



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

**AFLATOKSİNLERİN DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN
ELEKTROKİMYASAL DNA SENSÖRLERİ İLE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Songül Gökçe

(201192052010)

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay Çetinus

**SIVAS
KASIM 2018**

Songül Gökçe'nin hazırladığı ve "Aflatoksinlerin DNA ile etkileşimlerinin elektrokimyasal DNA sensörleri ile incelenmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ÇETİNUS
Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi: Prof. Dr. İsa GÖKÇE
Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Jüri Üyesi: Doç. Dr. H. İbrahim ULUSOY
Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi H. Bayram ZENGİN
Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Fatma GEDİKLİ
Gaziosmanpaşa Üniversitesi

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

Prof. Dr. İsmail Çelik
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

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



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F-452 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.



Bütün hakları saklıdır.
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Songül GÖKÇE, 2018

ETİK

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

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

02/11/2018

Songül GÖKÇE

TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Eğitim Fakültesi / İlk Öğretim Bölümü / Fen Bilgisi Eğitimi Anabilim Dalı öğretim üyesi ve sevgili eşim Doç. Dr. Gültekin Gökçe'ye çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarımında yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Şenay Çetinus'a çok teşekkür ederim.

SEM ve AFM görüntülerinin alınmasında yardımcı olan Pakistan Lahor Üniversitesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Akhtar Hayat'a teşekkür ederim.

Her konuda yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen aileme ve sürekli beni destekleyen, sabırla bu zorlu süreci bitirip, vaktimi kendilerine ayırmamı yıllardır bekleyen çocuklarım Melih ve Elif'e çok teşekkür ederim. Ayrıca desteğini esirgemeyen arkadaşım Selda Özüm'e çok teşekkür ederim.

ÖZET

AFLATOKSİNLERİN DNA İLE ETKİLEŞİMLERİNİN ELEKTROKİMYASAL DNA SENSÖRLERİ İLE İNCELENMESİ

Songül GÖKÇE

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şenay ÇETİNUŞ

2018, 141 sayfa

Elektrokimyasal sensör çalışmalarının son yıllarda artış göstermesiyle birlikte, biyomoleküler algılamaya yönelik yeni teknolojilerin oluşturulması gündeme gelmiştir.

Bu çalışmada DNA'nın bazı aflatoksinlerle (B₁, B₂, G₁ ve G₂) olan etkileşimi elektrokimyasal yöntemler kullanılarak incelendi. Çalışmanın ilk aşamasında tek sarmal DNA (ssDNA) ve çift sarmal DNA'nın (dsDNA), kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyine immobilizasyonunda en uygun immobilizasyon süresi ve en uygun DNA derişimi diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak tayin edildi ve immobilizasyon yöntemi olarak ıslak adsorpsiyon tercih edildi. Optimum immobilizasyon süresinin ssDNA ve dsDNA için 25 dakika, optimum ssDNA ve dsDNA derişiminin ise 35 µg/mL olduğu tespit edildi. DNA-aflatoksin etkileşiminde kullanılan PGE'nin karakterizasyonu her modifikasyon basamağından sonra taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), dönüşümlü voltametri (CV) ve elektrokimyasal empedans spektrometri teknikleri ile incelendi. Aflatoksinlerin DNA hibridizasyonuna olan etkisi DPV tekniği ile incelendi ve bunun için bir birinin tamamlayıcısı (komplementeri) olan DNA baz dizileri kullanılarak hibridizasyon öncesi ve sonrasındaki guanin pik akımlarındaki değişimler takip edildi. 2 µg/mL ve 4 µg/mL aflatoksin derişimlerinde guanin yükseltgenme sinyalinde düşüşler sırasıyla B₁ için %28 ve %50, G₁ için %50 ve %60, G₂ için %35 ve %55 olarak bulunmuştur. DNA hibridizasyonuna en yüksek inhibisyonu Aflatoksin G₁ göstermiştir.

Aflatoksinlerin DNA ile tayininde, PGE yüzeyine DNA immobilizasyonu sağlandıktan sonra elektrot yüzeyi bovin serum albumin (BSA) ile tamamen bloklandı ve böylece aflatoksinlerin sadece DNA ile etkileşmeleri sağlandı.

Empedimetrik ölçümler, oda sıcaklığında, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks çözeltisinde alındı ve her bir aflatoksin için tayin sınırı hesaplandı. Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ dsDNA etkileşiminde belirtme sınırı (LOD) 0.030 - 0.085 µg/mL, saptama alt sınırı (LOQ) ise 0.11 - 0.28 µg/mL arasında, Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ ssDNA etkileşiminde ise belirtme sınırı (LOD) 0.035 - 0.117 µg/mL, saptama alt sınırının (LOQ) ise 0.118 - 0.39 µg/mL arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin, Kalem Grafit Elektrot, Hibridizasyon, Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi, Buzağı Timus DNA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF INTERACTIONS OF AFLATOXINS WITH DNA BY ELECTROCHEMICAL DNA SENSORS

Songül GÖKÇE

Ph.D. Thesis

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Şenay ÇETİNUS

2018, 141 page

Designing of new technologies related to biomolecular recognition has been actual phenomena after the increase of electrochemical sensor works.

In this study, the interaction of DNA with some aflatoxins molecules (B₁, B₂, G₁ and G₂) was studied using electrochemical methods. The optimum immobilization time and the optimum DNA concentration were determined using differential pulse voltammetry (DPV) technique in the immobilization of single stranded DNA (ss DNA) and double stranded DNA (ds DNA) to the surface of pencil graphite electrode (PGE) and the wet adsorption method was preferred in the experiments. Optimum immobilization time and optimum DNA concentrations were determined as 25 min and 35 µg/mL in both of ssDNA and dsDNA. Characterization of PGE used in DNA-aflatoxin interaction was carried out by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), cycling voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectrometry techniques after each modification step. The effect of aflatoxins on DNA hybridization was examined by DPV technique by monitoring of the changes in guanine peak currents before and after hybridization using DNA base sequences, which were the targets of each other and concluded that aflatoxins affected the DNA structure and prevented hybridization. The concentrations of 2 µg/mL ve 4 µg/mL aflatoxins guanine peak currents decreased respectively 28% and 50% for Aflatoxin B₁, 50 % and 60% for Aflatoxin G₁, 35% and 55% for Aflatoxin G₂. The highest inhibition of DNA hybridization was observed by Aflatoxin G₁.

In the determination of aflatoxins by DNA sensors, the surface of the electrode was completely blocked with bovine serum albumin (BSA) after DNA immobilization on PGE surface, order to interact aflatoxins only with DNA. Empedimetric

measurements were performed in $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redox solution at room temperature and the limit of detection was calculated for each aflatoxin. LOD and LOQ values were found in range of 0.030 - 0.085 $\mu\text{g/mL}$, 0.11 - 0.28 $\mu\text{g/mL}$ respectively for aflatoxins (B1, B2, G1, G2) - dsDNA interactions. LOD and LOQ values were found range of 0.035 - 0.117 $\mu\text{g/mL}$, 0.118 - 0.390 $\mu\text{g/mL}$ respectively for aflatoxins (B1, B2, G1, G2) -ssDNA interaction.

Key Words: Aflatoxin, Pencil Graphite Electrode, Hybridization, Electrochemical Impedance Spectroscopy, Calf Thymus DNA



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLOLAR DİZİNİ	xvi
KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Aflatoksinler	2
1.1.1. Aflatoksinlerin kimyasal yapısı	3
1.1.2. DNA ile etkileşime girecek olan aflatoksinlerin kimyasal yapıları	4
1.2. DNA ve Yapısı	6
1.2.1. Nükleik asit (DNA) hibridizasyonu ve yöntemleri.....	11
1.3. Elektrokimya	14
1.3.1. Voltametri	16
1.3.1.1. Voltametrik akımlar	20
1.3.1.2. Voltametrik cihazlar	20
1.3.1.3. Polarize/Nonpolarize elektrotlar	21
1.3.1.4. Çalışma elektrotları.....	21
1.3.1.5. Referans elektrotlar.....	24
1.3.1.6. Karşıt elektrot (Yardımcı Elektrot).....	26
1.3.1.7. Voltametri de kullanılan uyarma sinyalleri	27
1.3.2. Elektrotlarda gerçekleşen olaylar.....	32
1.3.2.1. Faraday yasası	32
1.3.2.2. Elektrokimyasal olaylarda faradayik işlemler	32
1.3.2.3. Elektriksel çift katman	33
1.3.2.4. Elektrotlarda kütle taşınım yolları	34
1.3.3. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)	35
1.4. Biyosensörler.....	37
1.4.1. Biyosensörlerde bulunan yapısal kısımlar ve fonksiyonları.....	38
1.4.1.1. Algılama kısmı.....	38
1.4.1.2. Çevirici kısım.....	39
1.4.1.3. Elektronik kısım.....	42
1.4.2. DNA biyosensörleri	42
1.4.2.1. Elektrot yüzeyine DNA immobilizasyon teknikleri	43
1.4.2.2. DNA biyosensörleri ile DNA dizi algılama yöntemleri	44

1.4.2.3. Madde-DNA etkileşimine dayalı DNA biyosensörleri.....	49
1.4.2.4. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler.....	51
1.5. Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM).....	52
1.6. Atomik Kuvvet Mikroskopi (AFM)	54
2. MATERYAL VE METOD.....	55
2.1. Kullanılan Cihazlar.....	55
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	55
2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	56
2.4. Deney Düzenineğinin Hazırlanması.....	57
2.5. PGE yüzeyine DNA immobilizasyonunda uygun etkileşim zamanının tespit edilmesi.....	61
2.6. PGE yüzeyine DNA immobilizasyonunda uygun derişim miktarının tespit edilmesi.....	61
2.7. Aflatoksinlerin DNA hibridizasyonuna etkisinin gözlemlenmesi.....	62
2.8. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile Karakterizasyonu.....	63
2.9. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Atomik Kuvvet Mikroskopi (AFM) ile karakterizasyonu.....	64
2.10. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Dönüşümlü Voltametri (CV) Tekniğı ile İncelenmesi.....	64
2.11. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Empedimetrik Olarak İncelenmesi	65
2.12. Aflatoksin-DNA Etkileşiminde Aflatoksin Miktarının İncelenmesi.....	66
Kalem Grafit Elektrot (PGE)'nun Aktivasyonu:	66
3. BULGULAR	68
3.1. PGE Yüzeyine ct dsDNA ve ct ssDNA İmmobilizasyonunda Uygun Etkileşim Zamanın Belirlenmesine Ait Bulgular.....	68
3.2. PGE Yüzeyine ct dsDNA ve ct ssDNA İmmobilizasyonunda Uygun Derişim Miktarının Belirlenmesine İlişkin Bulgular.....	70
3.3. Aflatoksinlerin DNA Hibridizasyonuna Etkisine Ait Bulgular.....	72
3.4. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile Elektrot Karakterizasyonuna Ait Bulgular	76
3.5. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Atomik Kuvvet Mikroskopi (AFM) ile karakterizasyonuna Ait Bulgular.....	79
3.6. Döngüsel Voltametri (CV) Tekniğı İle DNA-Aflatoksin Etkileşiminde Elektrot Karakterizasyonuna Ait Bulgular	82
3.7. PGE Yüzeyinde DNA-Aflatoksin Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular	84
3.7.1. PGE Yüzeyinde ct dsDNA-Aflatoksin B ₁ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular.....	84

3.7.2. PGE Yüzeyinde ct dsDNA-Aflatoksin B ₂ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular	85
3.7.3. PGE Yüzeyinde ct dsDNA-Aflatoksin G ₁ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular	87
3.7.4. PGE Yüzeyinde ct dsDNA-Aflatoksin G ₂ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular	88
3.7.5. PGE Yüzeyinde ct ssDNA-Aflatoksin B ₁ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular	89
3.7.6. PGE Yüzeyinde ct ssDNA-Aflatoksin B ₂ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular	91
3.7.7. PGE Yüzeyinde ct ssDNA-Aflatoksin G ₁ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular	92
3.7.8. PGE Yüzeyinde ct ssDNA-Aflatoksin G ₂ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular	94
3.8. Aflatoksin-DNA Etkileşiminde Aflatoksin Miktarının Tayin Edilmesine Ait Bulgular	95
3.8.1. Aflatoksin B ₁ -ssDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular	95
3.8.2. Aflatoksin B ₁ -dsDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular	97
3.8.3. Aflatoksin B ₂ -ssDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular	99
3.8.4. Aflatoksin B ₂ -dsDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular	100
3.8.5. Aflatoksin G ₁ -ssDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular	102
3.8.6. Aflatoksin G ₁ -dsDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular	103
3.8.7. Aflatoksin G ₂ -ssDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular	105
3.8.8. Aflatoksin G ₂ -dsDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular	106
4. SONUÇ VE YORUM.....	108
5. KAYNAKLAR	113
ÖZGEÇMİŞ.....	121

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	DNA ve RNA yapısı.	7
Şekil 1.2	DNA'nın moleküler yapısı.	8
Şekil 1.3	Organik bazlar.	9
Şekil 1.4	İnterkalasyona uğrayan DNA.	10
Şekil 1.5	DNA-RNA hibridizasyonu.	12
Şekil 1.6	PCR aşamaları.	14
Şekil 1.7	Elektrokimyasal hücre şeması.	15
Şekil 1.8	Voltamogramı niteleyen büyüklükler.	19
Şekil 1.9	Kalem grafit elektrot.	22
Şekil 1.10	Karbon pasta elektrodu.	23
Şekil 1.11	Perde baskılı karbon elektrot.	24
Şekil 1.12	Doğrusal taramalı gerilim sistemi.	27
Şekil 1.13	Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri.	27
Şekil 1.14	Diferansiyel puls voltametriyi uyarma sinyalleri.	28
Şekil 1.15	Dönüşümlü voltametrizde kullanılan uyarma sinyali.	29
Şekil 1.16	Dönüşümlü voltamogramda akım-potansiyel eğrisi.	30
Şekil 1.17	Elektriksel çift katman.	34
Şekil 1.18	Elektrotlarda kütle taşınım yollarının şematize hali.	35
Şekil 1.19	Reel empedansa (Z') karşı imajiner empedans (Z'') ile oluşturulan Nyquist eğrisi.	36
Şekil 1.20	Bir elektrokimyasal hücrede empedimetrik ölçüm sonrasında oluşan Nyquist eğrisi.	37
Şekil 1.21	Biyosensörün şematik gösterimi.	38
Şekil 1.22	Bir DNA biyosensörünün şematize hali.	43
Şekil 1.23	Kimyasal yapıları gösterilen bazı hibridizasyon indikatörleri.	45
Şekil 1.24	İnterkalatör madde ile DNA dizi algılanması.	46
Şekil 1.25	DNA bazlarından biriyle etkileşen bir indikatör ile DNA dizi algılanması.	47
Şekil 1.26	İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi.	48
Şekil 1.27	Kimyasal yapıları gösterilen Guanin ve İnozin bazları.	48
Şekil 1.28	İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi (İnozinli prop ilkesi).	49
Şekil 2.1	Deney düzeneği ve PGE'nin hazırlanması.	58
Şekil 2.2	Deney basamakları şematik gösterimi.	60
Şekil 3.1	PGE yüzeyine immobilize edilen ct dsDNA'ların farklı sürerlerde etkileşim sonrasında DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyalleri.	68
Şekil 3.2	PGE yüzeyine immobilize edilen ct ssDNA'nın farklı sürerlerde etkileşim sonrası DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyalleri.	69
Şekil 3.3	PGE yüzeyine immobilize edilen farklı derişimlerde ki ct dsDNA'lara ait DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyalleri.	70
Şekil 3.4	PGE yüzeyine immobilize edilen farklı derişimlerdeki ct ssDNA'lara ait DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyalleri.	70
Şekil 3.5	Aflatoksin B ₂ 'in DNA hibridizasyonuna etkisinde hibrit DNA'nın guanin sinyalini.	72
Şekil 3.6	Aflatoksin G ₁ 'in DNA hibridizasyonuna etkisinde hibrit DNA'nın guanin sinyalleri.	74
Şekil 3.7	Aflatoksin G ₂ 'nin DNA hibridizasyonuna etkisinde hibrit DNA'nın guanin sinyalleri.	75

Şekil 3.8.	PGE, DNA-PGE, DNA/BSA-PGE, DNA/BSA/Aflatoksin B ₁ -PGE ve) DNA/BSA/Aflatoksin G ₁ -PGE'ye ait SEM görüntüleri	78
Şekil 3.9	Kalem grafit elektrotun (PGE) AFM görüntüsü.	79
Şekil 3.10	DNA immobilize edilmiş PGE'nin AFM görüntüsü.	80
Şekil 3.11	DNA/BSA modifiye PGE'nin AFM görüntüsü.	80
Şekil 3.12.	DNA/BSA modifiye PGE'nin Aflatoksin B ₁ ile etkileşime girdikten sonraki AFM görüntüsü.	81
Şekil 3.13	DNA/BSA modifiye PGE'nin Aflatoksin G ₁ ile etkileşime girdikten sonraki AFM görüntüsü.	81
Şekil 3.14	Aflatoksin-DNA etkileşiminin etkileşiminin CV tekniği ile ölçümü sonucunda alınan guanin yükseltgenme sinyalleri.	83
Şekil 3.15	Aflatoksin B ₁ ' in dsDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde etkileşimine ait EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi.....	84
Şekil 3.16	Aflatoksin B ₂ ' nin dsDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde etkileşimine ait EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi.....	86
Şekil 3.17	Aflatoksin G ₁ 'in dsDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde etkileşimine ait EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi.....	87
Şekil 3.18	Aflatoksin G ₂ 'nin dsDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde etkileşimine ait EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi.....	88
Şekil 3.19	Aflatoksin B ₁ ' in ssDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde etkileşimine ait EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi.....	90
Şekil 3.20	Aflatoksin B ₂ ' nin ssDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde etkileşimine ait EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi.....	91
Şekil 3.21	Aflatoksin G ₁ ' in ssDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde etkileşimine ait EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi.....	93
Şekil 3.22	Aflatoksin G ₂ ' in ssDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde etkileşimine ait EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi.....	94
Şekil 3.23	ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak ssDNA ve farklı Aflatoksin B ₁ derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı ve kalibrasyon grafiği	96
Şekil 3.24	ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak dsDNA ve farklı Aflatoksin B ₁ derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı ve kalibrasyon grafiği	98
Şekil 3.25	ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak ssDNA ve farklı Aflatoksin B ₂ derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı (A) ve buna ait kalibrasyon grafiği	100
Şekil 3.26	ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak dsDNA ve farklı Aflatoksin B ₂ derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı ve kalibrasyon grafiği	101
Şekil 3.27	ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak ssDNA ve farklı Aflatoksin G ₁ derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı ve kalibrasyon grafiği	103
Şekil 3.28	ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak dsDNA ve farklı Aflatoksin G ₁ derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı ve kalibrasyon grafiği	105
Şekil 3.29	ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak ssDNA ve farklı Aflatoksin G ₂ derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı ve kalibrasyon grafiği	106
Şekil 3.30	ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak dsDNA ve farklı Aflatoksin G ₂ derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı ve buna kalibrasyon grafiği	108
Şekil 4.1	Aktive edilmiş PGE'ye ssDNA ile Aflatoksin B ₁ 'in bağlanmasına ait şematik gösterim.	109
Şekil 4.2	Aktive edilmiş PGE'ye dsDNA ile Aflatoksin B ₁ ' in bağlanmasına ait şematik gösterim.	110

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1 Biyosensörlerin çevirici sistemlere göre sınıflandırılması.	40
---	----



KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
ABS	: Asetat tampon çözeltisi
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskopu
BSA	: Sığır serum albumin
C	: Sitozin
Ct dsDNA	: Calf thymus çift sarmal DNA
Ct ssDNA	: Calf thymus tek sarmal DNA
CV	: Dönüşümlü Voltametri
DCE	: Damlayan Civa Elektrot
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DPV	: Diferansiyel Puls Voltametri
dsDNA	: Çift sarmal DNA
EIS	: Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
G	: Guanin
HPLC	: Yüksek Performansı Sıvı Kromatografisi
IARC	: Dünya Kanseri Araştırmaları Merkezi
LOD	: Belirtme sınırı
LOQ	: Saptama alt sınırı
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGE	: Kalem grafit elektrot
RNA	: Ribonükleik asit
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu

SHE : Standart Hidrojen Elektrot
ssDNA : Tek sarmal DNA
T : Timin
TE : Tris-HCl, EDTA çözeltisi



1. GİRİŞ

Aflatoksin kelimesi onu yapan küfün adından (*Aspergillus flavus*) ve zehir anlamına gelen ‘toksin’ kelimesinden türetilmiştir. İnsan gıdalarında, yemlerde, kuru yiyeceklerde, tahıllarda rutubetin ve sıcaklığında etkisiyle küf türleri hızla ürer ve küf zehiri de denilen mikotoksin ürer. Aflatoksinler, mikotoksinlerin en önemlisidir. Aflatoksinlerinde çeşitleri (B₁ , B₂ , G₁ , G₂ vb) vardır. Aflatoksinler, hem zehirli hem de kanserojen maddelerdir. En zehirlisi Aflatoksin B₁’ dir (Scott, 1978).

Hedefi algılayıcı kısımları ile algılayarak bu etkileşimin ürününü çevirici kısımları ile okunabilir bir sinyale dönüştüren cihazlara sensör denir. Biyosensörler sensörlerin algılayıcı kısmında farklı biyolojik maddelerin kullanılması ile geliştirilmiştir. Antikor gibi bir biyomolekülün sensörün algılayıcı kısmına immobilizasyonu ile biyoafinite sensörleri, enzim immobilizasyonu ile katalitik biyosensörler geliştirilmektedir. Çevirici olarak ise optik, elektrokimyasal, kütle-duyarlı gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma gibi birçok endüstriyel alanda biyosensörler önemli rol oynarlar. Biyosensörler, gıda maddeleri, metabolitler, vitaminler, antibiyotikler, ilaçlar gibi organik maddeler ve bazı anorganik bileşiklerin tayininde de kullanılırlar (Cai vd., 1996).

Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS) esaslı biyosensörler, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerin belirlenmesinde oldukça hassas olduğu tespit edilmiştir. Analitik çözümler sunan EIS, membran özelliklerinin, biyosensör karakterizasyonun belirlenmesi ve biyosensör üretimi gibi çalışmaların yapılmasına imkan sağlar. Bağlanma sonrası gerçekleşen reaksiyon dizileri içermeyen biyomolekül etkileşimlerinde (antijen – antikor, DNA vb.), etkileşimlerden sonra meydana gelen yük transfer değişimlerine bakılarak EIS yoluyla etkileşim belirlenebilir.

EIS’nin UV-görünür bölge spektroskopisi, jel elektroforezi, NMR gibi klasik yöntemlere göre avantajı makromoleküllerin yüzey immobilizasyonunun eş zamanlı izlenebilmesidir.

Nükleik asitler hücrede genetik bilginin taşındığı, eksprese olduğu ve korunduğu merkezi moleküllerdir. Nükleik asitlerin Watson ve Crick tarafından keşfi ve yapılarının aydınlatılması ile birlikte biyomoleküler algılama ve tanı yöntemlerinin

geliştirilmesi için nükleik asitlere dayalı yeni nesil sensör tasarımları ortaya çıkmıştır.

Nükleik asitlerin elektroaktivitesi Palecek tarafından 1960 yılında gösterilmiştir (Palecek, 1960). Yeni nesil (biyo) moleküler algılama sistemlerinden olan elektrokimyasal DNA biyosensörleri, Millan ve Mikkelsen tarafından 1993'te geliştirilmiş, sonrasında bu konu üzerinde pek çok çalışma yapılmıştır.

Elektrokimyasal DNA biyosensörler, tanıma yüzeyi ile etkileşime giren analizi yapılacak maddenin (protein, ilaç, toksin vb.) etkileşim mekanizması ve etkileşim sonucunda DNA'nın ve maddenin yapısındaki değişimlerin elektrokimyasal yöntemlerle analiz edilmesi veya tek sarmal kısa DNA dizilerinin (prop) sensör yüzeyine immobilizasyonu ve karşılığı (hedef) ile eşleşerek hibridizasyonun gerçekleştirilmesi, hibrit ürünlerin de çeşitli elektrokimyasal ölçüm yöntemleriyle okunabilir sinyallere dönüştürülmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Diğer ölçüm yöntemleri ile kıyaslandığında elektrokimyasal yöntemler hızlı sonuç vermeleri, düşük maliyetli ve kolay uygulamalarının olmalarının yanı sıra, seçimli ve duyarlı bir şekilde analiz yapılmasına olanak verdiklerinden avantajlıdır (Palecek, 1988).

Çalışmanın amacı: Bu tez çalışmasında Aflatoksin-DNA etkileşiminin DNA hibridizasyonuna etkisi, diferansiyel puls voltametri (DPV) kullanılarak incelenmiştir. Elektrokimyasal empedans ölçümleri ile elektrot yüzeylerinde meydana gelen empedans değişimleri karşılaştırılarak Aflatoksin-DNA etkileşim özellikleri incelenmiştir. Aflatoksin-DNA etkileşimi yükseltgenme sinyalleri üzerinden, dönüşümlü voltametri (CV) yöntemi ile incelenip değerlendirilmiştir. Ayrıca Aflatoksin-DNA etkileşimi atomik kuvvet mikroskopu (AFM) ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile araştırılmıştır. Çalışmanın her basamağında pH, derişim ve etkileşim süresine yönelik optimizasyon çalışmaları, tayin sınırı, tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır.

1.1. Aflatoksinler

Küflerin ikincil metabolizmaları sonucu sentezlenen toksik maddelere genel olarak "mikotoksin" denilmektedir. Mikotoksinler, esas olarak protein yapısında ve antijen özellikte olan bakteriyel toksinlerin aksine, çok çeşitli kimyasal yapı ve biyolojik aktiviteye sahip maddelerdir. Küflerin hemen her yerde bulunabilmeleri ve birçok

gıda ve yem maddesinde gelişerek toksinlerini oluşturabilmeleri nedeniyle, mikotoksinler çok önemli doğal toksinler olarak kabul edilmektedir (Pohland, 1993). Üzerinde en çok çalışılmış mikotoksin grubu olan aflatoksinler 1960 yılında keşfedilmiş ve 1962 yılında da güçlü bir “hepatotoksik” ve “hepatokarsinojen” etkisi olduğu anlaşılmıştır (Pohland, 1993). Aflatoksinler, insanda karaciğer kanseri oluşturma potansiyeli en fazla olan maddelerdir ve Dünya Kanser Araştırmaları Merkezince (IARC) grup I karsinojenler içinde değerlendirilmektedir (Gündüz, 1998; Hazır vd., 1998; Trucksess vd., 2008). Aflatoksinlerin karaciğer kanseri dışında immün sistemi baskılama, protein metabolizmasında bozulmaya yol açma gibi birçok önemli zehirli etkileride bulunmaktadır (Williams vd., 2004). Aflatoksinler, *Aspergillus flavus*'un bazı suşları, *Aspergillus parasiticus*'un ise hemen hemen bütün suşları tarafından üretilmektedir (Fernandez vd., 2010; Zinedine vd., 2007).

Türk gıda kodeksine göre doğrudan insan tüketimine sunulan veya gıda bileşeni olarak kullanılan gıdalardan bazıları olan yerfıstığı, badem, antepfıstığı, kayısı çekirdeği, fındık, sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri, kurutulmuş meyveler, kırmızıbiber, karabiber, hintceviz, zencefil, zerdeçal için maksimum Aflatoksin $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ limiti $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 'ı geçmemelidir. Maksimum limiti aşan miktarda aflatoksin içeren gıdalar doğrudan insan tüketimine sunulamaz ve piyasaya arz edilemez (Anonim, 2011).

1.1.1. Aflatoksinlerin kimyasal yapısı

Aflatoksinler, “difurokumarosiklopentenon” ve “difurokumarolakton” gruplarında sınıflandırılmıştır. Aflatoksinlerin aflatoksin B_1 , B_2 , G_1 ve G_2 olmak üzere dört ana fraksiyonu bulunmaktadır. Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında aflatoksin B_1 ve B_2 'nin mavi, aflatoksin G_1 ve G_2 'nin ise yeşil floresan vermesiyle ilişkilidir (Groopman vd., 1988; Farkhondeh, 2014). B toksinleri kumarin yapıdaki lakton halkasına eklenmiş siklopentenon halkası, G toksinleri ise ek bir lakton halkası içermektedir.

Toksijenik *A.flavus* kültürleri ve aflatoksin ile kontamine olmuş ürünlerdeki biyolojik aktiviteden aflatoksin B_1 ve daha az olarak da aflatoksin G_1 sorumludur. Bu durum, her iki toksinin terminal furan halkasınının 8, 9 karbon pozisyonunda bir

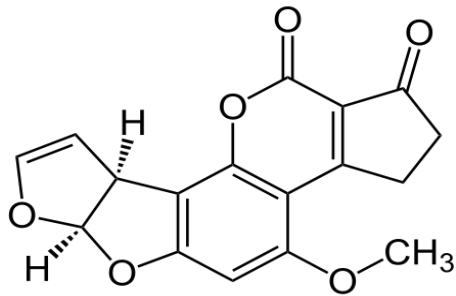
doymamış bağa sahip olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Groopman vd., 1988). Aflatoksin B₂, B₁'in, aflatoksin G₂ de G₁'in dihidro türevleridir ve “in vivo” koşullarda metabolik olarak B₁ ve G₁'e okside olmadıkları sürece biyolojik olarak inaktiftirler. Bu dört aflatoksin dışında aflatoksin M₁ ve aflatoksin M₂ olarak isimlendirilen önemli iki aflatoksin türevi daha bulunmaktadır. Bu toksinler de ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında mavi floresan verirler. Aflatoksin M₁ ve M₂, aflatoksin B₁ ve B₂'nin hidroksi türevleridir, aflatoksin M₂ aynı zamanda, dihidro-aflatoksin M₁'dir

Aflatoksinler, metanol, kloroform ve diğer birçok organik çözücüde çözünebilmektedir. Ancak sudaki çözünürlükleri azdır (10-30 µg/mL). Toksinler, UV ışığını (362 nm) kuvvetle absorblarlar ve aflatoksin B₁ ve B₂ için 425 nm de; aflatoksin G₁ ve G₂ için ise 450 nm de floresan emisyonu oluştururlar. Aflatoksinler gıda ve yem maddelerinde çok stabildir, ancak çok düşük veya yüksek pH'larda (3'den az ve 10'dan büyük), okside edici ajanlarla ve oksijen olan ortamda UV ışığına maruz kaldıklarında hızla aktivasyonlarını yitirirler (Groopman vd.,1988; Stoloff, 1977).

1.1.2. DNA ile etkileşime girecek olan aflatoksinlerin kimyasal yapıları

Aflatoksin B₁

Açık kimyasal formül:



Kapalı Formülü: C₁₇H₁₂O₆

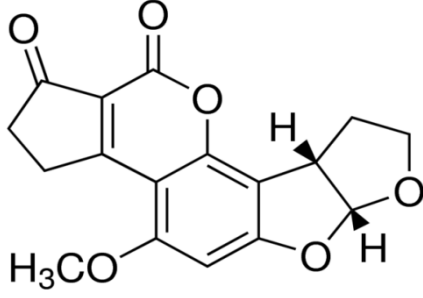
Kimyasal Adlandırma: [2,3,6a α, 9a α -tetrahidro-4- metoksisiklopenta [c] furo [3', 2': 4, 5] furo [2,3-h] [1] benzopiran-1, 11-dion]

Mol Kütle: 312,28 g/mol

Kimyasal Özellikleri: Kristal yapıda olup mavi floresans verir. Erime noktası 268-269 °C dir. Metanol, etanol ve klorofom'da çözünür.

Aflatoksin B₂:

Açık kimyasal formül:



Kapalı Formülü: C₁₇H₁₄O₆

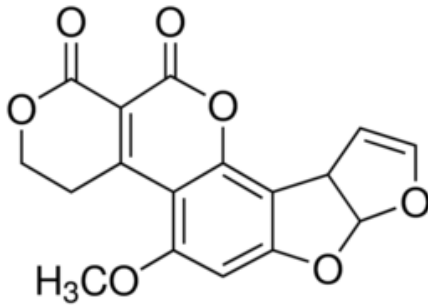
Kimyasal Adlandırma: [2,3,6α, 8,9,9α -hegzahidro-4- metoksisiklopenta[c]furo[3', 2':4, 5] furo[2,3-h] [1] benzopiran-1, 11-dion]

Mol Kütleli: 314,293 g/mol

Kimyasal Özellikleri: Aflatoksin B₁'in 8,9-dihidro türevi olup, kristal yapıdadır. Mavi floresans gösterir. Erime noktası 286-289 °C dir. Kloroform, metanol ve etanolde çözünür.

Aflatoksin G₁:

Açık kimyasal formül:



Kapalı Formülü: C₁₇H₁₂O₇

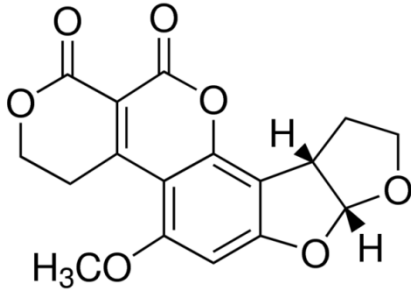
Kimyasal Adlandırma: [3,4,7 α , 10 α - tetrahidro-5-metoksi – 1H, 12H-furo[3', 2': 4, 5] furo[2,3-h] pirano [3,4-c]- [1] benzopiran-1,12 -dion]

Mol Kütlesi: 328,27 g/mol

Kimyasal Özellikleri: Kristal yapıdadır. Yeşil floresansa sahiptir. Erime noktası 244-246 °C dır. Kloroform, metanol ve etanolde çözünür.

Aflatoksin G₂:

Açık kimyasal formül:



Kapalı Formülü: C₁₇H₁₄O₇

Kimyasal Adlandırma: [3,4,7 α , 9, 10, 10 α - hegzahidro-5-metoksi – 1H, 12H-furo[3', 2': 4, 5] furo[2,3-h] pirano [3,4-c]- [1] benzopirano-1,12 -dion]

Mol Kütlesi: 330,29 g/mol

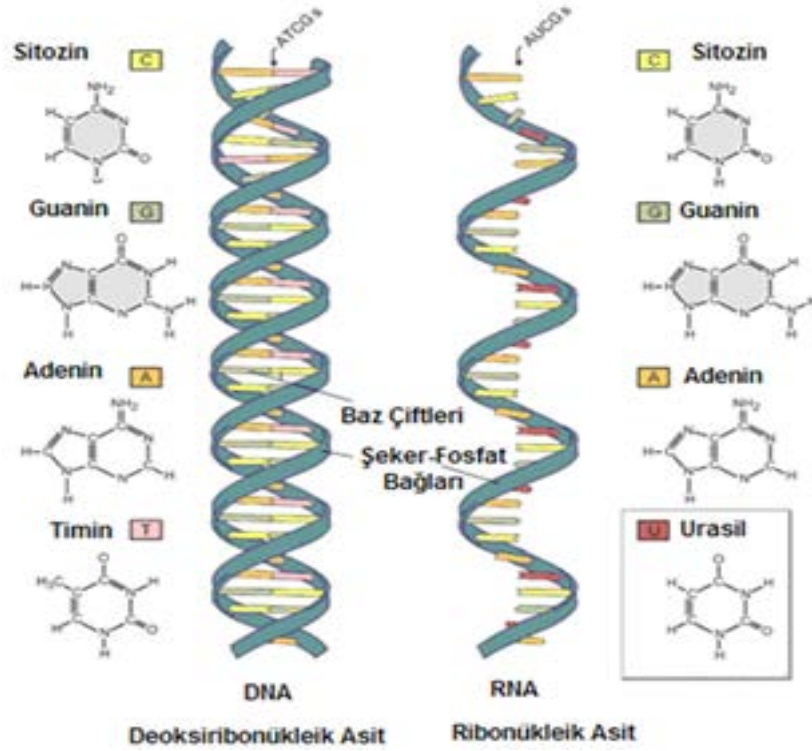
Kimyasal Özellikleri: Aflatoksin G₁'in 9,10- dihidro türevi olup, kristal yapıdadır. Yeşil floresanslıdır. Erime noktası 237-240 °C dır. Kloroform, metanol ve etanolde çözünür.

1.2. DNA ve Yapısı

Nükleik asitler, birçok nükleotidin bir araya gelmesiyle oluşan, genetik bilginin depo edilmesi ve ifadesinden sorumlu olan moleküllerdir.

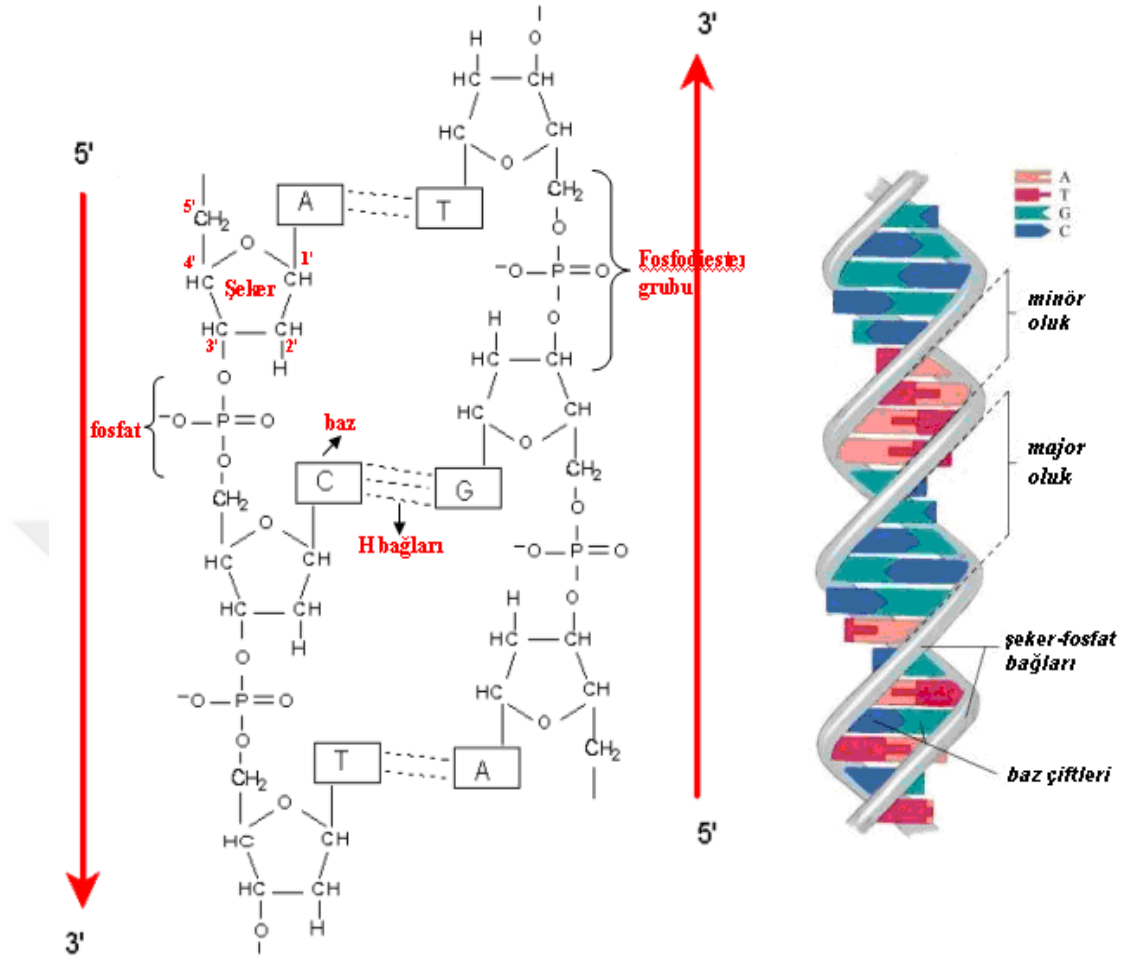
Makromoleküler yapıda şeker ve fosfat birimleri fosfodiester bağı ile birbirine bağlanarak molekülün ana omurgasını meydana getirir. Azotlu bazlar ise iki omurgayı bir arada tutmakla görevlidirler. Kısacası nükleik asitler birçok yapısal ünitenin bir düzen içinde bir araya gelmesi ile meydana gelmiştir.

Kimyasal olarak birbirinden farklı iki nükleik asit bulunmaktadır: Deoksiribonükleik asit (DNA) ve Ribonükleik asit (RNA). Her iki nükleik asit de nükleotidlerin polimerizasyonu ile oluşmaktadır. Ribonükleotidlerin polimerizasyonu RNA oluşumuna neden olurken, deoksiribonükleotidlerin polimerizasyonu DNA molekülünü oluşturmaktadır (Chen vd., 2001).



Şekil 1.1 DNA ve RNA yapısı (Passarge, 2000).

DNA molekülü, iki kollu merdiven şeklindedir ve heliks (sarmal) şeklinde kıvrılmıştır. Şeker (deoksiriboz) ve fosfat molekülleri merdivenin kenarlarını oluşturmaktadır. Fosfat grupları ve deoksiriboz ester bağlarıyla birbirlerine bağlanmış pozisyonlardır. Fosfodiester bağları veya kovalent ester bağları olarak da bilinen bu bağlar son derece kuvvetli bağlardır. Bu bağların varlığı DNA 'nın tek zincirli ikende dayanıklı ve kararlı olmasını sağlamaktadır. Pürinin 9 nolu pozisyonundaki veya pirimidinin 1 nolu pozisyonundaki azot atomu, şekerin 1 nolu pozisyonundaki karbon atomuna N-glikozidik bağ adı verilen bir bağ ile bağlanmaktadır (Chen vd., 2002; Passarge, 2000).

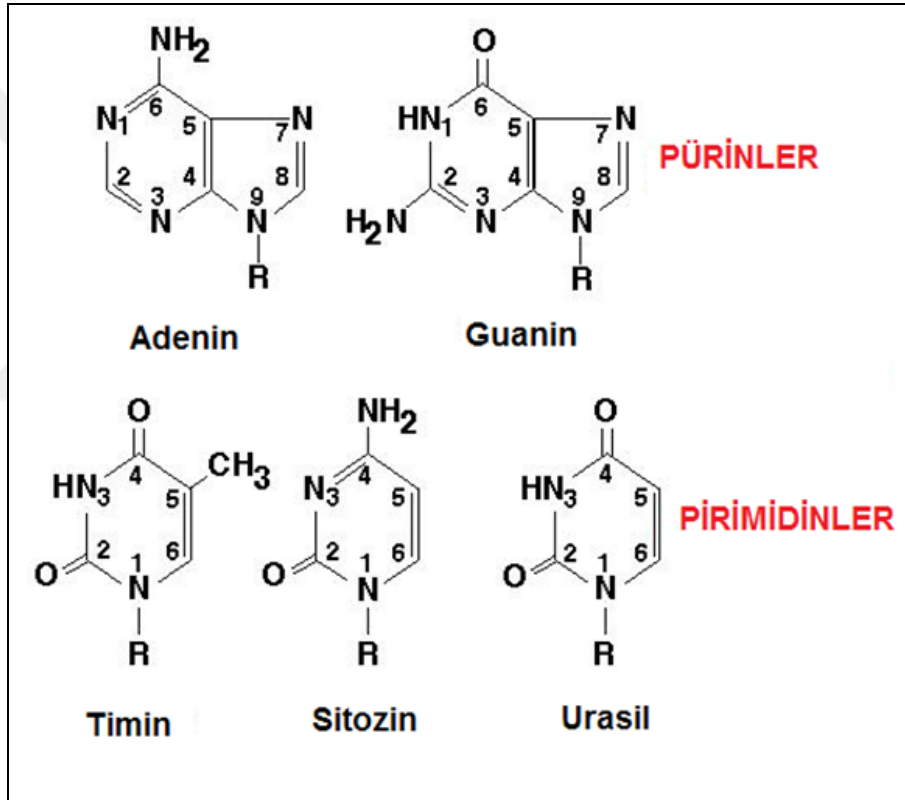


Şekil 1.2 DNA'nın moleküler yapısı (Passarge, 2000).

DNA heliksinde zincirlerin hidrofilik özellik gösteren deoksiriboz fosfat ana iskeleti molekülün dış kısmında yer alırken hidrofobik özellik gösteren bazlar ise içe doğru, heliks eksenine dik olarak yerleşmiştir. Heliksteki bu yerleşim düzeni sarmallar arasında geniş (majör) ve dar (minör) oluk meydana getirir.

Nükleotidler dört çeşittir. Taşıdıkları organik bazlara göre adlandırılırlar (Adenin, Guanin, Sitozin, Timin). Nükleotidler birbirlerine hidrojen bağları ile bağlanmıştır. Hidrojen bağları daima bir pürin (A,G) ile bir pirimidin (T,C) bazı arasından meydana gelir. Adenin ve timin baz çiftleri arasında 2, guanin ve sitozin baz çiftleri arasında ise 3 hidrojen bağı vardır. Hidrojen bağlarının özelleşmesi sayesinde, uygun nükleotid moleküllerinin karşılıklı gelerek birbirlerine uygun sayıda hidrojen bağları ile bağlanması gerçekleşir. Aslında bu tür bir eşleşme rastlantı olmayıp bazların

stereo-kimyasal yapılarına bağlı bir zorunluluktan oluşmuştur. Sarmalın kararlılığı ise bazların kendilerine ait hidrofobik özellikten kaynaklanan çekim güçleri sayesinde sağlanır. Bu özellik molekülün dış kısmının sıvı ortam ile ilişkisini sağlar hem de bazların bir arada kalmasını devam ettirir. Kısacası, iç kısım hidrofobik, dış kısım ise hidrofilik özelliktedir. Bu bağlar kolaylıkla birbirlerinden ayrılabilirler. Çünkü fosfor bağları kadar kuvvetli olmadığı için sıcaklık, basınç ve pH değişikliğinden kolay etkilenirler. Nükleotidler arasındaki hidrojen bağlarının ayrılması ile DNA'nın kendi kopyasını oluşturması ve gen anlatımı meydana gelmektedir (Passarge, 2000).



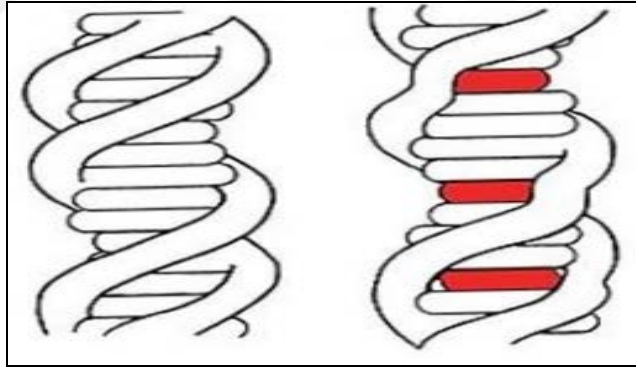
Şekil 1.3 Organik bazlar (Chen vd., 2002).

Nükleotidler bazik olmasına rağmen omurgadaki PO_4^{-3} (fosfat) grubu asittir ve bu polinükleotid zincirlerin asit özellik kazanmalarına yol açar ve nükleik asit adlandırması da bundan ileri gelmektedir. Ayrıca fosfat grubu negatif (-) yüklü olduğundan DNA molekülü de negatif yük ile yüklenmektedir.

DNA'da çift zincirlerin birbirlerinden kolaylıkla ayrılabilmesi (denatürasyon) ve yeniden birleştirilmesi (renatürasyon) DNA'nın önemli bir özelliğidir. Bu özellik sayesinde protein sentezi ve DNA replikasyonu (kendini kopyalaması) meydana gelir. DNA'daki zincirlerin, birbirine hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerle bağlı olmalarından dolayı nükleotidleri arasındaki kovalent bağlarda herhangi bir kopma olmaksızın ayrılabilir (denatürasyon). Denatüre olmuş DNA, uygun şartlar sağlandığında bazları arasında H bağlarının meydana gelmesi sonucu birleşip sarmal yapıyı yeniden oluşturabilir (renatürasyon) (Passarge, 2000).

DNA ile ilgili bazı terimleri tanımlayacak olursak;

İnterkalasyon, düzlemsel halka yapısına sahip olan bazı maddelerin DNA'da bulunan baz çiftleri arasına yerleşerek bu bazlara güçlü bir şekilde bağlanmasıdır (Erdem vd., 2003). Bu etkileşim tersinir ya da tersinmez şekilde maddenin yapısına bağlı olarak meydana gelebilir. İnterkalasyon, DNA'da zincir kırılması sonucunda DNA sentezini ve buna bağlı olarak RNA sentezini de bozmaktadır. İnterkalasyona yapan bu maddeler Topoizomeraz (II) enzimini devre dışı bırakırlar.



Şekil 1.4 İnterkalasyon yapısal distorsiyonlara (yani bir nesnenin şeklinin değişime uğraması) neden olur. Solda, normal DNA ikili sarmalı. Sağda, üç yerde interkalasyon olan bir DNA (koyu bölgeler) (Teles ve Fonseca, 2008).

Mutasyon, Nükleik asitlerdeki baz dizilerinde kimyasal veya radyoaktif herhangi bir mutajen ajan aracılığıyla ya da doğal yollarla oluşan değişimler **Mutasyon** olarak adlandırılır.

Gen, Canlıların normal yaşamlarını devam ettirebilmek ve özelliklerini bir sonraki kuşaklara aktarmak için kullandıkları molekül olan DNA; kalıtımın fiziksel ve

işlevsel birimidir. Ortalama 1500 nükleotitten meydana gelmiştir ve canlının genetik özelliklerinden herhangi birini taşır. Genler, kromozomların belli bir noktasındaki nükleotid dizilerinden meydana gelir (Bej, 1991).

DNA baz dizilişinin yazılımı ile ilgili temel bilgiler

Oligonükleotid: Birden fazla nükleotidin yan yana gelmesiyle oluşur.

Dinükleotidler: İki bazın yan yana gelmesiyle oluşur.

Trinükleotid: Üç nükleotidin yan yana gelmesiyle oluşur.

Tekrarlayan oligonükleotidler: Polimer içindeki tekrarlayan oligonükleotidler, tekrarlayan tek bir bazı, tekrarlayan iki bazı veya üç bazı ifade etmektedir. Tekrarlayan mononükleotide poly (A), dinükleotide poly (AT), trinükleotide poly (GAT) örnek olarak gösterilebilir.

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

Prob: Baz dizisi belli olan oligonükleotidi ifade eder.

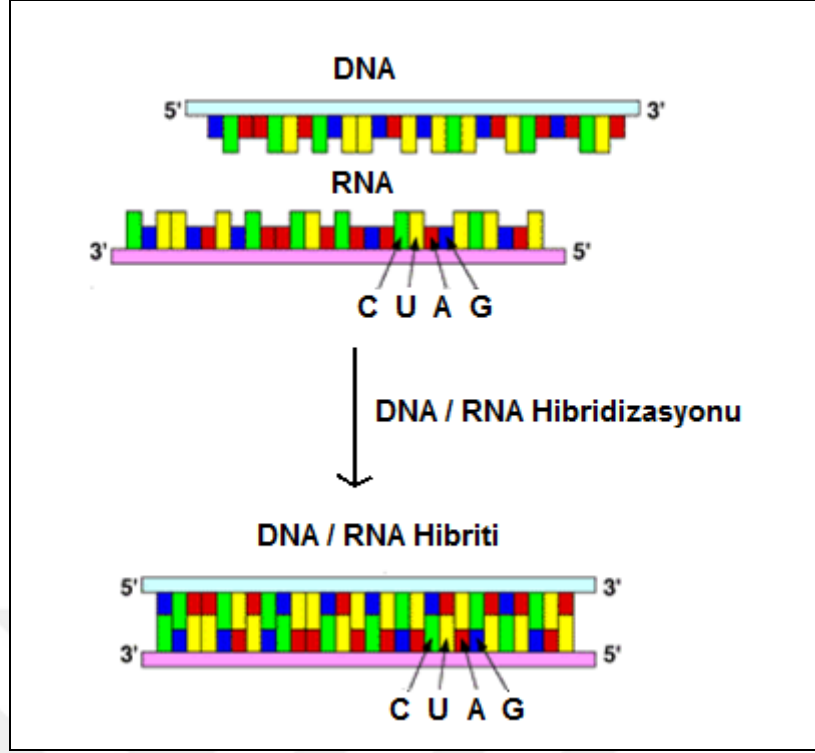
Hedef dizi (Target): Prop dizisinin karşılığı olan oligonükleotidi ifade eder.

Yanlış eşleşen dizi (Mismatch): Bir veya birden fazla bazı hedef diziden farklı olan oligonükleotidi ifade eder.

Rastgele dizi (Non complementary): Hedef diziden tamamen farklı baz dizisine sahip oligonükleotidi ifade eder.

1.2.1. Nükleik asit (DNA) hibridizasyonu ve yöntemleri

DNA hibritleşmesi; Birbirinin eşleniği olan iki adet tek sarmal nükleik asit dizisinin çift sarmallı tek bir yapı haline gelmesi olarak tanımlanır.



Şekil 1.5 DNA-RNA hibridizasyonu (Chen vd., 2002).

Yapay olarak çoğaltılmış ve DNA propları olarak hazırlanmış olan spesifik DNA fragmentlerinin, araştırılacak olan hedef DNA molekülü ile birleştirilmesi işlemine "**hibridizasyon**" denir.

Nükleotidlerin, normal şartlar altında kendi karşılığı olan eşlerine bağlanma özellikleri mevcuttur. DNA'da, Guanin ile Sitozin ve Adenin ile Timin birbirine komplementer bazlardır. Bu yüzden birbirine tamamen komplementer iki adet tek sarmal nükleik asit dizisi kolaylıkla birbirine bağlanır. İki dizilimde tek nükleotidte olabilecek bir farklılık bile bu bağlanmayı zorlaştırır (Passarge, 2000).

Günümüzde en çok kullanılan hibridizasyon yöntemleri şunlardır:

1. Southern blot
2. Northern blot
3. Dot blot
4. PCR

İn vitro koşullarda 15-20 nükleotidlik bir oligonükleotid dizisi (primer) kullanılarak, DNA'nın istenilen bir parçasının sıcaklığa dayanıklı enzim yardımı ile çoğaltılması işlemine polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) denir.

PCR, hücre içinde gerçekleşen doğal replikasyonun bir tüp içinde gerçekleştirilmesi esasına dayanır.

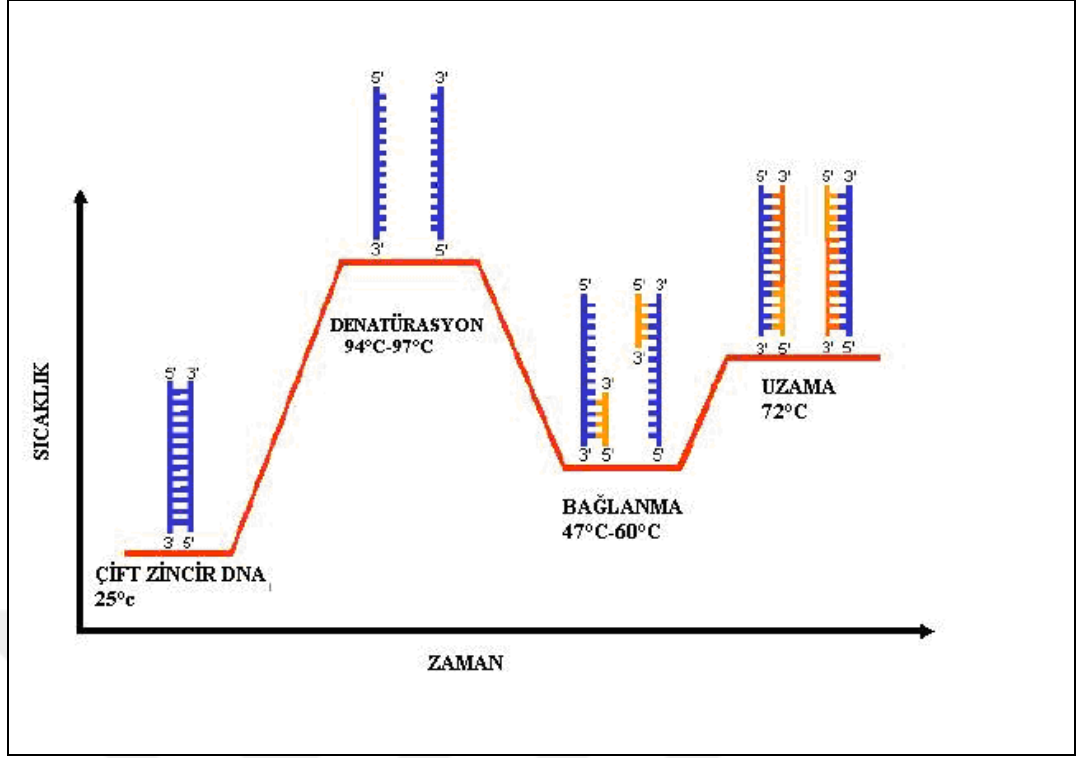
PCR ile DNA'nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımında çoğaltılacak olan kalıp DNA; bu DNA'da çoğaltılması planlanan bölgedeki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan primerler; enzim olarak DNA Polimeraz; sentezde kullanılacak deoksिनükleotid trifosfatlar (dNTP); polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak maddeler yer almalıdır (Chen vd., 2002; Passarge, 2000).

PCR başlıca 3 aşamada meydana gelir:

Hedef DNA'nın denatürasyonu: Gerekli bütün materyaller çok küçük miktarlarda mikrofij (Ependorf, vs.) tüplerine konduktan sonra özel bir alete (Thermal cycler) yerleştirilir. Alet içinde sıcaklık otomatik olarak 95°C'ye yükseltilir. Bu ısıda hedef DNA'ların denatürasyonu (nükleik asitin iki iplikçığının birbirlerinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi) gerçekleşir. Bu işlem, materyalin türüne göre değişmekle birlikte 3-5 dakika kadar sürebilir.

Primerlerin bağlanması: Sürenin sona ermesi ile, alet içindeki sıcaklık 50-52°C'ye indirilerek ortamda bulunan iki tür primerin, her birinin komplementeri olduğu tek iplikçik hedef DNA üzerindeki spesifik sekanslara bağlanması sağlanır. Bu işlem şöyle gerçekleşir, primerlerden biri kendine ait 5'-ucu ile hedef DNA'lardan birinin 3'-ucu ve diğer primerler de, ikinci tek iplikçik DNA'nın, antiparalel yöndeki diğer ucunda bulunan 3'-ucuna bağlanarak, DNA polimerazın çalışma yönüne uygun olarak (5'-3') bağlanırlar. Bu işlemlerin tamamlanması da yaklaşık yine 3-5 dakika kadar sürer.

Polimerizasyon: Bu bağlanma süresi bitince aletin sıcaklığı hemen 70-72 °C'ye yükseltilerek, tüpler içinde bulunan ve ısıya dayanıklı olan DNA polimeraz enzimi vasıtasıyla 5'-3' yönünde olmak üzere, ortamdaki nükleotidler kullanılarak, primerlerin 3'-ucuna nükleotidler yerleştirilir ve böylece hedef DNA sekansının bir kopyası elde edilir. Polimerizasyon tepkimesinde, hedef DNA'nın tek iplikçik sekansları kalıp görevi görür. Bu işlem de yaklaşık 3-5 dakika sürer.



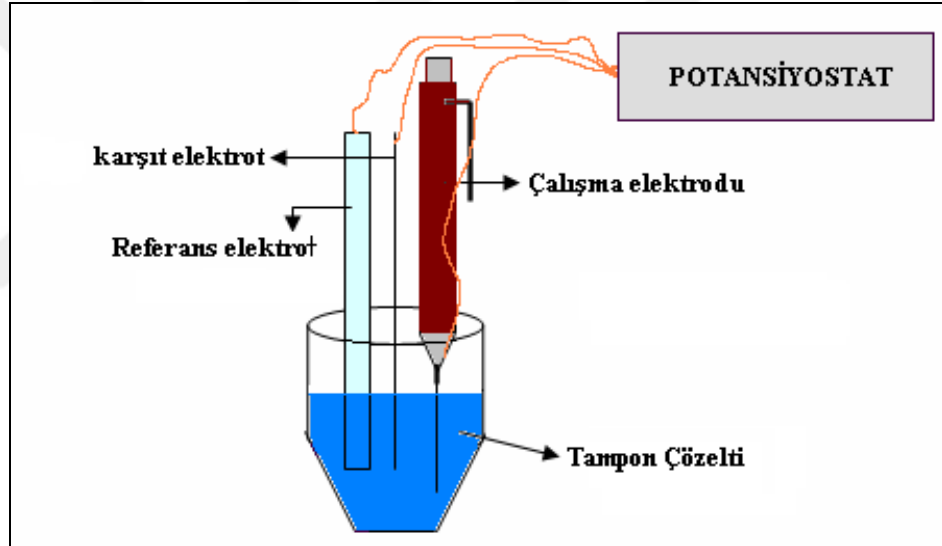
Şekil 1.6 PCR aşamaları (Passarge, 2000).

Böylece, PCR'in 3 aşamadan meydana gelen ve yaklaşık olarak 10–15 dakika kadar süren birinci amplifikasyon aşaması, tekrar sıcaklığının 95°C'ye yükseltilmesi ve aynı aşamaların 25–30 kez tekrarlanması durumunda tek bir hedef DNA segmenti, 2ⁿ formülüne göre, yaklaşık 33,6 milyon kez çoğaltılır (Chen vd., 2002;).

1.3. Elektrokimya

Elektrokimya, maddelerin elektriksel olarak davranışlarını ve elektrik enerjisi kullanılarak kimyasal tepkimeler arasındaki ilişkileri inceleyen bilim dalıdır. Elektrokimya, elektrik enerjisi üreten veya elektrik enerjisi vasıtasıyla oluşan tüm yükseltgenme-indirgenme (redoks) tepkimelerini kapsamaktadır. Maddelerin elektrokimyasal özelliklerini incelemek amacıyla kullanılan yöntemlere "elektroanalitik yöntemler" adı verilir. Elektrokimyasal olay bir redoks reaksiyonudur. Elektrokimyasal olayda, elektrik üretilir veya elektrik akımı yardımıyla bir tepkime meydana gelir. Her redoks reaksiyonu indirgenme ve yükseltgenme yarı reaksiyonundan oluşur (Cheng vd., 1995, Tural vd., 2003).

Elektrokimyasal hücre olarak adlandırılan bir hücrede oluşan ve elektrokimyasal tepkimelerde meydana gelen yükseltgenme (elektron verme)- indirgenme (elektron alma) reaksiyonları gerçekleştikleri elektrotlara göre ayrılırlar. Yükseltgenmenin olduğu elektrot anot, indirgenmenin olduğu elektrot ise katot olarak isimlendirilir. Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi için, analiz edilecek analit maddesini içeren çözelti, maddenin kimyasal değişime uğradığı elektrot sistemi ve bu elektrotların bağlandığı bir çevrim düzeneği (transducer)'ne ihtiyaç vardır. Günümüzde potansiyel düşmesinden kaynaklanan sıkıntılardan kurtulmak için üçlü elektrot sistemleri yaygın olarak tercih edilmekle birlikte ikili elektrot sistemleri de mevcuttur. Elektrokimyasal hücrede iletkenliği sağlamak amacıyla tampon çözelti kullanılır (Tural vd.,2003)



Şekil 1.7 Elektrokimyasal hücre şeması (Brett, 1993).

Elektroanalitik yöntemlerin diğer yöntemlere olan üstünlüklerini sıralayacak olursak;

- Kullanılan cihazlar daha ucuzdur,
- Tekrar edilebilirlikleri yüksek ve hızlıdır,
- Analiz edilecek maddenin çok düşük tayin sınırlarına kadar ulaşılabilir.
- Bu yöntemler, kimyasal türlerin aktiflikleri hakkında bilgi verir.

- Elektrokimyasal analizler genellikle bir elementin yükseltgenme basamağı için spesifiktir (Brett vd., 1993, Skoog vd., 1996).

Bütün elektrokimyasal yöntemlerde, elektriksel etki uygulanan elektrot-çözelti sisteminin elektriksel etkiye verdiği cevap ölçülür. Bütün elektrokimyasal tekniklerin hemen hemen hepsinde akım, zaman ve potansiyel değişkenleri (parametre) yer alır ve tekniğin adında yer verilir. Örneğin, voltametri, kronoamperometri, kronokulometri gibi isimlendirmelerde sırasıyla potansiyel-akım, zaman-akım ve zaman-yük parametrelerinden kullanılan teknik hakkında fikir sahibi olunabilir.

Elektroanalitik ölçümlerde, 2 çeşit ölçüm söz konusudur. Birincisi akımın sıfır veya çok küçük olduğu potansiyelin ölçüldüğü, ikincisi belli potansiyel aralığında tarama yapılması sonucu oluşan akımın ölçüldüğü durumlardır.

Elektroanalitik yöntemlerin en çok kullanılanlarından biri **Voltametri'** dir. İkili elektrot sisteminde kullanılan ikinci elektrot polarlanmayan özelliktedir ve **karşılaştırma elektrodu (referans elektrot)** olarak isimlendirilir. Üçlü elektrot sisteminde kullanılan üçüncü elektrot ise **yardımcı elektrot** olarak isimlendirilir.

Voltametrde farklı tür çalışma elektrotlarının kullanımının yanında farklı tür gerilim kaynakları da kullanılabilir. Doğru akım, alternatif akım, kare dalga akım, döngüsel akım, türleri farklı pulslu akımlar bu amaçla kullanılmaktadır (Bard ve Faulkner., 1980, Vaughan vd., 2001).

1.3.1. Voltametri

Voltametri, çalışma elektrodunun veya indikatörün polarlandığı ortam şartlarında akımın, uygulanan potansiyelin ölçülmesinden yararlanarak, analizi yapılacak madde hakkında bilgi sahibi olunan elektroanalitik metotlara verilen adlandırmadır. Akım-gerilim ve derişim parametreleri arasındaki ilişkinin polarize edilmiş bir çalışma elektrodu ile incelendiği elektroanalitik yöntemlerin genel ismidir. Bir diğer ifade ile elektrot geriliminin değiştirilmesi ile elektrolitik hücreden geçen akımda meydana gelen değişime dayalı elektroanalitik metotların genel ismidir. Çekoslovak Kimyacı Jaroslav Heyrovsky'nin 1920'lerin başında bulduğu polarografiden voltametri geliştirilmiştir. Voltametrinin önemli bir dalı ve özel bir tekniği olan **polarografi**, damlayan civa elektrodu (DCE)'nin çalışma elektrodu olarak kullanılması bakımından diğer voltametri çeşitlerinden farklıdır.

Voltametrde, elektrot-çözelti sistemine elektriksel etki uygulanır. Bu elektriksel etki, karakteristik bir akım yanıtı oluşturur. Bu yanıt elektrot-çözelti sistemi hakkında bize bilgi verir. Uygulanan potansiyele karşı ölçülen akım değerleri grafiği **voltamogram** olarak adlandırılır.

Voltametrde üç elektrotlu sistem kullanılır. Bu üç elektrottan birisi zamana bağlı olarak potansiyeli değiştirilen çalışma elektrodu veya indikatör elektrottur. Voltametrde çalışma elektrodu olarak, karbon elektrot (grafit, karbon pasta, camı karbon, perde baskılı karbon elektrot), civa, platin, altın, paladyum gibi elektrotlar kullanılır. Elektrotlardan ikincisi, deney sırasında potansiyeli sabit olan referans elektrottur. Referans elektrot olarak genellikle doymuş kalomel elektrot veya Ag/AgCl elektrot kullanılır. Sistemdeki üçüncü elektrot ise genellikle Pt tel kullanılan karşıt veya yardımcı elektrottur.

Voltametri, çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme-indirgenme işlemlerinin, yüzeylerdeki adsorpsiyon işlemlerinin, kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerindeki elektron aktarım mekanizmalarının ve moleküler oksijen tayini ile farmasötik açıdan önemli türlerin tayini gibi uygulama çalışmalarında duyarlı ve güvenilir bir yöntemdir (Bard ve Faulkner., 1980; Skoog vd., 1996; Tural vd., 2003; Yıldız ve Genç., 1993).

Voltametrde akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucu meydana gelir. İndirgenme sonucu oluşan akım **katodik akım**, yükseltgenme sonucu oluşan akım ise **anodik akım** olarak adlandırılır. Genel olarak, katodik akımlar pozitif, anodik akımlar ise negatif işaretlerle gösterilir.

Bir voltamogramı niteleyen üç temel büyüklük vardır. Bunlar **sınır (limit) akım**, **artık akım** ve **yarı dalga potansiyeli**'dir. Voltametrik dalga olarak bilinen doğrusal taramalı voltamogramlar genellikle sigmoidal şekilli eğrilerdir. Bu sigmoidal şekil uygulanan gerilime karşı ölçülen akım arasında çizilen eğrilerdir. Dik artışın ardından gelen ve sabit kalan bu akıma difüzyon kontrollü akım veya basitçe **sınır akım**, i_s , denir. Bu akım elektrot yüzeyinde elektroaktif türün derişiminin sifıra indiği andaki akım değeridir ve potansiyelden hemen hemen bağımsızdır. Bu akım, analitin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızındaki sınırlamadan kaynaklanır ve genellikle analitin derişimi ile doğru orantılıdır.

$$i_s = k \cdot C_A$$

[1.1]

Burada k bir sabittir ve C_A analit konsantrasyonudur.

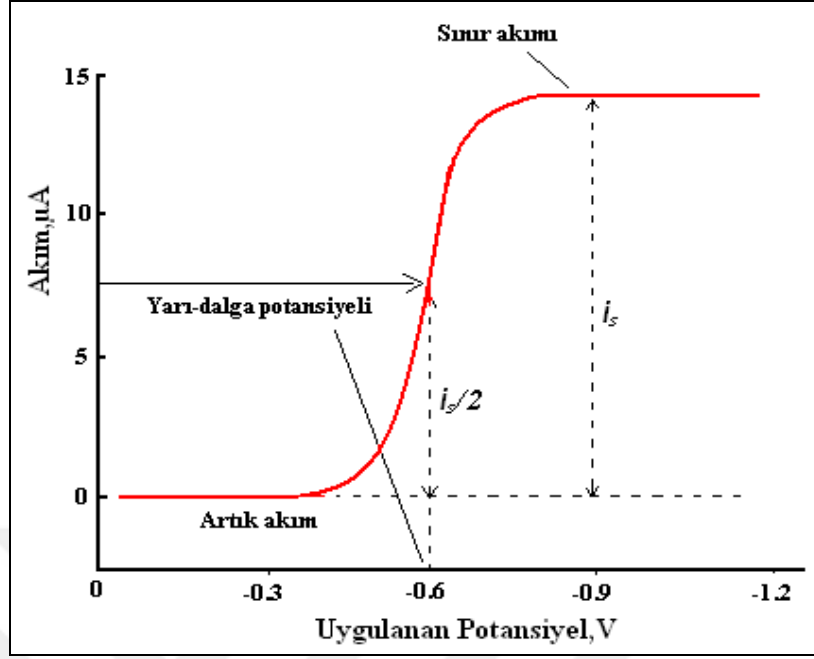
Elektroetkin olmayan ve derişimi elektroetkin iyonun derişiminin 50–100 katı olacak şekilde çalışma ortamına bir elektrolit ilave edilirse kütle taşınımını büyük oranda üstleneceğinden elektroetkin iyonun göç akımı yok sayılacak düzeye indirgenebilir. Bu görevi üstlenen ve elektroetkin olmayan elektrolit, *destek elektrolit* olarak tanımlanır.

Destek elektrolit göçü üstlenir ayrıca elektrokimyasal pilin iletkenliğini de sağlar. Direnci düşürdüğü için ohmik düşmeden kaynaklanan problemleri de azaltır. Elektroetkin safsızlıkların artık akımı arttırabilme ihtimali istenmeyen bir durumdur. Bu nedenle destek elektrolitler safsızlık içermemeli veya en az düzeyde olmalıdır.

Artık akım, elektrot üzerinde henüz reaksiyon olmadığı zaman küçük de olsa görülen akımdır. Artık akımın büyüklüğü yöntemin ne kadar duyarlı olduğunu belirler. Bu akım giderildiği veya minimuma indirildiği oranda duyarlılıkta artar. Duyarlılığı arttırma doğrusal tarama dışındaki bazı özel yöntemlerle olasıdır (puls, diferansiyel puls, kare dalga, alternatif akım voltametreleri gibi).

Dalga yüksekliği, sınır akımı ile artık akım arasındaki yüksekliktir ve dalga yüksekliği elektroetkin maddenin derişimi ile doğrusal olarak artar.

Yarı dalga potansiyeli ($E_{1/2}$) ; Sınır akımının yarısına ($i_s/2$) karşılık gelen potansiyel değeridir. Reaksiyonun standart potansiyeli ile yakından ilgili bir büyüklüktür. Bu değer elektroetkin maddenin türüne ve ortama bağlı sabit bir değerdir ve genellikle derişimden bağımsızdır. Bu nedenle türleri nitelemede kullanılır.



Şekil 1.8 Voltamogramı niteleyen büyüklükler (Tural vd., 2003).

Potansiyel uygulanan bir elektrot sisteminden iki çeşit akım geçer. Bunlar kapasitif akım ve faradayik akımdır.

Kapasitif akım (Faradayik Olmayan Akım) (i_c), bir elektrot elektrolit çözeltisine daldırıldığında negatif yüklenir ve sonuç olarak çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilirler. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. (+) ve (-) yüklerin ara yüzeyin iki tarafında birikmesi sonucu bu bölgede elektriksel çift tabaka oluşmuş olur. Oluşan çift tabaka, kapasitör görevi yapar. Kapasitör görevi yapan çift tabakayı yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya indirgenecek madde olmasa bile bir akım meydana gelir. Reaksiyondan bağımsız olarak sistemden kaynaklanan bu akım **Kapasitif akım** olarak tanımlanır. Bu akım ne kadar düşükse, ölçüm o kadar doğru yapılmış demektir. Kapasitif akım fon akımının oluşmasına yol açan etmenlerden biridir.

Faradayik akım (i_f), reaksiyondan (analiz edilecek maddeden) kaynaklanan akımdır.

Toplam akım(i)= faradayik akım(i_f) + kapasitif akım(i_c) olduğundan kapasitif akım azalır ise duyarlılık artar.

Genellikle 10^{-3} M ve üstünde kapasitif akım faradayik akımdan küçüktür ve çalışılabilir. 10^{-4} M da kısmen iyi sonuç alınır. 10^{-5} M ve üzerinde kapasitif akım faradayik akımdan çok büyük olacağı için çalışılmaz (Bard ve Faulkner., 1980; Skoog vd., 1996; Yıldız ve Genç., 1993).

1.3.1.1. Voltametrik akımlar

Bir elektroliz işleminde akım, analitin difüzyon tabakasının dış kısmından elektrot yüzeyine taşınma hızı ile kontrol edilir ve bu hız $\partial C_A / \partial X$ ile verilir. Burada X, cm cinsinden elektrottan olan uzaklığı gösterir. Düzlemsel bir elektrot için akım,

$$I = nFD_A (\partial C_A / \partial X)A \quad [1.2]$$

şeklinde ifade edilebilir. Burada:

I = Akım (Amper),

n= Analitin molü başına elektronların mol sayısı,

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

A =Elektrotun yüzey alanı (cm^2),

D_A = A' nın difüzyon katsayısı ($\text{cm}^2 / \text{s}^{-1}$),

C_A = A'nın derişimi (mol/cm^3)

Oluşan difüzyon akımının zamana karşı fonksiyonu **COTTRELL DENKLEMİ** ile ifade edilir (Skottrup vd., 2008).

$$I(t) = F \cdot A \cdot C_A (D_A / \pi t)^{1/2} \quad [1.3]$$

1.3.1.2. Voltametrik cihazlar

Elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolit olarak adlandırılan elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan oluşur. Bu çalışma elektrodunun potansiyelini sabit tutma amaçlı kullanılan ve “Potansiyostat” olarak isimlendirilen alete bağlı bir sistemdir (Bard ve Faulkner., 1980; Skoog vd., 1996; Tural vd., 2003; Yıldız ve Genç., 1993).

1.3.1.3. Polarize/Nonpolarize elektrotlar

Akım altında çalışılırken, başka bir deyişle bir pilden akım çekilmesi ya da pile dışarıdan akım uygulanması sırasında, elektrotlarda yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri oluşur. Bu tepkimeleri gerçekleştirebilen maddelere *elektroetkin maddeler* denir. Yükseltgen ya da indirgen türler çözeltide solvatasyona uğramalarının yanında, çözeltide bulunan diğer türlerle kimyasal tepkime de verebilirler. Bu tepkimeler elektron aktarma hızından daha hızlı ya da daha yavaş gerçekleşebilir. Bu hızlara bağlı olarak elektroetkin türün elektrot yüzeyindeki derişimi değişim gösterir. Böylece elektrodun niteliğinde de değişiklik görülür. Bir diğer ifade ile elektrodun potansiyeli denge değerinden farklı bir değer alır. Bu tür elektrotlar *polarize (polarlanmış) elektrotlar* olarak adlandırılır. *Polarize olmayan (polarlanmayan, nonpolarize) elektrotlar* olarak tanımlanan elektrotlar ise devreden akım geçmesine rağmen potansiyelinde değişim görülmeyen elektrotlardır (Vaughan vd., 2001).

1.3.1.4. Çalışma elektrotları

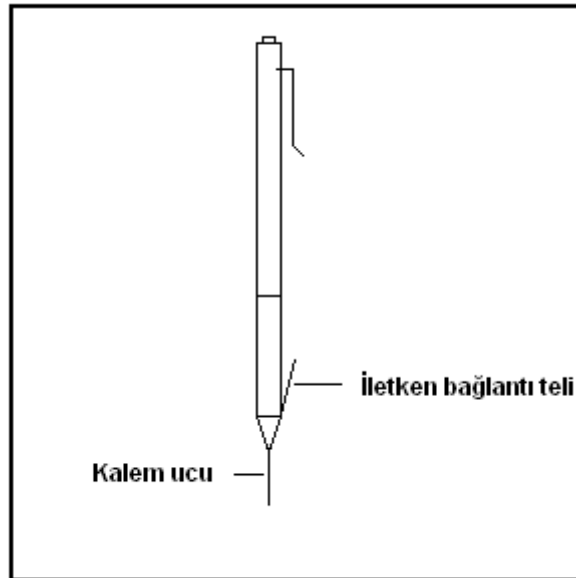
Yüzeyinde analizi yapılacak maddenin yükseltgendiği veya indirgendiği, zamanla potansiyeli analit derişimindeki değişimlerle beklenen şekilde değişen elektrot "*Çalışma elektrodu*" olarak adlandırılır. Çeşitli tür ve şekilde çalışma elektrotları kullanılmaktadır. Bunlar karbon bazlı katı elektrotlar, civa, platin, altın, bizmut ile modifiye elektrotlardır. Çalışma elektrotları kimyasal ve elektrokimyasal özellikleri açısından önemlidir. Bu elektrotlar polarlanabilen elektrot olmalıdırlar. Genellikle, çalışma elektrotlarının yüzeyleri küçük tutulur. Buradaki amaç polarizasyonu arttırmaktır.

Çalışma elektrodunun yapımı için kullanılan iletken malzeme, altın veya platin gibi inert bir metal, camsı karbon, karbon ya da pirolitik grafit, kalay oksit veya indiyum oksit gibi yarı-iletken ya da civa filmi ile kaplanmış bir metal olabilir. Durağan ya da döndürülerek kullanılabilen bu elektrotların her birinin potansiyel çalışma aralığı birbirinden farklıdır. Bu potansiyel aralığı sadece elektrot türüne bağlı olmayıp, aynı zamanda çözücü, kullanılan elektrolit türü ve pH gibi faktörlere de bağlıdır. Pozitif potansiyel (anodik) sınır ise elektrot materyalinin ya da çözücünün yükseltgenmesi, negatif potansiyel (katodik) sınır destek elektrolitin indirgenmesi

veya hidrojenin oluşumu ile belirlenir (Skoog vd., 1996; Tural vd., 2003; Vaughan vd., 2001; Yıldız ve Genç., 1993).

Karbon elektrotlar, tekrarlanabilir yüzey yapısı, geniş bir anodik potansiyel aralığı, düşük artık akım, düşük elektriksel direnç gibi birçok özelliğinden dolayı karbon tercih edilen bir elektrot malzemesidir. Karbon elektrot çeşitleri camsı karbon, karbon pasta, grafit elektrot ve karbon film şeklinde sıralanabilir (Vaughan vd., 2001).

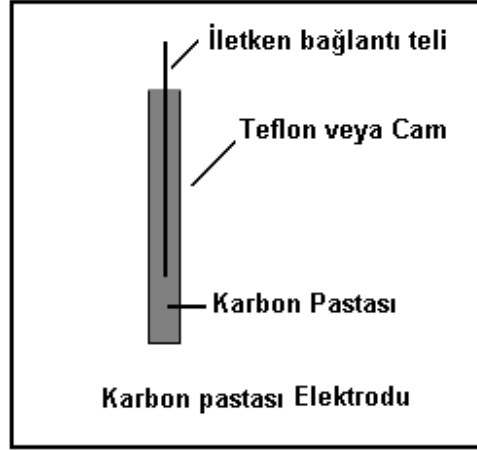
Grafit elektrotlar, elektrokimyasal çalışmalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Grafit ve elektro-grafit çubuklar grafit kömüründen yapılır. Daha toz ve sıkı bir yapısı vardır. Grafit elektrot olarak genellikle kalem grafit elektrotlar kullanılmaktadır. Kalem grafit elektrotlar tek kullanımlıktır ve kullanımı kolaydır. Bu elektrotlarla alınan sonuçlar değerlendirildiğinde düşük tayin sınırlarına ulaşılabildiği ve daha tekrarlanabilir sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir (Wang vd., 2001).



Şekil 1.9 Kalem grafit elektrot (Karadeniz vd., 2003).

Karbon pasta elektrotlar için pasta hazırlanırken organik bir sıvı (mineral yağ) ile toz grafit karıştırılır. Hazırlanan pasta sıkıştırılarak bir tüp içine doldurulur. Bakır ya da platin tel elektriksel bağlantıyı sağlamak için kullanılır. Oldukça geniş bir

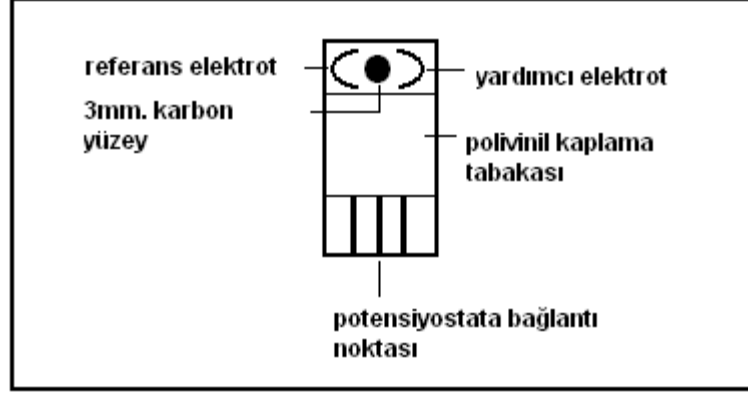
potansiyel aralığında çalışmak karbon pasta elektrotlar ile mümkündür. Yapılmaları ve yenilenmeleri için geçen süre kısa olup zemin akımları da oldukça düşüktür.



Şekil 1.10 Karbon pasta elektrodu (Vaughan vd., 2001).

Camsı karbon elektrotlar, özel bir yöntemle gözenek büyüklüğü azaltılarak elde edilirler. Camsı karbon elde ederken bazı polimerler yaklaşık 1800 °C'de ısıtılarak bozunmaya uğratılırlar. Yapısı sert bir malzeme olduğu için her seferinde parlatılabilir. +0,65 V' da bir ön polarizasyon işlemi uygulandıktan sonra kullanıma hazır hale gelirler. Bu elektrotlara yüksek performans kromatografisinde ve akışkan sistemlerde de dedektör olarak çok geniş yer verilir (Vaughan vd.,2001).

Tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar son yıllarda çok yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu elektrotlar ile özellikle biyosensör teknolojisinin geleceği olan DNA mikroçip teknolojisine uygulanabilirlik açısından oldukça başarılı sonuçlar alındığı için geleceğin elektrotları olarak gösterilmektedir (Mannelli vd., 2005).



Şekil 1.11 Perde baskılı karbon elektrot (Lucarelli vd., 2002).

Civa elektrotlar, her damlada yenilenen elektrot yüzeyi içerirler. Üzerinde hidrojenin çıkış potansiyelinin aşırı büyük olmasından dolayı, oldukça geniş bir katodik çalışma potansiyel aralığına sahiptirler. Ayrıca metallerle amalgam oluşturma özelliklerinden dolayı, metal iyonlarının metalik halde ön deriştirilmesini de sağladıkları için voltametri de oldukça geniş bir kullanım alanı bulmuşlardır.

Bu elektrotların tek dezavantajı; anodik çalışma bölgesindeki darlıktır. Daha pozitif potansiyelerde gerçekleşen yükseltgenme olaylarının incelenmesi gerektiğinde elektrot çalışma penceresinin izin vermesi hususunda sorunlar doğar. Bu nedenle elektrot malzemesinin anodik çözünmesinin daha pozitif potansiyelerde olması gerekir.

Civa elektrodunun; damlayan civa elektrot, disk elektrot, asılı civa damla elektrot, durgun civa damla elektrot gibi çeşitleri mevcuttur (Vaughan vd., 2001).

1.3.1.5. Referans elektrotlar

Anot olarak ele alınan referans elektrotlar, analit çözeltisinin bileşiminden bağımsızdır ve sabit elektrot potansiyeline sahiptir. Hemen hemen hiç akım geçirmemesinin sebebi elektrik direncinin çok büyük olmasıdır. Potansiyelleri iyi bilinir ve zamana karşı kararlı davranış gösterirler. Referans elektrotlar, metal/metal iyonu az çözünen tuzlardan meydana gelirler. Referans elektrot olarak genellikle Ag/AgCl veya Kalomel elektrot kullanılır.

Referans elektrottan istenen Referans elektrottan istenen özellikler şunlardır; potansiyelin sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olmalı, kolay hazırlanmalı, belli bir akım aralığında tersinir davranmalı, içinden küçük akımlar geçtiğinde bile gerilimi sabit kalmalı, potansiyeli zamanla değişmemeli, polarize edilmeyen bir elektrot olmalı, Nernst eşitliğine uymalı, doğru ve tekrarlanabilen bir potansiyel değerini hızlı bir şekilde okumalıdır (Tural vd., 2003; Vaughan vd., 2001; Yıldız vd., 1993). Standart hidrojen elektrot (SHE), gümüş-gümüş klorür elektrot (Ag/AgCl), kalomel elektrot (Hg/Hg₂Cl₂), civa-civa (1) sülfat elektrot referans elektrot olarak kullanılır.

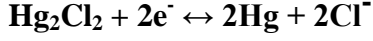
Elektrot potansiyeli her sıcaklıkta sıfır kabul edilen Standart Hidrojen Elektrodun kullanım amacı, potansiyeli bilinmeyen herhangi bir elektrodun standart potansiyelini belirlemektir. Elektrotun hazırlanma aşaması zor olduğu için kullanımı pek uygun değildir (Vaughan vd., 2001).

Gümüş-Gümüş Klorür referans elektrot (Ag/AgCl), referans elektrot olarak çok tercih edilen elektrotlardandır. Gümüş-gümüş klorür referans elektrot, gümüş klorür ile doyurulmuş potasyum klorür çözeltisine gümüş elektrodun daldırılmasıyla elde edilir (Pumera vd., 2007). Gümüş-gümüş klorür referans elektrodunun yüksek sıcaklıklarda kullanılabilmesi, civa (I) iyonlarına göre gümüş iyonlarının daha az sayıda analitle reaksiyona girmesi doymuş kalomel elektroda göre bir avantajdır.

Laboratuarda bir gümüş-gümüş klorür referans elektrodu kolaylıkla yapılabilir. Bir tüpün en alt kısmına plastik veya cam malzemedan yapılmış poröz bir tıpa yerleştirilir. Üzerine çözeltinin sızmasını önlemek için KCl çözeltisince doymuş bir agar köprüsü, onun üzerinede katı KCl konur. En üstte de içine 1–2 damla AgNO₃ damlatılmış doymuş KCl çözeltisi yer alır. Bu çözeltinin içine ucu AgCl ile kaplanmış bir gümüş tel veya sadece gümüş tel daldırılır.

Doymuş KCl çözeltisi kullanıldığı zaman Standart Hidrojen Elektrot (SHE)'a karşı 25 °C'de +0,222 voltluk bir potansiyel gösterir (Skoog vd., 1996; Tural vd., 2003; Vaughan vd., 2001; Yıldız ve Genç, 1993).

Kalomel referans elektrodun da, Gümüş-Gümüş Klorür elektrodu gibi kullanımı oldukça yaygındır. Elektrotta,

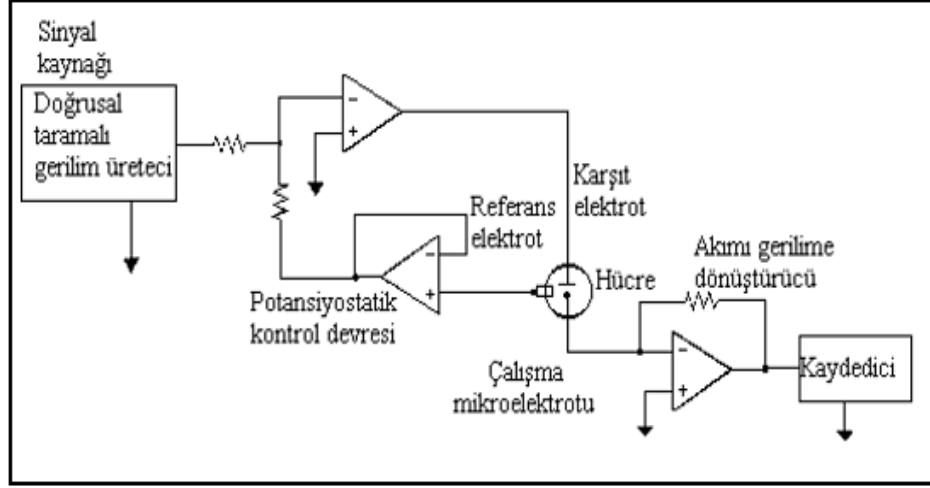


Tepkimesi meydana gelir. Tepkimenin potansiyeli ortamdaki klor iyonu derişimine bağlıdır. Sıcaklık değişiminde potansiyelinde fazla değişim olmasının yanında akım alınmalarına karşı çok dayanıklı bir elektrottur. Kalomel referans elektrotun laboratuarda hazırlanması kolaydır. Yalnız elektrodun dengeye gelmesi için hazırlandıktan sonra birkaç gün bekletilmesi gerekmektedir. Doymuş KCl çözeltisi kullanıldığı zaman SHE'na karşı 25 °C'de +0.244 voltluk bir potansiyel gösterir (Evans, 1991; Mutlu, 2002; Vaughan vd., 2001).

Civa-Civa (1) Sülfat referans elektrotta sülfat iyonlarının aktifliği sayesinde elektrot potansiyeli ortaya çıkar (Vaughan vd., 2001).

1.3.1.6. Karşıt elektrot (Yardımcı Elektrot)

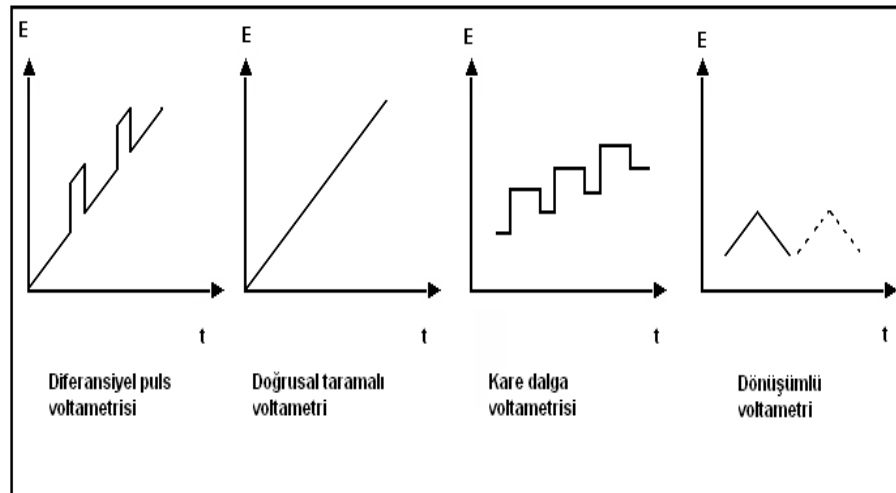
Yüksek akımlarda elektrotların polarlanmasının sebebi, ikili elektrot sistemindeki nonpolarize elektrot üzerinden akım geçmesidir. Ayrıca yüksek çözelti direnci varsa bu direnci yenmek için gerekli olan potansiyel önemli bir seviyeye ulaşır ve bunlar çalışma elektrodunun polarizasyon potansiyelinin algılanmasında sorun yaşanmasına sebep olur. Bu sorunun çözümü için sistemde üçüncü bir elektrot kullanımına gidilir. Bu üçüncü elektrot karşıt elektrottur. Bu karşıt elektrot çalışma elektrodu ile birlikte çalışır. Çalışma elektrodunu elektronlarla besler, ortamda olmaması gereken akımların üzerinden geçmesini sağlar, çözülden geçerek çalışma elektroduna ulaşması gereken elektriğin aktarımında önemli rol oynar. Platin, grafit, tantal ya da tungsten tel çubuklar karşıt elektrot olarak kullanılır çünkü akım karşıt elektrotlar üzerinden geçtiği için bu karşıt elektrotların soy metal olmaları gerekmektedir (Skoog vd., 1996).



Şekil 1.12 Doğrusal taramalı gerilim sistemi (Skoog vd., 1996).

1.3.1.7. Voltamtride kullanılan uyarma sinyalleri

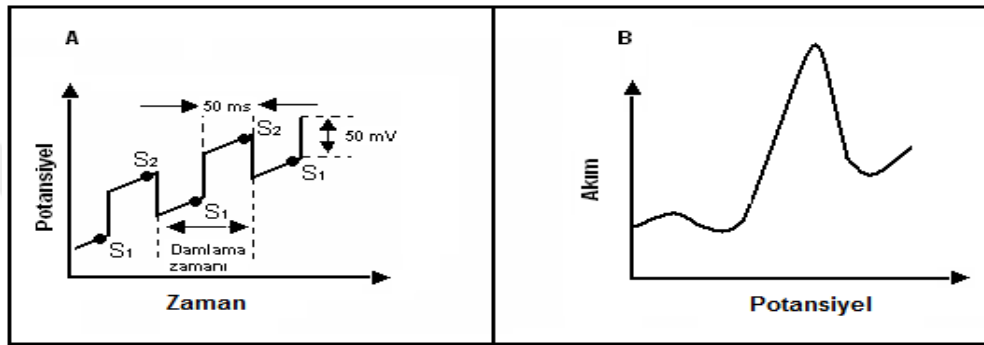
Voltamtride, elektrokimyasal hücredeki mikroelektrota değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali verilir ve sinyale karşı akım cevapları alınır. Voltamtride en çok kullanılan 4 tip uyarma sinyali vardır. Bunlar şekilde de görüldüğü gibi sırasıyla; 1- Diferansiyel Puls, 2- Doğrusal Taramalı, 3- Kare dalga ve 4- Üçgen (dönüşümlü, sıklık) dalgadır (Skoog vd., 1996; Tural vd., 2003; Yıldız ve Genç., 1993).



Şekil 1.13 Voltamtride kullanılan uyarma sinyalleri (Karadeniz vd., 2008).

Diferansiyel puls voltametri:

Diferansiyel Puls Voltametri tekniğinde, çalışma elektroduna doğrusal bir tarama sırasında periyodik darbeler uygulanır. Darbe uygulaman önce akım ölçülür. Darbe uygulandıktan sonra tekrar akım ölçülür. Darbe başına elde edilen akım farkı uygulanan potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen diferansiyel puls voltamogramı yüksekliği analizi yapılan maddelerin derişimi ile doğru orantılı akım piklerinden meydana gelmektedir.



Şekil 1.14 **A)** (Diferansiyel puls voltametri tekniği) Uyarma sinyali, **B)** Akım-potansiyel eğrisi (Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen) (Kuralay vd., 2009a).

DPV tekniğinde uyarma sinyalleri; doğrusal bir tarama sırasında periyodik pulsların oluşturulmasıyla gerçekleştirilir. Bu yöntemle, yarı-dalga potansiyelleri farkı yaklaşık 0,05 V olan maddelerin bile pik maksimumları elde edilebilmektedir. Duyarlılık sınırı 10^{-7} – 10^{-8} M'dır. DPV tekniğinde ölçüm, kapasitif akımın en düşük, faradayik akımın en yüksek olduğu anda yapıldığı için duyarlılık yüksektir. Ayrıca bu yöntemde seçicilik faktörü de yüksektir (Bard ve Faulkner., 1980; Skoog vd., 1996; Tural vd., 2003).

Kare dalga voltametri:

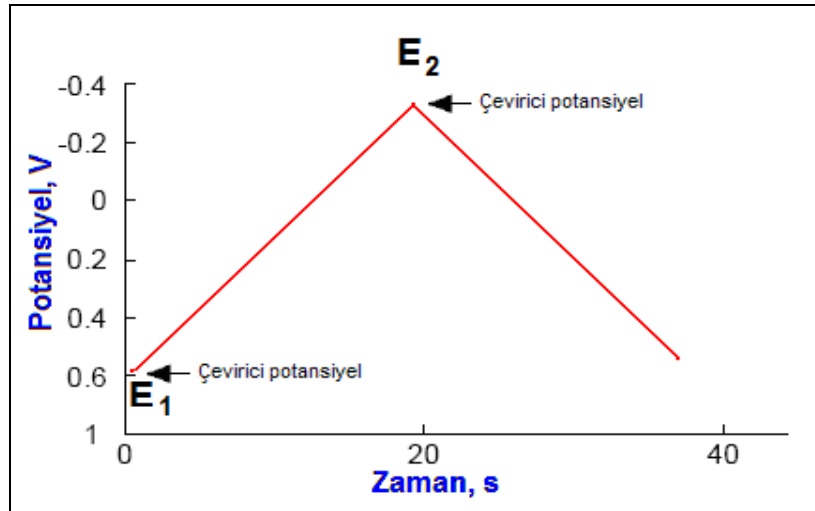
Kare dalga voltametri, uygulanan gerilim şeklinden dolayı pulslara benzerlik gösterir fakat bu yöntem bir puls tekniği olarak ifade edilemez. Akım sinüsoidal akım gibi değişir zaman içinde değişimi kare şeklindedir. Periyodun bir yarısında potansiyel negatif değer alırken, diğer yarısında pozitif değer alır.

Bu teknik diğer voltametrik tekniklerden çok daha hızlı tarama imkanı sağlar. Voltamogramın tamamı 10 milisaniyeden daha kısa bir sürede bitirilir. Ölçüm hızı son derece yüksek olduğu için analizin kesinliğini artırma amaçlı birkaç voltametrik taramanın ortalaması alınabilir. Hızlı, yüksek duyarlıklı bir teknik olması dolayısıyla Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisinde (HPLC) daha çok kullanılmaktadır (Skoog vd., 1996; Thiel vd., 1997; Tural vd., 2003; Yıldız ve Genç., 1993).

Dönüşümlü voltametri (CV):

Dönüşümlü voltametri (CV) , sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı belirli bir aralıkta, karıştırılmayan ortamda çalışma elektrodunun verdiği akım yanıtı olarak ifade edilebilir. Elektroetkin maddenin yükseltgenme – indirgenme tepkime mekanizmalarının aydınlatılmasında ve elektrokimyasal bir analiz öncesi sistemdeki maddelerin elektriksel davranışlarının belirlenmesinde çok sık kullanılan bir yöntemdir. Bunun yanında miktar tayinine dayalı analizlerde kullanım alanları biraz daha sınırlıdır.

Bir veya daha fazla analit için yükseltgenme veya indirgenmenin meydana geldiği potansiyel aralığı, çalışılan potansiyel aralığıdır. Bu aralık “Çevirici Potansiyeller” olarak da tanımlanabilir.

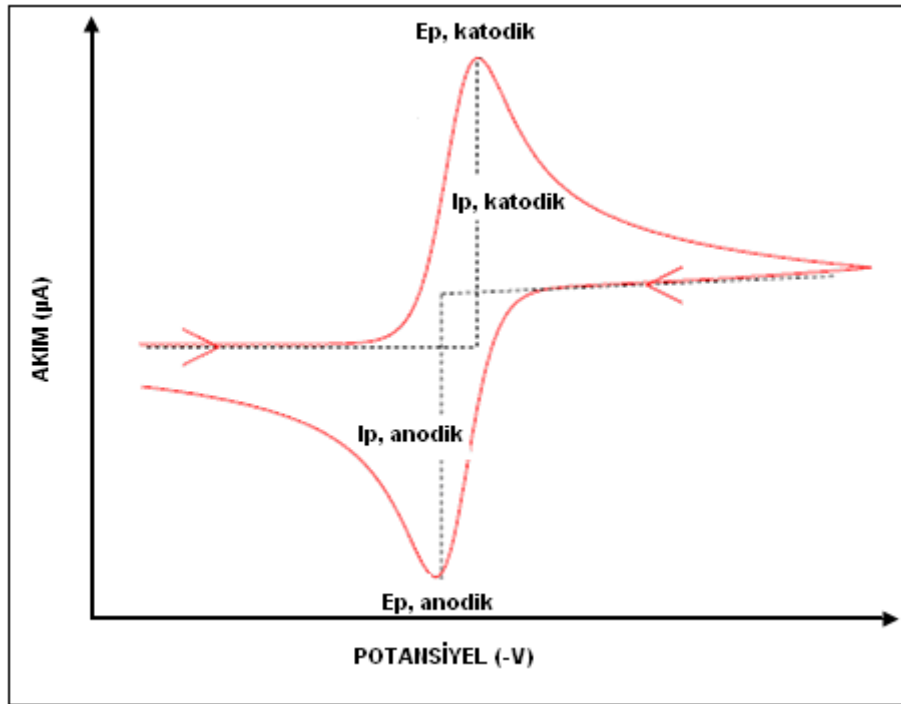


Şekil 1.15 Dönüşümlü voltametri de kullanılan uyarma sinyali (Kuralay vd., 2009b).

Şekil 1.15’de gösterildiği gibi potansiyelin E_1 değerinden E_2 değerine belli bir hızla taraması yapıldıktan sonra, taramanın yönü çevrilerek çoğunlukla aynı hızla E_1 değerine ulaşılır. (üçgen dalga şekilli potansiyel). Numunenin bileşimine bağlı olarak başlangıç taramasının yönü negatif ya da pozitif yönde olabilir.

Böylece elektrokimyasal tepkimeyle meydana gelen ürünün, ters döngüyle elektrokimyasal davranışı incelenebilir.

Numune çözeltisine bu yöntemde potansiyel uygulandığında, elektrot yüzeyi uygulanan potansiyele göre pozitif ya da negatif bir karakter gösterir ve çevresindeki çözelti ile elektron alışverişi yapar bu da ölçülebilir bir akım oluşturur. Çalışma ortamı karışan bir ortam olmadığı için elektron transferi elektrot yüzeyi ve çevresinde meydana gelir, bu nedenle elektrot çevresindeki bileşen miktarında zamanla azalma olur. Oluşan akımda zamanla pik yapar ve azalmaya başlar bu pikler indirgenme ve yükseltgenme pikleridir.



Şekil 1.16 Dönüşümlü voltamogramda akım-potansiyel eğrisi (Kuralay vd., 2009b).

Dönüşümlü voltamogramdaki önemli parametreler katodik pik akımı \dot{I}_{pc} , anodik pik akımı \dot{I}_{pa} , katodik pik potansiyeli E_{pc} ve anodik pik potansiyeli E_{pa} 'dir.

Pik potansiyelleri farkı; $\Delta E_p = 57 / n \text{ mV}$

Tersinir bir elektrokimyasal tepkimede analite ait pik akımının hesaplanacağı eşitlik şöyledir.

$$\dot{I}_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} \nu^{1/2} C \quad [1.4]$$

\dot{I}_p = Analitin pik akımı,

n = Transfer edilen elektron sayısı,

A = Elektrot yüzey alanı (cm^2),

D = Türler için difüzyon katsayısı (cm^2/s),

C = Türlerin çözelti içerisindeki derişimleri (mM),

ν = Tarama hızıdır (V/s).

Tersinir bir reaksiyonda anodik ve katodik pik akımlarının mutlak değerleri yaklaşık eşittir.

Analitin duyarlılık sınırı dönüşümlü voltametri 10^{-5} M 'dir. Dönüşümlü voltametri miktar tayini analizlerinde kullanılmaz ancak, metal organik sistemler ve özellikle organik sistemlerde yükseltgenme – indirgenmenin mekanizması ve hız çalışmaları için önemlidir. Bu yöntem, elektrokimyasal işlemler hakkında kantitatif bilgiler sağlayan temel ve teşhise dayalı çalışmalarda seçilen ilk yöntemdir (Skoog vd., 1996; Thiel vd., 1997; Tural vd., 2003).

Doğrusal taramalı voltametri:

Bu voltametri türünde elektrotlar arasında zamanla çizgisel artış ya da azalış gösteren doğru akım potansiyeli uygulanır. Genellikle potansiyel tarama hızı aralığı $5\text{--}20 \text{ mVs}^{-1}$ dir.

Doğrusal tarama, klasik bir uyarma şeklidir. Doğru akım potansiyelinde zamanla doğrusal bir şekilde artış yapılması ile uyarma sinyali elde edilir. Uygulanan bu potansiyel sonrasında analizi yapılan maddeye özgü akım yanıtları potansiyelin bir fonksiyonu olarak voltamogramlarda ele alınır. Güzel bir sonuç için doğrusal taramalı voltametri, pik maksimumlarının yarı – dalga potansiyel farkı, minimum

0,20 V civarında olmalıdır. İstenen potansiyel reostanın hareket ettirilmesiyle elde edilir. Reosta hareket ettirildiğinde çalışma elektrodu ile referans elektrot arasındaki potansiyelin bir fonksiyonu olarak ortaya çıkan akım kaydedilerek voltamogram elde edilir. Burada karşıt elektrot ile mikroelektrot arasında potansiyel olmadığının vurgulanması önemlidir. Hidrodinamik voltametri ve polarografi ve bu uygulama kapsamında ele alınır. **Hidrodinamik voltametri**, çözeltinin ya da mikroelektrodun sürekli hareket halinde olduğu doğrusal taramalı voltametridir, **polarografi** ise damlayan elektrodun kullanıldığı voltametridir (Bard ve Faulkner., 1980; Skoog vd., 1996; Skottrup vd., 2008; Tural vd., 2003; Yıldız ve Genç., 1993).

1.3.2. Elektrotlarda gerçekleşen olaylar

1.3.2.1. Faraday yasası

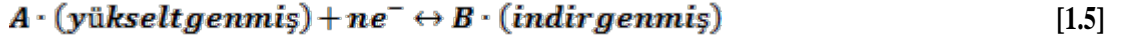
Akım altında çalışırken, başka bir deyişle bir pilden akım çekilirken ya da pile dışarıdan gerilim uygulanırken, elektrotlarda yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri oluşur. Elektrolitik pile dışarıdan uygulanan gerilimin ya potansiyeli ya da akım şiddeti, sabit tutularak, elektroliz gerçekleştirilebilir. Elektrotlardan herhangi birinde, elektrolizlenen madde ya da oluşan ürün miktarı tüketilen elektrik miktarı ile orantılıdır. Bu orantı *faraday yasasını* oluşturur. Yalnızca elektron alışverişine dayalı kimyasal dönüşüm için harcanan akıma da; *faradayik akım* denir.

Faraday yasasının geçerliliği için %100 akım verimiyle tepkimenin oluşması gerekir. Diğer bir ifade ile devreden geçen akımın tümünün tek bir kimyasal olay için tüketilmesi gerekir. Eğer birden fazla olay gerçekleşiyorsa, her biri için harcanan elektrik miktarlarının toplamı %100'dür. Her elektroetkin bileşenin bu tüketimdeki payı, onun elektrik verimini oluşturur (Vaughan vd., 2001).

1.3.2.2. Elektrokimyasal olaylarda faradayik işlemler

Elektrot ve çözelti arasındaki yüzeyden akım iletilmesi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonları meydana gelir diğerinde ise indirgenme gerçekleşir.

Bu reaksiyonlarda



A ve B'nin, sırasıyla, redoks çiftinin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade ettiği [1.5]'de gösterilmektedir. Termodinamiğe uygun olarak kontrol edilen sistemlerde, *NERNST Denklemine* göre, elektrot potansiyeli, elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişiminin [CA(0,t) ve CB(0,t)] saptanmasında kullanılabilir.

$$E = E^{\circ} + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{C_A}{C_B} \quad [1.6]$$

E° = Redoks tepkimesi için standart potansiyel

R = Gaz sabiti (8,314 JK⁻¹mol⁻¹)

T = Sıcaklık (°K)

n = Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

F = Faraday sabiti (96487 coulombs)

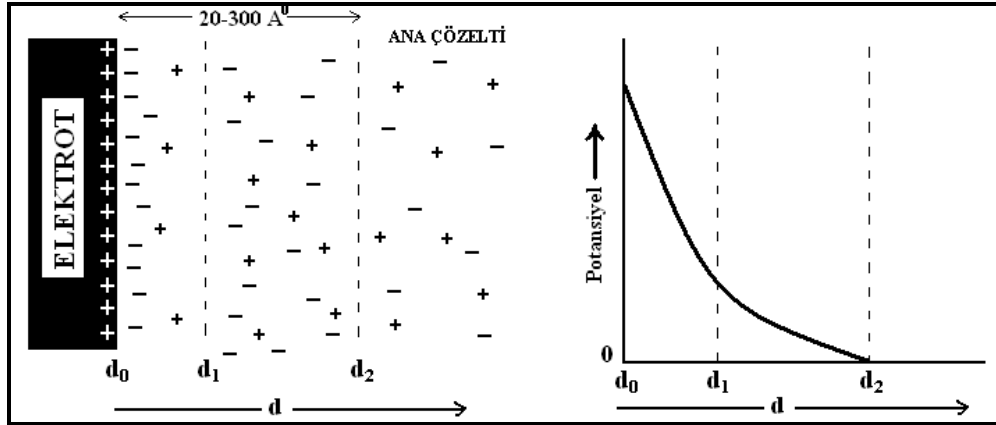
Akım, çözelti ara yüzeyinden iki şekilde iletilir. Elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonu meydana gelirken, diğesinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir ve elektronlardan doğrudan aktarılarak akım iletilir. Bu sırada oluşan akımlara *Faradayik akımlar* akımlar denir ve Faraday yasalarına uygun olmasından ayrıca elektrotta gerçekleşen kimyasal reaksiyon miktarının akımla orantılı olduğunu ifade etmek için bu tip işlemlere *Faradayik işlemler* adı verilir.

Analizi yapılacak madde ve ürünlerin derişimleri sadece elektrot yüzeyine olan uzaklığın bir fonksiyonu olarak ve Nernst tabakası içinde değişiklik gösterir (Skottrup vd., 2008).

1.3.2.3. Elektriksel çift katman

Elektrokimyasal olayların çoğu elektrot ve iyonik çözelti ara yüzeyinde oluşan süreçlere dayalı olarak gerçekleşir. Elektroda bitişik çözeltinin yapısını dikkate alırsak, elektroda pozitif bir potansiyel uygulandıktan hemen sonra elektrodun yüzeyinde reaksiyona girebilecek aktif bir tür olmadığı için hızlı bir şekilde sifıra düşen anlık bir akım dalgası oluşacaktır. Bu anlık akım her iki elektrodun yüzeyinde negatif yük fazlalığı (veya eksikliği) yaratan, yükleme akımıdır. Elektrotlara bitişik

olan çözelti tabakalarında iyonik hareketliliğin sonucu olarak hızlı bir şekilde zıt yüklenme meydana gelir. Bu etkileşim şekilde görülmektedir.



Şekil 1.17 Elektriksel çift katman (Bard ve Faulkner., 1980).

Şekil 1.17'de metal elektrodun yüzeyine uygulanan pozitif potansiyel neticesinde meydana gelen pozitif yük fazlalığı gösterilmiştir. Yüklenmiş çözelti tabakası iki kısımdan meydana gelmektedir: (1) yoğun iç tabaka (d_0 'dan d_1 'e), (2) difüze tabaka (d_1 'den d_2 'ye). Yoğun iç tabakada potansiyel, elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça yani mesafe ile doğrusal olarak azalış gösterirken difüze tabakada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça ortaya çıkan potansiyel üstel olarak azalış göstermektedir. *Elektriksel çift katman*, elektrot yüzeyindeki ve yüzeye bitişik çözeltideki bu yük topluluğudur (Skoog vd., 1996; Tural vd., 2003).

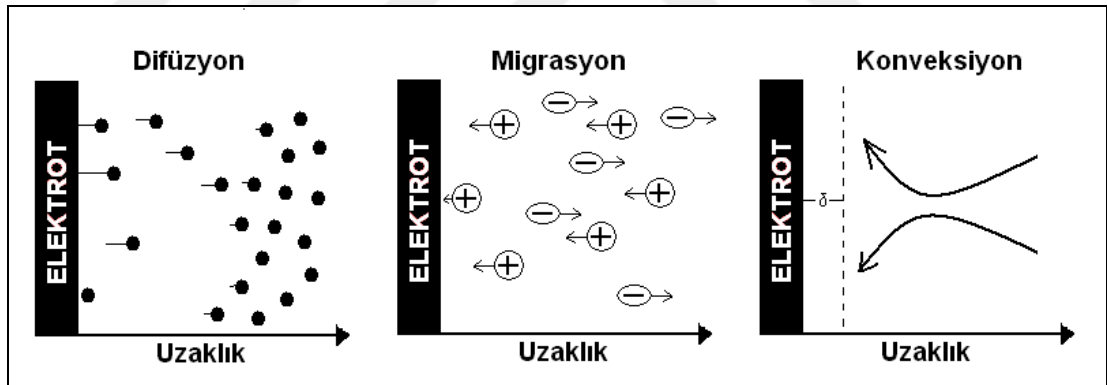
1.3.2.4. Elektrotlarda kütle taşınım yolları

Faradaik akımın elektroliz devresinden geçebilmesi için sırasıyla, elektroaktif maddenin elektroda taşınması, elektron aktarımı oluşan ürünün de elektrottan uzaklaşması gerekmektedir. Bir elektrolitteki herhangi bir taneciğin bir yerden başka bir yere taşınabilmesi için, o taneciğe bir kuvvet uygulanması gerekmektedir. Bu kuvvet kimyasal, elektriksel ya da mekanik bir kuvvettir. Bu kuvvetler üç çeşittir; difüzyon, göç (migrazyon) ve yığımsal taşıma (konveksiyon).

Difüzyon: Derişim farkından kaynaklanan kimyasal kuvvetlerin oluşturduğu taşıma *Difüzyon* olarak adlandırılır. Kimyasal kuvveti oluşturan etmen kimyasal potansiyeldir. Eğer bir türün derişimi çözeltilinin iki noktasında herhangi bir nedenle farklıymış ise, derişimin yüksek olduğu yerden düşük olduğu yere doğru bu kuvvetten dolayı taşınma işlemi olur.

Göç (Migrasyon): İyonlara bir elektriksel alan etkidiği zaman iyonlar elektriksel alandan kaynaklanan kuvvetle hareket eder. Elektrotlara dışardan bir gerilim uygulandığı zaman bu kuvvet anyonları anoda, katyonları da katoda doğru sürükler. Bu taşıma *göç (migrasyon)* ile taşıma olarak adlandırılır.

Yığımsal taşıma: (Konveksiyon): Karıştırma ve elektrodun dönmesi gibi mekanik kuvvetlerin yol açtığı taşınma *Yığımsal taşıma (Konveksiyon)* olarak tanımlanır. Konvektif taşınma çözeltilinin herhangi bir kesimindeki tüm bileşenlerin aynı hızda hareket etmesidir. Konvektif taşınmanın hızı uygulanan mekanik kuvvete bağlıdır (Vaughan vd., 2001).



Şekil 1.18 Elektrotlarda kütle taşınım yollarının şematize hali (Vaughan vd., 2001).

1.3.3. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)

Bir devrede veya bir elektrokimyasal hücrede, potansiyelin zamana bağlı sinüzoidal değişimi sonucunda oluşan alternatif akıma karşı bir direnç meydana gelir.

$$V = I \cdot Z$$

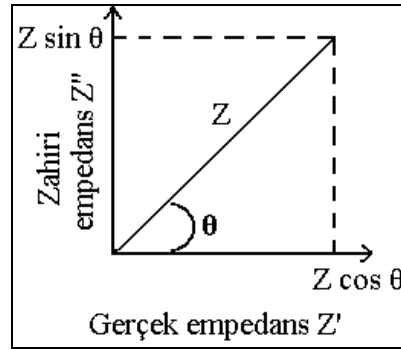
[1.7]

Bu denklemde, V potansiyeli, I alternatif akımı, Z ise empedansı ifade eder. Potansiyel ve alternatif akım zamana bağlı olarak değişmektedir. Z ohm (Ω) birimi ile ifade edilir. Alternatif akımın üretildiği bir devrede empedans, frekansın bir fonksiyonu olarak da tanımlanabilir.

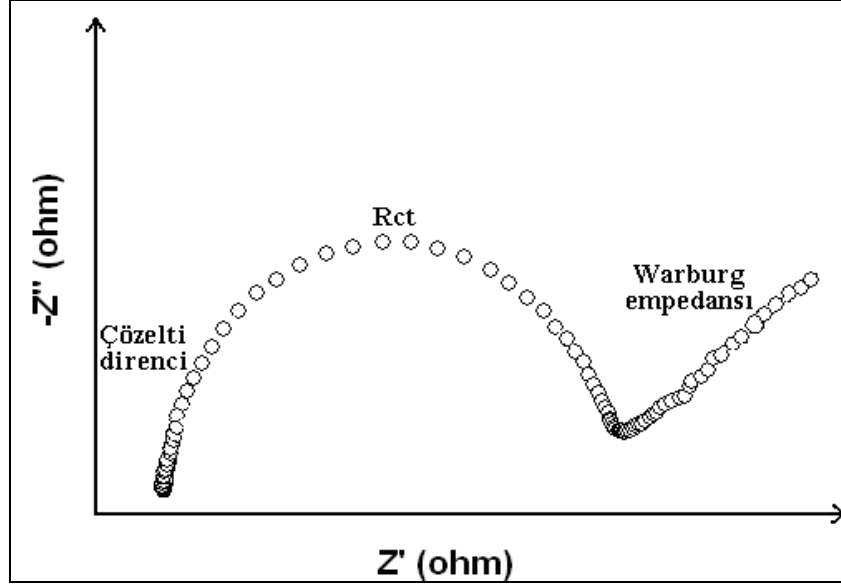
Empedansın gerçək ve zahiri empedans olmak üzere iki bileşeni vardır;

$$Z = Z' - jZ'' \quad (j = \sqrt{-1}) \quad [1.8]$$

Bu denklemde Z tüm empedansı, Z' gerçək, Z'' ise zahiri empedansı ifade eder. Gerçək empedansın x ekseninde, zahiri empedansın y ekseninde olduğu grafik, Nyquist eğrisi olarak tanımlanır.



Şekil 1.19 Reel empedansa (Z') karşı imajiner empedans (Z'') ile oluşturulan Nyquist eğrisi. θ , devrede sinüzoidal karakterdeki potansiyel ile akım arasında oluşan faz açısıdır (Monk, 2002).



Şekil 1.20 Bir elektrokimyasal hücrede empedimetrik ölçüm sonrasında oluşan Nyquist eğrisi (Monk, 2002).

Şekil 1.20’de gösterilen Nyquist eğrisi, bir elektrokimyasal hücrede, belirli bir frekans aralığında gerçekleştirilen empedimetrik ölçüm sonrası elde edilen grafikdir. Analizin ilk safhalarındaki yüksek frekanslarda meydana gelen çözelti direncini (R_s) takiben oluşan yarım daire elektrota transfer edilen yüke karşı oluşan direnci (R_{ct}) ve düşük frekanslarda difüzyonal süreç sonrasında oluşan lineer bölge ise Warburg empedansını (R_w) temsil etmektedir. Sistemin yük depolama özelliği ise kapasitans olarak tanımlanır.

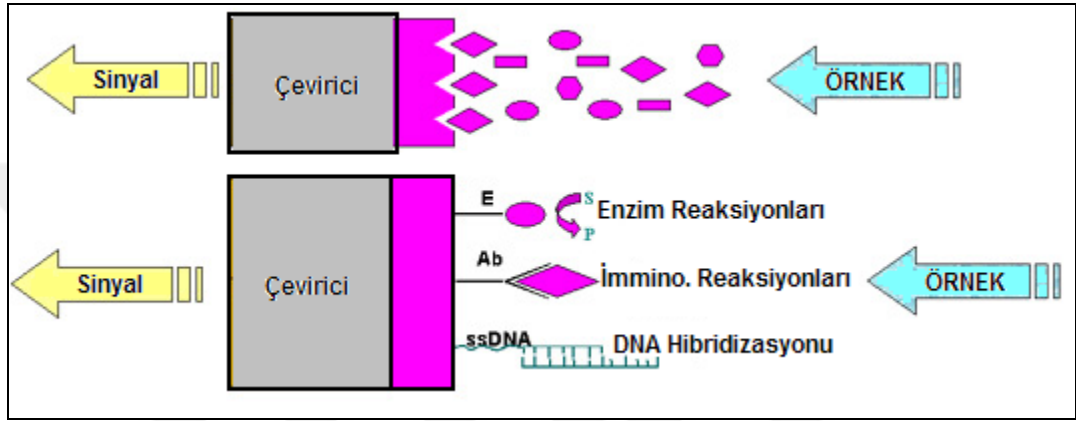
Bu teknikte, belli bir frekans aralığında elektrokimyasal hücrenin empedansı taranır ve elektrot yüzeyinde gerçekleşen kinetik olayların incelenmesinde yaygın olarak kullanılır. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektrokimyasal tepkimeler, R_{ct} değerindeki değişimler yorumlanarak değerlendirilir (Monk, 2002).

1.4. Biyosensörler

Biyosensör “biyo” (biyolojik kökenli) ve “sensör” (algılayıcı) kelimelerinden oluşmaktadır. Biyosensörler biri biyokimyasal diğeri ise elektrokimyasal iki çeviriciden oluşur. Biyokimyasal çevirici analizi yapılacak madde ile etkileşerek onu tanıır. Bu etkileşim sonucu oluşan madde (biyokimyasal ürün) elektrokimyasal çevirici tarafından okunabilir bir sayısal değere çevrilir. Bu ilkeye dayanılarak

biyosensörler kalitatif ve kantitatif analizi gerçekleştirebilen kompleks cihazlardır şeklinde tanımlanabilirler. Diğer bir ifade ile; biyosensörler, yapısında biyolojik algılayıcı içeren ve elektrokimyasal çevirici sistem ile birleştirilmiş analitik aygıtlar olarak da tanımlanabilirler (Chen vd., 2007; Coulet, 1991).

Bir biyosensör, bir veya daha fazla analizi yapılacak maddenin miktarıyla orantılı olarak devamlı sayısal elektrik sinyali üretmelidir.



Şekil 1.21 Biyosensörün şematik gösterimi (Bej, 1991).

1.4.1. Biyosensörlerde bulunan yapısal kısımlar ve fonksiyonları

Biyosensör sistemleri üç temel bileşenden meydana gelir. Bunlar, seçici olarak tanıma mekanizmasına sahip *algılama kısmı*, algılama kısmının incelenecek maddeyle etkileşimi sonucunda oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen *çevirici kısım* ve *elektronik kısım*'dir (Mutlu, 2002).

1.4.1.1. Algılama kısmı

Biyosensör sistemini meydana getiren üç temel bileşenden en önemlisi algılama kısmıdır. Algılama kısmı, tayini yapılacak maddeyle tersinir bir şekilde etkileşime girmeli ve son derece seçimli olmalıdır. Bu kısım sayesinde biyosensör, hedefi tanıyarak etkileşime girer. Antikorlar, nükleik asitler, enzimler, organeller, mikroorganizmalar, doku kesitleri, biyolojik membranlar içine yerleşmiş kimyasal reseptörler biyomolekül olarak kullanılmaktadırlar. Bunların arasında en yaygın

olarak enzimler (Rasooly., 2005; Bhunia., 2008), antikorlar (Killard vd., 2000; Vlatakis vd., 1993) ve nükleik asitler kullanılmaktadırlar (Collings ve Caruso., 1997; Wang vd., 1996; Wang vd., 1997a; Wang vd., 1997b; Wang., 2002; Drummond vd., 2003).

Biyosensör tanıma katmanı olarak antikor, enzim, mikroorganizma, nükleik asit, hücre, doku parçaları gibi birçok biyolojik (biyomolekül) kullanılır. Enzimlerin tanıma katmanı olarak kullanımı, uygun sıcaklık ve pH koşullarına bağlı olması ve enzimlerin kararlılıklarının düşük olmasından dolayı zordur. Ayrıca enzimin biyosensöre tutturulmasının ve tutturulma sonrasında kararlılığını sürdürmesinin de zorluğu tasarımı yapılacak biyosensörde dikkate alınması gereken en önemli hususlardır (Klibanov, 1979). Doku parçalarının canlı tutulmaları, beslenmeleri ve atıklarının uzaklaştırılmasının gerekliliği nedeniyle biyosensörlere spesifik olarak immobilize edilmeleri zorlaşmaktadır. Bu biyolojik materyallerden antikorlar ve nükleik asitler diğerlerine göre uygulaması kolay olan moleküllerdir. Antikorların özellikle günümüzde, yüzey plazmon rezonans (surface plasmon resonance, SPR) sistemlerinde tanıma katmanı olarak kullanımı mevcuttur. Yüzeğe tutturulmuş antikorlar antijenle etkileşime girerler ve bu özgün etkileşimin ölçüm ve tespiti optik sisteme dayalı olarak gerçekleştirilir.

1.4.1.2. Çevirici kısım

Çevirici kısım, reseptörlerin biyolojik tepkimesini ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal tepkimenin özelliğine göre kullanılır. Çevirici kısım, elektrokimyasal (potansiyometrik, voltametrik yöntemlere dayalı ve alan etkili-ISFET, chem FET), optik (surface plasmon resonance, floresans, yansıma, luminesans, kırılma indeksi), elektriksel (yüzey etkinliği-MOS, elektrolit iletkenliği), kütle duyarlı (piezoelektrik), manyetik (paramanyetik), termal (reaksiyon ısısı, adsorbsiyon ısısı) esaslı sistemlere dayalı olabilir (Castillo vd., 2004; Collings ve Caruso, 1997; Lowe, 1999; Rogers ve Mascini, 1998; Sadik vd., 2004).

Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin tayini yapılacak madde ile etkileştiğinde meydana gelen sinyalin iletim ve ölçümünde, genel olarak, elektrokimyasal, kalorimetrik, optik ve piezoelektrik esaslı sistemler kullanılır.

Tablo 1.1 Biyosensörlerin çevirici sistemlere göre sınıflandırılması.

İletim ve Ölçüm Sistemlerine Göre Sınıflandırma	
Biyosensörler	Sınıflandırması
Elektrokimyasal Esaslı Biyosensörler	Amperometri Esaslı Potansiyometri Esaslı Yarı İletken Esaslı
Optik Esaslı Biyosensörler	Fotometri Esaslı Fluorometri Esaslı Biyoluminesans Esaslı
Piezoelektrik Esaslı Biyosensörler	QCM
Kalorimetri Esaslı Biyosensörler	Termistörler

Elektrokimyasal özelliğe dayanılarak biyosensörler; kondüktometrik, potansiyometrik ve amperometrik olarak sınıflandırılabilir.

Kondüktometrik biyosensörlerde enzim tepkimesi sonucunda ortamdaki bazı iyonlu türlerin derişiminde net değişiklikler oluşur. Kondüktometrik biyosensörler, biyolojik bileşimin sonucu olarak, metal elektrot çifti arasındaki iletkenlik değişimini ölçmektedir.

Potansiyometrik biyosensörler en genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alan yöntem *Potansiyometri* olarak bilinir. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit derişimini tanımlamaktadır. Tek değerlikli iyonlar ya da pH'a duyarlı cam elektrotlar, anyon ya da kanyonlara duyarlı iyon seçimli elektrotlar ve karbondioksit ya da amonyağa yönelik gaz duyarlı elektrotlar; potansiyometrik biyosensörlerde kullanılan temel sensörlerdir.

Amperometrik biyosensörler genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alan yöntem *Amperometri* olarak bilinir. Söz konusu akım

yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ya da indirgenen elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. İkinci elektrot referans elektrot olarak iş yapar. Kalibrasyon sonrasında, akım yoğunluklarından ilgili türlerin derişimlerinin saptanmasında yararlanılır.

Kalorimetri esaslı enzim sensörleri, termal enzim sensörleri, enzim termistörleri ya da entalpimetrik enzim sensörleri gibi farklı isimlerle gruplandırılırlar. Bir enzimatik tepkimedeki entalpi değişiminden faydalanılarak substrat derişimini belirlemek temel ilkelerini oluşturmaktadır. Genel olarak enzimatik tepkimelerin ekzotermik doğasından faydalanılır. Enzimatik tepkime sonucunda oluşan sıcaklık değişimi ile substrat derişimi arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca varılır. Çok küçük sıcaklık değişimleri ise termal olarak yalıtılmış ortamlarda termistör veya termofiller yardımıyla izlenir.

Optik biyosensörler çevirici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir metodla uygun bir biyomolekülün immobilize edilmesi ile hazırlanan ölçüm aletleridir. Fotometri, florometri ve biyoluminesansa dayalı optik sistemler bulunmaktadır.

Etkileşim sonucunda oluşan kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümüne dayanırlar. Sinyal; ışık yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucunda oluşur. Örneğin optik lifin üzerine enzim immobilize edilmesi ile hazırlanan optik esaslı enzim sensörleri temelde absorpsiyon, fluoresans, biyoluminesans gibi temel ilkelere dayalı olarak işlev görürler.

Piezoelektrik sensörler en genel anlamıyla karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı saptayarak bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan numunenin kütle ölçümü esasına dayalı olarak çalışan, gravimetrik aletlerdir. Sensör seçimliliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime sahip analitin birikmesi ile ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiğinde piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki farklanmanın ölçülmesiyle sonuç elde edilir (URL-1).

Birçok fiziksel ve kimyasal prosesi kütledeki değişiklikleri izleyerek takip edebiliriz. Makromolekül özgül olarak liganda bağlandığında, sinyal değiştirici bağlanma olayı dolayısıyla fiziksel bir değişikliği ölçebilir. Genellikle sinyal değiştirici pH, ısı, ışık, direnç ya da kütledeki değişikliği ortaya çıkarır ve daha sonra veri işlenebilecek elektriksel bir sinyale dönüşür.

1.4.1.3. Elektronik kısım

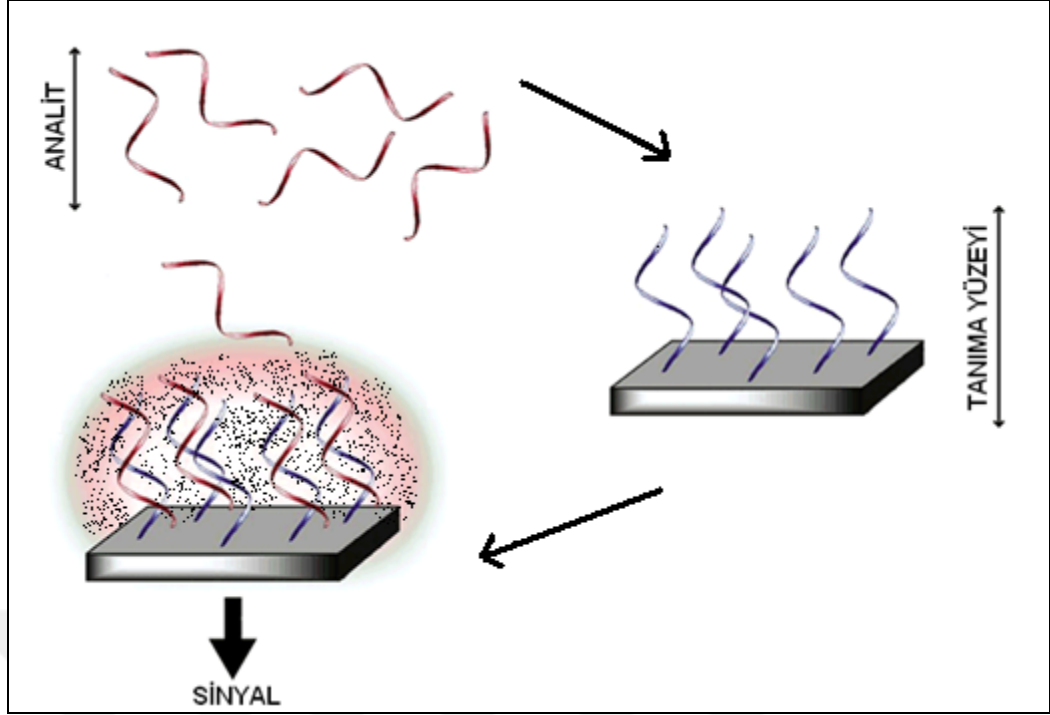
Çevirici kısmın elektrik sinyali üretmesi için gerekli osilatör, fark devresi, işlemsel yükselteç devresi, besleme devresi, analog-digital dönüştürücü vb. elektronik kısımdan meydana gelmektedir.

1.4.2. DNA biyosensörleri

Tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörleri denir. DNA tanıma yüzeyleri, dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (Wang vd., 1997c) veya bu yüzey ile etkileşime giren analizi yapılacak maddelerin tayin edilmesinde kullanılır.

Birçok küçük molekül dönüşümlü bir şekilde dsDNA ile öncelikli olarak 3 yolla birleşir;

1. Nükleik asit yapısındaki negatif yüklü şeker fosfat grubu ile elektrostatik etkileşim,
2. DNA çift sarmal yapısının oluklarına bağlanma sonucunda,
3. Doğal yapılı DNA'nın baz çiftleri arasına interkale olarak.



Şekil 1.22 Bir DNA biosensörünün şematize hali (Erdem ve Özsöz., 2002).

DNA'nın bazı kimyasal maddelerle etkileşmesi ve farklı metodlarla bu etkileşimin incelenmesi, madde tayininin gerçekleştirilmesi, ilaç tasarlanması ve tayin edilmesine; ayrıca çevre kirliliğine yol açan bazı atıkların tayin edilmesine ait yeni bir metodun geliştirilmesi açısından önem kazanmaktadır (Erdem ve Özsöz., 2002).

1.4.2.1. Elektrot yüzeyine DNA immobilizasyon teknikleri

Günümüzde DNA tanıma yüzeyinin stabilitesini arttırmak için farklı deneyler yapılmakta ve en düşük maliyetle, uygulanabilirliği kolay ve spesifik bağlanmayı sağlayacak yöntemler bulmaya çalışılmaktadır (Demers vd., 2000). Kullanılacak yönteme göre elektrot yüzeyinde yatay ve düşey olarak tutturulmuş DNA tanıma yüzeyi ortaya çıkmaktadır.

Adsorbsiyon yoluyla tutturma

DNA dizisi içeren analizi yapılacak çözeltinin elektroda uygulanması (Erdem vd., 2004; Ozkan vd., 2002a) sonucunda elektrot yüzeyine DNA tutturulur. DNA elektrot yüzeyine adsorbsiyonla bağlanır. Pahalı kimyasal madde kullanımı ve

elektrokimyasal potansiyel uygulaması gibi basamakları ortadan kaldıran bu yöntemde, tayin süresi kısadır ve maliyet düşüktür.

Elektrostatik yolla tutturma

Elektrot yüzeyine pozitif potansiyel uygulanması, negatif yüklü fosfat omurgası taşıyan DNA molekülünün elektriksel çekim kuvvetleri sayesinde tanıma yüzeyine paralel olarak tutturulmasını sağlar (Erdem vd., 1999; Marazza vd., 1999; Mascini vd., 2001; Popovich ve Thorp., 2002; Schöning, 2005; Wang vd., 1997d).

Kovalent yolla tutturma

DNA dizilerinin elektrot yüzeyine kovalent olarak tutturulmasında karbodiimit (Herne ve Tarlov., 1997; Huang vd., 2000; Levicky vd., 1998; Mikkelsen, 1996; Millan ve Mikkelsen., 1993; Ozkan vd., 2002b) ve silan kimyası (Eckhard vd., 2001) sıklıkla kullanılan ajanlardır.

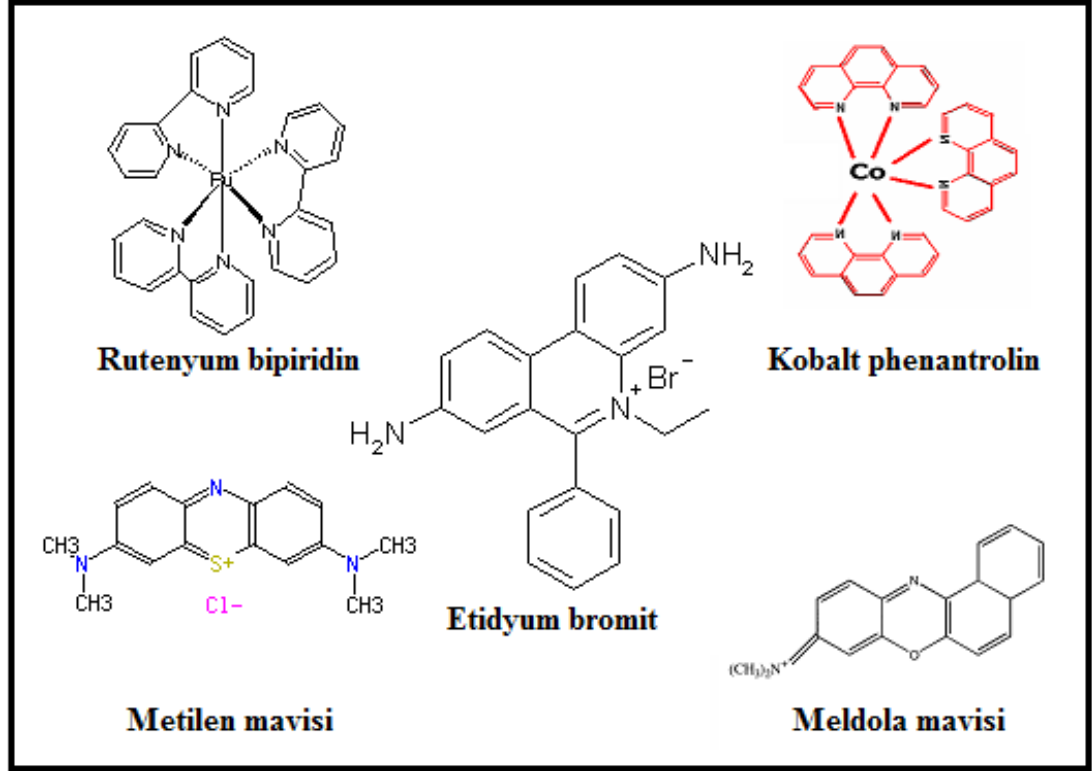
Karbon (grafit) elektrot yüzeyine kovalent yolla DNA dizisi immobilizasyonu N-Hidroksi süksinimit (NHS) ve Etil karbodiimit (EDC) gibi kovalent ajanlarla kaplama yapılmasının ardından güçlü bir şekilde gerçekleşmektedir (Yang vd., 1997).

1.4.2.2. DNA biyosensörleri ile DNA dizi algılama yöntemleri

İndikatör kullanımına dayalı DNA dizi algılama yöntemlerinde DNA molekülüne interkale olabilen (metal kompleksleri, antibiyotikler) (Del Pozo vd., 2005; Erdem vd., 2002; Wong ve Gooding, 2006) veya DNA dizisindeki bazlarla özgül olarak etkileşebilen elektroaktif maddeler (indikatör) ile tayini yapılabilmektedir (Erdem vd., 2000; Erdem vd., 2002; Erdem vd., 2001; Fojta vd., 2000; Kara vd., 2004; Steichen vd., 2006; Wei vd., 2006). Hibridizasyonu analitik sinyale çevirmede elektrokimyasal çeviriciler kullanılmaktadır.

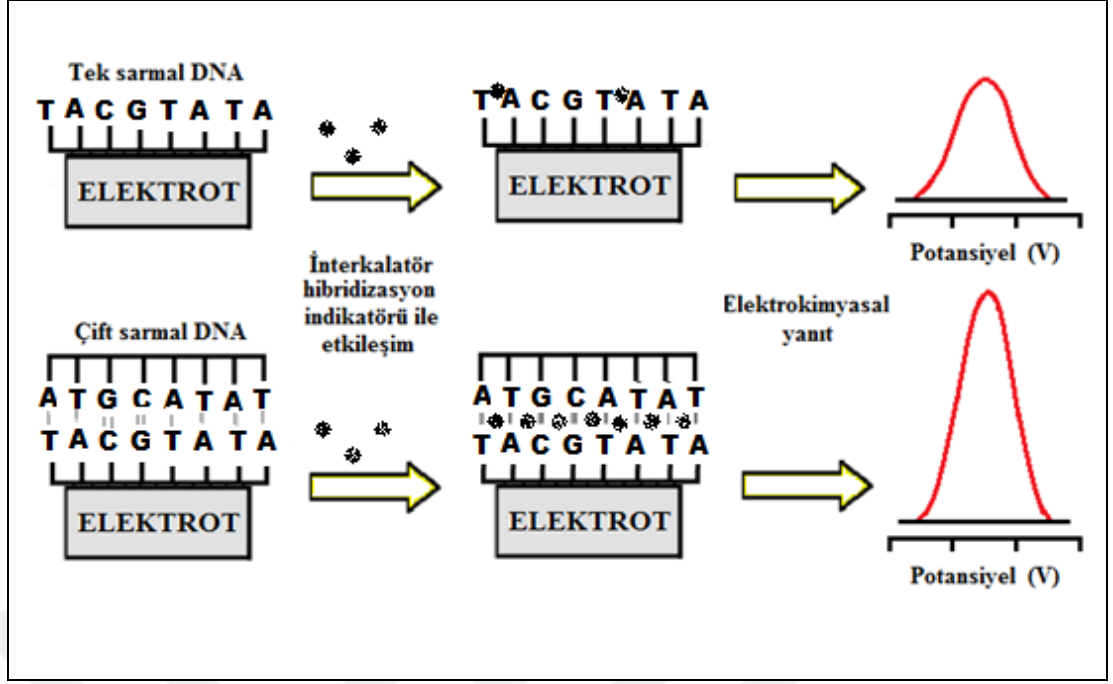
Elektrot yüzeyinde oluşan hibrit ile etkileşen indikatörün sebep olduğu artan veya azalan elektrokimyasal yanıt hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır (Motti vd., 2000; Ozkan vd., 2002b; Ozkan vd., 2002c; Wong vd., 2006; Wong vd., 2005). ssDNA ve dsDNA ile etkileşimi sonucu alınan yanıtlar arasında anlamlı bir fark oluşmasına bağlı olarak elektroaktif bir madde indikatör olarak kullanılabilir. Hibridizasyon indikatörü olarak sıklıkla kullanılan maddeler Meldola

Mavisi (MDB) (Kara vd., 2004; Kerman vd., 2004), Ru(II) (Erdem vd., 2002; Wong vd., 2005), Co(III) (Carter vd., 1989), Os(II), Os(IV) (Del Pozo vd., 2005) ün 1,10-fenantrolin ve 2,2''-piridin klatlarıdır (Carter vd., 1989).



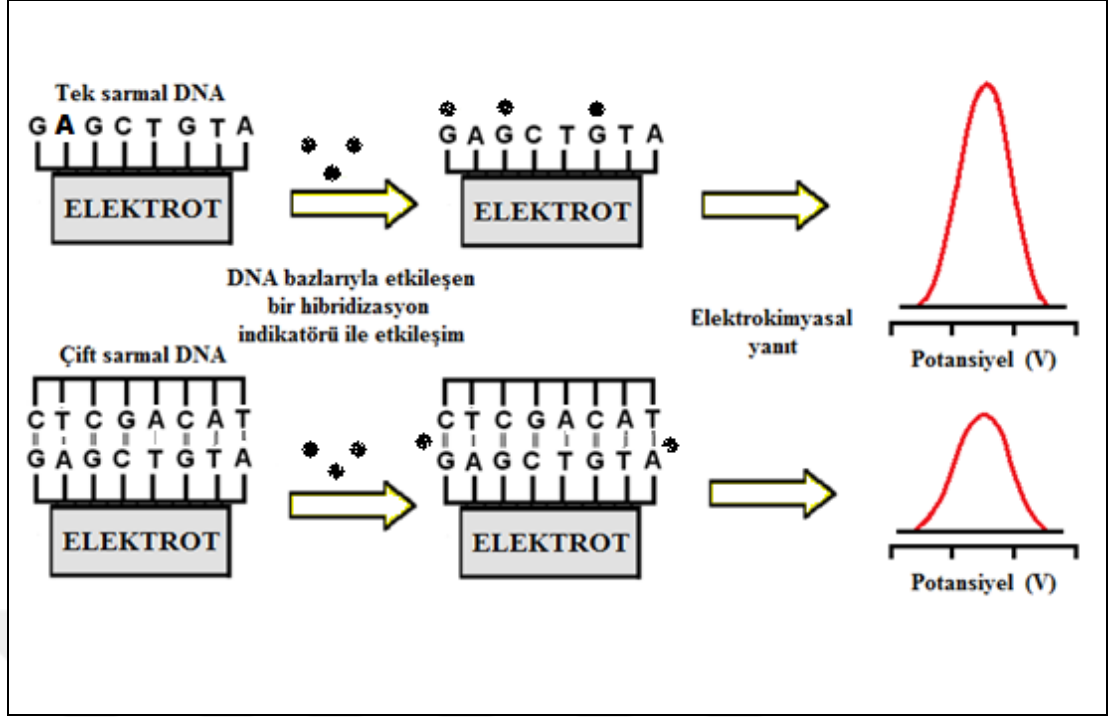
Şekil 1.23 Kimyasal yapıları gösterilen bazı hibridizasyon indikatörleri (Mascini vd., 2001).

İnterkalasyon; bir maddenin DNA çift sarmalı arasına girmesidir. Bu durumda; Şekil 1.24'de gözlemlendiği gibi; madde birikimi dolayısıyla çift sarmal DNA (dsDNA) ile etkileşim sonrası alınan madde sinyali tek sarmal DNA (ssDNA) ile etkileşim sonrası alınan madde sinyaline göre oldukça yüksek bir değerdir (Wang vd., 1998a).



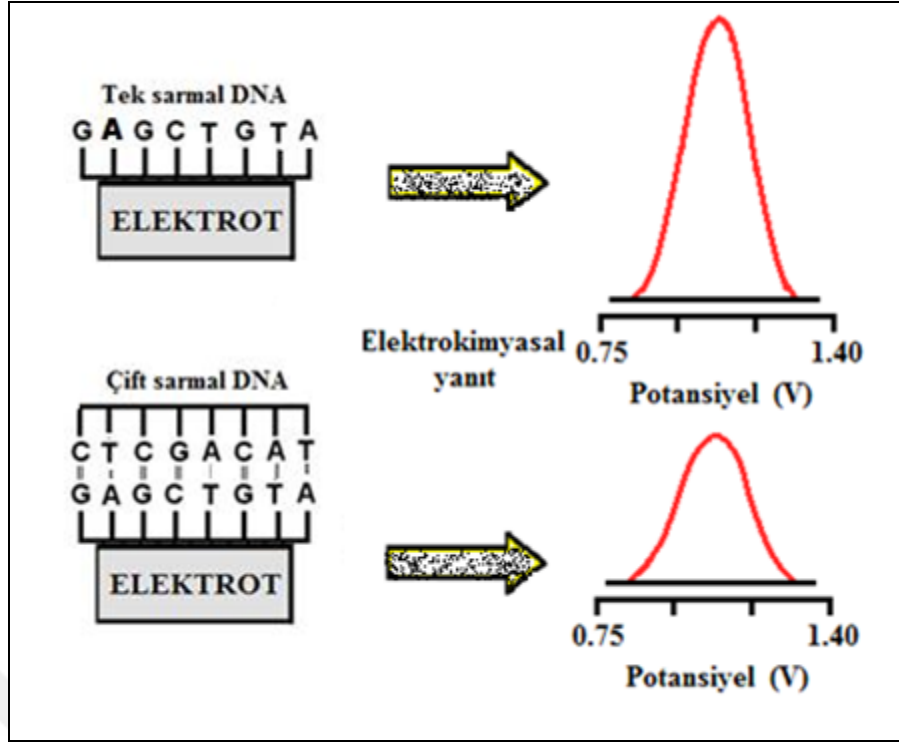
Şekil 1.24 İnterkalatör madde ile DNA dizi algılanması (Carmichael, 1988).

DNA'nın bazlarından biriyle (özellikle Guanin) indikatör olarak kullanılan madde etkileşiyor olabilir. Şekil 1.25'de görüldüğü gibi; tek sarmal DNA (ssDNA)'da bazlar açıkta olduğu için madde sinyali, hibridizasyondan sonra oluşan çift sarmal DNA (dsDNA)'da bazlar kapalı olduğu için bu durumda oluşan madde sinyaline göre oldukça yüksek bir değerdir (Carter vd., 1989; Erdem vd., 1999; Kara vd., 2002a; Kara vd., 2002b; Kerman vd., 2003; Meric vd., 2002; Ozkan vd., 2002d; Zhang ve Hu., 2006).



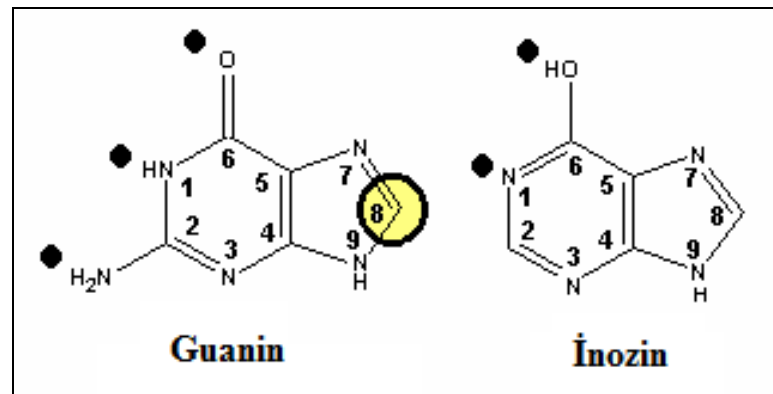
Şekil 1.25 DNA bazlarından biriyle etkileşen bir indikatör ile DNA dizi algılanması (Carpini vd., 2004).

İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemlerinde DNA'daki en elektroaktif ve kararlı yanıt alınan organik baz guanin bazıdır. Yaklaşık olarak +1,0V civarında yükseltgenme gösterir. Elektrot yüzeyine tutturulan tek sarmal DNA dizisindeki guanin bazları açık olduğu için yüksek yükseltgenme sinyali, hibridizasyon sonrasında ise sitozinle aralarında oluşturdukları hidrojen bağı köprüleri nedeniyle kısmen kapalı duruma gelen yükseltgenme dolayısıyla tek sarmala göre daha düşük yükseltgenme sinyali gösterir (Marin vd., 1998; Wang ve Kawde., 2002a; Wang vd., 1998b).



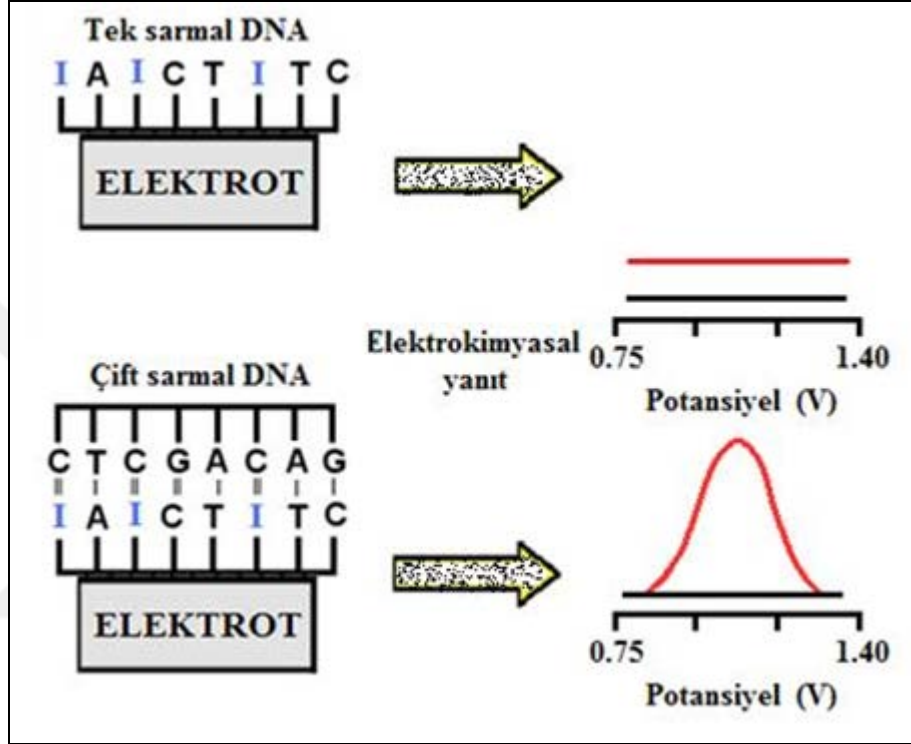
Şekil 1.26 İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi (Kara vd., 2003).

Diğer bir tayin yöntemi ise EVET/HAYIR SİSTEMİ adı verilen ve tek sarmal DNA (prop) dizisinde yer alan guanin bazları yerine bir guanin analogu olan inozin bazlarının sentezinin yapılmasıdır.



Şekil 1.27 Kimyasal yapıları gösterilen Guanin ve İnozin bazları (Aladağ,2008).

Guanin bazına yapı olarak benzerlik gösteren ve sitozin bazı ile ikili bağ oluşturan inozin bazı herhangi bir yükseltgenme sinyali vermemektedir. Bu nedenle elektrot yüzeyinde tek sarmal DNA dizisi varlığında +1,0 V'da herhangi bir yükseltgenme sinyali alınmazken, hibridizasyon sonrasında hedef diziden gelen guaninlerden ötürü bir yükseltgenme sinyali görülür (Aladağ, 2008).



Şekil 1.28 İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi (İnozinli prop ilkesi) (Aladağ, 2008).

1.4.2.3. Madde-DNA etkileşimine dayalı DNA biyosensörleri

DNA ile etkileşen maddeler sayesinde yeni DNA biyosensörleri tasarlanabilir. Bu alanda zararlı kimyasallar, çevre atıkları, biyolojik silahlar kullanılabileceği gibi ilaç niteliği taşıyan, sağlık alanında kullanılabilecek yararlı bileşiklerden de faydalanılabilir. Böylece geliştirilen DNA biyosensörleri birçok kullanım alanına sahip olmuştur.

Bazı kimyasal maddelerin (ilaç, çevresel atıklar, vb.) DNA molekülü ile etkileşiminin tasarlanan yeni biyosensörlerle incelenmesi;

- Yeni ilaç tasarımı,
- Çevresel toksik madde analizleri,
- Çeşitli kimyasal silahların (kimyasal savaş ajanlarının) tayinini gündem konusu yapmıştır.

Çeşitli maddeler; dsDNA ile etkileşime girer. Bu elektrostatik bağlanma, DNA çift sarmal yapısının küçük ve büyük oluklarına bağlanma veya doğal yapılı DNA'nın baz çiftleri arasında interkalasyonu sonucunda olur (Blackburn ve Gait, 1990; Graves ve Velea, 2000).

İlaç-DNA etkileşimine dayalı DNA biyosensörleri ile kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçların DNA ile etkileşimlerinin farklı yöntemlerle (Müller ve Crothers, 1975) incelenmesinin yanında, özellikle son zamanlarda elektrokimyasal yöntemlere bağlı tayinlerin gerçekleştirilmesi elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin önemini arttırmıştır. Düşük maliyetli ve basit olan bu yöntem, hızlı ve seçimli olarak, DNA ile etkileşim tipi değerlendirilen ve ilaç olarak hedeflenen maddenin çok düşük miktarlarında çalışmayı sağlamaktadır.

DNA biyosensörleri kullanılarak ilaç ile DNA arasında meydana gelen etkileşimler başarılı bir şekilde algılanabilmektedir. Bu algılama DNA'da bulunan guanin/adenin gibi elektroaktif bazların sinyali üzerinden ya da analiz edilecek ilacın elektrokimyasal sinyali üzerinden sağlanabilmektedir. Bu sinyallerdeki değişimler incelenerek ilaç-DNA etkileşimleri hakkında değerlendirmeler yapılabilir (Erdem vd., 2002).

Toksik madde-DNA etkileşimine dayalı DNA biyosensörlerinde bir maddenin DNA'da yol açtığı hasarın saptanmasından hareket edilerek tasarımı yapılan biyosensörler, çevreye zararlı toksik maddelerin belirlenmesinde kullanılan yöntemler içinde önemli yer tutar. Hava, su ve toprak analizlerinde biyosensör kullanımı son zamanlarda giderek artış göstermektedir. Analitin tanıma yüzeyi olarak DNA tutturulmuş biyosensör ile etkileşmesinin ardından, DNA davranışındaki değişimlerden veya maddenin DNA ile etkileşim sonrası davranışının belirlenmesinden hareketle birçok sonuca varılabilir (Chiti vd., 2001; Kerman vd., 2001; Labuda vd., 2005).

Kimyasal silah amacıyla kullanılan maddelerle de biyosensör sistemi tasarımı yapılabilir. Örneğin organofosfat içeren maddelerin DNA'ya verdikleri büyük hasar

biyosensör teknolojisi kullanılarak tanımlanmıştır (Wang vd., 2002b). Organofosfatlı savaş ajanları ve pestisitlerin tayini optik biyosensör kullanılarak yapılmıştır (Rice vd., 1983). Nitroaromatik patlayıcılar ve organofosfatlı sinir gazlarının tayini de akışkan enjeksiyon sistemi kullanılarak tek kanal mikroçip sisteminde gerçekleştirilmiştir (Berdar vd., 2006).

1.4.2.4. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler

Seçicilik: Bu özellik ideal bir biyosensör sisteminde en önemli parametrelerdendir. Biyolojik algılayıcı molekülün spesifik olması girişim yapabilecek türlerin bulunduğu çözeltilerde ön işlem basamağı atlanarak analizin yapılmasını sağlamaktadır. Biyosensör yeteri kadar seçici değilse bu eksikliği giderecek ek işlemlere ihtiyaç duyulur.

Kullanım ömrü: Biyolojik algılama yüzeyinin aktivitesindeki azalma biyosensörün kullanım ömrünü sınırlayan en önemli etkidir. Ayrıca bu durum biyosensörün stabilite, tekrarlanabilirlik ve kalibrasyon sıklığı gibi diğer parametrelerini de olumsuz etkilemektedir.

Kalibrasyon gereksinmesi: İdeal bir biyosensör sisteminin hiç kalibrasyona ihtiyaç göstermemesi ya da en az şekilde kalibrasyona ihtiyaç duyması istenir. Fakat bu özellik teorikte planlandığı gibi olmayabilir. Kullanım süreleri boyunca biyosensörlerin kalibrasyonu sıklıkla yapılmalıdır.

Tekrarlanabilirlik: Bu parametre ne kadar iyi olursa biyosensör uygulamalarının o denli iyi olduğundan bahsedilebilir. İdeal bir biyosensör için elektrodun aynı koşullar altında ard arda yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların elde edilmesi istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak, yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir.

Stabilite: Kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlı bir parametredir. Biyolojik molekülün kararlı olması çok sayıda analizin yapılmasına imkan sağladığı için biyosensörün ekonomik olmasına da ortam hazırlar. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortamın oksijen derişimi gibi fiziksel parametrelerden en az şekilde etkilenmesi istenir. Bu özellik fiziksel koşulların değişken olabildiği laboratuvar dışındaki şartlarda da güvenilir analizlerin yapılabilmesine imkan tanır.

Yüksek duyarlılık: Biyosensöre tutturulmuş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere duyarlı olması, ideal biyosensör sistemlerinin özelliklerindedir.

Yeterli düzeyde tayin sınırı: Tasarımı yapılan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir derişim değerin altında olması gerekir. Belirtilen bu sınır değeri, elektrot yüzey büyüklüğü, biyolojik materyalin tayini yapılacak maddeye olan afinitesi ve immobilize edilen madde miktarı gibi etmenlerden etkilenmektedir.

Geniş ölçüm aralığı: Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak ifade edilen bölge biyosensörlerden alınan akım-derişim eğrilerinin lineer olarak belirlendiğı derişim aralığıdır.

Hızlı cevap zamanı: Biyosensör sisteminde yanıt zamanının kısa olması biyosensör kullanılmasına neden olan önemli etkenlerden biridir. Bir biyosensör elektrodunun yanıt zamanı, akım-zaman grafiğine bakılarak anlaşılabilir. Örneğin elde edilen grafikte basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi durumda ise yanıt zamanı kısa (hızlı)'dır.

Hızlı geriye dönme zamanı: İlk örnekten ne kadar süre geçtikten sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirleyen bir parametredir. Yani ilk örnek ilavesi sonrasında sabit akım değerine kısa süre içinde ulaşılabiliriyorsa ikinci örnek aynı süre sonunda eklenebilecektir.

Basitlik ve ucuzluk: Düşük maliyetle tasarlanan kullanımı rahat biyosensör sistemleri idealdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve maliyeti fazla olan biyosensörler, daha sonra basitleştirilmiş ve ucuzlaştırılmıştır. Ayrıca ölçüm ünitesinin taşınabilir olması değişik alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmasına olanak sağlar.

Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Elektrotların sterilizasyonunun yapılabilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Bunun yanında biyosensör yapısında bulunan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu sınırlayan en önemli parametredir.

1.5. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

Serbest elektronlarla yüklü partiküller elektromanyetik veya elektrostatik alanda diğer yüklü partiküller gibi yön değiştirilebilir. Bu elektronlar aynı zamanda çok kısa

boylu dalgalar gibi davranır ve kırınımına uğrayabilir, absorplanabilir veya saçılabilir ve karşılaştığı noktaya bir miktar enerji taşırlar (Chamot & Mason., 1958). Bu prensiplerden yola çıkılarak Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope) (SEM), 1950'li yıllarda geliştirilmesi ile birlikte birçok bilim dalında geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Çünkü SEM büyük çeşitlilikte numunenin incelenbilmesine olanak sağlamıştır. Bir maddeye ait birçok özelliğinin cihazın yardımcı tekniklerle birlikte kullanılmasıyla elde edilebilmesinin yanında numune yüzeyinin görüntülenmesi ve bileşiminin belirlenmesi de sağlanmıştır (Heinrich. 1981).

Taramalı elektron mikroskopta, katı numune yüzeyi raster düzeninde yüksek enerjili bir elektron demetiyle taranır. Raster, bir katot ışınları tüpü veya bir televizyondaki tarama düzeni ilkesine benzer bir tarama şekli olup, bu sistemde bir elektron demetiyle önce yüzey boyunca düz bir doğru üzerinde (x yönünde) tarama yapılır, sonra demet başlangıç pozisyonuna döner ve son olarak aşağı doğru (y yönünde) belirlenmiş bir miktar kadar kaydırılır. Bu işlem söz konusu yüzey alanı tamamen taranana kadar tekrarlanır. Bu tarama işlemi sırasında yüzey üstünde (z yönü) bir sinyal alınır ve görüntüye dönüştürüleceği bir bilgisayar sisteminde toplanır (Skoog vd., 1998).

Bütün mikroskoplarda ana unsur büyütme derecesi ve görüntü netliğidir. Bir optik mikroskopta ışık dalgalarının odaklanmasında lensler kullanılır. SEM'de ise ekrandaki görüntüyü oluşturan elektron demetinin odaklanmasında elektromıknatıslar kullanılır. Elektromıknatısların kullanımı operatöre daha yüksek büyütme derecelerinde çalışma olanağı sağlar. Aynı zamanda elektron demeti daha net bir görüntü oluşturur.

SEM, katı madde yüzeylerinde direkt olarak çalışmak için tasarlanmış bir cihazdır. Cihaz tarafından sağlanan ve odaklanan elektron demeti ile yapılan tarama ile TV'dekine benzer bir görüntü oluşur. SEM optik mikroskoplara nazaran daha derin bir odaklama sağlar. Bu özellikleri nedeniyle, SEM ile bir numunenin üç boyutlu görüntüsü elde edilebilir.

SEM, daha çok görüntüleme amacı ile üretilmiştir. Çözünürlük topografik 10 nm ve kompozisyonda 100 nm'den daha iyi düzeyde elde edilebilir (Chamot ve Mason, 1958). İyi bir görüntü ve çalışması için numunelerin elektriksel olarak iletken

olmaları tercih edilir. Ayrıca elektrikçe iyi iletken numuneler genellikle ısıyı iyi ilettilerinden ısısal bozunma olasılığı en az düzeydedir. İletken olmayan numunelerin SEM görüntülerini elde etmek için numune yüzeyine vakumlu bir ortamda ince bir metalik film tabakası kaplanır (Skoog vd., 1998).

1.6. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Taramalı Tünelleme Mikroskobu iletken yüzeylerde atomları görüntülemeyi başaran mikroskoptur. Tünel akımındaki iğne ile yüzey arasındaki mesafeye göre üstel azalma, akımın sadece yüzeydeki ve iğnedeki en yakın atomlar arasında gerçekleşeceğini garanti eder. Bu özellik mesafeye monoton şekilde bağlı olduğundan geri besleme mekanizması kolayca kontrol edilebilir. Nanoamper mertebesindeki akım mütevazı bir deneysel düzenekle bile az bir gürültü seviyesiyle ölçülebilir.

Yalıtkan yüzeylerde de aynı hassasiyette görüntü alabilmek için Binnig, Quate ve Gerber 1986 yılında TTM' ye benzeyen Atomik Kuvvet Mikroskobunu geliştirdiler. AFM' de iğne-yay sistemi, örnek yüzeyinde piezoelektrik malzeme sayesinde tarama yapar. Piezoelektrik malzemeye verilen voltaj sayesinde tarama olur. Örnek ve tarama iğnesi arasında yer alan atomlar arası etkileşme kuvveti sebebiyle iğne-yay sisteminde sapmalar meydana gelir. Bu sapmalar optik ya da elektriksel yöntemlerle belirlenir ve daha sonra geri besleme mekanizmasına gönderilir ve görüntü elde edilirken referans olarak kullanılır.

AFM' nin kalbi niteliğinde olan iğne-yay sistemi kuvvet sensörü olarak görev almaktadır ve ölçtüğü kuvvetler sayesinde yüzeyin fiziksel özellikleri ve topografisi belirlenir. Pertürbasyon teorisine bağlı hesaplamalar tünel akımının iğne-yüzey arası etkileşim kuvvetine direkt olarak ilişkili olduğunu öngörse de, eş zamanlı yapılan TTM/AFM deneylerinde alınan sonuçlar tünel akımının ve etkileşim kuvvetinin farklı fiziksel bilgiler verdiği ve sonuçlar arasında ciddi farklılıklar bulunduğu anlaşılmıştır. AFM Fermi Enerji düzeyine kadar olan elektron durum yoğunluğunu görürken, TTM sadece Fermi Enerjisi seviyesi civarındaki elektron durum yoğunluğunu görebilmektedir. Stefan Hembacher ve diğ. bu olayı grafit yüzeyinin eş zamanlı TTM/AFM görüntüsünü alarak ispatlamışlardır (Hembacher vd., 2003).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Kullanılan Cihazlar

Deneyle ve ölçümler sırasında kullanılan tüm cihaz ve donanımlar şunlardır:

Terazi (Precisa XB)

Manyetik karıştırıcı (AGE velp)

Vorteks (Velp scientific)

Ses titreşimli temizleyici (Bandelin Sonorex)

pH-metre (WTW series)

Potansiyostat (AUTOLAB 302, GPRES 4,9 yazılımı, Eco Chemie)

Kalem Grafit Elektrot (PGE) (Çalışma elektrodu olarak kullanıldı)

Ag/AgCl (Referans elektrot olarak kullanıldı.)

Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı.)

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) (FEI. Model Quanta FEG 250)

Atomik kuvvet mikroskopu (AFM) (NT-MDT. Model AFM NTEGRA Solaris)

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Aflatoksin B₁, B₂, G₁, G₂ (Sigma)

Asetik asit (%99–100) (Sigma-Aldrich)

Hidroklorik asit (%37) (Sigma-Aldrich)

Sodyum klorür (NaCl) (Sigma)

Magnezyum klorür (MgCl₂) (Sigma)

Sodyum Hidroksit (NaOH) (Sigma)

Di potasyum mono hidrojen fosfat (K₂HPO₄) (Carlo erba)

Potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄) (Merck)

Metanol (Merck)

Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür (Trizma-HCl) (Sigma)

EDTA disodyum tuzu (Sigma)

Potasyum ferrosiyaniür [$K_4Fe(CN)_6$] (Merck)

Potasyum ferrisiyaniür [$K_3Fe(CN)_6$] (Merck)

Potasyum klorür (KCl) (Merck)

Sığır serum albumin (BSA)

Calf thymus dsDNA (Sigma)

Calf thymus ssDNA (Sigma)

Tüm çalışmalarda deney malzemelerini yıkamak ve çözeltileri hazırlamak için 18 mega-ohm'luk ultrapure su kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında ($25,0\pm 0,5$) °C'de gerçekleştirildi.

2.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Tampon çözeltilerin hazırlanışı

Tüm tampon çözeltilerin hazırlanışında 18 Mega-ohm' luk ultra saf su kullanılmıştır. Tamponlar hazırlık sonrasında balon jojelerde buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır.

Hazırlanan tampon çözeltilerinin pH'larının istenilen değerine getirilebilmesi, hazırlanan 0,10 N' lik NaOH ve/veya 0,10 N' lik HCl çözeltilerinin ve pH-metre cihazının kullanımıyla gerçekleştirilmiştir.

0,50 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH: 4,80) (ABS)

500 mL lik balon jojeye bir miktar ultra saf su konuldu. Derişik asetik asit çözeltisinden 28.9 mL alındı. Balon jodedeki suyun üzerine ilave edildi. 500 mL ye kadar ultra saf su ile tamamlandı ve 1 litrelik içinde karıştırıcı olan behere boşaltıldı. Karıştırıcı ve pH metre çalıştırıldı. pH 4.81 oluncaya dek 1N (1M) NaOH çözeltisi ilave edildi. Daha sonra 1.168 g NaCl tartıldı ve ilave edildi. pH 4.8 olunca çözelti 1L lik balon jojeye boşaltıldı ve ultra saf su ile 1L ye tamamlandı.

0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH:7,40) (PBS)

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

Ferri-Ferro çözeltisinin hazırlanışı

0,1645 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (mol kütlesi: 329,243 g) ve 0,20813 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (mol kütlesi: 422,38 g) çözeltisine iyonik şiddeti sabit tutmak için 1,49 g KCl eklendi (200 mL için). Çözelti günlük olarak hazırlandı ve karanlıkta bekletildi.

Sığır serum albumin (BSA) çözeltisinin hazırlanışı

0,01 g BSA'nın üzerine 10 mL PBS eklendi ve % 1'lik BSA çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti 4 °C de saklandı ve günlük hazırlandı.

DNA çözeltilerinin hazırlanışı

Buzağı timus bezinden elde edilen DNA (Calf Thymus DNA); çift sarmal DNA (dsDNA) stok çözeltileri; 1000µg/mL, TE çözeltisi (10 mM Tris- HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) ile hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı. Ct dsDNA seyreltik çözeltisi, 0,5M Asetat tamponu (pH 4,8) ile hazırlandı. Çözeltinin ışığa maruziyetini en aza indirebilmek için, ışık almayan bir kutu içerisinde buzdolabında -20°C'de muhafaza edildi.

Tek sarmal DNA (ssDNA) çözeltisi de yukarıda ct dsDNA için anlatıldığı gibi hazırlandı ve buzdolabında -20°C 'de muhafaza edildi.

Aflatoksinlerin stok çözeltilerinin hazırlanışı

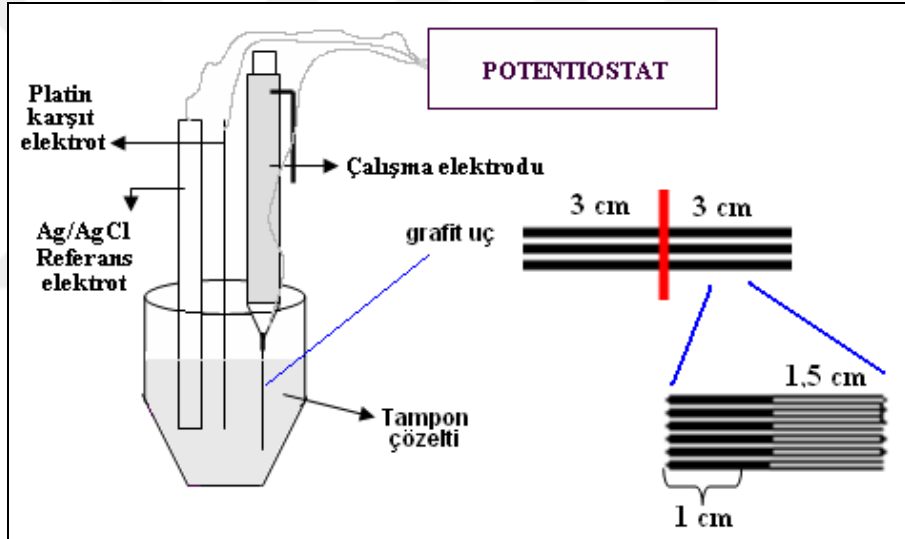
Sigma firması tarafından temin edilen aflatoksinlerin stok çözeltisi, %99.8'lik metanol (MeOH) çözeltisinde 1000 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

2.4. Deney Düzenekinin Hazırlanması

DPV ve CV tekniğinden yararlanılarak yapılan çalışmalarda, potansiyostat cihazı olarak µ-AUTOLAB III (Eco Chemie, Hollanda) ve yazılım programı olarak GPES

kullanılmıştır. Üçlü elektrot sistemi olarak ise, kalem grafit elektrot çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrot ve platin tel de karşıt elektrot olarak kullanılmıştır. Tüm elektrotlar sisteme metal bağlantılarla bağlanmış ve bu üçlü elektrot sistemin daldırıldığı ölçüm çözeltisinin hacmi 6 mL olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çalışma elektrodu olarak kullanılan, kalem grafit elektrodun (PGE) (Rotring T 0,5 kalem, Tombo HB model 0.5mm uç) 6 cm olan grafit uçları 3 cm boyunda kesildi (Wang vd., 2001; Erdem, 2007; Canavar vd., 2011). Bu 3 cm'nin 1,5 cm'lik kısmı işaretlenerek, 1 cm'lik kısmı çözelti içine daldırılacak şekilde sisteme yerleştirildi. Her bir deneme için farklı grafit yüzeyler oluşturularak tek kullanımlık elektrot sistemi sağlanmış oldu.



Şekil 2.1 Deney düzeneği ve PGE'nin hazırlanması.

dsDNA ve ssDNA Optimizasyon Çalışmaları İçin Deney Basamakları

1. Asetat tamponu içerisinde aktivasyon işlemi



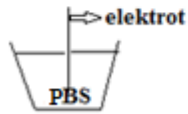
2. Pasif adsorpsiyon işlemi ile DNA'nın immobilizasyonu



ct dsDNA

ct ssDNA

3. Fosfat tamponunda yıkama + Fosfat tamponu içerisinde ölçüm



Aflatoksinlerin DNA Hibridizasyonuna Etkisinin Gözlemlenmesi İçin Deney Basamakları

1. Asetat tamponu içerisinde aktivasyon işlemi

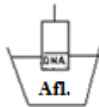


2. Pasif adsorpsiyon işlemi ile prob-1 immobilizasyonu



Prob-1

3. Prob-1 immobilize edilmiş elektrot yüzeyinde Aflatoksin etkileşimi



4. Hedef prob-2 ile hibridizasyon



Prob- 2

5. Fosfat tamponu içerisinde ölçüm

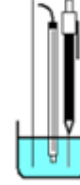
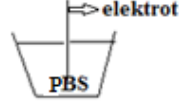


EIS İle DNA-Aflatoksin Etkileşimi Deney Basamakları

1. Asetat tamponu içerisinde aktivasyon işlemi



2. Fosfat tamponunda + Ferri-Ferro çözeltisi içerisinde ölçüm yıkama

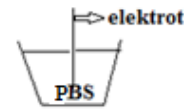


3. Pasif adsorpsiyon işlemi ile DNA'nın immobilizasyonu



ct dsDNA
ct ssDNA

4. Fosfat tamponunda + Ferri-Ferro çözeltisi içerisinde ölçüm yıkama

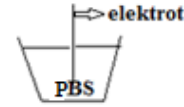


5. BSA ile modifikasyon



BSA

6. Fosfat tamponunda + Ferri-Ferro çözeltisi içerisinde ölçüm yıkama

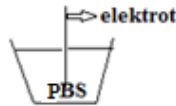


7. Aflatoksin ile etkileşim



Aflatoksin

8. Fosfat tamponunda + Ferri-Ferro çözeltisi içerisinde ölçüm yıkama



Şekil 2.2 Deney basamakları şematik gösterimi

2.5. PGE yüzeyine DNA immobilizasyonunda uygun etkileşim zamanının tespit edilmesi

Kalem Grafit Elektrot (PGE)'un Aktivasyonu:

Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan PGE elektrot 0,5 M asetat tamponu (pH: 4,80) çözeltisinde +1,40 V potansiyel uygulanarak 60 saniye süre ile aktive edildi.

PGE Yüzeyine ct ds DNA ve ct ssDNA'nın İmmobilizasyonu:

PBS (pH 7,40)'de hazırlanmış olan 35 µg/mL derişimindeki ct dsDNA çözeltisinden 110 µL alınarak viyalere koyuldu. Yüzeyi aktive edilmiş PGE bu çözeltiye daldırıldı ve pasif adsorpsiyon yöntemi ile farklı sürelerde (5-10-15-20-25-30 dakika) bekletildi. Tam olarak bağlanmamış DNA'ların uzaklaştırılması için kalem elektrot 0,5 M PBS'ye bir kere daldırılıp çıkartılarak yıkanmıştır.

PBS (pH 7,40)'de hazırlanmış olan 35 µg/mL derişimindeki ct ss DNA çözeltisinden 110 µL alınarak viyalere koyuldu. Yüzeyi aktive edilmiş PGE bu çözeltiye daldırıldı ve pasif adsorpsiyon yöntemi ile farklı sürelerde (5-10-15-20-25-30 dakika) bekletildi. Tam olarak bağlanmamış DNA'ların uzaklaştırılması için kalem elektrot 0,5 M PBS'ye daldırılarak bir kez yıkanmıştır.

Voltametrik Ölçüm:

DPV (diferansiyel pulse voltametri) tekniği ile 0,2 V ile 1,4 V arasında, 60 mV/s tarama hızıyla, 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, PBS (pH 7,40) ortamında guanin bazına ait yükseltgenme sinyalleri üçlü elektrot sistemi ile voltametrik olarak ölçülmüştür.

Çalışmalarda elektrot yüzeyi her seferinde tazelenmiştir. Her çalışma en az 5 kez ard arda tekrar edilmiştir.

2.6. PGE yüzeyine DNA immobilizasyonunda uygun derişim miktarının tespit edilmesi

PGE yüzeyine DNA immobilizasyonunda uygun derişim miktarının tespit edilmesi amacıyla sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

Kalem Grafit Elektrot (PGE)'un Aktivasyonu:

PGE, 0,5 M asetat tamponu (pH: 4,80) çözeltisinde +1,40 V potansiyel uygulanarak 60 saniye süre ile aktive edildi.

PGE Yüzeyine ct dsDNA ve ct ssDNA'nın İmmobilizasyonu:

PBS (pH 7,40)'de hazırlanmış olan farklı derişimlerde (10-15-20-25-30-35-40-45-50 µg/mL) ct dsDNA çözeltisinden 110 µL alınarak viyalere koyuldu. Yüzeyi aktive edilmiş PGE bu çözeltiye daldırıldı ve pasif adsorpsiyon yöntemi ile her derişim için 25 dakika sabit süre bekletildi. Süre sonunda 0,5 M PBS'de 1 kez yıkama işlemi yapıldı.

PBS (pH 7,40)'de hazırlanmış olan farklı derişimlerdeki (5-10-15-20-25-30-35-40-45 µg/mL) ct ssDNA çözeltisinden 110 µL alınarak viyalere koyuldu. Yüzeyi aktive edilmiş PGE bu çözeltiye daldırıldı ve pasif adsorpsiyon yöntemi ile her bir derişim için 25 dakika sabit süre bekletildi. Süre sonunda 0,5 M PBS'de 1 kez yıkama işlemi yapıldı.

Voltametrik Ölçüm:

DPV (diferansiyel pulse voltametri) tekniği ile 0,2 V ile 1,4 V arasında, 60 mV/s tarama hızıyla, 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, PBS (pH 7,40) ortamında guanin bazına ait yükseltgenme sinyalleri üçlü elektrot sistemi ile voltametrik olarak ölçülmüştür.

Çalışmalarda elektrot yüzeyi her seferinde tazelenmiştir. Her çalışma en az 5 kez ard arda tekrar edilmiştir.

2.7. Aflatoksinlerin DNA hibridizasyonuna etkisinin gözlemlenmesi

Kalem Grafit Elektrot (PGE)'nun Aktivasyonu:

PGE, 0,5 M ABS (pH 4,80) çözeltisinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye aktive edilmiştir.

Hibridizasyon ve Aflatoksin Etkileşimi:

Deneylerin gerçekleştirildiği araştırma laboratuvarında daha önce *Toxoplasma gondii* parazetine ait kısa zincirli ve bir birinin hedefi olan tek sarmal problemler bulunmaktaydı:

Prob 1: [5-NH₂(CH₂)₆-ICTCCCCTCTICTIICIAAAAI-3'; inozin modifiye]

Prob 2: (5'CTTTTCGCCAGCAGAGGGGAGC3'; hedef prob)

PGE, PBS (pH 7,4) çözeltisi ile hazırlanan 25 µg/mL prop-1' de 10 dakika bekletilerek adsorpsiyon yöntemi ile prob 1'in aktive edilmiş PGE yüzeyine immobilizasyonu sağlandı. Prob 1'in hedef karşılığı olan prob 2'nin de 40 µg/mL derişimindeki çözeltisi PBS'de (pH 7,4) hazırlandı. Aflatoksin B₁, G₁ ve G₂ için de her biri 2 µg/mL ve 4 µg/mL olacak şekilde PBS (pH 7,4) ortamında çözeltileri hazırlandı.

Aktive edilmiş yüzeyine 25 µg/mL prop1 immobilize edilen PGE sırasıyla 2 µg/mL aflatoksin B₁ ve 4 µg/mL aflatoksin B₁ çözeltilerinde 10 dakika bekletilip PBS'de yıkandıktan sonra, hedefi olan prob 2'de de 5 dakika bekletilip ölçüm alındı. Kör deney için, prob 1 modifiye PGE, doğrudan prob 2 çözeltisinde 5 dakika bekletilip ölçüm alındı. Aynı deneyler aflatoksin G₁ ve G₂ için de tekrar edildi.

Voltametrik Ölçüm:

DPV (diferansiyel pulse voltmetri) tekniği ile 0,2 V ile 1,4 V arasında, 100 mV/s tarama hızıyla, 50 mV'luk puls genliğinde tarama yapılarak, PBS (pH 7,4) ortamında guanin bazına ait yükseltgenme sinyalleri üçlü elektrot sistemi ile voltametrik olarak ölçülmüştür.

Her çalışmada elektrot yüzeyi yenilenmiş ve her çalışma en az 5 kez tekrar edilmiştir.

2.8. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile Karakterizasyonu

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile önce PGE' nin görüntüsü daha sonra sırasıyla 35 µg/mL DNA 25 dakika immobilize edilmiş PGE' nin SEM görüntüsü, DNA immobilize edilmiş PGE 0.1 M BSA çözeltisinde 30 dakika bekletildikten sonraki PGE' nin görüntüleri alınmıştır. Bu görüntülerden sonra bu modifiye PGE 1 µg/mL aflatoksin B₁ ile 2 dakika etkileştirildikten sonra SEM görüntüsü alınmıştır. Ayrıca modifiye PGE üzerinde DNA-Aflatoksin etkileşimini görüntülemek amacıyla modifiye PGE 5 µg/mL aflatoksin G₁ ile 2 dakika etkileştirildikten sonra taramalı elektron mikroskopu ile PGE yüzeyinde gerçekleşen değişimler görüntülenmiştir.

Elde edilen SEM görüntüleri 12 kV'luk voltaj uygulanarak, Pakistan'da Lahor Üniversitesinde alınmıştır.

2.9. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile karakterizasyonu

Bu mikroskop görüntüleri ile yüzeyin topografik haritasını ve 3 boyutlu görüntüsünün yanında yüzeyin pürüzlük (Roughness, R) değeri de elde edilmektedir. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile önce PGE' nin görüntüsü daha sonra sırasıyla 35 µg/mL DNA 25 dakika immobilize edilmiş PGE' nin AFM görüntüsü, DNA immobilize edilmiş PGE 0.1 M BSA çözeltisinde 30 dakika bekletildikten sonraki PGE' nin görüntüleri alınmıştır. Bu görüntülerden sonra bu modifiye PGE 1 µg/mL aflatoksin B₁ ile 2 dakika etkileştirildikten sonra AFM görüntüsü alınmıştır. Ayrıca modifiye PGE üzerinde DNA-Aflatoksin etkileşimini görüntülemek amacıyla modifiye PGE 5 µg/mL aflatoksin G₁ ile 2 dakika etkileştirildikten sonra atomik kuvvet mikroskobu ile PGE yüzeyinde gerçekleşen değişimler Pakistan'da Lahor Üniversitesinde görüntülenmiştir.

2.10. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Dönüşümlü Voltametri (CV) Tekniği ile İncelenmesi

Kalem Grafit Elektrot (PGE)'nun Aktivasyonu:

PGE, 0,5 M ABS (pH 4,80) çözeltisinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye aktive edilmiştir.

CV Tekniği ile DNA ve Aflatoksin Etkileşimi:

Yüzeyi aktive edilmiş PGE, PBS (pH 7,4)'de yıkandıktan sonra CV tekniği ile ölçüm alındı. Ölçümden sonra tekrar PBS ile yıkandı ve denatüre edilmiş 35 µg/mL derişimde ct ssDNA çözeltisine daldırıldı ve 25 dakika beklenerek pasif adsorpsiyon ile immobilizasyonu sağlandı. PBS ile yıkandıktan sonra tekrar CV tekniği ile ölçüm alındı. Ölçümden sonra PBS ile yıkanan PGE 0,1 M BSA çözeltisinde 30 dakika bekletildi. PBS ile yıkandıktan sonra CV tekniği ile ölçüm alındı. Ölçüm alınan PGE yıkandıktan sonra 4 µg/mL Aflatoksin B₁ çözeltisine daldırılarak 20 dakika etkileşim sağlandı. PBS ile yıkanarak CV tekniği ile ölçüm alındı.

Voltametrik ölçüm:

DPV (diferansiyel pulse voltametri) tekniği ile 0,2 V ile +1,6 V arasında, 100 mV/s tarama hızıyla, 1 mV'luk adım potansiyelinde tarama ile ölçüm yapıldı.

Tüm ölçümler ferri-ferro çözeltisinde alınmıştır.

Elektrotların yüzeyi her seferinde tazelandı, ardarda 5 kez deney tekrarlandı.

2.11. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Empedimetrik Olarak İncelenmesi

Kalem Grafit Elektrot (PGE)'nun Aktivasyonu:

PGE, 0,5 M ABS (pH 4,80) çözeltisinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye aktive edilmiştir.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile DNA-Aflatoksin etkileşimi:

Aktive edilmiş PGE, PBS çözeltisinde yıkandıktan sonra empedansı alındı. PGE, PBS çözeltisinde yıkandıktan sonra denatüre edilmiş 35 µg/mL ct ss DNA çözeltisine 25 dakika daldırılarak ss DNA'nın elektrot yüzeyine immobilize olması sağlanmıştır. DNA immobilize edilmiş PGE, PBS çözeltisinde yıkanarak elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniği ile empedansı alındı. Tekrar yıkandıktan sonra 0,1 M BSA çözeltisine elektrot daldırılarak 30 dakika beklendi. 30 dakika sonunda elektrot PBS ile yıkanarak tekrar empedans ölçümü yapıldı. PBS ile yıkanan PGE 5 µg/mL Aflatoksin B₁ çözeltisinde 2 dakika süre ile ssDNA-Aflatoksin etkileşimi sağlandı. PBS ile yıkandıktan sonra empedans ölçümü yapıldı. Aynı işlemler 35 µg/mL ct ssDNA ile 5 µg/mL Aflatoksin B₂ ile 5 dakika etkileştirilerek, 35 µg/mL ct ssDNA ile 5 µg/mL Aflatoksin G₁ ile 2 dakika etkileştirilerek, 35 µg/mL ct ssDNA ile 5 µg/mL Aflatoksin G₂ ile 5 dakika etkileştirilerek elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniği ile empedansı alınmıştır.

35 µg/mL ct dsDNA PGE yüzeyine 25 dakika immobilize edildikten sonra yukarıda anlatılan ssDNA için yapılan işlemler uygulanmıştır. 35 µg/mL ds DNA-Aflatoksin etkileşimi için 1 µg/mL aflatoksin B₁ ile 2 dakika, 5 µg/mL aflatoksin B₂ ile 1 dakika, 5 µg/mL aflatoksin G₁ ile 2 dakika, 5 µg/mL aflatoksin G₂ ile 5 dakika

etkileşim sağlanarak elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniği ile empedansları alınmıştır.

Ölçüm:

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi deneylerinde, Ag/AgCl referans elektrot ve Pt tel yardımcı elektrot olarak kullanıldı. Gamry Referans 600 potansiyostat / galvanostat / Frekans Analyzer (FRA) yazılımı kullanılarak, çözeltilerin elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniği ile empedansı alındı.

Empedans ölçümleri, hazırlanan ferro-ferri siyanür çözeltisi içinde dalga yüksekliği 10 mV'ta sabitlendi ve böylelikle sistem özelliklerinin denge durumunda tutulması sağlandı. Nyquist eğrilerinin elde edilebilmesi için uygulanan frekans 0,1 Hz ile 100 kHz arasında ayarlandı.

Elektrotların yüzeyi her seferinde tazelandı ve her bir aflatoksin için deneyler en az 5 kez tekrarlandı.

2.12. Aflatoksin-DNA Etkileşiminde Aflatoksin Miktarının İncelenmesi

Kalem Grafit Elektrot (PGE)'nin Aktivasyonu:

PGE, 0,5 M ABS (pH 4,80) çözeltisinde +1,40 V uygulanarak 60 saniye aktive edilmiştir.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile DNA-Aflatoksin etkileşimi:

Aktive edilmiş PGE, PBS çözeltisinde yıkandıktan sonra empedansı alındı. PGE, PBS çözeltisinde yıkandıktan sonra denatüre edilmiş 35 µg/mL ct ssDNA çözeltisine 25 dakika daldırılarak ss DNA'nın elektrot yüzeyine immobilize olması sağlandı. ss DNA immobilize edilmiş PGE, PBS çözeltisinde yıkanarak elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniği ile empedansı alındı. Tekrar yıkandıktan sonra 0,1 M BSA çözeltisine elektrot daldırılarak 30 dakika beklendi. 30 dakika sonunda elektrot PBS ile yıkanarak tekrar empedans ölçümü yapıldı. PBS ile yıkanan modifiye PGE sırasıyla 0.2 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL ve 5 µg/mL Aflatoksin B₁ çözeltisinde 2 dakika süre ile ssDNA-Aflatoksin etkileşimi sağlandı. PBS ile yıkandıktan sonra empedans ölçümü yapıldı. Aynı işlemler 35 µg/mL ct ssDNA ve 0.1 M BSA immobilize edilmiş modifiye PGE ile 1 µg/mL, 2 µg/mL ve 5 µg/mL Aflatoksin B₂ ile 5 dakika etkileştirilerek, 35 µg/mL ct ssDNA ve 0.1M BSA'lı modifiye PGE ile 0.2 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL ve 5 µg/mL Aflatoksin G₁ ile 2

dakika etkileştirilerek, 35 µg/mL ct ssDNA-BSA immobilize edilmiş PGE ile 0.1 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL ve 5 µg/mL Aflatoksin G₂ ile 5 dakika etkileştirilerek elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniği ile empedansı alınmıştır.

35 µg/mL ct dsDNA PGE yüzeyine 25 dakika immobilize edildikten sonra ssDNA için yukarıda anlatılan işlemler tekrar edilmiştir. 35 µg/mL dsDNA-BSA modifiye elektrot için 0.1 µg/mL, 1 µg/mL ve 2 µg/mL aflatoksin B₁ ile 2 dakika, 0.2 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL ve 5 µg/mL aflatoksin B₂ ile 1 dakika, 0.2 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL ve 5 µg/mL aflatoksin G₁ ile 2 dakika, 0.1 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL ve 5 µg/mL aflatoksin G₂ ile 5 dakika etkileşim sağlanarak elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniği ile empedansları alınmıştır.

Ölçüm:

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi deneylerinde, Ag/AgCl referans elektrot ve Pt tel yardımcı elektrot olarak kullanıldı. Gamry Referans 600 potantiyostat / galvanostat / Frekans Analyzer (FRA) yazılımı kullanılarak, çözeltilerin elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniği ile empedansı alındı.

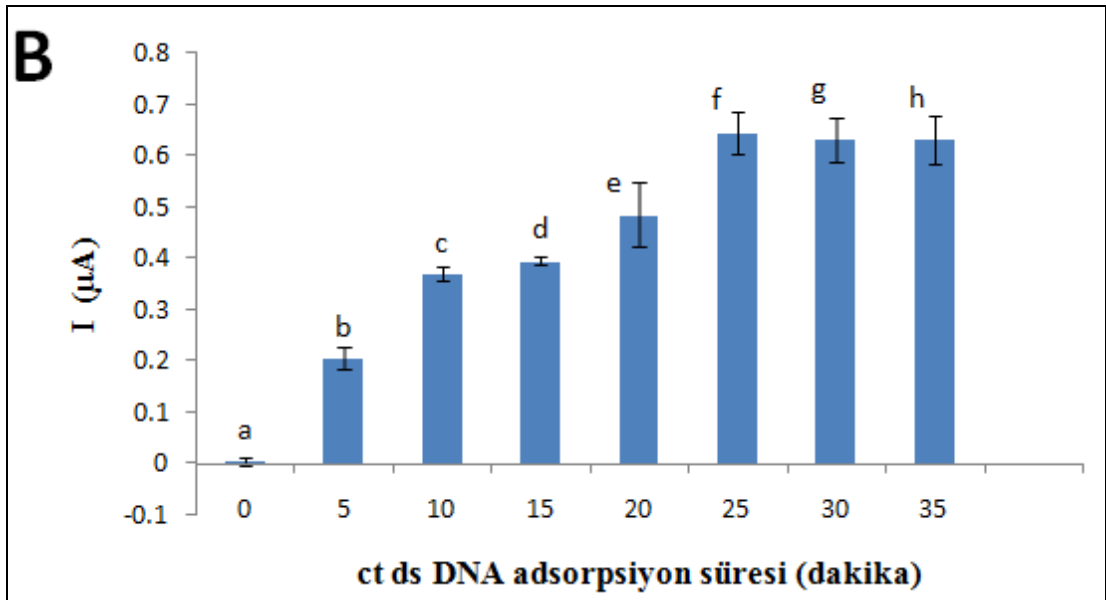
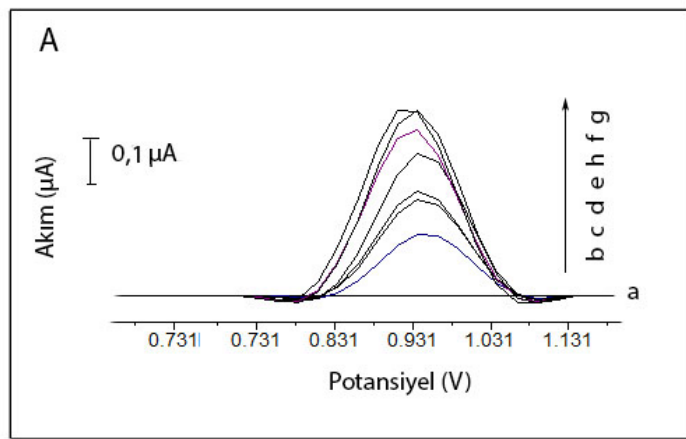
Empedans ölçümleri, hazırlanan ferro-ferri siyanür çözeltisi içinde dalga yüksekliği 10 mV'ta sabitlendi ve böylelikle sistem özelliklerinin denge durumunda tutulması sağlandı. Nyquist eğrilerinin elde edilebilmesi için uygulanan frekans 0,1 Hz ile 100 kHz arasında ayarlandı.

Elektrotların yüzeyi her seferinde tazelendi ve her bir aflatoksin için deneyler en az 5 kez tekrarlandı.

3. BULGULAR

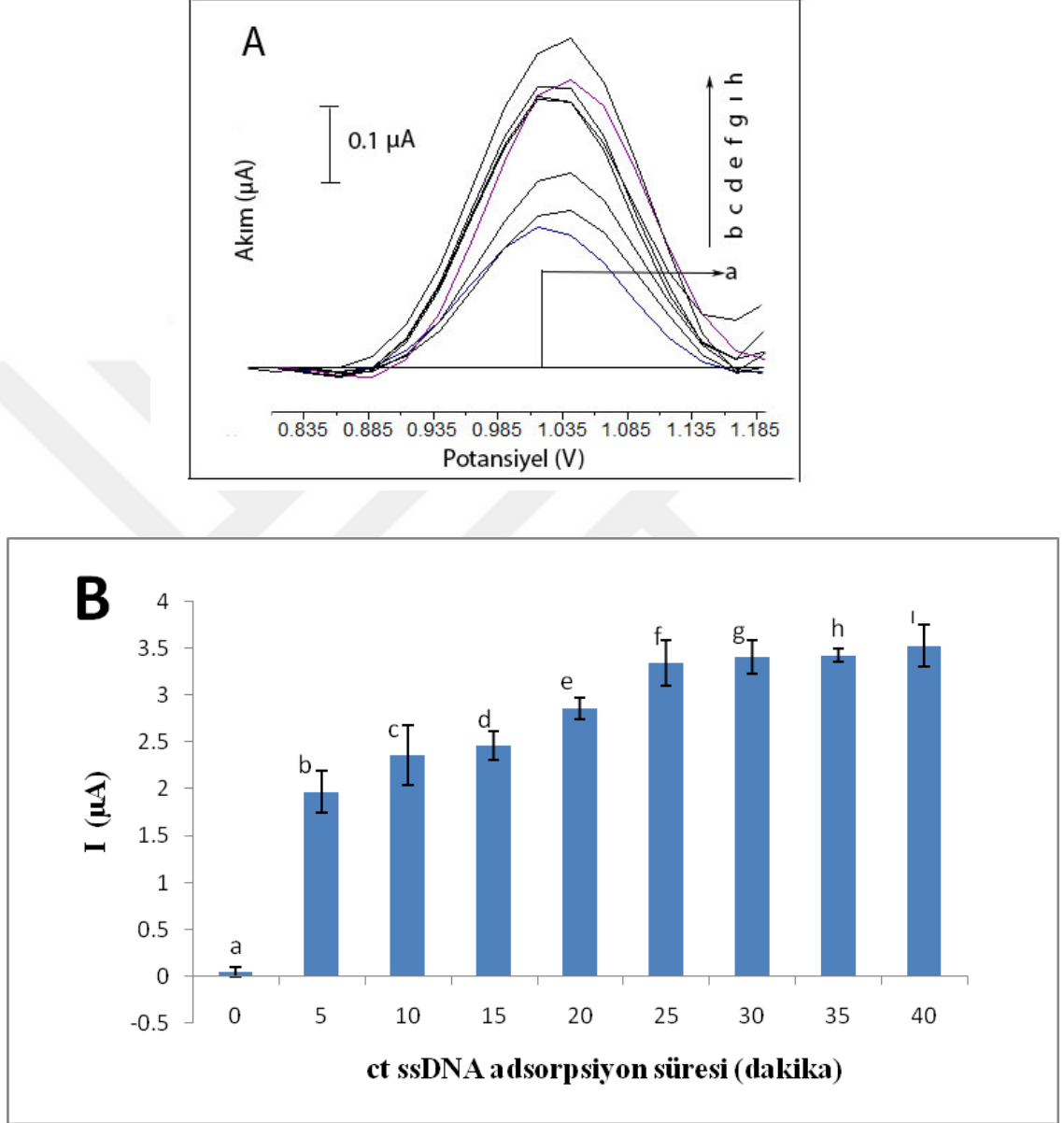
3.1. PGE Yüzeyine ct dsDNA ve ct ssDNA İmmobilizasyonunda Uygun Etkileşim Zamanının Belirlenmesine Ait Bulgular

Aktivasyonu gerçekleştirilen PGE yüzeyine 35 µg/mL ct dsDNA immobilizasyonu yöntem 2.5’de anlatıldığı gibi yapıldı. PGE yüzeyine ct dsDNA immobilizasyonunda etkileşme zamanları kıyaslandı. En uygun etkileşme zamanı 25 dakika olarak belirlendi. Elde edilen voltamogram ve histogram Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 PGE yüzeyine immobilize edilen ct dsDNA’ ların (a) ct dsDNA yokken (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 (f) 25 (g) 30 (h) 35 dakika etkileşim sonrasında DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren (A) voltamogramlar (B) histogramlar

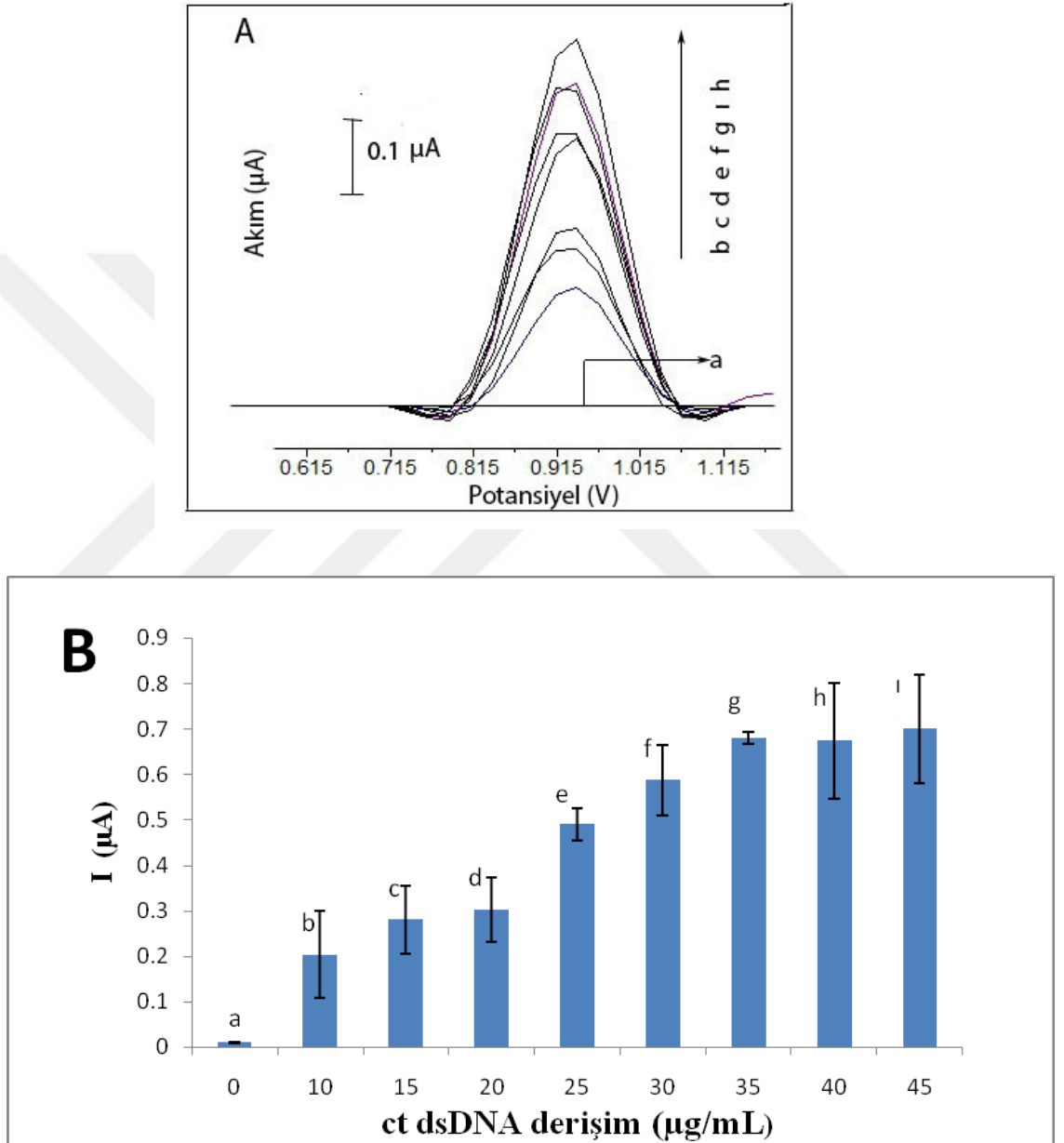
PGE yüzeyine 35 µg/mL ct ssDNA immobilizasyonu için en uygun etkileşme zamanı 25 dakika olarak belirlendi. Elde edilen voltamogram ve histogram Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 PGE yüzeyine immobilize edilen ct ssDNA'nın (a) ct ssDNA yokken (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 (f) 25 (g) 30 (h) 35 (i) 40 dakika etkileşim sonrası DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren (A) voltamogramlar (B) histogramlar

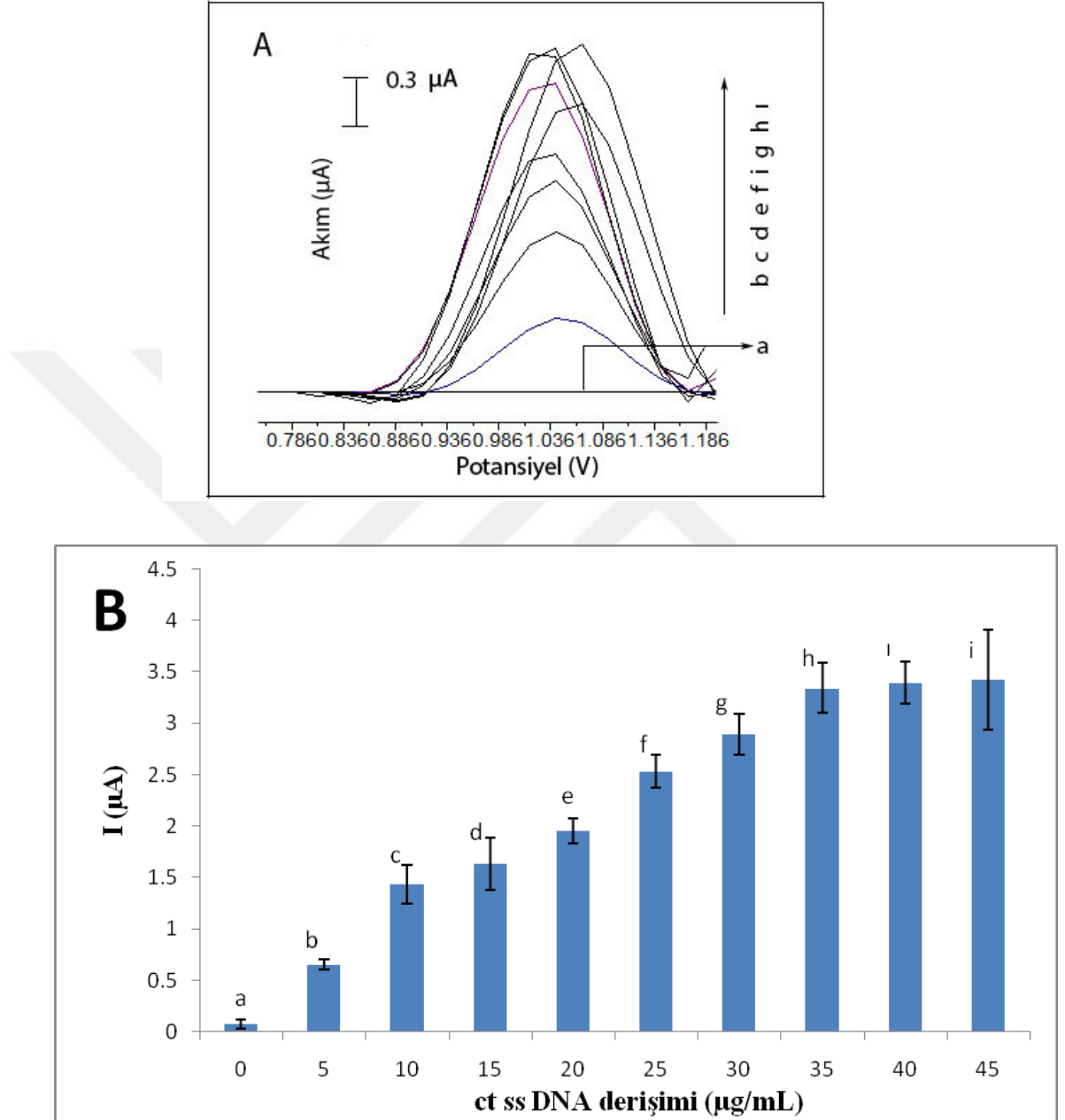
3.2. PGE Yüzeyine ct dsDNA ve ct ssDNA İmmobilizasyonunda Uygun Derişim Miktarının Belirlenmesine İlişkin Bulgular

PGE yüzeyine ct dsDNA immobilizasyonu için yöntem 2.5.'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. En uygun derişimin ct dsDNA için 35 $\mu\text{g/mL}$ olduğuna karar verilmiştir. Elde edilen voltamogram ve histogram Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 PGE yüzeyine immobilize edilen (a) ct dsDNA yokken (b) 10 (c) 15 (d) 20 (e) 25 (f) 30 (g) 35 (h) 40 (i) 45 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde ki ct dsDNA'lara ait DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren (A) voltamogramlar (B) histogramlar

PGE yüzeyine ct ssDNA immobilizasyonu için yöntem 2.5.'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. ct ssDNA için en uygun derişimin 35 $\mu\text{g/mL}$ olduğuna karar verilmiştir. Elde edilen voltamogram ve histogram Şekil 3.4'de gösterilmiştir.

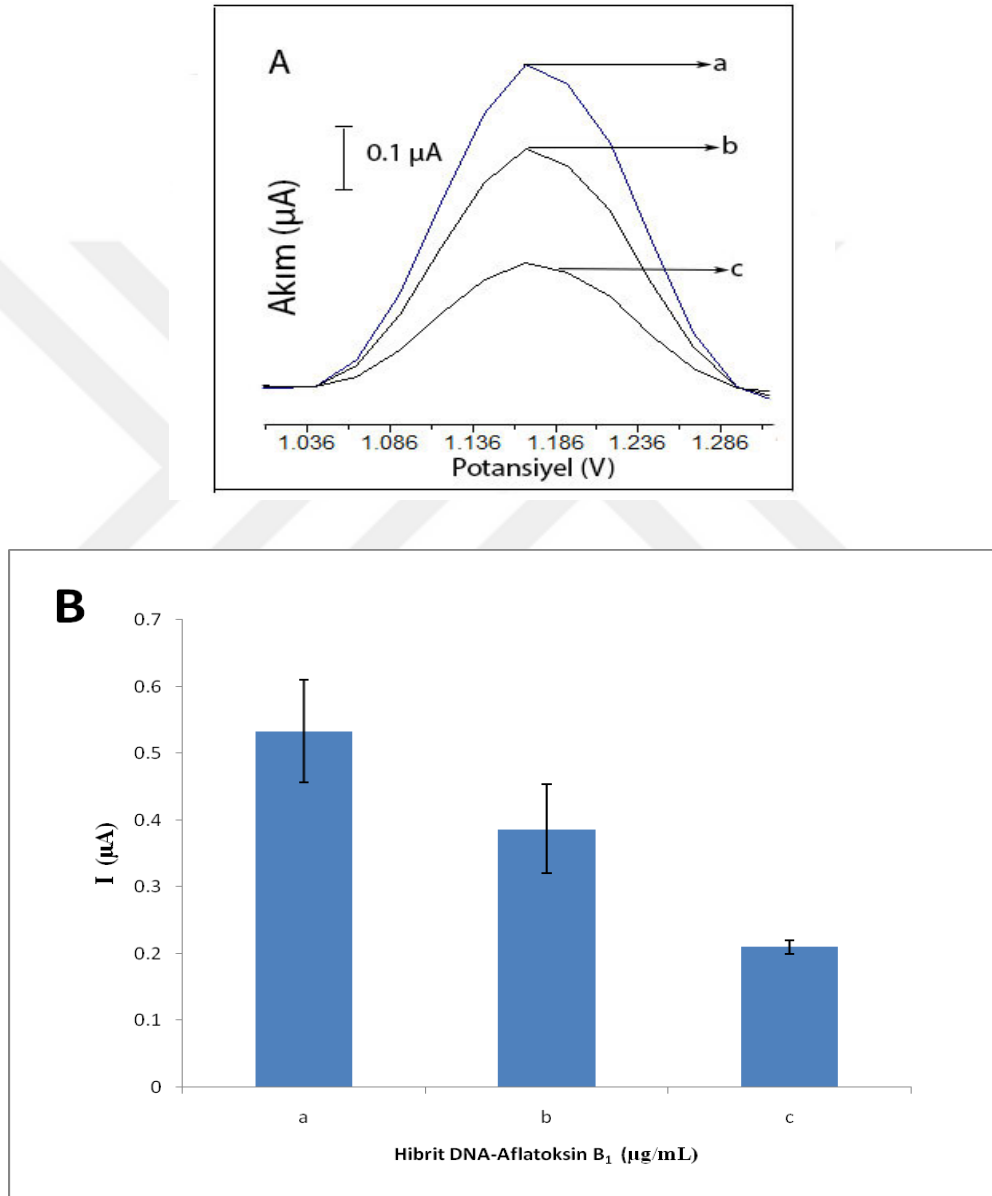


Şekil 3.4 PGE yüzeyine immobilize edilen (a) ct ssDNA yokken (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 (f) 25 (g) 30 (h) 35 (i) 40 (i) 45 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde ki ct ssDNA'lara ait DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren (A) voltamogramlar (B) histogramlar

3.3. Aflatoksinlerin DNA Hibridizasyonuna Etkisine Ait Bulgular

Aflatoksin B₁'in DNA hibridizasyonuna etkisine ait bulgular

Yöntem 2.7'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. 2 µg/mL ve 4 µg/mL Aflatoksin B₁'in hibridizasyona etkisi guanin yükseltgenme sinyallerindeki değişim üzerinden incelendi. Elde edilen voltamogram ve histogram Şekil 3.5'de gösterilmiştir.

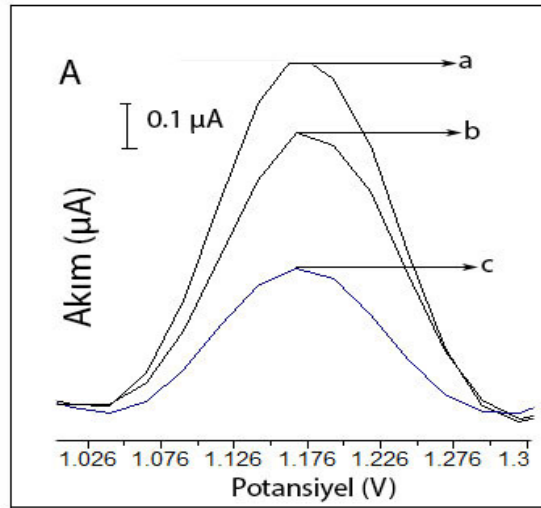


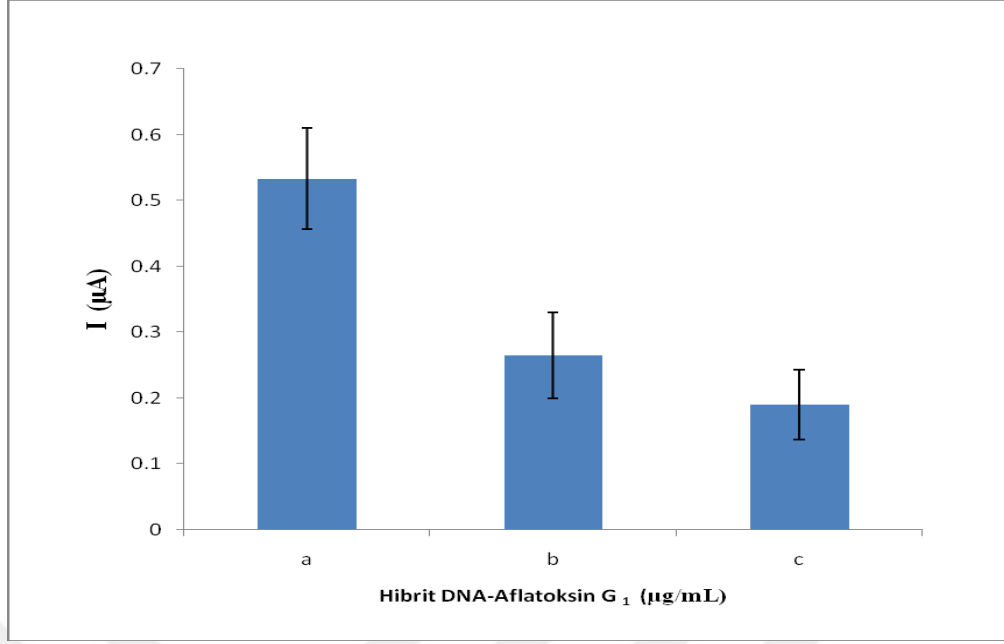
Şekil 3.5 (a) Aflatoksin B₁ ile etkileşmeden önce (b) 2 µg/mL Aflatoksin B₁ ile etkileştikten sonra (c) 4 µg/mL Aflatoksin B₁ ile etkileştikten sonra hibrit DNA'nın guanin sinyalini gösteren (A) voltamogram (B) histogram

Şekil 3.5’de Aflatoksin B₁ ile etkileşimden önce alınan prop yükseltgenme sinyali (a), 2 µg/mL Aflatoksin B₁ ile etkileştikten sonra (b) düşme gözlenmiş ve Aflatoksin B₁ miktarı 4 µg/mL’ye artırıldığında yükseltgenme sinyalinde (c) daha fazla azalma olduğu gözlenmiştir. Buradan da Aflatoksin B₁’in DNA hibridizasyonunu engellediği sonucuna varılmıştır. 2 µg/mL Aflatoksin B₁ ile etkileşim sonrası guanin yükseltgenme sinyalinin yaklaşık %30 azaldığı, Aflatoksin B₁ miktarı 4 µg/mL’ye artırıldığında sinyal azalmasının yaklaşık %50 olduğu tespit edilmiştir.

Aflatoksin G₁’in DNA hibridizasyonuna etkisine ait bulgular

Yöntem 2.7’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. 2 µg/mL ve 4 µg/mL Aflatoksin G₁’in hibridizasyona etkisi guanin yükseltgenme sinyallerindeki değişim üzerinden incelendi. Elde edilen voltamogram ve histogram Şekil 3.6’da gösterilmiştir.



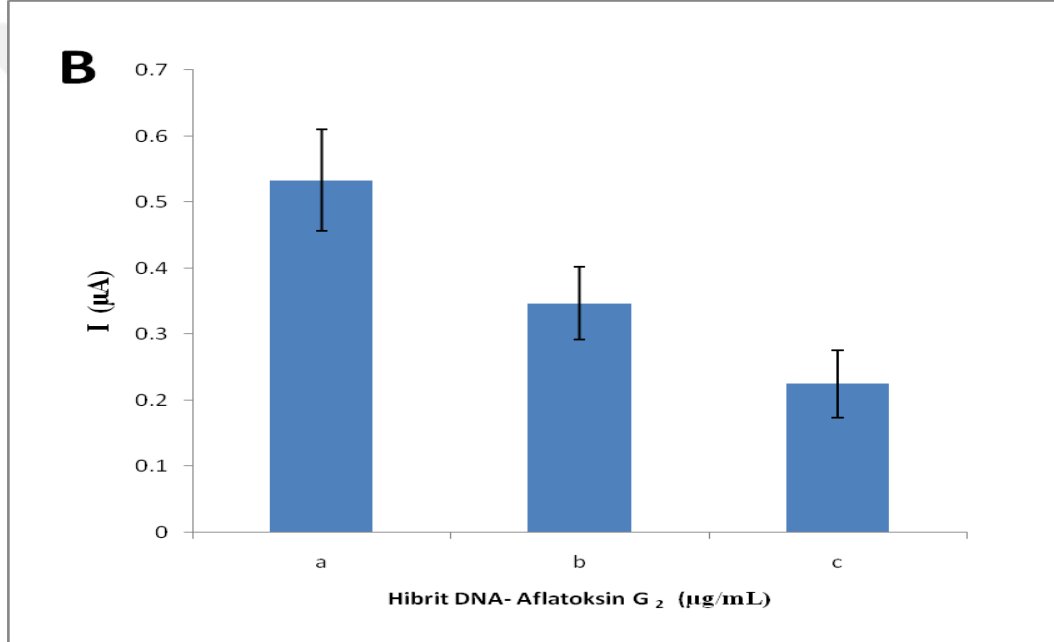
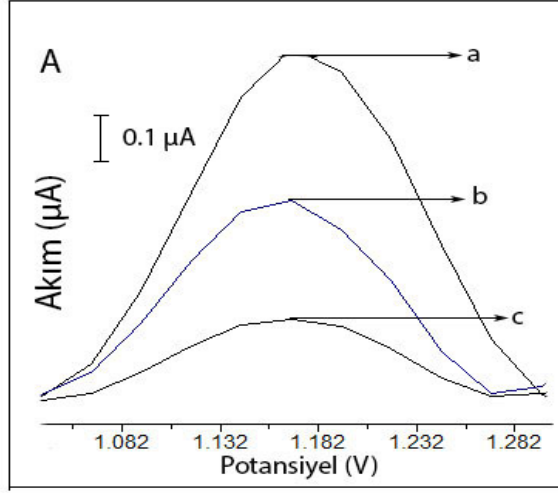


Şekil 3.6 (a) Aflatoksin G₁ ile etkileşmeden önce (b) 2 µg/mL Aflatoksin G₁ ile etkileştikten sonra (c) 4 µg/mL Aflatoksin G₁ ile etkileştikten sonra hibrit DNA'nın guanin sinyalinin gösteren (A) voltamogram, (B) histogram

Şekil 3.6'da Aflatoksin G₁ ile etkileşimden önce alınan prop yükseltgenme sinyali (a), 2 µg/mL Aflatoksin G₁ ile etkileştikten sonra (b) düşme gözlenmiş ve Aflatoksin G₁ miktarı 4 µg/mL'ye arttırıldığında yükseltgenme sinyalinde (c) daha fazla azalma olduğu gözlenmiştir. Buradan da Aflatoksin G₁'in DNA hibridizasyonunu engellediği sonucuna varılmıştır. 2 µg/mL Aflatoksin G₁ ile yapılan deneyler sonucunda guanin yükseltgenme sinyallerinin yaklaşık %50 oranında azaldığı, 4 µg/mL aflatoksin G₁ ile etkileşim sonrasında ise bu azalmanın %60 olduğu gözlenmiştir.

Aflatoksin G₂'nin DNA hibridizasyonuna etkisine ait bulgular

Yöntem 2.7.'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. 2 µg/mL ve 4 µg/mL Aflatoksin G₂'nin hibridizasyona etkisi guanin yükseltgenme sinyallerindeki değişim üzerinden incelendi. Elde edilen voltamogram ve histogram Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7 (a) Aflatoksin G₂ ile etkileşmeden önce **(b)** 2 μg/mL Aflatoksin G₂ ile etkileştikten sonra **(c)** 4 μg/mL Aflatoksin G₂ ile etkileştikten sonra hibrit DNA'nın guanin sinyalini gösteren **(A)** voltamogram, **(B)** histogram

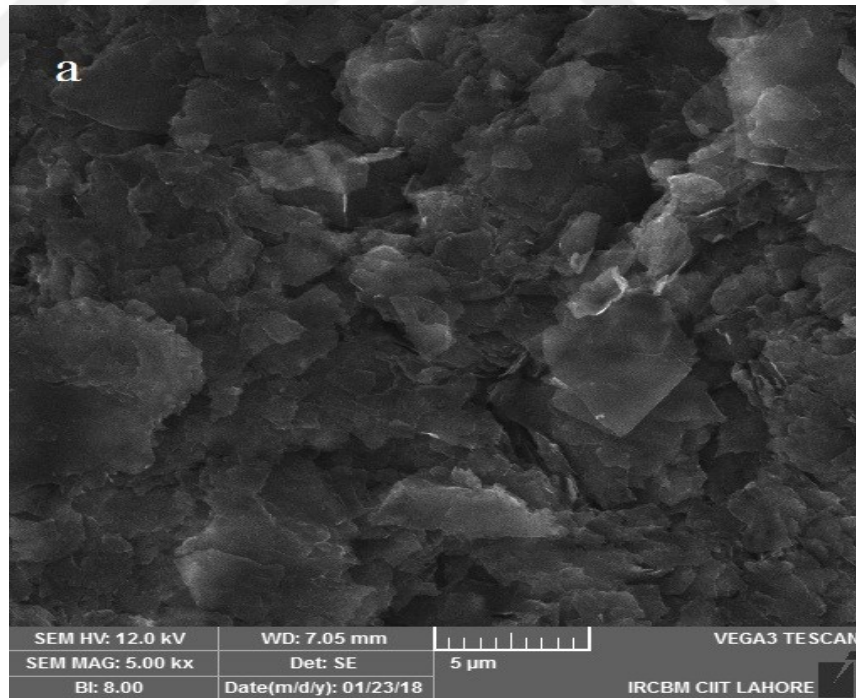
Şekil 3.7'de Aflatoksin G₂ ile etkileşimden önce alınan prob yükseltgenme sinyali (a), 2 μg/mL Aflatoksin G₂ ile etkileştikten sonra (b) düşme gözlenmiş ve Aflatoksin G₂ miktarı 4 μg/mL'ye arttırıldığında yükseltgenme sinyalinde (c) daha fazla azalma olduğu gözlenmiştir. Buradan da Aflatoksin G₂'nin DNA hibridizasyonunu engellediği sonucuna varılmıştır. Aflatoksin G₂'nin DNA hibridizasyonuna etkisini incelemek için yapılan deneylerde 2 μg/mL Aflatoksin

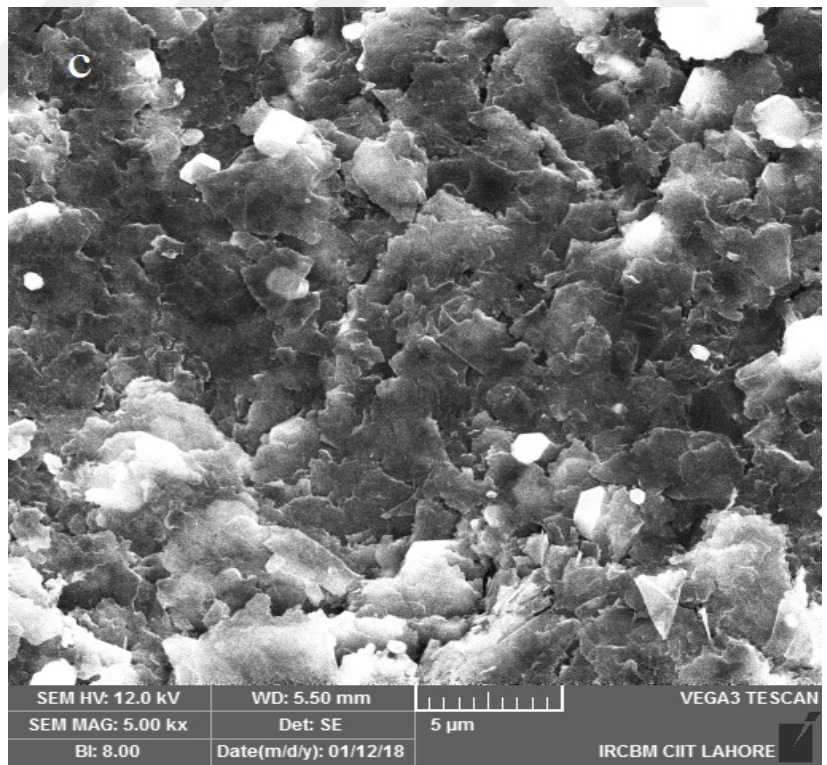
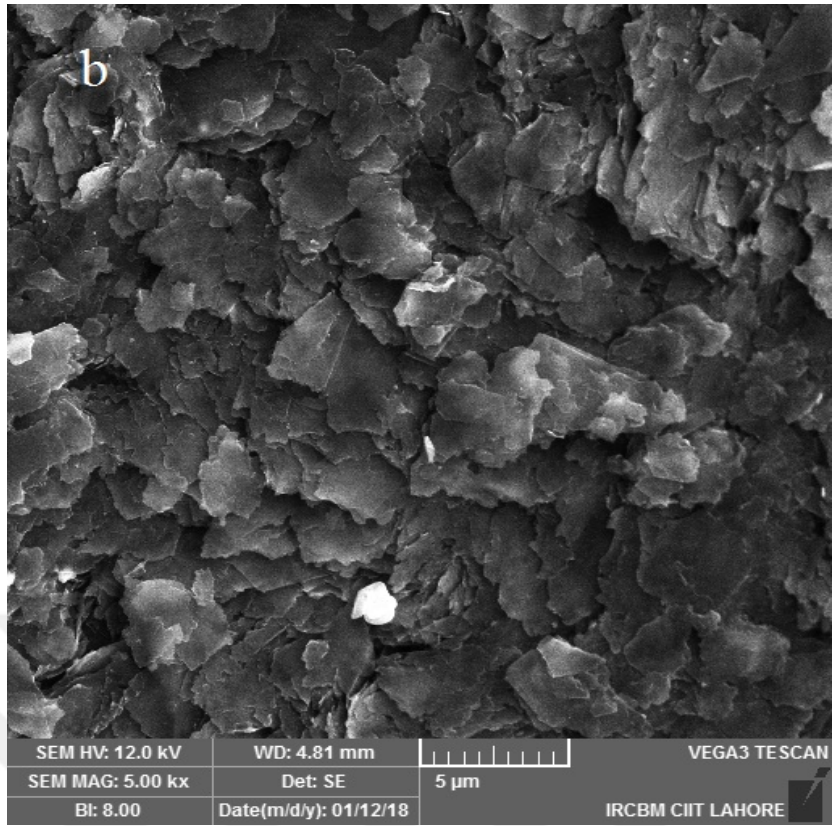
G₂ varlığında guanin yükseltgenme sinyallerinin %35, kadar azaldığı 4µg/mL Aflatoksin G₂ varlığında ise bu sinyallerin %55'e düştüğü düştüğü tespit edilmiştir.

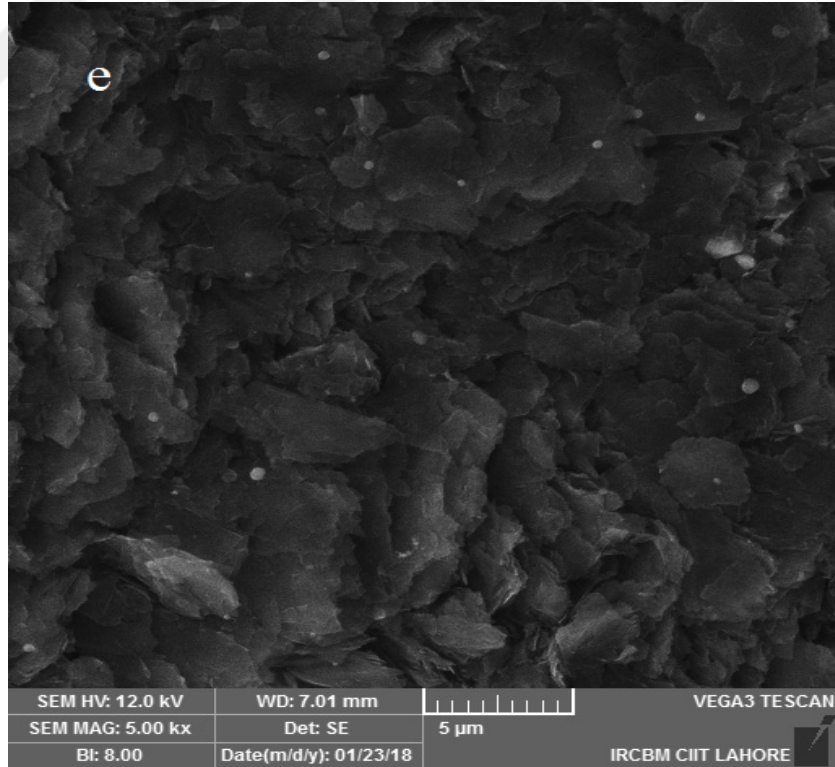
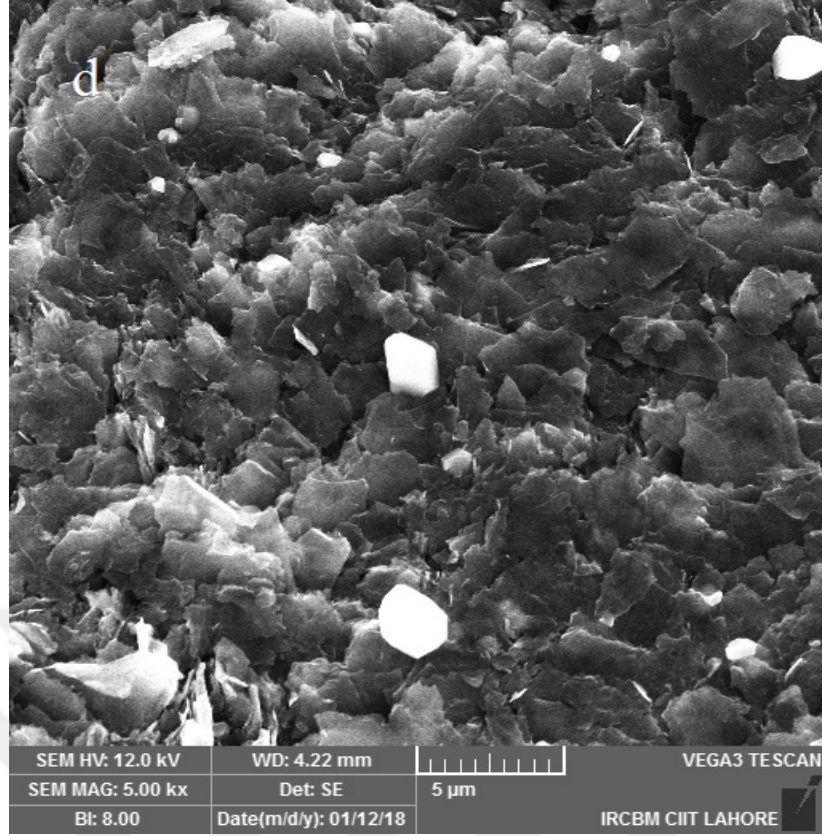
Sayısal değerlere bakıldığında aflatoksinlerin DNA'nın yapısına etkiyerek hibritleşmeyi engellediği bulunmuştur. Aflatoksin G₁'in guanin yükseltgenme sinyalini B₁ ve G₂'ye göre daha fazla düşürdüğü ve hibridizasyonu daha fazla inhibe ettiği gözlenmiştir.

3.4. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile Elektrot Karakterizasyonuna Ait Bulgular

PGE, DNA immobilize edilmiş PGE, DNA-BSA modifiye PGE ve DNA-BSA modifiye PGE'nin Aflatoksin B₁ ve Aflatoksin G₁ ile etkileştikten sonraki SEM görüntüleri Şekil 3.8'de gösterilmiştir.





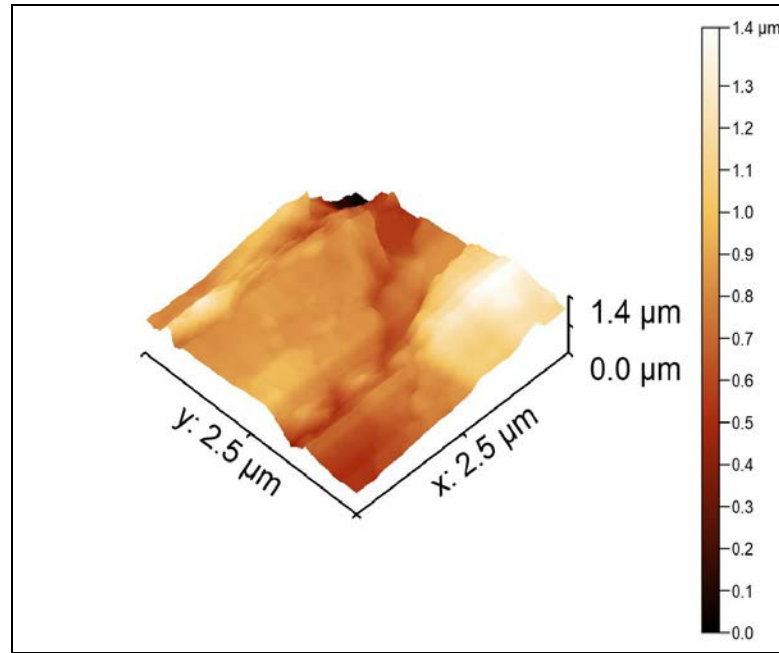


Şekil 3.8. Hızlandırma potansiyeli 12 kV; çözünürlük 5 μm 'de SEM görüntüleri
a) PGE b) DNA-PGE c) DNA/BSA-PGE d) DNA/BSA/Aflatoksin B₁-PGE e) DNA/BSA/Aflatoksin G₁-PGE.

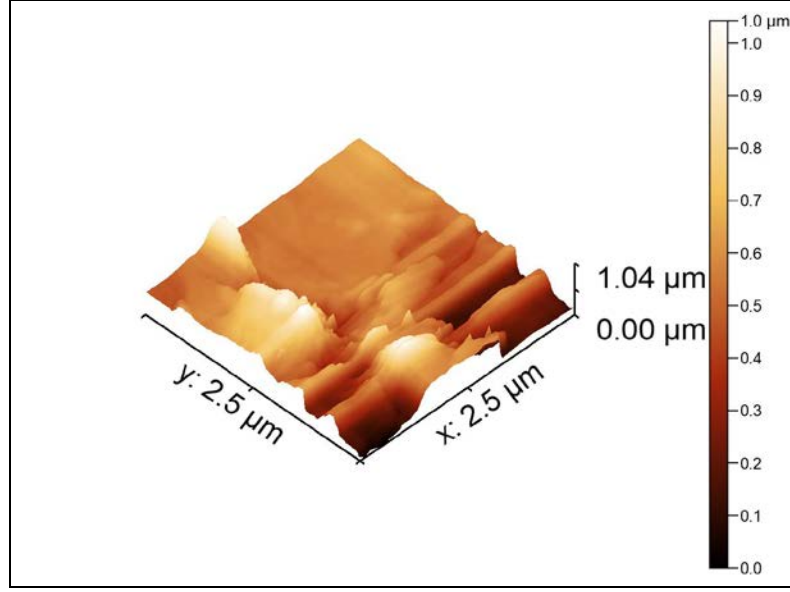
Taramalı elektron mikroskop görüntüleri, PGE'nin çıplak yüzey yapısını ve DNA, BSA ve son aşamada aflatoksin B1 ve aflatoksin G1 yüzey adsorpsiyonlarından sonra modifikasyonları her adımda incelemek için kullanıldı. Çıplak elektrot (PGE), lapa lapa yüzey görüntüsü verirken (a) Şekil 3.8, buradan grafit levhaların belirgin olmadığı görüldü, yüzeyin pürüzlü ve heterojen olduğu gözlemlendi. Çıplak elektrot farklı moleküller ile modifiye edildiğinde bu moleküller çıplak elektrot yüzeyine (PGE'ye) adsorbe olmuşlardır. Bu moleküller, pullu yüzey üzerine homojen olarak dağılmadığı, (Şekil 3.8 b, c, d, e) yüzeydeki moleküllerin sayısındaki artışın, DNA, DNA-BSA'nın (Şekil 3.8 b, c) adsorpsiyonu nedeniyle ortaya çıktığı gözlenmiştir. DNA-BSA/Aflatoksin B₁ ve DNA-BSA/Aflatoksin G1. (Şekil 3.8)'de modifiye edilmiş yüzey elektrodun yapısı SEM görüntülerinden de anlaşıldığı gibi DNA, protein ve aflatoksinlerin B1, G1'in fiziksel etkileşimi nedeniyle değişmiştir.

3.5. PGE Yüzeyinde Aflatoksin-DNA Etkileşiminin Atomik Kuvvet Mikroskopu (AFM) ile karakterizasyonuna Ait Bulgular

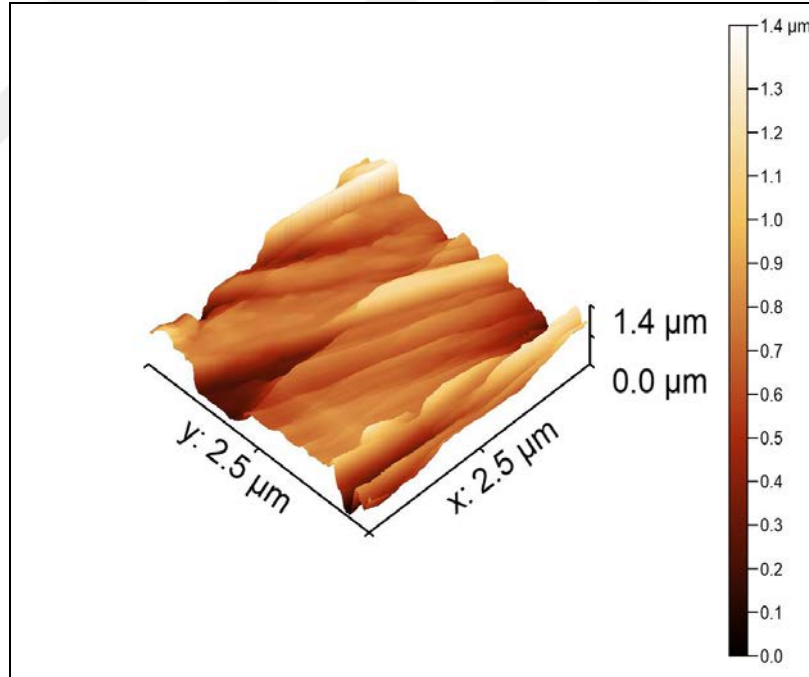
PGE, DNA immobilize edilmiş PGE, DNA-BSA modifiye PGE ve DNA-BSA modifiye PGE'nin Aflatoksin B₁ ve Aflatoksin G₁ ile etkileştikten sonraki AFM görüntüleri Şekil 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13'de gösterilmiştir.



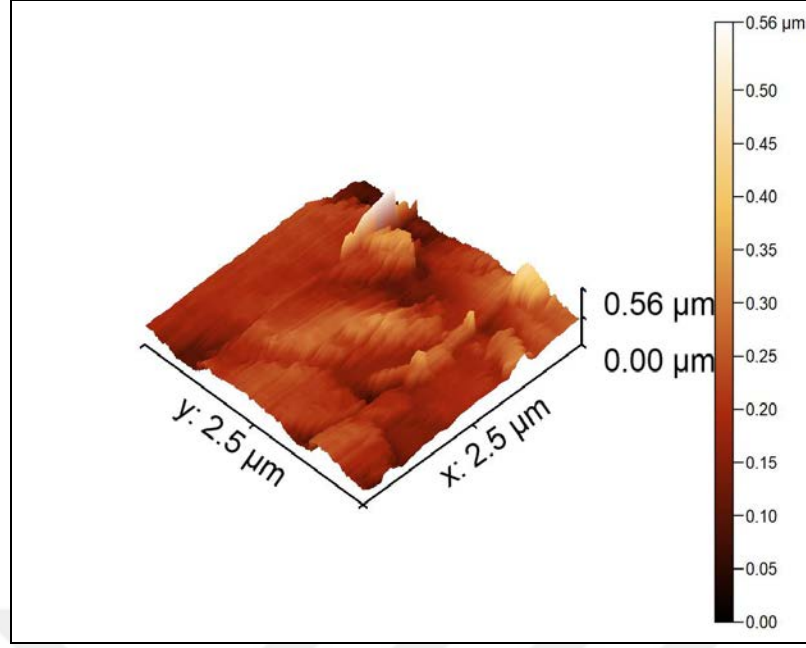
Şekil 3.9 Kalem grafit elektrotun (PGE) AFM görüntüsü.



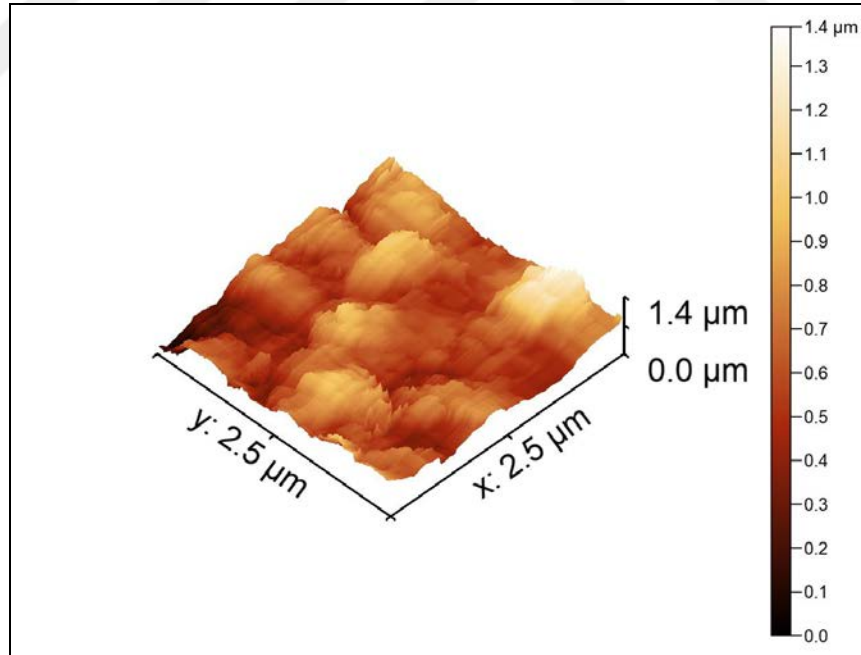
Şekil 3.10 DNA immobilize edilmiş PGE'nin AFM görüntüsü.



Şekil 3.11 DNA/BSA modifiye PGE'nin AFM görüntüsü.



Şekil 3.12. DNA/BSA modifiye PGE'nin Aflatoksin B₁ ile etkileşime girdikten sonraki AFM görüntüsü.

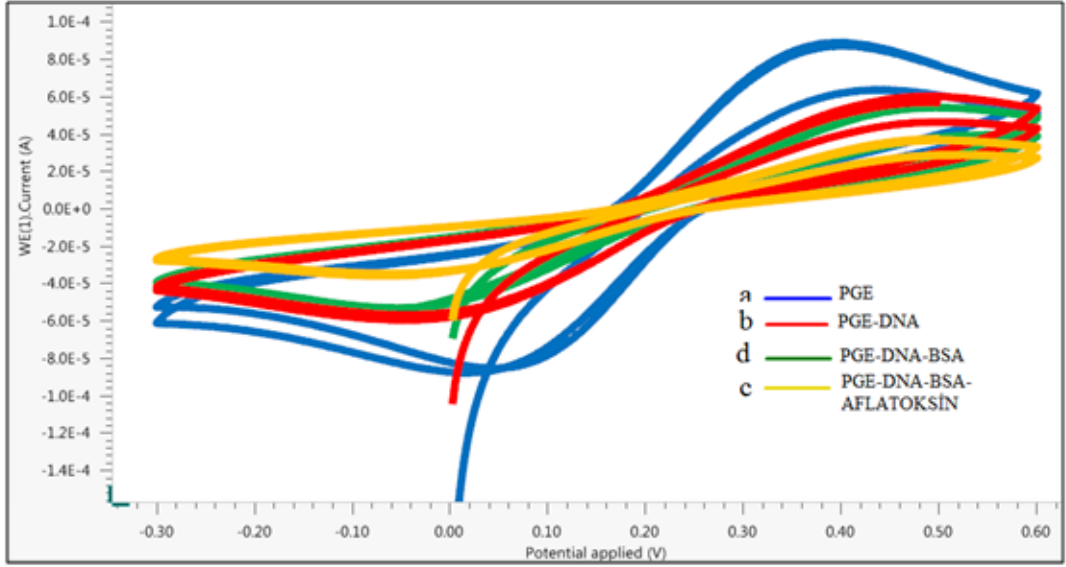


Şekil 3.13 DNA/BSA modifiye PGE'nin Aflatoksin G₁ ile etkileşime girdikten sonraki AFM görüntüsü.

Atomik kuvvet mikroskop görüntüleri (AFM), PGE'nin çıplak yüzey yapısını ve DNA, BSA ve aflatoksin B1 ve aflatoksin G1 yüzey adsorpsiyonlarından sonra modifikasyonları her adımda incelemek için kullanıldı. Empedans, PGE yüzeyinde bulunan gözeneklere doğru DNA ve aflatoksinin hareketinden etkilenmiştir. Bu hareketlilik ile direnç özellikleri açıklanabilir. Elde edilen sonuçlardaki değişimin nedeni yüzey yapısındaki değişkenlik olabilir. Yüzey yapısındaki değişimi görebilmek için çıplak PGE ve sırasıyla DNA modifiye PGE, DNA-BSA modifiye PGE, DNA-BSA/Aflatoksin B₁ modifiye PGE, DNA-BSA/Aflatoksin G₁ modifiye PGE'nin AFM görüntüleri elde edilip, sırasıyla Şekil 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13'de verilmiştir.

3.6. Döngüsel Voltametri (CV) Tekniği İle DNA-Aflatoksin Etkileşiminde Elektrot Karakterizasyonuna Ait Bulgular

Yöntem 2.10'da anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. İmmobilizasyon öncesi PGE yüzeyi, 35 µg/mL ssDNA immobilize edildikten sonra, %1' lik BSA çözeltisinde 30 dakika bekletildikten sonra ve son olarak 4 µg/mL Aflatoksin B₁ ile DNA etkileşimi sağlandıktan sonra CV tekniği ile redoks çözeltisinde alınan ölçümlere ait voltamogram şekil 3.14'de verilmiştir.



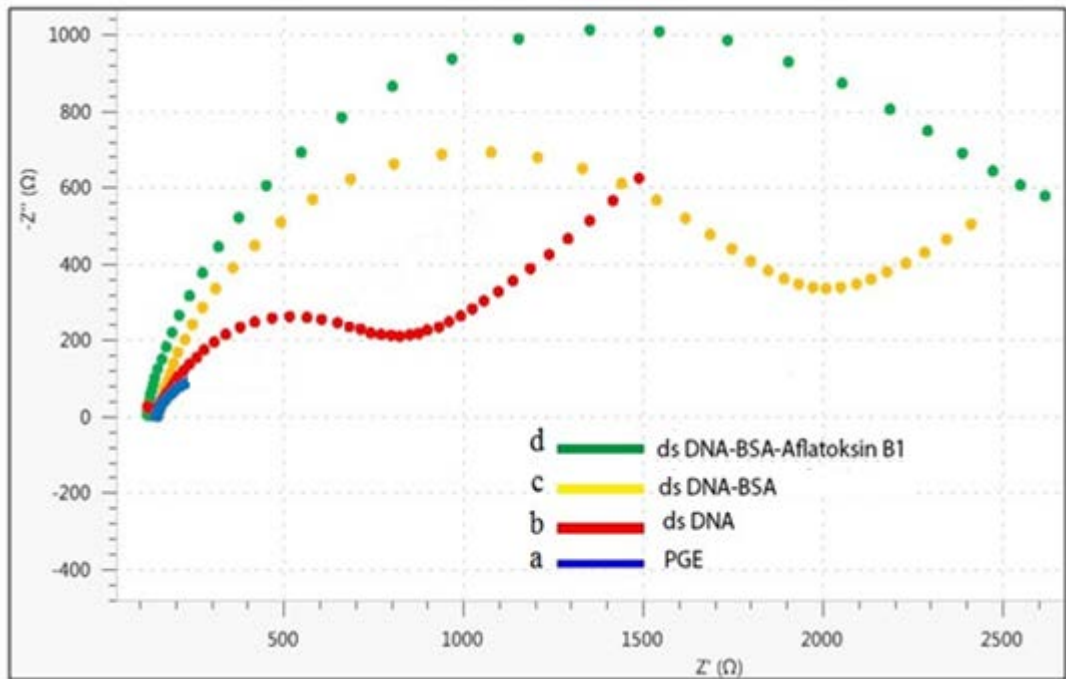
Şekil 3.14 Aflatoksin-DNA etkileşiminin etkileşiminin CV tekniği ile ölçümü sonucunda alınan yükseltgenme sinyallerine ait voltamogram; **a)** PGE **b)** 35 µg/mL ct ssDNA'nın Aflatoksin B₁ ile etkileşmeden önce, **c)** 35 µg/mL ct ssDNA-BSA ile etkileştikten sonra **d)** 35 µg/mL ct ssDNA-0.01 µg/mL BSA ile 4 µg/mL Aflatoksin B₁ ile etkileşimi sonucu yükseltgenme sinyallerinin ortalamaları.

Modifiye edilen yüzey özelliklerini araştırmak için PGE ile 2,5 mM ferri/ferrosiyamid çözeltisinde her yüzey modifikasyon basamağından sonra CV ölçümleri alındı ve voltamogramlar Şekil 3.14'de verilmiştir. Aktive edilmiş çıplak PGE ile alınan voltamogram tersinir ve keskin bir akım eğrisi gösterirken, DNA immobilizasyonundan sonra pik akımlarının azalması ve voltamogramın yayvanlaşması DNA'nın yüzeye başarılı bir şekilde tutturulduğunun bir göstergesidir. Sonraki basamakta DNA immobilize edilmiş PGE, BSA çözeltisinde yarım saat bekletilerek elektrot yüzeyinde DNA'nın boş bıraktığı alanlar bloke edilmiştir. Bu aşamadan sonra alınan voltamogramda pik akımlarının daha da azalmış olması bloklama işleminin amacına ulaştığını göstermiştir. Son aşamada, aflatoksin - DNA etkileşiminden sonra alınan voltamogramda pik akımlarının düşmesi, bu etkileşimin gerçekleştiğini göstermiştir.

3.7. PGE Yüzeyinde DNA-Aflatoksin Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular

3.7.1. PGE Yüzeyinde ct dsDNA-Aflatoksin B₁ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular

ct dsDNA-Aflatoksin B₁ etkileşimini empedimetrik olarak incelemek için yöntem 3.11’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Etkileşime ait Nyquist eğrisi şekil 3.15’de gösterilmiştir.



Şekil 3.15 1 µg/mL Aflatoksin B₁’ in dsDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde 2 dakika etkileşimine ait ferri- ferro çözeltisi içerisinde EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi; a) Modifiye edilmemiş PGE, b) dsDNA modifiye PGE, c) dsDNA-BSA modifiye PGE, d) Aflatoksin B₁’in dsDNA-BSA/PGE ile etkileşimi.

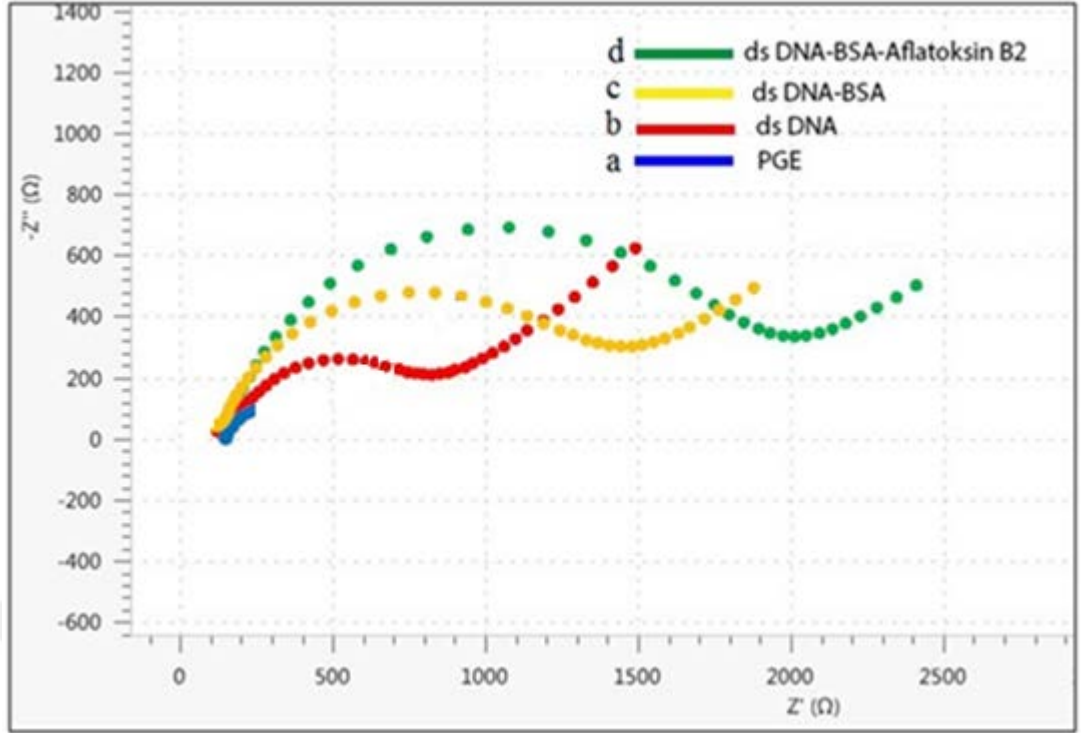
PGE yüzeyinde DNA-Aflatoksin B₁ etkileşimine ait Nyquist eğrisi Şekil 3.15’de gösterilmiştir.

Elektrot yüzeyinde yapılan her bir modifikasyon basamağı, immobilize edilen maddenin iletkenlik özelliğine bağlı olarak, elektrot ve elektrolit ara yüzeyinde oluşan Rct değerinde artışa veya azalışa neden olmaktadır. Çalışmamızda Aflatoksin B₁-dsDNA etkileşimi, Rct değerlerindeki değişimler yorumlanarak incelenmiştir.

EIS ile yapılan ölçümler sonucunda, dsDNA immobilizasyonu sonrasında Rct değeri PGE'nin Rct değerine göre artış göstermiştir. Çift sarmal DNA fosfat omurgası nedeniyle negatif yüklü olduğundan, anyonik $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ redoks çiftinin elektrot yüzeyine ulaşmasını engelleyerek Rct değerinde bir artışa neden olmaktadır. dsDNA immobilize edilmiş PGE, BSA çözeltisinde bekletildikten sonraki Rct değeri ise yüzeyin tamamen izole olması sebebiyle doğrudan artmıştır. Artık bu aşamadan sonra aflatoksinin elektrot yüzeyi ile teması engellenmiş ve sadece DNA ile etkileşmesi sağlanmıştır. Yani bu artış elektrot yüzeyinin dsDNA ve BSA ile modifiye edildiğini göstermektedir. Modifiye PGE'nin Aflatoksin B₁ ile etkileşiminden sonra ise Rct değerinde yine artma tespit edilmiştir. Bu artmanın sebebi olarak da aflatoksinin yapısında bulunan karbonil gruplarındaki oksijenin DNA ile etkileştiği düşünülmektedir (Mishra vd., 2015). Elde edilen sonuçlar SEM, AFM ve CV ile desteklenmektedir.

3.7.2. PGE Yüzeyinde ct dsDNA-Aflatoksin B₂ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular

ct dsDNA-Aflatoksin B₂ etkileşimini empedimetrik olarak incelemek için yöntem 2.11'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Etkileşime ait Nyquist eğrisi şekil 3.16'da gösterilmiştir.



Şekil 3.16 5 µg/mL Aflatoksin B₂' nin dsDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde 1 dakika etkileşimine ait ferri-ferro içerisinde EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi; a) Modifiye edilmemiş PGE, b) dsDNA modifiye PGE, c) dsDNA-BSA modifiye PGE, d) Aflatoksin B₂'nin dsDNA-BSA/PGE ile etkileşimi.

PGE yüzeyinde DNA-Aflatoksin B₁ etkileşimine ait Nyquist eğrisi Şekil 3.16'da gösterilmiştir.

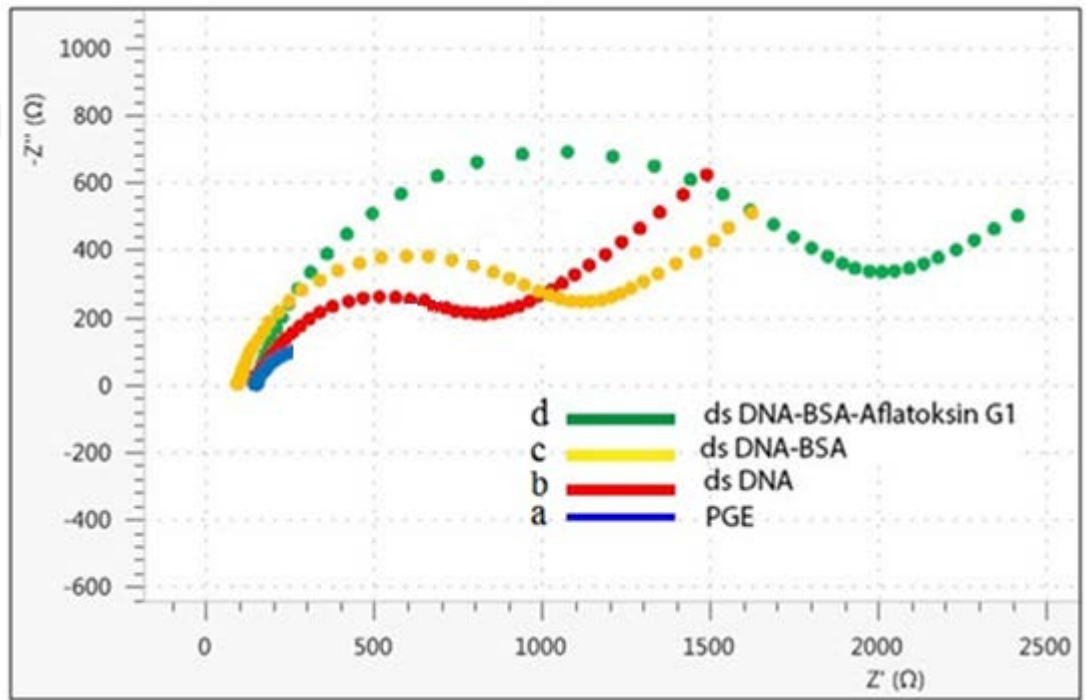
Çıplak elektrot (PGE) ve bu elektrot yüzeyinde yapılan her bir modifikasyon işlemi elektrot ve elektrolit ara yüzeyinde Rct değerinde artışa ve azalışa sebep olmaktadır. Çalışmamızda Aflatoksin B₂-dsDNA etkileşimi, Rct değerlerindeki değişimler yorumlanarak incelenmiştir.

PGE'nin Rct değeri EIS yöntemi ile ölçüldükten sonra dsDNA immobilize edilmiş PGE'nin Rct değeri ölçülmüş ve PGE'nin Rct değerine göre artış göstermiştir. dsDNA-PGE, BSA çözeltisinde 30 dakika bekletildikten sonra tekrar EIS yöntemi ile Rct değerine bakılmış ve dsDNA-PGE ye ait Rct değerine göre, yüzeyin tamamen bloklandığından dolayı artış gösterdiği saptanmıştır. dsDNA-BSA modifiye edilmiş PGE 5 µg/mL Aflatoksin B₂ ile 5 dakika etkileştirildikten sonra empedansı alınmış ve Rct değerinde artma olduğu görülmüştür. Bu artmanın sebebi olarak aflatoksin

B₂'nin yapısında bulunan karbonil gruplarının yük aktarım direncini artırdığı düşünülmektedir.

3.7.3. PGE Yüzeyinde ct dsDNA-Aflatoksin G₁ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular

ct dsDNA-Aflatoksin G₁ etkileşimini empedimetrik olarak incelemek için yöntem 2.11'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Etkileşime ait Nyquist eğrisi şekil 3.17'de gösterilmiştir.



Şekil 3.17 5 µg/mL Aflatoksin G₁' in dsDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde 2 dakika etkileşimine ait ferri-ferro içerisinde EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi; a) Modifiye edilmemiş PGE, b) dsDNA modifiye PGE, c) dsDNA-BSA modifiye PGE, d) Aflatoksin G₁'in dsDNA-BSA/PGE ile etkileşimi.

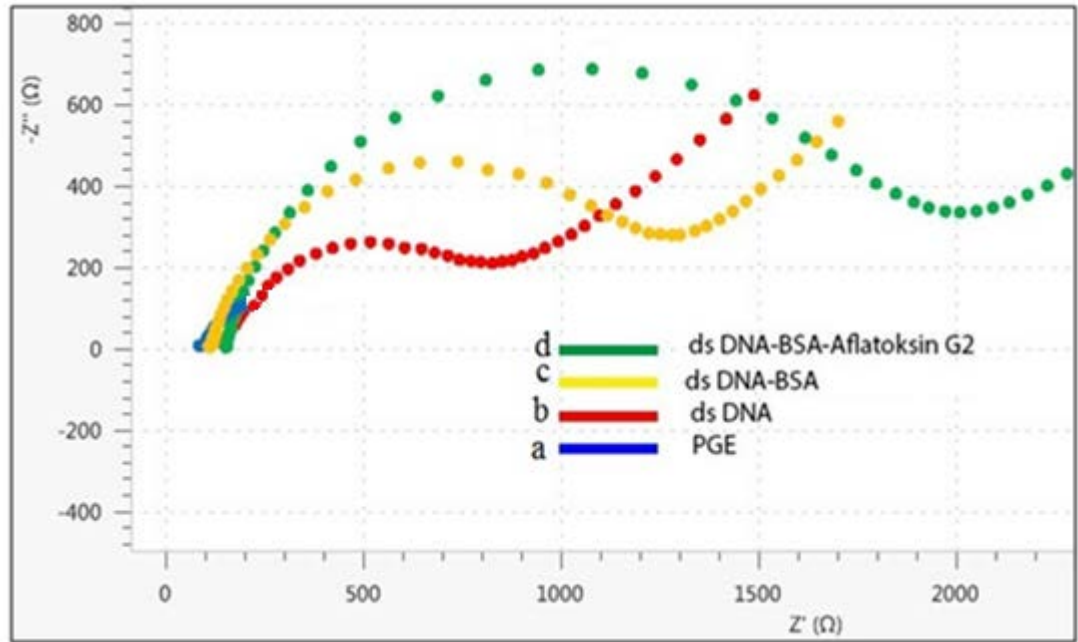
PGE yüzeyinde DNA-Aflatoksin G₁ etkileşimine ait Nyquist eğrisi Şekil 3.17'de gösterilmiştir.

Önce aktive edilmiş PGE'nin EIS tekniğiyle R_{ct} değeri belirlenmiştir. Aktive edilmiş PGE yüzeyine dsDNA'nın immobilizasyonunda, optimum dsDNA miktarının 35 µg/mL ve optimum etkileşim zamanının 25 dakika olduğu saptandıktan sonra dsDNA yüklü PGE'nin sabit potansiyelde ve farklı frekanslarda ferri-ferro çözeltisi

içinde empedimetrik ölçüm sonucunda R_{ct} değeri belirlenmiş ve Şekil 3.17’de görüldüğü gibi artma gözlenmiştir. Buradaki artma bize PGE’nin yüzeyinin dsDNA ile kaplandığını göstermiştir. Elektrotta boşluk kalmadığından emin olmak için ds DNA immobilize edilmiş PGE 0.1 M BSA çözeltisinde 30 dakika bekletildikten sonra empedans ölçümü yapılmış ve R_{ct} değerinde artma gözlenmiştir. dsDNA-BSA modifiye PGE elektrot 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoksin G_1 ile 2 dakika etkileştirildikten sonra yapılan EIS deneyleri sonucu R_{ct} değerinde artma saptanmıştır. Bu artmanın sebebinin aflatoksin G_1 ’in yapısında bulunan karbonil gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar SEM, AFM görüntüleri ve CV sonucu elde ettiğimiz veriler ile desteklenmektedir.

3.7.4. PGE Yüzeyinde ct dsDNA-Aflatoksin G_2 Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular

ct dsDNA-Aflatoksin G_2 etkileşimini empedimetrik olarak incelemek için yöntem 2.11’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Etkileşime ait Nyquist eğrisi şekil 3.18’de gösterilmiştir.



Şekil 3.18 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoksin G_2 ’ nin dsDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde 5 dakika etkileşimine ait ferri- ferro içerisinde EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi; a) Modifiye edilmemiş PGE, b) dsDNA modifiye PGE, c) dsDNA-BSA modifiye PGE, d) Aflatoksin G_2 ’nin dsDNA-BSA/PGE ile etkileşimi.

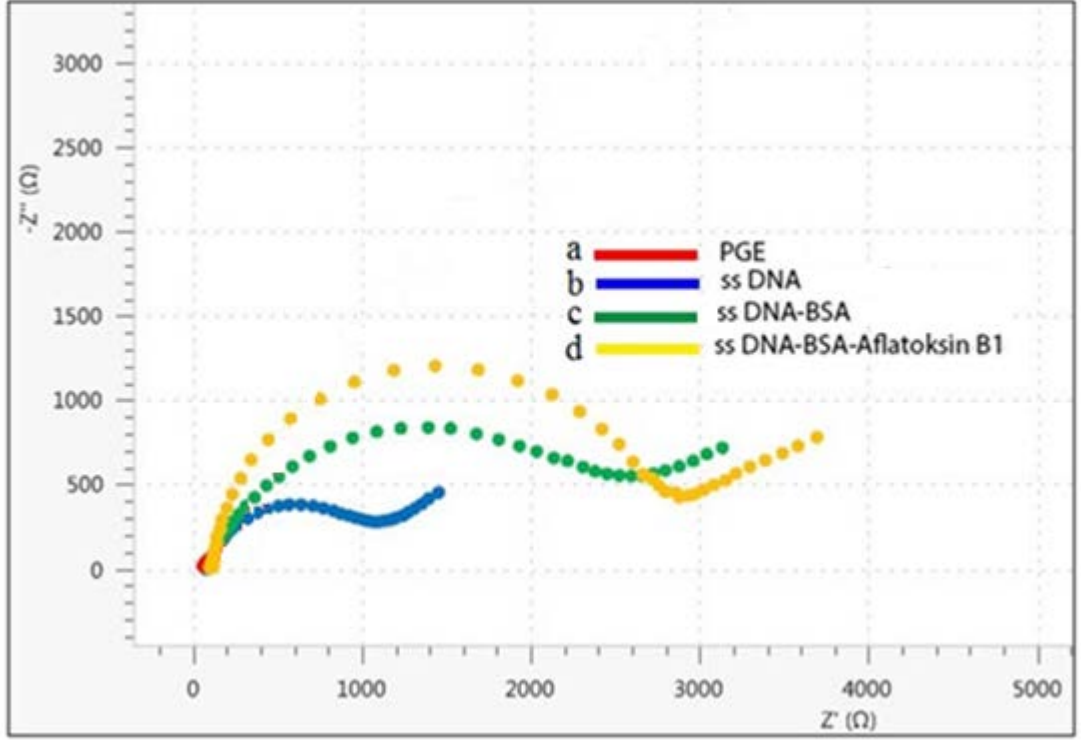
PGE yüzeyinde DNA-Aflatoksin G₂ etkileşimine ait Nyquist eğrisi Şekil 3.18’de gösterilmiştir.

Elektrot yüzeyinde yapılan her bir modifikasyon basamağı, immobilize edilen maddenin iletkenlik özelliğine bağlı olarak, elektrot ve elektrolit ara yüzeyinde oluşan Rct değerinde artışa veya azalışa neden olmaktadır. Çalışmamızda DNA-Aflatoksin G₂ etkileşimi, Rct değerlerindeki değişimler incelenerek yorumlanmıştır.

EIS ile yapılan ölçümler sonucunda, dsDNA immobilizasyonu sonrasında Rct değeri PGE’nin Rct değerine göre artış göstermiştir. Çift sarmal DNA fosfat omurgası nedeniyle negatif yüklü olduğundan, anyonik [Fe(CN)₆]^{-3/-4} redoks çiftinin elektrot yüzeyine ulaşmasını engelleyerek Rct değerinde bir artışa neden olmaktadır. dsDNA immobilize edilmiş PGE, BSA çözeltisinde bekletildikten sonraki Rct değeri dsDNA/PGE Rct değerine göre artmıştır. Bu artışların sebebi PGE yüzeyinin dsDNA ve BSA ile modifiye edildiğini göstermektedir. Modifiye PGE’nin Aflatoksin G₂ ile etkileşiminden sonra ise Rct değerinde artma tespit edilmiştir. Bu artmanın sebebinin aflatoksin G₂’nin yapısında bulunan karbonil gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar SEM, AFM ve CV ile desteklenmektedir (Mishra vd., 2015).

3.7.5. PGE Yüzeyinde ct ssDNA-Aflatoksin B₁ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular

ct ssDNA-Aflatoksin B₁ etkileşimini empedimetrik olarak incelemek için yöntem 2.11’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Etkileşime ait Nyquist eğrisi şekil 3.19’da gösterilmiştir.



Şekil 3.19 5 µg/mL Aflatoxin B₁' in ssDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde 2 dakika etkileşimine ait ferri- ferro içerisinde EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi; a) Modifiye edilmemiş PGE, b) ssDNA modifiye PGE, c) ssDNA-BSA modifiye PGE, d) Aflatoxin B₁'in ssDNA-BSA/PGE ile etkileşimi.

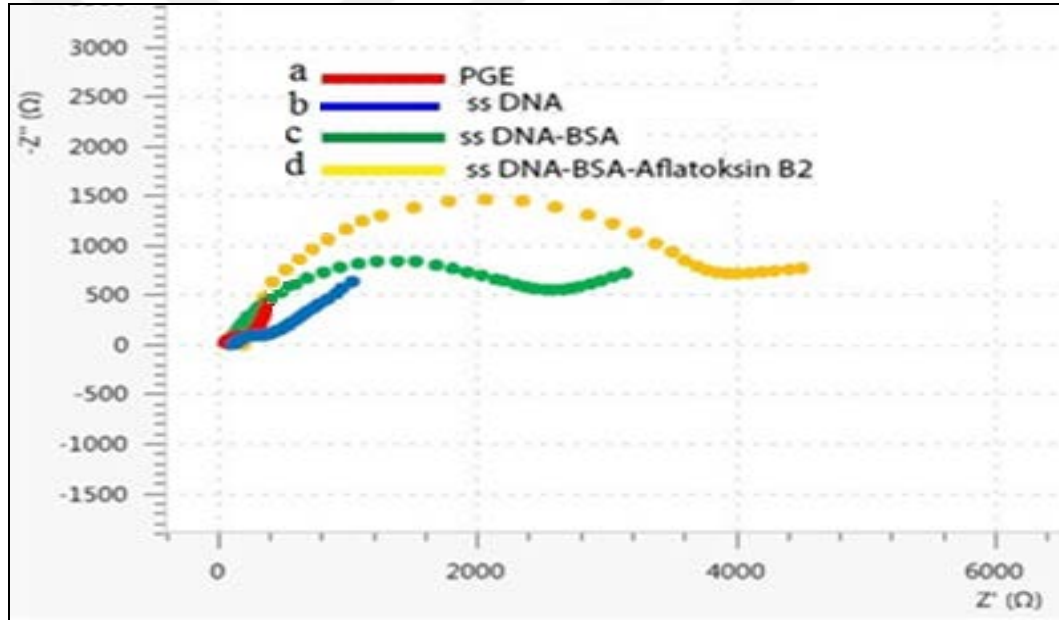
PGE yüzeyinde ssDNA-Aflatoxin B₁ etkileşimine ait Nyquist eğrisi Şekil 3.19'da gösterilmiştir.

Aktive edilmiş PGE elektrotun empedans ölçümü alınmış Rct değeri belirlenmiştir. Aktive edilmiş PGE yüzeyine ct ssDNA'nın immobilizasyon işlemi daha önce voltametrik yöntemlerle optimum miktarın 35 µg/mL ve en uygun immobilizasyon süresinde 25 dakika olduğu belirlendikten sonra PGE yüzeyine ssDNA immobilize edilmiş ve EIS tekniği ile empedans ölçümü alınmıştır. Burdan elde edilen Rct değeri PGE'nin Rct değeri ile karşılaştırıldığında artma gözlenmiştir (Şekil 3.19). Buda bize PGE elektrotun ssDNA ile modifiye olduğunu göstermiştir. ssDNA-BSA modifiye elektrotun empedans ölçümleri yapılmış ve Rct değeri ssDNA immobilize elektrotun Rct değerine kıyasla artmıştır. BSA çözeltisinde ssDNA immobilize edilmiş PGE 5 µg/mL Aflatoxin B₁ çözeltisinde 2 dakika bekletilerek ssDNA-Aflatoxin B₁ etkileşimi sağlanmış ve EIS tekniği ile empedans değerleri alınmıştır (Şekil 3.19). Burdan elde edilen Rct değeri ssDNA modifiye elektrotun Rct değeri ile

karşılaştırılmış ve Rct değerinde artma gözlenmiştir. Rct değerindeki artma, SEM, AFM ve CV sonuçları ssDNA ile Aflatoksin B₁ arasında bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Bu artmanın sebebi, aflatoksin B₁'in yapısında bulunan karbonil gruplarıdır (Mishra vd., 2015).

3.7.6. PGE Yüzeyinde ct ssDNA-Aflatoksin B₂ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular

ct ssDNA-Aflatoksin B₂ etkileşimini empedimetrik olarak incelemek için yöntem 2.11'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Etkileşime ait Nyquist eğrisi şekil 3.20'de gösterilmiştir.



Şekil 3.20 5 µg/mL Aflatoksin B₂' nin ssDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde 5 dakika etkileşimine ait ferri- ferro içerisinde EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi; a) Modifiye edilmemiş PGE, b) ssDNA modifiye PGE, c) ssDNA-BSA modifiye PGE, d) Aflatoksin B₂'nin ssDNA-BSA/PGE ile etkileşimi.

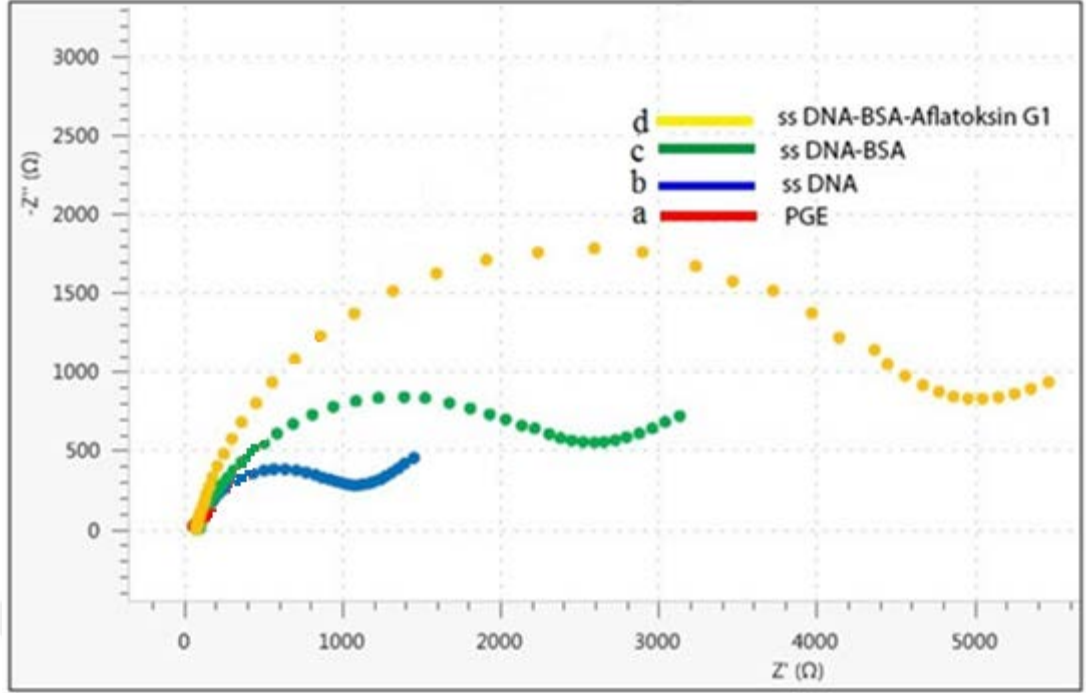
PGE yüzeyinde ssDNA-Aflatoksin B₂ etkileşimine ait Nyquist eğrisi Şekil 3.20'de gösterilmiştir.

Önce aktive edilmiş PGE'nin EIS tekniğiyle Rct değeri belirlenmiştir. Aktive edilmiş PGE yüzeyine ssDNA'nın immobilizasyonunda, optimum ssDNA miktarının 35

$\mu\text{g/mL}$ ve optimum etkileşim zamanının 25 dakika olduğu saptandıktan sonra ssDNA yüklü PGE'nin sabit potansiyelde ve farklı frekanslarda ferri-ferro çözeltisi içinde empedimetrik ölçüm sonucunda R_{ct} değeri belirlenmiş ve Şekil 3.20'de görüldüğü gibi artma gözlenmiştir. Buradaki artma bize PGE'nin yüzeyinin ssDNA ile bağlandığını göstermiştir. Elektrotta boşluk kalmadığından emin olmak için ssDNA immobilize edilmiş PGE 0.1 M BSA çözeltisinde 30 dakika bekletildikten sonra empedans ölçümü yapılmış ve R_{ct} değerinde tekrar artma gözlenmiştir. ssDNA-BSA modifiye PGE elektrot 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoksin B₂ ile 5 dakika etkileştirildikten sonra yapılan EIS deneyleri sonucu R_{ct} değerinde ssDNA immobilize edilmiş PGE'ye göre artma saptanmıştır. Bu artmanın sebebi olarak aflatoksin B₂'nin yapısında bulunan karbonil grupları olduğu düşünülmektedir (Mishra vd., 2015). Elde edilen sonuçlar, SEM, AFM görüntüleri ve CV sonucu elde ettiğimiz veriler ile desteklenmektedir.

3.7.7. PGE Yüzeyinde ct ssDNA-Aflatoksin G₁ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular

ct ssDNA-Aflatoksin G₁ etkileşimini empedimetrik olarak incelemek için yöntem 2.11'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Etkileşime ait Nyquist eğrisi şekil 3.21'de gösterilmiştir.



Şekil 3.21 5 µg/mL Aflatoxin G₁' in ssDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde 2 dakika etkileşimine ait ferri-ferro içerisinde EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi; a) Modifiye edilmemiş PGE, b) ssDNA modifiye PGE, c) ssDNA-BSA modifiye PGE, d) Aflatoxin G₁' in ssDNA-BSA/PGE ile etkileşimi.

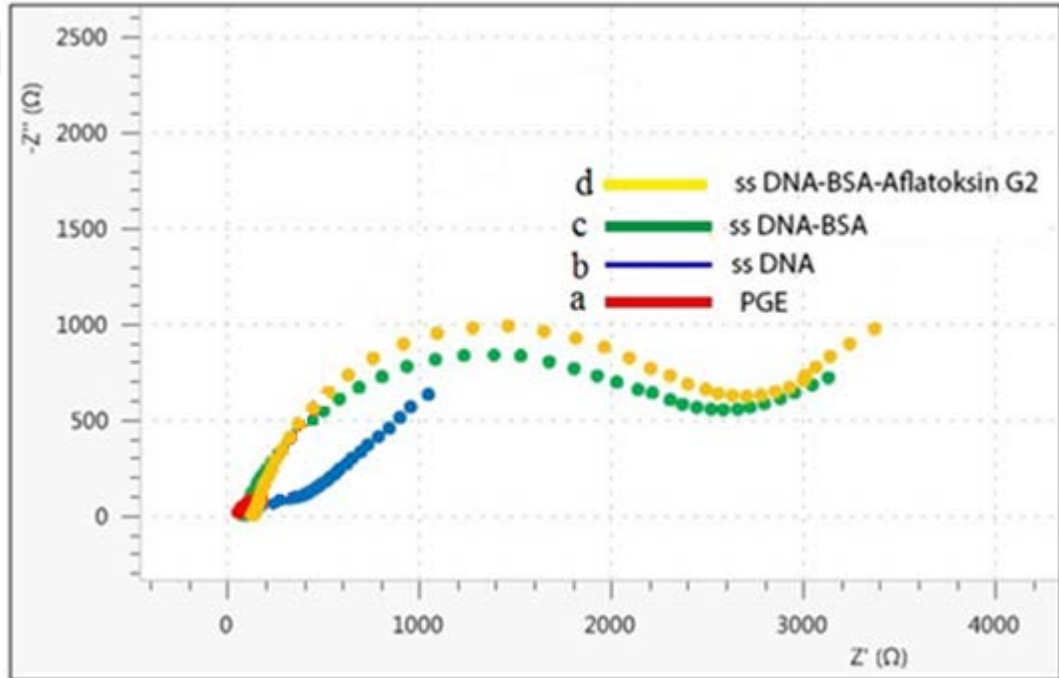
PGE yüzeyinde ssDNA-Aflatoxin G₁ etkileşimine ait Nyquist eğrisi Şekil 3.21'de gösterilmiştir.

Aktive edilmiş PGE elektrotun empedans ölçümü alınmış Rct değeri belirlenmiştir. Aktive edilmiş PGE yüzeyine ssDNA immobilize edilmiş ve EIS tekniği ile empedans ölçümü alınmıştır. Burdan elde edilen Rct değeri PGE'nin Rct değeri ile karşılaştırıldığında artma gözlenmiştir (Şekil 3.21). Buda bize PGE elektrotun ssDNA ile modifiye olduğunu göstermiştir. ssDNA-BSA modifiye elektrotun empedans ölçümleri yapılmış ve Rct değeri ssDNA immobilize elektrotun Rct değerine kıyasla artmıştır. ssDNA- BSA modifiye elektrot 5 µg/mL Aflatoxin G₁ çözeltisinde 2 dakika bekletilerek ssDNA-Aflatoxin G₁ etkileşimi sağlanmış ve EIS tekniği ile empedans değerleri alınmıştır (Şekil 3.20). Burdan elde edilen Rct değeri ssDNA-BSA modifiye elektrotun Rct değeri ile karşılaştırılmış ve Rct değerinde artma gözlenmiştir. Bu artmanın sebebi olarak aflatoxin G₁'in yapısında bulunan karbonil grupları olduğu düşünülmektedir. Rct değerindeki artma, SEM, AFM ve CV

sonuçları ssDNA ile Aflatoksin G₁ arasında bir etkileşim olduğunu göstermektedir (Mishra vd., 2015).

3.7.8. PGE Yüzeyinde ct ssDNA-Aflatoksin G₂ Etkileşiminin Empedimetrik Olarak Tayin Edilmesine Ait Bulgular

ct ssDNA-Aflatoksin G₂ etkileşimini empedimetrik olarak incelemek için yöntem 2.11’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Etkileşime ait Nyquist eğrisi şekil 3.22’de gösterilmiştir.



Şekil 3.22 5 µg/mL Aflatoksin G₂' nin ssDNA-BSA modifiye PGE yüzeyinde 5 dakika etkileşimine ait ferri-ferro içerisinde EIS tekniği ile elde edilen Nyquist eğrisi; a) Modifiye edilmemiş PGE, b) ssDNA modifiye PGE, c) ssDNA-BSA modifiye PGE, d) Aflatoksin G₂'nin ssDNA-BSA/PGE ile etkileşimi.

PGE yüzeyinde ssDNA-Aflatoksin G₁ etkileşimine ait Nyquist eğrisi Şekil 3.22’de gösterilmiştir.

Aktive edilmiş PGE’nin EIS tekniğiyle Rct değeri belirlenmiştir. ssDNA immobilize edilen PGE’nin sabit potansiyelde ve farklı frekanslarda ferri-ferro çözeltisi içinde empedimetrik ölçüm sonucunda Rct değeri belirlenmiş ve Şekil 3.22’de görüldüğü

gibi artma gözlenmiştir. Buradaki artma bize PGE'nin yüzeyinin ssDNA ile kaplandığını göstermiştir. Elektrotta boşluk kalmadığından emin olmak için ssDNA immobilize edilmiş PGE 0.1 M BSA çözeltisinde 30 dakika bekletildikten sonra empedans ölçümü yapılmış ve Rct değerinde artma gözlenmiştir. ssDNA-BSA modifiye PGE elektrot 5 µg/mL Aflatoksin G₂ çözeltisinde 5 dakika etkileştirildikten sonra yapılan EIS deneyleri sonucu Rct değerinde ssDNA-BSA modifiye PGE'ye göre artma saptanmıştır. Bu artmanın sebebinin aflatoksin G₂'nin yapısında bulunan karbonil grupları olduğu düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar SEM, AFM görüntüleri ve CV sonucu elde ettiğimiz veriler ile desteklenmektedir (Mishra vd., 2015).

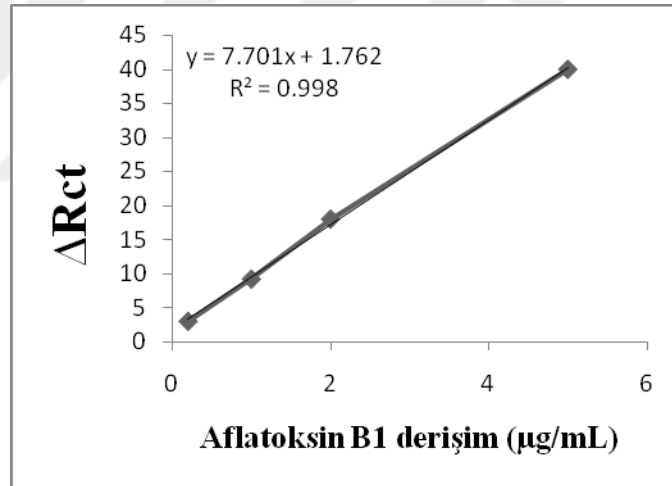
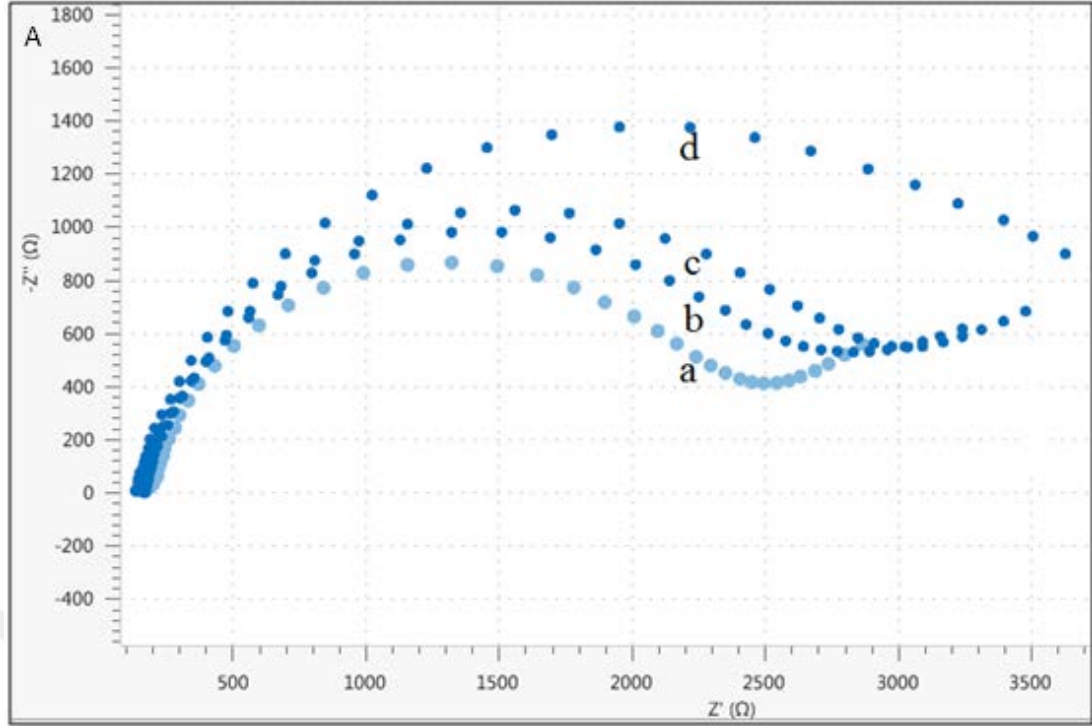
3.8. Aflatoksin-DNA Etkileşiminde Aflatoksin Miktarının Tayin Edilmesine Ait Bulgular

3.8.1. Aflatoksin B₁-ssDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular

Yöntem 2.12'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Kalibrasyon grafiği çizilirken her adımda, Aflatoksin B₁ miktarı değiştirilerek etkileşim sağlanarak elektrokimyasal empedansları alınmıştır. Hesaplama sistemi olarak aflatoksin ile etkileşmiş, ssDNA-BSA modifiye elektrotun Rct (ohm) değerinden boş PGE elektrotun verdiği Rct (ohm) değer çıkartılmıştır. Bu değer ssDNA-BSA modifiye elektrotun verdiği Rct (ohm) değerinden boş PGE'nin verdiği Rct (ohm) değerinin çıkartılmasıyla elde edilen değere bölünmüştür ve ΔRct değerleri elde edilmiştir.

$$\Delta R_{ct} = \frac{R_{ct}(PGE, ssDNA, BSA, Aflatoksin B_1) - R_{ct}(PGE)}{R_{ct}(PGE, ssDNA, BSA) - R_{ct}(PGE)} \quad [3.1]$$

ΔRct değerlerine karşılık Aflatoksin B₁ derişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.23 ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak ssDNA ile a) 0.2 $\mu\text{g/mL}$ b) 1 $\mu\text{g/mL}$ c) 2 $\mu\text{g/mL}$ ve d) 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoxin B₁ derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı (A) ve buna ait kalibrasyon grafiği (B)

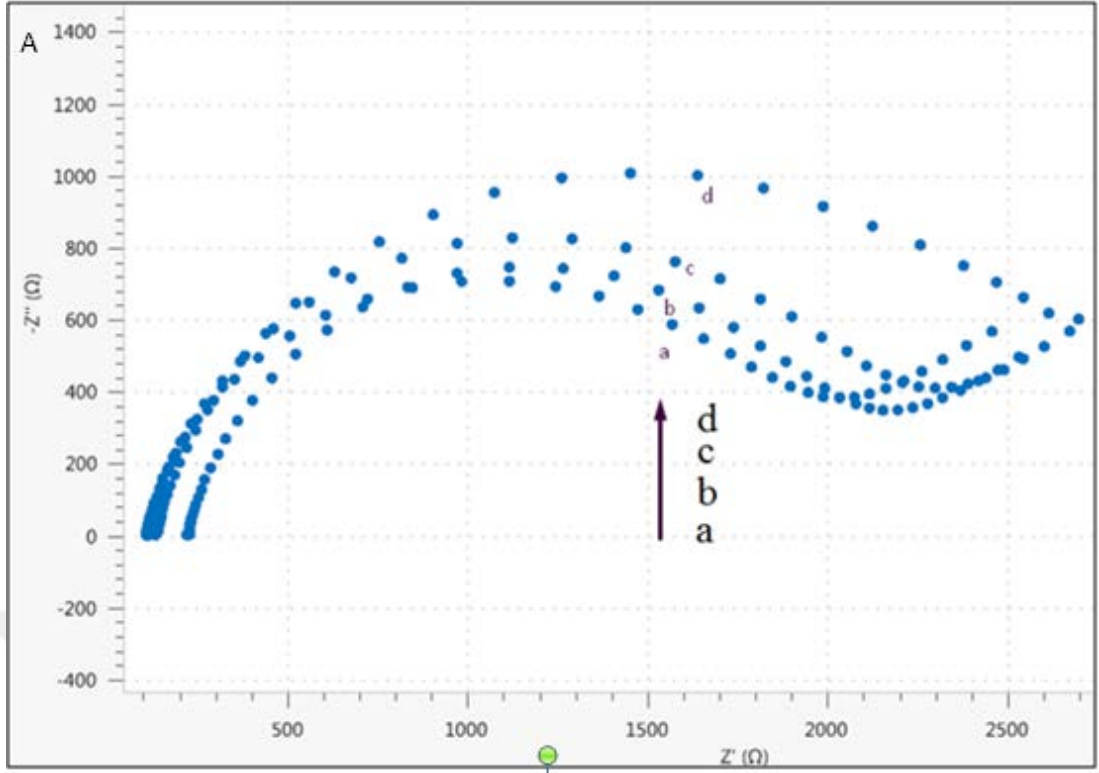
Optimum koşullarda hazırlanan ss DNA-BSA modifiye PGE elektrot kullanılarak farklı derişimlerde Aflatoxin B₁ çözeltilisinde 2 dakika etkileşim sağlandıktan sonra elektrokimyasal empedans spektrumları kaydedilmiştir. 0.2-5 $\mu\text{g/mL}$ aralığında değişen Aflatoxin B₁ derişimleri için toplam empedansın başlangıç empedansına göre değişim hesaplanarak standart grafik çizilmiştir (Şekil 3.23). Şekil 3.23 Aflatoxin B₁ derişimine karşı empedans spektrumlarından elde edilen empedans

değişimlerinin (ΔR_{ct}) grafiğini göstermektedir. Metodun doğrusallığı $y = 7.701x + 1.762$ $R^2 = 0.998$ denklemleriyle ifade edilmiştir. Denklemden y ΔR_{ct} , x ise Aflatoksin B₁ derişimidir.

En düşük Aflatoksin B₁ derişimi 0.2 µg/mL kullanılarak 5 kez empedans ölçümleri alınmış ve bu empedanslardan elde edilen R (ohm) değerleri kör değer olarak kabul edilmiş ve yöntem için belirtme alt sınırı hesaplanmış, buna göre elde edilen direnç değerlerinden yola çıkarak, standart sapma değeri, bu sensör sistemi için elde edilen kalibrasyon grafiğinin eğiminden yola çıkılarak LOD=0.04 µg/mL, LOQ değeri ise 0.14 µg/mL olarak bulunmuştur.

3.8.2. Aflatoksin B₁-dsDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular

Yöntem 2.12'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Kalibrasyon grafiği çizilirken her adımda, Aflatoksin B₁ miktarı değiştirilerek etkileşim sağlanarak elektrokimyasal empedansları alınmıştır. Hesaplama sistemi olarak aflatoksin ile etkileşmiş, dsDNA-BSA modifiye elektrotun R_{ct} (ohm) değerinden boş PGE elektrotun verdiği R_{ct} (ohm) değeri çıkartılmıştır. Bu değeri dsDNA-BSA modifiye elektrotun verdiği R_{ct} (ohm) değerinden boş PGE'nin verdiği R_{ct} (ohm) değerinin çıkartılmasıyla elde edilen değere bölünmüştür ve ΔR_{ct} değerleri bulunmuştur. ΔR_{ct} değerlerine karşılık Aflatoksin B₁ derişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.24 ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak dsDNA ile a) 0.1 $\mu\text{g/mL}$ b) 1 $\mu\text{g/mL}$ c) 2 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoksin B₁ derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı (A) ve buna ait kalibrasyon grafiği (B)

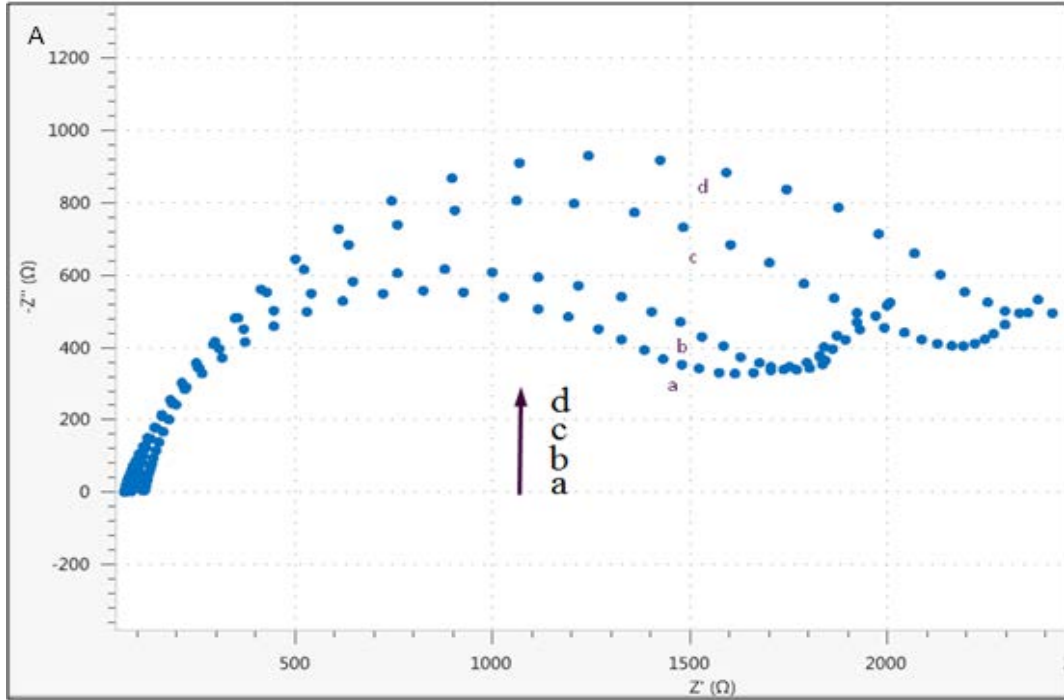
Optimum koşullarda hazırlanan dsDNA-BSA modifiye PGE elektrot kullanılarak farklı derişimlerde Aflatoksin B₁ çözeltisinde 2 dakika etkileşim sağlandıktan sonra elektrokimyasal empedans spektrumları kaydedilmiştir.

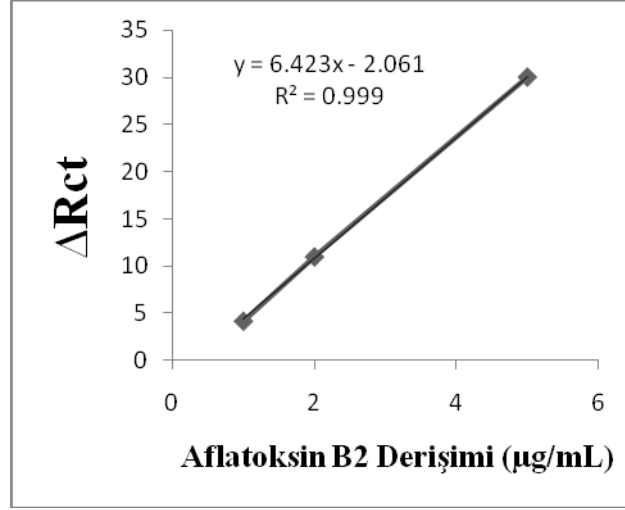
Farklı Aflatoksin B₁ derişimlerinde gerçekleştirilen empedans sonuçlarına göre kalibrasyon eğrisi, Şekil 3.24'de gösterilmiştir. 0.1 ile 2 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoksin B₁

derişimleri arasında ölçülen Rct değerlerinde düzenli bir artış gözlenmiştir. Şekil 3.24’de gösterilen ve doğrusal olan kalibrasyon eğrisinden ($y=8.413x + 3.306$ ve $R^2= 0.999$), LOD: $0.03 \mu\text{g/mL}$ ve LOQ: $0.11 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Çalışmamızda ds DNA-Aflatoksin B₁ etkileşiminin kısa sürede, elektrokimyasal olarak tayin edilebileceği gösterilmiştir.

3.8.3. Aflatoksin B₂-ssDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular

Yöntem 2.12’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Kalibrasyon grafiği çizilirken her adımda, Aflatoksin B₂ miktarı değiştirilerek etkileşim sağlanarak elektrokimyasal empedansları alınmıştır. Hesaplamalar 3.8.1. ve 3.8.2’de anlatıldığı gibidir ΔR_{ct} değerlerine karşılık Aflatoksin B₂ derişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.





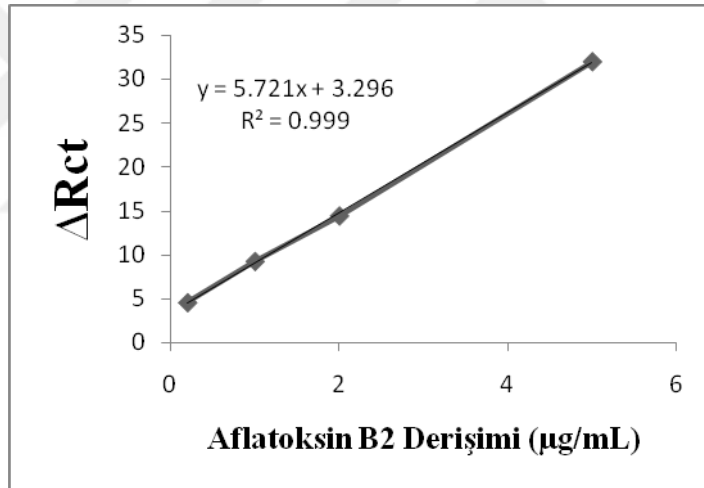
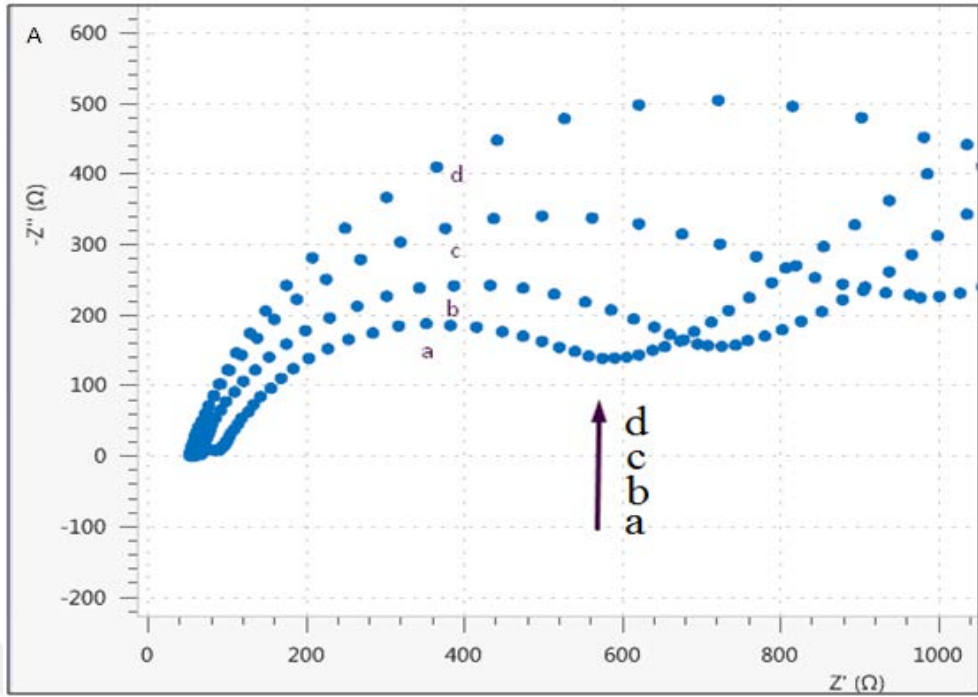
Şekil 3.25 ΔRct değerlerine bağlı olarak ssDNA ile a) 1 µg/mL b) 2 µg/mL c) 5 µg/mL Aflatoksin B₂ derişimlerinde elde edilen EIS spektrogramı (A) ve buna ait kalibrasyon grafiği (B)

Optimum koşullarda hazırlanan ssDNA-BSA modifiye PGE elektrot kullanılarak farklı derişimlerde Aflatoksin B₂ çözeltisinde 5 dakika etkileşim sağlandıktan sonra elektrokimyasal empedans spektrumları kaydedilmiştir.

Farklı Aflatoksin B₂ derişimlerinde gerçekleştirilen empedans sonuçlarına göre kalibrasyon eğrisi, Şekil 3.25’de gösterilmiştir. 1 ile 5 µg/mL Aflatoksin B₂ derişimleri arasında ölçülen Rct değerlerinde düzenli bir artış gözlenmiştir. Şekil 3.25’de gösterilen ve doğrusal olan kalibrasyon eğrisinden ($y=6.423x + 2.061$ ve $R^2= 0.999$) LOD: 0.09 µg/mL ve LOQ: 0.31 µg/mL olarak bulunmuştur. Çalışmamızda ssDNA-Aflatoksin B₂ etkileşiminin kısa sürede, düşük tayin sınırında, güvenilir bir şekilde, başarıyla elektrokimyasal olarak tayin edilebileceği gösterilmiştir.

3.8.4. Aflatoksin B₂-dsDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular

Yöntem 2.12’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Kalibrasyon grafiği çizilirken her adımda, Aflatoksin B₂ miktarı değiştirilerek etkileşim sağlanarak elektrokimyasal empedansları alınmıştır. Hesaplamalar 3.8.1. ve 3.8.2’de anlatıldığı gibidir ΔRct değerlerine karşılık Aflatoksin B₂ derişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.

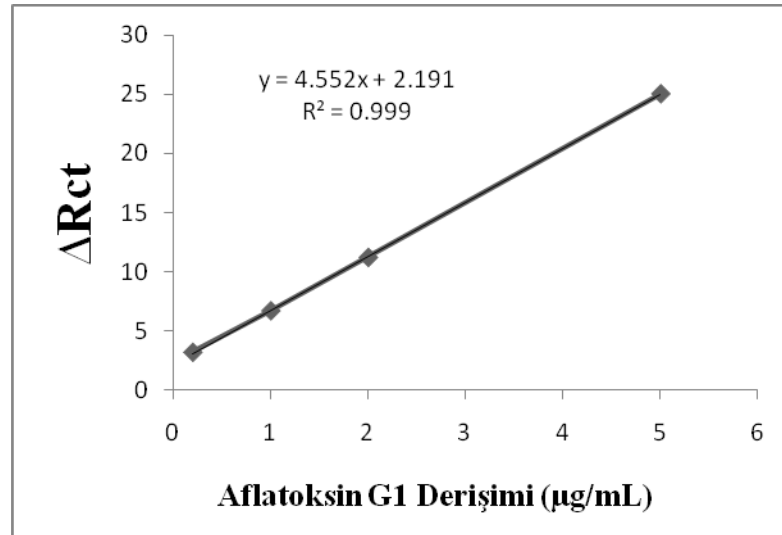
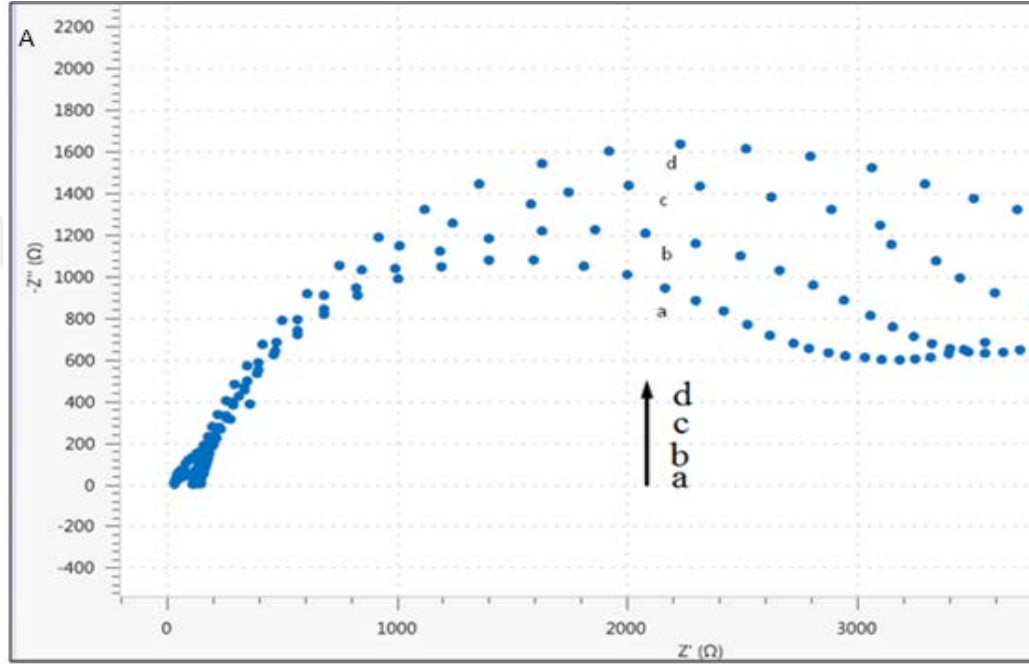


Şekil 3.26 ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak dsDNA ile a) 0.2 $\mu\text{g/mL}$ b) 1 $\mu\text{g/mL}$ c) 2 $\mu\text{g/mL}$ d) 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoxin B₂ derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı (A) ve buna ait kalibrasyon grafiği (B)

dsDNA-BSA modifiye PGE elektrot Aflatoxin B₂ çözeltilinde 1 dakika etkileştirildikten sonra EIS tekniği ile empedans değerleri alınmıştır. 0.2 ile 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoxin B₂ derişimleri arasında yapılan çalışmalar sonucu elde edilen Rct değerleri belirlenmiştir. Şekil 3.26'da gösterilen doğrusal kalibrasyon eğrisinden ($y=5.721x + 3.296$ ve $R^2= 0.999$) LOD: 0.038 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ: 0.12 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

3.8.5. Aflatoksin G₁-ssDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular

Yöntem 2.12’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Kalibrasyon grafiği çizilirken her adımda, Aflatoksin B₂ miktarı değiştirilerek etkileşim sağlanarak elektrokimyasal empedansları alınmıştır. Hesaplamalar 3.8.1. ve 3.8.2’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. ΔR_{ct} değerlerine karşılık Aflatoksin G₁ derişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



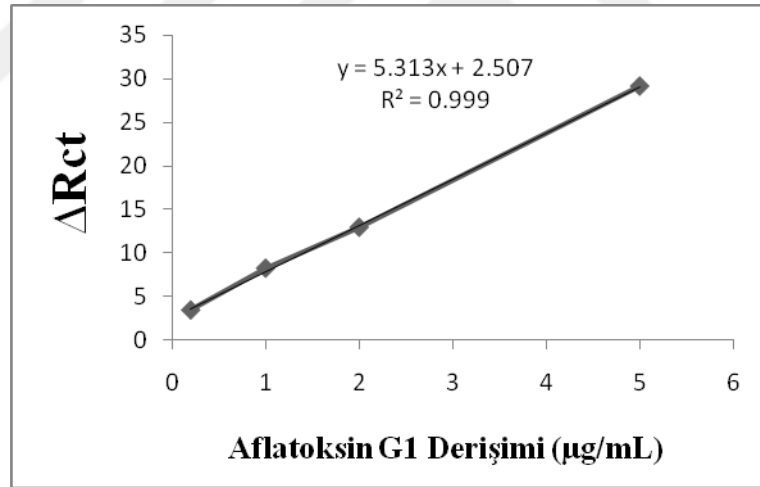
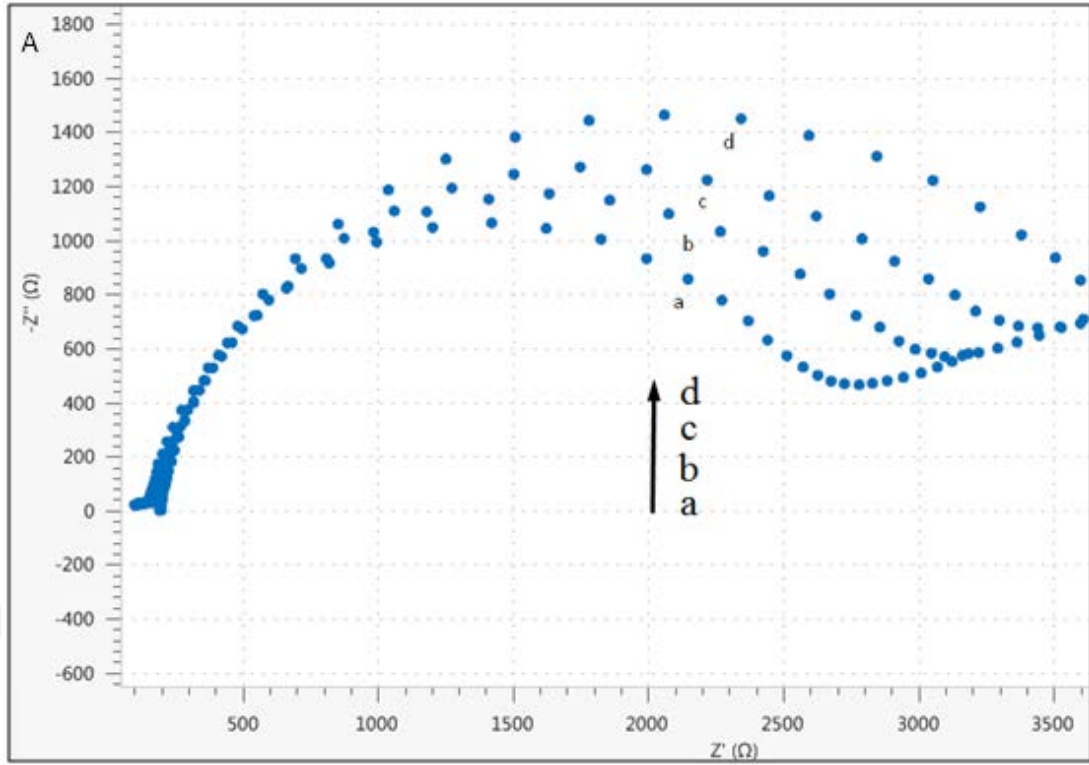
Şekil 3.27 ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak ssDNA ile a) 0.2 $\mu\text{g/mL}$ b) 1 $\mu\text{g/mL}$ c) 2 $\mu\text{g/mL}$ d) 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoksin G₁ derişimlerinde elde edilen EIS spektrogramı (A) ve buna ait kalibrasyon grafiği (B)

Optimum koşullarda hazırlanan ssDNA-BSA modifiye PGE elektrot kullanılarak farklı derişimlerde Aflatoksin G₁ çözeltilisinde 2 dakika etkileşim sağlandıktan sonra elektrokimyasal empedans spektrumları kaydedilmiştir. 0.2-5 µg/mL aralığında değişen Aflatoksin G₁ derişimleri için toplam empedansın başlangıç empedansına göre değişim hesaplanarak standart grafik çizilmiştir. Şekil 3.27 Aflatoksin G₁ derişimine karşı empedans spektrumlarından elde edilen empedans değişimlerinin (ΔR_{ct}) grafiğini göstermektedir. Metodun doğrusallığı $y = 4.552x + 2.191$ ve $R^2 = 0.999$ denklemleriyle ifade edilmiştir. Denklemden $y = \Delta R_{ct}$, x ise Aflatoksin G₁ derişimidir.

En düşük Aflatoksin G₁ derişimi olarak 0.2 µg/mL kullanılarak 5 kez empedans ölçümleri alınmış ve bu empedanslardan elde edilen R (ohm) değerleri kör değer olarak kabul edilmiş ve yöntem için belirtme alt sınırı hesaplanmış, buna göre elde edilen direnç değerlerinden yola çıkarak, standart sapma değeri, bu sensör sistemi için elde edilen kalibrasyon grafiğinin eğiminden yola çıkılarak LOD: 0.117 µg/mL, LOQ değeri ise 0.39 µg/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar elektrokimyasal olarak gerçekleştirilen çalışmalar ile karşılaştırıldığında literatüre uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. (Rupesh vd., 2015).

3.8.6. Aflatoksin G₁-dsDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular

Yöntem 2.12'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Kalibrasyon grafiği çizilirken her adımda, Aflatoksin G₁ miktarı değiştirilerek etkileşim sağlanarak elektrokimyasal empedansları alınmıştır. Hesaplamalar 3.8.1. ve 3.8.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. ΔR_{ct} değerlerine karşılık Aflatoksin G₁ derişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.28 ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak dsDNA ile a) 0.2 $\mu\text{g/mL}$ b) 1 $\mu\text{g/mL}$ c) 2 $\mu\text{g/mL}$ d) 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoxin G₁ derişimlerinde elde edilen EIS spektrogramı (A) ve buna ait kalibrasyon grafiği (B)

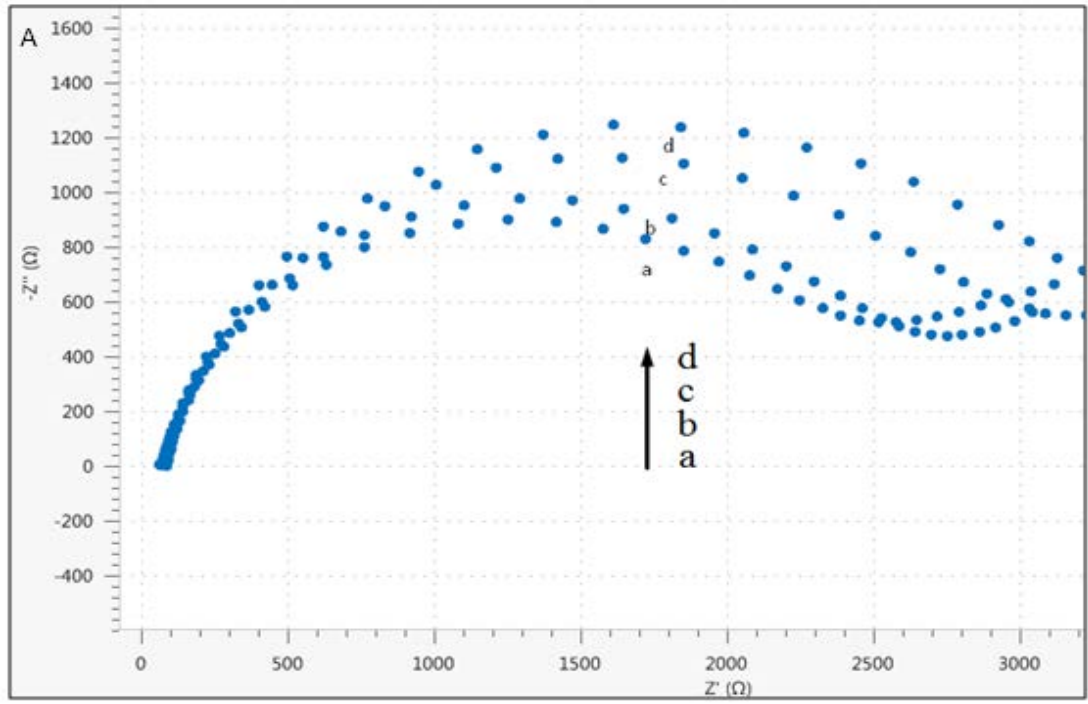
Optimum koşullarda hazırlanan dsDNA-BSA modifiye PGE elektrot kullanılarak farklı derişimlerde Aflatoxin G₁ çözeltilisinde 2 dakika etkileşim sağlandıktan sonra elektrokimyasal empedans spektrumları kaydedilmiştir.

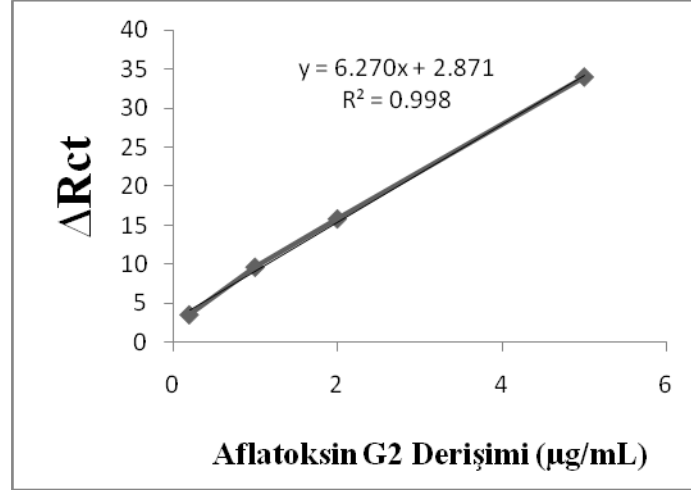
Farklı Aflatoxin G₁ derişimlerinde gerçekleştirilen empedans sonuçlarına göre kalibrasyon eğrisi, Şekil 3.28'de gösterilmiştir. 0.2 ile 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoxin G₁

derişimleri arasında ölçülen Rct değerlerinde düzenli bir artış gözlenmiştir. Şekil 3.28’de gösterilen ve doğrusal olan kalibrasyon eğrisinden ($y=5.313x + 2.507$ ve $R^2= 0.999$) LOD: 0.079 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ: 0.265 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

3.8.7. Aflatoksin G₂-ssDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular

Yöntem 2.12’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Kalibrasyon grafiği çizilirken her adımda, Aflatoksin G₂ miktarı değiştirilerek etkileşim sağlanarak elektrokimyasal empedansları alınmıştır. Hesaplamalar 3.8.1. ve 3.8.2’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. ΔR_{ct} değerlerine karşılık Aflatoksin G₂ derişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.





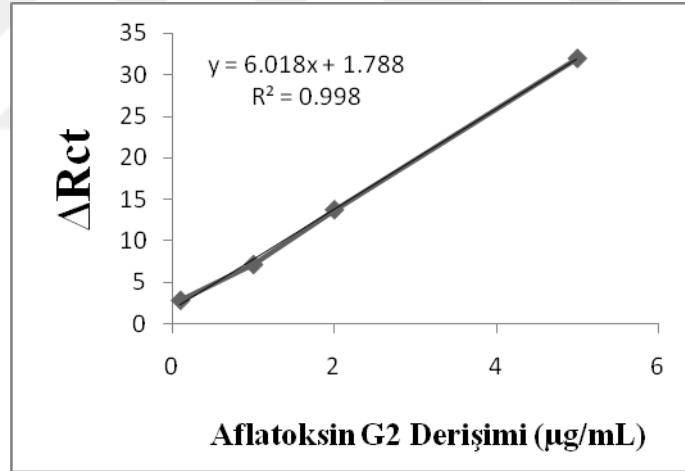
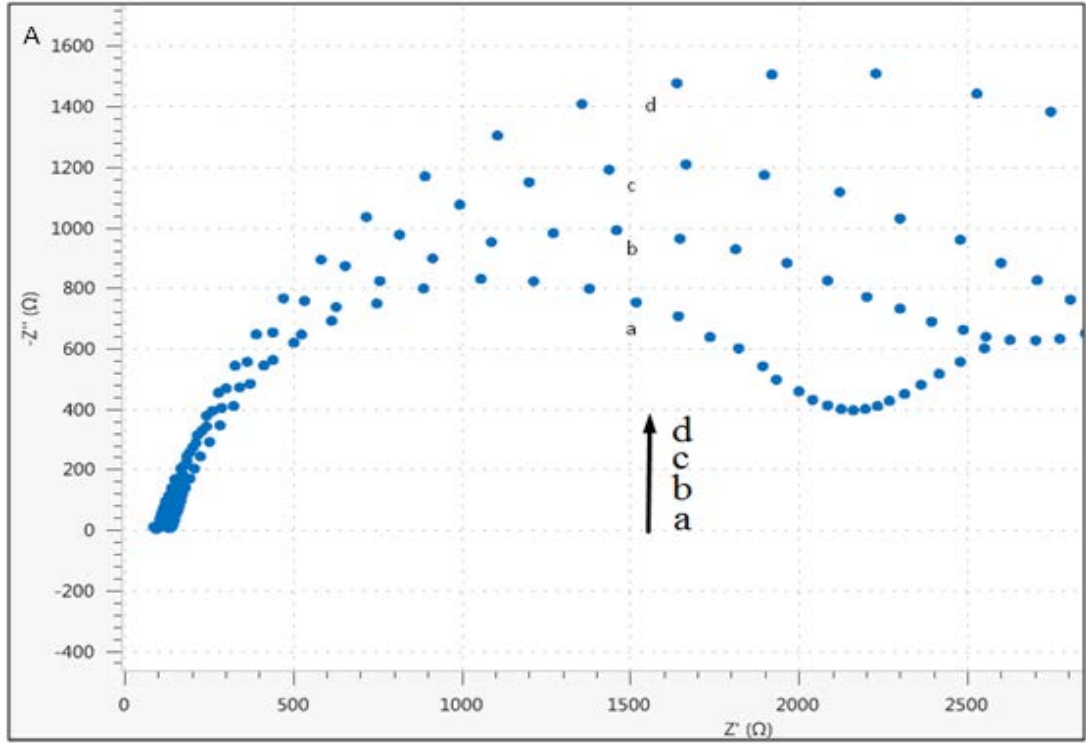
Şekil 3.29 ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak ssDNA ile a) 0.1 $\mu\text{g/mL}$ b) 1 $\mu\text{g/mL}$ c) 2 $\mu\text{g/mL}$ d) 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoksin G_2 derişimlerinde elde edilen EIS spektogramı (A) ve buna ait kalibrasyon grafiği (B)

Optimum koşullarda hazırlanan ssDNA-BSA modifiye PGE elektrot kullanılarak farklı derişimlerde Aflatoksin G_2 çözeltilisinde 5 dakika etkileşim sağlandıktan sonra elektrokimyasal empedans spektrumları kaydedilmiştir.

Farklı Aflatoksin G_2 derişimlerinde gerçekleştirilen empedans sonuçlarına göre kalibrasyon eğrisi, Şekil 3.29'da gösterilmiştir. 0.1 ile 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoksin G_2 derişimleri arasında ölçülen R_{ct} değerlerinde düzenli bir artış gözlenmiştir. Şekil 3.29'da gösterilen ve doğrusal olan kalibrasyon eğrisinden ($y=6.270x + 2.871$ ve $R^2= 0.998$) LOD: 0.035 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ: 0.118 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

3.8.8. Aflatoksin G_2 -dsDNA etkileşimi; kalibrasyon grafiğine ait bulgular

Yöntem 2.12'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Kalibrasyon grafiği çizilirken her adımda, Aflatoksin G_2 miktarı değiştirilerek etkileşim sağlanarak elektrokimyasal empedansları alınmıştır. Hesaplamalar 3.8.1. ve 3.8.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. ΔR_{ct} değerlerine karşılık Aflatoksin G_2 derişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.

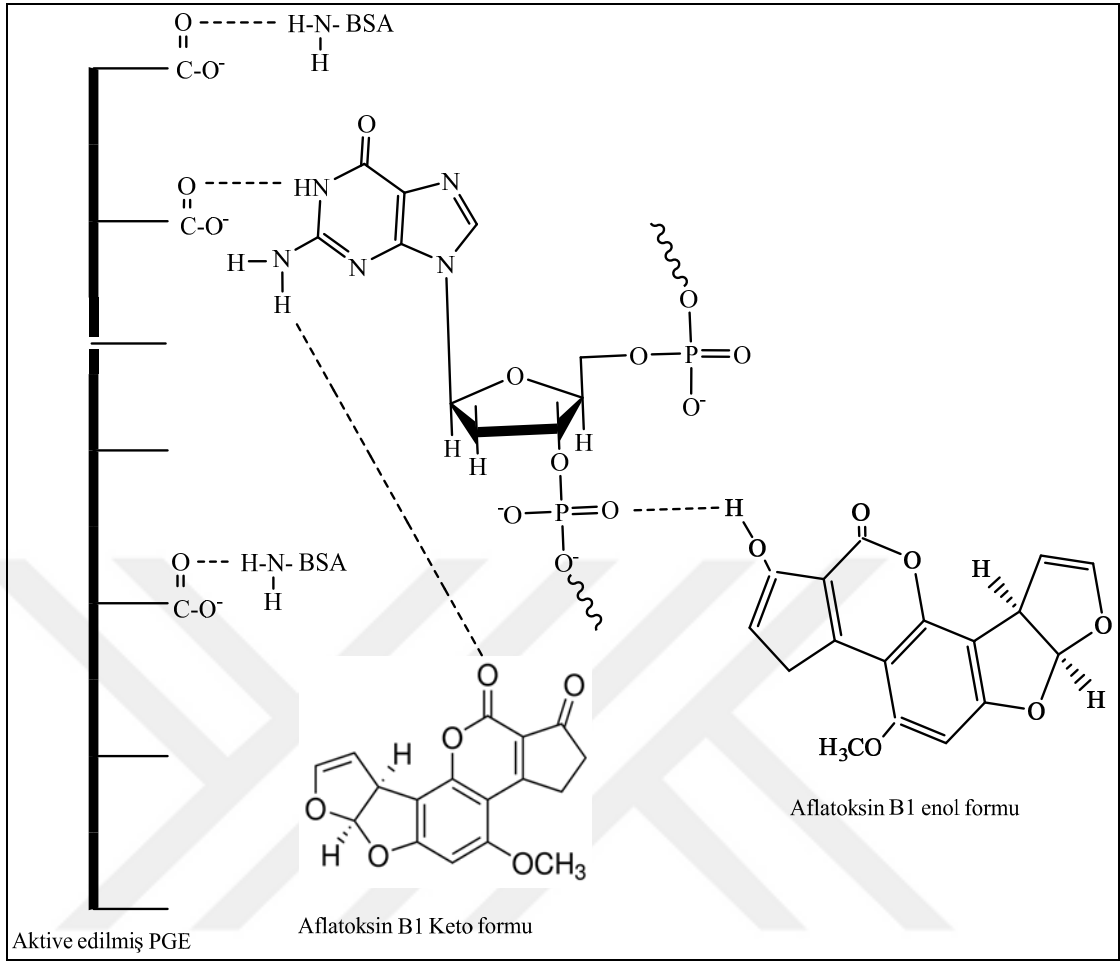


Şekil 3.30 ΔR_{ct} değerlerine bağlı olarak dsDNA ile a) 0.1 $\mu\text{g/mL}$ b) 1 $\mu\text{g/mL}$ c) 2, d) 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoxin G₂ derişimlerinde elde edilen EIS spektrogramı (A) ve buna ait kalibrasyon grafiği (B)

dsDNA-BSA modifiye PGE elektrot Aflatoxin G₂ çözeltilisinde 5 dakika etkileştirildikten sonra EIS tekniği ile empedans değerleri alınmıştır. 0.1 ile 5 $\mu\text{g/mL}$ Aflatoxin G₂ derişimleri arasında yapılan çalışmalar sonucu elde edilen R_{ct} değerleri belirlenmiştir. Şekil 3.30'da gösterilen doğrusal kalibrasyon eğrisinden $y=6.018x + 1.788$ ve $R^2= 0.998$), LOD: 0.085 $\mu\text{g/mL}$ ve LOQ: 0.28 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.

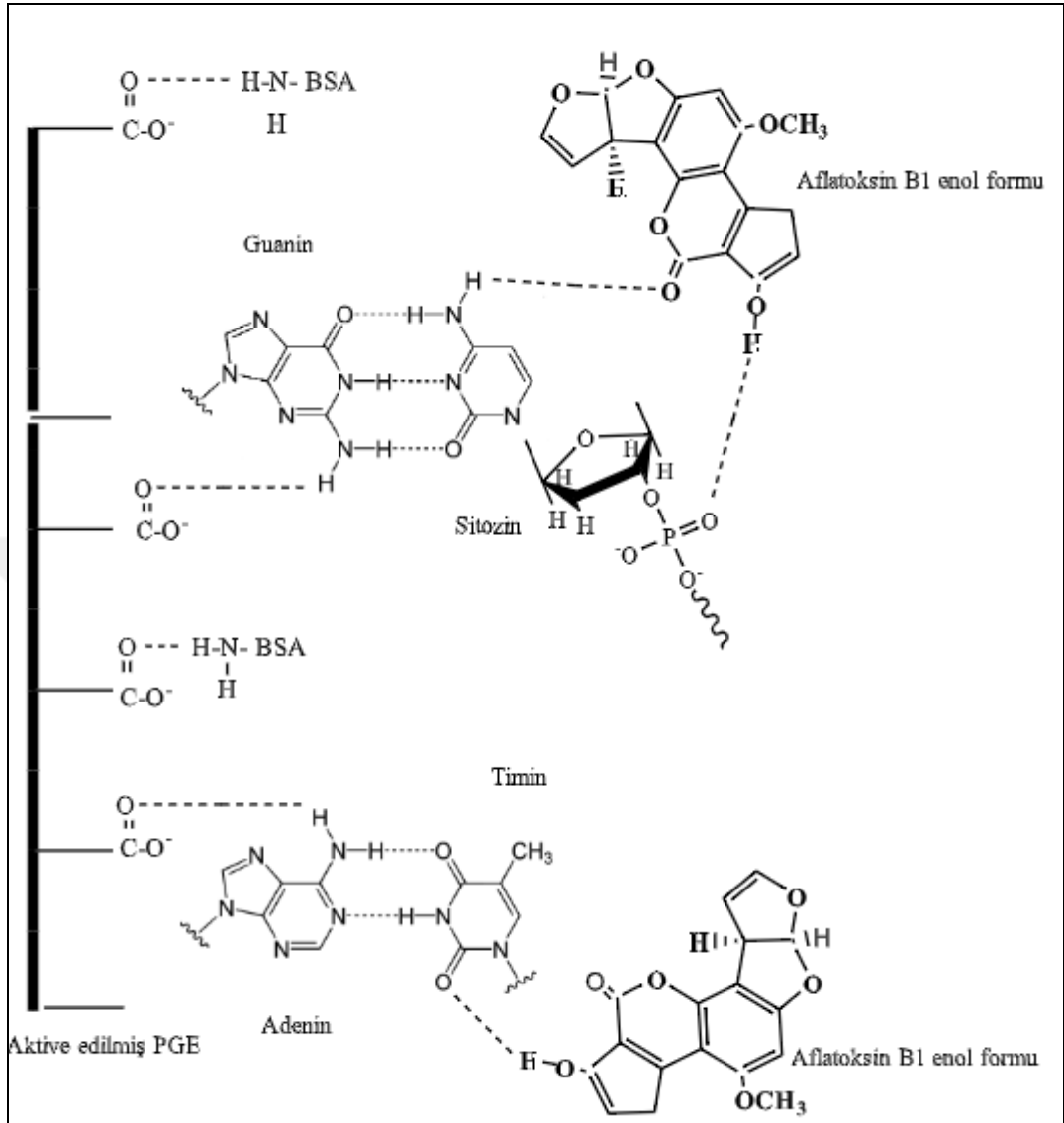
4. SONUÇ VE YORUM

- Çalışmamızın ilk bölümünde, sensör teknolojisine dayalı DNA analizlerine yönelik olarak, kalem grafit elektrotların (PGE) aktivasyonu, ct ssDNA ve ct dsDNA analizlerine yönelik optimizasyon çalışmaları elektrokimyasal yöntem olan diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak yapılmıştır. PGE yüzeyine immobilize edilen DNA'nın elektrokimyasal tayini, DNA'nın elektroaktif bazı olan guaninin yükseltgenme sinyali üzerinden yapılmıştır. PGE elektrot yüzeyine dsDNA ve ssDNA başarılı bir şekilde etkileştirilerek optimum etkileşim zamanı ve optimum DNA derişimleri tesbit edilmiştir.
- DNA immobilizasyonundan sonra, Aflatoksin B₁, G₁ ve G₂'nin DNA hibridizasyonuna etkisi, PGE yüzeyinde elektrokimyasal yöntem olan diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak, DNA'nın elektroaktif bazı olan guaninin yükseltgenme sinyalleri üzerinden incelenmiştir. Aflatoksin derişimindeki değişimin DNA hibridizasyonuna etkili olduğu gösterilmiştir. Aflatoksinlerin 1mg/mL derişimde hibridizasyona olan inhibisyon etkisinin Aflatoksin G₁'de daha yüksek ve etkili olduğu gözlenmiştir. Ortamda aflatoksin varlığı hibridizasyonu olumsuz yönde etkileyerek çiftsarmal DNA oluşumunu engelleyebileceği, yine aflatoksinlerin aynı şekilde mRNA ya da bağlanabileceği düşünülerek protein sentezini de olumsuz yönde etkileyebileceği söylenebilir.
- Çıplak kalem grafit elektrot (PGE), DNA immobilize edilmiş PGE, DNA-BSA modifiye PGE, DNA-BSA-Aflatoksin B₁ modifiye PGE ve DNA-BSA-Aflatoksin G₁ modifiye PGE'nin mikroskopik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) teknikleri ile, elektrokimyasal davranışları ise dönüşümlü voltametri (CV) tekniği kullanılarak incelenmiştir. SEM, AFM'den elde edilen görüntüler ve CV sonuçları PGE yüzeyinin modifiye olduğunu ve DNA-Aflatoksin etkileşiminin varlığını göstermiştir. Aflatoksin ve DNA yapıları göz önüne alındığında bu etkileşimlerin hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim, van der waals etkileşimleri ile olabileceği söylenebilir. Hidrojen bağı ile etkileşime ait şematik gösterim şekil 4.1 ve 4.2 de gösterilmiştir. Şekil 4.1 incelendiğinde aktive edilmiş PGE üzerindeki karbonil oksijeni ile ssDNA'da bulunan bazlardaki azot atomuna bağlı hidrojen arasında H bağı oluşumuna dayalı olarak ssDNA'nın etkileşime girdiği öngörülebilir.



Şekil 4.1 Aktive edilmiş PGE'ye ssDNA ile Aflatoksin B₁'in bağlanmasına ait şematik gösterim.

Buna göre guanin bazındaki azot atomuna bağlı hidrojen ile aktive edilmiş PGE üzerindeki karbonil oksijeni ile hidrojen bağı oluşturan etkileşim şematik olarak gösterilmiştir. Bu yapı üzerine ise aflatoksin etkileştirilmiştir. Aflatoksin B₁'in enol yapısı daha kararlı olduğu için yapıdaki H atomu ile DNA'daki fosfatın oksijeni arasında hidrojen bağıyla etkileşimi önerilmiştir. Keto yapısında ise Aflatoksin B₁'de bulunan karbonil oksijeni ile guaninin ikinci azot atomuna bağlı hidrojen arasında H bağı ile etkileştiği düşünülebilir. Aynı bağlanma mekanizması Aflatoksin B₂'nin ssDNA'ya bağlanması için de geçerli olacaktır. Aflatoksin G₁ ve G₂'nin ssDNA ile etkileşimi ise aflatoksin yapısında bulunan karbonil oksijeni ile guaninin ikinci azot atomuna bağlı diğer hidrojeni arasında (Aflatoksin B₁ keto formuna benzer şekilde) H bağı ile etkileşebileceği söylenebilir.



Şekil 4.2 Aktive edilmiş PGE'ye dsDNA ile Aflatoksin B₁' in bağlanmasına ait şematik gösterim.

Çift zincirli DNA da ise zincirler birbirlerine hidrojen bağlarıyla bağlıdır. G-C baz çiftindeki guaninin azot atomuna bağlı H ile aktive edilmiş PGE'nin karboksil oksijeni arasında hidrojen bağıyla, yine A-T baz çiftindeki adeninin azot atomuna bağlı H ile aktive edilmiş PGE nin karboksil oksijenine hidrojen bağıyla dsDNA'nın etkileşebileceği söylenebilir (Şekil 4.2). Bağlanan dsDNA ile aflatoksin etkileştirilmiştir. Aflatoksin B₁'deki karbonil oksijeni ile dsDNA'daki sitozin azotuna bağlı H arasında da bir H bağı ile etkileşim gözlenebilir. Yine aflatoksin B₁ keto formunda oksijene bağlı H ile dsDNA'daki timinin oksijeni arasında da H bağıyla etkileşime girerek Aflatoksin B₁'in DNA zincirine interkalasyonu

mümkündür. Ayrıca Aflatoksin B₁'in enol yapısındaki H ile dsDNA'nın fosfat omurgasındaki oksijen ile de H bağıyla etkileşebileceği gözlenmektedir. Aynı bağlanma mekanizması Aflatoksin B₂'nin dsDNA'ya bağlanması için de geçerli olacaktır. Aflatoksin G₁ ve G₂ yapılarında keto enol tautomerisi bulunmamaktadır. Bu durumda Aflatoksin G₁ ve G₂'deki karbonil oksijeni ile G-C baz çiftindeki sitozinin azot atomuna bağlı hidrojeni arasındaki hidrojen bağıyla etkileşime girebileceği söylenebilir. Aflatoksin yapıları benzerlik gösterdiği için şematik gösterim sadece Aflatoksin B₁'e göre yapılmıştır. Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ dsDNA ve ssDNA ile etkileşerek guanin sinyallerinde değişimlere sebep olmaktadır. Bundan sonraki çalışmalarımızda kullanılan elektrotların NMR ve IR analizleri yapılarak teorik hesaplamalar ile de desteklenerek kesin bağlanma türleri ve bağlanma güçlerinin belirlenmesi mümkün olabilecektir.

- Çalışmamızın diğer bölümünde, Aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ ile tek sarmal DNA ve çift sarmal DNA etkileşimi tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) kullanılarak, elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tekniği ile incelenmiştir. Çıplak PGE, tek ve çift sarmal DNA immobilize edilmiş PGE, DNA-BSA modifiye PGE ve Aflatoksin ile etkileşimi sonrasında R_{ct} değerlerindeki artış/azalış değerlendirilmiştir. DNA-Aflatoksin etkileşimini incelemeye elektrokimyasal empedans tekniğinin kullanılması sonucu tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir.
- Çalışmamızın son bölümünde DNA-Aflatoksin etkileşiminde aflatoksin derişiminin etkisi için DNA-BSA modifiye PGE değişen derişimlerde aflatoksin B₁, B₂, G₁ ve G₂ ile etkileştirilmiş ve empedimetrik olarak incelenmiştir. ΔR_{ct} değerlerine karşılık aflatoksin derişimleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrileri elde edilmiş, her bir grafik için LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Aflatoksin derişimi artışıyla ΔR_{ct} değerinde doğrusal olarak artışlar gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre DNA biyosensörü ile aflatoksinlerin DNA'ya bağlanma yeteneği kullanılarak aflatoksin miktarını saptamak mümkün olabilmıştır. Sonraki çalışmalarda bu yöntem ile diğer yöntemlerin karşılaştırması yapılarak aflatoksin miktar tayini için bu yöntemin rutin analizlerde kullanılabilirliğinin araştırılması çalışmaya daha fazla değer kazandıracağı kanaatindeyiz.
- Aflatoksinlerin canlı metabolizması için zararlı etkileri bilinmektedir. Bu çalışma aflatoksinlerin DNA ile etkileştiğini göstermektedir. Bu etkileşim sonucunda da hücre işlevinin olumsuz yönde etkilenmesi de beklenen bir durum olacaktır.

- Sonuç olarak, DNA biyosensörü ile aflatoksinlerin etkileşimi ile elde edilen bu sonuçların sensör teknolojilerine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.



5. KAYNAKLAR

- Aladağ, N.** (2008). "Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile Vitamin D Reseptör Genindeki Polimorfizmlerin Saptanması", Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir*, 3, 44.
- Anonim** (2011). Türk gıda kodeksi bulaşanlar yönetmeliği (28157 Mükerrer). TC Resmi Gazete, 29 Aralık, Ek-1.
- Bard, A. J., Faulkner L. R.** (1980). Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications. *John Wiley & Sons, New York*, 103p.
- Bej, A.K.** (1991). Acquisition of mitochondrial DNA by a transformation vector for *Ustilago violacea*, *Gene*, 98,135-140.
- Berdar, D., Marin, A., Herrera, F., Martin A.M.** (2006). DNA biosensor using fluorescence microscopy and impedance spectroscopy, *Sensors and Actuators B*, 118, 53–59.
- Bhunja, A.K.** (2008). Biosensors and bio-based methods for the separation and detection of foodborne pathogens. *Adv Food Nutr Res*, 54,1-44.
- Blackburn, G.M., Gait, M.J.** (1990). Nucleic acids in chemistry and biology *IRL Press*, New York, Ch. 8, 297 - 332p.
- Brett, C.M.A., Brett, A.M.O.** (1993). Electrochemistry, *Oxford University Press*, 464p.
- Cai, X., Rivas, G., Farias, P. A. M., Shiraishi, H., Wang, J., Fojta, M., Palecek, E.** (1996). Trace measurements of plasmid DNAs by adsorptive stripping potentiometry at carbon paste electrodes, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 40, 41-47.
- Canavar, E., Kuralay, F., Erdem, A.** (2011). "Interaction of mitomycin c with DNA immobilized onto singlewalled carbon nanotube/polymer modified pencil graphite electrode", *Elektroanalysis*, 23 (10), 2343 – 2349.
- Carmichael, W. W.** (1988). In marine toxins and venoms, *Handbook of Natural Toxins* (Ed: A. T. Tu), Dekker, New York, 3: 121-147.
- Carpini, G., Lucarelli, F., Marrazza, G., Mascini, M.** (2004). Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2), 167-175.
- Carter, M.T., Rodriguez, M., Bard, A.J.** (1989). Voltammetric studies of interaction of metal chelates with DNA 2. tris chelated complexes of Cobalt (III) and Iron (II) with 1,10-phenantroline and 2,2"-bipyridine, *Journal of the American Chemical Society*, 111, 8901-8911.
- Castillo, J., Gaspar, S., Leth, S., Niculescu, M., Mortari, A., Bontidean, I., Soukharev, V., Domeanu, S.A., Ryabov, A.D., Csoregi, E.** (2004). Biosensors for life quality-Design, Development and applications, *Sensors and Actuators B*, 102, 179-194.
- Chamot, E.M., Mason, C.W.** (1958). John Wiley&Sons,Inc., USA, *Handbook of Chemical Microscopy*, 3rd edition, Volume:1,258-269p.
- Chen, D., Cao, Y., Liu, B., Kong, J.** (2002). A BOD biosensor based on a microorganism immobilized on an Al₂O₃ sol-gel matrix, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(5-6),737-9.
- Chen, K.S., Chen, S.C., Lin, H.R., Yan, T.R., Tseng, C.C.** (2007). A Novel Technique to Immobilize DNA on Surface of a Quartz Crystal Microbalance

- by Plasma Treatment and Graft Polymerization, *Materials Science and Engineering*, 27, 716–724.
- Chen, R.J., Zhang, Y., Wang, D., Dai H.** (2001). Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization, *Journal of the American Chemical Society*, 123, 3838-3839.
- Cheng, C.C, Goll, J.G., Neyhart, G.A., Welch, T.W., Singh, P., Thorp, H.H.** (1995). Relative rates and potentials of competing redox process during DNA cleavage: oxidation mechanism and sequence specific catalysis of the self inactivation of oxometal oxidants by DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 117, 2970-2980.
- Chiti, G., Marazza, G., Mascini, M.** (2001). Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring, *Analytica Chimica Acta*, 427, 155–164.
- Collings, A.F., Caruso, F.** (1997). Biosensors: recent advances, *Reports in Progress in Physics*, 60, 1397-1445.
- Coulet, P.R.** (1991). What is a Biosensor?, *Chapter 1; Biosensor principles and applications*, Editörler; L.J. Blum, P.R. Coulet, Marcel Dekker Inc., New York, 1-6p.
- Del Pozo, M.V., Alonso, C., Pariente, F., Lorenzo, E.** (2005). Electrochemical DNA sensing using osmium complexes as hybridization indicators, *Biosensor. Bioelectron*, 20 (8), 1549-1558.
- Demers L.M., Mirkin C.A., Mucic R.C., Reynolds R.A., Letsinger R.L., Elghanian R., Viswanadham G.** (2000), A florescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 72 , 5535-5541.
- Drummond, T. G., Hill, M. G. and Barton, J. K.** (2003). "Electrochemical DNA sensors", *Nat Biotech*, 21 (10), 1192-1199.
- Eckhard E., Espenhanh M., Napier N., Popovich N.D., Thorp H.H., Witver R.** (2001). in *DNA Arrays: Technologies and Experimental Strategies* (Editör: Grigonenko E.V.), *CRC Pres*, Boca Raton, 39-60p.
- Erdem, A., Kerman, K., Meriç, B., Akarca, U.S., Ozsoz, M.** (1999). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Electroanalysis*, 11, 586-588.
- Erdem, A., Kerman, K., Meriç, B., Akarca, U.S., Ozsoz, M.** (2000). Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Analytica Chimica Acta*, 422, 139-149.
- Erdem A., Kerman K., Meriç B., Ozsoz, M.** (2001). Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator, *Electroanalysis*, 13(3), 219-223.
- Erdem A., Kerman K., Meric B., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz M.** (2002). DNA biosensor for microcystis spp. Sequence detection by using methylen blue and ruthenium complexes as hybridisation labels, *Turkish Journals Chemistry*, 26, 851-862.
- Erdem, A., Ozsoz, M.** (2002). Electrochemical DNA biosensors based on DNA-Drug interactions, *Electroanalysis*, 14, 965-974.
- Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Ozsoz, M.** (2003), Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on Guanine signal, *Electroanalysis*, 15 (7), 1- 7.

- Erdem A., Isabel Pividori M., Del Valle M., Alegret S.** (2004). Rigid carbon composites: a new transducing material for label-free electrochemical genosensing, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 567, 29-37.
- Erdem, A.** (2007). A review: Nanomaterial-based electrochemical DNA sensing strategies, *Talanta*, 74, 318-325.
- Evans; A.** (1991). Potentiometry and ISE, *Acol*, London, s.106-198.
- Farkhondeh Hal, A.** (2014). Erzurum’da Açıkta Satılan Bazı Kurutulmuş Meyveler Üzerinde Gelişen Aflatoksin Üretici Mikrofungusların Araştırılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, *Yüksek Lisans Tezi*.
- Fernández-Cruz, M.L., Mansilla, M.L., Tadeo, J.L.** (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*, 1, 113–122
- Fojta, M., Havran, L., Fulneckova, J., Kubicaova, T.** (2000). Adsorptive transfer stripping AC voltammetry DNA complexes with intercalators, *Electroanalysis*, 12, 926-934.
- Graves, D. E., and Velea., L.M.** (2000). Intercalative binding of small molecules to nucleic acids. *Current Organic Chemistry*, 4, 915–929.
- Groopman, J.D., Cain, L.G., Kensler, T.W.** (1988). Aflatoxin exposure in human populations: measurements and relationship to cancer, *Critical Reviews in Toxicology*, 19, 113.
- Gündüz, S.** (1998). *Kimyacılar için istatistik*, Gazi Kitabevi, Ankara. S. 89p.
- Hazır, Z., Çoksöyler, N.** (1998). Farklı bölgelerde ve farklı yöntemlerle elde edilen kırmızı biberlerde aflatoksin düzeyleri, *Gıda Mühendisliği Kongre ve Sergisi*, s 479-483. 16-18 Eylül, Gaziantep-Türkiye.
- Heinrich, K.F.J.** (1981). Van Nostrand Reinhold Company, New York, N.Y. *Electron Beam X-ray Microanalysis*, 467-515p.
- Hembacher, S., Mannhart, J., Quate, C.** (2003) Revealing the hidden atom in graphite by lowtemperature atomic force microscopy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 100, 12539.
- Herne, T.M., Tarlov, M.J.** (1997). Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *Journal of American Chemical Society*, 119, 8916-8920.
- Huang E., Zhou F., Deng L.** (2000). Studies of surface coverage and orientation of DNA molecules Immobilized onto performed alkanethiol self- assembled monolayers, *Langmuir*, 16, 3272-3280.
- Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P.E., Ozsoz, M.** (2002a). Label free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes, *Electroanalysis*, 14 (23), 1-6.
- Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z., Ozsoz, M.** (2002b). Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA, *Electrochemistry Communications*, 4, 705-709.
- Kara, P., Ozkan, D., Erdem, A., Kerman, K., Pehlivan, S., Ozkinay, F., Unuvar, D., İtirli G., Ozsoz, M.** (2003). Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology, *Clinica Chimica Acta*, 336(1-2), 57-64.
- Kara, P., Meric, B., Zeytinoglu, A., Ozsoz, M.** (2004). Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes simplex Type I and

- Type II viruses from PCR amplified real samples, *Analytica Chimica Acta*, 518 (1-2), 69-76.
- Karadeniz H., Gulmez B., Sahinci F., Erdem A., Irem Kaya G., Unver N., Kivcak B., Ozsoz, M.** (2003). Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33, 295-302.
- Karadeniz H., Erdem, A., Çalışkan, A.** (2008). Electrochemical Monitoring of DNA Hybridization by Multiwalled Carbon Nanotube Based Screen Printed Electrodes. *Electroanalysis*, 20(17), 1932-1938.
- Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara., P., Erdem, A., Ozsoz M.** (2001). Electrochemical DNA biosensor for the determination of Benzo[a]pyrene - DNA adducts, *Analytica Chimica Acta*, 450, 45-52.
- Kerman, K., Morita, Y., Takamura, Y., Tamiya, E.** (2003). Label-free electrochemical detection of DNA hybridization on gold electrode, *Electrochemistry Communications*, 5 (10), 887-891.
- Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Karadeniz, H., Ozkan, Z., Erdem, A., Jelen, F., Ozsoz, M.** (2004). Electrochemical detection of specific DNA sequences from PCR amplicons on carbon and mercury electrodes using methylol blue as an intercalator, *Turkish Journal of Chemistry*, 28: 523.
- Killard, A.J., Smyth, M.R., Grennan, K., Micheli, L., Palleschi, G.** (2000). Rapid antibody biosensor assays for environmental analysis, *Biochemical Society Transactions*, 28-2, 81-84.
- Klibanov, A.M.** (1979). Enzyme stabilization by immobilization, *Analytical Biochemistry*, 93, 1-24.
- Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S. Ozyoruk, H. Yıldız, A.** (2009a). Characterization of redox polymer based electrode and electrochemical behavior for DNA detection, *Analytica Chimica Acta*, 643, (1-2): 83-89.
- Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S. Ozyoruk, H. Yıldız, A.** (2009b). Poly(vinylferrocenium) coated disposable pencil graphite electrode for DNA hybridization, *Electrochemistry Communications*, 11(6), 1242-1246.
- Labuda J., Bubnicova K., Kovalova L., Vanickova M., Mattusch J., Wennrich R.** (2005). Voltammetric detection of damage to DNA by arsenic compounds at a DNA biosensor. *Sensors*, 5, 411-423.
- Levicky, R., Herne, T.M., Tarlov, M.J., Satija, S.K.** (1998). Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: a neutron reflectivity study. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 9787-9792.
- Lowe, C.R.** (1999). Chemoselective Biosensors, *Current Opinion in Chemical Biology*, 3, 106-111.
- Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G., Mascini, M.** (2002). Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples, *Talanta*, 56, 949-957.
- Mannelli, I., Minunni, M., Tombelli, S., Wang, R., Spiriti, M.M., Mascini, M.** (2005). Direct immobilisation of DNA probes for the development of affinity biosensors, *Bioelectrochemistry*, 66, 129-138
- Marazza, G., Chianella, I., Mascini, M.** (1999). Disposable DNA electrochemical DNA sensor for hybridisation detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 43-51.
- Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E.** (1998). Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C, *Biophysical Chemistry*, 75, 87-95.

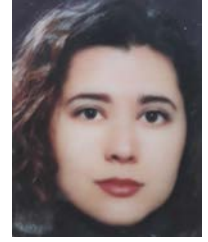
- Mascini, M., Palchetti, I., Marrazza, G.** (2001). DNA electrochemical biosensors, *Fresenius Journal of the Analytical Chemistry*, 369, 15-22.
- Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erensoy, S., Akarca, U.S., Mascini, M., Ozsoz, M.** (2002). Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue, *Talanta*, 56 (5),939-947.
- Mikkelsen, S.R.** (1996). Electrochemical biosensors for DNA sequence detection- a review, *Electroanalysis*, 8 (1), 15-19.
- Millan, K.M., Mikkelsen, S.R.** (1993). Sequence-selective biosensor for DNA Based on electroactive hybridization indicators, *Analytical Chemistry*, 65, 2317- 2323.
- Mishra, BB., Satyendra, G. S., Chander, R., Arun, S. A.** (2015). Characterization of nutritional, Organoleptic and Functional Properties of Intermediate Moisture Shelf Stable Ready-to-Eat Carica Papaya Cubes”. *Food Bioscience*, 10, 69–79.
- Motti, C., Dainese, E., Mascini, M., Minnuni, M., De Santis, P., Cozzani, I.** (2000). The use of biotechnology in agriculture and the methods for the detection of genetically modified organisms (GMOS) in food, *Italian Journal of the Biochemistry*, 49, 64-72.
- Monk, P.** (2002), *Fundamentals of Electroanalytical Chemistry*, Wiley & Sons, England, 14p.
- Mutlu, M.** (2002). Biyosensörler, *Bilim ve Teknik Dergisi*, Yeni Ufuklara, (Temmuz) 17p.
- Müller, W., Crothers, D.M.** (1975). Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids, *European Journal of Biochemistry*, 54, 267-277.
- Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Hassmann, J., Ozsoz, M.** (2002a). Allele specific genotype detection of factorV leiden mutation, from polymerase chain reaction amplicons based on label free electrochemical genosensor, *Analytical Chemistry*, 74, 5931-5936.
- Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Ozsoz, M.** (2002b). Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes, *Electrochemistry Communications*, 4 (10), 796-802.
- Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Ozsoz, M.** (2002c). Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 462 (1), 39-47.
- Ozkan, D., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Jelen, F., Nielsen, P.E., Ozsoz, M.** (2002d). DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label, *Bioelectrochemistry*, 58(1), 119-126.
- Palecek, E.** (1960). Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid, *Nature*, 188, 656-657.
- Palecek, E.** (1988). Adsorptive transfer stripping voltammetry: determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface, *Analytical Biochemistry*, 170, 421-431.
- Passarge, E.** (2000). Renkli Genetik Atlası, Editörler Güven Lüleci, Meral Sakızlı, Özgül Alper, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 34–39, 44–47, 72–73p.
- Pohland, A.E.** (1993). Mycotoxins in review, *Food Additives Contaminants*, 10, 17-28.

- Popovich N., Thorp H.** (2002). New Strategies for electrochemical nucleic acid detection, *Interface*, 11, 30-34.
- Pumera, M., Sanchez, S., Ichinose, I., Tang, J.** (2007). Electrochemical nanobiosensors, *Sensors and Actuators B Chemistry*, 123, 1195-1205.
- Rasooly, A.** (2005). Biosensor technologies. *Methods*, 37(1),1-3.
- Rupesh, K. M., Akhtar, H., Galle, C., Cristina, O., Jean, M.** (2015). A label free aptasensor for ochratoxin a detection in cocoa beans, *Analytica Chimica Acta*, 889,106-112
- Rice M., Galus Z., Adams R.N.** (1983). Graphite paste electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 143, 89.
- Rogers, K.R., Mascini, M.** (1998). Biosensors for Field Analytical Monitoring, *Field Analytical Chemistry and Technology*, 2, 317-331.
- Sadik, O.A., Wanekaya, A.K., Andreescu, S.** (2004). Advances in analytical technologies for environmental protection and public safety, *Journal of Environmental Monitoring*, 6, 513-522.
- Schöning M. J.** (2005). Playing around with field-effect sensors on the basis of EIS structures, laps and isfets, *Sensors*, 5, 126-138.
- Scott, P.M.** (1978). Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin, *Journal of Food Protection*, 41(5), 385-398.
- Skoog, D.A., West, D.A., Holler, F.J.** (1996). Analitik Kimyanın Temelleri, Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, *Bilim Yayıncılık*, 7. Baskı, 303-495p.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A.** (1998) Enstrümental Analiz İlkeleri, (Çeviri; Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H.), *Bilim Yayıncılık*, 5. Baskı, 563-670p.
- Skottrup, P.D., Nicolaisen, M., Justesen, A.F.** (2008), Towards on-site pathogen detection using antibody-based sensors, *Biosensors & Bioelectronics*, 3, 339-348.
- Steichen, M., Decrem, Y., Godfroid, E, Herman, C.B.** (2006). Electrochemical DNA hybridization detection using peptide nucleic acids and $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ on gold electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, 22(9-10), 2237-2243.
- Stoloff, L.** (1977). Aflatoxins: an overview. In mycotoxins in human and animal health, eds, J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine, and M.A. Mehlman, pp. 7-28. *Pathotox Publishers*, Park Forest South, IL.
- Teles, F.R.R., Fonseca, L.P.** (2008). Trends in DNA biosensors, *Talanta*, 77, 606-623.
- Thiel, A.J., Frutos, A.G., Jordan, C.E., Corn, A.M., Smith, L.M.** (1997). In situ surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization to oligonucleotide arrays on gold surfaces, *Analytical Chemistry*, 69, 4948-4956.
- Trucksess, M.W., Scott, P.M.** (2008). Mycotoxins in botanicals and dried fruits: a review. *Food Additives and Contaminants*. 25, 181-192.
- Tural, H., Gökçel, H. İ.,Ertaş, N.** (2003). Enstrümental Analiz I, *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları.*, No:186.
- URL-1** < <http://www.baskent.edu.tr/~cokeliler/biyosensor.doc>>, alındığı tarih: 29.06.2017.
- Vaughan,, R.D. O’Sullivan, C.K., Guilbault, G.G.** (2001). Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 635-638.

- Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R. ve Mosbach, K.** (1993). Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nature*, 361, 645–647.
- Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P.A.M., Dontha, N.** (1996). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus, *Analytical Chemistry*, 68, 2629-2634.
- Wang, J., Grant, D.H., Ozsoz, M., Cai, X., Tian, B., Fernandes, J.R.** (1997a). Adsorptive potentiometric stripping analysis of nucleic acids at mercury electrodes, *Analytica Chimica Acta*, 349, 77- 79.
- Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Shiraishi, H., Luo, D., Valera, F. S.** (1997b). Sequence-specific electrochemical biosensing of M. tuberculosis DNA, *Analytica Chimica Acta*, 337, 41-48.
- Wang, J., Nielsen, P., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Ozsoz, M., Beglieter, A., Mowat, M.** (1997c). Mismatch sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance, *Analytical Chemistry*, 69, 5200-5202.
- Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., Farias, P. A. M., Valera, F.S., Grant, D.H., Ozsoz, M., Flair, M.N.** (1997d). DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring-A review, *Analytica Chimica Acta*, 347, 1–8.
- Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D.H., Chicharro, M., Fernandes, J. R. and Palecek, E.** (1998a). Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 45, 33 - 40.
- Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R.** (1998b). Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor, *Analytica Chimica Acta*, 375, 197–203.
- Wang, J., Kawde, A.N., Erdem, A., Salazar, M.** (2001). Magnetic bead- based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 126, 2020-2024.
- Wang, J.** (2002). "Electrochemical nucleic acid biosensors", *Analytica Chimica Acta*, 469 (1), 63-71
- Wang, J., Kawde, A.N.,** (2002a). Amplified label-free electrical detection of DNA hybridisation, *Analyst*, 127(3), 383-386.
- Wang, J., Pumera, M., Chatratthi, M.P., Escarpa, A., Musameh, M.** (2002b). Single channel microchip for fast screening and detailed of nitroaromatic explosives or organophosphate nerve agents, *Analytical Chemistry*, 74, 1187-1191.
- Wei, M.-Y., Guo, L.-H., Chen, H.** (2006). Determination of surface- immobilized double-stranded DNA using a metallointercalator and catalytic voltammetry, *Microchim Acta*, 155 (3-4), 409-414.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggerwal, D.** (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions, *The American Journal Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122.
- Wong, E.L.S. Mearns, F.J., Gooding, J.J.** (2005). Further development of an electrochemical DNA hybridization biosensor based on long-range electron transfer, *Sensors Actuat*, 111, 515-521.

- Wong, E.L.S., Gooding, J.J.** (2006). Charge transfer through DNA: A selective electrochemical DNA biosensor, *Analytical Chemistry*, 78 (7), 2138-2144.
- Yang, M., McGovern, M.E., Thompson, M.** (1997). Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry, *Analytica Chimica Acta*, 346, 259-275.
- Yıldız, A., Genç, Ö.** (1993). Enstrümental Analiz, *Hacettepe Yayınları*, A-64, 289-384.
- Zhang, Y., Hu, N.** (2006). Cyclic voltammetric detection of chemical DNA damage induced by styrene oxide in natural dsDNA layer-by-layer films using methylene blue as electroactive probe, *Electrochemistry Communications*, 9 (1), 35-41.
- Zinedine, A., González-Osnaya, L., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Idrissi, L., Mañes, J.** (2007). Presence of aflatoxin M1 in pasteurized milk from Morocco. *International journal of food microbiology*, 114, 25–9.





ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı : Songül GÖKÇE
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul, 19.01.1975
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dil : İngilizce
İletişim Adresi : Karşıyaka Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi
E-posta Adresi : sonmel7509@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : Antalya Lisesi, 1992
Lisans : Ankara Üniversitesi, 1998
Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi, 2007
Doktora : Cumhuriyet Üniversitesi, 2018

İş Tecrübesi

Milli Eğitim Bakanlığı Kimya Öğretmeni, 1999-

Yayınlar

Uluslararası

Köse D.A., Gökçe G., Gökçe S., Uzun İ. (2009). Bis (N, N – diethylnicotinamide) p-chlorobenzoate complexes of Ni (II), Zn (II) and Cd (II) Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 95: 247-251

Sarı M., Gökçe G., Gökçe S., Şahin E., Necefoğlu H. (2007). Diaquabis (4-chlorobenzoate-KO) bis- (N,N-diethylnicotinamide-KN) zinc (II). *Acta Crystallographic*, E63:2191-2191

Kongreler ve Bildiriler

Uluslararası

Gökçe G., Gökçe S., Çetinus Ş. (2017) Determination of mycotoxins (aflatoxin G₁ and G₂) bioelectrochemical DNA biosensor. 3rd international conference on environmental science and technology, 19-23 Ekim 2017, Budapeşte/ Macaristan.

Gökçe G., Gökçe S., Çetinus Ş. (2017) Investigation of interaction between aflatoxin (B₁ and B₂) and DNA by electrochemical DNA biosensor. 3th international conference on environmental science and technology 19-23 Ekim 2017, Budapeşte/ Macaristan.