

**T. C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OPTİK VE ELEKTROKİMYASAL DNA BİYOSENSÖRLERİNİN**  
**GENETİK HASTALIK VE MİKROORGANİZMA TAYİNİNE**  
**YÖNELİK TASARIMI VE UYGULAMALARI**

**Analitik Kimya (Eczacılık) Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyokimyager**

**Yasin Uğur KAYRAN**

**Danışman**

**Yrd. Doç. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL**

**İZMİR**

**2011**



**T. C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Optik ve Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerinin Genetik Hastalık ve  
Mikroorganizma Tayinine Yönelik Tasarımı ve Uygulamaları**

**Analitik Kimya (Eczacılık) Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyokimyager**

**Yasin Uğur KAYRAN**

**Danışman**

**Yar. Doç. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL**

**İZMİR**

**2011**



**DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ**

**(Adı Soyadı)**

**(İmza)**

**Başkan** : Yrd. Doç. Dr. Dilşat ARIKSOYSAL .....

**(Danışman)**

**Üye** : Prof. Dr. M. E. Şengün ÖZSÖZ .....

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Buket KOSOVA .....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 22.12.2011

## ÖNSÖZ

Yüksek lisansım süresince ilgisini ve desteğini eksik etmeyen bilgisi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan danışmanım, değerli hocam Yrd. Doç.Dr. Dilşat (ÖZKAN) ARIKSOYSAL'a teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında yönlendirmeleri ve desteği ile her zaman yanımda olan Prof Dr. Mehmet Şengün ÖZSÖZ'e teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca dostuklarını ve desteklerini eksik etmeyen tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Destekleri ile her zaman yanımda olduklarını hissettiren, Ailem'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**İzmir,**

**30.11.2011**

**Biyokimyager**

**Yasin Uğur KAYRAN**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	I
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TABLolar DİZİNİ .....	VIII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM I.....	7
1 GENEL BİLGİLER .....	7
1.1 Biyosensörler .....	7
1.1.1 Biyosensörlerin Sınıflandırılması.....	8
1.1.1.1 Kullanılan Çevirici Türüne Göre Sınıflandırma .....	9
1.1.1.2 Biyosensörlerin Kullanılan Biyolojik Molekülün Türüne Sınıflandırılması.....	23
Enzimler .....	23
Antikorlar .....	23
Nükleik Asitler (DNA ve RNA) .....	24
1.2 ELEKTROKİMYA.....	30
1.2.1 Faradayik ve Faradayik Olmayan Akımlar [116, 134].....	31
1.2.2 Polarizasyon [116] .....	31
1.2.3 Elektrot Yüzeyindeki Tabakalar.....	32
1.2.4 Elektrot Yüzeyine Kütle Aktarım Yolları .....	34
1.2.5 Elektroanalitik Yöntemler .....	35
Voltametik Teknikler .....	37
Dönüşümlü Voltametri (CV).....	37
Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) .....	38
Kare Dalga Voltametri (SWV).....	40
1.3 Tez Kapsamında Tayini Gerçekleştirilen Genetik Hastalık ve Mikroorganizma Hakkında Genel Bilgi .....	41
BÖLÜM II.....	43
2 GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
2.1 Analitik Tayin Sistemleri.....	43
2.1.1 Elektrokimyasal sistemler .....	43
2.1.2 SPR sistemi .....	44

2.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	45
2.3	Kullanılan Tamponlar ve İçerikleri .....	46
2.4	Kullanılan Oligonükleotid Dizileri .....	46
2.5	Kullanılan Yöntemler.....	48
2.5.1	COMT Dizisinin Tayininde Kullanılan Elektrokimyasal Yöntem.....	48
	Aktivasyon .....	49
	Elektrot Yüzeyinin Kovalent Ajanla Kaplanması.....	49
	Elektrot Yüzeyine Prob Tutturulması .....	49
	Etanolamin ile Etkileşim .....	49
	Sensörün Kullanım Süresinin Belirlenmesi .....	49
	Hibridizasyon .....	50
	Sentetik Dizilerle Hibridizasyon .....	50
	PCR Ürünleriyle Hibridizasyon.....	50
	Ölçüm.....	50
2.5.2	Yüzey Plazmon Rezonans Sistemiyle ( SPR ) İnfluenza B Virüsünün Tayini Çalışmasında Kullanılan Yötem .....	51
	Ultra Saf Su Enjeksiyonu .....	52
	Tampon (5xSSC) Enjeksiyonu.....	53
	DNA Enjeksiyonu .....	53
BÖLÜM III	.....	54
3	BULGULAR.....	54
3.1	Elektrokimyasal Tayin ile COMT Dizisinde SNP Tayini Çalışmasında Elde edilen Bulgular .....	54
3.1.1	Sentetik Dizilerle Hibridizasyon ve Biyosensör Seçimliliğinin Tayini .....	54
3.1.2	Sensör Yüzeyinin En İyi Saklanma Koşullarının Bulunması ve Kullanım Süresinin Tayin .....	56
3.1.3	Gerçek Örneklerle (PCR ürünleri) Hibridizasyon ve Biyosensör Seçimliliğinin Tayini .....	61
3.2	SPR ile İnfluenza B. Virüsü Tayini Çalışmasından Elde Edilen Bulgular .....	62
3.2.1	Prob DNA'ya Ait Yanıtın Ölçümü.....	62
3.2.2	Hibrit Ölçümü .....	64
3.2.3	Rastgele PCR Ürünü İle Etkileştirilmiş Prob Ölçümü .....	65
BÖLÜM IV	.....	70
4	TARTIŞMA.....	70
4.1	COMT Gen Dizisinin Tayini Çalışmasında Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi.....	70

4.2 SPR ile İnfluenza B. Tayini İçin Geliştirilen Sensörün Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	72
Bölüm V .....	74
5 Sonuç ve Öneriler .....	74
ÖZET .....	77
ABSTRACT .....	80
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ .....	102

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Biyosensörün yapısı.....	8
Şekil 2 Biyosensörlerin Çevirici Sisteme Göre Sınıflandırılması.....	8
Şekil 3: Biyosensörlerin algılayıcı biriminde kullanılan biyomoleküllerin türlerine göre sınıflandırılması .....	9
Şekil 4: İnce film olarak iki farklı metalde (Gümüş ve Altın) gözlenen SPR minimumları.....	11
Şekil 5: Toplam iç kırınımın yapısı.....	13
Şekil 6: SPR minimumunun oluşumunu şematik gösterimi .....	14
Şekil 7 SPR temelli analizin dört farklı yönteminin şematik gösterimi; (a) direk yöntem ile analizi; (b) yarışmalı yöntem ile analiz; (c) sandviç yöntemi ile analizi: (d) inhibisyon yöntemi kullanılarak analiz .....	16
Şekil 8: RNA ve DNA'nın yapılarındaki şekerler .....	25
Şekil 9: Nükleotidin yapısı.....	25
Şekil 10: Nükleik asitte bulunan organik bazların kimyasal yapısı ve sınıflandırılması .....	26
Şekil 11: Nükleik asit hibridizasyonu .....	29
Şekil 12: Aşırı gerilim ve polarizasyon.....	32
Şekil 13: Elektrot yüzeyindeki heterojen tabakalar .....	33
Şekil 14: Dönüşümlü voltametrde uyarım ve voltamogram sonucu.....	37
Şekil 15: Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali.....	39
Şekil 16: Dijital cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali [5] .....	39

Şekil 17: Bazı katekolaminlerin molekülleri.....	41
Şekil 18: Elektrokimyasal tayin sisteminin görüntüsüne ait fotoğraf; elektrokimyasal hücre içerisindeki elektrolit çözeltisine daldırılmış referans elektrot, çalışma elektrodu ve platin tel gösterilmektedir. Yanında ise kullanılan yazılım ile voltamogram sonuçların nasıl elde edildiği gösterilmektedir. ....	44
Şekil 19: SPR sistemine ait fotoğraf görüntüsü; şırınga pompasındaki şırıngadan çıkan örnek kapiler boru yardımıyla sensör yüzeyine iletilmektedir. Yüzeyden geçen örnek yine kapiler boru yardımıyla atık kabına aktarılmaktadır. Şekilin yanında kullanılan yazılımla elde edilen sensogram göstereilmektedir. ....	45
Şekil 20: COMT dizisi tayininde izlenen yol.....	48
Şekil 21 : SPR sistemiyle İnfluenza B virüsünün tayinine yönelik geliştirilen biyosensörde kullanılan yöntem.....	52
Şekil 22: Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak sağlıklı tip prob (P1) tutturulmuş elektrot ile hibridizasyon öncesi ve sonrasında elde edilen guanin sinyalleri; , a) yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi), b) prob ile tüm baz dizilimi hedeften farklı ikinci dizi ile arasındaki etkileşim sonrasında, c) prob ile tüm baz dizilimi hedeften farklı bir dizi ile arasında etkileşim sonrasında, d) prob ile tek baz dizilimi hedeften farklı bir dizi (SNP) ile arasında etkileşim sonrasında, e) prob-hedef hibridizasyonu sonrasında, elde edilen guanin sinyali .....	55
Şekil 23: -20°C’ de saklanan elektrotların zamanla ve ETA kaplanmasına bağlı olarak stabiliteilerinin değişimini gösteren histogram. ETA ile etkileştirilmeden bekletilen elektrotlardan elde edilen yanıtlar (a), etkileşimden sonra elde edilen yanıtlar (b).....	57
Şekil 24: +25°C’ de saklanan elektrotlarla gerçekleştirilen hibridizasyon analizlerine ait histogram.....	59

Şekil 25: +4°C’ de saklanan elektrotlarla gerçekleştirilen hibridizasyon analizlerine ait histogram.....	60
Şekil 26: Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak sağlıklı tip prob (P1) tuturulmuş elektrotların PCR ürünlerinin etkileştirilmesi ile elde edilen yanıtlar; a) prob dizi (hibridizasyon öncesi), b) prob- tüm baz dizilimi hedeften farklı PCR ürünü, c) prob- bir bazı hedeften farklı PCR ürünü, d) Prob-hedef PCR ürünü guanin yanıtlarının ölçümü .....	61
Şekil 27: Akışkan sistemde İnfluenza B prob DNA yanıtının gözlenmesine ait sensogramlar. (a) tüm deneye ait sensogram, (b) değerlendirilmenin yapıldığı kısmı gösteren sensogram .....	63
Şekil 28: Akışkan sistemde influenza B prob – hedef PCR ürünü karışımının yüzeye gönderilmesini gösteren sensogramlar a) geniş sensogram, b) ölçümün yapılan bölümün büyütülmüş şekli.....	65
Şekil 29: Negatif olduğu bilinen örnekle probun tüpte etkileştirilmesi ile elde edilen örneğin elektrot yüzeyine gönderilmesi elde edilmiş sensogramlar; a) tüm sensogram, b) ölçümü yapılan bölümün büyütülmüş şekli.....	67
Şekil 30: PCR ürünleri ile gerçekleştirilen çalışmaların histogram grafiği. ....	68

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Bazı pestisitlerin analizi için tasarlanmış SPR biyosensörleri .....	17
Tablo 2: Bazı patlayıcı maddelerin tayini için tasarlanmış SPR biyosensörleri .....	18
Tablo 3: Bazı kirletici maddelerin tayini için tasarlanmış SPR biyosensörleri .....	18
Tablo 4: Bazı bakterilerin tayini için geliştirilmiş SPR biyosensörleri.....	19
Tablo 5: Bazı virüslerin tayini için tasarlanmış SPR biyosensörleri .....	19
Tablo 6: Bazı zehirli maddelerin tayini için tasarlanmış SPR biyosensörleri.....	20
Tablo 7: Biyomedikal uygulamalar için tasarlanmış bazı SPR biyosensörleri.....	21
Tablo 8: Tanıyıcı molekül olarak nükleik asitlerin kullanıldığı bazı SPR biyosensörleri .....	22
Tablo 9: Kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları.....	45
Tablo 10: Kullanılan tamponlar ve içerikleri .....	46
Tablo 11: Tez Çalışmasının Elektrokimyasal Bölümünde Katekol - O – metil Transferaz (COMT) Nokta Mutasyonu Analizinde Kullanılan Oligonükleotidler....	46
Tablo 12: Tez çalışmasının Optik bölümünde İnfluenza-B Tayininde Kullanılan Oligonükleotidler .....	47
Tablo 13: Farklı saklama koşullarında en uzun bekletilme süreleri .....	74

## KISALTMALAR DİZİNİ

21mer	21 baz uzunluğundaki oligonucleotid
A	Adenin
ACB	Asetat Tamponu
C	Sitozin
CV	Dönüşümlü voltametri
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPV	Diferasiyel Puls Voltametrisi
E	Potansiyel (gerilim)
EDC	Etil karbodiimit <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)
ETA	Etanolamin
G	Guanin
-HS	Tiyol grubu
H	Hemoglutinin
İ	İnozin
N	Neurominidaz
NHS	<i>N</i> -hidroksi süksinimid
-NH <sub>2</sub>	Amino grubu
Met	Metiyonin
PBS	Fosfat tamponu
PCR	Polimer zincir reaksiyonu
PGE	Kalem grafit elektrot
PNA	peptid nükleik asit
QCM	kuartz kristal mikrobals
RNA	Ribonükleik asit
SSC	Sodyum salin sitrat
SPR	Yüzey plazmon rezonans
SWV	Kare dalga voltametrisi
T	Timin
Val	Valin

# GİRİŞ

Yüksek seçicilik, yüksek hassasiyet ve kullanım kolaylığı gibi yararlı özellikleri sayesinde klasik tayin metotlarına (ELISA, jel elektroforezi vb.) alternatif olarak geliştirilen **biyosensörler** yakın zamanda rutin analizlerde de kullanılmaya başlanmıştır. Bir damla kan ile kan şekeri ölçebilen cihazlar bu sistemlere verilebilecek en güzel örnektir [20]. Clark ve arkadaşlarının tasarlamış olduğu bu ilk biyosensörde biyolojik tanıyıcı molekül olarak glikoz oksidaz enzimi kullanılmış, enzimlerin yüksek seçiciliğinden ve hızlı sürede reaksiyonu gerçekleştirebilmesinden yararlanılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda tanıyıcı molekül olarak antikor [115, 77], lipid [123, 125, 83], mikroorganizma [2, 105, 86], doku [57, 124, 143] ve nükleik asitler [48, 91] gibi biyolojik tanıma yüzeyine sahip biyosensörler geliştirilmiştir.

1960 yılında Emil Palacek'in nükleik asitlerin elektroaktif olduklarını keşfetmesinden [98] 36 yıl sonra 1996 yılında Joseph Wang ve arkadaşları DNA hibridizasyon tayinini gerçekleştirebilecek ilk elektrokimyasal DNA biyonsörünün tasarımını gerçekleştirdiler [135].

Genetik biliminde son yıllarda meydana gelen önemli gelişmeler ve insan genom projesinin tamamlanmasıyla DNA üzerindeki genlerin büyük çoğunluğunun görevleri tanımlanmış oldu [129]. Bu bilgiler ışığında nükleik asitlerin moleküler tanıma kullanılmasına yönelik çalışmalar da hız kazandı. Bu alandaki bir diğer gelişme ise istenilen gen bölgesinin, özgül primer DNA dizileri kullanılarak in vitro koşullarda çoğaltılabilmesi işlemidir (Polimer zincir reaksiyonu (PCR)).

Nükleik asitlerin moleküler tanıyıcı olarak kullanıldığı hibridizasyona dayalı biyosensör sistemleri ile mutasyon analizleri [3, 29, 94, 95, 103, 130, 132], gıdalarda bakteri tayinleri [25, 47, 122], yeni sentezlenen ilaçların moleküler etki mekanizmalarının aydınlatılması [8, 78, 96, 100, 130, 131], DNA hasarı oluşturan maddelerin tespiti [26, 50, 96, 99, 130], adli tıpta analizleri ve çevresel analizler [30, 61, 67] gibi pek çok alanda uygulamalar ve projeler gerçekleştirilmeye devam etmektedir.

Bu teknolojilerle birlikte daha seçimli biyosensörler üretilmekte ve düşük tayin sınırlarında analizler gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca tasarlanan biyosensörlerin boyutları küçültülmekte böylece çip teknolojisine uyarlanabilecek tasarımlar yapılmaktadır. Lab-on-a-chip sistemleri ile tek bir çip ile binlerce analizin tek seferde gerçekleştirilmesinin sağlanması tasarımdaki amaçlar arasındadır. 1994 yılında American Clinic Micro Sensors Inc. (CMS) firması tarafından kalıtsal hastalıkların DNA biyosensörleriyle tayinine yönelik tasarlanan sensör bu konudaki ilk çalışmadır [74] Biyosensör teknolojisi ile geliştirilmiş ve klinikte kullanıma hazır hale getirilmiş mikroçip cihazlarına örnek olarak Affymetrix ve nanogen firmalarının ürünleri gösterilebilir [23].

1996 yılında Joseph Wang'ın çalışmasından sonra elektrokimyasal DNA biyosensör tasarlama çalışmalarının sayısı hızla artmıştır. 2000 yılında bu konuda 72 makale yayınlanmışken 2011 yılında ise yayınlanan makale sayısı 916'ya çıkmıştır. Elektrokimyasal yöntemlerin hızlı ve hassas yanıt veriyor olması bu sayının neden bu kadar hızla arttığına yanıtıdır. DNA hibridizasyonuna dayalı elektrokimyasal

tainler ile özellikle biyomedikal ve çevresel araştırmalarda büyük önem kazanmıştır [97, 45, 88, 62, 67, 10, 92, 73, 91].

Tezin elektrokimyasal kısmında Katekol-O-Metil transferaz (COMT) enziminin translasyonundan sorumlu gen üzerinde gerçekleşen polimorfizmi tain edebilecek elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirmesi ve geliştirilen biyosensörün kullanılabilirlik süresinin belirlenmesi hedeflemiştir.

Polimorfizmin kelime anlamı çeşitlilik, bir populasyonun genetik yapısında gözlenen çeşitlilik genetik polimorfizim olarak adlandırılır. Tek nükleotid polimorfizmi kısaca SNP olarak tanımlanır, insanlar arasındaki genetik varyasyonun en yaygın tipidir. DNA dizisindeki bazlardan birinin yerine farklı bir bazın geçmesi olarak tanımlanır. Örnek olarak DNA dizisinde bir sitozin (C) yerine bir guanin (G) bazının geçmesi vb. verilebilir. Popülasyondaki tek baz değişimin frekansı %1'den küçük ise tek nokta mutasyonu olarak adlandırılır, %1'den fazla ise bu değişim SNP olarak adlandırılır. SNP'ler insan DNA'sında ortalama her 300 bazda 1 bulunabilir, bu da insan genomunda yaklaşık 10 milyon SNP olduğu anlamına gelir. Bu varyasyonlar genellikle genom içeriğindeki genler arasında yer alır. Bu nedenle birçok SNP rahatsızlığa sebep olmaz. Eğer SNP, bir gen üzerinde yer alıyor ise genin fonksiyonunu etkileyerek rahatsızlıkların oluşmasına sebep olabilir. İnsan genomundaki değişimlerin %85'i tek nükleotid polimorfizmden kaynaklanmaktadır. SNP'lerin tanımlanması genetik hastalıkların belirlenmesinde, genetik haritalamada, belirli hastalıkların kişilerde ortaya çıkma riskinin bilinmesi ve ilaçların o kişiye nasıl etki edeceklerinin bilinmesini sağlayarak kişiye özgü tedavi geliştirilmesinde çok önemli bir yer tutar [55, 126, 43].

Katekol-O-Metil transferaz enzimi bir metil grubunun S-adenozilmetiyoninden, katekolaminlere ( dopamin, epinefrin ve norepinefrin gibi nörotransmitter vb.) transferini katalizler. Bu O-metilasyon işlemi katekolamin transmitterlerinin yıkımında çok en önemli bir yıkım yolağıdır. Aynı zamanda hipertansiyon, astım ve Parkinson hastalıklarında kullanılan katekol içerikli ilaçların metabolize edilmesinde de COMT enzimi önem taşır [44, 28] COMT enzimini kodlayan gen üzerindeki SNP ( G → A; Val158MET ) enzim aktivitesinde yaklaşık 4 kat kadar değişikliğe sebep olmaktadır. Fonksiyonel polimorfizimlerine göre yüksek aktiviteli (Val/Val), orta seviyede aktiviteli (Val/Met) ve en düşük aktiviteli (Met/Met) olmak üzere 3 gruba ayrılmışlardır. Bu polimorfizmin, şizofrenide, bipolar duygu bozukluklarında, migrende, davranış bozukluklarında ve Parkinson hastalığının patogenizinde önemli rol oynadığı bilinmektedir [28].

Çalışmada tasarımı yapılan elektrokimyasal biyosensör yüzeyine (kalem grafit elektrot, PGE), amino (-NH<sub>2</sub>) grubu işaretli ve guanin bazı içermeyen DNA oligonükleotidleri kovalent olarak tutturuldu. Sonra yüzeydeki boşluklar etanolamin (ETA) ile kaplandı. Bu aşamadan sonra modifiye edilmiş elektrotlar farklı saklama koşullarında belirli süre bekletildi. Daha sonra hedef DNA çözeltisiyle gerçekleştirilen hibridizasyonun ardından diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği ile guanin yükseltgenme yanıtları ölçüldü. Prob dizi guanin bazı içermediği için yükseltgenme sırasında yanıt vermezken, hibridizasyon sonrasında hedef DNA'dan kaynaklanan guaninlerin yükseltgenmesi sonucunda sinyal elde edildi. Sentetik DNA dizileri ile en uygun tayin koşulları belirlendikten sonra gerçek hasta örnekleri (PCR ürünleri ) ile analizler gerçekleştirildi.

Tez çalışmasının optik biyosensörler ile patojen tayini bölümünde yüzey plazmon rezonans (SPR) sisteminin kullanıldığı DNA biyosensörü tasarlanması amaçlanmıştır. Çalışmada örnek patojen olarak Influenza B virüsü seçilmiştir.

Influenza virüsleri *Orthomyxoviridae* ailesinden, zarflı, tek zincirli RNA virüsleridirler. İnsanlar kuşlar ve birçok memelide hastalık yapmaktadırlar. Halk sağlığı için takip edilmeleri çok önemlidir. En sık görülen semptomları genellikle boğaz, baş ve kas ağrısı ile birlikte yüksek ateş ile titremedir. 20. yüzyıl boyunca üç defa pandemik influenza salgını gerçekleşmiş ve milyonlarca insan bu pandemilerde hayatını kaybetmiştir. 1918-1919 yılları arasına “İspanyol Gribi” olarak bilinen pandemide dünya genelinde yaklaşık 100 milyon insan hayatını kaybetmiştir [63, 90, 109]. Antijenik farklılıklarına göre A, B ve C alt tiplerine ayrılırlar. Influenza virüslerinin yapısında zarf glikoproteinleri hemaglutinin (H) ve neuraminidaz (N) vardır. H proteini, virüsün hedef hücreye bağlanmasından, N proteini ise bağlanmanın kolaylaştırılmasından sorumludur. Influenza A virüsleri H ve N glikoproteinlerine göre alt gruplara ayrılır. Hemaglutinin den kaynaklanan 16 (H1-H16) ve Neuraminidaz’dan kaynaklan 9 (N1-N9) alt grubu vardır [34]. Influenza B ve C virüslerinde H ve N alt tipleri yoktur. Influenza B virüsleri Yamagata ve Victoria olmak üzere iki alt grubu vardır. Victoria virüsleri sıklıkla batı Asya’da etkili iken Yamagata alt türü tüm dünyada bulunabilir [13].

Yüzey plazmon rezonans çevirici sistemini içeren SPR sensörlerinin temeli, ince metal film üzerindeki elektronların üzerlerine tam yansıma açısı ile gönderilen ışıktaki enerjinin bir kısmını absorbe ederek yüzey plazmonları durumuna geçmesi ve bu durumdayken yüzeydeki çevreye karşı aşırı duyarlı olmalarına dayanmaktadır. Yüzey plazmonalarının osilasyon yaptıkları yüzeydeki değişimlere bağlı olarak tam yansıma açısında değişmektedir [40].

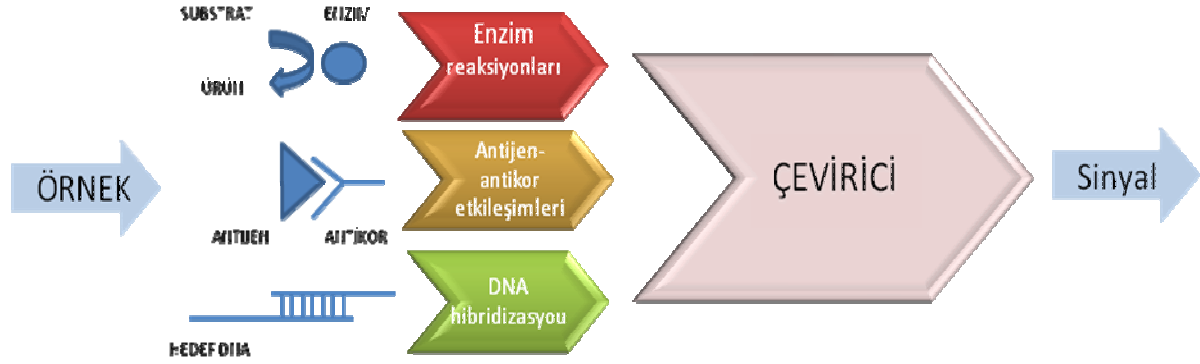
Tez çalışmasının bu bölümünde hibridizasyon analizi üzerinden Influenza B virüsünün tayini, tasarımı yapılan optik biyosensör ile gerçekleştirildi. Tayin, altın çip yüzeyinde değil çözelti ortamında gerçekleştirilmiştir. Sentetik hedef DNA çözeltisi ile tiyol (-SH ) grubu işaretli prob DNA çözeltisi oda sıcaklığında hibritleştirilerek SPR çip yüzeyine gönderilmiştir. Hibrit DNA'lar prob dizideki -SH grubu kısmından altın yüzeye kovalent olarak bağlanmış ve sensör yanıtını arttırmıştır. Elde edilen yanıtlar ve ölçümler hibridizasyon öncesinde ve sonrasında hesaplanarak değerlendirilmiştir.

## BÖLÜM I

### 1 GENEL BİLGİLER

#### 1.1 Biyosensörler

Biyosensörler (biyo-algılayıcılar), biyolojik kaynaklı bir tanıma yüzeyi, fizikokimyasal çevirici ve görüntüleyici sistemden oluşan, biyolojik moleküller kullanılarak diğer biyolojik molekülleri, direkt veya indirekt olarak saptayabilen cihazlardır. Diğer bir tanımla, biyoaktif materyaller içeren ve biyolojik ortamlarda bulunan çeşitli maddelerin analizi için kullanılan analitik cihazlardır. Elektrokimyasal sensörler Analitik Kimya’da oldukça yaygın kullanılan cihazlardır. Bu cihazlara IUPAC tarafından literatürde getirilen tanım ise şu şekildedir: “Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlara elektrokimyasal sensörler denir ” [14]. Bu sensörlerde algılayıcı olarak enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb. biyolojik yapıların kullanılmasıyla BİYONSENSÖR adını almışlardır [127]. Bir biyosensörün kısaca anlatımı şu şekilde yapılabilir; analizi yapılacak olacak molekül ile kuvvetli ve seçici olarak bağlanabilen tanıyıcı biyolojik molekül ile analit etkileştiği zaman transducer (çevirici sistemi) bu etkileşimi fiziksel bir sinyal dönüştürür ve sinyaller bilgisayar gibi cihazlarla anlamlı değerler olarak kullanıcıya aktarılır. [6, 16, 21, 106]



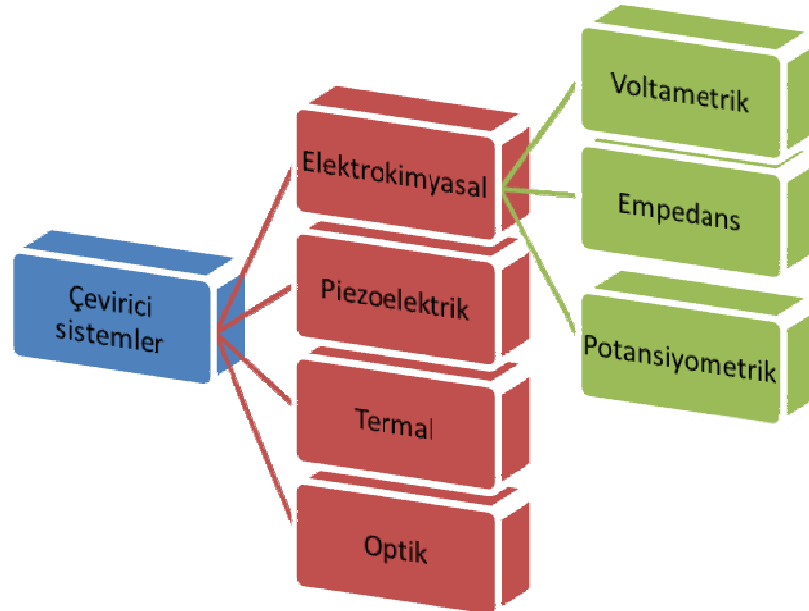
Şekil 1: Biyosensörün yapısı

### 1.1.1 Biyosensörlerin Sınıflandırılması

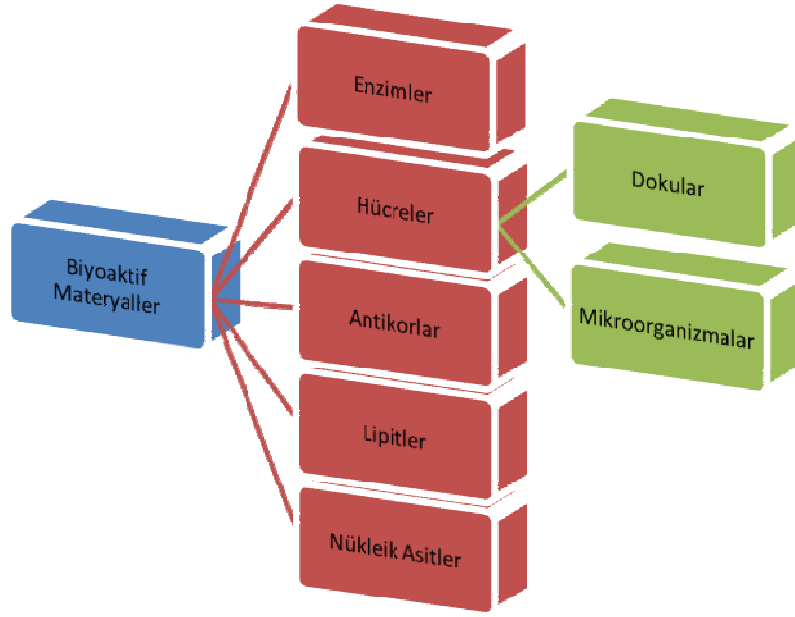
Biyolojik sensör sistemlerinde sınıflandırma,

- Çevirici sistemin türüne göre.
- Algılayıcı olarak kullanılan biyomolekülün türüne göre

yapılabilmektedir



Şekil 2 Biyosensörlerin Çevirici Sisteme Göre Sınıflandırılması



**Şekil 3:** Biyosensörlerin algılayıcı biriminde kullanılan biyomoleküllerin türlerine göre sınıflandırılması

#### 1.1.1.1 Kullanılan Çevirici Türüne Göre Sınıflandırma

##### **Piezoelektrik Sensörler**

Piezoelektrik etki ilk defa 1880'de Jaques ve Pierre Curie tarafından Rochelle tuzunda keşfedilmiştir [38]. Temel etki, mekanik basınç altında bırakılan bazı kristallerin bir yüzünde pozitif, karşı yüzünde ise negatif elektrik yüklerinin ortaya çıkması şeklinde tanımlanmaktadır.

##### **Kuvars Kristal Mikrobalans (QCM)**

Piezoelektrik bir kristalin yüzeyine fiziksel bir kuvvet uygulandığında yüzeyler arasında bir elektriksel potansiyel farkı oluştuğu gözlenmektedir. Oluşan elektriksel potansiyelin şiddetinin, uygulanan fiziksel kuvvet ile doğru orantılı olduğu bu etkiye "Piezoelektrik Etki" adı verilmektedir [39].

Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütesinin ölçülmesi esasına göre çalışan, gravimetrik aygıtlardır. QCM'in aktif elementi iki köşesine metal elektrotlar yerleştirilmiş ince kuvars kristal plakasıdır. Sistemde metal yüzeyindeki kütle değişimi, kuvarsın frekansında değişime neden olur. Yüzeyde kütle değişimi ile frekans değişimi arasında doğru orantı vardır. Kütle baskısına karşı frekans değişimi 'Saurbery' eşitliği ile tanımlanmıştır [60].

### **Optik Sensörler**

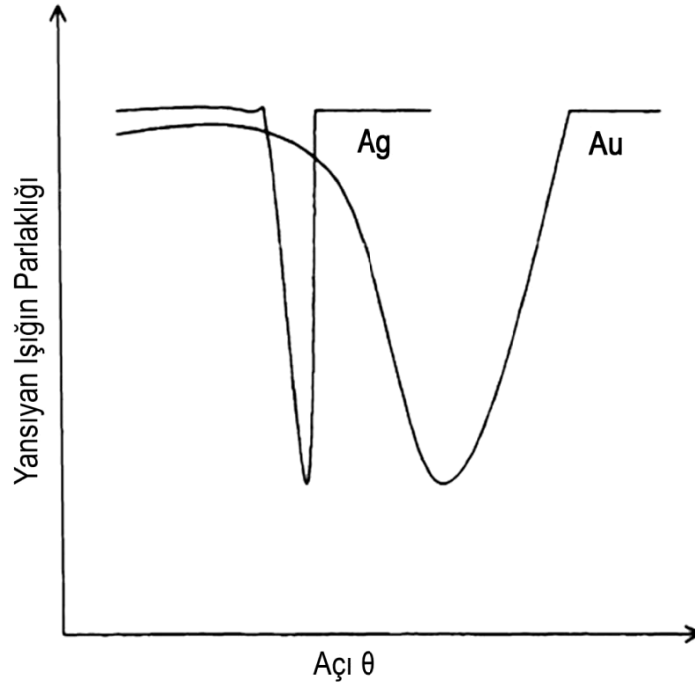
Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir biyomolekülün yüzeye tutturularak hazırlanığı ölçüm aygıtlarıdır. Fotometri, florometri ve biyoluminesansa dayalı optik sistemler vardır. Etkileşim sonucu meydana gelen sinyal, ışık yansımaları, saçılımını yada açısındaki değişimin ölçümünü esas alınır.

### **Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)**

Kritik bir açının üzerinde gönderilen polarize ışık, daha yüksek kırılma indisli bir ortama girdiğinde (havadan cama gibi) toplam iç yansımaya (TIR) uğrar. Bu koşullarda kendiliğinden sönümlü dalga (evanescent wave) adı verilen ışık, metal filmin içine doğru nüfuz eder. Belirli bir kırılma açısında bu dalga, metal yüzeydeki serbest elektronların yüzey plazmonları oluşturmasına sebep olur ve yansıyan ışığın yoğunluğu düşer. Bu olaya yüzey plazmon rezonans denir ve sadece rezonans açısı denilen belirli bir açıda gerçekleşir. Rezonans açısı, yüzeyde gerçekleşen modifikasyonlarla ve etkileşimlerle değişir. Bu da SPR biyosensörlerin temelini oluşturmaktadır.

Etkileşime girecek organik moleküllerden biri, sensördeki ince metal film yüzeyine tutturulur. Analit çözeltisi modifiye edilmiş yüzeye  $\mu\text{m}$  çapındaki tüpler yardımıyla gönderilir. Sensör yüzeyindeki etkileşim çözeltilerin belirli şartlar altında ışığı kırma güçlerinin sabit olması prensibinden hareketle bir organik tabakanın metal yüzeye bağlanmasıyla değişen refraktif indeksin ölçümüne dayalı bir yöntemdir. Yüzeyde gerçekleşen etkileşim gerçek zamanlı olarak cihaz sayesinde bilgisayarda sensogram grafiği şeklinde görüntülenir.

Genellikle SPR cihazlarında metal film olarak 50nm kalınlığında altın veya gümüş kullanılır. Altının tercih edilmesinin sebebi yükseltgenmeye, diğer atmosferik kontaminantlara dirençli olması ve biyoyumlu olmasından dolayıdır.

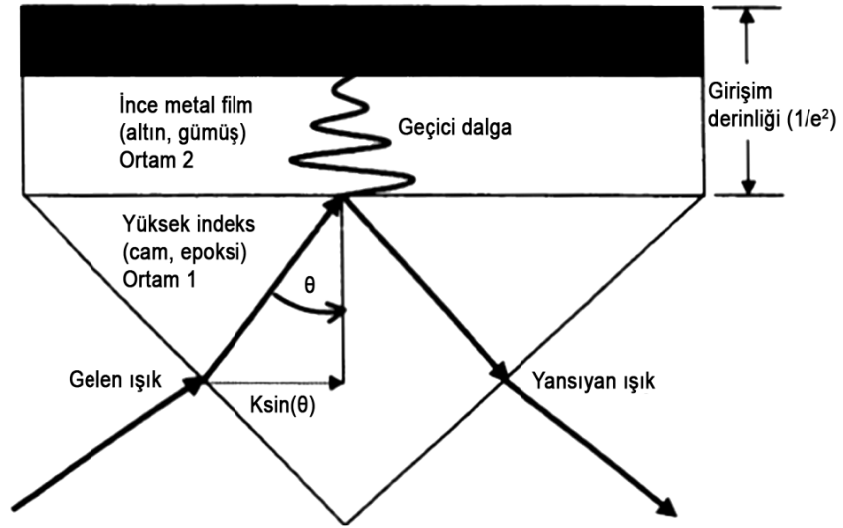


**Şekil 4:** İnce film olarak iki farklı metalde (Gümüş ve Altın) gözlenen SPR minimumları

## **Yüzey Plazmon Rezonansın Teorisi**

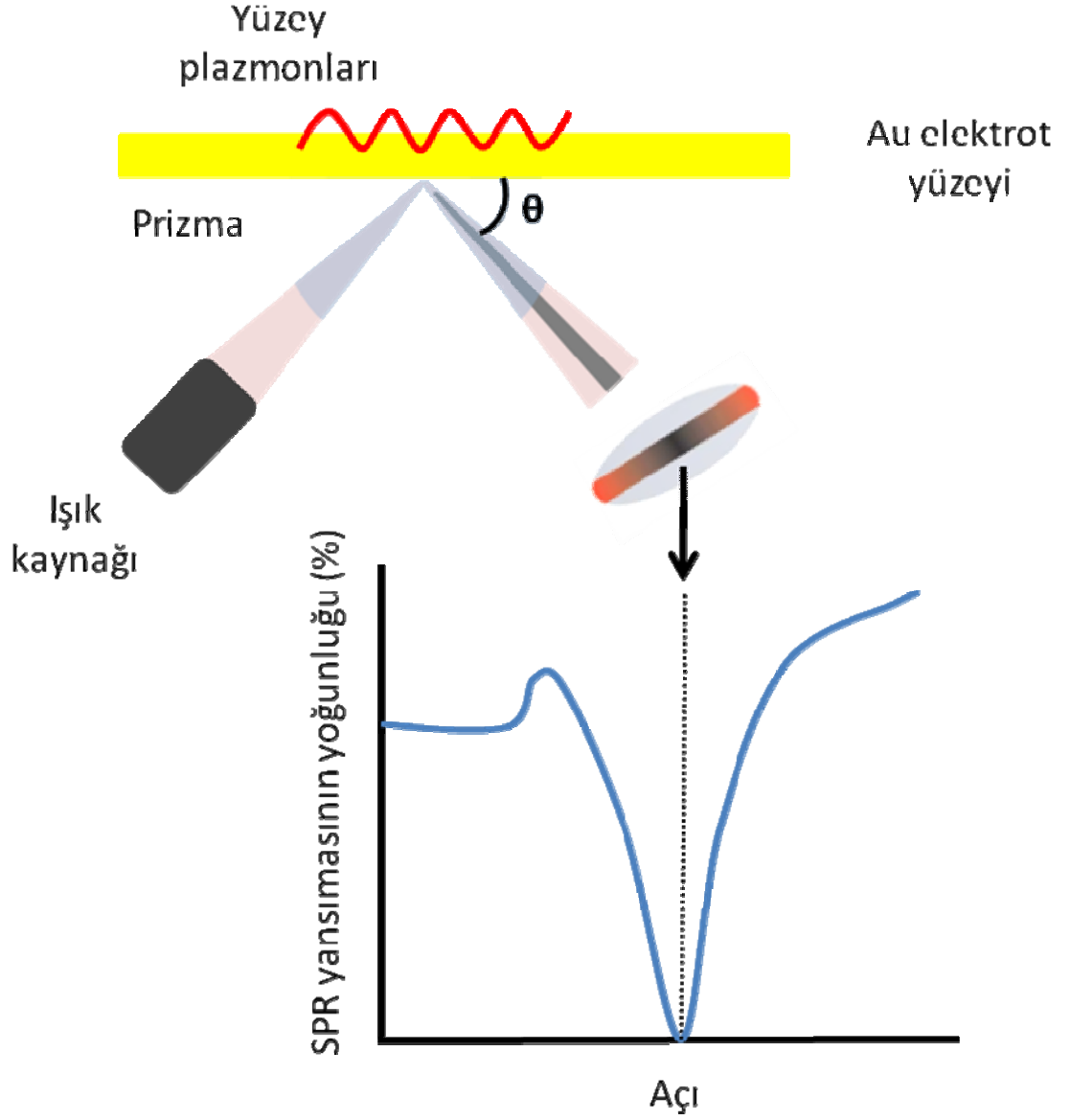
Bu teori enerji yüklü ışık fotonunun metalin elektronları ile birleşmesi veya enerji transferi ilkesine dayanmaktadır. Enerji transferinin gerçekleştiği ışığın geliş açısı yüzeydeki metalin türüne ve metalin yüzeyindeki ortama bağlı olarak değişmektedir. Belirli dalga boyunda salınım yapan enerji yüklü ışık fotonları ve metal yüzeyindeki serbest elektronlar arasında bir eşleşme veya rezonans yakalandığında enerji transferi gerçekleşir. Transfer edilen enerjinin büyüklüğü yüzeyden yansıyan ışığın miktarının ölçülmesi ile tayin edilir. Rezonansın yüzeye ve yüzeydeki değişmelere bağlı olarak sadece tek bir açı ile gönderilen ışıktaki gerçekleşir.

SPR hazırlanmasında kullanılan prizma yapısı Kretschmann prizma yapısıdır. Şekil 5’de görüldüğü gibi, metal film yüzeyindeki elektron bulutunun salınımını uyaran ışık demetinin toplam iç kırılması ile oluşan kendiliğinden sönümlü dalganın kullanıldığı bir yaklaşım vardır. Bu elektron salınımları, yüzey plazmonları olarak adlandırılmaktadır. Geçici alanın girişim derinliği ışığın dalgaboyuna, ışığın geldiği ortam ile çevresinin kırınım açısı indekslerinin oranına ve fotonun parlaklığına bağlıdır. Enerji alanı yüzeyden uzaklaştıkça üstel olarak azalmaktadır. Bundan dolayı, girişim derinliği aniden düşmektedir.



**Şekil 5:** Toplam iç kırınımın yapısı

Metal yüzeyi çevresindeki en ufak değişikliklerin rezonans açısında değişime olması yüzey plazmon rezonansın analitik bir cihaz olarak kullanılabilir olmasının asıl sebebidir. Metal yüzeye herhangi bir yolla tutturulmuş olan molekül rezonans için gerekli olan ışının geliş açısını değiştirir, bu değişiklikler yüzeye tutunan madde miktarı ile orantılıdır. Daha sonra yüzeye tutturulan molekülle etkileşime geçecek herhangi bir madde yüzeye enjekte edilirse rezonans açısı tekrar değişecektir. SPR’de açı değişimi yüzeyden geçen çözeltilerden bağımsız, metal yüzeye tutunabilen moleküllerden kaynaklıdır. Bu bağlanmalar uzaklaştırıldığında rezonans açısı eski derecesine geri döner.



**Şekil 6:** SPR minimumunun oluşumunu şematik gösterimi

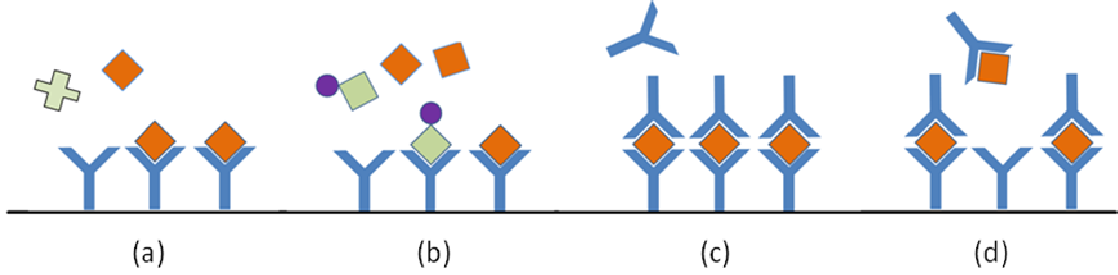
Yansıma açısındaki  $\theta$  açısı rezonans açısı olarak tanımlanır. Bu açının değişmesi yüzeydeki çevre ile ilişkilidir. Açının değişmesi ile dedektöre giden ışık yoğunlukları değişir. Dedektör üzerinde ışık yoğunluğunun en düşük olduğu noktaya SPR minimumu denir.  $\theta$  açısı değişimi SPR minimumunu da yer değiştirmesine neden olur.

## SPR Biyosensörleri ve Uygulama Alanları

Hiçbir işaretçi gereği duymadan moleküllerin etkileşimlerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesine olanak veren bir sistem olan SPR biyosensörleri çok geniş uygulama alanlarına sahiptir. Klinik tanı, milli savunma ve ilaç araştırmalarına kadar birçok alanda SPR biyosensörlerin geliştirilmiştir. Bu çalışmalarda biyolojik molekül olarak proteinler, karbohidratlar, hücreler, nükleik asitler ve reseptörler gibi çeşitli biyolojik materyallerin etkileşimleri incelenmiştir.

Şimdiye kadar SPR biyosensör uygulamaları için geliştirilen dört farklı uygulama formatı bulunmaktadır, bunlar; direk metod, sandviç metodu, yarışmalı metod ve inhibisyon formatlarıdır. Şekil 7 (a)'da gösterilen indirek yöntemde, tanıyıcı molekül SPR çip yüzeyine tutturulur, ve örnek tutturulmuş tanıyıcı molekül ile yakalanır. Bu yöntem genellikle orta ve büyük moleküle ağırlıklı (>10,000 D) analitler için kullanılır [40]. Yarışmalı yöntem [113], sandviç yöntem [76], ve inhibisyon yöntemi [80] genellikle düşük moleküler ağırlıklı analitler için kullanılmaktadır. Yarışmalı yöntemde şekil 7 (b) SPR çip yüzeyine tutturulmuş tanıyıcı molekül ile bağlanan iki farklı örnek kullanılır. Bu örneklerden biri serbest iken diğer örnek sığır serum albumin (BSA) gibi büyük bir proteinle işaretlenir. Yarışma sırasında sinyalde gerçekleşen düşüş hedef örnek miktarı ile orantılıdır. Sandviç yöntemi şekil 7 (c) çok bilindik bir yöntemdir. Yüzeye tutturulmuş tanıyıcı molekül tarafından yakalanmış örnek ile bağlanabilecek ikincil bir tanıyıcı molekül yüzeye gönderilir. İkincil tanıyıcının avantajı tayin sınırını düşürmesi ve analit ile bağlanarak doğruluğu arttırmasıdır. İnhibisyon methodu şekil 7 (d)'de gösterilmiştir. Türelerden biri sensör yüzeyine tutturulur, genellikle büyük bir protein ile işaretli olarak kullanılır. Analizlenmiş örnek, derişimi bilinen miktardaki antikor ile

etkileştirilir ve SPR sensör yüzeyine gönderilir. Etkileştirilmemiş antikorların örnek türevi ile bağlanmaları ölçülür. SPR yanıtı inkübasyon çöeltisindeki hedef derişimi ile ters orantılıdır.



**Şekil 7** SPR temelli analiz için dört farklı yöntemin şematik gösterimi; (a) direkt yöntem ile analiz; (b) yarışmalı yöntem ile analiz; (c) sandviç yöntemi ile analiz; (d) inhibisyon yöntemi kullanılarak analiz

Aşağıdaki tablolarda farklı SPR temelli biyosensör uygulamalarına örnekler yer almaktadır. Hangi yöntemin kullanıldığı, tayin sınırı ve tanıyıcı molekül olarak nelerin kullanıldığı da belirtilmiştir.

## - Pestisit Analizi için Geliştirilmiş Bazı SPR biyosensörleri

**Tablo 1:** Bazı pestisitlerin analizi için tasatlanmış SPR biyosensörleri

Pestisit	Yöntem	Tayin Sınırı ve tayin süresi	Tanıyıcı molekül	Referans
Altrazin	İnhibisyon yöntemi	0,05-1ng/mL 15 dakika	Monoklonal Antikor	76
Simazin	İnhibisyon yöntemi	0,2 g/L 22 dk	Poliklonal Antikor	80
Altrazin	Yarışmalı yöntem- HRP işaretli Altrazin kullanılmış	5 ng/mL 15 dk	Poliklonal Antikor	113
Altrazin	Direk Yöntem	1 ng/mL 15dk	Saccharomicet Cerevisia'dan özel olarak eksprese edilen mRNA	58
2,4- Diklorofenol	indirek inhibisyon yöntemi	10-250ppb	Antikor	117
Paraoxon	İndirek yöntem	1-100ppb	Asetilkolinesteraz enzimi	59

### - Patlayıcı Madde Analizi için Geliştirilmiş Bazı SPR biyosensörleri

**Tablo 2:** Bazı patlayıcı maddelerin tayini için tasarlanmış SPR biyosensörleri

Patlayıcının Türü	Yöntem	Tayin Sınırı ve tayin süresi	Referans
Trinitrolen (TNT)	Trinitrofenil-alanin (Tph-alanin) kullanılarak İndirek yarışmalı yöntem	8 ppt - 30 ppb 4 dk	49
2,4,6-Trinitrophenol (TNP)	BSA işaretli TNP kullanılarak İndirek yarışmalı yöntem	10ppt – 100ppb	111
TNT	İnhibisyon Yöntemi	1 g/mL	119

### - Kirletici Madde Analizi için Geliştirilmiş Bazı SPR biyosensörleri

**Tablo 3:** Bazı kirletici maddelerin tayini için tasarlanmış SPR biyosensörleri

Kirletici	Yöntem	Tayin Sınırı ve tayin süresi	Tanıyıcı molekül	Referans
4-Nonilfenol	İnhibisyon yöntemi	2 ng/mL 3 min	Monoklonal Antikor	108
Fenol	Direk yöntem	5 g/mL	E.coli	17
Kadmiyum, nikel, çinko	Direk tayin	0,1g/mL	Metallothionein hücresel proteinler	139
Bakır İyonları	Direk Tayin	0,063pg/mL – 6,3 g/mL	Squaylium boyası	85

## - Bakteri Tayini için Geliştirilmiş Bazı SPR biyosensörleri

**Tablo 4:** Bazı bakterilerin tayini için geliştirilmiş SPR biyosensörleri

Bakteri Türü	Yöntem	Tayin Sınırı ve tayin süresi	Referans
Escherichia coli O157:H7	Sandviç yöntemi	5-7.10 <sup>7</sup> cfu/mL	35
Escherichia coli O157:H7	Direk Yöntem	8:7 10 <sup>6</sup> cfu/mL	72
Salmonella typhimurium	Direk Yöntem	10 <sup>2</sup> -10 <sup>9</sup> cfu/mL	87
Listeria monocytogenes	İnhibisyon Yöntemi	10 <sup>5</sup> cfu/mL 30dk	56
Staphylococcus aureus	Direk Yöntem	10 <sup>4</sup> cfu/mL	7

## - Virüs Tayini için Geliştirilmiş Bazı SPR biyosensörleri

**Tablo 5:** Bazı virüslerin tayini için tasarlanmış SPR biyosensörleri

Virüs türü	Yöntem	Tayin Sınırı ve tayin süresi	Referans
Epstein-Barr virus	Direk Yöntem	0,2 ng/mL	128
Hepatit B virus (hHBV)	Direk ve sandviç yöntemleri	9,2 nM direk, 4,39 nM sandviç yöntemi için	18
Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)	Direk yöntem		12

## - Zehirli Madde Tayini için Geliştirilmiş Bazı SPR Biyosensörleri

**Tablo 6:** Bazı zehirli maddelerin tayini için tasarlanmış SPR biyosensörleri

Analit	Yöntem	Tayin Sınırı ve tayin süresi	Referans
Staphylococcal enterotoxin B (SEB)	Direk ve Sandviç Yöntemleri	5 ng/mL direk, 0,5 ng/mL sandviç Yöntemi için Tampondan analizde	40
SEB	Yarışmalı Yöntem	0,78 ng/ml -50ng/ml, Sütten analizde 0,312ng/ml- 25ng/mL	71
Aflatoksin B1	İnhibisyon Yöntemi	3 -100 ng/mL	24
Clostridium perfringens-toksin	Direk Yöntem		42
Domoic acid	İnhibisyon Yöntemi	0,1-1000 ng/mL	141
Yer Fıstığı Proteinleri	Direk Yöntem	0,7 ng /mL	79
Kazein	Sandviç Yöntemi	85 ng/mL 10 dk	81

## - Biyomedikal Analit Tayinleri için Geliştirilmiş Bazı SPR Biyosensörleri

**Tablo 7:** Biyomedikal uygulamalar için tasarlanmış bazı SPR biyosensörleri

Analit	Yöntem	Tayin Sınırı ve tayin süresi	Referans
Miyokardiyal hasar markörleri, Miyoglobin ve Tropionin I	Direk yöntem	3 ng/mL	68
Tropinin T	İnsan serumundan Direk Yöntem	0,01 ng/mL	27
Tropionin I	Serumdan Direk ve sandviç yöntem ile	2,5-40 ng/mL direk, 0,5-20 ng/mL sandviç yöntemde	137
Kanser Markörleri; Prostat-ölgül antijen (PSA)	Direk ve Sandviç Yöntem	0,15 ng/mL ve 2,4 ng/mL	11
İntelökin-8 (IL-8)	Sandviç Yöntem	2,5 pM (0,02 ng/mL)	140
Hormonlar; Estrone ve Estradiol	İnhibisyon yöntemi	0,01 – 3000 ng/mL	20
Morfın	İnhibisyon yöntem	0,1 – 10 ng/mL idrarda	107

## - Nükleik Asitler Kullanılarak Geliştirilmiş Bazı SPR biyosensörleri

**Tablo 8:** Tanıyıcı molekül olarak nükleik asitlerin kullanıldığı bazı SPR biyosensörleri

Analit	Yöntem	Tayin Sınırı ve tayin süresi	Referans
Bakteri Analizi	Direk Yöntem	0,03nM P. aeruginosa, 0,02 nM S. Aureus, 0,01 nM C. tetani 0.02 nM for C. perfringens.	129
İnsan immünoglobulin E.	Direk Yöntem	2 nM 60dk	104
Tek nokta mutasyon analizi	Direk Yöntem	50 nM 20dk	15
İlaç Görüntüleme	Direk yöntem	0,5µM 10dk	75

### Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimyasal sistemlerin temelinde kimyasal bir reaksiyonun sonucu olarak gerçekleşen elektron transferlerinin incelenmesi, elektrik alanın etkileri ve iletkenlikte değişimler vardır. Bu sistemler hakkında detaylı bilgi bölüm 2’de yer almaktadır.

### **1.1.1.2 Biyosensörlerin Kullanılan Biyolojik Molekülün Türüne Sınıflandırılması**

#### **Enzimler**

Canlı hücrelerdeki metabolik olayların tamamında düzenleyici rolü olan ve substratlarına karşı yüksek derecede seçiciliğe sahip genellikle protein yapılı katalizörlere enzim denilmektedir. Hedeflerine karşı yüksek afinite gösterirler ve hızla reaksiyonun gerçekleşmesini sağlamaktadırlar. Bu da enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek biyolojik tanıma yüzeyi olarak çeşitli biyosensörlerde kullanımı yönündeki çalışmaları ön plana çıkarmıştır. Enzim temelli biyosensörlerin kullanımı 1960'lı yıllarda glukoz tayinin yapılmasına ilişkin çalışmalarla başlamıştır. Biyosensör çalışmasının ilki 1962 yılında Clark ve Lyons 'un Glukoz Oksidaz (GOD) enzimini O<sub>2</sub> elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçmeyi başardıkları çalışmadır. Enzimlerin kullanılması uygun sıcaklık ve pH koşullarına bağlı olduğundan ve enzimlerin kararlılıklarının düşük olması nedeniyle zordur. Ayrıca enzimin elektrot yüzeyine tutuklanmasının ve tutuklanma sonrasında kararlılığını değişmeden sürdürmesinin de zorluğu tasarımı yapılacak biyosensörde dikkate alınması gereken en önemli unsurlardır [54]. Uygun şartlar altında sıcaklığa karşı kararlılık gösteren enzim biyosensörleri de yapılmıştır [37]. Enzimle işaretli immunosensörler de günümüz bilim dünyasında yerlerini almışlardır [97].

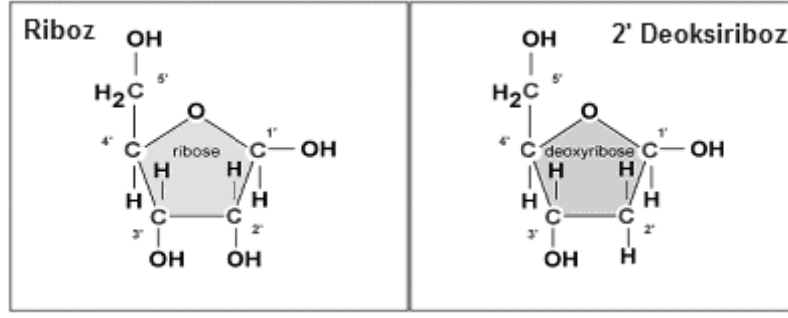
#### **Antikorlar**

Canlı organizmaların bağışıklık sistemlerinde vücuda giren yabancı maddelere karşı üretilen glikoprotein (karbohidrat ve aminoasit yapılı) yapısında moleküllere

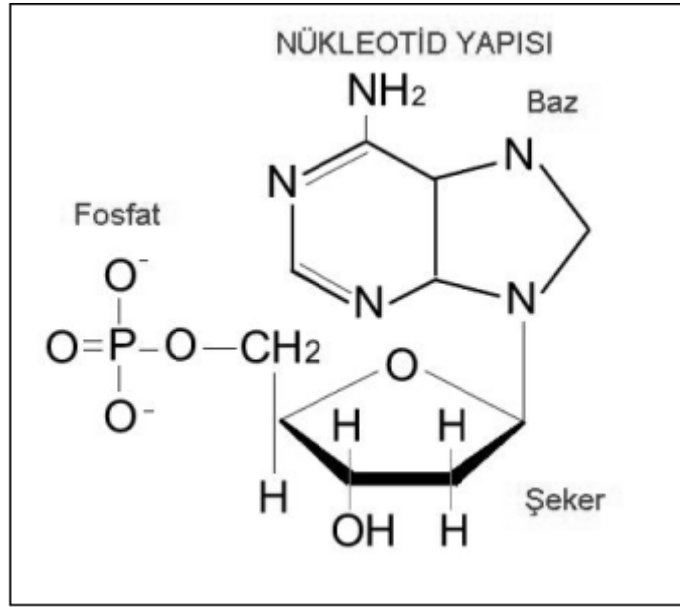
antikor (immünoglobulin) denilmektedir. Bağımsızlık sisteminin özgül hücreleri olan  $\beta$ -hücreleri tarafından üretilirler. Genellikle iki kısa (L zinciri), iki uzun (H zinciri) olmak üzere dört polipeptid zincirinden oluşmuşlardır, Y harfi şekline sahiptirler ve polipeptid zincirler disülfid bağları ile bir arada tutulmaktadır. Y'nin kolları antijen bağlama özelliğindedir. Her antikor-antijen etkileşimi özgül olduğu için biyosensör çalışmalarında kullanılırlar fakat antikor üretimi zorlu ve multidisipliner çalışma gerektiren bir konudur. Bu nedenle biyosensör çalışmaları için kullanımı sınırlıdır. Antikorlar makro moleküller oldukları için özellikle SPR ve QCM sistemlerinde reseptör katmanı olarak kullanılmaktadır [102]. Çip yüzeyine tutturulmuş antikorlar ilgili antijenle etkileşirler ve etkileşimin özgül tayini cihaz ölçümüyle tespit edilir. Bu tip immunosensör çalışmaları halen devam etmektedir.

### **Nükleik Asitler (DNA ve RNA)**

Canlı vücudunun kalıtım materyali olan nükleik asitler DNA (Deoksiribonükleik asit) ve RNA (Ribonükleik asit) yapısında olmak üzere iki farklı türdedir. Her iki tür de tekrarlayan nükleotid birimlerinden oluşan polimerdir. Bir nükleotid de; şeker, fosfat ve baz olmak üzere 3 farklı öğeden oluşur. Şekerin 2 numaralı karbonunda  $-OH$  gurubu olup (RNA) ve olmaması (DNA) durumuna göre nükleik asidin türü belirlenir.



**Şekil 8:** RNA ve DNA'nın yapılarındaki şekerler

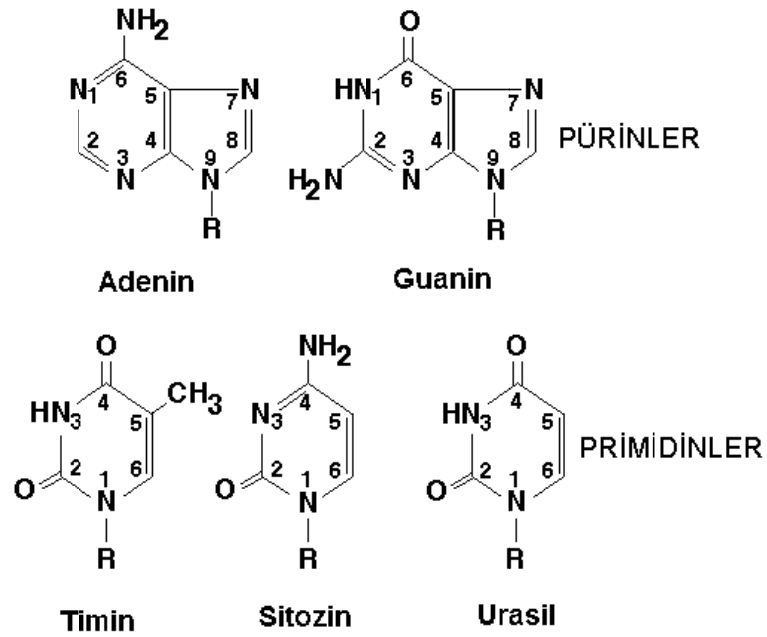


**Şekil 9:** Nükleotidin yapısı

Baz 2-deoksiriboz şekerine  $\beta$ -N glikozidik bağı ile bağlanır. Bu yapıya nükleosit denir. Fosfat şekeri 3' ya da 5' C atomuna bağlanır. Fosforile olmuş nükleosit nükleotid adını alır. İki nükleotid birincisinin  $-OH$  grubu ile diğerinin fosfat grubu arasında oluşan kovalent fosfodiester bağı ile bağlanır. Fosfodiester bağı şekerlerin 5' ve 3' C atomlarını bağladığı için yapı 5'→3' fosfodiester bağı olarak adlandırılır. İki DNA zinciri Eşleşen bazlar arasındaki ikili veya üçlü hidrojen bağları

ile bağlanarak çift zincirli DNA'yı oluşturur. RNA vücutta genellikle çift zincir olarak bulunmaz.

Çift zincirli sarmalda bazlar iç kısımda, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısımda yer alır. Pürin ve pirimidin nükleotidleri arasındaki eşleşmeler adenin karşısında timin, guanin karşısında sitozin şeklinde özgüdür. Bu nedenle bir dizisi bilinen DNA'nın diğer zincire ait dizisi de belirlenebilir.



**Şekil 10:** Nükleik asitte bulunan organik bazların kimyasal yapısı ve sınıflandırılması

DNA zincirindeki Guanin-Sitozin eşleşmesi arasında 3'lü Hidrojen bağı oluşur, Adenin-Timin eşleşmesinde 2'li hidrojen bağı oluşur. Hidrojen bağları zayıf etkileşimler oldukları için sıcaklıkla denatüre edilebilirler. Dizideki Guanin-Sitozin oranı yükseldikçe bağ sayısı da arttığı için denatürasyon için gerekli olan sıcaklığın artırılması gerekir. Denatüre olan bir DNA zinciri tekrar soğutulularak renatüre edilebilir. DNA'nın bu özelliği polimer zincir reaksiyonunda (PCR) kullanılan temel

özelliğidir. Bu yöntemle herhangi bir DNA dizisinden istenilen sayıda kopya DNA elde edilir.

DNA fosfodiester bağları enzimler ve kimyasal hidroliz sonucu kesilebilir. Bu işlemi gerçekleştiren enzimlere nükleazlar denir. DNA'yı uçlarından kesen enzimler ekzonükleaz, iç kısımlarından kesen enzimler ise endonükleaz adını alırlar.

### **Nükleik asit Sensörleri ile ilgili bazı terimler**

**Oligonükleotid:** Birden fazla nükleotidin yan yana gelmesiyle oluşan dizi.

**Dinükleotidler:** İki nükleotidin yan yana gelmesiyle oluşan dizi

**Tekrarlayan oligonükleotidler:** Nükleik Asit dizisi içindeki tekrarlayan oligonükleotidler, tekrarlayan tek bir bazı, tekrarlayan ikili bazı veya üçlü bazı ifade eder. Tekrarlayan mononükleotid poly (A), **dinükleotide poly (AT)**, **trinükleotid poly (GAT)** gibi.

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

**Prob :** Baz dizisi belli olan hedefi yakalayıcı olarak kullanılan oligonükleotit.

**Hedef dizi (Target):** Prob dizisinin karşılığını içeren oligonükleotit.

**Yanlış eşleşen dizi (Mismatch):** Bir bazı veya birden fazla bazı hedef diziden farklı olan oligonükleotit.

**Rastgele dizi (Non complementary):** Hedef diziden tamamen farklı baz dizilimine sahip oligonükleotit.

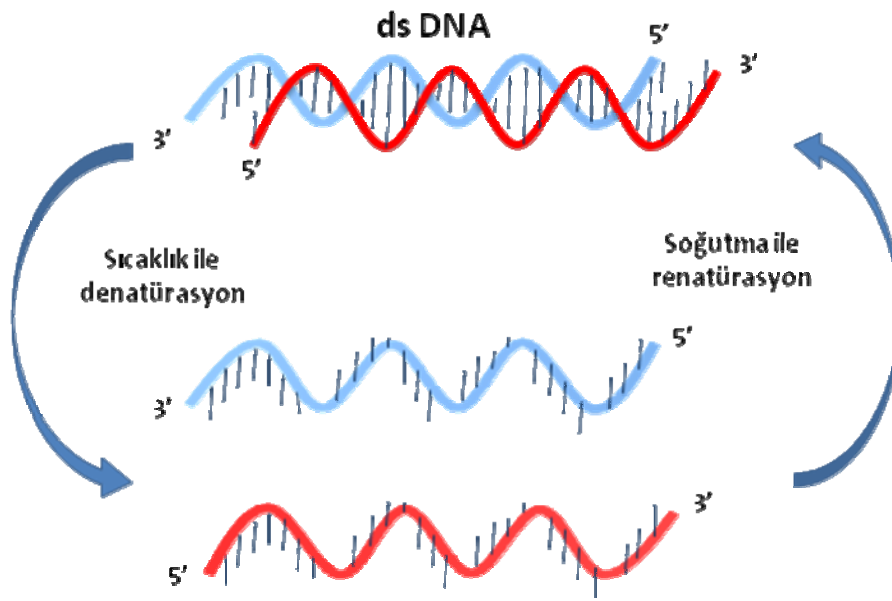
**İnterkalasyon:** Düzlemsel bir halka sistemine sahip olan bazı maddelerin DNA baz çiftleri arasına yerleşerek, güçlü bir şekilde bağlanması olayıdır [130, 132]. Maddenin yapısına bağlı olarak, bu etkileşim tersinir ya da tersinmez şekilde gerçekleşmektedir. İnterkalasyon, DNA' da zincir kırılmasına yol açarak ve DNA senteziyle DNA' ya bağımlı RNA sentezini bozmaktadır. Bu maddeler genellikle Topoizomerez (II) enzimini inhibe ederler.

**Mutasyon:** Nükleik asitlerdeki baz dizilerinde tabii yollarla yada kimyasal veya radyoaktif herhangi bir mutajen ajan vasıtasıyla meydana gelen değişimlere mutasyon adı verilir. Mutasyonlar silent mutasyon (etkisiz mutasyon) olup sağlık açısından hiç etki göstermeyebileceği gibi bazı proteinlerin sentezinin durdurulması veya yanlış sentezlenmesine yol açabilir. DNA tamir mekanizmasından eğer mutasyon tamir edilmeden çoğaltılırsa kalıtsal hastalıklara da sebep olabilir.

DNA'daki bir yada birkaç baz ile ortaya çıkan mutasyona nokta mutasyonu adı verilir. Tek bir bazda oluşan nokta mutasyonu en yaygın görülen türüdür. Bu durum herhangi bir bazın kendi tamamlayıcısı olan baz dışındaki bir baz ile eşleşmesine sebep olur fakat bu iki baz arasında hidrojen bağları kurulamaz.

**Gen:** Canlıların normal hayatlarını sürdürebilmek için ve özelliklerini bir sonraki kuşaklara aktarmak için kullanılan kalıtım materyali DNA'dır. Kalıtımın temel, fiziksel ve işlevsel birimidir. Ortalama 1500 nükleotidten oluşmuş canlınn kalıtsal özelliklerinden herhangi birini taşır. Her gen, protein veya RNA molekülü gibi özel bir işlev taşıyan kromozomların belli bir noktasındaki nükleotid dizilerinden oluşur.

**Nükleik asit (DNA) hibridizasyonu:** Birbirinin eşi olan iki nükleotid dizisinin eşleşmesi olayıdır.



**Şekil 11:** Nükleik asit hibridizasyonu

## 1.2 ELEKTROKİMYA

Kimyasal enerji ile elektrik enerjisi arasındaki etkileşmeyi, etkileşim sonucunda oluşan kimyasal dönüşümleri ve kimyasal reaksiyonları da gerçekleştiren elektron transferi olaylarını inceleyen, bilim dalı olarak tanımlanmaktadır.

Elektrokimyasal sisteminin oluşturulması için bir elektron alıcısı (katot), bir elektron vericisi (anot) ve iki uç arasındaki elektron transferine sağlayacak elektrolit çözeltisi gerekmektedir. Elektrokimyasal tepkimenin gerçekleştiği ortama elektrokimyasal hücre adı verilir. Analizlenecek maddenin elektrokimyasal özelliklerine dayalı olarak gerçekleştirilen kantitatif tayinler “elektroanalitik kimya” olarak adlandırılır. Elektroanalitik teknikler kısa sürede, yüksek hassasiyetli sonuçlar elde edilmesine ve düşük tayin sınırlarına ulaşılabilmesine izin verirler. [116].

Elektrokimyasal çalışmalarda genellikle kullanılan sistem 3'lü elektrot sistemidir. Bu sistemde bir çalışma elektrodu, bir referans elektrot ve bir de karşıt elektrot bulunmaktadır. Elektrotlar arasında elektrokimyasal hücre içerisinde gerçekleşen reaksiyon çevirici sistemler yardımıyla analizlenir. Elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla elektolit çözeltileri kullanılır. Analizlerde kullanılan çeşitli elektroanalitik yöntemler vardır, Diferansiyel Puls voltametri (DPV), Kare Dalga voltametri (SWV) ve Dönüşümlü Voltametri (CV) sıklıkla kullanılan tekniklerdendir. Belirli potansiyel aralığında tarama yapılarak bu esnada oluşan akım sürekli olarak ölçülür. Akım, Difüzyona bağlı olarak oluştuğundan burada ölçülen akım difüzyon akımıdır bu nedenle difüzyon hızı ile akım doğru orantılıdır. Difüzyon elektrot yüzeyindeki difüzyon tabakasında gerçekleşir.

### 1.2.1 Faradayik ve Faradayik Olmayan Akımlar [116, 134]

Elektrot çözelti ara yüzeyinden akım iki tip işlemle iletilir. Birincisinde elektrotlardan birinde yükseltgenme indirgenme reaksiyonu gerçekleşirken elektronların doğrudan aktarımı ile akım iletilir. Bu tip işlemlere bir elektrottaki kimyasal reaksiyon miktarının geçen akımla orantılı olduğunu ifade eden Faraday yasalarına uygun olması nedeniyle *faradayik işlemler* adı verilir, bu şekilde oluşan akımlara *faradayik akımlar (if)* denir. **Fardayik olmayan (kapasitif) akımlar** ise; elektrot / çözelti ara yüzeyindeki yüklü bir çift tabakadan oluşan yüklenme akımıdır. Bir elektrodun bir yüklenme çözeltisine daldırılması ve negatif yükü yüklenmesi ile çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin arayüzeyde sıralı olarak dizilmesi ile bu bölgede bir kapasitör gibi davranan bir elektriksel çift tabaka oluşur. Oluşan kapasitörün yüklenmesi için ortamda herhangi bir reaksiyon olamasa bile bir akım oluşur. Reaksiyona bağlı olmayıp, sistemden kaynaklanan bu akıma **faradayik olmayan kapasitif akım (ic)** denir.

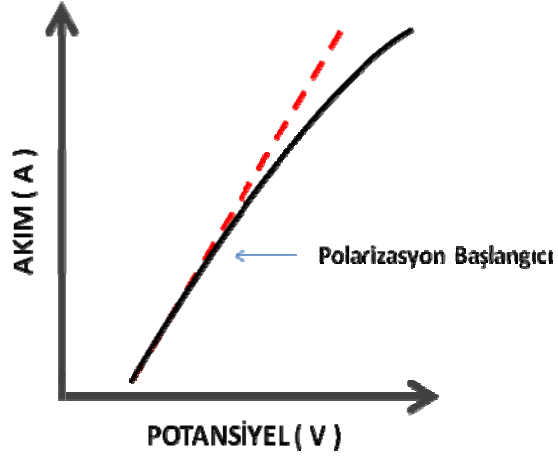
### 1.2.2 Polarizasyon [116]

Metalik iletkenler gibi elektrokimyasal hücrelerde yük akışına karşı direnç gösterirler. Ohm kanuna göre bir hücreden geçen akım ile hücrenin direncinin çarpımı, hücrenin ohmik potansiyeli (  $IR$  düşüşü ) olarak ifade edilir. Hücrede  $I$  amperlik bir akım oluşturmak için hücreye  $-IR$  volt kadar negatif potansiyel (  $E_{uygulanan}$  ) uygulanmalıdır.

$$\text{Eşitlik 1 } E_{uygulanan} = E_{katot} - E_{anot} - IR$$

$E_{\text{katot}}$  ve  $E_{\text{anot}}$  Nerst eşitliği ile hesaplanan elektrot potansiyelleridir.

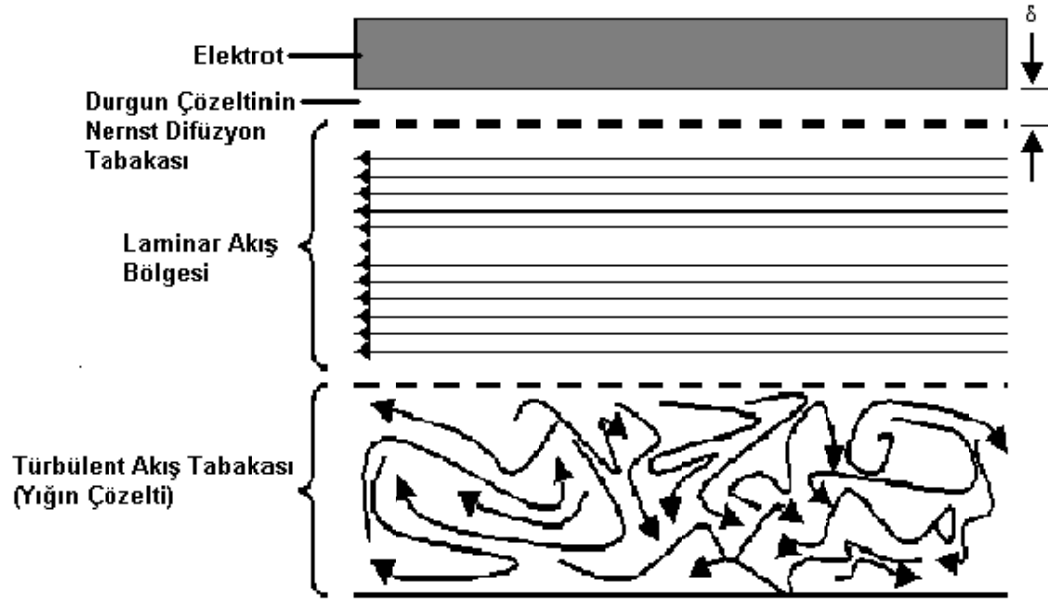
Elektrokimyasal bir hücrede uygulanan potansiyele karşı akım grafiği çizildiğinde düşük akımlarda doğrusal bir grafik elde edilir çünkü IR düşüşü fazla olmaz. Belli bir potansiyelden uygulamasından sonra ile potansiyel artışı ile akım doğrusallıktan sapmaya başlar.



Şekil 12: Aşırı gerilim ve polarizasyon

### 1.2.3 Elektrot Yüzeyindeki Tabakalar

Karıştırılan bir çözelti ile elektrokimyasal analizde derişimin etkisinin incelenmesi için yüzeydeki tabakaların nasıl oldukları incelenmelidir. Genel olarak karıştırılan bir sistemdeki tabakalar **şekil 13**'deki gibi görülmektedir.



Şekil 13: Elektrot yüzeyindeki heterojen tabakalar

**Türbülent akış tabakası:** Çalışma elektrodunun yüzeyinden uzakta bulunan yığın çözeltilde gözlenen akıştır.

**Laminer akış bölgesi:** Elektrot yüzeyine yaklaşıldığında aynı yönde düzenli bir akış geçişi olur. Laminer akışta sıvı tabakaları elektrot yüzeyine paralel bir yönde birbirini üzerine kayarlar.

**Nernst difüzyon tabakası:** Elektrot yüzeyinin hemen üzerinde, laminar akımının hızı sıvı ile elektrot arasındaki sürtünmeden dolayı sıfıra yaklaşır ve bunun sonucunda elektrot çevresinde, durgun bir çözelti tabakası oluşur. Genellikle bu tabakası, sıvının karıştırılma etkinliğine ve viskozitesine bağlı olarak  $10^{-2} - 10^{-4}$  cm kalınlığında olmaktadır. Analit ve ürünlerin derişimleri yalnızca bu tabaka içerisinde elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak değişir. Elektrot yüzeyinde reaksiyona giren türler bu tabakaya ulaşabilen moleküllerdir.

#### **1.2.4 Elektrot Yüzeyine Kütle Aktarım Yolları**

Elektrot yüzeyindeki reaksiyona katılacak türlerin yığın çözeltilerden nerst difüzyon tabakasına ulaşması için üç farklı kütle aktarım yolu vardır.

##### **Difüzyon**

Derişim farkından dolayı kendiliğinden gerçekleşen difüzyon ile elektrot yüzeyindeki derişimi elektrokimyasal reaksiyon süresince azalan molekül yada iyon yığın çözeltilerden elektrot yüzeyine taşınır. Aynı şekilde reaksiyon süresince derişimi artan moleküllerde elektrot yüzeyinden derişimi az olan yığın çözeltilere doğru taşınır. Difüzyon hızı derişim farkı ile orantılı olarak değişir.

##### **Göç**

Çözeltideki katyon ve anyonların yüklerinden dolayı elektrotlara doğru elektrostatik çekim kuvvetleri ile taşınmasıdır. Yükün bu hareketi ile potansiyel ile artan bir akım meydana getirmektedir.

##### **Konveksiyon**

Karıştırma, sarsma veya sıcaklık gibi mekanik etmenlerle iyon ve moleküllerin elektrotlara taşınımıdır. Konveksiyon etkisi nerst difüzyon tabakasını inceltir.

## 1.2.5 Elektroanalitik Yöntemler

### Voltametri

Çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edilen bir grup elektroanalitik yöntem voltametri denir. Voltametri bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektroda uygulanabilecek potansiyel aralığı, kullanılan çalışma elektroduna, çözeltiliye ve elektrolitin türlerine bağlıdır.

Elektroanalitik yöntemlerin en çok tercih edilen yöntemi olan voltametrik teknikler, analitik kimya, inorganik kimya, organik kimya ve biyokimya araştırmalarında hızlı bir analiz yöntemi olmasından dolayı sıklıkla kullanılmaktadır.

Voltametrik analizlerin sonucunda potansiyele karşı akım grafiği olarak elde edilen grafiğe **voltamogram** denir.

### Voltametri Yönteminde Kullanılan Elektrotlar [116]

#### Referans Elektrot

Referans elektrot, analit çözeltisinin bileşiminden bağımsız sabit elektrot potansiyeline sahip bir yarı hücredir. Elektrokimyasal reaksiyon süresince dış ortamdan etkilenmeden iç potansiyellerini korurlar. Referans elektrotlar potansiyeli ölçülmek istenin sistemin mutlak potansiyelini ölçemez, ilgilenilen potansiyel ile yarı hüce arasındaki potansiyel farkı ölçer. Üçlü elektrot sistemlerinde anot olarak görev alır. **Ag/AgCl** ve **Kalomel (Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)** referans elektrotlar yaygın olarak kullanılır.

### **İdeal bir referans elektrodun özellikleri;**

- Kolay hazırlanabilir olmalı
- Tersinir olmalı
- Nerst eşitliğine uymalı
- Zamanla potansiyeli değişmemeli ve sıcaklıkla potansiyel değişim

katsayısı düşük olmalı

- Direnci yüksek olmalı üzerinden akım geçişi olmamalı

### **Karşıtlar Elektrotlar**

Çalışma elektrodunda gerçekleşen reaksiyona veya ölçüme bir etkisi yoktur. Çalışma elektrodunu elektronlarla beslemek ve istenmeyen akımların sistemden uzaklaştırılmasını sağlamakla görevlidir. İç direnci "0" kabul edilir istenmeyen akımların sonucu etkilemesini engeller. Yaygın olarak kullanılan karşıtlar elektrotlar **platin** veya **tungsten** tel ve **grafittir**.

### **Çalışma Elektrotları**

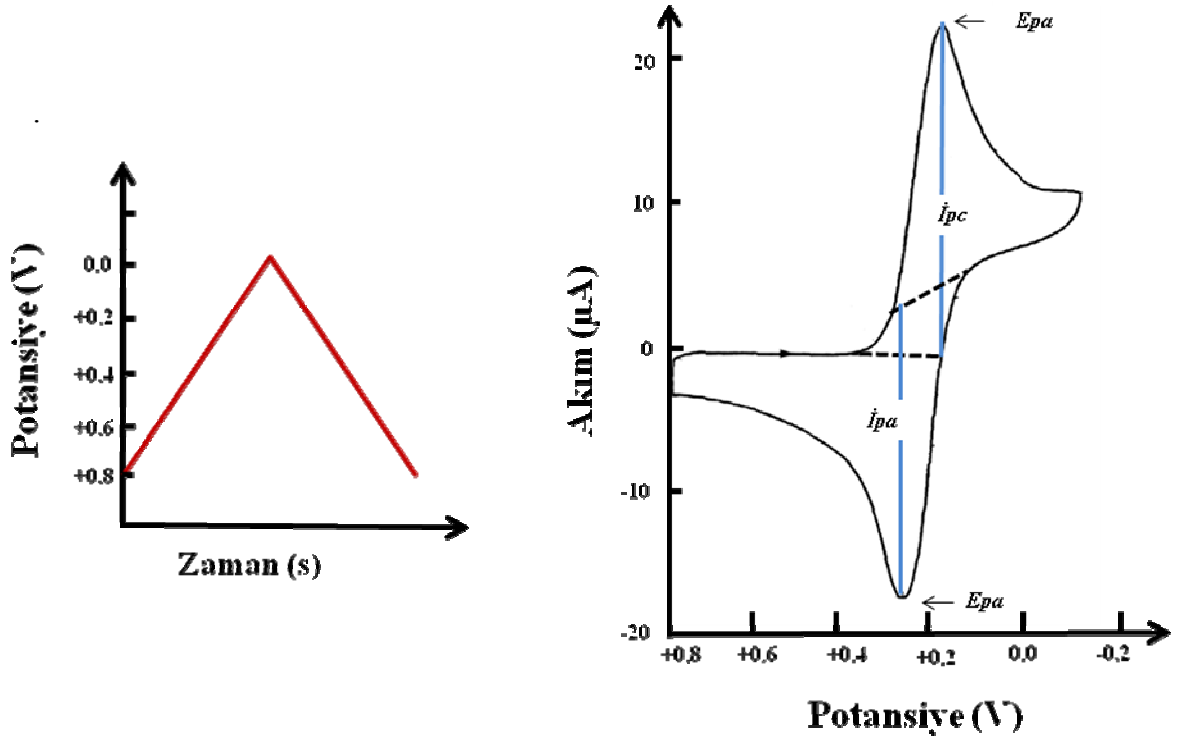
Analit ile reaksiyonun gerçekleştiği yer çalışma elektrodunun yüzeyidir, potansiyeli analitin zamanla değişen derişimine bağlı olarak değişir. Gerçekleştirilecek olan çalışmalara göre seçilecek çeşitli mikro ve makro boyutta, şekillerde karbon, altın, platin ve bizmut katı elektrotlar ve damlayan civa gibi sıvı elektrotlar yaygın olarak kullanılan çalışma elektrotlarıdır.

## Voltametrik Teknikler

Potantostat cihazları yardımıyla istenilen potansiyel ayarlanarak elektrokimyasal hücre uyarılır. Bu uyarma sinyallerine karşılık olarak, akım cevapları oluşur. Bu analizler için en sık kullanılan üç sistem; döngüsel taramalı, diferansiyel puls, kare dalga sistemleridir [116]

### Dönüşümlü Voltametri (CV)

Durgun üçlü elektrot sistemi ile potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesi ile gerçekleştirilir. Uyarımın yönü analize bağlı olarak önce pozitif sonra negatif yönde olabileceği gibi tam tersi olarak da gerçekleştirilebilir



Şekil 14: Dönüşümlü voltametri uyarım ve voltamogram sonucu

Şekil 14'de 6 mM potasyum ferrisiyanür ( $K_3Fe(CN)_6$ ) ve 1 M potasyum nitrat ( $KNO_3$ ) çözeltisinin dönüşümlü uyarma sinyaline verdiği akım cevabı görülmektedir.

+0,8 V - -0.1 V potansiyel aralığı taranan voltamogramda indirgenme ve yükseltgenme sinyalleri yaklaşık +0,2 V' da elde edilmiştir.

Katodik pik  $E_{pc}$ , anodik pik potansiyeli  $E_{pa}$ , katodik pik akımı  $i_{pc}$  ve anodik pik akımının  $i_{pa}$  hesaplanması **şekil 14**'de gösterilmiştir.

**Yarı dalga potansiyeli  $E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc}) / 2$**  olarak hesaplanmaktadır. Tersinir bir elektrot reaksiyonu için anodik ve katodik pik akımları mutlak değer olarak yaklaşık eşittir, fakat zıt işaretlidir ve pik potansiyellerinin farkı  **$0,0592/n$** ' dir. Burada **n**, yarı-reaksiyonda transfer edilen elektron sayısıdır.

Bu yöntemin tayin alt sınırı  $10^{-5}$  M'a kadar düşmektedir. Yöntem alt sınırı yüksek olduğu için kantitatif tayinlerde sık kullanılmaz fakat analizlenecek maddenin hangi potansiyelde nasıl bir reaksiyon gerçekleştirdiğini izlemek sıklıkla kullanılır.

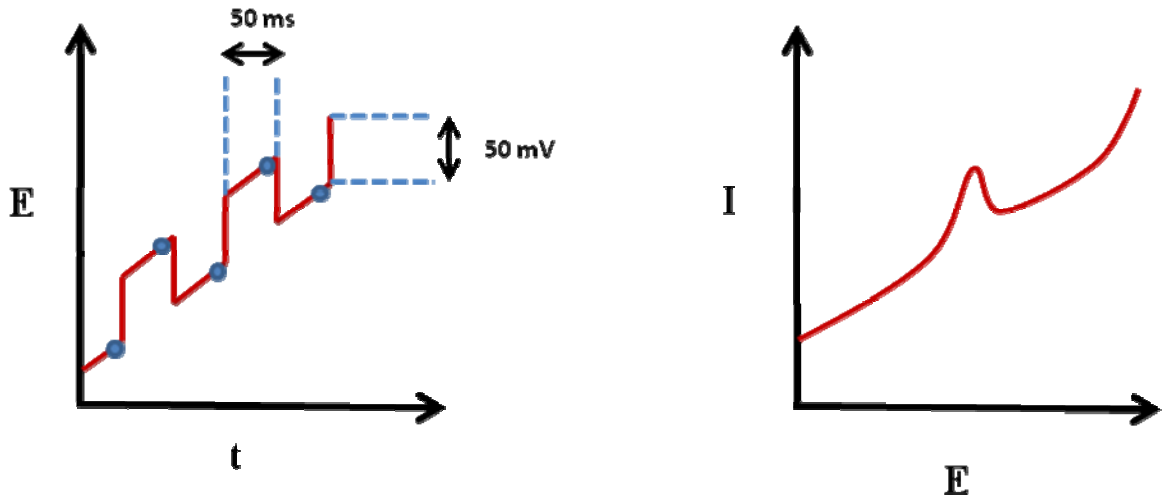
Bir dönüşümlü voltamogramdaki indirgenme ve yükseltgenme arasındaki gerilim farkı  $\Delta E_p$  ile ifade edilir ve şu eşitlikle hesaplanır.

$$\Delta E_p = \frac{57}{n} mV$$

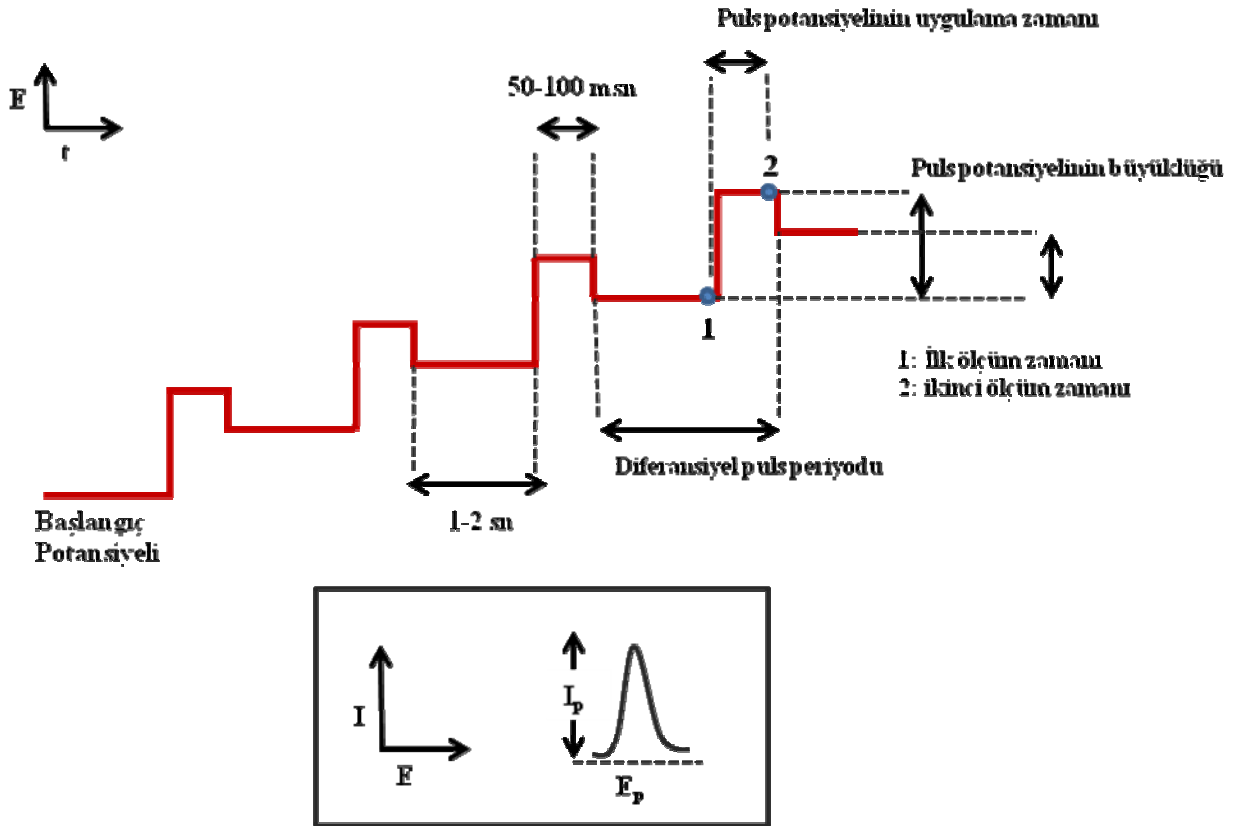
$\Delta E_p$  bu değere ne kadar yakın ise, reversible (dönüşümlü); ne kadar uzaksa irreversible (dönüşümsüz) olarak adlandırılır.

### **Diferansiyel Puls Voltametri (DPV)**

Bu teknikte, yarı-dalga potansiyelleri 0,04 V - 0,05 V kadar farklı olan maddeler için bile pik maksimumları elde edilebilmektedir. Diferansiyel puls voltametri, çok hassas bir yöntemdir ve tayin sınırı  $10^{-7}$  M -  $10^{-8}$  M arasındadır.



Şekil 15: Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali.



Şekil 16: Dijital cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali [5]

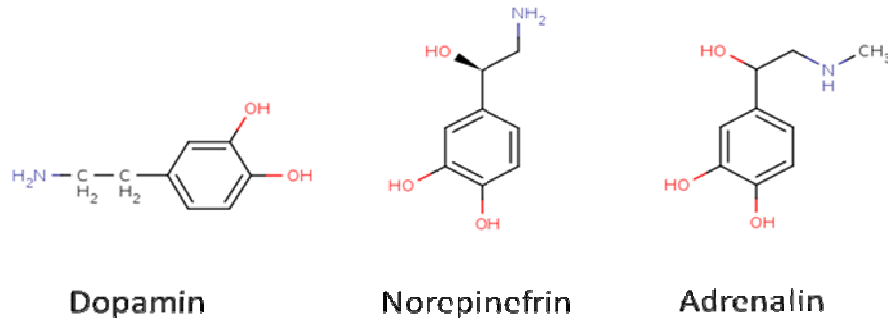
Her iki sistemde de akım ölçümü iki bölgede yapılmaktadır. Dijital sistemde ölçümlerden birinci doğru akım (dc) puls uygulamasından 16,7 ms önce (1), diğeri ise pulsün sonundan 16,7 ms sonra (2) yapılır. Puls başına akımdaki fark ( $\Delta I_p$ ) doğrusal olarak artan potansiyelin bir fonksiyonudur. Elde edilen diferansiyel eğrideki pikin yüksekliği reaksiyona giren moleküllerin derişimleri ile orantılıdır. Tayin sınırı bu yöntemde  $10^{-8}$  M'dır. Faradayik akımın artması, faradayik olmayan yükleme akımının ise azalması bu yüksek duyarlılığın sebebidir. Puls uygulandığı anda faradayik olmayan akımda görülen ilk dalgalanmanın ölçüme etkisini en aza indirmek için iki farklı zamanda akım ölçümü alınır. Böylece sinyal/gürültü oranı ve duyarlılık artar.

### **Kare Dalga Voltametri (SWV)**

Tüm ölçümün yaklaşık 10 ms kadar sürmesinden dolayı son derece hızlı ve tayin sınırının  $10^{-7}$  M –  $10^{-8}$  M arasında olmasından dolayı da duyarlı bir yöntemdir. İleri puls bir katodik akımını ( $i_1$ ) ve geri puls bir anodik akımı ( $i_2$ ) oluşturur. İki akım arasındaki fark alınarak  $\Delta i$  değerleri bulunur ve bu sonuçlarla voltamogram grafiği çizilir. Akımlar arasındaki bu fark reaksiyona giren moleküllerin derişimleri ile orantılıdır. [89]

### 1.3 Tez Kapsamında Tayini Gerçekleştirilen Genetik Hastalık ve Mikroorganizma Hakkında Genel Bilgi

Tez çalışmasının elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarımı yapılan 1. bölümünde EC.2.1.1.6. Katekol-O-Metil Transferaz (COMT) enziminden sorumlu gen üzerindeki tek nükleotid polimorfizminin (SNP) tayini hedeflenmiş. COMT enzimin dopamin, adrenalin ve noradrenalinin yıkımından sorumlu olduğu tanımlanmıştır.



**Şekil 17:** Bazı katekolaminlerin molekülleri

158. kodon üzerinde, exon 4'deki iki eş baskın allelin (G ve A) amino asit yapısında değişikliğe (valine veya metiyonin) sebep olduğu bilinmektedir. Bu değişikliğe bağlı olarak COMT enzim aktivitesinin genetik olarak polimorfik olduğu bilinmektedir. En yüksek aktiviteyi Val/Val genotipi, orta seviyede aktiviteyi Val/Met genotipi ve en düşük aktiviteyi Met/Met genotipi göstermektedir [41]. COMT Val158Met polimorfizminin psikoz çalışmalarında en çok kullanılan genidir, çünkü şizofreni, bipolar bozukluklar ve şizoaffektif bozukluklarda da bu poliorfizmin etkili olduğu bilinmektedir. [22].

Tez çalışmasının 2. Bölümünde influenza B virüsünün tayinine yönelik optik (SPR) biyosensör tasarımı yapılmıştır. İnfluenza virüsleri Orthomyxoviridae sınıfına ait RNA virüsleridirler. Memeli ve kuşlara etki ederler. İnfluenza virüsleri hemagglutinin (H) ve nöraminidaz (N) olmak üzere 2 farklı antijenik yüzey proteinleri taşırlar ve bu proteinlerdeki değişimlere göre alt tipleri vardır [1]. İnfluenza B ve C tiplerini genellikle insanları etkilemektedir fakat nadir de olsa diğer memelileri de etkilemektedirler. İnfluenza A virüsü birçok türü etkilemesine karşın genellikle hedefleri kuşlardır. Su kuşları, kuş gribi virüsü için konakçı konumundadır bu kuş popülasyonlarında virüs asemptomik etki gösterir [118].

İnfluenza en çok genç insanları bulaşmakta, en yüksek mortaliteyi ise yaşlı insanlarda göstermektedir. Zayıf bağışıklık sistemi bulunan hastalarda veya bağışıklık sistemini zayıflatacak ilaç kullanan hastalarda yaşına bakmaksızın mortal etkisi artmaktadır [1].

## BÖLÜM II

### 2 GEREÇ VE YÖNTEM

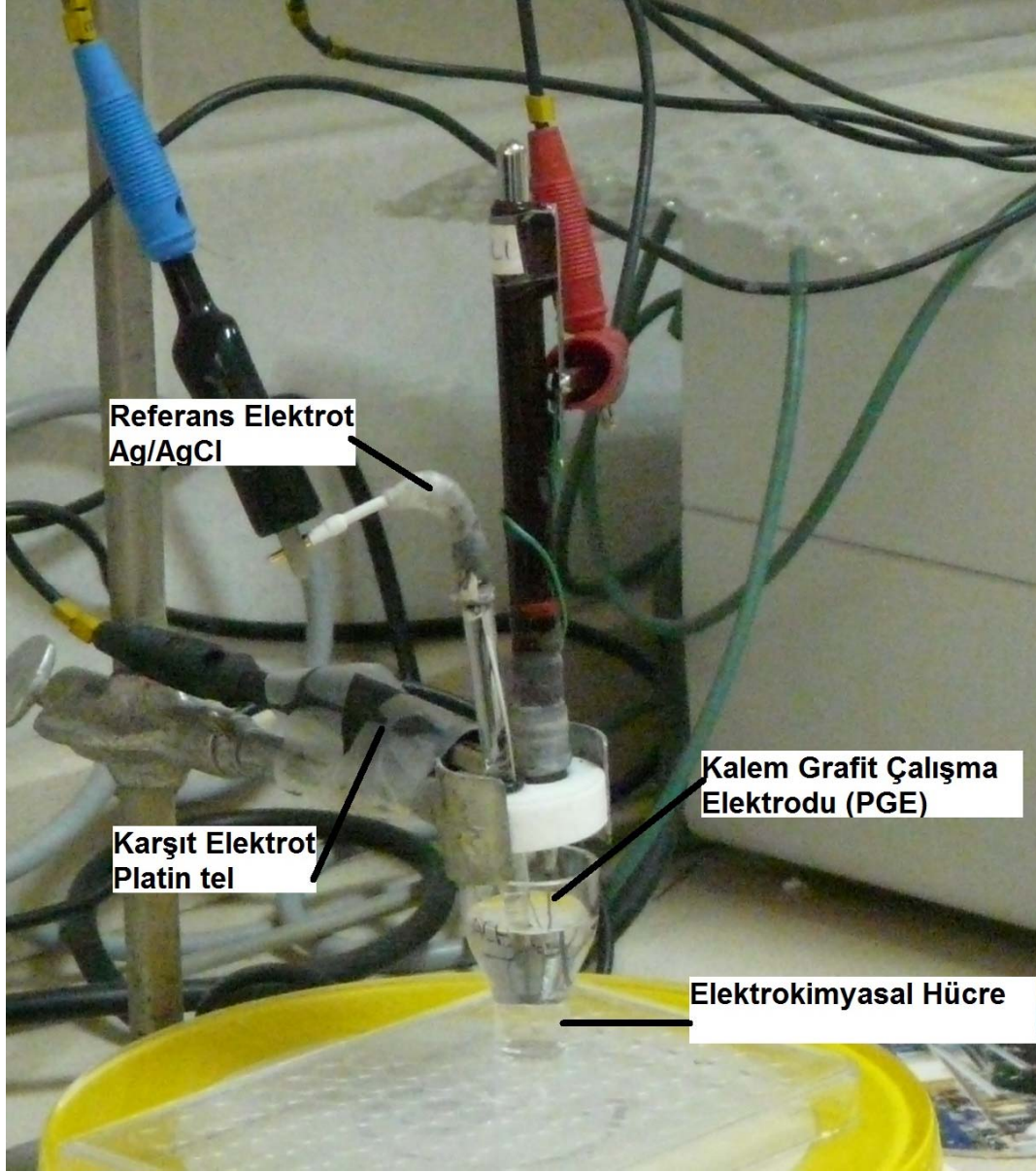
#### 2.1 Analitik Tayin Sistemleri

##### 2.1.1 Elektrokimyasal sistemler

Bu çalışmada elektrokimyasal sistemler için Autolab PGSTAT 12 (Eco. Chemie, Hollanda) cihazı kullanılmıştır. Cihazın bilgisayarlı kontrolü için GPES 4,9 yazılımı kullanılmaktadır.

Üçlü elektrot sistemini kurmak için kullanılan elektrotlar sırası ile; referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrod, karşıt elektrot olarak platin tel ve çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrottan (PGE) oluşmaktadır. Sistemde elektrotlar arasındaki elektriksel bağlantı elektrokimyasal hücre içerisindeki 4 mL elektrolit çözeltisi sağlanmaktadır.

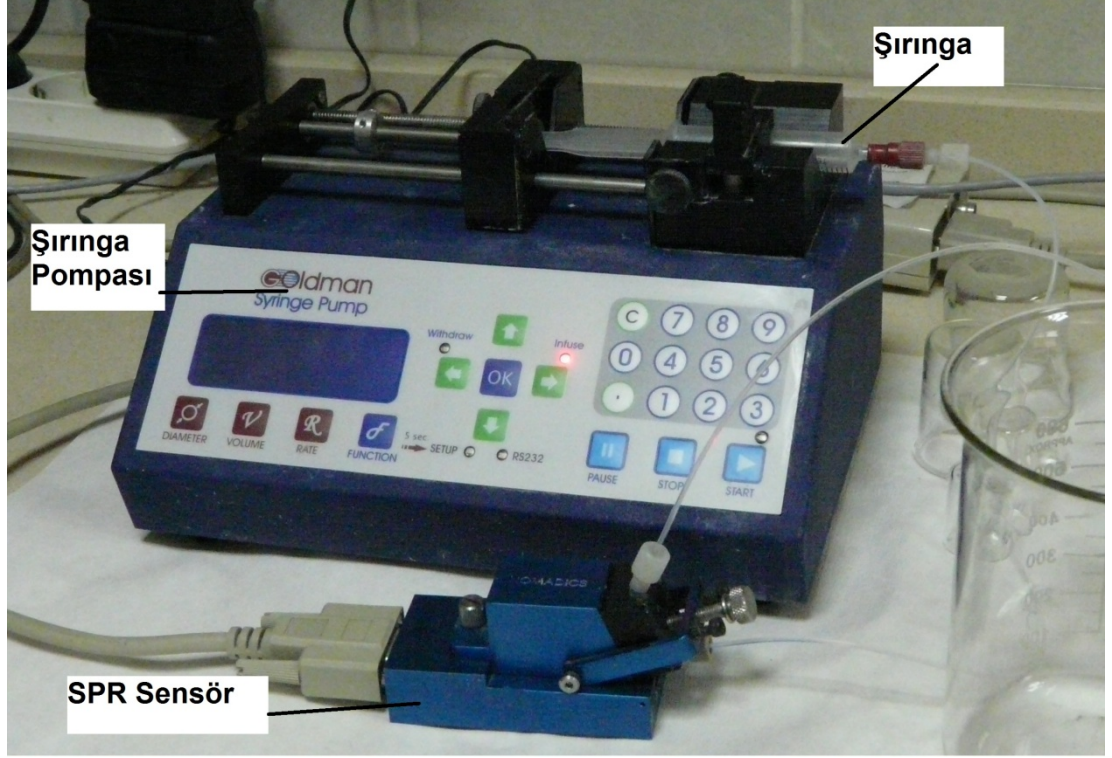
PGE'ler 6 cm uzunluğunda, 0,5 mm çapındaki kalem uçlarının (Tombo, Japonya) 3 cm olacak şekilde kesilmesi ile elde edilmektedir. Elektrokimyasal sistemle bağlantıyı sağlamak adına tutucu olarak elektrotla temas eden ucuna bir kablo lehimlenmiş uçlu kalem (Rotring, Almanya) kullanılmıştır.



**Şekil 18:** Elektrokimyasal tayin sisteminin görüntüsüne ait fotoğraf; elektrokimyasal hücre içerisindeki elektrolit çözeltisine daldırılmış referans elektrot, çalışma elektrodu ve platin tel(yardımcı elektrot).

### 2.1.2 SPR sistemi

Optik tayin sistemi SPR cihazı (spreeta Texas ins. ABD) ve peristaltik şırınga pompasından (Goldman, Türkiye) oluşmaktadır. Bu sistemde 1 ve 5ml'lik şırıngalar, istenilen çözeltileri elektrot yüzeyine göndermek için kullanılmaktadır.



**Şekil 19:** SPR sistemine ait fotoğraf görüntüsü; şırınga pompası, şırıngadan çıkan örneğin geçtiği kapiler borular, sensöre ait çipi içeren kısımdan oluşmaktadır.

### **Diğer Cihazlar**

Terazi ( A&D company, Japonya)

pH metre (Inolab, Almanya)

Vorteks (IKA Genius 3, USA)

Manyetik karıştırıcı (IKA Yellowline big squid, USA)

## **2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler**

**Tablo 9:** Kullanılan kimyasallar ve üretici firmaları

Madde Adı	Üretici Firma
Glasiyel Asetik Asit	Merck, Almanya
Hidroklorik Asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Klorür	Riedel-de Haen, Almanya

Etanol	Sigma, Almanya
Di potasyum hidrojen fosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Almanya
N-Hidroksisüksinimid (NHS)	Fluka, Almanya
Etilkarbodiimid 1-etil -3-(3-dimetil aminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC)	Thermo, ABD
Etanolamin	Sigma, Almanya

Tüm çalışmalarda su saflaştırma sistemiyle (ELGASTAT Maxima ultrapure water- İngiltere) elde edilen yüksek saflıkta deiyonize (18-mega ohm ) su kullanıldı ve çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

### 2.3 Kullanılan Tamponlar ve İçerikleri

**Tablo 10:** Kullanılan tamponlar ve içerikleri

Tampon Adı	İçeriği
Asetat tamponu (ACB)	20mM NaCl, 0,5M glasiyel asetik asit, pH 4,8
Fosfat tamponu (PBS)	20mM NaCl, 50mM fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ve K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), pH: 7,4
Fosfat tamponu (PBS)	500mM NaCl, 50mM fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ve K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), pH: 7,4
Etanolamin Çözeltisi	200mM NaCl içeren PBS tamponu içinde 10mM Etanolamin
Sodyum Sitrat (20xSSC)	3,0M NaCl, 0,3M C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O, pH:7,0

### 2.4 Kullanılan Oligonükleotid Dizileri

**Tablo 11:** Tez Çalışmasının Elektrokimyasal Bölümünde Katekol - O - metil Transferaz (COMT) Nokta Mutasyonu Analizinde Kullanılan Oligonükleotidler

Dizinin Adı	Sekansı
Prob 1 (Sağlıklı tip CP)	5'-NH <sub>2</sub> -TTI TCC TTC A <u>C</u> I CCA ICI AA-3'
Hedef 1 (Sağlıklı tip CT)	5'-TTC GCT GGC <u>G</u> TG AAG GAC AA-3'

Prob 2 (Mutant tip MTP)	5'-NH <sub>2</sub> -TTI TCC TTC <u>ATI</u> CCA ICI AA-3'
Hedef 2 (Mutant tip MTT)	5'-TTC GCT GGC <u>ATG</u> AAG GAC AA-3'

Bu oligonükleotidlerin dizileri gen haritasında COMT enziminin sentezlenmesinde sorumlu olduğu bilinen gen bölgesi incelenerek belirli bir bölge seçilmiştir. I simgesi dizilerdeki inozin bazını göstermektedir. Prob dizilerde guanin bazları yerine onların eş değeri olan, sitozin ile bağ yapabilen inozin içeren diziler kullanılmıştır.

**Tablo 12:** Tez çalışmasının Optik bölümünde İnfluenza-B Tayininde Kullanılan Oligonükleotidler

Dizinin Adı	Sekansı
Prob İnfluenza-A	5'- SH-CTG CAG CGT AGA CGC TTT GTC CAA AAT G-3'
Hedef İnfluenza-A	5'-CAT TTT GGA CAA AGC GTC TAC GCT GCA G-3'
Prob İnfluenza-B	5'- SH- ACC TTC GGC AAA AGC TTC AAT ACT CCA-3'
Hedef İnfluenza-B	5'-TGG AGT ATT GAA GCT TTT GCC GAA GGT-3'

Prob DNA dizileri Schweiger ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir [110]. Dizayn edilen sensörlerin seçimliliğinin anlaşılabilmesi için hedef dizilerinden farklı diziler prob diziler ile etkileştirilmek ve özgüllük çalışmaları yapılması amacıyla sentezletirildi.

### **Liyofilize Oligonükleotidlerin Çözeltilerinin Hazırlanması**

Liyofilize halde +4° C de saklanan oligonükleotidlerin son derişimleri 1000 µg/mL olacak şekilde Ultra saf su (18 mΩ) ile hazırlandı. 50'şer µL olacak şekilde steril viyallere dağıtıldı ve kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edildi. Çalışmalar



Geliştirilen biyosensör sisteminde hibridizasyon tayinleri ilk önce sentetik diziler kullanılarak gerçekleştirildi daha sonra PCR ürünleri ile tayin gerçekleştirildi.

### **Aktivasyon**

Elektrot yüzeyi 0,5 M asetat tampon çözeltisi ( pH: 4,8 ) içine daldırılarak 30 sn süresince +1,4 V gerilim uygulandı. Böylece elektrokimyasal olarak aktivasyon işlemi gerçekleştirildi ve yüzeyin elektrokimyasal olarak temizliği +0,75 V - +1,4 V potansiyel aralığında DPV metodu ile taranarak kontrol edildi.

### **Elektrot Yüzeyinin Kovalent Ajanla Kaplanması**

PBS tamponu içerisine 5,2 mM derişimde hazırlana EDC ve 8,68 mM NHS çözeltisine yüzeyi aktive edilmiş elektrotlar daldırılarak 60 dakika bekletildi.

### **Elektrot Yüzeyine Prob Tutturulması**

7 µg/mL derişimde sağlıklı veya mutasyonlu özelliğe sahip proplar kullanılarak hazırlanan çözeltiler, 0,2 mL'lik tüpler içerisinde 25 µL'şer olacak şekilde dağıtıldı ve kovalent ajan kaplı PGE'ler bu tüplere daldırıldı. 30 dakika bekletildi.

### **Etanolamin ile Etkileşim**

10 mM derişimde olacak şekilde hazırlanan ETA çözeltisi, prob kaplı yüzeylerle 30dk etkileştirildi. Yüzeydeki boşluklar kaplandı.

### **Sensörün Kullanım Süresinin Belirlenmesi**

Kovalent yolla prob tutturulmuş ve etanolamin ile etkileştirilmiş elektrotlar, üç farklı saklama koşulunda (hibridizasyon öncesi) bekletildi. Bu koşullar;

- 1) buzlukta (-20°C),
- 2) oda sıcaklığında (+25°C)
- 3) buzdolabında (+4°C),

## **Hibridizasyon**

### **Sentetik Dizilerle Hibridizasyon**

Belirli koşullar altında belirtilen elektrotlar, guanin bazı içeren ve derişimi 12µg/mL olan sentetik hedef DNA çözeltilisine daldırılarak 30 dakika süreyle etkileştirildi. Daha sonra elektrot yüzeyi PBS tamponuyla karıştırılmalı olarak yıkandı, bağlanmamış olan hedef diziler yüzeyden uzaklaştırıldı.

### **PCR Ürünleriyle Hibridizasyon**

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Bölümünden sağlanan, ( 1:40 ) oranında seyreltilen gerçek COMT PCR ürünleri hibridizasyon öncesinde denatüre edildi (97°C 6 dk, 0°C 2 dk). Daha sonra prob kaplı elektrotlarla 30 dk hibridizasyon için etkileştirildi. Etkileşim sonrasında 5 dk süreyle PBS tamponu ile karıştırılarak yıkandı. Ayrıca hedefe özgü hibridizasyon analizi rastgele ve tek bazı hedeften farklı diziyle de gerçekleştirildi. Böylece sensör seçimliliği kontrol edildi.

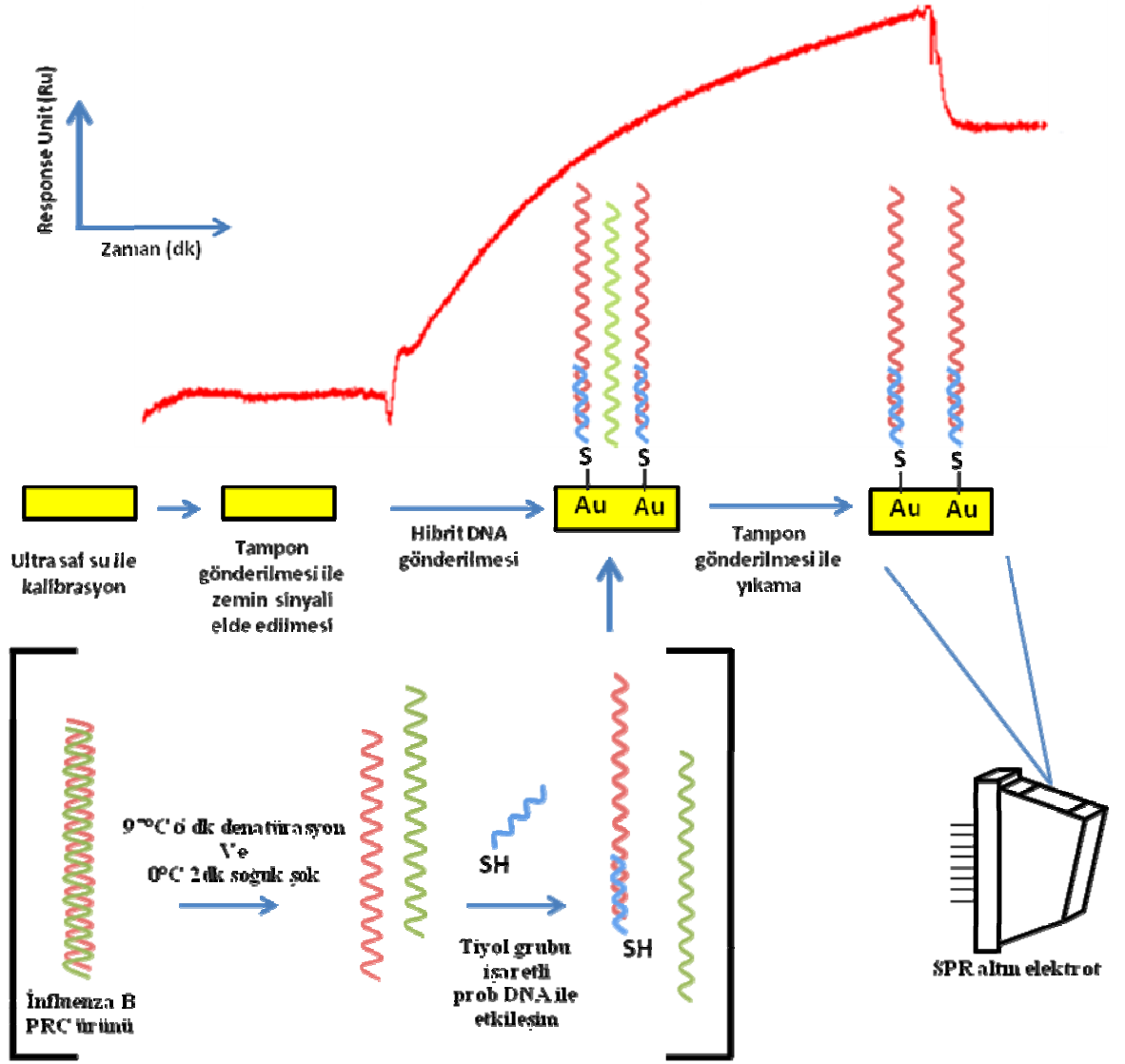
## **Ölçüm**

Differansiyel Puls Voltametri tekniği ile +0,75V - +1,40V potansiyel aralığı ve 100mV/sn tarama hızında ölçüm gerçekleştirildi. Hibridizasyon öncesi ve sonrasında

alınan yanıtlar karşılaştırılarak hibridizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği izlendi. Prob dizide guanin bazları yerine inozin bazları bulunduğu için prob ölçümlerinde voltamogramda herhangi bir yanıt gözlenmemesi, hibridizasyon sonrasında hedef diziden kaynaklanan guanin bazlarının yükseltgenmesi sayesinde yüksek yanıt alınması (hibridizasyon) beklendi.

### **2.5.2 Yüzey Plazmon Rezonans Sistemiyle (SPR) İnfluenza B Virüsünün Tayini Çalışmasında Kullanılan Yötem**

SPR sistemiyle gerçekleştirilen tayinde kullanılan yönteme ait basamaklar şema 2’de gösterilmiştir. Yöntem, sırasıyla ultra saf su, tampon, DNA ve tekrar tampon çözeltilerinin akışkan sistemde yüzeyden geçirilmesi olmak üzere 4 ana basamaktan oluşmaktadır.



Şekil 21 : İnfluenza B virüsünün tayinine yönelik geliştirilen optik biyosensörde kullanılan yöntem.

Tasarımı yapılan biyosensörde analizler, hedef PCR ürünleri kullanılarak gerçekleştirildi. Hedef dizi olarak İnfluenza B PCR ürünü, rastgele PCR ürünü olarak ise İnfluenza A PCR ürünü kullanılmıştır.

### Ultra Saf Su Enjeksiyonu

SPR cihazının kalibrasyonu için şırınga pompası yardımıyla yüzeden 100  $\mu\text{L}/\text{dk}$  hız ile 5 dakika boyunca su geçirildi.

### **Tampon (5xSSC) Enjeksiyonu**

30 dakika boyunca 100 µL/dk hızla yüzeye 5xSSC tamponu enjekte edildi. Yanıtta kararlılık elde edilene kadar beklendi.

### **DNA Enjeksiyonu**

Tiyol (-SH) işaretli prob DNA, SPR sistemine gönderilmeden önce hedef DNA ile çözelti ortamında hibritleştirilerek tiyol işaretli hibrit DNA elde edildi ve altın elektrot yüzeyine şırınga pompasıyla 1 saat boyunca 10 µL/dk hızla gönderildi. Hibrit DNA, 6 µg/mL derişimdeki 400 µL prob DNA ve ısı ile denatüre edilmiş 1:40 oranında seyreltilmiş 400 µL hedef veya hedeften farklı PCR ürünü bir tüp içerisinde hafifçe karıştırılarak elde edildi. Oda koşullarında 20 dakika hibridizasyonun gerçekleşmesi için bekletildikten sonra elektrot yüzeyine gönderildi.

### **İstenmeyen Bağlanmaların Tampon ile Yıkılarak Uzaklaştırılması**

Hibrit DNA sisteme gönderildikten sonra sensör yüzeyi 50 µL/dk hızla 5xSSC tamponu ile yıkandı (15 dakika süreyle). Bu işlem yüzeye kovalent olarak tutunmayan dizileri uzaklaştırmak amacıyla yapıldı.

### **Ölçüm**

SPR sistemine yapılan enjeksiyonların öncesinde ve sonrasında elde edilen yanıtlar ölçülerek aralarındaki fark hesaplandı ve net yanıt olarak değerlendirildi.

## BÖLÜM III

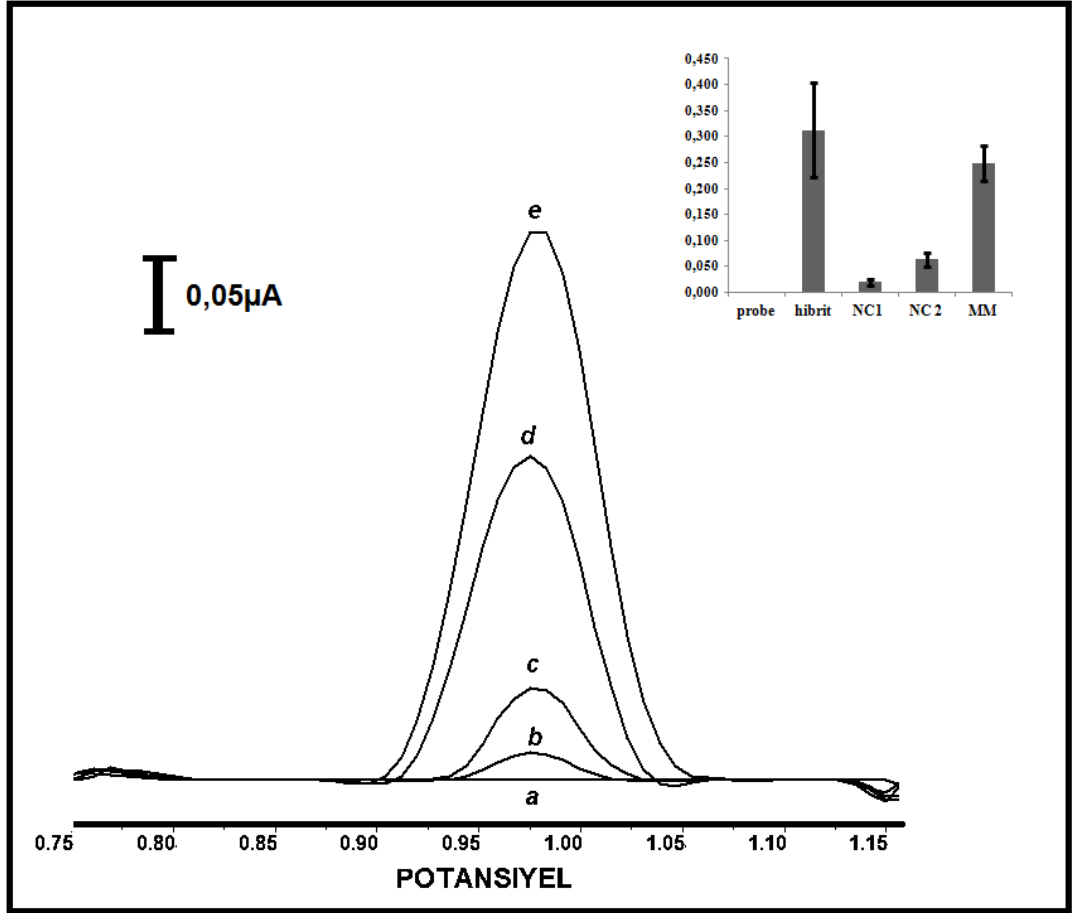
### 3 BULGULAR

#### 3.1 Elektrokimyasal Tayin ile COMT Dizisinde SNP Tayini Çalışmasında Elde edilen Bulgular

Çalışmalarda elde edilen bulgular en az 3'er ölçüm sonucu değerlendirilerek sunulmuştur.

##### 3.1.1 Sentetik Dizilerle Hibridizasyon ve Biyosensör Seçimliliğinin Tayini

Çalışmada hibridizasyon öncesi ve sonrasında voltamogramda yaklaşık +1,0V potansiyelde guanine özgü olduğu bilinen yükseltgenme yanıtları incelendi. Seçimliliğin incelenmesi amacıyla hedef dizi dışında hedeften farklı (rastgele) dizilerle de hibridizasyon deneyleri yapıldı. Biyosensörün hedef diziyle en yüksek hibridizasyon yanıtını vermesi, diğer dizilerle ise istenmeyen bağlanmalardan kaynaklanan düşük yanıtlar vermesi beklendi.



**Şekil 22:** Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak sağlıklı tip prob (P1) tutturulmuş elektrot ile hibridizasyon öncesi ve sonrasında elde edilen guanin sinyalleri; , a) yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi), b) prob ile tüm baz dizilimi hedeften farklı ikinci dizi ile arasındaki etkileşim sonrasında, c) prob ile tüm baz dizilimi hedeften farklı bir dizi ile arasındaki etkileşim sonrasında, d) prob ile tek baz dizilimi hedeften farklı bir dizi (SNP) ile arasındaki etkileşim sonrasında, e) prob-hedef hibridizasyonu sonrasında elde edilen guanin sinyalleri.

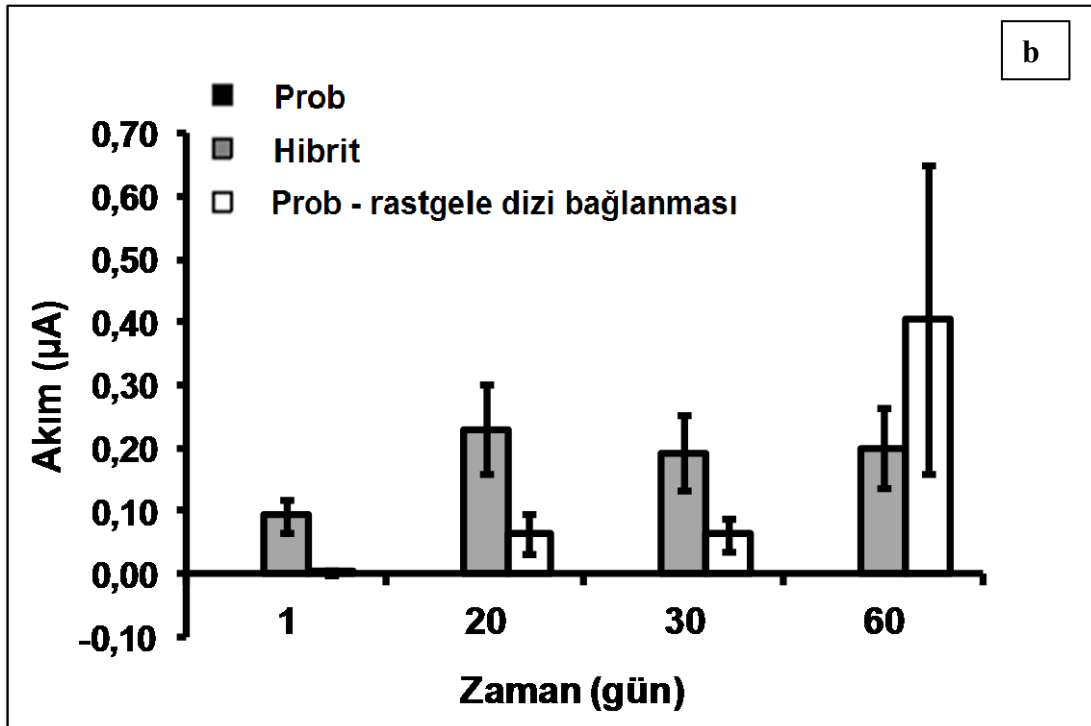
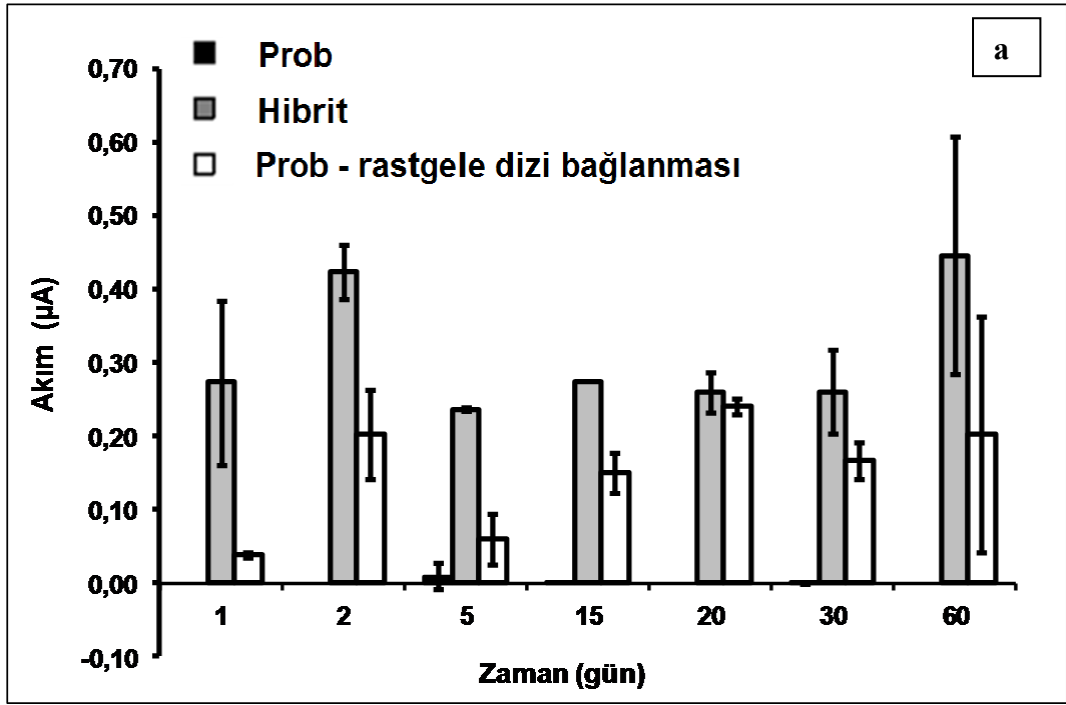
Guanin yükseltgenme yanıtlarının elde edilmesi ile hibridizasyon tayini gerçekleştirildi. İki farklı rastgele DNA dizisi ölçümü gerçekleştirilerek biyosensörün seçimliliği gösterildi. Guanin içermeyen prob DNA kullanıldığı için guanin yükseltgenme yanıtı gözlenmemiştir (Şekil 22d). Şekil 22b ve 22c'deki sinyaller

rastgele DNA'ların PGE yüzeyine özgül olmayan etkileşimlerle tutunmalarından kaynaklanmaktadır. Şekil 22a da gösterilen sinyal hedef DNA dizisi ile etkileşim sonucu elde edilen guanin yükseltgenme yanıtıdır. Rastgele dizilerle elde edilen yanıtlardan yaklaşık 6-7 kat daha yüksektir. Bu veriler kullanılarak şekil 22'de hibridizasyonun tayin edildiği ve biyosensörün seçimliliği gösterilmiştir. Hibrit ölçümü ile elde edilen yanıt %6,12 bağıl standart sapma ile ortalama olarak 273nA olarak ölçülmüştür. SNP içeren hedef ile etkileşim sonrasında alınan yanıt %7,05 bağıl standart sapma ile ortalama 248,1 nA'dır. Tüm baz dizilimi farklı hedefler ile etkileştirilmiş sensör elektrotlarda alınan yanıtlar sırası ile %15,9 ve %9,84 bağıl standart sapma ile ortalama 16 nA ve 56 nA olarak ölçülmüştür.

### **3.1.2 Sensör Yüzeyinin En İyi Saklanma Koşullarının Bulunması ve Kullanım Süresinin Tayin**

PGE yüzeyine kovalent yolla tutturulan prob DNA'nın bu şekilde hasar görmeden saklanabileceği en uygun ortam ve en uzun sürenin bulunması amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, prob kaplı sensör yüzeyleri farklı ortam koşullarında belirli sürelerde saklandı ve süre sonunda hibridizasyon deneyleri tekrarlandı (sensör yüzeyinin stabilite kontrolleri yapıldı).

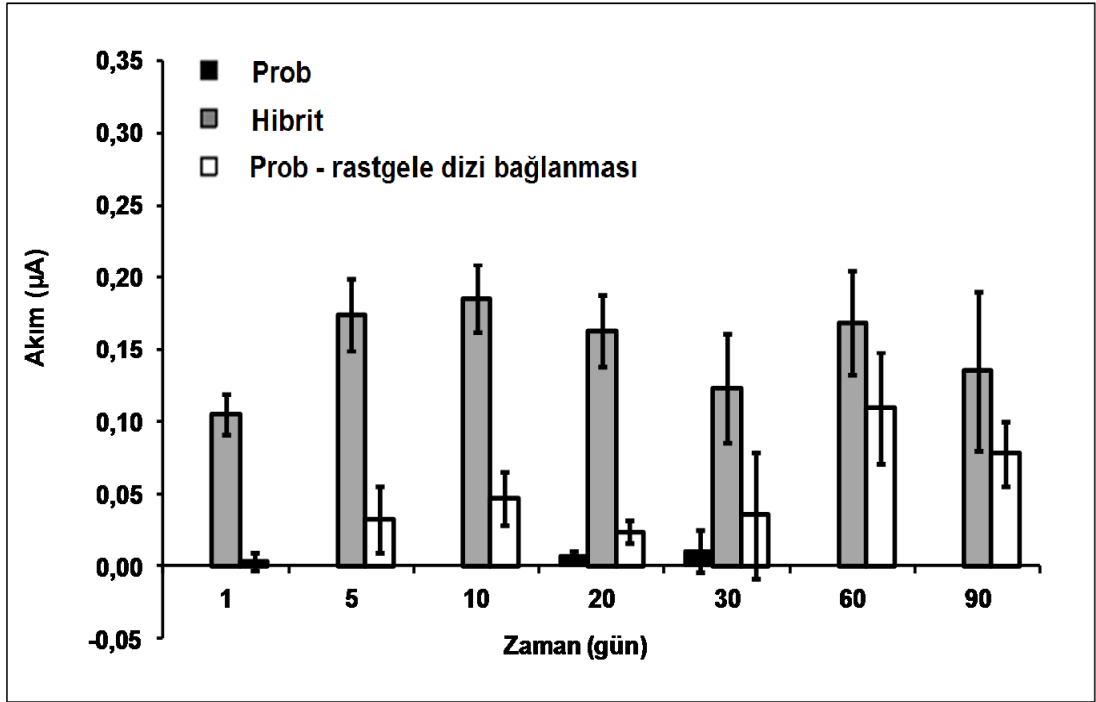
Kontroller sonrasında PGE'lere prob tutturulması sırasında yüzey boşluklarına ETA kaplanmasının hibridizasyon analizi üzerine olan etkisi de incelendi. ETA ile kaplanan ve kaplanmayan sensör elektrotlar, -20°C'de saklandı ve belirlenen günlerde hibridizasyonun kontrolü yapıldı.



Şekil 23: -20°C’ de saklanan elektrotların zamanla ve ETA kaplanmasına bağlı olarak stabilitelerinin değişimini gösteren histogram. ETA ile etkileştirilmeden bekletilen elektrotlardan elde edilen yanıtlar (a), etkileşimden sonra elde edilen yanıtlar (b).

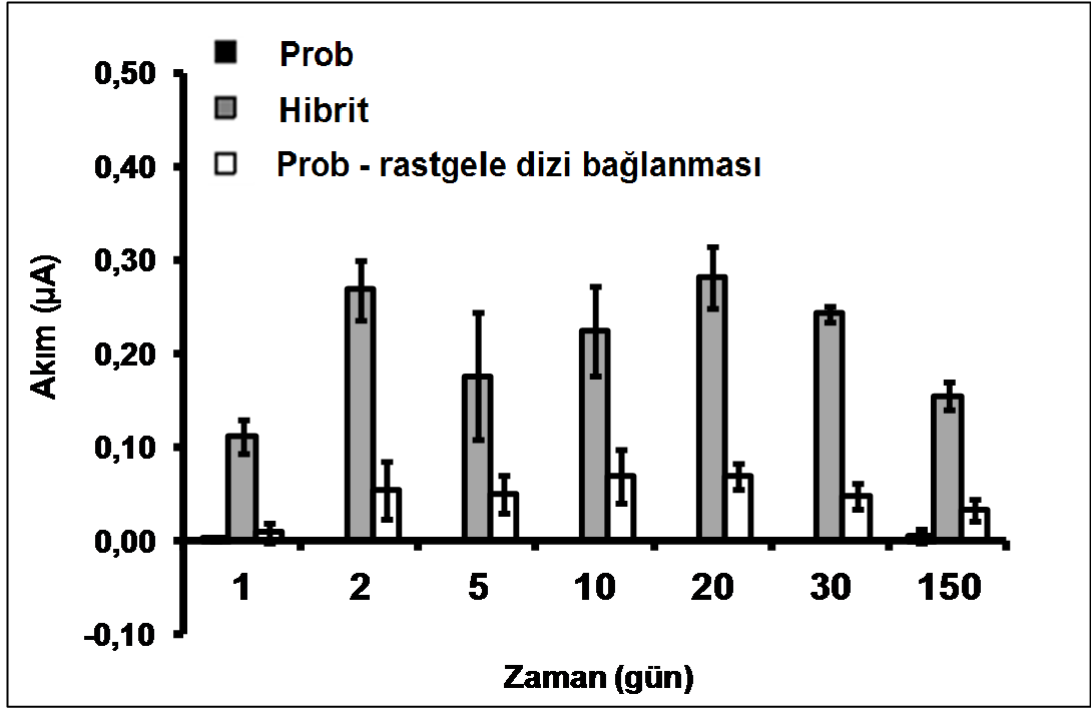
Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde ETA ile kaplanarak bekletilen elektrotlar daha uzun süreyle analizlerde kullanılabilirlerdir.

Burada, PGE yüzeyine kovalent bağlayıcılar kullanılarak tutturulan prob DNA'lar yüzeye dik olarak bağlanmaktadır. PGE yüzeyinde doğunluk sağlayacak derişimde (7µg/mL) prob DNA kullanılarak yüzey kaplandı. Fakat yüzeydeki tek sarmal haldeki prob DNA'lar zamanla kendi üzerlerine katlanmalar gerçekleştirebilmektedir. Elde edilen bulgulardan hareketle bu sonuca ulaşılmaktadır. Katlanmalar hibridizasyonu engellemekte ve sensörün etkili bir tayin yapamamasına neden olmaktadır (Şekil 23a 15.günden sonra, Şekil 23b 30.günden sonraki sonuçlar). Bu etkiyi ortadan kaldırmak amacıyla yüzeydeki boşluklar ETA ile kaplandı.



Şekil 24: +25°C’ de saklanan elektrotlarla gerçekleştirilen hibridizasyon analizlerine ait histogram.

Şema 1’de gösterilen basamaklar takip edilerek sensör elektrotlar hazırlandı ve +25°C’de saklandı. Planlanan günlerde elektrotlar 12 µg/mL hedef DNA çözeltisi ile etkileştirilerek hibridizasyon tayini gerçekleştirildi. 20. güne kadar hibridizasyon tayini gerçekleştirilebildi. 30. günden itibaren yanıtların tekrarlanabilirliğinin düştüğü ve biyosensör seçimliliğinin azaldığı gözlemlendi.



Şekil 25: +4°C’ de saklanan elektrotlarla gerçekleştirilen hibridizasyon analizlerine ait histogram.

+4°C’ de belirlenen süre bekletilen sensör elektrotlar, hedef DNA çözeltisine daldırılarak hibridizasyon tayini gerçekleştirildi. Tasarlanan sensör elektrotlardan 150 gün bekletilmiş olanlardan dahi seçici ve tekrarlanabilir yanıtlar elde edildi.

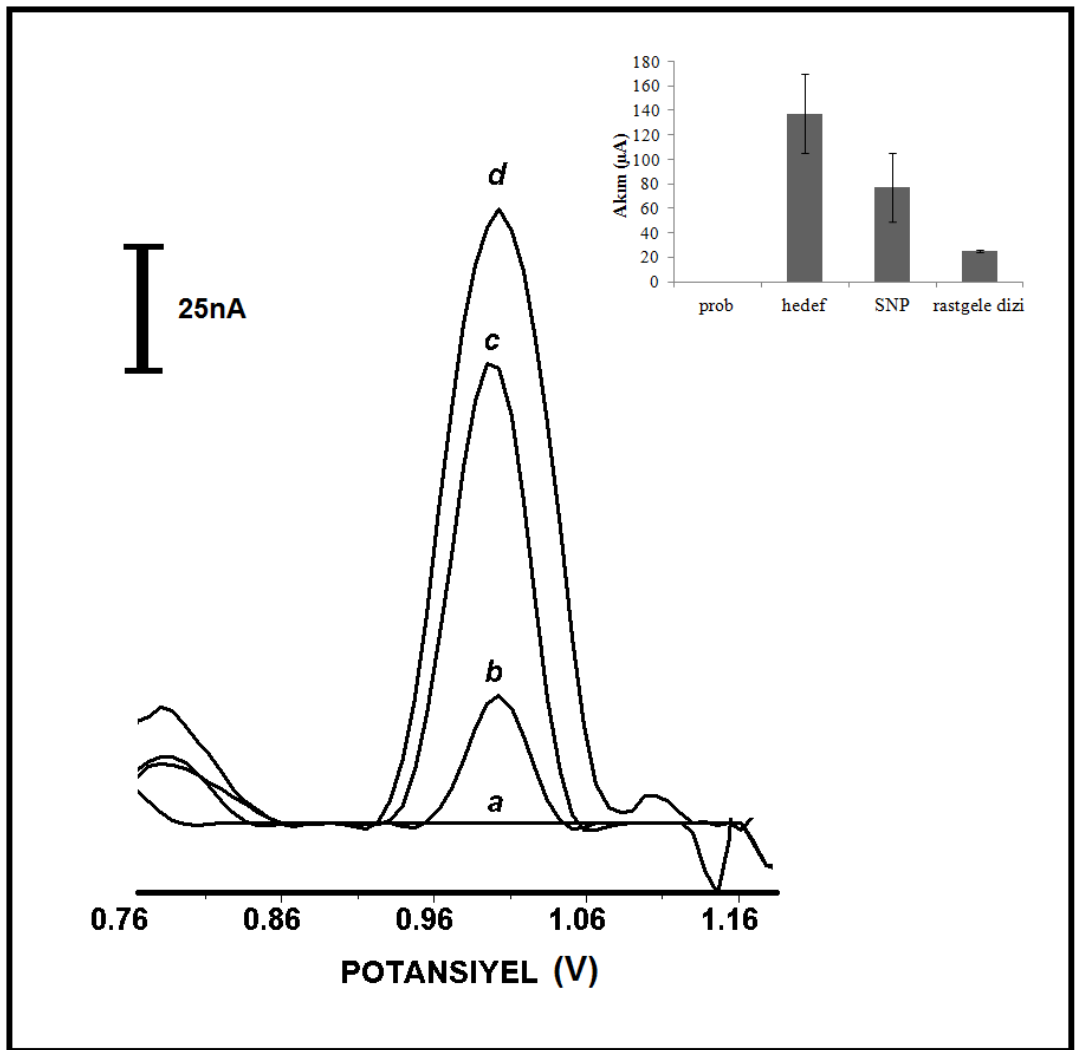
SNP tayini gerçekleştirmek üzere tasarlanan biyosensör için en uygun saklama koşulunun +4°C olduğunu gözlemlendi.

Farklı sıcaklıklarda belirli günlerden sonra seçiciliğin kaybolduğu gözlemlendi. PGE yüzeyindeki probun uzun süreli beklemeden dolayı hasar gördüğü söylenebilir. Hasar görmüş probun hedef ile etkileştirildiklerinde yüzeyde rasgele bağlanmalar olduğu gözlemlendi.

### 3.1.3 Gerçek Örneklerle (PCR ürünleri) Hibridizasyon ve Biyosensör Seçimliliğinin Tayini

Bu çalışmada, prob DNA kaplı elektrot yüzeyleri, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile üretilen ve COMT gen bölgesini içeren ürünlerle hibridize edilmiştir.

PCR ürünleri hibridizasyon öncesinde ısı ile denatüre edilerek tek sarmal haline getirilmiştir. Çalışmalar hedef DNA bölgesini içeren ve farklı PCR ürünleri ve hedeften farklı dizilime sahip PCR ürünleri ile gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 26:** Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak sağlıklı tip prob (P1) tuturulmuş elektrotların PCR ürünlerinin etkileştirilmesi ile elde edilen yanıtlar; a) prob dizi (hibridizasyon öncesi), b) prob- tüm baz dizilimi hedeften farklı PCR ürünü, c) prob- bir bazı hedeften farklı PCR ürünü, d) Prob-hedef PCR ürünü guanin yanıtının ölçümü

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji bölümü tarafından hazırlanan gerçek örnekler, PCR ile çoğaltılarak elde edildi. Hedef PCR ürünleri tasarlanan biyosensörde tayin edildi. Böylece sensörün gerçek örneklerde de SNP analizini gerçekleştirebildiği gösterildi. Pozitif PCR örneği ile elde edilen hibrit yanıtı %23,72 bağıl standart sapma ile ortalama olarak 137nA olarak ölçülmüştür. SNP içeren PCR örneği ile etkileşim sonrasında alınan yanıt %31,524 bağıl standart sapma ile ortalama 86,04 nA'dır. Tüm baz dizilimi farklı PCR örneği ile etkileştirilmiş sensör elektrotlarda alınan yanıt %3,64 bağıl standart sapma ile ortalama 25 nA olarak ölçülmüştür.

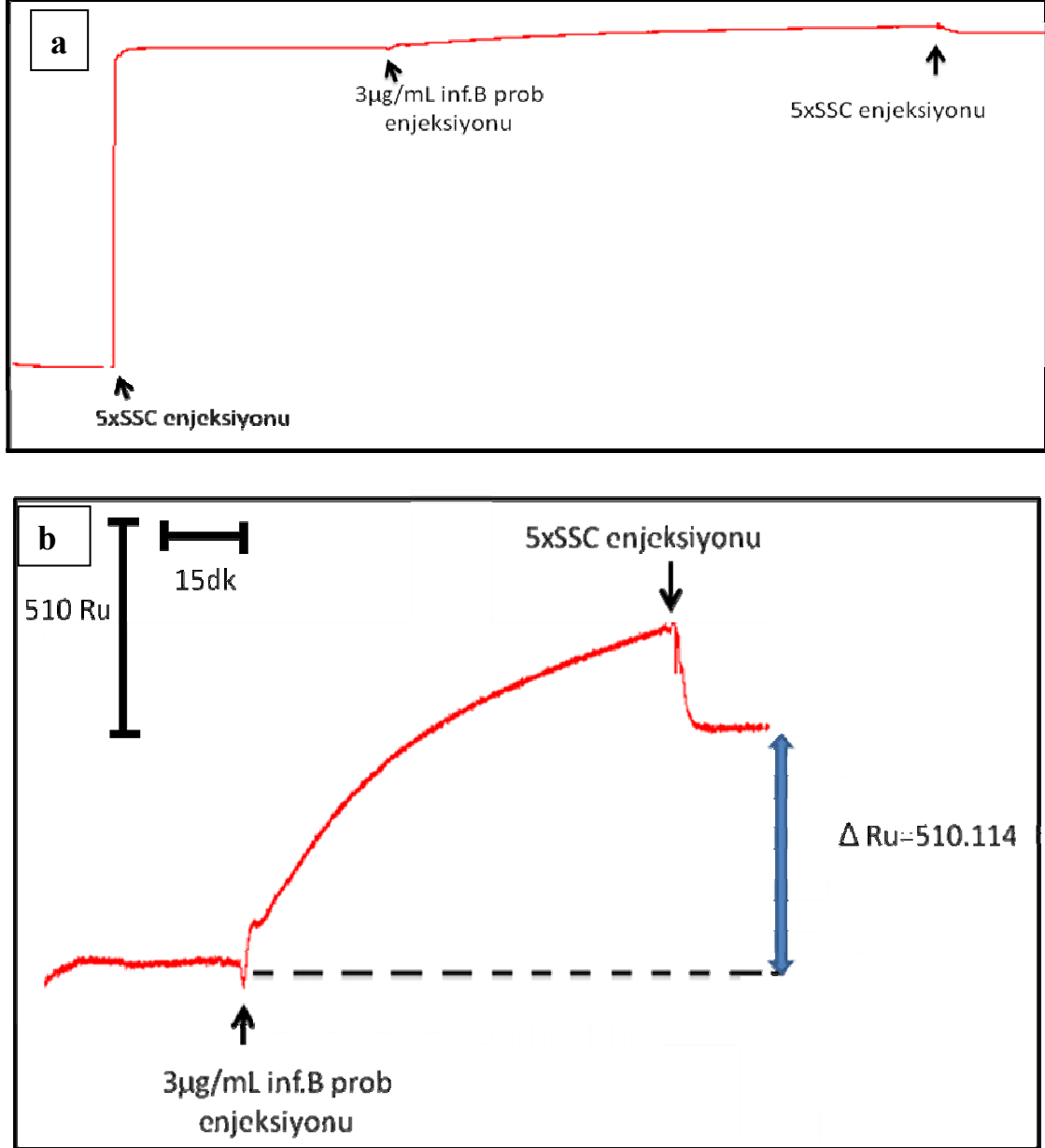
### **3.2 SPR ile İnfluenza B Virüsü Tayini Çalışmasından Elde Edilen Bulgular**

Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensör çalışmalarında kullanılan altın çip elektrotların temizliği deney öncesinde kontrol edilmiş ve ultra saf su ile SPR kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.1 Prob DNA'ya Ait Yanıtın Ölçümü**

Ultra saf su ile kalibrasyon sonrasında yüzeye 5xSSC tamponu gönderildi. Zemin sinyalinin gözlenmesi ve bu sinyalin sabitlenmesinden sonra prob DNA çözeltisi şırınga pompası yardımıyla 10µL/dk hızla yüzeye gönderildi (60dk süreyle). Prob DNA dizisi içerdiği –SH ( tiyol ) grupları sayesinde altın çip yüzeyine kovalent olarak bağlandı. Yüzeyde gerçekleşen zayıf etkileşimleri uzaklaştırmak için tampon

çözeltisi 50 $\mu$ L/dk hızla bir kez daha çip yüzeyine gönderildi (15dk süreyle) ve aradaki fark  $\Delta$ Ru olarak hesaplandı. (ortalama response unit = 533Ru, n=6)



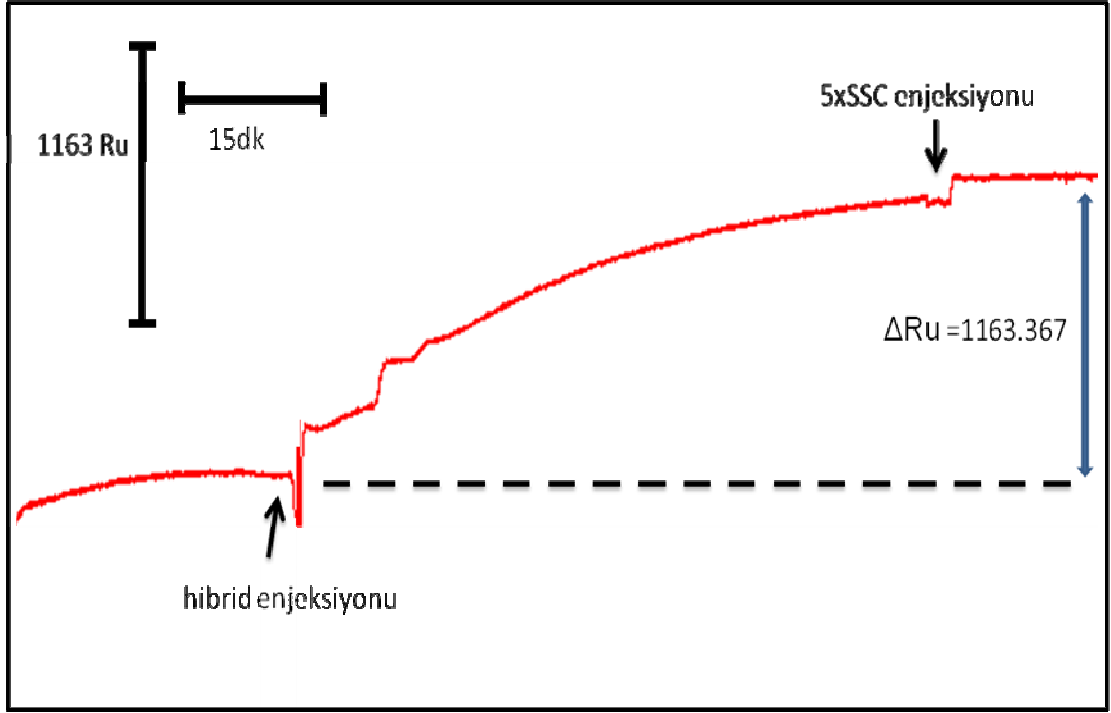
**Şekil 27:** Akışkan sistemde İnfluenza B prob DNA yanıtının gözlenmesine ait sensogramlar. (a) tüm deneye ait sensogram, (b) değerlendirilmenin yapıldığı kısmı gösteren sensogram.

Tiyol (-SH) grubu içeren 3µg/mL prob DNA, çip yüzeyindeki altın filme kovalent bağ ile tutunmuştur. Daha sonra yüzeye 5xSSC tamponu göndererek yıkanmıştır. Yüzeydeki bu değişimler, SPR açısında değişikliklere sebep olmuştur. SPR yanıtı Response Unit (Ru) cinsinden ölçülmüş ve aradaki fark hesaplanarak prob DNA yanıtı olarak kaydedilmiştir.

### 3.2.2 Hibrit Yanıtı Ölçümü

Ultra saf su ile kalibrasyon gerçekleştirildikten ve yüzeye 5xSSC tamponu gönderilerek zemin sinyali elde edildikten sonra hibrit DNA çözeltisi şırınga pompası yardımıyla yüzeye gönderildi ( 10µL/min ). Hibrit DNA çözeltisi için pozitif olduğu bilinen PCR örneği sıcaklıkla denatüre edildi ve -SH işaretli prob DNA ile 2 mL'lik tüp içerisinde hibritleşmesi için 20dk bekletildi. Yüzeydeki zayıf etkileşimlerden kaynaklanan yanıtların uzaklaştırılması için 5xSSC tamponu ile yıkandı. Aradaki fark ölçülerek  $\Delta Ru$  olarak kaydedildi. (ortalama response unit = 1020Ru, n=3)





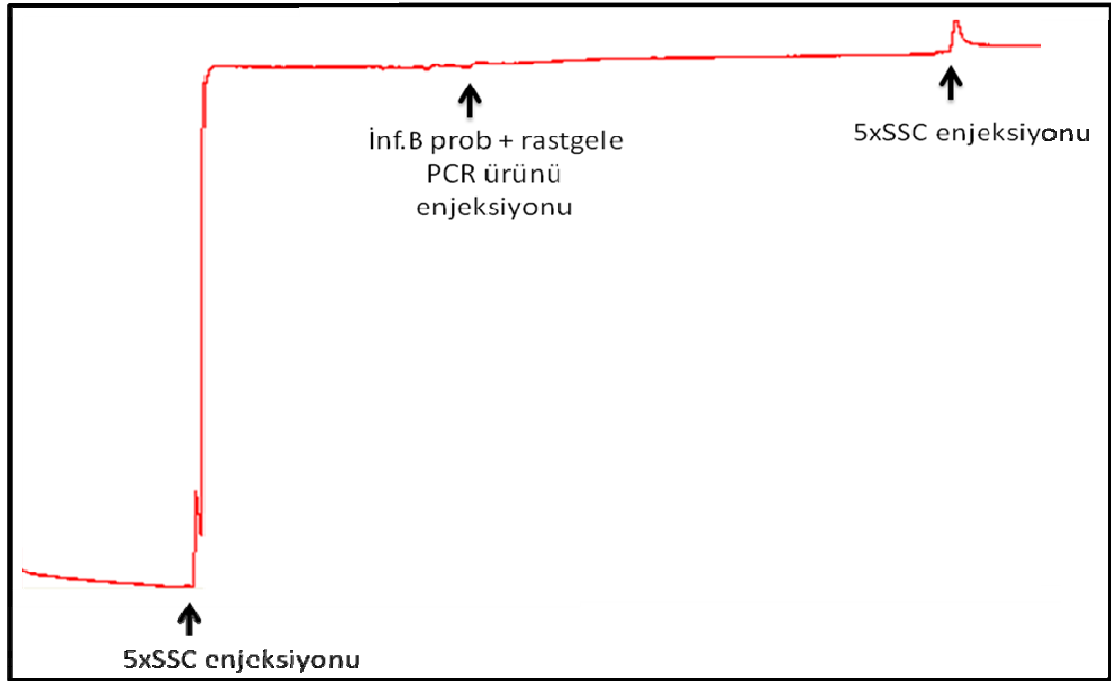
**Şekil 28:** Akışkan sistemde influenza B prob – hedef PCR ürünü karışımının yüzeye gönderilmesini gösteren sensogramlar a) geniş sensogram, b) ölçümün yapılan bölümün büyütülmüş şekli.

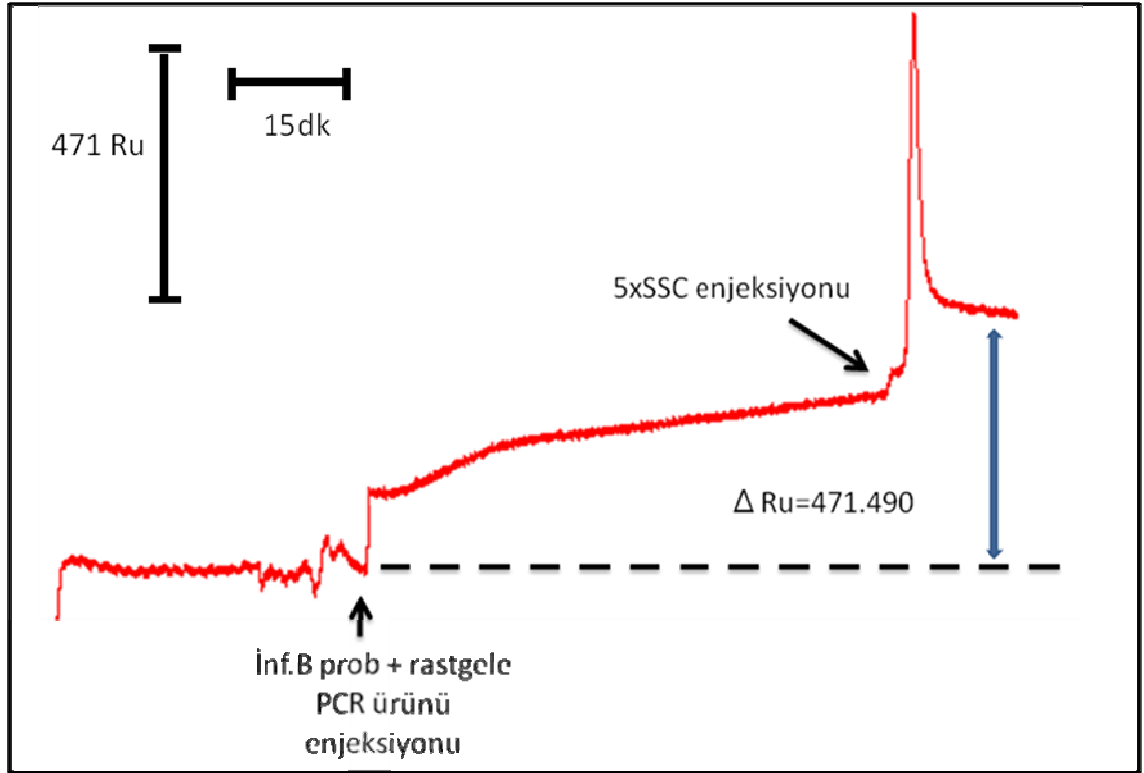
Tiyol (-SH) grubu içeren 3µg/mL prob DNA ile denatüre edilmiş hedef PCR ürünü bir tüp içerisinde 20dk bekletilmiş ve çip yüzeyine gönderilmiştir. Prob DNA'daki -SH grupları sayesinde hibrit DNA altın yüzeye kovalent olarak bağlanmıştır. Sonrasında yüzeye 5xSSC tamponu göndererek yüzey yıkanmış özgül olmayan bağlanmalar uzaklaştırılmıştır. SPR yanıtı (Response Unit, Ru) cinsinden ölçülmüş ve aradaki fark hesaplanarak Hibrit DNA yanıtı olarak kaydedilmiştir.

### 3.2.3 Prob ile Rastgele PCR Ürünü Etkileşiminin Ölçümü (istenmeyen bağlanma)

Rastgele DNA çözeltisi baz dizisinin hedef baz dizisinden tamamen farklı olduğu bilinen PCR ürünüdür. Rastgele PCR ürünü sıcaklıkla denatüre edildi ve -SH

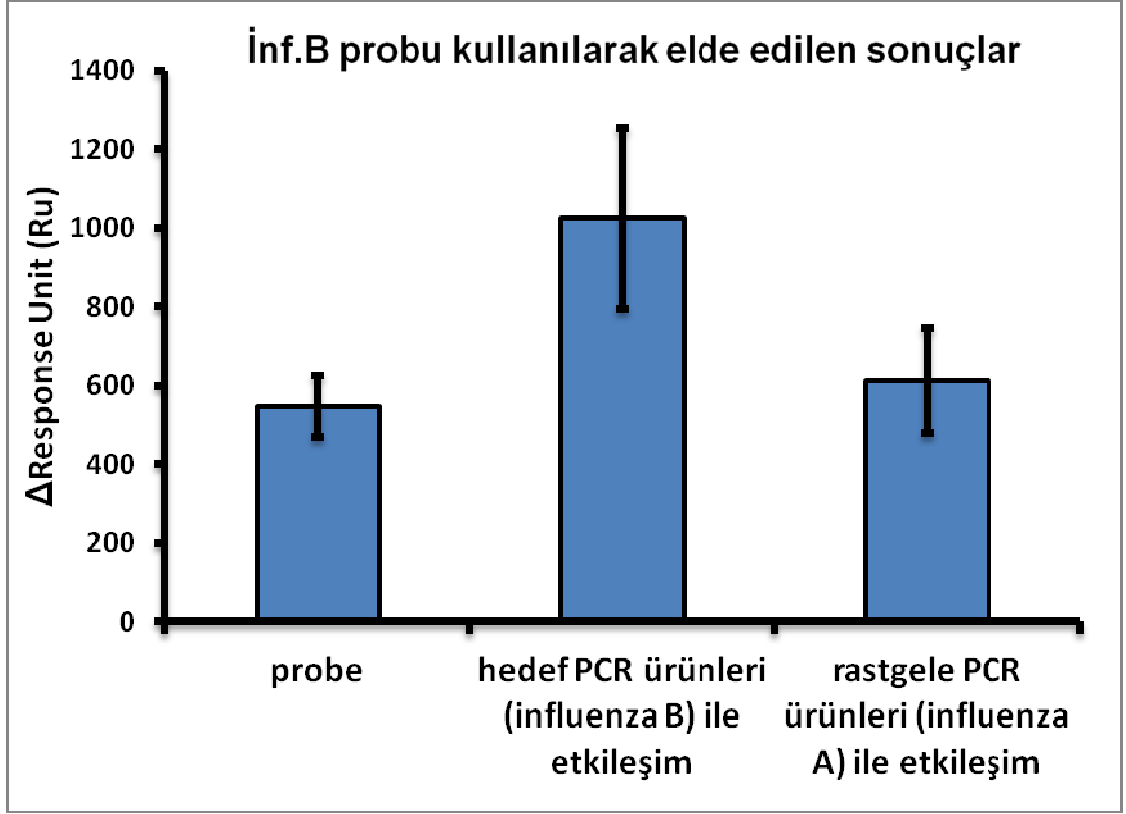
işaretli prob DNA ile 2 mL'lik tüp içerisinde etkileşmesi için 20dk bekletildi. Ultra saf su ile kalibrasyon yapıldı. Sonra yüzeye 5xSSC tamponu gönderilerek zemin sinyali elde edildi. Daha sonra prob DNA ve rastgele PCR ürünü karışımı şırınga pompası yardımıyla yüzeye gönderildi (10 $\mu$ L/min). Yüzeydeki zayıf etkileşimlerden kaynaklanan bağlanmaların uzaklaştırılması için 5xSSC tamponu ile yıkama yapıldı. Enjeksiyon öncesi ve sonrasında alınan yanıtlar arasındaki fark ölçülerek  $\Delta$ Ru olarak kaydedildi. Rastgele PCR ürünü ile prob DNA arasında hibridizasyon gerçekleşmediği için elde edilen yanıtlar da beklendiği gibi prob DNA'nın yalnız ölçümü ile elde edilen değerle uyumluluk göstermektedir (613 Ru, n=3).





**Şekil 29:** Negatif olduğu bilinen PCR ürünü ile probun etkileştirilmesi ile elde edilen sensogram; a) tüm sensogram, b) ölçümü yapılan bölümün büyültülmüş şekli.

Tiyol (-SH) grubu içeren  $3\mu\text{g/mL}$  prob DNA ile denatüre edilmiş rastgele PCR ürünü bir tüp içerisinde 20dk bekletildi ve çip yüzeyine gönderildi. Sonrasında özgül olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak amacıyla yüzeye 5xSSC tamponu göndererek yüzey yıkandı istenmeyen bağlanmalar uzaklaştırıldı. SPR yanıtı Ru ölçüldü ve enjeksiyon öncesi ve sonrası yanıtlar aradaki fark hesaplanarak rastgele PCR ürünü yanıtı olarak kaydedildi. Rastgele PCR ürünü hedef diziden farklı bir baz dizilimine olduğu için hibridizasyon gerçekleşmedi. Sonuçların sadece prob DNA ölçümünde elde edilen yanıtlarla uyumlu olduğu gözlemlendi.



**Şekil 30:** PCR ürünleri ile gerçekleştirilen çalışmalara ait histogram.

PCR ürünleri ile gerçekleştirilen tayinlerin sonuçları histogram grafiğine aktarıldığında beklenildiği üzere prob ve prob-rastgele PCR ürünü karışımının ölçümleri ile elde edilen yanıtların birbirlerine yakın olduğu gösterildi. Prob-hedef PCR ürünü karışımının yanıtları, prob yanıtlarından yaklaşık 2 kat kadar daha yüksek olduğu gözlemlendi. Prob ölçümü ile elde edilen sinyallerin Ru değeri %14,7 bağıl sapma ile yaklaşık 533Ru olarak bulundu (n=6). Hibrit DNA yanıtları %22 bağıl sapma ile yaklaşık 1020Ru olarak bulundu (n=3). Prob ve rastgele PCR ürünü (İnfluenza A) yanıtlarının Ru değeri %21 bağıl standart sapma ile 613 Ru olarak bulundu (n=3). Hibrit DNA'ların yüzeye tutunması ile elde edilen SPR yanıtının sadece prob DNA'nın yüzeye tutunmasından çok daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu farklanma hibridizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Prob DNA -Rastgele PCR

ürünü etkileşiminde hibridizasyon gerçekleşmediği için elde edilen yanıtlar prob DNA'ya yakın değerlerdedir.

## BÖLÜM IV

### 4 TARTIŞMA

#### 4.1 COMT Gen Dizisindeki Mutasyonun Tayini Çalışmasında Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada COMT enziminin sentezlenmesinden sorumlu gen bölgesindeki SNP'nin tayinini sağlayabilecek bir elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarlanması hedef alındı. Çalışmada, tasarlanan sensör elektrotların farklı sıcaklıklarda zamana karşı dayanıklılıkları ve ETA'nın hibridizasyona ve sensör dayanıklılığına olan etkisi incelendi. Daha önceden yapılmış diğer çalışmalar incelendiğinde COMT genindeki polimorfizmin tayini için geliştirilmiş sadece bir elektrokimyasal biyosensör çalışması bulunmaktadır [93]. Guanin bazının karbon elektrot ve DPV metodu kullanılarak +1,0V potansiyelde yükseltgenme yanıtı verdiği bilmektedir. Guanin içermeyen prob DNA'da +1,0V potansiyelde yanıt gözlenmezken hibridizasyon sonrası hedeften gelen guaninlerin yükseltgenme sinyallerinin ölçülmesi ile hibridizasyon analizi gerçekleştirildi. Guanin içermeyen prob DNA'lar kullanılarak hibridizasyon tayininin elektrokimyasal olarak yapıldığı biyosensör çalışmalarına örnekler literatürde mevcuttur [93, 32, 136].

Çalışmada kullanılan prob DNA (7µg/mL) ve hedef DNA (12µg/mL) derişimleri Özkan-Arıksoysal ve arkadaşlarının daha önce yaptığı çalışmadan en uygun derişimler olarak seçildi [93]. Özkan-Arıksoysal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada PGE yüzeyine prob DNA absorpsiyon yöntemi ile tutturulmuştur. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmada, uygun koşullarda saklanabilen, DNA-

modifiye edilmiş sensör yüzeyleri tasarlandı ve bu sensörlerin kit olarak kullanılıp kullanılmayacağı incelendi. Uzun süre bekletilecek olan yüzeylere prob DNA kovalent yolla tutturuldu. Prob DNA tutturulduktan sonra PGE, ETA ile etkileştirilerek yüzeydeki boşluklar kapatıldı. Böylece biyosensör seçimliliği arttırıldı ve DNA'nın daha uzun süre kendi üzerine katlanmadan durabilmesi sağlandı. ETA kullanımı, literatürde Kim ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Çalışmalarında geliştirdikleri sensörde yüzeye aptamer tutturduktan sonra ETA ile etkileştirmiş ve boşlukları kapladıktan sonra hedef molekül ile etkileştirmişlerdir [53]. Başka bir çalışmada Arya ve arkadaşları elektrot yüzeyini antikor tutturduktan sonra boşlukları ETA ile kaplamış böylece analizdeki seçimliliği arttırmışlardır [4].

Tasarlanan biyosensörün kolay hazırlanabilme, tek kullanımlık olma ve ucuzluk gibi yararları sahip olan PGE'lerin kullanılması, en uygun saklama koşulunun +4°C olması, hibridizasyon süresinin kısa olması, ölçümün 1dk gibi kısa bir sürede yapılabiliyor olması ve tasarımda kullanılan metodun insan sağlığına zarar verebilecek herhangi bir indikatör madde içermemesi, klasik tayin yöntemlerine ve önceki biyosensör tasarımlarına bir alternatif olmasını sağlamaktadır. Tasarımı yapılan bu biyosensör, kit benzeri kullanımı olabilecek altyapıya sahip literatürdeki ilk biyosensördür.

Literatürdeki diğer çalışmalara bakıldığında, SNP tayini için Zhang ve arkadaşlarının geliştirdiği elektrokimyasal sensörde altın elektrotlar kullanmışlar ve hibridizasyon tayini için metilen mavisi indikatörü kullanmışlardır [142]. Başka bir çalışmada SnO<sub>2</sub> nanopartiküller ve poli(vinilferosen) ile modifiye edilmiş PGE'ler kullanılarak gerçekleştirilmiştir [82]. Kerman ve arkadaşlarının SNP analizi için

tasarladığı biyosensörde altın elektrot kullanılmış, hibridizasyon indikatörü olarak metilen mavisi kullanılmış kullanılmıştır [51]. Özsoz ve arkadaşları kan pıhtılaşma faktörü olan faktor V genindeki tek nokta mutasyonu altın nanopartiküller kullanarak gerçekleştirmiştir [94]. Literatürde yer almış olan bu biyosensörler, tez kapsamındaki çalışmayla karşılaştırıldığında, sensör yüzeylerinin hazırlanma zorluğu ve yüksek maliyetleri nedeniyle ürüne dönüştürme durumunda bazı güçlüklerle karşılaşacağı açıktır.

#### **4.2 SPR ile İnfluenza B Virüsünün Tayini İçin Geliştirilen Sensöre ait Bulguların Değerlendirilmesi**

Bakteri ve virüslerin tayin edilmesi çok uzun yıllardır gerçekleştirilen bir analizdir. Bu analizin için tasarlanmış mevcut birçok analiz yöntemi vardır, daha hassas ve hızlı yöntemlerin geliştirilmesi için araştırmacılar çalışmalar ve projelere devam etmektedirler. Kültür yönteminde mikroorganizma türünü en az 2 gün inkübatörde tutulması gerekir ki bu çok uzun bir süredir, enzim immunoassay yöntemler pahalıdır ve  $\approx 2-6$  saatlik tayin süresine sahiptir. Ayrıca analiz için yetişmiş eleman ihtiyacı vardır. Real-time PCR yöntemi hızlı bir yöntem ( $\approx 45$ dk) olmasına karşın kullanılan florasın boyalar çok pahalıdır ve yine analizi gerçekleştirecek uzmana ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde İnfluenza B tür tayininin, DNA hibridizasyonu esasına dayalı olarak analizlenmesi hedeflenmiş ve bu amaçla SPR biyosensörü tasarlanmıştır. Önce yüzeye prob tutturup daha sonra hedef gönderilmesi çok klasik bir yöntemdir. Ayrıca bu yöntemin PCR ürünlerine uygulanmasında bazı

sorunlarla karşılaşılmaktadır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında hibrit DNA çözelti fazında elde edildi ve çip yüzeyine gönderildi.

Kim ve arkadaşlarının tasarladığı SPR biyosensöründe İnfluenza A virüsü DNA hibridizasyon yöntemi ile tayin edilmiştir bu amaçla hedef DNA'lar florasan olarak işaretlenmiştir. Bu çalışmada gerçek örneklerin analizi gerçekleşmemiş sadece sentetik hedef DNA'lar kullanılmıştır [52]. Parab ve arkadaşlarının *Chlamydia trachomatis* tayini için tasarladıkları SPR biyosensörü hibridizasyon sistemine dayalı olarak çalışmaktadır, sensör tasarımında iki farklı prob DNA ve altın nanoçubuklar kullanılmıştır [101]. Florasan işaretli DNA'lar ve altın nanoçubukların kullanılması yanıtların zenginleştirilmesi sağlarlar, iki farklı prob kullanılması seçiciliği artırır buna karşılık, altın nanoçubukların hazırlanmaları uzun işlemler gerektirir, florasan işaretli DNA kullanılması veya ikinci bir prob DNA kullanılması maliyeti artırır. Bu nedenle ideal bir biyosensörde olması gereken ucuzluk, hızlı ve kolay hazırlanım özelliklerini sağlamazlar.

Bir çalışmada yüzey glikoproteini hemaglutinin (H) analizi ile influenza tayini yapılmıştır. Bu çalışmada influenza türlerini ayıramamıştır [64]. Nilson ve arkadaşlarının geliştirdiği başka bir çalışmada yine H proteini üzerinden influenza tayini gerçekleştirilerek düşük tayin sınırına inilebilmiştir [84]. Subramanian ve arkadaşlarının *E.coli* tayini için geliştirdikleri SPR biyosensöründe saflaştırılmış monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanarak tayin sağlanmıştır [121].

Tez çalışması kapsamında hazırlanan SPR biyosensörünün tayin süresi bu çalışmalara göre daha uzundur fakat kullanım kolaylığı ve maliyet bakımında bu çalışmalara göre üstünlük sağlar. Ayrıca analiz DNA düzeyinde gerçekleştirilmiştir.

## Bölüm V

### 5 .Sonuç ve Öneriler

Tez çalışmasının elektrokimyasal bölümünde COMT geni üzerindeki SNP hem sentetik dizilerle hemde PCR ürünleri ile seçimli olarak analizlenmiştir. SNP için tasarlanan sensörün hangi koşullar altında uzun süre prob DNA bozunmadan saklanabileceği tayin edildi. Tez çalışmasının optik sensör bölümünde bir patojen olan İnfluenza B virüsünün tayini de gerçek örnekler (PCR ürünleri) kullanılarak gerçekleştirildi.

Saklama Koşulu	Prob Kaplı Sensörün En Uzun Saklanabilme Süresi
-20°C	30 gün
+4°C	150 gün
+25°C	20 gün

**Tablo 13:** Farklı saklama koşullarında sensörün bekletilebilme süreleri.

Bu çalışma ilk defa uzun süre saklanabilen elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarımının yapılması açısından önem taşımaktadır. Ayrıca COMT geni üzerindeki SNP analizi gerçek örneklerle(PCR) gerçekleştirildi. Elektrokimyasal yanıt +1,0V potansiyelde guanin bazlarının yükseltgenme yanıtlarının ölçülmesi ile edildi. Bu sistem kullanılarak biyosensörün hazırlanması yaklaşık 2 saat olarak tespit edildi. Hazırlanan sensör elektrotlar 20 dakika hedef ile etkileştirildikten sonra yaklaşık 1 dakikada ölçüm gerçekleştirilmektedir.

Geliştirilen biyosensörün tayin sınırı sentetik örneklerde 1,184pmol/30µL olarak hesaplandı. Hedef PCR örneklerinin analizinde ise tayin sınırı yaklaşık  $6,09 \times 10^5$  molekül olarak belirlendi.

Tek kullanımlık PGE'lerin kullanılması biyosensöre yenilenebilirlik, ucuzluk ve kolay kullanılabilirlik özellikleri sağlandı. Ayrıca tayinin kısa sürede (21dk), seçimli olarak yapılabiliyor olması ve uzun süre saklanabiliyor olması bu tasarımın ideal bir biyosensör olduğunu göstermiştir.

Bu tez kapsamında, gelecekte hastanın kendisinin kullanabileceği kolaylıkta (şeker ölçüm çubukları gibi) cihaz tasarımları amaçlandığından, gerçek örneklerle analizde PCR ürününün tazeliğini araştırılması ve PCR'sız doğrudan analizlerin yapılması için yakın gelecekte yeni çalışmalar planlanmıştır.

Tasarlanan bu uzun ömürlü elektrokimyasal DNA biyosensör sisteminin, farklı genlerde bulunan mutasyonların saptanması için de modifiye edilerek kullanılabilirliği açıktır.

SPR sensöründe hibridizasyon analizi üzerinden virüs tayini gerçekleştirildi. Yöntemin seçiciliğinin tayini için hedef PCR ürünü yerine rastgele PCR ürünleri ile etkileştirilmiş prob DNA'larda yüzeye gönderilerek ölçüldü. Ölçümün tamamı yaklaşık olarak 110 dakikada gerçekleştirildi. Tayin sınırı yaklaşık olarak  $6,88 \times 10^5$  molekül olarak hesaplandı.

Kullanım kolaylığı, pratikliği, gerçek zamanlı olarak analizin sağlanması ve analizin oldukça seçimli olması tasarlanan bu sensörün en önemli yararlarıdır. Kullanılan prob DNA'daki baz dizilimi değiştirilerek farklı patojenlerin analizinin de mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Biyoloji, kimya ve mühendislik bilimlerindeki gelişmeler ve ihtiyaçlar doğrultusunda biyosensör teknolojileride çok hızlı bir şekilde gelişmektedir. Mevcut tayin yöntemlerine göre daha seçici, düşük maliyetli, daha pratik ve hassas analizler yapabilmek üzere tasarlanan biyosensörler gelecek vaat eden biyoanalitik sistemlerdir. Uzun süre kullanılabilir olacak şekilde geliştirilmeleri seri üretime dönüştürülmeleri gelecekte tayin yöntemlerinde çok daha fazla kullanılabileceklarini göstermektedir.

Sonuç olarak yapılan tez çalışmasında COMT genindeki SNP tayini için uzun süre saklanabilecek elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarımı ve İnfluenza B virüs tayini için optik DNA biyosensörü (SPR) geliştirildi. Her iki sistem de fabrikasyona uygundur. Gelecekte seri üretim yapılabilmesi için sanayi-niversite iç birliği gerekmektedir.

## ÖZET

### OPTİK VE ELEKTROKİMYASAL DNA BİYOSENSÖRLERİNİN GENETİK HASTALIK VE MİKROORGANİZMA TAYİNİNE YÖNELİK TASARIMI VE UYGULAMALARI

DNA'de meydana gelen mutasyonların tayinini yapabilecek ve uzun süre boyunca kullanıma hazır bir şekilde saklanabilecek bir elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımı, DNA hibridizasyon esasıyla patojen tayinine yönelik SPR biyosensör tasarımı gerçekleştirildi.

DNA'nın yapısı aydınlatıldıktan ve önemi anlaşıldığından bu yana DNA analizleri için yeni yöntemler geliştirilmesi, moleküler biyoloji ve nanoteknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak ilerlemektedir. Bu gelişmelerle birlikte analiz sistemlerinin boyutları giderek küçültülmekte, hassasiyet ve özgüllükleri giderek arttırılmaktadır.

Tez çalışması kapsamında DNA'da mutasyon tayinine yönelik bir elektrokimyasal DNA biyosensör, ve patojen tayinine yönelik yüzey plazmon rezonans (SPR) DNA biyosensör tasarımı gerçekleştirildi.

Tez çalışmasının ilk bölümünde şizofreni, alzheimer gibi psikolojik rahatsızlıklardan sorumlu olduğu bilinen bir enzim olan katekol-o-metil transferaz (E.C.2.1.1.6.) sentezinden sorumlu gende gerçekleşen tek nokta polimorfizm (SNP) tayini yapıldı. Kalem grafit elektroda (PGE) tutturulan inozin işaretli prob DNA'lar kullanılarak, sentetik oligonükleotidlerde ve polimer zincir reaksiyonu (PCR) ile

üretileen ürünlerde hibridizasyonun tayini gerçekteştirildi. Hibridizasyon tayini guanin yükseltgenme sinyallerinin diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak ölçülmesi ile gerçekteştirildi. Biyosensör tasarımdan etanolaminin (ETA) hibridizasyona olan etkisi zamana bağlı olarak incelendi. En uygun saklama koşullarında ( -20°C, +4°C, +25°C) ne kadar süre ile saklanabilecekleri inceledi. Ölçümler asetat tamponu (pH: 4,8) içersinde gerçekteştirildi. Hibridizasyondan önce elektrot yüzeyinden guanin yükseltgenme yanıtı alınmazken, hedef dizi ile hibritleşme sonrasında elde edilen yanıtın yüksek olduğu gözlendi. Proben hedef dizi ile hibridizasyonunun yanı sıra prob, hedef diziden bir baz farklı dizilime sahip ve bazıları tamamen farklı olan iki ayrı hedef ile de etkileştirildi. Hibridizasyon sonrası alınan guanin sinyalleri, öngörüldüğu üzere, hedef ile hibridizasyon durumunda en yüksek iken, tek bazı farklı olan hedefle hibridizasyonda biraz daha düşük, rastgele diziyile yapılan hibridizasyonda ise en düşüktür. ETA'nın yüzeydeki boşukları kapladığını böylece sensör elektrotun uzun süre saklanabilmesine olanak verdiği buna karşın, elektron transferini zorlaştırdığı için yanıtlarda düşüşe neden olduğu gözlendi. Belirli sıcaklıklarda (-20<sup>0</sup>C, +4<sup>0</sup>C, +25<sup>0</sup>C) saklanarak, planlanan zamanlarda hedef ile etkileştirilerek hibridizasyon analizi gerçekteştirilen elektrotların, +4<sup>0</sup>C'de 150 gün süresince seçiciliğini kaybetmeden saklanabildiği görüldü. Tasarlanan sensörde kullanılan PGE'lerin tek kullanımlık ve ucuz olması, hazırlanan sensör elektrotların uzun süre bozulmadan bekleyebilir olması fabrikasyona ve seri üretime uygun olabileceği fikrini düşündürmüştür. COMT geni üzerindeki SNP'nin enzim aktivitesinde 4 kata kadar etkili olması ve enzimdeki bozuklukların psikolojik rahatsızlıklardan sorumlu olduğunun düşünülmesi, bu SNP'nin tayininin gerçekteştirilmesini gerekli kılmıştır. Tasarlanan biyosensör ile kısa sürede (21dk) yapılan mutasyon tayini klasik yöntemlere farklı güçlü bir

alternatif getirmiştir. Hesaplanan tayin sınırı sentetik hedeflerde 1,184 $\mu$ mol/30 $\mu$ L, PCR ürünlerinde ise 6,09 $\times 10^5$  moleküldür. Bu biyosensör yalnızca hızlı, ucuz ve kolay analiz sağlamakla kalmayıp aynı zamanda uzun bir kullanım süresine sahiptir.

Tez çalışmasının ikinci kısmında insan, kuş ve bazı memelilerde hastalığa sebep olan İnfluenza B virüsünün tayinine yönelik SPR biyosensörü tasarımı gerçekleştirildi. İnfluenza B virüsünü tanımlayan, tiyol grubu işaretli 21-mer oligonükleotit prob olarak kullanıldı. İlk önce prob DNA çip yüzeyine enjekte edildi. Oligonükleotitler tiyol gruplarından ince altın filmle kovalent olarak bağlandı. Bu etkileşim SPR sensöründe yanıtı sebep oldu. Yanıt hesaplandı ve prob DNA'nın yanıtı olarak kaydedildi. Daha sonra prob DNA ve hedef PCR ürünü (İnfluenza B PCR ürünü) ile etkileştirildi ve Prob DNA-hedef PCR (hibrit DNA) çip yüzeyine gönderilerek yüzey plazmon rezonans yanıtları hesaplandı. Hibrit DNA ile elde edilen yanıtların, prob DNA ile elde edilen yanıtlardan yaklaşık 2 kat kadar daha yüksek olduğu gözlemlendi. Hedef PCR ürünü yerine rastgele PCR ürünü (İnfluenza A PCR ürünü) prob DNA ile etkileştirildikten sonra çip yüzeyine gönderilmesi ile elde edilen yanıtların prob DNA yanıtları kadar olduğu gözlemlendi.

Geliştirilen bu biyosensör ile seçilecek özgül prop dizilerle kolayca ve gerçek zamanlı olarak tür tayini yapılmasına sağlamıştır. Klasik tayin yöntemlerine yeni bir alternatif getirmiştir. Tayin sınırı 6,88 $\times 10^5$  molekül olarak hesaplanmıştır.

Tez çalışması kapsamında geliştirilen her iki biyosensör de hazırlama kolaylığı, kullanım kolaylığı ve düşük maliyetleri gibi özellikleri sayesinde fabrikasyona geçirilebilmeye uygundur.

## **ABSTRACT**

### **THE DESIGN AND APPLICATIONS OF OPTICAL AND ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS FOR GENETIC DISEASES AND MICROORGANISM DETECTION**

In this study, by the principle of DNA hybridization, a SPR biosensor that is capable of detecting pathogens and an electrochemical DNA biosensor, ready to use for a long time, that will detect the mutations exist in DNA a were designed.

After the enlightening the structure of DNA and understanding its importance, for DNA analysis, new metods have been developed parellel to the developments of molecular biology and nanotechnology. By these advancements, the dimensions of analysis systems have been gradually decreased while the sensitivity and specificity have been gradually increased.

In this dissertation study, an electrochemical DNA biosensor for detection of DNA mutation and a surface plasmon resonance (SPR) DNA biosensor for detection of pathogens were developed.

In the first part of the study, an electrochemical DNA sensor designed to detect single nucleotid polimorphism (SNP) on COMT gene. The gene is responsible for the enzyme, cathecol-o-methyl transferaz enzyme, which causes the psycological diseases like schizophrenia and alzhemier. By the usage of inosine substituted probes that were immobilized on to the surface of pencil graphite electrode (PGE), hybridization between the probe and synthetic target oligonucleotides and polimer chain reaction (PCR) amplicons was achieved. The detection of hybridization was done by evaluation of guanine oxidation signals recorded by differential pulse

voltammetry. The effect of ethanolamine on hybridization was examined with respect to time. Also, the maximum duration of the electrodes at the optimum storage conditions (  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $+25^{\circ}\text{C}$ ) was specified. The measurements were done in acetate buffer solutions (pH : 4.8). Before hybridization, no guanine oxidation signal was recorded, after the hybridization of immobilized probe with target sequence, the recorded oxidation signal of guanine was relatively high. In addition to the hybridization of probe with its complementary target, probe was hybridized with a non-complementary target and a mismatch target. The purpose of doing this is, to prove the nonexistence of hybridization between probe and target that is not fully complementary to the probe. As expected, the guanine oxidation signals recorded after hybridization was seen to be highest in the case of full complementarity and decreasing from mismatch to noncomplementary. It was observed that, the usage of ETA enables the storage of electrode for a long time due to its coverage of electrode surface, although, the signals were seemed to be lowered since it makes difficult the electron transfer. Also, it was proved that, it is possible to store the electrodes for 150 days at  $+4^{\circ}\text{C}$  according to the tests repeated at different temperatures for specific duration periods. The idea of fabrication and mass production of PGEs due to their disposibility, cheapness and long shell life was supposed as a future aspect. It makes necessary to detect the Single nucleotide polymorphism (SNP) due to the fact that, the SNP on COMT gene, affects the enzyme activity up to 4 fold and this failure of enzymes are responsible for psychological diseases. By the designed biosensor, a new powerful alternative to the classical mutation methods was brought in. This biosensor not only rapid (21dk), cheap and enables easy analysis, but also has a long shell life. Detection limit calculated  $1,184\text{pmol}/30\mu\text{L}$  for synthetic target and  $6,09 \times 10^5$  molecules for PCR products.

In the second part of the dissertation study, a design of a SPR biosensor that is capable of detecting influenza B virus that causes the disease in human beings, birds and some mammals were done.

Thiol attached 21mer oligonucleotid which, represents the Influenza B virus was used as probe DNA. Firstly probe DNA enjected to the chip surface. The oligonucleotid attached covalently with gold thin metal film on chip surface. This interaction caused a response from SPR sensor. The response calculated and saved as probe response. After that probe DNA and target PCR product (influenza B PCR product) interacted than, probe DNA-target PCR product (hybrid DNA) was send to the chip surface and the responses of plasmon resonance were calculated. The response belonging to hybrid DNA was seen to be approximately two times higher than the responses of probe DNA. It was observed that, the signal recorded after sending the interacted probe with non-complementary PCR product (influenza A PCR product) instead of target PCR product to the chip surface, was as much as the signal of probe.

This developed biosensor enabled the detection of specimen by specific probe sequences and is an alternative method to classical detection methods. Detection limit calculated as  $6,88 \times 10^5$  molecules.

Both biosensors developed throughout this study are suitable for fabrication due to their ease of use and low cost features.

## YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Aktuğlu Y., (1998). İNFLUENZA AŞISI., *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Dergisi*, 69-75
2. Akyılmaz, E., Yaşa, İ., Dinçkaya, E., (2006). Whole cell immobilized amperometric biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* for selective determination of vitamin B1 (thiamine). *Analytical Biochemistry* 354(1) : 78-84.
3. Ariksoysal D.O, Karadeniz H., Erdem A., Sengonul A., Sayiner A.A., Ozsoz M., (2005). Label Free Electrochemical Hybridization Genosensor for the Detection of Hepatitis B Virus Genotype on the Development of Lamivudine Resistance, *Analytical Chemistry*, 77:4908-4917.
4. Arya, S.K., Chornokur, G., Venugopal, M., Bhansali, S., Antibody functionalized interdigitated  $\mu$ -electrode (ID $\mu$ E) based impedimetric cortisol biosensor. *Analyst* 135(8):941-1946.
5. AUTOLAB User Manual, (2005). Eco Chemie, The Netherlands
6. Baird C.L., Myszka D.G., (2001). Current and emerging commercial optical biosensors, *Journal of Molecular Recognition*, 14:261-268.
7. Balasubramanian, S., I. B. Sorokulova, V. J. Vodyanoy, & A. L. Simonian. (2007). Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus*—a surface plasmonresonance spectroscopic study. *Biosensors and Bioelectronics*. 22: 948–955.
8. Barry J.P., Barry J.P., Norwood C., Vouros P., (1996). Detection and identification of Benzo[a]pyrene diol epoxide adducts to DNA utilizing capillary electrophoresis- electrospray mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 68:1432-1438.

9. Barton, J.K. (1986), Metals and DNA Molecular left-handed complements, *American Association for the Advancement of Science*, 233: 727- 734.
10. Berganza J., Olabarria G., Garcia R., Verdoy D., Rebollo A., Arana S., (2007) DNA microdevice for electrochemical detection of Escherichia coli 0157:H7 molecular markers. *Biosensors and Bioelectronics*. 22: 2132-2137
11. Besselink, G. A., Kooyman R. P., Van Os P. J., Engbers, G. H. & Schasfoort R B.. (2004). Signal amplification on planar and gel-type sensor surfaces in surface plasmon resonance-based detection of prostate-specific antigen. *Analytical Biochemistry*. 333:165–173.
12. Bianchi, N., C. Rutigliano, M. Tomassetti, G. Feriotto, F. Zorzato, & R. Gambari. (1997). Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 generic sequences amplified by polymerase chain reaction. *Clinical Diagnostic and Virology*. 8:199–208.
13. Camillioni B., Neri M., Lepri E., Lorio A.M., (2009) Cross-reactive antibodies in middle-aged and elderly volunteers after MF59-adjuvanted subunit trivalent influenza vaccine against B viruses of the B/Victoria or B/Yamagata lineages, *Vaccine*, 27: 4099-4013
14. Camman, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B. (1991). Chemical Sensors and Biosensors-Principles and Applications, *Angewandte Chemie International Edition*, 30: 516-539.
15. Carrascosa L.G., Calle A., Lechuga L.M., (2009) Label-free detection of DNA mutations by SPR: application to the early detection of inherited breast cancer. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 393: 1173-1182

16. Castillo, J., Gaspar, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V.; Domeanu, S. A.; Ryabov, A. D.; Csoregi, E., (2004). Biosensors for life quality - Design, development and applications, *Sensors and Actuators B*, 102: 179-194.
17. Choi, J.-W., Park, K.-W., Lee, D.-B., Lee, W. & Lee, W. H.(2005). Cell immobilization using selfassembled synthetic oligopeptide and its application to biological toxicity detection usingsurface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*. 20: 2300–2305.
18. Chung, J. W., Kim, S. D., Bernhardt, R. & J. C. Pyun. (2005). Application of SPR biosensor for medical diagnostics of human hepatitis B virus (hHBV). *Sensors and Actuators B: Chemical*. 111–112:416–422.
19. Clark, L.C., Lyons, C., (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* 102: 29–45
20. Coille, I., Gauglitz, G., & Hoebeke J., (2002). Characterisation of antibodies and analytes by surface plasmon resonance for the optimisation of a competitive immunoassay based on energy transfer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372:293–300.
21. Collings A.F., Caruso F., (1997). Biosensors: recent advances. *Reports on Progress in Physics*, 60 (11): 1397-1445.

22. Craddock N., Owen M.J., O'Donovan M.C., (2006) The catechol-O-methyl transferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lesson. *Molecular Psychiatry*. 11:446-458
23. D'Orazio P., (2003). Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 334: 41-69.
24. Daly, S. J., Keating, G. J. Dillon, P. P. Manning, B. M. O'Kennedy, R. Lee, H. A. & M. R. A. Morgan. (2000). Development of surface plasmon resonance-based assay for Aflatoxins B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 5097–5104.
25. Del Giallo M.L., Ariksoysal D.O., Marrazza G., Mascini M., Ozsoz M., (2005). Disposable Electrochemical Enzyme-Amplified Genosensor for Salmonella Bacteria Detection, *Analytical Letters*, 38: 2509–2523.
26. Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M.S., Pfeifer, G.P. (1996). Preferential formation of Benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53, *Science*, 274: 430-432.
27. Dutra, R. F., & Kubota. L. T. (2007). An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl dextran-modified gold chip. *Clinica Chimica Acta* 37(6):114–120.
28. Erdal, N., Erdal, M., Çamdeviren, H., Gökdoğan, T., Herken, H. (2002) Bir Grup Sağlıklı Gönüllüde Katekol-O-Metiltransferaz (COMT) *Gen Polimorfizmi Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 12: 174-178

29. Erdem A., Ariksoysal D.O, Karadeniz H., Kara P., Sengonul A., Sayiner A.A., Ozsoz M., (2005). Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology, *Electrochemical Communications*. 7: 815–820.
30. Erdem A., Kerman K., Meric B., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz M, (2002), DNA biosensor for microcystis spp. Sequence detection by using methylene blue and ruthenium complexes as hybridisation labels, *Turkish Journal of Chemistry* 26: 851-862.
31. Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Ozsoz, M. (2003), Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on Guanine signal, *Electroanalysis*, 15 (7): 1-7.
32. Erdem, A., Sayar, F., Karadeniz, H., Guven, G., Ozsoz, M., Piskin, E., (2007). Development of Streptavidin Carrying Magnetic Nanoparticles and Their Applications in Electrochemical Nucleic Acid Sensor Systems. *Electroanalysis* 19(7-8), 798-804.
33. Eum, N.S., Yeom, S.H., Kwon, D.H., Kim, H.R., Kang, S.W. (2010) Enhancement of sensitivity using gold nanorods-Antibody conjugator for detection of E. coli O157:H7. *Sensors And Actuators B-Chemical* 143(2): 784-788
34. Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D., 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*. 79: 2814–2822.
35. Fratamico, P. M., T. P. Strobaugh, M. B. Medina, & A. G. Gehring. (1998). Detection of Escherichiacoli O157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor. *Biotechnology Techniques* 12:571–576.

36. Gobi, K. V., H. Tanaka, Y. Shoyama, & N. Miura. (2005). Highly sensitive regenerable immunosensor for label-free detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid at ppb levels by using surface plasmon resonance imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 111 (112):562–571.
37. Gorton, L., Csöregi, E., Domínguez, E., Emnéus, J., Jonsson-Pettersson, G., Marko-Varga, G., and Persson, B., (1991). Selective detection in flow analysis based on the combination of immobilized enzymes and chemically modified electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 250: 203–248.
38. Guilbault, G.G., Luong, J.H. (1988). Gas phase biosensors, *Journal of Biotechnology*, 9:1-29
39. He, H., Xie, Q., Zhang, Y., Yao, S. (2005). A simultaneous electrochemical impedance and quartz crystal microbalance study on antihuman immunoglobulin G adsorption and human immunoglobulin G reaction, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 62: 191–205
40. Homola, J., J. Dostálek, S. Chen, A. Rasooly, S. Jiang, & S. S. Yee. (2002). Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *International Journal of Food Microbiology* 75: 61–69
41. Hosak L., (2007). Role of the COMT gene Val158Met polymorphism in mental disorders: A review. *European Psychiatry*, 22: 276-281
42. Hsieh, H. V., B. Stewart, P. Hauer, P. Haaland, & R. Campbell. (1998). Measurement of *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin production by surface plasmon resonance immunoassay. *Vaccine* 16: 997–1003.
43. <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/genomicresearch/snp>
44. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list\\_uids=1312](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=1312)

45. Jelen F., Erdem A., Palecek E., (2002). Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode. *Bioelectrochemistry*, 55: 165-167.
46. Jeroen Pollet J., Delport F., Janssen K.P.F., Jans K., Maes G., Pfeiffer H., Wevers M., Lammertyn J. (2009) Fiber optic SPR biosensing of DNA hybridization and DNA–protein interactions, *Biosensors nad Bioelectronics*, 25: 864-869
47. Kalogianni DP, Koraki T, Christopoulos TK, Ioannou PC, (2006). Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms., *Biosensors and Bioelectronics.*, 21(7):1069-1076.
48. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., 2002. Label-free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes. *Electroanalysis* 14(24), 1685-1690.
49. Kawaguchi, T., D. R. Shankaran, S. J. Kim, K. V. Gobi, K. Matsumoto, K. Toko, & N. Miura. (2007). Fabrication of a novel immunosensor using functionalized self-assembled monolayer for trace level detection of TNT by surface plasmon resonance. *Talanta* 72:554–560.
50. Kerman K., Meric B., Ozkan D., Kara P., Erdem A., Ozsoz M., (2001). Electrochemical DNA biosensor for the determination of benzo[a]pyrene–DNA adducts, *Analytica Chimica Acta* 450: 45–52.
51. Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, B., Gooding, J.J., Ozsoz, M., (2002). Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes. *Analytica Chimica Acta* 462(1), 39-47.

52. Kim, S.A., Kim, S.J., Lee, S.H., Park, T.H., Byun, K.M., Kim, S.G., Shuler, M.L. (2009) Detection of Avian Influenza-DNA Hybridization Using Wavelength-scanning Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Journal Of The Optical Society Of Korea*, 13(3):392-297
53. Kim, Y.S., Jung, H.S., Matsuura, T., Lee, H.Y., Kawai, T., Gu, M.B., 2007. Electrochemical detection of 17 $\beta$ -estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip. *Biosensors and Bioelectronics* 22(11), 2525-2531.
54. Klibanov, A. M. (1979), Enzyme stabilization by immobilization. *Analytical Biochemistry* 93: 1–25
55. Lee Hwan Young, Park Myung Jin, Yoo Ji-Eun, Chung Ukhee, Han Gil-Ro And Shin Kyoung-Jin (2005), Selection Of Twenty-Four Highly Informative SNP Markers For Human Identification And Paternity Analysis in Koreans, *Forensic Science International* 148 ( 2-3): 107-112
56. Leonard, P., Heatry, S. Quinn, J., & O’Kennedy. R. (2004). A generic approach for the detection of whole *Listeria monocytogenes* cells in contaminated samples using surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics* 19:1331–1335.
57. Li, B., Zhang, Z., Jin, Y., 2002. Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling. *Biosensors and Bioelectronics* 17(6-7), 585-589.
58. Lim, T., M. Oyama, K. Ikebukuro, & I. Karube. (2000). Detection of atrazine based on the SPR determination of P450 mRNA levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Analytical Chemistry* 72:2856–2860.

59. Lin, T.-J., K.-T. Huang, & C.-Y. Liu. (2006). Determination of organophosphorous pesticides by a novel biosensor based on localized surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics* 22:513–518.
60. Lu F. , Lee H.P., Lim S.P., (2004). Quartz crystal microbalance with rigid mass partially attached on electrode surfaces. *Sensors and Actuators A: Physical*, 112: 203-210.
61. Lucarelli F., Palchetti I., Marrazza G., Mascini M., (2002). Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples, *Talanta*, 56: 949-957.
62. Lucarelli F., Tombelli S., Minunni M., Marrazza G., Mascini M., (2008) Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection *Analytical Chimica Acta* 609:139-159
63. Luk, J., Gross, P., Thompson, W.W., (2001). Observations on mortality during the 1918 influenza pandemic. *Clinical Infectious Diseases*. 33, 1375–1378
64. Mandenius, C.F., Wang, R.H., Alden, A., Bergstrom, G., Thebault, S., Lutsch, C., Ohlson, S. (2008) Monitoring of influenza virus hemagglutinin in process samples using weak affinity ligands and surface plasmon resonance. *Analytica Chimica Acta* 623(1):66-75
65. Männistö, PT, Kaakkola, S., (1999) Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacological Reviews* 51:593– 62
66. Marco Frasconi M., Tortolini C., Mazzei F., (2010). Multifunctional Au Nanoparticle Dendrimer-Based Surface Plasmon Resonance Biosensor and Its Application for Improved Insulin Detection. *Analytical Chemistry* 82: 7335-7342

67. Marrazza G., Chianella I., Mascini M., (1999). Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring, *Analytica Chimica Acta*, 387: 297-307.
68. Masson, J. F., L. Obando, S. Beaudoin, & K. Booksh. (2004). Sensitive and real-time fiber-optic-based surface plasmon resonance sensors for myoglobin and cardiac troponin I. *Talanta* 62:865–870.
69. Mauriz, E., A. Calle, A. Abad, A. Montoya, A. Hildebrandt, D. Barcelo, & L. M. Lechuga. (2006). Determination of carbaryl in natural water samples by surface plasmon resonance flow-through immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 21:2129–2136.
70. Mauriz, E., A. Calle, L. M. Lechuga, J. Quintana, A. Montoya, & J. J. Manclús. (2006). Realtime detection of chlorpyrifos at part per trillion levels in ground, surface and drinking water samples by a portable surface plasmon resonance immunosensor. *Analytica Chimica Acta*, 561:40–47
71. Medina, M. B. (2005). A biosensor method for a competitive immunoassay detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB) in milk. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 13:37–55.
72. Meeusen, C. A., E. C. Alocilja, & W. N. Osburn. (2005). Detection of *E. coli* O157: H7 using a miniaturized surface plasmon resonance biosensor. *Trans. Amer. Soc. Agr. Eng.* 6:2409–2416.
73. Meric B., Kerman K., Ozkan D., Kara P., Erensoy S., Akarca U., Mascini M., Ozsoz M., (2001) Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue. *Talanta*, 56: 837-846

74. Mikkelsen, S. (1994). Sequence-selective DNA Sensors for the diagnosis of inherited diseases (Voltametric), A.B.D Patent no: 5,312,527 (05/17/1994).
75. Minunni M., Tombelli S., Mascini M., Bilia A., Bergonzi M.C., Vincieri F.F., (2005). An optical DNA-based biosensor for the analysis of bioactive constituents with application in drug and herbal drug screening. *Talanta*, 65:578-585
76. Minunni, M., & M. Mascini. (1993). Detection of pesticide in drinking water using real-time biospecific interaction analysis (BIA). *Analytical Letters* 26: 1441–1460
77. Minunni, M., Tombelli, S., Gullotto, A., Luzi, E., Mascini, M. (2004) Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element the case of HIV-1 Tat protein *Biosensors and Bioelectronics* 20: 1149-1156
78. Modern Drug Discovery (1999) Milestones of antisense oligonucleotide therapeutics, Editör, J.F. Ryan, Washington DC, 1-2: sayfa 68.
79. Mohammed, I., W. M. Mullet, E. P. C. Lai, & J. M. Yeung. (2001). Is biosensor a viable method for food allergen detection? *Analytica Chimica Acta* 444:97–102.
80. Mouvet, C., Harris, R. D., Maciag, C., Luff, B. J., Wilkinson, J. S., Piehler, J., Brecht, A., Gauglitz, G., Abuknesha, R., & Ismail. G., (1997). Determination of simazine in water samples by waveguide surface plasmon resonance. *Analytica Chimica Acta* 338:109–117.
81. Muller-Renaud, S. P., D. Dupont, & P. Delieu. (2004). Quantification of beta-casein in milk and cheese using an optical immunosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 659–664.

82. Muti, M., Kuralay, F., Erdem, A., Abaci, S., Yumak, T., Sinag, A., (2010), Tin oxide nanoparticles-polymer modified single-use sensors for electrochemical monitoring of label-free DNA hybridization. *Talanta* 82(5), 1680-1686.
83. Nikolelis, P.D., Theoharis, G., (2003) Biosensor for dopamine based on stabilized lipid films with incorporated resorcin[4]arene receptor, *Bioelectrochemistry*, 59: 107-112
84. Nilsson C.E., Abbas S., Bennemo M., Larsson S., Hämäläinen M.D., Frostell-Karlsson A. (2010) A novel assay for influenza virus quantification using surface plasmon resonance. *Vaccine* 28(3) 759-766
85. Ock, K., G. Jang, Y. Roh, S. Kim, J. Kim, & K. Koh. (2001). Optical detection of Cu ion using a SQ-dye containing polymeric thin-film on Au surface. *Microchemical Journal* 70:301–305.
86. Odaci, D., Timur, S., Telefoncu, A., (2009). A microbial biosensor based on bacterial cells immobilized on chitosan matrix. *Bioelectrochemistry* 75(1), 77-82.
87. Oh, B. K., Kim, Y. K., Park, K. W., Lee, W. H., & Choi. J. W., (2004). Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhimurium. *Biosensors and Bioelectronics* 19: 1497–1504.
88. Oliviera-Brett, A. M., Diculescu, C.V., (2004) Electrochemical study of quercetin–DNA interactions Part II. In situ sensing with DNA biosensors. *Bioelectrochemistry* 64:143-150
89. Osteryoung J., (1993). Voltammetry for the future. *Accounts of Chemical Research*, 26: 77-83.

90. Oxford, J.S., (2000). Influenza A pandemic of the 20th century with special reference to 1918: virology, pathology and epidemiology. *Reviews in Medical Virology* 10: 119–133
91. Özkan D., Erdem A., Kara P., Kerman K., Gooding J. J., Nielsen P. E., Ozsoz M., (2002) Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes, *Electrochemistry Communications* 4: 796-802
92. Özkan D., Karadeniz H., Erdem A., Mascini., Ozsoz M., (2004) Electrochemical genosensor for Mitomycin C–DNA interaction based on guanine signal, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35: 905-912
93. Özkan-Ariksoysal, D., Tezcanli, B.,; Kosova, B., Ozsoz, M., (2008), Design of electrochemical biosensor systems for the detection of specific DNA sequences in PCR-amplified nucleic acids related to the catechol-O-methyltransferase val108/158Met polymorphism based on intrinsic guanine signal. *Analytical Chemistry*, 80(3), 588-596.
94. Özsoz M, Erdem A, Kerman K, Ozkan D, Tugrul B, Topcuoglu N, Ekren H., 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.
95. Palecek E., (2002). Past, presence and future of nucleic acids electrochemistry. *Talanta*, 56: 809-821.
96. Palecek E., Fojta, M., Tomschik M., Wang J., (1998). Electrochemical biosensors for DNA damage, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 621-628.

97. Palecek E., Kizek R., Havran L., Billova S., Fojta M., (2002). Electrochemical Enzyme –linked immunoassay in a DNA hybridization sensor, *Analytica Chimica Acta*, 469, 73-83.
98. Palecek, E., (1960). Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid, *Nature*, 188: 656-657.
99. Palecek, E., Fojta, M., (2001). Detecting DNA hybridisation and damage. *Analytical Chemistry*, 73, 75A–83A.
100. Pandey, P.C., Weetall, H.H. (1994). Application of photochemical reaction in electrochemical detection of DNA intercalation, *Analytical Chemistry*, 66: 1236-1241.
101. Parab J.H., Jung C., Lee J., Park H.G. (2010) A gold nanorod-based optical DNA biosensor for the diagnosis of pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(2): 667-673
102. Pietrzyk, D.J.; Frank, C.W. (1979). *Analytical Chemistry*, 2. Baskı, Academic press: 226- 239.
103. Pividori M.I., Merkoçi A., Alegret S., Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics* 15: 291-303.
104. Pollet, J., Delpont, F., Janssen, K.P.F., Jans, K., Maes, G., Pfeiffer, H., Wevers, M., Lammertyn, J., 2009. Fiber optic SPR biosensing of DNA hybridization and DNA–protein interactions. *Biosensors and Bioelectronics* 25 (4): 864-869.
105. Roach, P.C.J., Ramsden, D.K., Hughes, J., Williams, P., 2003. Development of a conductimetric biosensor using immobilised *Rhodococcus ruber* whole cells for the detection and quantification of acrylonitrile. *Biosensors and Bioelectronics* 19 (1): 73-78.

106. Rogers K.R., Mascini M., (1998). Biosensors for Field Analytical Monitoring. *Field Analytical Chemistry and Technology*, 2: 317-331.
107. Sakai, G., K. Ogata, T. Uda, N. Miura, & N. Yamazoe. (1998). A surface plasmon resonance-based immunosensor for highly sensitive detection of morphine. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 49: 5–12.
108. Samsonova, J. V., N. A. Uskova, A. N. Andresyuk, M. Franek, & C. T. Elliott. (2004). Biacore biosensor immunoassay for 4-nonylphenols: Assay optimization and applicability for shellfish analysis. *Chemosphere* 57: 975–985.
109. Scholtissek, C., Rohde, W., Hoyningen, V.V., Rott, R., 1978. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 87: 13–20
110. Schweiger B., Zadow I., Heckler R., Timm H., Pauli G., (2000). Application of a Fluorogenic PCR Assay for Typing and Subtyping of Influenza Viruses in Respiratory Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (4): 1552-1558
111. Shankaran, D. R., K. V. Gobi, T. Sakai, K. Matsumoto, T. Imato, K. Toko, & N. Miura. (2004). Highly sensitive surface plasmon resonance immunosensor for parts-per-trillion level for detection of 2,4,6-trinitrophenol. . *Sensors and Actuators B: Chemical* 100:450–454.
112. Shen, G., J. Lu, and C. Cai, (2011) The fabrication of a piezoelectric immunosensor based on DNA-antibody conjugate layer. *Analytical Biochemistry*. 418(2): 167-171.
113. Shimomura, M., Y. Nomura, W. Zhang, M. Saikino, K. Lee, K. Ikebukuro, & I. Karube. (2001 ). Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenylx and atrazine. *Analytica Chimica Acta* 434:223–230

114. Si, C.Y., Ye, Z.Z., Wang, Y.X. Gai, L., Wang, J.P., Ying, Y.B., (2011) Rapid Detection of Escherichia coli O157 H7 Using Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensor. *Spectroscopy And Spectral Analysis*, 31(10): 2598-2601
115. Skladal, P., Jilkova, Z., Svoboda, I., Kolar, V. (2005) Investigation of osteoprotegerin interactions with ligands and antibodies using piezoelectric biosensors. *Biosensor and bioelectronics* 20 2017-2034
116. Skoog, D.A., West, D.A., Holler, F.J., (1996) Analitik Kimyanın Temelleri, Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, . Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 303-495.
117. Soh, N., T. Watanabe, Y. Asano, & T. Imato. (2003). Indirect competitive immunoassay for Bisphenol A, based on a surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Materials*. 15: 423–438.
118. Spickler A. R., Trampel D. W., Roth J. A., (2008) The onset of virus shedding and clinical signs in chickens infected with high-pathogenicity and low-pathogenicity avian influenza viruse. *Avian Pathology*. 37 (6): 555-577
119. Strong, A., Stimpson, D.I., Bartholomew, D.U., Jenkins, T.F., & Elkind. J.L., (1999). Detection of trinitrotoluene (TNT) extracted from soil using a surface plasmon resonance (SPR)-based sensor platform. *Proceedings of SPIE* 37 (10): 362–372.
120. Strous R.D., Bark N., Woerner M., Lachman H.M., (1997), Lack of association of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 41: 493– 49
121. Subramanian A., Irudayaraj, J., Ryan., T (2006) A self assembled monolayer based surface plasmon immunosensor for detection of E. coli O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics* 21(7): 998-1006

122. Terry L.A., White S.F., T, gwell L.J., (2005). The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1309-1316.
123. Tien, T.H., Ottova, L.A., (1998) Supported planar lipid bilayers (s-BLMs) as electrochemical biosensors, *Electrochimica Acta* 40(23): 3587-3610
124. Topçu, S., Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E., 2004. Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. *Biosensors and Bioelectronics* 20(3): 592-597.
125. Trojanowicz, M., Miernik, A., (2000) Bilayer lipid membrane glucose biosensors with improved stability and sensitivity, *Electrochimica Acta*, 46: 1053-1061
126. Turchi C., Onofri V., Alessandrini F., Buscemi L., Pesaresi M., Presciuttini S. And Tagliabracci A. (2005), Multiplex Genotyping of 22 Autosomal SNP And its Application in The Forensic Field, *International Congress Series* 1288: 40-42 *Progress in Forensic Genetics 11 - Proceedings Of The 21st International ISFG Congress Held in Ponta Delgada, The Azores, Portugal*
127. Turner, A.P.F.(1987). Biosensors: Fundamentals and Applications, *Oxford University Press*, Oxford, sayfa v-vii.
128. Vaisocherová, H., K. Mrkvová, M. Piliarik, P. Jinoch, M. Šteinbachová, & J. Homola. (2007). Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibody against Epstein-Barrvirus. *Biosensors and Bioelectronics* 22: 1020–1026.
129. Venter C.J.. (2001) The Sequence of the Human Genome, *Science* 291,1304

130. Wang J., (2002). Electrochemical Nucleic acid biosensors, *Analytica Chimica Acta*, 469: 63-71.
131. Wang J., Luo Y., Zhang B., Chen M., Huang J., Zhang K., Gao W., Fu W., Jiang T., Liao P., (2011) Rapid label-free identification of mixed bacterial infections by surface plasmon resonance, *Journal of Translational Medicine* 9:85
132. Wang J., Xu D., Erdem A., Polsky R., Salazar M.A., (2002). Genomagnetic. electrochemical assays of DNA hybridization, *Talanta*, 56(5), 931-938.
133. Wang, A.H.-J.(1987). Interactions between antitumor drugs and DNA, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, 1: 52-69.
134. Wang, J., (1994), *Analytical Electrochemistry*, Wiley
135. Wang, J., Cai, X., Tian, B., Shiraishi, H., (1996). Microfabricated thick-film electrochemical sensor for nucleic acid determination, *Analyst* 121: 965–970.
136. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R., 1998. Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. *Analytica Chimica Acta* 375 (3): 197-203.
137. Wei, J., Mu, Y., Song, D., Fang, X., Liu, X., Bu, L., Zhang, H., Zhang, G., Ding, J., Wang, W. Jin, Q. & Luo. G., (2003). A novel sandwich immunosensing method for measuring cardiac troponin I in sera. *Analytical Biochemistry* 321:209–216.
138. Williams H.J., Owen M.J., O'Donovan M.C. (2007), Is COMT a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophr Bull.* 2007 ; 33: 635– 641

139. Wu, C., & L. Lin. (2004). Immobilization of metallothionein as a sensitive biosensor chip for the detection of metal ions by surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics* 20:864–871.
140. Yang, C. Brooks, Y.E., Li, Y., Denny, P., Ho, C. M., Qi, F. X., Shi, W. Y., Wolinsky, L., Wu B., Wong, D. T. W., & Montemagno C. D., (2005). Detection of picomolar levels of interleukin-8 in human saliva by SPR. *Lab on a Chip*. 10: 1017–1023.
141. Yu, Q. M., S. F. Chen, A. D. Taylor, J. Homola, B. Hock, & S. Y. Jiang. (2005). Detection of low-molecular-weight domoic acid using surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 107:193–201.
142. Zhang, S., Wu, Z., Shen, G., Yu, R., (2009). A label-free strategy for SNP detection with high fidelity and sensitivity based on ligation-rolling circle amplification and intercalating of methylene blue. *Biosensors and Bioelectronics* 24(11): 3201-3207
143. Zhu, L., Li, Y., Zhu, G., 2004. A novel renewable plant tissue-based electrochemiluminescent biosensor for glycolic acid. *Sensors and Actuators B: Chemical* 98(2-3): 115-121.

# ÖZGEÇMİŞ

**Yasin Uğur KAYRAN**

**Doğum Tarihi:** 29-04-1987

**Doğum Yeri:** Çanakkale

**İletişim bilgileri:**

**Adres:** Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya A.B.D, 35100

Bornova, İZMİR

**Tel:** 0-505-586-22-10

**Eğitim:**

**Lisans Eğitimi:**

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi (Eylül 2005-Haziran 2009 )

**Mezuniyet ortalaması:** 2,55/4,00

**Yüksek Lisans Eğitimi:**

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Programı Eylül 2009- Aralık 2011.

**Aldığı Burslar**

TÜBİTAK proje bursiyerliği proje no: 109S263 15.12.2010- 15.12.2010

**Görevli Olduğu Proje Çalışmaları**

Biyolojik Ajanların Karbon Elektrod Materyalleri (Karbon Nanotüpler)

Kullanılarak Nükleik Asid Biyosensörleri ile Tayini (TÜBİTAK projesi, proje no= 109S263)

### **Yurt dışında katıldığı projeler**

**01 Eylül 2010 - 30 Kasım 2010** tarihleri arasında Çek Cumhuriyetinde Biyofizik Enstitüsünde “Elektrokimyasal Sensörler” laboratuvarında Masaryk Ünivesitesi Analitik Kimya Prof. Dr. Libuse Trnkova gözetiminde “Xanthine türevlerinin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi” projesinde yer aldım.

### **Bidiriler**

1. Yasin Ugur KAYRAN, Dilsat OZKAN-ARIKSOYSAL, “EFFECT OF DIFFERENT IMMOBILIZATION METHODS FOR DNA ON THE DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSORS” International Postgraduate Student Meeting on Pharmaceutical Sciences (IPSMPS)-IZMIR, TURKEY-24-27.06.2010
2. Frantisek Jelen, Ugur Kayran, Libuse Trnkova, Dilsat Ariksoysal, Mehmet Ozsoz, “VOLTAMMETRIC ANALYSIS OF XANTHINE DERIVATIVES AT HE GRAPHITE ELECTRODE. EFFECT OF COPPER IONS.” XXI International Symposium On Bioelectrochemistry And Bioenergetics Cracow, POLAND 8- 12.05.2011
3. Dilsat OZKAN-ARIKSOYSAL, Yasin Ugur KAYRAN, Seda Nur TOPKAYA, Tuğba KILIÇ, Ceren ACIR, Mehmet ÖZSÖZ “ ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSORS FOR MICROBIOLOGICAL AGENT DETECTION” 9th International Electrochemistry Meeting in Turkey, 25-29 Ekim 2011
4. Yasin Ugur KAYRAN, Dilsat OZKAN-ARIKSOYSAL, Seda Nur TOPKAYA, Ceren ACIR, Mehmet ÖZSÖZ “CARBON NANOTUBE MODIFIED ELECTROCHEMICAL GENOSENSOR FOR THE DETECTION OF MICROORGANISM
5. Yasin Ugur KAYRAN, Mehmet ÖZSÖZ, Dilsat OZKAN-ARIKSOYSAL “RAPID DETECTION OF E.COLI VIA SSDNA-WRAPPED CNTS BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR” Biomed 2011- Ankara, Türkiye 23-25.11.2011