

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK TANIYA YÖNELİK DNA HİBRİDİZASYONUNA
DAYALI ELEKTROKİMYASAL GENOSENSÖR
TASARIMI**

Analitik Kimya Programı

Doktora Tezi

Uzman Eczacı
Pınar KARA KADAYIFCILAR

Danışman
Prof. Dr. M. E. Şengün ÖZSÖZ

İZMİR
2007

ÖNSÖZ

Çalışmalarımdeki değerli katkılarından dolayı başta Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, danışmanım, Sayın Prof. Dr. Mehmet Emin Şengün ÖZSÖZ'e, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Cengiz Çavuşoğlu'na, Anabilim Dalımızdaki diğer tüm Öğretim Üyelerine teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Çalışmalarıma maddi destek sağlayan Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'na, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM), Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) ve Devlet Planlama Teşkilatı'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her zaman desteklerini gördüğüm tüm değerli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında büyük bir sabır göstererek verdiği maddi ve manevi destek ile hep yanımda olan annem Hatice KARA'ya, eşim Fatih KADAYIFCILAR'a, ve tüm aileme teşekkür ederim.

Arş. Gör. Uzm. Ecz. Pınar KARA KADAYIFCILAR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	II
TABLolar DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
GİRİŞ VE AMAÇ	1

BÖLÜM I
GENEL BİLGİLER

1.1. Elektroanalitik Kimya	10
1.1.1. Elektrokimyasal Hücreler	11
1.1.2. Faradayik ve Faradayik Olmayan Akımlar	12
1.1.3. Polarizasyon	14
1.1.4. Elektrot Yüzeyinde Gerçekleşen Olaylar	15
1.1.4.1. Elektrolizde Oluşan Elektrokimyasal Tabakaların İncelemesi	15
1.1.4.2. Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları	16
1.1.4.3. Elektrot Yüzeyinde Konsantrasyon Değişimleri	17
1.1.5. Elektroanalitik Yöntemler	19
1.1.5.1. Voltametri	20
1.1.5.2. Voltametrik Cihazlar	21
1.1.5.2.1. Voltametrizde Kullanılan Referans Elektrotlar (Karşılaştırma Elektrotları)	22
1.1.5.2.2. Voltametrizde kullanılan çalışma elektrotları	24
1.1.5.3. Voltametrik Teknikler	29
1.1.5.3.1. Dönüşümlü Voltametri (CV)	29
1.1.5.3.2. Kare Dalga Voltametrisi (SWV)	30
1.1.5.3.3. Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)	31
1.1.5.3.4. Sıyırma Yöntemleri	33
1.2. Nükleik Asitler	34
1.2.1. Nükleik Asitlerin Yapısı	34

1.2.2. Nükleik Asitlerin Kimyasal Yapısı	37
1.2.3. Genetik Bilgi Aktarımı	39
1.2.3.1. Replikasyon.....	39
1.2.3.2. Transkripsiyon ve translasyon.....	40
1.2.3.3. Reverz (ters) transkripsiyon	40
1.2.4. DNA ile ilgili bazı terimler ve açıklamaları.....	40
1.2.5. Hibridizasyonun Kinetiğini Etkileyen Faktörler	44
1.3. DNA Analizleri.....	45
1.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	45
1.3.2. Amplifiye Edilmiş Ürünlerin Saptanması	48
1.3.2.1. Spektrofotometrik yöntemler	49
1.3.2.2. Elektroforetik yöntemler	49
1.3.2.3. DNA'nın enzimatik kesimi	49
1.3.2.4. Nükleik Asitlerin Melezlemesine Dayalı Yöntemler	50
1.3.2.5. Diğer Teknikler	53
1.4. Elektrokimyasal Genosensörler (DNA Biyosensörleri)	54
1.4.1. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler	56
1.4.2. Elektrokimyasal Genosensör ile DNA Dizi Algılama Yöntemleri.....	58
1.4.2.1. İndikatöre Dayalı Genosensörler ile Dizi Algılama Yöntemleri	59
1.4.2.1.1. İnterkalatör molekül kullanarak	60
1.4.2.1.2. DNA bazları ile etkileşen bir molekül aracılığıyla.....	61
1.4.2.2. İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemleri	62

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar	64
2.1.1. Elektrokimyasal Sistemler.....	64
2.1.2. Diğer Cihazlar	65
2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	65

2.2.1. Kimyasallar	65
2.2.2. Çözeltiler	66
2.3. Kullanılan DNA Dizileri	66
2.3.1. Oligonükleotid çözeltilerinin hazırlanışı	70
2.3.2. PCR Ürünü Örneklerinin Hazırlanması	70
2.3.3. Sentetik oligonükleotitler ve PCR ürünlerinin spektrofotometre ile miktar tayini	71
2.4. Kullanılan Yöntem	71
2.4.1. Elektrotların hazırlanması	73
2.4.2. Elektrot yüzeylerinin kaplanması	73
2.4.3. Elektrot Yüzeylerine Prob Bağlanması	73
2.4.4. Hibridizasyon	74
2.4.4.1. Sentetik hot-spot hedef dizisi ile hibridizasyon	74
2.4.4.2. PCR ile çoğaltılmış bakteri örnekler ile hibridizasyon	75
2.4.5. Yıkama	75
2.4.6. Voltametrik Ölçüm	75
2.5. İncelenen Parametreler	76
2.5.1. Sentetik hot-spot Hedef Dizisi ile Hibridizasyon Tayini	77
2.5.2. Hibridizasyon ve Mutasyon Analizlerinin En Uygun Koşullarının Saptanması	77
2.5.2.1. Prob Derişiminin Hibridizasyon ve Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi	77
2.5.2.1.1. Prob Derişiminin Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesi	77
2.5.2.1.2. Prob Derişiminin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi	78
2.5.2.2. Hedef Derişiminin Hibridizasyon ve Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi	78
2.5.2.2.1. Hedef Derişiminin Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesi	78
2.5.2.2.2. Hedef Derişiminin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi	79
2.5.2.3. Hibridizasyon Zamanının Hibridizasyon ve Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi	79

2.5.2.3.1. Hibridizasyon Zamanının Alınan Yanıt Etkisinin İncelenmesi	80
2.5.2.3.2. Hibridizasyon Zamanının Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi	80
2.5.2.4. Yıkama Tamponunun Hibridizasyon ve Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi.....	80
2.5.2.4.1. Yıkama Tamponunun Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesi.....	81
2.5.2.4.2. Yıkama Tamponunun Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi	81
2.5.2.5. Yıkama Zamanının Hibridizasyon ve Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi.....	81
2.5.2.5.1. Yıkama Zamanının Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesi.....	82
2.5.2.5.2. Yıkama Zamanının Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi	82
2.5.3. Sentetik Hot-spot Dizi ile Saptanan En Uygun Koşullarda Hibridizasyon Tayini.....	82
2.5.4. Tüm PCR Ürünlerini Kullanarak Direnç Mutasyon Analizi.....	84

BÖLÜM III

BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Sentetik Hot-spot Dizi ile Hibridizasyon Tayinde Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi.....	85
3.2. Hibridizasyon ve Mutasyon Analizlerinin En Uygun Koşullarının Saptanmasına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	88
3.2.1. Prob Değişiminin Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	88
3.2.2. Prob Değişiminin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi.....	89
3.2.3. Hedef Değişiminin Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	91

3.2.4. Hedef Derişiminin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	92
3.2.5. Hibridizasyon Zamanının Alınan Yanıtta Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	94
3.2.6. Hibridizasyon Zamanının Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	95
3.2.7. Yıkama Tamponunun Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	96
3.2.8. Yıkama Tamponunun Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	98
3.2.9. Yıkama Zamanının Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	99
3.2.10. Yıkama Zamanının Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	101
3.3. Sentetik Hot-spot Dizi ile Saptanan En Uygun Koşullarda Hibridizasyon Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	103
3.4. Tüm PCR Ürünlerini Kullanarak Direnç Mutasyon Analizine ait Bulguların Değerlendirilmesi.....	104

BÖLÜM IV

SONUÇ ve ÖNERİLER

ÖZET	114
ABSTRACT	116
YARARLANILAN KAYNAKLAR.....	118
ÖZGEÇMİŞ.....	136

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Algılama ve Çevirici Bölümlerine Göre Biyosensörler	55
Tablo 2: Çalışmada kullanılan DNA dizileri.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Elektrokimyasal Hücre	11
Şekil 2: Elektrot yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabaka.....	16
Şekil 3: Elektrot yüzeyindeki tabakaların şematik gösterimi	18
Şekil 4: Üçlü elektrot sisteminin çalışma prensibi	21
Şekil 5: Üçlü elektrot sisteminin genel gösterimi.....	22
Şekil 6. Grafit tozunda bulunan karbon.....	27
Şekil 7. Karbon pastası elektrodu. moleküllerinin dizilimi.	27
Şekil 8: Kalem ucu grafit elektrot.	28
Şekil 9: Altın elektrot.....	28
Şekil 10: (a) Dönüşümlü voltametrde elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği; (b) Dönüşümlü voltametrde elde edilen akım-gerilim eğrisi.	29
Şekil 11: Diferansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri.....	32
Şekil 12: Dijital cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali.....	32
Şekil 13: DNA çift sarmalının genel görünüşü	35
Şekil 14: 5'–3' şeker –fosfat bağı ile bir polinükleotit zincirinin oluşumu.	36
Şekil 15: Nükleik asitlerin birbirine bağlanması ve baz çifti oluşturması	38
Şekil 16: Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik gösterimi	47
Şekil 17: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> bakterisinin, rpoB gen bölgesinde RIF'e karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının Biotin işaretli diziler kullanılarak tayini.....	52
Şekil 18: Biyosensörün yapısı ve bileşenleri.....	55
Şekil 19: İnterkatör bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması	61
Şekil 20: DNA bazlarından biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması	62
Şekil 21: İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi.....	63
Şekil 22: Guanin ve İnozinin kimyasal yapıları.....	68
Şekil 23: Guanin ve inozinin elektrokimyasal yanıtları arasındaki fark	69

Şekil 24: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> rpoB direnç mutasyonu tayini çalışma basamakları	72
Şekil 25: Grafit elektrot yüzeyine; 5' ucunda aminohekzil işaretli prob dizinin kovalent bağlanması.....	74
Şekil 26: <i>Mycobacterium tuberculosis</i> S prob dizilerinin sentetik hot-spot dizi ile hibridizasyon tayininin şematik gösterimi.	83
Şekil 27: S1 prob dizi ile kaplı elektrot yüzeyinde S1 bölgesinde direnç mutasyonu içeren ve bu bölgede direnç mutasyonu içermeyen iki PCR ürünü örneğine ait mutasyon analizinin şematik gösterimi.....	84
Şekil 28: Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak A) S1, B) S2, C) S3, D) S4, E) S5 prob tutturulmuş elektrot yüzeyinde; a) prob tutturulmadan önce, b) herhangi bir hedef dizi içermeyen boş hibridizasyon tamponu ile, c) tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile ve d) sentetik hot-spot dizi ile hibridizasyonundan sonra elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerine ait voltamogram.	87
Şekil 29: Artan derişimde S1 prob kaplanmış elektrot yüzeyinde sabit 15 µg /mL derişiminde a) sentetik hot-spot dizi, b) tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyondan sonra diferansiyel puls voltametri tekniği ile alınan guanin yükseltgenme sinyaline dayalı histamogram.....	88
Şekil 30: Artan derişimlerde tüm S prob dizileri kaplanmış elektrot yüzeylerinde S1 bölgesinde direnç mutasyonu gösteren denatüre edilmiş PCR ürünü örnek ile hibridizasyonun ardından diferansiyel puls voltametrisi ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram.	90
Şekil 31: Sabit 10 µg /mL derişiminde S3 prob dizi kaplanmış elektrot yüzeyinde artan derişimlerde a) sentetik hot-spot dizi, b) tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyondan sonra diferansiyel puls voltametri tekniği ile alınan guanin yükseltgenme sinyaline dayalı histamogram.....	91

- Şekil 32:** Sabit 10 µg /mL derişiminde tüm S1, S2, S3, S4 ve S5 problemleri kaplanmış elektrot yüzeylerinde artan derişimlerde S4 ve S5 bölgelerinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü örnek ile hibridizasyonu sonucu diferansiyel puls voltametri ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram.93
- Şekil 33:** S2 prob dizisi kaplı elektrot yüzeyinde **a)** hot-spot dizisi, **b)** tüm bazları hedeften farklı rasgele dizisi ile hibridizasyonun ardından diferansiyel puls voltametri ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram.94
- Şekil 34:** Tüm S problemleri kaplı elektrot yüzeylerinde, denatüre edilmiş ve S4 ve S5 bölgelerinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü örnek ile hibridizasyondan sonra diferansiyel puls voltametri ile alınan guanin yükseltgenme sinyallerine ait histamogram.96
- Şekil 35:** S1 kaplı elektrot yüzeyinde; **a)** hot-spot dizisi ile **b)** tüm bazları hedeften farklı rasgele dizisi ile hibridizasyondan sonra farklı yıkama tamponları kullanılarak diferansiyel puls voltametri ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram.97
- Şekil 36:** Tüm S problemleri kaplı elektrot yüzeyinde denatüre edilmiş S4 ve S5 bölgelerinde direnç mutasyonu içeren örnek ile hibridizasyonun ardından, farklı iyonik dengelere sahip A) 1xSSC + %0.1SDS, B) 1xSSC + %0.5SDS, C) 2xSSC + % 0.1SDS, D) 2xSSC + %0.5SDS, E) 3xSSC + %0.1SDS ve F) 3xSSC + %0.5SDS içeren 6 farklı yıkama tamponu ile muamelesinden sonra diferansiyel puls voltametri ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram99
- Şekil 37:** S2 kaplı elektrot yüzeyinde; **a)** hot-spot dizisi, **b)** tüm bazları hedeften farklı rasgele dizisi ile hibridizasyonun ve farklı zamanlarda yapılan yıkama işlemlerinden sonra alınan guanin sinyallerine ait histamogram..... 100

- Şekil 38:** Tüm S prob dizileri kaplı farklı elektrot yüzeylerinde S3 bölgesinde direnç mutasyonu içeren denatüre edilmiş PCR ürünü örnek ile hibridizasyonundan sonra, 0,1,5,10,15, 30 ve 60 dakikalık yıkama zamanlarının uygulamasının ardından diferansiyel puls Voltametri tekniği ile alınan guanin sinyallerine ait voltamogram.....103
- Şekil 39:** Diferansiyel puls voltametrisi ile S1, S2, S3, S4 ve S5 prob kaplanmış elektrot yüzeylerinde **a)** hot-spot dizi ile,**b)** tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyondan sonra alınan guanin yükseltgenme sinyallerine ait histamogram.104
- Şekil 40:** Elektrot yüzeyine tüm S prob dizilerinin bağlanmasının ardından hibridizasyondan önce, (**prob**), tüm bazları hedeften farklı PCR ürünü ile (**rasgele dizi**), aynı anda S1 ve S2 bölgelerinde (**1. Örnek**), yalnızca S3 bölgesinde (**2. Örnek**) ve aynı anda S4 ve S5 bölgelerinde (**3. Örnek**) direnç mutasyonu içeren örnekler ile hibridizasyonundan sonra diferansiyel puls voltametrisi ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram.105
- Şekil 41:** *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin RIF'e karşı gösterdiği direnç mutasyonlarının saptanması amacıyla dizayn edilen bir elektrokimyasal genosensör.....106
- Şekil 42:** 21 adet *Mycobacterium tuberculosis* PCR ürünü örneğin elektrot yüzeyine tutturulan; **a)** S1 prob,**b)** S2 prob,**c)** S3 prob, **d)** S4 prob, **e)** S5 prob dizileri ile hibridizasyonu sonucu diferansiyel puls voltametrisi ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram.108
- Şekil 43:** Elektrokimyasal genosensör teknolojisi ile *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin RIF'e karşı gösterdiği direnç mutasyonlarının analizi için EVET / HAYIR sistemine dayalı mikroarray tasarımı.109

GİRİŞ VE AMAÇ

Biyolojik materyallerden (kan, serum, hücre, doku, bitkisel ekstrakt vs.), gıdalardan ya da çevresel atıklar gibi çeşitli patojenleri taşıma riski olan örneklerden spesifik nükleik asit tayini insanlarda kalıtsal ve mikrobiyolojik kökenli hastalıkların erken tanısına yol açar. Biyolojik materyallerden nükleik asit tayini; örnek hazırlama, incelenecek olan nükleik asit dizisinin çoğaltılması ve tayini olmak üzere üç basamaklı işlemlerden oluşur.

Örnek hazırlama basamağı DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması aşamalarını içerir. İlk önce ilgili hücreler nükleik asit eldesi için hücre membranının parçalanması suretiyle yok edilir. Daha sonra serbest kalan nükleik asitler farklı yöntemler ile ekstraksiyona ve saflaştırılmaya tabi tutulurlar.

Genellikle ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinden sonra elde edilen nükleik asit miktarı gerekli analizlerin yapılması için yeterli değildir. Bundan dolayı nükleik asitin belirli bir bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılma işlemine tabi tutulur.

Çoğaltılmış nükleik asit dizilerinin tayini için en sık kullanılan yol, etidyum bromürlü ortamda DNA'nın uzunluğuna göre ayrıldığı jel elektroforezi yöntemidir. Mutasyon analizlerinde ise restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi ve ardından elektroforeze uygulama yapılması en sık başvurulmuş yöntemdir.

Moleküler tanı yöntemleri “İnsan Genom Projesi”nin geliştirilmesi ile elde edilen insan genetik yapısına ilişkin yeni bilgiler ve bu bilgilerin sağlayacağı ileri düzeyde araştırmaların etkisiyle son yıllarda çok hızlı bir ilerleme göstermiştir.

Kan, serum, doku, hücre vb. gibi biyolojik materyallerden belirli bir hastalık, mutasyon gibi kalıtsal bir davranışı simgeleyen özgün DNA dizilerinin saptanması çalışmaları, son yıllarda tıpta ve diğer bilim dallarında önem kazanmış, bakteri, virüs, parazit, mantar gibi mikrobiyolojik kökenli hastalıklar ve kalıtsal hastalıklara neden olan bazı mutasyonların saptanmasında kullanılmaya başlanmıştır.

Bilinen konvansiyonel yöntemlere alternatif olmak üzere elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (genosensör) kullanımı gündeme gelmiştir.

Biyosensörler, “biyo” (biyolojik kökenli) ve “sensör” (algılayıcı) kelimelerinden oluşan nitel ve nicel analiz yapabilen kompleks cihazlardır. Tanım olarak ise; “Birbiri içine geçmiş, biri biyokimyasal, diğeri çevirici olmak üzere iki birleşik sistemden oluşur. Biyokimyasal kısım, analizlenecek madde ile etkileşerek onu tanır. Bu etkileşme sonucunda oluşan biyokimyasal ürün, çevirici kısım tarafından okunabilir bir sayısal değere çevrilir (26).

Son 10 yılda biyosensör tasarımında nükleik asitlerden oluşan tanıma yüzeylerinin kullanılması yaygınlaşmış ve Analitik Kimya alanında çip teknolojisine yönelik genosensör tasarımı çalışmaları oldukça hızlanmıştır (97,115,116,128). Bu çalışmalar, gerek Analitik Kimya gerekse diğer bilimlere yeni ve ender boyutlarda özellikler ekleyerek gelecekte hasta başında ve doktor gözetimindeki analizlerde çok önemli rol oynayacaktır (44, 59, 77, 84, 123).

Genosensörler; herhangi bir hastalığı, kalıtsal bir davranışı ya da bakteri ve virüslerinin patojenitesini simgeleyen bir prob DNA dizisinin, bu diziye karşılık gelen hedef diziyle oluşturduğu çift sarmalın biyokimyasal yapısı tanınma olayını mümkün kılmaktadır (9). Bu olayı ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştüren çeviricinin yüksek duyarlılığı ve hibridizasyonun yüksek seçiciliği genosensörlerin çevre analizlerinde, DNA-ilaç etkileşim tayinlerinde ve bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların tanısında kullanımını gerektirmektedir (36-39, 45, 62, 63, 73,78).

DNA tanıma yüzeyleri içeren genosensörler, dizisi belli genlerin hibridizasyon tayininde bu dizilere ilişkin kalıtsal ve infeksiyon hastalıkların tayininde ve bu yüzeyle etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojenik maddeler, ilaçlar vs) tayininde kullanılabilir (3,62, 63, 66, 73, 74, 101). Tayinler, DNA bazlarının birinin yükseltgenme sinyalindeki (indikatörsüz yöntem) ya da bu bazlardan en az biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörünün ve ya interkalatör özellikteki bir hibridizasyon indikatörünün yükseltgenme ve ya indirgenme sinyalindeki değişikliklerden (indikatörlü yöntem) yola çıkarak yapılır (4, 8-11, 16, 17, 24, 29-35, 43-45, 59).

Günümüzde kalıtsal ve infeksiyon hastalıkların indikatöre dayalı tanısında DNA bazlarından biriyle etkileşen örneğin Metilen Mavisi, ya da DNA çift sarmalında baz çiftleri arasına yerleşerek interkalasyon yapan örneğin Meldola Mavisi, etidyum bromür, rutenyum bipiridin, kobalt fenantrolin, akridin türevleri (9-aminoakridin, proflavin, akridin oranj vb) hibridizasyon indikatörü olarak kullanılmaktadır (16, 21, 29-34, 44, 56, 60, 69, 79, 83,110, 118).

Son yıllarda elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde, herhangi bir indikatör kullanmadan DNA bazlarından biri olan Guanin ve Adenin yükseltgenme sinyallerinden yararlanarak hibridizasyon tayini çalışmaları başlamış ve hızla ilerlemiştir. İndikatörsüz DNA hibridizasyon tayini yöntemi ile bazı infeksiyon ve kalıtsal hastalıkların tanısına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (11-13, 35, 41, 57, 59, 61, 66, 67, 121-127).

Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörleri, kalıtsal ve infeksiyon hastalıkların tanısında bilinen rutin analiz yöntemlerine göre alternatif olarak daha hızlı, ucuz ve kolay bir yöntemdir.

Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle kalıtsal ve infeksiyon hastalıkların tanısı amacıyla tasarlanan ve klinik uygulamalara hazır hale gelen genomik DNA çiplerinin tasarımı nükleik asit hibridizasyonuna dayanır (108).

Mikroarray teknolojisine yönelik ilk elektrokimyasal çalışmalar; K. Millan ve arkadaşları tarafından kistik fibrozise ait DNA dizileri kullanılarak bu hastalığın tayini için yapılmış (89), daha sonra J. Wang ve arkadaşları aynı tekniği kullanarak *E. Coli* ve *Mycobacterium tuberculosis*'e ait dizileri tayin etmişlerdir (125,126). Bunun dışında S. Mikkelsen'in 1994 yılında yapmış olduğu, kalıtsal hastalıkların dizi seçici DNA biyosensörleriyle tayin (88) Amerika Birleşik Devletleri tarafından korumaya alınmıştır (A.B.D. Patent No: 5.312.527-05/17/1994).

Teknolojinin gelişmesi ve ilerlemesi ile birlikte DNA mikroarray çalışmaları da hızlanmıştır. Bir yandan güvenilir ve hızlı yeni yöntemler için çalışmalar yapılırken bir yandan da daha ucuz, hızlı ve güvenilir yeni yöntemlerin geliştirilme çalışmaları yapılmaktadır.

Tüm bu çalışmaların doğrultusunda geliştirilen çeşitli mikroçip teknolojilerine dayalı cihazların kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. GeneChip® ve Affimetrix firmalarının ürettiği küçültülmüş biyosensörler binlerce genin tek bir çipte analizine olanak vermektedir. GeneChip® firmasının mikroçiplerinde DNA izolasyonu, çoğaltımı, işaretlenmesi ve optik yolla analiz tekniği esas alınmıştır (1). Bu analizler ayrıca tarayıcı sistemleri içermesinden dolayı oldukça pahalıdır (108). Bilinen bu yöntemlere alternatif olmak üzere elektrokimyasal genosensörlerin tasarımı gündeme gelmiştir.

Diyabetli hastalar için kullanılan glukoz oksidaz enziminin elektrokimyasal davranışına dayalı glukoz biyosensör teknolojisinin gelişimi bu teknolojinin DNA testleri için de kullanılabileceği fikrini doğurmuştur. Glukoz sensörüyle hastanın kendi başına kısa sürede ve kolayca kan glukoz seviyesini ölçebilmesi hayat kurtarıcı bir buluş olmuştur. Aynı şekilde hastaların kan örneğinin DNA biyosensörü (genosensör)'ne damlatılıp hastalık tanısı yapabilmesi düşüncesi, bu teknolojiye yönelik çalışmaların hızlanmasına yol açmıştır. Bu gelişmeler ile bir çok hastalığın önlenmesinde önemli bir faktör olan erken tanı fikrini doğurmuş, hatta ileride bu teknolojinin gelişimiyle hasta başında yada hasta tarafından evinde kolayca gerçekleştirilebilecek cihazların tasarımı çalışmaları hızlanmıştır.

Clinical Micro Sensors ile birlikte yine bir Amerikan şirketi olan Motorola'nın hazırlamış olduğu Affymetrix, Thorp ve arkadaşlarının kurduğu Xanthon Inc. firmalarında DNA mikroçiplerinin ön çalışmaları bitmiş ve bu çipler klinikte kullanıma hazır hale getirilmiştir. Tüm bu çalışmalar çok yakın bir süre sonra elektrokimyasal DNA mikroçiplerinin kullanıma hazır olacağını göstermiştir (51).

Genellikle optik yöntemlere dayanan mikroçip tekniklerine alternatif olarak daha ucuz ve daha hızlı bir yöntem olan elektrokimyasal genosensöre dayalı mikroçiplerin tasarımı çalışmalarına da başlanmıştır. November AG firması tarafından yürütülen Çip Üzerinde Laboratuar Teknolojisi (Laboratory on a Chip) olarak adlandırılan teknik üzerinde önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bu yeni teknolojinin amacı; tek bir çipte tüm genomun izlenmesini ve binlerce gen arasındaki etkileşmenin aynı zamanda belirlenmesini sağlayabilmektir. Bu teknolojinin esası elektrokimyasal genosensördür.

Araştırmanın Konusu ve Amacı

Tüberküloz hastalığı, insanlık tarihi boyunca toplumların gündeminde kalmış, araştırmacıların ilgi odağı olmuş, başlıca sağlık problemlerinden biridir. Tüberküloz ve lepra (cüzam) dışında hiçbir enfeksiyon hastalığının bu kadar eskiye dayandığına dair kanıt yoktur. Aynı zamanda enfeksiyon sonrası ölümlere yol açan en önemli bakterilerden biridir. Robert Koch 1882'de tüberküloza neden olan basilin izolasyonunu sağlamıştır. Bunu 1921'de tüberküloz aşısının bulunuşunu 1944'de ilk tüberküloz ilacı olan streptomisin keşfi takip etmiştir.

Tüberküloz tedavisinde kullanılan başlıca ilaçlar; izoniazin (INH), rifampin (RIF), pirazinamid (PZA), etambutol (ETA), streptomisin, sikloserin, kanamisin, kapreomisin gibi antibiyotikleridir.

Tüberküloz tedavisinden en çok korkulan konu ilaç direncidir. Tedavi sırasında kullanılan antibiyotiklere bakterinin direnç gösterme insidansı arttıkça bu enfeksiyona bağlı ölüm oranları da artmaya başlamıştır. Tedaviye

bağlı gelişen direncin erken tanısı etkili tedavi için çok önemlidir. Bugün dünyada en az 50 milyon çoklu ilaç dirençli tüberküloz olgusu bulunmaktadır. Tüberküloz hastalarında ilaç kullanımı ile ilaca karşı gelişen direncin klinik olarak hız bir şekilde saptanması tedaviye yeni bir yön verilmesi açısından önem taşımaktadır.

Rifampisin (RIF) en çok kullanılan antitüberküloz ilaçlarından biridir. Hidrofobik hücre zarından hızla difüze olur. Bakterinin DNA'ya bağımlı RNA polimerazın potent inhibitörü olarak etki eder. RIF, RNA polimerazı B alt ünitesine ait rpoB geni tarafından kodlanan B alt ünitesine bağlanarak inhibe eder. Türkiye'de yapılan RIF direnci DNA dizi çalışmalarında vakaların %95'inden fazlasının bakterinin rpoB genin 507-533. kodonlarını içeren 81 bazlık gen bölgesinde olduğu görülmüştür (18- 20). Bu da protein sentezinde inhibisyona yol açar ve klinikte çok sık rastlanır.

RIF direncine neden olan mutasyonların saptanması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Doğrudan dizinin bulunması yöntemi genel olarak kullanılmaktadır. Ancak bu oldukça zaman alıcı ve pahalıdır.

Günümüzde elektrokimyasal genosensörlerin hastalıkların tanısında kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu alanda son gelişmeler, elektrokimyasal mikroçip üretilmesine yönelik uygulamaları kapsamaktadır. Elektrokimyasal genosensörler diğer yöntemlere oranla daha ucuz, hızlı ve mikro boyutlarda tayine yönelik olması ile önemlidir (75, 76, 96, 101, 113, 117).

Çalışmada mutasyonların en sık gözlemlendiği 507 -513. kdonları içeren 81 baz uzunluğundaki rpoB genine ait 5 farklı bölgeden prob diziler seçildi. Bu diziler 5' ucunda amino heksil [$\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6$] işaretli olup içeriğindeki tüm

guaninler, analoğu olan inozin modifiye olarak sentezlenmiştir. Burada amaç; İndikarösüz Genosensör ile direnç mutasyonlarının analizini yapmaktır (52, 60).

Literatürde J. Wang, *Mycobacterium tuberculosis* basilinin indikatöre dayalı tanısını, ilk olarak elektrokimyasal genosensör ile sentetik oligonükleotid diziler kullanarak yapmıştır (126). Ancak direnç mutasyonlarının analizine ait elektrokimyasal genosensörler ile herhangi bir benzer çalışma bulunmamaktadır.

Tez alışması kapsamında; indikatörsüz elektrokimyasal genosensöre dayalı, ileride tasarlanabilecek bir mikroçip teknolojisine yönelik ve klinik tanıya uygulanabilir şekilde, *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin RIF antibiyotiğine karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının analizi amaçlanmıştır. Kullanılan yöntemin herhangi bir işaretleme basamağı ve karsinojenik materyallerin kullanımını gerektirecek bir hibridizasyon indikatörü kullanılmamaktadır. Böylece daha hızlı ve daha ekonomik bir genosensör tasarımına yol açmıştır.

Çalışmada mikroçip teknolojisine yönelik olarak tasarlanan tek kullanımlık grafit elektrotlar kullanılmıştır. Elektrot yüzeyine 5' ucundan aminohekzil işaretili prob diziler kovalent olarak tutturulmuş ve diziler inozin modifiye olduğu için Diferansiyel Pulse Voltametri (DPV) ile yapılan ölçümlerde elektrokimyasal bir guanin yükseltgenme sinyali alınmamıştır. Hedef dizi ile hibridizasyondan sonra alınan guanin sinyallerin farklılıkları; mutasyon analizinin temelini oluşturan EVET / HAYIR siteminin geliştirilmesini sağlamıştır. Hedef dizi ile hibridizasyonun en uygun koşulları; en uygun prob ve hedef dizilerin derişimleri, hibridizasyon, ve yıkama zamanı

ve koşulları incelenerek sağlanmıştır. Gerek sentetik diziler gerekse gerçek örnekler kullanılarak yapılan bu en uygun koşulların belirlenmesi aşamalarından sonra PCR ile oğaltılmış tüm gerçek örnekler denenmiş ve direnç mutasyonları saptanmıştır.

BÖLÜM I

GENEL BİLGİLER

1.1. Elektroanalitik Kimya

Elektrokimya, madde ile elektrik enerjisi arasındaki etkileşmeyi, bu etkileşimin sonucunda oluşan kimyasal enerjinin fiziksel enerjiye dönüşümü gibi kimyasal ve fiziksel değişimleri inceleyen bilim dalıdır (2). Elektrokimya bilimi bir maddeden diğer maddeye olan elektron geçişini inceler, bu olay, tayini yapılacak analit hakkında bilgi verecek akımı oluşturur.

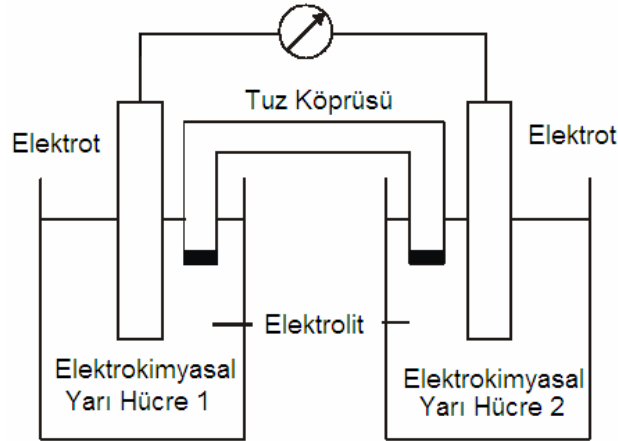
Elektroanalitik kimya, analit çözeltisi (analizi yapılacak olan çözelti), bir elektrokimyasal hücrenin parçası olduğunda çözeltinin elektrokimyasal özelliklerine dayanan bir grup kantitatif analit yöntemi kapsar. Elektrokimyasal tepkimeler, elektron transferi veya geçişi olan yükseltgenme - indirgenme türü tepkimeler olup elektrokimyasal hücre adı verilen bir kaptadır. Elektroanalitik yöntemler diğer analiz yöntemlerine göre bazı üstünlüklere sahiptirler. Elektrokimyasal ölçümler çoğu kez bir elemente, bir moleküle ve ya tepkime sonunda oluşan ürüne özel bir yükseltgenme / indirgenme basamağına özgüdür. Elektroanalitik yöntemlerin diğer bir üstünlüğü de kullanılan cihazların daha ucuz olmasıdır (2).

Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi için, incelenen maddeyi içeren bir çözelti, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrot sistemi

(genellikle üçlü elektrot sistemi) ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir çevirim sistemi (transducer) gereklidir. Çözelti olarak elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla tampon çözelti kullanılır. Çeşitli elektroanalitik yöntemler ile Doğru akım (DC), Diferansiyel Puls Voltametri (DPV), Dönüşümlü Voltametri (CV), Kare Dalga Voltametri (SWV), vb. de belirli potansiyel aralığında tarama yapılarak meydana gelen akım şiddeti ölçülür. Akım, difüzyona bağlı olarak oluştuğundan dolayı burada ölçülen difüzyon akımıdır. Difüzyon hızı akım ile doğru orantılıdır. Difüzyon, elektrot yüzeyinin yakınındaki difüzyon tabakasında oluşur (27).

1.1.1. Elektrokimyasal Hücreler (2, 6)

Her biri uygun bir elektrolit çözeltisine daldırılmış elektrotlardan oluşan sistemdir. Bir hücrede bir akım oluşabilmesi için, (a) elektronların bir metal iletken ile dış bağlantılarının sağlanması, (b) çözeltiler arasında birinden diğerine iyon geçişine imkan verecek bir temas olması, (c) elektrotların her birinde bir elektron aktarımı reaksiyonunun cereyan etmesi gereklidir.



Şekil 1: Elektrokimyasal Hücre

1.1.2. Faradayik ve Faradayik Olmayan Akımlar (2, 116)

Elektrot çözelti ara yüzeyinden akım iki tip işlemle iletilir. Birincisinde elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonu olurken diğesinde indirgenme reaksiyonu olur. Bu sırada elektronların doğrudan aktarımı ile akım iletilir. Bu tip işlemlere bir elektrottaki kimyasal reaksiyon miktarının geçen akımla orantılı olduğunu ifade eden Faraday yasalarına uygun olması nedeniyle *faradayik işlemler* adı verilir, bu şekilde oluşan akımlara *faradayik akımlar* (i_f) denir.

Faradayik olmayan (kapasitif) akımlar ise; elektrot / çözelti arayüzeyindeki yüklü bir çift tabakadan oluşan bir yükleme akımıdır. Bir elektrodun bir yükleme çözeltisine daldırılması ve negatif yükle yüklenmesi ile çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin arayüzeyin iki tarafında birikmesi ile bu bölgede bir elektriksel çift tabaka oluşur. Oluşan bu çift tabaka bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya indirgenecek madde olmasa bile bir akım oluşur. Bu akım reaksiyona bağlı değildir ve sistemden kaynaklanır ki bu akıma faradayik olmayan kapasitif akım (i_c) denir.

Faradayik ve kapasitif akım arasındaki temel farkı anlamak için dış devreden elektrot yüzeyine doğru hareket eden bir elektron düşünülüğünde; elektron çözelti arayüzeyine ulaştığında sadece iki şeyden birini yapabilir. Elektrot yüzeyinde kalarak faradayik olmayan bir akımı meydana getiren bir çift tabakadaki yükü arttırabilir, yada diğ bir alternatif olarak, elektrot

yüzeyini terk edebilir ve çözeltideki türlere aktarılarak faradayik bir akımın parçası olabilir.

Elektrokimyasal Bir Olayda Faradayik İşlemler

Çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonları olurken diğerinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir. Bu reaksiyonlarda;



Burada O (oksidan); kimyasal tepkimelerde elektron alarak (indirgenerek) karşısındakini yükseltgeyen madde, R (redüktan); kimyasal tepkimelerde elektron vererek (yükseltgenerek) karşısındakini indirgeyen maddedir..

O ve R'nin, sırasıyla, redoks çiftinin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade ettiği tepkime ile gösterilmektedir. Termodinamik kurallarla kontrol edilen sistemlerde, elektrot potansiyeli, elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişiminin [$C_O(0,t)$ ve $C_R(0,t)$], Nernst Denklemine (eşitlik 1) göre saptanmasında kullanılabilir.

Eşitlik 1:

$$E = E^0 - \frac{R.T}{n.F} \ln \frac{C_R(0,t)}{C_O(0,t)}$$

E^0 = Redoks tepkimesi için standart potansiyel

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

T = Sıcaklık ($^{\circ}\text{K}$)

n = Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

F = Faraday sabiti (96,487 coulombs)

Elektrot arayüzeyinde meydana gelen redoks tepkimesi sırasında akım, elektronların doğrudan aktarımı yoluyla iletilir. Bir elektrottaki kimyasal madde miktarının geçen akımla doğru orantılı olduğunu ifade eden bu tip işlemlere, *faradayik işlemler*, bu şekilde oluşan akımlara da *faradayik akımlar* adı verilir. Analizlenecek madde ve ürünlerin konsantrasyonları yalnızca elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak ve Nernst tabakası içinde değişir.

1.1.3. Polarizasyon

Elektrokimyasal bir hücrede uygulanan potansiyel akıma karşı grafiklendiğinde Eşitlik 2'e göre küçük akımlarda doğrusal bir grafik elde edilir. (Ölçümler E_{katot} ve E_{anot} 'un önemli ölçüde değişmeyeceği şekilde kısa bir zaman aralığında gerçekleştirildiğinde). Belirli bir potansiyel uygulanmasından sonra potansiyel artışı ile akım doğrusallıktan sapmaya başlar (2).

Eşitlik 2

$$E_{\text{uygulanan}} = E_{\text{katot}} - E_{\text{anot}} - IR$$

E_{katot} ve E_{anot} ; Nernst eşitliğinden hesaplanan elektrot potansiyelleridir.

IR; Elektrokimyasal hücrenin Ohmik potansiyelidir. Ohm kanununa göre bir hücrenin ohm olarak direnci ile hücreden geçen akımın çarpımı hücrenin ohmik potansiyeli (IR düşüşü) olarak ifade edilir.

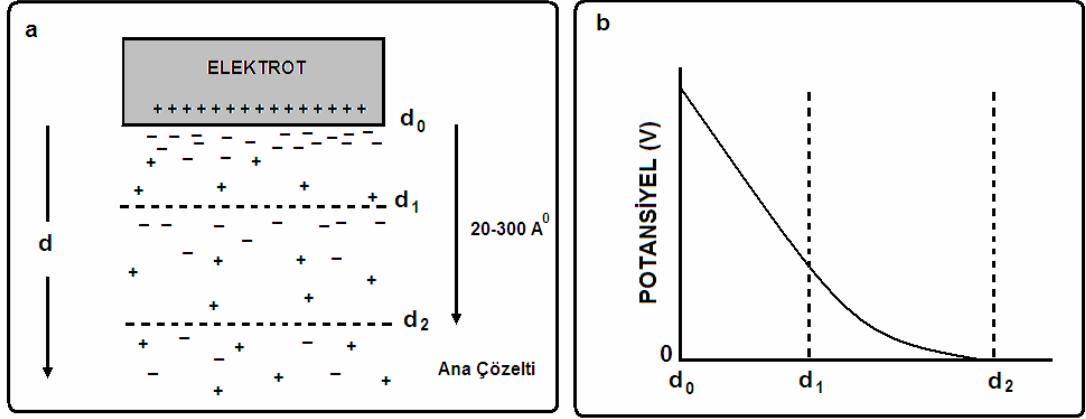
Bu nedenle hücrede I amperlik bir akım oluşturmak için termodinamik potansiyelden $-IR$ volt kadar negatif bir potansiyel ($E_{\text{uygulanan}}$) uygulanmalıdır.

1.1.4. Elektrot Yüzeyinde Gerçekleşen Olaylar

1.1.4.1. Elektrolizde Oluşan Elektrokimyasal Tabakaların İncelemesi

Elektrik akımı kullanılarak bir çözücü içerisinde çözülmüş kimyasal maddelerin ayrıştırılması işlemine elektroliz denir. Çözeltideki analitin sahip olduğu elektroaktif özellik nedeniyle, elektrot yüzeyine potansiyel uygulandığında karşıt yüklü iyonlar elektroda doğru hareket eder. Bu hareket sonucunda atom ve moleküler elektroda bağlanarak tepkimeye neden olurlar (50).

Elektroda pozitif bir gerilim uygulandıktan hemen sonra eğer elektrodun yüzeyinde tepkimeye girebilecek aktif bir tür yoksa, hızlı olarak sıfıra düşecek anlık bir akım dalgası oluşacaktır. Bu akım elektrodun yüzeyinde bir negatif yük fazlalığı veya eksikliği yaratan bir yükleme akımıdır. Fakat iyonik hareketliliğin bir sonucu olarak elektrotlara bitişik olan çözelti tabakalarında derhal bir zıt yükleme oluşur. Bu etkileşim Şekil 2'de gösterilmiştir. Elektrodun yüzeyinde, uygulanan pozitif gerilimin bir sonucu olarak pozitif bir yük fazlalığı oluşmuştur. Yüklü çözelti tabakası iki kısımdan oluşur.



Şekil 2: Elektrot yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabaka.

a) Yoğun iç tabaka (d_0 'dan d_1 'e): bu tabakada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça ortaya çıkan potansiyel mesafe ile doğru orantılı olarak azalır.

b) Difüze tabaka (d_1 'den d_2 'e): burada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça ortaya çıkan potansiyel üssel olarak azalır. Elektrot yüzeyindeki ve yüzeye bitişik çözeltideki bu yük topluluğu bir elektriksel çift tabaka olarak adlandırılır.

$i = i_f + i_c$ olduğundan i_c azalır ise duyarlılık artar.

Genellikle 10^{-3} M ve üstünde; $i_c < i_f$ dir ve çalışılabilir. 10^{-4} M da kısmen iyi sonuç alınır. 10^{-5} M ve üstünde; $i_c \gg i_f$ olduğu için çalışılmaz.

1.1.4.2. Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları (2, 6).

Bir elektrokimyasal hücrenin çalışması sırasında maddenin elektrot yüzeyine aktarımı üç şekilde gerçekleşmektedir. Bunlar; elektriksel göç (migrasyon), Difüzyon ve karıştırma olarak adlandırılır.

1- Elektriksel göç (MİGRASYON): Elektrokimyasal hücredeki katot ile anot arasındaki gerilim farkı elektriksel bir alan oluşturur. İyonlar bu alanın etkisiyle ters yüklü elektroda doğru hareket etme eğilimi içine girer ve böylece *migrasyon (elektriksel göç)* adı verilen bir olayla kütle aktarımı olur. İyonların elektriksel alandaki hareket hızları, iyonun yüküne, büyüklüğüne ve çalışma ortamındaki yönelme biçimine bağlıdır.

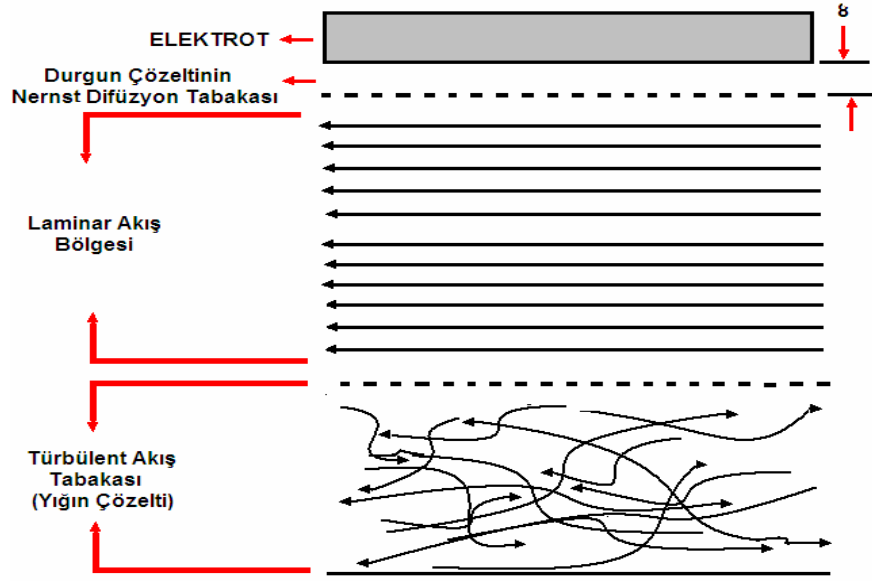
2- Karıştırma (KONVEKSİYON): Karıştırma veya titreşim sonucunda oluşan kütle aktarım yoludur.

3- Difüzyon: Hücrede elektrotta tüketilen elektroaktif maddenin arayüzeyde azalan derişimini arttırmak üzere çözeltilerden madde aktarımı, Difüzyon adını alır. Difüzyon ile kütle aktarım hızı, arayüzeyle çözeltilerin iç kesimleri arasındaki derişim farkına ve elektroaktif madde ile çözücünün türlerine bağlıdır.

Deneysel koşullara bağlı olarak bunlardan biri veya birkaçı kütle aktarımına katkıda bulunabilir.

1.1.4.3. Elektrot Yüzeyinde Konsantrasyon Değişimleri (2)

Karıştırılan bir çözeltiliye daldırılmış bir elektrot yüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal reaksiyona konsantrasyon / uzaklık değişimlerinin etkisini inceleyebilmek için önce karıştırılan çözeltilerde sıvı akışının nasıl geliştiğinin açıklanması gerekir. Genel olarak karıştırılan sistemlerdeki heterojen tabakaların bileşimi Şekil 3'de gösterilmiştir.



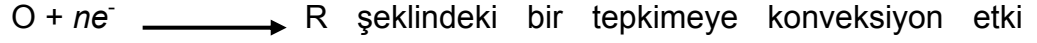
Şekil 3: Elektrot yüzeyindeki tabakaların şematik gösterimi.

Türbülent Akış Tabakası: Elektrot yüzeyinden uzakta bulunan çözelti yığınının gözlenir.

Laminer Akış Bölgesi: Yüzeğe yaklaşıldığında bir laminer akışa geçiş olur. Laminer akışta sıvı tabakaları elektrot yüzeyine paralel bir yönde birbirini üzerinde kayarlar.

Nernst Difüzyon Tabakası: Elektrot yüzeyinden δ cm uzaklıkta, laminer akımının hızı sıvı ile elektrot arasındaki sürtünmeden dolayı sıfıra yaklaşır ve bunun sonucunda da elektrot çevresindeki ince durgun bir çözelti tabakası oluşur. Genellikle bu çözelti tabakası, sıvının karıştırılma etkinliğine ve viskozitesine bağlı olarak 10^{-2} - 10^{-4} cm kalınlığında olabilmektedir. Analit ve ürünlerin derişimleri yalnızca bu tabaka içinde elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak değişir.

Elektrot yüzeyinde gerçekleşen;



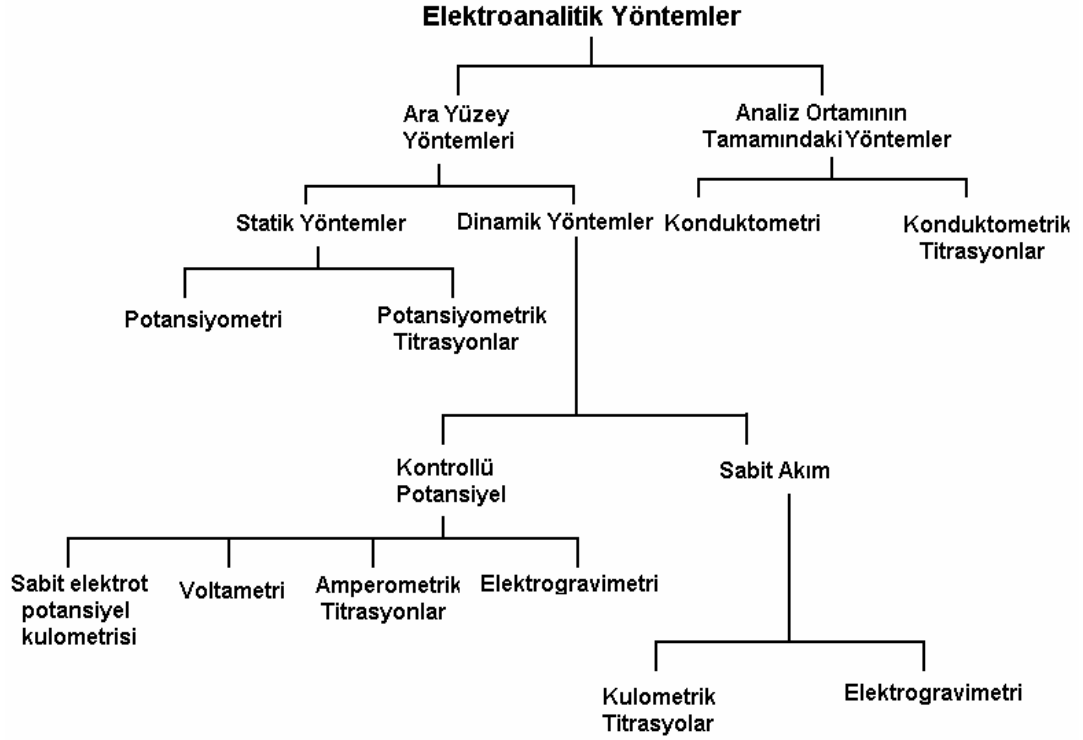
şeklindeki bir tepkimeye konveksiyon etki etmektedir. Konveksiyon laminar ve türbülent akış bölgelerinde O ile belirtilen maddelerin derişimlerini (C_0) başlangıç değerinde, R ile belirtilen ürünlerin derişimlerini (C_R) ise oldukça küçük bir değerde tutar.

1.1.5. Elektroanalitik Yöntemler (2)

Çok çeşitli elektroanalitik yöntemler önerilmektedir. Bunlardan en yaygın kullanılanlar aşağıda gösterilmektedir. Bu yöntemler ara yüzeyde gerçekleşen yöntemler ve tüm analiz ortamında gerçekleşen yöntemler olarak ikiye ayrılırlar.

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

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



1.1.5.1. Voltametri (116)

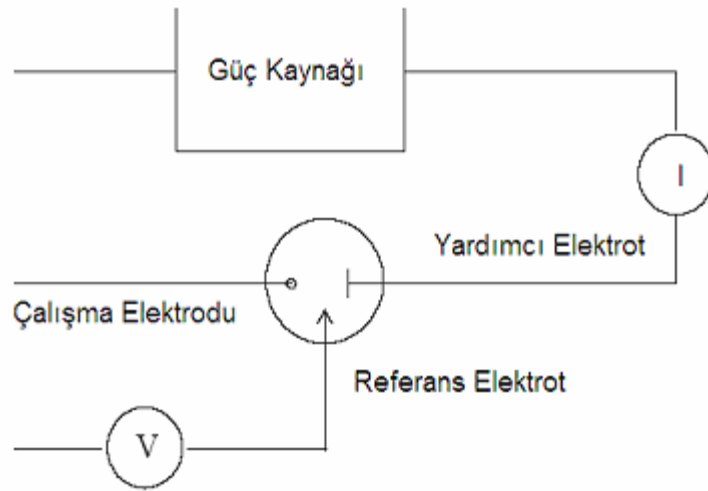
Voltametri, bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edilen bir grup elektroanalitik yöntemi kapsar. Voltametrde herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektroda uygulanabilecek gerilim aralığının sınırları, kullanılacak çalışma elektrodu, kullanılan çözelti ve elektrolitin türlerine bağlıdır.

Voltametri ilk olarak Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında voltametrinin özel bir tipi olan polarografi tekniğine dayanarak geliştirilmiştir. Voltametrinin hala önemli bir dalı olan polarografi, diğer voltametri tiplerinden çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodu kullanılması bakımından farklılık gösterir.

Voltametri, analitik kimya, inorganik kimya, fizikokimya ve biyokimyacılar tarafından çeşitli ortamlarda oluşan yükseltgenme / indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorbsiyon işlemlerinin incelenmesi, kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi analitik olmayan amaçlar içinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

1.1.5.2. Voltametrik Cihazlar

Voltametrik analizde kullanılacak cihazlar, elektrokimyasal hücre, analit (incelenecek madde) ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır.

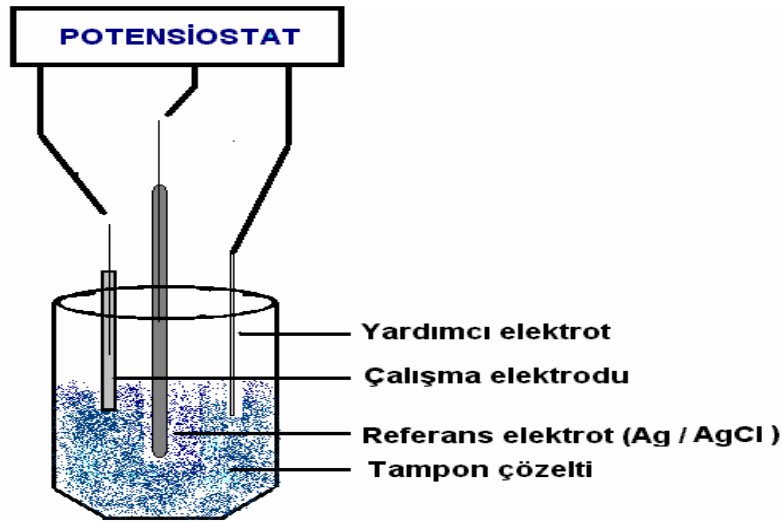


Şekil 4: Üçlü elektrot sisteminin çalışma prensibi

Çalışma elektrodu; Tasarımı yapılacak bir biyosensör bu üçlü sistemlerde kullanılabilir. Bu elektrot, yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur.

Referans elektrot; Referans elektrot, potansiyeli deney süresince sabit kalan bir elektrottur. Ag / AgCl veya doygun kalomel elektrot (DKE) kullanılabilir.

Yardımcı elektrot; Platin bir tel veya bir civa havuzu şeklinde olan ve elektriğin çözelti içinden çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlayan karşıt elektrottur. Bu elektrot, çalışma elektrotu ile bir çift oluşturan fakat ölçülen potansiyelin büyüklüğünün tayininde rol oynamayan bir elektrottur. Şekil 5, üçlü elektrot sistemini göstermektedir.



Şekil 5: Üçlü elektrot sisteminin genel gösterimi.

1.1.5.2.1. Voltametric Kullanılan Referans Elektrotlar (Karşılaştırma Elektrotları) (2, 28, 40, 107)

Elektroanalitik uygulamalarda elektrotlardan birinin yarı-hücre potansiyeli sabit, çalışılan çözeltinin bileşiminden bağımsız olması ve

değerinin bilinmesi istenir ve bu tanıma uyan elektrot **referans elektrot** olarak adlandırılır.

İdeal bir referans elektrot; 1) tersinirdir ve Nernst eşitliğine uyar, 2) zamanla değişmeyen bir potansiyeli vardır, 3) düşük bir akıma maruz kaldıktan sonra orijinal potansiyeline döner, 4) sıcaklık değişimiyle ufak bir histerisis gösterir.

Elektrokimyada ilk olarak Standart Hidrojen Elektrot (SHE) referans elektrot olarak kullanılmıştır. Ayrıca Hidrojen gaz elektrotlar, eskiden beri elektrokimyasal çalışmalarda sadece referans elektrotlar olarak değil, aynı zamanda pH tayinlerinde indikatör elektrotlar olarak da yaygın biçimde kullanılmıştır.

Referans elektrotların çeşitleri:

***Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrot:** En yaygın kullanılan referans elektrotlardan biri olan gümüş-gümüş klorür referans elektrot, Ag bir telin, elektrolitik yoldan AgCl ile kaplanarak Cl^- iyonu içeren bir çözeltiliye daldırılmasıyla elde edilir.

Doygun KCl çözeltisi kullanıldığı zaman standart hidrojen elektroduna göre potansiyeli, +0.222 V dur.

*** Kalomel Referans Elektrot:** Kalomel (Hg_2Cl_2) ve Hg' dan oluşmuş bir karışım, metalik civa ve KCl çözeltisinden oluşur. Bu elektrodun potansiyeli, klorür iyonlarının aktifliğine bağlıdır. Hazırlanışı çok kolaydır.

* **Civa – Civa (I) Sülfat Referans Elektrot:** Bu elektrot, doymun kalomel elektroda benzemektedir. Potansiyeli, sülfat iyonlarının aktifliği ile tayin edilir.

1.1.5.2.2. Voltametri de kullanılan çalışma elektrotları

Referans elektroda bağlı olarak çalışan ve cevabı analit derişimine bağlı olan elektroda çalışma elektrodu (indikatör elektrot) denir.

Voltametik analizlerin performansı çalışma elektrotlarında kullanılan materyalden önemli ölçüde etkilenmektedir. Çalışma elektrodu, tekrarlanabilir sonuç verme özelliğinin yanı sıra yüksek sinyal / gürültü oranı sağlamalıdır. Elektrodun kullanıma uygun olduğu potansiyel aralığı, elektrik iletkenliği, tekrarlanabilir yüzey elde edilmesinin kolaylığı, mekanik özellikleri, maliyeti, ulaşılabilirliği ve toksisitesi de incelenerek geliştirilmelidir.

Çalışma elektrodunun yapımında kullanılan iletken malzeme, platin ya da altın gibi inert bir metal; karbon, pirolitik grafit ya da camsı karbon; kalay oksit ya da indiyum oksit gibi yarı-iletken veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metal olabilir. Bu elektrotlar çeşitli Şekil ve büyüklükte olabilmektedirler ve biyosensör tasarımı için en uygun Şekilde geliştirilmektedirler.

Bu tür elektrotların kullanıldığı potansiyel aralığının tespiti çok önemlidir. Özellikle de bu potansiyel aralığı, sulu çözeltilerde sadece elektrot malzemesine değil, aynı zamanda bu elektrotların daldırıldığı çözeltilerin bileşimine bağlı olarak da değişir. Pozitif potansiyel sınırları genellikle moleküler oksijen verecek Şekilde, suyun yükseltgenmesi sonunda oluşan büyük akımlarla belirlenir. Negatif potansiyel sınırları yine suyun indirgenmesi sonunda oluşan hidrojen kaynaklanır.

Kullanılan çalışma ortamına göre çalışma elektrotları için seçilen potansiyel aralıkları; civa elektrodu için 1 M H₂SO₄ çalışma ortamında, (-0,8 V) ile (+0,4 V) aralığı ve 1 M KCl çalışma ortamında, (-1,6 V) ile (+0,2 V) aralığıdır. Karbon elektrodu için ise, 1 M HClO₄ ortamında, (+0,2 V) ile (+1,8 V) aralığı ile, 0,1 M KCl ortamında (-1,0 V) ile (+1,2 V) aralığıdır.

***Civa Elektrodu:** Civa elektrotları; negatif potansiyel sınırının çok yüksek olması, kolay oluşturulabilen yeni bir civa damlası ile taze bir metalik yüzey oluşturulabilmesi ve pek çok metal iyonun bir civa elektrodunun yüzeyinde amalgam oluşturmak suretiyle tersinir olarak indirgenebilmesini sağlaması ile voltametri de kullanılır. Ancak, civanın kolayca yükseltgenmesi ve toksik bir metal olması nedeniyle, kullanımı sınırlıdır.

*** Karbon Elektrotlar:** Karbon elektrotlar, özellikle çok ucuz olmaları ve geniş bir potansiyel aralığında çalışma yapılmasına olanak verdiği için dolayı elektrokimyasal analizlerde sık kullanılır. Ancak, karbonun, yüksek bir yüzey aktivitesi vardır ve bu nedenle organik bileşikler tarafından kolayca kirletilebilir. Hidrojen, hidroksil ve karboksil grupları ve hatta kinonlar ile karbon yüzeyinde bağlar oluşabilmektedir. Bu fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle karbon yüzeyine birçok değişik madde tutturulabilir.

Karbon Elektrotların Çeşitleri

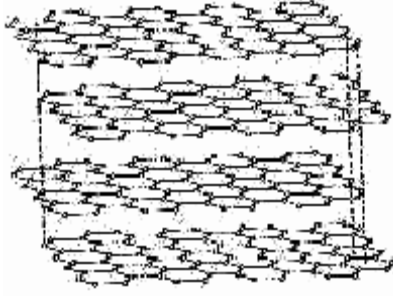
*** Perde baskılı karbon (grafit) elektrotlar(SCPE):** Son yıllarda tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar çok yaygın şekilde kullanım alanı bulmuştur. Özellikle biyosensör teknolojisinin geleceği olan DNA mikroçip

teknolojisine uygulanabilirliği açısından oldukça başarılı sonuçlar veren bu elektrotlar geleceğin elektrotları olarak gösterilmektedir (15, 71, 72, 80, 90).

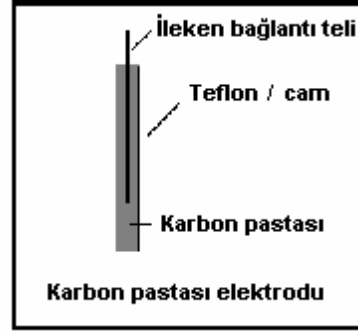
* **Camsı Karbon Elektrot (GCE)** : Camsı karbon fenol / formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin 1000⁰C - 3000⁰C arasında basınç altında karbonizasyona uğratılması ile elde edilir. Yüksek yoğunluğa sahip, kk porlar içeren amorf bir yapıdır. Birbirinin içine geçmiş, ince, grafitte benzer şeritlerden oluşmuştur. Karbon pastası elektrotlarına göre elektrokimyasal yanıt özellikleri yüzeyin çok daha pürüzsüz ve düzgün olması nedeniyle daha iyidir. Bunun yanısıra GCE yüzeyinin fiziksel dayanıklılığı daha yüksektir (63, 95,136).

* **Karbon Pastası Elektrodu (CPE)**: Grafit tozunda bulunan karbon moleküllerinin düzlemsel ve aromatik halkalar halinde dizilimi şekil 6' da görülmektedir. Zayıf π bağları ile birbirine bağlanmış olan bu tabakalar arasında hızlı bir elektron alışverişi olabilmektedir. şekli 7 bir karbon pasta elektrodunun genel gösterimidir.

CPE, ucuz olması, yüzey yenilenmesinin kolay olması, düşük artık akımlar oluşturması nedeniyle tercih edilmektedir. Bağlayıcı madde olarak, Nujol (mineral yağ), parafin yağı, silikon yağı ve bromonaftalen kullanılmaktadır. Elektrot aktivitesine pasta bileşiminin büyük etkisi vardır. Bağlayıcı organik sıvı oranı arttıkça, elektron transfer hızı azalmaktadır. CPE'nin en önemli sakıncası, yeterli miktarda organik çözgen içeren çözeltelerde kullanıldığı zaman, karbon pastası çözeltide dağılmaktadır (13, 54, 59, 61, 66, 70, 89, 99).



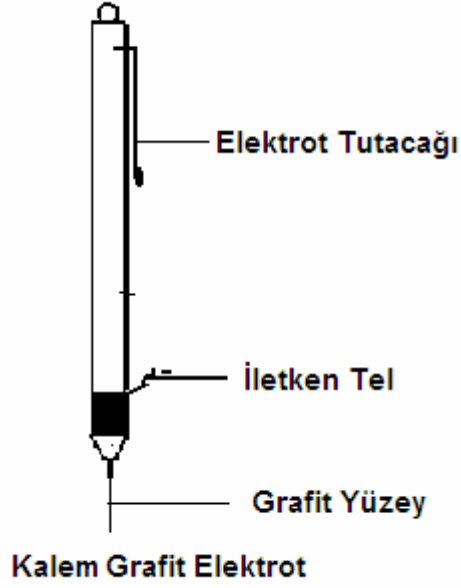
Şekil 6. Grafit tozunda bulunan karbon



Şekil 7. Karbon pastası elektrodu. moleküllerinin dizilimi.

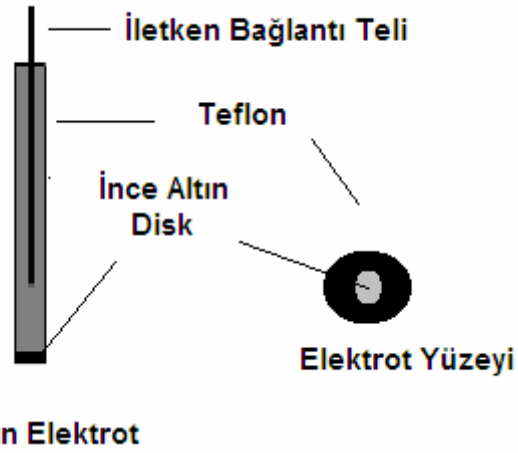
Kalem Ucu Elektrodu: Günümüzde kullanımı yaygınlaşmaya başlamış olan kalem grafit elektrotlar, tek kullanımlık olması ve kolayca yeni yüzey oluşturması sayesinde karbon pasta elektrotlarla kıyaslandığında üstünlük gösterir. Özellikle son yıllarda, bu elektrotlar ile tekrarlanabilirliğin daha iyi olması, daha düşük tayin sınırı, ucuzluk ve mikroçip tekniğine uygulanabilirliği gibi özellikleri ile elektrokimyasal çalışmalarda büyük ilgi görmektedir (35, 36, 58, 60, 121).

Çalışmada kullanılan kalem ucu elektrot; grafitten oluşmuş olup, Tombo HB kalem uçlarınının 3 cm boyutunda kesilmesiyle hazırlandı.



Şekil 8: Kalem ucu grafit elektrot.

Metal Elektrotlar: Platin ve altın en çok tercih edilen elektrot tipleridir.



Şekil 9: Altın elektrot (15, 47, 67, 96- 98).

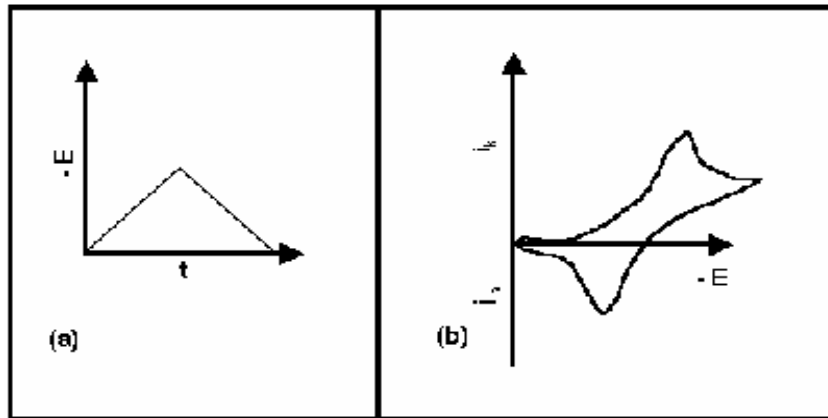
Diğer elektrotlar: Son on yıl içerisinde, boyutları mikroelektrotlardan daha küçük olan elektrotların tasarımı gerçekleştirilmiştir. Çapları 50 μm 'den daha küçük olan bu tip elektrotlara **ultramikroelektrotlar** denilmektedir.

1.1.5.3. Voltametrik Teknikler

Elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyelde sinyaller uygulanır. Bu uyarma sinyalleri, akım cevaplarını oluşturur. Bunlar, doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır. Bunlardan ilk üçü sıklıkla kullanılmaktadır (2).

1.1.5.3.1. Dönüşümlü Voltametri (CV)

Bu teknikle, gerilimin bir fonksiyonu olarak akım ölçülür. Sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı belirli bir aralıkta akımdaki değişim grafiğe geçirilerek **Dönüşümlü Voltamogram** elde edilir. Dönüşümlü voltametri ile durgun sistemde ve üçlü elektrot sistemiyle çalışılır. Burada hızı difüzyon tayin eder. Analitin yükseltgenmesi ve indirgenmesi voltamogramda gözlenebilmektedir. İlk olarak, potansiyel bir maksimuma kadar artar, daha sonra başlangıç değerine yine doğrusal olarak geri döner.



Şekil 10: (a) Dönüşümlü voltametri için elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği; (b) Dönüşümlü voltametri için elde edilen akım-gerilim eğrisi.

Kapasitif akımın en küçük olduğu bölgede çalışılır. Duyarlılık 10^{-5} M ile sınırlıdır. Dönüşümlü voltametri, miktar tayinine dayalı bir yöntem değildir ama analizlenecek maddenin hangi potansiyelde nasıl davrandığı hakkında bilgi verir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda o maddenin hangi potansiyelde optimum cevabı verebileceğini gösterir.

Dönüşümlü voltamogramların şekli ve yapısında seçilen potansiyel aralığının yanısıra seçilen tarama hızının, kaç defa tarama yapıldığının da etkisi vardır.

Bir dönüşümlü voltamogramdaki indirgenme ve yükseltgenme arasındaki pik gerilimleri farkı ΔE_p ile ifade edilir.

$$\Delta E_p = \frac{57}{n} mV$$

ΔE_p bu değere ne kadar yakın ise, reversible (dönüşümlü); ne kadar uzaksa irreversible (dönüşümsüz) olarak adlandırılır.

1.1.5.3.2. Kare Dalga Voltametrisi (SWV)

Son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir puls polarografi tekniğidir. Tersinir bir indirgenme reaksiyonunda bir pulsun boyutu, ileri tarama sırasında oluşan ürünün geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek kadar büyüktür. İleri puls bir katodik akımını (i_1), geri puls da bir anodik akımını (i_2) oluşturur. Kare dalganın, anodik ve katodik bölgesindeki iki noktaya ait akım değerlerinin farkları alınarak akım saptanır ($i = i_2 - i_1$). Yani elektrot tepkimelerinde yükseltgenme ile indirgenmede oluşan

akım farklılıkları alınır. Akımlardan biri negatif olduğu için fark akımların toplamını verir. Bu nedenle de duyarlılık yüksektir. Belirtme alt sınırı 10^{-7} - 10^{-8} M düzeyindedir.

1.1.5.3.3. Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)

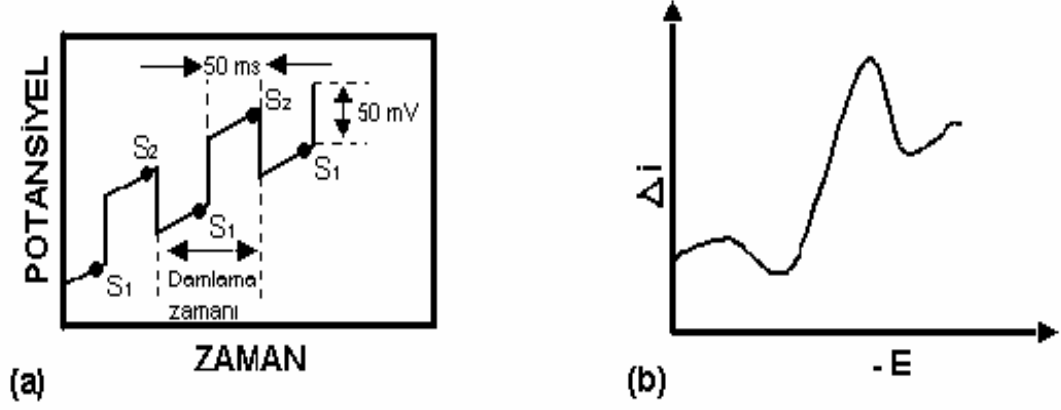
Bu teknikte, yarı-dalga potansiyelleri 0,04-0,05 V kadar farklı olan maddeler için bile pik maksimumları elde edilebilmektedir. Diferansiyel puls polarografisi, çok duyarlı bir yöntemdir ve tayin sınırı 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır.

10 mV' luk veya 50 mV' luk bir puls civa damlasına uygulanır. Uygulanan pulsun belli bir zaman öncesi ve sonrasında, puls başına elde edilen akımdaki fark (Δi), doğrusal olarak artan potansiyelin fonksiyonu olarak kaydedilir.

Gözlenen diferansiyel eğri pik şeklinde olup, yüksekliği konsantrasyonla doğru orantılıdır.

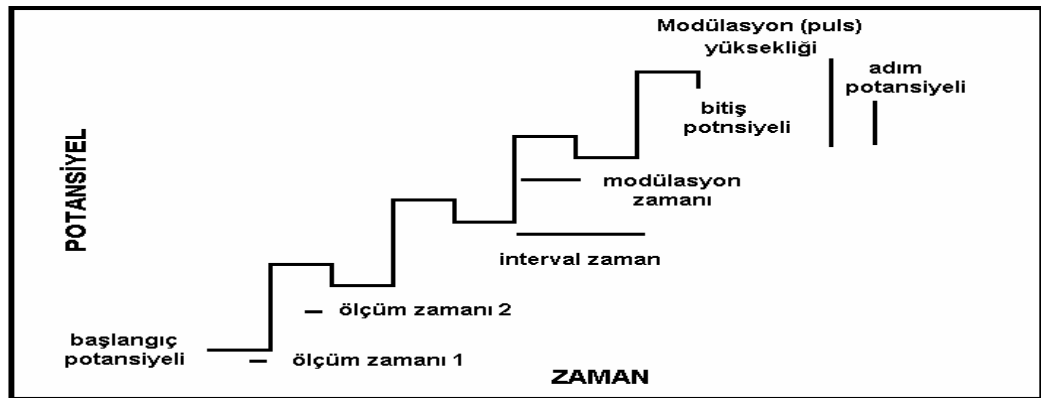
Faradayik akımın yüksek, faradayik olmayan yükleme akımının ise düşük değerde olması duyarlılığın artmasıyla açıklanabilir. Örneğin potansiyel aniden 50 mV arttırıldığında, elektrodu çevreleyen yüzey tabakasında, eğer elektroaktif bir tür varsa, analit derişimini yeni potansiyel tarafından istenen seviyeye düşürecek bir akım artışı gözlenir. Ancak bu potansiyel için gerekli olan denge derişimine erişilince, akım difüzyonu karşılayacak bir seviyeye düşer ki buna *difüzyon kontrollü akım* denir. Puls polarografisinde akım ölçümü, bu akım artışı tamamen sona ermeden önce yapılır. Toplam akım, difüzyon akımından büyüktür. Damla değiştğinde,

çözelti yeniden analizlenecek madde yönünden homojen hale gelmektedir (2, 116).



Şekil 11: Diferansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri; (a) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali; (b) Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen bir voltamogram.

Şekil 12' de dijital cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için uyarma sinyalleri yer almaktadır.



Şekil 12: Dijital cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali.

$$\text{modülasyon (puls) zamanı} = \frac{\text{adım gerilimi}}{\text{tarama hızı}}$$

Gerilim pulsu ilk uygulandığı zaman damla üzerinde yük artışı nedeniyle faradayik olmayan akımda da bir dalgalanma olur. Bu akım zamanla azalır ve yüzey alanının çok az değiştiği damla ömrünün sonuna doğru sifira yaklaşır. Dolayısıyla akımı bu anda ölçmek suretiyle faradayik olmayan artık akım büyük oranda azaltılır ve sinyal / gürültü oranı artar. Bunun sonucunda duyarlılık da artar (2).

Pulsun başlangıcından önce ve puls bitiminden önce akım değerleri alınır ve farkları kaydedilir. Tayin sınırı 10^{-8} M'dir. Modülasyon gerilimi sabit olduğundan dolayı kapasitif akım yaklaşık sabit baseline sahip olur ve yükseltgenip indirgenen maddeler de pik olarak görülür (5).

1.1.5.3.4. Sıyırma Yöntemleri:

Yöntemde önce analizlenecek madde, karıştırılan bir çözeltilde elektrot yüzeyinde biriktirilir. Belirlenen süre sonunda elektroliz ve karıştırma durdurularak uygun olan voltametrik yöntem ile tayin yapılır. Analizin voltametrik tayini içeren bu ikinci basamağında, madde elektrot yüzeyinde çözülür ve sıyırılır, bu yüzden yöntem sıyırma yöntemi adını alır.

Anodik sıyırma işleminde elektrot, biriktirme basamağında katot olarak, analizlenecek maddenin başlangıçtaki haline yükseltgendiği sıyırma

basamağında ise anot olarak davranır. Katodik sıyırma yönteminde ise anodik sıyırmanın tersine bir durum söz konusudur.

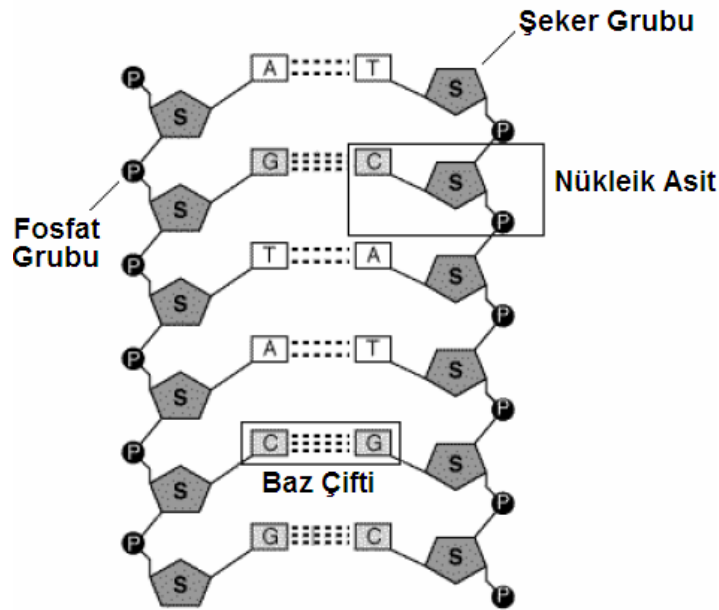
Eser element tayininde sıyırma yöntemleri önemli yer tutar, çünkü elektrolizdeki önderiştirme sayesinde eser miktardaki bir maddenin tayini gerçekleştirilebilir. Böylece $10^{-6} - 10^{-9}$ M derişimine sahip çözeltilerin analizi yapılabilir.

1.2. Nükleik Asitler

1.2.1. Nükleik Asitlerin Yapısı (49)

Nükleik asitler; iki nükleotidin birbiriyle fosfodiester bağı ile şeker ve fosfat gruplarının ardı ardına sıralandığı serilerden oluşan omurgaya sahip uzun polimerik yapılardır. Molekül içerisindeki nükleotid bağlarını parçalayan nükleaz enzimlerine **endonükleaz**, iki uçtan parçalayanlara ise **ekzonükleaz** adı verilmektedir. DNA (Deoksiribonükleik asit) moleküllerine ait X-ışınları difraksiyon verileri ve Chargaff tarafından DNA molekülünde adenin (A) ve timin (T) miktarları ile guanin (G) ve sitozin (C) miktarlarının eşit olduğu belirlenmiştir. Buna dayanarak Watson, Crick ve Wilkins tarafından 1950 yıllarında DNA yapısı için çift zincirli heliks şeklindeki yapı modeli önerilmiştir. Bazları arasında yer alan hidrojen bağları tarafından çift sarmal DNA molekülünün iki zinciri birarada tutulmaktadır. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmal iç kısımda fosfat ve şeker omurgası ise dış kısımda yer aldığı için sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Pürin ve pirimidin nükleotidleri arasındaki eşleşmeler son derece spesifiktir

(A-T ve G-C şeklinde). Bu sayede, DNA yapısında yer alan bir polinükleotid zinciri daima ikinci zincirin tamamlayıcısı olduğundan, bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde ikinci zincirdeki baz dizisi bulunabilmektedir. DNA ısıtıldığında, heliks yapısı bozularak ikiye ayrılır. Denatürasyon adı verilen DNA heliks yapısının bozulması 260 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçülerek gözlemlenebilmektedir. G ve C arasında üç hidrojen bağı ($G=C$) bulunduğundan yüksek derişimde G ve C içeren DNA iki hidrojen bağı taşıyan A ve T ($A=T$) bulunduran DNA yapısına göre daha yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır. Uygun şartlar altında çift zincirli DNA tekrar oluşabilir, bu işlem renatürasyon olarak isimlendirilir.

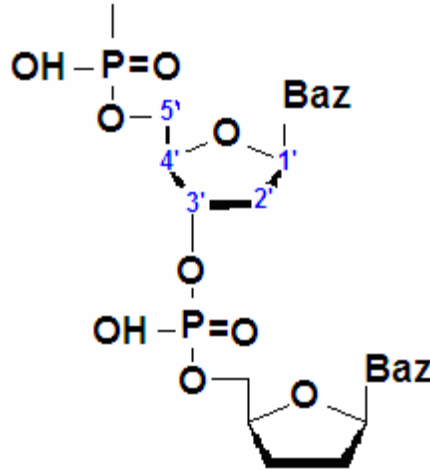


Şekil 13: DNA çift sarmalının genel görünüşü

Çift sarmal şeklindeki molekülün bir zinciri $5' \rightarrow 3'$ yönüne doğru, diğeri ise $3' \rightarrow 5'$ yönüne doğru olduğu için ters yönde paraleldir. Heliks içinde, iki zincirin arasındaki üç boyutlu sistemdeki ilişki, büyük oluk (majör) ve küçük

oluk (minör) oluşturmak şeklindedir. Molekülündeki zincirler, çift sarmalın dış yüzeyindedir. Bu zincirlerden her biri kovalent bağlılığı sağlayan fosfodiester köprülerinin bulunduğu fosfat ve pentoz gruplarından oluşmuştur. DNA çift sarmalın her iki zinciri, pürin ve pirimidin bazlarının arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulmaktadır.

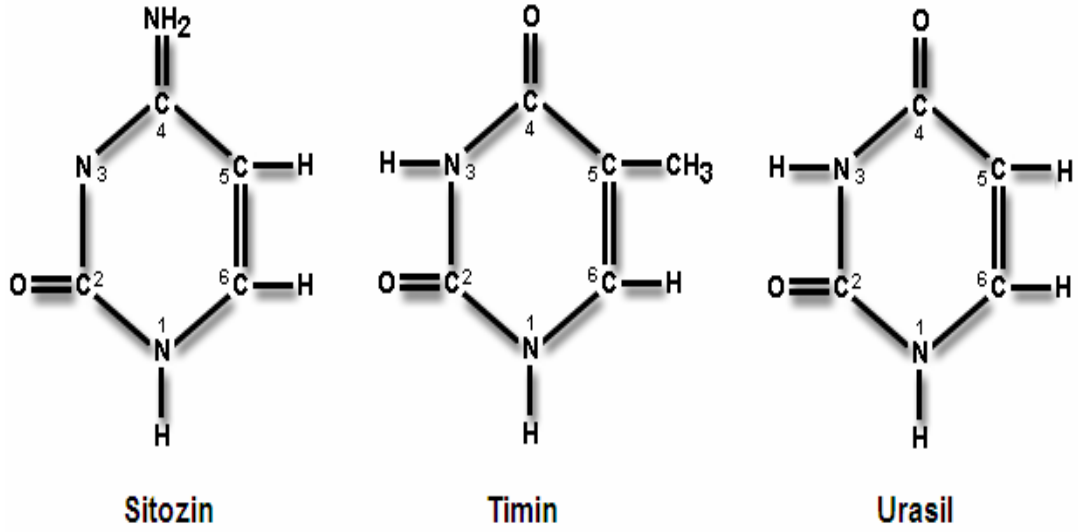
Watson ve Crick tarafından 1953 yılında önerilen ilk DNA yapısı, sağa doğru yönelmiş, her dönüşte 10 nükleotidi bulunan ve küçük oluğa mükemmel yerleşen bağlı su ile stabilize olabilen yapıya sahiptir. DNA dehidrate edildiği zaman, yapısal değişikliğe uğrayarak A-DNA adını almaktadır. A-DNA da sağa doğru yöneliktir ve her dönüşünde 11 nükleotid bulunmaktadır. Çift sarmalın çapı, pentoz gruplarının yapılanmasıyla genişlemektedir. Bu durumun bir sonucu olarak DNA'nın boyu kısalmaktadır (129, 130).



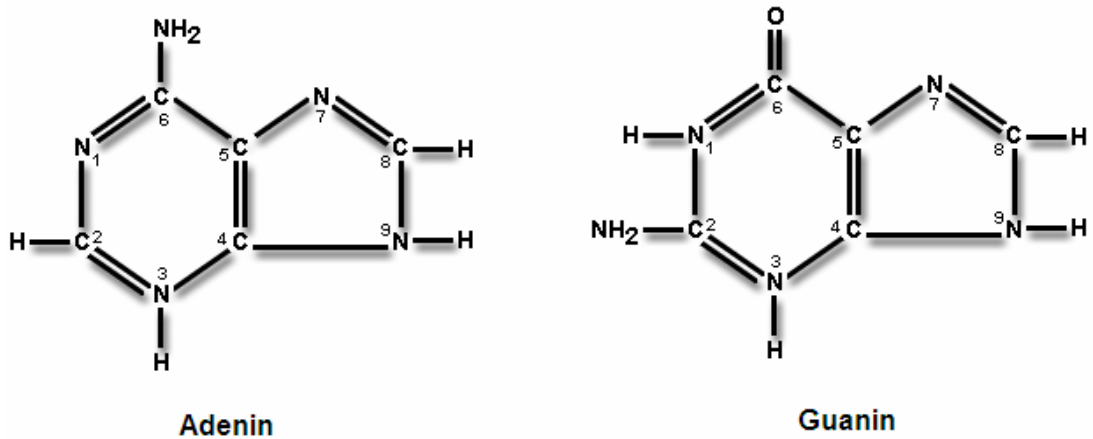
Şekil 14: 5' – 3' şeker –fosfat bağı ile bir polinükleotit zincirinin oluşumu.

1.2.2. Nükleik Asitlerin Kimyasal Yapısı (68, 129)

Primidin bazları: Sitozin (C), timin (T) ve urasil (U) primidin halkasına sahip nükleotid bazlarıdır. Sitozinde C-4'de $-NH_2$, timinde C-5'de $-CH_3$, urasilde C-4'de O ve bulunması durumuna göre birbirlerinden ayrılırlar.



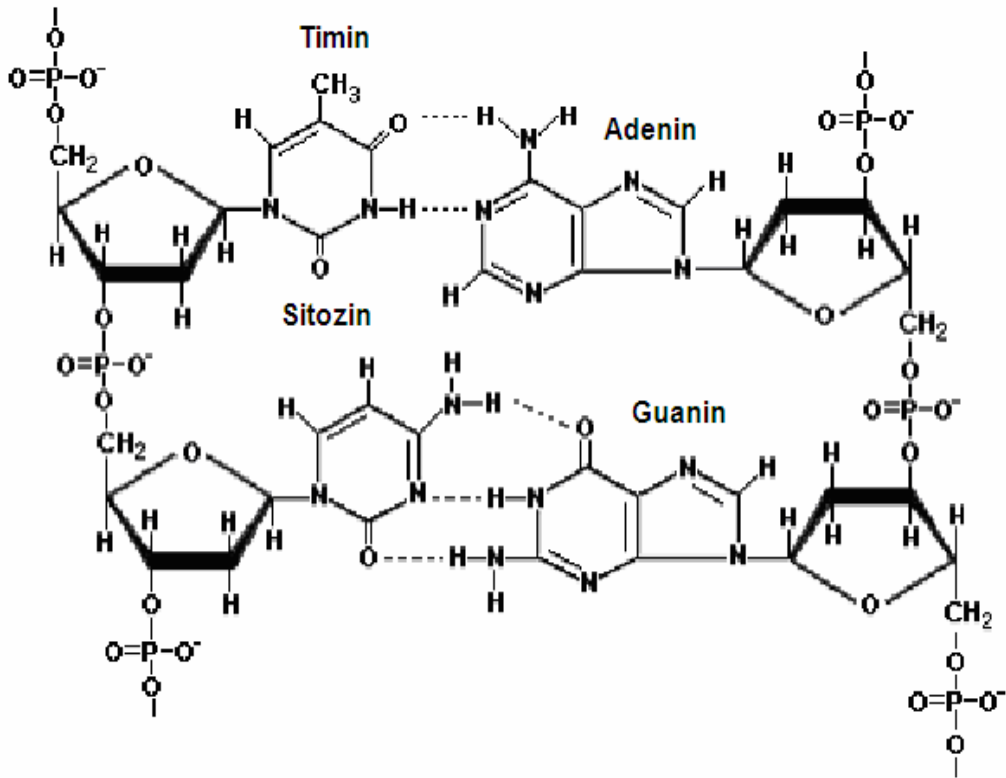
Pürin bazları: Adenin (A) ve guanin (G) pürin halkasına sahip nükleotid bazlarıdır. Guaninde C-2'de $-NH_2$, C-6'da O, Adeninde C-6'da $-NH_2$ bulunmasına göre birbirinden farklılık gösterirler.



Fosfat Grubu: Fosfat grupları pentoz şekerlerin 5 numaralı karbon atomlarındaki – OH gruplarına bağlanırlar.

Şeker Grubu: Nükleotitlerdeki şeker grupları 5 karbonlu pentoz şekeridir ve ribozdan (RNA) veya deoksiribozdan (DNA) türemiştir.

Nükleotidler: Bir nükleotid bazına ve fosfat grubuna bağlı 5 karbonlu şeker biriminden oluşan yapıdır. Nükleik asitlerin alt birimleridirler. Adenin ve guanindeki 9 numaralı, sitozin ve timindeki 1 numaralı N atomu, şekerin 1 numaralı C atomuna N- glikozidik bağ ile bağlanmasıyla oluşur.



Şekil 15: Nükleik asitlerin birbirine bağlanması ve baz çifti oluşturması.

1.2.3. Genetik Bilgi Aktarımı (93, 94)

Hücre içindeki bütün biyolojik olayları kontrol eden DNA'nın 3 temel fonksiyonu vardır bunlar; DNA replikasyonu, transkripsiyon & translasyon ve reverz transkripsiyon.

1.2.3.1. Replikasyon

DNA replikasyonu hücre bölünmesi sırasında bir zorunluluktur. Replikasyon sonucunda hücredeki genetik materyal iki katına çıkar, hücrenin iki yavru hücreye bölünmesiyle, kalıtım materyali de ikiye bölünür ve denge sağlanır. Genetik bilgi ana bireyden yavru bireylere DNA replikasyonu ile geçer. Her DNA molekülü çoğalabilmek için kendi yapısını kalıp DNA olarak kullanır. Her iki iplikçik ayrılarak birer kalıp DNA görevi görür, böylece serbest nükleotitlerle birleşerek kendilerine yeni birer iplikçik sentezlerler. Replikasyon sırasında gerçekleşen basamaklar aşağıdaki gibidir;

- a) replikasyon başlangıç noktasında DNA sarmalı açılır,
- b) nükleotid monomerlerin her biri sentezlenmekte olan iplikçiğe DNA polimeraz enzimi ile ilave eldir,
- c) sentezlenen yeni iplikçikteki baz dizisi ana iplikçiğe antiparalel olarak yerleşir,
- d) sentezlenen yeni iplikçikler birbirine hidrojen bağları ile bağlanırlar.

1.2.3.2. Transkripsyon ve translasyon

DNA'nın belirli bir geninden RNA molekülü sentezlenmesi olayına **transkripsyon**, adı verilir. Hücre içinde bulunan genetik şifrelerin yararlanılır bir hale gelmesi için aracı bir molekül olan mesajcı RNA (mRNA)'a aktarılması gerekir. Oluşan RNA molekülü şifresi doğrultusunda protein sentezi gerçekleşir. Proteini oluşturan amino asitlerin mRNA şifresine uygun olarak sentezine ise **translasyon** adı verilir. Ana DNA iplikçisindeki şifrenin RNA'ya aktarılması RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir.

1.2.3.3. Reverz (ters) transkripsyon

Transkripsyon sırasında RNA polimeraz DNA iplikçiklerinden birini kalıp olarak kullanarak buradaki genetik bilgiyi olduğu gibi mRNA'ya aktarır (DNA mRNA). Ancak kalıtım maddesi olarak RNA'ya sahip bazı virüsler kalıp olarak RNA'yı kullanırlar. Bu tür virüsler içerdikleri reverz transkriptaz enzimi ile bir anti paralel DNA (c-DNA) oluştururlar. Böylece bir RNA /DNA hibriti oluşur, oluşan bu cDNA bir kalıp görevi görür ve DNA polimeraz ile ikinci iplikçisi sentezler.

1.2.4.DNA ile ilgili bazı terimler ve açıklamaları

Nükleotid: Bir fosfat, bir pentoz ve pürin yada pirimidin yapısındaki bir organik bazın bir araya gelmesiyle oluşan yapıdır. Nükleik asitlerin monomerleridir.

Oligonükleotid: Birden fazla nükleotidin fosfodiester bağları ile bağlanarak yan yana dizilmesi ile oluşur.

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

Prob : Baz dizisi belli olan oligonükleotid.

Hedef dizi (Target) : Prob dizisinin karşılığını içeren sentetik oligonükleotid, PCR ile ya da klonlanarak çoğaltılmış DNA parçası ya da tüm DNA'yı ifade eder.

Yanlış eşleşen dizi (Mismatch) : Bir baz veya birden fazla baz hedef diziden farklı olan ve dolayısıyla yanlış eşleşen oligonükleotid.

Rastgele dizi (Non complementary) : Hedef diziden tamamen farklı baz dizilimine sahip dizi içeren oligonükleotid.

Mutasyon: Nükleik asitlerde tabii yollarla ya da kimyasal veya radyoaktif herhangi bir mutajen ajan vasıtasıyla meydana gelen değişimlere **mutasyon**, mutasyona uğramış bireye **mutant** adı verilir. Yapılan çalışmalar sonucunda farklı insan genomlarında yaklaşık her 200 nükleotidde bir nükleotit farklıdır buna **polimorfizm** denir.

DNA'da kalıcı olarak oluşan mutasyonlar, DNA replikasyonu, fiziksel veya kimyasal etmenler ile ortaya çıkmaktadır. DNA'daki bir ya da birkaç baz

ile ortaya çıkan mutasyona **nokta mutasyonu** adı verilir. En yaygın görülen şekli tek bir bazda oluşan nokta mutasyonudur, ki bu durum herhangi bir bazın kendi tamamlayıcısı olan baz dışındaki bir baz ile birleşmesi ile meydana gelir. Bunun dışında farklı şekillerde gelişebilen mutasyonlara da rastlanır. Örneğin bir proteinin sentezinden sorumlu bir dizinin herhangi bir noktasında oluşan eksilme yada ilavesi ile kodonlarda kayma sonucu oluşan *frame-shift mutasyonları*, pürin bazları (A ve G) ile deoksiriboz şeker molekülü arasında glikozit bağ bozulmasıyla oluşan *depürinasyon mutasyonları* bunlara örnektir.

Bunların dışında, kromozomun bir parçasında kopma veya yanlış bir kromozomla parça değiş tokuşu olması kromozom mutasyonları ile sonuçlanır. Kromozom mutasyonları nokta mutasyonlarından daha ağır hastalıklara neden olmaktadır.

Tek nükleotid Polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism - SNP):

Genomik DNA dizisi içerisinde bazlardan birinin (adenin, guanin, sitozin, timin) değişmesiyle meydana gelen DNA dizisi farklılıklarıdır. Hastalıkların gelişiminde her zaman tek başlarına bir rolleri bulunmamaktadır. Bazıları bir proteindeki aminoasit dizisinin veya ekspresyonunun değişimine neden olarak hastalıklara karşı yatkınlığı yada direnci değiştirebilirler.

Gen: DNA molekülünün ortalama 1500 nükleotitten oluşmuş canlının kalıtsal özelliklerinden herhangi birini taşıyan parçası, kalıtımın temel fiziksel ve işlevsel birimidir. Her gen, protein veya RNA molekülü gibi özel bir işlev taşıyan kromozomların belli bir noktasındaki nükleotid dizilerinden oluşur.

Kromozom: Prokaryot ve ökaryot hücrelerde üzerlerinde genleri taşıyan DNA ve nükleoproteinden oluşmuş yapıdır. Hücrenin kendi kendini eksiksiz olarak kopyalamasına yarayan tüm bilgileri içeren ve hücre çekirdeğinde yer alan DNA'ları içerir.

Hibridizasyon (Tam eşleşme): DNA hibritleşmesi; birbirine komplementer (tamamlayan) iki adet tek sarmal nükleik asit dizisinin çift sarmallı tek bir yapı haline gelmesi işlemidir. Nükleotidlerin, normal şartlar altında kendilerine karşılık gelen eşlerine bağlanma özellikleri vardır. DNA'da Guanin ile Sitozin ve Adenin ile Timin birbirine komplementerdir. Bu yüzden birbirine tamamen komplementer iki adet tek sarmal nükleik asit dizisi kolaylıkla birbirine bağlanır. Buna "yapışma" adı verilir. İki dizimdeki tek nükleotid farklılığı bile yapışmayı zorlaştırır.

Denatürasyon ve renatürasyon

Çift iplikçik yapıdaki DNA 100⁰C'e kadar ısıtıldığında yada alkali bir ortamda, sarmalı oluşturan iplikçikler arasındaki H bağları çözülür ve iplikçikler birbirinden ayrılır. Bu olaya **denatürasyon** adı verilir. Denatürasyonu sağlayan sıcaklığın derecesi molekülü oluşturan baz bileşenlerine bağlıdır. Guanin ile sitozin arasında 3, adenin ve timin arasında 2 hidrojen bağı bulunduğundan guanin-sitozin çifti adenin-timin çiftine göre daha geç ayrılır.

Isıtma yöntemi ile ayrılan iplikçikler yavaş yavaş soğutulursa, karşılıklı hidrojen bağları tekrar kurulur ve iplikçikler tekrar eşleşerek çift sarmalı oluşturur. Bu olaya **renatürasyon** denir (68).

DNA'nın hibritleşme ve denatüre olma özelliğinden birçok moleküler teknikte yararlanılmaktadır.

1.2.5. Hibridizasyonun Kinetiğini Etkileyen Faktörler (8)

Baz kompozisyonu: GC baz çiftinin ısıya karşı dayanıklılığı AT baz çiftine göre daha yüksektir. Bunun sebebi GC baz çiftinin üç, AT baz çiftinin 2 Hidrojen bağı ile birleşmesidir. Bu yüzden dizilerde GC oranı arttığında hibridizasyon hızı artar.

DNA dizi uzunluğu: Hibridizasyona tabi olacak olan dizilerin uzunluğu hibridizasyon hızı ile ters orantılıdır.

Sıcaklık: Isı, hibridizasyon kinetiğini hızlandırır. Özellikle erime derecesinin biraz altındaki sıcaklıklar en idealdir. Bunun için hibridizasyona tabi tutulacak olan dizilerin erime dereceleri hesaplanmalı ve en uygun hibridizasyon sıcaklığı saptanmalıdır.

İyonik kuvvet: İyonik kuvvetin artışına bağlı olarak, hibridizasyonun hızı da artış gösterir. Örneğin sodyum derişimi 0.1 M üzerinde iki kat arttığı zaman, hız 5-10 kat artmaktadır. Her çalışma için en uygun iyonik kuvvetin ve tuz derişiminin bulunması çalışması yapılmalıdır.

Baz değişimleri: Birbirinin tam karşılığı olmayan prob ve hedef diziler de kendi aralarında hibrit oluşturabilirler (yanlış eşleşme). Baz değişimine

uğramış diziler arasındaki hibridizasyon, tepkime hızını ve erime derecesini (T_m) azaltmaktadır.

pH: Hibridizasyon tepkimesi için en ideal pH 6.8 – 7.4 arasındaki nötr ortamlardır.

Viskozite: Hibridizasyon çözeltilisinin vizkozitesinin artışı, hibridizasyon hızını azaltır. Örneğin viskoz bir ajan kullanılıyorsa yüksek sıcaklıkta çalışılması önerilir.

1.3. DNA Analizleri

1.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

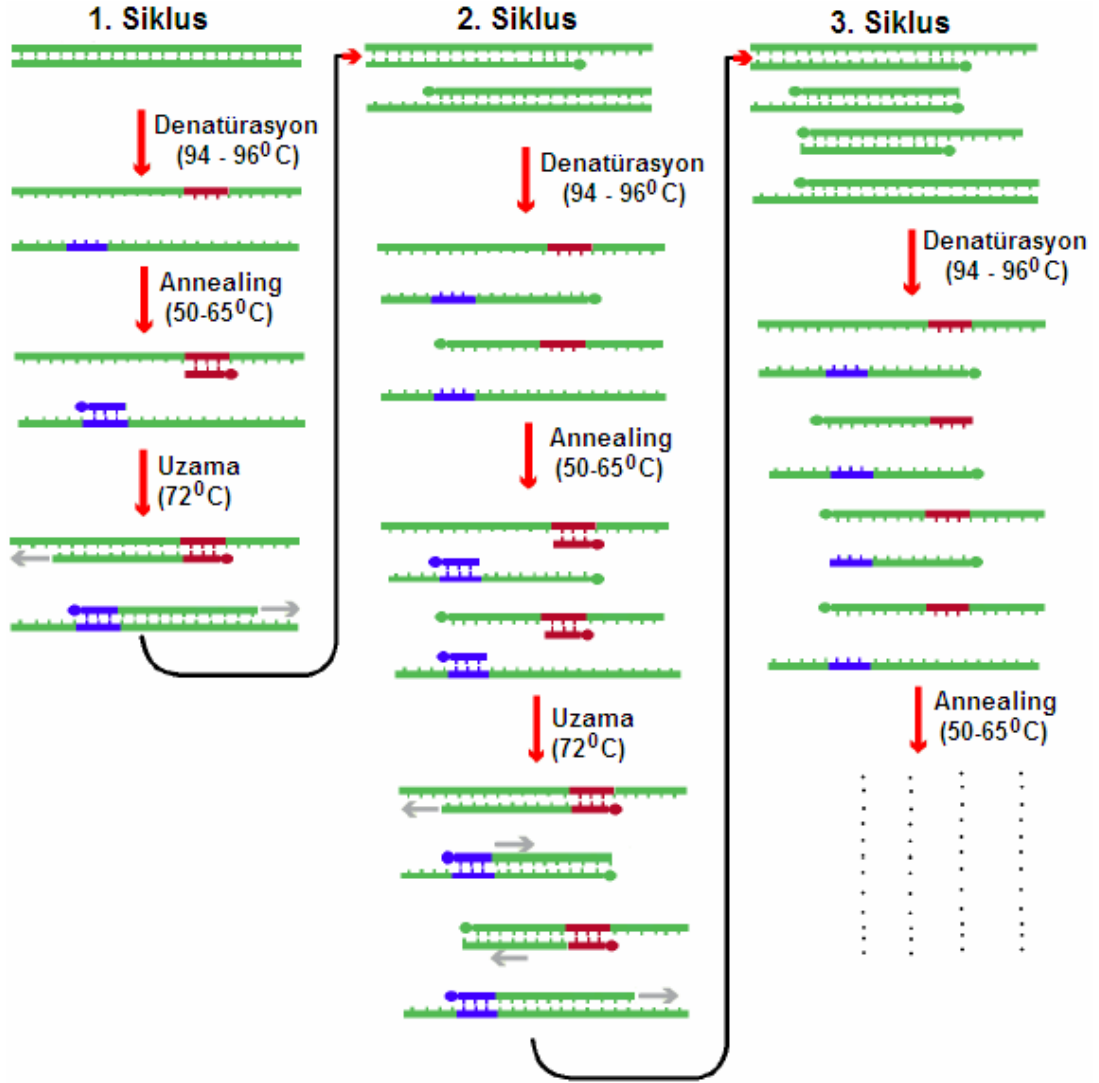
Hücre içinde genetik bilginin depolandığı yer olan DNA, doğal olarak replikasyon adı verilen olay sonucu kendini eşler. DNA, çift sarmalı, hidrojen bağlarının koparılmasıyla birbirinden ayrılır ve ayrılan iplikler kalıp olarak kullanılarak tamamlayıcıları sentezlenir. Bir DNA molekülünden onunla aynı dizilimi olan iki DNA molekülü meydana gelir. Buna göre de hücre bölünmesiyle yeni oluşan hücrelere tüm DNA bilgileri aynen geçer.

In vitro koşullarda, istenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin, çok sayıda kopyasının elde edilebilmesi için, 1985 yılında Cetus firması araştırcılarından Kary Mullis, mevcut yöntemlerin duyarlılıklarının artırılmasından ziyade, DNA ve RNA baz sıralarının amplifikasyon teknolojisine yani baz sıralarının sayısal olarak arttırılmasına dayanan ve

dolayısıyla da mevcut yöntemlerle analiz edilebilmelerini sağlayan, **'Polimeraz Zincir Reaksiyonu' (Polymerase Chain Reaction, PCR)** 'nu geliştirmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının, primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde çok az miktardaki bir DNA 'yı çabuk ve basit bir şekilde çoğaltmak mümkündür (53, 91, 92).

PCR, hücre içinde oluşan DNA replikasyonunda olduğu gibi, replikasyon sürecini taklit ederek yaklaşık 30 jenerasyon sonra, seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katını kopyalar. Aslında PCR'a, DNA çoğaltma yöntemi demek daha doğru olur. Çünkü bu yöntem ile RNA çoğaltılması yapılmak istenirse, önce Revers Transkriptaz kullanılarak hücre içerisinde (sitoplazmada) cDNA (komplementer DNA) oluşturulur. Yani revers transkripsiyon gerçekteştikten sonra PCR gerçekteşir (53).



Şekil 16: Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik gösterimi.

Günümüzde polimeraz zincir reaksiyonu;

- Allelik dizi varyasyonlarının gösterilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi,
- Doğum öncesi dönemde fetusta genetik hastalıkların araştırılması,
- Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (analık-babalık tayini) gibi tıbbın diğer kollarında,
- Genomik foot printing denilen genomik ayak izi analizlerinde,
- Tarımda; tohum saflığının belirlenmesinde,

- Doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizm belirlenmesi gibi sistematik ve evolüsyon çalışmalarının gerçekleştiği pek çok alanda,

- DNA'nın in vitro mutagenesi yöntemiyle DNA'da mutasyon oluşturup etkisinin araştırılmasında,

- İnfeksiyon hastalıklarının teşhis ve tedavisinde,

- Özgün bir DNA parçasının bol miktarda elde edilmesi ve DNA dizi analizinde,

- Global gen ekspresyonlarında ve RNA transcript yapısı analizlerinde,

- Genetik mühendisliği amaçları doğrultusunda rekombinant organizmalar elde edilmesinde gen aktarımı için kullanılmaktadır.

1.3.2. Amplifiye Edilmiş Ürünlerin Saptanması (111)

Nükleik asitlerin nanogram ve ya mikrogram düzeyindeki miktarlarının belirlenmesi genetik hastalıkların tayininde ve gen haritalanmasında çok önemlidir. Bu konuda çalışmalar ve yeni teknik arayışları tüm hızıyla devam etmektedir. Konvansiyonel yöntemlerde DNA'ların miktar tayininde genellikle spektrofotometrik yöntemler kullanılır. Nükleik asitlerin doğrudan görüntülenmesinde veya özgün dizilerde kesim yapan restriksiyon endonükleaz enzimleri ile oluşan farklı boyutlarda DNA parçalarının saptanmasında elektroforetik yöntemler kullanılmaktadır.

1.3.2.1. Spektrofotometrik yöntemler:

Nükleotitlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterir. Bu nedenle A_{260} 'da ölçülen absorpsiyon değerleri oldukça saf olarak izole edilen nükleik asitlerin mikrogram düzeyinde miktarlarının belirlenmesinde kullanılır.

Çift iplikli DNA molekülleri için 1 OD (optik dansite) 50 μg / mL'ye karşılık gelir. Buna göre miktar belirlenmesinde; $\text{DNA } (\mu\text{g} / \text{mL}) = A_{260} \times \text{seyrelme oranı} \times 50$ formülü kullanılır.

1.3.2.2. Elektroforetik yöntemler:

Pek çok laboratuvarında yararlanılan yöntemlerden en sık kullanılanı jel elektrofoezidir. UV ışığı altında floresans etki gösteren etidyum bromür boyası kullanımı ile çoğaltılan DNA'nın jel üzerindeki yeri izlenerek analiz yapılır. Elektroforetik ayırımın esası DNA molekülünün elektriksel bir alanda agaroz jel üzerindeki göçüne dayanır. Bu göç molekülün büyüklüğüne, yapısına, jelde kullanılan maddenin derişimine, iyonik kuvvete, uygulanan akıma bağlı olarak değişir.

1.3.2.3. DNA'nın enzimatik kesimi

DNA'nın enzimatik kesimi restriksiyon endonükleazları (RE) ile yapılır. Bakterilerde bulunan bu enzimler DNA'da özgün kısa dizileri tanır ve enzime özgü olmak üzere belirli bir dizide kesme işlemini gerçekleştirir. Kesim

sonucunda küt veya yapışkan uçlu DNA parçaları oluşur. RE kesimi sonucu elde edilen DNA parçalarının analizi boyutları bilinen standart DNA parçaları kullanılarak jel elektroforezi ile yapılır.

1.3.2.4. Nükleik Asitlerin Melezlemesine Dayalı Yöntemler (111)

Nükleik asit melezleme (hibridizasyon) yöntemleri, tek iplikli nükleik asit moleküllerinin kendilerine karşılık gelen tamamlayıcı diziler ile uygun koşullar altında eşleşerek çift iplikli hibritler oluşturma esasına dayanır. Bu tip analizler tüm tek iplikli nükleik asit molekülleri arasında gerçekleşebilir (DNA/DNA, RNA/RNA, RNA/DNA). Bu reaksiyonlar RNA ve DNA molekülleri üzerindeki belirli genlere ait dizileri tayin etmek amacıyla uygulanır. Bu yöntemlerde tek iplikli olan bu nükleik asit dizilerinin tamamlayıcı dizilerine ihtiyaç vardır. Ayrıca hibridizasyon sonrası oluşan moleküllerin görünür hale gelmesi için radyoaktif ya da non-radyoaktif belirleyici bir prob dizisi kullanılır.

a) In situ hibridizasyon tekniği: Nükleik asit dizilerinin, kromozomlar, hücreler veya doku kesitlerinde saptanarak analizini sağlayan, hibridizasyon kinetiğinin kullanıldığı ve diğer yöntemlerden farklı olarak nükleik asitlerin kendi hücresel ortamlarında analizlendiği bir tekniktir. Böylece hedef nükleik asit dizisinin hücredeki yeri belirlenmiş olur.

Biyolojik materyalin hazırlanması ve nükleik asit dizisinin prob elde etmek üzere radyoaktif ve ya radyoaktif olmayan bir işaretleyici ile işaretlenmesi ilk işlemlerdir. Daha sonra nükleik asitleri tek iplikli hale getirmek için denatürasyon yapılır. Bir sonraki aşamada ise işaretli prob

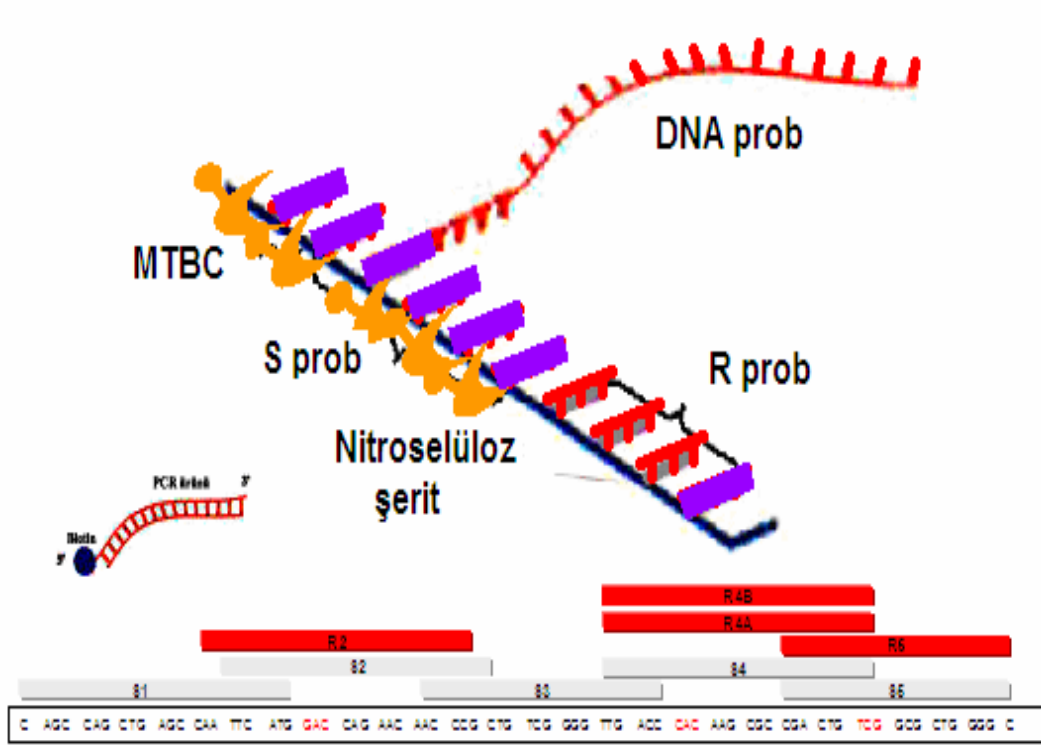
kontrollü deneysel koşullar altında biyolojik materyaldeki tek iplikli nükleik asit dizisi ile hibridizasyona tabi tutulur ve çift iplikli molekül oluşur. En son aşamada işaretleyici taşıyan bu moleküldeki hibridizasyon bölgeleri saptanarak görünür hale getirilir.

Son yıllarda nükleik asitleri işaretlemek için bir çok yöntem geliştirilmiştir. Günümüzde biyotin, digoksinin, dinitrofenil ve ya fluorokromlarla enzimatik olarak işaretleme genellikle tercih edilmektedir. Piyasada çeşitli prob işaretleme kitlerinin bulunması bu işlemi oldukça kolaylaştırmaktadır.

Insitu hibridizasyon yönteminde, radyoaktif olmayan saptama yöntemleri doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki çeşittir. Doğrudan yöntemlerde prob ile işaretleyici molekül arasındaki bağın hibridizasyon ve yıkamalar sırasındaki koşullara dayanıklı olmalıdır. Ayrıca bu molekülün hibridizasyonu engellememesi gereklidir. Dolaylı yöntemde proba bağlanan işaretleyici molekül doğrudan doğruya görülemez. Hibridizasyondan sonra ikinci bir molekül probdaki haberciye bağlanır ve böylece probun hibridizasyon yaptığı bölgeler görünür hale gelir. En çok kullanılan radyoaktif olmayan işaretleyiciler, biyotin ve digoksinidir. Bunlar kendilerine karşı oluşturulan antikorlar ile saptanabilirler.

Tez kapsamında; *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin rifampin antibiyotigine karşı geliştirdiği direnç mutasyonları, Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.B.D. tarafından ilk önce biyotin işaretlemeye dayalı hibridizasyon tekniği ile tayin edilmiştir. Buna dayalı yapılan çalışma Şekil 17'de şematik olarak gösterilmiştir. Buna göre, prob diziler ile kaplı nitroselüloz membran, biyotin işaretli hedef dizi ile

hibridizasyonun ardından, biyotine bağlanan avidin ve substratı olan alkalen fosfataz ile etkileşimden sonra membranlarda renk değişimi gözlenir (18).



Şekil 17: *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin, *rpoB* gen bölgesinde RIF'e karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının Biyotin işaretli diziler kullanılarak tayini.

b) Southern blotting tekniği: Özellikle gen yapısı, gen anlatımı, genom organizasyonu, haritalama ve gen aktarımı çalışmalarında aranan DNA dizisinin saptanması için kullanılan bir yöntemdir. Yöntem; istenilen DNA parçasının onun tamamlayıcısı olan gerek radyoaktif gerekse non radyoaktif işaretli proplar kullanılarak oluşan hibridizasyonun, işaretleyici molekülün özelliğine göre, radyoaktif, immunolojik, kimyasal yada floresansa dayalı yöntemlerle görünür hale gelmesi esasına dayanır.

c) Northern blotting tekniği: Analizi yapılacak genin transkripsiyon ürünü olan RNA'nın RNA /DNA hibridizasyonunun tayinine dayalı bir tekniktir. Bu yöntemde önce RNA jelde yürütülerek ayrılması sağlanır ve ayrılan RNA naylon yada nitroselülozdan oluşan membrana aktarılır ve RNA'nın membran üzerinde sabit şekilde bağlanması sağlandıktan sonra uygun problarla hibridizasyonuna dayalı analiz gerçekleştirilir.

1.3.2.5. Diğer Teknikler

Amplikonları (PCR ürünleri) belirlemeye diğerlerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmaya yönelik bazı teknikler de geliştirmiş ve denenmiştir.

Spesifik problarla hibridize olmuş DNA moleküllerinde, polimeraz enziminin 5'→3' yönündeki ekzonukleaz aktivitesi, hibridize olmuş prob'ları ayrıştırarak 5'- uçlarında izotop bulunan prob DNA'sının boyutlarında küçülmeler oluşturulur ve bunlar da radiografi ile ortaya konulurlar.

Hibridizasyon Proteksiyon Testi de aynı amaç için denenmiştir. Bunda, ayrıca, dijital okuma sistemleri de bulunmakta ve süre çok kısalmaktadır. PCR ürünlerini saptamada son yıllarda nonizotopik problemlerin kullanılması yönünde bir eğilim bulunmaktadır. Biotin veya digoxigenin'le işaretlenmiş problemleri hazırlamak daha kolay ve daha uzun süre de kullanma olanağı sağlamaktadır.

Amplifiye edilmiş PCR ürünleri laboratuvarımızda "**Elektrokimyasal Genosensörler (DNA Biyosensörleri)**" ile tayin edilmektedir.

1.4. Elektrokimyasal Genosensörler (DNA Biyosensörleri)

Elektrokimyasal genosensörler, kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların tanısı amacıyla kullanılan yüzeyine genetik materyal tutturulmuş biyosensörlerdir.

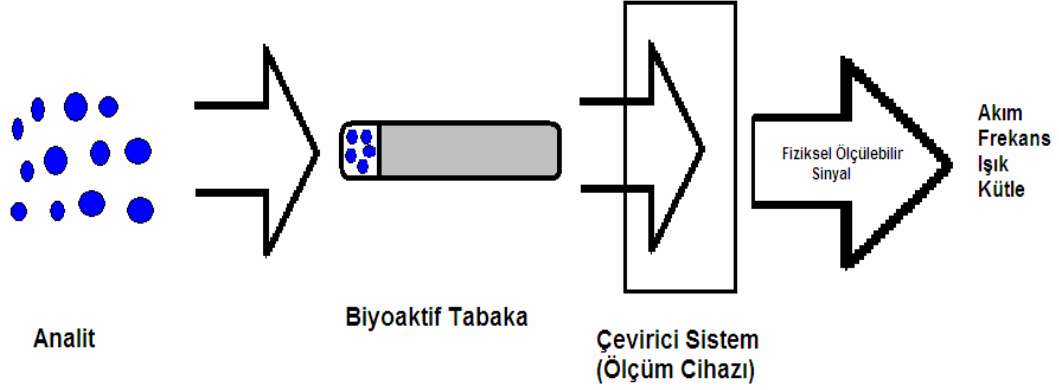
Biyosensörler biyolojik tepkimelerde hedef analitleri denetlemek için kullanılan küçük algılayıcı cihazlardır. Birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir (22, 114).

Tüm biyosensörler moleküler düzeyde algılama ve sinyal çevirimi olmak üzere iki temel görevi yerine getirmektedir.

Algılama Bölümü: Ortamda bulunan ve analizi yapılacak olan kimyasal yada biyolojik materyal ile etkileşme girerek algılanmasını sağlayan “biyolojik arayüzey” dir. Algılama bölümü biyosensör için oldukça önem taşıdığından seçici ve kararlı yapıda olması gerekir. Biyosensörün arayüzeyini oluşturan doku, hücre, antikor, enzim, reseptör, nükleik asit gibi biyolojik materyaller, özgül şekilde bağlanarak hedef ile etkileşirler. Genosensörlerde bu arayüzey nükleik asitlerde oluşur.

Fiziksel Çevirici Bölüm: Hedef ile biyolojik arayüzeyin etkileşimi sonucu oluşan ürün, çevirici birimi tarafından okunabilir sayısal bir değere

çevrilir. Çevirici cihazlar, akım, potansiyel, ışık şiddeti, kütle yada ısı değişimine duyarlı olabilir.



Şekil 18: Biyosensörün yapısı ve bileşenleri.

Tablo 1. Algılama ve Çevirici Bölümlerine Göre Biyosensörler:

Algılama Bölümü	Çevirici Bölüm
Antikor – Antijen (immunosensörler)	*Elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik, voltametrik yöntemlere dayalı sistemler)
Enzim (enzimatik sensörler)	Optik (floresans, yansıma, kırılma indeksi, ışık şiddetine duyarlı sistemler)
Peptitler	Piezoelektrik- Kütleyle Dayalı (piezoelektrik kristallerinin rezonans frekansı, yüzey akustik dalgalarına duyarlı sistem)
Hücre	Elektrikse (yüzey etkinliği, elektrolit iletkenliğine duyarlı sistem)
Doku	Manyetik (paramanyetik)
Membran reseptörleri	Termal (tepkime ısısına duyarlı sistem)
*DNA / RNA (genosensörler)	

1.4.1. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler (46)

Seçicilik: İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse bu eksikliği giderecek uzun ek işlemler gerekir.

Kullanım Ömrü: Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametrelerini de etkilemektedir.

Kalibrasyon Gereksinmesi: İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planladığı gibi, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

Tekrarlanabilirlik: İdeal bir biyosensör için, elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların okunması istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensörün uygulamalarının da o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

Stabilite: Elektrot stabilitesinin (kararlılığının) yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel

dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam, O₂ derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

Yüksek Duyarlılık: Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması ideal biyosensörlerin özelliklerindedir.

Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı: Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir derişim değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

Geniş Ölçüm Aralığı: Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım - derişim eğrilerinin lineer olduğu derişim aralığıdır.

Hızlı Cevap Zamanı: Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır.

Hızlı Geriye Dönme Zamanı: Geriye dönme zamanı örneğin amperometrik çalışmalarında ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

Basitlik ve Ucuzluk: Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyeti düşürülmüştür.

Küçültülebilirlik ve Sterilize edilebilirlik: Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

1.4.2. Elektrokimyasal Genosensör ile DNA Dizi Algılama Yöntemleri

Çeşitli yöntemlerle biyolojik örneklerden özgün DNA dizisi saptanması biyomedikal alanda çok önemlidir (112). Hastalık tanısında insan, virüs ve bakteri baz diziliminin tayini ile pek çok kalıtsal hastalıklara neden olan mutasyonlar artık saptanabilmektedir.

Hibridizasyon tayinlerinde kullanılan çeşitli immünokimyasal ve voltametrik metodlar karşılaştırıldığında birkaç örneğin çalışıldığı durumda voltametrik yöntemlerin daha hızlı yanıt verdiği gözlenir, ancak büyük miktarda bir seri benzer örnek analizlenecekse, iyi bir otomasyona sahip EIA gibi immünokimyasal tekniklerin kullanılması daha uygun olmaktadır (105).

Diziyeye özgün genosensörler (DNA biyosensörleri), bir çevirim sistemi ile beraber DNA probundan oluşmuştur. DNA biyosensörlerinin esası, DNA

bazlarının hibridizasyonuna dayanır (3, 12, 15, 30-35, 47, 54, 58-62, 71, 72, 76, 82, 119-128).

Elektrokimyasal genosensörler, aranan hedefin baz dizisinin karşılığı olan 20-40 baz gibi kısa bir baz dizimine sahip olan sentetik tek sarmallı DNA (ssDNA) oligomerin (veya "PROB" olarak isimlendirilir), elektrot yüzeyine bağlanmasına dayanmaktadır. Hedefi içeren bir örnek çözeltisine sensörün uygulanması, ile elektrot yüzeyinde hibrit oluşur. Elektrokimyasal ölçümlerde elektrot yüzeyinde oluşan hibrit iki yöntemle tayin edilir; bunlardan ilki bir elektroaktif indikatör aracılığıyla (örneğin bir redoks-aktif katyonik metal kompleksi) yapılan tayindir. Bu yöntemde yüzeyinde hibrit oluşan elektrot indikatörü içeren çözeltiliye daldırılır ve indikatörün hibrite bağlanma düzeyi belirlenir (29-35, 56, 60, 65, 78, 79, 133, 134). Diğer yöntem ise DNA bazlarından en elektroaktif olan Guanin bazının 1.0 V' da verdiği yükseltgenme sinyalinin farklılanmasından yola çıkılarak yapılan tayindir (3, 11, 41, 59, 66, 67 99, 121 -124).

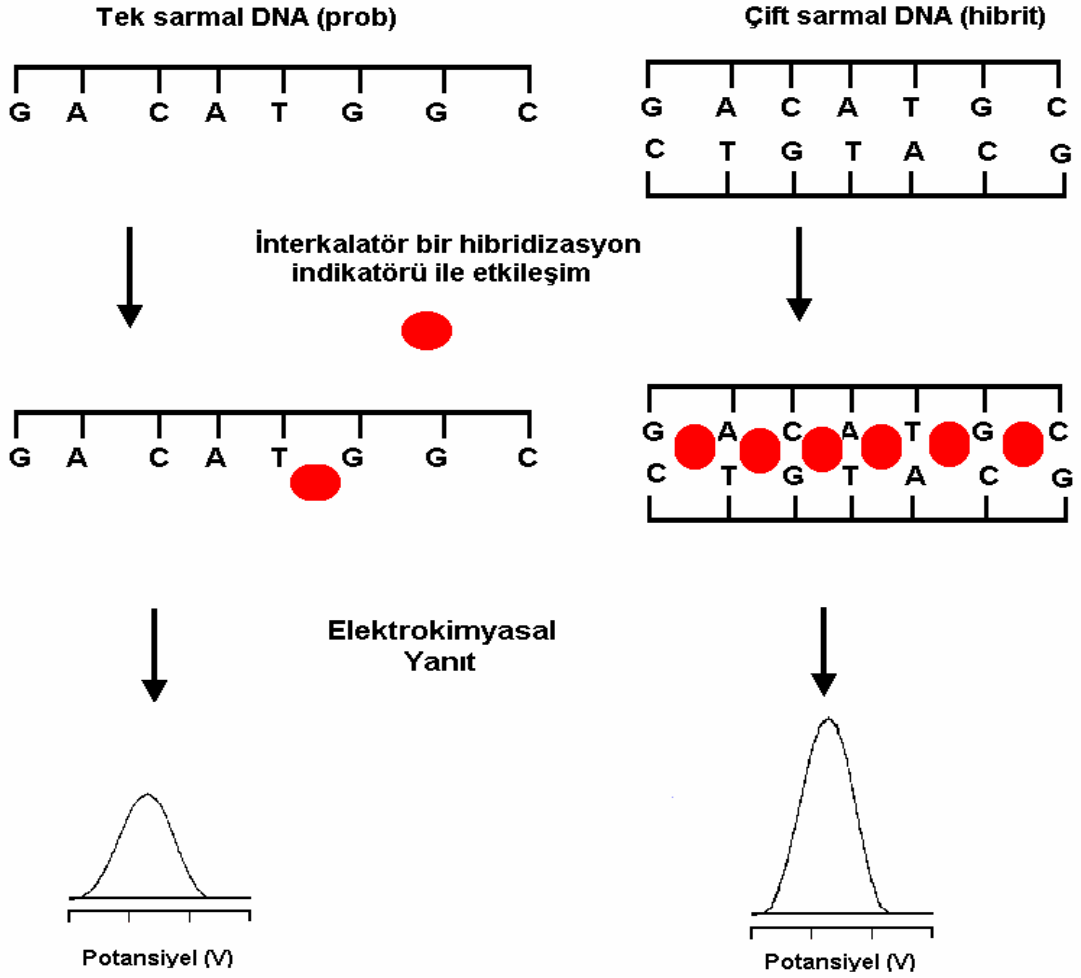
1.4.2.1. İndikatöre Dayalı Genosensörler ile Dizi Algılama Yöntemleri:

İndikatöre dayalı DNA dizi algılanması, ya DNA'ya interkale olabilen (metal kompleksleri, antibiyotikler) (7, 16, 17, 24, 73, 133) veya DNA dizisindeki bazlarla özgün olarak etkileşen (MB, Ru(bpy)₃³⁺, vb.) elektroaktif maddeler (indikatör) ile tayin edilebilmektedir (30-33, 44, 45, 60, 110, 131). Elektrokimyasal çeviriciler, hibridizasyon olayını analitik sinyale çevirmede etkin bir şekilde kullanılmaktadır.

Elektrot yüzeyinde oluşan hibrit ile etkileşen indikatörün neden olduğu artan veya azalan elektrokimyasal yanıt hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır (90, 97, 98, 131, 133, 134).

Elektroaktif bir maddenin indikatör olarak kullanılabilmesi için ssDNA ve dsDNA ile etkileşimi sonucu alınan yanıtlar arasında anlamlı bir fark olması gerekmektedir. Ru(II) (7, 30, 110), Co(III) (16, 17), Os(II), Os(IV) (24, 79, 110)' in 1,10-fenantrolin ve 2,2'-piridin (17) kelatları hibridizasyon indikatörü olarak sıklıkla kullanılan maddelerdir.

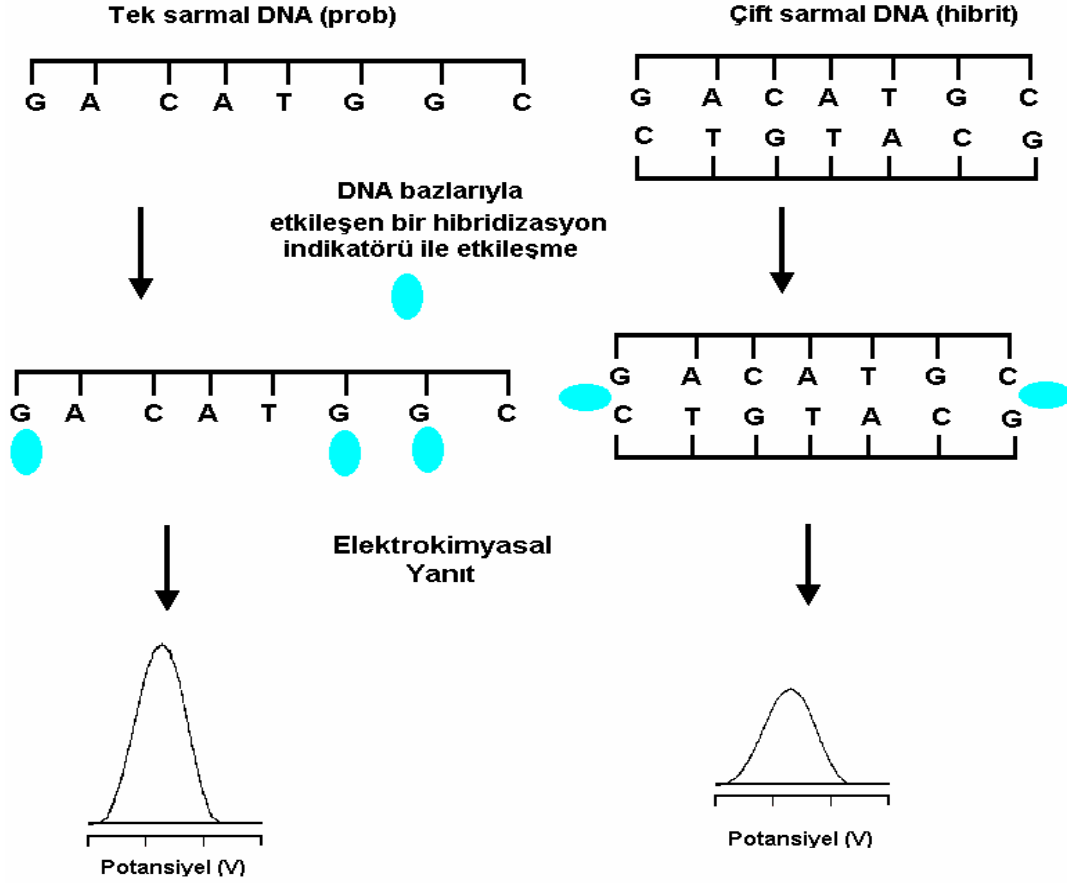
1.4.2.1.1. İnterkalatör molekül kullanarak: İnterkalasyon; bir maddenin DNA çift sarmalı arasına girip birikmesidir. Bu durumda; (Şekil 19) çift sarmal DNA (dsDNA) ile etkileşimden sonra alınan madde sinyali maddenin birikmesinden dolayı tek sarmal DNA (ssDNA) ile etkileşimden sonra alınan madde sinyaline göre oldukça yüksektir (4, 7, 16, 17, 29, 30, 44, 47, 60, 65, 131).



Şekil 19: İnterkakatör bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması

1.4.2.1.2. DNA bazları ile etkileşen bir molekül aracılığıyla:

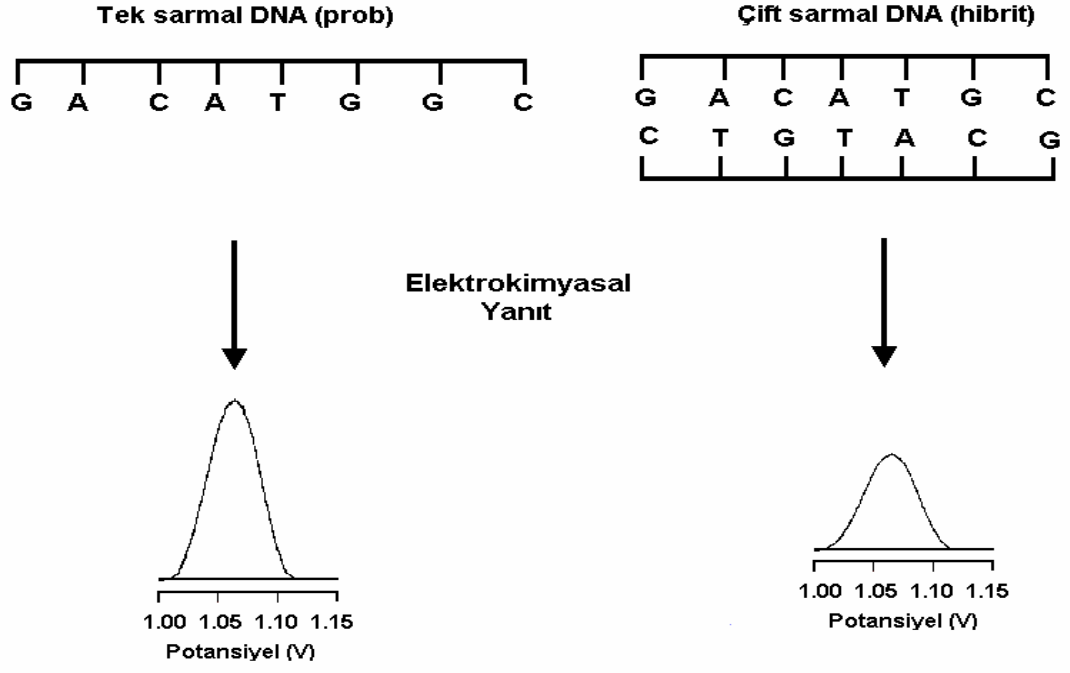
Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan madde DNA'nın bazlarından biriyle (özellikle Guanin) etkileşiyor olabilir. Bu durumda; (Şekil 20) tek sarmal DNA (ssDNA) 'da bazlar açıkta olduğundan dolayı alınan madde sinyali, hibridizasyondan sonra oluşan çift sarmal DNA (dsDNA) 'da bazlar kapalı olduğundan dolayı alınan madde sinyaline oranla oldukça yüksektir (15, 30-32, 59, 62, 67, 83, 97, 98, 100, 135, 134).



Şekil 20: DNA bazlarından biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması.

1.4.2.2. İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemleri:

Elektrot yüzeyine tutturulan tek sarmal prob dizisine (ssDNA) ait Guaninlerin verdiği elektrokimyasal yanıt ile, probun komplementeriyle birleşmesinden sonra oluşan çift sarmal DNA' ya ait guaninlerden alınan elektrokimyasal yanıt arasında Şekil 21'de gözlendiği gibi önemli bir farklılık vardır. Bu farklılık hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır (41, 58, 63, 66, 67, 99, 102, 121-124).



Şekil 21: İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar

2.1.1. Elektrokimyasal Sistemler:

Tez kapsamında kullanılan ana elektrokimyasal sistem Autolab PGSTAT 30 (Eco Chemie – Hollanda) potansiyostat cihazıdır. Bilgisayar bağlantılı olarak ve GPES 4.8 yazılımı ile birlikte kullanılmaktadır. Elektrokimyasal analizör ara birim olarak üçlü elektrot sistemine sahip elektrokimyasal hücre içermektedir. Hücre ile cihaz arasındaki bağlantıyı genel amaçlı elektrik kabloları sağlamaktadır.

Elektrokimyasal hücre çalışma elektrodu (tek kullanımlık kalem grafit elektrot – PGE), platin karşıt elektrot ve Ag / AgCl referans elektrodundan oluşan “üçlü elektrot sistemi”ni içermektedir. Hücreyle bağlantılı kablolardan üçü bu elektrotlara bağlı, biri ise topraklama için ayrılmıştır. Üçlü elektrot sisteminin içine daldırıldığı bir tampon çözelti bulunmaktadır.

2.1.2. Diğer Cihazlar:

- Terazi (Saritorious-Analytic A-200)
- Ses titreşimli temizleyici (Ultrasonic LC 30 H)
- Ph-metre (Schott-Mainz CG 710)
- Manyetik karıştırıcı (Elektro-mag ve ARE 2-Velp)
- Spektrofotometre (UV 160 A-Shimadzu)
- Ag/AgCl referans elektrot
- Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı.)

2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

2.2.1. Kimyasallar

Madde Adı	Maddenin Satın Alındığı Firma
Asetik Asit (%99-100)	Merck
Hidroklorik asit /%37)	Merck
Sodyum Hidroksit	Merck
Tris (hidroksimetil)aminometan hidroklorür	Sigma
Sodyum klorür	Sigma
Sodyum asetat trihidrat	Sigma
Sodyum dodecyl sülfat (SDS)	Sigma
Etilkarbodiimid 1-etil -3-dietil aminopropil karbodiimid hidroklorür (EDC)	Sigma
N- hidroksi süksinimit	Sigma

2.2.2. Çözeltiler

Çözelti Adı	İçeriği
Asetat tampon çözelti (ACB)	0.5 M glasiyel asetik asit 20mM NaCl (pH : 4.8)
Tris – HCl tampon çözelti (TBS)	20mM Trizma-HCl 20mM NaCl (pH : 7.00)
Sodyum dodecyl sülfat (SDS)	%10 'luk (100g. SDS / 1L d.su)
20xSodium saline citrate tamponu (20xSSC)	0.3 M Sodyum sitrat 3M NaCl (pH: 7.00)
Prob bağlama tamponu	5mM N-hidroksi süksinimit (NHS) & 8mM Etilkarbodiimid 1-etil -3-dietil aminopropil karbodiimid hidroklorür (EDC)
Hibridizasyon tamponu	2xSSC (0.03M Sodyum sitrat, 0.3 M NaCl)
Yıkama tamponu	1xSSC+%o.1SDS (15mM Sodyum sitrat & o.5 M NaCl)

Tüm çalışmalarda sterilize edilmiş deiyonize su kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında (25.0 ± 0.5) ° C' de gerçekleştirildi.

2.3. Kullanılan DNA Dizileri

Çalışmada kullanılan tüm sentetik diziler (S1, S2, S3, S4, S5 ve hot-spot) liyofilize toz halinde TIB Molbiol (Almanya)'dan sağlandı. Ayrıca *Mycobacterium tuberculosis* bakterisine ait PCR ürünü örnekleri Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlandı. Bu oligonükleotitlerin baz dizilimi Tablo 2'de gösterilmiştir.

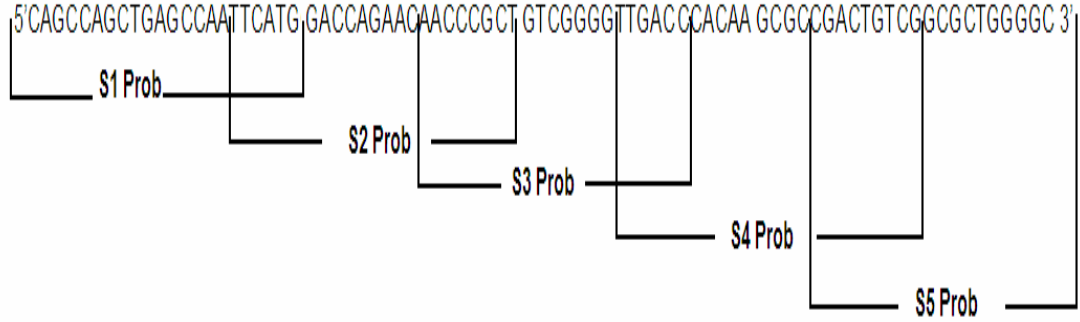
Tablo 2: Çalışmada kullanılan DNA dizileri.

DNA Dizisinin Adı	Baz Dizilimi
S1 Prob Dizi	5' NH ₂ - (CH ₂) ₆ -CAT IAA TTI ICT CAI CTI ICTI 3'
S2 Prob Dizisi	5' NH ₂ - (CH ₂) ₆ - AI CII ITT ITT CTI ITC CAT IAA 3
S3 Prob Dizisi	5' NH ₂ - (CH ₂) ₆ -IIT CAA CCC CIA CAI CII ITT 3'
S4 Prob Dizisi	5' NH ₂ - (CH ₂) ₆ -CIA CAI TCI ICI CTT ITI IIT CAA 3'
S5 Prob Dizisi	5' NH ₂ - (CH ₂) ₆ -I CCC CAI CGC CIA CAI TCI 3'
hot-spot (sıcak bölge) (rpoB geninde 507.-533. kodonları içeren 81 baz uzunluğundaki bölge)	5'CAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGACCAG AACAAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAA GCGCCGACTGTCGGCGCTGGGGC 3'
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ' e ait PCR ile Çoğaltılmış Bölge	5'CCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACACCGCAGACG TTGATCAACATCCGGCCGGTGGTCGCCGCGATCAAGG AGTTCTTCGGCACCAGCCAGCTGAGCCAATTCATGGA CCAGAACAACCCGCTGTCGGGGTTGACCCACAAGCGC CGACTGTTCGGCGCTGGGGCCCGGCGGTCTGTACGT GAGCACCCGTTCGCACTACGGCCGGATGTGCCCGATC GAAACCCCTGAGGGGCCCAACATCGGTCTGATCGGCT CGCTGTTCGGTGTACGCGCGGGTCAACCCGTTTCGGGT CATCGAAACG 3'
Tüm Bazları Hedeften Farklı (Rasgele) Dizi	5' TTG AGG ATC CTG GAA TTA 3'
PCR ile çoğaltılmış Rasgele hedef Dizi	5' ATC AAC TTC GAC TGG CCC TTC TTG CTG GCC AAG CTG ACG GAC ATT TAC AAG GTC CCC CTG GAC GGG TAC GGC CGC ATG AAC GGC CGG GGC GTG TTT CGC GTG TGG GAC ATA GGC CAG AGC CAC TTC CAG AAG CGC AGC AAG ATA AAG GTG AAC GGC ATG GTG AGC ATC GAC ATG TAC GG 3'

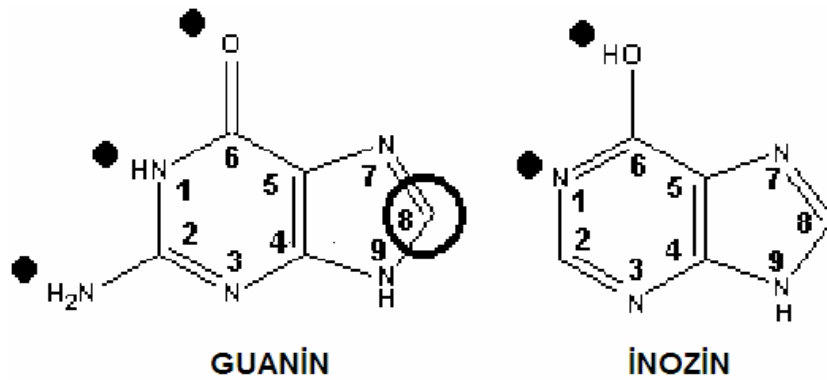
(I= İnozin)

Mycobacterium tuberculosis'de rifampin antibiyotiğine karşı gelişen direncin en sık nedeni rpoB geninin 507-533. kodonlarını içeren ve "hot-spot" (sıcak bölge) olarak adlandırılan 81bp'lık gen bölgesindeki mutasyonlardır (18-20). Tüm sentetik hibridizasyon çalışmaları bu 81 baz uzunluğundaki dizi ile gerçekleştirildi. Buna bağlı olarak kullanılan 5 farklı prob dizileri ise,

burada en sık gözlenen mutasyonları içerecek şekilde tüm hot-spot dizisi boyunca seçildi. Bunların konumu aşağıda gösterilmiştir.

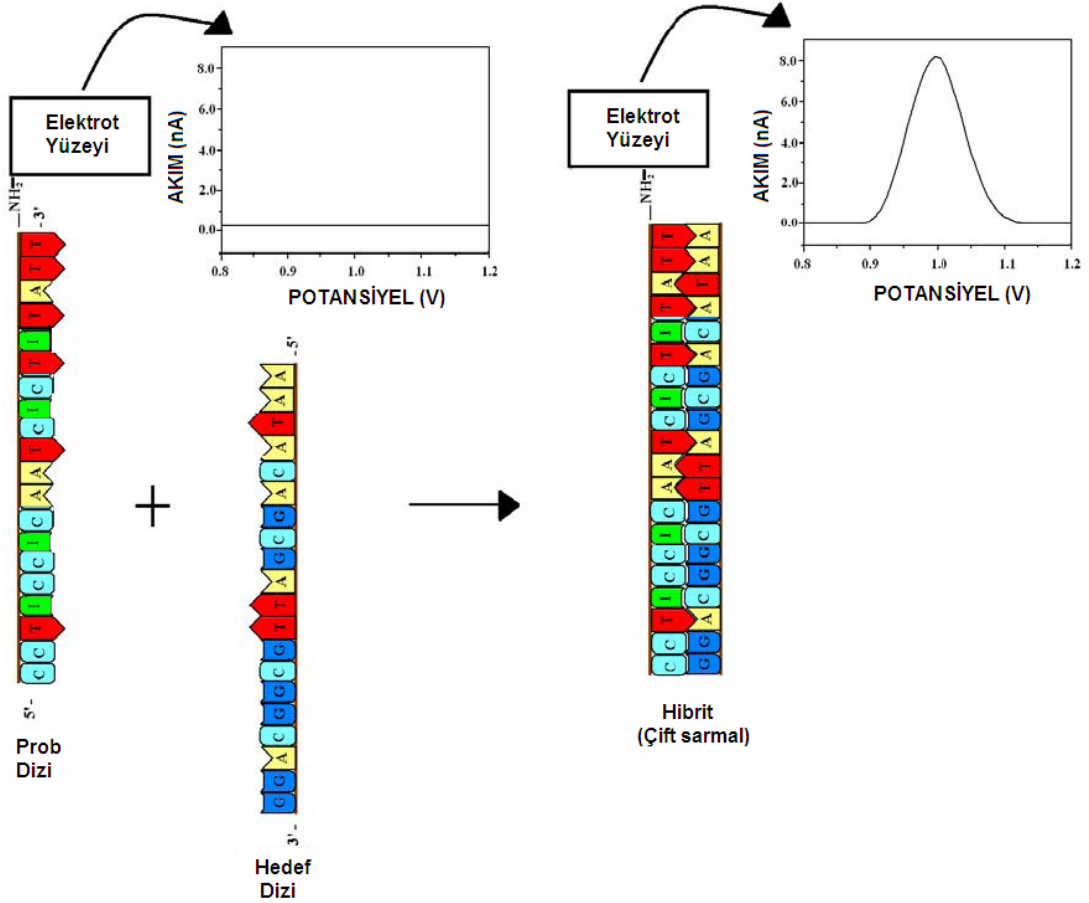


Çalışmada kullanılan tüm prob diziler guanin yerine inozin modifiye olarak sentezlenmiştir. İnozin, guanin analogu bir moleküldür. Bir oligonükleotid dizisinde guanin yerine geçerek sitozin ile Hidrojen bağı yapar ancak bu bağı üçlü yerine ikili Hidrojen bağıdır. İnozinin kimyasal yapısında guaninden farklılık göstermesi ile; herne kadar oluşturduğu bir çift sarmal dizide guanin gibi davranırsa da, guaninin yükseltgendiği bölgede (1.0 V 'da) yükseltgenemez ve elektrokimyasal olarak sinyal alınamaz. Guanin ve İnozinin kimyasal yapıları Şekil 22' de gösterilmiştir.



Şekil 22: Guanin ve İnozinin kimyasal yapıları.

İnozinin sitozinle hibridizasyon göstermesine rağmen guaninin yükseltgenme sinyali olan 1.0 V'da bir sinyal vermemesi; inozin içeren prob dizilerden de bu aralıkta herhangi bir sinyal göstermemesini sağlar. Böylece elektrot yüzeyinde yalnızca prob dizi bağlı olduğunda hibridizasyondan önce bir elektrokimyasal yanıt alınmazken, hibridizasyondan sonra hedef diziden gelen guaninlerin varlığı ile yanıt elde edilir. Şekil 23'de inozine ve inozinli diziyle hibridizasyon sonucu alınan Guanine ait sinyaller gözlenmektedir. Bu; **EVET / HAYIR** sisteminin temelini oluşturur (35, 61 99, 102).



Şekil 23: Guanin ve inozinin elektrokimyasal yanıtları arasındaki fark.

2.3.1. Oligonükleotid çözeltilerinin hazırlanışı-

Mycobacterium tuberculosis rifampin rpoB direnç mutasyonu analizi için kullanılan oligonükleotit stok çözeltileri 10000 µg/mL derişiminde ultra saf su ile hazırlandı ve -20°C'de saklandı.

µg/mL (ppm)'in molarite cinsinden hesaplanacak olursa;

$$n \text{ (mol)} = M \text{ (kütle) g} / MA \text{ (molekül kütlesi) g/mol}$$

$$\text{Molar} = n \text{ (mol)} / V \text{ (hacim)} = \text{mol /L}$$

$$M \text{ (Molarite)} = M \text{ (kütle)} / [MA \text{ (molekül kütlesi)} \times V \text{ (hacim)}] = \text{mol /L}$$

Prob olarak kullanılan oligonükleotitlerin 20 mM NaCl içeren 0,5 M Asetat tamponu (pH 4,8) ile, hedef olarak kullanılan oligonükleotitlerin seyreltik çözeltileri ise 0.03M sodyum sitrat ve 0.3 M NaCl içeren tampon çözeltisi (pH 7,0) ile (2xSSC hibridizasyon tamponu) hazırlandı.

2.3.2. PCR Ürünü Örneklerinin Hazırlanması

Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından kültürde üretilmiş *M.tuberculosis* izolatlarından ekstrakte edilen DNA'nın rpoB geninin 329 bp'lik bölümü (5'-CCACCCAGGACGTGGAGGCGATCACAC-3') ve (5'- CGTTTCGATGAACCCGAACGGGTTGAC-3') primerleri kullanılarak PCR ile amplifiye edildi (18-20). Bu ürünler hibridizasyon tamponu ile uygun derişime seyreltilip, hibridizasyondan önce denatüre edilerek tek iplikli hale getirildi.

2.3.3. Sentetik oligonükleotitler ve PCR ürünlerinin spektrofotometre ile miktar tayini

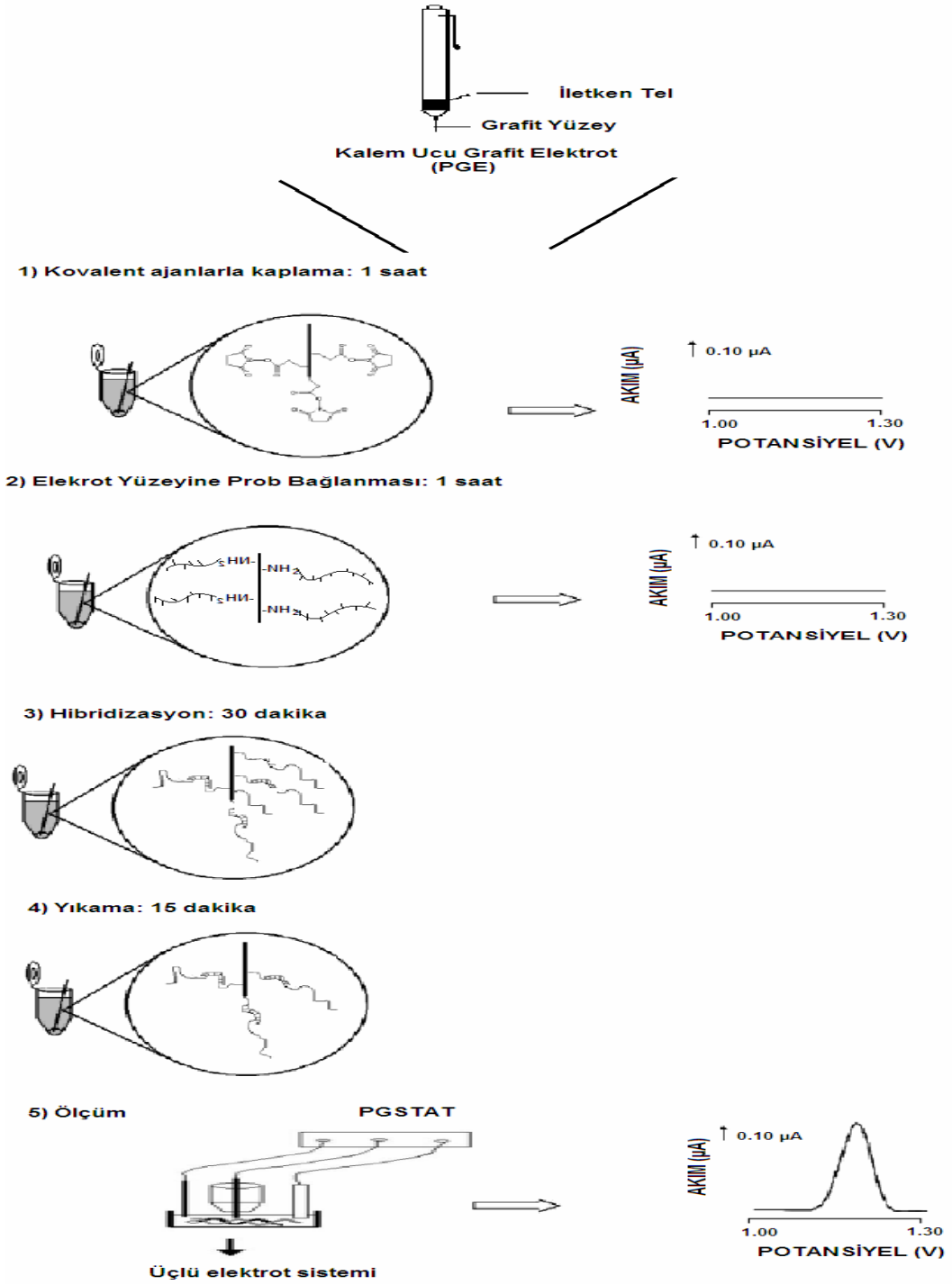
UV görünür bölge spektrofotometre (UV – vissectrophotometer – Shimadzu, Japonya) 1mL'lik ve 10 mm uzunluğunda kuvars küvetler (Starna, İngiltere) kullanılarak yapılan derişim ölçümlerinde bir A_{260} birimi çift sarmal DNA 50 μg /mL ve bir A_{260} birimitek sarmal DNA 33 μg /mL kabul edilerek hesaplama yapılmıştır (99, 100, 101, 112).

2.4. Kullanılan Yöntem

Günümüzde dek yapılan elektrokimyasal dizi analizi çalışmaları göz önünde bulundurularak yeni bir genosensör tasarımı yapılmıştır. Bu tasarlanan genosensör ile *Mycobacterium tuberculosis* rifampin direnç mutasyonu analizi için kullanılan yöntem basamakları Şekil 24'de şematize edilmiştir.

Tayin için belirtilen aşamaların uygulanması için yaklaşık 179 dakika süre gerekmektedir. Deneysel aşamalardaki süreler aşağıdadır:

- PGE yüzey kaplanması 60 dakika
- Prob tutturulması 60 dakika
- Denatürasyon 13 dakika
- Hibridizasyon 30 dakika
- Yıkama 15 dakika
- Ölçüm 1 dakika



Şekil 24: *Mycobacterium tuberculosis* rpoB direnç mutasyonu tayini çalışma basamakları.

2.4.1. Elektrotların hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan kalem grafit çalışma elektrodu (Noki kalem model 2000, Japonya) 0.5 mm çapında 30 mm uzunluğunda kesilerek hazırlanmış grafit çubuğun 10mm'lik kısmı çözelti içine daldırılacak şekilde bir elektrot tutacağı içine yerleştirilmesi ile oluşturuldu (35, 36, 58, 60, 101, 102, 121). Her bir parametre için farklı grafit yüzeyler oluşturularak tek kullanımlık elektrot sistemi sağlandı.

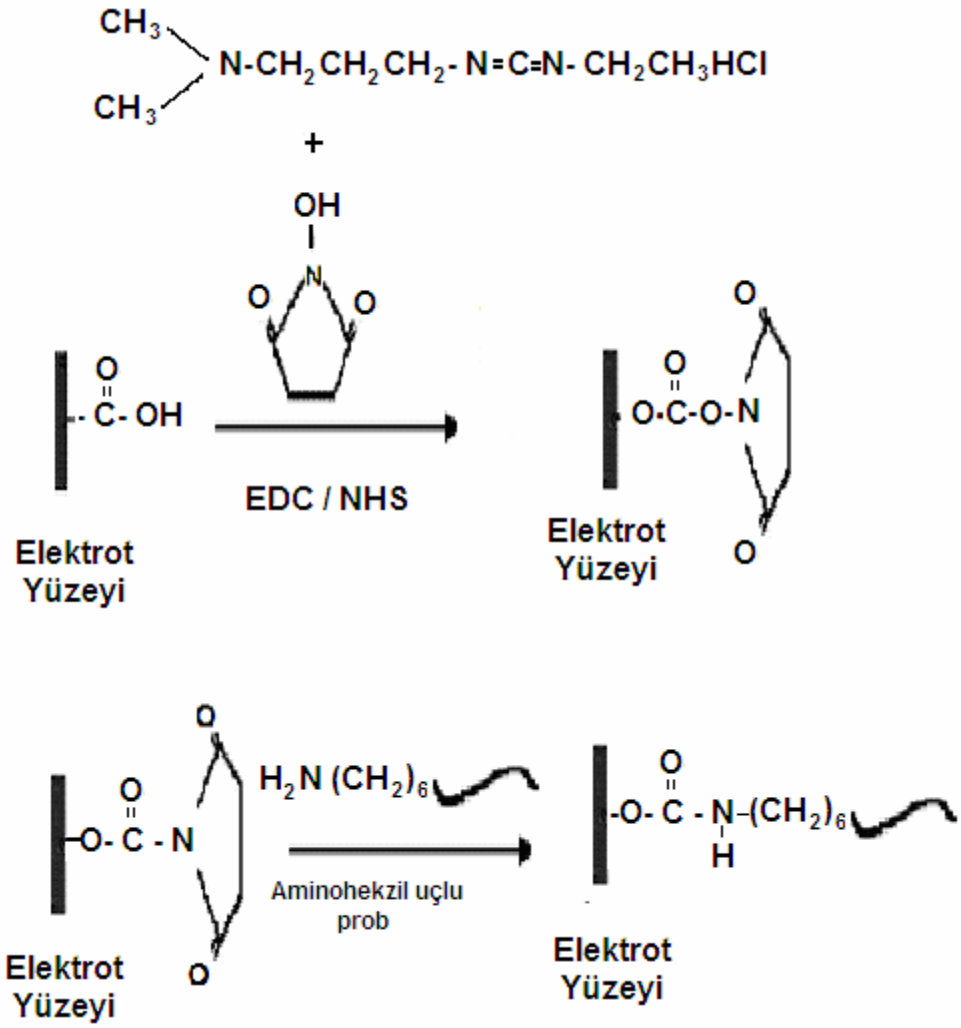
2.4.2. Elektrot yüzeylerinin kaplanması

Mycobacterium tuberculosis prob dizileri PGE yüzeylerine kovalent bağlama yöntemi ile tutturuldu. Bu amaçla taze hazırlanmış 5mM N-hidroksi süksinimit (NHS) – 8 mM Etilkarbodiimid 1-etil -3-dietil aminopropil karbodiimid hidroklorür (EDC) içeren yüzey kaplama çözeltisi içinde elektrotlar 1 saat bekletildi (52, 58, 60, 70).

2.4.3. Elektrot Yüzeylerine Prob Bağlanması

0.05M asetat tamponu (pH 4.8) içinde hazırlanmış 5 farklı prob dizisini içeren çözeltiler hazırlandı. Yüzeyi kovalent ajanlarla kaplanmış olan elektrotlar prob çözeltisi içinde 1 saat bekletildi.

Şekli 25'de grafit yüzeyin kovalent ajanlarla kaplanması ve ardından amino heksil uçlu prob dizi bağlanması gösterilmiştir.



Şekil 25: Grafit elektrot yüzeyine; 5' ucunda aminoheksil işaretli prob dizinin kovalent bağlanması.

2.4.4. Hibridizasyon

2.4.4.1. Sentetik hot-spot hedef dizisi ile hibridizasyon:

Yüzeylerinde prob bağlı olan elektrotlar, hibridizasyon tamponu içinde hazırlanmış olan (2xSSC pH: 7.4) 15 µg /mL derişimindeki tek iplik halindeki hot-spot hedef dizi çözeltisi içinde 30 dakika bekletilerek hibridizasyon sağlandı.

2.4.4.2. PCR ile çoğaltılmış bakteri örnekler ile hibridizasyon:

Çift iplikli halde olan PCR ürünleri, hibridizasyon tamponu ile derişimi 20 µg /mL olacak şekilde seyreltildi ve hibridizasyona uygun olması için denatüre edilerek tek iplikli hale getirildi. Denatürasyon işlemi için ürünler 8 dakika kaynar su banyosunda (95⁰ - 100⁰C) tutularak ipliklerin birbirinden ayrılması, ardından ayrılan ipliklerin kendi üstüne tekrar bağlanmasını engellemek amacıyla 0⁰C buz banyosunda 5 dakika bekletilerek prob ile hibridizasyona uygun tek iplikli diziler elde edildi.

Denatürasyondan sonra yüzeyleri prob kaplı elektrotlar 30 dakika bekletilerek hibridizasyon sağlandı.

2.4.5. Yıkama

Hibridizasyondan sonra, elektrot yüzeylerinden bağlanmayan ya da mutasyon içerdiği için hibridizasyon sonucu iyi bağlanmamış zayıf hibritleri yüzeyden uzaklaştırmak için elektrotlar, yıkama tamponu (1xSSC + % 0.1 SDS) içinde 15 dakika bekletilerek yıkandı.

2.4.6. Voltametrik Ölçüm

Elektrot yüzeyindeki oluşan çift iplikli DNA, Diferansiyel puls voltametri tekniği ile 0.75 V' dan 1.4 V' a kadar 15 mV /s tarama hızında 50 mV amplitüde ve 10 mV genlik kullanarak 20mM NaCl içeren 0.5M'lık asetat

tamponu (pH = 4.8) içinde hibridizasyon öncesi ve hibridizasyon sonrasında elde edilen guanin yükseltgenme sinyali tayini yapıldı.

2.5. İncelenen Parametreler

Yapılan çalışmaların tümü, rpoB geninde direnç mutasyonlarının tayini için, en uygun hibridizasyon ve mutasyon ayırımı koşullarının saptanmasına yöneliktir.

En uygun hibridizasyon koşullarının saptanmasında esas olan, prob dizilerin karşılığı olan sentetik hot-spot hedef dizi ile ve tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile alınan yanıtlar arasındaki farklılıktır. Bu tasarlanan genosensörün seçimliliğini gösterir. Hibridizasyondan sonra hot-spot hedef dizi ile yüksek bir sinyal alınması beklenirken tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile düşük bir sinyal alınması beklenir. Her iki dizi ile alınan yanıtların oranı bu seçimliliğin göstergesidir.

En uygun mutasyon ayırım koşullarının saptanması ise; bir önceki basamakta genel olarak belirlenen hibridizasyon koşullarına dayanarak, belirli bir bölgede mutasyon içeren bir PCR ürünü kullanımı ile mutasyonun en iyi gözlemlendiği koşulların seçilmesidir. Hibridizasyondan sonra mutasyon gösteren bölgeye ait prob dizi ile en düşük, diğer bölgedeki prob ile en yüksek sinyalin elde edildiği aralık saptanır.

2.5.1. Sentetik hot-spot Hedef Dizisi ile Hibridizasyon Tayini

Yukarıda belirtilen koşullarda, farklı elektrot yüzeylerine bağlanmış 10µg /mL derişimindeki S1, S2, S3, S4 ve S5 prob diziler ile 15 µg /mL sentetik hedef dizinin hibridizasyonu ve 10 dakika yıkama tamponu ile yıkama aşamasından sonra alınan ölçümler ile hibridizasyonun sentetik diziler ile kontrolü çalışıldı.

2.5.2. Hibridizasyon ve Mutasyon Analizlerinin En Uygun Koşullarının Saptanması

2.5.2.1. Prob Derişiminin Hibridizasyon ve Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi:

Bu çalışmada artan prob derişimine karşı sabit derişimdeki sentetik hedef, rasgele diziler ve sabit derişimdeki PCR ürünü ile çoğaltılmış hedef diziler ile hibridizasyondan sonra alınan guanin yükseltgenme sinyalleri DPV tekniği ile belirtilen koşullarda incelenerek elektrot yüzeyinin tamamen kaplandığı prob dizi derişimi saptandı.

2.5.2.1.1. Prob Derişiminin Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesi:

Artan S1 prob dizisi ile sabit 15 µg /mL derişimdeki hot-spot hedef dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi arasındaki hibridizasyondan ve yıkamadan sonra alınan guanin sinyalleri incelendi.

2.5.2.1.2. Prob Derişiminin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi:

Artan derişimlerde S1, S2, S3, S4 ve S5 prob dizileri ile sabit 1/40 seyrelme oranında PCR ile çoğaltılmış ve denatüre edilerek tek iplikli hale getirilen 513. kodonunda CAA'nın CCA'ya dönüşmesi ile S1 bölgesinde direnç mutasyonu içeren örnek hedef dizi ile hibridizasyondan ve yıkamadan sonra alınan guanin sinyalleri incelendi.

2.5.2.2. Hedef Derişiminin Hibridizasyon ve Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi:

Bir önceki çalışmada elektrot yüzeyini tam olarak kaplayan prob dizi derişimi saptandıktan sonra, bu derişim sabit tutularak artan derişimlerde sentetik hot-spot hedef ve tüm bazları hedeften farklı rasgele diziler ve PCR ile çoğaltılmış örnek diziler ile hibridizasyondan sonra alınan guanin yükseltgenme sinyalleri DPV tekniği ile belirtilen koşullarda incelenerek en uygun sentetik hedef ve PCR ürünü derişimi saptandı.

2.5.2.2.1. Hedef Derişiminin Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesi:

Bu çalışmada sabit 10 µg /mL S3 prob derişimine karşın artan derişimlerdeki sentetik hot-spot ve tüm bazları hedeften farklı rasgele hedef dizi ile yapılan hibridizasyonun ardından alınan guanin sinyalleri karşılaştırılarak en uygun sentetik hedef derişimi saptandı.

2.5.2.2.2. Hedef Derişiminin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi:

Bu çalışmada, sabit prob derişimine karşın artan derişimlerdeki denatüre edilmiş PCR ürünü hedef dizi ile yapılan hibridizasyonun ardından alınan guanin sinyalleri incelendi. Mutasyonun analizi için en uygun PCR ürünü derişimi, tüm problemlerin bağlandığı farklı yüzeylerde, hedef dizinin hibridizasyonu sonucu alınan guanin sinyalleri ile sağlandı.

Kullanılan örnek 531. kodonunda *TCG*'nin *TTG*'ye dönüşmesiyle S4 ve S5 prob dizilerinin karşılık geldiği bölgede direnç mutasyonu içermektedir.

Önceden spektrofotometre ile yapılan tayinde amplifikasyon sonrası örneğin 753 µg /mL olduğu saptanmıştı.

2.5.2.3. Hibridizasyon Zamanının Hibridizasyon ve Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi:

Bu çalışmada, hibridizasyon zamanındaki değişimin, sentetik hot-spot ve tüm bazları hedeften farklı rasgele diziler ile denatüre edilmiş belirli bir bölgesinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü hedef dizi ile yüzeye tutturulan prob dizilerin 10, 15, 30, 45, 60 ve 90 dakikalık hibridizasyonundan ve yıkamanın ardından alınan guanin sinyali üzerine etkisi DPV tekniği ile belirtilen koşullarda incelenerek en uygun hibridizasyon zamanı saptandı.

2.5.2.3.1. Hibridizasyon Zamanının Alınan Yanıt Etkisinin İncelenmesi:

Artan hibridizasyon zamanları ile, yüzeye tutturulan S2 prob dizi ile sentetik hot-spot dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele dizilerin hibridizasyonundan ve yıkamanın ardından alınan guanin sinyali üzerine etkisi DPV tekniği ile belirtilen koşullarda incelendi.

2.5.2.3.2. Hibridizasyon Zamanının Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi

Elektrot yüzeyine tutturulan tüm prob diziler ile denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş bir PCR ürünü örneği değişen zamanlarda hibridizasyona tabi tutularak mutasyonun en iyi gözlemlendiği süre seçildi.

Kullanılan PCR ürünü 531. kodonunda *TCG*'nin *TTG*'ye dönüşmesiyle S4 ve S5 prob dizilerinin karşılık geldiği bölgede direnç mutasyonu içermektedir.

2.5.2.4. Yıkama Tamponunun Hibridizasyon ve Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi:

Bu çalışmada prob dizilerin sentetik hot-spot dizi, tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ve belirli bir bölgesinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü hedef dizi ile hibridizasyonunun ardından; A) **1xSSC + %0.1 SDS**, B) **1xSSC + %0.5 SDS**, C) **2xSSC + %0.1 SDS**, D) **2xSSC + %0.5 SDS**, E) **3xSSC + %0.1 SDS** ve F) **3xSSC + %0.5 SDS** olmak üzere 6 farklı yıkama tamponlarının kullanımından sonra alınan guanin sinyalleri aralarındaki farklar incelendi ve en uygun yıkama tamponu seçildi.

2.5.2.4.1. Yıkama Tamponunun Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesi:

Bu çalışmada S1 prob dizinin sentetik hot-spot dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyonunun ardından yukarıda belirtilen 6 farklı yıkama taponu ile yıkama işleminden sonra alınan guanin yükseltgenme sinyalleri incelendi.

2.5.2.4.2. Yıkama Tamponunun Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi:

Bu çalışmada tüm prob dizileri PCR ürünü örneğin denatüre edilmesi ile elde edilen tek iplikli hedef ile hibridizasyonunun ardından; yukarıda belirtilen 6 farklı yıkama tamponlarının kullanımından sonra alınan guanin sinyalleri aralarındaki farklar incelendi ve mutasyonun en iyi gözleendiği yıkama tamponu seçildi.

Bu amaçla kullanılan PCR ürünü örneği 531. kodonunda *TCG*'nin *TTG*'ye dönüşmesiyle S4 ve S5 prob dizilerinin karşılık geldiği bölgede direnç mutasyonu içermektedir.

2.5.2.5. Yıkama Zamanının Hibridizasyon ve Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi:

Bu çalışmada yüzeye bağlanan prob dizilerin sentetik hot-spot dizi, tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ve belirli bir bölgesinde direnç mutasyonu içeren PCR örnek ile hibridizasyonundan sonra 0, 1, 5, 10, 15, 30 ve 60

dakika gibi farklı zamanlarda gerçekleştirilen yıkama işleminden sonra alınan guanin sinyallerinin incelenmesiyle en uygun yıkama zamanı saptandı.

2.5.2.5.1. Yıkama Zamanının Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesi:

Yukarıda belirtilen farklı yıkama zamanlarının; kullanılan S2 prob dizisinin sentetik hot-spot dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyonundan sonra alınan guanin sinyallerine etkisi incelendi.

2.5.2.5.2. Yıkama Zamanının Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesi:

Yüzeye bağlanan tüm S prob dizilerinin PCR örneğinin denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş S3 bölgesinde direnç mutasyonu içeren hedef dizi ile hibridizasyonu ve yukarıda belirtilen farklı zamanlarında gerçekleştirilen yıkama koşullarının uygulanmasının ardından alınan guanin sinyalleri incelenerek mutasyonun en iyi gözlemlendiği yıkama zamanı saptandı.

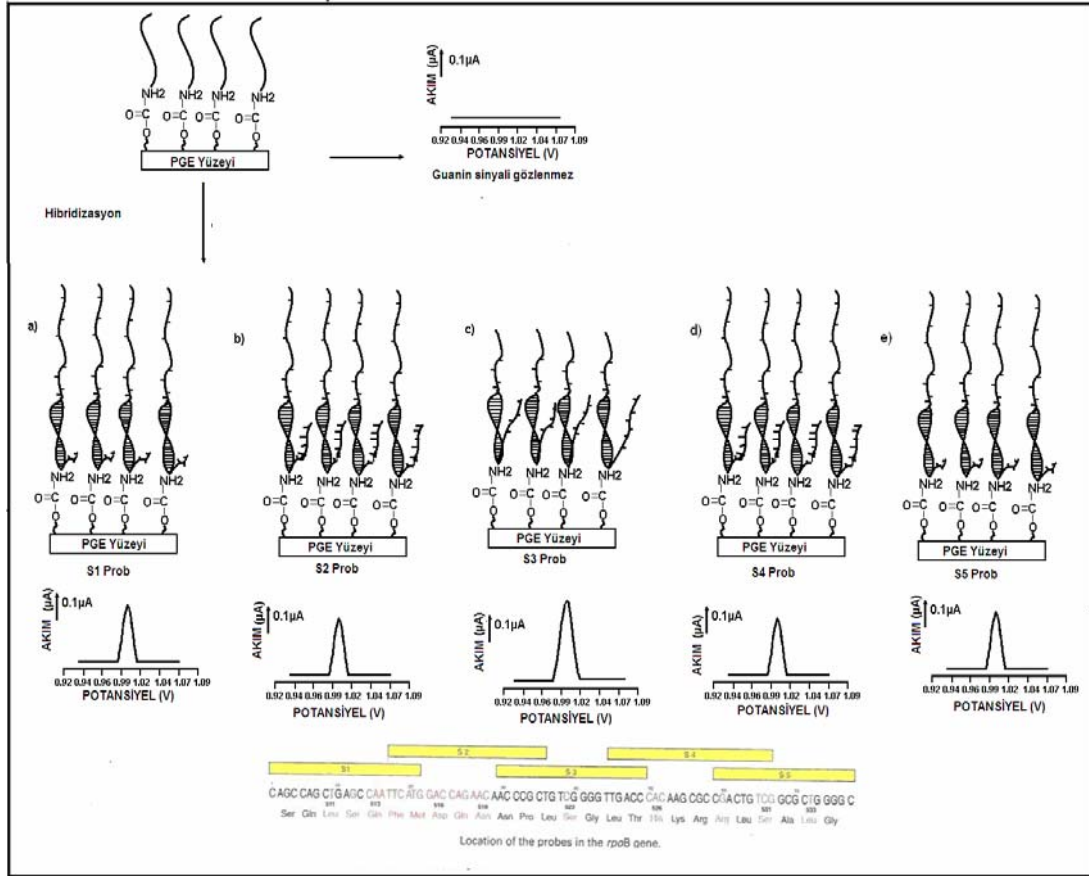
Tüm parametrelerin incelenmesiyle hibridizasyon ve mutasyon analizi için gerekli en uygun koşullar sağlandı ve bilinmeyen örneklerin tek tek analizleri aşaması başlamış oldu.

2.5.3. Sentetik Hot-spot Dizi ile Saptanan En Uygun Koşullarda Hibridizasyon Tayini

En uygun hibridizasyon koşullarının saptanmasıyla sentetik örnekler bu koşullar altında hibridizasyona tabi tutuldu. Buna göre;

10 µg / mL S1, S2, S3, S4 ve S5 kaplanmış elektrot yüzeylerine, 15 µg / mL hot-spot dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile 30 dakika hibridizasyonun ardından 15 dakika 1xSSC + %0.1 SDS içeren yıkama tamponu ile muamelesinin ardından diferansiyel puls voltametri ile guanin sinyalleri incelendi.

Şekil 26'da 5 farklı prob dizi ile sentetik hot-spot dizi, hibridizasyon çalışmasına ait çizilmiş genel bir analiz şeması örneği vardır.

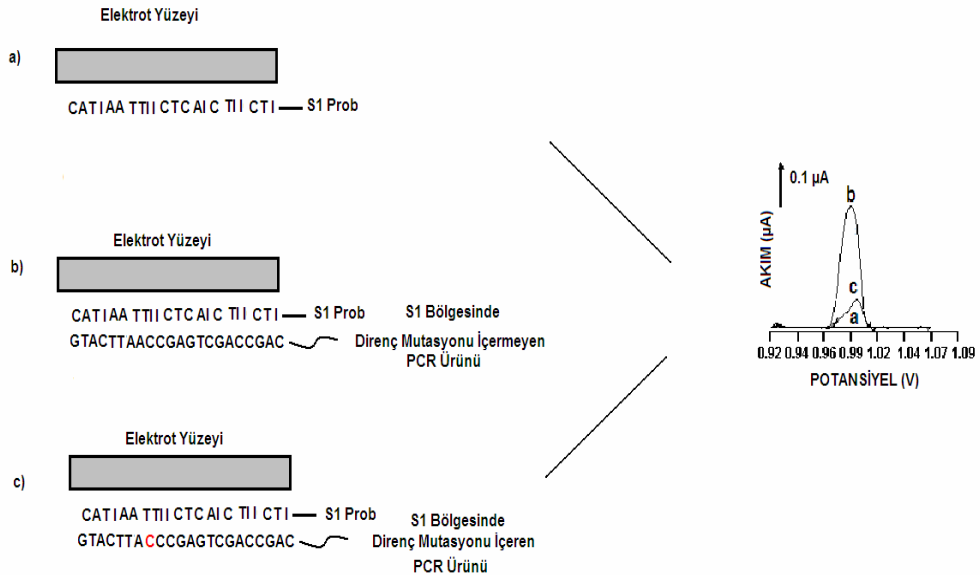


Şekil 26: *Mycobacterium tuberculosis* S prob dizilerinin sentetik hot-spot dizi ile hibridizasyon tayininin şematik gösterimi.

2.5.4. Tüm PCR Ürünlerini Kullanarak Direnç Mutasyon Analizi:

PCR ile çoğaltılmış gerçek hedef dizilerin kullanılmasıyla belirlenen en uygun hibridizasyon koşulları sağlanarak tüm PCR ürünü örnekler ve analizlerin güvenilirliğini sağlamak amacıyla Herpes simpleks virüsüne (HSV) ait rasgele bir PCR ürününün de kullanılmasıyla analizler yapıldı.

Şekil 27’de S1 bölgesinde direnç mutasyonu içeren bir PCR örneğinin analizine yönelik şematik bir gösterim bulunmaktadır. Burada gözlemlendiği üzere prob dizi guanin içermediğinden dolayı herhangi bir sinyal alınmaz iken S1 bölgesinde direnç mutasyonu içermeyen bir PCR ürünü ile hibridizasyonundan sonra oldukça yüksek bir guanin sinyali elde edilir. Ancak mutasyon içeren hedef dizi ile hibridizasyonun ardından guanin sinyalinin büyük oranda düşerek, prob diziden alınan sinyale yaklaştığı gözlenir.



Şekil 27: S1 prob dizi ile kaplı elektrot yüzeyinde S1 bölgesinde direnç mutasyonu içeren ve bu bölgede direnç mutasyonu içermeyen iki PCR ürünü örneğine ait mutasyon analizinin şematik gösterimi.

BÖLÜM III

BULGULAR ve TARTIŞMA

Tüberküloz Hastalarında Rifampin Antibiyotiğine Karşı Gelişen Direnç Mutasyonlarının Saptanmasına Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

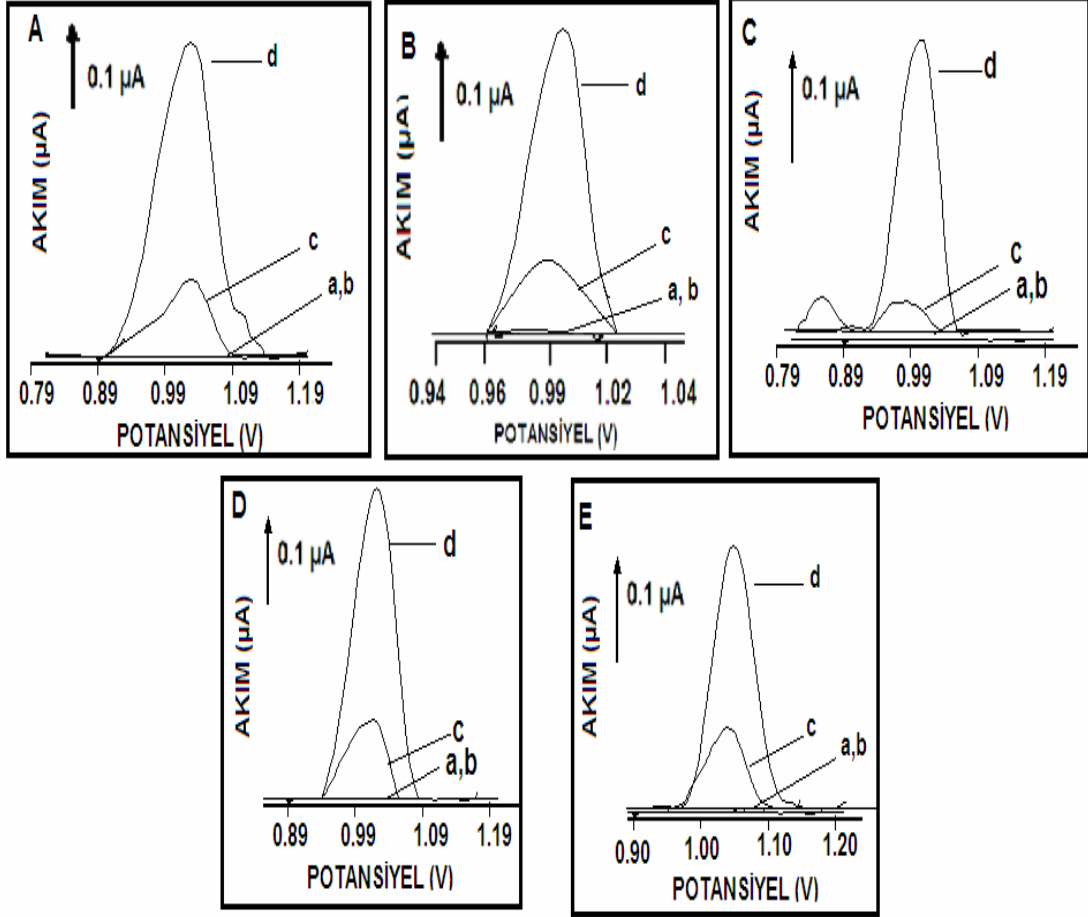
Tüberküloz hastalarında ilaç kullanımı ile ilaca karşı bakterinin geliştirdiği direncin klinikte hızlı tanısı tedavinin seyri için büyük önem taşımaktadır. Tez çalışmasında tüberküloz tedavisinde yaygın olarak kullanılan rifampin antibiyotiğine karşı bakterinin geliştirdiği direnç mutasyonlarının elektrokimyasal genosensör ile klinik tanıya yönelik olarak tayinini kapsamaktadır. Tasarlanan genosensör indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi esasına dayalı olarak kullanıldı. Direnç mutasyonlarının en sık gözleendiği rpoB gen bölgesine karşılık gelen 5 farklı inozin içeren prob dizi ile hibridizasyon ve mutasyon analizleri gerçekleştirildi.

3.1. Sentetik Hot-spot Dizi ile Hibridizasyon Tayinde Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

Geliştirilen genosensör tasarımında ilk önce 5 tip prob dizinin sentetik hedef ve rasgele diziler ile hibridizasyon tayini gerçekleştirildi. 10 µg /mL asetat tamponunda hazırlanmış prob dizi ile hibridizasyon tamponunda

hazırlanmış 15 µg /mL hedef diziler kullanıldı ve Yöntem 2.5.1.'de belirtilen koşullarda çalışma gerçekleştirildi. Yüzeğe prob bağlanmadan önce, hibridizasyondan önce ve sonra olmak üzere her bir parameteye ait ayrı ölçümle alınarak hibridizasyonun seçimliliği tayin edildi.

Şekli 28'de yapılan çalışmada prob bağlama amacıyla kullanılan yüzey kaplama çözeltisi uygulamasından sonra herhangi bir guanin sinyali gözlenmez iken guanin içermeyen prob dizilerin bağlamasından sonra alınan voltametrik ölçümde de bir sinyal olmadığı gözlemlendi. Elektrot yüzeyine bağlı prob dizilerin sentetik hot-spot dizi ile hibridizasyonundan sonra ise guanin sinyalinde büyük oranda artış gözlenirken, tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyondan sonra guanin sinyalinin tekrar büyük oranda düştüğü hatta prob diziden alınan sinyale oldukça yaklaşmış olduğu gözlemlendi. Tüm bazları hedeften farklı dizi ile hibridizasyonun ardından alınan sinyalin düşük olması, tasarlanan genosensörün dizi seçimli olduğunu kanıtlanmış oldu.



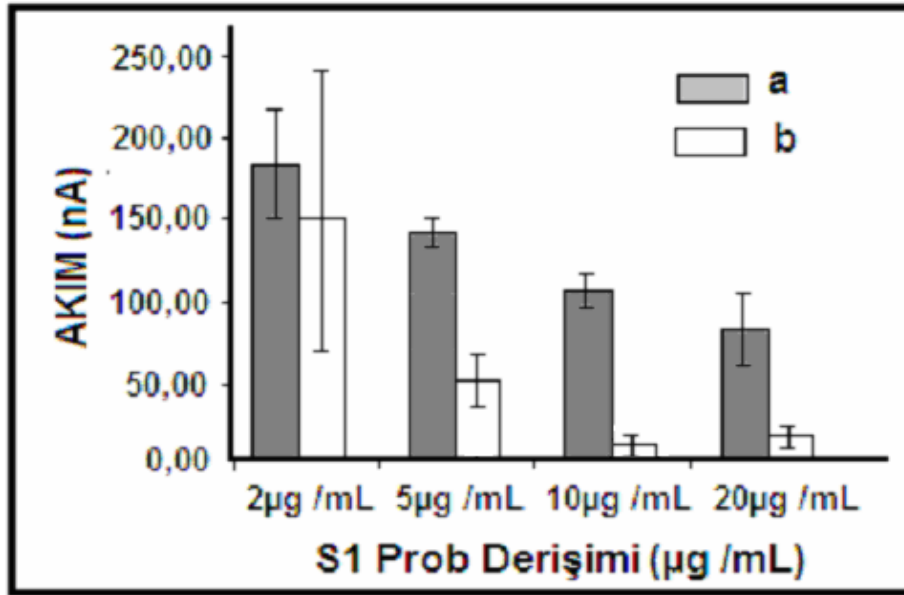
Şekil 28: Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak **A)** S1, **B)** S2, **C)** S3, **D)** S4, **E)** S5 prob tutturulmuş elektrot yüzeyinde; **a)** prob tutturulmadan önce, **b)** herhangi bir hedef dizi içermeyen boş hibridizasyon tamponu ile, **c)** tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile ve **d)** sentetik hot-spot dizi ile hibridizasyonundan sonra elde edilen guanin yükseltgenme sinyallerine ait voltamogram.

Tüm parametrelerin guanin sinyallerine ait beşer ardışık ölçümleri tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir.

3.2. Hibridizasyon ve Mutasyon Analizlerinin En Uygun Koşullarının Saptanmasına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

3.2.1. Prob Derişiminin Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Bu çalışma; en uygun prob derişimini saptamak amacıyla artan derişimlerde S1 prob dizisi ve sabit 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişiminde sentetik hot-spot dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi kullanılarak yöntem 2.5.2.1.1'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi .



Şekil 29: Artan derişimde S1 prob kaplanmış elektrot yüzeyinde sabit 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişiminde **a)** sentetik hot-spot dizi, **b)** tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyondan sonra diferansiyel puls voltametri tekniği ile alınan guanin yükseltgenme sinyaline dayalı histamogram.

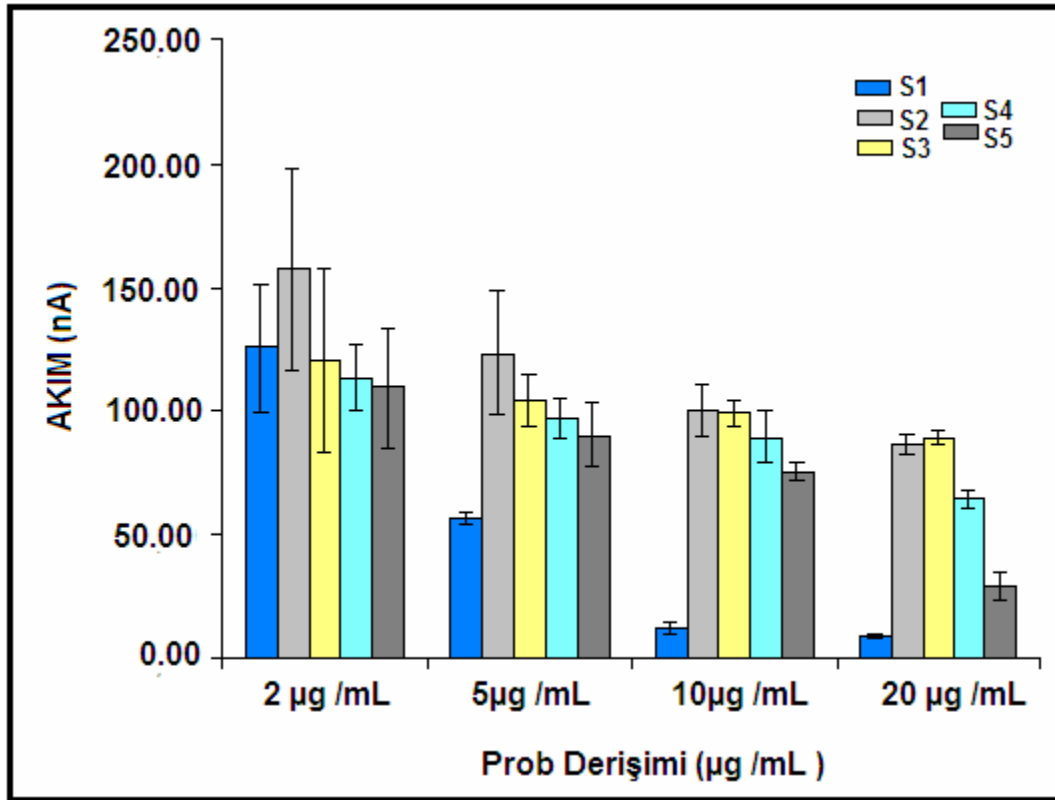
Şekil 29'da; farklı derişimlerde S1 dizisi kaplı elektrotların yüzeyleri sabit derişimdeki sentetik hedef ve rasgele dizi ile hibridizasyona tabi tutulmuştur. Burada amaç yüzeyin en iyi biçimde kaplandığı ve en iyi hibridizasyon seçimliliğinin sağlandığı (hot-spot dizi ile yüksek, rasgele dizi ile düşük yanıt alınması) prob derişimini saptamaktır. Alınan sonuçlar incelendiğinde; 2µg /mL derişiminde prob bağılı elektrot yüzeylerinde hibridizasyondan sonra yüksek oranda guanin sinyali elde edilmesine rağmen hedef ile rasgele dizi arasında herhangi bir farklılanma gözlenmemiştir. Bunun sebebi derişimin düşük olmasından dolayı yüzeyin iyi kaplanmaması ve çıplak kalan elektrot yüzeylerine hibridizasyondan sonra her iki dizinin de spesifik olmayan bağlanma yapmasıdır. Bu iki dizinin birbirinden ayırımı 5µg /mL prob derişiminden itibaren netlik kazanmaya başlar, ancak en iyi ayırım 10 ve 20 µg /mL derişimlerde elde edilir.

3.2.2. Prob Derişiminin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Bu çalışma, en uygun prob derişimini saptamak amacıyla 2, 5, 10 ve 20 µg /mL olmak üzere artan derişimlerde S1, S2, S3, S4 ve S5 prob dizilerinin sabit derişimdeki 513. kodonunda CAA'nın CCA'ya dönüşmesiyle S1 dizisinin karşılık geldiği bölgede direnç mutasyonu içeren denatüre edilmiş PCR ürünü örnek ile hibridizasyonu yöntem 2.5.2.1.2.'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Burada beklenen S1 bölgesinde bulunan direnç mutasyonunun en iyi gözleendiği pron derişimi tespit etmektir. Buna yönelik yapılan çalışmada

alınan sonuçlar incelendiğinde, bir önceki çalışmada gözlemlendiği gibi $2\mu\text{g}/\text{mL}$ derişiminde herhangi bir farklılık gözlenmez iken, 10 ve $20\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimlerde oldukça net bir mutason ayırımı gözlenmiştir. Belli bir derişimden sonra akımdaki azalma, yüzey doygunluğuna erişilmesinden kaynaklanmaktadır.

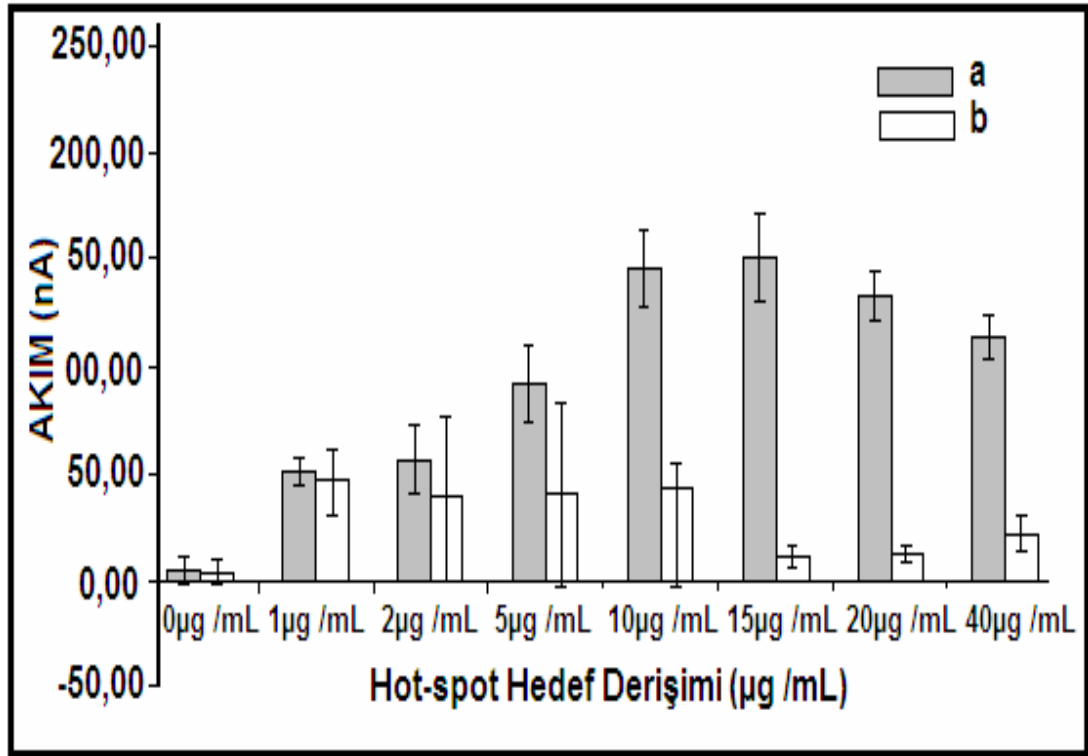


Şekil 30: Artan derişimlerde tüm S prob dizileri kaplanmış elektrot yüzeylerinde S1 bölgesinde direnç mutasyonu gösteren denatüre edilmiş PCR ürünü örnek ile hibridizasyonun ardından diferansiyel puls voltametri ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram.

Yapılan her iki çalışmada da prob dizinin yüzeyi $10\mu\text{g}/\text{mL}$ derişiminde tamamen kapladığı gözlemlendiğinden $10\mu\text{g}/\text{mL}$ en uygun prob dizi derişimi koşulu seçilmiştir.

3.2.3. Hedef Derişiminin Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

En uygun sentetik hedef dizi derişimini saptamak amacıyla yapılan çalışmada S3 prob dizi olarak kullanıldı. Sabit 10 µg /mL derişiminde S3 prob dizi ile artan derişimlerde hot-spot dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele dizilerinin hibridizasyon tayini, yöntem 2.5.2.2.1'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

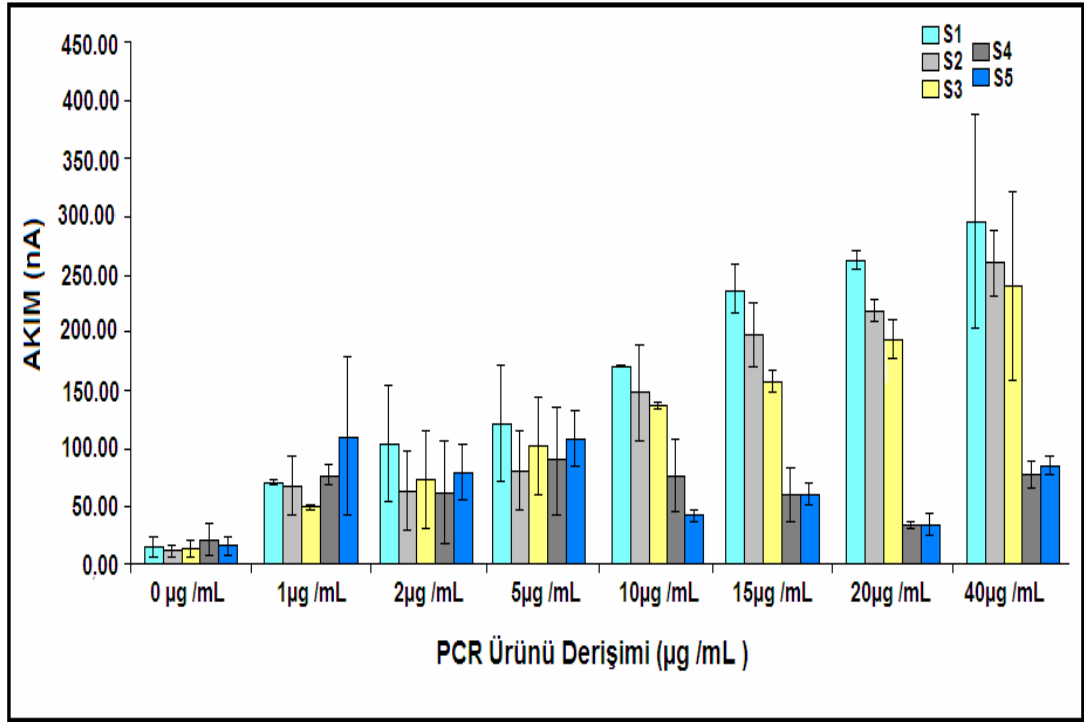


Şekil 31: Sabit 10 µg /mL derişiminde S3 prob dizi kaplanmış elektrot yüzeyinde artan derişimlerde a) sentetik hot-spot dizi, b) tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyondan sonra diferansiyel puls voltametri tekniği ile alınan guanin yükseltgenme sinyaline dayalı histamogram.

Yapılan çalışmada hibridizasyondan önce (0µg /mL) sıfıra yakın guanin sinyali alınırken hedef derişiminin artmasıyla guanin yanıtlarının da 15µg /mL derişime kadar arttığı gözlenmiştir, ancak bu derişimde yüzeyde hibridizasyona uğrayan prob ve hedef diziler arasında doygunluğa ulaşılmış ve guanin yanıtlarının sabitlendiği gözlenmiştir. Aynı zamanda artan hedef ve rasgele dizi derişimi ile birlikte genosensörün hibridizasyon seçimliliği de artmıştır. 15 ve 20 µg /mL hedef derişimi kullanıldığında hot-spot dizi ile alınan yanıtlar yüksek, rasgele hedef dizi ile alınan yanıtlar ise oldukça düşüktür. Buna göre 15 µg /mL en uygun hedef derişimi olduğuna karar verilmiştir.

3.2.4. Hedef Derişiminin Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

En uygun hedef derişimini saptamak amacıyla 531. kodonunda *TCG*'nin *TTG*'ye dönüşümüyle oluşan, S4 ve S5 prob dizi bölgelerinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü örnek kullanılarak yöntem 2.5.2.2.2.'de belirtilen koşullarda çalışma gerçekleştirildi.



Şekil 32: Sabit 10 µg /mL derişiminde tüm S1, S2, S3, S4 ve S5 problemleri kaplanmış elektrot yüzeylerinde artan derişimlerde S4 ve S5 bölgelerinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü örnek ile hibridizasyonu sonucu diferansiyel puls voltmetresi ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram.

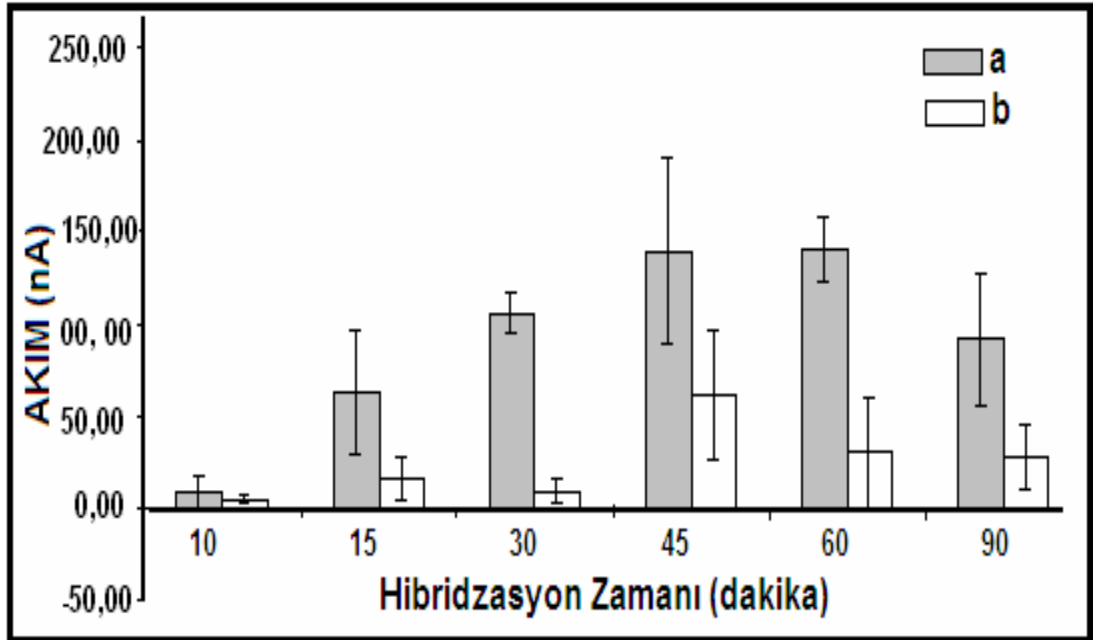
Şekil 32'de alınan guanin sinyalleri değerlendirildiğinde; bir önceki çalışmaya paralel olarak hedef derişiminin artması alınan guanin sinyallerinin de artmasına yol açmış ancak mutasyon ayırımı yani S1, S2 ve S3 ile hibridizasyonun ardından yüksek, S4 ve S5 ile hibridizasyonun ardından düşük yanıt alımı 10µg /mL'dan itibaren başladığı 20 ve 40 µg /mL'da mümkün olduğu gözlenmiştir.

Mümkün olan en düşük derişimde çalışmak adına 20µg /mL en uygun PCR ürünü hedef dizi derişimi olarak seçildi.

3.2.5. Hibridizasyon Zamanının Alınan Yanıtta Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

En uygun hibridizasyon zamanını saptamak amacıyla yapılan çalışmada S2 prob dizi olarak kullanıldı. 10 µg /mL derişiminde S2 prob ile kaplı elektrot 15 µg /mL derişimindeki hot-spot dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele diziler ile farklı zamanlardaki hibridizasyonun alınan yanıtta etkisi yöntem 2.5.2.3.1'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Şekil 33'de yer alan Hibridizasyon zamanı – akım grafiğinde gözleendiği üzere, 30 dakikalık hibridizasyondan sonra düşük rasgele hedef yanıtı ve yüksek hot-spot dizi yanıtı gözleendi ve 30 dakika en uygun hibridizasyon koşulu seçildi.



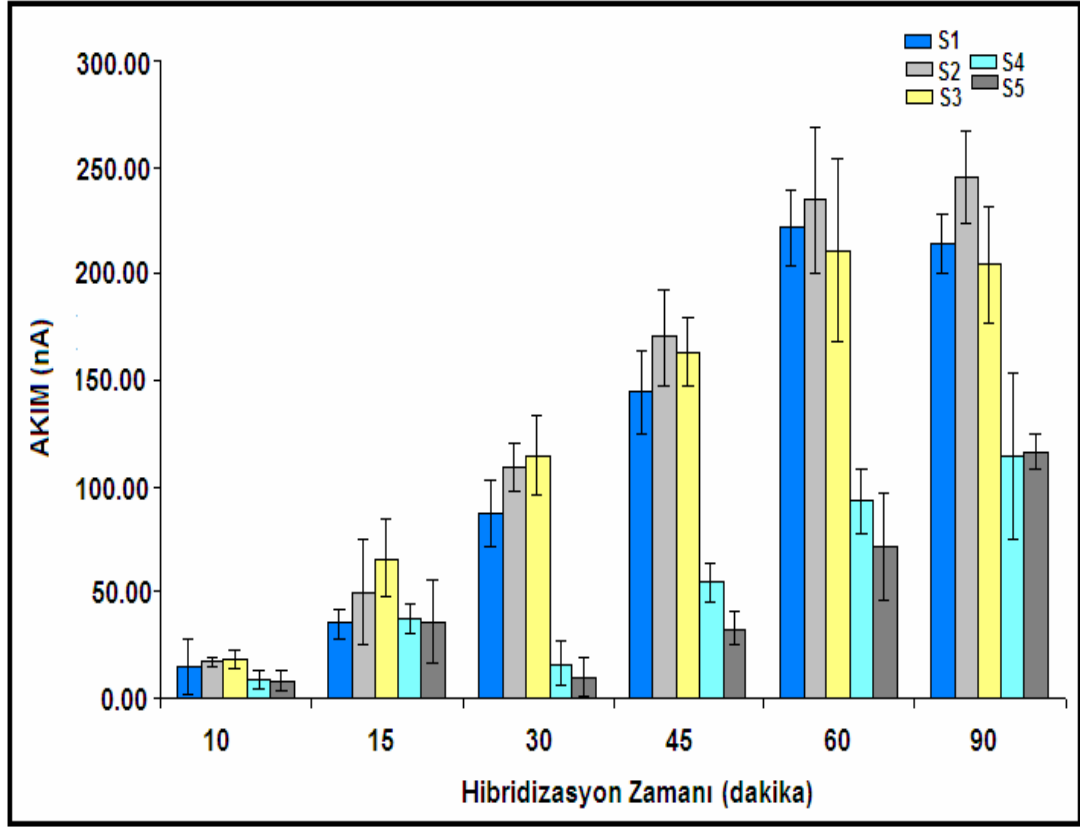
Şekil 33: S2 prob dizi kaplı elektrot yüzeyinde a) hot-spot dizi, b) tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyonun ardından diferansiyel puls voltametri ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram.

3.2.6. Hibridizasyon Zamanının Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmada 531. kodonunda *TCG*'nin *TTG*'ye dönüşümüyle oluşan ve S4 ve S5 prob dizi bölgesinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü örnek kullanılarak yöntem 2.5.2.3.2.'de belirtilen koşullarda çalışma gerçekleştirildi.

Şekil 34'de görüldüğü üzere S1, S2 ve S3 ile hibridizasyonun ardından yüksek, S4 ve S5 ile hibridizasyonun ardından en düşük alınan yanıtlar 30 dakikalık bir hibridizasyonun zamanı ile elde edildi. Daha düşük zamanlarda gerçekleşen hibridizasyonlarda hem elde edilen guanin sinyalleri düşük çıkmış hem de mutasyon analizi gerçekleşmemiştir. Ancak 30 dakikanın üzerinde bir hibridizasyon yapıldığında ise artan zamanla birlikte guanin sinyalinin de arttığı ancak mutasyon ayırımının düştüğü gözlenmiştir. Bunun sebebi artan zamanın PCR ürününün kendi üstünde katlanmaya yol açması olabilir.

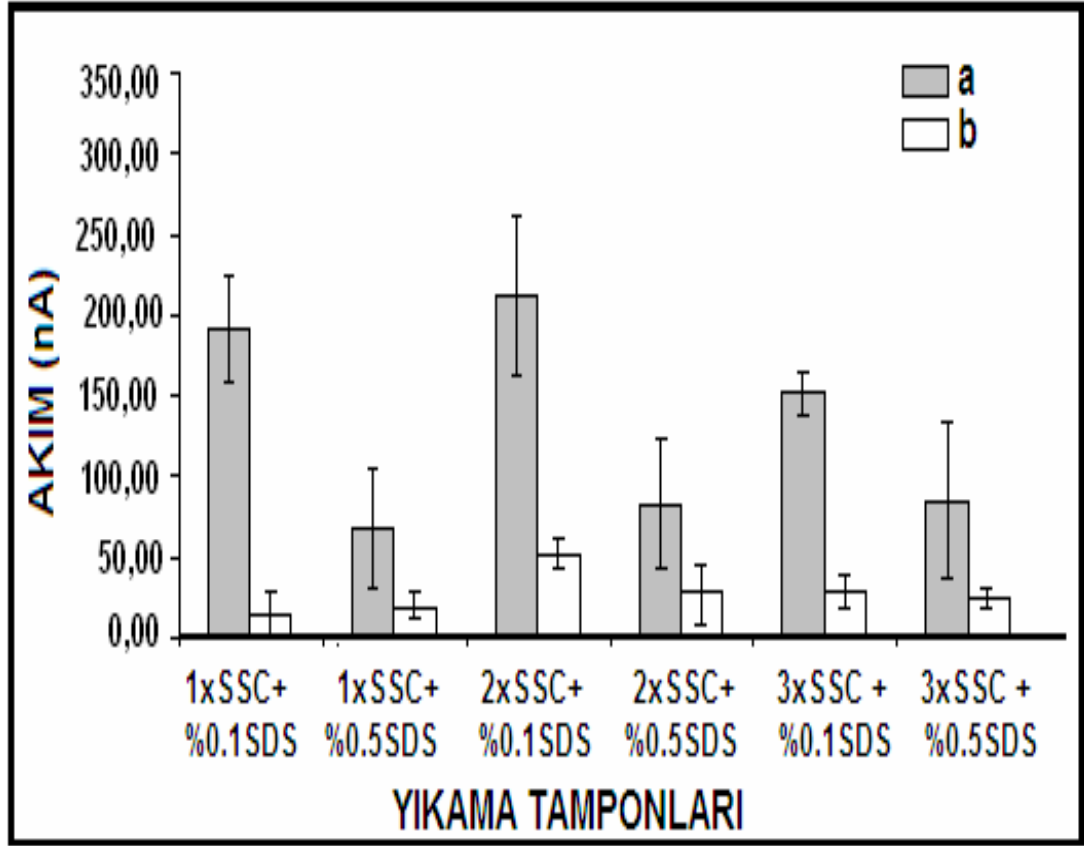
Böylece 30 dakika en uygun hibridizasyon zamanı olarak seçildi.



Şekil 34: Tüm S problemleri kaplı elektrot yüzeylerinde, denatüre edilmiş ve S4 ve S5 bölgelerinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü örnek ile hibridizasyondan sonra diferansiyel puls voltametri ile alınan guanin yükseltgenme sinyallerine ait histogram.

3.2.7. Yıkama Tamponunun Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

En uygun yıkama tamponunu bulmak amacıyla yapılan çalışmada S1 prob dizi olarak kullanıldı. Prob dizi ile kaplı elektrot hot-spot dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele diziler ile hibridizasyonun ardından yöntem 2.5.2.4.1'de belirtilen koşullarda gerçekleştirdi. A) **1xSSC + %0.1 SDS**, B) **1xSSC + %0.5 SDS**, C) **2xSSC + %0.1 SDS**, D) **2xSSC + %0.5 SDS**, E) **3xSSC + %0.1 SDS**, F) **3xSSC + %0.5 SDS** olmak üzere 6 farklı yıkama tamponu ile yıkamanın ardından alınan guanin sinyalleri değerlendirildi.



Şekil 35: S1 kaplı elektrot yüzeyinde; **a)** hot-spot dizi ile **b)** tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyondan sonra farklı yıkama tamponları kullanılarak diferansiyel puls voltametri ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram.

Şekil 35'de farklı iyonik denge içeriklerine sahip 6 farklı yıkama tamponunun hibridizasyona ve dizi seçimliliğine etkisini gösteren bir Yıkama tamponu – Akım grafiği bulunmaktadır. Buradan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde A) **1xSSC + %0.1 SDS**, ve C) **2xSSC + %0.1 SDS** daha yüksek ve tekrarlanabilir hedef dizi sinyali aynı zamanda düşük rasgele dizi sinyali gözlenmiştir. Ancak E) **3xSSC + %0.1 SDS**, ve **%0.5 SDS** içeriğine sahip diğer 3 tamponda (B, D ve F) hem hibridizasyona ait sinyallerin düştüğü hem de dizi seçimliliğinin düştüğü gözlenmiştir. Bunun nedeni ortamda deterjan oranının artmasıyla (%0.5 SDS) yüzeydeki oluşan çift

sarmal molekülün uzaklaşarak düşük yanıt vermesi ve NaCl derişiminin artmasının da (3xSSC = 0.9mM NaCl) hibridizasyonu deforme etmesi olabilir.

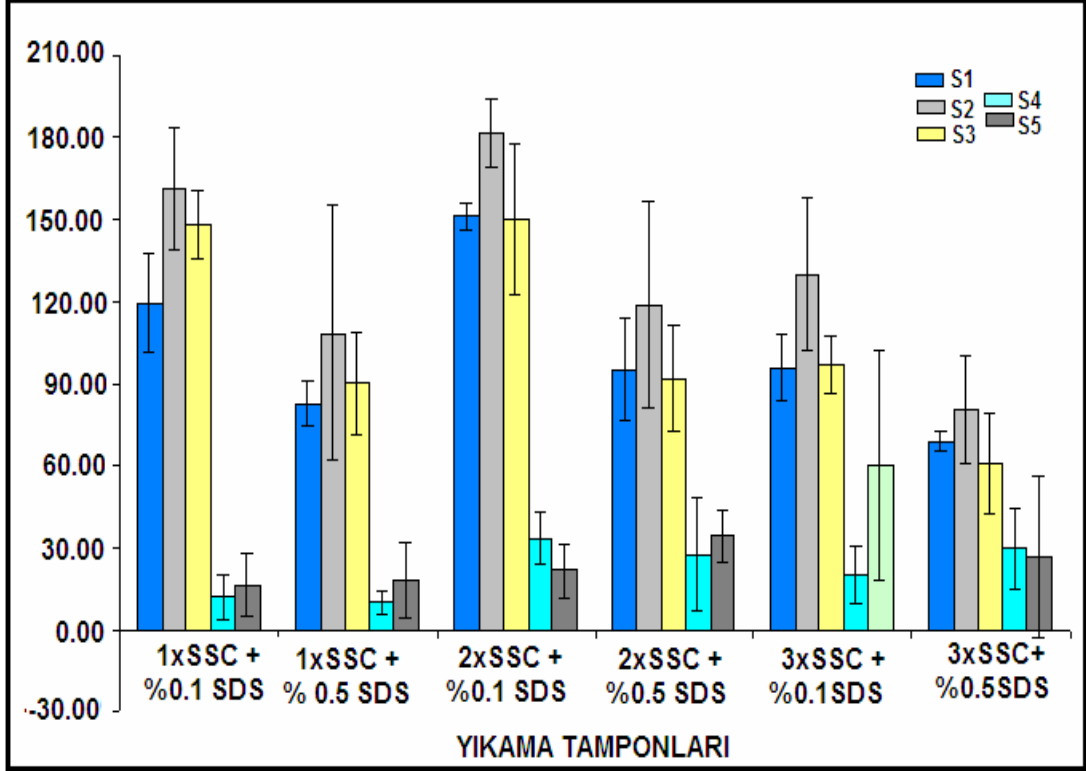
Sonuçta en düşük rasgele dizi ve yüksek hedef dizi yanıtları A) **1xSSC + % 0.1 SDS** içeren tampondan elde edilmiştir. Bundan sonraki çalışmalar için bu yıkama tamponu en uygun yıkama koşulu seçildi.

3.2.8. Yıkama Tamponunun Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Yıkama tamponunun mutasyon tayinine etkisinin incelenmesi ve bu en uygun iyonik dengeyi sağlayan yıkama tamponunun seçilmesi amacıyla yapılan çalışmada, örnek olarak 531. kodonunda *TCG*'nin *TGG*'ye dönüşümüyle oluşan ve S4 ve S5 prob dizi bölgesinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü örnek kullanılarak yöntem 2.5.2.4.2.'de belirtilen koşullarda çalışma gerçekleştirildi.

Şekli 36; bir Yıkama tamponu – Akım grafiğidir. Bu çalışmada farklı iyonik dengeler içeren 6 farklı yıkama tamponunun A) **1xSSC + %0.1 SDS**, B) **1xSSC + %0.5 SDS**, C) **2xSSC + %0.1 SDS**, D) **2xSSC + %0.5 SDS**, E) **3xSSC + %0.1 SDS**, F) **3xSSC + %0.5 SDS**; S4 ve S5 prob bölgelerinin kesişim noktasında direnç mutasyonu içeren bir PCR ürünü ile hibridizasyonundan sonra yüzeydeki ayırma etkisi incelendi. Direnç mutasyonu S4 ve S5 prob bölgelerinde bulunduğu için bu problemler ile yapılan hibridizasyona ait sonucun en düşük, ancak herhangi bir mutasyon içermeyen S1, S2, ve S3 prob bölgelerine ait hibridizasyon sonucunun

yüksek olması beklendi. Bu beklentiler doğrultusunda A) **1xSSC + %0.1 SDS** tampon çözeltisi seçildi.

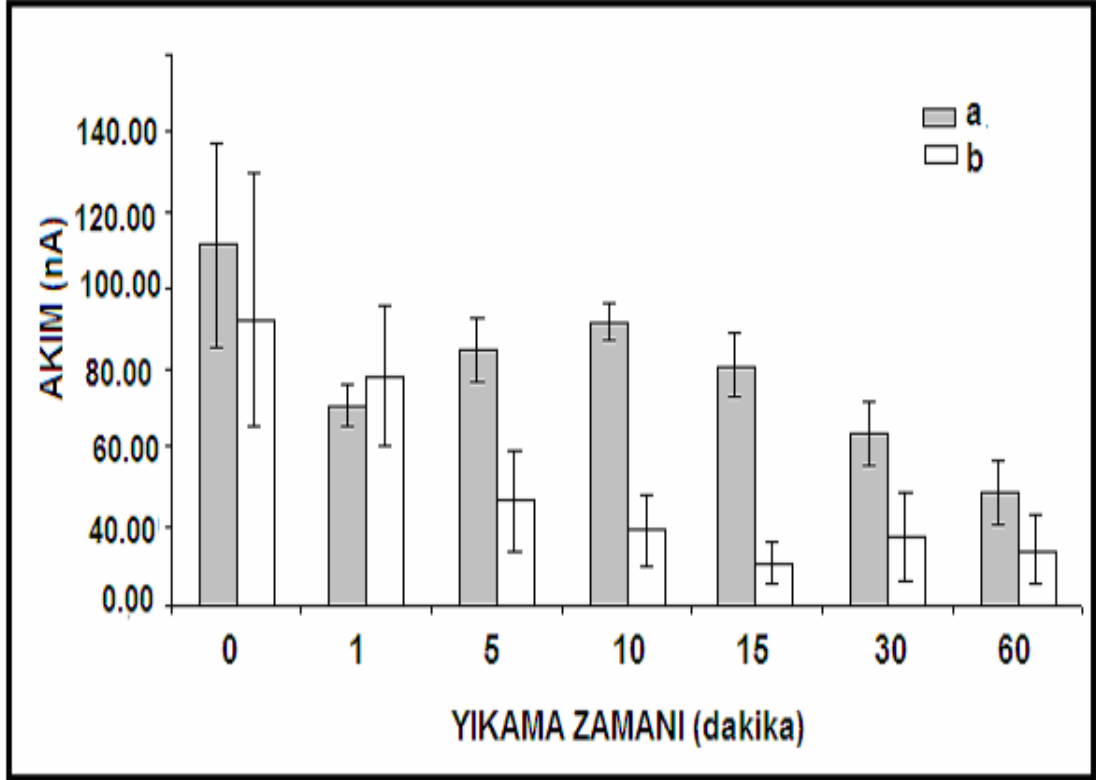


Şekil 36: Tüm S problemleri kaplı elektrot yüzeyinde denatüre edilmiş S4 ve S5 bölgelerinde direnç mutasyonu içeren örnek ile hibridizasyonun ardından, farklı iyonik dengelere sahip A) **1xSSC +%0.1SDS**, B) **1xSSC +%0.5SDS**, C) **2xSSC + % 0.1SDS**, D) **2xSSC + % 0.5SDS**, E) **3xSSC +%0.1SDS** ve F) **3xSSC+%0.5SDS** içeren 6 farklı yıkama tamponu ile muamelesinden sonra diferansiyel pus voltametri ile alınan guanin sinyallerine ait histogram.

3.2.9. Yıkama Zamanının Hibridizasyona Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Yıkama zamanının hibridizasyondan alınan yanıtı etkisi ve en uygun yıkama zamanını tayin etmek amacıyla yapılan çalışmada S2 prob dizi olarak

kullanıldı. Yöntem 2.5.2.5.1’de belirtilen koşullarda; S2 prob kaplı elektrot yüzeyinde hot-spot dizi ile hibridizasyonun ardından 0, 1, 5, 10, 15, 30, 60 dakikalık farklı zamanlarda yapılan yıkama işlemlerinden sonra alınan guanin sinyalleri değerlendirildi.



Şekil 37: S2 kaplı elektrot yüzeyinde; **a)** hot-spot dizi, **b)** tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyonun ve farklı zamanlarda yapılan yıkama işlemlerinden sonra alınan guanin sinyallerine ait histogram.

Şekil 37, S2 prob dizi ile kaplı elektrotların yüzeyinde hedef ve rasgele dizi ile hibridizasyonun ardından farklı zamanlarda yıkama tamponu ile muamelesi sonucu elde edilmiş bir Yıkama zamanı – akım grafiğidir. Buna göre herhangi bir yıkama yapmadan hedef ve rasgele dizilere ait yanıtlar arasında fazla bir fark gözlenmemiş ancak yüksek guanin yanıtları elde

edilmiştir. Yıkama zamanının artmasıyla elde edilen guanin sinyalleri de düşmüş bunun yanı sıra genosensörün seçimliliği artmaya başlamıştır. Seçimlilikteki bu artış 30 dakikalık yıkamaya kadar devam etmiş ancak bundan itibaren tekrar düşmüştür. 30 ve 60 dakikalık yıkama sürelerinde hem hedef dizi ile elde edilen guanin sinyali büyük oranda düşmüş hem de rasgele dizi ile alınan yanıtta meydana gelen bir artış ile genosensörün seçimliliği de azalmaya başlamıştır. Hedef dizi ile meydana gelen düşme yıkama tamponunun deterjan içeriğinin uzun süre yıkamanın ardından yüzeydeki çift sarmal yapıyı uzaklaştırmasından kaynaklanabilir.

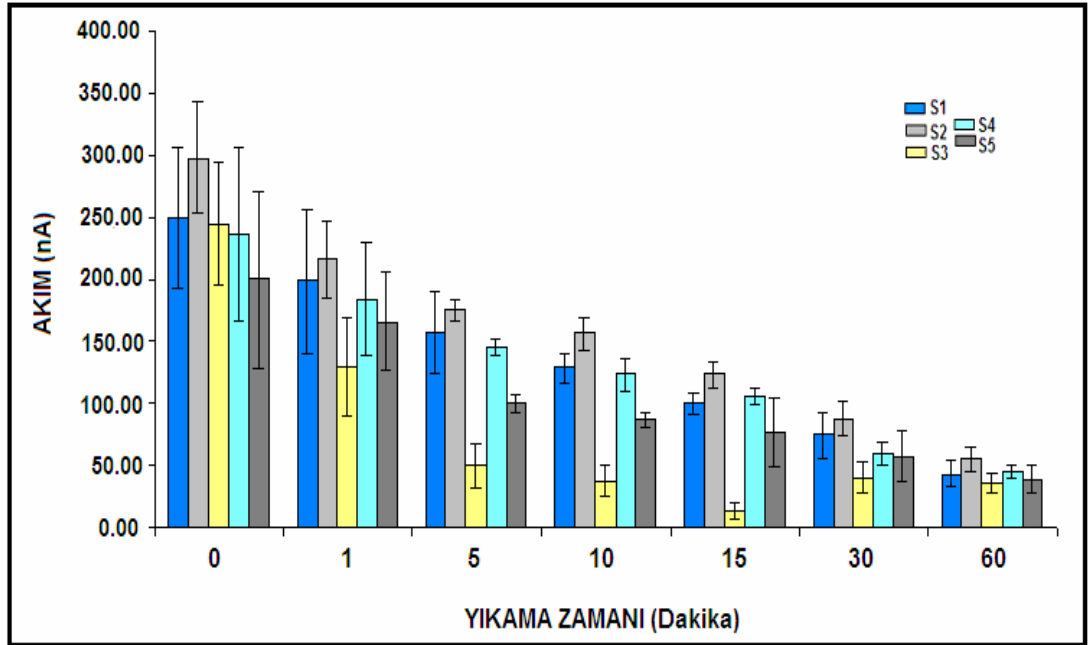
Tüm bunların sonucunda 10 ve 15 dakikalık yıkama zamanlarından sonra hedef dizi ile alınan yanıtlar oldukça yüksek, rasgele dizi ile alınan yanıtlar ise oldukça düşüktür. En uygun yıkama zamanının seçimi aynı çalışmanın mutasyon analizine etkisinden sonra seçilecektir.

3.2.10. Yıkama Zamanının Mutasyon Analizine Etkisinin İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

İyi bir mutasyon analizinde en uygun yıkama zamanını belirlemek amaçlı yapılan çalışmada tüm S problemleri ile kaplı elektrot yüzeyinde denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş ve 522. kodonunda *TCG*'nin *TGG*'ye dönüşmesiyle S3 prob dizisinin karşılık geldiği bölgede direnç mutasyonu içeren örneğin hibridizasyonun ardından 0, 1, 5, 10, 15, 30 ve 60 dakikalık yıkamaların sonucuna alınan guanin sinyalleri değerlendirildi.

Şekil 38, bir Yıkama zamanı – akım grafiğidir. Buradan alınan sonuçlara göre; herhangi bir yıkama yapılmadan alınan hibridizasyon

yanıtları oldukça yüksek olmasına rağmen mutasyon ayırımı gözlenmemiştir. Artan yıkama zamanı ile birlikte mutasyon içeren bölgede farklılaşma başlamış ve bu farklılaşma 30 dakikalık süreye kadar artarak devam etmiştir. Aynı zamanda guanin sinyallerinden alınan yanıtlarda düşmeye başlamıştır. Ancak 30 dakika ve üzeri yıkama zamanlarından sonra alınan yanıtlarda mutasyon ayırımı mümkün olmamaktadır. Bu durum uzun süreli yıkama sırasında tamponun iyonik ve deterjan içeriğinden dolayı elektrot yüzeyinin bozulmasından kaynaklanmış olabilir.



Şekil 38: Tüm S prob dizileri kaplı farklı elektrot yüzeylerinde S3 bölgesinde direnç mutasyonu içeren denatüre edilmiş PCR ürünü örnek ile hibridizasyonundan sonra, 0,1,5,10,15, 30 ve 60 dakikalık yıkama zamanlarının uygulamasının ardından diferansiyel puls Voltametri tekniği ile alınan guanin sinyallerine ait voltamogram.

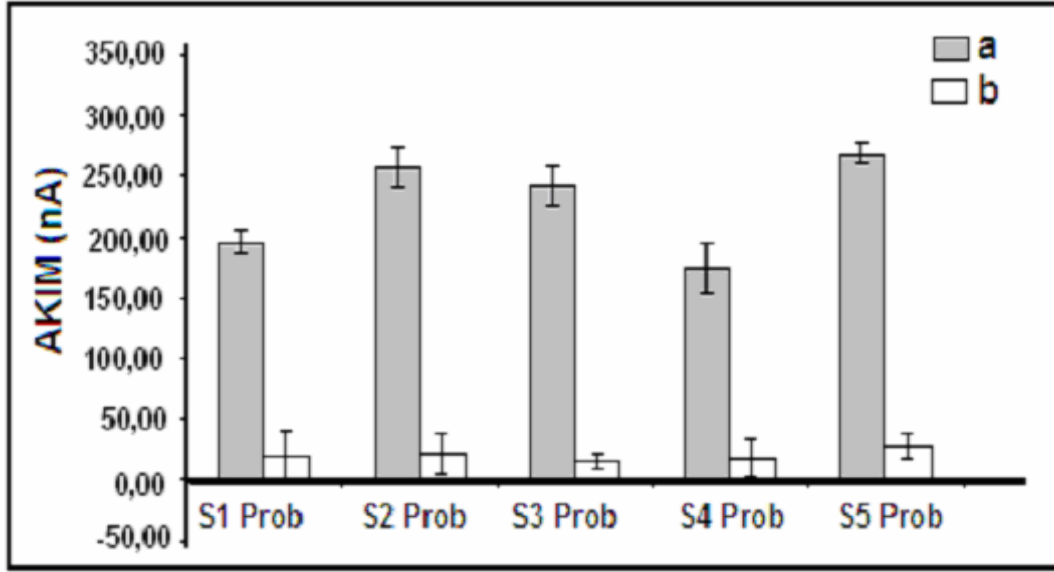
Sonuçta en uygun yıkama zamanını seçmek için yapılan değerlendirmede, kullanılan örneğin S3 bölgesinde direnç mutasyonuna

sahip olması ile S1, S2, S4 ve S5 bölgelerinden alınan yanıtın yüksek, S3 ile alınan yanıtın ise düşük olduğu aralık değerlendirildi ve bu koşulu en iyi şekilde sağlayan 15 dakikalık yıkama zamanı en uygun olarak seçildi.

3.3. Sentetik Hot-spot Dizi ile Saptanan En Uygun Koşullarda Hibridizasyon Tayinine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada önceden saptanan en uygun hibridizasyon koşulları kullanılarak S1, S2, S3, S4 ve S5 prob dizilerin bağlandığı kaplı elektrot yüzeylerinde sentetik hot-spot dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele dizilerin yöntem 2.5.3.'de belirtilen koşullarda tayini gerçekleştirildi.

Şekil 39; 10 µg /mL derişiminde tüm S prob dizilerinin, 15 µg /mL derişiminde hot-spot dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile 30 dakikalık hibridizasyonu ve 15 dakika yıkama tamponu (1xSSC + %0.1 SDS) ile muamelesinden sonra diferansiyel puls voltametrisi ile alınan guanin sinyallerine ait histamogramı gösterir. En uygun hibridizasyon koşullarının sağlanması ile hot-spot dizisi kullanılarak alınan yanıtlar yüksektir, buna karşılık tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile alınan yanıtlarda büyük oranda bir düşme bulunmaktadır.

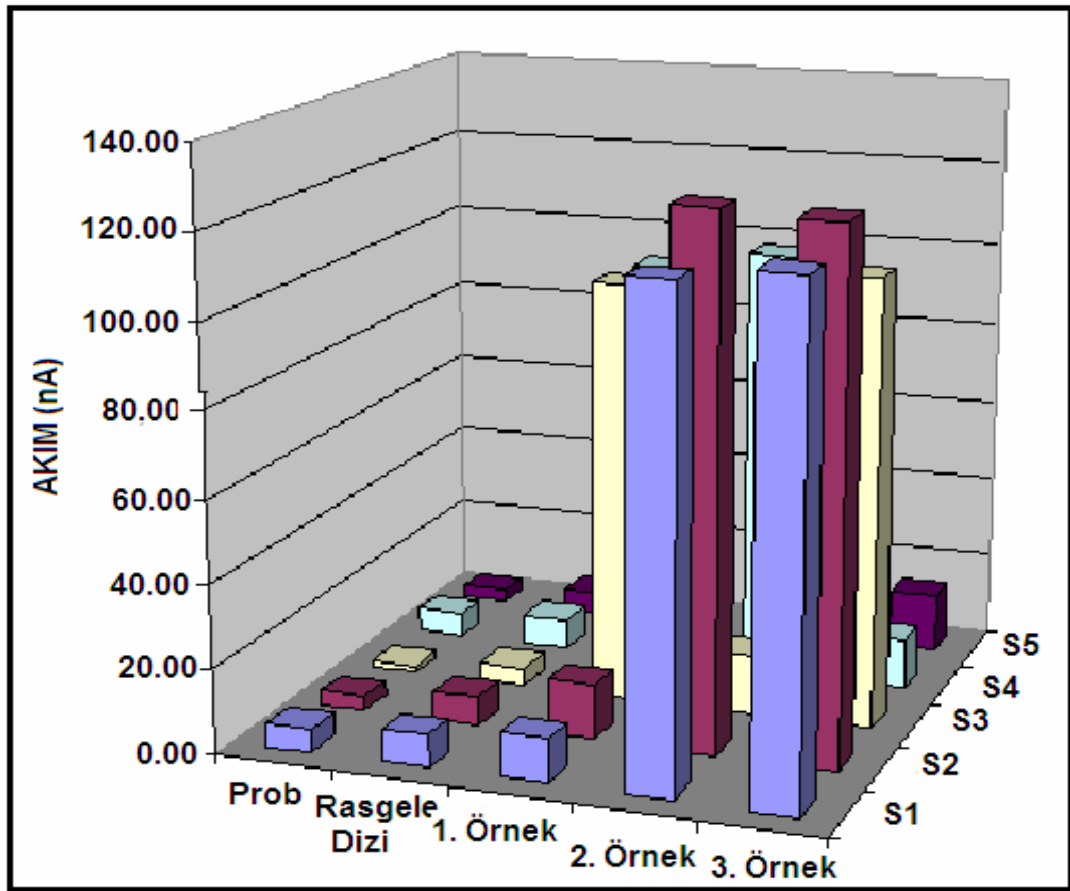


Şekil 39: Diferansiyel puls voltametri ile S1, S2, S3, S4 ve S5 prob kaplanmış elektrot yüzeylerinde **a)** hot-spot dizi ile, **b)** tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyondan sonra alınan guanin yükseltgenme sinyallerine ait histamogram.

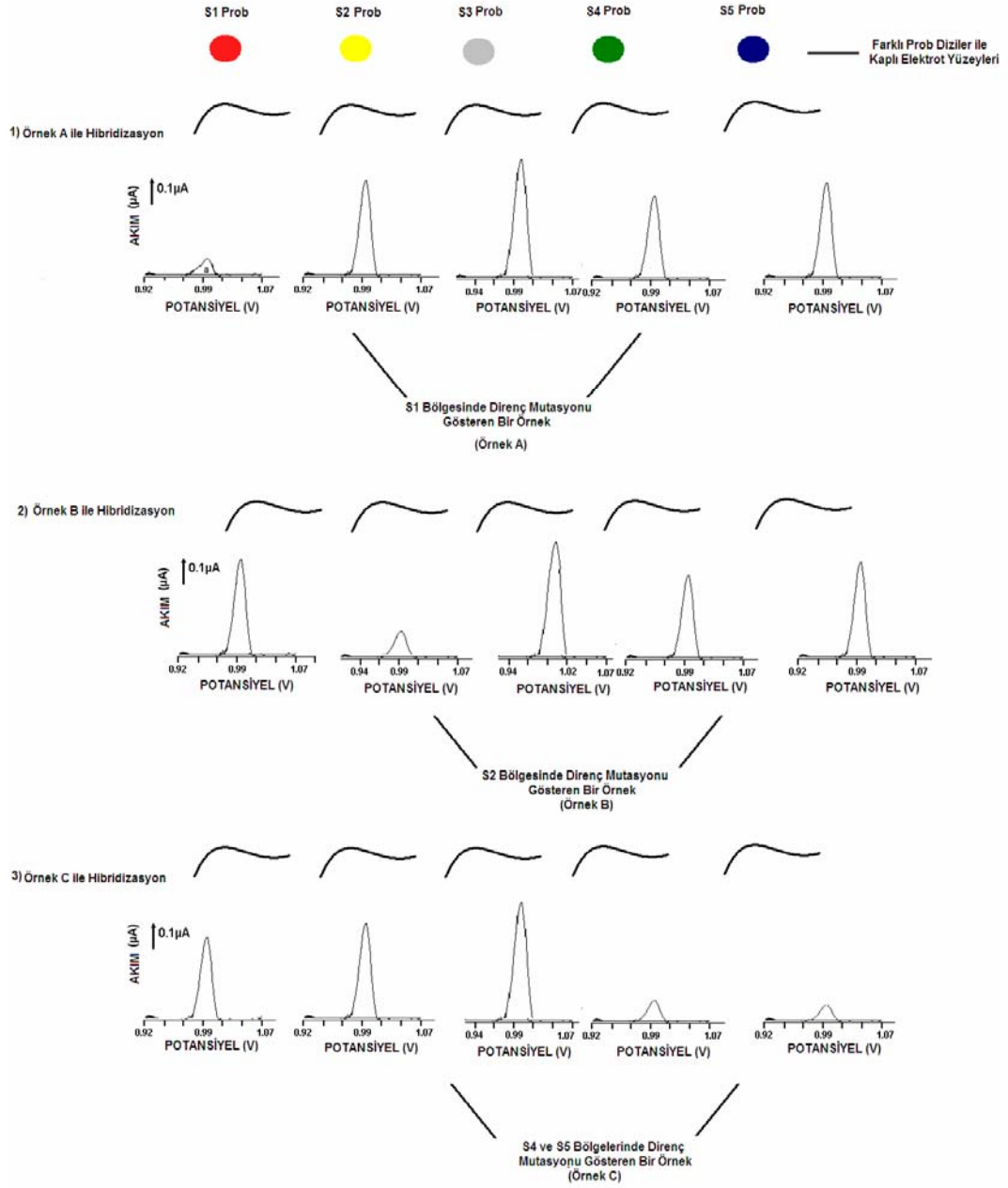
3.4. Tüm PCR Ürünlerini Kullanarak Direnç Mutasyon Analizine ait Bulguların Değerlendirilmesi

Şekil 40; yöntem 2.5.4.'de belirtilen koşullarda; tüm S problemlerinin farklı elektrot yüzeylerine bağlanmasının ardından, hibridizasyondan önce ve biri tüm bazları hedeften farklı olan Herpes simpleks virüsüne ait olmak üzere 4 farklı PCR ürünü ile hibridizasyondan sonra alınan guanin sinyallerinin üç boyutlu bir histamogramı şematik olarak gösterimidir. Buna göre hibridizasyondan önce yüzeyde yalnızca prob diziler kaplı durumda iken, çok düşük oranda hatta sıfıra yakın sinyal gözlemlendi, ayrıca tüm bazları hedeften farklı olan ve Herpes simpleks virüsüne ait PCR ürünü ile hibridizasyonundan sonra alınan yanıtta da anlamlı bir değişim gözlenmedi, bu da hibridizasyonun seçiciliğini kanıtladı. Birbirinden farklı 3 örneğin her bir prob dizi ile verdikleri yanıtlar değerlendirildiğinde; 1.

örneğin hem S1 hem de S2 prob dizileri ile düşük, S3, S4 ve S5 prob dizileri ile yüksek, 2. örneğin yalnızca S3 prob dizi ile düşük diğer prob dizileri ile, 3. örneğin hem S4 hem de S5 problemleri ile düşük S1, S2 ve S3 problemleri ile yüksek yanıt verdiği gözlemlendi. Buna göre yapılan değerlendirmede 1. örneğin S1 ve S2, 2. örneğin S3, 3. örneğin S4 ve S5 prob dizileriyle at bölgelerinde direnç mutasyonu olduğu sonucu bulundu.



Şekil 40: Elektrot yüzeyine tüm S prob dizilerinin bağlanması sonrasında hibridizasyondan önce, (**prob**), tüm bazları hedeften farklı PCR ürünü ile (**rasgele dizi**), aynı anda S1 ve S2 bölgelerinde (**1. Örnek**), yalnızca S3 bölgesinde (**2. Örnek**) ve aynı anda S4 ve S5 bölgelerinde (**3. Örnek**) direnç mutasyonu içeren örnekler ile hibridizasyonundan sonra diferansiyel puls voltametri ile alınan guanin sinyallerine ait histogram.



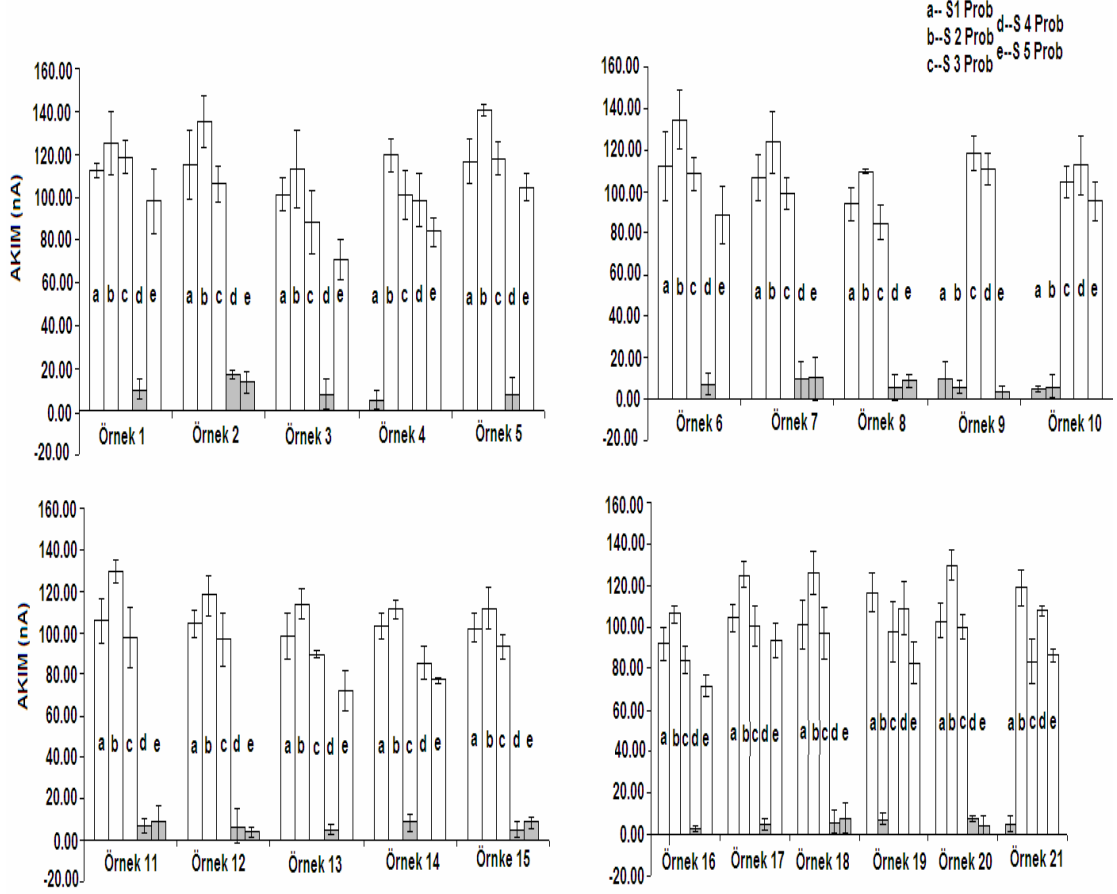
Şekil 41: *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin RIF'e karşı gösterdiği direnç mutasyonlarının saptanması amacıyla dizayn edilen bir elektrokimyasal genosensör.

Şekil 41; tasarlanan genosensörün genel olarak çalışma ilkesinin şematik gösterimidir. Buna göre yalnızca S1 bölgesinde (**Örnek A**), yalnızca S2 bölgesinde (**Örnek B**), aynı anda S4 ve S5 bölgelerinde (**Örnek C**) direnç mutasyonu içeren 3 farklı örneğin tüm prob dizileri ile hibridizasyonundan

sonra alınan yanıtlar incelendiğinde; Örnek A ile S1 probu kaplı elektrot yüzeyinde düşük, diğer problemlerin kaplı olduğu elektrot yüzeylerinde yüksek, Örnek B ile S2 probu kaplı elektrot yüzeyinde düşük diğer problemlerin kaplı olduğu elektrot yüzeylerinde yüksek, Örnek C ile S4 ve S5 problemlerin kaplı olduğu elektrot yüzeylerinde düşük S1, S2 ve S3 problemlerin kaplı olduğu elektrot yüzeylerinde tam hibridizasyon göstererek yüksek yanıt alındığı gözlemlendi. Böylece A'nın yalnızca S1 bölgesinde, B'nin yalnızca S2 bölgesinde C'nin ise hem S4 hem S5 bölgesinde direnç mutasyonu içerdiği saptandı.

En uygun mutasyon analizi şartlarına göre tüm örneklerin tayini yöntem 2.5.4.'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. Şekil 42; tüm örneklerle ait sonuçları değerlendiren histamogramdır.

Elektrokimyasal genosensör ile analizi yapılan örnekler, Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalı tarafından yapılan Dizi analizi ve insitu hibridizasyon teknikleri ile karşılaştırıldı. Bunların sonucunda; 2 adet yalnızca S1 bölgesinde, 1 adet S1 ve S2 bölgesinde aynı anda, 1 adet yalnızca S2 bölgesinde, 1 adet yalnızca S3 bölgesinde, 7 adet yalnızca S4 bölgesinde, 8 adet S4 ve S5 bölgelerinde aynı anda ve 1 adet S1, S4 ve S5 bölgelerinde aynı anda direnç mutasyonu içeren örnekler saptandı.



Şekil 42: 21 adet *Mycobacterium tuberculosis* PCR ürünü örneğin eletrot yüzeyine tutturulan; **a)** S1 prob, **b)** S2 prob, **c)** S3 prob, **d)** S4 prob, **e)** S5 prob dizileri ile hibridizasyonu sonucu diferansiyel puls voltmetresi ile alınan guanin sinyallerine ait histamogram.

Tüm örneklerin çalışılmasının ardından tasarlanan genosensörün kliniğe uygulanabilirliği ve ileride bir mikroçip tasarımının temelini oluşturabileceği gözlemlendi. Şekil 43, *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin rifampine karşı oluşturduğu direnç mutasyonlarının EVET / HAYIR sistemine dayalı analizinin mikroçip sistemine yönelik şematik gösterimidir.



Şekil 43: Elektrokimyasal genosensör teknolojisi ile *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin RIF'e karşı gösterdiği direnç mutasyonlarının analizi için EVET / HAYIR sistemine dayalı mikroarray tasarımı.

Buna göre düşünülen mikroçipte, S prob dizileri ile kaplı elektrot yüzeyleri denatüre edilerek tek iplikli hale getirilmiş bir PCR ürünü ile

hibridizasyonun ardından, direnç mutasyonu içeren bölgede yeterli sinyal alınmayacaktır. Kırmızı renkle işaretli kısımlar bu durumu gösterir. Direnç mutasyonu içermeyen bir örnek kullanıldığında ise; tam bir hibridizasyon gözleneceği için yüksek sinyal alınacaktır. Yeşil renkle işaretli elektrotlar da mutasyonun gözlenmediği bu bölgeleri temsil eder.

BÖLÜM IV

SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi kullanılarak tuberküloz tedavisinde kullanılan rifampin antibiyotiğine karşı *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin geliştirdiği direnç mutasyonlarının tayinine yönelik elektrokimyasal bir genosensör geliştirildi. Tasarlanan genosensörde çalışma elektrodu olarak tek kullanımlık kalem grafit elektrot kullanıldı.

Bu amaçla tasarlanan genosensörde; direnç mutasyonlarının en sık gözlemlendiği, bakterinin rpoB geninin 507-533. kodonlarını içeren 81 baz uzunluğundaki gen bölgesinin farklı kısımlarından seçilen inozin modifiye edilmiş 5 prob dizi, elektrot yüzeyine kovalent bağlarla bağlanarak hedef dizi ile hibridizasyondan sonra Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) tekniği ile guanin sinyalleri esas alınarak analiz gerçekleştirildi.

Gerçek hasta örnekleriyle çalışmalara geçmeden önce en uygun hibridizasyon ve mutasyon analizi sağlanması için sentetik dizilerle tayin gerçekleştirildi. Optimum hibridizasyon ve mutasyon analizi koşulları sağlandıktan sonra hasta örneklerinden hazırlanan PCR ürünü örnekler ile tayin gerçekleştirildi. Prob ve hedef derişimi, yıkama tamponunun iyonik dengesi, hibridizasyon ve yıkama zamanı gibi parametreler; en uygun hibridizasyon koşullarını sağlamak amacıyla senetik hedef ve rasgele dizileri

kullanarak, en uygun mutasyon analizi koşullarını saptamak amacıyla ise belirli bölgesinde direnç mutasyonu içeren *Mycobacterium tuberculosis* PCR ürünleri kullanılarak incelendi.

Tüm koşulların sağlanmasının ardından gerçek örneklerin tek tek analizleri gerçekleştirildi. Buna göre elektrot yüzeyine bağlanan prob dizilerin inozin içeriği nedeniyle hibridizasyondan önce herhangi bir guanin sinyali gözlenmez iken, sentetik hedef dizi ile ve o bölgede direnç mutasyonu içermeyen bir PCR ürünü ile hibridizasyondan sonra guanin sinyalinde büyük bir artış gözlemlendi. Buna karşılık kullanılan prob dizi bölgesinde direnç mutasyonu içeren PCR ürünü ile ve sentetik yada PCR ile üretilmiş tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyondan sonra guanin sinyalinin büyük oranda düşerek prob sinyaline yaklaştığı gözlemlendi.

Herhangi bir indikatör kullanmadan, guanin sinyaline dayalı dizi tayini, harici indikatör gereksinimini ortadan kaldırarak çalışma süresini kısaltmıştır. Böylece etidyum bromür gibi karsinojenik maddeler ile uzun süren jel üzerinde yürütme basamağı ve UV lamba ile görüntüleme çalışmaları elimine edildi. Çalışmalarımızın amacı, DNA analiz basamaklarını kolaylaştırarak hızlandıracak bir tekniği hastalardan alınan PCR örneklerine uygulamaktır ve bunu indikatörsüz olarak EVET / HAYIR sistemi ile gerçekleştirildi.

Çalışmanın sonucunda, indikatörsüz dizi algılama yöntemine dayalı, *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin rifampin antibiyotiği kullanımına karşı geliştirmiş olduğu direnç mutasyonlarının saptanmasına yönelik, aynı zamanda klinik tanıya da uyarlanabilen bir genosensör geliştirildi. Geliştirilen genosensörün, günümüzde rutinde kullanılan pahalı ve kanserojen ajan

kullanılan yöntemlere alternatif olarak daha kolay ve ucuz bir yöntem olan ve DNA mikroarray teknolojisinin alt yapısına sahip olduğu gözlendi.

Bundan sonraki çalışmalarında diğer önemli hastalıkların tanısına yönelik yeni genosensörlerin tasarımını ve mikroçip teknolojisi ile fabrikasyona elverişli ileri teknikler kullanım çalışmalarına devam etmeyi planlıyorum.

ÖZET**KLİNİK TANIYA YÖNELİK DNA HİBRİDİZASYONUNA DAYALI
ELEKTROKİMYASAL GENOSENSÖR TASARIMI**

Bu çalışmada, indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi dayalı bir elektrokimyasal genosensör tasarımı yapıldı. Yapılan genosensörün klinik olarak uygulanabileceği gerçek hasta örnekleri kullanılarak gösterildi.

Çalışmada indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemine dayalı *Mycobacterium tuberculosis* bakterisinin tedavi sırasında rifampin (RIF) antibiyotikine karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının tayinine yönelik elektrokimyasal bir genosensör tasarımı gerçekleştirildi. Kullanılan prob diziler, bakterinin RIF'e karşı en sık direnç gösterdiği rpoB geninin 507-533. kodonlarını içeren 81 baz uzunluğundaki "hot-spot" (sıcak bölge)'sine karşılık gelen 5 farklı bölgeden seçildi. Bu prob diziler guanin yerine analogu olan inozin ile modifiye olarak sentezlendi.

Çalışmada tek kullanımlık grafit elektrotlar kullanıldı. 5' ucunda amino-hekzil işaretli prob diziler elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlandı. Prob dizi ile kaplı elektrotlar, 81 baz uzunluğundaki sentetik hot -spot hedef dizi ve tüm bazları hedeften farklı rasgele dizi ile hibridizasyona tabi tutularak alınan guanin yükseltgenme sinyalleri değerlendirildi. Bu iki diziden alınan yanıtlar

arasındaki farklılıklar, tasarlanan genosensörün seçimliliğini gösterdi. Genosensörün seçiciliğinin tayinine yönelik olarak, en uygun hibridizasyon koşulları (prob ve hedef derişimi, hibridizasyon, yıkama zamanları, vs..) çalışmaları yapıldı.

Genosensör seçimliliğinin saptanmasının ardından, gerçek örnekler ile çalışmalara başlandı. Bunun için ilk etapta mutasyon ayırımının en iyi gözleendiği koşulların tayini yapıldı. Burada tüm problemlerin kaplı olduğu elektrot yüzeylerinde belirli bir prob dizi bölgesinde direnç mutasyonu için bir PCR ürünü değişen koşullarda hibridizasyona uğratıldı. Alınan yanıtlara göre, mutasyonun bulunduğu prob dizi bölgesinden en düşük diğer bölgelerden en yüksek sinyalin gözleendiği koşullar tayin edildi. Bunların sonucunda tüm PCR ürünü örnekleri kullanılarak mutasyon analizleri gerçekleştirildi.

Böylece *Mycobacterium tuberculosis*'in rifampin antibiyotiğine karşı geliştirdiği direnç mutasyonlarının bir EVET / HAYIR sisemine dayalı tasarlanan elektrokimyasal genosensör ile tayini yapılarak, günümüzde bu amaçla kullanılan rutin yöntemlere alternatif bir yöntem olduğu ve klinik tanıya uygulanabilirliği, ayrıca sahip olduğu tek kullanımlık elektrot sistemi ile bir mikrçip tasarımının temeli olduğu kanıtlandı.

ABSTRACT

AN ELECTROCHEMICAL GENOSENSOR DESIGN FOR CLINICAL ANALYSIS BASED ON DNA HYBRIDIZATION DETECTION

In this study, an electrochemical genosensor based on indicator-free DNA detection method was developed. The applicability of this method on detection of genetic and inherited diseases was showed by using real samples from patients.

An electrochemical genosensor was designed based on indicator-free DNA detection technology for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance mutations to rifampin treatment. Probe sequences represent 5 different parts of the 81 base hot-spot region of the rpoB gene which contains the resistance mutations to rifampin. These probe sequences are inosine modified (guanine –free).

Disposable pencil graphite electrodes (PGE) were used as working electrode. 5' aminohexyl labeled probe sequences were covalently immobilized on to PGE surfaces. Guanine oxidation signals obtained from probe sequences coated PGE surfaces after hybridization with 81 mer synthetic hot-spot and noncomplementary targets. The differences between responses obtained after hybridization with synthetic targets (hot-spot and noncomplementary) proved the selectivity of the genosensor. Optimization of

the genosensor selectivity was performed by the detection of optimum hybridization conditions (optimum prob and target concentrations, washing buffers, washing and hybridization times).

After the optimization of hybridization conditions and genosensor selectivity optimum mutation detection conditions were performed. S probes coated electrode surfaces were hybridized with PCR products which had a resistance mutation at one of the S probe's region, in different hybridization and washing conditions. Optimum mutation detection conditions were observed, due to the differences between responses obtained after hybridization with PCR products.

Mycobacterium tuberculosis, rpoB gene mutations to rifampin resistance were detected by using electrochemical genosensor technology. Observed results based on a YES / NO system are showed the applicability of this study on clinical diagnosis, alternative to conventinal methods. Dispoable electrode system technique proved applicability of the system to microchip technology.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Affymetrix web site "<http://www.affymetrix.com/products/instruments>
Ocak 2007.
2. Analitik Kimyanın Temelleri, Skoog, D.A., West, D.A., Holler, F.J., Çeviri editörleri: Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, (1996), Bilim Yayıncılık, 7. baskı, 303-395.
3. Ariksoysal, D.O., Karadeniz, H., Erdem, A., Sengonul, A., Sayiner, A.A., Ozsoz, M. (2005), Label-free electrochemical hybridization genosensor for the detection of hepatitis B virus genotype on the development of lamivudine resistance, *Anal. Chem.*, 77 (15): 4908-4917.
4. Arkin, M.R., Stemp, E.D.A., Holmlin, R.E., Barton, J.K., Hörmann, A., Olson, E. J. O., Barbara, P.F., (1996), Rates of DNA mediated electron transfer between metallointercalators, *Science*, 273: 475-480.
5. AUTOLAB User Manual, (2005), EchoChemie, The Netherlands.
6. Bard, A. J., Bard, A. J., Faulkner L. R., (1980), *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Canada .
7. Barton, J.K., Goldberg, J.M., Kumar, C.V., Turro, N.J., (1986), Binding modes and base spesificity of tris (phenantroline) ruthenium (II) enantiomers with nucleic acids tuning the stereoselectivity, *J. Am. Chem. Soc.*, 108: 2081-2088.

8. 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.
9. Brabec, V., Koudelka, J. (1980), Oxidation of DNA at carbon electrodes the effect of the quality of the DNA sample, *J. Electroanal. Chem.*, 116: 793-805.
10. Brett, A.M. Oliveira, Macedo, T.R.A., Raimundo, D., Marques, M.H., Serrano, S.H.P. (1998). Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, *Biosens Bioelectron.*, 13: 861-867.
11. Brett, A.M.O., Piedade, J.A.P., Serrano, S.H.P., (2000), Electrochemical oxidation of 8-oxoguanine, *Electroanal.*, 12, 969-973.
12. Cai, H., Xu, Y., He, P.-G., Fang, Y.-Z. (2003), Indicator Free DNA Hybridization Detection by Impedance Measurement Based on the DNA-Doped Conducting Polymer Film Formed on the Carbon Nanotube Modified Electrode, *Electroanal.*, 15 (23-24): 1864-1870.
13. Cai, X., Rivas, G., Farias, P.A.M., Shiraishi, H., Wang, J., Fojta, M., Palecek, E. (1996), Trace measurements of plasmid DNAs by adsorptive stripping potentiometry at carbon paste electrode, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 40: 41-47.
14. Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P., Wang, J., Tomschik, M., Jelen, F., Palecek, E. (1997), Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces, *Anal. Chim. Acta*, 344: 65-76.
15. Carpini, G., Lucarelli, F., Marrazza, G., Mascini, M. (2004), Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2): 167-175.

16. Carter, M.T. and Bard, A. J. (1987). Voltammetric studies of the interaction of tris (1,10-phenanthroline) cobalt (III) with DNA, J. Am. Chem. Soc., 109: 7528-7530.
17. Carter, M.T., Rodriguez, M., Bard, A.J., (1989), Voltammetric studies of interaction of metal chelates with DNA 2. tris chelated complexes of Cobalt (III) and Iron (II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine, J. Am. Chem. Soc., 111:8901-8911.
18. Cavusoglu, C., Hilmioğgu, S., Guneri, S., Bilgic, A., (2002), Characterisation of rpoB Mutations in Rifampin – Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and Line Probe Assay, J. Clinic. Microbiol., 40 (12) : 4435-4438.
19. Cavusoglu, C., Karaca Derici, Y., Bilgic, A., (2004), Invitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known rpoB mutations, Clinic. Microbiol. Infec., 10 (7): 662-665.
20. Cavusoglu, C., Turhan, A., Akinci, P., Soyler, I., (2006), Evaluation of the Genotype MTBDR Assay for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates, J. Clinic. Microbiol., 44 (7): 2338-2342.
21. 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, J.AM.Chem. Soc., 117: 2970-2980.

22. Coulet, P. R., "What is a Biosensor?" Chapter 1; " Biosensor principles and applications", Ed: Blum, L. J., Coulet, P. R., (1991), Marcel Dekker Inc., New York, sayfa 1-6.
23. D'Orazio P., (2003), Biosensors in Clinical Chemistry, Clin. Chim. Acta, 334: 41-69.
24. Del Pozo, M.V., Alonso, C., Pariente, F., Lorenzo, E. (2005), Electrochemical DNA sensing using osmium complexes as hybridization indicators, Biosens. Bioelectron. 20 (8 SPEC. ISS.): 1549-1558.
25. Dervan, P.B. (1998). Sequence specific recognition of double helical DNA A synthetic approach, Nucleic Acids and Molecular Biology, 2: 49-64.
26. Eberhard Pasarge, Jürgen Wirth, Color Atlas of Genetics, 2000.
27. Electrochemistry, C. M. A., Brett, A. M. O., (1992), Oxford University Press, 3. Baskı.
28. Enstrümental Analiz, Prof. Dr. Atilla Yıldız ve Prof. Dr. Ömer Genç, Hacettepe Yayınları A-64, 1993, sayfa; 289-384.
29. Erdem A, Meriç B., Kerman K., Dalbastı T., Ozsoz M. (1999), Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor, Electroanal., 11: 1372-1376.
30. Erdem A., Kerman K., Meric B., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz M, (2002), DNA biosensor for microcystis spp. Sequence detection by using methylene blue and ruthenium complexes as hybridisation labels, Turk. J. Chem. 26: 851-862.

31. 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.
32. Erdem A., Kerman K., Meriç B., Akarca U.S., Ozsoz M. (2000), Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Anal. Chim. Acta*, 422: 139-149.
33. Erdem A., Kerman K., Meriç B., Ozsoz, M. (2001). Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator, *Electroanal.*, 13: No. 3, 219-223.
34. Erdem, A, Meric, B., Kerman, K., Dalbasti, T., Ozsoz, M., (1999), Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor, *Electroanal.*, 11 (18): 1372-1376.
35. Erdem, A., Ariksoysal, D.O., Karadeniz, H., Kara, P., Sengonul, A., Sayiner, A.A., Ozsoz, M., (2005), Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology, *Elect. Com.*, 7 (8): 815-820.
36. Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Ozsoz, M., (2003), Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on Guanine signal, *Electroanal.*, 15 (7): 1-7.
37. Erdem, A., Ozsoz, M., (2000), Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA, *Turk. J. Chem.*, 25: 469-475

38. Erdem, A., Ozsoz, M., (2001), Interaction of anticancer drug epirubicin with DNA, *Anal. Chim. Acta*, 437: 107-114.
39. Erdem, A., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical DNA biosensor based on DNA drug interactions, *Electroanal.*, 14 (14): 965-974.
40. Evans; A. (1991). *Potentiometry and ISE*, ACOL, London, s.106-198.
41. Floch, F.Le., Ho, H.-A., Harding-Lepage, P., Leclerc, M.,(2005), New ferrocene-functionalized cationic polythiophene for label-free electrochemical DNA detection, *NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech 2005 Technical Proceedings*, 374-375.
42. Fojta, M. (2002), Electrochemical sensors for DNA interactions and damage, *Electroanal.* 14 (21): 1449-1463.
43. Fojta, M., Doffkova, R., Palecek, E.(1996). Determination of traces of RNA in submicrogram amounts of single- or double-stranded DNAs by means of nucleic acid-modified electrodes, *Electroanal.*, 8(5): 420-426.
44. Fojta, M., Havran, L., Fulneckova, J., Kubicaova, T., (2000), Adsorptive transfer stripping AC voltammetry DNA complexes with intercalators, *Electroanal.*, 12: 926-934.
45. Fojta, M., Havran, L., Fulneckova, J., Kubicaova, T., (2000), Adsorptive transfer stripping AC voltammetry DNA complexes with intercalators, *Electroanal.*, 12: 926-934.
46. Hall, E.A.H. (1990). *Biosensors*, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere; s.3-30.
47. Herne, T.M., Tarlov, M.J.(1997). Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 8916-8920.

48. Hodgson, J., "Shrinking DNA diagnostics to fill the markets of the future", *Nat. Biotechnol.*, 16, (1998), 725-727.
49. <http://en.wikipedia.org/wiki/DNA>, Ocak 2007.
50. <http://tr.wikipedia.org/Elektroliz/>, Ocak 2007.
51. <http://www.motorola.com>.
52. Huey, F.T., Gong, H., Dong, X.-D., Zeng, X., Tan, A.L.K., Yang, X., Swee, N.T. (2005), Electrochemical biosensing of DNA with capture probe covalently immobilized onto glassy carbon surface, *Anal. Chim. Acta*, 551 (1-2): 23-29.
53. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., Thomas, J.W., *PCR Protocols: A Guide to methods and applications*, Academic Press INC., San Diego-California.
54. Ioannou, A.K., Pantazaki, A.A., Girousi, S.T.H., Millot, M.-C., Vidal-Madjar, C., Voulgaropoulos, A.N. (2006), DNA biosensor based on carbon paste electrodes modified by polymer multilayer, *Electroanal.* 18 (5): 456-464.
55. Jelen, F., Fojta, M., Palecek, E. (1997). Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNAs, *J. Electroanal. Chem.*, 427: 49-56.
56. Johnston, D.H., Glasgow, K.C., Thorp, H.H. (1995). Electrochemical measurement of the solvent accessibility of nucleobases using electron transfer between DNA and Metal complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 117: 8933-8938.

57. Johnston, D.H., Welch, T.W., Thorp, H.H. (1996). Electrochemically activated nucleic acid oxidation; Metal Ions in Biological systems, Ed. Sigel, A., Sigel, H.; 33: Marcel Dekker, Inc, NY; 299-324.
58. Kara, P., Erdem, A., Girousi, S., Ozsoz, M. (2005), Electrochemical detection of enzyme labeled DNA based on disposable pencil graphite electrode, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 38 (1): 191-195.
59. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002), Label free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes, *Electroanal.*, 14 (23), 1-6.
60. Kara, P., Meric, B., Zeytinoglu, A., Ozsoz, M., (2004), Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes simplex Type I and Type II viruses from PCR amplified real samples, *Anal. Chim. Acta* 518 (1-2): 69-76.
61. Kara, P., Ozkan, D., Erdem, A., Kerman, K., Pehlivan, S., Ozkinay, F., Unuvar, D., Itirli G., and Ozsoz, M., (2003), Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology, *Clin. Chim. Acta*, 336(1-2): 57-64.
62. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA, *Electrochem. Commun.*, 4: 705-709

63. Kara, P., Ozkan, D., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Ozsoz, M., (2002), DNA sensing on glassy carbon electrodes by using hemin as electrochemical hybridisation label, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373: 710-716.
64. 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.
65. Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara, P., Jelen F., Karadeniz H., Ozkan Z., Ozsoz M., (2004), Dna Sensing On Mercury And Carbon Electrodes By Using Meldola Blue As The Electrochemically Active Intercalator, *Turk. J. Chem.*, 28: 1-11.
66. Kerman, K., Morita, Y., Takamura, Y., Ozsoz, M., Tamiya, E. (2004), DNA-directed attachment of carbon nanotubes for enhanced label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Electroanal.*, 16 (20):1667-1672.
67. Kerman, K., Morita, Y., Takamura, Y., Tamiya, E. (2003), Label-free electrochemical detection of DNA hybridization on gold electrode, *Electrochem. Commun.*, 5 (10): 887-891.
68. Lewin, B. *Genes*. Oxford University Press, Oxford 1997.
69. Li, Z., Kang, J., Lu, X. (2007), Electrochemical study on behavior of EuMo₂ complex and its interaction with DNA, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 26 (1): 9-22.
70. Ligaj, M., Jasnowska, J., Musia³, W.G., Filipiak, M. (2006), Covalent attachment of single-stranded DNA to carbon paste electrode modified by activated carboxyl groups, *Electrochim. Acta*, 51 (24): 5193-5198.

71. Lucarelli, F., Marazza, G., Palchetti, I., Cesaretti, S., Mascici, M., (2002), Coupling of an indicator-free electrochemical DNA biosensor with polymerase chain reaction for the detection of DNA sequences related to the apolipoprotein E, *Anal. Chim. Acta*, 469: 93-99.
72. 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.
73. Lukasova, E., Jelen, F. and Palecek, E. (1982). Electrochemistry of dum-Nucleic acid complexes: A probe for single-stranded and distorted double-stranded regions in DNA, *Gen. Physiol., Biophys.*, 1: 53-70.
74. Lumbey-Woodyear, T., Campbell, C.N., Freeman, E. Freeman, Georgiou, G. Heller, A. (1999). Rapid Amperometric verification of PCR amplification of DNA, *Anal. Chem.*, 71: 535-538.
75. Marazza, G., Chianella, I., Maccini, M. (1999), Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring, *Anal. Chim. Acta*, 387: 297-307.
76. Marazza, G., Chianella, I., Maccini, M., Anichini, M., (2000), Detection of human apolipoprotein E genotypes with DNA electrochemical biosensor coupled with PCR, *Clin. Chim.*, 46: 31-37.
77. Marchand, G., Delattre, C., Campagnolo, R., Pouteau, P., Ginot, F. (2005), Electrical detection of DNA hybridization based on enzymatic accumulation confined in nanodroplets, *Anal. Chem.*, 77 (16): 5189-5195.
78. Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E. (1998). Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C, *Biophys Chem.*, 75: 87-95.

79. Maruyama, K., Mishima, Y., Minagawa, K., Motonaka, J. (2001), Electrochemical and DNA-binding properties of dipyrrophenazine complexes of osmium(II), *Journal of Electroanal. Chem.* 510 (1-2): 96-102.
80. Mascini, M., Palchetti, I., Marazza, G., (2001), DNA electrochemical biosensors., *Fresenius J Anal Chem*, 369(1):15-22.
81. 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.
82. Meric, B., Kerman, K., Marrazza, G., Palchetti, I., Mascini, M., Ozsoz, M. (2004), Disposable genosensor, a new tool for the detection of NOS-terminator, a genetic element present in GMOs, *Food Control*, 15 (8): 621-626.
83. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erensoy, S., Akarca, U.S., Mascini, M., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue, *Talanta*, 56 (5): 939-947.
84. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz, M., (2002), Indicator-free DNA biosensor based on adenine and guanine signals, *Electroanal.*, 14(18): 1245-1250.
85. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erdem, A., Kucukoglu, O., Erciyas, E., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4-4' dihydroxy chalcone based on guanine and adenine signals, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 30(4): 1339-1346

86. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erdem, A., Kucukoglu, O., Erciyas, E., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4-4' dihydroxy chalcone based on guanine and adenine signals, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 30(4): 1339-1346
87. Mikkelsen, S. (1994). Sequence-selective DNA Sensors for the diagnosis of inherited diseases (Voltametric), A.B.D Patent no: 5,312,527 (05/ 17/1994).
88. Millan K.M., Mikkelsen, S.R. (1993), Sequence selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators, *Anal.Chem.*, 65: 2317-2323.
89. Millan, K.M., Saraullo, A., Mikkelsen, S.R., (1994), Voltammetric DNA Biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode, *Anal. Chem.*, 66: 2943-2948.
90. Motti, C., Dainese, E., Mascini, M., Minnuni, M., De Santis, P., Cozzani, I., (2000), The use of biotechnology in agriculture and the methods for the detection of genetically modified organisms (GMOS) in food, *Italian J. Biochem.*, 49: 64-72.
91. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., (1986), Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51(1): 263-273.
92. Mullis, K.B., (1990), Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction, *Ann Biol Clin*, 48(8): 579-582.
93. Neidle, S. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*. Oxford University Press, Oxford, 1999.

94. Nihat Dilsiz, Moleküler Biyoloji, Palme Yayınları, 2004.
95. Oliveira Brett, A.M., Chiorcea Paquim, A.-M., Diculescu, V., Oretskaya, T.S., (2005), Synthetic oligonucleotides: AFM characterisation and electroanalytical studies, *Bioelectrochem.*, 67 (2 SPEC. ISS.): 181-190.
96. Ovadekova, R., Jantova, S., Letasiova, S., Stepanek, I., Labuda, J., (2006), Nanostructured electrochemical DNA biosensors for detection of the effect of berberine on DNA from cancer cells, *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (7-8): 2055-2062.
97. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Ozsoz, M. (2002), Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, *Anal. Chim. Acta* 462 (1): 39-47.
98. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Ozsoz, M. (2002), Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes, *Electrochem. Commun.*, 4 (10): 796-802.
99. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Hassmann, J., Ozsoz, M., (2002), Allele specific genotype detection of FactorV Leiden mutation, from polymerase chain reaction amplicons based on label free electrochemical genosensor, *Anal. Chem.*, 74: 5931-5936.
100. Ozkan, D., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Jelen, F., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002), DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label. *Bioelectrochem.*, 58(1): 119-126.

101. Ozsoz, M., Erdem, A., Kerman, K., Ozkan, D., Tugrul, B., Topcuoglu, N., Erken, H., Taylan, M., (2003), Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of Factor V leiden mutation using disposable pencil graphite electorodes, *Anal. Chem.*, 75: 2181-2187.
102. Ozsoz, M., Erdem, A., Ozkan, D., Kara, P., Karadeniz, H., Meric, B., Kerman, K., Girousi, S. (2005), Allele-specific genotyping by using guanine and gold electrochemical oxidation signals, *Bioelectrochemistry* 67 (2 SPEC. ISS.): 199-203.
103. Palecek, E., (1988), New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochem.*, 20: 179-194.
104. Palecek, E., (1995), Nucleic acids: electrochemical and immunochemical methods, *Encyclopedia of Analytical Science* (Ed. Alan Townshend), London, Academic Press, Vol. 6, 3600-3609.
105. Palecek, E., (1996), From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid Modified Electrodes, *Electroanal.*, 8: 7-14.
106. Palecek, E., Postbieglova, I. (1986). Adsorptive stripping voltammetry of biomacromolecules with transfer of the adsorbed layer, *J. Electroanal. Chem.*, 214: 359-371.
107. Pietrzyk, D.J.; Frank, C.W. (1979), *Analytical Chemistry*, 2.Baskı, *and Academic press*: s.226- 239.
108. Service, R. F., (1998), New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science*, 282: 396-399.
109. Steel, A. B., Herne, T.M., Tarlov, M.J.(1998). Electrochemical Quantitation of DNA immobilized on gold, *Anal. Chem.*, 70: 4670-4677.

110. Takeuchi, K.J., Thompson, M.S., Pipes, D.W., Meyer, T. J. (1984). Redox and spectral properties of monooxo polypyridyl complexes of ruthenium and osmium in Aqueous media, *Inorg. Chem.*, 23: 1845-1851.
111. Temizkan, G., Yilmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya A.T., Arda, N., (2004), *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler BİYOGEM Yayınları*.
112. Thayer, A.M. (1999), *Deciphering Diseases*, Chemical & Engineering News, Ed. by M. Jacobs, J. Am. Chem. Soc., North Carolina, 19-28.
113. Thorp, H., (1998), Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidations, *TIB TECH*, 16: 117- 121.
114. Turner, A. P. F., "Biosensors: Fundamentals and Applications", Ed: Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S.; Oxford University Press, (1987), Oxford, sayfa 5-7.
115. Vernon, S.D., Farkas, D.H., Unger E.R., Chan, V., Miller, D.L., Chen, Y.P., Blackburn, G., Reeves, W.C., (2003), Bioelectronic DNA detection of human papillomaviruses using eSensor™: a model system for detection of multiple pathogens, *J. Infect. Dis.*, 3 (12): 1-9.
116. Wang, J., (1994), *Analytical Electrochemistry*, Wiley – VCH, New York.
117. Wang, J., (1999), Towards genoelectronics: Electrochemical biosensing of DNA hybridization, *Chem. Eur.*, J.5 (6):1681-1685.
118. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H.(1996). Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes, *Anal. Chim. Acta*, 326: 141-147.

119. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P.A.M., Dontha, N. (1996). DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus, *Anal. Chem.*, 68: 2629-2634.
120. Wang, J., Grant, D.H., Ozsoz, M., Cai, X., Tian, B., Fernandes, J.R. (1997). Adsorptive potentiometric stripping analysis of nucleic acids at mercury electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 349: 77- 79.
121. Wang, J., Kawde, A.N., (2001), Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Anal. Chim. Acta*, 431(2): 219-224
122. Wang, J., Kawde, A.N., (2002), Amplified label-free electrical detection of DNA hybridisation, *Analyst.*, 127(3):383-386.
123. Wang, J., Kawde, A.N., Erdem, A., Salasar, M., (2001), Magnetic beads based label free electrochemical detection of DNA hybridisation, *Analyst*, 120: 2020-2024.
124. Wang, J., Kawde, A.N., Musameh, M., (2003), Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes for amplified label-free electrochemical detection of DNA hybridisation, *Analyst*, 128(7): 912-916.
125. Wang, J., Rivas, G., Cai, X. (1997). Screen-printed electrochemical hybridization biosensor for the detection of DNA sequences from the *Escherichia coli* pathogen, *Electroanal.*, 9(5): 395-398.
126. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Dontha, N., Shiraishi, H., Luo, D., Valera, F. S. (1997). Sequence-specific electrochemical biosensing of *M. tuberculosis* DNA, *Anal. Chim. Acta*, 337: 41-48.

127. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R., (1998). Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 375: 197-203.
128. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F.S., Dontha, N., (1996), DNA-modified electrode for the detection of aromatic amines, *Anal. Chem.*, 68, 4365-4369.
129. Watson, J. D., Crick, F. H. C.(1953), A structure of desoxyribonucleic acid, *Nature*, 171: 737-738.
130. Watson, J. D., Crick, F. H. C., (1953), Genetical implications of the structure of desoxyribonucleic acid. *Nature*, 171: 964-967.
131. Wei, M.-Y., Guo, L.-H., Chen, H. (2006), Determination of surface-immobilized double-stranded DNA using a metallointercalator and catalytic voltammetry, *Microchim. Acta* 155 (3-4): 409-414.
132. Wilson, E.K., (1998), Instant DNA detection, *Chem & Eng. News*, 76: 47-.
133. Wong, E.L.S., Gooding, J.J., (2006), Charge transfer through DNA: A selective electrochemical DNA biosensor, *Anal. Chem.*, 78 (7): 2138-2144.
134. Wong, E.L.S., Mearns, F.J., Gooding, J.J. (2005), Further development of an electrochemical DNA hybridization biosensor based on long-range electron transfer, *Sensors Actuat.*, 111: 515-521.
135. Zhang, Y., Hu, N. (2006), Cyclic voltammetric detection of chemical DNA damage induced by styrene oxide in natural dsDNA layer-by-layer films using methylene blue as electroactive probe, *Electrochem. Commun.*, 9 (1): 35-41.

136. Zhao, J., Hu, G.-Z., Yang, Z.-S., Zhou, Y.-Y. (2007), Determination of 1-naphthol with denatured DNA-modified pretreated glassy carbon electrode, *Anal. Lett.*, 40 (3): 459-470.

Arş. Gör. Pınar KARA KADAYIFCILAR 'ın Özgeçmişi**KİŞİSEL BİLGİLER**

Doğum Tarihi: 3 Aralık 1978

Doğum Yeri: Manisa

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dil : İngilizce (iyi)

Adres: Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Bornova, 35100 Türkiye

Tel:+ 90 - 232 - 388 01 10 Ext 1353

Faks: +90 - 232 - 388 52 58

E-mail. pnrkara@hotmail.com

Lisans Eğitimi:

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Eylül 1996 - Ekim 2000).

Yüksek Lisans Eğitimi:

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans programı (Şubat 2001-Ocak 2003).

Doktora Eğitimi:

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans programı (Şubat 2004-devam ediyor).

Görevleri:

- Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi (15 / 12 / 2001)

Yürüttüğü Tez Çalışmaları:

- **Y.Lisans Tez Konusu:** Çeşitli Bulaşıcı ve Kalıtsal Hastalıklara Neden Olan Gen Dizilerini İçeren PCR Ürünü Örnekler Kullanarak, Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile Bu Hastalıkların Saptanması.
- **Doktora Tez Konusu:** Klinik Tanıya Yönelik DNA Hibridizasyonuna Dayalı Elektrokimyasal Genosensör Tasarımı.

Tamamladığı ve Halen Yürüttüğü Proje Çalışmaları:

1. Genetik ve Bazı Bulaşıcı Hastalıkların Tanınması İçin Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerinin Tasarımı (Devlet Planlama Teşkilatı Proje no: 02 / DPT / 001)-2000-2002.
2. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri, (TUBITAK, proje no: TBAG 1871 199T112), Haziran 2000- Aralık 2001.
3. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri (EBİLTEM projesi - Proje No: 2000 / BİL / 031); 2000-2002.
4. Çeşitli Bulaşıcı ve Kalıtsal Hastalıklara Neden Olan Gen Dizilerini İçeren PCR Ürünü Örnekler Kullanarak, Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile Bu Hastalıkların Saptanması (Ege Üniversitesi Proje Koordinatörlüğü 2001 / ECZ / 014); 2001 - 2004.

5. Kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların tayininde kullanılan elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımı,(TUBITAK proje no: TBAG / 2161), Ağustos 2002-Ocak 2005.
6. Electrochemical DNA Biosensors for the detection of infectious and inherited diseases considering public health and environmental, TUBITAK ile Yunanistan Kalkınma Bakanlığı'na bağlı Araştırma ve Teknoloji Genel Sekreterliği (GSRT- General Secretariat for Research and Technology) ortak proje, proje no: TBAG – U /36 (101T179), 2002 – 2005.
7. Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (Genosensörlerin) tasarımında kullanılan yeni teknikler ve uygulamaları (TÜBİTAK projesi - Proje No: TBAG-2233; Ocak 2003-2005.
8. Klinik Tanıya Yönelik DNA Hibridizasyonuna Dayalı Elektrokimyasal Genosensör Tasarımı, (Ege Üniversitesi Proje Koordinatörlüğü 04 / ECZ / 016), 2004-devam ediyor.
9. Elektrokimyasal ve Optik Biyosensörler ile DNA Hibridizasyonuna Dayalı Mikroorganizmalar ve Biyolojik Ajanların Tayini ile Gıda Güvenliği ve Kalitesinin Saptanması (Devlet Planlama Teşkilatı Proje no: 06 / DPT / 001)-2005- devam ediyor.
10. DNA Dizilerinin Optik, Piezoelektrik ve Elektrokimyasal Biyosensör ile Algılanması, (TUBITAK Proje no: SBAG 3291 – 105S484), 2005-devam ediyor.

Yurt Dışında Katıldığı Projeler

1. 06 Temmuz – 06 Eylül 2002 tarihleri arasında Friedrich Alexander Üniversitesi Biyosensör Laboratuvarı'nda Prof. Dr. Paul Müller ve Dr. Jörg Hassmann gözetiminde DNA mikroarray teknolojisi üzerinde çalışma.
2. 19 Haziran 2004 – 15 Ağustos 2004 tarihleri arasında, Directif GmbH Mikroarray firması Biyosensör Laboratuvarı'nda Laboratory on a Chip üzerine Dr. Jürgen Schulein gözetiminde DNA mikroarray teknolojisi üzerinde çalışma.
3. 07 – 14 Şubat 2005 tarihleri arasında Aristotlle Üniversitesi Kimya Bölümü, Analitik Kimya Biyosensör Laboraturında Dr. Stella Girousi gözetiminde Biyosensör Mekanizmaları üzerinde çalışma.

Uluslararası Science Citation Index ve Social Science Citation Index'ce**Taranan Dergilerde Yayınlanmış Makaleleri:**

1. Kara, P.,Cavdar, S., Meric, B., Erensoy, S., Ozsoz, M., (2006), Electrochemical probe DNA design in PCR amplicon sequence for the optimum detection of microbiological diseases, Bioelectrochemistry, basımda.
2. Kara P., Erdem A., Girousi S., Ozsoz M., (2005), Electrochemical detection of enzyme labelled DNA based on - disposable pencil graphite electrode, J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 38, 191-195.
3. Erdem, A., Arıksoysal,Ozkan, D., Karadeniz, H., Kara, P., Sengonul, A., Sayiner, A., Ozsoz, M., (2005), Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitisB virus DNA in polymerase chain reaction

amplicons by - using disposable sensor technology, *Electrochemistry communications*, 7: 815-820.

4. Ozsoz M., Erdem A., Ozkan D., Kara P., Meric B., Kerman K., Girousi S., (2005), Allele specific genotyping - by using guanine and gold electrochemical oxidation signals, *Bioelectrochemistry* 67: 199– 203.
5. Ozkan, D., Kara, P., Karadeniz, H., Ozkan, Z., Erdem, A., Jelen, F., Kerman, K., Ozsoz, M., (2004), Electrochemical Detection of Specific DNA Sequences From PCR Amplicons on Carbon and Mercury Electrodes Using Meldola's Blue as an Intercalator, *Turk. J. Chem.*, 28, 1-11.
6. Kara, P., Meric, B., Zeytinoglu, A., Ozsoz, M., (2004), Electrochemical DNA Biosensor for the detection and discrimination of Herpes simplex type1 and type2 viruses from PCR amplified real samples, *Analytica Chimica Acta*, 518, 60-66.
7. Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Ozsoz, M., (2003), Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on Guanine signal, *Electroanalysis*, 15 (7): 1-7.
8. Kerman K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, Erdem A., Nielsen P. E., Ozsoz M., (2003) Label - Free Bioelectronic detection of point mutation by using peptide nucleic acid probes *Electroanalysis*, 15(7): 1-4,
9. Kara, P., Ozkan, D., Erdem, A., Kerman, K., Pehlivan, S., Ozkinay, F., Unuvar, D., Itirli G., and Ozsoz, M., (2003), Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon

- electrodes based on electrochemical DNA chip technology, *Clinica Chimica Acta*, 336(1-2): 57-64
10. Ozkan D., Kerman K., Meric B., Kara P., Demirkan H., Polverejan M., Pinnavaia T., Ozsoz M., (2002), Heterostructured Fluorohectorite clay as an Electrochemical Sensor for the Detection of 2,4-Dichlorophenol and the Herbicide 2,4-D - *Chemistry of Materials*, 14, 1555-1561
 11. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erensoy, S., Akarca, U.S., Mascini, M., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue, *Talanta*, 56 (5): 939-947.
 12. Kerman K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, B., Gooding, J.J., Ozsoz, M., (2002), Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 462: 39-47.
 13. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz, M., (2002), Indicator-free DNA biosensor based on adenine and guanine signals, *Electroanalysis*, 14(18): 1245-1250.
 14. Kara, P., Ozkan, D., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Ozsoz, M., (2002), DNA sensing on glassy carbon electrodes by using hemin as electrochemical hybridisation label, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373: 710-716.
 15. Erdem A., Kerman K., Meric B., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz M, (2002), DNA biosensor for microcystis spp. Sequence detection by using methylene blue and ruthenium complexes as hybridisation labels, *Turk. J. Chem.* 26: 851-862.

16. Ozkan, D., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Jelen, F., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002), DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label. *Bioelectrochemistry*, 58(1): 119-126.
17. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002), Label free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes, *Electroanal.*, 14 (23), 1-6.
18. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erdem, A., Kucukoglu, O., Erciyas, E., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4-4' dihydroxy chalcone based on guanine and adenine signals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(4): 1339-1346.
19. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA, *Electrochemistry Communications*, 4: 705-709.
20. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Hassmann, J., Ozsoz, M., (2002), Allele-Specific Genotype of Mutations of Factor V Leiden mutation from Polymerase Chain Reaction Amplicons Based on label-free electrochemical genosensor, *Anal. Chem.*, 74(23): 5931-5936.
21. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol

monolayer modified gold electrodes, *Electrochemistry Communications*, 4: 795-802.

22. 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.
23. Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz, M., (2001), Indicator based an indicator free electrochemical DNA biosensor, *Annual Reports of the Research Reactor Institute, Kyoto University* 4: 3240-3243.

Bildiriler ve Ödüller

1. A.Erdem, B.Meric, K.Kerman, D.Ozkan, P.Kara, M.Ozsoz, P.Alcıl, B.Karasahın, Z.Ozkan, N.Palanduz, I.Sarıkan, "Electrochemical Determination Of Benzo[A]Pyrene-DNA Adducts By Using DNA Biosensor", IPORSIP-2000, The 2nd International Postgraduate Research Symposium On Pharmaceutics., 6-8 Eylül 2000, İstanbul Poster Bildiri.
2. S.Gungor, N.Karakaya, K.Kerman, B.Meric, D. Ozkan, P.Kara, M.Ozsoz, "Elektrokimyasal Dna Biyosensörleri", III.Ulusal Veteriner Hekimliği Öğrencileri Araştırma Kongresi, 10-12 Mayıs 2001, İstanbul, poster bildiri.
3. K.Kerman, B.Meric, D.Ozkan, P.Kara, A.Erdem M.Ozsoz,"Determination of Benzo [a]Pyrene – DNA Adducts By Using Electrochemical DNA Biosensor", BIOMED 8, 8th Biomedical Science And Technology Symposium, Eylül 5-8, 2001, ODTÜ, Ankara. Sözlü bildiri.
4. B.Meric, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, A. Erdem, U. S. Akarca, S. Erensoy, M.Ozsoz "Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri Kullanarak PCR

Ürünü Örneklerden Bulaşıcı Ve Kalıtsal Hastalıkların Tanısı", Proje Sergisi 2001, Ege Üniversitesi, EBİLTEM, İzmir, 15-26 Ekim 2001.

Ebiltem Proje Yarışması 2001 birincilik ödülü

5. D.Ozkan, A.Erdem, P.Kara, K.Kerman, J.Gooding, P.E. Nielsen, Mozsoz, "Altın Elektrot Yüzeyinde Düzenli Peptid Nükleik Asit Tabakası Ve Metilen Mavisine Dayalı Elektrokimyasal DNA Hibridizasyonu Tayini, Proje Sergisi 2001, Ege Üniversitesi, EBİLTEM, 04-15 Kasım 2002, İzmir, Proje Sergisi.

Ebiltem Proje Yarışması 2002 ikincilik ödülü.

6. P.Kara, D. Ozkan, A.Erdem, K.Kerman, S.Pehlivan, F.Ozkinay, D.Unuvar, G.Itırlı, H.Karadeniz, M.Ozsoz, "İndikatörsüz Elektrokimyasal Genosensör İle Akondroplazi G380R Mutasyonunun Allel Özgül Genotip Tayini, Proje Sergisi 2002, Ege Üniversitesi, EBİLTEM, 04-15 Kasım 2002, İzmir, Proje Sergisi.

Ebiltem Proje Yarışması 2002 birincilik ödülü

7. M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan,, P. Kara, B. Meric, B. Tugrul, N. Topcuoglu, H. Erken, M. Taylan, "DNA Hibridizasyonunun Altın Nanopartiküllere Dayalı Elektrokimyasal Biyosensörlerle Algılanması" Ege Üniversitesi, EBİLTEM, 2003, İzmir, Proje Sergisi.

Ebiltem Proje Yarışması 2003 ikincilik ödülü.

8. P. Kara, M. Ozsoz, "Elektrokimyasal DNA Biyosensörleriyle Kalıtsal ve Bulaşıcı Hastalıkların Tanısı", 1. Ulusal Viroloji Kongresi, 21-25 Eylül 2003, Kuşadası, sözlü bildiri.
9. P. Kara, M. Ozsoz, "Environmental in Turkey", Birleşmiş Milletler Endüstri Gelişim Organizasyon; Application of Remediation Technologies for

Heavily Polluted Sites wit Focus on Water and Promotion of Projects for the Mediterranean Region, 29 – 30 Eylül 2003, Fez- Morocco, sözlü bildiri.

10. M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, B. Meric, F. Sahinci, B. Gulmez, “Novel approaches for electrochemical DNA biosensors”, ISOPS 7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 24-27 Haziran 2003, Ankara, sözlü bildiri.
11. P. Kara, A. Erdem, D. Ozkan, K. Kerman, S. Pehlivan, F. Ozkinay, D. Unuvar, G. Itirli, M. Ozsoz, “The detection of Achondroplasia G 380 R. mutation by using electrochemical DNA biosensor”, ISOPS 7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 24-27 Haziran 2003, Ankara, poster bildiri.
12. D. Ozkan, A. Erdem, P. Kara, F. Sahinci, B. Gulmez, H. Karadeniz, M. Ozsoz, “Disposable electrochemical DNA biosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus using synthetic PCR and sandwich assay model”, ISOPS 7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 24-27 Haziran 2003, Ankara, poster bildiri.
13. M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, D. Ozkan, P. Kara, “Novel advances in electrochemical genosensor based on gold nanoparticles”, 3rd International Conference; Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Application (IMA 2003), 23-27 Eylül 2003, Selanik-Yunanistan, sözlü bildiri.
14. M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Meric, P. Kara, H. Karadeniz, B. Tugrul, N. Topcuoglu, H. Ekren, M. Taylan, “New trendson

electrochemical genosensor based on gold nanoparticles and guanine signals”, Bilkent Üniversitesi, 21 Kasım 2003, Ankara, sözlü bildiri.

15.M. Ozsoz, . Erdem, D. Ozkan, P. Kara, H. Karadeniz, “Elektrokimyasal DNA biyosensörleri”, Uluslar arası Biyomühendislik: Problemler ve Perspektifler Çalıştayı, 20 -23 Ekim 2004, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, sözlü bildiri.

16.M. Ozsoz, P. Kara, A. Zeytinoglu, A. Erdem. D. Ozkan, H. Karadeniz, “Elektrokimyasal genosensör teknolojisi ile Herpes simpleks tip I ve tip II virüslerinin birbirinden ayırımı” Ege Üniversitesi, EBİLTEM, 2004, İzmir, Proje Sergisi.

Ebiltem Proje Yarışması 2004 birincilik ödülü.

17.M. Ozsoz, A. Erdem, D. Ozkan, P. Kara, H. Karadeniz, B. Karasahin, “Elektrokimyasal DNA biyosensörleri ve yeni gelişmeler”, II. Uluslararası Moleküler Tanı ve Uygulamaları Sempozyumu, 10 – 14 Mayıs 2004, E.Ü. Eczacılık Fakültesi, Bornova İzmir, sözlü bildiri.

18.A. Erdem, H. Karadeniz, D. Ozkan, P. Kara, M. Ozsoz, “An overview to electrochemical genosensors combined with particles, FEBS International Summer School, Chemistry Meets Biology, Spetses, GREECE, 17 – 19 Temmuz 2005, poster bildiri.

19.P. Kara, K. Dagdeviren, S. Girousi, M. Ozsoz, “Electrochemical biosensor for the detection of DNA damage by radioactive iodine and technetium” Joint Meeting Bioelectrochemistry, Coimbra, Portekiz, 19 – 24 Haziran 2005, poster bildiri.

- 20.**M. Ozsoz, A. Erdem, D. Ariksoysal, P. Kara, H. Karadeniz, "Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri", 6. Elektrokimya Günleri Toplantısı, Eskişehir, 29 Haziran – 1 Temmuz 2005, sözlü bildiri.
- 21.**M. Ozsoz, A Erdem, D. Ariksoysal, P. Kara Kadayıfcılar, H. Karadeniz, "Electrochemical DNA Biosensors" Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications, Crete, Yunanistan, 2-6 Ekim 2005, sözlü bildiri.
- 22.**S. Girousi, A.G. Angelikaki, P. Kara, M. Ozsoz, "Study of interactions between tetracyclines and dsDNA using carbon paste and pencil graphite electrode" " Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications, Crete, Yunanistan, 2-6 Ekim 2005, poster bildiri.
- 23.**M. Ozsoz, A. Erdem, D. Ariksoysal, P. Kara Kadayıfcılar, H. Karadeniz, G. Yalcin, S. Cavdar, B. Meric, "Electrochemical DNA biosensors", ISOPS 8th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, 13 – 16 Haziran 2006, sözlü bildiri.
- 24.**D. Ozkan, M. Ozsoz, P. Kara Kadayıfcılar, G. Yalcin, S. Cavdar, B. Meric, "Use of carbon nanotubes in biosensor systems for signal enhancement", ISOPS 8th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, 13 – 16 Haziran 2006, poster bildir.
- 25.**G. Yalcin, M. Cizmecioglu, P. Kara Kadayıfcılar, D. Ariksoysal, S. Cavdar, B. Meric, O. Sogut, M. Ozsoz, "Electrochemical Biosensors for the interaction of DNA and antitumoral and cytotoxic chalcone derivates", ISOPS 8th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, 13 – 16 Haziran 2006, poster bildiri.

26. M. Ozsoz, A. Erdem, D. Arıksoysal, P. Kara Kadayıfçılar, H. Karadeniz, G. Yalcın, S. Cavdar, B. Meric, "Elektrokimyasal DNA biyosensörleri", 7. Elektrokimya Güneri Toplantısı, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 28 – 30 Haziran 2006, sözlü bildiri.

Düzenlediği Toplantılar

- 1) Moleküler Tanı ve Uygulamaları Yaz Okulu, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Bornova, İzmir, 28-31 Mayıs 2002.
- 2) II. Uluslar arası Katılımlı Moleküler Tanı ve Uygulamaları Sempozyumu, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Bornova, İzmir, 10- 14 Mayıs 2004.
- 3) Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi – Fen Fakültesi Doç. Dr. Yücel Şahin yönetiminde düzenlenen Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri konulu çalıştay. (öğretici olarak) 31 Ocak – 1 Şubat 2005 Eskşehir.
- 4) Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde Prof. Dr. Esmâ Kılıç yönetiminde düzenlenen Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri konulu çalıştay. (öğretici olarak) 21 – 22 Mart 2005 Ankara.