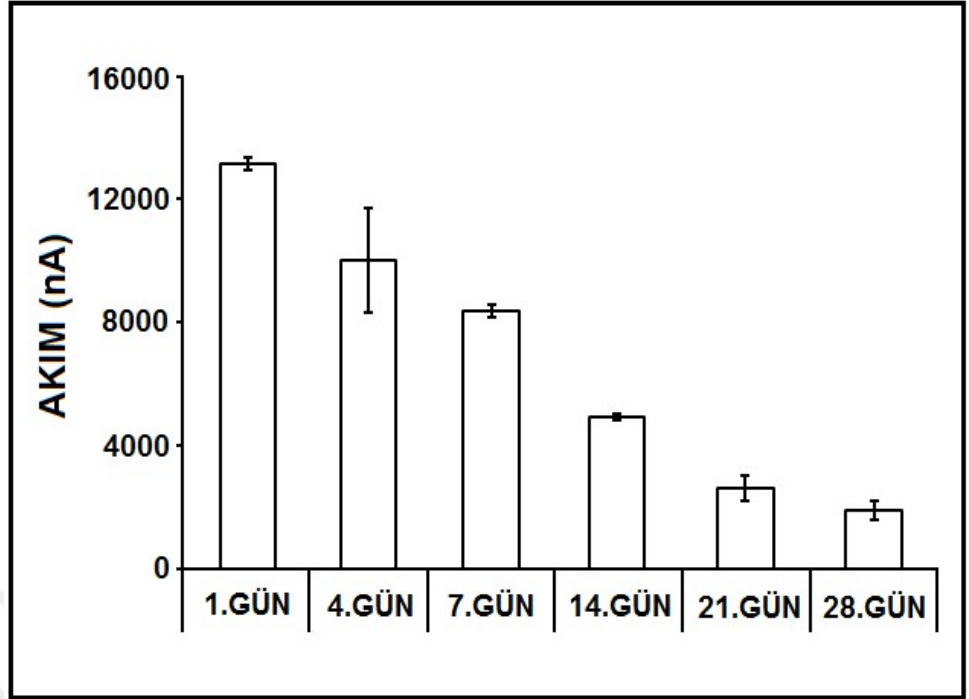
100 µg/mL SH-HBV prob ile 100 µg/mL MM / 100 µg/mL hedef dizi ile MM karışımı (1:1) / 100 µg/mL NC / 100 µg/mL hedef dizi ile NC karışımı (1:1) arasında 30 dakika boyunca gerçekleşen hibridizasyon sonrasında + 1,037 V daki guanin yükseltgenme sinyalleri üzerindeki % değişimi gösteren histogram şekil 4.11 de gösterildi.



Şekil 4.11. 100 µg/mL SH-HBV prob ile farklı DNA dizileri arasında olası hibridizasyon sonrası guanin yükseltgenme sinyallerindeki % değişimi gösteren histogram (n=3). 100 µg/mL SH-HBV prob ile **(a)** 100 µg/mL MM dizi, **(b)** 100 µg/mL hedef dizi ve MM (1:1) karışım çözeltisi, **(c)** 100 µg/mL NC dizi, **(d)** 100 µg/mL hedef dizi ve NC (1:1) karışım çözeltisi hibridizasyonu sonrası guanin yükseltgenme sinyalindeki % değişimler. 100 µg/mL HBV DNA prob ile 100 µg/mL hedef DNA dizisi arasındaki DNA hibridizasyonu sonrasında ölçülen guanin sinyali 100 olarak kabul edildi ve hesaplamalar buna göre yapıldı.

4.3.6. Manyetik nanopartiküllerin stabilitesinin incelenmesine yönelik bulgular

Manyetik nanopartikül sentezinin 1., 4., 7., 14., 21. ve 28. günlerinde partikül yüzeyine SH-12 G prob DNA tutturulmasından sonra + 1,012 V da ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerindeki değişim şekil 4.12 de gösterildi.



Şekil 4.12. Manyetik nanopartikül sentezinin 1., 4., 7., 14., 21., 28. günlerinde, DNA immobilizasyonu sonrasında ölçülen guanin yükseltme sinyallerini gösteren histogram (n=3).

5. TARTIŞMA

5.1. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Elde Edilen Bulgular İle İlgili Tartışma

5.1.1. Manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliğinin incelenmesinde elde edilen bulgular ile ilgili tartışma

Şekil 4.1 de görüldüğü gibi sentezlenen manyetik nanopartiküller için 2200 G civarında yaklaşık 26000 mAU sinyal şiddeti elde edildi. Böylece uçları amino grupları ile işaretlenen nanopartiküllerin manyetik özelliklerinde bir kayıp olmadığı gözlemlendi. Moleküllerin üzerindeki eşleşmemiş elektronların karakteristik sayısal bir ifadesi olan g faktörünün hesaplanması için $g = h\nu / (B H_r)$ eşitliği kullanılmaktadır. Burada h (Planck sabiti) değeri $6,626 \times 10^{-27}$ erg/s, B (evrensel sabit) değeri $9,274 \times 10^{-21}$ erg/G, ν (frekans) değeri $9,707 \times 10^9$ Hz'dir. H_r değeri ise (manyetik alanın rezonansı) grafikten 2663 G olarak elde edildi. Bu veriler kullanılarak g faktörü 2,6 olarak hesaplandı. Literatürde Fe^{3+} için düşük-spin ve yüksek-spin kompleksleri sırasıyla 1,4-3,1 ve 2,0-9,7 olarak belirlenmiştir (Akgöl et al., 2005). Sentezlenen amino işaretli manyetik nanopartiküller (nano-MP-NH₂) için g faktör değerinin de literatürle uyumlu olduğu görüldü ve elde edilen sonuçlara göre sentezlenen manyetik nanopartiküllerin yapılarında lokal bir manyetik alana sahip olduğu anlaşıldı (Çorman et al., 2010).

5.1.2. Manyetik nanopartiküllerin mikroskopik karakterizasyonunda elde edilen bulgular ile ilgili tartışma

SEM görüntüsü ve partikül büyüklüğü ölçümünden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, çoğunlukla dairesel olduğu görülen nanopartiküllerin ortalama yarı çapı 28 nm olarak ölçüldü. Ayrıca EDX analizi sonucu, manyetik nanopartikül içindeki elementlerin yüzde değerleri belirlendi. Analiz sonucunda, sentez sırasında kullanılan Fe_3O_4 ' ten beklenen demir ve oksijen elementleri, karamelizasyon basamağı sonrası yapıya katılması beklenen karbon elementi, silanizasyon basamağı sonrası yapıya katılması beklenen silisyum, azot ve oksijen elementleri tespit edildi.

5.1.3. Manyetik nanopartiküllerin spektroskopik karakterizasyonunda elde edilen bulgular ile ilgili tartışma

Karakteristik olarak Fe_3O_4 bandı 600 cm^{-1} civarında görülür. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerde Fe_3O_4 varlığı, 628 cm^{-1} ve 563 cm^{-1} civarında gözlenen iki güçlü absorpsiyon bantları olarak görüldü. Literatürde rapor edilen diğer çalışmaların sonucuna paralel, bu iki pik civarında Fe_3O_4 bantları görüldüğü saptandı (Yamaura et al., 2004; Chen and Chen, 2005).

Silanizasyon basamağı sonrasında, silika bağı (Fe-O-Si) manyetik nanopartikül yüzeyinde adsorbe edilir. Bu bağ FTIR spektrumunda gözükmemektedir; çünkü silika bağ, 584 cm^{-1} civarında gözükmemektedir. Bu aralıkta Fe-O titreşim piki ile örtüşmektedir. Çalışmamızda, yapıya silan yapısının katıldığı, FTIR spektrumunda 1124 cm^{-1} , 1064 cm^{-1} , 978 cm^{-1} gözlenen Si-O-Si, SiO-H ve Si-O-H bağlarının bantlarıyla doğrulandı ve literatüre paralel sonuçlar elde edildiği saptandı (Yamaura et al., 2004; Chen and Chen, 2005). Manyetik nanopartikül sentezi sırasında yapıya glukoz ve APTES moleküllerinin katılması, 1400 cm^{-1} de C-H bağlarına ait esneme bandının gözlenmesiyle doğrulandı (Lambert et al., 1987; Silverstein et al., 1981). Ayrıca, 3409 cm^{-1} ve 1626 cm^{-1} de gözlenen iki geniş bandın sırasıyla, N-H gerilme titreşim ve serbest $-\text{NH}_2$ grubundan kaynaklanan $-\text{NH}_2$ eğilme bantları olarak gözlemlendiğine karar verildi (Yamaura et al., 2004). Silanizasyon basamağı sonrası manyetik nanopartiküllerin ucuna amino grubu bağlanmasına yönelik şekil 4.5 de gösterilen nano-MP ve nano-MP- NH_2 spektrumları karşılaştırıldığında, 3409 cm^{-1} ve 1626 cm^{-1} de gözlenen bantlarda şiddetin artmasıyla doğrulandı.

5.2. Farklı Çözelti Ortamlarındaki Manyetik Nanopartiküllerle Hazırlanan Örneklerle Elde Edilen Bulgular İle İlgili Tartışma

Şekil 4.6 da farklı çözelti ortamlarında hazırlanan manyetik nanopartiküllerin yüzeyine DNA immobilizasyonu sonrası $+1,012\text{ V}$ da ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerinin kıyaslaması gösterildi. PBwS, PBG ve PBTw tamponlarında hazırlanan nano-MP- NH_2 kullanılarak yöntem 3.5.2 de anlatıldığı gibi DNA prob nanopartikül yüzeyine tutturuldu. Nanopartikül sentezinin 1. gününde yapılan çalışma sonuçları şekil 4.6.A da gösterildi. PBwS tamponunda hazırlanan nano-MP- NH_2 kullanılarak $12650 \pm 1767,77\text{ nA}$ (%RSD= % 13,97; n=3), PBG tamponunda hazırlanan nano-MP- NH_2 kullanılarak $13050 \pm 636,40\text{ nA}$ (%RSD= % 4,88; n=3), PBTw tamponunda hazırlanan nano-MP- NH_2 kullanılarak

13150 $\pm$ 212,13 nA (%RSD= % 1,61; n=3) ortalama guanin yükseltgenme sinyali elde edildi. Manyetik nanopartikül sentezinin 1., 7. ve 14. günlerinde partiküllerin stabilitesinde farklı çözelti ortamlarının etkisini incelemek için yapılan çalışma sonuçları şekil 4.6.B de histogram olarak gösterildi. PBwS tamponunda hazırlanan partiküller kullanılarak 1. günde elde edilen guanin yükseltgenme sinyalinde, 14. günde % 63,52 azalış gözlemlendi. PBG tamponunda hazırlanan partiküller kullanılarak 1. günde elde edilen guanin yükseltgenme sinyalinde, 14. günde % 69,51 azalış gözlemlendi. PBTw tamponunda hazırlanan partiküller kullanılarak 1. günde elde edilen guanin yükseltgenme sinyalinde, 14. günde % 62,54 azalış gözlemlendi. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, PBTw tamponunda nanopartiküllerin daha stabil olduğu ve bu ortam kullanılarak daha yüksek, daha tekrarlanabilir guanin yükseltgenme sinyali elde edildiğine karar verildi.

5.3. Manyetik Nanopartikül Yüzeyinde Gerçekleştirilen DNA Hibridizasyonunda Elde Edilen Bulgular İle İlgili Tartışma

5.3.1. Manyetik nanopartikül yüzeyine immobilize edilen prob konsantrasyondaki değişimin hibridizasyon varlığında elde edilen yanıt etkisine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

Manyetik nanopartikül yüzeyinde DNA hibridizasyonunda prob konsantrasyonunun etkisini incelemek için yapılan 100 μ g/mL HBV hedef dizi ile 25, 50, 75, 100, 125 μ g/mL konsantrasyonlarındaki SH-HBV prob dizi hibridizasyon sonuçları şekil 4.7.A da voltamogram olarak, şekil 4.7.B de histogram olarak gösterildi. HBV'yi temsil eden prob dizisinin guanin bazı içermemesi nedeniyle, sadece prob içeren örnekte alınan ölçümde, + 1,037 V'da guanin yükseltgenme sinyali gözlenmedi (şekil 4.7.A-b ve şekil 4.7.B-b). HBV prob dizisinin guanin bazı içermemesine bağlı olarak guanin bazının sentetik analogu ve pahalı bir işaretleyici olan inosin bazının prob dizisinde yer almaması, sensörümüze üstünlük kazandırmıştır. Böylece, literatürde daha önce rapor edilen inosin ile işaretlenmiş DNA dizilerine dayalı çalışmalara kıyasla, çalışmamızda kullandığımız probun inosin ile işaretlemesine gerek kalmadan (Karadeniz et al., 2009; Erdem et al., 2006b; Özsöz et al., 2003; Wang et al., 2004) hibridizasyon tayini guanin sinyalindeki değişim üzerinden doğrudan yapılmıştır.

SH-HBV prob dizi konsantrasyonundaki değişimin hibridizasyon varlığında + 1,037 V da ölçülen guanin yükseltgenme sinyalleri üzerindeki etkisi incelendiğinde, 100 μ g/mL SH-HBV prob konsantrasyonuna kadar guanin

yükseltgenme sinyalinin sürekli bir şekilde artış olduğu gözlemlendi. 125 µg/mL prob ile hedef dizi hibridizasyon sonrası guanin sinyalinde bir azalış olduğu gözlemlendi. 100 µg/mL hedefi dizi ile 25, 50, 75, 100, 125 µg/mL SH-HBV prob hibridizasyonu sonrası ortalama guanin yükseltgenme sinyalleri (n=3) sırasıyla, $968,5 \pm 72,83$ nA (%RSD= % 7,52); $1480 \pm 169,71$ nA (%RSD= % 11,47); $1730 \pm 480,83$ nA (%RSD= % 27,79); $2164 \pm 192,95$ nA (%RSD=% 8,92); $2070 \pm 14,14$ nA (%RSD=% 0,68) olarak ölçüldü. En yüksek guanin sinyalinin 100 µg/mL SH-HBV prob ile hibridizasyon sonrası elde edildiği için optimum prob konsantrasyonu 100 µg/mL olarak seçildi.

5.3.2. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına HBV hedef dizi konsantrasyondaki değişimin etkisine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

Manyetik nanopartikül yüzeyinde DNA hibridizasyonunda hedef dizi konsantrasyonunun etkisini incelemek için, yöntem 3.6.4 de anlatıldığı gibi optimum prob konsantrasyonu olarak seçilen 100 µg/mL SH-HBV prob ile 5-125 µg/mL aralığında farklı konsantrasyonlarda HBV hedef dizi hibridizasyonu gerçekleştirildi. Şekil 4.8 de gösterilen hibridizasyon sonrasında + 1,037 V da ölçülen guanin yükseltgenme sinyalleri, 100 µg/mL hedef dizi konsantrasyonuna kadar aşamalı olarak arttığı görüldü. 125 µg/mL hedef dizi hibridizasyonu sonrasında guanin yükseltgenme sinyalinde azalış gözlemlendi. 100 µg/mL SH-HBV prob ile 25, 50, 75, 100, 125 µg/mL hedef dizi hibridizasyonu sonrası ortalama guanin yükseltgenme sinyalleri (n=3) sırasıyla, $978,83 \pm 298,98$ nA (%RSD=% 30,54); $1240 \pm 113,14$ nA (%RSD= % 9,12); $1635 \pm 360,62$ nA (%RSD=% 22,06); $2164 \pm 192,95$ (%RSD=% 8,92); $1662,5 \pm 207,10$ nA (%RSD=% 12,46) olarak ölçüldü. 100 µg/mL hedef dizi konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonlarda gerçekleşen hibridizasyonda, hibridizasyon verimin düştüğü buna bağlı olarakta guanin sinyalinde azalma olduğu saptandı. Bu nedenle optimum hedef dizi konsantrasyonu olarak 100 µg/mL seçildi.

5.3.3. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyon yanıtına hibridizasyon süresindeki değişimin etkisine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonunda hibridizasyon süresinin etkisini incelemek için, yöntem 3.6.5 de anlatıldığı gibi optimum prob konsantrasyonu olarak seçilen 100 µg/mL SH-HBV prob ile

optimum hedef dizi konsantrasyonu olarak seçilen 100 µg/mL HBV hedef dizi 5, 15, 30, 60 dakika boyunca farklı sürelerde hibridizasyonu gerçekleştirildi. Şekil 4.9 da gösterilen 5, 15, 30, 60 dakika hibridizasyon süreleri sonrasında + 1,037 V da ortalama guanin yükseltgenme sinyalleri (n=3) sırasıyla, $1390 \pm 212,132$ nA (%RSD= % 15,26); $1437 \pm 205,51$ nA (%RSD= % 14,30); $2164 \pm 192,95$ nA (%RSD= % 8,92); $1082 \pm 157,69$ nA (%RSD= % 14,57) ölçüldü. 30 dakikadan uzun hibridizasyon süresi sonrasında guanin yükseltgenme sinyalinde azalma gözlemlendi. En yüksek ve en tekrarlanabilir guanin yükseltgenme sinyali 30 dakika hibridizasyon varlığında elde edildiği için optimum hibridizasyon süresi olarak 30 dakika seçildi.

5.3.4. Manyetik nanopartikül yüzeyinde DNA hibridizasyonunda HBV hedef DNA için tayin sınırı incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

HBV hedef DNA dizisi için tayin sınırını (DL) belirlemek amacıyla, 5-25 µg/mL hedef dizi konsantrasyon aralığında çalışıldı. Şekil 4.10 da gösterilen doğrusal kalibrasyon eğrisinden ($y=17,77x + 361,35$ ve $R^2= 0,99$) tayin sınırı, Miller ve Miller yöntemine göre (Miller and Miller, 2000), tayin sınırı 1,15 µg/mL (110 µL örnekte 20 pmol) olarak hesaplandı. Literatürde HBV DNA'nın elektrokimyasal sensörlerle tayinine ilişkin mevcut çalışmaların sonuçları ile kıyaslandığında (Çalışkan et al., 2009; Muti et al., 2010; Muti et al., 2012; Muti et al., 2011; Erdem et al., 2012b; Hassen et al., 2008), çalışmamızda geliştirilen manyetik nanopartiküllere dayalı tek kullanımlık DNA biyosensörüyle herhangi bir indikatör kullanılmaksızın, daha kısa sürede ve daha seçimli bir şekilde düşük tayin sınırında HBV DNA hibridizasyonun elektrokimyasal tayininin gerçekleştirilebildiğine karar verildi.

Çizelge 5.1. HBV DNA tayini için gerçekleştirilmiş elektrokimyasal çalışmalara örnekler ve sonuçların karşılaştırılması.

Elektrot	Yanıt	Yöntem	Tayin Sınırı	Kaynak
SWCNT-PGE	Guanin sinyali ve R_{ct}	DPV ve EIS	210 nM	(Çalışkan et al., 2009)
STR-MWCNT-PGE	Guanin sinyali ve R_{ct}	DPV ve EIS	145 nM	(Erdem et al., 2010)
SNP- PVF ⁺ -PGE	Guanin sinyali ve R_{ct}	DPV ve EIS	279 nM	(Muti et al., 2010)
SWCNT-PVF ⁺ -PGE	Guanin sinyali ve R_{ct}	DPV ve EIS	5,14 µM	(Muti et al., 2012)

GRPox-PGE	Guanin sinyali ve R_{ct}	DPV ve EIS	2,02 μ M	(Muti et al., 2011)
SWCNT-CHIT-PGE	Guanin sinyali ve R_{ct}	DPV ve EIS	2,09 μ M	(Erdem et al., 2012-b)
AuE	Guanin sinyali ve R_{ct}	CV ve EIS	25,3 μ M	(Hassen et al., 2008)
GCE	$Cd(bzim)_2(NO_3)_2$	CV ve DPV	84 nM	(Li et al., 2007-a)
GCE	MnL_2Cl_2	floresans spektroskopisi ve CV	6,8 nM	(Liu et al., 2008)
Ag-MWCNT-GCE	$C_{30}H_{18}CuO_{12}$	floresans spektroskopisi ve CV	0,646 pM	(Niu et al., 2009)
GCE	$[Cu(dafone)_2]Br_2$	DPV	3,18 nM	(Li et al., 2008)
GCE	$Cu(dmp)(H_2O)Cl_2$	CV ve DPV	70 nM	Li et al., 2007-b)
GCE	$Co(dmp)(H_2O)(NO_3)_2$	CV	19,4 nM	(Ding et al., 2008)
CPE	R_{ct}	EIS	3,1 pM	(Mashhadizadeh et al., 2016)
GE	Guanin sinyali	DPV	2,61 nM	(Castro et al., 2014)
PGE	Guanin sinyali	DPV	1,15 μ g/mL (182 nM)	tez çalışması

DPV: Diferansiyel puls voltametri, **CV:** Dönüşümlü voltametri, **EIS:** Elektrokimyasal empedans spektroskopisi, **PGE:** Kalem grafit elektrot, **GCE:** Camısı grafit elektrot, **CPE:** Karbon pastası elektrot, **AuE:** Altın elektrot, **SWCNT:** Tek duvarlı karbon nanotüp, **MWCNT:** Çok duvarlı karbon nanotüp, **R_{ct} :** Transfer edilen yüke karşı direnç, **STR:** Streptavidin, **SNP:** Kalay oksit (SnO_2) nanopartikül, **PVF⁺:** Poli(vinilferrosenyum), **GRPox:** Grafen oksit, **CHIT:** Kitosan.

5.3.5. Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen DNA hibridizasyonunda seçicilik incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

Şekil 4.11 de verilen histogramda 100 μ g/mL SH-HBV prob ile 100 μ g/mL MM / hedef dizi ve MM karışımı (1:1) / NC / hedef dizi ve NC karışımı (1:1), 30 dakika hibridizasyon süresi sonrasında + 1,037 V da ölçülen guanin yükseltgenme sinyallerinin yüzde değişimi gösterildi. En yüksek guanin yükseltgenme sinyali

prob ile hedef dizi hibridizasyonundan sonra gözlendi ve HBV DNA prob ile hedef dizi hibridizasyonu sonrası ölçülen guanin yükseltgenme sinyalindeki değişim % 100 olarak kabul edildi. Buna oranla, probun tek bazı hedef diziden farklı dizi (MM) ile hibridizasyonu sonrasında guanin yükseltgenme sinyalinde % 31,6 değişim olduğu, hedef dizi ile MM (1:1) karışım çözeltisi ile hibridizasyon sonrasında guanin yükseltgenme sinyalinde % 83,1 değişim olduğu gözlendi; dolayısıyla ortamda hedef DNA'dan tek bazı farklı bir dizinin olması durumunda bile seçimliliğin yüksek olduğuna karar verildi.

Prob ile rastgele dizi ile hibridizasyonu sonrasında guanin yükseltgenme sinyalindeki değişim % 2,1 olarak hesaplandı. 1:1 oranında hedef dizi ile rastgele dizi içeren karışım çözeltisinde hibridizasyon sonrasında guanin yükseltgenme sinyalindeki değişim % 74,6 olarak hesaplandı. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, MM veya rastgele dizi içeren karışım ortamlarında prob dizisinin hedef diziyi seçimli bir şekilde algıladığı ve etkin manyetik ayırma sayesinde yüksek seçimlilikte DNA hibridizasyon tayinini mümkün kıldığına karar verildi.

5.3.6. Manyetik nanopartiküllerin stabilitesinin incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

Şekil 4.12 de PBTw tampon çözeltisinde hazırlanmış manyetik nanopartikül yüzeyine DNA immobilizasyonu sonrası + 1,012 V da ölçülen guanin yükseltgenme sinyalleri gösterildi. Manyetik nanopartikül kullanılarak yöntem 3.6.7 de anlatıldığı gibi SH-12G prob partikül yüzeyine tutturuldu. Partikül sentezinin 1., 4., 7., 14., 21., 28. günlerinde stabilitesini incelemek için yapılan çalışma sonuçlarında ölçülen ortalama guanin yükseltgenme sinyalleri (n=3) histogram olarak gösterildi. PBTw tampon çözeltisinde hazırlanmış manyetik nanopartiküller kullanılarak 1.gün, $13150 \pm 212,13$ nA (%RSD= % 1,61), 4.gün $10005 \pm 1689,99$ nA (%RSD= % 16,89), 7.gün $8370 \pm 183,85$ nA (%RSD= % 2,20), 14.gün $4925 \pm 106,07$ nA (%RSD= % 2,15), 21.gün $2620 \pm 410,12$ nA (%RSD= % 15,65), 28.gün $1860 \pm 311,13$ nA (%RSD= % 16,73) guanin yükseltgenme sinyalleri elde edildi. 28 gün boyunca farklı zaman dilimlerinde alınan ölçümler sonucunda guanin yükseltgenme sinyalinde hesaplanan % azalış değerleri, çizelge 5.2 de verildi.

Çizelge 5.2. 28 gün boyunca farklı zaman dilimlerinde alınan ölçümler sonucunda guanin yükseltgenme sinyalinde hesaplanan % azalış değerleri.

	guanin sinyalindeki % azalış
4.gün	23,9
7.gün	36,3
14.gün	62,5
21.gün	80,0
28.gün	85,9

Bu sonuçlara bakarak, manyetik nanopartiküllerin sentezinden itibaren 28 gün içerisinde stabilitesini % 85,9 oranında kaybettiği saptandı.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Manyetik nanopartiküllere dayalı elektrokimyasal DNA hibridizasyon analizlerine yönelik çalışmamızda, sentezlediğimiz amino işaretli manyetik nanopartikül yüzeyinde, dizi seçimli Hepatit B virüsü DNA dizisine dayalı hibridizasyonunun indikatörsüz olarak elektrokimyasal tayini gerçekleştirildi.

Amino-tiyol gruplarının etkileşmesi sonucunda manyetik nanopartiküller yüzeyinde DNA hibridizasyonu gerçekleşmesi ve tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) ile hibridizasyon tayini, guanin sinyalinin DPV tekniği kullanılarak ölçülmesiyle gerçekleştirildi. Manyetik nanopartiküllere dayalı elektrokimyasal HBV DNA dizisi hibridizasyon tayini, literatürde ilk defa amino işaretli manyetik nanopartiküllerle çalışmamızda gerçekleştirildi. Ayrıca, tek kullanımlık grafit elektroda dayalı geliştirilen sensör teknolojisinde, HBV DNA hibridizasyon tayini için DPV tekniğiyle ölçülerek izlenen guanin bazına ait yükseltgenme sinyalleri, kendi sentezlediğimiz manyetik nanopartiküller ve PGE kullanarak literatürdeki manyetik nanopartikül çalışmalarında elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerinden daha yüksek olduğu saptandı (Erdem et al., 2007b; Erdem et al., 2005). Bu sonuçlar, hem sentezlenen manyetik nanopartiküllerin hem de kullanılan kalem grafit elektrotların duyarlılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

Manyetik nanopartiküllere dayalı dizi seçimli DNA hibridizasyonunda uygulamalarına yönelik çalışmalara bakıldığında, herhangi bir elektroaktif indikatör kullanılmaksızın HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayini, tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar (PGE) ile gerçekleştirildi. Çalışmamızda, mikroskopik ve spektroskopik karakterizasyonu gerçekleştirilen manyetik nanopartikül boyutları, literatürdeki diğer sentezlenen manyetik nanopartiküllerin boyutları ile kıyaslandığında benzer boyutlarda olduğu gözlemlendi (Jiang et al., 2011; Yamaura et al., 2004). Manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilecek DNA hibridizasyonunun verimliliği için optimum prob DNA, hedef DNA konsantrasyonu bulundu ve hibridizasyonda seçimlilik parametreleri incelendi. Elde edilen sonuçlar, literatürdeki mevcut çalışmalarla kıyaslandığında (Hassen et al., 2008; Erdem et al., 2007b), daha duyarlı sonuçların tekrarlanabilir bir şekilde elde edildiği görüldü. Geliştirilen sensör teknolojisi ile daha tekrarlanabilir ve daha duyarlı sonuçlar elde edilmesinin yanı sıra, yüksek seçimlilik gösteren yüzeylerin elde edildiği saptandı. Seçimlilik ile ilgili yapılan çalışmalarda probun kendi tamamlayıcısına yüksek seçimlilik derecesiyle hibridizasyonun

gerçekleştirdiği gözlemlendi. Hedef DNA-MM ve hedef DNA-NC karışım çözelti ortamlarında bile hedef DNA' yı seçebildiği yapılan çalışmalarla gösterildi. 30 µL gibi çok az miktarda örnek ile amino işaretli manyetik nanopartikül yüzeyinde gerçekleştirilen HBV DNA hibridizasyonunun tayini, guanin yükseltgenme sinyalinin DPV tekniği ile ölçülmesiyle gerçekleştirildi. Literatürde HBV DNA'nın elektrokimyasal sensörlerle tayinine ilişkin mevcut çalışmaların sonuçları ile kıyaslandığında (Çalışkan et al., 2009; Muti et al., 2010; Muti et al., 2012; Muti et al., 2011; Erdem et al., 2012b; Hassen et al., 2008), çalışmamızda kullanılan tek kullanımlık kalem grafit sensörüyle herhangi bir indikatör kullanılmadan, düşük tayin sınırında seçimliliği ve güvenilirliği yüksek ayrıca daha kısa sürede ve daha seçimli bir şekilde HBV DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayin edilebildiğine karar verildi.

Çalışmamızda geliştirilen manyetik nanopartiküllerin ticari olarak üretilmesine engel teşkil eden en büyük etken, manyetik nanopartiküllerin uzun süreli stabilizasyon problemi gösterilebilir. Stabilite sorununun çözülmesi için, kimya, fizik, malzeme bilimi gibi ilgili alanlarla işbirliği yapılarak yeni çözelti ortamların geliştirilmesi ve partiküllerin stabilite süresinin arttırılması planlanmaktadır.

Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin, üstün özelliklere sahip manyetik nanopartiküllerle birlikte kullanımı sonrasında, duyarlılık açısından daha düşük tayin sınırlarında ve manyetik ayırım sayesinde daha seçimli nükleik asit analizlerine olanak sağladığı görülmüştür. Bu özellikler sayesinde, kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların analizlerinde özellikle mutasyon analizlerine yönelik yöntem geliştirmede avantajlı sonuçlar elde edileceği düşünülmektedir. Çalışmamızdaki tekniğin en önemli özelliklerinden biri basit uygulamaya sahip olmasıdır. Ayrıca, gelecekte yeni sensör tasarımlarıyla, analizlere ait sonuçların daha hızlı, daha seçimli bir şekilde elde edilmesine olanak sağlaması ve daha düşük maliyete sahip olması gibi avantajları beraberinde getireceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Affymetrix**, “Microarray”, <http://www.affymetrix.com/estore/index.jsp> (Erişim tarihi: 19 Şubat 2016).
- Akgöl, S., Bereli, N. and Denizli, A.**, 2005, Magnetic dye affinity beads for the adsorption of β -Casein, *Macromolecular Bioscience*, 5:786–794.
- Bej, A.K.**, 1996, Chapter 1: Nucleic acid hybridizations: principles and strategies, Nucleic acid analysis; Principles and Bioapplications, Dangler, C.A., Wiley-Liss (Ed), Inc., 30p.
- Ben-Yoav, H., H.Dykstra, P., E.Bentley, W. and Ghodssi, R.**, 2012, A microfluidic-based electrochemical biochip for label-free diffusion-restricted DNA hybridization analysis, *Biosensors and Bioelectronics*, 38:114–120.
- Berti, F., Laschi, S., Palchetti, I., Rossier, J.S., Reymond, F., Mascini, M. and Marrazza, G.**, 2009, Microfluidic-based electrochemical genosensor coupled to magnetic beads for hybridization detection, *Talanta*, 77:971–978.
- Boyer, R.**, 2006, Part III Storage and Transfer of Biological Information, Concepts in Biochemistry, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 135p.
- Brett, A.M., Oliveira, Macedo, T.R.A., Raimundo, D., Marques, M.H. and Serrano, S.H.P.**, 1998, Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 13:861-867.
- Carpini, G., Lucarelli, F., Marrazza, G. and Mascini, M.**, 2004, Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids, *Biosensors and Bioelectronics*, 20:167-175.
- Castro, A.C.H., França, E.G., Paula, L.F., Soares, M.M.C.N., Goulart, L.R., Madurro, J.M., Brito-Madurro, A.G.**, 2014, Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus, *Applied Surface Science*, 314:273–279.
- Chen, C.T. and Chen, Y.C.**, 2005, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{TiO}_2$ Core/Shell Nanoparticles as Affinity Probes for the Analysis of Phosphopeptides Using TiO_2 Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 77:5912-5919.
- Coulet, P.R.**, 1991, What is a Biosensor?, Chapter 1; Biosensor principles and applications, L.J.Blum, P.R. Coulet (Ed), M. Dekker Inc., New York, 7p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Çalışkan A., Erdem, A. ve Karadeniz, H.,** 2009, Direct DNA hybridization on the single-walled carbon nanotubes modified sensors detected by voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy, *Electroanalysis*, 21:2116 – 2124.
- Çorman, M.E., Öztürk, N., Tüzmen, N., Akgöl, S. and Denizli, A.,** 2010, Magnetic polymeric nanospheres as an immobilized metal affinity chromatography (IMAC) support for catalase, *Biochemical Engineering Journal*, 49:159–164.
- Dervan, P.B.,** 1986, Design of Sequence-specific DNA-binding molecules, *Science*, 232:464-471.
- Ding, C., Zhao, F., Zhang, M., Zhang, S.,** 2008, Hybridization biosensor using 2,9-dimethyl-1,10-phenantroline cobalt as electrochemical indicator for detection of hepatitis B virus DNA, *Bioelectrochemistry*, 72:28–33.
- Du, P., Li, H., Mei, Z. and Liu, S.,** 2009, Electrochemical DNA biosensor for the detection of DNA hybridization with the amplification of Au nanoparticles and CdS nanoparticles, *Bioelectrochemistry*, 75:37–43.
- Erdem, A., Kerman, K., Meriç, B., Akarca, U.S. and Özsöz, M.,** 1999, DNA Electrochemical Biosensor for the Detection of Short DNA Sequences Related to the Hepatitis B Virus, *Electroanalysis*, 11:586-588.
- Erdem, A., Meriç, B., Kerman, K., Dalbastı, T. and Özsöz, M.,** 1999, Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor, *Electroanalysis*, 11:1372-1376.
- Erdem, A., Kerman, K., Meriç, B., Akarca, U.S. and Özsöz, M.,** 2000, Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Analytica Chimica Acta*, 422: 139-149.
- Erdem, A., Kerman, K., Meriç, B. and Özsöz, M.,** 2001, Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator, *Electroanalysis*, 13:219-223.
- Erdem, A., Kerman, K., Meriç, B., Özkan, D., Kara, P. and Özsöz, M.,** 2002, DNA biosensor for microcystis spp. Sequence detection by using methylene blue and ruthenium complexes as hybridisation labels, *Turkish Journal of Chemistry*, 26: 851-862
- Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Özkan, D. and Özsöz, M.,** 2003, Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on Guanine signal, *Electroanalysis*, 15:1-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erdem, A., Özkan, Arıksoysal, D., Karadeniz, H., Kara, P., Şengönül, A., Sayiner, A.A. and Özsöz, M.,** 2005, Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology, *Electrochemistry Communications*, 7:815–820.
- Erdem, A., Papakonstantinou, P. and Murphy, H.,** 2006, Direct DNA hybridization at disposable graphite electrodes modified with carbon nanotubes, *Analytical Chemistry*, 78: 6656-6659.
- Erdem, A., Pividori, M.I., Lermo, A., Bonanni, A., Valle, M. and Alegret, S.,** 2006, Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes, *Sensors and Actuators B*, 114:591–598.
- Erdem, A.,** 2007, Electrochemical Sensor Analysis-Comprehensive Analytical Chemistry Book, Alegret, S., Merkoci, A., (Ed), Elsevier, 9p.
- Erdem, A., Sayar, F., Karadeniz, H., Güven, G., Özsöz, M. and Pişkin, E.,** 2007, Development of streptavidin carrying magnetic nanoparticles and their applications in electrochemical nucleic acid sensor systems, *Electroanalysis*, 19:798 – 804.
- Erdem, A., Karadeniz, H., Mayer, G., Famulok, M. and Çalışkan, A.,** 2009, Electrochemical sensing of aptamer-protein interactions using a magnetic particle assay and single-use sensor technology, *Electroanalysis*, 21:1278–1284.
- Erdem, A., Papakonstantinou, P., Murphy, H., McMullan, M., Karadeniz, H. and Sharma, S.,** 2010, Streptavidin modified carbon nanotube based graphite electrode for label-free Sequence specific DNA detection, *Electroanalysis*, 22:611 – 617.
- Erdem, A., Karadeniz, H., Canavar, P.E. and Çongur, G.,** 2012, Single-use sensor platforms based on carbon nanotubes for electrochemical detection of DNA hybridization related to *Microcystis* spp., *Electroanalysis*, 24:502–511.
- Erdem, A., Muti, M., Karadeniz, H., Çongur, G. and Canavar, E.,** 2012, Electrochemical monitoring of indicator-free DNA hybridization by carbon nanotubes–chitosan modified disposable graphite sensors, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95:222 – 228.
- Erdem, A., Çongur, G., Eksin, E.,** 2013, Multi channel screen printed array of electrodes for enzyme-linked voltammetric detection of MicroRNAs, *Sensors and Actuators B*, 188:1089 – 1095.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erdem, A., Duruksu, G., Çongur, G., Karaöz, E.,** 2013, Genomagnetic assay for electrochemical detection of osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells, *Analyst*, 138:5424 – 5430.
- Erdem, A., Çongur, G.,** 2014, Voltammetric aptasensor combined with magnetic beads assay developed for detection of human activated protein C, *Talanta*, 128: 428–433.
- Evans, A.,** 1991, Potentiometry and ISE, ACOL, London, 93p.
- Flegler, S.L., Heckman, J.W. and Klomparens, K.L.,** 1993, Scanning and Transmission Electron Microscopy: An Introduction, Oxford University Press, New York, 17p.
- Gao, H., Jiang, X., Dong, Y.J., Tang, W.X., Hou, C. and Zhu, N.N.,** 2013, Dendrimer-encapsulated copper as a novel oligonucleotides label for sensitive electrochemical stripping detection of DNA hybridization, *Biosensors and Bioelectronics*, 48:210–215.
- Geng, P., Zhang, X., Teng, Y., Fu, Y., Xu, L., Xu, M., Jin, L. and Zhang, W.,** 2011, A DNA sequence-specific electrochemical biosensor based on alginic acid-coated cobalt magnetic beads for the detection of E. Coli, *Biosensors and Bioelectronics*, 26:3325–3330.
- Goldstein, A.N.,** 1997, Handbook of Nanophase Materials, Marcel Dekker Inc., New York, 250p.
- Hall, E.A.H.,** 1990, Biosensors, Chapter 1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere, 28p.
- Hassen, W.M., Chaix, C., Abdelghani, A., Bessueille, F., Leonarda, D. and 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.
- Jiang, W., Zhang, X., Sun, Z., Fang, Y., Li, F., Chen, K. and Huang, C.,** 2011, Preparation and mechanism of magnetic carbonaceous polysaccharide microspheres by low-temperature hydrothermal method, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 323:2741-2747.
- Kara, P., Kerman, K., Özkan, D., Meriç, B., Erdem, A., Özkan, Z. and Özsöz, M.,** 2002, Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA, *Electrochemistry Communications*, 4:705-709.
- Kara, P., Özkan, D., Kerman, K., Meriç, B., Erdem, A. and Özsöz, M.,** 2002, DNA sensing on glassy carbon electrodes by using hemin as electrochemical hybridization label, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373:710-716.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kara, P., Özkan, D., Erdem, A., Kerman, K., Pehlivan, S., Özkınay, F., Unuvar, D., İtirli G. and Özsöz, M.,** 2003, Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology, *Clinica Chimica Acta*, 336:57-64.
- Karadeniz H., Erdem, A., Caliskan, A., Pereira, C.M., Pereira, E.M. and Ribeiro, J.A.,** 2007, Electrochemical sensing of silver tags labelled DNA immobilized onto disposable graphite electrodes, *Electrochemistry Communications*, 9:2167–2173.
- Karadeniz, H., Erdem, A. and Caliskan, A.,** 2008, Electrochemical Monitoring of DNA Hybridization by Multiwalled Carbon Nanotube Based Screen Printed Electrodes, *Electroanalysis*, 20:1932–1938.
- Karadeniz, H., Erdem, A., Kuralay, F. and Jelen, F.,** 2009, Indicator-based and indicator-free magnetic assays connected with disposable electrochemical nucleic acid sensor system, *Talanta*, 78:187–192.
- Karadeniz, H., Kuralay, F., Abacı, S. and Erdem, A.,** 2011, The recent electrochemical biosensor technologies for monitoring of nucleic acid hybridization, *Current Analytical Chemistry*, 7:63-70.
- Lambert, J.B., Shurvell, H.F. and Cooks, R.G.,** 1987, Introduction to Organic Chemistry, Macmillan Publishing Company, New York, 222p.
- Laschi, S., Palchetti, I., Marrazza, G. and Mascini, M.,** 2009, Enzyme-amplified electrochemical hybridization assay based on PNA, LNA and DNA probe-modified micro-magnetic beads, *Bioelectrochemistry*, 76:214–220.
- Lei, Y., Chen, W. and Mulchandani, A.,** 2006, Microbial Biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 568:200-210.
- Li, G., Liu, N., Liu, S., Zhang, S.,** 2008, Electrochemical biosensor based on the interaction between copper(II) complex with 4,5-diazafluorene-9-one and bromine ligands and deoxyribonucleic acid, *Electrochimica Acta*, 53:2870–2876.
- Li, X.M., Ju, H.Q., Du, L.P., Zhang, S.S.,** 2007, A nucleic acid biosensor for the detection of a short sequence related to the hepatitis B virus using bis(benzimidazole)cadmium(II) dinitrate as an electrochemical indicator, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101:1165–1171.
- Li, X.M., Ju, H.Q., Ding, C.F., Zhang, S.S.,** 2007, Nucleic acid biosensor for detection of hepatitis B virus using 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline copper complex as electrochemical indicator, *Analytica Chimica Acta*, 582:158–163.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liang, Y., Gong, J.L., Huang, Y., Zheng, Y., Jiang, J.H., Shen, G.L. and Yu, R.Q.,** 2007, Biocompatible core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering probes for detection of DNA related to HIV gene using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools, *Talanta*, 72:443–449.
- Liu, M., Luo, C. and Peng, H.,** 2012, Electrochemical DNA sensor based on methylene blue functionalized polythiophene as a hybridization indicator, *Talanta*, 88:216–221.
- Liu, N., Li, G.J., Liu, S.F., Zhang, S.S.,** 2008, Electrochemical DNA biosensor for the detection of interaction between di[azino-di(5,6-azafluorene)- κ^2 -NN']dichlormanganous and DNA, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 133:582–587.
- Liu, X., Qu, X., Dong, J., Ai, S. and Han, R.,** 2011, Electrochemical detection of DNA hybridization using a change in flexibility, *Biosensors and Bioelectronics*, 26:3679–3682.
- Liveri, V.T.,** 2006, Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems, Springer Science+Business Media Inc., New York, 50p.
- Loaiza, O.A., Jubete, E., Ochoteco, E., Cabanero, G., Grande, H. and Rodriguez, J.,** 2011, Gold coated ferric oxide nanoparticles based disposable magnetic genosensors for the detection of DNA hybridization processes, *Biosensors and Bioelectronics*, 26:2194–2200.
- Mashhadizadeh, M. H., Talemi, R. P.,** 2016, Synergistic effect of magnetite and gold nanoparticles onto the response of a label-free impedimetric hepatitis B virus DNA biosensor, *Materials Science and Engineering: C*, 59:773–781.
- Medley, C.D., Bamrungsap, S., Tan, W. and Smith, J.E.,** 2011, Aptamer-Conjugated nanoparticles for cancer cell detection, *Analytical Chemistry*, 83:727-734.
- Meriç, B., Kerman, K., Özkan, D., Kara, P. and Özsöz, M.,** 2002, Indicator-free DNA biosensor based on adenine and guanine signals, *Electroanalysis*, 14:1245-1250.
- Mikkelsen S.R.,** 1996, Electrochemical Biosensor for DNA sequence Detection A Review, *Electroanalysis*, 8:15-19.
- Miller, J.N., and Miller, J.C.,** 2000, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education.
- Miller, J.C., Serrato, R., Represas, Cardenas, J. M. and Kundahl, G.,** 2004, *The Handbook of Nanotechnology*, John Wiley & Sons.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Morales, M.A., Mascarenhas, A.J.S., Gomes, A.M.S., Leite, C.A.P., Andrad, H.M.C., Castilho, C.M.C. and Galembeck, F.,** 2010, Synthesis and characterization of magnetic mesoporous particles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 342:269–277.
- Muti, M., Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Yumak, T. and Sinağ, A.,** 2010, Tin oxide nanoparticles-polymer modified single-use sensors for electrochemical monitoring of label-free DNA hybridization, *Talanta*, 82:1680–1686.
- Muti, M., Sharma, S., Erdem, A. and Papakonstantinou, P.,** 2011, Electrochemical monitoring of nucleic acid hybridization by single-use graphene oxide-based sensor, *Electroanalysis*, 23:272–279.
- Muti, M., Kuralay, F. and Erdem, A.,** 2012, Single-walled carbon nanotubes-polymer modified graphite electrodes for DNA hybridization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 91:77–83.
- Nelson, D.L. and Cox, M.M.,** 2008, Lehninger Biyokimyanın Temelleri, 3. Baskı, Çeviri Editörü Prof. Dr. Nedret Kılıç, Palme Yayıncılık, Ankara, 1100s.
- Niu, S., Han, B., Cao, W., Zhang, S.,** 2009, Sensitive DNA biosensor improved by Luteolin copper(II) as indicator based on silver nanoparticles and carbon nanotubes modified electrode, *Analytica Chimica Acta*, 651:142–47.
- Özsöz, M., Erdem, A., Kerman, K., Özkan, D., Tuğrul, B., Topçuoğlu, N., Ekren, H. and Taylan, M.,** 2003, Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of factor V leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes, *Analytical Chemistry*, 75:2181–2187.
- Palecek, E.,** 1988, New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 20:179-194.
- Palecek, E.,** 1995, Encyclopedia of Analytical Science, Alan Townshend (Ed), Academic press, London, 9p.
- Palecek, E., Fojta, M. and Jelen, F.,** 2002, New approaches in the development of DNA sensors: hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces, *Bioelectrochemistry*, 56:85–90.
- Palecek, E., Kizek, R., Havran, L., Billova, S. and Fojta, M.,** 2002, Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor, *Analytica Chimica Acta*, 469:73-83.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Palecek, E. and Fojta, M.**, 2007, Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing, *Talanta*, 74:276–290.
- Pietrzyk, D.J. and Frank, C.W.**, 1979, Analytical Chemistry, 2nd edition, Academic press, New York, 13p.
- Pita, M., Abad, J.M., Vaz-Dominguez, C., Briones, C., Mateo-Martí, E., Martín-Gago, J.A., Morales, M.P. and Fernandez, V.M.**, 2008, Synthesis of cobalt ferrite core/metallic shell nanoparticles for the development of a specific PNA/DNA biosensor, *Journal of Colloid and Interface Science*, 321:484–492.
- Rao, C.N.R., Müller, A., Cheetham, A.K.**, 2005, The Chemistry of Nanomaterials Volume 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 761p.
- Rohrbach, F., Karadeniz, H., Erdem, A., Famulok, M. and Mayer, G.**, 2012, Label-free impedimetric aptasensor for lysozyme detection based on carbon nanotube-modified screen-printed electrodes, *Analytical Biochemistry*, 421:454–459.
- Sarıkaya, Y.**, 2008, Fizikokimya, genişletilmiş 9.baskı, Gazi Kitabevi, Ankara, 1151s.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O.**, 1995, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science*, 270:467-70.
- Service, R.F.**, 1998, New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science*, 282:396-399.
- Sheng-Zhen, C., Qiang, C., Fang-Yi1, P., Xin-Xin, H. and Yu-Ling, J.**, 2012, Screen-Printed Electrochemical Biosensor for Detection of DNA Hybridization, *Chinese Journal Analytical Chemistry*, 40:1194–1200.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. and Morrill, T.C.**, 1981, Spectrometric Identification of Organic Compounds, John Wiley and Sons, New York, 166p.
- Smerkova, K., Dostalova, S., Vaculovicova, M., Kynicky, J., Trnkova, L., Kralik, M., Adam, V., Hubalek, J., Provaznik, I. and Kizek, R.**, 2013, Investigation of interaction between magnetic silica particles and lambda phage DNA fragment, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 86:65–72.
- Skoog, D.A. and West, D.M.**, 1981, *Principles of Instrumental Analysis*, 2nd Edition,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Skoog, D.A., West, D.A. and Holler, F.J.**, 1996, Analitik Kimyanın Temelleri, 8. Baskı, Çeviri Editörleri Prof. Dr. Esma Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, Bilim Yayıncılık, Ankara, 213s.
- Sole, S., Merkoci, A. and Alegret, S.**, 2001, New materials for electrochemical sensing III. Beads, *Trends in Analytical Chemistry* 20:102-110.
- Son, A., Dosev, D., Nichkova, M., Ma, Z., Kennedy, I.M., Scow, K.M. and Hristova, K.R.**, 2007, Quantitative DNA hybridization in solution using magnetic/luminescent core-shell nanoparticles, *Analytical Biochemistry*, 370:186-194.
- Telefoncu, A.**, 1999, Biyosensorler. Biyokimya lisansüstü yaz okulu 20-26 Haziran, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, Aydın, 9s.
- Tichoniuk, M., Gwiazdowska, D., Ligaj, M. and Filipiak, M.**, 2010, Electrochemical detection of foodborne pathogen *Aeromonas hydrophila* by DNA hybridization biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 26:1618-1623.
- Tural, H., Gökçel, H.İ., Ertas, F.N.**, 2003, Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları no: 186, İzmir, 75s.
- Turner, A.P.F.**, 1987, Biosensors: Fundamentals and Applications, Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S., (Ed), Oxford University Press, Oxford, 3p.
- Wang, J., Nielsen, P., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Ozsoz, M., Beglieter, A. and Mowat, M.**, 1997, Mismatch sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance, *Analytical Chemistry*, 69:5200-5202.
- Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Shiraishi, H., Luo, D. and Valera, F.S.**, 1997, Sequence-specific electrochemical biosensing of *M. tuberculosis* DNA, *Analytica Chimica Acta*, 337:41-48.
- Wang, J., Rivas, Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shirashi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., farias, P.A.M., Valera, F.S., Grant, D.H., Özsöz, M. and Flair, M.N.**, 1997, DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A Review, *Analytica Chimica Acta*, 347:1-8.
- Wang, J., Kawde, A.N. and Sahlin, E.**, 2000, Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA, *Analyst*, 125:5-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, J., Kawde, A.N., Erdem, A. and Salazar, M.,** 2001, Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 126: 2020-2024.
- Wang, J. and Kawde, A.N.,** 2002, Amplified label-free electrical detection of DNA hybridisation, *Analyst*, 127:383-386.
- Wang, J., Xu, D., Erdem, A., Polsky, R. and Salazar, M. A.,** 2002, Genomagnetic electrochemical assays of DNA hybridization, *Talanta*, 56: 931-938.
- Wang, J.,** 2003, Nanoparticle-based electrochemical DNA detection, *Analytica Chimica Acta*, 500:247-257.
- Wang, J., Liu, G. and Merkoçi, A.,** 2003, Particle-based detection of DNA hybridization using electrochemical stripping measurements of an iron tracer, *Analytica Chimica Acta*, 482:149-155.
- Wang, J., Flechsig, G.U., Erdem, A., Korbut, O. and Grundler, P.,** 2004, Label-free DNA Hybridization Based on Coupling of a Heated Carbon Paste Electrode with Magnetic Separations, *Electroanalysis*, 16:928-931.
- Wang, J.,** 2006, Analytical Electrochemistry, 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 272p.
- Yamaura, M., Camilo, R.L., Sampaio, L.C., Macedo, M.A., Nakamura, M. and Toma, H.E.,** 2004, Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 279:210-217.
- Yang, Y., Zhou, J., Zhang, Y., Zou, Q., Zhang, X. and Chen, J.,** 2013, Sensitive electrochemical detection of hydroxyl radical based on MBs-DNA-AgNPs nanocomposite, *Sensors and Actuators B*, 182:504- 509.
- Yıldız, A. ve Genç, Ö.,** 1993, Enstrümental Analiz, Hacettepe Yayınları, A-64, s. 289-384.
- Yumak, T., Kuralay, F., Muti, M., Sinag, A., Erdem, A. and Abacı, S.,** 2011, Preparation and characterization of zinc oxide nanoparticles and their sensor applications for electrochemical monitoring of nucleic acid hybridization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86:397-403.
- Zuo, S.H., Zhang, L.F., Yuan, H.H., Lan, M.B., Lawrance, G.A. and We, G.,** 2009, Electrochemical detection of DNA hybridization by using a zirconia modified renewable carbon paste electrode, *Bioelectrochemistry*, 74:223-226.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi: 17.01.1989

Doğum yeri: Bursa

Eğitim:

Orta öğrenimi: Ahmt Uyar İlköğretim Okulu (1995-2003)

Lise öğrenimi: Bursa Atatürk Anadolu Lisesi (2003-2007)

Lisans Eğitimi: Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2007-2012)

Yüksek Lisans Eğitimi: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı (2012-2016)

Yer aldığı projeler:

Bursiyer, 111T073 no'lu TÜBİTAK projesi (Eylül 2012-Ekim 2013)
Araştırmacı, 013/FBE/010 no'lu EBİLTEM Projesi (Nisan 2013-Ağustos 2015)

Yayınlar:

Altay, C., Ekşin, E., Çongur, G., Erdem, A., 2015, Electrochemical monitoring of the interaction between Temozolamide and Nucleic acids by using disposable pencil graphite electrode, *Talanta*, 144:809-815.

Bildiriler:

Altay, C., Ekşin, E., Çongur, G., Erdem, A., Temozolomid-DNA etkileşiminin elektrokimyasal sensörlerle tayini, IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 13-16 Aralık 2012, Poster Sunumu, Uludağ Üniversitesi, Bursa-TÜRKİYE.

Altay, C., Muti, M., Eksin, E., Erdem A., Tek duvarlı karbon nanotüp modifiye biyosensörlerle antikanser ilaç-DNA etkileşiminin elektrokimyasal tayini, 1. Ege Nanoteknoloji Günleri, 18-19 Nisan 2013, Poster Sunumu, Ege Üniversitesi, İzmir-TÜRKİYE.

Altay, C., Erdem A., Elektrokimyasal DNA tayinine yönelik Poli-L-(glutamik asit) modifiye elektrotlar, II. Ulusal Ege Kompozit Malzemeler Sempozyumu, Poster Sunumu, 07-09 Kasım 2013, Kuşadası-TURKEY.

İş tecrübesi: Abdi İbrahim Otsuka İlaç A.Ş. (27.01.2014 – 29.08.2015)