

**KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN TESPİTİNE YÖNELİK
DNA TABANLI ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Begüm TERZİ AKSOY

Biyomühendislik Anabilim Dalı

ARALIK 2022

KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN TESPİTİNE YÖNELİK
DNA TABANLI ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Begüm TERZİ AKSOY
(160842101)

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU
Eş Danışman: Prof. Dr. Filiz KURALAY

ARALIK 2022

TEZ ONAYI

Begüm TERZİ AKSOY tarafından hazırlanan Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların Tespitine Yönelik DNA Tabanlı Elektrokimyasal Biyosensör Geliştirilmesi adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Prof. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

İkinci Danışman:

Prof. Dr. Filiz KURALAY

Jüri Üyeleri

İmza:

Prof. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Prof. Dr. Savaş SÖNMEZOĞLU

Prof. Dr. Muhammad ASIM

Doç. Dr. Yakup ULUSU

Doç. Dr. Recep TAŞ

Tez Savunma Tarihi: 26/12/2022

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Ahmet KAYABAŞI
Enstitü Müdürü



BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Begüm TERZİ AKSOY





Eşime ve biricik aileme,



ÖNSÖZ

Akademik eğitimim boyunca, üzerimdeki emeklerinin çok olduğunu bildiğim, desteğini her zaman üzerimde hissettiğim, önümü daima açan, vazgeçmeden tekrar ettirerek doğruya ulaşmamı sağlayan, yorulduğumda, üzüldüğümde, heyecanlandığımda fark eden, bilgi birikimini her zaman benimle paylaşan ve cesaretlendiren çok sevdiğim danışman hocam Prof. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU'na teşekkür ederim.

Kendisiyle çalışma fırsatı bulduğum için çok memnun olduğum, çalışma azmi, disiplini ve hiç tükenmeyen enerjisiyle ilham veren, bana yepyeni bir pencere açan, tecrübelerini paylaşan değerli danışman hocam Filiz KURALAY'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Doktora eğitimimin boyunca bilgi birikimini bizlerle paylaşmaktan çekinmeyen, devamlı sormaya, sorgulamaya, merak etmeye teşvik eden, tavsiyeleri ve deneyimiyle bilgiye ulaşmada öğrenme isteğimi sürekli kılan sayın hocam Savaş SÖNMEZOĞLU'na teşekkür ederim. Tez izleme toplantıları boyunca değerli katkılarını ve desteklerini sunan sayın hocam Yakup ULUSU'ya katkıları için teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım süresince her zaman desteğini hissettiğim, gece gündüz demeden her anımda yardıma koşmaya hazır olan, üzüntümü, mutluluğumu paylaşan ve gelecekte çok güzel yerlere geleceğine inandığım Alaa KAMO'ya, grafen çalışmalarım boyunca kendisiyle çalışmaktan keyif aldığım, çalışma arkadaşından öte dostluğu için de minnet duyduğum Ayşe CULU'ya teşekkür ederim. Biyosensör çalışmalarımız boyunca beraber olduğum, yardımları, nezaketleri ve samimiyetleriyle kendimi yanlarında hiç yabancı hissetmediğim, kendileriyle tanışma fırsatı duyduğum için çok memnun olduğum Mustafa Ali GÜNGÖR ve Elif ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde 03-D-21 numaralı proje kapsamında destek veren KMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na, çalışmalarımı yürüttüğüm KMÜ Biyomühendislik bölümü hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Nedeni ve sonucu ne olursa olsun, her zaman yanımda oldukları gibi doktora eğitimim boyunca da yanımda olan, karşılıksız sevgilerini hep hissettiğim canım aileme sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Benimle hayatını paylaşan, her zor anımda kendisinden destek bulduğum eşim İlyas Cihan AKSOY'a ve doktora eğitimim içinde hayatımıza katılan her sabah gülümsemesiyle güneşi kalbime dolduran canım oğlum İlber Dora AKSOY'a teşekkür ederim. İyi ki varsınız.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SEMBOLLER	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xix
ÖZET.....	xxi
ABSTRACT	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1 Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO)	5
2.1.1 Biyoteknoloji ve genetiği değiştirilmiş organizmalar	5
2.1.2 GDO mekanizması	7
2.1.3 Genetiği değiştirilmiş bitkilerin üretimi.....	9
2.1.4 Transgenik soya fasulyesi	11
2.1.5 GDO konusundaki endişeler	12
2.1.6 GDO’lu gıdalar konusundaki destekleyici görüşler	14
2.1.7 GDO konusunda yasal düzenlemeler	15
2.1.8 GDO tespit yöntemleri	17
2.2 Biyosensörler	20
2.2.1 Biyosensörlerin tanımı ve tarihi	20
2.2.2 Biyosensörü oluşturan temel bileşenler	21
2.2.3 Biyoreseptör türüne göre biyosensörler	22
2.2.4 Analit ve biyoaktif madde arası etkileşime göre biyosensörler	23
2.2.5 Transdüser (sinyal çevirici) çeşidine göre biyosensörler	24
2.2.6 Biyosensörlerin avantajları ve kullanım alanları.....	25
2.3 Elektrokimya ve Elektrokimyasal Teknikler.....	26
2.3.1 Voltametrik teknikler	27
2.3.2 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi	29
2.4 Elektrokimyasal Biyosensörler.....	30
2.5 Moleküler Tanıma, Prob İmmobilizasyonu ve Hibridizasyon	32
2.6 Nükleik Asit Temelli Biyosensörler	33
2.7 Grafen Sentezi ve Üretim Yöntemleri.....	33
2.7.1 Elektrot malzemesi olarak grafen.....	37
2.7.2 Grafen tabanlı kompozit malzemeler	38
2.7.3 Nükleik asit tespitinde grafen temelli biyosensörler	39
2.8 GDO Tespitinde Kullanılan Biyosensörler	41
3. MATERYAL ve METOT.....	49
3.1 DNA İzolasyonu ve Moleküler Çalışmalar	49
3.1.1 Gıda numunelerinin temini	49
3.1.2 DNA izolasyon metotları	50
3.1.3 DNA miktar ve saflık analizleri	53
3.1.4 Soya ve mısır geninin moleküler taraması	54
3.1.5 GDO tarama	55
3.1.6 İstatistiksel analiz	56

3.2 Grafen Oksit ve İndirgenmiş Grafen Oksit Sentezi.....	56
3.2.1 Kullanılan kimyasal ve çözeltiler	56
3.2.2 Ön oksitleme	57
3.2.3 Oksitleme	57
3.2.4 Diyaliz ve kurutma	58
3.2.5 Pullandırma	59
3.2.6 İndirgeme	60
3.2.7 Karakterizasyonda kullanılan cihazlar ve donanım	61
3.4 Biyosensör Çalışmaları.....	61
3.4.1 Kullanılan elektrokimyasal sistemler ve cihazlar	61
3.4.2 Kullanılan çözeltiler ve kimyasallar.....	62
3.4.3 Oligonükleotid dizileri ve DNA numunelerinin hazırlanması	63
3.4.4 Çalışma elektrodu yüzey modifikasyonu ve biyosensör düzeneğinin oluşturulması	64
3.4.5 Oligonükleotid immobilizasyonu ve hibridizasyon basamakları	64
3.4.6 Gerçek örnek ölçümleri	65
3.4.7 GDO biyosensör geliştirme basamakları.....	65
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	67
4.1 DNA İzolasyonu ve Moleküler Çalışmalar	67
4.2 Grafen Sentezi ve Karakterizasyonu	77
4.3 Biyosensör Geliştirilmesi ve Gerçek Örnek Ölçümleri	87
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	102
KAYNAKLAR.....	105
ÖZGEÇMİŞ.....	128

KISALTMALAR

CaMV	: Cauliflower Mosaic Virus
CE	: Karşıt Elektrot
CNT	: Karbon Nanotüp
CV	: Dönüşümlü Voltametri
CVD	: Kimyasal Buhar Biriktirme
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPV	: Diferansiyel Puls Voltametrisi
dsDNA	: Çift Sarmal DNA
EPSPS	: <i>5-enol-pyruvyl shikimat-3-fasfat sentaz</i> geni
EIS	: Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GCE	: Camsı Karbon Elektrot
GDO	: Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GFN	: Grafen Ailesi Nanomalzemeleri
GM	: Genetik Modifikasyon
GO	: Grafen Oksit
GOD	: Glikozoksidaz Enzimi
ISAAA	: International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications
LOD	: Teşhis sınırı
LSV	: Lineer Sıyırma Voltametrisi
MB	: Metilen Mavisi
NMP	: N-Metil-2-Pirrolidon
NP	: Nano Partikül
<i>nptII</i>	: <i>Neomisin fosfotransferaz II</i> geni
PGE	: Kalem Grafit Elektrot
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QCM	: Kuvars Kristal Mikro Terazî
RE	: Referans Elektrot
rGO	: İndirgenmiş Grafen Oksit

RNA	: Ribonükleik Asit
RRTM	: Roundup Ready Soybean
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
ssDNA	: Tek Sarmal DNA
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonansı
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskopisi
<i>t</i>NOS	: Nopaline Synthase Terminator
XRD	: X Işıını Difraktometrisi
WHO	: Word Health Organization
WE	: Çalışma Elektrodu



SEMBOLLER

C	: Konsantrasyon
E	: Elektrostatik Potansiyel
F	: Faraday Sabiti
Hz	: Frekans Birimi
I	: Akım
M	: Molarite
R	: Direnç
t	: Zaman
Z	: Empedans



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 : GDO analizinde kullanılan gıda örnekleri.	49
Çizelge 3.2 : Soya ve mısır DNA'sı taramasında kullanılan primerlere ait bilgiler..	54
Çizelge 3.3 : Lektin primerleri için kullanılan PCR döngü koşulları.	55
Çizelge 3.4 : Zein primerinin amplifikasyonu için PCR döngü koşulları.	55
Çizelge 3.5 : 35S promotor dizisi taramasında kullanılan primerlere ait bilgiler.....	56
Çizelge 3.6 : Sentetik oligonükleotidlere ait sekans bilgileri.	63
Çizelge 4.1 : Gıda DNA'larının konsantrasyon ve saflık analizi sonuçları.....	70
Çizelge 4.2 : Grafit, GO, GO-B ve rGO için hesaplanan 2θ ve d-aralığı değerleri...	80
Çizelge 4.3 : Grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksit iletkenlik ölçümleri.....	87
Çizelge 4.4 : Genetiği değiştirilmiş organizmaların tespiti için literatürde yapılmış olan bazı çalışmalar.....	96
Çizelge 4.5 : İncelenen GDO ürünleri için geri kazanım sonuçları.....	101



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Glikoz tespitinde kullanılan Clark elektrodu.....	21
Şekil 2.2 : Dönüşümlü voltametri a) anodik anlamda başlayan potansiyel tarama b)tersinir bir redoks sisteminin dönüşümlü voltamogramı (SP, başlangıç potansiyeli; EP, bitiş potansiyeli; t_0 ve t_f , taramanın başlangıç ve son zamanları).....	27
Şekil 2.3 : Çıplak bir Pt elektrotta ferri/ferrosiyanür redoks çifti kullanılarak alınan dönüşümlü voltamogram.....	28
Şekil 2.4 : Nyquist grafiği şeklinde sunulan şematik empedans spektrumu.	30
Şekil 2.5 : Grafen ailesi nanomalzemeleri (GFN): tek katmanlı grafen, çift katmanlı grafen, grafen oksit (GO), indirgenmiş grafen oksit (rGO) ve çok katmanlı grafen.....	34
Şekil 2.6 : GO sentezi için kullanılan farklı yöntemler.	35
Şekil 2.7 : Grafitin kimyasal indirgenmesi ve pullandırma.	37
Şekil 3.1 : Spektrofotometrik ölçümlerinde kullanılan NanoDrop ve UV transillüminatör cihazı.....	54
Şekil 3.2 : Grafitin ön oksitlemesi.	57
Şekil 3.3 : Grafitin oksitleme basamakları.	58
Şekil 3.4 : Diyalize bırakılan membran filtre içindeki GO örnekleri.	59
Şekil 3.5 : Vakumlu fırında 24 saat kurumaya bırakılan örnekler.....	59
Şekil 3.6 : GO örneklerinin pullandırılması.	60
Şekil 3.7 : GO indirgeme işlemi boyunca uygulanan basamaklar.....	61
Şekil 3.8 : Kullanılan üçlü elektrot ve elektrokimyasal sistem.	62
Şekil 3.9 : GDO biyosensör modifikasyon basamakları.....	66
Şekil 4.1 : Farklı DNA izolasyon protokollerine ait agaroz jel görüntüleri a) DNA izolasyon metot-1, b) DNA izolasyon metot-2, c) DNA izolasyon metot-3, d) DNA izolasyon metot-4. L, 1 kb DNA Ladder, Kuyucuk; 1-6 bisküvi, 7-10 kek, 11-13 kraker, 14-15 mısır cipsi, 16-17 mısır unu, 18-19 soya unu, 20 GM soya, 21 GM mısır ve 22 negatif kontrol (ddH ₂ O).68	68
Şekil 4.2 : Lektin primeri için PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü. 1) 100 bp DNA Ladder, 2) GM Soya (pozitif kontrol); 3-8) bisküvi; 9-12) kek; 13-15) kraker; 16-17) mısır cipsi; 18-19) soya unu.....	72
Şekil 4.3 : Zein primeri için PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü. 1) 100 bp DNA Ladder, 2) GM Mısır (pozitif kontrol); 3-8) bisküvi; 9-12) kek; 13-15) kraker; 16-17) Mısır cipsleri; 18-19) Mısır unu; 20) Buğday DNA'sı (negatif kontrol).	73
Şekil 4.4 : 35s cf3/cf4 primeri için PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü. 1) 100 bp DNA Ladder, 2) GM Soya pozitif kontrol); 3) soya unu; 4) kek; 5) mısırcipsi; 6-8) bisküvi; 9-10) kraker; 11) mısır unu; 12) buğday DNA'sı (negatif kontrol).	75
Şekil 4.5 : Grafen sentezi boyunca uygulanan işlem basamaklarına ait XRD a), FTIR b), Raman c) ve UV-vis spektrum d) grafikleri.	78

Şekil 4.6 : rGO (a-b), GO-B (c-d) ve GO'ya (e-f) ait SEM görüntüleri (1-0,5 µm, 5 kV).....	85
Şekil 4.7 : GO a) ve rGO'ya b) ait TEM mikrografları (200 nm).	86
Şekil 4.8 : a) Au-Ag nano yapılarının biriktirilmesine dair sonuçlar ve b) bar grafikleri.	88
Şekil 4.9 : a) Farklı tarama hızlarına sahip (5,10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 mV/s)Au-Ag/GO-rGO/PCE CV ölçümleri ve b) Yükseltgenme pik şiddetinin (I_{pa}) tarama hızıyla ilişkisi ($\sqrt{v}$).	89
Şekil 4.10 : a) Elektrot yüzey modifikasyonuna dair 0,1 M KCl içeren 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içinde alınan CV ölçümleri b) CV ölçümlerine ait bar grafikleri.	90
Şekil 4.11 : a) Çıplak elektrot (PGE), b) GO-rGO/PGE ve c) Au-Ag/GO-rGO/PGE SEM görüntüleri (5 µm, içerideki görüntüler; 1 µm, 10 kV), d) Au-Ag/GO-rGO/PGE EDX ve e) haritalama sonuçları.	92
Şekil 4.12 : a) 0,1 M KCl içeren 5 mM $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içinde Au-Ag/GO-rGO/PGE, immobilize elektrot (ssDNA/ Au-Ag/GO-rGO/PGE) ve hibridize elektrot (ssDNA/ Au-Ag/GO-rGO/PGE) EIS yanıtları b) EIS yanıtları sonucu elde edilen bar grafikleri.	93
Şekil 4.13 : a) Prob ssDNA konsantrasyonunun ve b) prob ssDNA inkübasyon süresinin elektrokimyasal DNA biyosensörünün analitik performansı üzerine etkileri.	94
Şekil 4.14 : a) Hedef DNA'nın farklı konsantrasyonlarının saptanması için ssDNA/Au-Ag/GO-rGO/PGE 'nin EIS yanıtları (1×10^{-12} , 1×10^{-13} , 1×10^{-14} , 1×10^{-15} , 1×10^{-16}), b) hedef DNA tespiti için kalibrasyon eğrisi.	95
Şekil 4.15 : a) EIS yanıtları ve b) 10^{-15} M konsantrasyonda farklı oligonükleotitlerle her bir hibridizasyon olayı için önerilen DNA biyosensörünün R_{ct} değerleri: (I) immobilize elektrot (ssDNA/Au-Ag/GO-rGO/PGE), (II) tamamlayıcı olmayan (Nc), (III) 3-baz çifti uyumsuzluğu (M3).	97
Şekil 4.16 : 35S promotör bölgesinin tespiti için yapılan PCR sonuçları (L: 100 bp DNA Ladder, 1) GM soya-1 (pozitif kontrol), 2) GM soya-2, 3) gıda-1, 4) gıda-2, 5) soya (negatif kontrol) 6) ddH ₂ O (negatif kontrol)).	98
Şekil 4.17 : a) GDO biyosensörün gerçek numunelere ait R_{ct} değerleri ve b) R_{ct} değerlerine ait bar grafikleri.	100

ÖZET

Doktora Tezi

GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ ORGANİZMALARIN TESPİTİNE YÖNELİK DNA TABANLI ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Begüm TERZİ AKSOY

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU
İkinci Danışman: Prof. Dr. Filiz KURALAY

Aralık, 2022, 155 sayfa

Genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO), artan gıda ihtiyacını karşılamak amacıyla geliştirilen verim artışı, yüksek besin değeri ve herbisitlere dayanıklılık gibi olumlu etkileri yanında doğadaki tür dağılımı ve alerjik reaksiyonlar gibi endişeler ülkelerin GDO teknolojisine karşı yaklaşımlarını etkilemiştir. Transgenik bitkilerin gıda ürünlerindeki kullanımlarının dünya genelinde giderek artması bu ürünlerin tespitine yönelik ihtiyacı beraberinde getirmiştir. GDO'lu ürünlerin tespiti için son yıllarda kullanımı basit ve iyi analitik özelliklere sahip biyosensörler tercih edilmektedir. Bu tez çalışmasında, gıda ürünlerinde transgenik soya içeriğinin tespiti amacıyla elektrokimyasal yöntemle yüzeyi altın (Au) ve gümüş (Ag) elementleri ile modifiye edilmiş grafen oksit (GO)/indirgenmiş grafen oksit (rGO) nanokompozit kaplı kalem grafit elektrotlar (PGE) tasarlanmış ve elektrokimyasal biyosensör özellikleri incelenmiştir. GDO ürünlerinin tespiti için yakalayıcı DNA probu olarak CaMV 35S promotör bölgesine spesifik tiyol işaretli oligonükleotidler ile hedef gen hibridizasyonuna bağlı olarak elde edilen sonuçlar elektrokimyasal empedans spektroskopisine (EIS) dayalı olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre 10^{-12} - 10^{-16} M doğrusal konsantrasyon aralığında tespit gerçekleştirilmiştir. Çalışmada farklı işlenmişlik seviyelerine sahip gıda ürünlerine (bisküvi, kek, kraker, mısır cipsi, soya unu, mısır unu) için en uygun DNA izolasyon yöntemleri belirlenmiştir. Moleküler taramalar sonucunda soya içeren bazı gıda ürünlerinde CaMV 35S bölgesi bakımından GDO taramaları yapılmıştır. Tasarlanan GDO biyosensöründe, gerçek örnek denemeleri için izole edilen genomik DNA ürünleri doğrudan hedef olarak kullanılmış ve işlenmiş gıda ürünlerinde GDO tespitine yönelik alternatif ve hızlı bir teknik geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Genetiği değiştirilmiş organizma, GDO, elektrokimyasal biyosensör, grafen oksit, transgenik soya, PCR



ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DEVELOPMENT OF DNA BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR FOR DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS

Begüm TERZİ AKSOY

**Karamanoğlu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU
Co-Supervisor: Prof. Dr. Filiz KURALAY**

December, 2022, 155 pages

Genetically modified organisms (GMOs) have positive effects such as increased yield, high nutritional value, and resistance to herbicides in order to meet the increasing food demand. However, concerns such as species distribution in nature and allergic reactions have affected countries approaches to genetically modified organism technology. The increasing use of transgenic plants in food products around the world has brought about the need for the detection of these products. In recent years, for the detection of GMO products, biosensors are preferred due to their ease to use, automation, and good analytical properties. In this thesis study, graphene oxide (GO)/reduced graphene oxide (rGO) nanocomposite-coated pencil graphite electrodes (PGEs) modified with gold (Au) and silver (Ag) elements were designed and used to determine the transgenic content in food products with the electrochemical method. Thiol-labeled oligonucleotides specific to the CaMV 35S promoter region were used as capture DNA probes. The results obtained due to target gene hybridization were evaluated according to electrochemical impedance spectroscopy (EIS). According to these results, detection was carried out in a linear range of 10^{-12} - 10^{-16} M. In the study, the most appropriate DNA isolation methods for processed food products (biscuits, cakes, crackers, corn chips, soy flour, corn flour) were determined. As a result of molecular studies, GMO was determined in terms of CaMV 35S region in some food products containing soy. In the designed GMO biosensor application, the isolated genomic DNA products were used as direct targets for real samples, and an alternative and rapid technique for GMO detection in processed food products was developed.

Keywords: Genetically modified organism, GMO, electrochemical biosensor, graphene oxide, transgenic soybean, PCR



1. GİRİŞ

Rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemeler, yaygın şekilde yetiştirilen bitkisel ürünlerin transgenik üretimi başta olmak üzere genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO) üretimini arttırmıştır. GDO teknolojisi, ilgili genetik materyalin doğal olarak hibritleşme veya doğal rekombinasyon yoluyla meydana gelemeyecek şekilde değiştirilmesi ile oluşturulan organizmaları tanımlamaktadır (Mahgoub ve Nollet, 2019). Dünya genelinde nüfus artışının sürekli olarak yükselmesi gıda ihtiyacını karşılayacak etkili yöntemlere ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Bu sebeple verimi iyileştirmek, besin değerini arttırmak, stres koşullarına dayanıklılığı geliştirmek için genetik modifikasyondan yararlanılmaktadır. Transgenik teknolojisi uzun yıllardan beri geliştirilmiş olmasına rağmen, başta gıda güvenliği, çevresel risk ve etik kaygılar olmak üzere çok sayıda araştırma yapılmaya devam etmektedir. Bununla beraber, GDO teknolojisinin gıda ürünleri içeriğinde yer alması bu ürünlerin tespiti konusunda büyük bir ihtiyaç doğurmaktadır. Yaklaşık 40'tan fazla ülke GDO etiketlemesi için yasa ve kurallar dizisi oluşturmuş ve ülkeler arasındaki farklı düzenlemeler GDO'nun tespiti ve tanımlanmasının önemini arttırmıştır. Bu kapsamda genetiği değiştirilmiş organizmaların kullanım alanları ve etiketlemelerine ilişkin yaptırımlar çeşitlilik göstermektedir. Avrupa birliği GDO içeriğine sahip gıdaların etiketlenmesi konusunda daha sıkı politikalara sahipken, Kanada ve ABD gibi bazı ülkeler, transgenik içeriğe sahip gıda ürünlerinin etiketlemesini zorunlu kılmamaktadır (Ateş, 2020; Vega Rodriguez ve diğerleri, 2022). Ülkemizde 2010 yılı 5977 sayılı Biyogüvenlik Kanununa göre GDO'lu ürünlerin gıdalarda kullanımı yasak olmakla birlikte, hayvan yemlerinde kullanımı izin verilmiş genlere ait eşik değerleri çerçevesinde etiketleme zorunluluğu içerisinde yer almaktadır.

GDO teknolojisi, gıda testleri ve etiketlemeyi kapsayan düzenlemelerle tüketicinin bilgilendirilmesi ve tercih hakkı sunulması için elverişli sistemlere ihtiyaç duymaktadır. Bu bakımdan hem bilinçli tüketimi desteklemek hem de biyoçeşitliliği korumak için transgenik ürünleri hammadde olarak bulunduran işlenmiş gıdaların takibi önemlidir. Limanlarda ve gümrük kapılarında kontrol ve tespit

laboratuvarlarının kurulması ile özellikle ithal olarak ülkemize gelen ürünlerin hızlı bir şekilde GDO testlerine tabi tutulmaları gerekmektedir.

GDO'nun tespiti için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Roundup Ready soya fasulyesi (Wurz ve diğerleri, 1997) ve Bt-mısır (Hupfer ve diğerleri, 1998) incelenmesinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile tespit prosedürü uygulanmaktadır. Bu prosedüre göre kullanılan primerler, gıdaların genel olarak taranmasına olanak sağlamak için karnibahar mozaik virüsü (CaMV 35S), *Agrobacterium tumefaciens*'ten türetilmiş nos terminatöründen ve antibiyotik marker geni *NPTII*'den (*neomisin-fosfotransferaz II*) türetilen promotör ve terminatör parçalarını çoğaltmak üzere tasarlanmaktadır. Radyoizotopik ve floresan izlemeye dayanan DNA tespitine yönelik geleneksel yöntemler, yetişmiş personel ile alt yapı gerektirir ve zaman alıcıdır. Bu nedenle özellikle inceleme noktasındaki rutin ve hızlı analizler için pek uygun değildir. Nükleik asit ve protein temelli yöntemlerin deneyimli eleman, işgücü ve maliyetli ekipman gerektirmesi nedeniyle GDO'ların tespiti amacıyla etkin metodolojilerin geliştirilmesi önemlidir. Bu amaçla GDO içeren ve içermeyen gıdaların tanımlanmasını hedefleyen otomatik tespit sistemlerinin ve ayrıca gıdalardaki GDO seviyelerinin doğrulanmasını amaçlayan teknolojilerin üretilmesi gerekmektedir. Son yıllarda hızlı ve hassas GDO tespiti için çeşitli biyosensörler geliştirilmekte ve uygulanmaktadır (Manzanares ve diğerleri, 2015; He ve diğerleri, 2017; Jamaluddin ve diğerleri, 2018; Liu ve diğerleri, 2020; Zeng ve diğerleri, 2021).

Elektrokimyasal biyosensörler GDO tespiti için umut verici biyoanalitik araçlardır. Elektrokimyasal tespit maliyeti daha düşük, hızlı ve taşınabilir bir analiz teknolojisi sunmaktadır (Zheng ve diğerleri, 2022). Ancak, elektrokimyasal algılama platformlarında, karmaşık biyolojik ortamlarda elektrot kirlenmesinden dolayı düşük hassasiyet ve algılama problemleri gibi sınırlamalar mevcuttur. Bu problemleri gidermek için elektrokimyasal biyosensörlerin önemli bir bileşeni olan algılayıcı elektrotların nanoyapılarda üretilmesi ya da farklı modifikasyonlarla geliştirilmesi gerekmektedir. Nanoyapılı elektrotlar, yüksek yüzey aktifliği ve karmaşık biyolojik numunelerde çalışırken (serum, kan vb) biyolojik kirlenme direnci gibi avantajlı özellikler sağlayarak biyosensörlerin duyarlılık ve tespit avantajlarının gelişmesine yardımcı olmaktadır.

Bu tez çalışmasında, GDO ürünlerinin tespiti için yüzeyi indirgenmiş ve pullandırılmış grafen oksit yapısı ile temellendirilmiş, devamında ise altın (Au) ve

gümüş (Ag) bimetalik nano yapıları ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotlar (PGE) kullanılmıştır. Biyosensör yüzeyinin iletkenliğini iyileştirmenin yanında sensör yapısının duyarlılığını arttırmak için elektrot yüzeyine kaplanan pullandırılmış grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksit yapıları tez çalışması boyunca modifiye Hummers yöntemine göre sentezlenmiş ve pullandırma işlemi için bilyalı öğütme metodu kullanılmıştır. Sentezlenen grafen yüzey üzerine altın-gümüş nano yapıların modifikasyonu yapılarak Au-Ag/GO-rGO/PGE yoluyla GDO tespitine yönelik DNA bazlı elektrokimyasal biyosensör üretimi tamamlanmıştır. Ayrıca işlenmiş gıda ürünlerine ait genomik DNA kalite ve miktar karşılaştırması bakımından farklı DNA izolasyon protokolleri ile incelenmiş, incelenen ürünlerde soya ve mısır içeriğinin taranması için lektin ve zein genine spesifik primerlerle spesifik taramalar yapılmış, CaMV 35S promotör dizilerinin moleküler taraması gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının son basamağında ise moleküler verilerle karşılaştırmak ve tasarlanan GDO biyosensörünün etkinliğini gerçek gıda örneklerinde test etmek amacıyla elektrokimyasal empedans spektroskopisinden faydalanılmıştır. Elde edilen sonuçlar geliştirilen biyosensörün GDO tespitinde CaMV 35S promotör bölgesine sahip gıda ürünlerini bu gen bölgesini içermeyen ürünlerden ayırabildiğini göstermiştir. Bu tez çalışması ile elde edilen sonuçların, özellikle transgenik ürünlerin limanlarda ve gümrük kapılarında kontrol ve tespitinde kullanılması ile ithal olarak ülkemize gelen içeriğinde CaMV 35S promotör bölgesi bakımından GDO içeriği bulunduran işlenmiş ürünlerin hızlı bir şekilde GDO tarama testlerine tabi tutulmaları konusunda fayda sağlaması beklenmektedir.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO)

2.1.1 Biyoteknoloji ve genetiği değiştirilmiş organizmalar

Biyoteknoloji, canlı organizmalarla ilgilenen tüm teknolojileri kapsayan bir terimdir. "Biyoteknoloji" kelimesi, "bios" (hayatla ilgili her şeyi ifade eden) ve "technikos" (insan bilgi ve becerilerini içeren) olmak üzere iki Yunanca kelimedenden türetilmiştir (EuropaBio, 2017). Biyoteknoloji yeni, kullanışlı ürünler ve süreçler oluşturmak için biyolojik madde veya süreçleri kullanan teknolojileri içermektedir. Biyoteknolojiden yararlanan uygulama yelpazesi, ekmek, alkol ve peynir üretimi gibi geleneksel kullanımlardan genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) üretimi gibi daha modern uygulamalara kadar uzanmaktadır. Bu anlamda GDO üretimi, biyoteknolojinin modern uygulamalarından biri olan biyoteknoloji çatısı altına girmektedir. GDO'ları üretmek için çeşitli biyoteknoloji araçları kullanılmaktadır. Tarım, farmakoloji ve tıp disiplinleri altında biyoteknolojinin kullanıldığı alanlardan bazıları moleküler biyoloji, mikrobiyoloji, embriyoloji, doku kültürü ve genetik mühendisliğidir.

“Genetik modifikasyon” hem eski hem de yeni biyoteknolojileri kapsayan genel bir terimdir. Biyoteknoloji aşağıdaki gibi iki temel bölüme ayrılabilir (Shrestha, 2010):

- Gen dışında kalan biyoteknoloji (eski biyoteknoloji) tüm hücre, doku ve hatta bireysel organizmaları inceleyen süreçler ve metodolojiler.
- Genetik teknikleri içeren biyoteknoloji (yeni biyoteknoloji) klonlama, genetik manipülasyon gibi benzer süreçleri içeren teknikler.

“Transgenik teknoloji” ve “genetik mühendisliği” olarak da bilinen genetik modifikasyon (GM), canlı bir organizmanın genetik materyal DNA'sını değiştirmek veya mühendislik yapmak için kullanılan bir dizi tekniği içeren modern biyoteknoloji türüdür. Bu teknikler, genleri kesip birleştirmeye, mutasyona uğratmaya, kopyalamaya, çoğaltmaya ve ardından bu genleri bir organizmadan diğerine izole ve transfer ederek genetiği değiştirilmiş organizma olarak bilinen teknolojiyi oluşturur.

Çevre üzerinde zararlı bir etkiye sahip olmadan, kaliteden ödün vermeden gıda ve yem verimini arttırmanın yanında sağlıklı ve sürdürülebilir üretim yapabilmek tarımsal biyoteknoloji endüstrisinin en önemli hedeflerinden biridir. GDO teknolojisi bu konuda kullanılan genetik materyalin, doğal olarak hibritleşme veya doğal rekombinasyon ile oluşamayacak şekilde insanlar tarafından değiştirilmesi ile oluşan organizma olarak tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO, 2014) göre ise GDO'lar “genetik materyalin (DNA) doğal olarak meydana gelmeyecek şekilde değiştirildiği organizmalar” olarak tanımlanmaktadır. Benzer bir tanımla FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) ve Avrupa Komisyonu da GDO'yu rekombinasyon/çiftleşme yoluyla oluşmayan ürün veya ürünler olarak belirtmektedir (FAO, 2016). Bu tanımlar daha düşük fiyat, dayanıklılık, daha yüksek besin değeri veya her ikisi gibi bazı avantajlar sağlayabildikleri için üretilen genetiği değiştirilmiş canlıları kapsamaktadır (Mahgoub ve Nollet, 2019).

GDO üretiminin en etkili sebepleri arasında küresel nüfus artışı karşısında artan besin ihtiyacını karşılayabilme ihtiyacıdır. Birleşmiş Milletler Nüfus Fonu (UNFPA) 2022 tahminlerine göre mevcut küresel insan nüfusunun 2021 yılı için yaklaşık 7 milyar 874 milyon 965 bin 732 kişi olduğu ve 2022 yılı için bu rakamın yaklaşık 8 milyar kişi olacağı tahmin edilmiştir (TÜİK 2022). Birleşmiş Milletler Ekonomik ve Sosyal İşler Departmanı/Nüfus Bölümü Dünya Nüfus Beklentileri: 2015 Revizyonu raporuna göre, dünya nüfusunun büyüme hızı son yıllarda yavaşlamış olsa da yıllık 83 milyon kişinin eklenmesi beklenmektedir. Buna göre, tahmini dünya nüfusu 2030'da 8,5 milyar ve 2050'de 9,7 milyar olacaktır. Nüfusun genişlemesi, dünyadaki yetersiz beslenmeye neden olan en önemli sebeplerden biridir. 2016 yılında, BM Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), 780 milyonu geliştirmekte olan bölgelerde olmak üzere dünyada 795 milyon insanın yetersiz beslendiğini bildirmiştir (FAO, 2015). Bu nedenle, yetersiz beslenmenin ortadan kaldırılması küresel politika oluşturma'nın önceliği olmalıdır. Mahsullere yönelik artan küresel talebi karşılamak için en gerçekçi çözüm, halihazırda ekili olan arazilerde mahsul verimini artırmaktır. FAO, kişi başına gıda üretimi için mevcut sınırlı ekilebilir arazi miktarının 0,242 hektardan 2050 yılına kadar 0,18 hektara düşeceğini öngörmektedir (Alexandratos, 2012). Dönüm başına daha fazla verim sağlanmalıdır. Bu sebeple çözüm, hastalık direnci, yabancı ot kontrolü gibi genetik iyileştirmelerden gelmelidir (Oliver, 2014).

Geleneksel ıslah, istenen bazı özelliklerin (örneğin hastalık direnci) ifade edilmesi için bir ebeveyn soyunun başka bir ebeveyn soyu ile çaprazlanmasına dayanmaktadır (Oliver, 2014). İstenen özelliği seçmek ve/veya istenmeyen özellikleri en aza indirmek için en iyi nesil seçilir ve ebeveynlerinden birine (bitki veya hayvan) geri melezlenir. İstenen özelliğin ifadesi için bu süreç genellikle birkaç yıl alır (örneğin buğday için 10-15 yıl) ve sonrasında geleneksel ıslah yolu ile ticari olarak yeterli sayılarda çoğaltılır. Uzun ıslah sürelerinin yanında istenen özellikleri gösteren bir gen havuzu ve geliştirilmek istenen organizmaların melezlenebilmesi için birbiri ile uyumlu olması gerekmektedir. Tüm bu gereklilikler geleneksel ıslahın gelişimini kısıtlamaktadır. Modern metodolojiler, yeni mutasyon varyasyonlarını belirlemek için kimyasallar veya radyasyon kullanabilir. Ancak bunlar, istenilen özelliğe ulaşmak için rastgele şans faktörüne bağlıdır (Oliver, 2014; Zhang ve diğerleri, 2016). Bu sebeple genetiği değiştirilmiş gıdaların besin zincirimize girmesi için neden bu kadar büyük çaba gösterildiğini anlamak önemlidir (Zhang ve diğerleri, 2016).

2.1.2 GDO mekanizması

GDO'ları üretmek için hem geleneksel hem de modern biyoteknolojik teknikler kullanılmaktadır. Tarımda kullanılan geleneksel biyoteknoloji teknikleri aşağıdaki metotları içerir (Mahgoub, 2016):

- Basit seçim
- Markör destekli seçim
- Çaprazlama/Melezleme
- Türler arası çaprazlama
- Embriyo kurtarma
- Somatik hibridizasyon
- Somaklonal varyasyon
- Mutasyon ıslahı
- Bitki doku kültürü ve mikro çoğaltma

Bu teknikler uzun süredir tarımda kullanılmakta ve doğal olarak var olmayan bitkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Modern biyoteknolojik teknikler genellikle genetik mühendisliğinde kullanılan tekniklerdir. Aşağıdaki yöntemler, tarımsal ürünlerin genetik yapısında istenen değişiklikleri elde etmek için bugün uygulanan modern tekniklerden bazılarıdır:

- Mikrobiyal vektörler (bakteriyel taşıyıcılar ve viral taşıyıcılar dahil)
- Elektroporasyon
- Mikroenjeksiyon
- Mikropartikül bombardımanı
- Gen ekleme
- Gen susturma
- Kalsiyum fosfat çökeltme

DNA'nın bir canlı organizmadan diğerine transferinin keşfi 1946 yılı itibari ile olmuştur. Genetiğiyle oynanmış ilk bitki olan antibiyotiğe dirençli tütün bitkisi 1983'te geliştirilmiştir. Genetik mühendisliği yoluyla geliştirilen gıdayla ilgili ilk GDO'lardan biri ise Flavır Savr domatestir. Kaliforniya merkezli Calgene şirketi, bu genetiği değiştirilmiş domatesin olgunlaşmasını toplama sonrasına kadar geciktiren ACC sentaz genini içerecek şekilde üretmişlerdir. Flavır Savr domatesin üretimi, kanola, mısır, soya fasulyesi, patates ve kabak dahil *Bacillus thuringiensis* (Bt) mahsullerinin üretimine yol açan genetik olarak modifiye mahsulleri üretmek için daha fazla çalışmanın başlatılmasına yardımcı olmuştur. GM'un kazandırdığı özelliklerden bazıları, herbisitlere ve virüslere karşı dirençtir. Genetik modifikasyon tarafından elde edilen bir diğer olumlu özellik, gıda ürünlerindeki besin maddelerinin arttırılmasıdır. 2000 yılında, A vitamini içeriğini artırmak için pirincin genetiği değiştirilmiştir ve bu teknoloji, gıdanın besin içeriğini artırmak için ilk kez kullanılmıştır (Takepart, 2017).

GM süreci temel olarak şu adımları içermektedir; ilgilenilen bir özelliğin belirlenmesi, bu genetik özelliğin izole edilmesi, bu özelliğin istenen bir organizmanın genomuna eklenmesi ve ardından tasarlanmış organizmanın büyütülmesidir (Powell, 2015).

GM'da izlenen adımların ayrıntıları aşağıdadır:

Adım 1: Nükleik asit (DNA/RNA) Ekstraksiyonu

Herhangi bir izolasyon prosedüründe ilk adım, viral, bakteriyel veya bitki hücreleri olabilen istenen özelliği içeren organizmanın hücre duvarını kırmak için hücrenin parçalanmasıdır. Bu, nükleik asidin ekstraksiyonuna yardımcı olur.

2. Adım: Gen Klonlama

Klonlama işlemi dört aşamadan oluşur: DNA parçalarının üretilmesi, bir vektöre aktarılması, konak hücreye girilmesi ve gerekli dizinin seçilmesi.

Adım 3: Gen Tasarımı

İstenen gen klonlandıktan sonra, bitki hücresi içindeki ekspresyonunu kontrol edecek DNA parçalarına bağlanmalıdır.

Adım 4: Transformasyon (Gen yerleştirme)

Adım 5: Geri çaprazlama (Backcross breeding)

Bu işlem, halihazırda istenen tarımsal özelliklere sahip olan ancak transgenin özelliğinden yoksun olan elit üreme hatları veya ticari çeşitler ile üretilen transgenik bitkilerin çaprazlanmasını içerir. Tüm bu adımlar biyoteknoloji laboratuvarında başlatılır, daha sonra ilk büyüme için seraya aktarılır ve son olarak mahsulün olgunluğa ulaştığı tarlaya götürülür.

Genetiği değiştirilmiş bitkilerin üretiminde ilgili seçilmiş yabancı genler bitki genomlarına eklenmişlerdir. Yabancı DNA'nın genoma katılmasıyla başlayan bu süreç, birkaç elementin fonksiyonel bir genetik birim oluşturmak üzere birleştirilmesini gerektirir. Modifikasyon genellikle bir promotör ve bir terminatör olmak üzere iki düzenleyici öge olarak seçilen gen bölgelerini içerir. Karnabahar mozaik virüsünden konstitütif 35S promotörü ve *Agrobacterium tumefaciens*'in nopalın sentaz geninden (NOS) izole edilen NOS 3 sonlandırıcı, kullanılan en yaygın düzenleyici öğelerden ikisidir. Bu iki element, transagenik organizmaların çoğunda birlikte veya tek olarak bulunur. CaMV 35S promotörü, birkaç farklı bitki türünde yapısal olarak aktiftir. CaMV 35S promotörünün uzunluğu 400 baz çiftine ulaşabilir. GDO tespit çalışmalarında, testin doğruluğu, her numunede kontrol olarak kullanılacak negatif ve pozitif kontrollerin varlığına bağlıdır (Wurz ve diğerleri, 1999). Bu tez çalışmasında incelenen örneklerde GDO içeriğinin tanımlanması için karnabahar mozaik virüsünden konstitütif 35S promotörünün taranması amaçlanmıştır.

2.1.3 Genetiği değiştirilmiş bitkilerin üretimi

Genetiği değiştirilmiş bitkiler üretmek için, belirli özellikleri kodlayan gen veya genler bitki hücresine sokulur, ardından doku kültürü yoluyla bitki yeniden oluşturulur. Genel olarak, hücrelerdeki genleri değiştirmenin üç yolu vardır (Zhang ve diğerleri, 2016).

Mikropartikül bombardımanı 1980'lerin sonunda Sanford (Stanford, 1990) tarafından geliştirilen ve eksojen DNA'yı iletmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Eksojen DNA, altın veya tungsten mikropartiküller üzerinde kaplanır. DNA, tohum veya meristemler gibi embriyonik dokulardan basınçlı helyum tarafından hedeflenen dokulara yüksek hızda iletilir. Protoplastlara elektroporasyon, mikroenjeksiyon, kloroplast transformasyonu, silikon-karbür şeritleri, mezogözenekli silika nanoparçacıkları vb. dahil olmak üzere, DNA'yı bitki hücrelerine iletmenin başka yolları da vardır. (Barampuram ve Zhang, 2011). Bununla birlikte, parçacık bombardımanı, büyük DNA parçalarının, hatta bütün kromozomların aynı anda transferinde daha etkili bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (Schmidt ve diğerleri, 2008).

Agrobacterium tumefaciens'in kullanımı, bitki hücrelerine eksojen genlerin aktarılmasında yeni bir çağ açmıştır. Bir toprak bakterisi olan *A. tumefaciens*, bitkileri enfekte ederek taç tümörü oluşturur. Bu bakteriler bitkinin genomunu değiştirerek sadece bitki hücrelerinin çoğalmasına neden olmakla kalmaz, aynı zamanda bitkinin kendileri için modifiye amino asitler üretmesini sağlar. Bakteriler, gen aktarımını gerçekleştirmelerini sağlayan tümör indükleyici plazmide ("Ti-plazmit") sahiptir. Araştırmacılar Ti-plazmitin T-DNA (transfer DNA) bölümüne "tasarımcı genler" ekleyerek plazmidi modifiye edebilmektedir (Zhang ve diğerleri, 2016).

2012 yılında ise "CRISPR-Cas9" sistemi geliştirilmiştir. Yeni bir genom düzenleme aracı olarak bu sistem çeşitli hücre tiplerindeki genleri değiştirmek için bir yöntem sağlar (Ran ve diğerleri, 2013). Bu teknik, genetik mühendisliğinin etkinliğini önemli ölçüde artırarak bitkilerle çalışmayı çok daha kolay hale getirmektedir (DeMayo ve Spencer, 2014). Cas9, orijinal olarak bakterilerde bulunan ve konakçı bakterileri istilacı DNA moleküllerinden (örneğin virüsler) koruyan bir DNA endonükleazdır. Endonükleaz, dizisi çıkarılacak hedef DNA'ya diziye tamamlayıcı olan özel bir "kılavuz RNA" (gRNA) tarafından yönlendirilir. Böylece saldırı tarafından yönlendirilen Cas9, çift sarmallı DNA'nın her iki zincirini de bölmek için iki aktif bölgesini kullanır. Yeni oluşan DNA çift sarmallı kopmalar daha sonra hücrelerin içinde iki farklı mekanizma tarafından onarılır. Bunlardan "homolog olmayan uç birleştirme" mekanizması, küçük bir silmeye veya rastgele DNA yerleştirmesine neden olarak, kesilmiş bir gen veya nakavt ile sonuçlanabilir. "homolog rekombinasyon" mekanizması ise kırılma bölgesindeki endojen gene bir donör DNA'nın eklenmesine izin verir (Zhang ve diğerleri, 2016).

2.1.4 Transgenik soya fasulyesi

Gıda üretimi için onaylanan ilk ve en yaygın mahsul, 1996'da Roundup Ready (RRTM) soyadır (Rott ve diğerleri, 2004). Monsanto tarafından geliştirilmiştir ve Roundup herbisite toleranslıdır. Bu transgenik içerik, 35S promotor, *Petunia hybrida*'dan CTP4 lider sekansı, *Agrobacterium tumefaciens*'ten 5-enol-pyruvyl shikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS) genini ve herbisit toleransı için *Agrobacterium tumefaciens* nopalın sentaz (nos) sonlandırıcısı bulundurur (Monsanto Şirketi, 2000). Transgenik soya fasulyesi, soya fasulyesinin biyolojik özelliklerini modifiye etmek için yapay olarak izole ve modifiye edilmiş genlerin mevcut soya fasulyesi genomuna sokulmasıyla meydana gelmektedir (Li ve diğerleri, 2016; Du ve diğerleri, 2016; Fu ve diğerleri, 2018). Moleküler biyoloji teknikleriyle transgenik olarak elde edilen transgenik soya için geleneksel ıslah yoluyla yapılan melezlemenin neden olduğu herhangi bir bağlı gen sürüklenmesi sorunu yoktur. Transgenik soya fasulyesindeki hedef genler uzak türlerden veya sentetik genlerden elde edilebilmeleri bakımından geniş bir kaynak yelpazesine sahiptir. Bu yöntem, mevcut genetik kaynakları arttırmakta ve soyanın dar genetik geçmişinin neden olduğu üreme sınırlamalarını önlemektedir (Fu ve diğerleri, 2018). Transgenik soya tüm bu nedenlerden dolayı transgenik teknolojinin kullanıldığı en yaygın alanlardan birini oluşturmaktadır.

1960'lardan beri soya ve soya ürünleri çeşitli gıda türlerinde içerik olarak kullanılmaktadır. Gıda ürünlerine soya eklenmesi sadece ürün kalitesini iyileştirmekle kalmaz (örn. gelişmiş duyuşal özellikler ve emülsifikasyon), aynı zamanda değerli bir temel amino asit kaynağıdır. Üretim sürecinde soya unu / irmik, soya proteini konsantreleri ve soya proteini izolatları gibi çeşitli farklı formlarda soya ürünleri kullanılabilir (Belloque ve diğerleri, 2002). Singh ve diğerleri (2008), sert kurabiyelerde % 2-5 yağsız soya ununun eklenmesinin eşleştirmeyi iyileştirdiğini ve gevrek bir doku oluşturduğunu bildirmiştir. Bu amaçla fırıncılık ürünlerinde soya türevlerinin kullanımına uzun yıllardır büyük ilgi vardır. Bunun yanında, soya fasulyesi beslenme içeriği bakımından iyi bir bitkisel yağ ve protein kaynağıdır (Korth, 2008).

Türkiye'de tüketilen soyanın çoğu, transgenik soya fasulyesi ekiminin ve yetiştirilmesinin serbest olduğu başka ülkelerden ithal edilmektedir. Bu sebeple işlenmiş gıdalarda transgenik soya varlığının ve miktarının tespiti en önemli tüketici

endişelerinden biri olan gıda kalitesi ve güvenliği konusunda bilgi sağlanmasına katkı sağlayacaktır (Mandacı ve diğerleri, 2014). Ülkemizde de tüketilen pek çok gıda içeriğinde soya ürünleri kullanılmaktadır bu sebeple yapılan bu tez çalışmasında da seçilen örnekler çoğunlukla soya içeriği bulunduran işlenmiş gıda örneklerinden oluşmaktadır.

Genetiği değiştirilmiş soya ürünlerinin tespiti ve zorunlu etiketleme gerekliliğini karşılamak için, çeşitli ülkeler bu alana önemli insan gücü ve malzeme kaynakları yatırmakta bu sayede tespit teknolojisi sürekli olarak iyileşmektedir. Bu bağlamda, genetiği değiştirilmiş soya fasulyesinin ana saptama yöntemleri, protein tespiti ve nükleik asit tespiti olmakla birlikte elektrokimyasal gen teknolojisi, son yıllarda hızla gelişen yeni ve oldukça etkili bir moleküler biyoloji teknolojisi (Deng ve diğerleri, 2019). Gerçekleştirilen tez çalışmasında GDO tespitinde etkin bir şekilde kullanılan moleküler biyoloji tekniklerinin biyosensör teknolojileri ile birleştirilmesi ve desteklenmesi hedeflenmektedir.

2.1.5 GDO konusundaki endişeler

Genetiği değiştirilmiş gıdaların ortaya çıkışı, küresel gıda kıtlığı sorununu çözmüştür fakat bununla birlikte gıda güvenliği tartışma konusu haline gelmiştir. GM teknolojisinin karşıtları tarafından sunulan temel argüman, daha iyi alternatifler olduğu için uygulanmasına gerek olmadığı yönündedir. Önerilen alternatifler arasında geleneksel ıslah, GM olmayan biyoteknoloji ve organik tarım kullanımı yer almaktadır. GM teknolojisinin muhalifleri tarafından dile getirilen bir eleştiri, bu teknoloji 1-2 gen gerektiren uygulamalar için iyi olsa da, bazı özelliklerin (kuraklığa dayanıklılık gibi) birçok gen içermesi sorunudur.

Eleştirmenler ayrıca genetiği değiştirilmiş herbisite dayanıklı ekinlerin çoğalmasının "süper yabancı otlar" ve "süper zararlılar" ile herbisitlere ve pestisitlere karşı dayanıklı böceklerin mutasyona uğramasına yol açtığına dikkat çekmektedir. GM ürünleri ABD tarımına dahil edildiğinden beri pestisit ve herbisit kullanımında bir artışa yol açmıştır. Organik ürünler yetiştiren ve satan bazı çiftçilerin GM tarlalarında çapraz kontaminasyon yaşadığını iddia edilmektedir (Takepart, 2017).

GDO'ların güvenliği ile ilgili olarak düzenleyici makamlar tarafından yapılan çalışmaların nesnelliği konusunda da endişe duymaktadırlar. Karşıt gruplar tarafından dile getirilen diğer endişeler arasında GDO'suz gıda ürünlerinin olası

kontaminasyonu, GDO'ların çevre üzerindeki potansiyel zararlı etkileri ve GDO'ları üreten ve pazarlayan şirketlerde gıda arzının sıkı kontrolüne duyulan ihtiyaç yer almaktadır. GDO karşıtları, Monsanto, Syngenta ve Dow gibi birkaç güçlü şirketin hem tohumların GDO'sunu hem de bu mahsullerin direnç oluşturmak üzere tasarlandığı pestisit ve herbisitlerin üretimini kontrol ettiği gerçeğine işaret ediyor. GM, belirli tohumların patentlenmesine yol açmıştır ve Monsanto, çiftçilere şirketin sahip olduğu tohumları biriktirip yeniden ektikleri için dava açmıştır.

GDO'ların güvenliği konusuyla ilgili olarak eleştirmenler, GDO'ların ve onlardan türetilen ürünlerin insan veya hayvan kullanımı için güvenli olduğu iddiasını destekleyecek bilimsel bir fikir birliği olmadığına inanmaktadır (Takepart, 2017).

Liu (2021), GDO'lu gıdaların gıda güvenliği konusunda sunduğu çalışmada genetiği değiştirilmiş gıdaların güvenliği konusunda daha ayrıntılı araştırma ve değerlendirmeye ihtiyaç duyulduğundan bahsetmektedir. Bu kaygılardan bazıları özetle şu şekilde ifade edilmektedir. GDO'lu ürünlerle ilgili kaygıların başında günlük olarak tüketilen ve akut zehirlenme riski az olan gıdaların doğal özelliklerinin değişmesi kaynaklı olarak öngörülemeyen zararlar gelmektedir. Bunun yanında, genetiği değiştirilmiş mahsuller, biyolojik zinciri ve orijinal ekolojik yapıyı tahrip ederek orijinal çeşitlerin doğal olmayan şekilde ortadan kaldırılmasına ve tür çeşitliliğinin etkilemesine neden olabilmektedir. Genetiği değiştirilmiş ürünlerin insan vücuduna verdiği zarar konusunda ise, yapılan iddialar spekülasyon olarak görülmektedir, çünkü bu gıdalar henüz uzun vadeli güvenlik araştırmalarından geçmemiştir. Bu aşamada genetiği değiştirilmiş gıdaların insan vücudu üzerindeki olası etkileri, insanlarda alerjik reaksiyonlara neden olabileceği şeklindedir. Bir besine karşı alerjisi olan kişi, daha önce alerjisi olmadığı bir besine karşı alerji gösterebilir. Bunun nedeni, bu tür yiyeceklerin alerjiye neden olan proteinleri içermesidir. Doğal seçilimin etkisi altında genetiği değiştirilmiş bitkiler, yerel çevreye uyum sağlama ve daha geniş bir yaşam alanı işgal etme konusunda avantajlara sahiptir. Bu durumdan etkilenen bazı orijinal türler yaşam alanlarını kaybedebilir veya genetiği değiştirilmiş mahsullerin getirdiği ekolojik çevredeki değişikliklere uyum sağlayamayabilir. Tüm bu etkilerinin yanında, yeni teknolojilerin geliştirilmesi ile bu süreç geliştirilmeye devam edecektir. Bu nedenle, şu anda piyasada bulunan genetiği değiştirilmiş gıdalar, sıkı güvenlik değerlendirmelerinden geçmektedir. Analiz ve araştırmaların sürekli derinleşmesiyle,

insanların genetiği değiştirilmiş teknolojinin getirdiği yiyeceklerin besin zincirine daha güvenli bir şekilde girmesi hedeflenmektedir.

GDO'lar hakkında, özellikle gıda üretiminde kullanımları konusunda geniş tartışmalar olduğu açıktır. Anlaşmazlık, tüketiciler, biyoteknoloji şirketleri, resmi düzenleyiciler, sivil toplum kuruluşları ve bilim adamları dahil olmak üzere farklı tarafları içermektedir. GDO'ların üretimi ve kullanımıyla ilgili olarak tartışmalara yol açan temel endişe konuları Mahgoub (2016) tarafından aşağıdaki şekilde listelenmiştir:

- Gıda güvenliği ve insan sağlığı ile ilgili endişeler
- Çevresel kaygılar
- Etik kaygılar
- Düzenleyici ve yasal kaygılar
- Ekonomik kaygılar
- Hayvan sağlığı ve refahı
- Tüketici tercihi
- Bilimsel yayıncılıkta önyargı ile ilgili endişeler

Biyogüvenlik ve çevresel kaygılara rağmen, transgenik teknoloji, gelişmiş mahsul bitkilerinin hızlı gelişimi ve elverişli özelliklerin istiflenmesi bakımından tercih edilen bir yöntemdir. Son 22 yılda, küresel transgenik mahsul alanı 1996'da 1,7 milyon hektardan 2018'de 191,7 milyon hektara, yani 113 kat artmıştır. Bu ürünler içerisinde, 95,9 milyon hektar (% 50) transgenik soya fasulyesi, 58,9 milyon hektar (% 31) transgenik mısır, 24,9 milyon hektar (% 13) transgenik pamuk, 10,1 milyon hektar (% 5,3) transgenik kanola ve 1,9 milyon hektar (< % 1) diğer transgenik ürünler yer almaktadır (ISAAA, 2018). Bugüne kadar, 32 üründe toplam 525 transgenik içerik ticarileştirilmiştir (ISAAA, 2019; Kumar ve diğerleri, 2020). Sırasıyla maksimum içerik miktarı bakımından mısır (238), ardından pamuk (61), patates (49), Arjantin kanolası (42), soya fasulyesi (41), karanfil (19) ve diğerleri gelmektedir.

2.1.6 GDO'lu gıdalar konusundaki destekleyici görüşler

Destekçiler tarafından sunulan argümanlar, GM'un bitki ve hayvanların özelliklerini iyileştirmek için bir araç olarak kullanılabileceği, dünya çapında açlığın ve yetersiz beslenmenin azaltılmasına yardımcı olabileceği, ayrıca bitki ve hayvanların üretim

maliyetlerini azaltabileceği yönündedir. Buna ek olarak sağlık veya çevresel riskler bakımından GM ürünlerinin kanıtlanmış örnekleri veya vakaları yoktur.

GDO savunucuları, GDO teknolojisinin yeni olmadığına ve organizmaları değiştirmek için binlerce yıldır kullandığımız çeşitli teknolojilerin bir uzantısı olduğuna dikkat çekmektedir. İnsanlar tarafından tüketilen yiyeceklerin hemen hemen tamamı, örneğin yapay seçilim veya çapraz tozlaşma yoluyla, insan faaliyeti tarafından halihazırda kapsamlı bir şekilde değiştirilmiştir (Novella, 2014).

Genetiği değiştirilmiş gıdaların savunucuları, insan tüketimi için tamamen güvenli olduklarını ve kullanımlarıyla ilişkili hiçbir olumsuz etkiye rastlanmadığını savunmaktadır. Ayrıca, dünya çapında mahsul verimini artırmak ve dünyadaki açlığı önemli ölçüde azaltmak için GM gıdaların yetiştirilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir. Dünyanın dört bir yanındaki tüketiciler, uzun süredir genetiği değiştirilmiş gıdaları tüketmekte ve daha ucuza satın almaktadır (Takepart, 2017).

GDO'lu gıdaların güvenliği ve potansiyel sağlık etkileri sürekli olarak araştırılmaktadır. Büyük hacimli araştırma sonuçları, mevcut GDO'ların insan tüketimi ve hayvan yemi olarak güvenli olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, The American Association for the Advancement of Science (AAAS), The National Academies of Science (NAS), The World Health Organisation (WHO) gibi birçok güvenilir meslek kuruluşu tarafından onaylanmıştır.

Eleştirmenler ise GDO'nun yarar veya zararları konusunda yeterli test yapılmadığını iddia etmektedir (Novella, 2014). Bu nedenle, tüm faaliyetlerin risklerini değerlendirmek, insanları ve çevreyi korumak için gerekli kontrollerin yapıldığından emin olmak çok önemlidir. Bu tür işler için risk değerlendirmelerinin, çalışmaya başlamadan önce onay için düzenleyici makamlara sunulması tavsiye edilmektedir. Düzenleyici makamlar, bu nedenle, çalışma faaliyetleri sırasında bulaşıcı materyalleri içeren tesis ve ekipmanlarda çalışmanın yapılmasını sağlayacak konumdadır.

2.1.7 GDO konusunda yasal düzenlemeler

Transgenikler hakkındaki ana tartışma alanları, genetik olarak modifiye mahsullerin ve GM gıdaların insan, hayvan sağlığı ve çevre üzerindeki gerçek ve potansiyel riskleri, pestisit direnci üzerindeki etkisi, yapılan ve yayınlanan araştırmaların gen teknolojisi ve GM üzerindeki güvenilirliği ile objektifliği hakkındadır. GM gıdaların

etiketlenmesinin gerekip gerekmediği, gen teknolojisi ve GM mahsullerinin çiftçiler üzerindeki etkisi, biyoteknoloji şirketleri, araştırmacılar ve hükümet arasındaki çıkar çatışmaları, GM gıdaların dünya nüfusu üzerindeki beslenmedeki olası rolü ve dünya çapında gıda güvensizliğinin azaltılmasına yardımcı olup olmadığı hakkında tartışmalar devam etmektedir. Bu sebeple, GDO'ların, insanlar ve çevre arasındaki temasını yönetmek ve sınırlandırmak için bazı kontrol önlemlerinin uygulanması gerekmektedir. Transgeniklerin yönetim süreci GDO'ların kullanımı, depolanması, taşınması ve imhasını kapsamaktadır (Health and Safety Executive, 2017).

GM gıdalar da dahil olmak üzere GDO ürünlerinin etiketlenmesi, düzenleyici kurum ve yetkilileri ilgilendiren ana konulardan biridir. Genel olarak, GDO ürünlerinin etiketlenmesi ülkeler arasında değişen bir eşik GDO içerik seviyesine kadar zorunlu veya isteğe bağlı olmakla beraber bu konuda çok fazla tartışma vardır. Tarım endüstrisi etiketlemenin gönüllü olması gerektiğine, serbest pazar ve tüketici tercihlerinin etiketleme sürecini etkileyeceğine inanmaktadır. Tüketicilerin etiketli gıdaları etiketsiz gıdalara tercih etmesi durumunda, endüstri kendini yeniden düzenleme veya tüketicileri kaybetme riski taşımaktadır. Tartışmanın diğer tarafında, insanların ne yediklerini bilme hakkına sahip olduklarını belirten GDO gıdalarının zorunlu olarak etiketlenmesine inanan tüketici grupları bulunmaktadır.

GDO teknolojisinde etiketleme hakkında uluslararası görüş farklılıkları vardır. Avrupa birliği (AB), GDO mahsulü üretim sürecine dayanan düzenleyici rejimler ve yasal zorunluluklar uygulayarak, GDO'lu ürünlerin izlenebilirliği ve etiketlenmesi yoluyla tüketici seçimine bağlı bir uygulama sunmaktadır. Ayrıca GDO olmayan tahıl veya gıda / yem ürünlerinde tesadüfî veya düşük seviyeli GDO varlığı da Cartagena Biyogüvenlik Protokolü'ne uyan ülkeler için uluslararası endişe kaynağı olmuştur. Bu yaklaşıma göre, genetiği değiştirilmiş organizmalar, bu ürünlerin etkinliğini ölçen bilimsel verilere ilişkin olarak, insan sağlığı ve biyolojik çeşitlilik üzerindeki riskleri en aza indirecek şekilde kullanılmalı, taşınmalı ve işlenmelidir (Madde 18.2.a). AB'deki mevzuata göre, analitik bir numunede ağırlıkça % 0,9'luk GDO içeriğinin eşik seviyesinde mevcut olabileceği ve en az bu oranda varlığı kanıtlanan tahılların / yağlı tohumların, gıda ve yem ürünlerinin izlenebilirliği ve etiketlenmesinin kabul edilebilir olduğu belirtilmektedir. Kanada ve ABD, son ürünün besin içeriği ve gıda güvenliği yönündeki GDO varlığının GDO olmayan

ürünlerden ayırt edilemez olduğunu ve bu gıda ürünlerinin GDO'lu ürünler ile büyük ölçüde eşdeğer olduğunu düşünmektedir (Vega Rodriguez ve diğerleri, 2022).

Ülkemizde de 2010 yılı 5977 sayılı Biyogüvenlik Kanununa göre GDO'lu ürünlerin gıdalarda kullanımı yasaktır ve hayvan yemlerinde kullanımı yine biyogüvenlik kurulu tarafından belirlenen izin verilmiş genlere ait eşik değerleri çerçevesinde etiketleme zorunluluğu içerisinde. GDO içerikleri bakımından var olan ülkeler arası bu temel farklılıklar dünya çapında eş zamansız düzenlemeler ve izlenebilirlik gereksinimleri nedeniyle, tedarik zincirini izleyen, ürün içeriğini doğru bir şekilde onaylayan ve uluslararası etiketlemeye uygunluk gösteren doğrulanmış analitik yöntemler uygulanmadıkça tahıl ticaretini bozma potansiyeli yaratmaktadır (Demeke ve Jenkins, 2010). Bu sebeple yapılan tez çalışmasının, ülkemizde özellikle işlenmiş gıdalar için yapılan GDO tespiti metotlarının daha da geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

2.1.8 GDO tespit yöntemleri

Avrupa mevzuatına göre (Komisyon Tavsiyesi, 2004/787 / CE), transgenik DNA'nın miktarı, GDO DNA kopyaları / taksonomik DNA kopyaları oranı olarak ifade edilmelidir, bu yüzden GDO'ları içeren numunelerin analizi, yabani tür organizmada mevcut olan hedef bitki türlerinden toplam DNA miktarının bir tahminini sağlamak için taksonya özgü miktarların belirlenmesini gerektirir. Gıda ve yem örneklerinde GDO'ların varlığının ortaya koyulması protokole uygun bir ön işlem adımından taksona özgü deneyle başlamaktadır. Bitkisel DNA bulunması durumunda pozitif sonuç elde edilir. Sonraki adımdaki, tarama testi ile herhangi bir GDO'nun varlığının doğrulanması amaçlanmaktadır. Son olarak ise, spesifik olayı ve / veya eklenmiş geni ayırt etmek ve ardından numunedeki GDO içeriğinin niceliksel olarak belirlenmesi gerekmektedir (Noma ve diğerleri, 2022). Bu deneysel akış metoduna göre, tez çalışmasının moleküler ayağı boyunca hedef bitki türlerinin tespiti için soya ve mısır içeriği bakımından taksona özgü PCR taramaları yapılmış, ardından transgenik gen bölgesi taramaları gerçekleştirilmiştir.

Tarımsal ürünlerde, gıda ve yemlerde GDO'ların mevcudiyetinin ve miktarının izlenmesi ve doğrulanması ihtiyacı, bu ürünlerin doğru, hassas, hızlı, ucuz tespiti için analitik yöntemlere olan ilgiyi ortaya çıkarmıştır. GDO'ların varlığını ortaya koymak için protein ve DNA'nın saptanmasına dayanan iki klasik yaklaşım kullanılmıştır

(Elenis ve diğ erleri, 2008). Protein temelli yöntemler, transgenik genler tarafından kodlanan yeni proteinleri tespit ederken, DNA temelli yöntemler, genetik modifikasyonla ilgili DNA dizisini tespit etmektedir. Bu iki yöntem içerisinde DNA temelli yöntemler daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Fraiture ve diğ erleri, 2015).

GDO'larda bulunan DNA hedeflerine göre, DNA temelli GDO testleri farklı basamaklarda sınıflandırılmaktadır. Birinci basamakta yer alan yöntemler sıklıkla “tarama yöntemleri” olarak adlandırılır ve birçok farklı GDO'da bulunan promotörler ve terminat rler gibi GDO'larda ortak olan DNA elementleri içerir. Bazen, *neomisin fosfotransferaz II (nptII)* geni olarak adlandırılan neomisin-kanamisin dirençli gen gibi marker genleri de tarama hedefleri olarak kullanılmaktadır (Wang ve diğ erleri, 2009). İkinci basamak, spesifik genetik modifikasyonla ilişkili özellik geninin bir parçasını tespit eden gene özgü yöntemlerdir. Bu yönteme örnek olarak *Bt* veya *CP4 EPSPS* genleri verilebilir. Pozitif bir sinyal elde edilirse, GM ile ilişkili dizilerin varlığı oldukça muhtemeldir, ancak belirli bir GDO'yu tanımlamak bu özellik geninin farklı organizmaların transformasyonunda da kullanılabilir olması bakımından kesinlik sağlamaz (Miraglia ve diğ erleri, 2004). Hem tarama hem de gen spesifik yöntemler doğal olarak meydana gelen DNA sekanslarına çok yakın bir şekilde tespit edilir ve bu da testlerde yanlış pozitif analitik sonuç elde etme riskini önemli ölçüde arttırır.    nc  basamak, promotör özellik geni ve sürekli terminatör gibi iki DNA unsuru arasındaki bağlantıyı hedefleyen yapıya özgü yöntemlerdir. Bu yöntemler, doğada bulunmayan DNA dizilerini hedefler. Bununla birlikte, farklı GDO'lar, örnek olarak, aynı promotör ve özellik genlerine sahip iki farklı GDO mısı, MON809 ve MON810 için olduğu gibi aynı DNA elemanlarını payla abilirler. En yüksek özgüllüğe, eklenen DNA ile alıcı genomu arasındaki entegrasyon lokusunda bulunan, hedefin karakteristiği olan benzersiz birleşim noktaları olması durumunda ulaşılır. Bu tür yöntemlere olaya özel yöntemler denir. Ancak, bu yöntemlerin bile sınırlamaları vardır. İki GDO hattı arasındaki melezleme, istiflenmi  genlere yol açabilir. Örneğin, herbisit toleranslı bir GDO, insektisit toleranslı bir GDO ile birleştirilebilir. Ortaya çıkan melezlerde her iki dizi gen bulunur. Kantitatif yöntemler istiflenmi  gene sahip GDO ve iki ebeveyn GDO'su arasında ayırım yapamaz. ABD'de, bu tür hibrid GDO düzenlenemez. Bununla birlikte, Avrupa Birliği'nde, gen istiflenmi  melezler yeni tek GDO olarak kabul edilir ve kendi yetkilerini gerektirir (Miraglia ve diğ erleri, 2004).

Protein temelli yöntemler, protein ve spesifik antikor arasındaki bağlanmayı hedef alır ve bu yöntemlerin çoğu enzim bağlı immünosorbent analizine (ELISA) dayanmaktadır. Bu durumda, proteinin bütünlüğünü etkileyen teknolojik süreçler göz önünde bulundurulmalıdır ve bu yaklaşımlar genellikle aynı veya benzer proteinleri eksprese eden çeşitli GDO'lar arasında ayırım yapamaz (Mafra ve diğerleri, 2008). GDO tespiti için uygulanan DNA bazlı yöntemler içinde bu yöntemin yüksek duyarlılığı nedeniyle gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yer almaktadır (Gašparič ve diğerleri, 2010). Ancak, teknik nispeten pahalı ekipman ve nitelikli personel gerektirir.

Gıda güvenliği değerlendirmesinin temel amacı, gıdaların kimliği ve bileşimi hakkında güvenilir bilgi sağlamak ve zararlı bileşenlerin varlığını azaltmaktır. Günümüzde, patojenlerin varlığından ziyade, gizli alerjenlerin varlığı, hileli uygulamalar ve gıdadaki genetik modifikasyonlar üzerine yaygın tüketici endişeleri bulunmaktadır. Buna göre, gıda düzenlemeleri yüksek düzeyde koruma sunmaya ve tüketicilere şeffaf bilgi vermeye yönelmektedir. Bu gereksinimleri yerine getirmek için analitik yöntemlerin kullanılabilirliği önemlidir. Protein temelli stratejiler genellikle bu amaçla kullanılır, ancak bazı sınırlamalar sunar. DNA, çoğu dokularda bulunan ve çoğaltılabilen daha kararlı bir molekül olduğundan, DNA bazlı yaklaşımların (polimeraz zincir reaksiyonu, mikrodiziler ve genosensörler) geliştirilmesi giderek artmaktadır. Bu nedenle, GDO'ların saptanmasında alternatifler sağlayabilecek diğer bazı analitik teknolojiler ortaya çıkmaktadır.

Basitlik, otomasyon, düşük maliyet ve iyi analitik özellikleri nedeniyle biyosensörler GDO analizi için yeni bir DNA tespit teknolojisi olarak tercih edilmektedir. Bu sebeple bu tez çalışmasında da tercih edilen elektrokimyasal genosensörler bu ihtiyaçların giderilmesinde büyük rol oynayabilir. DNA biyosensörleri, iki tamamlayıcı iplik, hedef ve prob olarak adlandırılan tanıma elemanı arasında bir hibridizasyon tespit reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu cihazlarda, transdüser olarak elektrot bazlı platform kullanır ve bu oldukça spesifik hibridizasyon reaksiyonunu ölçülebilir bir sinyale dönüştürmek için genellikle bir raportör molekül (elektroaktif moleküller veya enzimler) sisteme eklenir (Martín-Fernández ve diğerleri, 2017).

2.2 Biyosensörler

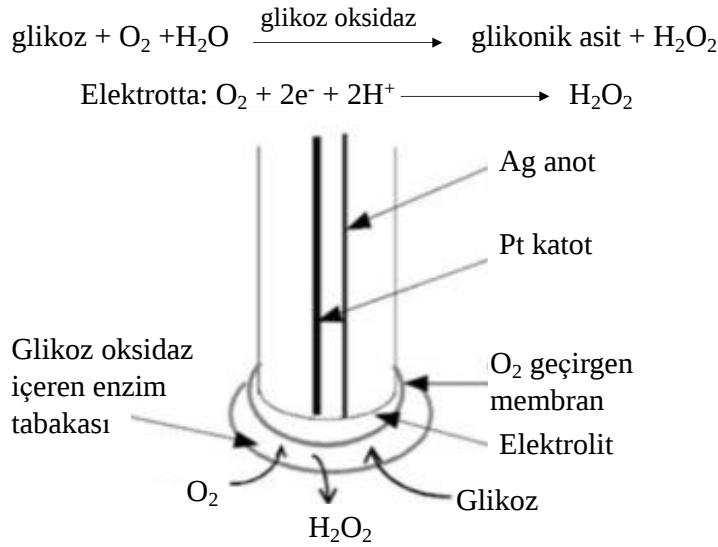
2.2.1 Biyosensörlerin tanımı ve tarihi

"Sensör" kelimesi, kökeninde Latince "sentire" kelimesinden gelmektedir; bu sözcük herhangi bir şeyi 'tanımlamak' anlamına gelir. Temel olarak fiziksel ve kimyasal sensörler insan duyularına dayanmaktadır (Ali ve diğerleri, 2017). Fiziksel sensörler, elektromanyetik radyasyon, akustik dalgalar ve basınç gibi fiziksel özelliğe yanıt veren yapılardan oluşur ve bu durum görme duyusu, işitme, dokunma gibi dış uyarılara tepki verme durumuna benzetilebilir (Yuriyama ve Kushida, 2010).

Fiziksel ve kimyasal algılama tekniklerini içeren biyosensörler, son zamanlarda tanımlanan sensör sınıflarından biridir (Buenger ve diğerleri, 2012). Ortamdaki biyokimyasal ve biyofiziksel değişimlerin yorumlanmasında kullanılan biyosensörler, alıcı-dönüştürücü temelli araçlardır. Başka bir tanımla biyosensörler, biyolojik bir olayı ölçülebilir bir sinyale dönüştüren analitik cihazlardır. Ayrıca biyosensörlerin diğer sensör çeşitlerine göre en ilgi çekici özelliği ortamda bulunan bazı biyolojik moleküllerin algılanmasında görev alan biyolojik tabanlı tanıma elemanının varlığıdır (Wang, 2006). Antikor-antijen etkileşimi gibi belirli biyolojik analitlerin tespiti ve gözlemi için elektrokimyasal transdüserlerle (sinyal çeviriciler) DNA, RNA ve proteinler/enzimler gibi biyolojik varlıkların kombinasyonunu içermesi bakımından disiplinler arası bir teknolojidir ve mühendislik, mikrobiyoloji, fizik, kimya, biyoloji ve biyoteknolojinin ortak çabalarını içerir (Hinze, 1994).

Klinik, gıda ve çevre uygulamasında kullanılan birçok sensör, ortamdaki analiti aynı anda ve devamlı şekilde izleyebilmelidir. Şeker hastaları tarafından kişisel kan şekerinin takibi gibi bazı önemli tıbbi uygulamalar için tek kullanımlık biyosensörler bulunmaktadır. Örneğin, gen çalışmalarında floresan temelli biyosensörler, araştırmacıların karmaşık kimyasal süreçleri incelemesi ve analiz etmesi bakımından büyük öneme sahiptir (Palmer, 2011). Gıda endüstrisinde kullanılan biyosensörler, hem taze gıdalardaki mantar ve bakteri kontaminasyonunun takibi hem de bozuk gıdalardan kaynaklanan biyolojik içeriğin tespit edilmesi için uygulanabilir teknikler önermektedir (Situ, 2010). Çevresel açıdan bakıldığında, biyosensörler hava kirliliği, ağır metal veya patojen vb. varlığının tespitinde (Tamayo, 2001), savunma sanayi için özellikle biyoterör saldırılarında *Bacillus anthracis*, Ebola, hepatit C virüsleri gibi biyolojik varlıkları tespit etmede kullanılabilir (Edelstein ve diğerleri, 2000).

Biyosensörlerin tarihçesi, glikoz tespiti ve ölçümü için icat edilmiş potansiyometrik enzim temelli bir elektroda dayanmaktadır (Clark ve Lyons, 1962). L.C. Clark, ameliyat esnasında kandaki O₂ miktarını elektrokimyasal olarak izlemiştir. Glikoz, elektrot etrafındaki membranda elektrot yüzeyine geldiğinde glikoz glukonik aside dönüşür (Şekil 2.1). Böylece hem elektrot ile fiziksel sistemin duyarlılığı hem de enzim varlığı ile biyolojik sistemin spesifikliğı birleştirilmiştir.



Şekil 2.1 : Glikoz tespitinde kullanılan Clark elektrodu (Kökbaş ve diğerleri, 2013)

Klasik elektrokimyada sensörler ilk aşamada, sadece anyon ve katyon tespitinde kullanılırken, ilerleyen yıllarda biyolojik materyalin de sisteme katılması ile pek çok maddenin tayini mümkün olmuştur. Son zamanlarda ise, taşınabilir, küçük boyutlu/nano boyutlu ve çok işlevli biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik daha ekonomik biyosensör tasarımları üzerine çalışılmaktadır (Vidal, 2013).

2.2.2 Biyosensörü oluşturan temel bileşenler

Sensör yapıları, ortamda belli bir analite yanıt verebilen belirli reaksiyon bölgeleri içermektedir. Analitten gelen bilginin elektrik sinyaline dönüştürülmesini başlatan bölgede fiziko-kimyasal bir etkileşim tetiklenmektedir. Sonrasında, oluşan elektrik sinyali algılama yanıtını gerçekleştiren işlem birimine iletilir (Yogeswaran ve Chen, 2008). Teknik olarak sensörler, algılama kısmı ve dönüştürücü olmak üzere iki bölümden oluşur. Reseptör, fiziksel/kimyasal uyarıyı alır ve bu bilgiyi elektrik enerjisi biçiminde dönüştürürken, dönüştürücü bu enerjiyi daha sonra analiz

edilebilecek ve elektronik bir biçimde sunulabilecek değerli analitik sinyale dönüştürme işlevini yerine getirir (Gordeliy ve diğerleri, 2002).

Biyosensörlerde biyoelement (biyoreseptör) ve algılama elemanı temeldir. Biyoelement, genellikle ortamdaki diğer türlere karşı tepkisiz kalırken, ilgili ortamdan belirli analiti spesifik olarak tespit etmesi gereken türdür. Algılama ise, biyosensörün manyetik, optik, elektrokimyasal mekanizmalar gibi yollarla sinyal üretilmesine dayanır (Chao ve diğerleri, 2016).

Biyosensörün performansı genellikle, duyarlılığı, teşhis sınırı (LOD), doğrusal ve dinamik aralıkları, yanıtın tekrarlanabilirliği veya kesinliği, seçiciliği ile girişim yapan türlere karşı yanıtı gibi temellere bağlı olarak değerlendirilir (Eggins, 2002). Sıklıkla karşılaştırılan diğer parametreler arasında da sensörün tepki/cevap süresi, çalışma ve depolama kararlılığı, kullanım kolaylığı ve taşınabilirlik yer alır. İdeal olarak, ardışık birkaç ölçümün yapılabilmesi bakımından algılamanın gerçekleştiği sensör yüzeyinin yenilenebilir olması önemlidir (Ronkainen ve diğerleri, 2010).

2.2.3 Biyoreseptör türüne göre biyosensörler

Biyosensörlerin sınıflandırılmasında birkaç farklı yaklaşım bulunmaktadır (Buenger ve diğerleri, 2012). Biyoelement temelinde bir sınıflandırma yapıldığında; enzim, nükleik asit, proteinler, mikroorganizmalar, oligonükleotidler, ligandlar vb. gibi farklı biyosensör çeşitleri mevcuttur (Mohanty ve Kougianos, 2006). Tespit edilen analit tipinin ardından DNA, glikoz, toksinler, mikotoksinler, ilaçlar veya enzim bazlı biyosensör sınıfları elde edilmektedir (Turner, 2000).

Enzim biyosensörlerinde, enzimlerin moleküler tanıma özelliklerinin kullanımı analitik yöntemin yüksek hassasiyetiyle birleştirilir. Enzimler substratı ürüne katalize eden, reaksiyonda tüketilmeyen proteinlerdir. Hedef analiti anahtar kilit ilişkisine benzer şekilde tanıyabilirler. Enzimler ayrıca, diğer biyolojik reseptörlere göre oldukça hızlıdır, çeşitli transdüksiyon mekanizmalarıyla birlikte kullanılabilir ayrıca daha hassas ve duyarlıdır. Bu biyoreseptörlerin çalışma mekanizmaları:

- (1) analitin sensörle saptanabilir bir ürüne dönüştürülmesi;
- (2) enzim inhibitörü veya aktivatörü olarak görev yapan bir analitin tespiti; veya
- (3) analit ile etkileşim üzerine enzim özelliklerinin modifikasyonunun değerlendirilmesi şeklinde olabilir.

Bir immünoşensör, spesifik antijeni tespit etmek için antikorları biyoreseptör olarak kullanır. İmmünolojik testler spesifik analitik tekniklerdir çünkü son derece düşük teşhis sınırları sağlar ve çeşitli maddeler için kullanılabilir. Bu tür deneyler, proteinlerin tanımlanması ve nicelenmesi için son derece kullanışlı hale gelir. İmmünoanaliz terimi, immünreaksiyonlara dayalı testler için kullanılırken, immünoşensör terimi özellikle tüm aletleri, yani immünreaksiyonlara dayalı biyosensörleri tanımlamak için kullanılır (Kuranakaran ve diğerleri, 2015).

Nükleik asit temelli biyolojik tanıma mekanizması, DNA veya RNA'nın hibridizasyonunu içerir. Çift sarmallı DNA (dsDNA) oluşturmak için tek sarmallı iki DNA (ssDNA) zinciri arasındaki yüksek düzeyde spesifik afinite bağlama reaksiyonu, nükleik asitleri biyolojik tanıma elemanı olarak kullanan nükleik asit temelli biyosensörlerde kullanılmaktadır. DNA'nın birbirine eşlenik dizileri arasındaki baz etkileşimleri oldukça sağlam ve spesifiktir. Bu sayede DNA, biyoalgılama uygulamaları için oldukça uygun bir molekül olarak öne çıkmaktadır. DNA tabanlı biyosensörlerde, hedef DNA, tanıma katmanında yakalanır. Ortaya çıkan hibridizasyon sinyali, görüntüleme ve analiz için kullanılabilir bir sinyale dönüştürülür (Kuranakaran ve diğerleri, 2015; Kuralay ve diğerleri, 2018; Gürsoy ve diğerleri, 2019).

Mikrobiyal biyosensörler, hedef analitlerin tespiti için mikroorganizmaları bir dönüştürücü üzerinde immobilize hale getiren analitik cihazlardır. Bakteriler ve mantarlar gibi mikroorganizmalar, belirli molekülleri veya çevredeki ortamın genel durumunu saptamak için biyosensörlerde tanıma elementi olarak kullanılabilir. Enzim bazlı biyosensörlerle karşılaştırıldığında, mikrobiyal biyosensörler saflaştırma gerektirmez (Kuranakaran ve diğerleri, 2015).

2.2.4 Analit ve biyoaktif madde arası etkileşime göre biyosensörler

Analit ile biyoaktif madde arasındaki etkileşime bağlı olarak biyosensörler, biyoafinite, biyokatalitik, immobilize hücre temelli ve transmembran esaslı olmak üzere çeşitlendirilebilir.

Biyoafinite biyosensörleri, biyolojik bileşenler arasındaki seçici bağlanma etkileşimlerini temel almaktadır. Bu bileşenler, nükleik asitler, reseptörler veya analit ile antikor arasındaki etkileşimler olabilir (Babamiri ve diğerleri, 2019). Bu biyosensörler, reseptör moleküllerinin analit moleküllerini “geri dönüşümsüz olarak”

bağladığı ve oluşan etkinin bir dönüştürücü tarafından algılanan fizikokimyasal değişikliğe neden olduğu cihazlardır.

Biyokatalitik esaslı biyosensörler, çeşitli kimyasal maddelerin tayini için, enzim immobilizasyonu ile enzimin substratı, aktivatörü, koenzimi veya substratını kullanan sensör gruplarıdır. Örneğin, immobilize glikoz oksidazlı sensör şeritleri, şeker hastalığının kişisel/evde izlenmesi için kullanılmaktadır.

İmmobilize hücre temelli biyosensörlerde, iletici sistem üzerindeki hücrelerin immobilizasyonu sayesinde, bu hücreler tarafından metabolize edilmiş olan farklı maddelerin tayini yapılabilir.

Transmembran temelli biyosensörlerde, hücre membranları içinde yer alan farklı moleküllere spesifik membran proteinleri veya reseptörleri kullanılarak belli moleküllerin seçimli bir şekilde tayin edilmesi sağlanır.

2.2.5 Transdüser (sinyal çevirici) çeşidine göre biyosensörler

Kullanılan transdüksiyon (çevrim) ilkesine bağlı olarak biyosensörler; elektrokimyasal, optik, sıcaklığa bağlı, kütle tabanlı biyosensörler gibi sınıflara ayrılmaktadır (Thevenot ve diğerleri, 2001).

Optik biyosensörler, yüksek hassasiyetleri nedeniyle uygulamalar için umut verici sensörler olarak kabul edilirler. Biyomoleküllerin gerçek zamanlı ve yerinde etkileşimini tespit etmek için, biyomoleküllerin algılama plakalarının yüzeyinde hareketsiz hale getirilmiş reseptörlere bağlanmasından sonra oluşan fiziksel değişiklikler optik özelliklere bağlı olarak sinyaller oluşturmaktadır. Optik biyosensörler yüzey plazmon rezonansı (SPR), Raman ve Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve floresan etkilerine göre çeşitlendirilebilmektedir (Yang ve diğerleri, 2020).

Sıcaklığa bağlı (termal) biyosensörlerde, genel olarak etkileşim sonucu oluşan sıcaklık değişikliği takip edilmektedir (Dinh ve diğerleri, 2017). Termal biyosensörler, reaksiyon entalpilerindeki değişimi termometrik olarak tespit etmek için kullanılır (Grime, 1985; Yang ve diğerleri, 2020).

Kütle tabanlı biyosensörler, piezoelektrik sensör, kuvars kristal mikro terazi (QCM) ve yüzey akustik dalgası gibi farklı türdeki sensörlerde karşılık gelen bir değişiklik

belirlenen analitlerin tanınması için kütle değişikliklerinden yararlanan kütle tabanlı biyoalgılama uygulamalarını kapsar (Yang ve diğerleri, 2020).

Elektrokimyasal biyosensörde etkileşimin gerçekleştiği alt taban elektrottur. Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik bir olayın elektrik sinyaline doğrudan dönüştürülmesini hassas ve hızlı bir şekilde sağlama yeteneğine sahiptir, bu da onları biyolojik bir numune veya ilgilenilen analitin içeriğini ya da konsantrasyonunu tespit etmek için oldukça arzu edilir ve çekici kılar. Elektrokimyasal biyosensörler, reaksiyon hacminden bağımsızdır, öyle ki küçük hacimli numuneler bile ölçülebilir. Sensör çalışmaları genellikle çalışma, referans ve bir karşı elektrot içermektedir. Bazı durumlarda (potansiyometrik analiz gibi) sadece çalışma ve referans elektrot kullanılmaktadır. Potansiyometri, iletkenlik, amperometri, elektrokimyasal empedans spektroskopisi gibi yöntemlere dayalı olarak elektrokimyasal sensörler gruplandırılmaktadır. Ayrıca, elektroanalitik çalışmalarda voltametrik tekniklerden de faydalanılmaktadır (Yang ve diğerleri, 2020). Bu tez çalışmasında; yüksek hassasiyetleri, kullanım kolaylıkları, taşınabilirlik, düşük maliyet ve üretim kolaylığı gibi birçok avantajından dolayı elektrokimyasal biyosensör teknolojisinden yararlanılmıştır.

2.2.6 Biyosensörlerin avantajları ve kullanım alanları

Biyosensörler, farklı türlerin tayinine olanak veren modern analitik cihazlardır ve hastalık teşhisi, tıp, gıda uygulamaları gibi önemli alanlarda kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Maliyet etkinliği, hızlı analiz, kullanıcı dostu olma gibi özellikler biyosensör kullanımını artırmaktadır (Chowdhury ve diğerleri, 2019; Thapa ve diğerleri, 2021). Bu kriterlerin sağlanması adına kimya, nanoteknoloji ve biyolojik bilim yaklaşımlarını içeren çalışmalar önem kazanmaktadır. Biyosensör teknolojisi; gıda, çevre, tarım ve diğer birçok biyoteknolojik endüstriler gibi sayısız uygulama alanı bulmaktadır (Arora, 2018; Kumar ve Arora, 2020; Fatima ve diğerleri, 2022, Mei ve diğerleri, 2022; Ventura-Aguilar ve diğerleri, 2023).

Örneğin, çeşitli giyilebilir elektrokimyasal biyosensörler, bir kullanıcının sağlık durumunun göstergeleri olarak vücut sıvısındaki elektrolitlerin ve metabolitlerin gerçek zamanlı invazif olmayan tarama amaçlı ortaya konulmuştur (Bandodkar ve Wang, 2014).

Biyosensörlerin gıda endüstrisinde bozulmuş gıda gazlarını tespit etmek, kontamine gıdaları tanımlamak ve taze gıdalardaki bakteri, mantar gibi mikroorganizmaların varlığını ve büyümesini kontrol etmek için de uygulamaları vardır (Tamayo ve diğerleri, 2001). Ayrıca, dünyanın mevcut senaryosunda, biyoterörizm tehditleriyle karşı karşıya olmamız bakımından biyosensörler, *B. anthracis* (*Bacillus anthracis*), hepatit C virüsü, E-bola, SARS (Şiddetli Akut Solunum Sendromu) virüsü vb. biyolojik varlıkların mevcut zararları ve zarar vermek için kasıtlı olarak kullanılmasına karşı bu saldırıları baskın çıkmadan önce tespit etmek adına başarıyla kullanılmıştır (Edelstein ve diğerleri, 2000). Biyosensörler, yapılandırarak sürekli izleme ve süreç kontrolü optimize edilebilmektedir. Bu sayede uğraştırıcı ve zaman alıcı tanı laboratuvar analizlerinin önemli parametreleri yerinde teşhis ve tespit edilebilecektir.

Sonuç olarak, biyosensörlerin gelişimi çoğunlukla duyarlılık, seçicilik, küçük molekül tespitine olanak ve maliyet etkinliği gibi özelliklere dayanmaktadır. Nanomalzemelerle kombinasyon halinde elektrokimyasal sensörlerde görülen ilerlemenin bir kısmı, iyileştirilmiş özelliklere sahip biyosensör tasarımları ile sonuçlanmaktadır (Bandodkar ve Wang, 2014). Genel olarak, biyoalgılama ve biyofabrikasyonun, elektrokimyasal, optik veya biyo-elektronik ilkeleri ile bunların kombinasyonunu kullanan sentetik biyoloji yaklaşımlarıyla modern çağ için güçlü biyosensörlerin başarılı bir şekilde geliştirilmesinin yolu açılmaktadır (Vigneshvar ve diğerleri, 2016). Geniş kullanım alanı ve avantajları sayesinde, biyosensör teknolojisi gelecek için umut vericidir, ancak biyosensör sistemini araştırma ve geliştirme laboratuvarından pazara çıkarmak için kararlı, uygun maliyetli ve çok disiplinli yaklaşımlar gerekmektedir (Fatima ve diğerleri, 2022; Chadha ve diğerleri, 2022; Kulkarni ve diğerleri, 2022)

2.3 Elektrokimya ve Elektrokimyasal Teknikler

Elektrokimya, biyosensörlerde analit tayini için avantajlar sunan bir tekniktir. Biyosensör çalışmalarında kullanılan elektrokimyasal teknikler; genellikle akım, iletkenlik, potansiyel (veya gerilim) ve empedans temelli ölçümlere dayanmaktadır (Goswami, 2020; Hashem ve diğerleri, 2022; Ramya ve diğerleri, 2022).

Tez kapsamında yer alan elektrokimyasal karakterizasyon ve elektroanalitik çalışmalarda kullanılan yöntemlere ait genel bilgiler aşağıda sunulmaktadır:

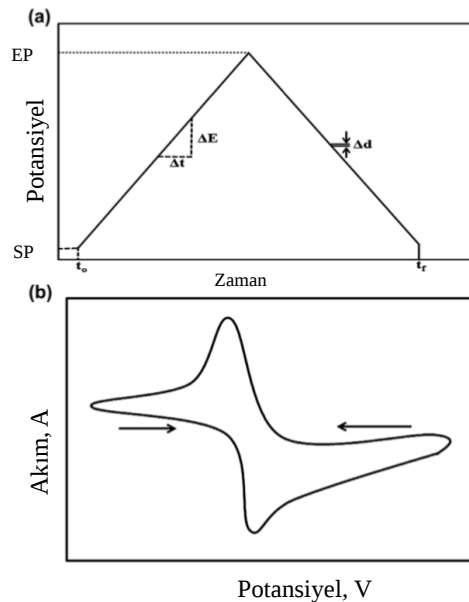
2.3.1 Voltametrik teknikler

Voltametri, elektroanalitik ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılan çok yönlü bir tekniktir. Bu teknikte, değiştirilen potansiyele bağlı olarak değişen akım ölçülür. Akım değerleri analit konsantrasyonu ile ilişkilendirilir (Bard ve Faulkner, 2001). Ek olarak voltametri, tek bir elektrokimyasal deneyle birbirinden farklı potansiyellerde cevap veren birden fazla bileşiği saptayabilir. Böylece birden çok analitin aynı anda tayini gerçekleştirilebilir.

Voltamogram adı verilen akım-potansiyel grafiği, kimyasal reaksiyon hakkında bilgi sağlar. Voltametrik yöntemler arasında dönüşümlü voltametri (CV), lineer sıyırma voltametrisi, hidrokinamik voltametri, diferansiyel puls voltametrisi ve kare dalga voltametrisi sayılabilir.

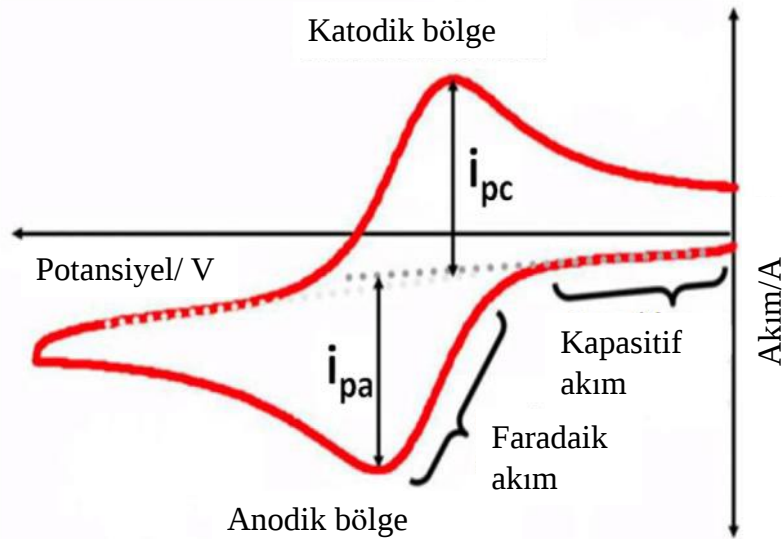
Dönüşümlü voltametri

Dönüşümlü voltametri, kimyasal türlerin elektrokimyasal özelliklerinin bir göstergesi olarak redoks potansiyellerini ve analit veya herhangi bir redoks probuna bağlı redoks akımlarını ölçmenin klasik yöntemidir (Khalafi ve Rafiee, 2017). Bu teknik, Şekil 2.2'de gösterildiği gibi çalışma elektrodunda üçgen şeklinde bir tarama gerçekleştiren lineer sıyırma voltametrisi (LSV)'ye benzer. Dönüşümlü voltametride grafik kapalı bir eğriden oluşur ve geri yönde tarama söz konusudur.



Şekil 2.2 : Dönüşümlü voltametri **a)** anodik anlamda başlayan potansiyel tarama **b)** tersinir bir redoks sisteminin dönüşümlü voltamogramı (SP, başlangıç potansiyeli; EP, bitiş potansiyeli; t_0 ve t_r , taramanın başlangıç ve son zamanları) (Karunakaran, 2015).

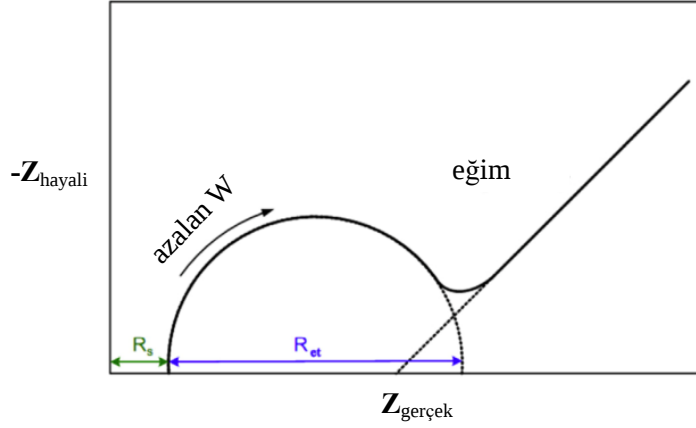
Voltametrik teknikler arasında, dönüşümlü voltametri elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında sıklıkla kullanılır. Karakterizasyon amaçlı olarak ise kullanılan redoks çiftlerinin davranışını incelemeye oldukça faydalar sağlar (Kuralay ve diğerleri, 2018; Gürsoy ve diğerleri, 2019). Dönüşümlü voltametrde, çalışma elektrodu adı verilen bir elektrodun karıştırılmayan bir çözelti ortamına daldırılması ve belirli bir tarama hızında sistemin tutulması ile katodik ve anodik yönde tarama yapılır. Bu aşamada, çalışma elektrotunun potansiyeli, bir referans elektroda karşı kontrol edilir. Tarama sırasında takip edilen akım ise karşıt elektroda göre kontrol edilir (Bard ve Faulkner, 2001). Bu voltametrik teknikte; potansiyel başlangıç potansiyelinden son potansiyele ve sonra tekrar başlangıç potansiyeline çevrilmektedir. Ortaya çıkan grafiğe, dönüşümlü voltamogram adı verilmektedir (Şekil 2.3). Bu voltamogram platin (Pt) çalışma elektrodu kullanılarak ferri/ferrosiyanür ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$) redoks çifti içeren çözelti ortamına aittir. Redoks çiftinin yükseltgenme/indirgenmesine bağlı olarak redoks potansiyellerine karşılık gelen iki farklı akım tepe noktası (I_{pa} ve I_{pc}) gözlenir. E_{pc} , katodik tepe (pik) akımına (I_{pc}) karşılık gelen potansiyeldir, E_{pa} ise anodik tepe (pik) akımını (I_{pa}) ile ilişkili potansiyeldir (Schöning ve Poghossian, 2018).



Şekil 2.3 : Çıplak bir Pt elektrotta ferri/ferrosiyanür redoks çifti kullanılarak alınan dönüşümlü voltamogram (Karunakaran ve diğerleri, 2015).

2.3.2 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi

Empedans terimi akımın (alternatif akım) akışına karşı direncin ölçülmesi şeklinde tanımlanabilir. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), belirli bir frekans aralığında empedansın ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Bu teknik; elektrokimya çalışmalarında malzeme karakterizasyonu, (biyo)sensör çalışmaları, korozyon gibi uygulama alanlarında oldukça karşımıza çıkmaktadır. Özellikle (biyo)sensör çalışmalarında elektrot-çözelti arayüzündeki yük transferinin ölçüldüğü yük transfer direnci (R_{ct}) değeri sıklıkla kullanılmaktadır. Elektrotların biyokomponentlerle (biyoreseptörlerle) immobilizasyonu, arayüzde transfer direncinde ve kapasitansta değişiklikler meydana getirmektedir. Ayrıca bu teknikle, analitlerin etiket gerektirmeyen (işaretsiz) tespiti yapılabilmektedir. Bir biyosensör çalışmasında, analit ile etkileşen biyoreseptör fizikokimyasal bir değişiklik sağlamaktadır. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ele alındığında, arayüzdeki yük transferi, çözelti direnci, çift katmanlı kapasitans gibi kriterler bu aşamada ön plana çıkmaktadır (Barsoukov ve Macdonald, 2005; Karunakaran ve diğerleri, 2015; Hosseini ve diğerleri, 2022). EIS son yıllarda artan bir popülerlik kazanmıştır ve sensör, biyolojilama süreçlerinde hassas ve doğru tespit anlamında avantajlar sağlamaktadır (Jolly ve diğerleri, 2015; Hammond ve diğerleri, 2016). Elektrokimyasal empedans verilerini değerlendirmek için en popüler formatlar Nyquist ve Bode grafikleridir. Nyquist grafiği şeklinde sunulan empedans spektrumu Şekil 2.4'te gösterilmektedir. Bu grafikte, hayali empedans bileşeni (Z''), her uyarma frekansında gerçek empedans bileşenine (Z') karşı çizilmektedir. R_s , çözelti direncidir. R_{ct} , yük transfer direncini ifade eder. C , çift katmanlı kapasitansdır. W , Warburg empedansıdır ve kütle transfer sınırlamalarının etkilerini açıklayan bir elementtir.



Şekil 2.4 : Nyquist grafiği şeklinde sunulan şematik empedans spektrumu (Karunakaran ve diğerleri, 2015).

Bir Nyquist grafiği, arayüz ve yük (elektron) transfer reaksiyonu hakkında bilgi içerir. Bu grafik genellikle düz bir çizgi tarafından takip edilen eksen üzerinde uzanan yarım daire bir bölgeyi içerir. Daha yüksek frekanslarda gözlenen yarım daire kısmı yük transferiyle sınırlandırılmış sürece karşılık gelirken, doğrusal kısım daha düşük frekans aralığının karakteristiğidir ve difüzyonla sınırlı elektrokimyasal süreci temsil eder. Yarım dairenin çapı yük transfer direncine, R_{ct} 'e eşittir (Karunakaran ve diğerleri, 2015; Strong ve diğerleri, 2021; Brett, 2022).

2.4 Elektrokimyasal Biyosensörler

Kimyasal sensörlerin bir alt sınıfı olarak elektrokimyasal biyosensörler, düşük maliyet, yerinde ve basit kullanım gibi avantajlarının yanında elektrokimyasal tekniklerin sahip olduğu yüksek hassasiyet gibi özellikleri de kapsamaktadır (Eggins, 2002; Wang, 2006; Hassanpour ve diğerleri, 2018; Hosseini ve diğerleri, 2022). Elektrokimyasal biyosensörler hedef analit ile seçici olarak reaksiyona girebilen ve çalışılan analitin konsantrasyonu ile ilgili bir elektrik sinyali üreten bir biyolojik tanıma elemanı içerir. Bu biyolojik tanıma elemanı diğer biyosensör türlerinde olduğu gibi antikorlar, proteinler, hücreler, enzimler, dokular veya nükleik asitler olabilir. Elektrokimyasal biyosensör çalışmaları, üçlü veya ikili elektrot sistemlerini içeren ortamda gerçekleştirilir. Elektrokimyasal biyosensör çalışmalarında, amperometri, potansiyometri, iletkenlik, impedimetri ve voltametri gibi tekniklerden faydalanılır (Baranwal ve diğerleri, 2022).

Çalışma elektrodu (WE), ilgilenilen reaksiyonun gerçekleştiği elektrottur (Karunakaran ve diğerleri, 2015). Çalışma elektrodunun belirli özelliklere sahip olması önemlidir. İlgili reaksiyon (indirgenme/indirgenme) çalışma elektrodunda gerçekleştiğinden, yüksek sinyal-gürültü özellikleri, tekrarlanabilir cevap, çalışma aralığında inert olma gibi hususlar tercih sebebidir. Ayrıca elektriksel iletkenlik, yüzey tekrarlanabilirliği, mekanik özellikler, toksisite ve maliyet gibi etkenler de dikkate alınmalıdır. Camsı karbon elektrot (GCE), platin (Pt) elektrot, altın (Au) elektrot, serigrafi veya perde baskılı elektrotlar, indiyum kalay oksit (ITO), kalem grafit elektrot (PGE) gibi farklı çalışma elektrotları bulunmaktadır (Zhou ve diğerleri, 2010; Abdulbari ve Basheer; 2017; Horwood, 2022).

Kalem grafit elektrotlar:

Düşük maliyetleri ve kolay kullanımı nedeniyle yazma amaçlı kullanılan ve grafit temelli kurşun kalem uçları farklı modifikasyonlara da açık oluşları nedeniyle elektrot malzemesi olarak kullanılabilirler. Bu aşamada kalem ucu, kalem ile birlikte kullanılır. Bu nedenle kaleme elektriksel bağlantı için bakır tel sarılabilir. Ortaya çıkarılan bu elektroda kalem grafit elektrot (PGE) denilmektedir. Herkes tarafından günlük olarak kullanılan kalem, dünyanın her yerinde çeşitli çap ve uzunluklarda bulunan taşınabilir, düşük maliyetli, basit bir grafit malzemedir (Jadon ve diğerleri, 2017). Grafit haricinde kil de içermektedir. Avrupa standartlarına göre harf ölçeği H (sertlik) ve B (siyahlık) şeklinde ifade edilir. 9H'den (en sert) 8B'ye (en yumuşak) sertlik veya siyahlık derecesi belirlenir. B tipi uçlar büyük miktarda grafit içermektedir ve daha yumuşaktır (Kariuki, 2012; Sharma ve diğerleri, 2019), Şimdiye kadar, elektroanalizde çalışma elektrotları olarak B, 2B, 3B, 4B, 6B, 3H, 2H, 4H, 6H, HB gibi farklı sertlikte çeşitli kurşun kalem uçları kullanılmıştır (Wang ve Kawde, 2001; Kariuki, 2012; Vishnu ve Kumar, 2015). Kalem grafitin ana bileşimi olan grafit iletkenlik ve kolay analit adsorpsiyonu sağlamaktadır (McCreery, 2008). Ayrıca, karbon pasta, camsı karbon gibi elektrotlarda yüzeyde farklı safsızlık, kirlilik oluşması gibi durumların tek kullanımlık kalem grafit elektrot gibi substratlarda yaşanmaması kullanım potansiyelini artırmaktadır. Kolay erişilebilirliği, iyi mekanik kararlılığı, modifikasyon kolaylığı gibi özellikleri nedeniyle de kalem grafit elektrotlar rağbet görmektedirler. Özellikle nanomalzeme gibi malzemelerle modifikasyondan sonra özelliklerinin daha da iyileştirilebileceği tespit edilmiştir (Yardım, 2011; Akanda ve diğerleri, 2016; Gürsoy ve diğerleri, 2019).

Farklı çalışmalara dayanarak, çeşitli polimerler, metal oksit ve diğer farklı malzemeler ile modifiye edilen kalem grafit yüzeylerin, kan, gıda, endüstriyel ve çeşitli çevresel örnekler gibi çeşitli gerçek numune ortamlarında var olan biyomoleküllerin hassas şekilde izlenmesi için verimli bir şekilde uygulanabileceği gözlemlenmiştir (Malifarge ve diğerleri, 2017; Pandey ve diğerleri, 2018). Örneğin, Kuralay ve diğerleri (2018) çalışmalarında poli-L-lizin temelli kurşun kalem grafit elektrotları nükleik asit (DNA hibridizasyon tespiti) tayininde kullanmışlardır. Yakın bir zamanda Huang ve arkadaşları organik kafes yapıları kullanarak modifiye edilen kalem grafit elektrotlar ile bisfenol A ve bisfenol S'nin tayinini gerçekleştirmişlerdir (Huang ve diğerleri, 2022). Genel olarak, PGE'nin diğer daha pahalı ticari karbon elektrotlara kıyasla elektrokimyasal ölçümler için ucuz ve tek kullanımlık sensör tasarımında sağlayabileceği avantajlar göz önüne alınarak bu tez kapsamında yürütülen biyosensör çalışmalarında kullanımı tercih edilmiştir.

2.5 Moleküler Tanıma, Prob İmmobilizasyonu ve Hibridizasyon

Bir biyosensörün başarısı hedef analiti etkin bir şekilde tanınmasına bağlıdır (Karunakaran ve diğerleri, 2015; Goswami, 2020). GDO'ları tespit etmede, DNA'dan proteinlere kadar biyolojik ajanlar ve biyobelirteçlerin saptanmasına yönelik çeşitli tiplerde nanobiosensörler geliştirilmiştir (Topkaya ve diğerleri, 2016; Aghili ve diğerleri, 2017). Bir elektrokimyasal genosensörün yapımı genellikle aşağıdaki aşamaları içerir:

- (1) DNA probunun elektrot yüzeyine immobilizasyonu,
- (2) hedef diziyle hibridizasyon,
- (3) etiketli veya etiketsiz olarak sinyal okuma (Deng ve diğerleri, 2000; Azimzadeh ve diğerleri, 2016).

Her adımın optimizasyonu, sensörün genel performansını iyileştirmek için gereklidir. Prob immobilizasyon aşaması, elektrokimyasal DNA biyosensörünün performansını belirlemede önemli bir rol oynar. Adsorpsiyon, kovalent bağlanma, kendiliğinden düzenlenmiş tek tabakalar (SAM) ve elektropolimerizasyon dahil olmak üzere DNA'nın immobilizasyonu için birçok yöntem veya yüzey kimyası kullanılmıştır (Goswami, 2020). İmmobilizasyonu için altın, gümüş, silikon ve bakır nanopartiküller dahil olmak üzere farklı türde nanomateryallerin kullanımı

bilinmektedir. Ayrıca grafit, grafen ve karbon nanotüpler (CNT) gibi karbon temelli malzemeler, elektrot yüzeyinde nükleik asit immobilizasyonunda uygulama bulmuş, duyarlılığı, iletkenliği ve seçiciliği kolaylaştırmıştır (Apiwat ve diğerleri, 2016; Xing ve diğerleri, 2016; Sang ve diğerleri, 2016; Hashem ve diğerleri, 2021).

2.6 Nükleik Asit Temelli Biyosensörler

Nükleik asit biyosensörleri, genellikle tamamlayıcı sarmal ile hibridize olabilen, son derece yüksek verimliliğe ve iyi özgüllüğe sahip tek sarmallı ssDNA'dan oluşur ve böylece tamamlayıcı sarmal DNA veya RNA'nın tespiti kolayca gerçekleştirilebilir (Turner, 2013; Du ve Dong, 2017; Morales ve Halpern, 2018; Hashem ve diğerleri, 2022). Tespit yüksek özgüllük (seçicilik) ile hibridizasyona dayanır. Aynı zamanda genosensörler olarak da ifade edilebilecek olan DNA sensörlerindeki biyolojik tanıma öğeleri, ilgilenilen DNA sekansını (hedef) tamamlayan problemler olarak adlandırılan DNA dizileridir. Uyumsuzların varlığında bile tamamlayıcı sekanslar arasındaki baz eşleştirme etkileşiminin yüksek özgüllüğünden dolayı seçicilik sağlanmaktadır (Hashem ve diğerleri, 2021).

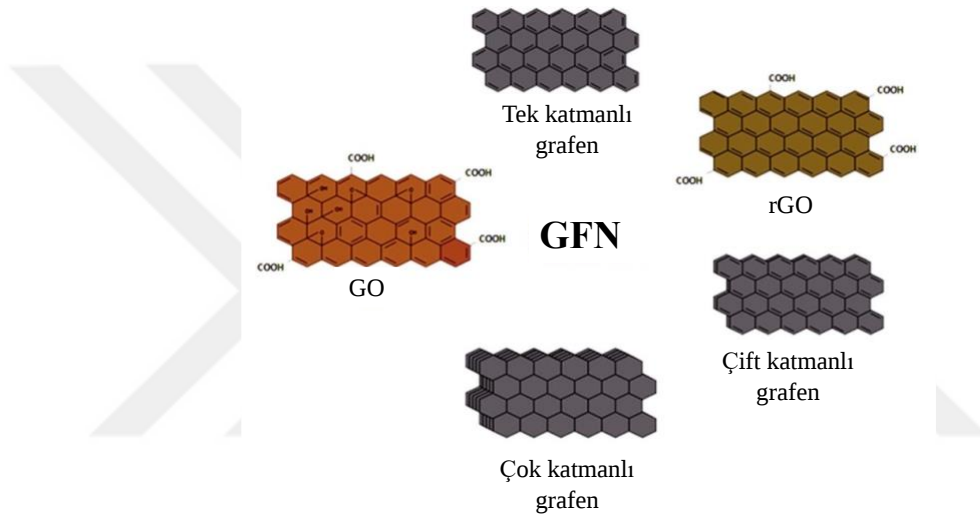
Çeşitli yüksek hassasiyetli ve seçici nükleik asit biyosensörler arasında, nanomateryal tabanlı elektrokimyasal nükleik asit biyosensörleri dikkat çekmektedir. Yüksek hassasiyet, mikro fabrikasyon teknolojilerine uyum sağlama, maliyet etkinliği ve taşınabilirlikleri sayesinde elektrokimyasal nükleik asit biyosensörleri temel bilim ilkelerini nanobilim temelleriyle ilişkilendirebilen çok disiplinli bir çalışma alanı olmuştur (Hashem ve diğerleri, 2021).

2.7 Grafen Sentezi ve Üretim Yöntemleri

Grafen, karbon atomlarının sp^2 hibridizasyonu ile iki boyutlu yapıda altıgen olarak düzenlenmiş mükemmel kristal ve elektronik özelliklere sahip bir malzemedir. Grafenin en ilgi çekici özelliklerinden bazıları, esnekliği, şeffaflığı (% 97,7) (Novoselov ve diğerleri, 2005; Nair ve diğerleri, 2008) ve kaliteye bağlı olarak 10^3 - 10^6 cm^2/V 'lık yük taşıyıcı hareketliliğidir (Morozov ve diğerleri, 2008). Sağlam karbon-karbon bağı sayesinde çok daha iyi termal ve elektrik iletkenliğine sahiptir. Grafenin tek katmanlı kesintisiz yapısı, yüksek termal iletkenliğinden sorumludur ve oda sıcaklığı koşullarında, iyi elektriksel iletkenlik (104 S/m), ısı iletkenlik (5000

W/mK), yüksek mekanik dayanıklılık (42 N/m kırılma dayanımı ve 1,0 TPa Young katsayısı) gibi mükemmel özellikler göstermektedir. Grafenin yaklaşık 2600 m²/g'lik özgül yüzey alanı ve mekanik mukavemeti, onu hafif kompozit malzemeler için çekici kılmaktadır (Yi ve Shen, 2015; Halbig ve diğerleri, 2016). Tüm bu avantajlar göz önüne alındığında, 2028 yılına kadar grafen pazarının 300 milyon dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir (Cinti ve diğerleri, 2018; Ghaffarzadeh, 2019).

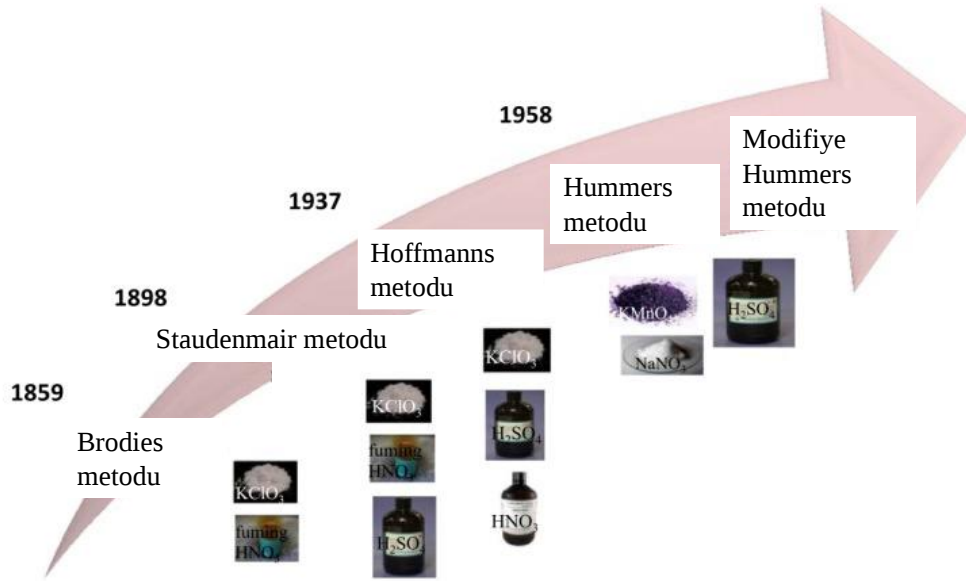
Grafen ailesi nanomalzemeleri (GFN), tek katmanlı grafen, çok katmanlı grafen, oksitlenmiş grafen formu (grafen oksit, GO) ve indirgenmiş grafen oksit formundan oluşmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 : Grafen ailesi nanomalzemeleri (GFN): tek katmanlı grafen, çift katmanlı grafen, grafen oksit (GO), indirgenmiş grafen oksit (rGO) ve çok katmanlı grafen (Jaleel ve diğerleri, 2017).

Saflık ve yüzey kimyası dışında GFN'nin her bir üyesinin kusur yoğunluğu ve bileşiminde farklılıklar bulunmaktadır. Tek katmanlı grafen daha yüksek yüzey alanına sahiptir. Katman sayısı arttıkça yüzey alanı azalır ve rijitlik artar. Tek katmanlı hatasız grafenin sentezi ile ilgili zorluklar ve yüksek reaktivitesi nedeniyle, çok katmanlı grafen veya GO biyolojik uygulamalar için yaygın olarak araştırılmaktadır (Goenka ve diğerleri, 2014). Bununla birlikte grafen ailesi nanomalzemeleri, adsorpsiyon karakteri nedeniyle DNA ve RNA'nın tespitinde kullanılabilir. Pozitif yüklü grafen, negatif yük taşıyan nükleotidlerle etkileşime girebilir ve DNA'yı nükleaz enzimlerinden koruyabilir (Wu ve diğerleri, 2011; Jaleel ve diğerleri, 2017).

1859'da Brodie, grafiti potasyum klorat ve nitrik asit karışımıyla oksitlemiştir. Fakat bu yöntemle geliştirilen GO zaman alıcı bir prosedüre sahiptir ve ürün oluşumunu sağlamak için tekrarlanan bir oksidasyon işlemi gerektirmektedir (Şekil 2.6) (Brodie, 1859). 1898'de Staudenmair tarafından değiştirilen Brodies yöntemi; grafitin oksidasyonunun sülfürik asit, nitrik asit ve potasyum klorat karışımı ile sentezidir. 1937'de Hoffmann, nitrik asidi % 68'lik nitrik asitle değiştirmiştir (Poh ve diğerleri, 2012). GO sentezi için yaygın olarak kullanılan yöntem, 1958 yılında Hummer ve Offeman tarafından geliştirilmiş daha verimli ve güvenli bir yöntemdir. Bu yöntem, konsantre sülfürik asit ile potasyum permanganat ve sodyum nitrat gibi güçlü oksitleyici ajanlar varlığında grafit veya grafenin oksidasyonunu içermektedir. Reaksiyon patlayıcıdır, bu nedenle tehlikeli durumdan kaçınmak için KMnO_4 ilavesi buz banyosu altında gerçekleştirilir. Sodyum nitratın hariç tutulması dahil olmak üzere Hummers yöntemi için çeşitli modifikasyonlar araştırılmıştır (Paulchamy ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.6 : GO sentezi için kullanılan farklı yöntemler (Jaleel ve diğerleri, 2017).

Grafen, genellikle altıgen karbon kafesin pul boyutunu ve kalitesini etkileyen aşağıdan yukarıya (bottom-up) veya yukarıdan aşağıya (top-down) yöntemlerle sentezlenmektedir (Eigler ve Hirsch, 2014; Zhang ve diğerleri, 2018). Grafen için aşağıdan yukarıya sentezler, küçük organik moleküllerin katalitik aktif yüzeyler

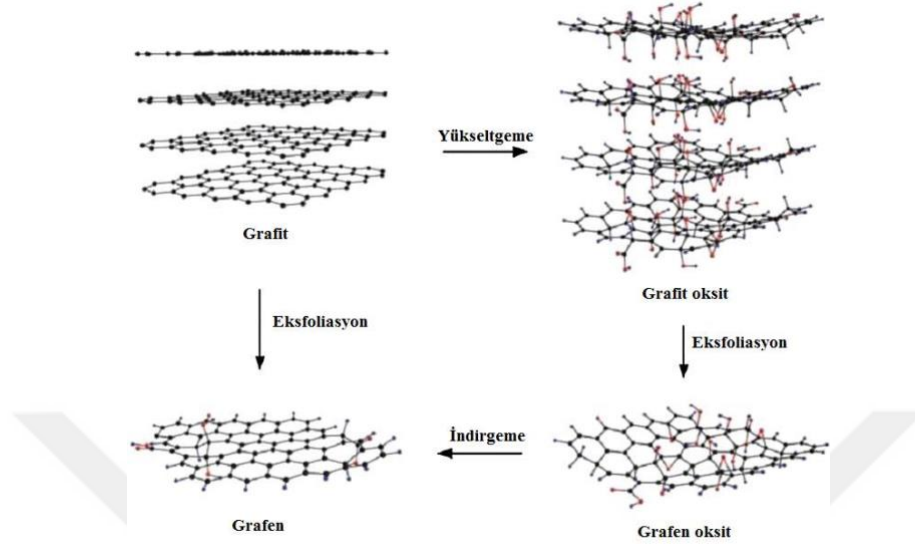
üzerinde ayrışmasına dayanır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımlar grafitten başlar ve grafen katmanlarını ayırılır. Grafitten tabakaların mekanik olarak soyulması konusundaki örnekler; tekrarlanan yapışkan bant delaminasyonu (Novoselov ve Geim, 2004), ultrasonikasyon (Guardia ve diğerleri, 2011), ıslak/kuru bilyeli öğütme (Damm ve diğerleri, 2015) ve jet kavitasyon/yüksek basınçlı homojenizasyon (Nacken ve diğerleri, 2015) olarak verilebilir. Bu yöntemler esas olarak birkaç katmanlı grafen eldesi sağlar. Grafitin indirgeyici veya oksidatif yollarla kimyasal aktivasyonu ise, işlenebilen ve grafene dönüştürülebilen işlevselleştirilmiş tek grafen katmanları sağlayabilir (Halbig ve diğerleri, 2016).

Grafitin sıvı fazda pul pul dökülmesi genellikle ıslak kimyasal dağılımı ve ardından yüzey aktif maddelerin varlığında veya yokluğunda uygun çözücülerde sonikasyon kaynaklı pul pul dökülmeyi içerir. Çeşitli çözücüler ve yüzey aktif maddeler kullanılarak pul pul grafitten bir ila dört katmanlı grafen üretmek için sıvı fazlı pul pul dökülme tekniği uygulanarak, rastgele substratlar üzerine yerleştirilebilen, elektronik ve fotonik uygulamalar için faydalı olabilecek yarım santimetre boyutunda grafen filmler elde edilebilmektedir (Pavlova ve diğerleri, 2016; Coroş ve diğerleri, 2019).

Aşağıdan yukarıya sentez, epitaksiyel yöntem, kimyasal buhar biriktirme (CVD), termal piroliz (Tan ve diğerleri, 2018) ve aromatik moleküllerden kimyasal sentezi içerir. Silisyum karbürün (SiC) termal ayrışması, yüksek kaliteli grafen hazırlamak için umut verici bir yöntemdir. Bu yolla elde edilen epitaksiyel grafen, grafen temelli elektrikli cihazlara doğrudan uygulanabilir. CVD, yüksek kaliteli grafenin hazırlanması için çekici bir yöntem olmakla beraber, aynı zamanda sentez parametrelerinin (sıcaklık, basınç, biriktirme süresi, öncülerin türü) hassas kontrolünü gerektiren karmaşık bir yöntemdir (Fauzi ve diğerleri, 2018; Coroş ve diğerleri, 2019).

Bunların arasında, grafen oksitin (GO) kimyasal olarak indirgenmesinin, kısa sürede düşük maliyetle büyük ölçekli üretim açısından en umut verici yöntem olduğuna inanılmaktadır (De Silva ve diğerleri, 2017). Bu sebeple grafen oksit ve grafen sentezinde kullanılan en yaygın yöntemdir. Bu yöntemlerin temelinde grafitin fiziksel, kimyasal veya mekanik eksfoliasyonu yer almaktadır (Şekil 2.7). Hummers metodu güçlü asit ve oksitleyicilerin kullanıldığı düşük maliyet ve büyük ölçekte üretime izin veren bir kimyasal sentez metodudur (Hummers ve Offeman, 1958).

Tüm bu avantajlarından dolayı bu tez çalışmasında tercih edilen indirgenmiş grafen oksit sentez metodu olarak modifiye Hummers metodu kullanılmıştır.



Şekil 2.7 : Grafitin kimyasal indirgenmesi ve pullandırma (Hu ve diğerleri, 2013).

2.7.1 Elektrot malzemesi olarak grafen

Dikkat çekici elektronik, optik, mekanik, termal ve elektrokimyasal özelliklerinin yanında grafen elektronik olarak düşük gürültüye sahip, elektrokimyasal algılama için uygun bir malzemedir. Tüm bunlara ek olarak, yüksek elektriksel iletkenliği ve verimli elektrokatalitik davranışları, elektrokimyasal uygulamalar için ilgi çekicidir. Grafenin benzersiz avantajları arasında gelişmiş elektronik özellikler, geniş bir kenar düzlemi/bazal düzlem oranı ve hızlı elektrot kinetiği bulunur. Grafen tabanlı elektroanalitik elektrotlar, geleneksel karbon elektrotlardan daha yüksek hassasiyetlere, daha düşük algılama sınırlarına ve daha hızlı elektron transfer kinetiğine sahiptir. Grafenin yüksek yüzey alanı, mükemmel elektron iletkenliği, hidrofobikliği ve grafen filmlerinin gelişmiş mekanik mukavemeti, grafen filmlerinin son yıllarda önem kazanmasını sağlamıştır. Birçok biyosensör, grafeni biyomoleküler moleküller için algılama elemanları olarak dahil etmiştir (Cernat ve diğerleri, 2015; Borisova ve diğerleri, 2016).

Pirolitik grafitten eksfoliasyon tekniği ile elde edilebilen grafen, tek karbon atomunun katmanlarıdır. Sentez kolaylığı ve dispersiyon prosesine uygun olması nedeniyle grafen, elektrokimyasal cihazların geliştirilmesi gibi teknolojik kütle

ölçekli uygulamalar için ucuz ve cazip hale gelmektedir (Li ve diğerleri, 2008; Novoselov, 2010).

2.7.2 Grafen tabanlı kompozit malzemeler

Kompozit malzemeler, benzersiz özelliklere sahip bir son malzeme üretmek için farklı özelliklere sahip iki veya daha fazla malzemenin birleştirilmesiyle oluşturulan malzemelerdir ve her birinin en iyi özelliklerinden yararlanmak için iki veya daha fazla malzemenin birleşimini içerir. Saf grafenin geniş bir yüzey alanı, mükemmel elektron hareketliliği, iletkenliği ve geniş bir elektrokimyasal kapasitesi vardır, ancak birçok araştırmacı saf grafenin bir elektrot malzemesi olarak önemli avantajlar sergileyebilmesinde elektrokimyasal aktivitenin ve işlevselliğin kompozit malzemelerle geliştirilebileceğini belirtmektedir (Ramakrishnan ve diğerleri, 2015; Lawal, 2019). Bu kompozitlerde grafenin varlığı, malzemelerin mekanik/elektriksel özelliklerini iyileştirmektedir.

Grafenin termal, mekanik ve elektronik özellikleri, onu kompozit uygulamalar için ana dolgu maddesi olarak öne çıkarmaktadır. Nanokompozitlerin mekanik, elektriksel ve termal özelliklerini geliştirmek için çok sayıda araştırmacı nanokompozitlerle grafen üzerinde araştırma yapmıştır. Grafen nanokompozit elektrotlar, Au nanoyapılar (Li ve diğerleri, 2017), Ag nanopartikül (NP) (Jamil ve diğerleri, 2015; Yusoff ve diğerleri, 2017), FeNP (Yu ve diğerleri, 2017), PtNP'ler (Zan ve diğerleri, 2016), TiO₂ NP (Liu ve diğerleri, 2017), ZnO (Sandhya ve diğerleri, 2018) ile biyomoleküllerin tespiti için elektrokimyasal biyosensörler çalışmalarında kullanılmıştır.

Metal NP'lerin grafen levhalar üzerine immobilizasyonu, yüksek iletkenlik, elektrokatalitik aktivite, daha az biyolojik kontaminasyon, yüksek hassasiyet ve yüksek seçicilik sağlamak ve bu malzemelerin elektrokimyasal sensörlerde kullanımı onları ideal bir aktif malzeme haline getirmektedir (El-Shal ve diğerleri, 2019). Ayrıca, < 10 nm'lik sentezlenmiş soy metal parçacıkları, bu malzemelere metal oksitlerin sağladığından daha büyük bir yüzey alanı sağlamaktadır (Wang ve diğerleri, 2016a).

Altın, basit sentezlenme prosedürü ve kimyasal işlevselliği nedeniyle tercih edilen bir malzemedir. DNA etkileşimini kolaylaştırmak için, altın nanopartiküller, biyosensör tasarımında, elektrot yüzey modifikasyonunda sıkça kullanılmaktadır. AuNP'ler,

yüksek kimyasal kararlılıkları, iyi biyouyumlulukları ve biyomoleküller ile elektrotlar arasında elektron transferini kolaylaştırma yetenekleri nedeniyle DNA tayininde tercih edilmişlerdir (Wang ve diğerleri, 2014; Chou ve diğerleri, 2022). Ayrıca AuNP'ler, Au-NH veya Au-S bağları yoluyla veya elektrostatik etkileşimler yoluyla çeşitli türlerle etkileşimde bulunabilir (Zhang ve Huang, 2012). Elektrokimyasal biyosensörler alanında kullanım için grafenin hibrit yapılarının AuNP'lerle hazırlanmasında çok sayıda girişimde bulunulmuştur (Huang ve diğerleri, 2015; Nooranian ve diğerleri, 2021).

Gümüş nanoparçacıklar ise (AgNP'ler), diğer metal nanoparçacıklara kıyasla üstün elektriksel ve elektrokimyasal özelliklerinden dolayı en çok kullanılan metal nanoparçacıklar arasındadır (Fatema ve diğerleri, 2022). Kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle, gümüşle katkılanmış grafen, sensör, enerji depolama gibi önemli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür metal nanoparçacıkların grafen levha üzerinde işlevselleştirilmesi, çeşitli alanlardaki uygulamalarıyla grafen levhanın özelliklerini kat kat arttırabilmektedir (Lin ve diğerleri, 2016; Zhou ve diğerleri, 2018; Cai ve diğerleri, 2018; Fatema ve diğerleri, 2022; Mashuni ve diğerleri, 2022).

Bu çalışmada da grafen üzerine altın ve gümüş birlikte modifiye edilerek elektrokimyasal biyosensör sistemi tasarlanmıştır.

2.7.3 Nükleik asit tespitinde grafen temelli biyosensörler

Nükleik asitlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri bu biyomolekülü biyoalgılama teknolojisi için uygun kılmaktadır. Geleneksel antikor-antijen immün reaksiyonu, çeşitli biyomoleküllerin saptanmasında önemli bir rol oynamaktadır, ancak antikor, pH ve sıcaklık gibi dış etkenlere karşı hassastır. Ayrıca, üretim süreci karmaşıktır ve döngü uzundur. Bu nedenle; uygun sentez, düşük maliyet ve yüksek stabilite kombinasyonu, nükleik asitleri biyosensörlerde yaygın olarak kullanılır hale getirmektedir (Saharafeldin ve diğerleri, 2017; Wang ve diğerleri, 2020). Antikorla modifiye edilmiş immünosensörler gibi nükleik asit bazlı sensörlerin etkinliği de pH ve sıcaklıktan etkilenebilir, ancak genellikle antikora göre bu durum daha iyi düzeydedir. Örneğin, bazı sensörler, 7,0'ın altındaki pH değerlerinde iyi bir cevap sergileyemeyebilir. Bu durumda, sensörün çalışma ortamı olarak fosfat gibi bir tampon çözelti gereklidir (Rahman ve diğerleri, 2017).

Yapılan alışmalar, genetik mutasyonların insan genetik hastalıklarının ana nedeni olduğunu gösterdiğinden, gıda güvenliği testleri, klinik teşhis ve güvenlik gibi uygulamalarda eser miktardaki nükleik asitlerin spesifik tespiti büyük ilgi görmektedir. Elektrokimyasal tayin, birçok nükleik asit saptama yönteminde en çekici ve gelecek vaat eden teknolojilerden biridir. Nükleik asitlerin elektrokimyasal analizinde nükleik asitlerin doğrudan elektrokimyasal cevabının takibi en basit yöntem olarak kabul edilir. Elektrokimyasal sinyal, dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametrisi veya elektrokimyasal empedans spektroskopisi gibi teknikler kullanılarak tespit edilebilir. Bu tekniklerle birlikte kullanılacak olan elektrot malzemesinin seğimi de oldukça önemlidir. Grafen bazlı malzemelerin elektrokimyasal nükleik asit sensörlerinde kullanılması belirli avantajlar getirmektedir. Bu elektrokimyasal biyosensörler, düşük maliyetleri, hassas oluşları ve seğicilikleri ile dikkat çekmiştir (Wang ve diğerleri, 2020).

Niu ve diğerleri (2013), $[Co(phen)_2(Cl)(H_2O)]^+$ kullanarak hassas bir dsDNA elektrokimyasal biyosensörü retmişleridir. Tiyol işaretili prob DNA, AuNPs/GR ile modifiye edilmiş elektrot üzerine immobilize edilmiştir. Grafen ve AuNP'lerin geniş yüzey alanı nedeniyle, önerilen yöntem hassasiyeti artırmış ve 8,33 pM ($S/N = 3$) teşhis sınırı ile 25 pM-1.25 nM aralığında *E. coli* hedef DNA konsantrasyonunun logaritması ile doğrusallık yakalanmıştır. Ahour ve Ahsani (2016), guanin yükseltgenme sinyali kullanarak trombinin hızlı tespiti için ssDNA modifikasyonu ile etiketsiz elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmişlerdir. Aptamer ilk olarak GO yüzeyinde adsorbe edilmiş ve güçlü bir elektrik sinyali göstermiştir. Trombin ile reaksiyona girdikten sonra aptamer-trombin kompleksi elektrot yüzeyinden ayrılmış ve yükseltgenme sinyali önemli ölçüde azalmıştır. 0,1 ile 10 nM arasında doğrusal bir aralık ve 0,07 nM'lik LOD elde edilmiştir. Yang ve diğerleri (2018), yalnızca GO kullanarak basit, hızlı, etiketsiz bir aptamer elektrokimyasal biyosensör üretmişlerdir. Bu sensörün lineer çalışma aralığı $0,01-100 \text{ ng mL}^{-1}$ ve LOD 3 pg mL^{-1} olarak bildirilmiştir. Tanıma molekülü olarak AFP-aptamer ve sensör platformu olarak tiyonin/rGO/AuNP'lerin kullanıldığı etiketsiz başka bir elektrokimyasal biyosensör Li ve arkadaşları tarafından tasarlanmıştır (Li ve diğerleri, 2018). AuNP'ler ve rGO, yalnızca aptameri etkili bir şekilde yakalamak ve immobilize etmek için köprü molekülleri olarak değil, aynı zamanda tiyonin moleküllerini yüklemek için de fayda sağlamıştır. Doğrusal alışma aralığı $0,1-100,0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ve LOD $0,050 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$

olarak bildirilmiştir. Grafen bazlı malzemeler üzerinde yapılan çalışmalar, DNA'yı tespit etmek için ssDNA immobilize edilmiş grafen bazlı elektrokimyasal biyosensörler kullanıldığında, LOD değerlerinin oldukça iyileştiğini işaret etmektedir (Gong ve diğerleri, 2017; Wang ve diğerleri, 2020).

2.8 GDO Tespitinde Kullanılan Biyosensörler

Genetiği değiştirilmiş bitkiler, herbisitlere ve zararlılara karşı direnç, daha etkili yabancı ot kontrolü ve daha az pestisit kullanımı bakımından iyileştirilmiş özelliklere sahiptir. GM bitkilerin sahip oldukları tüm iyileştirici özelliklere rağmen, insan ve çevre üzerindeki etkilerine dair endişeler devam etmektedir. Bazı gelişmiş ülkelerde GDO içeren ürünlerin etiketleme yükümlülüğü ile ilgili düzenlemeler geliştirilmiş olmasına rağmen, dünya pazarlarındaki gıda ürünlerinin pek çoğunun GDO'lar için analiz edilmesi gerekmektedir (Arugula ve diğerleri, 2014). Bu nedenle, GM bileşenlerinin oldukça hassas ve kantitatif tespiti, GM ürünleri etiketleme politikasının uygulanması bakımından önemlidir.

GDO'lu ürünler gıda ve yem pazarına sürüldükten kısa bir süre sonra, birçok genosensör tespitine yönelik alternatif yöntemler bildirilmiştir (Arugula ve diğerleri 2014). GDO biyosensörler için, hedef seçiminde transgenik eklemeler ve spesifik sekanslar, veritabanlarında ulaşılabilir durumdadır ve bu teknolojiyi içeren ürünlerin onaylandıkları zaman valide edilmiş PCR yöntemleri de tam olarak açıklanmıştır. Bu dizilerin bazıları, 35S veya PEP promotörleri ile NOS terminatörleri gibi tüm GDO içeren ürünler için “genetik” hedefler olarak işlev görür, bu nedenle bu tür dizileri hedefleyen yöntemler “tarama yöntemleri” olarak adlandırılır ve ön analizde yardımcı olurlar. Bununla birlikte, en yüksek özgüllük seviyesi, hedeflerin, eklenen DNA ile alıcı genomu arasındaki entegrasyon bölgesinde bulunan her bir transgenik olayın karakteristiği sebebiyle benzersiz birleşimin olduğu olaya özgü (event-spesifik) yöntemlerdir. GDO ölçümü ve ön tarama analizinde türlerin tanımlanması için taksona özgü tespit gereklidir, ancak bu genellikle elektrokimyasal yöntemler geliştirilirken gerçekleştirilmez (Sánchez-Paniagua López ve diğerleri, 2018).

Biyosensörlerde ve genosensörlerde birkaç transdüser (sinyal çevirici) kullanılmasına rağmen, genellikle optik, piezoelektrik ve elektrokimyasal temelli DNA biyosensörleri, GDO sekanslarının saptanması için başarıyla geliştirilmiştir (Karamollaoğlu 2009; Li ve diğerleri, 2017; Chou ve diğerleri, 2022).

Mascini ve diğeri (2005), GDO taraması için elektrokimyasal algılama platformlarının geliştirilmesine öncülük etmiştir. Enzimatik etiketleme ile sandviç hibridizasyonun kullanıldığı sistemde elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile ölçüm yapılmıştır. Sinyalin amplifikasyonu, biyotin probuna bağlanan alkaline fosfat (ALP)-streptavidin konjugatının eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir (Lucarelli ve diğeri, 2005). Sonuç olarak, 1,2 pM'lik bir teşhis sınırı ile dikkat çekici bir hassasiyet elde edilmiştir. Ancak, bu impedimetrik genosensör, PCR ile amplifiye edilen GDO soya ve mısır tozu referans malzemelerinin iki farklı konsantrasyonunu ayırt edememiştir. Bu nedenle bu yöntemin sadece “evet veya hayır” sistemi olarak çalışabileceği sonucuna varılmıştır.

Mao-Qing ve diğeri (2008), camı karbon elektrodun (GCE) yüzeyinde platin nanopartiküllerin (Pt-nano) elektropozisyonu ile fonksiyonel nükleik asit biyosensörü geliştirmişlerdir. Platin nanopartiküllerin yüksek adsorpsiyon ve katalitik aktivitesi nedeniyle, özellikle elektrot yüzeyindeki biyomoleküllerin modifikasyonu için uygundur. Bunun yanında çok çeşitli biyomoleküller ve kimyasal ligandlar ile kolaylıkla modifiye edilebilir ayrıca elektron transferini kolaylaştırabilirler. Elektrokimyasal biriktirme yönteminin temel prensibine dayanarak, platin nanopartiküller elektroda doğrudan modifiye edilebilir. Çalışmada, CaMV 35S'nin 19-mer ssDNA'sı Pt nanopartikül modifiye GCE üzerinde sabitlenmiştir. Bu prob, $[Co(phen)_3]^{3+}$ ile birlikte tamamlayıcı (hedef) DNA'nın tayininde kullanılmıştır. Sonuçlar, çıplak elektroda göre modifiye elektrodun cevabının daha yüksek olduğunu göstermiştir (Mao-Qing ve diğeri, 2008).

$[OsO_4(bipy)]$ kompleksinin kullanıldığı bir araştırmada, voltametik (kare dalga voltametri) sinyaller takip edilmiştir (Mix ve diğeri, 2012). Çalışmada, asimmetrik PCR'dan sonra, tek iplikçikli ssDNA'yı oluşturmak için Sawady Taq DNA polimeraz kullanılmış ve sonrasında ürünler, osmiyum tetroksit bipiridin kompleksi ile etiketlenmiştir ve altın elektrotlar üzerinde immobilize edilmiş oligonükleotid prolarla hibridize edilmiştir. Bu biyosensör kullanılarak transgenik mısır MON810 içeren gerçek mısır örnekleri hedef olarak alınmıştır. Transgen *kry1a/b* ve MON810 spesifik fragmanı tüm transgenik mısır örneklerinde tespit edilmiş ve karışık numunelerde MON810'un saptama sınırının % 0,6 kadar düştüğü saptanmıştır. Transgen *kry1a/b* veya MON810'un transjenik mısır % 0,5 olduğunda

saptanamamasının, büyük olasılıkla kalıp DNA'nın yetersiz amplifikasyonu nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Jiang ve diğerleri (2014), hedef olarak CaMV 35S promoter sekansını kullanarak kolorimetrik GDO tespitinde etiketsiz G-quadruplex DNAzim sensörü geliştirmişlerdir (Jiang ve diğerleri, 2014). G-quadruplex hemin ile bağlandığında, DNAzim peroksidaz benzeri aktivitelere sahiptir, bu da 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzunun (ABTS_{2y}) oksidasyonuna aracılık ederek H₂O₂'yi katalize eder böylece renkli bir radikal anyon ABTS⁻ görünür bir renk değişimi üretir. Çalışmada, hemin konsantrasyonları, bölünmüş prob modları ve G-quadruplex ile hemin inkübasyon süresi gibi faktörler optimize edilmiştir. Optimum koşullar altında, % 0,9 transgen bileşeni içeren numunlerde, absorpsiyon ve renk sinyali açıkça tanımlanabilmektedir. Geliştirilen G-quadruplex DNA biyosensör testi, genetik olarak değiştirilmiş organizma tespiti ve gıda güvenliği kontrolünde yaygın olarak uygulanabilecek bir potansiyeldir.

Ulianas ve diğerleri (2014), perde baskılı karbon elektrotlar üzerine akrilik mikroküreler ve altın nanopartiküllerin kullanıldığı bir kompozitin kullanımının sub-femtomolar algılama seviyelerine ulaştığını bildirmişlerdir (Ulianas ve diğerleri, 2014). Bu çalışmada, elektron transfer malzemesi olarak kullanılan nanopartiküller, etanol içinde dağıtılmış ve elektrot yüzeyine modifiye edilmiştir. Ardından, kovalent bağlanma yoluyla DNA problemlerinin immobilizasyonu için modifiye edilmiş elektrot üzerine akrilik mikroküreler konulmuştur. Çift sarmalda interkalasyon kapasitesi nedeniyle hibridizasyon meydana geldiğinde artan sinyal, hibridizasyon redoks göstergesi olarak antrakınon-2-sülfonik asit monohidrat sodyum tuzunun davranışına bağlı olarak diferansiyel puls voltametri ile izlenmiştir. Çalışmada kullanılan biyosensör GDO soya örneklerinden elde edilen GDO'nun belirlenmesi için kullanılmıştır ve sentetik oligonükleotidlerle 0,779 fM teşhis sınırı elde edilmiştir.

Barroso ve diğerleri (2015), transgenik mısırın tespiti için 0.48 nM'lik LOD değeri olan 3D-nano-yapılandırılmış Au elektrotlarına dayalı bir elektrokimyasal genosensör geliştirmişlerdir (Barroso ve diğerleri, 2015). Başka bir çalışmada, çoklu enzimatik etiketleme stratejisi, soya fasulyesi GDO'larının 0.11 ng DNA ile saptanması için iki DNA dizisinin sandviç hibridizasyonu yoluyla eş zamanlı manyetik yakalanmasında kullanılmıştır (Manzanares ve diğerleri, 2015). Huang ve diğerleri (2015), 0.1 pM DNA tespitine ulaşmak için eksonükleaz enzim katalitik

reaksiyonu ve altın nanoparçacık temelli biyobarkodlama stratejileri sunmuştur. Başka bir araştırmada, tek duvarlı karbon nanotüp alan etkisi transistörüne dayanarak, CaMV 35S promotör dizisi, düşük teşhis sınırı (1,0 nM) sağlayabilen basılı bir elektrot kullanılarak tayin edilmiştir (Tam, 2015).

An ve diğerleri (2021), GDO'ların tespiti için yenilenebilir ve gerçek zamanlı bir SPR biyosensörü bildirmişlerdir (An ve diğerleri, 2021). Biyosensör T-nos, CaMV35S ve cry1A'nın kalitatif tespiti için oluşturulmuş ve iyi bir özgüllük ve duyarlılık göstermiştir. Bu biyosensörün LOD'si, herhangi bir sinyal amplifikasyonu olmaksızın 0,1 nM olarak belirlenmiştir.

Nanoteknoloji, bilim ve teknoloji alanlarında nano malzemelerin kullanımının giderek yaygınlaşmasıyla önemli bir etki yaratmıştır. Karbondan altına pek çok nanoyapı yaygın bir şekilde farklı elektrot tasarımlarında kullanılmaktadır. Genetiği değiştirilmiş organizmaların tespiti için, biyolojik ajanları ve biyokimyasal belirleyicileri tespit edebilen nanobiyosensörler geliştirilmektedir. Pek çok nanomalzemeyle bu organizmaları tespit etmek için elektrokimyasal nanobiosensör sistemleri üzerinde çalışılmıştır. Kullanım amacına göre çeşitlenen çok sayıda nanomateriyaller DNA sensörü çalışmalarında geniş bir yer bulmaktadır. Bunların içinde grafen oksit ve grafen temelli materyaller daha önce bahsedilen avantajlarından dolayı elektrokimyasal biyosensörler için ideal adaylardır.

Gao ve diğerleri (2012), grafen, TiO₂ nanoçubukları ve kitosan nanokompozit modifiye karbon iyonik sıvı elektrota (CILE) dayalı, MON89788'in transgenik soya fasulyesi dizisinin tespiti için bir elektrokimyasal DNA biyosensörü üretmişlerdir (Gao ve diğerleri, 2012). Farklı ssDNA dizileri ile hibridizasyonun izlenmesi için hibridizasyon indikatörü olarak metilen mavisi (MB) kullanılmış ve diferansiyel puls voltametrik yanıtı kaydedilmiştir. Optimal koşullar altında, hedef ssDNA dizisi; $7,21 \times 10^{-13}$ mol/L teşhis sınırı ile $1,0 \times 10^{-12}$ - $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L konsantrasyon aralığında tespit edilmiştir.

Sun ve diğerleri (2014), transgenik mısır MON810 dizisinin tespiti için elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen (ERG) modifiye elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarlamışlardır (Sun ve diğerleri, 2014). Prob ssDNA dizisi, ERG/CILE yüzeyine immobilize edilmiş ve ERG'nin varlığı, elektrot üzerindeki prob ssDNA dizisinin adsorpsiyon miktarlarını arttırmıştır. Optimum koşullar altında metilen

mavisinin diferansiyel puls voltametrik cevaplarına bağı olarak, $1,0 \times 10^{-11}$ ile $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L aralığında doğrusallık ve teşhis sınırı $4,52 \times 10^{-12}$ mol/L olarak belirlenmiştir. Sensör, transgenik mısır numunelerinin PCR ürünlerinin tespiti için kullanılmıştır.

Aghili ve diğerleri (2017), serigrafi karbon elektrodun modifiye edilmesi için pullandırılmış grafen oksit ve altın nano yapısı üzerinde çalışmışlardır (Aghili ve diğerleri, 2017). GDO'ların sıkça kullanılan CaMV 35S promotör sekansını saptamak için, altın nanoyapı yüzeyinde özel bir alkan tiyol DNA probu immobilize edilmiş ve pullandırılmış grafen oksit (EGO)-perde baskılı karbon elektrot (SPCE) tasarlanmıştır. ssDNA immobilizasyon işlemi, DNA hibridizasyon süreci ve indikatör olarak kullanılan hematoksiline ait parametrelerin optimize edilmesiyle, elektrokimyasal değerlendirmede en iyi koşullar seçilmiştir. Sonuçlar, nanobiyosensörün gerçek örnek ortamında mükemmel bir performans gösterdiğine işaret etmiştir. Biyosensörün geniş lineer aralığa ve düşük algılama sınırına sahip olmasının yanında aynı zamanda uygun maliyetli kolay bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Önerilen nanobiyosensör GDO tespiti için kolay, hızlı ve güvenilir bir yol sunmuştur.

Jamaluddin ve diğerleri (2020), genetik olarak değiştirilmiş soya fasulyesi tayini için elektrokimyasal bir DNA biyosensörü geliştirdikleri çalışmalarında piren bütirik asit (PBA) ile işlevselleştirilmiş grafit nanokürelerle süslenmiş grafen kullanmışlardır (Jamaluddin ve diğerleri, 2020). DNA hibridizasyon göstergesi olarak antrakinin monosülfonik asit redoks indikatörü kullanılarak, biyosensör yanıtı DPV elektrokimyasal yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada, $1,0 \times 10^{-16}$ M'den $1,0 \times 10^{-8}$ M'ye kadar olan hedef DNA konsantrasyonları arasında doğrusallık ve $1,0 \times 10^{-16}$ M'den daha düşük bir teşhis sınırı elde edilmiştir.

Altın nanopartiküller de (AuNP) eşsiz optik ve elektronik özelliklerinden dolayı son zamanlarda geniş kullanım alanına sahiptir. Altın-indirgenmiş grafen oksit (Au-rGO) nanokompozitler algılama alanını ve elektron transfer hızını arttıran etkilere sahip olması bakımından biyosensör çalışmalarında hassasiyet ve seçicilik açısından tercih edilmektedir. He ve diğerleri (2017), genetiği değiştirilmiş Bt63'e spesifik tanıma sağlayan Au-rGO nanokompozit temelli sensör platformu üzerinde çalışmışlardır. Sonuçlara göre biyosensör tekrar kullanılabilirlik, kararlılık ve Bt63'e karşı seçicilik bakımından oldukça iyi özellikler göstermiştir (He ve diğerleri, 2017).

Başka bir çalışmada, olaya özgü Roundup Ready (RR) soya fasulyesi ve taksona özgü DNA dizilerinin immobilizasyonu için platform olarak ultra küçük çekirdek-kabuk $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ manyetik nanoparçacıkları (MNP'ler) kullanılmıştır (Placido ve diğerleri, 2018). $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ MNP'lerin Au kabuğu üzerine ssDNA probunun kovalent immobilizasyonu, alkan tiyollerin (6-merkapt-1-hekzanol ve merkaptohexanoik asit) karışımlarından oluşturulan kendi kendine düzenlenen tek tabaka (SAM) yoluyla sağlanmıştır. Çalışmada ayrıca tiyol oranının, elde edilen elektrokimyasal cevap üzerindeki etkisi incelenmiştir. Olaya özgü (RR) ve taksona özgü (lektin) hedefler için sırasıyla 0,02 nM ve 0,05 nM'lik benzer teşhis sınırlarıyla 0,1 ile 10,0 nM ve 0,1 ile 5,0 nM arasında doğrusal aralıklar belirlenmiştir. Yapılan çalışma ile yem ve gıdalardaki genetiği değiştirilmiş organizmaların tespiti konusunda başarı sağlanmıştır.

Karnabahar Mozaik Virüsü 35S'yi (CaMV 35S) tanıyarak genetiği değiştirilmiş soya fasulyesi tespiti için basit ve etiketsiz bir elektrokimyasal impedimetrik DNA biyosensörü üzerine yapılan bir çalışmada, Wang ve diğerleri (2016b), algılama sisteminde, çok duvarlı karbon nanotüple indirgenmiş grafen oksit nanoşeritler ile işlevselleştirilmiş altın nanoparçacıkları, tek sarmallı DNA'yı immobilize etmek için kullanmışlardır. Hedef DNA, hibridizasyon yoluyla modifiye elektrot yüzeyine sabitlendiğinde, elektron transfer sürecini kısıtlayan çift sarmallı DNA nedeniyle impedimetrik sinyal artan bir eğilim göstermiştir. Optimal koşullar altında, önerilen DNA biyosensörünün artan impedimetrik sinyali, 1×10^{-16} M ile 5×10^{-10} M aralığında hedef DNA konsantrasyonlarının logaritması ile doğrusaldır ve çalışmada $3,3 \times 10^{-17}$ M gibi düşük bir teşhis sınırı elde edilmiştir.

Liu ve diğerleri (2020), genetiği değiştirilmiş mısır tespiti için altın nanoparçacıklarla işlevselleştirilmiş nitrojen katkılı grafen nano tabakalara dayalı bir elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirmişlerdir. Hedef DNA hibridizasyon olayını izlemek için metilen mavisi indikatörünün diferansiyel puls voltametri yanıtı kullanılmıştır. Optimum koşullar altında, $1,0 \times 10^{-14}$ M ile $1,0 \times 10^{-8}$ M aralığında DNA konsantrasyonunun logaritması ile değişen bir doğrusallık elde edilmiştir ve teşhis sınırı $2,52 \times 10^{-15}$ M (S/N = 3) olarak belirlenmiştir. DNA biyosensörünün yüksek seçiciliğe, iyi bir kararlılığa ve üretim tekrarlanabilirliğine sahip olduğu da gösterilmiştir.

Zeng ve diğerkleri (2021), genetiğı değıştirilmiş (GM) mahsullerde CP4-EPSPS proteininin tespiti için nitrojen katkılı grafen ve poliamid-amin (GN-PAM) kompozitlerine dayalı basit bir elektrokimyasal immünosensör önermişlerdir. Bu immünosensörde, algılama sinyalinin amplifikasyonu, altın nanopartiküller (AuNP'ler) ile etiketlenmiş antikorlar aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. GM soya fasulyesi RRS ve mısır NK603 için teşhis sınırları sırasıyla % 0,01 ve % 0,03 kadar düşük bulunmuştur. Elde edilen bulgular immünosensörün CP4-EPSPS proteininin hassas tespiti için yeni bir yaklaşım sağladığını göstermiştir.

Chou ve diğerkleri (2022), tek katmanlı altın nanoparçacıklara sahip basit bir elektrot kullanarak genetiğı değıştirilmiş soya fasulyelerini niteliksel ve niceliksel olarak tespit edebilen bir DNA sensörü tasarlamışlardır. Yakalama probu olarak CaMV 35S promotörünün tamamlayıcısı (P35S) kullanılmış ve sentezlenmiş DNA segmentleri yerine doğrudan genetiğı değıştirilmiş soya fasulyesinden ekstrakte edilen hedef DNA kullanılmıştır. Teşhis sınırı % 1 olarak belirlenmiştir. % 4 ve % 5,7 GDO DNA'sı için geri kazanım oranları, % 6,24 ve % 2,54'te RSD ile % 104,1 ve %102,49 olarak ölçülmüştür. Deneysel sonuçlar, önerilen biyosensörün soya fasulyesinden izole edilen genetiğı değıştirilmiş genleri doğrudan tespit edebildiğini göstermiştir.

Cui ve diğerkleri (2022), genetiğı değıştirilmiş mısır tespiti için rekombinaz Polimeraz amplifikasyonu ile birleştirilmiş etiketsiz elektrokimyasal empedans genosensörü geliştirmişlerdir. Optimum koşullar altında, rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA) ile birleştirilmiş önerilen genosensör, % 0,10'luk bir teşhis sınırı ile % 0,10-5,0'lik bir aralıkta DNA konsantrasyonunun logaritması ile değışen bir doğrusallık ile mısır Ruifeng12-5'i tespit edebilmiştir. Geliştirilen yöntemin GD organizma tespiti için kullanımı kolay ve hassas bir platform sağlayacağı bildirilmiştir.



3. MATERYAL ve METOT

3.1 DNA İzolasyonu ve Moleküler Çalışmalar

3.1.1 Gıda numunelerinin temini

Çalışmada gıda materyali olarak yerel marketlerden temin edilmiş, içeriğinde soya veya mısır bulunan bisküvi, kraker, kek, mısır cipsi, soya unu ve mısır unu gibi çeşitli gıda ürünleri kullanılmıştır. DNA izolasyonunda kullanılan bu ürünler, farklı markalardan ve farklı işlenmişlik düzeylerine sahip 20 ayrı üründen oluşmaktadır (Çizelge 3.1). Pozitif kontrol olarak TÜBİTAK-MAM Biyoteknoloji Enstitüsünden temin edilen standart GM soya küspesi ve GM mısır tohumu, negatif kontrol olarak ise buğday DNA'sı kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 : GDO analizinde kullanılan gıda örnekleri.

Örnek No	Gıda Ürünü	Örnek No	Gıda Ürünü
1	Bisküvi (marka 1)	13	Kraker (marka 3)
2	Bisküvi (marka 2)	14	Mısır cipsi (marka 1)
3	Bisküvi (marka 3)	15	Mısır cipsi (marka 2)
4	Bisküvi (marka 4)	16	Mısır unu (marka 1)
5	Bisküvi (marka 5)	17	Mısır unu (marka 2)
6	Bisküvi (marka 6)	18	Soya unu (marka 1)
7	Kek (marka 1)	19	Soya unu (marka 2)
8	Kek (marka 2)	20	Soya unu (marka 3)
9	Kek (marka 3)	21	Referans GM soya küspesi
10	Kek (marka 4)	22	Referans GM soya küspesi
11	Kraker (marka 1)	23	Referans GM mısır
12	Kraker (marka 2)	24	Referans GM mısır

3.1.2 DNA izolasyon metotları

Bu tez çalışmasında biyosensör analizinde kullanılmak üzere hedeflenen örnek gruplarının seçilmesi amacıyla gıda örneklerinden yüksek moleküler ağırlıklı ve kaliteli DNA eldesi için literatürden seçilen izolasyon protokolleri karşılaştırılmış ve incelenen işlenmiş gıda ürünlerinde en iyi sonuç veren DNA izolasyon protokolü seçilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan DNA izolasyon prosedürleri sırasıyla; Metot-1; Modifiye Wizard yöntemi (Tung Nguyen ve diğerleri, 2009; Sönmezoğlu ve Keskin 2015), Metot-2; modifiye CTAB yöntemi (Matthes ve diğerleri, 2020), Metot-3; modifiye Wizard-CTAB yöntemi ve Metot-4; klasik CTAB yöntemi (Doyle ve Doyle, 1990) olarak uygulanmış, ayrıca biyosensör çalışmalarında geleneksel izolasyon yöntemleriyle birlikte kullanılmak üzere ticari DNA ekstraksiyon kiti (DNasy Mericon Food Kit – Qiagen) ile de DNA izolasyonu yapılmıştır.

Gıda numuneleri eşit oranlarda her biri 50 mg olacak şekilde homojenize edilmiş numuneler halinde hazırlanmıştır. Ekstraksiyonun güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği için DNA izolasyon yöntemi üç tekrarlı olarak uygulanmıştır. Kontaminasyon risklerine karşı deney sırasında her sete bir numune yerine su eklenerek kontrol yapılmıştır.

DNA izolasyon prosedürleri boyunca kullanılan cihazlar, santrifüj cihazı (Eppendorf 5810 R), su banyosu (Nüve BM 302), analitik hassas terazi (AND), ph metre (Inolab pH-7110), -20 dondurucu (Sanyo), ısıtıcı blok (Eppendorf) ve Bio-Rad dikey agaroz elektroforez sistemidir.

İşlenmiş gıda ürünlerinde kullanılan DNA izolasyon yöntemlerine ait prosedürler aşağıda verilmiştir.

Metot-1 : Modifiye Wizard Yöntemi

1. Homojenize gıda numunesi (50 mg) 2 ml'lik steril bir tüpe aktarıldı. Üzerine 1500 µL TNE tamponu ve 50 µl proteinaz K (Sigma Aldrich) (20 mg/ml) eklendi.
2. Gıda numuneleri su banyosunda 55 °C'de 2 saat inkübe edildikten sonra, 5 µl 10 mg/ml ribonükleaz enzimi (RNase) (Thermo Scientific) eklendi. 1 saat boyunca 60 °C'de su banyosunda bekletildi.

3. Örnekler 1300 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. ~700 µl süpernatant yeni bir tüpe aktarıldı. Aynı hacimde kloroform (Sigma Aldrich) eklendi ve daha sonra karışım 13000 rpm'de 10 dakika daha santrifüjlendi.
4. Süpernatant yeni bir 1,5 ml tüpe alındı. 15 µl 3M sodyum asetat (pH 5,2) ve 50 µl saf etanol (Sigma Aldrich) 600 µl süpernatanta ilave edilerek kalan nişasta polisakkaritleri çözüldü. Karışım 15 dakika buz üzerinde tutuldu ve 7 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüjlendi.
5. Yeni bir tüpe alınan süpernatanta 5 µl 3M sodyum asetat (pH 5,2) ve 500 µl saf etanol eklendi.
6. DNA'nın çökmesi için 15 dakika buz üzerinde inkübe edildi, ardından 12000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım döküldü ve pelet elde edildi.
7. Peletler, 1000 µl % 70 etanol ile yıkandı. Çöktürmek için 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, sıvı kısım döküldü ve pelet oda sıcaklığında kurutuldu.
8. Pelet 100 µl çift distile su (ddH₂O) içinde çözüldü ve kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Metot-2 : Modifiye CTAB Yöntemi

1. 50 mg öğütülmüş numunelere önceden ısıtılmış (65 °C) 700 µl CTAB lizis tamponu, 5 µl RNase A (10 mg/ml) ve 20 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklendi. Karışım, 60 dakika boyunca 65°C'de çalkalanan bir termomikser içinde inkübe edildi.
2. Çöktürme için örnekler 10000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantın üzerine 500 µl kloroform eklendi, üst faz yeni tüpe alındı ve 45 saniye karıştırıldı.
3. DNA örnekleri, iki hacim CTAB çöktürme çözeltisi eklendikten sonra oda sıcaklığında 60 dakikalık bir inkübasyon adımıyla çöktürüldü ardından 10000 rpm'de 5-10 dakika santrifüjlendi.
4. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Pelet 350 µl 1,2 M NaCl içinde yeniden süspanse edildi. Ardından 350 µl kloroform eklenerek karıştırıldı.
5. Yeni tüpe alınan süpernatant, 0,6 hacim izopropanol eklenerek çöktürüldü. -20 °C'de 15 dakikalık bir inkübasyon adımıyla karışım, 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.
6. Elde edilen süpernatant dikkatlice atıldı. Pelet 1000 µl % 70 (h/h) etanol ile yıkandı, tekrar 10 dakika santrifüjlendi.

7. DNA kurutuldu ve 100 µl ddH₂O içinde çözüldü. Ardından kullanılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Metot-3 : Modifiye Wizard-CTAB Yöntemi

1. Her bir örnek için, yaklaşık 50 mg numune tartıldı. 1000 µl TNE tamponu ve 30 µl Proteinaz K (20 mg/ml) ile karıştırıldı. Bu karışım, 65 °C'lik bir su banyosunda üç saat tutuldu ve her 15 dakikada bir karıştırıldı.

2. Örnekler, karışıma 5 µl (10 mg/ml) RNase eklenerek bir saat daha 65 °C'de inkübe edildi.

3. 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni steril eppendorf tüplere alındı. Tüplerin üzerine aynı hacimde Kloroform/izoamil alkol (24:1) ilave edildi.

4. 13000 rpm'de 10 dakikalık santrifüjden sonra süpernatant yeni tüplere alındı ve 3/2 izopropanol eklendi.

5. 13000 rpm'de 20 dakika daha çöktürmeden sonra, pelet 400 µl TE tamponu içinde çözündürüldü ve gece boyunca + 4 °C'de inkübe edildi.

6. Ertesi gün numune tüpleri 60 °C'lik su banyosunda yeniden süspanse edildi ve Kloroform/izoamil alkol (24: 1) basamağı tekrar edildi.

7. 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst faz yeni tüplere alındı.

8. Çöktürme aşaması için alınan süpernatantlara 9 µl 3M sodyum asetat (pH: 5,2) ve 30 µl saf etanol solüsyonu ilave edildi ve karıştırıldı.

9. Karışım, DNA'yı çöktürmek için buz üzerinde 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

10. Üst faz yeni bir tüpe alındı. Üzerine 3 µl sodyum asetat ve 500 µl saf etanol solüsyonu ilave edildikten sonra tekrar 15 dakika buz üzerinde inkübe edildi.

11. Numuneler 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü ve pelet % 70 alkol ile yıkandı.

12. Ardından pelet alkol içinde yeniden santrifüjlendi, temizlendi, iyice kurutuldu, alkolden arındırıldı ve 100 µl ddH₂O içinde çözüldü. Kullanılana kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Metot-4 : Klasik CTAB Yöntemi

1. Homojenize gıda numunesi (50 mg), 2 ml'lik steril bir eppendorf tüpe aktarıldı. 1200 µl TNE tamponu ve 40 µl proteinaz K (20 mg/ml) ilave edildikten sonra vorteks ile iyice karıştırıldı.
2. 65 °C'de 2 saat su banyosunda inkübe edildikten sonra karışıma 5 µl 10 mg/ml RNase ilave edildi ve bir saat daha 65°C'de inkübe edildi.
3. Çözelti, 15 dakika boyunca 15000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant yeni bir tüpe alındı ve aynı hacimde kloroform/izoamil alkol (24:1) eklendi. Karışım hafifçe ters çevrilerek karıştırıldıktan sonra tekrar 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Üst faz yeni bir 1,5 µl'lik tüpe alındı. Üzerine 100 µl 1,2 M NaCl ve 800 µl mutlak etanol eklendi ve karıştırıldı. Ardından karışım 14000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi.
5. Süpernatant atıldı. Pelet % 70 etanol eklenerek yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu.
6. Peletlere 100 µl ddH₂O eklenerek kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

Ekstra temizleme adımı (gerekirse)

Numuneler 60 °C'de 1 saat ısıtıldı ve DNA, 500 µL mutlak etanol ile çöktürüldü. Tüplere 100 µl ddH₂O eklenerek 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Pelet % 70 alkol ile yıkandı ve tekrar 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Pelet iyice kurutuldu.

3.1.3 DNA miktar ve saflık analizleri

İzole edilen DNA'nın saflığını ve miktarını belirlemek için spektrofotometrik yöntemler ve jel elektroforezinden faydalanılmıştır (Şekil 3.1). Bu amaçla numuneler mikro hacimli spektrofotometre (NanoDrop-Denovix DS-11) ile 260-280 nm dalga boylarında ölçülerek kantitatif tayinler yapılmıştır (Wilfinger ve diğerleri, 2006). Agaroz jel elektroforezi, izole edilmiş DNA'yı görselleştirmek için tercih edilmiştir. Elde edilen genomik DNA'lar, % 1 agaroz jellerde yürütülmüştür. DNA'yı agaroz jel içinde yürütmek için 1 X Tris-Borik asit (TBE) tamponu kullanılmıştır. Örneklerin yüklendiği % 1'lik agaroz jel; 1,2 g agaroz, 24 ml 1 x TBE tamponu ve 96 ml ddH₂O'dan oluşmaktadır. Jel boyama için, jelle 8 µl etidyum bromür (Sigma Aldrich) (20 mg/ml) ilave edilmiştir. Numunelere ait agaroz jeller UV transilluminatör (BioRad, ChemiDocTMMP Imaging System) kullanılarak görüntülenmiştir.



Şekil 3.1 : Spektrofotometrik ölçümlerinde kullanılan NanoDrop ve UV transillüminatör cihazı.

3.1.4 Soya ve mısır geninin moleküler taraması

Çalışmada incelenen gıda ürünlerinin GDO taramalarının yapılması için öncelikle genomik DNA izolasyonu tamamlanan gıda numunelerinin soya ve mısır içeriğinin varlığı araştırılmıştır. PCR çalışmaları boyunca Bio-Rad C1000 Touch termal döngü cihazı kullanılmıştır.

Yerel marketlerden temin edilen ve çeşitli marka gıda örneklerinde soya/mısır içeriğini tespit etmek için spesifik primerler yardımıyla soya-mısır DNA taraması yapılmıştır. İzole edilen örnek DNA’larda soya içeriğinin belirlenmesinde lektin geni varlığının izlenmesi için LEC1/LEC2 primer çiftleri (İontek) (Vollenhofer ve diğerleri, 1999) kullanılmış ve aynı şekilde mısır içeriğinin tespiti amacıyla mısır bitkisine özgü zein geninin örneklerde izlenmesi için ZEIN03/ZEIN04 (Pauli ve diğerleri, 2000) primer çiftleri (İontek) kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 : Soya ve mısır DNA’sı taramasında kullanılan primerlere ait bilgiler.

Primer Adı	Baz Dizisi (5’-3’)	Beklenen Bant Büyükliği (bp)
LEC1	GTG CTA CTG ACC AGC AAG GCA AAC TCA GCG	164
LEC2	GAG GGT TTT GGG GTG CCG TTT TCG TCA AC	164
ZEIN03	AGT GCG ACC CAT ATT CCA	277
ZEIN04	GAC ATT GTG GCA TCA TCA TTT	277

Gıda örneklerinin soya ve mısır tespitinde kullanılan spesifik primerlere özgü PCR amplifikasyon işlemi için hazırlanan mix solüsyonu; 4 µl 10X Taq Buffer, 3,2 µl 25 mM MgCl₂, 3,2 µl dNTP mix solüsyonu, 1'er µl 10 mM ileri ve geri primer, 0,5 U Taq DNA polimeraz, 2 µl kalıp DNA ve ddH₂O olmak üzere toplam 40 µl reaksiyon hacmine sahiptir. Lektin geni PCR reaksiyonu için döngü koşulları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3 : Lektin primerleri için kullanılan PCR döngü koşulları.

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	12 dk	1
Denatürasyon	95	1 dk	40
Primerin DNA'ya yapışma safhası	72	30 sn	
Uzama safhası	72	30 sn	
Son uzama safhası	72	10 dk	1

Zein geni taramaları için yapılan amplifikasyon sonucu beklenen bant büyüklüğü 277 bant çiftidir (Pauli ve diğerleri, 2000). Zein geninin amplifikasyonu için kullanılan PCR döngü koşulları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4 : Zein primerinin amplifikasyonu için PCR döngü koşulları.

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	96	1 dk	40
Primerin DNA'ya yapışma safhası	60	1 dk	
Uzama safhası	72	1 dk	
Son uzama safhası	72	5 dk	1

3.1.5 GDO tarama

DNA'nın hangi bitki türüne ait olduğu belirlendikten sonra Camv 35S promotör bölgesinin amplifikasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, P35s-cf3/cf4 primerleri (İontek) (Cardarelli ve diğerleri 2005; Lipp ve diğerleri 2001) kullanılmıştır (Çizelge 3.5). Bu

primerlerin kullanıldığı pozitif kontrolde görülmesi beklenen bant büyüklükleri, P35s-cf3/cf4 primeri için 123 baz çiftidir.

Çizelge 3.5 : 35S promotor dizilerinin taramasında kullanılan primerlere ait bilgiler.

Primer Adı	Baz Dizisi (5'-3')	Beklenen Bant Büyüklüğü (bp)
P35s cf3	CCACGTCTTCAAAGCAAGTGG	123
P35s cf4	TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC	123

Promotör gen bölgesi taramasında kullanılan primerler ile amplifikasyonun PCR reaksiyon koşulları, çalışmada kullanılan örneklerle yapılan çalışmalar için kaynak makalelerde belirtilen koşullara göre optimize edilmiştir. Buna göre, toplam 25 µl reaksiyon hacimi için 2,5 µl 10x *Taq* Buffer, 160 µM her bir dNTP, 0,24 µM ileri ve ters primer, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 U *Taq* DNA polimeraz, 2 µl kalıp DNA ve ddH₂O kullanılmıştır.

3.1.6 İstatistiksel analiz

Spektrofotometrik verileri değerlendirmek için iki yönlü varyans analizinden (ANOVA) yararlanılmıştır. Rastgele blok tasarımına göre SPSS 15.0 yazılımı kullanılarak ölçümler iki kopya halinde alınmış ve ortalama verileri karşılaştırmak için Duncan testi kullanılmıştır.

3.2 Grafen Oksit ve İndirgenmiş Grafen Oksit Sentezi

Tez çalışmasında elektrot yüzeyine kaplanması hedeflenen grafen tabakalarının sentezi için, modifiye Hummers metodu ile indirgenmiş grafen oksit (rGO) elde edilerek grafen oksit (GO) ve rGO tabakalarının karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.2.1 Kullanılan kimyasal ve çözeltiler

Tez çalışmasında grafen sentez çalışmaları boyunca kullanılan kimyasallar; potasyum persülfat (K₂S₂O₈) (Acros Organics), fosfor pentaoksit (P₄O₁₀) (Acros Organics), sülfürik asit (H₂SO₄) (Acros Organics) grafit tozu (Sigma Aldrich), sodyum nitrat (NaNO₃) (Merc), Potasyum permanganat (KMnO₄) (Kimetsan) ve

H₂O₂ (Merc)'dir. Kullanılan çözeltiler, % 37'lik HCl çözeltisi olarak hazırlanmıştır. Pullandırma için kullanılan N-metil-2-propilidene Acros Organics ve indirgeme ajanı olarak kullanılan hidrazin hidrat Merck'ten temin edilmiştir.

3.2.2 Ön oksitleme

Grafrit tabakalarının ön oksitleme işlemi için, 2,5 g potasyum persülfat (K₂S₂O₈), 2,5 g fosfor pentaoksit (P₄O₁₀) ve 12,5 ml sülfürik asit (H₂SO₄) kullanılmıştır. Hazırlanan karışım yağ banyosunda yaklaşık 80°C sıcaklığa kadar ısıtılmış ardından grafit tozu eklenmiştir. Beş saat sonunda çözelti yağ banyosundan alınarak soğutulmuştur. Oda sıcaklığına gelen çözelti üzerine 500 ml deiyonize su eklenerek karışım bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından kalan asit kalıntıların giderilmesi için karışım filtre kağıdı kullanılarak yıkama ve süzme işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 : Grafitin ön oksitlemesi.

3.2.3 Oksitleme

Oksitleme için 1,5 g sodyum nitrat (NaNO₃) ve 69 ml sülfürik asit (H₂SO₄) buz banyosu içinde karıştırılmış ardından ön oksitlenmiş grafit tozu eklenmiştir. Potasyum permanganatın (KMnO₄) ilavesinin ardından sıcaklık kontrollü bir şekilde reaksiyon devam ettirilmiştir. Sıcaklık 50°C'ye geldikten sonra, reaksiyona deiyonize su eklenerek sıcaklık 95 °C üzerine çıkartılmıştır. Ardından tekrar bir miktar deiyonize su ve H₂O₂ ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Elde edilen çözelti bir gece boyunca oda koşullarında bekletilmiş, 1:10 oranında 1 L % 37'lik HCl

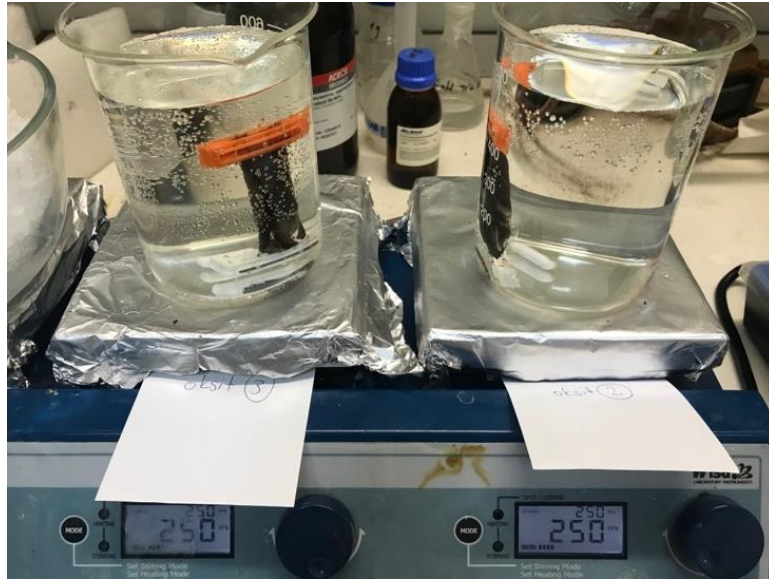
özeltisi ile muamele edilmiştir. 3-4 saat oda sıcaklığında bekletilen çözelti santrifüj işlemi ile yıkanarak kurutulmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 : Grafitin oksitleme basamakları.

3.2.4 Diyaliz ve kurutma

Oksitlemeden sonra kuruyan grafit oksit (GO) diyaliz membran içerisinde alınarak deiyonize su içerisinde yedi gün boyunca diyaliz işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 : Diyalize bırakılan membran filtre içindeki GO örnekleri.

Diyalizden alınan örnekler cam petri içinde vakumlu fırına götürülerek, 60°C sıcaklıkta ve vakum altında 24 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 : Vakumlu fırında 24 saat kurumaya bırakılan örnekler.

3.2.5 Pullandırma

Vakumlu fırından alınan örnekler 2,5 g tartılarak, bir miktar N-metil-2-propilidene çözeltisi ile birlikte pullandırma işlemine tabi tutulmuştur. Pullandırma (exfoliation) aşaması için bilyalı öğütme (ball milling) tekniği kullanılmıştır. Bilyalı öğütme işleminde fiziksel olarak parçalanmış örnekler çözücü ile koyu siyah renkte görünürler. Karışım, deiyonize su ile çözündürülerek santrifüj yoluyla yıkanmış ve

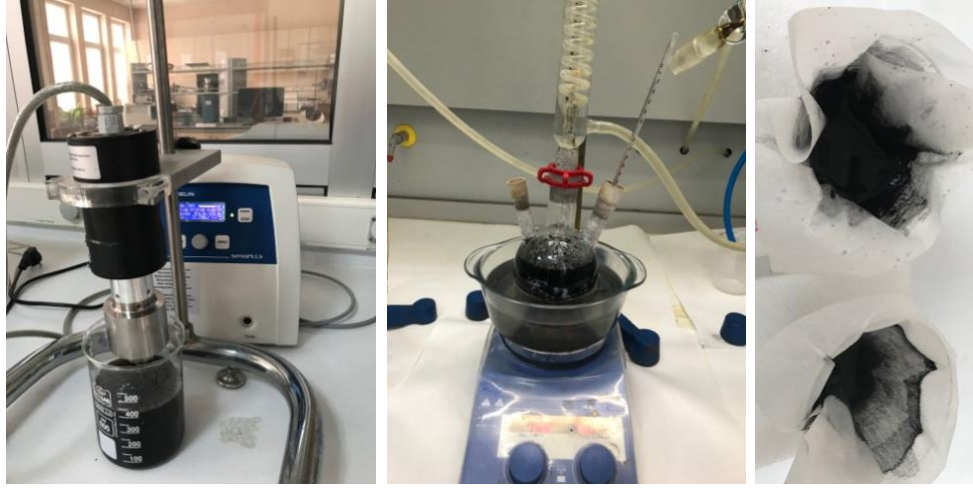
bilyalı öğütme için kullanılan çözücü ortamdan uzaklaştırılmıştır. Yıkanan pelet oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.6). GO-B bu aşmada elde edilmiştir.



Şekil 3.6 : GO örneklerinin pullandırılması.

3.2.6 İndirgeme

Pullandırılmış GO-B tabakalarının indirgeme basamağı için 0,4 g GO-B, 240 ml deiyonize su içerisinde sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Çözelti daha sonra birkaç saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve bu basamakta indirgeme ajanı olarak hidrazin hidrat kullanılmıştır. Karışım daha sonra yağ banyosuna alınarak 95 °C sıcaklıkta bir gece boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyon sonunda oda sıcaklığında soğuyan karışım filtre kağıdı ile kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.7). İndirgeme basamağı sonunda rGO elde edilmiştir.



Şekil 3.7 : GO indirgeme işlemi boyunca uygulanan basamaklar.

3.2.7 Karakterizasyonda kullanılan cihazlar ve donanım

Sentezlenen grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (rGO) örneklerinin yapısındaki fonksiyonel gruplarının incelenmesi için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi FTIR (Bruker VERTEX 70), kristal özellikleri ve tabakalar arasındaki değişikliklerin incelenmesi için X-ışını difraktometrisi XRD (Bruker D8 Advanced) analizlerinden yararlanılmıştır. Bu tez çalışmasında Hummers metodu ile sentezlenen GO ve rGO için yapıdaki bozulmalar, safsızlıklar ve karbon-karbon bağ gerilmesinden meydana gelen yapılar RAMAN spektroskopisi (Renishaw inVia Raman microscope) ile 633 nm dalga boyunda lazer ölçümü alınarak incelenmiştir. Grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksit tabakalarının morfolojisinin incelenmesi için taramalı elektron mikroskobu (HITACHI SU5000 SEM) görüntülerinden yararlanılmıştır. Bunun yanında sentezlenen örneklerin UV-vis spektrumları (HITACHI Floresans spektrofotometresi F-7100) incelenmiştir.

Biyosensör çalışmaları için tasarlanan modifiye elektrodun analizi için karakterizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Bunun için elektrokimyasal tekniklerin (CV, EIS) yanında SEM analizlerine dair sonuçlar tez çalışması boyunca analiz edilmiş ve elde edilen veriler bulgular ve tartışma kısmında değerlendirilmiştir.

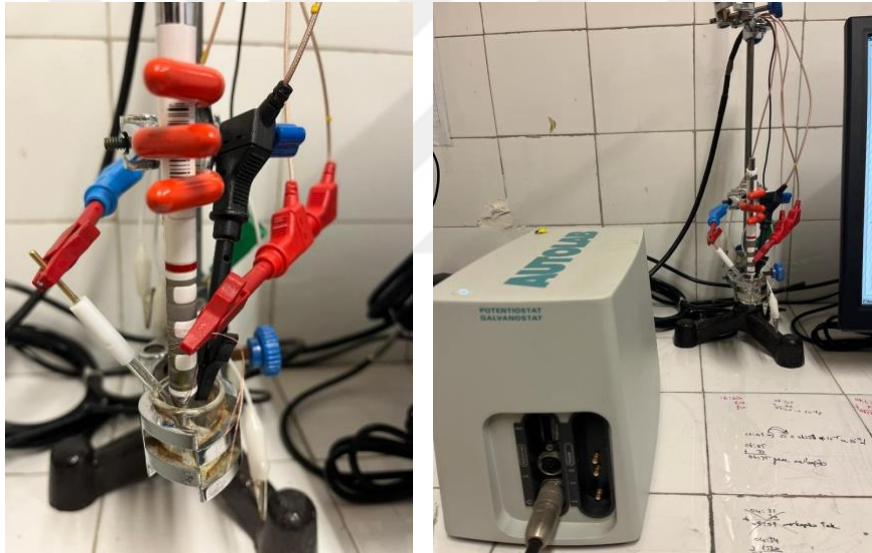
3.4 Biyosensör Çalışmaları

3.4.1 Kullanılan elektrokimyasal sistemler ve cihazlar

Bu tez çalışmasında biyosensör çalışmaları için düşük maliyet, seri üretim kolaylığı ve hız gibi avantajları bakımından diğer daha pahalı ticari karbon elektrotlara kıyasla

elektrokimyasal ölçümler için ucuz ve tek kullanımlık sensör malzemeleri olan kalem grafit elektrotlar (PGE) tercih edilmiştir.

Elektrokimyasal ölçümler için referans elektrot olarak Ag-AgCl, karşıt elektrot olarak Pt tel (% 99,9) ve çalışma elektrodu olarak Tombow HB kurşun kalem (0,50 mm) içeren üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Kalem ucunu tutmak için Rotring (Almanya) marka mekanik kurşun kalem kullanılmıştır. Elektrik bağlantısını sağlamak için kurşun kalemin metalik gövdesine bakır tel sarılmıştır. Potansiyostat/Galvanostat olarak, Autolab PGSTAT 204 cihazı ile Nova 2.1 yazılım programı kullanılmıştır. Bu cihazda elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) deneyleri için sisteme entegre edilen FRA32M modülünden yararlanılmıştır. Kullanılan çalışma elektrodu, referans ve karşıt elektrodu içeren üçlü elektrot sistemi ile elektrokimyasal sistem Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8 : Kullanılan üçlü elektrot ve elektrokimyasal sistem.

Kullanılan diğer yardımcı cihazlar pH metre (HANNA Instruments HI 2550), hassas terazi (KERN ACJ/ACS), ultrasonik banyo (KUDOS SK1200H), manyetik karıştırıcı (IKA), otomatik mikro pipetler (Eppendorf) ve uygun pipet uçlarıdır.

3.4.2 Kullanılan çözeltiler ve kimyasallar

Stok solüsyonların hazırlanmasında kullanılan kimyasallar; potasyum ferrosiyaniür ($K_4[Fe(CN)_6]$), potasyum ferrisiyaniür ($K_3[Fe(CN)_6]$), sodyum klorür ($NaCl$), magnezyum klorür ($MgCl_2$), potasyum klorür (KCl), sodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), sodyum dihidrojen fosfat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), etilen diamin

tetraasetik asit (EDTA), sodyum hidroksit (NaOH), Sigma-Aldrich ve Merck'ten temin edilmiştir.

Hazırlanan stok solüsyonları;

50 mM Tris-HCl tampon çözeltisi; 0,1 M NaCl, 0,2 M KCl, 5,0 mM MgCl₂, 1,0 mM EDTA ile pH 7,4'e ayarlanarak hazırlanmıştır.

0,1 M Fosfat tampon solüsyonu (PBS, pH 7,4); NaH₂PO₄ ve Na₂HPO₄ standart stok solüsyonları karıştırılarak 0,1 M NaOH ile pH ayarlanarak hazırlanmıştır.

Immobilizasyon tampon solüsyonu 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA ve 0,3 M NaCl eklenerek pH 8,0'e ayarlanmıştır.

Ferri/ferrosiyaniür çözeltisi; 0,1 M KCl içerecek şekilde 5 mM potasyum ferrosiyaniür ve potasyum ferrosiyaniür ile hazırlanmıştır.

Tris-EDTA (TE) tampon solüsyonu (1X); 1 mL 1 M Tris-HCl (pH 8,0) ve 0,2 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0) ile hazırlanmıştır.

6-merkapt-1 hekzanol (MCH) solüsyonu; immobilizasyon tamponunda 0,1 M olacak şekilde hazırlanmıştır.

Kullanılan tüm solüsyonlar distile su (saf su) içinde hazırlanmıştır.

3.4.3 Oligonükleotid dizileri ve DNA numunelerinin hazırlanması

Oligonükleotid stok çözeltileri 100 µM olacak şekilde ultra saf su içinde hazırlanmış ve kullanılabilecek kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Kullanılan sentetik oligonükleotidler Microsynth firmasından temin edilmiştir. Tez çalışması boyunca elektrot yüzeyinde kullanılan oligonükleotidlere ait sekans bilgileri Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6 : Sentetik oligonükleotidlere ait sekans bilgileri.

Materyal	Sekans bilgisi
-SH işaretli oligonükleotid prob (P35S)	5' -SH-(CH ₂) ₆ - GGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCC 3'
Oligonükleotid hedef CaMV 35S (tamamlayıcı hedef - tDNA)	5' GGCAGAGGCATCTTCAACGATGGCC 3'
Oligonükleotid hedef CaMV 35S (3 baz çifti uyumsuzluğu - M3)	5' GGCAGACGCAACTTCAAGGATGGCC 3'
Oligonükleotid hedef CaMV 35S (tamamlayıcı olmayan - Nc)	5' GATTAGAGTCCCGCAATTAATCATT 3'

3.4.4 Çalışma elektrodu yüzey modifikasyonu ve biyosensör düzeneğinin oluşturulması

Çalışma elektrodu modifikasyonu için tez çalışması boyunca grafen sentez basamağında elde edilmiş olan pullandırılmış GO (1 mg) ve rGO (2 mg) 2 ml saf su içinde ultrasonik banyoda 2 saat boyunca dispers edildi. Ardından çalışma elektrodu (PGE) hazırlanan GO-rGO solüsyonu içine daldırılarak oda sıcaklığında 10 dk boyunca bekletildi (GO-rGO/PGE). Kalem uçları kullanılmadan önce etanolde yıkanmış ve kurutularak kullanılmıştır. Aktive edilen ve edilmeyen uçların cevaplarında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Yüzeye altın (Au) ve gümüş (Ag) bimetal yapısı kaplama işlemi için, 1:1 oranında HAuCl_4 ve AgNO_3 içeren kaplama çözeltisi, 2 ml sülfürik asit (H_2SO_4) içinde 3 mM HAuCl_4 (Alfa Aesar) ve 3 mM AgNO_3 çözeltisi ile hazırlandı. Bu çözelti dönüşümlü voltametri ile -1.0 V ile +0.1 V aralığında 100 mV/s tarama hızında 10 döngü boyunca elektrot yüzeyine biriktirildi (Au-Ag/GO-rGO/PGE) (Arvinte ve diğerleri, 2018).

Yüzey modifikasyonun tamamlanmasının ardından modifiye elektrot yüzeyine tiyol işaretli problemlerin immobilizasyonu için sentetik oligonükleotidlerin immobilizasyon basamağına geçilmiştir.

3.4.5 Oligonükleotid immobilizasyonu ve hibridizasyon basamakları

İmmobilizasyon basamağı için tiyol (-SH) işaretli oligonükleotid problemler immobilizasyon solüsyonu içinde seyreltildi (25 μM). Çalışma elektrodu 90 dk boyunca 25 μM prob DNA çözeltisi içinde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından çalışma elektrodu inkübasyon tamponu ile yıkandı, hemen ardından immobilize olmayan bölgelerin bloklanması için çalışma elektrodu 0,1 M 6-merkapt-1 hekzanol (MCH) çözeltisine daldırılarak 30 dk boyunca inkübe edildi. Sonrasında yüzey, fosfat tampon solüsyonu ile yıkandı.

Hibridizasyon basamağı için hedef DNA solüsyonları hibridizasyon tampon solüsyonu içinde seyreltildi (10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} , 10^{-16} M). Prob oligonükleotid bağlı çalışma elektrodu, hedef DNA içeren immobilizasyon tampon çözeltisi içinde oda sıcaklığında 30 dk boyunca inkübe edilerek hibridizasyon gerçekleştirildi.

Ardından yüzey yeniden fosfat tampon çözeltisi ile yıkanarak 0,1 M KCl içeren 5 mM ferri/ferrosiyandır çözeltisinde empedans ölçümleri alındı.

3.4.6 Gerçek örnek ölçümleri

Moleküler çalışmalar basamağında izole edilen paketli gıda örneklerine ait genomik DNA numuneleri gerçek örnek analizleri için kullanıldı. Biyosensör analizleri için izole edilen genomik DNA örnekleri daha önce belirtilmiş olan DNA izolasyon metodu-3 (modifiye Wizard-CTAB) ve ticari kit (DNasy Mericon Food Kit – Qiagen) izolasyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir.

Transgenik içeriğin tespit edilmesi için CaMV 35s promotör bölgesinin PCR reaksiyonu ile amplifikasyonu sonucu elde edilen tarama sonuçlarına göre pozitif bant profili gösteren paketli gıda ürünlerinin biyosensör analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için pozitif kontrol olarak GDO'lu soya, agaroz jel sonucu pozitif bant profili gösteren 2 adet paketli gıda numunesi, negatif kontrol olarak GDO içermeyen soya örneği ve GDO soya numunesi için hedef genin çoğaltıldığı PCR ürünü kullanılmıştır.

Ayrıca çalışmada, moleküler taramalar boyunca DNA izolasyonu gerçekleştirilen diğer gıda numunelerine ait biyosensör analizleri yapılmıştır. Kek, cips, mısır unu, soya unu, bazı bisküvi ve kraker örneklerinin hedef olarak taranan CaMV 35S bölgesini içermemesi veya bu bölgenin büyük oranda denatüre olması sebebiyle biyosensör analizlerinden bu örnekler için sonuç alınamamıştır.

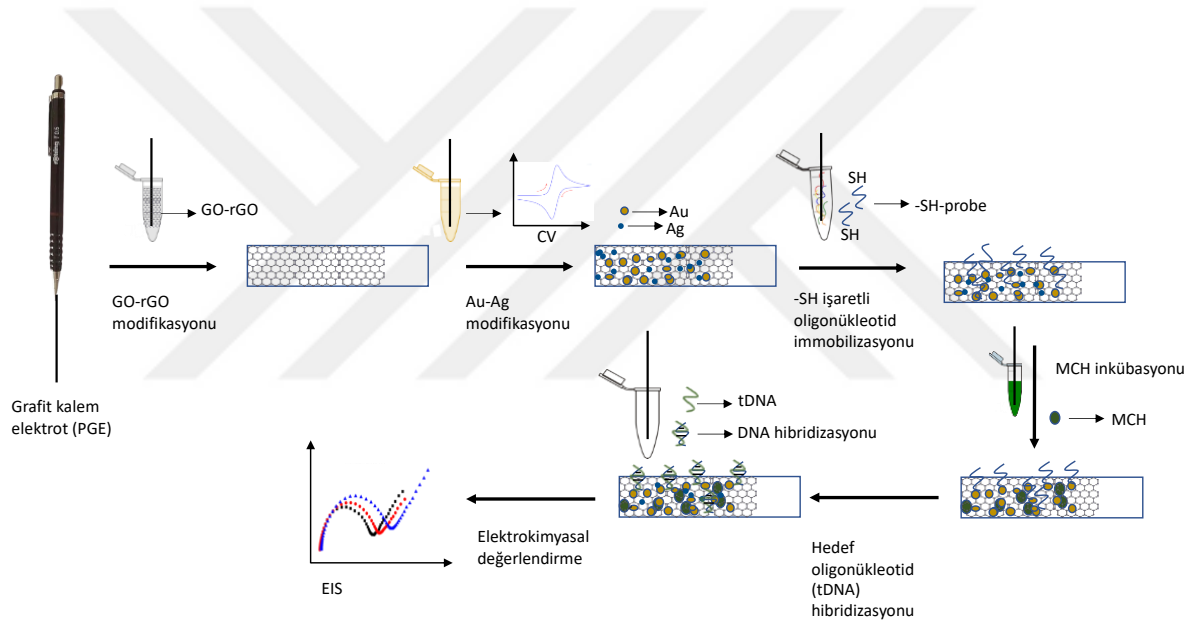
Gerçek örnek denemelerinde kullanılan genomik DNA numuneleri DNA'nın çift zincirli yapısının açılması için öncelikle 5 dk boyunca 95°C'de su banyosu içinde inkübe edilmiş hemen ardından 1 dk boyunca buzda bekletilmiştir.

Hibridizasyon işlemi için, prob bağlı çalışma elektrotları, TE buffer (pH 8,0) içinde seyreltilmiş (10^{-15} M) olan tek zincirli genomik DNA çözeltileri içinde oda sıcaklığında 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında gerçek örnekler için elektrokimyasal ölçümler alınarak kaydedilmiştir.

3.4.7 GDO biyosensör geliştirme basamakları

GDO biyosensör geliştirme basamakları Şekil 3.9'da görselleştirildiği gibi sırasıyla aşağıdaki basamakları kapsamaktadır;

- Kalem grafit elektrodun (PGE) pullandırılmış grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (rGO) ile modifikasyonu (GO-rGO/PGE)
- GO-rGO/PGE'nin altın (Au) ve gümüş (Ag) nanoyapıları ile modifikasyonu (Au-Ag/GO-rGO/PGE)
- Yüzeyi modifiye edilmiş çalışma elektroduna (Au-Ag/GO-rGO/PGE) -SH işaretli oligonükleotid problemlerin immobilizasyonu
- İmmobilize olmayan bölgelerin bloklanması için MCH inkübasyonu
- Hedef DNA hibridizasyonu
- Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile elektrokimyasal değerlendirme



Şekil 3.9 : GDO biyosensör modifikasyon basamakları.

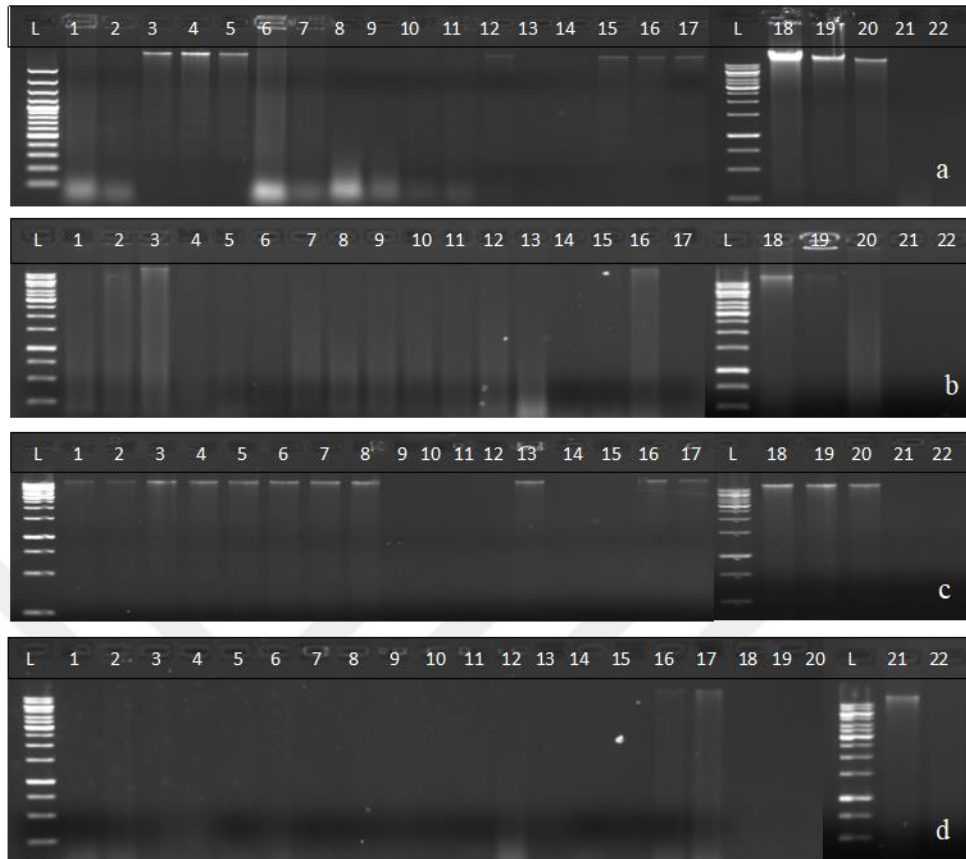
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 DNA İzolasyonu ve Moleküler Çalışmalar

GDO analizinde DNA izolasyon yöntemi DNA kalitesini belirlemesi bakımından önemli basamaklardan biridir. DNA amplifikasyon yöntemlerinin başarısı karmaşık veya yüksek oranda işlenmiş gıda matrislerinin analizinde kritik olan DNA ekstraksiyon protokollerinin verimliliğine bağlıdır.

Agaroz jel elektroforezi, farklı boyutlardaki DNA ve RNA moleküllerini ayırmak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında numunelerdeki DNA miktarı hakkında faydalı bilgiler sağlaması adına DNA kalitesini değerlendirmek için agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında incelenen gıda ürünlerinden farklı DNA izolasyon protokolleri ile elde edilen örnekler % 1 konsantrasyona sahip agaroz jeller kullanılarak, yüksek yoğunluklu DNA fragmanları halinde görüntülenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 : Farklı DNA izolasyon protokollerine ait agaroz jel görüntüleri **a)** DNA izolasyon metot-1, **b)** DNA izolasyon metot-2, **c)** DNA izolasyon metot-3, **d)** DNA izolasyon metot-4. L, GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Termo Scientific). Kuyucuk; 1-6 bisküvi, 7-10 kek, 11-13 kraker, 14-15 mısır cipsi, 16-17 mısır unu, 18-19 soya unu, 20 GM soya, 21 GM mısır ve 22 negatif kontrol (ddH₂O).

Agaroz jelde dağılım göstermiş olan yüksek moleküler ağırlıklı ve net görünen bant profilleri, en az bozulmaya uğramış sağlam genomik DNA'yı gösterir. Bozulmuş veya kırılmış DNA ve RNA kontaminasyonu, jelde yayılma olarak görülebilir (Shokere ve diğerleri, 2009). Bu tez çalışmasında farklı izolasyon protokollerine ait agaroz jel fotoğraflarına göre, daha yüksek moleküler ağırlıklı genomik DNA örneklerinin modifiye Wizard metodu (Şekil 4.1'a) ile CTAB-Wizard DNA metoduna (Şekil 4.1 c) ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). Agaroz jel sonuçları, izolasyon protokolü için izolasyon verimliliğinde numune işleme seviyelerinin ve öğütme adımlarının önemini göstermektedir. DNA ekstraksiyon verimliliği, numunedeki partikül boyutu azaldıkça artabilir (Trifa ve Zhang, 2004). Tane boyutunun DNA ekstraksiyonunun verimliliği üzerindeki etkisi ile ilgili olarak, Moneano ve diğerleri (2005), farklı tane boyutlarındaki (irmik, un, küspe) mısır

örneklerini karşılaştırmıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre, en yüksek verimin en küçük tane boyutuna sahip mısıra ait olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum daha küçük parçacıkların ekstraksiyon reaktiflerine daha büyük bir yüzey alanı sunması ile ilişkilendirilebilir. Bu çalışmada, mısır unu örnekleri tüm izolasyon yöntemleri için en az bir net bant verirken soya unu örnekleri, metot-4 (klasik CTAB) hariç diğer tüm protokoller için temiz bant profilleri vermiştir. Diğer üç DNA izolasyon yöntemine göre mısır unu numunesi soya unu numunelerinden daha temiz ve yoğun bir bant profili göstermemiştir. Literatür ile uyumlu olarak gıda, tohum/tahıl veya yem örneklerinden izole edilen DNA'nın miktarı ve kalitesi, örnek boyutundan, optimal örnekleme yönteminden, biyolojik faktörlerden, inhibitörlerden ve matris tipinden etkilenmektedir (Ondşej, 2004; Laffont ve diğerleri, 2005; Gryson, 2010).

Isı, enzimatik aktivite ve düşük pH gibi işleme tekniklerinin DNA'nın miktarı ve bütünlüğü üzerindeki etkisinden dolayı, işlenmiş gıda maddelerinden yeterli miktarda çoğaltılabilir DNA ekstraksiyonu elde etmek çok daha zor olmaktadır (Tengel ve diğerleri, 2001; Peano ve diğerleri, 2004; Vijayakumar ve diğerleri, 2009; Arun ve diğerleri, 2013; Turkeç ve diğerleri, 2015; Pacheco Covello ve diğerleri, 2017; Soylu ve diğerleri, 2020; Joelma ve diğerleri, 2022). İşlenmiş gıda numunelerinin agaroz jel sonuçlarına göre bisküvi, kek ve kraker numuneleri için jelin daha düşük moleküler ağırlıklı kısımlarına doğru kaymalar gözlenmiştir (Şekil 4.1). Agaroz jel elektroforezinde düşük moleküler ağırlıklı fraksiyonlar kırık veya bozulmuş RNA/DNA kontaminasyonunu göstermektedir. Jelde daha yüksek moleküler ağırlıkta yoğun bant bulunması, genomik DNA'nın sağlam ve minimum düzeyde kontamine olduğu anlamına gelir (Shokere ve diğerleri, 2009). Pişirmenin DNA izolasyon verimini ve PCR sonuçlarını olumsuz etkilediği bilinmektedir (Bauer ve diğerleri, 2003; Gryson ve diğerleri, 2007; Gryson, 2010). Bu bakımdan pişirme, kızartma, asit ve pH değişimlerine maruz kalma düzeyi açısından bisküvi, kek, kraker ve mısır cipsi örneklerinin agaroz jel elektroforezinde düşük moleküler ağırlıklı kısımlara doğru yayılmalar göstermesi beklenen bir sonuçtur.

İncelenen DNA izolasyon yöntemlerinden elde edilen DNA konsantrasyonları ve 260/280 oranları ürün çeşidine göre değişmektedir (Çizelge 4.1). 260/280 oranı, DNA'nın saflığı ve kalitesi hakkında bilgi sağlamaktadır. DNA'daki protein kontaminasyonunun değerlendirilmesi için rutin olarak 260/280 oranı kullanılmaktadır. Bu orana göre 1,7 ve üzeri değerler kabul edilebilir olarak

değerlendirilebilir (Sambrook ve Russell 2001). 1,8 oranı, protein ve fenolik bileşiklerin yokluğunda yüksek saflığa sahip bir DNA derecesidir. Bu oran 2'nin üzerine çıktığı zaman RNA kontaminasyonundan söz edilebilmektedir (Sönmezoğlu ve Terzi, 2018).

Çizelge 4.1 : Gıda DNA'larının konsantrasyon ve saflık analizi sonuçları.

Gıda Ürünü	DNA İzolasyonu Metot-1		DNA İzolasyonu Metot-2		DNA İzolasyonu Metot-3		DNA İzolasyonu Metot-4		Ortalama* ng/μl	Ortalama* 260/280
	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280	ng/μl	260/280		
Bisküvi	125,22ab	1,80a	35,05b	1,86c	68,43ab	1,77b	52,19ab	1,88c	70,22	1,83
Kek	118,87ab	1,72a	8,27a	1,41a	37,81ab	1,58ab	45,26ab	1,61ab	52,55	1,58
Kraker	274,58bc	1,80a	26,08ab	1,76c	57,83ab	1,58ab	68,02b	1,79bc	106,62	1,73
Mısır Cipsi	81,80ab	1,67a	45,24b	1,76c	58,98ab	1,72ab	46,65ab	1,57a	58,16	1,68
Mısır Unu	36,16a	1,75a	25,40ab	1,76c	25,03ab	2,05c	16,86a	1,67ab	32,86	1,81
Soya Unu	593,58d	1,89a	107,12cd	1,71bc	63,98ab	1,47a	82,14b	1,75abc	211,80	1,71
GM Soya	380,77c	1,83a	159,47e	1,46ab	78,53b	1,81bc	12,65a	2,14d	157,86	1,81
GM Mısır	150,84ab	1,81a	134,61d	1,94c	20,67a	1,45a	13,66a	1,74abc	79,85	1,74
Ortalama*	220,22	1,78	67,65	1,71	51,41	1,68	42,18	1,77		

*Aynı sütun ve ardından gelen farklı harfler ortalamalarda önemli ölçüde farklılık göstermiştir. (P<0.05).

Tüm izolasyon yöntemlerine göre ekstrakte edilen örnekler arasındaki DNA miktarı 8,27 ng/μl (Metot-2) ile 593,58 ng/μl (Metot-1) arasındadır. Gıda ürünleri üzerinde yapılan istatistiksel analizlere göre örneklerin ortalama A260/A280 oranlarının en düşük ve en yüksek olduğu değerler 1,58 (kek) ve 1,83 (bisküvi) olmuştur. Çizelge 4.1'deki spektrofotometre sonuçları incelendiğinde toplam DNA varlığının en yüksek değerlerinin soya unu örneklerine (593,58 ng/μl), en düşük miktarın ise mısır unu, kek ve mısır cipsi örneklerine ait olduğu görülmektedir. Çikolata ve sos gibi bileşenlerin yanı sıra nişasta ve lesitin içeren örneklerden kaliteli ve bozulmamış DNA elde etmek zordur (Greiner ve diğerleri, 2005). Bu nedenle yapılan çalışmada ürün işleme düzeyinin olumsuz etkisinin yanında ürün bileşiminden kaynaklanan farklılıkların numune türü açısından farklı sonuçlara yol açabileceği desteklenmektedir. Bu sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Türkeç ve diğerleri (2015), inceledikleri ürünler arasındaki DNA veriminin incelenen izolasyon yöntemine göre farklılık göstermesine rağmen, orta ve yüksek işlenmiş

mısır içeriğine sahip ürünlerde genellikle daha düşük saflık değerleri elde edildiğine dikkat çekmiştir (Bernardo ve diğerleri, 2007).

En düşük DNA verimi, bazı kek (8,27 ng/μl), kraker (26,08 ng/μl), mısır cipsi (45,24 ng/μl) gibi işlenmiş gıda örneklerinde görülmektedir. Bu sonuç, gıdalardaki işleme seviyelerine bağlı olarak DNA miktarında azalma ve bozulma olduğunu doğrulamaktadır. Bu ürünlerin, yüksek sıcaklığa maruz kalmaları DNA'larının da bu yüksek sıcaklıkta degrade olmasına neden olmaktadır. > 1,9 saflık oranı bazı örneklerde RNA'yı belirtirken, ekstrakte edilen DNA örneğinde < 1,7'lik bir oran bu örneklerde proteinlerin varlığını göstermektedir (Abdel-Latif ve Osman 2017). Bu tez çalışmasında incelenen tüm modifiye izolasyon yöntemlerine göre gıda örneklerinde sırasıyla kek (1,58) ve mısır cipsi (1,68) ortalama 260/280 oranı 1,7'den az bulunmuştur. İncelenen diğer gıda numuneleri için ortalama 260/280 oranı 1,7 ile 2,0 arasındadır ve bu sonuçlar numunelerde protein ve polisakkaritler tarafından önemsiz düzeyde kontaminasyon seviyelerine işaret etmektedir (Pervaiz ve diğerleri, 2011). Tüm numuneler için 260/280 oranının ortalama değerleri 2,0'ın altındadır ve bu sonuç incelenen izolasyon protokolleri açısından gıda numunelerinde minimal, nükleik asit kontaminasyonunu göstermektedir.

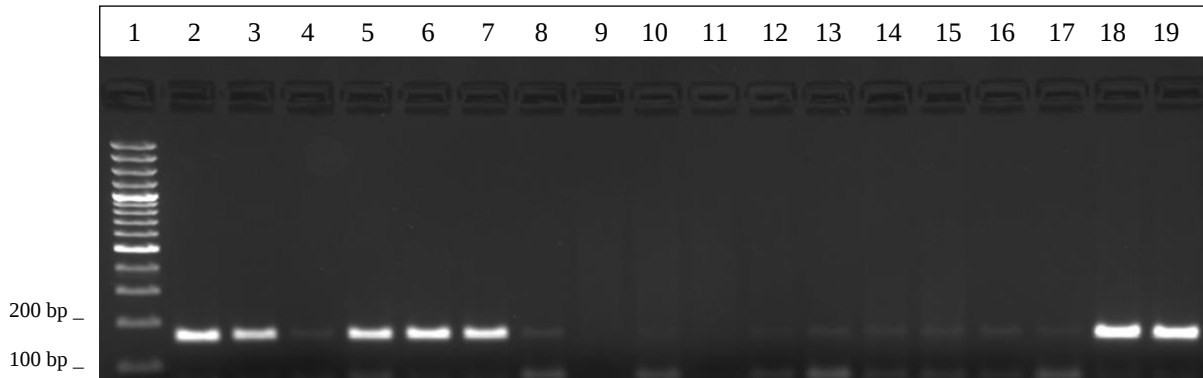
Türkeç ve diğerleri (2015), Türkiye'de ticari olarak satılan mısır içeren gıda ve yem ürünlerinde GDO tespitini değerlendirmek için DNA ekstraksiyon yöntemlerini incelemiştir. İncelenen tüm gıda ve yem ürünleri için Wizard, Genespin kit izolasyon protokolleri ve CTAB prosedürleri başarıyla uygulanmıştır. Araştırmacılara göre, CTAB yöntemi, ticari kitlelere kıyasla ham soya ile mısır ve yüksek oranda işlenmiş gıda numuneleri için en uygun yöntem olarak bildirilmiştir. Mısır ekmeği hariç incelenen örneklerde CTAB yönteminin DNA saflığının 1,5'in üzerinde olması, ekstrakte edilen DNA'nın amplifikasyon analizi için uygun olduğunu göstermiştir (Querci ve diğerleri, 2005; Turkeç ve diğerleri, 2015). Bu çalışmada incelenen örnekler için soya unu ve kek hariç tüm örneklerde 260/280 değerinin ortalaması 1,7'nin üzerindedir.

Mathes ve diğerleri (2020), protein açısından zengin mısır yemlerinden DNA ekstraksiyonu için modifiye bir CTAB protokolü önermiştir. Karşılaştırdıkları diğer protokoller arasında bu protokolün yüksek oranda işlenmiş mısır örneklerinden DNA ekstraksiyonu için en uygun ve tekrarlanabilir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Aynı DNA ekstraksiyon protokolü, bu tez çalışmasında da küçük değişikliklerle

kullanılmıştır (metot-2). Mısır unu ve referans mısır örneği için uygulanan DNA izolasyon metodu-2, metot-1'den sonra en yüksek DNA verimine sahip protokol olmuştur. Ek olarak, taksona özgü PCR çalışmaları için zein içeriğinin tarandığı agaroz jel elektroforez görüntüleri, numunelerin beklenen baz çifti aralığında tekrarlanabilir temiz bant profilleri verdiğini göstermiştir.

İşlenmiş gıda ürünlerinin çoğu, çeşitli bitki kaynaklarından farklı genomik DNA içeriği bulundurmaktadır. Bu karmaşık matris içinde, PCR için şablon olarak kullanılan genomik DNA'nın sadece küçük bir kısmı, amplifikasyon için uygun hedefi içermektedir. Bu nedenle taksona özgü referans gen (endojen kontrol) ile yapılan ön çalışmalar PCR güvenilirliği için kritik bir adımdır (Shokere ve diğerleri, 2009). Bu tez çalışmasında, soya ürünlerinin içeriğini belirlemek için lektin geninin varlığının ve mısır ürünlerinin içeriğini belirlemek için zein geninin varlığı izlenmiştir.

PCR çalışmalarında incelenen gıda ürünlerinde soya içeriğinin varlığı araştırılmıştır. Lektin geninin varlığının saptanması için yapılan PCR sonucunda beklenen yaklaşık bant boyutu 164 baz çiftidir. Pozitif kontrol olarak kullanılan referans soya fasulyesi örneğinde ve ürünlerde soya içeriğinden bakımından beklenen baz çifti aralığında doğru bandın varlığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 : Lektin primeri için PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü. 1) 100 bp DNA Ladder (Thermo Scintific) 2) GM Soya (pozitif kontrol); 3-8) bisküvi; 9-12) kek; 13-15) kraker; 16-17) mısır cipsi; 18-19) soya unu.

Şekil 4.2'ye göre soya içerikli örnekler sırasıyla, 3-8 (bisküvi), 10,12 (kek), 13-15 (kraker), 16-17 (mısır cipsi), 18-19 (soya unu) örnekleri olarak seçilmiştir. Soya unu ve bisküvi örnekleri, beklenen baz çifti aralığında doğru bant profilini gösteren örnekler arasında daha yoğun ve belirgin bant profilleri göstermiştir. Öte yandan, kek

örnekleri agaroz jelde belirgin bant profilleri göstermemiştir. Bu tez çalışmasında incelenen dört izolasyon protokolünün ortalaması ile karşılaştırıldığında, DNA kalitesi kek numuneleri için en düşük ortalamaya sahiptir (1,58). DNA kalite sonuçlarına göre soya içeriğinin belirlenmesinde en temiz bant profiline sahip örnek grupları olan bisküvi ve soya unu örneklerinin DNA kalite oranlarının sırasıyla 1,83 ve 1,81 olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1).

Zein gen taramaları için kullanılan ZEIN03 / ZEIN04 primer çifti ile amplifikasyondan elde edilen agaroz jel görüntüsü Şekil 4.3'de verilmiştir. İncelenen primer açısından zein geninin varlığı için beklenen 277 bp aralığında doğru bant değerleri esas alınmıştır.



Şekil 4.3 : Zein primeri için PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü.
1) 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) 2) GM Mısır (pozitif kontrol); 3-8) bisküvi; 9-12) kek; 13-15) kraker; 16-17) Mısır cipsleri; 18-19) Mısır unu; 20) Buğday DNA'sı (negatif kontrol).

Mısır içeriğini belirlemek için yapılan PCR taraması sonuçlarının agaroz jel görüntüsüne göre (Şekil 4.3) 3, 4 ve 6 numaralı bisküvi numuneleri, 17 numaralı mısır cipsi ve 18-19 numaralı mısır unlarında Zein geninin varlığı tespit edilmiştir. Kek ve kraker numunelerinde incelenen numune grupları arasında mısır içeriğine ilişkin bant profili elde edilememiştir. Bu sonuçların mısır unu numuneleri için beklenmesine rağmen, incelenen numunelerde mısır içeriği soya fasulyesi içeriğine göre daha az olması veya ilgili gen bölgesinin denatürasyonu ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Mandacı ve diğerleri (2014), çalışmalarında inceledikleri tüm örnekler için soya varlığını gösteren lektin geninin 118 bp aralığında doğru bant profilini soya içeren dokuz örnekte elde etmişlerdir.

Meriç ve diğerleri (2014), mısır ve soya fasulyesinin türe özgü genlerini saptamak için mısır için zein genine özgü ZEIN_1-L / ZEIN_1-R primerlerini ve soya fasulyesi

için lektin gen bölgesine özgü GM03F / GM04R primerlerini kullanmıştır. Bu taramalar, 11 yem ürününün mısır ve soya varlığı tespit edilmiştir.

Arun ve diğerleri (2013), yanlış negatif sonuçları ortadan kaldırmak için sırasıyla CaMV 35S ve nos negatif örneklerde GDO'lu ve GDO'suz soya ve mısırdaki bulunan soyaya özgü lektin ve mısıra özgü zein dizilerini analiz etmişlerdir. Taranan 100 üründen soya ve mısır içeriğindeki pozitif ürünlerin dağılımı; test edilen 43 mısır örneğinin 14' (% 32,6) ve test edilen 57 soya fasulyesi örneğinin 11'i (% 19,3) pozitif bulunmuştur.

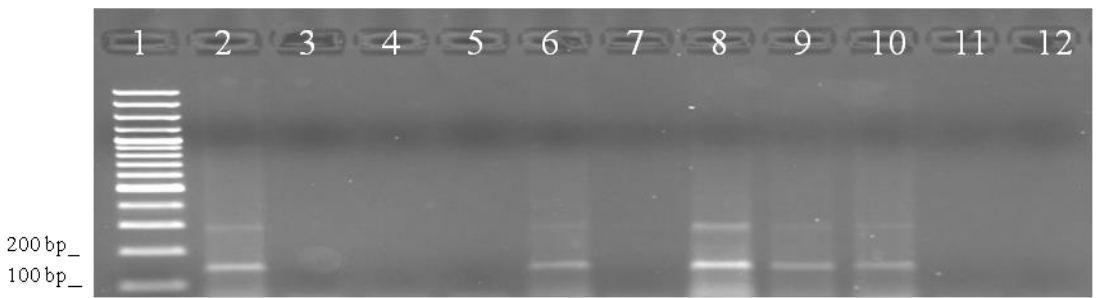
şeker, bitkisel yağlar, yüksek oranda işlenmiş karbonhidratlar yüksek sıcaklık ve kimyasal faktörlere maruz kalan gıda ürünleri için transgenik bölge bozulabilir (Rastegar ve diğerleri 2021). İzolasyon protokolünün etkinliği ile bu durumun üstesinden gelinebilse de DNA izolasyonu sırasında ürünlerin maruz kaldığı fenolik asit kalıntıları veya polisakkaritler ortamdan tamamen uzaklaştırılamamaktadır. Bu kirleticiler, PCR amplifikasyonu sırasında DNA polimeraz aktivasyonunu etkilemekte ve hatta inhibe etmektedir (Arun ve diğerleri 2013; Aboul-Maaty ve Oraby, 2019; Jia ve diğerleri 2019). Bununla birlikte, PCR ile küçük miktarlarda DNA amplifiye edilebilmektedir, ancak agaroz jel sonuçlarına göre bant profillerinde DNA kalitesi ve veriminde farklılıklar oluşmaktadır. GDO tespitinde rutin olarak kullanılan PCR çalışmalarına dair bu tür dezavantajları ortadan kaldırmak için biyosensör sistemleri daha hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar verebilir. Bu sebeple bu tez çalışmasında işlenmiş gıda örnekleri kullanılarak hem PCR tabanlı moleküler tespit yöntemi hem de biyosensör sisteminin karşılaştırılması ve değerlendirilmesi esas alınmıştır.

Bu tez çalışmasında Metot-3 izolasyon protokolüne göre elde edilen genomik DNA rneklerinin GDO taraması, 35S promotör bölgesinin amplifikasyon sonuçlarına göre değerlendirilmiştir (şekil 4.4). İncelenen gıda örnekleri arasında pozitif kontrol rneği olan GM soya cf3/cf4 primerleri ile yapılan PCR amplifikasyonu sonucu beklenen bant büyüklüğü olan 123 bp aralığında net bir bant profili göstermiştir. İncelenen diğer gıda örnekleri içinse 6 ve 8 numaralı bisküvi, 9-10 numaralı kraker örnekleri benzer aralığta bant profilleri göstermiştir. Negatif kontrol örneğinde herhangi bir amplifikasyona ratlanmamıştır (şekil 4.4).

Transgenin kopya sayısı, gıda işleme ile bağlantılı yüksek sıcaklık ve basıncın bir sonucu olarak önemli fiziksel hasar ve parçalanma ile azalır. Bu bakımdan çoğaltılabilir DNA hedef dizilerinin PCR analizlerindeki zorluğu, işleme prosesinin şiddeti ile orantılıdır. Sıcaklık ve/veya basınç ne kadar yüksek ve işlem süresi ne kadar uzun olursa, DNA'ya verilen hasar da o kadar artmaktadır. Genomik DNA'nın bozunması, öncelikle düşük pH'ta gerçekleştirilen işlemlerle bağlantılıdır ve bu bozunma termal stres ile önemli ölçüde artar (Vijayakumar ve diğerleri, 2009). Şekil 4.4'te pozitif GM soya örneğine ait bant profili net olarak görünmektedir.

Peano ve diğerleri (2004) ısı gibi kimyasal ve fiziksel işlemlerin yüksek moleküler ağırlıklı DNA zincirlerinin parçalanmasına neden olabileceğini ve dolayısıyla ortalama parça boyutunu azaltabileceğini belirtmişlerdir. Aynı şekilde, Gryson ve diğerleri (2007), ısı işlemin, DNA konsantrasyonunu düşürmeden toplam DNA fragman uzunluğunu azalttığını ifade etmiştir. Benzer şekilde, Lipp ve diğerleri (2001), DNA bozulmasının, gıdalarda GDO'ların saptanmasına izin verecek kadar uzun olan DNA fragmanlarının miktarında önemli bir azalmaya neden olabileceğini göstermiştir.

Vijayakumar ve diğerleri (2009), fırınlama işleminde bozulmamış DNA'da önemli bir bozulma görülse de çoğaltılabilir diziler hala mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle bazı bisküvi ve kraker örnekleri (6, 8, 9, 10) hem DNA izolasyonu hem de PCR analizleri bakımından diğer ürün gruplarına göre daha iyi sonuçlar vermektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 : 35s cf3/cf4 primeri için PCR örneklerinin agaroz jel görüntüsü. 1) 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific); 2) GM Soya pozitif kontrol); 3) soya unu; 4) kek; 5) mısır cipsi; 6-8) bisküvi; 9-10) kraker; 11) mısır unu; 12) buğday DNA'sı (negatif kontrol).

Al-Salameen ve arkadaşlarına göre (2012), işlenmiş gıdalardan ekstrakte edilen DNA genellikle düşük kalitededir bu sebeple PCR amplifikasyonunda tespit edilmeyebilir, çok düşük konsantrasyonlarda bulunabilir veya ciddi şekilde hasar görmüş olabilir.

Böyle bir durumda GDO içeriğinin moleküler analizle tespiti başarılı olmayabilir. Türkiye'de satışa sunulan cips ve kahvaltılık ürünlerinde GDO tespitinin yapıldığı farklı bir çalışmada incelenen örnekler CTAB ve ticari kit izolasyon yöntemleri uygulanmıştır. İncelenen örneklerin hiçbirinde yeterli kalite ve miktarda DNA elde edilemediği için bu çalışma sonuçları, ürün işleme süreçlerinin DNA hasarına neden olduğunu desteklemiştir (Mutlu ve diğerleri, 2021). Başka bir çalışmada Artuvan ve Aksay (2021), bebek formüllerinde GDO içeriğini taramışlar ve Türkiye'de marketlerde satışa sunulan bebek devam sütlerinde, p35S, tNOS ve pFMV transgenik içeriğine rastlamamışlardır. Türkiye'de GDO içeriğinin gıda ürünlerinde kullanımına ilişkin katı yasal önlemler bulunmaktadır (Yönetmelik TR, 2010). Ülkemizde gıda ürünlerinde GDO'lar üzerine yapılan diğer çalışmalarda (Sönmezöğlu ve Keskin, 2015; Turkeç ve diğerleri 2015; Avsar ve diğerleri 2020), transgenik gen bölgesine özgü tarama sonuçları pozitif olsa da soya ve mısır içeriği açısından doğrulanmış bir GDO içeriği bildirilmemiştir.

Bu çalışmada incelenen paketli gıda örneklerinden bazılarında (bisküvi, kraker) 35s promotör bölgesi bakımından pozitif sonuçlara ulaşılmıştır. Fakat nitel ve nicel çalışmalarla belirlenen düşük miktarda GDO'ların varlığının bir sonraki adımda dizi analizi ile incelenmesi önerilmektedir. Bu çalışmada bazı örneklerde pozitif olarak elde edilen bant profilinin, düşük konsantrasyonlarda GDO içeriği bakımından pozitif olabileceği, bunun da transfer veya aynı üretim hattında kontaminasyona bağlanabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle geleneksel PCR yöntemi ile yapılan GDO analiz çalışmalarında ilgili kanunlarca belirlenen sınır eşik değerinin belirlenmesi için kantitatif analizlerin yapılması ve nihai sonuca yönelik dizi analizlerinin yapılması önerilmektedir (Arun ve diğerleri 2013; Avsar ve diğerleri 2020). Bu bakımdan biyosensör çalışmalarının tarama testleri için önemli bir kontrol basamağı oluşturacağı düşünülmektedir bu sebeple bu çalışmanın işlenmiş gıdalarda GDO taraması amacıyla kullanım bulması beklenmektedir.

Buraya kadar gerçekleştirilen adımlar GDO tespit güvenilirliği bakımından temel adımlar olan genomik DNA izolasyonu, soya ve mısıra özgü bitkisel içeriğin belirlenmesi ve rutin PCR tarama testlerini kapsamaktadır. Tez çalışmasının moleküler ayağı boyunca tamamlanan çalışmalar sonucunda metot-3'de belirtilen CTAB-Wizard DNA izolasyon protokolünün hem lektin ve zein içeriğinin

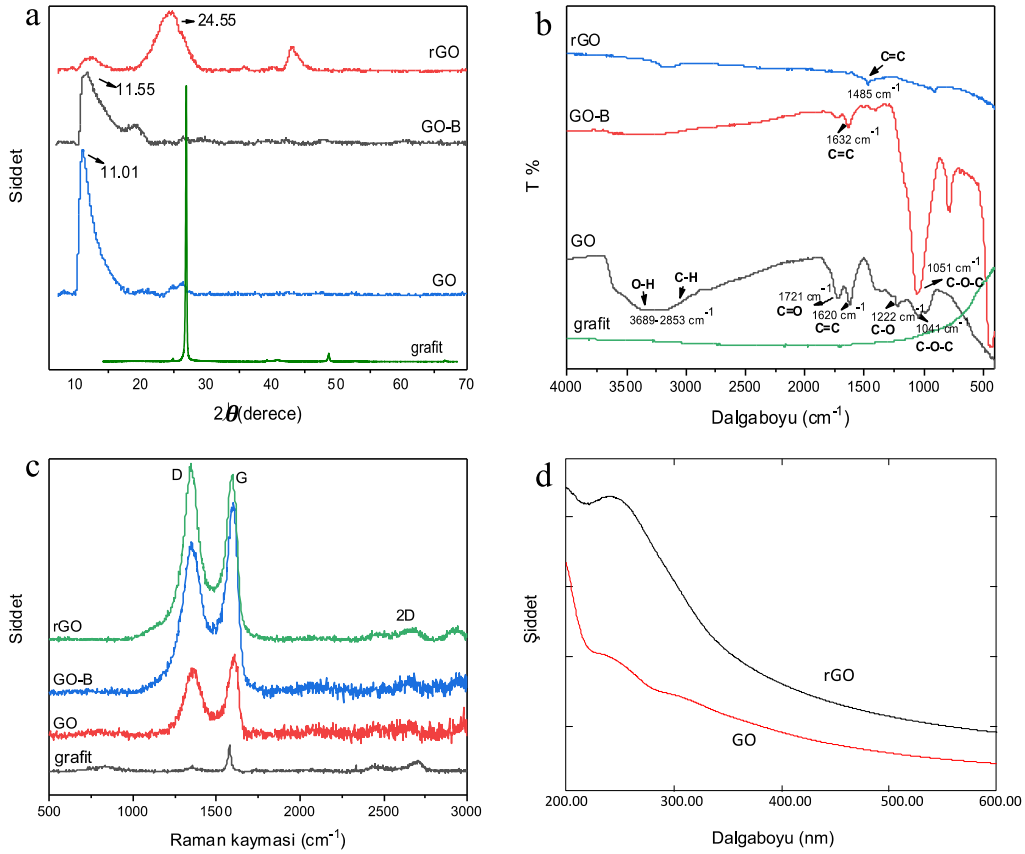
belirlenmesi hem de kalitatif PCR analizi için yeterli miktar ve kalitede DNA örnekleri içerdiği belirlenmiştir.

CaMV 35S transgenik içeriğin tespiti için, tüm gıda üretim süreçleri içinde gerçekleşen proses adımları boyunca genomik DNA bütünlüğü farklı oranlarda veya kısmen denatüre olmuş numune örneklerinin PCR ile takibi, ürün çeşidine bağlı olarak farklı optimizasyon adımları gerektiren, zaman alıcı ve deneyimli elemana ihtiyaç duyan karmaşık bir süreçtir.

Bu sebeple tezin devamında GDO biyosensör üretim basamakları için işlenmiş gıda numunelerinden izole edilen genomik DNA'nın doğrudan tespitine dayalı elektrokimyasal sensör yanıtlarını değerlendirmek üzere elektrot modifikasyonu ve sensör tasarımı basamaklarına dair sonuçlar değerlendirilmiştir.

4.2 Grafen Sentezi ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada grafen oksit (GO), bilyalı değirmen ile pullandırma sonrası GO (GO-B) ve indirgenmiş GO'nun (rGO) kristal özellikleri, tabakalar arasındaki değişiklikler, yapıdaki bozulmalar, safsızlıklar, karbon-karbon bağ gerilmesinden meydana gelen yapılar ile yapıdaki fonksiyonel grupların incelenmesi için XRD, FTIR, Raman ve UV-vis sonuçları değerlendirilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 : Grafen sentezi boyunca uygulanan işlem basamaklarına ait XRD **a)**, FTIR **b)**, Raman **c)** ve UV-vis spektrum **d)** grafikleri.

X-ışını difraktometresi (XRD), GO'nun kristal yapısının tayininde kullanılan güvenilir bir tekniktir. Bu tekniğe göre, kısa dalga boyuna sahip elektromanyetik dalgalardan meydana gelen X-ışınları demeti analiz edilmek istenen numunenin üzerine iletilir ve kristallerin atomlarına çarptırılarak geri gönderilir (İkram ve diğerleri, 2020).

Grafit temel olarak $2\theta = 26,50^\circ$ (002) ve $54,65^\circ$ (004) civarında iki yoğun düzleme sahiptir (Siburian ve diğerleri, 2018; Sharma ve diğerleri, 2020). (002) düzlemi, altıgen dizilimde grafen tabakaları arasındaki mesafeyle ilgilidir. Literatüre göre, (Saleem ve diğerleri, 2018) 9° ile 15° arasındaki düzlemin (001) düzlemini temsil ettiği bilinmektedir (Feizi ve diğerleri, 2019). Tipik olarak GO, (001) kafes düzlemine karşılık gelen 2θ değerinde 10° 'de keskin ve güçlü karakteristik pikler gösterir. Bu tez çalışmasında sentezlenen grafen oksit için elde edilen XRD grafiğine (Şekil 4.5 a) göre hesaplanan 2θ değerlerine ait pikler grafit için, $2\theta=26,28^\circ$ GO için $2\theta=11,01^\circ$ 'dir. Grafit ve GO arasındaki bu patern farkının nedeni oksijenli

fonksiyonel grupların varlığından kaynaklanmaktadır (Feizi ve diğerleri, 2019). GO'nun XRD sonucu incelendiğinde grafitte göre keskin tepenin azaldığı ve GO'nun kristal yapısında tabakalar arasına yerleşen oksijen gruplarından dolayı bozunuma uğradığı ve tabakalar arası mesafe artışından dolayı pikin sola doğru kaydığı görülmektedir (Song ve diğerleri, 2014). Bu kayma grafitin başarılı bir şekilde oksidasyona uğratıldığı ve GO yapısının başarılı bir şekilde elde edildiğini gösteren beklenen bir sonuçtur (Loryuenyong ve diğerleri, 2013; Karteri ve diğerleri, 2015). Bilyalı öğütme sonrası pullandırılmış GO'ye ait XRD değeri ise $2\theta=11,55^\circ$ olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5 a). Pullandırma sonrası grafen oksit pikinin şiddeti düşmüş ve rGO yönüne doğru bir kayma gerçekleşmiştir. Bu durum tabakalar arasında yer alan fonksiyonel grupların koparıldığı ve böylece tabakaların birbirinden ayrılması işlemi bakımından pullandırma işleminin etkinliğini ifade eden bir kaymadır. Bununla birlikte literatürdeki çalışmalar incelendiğinde GO'nun rGO'ya indirgenmesiyle birlikte 10° civarında olan 2θ değeri sırasıyla (002) ve (100) düzlemlerine atfedilen $26,8^\circ$ ve $42,7^\circ$ civarında pik verecek şekilde kaybolduğu bilinmektedir (Shahid ve diğerleri, 2014; Sharma ve diğerleri, 2017; Al-Gaashani ve diğerleri, 2019). Şekil 4.5 a'daki indirgenmiş grafen oksit örneği için sırasıyla (002) ve (100) düzlemlerine göre beklenen XRD pikleri sırasıyla $2\theta=24,55^\circ$ ve $2\theta=43,23^\circ$ olarak belirlenmiştir. İndirgenmiş grafen oksit örneği için sırasıyla (002) ve (100) düzlemlerine ait tepe noktaları, grafen tabakalarının yeniden istiflenmesinden kaynaklanan azalmayı göstermektedir. Ayrıca, GO indirgemesi sırasında, oksijenli elektronegatif parçalar çıkarılır ve bu da π - π etkileşimlerine atfedilebilen grafen tabakalarının yeniden istiflenmesine işaret etmektedir (Ismail, 2019). Bu sonuç pullandırılan GO tabakalarının başarılı bir şekilde indirgendiğini göstermektedir.

Katmanlar arası boşluk (d-uzaklığı) hesaplamaları, denklem (4.1)'deki Bragg Yasası kullanılarak belirlenmiştir (Rochman ve diğerleri, 2019). Denklem (4.1) aşağıdaki gibidir;

$$n\lambda=2 d \sin \theta \quad (4.1)$$

Burada n bir tam sayıdır, λ elektronların dalga boyudur (nm), d kristal düzlemlerin ara katman aralığıdır ve θ Bragg açısıdır. Bu tez çalışmasında sentezlenen GO, GO-B ve rGO için hesaplanan d-uzaklığı ve 2θ değerleri çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Grafit, GO, GO-B ve rGO için hesaplanan 2θ ve d-aralığı değerleri.

	Grafit	Grafen oksit (GO)	Pullandırma sonrası grafen oksit (GO-B)	İndirgenmiş grafen oksit (rGO)
2θ	26,28°	11,01°	11,55°	24,55°
d-uzaklığı	3,39	8,04	7,65	3,62

Saleem ve Abbasi (2018) çalışmalarında, grafitin oksitlenmesi aşamasında düzlemler arası mesafenin 3,4 Å'den 7,5 Å'ye yükseldiğini gözlemlemişler ve düzlemler arası bu genişlemenin grafen oksit katmanları arasına katılan oksijenli fonksiyonel grupların varlığı olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde, Rochman ve diğerleri (2019) çalışmalarında grafit, GO ve rGO numunelerinin d-uzaklığını sırasıyla 3,37 Å, 8,22 Å ve 3,56 Å olarak belirtmişlerdir ve aradaki değişen farkın oksidasyon sırasında oluşan oksijen fonksiyonel gruplarının varlığını gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen d-uzaklıkları ise grafit, GO, GO-B ve rGO için sırasıyla 3,39 Å, 8,04 Å, 7,65 Å ve 3,62 Å olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.2). Oksitleme sırasında d-uzaklığının arttığı görülmüştür. Elektrostatik itme nedeniyle, tepe noktasının yoğunluğu, elektronegatif fonksiyonel gruplardan kaynaklanan tabaka ara katmanları arasındaki mesafe ile ilişkilidir. Bu bakımdan elektronegatif fonksiyonel gruplar, π - π etkileşimleri nedeniyle grafen tabakalarının yeniden istiflenmesini önlemeye yardımcı olurlar (Sharma ve diğerleri, 2017). İndirgeme sonrası d-uzaklığı değerindeki azalma ise GO yapısındaki oksijen fonksiyonel gruplarının uzaklaştırılmasıyla GO'nun başarılı bir şekilde indirgenmiş olduğunu göstermektedir (Ziang ve diğerleri, 2014).

Nano tabakaların yüzeyinde ve kenarlarındaki oksijenli gruplar varlığının tespiti için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrumu (FTIR) karakterizasyonu gereklidir (Tienne ve diğerleri, 2022). FTIR, bir malzemenin fonksiyonel gruplarının incelenmesinde etkili bir analizdir ve grafit, GO ile rGO, FTIR spektrumları incelenerek etkin bir şekilde analiz edilebilir (Ikram ve diğerleri, 2020). Grafit, GO, GO-BO ve rGO örneklerine ait FTIR grafiği Şekil 4.5 b'de görülmektedir. Şekil 4.5 b'deki GO FTIR spektrumu incelendiğinde GO üzerine adsorbe edilen OH grupları su moleküllerinin gerilme ve bükülme titreşimine karşılık gelen yüksek frekanslı alan arasında ($3689 - 2853 \text{ cm}^{-1}$) geniş bir tepe göstermektedir. 3400 cm^{-1} civarındaki bu geniş bant GO'daki su moleküllerinin ve diğer hidroksil fonksiyonel gruplarının OH bağı/gerilme titreşimlerini ifade etmektedir (Ismail, 2019). Bu nedenle, numunenin

güçlü bir hidrofilikliğe sahip olduğu sonucuna varılabilir. Şekil 4.5 b’de GO için, karboksil C=O’nun karakteristik zirveleri 1721 cm^{-1} ’de görülmüştür. 1721 cm^{-1} ’deki C=O kaynaklı gerilme titreşimlerinin ve 1620 cm^{-1} ’deki C=C bağlarının varlığından dolayı oluşan aromatik germe titreşimleri oksidasyon işleminin başında ve sonunda bulunmaya devam etmiştir. Rochman ve diğerlerine (2019) göre, 1213 ve 1053 cm^{-1} arasındaki pikler, C–O–C epoksi veya C–O alkol varlığına bağlanabilir (Rochman ve diğerleri, 2019). Benzer şekilde, 1222 cm^{-1} ve 1041 cm^{-1} meydana gelen tepe noktaları, oksidasyon işlemi sırasında oksit fonksiyonel gruplarının varlığını doğrulamaktadır. GO için bu bağların varlığı grafen oksit oluşumunu desteklemektedir (Saleem ve Habib, 2016; Saleem ve diğerleri, 2018). Şekil 4.5 b’deki rGO için 1485 cm^{-1} ’deki bant, bağlantının polar olmayan karakteri nedeniyle yoğun olmayan C=C titreşimi ile ilgilidir (Yang ve diğerleri, 2018). Oksijenli grupların etkisi nedeniyle, C=C kimyasal bağının dipolar özelliği arttırılabilir ve bu durumda bandın yoğunluğu artabilir (Safajou ve diğerleri, 2017). Bu sebeple GO için C=C bağları daha belirgin gözükmemektedir. Teorik olarak, aynı kimyasal elementi içeren C=C gibi kimyasal bağlar, elektronlar aynı yoğunluk ve kuvvet türü altında olduğundan kohezyonu sürdürmek için polar olmayan bir bağ oluşturma eğilimindedir. Polar olmayan kovalent bağa ek olarak, karbonlar arasındaki bağların eşleşmemiş elektronları yoktur. Sonuç olarak, molekülün dipol moment değişimi sıfırdır, çünkü hiçbir endüktif ve elektronegatif etki, molekülde sapma veya açısız bir momentum oluşturma eğiliminde değildir (Manoratne ve diğerleri, 2017). Bu durumda varsayımsal olarak grafen aynı sp^2 hibridizasyonundaki karbon atomlarından herhangi bir kusur olmadan oluşmalıdır. Fakat heteroatomların yan gruplar olarak eklenmesiyle kusurlu yapılar söz konusu olur ve bu ekleme molekülün açı oluşturmalarını etkiler çünkü oksijenli grupların elektronu bu bağda bir açı oluşturma ve saptırma eğilimi gösterir (Manoratne ve diğerleri, 2017; Rochman ve diğerleri, 2019; Tienne ve diğerleri, 2022). Şekil 4.5 b’de GO-B için 1051 cm^{-1} ’de ortaya çıkan bandın C–O–C gruplarından ($1120 - 1000\text{ cm}^{-1}$) kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bilyalı öğütme sırasında çözücü olatak kullanılan NMP moleküllerinin grafen düzlemleri ile etkileşiminin, çift oksijen bağlarının kopmasına ve C–O–C’nin R–O–C alkoksi bağlarının oluşumuyla ilerleyen NMP moleküllerinin oksijen aracılığıyla grafene bağlanmasına yol açtığı görülmektedir (Yakimchuk ve diğerleri, 2019).

rGO'nun FTIR spektrumları GO ile karşılaştırıldığında, 1721 cm^{-1} 'deki karboksil C=O için karakteristik tepe noktasının çok daha düşük bir yoğunluk gösterdiği ve indirgenmiş grafenin FTIR spektrumundaki tepe noktalarının yoğunluğu, deoksijenasyon nedeniyle $3689 - 2853\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki (OH germe titreşimleri) dahil olmak üzere azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.5 b). rGO durumunda, oksijenlenmiş işlevselliklerin kaldırılması nedeniyle yukarıda bahsedilen tüm bantların yoğunluğu önemli ölçüde azalması beklenen bir sonuçtur (Monteserín ve diğerleri, 2017; Al-Gaashani ve diğerleri, 2019).

Raman ve Krishnan (1928), moleküller tarafından saçılan ışının dalga boyunun gelen demetinkinden farklı olduğunu, dalga boyundaki kaymaların saçılmaya sebep olan moleküllerin kimyasal yapısına göre değiştiğini bildirerek 1931'de Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir. Raman spektroskopisi, konjuge ve C=C çift bağları dahil olmak üzere karbon ürünlerinin karakterizasyonu için yüksek yoğunlukta Raman pikleri veren, güçlü bir teknik olmasının yanında karbon bazlı malzemelerin karakterizasyonunda hızlı ve tahribatsız analiz sağlamaktadır (Novoselov, 2007; Ikram ve diğerleri, 2020). Raman spektroskopisi, GO'nun rGO'ya indirgenmesini analiz etmek kullanılan yöntemlerden birisidir (Manouchehri ve diğerleri, 2019). Raman spektrumunda, D (sp^3) bandı karbon yapının düzensizliklerini, yapıdaki bozulmaları ve amorf yapıları belirtirken, G (sp^2) bandı ise aromatik/düzenli yapıları belirtmektedir. 2D bandı varlığı ise tek tabaka grafenin varlığını doğrulamak için kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Raman spektroskopisi ile modifiye Hummers metodu yoluyla sentezlenen GO ve rGO için yapıdaki bozulmalar, safsızlıklar ve karbon-karbon bağ gerilmesinden meydana gelen yapılar incelenmiştir.

Şekil 4.5 c'de grafit, GO, GO-B ve rGO sonuçlarına dair Raman sonuçları verilmiştir. GO için Raman spektrumunda, D ve G bandı değerleri sırasıyla 1359 cm^{-1} ve 1606 cm^{-1} , pullandırma sonrası GO için D ve G bandı değerleri, 1353 cm^{-1} ve 1594 cm^{-1} olarak belirlenmiştir. Grafit için önceki bazı literatür çalışmaları, G ve 2D'ye karşılık gelen yaklaşık 1600 ve 2700 cm^{-1} 'de iki karakteristik tepe noktası bildirmiştir (Dresselhaus ve diğerleri, 2008; Sharma ve diğerleri, 2017). Bu çalışmada rGO spektrumunun D bandı ve G bandı ise sırasıyla 1343 cm^{-1} ve 1587 cm^{-1} olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5 c). Şekil 4.5 c'deki rGO için 2D bandı ise 2672 cm^{-1} 'de keskin olmayan bir tepe olarak görülmektedir.

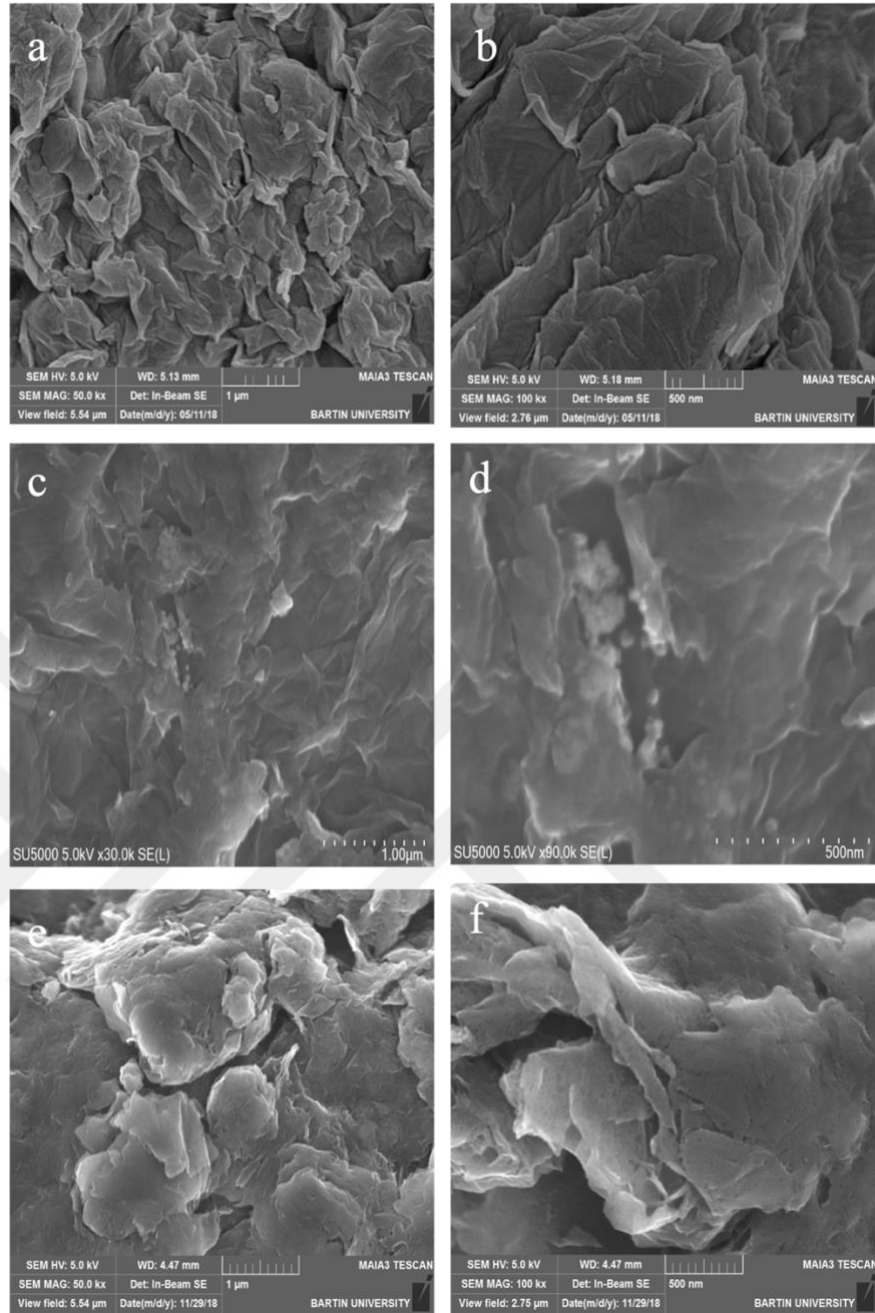
GO için, Raman spektrumunda görülebilen D, G ve 2D gibi iyi tanımlanmış ve belirgin üç tepe noktası görülmektedir (Voiry ve diğerleri, 2016). Kenarlardan kaynaklanan D bandı tepkisi, kusurlu veya translasyonel simetrisinin parçalanmasına bağlanabilirken, G bandı grafitin sp² bölgesinin E_{2g} modunun birinci dereceli saçılmasına karşılık gelmektedir. D bandının G bandına kıyasla nispi gücü, grafitik materyallerdeki düzensizlik miktarına büyük ölçüde bağlıdır (Wang ve diğerleri, 2008). 2D bandı, G'deki ikinci merteye bölge sınırı fononlarının Raman saçılması nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Ferrari ve diğerleri, 2006). 2D bandın şekli (yoğunluğu ve genişliği) ve konumu, yığılmış grafen katmanlarının sayısı azaldıkça artar (Hack ve diğerleri, 2018).

D ile G bandı arasındaki oran, GO'nun rGO'ya indirgenmesini değerlendirmek için hesaplanan bir değerdir (Muzyka ve diğerleri, 2018). Wu ve diğerleri, (2018) çalışmalarında GO için D/G oranının 1'den az olduğu gözlemlemiştir ve bu oran GO'nun indirgenmesiyle önemli ölçüde iyileştirilmiştir (Wu ve diğerleri, 2018). Bu tez çalışmasında sentezlenen rGO için D/G oranı ($I_D / I_G = 1,03$) GO için hesaplanan D/G oranından ($I_D / I_G = 0,81$) daha yüksektir. Bunun nedeni, düzenli kristal yapıların kısmen oluşması ve GO'nun rGO'ya indirgenmesi sırasında düzlem içi sp² alanlarının boyutunun azalmasıdır (Xi ve diğerleri, 2019). GO-B için hesaplanan D/G değeri (0,78), rGO ile kıyaslandığında (1,03) daha düşük bulunmuştur. Bu değişiklik, pullandırılmış GO'nun indirgenmesiyle sp² alanlarının ortalama boyutunda bir azalma olduğunu göstermekte olup indirgemenin önce GO-B'de bulunan boyut olarak daha küçük, fakat sayıca daha fazla yeni grafitik alanların ortaya çıkışına atfedilebilir (Stankovich ve diğerleri, 2007). Sonuç olarak hem GO hem de GO-B yapıları ile karşılaştırıldığı zaman oksijen içeren fonksiyonel grupların rGO yapısından indirgeme sebebiyle çıkarılmasıyla birlikte ortalama sp² alanlarında bir azalma olduğu ortaya çıkmaktadır (Lee ve diğerleri, 2017).

Şekil 4.5 d'de GO ve rGO numunelerine ait ultraviyole-görünür bölge (UV-Vis) spektrumları verilmiştir. GO ve rGO numunelerinin UV-Vis spektroskopisi için ölçümler 1 mg/ml distile su içinde hazırlanmıştır. GO'nun UV-görünür spektrumunda iki karakteristik absorpsiyon bandı vardır. Yaklaşık 230 nm'deki absorpsiyon bandı $\pi-\pi^*$ aromatik C-C bağlarının geçişlerini 300 nm'de ortalan pik ise $n-\pi^*$ C=O bağlarının geçişlerine karşılık gelir (Lai ve diğerleri, 2012; Alam ve diğerleri, 2017). Şekil 4.5 d'ye göre hidrazin hidrat ile indirgeme reaksiyonundan sonra, bütün

spektrumdaki absorbans değerleri artmıştır. Grafen indirgendiğinde 232 nm'deki GO pik zirvesi yaklaşık 270 nm'ye doğru kayar ve yaklaşık 300 nm'deki diğer pik ise ortadan kaybolur. şekil 4.5 d'de elde edilen GO ve rGO örneklerine ait UV-görünür spektrumları GO yüzeyindeki fonksiyonel grupları içeren oksijenin çoğunlukla çıkarıldığını ve grafen nano tabaka içindeki elektronik konjugasyonun indirgenme reaksiyonu ile modifiye edildiğini göstermektedir. Benzer sonuçlar literatürde elde edilmiş diğer sonuçlarla uyumluluk göstermektedir (Xu ve diğerleri, 2011; Yu ve diğerleri, 2013).

Taramalı elektron mikroskobu, GO nano tabakalarının yüzey morfolojisini incelemek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Farklı sentez metotları ile edilen GO malzemeleri, SEM görüntülemeleri sonucunda farklı morfolojiler göstermektedir. Genel olarak, GO'nun SEM görüntüleri, çeşitli yüzey oluşumları ile katmanlı bir yapı gösterir (Ikram ve diğerleri, 2020). Bu çalışmada da grafen oksit, pullandırılmış grafen oksit, ve indirgenmiş grafen oksit, tabakalarının morfolojisinin incelenmesi için SEM görüntülerinden yararlanılmıştır (şekil 4.6).



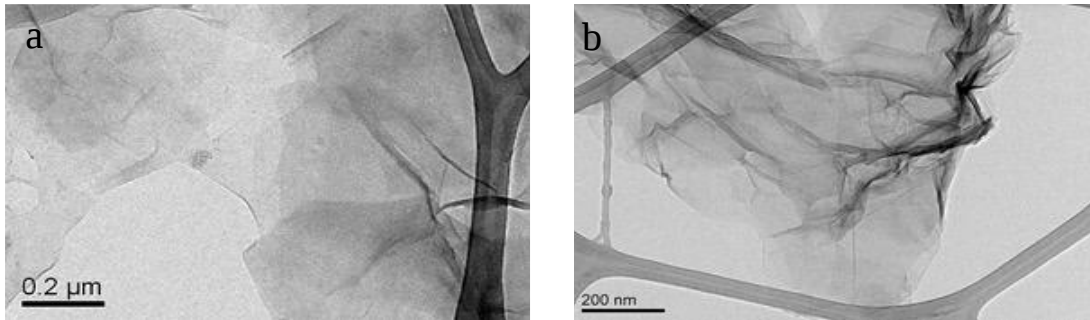
Şekil 4.6 : rGO (a-b), GO-B (c-d) ve GO'ya (e-f) ait SEM görüntüleri (1-0,5 μ m, 5 kV).

İncelenen rGO örneklerinde 4.6 (a, b) pullandırma ve yeniden istifleme işlemleri nedeniyle deformasyonun bir sonucu olan buruşuk ve dalgalanan bir yapı ortaya çıkmaktadır. rGO'ya ait SEM görüntüleri, kenarlar belirgin, yüzey buruşuk ve katlanmış, rasgele kümelenmiş benzer ince levhalar şeklindedir (Shalaby ve diğerleri, 2015). rGO yüzeyindeki boşluklu yapılar, indirgeme işlemi sırasında GO yüzeyinden oksijen fonksiyonel gruplarının ortamdan uzaklaştırılması ile ortaya çıkmaktadır (Sharma ve diğerleri, 2017). rGO nano tabakaları, SEM görüntülerinde gösterildiği gibi, katman yapılı, düzensiz katlanmış ve birbirleriyle dolaşmış şekilde

görülmektedirler. Pullandırılmış GO-B tabakaları Şekil 4.6 (c, d)'de görüldüğü gibi pullandırmadan kaynaklanan kısmi indirgeme nedeniyle rGO yapısına benzer buruşuk bir yapı göstermektedir.

GO tabakalarının tek tabakalı grafenin kalınlığından daha büyük olduğu Şekil 4.6 (e, f)'deki SEM görüntüleri ile ortaya konmuştur. Kalınlıktaki artış, oksijen içeren fonksiyonel grupların girmesinden kaynaklanmaktadır. GO katmanlarının kenarlarda daha kalın olduğu da belirtilebilir. Bunun nedeni, oksijen içeren fonksiyonel grupların çoğunlukla GO'nun kenarlarında oluşmasıdır. Literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, Shojaenezhad ve diğerleri (2017), GO'nun SEM görüntülerinin esnek ve kırışmış tabakalar sergilediğini göstermiştir. Shahriary ve Athawale (2014), SEM görüntülerinden, katmanlı yapıdaki GO filmlerinin kenarlardan, bükülmüş ve kırışmış alanlar gösterdiği sonucuna varmıştır. Bu tez çalışmasındaki SEM görüntüleri bu bakımdan literatürdeki diğer çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Ayrıca rGO'nun (Şekil 4.7 b) GO'ya (Şekil 4.7 a) kıyasla kenarlarda daha fazla kırışıklık gösterdiği geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntülerinde daha net görünmektedir (Şekil 4.7). TEM görüntüleri rGO tabakalarının birbiri üzerine istiflenmiş birkaç katmandan oluştuğunu göstermekle olup yapının indirgendiğine dair yüzey morfolojisi hem TEM hem SEM görüntüleri ile desteklenmektedir.



Şekil 4.7 : (a) GO ve (b) rGO'ya ait TEM mikrografları (200 nm).

Çizelge 4.3'te grafen ve grafen oksit örneklerine ait iletkenlik ölçümlerine ait sonuçlar verilmiştir. Dört nokta prob ölçümü grafenin tabaka direncini (R_s) belirlemek için kullanılan yöntemlerden birisidir. Elde edilen numunelerin öz dirençlerinin belirlenebilmesi için gereken elektrik direnci, maddenin üzerinden geçen I akımı ve onun meydana getirdiği V geriliminin oranı ile bulunur. Elektriksel direnç (ρ), numune kalınlığı (L) ve numunenin yüzey alanı (A) verileri ile aşağıdaki

eşitlik kullanılarak elektriksel iletkenlik (σ) hesaplamaları yapılmıştır (Wu ve diğerleri, 2011).

$$\sigma \text{ (S/cm)} = \frac{L}{A} \rho$$

Elektriksel iletkenlik, σ sembolü ile gösterilmektedir ve metre başına Siemens SI birimine (S/m) sahiptir. Elektriksel iletkenlik (σ), elektriksel direncin (ρ) tersidir (Helmenstine, 2018):

$$\sigma = \frac{1}{\rho}$$

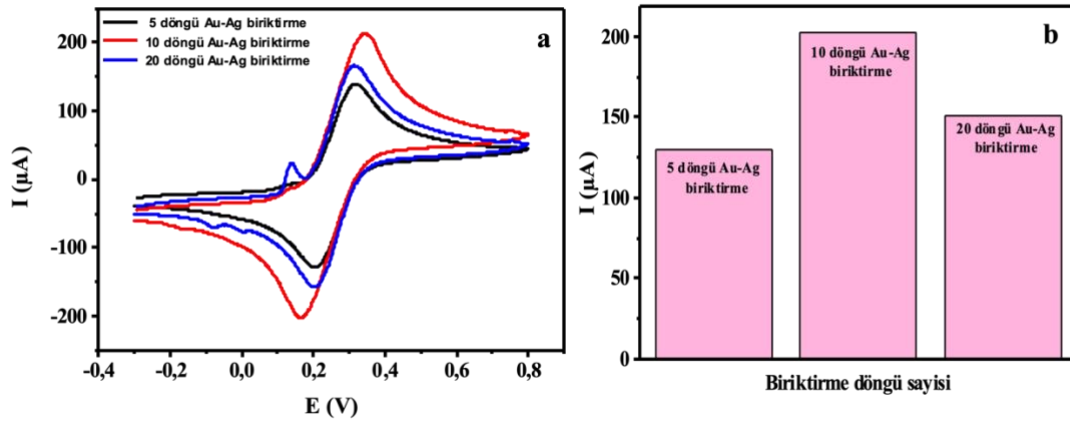
Çizelge 4.3 : Grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksit iletkenlik ölçümleri.

	Öz direnç (ρ) [Ohm.cm]	Yüzey direnci [Ohm/sq]	$\sigma_{\text{res.}}$ (S/m)	$\sigma_{\text{sres.}}$ (S/m)
Gres	1,42E+01	7,12E+06	7,02E-02	1,40E-07
Gres1	1,50E+01	7,51E+06	6,66E-02	1,33E-07
Gres2	2,06E+02	1,03E+08	4,86E-03	9,72E-09
Gres3	1,12E+01	5,59E+06	8,94E-02	1,79E-07
Gres4	1,88E+05	9,40E+10	5,32E-06	1,06E-11
G _{ort.}			4,62E-02	9,24E-08
Rres	1,09E+01	5,44E+06	9,19E-02	1,84E-07
Rres1	1,26E+01	6,28E+06	7,96E-02	1,59E-07
Rres2	1,10E+01	5,48E+06	9,12E-02	1,82E-07
Rres3	1,63E+01	8,15E+06	6,13E-02	1,23E-07
Rres4	1,56E+01	7,81E+06	6,40E-02	1,28E-07
R _{ort.}			7,76E-02	1,55E-07

Çizelge 4.3 incelendiğinde, GO ve rGO için iletkenlik değerleri karşılaştırması sonucu beklenildiği gibi rGO'nun iletkenlik değerlerinin GO'e göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

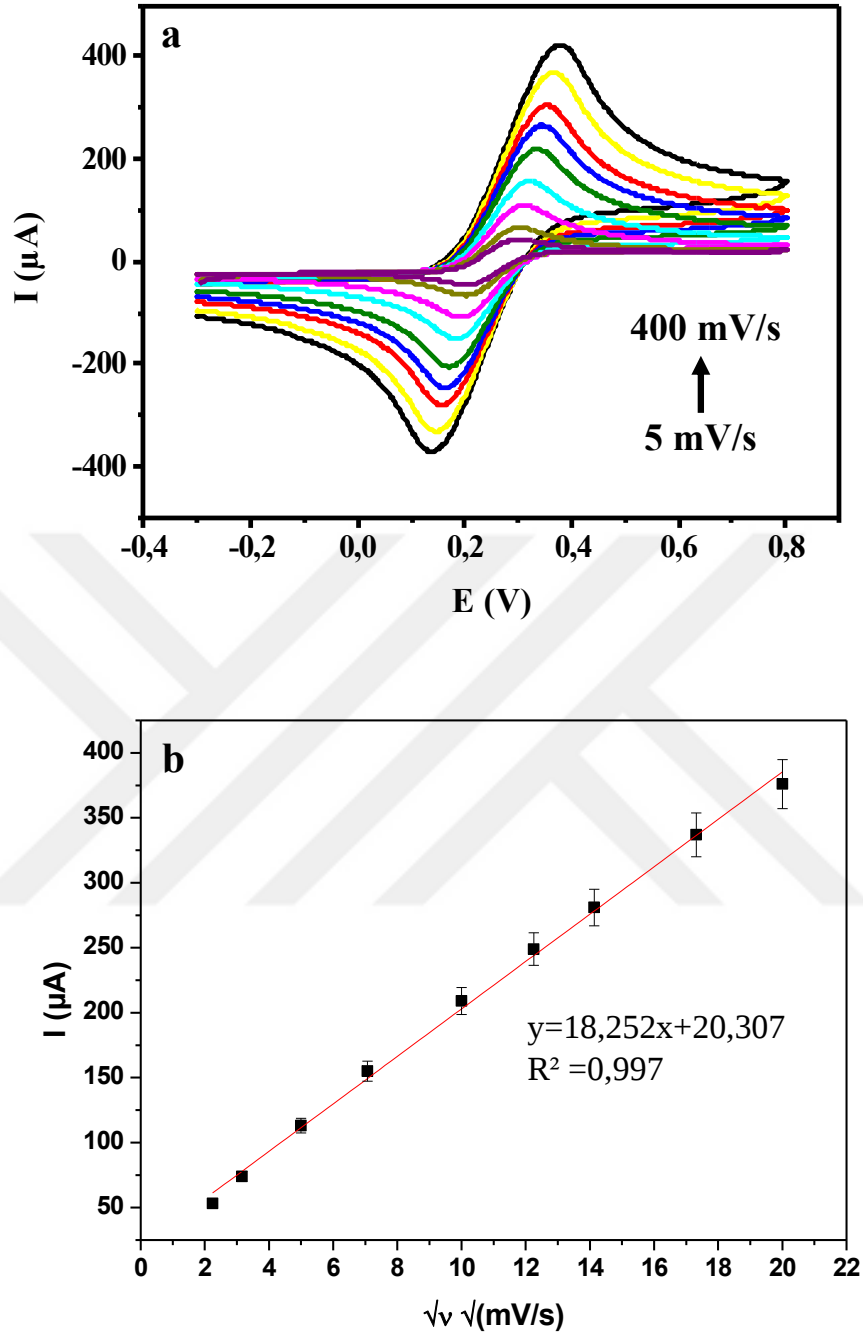
4.3 Biyosensör Geliştirilmesi ve Gerçek Örnek Ölçümleri

Ag-Au'nun birikimini ve redoks davranışlarını değerlendirmek için dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılmıştır. Au-Ag bimetal nano yapılarının elektro kaplama sonuçlarının optimizasyonuna ait çalışılan döngü sayılarına (5, 10 ve 20 döngü) dair veriler değerlendirilmiştir (Şekil 4.8). Bu sonuçlara göre kaplama için döngü sayısı 10 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.8 : a) Au-Ag nano yapılarının biriktirilmesine dair sonuçlar ve b) bar grafikleri.

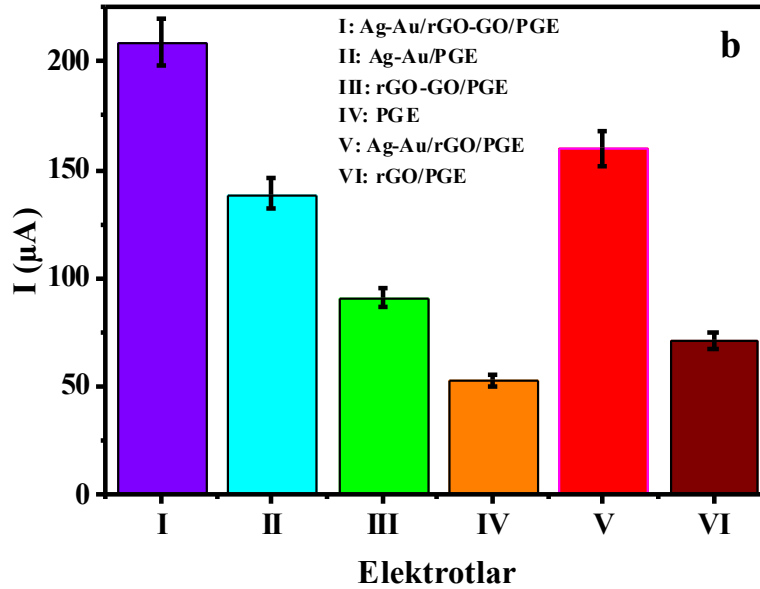
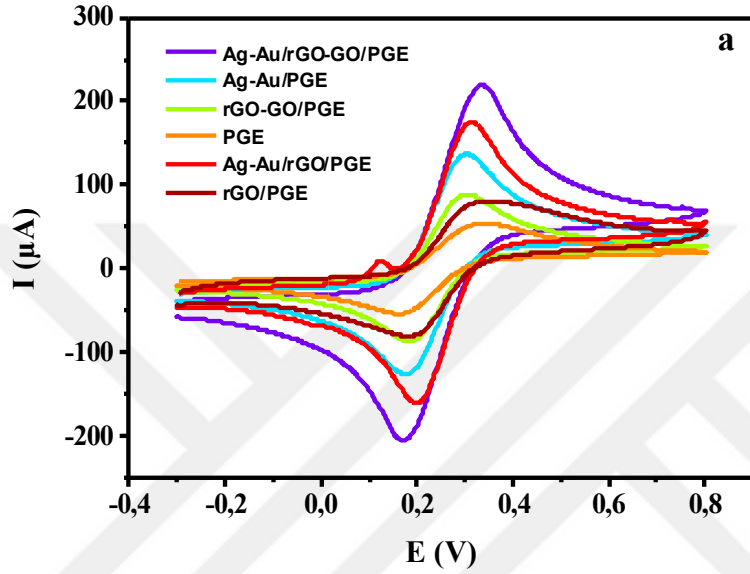
Tarama hızı ile pik akımları arasındaki ilişkinin incelenmesi için CV ölçümlerinden faydalanılarak elektrokimyasal mekanizmalar hakkında veri elde etmek amacıyla şekil 4.9'da tarama hızına bağlı olarak I_{pa} ve I_{pc} için artan pik şiddetleri görülmektedir. Bu sonuçlara göre, elektrot üzerindeki redoks tepe noktaları (pik şiddetleri), tarama hızı arttıkça kademeli olarak büyümektedir. Yükseltgenme pik akımı (I_{pa}), Şekil 4.9 b'de gösterildiği gibi tarama hızının karekökü ile doğrusal değişim göstermektedir ($R^2=0,997$ 'dir). Bu sonuç, önerilen biyosensör algılama arabirimi üzerindeki indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonunun, yüzey difüzyon kontrollü bir süreç içinde gerçekleştiğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.9 : a) Farklı tarama hızlarına sahip (5,10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 mV/s) Au-Ag/GO-rGO/PCE CV ölçümleri ve **b)** Yükseltgenme pik şiddetinin (I_{pa}) tarama hızıyla ilişkisi ($\sqrt{v}$).

Elektrokimyasal sensörlerin hassasiyetini daha da artırmak için, elektrot yüzeyi genellikle özellikleri iyileştirecek şekilde değiştirilir (Zheng ve diğerleri, 2022). Tasarlanan GDO biyosensör elektrot yüzeyi için uygulanan yüzey modifikasyonlarının incelenmesi için modifiye PGE'lerin $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ redoks

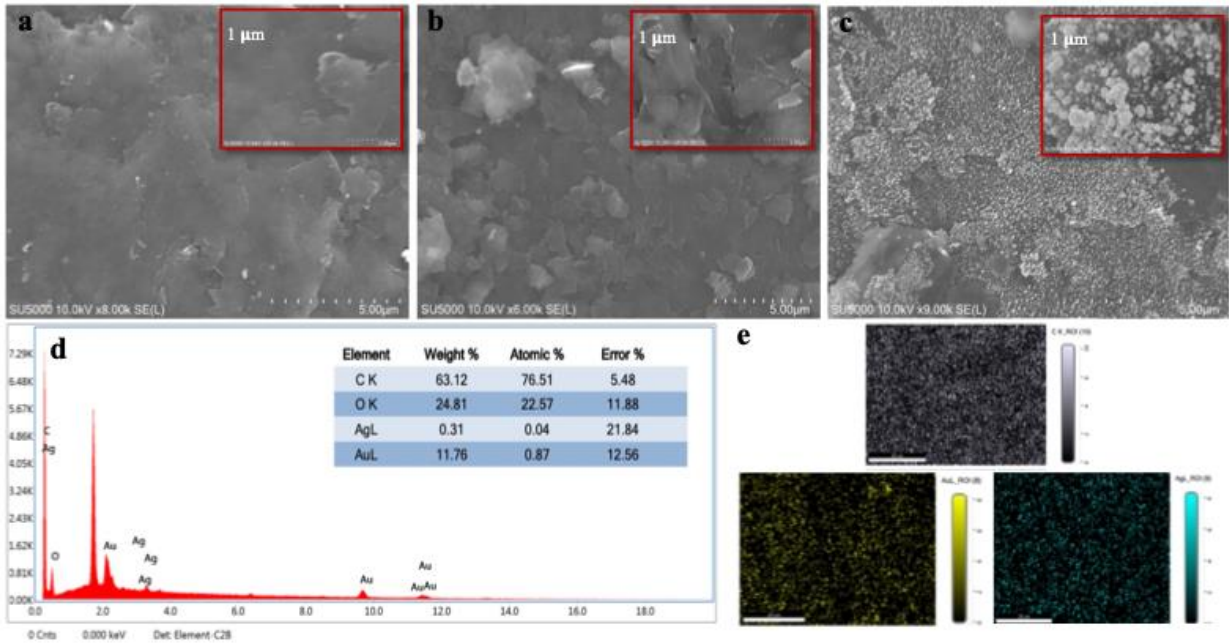
çözeltisi içinde alınan CV ölçümlerinden yararlanılmıştır. Şekil 4.10'da çıplak kalem grafit elektroda ait akım değerleri ile karşılaştırıldığında rGO ve GO'nun birlikte kullanılması elektron transferini kolaylaştırmaktadır. Bu yüzey üzerine modifiye edilen Au-Ag bimetallik nano yapılarının anodik pik akımlarını önemli ölçüde iyileştirmiş olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar GO-rGO ve Au-Ag nanoyapılarının elektron transferini iyileştirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.10 : a) Elektrot yüzey modifikasyonuna dair 0,1 M KCl içeren 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içinde alınan CV ölçümleri b) CV ölçümlerine ait bar grafikleri.

Au-Ag/GO-rGO/PGE yüzey modifikasyonlarının morfolojik değerlendirmesi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Elektrot yüzeyinde biriken Au-Ag miktarı ve dağılımı alan haritalaması kullanılarak SEM'e bağlı enerji dağılım spektrumu (EDX) ile ölçülmüştür. Biriken nanopartiküllerin morfolojik kalitesi, PGE elektrot yüzeyinde uygulanan her modifikasyondan aşamasında incelenmiştir. Şekil 4.11'de elektrot yüzeyine kaplanan GO-rGO ve Au-Ag nano yapılarının SEM görüntüleri verilmiştir. GO-rGO yapıları (b) yüzeyin yüzeyin modifikasyonu nedeniyle çıplak PGE (a) üzerinde buruşuk, dalgalı ve katlı görüntüler sergilemiştir. Au-Ag bimetallik nano yapıları ise GO-rGO/PGE üzerinde net şekilde görülmektedir (c). Parçacık boyutu, miktar ve kompaktlık olarak Au ve Ag parçacıklar arasında bazı farklar mevcuttur. Arvinte ve diğerleri (2018), çalışmalarında karbon nanotüp (CNT) elektrot yüzeyine biriktirmiş oldukları Au parçacık miktarının Ag'ye göre daha fazla ve daha kompakt bir görüntü sergilediğini belirtmişlerdir. Aynı zamanda EDX analizleri sonucu yüzeyde Ag birikimine (% 5-6 Ag - % ağırlık) kıyasla daha yüksek bir Au birikim yüzdesi (% 37-39 Au - ağırlık %) elde etmişlerdir.

SEM görüntülerindeki Au-Ag miktarı ve dağılımı EDX ile Şekil 4.11'de değerlendirilmiştir. Sonuçlar Au yapılarının Ag'ye göre miktarının daha fazla olduğunu doğrulamakla birlikte (d) Au ve Ag nano yapılarının GO-rGO/PGE yüzeyinde homojen ve uniform bir dağılım gösterdiğine dikkat çekmektedir (e). Bu çalışmada uygulanan elektrobiriktirme yöntemi sonucu elde edilen SEM görüntüleri ve EDX sonuçları bu bakımdan literatür ile uyumlu görünmektedir (Arvinte ve diğerleri, 2018).

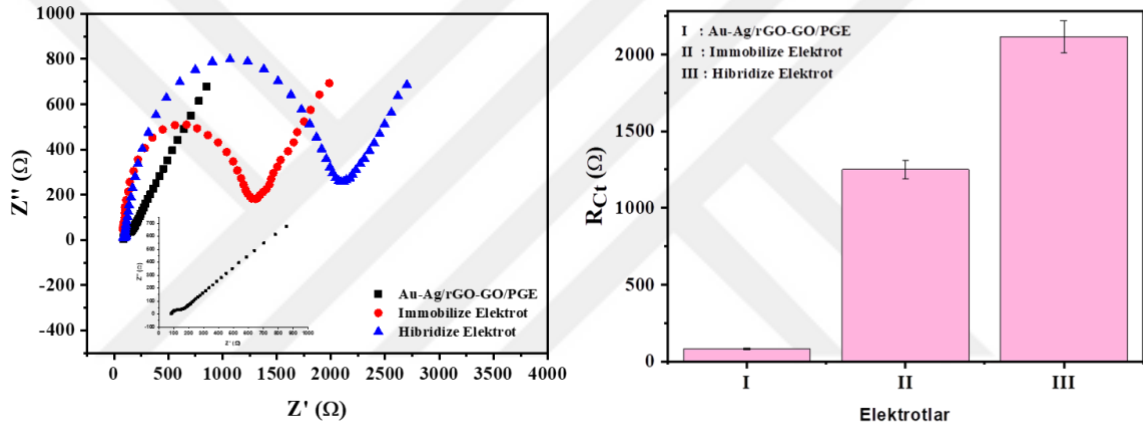


Şekil 4.11 : a) Çıplak elektrot (PGE), b) GO-rGO/PGE ve c) Au-Ag/GO-rGO/PGE SEM görüntüleri (5 μm, içindeki görüntüler; 1 μm, 10 kV), d) Au-Ag/GO-rGO/PGE EDX ve e) haritalama sonuçları.

EIS, yüzeyi modifiye edilmiş elektrotların arayüz özelliklerini incelemek için etkili bir tekniktir. EIS ölçümlerinde, yüksek frekanslardan çıkan yarım daire kısmı, elektron transferini sınırlama işlemine karşılık gelmektedir, dolayısıyla elektron transfer direnci (R_{ct}) doğrudan yarım daire çapı ile ölçülebilir (Wang ve diğerleri, 2016).

Probun immobilizasyonu ve hedef ile hibridizasyon reaksiyonu elektrot yüzeyinde gerçekleştirildiğinden, elektrot malzemesi ve yüzey özellikleri elektrokimyasal algılama sonuçları üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Karimi Maleh ve diğerleri, 2021; Karimi Maleh ve diğerleri, 2022). Bu tez çalışmasında, DNA biyosensör üretim basamaklarının farklı aşamalarını incelemek için EIS ölçümlerinden yararlanılmıştır. Şekil 4.12 a’da görüldüğü gibi Au-Ag/GO-rGO/PGE yüzeyine -SH işaretli tek zincirli prob DNA (ssDNA) tiyol-Au etkileşimi yoluyla modifiye edilmiş elektrodun yüzeyine bağlanmış ve R_{ct} belirgin bir şekilde artmıştır (Gao ve diğerleri, 2022). Negatif yüklü ssDNA’nın $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ’e karşı elektrostatik itici bir kuvvet oluşturabilmesi nedeniyle literatürde daha önce yapılmış olan benzer çalışmalarla (Benvidi ve Jananbani, 2016; Wang ve diğerleri, 2016) tutarlı bir şekilde elektrokimyasal empedansın önemli ölçüde etkilendiği görülmektedir. Tek zincirli prob DNA’nın yüzeye başarılı bir şekilde tutunmasının ardından ortama hedef

DNA'nın eklenmesiyle birlikte elektrot yüzeyinde tek zincirli prob DNA ve hedef DNA'nın hibridizasyonundan kaynaklı çift zincirli DNA (dsDNA) yapısı oluşmuştur. 25 μ M ssDNA probunun immobilizasyonundan sonra ortama eklenen 10^{-15} M tamamlayıcı hedef DNA, empedansı önemli ölçüde arttırmıştır. Au-Ag/GO-rGO/PGE yüzeyinde çift zincirli DNA (dsDNA) oluşumu, negatif yüklerin yoğunluğunu arttırmaktadır. Bu sonuca bağlı olarak elektrot yüzeyinde $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ arasındaki yük transferinin (elektron transferi) daha fazla engellemesiyle R_{ct} değeri beklenen şekilde artmaktadır (Benvidi ve diğerleri, 2014). Bu tez çalışmasında tasarlanan Au-Ag/GO-rGO/PGE hedef DNA'ya bağlı olarak artan EIS sinyali göstermiştir. Tasarlanan biyosensörün ölçülen EIS sinyalini izleyerek hedef DNA'yı tespit etmek için uygulanabilir olduğu belirlenmiştir.



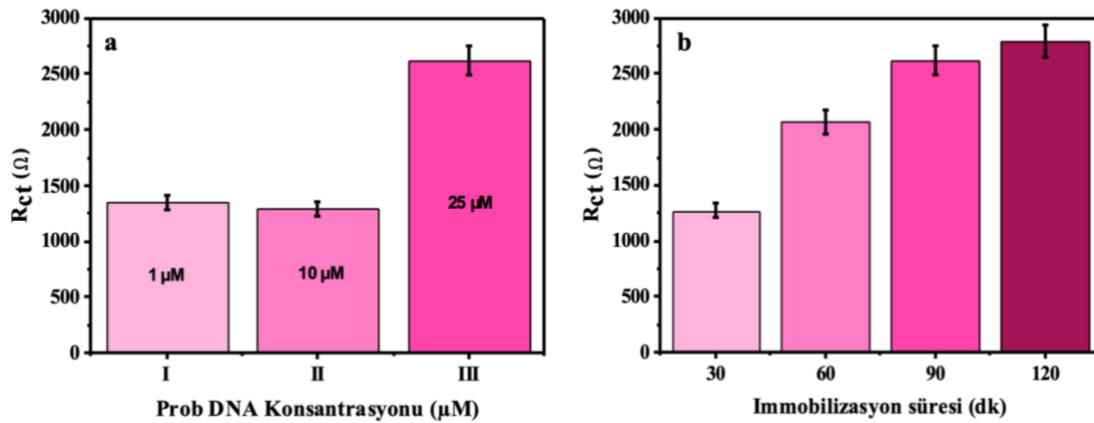
Şekil 4.12 : a) 0,1 M KCl içeren 5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ çözeltisi içinde Au-Ag/GO-rGO/PGE, immobilize elektrot (ssDNA/ Au-Ag/GO-rGO/PGE) ve hibridize elektrot (ssDNA/ Au-Ag/GO-rGO/PGE) EIS yanıtları **b)** EIS yanıtları sonucu elde edilen bar grafikleri.

Kullanılan DNA biyosensörlerinin duyarlılığını ve seçiciliğini artırmak için, farklı prob ssDNA konsantrasyonları ve prob ssDNA'nın inkübasyon süreleri deneysel koşullar altında optimize edilmiştir (Şekil 4.13)

Elektrokimyasal DNA biyosensörünün hassasiyeti, DNA biyosensörünün hassasiyeti için çok önemli olan ssDNA probunun konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir (Wang ve diğerleri, 2016). Şekil 4.13 a'da gösterildiği gibi, R_{ct} değeri, prob ssDNA konsantrasyonunun artmasıyla belirgin bir şekilde artmaktadır. 1, 10 ve 25 μ M prob ssDNA konsantrasyonları karşılaştırıldığında, 25 μ M bu çalışmada kullanılan optimal prob ssDNA konsantrasyonu olarak seçilmiştir. Wang ve diğerleri, (2016) çalışmalarında AuNPs/MWCNT-rGONR/GCE için belirledikleri optimal prob

ssDNA konsantrasyonunu 10 μM olarak seçmişlerdir. Bu çalışmada önerilen biyosensör için daha yüksek bir prob ssDNA konsantrasyonu belirlenmiş olmasının sebebi elektrot yüzeyine modifiye edilen indirgenmiş grafen oksit yapısı ile Au nanopartikül yapılarının prob ssDNA için daha yüksek bir tutunma alanı oluşturması olabileceği düşünülmektedir.

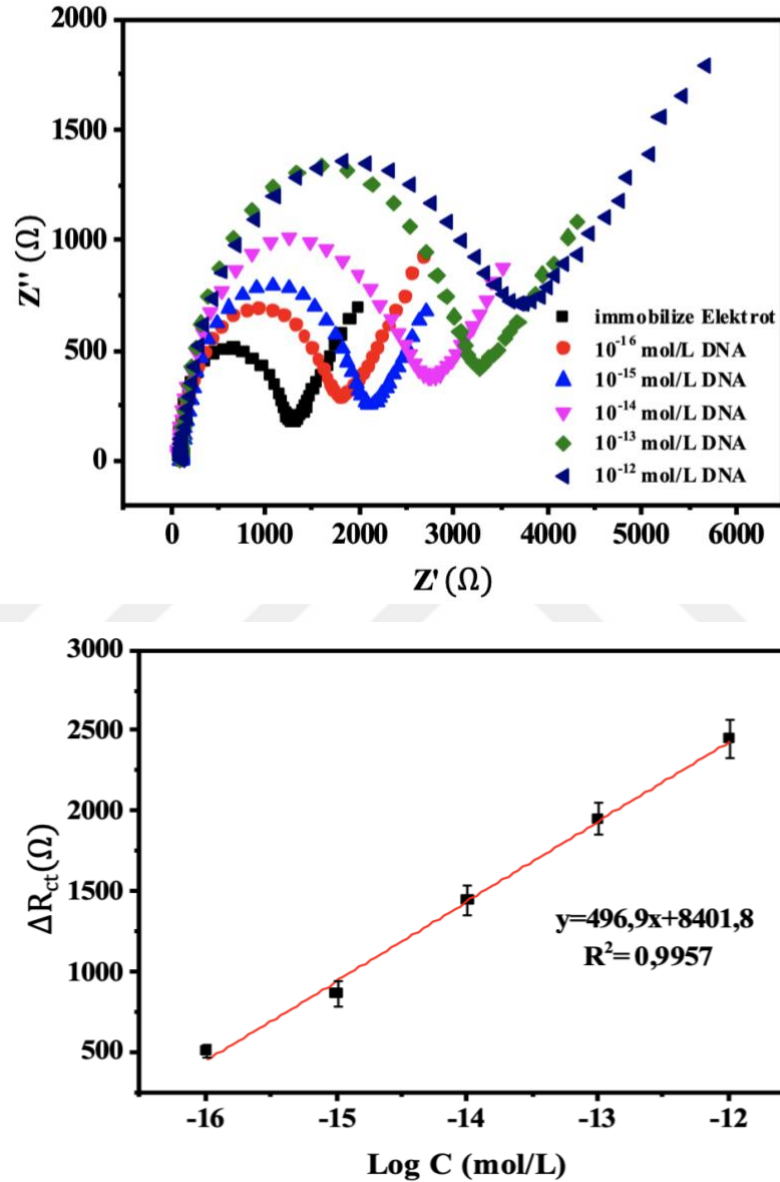
DNA biyosensörünün performansı, prob ssDNA ve Au/GO-rGO/PGE arasındaki inkübasyon süresinin artmasıyla birlikte immobilizasyon miktarının arttırılmasını (Wang ve diğerleri, 2011) desteklemektedir. Biyosensörün performansını, özellikle hassasiyeti optimize etmek için, inkübasyon süresinin etkisi ayrıca araştırılmıştır. Şekil 4.13 b'de gösterildiği gibi, R_{ct} kademeli olarak artmıştır. 30, 60, 90 ve 120 dk arasında R_{ct} değeri, sürekli artış eğilimi göstermekle birlikte 90 ve 120 dk arasında çok belirgin bir artış görülmemiştir bu sebeple bu çalışma için optimum prob ssDNA immobilizasyon süresi 90 dk olarak seçilmiştir.



Şekil 4.13 : a) Prob ssDNA konsantrasyonunun ve b) prob ssDNA inkübasyon süresinin elektrokimyasal DNA biyosensörünün analitik performansı üzerine etkileri.

Optimum deneysel koşullar altında, hedef DNA'nın farklı konsantrasyonlarını kantitatif olarak tespit etmek için hedef DNA'nın farklı konsantrasyonları varlığında Au-Ag/GO-rGO/PGE biyosensörü için ölçülen EIS cevapları şekil 4.14'de verilmiştir. Elde edilen EIS yanıtları, elektrot yüzeyinde ne kadar çok hedef DNA yakalanırsa (veya bağlanırsa), o kadar büyük R_{ct} değeri elde edildiğini göstermektedir.

Lineer regresyon denklemi; $\Delta R_{ct}(\Omega) = 496,9 \log C(\text{mol/L}) + 8401,8$ ($R^2 = 0,9943$) olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan biyosensör, 1×10^{-12} M ile 1×10^{-16} M aralığında hedef DNA konsantrasyonlarının logaritmasıyla doğrusaldır ve 10^{-17} M mertebelerinde düşük teşhis sınırına sahiptir.



Şekil 4.14 : a) Hedef DNA'nın farklı konsantrasyonlarının saptanması için ssDNA/Au-Ag/GO-rGO/PGE 'nin EIS yanıtları (1×10^{-12} , 1×10^{-13} , 1×10^{-14} , 1×10^{-15} , 1×10^{-16}), **b)** hedef DNA tespiti için kalibrasyon eğrisi.

Bu tez çalışmasında önerilen elektrokimyasal DNA biyosensörünün, Çizelge 4.4'de listelenen GDO tayini için literatürde daha önce bildirilen yöntemlerle karşılaştırıldığında, düşük tespit limitlerine sahip elektrokimyasal GDO

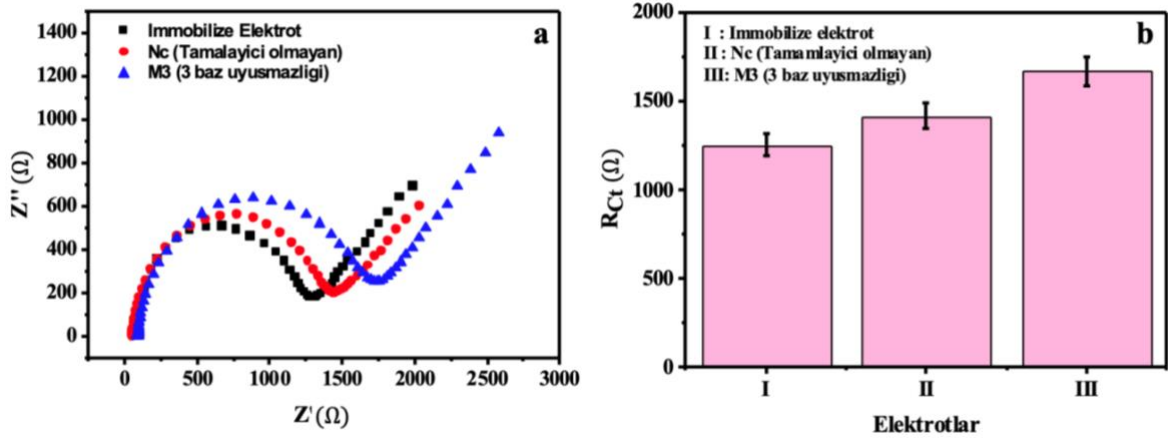
biyosensörleri ile yarışabilecek kadar hassas ve düşük bir tespit limitine sahip olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4 : Genetiği değiştirilmiş organizmaların tespiti için literatürde yapılmış olan bazı çalışmalar.

Elektrot	Elektrokimyasal teknik	Doğrusal aralık	LOD	Referans
GCDs (Altın karbon elektrot)	EIS	1.0×10^{-13} – 1.0×10^{-7} M	$3,1 \times 10^{-14}$ M	Gao ve diğerleri, (2022)
Fe ₃ O ₄ -Au@Ag MNPs nano prob etiketli genosensör	DPV	1×10^{-16} – 1×10^{-10} M	$1,26 \times 10^{-17}$ M	Ye ve diğerleri, (2020)
ssDNA/RGO/CPE (Karbon pasta elektrot)	DPV	3×10^{-15} – 5×10^{-7} M	$1,7 \times 10^{-12}$ M	Deng ve diğerleri, (2020)
Poly(nBA-NAS)-rGO modifiye SPE (Ekran baskılı elektrot)	DPV	1×10^{-15} – 1×10^{-8} M	$6,3 \times 10^{-16}$ M	Jamaluddin ve diğerleri, (2018)
AbC-Cu ₂ sinyal etiketli Au elektrot	DPV	0.10×10^{-12} – 0.50×10^{-9} M	$0,06 \times 10^{-12}$ M	Zhan ve diğerleri, (2017)
Eksfoliyeli Edilmiş Grafen Oksit (EGO) ve Altın Nano-Urchins (GNU) modifiye SPCE (Ekran baskılı karbon elektrot)	DPV	40.0– 1100.0×10^{-15} M	13×10^{-15} M	Aghili ve diğerleri, (2017)
Au NPs/MWCNT-rGONR	EIS	1×10^{-16} – 5×10^{-10} M	$3,3 \times 10^{-17}$ M	Wang ve diğerleri, (2016b)
core-shell SiO ₂ @ CdTe modifiye PEC (fotoelektrokimyasal biyosensör)	EIS	1×10^{-16} – 5×10^{-10} M	$0,05 \times 10^{-12}$ M	Li ve diğerleri, (2016)
SWCNT-FET (alan etkili transistör)	EIS	$1-10 \times 10^{-9}$ M	1×10^{-9} M	Tam, (2015)
Akrilik mikro küre ve altın nanoparçacık modifiye SPE (ekran baskılı elektrot)	DPV	2.0×10^{-12} – 2.0×10^{-7} M	$7,79 \times 10^{-16}$ M	Ulianas ve diğerleri, (2014)
indirgenmiş grafen (ERG) modifiye CILE (karbon iyonik sıvı elektrot)	DPV	2.0×10^{-12} – 2.0×10^{-7} M	$4,52 \times 10^{-12}$ M	Sun ve diğerleri, (2014)
Au-PtNPs/Pty (elektropolimerize polistiramin (Pty) film)	EIS	1.0×10^{-12} – 1.0×10^{-7} M	$3,6 \times 10^{-13}$ M	Yang ve diğerleri, (2012)

GDO tespitinde kullanılmak üzere önerilen DNA biyosensörünün seçiciliği, ssDNA immobilize elektrot yüzeyinde aynı konsantrasyonlarda (10^{-15} M) 3 baz çifti uyumsuz DNA (M3), ve tamamlayıcı olmayan DNA (Nc) varlığı bakımından değerlendirilmiştir. Şekil 4.15'de gösterildiği gibi, elde edilen R_{ct} değerleri, tamamlayıcı olmayan DNA (Nc) dizilerini kıyasla 3 baz çifti uyumsuz DNA (M3) varlığında biraz daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar GDO biyosensörün

tamamlayıcı olmayan ve uyumsuz oligonükleotid fragmanlarını ayırt edebildiğini göstermektedir (Hu ve diğerleri, 2015).

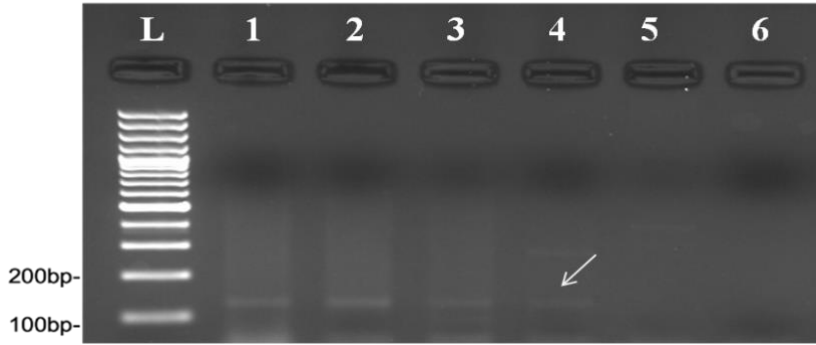


Şekil 4.15 : a) EIS yanıtları ve **b)** 10^{-15} M konsantrasyonda farklı oligonükleotitlerle her bir hibridizasyon olayı için önerilen DNA biyosensörünün R_{ct} değerleri: (I) immobilize elektrot (ssDNA/Au-Ag/GO-rGO/PGE), (II) tamamlayıcı olmayan (Nc), (III) 3-baz çifti uyumsuzluğu (M3).

Biyosensör yanıtlarını karşılaştırmak ve CaMV 35s promotör bölgenin incelenen gıda numunelerinde varlığını kanıtlamak için bu transgenik gen bölgesine özgü P35S cf3/cf4 primerleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Gerçek örnek denemelerinde sensör yanıtı için kullanılan örneklerin PCR amplifikasyonlarına dair sonuçlarının görselleştirilmesi için örnekler etidyum bromür (EB) boyası kullanılarak % 2 agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir.

Şekil 4.16'da GDO'lu soya numuneleri; GDO soya-1, (CTAB-Wizard izolasyon yöntemi, 20,67 ng/μl, 260/280; 1,45), GDO soya-2 (kit izolasyon yöntemi, 100 ng/μl, 260/280; 1,76), iki adet gıda örneği (bisküvi örnekleri, CTAB-Wizard izolasyon yöntemi, ~68,43 ng/μl, 260/280; ~1,77), transgenik olmayan gıda numunesi (soya unu) ve negatif kontrol olarak çift distile su (ddH₂O) kullanılan agaroz jel sonuçları verilmiştir. 35S promotör bölgesi tayini için beklenen bant profili 123 bp'de pozitif kontrol olarak kullanılan GDO soya ve gıda numunelerinde ortaya çıkarken, bu gen bölgesini bulundurmeyen soya örneği ve PCR inhibitör kontrolü için eklenen ddH₂O negatif kontrol örneği agaroz jelde bant vermemektedir. Biyosensör gerçek örnek denemeleri için Şekil 4.16'daki agaroz jel fotoğrafı referans alınarak, GDO soya örneği için 1. kuyucuktaki GDO soya-1 örneğinin agaroz jelin

alt taraflarına doğru yoğunlaşan ve spesifik olmayan bant profili göstermesi sebebiyle daha temiz bant profili gösteren 2. kuyucuktaki GDO soya-2 örneği tercih edilmiştir. Biyosensör denemelerinde PCR karşılaştırması yapılmak üzere incelenen amplifikasyon ürünü 2.kuyucuktaki GDO soya numunesine aittir.

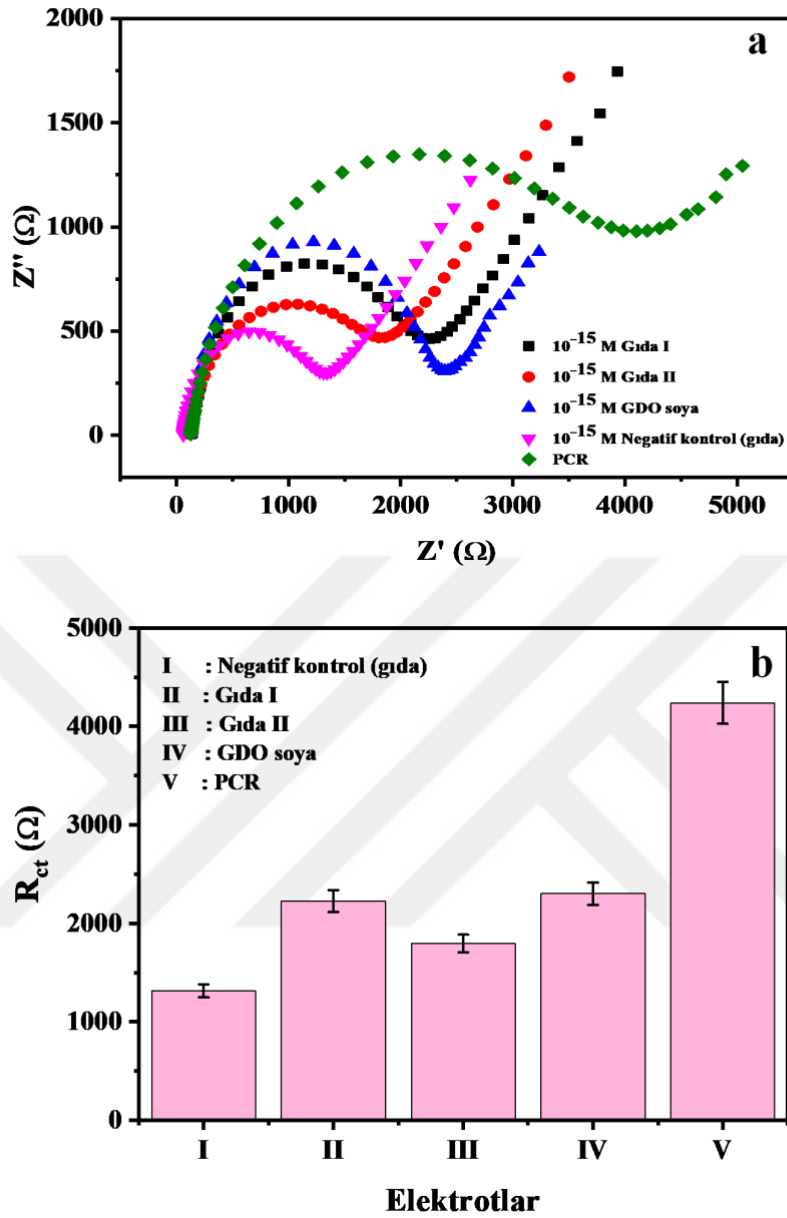


Şekil 4.16 : 35S promotör bölgesinin tespiti için yapılan PCR sonuçları (L: 100 bp DNA Ladder (Thermo Scinetific), 1) GM soya-1 (pozitif kontrol), 2) GM soya-2, 3) gıda-1, 4) gıda-2, 5) soya unu (negatif kontrol) 6) ddH₂O (negatif kontrol)).

Bir elektrokimyasal nanobiyoalgılama sisteminin gelecekteki gelişimi ve kullanılan tekniğin büyük ölçekli pratik uygulama alanı bulması doğrudan gerçek biyolojik ortamdaki performansına bağlıdır (Aghili ve diğerleri, 2017). Tasarlanan elektrokimyasal DNA biyosensör tespit yönteminin uygulanabilirliğini test etmek için tez çalışmasının moleküler basamakları boyunca izole edilmiş ve Şekil 4.16’da PCR sonuçları verilmiş olan genomik DNA numuneleri TE buffer içinde (pH 8.0) femtomolar konsantrasyonlarda seyreltilerek analiz edilmiştir. EIS tekniğinde negatif yüklü redoks habercisi olarak kullanılan potasyum ferri-ferrosiyanürün ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) elektrostatik etkileşimler nedeniyle DNA ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine yaklaşması engellenir böylece yük transfer direncinde bir artış tespit edilebilir (Tertis ve diğerleri, 2019; Manzano ve diğerleri, 2019; Hai ve diğerleri, 2020). Şekil 4.17’de gösterildiği gibi, biyosensörün R_{ct} değerleri pozitif kontrol olarak kullanılan GDO’lu soya fasulyesinden elde edilen hedef DNA ve iki gıda örneği için daha yüksek gözlemlenirken, incelenen transgenik içeriği bulundurmeyen soya örneğinden daha düşük bir değer elde edilmiştir. Sensör yanıtları, önerilen Au-Ag/GO-rGO/PGE biyosensörün paketli gıda ürünlerinden izole edilmiş olan genomik DNA numunelerini CaMV 35s promotör bölgesi bakımından GDO içermeyen örneklerden ayırabildiğini göstermektedir.

Çalışmada ayrıca sensör yanıtları genomik DNA ve PCR ürünlerine ait sensör yanıtları karşılaştırılmıştır. Buna göre Şekil 4.17’de gösterildiği üzere GDO’lu soya numunesine ait PCR ürününe ait R_{ct} değeri daha yüksektir. PCR ürünlerinin hedef olarak kullanılan transgenik gen bölgesini spesifik olarak çoğaltması sebebiyle bu beklenen bir sonuçtur. Literatürde GDO tespiti için yapılmış olan elektrokimyasal biyosensör çalışmalarının çok büyük bir bölümü analit olarak PCR amplifikasyon ürününün elektrokimyasal tespitine dayanmaktadır (Wang ve diğerleri, 2016; Li ve diğerleri, 2016b; Placido ve diğerleri, 2018; Deng ve diğerleri, 2020; Gao ve diğerleri, 2022). Bu tez çalışmasında amacımız CaMV 35S transgenik içeriğe sahip, karmaşık biyolojik matriks içerikli, yüksek oranda bozulmuş veya denatüre olmuş işlenmiş gıda numunelerinin ekstra PCR analizine ihtiyaç olmadan genomik DNA yoluyla doğrudan tespitini incelemektir. Bu bakımdan Şekil 4.17’de verilen gerçek örnek numunelerine dair elde edilen sonuçlar literatürde var olan diğer GDO biyosensör çalışmalarından ayrılarak, tasarlanan biyosensörün özgünlüğüne katkı sağlamaktadır.

Jel elektroforezi görüntülerine göre elde edilen sonuçlar, tasarlanan DNA biyosensörü ile elde edilen sonuçlarla iyi bir uyum içindedir. Önerilen elektrokimyasal DNA biyosensörünün paketli gıda gibi farklı proses adımları sebebiyle DNA içeriği büyük oranda denatüre olmuş GDO’lu içeriği ek PCR basamağına ihtiyaç duymadan tespit edebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.17 : a) GDO biyosensörün gerçek numunelere ait R_{ct} değerleri ve **b)** R_{ct} değerlerine ait bar grafikleri.

Bu tez çalışmasında GDO örneklerinin tespiti için tasarlanan elektrokimyasal biyosensör sistemi GDO'lu soya ve bazı paketli gıda örnekleri için ayırt edici sensör yanıtları vermiştir. Fakat gerçek örneklerde çoğunlukla hedef saptama sürecini engelleyebilecek ve yanlış negatif ve/veya pozitif yanıtlara neden olabilecek çeşitli biyomolekül türleri vardır.

Aghili ve diğerleri (2017), GDO ürünlerinin tespiti için geliştirdikleri nanobiyosensör çalışmalarında sentezlenmiş DNA çözeltisine dört potansiyel girişim molekülü (% 25 CTAB, % 25 glukoz, % 25 etanol ve % 25 SDS) ekleyerek simüle

edilmiş bir ekstrakte DNA çözeltisi oluşturmuşlar ve bilinen miktarlarda hedef DNA'yı simüle edilmiş ekstrakte DNA örneklerine ekleyerek bağıl geri kazanım yüzdesi değerleri hesaplamışlardır. Elde ettikleri değerlere göre geliştirdikleri biyosensör yönteminin bağıl geri kazanım yüzdesi oldukça yüksek (% 98,3, % 101,98, % 99,5) bulunmuştur. Bu değerlere göre sunulan DNA biyosensörünün GDO'ların ekstrakte edilmiş DNA'sı ile gerçek laboratuvar testleri için pratik potansiyele sahip olduğunu ve gelecekte gıda endüstrisinde ve/veya tespit laboratuvarlarında GDO içeren ürünleri tespit etmek için kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada Chou ve diğerleri (2022), GDO'lu soya tespiti için geliştirdikleri biyosensör çalışmalarında iki hedef DNA örneği kullanarak (% 4 ve % 5,7) GDO DNA örnekleri için sırasıyla % 104,1 ve % 102,49 geri kazanım oranları hesaplamışlardır. Bu sonuçlarla gerçek numune algılama sonuçlarının, önerilen sensör sisteminin GDO DNA'sını tam olarak algılabileceğini doğruladığını bildirmişlerdir. Zhan ve diğerleri (2017), CaMV 35S promotör bölgesinin tespiti için önerdikleri elektrokimyasal DNA biyosensörü için yaptıkları gerçek örnek denemelerinde karmaşık matrislere sırasıyla 1,00 pM, 10,0 pM ve 50,0 pM CaMV 35s ile içeren hedef DNA eklemişler ve test edilen geri kazanım oranlarını %96,4-102,0 aralığında bulmuşlardır. Elde ettikleri bu gözlemler önerdikleri yöntemin gerçek örneklerde CaMV 35'lerin tespiti için potansiyel olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Geri kazanım çalışmalarında, 10^{-15} M ve 10^{-13} M olmak üzere iki konsantrasyon kullanılmış ve elde edilen geri kazanım yüzdeleri sırasıyla % 97,5 ve % 101,7 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.5). Bu sonuçlara göre hesaplanan her iki ölçümün % 80-120'lik kabul edilebilir iyileşme oranı aralığında olduğu tespit edilmiştir (Chou ve diğerleri, 2022).

Çizelge 4.5 : İncelenen GDO ürünleri için geri kazanım sonuçları.

Derişim (mol/L)	Ölçülen (Ohm)	R_{ct}	Gerçek (Ohm)	R_{ct}	% Geri kazanım
10^{-15}	2115		2169		% 97,5
10^{-13}	3204		3150		% 101,7

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gıda ve yemlerdeki genetik modifikasyon bileşenlerinin tespit edilmesi, denetim otoritelerinin transgenik ürün varlığı hakkında endişe duyan tüketicilere güvenilir bilgi sunmasına yardımcı olmaktadır. Gıdalardaki kalitatif GDO analizinin elektrokimyasal DNA biyosensörü ile tespitini amaçlayan bu tez çalışmasının ilk işlem basamaklarından biri, marketlerde tüketicilere satılan gıda materyallerinin GDO varlığının belirlenmesidir.

Bu amaçla, bu tez çalışmasında farklı marka ve farklı işlenmişlik düzeylerindeki işlenmiş gıda ürünlerinin genomik DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş, incelenen ürünlerdeki soya ve mısır varlığı belirlenmiş ardından bu ürünlerdeki GDO varlığı araştırılmıştır.

Çalışmanın ilk basamağı olan mekanik, termal, kimyasal ve enzimatik işlemlere tabi tutulmuş gıda ürünlerinden yüksek verimde bozulmamış genomik DNA elde edilmesi amacıyla literatürde belirtilen DNA izolasyon protokolleri araştırılmış ve küçük modifikasyonlarla gıda örneklerinin DNA izolasyonunda kullanılmıştır. Tez çalışmasında işlenmiş gıda ürünlerinin izolasyonunda denenilen farklı DNA ekstraksiyon protokollerinin karşılaştırılması sonucunda metot-3'de belirtilen CTAB-Wizard DNA izolasyon protokolünün hem lektin ve zein varlığının belirlenmesinde hem de kalitatif PCR analizi için yeterli miktar ve kalitede DNA içerdiği belirlenmiştir. PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere izole edilen genomik DNA örneklerinin saflık ve miktar analizleri gerçekleştirilerek yeterli kalitede genomik DNA izolasyonu tamamlanmıştır. Modifiye DNA izolasyonu metotları ile elde edilen yeterli kalite ve miktar içeriğine sahip genomik DNA numuneleri seçilerek çalışmanın biyosensör basamağı boyunca gerçek örnek analizleri için kullanılmıştır.

Gıda örneklerinde soya geni içeriklerinin belirlenmesi amacıyla lektin genine özgü primerlerle PCR taramaları gerçekleştirilmiştir. Moleküler taramalar ile 6'sı bisküvi,

2'si kek, 3'ü kraker, 2'si mısır cipsi ve 2 tanesi soya unu olmak üzere toplam 15 gıda numunesinde soya içeriği belirlenmiştir.

Soya içeren numunelerde CaMV 35S promotör bölgesi bakımından moleküler GDO taramaları yapılmıştır. 35S spesifik cf3/cf4 primeri ile yapılan GDO taraması sonucu incelenen tüm gıda ürünleri (bisküvi, kek, mısır cipsi, kraker, soya ve mısır unu) içerisinde 2 adet bisküvi ve 2 adet kraker numuneleri beklenen büyüklükte net pozitif bant profilleri göstermiştir. Elde edilen yeterli kalite ve miktar içeriğine sahip genomik DNA numuneleri seçilerek, çalışmanın biyosensör basamağı boyunca gerçek örnek analizleri için kullanılmıştır.

GDO tespitine yönelik DNA-bazlı elektrokimyasal biyosensör üretiminin hedeflendiği Au-Ag/GO-rGO/PGE tasarımı amacıyla grafen oksit yapılarının sentezi için grafit tozundan indirgenmiş grafen oksit üretimi çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada kullanılan GO üretiminde modifiye işlemler yoluyla daha güvenilir/kullanılabilir hale getirilmiş ve diğer üretim yöntemlerine göre daha ekonomik olan modifiye Hummers yöntemi kullanılmıştır (Shahriary ve Athawale, 2014; Song ve diğerleri, 2014). Modifiye Hummers yöntemi ile elde edilen GO bileşiklerinin karakterizasyon çalışmalarında FTIR, XRD, Raman, SEM ve TEM yöntemleri kullanılarak sentezlenen GO'nun yapısal ve kristal özellikleri, bağ yapıları, içerdiği fonksiyonel gruplar ve morfolojik özellikleri hakkında yorumlar yapılmıştır. Sonuç olarak sentezlenen pullandırılmış grafen oksit ve indirgenmiş grafen oksit yapılarının literatürde belirtilen özelliklere uygun nitelikte olduğu tespit edilerek biyosensör çalışmalarında kullanılmak üzere çalışma elektrodu yüzeyine modifiye edilmiştir.

Elektrot modifikasyonu ve biyosensör üretim basamakları için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elektrokimyasal karakterizasyon çalışmaları başarıyla tamamlanmıştır. Tasarlanan elektrokimyasal GDO biyosensörü sentetik hedef için 10^{-12} ve 10^{-16} M konsantrasyon aralığında bir doğrusallık göstermiştir.

Tez çalışmasının moleküler basamağı boyunca GDO içerdiği tespit edilen işlenmiş gıda ürünlerinden izole edilmiş olan genomik DNA'lar tasarlanan elektrokimyasal GDO biyosensörü kullanılarak incelenmiştir.

GDO'lu ürünlerin tespiti sadece tüketici tercihiyle ilgili olarak gıda güvenliğinde değil aynı zamanda ticari faaliyetlerde de önemli bir rol oynama potansiyeline

sahiptir. Geleneksel GDO tespit yöntemleri, gelişmiş cihazlar ve deneyimli personel gerektiren karmaşık adımlar içermektedir. Bu bakımdan elektrokimyasal sensörler, minyatürleştirilebilir olmaları, kullanım kolaylıkları ve hızlı sonuç vermeleri sayesinde saha testleri için uygun analitik cihazlardır. Bu tez çalışması ile işlenmiş gıdalarda GDO'nun tespitine olanak sağlayabilecek olan hassas ve pratik elektrokimyasal tabanlı, hibridizasyon esaslı bir DNA biyosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir.

Özellikle işlenmiş gıdaların DNA'sının ısı işlemlerden dolayı zarar görmesi ve denatüre olması PCR tespitini zorlaştırmaktadır. Bu tez çalışması, genomik DNA'nın doğrudan analiz edilebilmesine olanak sağlaması açısından işlenmiş gıdaların GDO taramaları için umut verici sonuçlar içermektedir. Böylece GDO'nun gıdalarda etkin tespiti açısından literatüre önemli bir katkı sağlaması ve kalitatif PCR testlerine alternatif daha pratik bir test aracı sunması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Latif, A. ve Osman, G. (2017). Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*, 13(1), 1-9. doi: 0.1186/s13007-016-0152-4
- Abdulbari, H.A. ve Basheer, E.A. (2017). Electrochemical biosensors: electrode development, materials, design, and fabrication. *ChemBioEng Reviews*, 4(2), 92-105. doi: 10.1002/cben.201600009
- Aboul-Maaty, N.A.F., Oraby, H.A.S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-10. doi: 10.1186/s42269-019-0066-1
- Aghili, Z., Nasirizadeh, N., Divsalar, A., Shoeibi, S., Yaghmaei, P. (2017). A nanobiosensor composed of exfoliated graphene oxide and gold nano-urchins, for detection of GMO products. *Biosensors and Bioelectronics*, 95, 72-80. doi: 10.1016/j.bios.2017.02.054
- Ahmed, M.U., Saito, M., Hossain, M.M., Rao, S.R., Furui, S., Hino, A. ve Tamiya, E. (2009). Electrochemical genosensor for the rapid detection of GMO using loop-mediated isothermal amplification. *Analyst*, 134(5), 966-972. doi: 10.1039/B812569D
- Ahour, F. ve Ahsani, M.K. (2016). An electrochemical label-free and sensitive thrombin aptasensor based on graphene oxide modified pencil graphite electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 764-769. doi: 10.1016/j.bios.2016.07.053
- Akanda, M.R., Sohail, M., Aziz, M.A. ve Kawde, A.N. (2016). Recent advances in nanomaterial-modified pencil graphite electrodes for electroanalysis. *Electroanalysis*, 28(3), 408-424. doi: 10.1002/elan.201500374
- Alam, S. N., Sharma, N. ve Kumar, L. (2017). Synthesis of graphene oxide (GO) by modified hummers method and its thermal reduction to obtain reduced graphene oxide (rGO). *Graphene*, 6(1), 1-18. doi: 10.4236/graphene.2017.61001
- Alexandratos, N.B.J. (2012). World Agriculture Towards 2030/2050, www.fao.org/economic/esa adresinden erişildi.
- Al-Gaashani, R., Najjar, A., Zakaria, Y., Mansour, S. ve Atieh, M.A. (2019). XPS and structural studies of high quality graphene oxide and reduced graphene oxide prepared by different chemical oxidation methods. *Ceramics International*, 45(11), 14439-14448. doi: 10.1016/j.ceramint.2019.04.165
- Ali, J., Najeeb, J., Ali, M.A., Aslam, M.F. ve Raza, A. (2017). Biosensors: their fundamentals, designs, types and most recent impactful applications: a review. *Journal of Biosensors and Bioelectron*, 8(1), 1-9. doi: 10.4172/2155-6210.1000235

- Al-Salameen, F., Kumar, V., Al-Aqeel, H., Al-Hashash H. ve Hejji A.B. (2012). Detection of genetically modified DNA in fresh and processed foods sold in Kuwait. *GM Crops and Food*, 3(4): 283-288. doi: 10.4161/gmcr.21364
- An, N., Li, K., Zhang, Y., Wen, T., Liu, W., Liu, G. ve Jin, W. (2021). A multiplex and regenerable surface plasmon resonance (MR-SPR) biosensor for DNA detection of genetically modified organisms. *Talanta*, 231, 122361. doi: 10.1016/j.talanta.2021.122361
- Apiwat, C., Luksirikul, P., Kankla, P., Pongprayoon, P., Treerattrakoon, K., Paiboonsukwong, K. ve Japrun, D. (2016). Graphene based aptasensor for glycated albumin in diabetes mellitus diagnosis and monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 82, 140-145. doi: 10.1016/j.bios.2016.04.015
- Arora, K. (2018). Advances in nano based biosensors for food and agriculture. *Nanotechnology, Food Security and Water Treatment*, 1-52. doi: 10.1007/978-3-319-70166-0_1
- Artuvan, E. ve Aksay, S. (2021). Investigation of the Genetically Modified Organism (GMO) Existence in Baby Foods on the Market in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(10), 1945-1952. doi: 10.24925/turjaf.v9i10.1945-1952.4129
- Arun, Ö.Ö., Yılmaz, F. ve Muratoğlu, K. (2013). PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods. *Food Control*, 32(2), 525-531. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.023
- Arugula, M.A., Zhang, Y. ve Simonian, A.L., (2014). Biosensors as 21st century technology for detecting genetically modified organisms in food and feed. *Analytical Chemistry*, 86(1), 119-129. doi: 10.1021/ac402898j
- Arvinte, A., Crudu, I. A., Doroftei, F., Timpu, D. ve Pinteala, M. (2018). Electrochemical codeposition of silver-gold nanoparticles on CNT-based electrode and their performance in electrocatalysis of dopamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 829, 184-193. doi: 10.1016/j.jelechem.2018.10.017
- Ateş, Z.G. (2020). Genetiği Değiştirilmiş Organizmalara (GDO) İlişkin Avrupa Birliği'ndeki Yasal Düzenlemeler. *İnsan ve İnsan*, 7(24), 9-29. doi: 10.29224/insanveinsan.678783
- Avsar, B., Sadeghi, S. Turkeç, A., ve Lucas, S. J. (2020). Identification and quantitation of genetically modified (GM) ingredients in maize, rice, soybean and wheat-containing retail foods and feeds in Turkey. *Journal of food Science and Technology*, 57(2), 787-793. doi: 10.1007/s13197-019-04080-2
- Azimzadeh, M., Rahaie, M., Nasirizadeh, N., Ashtari, K. ve Naderi-Manesh, H. (2016). An electrochemical nanobiosensor for plasma miRNA-155, based on graphene oxide and gold nanorod, for early detection of breast cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 99-106. doi: 10.1016/j.bios.2015.09.020
- Babamiri, B., Bahari, D. ve Salimi, A. (2019). Highly sensitive bioaffinity electrochemiluminescence sensors: recent advances and future directions. *Biosensors and Bioelectronics*, 142, 111530. doi: 10.1016/j.bios.2019.111530
- Bandodkar, A. J. ve Wang, J. (2014). Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. *Trends in Biotechnology*, 32(7), 363-371. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.04.005
- Barampuram, S. ve Zhang, Z. J. (2011). Recent advances in plant transformation. *Plant chromosome engineering*, 1-35. doi: 10.1007/978-1-61737-957-4_1

- Baranwal, J., Barse, B., Gatto, G., Broncova, G. ve Kumar, A. (2022). Electrochemical sensors and their applications: a review. *Chemosensors*, 10(9), 363. doi: 10.3390/chemosensors10090363
- Bard, A. J. ve Faulkner, L. R. (2001). Chapter 5. Electrochemical methods, *Fundamentals and Applications, second ed.*, John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Barroso, M.F., Freitas, M., Oliveira, M.B.P., de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M.J. ve Delerue-Matos, C. (2015). 3D-nanostructured Au electrodes for the eventspecific detection of MON810 transgenic maize. *Talanta*, 134, 158-164. doi: 10.1016/j.talanta.2014.10.017
- Barsoukov, E. ve Macdonald, J.R. (2005). Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and. Applications. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- Bauer, T., Weller, P., Hammes, W. P. ve Hertel, C. (2003). The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research and Technology*, 217(4), 338-343. doi: 10.1007/s00217-003-0743-y
- Belloque, J., Garcia, M. C., Torre, M. ve Marina, M. L. (2002). Analysis of soyabean proteins in meat products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(5), 507-532. doi: 10.1080/20024091054238
- Benvidi, A. ve Jahanbani, S. (2016). Self-assembled monolayer of SH-DNA strand on a magnetic bar carbon paste electrode modified with Fe₃O₄@ Ag nanoparticles for detection of breast cancer mutation. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 768, 47-54. doi: 10.1016/j.jelechem.2016.02.038
- Benvidi, A., Rajabzadeh, N., Mazloun-Ardakani, M., Heidari, M.M. ve Mulchandani, A. (2014). Simple and label-free electrochemical impedance Amelogenin gene hybridization biosensing based on reduced graphene oxide. *Biosensors and Bioelectronics*, 58, 145-152. doi: 10.1016/j.bios.2014.01.053
- Berdal, K.G. ve Holst-Jensen, A. (2001). Roundup Ready® soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses. *European Food Research and Technology*, 213(6), 432-438. doi: 10.1007/s002170100403
- Bernardo, G. D., Gaudio, S. D., Galderisi, U., Cascino, A. ve Cipollaro, M. (2007). Comparative evaluation of different DNA extraction procedures from food samples. *Biotechnology progress*, 23(2), 297-301. doi: 10.1021/bp060182m
- Borisova, B., Sánchez, A., Jiménez-Falcao, S., Martín, M., Salazar, P., Parrado, C. Ve Villalonga, R. (2016). Reduced graphene oxide-carboxymethylcellulose layered with platinum nanoparticles/PAMAM dendrimer/magnetic nanoparticles hybrids. Application to the preparation of enzyme electrochemical biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 232, 84-90. doi: 10.1016/j.snb.2016.02.106
- Brett, C.M. (2022). Electrochemical Impedance Spectroscopy in the Characterisation and Application of Modified Electrodes for Electrochemical Sensors and Biosensors. *Molecules*, 27(5), 1497. doi: 10.3390/bios12070551
- Brodie, B.C. (1859). XIII. On the atomic weight of graphite. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, (149), 249-259. doi: 10.1098/rstl.1859.0013
- Buenger, D., Topuz, F., Groll, J. (2012). Hydrogels in sensing applications. *Progress in Polymer Science*, 37(12), 1678-1719. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2012.09.001

- Cardarelli, P., Branquinho, M.R., Ferreira, R.T., da Cruz, F.P. ve Gemal, A.L. (2005). Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. *Food control*, 16(10), 859-866. doi: 10.1016/j.foodcont.2004.07.010
- Cai, G., Yu, Z., Ren, R. ve Tang, D. (2018). Exciton-plasmon interaction between AuNPs/graphene nanohybrids and CdS quantum dots/TiO₂ for photoelectrochemical aptasensing of prostate-specific antigen. *ACS sensors*, 3(3), 632-639. doi: 10.1021/acssensors.7b00899
- Center, P.S. (2000). Updated molecular characterization and safety assessment of Roundup Ready® Soybean event 40-3-2. *Monsanto Company Confidential Report* içinde. Monsanto Company
- Cernat, A., Tertiș, M., Săndulescu, R., Bedioui, F., Cristea, A. ve Cristea, C. (2015). Electrochemical sensors based on carbon nanomaterials for acetaminophen detection: A review. *Analytica Chimica Acta*, 886, 16-28. doi: 10.1016/j.aca.2015.05.044
- Chadha, U., Bhardwaj, P., Agarwal, R., Rawat, P., Agarwal, R., Gupta, I. ve Sonar, P. (2022). Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. doi: 10.1016/j.jiec.2022.02.010
- Chao, J., Zhu, D., Zhang, Y., Wang, L. ve Fan, C. (2016). DNA nanotechnology-enabled biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 76, 68-79. doi: 10.1016/j.bios.2015.07.007
- Chen, J.C., Shih, J.L., Liu, C. H., Kuo, M.Y. ve Zen, J.M. (2006). Disposable electrochemical sensor for determination of nitroaromatic compounds by a single-run approach. *Analytical Chemistry*, 78(11), 3752-3757. doi: 10.1021/ac060002n
- Chou, C.C., Lin, Y.T., Kuznetsova, I. ve Wang, G.J. (2022). Genetically Modified Soybean Detection Using a Biosensor Electrode with a Self-Assembled Monolayer of Gold Nanoparticles. *Biosensors*, 12(4), 207. doi: 10.3390/bios12040207
- Chowdhury, A.D., Takemura, K., Li, T.C., Suzuki, T. ve Park, E. Y. (2019). Electrical pulse-induced electrochemical biosensor for hepatitis E virus detection. *Nature communications*, 10(1), 1-12. doi: 10.1038/s41467-019-11644-5
- Clark Jr, L.C., ve Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of sciences*, 102(1), 29-45. doi: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x
- Cinti, S., Scognamiglio, V., Moscone, D. ve Arduini, F. (2018). Efforts, challenges, and future perspectives of graphene-based (bio) sensors for biomedical applications. *In Graphene bioelectronics* içinde Elsevier.
- Coroș, M., Pogăcean, F., Măgerușan, L., Socaci, C., Pruneanu, S. (2019). A brief overview on synthesis and applications of graphene and graphene-based nanomaterials. *Frontiers of Materials Science*, 13(1), 23-32. doi: 10.1007/s11706-019-0452-5
- Cui, D., Zhai, S., Yang, Y., Wu, Y., Li, J., Yan, X. ve Wu, G. (2022). A Label-Free Electrochemical Impedance Genosensor Coupled with Recombinase Polymerase Amplification for Genetically Modified Maize Detection. *Agriculture*, 12(4), 454. doi: 10.3390/agriculture12040454

- Damm, C., Nacken, T.J. ve Peukert, W. (2015). Quantitative evaluation of delamination of graphite by wet media milling. *Carbon*, 81, 284-294. doi: 10.1016/j.carbon.2014.09.059
- DeMayo, F.J., Spencer, T.E., ve Editors-in-Chief, *Biology of Reproduction*. (2014). CRISPR bacon: a sizzling technique to generate genetically engineered pigs. *Biology of Reproduction*, 91(3), 79-1. doi: 10.1095/biolreprod.114.123935
- Demeke, T. ve Jenkins, G.R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 1977-1990. doi: 10.1007/s00216-009-3150-9
- Deng, Y., Wu, J., Tu, K., Xu, H., Ma, L., Chen, J. ve Wang, J. (2019). Analysis of Bean Products and Genetically Modified Soybean Using Electroanalytical Methods: A Mini Review. *International Journal of Electrochemical Science*, 14, 6223-6233. doi: 10.20964/2019.07.70
- Deng, Y., Wu, J., Tu, K., Xu, H., Ma, L., Chen J. ve Wang J. (2020). Preparation of DNA-Based Biosensor for Electrochemically Identification of Transgenic Soybean. *International Journal of Electrochemical Science*, 15, 4556-4566. doi: 10.20964/2020.05.09
- De Silva, K.K.H., Huang, H.H., Joshi, R.K. ve Yoshimura, M. (2017). Chemical reduction of graphene oxide using green reductants. *Carbon*, 119, 190-199. doi: 10.1016/j.carbon.2017.04.025
- Dinh, T., Phan, H.P., Qamar, A., Woodfield, P., Nguyen, N.T. ve Dao, D.V. (2017). Thermoresistive effect for advanced thermal sensors: Fundamentals, design considerations, and applications. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 26(5), 966-986. doi: 10.1109/JMEMS.2017.2710354
- Doyle, J.J. ve Doyle, J.L., 1990. Isolation of Plant DNA From Fresh Tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Dresselhaus, M.S., Dresselhaus, G. ve Hofmann, M. (2008). Raman spectroscopy as a probe of graphene and carbon nanotubes. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 366(1863), 231-236. doi: 10.1098/rsta.2007.2155
- Du, H., Zeng, X., Zhao, M., Cui, X., Wang, Q., Yang, H. ve Yu, D. (2016). Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. *Journal of biotechnology*, 217, 90-97. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.11.005
- Du, Y. ve Dong, S. (2017). Nucleic acid biosensors: recent advances and perspectives. *Analytical chemistry*, 89(1), 189-215. doi: 10.1021/acs.analchem.6b04190
- Edelstein, R.L., Tamanaha, C.R., Sheehan, P.E., Miller, M.M., Baselt, D.R., Whitman, L. ve Colton, R.J. (2000). The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents. *Biosensors and Bioelectronics*, 14(10-11), 805-813. doi: 10.1016/S0956-5663(99)00054-8
- Eggins, B.R. (2002). *Chemical sensors and biosensors* (Vol. 2). West Sussex: John Wiley & Sons.
- Eigler, S. ve Hirsch, A. (2014). Chemistry with graphene and graphene oxide—challenges for synthetic chemists. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(30), 7720-7738. doi: 10.1002/anie.201402780
- Elenis, D.S., Kalogianni, D.P., Glynou, K., Ioannou, P.C. ve Christopoulos, T.K. (2008). Advances in molecular techniques for the detection and

- quantification of genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical chemistry*, 392(3), 347-354. doi: 10.1007/s00216-008-1868-4
- El-Shal, M.A., Hendawy, H.A., Eldin, G.M. ve El-Sherif, Z.A. (2019). Application of nano graphene-modified electrode as an electrochemical sensor for determination of tapentadol in the presence of paracetamol. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 16(5), 1123-1130. doi: 10.1007/s13738-018-01585-z
- EuropaBio. 2017. What is biotechnology? <http://www.europabio.org/biotech-benefits/what-is-biotechnology> adresinden erişildi.
- FAO, 2015. Nations FaAOotU: The State of Food Insecurity in the World, 2015, <http://www.fao.org/3/a-i4646epdf> adresinden erişildi.
- FAO, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/docrep/005/y2772e/y2772e04htm> adresinden erişildi.
- Farrell, S., Ronkainen-Matsuno, N.J., Halsall, H.B. ve Heineman, W.R. (2004). Bead-based immunoassays with microelectrode detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 379(3), 358-367. doi: 10.1007/s00216-004-2632-z
- Fatema, K.N., Sagadevan, S., Cho, J.Y., Jang, W.K. ve Oh, W.C. (2022). Graphene-based nanocomposite using new modeling molecular dynamic simulations for proposed neutralizing mechanism and real-time sensing of COVID-19. *Nanotechnology Reviews*, 11(1), 1555-1569. doi: 10.1515/ntrev-2022-0093
- Fatima, A., Younas, I. ve Ali, M.W. (2022). An Overview on Recent Advances in Biosensor Technology and its Future Application. *Archives of Pharmacy Practice*, 1, 5.
- Fauzi, F.B., Ismail, E., Ani, M.H., Bakar, S.N.S.A., Mohamed, M.A., Majlis, B.Y. ve Abid, M.A.A. M. (2018). A critical review of the effects of fluid dynamics on graphene growth in atmospheric pressure chemical vapor deposition. *Journal of Materials Research*, 33(9), 1088-1108. doi: 10.1557/jmr.2018.39
- Feizi, S., Mehdizadeh, A., Hosseini, M.A., Jafari, S.A. ve Ashtari, P. (2019). Reduced graphene oxide/polymethyl methacrylate (rGO/PMMA) nanocomposite for real time gamma radiation detection. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 940, 72-77. doi: 10.1016/j.nima.2019.06.001
- Ferrari, A. C., Meyer, J.C., Scardaci, V., Casiraghi, C., Lazzeri, M., Mauri, F., ve Geim, A.K. (2006). Raman spectrum of graphene and graphene layers. *Physical review letters*, 97(18), 187401. doi: 10.1103/PhysRevLett.97.187401
- Fraiture, M.A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D. ve Roosens, N. H. (2015). Current and new approaches in GMO detection: challenges and solutions. *BioMed research international*, 1-22. doi: 10.1155/2015/392872
- Fu, L., Liu, Z., Huang, Y., Lai, G., Zhang, H., Su, W. ve Yu, A. (2018). Square wave voltammetric quantitative determination of flavonoid luteolin in peanut hulls and Perilla based on Au NPs loaded boron nitride nanosheets. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 817, 128-133. doi: 10.1016/j.jelechem.2018.04.009
- Gao, H., Cui, D., Zhai, S., Yang, Y., Wu, Y., Yan, X. ve Wu, G. (2022). A label-free electrochemical impedimetric DNA biosensor for genetically modified soybean detection based on gold carbon dots. *Microchimica Acta*, 189(6), 1-9. doi: 10.1007/s00604-022-05223-7

- Gao, H., Sun, M., Lin, C., Wang, S. (2012). Electrochemical DNA biosensor based on graphene and TiO₂ nanorods composite film for the detection of transgenic soybean gene sequence of MON89788. *Electroanalysis*, 24(12), 2283-2290. doi: 10.1002/elan.201200403
- Gašparič, M., Tengs, T., La Paz, J.L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T. ve Gruden, K. (2010). Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2023-2029. doi: 10.1007/s00216-009-3418-0
- Ghaffarzadeh, K. (2019). Graphene, 2D Materials and Carbon Nanotubes: Markets, Technologies and Opportunities 2019-2029.
- Geim, A.K. ve Novoselov, K.S. (2010). The rise of graphene. In *Nanoscience and technology: a collection of reviews from nature journals*, 11-19. doi: 10.1142/9789814287005_0002
- Goenka, S., Sant, V., Sant, S. (2014). Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 173, 75-88. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.10.017
- Gong, Q., Wang, Y. ve Yang, H. (2017). A sensitive impedimetric DNA biosensor for the determination of the HIV gene based on graphene-Nafion composite film. *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 565-569. doi: 10.1016/j.bios.2016.02.045
- Gordeliy, V.I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R. ve Engelhard, M. (2002). Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II–transducer complex. *Nature*, 419(6906), 484-487. doi: 10.1038/nature01109
- Goswami, P. (2020). Advanced Materials and Techniques for Biosensors and Bioanalytical Applications.
- Graves, P.R.G.D.J. ve Gardiner, D. (1989). Practical Raman spectroscopy. *Springer*, 10, 978-3.
- Greiner, R., Konietzny, U. ve Villavicencio, A.L. (2005). Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. *Food Control*, 16(8), 753-759. doi: 10.1016/j.foodcont.2004.06.015
- Grime, J.K. (1985). Thermodynamics, thermochemistry and calorimetry. *Analytical solution calorimetry*, 1-29.
- Gryson, N., Dewettinck, K. ve Messens, K. (2007). Detection of genetically modified soy in doughs and cookies. *Cereal chemistry*, 84(2), 109-115. doi: 10.1094/CCHEM-84-2-0109
- Gryson, N. (2010). Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2003-2022. doi: 10.1007/s00216-009-3343-2
- Guardia, L., Fernández-Merino, M.J., Paredes, J.I., Solís-Fernández, P., Villar-Rodil, S., Martínez-Alonso, A. ve Tascón, J.M.D. (2011). High-throughput production of pristine graphene in an aqueous dispersion assisted by non-ionic surfactants. *Carbon*, 49(5), 1653-1662. doi: 10.1016/j.carbon.2010.12.049
- Gürsoy, S., Dükar, N., Yaman, Y. T., Abaci, S. ve Kuralay, F. (2019). Electroactive polyglycine coatings for nanobiosensing applications: Label-free DNA hybridization, DNA-antitumor agent interaction and antitumor agent

- determination. *Analytica Chimica Acta*, 1072, 15-24. doi: 10.1016/j.aca.2019.04.044
- Hack, R., Correia, C.H.G., Zanon, R.A.D.S. ve Pezzin, S.H. (2018). Characterization of graphene nanosheets obtained by a modified Hummer's method. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 23. doi: 10.1590/S1517-707620170001.0324
- Hai, X., Li, Y., Zhu, C., Song, W., Cao, J. ve Bi, S. (2020). DNA-based label-free electrochemical biosensors: From principles to applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 133, 116098. doi: 10.1016/j.trac.2020.116098
- Halbig, C.E., Nacken, T.J., Walter, J., Damm, C., Eigler, S. ve Peukert, W. (2016). Quantitative investigation of the fragmentation process and defect density evolution of oxo-functionalized graphene due to ultrasonication and milling. *Carbon*, 96, 897-903. doi: 10.1016/j.carbon.2015.10.021
- Hammond, J.L., Formisano, N., Estrela, P., Carrara, S. ve Tkac, J. (2016). Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays in biochemistry*, 60(1), 69-80. doi: 10.1042/EBC20150008
- Hassanpour, S., Baradaran, B., Hejazi, M., Hasanzadeh, M., Mokhtarzadeh, A. ve de la Guardia, M. (2018). Recent trends in rapid detection of influenza infections by bio and nanobiosensor. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 98, 201-215. doi: 10.1016/j.trac.2017.11.012
- Hashem, A., Hossain, M.M., Marlinda, A.R., Mamun, M.A., Sagadevan, S., Shahnavaz, Z. ve Johan, M.R. (2022). Nucleic acid-based electrochemical biosensors for rapid clinical diagnosis: Advances, challenges, and opportunities. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 59(3), 156-177. doi: 10.1080/10408363.2021.1997898
- He, C., Tang, Y., Wang, S., Liu, J., Chen, Y., Dong, Y. ve Tan, T. (2017). An Electrochemical DNA Biosensor Based on Au-reduced Graphene Oxide Nanocomposite for Transgenic Event Bt63 Detection. *Analytical Sciences*, 33(10), 1155-1160. doi: 10.2116/analsci.33.1155
- Health and Safety Executive. 2017. What are GMOs? <http://www.hse.gov.uk/biosafety/gmo/whatare.htm> adresinden erişildi.
- Helmenstine, A.M. (2018). Electrical Conductivity Definition.
- Hinze, S. (1994) Bibliographical cartography of an emerging interdisciplinary discipline: The case of bioelectronics. *Scientometrics*, 29, 353-376. doi: 10.1007/bf02033445
- Hu, C., Lu, T., Chen, F. ve Zhang, R. (2013). A brief review of graphene-metal oxide composites synthesis and applications in photocatalysis. *Journal of the Chinese Advanced Materials Society*, 1, 21-39. doi: 10.1080/22243682.2013.771917
- Hu, Y., Wang, K., Zhang, Q., Li, F., Wu, T. ve Niu, L. (2012). Decorated graphene sheets for label-free DNA impedance biosensing. *Biomaterials*, 33(4), 1097-1106. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.045
- Hu, Q., Hu, W., Kong, J. ve Zhang, X. (2015). Ultrasensitive electrochemical DNA biosensor by exploiting hematin as efficient biomimetic catalyst toward in situ metallization. *Biosensors and Bioelectronics*, 63, 269-275. doi: 10.1016/j.bios.2014.07.034
- Huang, H., Bai, W., Dong, C., Guo, R. ve Liu, Z. (2015). An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, doi: 10.1016/j.bios.2015.01.039

- Huang, Y.Y., Pang, Y.H., Shen, X.F., Jiang, R. ve Wang, Y.Y. (2022). Covalent organic framework DQTP modified pencil graphite electrode for simultaneous determination of bisphenol A and bisphenol S. *Talanta*, 236, 122859. doi: 10.1016/j.talanta.2021.122859
- Hummers, W.S. ve Offeman, R.E. (1958). Preparation of Graphitic Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80(6), 1339-1339. doi: 10.1021/ja01539a017
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K. ve Engel, K.H. (1998). Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch*, 206, 203-207. doi: 10.1007/s002170050243
- Horwood, C. (2022). Ionic liquids as electrolytes for electrochemistry. In *Ionic Liquids in Analytical Chemistry* içinde. Elsevier.
- Hosseini, S.S., Jebelli, A., Vandghanooni, S., Jahanban-Esfahlan, A., Baradaran, B., Amini, M. ve Eskandani, M. (2022). Perspectives and trends in advanced DNA biosensors for the recognition of single nucleotide polymorphisms. *Chemical Engineering Journal*, 135988. doi: 10.1016/j.cej.2022.135988
- Ikram, R., Jan, B.M. ve Ahmad, W. (2020). An overview of industrial scalable production of graphene oxide and analytical approaches for synthesis and characterization. *Journal of Materials Research and Technology*, 9(5), 11587-11610. doi: 10.1016/j.jmrt.2020.08.050
- Inzelt, G., Lewenstam, A. ve Scholz, F. (2013). *Handbook of reference electrodes* (Vol. 541). Berlin: Springer.
- ISAAA (2018) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2018: Biotech Crops Continue to Help Meet the Challenges of Increased Population and Climate Change. ISAAA Brief No. 54. ISAAA: Ithaca, NY. <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/54/executive-summary/pdf/B54-ExecSummary-English.pdf> adresinden erişildi.
- ISAAA database (2019) GM Approval 2019. <https://www.isaaa.org/gmapproval/database/default.asp> adresinden erişildi.
- Ismail, Z. (2019). Green reduction of graphene oxide by plant extracts: a short review. *Ceramics International*, 45(18), 23857-23868. doi: 10.1016/j.ceramint.2019.08.114
- Jadon, N., Jain, R. ve Pandey, A. (2017). Electrochemical analysis of amlodipine in some pharmaceutical formulations and biological fluid using disposable pencil graphite electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 788, 7-13. doi: 10.1016/j.jelechem.2017.01.055
- Jaleel, J. A., Sruthi, S. ve Pramod, K. (2017). Reinforcing nanomedicine using graphene family nanomaterials. *Journal of Controlled Release*, 255, 218-230. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.04.041
- Jamaluddin, R.Z.A.R., Heng, L.Y., Tan, L.L. ve Chong, K.F. (2018). A Biosensor for Genetic Modified Soybean DNA Determination via Adsorption of Anthraquinone-2-sulphonic Acid in Reduced Graphene Oxide. *Electroanalysis*, 30(2), 250-258. doi: 10.1002/elan.201700612
- Jamaluddin, R.Z.A.R., Tan, L.L., Chong, K.F. ve Heng, L.Y. (2020). An electrochemical DNA biosensor fabricated from graphene decorated with graphitic nanospheres. *Nanotechnology*, 31(48), 485501. doi: 10.1088/1361-6528/abab2e

- Jamil, A., Lim, H.N., Yusof, N.A., Tajudin, A.A., Huang, N.M., Pandikumar, A. ve Andou, Y. (2015). Preparation and characterization of silver nanoparticles-reduced graphene oxide on ITO for immunosensing platform. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 221, 1423-1432. doi: 10.1016/j.snb.2015.06.156 doi: 10.1016/j.snb.2015.06.156
- Jia, R., Unsal, T., Xu, D., Lekbach, Y. ve Gu, T. (2019). Microbiologically influenced corrosion and current mitigation strategies: a state of the art review. *International biodeterioration & biodegradation*, 137, 42-58. doi: 10.1016/j.ibiod.2018.11.007
- Jiang, X., Zhang, H., Wu, J., Yang, X., Shao, J., Lu, Y. ve Chen, G. (2014). G-quadruplex DNA biosensor for sensitive visible detection of genetically modified food. *Talanta*, 128, 445-449. doi: 10.1016/j.talanta.2014.05.002
- Joelma, L.B., Olvia, C.P., Amlia, M.M., Artimsia, M.M., Lucinda, D.A., Lus, D.N., ve Dcia, C. (2022). Detection of genetically modified organisms in food products commercialized in Mozambique. *African Journal of Food Science*, 16(2), 22-29. doi: 10.5897/AJFS2021.2162
- Jolly, P., Formisano, N., Tkáč, J., Kasák, P., Frost, C.G. ve Estrela, P. (2015). Label-free impedimetric aptasensor with antifouling surface chemistry: A prostate specific antigen case study. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 209, 306-312. doi: 10.1016/j.snb.2014.11.083
- Karamollaoğlu, İ., Öktem, H.A. ve Mutlu, M. (2009). QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs). *Biochemical Engineering Journal*, 44(2-3), 142-150. doi: 10.1016/j.bej.2008.11.011
- Karimi-Maleh, H., Ayati, A., Davoodi, R., Tanhaei, B., Karimi, F., Malekmohammadi, S. ve Sillanpää, M. (2021). Recent advances in using of chitosan-based adsorbents for removal of pharmaceutical contaminants: A review. *Journal of Cleaner Production*, 291, 125880. doi: 10.1016/j.jclepro.2021.125880
- Karimi-Maleh, H., Beitollahi, H., Kumar, P. S., Tajik, S., Jahani, P. M., Karimi, F. ve Zare, N. (2022). Recent advances in carbon nanomaterials-based electrochemical sensors for food azo dyes detection. *Food and Chemical Toxicology*, 112961. doi: 10.1016/j.fct.2022.112961
- Kariuki, J., Ervin, E. ve Olafson, C. (2015). Development of a novel, low-cost, disposable wooden pencil graphite electrode for use in the determination of antioxidants and other biological compounds. *Sensors*, 15(8), 18887-18900. doi: 10.3390/s150818887
- Kariuki, J.K. (2012). An electrochemical and spectroscopic characterization of pencil graphite electrodes. *Journal of the Electrochemical Society*, 159(9), H747. doi: 10.1149/2.007209jes
- Karunakaran, C., Bhargava, K. ve Benjamin, R. (2015). *Biosensors and bioelectronics*. Amsterdam: Elsevier.
- Karteri, İ., Karataş, Ş., Al-Ghamdi, A.A. ve Yakuphanoglu, F. (2015). The electrical characteristics of thin film transistors with graphene oxide and organic insulators. *Synthetic Metals*, 199, 241-245. doi: https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2014.11.036
- Khalafi, L. ve Rafiee, M. (2017). Cyclic voltammetry. *Encyclopedia of Physical Organic Chemistry* içinde. New Jersey: John Wiley & Sons
- Korth, K.L. (2008). Genes and traits of interest for transgenic plants. *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques and applications* içinde. New York: John Wiley and Sons. doi: 10.1002/9780470282014.ch8.

- Kökbaş, U., Kayrın, L. ve Tuli, A. (2013). Biyosensörler ve Tıpta Kullanım Alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22.4.
- Kulkarni, M.B., Ayachit, N.H. ve Aminabhavi, T.M. (2022). Biosensors and microfluidic biosensors: From fabrication to application. *Biosensors*, 12(7), 543. doi: 10.3390/bios12070543
- Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A.K., Singh, A., Jha, A.K. ve Rakshit, S. (2020). Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, 251, 1-27. doi: 10.1007/s00425-020-03372-8
- Kumar, V. ve Arora, K. (2020). Trends in nano-inspired biosensors for plants. *Materials Science for Energy Technologies*, 3, 255-273. doi: 10.1016/j.mset.2019.10.004
- Kuralay, F., Dükar, N., ve Bayramlı, Y. (2018). Poly-L-lysine Coated Surfaces for Ultrasensitive Nucleic Acid Detection. *Electroanalysis*, 30(7), 1556-1565. doi: 10.1002/elan.201800153
- Laffont, J.L., Remund, K.M., Wright, D., Simpson, R.D. ve Grégoire, S. (2005). Testing for adventitious presence of transgenic material in conventional seed or grain lots using quantitative laboratory methods: statistical procedures and their implementation. *Seed Science Research*, 15(3), 197-204. doi: 10.1079/SSR2005210
- Lai, Q., Zhu, S., Luo, X., Zou, M. ve Huang, S. (2012). Ultraviolet-visible spectroscopy of graphene oxides. *Aip Advances*, 2(3), 032146. doi: 10.1063/1.4747817
- Lawal, A.T. (2019). Graphene-based nano composites and their applications. A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 141, 111384. doi: 10.1016/j.bios.2019.111384
- Lee, C.S., Yu, S.H. ve Kim, T.H. (2017). One-step electrochemical fabrication of reduced graphene oxide/gold nanoparticles nanocomposite-modified electrode for simultaneous detection of dopamine, ascorbic acid, and uric acid. *Nanomaterials*, 8(1), 17. doi: 10.3390/nano8010017
- Li, A., Tang, L., Song, D., Song, S., Ma, W., Xu, L. ve Xu, C. (2016). A SERS-active sensor based on heterogeneous gold nanostar core–silver nanoparticle satellite assemblies for ultrasensitive detection of aflatoxinB1. *Nanoscale*, 8(4), 1873-1878. doi: 10.1039/C5NR08372A
- Li, D., Müller, M.B., Gilje, S., Kaner, R.B., Wallace, G.G. (2008). Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nature nanotechnology*, 3(2), 101-105. doi: 10.1038/nnano.2007.451
- Li, G., Li, S., Wang, Z., Xue, Y., Dong, C., Zeng, J. ve Zhou, Z. (2018). Label-free electrochemical aptasensor for detection of alpha-fetoprotein based on AFP-aptamer and thionin/reduced graphene oxide/gold nanoparticles. *Analytical biochemistry*, 547, 37-44. doi: 10.1016/j.ab.2018.02.012
- Li, M., Wang, P., Li, F., Chu, Q., Li, Y. ve Dong, Y. (2017). An ultrasensitive sandwich-type electrochemical immunosensor based on the signal amplification strategy of mesoporous core–shell Pd@ Pt nanoparticles/amino group functionalized graphene nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 752-759.
- Li, Y., Sun, L., Liu, Q., Han, E., Hao, N., Zhang, L. ve Wang, K. (2016b). Photoelectrochemical CaMV35S biosensor for discriminating transgenic from non-transgenic soybean based on SiO₂@ CdTe quantum dots core-shell nanoparticles as signal indicators. *Talanta*, 161, 211-218. doi: 10.1016/j.talanta.2016.08.047

- Lin, Y., Zhou, Q., Tang, D., Niessner, R., Yang, H. ve Knopp, D. (2016). Silver nanolabels-assisted ion-exchange reaction with CdTe quantum dots mediated exciton trapping for signal-on photoelectrochemical immunoassay of mycotoxins. *Analytical chemistry*, 88(15), 7858-7866. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02124
- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G. ve Anklam, E. (2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research and Technology*, 212(4), 497- doi: 10.1007/s002170000274
- Liu, H., Guo, K., Duan, C., Dong, X. ve Gao, J. (2017). Hollow TiO₂ modified reduced graphene oxide microspheres encapsulating hemoglobin for a mediator-free biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 473-479. doi: 10.1016/j.bios.2016.08.089
- Liu, Z. (2021). Food Safety of Genetically Modified Organisms. *Journal of Frontiers in Educational Research*, 1(2), 92-95.
- Loryuenyong, V., Totepvimarn, K., Eimburanaprat, P., Boonchompoo, W. ve Buasri, A. (2013). Preparation and characterization of reduced graphene oxide sheets via water-based exfoliation and reduction methods. *Advances in Materials Science and Engineering*. Doi: 10.1155/2013/923403
- Lucarelli, F., Marrazza, G. ve Mascini, M. (2005). Enzyme-based impedimetric detection of PCR products using oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2001-2009. doi: 10.1016/j.bios.2004.08.025
- Mafra, I., Ferreira, I.M. ve Oliveira, M.B.P. (2008). Food authentication by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, 227(3), 649-665. doi: 10.1007/s00217-007-0782-x
- Mahgoub, S.E. (2016). *Genetically modified foods: Basics, applications, and controversy*. New York: CRC Press.
- Mahgoub, S.E. ve Nollet, L.M. (2019). *Testing and Analysis of GMO-containing Foods and Feed*. New York: CRC Press.
- Malifarge, S., Delobel, B. ve Delacourt, C. (2017). Determination of tortuosity using impedance spectra analysis of symmetric cell. *Journal of The Electrochemical Society*, 164(11), E3329. doi: 10.1149/2.0331711jes
- Mandaci, M., Çakir, Ö., Turgut-Kara, N., Meriç, S. ve Ari, Ş. (2014). Detection of genetically modified organisms in soy products sold in Turkish market. *Food Science and Technology*, 34(4), 717-722. doi: 10.1590/1678-457X.6441
- Manouchehri, M., Seidi, S., Rouhollahi, A. ve Shanehsaz, M. (2019). Porphyrin-functionalized graphene oxide sheets: An efficient nanomaterial for micro solid phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from urine samples. *Journal of Chromatography A*, 1607, 460387. doi: 10.1016/j.chroma.2019.460387
- Manoratne, C. H., Rosa, S. ve Kottegod, I.R.M. (2017). XRD-HTA, UV visible, FTIR and SEM interpretation of reduced graphene oxide synthesized from high purity vein graphite. *Mater. Sci. Res. India*, 14(1), 19-30. doi: 10.13005/msri/140104
- Manzanares-Palenzuela, C.L., Martín-Fernández, B., López, M.S.P. ve López-Ruiz, B. (2015). Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of

- genetically modified organisms. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 66, 19-31. doi: 10.1016/j.trac.2014.10.006
- Manzano, M., Viezzi, S., Mazerat, S., Marks, R. S. ve Vidic, J. (2018). Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor for detecting hepatitis A virus. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 89-95. doi: 10.1016/j.bios.2017.08.043
- Mao-Qing, W.A.N.G., Xiao-Yan, D.U., Qian, S.U.N. ve Jiang, X.C. (2008). DNA biosensor prepared by electrodeposited Pt-nanoparticles for the detection of specific deoxyribonucleic acid sequence in genetically modified soybean. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36(7), 890-894. doi: 10.1016/S1872-2040(08)60048-1
- Martín-Fernández, B., Manzanares-Palenzuela, C. L., Sánchez-Paniagua López, M., de-Los-Santos-Álvarez, N. ve López-Ruiz, B. (2017). Electrochemical genosensors in food safety assessment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2758-2774. doi: 10.1080/10408398.2015.1067597
- Mascini, M., Del Carlo, M., Minunni, M., Chen, B. ve Compagnone, D. (2005). Identification of mammalian species using genosensors. *Bioelectrochemistry*, 67(2), 163-169. doi: 10.1016/j.bioelechem.2004.06.011
- Mashuni, M., Ritonga, H., Jahiding, M., Rubak, B. ve Hamid, F.H. (2022). Highly Sensitive Detection of Carbaryl Pesticides Using Potentiometric Biosensor with Nanocomposite Ag/r-Graphene Oxide/Chitosan Immobilized Acetylcholinesterase Enzyme. *Chemosensors*, 10(4), 138. doi: 10.3390/chemosensors10040138
- Matthes, N., Westphal, K., Haldemann, C., Egert, M., Jokisch, C. ve Speck, B. (2020). Validation of a modified CTAB method for DNA extraction from protein-rich maize feedstuffs. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 1-10. doi: 10.1007/s00003-020-01285-y
- McCreery, R.L. (2008). Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry. *Chemical reviews*, 108(7), 2646-2687. doi: 10.1021/cr068076m
- Mei, Y., He, C., Zeng, W., Luo, Y., Liu, C., Yang, M. ve Huang, Q. (2022). Electrochemical Biosensors for Foodborne Pathogens Detection Based on Carbon Nanomaterials: Recent Advances and Challenges. *Food and Bioprocess Technology*, 1-16. doi: 10.1007/s11947-022-02759-7
- Meriç, S., Çakır, Ö., Turgut-Kara, N. ve Arı, Ş. (2014). Detection of genetically modified maize and soybean in feed samples. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 1160. doi: 10.4238/2014.February.25.2
- Meyer, R., Chardonens, F., Hübner, P. ve Lüthy, J. (1996). Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 203(4), 339-344. doi: 10.1007/BF01231072
- Miraglia, M., Berdal, K. G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E. J. ve Zagon, J. (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, 42(7), 1157-1180. doi: 10.1016/j.fct.2004.02.018
- Mix, M., Rüger, J., Krüger, S., Broer, I. ve Flechsig, G.U. (2012). Electrochemical detection of 0.6% genetically modified maize MON810 in real flour samples. *Electrochemistry communications*, 22, 137-140. doi: 10.1016/j.elecom.2012.06.019

- Mohanty, S.P. ve Kougianos, E. (2006). Biosensors: A tutorial review. *Ieee Potentials*, 25(2), 35-40. doi: 10.1109/MP.2006.1649009
- Morales, M.A. ve Halpern, J.M. (2018). Guide to selecting a biorecognition element for biosensors. *Bioconjugate chemistry*, 29(10), 3231-3239. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00592
- Monteserín, C., Blanco, M., Aranzabe, E., Aranzabe, A., Laza, J.M., Larrañaga-Varga, A. ve Vilas, J.L. (2017). Effects of graphene oxide and chemically-reduced graphene oxide on the dynamic mechanical properties of epoxy amine composites. *Polymers*, 9(9), 449.
- Moreano, F., Busch, U. ve Engel, K.H. (2005). Distortion of genetically modified organism quantification in processed foods: influence of particle size compositions and heat-induced DNA degradation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(26), 9971-9979. doi: 10.1021/jf051894f
- Morozov, S.V., Novoselov, K.S., Katsnelson, M.I., Schedin, F., Elias, D.C., Jaszczak, J.A. ve Geim, A. K. (2008). Giant intrinsic carrier mobilities in graphene and its bilayer. *Physical review letters*, 100(1), 016602.
- Mutlu, Ş., Şimşek, O. ve Öksüz, Ö. (2021). Investigating The GMO Existence in Chips and Breakfast Cereals Marketed in Turkey. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(3), 375-385. doi: 10.33462/jotaf.670008
- Muzyka, R., Drewniak, S., Pustelny, T., Chrubasik, M. ve Gryglewicz, G. (2018). Characterization of graphite oxide and reduced graphene oxide obtained from different graphite precursors and oxidized by different methods using Raman spectroscopy. *Materials*, 11(7), 1050. doi: 10.3390/ma11071050
- Nacken, T.J., Damm, C., Walter, J., Rüger, A. ve Peukert, W. (2015). Delamination of graphite in a high pressure homogenizer. *Rsc Advances*, 5(71), 57328-57338. doi: 10.1039/C5RA08643D
- Naik, K.M., Ashi, C.R. ve Nandibewoor, S.T. (2015). Anodic voltammetric behavior of hydroxyurea and its electroanalytical determination in pharmaceutical dosage form and urine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 755, 109-114. doi: 10.1016/j.jelechem.2015.07.038
- Nair, R.R., Blake, P., Grigorenko, A.N., Novoselov, K.S., Booth, T.J., Stauber, T. ve Geim, A.K. (2008). Fine structure constant defines visual transparency of graphene. *science*, 320(5881), 1308-1308. doi: 10.1126/science.1156965
- Nguyen, H.H. ve Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157-163. doi: 10.5757/ASCT.2017.26.6.157
- Niu, S., Sun, J., Nan, C. ve Lin, J. (2013). Sensitive DNA biosensor improved by 1, 10-phenanthroline cobalt complex as indicator based on the electrode modified by gold nanoparticles and graphene. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 176, 58-63. doi: 10.1016/j.snb.2012.08.085
- Noma, S., Kikuchi, Y., Satou, M., Tanaka, T., Takiya, T., Okusu, H. ve Mano, J. (2022). Simple, Precise, and Less Biased GMO Quantification by Multiplexed Genetic Element-Specific Digital PCR. *Journal of AOAC International*, 105(1), 159-166. doi: 10.1093/jaoacint/qsab138
- Nooranian, S., Mohammadinejad, A., Mohajeri, T., Aleyaghoob, G. ve Kazemi Oskuee, R. (2022). Biosensors based on aptamer-conjugated gold nanoparticles: a review. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(4), 1517-1534. doi: 10.1002/bab.2224
- Novella, S. 2014. The GMO controversy. Neurologica blog <http://theness.com/neurologicablog/index.php/the-gmo-controversy/> adresinden erişildi.

- Novoselov, K. (2007). Mind the gap. *Nature materials*, 6(10), 720-721. doi: 10.1038/nmat2006
- Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S.V., Jiang, D.E., Zhang, Y., Dubonos, S.V. ve Firsov, A.A. (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *science*, 306(5696), 666-669. doi: 10.1126/science.1102896
- Novoselov, K. S., Jiang, D., Schedin, F., Booth, T.J., Khotkevich, V.V., Morozov, S. V. ve Geim, A.K. (2005). Two-dimensional atomic crystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(30), 10451-10453. doi: 10.1073/pnas.0502848102
- Ondşej, M. (2004). Testing of Genetically Modified Organisms in Food. *Biologia Plantarum*, 48(4), 516-516. doi: 10.1023/B:BIOP.0000047189.54667.fc
- Oliver, M.J. (2014). Why we need GMO crops in agriculture. *Missouri medicine*, 111(6), 492.
- Pacheco Coello, R., Pestana Justo, J., Factos Mendoza, A. ve Santos Ordoñez, E. (2017). Comparison of three DNA extraction methods for the detection and quantification of GMO in Ecuadorian manufactured food. *BMC research notes*, 10(1), 1-7. doi: doi.org/10.1186/s13104-017-3083-x
- Palchetti, I., Hansen, P.D. ve Barcelo, D. (2017). *Past, Present and Future Challenges of Biosensors and Bioanalytical Tools in Analytical Chemistry: A Tribute to Professor Marco Mascini*. Amsterdam: Elsevier.
- Palmer, A.E., Qin, Y., Park, J.G. ve McCombs, J.E. (2011). Design and application of genetically encoded biosensors. *Trends in biotechnology*, 29(3), 144-152. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.12.004
- Pandey, I., Tiwari, J.D. ve Sekhar, P.K. (2018). Metal incorporated polymeric nanodots based electrode material for fluorescent supercapacitors. *Journal of The Electrochemical Society*, 165(8), B3035. doi: 10.1149/2.0071808jes
- Pandey, R., Kumar, P., Sharma, P., & Punia, R. (2023). Potential and practical applications of bioelectrochemical sensors. *Multifaceted Bio-Sensing Technology*, 63-80.
- Paulchamy, B., Arthi, G. ve Lignesh, B.D. (2015). A simple approach to stepwise synthesis of graphene oxide nanomaterial. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 6(1), 1. doi: 10.4172/2157-7439.1000253
- Pauli, U., Liniger, M., Zimmermann, A., Schrott, M. ve Schouwey, B. (2000). Extraction and amplification of DNA from 55 foodstuffs. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 91(5), 491-501.
- Pavlova, A.S., Obraztsova, E.A., Belkin, A.V., Monat, C., Rojo-Romeo, P. ve Obraztsova, E.D. (2016). Liquid-phase exfoliation of flaky graphite. *Journal of Nanophotonics*, 10(1), 012525. doi: 10.1117/1.JNP.10.012525
- Pervaiz, Z.H., Turi, N.A., Khaliq, I., Rabbani, M.A. ve Malik, S.A. (2011). Methodology: a modified method for high-quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants. *Genetics and molecular research: GMR*, 10(3), 1669-1673. doi: 10.4238/vol10-3gmr1346
- Peano, C., Samson, M.C., Palmieri, L., Gulli, M. ve Marmioli, N. (2004). Qualitative and quantitative evaluation of the genomic DNA extracted from GMO and non-GMO foodstuffs with four different extraction methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(23), 6962-6968. doi: 10.1021/jf040008i
- Plácido, A., Pereira, C., Guedes, A., Barroso, M. F., Miranda-Castro, R., de-Los-Santos-Álvarez, N. ve Delerue-Matos, C. (2018). Electrochemical genoassays on gold-coated magnetic nanoparticles to quantify genetically

- modified organisms (GMOs) in food and feed as GMO percentage. *Biosensors and Bioelectronics*, 110, 147-154. doi: 10.1016/j.bios.2018.03.042
- Poh, H. L., Šaněk, F., Ambrosi, A., Zhao, G., Sofer, Z. ve Pumera, M. (2012). Graphenes prepared by Staudenmaier, Hofmann and Hummers methods with consequent thermal exfoliation exhibit very different electrochemical properties. *Nanoscale*, 4(11), 3515-3522. doi: 10.1039/C2NR30490B
- Powell, C. (2015). How to make a GMO. Harvard University, The Graduate School of Arts and Sciences Blog, Special Edition on GMOs. <http://sitn.hms.harvard.edu/flash/2015/how-to-make-a-gmo/> adresinden erişildi.
- Querci M, Jermini M, Van den Eede G (2005) *Users manual – training course on the analysis of food and feed samples for the presence of genetically modified organisms*. Joint Research Centre: Ispra.
- Rahman, M., Heng, L.Y., Futra, D., Chiang, C.P., Rashid, Z.A. ve Ling, T.L. (2017). A highly sensitive electrochemical DNA biosensor from acrylic-gold nanocomposite for the determination of arowana fish gender. *Nanoscale research letters*, 12(1), 1-10.
- Ramakrishnan, S., Pradeep, K.R., Raghul, A., Senthilkumar, R., Rangarajan, M. ve Kothurkar, N.K. (2015). One-step synthesis of Pt-decorated graphene-carbon nanotubes for the electrochemical sensing of dopamine, uric acid and ascorbic acid. *Analytical Methods*, 7(2), 779-786. doi: 10.1039/C4AY02487G
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A. ve Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281-2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143
- Ramya, M., Kumar, P. S., Rangasamy, G., Rajesh, G., Nirmala, K., Saravanan, A. ve Krishnapandi, A. (2022). A recent advancement on the applications of nanomaterials in electrochemical sensors and biosensors. *Chemosphere*, 136416. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136416
- Rastegar, H., Khosrokhavar, R., Shoeibi, S., Jafarisl, M., Ershadi, A. ve Taherian, M. (2021). Investigation of transgenic elements in genetically modified maize germ (*Zea mays*) and maize germ oil distributed in local market by qualitative PCR method. *Human, Health and Halal Metrics*, 1(2), 64-70. doi: 10.30502/JHHHM.2021.255349.1026
- Rochman, R.A., Wahyuningsih, S., Ramelan, A.H. ve Hanif, Q.A. (2019). Preparation of nitrogen and sulphur Co-doped reduced graphene oxide (rGO-NS) using N and S heteroatom of thiourea. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* kongresi içinde.
- Ronkainen, N.J., Halsall, H.B. ve Heineman, W.R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*, 39(5), 1747-1763. doi: 10.1039/B714449K
- Rott, M.E., Lawrence, T.S., Wall, E.M. ve Green, M.J. (2004). Detection and quantification of roundup ready soy in foods by conventional and real-time polymerase chain reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5223-5232. doi: 10.1021/jf030803g
- Safajou, H., Khojasteh, H., Salavati-Niasari, M. ve Mortazavi-Derazkola, S. (2017). Enhanced photocatalytic degradation of dyes over graphene/Pd/TiO₂ nanocomposites: TiO₂ nanowires versus TiO₂ nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 498, 423-432. doi: 10.1016/j.jcis.2017.03.078

- Saleem, H. ve Habib, A. (2016). Study of band gap reduction of TiO₂ thin films with variation in GO contents and use of TiO₂/Graphene composite in hybrid solar cell. *Journal of Alloys and Compounds*, 679, 177-183. doi: 10.1016/j.jallcom.2016.03.240
- Saleem, H., Haneef, M. ve Abbasi, H. Y. (2018). Synthesis route of reduced graphene oxide via thermal reduction of chemically exfoliated graphene oxide. *Materials Chemistry and Physics*, 204, 1-7. doi: 10.1016/j.matchemphys.2017.10.020
- Sambrook, J. ve Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Paniagua López, M., Manzanares-Palenzuela, C.L. ve López-Ruiz, B. (2018). Biosensors for GMO testing: nearly 25 years of research. *Critical reviews in analytical chemistry*, 48(5), 391-405 doi: 10.1080/10408347.2018.1442708
- Sandhya, P.K., Jose, J., Sreekala, M.S., Padmanabhan, M., Kalarikkal, N. ve Thomas, S. (2018). Reduced graphene oxide and ZnO decorated graphene for biomedical applications. *Ceramics International*, 44(13), 15092-15098. doi: 10.1016/j.ceramint.2018.05.143
- Sanford, J.C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, 79(1),
- Sang, S., Wang, Y., Feng, Q., Wei, Y., Ji, J. ve Zhang, W. (2016). Progress of new label-free techniques for biosensors: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 36(3), 465-481. 10.3109/07388551.2014.991270
- Schmidt, M.A., LaFayette, P.R., Artelt, B.A. ve Parrott, W.A. (2008). A comparison of strategies for transformation with multiple genes via microprojectile-mediated bombardment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44(3), 162-168. doi: 10.1007/s11627-007-9099-5
- Schöning, M.J. ve Poghossian, A. (2018). Label-Free Biosensing. *Advanced Materials, Devices and Applications*. Springer International Publishing.
- Shahriary, L. ve Athawale, A.A. (2014). Graphene oxide synthesized by using modified hummers approach. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 2(01), 58-63.
- Shahid, M.M., Pandikumar, A., Golsheikh, A.M., Huang, N.M. ve Lim, H.N. (2014). Enhanced electrocatalytic performance of cobalt oxide nanocubes incorporating reduced graphene oxide as a modified platinum electrode for methanol oxidation. *RSC Advances*, 4(107), 62793-62801. doi: 10.1039/C4RA08952A
- Shalaby, A., Nihtianova, D., Markov, P., Staneva, A.D., Iordanova, R.S. ve Dimitriev, Y.B. (2015). Structural analysis of reduced graphene oxide by transmission electron microscopy. *Bulgarian Chemical Communications*, 47(1), 291-295.
- Sharma, N., Arif, M., Monga, S., Shkir, M., Mishra, Y.K. ve Singh, A. (2020). Investigation of bandgap alteration in graphene oxide with different reduction routes. *Applied Surface Science*, 513, 145396. doi: 10.1016/j.apsusc.2020.145396
- Sharma, N., Sharma, V., Jain, Y., Kumari, M., Gupta, R., Sharma, S.K. ve Sachdev, K. (2017). Synthesis and characterization of graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO) for gas sensing application. Makromoleküler sempozyumu içinde.

- Sharma, S., Jain, R. ve Raja, A.N. (2019). Pencil graphite electrode: An emerging sensing material. *Journal of The Electrochemical Society*, 167(3), 037501. doi: 10.1149/2.0012003JES
- Shrestha, R. 2010. The Importance of biotechnology in today's time. Aakhayan. A Chapter Scripting Life. <http://raunakms.wordpress.com/2010/06/04/the-importance-of-biotechnology-in-todays-time/> adresinden erişildi.
- Shojaeenezhad, S.S., Farbod, M. ve Kazeminezhad, I. (2017). Effects of initial graphite particle size and shape on oxidation time in graphene oxide prepared by Hummers' method. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 2(4), 470-475. doi: 10.1016/j.jsamd.2017.09.003
- Shokere, L.A., Holden, M.J. ve Jenkins, G.R. (2009). Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA. *Food control*, 20(4), 391-401. doi: 10.1016/j.foodcont.2008.07.009
- Siburian, R., Sihotang, H., Raja, S. L., Supeno, M. ve Simanjuntak, C. (2018). New route to synthesize of graphene nano sheets. *Oriental Journal of Chemistry*, 34(1), 182.
- Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S.N. ve Bawa, A.S. (2008). Functional and edible uses of soy protein products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 7(1), 14-28. doi: 10.1111/j.1541-4337.2007.00025.x
- Situ, C., Mooney, M.H., Elliott, C.T. ve Buijs, J. (2010). Advances in surface plasmon resonance biosensor technology towards high-throughput, food-safety analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(11), 1305-1315. doi: 10.1016/j.trac.2010.09.003
- Song, J., Wang, X. ve Chang, C.T. (2014). Preparation and characterization of graphene oxide. *Journal of Nanomaterials*, 2014. doi: 10.1155/2014/276143
- Soylu, B.B., Erkan, I. ve Yükseloğlu, E.H. (2020). Searching of the genetically modified organisms and their products' status and evaluation of food safety and regulations in Turkey in terms of the Forensic Sciences. *Commagene Journal of Biology*, 4(2), 104-109. doi: 10.31594/commagene.789682
- Sönmezoğlu, Ö.A. ve Keskin, H. (2015). Determination of genetically modified corn and soy in processed food products. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 3, 32-37. doi: 10.7324/JABB.2015.3307
- Sönmezoğlu, Ö.A. ve Terzi, B. (2018). Characterisation of some bread wheat genotypes using molecular markers for drought tolerance. *Physiology and molecular biology of plants*, 24(1), 159-166. doi: 10.1007/s12298-017-0492-1
- Stankovich, S., Dikin, D.A., Piner, R.D., Kohlhaas, K.A., Kleinhammes, A., Jia, Y. ve Ruoff, R.S. (2007). Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon*, 45(7), 1558-1565. doi: 10.1016/j.carbon.2007.02.034
- Strong, M.E., Richards, J.R., Torres, M., Beck, C.M. ve La Belle, J.T. (2021). Faradaic electrochemical impedance spectroscopy for enhanced analyte detection in diagnostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 177, 112949. doi: 10.1016/j.bios.2020.112949
- Sun, J.Z., Peter Kingori, G., Si, R.W., Zhai, D.D., Liao, Z.H., Sun, D.Z. ve Yong, Y.C. (2015). Microbial fuel cell-based biosensors for environmental monitoring: a review. *Water Science and Technology*, 71(6), 801-809. doi: 10.2166/wst.2015.035

- Sun, W., Lu, Y., Wu, Y., Zhang, Y., Wang, P., Chen, Y. ve Li, G. (2014). Electrochemical sensor for transgenic maize MON810 sequence with electrostatic adsorption DNA on electrochemical reduced graphene modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 202, 160-166. doi: 10.1016/j.snb.2014.05.072
- Takepart. 2017. What are GMOs? <http://www.takepart.com/flashcards/what-are-gmos> adresinden erişildi.
- Tamayo, J., Humphris, A.D.L., Malloy, A.M. ve Miles, M.J. (2001). Chemical sensors and biosensors in liquid environment based on microcantilevers with amplified quality factor. *Ultramicroscopy*, 86(1-2), 167-173. doi: 10.1016/S0304-3991(00)00082-6
- Tam, P.D. (2015). Genetically modified organism (GMO) detection by biosensor based on SWCNT material. *Current Applied Physics*, 15(3), 397-401. doi: 10.1016/j.cap.2015.01.017
- Tan, H., Wang, D. ve Guo, Y. (2018). Thermal growth of graphene: A review. *Coatings*, 8(1), 40. doi: 10.3390/coatings8010040
- Tengel, C., Schüßler, P., Setzke, E., Balles, J. ve Sprenger-Haussels, M. (2001). PCR-based detection of genetically modified soybean and maize in raw and highly processed foodstuffs. *BioTechniques*, 31(2), 426-429. doi: 10.2144/01312pf01
- Tertis, M., Leva, P. I., Bogdan, D., Suci, M., Graur, F. ve Cristea, C. (2019). Impedimetric aptasensor for the label-free and selective detection of Interleukin-6 for colorectal cancer screening. *Biosensors and Bioelectronics*, 137, 123-132. doi: 10.1016/j.bios.2019.05.012
- Thapa, K., Liu, W. ve Wang, R. (2022). Nucleic acid-based electrochemical biosensor: Recent advances in probe immobilization and signal amplification strategies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 14(1), e1765. doi: 10.1002/wnan.1765
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and bioelectronics*, 16(1-2), 121-131. doi: 10.1016/S0956-5663(01)00115-4
- Thomas, F. G. ve Henze, G. (2000). *Introduction to voltammetric analysis: theory and practice*. Collingwood: Csiro Publishing.
- Tienne, L.G.P., da Silva Candido, L., da Cruz, B.D.S.M., Gondim, F.F., Ribeiro, M. P., Simão, R.A. ve Monteiro, S.N. (2022). Reduced graphene oxide synthesized by a new modified Hummer's method for enhancing thermal and crystallinity properties of Poly (vinylidene fluoride). *Journal of Materials Research and Technology*, 18, 4871-4893. doi: 10.1016/j.jmrt.2022.04.092
- Topkaya, S.N., Azimzadeh, M. ve Ozsoz, M. (2016). Electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection: Recent advances and challenges. *Electroanalysis*, 28(7), 1402-1419. doi: 10.1002/elan.201501174
- Trifa, Y. ve Zhang, D. (2004). DNA content in embryo and endosperm of maize kernel (*Zea mays* L.): impact on GMO quantification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1044-1048. doi: 10.1021/jf034574+
- Tung Nguyen, C.T., Son, R., Raha, A.R., Lai, O.M. ve Clemente Michael, W.V.L. (2009). Comparison of DNA extraction efficiencies using various methods for the detection of genetically modified organisms (GMOs). *International Food Research Journal*, 16(1), 21-30.

- Turkec, A., Kazan, H., Karacanli, B., Lucas, S.J. (2015). DNA extraction techniques compared for accurate detection of genetically modified organisms (GMOs) in maize food and feed products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 5164-5171. doi: 10.1007/s13197-014-1547-8
- Turner, A.P. (2000). Biosensors--sense and sensitivity. *Science*, 290(5495), 1315-1317. doi: 10.1126/science.290.5495.1315
- Turner, A.P. (2013). Biosensors: sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184-3196. doi: 10.1039/C3CS35528D
- TÜİK, 2022 Türkiye İstatistik Kurumu, Dünya Nüfus Günü, 2022. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Dunya-Nufus-Gunu-2022-45552> adresinden erişildi.
- Ulianas, A., Heng, L.Y., Ahmad, M., Lau, H.Y., Ishak, Z. ve Ling, T.L. (2014). A regenerable screen-printed DNA biosensor based on acrylic microsphere–gold nanoparticle composite for genetically modified soybean determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 190, 694-701. doi: 10.1016/j.snb.2013.09.040
- Vega Rodríguez, A., Rodríguez-Oramas, C., Sanjuán Velázquez, E., Hardisson de la Torre, A., Rubio Armendáriz, C. ve Carrascosa Iruzubieta, C. (2022). Myths and realities about genetically modified food: A risk-benefit analysis. *Applied Sciences*, 12(6), 2861. doi: 10.3390/app12062861
- Ventura-Aguilar, R. I., Bautista-Baños, S., Mendoza-Acevedo, S. ve Bosquez-Molina, E. (2023). Nanomaterials for designing biosensors to detect fungi and bacteria related to food safety of agricultural products. *Postharvest Biology and Technology*, 195, 112116. doi: 10.1016/j.postharvbio.2022.112116
- Verma, M.L., Dhanya, B.S., Saini, R., Das, A. ve Varma, R.S. (2022). Synthesis and application of graphene-based sensors in biology: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 1-24. doi: 10.1007/s10311-022-01404-1
- Vidal, J.C., Bonel, L., Ezquerra, A., Hernández, S., Bertolín, J.R., Cubel, C. ve Castillo, J.R. (2013). Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 146-158. doi: 10.1016/j.bios.2013.05.008
- Vigneshvar, S., Sudhakumari, C.C., Senthilkumaran, B. ve Prakash, H. (2016). Recent advances in biosensor technology for potential applications—an overview. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 4, 11. doi: 10.3389/fbioe.2016.00011
- Vishnu, N. ve Kumar, A.S. (2015). A preanodized 6B-pencil graphite as an efficient electrochemical sensor for mono-phenolic preservatives (phenol and meta-cresol) in insulin formulations. *Analytical Methods*, 7(5), 1943-1950. doi: 10.1039/C4AY02798A
- Vijayakumar, K.R., Martin, A., Gowda, L.R. ve Prakash, V. (2009). Detection of genetically modified soya and maize: Impact of heat processing. *Food Chemistry*, 117(3), 514-521. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.028
- Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J. ve Kroath, H. (1999). Genetically Modified Organisms in Food-Screening and Specific Detection by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5038-5043. doi: 10.1021/jf990353l
- Voiry, D., Yang, J., Kupferberg, J., Fullon, R., Lee, C., Jeong, H.Y. ve Chhowalla, M. (2016). High-quality graphene via microwave reduction of solution-exfoliated graphene oxide. *Science*, 353(6306), 1413-1416.

- Wang, C.F., Sun, X.Y., Su, M., Wang, Y.P. ve Lv, Y.K. (2020). Electrochemical biosensors based on antibody, nucleic acid and enzyme functionalized graphene for the detection of disease-related biomolecules. *Analyst*, 145(5), 1550-1562. doi: 10.1039/C9AN02047K
- Wang, J. ve Kawde, A.N. (2001). Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Analytica Chimica Acta*, 431(2), 219-224. doi: 10.1016/S0003-2670(00)01318-0
- Wang, J., Sheng, Q., Tian, N., Chen, L., Xu, Z. ve Zheng, J. (2009). Electrochemical detection of the neomycin phosphotransferase gene (NPT-II) in transgenic plants with a novel DNA biosensor. *Journal of Applied Electrochemistry*, 39(6), 935-945. doi: 10.1007/s10800-008-9775-0
- Wang, J.X., Sun, X.W., Wei, A., Lei, Y., Cai, X. P., Li, C.M. ve Dong, Z.L. (2006). Zinc oxide nanocomb biosensor for glucose detection. *Applied physics letters*, 88(23), 233106. doi: 10.1063/1.2210078
- Wang, J., Zhang, G., Sun, W., Sun, J., Luo, L., Chang, Z. ve Sun, X. (2016a). Synthesis of ultrastable Ag nanoplates/polyethylenimine-reduced graphene oxide and its application as a versatile electrochemical sensor. *Chemistry-A European Journal*, 22(31), 10923-10929. doi: 10.1002/chem.201601667
- Wang, S., Liu, Q., Li, H., Li, Y., Hao, N., Qian, J. ve Wang, K. (2016b). Fabrication of label-free electrochemical impedimetric DNA biosensor for detection of genetically modified soybean by recognizing CaMV 35S promoter. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 782, 19-25. doi: 10.1016/j.jelechem.2016.09.052
- Wang, W.Y. ve Fang, T. (2005). Development of Multiplex and Quantitative PCR Assay to Detect Genetically Modified Roundup Ready Soybean in Foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13, 132-138.
- Wang, Y., Li, X., Cao, W., Li, Y., Li, H., Du, B. ve Wei, Q. (2014). Ultrasensitive sandwich-type electrochemical immunosensor based on a novel signal amplification strategy using highly loaded toluidine blue/gold nanoparticles decorated KIT-6/carboxymethyl chitosan/ionic liquids as signal labels. *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 618-624. doi: 10.1016/j.bios.2014.05.059
- Wang, Z., Zhang, J., Chen, P., Zhou, X., Yang, Y., Wu, S. ve Zhang, H. (2011). Label-free, electrochemical detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus DNA with reduced graphene oxide-modified electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(9), 3881-3886. doi: 10.1016/j.bios.2011.03.002
- WHO. 2014. Food safety. Frequently asked questions on genetically modified foods. http://www.who.int/foodsafety/areas_work/food-technology/faq-genetically-modified-food/en/ adresinden erişildi.
- Wilfinger, W.W., Mackey, K. ve Chomczynski, P. (2006). Assessing the quantity, purity and integrity of RNA and DNA following nucleic acid purification. *DNA sequencing II optimizing preparation and cleanup*, 291, 312.
- Wu, J.B., Lin, M.L., Cong, X., Liu, H.N. ve Tan, P.H. (2018). Raman spectroscopy of graphene-based materials and its applications in related devices. *Chemical Society Reviews*, 47(5), 1822-1873. doi: 10.1039/C6CS00915H
- Wu, M., Kempaiah, R., Huang, P.JJ., Maheshwari, V. ve Liu, J. (2011). Adsorption and desorption of DNA on graphene oxide studied by fluorescently labeled oligonucleotides. *Langmuir*, 27(6), 2731-2738. doi: 10.1021/la1037926

- Wurz, A., Bluth, A., Zeltz, P., Pfeifer, C. ve Willmund, R. (1999). Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control*, 10(6), 385-389. doi: 10.1016/S0956-7135(99)00080-8
- Wurz, A. ve Willmund, R. (1997). Identification of Transgenic Glyphosateresistant soybeans. Foods Produced by Means of Genetic Engineering 2nd Status Report içinde. Berlin: Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine.
- Xing, X.J., Xiao, W.L., Liu, X.G., Zhou, Y., Pang, D.W. ve Tang, H.W. (2016). A fluorescent aptasensor using double-stranded DNA/graphene oxide as the indicator probe. *Biosensors and Bioelectronics*, 78, 431-437. doi: 10.1016/j.bios.2015.11.076
- Xu, Z., Gao, H. ve Guoxin, H. (2011). Solution-based synthesis and characterization of a silver nanoparticle-graphene hybrid film. *Carbon*, 49(14), 4731-4738. doi: 10.1016/j.carbon.2011.06.078
- Yakimchuk, E., Volodin, V. ve Antonova, I. (2019). New graphene derivative with N-methylpyrrolidone: Suspension, structural, optical and electrical properties. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(23), 12494-12504. doi: 10.1039/C9CP01612K
- Yang, S., Zhang, F., Wang, Z. ve Liang, Q. (2018). A graphene oxide-based label-free electrochemical aptasensor for the detection of alpha-fetoprotein. *Biosensors and Bioelectronics*, 112, 186-192. doi: 10.1016/j.bios.2018.04.026
- Yang, T., Zhou, N., Li, Q., Guan, Q., Zhang, W. ve Jiao, K. (2012). Highly sensitive electrochemical impedance sensing of PEP gene based on integrated Au-Pt alloy nanoparticles and polytyramine. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 97, 150-154. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.04.007
- Yang, Y., Zhang, W., Liu, R., Cui, J. ve Deng, C. (2018). Preparation and photocatalytic properties of visible light driven Ag-AgBr-RGO composite. *Separation and Purification Technology*, 190, 278-287. doi: 10.1016/j.seppur.2017.09.003
- Yardımcı, Y. (2011). Cathodic adsorptive stripping voltammetry of abscisic acid using pencil-lead bismuth-film electrode. *Reviews in Analytical Chemistry*, 30(1), 37-43. doi: 10.1515/revac.2011.011
- Ye, Y., Mao, S., He, S., Xu, X., Cao, X., Wei, Z. ve Gunasekaran S. (2020). Ultrasensitive electrochemical genosensor for detection of CaMV35S gene with Fe₃O₄-Au@Ag nanoprobe. *Talanta*, 206, 120205. doi: 10.1016/j.talanta.2019.120205
- Yi, M. ve Shen, Z. (2015). A review on mechanical exfoliation for the scalable production of graphene. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(22), 11700-11715. doi: 10.1039/C5TA00252D
- Yogeswaran, U. ve Chen, S.M. (2008). A review on the electrochemical sensors and biosensors composed of nanowires as sensing material. *Sensors*, 8(1), 290-313. doi: 10.3390/s8010290
- Yu, N., Wang, Z., Wang, C., Han, J. ve Bu, H. (2017). Combining padlock exponential rolling circle amplification with CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles for microRNA detection by nanoelectrocatalysis without a substrate. *Analytica chimica acta*, 962, 24-31. doi: 10.1016/j.aca.2017.01.069

- Yu, S., Yin, Y., Liu, J. (2013). Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(1), 78-92.
- Yuriyama, M. ve Kushida, T. (2010). Sensor-cloud infrastructure-physical sensor management with virtualized sensors on cloud computing. *13th international conference on network-based information systems* içinde.
- Yusoff, N., Rameshkumar, P., Mehmood, M.S., Pandikumar, A., Lee, H.W. ve Huang, N.M. (2017). Ternary nanohybrid of reduced graphene oxide-nafion@ silver nanoparticles for boosting the sensor performance in non-enzymatic amperometric detection of hydrogen peroxide. *Biosensors and Bioelectronics*, 87, 1020-1028. doi: 10.1016/j.bios.2016.09.045
- Zan, X., Bai, H., Wang, C., Zhao, F. ve Duan, H. (2016). Graphene paper decorated with a 2D array of dendritic platinum nanoparticles for ultrasensitive electrochemical detection of dopamine secreted by live cells. *Chemistry a European Journal*, 22(15), 5204. doi: 10.1002/chem.201504454
- Zeng, H., Yang, Q., Liu, H., Wu, G., Jiang, W., Liu, X. ve Tang, X. (2021). A sensitive immunosensor based on graphene-PAMAM composites for rapid detection of the CP4-EPSPS protein in genetically modified crops. *Food Chemistry*, 361, 129901. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129901
- Zhan, F., Liao, X., Gao, F., Qiu, W. ve Wang, Q. (2017). Electroactive crown ester-Cu²⁺ complex with in-situ modification at molecular beacon probe serving as a facile electrochemical DNA biosensor for the detection of CaMV 35s. *Biosensors and Bioelectronics*, 92, 589-595. doi: 10.1016/j.bios.2016.10.055
- Zhang, C., Wohlhueter, R. ve Zhang, H. (2016). Genetically modified foods: A critical review of their promise and problems. *Food Science and Human Wellness*, 5(3), 116-123. doi: 10.1016/j.fshw.2016.04.002
- Zhang, G., Han, Y., Shao, C., Chen, N., Sun, G., Jin, X. ve Qu, L. (2018). Processing and manufacturing of graphene-based microsupercapacitors. *Materials Chemistry Frontiers*, 2(10), 1750-1764. doi: 10.1039/C8QM00270C
- Zhang, Y. ve Huang, L. (2012). Label-free electrochemical DNA biosensor based on a glassy carbon electrode modified with gold nanoparticles, polythionine, and graphene. *Microchimica Acta*, 176(3), 463-470. doi: 10.1007/s00604-011-0742-9
- Zheng, Y., Karimi-Maleh, H., ve Fu, L. (2022). Advances in Electrochemical Techniques for the Detection and Analysis of Genetically Modified Organisms: An Analysis Based on Bibliometrics. *Chemosensors*, 10(5), 194. doi: 10.3390/chemosensors10050194
- Zhou, F., Xing, D. A., Wu, B., Wu, S., Ou, Z. ve Chen, W. R. (2010). New insights of transmembranal mechanism and subcellular localization of noncovalently modified single-walled carbon nanotubes. *Nano letters*, 10(5), 1677-1681. doi: 10.1021/nl100004m
- Zhou, Q., Lin, Y., Zhang, K., Li, M. ve Tang, D. (2018). Reduced graphene oxide/BiFeO₃ nanohybrids-based signal-on photoelectrochemical sensing system for prostate-specific antigen detection coupling with magnetic microfluidic device. *Biosensors and Bioelectronics*, 101, 146-152. doi: 10.1016/j.bios.2017.10.027



