

**ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM'UN  
TAYININE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL  
DNA SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ  
VE UYGULAMALARI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Çağdaş CEYLAN**

**(201192051018)**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Adil ELİK**

**ŞUBAT 2015**

**T. C.  
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*'UN TAYİNİNE YÖNELİK  
ELEKTROKİMYASAL DNA SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ VE  
UYGULAMALARI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Çağdaş CEYLAN**

**201192051018**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Adil ELİK**

**II. Danışman: Doç. Dr. Gültekin GÖKÇE**

**SİVAS**

**ŞUBAT 2015**

**ÇAĞDAŞ CEYLAN**'nın hazırladığı ve “*Anaplasma phagocytophilum*‘un Tayinine Yönelik Elektrokimyasal DNA Sensörü Geliştirilmesi ve Uygulamaları” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANA BİLİM DALI**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı** : **Yrd. Doç. Dr. Adil ELİK** .....  
Cumhuriyet Üniversitesi

**Eş/İkinci Danışman** : **Doç. Dr. Gültekin GÖKÇE** .....  
Cumhuriyet Üniversitesi

**Jüri Üyeleri** : **Prof. Dr. Ramazan GÜRKAN** .....  
Cumhuriyet Üniversitesi

**Doç. Dr. Nuri ÜNLÜ** .....  
Aksaray Üniversitesi

**Doç. Dr. Halil İbrahim ULUSOY** .....  
Cumhuriyet Üniversitesi

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCI**  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

*Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F-386 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*

Bütün hakları saklıdır.

Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Çağdaş CEYLAN, 2015

## ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

15/02/2015

Çağdaş CEYLAN

## **KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR**

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocalarım Yrd. Doç. Dr. Adil ELİK ve Doç. Dr. Gültekin GÖKÇE' ye, tüm yaşantım boyunca beni her zaman destekleyen ve bu günlere getiren aileme çok teşekkür ederim.

## ÖZET

### **ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM'UN TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL DNA SENSÖRÜ GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI**

**Çağdaş CEYLAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Adil ELİK**

**II. Danışman: Doç. Dr. Gültekin GÖKÇE**

**2015, 55+xv sayfa**

Bu çalışma, oldukça geniş bir konakçı grubunda enfeksiyona yol açan bir patojen olan *A. phagocytophilum* dizi seçimli DNA hibridizasyonunun voltametrik yöntemle tayin edildiği tek kullanımlık elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirilmesine yöneliktir.

Herhangi bir etiketlenmenin yapılmadığı bu elektrokimyasal çalışmanın esasını DNA hibridizasyonu sonrasında Guanin bazının yükseltgenme sinyalinin ölçülmesi ile bir ikili oluşumunun izlenmesi oluşturur. Söz konusu biyosensör tasarımı inozin modifiye (guanin içermeyen) probun, kalem grafit elektroda (PGE) immobilize edilmesi ve diferansiyel puls voltametri (DPV) ile guaninin yükseltgenme sinyalinin ölçülerek, ikili oluşumunun tayinini içerir.

Bu çalışmanın ilk aşamasında, *A. phagocytophilum* temsil eden prob dizisi, aktive edilmiş, kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyine yaş adsorbsiyon (wet adsorbition) yöntemi ile immobilize edilmiş ve daha sonra prob ve hedefi arasındaki

hibridizasyonun varlığı 1000 mV'da gözlenen guanin yükseltgenme sinyali ile tespit edilmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmasında prob derişiminin 25 µg/mL, prob immobilizasyon süresi 6 dakika; hibridizasyon için hedef derişimi 40 µg/mL ve hibridizasyon süresinin 10 dakika olduğu gözlenmiştir. Geliştirilen elektrokimyasal biyosensörün spesifikliği; baz sırasından bir bazının yeri (MM) ve tüm bazlarının yerleri farklı (NC) olan hedef diziler kullanılarak test edilmiştir.

Ferri/Ferro siyanür redoks sistemi altında elektrokimyasal empedans yöntemi kullanılarak yapılan empedimetrik ölçümler ile DNA hibridizasyonunun gerçekleştirildiği ayrıca teyit edilmiştir. Tayin sınırını (DL) belirlemek için hedef derişimi 0,78 - 3,90 µM arasında değişen hedef diziler kullanılmış ve tayin sınırı 0,244 µM olarak bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Elektrokimyasal DNA sensörü; Grafit Kalem Elektrot, *Anaplasma phagocytophilum*, Diferansiyel Puls Voltametri.

## **ABSTRACT**

### **DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL DNA SENSOR FOR THE DETERMINATION OF *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* AND IT'S APPLICATIONS**

**Çağdaş CEYLAN**

**Master of Science Thesis, Department of Chemistry**

**Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Adil ELİK**

**II. Supervisor: Doç. Dr. Gültekin GÖKÇE**

**2015, 55+xv pages**

This study was intended to enhance the disposable electrochemical DNA biosensor through which *A. phagocytophilum*, a pathogen causing infection in a considerably wide host group, sequence selective DNA hybridization was detected with a voltametric method. Monitoring the formation of a duplex by measuring the oxidation signal of guanine base after DNA hybridization forms the basis of this study in which no labeling is done. The biosensor design contains immobilizing inosine modified (guanine-free) probe to the pencil graphite electrode (PGE) and detecting duplex formation by measuring guanine oxidation signal with differential pulse voltammetry (DPV).

In the first stage of this study, probe sequence representing *A. phagocytophilum* was immobilized to the activated surface of pencil graphite electrode (PGE) by wet adsorption method, and then the hybridization between probe and its target was confirmed with guanine oxidation signal observed at 1000 mV. In the optimization study, it has been observed that probe concentration is 25 µg/mL, immobilization time is 6 minutes; for the hybridization, target concentration was 40 µg/mL and hybridization time is 10 minutes. Respectively of the developed biochemical

biosensor was tested by using mismatch and non complementary target sequences. It has been also confirmed that DNA hybridization is carried out with impedimetric measurements by using electrochemical impedance method under the ferri/ferrocyanide redox system. To estimate the detection limit (DL), target sequences whose concentrations varied in range of 0,78 - 3,90  $\mu\text{M}$  were chosen and it was to be 0,244  $\mu\text{M}$ .

**Key Words:** Electrochemical DNA sensor, Pencil Graphite Electrode, *Anaplasma phagocytophilum*, Differential Pulse Voltammetry.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	vii
ABSTRACT .....	ix
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiv
KISALTMALAR DİZİNİ .....	xv
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Elektrokimya .....	2
1.2 Elektrokimyasal Bir Olayda Kütle Aktarım Yolları.....	2
1.3 Elektroanalitik Yöntemler .....	3
1.4 Voltametri.....	4
1.4.1 Voltametrik elektrokimyasal analizlerde kullanılan elektrotlar.....	5
1.4.1.1 Çalışma elektrotları (indikatör elektrotlar).....	5
1.4.1.2 Referans elektrotlar .....	8
1.4.1.3 Yardımcı (karşıt) elektrot .....	9
1.4.2 Voltametriye kullanılan uyarma sinyalleri .....	10
1.4.2.1 Doğrusal taramalı voltametri.....	11
1.4.2.2 Kare dalga voltametrisi .....	11
1.4.2.3 Diferansiyel puls voltametrisi .....	12
1.4.2.4 Dönüşümlü voltametri (CV) .....	12
1.4.3 Voltamogramlar .....	13
1.4.3.1 Kapasitif akım ( $i_c$ ) .....	14
1.4.3.2 Faradaik akım ( $i_f$ ) .....	14
1.4.4 Nernst eşitliği.....	15
1.5 Biyosensörler.....	15
1.5.1 Biyosensör yapısındaki biyomateryaller ve çevirici sistemleri .....	16
1.5.2 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler.....	18
1.5.2.1 Seçimlilik .....	18
1.5.2.2 Kullanım ömrü .....	18
1.5.2.3 Tekrarlanabilirlik.....	18
1.5.2.4 Stabilite (Kararlılık) .....	18
1.5.2.5 Duyarlılık .....	19
1.5.2.6 Tayin sınırı .....	19
1.5.2.7 Ölçüm aralığı.....	19
1.5.2.8 Yanıt zamanı .....	19
1.5.2.9 Geriye dönme zamanı .....	19
1.5.2.10 Basitlik ve ucuzluk .....	19
1.5.2.11 Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik .....	19
1.5.3 Nükleik asitler.....	20
1.5.4 DNA biyosensörleri .....	22
1.5.5 DNA biyosensörlerinde prob tutturma yöntemleri .....	24
1.5.5.1 Adsorbsiyon yoluyla .....	24

1.5.5.2 Elektrostatik yolla Tutturulması.....	24
1.5.5.3 Kovalent bağlanma ile prob tutturulması.....	24
1.6 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS).....	25
1.7 Çalışmanın Amacı .....	28
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>29</b>
2.1 Kullanılan Cihazlar.....	29
2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	29
2.3 Kullanılan DNA Dizileri .....	30
2.4 Kullanılan Sentetik Probtan ve Hedef Dizilerden Stok Çözeltinin Hazırlanışı	30
2.5 Kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanması.....	30
2.5.1 0,05 M fosfat tampon çözeltinin hazırlanışı (PBS, pH 7,4).....	30
2.5.2 0,50 M asetat tampon çözeltinin hazırlanışı (ABS, pH 4,8).....	31
2.5.3 0,02 M Tris / HCl tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 7.0).....	31
2.5.4 0,01 M Tris HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 8.0).	31
2.6 Yapılan Optimizasyonlar.....	31
2.6.1 Elektrot yüzeyinin aktive edilmesi .....	32
2.6.2 Elektrot yüzeyine DNA probunun tutturulmasının guanin yükseltgenme sinyaline bağlı olarak tayini.....	32
2.6.3 Hibridizasyon çalışması .....	33
2.6.4 Hedef diziden tamamen farklı bir dizinin (NC) ve hedef diziden bir bazı farklı olan dizinin (MM) hibritleşmesinin incelenmesi (seçimlilik çalışması) .....	34
2.6.5 Elektrokimyasal impedans spektroskopi deneyleri.....	34
2.6.6 DNA immobilizasyonuna pH etkisinin incelenmesi .....	34
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>35</b>
3.1 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> Probonun Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonunun Guanin Yükseltgenme Sinyaline Bağlı Olarak Tayini ..	35
3.2 <i>Anaplasma Phagocytophilum</i> 'u Temsil Eden Tek Sarmal DNA Probonun Hedef Eşleniği ile Hibridizasyonu İçin Süre ve Derişim Koşullarının Çalışılması .....	36
3.3 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 'a duyarlı DNA Sensörü için Seçimlilik Çalışılması .....	38
3.4 Hedef Dizi Konsantrasyonundaki Değişimin Hibridizasyon Yanıtına Etkisi ..	39
3.5 EIS Çalışması .....	40
3.6 İmmobilizasyona pH ve Çözücü Etkisinin İncelenmesi.....	40
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>42</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>45</b>
<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>46</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>55</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları .....	3
Şekil 1.2 Üçlü elektrot sistemi .....	5
Şekil 1.3 Karbon pasta elektrotunun şematik olarak gösterimi .....	6
Şekil 1.4 Kalem grafit elektrotun şematik gösterimi .....	7
Şekil 1.5 Perde baskılı karbon elektrot .....	8
Şekil 1.6 Üçlü elektrot sisteminin potansiyostata yerleşiminin şematik olarak gösterimi .....	10
Şekil 1.7 Voltametri de kullanılan uyarma sinyalleri .....	11
Şekil 1.8 Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri si için kullanılan uyarma sinyali .....	12
Şekil 1.9 Pik akımlarını ve potansiyellerini gösteren dönüşümlü bir voltamogram.	13
Şekil 1.10 Biyosensörlerin yapısı .....	16
Şekil 1.11 Nükleik asitlerin yapısı .....	20
Şekil 1.12 Pürin ve pirimidin bazlarının DNA ve RNA'daki dizilimi .....	22
Şekil 1.13 Linear bir sistemde sinüzoidal akım yanıtı .....	26
Şekil 1.14 Empedans vektörünün belirtildiği nyquist eğrisi .....	27
Şekil 1.15 Tek zaman sabitli basit denklik devresi .....	27
Şekil 2.1 PGE'nin Hazırlanması .....	32
Şekil 3.1 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 'u temsil eden DNA probunun immobilizasyonu için derişim optimizasyonu (10 dakika sabit sürede)....	35
Şekil 3.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> 'u temsil eden DNA probunun immobilizasyonu için süre optimizasyonu (25 µg/mL sabit derişimde) tayini .....	36
Şekil 3.3 Hibridizasyon öncesi (b) ve sonrası (a) guanin pik akımları [10] .....	37
Şekil 3.4 Hibridizasyon için optimum hedef derişimi tayini .....	37
Şekil 3.5 Optimum hibridizasyon süresi tayini .....	38
Şekil 3.6 Sabit derişimde (40 µg/mL) hedef, bir baz farklı (MM) ve hedeften tamamen farklı (NC) baz dizilimi ile hibritleşme sonrası guanin akımları	39

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1</b> Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması.....	4
<b>Çizelge 1.2</b> Biyosensörlerde analiz edilecek madde ve çevirici kısımları.....	17

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ABS</b>	Asetat Tampon Çözeltisi
<b>CPE</b>	Karbon Pastası Elektrot
<b>DNA</b>	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>DPV</b>	Differansiyel Puls Voltametri
<b>dsDNA</b>	Çift Sarmal DNA
<b>E</b>	Potansiyel
<b>EDTA</b>	Etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu
<b>EIS</b>	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
<b>ISFET</b>	İyon Seçici Alan Etkili Transistör
<b>MM</b>	Yanlış Eşleşen
<b>MOS</b>	Yüzey Etkinliği
<b>NC</b>	Tamamlayıcı Olmayan
<b>PGE</b>	Kalem Grafit Elektrot
<b>PBS</b>	Fosfat Tampon Çözeltisi

## 1. GİRİŞ

Canlı genomunun yapısı ve işlevi hakkında bilgi edinildikçe son yıllarda bu alandaki çalışmalarda artmıştır. Canlıya özgü DNA dizileri ile çalışmalar, DNA dizilerindeki baz dizilimlerinin analizi ile klinik tanımlar, ilaç geliştirme, salgın önleme ve biyomühendislik hız kazanmıştır [1]. Gen teknolojisindeki hızlı ilerlemeler, tıbbi ve biyoteknolojik uygulamalarının yanı sıra büyük uluslararası projelere de konu olmaktadır. Kalıtsal hastalıklar, bulaşıcı hastalıklar, DNA mutasyonları, bir besi ortamındaki bakteri cinsi ve miktar tayinine kadar birçok alanda etkin olarak kullanılan, elektrokimyasal sensörlerin yapılarına enzim, hücre, doku, antikor, nükleik asit vb. biyolojik maddeler eklendiği zaman “biyosensör” adını almaktadır [2].

Bilinen geleneksel yöntemlere alternatif olmak üzere elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (genosensör) kullanımı gündeme gelmiştir. Son 10 yılda biyosensör tasarımında nükleik asitlerden oluşan tanıma yüzeylerinin kullanılması yaygınlaşmış ve Analitik Kimya alanında çip teknolojisine yönelik genosensör tasarımı çalışmaları oldukça hızlanmıştır [3-5]. Bu çalışmalar, gerek Analitik Kimya gerekse diğer bilimlere yeni ve ender boyutlarda özellikler ekleyerek gelecekte hasta başında ve doktor gözetimindeki analizlerde çok önemli rol oynayacaktır [6 - 8]. DNA tanıma yüzeyleri içeren genosensörler, dizisi belli genlerin hibridizasyon tayininde bu dizilere ilişkin kalıtsal ve enfeksiyon hastalıkların tayininde ve bu yüzeyle etkileşime giren analizlenecek maddelerin (kanserojenik maddeler, ilaçlar vs) tayininde kullanılabilir [9 - 11]. Tayinler, DNA bazlarının birinin yükseltgenme sinyalindeki (indikatörsüz yöntem) ya da bu bazlardan en az biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörünün veya intenedate özellikteki bir hibridizasyon indikatörünün yükseltgenme veya indirgenme sinyalindeki değişikliklerden (indikatörlü yöntem) yola çıkarak yapılır [12 -15].

Son yıllarda elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde, herhangi bir indikatör kullanmadan DNA bazlarından biri olan Guanin ve Adenin yükseltgenme sinyallerinden yararlanarak hibridizasyon tayini çalışmaları başlamış ve hızla ilerlemiştir. İndikatörsüz DNA hibridizasyon tayini yöntemi ile bazı enfeksiyon ve

kalıtsal hastalıkların tanısına yönelik çalışmalar yapılmaktadır [16 - 20]. Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörleri, kalıtsal ve enfeksiyon hastalıkların tanısında bilinen rutin analiz yöntemlerine alternatif olarak daha hızlı, ucuz ve kolay bir yöntemdir.

### **1.1 Elektrokimya**

Elektrokimya; elektrik enerjisiyle etkileşim sonucunda maddelerin kimyasal enerjiye, kimyasal enerjisinin de yeniden elektrik enerjisine dönüşümünü inceleyen bilimdir. Elektrokimyasal deneyler genellikle hücre adı verilen kaplarda gerçekleştirilir.

Hücre, elektrokimyasal tepkimelerin oluşması için analizi yapılacak maddeyi içeren bir çözelti, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı bir elektrot sistemi ve bu sistemi okuyan yani çeviren bir sistemden ibarettir.

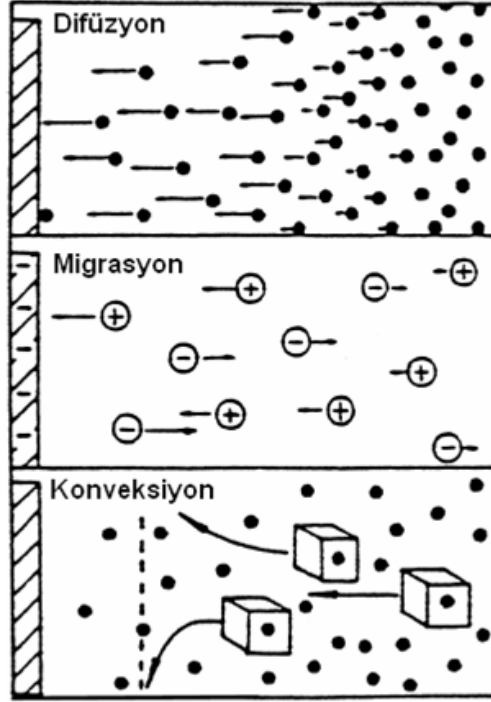
### **1.2 Elektrokimyasal Bir Olayda Kütle Aktarım Yolları**

Elektrokimyasal hücredeki analit üç yolla elektrot yüzeyine aktarılır (Şekil 1.1).

**a) Karıştırma (Konveksiyon):** Tampon çözeltide bulunan indirgen ya da yükseltgen analitin karıştırma, titreşim gibi fiziksel etkilerle elektrot yüzeyine taşınması yöntemidir.

**b) Difüzyon (Derişim farkı ile):** Difüzyon, maddelerin çok yoğun ortamdan az yoğun ortama enerji harcanmadan geçişidir. Hücrelerde bir film ya da zar yardımı ile tampon çözeltideki analitin derişim farkından dolayı elektroda doğru hareket etmesidir. Derişimler eşitlendiğinde difüzyon da durur.

**c) Göç (Migrasyon):** Yüklü molekül ya da atomların elektriksel alan kuvvetinin etkisiyle hareket etmesidir.



Şekil 1.1 Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları

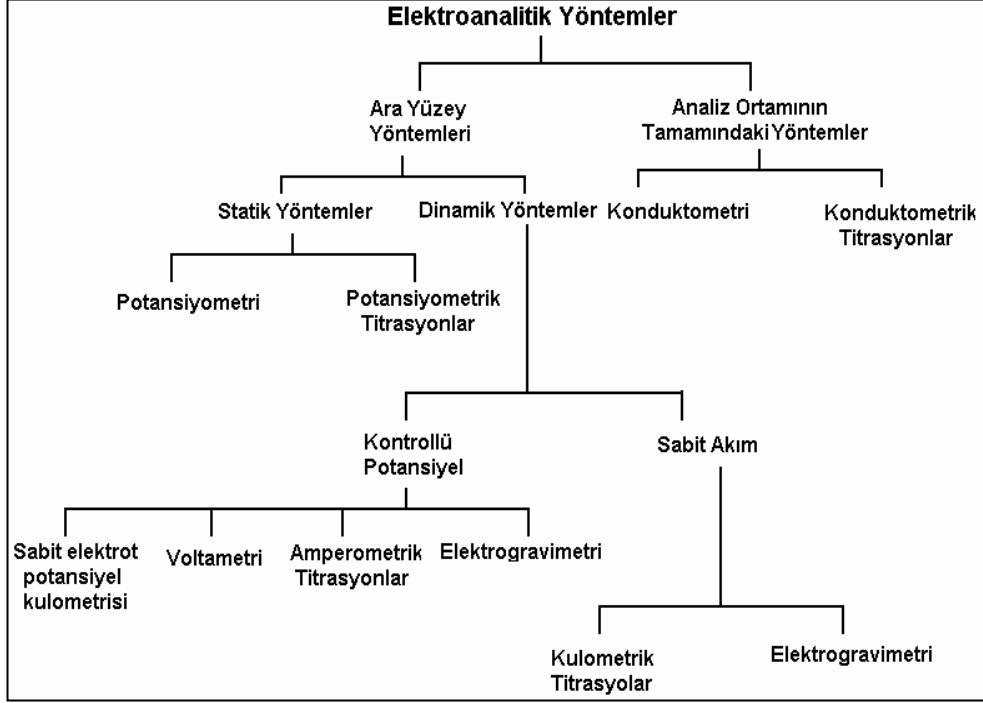
### 1.3 Elektroanalitik Yöntemler

Çok çeşitli elektroanalitik yöntemler önerilmektedir [21]. Bunlardan en yaygın kullanılanlar, Çizelge 1.1’de gösterilmektedir. Bu yöntemler ara yüzeyde gerçekleşen yöntemler ve tüm analiz ortamında gerçekleşen yöntemler olarak ikiye ayrılırlar.

Ara yüzeylerde gerçekleştirilen yöntemlerin daha genel bir kullanım alanı vardır. Ara yüzey yöntemleri, elektrot yüzeyleri ve bu yüzeylere hemen bitişik olan ince çözelti tabakası arasındaki ara yüzeyde oluşan olaylara dayanmaktadır. Tüm analiz ortamı yöntemleri aksine çözeltinin tamamında oluşan olaylara dayalıdır ve ara yüzey etkilerinden kaçınmak için her yola başvurur.

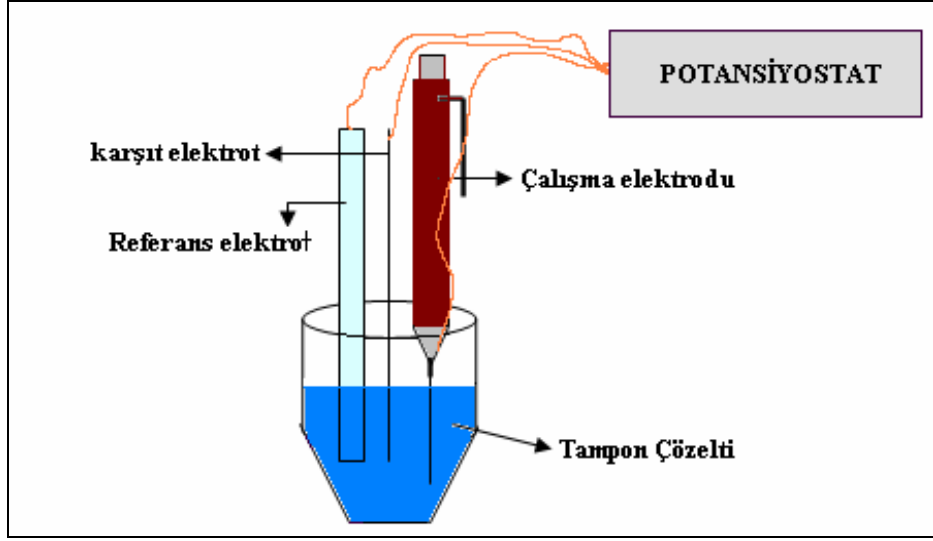
Ara yüzey yöntemleri, elektrokimyasal hücrelerin akım varlığında veya yokluğunda işleyişine göre statik ve dinamik olmak üzere iki ana sınıfa ayrılırlar.

**Çizelge 1.1** Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması



#### 1.4 Voltametri

Çalışma elektrotunun ya da bir indikatörün polarize olmuş bir ortama uygulanan potansiyelin oluşturduğu akımın ölçülmesiyle elde edilen değerden yola çıkılarak, çalışılan analitin incelendiği sisteme verilen isimdir. Voltametri, çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme-indirgenme olaylarının, yüzeylerdeki adsorpsiyon olaylarının ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerindeki elektron aktarım mekanizmalarının temel çalışmalarını kapsayan ve çok başvurulan duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir. Voltametrik analizde kullanılacak hücreler, elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen bir elektrolitin aşırısını içeren çözeltiye daldırılmış üç elektrottan oluşur (Şekil 1.2)



Şekil 1.2 Üçlü elektrot sistemi

Üç elektrottan birisi zamanla potansiyeli değiştirilen çalışma elektrotu veya indikatör elektrotudur. Voltametrde çalışma elektrotu olarak, karbon elektrot (grafit, karbon pasta, camsı karbon, perde baskılı karbon elektrot), cıva, platin, altın, paladyum gibi elektrotların yaygın kullanımları vardır. Elektrot sistemindeki diğer elektrot, potansiyeli deney süresince sabit kalan referans elektrotudur. Referans elektrot genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrotudur. Elektrot sistemindeki üçüncü elektrot ise karşıt veya yardımcı elektrotudur. Karşıt elektrot olarak ise genellikle platin tel kullanılır [21 - 24].

#### 1.4.1 Voltametrik elektrokimyasal analizlerde kullanılan elektrotlar

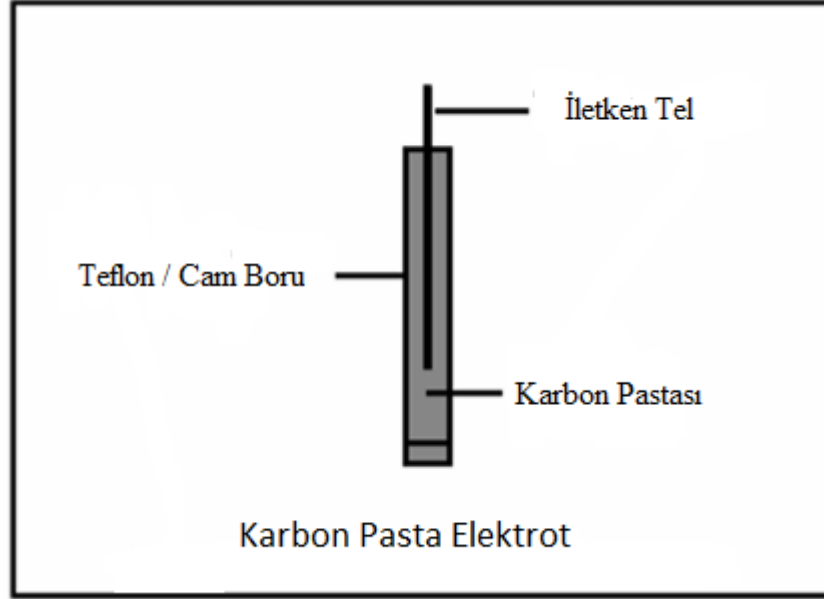
Genellikle üçlü elektrot sistemi kullanılır. Bu sistem çalışma elektrotu, referans elektrotu ve karşıt elektrottan meydana gelir.

##### 1.4.1.1 Çalışma elektrotları (indikatör elektrotlar)

###### a) Karbon pasta elektrot (CPE)

%70 grafit, %30 Nujol (mineral yağ), parafin yağı, silikon yağı ve bir bağlayıcı maddenin homojen olarak karıştırılması ve karışımın 2–4 mm çapındaki cam ya da teflon özellikteki borulara sıkıştırılmasıyla hazırlanır (Şekil 1.3). Pasta bileşimi elektrot aktivitesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Elektriksel iletkenlik, bu borunun 2/3'üne kadar uzatılan iletken bir tel aracılığı ile sağlanmaktadır. Grafit

tozunda bulunan karbon atomları düzlemsel ve aromatik halkalar halinde birbirlerine zayıf  $\pi$  bağı ile bağlanırlar. Bu tabakalar arasında hızlı bir elektron alışverişi olabilmekte ve böylece iletkenlik sağlanmaktadır. Elektron transfer hızı, bağlayıcı organik sıvı oranıyla ters orantılıdır. Ucuz olması, yüzey yenilenme işleminin kolay olması ve düşük artık akımlar oluşturması nedeniyle tercih edilmektedir [25, 26].



Şekil 1.3 Karbon pasta elektrotunun şematik olarak gösterimi

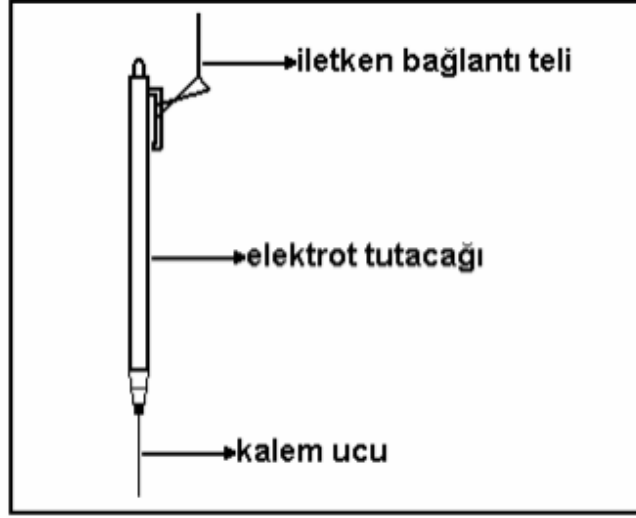
#### b) Camsı karbon elektrot

Camsı karbon elektrot, mikrometre boyutlu grafit tozu partiküllerinin, sert ve yapıştırıcı madde ile inert malzemedan yapılmış elektrot gövdesi içerisine sıkıştırılmasıyla elde edilir. Tekrarlanabilir yüzeyler sağlanır. Kimyasal tepkimelere girmezler. Geniş bir potansiyel aralığında çalışılmasına olanak sağlar. Karbon pasta elektrotlarına göre daha düzgün ve pürüzsüz elektrot yüzeyleri elde edilir. Fiziksel dayanıklılığı daha fazladır [27, 28].

#### c) Kalem grafit elektrot

Çalışmalarda kullanılan kalem grafit elektrot (Şekil 1.4) grafitten oluşmuş olup, Tombo 0,5 mm HB kalem uçlarınının 3 cm'lik eşit iki parçaya kesilmesiyle hazırlanır [27 - 30].

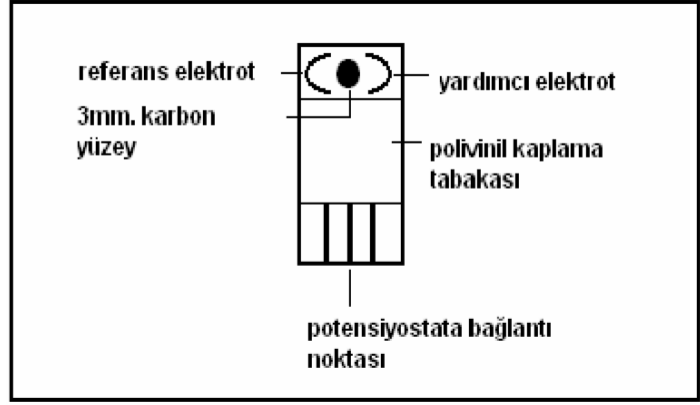
Kalem grafit elektrotlar hem hazırlanma süresi olarak hem de maliyet olarak ekonomiktir. Hazırlanan kalem düzeneği ile seri olarak deneyler yapılabilmektedir. Genel olarak diğer elektrotlarda da olduğu gibi spesifik bir sonuç elde etmek için elektrot yüzeyleri hiçbir madde ve yüzeye etkileşime girmeden kullanılmalıdır. Dikkat edilecek en önemli husus budur.



Şekil 1.4 Kalem grafit elektrotun şematik gösterimi

#### d) Perde baskılı karbon elektrotlar

DNA mikroçip teknolojisinde ve biyosensör sistemlerinde kullanılan, tek kullanımlık olan bu elektrotlar geleceğin elektrotları olarak adlandırılmaktadır. Tek kullanımlık bu elektrotların tekrarlanabilirliğe sahip olması ve 20 - 40  $\mu\text{L}$  gibi çok düşük miktarlarda örnek kullanılması gibi avantajlarının yanında, diğer elektrotlara kıyasla uzun fabrikasyon süresi ve yüksek maliyete sahip olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. [31].



Şekil 1.5 Perde baskılı karbon elektrot

#### e) Cıva elektrotlar

Elektrokimyasal analizde oldukça yaygın kullanılmaktadır. Büyük negatif potansiyel aralıklarında çalışmasına imkân sağlar. Bunun yanında cıva kolayca yükseltgenebilir. Bu özelliğinden dolayı anot olarak kullanılabilirdiği potansiyel aralığı oldukça düşüktür. En büyük üstünlüklerinden bir tanesi her seferinde yeni bir elektrot yüzeyi oluşturabilmesidir. Bunun yanında cıva toksik bir metal olduğu için kullanımı tehlikelidir. Cıva elektrotunun; disk elektrot, asılı cıva damla elektrot, damlayan cıva elektrot, statik cıva damla elektrot gibi çeşitleri vardır [27, 32].

Diğer elektrotlar ise metal elektrotlar, ultramikro elektrotlar, nano elektrotlar karbon fiber elektrotlardır.

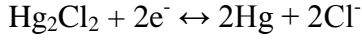
#### 1.4.1.2 Referans elektrotlar

##### a) Standart hidrojen elektrot (SHE)

Elektrokimyasal çalışmalarda ilk olarak kullanılan referans elektrottur. Bir tuz köprüsü aracılığıyla birleştiği yarı-hücreye bağlı olarak anot veya katot olarak davranır. Elektrot anot olduğunda hidrojen, hidrojen iyonlarına yükseltgenir; elektrotun katot olması durumunda ters reaksiyon oluşur. Uygun şartlar altında hidrojen elektrot elektrokimyasal olarak tersinirdir. Geleneksel olarak bu elektrotun potansiyeli tüm sıcaklıklarda sıfır volt olarak kabul edilir. Hidrojen gaz elektrotlar, eskiden beri elektrokimyasal çalışmalarda sadece referans elektrotlar olarak değil, aynı zamanda pH tayinlerinde indikatör elektrotlar olarak da yaygın biçimde kullanılmıştır. Hazırlanması zor bir elektrot olduğundan fazla kullanışlı değildir.

### **b) Kalomel referans elektrot (Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)**

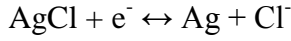
Laboratuvarında hazırlanması kolaydır. Kullanımı bu yüzden yaygındır. Kalomel (Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ve cıvadan (Hg) oluşan bir karışım, potasyum klorür (KCl) ve metalik cıva çözeltisinden oluşur. Elektrotun potansiyeli klorür iyonlarının (Cl<sup>-</sup>) derişimine bağıdır. İçinde doygun potasyum klorür çözeltisi bulunan en yaygın olan, doygun kalomel elektrottur.



Standart Hidrojen elektroduna (SHE) göre potansiyeli 25°C de + 0.244 V olarak bulunmuştur. Diğer kalomel elektrotlara oranla sıcaklık katsayısı daha büyüktür [21, 33, 34].

### **c) Gümüş – gümüş klorür referans elektrot (Ag/AgCl)**

Doygun kalomel referans elektrot gibi kullanımı yaygındır. Kalomel elektrotlara göre daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilir. Gümüş iyonlarının cıva iyonlarına oranla analitlerle daha az tepkimeye girmesi diğer bir avantajıdır.



Gümüş bir telin, elektrolitik yoldan gümüş klorür ile kaplanarak, Cl<sup>-</sup> iyonları içeren çözeltiye temasından oluşur [35].

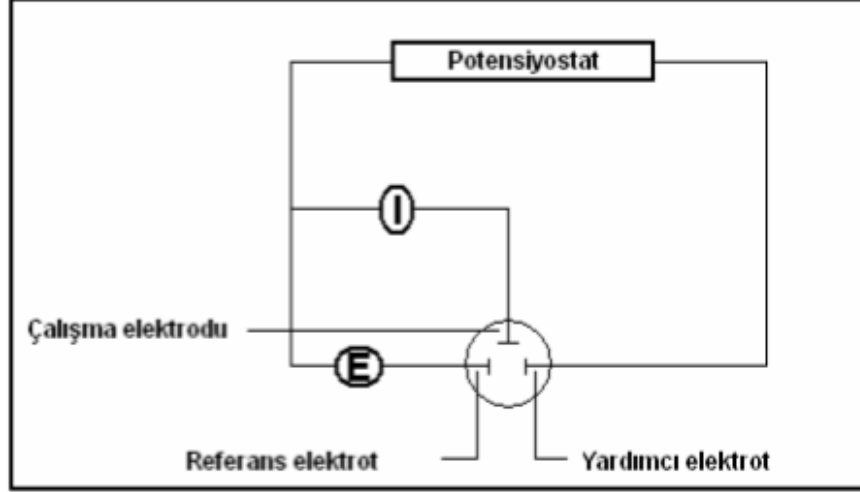
### **d) Cıva – cıva sülfat referans elektrot**

Sülfat iyonlarının aktifliği ile elektrot potansiyeli hesaplanır. Doygun kalomel elektrot ile benzerlik gösterir [21, 35].

#### **1.4.1.3 Yardımcı (karşıt) elektrot**

İkili elektrot sistemindeki polarlanmamış elektrot üzerinden akım geçtiği için, yüksek akımlarda bu elektrotlar polarlanır. Ayrıca eğer çözelti direnci yüksek ise bu direnci yenmek için gerekli olan potansiyel önemli bir düzeye ulaşır. Bu iki nedenle çalışma elektrodunun polarizasyon potansiyelinin algılanmasında hataya düşölür. Bu sorunun çözümü için sistemde üçüncü bir elektrot kullanımına gidilir. Bu elektrotlara Karşıt Elektrot denir.

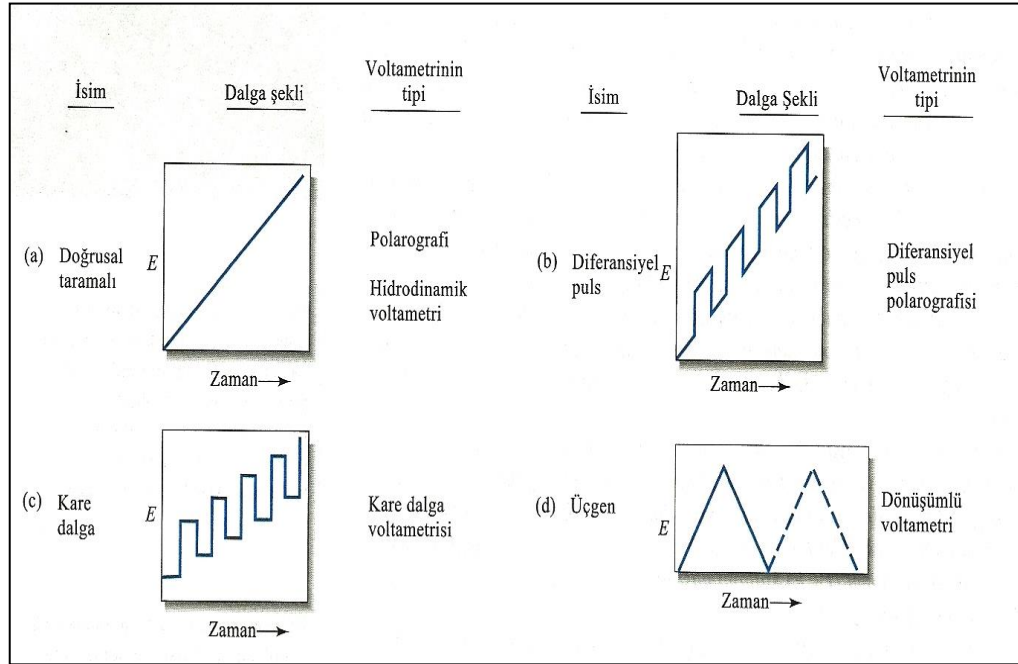
Platin tel ya da civa havuzu yardımcı elektrot olarak sıkça kullanılır. Grafit, tungsten ve tantal ise diğer yardımcı elektrotlardır. Çalışma elektroduna elektron aktaran elektrotur. İstenmeyen akımların da üzerinden geçmesini sağlar [21, 22].



**Şekil 1.6** Üçlü elektrot sisteminin potansiyostata yerleşiminin şematik olarak gösterimi

#### 1.4.2 Voltametrde kullanılan uyarma sinyalleri

Çalışma elektrodunun bulunduğu elektrokimyasal hücreye değiştirilebilen potansiyeller uygulanır. Bu potansiyel çeşitlerine göre de farklı akım sinyalleri alınır. Sıklıkla kullanılan potansiyeller doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve dönüşümlü voltametrdir..



Şekil 1.7 Voltametriye kullanılan uyarma sinyalleri

#### 1.4.2.1 Doğrusal taramalı voltametri

Zamanla doğru akım potansiyelinin doğrusal bir şekilde artırılmasıyla elde edilir. Uygulanan potansiyel sonrasında analit maddeye özgü akım yanıtları uygulanan potansiyelin sonuçları olarak voltamograma yansır. Daha simetrik ve net pik maksimumları elde etmek için yarı dalga potansiyeli farkı en az 0,2 V civarında olmalıdır.

$$\Delta E_{1/2} = \Delta E_{e,1/2} - E'_{c,1/2}$$

Doğrusal taramalı voltametri; çözelti veya elektrodun sürekli hareket içinde olduğu hidrodinamik voltametri ve çalışma elektrodu olarak cıva elektrodunun kullanıldığı polarografi olmak üzere iki çeşittir.

#### 1.4.2.2 Kare dalga voltametri

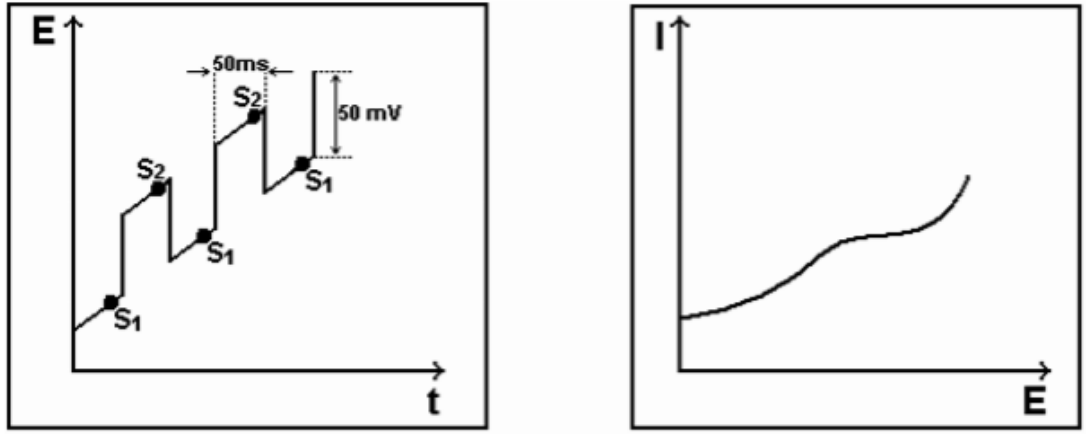
Diğer tekniklere göre daha hızlı ve duyarlı bir tekniktir. 1-2 s içinde voltogram elde edilir. Tayin sınırı  $10^{-7}$  -  $10^{-8}$  mol/L arasındadır. Hızlı ve duyarlılığı yüksek oluşu nedeniyle daha çok yüksek performanslı sıvı kromatografisinde dedektör (HPLC) kullanılır.

Bir sisteme merdiven şeklinde doğrusal gerilim, kare dalga şeklinde değişken bir gerilim yüklenirse, bu gerilimlerin toplamı olan kare dalga uygulanmış olur. Bu tarzda oluşan sistemle gerçekleştirilen elektrometrik yöntemle kare dalga voltametri denir. Değişken bir akımdır ve zamanla değişimi kare dalga şeklindedir [34, 35].

#### 1.4.2.3 Diferansiyel puls voltametri

Diferansiyel puls voltametrisinde (DPV) uyarma sinyalleri periyodik pulslar gönderilerek elde edilir. Uygulanan pulsların belirli bir zaman öncesinde ve sonrasındaki akım farkı  $\Delta i$  ile gösterilir ve doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu olarak belirtilir. Seçimliliği yüksektir.

DPV tekniğinde, doğrusal bir tarama sırasında çalışma elektroduna periyodik pulslar uygulanır. Pulslar uygulamadan önce ve sonra olmak üzere iki kez akım ölçülür. Puls başına elde edilen akımdaki fark uygulanan potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen diferansiyel puls voltamogramı yüksekliği analizi yapılan maddelerin derişimi ile orantılı akım piklerinden oluşmaktadır [2, 36].



Şekil 1.8 Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali

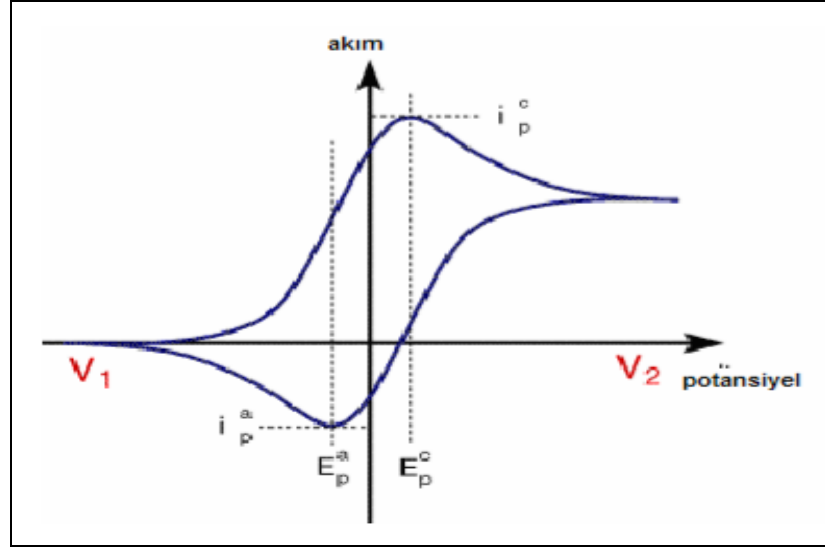
#### 1.4.2.4 Dönüşümlü voltametri (CV)

Bir sistemdeki maddelerin redoks davranışlarının saptanmasında kullanılan bir tekniktir. Miktar tayininde kullanım alanı dardır. Özellikle yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinin aydınlatılmasında kullanılır.

Bu yöntemde, belirlenen bir başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline doru sabit hızda bir gerilim uygulanır. Bu gerilim pozitif ya da negatif yönde uygulanabilir. Daha sonra uygulanan bu gerilim, aynı sabit hızla bitiş potansiyelinden başlangıç potansiyeline doğru tekrar uygulanır. Bu esnada elektroaktif türlerin yükseltgenmesi ve indirgenmesi voltamogramda incelenebilmektedir [27, 37].

Verilen bir deney için bir veya daha fazla analit için yükseltgenme veya indirgenmesinin meydana geldiği potansiyel aralığı, çalışılan potansiyel pencere aralığıdır. Bu aralık “Çevirici Potansiyeller” olarak da tanımlanabilir [22, 37].

Bir dönüşümlü voltamogramın en önemli parametreleri katodik pik potansiyeli  $E_p^c$ , anodik pik potansiyeli  $E_p^a$ , katodik pik akımı  $I_p^c$  ve anodik pik akım  $I_p^a$  dır. Dönüşümlü bir voltamogramda indirgenme ve yükseltgenme arasındaki gerilim farkı  $\Delta E_p$  ile ifade edilir.  $\Delta E_p$  bu değere ne kadar yakın ise, reversible (geri dönüşümlü); ne kadar uzaksa irreversible (geri dönüşümsüz) olarak ifade edilir [38].



**Şekil 1. 9** Pik akımlarını ve potansiyellerini gösteren dönüşümlü bir voltamogram

### 1.4.3 Voltamogramlar

Elektrokimyasal hücrelerde çalışma elektrodundaki maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda akım oluşur. İndirgenme ile oluşan akım katodik akım, yükseltgenme ile oluşan akım ise anodik akımdır. Elektrokimyasal hücreye uygulanan potansiyel ile akım arasındaki çizilen eğriye voltamogram denir. Genellikle doğrusal taramalı voltamogramlar sigmoidal eğriler (S şeklinde)

şeklindedir. Bunlar voltametrik dalga olarak bilinir. Keskin artıştan sonraki sabit akıma sınır akımı  $i_s$  denir.

$$i_s = k.C_A$$

Burada  $C_A$ , analit konsantrasyonu ve  $k$  ise bir sabittir. Kantitatif doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye dayanır. Akım, analizlenecek maddenin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızıyla sınırlıdır. Sınır akımları genellikle analizlenecek madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Çözelti veya elektrodun sürekli hareket halinde olduğu doğrusal taramalı voltametriye hidrodinamik voltametri adı verilir. Damlayan cıva elektrodun kullanıldığı voltametriye polarografi denir. Elektrot sistemine potansiyel uygulandığında kapasitif (faradayik olmayan) akım ve faradayik akım olmak üzere iki çeşit akım oluşur [33, 35].

#### **1.4.3.1 Kapasitif akım ( $i_c$ )**

Bir elektrodun bir elektrolit çözeltisine daldırılması ve negatif yük ile yüklenmesiyle çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin ara yüzeyin iki tarafında birikmesi ile bu bölgede bir elektriksel çift tabaka oluşur. Oluşan bu çift tabaka, bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya indirgenecek madde olmasa dahi bir akım oluşur. Bu akım reaksiyona bağlı değildir; sistemden kaynaklanır ki bu akıma kapasitif akım denir. Ne kadar düşük olursa, o kadar doğru ölçüm yapılır. Kapasitif akım zemin akımının oluşmasına neden olan etkenlerden biridir [21, 39].

#### **1.4.3.2 Faradaik akım ( $i_f$ )**

Elektrokimyasal hücredeki çözelti ve elektrotlar arasında yükseltgenme indirgenme tepkimeleri oluşur. Bu tepkimeleri gerçekleştiren maddelere elektroaktif madde denir. Yükseltgenme - indirgenme tepkimeleri esnasında elektronların aktarımı ile akım iletilir. Elektrottaki tepkimeye giren miktarı geçen akımla orantılıdır.

Genellikle  $10^{-3}$  M ve üstünde kapasitif akım faradayik akımdan küçüktür ve çalışılabilir.  $10^{-4}$  M da kısmen iyi sonuç alınır.  $10^{-5}$  M ve üzerinde kapasitif akım faradayik akımdan çok büyük olacağı için çalışılmaz [21, 22, 35].

Toplam akım ( $i$ )=faradaik akım ( $i_f$ )+kapasitif akım ( $i_c$ ) olduğundan kapasitif akım azalır duyarlılık artar.

#### 1.4.4 Nernst eşitliği

Elektrokimyasal bir analizde elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişimini bulmak için elektrot potansiyellerinin kullanılması Nernst denkleminde göre açıklanabilir. Çözelti ve elektrot arasındaki ara yüzeyden akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme tepkimeler olurken diğesinde indirgenme tepkimesi meydana gelir.

$$E = E^0 + \frac{2,303 RT}{nF} \log \frac{C_0}{C_R} \quad , \quad C_0 + n_e \leftrightarrow C_R$$

$E^0$  = Redoks tepkimesi için standart potansiyel (volt)

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

T = Sıcaklık ( $^{\circ}\text{K}$ )

n = Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

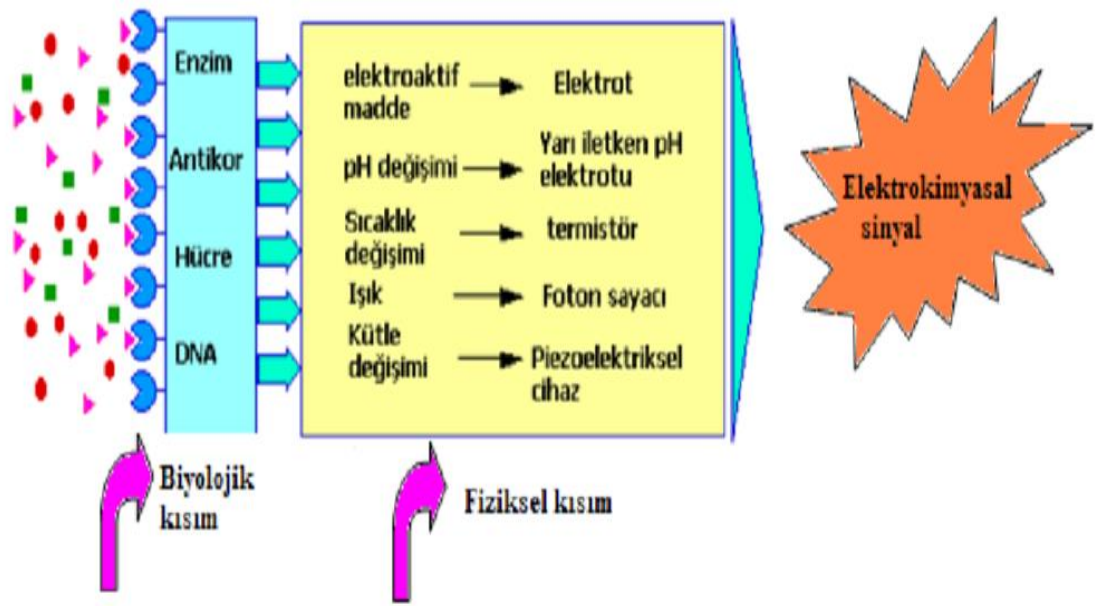
F = Faraday sabiti (96487 kulon)

$E^0$  Standart elektrot potansiyelidir. Standart elektrot potansiyeli söz konusu çifte ilişkin yükseltgen ve indirgen türlerin aktivitelerinin birim aktivitede olduğu durumlardaki elektrot potansiyelidir. Tek başına bir elektrodun mutlak potansiyeli ölçülemediğinden, elektrot potansiyeli (E) ve standart elektrot potansiyeli ( $E^0$ ) ancak bir karşılaştırma sistemi yanında ölçülebilir [34, 36].

#### 1.5 Biyosensörler

Geleceğin teknolojik alt yapısını oluşturan biyosensörler, elektrokimyaya DNA, hücre, doku, antikor, enzim gibi biyolojik maddelerin girmesiyle ortaya çıkmıştır. Biyosensörler, biyokimyasal kısım ve çevirici kısım olmak üzere iki bölümden oluşur. Biyokimyasal kısım analizlenecek maddeyle etkileşime girer ve onu tanır. Çevirici kısım ise tanınan bu etkileşimi ölçülebilir bir sinyale çevirir.

İlk olarak biyosensör çalışmaları Dr. Leland C. Clark tarafından, 1960'lı yıllarda, geliştirdiği glikoz konsantrasyonunu glikoz oksidaz enzimiyle ölçmeye yarayan, karbonhidrat metabolizması ile ilgili hastalıklarda teşhis ve tedavi yönünden önemli olan "enzim elektrodu" ile ortaya çıkmıştır. Günümüzde hala, en sık kullanılan biyosensörler glikoz analizi için kullanılanlardır [40 - 44].



Şekil 1.10 Biyosensörlerin yapısı

### 1.5.1 Biyosensör yapısındaki biyomateryaller ve çevirici sistemleri

Pek çok materyal biyosensör algılayıcı malzemesi olarak kullanılmıştır (Çizelge 1.2). Bu malzemeler metallere, yarı-iletkenlere, iyonik bileşiklerden, moleküler kristallere, polimerlere ve enzim, antikor gibi biyolojik malzemelere kadar çok geniş bir spektrum içermektedir [25, 45].

**Çizelge 1.2** Biyosensörlerde analiz edilecek madde ve çevirici kısımları

<b>Algılama biriminde kullanılabilir materyal</b>	<b>Çevirici Kısım</b>
* Çeşitli enzimler (Enzim sensörleri)	* Elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, voltametrik yöntemlere dayalı ve alan etkili (ISFET, chem FET))
* Antikorlar (İmmunosensörler)	
* DNA (DNA biyo/genosensörleri)	
* Peptidler	
* Bitki-Hayvan hücre veya dokuları (mikrobiyal sensör)	* Optik (Surface plasmon resonance, floresans, yansıma, luminesans, kırma indisi) * Elektriksel [Yüzey etkinliği (MOS), Elektrolit iletkenliği] * Kütle duyarlı (piezoelektrik) (Piezoelektrik kristallerinin rezonans frekansı, yüzey akustik dalgaları) * Manyetik (paramanyetik) * Termal (Reaksiyon ısısı, Adsorpsiyon ısısı)

Biyosensör uygulamaları, medikal, çevresel, halk sağlığı ve gıda güvenliği alanlarını kapsar. Medikal uygulamalar içerisinde, farmasötik ve cihaz üretimi, araştırma gibi alanlar bulunur. Biyosensör bazlı tanı, hastalığın görüntülenmesini ve erken tanı ile beraber gelişmiş tedaviyi sağlayabilir. Çevresel uygulamalarda biyosensörler, atık yok edilmesi gözlemlerinde kullanılır. Gıda sağlığı uygulamaları, gıda üretiminin denetlenmesi, düzenleyici gözlem, gıda zehirlenmesi teşhisidir [43, 46 - 49].

## **1.5.2 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler**

### **1.5.2.1 Seçimlilik**

Yöntemin seçimliliği; analiti örnekte varlığı tespit edilmiş, girişim yapabilen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir. Seçimlilik ideal bir biyosensörün sahip olması gereken en önemli özelliklerden bir tanesidir. Seçimlilik yeterli değilse, bunu sağlamak için yöntem modifikasyonuna gidilebilmektedir [50].

### **1.5.2.2 Kullanım ömrü**

Biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalma biyosensörlerin kullanım ömürlerini kısıtlayan en önemli faktördür. İdeal bir biyosensörün kullanım ömrü uzun olmalıdır. Biyosensör tasarımı için kullanılan cihazın kalibrasyon gereksiniminin mümkün olduğunca az olması istenmektedir [42].

### **1.5.2.3 Tekrarlanabilirlik**

Tekrarlanabilirlik, aynı kişi tarafından aynı şartlarda analizinin kısa bir zaman zarfında belli bir örneğin belli bir yöntem kullanılarak yapılan bir dizi işlemin, kesinliği olarak tanımlanır. Eczacılıkta, kalite kontrol analizi için bağıl standart sapması %1' den daha iyi olan kesinlik kolaylıkla başarılabilirken, biyolojik örnek için %15' den fazla ve diğer konsantrasyon seviyelerinde %10 bağıl standart sapma ile kesinlik sağlanabilir. İdeal bir biyosensör yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olmalıdır. Fakat pratikte bu durum pek mümkün değildir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün uygulamalarının o denli iyi olduğundan söz edilebilir. Dolayısıyla çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir [27, 42].

### **1.5.2.4 Stabilitate (Kararlılık)**

Stabilitate, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. pH, ısı, nem, oksijen derişimi stabiliteyi etkileyen faktörlerdir. İdeal bir biyosensör stabil olmalıdır.

### **1.5.2.5 Duyarlılık**

Duyarlılık, test işleminin derişimindeki küçük değişimleri algılama kapasitesidir. Veya standart çözeltilerden elde edilen sinyallerle çizilen kalibrasyon eğrisinin eğimidir. Biyosensördeki biyolojik materyelin duyarlılığının yüksek olması gerekir.

### **1.5.2.6 Tayin sınırı**

Tayin sınırı, analitin belirli bir güven düzeyinde tayin edilebilecek en düşük derişimidir. Tayin sınırı, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyelin tayin edilecek maddeye afinitesi, elektrot yüzeyine tutturulan madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir. Tasarlanan biyosensörün olabildiğince küçük bir tayin sınırına sahip olması istenir.

### **1.5.2.7 Ölçüm aralığı**

Biyosensörden elde edilen akım – konsantrasyon eğrilerinin doğrusal olması ve doğrusal olduğu derişim aralığının geniş olması istenir.

### **1.5.2.8 Yanıt zamanı**

Akım – zaman eğrilerinden yanıt zamanı hakkında bilgiler edinilebilir. Elde edilen eğrilerde basamakların ekli yayvan ve genişse yanıt zamanı yavaş, tersi söz konusu ise yanıt zamanı hızlıdır. Biyosensörün yanıtının hızlı olması gerekmektedir.

### **1.5.2.9 Geriye dönme zamanı**

Amperometrik çalışmalarda, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceği geriye dönme zamanı olarak ifade edilebilir. İdeal bir biyosensörün geriye dönme zamanı olabildiğince hızlı olmalıdır.

### **1.5.2.10 Basitlik ve ucuzluk**

İdeal bir biyosensörün kullanımı kolay olmalıdır. Tasarımı karmaşık olmamalı, maliyeti mümkün olduğunca düşük olmalıdır.

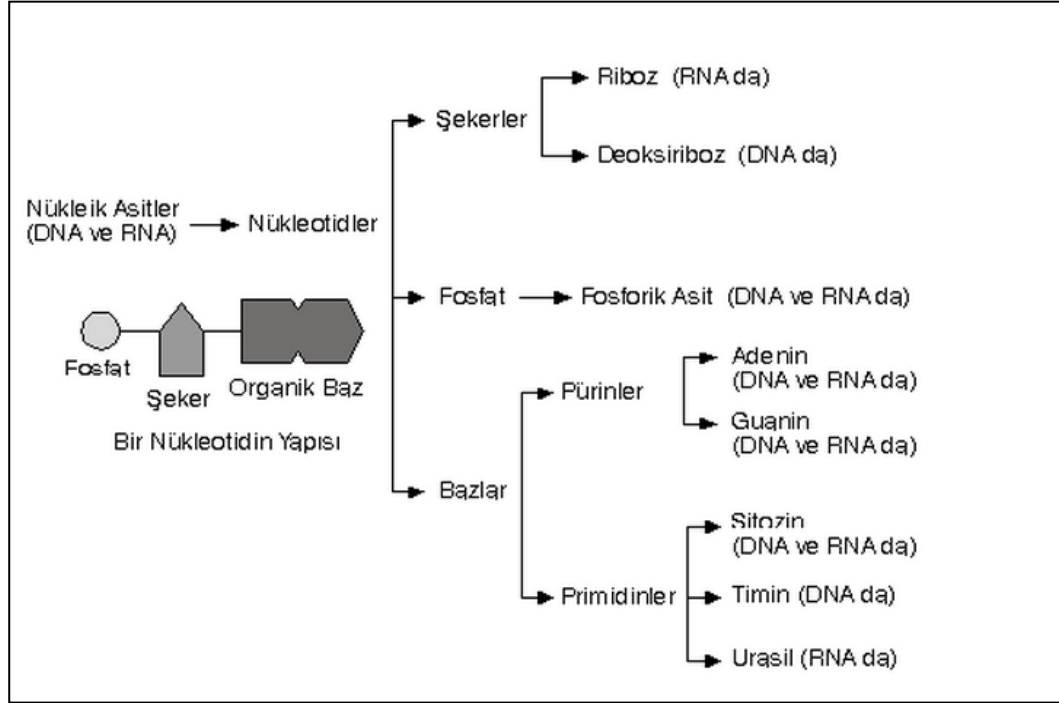
### **1.5.2.11 Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik**

Biyosensör bünyesinde bulunan materyallerin mümkün olduğu kadar küçültülebilmesi, biyosensörün tasarımı açısından önemlidir. Ayrıca bünyesindeki

biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyon açısından önemlidir. İdeal bir biyosensör küçültülebilir ve sterilize edilebilir özelliklere sahip olmalıdır [27].

### 1.5.3 Nükleik asitler

Bütün canlı hücrelerde ve virüsler de bulunan, yönetici bilgileri barındıran, genetik kodların bulunduğu, nesillere aktarılan nükleotitlerden meydana gelmiş polimerleşmiş organik moleküllerdir. DNA (deoksiribonükleik asit) ve RNA (ribonükleik asit) olarak işlevine göre iki çeşittir [51].



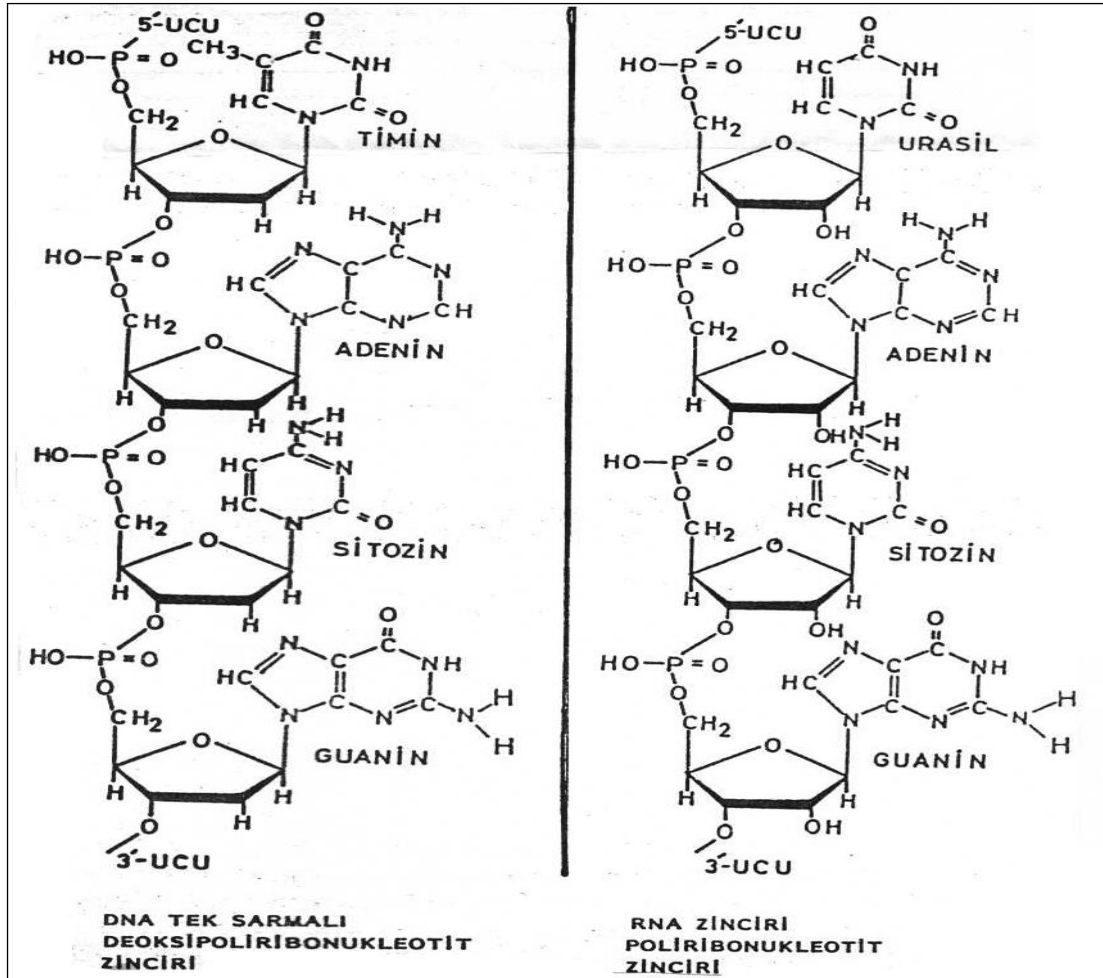
Şekil 1.11 Nükleik asitlerin yapısı

Nükleik asitler nükleotitlerden meydana gelir (Şekil 1.11). Bir nükleotidde şeker gurubu, pürin bazı ya da pirimidin bazı ve fostat gurubu vardır. Yapısındaki şekere ve nükleotidine göre DNA ya da RNA olarak farklılaşırlar.

DNA'nın yapısında deoksiriboz şekeri, RNA'nın yapısında riboz şekeri bulunur. DNA'nın yapısında adenin, timin, sitozin ve guanin bulunur. Yani DNA'daki timin yerine RNA'da urasil bazı girmektedir. DNA hemen hemen her zaman çift sarmal yapıda bulunur. İstisna olarak bazı virüslerdeki DNA tek sarmalıdır. RNA'lar hemen hemen her zaman tek zincir halinde bulunurlar. Nadir hallerde örneğin; tRNA yapısında kısmi çift sarmal yapı meydana getirirler. DNA her zaman kalıtsal özelliği

taşıyan molekül olarak ödev yapmaktadır. RNA'lar çoğu zaman yapısal ödev yapmakta veya protein sentezinde genetik bilginin DNA'dan proteine aktarılmasında aracı rolü taşıyan bir molekül olarak hareket etmektedir. DNA' larda adeninin sayısı timine, guaninin sayısı ise sitozone eşittir(Şekil 1.12). RNA' daki bazlar arasında böyle bir oran söz konusu değildir [51 - 53].

Deoksiribonukleotitlerin polimerize olmasıyla DNA ve ribonukleotitlerin polimerize olmasıyla da RNA meydana gelmektedir. Bir nukleotitteki şekerin 5' – karbonuna bağlı fosfat grubunun hidroksili ile diğer nukleotitteki şekerin 3' – hidroksil grubu arasında bir fosfodiester bağı oluşur. Böylece bir şeker ile bir fosfatın tekrarlı bir şekilde devam etmesi ve arada fosfodiester bağının bulunması ile nukleik asitlerin ana omurgası meydana gelmektedir. DNA ve RNA arasında bir şeker ve baz farklılığı bir yana bırakılacak olursa her iki molekülün bir çok özellikleri birbirine benzemektedir. Gerek DNA da gerekse RNA'da nukleotitler fosfodiester bağı ile birbirine bağlanarak polinukleotitler meydana gelmektedir [53].



Şekil 1.12 Pürin ve pirimidin bazlarının DNA ve RNA'daki dizilimi

#### 1.5.4 DNA biyosensörleri

Analiz edilecek maddeyi tanıyacak sensör olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlerdir. Dizisi bilinen DNA biyosensörlerinin hibridizasyon olaylarının incelenmesine bağlıdır. Genetiksel ya da bulaşıcı hastalıkların tayininde, DNA da meydana gelen mutasyon analizlerinde, DNA'yı hedefleyen ilaçların etkinliklerinin ölçümünde, DNA'ya karışmış toksit maddelerin tayininde, genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO) tayini gibi birçok moleküler biyoloji, biyoteknoloji alanına ışık tutmakta ve geleceğe yön vermektedir [42, 43, 54 - 56].

Hem maliyet açısından hem de süre olarak geniş kapsamlı genetik testlere göre ekonomik ve güvenilirdir. DNA hibridizasyonuna bağlı olarak gerçekleştirilir. Özellikle son 10 yıl içerisinde bu alandaki çalışmalar hız kazanmıştır. Günümüze

kadar yapılmış DNA biyosensörü çalışmalarında yer alan algılama metodları temel olarak 5 grupta toplanabilir:

1. İşaretli sentetik hedef dizi kullanımı
2. İşaretli sinyal probu varlığında sandviç hibridizasyon tekniği kullanımı
3. Mediyatör/interkalatör maddenin tek sarmal ve çift sarmal DNA'ya olan farklı ilgisi üzerinden
4. Mevcut yüzey özelliklerinin değişmesi üzerinden
5. DNA bazlarının elektroaktiflik özelliklerinin kullanımı [33, 34, 42, 43].

Çalışmaya, ilk olarak bakteri, virüs veya insan DNA'sında, aranılan özelliğe ait ve genom çalışmalarıyla dizisi belirlenmiş kısa bir DNA parçasının (oligonükleotit) hibridizasyon için gerekli ilk zinciri oluşturması için seçilmesi (bu zincire prob adı verilmektedir) ile başlanır. Örneklerden çeşitli yöntemlerle izole edilen ve polimeraz zincir reaksiyonuyla çoğaltılan çift sarmal DNA, yüksek ısı uygulanması gibi çeşitli yöntemlerle tek sarmal DNA haline getirilir (denatürasyon). Bu şekilde tek sarmal hale getirilen hedef zincir ile prob, eğer birbirlerinin tam karşılığı olan baz dizilimi içeriyorsa birleşerek çift sarmal oluşturmaktadırlar. Oluşan çift sarmal DNA'ya hibrit, olaya ise hibridizasyon denilmektedir [33, 34, 51, 53].

Özetlenecek olursa, DNA'ya özgü en az iki prob dizisi belirlenir. Bu problemlerin derişim optimizasyonu sağlanır. Uygun derişim altında en yüksek elektriksel sinyal almak hedeflenir. Probonun tek sarmal oligonükleotid olması süreci daha da kolaylaştırır. Daha sonra probun eşleniği olan hedef ile hibridizasyonu sürecidir. Daha sonra bir nükleotidi değiştirilmiş dizi ile hibridizasyonu yapılır. Son olarak hiçbir nükleotidi eşleşmeyen bir dizi ile hibridizasyonu ölçülerek sürece yön verilir.

Tipik bir elektrokimyasal DNA biyosensörünün üç aşamada tasarımı yapılır:

- 1- Prob tutturulması (immobilizasyon)
- 2- Hedef dizi ile hibridizasyon
- 3- İşaretlemeye dayalı veya işaretlemesiz tekniklerin kullanımıyla tayinin yapılması.

**Oligonükleotid:** Birden fazla baz yan yana geldiğinde oligonükleotidleri oluşturur. Dinükleotidler; İki bazın yanyana gelmesiyle, Trinükleotidler; üç bazın yanyana gelmesiyle oluşur. Tekrarlayan oligonükleotidler: Polinükleotid yapısı içinde tekrarlayan tek, tekrarlayan iki veya üç bazı ifade eder. Örneğin, poly (A), dinükleotid'e poly (AT), trinükleotid'e poly (GAT) örnek verilebilir.

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

**Prob:** Baz dizisi belirli olan ve genellikle hibridizasyonun tanısı için sentezlenen oligonükleotid.

**Hedef dizi (Target) :** Prob dizisinin karşılığını içeren sentetik oligonükleotid, klonlanmış DNA parçası, PCR'ı yapılmış ürün veya tüm DNA'yı ifade eder.

**Yanlış eşleşen dizi (Mismatch) :** Bir veya birden fazla bazı hedef diziden farklı olan ve dolayısıyla yanlış eşleşen oligonükleotid, klon veya PCR ürünü.

**Rastgele dizi (Non complementary) :** Hedef diziden tamamen farklı baz dizilimine sahip diziyi içeren oligonükleotid klon veya PCR ürünü [51, 53].

### 1.5.5 DNA biyosensörlerinde prob tutturma yöntemleri

#### 1.5.5.1 Adsorbsiyon yoluyla

Belirlenmiş kısa DNA dizisi (prob) içeren analit çözeltinin elektrodta teması ile yüzeye tutunmasıdır (immobilizasyon). En basit yöntemdir. Biyosensör hazırlama süresi kısadır ve maliyeti düşük olduğu için ekonomiktir [45].

#### 1.5.5.2 Elektrostatik yolla Tutturulması

Elektrot yüzeyine pozitif potansiyel uygulanarak, eksi yüklü olan fosfat omurgalı DNA'nın elektriksel çekim ile elektrot yüzeyine paralel olarak tutunması sağlanır [57, 58].

#### 1.5.5.3 Kovalent bağlanma ile prob tutturulması

DNA dizilerinin elektrot yüzeyine kovalent olarak tutturulmasında karbodiimit ve silan kimyası kullanılmaktadır. Karbon elektrot yüzeyine kovalent yolla prob bağlanması, kovalent bağlama kimyasalları ile yapılan veya elektrot ön hazırlık

işleminde sonra kovalent ajanlarla yüzeye amino grubu işaretli probun güçlü bir şekilde bağlanması ile yapılır [34, 59].

### **1.6 Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)**

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi farklı araştırma alanlarında geniş ölçüde kullanılan değerli bir tekniktir. Metot, potansiyel ya da akımın küçük bir uyarmanın uygulanmasını içerir. Bu uyarma tekli bir sinüs dalgası veya üst üste eklenmiş farklı frekanslardaki çok sayıda sinüs dalgasıdır. Uygulanan uyarıdan ve bunun ölçülmüş yanıtından, empedansın büyüklüğü ve faz kayması belirlenir. Bu teknik spektroskopi olarak adlandırıldığından, parametreler uygulanan uyarma frekansının bir fonksiyonu olarak ölçülür [60].

Elektriksel direnç; bir devre elemanının, elektriksel akım döngüsüne karşı direnme yeteneğidir. Direnç, potansiyel (E) ve akım (I) arasındaki orantıya dayanarak Ohm kuralları tarafından belirlenir. Buradan yola çıkılarak oldukça iyi bilinen aşağıdaki bağıntı yazılabilir;

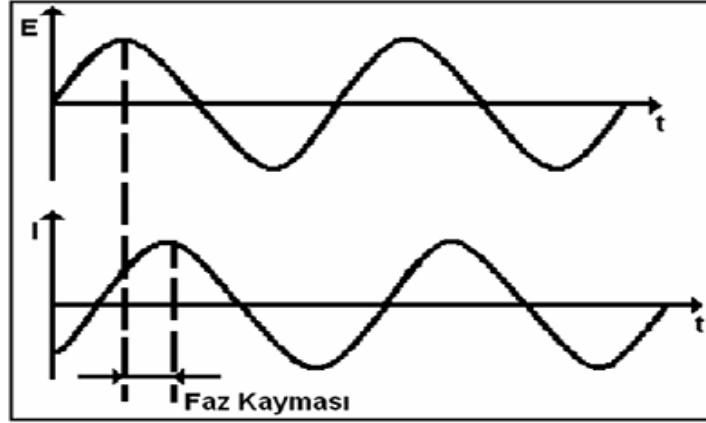
$$R(\text{Ohm})=E(\text{Volt})/I(\text{Amper})$$

Ancak bu bağıntının kullanımı ideal rezistör olarak adlandırılan sadece bir devre elemanı ile sınırlandırılır. İdeal bir rezistör birtakım sadeleştirici özellikler (Ohm Kanunları) tarafından sınırlandırılmıştır. Bunlar; tüm akım ve potansiyel düzeylerinde Ohm kurallarına bağlı kalır, rezistansı, frekanstan bağımsızdır ve bir rezistöre bağlı AC akım ve voltaj sinyalleri birbirleriyle eş evrelidir.

Gerçek hayatta devre elemanları çok daha kompleks davranışlar sergilerler. Bu elemanlar bizi rezistansın basit konseptini terk etmek durumunda bırakırlar. İşte bu noktada rezistans yerine daha genel bir devre parametresi olan empedans kullanılmaktadır. Empedanstaki rezistans gibi bir devre elemanının, elektriksel akım deverenine karşı direnç gösterme yeteneğinin ölçüsüdür. Rezistanstan farklı olarak birtakım sadeleştirici özellikler tarafından sınırlandırılmamaktadır.

Elektrokimyasal empedans genellikle elektrokimyasal hücreye bir AC potansiyelin uygulanmasıyla ölçülür. Bu işlemde hücre içerisindeki akım ölçülmektedir. Bir sinüzoidal potansiyel sarsımı uygulanır ve bu potansiyele karşı alınan yanıt uyarma frekansıyla bunun oranlarını içeren bir AC akım sinyalidir. Bu akım sinyali,

sinüzoidal fonksiyonların bir toplamı olarak analiz edilebilir. Elektrokimyasal empedans normalde küçük bir uyarma sinyali kullanılarak ölçülür. Bunun nedeni lineer bir hücre yanıtı elde etmektir ve sistemden elde edilen hücre yanıtı psödo-lineerdir. Lineer bir sistemde bir sinüzoidal potansiyele karşılık olan akım yanıtı, aynı frekansta bir sinüzoid olacaktır ancak bir faz kayması meydana gelecektir.



**Şekil 1.13** Linear bir sistemde sinüzoidal akım yanıtı

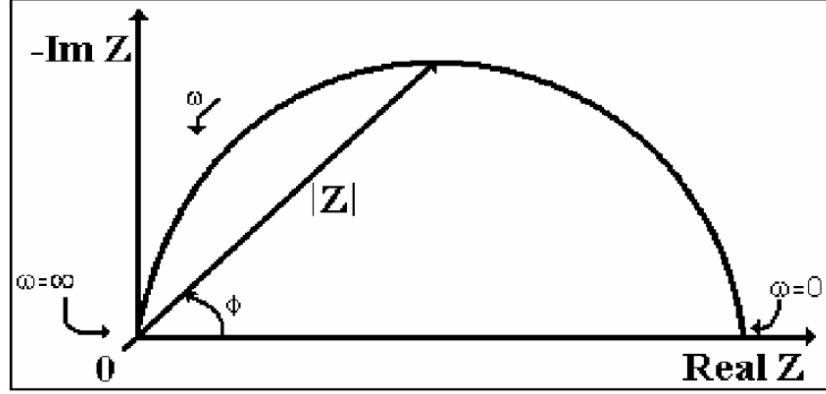
Ohm kanuna paralel olan bir ifade sistem empedansının şu şekilde hesaplanmasına olanak sağlar;

$$Z = E_{(t)} / I_{(t)}$$

Burada; Z empedans değeri, E(t) küçük uyarma sinyali (zamanın bir fonksiyonu olarak), I(t) yanıt sinyali (zamanın bir fonksiyonu olarak) olarak ifade edilmektedir.

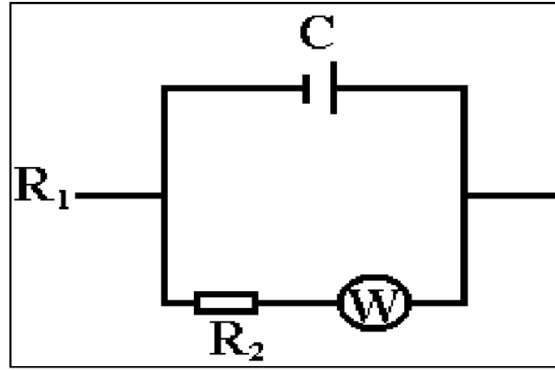
Çalışmalarımızda kullanılan empedans diyagramı bir gerçek bir de hayali kısımdan oluşmaktadır. X ekseninde gerçek, y ekseninde ise hayali kısmın yer aldığı ve sinyal yanıtlarının bu şekilde çizildiği diyagramlardan bir Nyquist eğrisi elde edilmektedir. Bu diyagramda y ekseninin negatif olduğu ve Nyquist eğrisindeki her bir noktanın farklı bir frekanstaki empedans değeri olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Nyquist eğrisinde empedans mesafenin (uzunluğun) bir vektörü olarak sunulabilir IZI. Bu vektör ile x eksenini arasındaki açı frekansı (f-Hertz) verir. Nyquist eğrilerinde diyagram üzerindeki veri noktalarına bakıldığında, o noktayı kaydetmek için hangi frekans değerinin kullanıldığı konusunda bir şey söylemek mümkün değildir. Ölçüm

sonucunda elde edilen sinyale ait sayısal analiz uydurma ve simülasyon seçeneği kullanılarak okunabilir değerler elde edilir.



**Şekil 1.14** Empedans vektörünün belirtildiği nyquist eğrisi

Şekil 1.14’de yer alan Nyquist eğrisi Şekil 1.15’de gösterilen elektriksel devreden çıkartılır. Yarım daire tek bir zaman sabitinin karakteristiğidir. Elektrokimyasal empedans çizimleri birkaç tane zaman sabiti içerirler ve buna bağlı olarak oluşan yarım dairelerden yalnızca bir parçası diyagram üzerinde görülebilir.



**Şekil 1.15** Tek zaman sabitli basit denklik devresi

Bir EIS spektrumunun ölçülmesi genellikle çok uzun zaman alır. Ölçülmekte olan sistem, EIS spektrumunun ölçülmesi için gereken süre boyunca sabit bir konumda olmalıdır. Pratikte sabit bir konum yakalamak zordur çünkü çözeltideki safsızlıkların adsorbsiyonuyla, oksit tabakanın oluşumuyla, çözeltide reaksiyona bağlı ürünlerin oluşumuyla, yüzey kaplamasının aşınmasıyla, ısı değişiklikleriyle ve benzeri bir takım nedenlerle elektrokimyasal hücrede değişiklikler meydana gelebilir. Standart EIS analiz cihazları sabit konumlu olmayan bir sistem için oldukça hatalı sonuçlar

verebilir. Bu metotta elde edilen veriler farklı alanlarda sunulabilir. EIS’de bu alanlardan zaman ve frekans alanları olmak üzere ikisi kullanılmaktadır. Zaman alanında sinyaller zamana karşı genlik sinyali olarak sunulur. Diğerinde ise veri frekansa karşı akım alanı olarak gösterilir [2, 61].

### **1.7 Çalışmanın Amacı**

Biyosensörler, optik (fiber optik aygıtlar), elektro-optik (akustik dalga), akustik-kütle veya elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik) modlarda geliştirilebilmektedir. Elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin diğer sistemlere göre basit, ekonomik, kolay kullanıma sahip ve birçok yeni türün analizi için ümit verici olması bu sensör sistemlerine olan ilgiyi artırmıştır. Sağlanan bilimsel ve teknik ilerlemeler, elektrokimyasal biyosensör teknolojisinde önemli gelişmelere yol açarak bu sensörlerin birçok alanda yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur. Amonyak, glikoz, DNA, üre ve kreatinin gibi biyosensörler, çevre ve biyolojik örneklerde rutin olarak kullanılan biyosensörlere örnek olarak verilebilir.

Bu bilgiler ışığında araştırmanın amacı, geniş bir konakçı grubunda bulunan ve yaşadığı konakçılarda özellikle de insanlarda ciddi enfeksiyonlar meydana getiren *A. phagocytophilum* ‘un seçimli DNA hibridizasyonunun voltametrik yöntemle tayin edildiği tek kullanımlık elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirilmesine yöneliktir. Söz konusu biyosensör tasarımıyla, inozin modifiye (guanin içermeyen) probun kalem grafit elektroda (PGE) immobilize edilmesi ve diferansiyel puls voltametri (DPV) ile guanin yükseltgenme sinyalinin ölçülerek, dubleks oluşumunun sağlanması ve *A. phagocytophilum* seçimli DNA hibridizasyonunun tayini yapılacaktır..

*A. phagocytophilum* temsil eden prob dizisi, aktive edilmiş kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyine yaş adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilecek ve daha sonra prob ve hedefi arasındaki hibridizasyonun varlığı 1000 mV’da gözlenen guanin yükseltgenme sinyali ile tespit edilecektir. Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan bu elektrokimyasal PGE-DNA biyosensörü, kalıtsal ve enfeksiyon hastalıklarının tanısında bilinen rutin analiz yöntemlerine göre alternatif olarak daha hızlı, ucuz ve kolay bir yöntem olacaktır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1 Kullanılan Cihazlar

Ölçümler ve deneyler sırasında kullanılan tüm cihaz, donanım ve yazılımlar şunlardır;

- Duyarlı Terazi (Presica XB 220A)
- Ses titreşimli temizleyici (Bandelin Sonorex)
- pH-metre (WTW Inolab pH 720)
- Manyetik karıştırıcı ( Elektro-mag ve ARE 2-Velp )
- Potansiyostat;  $\mu$ -AUTOLAB type III (GPES ve FRA Modülleri – Eco Chemie, Hollanda)
- Ag/AgCl referans elektrot
- Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı)
- Manyetik karıştırıcı (AGE Velp)

### 2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck)
- Di potasyum mono hidrojen fosfat ( $K_2HPO_4$ ) (Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ ) (Merck)
- Tris hidroklorik asit (Trizma-HCl) (Sigma)
- Sodyum klorür (NaCl) (Sigma)
- tri – Sodyum sitrat dihidrat (Merck)
- EDTA (Merck)
- Asetik Asit %100 (Merck)
- Trizma Hidroklorür (Sigma)

Tüm çalışmalarda Mili Q distile su (18 Mega – ohm'luk) ve analitik saflıkta kimyasal reaktifler kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında ( $25,0 \pm 0,5$ ) °C' de gerçekleştirildi.

### 2.3 Kullanılan DNA Dizileri

Çalışmada kullanılan *Anaplasma phagocytophilum*'a ait tüm sentetik diziler liyofilize toz halinde Gürbüz Medikal - Sivas'tan sağlandı.

Prop	NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	5'-TGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCC -3'
I-Prop	NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	5'-TIACIIITACCTACAIAAIAAITCCC -3'

Hedef	5'-GGGACTTCTTCTGTAGGTACCGTCA-3'
MM	5'-GGGACTTCTTCT <u>A</u> TAGGTACCGTCA-3'
NC	5'-TTCGGCAAGCGGTCGTTCCGAAAAG-3'

### 2.4 Kullanılan Sentetik Probtan ve Hedef Dizilerden Stok Çözeltinin Hazırlanışı

Liyofilize DNA oligonükleotidlerin stok çözeltileri, derişimleri 1000 µg/mL olacak şekilde 10 mmol/L Tris-HCl ve 1 mmol/L EDTA içeren TrisEDTA (TE) tampon çözeltisi (voltametik teknik için pH 8,0, impedimetrik teknik için pH 7,4) ile hazırlandı. 1000 µg/mL derişimine sahip stok DNA çözeltileri, -20 °C'de sterilize DNA tüpleri içinde stok olarak saklanmıştır.

Problar asetik asit tampon çözeltisinde (ABS pH 4,8), hedefler ise fosfat tampon çözeltisinde (PBS pH 7,4) seyreltilerek çalışılmıştır.

### 2.5 Kullanılan tampon çözeltilerin hazırlanması

#### 2.5.1 0,05 M fosfat tampon çözeltinin hazırlanışı (PBS, pH 7,4)

Ölçümler sırasında kullanılan 0,05 M fosfat tampon çözeltisi litresinde 1,36 g (0,01 mol) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 6,96 g (0,04 mol) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> içermektedir. Hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 7,4 olmaktadır. Gerekli olduğu yerde pH, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle pH metre ile 7,4'e ayarlandı.

### **2.5.2 0,50 M asetat tampon çözeltinin hazırlanışı (ABS, pH 4,8)**

Kullanılan 0,50 M asetat tampon çözeltisi litresinde 0,2722 g (0,002 mol) sodyum asetat trihidrat ve 0,1154 mL asetik asit içermektedir. Çözeltinin pH'sının 4,8 değerine ayarlanması, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirildi.

### **2.5.3 0,02 M Tris / HCl tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 7.0)**

Kullanılan 0,02 M Tris HCl tampon çözeltisi litresinde 3,152 g Tris HCl içermektedir. Çözeltinin pH'sının 7,0 değerine ayarlanması, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

### **2.5.4 0,01 M Tris HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 8.0)**

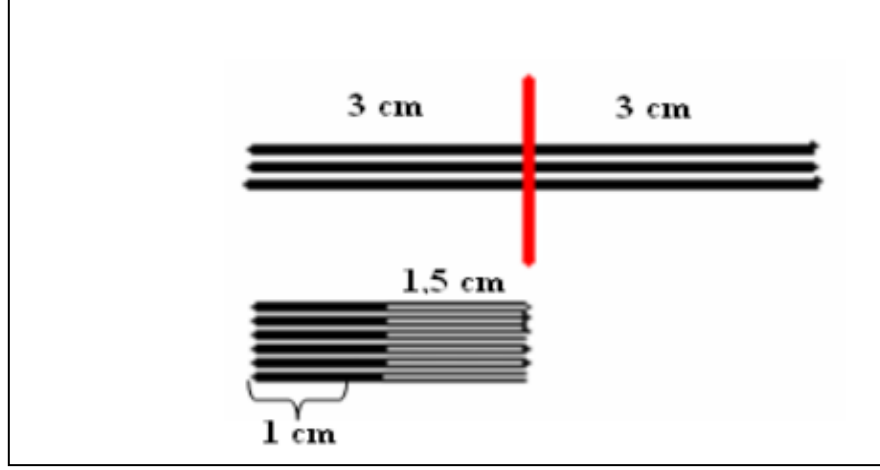
Kullanılan 0.01 M Tris HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisi litresinde 1,576 g Trizma HCl ve 0,372 g EDTA içermektedir. Çözeltinin pH'sının 8,0 değerine ayarlanması, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirilir.

## **2.6 Yapılan Optimizasyonlar**

Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) tekniği kullanılarak elektrokimyasal yoldan saptanmıştır.

- Elektrot yüzeyinin aktive edilmesi, 1 dakika
- Elektrot yüzeyine optimum derişimdeki probun adsorbe olduğu derişimin bulunması, 25 µg/mL
- Prob adsorbasyon optimum süre çalışması, 6 dakika
- Hibridizasyon için uygun hedef derişimi, 40 µg/mL
- Hedef ile hibridizasyon süresi, 10 dakika
- NC ve MM ile yapılan ölçümler, (hedef ile eşit derişimde ve sürede)
- Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Deneyleri (Empedimetrik Ölçüm)
- ABS ve PBS tampon çözeltilerinin pH'sı değiştirilerek yapılan çalışmalar

Çalışmada kullanılan kalem ucu elektrot, Tombo marka kalem uçlarının 3 cm boyunda kesilmesiyle hazırlandı. Kesilen kısmın 1,5 cm'si kalem içerisinde kalacak şekilde yerleştirildi.



Şekil 2.1 PGE'nin Hazırlanması

### 2.6.1 Elektrot yüzeyinin aktive edilmesi

Kalem grafit elektrotlar 6cm olan Tombo hb kalem uçlarının steril bir ortamda 3'er cm'lik olarak kesilmesi ile kullanıma hazır hale getirildi. 1cm'si tampon çözeltide olacak şekilde üçlü elektrot sistemine yerleştirildi. Elektrot yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH 4,8) potansiyostat cihazı [ $\mu$ -AUTOLAB III (Eco Chemie, Hollanda)] kullanılarak +1,40 V gerilim 60 saniye süreyle aktive edildi. Çalışmanın her aşamasında bu yöntem tekrarlandı.

### 2.6.2 Elektrot yüzeyine DNA probunun tutturulmasının guanin yükseltgenme sinyaline bağlı olarak tayini

**PGE'nin aktif edilmesi:** PGE yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH 4,8) +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**PGE yüzeyine *Anaplasma* probunun immobilizasyonu tayini:** 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olan stok *Anaplasma* prob çözeltisinden ABS ile seyreltme yapılarak 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 35  $\mu\text{g}/\text{mL}$  olacak şekilde deney çözeltileri hazırlanmıştır. 10 dakika sabit sürede dsDNA aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilizasyonu sağlanmıştır. PGE'ler, farklı derişimlerde hazırlanan DNA prob çözeltilerinde 10 dakika bekletildi.

Anaplasma probunun optimum immobilizasyon süresi sabit derişimde farklı zamanlarda PGE yüzeyine adsorbsiyon çalışıldı. Anaplasma dsDNA probunun aktive edilmiş PGE yüzeyine adsorbe olduğu en uygun sürenin belirlenmesi için PGE'ler 25 µg/mL sabit derişimde hazırlanan prob çözeltilerinde farklı zamanlarda (2-3-4-5-6-8-10 dk) bekletildi ve optimum süre tayin edildi.

**Yıkama:** Ölçme işleminden önce 10 saniye süre ile ABS tamponu ile yıkandı ve bu işlem her ölçüm öncesi tekrar edildi.

**Ölçüm:** ABS (pH=4,8) ile dolu elektrostatik hücre içerisinde, +0,75 V ile + 1,40 V arasında 15 mV/s tarama hızıyla 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak ölçüm alındı. Her bir derişim için ölçümler en az dört kez tekrarlandı. Guanin yükseltgenme sinyalleri incelendi.

### 2.6.3 Hibridizasyon çalışması

**PGE'nin aktif edilmesi:** PGE yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH 4,8) +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**PGE yüzeyine prob immobilizasyonu:** 25 µg/mL inozinli prob 6 dakika Anaplasma DNA çözeltisinde bekletilerek aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilize edildi.

**Hibridizasyon:** Tris-EDTA tamponu ile hazırlanan 1000 µg/mL'lik stok hedef çözeltisinden 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 ve 45 µg/mL olacak şekilde PBS ile seyreltilen deney çözeltileri hazırlandı. PGE yüzeylerine inozinli prob tutturulmuş elektrotlar ile hedef dizinler 10 dakika sabit sürede hibritleşmeye tabi tutuldu.

Hibritleşmenin en uygun derişimi 40 µg/mL olarak bulunduktan sonra optimum süre çalışması için farklı hibritleşme (2, 4, 6, 8, 10, 12 ve 14 dakika) süreleri çalışıldı.

**Yıkama:** Hibritleşme sonrasında PGE'ler 10 saniye süre ile PBS tamponu içerisinde yıkandı ve bu işlem her ölçüm öncesi tekrar edildi.

**Ölçüm:** +0,75 V ile + 1,40 V arasında 50 mV/s tarama hızıyla tarama yapılarak ölçüm alındı. Guanin yükseltgenme sinyalleri üzerinden ölçüm alındı. Her bir derişim için ölçümler en az dört kez tekrarlandı (ABS pH 4,8)

#### **2.6.4 Hedef diziden tamamen farklı bir dizinin (NC) ve hedef diziden bir bazı farklı olan dizinin (MM) hibritleşmesinin incelenmesi (seçimlilik çalışması)**

**PGE'nin aktive edilmesi:** PGE yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH 4,8) +1,40 V uygulanarak 60 saniye süreyle karışmayan ortamda aktive edildi.

**Hibridizasyon:** Hedef dizin ile aynı sürede ve eşit derişimdeki, hedef baz diziliminden bir bazı farklı olan (uyumlu olmayan) ve hedef baz diziliminden tamamen farklı sıralamaya sahip bir baz (tamamlayıcı olmayan) dizisi ile prob immobilize edilmiş PGE'lerin hibritleşmesi sağlandı.

**Yıkama:** Hibritleşme sonrasında PGE'ler 10 saniye süre ile PBS tamponu içerisinde yıkandı ve bu işlem her ölçüm öncesi tekrar edildi.

**Ölçüm:** +0,75 V ile + 1,40 V / arasında 50 mV/s tarama hızıyla tarama yapılarak ölçüm alındı. Guanin yükseltgenme sinyalleri üzerinden ölçüm alındı. Her bir derişim için ölçümler en az dört kez tekrarlandı.

#### **2.6.5 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi deneyleri**

164,5 mg  $K_3Fe(CN)_6$ , 208,13 mg  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  ve 1,49 g KCl tartılıp hacmi saf su ile 200 mL'ye tamamlanarak empedimetrik ölçümler için redoks çözelti hazırlandı. Üçlü elektrot sisteminde  $\mu$ -AUTOLAB III (Eco Chemie, Hollanda) FRA (Frekans Analyzer) sistemi kullanılarak empedans ölçümleri alındı.

#### **2.6.6 DNA immobilizasyonuna pH etkisinin incelenmesi**

**PGE'nin Aktif Edilmesi:** PGE yüzeyi, 0,50 M asetat tampon çözeltisi içinde (pH 4,8) +1,40 V uygulanarak 1 dakika süreyle karışmasız ortamda aktive edildi.

**PGE yüzeyine prob immobilizasyonu:** 25  $\mu$ g/mL prob 10 dakika *Anaplasma* DNA çözeltisinde bekletilerek aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilize edildi.

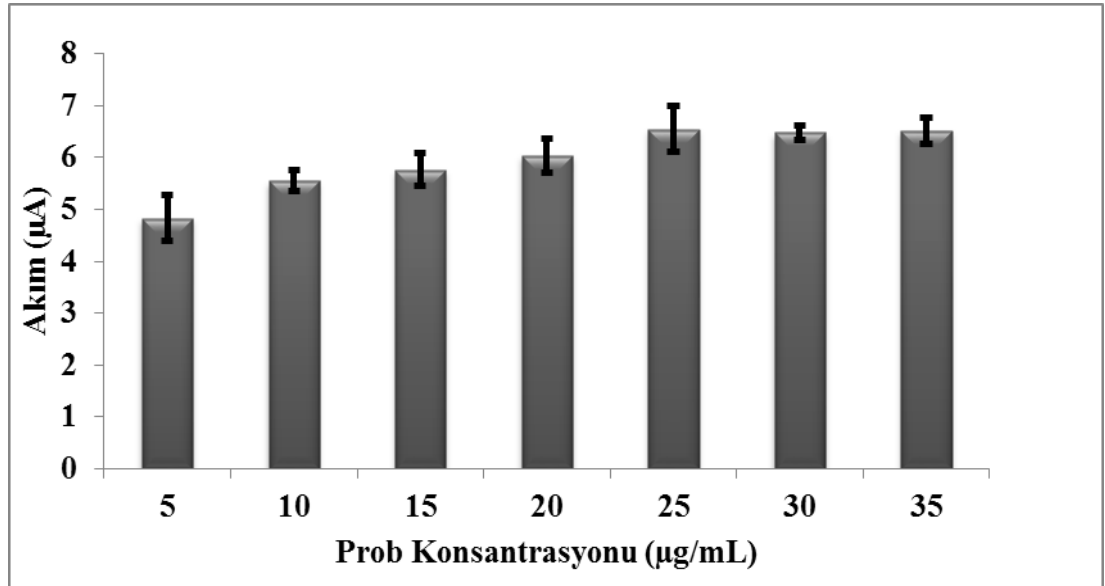
**Yıkama:** Ölçme işleminden önce 10 saniye süre ile ABS tamponu ile yıkandı ve bu işlem her ölçüm öncesi tekrar edildi.

**Ölçüm:** Farklı pH'lardaki (pH 4,8 pH 3,8 ve pH 5,8) ABS ve PSB (pH 7,4) ile dolu elektrostatik hücre içerisinde, +0,75 V ile + 1,40 V arasında 50 mV/s tarama hızıyla tarama yapılarak ölçüm alındı. Her bir derişim için ölçümler en az dört kez tekrarlandı. Guanin yükseltgenme sinyalleri incelendi

### 3. BULGULAR

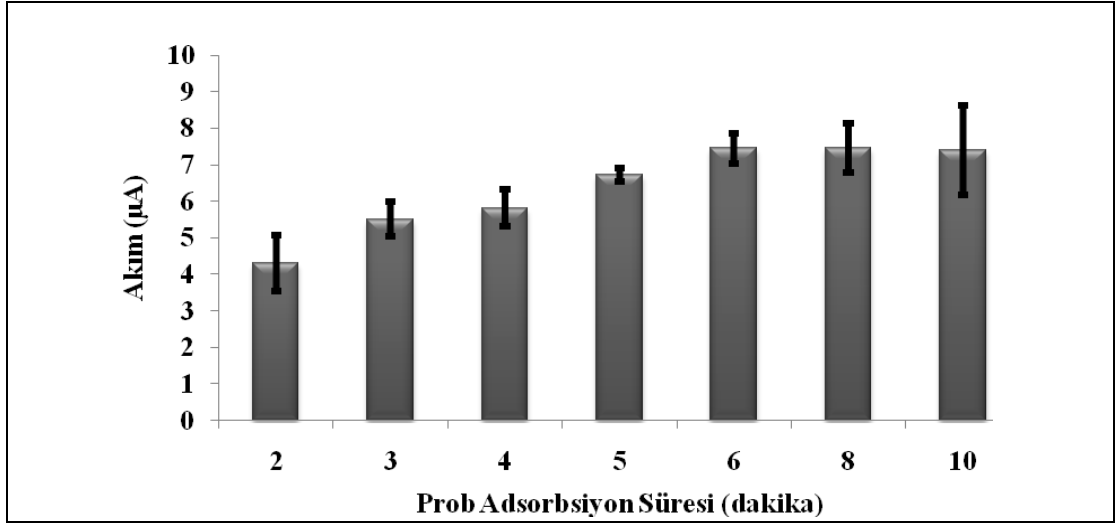
#### 3.1 *Anaplasma phagocytophilum* Probonun Elektrot Yüzeyine İmmobilizasyonunun Guanin Yükseltgenme Sinyaline Bağlı Olarak Tayini

İlk olarak *Anaplasma phagocytophilum*'un tek sarmal gen dizilimini temsil eden DNA probunun PGE yüzeyine 10 dakika sabit sürede immobilizasyonu sonucunda Guanin bazının verdiği pik akımlarının en yüksek değerlerinin 25 µg/mL de olduğu görülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 *Anaplasma phagocytophilum*'u temsil eden DNA probunun immobilizasyonu için derişim optimizasyonu (10 dakika sabit sürede)

PGE yüzeyine immobilize edilecek DNA probunun sabit sürede optimum derişimi tayin edildikten sonra bu derişimde immobilizasyonun en iyi şekilde gerçekleşebilmesi için PGE'nin DNA çözeltisi içinde tutulması gereken optimum süre de tespit edildi. Şekil 3.2'den de görüldüğü gibi sabit derişimde immobilizasyon süresinin optimum 6 dakika olduğuna karar verilmiştir.

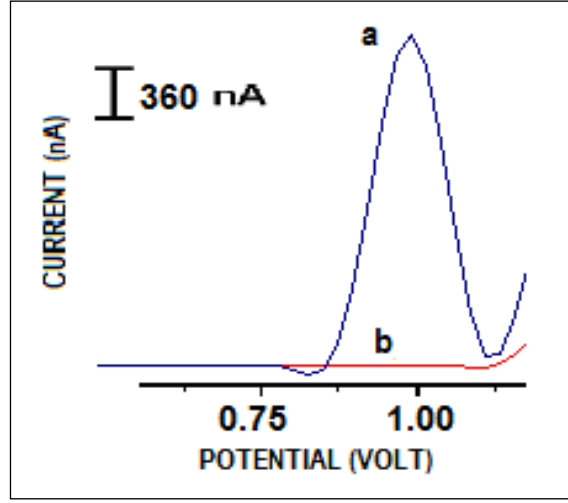


**Şekil 3.2** *Anaplasma phagocytophilum*'u temsil eden DNA probunun immobilizasyonu için süre optimizasyonu (25 µg/mL sabit derişimde) tayini

Bu deneyler sonucunda *Anaplasma phagocytophilum*'u temsil eden DNA probunun immobilizasyonu için optimum prop derişimi 25 µg/mL ve optimum immobilizasyon süresi 6 dakika olarak tayin edilmiştir.

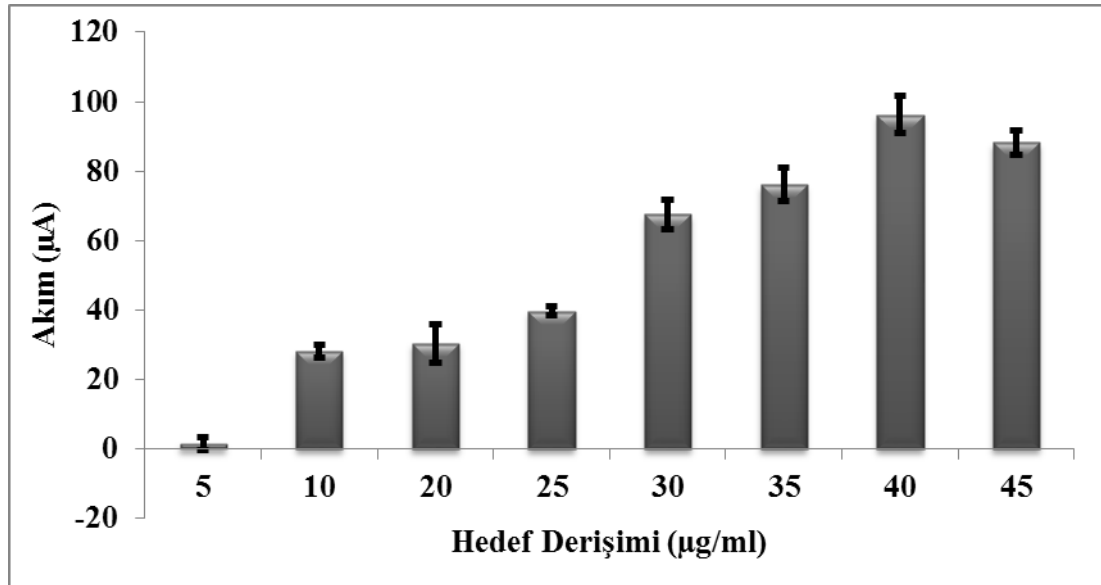
### **3.2 *Anaplasma Phagocytophilum*'u Temsil Eden Tek Sarmal DNA Probonun Hedef Eşleniği ile Hibridizasyonu İçin Süre ve Derişim Koşullarının Çalışılması**

*Anaplasma phagocytophilum*'u temsil eden tek sarmal DNA probunun hedef eşleniği ile hibridizasyon şartlarının belirlenmesi için önce 10 dakika sabit sürede farklı derişimlerdeki hedef proplar kullanılmıştır. Bunun için ilk önce aktive edilmiş PGE yüzeyine, immobilizasyon koşulları daha önceden belirlenmiş (25 µg/mL prob derişimi ve 6 dakika tuturtma süresi), inozin modifiye DNA probu adsorbe edilmiş ve uygun hedef derişimin hangisi olduğuna, hibridizasyondan sonra Guanin yükseltgenme akımları incelenerek karar verilmiştir (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3** Hibridizasyon öncesi (b) ve sonrası (a) guanin pik akımları [10]

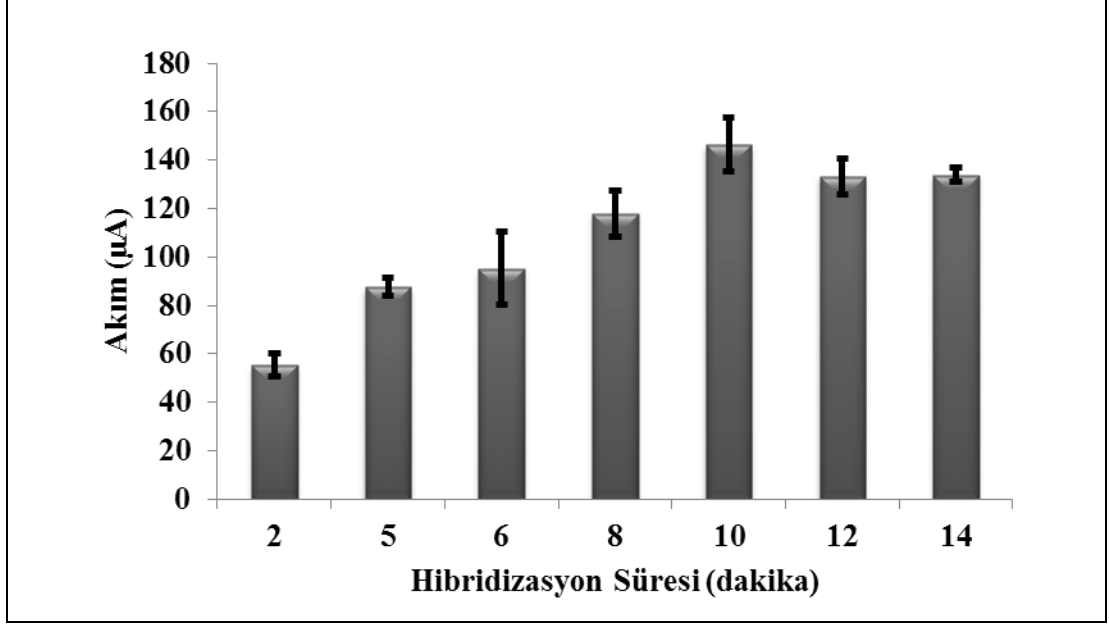
İnozinli DNA probu (baz diziliminde guanin yerine muadili olan inozin içeren prop) hibridizasyondan önce alınan ölçümlerde hiç sinyal vermezken, hibridizasyondan sonra sitozinlere 3 H bağı ile bağlanan hedefteki Guanin bazının derişimine bağılı olarak pik akımları ortaya çıkmaktadır. Şekil 3.4'ten de görüldüğü gibi en yüksek pik akımı 40  $\mu\text{g/mL}$  hedef derişiminde gözlenmiştir.



**Şekil 3.4** Hibridizasyon için optimum hedef derişimi tayini

*Anaplasma phagocytophilum*'u temsil eden DNA probunun hedef prop ile hibridizasyonu için optimum hedef derişimi 40  $\mu\text{g/mL}$  olarak tayin edildikten sonra bu derişimde hazırlanan hedef DNA probu içeren çözeltiye, inozin modifiye DNA

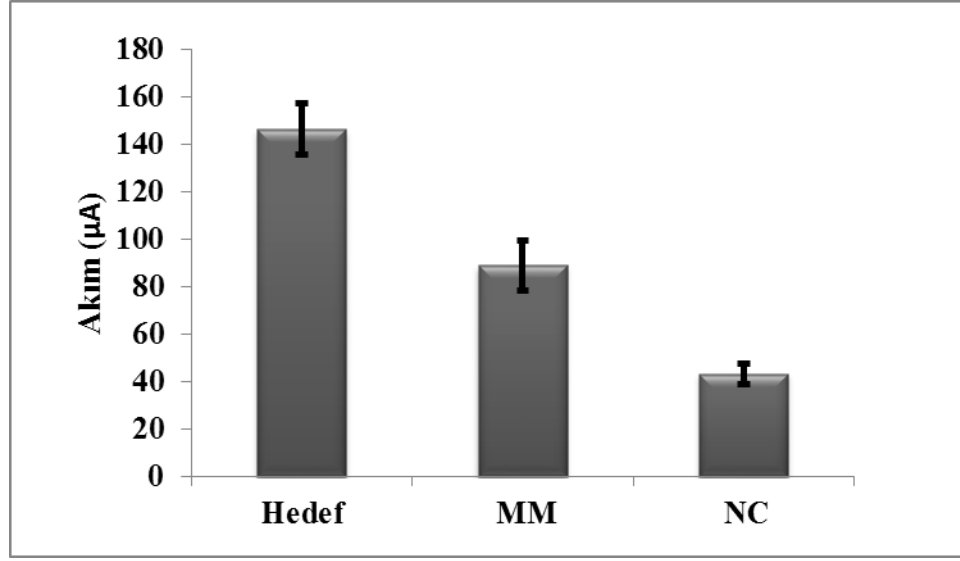
probu immobilize edilmiş aktif PGE'ler daldırılarak değişen sürelerde bekletilmiş ve aynı şekilde hibridizasyondan sonra gözlenen Guanin yükseltgenme akımlarının değerlerine bakılarak hibridizasyon süresi optimize edilmiştir. Şekil 3.5'ten de görüldüğü gibi en yüksek pik akımları 10 dakikalık hibridizasyon süresinde elde edilmiştir.



Şekil 3.5 Optimum hibridizasyon süresi tayini

### 3.3 *Anaplasma phagocytophilum*'a duyarlı DNA Sensörü için Seçimlilik Çalışılması

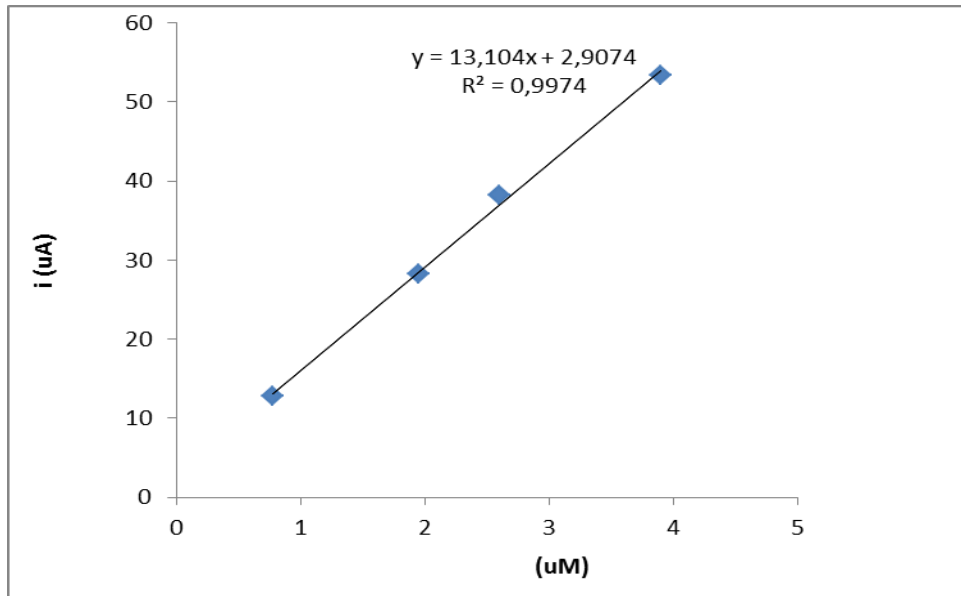
Uygun hibridizasyon süresinin ve uygun hedef derişiminin saptanmasında prob ve ilgili hedefi arasındaki etkileşimin yanı sıra dizilimi hedef diziden bir baz farklı (mismatch, MM) ve tamamen farklı (noncomplementary, NC) olan hedef diziler kullanılarak, bunların aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilen DNA probu ile hibridizasyonları incelenerek seçimlilik çalışması yapılmıştır. Tüm hedef dizilerin hibridizasyon sonrası oluşturdukları Guanin pik akımları incelendiğinde en yüksek akımın probun tam karşılığı olan hedef diziden, daha sonra bir bazı farklı olan (MM) dizi ve en düşük pik akımının da tüm bazları farklı olan (NC) diziden elde edildiği gözlenmiştir (Şekil 3.6 )



**Şekil 3.6** Sabit derişimde (40 µg/mL) hedef, bir baz farklı (MM) ve hedeften tamamen farklı (NC) baz dizilimi ile hibritleşme sonrası guanin akımları

### 3.4 Hedef Dizi Konsantrasyonundaki Değişimin Hibridizasyon Yanıtına Etkisi

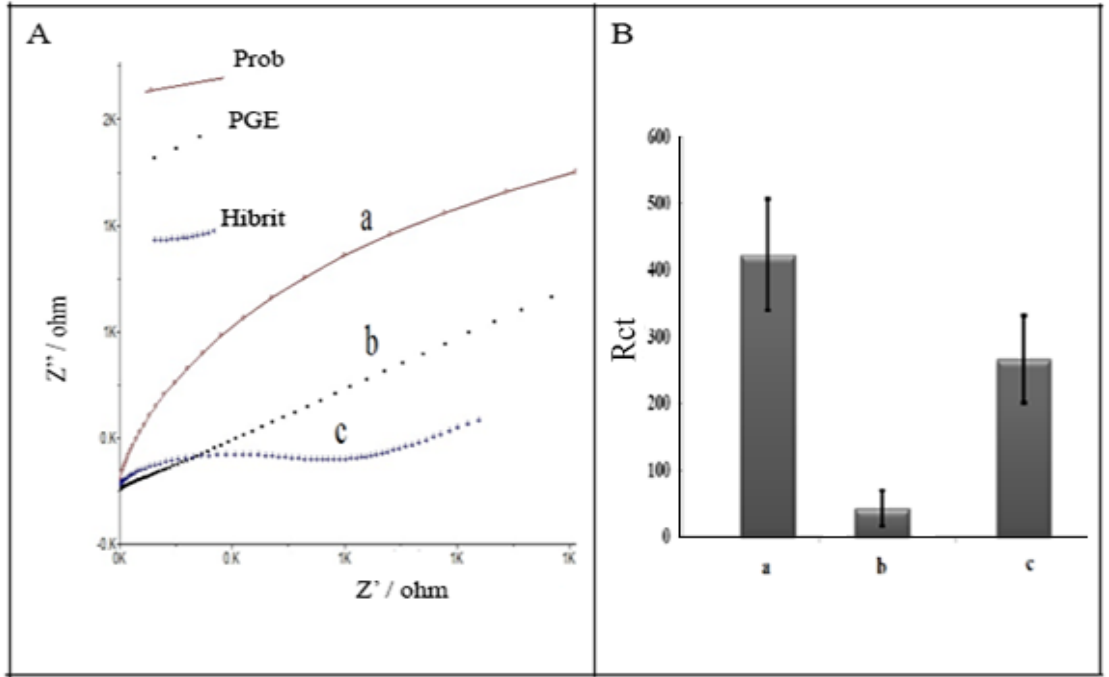
Hibridizasyon derişiminin 0,65 – 5,20 µM arasında değiştirilmesi ile hedef DNA konsantrasyon değişiminin yanıtta olan etkisi incelenmiştir. Elde edile veriler ile kalibrasyon eğrisi Şekil 3.7’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.7** Hedef DNA konsantrasyon değişiminin yanıtta olan etkisi ve kalibrasyon eğrisi

### 3.5 EIS Çalışması

Bu bölümde *A. Phagocytophilum* DNA hibridizasyonuna ait sonuçlar elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile incelendi. PGE, prob ve hibridizasyona ait EIS sonuçları ve bu sonuçların  $R_{ct}$  değerlerine ait histogramlar Şekil 3.8’de gösterildi.

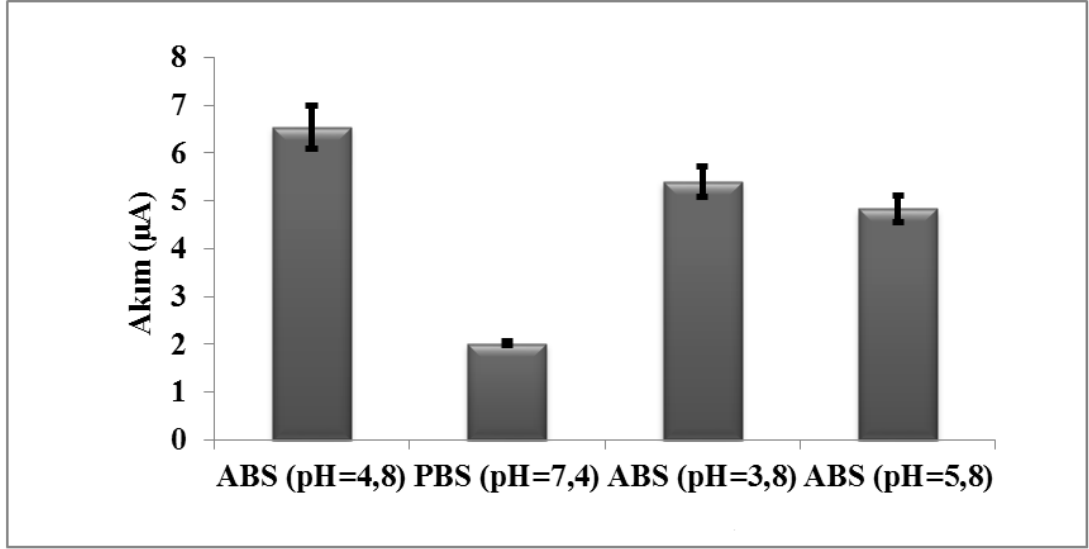


**Şekil 3.8** (A) Nyquist diagramları (destek çözeltisi 0,1 M KCl içeren 2,5 mmol/L  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ ) (B)  $R_{CT}$  değerlerine ait histogramlar; (a) *A. Phagocytophilum* prob (b) PGE, (c) *A. phagocytophilum* hibridizasyonu

### 3.6 İmmobilizasyona pH ve Çözücü Etkisinin İncelenmesi

*Anaplasma phagocytophilu*'mu temsil eden tek sarmal dizilerin aktive edilmiş PGE'lere immobilizasyonunda ölçüm alınan çözelti ortamının pH değeri, guanin pik akımlarını doğrudan etkilemektedir. Bu etkiyi görmek ve optimum pH değerinin literatürde [62] verilen ile aynı olduğunu (pH 4,8) teyit etmek amacıyla ölçüm ortamının pH'sı asidik (pH 3,8) ve bazik (pH 7,4) yapılarak ve yine çözücü etkisinin incelenmesi için de ABS tamponu yerine PBS tamponu kullanılarak ölçümler alındı. Ölçüm koşulları olarak prop derişimi 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve tutturma süresi 6 dakika olarak

(daha önce tayin edilen optimum immobilizasyon koşulları) alınmıştır. Sonuçlar Şekil 3.9’da verilmiştir.



Şekil 3.9 Prob immobilizasyonuna pH ve çözücü etkisi

#### 4. TARTIŞMA

*Anaplasma phagocytophilum* kene türlerinden bulaşan ve geniş bir konakçı grubunda enfeksiyona yol açan bir patojendir. Başlangıçta bu enfeksiyonun sadece keneler ile geviş getiren hayvanlar arasında bulaşıldığı düşünülmüşse de [63] günümüzde konakçı türler içinde kemirgenlerin, kirpilerin, kuşların, kedilerin, geyiklerin, atların, sığırların, köpeklerin, koyunların ve insanların da yer aldığı bilinmektedir [64]. *Anaplasma phagocytophilum* Avrupa’da ekonomik etkileri oldukça önemli olan bir koyun patojenidir ve enfeksiyonu septisemiye yol açarak ikincil enfeksiyonlara, düşüklere ve kuzuların topal olarak doğmalarına sebep olmaktadır [60, 65, 66]. Buna bağlı olarak bu bakteri ile enfekte olmuş hastalarda, bakterinin klinik olarak hızlı tayininin yapılması oldukça önemlidir. Bu bakterinin tanısına yönelik PCR esaslı çok sayıda moleküler teknik mevcuttur [67 - 75]. Tez çalışmamızda hibridizasyona yönelik DNA biyosensör tasarımı amaçlanmış ve bir biyosensörde bulunması gereken parametreler göz önünde bulundurulmuştur. Bu parametrelerden en önemlileri geliştirilen biyosensörün duyarlı, seçiciliği yüksek ve düşük maliyetle kısa sürede tayin yapabilmeye elverişli olmasıdır. Herhangi bir etiketlemenin olmadığı ve indikatörün kullanılmadığı hibridizasyon tayin yöntemi kullanılarak tasarımı yapılan biyosensör ile *Anaplasma phagocytophilum* bakterisinin gen dizilimine özgü prob tasarımına bağlı tayini, diferansiyel puls voltametri tekniğiyle guanin yükseltgenme sinyalindeki değişimler esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Tayinde hibridizasyon öncesinde biyosensör yüzeyine yalnızca gen haritasından seçilen bölge (prob) ve aynı bölgeden guanin yerine inozin içeren prob dizilerle yapılan immobilizasyon işleminden sonra ölçümler alınmış; inozin içeren prob sinyal vermezken, guaninli prob dizilerden beklenildiği gibi yüksek sinyaller elde edilmiştir. Hibridizasyondan önce yükseltgenme sinyali vermeyen tek sarmal prob, hedef eşleniği ile hibridizasyona tabi tutulduktan sonra yapılan potansiyel taramasında, yaklaşık +1000 mV civarında [73, 76] guanine ait yükseltgenme piki vermesi, hibridizasyonun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Guanin bazının yükseltgenme sinyalinin büyüklüğü, PGE yüzeyine immobilize edilen proba bağlı olarak örnekte *Anaplasma phagocytophilum* bakterisine özgü dizinin bulunup

bulunmadığına ilişkin bilgi vermiştir. Başka bir deyişle örnekte *Anaplasma phagocytophilum* 'u temsil eden tek sarmal bir gen dizisi mevcut ise, elektrot yüzeyindeki tek sarmal gen dizisi ile hibridizasyon sonrasında alınan ölçümde guanin pik akımları görülecektir. Bu akımlar hem hibridizasyonun gerçekleştiğini hem de örneğin söz konusu bakterinin gen dizisini taşıdığını gösterecek böylece geliştirilen sistem, örneğin alındığı bireyle ilgili olarak pozitif mi yoksa negatif mi olduğuna dair yorum yapabilmeye imkânı sağlayacaktır. Ayrıca tayinde kullanılan DPV tekniği, diğer elektrokimyasal tekniklere göre daha düşük tayin sınırına da sahiptir [77]. Bu tez çalışmasında geliştirilen biyosensörün herhangi bir işaretleme basamağı ve hibridizasyon indikatörü içermemesi [78, 79] de gerek ekonomik açıdan gerekse zaman tasarrufu açısından önemli avantajlar sağlamaktadır. Herhangi bir etiketlemenin yapılmadığı bu biyosensör tasarımında gerek PGE yüzeyine immobilize edilecek prob için optimum derişim ve tutturma süresi gerekse hibridizasyona girecek olan hedef probun optimum derişim ve etkileşim süresinin belirlenmesi biyosensörün hassasiyetliği açısından oldukça önemlidir. Söz konusu optimum şartların sağlanması için gen dizilerinde yer alan guanin bazının yükseltgenme sinyalleri takip edilmiş ve en yüksek pik akımlarının gözlemlendiği şartlar optimum olarak kabul edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarında prob derişiminin 25 µg/mL, prob immobilizasyon süresinin 6 dakika; hibridizasyon için hedef derişiminin 40 µg/mL ve hibridizasyon süresinin 10 dakika olması gerektiğine karar verilmiştir. Biyosensörün seçiciliğini test etmek amacıyla probun tam eşlenik karşılığı olan dizi yerine bir bazının yeri farklı hedef dizi (MM) ve tüm bazlarının yerleri farklı hedef dizi kullanılarak hibridizasyon yapılmış ve deneyler sonrasında en yüksek pik akımının, probun tam eşlenik karşılığı olan diziden elde edildiği; MM dizisi kullanıldığında pik akımının bariz şekilde düştüğü NC dizisinde ise çok daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. Çalışma kapsamında ayrıca EIS ile analizler yapılmıştır. Empedimetrik teknik ile sabit potansiyelde ve farklı frekanslarda hücre içindeki akım ölçümüne bağlı olarak elde edilen empedans değerlerine bağlı analizler yapılmış ve elde edilen sonuçların aktive edilmiş PGE, prob tutturulmuş PGE ve hibridizasyondan sonra PGE yüzeyi için farklı olduğu görülmüştür. Bu farklılığın yukarıda sözü edilen üç PGE yüzeyinin de bir birinden farklı olduğu, özellikle hibridizasyondan sonra PGE yüzey davranışlarının tamamen değişmesinden

kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Çalışmada ölçme ortamının pH'sı ve çözücü türünün ne olması gerektiği ile ilgili daha önce birçok çalışma [62, 78, 80] olsa da, bu çalışmadaki deney koşulları açısından ortamın pH'sı ve çözücü türünün sonuçlara etkisini araştırıldı. Bu etkiyi görmek ve optimum pH değerinin literatürlerde verilen ile aynı olduğunu (pH 4,8) teyit etmek amacıyla ölçüm ortamının pH'sı asidik (pH 3,8) ve bazik (pH 7,4) yapılarak ve yine çözücü etkisinin incelenmesi için de ABS tamponu yerine PBS tamponu kullanılarak ölçümler alınmış ve literatürdekinden farklı sonuçlar bulunmamıştır. Sentetik dizilerle dizayn edilen DNA biyosensörünün tayin sınırı araştırılmış; bunu belirlemek için hedef derişimi 0,78  $\mu\text{M}$  ile 3,90  $\mu\text{M}$  arasında değişen hedef diziler kullanılmış ve tayin sınırı 0,244  $\mu\text{M}$  olarak bulunmuştur. Bu değer kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında kullanılan en küçük derişim değerinin de altında olması DNA biyosensörünün yeterli bir tayin sınırına sahip olduğunu göstermiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kene türlerinden bulaşan ve geniş bir konakçı grubunda enfeksiyona yol açan bir patojen olan *Anaplasma phagocytophilum*'un tayinine yönelik bir DNA biyosensörü geliştirilmesi tasarlanmıştır. Bu amaçla tasarlanan biyosensörde, *Anaplasma phagocytophilum* bakterisinin elektrokimyasal olarak tanısı, diferensiyal puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak, tek kullanımlık kalem grafit elektroda (PGE) immobilize edilen DNA'nın gen dizisinde yer alan guanin bazının yükseltgenme sinyalleri esas alınarak ekonomik, güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu olarak tek kullanımlık PGE'ler kullanılması diğer karbon esaslı elektrotlarla karşılaştırıldığında ucuz olması, her seferinde yeni yüzeylerin kullanılması ve daha tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmesi açısından da önemli avantajlar sağlamıştır. Çalışmada en uygun hibridizasyon koşullarının bulunabilmesi için sentetik diziler kullanılarak derişim ve süre optimizasyonları yapılmıştır. Ayrıca hedef diziden farklı diziler kullanılarak da geliştirilen DNA biyosensörünün seçiciliği test edilmiştir. Hibridizasyonun gerçekleştiğini teyit etmek amacıyla guanin yükseltgenme sinyallerinin takip edilmesinden farklı olarak elektrokimyasal empedans deneyleri yapılmış ve farklı elektrot yüzeyleri farklı direnç değerlerinin ortaya çıktığı gözlenerek beklenen sonuçlar elde edilmiştir. Geliştirilen DNA biyosensöründe herhangi bir etiketlemenin yapılmaması veya indikatör kullanılmaması da ayrıca süre ve maliyet açısından avantajlar sağlamıştır. Ayrıca geliştirilen bu tip biyosensör gelecekte hasta başı analizlerde kullanılmak üzere mikro-üretim teknolojisine uyarlanabilir bir alt yapıya da sahip olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak tez kapsamında belirtilen amaçlar büyük ölçüde gerçekleştirilmiş olup bundan sonraki çalışmalarda daha üstün özelliklere sahip yeni DNA biyosensörleri geliştirilmesi hedeflenmektedir.

## KAYNAKÇA

- [1]. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., Farias, P. A. M., Valera, F. S., Grant, D. H., Ozsoz, M., Flair, M. N. (1997), DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review, *Analytica Chimica Acta*, 347 (1-2): 1-8.
- [2]. Aladağ, N. (2008). Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile Vitamin D Reseptör Genindeki Polimorfizmlerin Saptanması, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı (Yüksek Lisans Tezi), syf12, İzmir.
- [3]. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F.S., Dontha, N. (1996). DNA-modified electrode for the detection of aromatic amines, *Anal. Chem.*, 68, 4365-4369.
- [4]. Özkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Özsöz, M. (2002). Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, *Anal. Chim. Acta* 462 (1): 39-47.
- [5] Wang, J. (1999). Towards genoelectronics: Electrochemical biosensing of DNA hybridization, *Chem. Eur., J.5* (6):1681-1685.
- [6] Wang, J., Kawde, A.N., Erdem, A., Salasar, M. (2001). Magnetic beads based label free electrochemical detection of DNA hybridisation, *Analyst*, 120: 2020-2024.
- [7] Meriç, B., Kerman, K., Özkan, D., Kara, P., Özsöz, M. (2002). Indicator-free DNA biosensor based on adenine and guanine signals, *Electroanal.*, 14(18): 1245-1250.
- [8]. Fojta, M., Havran, L., Fulneckova, J., Kubicaova, T. (2000). Adsorptive transfer stripping AC voltammetry DNA complexes with intercalators, *Electroanal.*, 12: 926-934.

- [9]. **Kara, P., Kerman, K., Özkan, D., Meriç, B., Erdem, A., Özkan, Z., Özsöz, M.** (2002). Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA, *Electrochem. Commun.*, 4: 705-709
- [10]. **Arıksoysal, D., Karadeniz, H., Erdem, A., Şengönül, A., Saymer, A. A., Özsöz, M.** (2005). Label-free electrochemical hybridization genosensor for the detection of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance, *Anal. Chem.*, 77 (15): 4908-4917.
- [11]. **Lumbey-Woodyear, T., Campbell, C.N., Freeman, E. Freeman, Georgiou, G. Heller, A.** (1999). Rapid Amperometric verification of PCR amplification of DNA, *Anal. Chem.*, 71: 535-538.
- [12]. **Fojta, M., Doffkova, R., Palecek, E.** (1996). Determination of traces of RNA in submicrogram amounts of single -or double- stranded DNAs by means of nucleic acid-modified electrodes, *Electroanal.*, 8(5): 420-426.
- [13]. **Erdem A, Meriç B., Kerman K., Dalbastı T., Özsöz M.** (1999). Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor, *Electroanal.*, 11: 1372-1376.
- [14]. **Del Pozo, M.V., Alonso, C., Pariente, F., Lorenzo, E.** (2005). Electrochemical DNA sensing using osmium complexes as hybridization indicators, *Biosens. Bioelectron.* 20 (8 SPEC. ISS.): 1549-1558.
- [15]. **Brabec, V., Koudelka, J.** (1980), Oxidation of DNA at carbon electrodes the effect of the quality of the DNA sample, *J. Electroanal. Chem.*, 116: 793-805.
- [16]. **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.
- [17] **Özkan, D., Karadeniz, H., Erdem, A., Mascini, M., Özsöz, M.** (2004). Electrochemical genosensor for Mitomycin C- DNA interaction based on guanine signal, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35: 905-912.

- [18]. **Pividori, M.I., Merkoçi, A., Alegret, S.** (2000). Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 15: 291-303.
- [19]. **Turner, A. P. F.** (1987). *Biosensors: Fundamentals and Applications*, **Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S.** (Ed); *Oxford University Press*, Oxford, sayfa v-vii.
- [20]. **Wang, A. H. J.** (1987). Interactions between antitumor drugs and DNA, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.1: 52-69. (**Ed; Eckstein, F., Lilley, D.M.J.**), Springer-Verlag Berlin Heidelberg - Germany
- [21]. **West, M., D.A. Skoog, Holler, F.J.** (1996). *Analitik Kimyanın Temelleri*, **Kılıç, E, Köseoğlu, F.** (Ed.), *Bilim Yayıncılık*, 7. Baskı, 303-495s. Ankara.
- [22]. **Çolak, N.** (2009). Düşük Molekül Ağırlıklı Maddelerin DNA ile Etkileşmesinin Elektrokimyasal DNA Biyosensörleriyle Algılanması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, *Analitik Kimya Programı (Yüksek Lisans Tezi)*, 67syf, İzmir.
- [23]. **Bard, A. J., Faulkner L. R.** (1980). *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications. John Wiley & Sons*, 2, 20-40s, Canada.
- [24]. **Tural, H., Gökçel, İ., Ertaş, N.** (2003). *Enstrümental Analiz I*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No:186. syf125, İzmir.
- [25]. **Buket, M.** (2008). *Influenza A Virüsünün Tanısına Yönelik Elektrokimyasal DNA Biyosensör Tasarımı*, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü *Biyoteknoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi)*, 65syf, İzmir.
- [26]. **Girousi, S. T., I. C. Gherghi, et al.** (2003). Study of interactions between actinomycin D and DNA on carbon paste electrode (CPE) and on the hanging mercury drop (HMDE) surface, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 31(6), 1065-1078.
- [27]. **Yalçın, G.** (2007). *Bazı Kimyasal Maddelerin DNA İle Etkileşmesinin Biyosensörler İle Algılanması*, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, *Analitik Kimya Programı (Yüksek Lisans Tezi)*, 10syf, İzmir.

- [28]. **Ye, B. X., Tian X., et al.** (2008). Interaction of anticancer herbal drug berberine with DNA immobilized on the glassy carbon electrode, *Bioelectrochemistry* 73(1), 18-22
- [29]. **Erdem, A., F. Sayar, et al.** (2007), Development of streptavidin carrying magnetic nanoparticles and their applications in electrochemical nucleic acid sensor systems, *Electroanalysis*, 19(7-8): 798-804.
- [30]. **Özkan, S. A., Dogan-Topal, B.** (2011). A novel sensitive electrochemical DNA biosensor for assaying of anticancer drug leuprolide and its adsorptive stripping voltammetric determination, *Talanta*. 83(3), 780-788.
- [31]. **Kara, P., Erdem, A., Girousi, S., Ozsoz, M.** (2005). Electrochemical detection of enzyme labeled DNA based on disposable pencil graphite electrode, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (38), 191-195.
- [32]. **Alvarez-Lueje, A., Braiin-Isasi, S., Nunez-Vergara, L.J., Squella, J.A.** (2007). Voltammetric reduction of finasteride at mercury electrode and its determination in tablets, *Talanta*. 81, 750-770.
- [33]. **Ariksoy, D.** (2006). DNA'da Meydana Gelen Bazı Mutasyonların Ve Hibridizasyonun Tayinine Yönelik Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerinin Tasarımı, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı (Doktora Tezi), syf63, İzmir.
- [34]. **Aydınlık, Ş.** (2010). Altın Nanopartiküllerle Zenginleştirilmiş Elektrokimyasal DNA Biyosensörü İle İnfluenza B (Kuş Gribi) Virüsünün Tayini, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi), 50 syf, İzmir.
- [35]. **Yıldız, A. Genç, Ö.** (1993). Enstrümental Analiz, *Hacettepe Yayınları*, A-64, 289-384s, Ankara.
- [36]. **Doğan-Topal, B., Özkan, S. A.** (2011). Electrochemical determination of anticancer drugful vestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode, *Electrochimica Acta*, 56 (12), 4433-4438.

- [37]. **Özaltın, N., Yola, M. L.** (2011). Electrochemical studies on the interaction of an antibacterial drug nitrofurantoin with DNA, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 653(1-2): 56-60.
- [38]. **Topkaya, S.** (2009). Biyolojik ve Kimyasal Bazı Maddelerin DNA ile Etkileşiminin Elektrokimyasal Biyosensörlerle Algılanması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı (Yüksek Lisans Tezi), syf 54, İzmir.
- [39]. **Turan, A.** (2009). İlaç-DNA Etkileşimi ve DNA Analizleri için Elektrokimyasal Sensörlerin Geliştirilmesi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı (Yüksek Lisans Tezi), syf 24, İzmir.
- [40]. **Cin, I.** (2007). Elektrokimyasal Genosensör ile DNA Dizi Tayini, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı (Yüksek Lisans Tezi), syf 25, İzmir.
- [41]. **Coulet, P. R.** (1991). What is a Biosensor? **Blum L.J., Coulet P.R., Dekker M.** (Ed.), *Chapter 1; Biosensor principles and applications*, Inc., 1-6, New York.
- [42]. **Hall, E.A.H.**(1990). Biosensors, Ch.1: Biosensors in context, *Open University Press*, İngiltere; s.3-30.
- [43]. **Kissinger P.T.** (2005). Biosensors a perspective, *Biosensors & Bioelectronics*, 20: 2512-2516.
- [44]. **Wilson, E. K.** (1998). Instant DNA detection, *Chem. & Eng. News*, 76: 47
- [45]. **Marrazza, G., Chianella, I., Mascini, M.** (1999), Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection, *Biosens Bioelectron*, 14 (1): 43-51.
- [46]. **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.

- [47] **Collings A.F., Caruso F.** (1997). Biosensors: recent advances, *Reports on Progress in Physics*, 60: 1397-1445.
- [48]. **Kılıç, T.** (2011). Antikanser İlaç Olan Mitomycin-C'nin DNA'ya Etki Mekanizmasının Elektrokimyasal Nükleik Asit Biyosensörler İle Belirlenmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi), syf26, İzmir.
- [49]. **Skottrup, P.D., Nicolaisen, M., Justesen, A.F.** (2008). Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors, *Biosensors & Bioelectronics*, 24: 339–348.
- [50]. **Söğüt, E., Ö., Kayalı, A.** (2005). Analitik yöntem geçerliliğine genel bir bakış, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 34(1): 41-57.
- [51]. **Dervan, P.B.** (1998). Sequence specific recognition of double helical DNA. A synthetic approach, **Eckstein,F. and Lilley, D.M.J., Springer-Verlag,** (Ed.), *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Inc., s.49-64, Berlin.
- [52]. **Boon E.M., Barton J.K.** (2003). DNA Electrochemistry as a probe of base pair stacking in A-, B-, and Z-form DNA, *Bioconjugate Chemistry*, 14(6), 1140-1147.
- [53]. **Passarge, E.** (2000). Renkli Genetik Atlası, **Lüleci G., Sakızlı M., Alper Ö.,** (Ed.) Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 34–39, 44–47, 72–73.
- [54]. **Brabec, V.** (1983). Conformational changes in DNA induced by its adsorption at negatively charged surfaces – The effects of base composition in DNA and the chemical nature of the adsorbent, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11:245-255.
- [55]. **Brett, A.M.O., Macedo, T.R.A., Raimundo, D., Marques, M.H. Serrano, S.H.P.** (1998). Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, *Biosensors & Bioelectron.*, 13: 861-867.
- [56]. **Cai, X., Rivas, G., Farias, P.A.M., Shiraishi, H., Wang, J., Fojta, M., Palecek, E.** (1996). Trace measurements of plasmid DNAs by adsorptive

stripping potentiometry at carbon paste electrodes, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 40: 41-47.

- [57]. **Marie, R., Jensenius, H., Thaysen, J., Christensen, C. B., Boisen, A.** (2002), Adsorption kinetics and mechanical properties of thiol-modified DNAoligos on gold investigated by microcantilever sensors, *Ultramicroscopy*, 91 (1-4): 29-36.
- [58]. **Mascini, M., Palchetti, I., Marrazza, G.** (2001), DNA electrochemical biosensors, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 369 (1): 15-22.
- [59] **Chen, K.S., Chen, S.C., Lin, H.R., Yan, T.R., Tseng, C.C.** (2007). A Novel Technique to Immobilize DNA on Surface of a Quartz Crystal Microbalance by Plasma Treatment and Graft Polymerization, *Metaterials Science and Engineering*, 27: 716–724
- [60] **Stuen S., Torsteinbo W.O., Bergstrom K., Bardsen K.** (2009), Superinfection occurs in *Anaplasma phagocytophilum* infected sheep irrespective of infection phase and protection status, *Acta Vet. Scand.*, 5, pp. 1–6
- [61] **Miller, J. N., Miller, J. C.** (2000). Statistics And Chemometrics For Analytical Chemistry, *Pearson Education*, 271, London.
- [62]. **Erdem A., Özsöz M.** (2001). Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA, *Turk. J. Chem*, 25: 469-475.
- [63] **Dumitrache M.O., Paștiu A.I., Kalmár Z., Mircean V., Sándor A.D., Gherman C.M., Peștean C., Mihalca A.D., Cozma V.** (2013), Northern white-breasted hedgehogs *Erinaceus roumanicus* as hosts for ticks infected with *Borrelia burgdorferisensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in Romania, *Ticks Tick-borne Dis.*, 4 (3) pp. 214–217
- [64] **Woldehiwet Z.** (2010), The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*, *Vet. Parasitology*, 167, pp. 108–122
- [64] **Grøva L., Olesen I., Steinshamn H., Stuen S.** (2011), Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection and effect on lamb growth, *Acta Vet. Scand.*, 53, p. 30.

- [66] **Stuen S.** (2007). *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe, *Vet. Res. Commun.*, 31 (Suppl. 1), pp. 79–84
- [67] **Kathrin H., Rainer O., Henning F., Stefan O. B., Dieter H., Peter K.** (2004), Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (Ehrlichia sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany., *Int. J. Med. Microbiol.* 293, Suppl. 37, 86-92.
- [68] **Petrovec M, Bidovec A, Sumner JW, Nicholson WL, Childs JE, Avsic-Zupanc T.** (2002), Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages, *Wiener Klinische Wochenschrift*, 114, 641–647.
- [69] **Petrovec M, Sixl W, Marth E, Bushati N, Wust G.** (2003), Domestic animals as indicators of *Anaplasma* species infections in Northern Albania, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 112–115.
- [70] **Petrovec M, Sumner JW, Nicholson WL, Childs JE, Strle F, Barlic J, Lotric-Furlan S, Avsic-Zupanc T.** (1999), Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia, *Journal of Clinical Microbiology* 37, 209–210.
- [71] **Rymaszewska A.** (2008). Divergence within the marker region of the groESL operon in *Anaplasma phagocytophilum*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27, 1025–1036.
- [72] **Shukla S.K., Asani V., Stockwell P.J., Reed KD.** (2007), Contribution of polymorphism in ankA, gltA and groESL in defining genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2312–2315
- [73] **Smrdel K.S., Seret M., Duh D., Knap N., Avsic-Zupanc T.** (2010). *Anaplasma phagocytophilum* in ticks in Slovenia, *Parasites and Vectors*, 3, 210.

- [74] **Sumner J.W., Nicholson W.L., Massung R.F.** (1997), PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of Ehrlichia species, *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2087–2092.
- [75] **Von Loewenich F.D., Baumgarten B.U., Schroppel K., Geissdorfer W., Rollinghoff M., Bogdan C.** (2003), High diversity of ankA sequences of Anaplasma phagocytophilum among Ixodes ricinus ticks in Germany, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5033–5040.
- [76] **Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H.** (1996). Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes, *Anal. Chim. Acta*, 326: 141-147.
- [77] **Palecek, E., Fojta, M.** (1994). Differential pulse voltammetric determination of RNA at the picomole level in the presence of DNA and nucleic acid component, *Anal. Chem.*, 66: 1566-1571.
- [78] **Meriç, B., Kerman, K., Özkan, D., Kara, P., Erensoy, S., Akarca, U.S., Macsini, M., Özsöz, M.** (2002). Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue, *Talanta*, 56 (5): 939-947.
- [79] **Özkan D., Erdem A., Kara P., Kerman K., Gooding J.J., Nielsen P. E., Özsöz M.** (2002). Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylen blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes. *Electrochem. Commun.*, 4: 796- 802.
- [80]. **Erdem, A., Sayar, F., Karadeniz, H., Guven, G., Ozsoz, M., Piskin, E.** (2007). Development of Streptavidin Carrying Magnetic Nanoparticles and Their Applications in Electrochemical Nucleic Acid Sensor Systems, *Electroanal.* 19, 798-804.

## ÖZGEÇMİŞ



### Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Çağdaş Ceylan
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 09.08.1987
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Bölümü 58140 Sivas
E-posta Adresi	cagdassceylan@gmail.com

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Prof. Dr. Necati Erşen A.Ö.L.
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi 2011