

T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERİTROMİSİNİN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞLARININ DNA
BİYOSENSÖRLERİ İLE İNCELENMESİ

FATMA BUDAK
20179150103

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. GÜLTEKİN GÖKÇE
SİVAS-2020

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.



KATKI BELİRTME/TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında her zaman bilgileriyle yanımda olan, başaracağız diyen ve desteğini esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Gültekin GÖKÇE'ye teşekkür ederim ve saygılarımı sunarım.

Bu süreçte maddi manevi her koşulda yanımda olan ve bunu her şekilde gösteren babam Mehmet Mustafa BUDAK'a ve annem Güllü BUDAK'a ve kardeşlerime uzaklık demeden her zaman yanımda oldukları ve destekledikleri için çok teşekkür ederim.



ÖZET

ERİTROMİSİNİN ELEKTROKİMYASAL DAVRANIŞLARININ DNA BİYOSENSÖRLERİ İLE İNCELENMESİ

Fatma BUDAK

Yüksek Lisans Tezi

Analitik Kimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gültekin GÖKÇE

2020,77 sayfa

Eritromisin, akciğer, boğaz ve kulaktaki bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan bir makrolid antibiyotiktir. Bu tez başlıca eritromisinin tek ve çift sarmal calf thymus DNA ile etkileşim özelliklerini içerir. Yöntem olarak dönüşümlü voltametri, kare dalga voltametrisi, diferansiyel puls voltametrisi ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi kullanılmıştır. Çalışmada sırasıyla kalem grafit elektrotların aktive edilmesi, aktif elektrot yüzeyine DNA probunun tutturulması ve DNA'nın eritromisin ile etkileşiminin voltametrik ve impedimetrik olarak incelenmesi ve sonuçların istatistiksel verilerle açıklanması basamakları yer almaktadır. Tek sarmal ve çift sarmal DNA'nın katı elektrot yüzeyinde eritromisin ile etkileşim özellikleri voltametrik olarak guanin bazının yükseltgenme sinyallerinde ve impedimetrik olarak da yük aktarım dirençlerinde meydana gelen değişimlerden yararlanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada indikatör elektrot olarak kalem grafit elektrot (PGE); referans elektrot olarak Ag/AgCl ve karşı elektrot olarak platin tel kullanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Eritromisin, Kalem grafit elektrot, Tek sarmal DNA, Diferansiyel Puls Voltametrisi, Kare Dalga Voltametrisi

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR OF ERYTHROMYCIN BY THE DNA BIOSENSORS

Fatma BUDAK

Master Thesis

Department of Analytical Chemistry

Supervisor Assistant :Prof. Dr. Gültekin GÖKÇE

2020,77 pages

Erythromycin is a macrolide antibiotic used to treat infections caused by bacteria in the lung, throat and ear. This thesis mainly includes the interaction properties of erythromycin with single and double stranded calf thymus DNA. Cyclic voltammetry, square wave voltammetry, differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy were used as methods. In the study, the steps of activating the pencil graphite electrodes, attaching the DNA probe to the active electrode surface and examining the interaction of DNA with erythromycin voltammetrically and impedimetrically and explaining the results with statistical data are included. The interaction properties of single-stranded and double-stranded DNA with erythromycin on the solid electrode surface were evaluated using the changes in the oxidation signals of the guanine base voltammetrically and the charge transfer resistances impedimetrically. In this study, pencil graphite electrode (PGE) as indicator electrode; Ag / AgCl as the reference electrode and platinum wired as the counter electrode were used.

Keywords: Erythromycin, Pencil graphite electrode, Single-stranded DNA, Differential Pulse Voltammetry, Square Wave Voltammetry

İÇİNDEKİLER

İçindekiler

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
INVESTIGATION OF THE ELECTROCHEMICAL BEHAVIOR OF ERYTHROMYCIN BY THE DNA BIOSENSORS	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar/ŞEMALAR	x
KISALTMALAR/SİMGELER	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Elektrokimya	4
2.1.1. Elektrokimyasal tabakalar	4
2.1.2. Elektrokimyasal Olayda Kütle Aktarım Yolları	6
2.1.3. Voltametri	6
2.1.2.1. Voltametri de kullanılan uyarma sinyalleri:	7
2.1.2.2. Voltametri de Kullanılan Elektrotlar	8
2.1.2.3. Referans Elektrotlar	8
2.1.2.4. Çalışma Elektrotları	9
2.1.2.4. Karşıt elektrot	11
2.1.3. Voltamogramlar	11
2.1.4. Voltametrik Teknikler	12
2.1.4.1. Dönüşümlü Voltametri	12
2.1.4.2. Diferansiyel Puls Voltametri:	13
2.1.4.4. Kare Dalga Voltametri	14
2.2. Biyosensör	17
2.2.1. Bir biyosensör de olması gereken özellikler	18
2.3. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Moleküller ve Yapıları:	19
2.3.1. Nükleik Asitler ve DNA:	19
2.3.2. İnterkalasyon	22
2.3.3. DNA Hakkında Kullanılan Terimler	23
2.4. Genosensörler (DNA Biyosensörleri)	23
2.4.1. DNA - İlaç Etkileşiminin Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerle algılanması:	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	29
3.1. Kullanılan Aletler	29
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.3. Eritromisin Hakkında Genel Bilgi	29

3.4. Deneyde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	30
3.4.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması:.....	30
3.4.2 DNA Çözeltilerinin Hazırlanması:.....	31
3.5. Kullanılan Yöntem.....	31
3.5.1 Kullanılan Elektrotların Deneye Hazırlanması:.....	32
3.6. DNA'nın Aktive Edilmiş PGE Yüzeyine tutturulması.....	33
3.6.1. ct dsDNA ve ct ssDNA PGE Yüzeyine İmmobilizasyonunun İncelenmesi:.....	33
3.6.2. DNA İmmobilize Edilmiş PGE' lerle ERT-DNA Etkileşiminin İncelenmesi.....	34
4. BULGULAR.....	37
4.1. CV yöntemi kullanılarak yapılan deneylere ilişkin bulgular.....	37
4.2. SWV yöntemi kullanılarak yapılan deneylere ilişkin bulgular.....	37
4.3. DPV yöntemi kullanılarak yapılan deneylere ilişkin bulgular.....	39
4.3.1. ct dsDNA ve ct ssDNA PGE yüzeyiyle immobilizasyonuna ilişkin bulgular.....	39
4.3.2 ERT-DNA etkileşimine ilişkin bulgular.....	43
4.4. ERT için EIS yöntemi kullanılarak yapılan deneylere ilişkin bulgular.....	50
4.4.1. ct ssDNA ve ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin bulgular.....	53
4.4.2 ERT-DNA ile etkileşimine ilişkin bulgular.....	56
5.TARTIŞMA.....	61
5.1 Eritromisin'in Elektrokimyasal Davranışlarına İlişkin Tartışma.....	61
5.2. DPV Yöntemi İle DNA'nın PGE Yüzeyine İmmobilizasyonuna İlişkin Tartışma.....	62
5.3. DPV Yöntemi İle DNA-ERT Etkileşiminin İncelenmesine İlişkin Tartışma.....	63
5.4. EIS Yöntemi İle DNA'nın PGE Yüzeyine İmmobilizasyonuna İlişkin Tartışma.....	65
5.5. EIS Yöntemi İle DNA-ERT Etkileşiminin İncelenmesine İlişkin Tartışma.....	67
6. SONUÇ.....	70
7. KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u> <u>Numarası</u>
ŞEKİL 2. 1 ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR DÜZENEGİ.....	4
ŞEKİL 2. 2 ELEKTROT YÜZEYİNDE OLUŞAN TABAKA ŞEMASI.....	5
ŞEKİL 2. 3 VOLTAMETRİDE KULLANILAN YÖNTEMLERDE POTANSİYEL UYARMA SİNYALLERİ.....	7

ŞEKİL 2. 4 KARBONA DAYALI ELEKTROT ÇEŞİTLERİ. (A) KARBON PASTASI ELEKTRODU (CPE), (B) KALEM GRAFİT ELEKTROT (PGE), (C) PERDE BASKILI ELEKTROT (SPE), (D) CAMSI KARBON ELEKTROT (GCE). [33].	10
ŞEKİL 2. 5 ELEKTROKİMYASAL HÜCREDE İMPEDİMETRİK ÖLÇÜMDE OLUŞAN NYQUIST EĞRİSİ	16
ŞEKİL 2. 6 BİYOSENSÖRÜN YAPISI	17
ŞEKİL 2. 7 BİYONSENSÖR DÖNÜŞÜM YAPISI	18
ŞEKİL 2. 8 DNA-RNA GÖSTERİMİ	19
ŞEKİL 2. 9 (A)PÜRİN VE PİRİMİDİN BAZLARI YAPISI VE (B) RNA-DNA GÖSTERİMİ	20
ŞEKİL 2. 10 DNA MOLEKÜLÜNÜN ÇİFT ZİNCİRLİ YAPISI	21
ŞEKİL 2. 11 İNTERKALASYON GÖSTERİMİ	22
ŞEKİL 2. 12. DNA BAZLARIYLA ETKİLEŞEN HİBRİDİZASYON İNDİKATÖRÜ İLE DNA DİZİ ALGILANMASI	26
ŞEKİL 2. 13 DNA DİZİ ALGILAMA YÖNTEMİ	26
ŞEKİL 2. 14 DNA'DA GUANİN BAZ YÜKSELTGENMESİ	27
ŞEKİL 3. 1 KULLANILAN DENEY DÜZENEGİ	32
ŞEKİL 4. 1 10^{-3} M ERTNİN DÖNÜŞÜMLÜ VOLTAMOGRAMI	37
ŞEKİL 4. 2 ERİTROMİSİNİN PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONU (A) 1 (B) 5 (C) 10 (D) 15 (E) 20 DAKİKA FARKLI SÜRELERDE ETKİLEŞİM SONRASINDA SWV TEKNİĞİ İLE YAPILAN ÖLÇÜM SONUCU VOLTAMOGRAMLAR (A) HİSTOGRAMLAR (B)	38
ŞEKİL 4. 3 ERİTROMİSİNİN PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONU (A) 10 (B) 15 (C) 25 (D) 30 (E) 40 (F) 50 PPM FARKLI DERİŞİMLERDE ETKİLEŞİM SONRASINDA SWV TEKNİĞİ İLE YAPILAN ÖLÇÜM SONUCU VOLTAMOGRAMLAR (A) HİSTOGRAMLAR (B)	39
ŞEKİL 4. 4 CT DSDNA' NIN PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONU (A) 5 (B) 10 (C) 15 (D) 30 (E) 40 (F) 50 DAKİKA FARKLI SÜRELERDE ETKİLEŞİM SONRASINDA DPV TEKNİĞİ İLE ÖLÇÜLEN GUANİN SİNYALLERİNİ GÖSTEREN VOLTAMOGRAMLAR (A) HİSTOGRAMLAR (B)	40
ŞEKİL 4. 5 CT SSDNA' NIN PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONU (A) 5 (B) 10 (C) 15 (D) 20 (E) 30 (F) 40 DAKİKA FARKLI SÜRELERDE ETKİLEŞİM SONRASINDA DPV TEKNİĞİ İLE ÖLÇÜLEN GUANİN SİNYALLERİNİ GÖSTEREN VOLTAMOGRAMLAR (A) HİSTOGRAMLAR (B)	41
ŞEKİL 4. 6 CT DSDNA' NIN PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONU (A) 5 (B) 10 (C) 15 (D) 20 (E) 25 (F) 30 PPM FARKLI DERİŞİMLERİNDE ETKİLEŞİM SONRASINDA DPV TEKNİĞİ İLE ÖLÇÜLEN GUANİN SİNYALLERİNİ GÖSTEREN VOLTAMOGRAMLAR (A) HİSTOGRAMLAR (B)	42
ŞEKİL 4. 7 CT SSDNA' NIN PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONU (A) 5 (B) 10 (C) 15 (D) 20 (E) 25 (F) 30 PPM FARKLI DERİŞİMLERİNDE ETKİLEŞİM SONRASINDA DPV TEKNİĞİ İLE ÖLÇÜLEN GUANİN SİNYALLERİNİ GÖSTEREN VOLTAMOGRAMLAR (A) HİSTOGRAMLAR (B)	43
ŞEKİL 4.8 ERT İMMOBİLİZASYON ÇALIŞMASININ YANITA OLAN CEVABI: CT DSDNA İLE İMMOBİLİZE EDİLEN PGE'LER ERT İÇERİSİNDE (A) 2 (B) 5 (C) 10	

(D) 15 (E) 20 (F) 25 (G) 30 DAKİKALARDA BEKLETİLEREK DPV TEKNİĞİYLE GUANİN SİNYALLERİNİ GÖSTEREN VOLTAMOGRAM (A) VE HİSTOGRAM (B)	44
ŞEKİL 4. 9 ERT İMMOBİLİZASYON ÇALIŞMASININ YANITA OLAN CEVABI: CT SSDNA İLE İMMOBİLİZE EDİLEN PGE'LER ERT İÇERİSİNDE (A) 2 (B) 5 (C) 10 (D) 15 (E) 20 (F) 25 DAKİKALARDA BEKLETİLEREK DPV TEKNİĞİYLE GUANİN SİNYALLERİNİ GÖSTEREN VOLTAMOGRAM (A) VE HİSTOGRAM (B)	46
ŞEKİL 4. 10 ERT DERİŞİM İMMOBİLİZASYON ÇALIŞMASININ YANITA OLAN CEVABI: CT DSDNA İLE İMMOBİLİZE EDİLEN PGE'LER (A) 2 (B) 5 (C) 10 (D) 15 (E) 20 (F) 25 (G) 30 (H) 40 PPM ERT İÇERİSİNDE BEKLETİLEREK DPV TEKNİĞİYLE GUANİN SİNYALLERİNİ GÖSTEREN VOLTAMOGRAM (A) VE HİSTOGRAM (B)	47
ŞEKİL 4. 11 ERT-DSDNA ETKİLEŞİMİNE AİT KALİBRASYON GRAFİĞİ.....	48
ŞEKİL 4. 12 ERT DERİŞİM İMMOBİLİZASYON ÇALIŞMASININ YANITA OLAN CEVABI: CT SSDNA İLE İMMOBİLİZE EDİLEN PGE'LER (A) 2 (B) 5 (C) 10 (D) 15 (E) 20 (F) 25 ERT İÇERİSİNDE BEKLETİLEREK DPV TEKNİĞİYLE GUANİN SİNYALLERİNİ GÖSTEREN VOLTAMOGRAM (A) VE HİSTOGRAM (B).....	49
ŞEKİL 4. 13 ERT-SSDNA ETKİLEŞİMİNE AİT KALİBRASYON GRAFİĞİ	50
ŞEKİL 4. 14 DSDNA-ERT ETKİLEŞİMİNE AİT DÖNÜŞÜMLÜ VOLTAMOGRAM A) AKTİVE EDİLMİŞ PGE B) DSDNA İMMOBİLİZE EDİLMİŞ PGE C) ERT-DSDNA ETKİLEŞİMDEN SONRA PGE (AG/AGCL REFERANS ELEKTRODA KARŞI, 2,5X10 ⁻³ M REDOKS ÇÖZELTİSİNDE, TARAMA HIZI: 50 MV/S).....	51
ŞEKİL 4. 15 SSDNA-ERT ETKİLEŞİMİNE AİT DÖNÜŞÜMLÜ VOLTAMOGRAM A) AKTİVE EDİLMİŞ PGE B) SSDNA İMMOBİLİZE EDİLMİŞ PGE C) ERT-SSDNA ETKİLEŞİMDEN SONRA PGE (AG/AGCL REFERANS ELEKTRODA KARŞI, 2,5X10 ⁻³ M REDOKS ÇÖZELTİSİNDE, TARAMA HIZI: 50 MV/S).....	51
ŞEKİL 4. 18 30 PPM DSDNA'NIN SABİT DERİŞİMDE PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONUNA İLİŞKİN İMPEDİMETRİK ÖLÇÜMLERİNİN ORTALAMA ΔORAN DEĞERLERİNİN ADSORPSİYON SÜRESİNE GÖRE DEĞİŞİMİ.....	53
ŞEKİL 4. 19 30 PPM SSDNA'NIN SABİT DERİŞİMDE PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONUNA İLİŞKİN İMPEDİMETRİK ÖLÇÜMLERİNİN ORTALAMA ΔORAN DEĞERLERİNİN ADSORPSİYON SÜRESİNE GÖRE DEĞİŞİMİ.....	54
ŞEKİL 4. 20 10 DAKİKA DSDNA'NIN PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONUNA İLİŞKİN İMPEDİMETRİK ORTALAMA ΔORAN DEĞERLERİNİN DSDNA ADSORPSİYON SÜRESİNE GÖRE DEĞİŞİMİ.....	55
ŞEKİL 4. 21 10 DAKİKA SSDNA'NIN PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONUNA İLİŞKİN İMPEDİMETRİK ORTALAMA ΔORAN DEĞERLERİNİN SSDNA ADSORPSİYON SÜRESİNE GÖRE DEĞİŞİMİ.....	55
ŞEKİL 4. 22 30 PPM SABİT DERİŞİMDEKİ ERT'NİN DSDNA İLE PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONUNA İLİŞKİN İMPEDİMETRİK ORTALAMA ΔORAN DEĞERLERİNİN ADSORPSİYON SÜRESİNE GÖRE DEĞİŞİMİ	57

ŞEKİL 4. 23 30 PPM SABİT DERİŞİMDEKİ ERT'NİN SSDNA İLE PGE YÜZEYİNE İMMOBİLİZASYONUNA İLİŞKİN İMPEDİMETRİK ORTALAMA ΔORAN DEĞERLERİNİN ADSORPSİYON SÜRESİNE GÖRE DEĞİŞİMİ	58
ŞEKİL 4. 24 15 DAKİKA SABİT SÜREDE ERT'İN DSDNA İLE ETKİLEŞİMİNE İLİŞKİN İMPEDİMETRİK ORTALAMA ΔORAN DEĞERLERİNİN ETKİLEŞİM MİKTARINA GÖRE DEĞİŞİMİ.....	59
ŞEKİL 4. 25 İMPEDİMETRİK ORTALAMA ΔORAN DEĞERLERİNİN ERT İLE DSDNA ETKİLEŞEN DERİŞİMİNE GÖRE DEĞİŞİMİNE AİT KALİBRASYON GRAFİĞİ ..	59
ŞEKİL 4. 26 10 DAKİKA SABİT SÜREDE ERT'NİN SSDNA İLE ETKİLEŞİMİNE İLİŞKİN İMPEDİMETRİK ORTALAMA ΔORAN DEĞERLERİNİN ETKİLEŞİM MİKTARINA GÖRE DEĞİŞİMİ.....	60
ŞEKİL 4. 27 İMPEDİMETRİK ORTALAMA ΔORAN DEĞERLERİNİN ERT İLE SSDNA ETKİLEŞEN DERİŞİMİNE GÖRE DEĞİŞİMİNE AİT KALİBRASYONGRAFİĞİ ...	60



TABLolar/ŞEMALAR

TABLO 1: DNA BİYOSENSÖRLERİ KULLANILARAK DNA HEDEFLİ BAZI MADDELERİN VE ANTİ KANSER İLAÇLARIN DNA İLE ETKİLEŞMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER.....	27
TABLO 2: KOVALENT BAĞLANMAYLA DNA BİYONSENSÖRÜ YÖNTEMLERİ....	28

KISALTMALAR/SİMGELER

ERT	Eritromisin
RNA	Ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
SPCE	Perde baskılı karbon elektrot
CPE	Karbon pasta elektrodu
R-GCE	Dönen camsı karbon elektrot
PGE	Kalem grafit elektrot
GCE	Camsı karbon elektrot
DKE	Doygun kalomel elektrot
SHE	Standart Hidrojen Elektrot
HMDE	Asılı civa damla elektrodu
AuE	Altın elektrot
SWV	Kare Dalga Voltametrisi
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
CV	Dönüşümlü voltametri
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
ABS	Asetat Tampon çözelti
Rct	Aktarılan yüke karşı gerçekleşen direnç
Cdl	Çift tabaka kapasitansı
PBS	Fosfat Tampon çözelti
CPSA	Kronopotansiyometrik sıyırma analizi
W	Warburg empedansı

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Elektrokimyasal algılayıcı sistemler (sensörler) özellikle analitik kimya olmak üzere; biyoloji, tıp, kimya, fizik, biyokimya, mühendislik vb. pek çok bilim dalının bilgilerinden faydalanıp yararlanarak birçok uygulama alanı bulmuş ve çalışmamızın temelini oluşturmuştur. Elektrokimyasal algılayıcı sistemler IUPAC tarafından “İyonlara seçici ya da kimyasal bileşiklere tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlar” olarak tanımlanmıştır [1].

Biyosensörler, biyolojik olayı algılayan işlenebilir bir sinyale dönüştüren analitik aletlerdir [2]. Elektrokimyasal algılayıcı sistemlerin yapısına DNA, enzim, antikor, hücre vb. gibi biyolojik maddelerin eklenmesiyle meydana gelen sensörlere biyosensörler denir. Biyosensör kelimesi “**biyo**” (biyolojik kökenli) ve “**sensör**” (algılayıcı) gibi iki ayrı kelimedenden meydana gelen nitel ve nicel analiz yapabilen kompleks aletlerdir [3]. Bu aletler son yıllarda hayatı kolaylaştırmak açısından büyük önem taşımaktadır. Analizi yapılacak maddelerin biyolojik sinyallerini elektriksel sinyallere dönüştüren analitik aletler biyosensörlerdir. Biyosensörler elektrokimyasal ve biyokimyasal olmak üzere iki dönüştürücü sistemden oluşurlar. Biyokimyasal kısmı analiz yapılacak maddeyle etkileşime girip maddeyi tanıırken, elektrokimyasal kısmı ise bu analiz sonucunu anlamlı sayısal verilere dönüştürür.

Canlılar yaşadıkları ortamdaki çevre ile vücutlarında sahip oldukları kimyasal ve fiziksel biyolojik sensörler aracılığıyla iletişim kurmaktadır. Örneğin duyu organları sayesinde duyabilir, konuşabilir, koklayabilir, dokunabilir, görebilir veya tadabilirler. Yani canlı vücudu kendi başına bir biyolojik sensör özelliğine sahiptir ve biyosensörlerin en iyi örneğidir. Bu nedendir ki biyolojik sensörler canlıları ilgilendiren bütün alanlarda kullanılmaktadır.

Nitel ve nicel analiz yapabilen kompleks cihazlar olan biyosensörler, bir diğer ifadeyle biyolojik kökenli algılayıcılar olarak ifade edilir. Bir biyosensör tanıma elementi, sinyal çevirici ve amplifiye edici elementten meydana gelir.

Biyosensörlerde biyolojik madde olarak Deoksiribonükleik asit (DNA)’nın kullanıldığı aletlere DNA biyosensörleri yani Genosensörler olarak adlandırılır [4]. DNA yapısında Guanin, Adenin, Timin, Sitozin bazlarından oluşur ve bilinen bir oligonükleotid dizisi bulunmaktadır. Bu yapılar DNA biyosensöründe ligand olarak kullanılır. Ve son yıllarda

DNA biyosensörlerine ilgi oldukça fazlalaşmıştır. Bu biyosensörlere, DNA hedefli maddelerin veya bazı ilaçların DNA'ya olan etkilerinin ortaya çıkarılmasında ve bu maddelerin toksik etkilerinin belirlenmesinde, mutasyonlarının tayinlerinde veya maddelerin etkileşim mekanizmasında kullanılabilirler [4,5].

DNA biyosensörleri kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların ortaya çıkarılmasında hızlı sonuçlar almada olanak sağlamaktadır. Bu şekilde, DNA ile etkileşime girerek ona zarar veren maddelerin saptanmasını da sağlar.

DNA kimyasal maddelerle ve ilaç molekülleriyle etkileşim gerçekleştirmektedir. Bu etkileşimde geliştirilen yöntemlerle incelenmesi; ilaç tasarımı ve tayinine yönelik yeni yöntem geliştirme açısından büyük önem taşımaktadır. Özellikle bu durum anti kanser etkisi taşıyan ilaç moleküllerinde DNA ile etkileşmesinden dolayı güvenilir ve hızlı şekilde ortaya konması ve ilaç geliştirme konusunda oldukça büyük önem taşımaktadır [6-8].

Elektrokimyasal tayin sonunda ilaç ve DNA etkileşmesinde sinyallerde bir artış ya da azalma olayı görülmektedir. DNA'nın ilaç molekülleriyle etkileşmesi ve bu etkileşimi biyosensörlerle incelenmesi, ilaç tayinine ve yeni ilaç üretilmesine yönelik çalışmalarda yeni yöntemler ortaya çıkarmıştır. Bu açıdan elektrokimyasal DNA biyosensörleri oldukça hızlı, basit ve hassas analiz yapabilen yöntemler arasında yer almıştır [9]. DNA da ki hasarı bulmak içinde en önemlisi anti kanser ilaçlardan ve tehlikeli maddelerden kaynaklanan hasarı bulmada kullanılan hassas, güvenilir ve hızlı yöntemleri geliştirmek için pek çok çalışma yapılmaktadır. DNA ile ilaç etkileşimlerini ortaya çıkarmak için elektrokimyasal DNA biyosensör çalışmaları yapılmaktadır [10-12].

Pek çok sentetik ilaç DNA ile etkileşime girmektedir ve böylelikle karmaşık yapıları meydana getirir. Bazı antibiyotikler DNA bazciflerinin aralarına yerleşmesiyle oluşan ürüne duyarlı olan elektrokimyasal biyosensörler ortaya çıkmıştır. Antibiyotik ile DNA etkileşiminin elektrokimyasal tayininde açığa çıkan sinyaldeki artma ya da azalma meydana gelir. Burada elde ettiğimiz sinyaldeki artma ya da azalma sonucuna göre etkileşimin ne yönde olduğu açıklanır [13].

Çalışmaların türüne göre DNA-madde etkileşmesinin sonucunda elde edilen madde yanıtlarına veya DNA'daki adenin ve guanin bazlarının sinyallerinde azalma ya da artmaya göre elektrokimyasal tayinler ortaya çıkmaktadır. DNA ile kansere dirençli ilaçlarla etkileşimi anlamamıza yarayan biyosensörler elektrokimyasal DNA biyosensörleridir. Bu biyosensörler DNA-ilaç ya da DNA-DNA etkileşimlerinden ortaya çıkan elektrokimyasal sinyalleri gözlemlemek, oluşan karmaşık yapıları anlamak, bağlanma sabiti, ilacın hangi noktaya

bağlandığı bölgenin yapısı ve ilacın etkileşimi sırasında açığa çıkan serbest radikallerin gözlenmesi ve belirlenmesine katkı sağlar.

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri uygulama yöntemleri bakımından karmaşık ve daha fazla ekipmana gerek duyulmaması nedeniyle basit, kolay, ucuz ve diğer yöntemlere kıyasla daha hızlı, seçimli ve az miktarda madde ile ölçüm yapmaya olanak sağlamaktadır.

Şimdiye kadar yapılmış birçok ilaç-DNA etkileşimine yönelik çalışma vardır. İnterkalatör ajan olan deoksorubin ve anti kanserin, bağlanmadan kaynaklanan DNA konformasyonel yapısında gerçekleştirdiği değişimleri Fojta incelemiştir [14]. Anti kanser ilaç olan karboplatini DNA modifiye elektrot kullanarak tedavi gören over(yumurtalık) kanseri kanlarında tayin örneğini Bret ve arkadaşları gerçekleştirmiştir. Bu ilacın düşük konsantrasyonlar da guanin bazına kıyasla adenin bazıyla daha çok etkileşim gerçekleştirdiği ortaya konulmuştur [15].

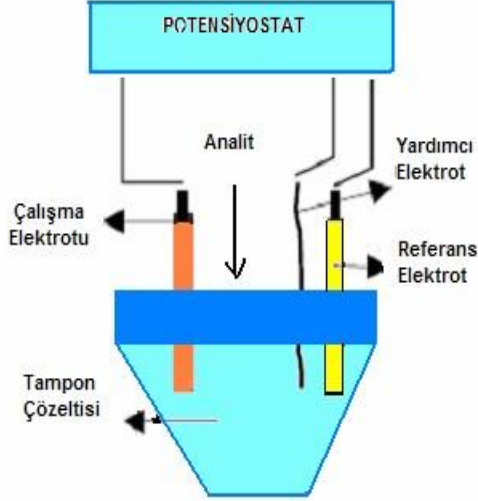
Serum, şeker, kan ve vücut sıvıları vb. biyolojik örneklerde kendine ait DNA dizisi bulunması biyomedikal açısından önemli bir alan oluşturmaktadır. Bu nedenle günümüzde genetik ve bulaşıcı hastalıkların saptanmasında DNA biyosensörleri büyük önem taşımaktadır. Deoksiribonükleik asit (DNA), hücrelerin gelişmesi ve farklılaşmasını, genetik süreçlerin mekanizmasını anlamak için oldukça önem taşımaktadır. DNA'yı hedefleyen farmakolojik aktiviteye sahip ilaçların DNA replikasyonunu etkiler ve böylelikle de proteinlerin transkripsiyon ve sentez işlemlerine müdahale eder [16,17].

1.2. Araştırmanın Amacı:

Bu tez çalışmasında tasarımı yapılan elektrokimyasal DNA biyosensörü ile DNA-antibiyotik etkileşim özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Tek sarmal ve çift sarmal DNA'nın ERT ile olan etkileşimleri ayrı ayrı incelenerek hangi türün tanıma yüzeyi olarak kullanılmasında daha etkin olacağı gösterilecektir. ERT-DNA etkileşimi özelliklerinin aydınlatılmasında gerek tek sarmal ve gerekse çift sarmal DNA için DPV ve EIS teknikleri ile bağımsız paralel deneyler yapılarak söz konusu tekniklerin üstünlükleri bulunan tayin sınırları esas alınarak karşılaştırılacaktır. Elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarımlarında kullanılan platin, altın, karbon pasta, camsı karbon gibi indikatör elektrotların maliyetleri oldukça yüksektir. Bu çalışmadaki hedeflerden biri de indikatör elektrot olarak kullanılan PGE'nin diğer elektrotlara göre tasarımının çok basit, maliyetinin çok düşük ve duyarlılığının da oldukça yüksek olduğunun kanıtlanması olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Elektrokimya



Şekil 2. 1 Elektrokimyasal Biyosensör Düzenegi

Maddelerin elektriksel davranışlarını, elektrik enerjisiyle kimyasal olayları arasındaki ilişkiyi inceleyen bilim dalına elektrokimya adı verilir. Elektrokimyasal tepkimelerin gerçekleşebilmesi için uygun sistemin oluşturulması gereklidir. İndirgenme ve yükseltgenme tepkimelerinin yani redoks tepkimelerinin bir arada yürüdüğü elektron aktarımı olan tepkimelerde ve elektrokimyasal hücre adı verilen bir düzenekte meydana gelir. Bu elektrokimyasal hücre içerisine analizi yapılacak olan maddeyi içeren çözelti konularak, ikili veya üçlü elektrot sisteminden oluşan maddenin kimyasal dönüşümünün gerçekleştiği elektrot sistemi ve bu sistemi birbirine bağlayan bir dış çevirici kullanılarak oluşturulur. En çok üçlü elektrot sistemi kullanılır. Üçlü elektrot sistemi çalışma elektrotu, referans elektrotu ve yardımcı elektrottan meydana gelmektedir.

2.1.1. Elektrokimyasal tabakalar

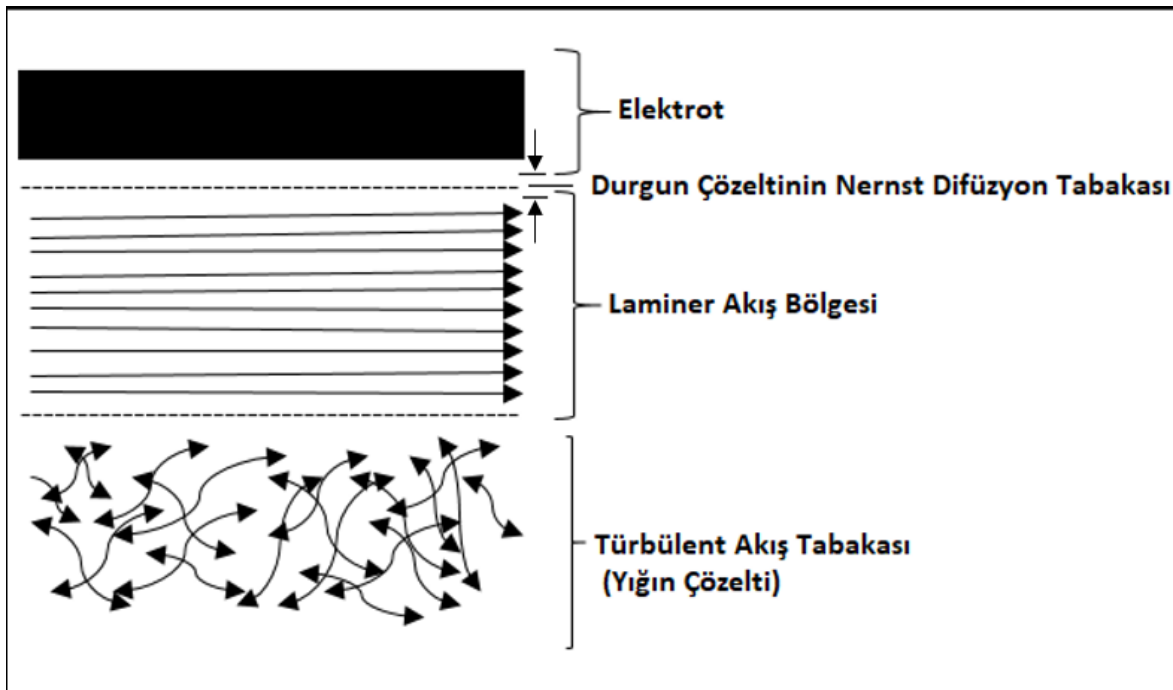
Elektroanalitik yöntemler maddelerin elektrokimyasal durumlarının analiz işlemlerinde kullanılan yöntemlerdir. Elektroanalitik yöntemler, maddelerin ara yüzeylerindeki yük akışının adsorpsiyon ve derecesi, kütle aktarım hızlarını, sitokiyometrisi, kimyasal tepkimelerin denge sabitleri ve hızları gibi bilgileri sunar. Diğer analiz yöntemlerine oranla elektroanalitik yöntemler üstünlüğe sahiptirler. Bunlardan birincisi, elektrokimyasal ölçümler

elemente, moleküle ya da tepkime sonucunda meydana gelen ürüne özel yükseltgenme basamağı için spesifikdir. İkincisi ise kullanılan aletlerin ucuz olmasıdır [18-20].

Bu yöntemlerle analiz edilecek maddenin çok düşük tayin düzeylerine kadar ölçüm yapılabilir. Kullanılan aletlerin diğer yöntemlerde kullanılan aletlere kıyasla yüksek hassasiyet ve duyarlılıkları, kullanım kolaylığı, ucuz maliyetli olması, hızlı ve doğru yanıt alımı, elde edilen elektrokimyasal ölçümlerin pek çoğu bir elementin veya molekülün özel yükseltgenme basamağı için seçici yani spesifik olması bu elektroanalitik yöntemlerin bize sunduğu avantajlardan bazılarıdır.

Elektrokimyasal yöntemlerde, elektrot-çözelti sistemine elektriksel etki uygulanarak sistemin verdiği yanıt ölçülür. Bu yöntemlerin hepsinde akım, potansiyel ve zaman kavramları yer alır. Bu yöntemlerle yapılan elektroanalitik ölçümlerde, iki çeşit ölçüm vardır. Bunlardan birincisi belli bir potansiyel aralığının belirlenip bu aralıkta tarama yapılması sonucu oluşan akımın ölçülmesi, ikincisi ise akımın sıfır ya da çok düşük olduğu potansiyellerde ölçüldüğü ölçümlerdir.

Elektrokimyasal ölçümler esnasında elektrot yüzeyi ile analit çözelti arasında kütle aktarım durumuna bağlı heterojen tabakalar meydana gelir [21]. Bu elektrokimyasal tabakaların oluşumu şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2. 2 Elektrot yüzeyinde oluşan tabaka şeması

Nernst difüzyon tabakası: Elektrot yüzeyine uzaklığı δ cm olan laminer akışın hızı elektrot ile sıvı arasındaki sürtünmeden kaynaklı sıfıra yaklaşır. Bundan kaynaklıda elektrot etrafında durgun, ince bir çözelti tabakası meydana gelir.

Laminer akış bölgesi: Düzgün paralel yönde sıvı tabakaları elektrot yüzeyinde birbiri üzerine kayarlar. Yüzeyle yaklaşıldığında laminer akış meydana gelir.

Türbülent akış tabakası: Çözelti yığımında oluşur.

Şekil 2.2’de gösterilen bölgelerden birinci bölgede çözelti Türbülent ve laminer akış bölgelerinin meydana getirdiği çözülden oluşan ve buradaki kütle aktarımı karıştırıcı tarafından oluşan iletimle sağlanır. İkinci bölgede ise elektrot yüzeyinde meydana gelen γ kalınlığındaki Nernst difüzyon tabakasını meydana getirir. Bu durgun difüzyon tabakası içinde kütle aktarımı, aynı karıştırılmayan çözümlerdeki gibi yalnızca difüzyonla meydana gelir [22].

2.1.2. Elektrokimyasal Olayda Kütle Aktarım Yolları

Elektrolitte bulunan herhangi bir taneciğin taşınabilme durumu için, elektrolitteki taneciğe bir kuvvetin etki etmesi gerekmektedir. Bu etki eden kuvvet elektriksel, mekanik veya kimyasal yönde bir kuvvet olmalıdır [23].

Elektrokimyasal bir hücrenin çalışması durumunda maddenin elektrot yüzeyine aktarımı üç farklı şekilde gerçekleşmektedir [24]. Elektrot yüzeyine aktarım yolları şu şekildedir:

Göç: Elektriksel alanın etkisiyle meydana gelen yüklü parçacıkların aktarımının gerçekleşmesi yoludur. Bu olaya **migrasyonda** denir.

Difüzyon: Maddelerin az yoğun ortamdan çok yoğun ortama geçme olayına denir. Bu olayda derişim farkından kaynaklı meydana gelen kimyasal kuvvetin oluşturduğu kütle aktarım yoludur.

Konveksiyon: İndirgenebilen ve yükseltgenebilen maddelerin çözelti içerisinde meydana getirdiği titreşme ve karıştırma sonucunda meydana gelen kütle aktarım yoludur.

Bu yollardan bir veya birkaçı deneysel olayların durumuna göre kullanılabilirler.

2.1.3. Voltametri

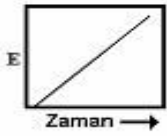
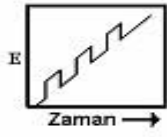
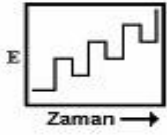
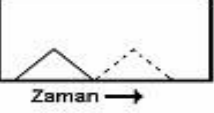
Voltametri çalışma elektrotunun veya indikatörün polarize edildiği koşullarda uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden meydana gelen elektro analitik bir

yöntemdir. Bu yöntemde oluşturulan grafiğe **voltamogram** denir [25]. Bu yöntemlerde bazı durumlarda potansiyel değeri sabit tutularak ya da istenilen duruma göre değiştirilerek madde miktarına göre oluşan akım miktarına bakılır. Uygulanan potansiyelin sınırları kullanılan çalışma elektrotuna, çözücüye ve elektrolitin türüne bağlı olarak değişebilir.

Voltametri yönteminde hücre içerisine alanı küçük olan mikro çalışma elektrotuyla karşılaştırma elektrotu arasına uygulanan ve değeri zamanla farklılaştırılan potansiyele karşı hücrede çalışma elektrotu ile karşıt elektrot arasında meydana gelen akım ölçülür. Voltametri yönteminde deneyler üç elektrotlu sistemle yapılır.

2.1.2.1. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri:

Voltametri de kullanılan elektrotlara ve elektrokimyasal hücreye bağlı olarak bir uyarma sinyali uygulanır. Voltametri de dört yöntem uygulanır. Bu yöntemler kare dalga, diferansiyel puls, üçgen dalga ve doğrusal taramalıdır.

<u>İsim</u>	<u>Dalga Şekli</u>	<u>Voltametrinin tipli</u>
(a) Doğrusal taramalı		POLAROGRAFİ HİDRODİNAMİK VOLTAMETRİ
(b) Diferansiyel puls		DİFERANSİYEL PULS POLAROGRAFİSİ
(c) Kare dalga		KARE DALGA VOLTAMETRİSİ
(d) Üçgen		DÖNÜŞÜMLÜ VOLTAMETRİ

Şekil 2. 3 Voltametrizde kullanılan yöntemlerde potansiyel uyarma sinyalleri

2.1.2.2.Voltametri de Kullanılan Elektrotlar

2.1.2.3.Referans Elektrotlar

Elektrokimyasal işlemler esnasında potansiyeli dış etkenlerden etkilenmeyen, sabit duran ve çalışılan çözeltinin bileşimine duyarlı olan elektrotlardır [26]. Referans elektrotların belli bir özelliğe sahip olması gerekmektedir [27,28]. Bu özellikler:

- Potansiyeli sabit kalmalı
- Kolay ve hızlı hazırlanabilmeli
- Tekrarlanabilir olmalı
- Polarize edilmemeli
- Küçük akımlarda bile potansiyeli sabit kalmalı

Referans yani karşılaştırma elektrotları kendi içerisinde çeşitlere ayrılır. Bunlar şu şekildedir:

Kalomel Elektrot

Kalomel (Hg_2Cl_2) elektrotun hazırlanması çok kolay olduğu için deneysel çalışmalara kolaylık sağlar ve bu nedenle yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolay hazırlanmasına rağmen kullanımı bütün sistemlerde yatkın değildir. Sıcaklık değişiminden etkilenirler.

Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrot

Gümüş gümüş elektrotları oldukça yaygın kullanılmaktadır. Bu elektrotlar doygun kalomel elektrota göre elektrota oranla çok yüksek sıcaklıklarda kullanımı tercih edilir. Gümüş (Ag) iyonları cıva(I)(Hg) iyonlarına oranla daha az sayıda analiz edilecek maddeyle reaksiyon gerçekleştirirler.

Gümüş yapıda bir telin, elektrolitik yöntemden hareketle $AgCl$ ile kaplanarak Cl^- iyonu bulunduran çözeltiye daldırılmasıyla gümüş-gümüş klorür referans elektrotu oluşturulur.

Gümüş-gümüş klorür elektrotunun reaksiyonu $AgCl + e^- \leftrightarrow Ag + Cl^-$ bu şekilde gerçekleşir. Doygun KCl çözeltisi kullanıldığında $25\text{ }^\circ C$ ' de standart hidrojen elektroda oranla potansiyeli $+0,222\text{ V}$ 'dur.

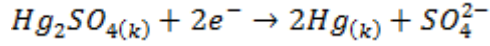
Standart hidrojen elektrot (SHE)

Bu elektrotların hazırlanması zor olduğu için hızlı ve pratik çalışmalarda diğer referans elektrotlar daha çok tercih edilir. Genellikle standart hidrojen elektrotun potansiyel değeri tüm sıcaklıklarda sıfır volt olarak alınır. Hidrojen gaz elektrotlar, pH tayinlerinde indikatör elektrot olarak yaygın bir kullanıma sahiptir [29].

Bir elektrotun standart potansiyelini belirlemek için potansiyel değeri sıfır olarak kabul edilen Standart Hidrojen Elektrot kullanılarak belirlenir.

Cıva – cıva (I) sülfat referans elektrot

Sülfat iyonlarının aktifliği ile potansiyeli belirlenir. Genel olarak doygun kalomel elektrotta benzer. Tepkimesi şu şekildedir:



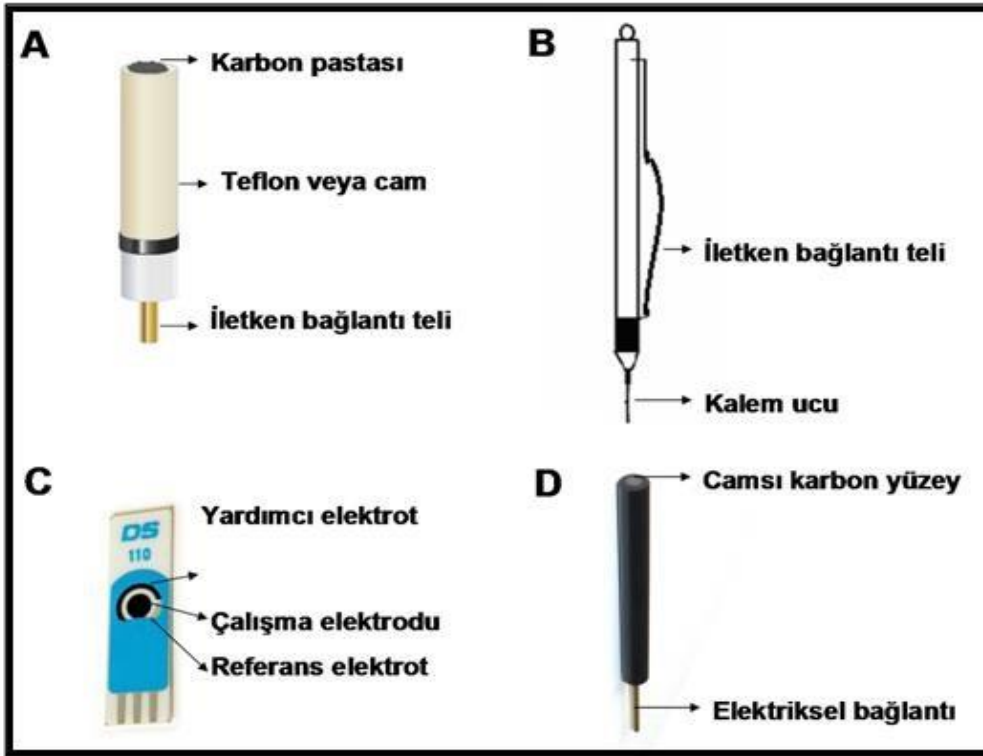
2.1.2.4.Çalışma Elektrotları

Bu tip elektrotlar yapısında cıva, altın, bizmut, platin, karbon bazlı katı elektrotlar ve bu elektrotlar modifiye olarak sayılırlar. Bunların zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişen, yüzeyinde analitin yükseltgenip-indirgendiği mikro elektrotlardır. Kullanılan bu tip elektrotların potansiyel çalışma aralıkları birbirinden farklıdır ve bu aralığın tespiti çok önemlidir. Bu aralığı saptamak çözücüye, elektrot türüne, kullanılan elektrolit türüne ve pH'a bağlı olarak değişmektedir [30].

Çalışma elektrotları yapıları gereği çeşitlere ayrılmaktadır. Bunlar şu şekildedir:

Karbon esaslı elektrotlar:

Potansiyel aralığı bakımından oldukça geniş bir aralığa sahip olduklarından ve maliyet bakımından da düşük olmasından kaynaklı elektrokimyasal analizlerde çok sık tercih edilmektedir [31]. Karbon esaslı elektrotlarda kendi içerisinde camı karbon elektrot (GCE), kalem grafit elektrot (PGE), karbon pasta elektrot (CPE) ve perde baskılı karbon elektrot (SPCE) olarak ayrılmaktadır [32].



Şekil 2. 4 Karbona dayalı elektrot çeşitleri. (A) Karbon pastası elektrodu (CPE), (B) kalem grafit elektrot (PGE), (C) perde baskılı elektrot (SPE), (D) Camsı karbon elektrot (GCE) [33].

⌚ **Karbon Pastası Elektrotu (CPE):**

Karbon pasta elektrot (CPE), maliyet bakımından ucuz olması, düşük artık akımlar meydana getirmesi, yüzey yenilenmesinin basit olması sebebiyle yaygın olarak kullanım olanağı sağlamaktadır. CPE için bağlayıcı madde, bromonaftalen, mineral, parafin ve silikon yağları kullanılır. Pasta bileşiminin en büyük etkisi elektrot aktivitesindedir [34].

⌚ **Camsı Karbon Elektrot (GCE):**

Camsı karbon elektrot (GCE), çok iyi mekanik ve elektriksel özelliklere sahiptir. Geniş potansiyel aralığına sahip olması, kimyasal reaksiyonlara girmemesi ve tekrarlanabilir yüzeyler sağlaması sebebiyle yaygın kullanılmaktadır. Bu elektrotlar fenol / formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin 1000⁰C - 3000⁰C arasında basınç altında karbonizasyona uğraması sonucunda oluşur. Bunların yanı sıra GCE yüzeyinin fiziksel dayanıklılığı oldukça yüksektir.

⌚ **Perde baskılı karbon(grafit) elektrotlar(SCPE):**

Perde baskılı elektrotlar tek kullanımlıktır ve maliyet bakımından ucuz değildir. Buna rağmen son yıllarda yapılan çalışmalar da yaygın bir şekilde kullanım alanına sahip olmuştur. Kullanım alanlarından biri olaraktan biyosensör teknolojisinin geleceği olan DNA mikroçip

teknolojisi için uygulanabilirliği bakımından oldukça başarılı sonuçlar veren perde baskılı karbon elektrotlar geleceğin elektrotları olarak ortaya konmaktadır [35,36].

🕒 **Kalem Grafit Elektrot (PGE):**

Kalem grafit elektrot (PGE) maliyetinin oldukça ucuz olması, çok düşük tayin sınırı olması, tekrarlanabilirliğinin oldukça iyi olması ve tek kullanımlık olması nedeniyle kullanımları her gün artmaktadır [37].

Civa Elektrot:

Bu elektrotlar elektrokimyasal analizlerde daha yaygın kullanılmaktadır. Negatif potansiyel sınırının çok yüksek olması ve civanın kolayca yükseltgenebilirliği kullanımını artırmaktadır. Kullanımının zahmetli olmasının nedeni civanın toksik bir madde olmasıdır.

2.1.2.4. Karşıt elektrot

Karşıt elektrotlara yardımcı elektrotta denir. Üçlü elektrot sisteminde kullanılır ve çalışmada elektrotun polarizasyon potansiyelinin ölçümünde yapılan hatayı engellemek için kullanılır. Civa havuzu ya da platin tel karşıt elektrot olarak kullanılır.

2.1.3. Voltamogramlar

Voltamogram uygulanan potansiyele karşı ölçümü yapılan akım arasında çizilen eğrilerdir. Doğrusal taramalı voltamogramlar çoğunlukla sigmoidal (S şeklinde) eğriler şeklindedir. Bu eğriler voltametrik dalgalar olarak bilinirler. Net belirgin artıştan sonraki sabit akım **sınır(limit) akım (i_s)** olarak adlandırılır. Çünkü bu akım, analizi yapılacak maddenin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızıyla sınırlıdır. Analizi yapılacak maddenin konsantrasyonu ile sınır akımları doğru orantılıdır. Bundan kaynaklı aralarındaki bağlantı şu şekildedir:

$$i_s = k \cdot C_A$$

Bu formülde;

i_s : sınır akım

C_A : analit konsantrasyonu

k :sabit

Kantitatif doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye bağlıdır [38].

Yarı-dalga potansiyeli, oluşan sınır akımının yarısına eşit olan potansiyeldir. $E_{1/2}$ gösterilmektedir ve bu potansiyel derişimden bağımsızdır. **Hidrodinamik Voltametri**, çözelti

veya elektrotun sürekli hareket halinde olduğu doğrusal taramalı voltametridir. **Polarografi**, damlayan civa elektrotunun kullanıldığı voltametridir.

Elektrot sistemine potansiyel uygulandığı zaman ortaya iki akım çıkar. Bunlar faradayik akım ve kapasitif akımdır.

1-Kapasitif akım (i_c):

Elektrotun elektrolit çözeltisi içerisine batırılması ve negatif yüklenmesi sonucu çözeltideki pozitif yükler elektroda doğru çekilirler. Bu durumda ara yüzeyde gerilim farkı oluşur. Zıt işaretli yüklerin ara yüzeyin her iki tarafında birikmesi sonucunda bu bölgede elektriksel çift tabaka meydana gelir. Oluşan çift tabaka, kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya indirgenecek madde olmasa da bir akım meydana gelir. Burada oluşan akım reaksiyondan bağımsız olarak meydana gelir ve bu akım **Kapasitif akım** denir.

Oluşan akım ne kadar düşük olursa o kadar doğru ölçüm yapılır. Kapasitif akım fon akımın meydana gelmesine yol açan etkenlerden biridir.

2-Faradayik akım (i_f):

Elektrot ile çözelti arasındaki yüzeyde akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonları meydana gelirken diğerinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir. Bu şekilde de elektrotların doğrudan aktarım ile akım iletilir. Bu akıma **faradayik akım** denir.

$$i = i_f + i_c$$

Bu formüle göre i_f azalırsa duyarlılık artar.

2.1.4. Voltametrik Teknikler

2.1.4.1. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri, üçlü elektrot sistemi ve durgun bir sistemle çalışma yapılır. Dönüşümlü voltametri (CV) hızlı taramalı voltametriye benzetilmektedir ancak potansiyel tarama işlemi döngüselidir. Potansiyelin fonksiyon olarak ölçüldüğü önemli ve yaygın olarak kullanılan elektroanalitik yöntemdir. Bu yöntem sürekli değişen potansiyel değerine karşılık gelen belli bir aralıktaki akımın değişimini ölçer. Analizi yapılacak maddenin yükseltgenmesi ve indirgenmesi voltamogram da gözlenmektedir.

İlk başta taramanın yönü, numune bileşimine bağlı olarak pozitif veya negatif yönde olabilir. Çevrim süresi genellikle 1 ms ya da daha kısa süreden 100 s ya da daha uzun süre aralığında olur. Bu yöntem kullanılarak oluşan voltamogramların ayrıntılı şekilde incelenmesiyle, bir sistemin hangi potansiyelerde ve kaç adımda yükseltgenip indirgenildiği, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığını, elektrot reaksiyonunun bir çözelti reaksiyonu ile birlikte gidip gitmediğini, yükseltgenme veya indirgenme ürünlerinin kararlı halde olup olmadığını ve elektrot reaksiyonunda rol oynayan maddelerin yüzeye tutunup tutunmadığını kolayca anlamak mümkündür [39,40].

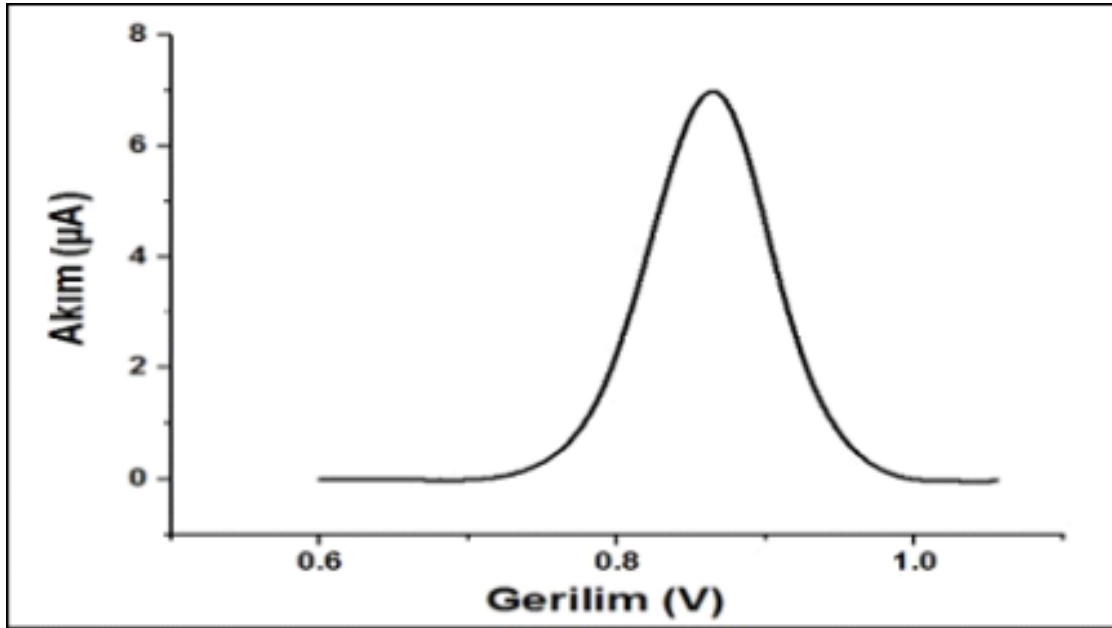
2.1.4.2. Diferansiyel Puls Voltametri:

Tayin sınırının düşürülmesi için voltametrik çalışmalarda kullanılan yöntemlerden birisi de diferansiyel puls voltametrisidir. Bu yöntem pek çok elektroaktif türün eser miktarının tayininde çoğunlukla kullanılır. Diferansiyel puls voltametrisinde akım, pulstan önce ve pulsun sonuna doğru iki defa ölçümü yapılarak bunların farkı sinyal olarak kaydedilir [41]. Bir analite ait yarı dalga potansiyeli;

$E_P = E_{1/2} - \Delta E/2$ formülünden hesaplanır.

ΔE : puls genliği

Bu yöntemde potansiyelin ve puls genliğinin çok iyi seçilmiş olması duyarlılığı artırır. Pek çok durumda 50 mV'luk potansiyel farkıyla pikler birbirinden ayırt edilebilir. Bu yöntemin ayırt ediciliği yüksek olan duyarlılık sınırı 10^{-7} – 10^{-8} M'dir. Duyarlılığının yüksek olmasının sebebi; çalışmanın faradayik akımının yüksek kapasitif akımının ise düşük olduğu zamanda yapılmasından kaynaklanır. Analitin derişimiyle pik akımları doğru orantılıdır.



Şekil 2.5. Diferansiyel puls voltametrisi örneği

2.1.4.3. Doğrusal Taramalı Voltametri

Uyarma sinyali doğru akım potansiyelinin zamanla doğrusal olarak artırılmasıyla meydana gelir. Potansiyele göre elde edilen akım voltamogramlarda incelenir. Bu yöntemde pik maksimumları elde edebilmek için yarı dalga potansiyel farkı minimum 0,2 V olmalıdır. Doğrusal taramalı voltametrinin genellikle potansiyel tarama hızı $5\text{-}20\text{ mVs}^{-1}$ aralığında ve voltamogramlar sigmoidal eğrisi şeklindedir.

2.1.4.4. Kare Dalga Voltametrisi

Kare dalga voltametrisi son derece duyarlı ve hızlı yöntemdir. Bu yöntemde akımlar arası fark (Δi); iki farklı şekilde hesaplanır. Bunlar; birincisi potansiyelindeki akımdan, ikincisi ise potansiyelindeki akım değeri çıkarılarak hesaplama yapılır. Tersinir bir indirgenme tepkimesinde pulsun boyutu, ileri tarama esnasında elde edilen ürünün geri tarama sırasında yükseltgenmesini yetecek kadar büyüklüktedir. Bu yöntemde akımlar arasındaki fark arttıkça derişimlerde artar bundan dolayı derişimle akım doğru orantılıdır. İleri pulsla katodik akım (i_1), geri pulsla da anodik akım (i_2) meydana gelir.

2.1.4.5. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi elektrokimyasal tepkimelerin oluştuğu durumlarda yük transfer değerleri hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca sıvı /katı ara yüzeylerin karakterizasyonu için kullanılan bir elektrokimyasal metot olan EIS, bu ara yüzeylerin dielektrik özellikleri hakkında bilgi vermektedir [39]. Elektrokimyasal hücre içerisinde

potansiyelin zamana bağlı sinüzoidal değişiminde oluşan alternatif akıma karşı direnç oluşur. “ $V = I \cdot Z$ ” formülünde potansiyel (V) ve alternatif akım (I) zamana göre değişmektedir. Bu formülde Z ise empedansı göstermektedir. Burada oluşan direnç ve empedansın birimi Ohm(Ω)’dur. Empedans (Z) şu şekilde hesaplanır:

$$Z = E_t / I_t$$

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi verileri Nyquist ve Bode eğrileri ile bulunur [42]. Bu yöntemde ölçüm yapılırken üçlü elektrot sistemi kullanılır. Ve hücre içerisinde redoks probu çözeltisi kullanılır. Bu çözelti genel olarak Ferri/ferrosiyanür içeren redoks çözeltisidir.

EIS, iki bileşenden oluşur. Bu bileşenler gerçek ve zahiridir.

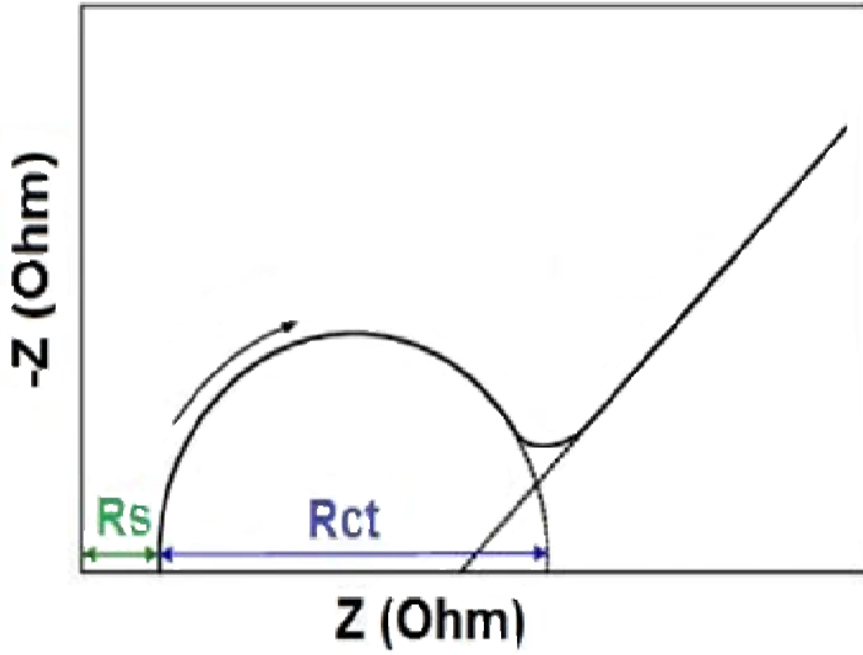
$$Z = Z' - jZ'' \quad (i = \sqrt{-1})$$

Z = empedans

Z' = gerçek empedans,

Z'' = zahiri empedans

Bu bileşenler gerçek empedansın x, zahiri empedansın y ekseninde olduğu grafik Nyquist eğrisi olarak bulunurlar [43].

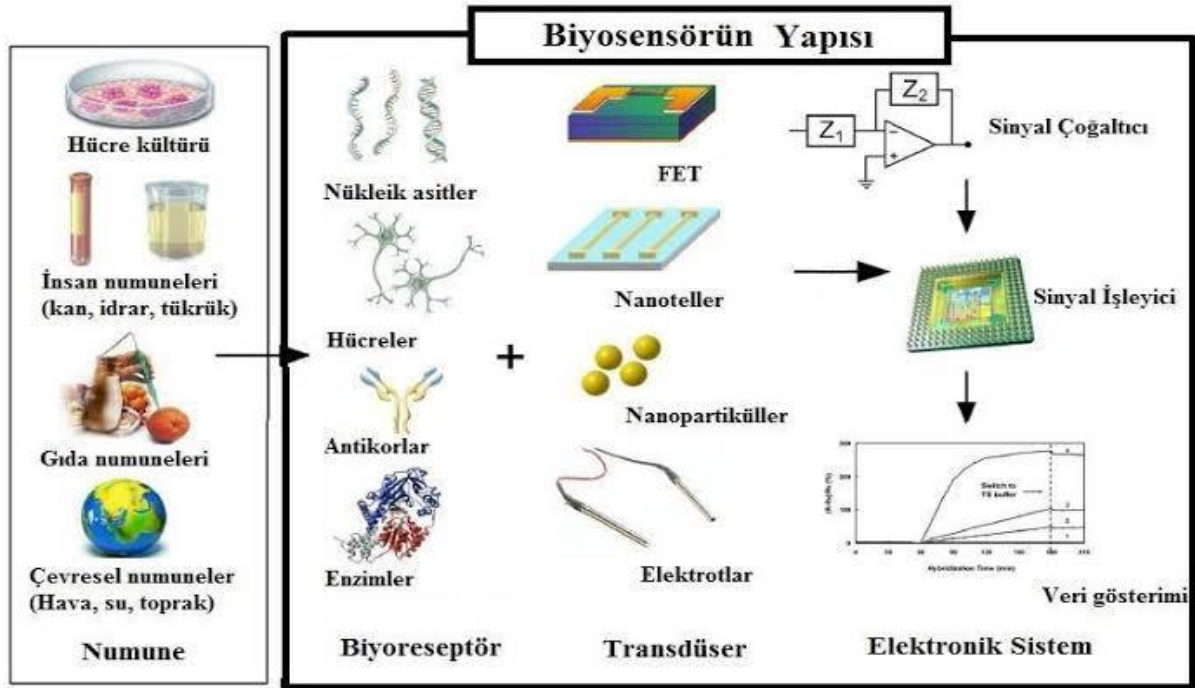


Şekil 2. 5 Elektrokimyasal hücrede impedimetrik ölçümde oluşan Nyquist eğrisi

Şekil 2.6'da gösterilen Nyquist eğrisinde, yapılan ölçümün ilk aşamasında yüksek frekanslara sahip oluşan çözelti direnci (R_s),bu direnci takip eden yarım daire elektrotta transfer edilen yüke karşı meydana gelen direnç (R_{ct}) ve düşük frekanslarda oluşan lineer bölgedeyse Warburg Empedansı (R_w) şekilde gösterilmektedir. Kapasitans, sistemin yük depolama özelliğidir. Bu yöntemle belirlenen frekans aralığıyla empedans taraması gerçekleştirilmektedir. Burada elektrot yüzeyinde oluşan olayların incelenmesinde R_{ct} değerinde meydana gelen değişimler yorumlanır.

Bu yöntem yüzey kaplama, hız sabitleri ve bağlanma sabitleri gibi biyolojik moleküllerin birbiriyle etkileşimlerinin karakterizasyonu hakkında bilgi verir. Ayrıca günümüzde oldukça yaygın yöntem olmaktadır [44].

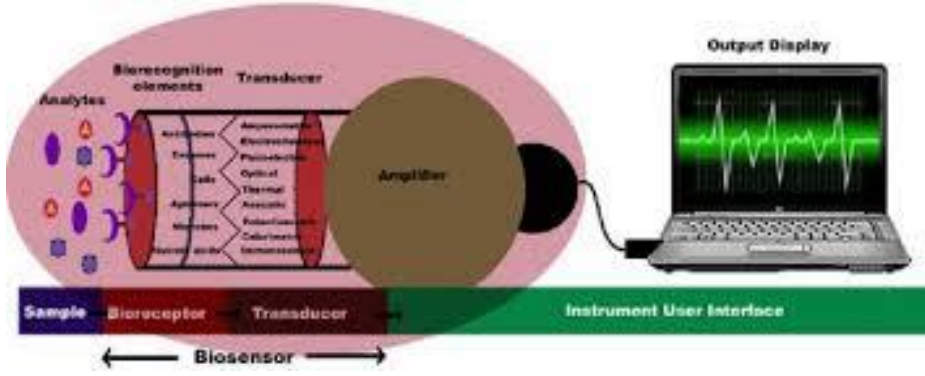
2.2. Biyosensör



Şekil 2. 6 Biyosensörün yapısı

“Biyo” ve “sensör” kelimelerinin birleşimiyle biyosensör oluşmaktadır. Burada “biyo” biyolojik kökenli olduğunu, “sensör” kelimesi ise algılayıcı yapıda olduğunu belirtmektedir. Biyosensörler iç içe geçmiş biri kimyasal diğeryse elektrokimyasal olan iki çeviriciden meydana gelir. Bir biyokimyasal çevirici analizi yapılacak maddeyle etkileşime girerek onu tanımayı sağlar. Bu etkileşimle meydana gelen madde (biyokimyasal ürün) elektrokimyasal çeviriciyle okunabilir sayısal değere çevrilir. Buna dayanarak biyosensörler kantitatif ve kalitatif analizi gerçekleştiren kompleks cihazlardır. Veyahut biyosensörler yani biyoalgılayıcılar için yapılarında biyolojik bir algılayıcı içeren ve bir fizikokimyasal dönüştürücüyle birleştirilmiş analitik aygıtlardır [45,46].

Biyoloji, tıp, fizik, mühendislik, kimya, elektronik gibi birçok bilim dallarında bilgi birikiminden çoklu bir anlayış çerçevesinden faydalanılarak ve biyolojik bileşenlerin ya da sistemlerin seçimlilik özellikleriyle modern elektronik yöntemlerin işlem özelliklerinin birleşmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlara biyosensörler denir.



Şekil 2. 7 Biyosensör dönüşüm yapısı

Biyosensörler, esneklik ve arttırılmış algılama hızı gibi özellikleri bakımından diğer tayin yöntemlerine göre pek çok avantaja sahiptirler.

2.2.1. Bir biyosensör de olması gereken özellikler

Kullanım Ömrü: Bir biyosensörün ömrünü sınırlayan en önemli etken biyolojik algılayıcı katmanın aktivitesinin azalmasıdır. Buna göre bir biyosensörün kullanım ömrünün uzun olması gerekmektedir. Kullanım ömrü biyosensörün tekrarlanabilirlik, stabilite, kalibrasyon sıklığını ve diğer parametreleri de olumsuz olarak etkilemektedir.

Kalibrasyon: Bir biyosensörün olabildiğince az kalibrasyona ya da kalibrasyona hiç ihtiyaç duymaması beklenmektedir. Fakat biyosensörler çalıştıkları süre boyunca kalibre edilmeye oldukça ihtiyaç duyarlar.

Seçicilik: En önemli parametrelerden biridir. Analizi yapılacak maddenin örnekte varlığı tespit edilmiş ve diğer maddelerden ayrımını yapmak için yapılan işlemidir.

Tekrarlanabilirlik: Aynı koşullar altında ard arda yapılan ölçümlerin kesinliği için yapılan işlemlerdir. Yapılan ölçümlerin birbirine yakın olması beklenir. Buna göre tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensör uygulaması da o kadar iyi olduğu söylenebilir.

Stabilite: Kullanılan elektrotların stabil olması gerekmektedir. Elektrotların stabilitesi yani kararlı olması biyolojik malzemenin dayanıklılığına, pH, nem, ısı, oksijen derişimi gibi fiziksel etkenlere bağlıdır.

Geniş Ölçüm Aralığı: Analizi yapılacak madde belli bir derişim aralığına sahiptir. Bu aralıktan az ya da fazla olursa ölçüm sonuç vermeyebilir.

Yüksek Duyarlılık: Biyosensör bağlanmış biyolojik maddenin yalnızca belirli maddelere karşı duyarlı olmalıdır.

Tayin Sınırı: Tayin sınırı, analitin yapılacak işlemdeki en küçük derişimidir. Elektrot yüzey alanının büyüklüğü, maddenin miktarı ve maddenin duyarlılığı tayin sınırını etkileyen etkenlerdir.

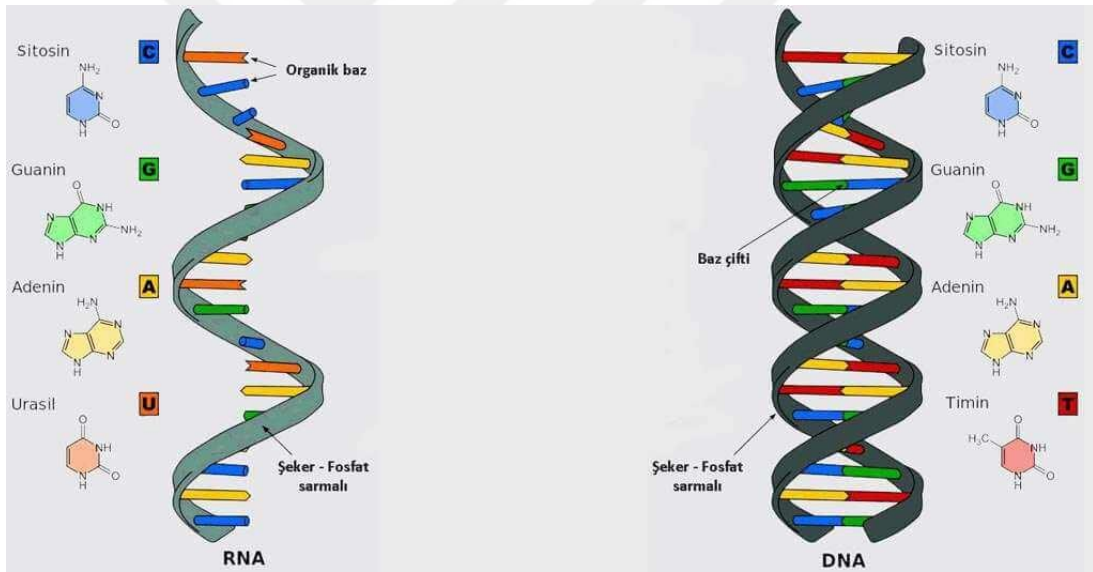
Hızlı Cevap Zamanı: Elde edilen akım-zaman grafiğinden elektrotun cevap zamanı hakkında bilgi edinilebilir. Oluşan grafikteki eğrilerde basamakları dar ise cevap zamanının hızlı, geniş ise yavaş olduğunu göstermektedir. Kullandığımız biyosensörün cevap arlığının hızlı olması gerekmektedir.

Basitlik ve ucuzluk: Bir biyosensörün kullanımı kolay ve ucuz olmalıdır.

Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Biyosensörün tasarım açısından bu özellik çok önemlidir. İdeal bir biyosensör küçültülebilirlik ve sterilize edilebilir olması gerekmektedir.

2.3. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Moleküller ve Yapıları:

2.3.1. Nükleik Asitler ve DNA:



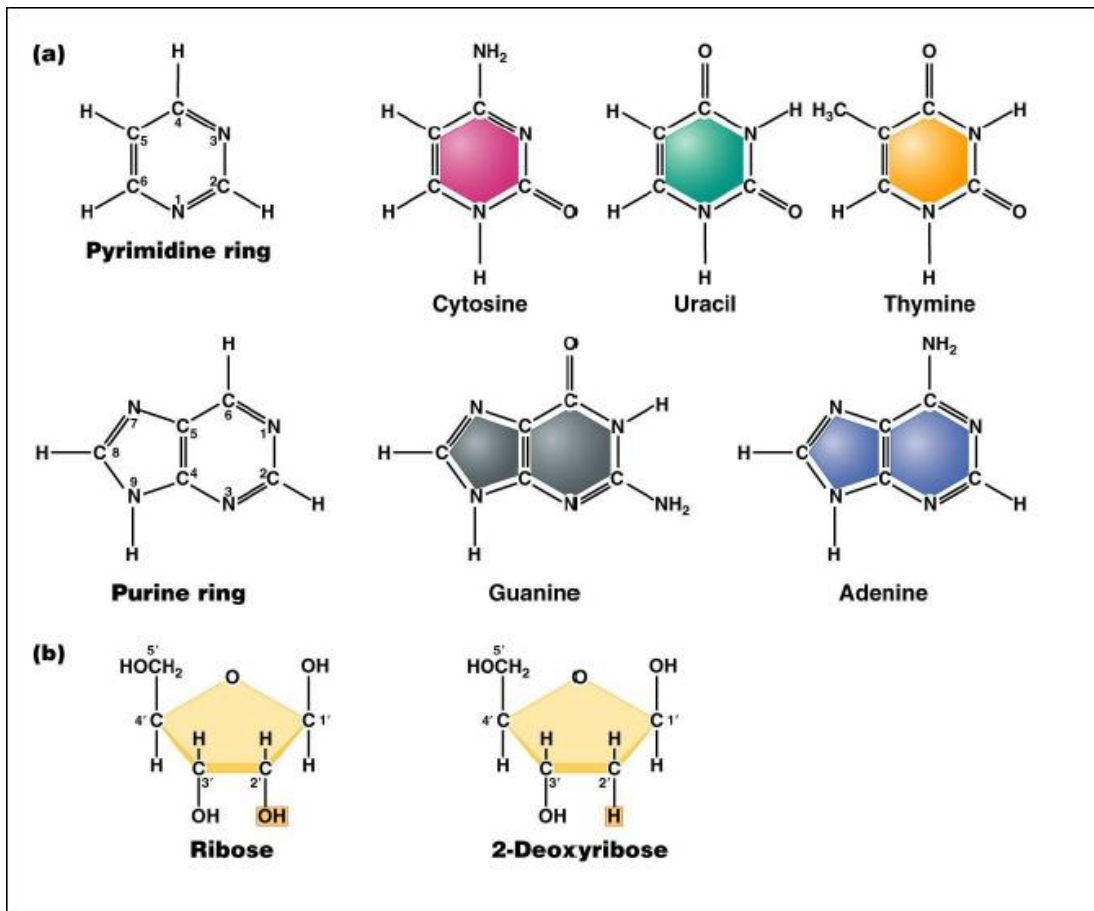
Şekil 2. 8 DNA-RNA gösterimi

Nesilden nesile genetik bilgilerin aktarıldığı, taşındığı ve korunduğu makro moleküller nükleik asit denir. Nükleik asitlerin yapı taşı nükleotid denmektedir. Nükleik asitler iki tiptedir. Bunlar : deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA)'dır.

Nükleotidlerin bir araya gelmesiyle nükleik asitler oluşur. Nükleotidin yapısında pürin bazı veya pirimidin bazı, şeker grubu ve fosfat grubu bulunur. Nükleotidler içerisinde bulundurduğu azotlu baza göre isimlendirilirler. Azotlu bazlar ise kendi içerisinde pürin ve pirimidin olarak ayrılmaktadır. Pürin bazları; adenin(A) ve guanin(G), pirimidin bazları ise

sitozin(S), timin(T) ve urasil(U)'dir. Yalnız pirimidin bazı olan urasil(U) sadece RNA'da bulunur. Beş karbonlu şeker ve fosfat grubu içermektedirler. DNA ve RNA birbirinden ayıran özelliklerden bir tanesi de içerdikleri beş karbonlu şekerdeki bir oksijen atomunun eksik olmasıdır.

Nükleik asitler belli bir düzene göre dizilirler. Bu dizilişe göre belirli tür ve sayıdaki nükleotidlerin 3'-5' fosfodiester bağlarıyla bağlanma gerçekleştirerek polinükleotid zincirli birincil(primer) yapılardan oluşur. DNA ve RNA'nın kovalent yapısını fosfodiester bağları meydana getirmektedir. Nükleik asitlerin yapılarındaki şekere göre DNA(deoksiribonükleik asit) ya da RNA(ribonükleik asit) isimlendirilirler [47,48].



Şekil 2. 9 (a)Pürin ve Pirimidin Bazları Yapısı ve (b) RNA-DNA gösterimi

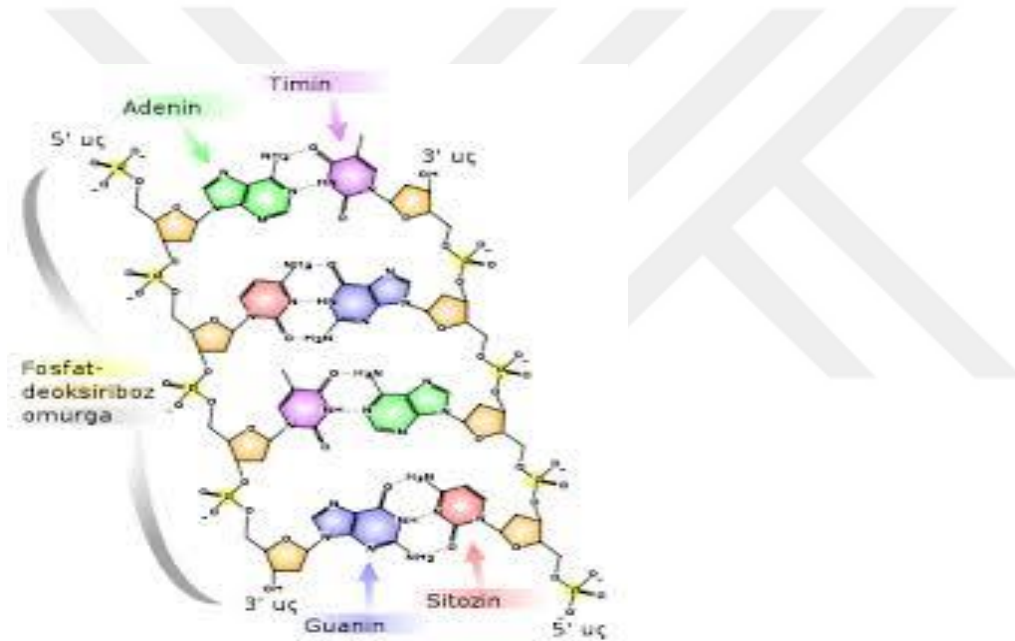
DNA, canlılardaki biyolojik işlemlerin şifresini taşıyan genleri oluşturur. Böylelikle genetik bilgiyi taşır. Hücrelerin ihtiyacı olan maddelerin üretilmesi için gerekli bilgiler DNA da bulunur. Ayrıca DNA'da bakteri ve virüs gibi canlı yapılarda bulunur. Hücrelerin DNA'sı kimyasal olarak kopyalanabilmektedir. Canlı organizmalar genetik bilgilerin transkripsiyon ve replikasyon yoluyla enzim ve proteinlerin biyolojik açıdan sentezini sağlamaktadır.

DNA'daki pürin ve pirimidin bazları birbirine hidrojen bağlarıyla tutunmaktadır. Bu bazlar şu şekilde tutunur:

- Adenin-Timin bazları ikili bağ
- Guanin-Sitozin bazları üçlü bağ yaparlar.

Bazların aralarında bulunan hidrojen bağları zayıf bağ olduğundan DNA'nın ısı görmesiyle çift sarmal yapısı tahrip olarak ikiye ayrılır. Buna da **denatürasyon** denir. Fakat DNA çift sarmal yapısına uygun koşullar altında tekrar dönebilir. Buna ise **renatürasyon** denir.

DNA'da bulunan bazlar arasındaki hidrojen bağları DNA molekülündeki iki zinciri bir arada tutarlar. Çift zincirli DNA molekülünde bazlar sarmal iç kısmında, fosfat ve şeker grubu ise dış kısmında bulunurlar. Sarmalın dış kısmı hidrofilik, iç kısmı ise hidrofobik yapıdadır.



Şekil 2. 10 DNA Molekülünün Çift Zincirli Yapısı

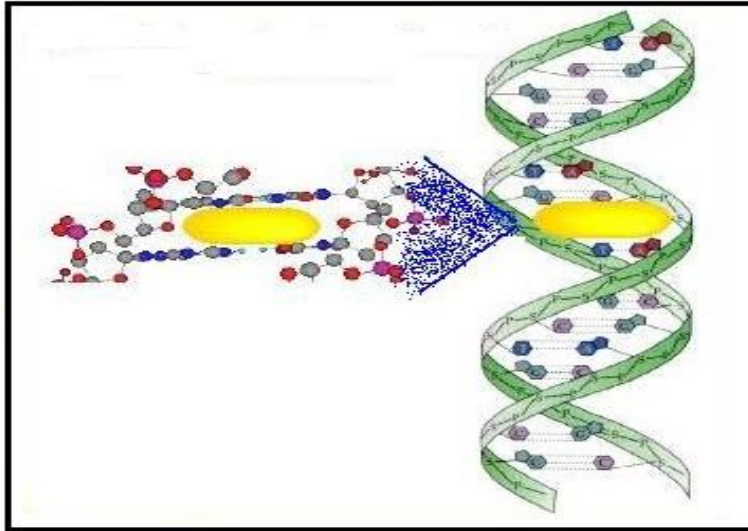
DNA ve RNA da yani nükleotidlerde fosfat ve şeker grubu aynıdır. Aralarındaki fark ise içerisinde buldukları bazların farklı olmasıdır. DNA'da pirimidin bazların sayısı fazladır ancak en fazla timin (T) ve sitozin (C) bazları bulunur. Pürin bazı olarak sadece adenin (A) ve guanin (G) olarak iki çeşittir. İçerisinde buldukları bazlara göre DNA ve RNA nükleotidleri adlandırılırlar. Yapılarında bulunan bileşiklerin birbiri arasında kurduğu bağ kendilerine özgüdür. Yani, şeker grubu C-1' atomu ile azotlu baz ile kimyasal bağ kurar. Pürin bazları ise N-9 atomu ile şeker grubuna kovalent olarak bağlanırlar. Pirimidin bazları ise şekerde bulunan C-1 atomu ile N-1 atomu bağ kurarlar [49].

DNA'nın çift sarmal şeklindeki yapısı James D. Watson ve Francis H. Crick tarafından 1953 yılında bulunmuştur. DNA'nın yapısında bulunan bütün nükleotidlerdeki şeker ve fosfat grupları aynıdır. DNA'da hücre bölünmesinin hazırlıkları esnasında kendini kopyalayabilmesi ve kromozomlarının ikiye bölünmesi için bir kopyasını oluşturmaktadır. Ve bu olaya da **duplikasyon** denilmektedir. DNA'nın diğer bir görevi ise RNA'ya bilgi aktarmaktır. RNA'ya aktardığı bilgi ribozomlarda protein sentezinde ve enzim gibi bileşenlerinde sentezinde kullanılır. Ve bu olaya da **transkripsiyon** denilmektedir.

2.3.2. İnterkalasyon

DNA'daki baz çiftleri arasına yerleşerek güçlü bir bağlanma olayı gerçekleşir. Bu olaya İnterkalasyon denir [50,51]. Bu olayda DNA baz çiftleri arasına yerleşen maddeler düzlemsel bir halka sistemine sahiptir. İki baz çifti arasına interkalatörün girmesi için baz çiftlerinin arasının açılması gerekir. Bunun içinde DNA sarmal yapısının normalin tersi yönde kıvrılarak gevşemesi gerekir. Böylelikle transkripsiyon engellenir, zehirlenme ve mutasyon olayı oluşur. Bundan kaynaklı da DNA interkalatörleri genellikle kanserojendir.

İnterkalasyon maddenin yapısına göre dönüşümlü veya dönüşümsüz olarak gerçekleşir [52]. İnterkalasyon olayı esnasında DNA'da zincir kırılması gerçekleşir. Bu kırılma olayı da DNA senteziyle DNA'ya bağımlı olan RNA sentezini bozmaktadır. Buna sebep olan maddeler Topoizomeraz(II) enzimini inhibe ederler [53].



Şekil 2. 11 İnterkalasyon gösterimi

2.3.3. DNA Hakkında Kullanılan Terimler

Prob: Etiketli ya da etiketsiz yapıda, melezleşme teknikleriyle tamamlayıcı hedef dizileri saptamak için kullanılan baz dizisi belli olan oligonükleotit.

Sentez: Oluşan yeni DNA'da yeni zincirin uzaması.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR): Önceden belirlenmiş bir primer çifti tarafından çift sarmallı DNA'nın laboratuvar ortamında sentezlenmesi işlemi.

Oligonükleotit: Pek çok bazın bir araya gelmesiyle oluşur.

Dinükleotitler: Bazlardan iki tanesinin yan yana gelmesiyle oluşur.

Trinükleotitler: Bazlardan üç tanesinin yan yana gelmesiyle oluşur.

Hedef dizi (Target): Prob dizisine karşılık gelen oligonükleotit.

Tekrarlayan oligonükleotitler: Polimer içindeki tekrarlayan oligonükleotitler, tekrarlayan bazları ifade eder. Tekrar eden bazlara ise baz sayısına göre mononükleotide poly (A), dinükleotide poly (AT), trinükleotide poly (GAT) örnek olarak verilebilir.

Çift sarmal tekrarlayan polimerler: 5'- 3' polaritesine sahip ve noktayla ayrılarak ifade edilen baz çiftlerinden oluşan polimerlerdir.

Baz çifti: İki bazın bir araya gelmesiyle oluşur. Örneğin bu çiftler şu şekilde A-T ya da G-C baz çiftleri oluşur.

Yanlış eşleşen dizi (Mismatch): Bir bazı ya da birden fazla bazı hedef dizisinden farklı olan oligonükleotittir.

Rastgele dizi (Non complementary): Hedef olarak belirlenen baz dizisinden tamamen farklı bir baz dizilimine sahip oligonükleotittir.

2.4. Genosensörler (DNA Biyosensörleri)

Günümüzde gelişmekte olan ve yoğun ilgi gören DNA biyosensörleri algılayıcı biyolojik madde olarak nükleik asitleri kullanırlar. Bu biyosensörlerde tanıma yüzeyi olarak DNA kullanılmaktadır ve bu nedenle DNA biyosensörleri veya Genosensörler denilmektedir. Analizlerde yaygın kullanılan DNA biyosensörleri spesifik, seçimli, analitik, pratik, duyarlı, maliyeti düşük, hızlı ve tekrarlanabilir olması gibi özelliklere sahiptir [54].

DNA biyosensörleri gelecek için yeni boyutlar kazandıracak ve analizlerde önemli rol oynayacaktır. Bu biyosensörler ayrıca elektrokimyasal biyosensörler arasına da girmektedir [55].

DNA ile diğer maddeler arasında gerçekleşen etkileşim; hastalık teşhisinde, mutasyonların analizinde, tıpta, çevreyle alakalı araştırmalarda, ilaç etki mekanizmalarının aydınlatılmasında, toksik madde analizinde vb. pek çok alanda araştırma yapılmaktadır [56].

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri üç aşamada tasarlanır. Bu aşamalar:

- İmmobilizasyon (Proben tutturulması)
- Hedef diziyle hibridizasyon
- İşaretlemesiz veya işaretlemeyle dayalı tekniklerin kullanımıyla tayinin gerçekleştirilmesi.

DNA biyosensörlerinde elektrot yüzeyine DNA'nın sağlam bir şekilde tutturulması gerekmektedir. Bu da şu üç teknikle gerçekleşir:

- Kovalent bağlanma,
- Adsorbsiyon,
- Elektrostatik bağlanma

Günümüzde DNA biyosensörleri biyolojik silah tayininde, kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların tanısında sık kullanılmaktadır. Bakteri, parazit, mantar ve virüs kökenli hastalıkların saptanmasında kullanılmaktadır.

2.4.1. DNA - İlaç Etkileşiminin Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerle algılanması:

DNA-ilaç etkileşiminin incelenmesinde en yaygın kullanılan yöntem DNA biyosensörleri olmaktadır. DNA'da bulunan ve elektroaktif baz olan guanin/adenin bazlarının sinyali üzerinden veya analiz edilecek maddenin elektrokimyasal sinyali üzerinden faydalanarak gerçekleştirilir. Burada alınan sinyallerdeki değişimlere göre ise DNA-ilaç etkileşimi hakkında yorum yapılır [57]. İlaçların DNA ile etkileşmesiyle ilgili çeşitli etkileşim türleri vardır. Bunlar:

- ✓ Elektrostatik bağlanma
- ✓ İnterkalasyon
- ✓ Çapraz bağlanmadır.

Hedef molekül ya da ilaç ve DNA arasındaki etkileşim, bu bileşiklerin hızlı bir şekilde görüntülenmesi ve aygıtların geliştirilmesi için oldukça önemlidir. DNA-ilaç etkileşimi tayinlerinde elektrokimyasal biyosensörlerle;

- ✓ DNA'daki guanin veya adenin sinyalinde
- ✓ DNA ile etkileşen ilacın yaydığı kendi sinyalinde oluşan artma veya azalma ile birçok tayin yapılabilmektedir.

Analiz edilecek maddelerin DNA ile etkileşimleri şu şekilde olur;

- ✓ DNA çift sarmal yapısında bulunan küçük ve büyük oluklara bağlanmasıyla,
- ✓ Madde, 3'-5' fosfat omurgasına elektrostatik olacak şekilde bağlanmasıyla, nükleik asidi negatif yüklü çeker

✓ DNA'nın baz çiftleri arasına girerek İnterkalasyon yapması şeklinde sınıflandırılabilir.

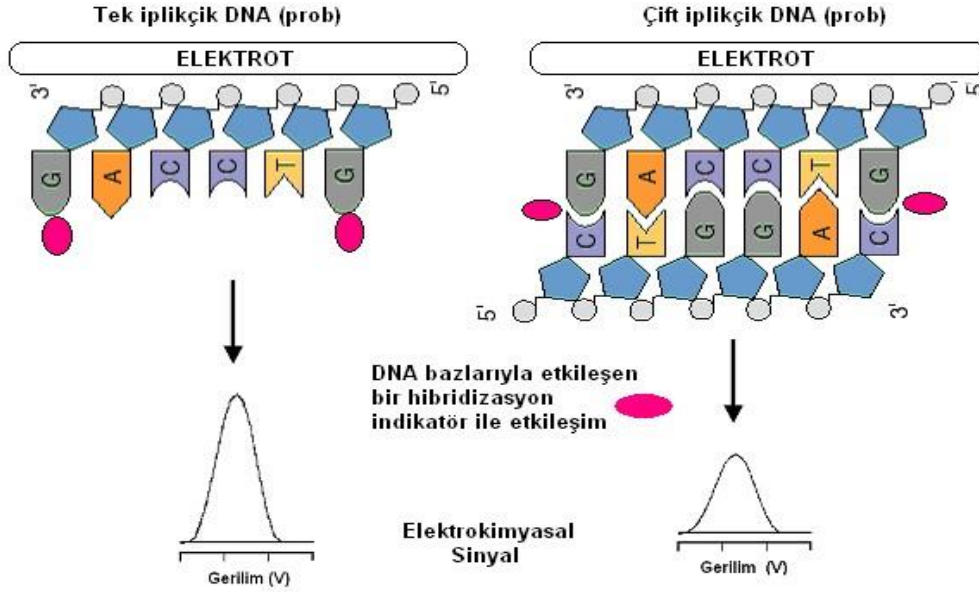
Literatürde DNA-ilaç etkileşimine dayalı birçok yayın bulunmaktadır. Bu yayınlarda genel olarak yeni sentezlenecek maddelerin DNA hedefli ilacın sentezi gerçekleştirilirken, bu maddelerin etkileşimlerinin hızlı ve etkin şekilde olması beklenmektedir. Bunların yanı sıra çevresel atıkların, kimyasal maddelerin DNA ile etkileşimlerinin bulunması ve bu maddelerin insanlardaki olumlu-olumsuz etkilerinin araştırılması açısından önemlidir.

DNA-ilaç etkileşiminden sonra aşama aşama deney yapılır. Bu aşamalar elektrot yüzünün yıkanması, voltametri kullanılarak elektrokimyasal ölçümlerin yapılması ve alınan sinyallerin aynı olup olmadığı karşılaştırılmasına bakılır. Ayrıca DNA-ilaç etkileşiminin öncesi ve sonrası için ilaç ve DNA'nın daha önceden alınmış sinyallerindeki artış veya azalma durumu da incelenir.

Çalışma sırasında üzerinde çalışılan maddenin; DNA ile etkileşmesinden sonra madde sinyalinin ya da DNA'daki bir bazın sinyalinde oluşan artma ya da azalma sonucu etkileşimi yorumlanabilir. İlaç-DNA etkileşimini incelemek için elektrokimyasal biyosensörler kullanılarak tayin yapılır. Bu tayin sırasında ilaç-DNA etkileşimi öncesi ve sonrası ilaç sinyalindeki ya da DNA'daki elektroaktif bazlardan Guanin ve Adenin sinyalindeki değişim ölçülür. Yapılan ölçümlerde meydana gelen değişime göre etkileşim hakkında yorum yapılır [58].

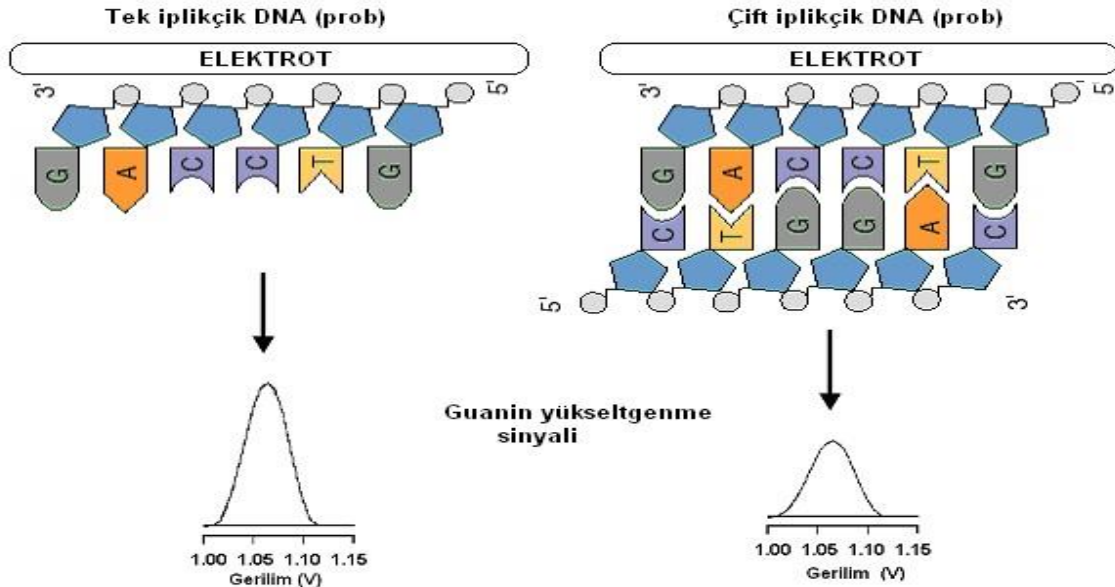
Anti kanser ilaçların bazılarında DNA ile yaptığı etkileşimlerde farklı yöntemlerle incelenmesinin yanı sıra, son yıllarda yapılan elektrokimyasal yöntemlere dayalı tayinlerin kullanılması DNA biyosensörlerinin(Genosensörler) önemini arttırmaktadır [59-61].

Hibridizasyon indikatörü olarak DNA kullanıldığında DNA'daki bazlarla (en çok Guanin ile) etkileşim sağlıyor. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan madde DNA'nın bazlarından biriyle (özellikle Guanin) etkileşiyor olabilir. Şekil 2.13.'de belirtildiği gibi; ssDNA 'da görülen sinyali (bazların açıkta olması nedeniyle), hibridizasyondan sonra meydana gelen dsDNA 'da (bazlar kapalı olduğundan) görülen madde sinyalindeki oranla oldukça yüksektir [62].

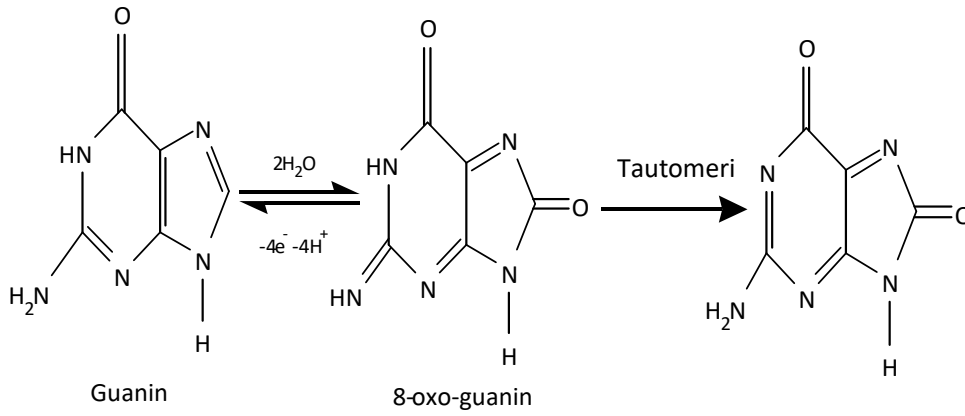


Şekil 2. 12. DNA bazlarıyla etkileşen hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması

PGE yüzeyine immobilize edilen tek sarmal (ssDNA) Prob diziye ait guanin sinyallerinin verdiği elektrokimyasal cevapla Probun komplementeriyle birleşimiyle oluşan çift sarmal DNA'ya (dsDNA) ait guanin sinyallerinden alınan elektrokimyasal cevap arasındaki farklılaşma şekil 2.14'de gösterilmiştir [62].



Şekil 2. 13 DNA dizi algılama yöntemi



Şekil 2. 14 DNA’da Guanin baz yükseltgenmesi

İlaç	Elektrokimyasal Yöntem	İlaç sinyali	DNA sinyali	Kullanılan elektrot	Kaynaklar
Doksorubisin	Adsorptif Transfer Sıyırma Alternatif Akım Voltametrisi	İnterkalasyon sebebiyle sinyalde azalma	-	Asılı civa damla elektrodu	96
Daunomisin	Kronopotansiyometrik Sıyırma analizi, Dönüşümlü voltametri	İnterkalasyon sebebiyle sinyalde azalma	Guanin sinyalinde herhangi bir değişiklik yok.	Perde baskılı karbon elektrot, Karbon pastası elektrodu, Dönen disk elektrot	119
Mitomisin C	Dönüşümlü voltametri Kare dalga voltametrisi	Asit ile aktive edilmiş Mitomisin C sinyalinde azalma	Guanin sinyalinde azalma	Asılı civa damla elektrodu, Perde baskılı karbon elektrot	71, 82
Mitoksantron	Diferansiyel Puls voltametrisi, Dönüşümlü voltametri, Kare dalga voltametrisi	Dönüşümsüz ve pH'a bağlı bir ilaç elektroksidasyonu sözkonusudur.	Guanin ve adenin bazına ait spesifik bir etkileşme gözlenmemiştir.	Camsı karbon elektrot, Karbon pastası elektrodu	9, 32
Prometazin Fenotiyazin Klorpromazin Tiyoridazin Proklorperazin	Potansiyometrik Sıyırma analizi, Diferansiyel Puls voltametrisi	İnterkalasyon sebebiyle sinyalde artış	Guanin sinyalinde azalma	Karbon pastası elektrodu	120
Karboplatin	Diferansiyel puls voltametrisi	-	DNA'ya çapraz bağlanması sebebiyle, Adenin sinyalinde artış	Camsı karbon elektrot	11
Epirubisin	Dönüşümlü voltametri, Diferansiyel puls voltametrisi	İnterkalasyon sebebiyle sinyalde azalma	-	Karbon pastası elektrodu, Camsı karbon elektrot	28, 128

Tablo 1: DNA biyosensörleri kullanılarak DNA hedefli bazı maddelerin ve anti kanser ilaçların DNA ile etkileşmesinde kullanılan yöntemler [37].

Kimyasal Grup Bağlı DNA (prob)	Algılayıcı Yüzeyine Tutturma Şekli	Elektrot Tipi
Tiyol (-SH)	Doğrudan	Au, perde baskılı Au, Au nanopartikül kaplı elektrot
Amin (-NH ₂)	Dolaylı (Merkaptoalkil ve kovalent bağ kimyasalı kaplı yüzey üzerine)	Au, perde baskılı Au, Au nanopartikül kaplı elektrot
Amin (-NH ₂)	Dolaylı (kovalent bağ kimyasalı kaplı yüzeye)	Karbon, perde baskılı karbon
Biyotin (-Bio)	Doğrudan (streptavidin kaplı yüzeye)	Au, perde baskılı Au, Au nanopartikül kaplı elektrot, Karbon,perde baskılı karbon, manyetik boncuklar.

Tablo 2: Kovalent bağlanmayla DNA biyosensörü yöntemleri

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Kullanılan Aletler

Yapılan ölçümler ve deney esnasında kullanılan bütün alet ve donanımlar;

- ✓ Ag/AgCl referans elektrodu
- ✓ Manyetik karıştırıcı (AGE Velp)
- ✓ Duyarlı Terazı (precisa XB 220A)
- ✓ pH-metre (8WTW Inolab pH 720)
- ✓ Kalem grafit elektrot (çalışma elektrodu) (0,5 mm Rotring Kalem 0,5, Tombow HB

model)

- ✓ Yardımcı elektrot (Platin tel)
- ✓ Ses Titreşimli Temizleyici (Bandelin Sonorex)
- ✓ Manyetik Karıştırıcı (ARE 2-Velp ve elektro-mag)
- ✓ Vortex (Velp Scientifica)
- ✓ Potansiyostat; μ -AUTOLAB TYPE III (FRA 2 modüllü- Chemie, Hollanda)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- ✓ Eritromisin(Sigma)
- ✓ Potasyum Di Hidrojen Fosfat (KH_2PO_4)
- ✓ Potasyum Bi fosfat(K_2HPO_4)
- ✓ Hidroklorik asit (HCl, Merck, %37)
- ✓ Asetik asit (Merck, %99-100)
- ✓ Potasyum ferri siyanür ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)
- ✓ Potasyum Ferro Siyanür ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)
- ✓ Potasyum Klorür (KCl)
- ✓ Tris hidroklorik asit (Sigma)
- ✓ Sodyum Hidroksit (NaOH, Merck)
- ✓ Sodyum klorür(NaCl, Merck)
- ✓ Buzağı timus bezinden elde edilen tek ve çift sarmal DNA (ssDNA- dsDNA, Sigma)

Deney çalışmaları yapılırken deney ortamı oda şartlarında yapıldı.($25,0 \pm 0,5$ °C'). Ve kullanılan su ultra saf su olarak kullanıldı.

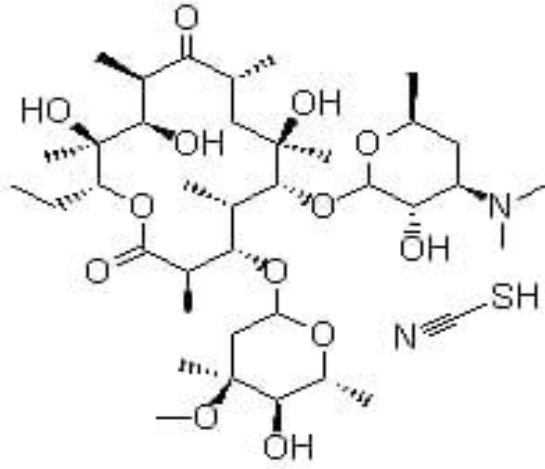
3.3.Eritromisin Hakkında Genel Bilgi

Molekül Ağırlığı: 733,93 g/mol

Protein Bağlama: %90

Formül: C₃₇H₆₇NO₁₃

Açık Kimyasal Formül:



Eritromisin makrolit antibiyotiklerindedir. Anti mikrobik spektrumu penisiline benzemesinden dolayı genellikle penisiline alerjisi olan insanlarda kullanılır. Eritromisin solunum yolu enfeksiyonları, cilt enfeksiyonları, klamidya enfeksiyonları ve özellikle frengi de kullanılmaktadır. Geciken mide boşaltımlarını geliştirmek için ve hamilelikte, yeni doğanlarda Grup B streptokoksik enfeksiyonları önlemek için kullanılmaktadır. Çoğunlukla bakteriyostatik etki alanına sahiptirler. Bu nedenle de bakteriye göre protein yapımını azaltarak çalışır.

Eritromisin 1952’de ilk kez izole edilmiştir. Bu antibiyotik saccharopolyspora erythraea bakteri türünden üretilmektedir. Eritromisinin müdahale alanı protein sentezidir. Bunu, bakteri ribozomlarının 50S alt-ünitelerine bağlanarak oluşturur. Çoğunlukla bakteriyostatik etki alanına sahiptir. Fakat anaerob bakterilerine karşı davranışı etkisizdir.

3.4. Deneyde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması:

Bütün tampon çözeltilerin hazırlanışında ultra saf su kullanıldı. Bu hazırlanan tampon çözeltileri cam şişelere konularak buzdolabında saklandı.

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

Ölçümlerde kullanılmak için hazırlanan asetat tampon çözeltisi, 28,8 ml asetik asit alınıp saf su içerisine eklenir. Ve litresinde 0,5 mol CH₃COOH içeren çözelti için pH 4,8 oluncaya

kadar damla damla 0,1 M NaOH çözeltisi ilave edilir. Burada iyonik şiddeti dengede tutmak için 1,168 g NaCl tartılıp eklenir.

0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanması (pH 7,4; PBS):

Ölçümlerde kullanılmak için hazırlanan fosfat tampon çözeltisi, litresinde 1,36 g KH_2PO_4 (0,01 mol) ve 6,96 g K_2HPO_4 (0,04 mol) tartılıp saf su içerisinde konulur. 1,168 g NaCl (0,02 mol) tartılır ve çözelti içerisine eklenir.

Hazırlanan PBS pH değeri yaklaşık 7,4'e ayarlanılır. pH ayarlamak için gerekirse 0,1 M NaOH ya da 0,1 M HCl çözeltileri kullanılır.

0,02 M Tris HCl tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 8,0; TBS):

Elimizde bulunan stok DNA çözeltilerini hazırlamak için kullanılır. Litresinde 10 mmol Trizma HCl ve 1 mmol EDTA bulunmaktadır.

Redoks Çözeltisinin Hazırlanışı

EIS ölçümleri için molekül ağırlığı 329,243 g olan $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 'den 164,5 mg ve molekül ağırlığı 422,38g olan $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 'dan 208,13 mg alınıp redoks propları içeren 200 mL çözelti hazırlanır. Bu çözeltinin iyonik şiddetini sabit tutmak için 1,49 g KCl eklenir. Bu çözelti karanlık ortamda muhafaza edildi.

3.4.2 DNA Çözeltilerinin Hazırlanması:

Bu çalışmada Calf Thymus DNA kullanıldı. Bu DNA buzağı timus bezinden elde edilir. Calf Thymus DNA'nın hem tek sarmal DNA(ct ssDNA) hem de çift sarmal DNA (ct dsDNA) şeklinde ayrı ayrı hazırlandı.

Stok DNA çözeltileri 1000 ppm olmak koşuluyla 0,02 M Tris-EDTA (pH 7,0) ile hazırlanarak 20°C'de karanlık bir ortamda muhafaza edildi. Stok olarak hazırlanan DNA çözeltilerinden istenilen derişimlerde 0,05 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) kullanılarak hazırlandı. Fakat ssDNA deneye başlanmadan önce 5 dk. kaynayan suda denatüre edildi. Bunun amacı ise ssDNA'nın kendini eşlemesini engellemektir.

3.5. Kullanılan Yöntem

Tez çalışması kapsamında yapılan bütün elektrokimyasal deneylerde NOVA 2.1 yazılımını içeren μ -AUTOLAB TYPE III (FRA 2 modüllü) Potansiyostat cihazı kullanıldı. Diferansiyel puls voltametri (DPV), dönüşümlü voltametri (CV), kare dalga voltametri

(SWV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemleri kullanılarak elektrokimyasal deneyler yapıldı. Deneylerde üçlü elektrot sistemi kullanıldı. Bu üçlü elektrot sisteminde yardımcı elektrot olarak platin tel, çalışma elektrodu olarak tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) ve referans elektrodu olarak ise Ag/AgCl referans elektrodu kullanıldı.

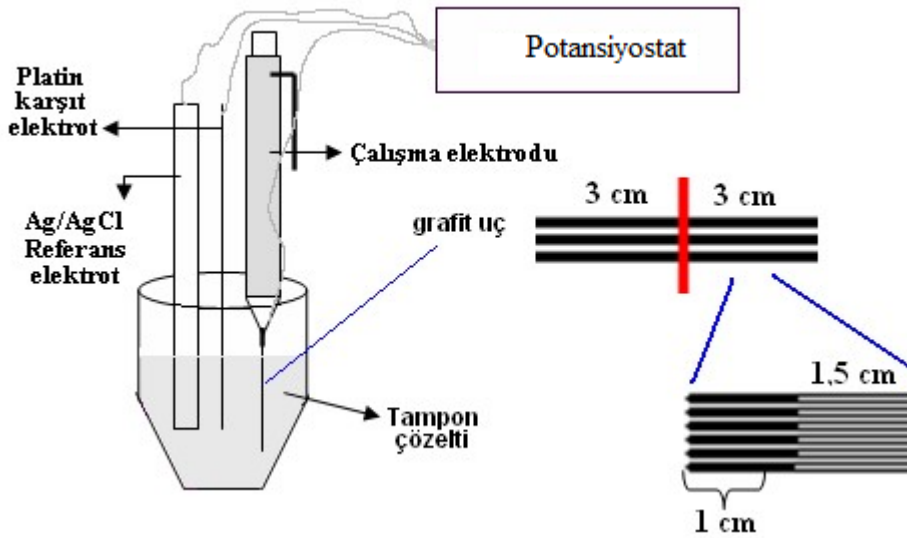
Deneyde kullanılan elektrotların aktivasyonu, elektrot yüzeyinde DNA-analit etkileşiminin ve DNA'nın elektrot yüzeyine immobilizasyonunun incelenmesi basamaklarında literatürde geçen yöntemler kullanıldı [63-65].

3.5.1 Kullanılan Elektrotların Deneye Hazırlanması:

- **Tek kullanımlık grafit elektrot (PGE):**

Deney esnasında kullanılan kalem grafit elektrotlar (PGE), Tombow marka kalem uçlarının 3 cm boyunda kesilip hazırlanarak deney için hazırlandı.[66]. Ölçüm esnasında kalem uçları çözelti içerisinde 1,5 cm'lik bölümü batacak şekilde hücre içerisine yerleştirildi.

Hazırlanan elektrotların yüzey aktivasyonunu yapmak için 30 saniye boyunca +1,4 V potansiyel uygulanır. Bu potansiyel uygulanırken hücre içerisine ABS (pH 4,8) konuldu.



Şekil 3. 1 Kullanılan Deney Düzenegi

Bu çalışmada ERT'nin DNA ile etkileşim özelliklerinin incelenmesi esas alınmıştır ancak bu aşamaya geçmeden önce ERT'nin tek başına aktif PGE yüzeyindeki elektrokimyasal davranışları da ayrıca dönüşümlü voltametri (CV) ve kare dalga voltametrisi (SWV) ile incelenmiştir.

3.6. DNA'nın Aktive Edilmiş PGE Yüzeyine tutturulması

3.6.1. ct dsDNA ve ct ssDNA PGE Yüzeyine İmmobilizasyonunun İncelenmesi:

DNA'nın PGE yüzeyine tutturulmasında adsorpsiyon yöntemi kullanıldı. Önceden aktive edilmiş PGE yüzeylerine DNA immobilizasyonu deneyleri ct ssDNA ve ct dsDNA için ayrı ayrı yapıldı.

3.6.1.1. DNA İmmobilizasyonunda Uygun Etkileşim Süresinin İncelenmesi:

ct dsDNA immobilizasyonunda aktive edilmiş PGE'lerle yapılan süre optimizasyonu:

DPV yönteminde PGE'ler, aktive edilmiş yüzeyleri çözelti içine girecek şekilde içerisine 0,05 M PBS'de hazırlanan 30 ppm ct dsDNA'dan 110 µL koyulan viallere daldırıldı ve adsorpsiyon yöntemine göre değişik bekleme sürelerinde (5-10-15-30-40-50 dakika) bekletildi. (DPV tekniğinde kullanılan parametreler; Basamak potansiyeli: 0,025 V, Modülasyon süresi: 0,05 s; Tarama hızı: 0,05 V/s). DPV tekniğinden elde edilen voltamogramlardaki guanin pik akımında meydana gelen değişimlerden yararlanılarak en uygun etkileşim süresi bulundu. Tüm deneylerde ölçme işleminden önce PGE'ler, etkileşim çözeltinin çözücüsüne 3 s daldırılıp çıkarılarak yıkama işlemi yapıldı (arta kalan, bağlanmayan veya etkileşime girmeyen reaktifleri uzaklaştırmak için). DPV yöntemindeki ölçümler 0,5 M ABS (pH 4,8) çözeltisinde gerçekleştirildi.

EIS yönteminde deney basamakları aktive edilmiş PGE, PGE-DNA etkileşiminde süre ve derişim optimizasyonu ve ERT-DNA etkileşiminin incelenmesinden oluşmaktadır. Bu ölçümler 0,1 mol/L KCl içeren $2,5 \times 10^{-3}$ M $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1/1) redoks çözeltisinde alındı. Ct dsDNA immobilizasyonunda süre optimizasyonu için 0,05 M PBS'de hazırlanan 20 ppm sabit dsDNA derişimin de farklı adsorpsiyon sürelerinde (5-10-15-20-25-30-40 dakika) empedans ölçümlerinden elde edilen Rct değerlerinden yararlanarak süre optimizasyonu yapıldı. Ölçümler 0,1 MHz - 0,1 Hz frekans aralığında ve genlik 0,01 V olacak şekilde, + 0,22 V'luk açık devre potansiyelinde ve Ag/AgCl referans elektroduna karşı gerçekleştirildi. Diğer tüm empedans ölçümlerinde aynı parametreler kullanıldı.

ct ssDNA aktive edilmiş PGE'lerle yapılan immobilizasyonunda süre optimizasyonu:

Deney basamakları aktive edilmiş PGE ile DPV yönteminde, ssDNA immobilizasyonunun süre optimizasyonu için 0,05 M PBS'de hazırlanan 30 ppm sabit derişimde ct ssDNA farklı adsorpsiyon sürelerinde (5-10-15-20-25-30-40 dakika) DPV ölçümleri yapıldı. DPV yöntemi

kullanılarak elde edilen voltamogramlarda oluşan guanin pik akımındaki değişimlerden faydalanılarak en uygun optimizasyon süresi bulundu.

ct ssDNA immobilizasyonunda EIS yönteminde süre optimizasyonu yapılırken 0,05 M PBS’de hazırlanan 30 ppm sabit derişimde ssDNA için farklı adsorpsiyon sürelerinde (20-25-30-35-40-45 dakika) EIS ölçümleri yapıldı. Yapılan bu ölçümlerde Rct değerlerinden faydalanılarak süre optimizasyonu yapıldı.

3.6.1.2.DNA İmmobilizasyonunda PGE Yüzeyine Uygun Derişim Miktarının İncelenmesi:

ct dsDNA immobilizasyonunda aktive edilmiş PGE’ lerle yapılan derişim optimizasyonu:

Deney basamakları aktive edilmiş PGE için DPV yönteminde, dsDNA immobilizasyonunun derişim optimizasyonu için önceden belirlenmiş sabit bekleme süresinde farklı derişimlerde (5-10-15-20-25-30-40 ppm) DPV ölçümleri yapıldı. DPV yöntemi kullanılarak oluşturulan voltamogramlarda guanin pik akımının değişiminden faydalanılarak en uygun optimizasyon derişimi bulundu.

ct dsDNA immobilizasyonunda EIS yönteminde derişim optimizasyonu yapılırken önceden belirlenen sabit bekleme süresinde farklı derişimlerde (5-10-15-20-25-30-40 ppm) bekletilerek ölçüm alındı. Yapılan bu ölçümlerde Rct değerlerinden faydalanılarak derişim optimizasyonu yapıldı.

ct ssDNA immobilizasyonunda aktive edilmiş PGE’ lerle yapılan derişim optimizasyonu:

Deney basamakları aktive edilmiş PGE için DPV yönteminde, ssDNA immobilizasyonunun derişim optimizasyonu için önceden belirlenmiş sabit bekleme süresinde farklı derişimlerde (5-10-15-20-25-30-40 ppm) DPV ölçümleri yapıldı. DPV yöntemi kullanılarak oluşturulan voltamogramlarda guanin pik akımının değişiminden faydalanılarak en uygun optimizasyon derişimi bulundu.

ct ssDNA immobilizasyonunda EIS yönteminde derişim optimizasyonu yapılırken önceden belirlenen sabit bekleme süresinde farklı derişimlerde (5-10-15-20-25-30-40 ppm) bekletilerek ölçüm alındı. Yapılan bu ölçümlerde Rct değerlerinden faydalanılarak derişim optimizasyonu yapıldı.

3.6.2. DNA İmmobilize Edilmiş PGE’ lerle ERT-DNA Etkileşiminin İncelenmesi:

Aktivasyon işlemi yapılan PGE'lere optimum koşullarda ct DNA (ssDNA ve dsDNA) immobilizasyonu yapıldıktan sonra ct DNA modifiye PGE yüzeylerinde DNA-ERT etkileşiminin incelenmesi için deneyler aşağıdaki gibi yapıldı:

3.6.2.1. DNA İmmobilize Edilmiş PGE' lerle ERT-DNA Etkileşiminde Uygun Etkileşim Süresinin incelenmesi:

ERT ile ct dsDNA immobilize edilmiş PGE'lerin etkileşimi için süre optimizasyonu:

DPV yönteminde, optimum koşullarda önceden ct dsDNA immobilizasyonu gerçekleştirilen PGE'ler, 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanan sabit derişimde ERT içeren 110 µL' lik viallere daldırıldı ve değişik etkileşim sürelerinde (2-5-10-15-20-25-30-40 dakika) bekletildi ve sonra DPV ölçümlerinden elde edilen guanin pik sinyallerindeki değişimden yararlanarak süre optimizasyonu yapıldı.

EIS yönteminde ki çalışmada ise optimum koşullarda ct dsDNA immobilize edilmiş PGE'ler 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanan sabit derişimde ERT içeren 110 µL' lik viallere daldırıldı ve değişik adsorpsiyon sürelerinde (1-2-3-5-10-15-20-40 dakika) bekletildi ve empedans ölçümleri alındı. Ölçümlerden elde edilen Rct değerlerinden yararlanarak süre optimizasyonu yapıldı.

ct ssDNA immobilize edilmiş PGE'ler ile ERT etkileşimi için süre optimizasyonu:

DPV yönteminde, optimum koşullarda önceden ct ssDNA immobilizasyonu gerçekleştirilen PGE'ler, 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanan sabit derişimde ERT içeren 110 µL'lik viallere daldırıldı ve değişik adsorpsiyon sürelerinde (2-5-10-15-20-25-30-40 dakika) bekletildi ve sonra DPV ölçümlerinden elde edilen guanin pik sinyallerindeki değişimden yararlanarak süre optimizasyonu yapıldı.

EIS yöntemindeki çalışmada ise optimum koşullarda ct ssDNA immobilize edilmiş PGE'ler 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanan sabit derişimde ERT içeren 110 µL'lik viallere daldırıldı ve değişik adsorpsiyon sürelerinde (1-2-3-5-10-15-20-40 dakika) bekletildi ve empedans ölçümleri alındı. Ölçümlerden elde edilen Rct değerlerinden yararlanarak süre optimizasyonu yapıldı.

3.6.2.2. ERT-DNA- Etkileşiminde DNA İmmobilize Edilmiş PGE' lerle Uygun Derişimdeki ERT Miktarının İncelenmesi:

ERT ile ct dsDNA immobilize edilmiş PGE'lerin etkileşimi için derişim optimizasyonu:

DPV yönteminde, optimum koşullarda önceden ct dsDNA immobilizasyonu gerçekleştirilen PGE'ler, 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanmış ERT içeren 110 µL'lik viallere daldırıldı ve sabit sürede değişik derişimlerdeki (2-5-10-15-20-25-30-40 ppm) ERT çözeltilerinde bekletildi ve sonra DPV ölçümlerinden elde edilen guanin pik sinyallerindeki değişimden yararlanarak kalibrasyon grafiği çizildi.

EIS yöntemindeki çalışmada ise optimum koşullarda ct dsDNA immobilize edilmiş PGE'ler 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanmış ERT içeren 110 µL'lik viallere daldırıldı ve sabit sürede değişik derişimlerdeki (0,1-0,5-1-2-5-10-15 ppm) ERT çözeltilerinde bekletildi ve empedans ölçümleri alındı. Ölçümlerden elde edilen Rct değerlerinden yararlanarak kalibrasyon grafiği çizildi.

ERT ile ct ssDNA immobilize edilmiş PGE'lerin etkileşimi için derişim optimizasyonu:

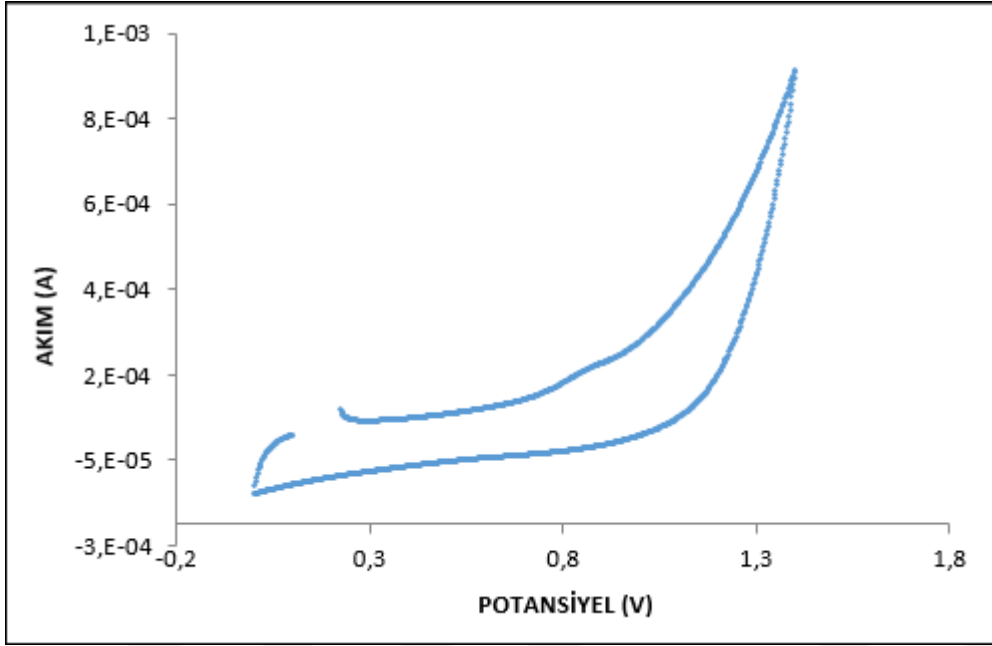
DPV yönteminde, optimum koşullarda önceden ct ssDNA immobilizasyonu gerçekleştirilen PGE'ler, 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanmış ERT içeren 110 µL'lik viallere daldırıldı ve sabit sürede değişik derişimlerdeki (2-5-10-15-20-25-30-40 ppm) ERT çözeltilerinde bekletildi ve sonra DPV ölçümlerinden elde edilen guanin pik sinyallerindeki değişimden yararlanarak kalibrasyon grafiği çizildi.

EIS yöntemindeki çalışmada ise optimum koşullarda ct ssDNA immobilize edilmiş PGE'ler 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanmış ERT içeren 110 µL'lik viallere daldırıldı ve sabit sürede değişik derişimlerdeki (0,1-0,5-1-2-5-10-15 ppm) ERT çözeltilerinde bekletildi ve empedans ölçümleri alındı. Ölçümlerden elde edilen Rct değerlerinden yararlanarak kalibrasyon grafiği çizildi.

4. BULGULAR

4.1. CV yöntemi kullanılarak yapılan deneylere ilişkin bulgular

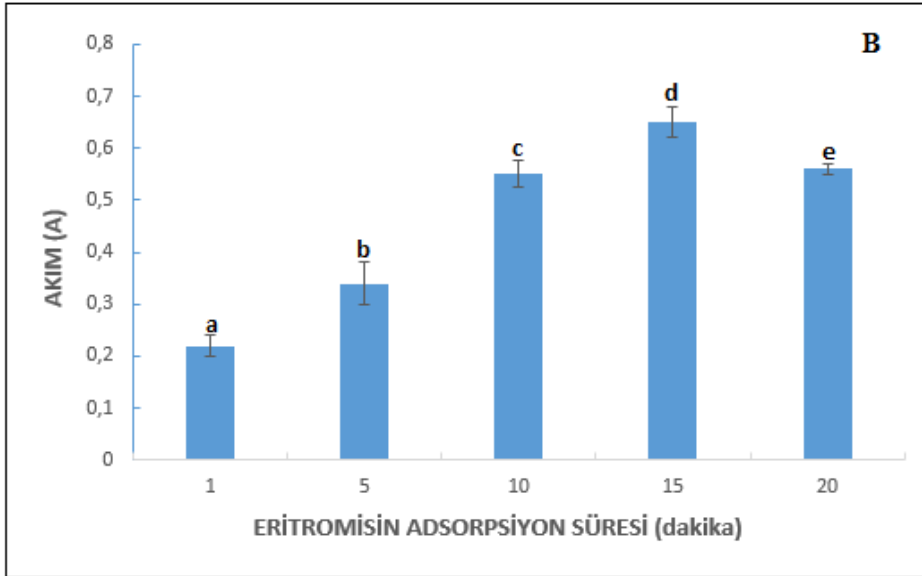
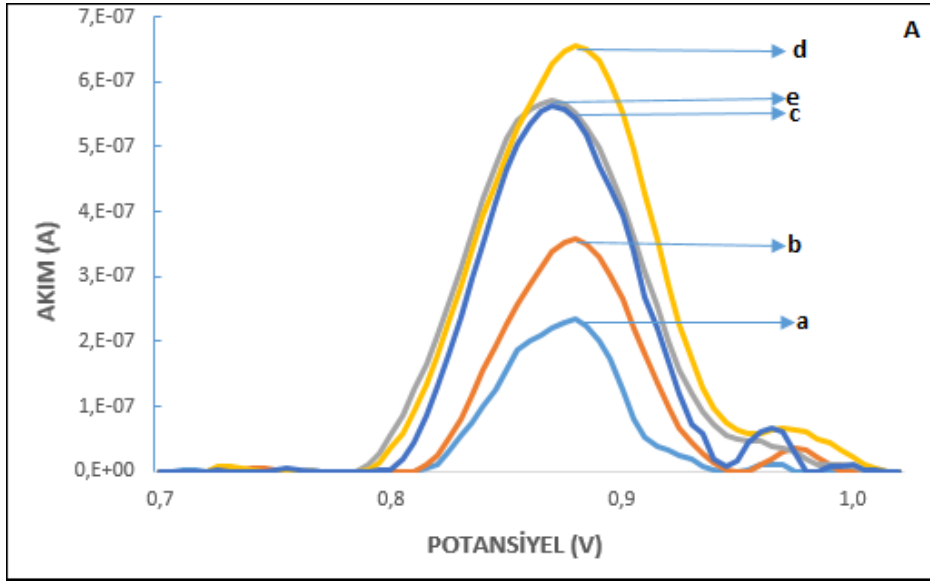
Dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılarak hücre içerisine 0,05 M PBS çözeltisinde hazırlanmış 10^{-3} M ERT konularak 50 mV/s tarama hızında ölçüm alındı. Bu ölçüm sonucunda elde edilen dönüşümlü voltamogram Şekil.4.1’de gösterilmektedir.



Şekil 4. 1 10^{-3} M ERT'nin dönüşümlü voltamogramı

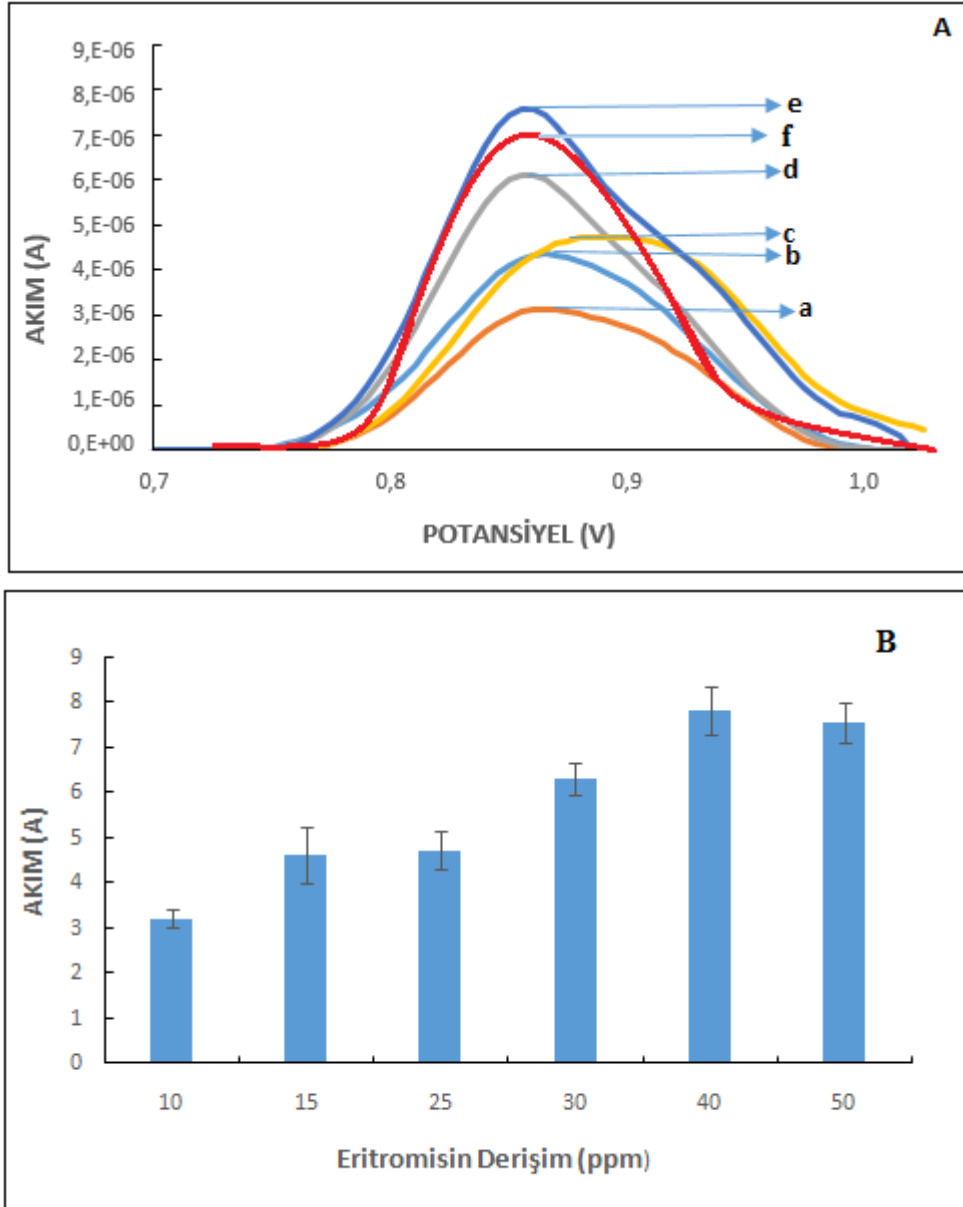
4.2. SWV yöntemi kullanılarak yapılan deneylere ilişkin bulgular

Kare dalga puls voltametri (SWV) yöntemi kullanılarak da ERT'nin katı elektrot yüzeyindeki davranışları incelendi. Bunun için de PGE yüzeyine adsorbe edilen ERT'nin adsorpsiyon süresi ve ERT derişimi optimize edildi. SWV yöntemi kullanılarak en uygun adsorpsiyon süresinin belirlenmesi için PBS tamponunda hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki ERT'nin, farklı sürelerde (1-5-10-15-20 dakika) voltamogramları alındı. Bu çalışma sonucunda optimum adsorpsiyon süresi 15 dakika olarak belirlendi. Elde edilen voltamogram ve histogram grafikleri Şekil.4.2’de gösterilmektedir.



Şekil 4. 2 Eritromisinin PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika farklı sürelerde etkileşim sonrasında SWV tekniği ile yapılan ölçüm sonucu voltamogramlar (A) histogramlar (B)

Eritromisinin SWV yöntemi kullanılarak en uygun derişim çalışması 15 dakika sabit sürede farklı derişimlerde (10-15-25-30-40-50 ppm) deneyler yapıldı. Bu çalışma sonucunda optimum derişim miktarı 40 ppm olarak belirlendi. Elde edilen voltamogram ve histogram grafikleri Şekil 4.3’de gösterilmektedir.



Şekil 4. 3 Eritromisinin PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 10 (b) 15 (c) 25 (d) 30 (e) 40 (f) 50 ppm farklı derişimlerde etkileşim sonrasında SWV tekniğı ile yapılan ölçüm sonucu voltamogramlar (A) histogramlar (B)

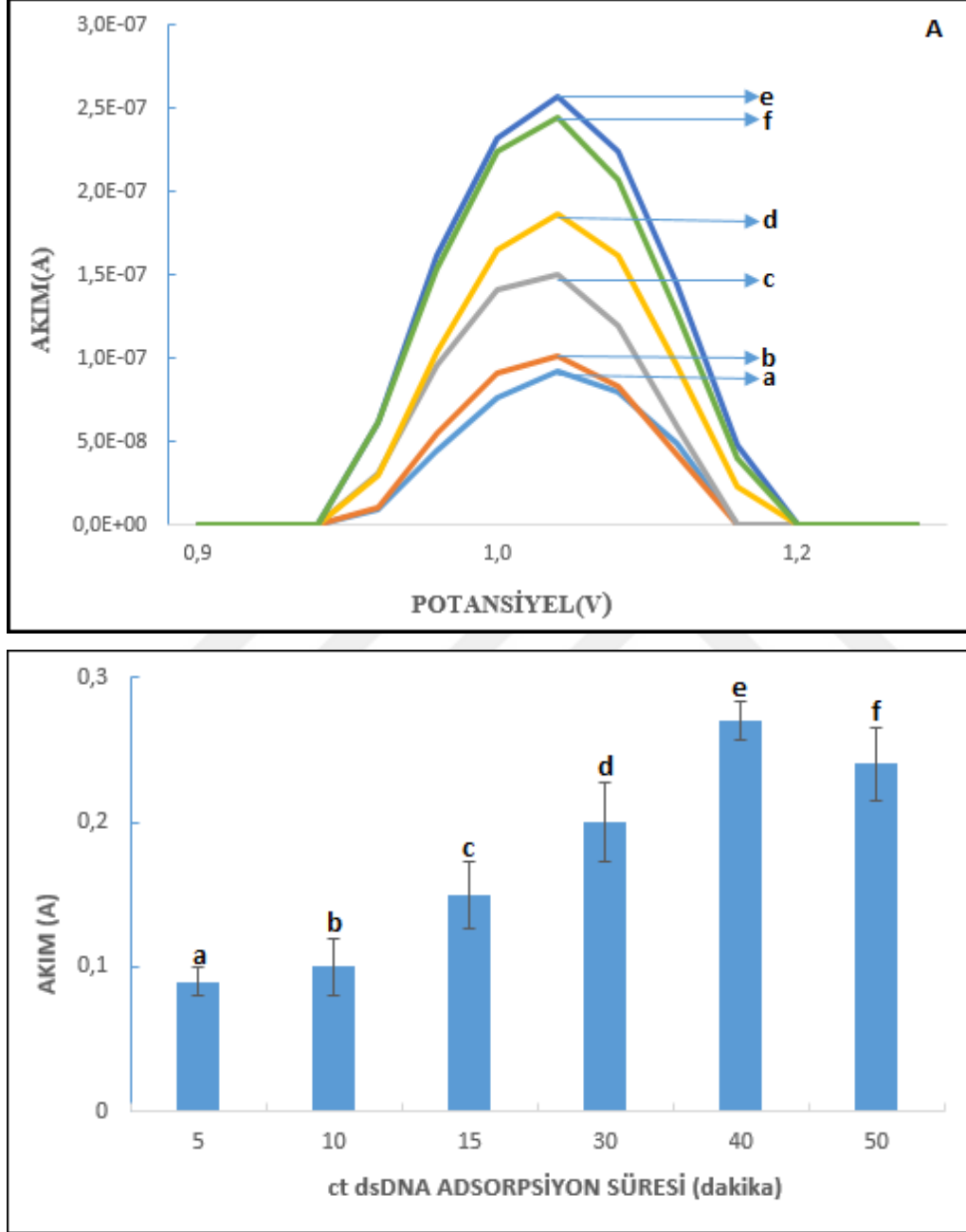
4.3. DPV yöntemi kullanılarak yapılan deneylere ilişkin bulgular

4.3.1. ct dsDNA ve ct ssDNA PGE yüzeyiyle immobilizasyonuna ilişkin bulgular

4.3.1.1. ct dsDNA ve ct ssDNA PGE yüzeyiyle immobilizasyonunda en uygun etkileşim süresinin belirlenmesine ilişkin bulgular

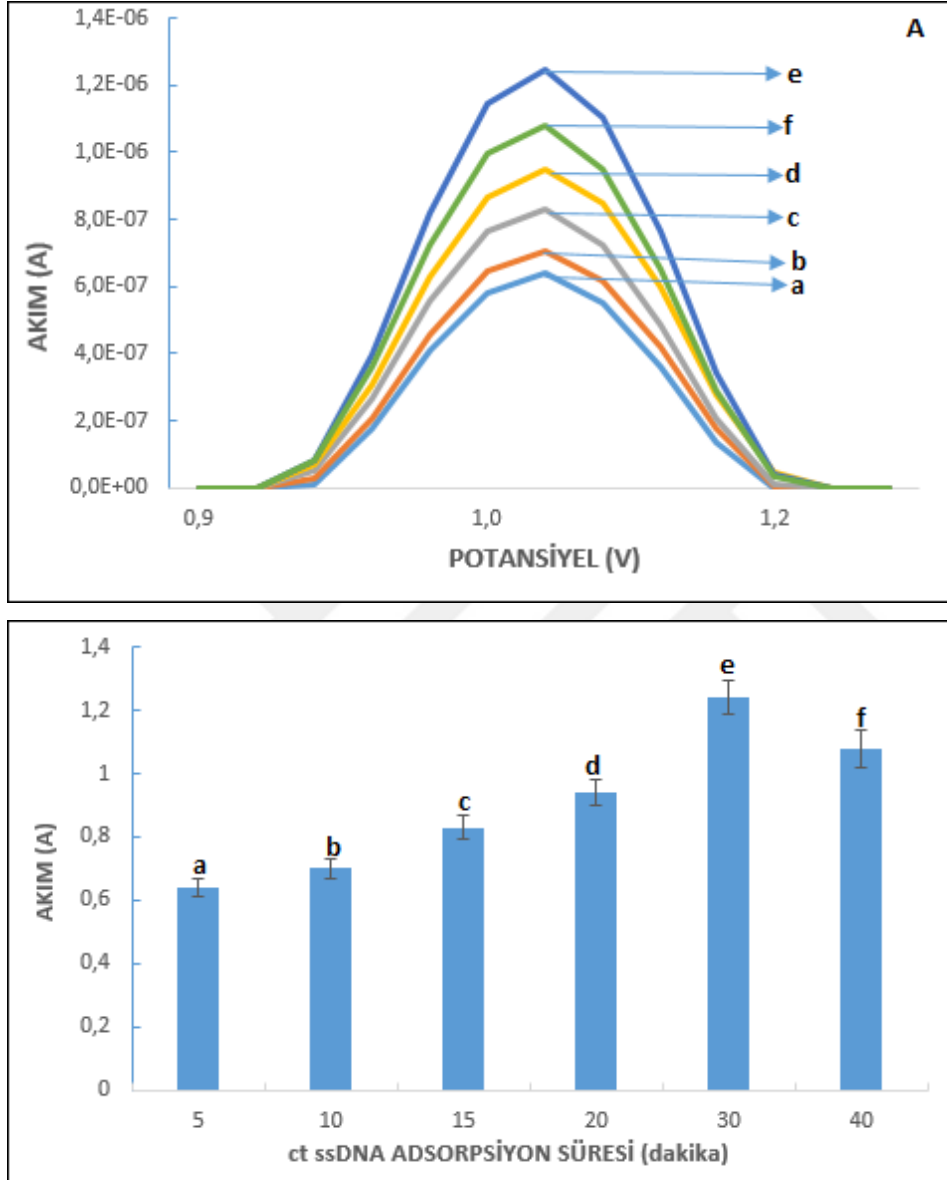
3.6.1.1.'de de açıklandığı gibi ct dsDNA ve ct ssDNA için deneyler yapılarak voltametrik ölçümler alındı.

ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonunda etkileşim süreleri incelendiğinde en uygun etkileşim süresinin 40 dakika olduğu görüldü. Elde edilen voltamogram ve histogram grafikleri Şekil 4.4'de gösterilmektedir.



Şekil 4. 4 ct dsDNA' nın PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 5 (b) 10 (c) 15 (d) 30 (e) 40 (f) 50 dakika farklı sürelerde etkileşim sonrasında DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) histogramlar (B)

ct ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonunda etkileşim süreleri incelendiğinde en uygun etkileşim süresinin 30 dakika olduğu görüldü. Elde edilen voltamogram ve histogram grafikleri Şekil 4.5'de gösterilmektedir.

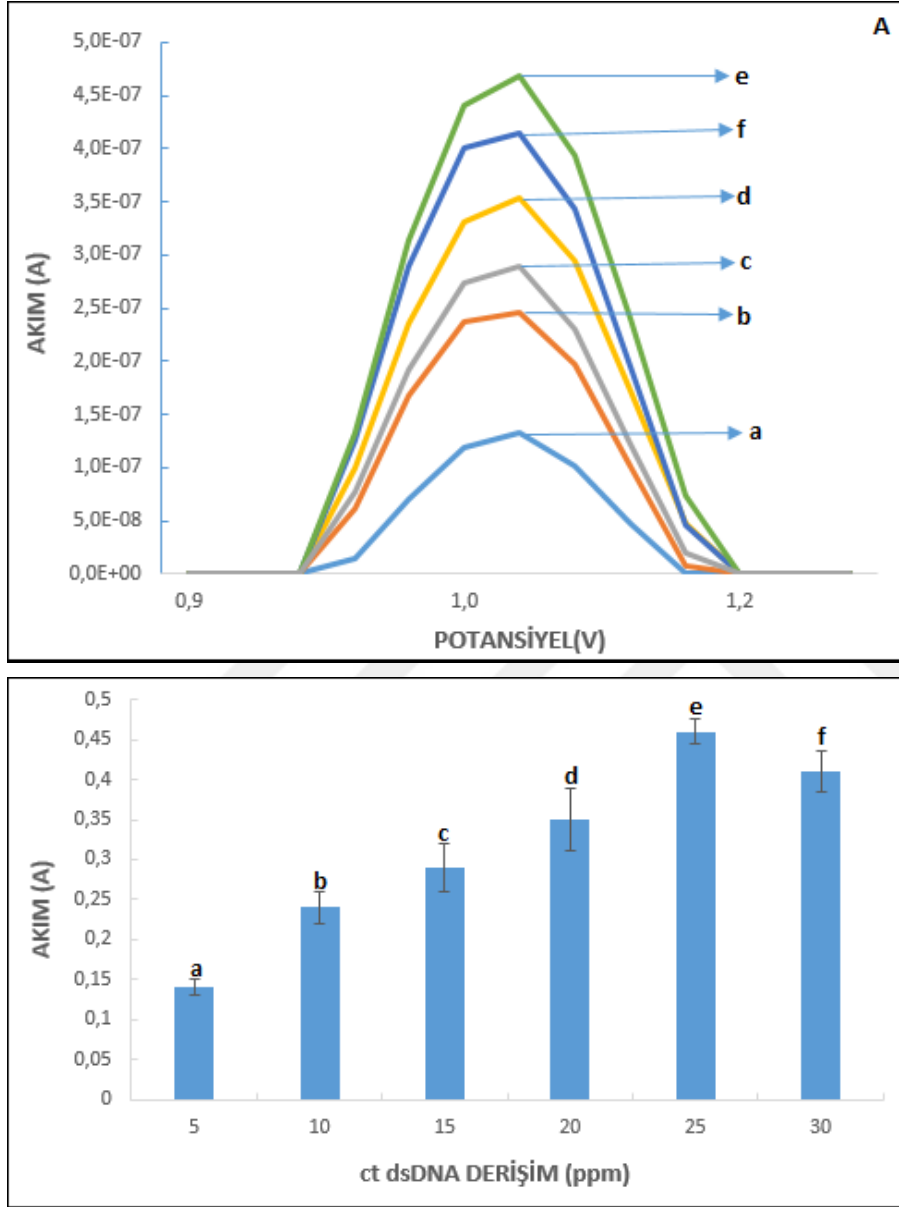


Şekil 4. 5 ct ssDNA' nın PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 5 (b) 10 (c) 15 (d) 20 (e) 30 (f) 40 dakika farklı sürelerde etkileşim sonrasında DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) histogramlar (B)

4.3.1.2. ct dsDNA ve ct ssDNA PGE yüzeyiyle immobilizasyonunda en uygun etkileşim miktarının belirlenmesine ilişkin bulgular

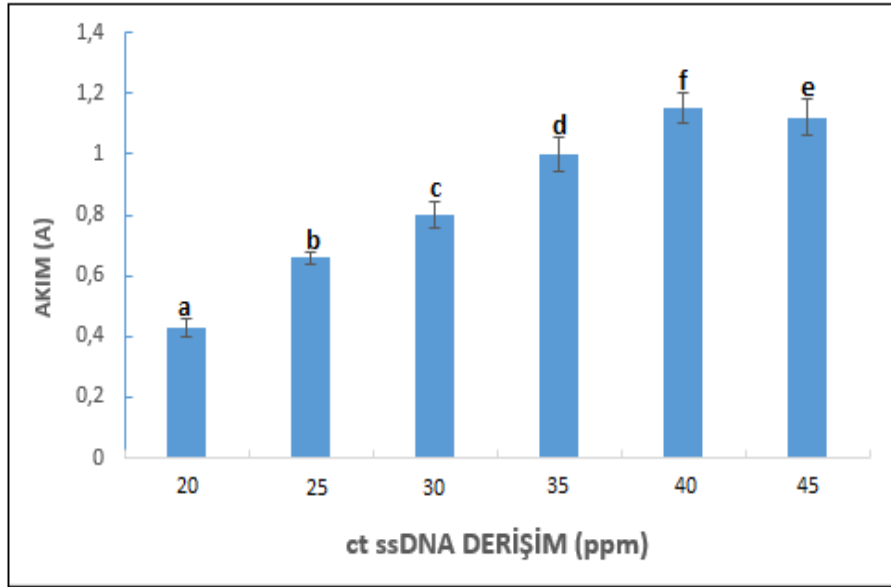
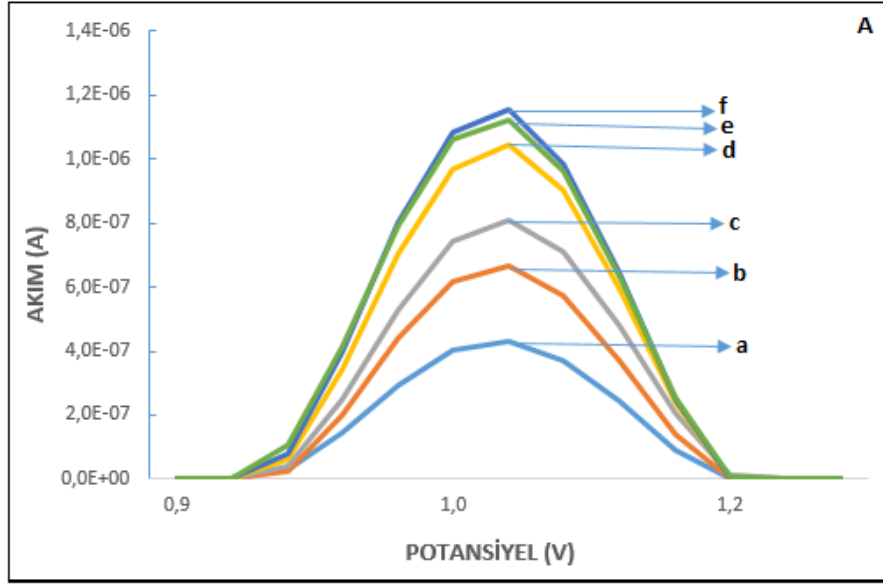
3.6.1.1.'de de açıklandığı gibi ct dsDNA ve ct ssDNA için deneyler yapılarak voltametrik ölçümler alındı.

ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonunda etkileşim derişimleri incelendiğinde en uygun etkileşim derişiminin 25 ppm olduğu görüldü. Elde edilen voltamogram ve histogram grafikleri Şekil 4.6'da gösterilmektedir.



Şekil 4. 6 ct dsDNA' nın PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 5 (b) 10 (c) 15 (d) 20 (e) 25 (f) 30 ppm farklı derişimlerinde etkileşim sonrasında DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) histogramlar (B)

ct ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonunda etkileşim derişimleri incelendiğinde en uygun etkileşim derişiminin 40 ppm olduğu görüldü. Elde edilen voltamogram ve histogram grafikleri 4.7'de gösterilmektedir.



Şekil 4. 7 ct ssDNA' nın PGE yüzeyine immobilizasyonu (a) 5 (b) 10 (c) 15 (d) 20 (e) 25 (f) 30 ppm farklı derişimlerinde etkileşim sonrasında DPV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogramlar (A) histogramlar (B)

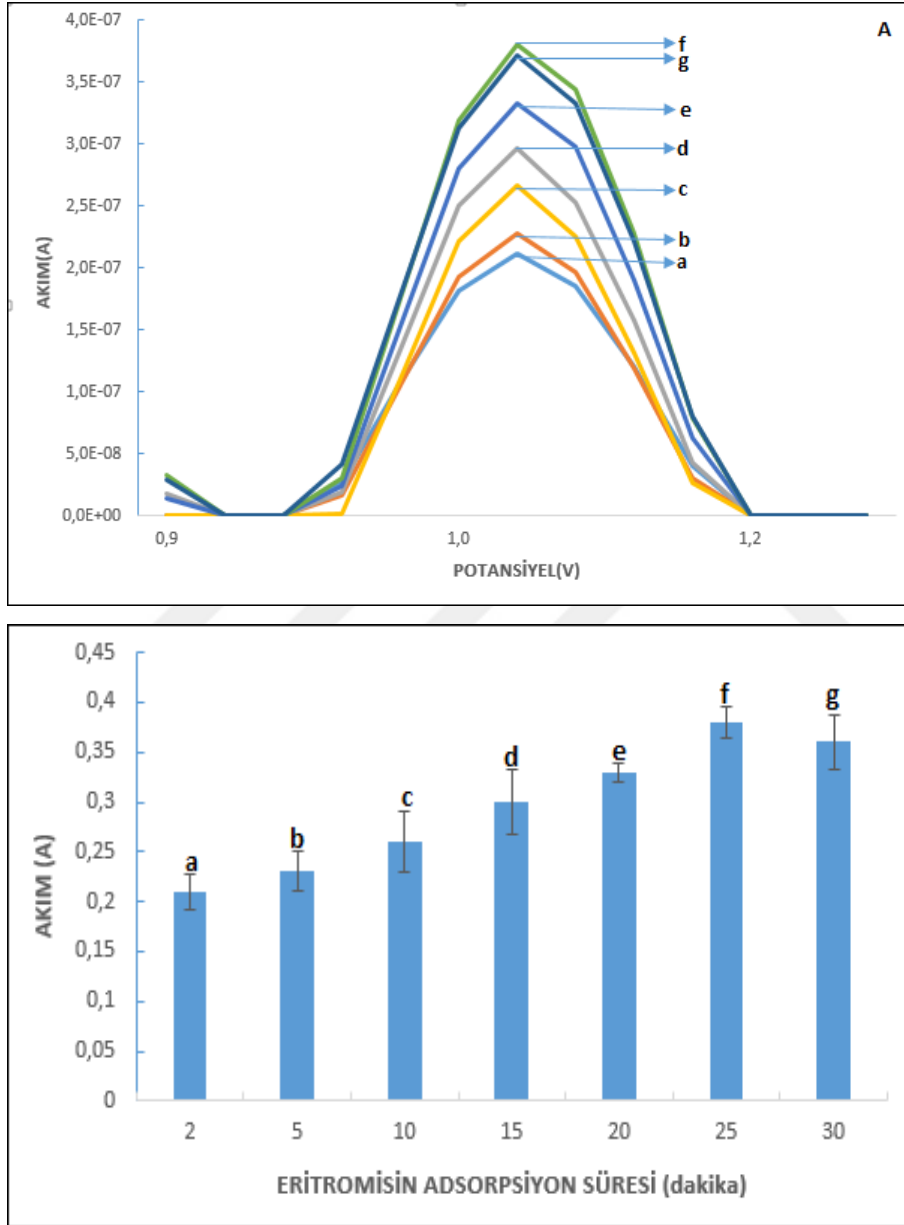
4.3.2 ERT-DNA etkileşimine ilişkin bulgular

4.3.2.1. ERT-DNA etkileşiminde en uygun etkileşim süresinin belirlenmesine ilişkin bulgular

Hem ct dsDNA hem de ct ssDNA için yöntem 3.6.1.1' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı.

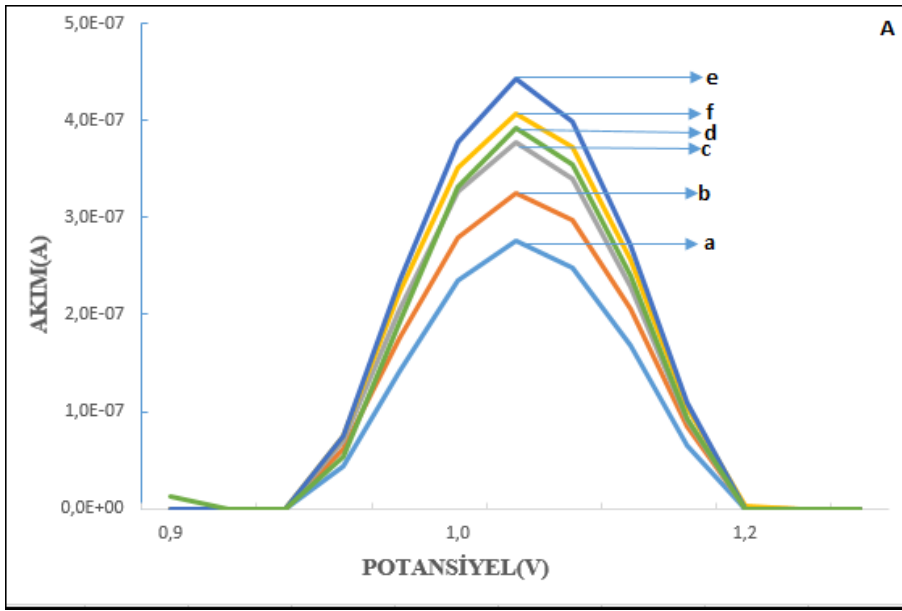
DPV yöntemi ile ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu için en uygun derişim 25 ppm ve en uygun etkileşim süresi 40 dakika olarak bulunmuştu. Bu koşullarda yüzeyine ct dsDNA immobilize edilmiş PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 25 ppm sabit

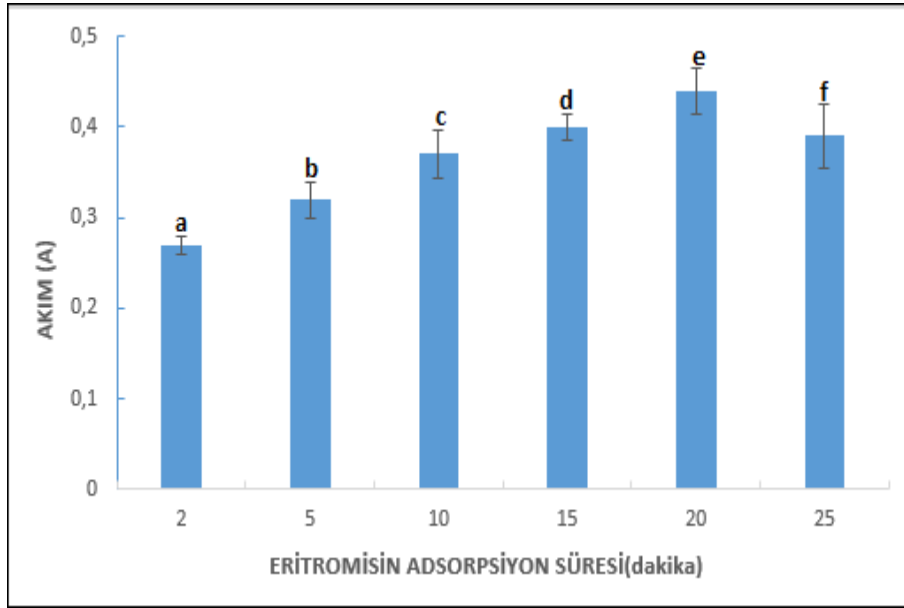
derişimdeki ERT çözeltisi (110 µL hacmindeki viallerde bulunan) ile değişik sürelerde (2-5-10-15-20-25-30 dakika) etkileştirildi ve yıkama işleminden sonra voltametrik ölçümler alındı. Guanin yükseltgenme sinyalinde meydana gelen değişimler incelendi ve optimum ERT-dsDNA etkileşim süresi 25 dakika olarak bulundu. Elde edilen voltamogram ile histogram Şekil 4.8’te verilmiştir.



Şekil 4.8 ERT immobilizasyon çalışmasının yanıtı olan cevabı: ct dsDNA ile immobilize edilen PGE’ler ERT içerisinde (a) 2 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 (f) 25 (g) 30 dakikalarda bekletilerek DPV tekniğiyle guanin sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B)

DPV yöntemi ile ct ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu için en uygun derişim 40 ppm ve en uygun etkileşim süresi 30 dakika olarak bulunmuştu. Bu koşullarda yüzeyine ct ssDNA immobilize edilmiş PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 25 ppm sabit derişimdeki ERT çözeltisi (110 µL hacmindeki viallerde bulunan) ile değişik sürelerde (2-5-10-15-20-25 dakika) etkileştirildi ve yıkama işleminden sonra voltametrik ölçümler alındı. Guanin yükseltgenme sinyalinde meydana gelen değişimler incelendi ve optimum ERT-ssDNA etkileşim süresi 20 dakika olarak belirlendi. Buna göre oluşan histogram ve voltamogram grafikleri Şekil4.9'da verilmiştir.



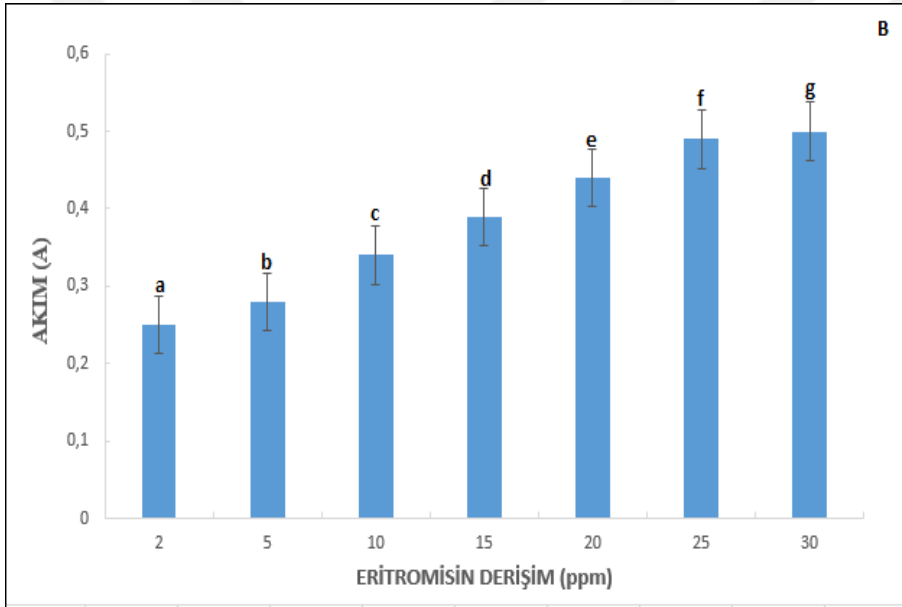
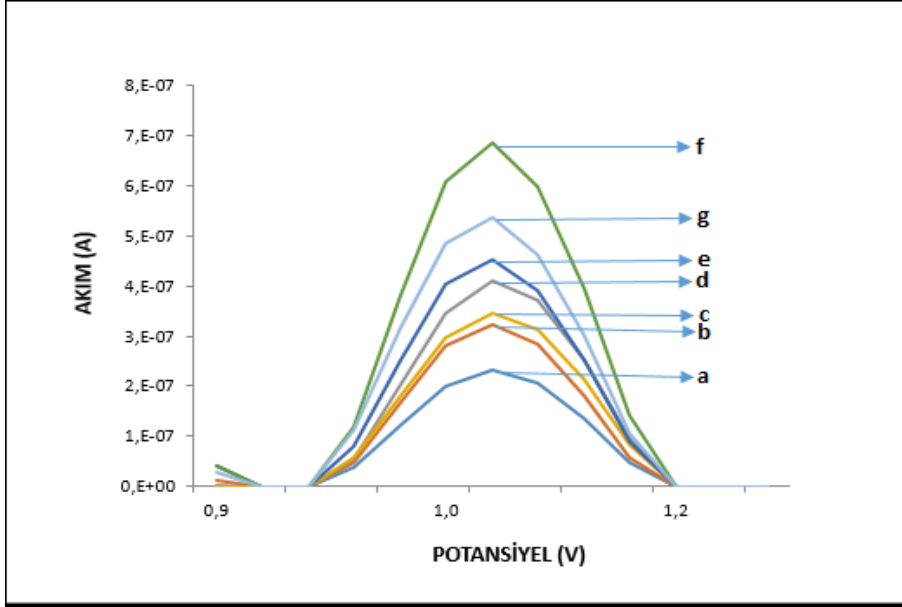


Şekil 4. 9 ERT immobilizasyon çalışmasının yanıtı olan cevabı: ct ssDNA ile immobilize edilen PGE'ler ERT içerisinde (a) 2 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 (f) 25 dakikalarda bekletilerek DPV tekniğiyle guanin sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B)

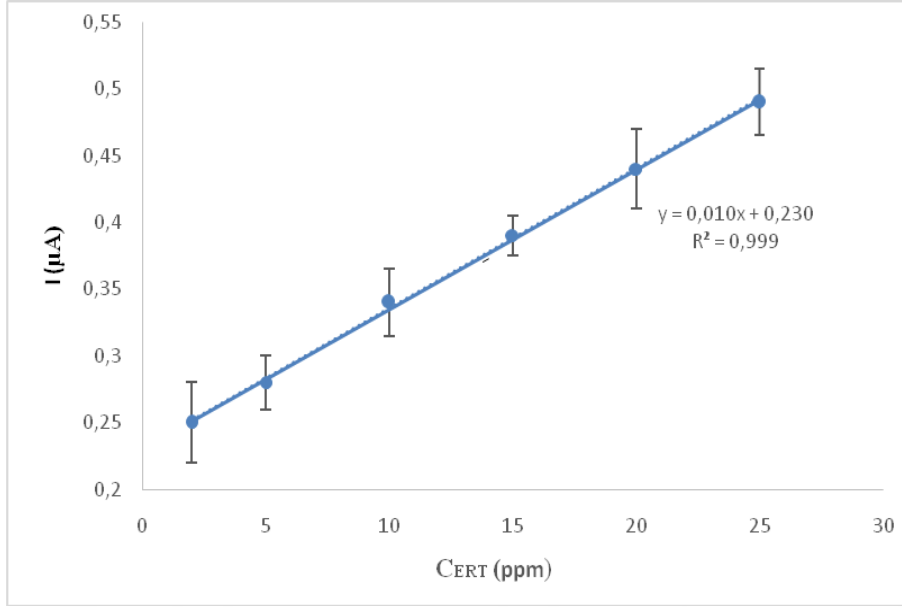
4.3.2.2. ERT-DNA etkileşiminde en uygun etkileşim derişimlerinin belirlenmesine ilişkin bulgular

Hem ct dsDNA hem de ct ssDNA için yöntem 3.6.1.1' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı.

Optimum koşullarda dsDNA immobilize edilen PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan farklı derişimlerdeki (2-5-10-15-20-25-30 ppm) ERT çözeltisi (110 µL hacmindeki viallerde bulunan) ile 25 dakika sabit sürede etkileştirildi ve yıkama işleminden sonra voltametik ölçümler alındı. Guanin yükseltgenme sinyalinde meydana gelen derişimler incelendi ve dsDNA ile etkileşen optimum ERT derişimi 25 ppm olarak bulundu (Şekil 4.10). ERT derişimine bağlı olarak guanin sinyalindeki derişimden yararlanarak çizilen kalibrasyon grafiği (Şekil 4.11) ve deneysel verilerden en düşük tayin sınırı 1,698 ppm (S/N=3) olarak hesaplandı.

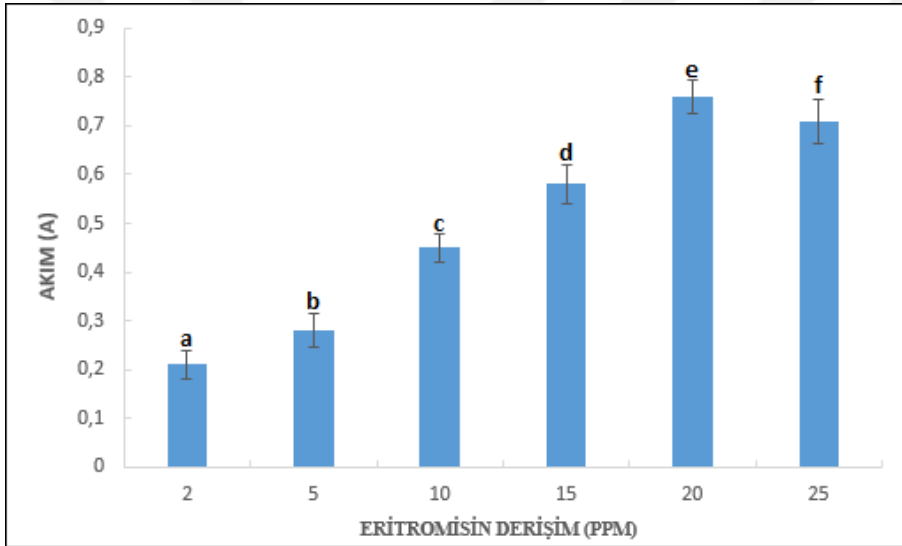
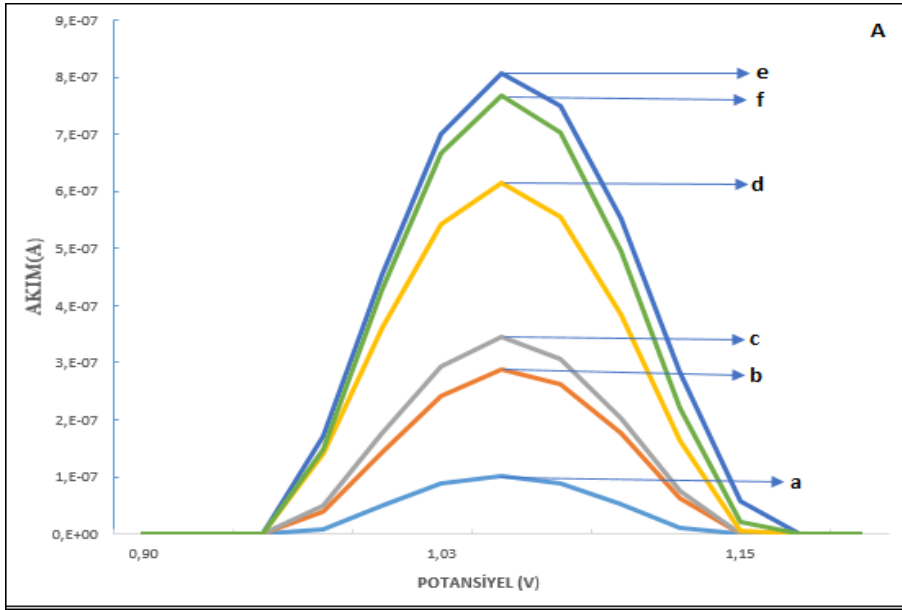


Şekil 4. 10 ERT derişim immobilizasyon çalışmasının yanıtı olan cevabı: ct dsDNA ile immobilize edilen PGE'ler (a) 2 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 (f) 25 (g) 30 (h) 40 ppm ERT içerisinde bekletilerek DPV tekniğiyle guanin sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B)

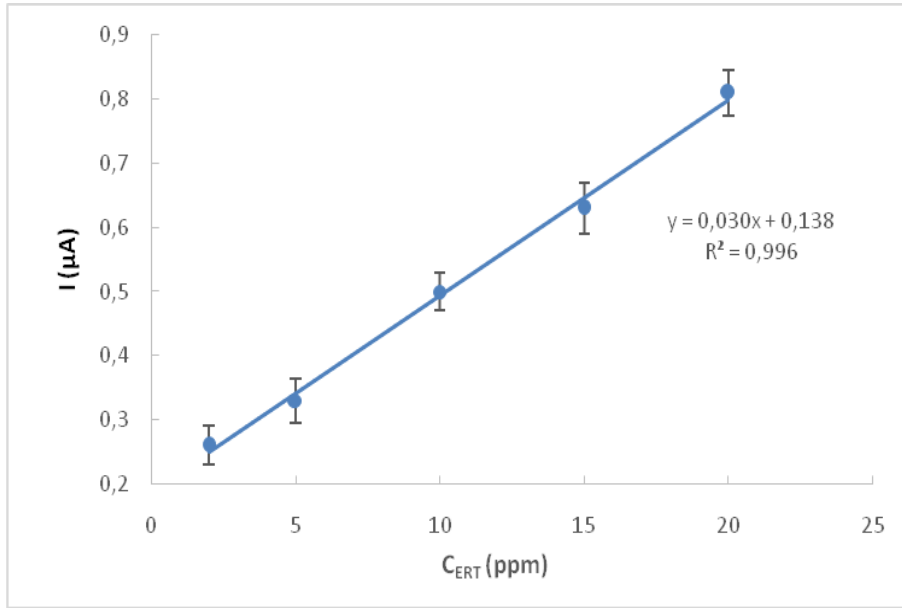


Şekil 4. 11 ERT-dsDNA etkileşimine ait kalibrasyon grafiği

ct ssDNA'nın DPV metoduyla PGE yüzeyine immobilizasyon çalışması sonucunda ssDNA için optimum koşullar 45 ppm 30 dakika olarak belirlenmişti. Optimum koşullarda ssDNA immobilize edilen PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan farklı derişimlerdeki (2-5-10-15-20-25 30 ppm) ERT çözeltisi (110 μL hacmindeki vialerde bulunan) ile 20 dakika optimum sürede etkileştirildi ve yıkama işleminden sonra voltametrik ölçümler alındı. Guanin yükseltgenme sinyalinde meydana gelen değişimler incelendi ve ssDNA ile etkileşen optimum ERT derişimi 20 ppm olarak bulundu (Şekil 4.12). ERT derişimine bağlı olarak guanin sinyalindeki değişimden yararlanarak çizilen kalibrasyon grafiği (Şekil 4.13) ve deneysel verilerden en düşük tayin sınırı 0,566 ppm (S/N=3) olarak hesaplandı.



Şekil 4. 12 ERT derişim immobilizasyon çalışmasının yanıtı olan cevabı: ct ssDNA ile immobilize edilen PGE'ler (a) 2 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 (f) 25 ERT içerisinde bekletilerek DPV tekniğiyle guanin sinyallerini gösteren voltamogram (A) ve histogram (B)



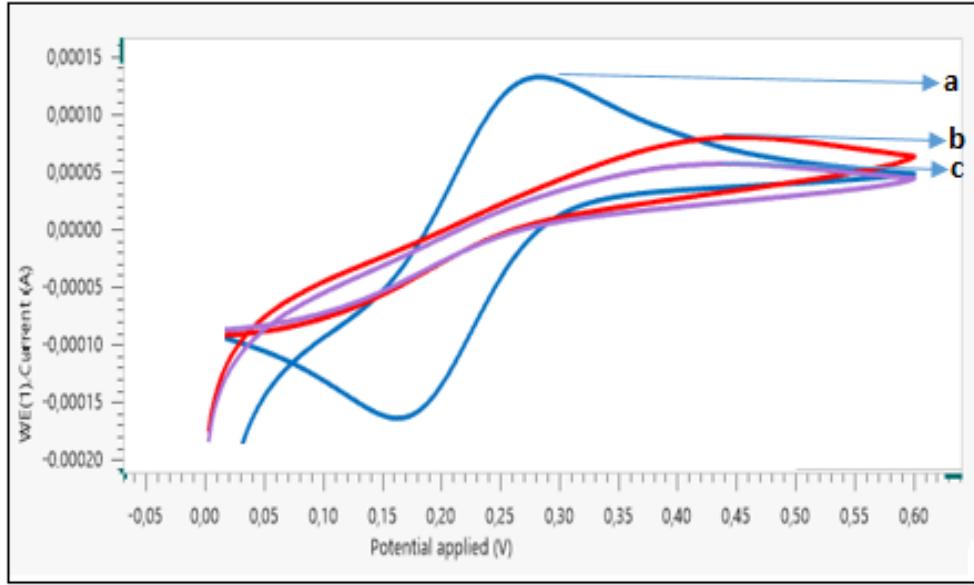
Şekil 4. 13 ERT-ssDNA etkileşimine ait kalibrasyon grafiği

4.4. ERT için EIS yöntemi kullanılarak yapılan deneylere ilişkin bulgular

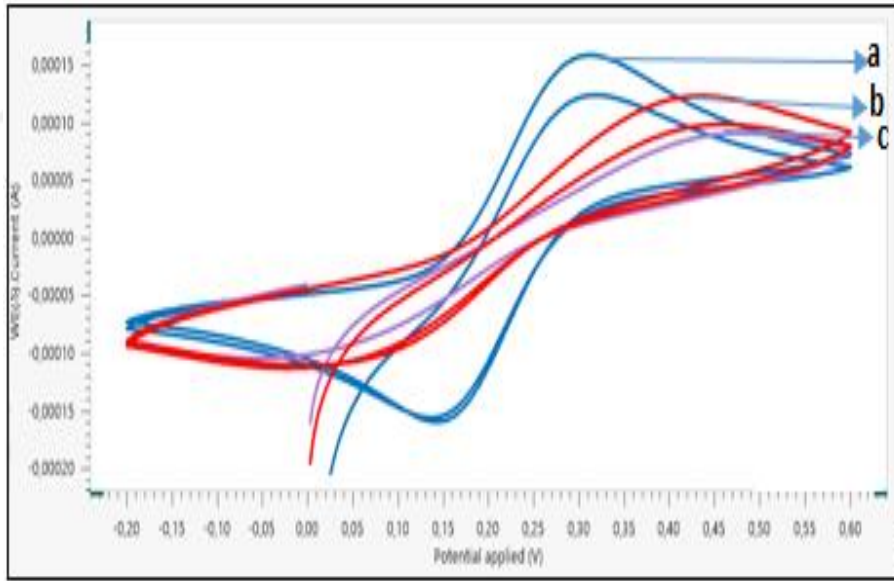
Bu yöntemde PGE'ler önceki yöntemde olduğu gibi 30 saniye 1,4 V potansiyel uygulanarak voltametrik olarak aktive edildi; impedans ölçümleri 1 M KCl destek elektrolit çözeltisinde hazırlanan $2,5 \times 10^{-3}$ M $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ karışımı (1/1) içeren redoks probunda Bölüm 3.6.1.1.'de belirtildiği şekilde yapıldı.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ölçümleri, dönüşümlü voltametri ölçümleri ile paralel olarak gerçekleştirildi. Sırasıyla aktive edilmiş elektrodun (PGE_{aktive}), ct DNA (ct dsDNA veya ct ssDNA) immobilize edilmiş elektrodun ($PGE_{aktive/DNA}$) ve ERT ile etkileştirilmiş elektrodun ($PGE_{aktive/DNA/ERT}$) CV ve EIS ölçümleri alındı. EIS deneylerinden elde edilen spektrum verilerinden ct dsDNA ve ct ssDNA için ayrı ayrı immobilizasyon süresi ve derişim değerleri optimize edildi. Dönüşümlü voltametri yönteminden elde edilen sonuçlar, DNA'nın immobilizasyonundan ve ERT-DNA etkileşiminden sonra elektrot yüzeyinde gerçekleşen değişimlerin de bir göstergesi olmuştur.

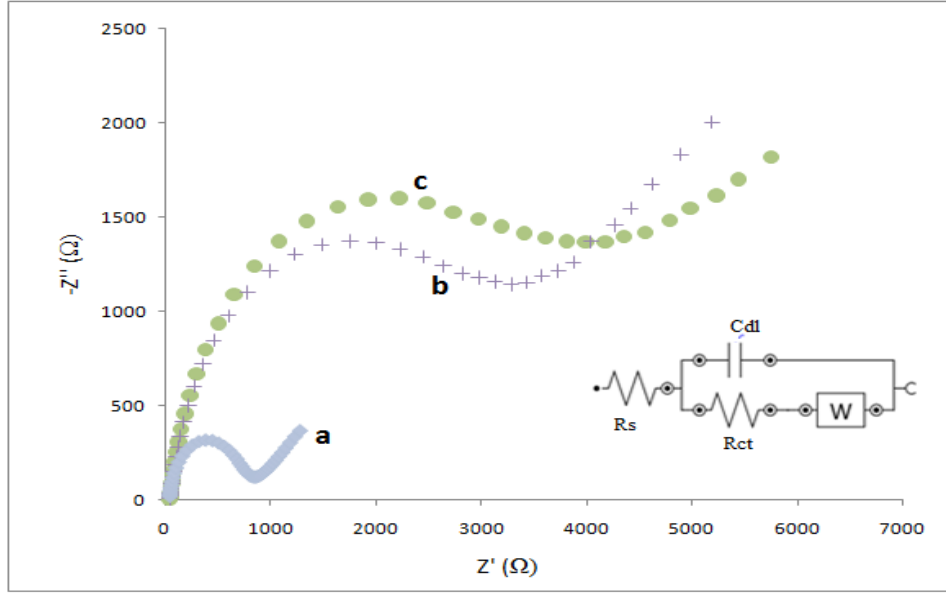
ct dsDNA ve ct ssDNA immobilize edilen PGE'lerin ERT etkileşimlerinden sonra ve önce redoks çözeltisindeki dönüşümlü voltametrik davranışları Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de, impedimetrik davranışları ise Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de verilmiştir:



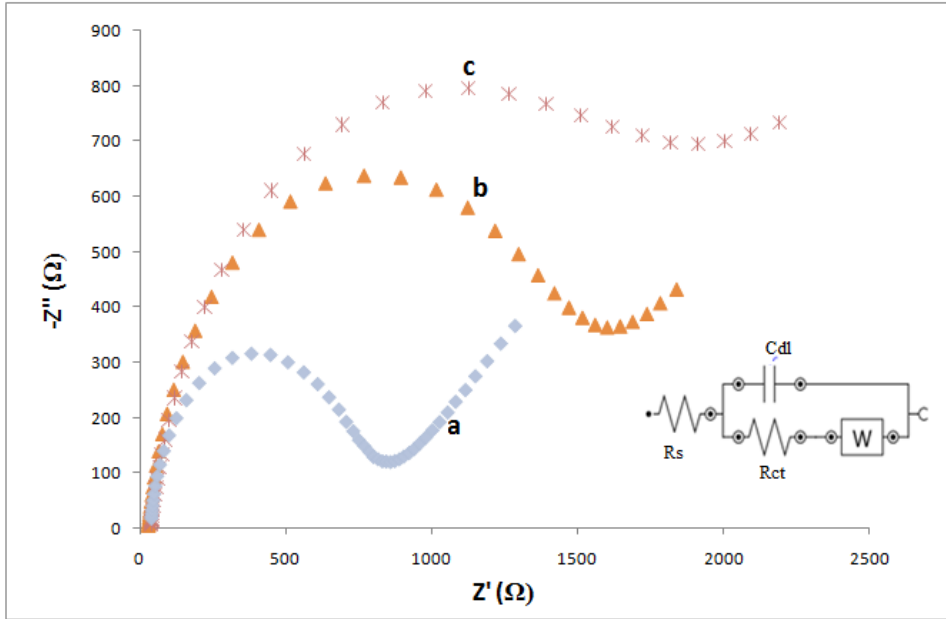
Şekil 4. 14 dsDNA-ERT etkileşimine ait dönüşümlü voltamogram
a) Aktive edilmiş PGE b) dsDNA immobilize edilmiş PGE c) ERT-dsDNA etkileşimden sonra PGE (Ag/AgCl referans elektroda karşı, $2,5 \times 10^{-3}$ M redoks çözeltisinde, tarama hızı: 50 mV/s).



Şekil 4. 15 ssDNA-ERT etkileşimine ait dönüşümlü voltamogram
a) Aktive edilmiş PGE b) ssDNA immobilize edilmiş PGE c) ERT-ssDNA etkileşimden sonra PGE (Ag/AgCl referans elektroda karşı, $2,5 \times 10^{-3}$ M redoks çözeltisinde, tarama hızı: 50 mV/s).



Şekil 4.16. ERT-dsDNA etkileşimine ait Niquist grafiği a) Aktive edilmiş PGE b) dsDNA immobilize edilmiş PGE c) ERT-dsDNA etkileşiminden sonra PGE ($2,5 \times 10^{-3}$ M redoks çözeltisinde, 0,1 MHz - 0,1 Hz frekans aralığında, 0,22 V açık devre potansiyelinde ve 10 mV AC genliğinde).



Şekil 4.17. ERT-ssDNA etkileşimine ait Niquist grafiği a) Aktive edilmiş PGE b) ssDNA immobilize edilmiş PGE c) ERT-ssDNA etkileşiminden sonra PGE ($2,5 \times 10^{-3}$ M redoks çözeltisinde, 0,1 MHz - 0,1 Hz frekans aralığında, 0,22 V açık devre potansiyelinde ve 10 mV AC genliğinde).

4.4.1. ct ssDNA ve ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin bulgular

4.4.1.1 ct ssDNA ve ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonunda uygun etkileşim süresinin belirlenmesine ilişkin bulgular

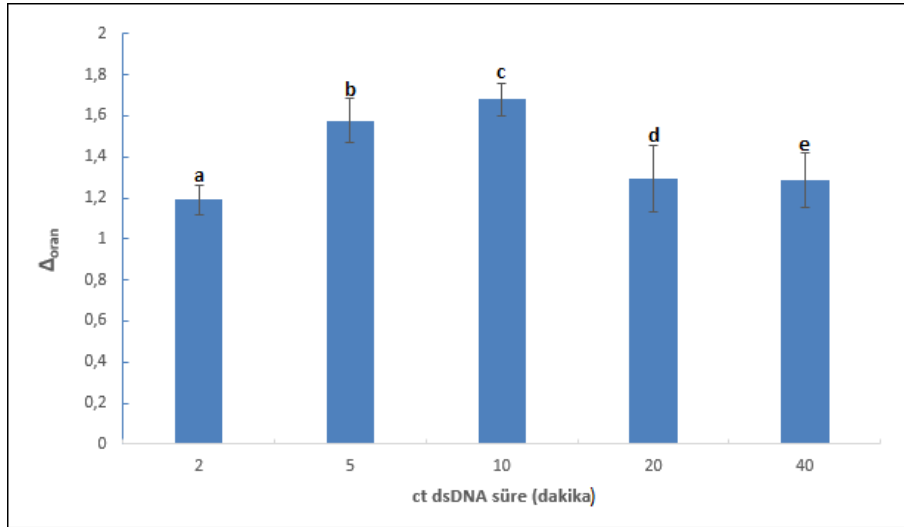
Hem ct dsDNA hem de ct ssDNA için Bölüm 3.6.1.1.'de anlatıldığı şekilde deneyler yapıldı ve impedimetrik ölçümler alındı. Yük aktarım direncinin (R_{ct}) immobilizasyon süresine göre bağlı değişimi (Δ_{oran}) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır [67].

$$\Delta_{oran} = \frac{a - b}{b}$$

a: DNA modifiye elektrot için R_{ct}

b: Çıplak elektrot için R_{ct}

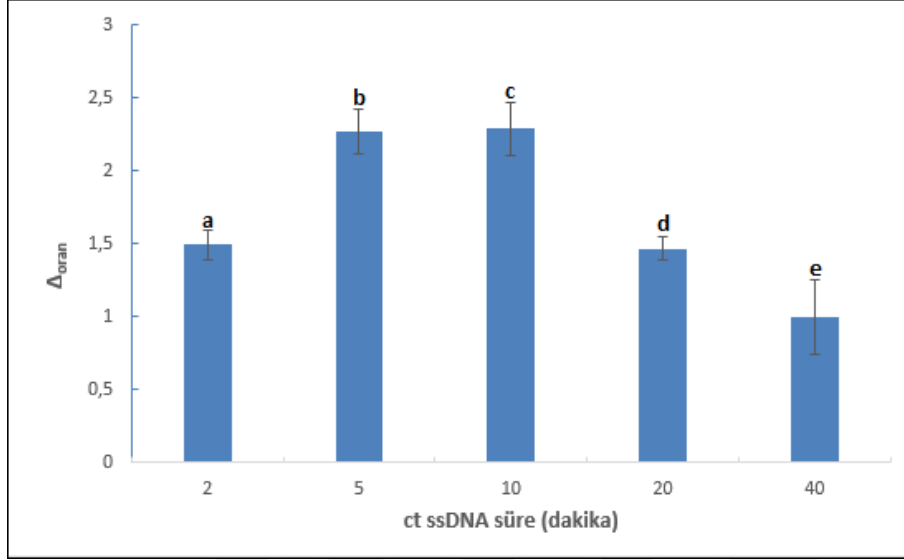
Aktive edilmiş PGE'ler (çıplak PGE), 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 20 ppm sabit derişimdeki dsDNA çözeltisi (110 μ L hacmindeki viallerde bulunan) ile değişik sürelerde (2-5-10-20-40 dakika) etkileştirildi ve yıkama işleminden sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ_{oran} değerlerinde meydana gelen değişimler incelendi ve optimum dsDNA immobilizasyon süresi 10 dakika olarak bulundu. Elde edilen histogram Şekil 4.18'te gösterildi:



Şekil 4. 16 30 ppm dsDNA'nın sabit derişimde PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ölçümlerinin ortalama Δ_{oran} değerlerinin adsorpsiyon süresine göre değişimi

Aktive edilmiş PGE'ler (çıplak PGE), 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki ssDNA çözeltisi (110 μ L hacmindeki viallerde bulunan) ile değişik sürelerde (2-

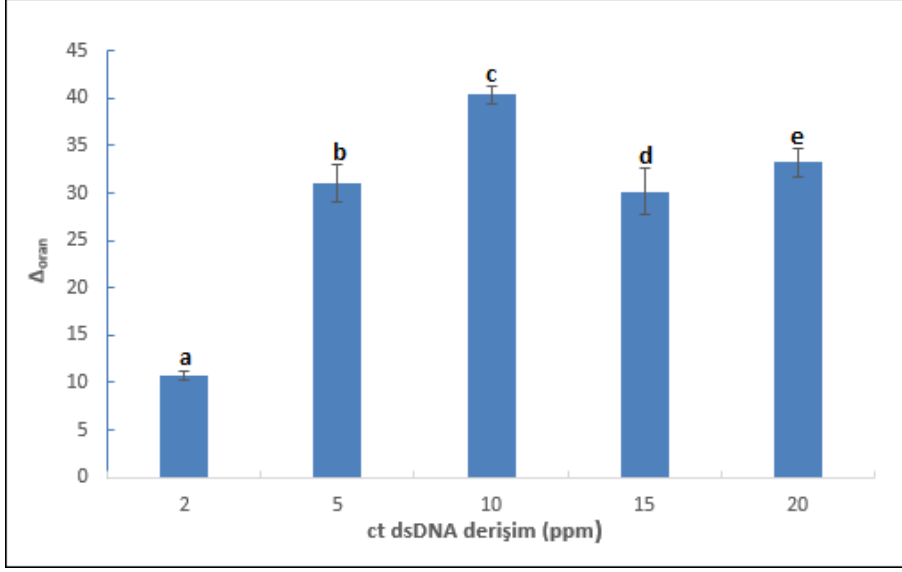
5-10-20-40 dakika) etkileştirildi ve yıkama işleminde sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ_{oran} değerlerinde meydana gelen değişimler incelendi ve optimum ssDNA immobilizasyon süresi 10 dakika olarak bulundu. Elde edilen histogram Şekil 4.19'da gösterildi:



Şekil 4. 17 30 ppm ssDNA'nın sabit derişimde PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ölçümlerinin ortalama Δ_{oran} değerlerinin adsorpsiyon süresine göre değişimi

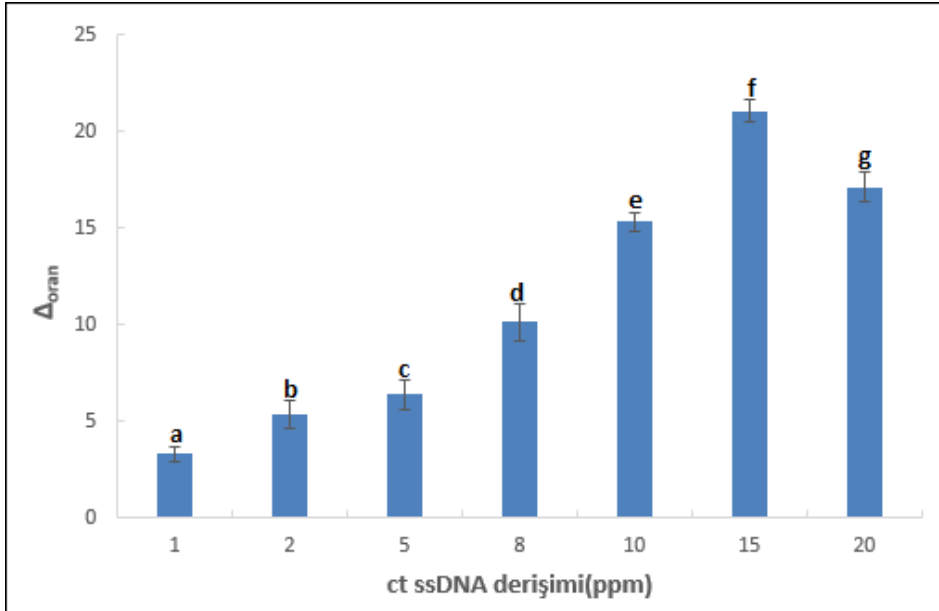
4.4.1.2 ct ssDNA ve ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonunda uygun etkileşim derişiminin belirlenmesine ilişkin bulgular

Aktive edilmiş PGE'ler (çıplak PGE), 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan farklı derişimlerdeki (2-5-10-15-20 ppm) ct dsDNA ile 10 dakika sabit sürede etkileştirildikten sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ_{oran} değerlerinde meydana gelen değişimler incelendi ve immobilize edilen optimum dsDNA derişimi 10 ppm olarak bulundu. Elde edilen histogram Şekil 4.20'de gösterildi:



Şekil 4. 18 10 dakika dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ortalama Δ_{oran} değerlerinin dsDNA adsorpsiyon süresine göre değişimi

Aktive edilmiş PGE'ler (çıplak PGE), 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan farklı derişimlerdeki (1-2-5-8-10-15-20 ppm) ct ssDNA ile 10 dakika sabit sürede etkileştirildikten sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ_{oran} değerlerinde meydana gelen değişimler incelendi ve immobilize edilen optimum ssDNA derişimi 15 ppm olarak bulundu. Elde edilen histogram Şekil 4.21'de gösterildi:



Şekil 4. 19 10 dakika ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ortalama Δ_{oran} değerlerinin ssDNA adsorpsiyon süresine göre değişimi

4.4.2 ERT-DNA ile etkileşimine ilişkin bulgular

4.4.2.1. ERT-DNA etkileşiminde en uygun etkileşim süresinin belirlenmesine ilişkin bulgular

Hem ct dsDNA hem de ct ssDNA için yöntem 3.6.1.1.' de EIS yöntemi için verilen prosedüre göre deneyler yapıldı.

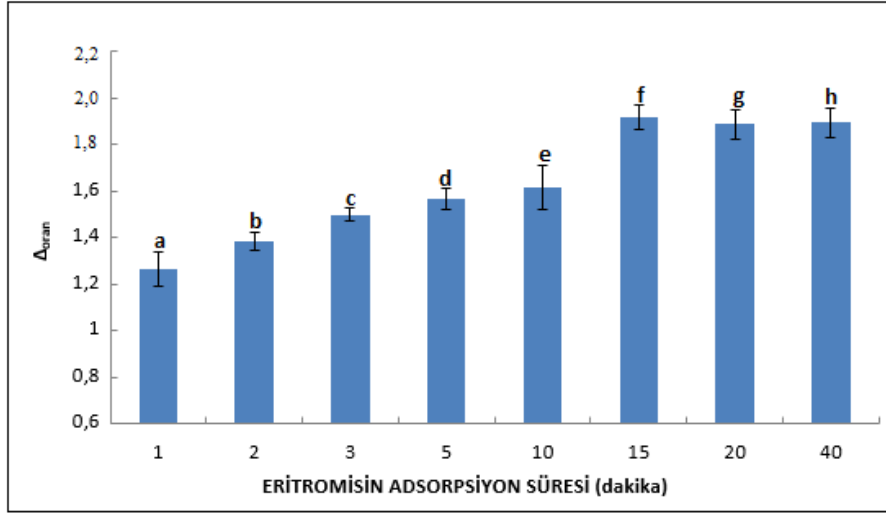
EIS yöntemi ile ct dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu için en uygun derişim 10 ppm ve en uygun etkileşim süresi 10 dakika olarak bulunmuştu. Bu koşullarda yüzeyine ct dsDNA immobilize edilmiş PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki ERT çözeltisi (110 µL hacmindeki viallerde bulunan) ile değişik sürelerde (1-2-3-5-10-15-20-40 dakika) etkileştirildi ve yıkama işleminden sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ_{oran} değerlerinde meydana gelen değişimler incelendi ve ERT-dsDNA etkileşimi için optimum süre 15 dakika olarak bulundu. Elde edilen histogram Şekil 4.22'de gösterildi. Δ_{oran} aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır [67].

$$\Delta_{oran} = \frac{c - b}{a - b}$$

a: DNA modifiye elektrot için Rct

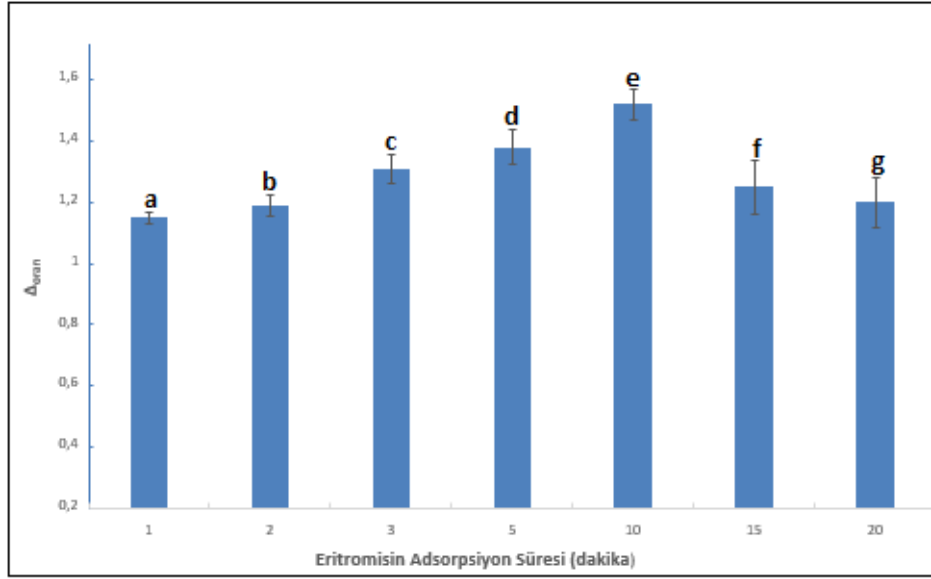
b: Çıplak elektrot için Rct

c: ERT etkileşiminden sonraki Rct



Şekil 4. 20 30 ppm sabit derişimdeki ERT'nin dsDNA ile PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ortalama Δ oran değerlerinin adsorpsiyon süresine göre değişimi

EIS yöntemi ile ct ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu için en uygun derişim 15 ppm ve en uygun etkileşim süresi 10 dakika olarak bulunmuştu. Bu koşullarda yüzeyine ct ssDNA immobilize edilmiş PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan 10 ppm sabit derişimdeki ERT çözeltisi (110 μ L hacmindeki viallerde bulunan) ile değişik sürelerde (1-2-3-5-10-15-20 dakika) etkileştirildi ve yıkama işleminde sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ oran değerlerinde meydana gelen değişimler incelendi ve ERT-ssDNA etkileşimi için optimum süre 10 dakika olarak bulundu. Elde edilen histogram Şekil 4.23'de gösterildi:

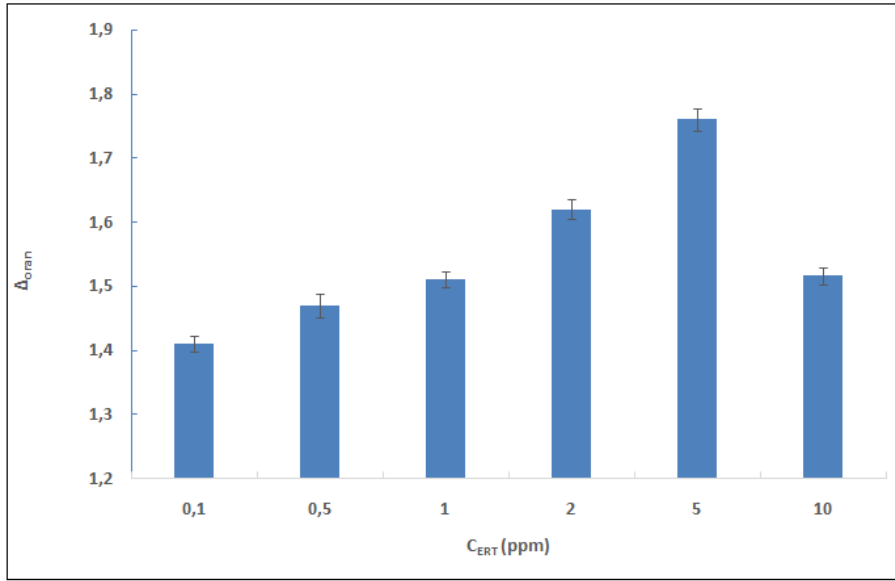


Şekil 4. 21 30 ppm sabit derişimdeki ERT'nin ssDNA ile PGE yüzeyine immobilizasyonuna ilişkin impedimetrik ortalama Δ_{oran} değerlerinin adsorpsiyon süresine göre değişimi

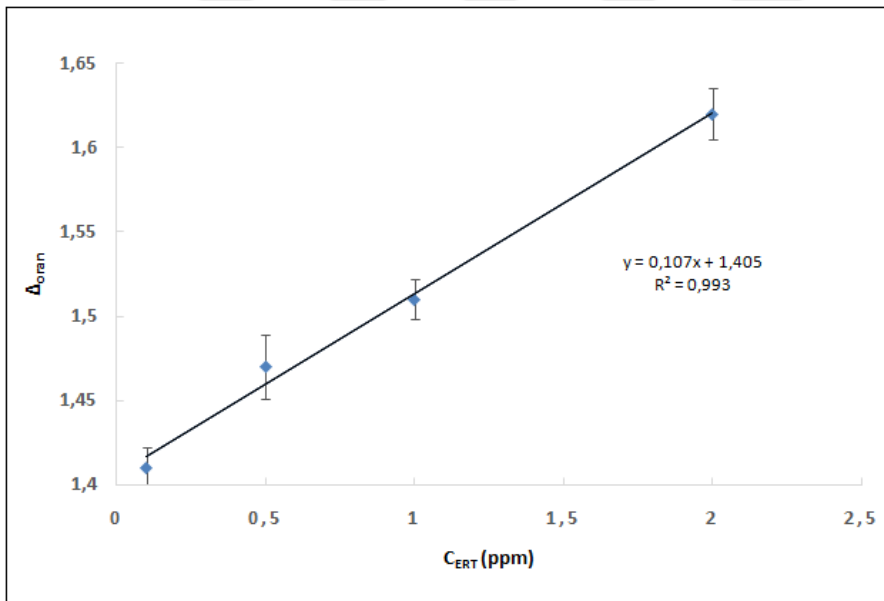
4.4.2.2 ERT-DNA etkileşiminde en uygun etkileşim miktarının belirlenmesine ilişkin bulgular

Hem ct dsDNA hem de ct ssDNA için yöntem Bölüm 3.5.2.2.'de EIS yöntemi için verilen prosedüre göre deneyler yapıldı.

Optimum koşullarda dsDNA immobilize edilen PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan farklı derişimlerdeki (0,1-0,5-1-2-5-10 ppm) ERT çözeltisi (110 μ L hacmindeki viallerde bulunan) ile 15 dakika sabit sürede etkileştirildi ve yıkama işleminde sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ_{oran} değerlerinde meydana gelen değişimler incelendi ve dsDNA ile etkileşen optimum ERT derişimi 5 ppm olarak bulundu (Şekil 4.24). Δ_{oran} değerlerinin ERT derişimiyle değişiminden yararlanarak çizilen kalibrasyon grafiği (Şekil 4.25) ve deneysel verilerden en düşük tayin sınırı 0,159 ppm (S/N=3) olarak hesaplandı.



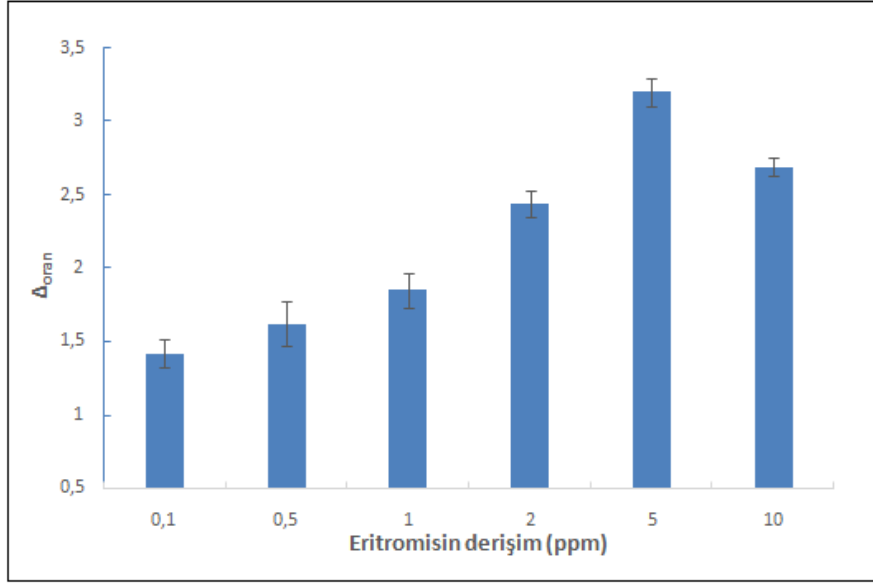
Şekil 4. 22 15 dakika sabit sürede ERT'in dsDNA ile etkileşimine ilişkin impedimetrik ortalama Δ oran değerlerinin etkileşim miktarına göre değişimi



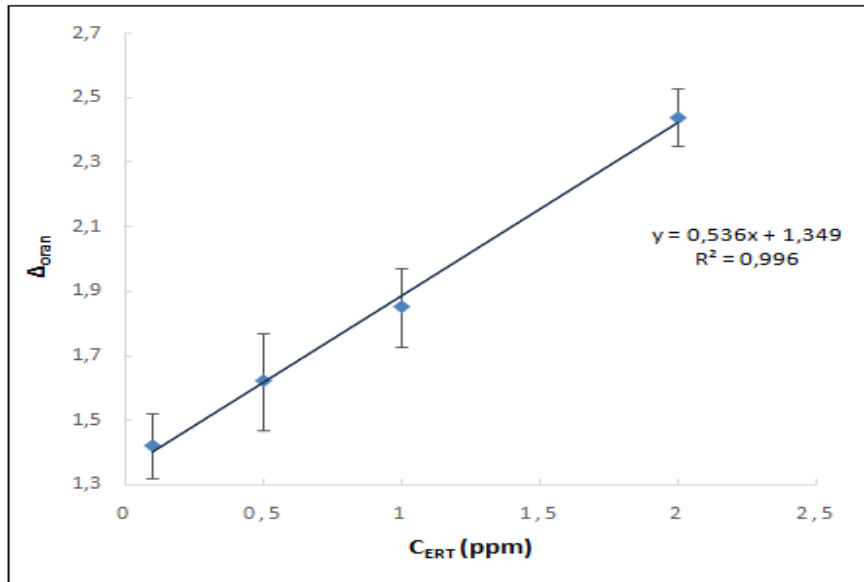
Şekil 4. 23 İmpedimetrik ortalama Δ oran değerlerinin ERT ile dsDNA etkileşen derişimine göre değişimine ait kalibrasyon grafiği

Optimum koşullarda ssDNA immobilize edilen PGE'ler, 0,05 M PBS'de (pH 7,4) hazırlanan farklı derişimlerdeki (0,1-0,5-1-2-5-10 ppm) ERT çözeltisi (110 μ L hacmindeki viallerde bulunan) ile 10 dakika sabit sürede etkileştirildi ve yıkama işleminden sonra impedimetrik ölçümler alındı. Δ oran değerlerinde meydana gelen değişimler incelendi ve ssDNA ile etkileşen optimum ERT derişimi 5 ppm olarak bulundu (Şekil 4.26). Δ oran

değerlerinin ERT derişimiyle değişiminden yararlanarak çizilen kalibrasyon grafiği (Şekil 4.27) ve deneysel verilerden en düşük tayin sınırı 0,032 ppm (S/N=3) olarak hesaplandı.



Şekil 4. 24 10 dakika sabit sürede ERT'nin ssDNA ile etkileşimine ilişkin impedimetrik ortalama Δ_{Oran} değerlerinin etkileşim miktarına göre değişimi

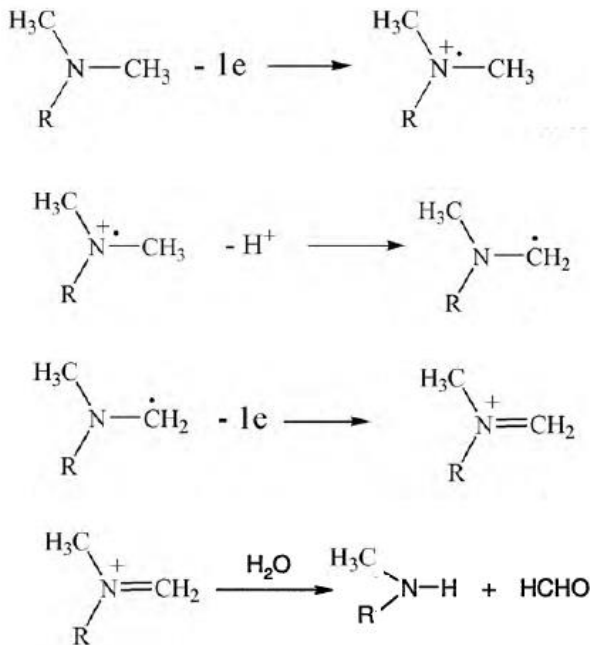


Şekil 4. 25 İmpedimetrik ortalama Δ_{Oran} değerlerinin ERT ile ssDNA etkileşen derişimine göre değişimine ait kalibrasyongrafiği

5.TARTIŞMA

5.1 Eritromisinin Elektrokimyasal Davranışlarına İlişkin Tartışma

Bu çalışmanın temelini DNA'nın bir makrolid antibiyotik olan eritromisinle (ERT) etkileşim özelliklerinin incelenmesi oluşturmaktadır. DNA'nın elektroaktif olan guanin ve adenin bazlarının yükseltgenme sinyalleri verdiği potansiyel aralığında eritromisinin elektrokimyasal davranışları incelenmiş ve bunun için dönüşümlü voltametri (CV) ve kare dalga voltametrisi (SWV) yöntemleri kullanılmıştır. DNA-ERT etkileşim özelliklerinin incelendiği fosfat tampon çözeltisinde (pH:7,4), 10^{-3} M ERT'nin 50 mV/s tarama hızında CV voltamogramında (Şekil 4.1) +0,85 V civarında belirgin olmayan bir yükseltgenme piki görülmektedir. Negatif yönde yapılan taramada ise herhangi bir indirgenme akımına rastlanmamıştır. Yani ERT, çalışılan bu ortamda tersinir olmayan bir elektrokimyasal yükseltgenme davranışı göstermiştir. CV'de belirgin olmayan yükseltgenme piki aynı potansiyelde SWV'de daha anlaşılır bir şekilde gözlenmiştir. (Şekil 4.2). Adsorpsiyon yoluyla PGE yüzeyinde biriktirilen ERT'nin optimum adsorpsiyon süresi ve PGE yüzeyinde doymuş hale gelen ERT derişimi için de bir çalışma yapılmış; 40 ppm derişim ve 15 dakika adsorpsiyon süresinin en uygun değerler olduğu gözlenmiştir. 0,85 V civarında gözlenen tersinmez yükseltgenmenin mekanistik çalışmasıyla ilgili olarak Hu ve arkadaşları [68] aşağıdaki mekanizmayı önermişlerdir:



Mekanizmaya göre elektrokimyasal yükseltgenmeyi önce bir kimyasal reaksiyon daha sonra bu reaksiyonda meydana gelen radikalik ara ürünün yükseltgendiği ikinci bir elektrokimyasal reaksiyon takip etmektedir (ECE mekanizması). Sonuç olarak çalışılan potansiyel aralığında guanin yükseltgenme sinyalleri 1,0 V civarında gözlemlendiğinden, ilaçtan kaynaklanan herhangi bir girişim olmamıştır.

5.2. DPV Yöntemi İle DNA'nın PGE Yüzeyine İmmobilizasyonuna İlişkin Tartışma

Tez kapsamında tanıma yüzeyi olarak kullanılan ct dsDNA ve ct ssDNA'nın, 30 s ve 1,4 V potansiyel uygulanarak aktive edilmiş PGE yüzeyine adsorpsiyon metodu ile immobilizasyonunun ilk basamağını en uygun immobilizasyon süresini tayin etmek için oluşturmuştur. Bunun için DPV yöntemi ile yapılan 0,2 V -1,5 V potansiyel aralığında, ABS tamponunda (pH 4,8) yapılan potansiyel taramasında, yaklaşık 1,0 V'luk potansiyelde görülen guanin bazının yükseltgenme pik akımı referans olarak seçilmiştir. Ct dsDNA'nın en uygun immobilizasyon süresi tayin edilirken aktive edilmiş elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 25 ppm sabit derişimdeki dsDNA çözeltilerinde 5 dakikadan 50 dakikaya kadar değişen sürelerde bekletildi ve ABS tamponunda DPV ölçümleri alındı ve sonuçlar Şekil 4.4'de voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte guanin pik akımlarının da arttığı ve 40 dakikalık etkileşim süresinden sonra guanin pik akımlarının yeniden azalmaya başladığı yani bu süre sonunda elektrot yüzeyinin dsDNA ile tamamen bloke olduğu anlaşılmış ve böylece dsDNA immobilizasyonu için optimum süre tayin edilmiştir.

Ct ssDNA'nın immobilizasyonunda optimum sürenin tayin edilmesinde yukarıda işlemler tekrar edildi. Aktive edilmiş elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki ssDNA çözeltilerinde 5 dakikadan 40 dakikaya kadar değişen sürelerde bekletildi ve ABS tamponunda DPV ölçümleri alındı ve sonuçlar Şekil 4.5'de voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte guanin pik akımlarının da arttığı ve 30 dakikalık etkileşim süresinden sonra guanin pik akımlarının yeniden azalmaya başladığı yani bu süre sonunda elektrot yüzeyinin ssDNA ile tamamen bloke olduğu anlaşılmış ve böylece ssDNA immobilizasyonu için optimum süre 30 dakika olarak tayin edilmiştir.

Ct dsDNA için optimum immobilizasyon süresi 40 dakika olarak tayin edildikten sonra, PGE yüzeyine immobilize edilen ct dsDNA'nın optimum derişim değerinin belirlenmesi basamağına geçildi. Bunun için aktive edilmiş elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 5 ppm – 30 ppm derişim aralığındaki dsDNA çözeltilerinde 40 dakika bekletildi ve ABS tamponunda DPV ölçümleri alındı ve sonuçlar Şekil 4.6'da voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan dsDNA derişimiyle birlikte guanin pik akımlarının da arttığı ve 25 ppm dsDNA derişiminden sonra guanin pik akımlarının azalmaya başladığı yani bu derişim değerine ulaşıldığında elektrot yüzeyinin DNA ile tamamen kaplandığı

anlaşılması ve böylece dsDNA immobilizasyonu için optimum derişim 25 ppm olarak tayin edilmiştir.

Ct ssDNA'nın immobilizasyonunda optimum derişim değerin tayin edilmesinde dsDNA için yapılan işlemler tekrar edildi. Ct ssDNA için optimum immobilizasyon süresi 30 dakika olarak tayin edildikten sonra, PGE yüzeyine immobilize edilen ct ssDNA'nın optimum derişim değerin belirlenmesi basamağına geçildi. Bunun için aktive edilmiş elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 20 ppm – 45 ppm derişim aralığındaki ssDNA çözeltilerinde 30 dakika bekletildi ve ABS tamponunda DPV ölçümleri alındı ve sonuçlar Şekil 4.7'de voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan ssDNA derişimiyle birlikte guanin pik akımlarının da arttığı ve 40 ppm ssDNA derişiminden sonra guanin pik akımlarının değişmediği yani bu derişim değerin ulaşıldığında elektrot yüzeyinin ssDNA ile tamamen kaplandığı anlaşılması ve böylece ssDNA immobilizasyonu için optimum derişim 40 ppm olarak tayin edilmiştir.

5.3. DPV Yöntemi İle DNA-ERT Etkileşiminin İncelenmesine İlişkin Tartışma

dsDNA'nın aktif PGE yüzeyine immobilizasyonunda optimum etkileşim süresi 40 dakika ve optimum DNA derişimi 25 ppm olarak belirlenmişti. Bundan sonraki basamakta optimum koşullarda PGE yüzeyine immobilize edilen dsDNA ile ERT etkileşimi incelendi. Bunun için DPV yöntemi ile yapılan 0,2 V -1,5 V potansiyel aralığında, ABS tamponunda (pH 4,8) yapılan potansiyel taramasında, yaklaşık 1,0 V'luk potansiyelde görülen guanin bazının yükseltgenme pik akımı referans olarak seçilmiştir. ERT-dsDNA etkileşiminde ERT'in dsDNA ile en uygun etkileşim süresi tayin edilirken, optimum şartlarda dsDNA immobilize edilmiş PGE'ler, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 25 ppm sabit derişimdeki ERT çözeltilerinde 2 dakikadan 30 dakikaya kadar değişen sürelerde bekletildi, ABS tamponunda DPV ölçümleri alındı ve sonuçlar Şekil 4.8'te voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte guanin pik akımlarının azaldığı ve 25 dakikalık etkileşim süresine kadar guanin pik akımlarının arttığı ve daha sonraki sürelerde yeniden azalmaya başladığı yani dsDNA ile ERT etkileşiminin en uygun 25 dakika olduğu belirlendi.

ERT-ssDNA etkileşiminde ERT'in ssDNA ile en uygun etkileşim süresinin tayin edilmesinde yukarıda işlemler tekrar edildi. Optimum şartlarda ssDNA immobilize edilmiş PGE'ler, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 20 ppm sabit derişimdeki ERT çözeltilerinde 2 dakikadan 25 dakikaya kadar değişen sürelerde bekletildi, ABS tamponunda DPV ölçümleri alındı ve sonuçlar Şekil 4.9'da voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de

anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte guanin pik akımlarındaki artışın 20 dakikalık etkileşim süresine kadar devam edebildiği yani ssDNA ile ERT etkileşiminin en uygun 20 dakika olduğu belirlendi.

ERT-ct dsDNA etkileşiminde ERT'in dsDNA ile en uygun etkileşim süresi 25 dakika olarak tayin edildikten sonra, dsDNA ile etkileşen ERT'in optimum derişim değerinin belirlenmesi ve guanin pik akımlarındaki artmanın ERT derişimindeki değişimine göre kalibrasyon grafiğinin oluşturulması basamağına geçildi. Optimum şartlarda dsDNA immobilize edilmiş PGE'ler, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 2 ppm – 30 ppm derişim aralığındaki ERT çözeltilerinde 25 dakika bekletildi ve PBS tamponunda DPV ölçümleri alındı ve sonuçlar Şekil 4.10'da voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan ERT derişimiyle birlikte guanin pik akımlarının da arttığı ve 25 ppm ERT derişiminden sonra guanin pik akımlarının değişmediği yani dsDNA ile etkileşen en fazla ERT derişiminin 25 ppm olduğu anlaşıldı. ERT-dsDNA etkileşiminde ERT derişimine bağlı olarak guanin pik akımlarında meydana gelen değişimden yararlanarak kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Şekil 4.11'de verilen grafik ve deneysel verilerden en düşük tayin sınırı 1,69 ppm (S/N=3) olarak hesaplandı.

ERT- ct ssDNA etkileşiminde ERT'in ssDNA ile en uygun etkileşim süresi 25 dakika olarak tayin edildikten sonra, ssDNA ile etkileşen ERT'in optimum derişim değerinin belirlenmesi ve guanin pik akımlarındaki artmanın ERT derişimindeki değişimine göre kalibrasyon grafiğinin oluşturulması basamağına geçildi. Optimum şartlarda ssDNA immobilize edilmiş PGE'ler, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 2 ppm – 25 ppm derişim aralığındaki ERT çözeltilerinde 20 dakika bekletildi ve PBS tamponunda DPV ölçümleri alındı ve sonuçlar Şekil 4.12'de voltamogram ve histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan ERT derişimiyle birlikte guanin pik akımlarının da arttığı ve 20 ppm ERT derişiminden sonra guanin pik akımlarının değişmediği yani ssDNA ile etkileşen en fazla ERT derişiminin 20 ppm olduğu anlaşıldı. ERT-ssDNA etkileşiminde ERT derişimine bağlı olarak guanin pik akımlarında meydana gelen değişimden yararlanarak kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Şekil 4.13'de verilen grafik ve deneysel verilerden en düşük tayin sınırı 0,566 ppm (S/N=3) olarak hesaplandı.

ERT'nin DNA ile etkileşiminin incelendiği bu voltametrik çalışmalarda etkileşim süresi ve etkileşen ERT derişiminin artmasıyla ERT'nin DNA üzerinde oksidatif bir bozunmaya sebep olduğu ve bunun sonucunda da artan pik akımlarının serbest kalan guanin bazlarından

kaynaklandığı düşünülebilir.[69]. Şekil 4.11 ve Şekil 4.13 incelendiğinde ise kalibrasyon grafiklerinde görülen eğim değerlerinin ERT-ssDNA etkileşiminde çok daha büyük bir değere sahip olduğu ve böylece ERT'nin ssDNA'ya afinitesinin çok daha fazla olduğu görülmektedir.

5.4. EIS Yöntemi İle DNA'nın PGE Yüzeyine İmmobilizasyonuna İlişkin Tartışma

Çalışma elektrotu olarak kullanılan PGE yüzeyleri, EIS yönteminde de tıpkı DPV yönteminde olduğu gibi 30 s ve 1,4 V potansiyel uygulanarak aktive edildi. Bundan sonraki aşamalarda planlanan deney akışında DPV yönteminde olduğu gibi DNA aktif PGE yüzeyine immobilize edildi ve bunun için optimum immobilizasyon süresi ve optimum DNA derişimleri impedimetrik olarak tayin edildi. İmpedimetrik ölçümlerde yük aktarım direncinde (R_{ct}) veya bağıl yük aktarım direncinde (Δ_{oran}) meydana gelen değişimler incelenerek deney sonuçları yorumlandı. Empedans ölçümleri için uygulanması gereken potansiyel değeri (Ag/AgCl referans elektroda karşı 0,22 V), $2,5 \times 10^{-3}$ M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ sisteminin redoks potansiyelinden hesaplandı. İmpedimetrik ölçümler, bu sabit potansiyelde 0,1 MHz - 0,1 Hz frekans aralığında ve 10 mV AC genliğinde gerçekleştirildi. Empedans değerleri FRA yazılımı desteği ve sisteme eşdeğer bir elektrik devresi ($R_s/C_{dl}/R_{ct}/W$) kullanılarak çizilen Nyquist grafiklerinden hesaplandı. Elektroda ait elektriksel parametrelerin yorumlanmasında, elektronların PGE/çözelti ara yüzeyindeki geçişine karşı elektrot direnci olarak tanımlanan R_{ct} değeridir ve bu değer Nyquist grafiğindeki yarım dairenin çapı ile orantılıdır.[70]. İmpedimetrik deney basamaklarında kullanılan farklı elektrotlardan elde edilen sonuçları karşılaştırmak, bağımsız ve tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için bağıl R_{ct} değerleri (Δ_{oran}) değerleri kullanıldı.[71].

Ct dsDNA'nın en uygun immobilizasyon süresi tayin edilirken, DPV yöntemi ile aktive edilmiş elektrotların (çıplak elektrot), 0,22 V sabit devre potansiyelinde, $2,5 \times 10^{-3}$ M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct}(\text{çiplak})$] bulundu. Daha sonra bu elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki dsDNA çözeltilerinde 1 dakikadan 40 dakikaya kadar değişen sürelerde bekletildi ve aynı şekilde empedans ölçümleri alınarak Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct}(\text{dsDNA})$] bulundu. Literatüre göre [67] her bir süre için Δ_{oran} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.18'de histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte Δ_{oran} değerlerinin de arttığı ve 10 dakikalık etkileşim süresinden sonra sabit kaldığı yani bu süre sonunda elektrot yüzeyinin dsDNA ile tamamen bloke olduğu anlaşılmış ve böylece dsDNA immobilizasyonu için optimum süre impedimetrik olarak tayin edilmiştir.

Rct değerleri yük aktarım direnci olarak tanımlanmıştı. Redoks probunu içeren deney çözeltisinde, $Fe^{2+/3+}$ sisteminin indirgenme-yükseltgenme olayı esnasında elektrot yüzeyinden çözelti ortamına (veya tersi) yük transferi, elektrot yüzeyinin elektriksel yapısıyla doğrudan ilgilidir. Negatif yüklü fosfat iskelet yapısına sahip DNA'nın elektrot yüzeyine immobilize edilmesiyle birlikte elektrot yüzeyi kısmen negatif yüklenecek ve immobilizasyon süresi arttıkça elektrot yüzeyindeki negatif yük yoğunluğu da artacaktır. Sonuç olarak anyonik redoks probu ($[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$) ile DNA arasındaki elektrostatik itme, yük aktarım direncini artıracak ve belirli bir etkileşim süresinden sonra da sabit kalacaktır.

Ct ssDNA'nın immobilizasyonunda optimum sürenin tayin edilmesinde yukarıda işlemler tekrar edildi. DPV yöntemi ile aktive edilmiş elektrotların (çıplak elektrot), 0,22 V sabit devre potansiyelinde, $2,5 \times 10^{-3}$ M $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden Rct değerleri $[Rct_{(çiplak)}]$ bulundu. Daha sonra bu elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki ssDNA çözeltilerinde 1 dakikadan 20 dakikaya kadar değişen sürelerde bekletildi ve aynı şekilde empedans ölçümleri alınarak Nyquist grafiğinden Rct değerleri $[Rct_{(ssDNA)}]$ bulundu. Literatüre göre [67] her bir süre için Δ_{oran} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.19'da histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte Δ_{oran} değerlerinin de arttığı ve 10 dakikalık etkileşim süresinden sonra sabit kaldığı yani bu süre sonunda elektrot yüzeyinin ssDNA ile tamamen bloke olduğu anlaşılmış ve böylece ssDNA immobilizasyonu için optimum süre impedimetrik olarak tayin edilmiştir.

Ct dsDNA için optimum immobilizasyon süresi 10 dakika olarak tayin edildikten sonra, PGE yüzeyine immobilize edilen ct dsDNA'nın optimum derişim değerinin impedimetrik olarak belirlenmesi basamağına geçildi. Bunun için DPV yöntemi ile aktive edilmiş elektrotların (çıplak elektrot), 0,22 V sabit devre potansiyelinde, $2,5 \times 10^{-3}$ M $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$ redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden Rct değerleri $[Rct_{(çiplak)}]$ bulundu. Daha sonra bu elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 2 ppm – 20 ppm derişim aralığındaki dsDNA çözeltilerinde 10 dakika bekletildi ve empedans ölçümleri alınarak Nyquist grafiğinden Rct değerleri $[Rct_{(dsDNA)}]$ bulundu. Literatüre göre [67] her bir dsDNA derişimi için Δ_{oran} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.20'de histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan dsDNA derişimleri ile birlikte Δ_{oran} değerlerinin de arttığı ve 10 ppm dsDNA derişiminden sonra sabit kaldığı yani bu derişim değerine ulaşıldığında elektrot yüzeyinin dsDNA ile tamamen kaplandığı anlaşılmış ve böylece dsDNA immobilizasyonu için optimum derişim 10 ppm olarak tayin edilmiştir.

Ct ssDNA için optimum immobilizasyon süresi 10 dakika olarak tayin edildikten sonra, PGE yüzeyine immobilize edilen ct ssDNA'nın optimum derişim değerinin impedimetrik olarak belirlenmesi basamağına geçildi. Bunun için DPV yöntemi ile aktive edilmiş elektrotların (ıplak elektrot), 0,22 V sabit devre potansiyelinde, $2,5 \times 10^{-3}$ M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct(\text{çıplak})}$] bulundu. Daha sonra bu elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 1 ppm – 20 ppm derişim aralığındaki ssDNA çözeltilerinde 10 dakika bekletildi ve empedans ölçümleri alınarak Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct(\text{ssDNA})}$] bulundu. Literatüre göre [67] her bir ssDNA derişimi için Δ_{oran} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.21'de histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan ssDNA derişimleri ile birlikte Δ_{oran} değerlerinin de arttığı ve 15 ppm ssDNA derişiminden sonra sabit kaldığı yani bu derişim değerine ulaşıldığında elektrot yüzeyinin ssDNA ile tamamen kaplandığı anlaşılmış ve böylece ssDNA immobilizasyonu için optimum derişim 15 ppm olarak tayin edilmiştir.

5.5. EIS Yöntemi İle DNA–ERT Etkileşiminin İncelenmesine İlişkin Tartışma

dsDNA'nın aktif PGE yüzeyine immobilizasyonunda optimum etkileşim süresi 10 dakika ve optimum dsDNA derişimi 10 ppm olarak belirlenmişti. Bundan sonraki basamakta optimum koşullarda PGE yüzeyine immobilize edilen ERT ile dsDNA etkileşimi impedimetrik olarak incelendi. Bunun için her sistematik deney başlangıcında olduğu gibi PGE'ler DPV yöntemi ile 30 s ve 1,4 V potansiyel uygulanarak aktive edildikten sonra 0,22 V sabit devre potansiyelinde, $2,5 \times 10^{-3}$ M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct(\text{çıplak})}$] bulundu. Bu elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 10 ppm derişimindeki dsDNA çözeltilerinde 10 dakika bekletildi, redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct(\text{dsDNA})}$] bulundu. Daha sonra aynı elektrotlar PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki ERT çözeltilerinde 1 dakikadan 40 dakikaya kadar değişen sürelerde bekletildi, redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct(\text{dsDNA+ERT})}$] bulundu. Literatüre göre [67] her bir süre için Δ_{oran} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.22'de histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte Δ_{oran} değerlerinin de arttığı ve 15 dakikalık etkileşim süresinden sonra sabit kaldığı yani ERT ile dsDNA etkileşiminin en uygun 15 dakika olduğu belirlendi.

ssDNA'nın aktif PGE yüzeyine immobilizasyonunda optimum etkileşim süresi 10 dakika ve optimum ssDNA derişimi 15 ppm olarak belirlenmişti. ERT-ssDNA etkileşiminde ERT'in ssDNA ile en uygun etkileşim süresinin impedimetrik olarak tayin edilmesinde

yukarıda işlemler tekrar edildi. PGE'ler aktive edildikten sonra 0,22 V sabit devre potansiyelinde, $2,5 \times 10^{-3}$ M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri $[R_{ct}(\text{çiplak})]$ bulundu. Bu elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 15 ppm derişimindeki ssDNA çözeltilerinde 10 dakika bekletildi, redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri $[R_{ct}(\text{ssDNA})]$ bulundu. Daha sonra aynı elektrotlar PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 30 ppm sabit derişimdeki ERT çözeltilerinde 1 dakikadan 20 dakikaya kadar değişen sürelerde bekletildi, redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri $[R_{ct}(\text{ssDNA+ERT})]$ bulundu. Literatüre göre [67] her bir süre için Δ_{oran} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.23'te histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan etkileşim süresiyle birlikte Δ_{oran} değerlerinin de arttığı ve 10 dakikalık etkileşim süresinden sonra sabit kaldığı yani ssDNA ile ERT etkileşiminin en uygun 10 dakika olduğu belirlendi.

dsDNA'nın aktif PGE yüzeyine immobilizasyonunda impedimetrik olarak optimum etkileşim süresi 10 dakika, optimum dsDNA derişimi 10 ppm ve ERT- ct dsDNA etkileşiminde ERT'in dsDNA ile en uygun etkileşim süresi 15 dakika olarak tayin edildikten sonra, dsDNA ile etkileşen ERT'in optimum derişim değerinin impedimetrik olarak belirlenmesi ve Nyquist grafiklerinden elde edilen Δ_{oran} değerlerinin ERT derişimine karşı değişiminden de kalibrasyon grafiğinin oluşturulması basamağına geçildi. PGE'ler aktive edildikten sonra 0,22 V sabit devre potansiyelinde, $2,5 \times 10^{-3}$ M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri $[R_{ct}(\text{çiplak})]$ bulundu. Bu elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 10 ppm derişimindeki dsDNA çözeltilerinde 10 dakika bekletildi, redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri $[R_{ct}(\text{dsDNA})]$ bulundu. Daha sonra aynı elektrotlar PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 0,1 ppm – 20 ppm derişim aralığındaki ERT çözeltilerinde 15 dakika bekletildi, redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri $[R_{ct}(\text{dsDNA+ERT})]$ bulundu. Literatüre göre [67] her bir ERT derişimi için Δ_{oran} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.24'te histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan ERT derişimiyle birlikte Δ_{oran} değerlerinin de arttığı ve 5 ppm ERT derişiminden sonra değişmediği yani dsDNA ile etkileşen en fazla optimum ERT derişiminin 5 ppm olduğu anlaşıldı. ERT-dsDNA etkileşiminde ERT derişimine bağlı olarak değişen Δ_{oran} değerlerinden yararlanarak kalibrasyon grafiğı oluşturuldu. Şekil 4.25'te verilen grafik ve deneysel verilerden en düşük tayin sınırı 0,159 ppm (S/N=3) olarak hesaplandı.

ssDNA'nın aktif PGE yüzeyine immobilizasyonunda impedimetrik olarak optimum etkileşim süresi 10 dakika, optimum ssDNA derişimi 15 ppm ve ERT- ct ssDNA etkileşiminde ERT'in ssDNA ile en uygun etkileşim süresi 10 dakika olarak tayin edildikten sonra, ssDNA ile etkileşen ERT'in optimum derişim değerinin impedimetrik olarak belirlenmesi ve Nyquist grafiklerinden elde edilen Δ_{oran} değerlerinin ERT derişimine karşı değişiminden de kalibrasyon grafiğinin oluşturulması basamağına geçildi. PGE'ler aktive edildikten sonra 0,22 V sabit devre potansiyelinde, $2,5 \times 10^{-3}$ M $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct(\text{çiplak})}$] bulundu. Bu elektrotlar, PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 15 ppm derişimindeki ssDNA çözeltilerinde 10 dakika bekletildi, redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct(ssDNA)}$] bulundu. Daha sonra aynı elektrotlar PBS tamponunda (pH 7,4) hazırlanan 1 ppm – 10 ppm derişim aralığındaki ERT çözeltilerinde 10 dakika bekletildi, redoks probunda empedans ölçümleri alındı ve Nyquist grafiğinden R_{ct} değerleri [$R_{ct(ssDNA+ERT)}$] bulundu. Literatüre göre [67] her bir ERT derişimi için Δ_{oran} değerleri hesaplandı ve sonuçlar Şekil 4.26'da histogram olarak verildi. Şekilden de anlaşılacağı gibi artan ERT derişimiyle birlikte Δ_{oran} değerlerinin de arttığı ve 5 ppm ERT derişiminden sonra değişmediği yani ssDNA ile etkileşen en fazla optimum ERT derişiminin 5 ppm olduğu anlaşıldı. ERT-ssDNA etkileşiminde ERT derişimine bağlı olarak değişen Δ_{oran} değerlerinden yararlanarak kalibrasyon grafiği oluşturuldu. Şekil 4.27'de verilen grafik ve deneysel verilerden en düşük tayin sınırı 0,032 ppm (S/N=3) olarak hesaplandı.

İmpedimetrik ölçümlerden elde edilen deney sonuçları kendi içinde karşılaştırıldığında, DPV yöntemi ile elde edilen sonuçlara benzerlik gösterdiği görülmüştür. Şekil 4.24 ve Şekil 4.26 karşılaştırıldığında ERT'in DNA ile etkileşiminde artan derişim değerleri ile birlikte Δ_{oran} değerlerindeki değişimin ERT-ssDNA etkileşiminde daha belirgin olduğu; Şekil 4.25 ve Şekil 4.27 incelendiğinde ise kalibrasyon grafiklerinde görülen eğim değerlerinin ERT-ssDNA etkileşiminde çok daha büyük bir değere sahip olduğu ve böylece ERT'in ssDNA'ya afinitesinin çok daha fazla olduğu görülmektedir.

DPV ve EIS yöntemlerinden elde edilen deney sonuçları karşılaştırıldığında ise, EIS yönteminde DNA immobilizasyonunun hem süre hem de derişim bakımından çok daha avantajlı olduğu görülmüştür. Ayrıca her iki yöntemden bulunan en düşük tayin sınırları karşılaştırıldığında impedimetrik olarak tayin edilenlerin daha düşük sınır değerlerinde olduğu tespit edilmiştir.

İmpedimetrik ölçümlerle paralel olarak gerçekleştirilen dönüşümlü voltametri deneylerinden elde edilen sonuçlar ERT-DNA etkileşiminin karakteristiğinin ortaya koyulmasına yardımcı olmuştur. Şekil 4.14 ve 4.15 incelendiğinde, modifiye edilmemiş (çıplak) elektrot ile redoks probunda alınan dönüşümlü voltamogramda pik akımının, modifiye edilmiş elektroda göre çok yüksek olması çıplak elektrot yüzeyinin iletkenliğinin de yüksek olduğuna işaret eder. Şekil 4.14'de görüldüğü gibi, dsDNA immobilizasyonu yapıldıktan sonra, aynı koşullarda redoks sisteminden elde edilen dönüşümlü voltamogramda pik akımındaki şiddetli azalma elektrot yüzeyinin dsDNA ile kaplandığını ve buna paralel olarak negatif yüklü prop ve negatif yüklü DNA iskeleti arasındaki elektrostatik itmenin bir sonucu olarak, elektrot yüzeyinin iletkenliğinin de azaldığı anlaşılmaktadır [72]. Aynı şekilde ssDNA immobilizasyonundan sonra alınan dönüşümlü voltamogramda da (Şekil 4.15) pik akımlarının azaldığını ancak bu azalmanın dsDNA immobilize edilen elektrottan alınan voltamograma göre daha az olduğunu yani dsDNA'nın elektrot yüzeyi ile daha fazla etkileştiğini görmek mümkündür. Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de DNA'nın ERT ile etkileşiminden sonra aynı koşullarda alınan dönüşümlü voltamogramlarında ise redoks sisteminde pik akımlarının daha da azaldığı görülmektedir. Bu durum ERT'in DNA ile interkalatif olarak etkileştiğini yani ERT'in DNA'nın heterosiklik düzlemsel yapısına etkin bir şekilde konumlanarak DNA'nın yapısını bozduğu şekilde düşünülebilir. İlaç-DNA etkileşimleri ile ilgili yapılan voltametrik çalışmalar, potansiyel değerindeki bu tip bir pozitif kaymanın interkalasyon sonucu gerçekleştiğini ortaya koymuştur [73, 74].

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de verilen Nyquist grafikleri de dönüşümlü voltametri deneylerinden elde edilen sonuçlara uygun veriler ortaya koymaktadır. Redoks probunda alınan impedimetrik ölçümlerde, modifiye edilmemiş elektrodun yük aktarım direnci (R_{ct}), iletkenliği yüksek olduğu için, DNA modifiye elektroda göre oldukça düşüktür. DNA modifiye elektrotun aynı koşullarda alınan impedimetrik ölçümlerinde R_{ct} değerinin şiddetle arttığı, DNA-ERT etkileşiminden sonra alınan ölçümlerde ise bu artışın devam ettiği görülmüştür.

6. SONUÇ

Bu çalışma bir makrolid antibiyotik olan eritromisin DNA ile etkileşim özelliklerinin tek kullanımlık kalem grafit elektrotlarla elektrokimyasal olarak incelenmesini içerir. Çalışmada DNA'nın elektroaktif bazı olan guaninin yükseltgenme sinyalleri referans olarak alınmış ve bu sinyaldeki değişimlerden yararlanılarak ilaç-DNA etkileşim karakteristiği tanımlanmaya çalışılmıştır. Söz konusu etkileşime ait diferansiyel puls voltametrisinden elde edilen sonuçlar

elektrokimyasal impedans spektroskopisinden elde edilenlerle karşılaştırılmıştır. Tek kullanımlık kalem grafit elektrotların kullanıldığı çalışmada calf thymusdan izole edilen tek sarmal ve çift sarmal DNA'nın elektrot yüzeyine immobilizasyonu her iki metotla da ayrı ayrı optimize edilmiş ve katı elektrot yüzeyinde ERT-DNA etkileşimi voltametrik ve impedimetrik olarak incelenmiştir. İmpedimetrik yöntemden elde edilen sonuçların daha duyarlı olduğu ve ayrıca ERT'nin ssDNA'ya afinitesinin dsDNA'ya oranla çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışma, ERT-DNA etkileşiminin voltametrik ve impedimetrik olarak incelenmesi yönünden literatür de bir ilk olması bakımından önemlidir. Ayrıca diğer grafit tabanlı elektrotlarla kıyaslandığında maliyeti oldukça düşük olan tek kullanımlık kalem grafit elektrotlarla herhangi bir etiketleme yapmadan tekrarlanabilir, kararlılığı ve duyarlılığı yüksek sonuçlar elde edilmiştir.



7. KAYNAKLAR

- [1] Camman, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B. (1991). Chemical Sensors and Biosensors-Principles and Applications, *Angew. Chem. Int. De. Engl.*, 30: 516-539.
- [2] Lowe CR (1984). Biosensors: Trends in Biotechnology. Elsevier, 2(3): 59–65.
- [3] Coulet, P. R. (1991). What is a Biosensor?, *Chapter 1; Biosensor principles and applications*, L.J.Blum, P.R. Coulet (Ed), M. Dekker Inc., New York, 1-6.
- [4] Brett., C. M. A, Brett. A. M.O. (1992). Electrochemistry, Oxford University Press, Oxford.
- [5] Carter, M.T. and Bard, A. J. (1987). Voltammetric studies of the interaction of tris (1,10-phenanthroline) cobalt (III) with DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 109: 7528-7530.
- [6] Jelen, F., Erdem A., Palecek, E. (2002). Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and singlestranded DNA adsorbed at the electrode, *Bioelectrochemistry*, 55: 165167.
- [7] Kelley, S. O., Holmlin, R. E., Stemp, E.D.A. and Barton, J.K. (1997). Photoinduced electron transfer in Ethidium-modified DNA duplexes: dependence on distance and base stacking, *J.Am. Chem. Soc.*, 119: 9861-9870.
- [8] Kolakowski, B., Battaglini, F., Lee, Y.S., Giannoula, K., Mikkelsen, S.R. (1996). Comparison of an intercalating dye and an intercalant-enzyme conjugate for DNA detection in a microtiter-based assay, *Anal. Chem.*, 68: 1197-1200.
- [9] Doğan Topal, B (2011). Bazı antiviral ve antineoplastik ilaç etken maddelerinin DNA ile etkileşimi ve elektrokimyasal analizleri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [10] Kelley SO, Barton JK (1997). Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode. *Bioconjugate Chem*, 8: 31-37.
- [11] Palaska P, Aritzoglou E, Girosi S (2007). Sensitive detection of cyclophosphamide using DNA-modified carbon paste, pencil graphite and hanging mercury drop electrodes. *Talanta*, 72: 1199-1206.
- [12] Liu J, Hail ME, Lee MS, Abid S, Hangeland J, Zein N (1998) Use of affinity capillary electrophoresis for the study of protein and drug interactions. *Analyst*, 123: 1455-1459.
- [13] Congur G, Erdem A, Mese F (2015). Electrochemical investigation of the interaction between topotecan and DNA at disposable graphite electrodes. *Bioelectrochemistry*, 102: 21-28.
- [14] Erdem, A., Ozsoz, M., (2001). Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA, *Analytica Chimica Acta*, 437: 107.
- [15] Fojta, M., Havran, L., Fulneckova, J., Kubicarova, T. (2000). Adsorptive transfer stripping AC voltammetry of DNA complexes with intercalators, *Electroanalysis*, 12: 926-934.

- [16] Nowicka AM, Zabost E, Donten M, Mazerska Z, Stojek Z(2007). Electroanalytical and spectroscopic procedures for examination of interactions between double stranded DNA and intercalating drugs. *Anal. Bioanal. Chem*, 389: 1931–1940.
- [17] Brabec V, Vetterl V, Vrana O (1996). Electroanalysis of biomacromolecules. *Experimental techniques in bioelectrochemistry*, in: V. Brabec, D. Walz, G. Milazzo (Eds.), *Bioelectrochemistry: Principles and Practice*, 3, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 287–359.
- [18] *Analitik Kimyanın Temelleri*, Skoog, D. A., West, D. A., Holler, F. J., Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esma Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu (1996), Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 303-495.
- [19] Brett, C. M. A., Brett, A. M. (1992). *Electrochemistry*, Oxford University Press, 3. baskı
- [20] Brett, A. M. O., Serrano, S. H. P., Macedo, T. A., Raimundo, D., Marques, M. H., LaScalea, M. A. (1996). Electrochemical determination of carboplatin in serum using a DNA-modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 8: 992-995
- [21] Skoog DA, West DA, Holler FJ (1996). *Analitik Kimyanın Temelleri*, (Çev. E. Kılıç, F. Köseoğlu). Bilim Yayıncılık, Ankara, 303-495.
- [22] Tural H, Gökçel İ, Ertuş N (2006). *Enstrümental Analiz I elektroanalitik yöntemler*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, No:186, 2. Baskı, s. 131-206.
- [23] *Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler*, Tural, H., Gökçel, H. İ., Ertuş, F. N., (2006). Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi Yayın No: 186, 2. Baskı, s. 131-206.
- [24] *Enstrümental Analiz*, Yıldız, A., Genç, Ö. (1993)., Hacettepe Yayınları, A-64, s. 289-384
- [25] *Enstrümental Analiz İlkeleri*, Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., Çeviri editörleri; Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H. (1998). Bilim Yayıncılık, 5. Baskı, s. 563-670.
- [26] Skoog, D. A., West, D.A., Holler, F.J., *Analitik Kimyanın Temelleri*, Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esma Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, (1996), Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 303-495
- [27] Erdem, A., Pividori, M. I., Lermo, A., Bonanni, A., del Valle, M., Alegret, S. (2006). Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes, *Sensors and Actuators B-Chemical*, 114: 591-598
- [28] Pietrzyk, D.J.; Frank, C.W. (1979). *Analytical Chemistry*, 2. Baskı, *Academic press*: s. 226-239.
- [29] Evans A (1991). *Potentiometry and ISE*. ACOL, London, 106-198.
- [30] Yıldız, A., Genç, Ö. and Bektaş, S., 1997, *Enstrümental Analiz Yöntemleri*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64,17, Ankara, 331-372 s.
- [31] Erdem A, Ozsoz M (2001a). Interaction of anticancer drug. Epirubicin with DNA, *Analytical Chimica Acta*, 437: 107-114.
- [32] Wang J, Rivas, G, Cai X, Shiraishi, H, Farias PAM, Dontha N, Luo D (1996). Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 332: 139-144.

- [33] Eşkin E. (2013). DNA ve protein analizine yönelik elektrokimyasal sensörlerin Geliştirilmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı YüksekLisans Tezi, 614.02.07.
- [34] Cai X, Rivas G, Farias PAM, Shiraishi H, Wang J, Palecek E (1996). Evaluation of Different Carbon Electrodes for Adsorptive Stripping Analysis of Nucleic acids. *Electroanalysis*, (8-9): 753-758
- [35] 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.
- [36] Marazza, G., Chianella, I., Maccini, M. (1999). Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring *Anal. Chim. Acta*, 387: 297-307.
- [37] Karadeniz, H., Erdem, A., Caliskan, A., Pereira, C.M., Pereira, E.M., Ribiero, J.A. (2007). Electrochemical sensing of silver tags labelled DNA immobilized onto disposable graphite electrodes, *Electrochem. Commun.*, 9: 2167-2173.
- [38] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. (Çeviri Editörleri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Enstrümental Analiz İlkeleri) 1. baskı. Bilim Yayıncılık Ltd.Şti, Ankara.
- [39] Yalçın G (2007). Bazı Kimyasal Maddelerin DNA İle Etkileşmesinin Biyosensörler İle Algılanması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı (YüksekLisansTezi), İzmir, 10.
- [40] Çolak N (2009). DüşükMolekülAğırlıklıMaddelerin DNA Biyosensörleriyle Algılanması. Egeüniversitesi Fen BilimleriEnstitüsü, AnalitikKimyaProgramı(YüksekLisansTezi), 67 syf, İzmir.
- [41] Aladağ N (2008). Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile Vitamin D reseptöründeki Polimorfizmlerin Saptanması. EgeÜniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, AnalitikKimyaProgramı(yükseklisansTezi), İzmir, 12.
- [42] Macdonald JR (1992). Impedance Spectroscopy. *Annals of Biomedical Engineering*, 20: 289-305.
- [43] Monk, P., 2002, *Fundamentals of electroanalytical chemistry*, Willey & Sons, England, 14s.
- [44] Prodromidis MI (2007). Impedimetric Biosensors and Immunosensors. *Pak. J. Anal Environ. Chem*, 8: 69 -71.
- [45] 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.
- [46] 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, 1-6.
- [47] Pividori, M. I., Merkoçi, A., Alegret, S. (2000). Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 15: 291-303.

- [48] Dervan, P. B. (1998). Sequence specific recognition of double helical DNA. A synthetic approach, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2: Ed. Eckstein, F. and Lilley, D.M.J., Springer-Verlag, Berlin, s.49-64.
- [49] DNA structure and Function; Chapter 1- Introduction to the Structure, properties, and reactions of DNA; Editör, R. R. Sinden, Academic Press, California, 1994, s. 1-57.
- [50] Bertino, J. R. (1992). Antineoplastic Drugs, *Textbook of Pharmacology*, Smith, C. M. and Reynard, A. M., Section IX - Cancer Chemotherapy; W. B. Saunders Company, USA;957-958.
- [51] Farmakoloji - İlaç uygulamalarında temel kavramlar, (1992). 63.Bölüm: Antikanser İlaçlar, Prof. Dr. İ. Dökmeci (Ed), Nobel Tıp Kitabevleri, 819-848.
- [52] Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F. S., Dontha, N., Farias, P. A. M., Shiraishi, H. (1996). DNA Biosensor for the detection of hydrazines, *Anal. Chem.*, 68: 2251-2254.
- [53] Wang J, Rivas G, Luo D, Cai X, Valera FS, Dontha N, Farias PAM, Shiraishi H (1996). DNA Biosensor for the detection of Hydrazines. *Anal. Chem*, 68: 2251-2254.
- [54] Palecek E, Fojta M (2001). Electrochemists are developing fast and easy methods for determining nucleic acid sequences and DNA damage. *Analytical Chemistry*, 73: 74A-83A
- [55] Wang, A. H. J. (1987). Interactions between antitumor drugs and DNA, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.1: 52-69. (Ed; Eckstein, F., Lilley, D.M.J., Springer-Verlag Berlin Heidelberg - Germany)
- [56] Mikkelsen S.R. (1996). Electrochemical Biosensor for DNA sequence Detection A Review, *Electroanalysis*, 8: 15-19.
- [57] Erdem A., Ozsoz M. (2002). Electrochemical DNA biosensors based on DNA- Drug interactions, *Electroanalysis*, 14: 965-974.
- [58] Ozsoz M., Erdem A., Kara P., Kerman K., Ozkan D. (2002). Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on guaninesignals, *Electroanalysis*, 15: 613-619.
- [59] Firedman, T., Brown, D. M. (1978). Base specific reactions useful for DNA sequencing: methyleneblue – sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxide modification of thymine, *Nucl. Acids Res.*, 5: 615-623.
- [60] Levison, P. R., Dennis, J. W., Jones, K. D., Philpott, R. W., Taylor, S. L., Grimm, V. (1998). New approaches in the binding of DNA for clinical applications, *Clin. Chem.*, 44: 2060-2061.
- [61] McGown, L. B., Joseph, M. J., Pitner, J. B., Vonk, G. P. ve Linn, C. P. (1995). The Nucleic acid ligand: A new tool for molecular recognition, *Anal. Chem.*, 67: 663 A668 A
- [62] Yardım Y. 2009 Elektrokimyasal DNA biyosensörlerin bazı kullanım alanlarının guanin ya da adenin sinyali üzerinden incelenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi

- [63] Erdem A, Ariksoysal DO, Karadeniz H, Kara P, Sengonul A, Sayiner AA, Ozsoz M (2005b). Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology. *Electrochem, Commun*, 7: 815-820.
- [64] Erdem A, Ozsoz M (2001b). Voltammetry of anticancer drug. Mitoxantrone and DNA, *Turkish Journal of Chemistry*, 25(4): 469-475.
- [65] Karadeniz H, Alparslan L, Erdem A, Karasulu E (2007). Electrochemical investigation of interaction between mitomycin C and DNA in a novel drug-delivery system. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45: 322–326.
- [66] Wang, J., Kawde, A. N. , Erdem, A., Salazar, M. (2001). Magnetic bead based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 126: 2020-2024.
- [67] Bonanni A, Esplandiú MJ, Pividori MI, Alegret S, Del Valle M (2006). Impedimetric genosensors for the detection of DNA hybridization. *Anal Bioanal Chem*, 385: 1195-1201
- [68] Hu, X., Wang, P., Yang, J., Zhang, B., Li, J., Luo, J., Wu, K., (2010) Enhanced electrochemical detection of erythromycin based on acetylene black nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81: 27–31.
- [69] Fojta, M., (2002). Electrochemical Sensors for DNA Interactions and Damage. *Electroanalysis*, 14, 1449-1463.
- [70] Bonanni A, Pumera M (2013). High-resolution impedance spectroscopy for graphene characterization. *Electrochem. Comm*, 26: 52-54.
- [71] Mishra RK, Hayat A, Catanante G, Ocana C, Marty JL (2015). A label free aptasensor for Ochratoxin A detection in cocoa beans: An application to chocolate industries. *Analytica Chimica Acta*, 889: 106-112
- [72] Erdem A, Congur G (2013). Impedimetric detection of in situ interaction between anti-cancer drug bleomycin and DNA. *Internatiol Journal Of Biological Macromolecules*, 61: 295-301
- [73] Sirajuddin M, Ali S Badshah (2013). Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124: 1–19.
- [74] Topkaya SN, Cetin AE (2019). Determination of Electrochemical Interaction between 2-(1H-benzimidazol-2-yl) Phenol and DNA Sequences. *Electroanalysis*, 31: 1571-1578.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Fatma BUDAK
Doğum Yeri ve Tarihi	Darende-15.09.1995
Medeni Hali	Bekâr
Yabancı Dil	İngilizce
E-posta Adresi	ftmbdkk04@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise	Hekimhan Anadolu Lisesi, 2013
Lisans	Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, 2017