



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

**TETRASİKLİN VE OKSİTETRASİKLİN'İN DNA  
BİYOSENSÖRLERİ İLE İNCELENMESİ**

**ŞEYMA YILMAZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI**

**SIVAS - 2021**

**T.C.  
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TETRASİKLİN VE OKSİTETRASİKLİN'İN DNA  
BİYOSENSÖRLERİ İLE İNCELENMESİ**

**ŞEYMA YILMAZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ANALİTİK KİMYA ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. GÜLTEKİN GÖKÇE**

**SİVAS - 2021**

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.

## ÖZET

### TETRASİKLİN VE OKSİTETRASİKLİN'İN DNA BİYOSENSÖRLERİ İLE İNCELENMESİ

Şeyma YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gültekin GÖKÇE

2021, 51 sayfa

Tetrasiklin, insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir grup antibiyotiğe verilen genel isimdir. Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin'de bu antibiyotiklerin türevlerindedir. Bu tezde tek ve çift sarmal balık sperm DNA'nın Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin ile etkileşimi üzerine çalışılmıştır. Yöntem olarak dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametrisi ve kare dalga voltametrisi kullanılmıştır. Çalışmanın aşamaları sırasıyla; kalem grafit elektrotların aktive edilmesi, aktif elektrot yüzeyine DNA probunun tutturulması ve DNA'nın Tetrasiklin grubu antibiyotiklerle etkileşiminin voltametrik olarak katı elektrot yüzeyinde ve çözelti ortamında incelenmesidir. Çalışılan ortamlarda tek ve çift sarmal DNA'nın Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin ile etkileşiminde guanin bazına ve ilaçlara ait yükseltgenme sinyallerinde meydana gelen değişimlerden yararlanılmıştır. Çalışmada referans elektrot olarak Ag/AgCl karşıt elektrot olarak platin tel çalışma elektrodu olarak da kalem grafit elektrot (PGE) kullanılmıştır. Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından ECZ-068 numaralı proje ile desteklenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tetrasiklin, Oksitetrasiklin, Kalem grafit elektrot, tek sarmal DNA, Diferansiyel Puls Voltametrisi, Kare Dalga Voltametrisi

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF TETRACYCLINE AND OXYTETRACYCLINE BY DNA BIOSENSORS

Şeyma YILMAZ

Master Thesis

Department of Analytical Chemistry

Supervisor :Prof. Dr. Gültekin GÖKÇE

2021, 51 pages

Tetracycline is the general name given to a group of antibiotics widely used in the treatment of human and animal infections. Tetracycline and Oxytetracycline are also derivatives of these antibiotics. In this thesis, the interaction of single and double stranded fish sperm DNA with Tetracycline and Oxytetracycline was studied. Cycling voltammetry, differential pulse voltammetry and square wave voltammetry were used as the electrochemical methods. The stages of the study, respectively; activating pencil graphite electrodes, attaching the DNA probe to the active electrode surface, and investigating the interaction of DNA with Tetracycline group antibiotics voltammetrically on the solid electrode surface and in solution phase. Changes in the oxidation signals of guanine base and drugs were used as reference in the interaction of single and double stranded DNA with Tetracycline and Oxytetracycline in the studied media. In the study, as the reference electrode, as the Ag / AgCl counter electrode, the platinum wire was used as the working electrode and the pencil graphite electrode (PGE). This thesis was supported by Cumhuriyet University Scientific Research Projects Department with the project number of ECZ - 068.

**Keywords:** Tetracycline, Oxytetracycline, Pencil graphite electrode, Single-stranded DNA, Differential Pulse Voltammetry, Square Wave Voltammetry

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>KATKI BELİRTME/TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>KISALTMALAR/SİMGELER</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1.GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi .....	1
1.2. Araştırmanın Amacı .....	3
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. Elektrokimya .....	4
2.1.1. Elektrokimyasal Tabakalar .....	4
2.1.2. Voltametri.....	5
2.1.3. Voltametrik Cihazlar .....	6
2.1.3.1 Çalışma Elektrodu .....	7
2.1.3.2. Referans Elektrot .....	10
2.1.3.3. Karşıt Elektrot.....	10
2.1.4. Voltametrik Yöntemler.....	11
2.1.4.1. Dönüşümlü voltametri (CV).....	11
2.1.4.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV).....	11
2.1.4.3. Kare Dalga Voltametrisi (SWV) .....	12
2.1.4.4. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS).....	12
2.2. Biyosensör.....	13
2.2.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu.....	13
2.2.2. Nitelikli Biyosensörlerde Aranılan Özellikler .....	13
2.2.3. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Biyolojik Bileşenler.....	14
2.2.3.1. Nükleik Asit ve DNA .....	14
2.2.3.2. İnterkalasyon .....	16
2.2.3.3. DNA ile İlgili Kavramlar.....	17

2.3. Genosensörler (DNA Biyosensörleri) .....	17
2.3.1. DNA – İlaç Etkileşimine Dayalı DNA Biyosensörleri .....	18
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>19</b>
3.1.Kullanılan Cihazlar .....	19
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	19
3.3. Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin Hakkında Genel Bilgi .....	20
3.4. Deneyde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....	21
3.4.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması .....	21
3.4.1.1. 0,5 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanması (pH 4,81; ABS) .....	21
3.4.1.2. 0,02 M Tris -EDTA tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 8,0).....	21
3.4.1.3. Redoks Çözeltisinin Hazırlanışı .....	21
3.4.2. DNA Çözeltilerinin Hazırlanması .....	21
3.5. Kullanılan Yöntem .....	22
3.5.1. Kullanılan Elektrotların Deneye Hazırlanması .....	22
3.6. Aktive Edilmiş PGE Yüzeyine DNA Tutturulması .....	23
3.6.1. fs dsDNA ve fs ssDNA'nın PGE Yüzeyine İmmobilizasyonunun İncelenmesi .....	23
3.6.1.1. DNA İmmobilizasyonunda Uygun Etkileşim Süresinin İncelenmesi .....	23
3.6.1.2. DNA İmmobilizasyonunda Uygun Derişim Değerinin İncelenmesi .....	24
3.7. DNA-TET ve DNA-OTC Etkileşiminin İncelenmesi.....	24
3.7.1. Elektrot Yüzeyindeki Etkileşimlerin İncelenmesi.....	24
3.7.1.1. PGE/DNA ile TET ve OTC etkileşimi için süre optimizasyonu.....	25
3.7.1.2. PGE/DNA ile TET ve OTC tayini.....	25
3.7.1.3. PGE/TET ve PGE/OTC ile DNA etkileşiminin incelenmesi .....	25
3.7.2. Çözelti Ortamında DNA-İlaç Etkileşimlerinin İncelenmesi .....	25
<b>4.BULGULAR ve TARTIŞMA .....</b>	<b>26</b>
4.1. CV Yöntemi Kullanılarak Yapılan Deneylere İlişkin Bulgular ve Tartışma ..	26
4.2. SWV Yöntemi Kullanılarak Yapılan Deneylere İlişkin Bulgular ve Tartışma .....	27
4.2.1. fs dsDNA ve fs ssDNA'nın PGE Yüzeyine İmmobilizasyonuna İlişkin Bulgular.....	27

4.2.1.1. fs dsDNA ve fs ssDNA İmmobilizasyonunda En Uygun Etkileşim Süresinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular.....	27
4.2.1.2. fs dsDNA ve fs ssDNA PGE İmmobilizasyonunda En Uygun Etkileşim Miktarının Belirlenmesine İlişkin Bulgular.....	28
4.2.2. DNA-TET ve DNA-OTC Etkileşimine İlişkin Bulgular ve Tartışma ....	30
4.2.2.1. Elektrot Yüzeyindeki Etkileşimlerin İncelenmesi.....	30
4.2.2.2. Çözelti Ortamındaki Etkileşimlerin İncelenmesi .....	39
<b>5. SONUÇ .....</b>	<b>43</b>
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>45</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>51</b>





## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Elektrokimyasal Sistem.....	4
Şekil 2.2. Elektrot Yüzeyindeki Tabakaların Şematize Olarak Gösterilmesi.....	5
Şekil 2.3. Voltametrde Kullanılan Uyarma Sinyalleri.....	6
Şekil 2.4. Üçlü Elektrot Sistemi .....	7
Şekil 2.5. Karbona dayalı elektrot çeşitleri. (A) Karbon pastası elektrodu (CPE), (B) kalem grafit elektrot (PGE), (C) perde baskılı elektrot (SPE), (D) Camsı karbon elektrot (GCE) [23] .....	7
Şekil 2.6. Karbon Pastası Elektrodu .....	8
Şekil 2.7. Perde Baskılı Elektrotun Yapısı .....	8
Şekil 2.8. Camsı Karbon Elektrot.....	9
Şekil 2.9. Kalem Grafit Elektrot.....	9
Şekil 2.10. Referans Elektrot.....	10
Şekil 2.11. Karşıt Elektrot .....	11
Şekil 2.12. Elektrokimyasal Hücrede İmpedimetrik Ölçümde Oluşan Nyquist Eğrisi .....	12
Şekil 2.13. Biyosensörlerin Genel Çalışma Mekanizması [40].....	13
Şekil 2.14. Nükleik Asitlerin Yapısını Oluşturan Nükleotidlerin Oluşum Şeması ....	15
Şekil 2.15. DNA MOLEKÜLÜ (a) ve DNA çift sarmal (b) yapısı.....	16
Şekil 3.1. Tetrasiklin'in Açık Kimyasal Formülü .....	20
Şekil 3.2. Oksitetrasiklin'in Açık Kimyasal Formülü.....	20
Şekil 3.3. Deneylede Kullanılan Yöntem.....	22
Şekil 3.4. Uç kesme işlemi .....	23
Şekil 4.1. $10^{-3}$ M TET'nin Dönüşümlü Voltamogramı .....	26
Şekil 4.2. $10^{-3}$ M OTC'nin Dönüşümlü Voltamogramı .....	26
Şekil 4.3. PGE yüzeyine immobilize edilen fs dsDNA'nın (a) 3 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika farklı sürelerde etkileşimi sonrasında SWV yöntemi ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram.....	27
Şekil 4.4. PGE yüzeyine immobilize edilen fs ssDNA'nın (a) 3 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika farklı sürelerde etkileşimi sonrasında SWV yöntemi ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram.....	28
Şekil 4.5. PGE yüzeyine immobilize edilen fs dsDNA'nın (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 ppm farklı derişimlerde etkileşimi sonrasında SWV yöntemi ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram.....	29
Şekil 4.6. PGE yüzeyine immobilize edilen fs ssDNA'nın (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 ppm farklı derişimlerde etkileşimi sonrasında SWV yöntemi ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram.....	29
Şekil 4.7. PGE/dsDNA'nın farklı sürelerdeki (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika TET çözeltisinde bekletilip SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram .....	30

<b>Şekil 4.8.</b> PGE/ssDNA'nın farklı sürelerdeki (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika TET çözeltisinde bekletilip SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram .....	31
<b>Şekil 4.9.</b> PGE/dsDNA'nın farklı sürelerdeki (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika OTC çözeltisinde bekletilip SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram .....	31
<b>Şekil 4.10.</b> PGE/ssDNA'nın farklı sürelerdeki (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika OTC çözeltisinde bekletilip SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram .....	31
<b>Şekil 4.11.</b> PGE/dsDNA'nın farklı derişimlerdeki (a) 0 (b) 0,005 (c) 0,01 (d) 0,025 (e) 0,05 (f) 0,1 (g) 0,25 (h) 0,5 ppm TET çözeltisinde 10 dakika sabit sürede bekletilip SWV tekniği ile ölçülen ortalama guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram .....	33
<b>Şekil 4.12.</b> PGE/ssDNA'nın farklı derişimlerdeki (a) 0 (b) 0,005 (c) 0,01 (d) 0,025 (e) 0,05 (f) 0,1 (g) 0,25 0,5 ppm TET çözeltisinde 10 dakika sabit sürede bekletilip SWV tekniği ile ölçülen ortalama guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram .....	33
<b>Şekil 4.13.</b> PGE/dsDNA'nın farklı derişimlerdeki (a) 0 (b) 0,005 (c) 0,01 (d) 0,025 (e) 0,05 (f) 0,1 (g) 0,25 (h) 0,5 ppm OTC çözeltisinde 10 dakika sabit sürede bekletilip SWV tekniği ile ölçülen ortalama guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram .....	34
<b>Şekil 4.14.</b> PGE/ssDNA'nın farklı derişimlerdeki (a) 0 (b) 0,005 (c) 0,01 (d) 0,025 (e) 0,05 (f) 0,1 (g) 0,25 (h) 0,5 ppm OTC çözeltisinde 10 dakika sabit sürede bekletilip SWV tekniği ile ölçülen ortalama guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram .....	34
<b>Şekil 4.15.</b> PGE/dsDNA-TET etkileşiminde TET derişiminin guanin pik akımındaki değişimine etkisinden elde edilen kalibrasyon grafiği .....	35
<b>Şekil 4.16.</b> PGE/ssDNA-TET etkileşiminde TET derişiminin guanin pik akımındaki değişimine etkisinden elde edilen kalibrasyon grafiği .....	35
<b>Şekil 4.17.</b> PGE/dsDNA-OTC etkileşiminde OTC derişiminin guanin pik akımındaki değişimine etkisinden elde edilen kalibrasyon grafiği .....	36
<b>Şekil 4.18.</b> PGE/ssDNA-OTC etkileşiminde OTC derişiminin guanin pik akımındaki değişimine etkisinden elde edilen kalibrasyon grafiği .....	36
<b>Şekil 4.19.</b> PGE/TET-dsDNA etkileşimine ait 10 dakika etkileşim sürelerinde SWV tekniğinden elde edilen TET (a, b, c) ve guanin sinyalleri [a: 4 ppm TET, b: 4 ppm TET + 4 ppm dsDNA, c: 4 ppm TET + 20 ppm dsDNA] .....	37
<b>Şekil 4.20.</b> PGE/TET-ssDNA etkileşimine ait 10 dakika etkileşim sürelerinde SWV tekniğinden elde edilen TET (a, b, c) ve guanin sinyalleri [a: 4 ppm TET, b: 4 ppm TET + 4 ppm ssDNA, c: 4 ppm TET + 20 ppm ssDNA] .....	38

<b>Şekil 4.21.</b> PGE/OTC-dsDNA etkileşimine ait 10 dakika etkileşim sürelerinde SWV tekniğinden elde edilen OTC (a, b, c) ve guanin sinyalleri [a: 4 ppm OTC, b: 4 ppm OTC + 4 ppm dsDNA, c: 4 ppm OTC + 20 ppm dsDNA] .....	38
<b>Şekil 4.22.</b> PGE/OTC-ssDNA etkileşimine ait 10 dakika etkileşim sürelerinde SWV tekniğinden elde edilen OTC (a, b, c) ve guanin sinyalleri [a: 4 ppm OTC, b: 4 ppm OTC + 4 ppm ssDNA, c: 4 ppm OTC + 20 ppm ssDNA].....	39
<b>Şekil 4.23.</b> Çözelti ortamında dsDNA - TET etkileşiminden elde edilen SWV voltamogramı (a: 5 ppm dsDNA, b: 1ppm TET, c: 5 ppm dsDNA + 1 ppm TET, d: 5 ppm dsDNA + 4 ppm TET, e: 1ppm dsDNA + 4 ppm TET) .....	40
<b>Şekil 4.24</b> Çözelti ortamında ssDNA - TET etkileşiminden elde edilen SWV voltamogramı (a: 5 ppm ssDNA, b: 1ppm TET, c: 5 ppm ssDNA + 1 ppm TET, d: 5 ppm ssDNA + 4 ppm TET, e: 1ppm ssDNA + 4 ppm TET) .....	40
<b>Şekil 4.25.</b> Çözelti ortamında dsDNA - OTC etkileşiminden elde edilen SWV voltamogramı (a: 5 ppm dsDNA, b: 1ppm OTC, c: 5 ppm dsDNA + 1 ppm OTC, d: 5 ppm dsDNA + 4 ppm OTC, e: 1 ppm dsDNA + 4 ppm OTC).....	41
<b>Şekil 4.26.</b> Çözelti ortamında ssDNA - OTC etkileşiminden elde edilen SWV voltamogramı (a: 5 ppm ssDNA, b: 1 ppm OTC, c: 5 ppm ssDNA + 1 ppm OTC, d: 5 ppm ssDNA + 4 ppm OTC, e: 1 ppm ssDNA + 4 ppm OTC).....	41

## KISALTMALAR/SİMGELER

<b>TET</b>	Tetrasiklin
<b>OTC</b>	Oksitetrasiklin
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>CPE</b>	Karbon pasta elektrodu
<b>PGE</b>	Kalem grafit elektrot
<b>GCE</b>	Camsı karbon elektrot
<b>AuE</b>	Altın elektrot
<b>CV</b>	Dönüşümlü voltametri
<b>DPV</b>	Diferansiyel Puls Voltametrisi
<b>SWV</b>	Kare Dalga Voltametrisi
<b>EIS</b>	Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi
<b>ABS</b>	Asetat Tampon Çözelti
<b>PBS</b>	Fosfat Tampon Çözelti
<b>R<sub>fs</sub></b>	Aktarılan yüke karşı gerçekleşen direnç
<b>C<sub>dl</sub></b>	Çift tabaka kapasitansı
<b>W</b>	Warburg empedansı

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Canlılar yaşamlarını devam ettirebilmek için çevrelerindeki değişimleri algılayıp buna uyum sağlamalıdır. Örneğin yemek sonrasında kan şekerinin yükselmesiyle çeşitli hücreler tarafından tespit edilerek pankreastan insülin salgılanması, köpekbalıklarının çok uzaktaki kanı algılaması, sürüngenlerin çevrelerindeki en ufak sıcaklık değişimini fark etmesi biyolojik algılama mekanizmalarına örnek olarak verilebilir. Bu algılama ve uyum sağlama gücü bilim insanlarına ilham kaynağı olmuştur [1-2]. Bu gözlemlerin sonucunda biyosensörler geliştirilmiştir.

Biyosensörlerden tıbbi uygulamalar, endüstriyel atık su denetimi, ilaç üretimi, kalite kontrol, tarım ve veterinerlik gibi birçok alanda yararlanılmaktadır.

Elektrokimyasal sensörlerin yapılarına enzim, doku, nükleik asit vb. gibi biyolojik maddeler eklendiğinde elektrokimyasal sensörlerin en yaygın kullanım alanlarından biri olan biyosensörler oluşur [3]. Biyosensörler, biyolojik durumu algılayan ve işlenebilir bir sinyale dönüştüren analitik cihazlardır [4]. Biyosensörde mutlaka biyolojik bir madde kullanılmalıdır. Bu maddeler DNA, hücre, doku, enzim, antikor vb. olabilir.

Biyosensörlerde biyolojik algılayıcı olarak DNA kullanılması; DNA ile etkileşime giren maddelerin miktar tayini, DNA-madde etkileşiminin tespit edilmesinde oldukça önemlidir [5-6]. DNA'nın biyolojik madde olarak kullanıldığı biyosensörlere *DNA* biyosensörleri (Genosensörler) adı verilir [7]. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri kolay uygulanabilirlik ve düşük maliyeti açısından diğer uygulamalara göre daha avantajlı olabilmektedir. DNA biyosensörleri, bazı ilaçların DNA'ya olan etkilerinin belirlenmesinde, madde etkileşim ve mutasyon tayinlerinde, bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların hızlı bir şekilde ortaya çıkarılmasında kullanılabilirler [8-9].

Kimyasal maddelerin ve ilaç moleküllerinin etkileşiminin yeni ve farklı yöntemlerle incelenmesi yeni ilaç tasarımı, tayin ve yöntemi geliştirme açısından önemlidir. Maddenin DNA ile etkileşimi sonucunda, madde sinyali ya da DNA'daki adenin veya guanin bazlarının sinyallerinin artma veya azalmasına bağlı olarak

elektrokimyasal tayin gerçekleştirilmektedir. Elektrokimyasal tayinlerde, incelenecek analit türlerinin farklı türlerde sonuç verme ilkesinden yararlanır. Potansiyeldeki bu değişim, formal potansiyel değişimi veya elektron transfer hızındaki değişimin sonucudur [10-11].

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri uygulama yöntemleri bakımından karmaşıklığından uzak ve az sayıda ekipmanla basit, kolay, ucuz ve diğer yöntemlere kıyasla daha hızlı ve az miktarda madde ile ölçüm yapmaya olanak sağlamaktadır.

Polinükleotit bir zincir üzerindeki bazların dizilim sırasına DNA dizilimi denmektedir. Organizmanın oluşumu için gerekli genetik emirlerin verilmesinden bu dizilim sorumludur ve organizmanın karakteristik özelliklerini (dış görünüşü, metabolizması, karakteri ve davranışları, hastalıklarla savaşma gücü, yetenekleri, vb.) belirlemektedir.

DNA, kalıtsal bilgilerimizin ana kaynağı ve hücreyi yöneten biyomoleküldür. DNA vücutta çift sarmal şekilde bulunur ve her sarmal birbirine dört adet nükleotid ile bağlanır. Biyo-algılama yüzeyi nükleotid olan elektrokimyasal DNA biyosensörleri, nükleotidlerin elektroaktivitelerinin açıklanmaya çalışılması ile DNA hedefli bazı ilaçların ya da maddelerin DNA'ya olan etkilerinin ve etkileşim mekanizmasının aydınlatılmasında, bu maddelerin toksisitesinin belirlenmesinde, hibridizasyon indikatörü olup olmayacağını saptanmasında ya da nokta mutasyonlarının tayinlerinde kullanılırlar [12].

Bazı hastalıklara ait DNA dizilerinin tanımlanmasında nükleik asit hibridizasyonundan faydalanılmıştır. Elektrokimyasal DNA biyosensörünün hedeflerinden biri de DNA'daki hibridizasyonun tayinidir [13-14]. Diziye özgün ve seçimli olarak tayin yapabilen DNA biyosensörleri, bir DNA probu içeren kısım ve tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştüren çevirim sisteminden oluşmaktadır [15-16].

DNA da ki hasarları tespit etmek, anti kanser ilaçlarından ve tehlikeli maddelerden kaynaklanan hasarları hızlı ve hassas bir yöntemle bulabilmek için birçok çalışma yapılmaktadır. Ayrıca DNA ile ilaç etkileşimlerini anlamak için elektrokimyasal DNA biyosensör çalışmaları yapılmaktadır [17-18].

## 1.2. Araştırmanın Amacı

Bu tez çalışmasında tasarımı yapılan elektrokimyasal DNA biyosensörü ile DNA-TET ve DNA-OTC etkileşim özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Tek sarmal ve çift sarmal DNA'nın Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin ile olan etkileşimleri ayrı ayrı incelenerek hangi türün tanıma yüzeyi olarak kullanılmasında daha etkin olacağı gösterilecektir. TET-DNA ve OTC-DNA etkileşimi özellikleri aydınlatılacak ve tayin sınırları 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.

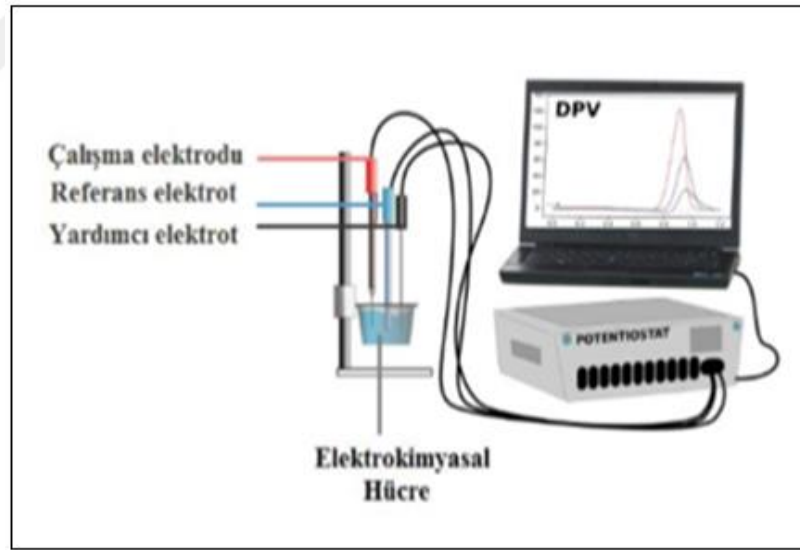
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Elektrokimya

Yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinde ortaya çıkan elektron alışverişinin incelendiği bilim dalına elektrokimya denir. Elektrokimya, elektrik enerjisi üreten veya elektrik enerjisiyle yürüyen elektron aktarımlarının yer aldığı bilim dalıdır [19].

Elektron değişimleri elektrokimyasal hücrede gerçekleşir. Hücrede incelenilecek maddeyi içeren çözelti, maddenin kimyasal dönüşümünün gerçekleştiği elektrotlar ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir dış devreden oluşur. Kullanılan elektrotlar çalışma elektrotu, referans elektrot ve yardımcı elektrotur.

Diğer analiz yöntemlerine kıyasla elektroanalitik yöntemlerin iki avantajı vardır. İlki, ölçümler genellikle yükseltgenme basamağına göre spesifiktir, ikincisi ise çalışılan cihazların diğer çalışmalardaki cihazlara oranla maliyetinin düşük olmasıdır.

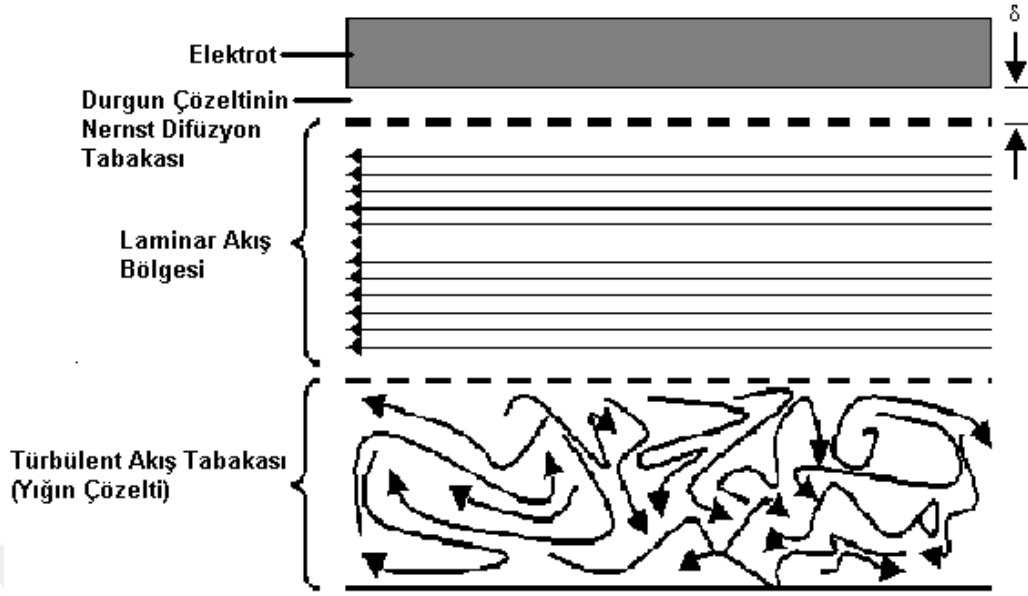


Şekil 2.1. Elektrokimyasal Sistem

#### 2.1.1. Elektrokimyasal Tabakalar

Elektrodun kendisine bitişik çözelti tabakasına elektron verip alması, ölçüm aşamasında elektrot yüzeyi ve analit sıvısı arasında heterojen tabakalar meydana gelmesine neden olur. Bu tabakaların birleşimi aşağıdaki şekilde görülmektedir.





Şekil 2.2. Elektrot Yüzeyindeki Tabakaların Şematize Olarak Gösterilmesi

**Laminer akış bölgesi:** Akışın herhangi bir çalkantıya uğramadan elektrot yüzeyine paralel bir yönde birbirleri üzerinden düzenli bir şekilde akmasıdır.

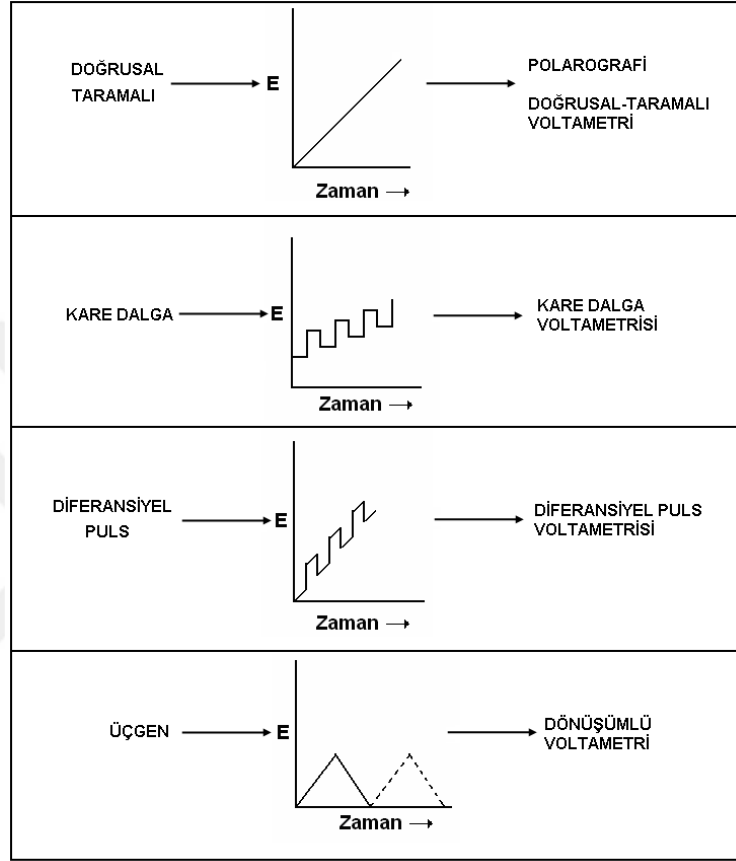
**Nernst difüzyon tabakası:** Elektrot yüzeyinden  $\delta$  cm uzaktaki laminar akımın hızı, elektrot ve sıvı arasında oluşan sürtünmeden dolayı sıfıra yaklaşır ve bu şekilde elektrot çevresindeki ince ve durgun çözelti tabakası meydana gelir.

**Türbülent akış tabakası:** Elektrottan uzak çözelti yığnında gözlenir.

### 2.1.2. Voltametri

Voltametri; akımın, elektroda uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesine dayanan elektrokimyasal yöntemdir. Voltametriye biri çalışma elektrodu olmak üzere iki elektrot arasına bir potansiyel farkı uygulanır. Bu uygulama hücrede reaksiyon gerçekleşmesine neden olur ve sonunda bir akım oluşur. Değeri farklılaştırılan potansiyelle karşı, hücrede çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasında meydana gelen akım ölçülür. Analizi yapılacak uygun bir çözelti ile elektroliz hücresi doldurulur. Adım adım artan potansiyel farkları uygulanır ve hücreden geçen akım değerleri okunur. Potansiyel farkı akıma karşı grafiğe geçirildiğinde bir eğri elde edilir. Bu eğriye akım-potansiyel eğrisi, kullanılan elektrodun cinsine göre de polarogram veya voltamogram adı verilir.

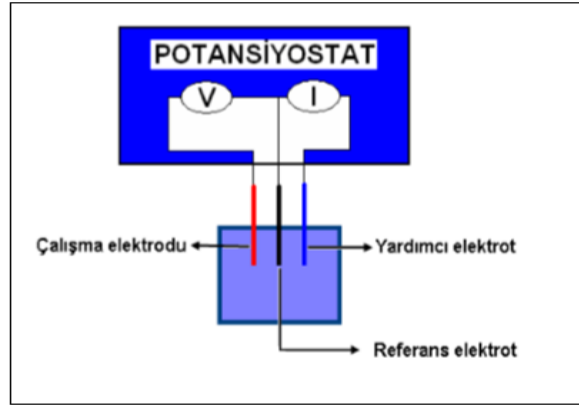
Voltametrizde uygulanacak yönteme göre elektroliz hücresine uyarma sinyali uygulanır. Voltametrizde sıklıkla kullanılan uyarma sinyalleri; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır.



Şekil 2.3. Voltametrizde Kullanılan Uyarma Sinyalleri

### 2.1.3. Voltametrik Cihazlar

Voltametrik lçmler için oluŐturulan düzenek, analit ve destek elektrottan oluşmuş hücreye daldırılan  elektrottan yapılmıŐtır [20].



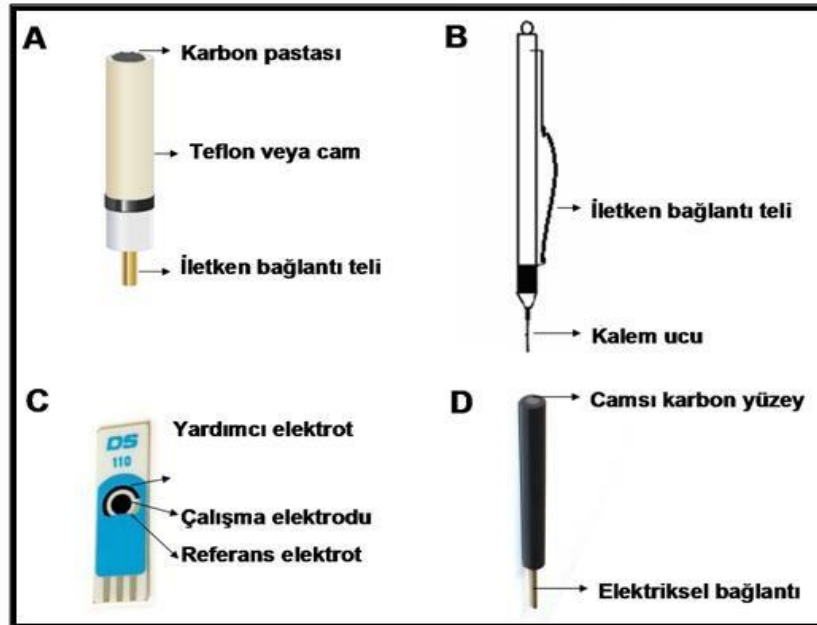
Şekil 2.4. Üçlü Elektrot Sistemi

### 2.1.3.1 Çalışma Elektrodu

Potansiyeli doğrusal olarak değişen elektrotlardır. En yaygın kullanılan çalışma elektrotları; altın, cıva, platin, camsı karbon, grafit ve karbon bazlı elektrotlardır.

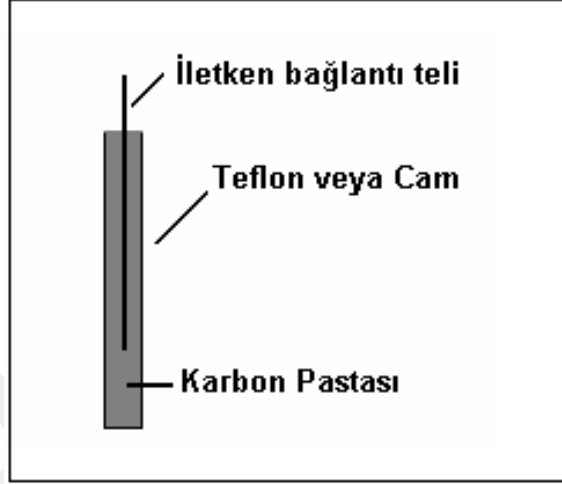
#### a) Karbon esaslı elektrotlar

Hem yükseltgenme hem de indirgenme alanında geniş potansiyel aralıklarında çalışma imkanı sunar [21]. Geniş potansiyel aralığı, düşük elektriksel direnç, tekrarlanabilir yüzey yapısından dolayı oldukça kullanışlıdır [22].



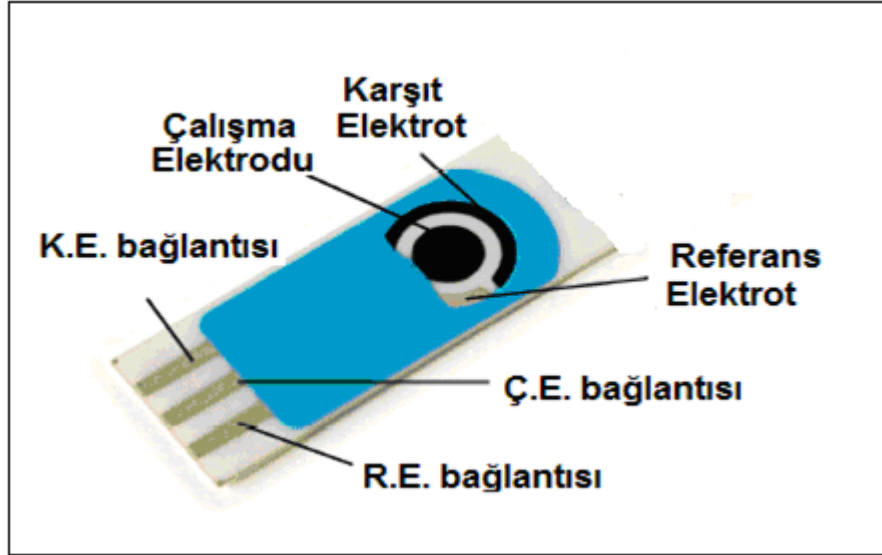
Şekil 2.5. Karbona dayalı elektrot çeşitleri. (A) Karbon pastası elektrodu (CPE), (B) kalem grafit elektrot (PGE), (C) perde baskılı elektrot (SPE), (D) Camsı karbon elektrot (GCE) [23]

- ✦ **Karbon Pastası Elektrodu (CPE):** Toz grafitin organik bir sıvı ile karıştırılmasıyla hazırlanır. Tüpün içi bu karışım ile doludur. İletken bağlantı teli için platin veya bakır bir tel kullanılır. Oldukça geniş potansiyel aralığına sahiptir.



Şekil 2.6. Karbon Pastası Elektrodu

- ✦ **Perde Baskılı Elektrot (SPE):** Uzun süreli kararlılık ve yüksek tekrarlanabilirlik özelliklerine sahiptir.



Şekil 2.7. Perde Baskılı Elektrotun Yapısı

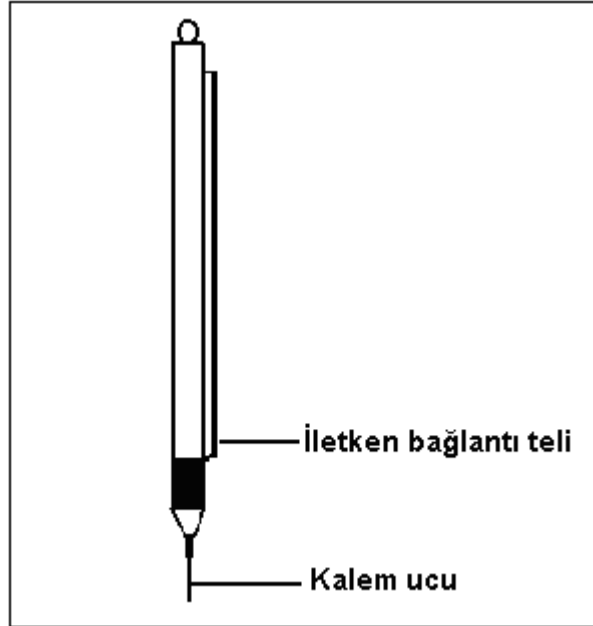
- ✦ **Camsı Karbon Elektrot (GCE):** Yüzeyinin düzgün ve pürüzsüz olmasından dolayı elektrokimyasal yanıt verme özelliği daha iyidir. Kimyasal tepkimelere girmemesi, tekrarlanabilirliği, geniş potansiyel aralığı vb. özelliklerinden dolayı

oldukça kullanışlıdır. Karbon pastası elektrotlarına göre fiziksel olarak çok daha dayanıklıdır.



Şekil 2.8. Camsı Karbon Elektrot

- ✦ **Kalem Grafit Elektrot (PGE):** Düşük tayin sınırı, yüksek tekrarlanabilirlik, ucuz ve pratik olması sebebiyle oldukça yaygın kullanılan bir elektrot türüdür. Yumuşak ve gözenekli bir yapıda olduğundan yüksek adsorbsiyon özelliği vardır [24,26].



Şekil 2.9. Kalem Grafit Elektrot

### b) Cıva elektrot

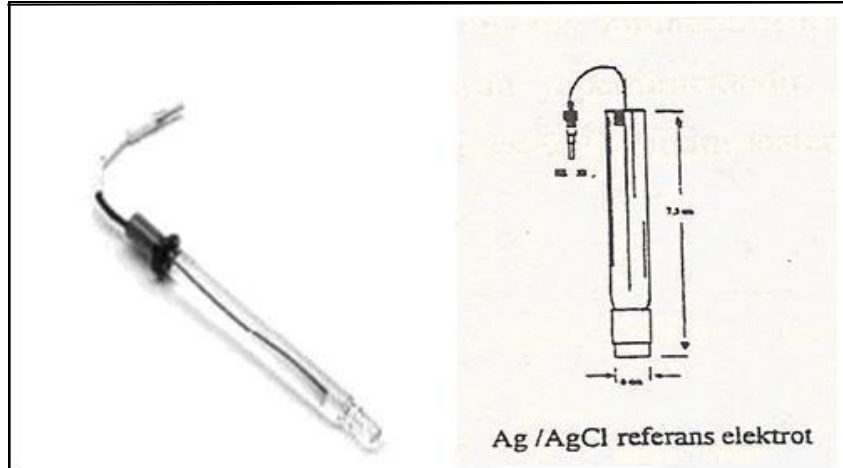
Düşük negatif potansiyel aralıklarında çalışılabilmesi, pratik bir şekilde oluşturulabilen yeni bir cıva damlası ile yeni bir metalik yüzey oluşturulabilmesi ve birçok metal iyonunun cıva yüzeyinde tersinir reaksiyon verebilmesi özelliklerinden ötürü kullanışlı bir elektrot türüdür. Toksik bir metal olması ve pozitif potansiyel aralığına sahip olması dezavantajlarıdır.

### c) Metal elektrot

Geniş pozitif potansiyel aralığına ve yüksek elektron transfer kinetiklerine sahiptirler. Platin ve altın en sık kullanılan metal elektrot çeşitlerindedir.

### 2.1.3.2. Referans Elektrot

Deney süresince potansiyeli sabit tutulan elektrottur [27]. En çok tercih edilen elektrotlardan biri ve çalışmamızda kullandığımız elektrot Ag/AgCl referans elektrodudur. Üzerinden akım geçtiğinde yükseltgenir ve ortamdaki aşırı klorürde çökdikleri için elektrot yüzeyindeki derişimlerde değişiklik olmaz ve potansiyelleri akımdan bağımsız hale gelmiş olur [28].



Şekil 2.10. Referans Elektrot

### 2.1.3.3. Karşıt Elektrot

Platin tel ya da cıva havuzu biçiminde olan, elektriğin çözelti içinden çalışma elektroduna aktarılmasını sağlayan elektrottur. Çalışma elektrodu ile bir çift oluşturur fakat potansiyel tayininde rol oynamaz [28].



**Şekil 2.11.** Karşıt Elektrot

## **2.1.4. Voltametrik Yöntemler**

### **2.1.4.1. Dönüşümlü voltametri (CV)**

Yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarının gözlemlenmesinde, reaksiyon sonucu oluşan ara ürünlerin incelendiği voltametrik yöntemdir. Gerilim sabit hızla belli bir değere çıkarılır, daha sonra aynı hızla ilk değere döndürülür ve bu şekilde dönüşümlü voltamogram elde edilir [29]. Durgun bir çözeltilde üçlü elektrot sistemi ile çalışır. Taramanın ters döndüğü potansiyeller dönüş potansiyeli olarak adlandırılır. Tarama süreleri 1 ms den başlayıp 100 s ve üzeri değerlere kadar çıkabilir. Dönüşümlü Voltametrisinin kullanım alanı farklı şartlar altında elektrokimyasal süreçlerle ilgili nitel bilgi sağlamaktır [30].

Dönüşümlü voltametrinde başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline doğru bir gerilim uygulanır. Bu gerilim pozitif veya negatif olabilir. Uygulanan gerilim bitiş potansiyelinden başlayıp başlangıç potansiyeline doğru devam eder [31-32]. Genellikle indirgenme/yükseltgenme reaksiyonlarında oluşan ara ürünlerin tespiti voltamogramlarla mümkün olmaktadır.

### **2.1.4.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)**

Diferansiyel Puls Voltametrisinde iki tane akım ölçümü yapılmaktadır. Bunlardan ilki pulsdan hemen önce diğeri ise pulsun bitiminden hemen önce yapılır. Uygulanan bu pulsların akım farkı  $\Delta_i$  sembolü ile gösterilir. Bu iki akım arasındaki fark alınıp bulunan akım değeri potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Diferansiyel eğride pik yüksekliği derişimle doğru orantılıdır.

DPV'nin avantajlarından biri, 0,04 ile 0,05 aralığındaki yarı dalga potansiyelli maddeler için bile ayrı pik maksimumları vermesidir [33].

#### 2.1.4.3. Kare Dalga Voltametrisi (SWV)

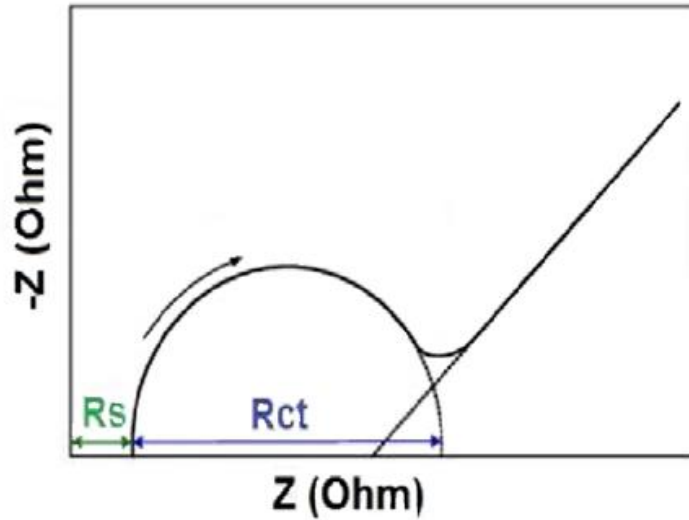
Oldukça hızlı ve duyarlı bir analitik yöntemdir. SWV düşük derişimlerde de çalışmalar yapılabilir [34]. DPV'ne kıyasla daha hassas ve hızlıdır. Son derece hızlı ölçüm yapıldığından birden fazla voltametrik taramanın ortalaması alınarak kesinlik artırılabilir. Tayin sınırları  $10^{-7}$  ile  $10^{-8}$  M arasındadır [35-37].

#### 2.1.4.4. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)

Empedans spektroskopisi, elektrokimya, malzeme bilimi, biyoloji ve tıp, yarı-iletken endüstrisi ve sensörler gibi birçok uygulama alanında kullanılan güçlü bir ölçüm yöntemidir. Elektrokimyasal bir hücrede potansiyelin zamana bağlı değişimi sonucu oluşan alternatif akıma karşı bir direnç meydana gelir. Elektrokimyasal tepkimelerin olduğu durumlarda yük transfer değerleri hakkında bilgi vermektedir.

$$Z = E_t/I_t$$

E sisteme uygulanan potansiyel, I uygulanan potansiyel sonucunda açığa çıkan alternatif akımdır. EIS verileri Nyquist ve Bode eğrileri yardımıyla bulunur [38,39]. Empedansın gerçek ( $Z'$ ) ve hayali ( $Z''$ ) olmak üzere iki bileşeni vardır. Grafikte x eksenini gerçek, y eksenini hayali bileşen ifade eder.



Şekil 2.12. Elektrokimyasal Hücrede İmpedimetrik Ölçümde Oluşan Nyquist Eğrisi



## 2.2. Biyosensör

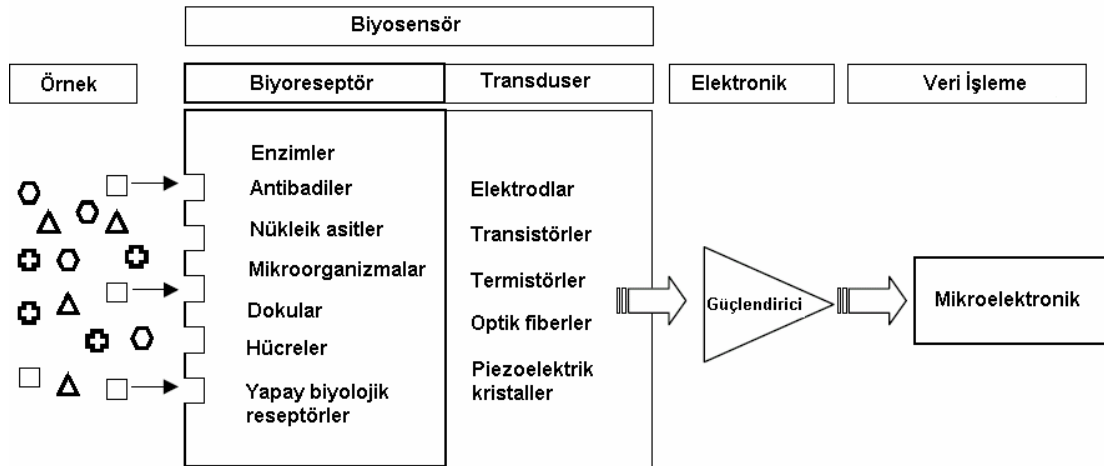
Biyosensör, biyomoleküllerin çeşitli ortamlarda izlenmesinde kalitatif ve/veya kantitatif tayinini mümkün kılan cihaz olarak tanımlanabilir. Analiz edilecek malzeme olarak mutlaka biyolojik bir madde kullanılır. Etkileşimin sonucunda çok seçici, hassas ve daha hızlı ölçüm yapabilmektedir.

Biyosensörün amacı, analitin ( analiz edilecek madde ) miktarıyla orantısal olarak sayısal elektrik sinyali üretmektir.

### 2.2.1. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonu

Biyosensör sistemi üç temel bileşenden oluşmaktadır.

- **Biyomolekül (algılama kısmı):** Seçici tanıma mekanizması.
- **Çevirici kısım:** Seçici mekanizmada incelenen madde ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştüren kısım.
- **Elektronik kısım:** Sinyallerin ekrana yansıdığı bölüm.



Şekil 2.13. Biyosensörlerin Genel Çalışma Mekanizması [40]

### 2.2.2. Nitelikli Biyosensörlerde Aranılan Özellikler

Biyosensörler sekiz parametreye göre nitelendirilirler:

**Duyarlılık:** Cihazın analitteki değişime birebir cevap vermesidir. Duyarlılık yüksekse analitteki birim değişim sensörün ekranından okunur.

**Seçicilik:** Cihazın sadece analite özgünlüğünü gösterir. Cihaz başka reaktiflere ilgi göstermez ve hatalı sonuç vermez.

**Ölçüm aralığı:** Cihazın ölçebildiği analit konsantrasyonun aralığıdır. Analit belli bir konsantrasyondan az veya çoksa cihaz iyi bir duyarlılıkta sonuç vermeyebilir.

**Ölçüm süresi:** Cihazın ölçme hızını gösterir.

**Tutarlılık:** Cihazın sonuçlarındaki tutarlılığı ifade eder.

**Tespit sınırı:** Cihazın tespit edebileceği en düşük analit konsantrasyonunu ifade eder.

**Ömrü:** Cihazın, performansında gözle görülür bir azalma olmadan verdiği hizmet ömrünü ifade eder.

**Kararlılık:** Belirli bir süre içinde cihazın duyarlılığındaki değişimleri dikkate alan bir kalite ölçüm değeridir.

### **2.2.3. Biyosensör Tasarımında Kullanılan Biyolojik Bileşenler**

Biyosensör yüzeylerinde antikor, enzim, doku, nükleik asit, hücre vb. gibi biyolojik maddeler kullanılır. Enzimlerin, uygun sıcaklık ve pH koşullarına bağlı olması nedeniyle kullanımları zordur.

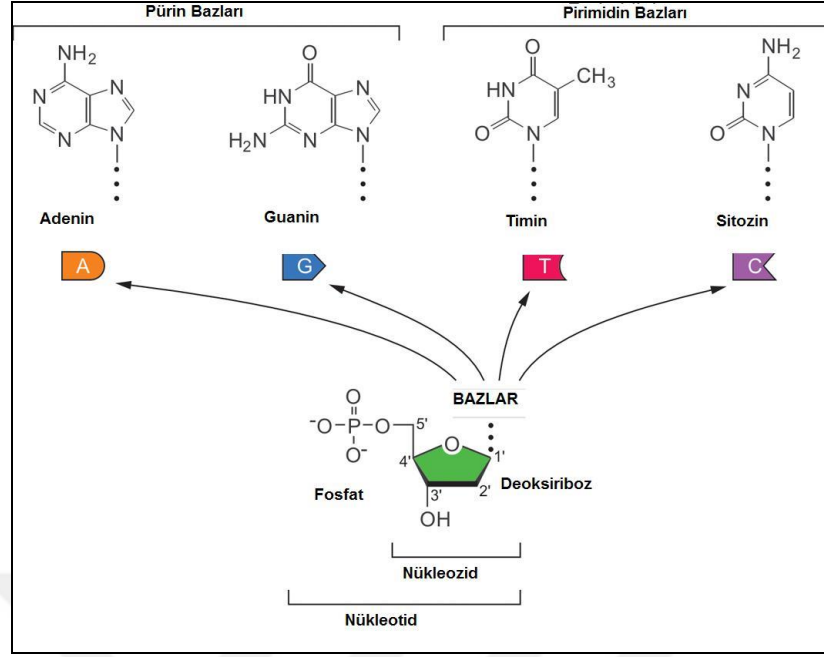
Doku parçalarının canlı tutulmaları, beslenmeleri ve atıklarının uzaklaştırılması gereksinimi sebebiyle biyosensörlerde immobilize edilmeleri zordur.

#### **2.2.3.1. Nükleik Asit ve DNA**

Nükleik asitler, genetik bilgilerin kodlandığı ve bu kodların nesilden nesile aktarılmasını sağlayan ve birçok nükleotidin birleşmesi ile meydana gelen moleküllerdir.

Nükleik asitler, adenin ve guanin (pürin) ile sitozin, timin ve urasil (pirimidin) bazlarını içerirler. Pirimidin bazlarından timin yalnızca DNA'da, urasil yalnızca RNA'da bulunurken sitozin her ikisinde de bulunmaktadır. Büyük molekül yapıda şeker ve fosfat fosfodiester bağı ile birbirine bağlanır ve molekülün omurgasını oluşturur. Azotlu bazlar ise 2 omurgayı bir arada tutmaktadır.

Nükleotid yapısında azotlu bir baz, beş karbonlu şeker ve fosfat grubu içerir.



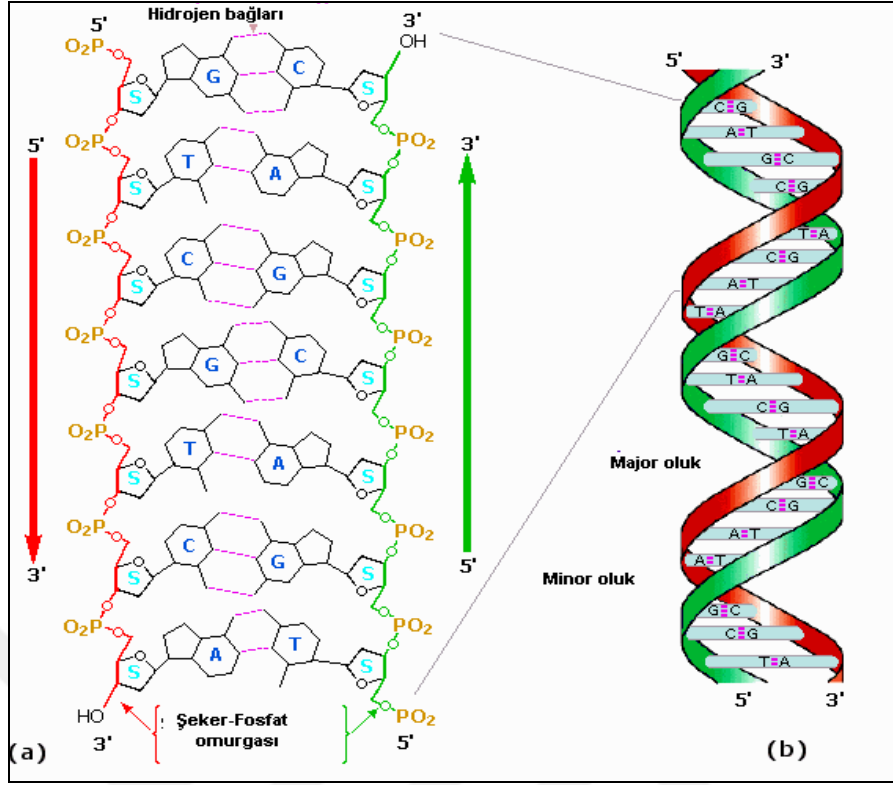
**Şekil 2.14.** Nükleik Asitlerin Yapısını Oluşturan Nükleotidlerin Oluşum Şeması

^

İki tip nükleik asit vardır. Bunlar DNA (deoksiribonükleik asit) ve RNA (ribonükleik asit)' dir. Her iki nükleik asit de nükleotidlerin birleşimi ile meydana gelmektedir. Ribonükleotidlerin birleşmesi RNA, deoksiribonükleotidlerin birleşmesi sonucu da DNA oluşur [41,42].

Deoksiribonükleik asit (DNA) tüm organizmalar ve bazı virüslerin canlılık işlevleri ve biyolojik gelişmeleri için gerekli olan genetik talimatları taşıyan bir nükleik asittir. Çok sayıda nükleotidin bir araya gelmesiyle DNA molekülü oluşur. Genetik enformasyon nükleotitlerin dizilişinde bulunmakta olup, genler DNA zinciri boyunca uzanır. Nükleotitlerin üç tanesi bir şifredir ve protein sentezinde bir aminoasite karşılık gelir.

DNA molekülü, sarmal şeklinde kıvrılmış, iki kollu merdiven şeklindedir. Bazlar arasında yer alan hidrojen bağları DNA molekülünün iki zincirini bir arada tutmaktadır. Nükleotitlerin arasındaki bazların eşleşmeleri; A karşısına T; G karşısına C şeklindedir. Bu yüzden çift sarmal DNA yapısının bir zincirindeki baz dizisi verildiğinde diğer zincirdeki baz dizisi de bulunabilir [43].



**Şekil 2.15.** DNA MOLEKÜLÜ (a) ve DNA çift sarmal (b) yapısı

DNA'nın iki zinciri, birbirine sadece H bağları ve hidrofobik etkileşimlerle bağlıdır, bu yüzden nükleotidler arasındaki kovalent bağlar herhangi bir kopma olmaksızın çözülebilir. Bu durum **denatürasyon** olarak isimlendirilir. Aynı şekilde zincirler H bağları ile yeniden birleşip çift sarmal yapıyı oluşturabilir. Bu durum ise **renatürasyon** olarak adlandırılır [44].

### 2.2.3.2. İnterkalasyon

Mutajen özelliğe sahip bazı maddelerin iki baz çifti arasına girmesi olayına **interkalasyon** denir [45]. Bu olayın gerçekleşmesi için baz çiftinin arasının açılması gerekir, bunun olabilmesi için de DNA sarmalının aksi yönde hareket ederek gevşemesi gerekir. İnterkalasyon gerçekleştiğinde DNA sentezi bozulur ve zehirlenme veya mutasyonlar meydana gelir. Bu yüzden DNA interkalatörleri genellikle kanserojendir. İnterkalatörler DNA transkripsiyonuna engel olduğu için hızla büyüyen kanser hücrelerini engellemek amacıyla kemoterapide kullanılırlar.

### 2.2.3.3. DNA ile İlgili Kavramlar

**Oligonükleotit:** Birkaç nükleotitten oluşmuş DNA parçalarıdır.

**Dinükleotit:** İki nükleotidin bir araya gelmesiyle oluşur.

**Trinükleotit:** Üç nükleotidin bir araya gelmesiyle oluşur.

**Prob:** Genetik çalışmalarda kullanılan, baz dizisi belli oligonükleotitlerdir.

**Hedef Dizi (Target):** Prob dizisine karşılık gelen oligonükleotit.

**Baz Çifti:** Karşılıklı gelen iki bazı ifade eder. Örneğin, A.T veya G.C baz çiftleri gibi.

**Rastgele Dizi (Non complementary-NC):** Oligonükleotitlerin asıl diziden farklı baz dizilimine sahip olmalarıdır.

**Yanlış Eşleşen Dizi (Mismatch-MM):** En az bir bazı hedef diziden farklı olan oligonükleotitlerdir.

### 2.3. Genosensörler (DNA Biyosensörleri)

Tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlerdir [46-49]. Genosensörler, DNA ile etkileşime giren maddelerin tayininde ve hibridizasyon incelenmesinde kullanılır. Madde DNA etkileşimi sonucu, incelenen maddenin ya da DNA'daki bir bazın sinyalindeki farklılıktan yola çıkılarak madde tayini yapılır.

DNA'nın elektrot yüzeyine tutturulması üç yöntemle gerçekleşir. Bunlar; adsorpsiyon, elektrostatik bağlanma ve kovalent bağlanmadır.

Yüksek hassasiyette, düşük maliyetli, taşınabilir boyutlarda küçültülebilir ve tek kullanımlık olmaları gibi avantajlarından dolayı genosensörlerin kullanımı oldukça artmıştır [50-52].

Genosensörlerin, biyolojik silah, gıda ve çevreyi olumsuz etkileyen mikroorganizmaların tayininde ve bulaşıcı hastalıkların tanısında kullanımı oldukça artmıştır. Doku, hücre gibi biyolojik maddelerden mutasyon dizileri veya hastalıklar üzerine çalışılmaktadır ve bu çalışmalar ışığında virüs, bakteri ve mantar kökenli hastalıklar tespit edilebilir.

### 2.3.1. DNA – İlaç Etkileşimine Dayalı DNA Biyosensörleri

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile ilaç-DNA etkileşimi üzerine birçok çalışma yapılmaktadır. İlaç-DNA etkileşimiyle DNA yapısındaki bir baz sinyali veya ilaç sinyalindeki değişimler analiz edilerek ilaç-DNA etkileşimi hakkında bilgi edinilir [53-56]. Etkileşim türlerine elektrostatik bağlanma, çapraz bağlanma ve interkalasyon örnek verilebilir.

Antikanser ilaçların DNA ile etkileşiminin incelenmesi ve bu doğrultuda elektrokimyasal yöntemlerin kullanılması Genosensörlerin önemini arttırmaktadır [55,56]. Antikanser ilaç moleküllerinin DNA ile etkileşimlerinin hızlı ve güvenilir tespiti, farmakolojik çalışmalar için oldukça önemlidir.

İlaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal biyosensörlerle tayininde;

1. DNA'nın guanin veya adenin bazlarının sinyalinde,
2. DNA ile etkileşen ilacın verdiği sinyalde meydana gelen artma veya azalma ile birçok tayin yapılabilmektedir.

DNA biyosensörlerinin esası DNA hibridizasyonuna dayanmaktadır. İlk aşamada hedef diziye karşılık gelen oligomer (tek sarmal DNA) elektrot yüzeyine bağlanır. Daha sonra örnek çözeltiye daldırılan elektrot yüzeyinde hibrit oluşumu sağlanır. Son olarak hibridizasyon transduser sinyali ile gözlemlenir [57].

## 3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 3.1.Kullanılan Cihazlar

Ölçümler ve deneyler sırasında kullanılan tüm cihaz ve donanımlar:

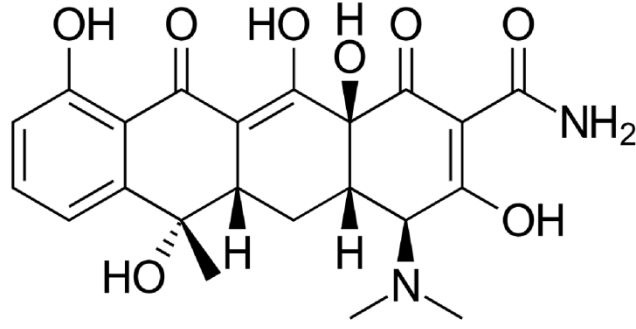
- ✦ Kalem grafit elektrot (çalışma elektrodu) (0,5 mm Rotring Kalem 0,5 Tombow HB model)
- ✦ Ag/AgCl referans elektrodu
- ✦ Yardımcı elektrot (Platin tel)
- ✦ Ses Titreşimli Temizleyici (Bandelin Sonorex)
- ✦ Manyetik Karıştırıcı (ARE 2-Velp ve elektro-mag)
- ✦ Manyetik karıştırıcı (AGE Velp)
- ✦ Vortex (Velp Scientifica)
- ✦ Duyarlı Terazi (precisa XB 220A)
- ✦ pH-metre (8WTW Inolab pH 720)
- ✦ Potansiyostat;  $\mu$ -AUTOLAB TYPE III (FRA 2 modüllü- Chemie, Hollanda)

### 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

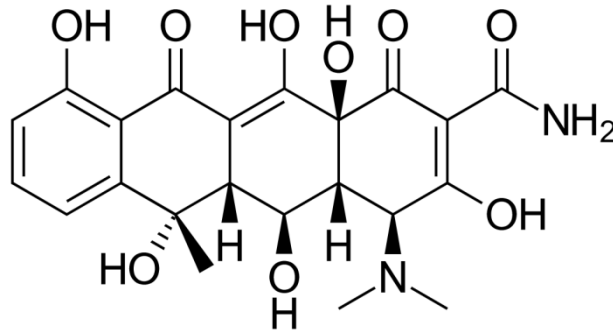
- ✦ Tetrasiklin (Sigma)
- ✦ Oksitetrasiklin (Sigma)
- ✦ Balık sperm DNA'dan elde edilen tek ve çift sarmal DNA (ssDNA-dsDNA)
- ✦ Potasyum Dihidrojen Fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck)
- ✦ Potasyum Bifosfat( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Merck)
- ✦ Hidroklorik asit (HCl, Merck, %37)
- ✦ Asetik asit (Merck, %99-100)
- ✦ Potasyum Klorür (KCl, Merck)
- ✦ Tris hidroklorik asit (Sigma)
- ✦ Sodyum Hidroksit (NaOH, Merck)
- ✦ Sodyum klorür(NaCl, Merck)
- ✦ Potasyum Ferrisiyanür ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , Sigma)
- ✦ Potasyum Ferro Siyanür ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , Sigma)

### 3.3. Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin Hakkında Genel Bilgi

	Tetrasiklin	Oksitetrasiklin
Molekül Ağırlığı	444,435 g/mol	460,439 g/mol
Kimyasal Formülü	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>



Şekil 3.1. Tetrasiklin'in Açık Kimyasal Formülü



Şekil 3.2. Oksitetrasiklin'in Açık Kimyasal Formülü

Tetrasiklin bir grup antibiyotiğe verilen genel isimdir. Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin de bu antibiyotik grubundandır. Kısa süre etkili ve doğal antibiyotiklerdir.

Bakteriyostatik yapıya sahiptirler. Yani bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önleyerek bakterinin vücudun savunma mekanizması tarafından kolayca yok edilmesine yardımcı olurlar.

Tetrasiklinler, duyarlı mikroorganizmaların neden olduğu kulak burun boğaz ve alt solunum yolu infeksiyonları, üriner sistem infeksiyonları, deri ve yumuşak doku infeksiyonları, akne, difteri, kızıl, basilli ve amipli dizanteri gibi rahatsızlıklarda kullanılır.



Oksitetrasiklin, geniş spektrumlu olma özelliğinden dolayı birçok farklı enfeksiyonun tedavisinde kullanılır. Solunum yolu, sinüs, orta kulak, deri, idrar yolları iltihaplarından bel soğukluğuna ve ağır akne tedavisine kadar birçok enfeksiyonun tedavisinde etkili bir kullanım alanı vardır.

### **3.4. Deneyde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması**

#### **3.4.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması**

Tampon çözeltilerin hazırlanmasında ultra saf su kullanıldı. Cam şişelerde ve serin ortamda muhafaza edildi.

##### **3.4.1.1. 0,5 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanması (pH 4,81; ABS)**

Bir miktar saf suya 28,9 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  çözeltisi eklendi. Çözelti içerisine, pH 4,81 oluncaya kadar 0,1M NaOH damla damla eklendi. İyonik şiddeti dengede tutamak için 1,168g NaCl çözeltiye ilave edildi. Çözelti 1000 ml oluncaya kadar saf su ilave edildi.

##### **3.4.1.2. 0,02 M Tris -EDTA tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 8,0)**

1 litrelik Tris-Edta çözeltisi, saf suya eklenen 0,788 g Tris HCl ve 0,186 g EDTA ile hazırlandı.

##### **3.4.1.3. Redoks Çözeltisinin Hazırlanışı**

0,164 g  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  ve 0,208g  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  ile 200 ml'lik çözelti hazırlandı. İyon şiddetini dengede tutmak için 1,49 g KCl çözelti içerisine eklendi.

#### **3.4.2. DNA Çözeltilerinin Hazırlanması**

Bu çalışmada balık sperm DNA kullanıldı. Balık sperm DNA çift sarmal DNA (fs dsDNA) ve tek sarmal DNA (fs ssDNA) olarak hazırlandı. Stok şeklinde hazırlanan DNA çözeltileri, 1000ppm olacak şekilde 0,02 M Tris-EDTA çözeltisi (pH 7,0) ile hazırlandı. Çözelti 20°C'de karanlık ortamda muhafaza edildi. Deneylerde kullanılacak DNA çözeltisi istenilen derişimlerde 0,5 M asetat tampon çözeltisi (pH 4,81) kullanılarak hazırlandı. ssDNA'da ek olarak DNA'nın kendisini eşlemesini engellemek amacıyla denatüre işlemi (deneye başlanmadan önce 5 dk. kaynayan suda bekletilip hızlıca soğutularak) yapıldı.

### 3.5. Kullanılan Yöntem

Yapılan tüm elektrokimyasal deneylerde NOVA 2.1. yazılım programını içeren  $\mu$ -AUTOLAB TYPE III (FRA 2 modüllü) potansiyostat cihazı kullanıldı. Yöntem olarak, diferansiyel puls voltametri (DPV), dönüşümlü voltametri (CV) ve kare dalga voltametri (SWV) kullanıldı. Deneylerde, yardımcı elektrot olarak platin tel, çalışma elektrodu olarak tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) ve referans elektrodu olarak ise Ag/AgCl referans elektrodu kullanıldı. Tez çalışmalarında kullanılan elektrotların aktivasyonu, elektrot yüzeyinde DNA-analit etkileşimi ve DNA'nın elektrot yüzeyine immobilizasyon incelenme basamaklarında literatürdeki yöntemler kullanıldı [58,59].

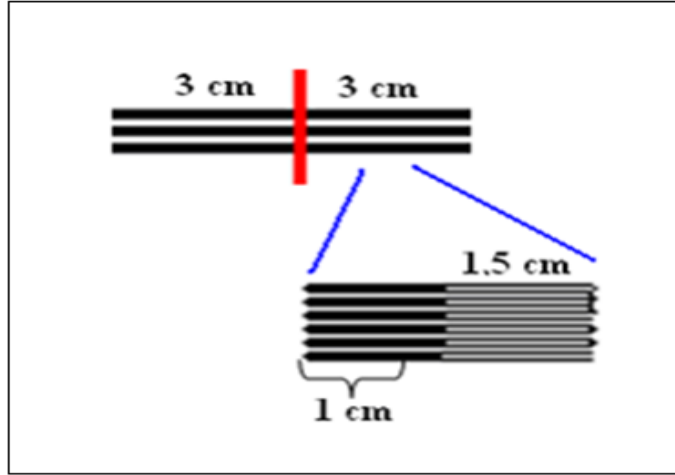


Şekil 3.3. Deneylerde Kullanılan Yöntem

#### 3.5.1. Kullanılan Elektrotların Deneye Hazırlanması

Deneyde kullanılan ve çalışma elektrodu olan Tombow marka tek kullanımlık kalem grafit elektrotlar (PGE) 3cm boyunda kesildi. Kalem uçları çözeltili içerisinde 1,5 cm'lik bölümü batacak şekilde hücre içerisine yerleştirildi [25].

Bir hücre içerisine ABS (pH 4,81) konuldu. ABS içerisine daldırılan elektrotların yüzey aktivasyonunu yapmak için 30 saniye boyunca +1,4 V potansiyel uygulandı.



Şekil 3.4. Uç kesme işlemi

### 3.6. Aktive Edilmiş PGE Yüzeyine DNA Tutturulması

#### 3.6.1. fs dsDNA ve fs ssDNA'nın PGE Yüzeyine İmmobilizasyonunun İncelenmesi

PGE yüzeyine DNA immobilizasyonunda adsorpsiyon metodu kullanıldı. Aktive edilmiş PGE yüzeylerine DNA immobilizasyonu aşamaları fs ssDNA ve fs dsDNA için ayrı ayrı uygulandı. Tüm ölçümler 0,5 M ABS (pH 4,81) çözeltisinde alındı. Elde edilen voltamogramlarda guanin yükseltgenmesine ait akım sinyalleri incelenerek ssDNA ve dsDNA için süre ve derişim optimizasyonları yapıldı.

SWV tekniğinde kullanılan parametreler;

- Basamak potansiyeli: 0,005 V
- Modülasyon genliği: 0,02 V
- Tarama hızı: 0,125 V/s

#### 3.6.1.1. DNA İmmobilizasyonunda Uygun Etkileşim Süresinin İncelenmesi

**fs dsDNA immobilizasyonunda aktive edilmiş PGE'lerle yapılan süre optimizasyonu:**

30 ppm fs dsDNA, 0,5M ABS çözeltisi ile hazırlandı. Viallere 110 µl koyuldu ve yüzeyi DPV yöntemi ile aktive edilmiş olan PGE'ler viallere daldırıldı. PGE'ler dsDNA içerisinde farklı sürelerde (3, 5 ,10 ,15, 20 dakika) bekletildi ve bekleme işlemi bittikten

sonra 3'er saniye etkileşim çözeltisinin çözücüsüne daldırılıp yıkandı. Bu aşamadan sonra SWV tekniği ile ölçüm alındı.

#### **fs ssDNA aktive edilmiş PGE'lerle yapılan immobilizasyonunda süre optimizasyonu:**

30 ppm fs dsDNA, 0,5 M ABS çözeltisi ile hazırlandı. Viallere 110 µl koyuldu ve yüzeyi DPV yöntemi ile aktive edilmiş olan PGE'ler viallere daldırıldı. PGE'ler ssDNA içerisinde farklı sürelerde (3, 5, 10, 15, 20 dakika) bekletildi ve bekleme işlemi bittikten sonra 3'er saniye etkileşim çözeltisinin çözücüsüne daldırılıp yıkandı. Bu aşamadan sonra SWV tekniği ile ölçüm alındı. Ölçüm sonucunda voltamogramlardaki akım değişimleri gözlemlendi ve optimum etkileşim süresi tespit edildi.

#### **3.6.1.2. DNA İmmobilizasyonunda Uygun Derişim Değerinin İncelenmesi**

##### **fs dsDNA immobilizasyonunda dsDNA'nın derişim optimizasyonu:**

Aktive edilmiş PGE'ler değişik derişimlerde (10, 20, 30, 40, 50 ppm) hazırlanan fs dsDNA çözeltilerinden 110 µL alınarak viallere koyulan çözeltilere daldırıldı ve daha önce tayin edilen sabit bekleme süresince bu çözeltilerde bekletildikten sonra SWV ölçümlerinden elde edilen guanin pik sinyallerindeki değişimden yararlanarak derişim optimizasyonu yapıldı.

##### **fs ssDNA immobilizasyonunda ssDNA'nın derişim optimizasyonu:**

Aktive edilmiş PGE'ler değişik derişimlerde (10, 20, 30, 40, 50 ppm) hazırlanan fs ssDNA çözeltilerinden 110 µL alınarak viallere koyulan çözeltilere daldırıldı ve daha önce tayin edilen sabit bekleme süresince bu çözeltilerde bekletildikten sonra SWV ölçümlerinden elde edilen guanin pik sinyallerindeki değişimden yararlanarak derişim optimizasyonu yapıldı.

#### **3.7. DNA-TET ve DNA-OTC Etkileşiminin İncelenmesi**

##### **3.7.1. Elektrot Yüzeyindeki Etkileşimlerin İncelenmesi**

Optimum koşullarda DNA immobilizasyonu yapılan PGE'lerin (PGE/DNA) ilaçlar ile katı elektrot yüzeyindeki etkileşiminde dsDNA ve ssDNA'nın TET ve OTC ile etkileşim süresi optimize edildi. Tayin edilen optimum etkileşim süresinde ilaçların derişimleri değiştirilerek PGE/DNA ile ilaç tayinleri yapıldı ve kalibrasyon grafikleri oluşturuldu.

SWV yönteminin kullanıldığı deneylerde guanin pik akımında meydana gelen değişimler takip edildi.

### **3.7.1.1. PGE/DNA ile TET ve OTC etkileşimi için süre optimizasyonu**

DPV yönteminde, optimum koşullarda önceden fs dsDNA ve fs ssDNA immobilizasyonu gerçekleştirilen PGE'ler, 0,5 M ABS (pH: 4,81) çözeltisinde hazırlanan sabit derişimde TET veya OTC içeren 110 µL' lik viallere daldırıldı ve değişik etkileşim sürelerinde bekletildi ve sonra SWV ölçümlerinden elde edilen guanin pik sinyallerindeki değişimden yararlanarak süre optimizasyonu yapıldı.

### **3.7.1.2. PGE/DNA ile TET ve OTC tayini**

DPV yönteminde, optimum koşullarda önceden fs dsDNA ve fs ssDNA immobilizasyonu gerçekleştirilen PGE'ler, 0,5 M ABS (pH: 4,81) çözeltisinde hazırlanan farklı derişimlerde TET veya OTC içeren 110 µL' lik viallere daldırıldı ve daha önce belirlenen sabit etkileşim süresi kadar bu çözeltilerde bekletildi ve sonra SWV ölçümlerinden elde edilen guanin pik sinyallerindeki değişimden yararlanarak ilaç tayinleri yapıldı ve kalibrasyon grafikleri çizildi.

### **3.7.1.3. PGE/TET ve PGE/OTC ile DNA etkileşiminin incelenmesi**

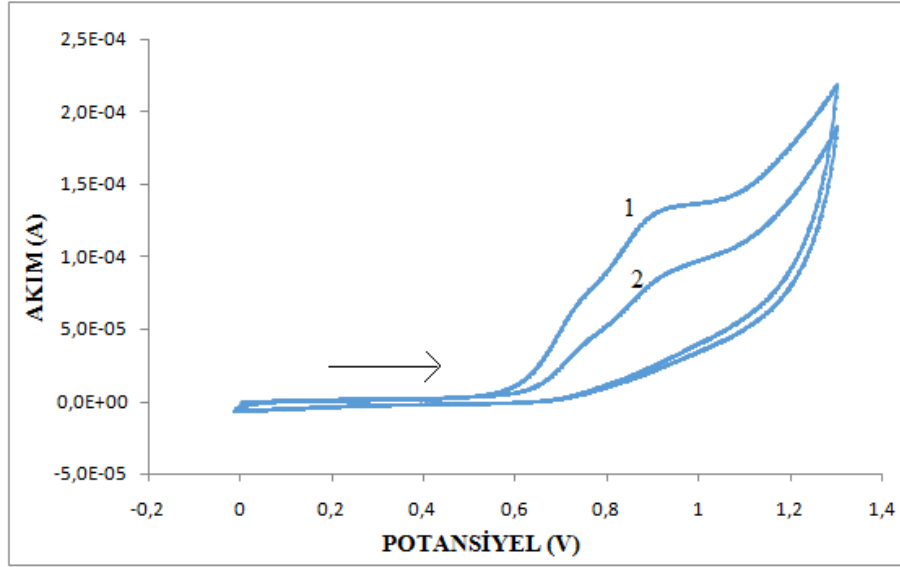
İlaç-DNA etkileşim mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlaması amacıyla, yukarıdaki işlemlerin aksine, önce PGE yüzeyine ilaçlar immobilize edildi. Bunun için aktive edilen PGE'ler ABS çözeltisinde hazırlanan belirli derişimdeki ilaç çözeltilerinde belirli süre bekletilerek ilaçların katı elektrot yüzeyine immobilizasyonu sağlandı. Bu elektrotlar daha sonra ABS'de hazırlanan muhtelif derişimlerdeki ssDNA ve dsDNA çözeltileri etkileştirildi. Etkileşim öncesi ve sonrası SWV ölçümleri alınarak hem guanin hem de ilaç piklerinde meydana gelen değişimler incelendi.

### **3.7.2. Çözelti Ortamında DNA-İlaç Etkileşimlerinin İncelenmesi**

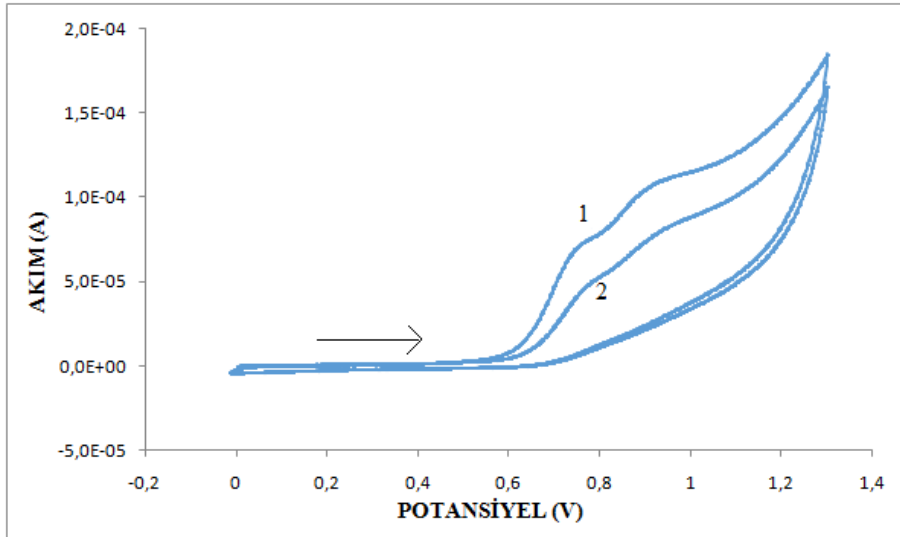
Katı elektrot yüzeyinden farklı olarak, çözelti ortamında da DNA-ilaç etkileşimi incelendi. ABS tamponunda hazırlanan hem ssDNA hem de dsDNA'nın muhtelif derişimlerdeki çözeltileri yine ABS'de hazırlanan TET ve OTC'nin muhtelif derişimlerdeki çözeltileri ile belirli sürede karıştırıldı ve bu ortamda PGE ile SWV ölçümleri alındı.

## 4.BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. CV Yöntemi Kullanılarak Yapılan Deneylere İlişkin Bulgular ve Tartışma



Şekil 4.1.  $10^{-3}$  M TET'nin Dönüşümlü Voltamogramı



Şekil 4.2.  $10^{-3}$  M OTC'nin Dönüşümlü Voltamogramı

TET ve OTC'nin ABS tamponunda  $10^{-3}$  M derişiminde çözeltileri hazırlandı, 0,0 - 1,4 V potansiyel aralığında 100 mV/s tarama hızıyla dönüşümlü voltamogramları alındı. Her iki türün de elektroaktif olduğu, sırasıyla 0,70 V ve 0,90 V potansiyel civarında iki adet tersinir olmayan yükseltgenme pikleri verdiği ve elektrokimyasal davranışları arasında önemli bir fark olmadığı görülmüştür. İkinci taramalarda

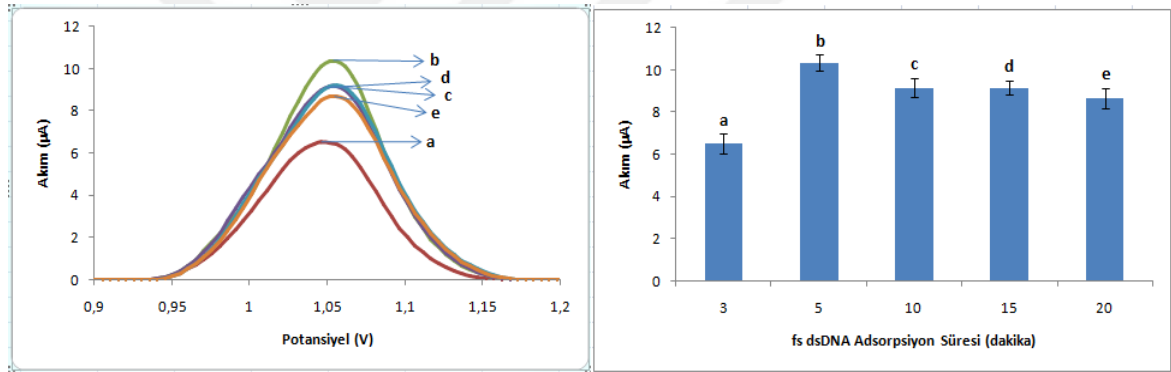
yükseltgenme pik akımlarında görülen belirgin azalmanın ise her iki türün de elektrot yüzeyine adsorbe olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

## 4.2. SWV Yöntemi Kullanılarak Yapılan Deneylere İlişkin Bulgular ve Tartışma

### 4.2.1. fs dsDNA ve fs ssDNA'nın PGE Yüzeyine İmmobilizasyonuna İlişkin Bulgular

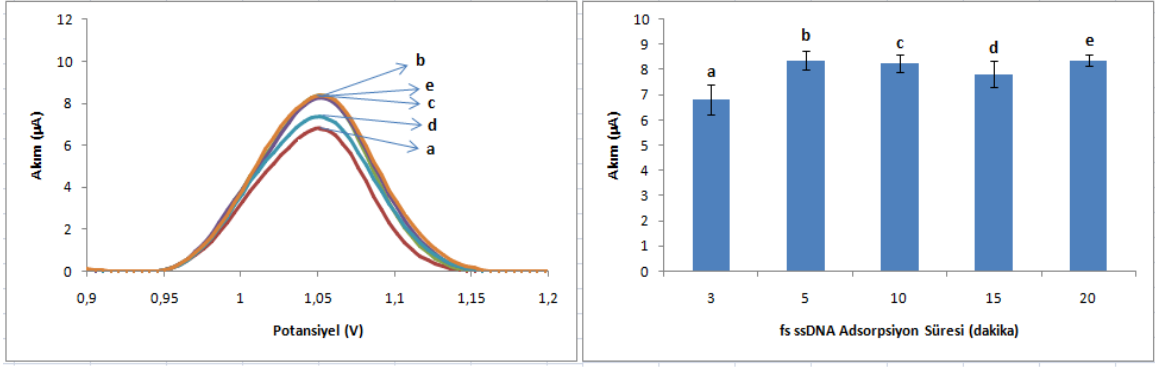
#### 4.2.1.1. fs dsDNA ve fs ssDNA İmmobilizasyonunda En Uygun Etkileşim Süresinin Belirlenmesine İlişkin Bulgular

fs dsDNA ve fs ssDNA için 3.6.1.1'de açıklandığı gibi deneyler yapılarak voltametrik ölçümler alındı. fs dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu ile etkileşim süreleri incelendi ve en uygun etkileşim süresi 5 dk olarak belirlendi. Çalışma sonucu elde edilen voltamogram ve histogramlar aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.3.** PGE yüzeyine immobilize edilen fs dsDNA'nın (a) 3 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika farklı sürelerde etkileşimi sonrasında SWV yöntemi ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram

fs ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu ile etkileşim süreleri incelendi ve en uygun etkileşim süresi 5 dk olarak belirlendi. Çalışma sonucu elde edilen voltamogram ve histogramlar aşağıda verilmiştir.



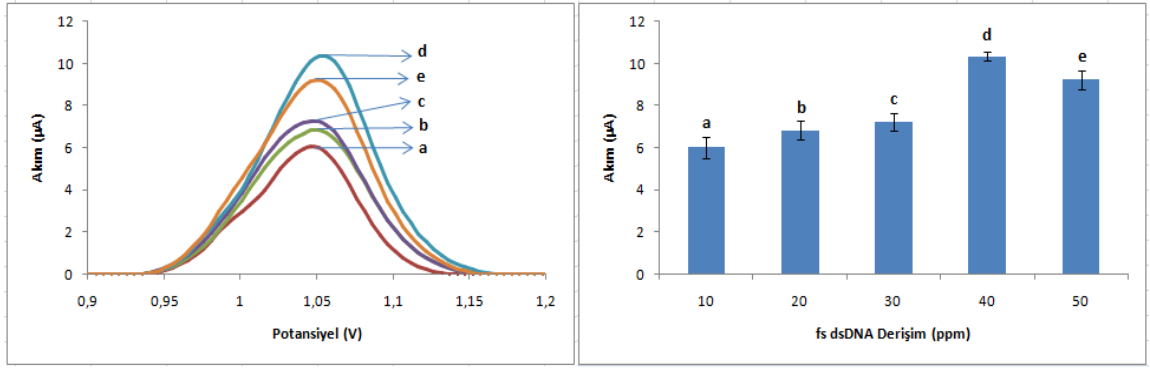
**Şekil 4.4.** PGE yüzeyine immobilize edilen fs ssDNA'nın (a) 3 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika farklı sürelerde etkileşimi sonrasında SWV yöntemi ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram

Daha önceki laboratuvar deneyimlerimizden DNA immobilizasyonu ile ilgili olarak en uygun yöntemin pasif adsorpsiyon olduğunu biliyoruz dolayısıyla bu çalışmada da aynı yöntem kullanılmıştır. Süre optimizasyonu yapılırken DNA'nın sabit derişimi 30 ppm olarak seçilmiş ve aktive edilmiş PGE'ler muhtelif sürelerde DNA çözeltilerinde bekletildikten sonra SWV ölçümleri alınmıştır. Guanin pik akımları incelendiğinde ssDNA ve dsDNA'nın her ikisi için de 5 dakika immobilizasyon süresinden sonra akımların değişmediği veya azaldığı görülmüştür. Guanin pik akımlarının sabitlendiği değerler optimum immobilizasyon süreleri olarak kaydedilmiş ve bundan sonraki DNA-ilaç etkileşimlerinde de bu değerler kullanılmıştır.

#### 4.2.1.2. fs dsDNA ve fs ssDNA PGE İmmobilizasyonunda En Uygun Etkileşim Miktarının Belirlenmesine İlişkin Bulgular

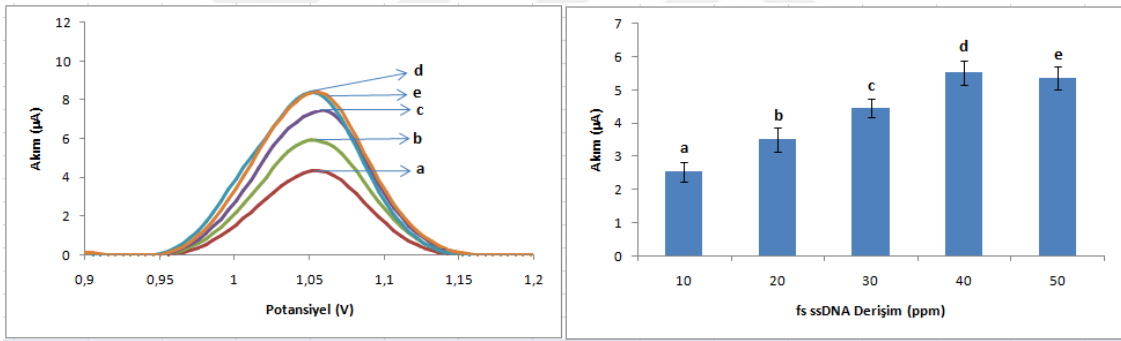
fs dsDNA ve fs ssDNA için 3.6.1.2'de açıklandığı gibi deneyler yapılarak voltametrik ölçümler alındı. fs dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu ile etkileşim derişimleri incelendi ve en uygun etkileşim miktarı 40 ppm olarak belirlendi. Çalışma sonucu elde edilen voltamogram ve histogramlar aşağıda verilmiştir.





**Şekil 4.5.** PGE yüzeyine immobilize edilen fs dsDNA'nın (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 ppm farklı derişimlerde etkileşimi sonrasında SWV yöntemi ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram

fs ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonu ile etkileşim derişimleri incelendi ve en uygun etkileşim miktarı 40 ppm olarak belirlendi. Çalışma sonucu elde edilen voltamogram ve histogramlar aşağıda verilmiştir.



**Şekil 4.6.** PGE yüzeyine immobilize edilen fs ssDNA'nın (a) 10 (b) 20 (c) 30 (d) 40 (e) 50 ppm farklı derişimlerde etkileşimi sonrasında SWV yöntemi ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram

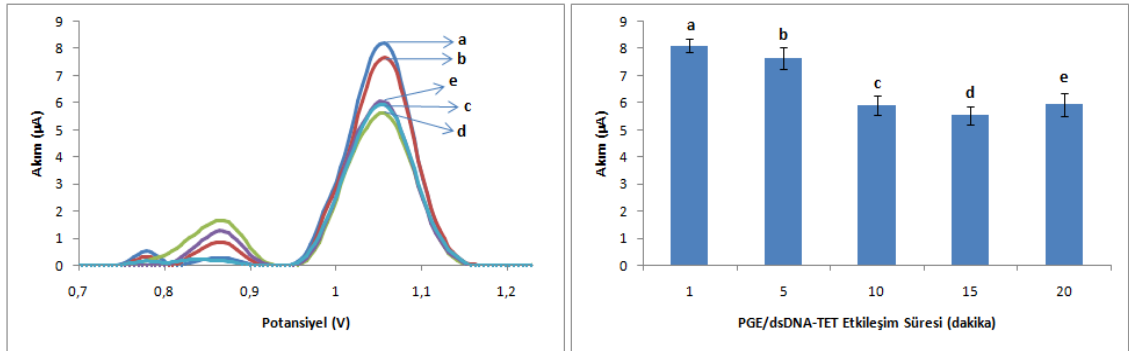
DNA immobilizasyonunda optimum koşullar belirlenirken önce sabit derişimde optimum süreler tayin edilmişti. Sonraki aşamada aktive edilmiş PGE'ler bu sabit süreler kullanılarak muhtelif derişimlerdeki DNA çözeltilerinde bekletildi. dsDNA ve ssDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonunda optimum derişim değerleri arasında herhangi bir fark görülmemiştir.

## 4.2.2. DNA-TET ve DNA-OTC Etkileşimine İlişkin Bulgular ve Tartışma

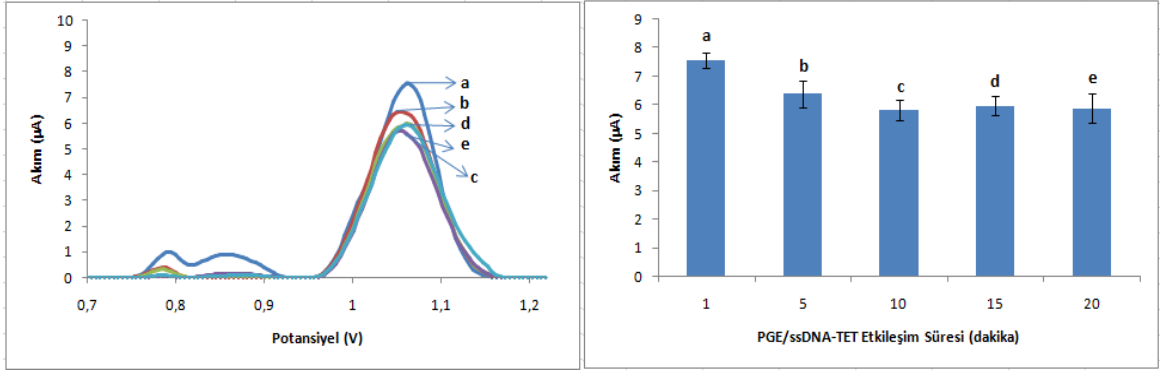
### 4.2.2.1. Elektrot Yüzeyindeki Etkileşimlerin İncelenmesi

#### PGE/DNA-TET ve PGE/DNA-OTC etkileşiminde uygun etkileşim süresinin belirlenmesine ilişkin bulgular:

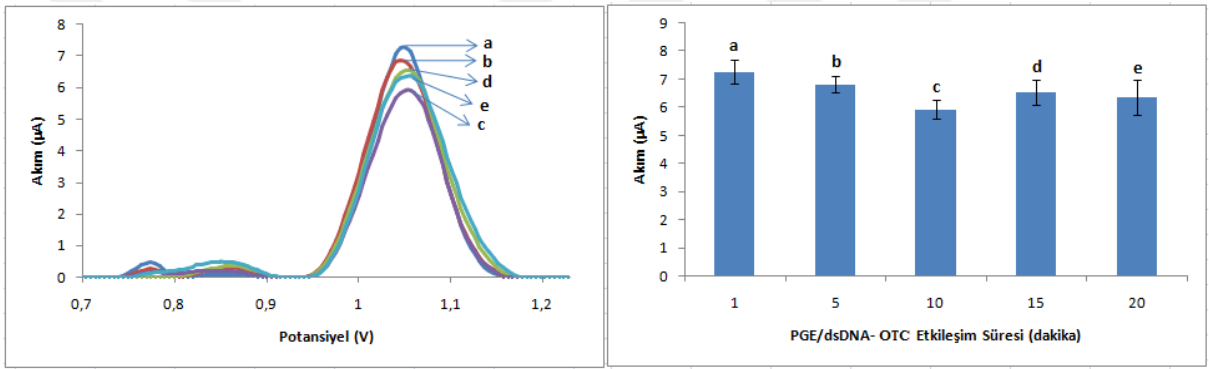
Optimum koşullarda DNA immobilizasyonu yapılan PGE'lerin (PGE/DNA) ilaçlar ile katı elektrot PGE yüzeyine immobilizasyonunda hem fs dsDNA hem de fs ssDNA için optimum etkileşim süresi 5 dakika ve optimum derişim 40 ppm olarak belirlenmişti. Bu koşullarda dsDNA ve ssDNA'nın aktif PGE yüzeyine immobilizasyonu yapıldı daha sonra bu elektrotlar (PGE/DNA) TET ve OTC ile optimum koşullarda etkileştirildi. Bunun için optimum koşullarda immobilizasyonu yapılan dsDNA ile hazırlanan PGE/dsDNA ABS'de hazırlanan 4ppm sabit derişimdeki TET çözeltisinde muhtelif sürelerde bekletildikten sonra SWV tekniği ile voltametrik ölçümler alındı ve guanin akım sinyallerindeki değişimler takip edilerek optimum etkileşim süresi tayin edildi. Voltametrik ölçme parametreleri daha önceki parametrelerle aynı idi. PGE/dsDNA-TET etkileşim süresinin optimize edilmesinde izlenen yol PGE/ssDNA-TET, PGE/dsDNA-OTC ve PGE/ssDNA-OTC etkileşimlerinde de aynen tekrar edildi. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.7 - Şekil 4.10'da verilmiştir:



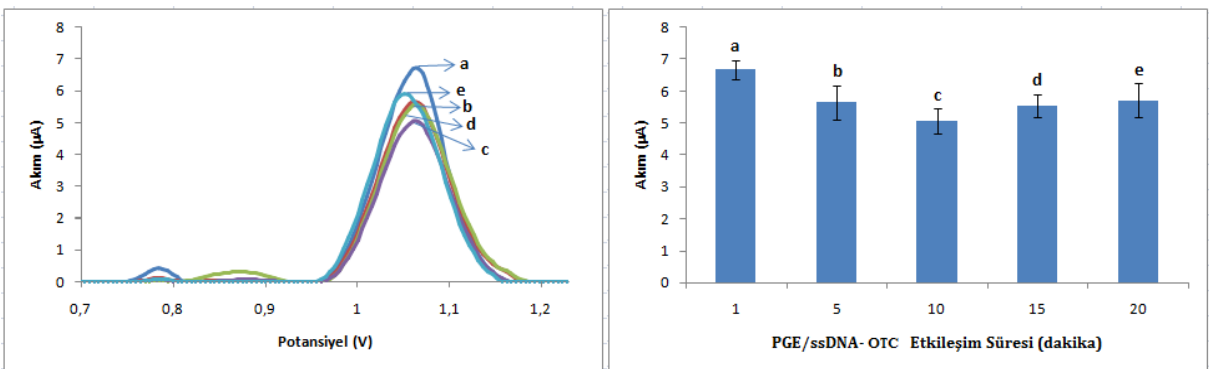
**Şekil 4.7.** PGE/dsDNA'nın farklı sürelerdeki (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika TET çözeltisinde bekletilip SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram



**Şekil 4.8.** PGE/ssDNA'nın farklı sürelerdeki (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika TET çözeltisinde bekletilip SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram



**Şekil 4.9.** PGE/dsDNA'nın farklı sürelerdeki (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika OTC çözeltisinde bekletilip SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram



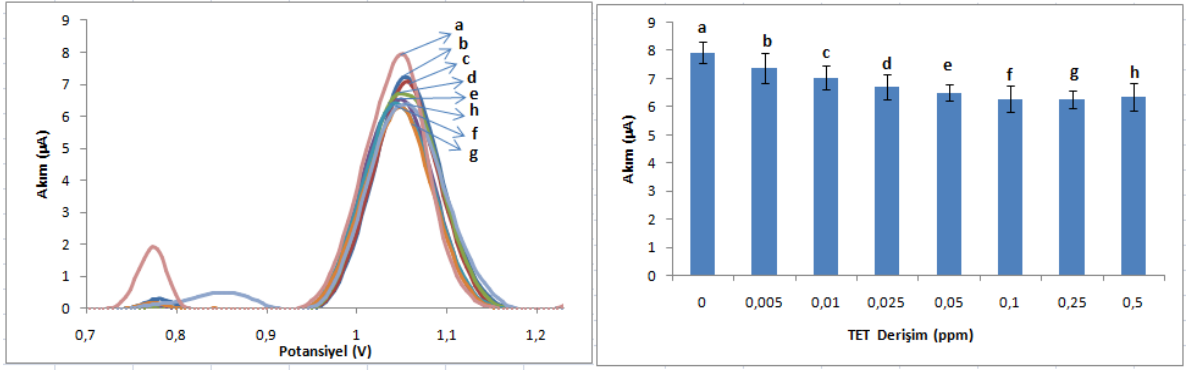
**Şekil 4.10.** PGE/ssDNA'nın farklı sürelerdeki (a) 1 (b) 5 (c) 10 (d) 15 (e) 20 dakika OTC çözeltisinde bekletilip SWV tekniği ile ölçülen guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram

DNA'nın hedef moleküllerle kuvvetli bir şekilde etkileşme potansiyeline sahip olması nedeniyle elektrokimyasal yöntemlerde tanıma yüzeyi olarak kullanılması son

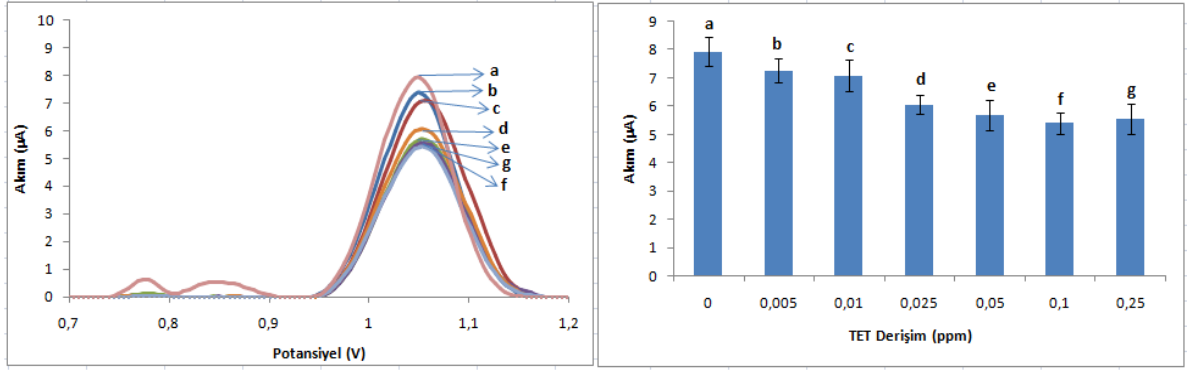
yıllarda sıklıkla başvurulan yöntemlerden biri olmuştur. DNA'nın elektrot yüzeyine immobilizasyonunda DNA'ya ait elektroaktif bazların elektrokimyasal davranışlarındaki değişikliklerden yararlanır. Genellikle indikatör elektroda uygun olarak çalışılan potansiyel aralığında elektroaktif olan türler guanin ve adenin bazlarıdır ve bu bazların elektrot yüzeyini tamamen kaplaması ve yeterli kararlılıkta olması DNA'nın elektrot yüzeyi ile etkileşim süresi ve DNA derişimine bağlıdır. İmmobilizasyonu yapılacak DNA için en uygun süre ve en uygun derişim, etkileşimden sonra ölçülen guanin ve adenin bazlarının pik akımlarıyla takip edilir. Uygulanan voltametrik yöntemde de bağlı olarak söz konusu pik akımlarının doyunluğa ulaştığı parametreler optimum değerler olarak belirlenir ve bundan sonraki DNA-molekül etkileşimleri incelenirken tayin edilen bu parametreler kullanılır [24]. DNA-hedef molekül etkileşimlerinde, etkileşimin karakteristiğini belirlemek veya hedef molekül kantitatif olarak tayin etmek için ya etkileşimden önce ve sonra DNA bazlarının akım sinyallerinde meydana gelen değişimler veya (varsa) hedef molekülün etkileşimden önce ve sonra elektrokimyasal davranışlarında meydana gelen değişimlerden yararlanır. Bu çalışmada optimum DNA-ilaç etkileşim süresinin belirlenmesinde DNA'ya ait guanin pik akımlarında meydana gelen değişimler takip edilmiştir. Aktif PGE yüzeyine immobilize edilmiş gerek ssDNA ve gerekse dsDNA'nın hem TET ve hem de OTC ile etkileşim sürelerinin optimizasyonu için alınan kare dalga voltamogramları incelendiğinde guanin pik akımlarının etkileşim süresi arttıkça azaldığı ve 10 dakikalık bir etkileşimden sonra sabit kaldığı görülmüştür. Bundan sonraki deney aşamasında ilaç tayinleri yapılırken optimum DNA - ilaç etkileşim süresi 10 dakika olarak alınacaktır.

#### **PGE/DNA ile TET ve OTC tayinine ilişkin bulgular ve tartışma:**

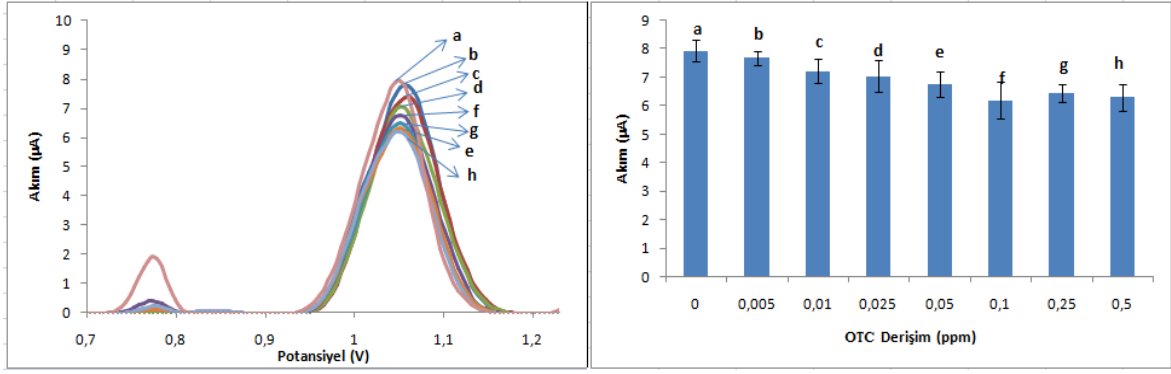
PGE yüzeyine immobilize edilen dsDNA ve ssDNA'nın 0,005 - 0,5 µg/mL aralığında değişen ve ABS çözeltisinde hazırlanan TET ve OTC ile etkileşiminden elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerinin ortalama büyüklüklerini gösteren grafikler Şekil 4.11 - Şekil 4.14'te verilmiştir:



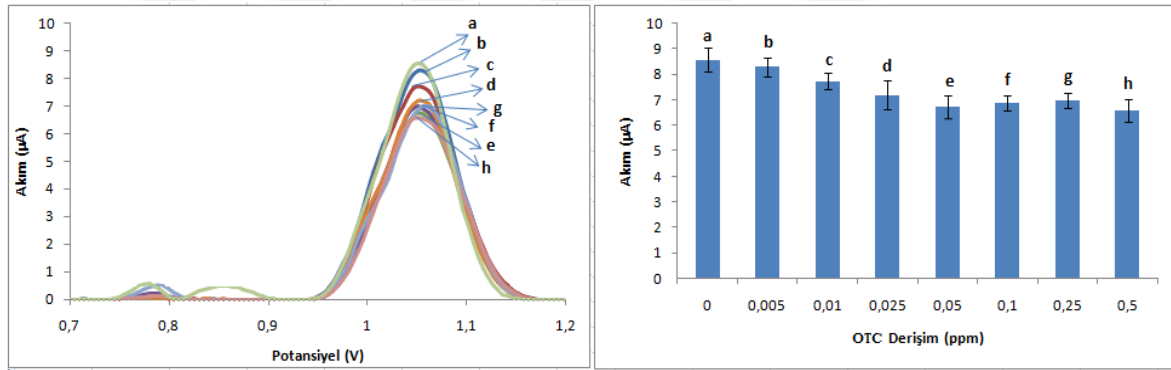
**Şekil 4.11.** PGE/dsDNA'nın farklı derişimlerdeki (a) 0 (b) 0,005 (c) 0,01 (d) 0,025 (e) 0,05 (f) 0,1 (g) 0,25 (h) 0,5 ppm TET çözeltisinde 10 dakika sabit sürede bekletilip SWV tekniği ile ölçölen ortalama guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram



**Şekil 4.12.** PGE/ssDNA'nın farklı derişimlerdeki (a) 0 (b) 0,005 (c) 0,01 (d) 0,025 (e) 0,05 (f) 0,1 (g) 0,25 0,5 ppm TET çözeltisinde 10 dakika sabit sürede bekletilip SWV tekniği ile ölçölen ortalama guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram

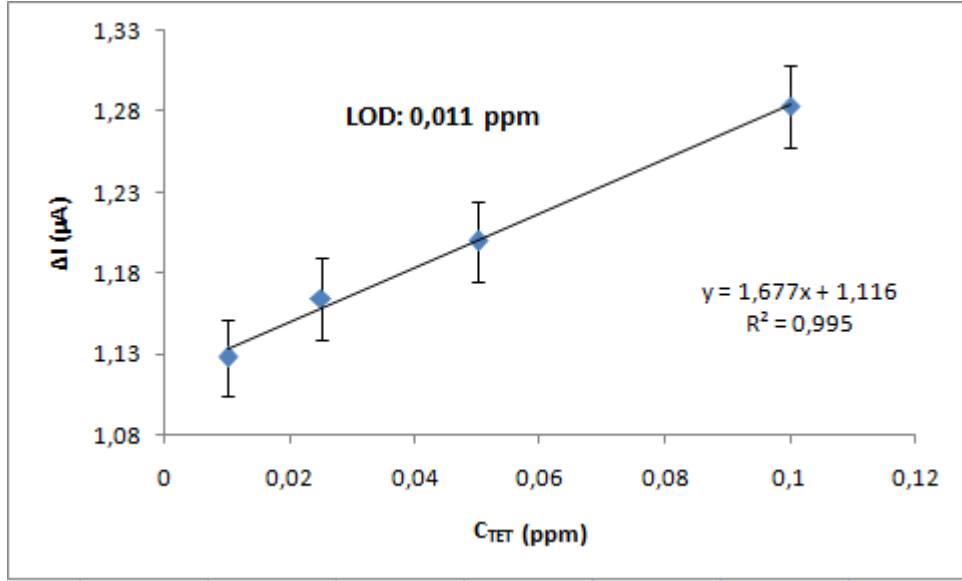


**Şekil 4.13.** PGE/dsDNA'nın farklı derişimlerdeki (a) 0 (b) 0,005 (c) 0,01 (d) 0,025 (e) 0,05 (f) 0,1 (g) 0,25 (h) 0,5 ppm OTC çözeltilisinde 10 dakika sabit sürede bekletilip SWV tekniği ile ölçölen ortalama guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram

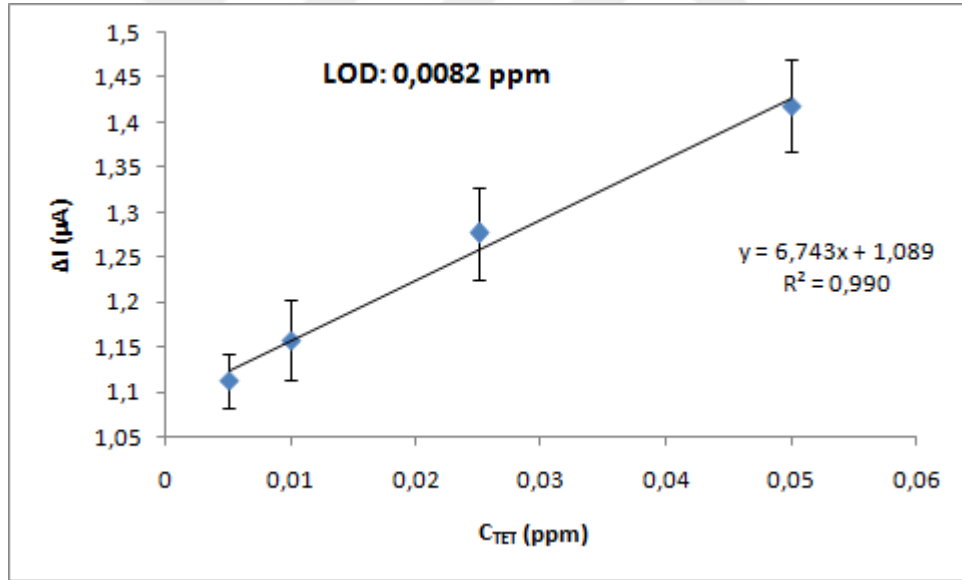


**Şekil 4.14.** PGE/ssDNA'nın farklı derişimlerdeki (a) 0 (b) 0,005 (c) 0,01 (d) 0,025 (e) 0,05 (f) 0,1 (g) 0,25 (h) 0,5 ppm OTC çözeltilisinde 10 dakika sabit sürede bekletilip SWV tekniği ile ölçölen ortalama guanin sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram

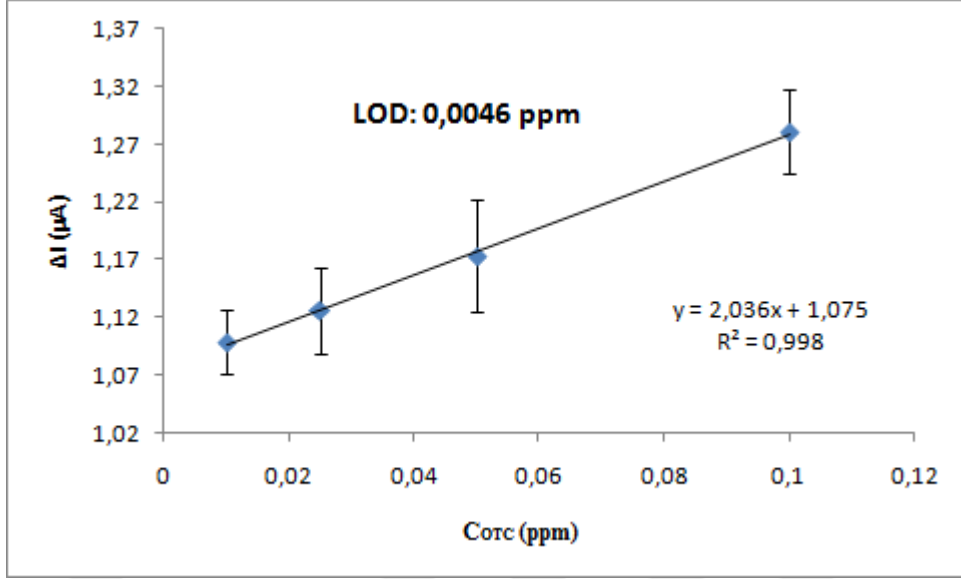
TET ve OTC derişiminin guanin pik akımlarındaki değişime karşı çizilen kalibrasyon grafiklerinde pozitif eğimli kalibrasyon doğrusu elde etmek için etkileşimden önceki guanin pik akım değerine her bir etkileşimden sonra elde edilen guanin pik akım değerine oranlanmıştır ( $\Delta I$ ). Kalibrasyon grafikleri ve regresyon doğrusunun standart sapması ve eğiminden yararlanılarak hesaplanan tayin sınırları Şekil 15 - Şekil 18'de verilmiştir:



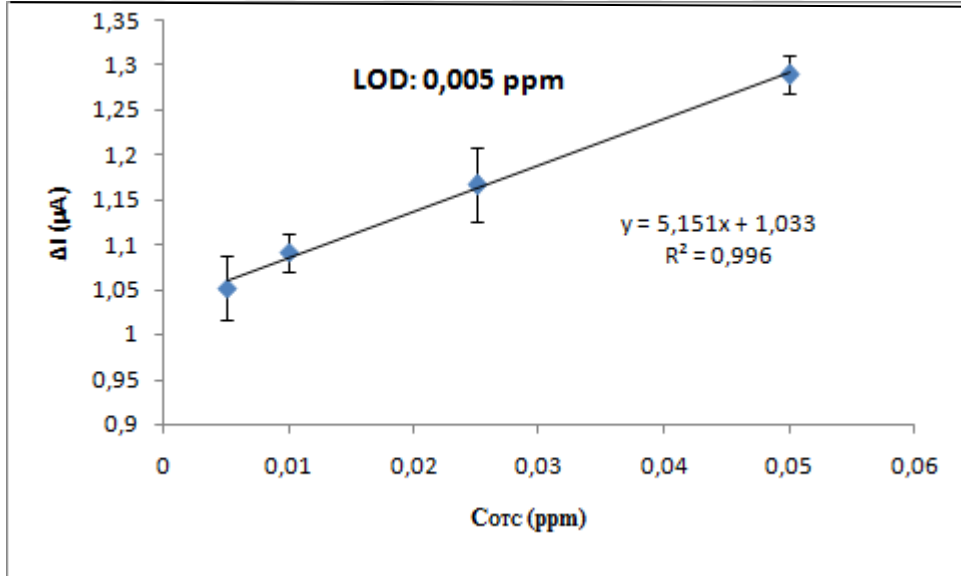
Şekil 4.15. PGE/dsDNA-TET etkileşiminde TET derişiminin guanin pik akımındaki değişimine etkisinden elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.16. PGE/ssDNA-TET etkileşiminde TET derişiminin guanin pik akımındaki değişimine etkisinden elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.17. PGE/dsDNA-OTC etkileşiminde OTC derişiminin guanin pik akımındaki değişimine etkisinden elde edilen kalibrasyon grafiği



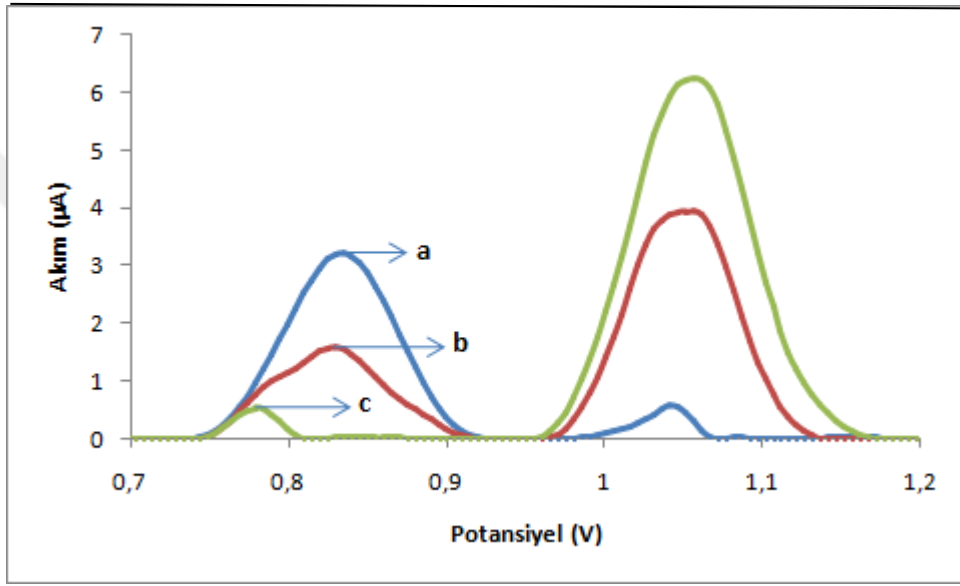
Şekil 4.18. PGE/ssDNA-OTC etkileşiminde OTC derişiminin guanin pik akımındaki değişimine etkisinden elde edilen kalibrasyon grafiği

PGE yüzeyinin dsDNA veya ssDNA ile kaplandıktan sonra DNA'nın deney konusu antibiyotiklerle elektrot yüzeyindeki etkileşimleri incelendiğinde, her iki ilacında DNA'ya etki ederek guanin sinyallerini düşürdüğü görülmektedir. Hesaplanan en düşük tayin sınırlarının oldukça düşük değerlerde olması her iki ilacın da katı elektrot

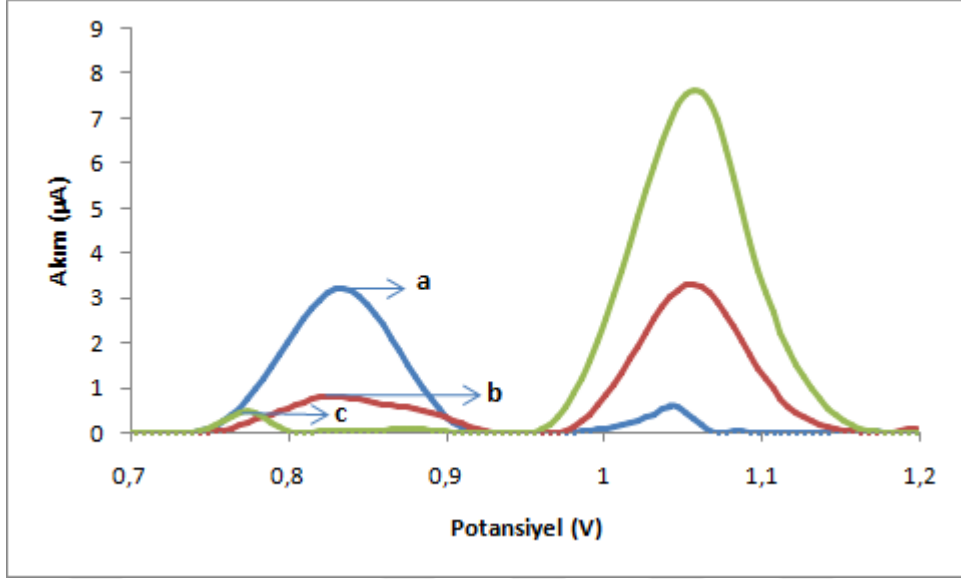


yüzeyinde DNA ile güçlü bir etkileşime sahip olduklarını göstermektedir. Başka bir deyişle DNA'nın tanıma yüzeyi olarak kullanılmasıyla geliştirilen DNA biyosensörü ile Tetrasiklin veya Oksitetrasiklin tayini yüksek hassasiyetle gerçekleştirilebilir.

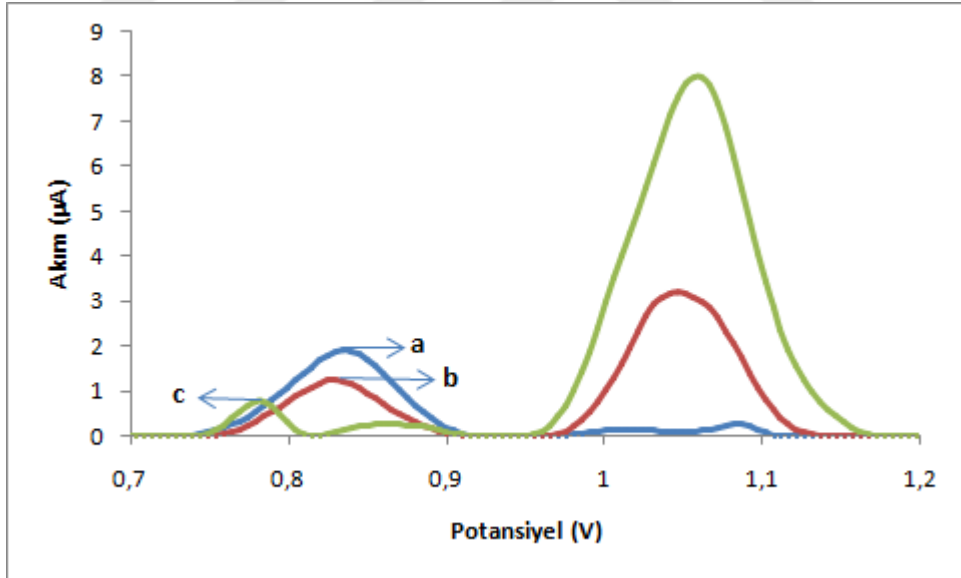
Katı elektrot yüzeyine DNA yerine ilacın immobilize edilip, DNA varlığında ilaç sinyallerinde meydana gelen değişimler de incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.19 - Şekil 4.22'de verilmiştir:



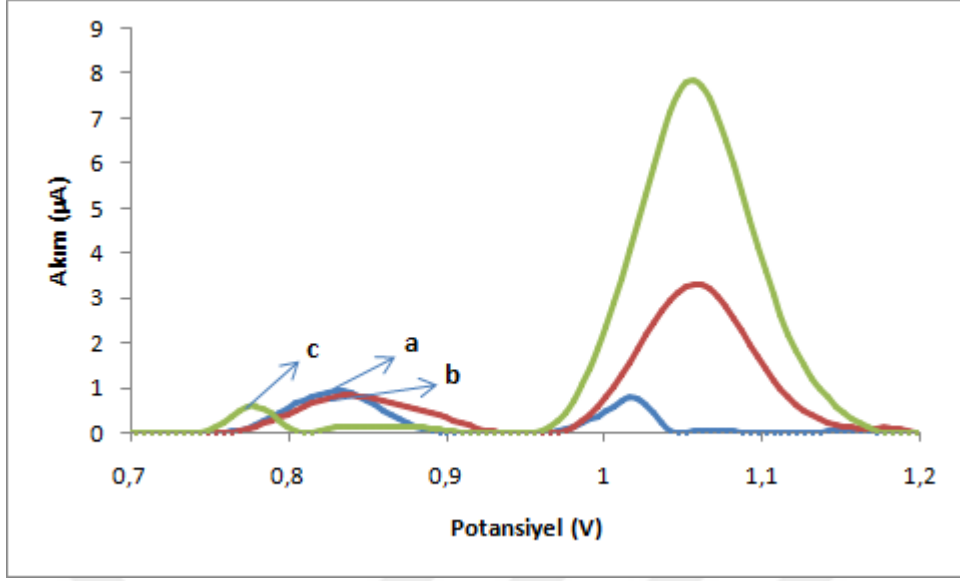
**Şekil 4.19.** PGE/TET-dsDNA etkileşimine ait 10 dakika etkileşim sürelerinde SWV tekniğinden elde edilen TET (a, b, c) ve guanin sinyalleri [a: 4 ppm TET, b: 4 ppm TET + 4 ppm dsDNA, c: 4 ppm TET + 20 ppm dsDNA]



**Şekil 4.20.** PGE/TET-ssDNA etkileşimine ait 10 dakika etkileşim sürelerinde SWV tekniğinden elde edilen TET (a, b, c) ve guanin sinyalleri [a: 4 ppm TET, b: 4 ppm TET + 4 ppm ssDNA, c: 4 ppm TET + 20 ppm ssDNA]



**Şekil 4.21.** PGE/OTC-dsDNA etkileşimine ait 10 dakika etkileşim sürelerinde SWV tekniğinden elde edilen OTC (a, b, c) ve guanin sinyalleri [a: 4 ppm OTC, b: 4 ppm OTC + 4 ppm dsDNA, c: 4 ppm OTC + 20 ppm dsDNA]

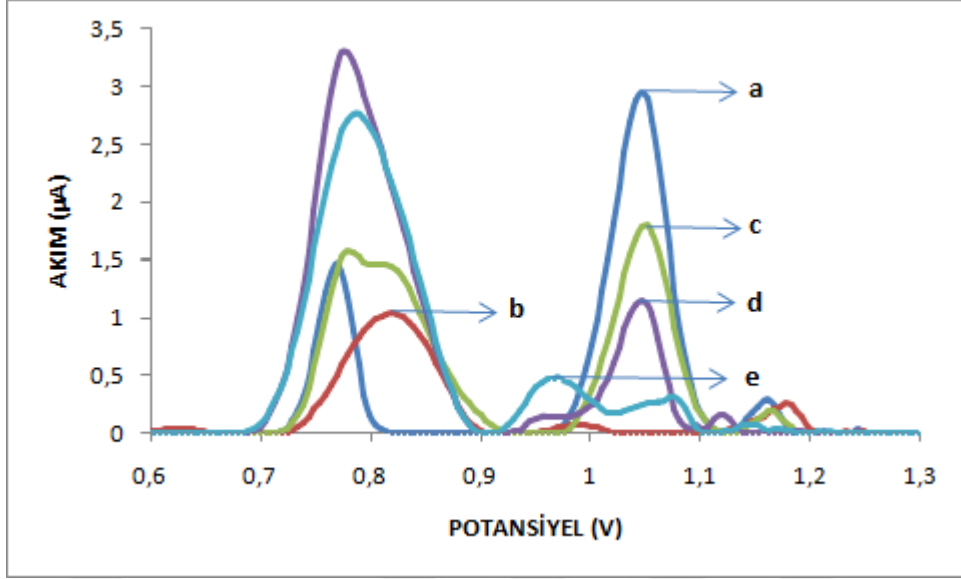


**Şekil 4.22.** PGE/OTC-ssDNA etkileşimine ait 10 dakika etkileşim sürelerinde SWV tekniğinden elde edilen OTC (a, b, c) ve guanin sinyalleri [a: 4 ppm OTC, b: 4 ppm OTC + 4 ppm ssDNA, c: 4 ppm OTC + 20 ppm ssDNA]

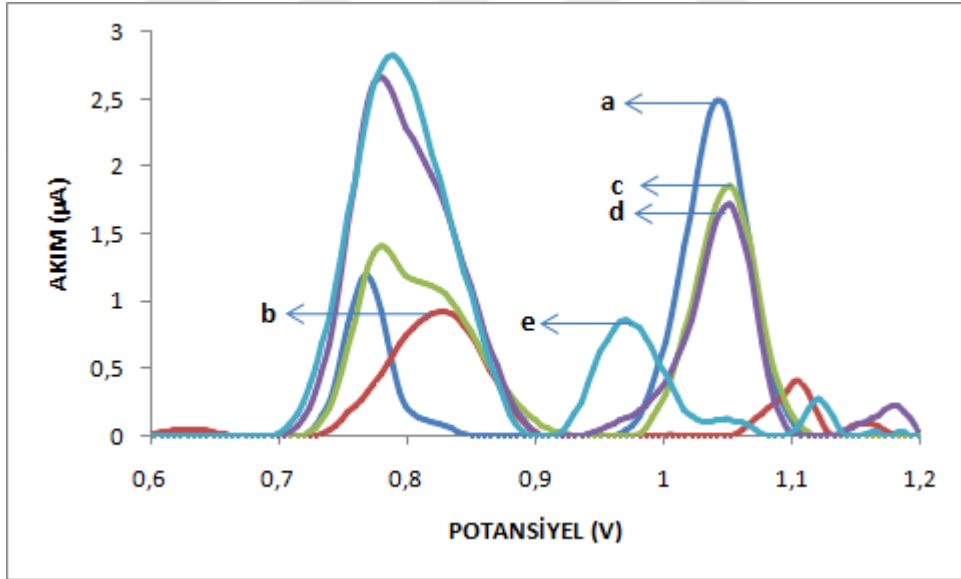
Yukarıdaki grafikler incelendiğinde PGE yüzeyine immobilize edilen TET ve OTC'ye hem ssDNA'nın hem de dsDNA'nın etki ederek ilaca ait pik akımlarını düşürdüğü gözlemlenmektedir. Özellikle PGE/TET'nin DNA ile etkileşimlerine dikkat edildiğinde 4 ppm TET ile etkileşen DNA derişimi 4 ppm olduğunda ilaca ait pik akımının yarıya düştüğü; 20 ppm DNA derişiminde ise ilaca ait yükseltgenme pikinin tamamen kaybolduğu görülmektedir (Şekil 19 ve Şekil 20). PGE/OTC'nin DNA etkileşimde ise aynı derişimlerle çalışıldığında ilaca pik akımlarının azaldığı ancak yüksek DNA derişiminde bile hala pik akımlarının gözlemlendiği görülmektedir (Şekil 21 ve Şekil 22). Bu sonuçlara göre TET'nin OTC'ye göre DNA ile daha güçlü bir etkileşime sahip olduğu düşünülmektedir.

#### 4.2.2.2. Çözelti Ortamındaki Etkileşimlerin İncelenmesi

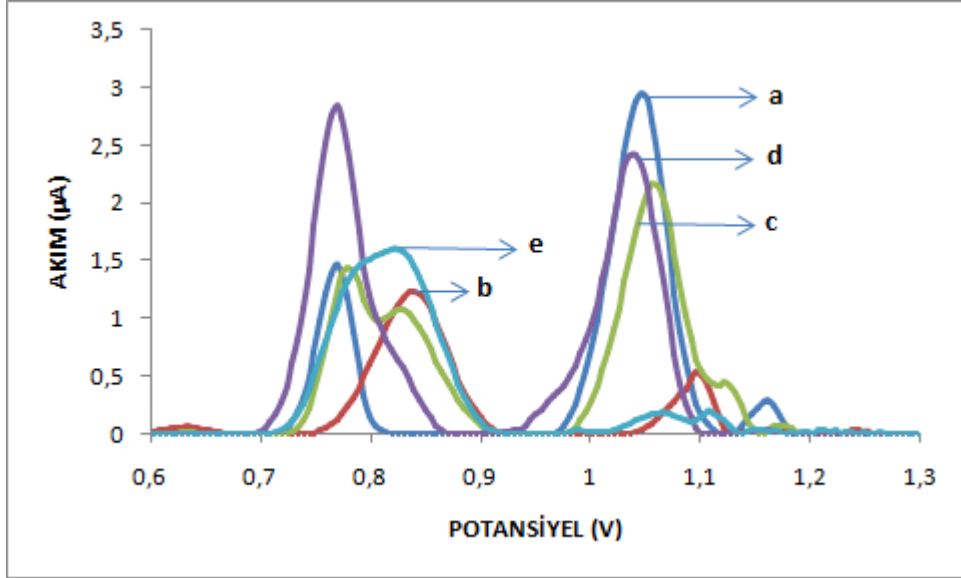
Çözelti ortamında ilaç ve DNA'daki arasındaki etkileşimin tespiti için, ilaç ve DNA aynı çözelti ortamına konur ve belirli bir etkileşim süresinden sonra, ilaç-DNA kompleksinin elektrokimyasal sinyallerindeki değişiklikler, tek başına DNA veya ilaç ile karşılaştırılır [60]. Bu çalışmada çözelti fazında DNA-ilaç etkileşimi SWV tekniği ile incelendi ve elde edilen voltamogramlar Şekil 23- Şekil 26'da verildi:



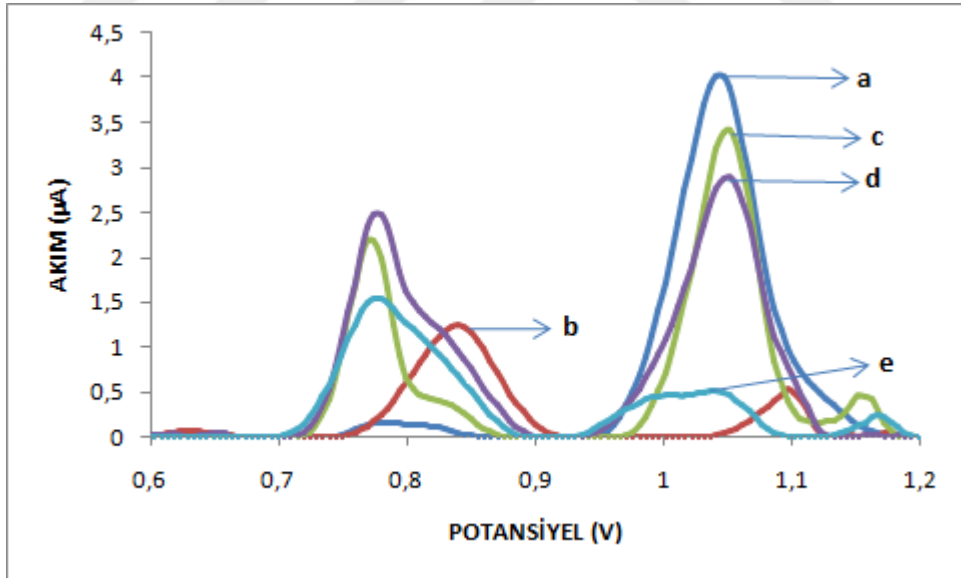
**Şekil 4.23.** Çözelti ortamında dsDNA - TET etkileşiminden elde edilen SWV voltamogramı (a: 5 ppm dsDNA, b: 1ppm TET, c: 5 ppm dsDNA + 1 ppm TET, d: 5 ppm dsDNA + 4 ppm TET, e: 1ppm dsDNA + 4 ppm TET)



**Şekil 4.24** Çözelti ortamında ssDNA - TET etkileşiminden elde edilen SWV voltamogramı (a: 5 ppm ssDNA, b: 1ppm TET, c: 5 ppm ssDNA + 1 ppm TET, d: 5 ppm ssDNA + 4 ppm TET, e: 1ppm ssDNA + 4 ppm TET)



**Şekil 4.25.** Çözelti ortamında dsDNA - OTC etkileşiminden elde edilen SWV voltamogramı (a: 5 ppm dsDNA, b: 1 ppm OTC, c: 5 ppm dsDNA + 1 ppm OTC, d: 5 ppm dsDNA + 4 ppm OTC, e: 1 ppm dsDNA + 4 ppm OTC)



**Şekil 4.26.** Çözelti ortamında ssDNA - OTC etkileşiminden elde edilen SWV voltamogramı (a: 5 ppm ssDNA, b: 1 ppm OTC, c: 5 ppm ssDNA + 1 ppm OTC, d: 5 ppm ssDNA + 4 ppm OTC, e: 1 ppm ssDNA + 4 ppm OTC)

Voltamogramlardan da görüldüğü gibi, çözelti ortamında ilaç-DNA etkileşimi çalışılırken tek başına ilaç ve tek başına DNA ile birlikte ilaç ve DNA'nın karşılıklı bir düşük diğeri yüksek derişimli karışımları incelenmiştir. Şekil 23 ve Şekil 24 TET'nin çözelti ortamında sırasıyla ssDNA ve dsDNA etkileşimiyle ilgilidir. TET'nin dsDNA ile etkileşiminde (Şekil 23) 5 ppm dsDNA'nın 1 ppm TET ile etkileşiminde guanin piki azalırken ilacın pikinde bir miktar artma (tek başına ilaç pikine göre) meydana gelmiştir. Bu durum TET ile guanin arasında bir kimyasal etkileşim veya bir kovalent bağlanma olduğunu düşündürmüştür. 5 ppm dsDNA'nın 4 ppm TET ile etkileşiminde aynı miktar DNA'ya karşı ilaç derişimi artırıldığında ise guanin pikindeki daha fazla azalma olmuş ve ilaç piki en yüksek değerine ulaşırken 0,95 V potansiyel civarında yeni bir pik meydana gelmiştir. Oluşan bu yeni pikin dsDNA-TET etkileşimi sonucu oluşan yeni bir elektroaktif ürüne ait olduğu anlaşılmaktadır. dsDNA derişimi 1 ppm, TET derişimi 4 ppm olacak şekilde gerçekleşen etkileşimde ise artık guanin pikinin tamamen kaybolduğu ve 0,95 V civarındaki yeni elektroaktif türe ait pikin arttığı görülmüştür. Bu son durum dsDNA ile TET arasında bir kovalent bağlanmanın var olduğunu teyit etmiştir. dsDNA-TET etkileşimde meydana gelen değişimlerin aynısı ssDNA-TET arasında da gözlenmiştir (Şekil 24). dsDNA-OTC etkileşiminin çözelti ortamında incelendiği voltamogramda (Şekil 25), yüksek derişimdeki DNA'nın yine yüksek derişimdeki ilaç ile olan etkileşiminde guanine ait pik akımı azalırken ilaç piki en büyük değerinde kendini göstermiş ve pik potansiyeli daha negatife kaymıştır. İlaç pikine ait potansiyelin daha negatif değere kayması ilaç-DNA etkileşiminde elektrostatik etkileşimi düşündürmektedir [61]. Düşük DNA derişimine karşın yüksek ilaç derişimindeki etkileşimde ise guanin pik akımı TET etkileşiminde olduğu gibi kaybolmuş ancak farklı olarak yeni bir elektroaktif ürün meydana gelmemiştir. ssDNA'nın çözelti ortamında OTC ile etkileşiminde de (Şekil 26) dsDNA'dan farklı bir durum görülmemiş ve etkileşimden sonra ilaca ait pik potansiyel değeri belirgin bir şekilde negatife kaymıştır.

## 5. SONUÇ

İlaç-DNA etkileşiminin araştırılması, özellikle yeni ilaç tasarımlarının geliştirilmesinde ve ileride DNA mikroçip sistemleri haline geleceği düşünülen yeni DNA biyosensörlerinin tasarımlarında önemli bir role sahiptir. Ayrıca insan sağlığını yakından ilgilendiren besin zincirinde antibiyotik kalıntılarının kısa sürede hassas ve seçici olarak tayin edilmesi de oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında Tetrasiklin ve Oksitetrasiklin antibiyotiklerinin tayini için hassas ve seçici DNA biyosensörü geliştirilmiştir. Tetrasiklinler besi hayvanlarında bulaşıcı hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerdendir. Tetrasiklinlerin veteriner hekimlikte antibiyotik ve büyüme destekleyici olarak yaygın kullanımı et, süt, bal, yumurta/tavuk gibi günlük gıda ürünlerinde birikmesine yol açtığı ve insan sağlığına ciddi tehditler oluşturduğu bildirilmiştir [62]. Bu nedenle, gıda ürünlerindeki Tetrasiklinleri tespit etmek için hızlı, basit, hassas ve spesifik bir tespit yöntemi geliştirmek çok önemlidir.

Bu tez çalışması DNA-ilaç etkileşimine dayalı bir elektrokimyasal DNA biyosensörü ile TET ve OTC tayini ve bu ilaçların tek sarmal DNA (ssDNA) ve çift sarmal DNA (dsDNA) ile etkileşim özelliklerinin açıklanmasını kapsamaktadır. Biyosensör tasarımında balık sperm DNA'sı dsDNA ve bunun denatürasyonu ile elde edilen ssDNA kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda indikatör elektrot olarak tek kullanımlık kalem grafit elektrot kullanılırken, çevirici sistem olarak DPV ve SWV seçilmiştir. Bu ölçüm sistemleri kullanılarak tayin 30 dakika gibi kısa sürede gerçekleştirilmiştir.

TET ve OTC'nin DNA biyosensörü ile tayininde işlem sırası olarak tek kullanımlık PGE'lerin ABS tamponunda 30 saniye süreyle 1,4 V potansiyel uygulayarak aktive edilmesi; ssDNA ve dsDNA'nın PGE yüzeyine immobilizasyonunda en uygun süre ve derişimin belirlenmesi; PGE yüzeyinde DNA-ilaç ve ilaç-DNA etkileşiminin incelenmesi; DNA-ilaç etkileşimlerinden yararlanarak en düşük tayin sınırlarının belirlenmesi ve çözelti ortamında ilaç-DNA etkileşimlerinin incelenmesi yer almaktadır. Tayinler yapılırken DNA'ya ait guanin bazının yükseltgenme sinyallerinde meydana gelen değişimlerden yararlanılmıştır. Bu değişim çerçevesinde TET ve OTC yapı benzerliği dolayısıyla birbirine yakın sonuçlar vermiştir. İncelen ilaçların elektrot

yüzeyine tutturulmuş ve çözelti ortamındaki DNA ile etkileşimi sonucunda DNA'nın heliks yapısında hasar yaratabileceği veya DNA'nın guanin bazına spesifik bir bağlanma ile akım cevaplarında bir azalma olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca bu etkileşimlerde TET'nin DNA'ya kovalent OTC'nin ise elektrostatik olarak bağlandığı düşünülmüştür.

Tez çalışmasında tek kullanımlık PGE ile ilaç-DNA etkileşimin tayininde, herhangi bir yüzey değişikliği veya etiketleme yapılmadan hassas, hızlı ve düşük maliyetli bir sensör geliştirildiği sonucuna varılmıştır.





## KAYNAKÇA

- [1] Putzbach, W., Ronkainen, N. J., “Immobilization Techniques in the Fabrication of NanomaterialBased Electrochemical Biosensors: A Review”, *Sensors*, Cilt 13, s. 4811-4840, 2013.
- [2] Bulut, Y., “Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış”, 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS’11) Elazığ, Türkiye, 16-18 Mayıs 2011.
- [3] Turner, A. P. F. (1987). *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S. (Ed); *Oxford University Press*, Oxford, sayfa v-vii.
- [4] Lowe CR (1984). *Biosensors: Trends in Biotechnology*. Elsevier, 2(3): 59–65.
- [5] Erdem A, Ozsoz M (2002). Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interaction. *Electroan*, 14 (14), 965-974.
- [6] CongurG, Erdem A, Mese F (2015). Electrochemical investigation of the interaction between topotecan and DNA at disposable graphite electrodes. *Bioelectrochemistry*, 102: 21-28.
- [7] Brett., C. M. A, Brett. A. M.O. (1992). *Electrochemistry*, Oxford University Press, Oxford.
- [8] Brett. A.M.O., Piedade, J.A.P., Serrano, S.H.P., (2000). Electrochemical oxidation of 8-oxoguanine, *Electroanal.*, 12, 969-973.
- [9] 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.
- [10] NowickaAM, 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.
- [11] BrabecV, 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, BirkhauserVerlag, Basel, Switzerland, 287–359
- [12] Erdem, A., Ozsoz, M., (2001). Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA, *Analytica Chimica Acta*, 437: 107.
- [13] Bej, A.K. (1996). Chapter 1: Nucleic Acid Hybridizations: Principles and Strategies, *Nucleic Acid Analysis: Principles and Bioapplications*; *Ed. Dangler, C.A., Wiley-Liss, Inc., s. 1-29.*

- [14] Likhitwitayawuid K., Angerhofer C.K., Chai H., Pezzuto J.M., Cordell G.A., J. (1993). Cytotoxic and Antimalarial Alkaloids from the Bulbs of *Crinum Amabile*, *Nat.Prod.*, 56: 1331-1338.
- [15] Liu, J., Abid, S., Hail, M. E., Lee, M. S., Hangeland, J., Zein, N. (1998). Use of affinity capillary electrophoresis for the study of protein and drug interactions, *Analyst*, 123: 1455-1459.
- [16] Palecek, E. (1994). Probing of DNA structure with osmium tetroxide complexes *in vitro* and in cells, F. Eckstein and D. M. J. Lilley (Ed), *Nucleic acids and Molecular Biology*, Vol. 8: Springer-Verlag Berlin, 1994, 1-13.
- [17] Kelley SO, Barton JK (1997). Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode. *Bioconjugate Chem*, 8: 31-37.
- [18] Palaska P, Aritzoglou E, Girousi S (2007). Sensitive detection of cyclophosphamide using DNA-modified carbon paste, pencil graphite and hanging mercury drop electrodes. *Talanta*, 72: 1199-1206.
- [19] Cheng, C.C., Goll, J.G., Neyhart, G.A., Welch, T.W., Singh, P., Thorp, H.H. (1995). Relative rates and potentials of competing redox process during DNA cleavage: oxidation mechanism and sequence specific catalysis of the self inactivation of oxometal oxidants by DNA, *Journal of the American Chemical Society*, 117: 2970-2980.)
- [20] Kılıç E., Yılmaz H., 1999 Analitik Kimya Temel İlkeler (Skoog'tan çeviri). Bilim Kitap Evi, Ankara s:667-668
- [21] Tunçel, T., Bergisadi, M., Akın, L., Otuk, G., Kuşcu, İ., 1996. In-Vitro and In-Vivo, Studies on Micro Capsules and Tableted Micro Capsules Cephadrine, *Pharmazie*, 51, 168-171.
- [22] Erdem A, Ozsoz M (2001a). Interaction of anticancer drug. Epirubicin with DNA, *Analytical ChimicaActa*, 437: 107-114.
- [23] Eşkin E. (2013). DNA ve protein analizine yönelik elektrokimyasal sensörlerin Geliştirilmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 614.02.07.
- [24] Karadeniz, H., Gulmez, B., Sahinci, F., Erdem, A., Irem Kaya, G., Unver, N., Kivcak, B., Ozsoz, M. (2003). Disposable electrochemical biosensor for the

detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals, *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 33: 295-302.

- [25] Wang, J., Kawde, A. N. , Erdem, A., Salazar, M. (2001). Magnetic beadbased label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*,126: 2020-2024.
- [26] 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.
- [27] Kılıç E., Yılmaz H., 1999 Analitik Kimya Temel İlkeler (Skoog'tan çeviri). Bilim Kitap Evi, Ankara s: 667.
- [28] Türe, M., 2009. Fenilefrin Hidroklorür'ün Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi ve Ticari İlaç Formlarından Miktarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Çanakkale s: 23-24
- [29] Türe, M., 2009. Fenilefrin Hidroklorür'ün Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi ve Ticari İlaç Formlarından Miktarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Çanakkale s: 46.
- [30] Kılıç, E., Köseoğlu, F., 1999. Analitik Kimya Temelleri (Skoog'tan çeviri). Bilim Kitap Evi, Ankara s: 694-697
- [31] Yalçın G (2007). Bazı Kimyasal Maddelerin DNA İle Etkileşmesinin Biyosensörler İle Algılanması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (Yüksek Lisans Tezi), İzmir, 10.
- [32] Özaltın N, Yola ML (2011). Electrochemical studies on the interaction of an antibacterial drug nitrofurantoin with DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 653(1-2):56-60.
- [33] Kılıç, E., Köseoğlu, F., 1999. Analitik Kimya Temelleri (Skoog'tan çeviri). Bilim Kitap Evi, Ankara s: 690

- [34] J. Osteryoung and J. J. O'Dea, *Elektroanal. Chem.*, 1986, 14, 209
- [35] Yıldız, A., Genç, Ö., (1993). *Enstrümental Analiz*, Hacettepe Yayınları A-64: 289-384. (152)
- [36] Skoog, D.A., West, D.A., Holler, F.J., (1996). *Analitik Kimyanın Temelleri*, Çeviri editörleri: Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Hamza Yılmaz, Bilim Yayıncılık, 8. baskı, 691-692.
- [37] Bard, A. J., Faulkner L. R., (1980). *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Canada. (6)
- [38] Macdonald JR (1992). *Impedance Spectroscopy*. *Annals of Biomedical Engineering*, 20: 289-305.
- [39] Prodromidis MI (2007). *Impedimetric Biosensors and Immunosensors*. *Pak. J. Anal Environ. Chem*, 8: 69 -71.
- [40] Velasco-Garcia, M. N. ve Mottram, T., 2003. *Biosensor technology addressing agricultural problems*. *Biosystems Engineering Vol 84 (1):1-12*.
- [41] Chen, D., Cao, Y., Liu, B., Kong, J., (2002). A BOD biosensor based on a microorganism immobilized on an Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sol-gel matrix, *Anal. Bioanal. Chem.*, 372(5-6):737-9.
- [42] 109. Passarge, E., (2000). *Renkli Genetik Atlası*, Editörler Güven Lüleci, Meral Sakızlı, Özgül Alper, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 34–39, 44–47, 72–73.
- [43] Ravanat JL, Guicherd P, Tuce Z, Cadet J. (1999). Simultaneous determination of five oxidative DNA lesions in human urine *Chem Res Toxicol*, 12, 802-8.
- [44] Gorton, L., Csöregi, E., Dominguez, E., Emneus, J., Jonsson-Petterson, G., Makro-Varga, G., Persson, B., (1991). Selective detection in flow analysis based on the combination of immobilized enzymes and chemically modified electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 250: 203-248.
- [45] *DNA strufsure and Funfsion; Chapter 1- Introdufsion to the Strufsure, propTETRA ve OTCies, and reactions od DNA; Editör, R. R. Sinden, Academic Press, California, 1994, sayfa 1-57.*

- [46] Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara., P., Erdem, A., Ozsoz M., (2001). Electrochemical DNA biosensor for the determination of Benzo[a]pyrene - DNA adducts, *Anal. Chim. Acta.*, 450: 45-52.
- [47] Mikkelsen S.R., (1996). Electrochemical Biosensor for DNA sequence Detection A Review, *Electroanalysis*, 8(1): 15-19.
- [48] Palecek, E., (1988). New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 20: 179-194.
- [49] Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Jiang, M., Paz, J.L.L., Waymire, R., Nielsen, T.W., Getts, R.C., (1998). Adsorption and detection of DNA dendrimers at carbon electrodes, *Electroanalysis*, 10(8): 553-556.
- [50] Carpini, G., Lucarelli, F., Marrazza, G., Mascini, M. (2004). Oligonucleotidemodified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2): 167-175.
- [51] Erdem A., Kerman K., Meriç B., Akarca U.S., Ozsoz M. (1999). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Electroanal.*, 11: 586-588.
- [52] Kelley, S.O., Boon, E.M., Barton, J.K., Jackson, N.M., Hill, M.G., (1999). Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA, *Nucl. Acids Res.*, 27: 4830-4837.
- [53] 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.
- [54] 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 A-668 A.
- [55] Müller, W., Crothers, D. M. (1975). Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids, *Eur. J. Biochem.*, 54: 267-277.

- [56] Firedman, T., Brown, D. M. (1978). Base specific reactions uTETRA VE OTCul for DNA sequencing: methyleneblue – sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxide modification of thymine, *Nucl. AcidsRes.*, 5: 615-623.
- [57] McGown, L. B., Joseph, M. J., Pitner, J. B., Vonk, G. P. ve Linn, C. P. (1995). TheNucleicacid ligand: A newtool for molecularrecognition, *Anal. Chem.*, 67: 663 A668 A
- [58] Ozsoz, M., 2005. Elektrokimyasal DNA biyosensorleri. Gıda kongresi (19-21 Nisan 2005 Bornova/İzmir) Sozlu bildiriler s:266-273.
- [59] 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.
- [60] 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.
- [61] Kurbanoglu S, Plata E, Ozkan SA, Uslu B (2016). Advances in electrochemical DNA biosensors and their interaction mechanism with pharmaceuticals. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775, 8–26.
- [62] Le LH, Pham VP, La TH (2016). Electrochemical aptasensor for detecting tetracycline in milk. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, 7, 015008 (6pp).