

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DNA'DA MEYDANA GELEN BAZI
MUTASYONLARIN VE HİBRİDİZASYONUN
TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL DNA
BİYOSENSÖRLERİNİN TASARIMI

Doktora Tezi

Uzman Eczacı
Dilşat (ÖZKAN) ARIKSOYSAL

DANIŞMAN
Prof. Dr. M. E. Şengün ÖZSÖZ

İZMİR
2006

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DNA'DA MEYDANA GELEN BAZI
MUTASYONLARIN VE HİBRİDİZASYONUN
TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL DNA
BİYOSENSÖRLERİNİN TASARIMI

Analitik Kimya Anabilim Dalı Programı

Doktora Tezi

Uzman Eczacı
Dilşat (ÖZKAN) ARIKSOYSAL

DANIŞMAN
Prof. Dr. M. E. Şengün ÖZSÖZ

İZMİR
2006

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ**(Adı Soyadı)****(İmza)**

Başkan: Prof.Dr. M.E.Şengün ÖZSÖZ (Danışman)	
Üye: Prof. Dr. U. Salih AKARCA	
Üye: Doç. Dr. A. Arzu SAYINER	
Üye: Doç. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN	
Üye: Doç. Dr. M. Emrah KILINÇ	

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: **10 Temmuz 2006**

ÖNSÖZ

Çalışmalarımdaki değerli katkılarından dolayı başta, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, danışmanım, Sayın *Prof. Dr. Mehmet Emin Şengün ÖZSÖZ*'e, Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, hocam, Sayın *Doç. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN*'a, Anabilim Dalımızdaki diğer tüm *Öğretim Üyelerine*, İtalya Floransa Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın *Profesör Marco Mascini*'ye ve öğrencisi *Maria Lisa del Giallo*'ya teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Çalışmalarıma maddi destek sağlayan *Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı*'na, *Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM)*'e ve *Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)* 'a teşekkür ederim.

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

Büyük sabır göstererek, çalışmamın tüm aşamalarında verdiği maddi ve manevi desteklerle yanımda olan eşim *Hüseyin ARIKSOYSAL*'a, özellikle tez yazımı sırasında beni yüreklendiren, destekleyen ve boş zaman sağlayan annelerim *Huriye ÖZKAN* ve *Safiye ARIKSOYSAL*'a, babalarım *Mehmet ÖZKAN* ve *Yılmaz ARIKSOYSAL*'a ve tüm *aileme* teşekkür ederim.

Tezimin yazım aşamasındaki sıkışık dönemde değerli yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım *Özge ve Barış TUNCA*'ya, *Özün YALÇIN*'a ve başarımda katkısı olan *herkese*, teşekkür ederim.

İzmir,
07.06.2006

Arş. Gör. Uzm. Ecz.
Dilşat ARIKSOYSAL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	xii
GİRİŞ	1

BÖLÜM I GENEL BİLGİLER

1.1. Elektrokimya	15
1.1.1. Elektrokimyasal-Spektrofotometrik Tayin Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	17
1.1.2. Elektrot Yüzeyinde Gerçekleşen Olaylara Genel Bakış.....	18
1.1.2.1. Elektrolizde Elektrot Yüzeyinde Oluşan Tabakaların Elektriksel Olarak İncelenmesi	18
1.1.2.2. Elektrot Yüzeyindeki Konsantrasyon Değişimleri.....	19
1.1.2.3. Elektrot Yüzeyindeki Tepkime Oranını ve Akımı Etkileyen Faktörler	22
1.1.3. Elektrokimyasal Hücreler ve Hücre Direnci	23
1.1.3.1. Ohmik Potansiyel, IR Düşüşü	24
1.1.3.2. Polarizasyon	24
1.1.3.2.1. Konsantrasyon Polarizasyonu	26
1.1.3.2.1.1. Elektrot Yüzeyine Kütle Aktarım Yolları	27
1.1.3.2.2. Kinetik Polarizasyon	28
1.1.4. Voltametri Ve Esasları	29
1.1.4.1. Voltametrik Cihazlar	30
1.1.4.2. Voltametride Kullanılan Referans (Karşılaştırma) Elektrotları.....	32
1.1.4.3. Voltametride Kullanılan Çalışma (İndikatör) Elektrotları ...	33

1.1.4.3.1. Civa Elektrotlar	34
1.1.4.3.2. Karbon Elektrotlar.....	35
1.1.4.3.2.1. Karbon Pastası Elektrodu (CPE)	36
1.1.4.3.2.2. Camı Karbon Elektrotlar (GCE)	37
1.1.4.3.2.3. Tek Kullanımlık Kalem Grafit Elektrot (PGE)	38
1.1.4.3.2.4. Karbon Fiber Elektrotlar.....	38
1.1.4.3.2.5. Tek Kullanımlık Perde Baskılı Karbon Elektrot (SPCE)	39
1.1.4.3.3. Metal Elektrotlar	40
1.1.4.3.3.1. Altın Elektrot	40
1.1.4.3.3.2. Tek Kullanımlık Perde Baskılı Altın Elektrot (Au-SPCE).....	41
1.1.4.3.4. Mikroelektrotlar	41
1.1.4.3.5. Membran Elektrotlar	42
1.1.4.3.5.1. Sıvı Membran Elektrotlar	42
1.1.4.3.5.2. Kristalin Membran Elektrotlar.....	43
1.1.4.4. Voltamogramlar	43
1.1.4.5. Voltametrik Akımlar	45
1.1.4.6. Elektrokimyasal Bir Tepkimede Faradayik İşlemler	47
1.1.4.7. Polarografi.....	48
1.1.4.8. Voltametrde Kullanılan Uyarma Sinyalleri ve Teknikler ...	50
1.1.4.8.1. Dönüşümlü Voltametri.....	51
1.1.4.8.2. Diferansiyel Puls Voltametri.....	54
1.1.4.8.3. Kare Dalga Voltametri	56
1.2. Biyosensörler	57
1.2.1. Biyosensörün Yapısını Oluşturan Biyomateryaller ve Çevirici Sistemleri.....	60
1.2.2. Biyosensör Tasarımı.....	62
1.2.3. Biyosensörlerde Önemli Kriterler	62
1.2.4. Biyosensörlerde Algılama Biriminde Kullanılan Fiziksel Materyaller	63
1.2.4.1. Nanomateryaller ve Nanoteknoloji	63
1.2.4.2. Altın Nanopartiküller	65

1.2.4.3. Karbon Nanotüpler.....	66
1.2.4.4. Kuantum Noktalar.....	67
1.2.4.5. Manyetik Boncuklar.....	68
1.2.5. Biyosensörlerde Algılama Biriminde Kullanılan Biyolojik Materyaller.....	69
1.2.5.1. Enzimler.....	69
1.2.5.2. Antikorlar.....	70
1.2.5.3. Aptamerler.....	71
1.2.5.4. Moleküler Fenerler.....	71
1.2.5.5. Nükleik Asitler ve DNA.....	73
1.2.5.5.1. DNA ile İlgili Bazı Önemli Terimler ve Açıklamaları.....	82
1.2.5.5.2. DNA Baz Dizilişinin Yazılımı ile İlgili Genel Bilgiler.....	86
1.2.5.5.3. Nükleik Asit (DNA) Hibridizasyonu.....	87
1.2.5.5.4. DNA Hibridizasyon Kinetiğini Etkileyen Faktörler.....	88
1.2.5.5.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	89
1.2.5.6. Peptid Nükleik Asitler.....	95
1.2.6. Çevirici Birimini Oluşturan Sistemlere Göre Biyosensörler.....	96
1.2.6.1. Optik Biyosensörler- Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi (SPR).....	96
1.2.6.2. Piezoelektrik Biyosensörler- Kuvars Kristal Mikrobals Sistemi (QCM).....	99
1.2.6.3. Elektrokimyasal biyosensörler.....	101
1.2.6.3.1. İyon Seçici Alan Etkili Transistörler (İSFET) ..	101
1.2.6.3.2. Taramalı Elektrokimyasal Mikroskopi Sistemi (SECM).....	102
1.2.6.3.3. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS).....	102
1.2.6.3.4. Voltametrik Sensörler.....	103
1.2.7. DNA Biyosensörleri.....	105
1.2.7.1. DNA Biyosensörlerinde Prob Dizilerinin Elektrot Yüzeyine Modifiye Edilme Yolları.....	108

1.2.7.1.1. Adsorbsiyon Yoluyla Prob Tutturulması	109
1.2.7.1.2. Elektrostatik Yolla Prob Tutturulması	109
1.2.7.1.3. Kovalent Yolla Prob Tutturulması	109
1.2.7.1.4. Avidin-Biyotin Etkileşimi Yolu ile Prob Tutturma	111
1.2.7.2. Hibridizasyon	111
1.2.7.3. İstenmeyen Bağlanmaların Önlenmesi.....	112
1.2.7.4. Elektrokimyasal Tayin	112
1.2.7.4.1. İşaretlemeye Dayalı DNA Dizi Algılama Yöntemleri	112
1.2.7.4.1.1. Mediyatör / İndikatör / Enzim Aracılığı İle Tayin.....	112
1.2.7.4.1.2. İnterkalatör Aracılığı ile Tayin	113
1.2.7.4.1.3. Elektroaktif Madde ile İşaretleme Yolu İle Tayin.....	114
1.2.7.4.2. İşaretlemesiz DNA Dizi Algılama Yöntemleri.	114
1.2.7.4.2.1. Elektroaktif DNA Bazlarının Sinyali ile Tayin.....	114
1.2.7.5. Madde-DNA Etkileşmesinin ve DNA Hibridizasyonunu Tayinine Yönelik Biyosensör Tasarımı.....	116
1.2.7.5.1. Madde-DNA Etkileşmesine Dayalı DNA Biyosensörleri	116
1.2.7.5.1.1. İlaç-DNA Etkileşmesine Dayalı DNA Biyosensörleri	117
1.2.7.5.1.2. Toksik Madde-DNA Etkileşmesine Yönelik DNA Biyosensörleri	118
1.2.7.5.1.3. Kimyasal Savaş Ajanlarının Tayinine Yönelik Biyosensörler	118
1.2.7.5.2. DNA Hibridizasyonununa Dayalı DNA Biyosensörleri	119
1.2.7.5.2.1. Bulaşıcı ve Kalıtsal Hastalıkların/ DNA Mutasyonlarının Tanısına Yönelik DNA Biyosensörleri	119

1.2.7.5.2.2. Gıdalarda	İstenmeyen	
	Mikroorganizmaların ve Çevre /	
	İnsan Sağlığını Olumsuz Etkileyen	
	Mikroorganizmaların	Tayinine
	Yönelik DNA Biyosensörleri	121
1.2.7.5.2.3. Biyolojik	Silah	Olarak
	Kullanılabilecek	
	Mikroorganizmaların	Tayinine
	Yönelik DNA Biyosensörleri	122
1.2.7.6. İdeal Bir Elektrokimyasal Biyosensörün Sahip Olması		
	Gereken Özellikler	123

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar	125
2.1.1. Elektrokimyasal Sistemler	125
2.1.2. Diğer Cihazlar	127
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	127
2.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Tampon Çözeltiler	128
2.2.2. Hepatit B-Lamivudin Direnç Mutasyonlarının Tayini	
Çalışmasında Kullanılan Oligonükleotitler, Hazırlanışları ve	
Saflık Kontrolleri.....	129
2.2.3. Salmonella choleraesuis subsp. choleraesuis Tayini İçin	
Geliştirilen Biyosensörde Kullanılan Oligonükleotitler,	
Hazırlanışları ve Saflık Kontrolleri	132
2.2.3.1. Salmonella choleraesuis subsp. choleraesuis Tayininde	
Kullanılan PCR Ürünlerinin Elde Edilmesi	133
2.2.4. Kovalent Bağlanmayı Sağlayan Çözeltilerin Hazırlanışı	134
2.3. Kullanılan Yöntem	135
2.3.1. Hepatit B – Lamivudin Direnç Mutasyonlarının Tayini	
Çalışmasında Kullanılan Yöntem.....	135
2.3.1.1. Elektrot Yüzeyine Prob Tutturulması	136

2.3.1.2. Hibridizasyon	137
2.3.1.2.1. Sentetik Dizilerle Hibridizasyon	137
2.3.1.2.2. Klonlanmış PCR Ürünleri İle Hibridizasyon.....	137
2.3.1.2.3. Gerçek PCR Ürünleriyle Hibridizasyon	138
2.3.1.3. Ölçümlerde Kullanılan Voltametrik Yöntem.....	139
2.3.2. Salmonella choleraesuis subsp. choleraesuis Tayini Çalışmasında Kullanılan Yöntem	140
2.3.2.1. Biyosensör Yüzeyine Prob Tutturulması	140
2.3.2.1.1. Kovalent Yolla Prob Tutturulması.....	140
2.3.2.1.2. Adsorbsiyon Yoluyla Prob Tutturulması	140
2.3.2.2. Genosensör Yüzeyinde Hibridizasyon	141
2.3.2.3. Enzimle İşaretleme Ve Ölçüm	142

BÖLÜM III

BULGULAR

3.1. Hepatit B-Lamivudin Direnç Mutasyonlarının Tayini Çalışmasında Elde Edilen Bulgular	143
3.1.1. Sentetik Dizilerle Hibridizasyon ve Biyosensör Özgüllüğünün (Seçimlilik) Tayini	143
3.1.2. Klonlanmış PCR Ürünleriyle Hibridizasyon ve Seçimliliğin Tayini	146
3.1.3. Hibridizasyon için En Uygun Hedef Konsantrasyonunun Bulunması.....	147
3.1.4. Hibridizasyon Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi.....	149
3.1.5. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi	150
3.1.6. Karışım Halindeki Hedef Çözeltilere Uygulanan Biyosensörün Seçimliliğinin İncelenmesi	151
3.1.7. PCR Ürünleri ile Gerçekleştirilen Tayin Çalışmaları.....	154
3.2. Salmonella choleraesuis subsp. choleraesuis Tayini Çalışmasında Elde Edilen Bulgular	157

3.2.1. Prob Tuturma Yönteminin Hibridizasyona Olan Etkisinin İncelenmesi	158
3.2.2. İşaretli Prob Kullanılmasının Elektrot Yüzeyindeki Tutunmaya Olan Etkisinin İncelenmesi	160
3.2.3. Hedef Derişimindeki Artışın Hibridizasyon Ve Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi	162
3.2.4. PCR Ürünleriyle Gerçekleştirilen Çalışmalar	163

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

4.1. Hepatit B-Lamivudin Direnç Mutasyonlarının Tayini Çalışmasında Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi	166
4.2. Salmonella choleraesuis subsp. choleraesuis Tayini Çalışmasında Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi	173

BÖLÜM V

SONUÇ VE ÖNERİLER

ÖZET	180
ABSTRACT	183
KAYNAKLAR	186
ÖZGEÇMİŞ	221
SÖZLÜK	237

KISALTMALAR DİZİNİ

20 mer	20 baz uzunluğundaki oligonükleotit
A	Adenin (DNA'daki 4 bazdan biri)
ACB	Asetat tamponu çözeltisi
Au-SPE	Perde baskılı altın elektrotlar
bp	Nükleotid baz çifti
BSA	Bovine Serum Albümin
C	Sitozin (DNA'daki 4 bazdan biri)
CV	Dönüşümlü voltametri tekniği
DNA	Deoksiribonükleik asit
DKE	Doygun Kalomel Elektrot
DPV	diferansiyel puls voltametri tekniği
E	Potansiyel(gerilim)
EDC	Etil karbodiimit <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> - etilkarbodiimit hidroklorür / 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)karbodiimit hidroklorür
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit disodyum tuzu
G	Guanin (DNA'daki 4 bazdan biri)
HBV	Hepatit B virüsü
ISFET	İyon-Seçici Alan Etkili Transistör
KPCR	Klonlanmış PCR ürünleri
mRNA	mesajcı RNA
MOSFET	metal oksit alan etkili transistör
NHS	<i>N</i> - hidroksi süksinimit
-NH ₂	Amino grubu
PBS	fosfat tamponu çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu veya reaksiyonla çoğaltılmış hasta ürünleri
PGE	kalem grafit elektrot
PNA	Peptid nükleik asit
QCM	Kuartz kristal mikrobals
RNA	Ribonükleik asit

SAM	Kendi kendine toplanan düzenli elektrot yüzeyi tabakası (self-assembled monolayer)
SDS	Sodyum dodesil sülfat (deterjan)
SECM	Taramalı elektrokimyasal mikroskopi
-SH	Tiyol grubu
SHE	Standart hidrojen elektrodu
SNP	Tek nükleotit polimorfizmi
SPCE	Perde baskılı karbon(grafit) elektrot
SPR	Yüzey plazmon rezonans (surface plasmon resonance)
SWV	Kare dalga voltametri tekniği
T	Timin (DNA'daki 4 bazdan biri)
TBS	Tris tamponu çözeltisi
TE	Tris-HCl ve EDTA tampon çözeltisi
YIDD	HBV Mutant tip 2 probunun klonlanmış/PCR'ı yapılmış üründeki hedefi (metiyonin yerine izolösin kodonu)
YMDD	HBV Yabanıl tip (sağlıklı) probunun klonlanmış/PCR'ı yapılmış üründeki hedefi [tirozin (Y), metiyonin (M), aspartat (D), ve aspartat (D)]
YVDD	HBV Mutant tip 1 probunun klonlanmış/PCR'ı yapılmış üründeki hedefi (metiyonin yerine valin kodonu)

GİRİŞ

Moleküler tanı yöntemleri (gene dayalı tanı yöntemleri), "İnsan Genom Projesi" çerçevesinde elde edilen insan genetik yapısına ilişkin yeni bilgiler ve bu bilgilerin sağlayacağı ileri düzeyde araştırmaların etkisiyle birlikte son 15 yıl içerisinde çok hızlı bir ilerleme ve gelişme göstermiştir.

DNA'nın belli bir bölgesini milyonlarca kez kopyalayarak çoğaltan polimeraz zincir reaksiyonu, otomatik DNA dizi sentez teknikleri ve başta elektronik bilgisayar ve bilişim olmak üzere diğler alanlardaki ileri düzeyde gelişmeler gen mühendisliğı çalışmalarına yön vermeye devam etmektedir. Bakterilere gen aktarımıyla başlayan ve günümüzde ağaçtan insana kadar her organizma üzerinde genetik tanı analizine imkan veren birçok moleküler tanı tekniğı bilim dünyasına kazandırılmış durumdadır. Gen teknolojisindeki bu hızlı ilerlemeler, tıbbi ve biyoteknolojik uygulamalarının yanı sıra büyük uluslararası projelere de konu olmaktadır.

Bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların, DNA hibridizasyonunun veya mutasyonlarının moleküler düzeyde analizinden [9, 87, 263, 266, 268, 295, 364, 374], besinlerde bakteri tayinlerine [70, 174, 339], yeni sentezlenen ilaç moleküllerinin etki mekanizmalarının aydınlatılmasından [18, 238, 261, 268, 277, 278, 279, 341, 364, 377], DNA'da hasar oluşturan maddelerin tespitine [72, 178, 268, 273, 364], adli tıpta suçluların bulunmasına yönelik analizlerden çevresel analizlere [89, 213, 220] kadar pek çok alanda biyosensörlerin ve nükleik asit biyosensörlerinin kullanımı, günümüzün bilim dünyasında önemi son derece artmış

konular arasında yer almaktadır. Sağlık ve ekolojik alanlardaki sorunların ekonomik ve etik değerlere uygun şekilde araştırılması için bir analitik kimyacı, başta insan sağlığı olmak üzere, çevre ortamının ve tüketilen gıdaların analizleri için yeni tayin yöntemleri geliştirerek, klasik analiz yöntemlerine alternatifler getirmek durumundadır.

Yüzyılın büyük teknolojik ilerlemesi olan insan genom projesinin taslağının tamamlandığının bildirilmesiyle birlikte, 30.000 dolayında genin dizilimi belirlenmiş ve genom üzerinde ortalama her 2000-2500 nükleotide bir, bireyler arasında değişikliğe neden olan tek nokta mutasyonu (SNP, single nucleotide polymorphism) bulunduğu [161] ortaya konmuştur. Ayrıca insan genomunun tüm genlerinin haritalanmasının ve diğer tüm varyasyonların baz diziliminin yakın gelecekte belirlenmesinin mümkün olduğu ortaya çıkmıştır. Bu projeye paralel olarak, kişiden kişiye değişen ve yaklaşık her bin bazda bir meydana gelen [326, 420] genetik yapı ve farklılıkların % 90' ını oluşturan tek nükleotit polimorfizm (SNPs)' lerinin de haritalanmasına çalışılmaktadır [126, 306].

İnsan genom projesi, günümüzde tıbbi ve medikal alanda pek çok önemli araştırmanın çıkış noktası olmuştur. Artık birçok hastalık "genetik hastalık" olarak tanımlanmakta ve bu hastalıkların tanısına (tayinine) yönelik "genetik testler" geliştirilmektedir.

Hasta başı moleküler genetik analizler için otomatik, küçültülebilir, ekonomik, kolay uygulanabilen ve taşınabilir test cihazlarına olacak ihtiyaç nedeniyle pek çok moleküler tanı laboratuvarı, DNA analizleri(özellikle DNA hibridizasyon analizi) için, spesifik, hızlı ve güvenilir tayine yönelik çalışmalar yapmaktadır. Bilim dünyası yüksek kalitede, gittikçe küçülen, nanometre boyutlardaki ileri teknoloji ürünleri ile moleküler düzeyde DNA analizi yapma noktasına ulaşmıştır [10, 45, 84, 87, 199,

201, 206, 263, 281, 285, 361, 369, 414]. Tüm bu analitik tayin yöntemleri, gen teknolojisindeki ve nano-teknolojideki ilerlemelere paralel olarak geliştirilmektedir.

Günümüzde kullanılan DNA analiz teknolojileri

Gen dizilerinin moleküler tayini; patojen mikroorganizmaların, genetik hastalıkların ve mutasyonların son derece duyarlı, yüksek derecede seçimli ve nicel analizine olanak tanımaktadır. Günümüzde halen kullanılmakta olan geleneksel metodlarla yapılan tayinler genellikle genlerin direkt olarak sekans analizi (baz dizisi analizi) veya DNA hibridizasyonunun tespiti esasına dayalıdır. Gen üzerindeki nükleotid baz diziliminin doğrudan analizinin zor ve pahalı oluşu DNA hibridizasyonuna dayalı analizleri ön plana çıkarmıştır. Bu yöntemlerden bazıları analizde çeşitli radyoaktif boyaların kullanımını gerektirmektedir. Hassas tayine imkan veren radyoaktif işaretleme işleminin, çok kısa ömürlü oluşu, araştırmacının radyasyona maruz kalması, yüksek maliyet, depolama ve kullanım güçlüğü gibi önemli sakıncaları da bulunmaktadır. Enzimatik ve luminesans (ışık saçan) materyalle işaretlemeye dayalı radyoaktif özellik taşımayan klasik tayin metodlarının ise enzim içerikleri nedeniyle uygulamalarda yüksek kararlılık gösterememesi ve düşük hassasiyete sahip olmaları gibi negatif özellikleri bulunmaktadır [212].

DNA analizleri için günümüzde elektroforetik ayırım yöntemleri ve immünokimyasal yöntemler de kullanılmaktadır [315]. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'na dayalı bu yöntemler, hasta başında gerçekleştirilecek hızlı ve kesin yanıtlar alınması gereken rutin analizler için uygun değildir. Jel elektroforezi işleminde oldukça zararlı olan etidyum bromür maddesinin kullanımı ve analizde eğitimli personele olan ihtiyaç ise yöntemin diğer sakıncalarıdır.

Dideoksi nükleotitler kullanılarak PCR ile çoğaltılan DNA parçasının sekanslanması da son yıllarda ilgi gösterilen bir tekniktir [314]. Fakat sekansın bulunması (okunması) işlemi hem zaman alıcı, hem de çok pahalı bir işlemdir.

Southern blot tekniği de günümüzde halen birçok araştırma laboratuvarında sıklıkla kullanılan DNA hibridizasyonuna dayalı bir analiz yöntemidir. Yöntemde radyoaktif madde ile işaretli probler kullanılmaktadır. Radyoaktivite nedeniyle DNA'da hasar oluşumu, radyoaktif maddeyi kullanabilecek uzman gereksinimi ve uzun süren tayinin her aşamasında farklı malzeme ve cihaza olan ihtiyaç nedeniyle tekniğin bazı sakıncaları bulunmaktadır.

Mikroçip teknolojisinin kullanıldığı cihazlar günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. GeneChip® ve Affymetrix [65] firmalarının ürettiği küçültülmüş biyosensörler binlerce genin tek bir çipte analizine olanak vermektedir. Kovalent ajan ve pahalı materyal kullanımını gerektiren GeneChip® firmasının mikroçiplerinde DNA izolasyonu, çoğaltımı, işaretlenmesi ve optik yolla analiz tekniği esas alınmıştır [1]. Bu analizler ayrıca tarayıcı sistemleri içermesinden dolayı oldukça pahalıdır [315].

Bilinen bu yöntemlere alternatif olmak üzere elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımı gündeme gelmiştir.

Biyolojik madde algılayıcı cihazlar **“Biyosensörler”** son on yılda moleküler tanı alanındaki bu gereksinim nedeniyle geliştirilen cihazlardır ve biyosensör tasarım teknolojisi, kesin sınırları çizilemeyen multidisipliner bir çalışma alanı olma özelliğini korumaktadır. Biyosensörler, analizi yapılacak biyolojik örnekler içerisindeki kimyasal türlerin aktivitelerine veya konsantrasyonlarına seçici ve dönüşümlü olarak yanıt verebilen, elektroaktif biyolojik bir madde ile bir çevirici içeren analitik cihazlar olarak ifade edilirler [62]. Elektrokimyasal biyosensördeki

biyolojik kısım, hedeflenen biyolojik madde ile etkileşerek onunla birleşir. Elektrokimyasal çevirici ise meydana gelen bu biyokimyasal olayı ölçülebilir bir analitik sinyale çevirir.

Günümüzde sıklıkla diyabetli hastalar için kullanılan glukoz oksidaz enzimine dayalı glukoz biyosensör teknolojisinin, DNA testleri için de kullanılabileceği fikri 1998’li yıllarda doğmuştur [396]. Glukoz sensörüyle hastanın kendi başına kısa sürede, kolaylıkla kan glukoz düzeyini ölçebilmesi hayat kurtarıcı bir rol oynamıştır. Aynı şekilde hastaların bir damla kanını DNA biyosensörüne damlatarak hastalığını tanıyabilmesi fikri, tıp dünyasında büyük bir gelişmedir. Bu gelişme ise birçok hastalığın önlenmesinde hayati önem taşıyan erken tanıyı gündeme getirerek, bu tip özgül tayinlerin DNA biyosensörleri ile gerçekleştirilebileceği, hatta tayinin klinikte hasta başında veya hasta tarafından evinde kolayca gerçekleştirilebileceği fikrini doğurmuştur.

İnsan genomu ve kişilere özgü SNP haritalarının kullanılması ile DNA hibridizasyonu ve mutasyon analizlerine yönelik tasarımı yapılacak biyosensörler kanser, diyabet, vasküler hastalıklar gibi poligenik(çok etkenli) kalıtım gösteren hastalıkların tanılarında büyük fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

DNA dizilerinde meydana gelen mutasyonlar, kimyasallar ve ilaçlar gibi çevresel etkenlere kişilerin verdiği yanıtı etkilemektedir. Bu nedenle SNP’lerin (mutasyon) belirleyecek yöntemlerin bulunması, biyomedikal araştırmalarda ve farmakolojik ürünlerin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır.

Elektronik ve moleküler biyoloji bilimlerindeki hızlı ilerlemelere paralel olarak biyosensör teknolojisindeki gelişmeler halen devam etmektedir. Yakın gelecekte hasta başı analizlere imkan verecek, küçük taşınabilir cihazlara (mikroçipler) dönüştürülebilecek elektrokimyasal genosensörlerin (biyosensör) temelinde yatan ve

analitik kimya alanına giren çalışmalar ise ağırlıklı olarak elektro-analitik kimyacılar tarafından yürütülmektedir [27, 28, 46, 49, 54, 68, 116, 127, 128, 129, 130, 212, 219, 235, 260, 263, 266, 273, 274, 294, 295, 316, 354, 359, 364, 370, 374, 380, 399, 400, 409].

Moleküler düzeyde nitel ve nicel analiz yapma amacına yönelik tasarlanan [31, 32, 33, 46, 103, 166, 271] elektrokimyasal biyosensörlerde tanıma yüzeyi olarak DNA katmanı kullanılması, günümüzün bilim dünyasında büyük önem taşımaktadır [226, 231, 270, 325, 389].

DNA kaplı tanıma yüzeyleri, hibridizasyon olaylarının incelenmesinde veya yüzey ile etkileşime girecek maddelerin (ilaç, geno-toksik molekül vb.) tayini için kullanılabilir [266, 273]. DNA'daki bir bazın veya yüzeyle etkileşen maddenin değişen elektrokimyasal sinyali üzerinden analiz gerçekleştirilebilmektedir.

Elektrokimyasal biyosensör kullanımının, klasik tayin yöntemlerine göre daha hızlı ve kolay analiz gerçekleştirme, ucuzluk, seçicilik, düşük tayin sınırına sahiplik gibi yararları bulunmaktadır [191, 266]. Ayrıca taşınabilir biyosensörlerin yaygın olarak üretilmesiyle birlikte analizlenecek örneklerin stabil şekilde donanımlı bir laboratuara taşınması işlemi ortadan kalkacağı için sistem birçok yeni yararı da beraberinde getirecektir. Biyosensörlerde, algılayıcı kısımda kullanılan biyolojik materyalin özelliğine göre tasarımlar gerçekleştirilebilmektedir. Diğer bir ifadeyle, biyosensör tasarımı kullanılan biyolojik materyalin özelliği ile sınırlanmaktadır. Ayrıca analizler, uygun pH, iyonik şiddet, sıcaklık ve genellikle sulu ortama gereksinme gösterir. Clark ve Lyons'un 1962 yılında tasarımı yaptığı ilk biyosensör olan glukoz biyosensörünün [60] geliştirilmesinden bu yana biyosensör tasarım çalışmalarında özellikle de elektrokimyasal DNA biyosensörleri alanında

büyük çapta artış görülmektedir [212, 364] ve bu çalışmalar biyosensörlerdeki sakıncaların ortadan kaldırılmasına yöneliktir. Yaklaşık 40 yıl kadar önce Emil Palecek'in nükleik asitlerin elektroaktivitesini keşfedişi [272] ve bu gelişmenin ardından günümüzden 10 yıl önce Joseph Wang ve arkadaşlarının DNA hibridizasyon biyosensörü tasarımını gerçekleştirmeleri [381] bu alandaki çalışmaların en önemlileridir.

Birçok biyosensör yoğun olarak klinik tanıda, ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında kullanılırken, ayrıca çevresel analizler, gıda kalitesinin araştırılması, adli analizler, güvenlik ve savunma amaçlı uygulamalar için de kullanılmaktadır [55, 61, 162, 307, 421].

Son yıllarda dünyada **'Laboratory-on-a-Chip'**(çipte laboratuvar teknolojileri) olarak adlandırılan bu yeni teknoloji üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu yeni teknolojinin amacı, tek bir çipte (=küçültülmüş biyosensörde) tüm genomu izlemeyi ve binlerce gen arasındaki etkileşmeyi eş zamanlı olarak belirlenmesini sağlayabilmektir.

Biyosensör alanında yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bilgiler kullanılarak DNA çipleri (yonga) üretilmektedir. Örneğin, bu alandaki ilk çalışma S. Mikkelsen'in 1994 yılında yapmış olduğu kalıtsal hastalıkların DNA biyosensörleri ile tayini projesi [232]' dir. Proje, Amerikan Clinical Micro Sensors Inc. firması (CMS) tarafından hayata geçirilmiştir. Üretilen biyosensör teknolojilerinin klinikte kullanıma uygun hale getirildiği mikroçip cihazları, günümüzde yaygın olarak üretilmektedir. Affymetrix firmasının Genechip adlı ürünü [1, 65], ve Nanogen [243] firmalarının cihazları bunlardan bazılarıdır. Genellikle bu cihazların teknolojilerinin temeli optik biyosensörlere dayanmaktadır.

Taşınabilir sensörlerin üretilmeye başlanmış olması, elektrokimyasal mikroçip cihazlarının da kısa zamanda üretilmesi olanaklı hale gelecektir [109].

Araştırmanın konusu ve amaçları

Hepatit B virüsü (HBV), akut ve kronik hepatit, karaciğer sirozu ve karaciğer kanserine neden olmaktadır [200]. Dünyada ölüm nedenleri arasında hepatit B virüsünün yol açtığı enfeksiyonlar 9. sırada yer almaktadır [80, 224, 299]. Dünya sağlık örgütünün verilerine göre 350 milyondan fazla kronik hepatit B hastası bulunmaktadır [5]. Kronik hastaların tedavisinde interferon- α ve lamivudin [(-)- β -L-2',3'-dideoksitasidin, 3TC] kullanılmaktadır. Uzun süreli lamivudin tedavisi ilaca karşı direnç gelişmesi gibi problemleri beraberinde getirmektedir [77, 100, 197].

Lamivudin, DNA polimeraz ve viral revers transkriptaz enzimlerinin aktivite göstermesini engelleyerek virüsün replikasyonunu inhibe eden nükleozit analogu bir ilaçtır [229]. Direnç gelişimi genellikle en erken tedavi başlangıcından 6 ay sonra tayin edilebilmektedir [342]. İlacın tedavi edici etkisi, direnç gelişimi nedeniyle 1 yıl içerisinde %14-32, 2. yıldan sonra ise %38-58 oranında azalmaktadır. Lamivudin direnci, polimeraz geni 204. kodon aminoasitindeki tek nükleotit değişimi sonucunda oluşur. Direnç gelişimiyle bu kodondaki metiyonin aminoasiti, valine (V) veya izolösine (I) dönüşür. Böylece tirozin (Y), metiyonin (M), aspartat (D), aspartat (D)-YMDD şeklindeki normal HBV motif yapısı YVDD veya YIDD ile ifade edilen mutasyonlu motiflere dönüşür [5, 125, 142, 186, 253, 330]

Hepatit B hastalarında ilaç kullanımı ile ilaca karşı gelişen direncin klinik olarak hızlı tayininin yapılması tedaviye yeni bir yön verilmesi açısından önem taşımaktadır. Direnç gelişimiyle, kan serumundaki virüs DNA'sının miktarı ve

karaciğer enzimlerinin(ALT) seviyeleri yükselmektedir ve bu durum hastaların %10-25'inin karaciğerinde hasarı oluşumuyla sonuçlanmaktadır. [216, 300].

Lamivudin direncine neden olan mutasyonların tayini için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Doğrudan dizinin bulunması yöntemi genel olarak kullanılmaktadır. [29, 252]. Fakat yöntem çok sayıda örnekle çalışıldığında oldukça zaman alıcı ve pahalıdır. HBV varyasyonlarının tayininde kullanım kolaylığı olan diğer yöntemler RFLP ve PCR yöntemleridir [50, 329]. Her iki yöntemden PCR nispeten hızlı analiz sağlamaktadır fakat pahalı kit ve toksik kimyasal madde kullanımını gerektirmektedir [50].

Günümüzde elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (genosensör) hastalıkların tanısında kullanılması yaygınlaşmıştır. Özellikle DNA hibridizasyonunun tayini biyomedikal ve çevresel araştırmalarda önem kazanmıştır [90, 185, 273, 295, 358, 367]. Çalışmalar, hastalıkların erken tanısına yönelik basit, kullanımı kolay, hızlı ve ucuz tayini sağlayacak yöntemin bulunması yönünde sürmektedir. Bazı çalışmalarda, guanin bazının elektrokimyasal yanıtı kullanılarak doğrudan DNA hibridizasyonu ve mutasyon analizleri gerçekleştirilmiştir [88, 260, 390]. Wong ve Gooding [400] tek nokta mutasyonunun tayinine yönelik elektron transferine dayalı hibridizasyon biyosensörünü altın elektrot ve antrakınon-2,6-disülfonik asit interkalatörü kullanarak geliştirmişlerdir. Kelley ve arkadaşları ise nokta mutasyonu içeren dizilerin analizini metilen mavisi ve ferrrisiyanür aracılığı ile yaptılar [177]. Benzer şekilde metilen mavisi ve peptid nükleik asitleri kullanarak Özkan ve arkadaşları da tek nokta mutasyonlarını içeren DNA dizilerini metilen mavisi kullanarak tayin etmişlerdir [262].

Bu alanda son gelişmeler, daha önce de belirtildiği gibi elektrokimyasal mikroçip üretilmesine yönelik uygulamaları kapsamaktadır. Bu noktada

genosensörler ucuz, hızlı ve mikro boyutlarda üretime uygulanabilir olmaları nedeniyle önem taşımaktadırlar [220, 263, 341, 379, 393].

Hepatit B virüsünün tayinine yönelik geliştirilen elektrokimyasal genosensörler de literatürde yerini almış durumdadır. Erdem ve arkadaşları [91, 92], redoks indikatörleri kobalt fenantrolin $[Co(phen)_3^{3+}]$ /metilen mavisini kullanarak indikatörlü biyosensör tasarımı gerçekleştirmişlerdir. Diğer bir HBV biyosensöründe, metilen mavisini indikatörlüğünde hem sentetik dizilerle hem de polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri ile tayin gerçekleştirilmiştir [228]. Altın elektrot yüzeyinde düzenli nükleik asit tabakası oluşturularak gerçek PCR ürünlerinden HBV tayinine ait diğer bir çalışma Ye ve arkadaşlarınca yapılmıştır [413]. Literatürde osmiyum bipiridin $[Os(bpy)_2Cl_2]$ indikatörü ile gerçekleştirilmiş benzer bir elektrokimyasal çalışma daha bulunmaktadır [171].

Literatürde HBV tedavisinde ilaç kullanımı ile meydana gelen tek nokta mutasyonlarının elektrokimyasal biyosensörle tayinine yönelik kayda rastlanmamıştır. HBV ve varyasyonlarının tayini için tez çalışması kapsamında geliştirdiğimiz elektrokimyasal DNA hibridizasyon biyosensörü ile mutasyon tayini ve HBV (YMDD) ile mutant HBV (YVDD-YIDD) ayrımının yapılması amaçlanmıştır. Kullanılacak yöntemin herhangi bir işaretleme basamağı ve hibridizasyon indikatörü (karsinojenik antitümör ilaç, metal kompleksi, organik boya vb.) içermemesi, ve bu nedenle daha ekonomik ve daha hızlı sonuç vermesi planlanmıştır. İndikatöre dayalı tayinlerde indikatörle etkileşim için ayrıca deneysel işlemlere ve dolayısı ile daha fazla süreye ihtiyaç duyulmaktadır [91, 92, 171, 177, 228, 262, 413].

Çalışmada yüzeyine guanin bazı içermeyen kısa DNA oligonükleotit (prob) dizileri tutturulan kalem grafit elektrot (PGE) kullanılmıştır. Prob tutturulmuş

elektrodun, içinde hedef bulunan çözeltiliye daldırılması ile gerçekleşen hibridizasyon olayı sonrasında elde edilen ve hedef DNA dizisiyle bağlanma sonucunda ortaya çıkan guanin sinyalinin diferansiyel puls voltametri(DPV) tekniği ile ölçülmesiyle işaretli “EVET/HAYIR” biyosensör sistemi oluşturulmuştur. Hedef dizi ile elektrot yüzeyine tutturulmuş sentetik prob dizisinin etkileşme süresi (hibridizasyon zamanı), uygun hedef konsantrasyonu, uygun yıkama çözeltisinin ve konsantrasyonunun bulunması, uygun yıkama süresi, rastgele, mutasyonlu ve hedef dizilerin karışımını içeren bir ortamda probun hedefine olan seçiciliği, tekrarlanabilirlik gibi birtakım deneysel parametreler incelenmiştir. Sentetik DNA dizileriyle en uygun tayin koşullarının bulunması amacı ile yapılan bu çalışmaların ardından klonlanmış DNA ürünleri ve gerçek hasta örnekleriyle(PCR) ile tayinler gerçekleştirildi.

Salmonella choleraesuis subsp. *choleraesuis* bakterisinin tayinine yönelik enzime dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörünün geliştirilmesi tez çalışmasının ikinci bölümünü oluşturmaktadır.

Bilindiği gibi insan ve hayvanlarda birçok bağırsak hastalığının (Ör: salmonellosis, diyare vb.) etkeni olan salmonella bakterisi, özellikle gelişmekte olan ülkelerin önemli sağlık sorunları arasındadır. Bakteri nedeniyle ishal, en çok çocuklarda görülmekte; az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki 5 yaşın altındaki çocuk ölümlerinin en önemli nedeni olarak kabul edilmektedir. Bakteri, kontamine yiyecek (et ve et ürünleri, çiğ yumurta ve pastörize edilmemiş süt vb.) veya su yolu ile bulaşmaktadır.

Günümüzde gıdalarda türe özgü patojen bakteri tayini, gıda güvenliği ve gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi açısından önem taşımaktadır. Araştırmalar, bu bakterilerin erken tayininin, gıda kaynaklı birçok hastalığa yakalanma riskini ve bu hastalıkların neden olduğu ölümleri azalttığını göstermiştir. Patojen bakteri tayininde

kullanılan geleneksel yöntemlerin karmaşık ve yavaş olması, ayrıca hastalık etkeni olan *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Salmonella* gibi bakterilerin çok düşük miktarlarının tayin edilmesinin gerekliliği, yeni tayin yöntemlerine olan ihtiyacı gündeme getirmiştir [198]. Klasik yöntemler, ilgili patojen bakterinin laboratuvar ortamında kültürünün yapılmasını ve çoğaltılmasını gerektirmektedir. Bu işlemler, en az bir gün sürmektedir [198].

Bakteriye özgü tayinlerde ayrıca PCR yöntemi de kullanılmaktadır. Bu yöntem, zaman alıcı kültür yöntemlerine, hızlı ve güvenilir olması nedeniyle alternatif getirmiştir. Fakat PCR ile çoğaltılan DNA'nın daha sonra Southern blot ve kapiller elektroforez gibi yöntemlerle analizi, sistemin yaygın kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle son yıllarda taşınabilir PCR cihazları üretilmeye başlamıştır [198]. PCR ürünleri analizinde optik yöntemin ve interkalatör boyaların kullanıldığı çalışmalar rapor edilmiştir [198]. Bu çalışmalarda görülen istenmeyen bağlanmaların yalancı pozitif sonuç vermeleri nedeniyle bazı çalışmalarda moleküler fenerler ve floresan işaretli boyalar kullanılmıştır [198]. Bu yöntemlerin sakıncası, pahalı ve zaman alıcı olmalarıdır.

Gıda hammaddelerindeki patojen bakterilerin hızlı ve doğru analizi için yeni analitik tayin yöntemleri geliştirilmeye devam etmektedir. Bu doğrultuda, tez çalışmamızda kontamine olmuş gıdalarda salmonella tayininin tasarımı yapılacak yeni biyosensörle yapılması amaçlanmıştır.

Literatürde enzim-süstrat ilişkisi kullanılarak hibridizasyon tayininin yapıldığı çalışmalar bulunmaktadır [12, 51, 269, 374 283, 296, 417].

Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde enzimle işaretleme yönteminin kullanılması, hibridizasyon yanıtını arttırması açısından önemlidir.

Geliştirilecek genosensörün ucuz, hızlı, kesin ve doğru analiz sağlaması planlanmıştır. Ayrıca kullanım kolaylığı sağlaması ve fabrika üretimine uygulanabilir olması ile literatürdeki tayin yöntemlerine yeni bir alternatif getirmesi çalışmanın diğer amaçlarıdır.

Elektrokimyasal tayinde, salmonella genomunu tanıyacak özellikteki prob DNA dizisi, perde baskılı karbon (grafit) elektrot (SPCE), enzime dayalı sandviç hibridizasyon tayin yöntemi ve diferansiyel puls voltametri(DPV)/ kare dalga voltametri (SWV) teknikleri kullanıldı. Biyosensör yüzeyinde prob ve hedef arasında hibritleşme oluştuğunda, enzim ve sübstrat etkileşimi sonucunda ürün olarak α -Naftol oluşmaktadır. Elektroaktif özellikteki α -Naftol'un sinyalinin ölçülmesi ile dolaylı olarak hibridizasyon tayini gerçekleştirilmiştir. Sentetik kısa DNA dizileriyle en uygun tayin koşullarının bulunması amacı ile uygun prob tutturma yönteminin bulunması, uygun prob konsantrasyonunun tayini, çeşitli özelliklere sahip problemlerin tayine olan etkisi, problemlerle eşleşen hedef dizinin davranışı, hedef yerine tüm bazları hedeften farklı (rastgele) bir oligonükleotid kullanıldığında biyosensörden alınan yanıt ve biyosensör seçimliliği, hedef dizinin farklı konsantrasyonlardaki davranışı incelendi. Tüm deneysel parametrelerin incelenmesinin ardından bulunan uygun koşullar doğrultusunda gerçek örneklerle(PCR) tayin çalışmaları gerçekleştirildi. Ayrıca salmonella tayini için tasarımı yapılan biyosensörün en düşük tayin sınırının bulunması ve tekrarlanabilirlik çalışmaları da gerçekleştirildi.

Tez kapsamındaki çalışmalarımızda gerçekleştirilen medikal tanı ve gıdalarda mikroorganizma analizine yönelik DNA dizi tayinleri, hedef bölgedeki bazların tek tek bulunarak sekanslanması yoluyla değil, hedef bölgelere özgül olarak bağlanacak (hibritleşecek) dizilerin seçilmesi yoluyla yapılmıştır. Bu şekilde tayini istenilen bölge ile hibridizasyon gerçekleştiğinde o hedef bölgedeki baz dizilimi belirlenmiş

olmaktadır. Genel olarak, deney öncesi hazırlığı kolay, güvenilir ve seçimli sonuçlar veren, küçültülmeye ve fabrika üretimine uygulanabilir, geleceğin mikroçiplerinde kullanılacak elektrokimyasal biyosensör sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Tasarımını yaptığımız DNA hibridizasyonunun ve DNA mutasyonlarının tayinine dayalı biyosensörlerle, klasik yöntemlere güçlü bir alternatif olacak elektrokimyasal biyosensör yapılması, genetik hastalıkların hasta başında ve kısa sürede tayin edilebilmesi için yapılacak çalışmalara yeni bir boyut getirilmesi ve bu konuda çalışma yapacak araştırmacılara kaynak oluşturulması tez çalışmalarının amaçları arasındadır. Ayrıca, tez kapsamında tasarımı yapılan iki genosensöre benzer şekilde yeni biyosensörler tasarlanabileceği ve diğer bulaşıcı ve kalıtsal hastalık tayinlerinin de yapılabilceği gösterilmiştir.

BÖLÜM 1

GENEL BİLGİLER

1.1. Elektrokimya

Kimyasal enerji ile elektrik enerjisi arasındaki etkileşmeyi, etkileşim sonucunda oluşan kimyasal dönüşümleri, fiziksel değişiklikleri, kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini ve bunlarla ilgili olayları inceleyen bilim dalı *elektrokimya* olarak tanımlanmaktadır. Elektrokimya bilimi, bir maddeden diğer maddeye olan elektron geçişini inceler, bu olay, tayini yapılan analit hakkında bilgi verecek akımı oluşturur.

Elektrokimya konuları arasında özellikle sulu çözeltiler ve elektrolitlerin özelliklerinin incelenmesi önemli yere sahiptir. Ayrıca, elektrolitik ayrılma (disosiasyon), çözeltilerde iyonik dengeler, iletkenlik ve daha birçok konu elektrokimya içinde yer almaktadır. Elektrokimyasal termodinamikte ise elektrot işlemlerinin termodinamiği ve kinetiği incelenir. Bu kapsamda öncelikli olarak, denge halindeki elektrotlara ait olaylar (elektrot potansiyelleri, elektromotor kuvvet ve bunlarla ilgili konular) incelenirken, ikinci kısımda denge halinde olmayan elektrotlara ait olaylar (polarizasyon, elektroliz ve bunlarla ilgili hususlar) incelenir.

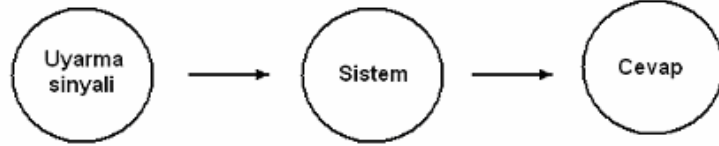
Elektrokimyasal tepkimeler, elektron verme (yükseltgenme)-elektron alma (indirgenme) türü olayların gerçekleştiği tepkimelerdir ve “elektrokimyasal hücre” adı verilen bir hücrede gerçekleşir. Analizlenecek maddenin elektrokimyasal

davranışının incelenmesine dayalı kantitatif tayinler “elektroanalitik kimya”nın kapsamına girmektedir. Elektroanalitik teknikler çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilirler ve elektrokimyasal yöntemlerin uygulanabildiği sistemler hakkında, ayrıntılı bilgiler verirler.

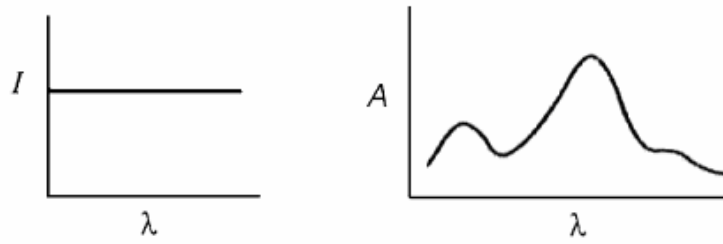
Elektroanalitik yöntemler diğer analiz yöntemlerine göre bazı üstünlüklere sahiptirler. Elektrokimyasal ölçümler çoğu kez bir elemente, moleküle veya tepkime sonunda oluşan ürüne özel bir yükseltgenme/indirgenme basamağı için özgüdür. Elektroanalitik yöntemlerin diğer bir önemli üstünlüğü de, kullanılan cihazların nispeten ucuz olmasıdır [6].

1.1.1. Elektrokimyasal – Spektrofotometrik Tayin Yöntemlerinin Karşılaştırılması [16]

a) Genel görüş

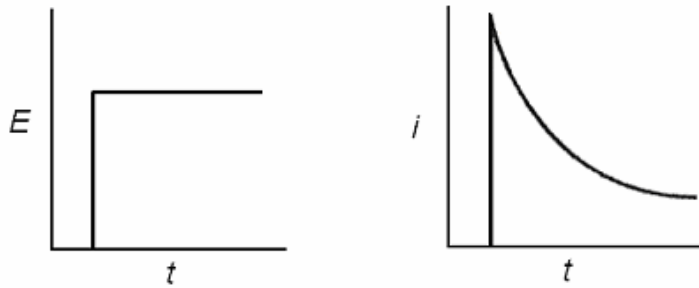


b) Spektrofotometrik deneyler



I : ışık şiddeti λ : dalga boyu A : absorbans

c) Elektrokimyasal deneyler



E : potansiyel t : zaman i : akım

Şekil 1: Analitik tayin sistemlerinde genel görüş ve spektrofotometrik/elektrokimyasal yöntemlerin karşılaştırılması

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 elektrolitik yöntemler ile Diferansiyel Puls (DPV), Kare dalga (SWV), Dönüşümlü voltametri (CV) vb. de belirli potansiyel aralığında potansiyel taraması yapılarak oluşan akım ölçülür. Akım, difüzyona bağlı olarak oluştuğundan dolayı burada ölçülen difüzyon akımıdır. Difüzyon hızı akım ile doğru orantılıdır. Difüzyon, elektrot yüzeyinin yakınındaki difüzyon tabakasında oluşur.

1.1.2. Elektrot Yüzeyinde Gerçekleşen Olaylara Genel Bakış

1.1.2.1. Elektrolizde Oluşan Elektrokimyasal Tabakaların Elektriksel Olarak İncelenmesi

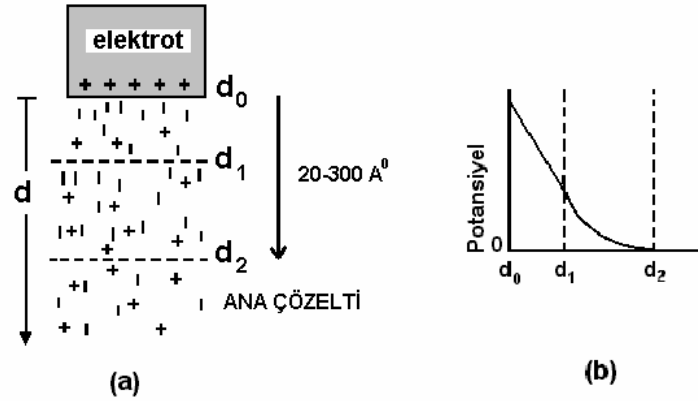
Elektrik akımı kullanılarak, bir çözücü içerisinde çözülmüş kimyasal maddelerin ayrıştırılması işlemi *elektroliz* olarak tanımlanmaktadır. Çözeltideki analitin sahip olduğu elektroaktif özellik nedeniyle, elektrot yüzeyine potansiyel uygulandığında, karşıt yüklü iyonlar elektroda doğru hareket eder. Bu hareket sonucunda atom veya moleküller elektroda bağlanarak tepkimeye neden olurlar [146].

Elektroda pozitif bir potansiyel uygulandıktan hemen sonra eğer elektrodun yüzeyinde reaksiyona 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 yüklenme oluşur. Bu etkileşim Şekil-2’de gösterilmektedir. Elektrodun yüzeyinde, uygulanan pozitif

potansiyelin bir sonucu olarak pozitif yük fazlalığı oluşmuştur. Yüklü çözelti tabakası iki kısımdan oluşmaktadır :

1- bir yoğun iç tabaka (d_0 'dan d_1 ' e), bu tabakada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça ortaya çıkan potansiyel mesafe ile doğru orantılı olarak azalır.

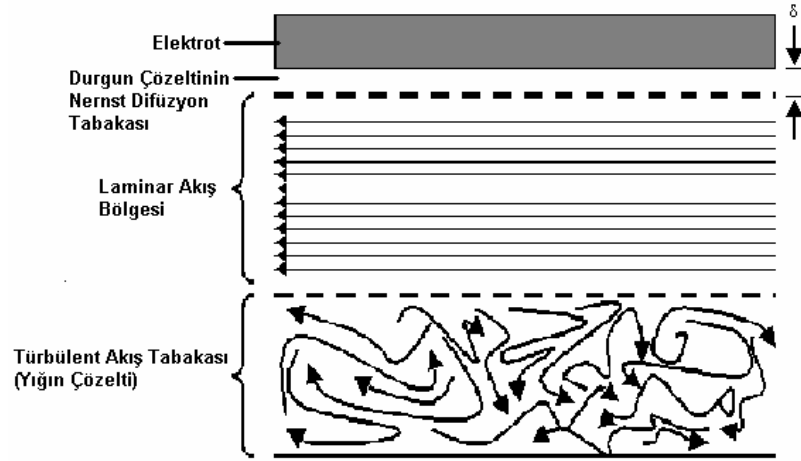
2- bir difüze tabaka (d_1 'dan d_2 ' e), burada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça ortaya çıkan potansiyel üstel olarak azalır (Şekil-2b). Elektrot yüzeyindeki ve yüzeye bitişik çözeltideki bu yük topluluğu bir *elektriksel çift tabaka* olarak adlandırılır.



Şekil 2 : Elektrot yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabaka

1.1.2.2. Elektrot Yüzeyindeki Konsantrasyon Değişimleri [6]

Karıştırılan bir çözeltiye daldırılmış düzlemsel bir mikroelektrot yüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal reaksiyona konsantrasyon / uzaklık değişimlerinin etkisini inceleyebilmek için öncelikle karıştırılan çözeltide sıvı akışının nasıl geliştiğinin açıklanması gerekir. Genel olarak karıştırılan sistemlerdeki heterojen tabakaların bileşimi Şekil 3'de görülmektedir:



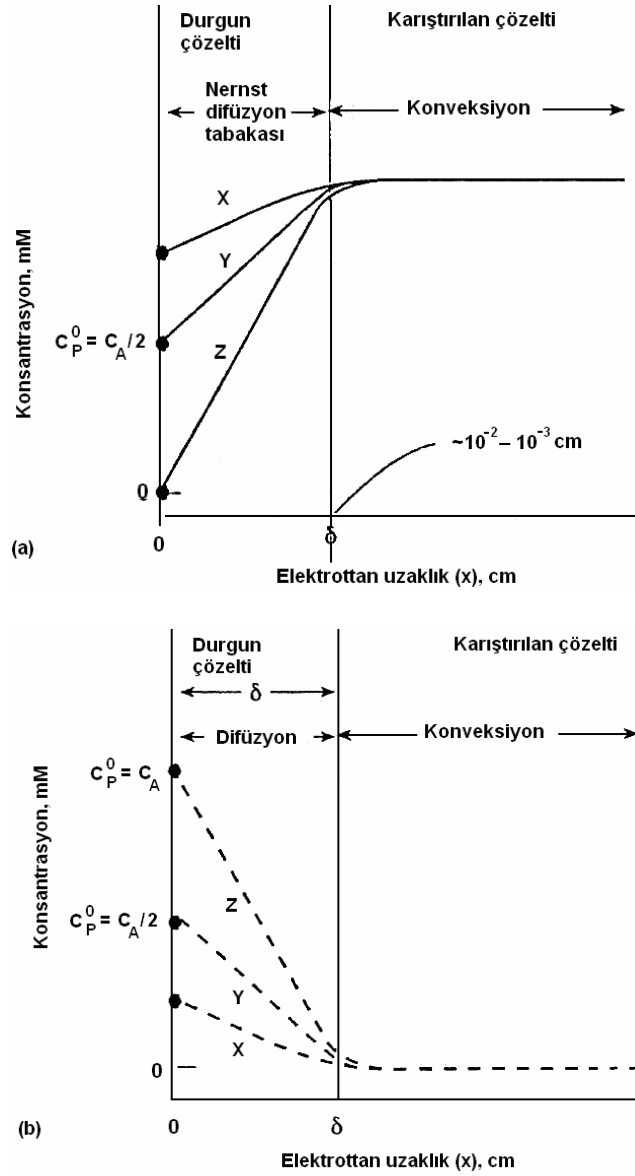
Şekil 3: Elektrot yüzeyindeki tabakaların şematize olarak gösterilmesi.

Türbülent akış tabakası: Elektrot yüzeyinden uzakta bulunan çözelti yığnında gözlenir.

Laminer akış bölgesi: Yüzeğe yaklaşıldığında bir laminer akışa geçiş olur. Laminer akışta sıvı tabakaları elektrot yüzeyine paralel bir yönde birbiri üzerine kayarlar.

Nernst difüzyon tabakası: Elektrot yüzeyinden δ cm uzakta, 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 konsantrasyonları yalnızca bu tabaka içerisinde elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak değişir.

Elektrot yüzeyinde gerçekleşen $A + ne^- \leftrightarrow P$ şeklindeki bir tepkimeye konveksiyon etki etmektedir. Konveksiyon, laminer ve türbülent akış bölgelerinde, A ile belirtilen tepkiyenlerin konsantrasyonunu (C_A) başlangıç değerinde; P ile belirtilen ürünlerin konsantrasyonunu (C_P) ise oldukça küçük bir değerde tutar.



Şekil 4: Elektrokimyasal bir reaksiyonda analit(a) ve ürün(b) konsantrasyonlarının elektrot yüzeyinden olan uzaklıkla değişimi.

Şekil 4-a'da, şekil 20'de belirtilen X, Y ve Z ile gösterilen üç farklı potansiyel değerinde A'nın konsantrasyonunun uzaklık ile değişimini göstermektedir. Nernst difüzyon tabakası ve çözelti yığını olmak üzere çözelti iki bölgeye ayrılmıştır. Çözelti yığnında kütle aktarımı oluşturulan mekanik konveksiyonla sağlanır. Elektrot yüzeyinin hemen yakınındaki δ kalınlığındaki Nernst difüzyon tabakası

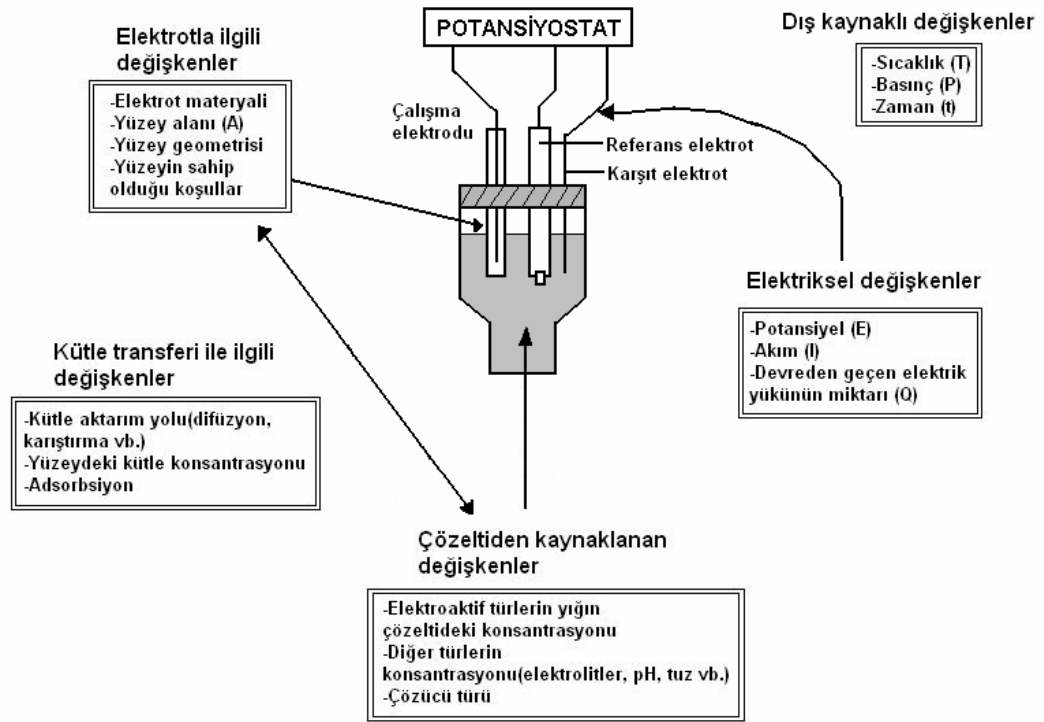
içindeki kütle aktarımı ise aynen karıştırılmayan çözeltilerde olduğu gibi yalnızca difüzyonla olur. Fakat karıştırılan çözeltide difüzyon dar bir sıvı tabakasında görülür, çözeltilinin tamamına yayılmaz. Bunun sonucu olarak, bir potansiyelin uygulanmasının ardından kısa süre sonra kararlı ve difüzyon kontrollü akımlar oluşur.

Şekil 4-b'de X, Y ve Z potansiyellerindeki P'nin konsantrasyon değişimlerini göstermektedir. Nernst difüzyon tabakasında konsantrasyonun elektrot yüzeyinden olan uzaklık ile doğrusal olarak azaldığı ve δ uzaklığında sifira yaklaştığı görülmektedir.

1.1.2.3. Elektrot Yüzeyindeki Tepkime Oranını ve Akımı Etkileyen Faktörler

Genel elektrot reaksiyonu, $A + ne^- \leftrightarrow P$ düşünüldüğünde bu reaksiyonun çözeltideki çözünmüş haldeki yükseltgenmiş türlerden(A), indirgenmiş türlere(P) kadar birçok etkene bağlı olduğu ortaya çıkmaktadır. Genellikle akım (elektrot reaksiyon oranı), çeşitli işlemlerin gerçekleşmesi oranında oluşur. Bunlar:

Elektrot reaksiyonunu etkileyen çeşitli değişkenler



Şekil 5: Elektrokimyasal analizde elektrot reaksiyonuna etki eden etmenleri gösteren şema [16].

1.1.3. Elektrokimyasal Hücreler ve Hücre Direnci [6]

Polarize olmayan referans elektroda karşı çalışma elektroduna uygulanan potansiyel, her zaman sistemdeki direnç potansiyelini de içermektedir. Diğer bir ifadeyle, elektrokimyasal bir hücreden akım geçtiğinde iki elektrot arasında ölçülen potansiyel, katot ve anodun elektrot potansiyeli arasındaki fark (termodinamik hücre potansiyeli) değildir. Ohmik potansiyel (direnç potansiyeli-IR düşüşü) ve polarizasyon gibi olaylar bir elektrokimyasal hücreyi çalıştırmak için termodinamik potansiyelden daha büyük bir potansiyelin uygulanmasını gerektirir ve bir galvanik

hücrede teorik olarak beklenen potansiyelden daha düşük bir potansiyel ortaya çıkmasına neden olur.

1.1.3.1. Ohmik Potansiyel; IR Düşüşü [6]

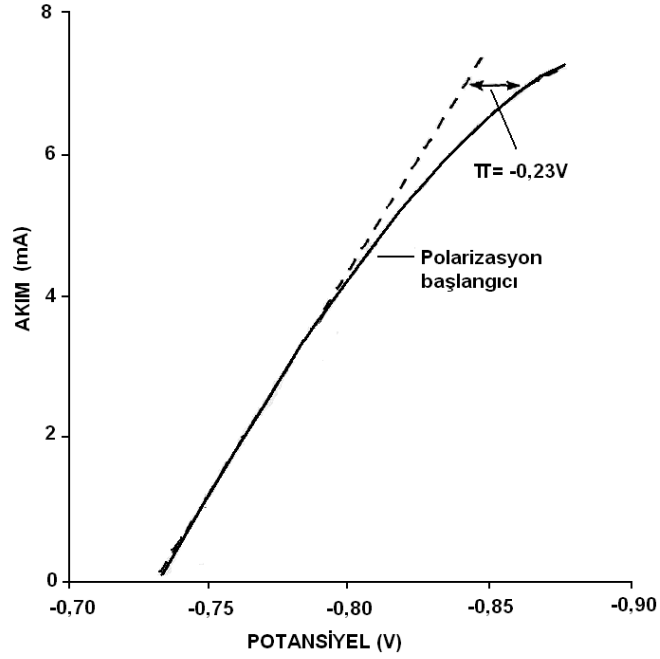
Elektrokimyasal hücreler, metalik iletkenler gibi yük akışına direnç gösterirler. Ohm kanununa göre bir hücrenin ohm olarak direnci ile hücreden geçen akımının çarpımı hücrenin ohmik potansiyeli (IR düşüşü) olarak ifade edilir. Bu nedenle hücrede I amperlik bir akım oluşturmak için termodinamik potansiyelden $-IR$ volt kadar negatif bir potansiyel (E uygulanan) uygulanmalıdır. Kısaca bu durum;

Eşitlik 1 $E_{uygulanan} = E_{katot} - E_{anot} - IR$ eşitliğiyle ifade edilebilir.

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

1.1.3.2. Polarizasyon [6]

Elektrokimyasal bir hücrede uygulanan potansiyel akıma karşı grafikleldiğinde eşitlik 1'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) Belli bir potansiyel uygulamasından sonra potansiyel artışı ile akım doğrusallıktan sapmaya başlar. (Şekil 6)



Şekil 6: Aşırı gerilim ve polarizasyon [6].

Yüksek akımlarda doğrusal olmayan akım davranışı gösteren hücreler *polarize* olmuştur ve polarizasyonun derecesi aşırı gerilimle ifade edilir. Aşırı gerilim Π ile simgelenir. Bu durum Eşitlik 1'i değiştirmektedir;

$$\text{Eşitlik 2} \quad E_{\text{çıkış}} = E_{\text{katot}} - E_{\text{anot}} - IR - \Pi$$

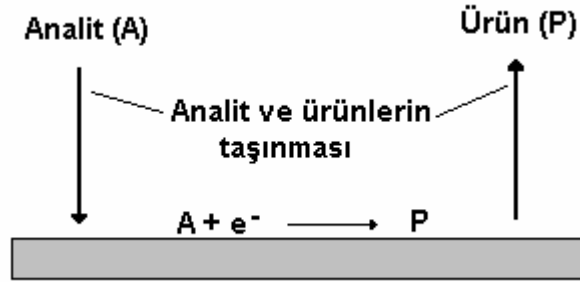
Polarizasyon bir hücredeki elektrotlardan birini veya her ikisini etkileyebilmektedir. Bir elektrodun polarizasyon derecesi geniş bir aralıkta değişir ve bazı durumlarda aşırı gerilim sifıra yaklaşır fakat bazı durumlarda hücredeki akım uygulanan potansiyelden bağımsız olacak kadar büyük olabilir. Bu durumda polarizasyon tamamlanmış olmaktadır.

Polarizasyonu; 1. Elektrot boyutu, şekli ve bileşimi, 2. Elektrolit çözeltisinin bileşimi, 3. Sıcaklık ve karıştırma hızı, 4. Akım seviyesi ve 5. Kimyasal reaksiyonunda yer alan türlerin fiziksel hali gibi faktörler etkilemektedir.

Polarizasyon olayı konsantrasyon polarizasyonu ve kinetik polarizasyon olarak ikiye ayrılmaktadır.

1.1.3.2.1. Konsantrasyon Polarizasyonu

Elektrot yüzeyinin hemen yakınında bulunan, sınırlı sayıda elektroaktif iyon veya molekül içeren kalınlığı birkaç nanometre olan tepkimelerin gerçekleştiği ince çözelti filmi “Nernst difüzyon tabakası” olarak adlandırılır.



Şekil 7: Elektrot yüzeyine yakın bölgedeki çözeltide meydana gelen fiziksel değişimler ve kimyasal dönüşümler.

Bazı durumlarda çözeltideki elektroaktif tür ile elektrot arasındaki elektron aktarımı yalnızca Nernst ince çözelti filminden elektrot yüzeyine olmaktadır. Elektrokimyasal bir hücrede kararlı bir akımın elde edilebilmesi için, Nernst difüzyon tabakasının sürekli olarak yığın çözeltilerden elektroaktif tür ile beslenmesi gerekmektedir. Yani elektrokimyasal olarak aktif (elektroaktif) iyon veya moleküller reaksiyon süresince harcanırken, akımın geçmesine yetecek kadar uygun bir hızla yüzey filmine taşınmalıdır ve aynı hızla da oluşan ürün uzaklaşmalıdır. Başka bir deyişle reaksiyonda iyonların taşınımı beklenen hızla katot yüzeyine doğru gerçekleşmediğinde veya ürünlerin anottan uzaklaşmadığı durumlarda

konsantrasyon polarizasyonu oluşur. Bu durum biyosensör sistemleri için şöyle özetlenebilir; çalışma elektrodu yüzeyine belli hızda kütle aktarımı sonucunda reaksiyon gerçekleşmesinin ardından, oluşan ürünün (yükseltgenen veya indirgenen iyon ya da molekülün) aynı hızla elektrot yüzeyinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu durum gerçekleşmediğinde oluşan konsantrasyon polarizasyonu, Eşitlik 2 beklenenden daha düşük değerlerle sınırlanır [6].

1.1.3.2.1.1. Elektrot Yüzeyine Kütle Aktarım Yolları

Çözeltideki maddeler elektrot yüzeyine 3 temel mekanizma ile taşınırlar; Difüzyon, göç ve konveksiyon.

Difüzyon; bir çözeltinin iki bölgesi arasındaki konsantrasyon farkından kaynaklanan, iyon veya molekülce yoğun bölgeden az yoğun bölgeye doğru hareketi ifade etmektedir ve bu hareket iki bölge arasında derişim farkı kalmayıncaya kadar devam eder. Difüzyon hızı konsantrasyon farkı ile doğru orantılıdır.

Bir elektrokimyasal hücredeki kütle transferinin ana nedeni olan **Göç;** çözeltideki iyonlar ve elektrotlar arasındaki elektrostatik çekim (elektrik alanı etkisi) nedeniyle iyonların elektroda doğru hareket etmesine denir. Yükün bu hareketiyle potansiyel ile de artan bir akım meydana getirir.

Konveksiyon; karıştırma, sarsma veya sıcaklık değişimi gibi mekanik yollarla bir elektrokimyasal hücredeki iyonların elektroda taşınmasıdır. Konveksiyon işlemi elektrot yüzeyindeki 10^4-10^7 A^0 civarında olan difüzyon tabakasının kalınlığını azaltır ve böylece konsantrasyon polarizasyonu azalır. Ayrıca sıcaklık veya yoğunluk farkı ile oluşan doğal konveksiyon da çözeltiden elektroda veya elektrottan çözeltiliye olan molekül taşınmasına yardımcı olur.

Elektrot yüzeyine veya elektrot yüzeyinden bir maddeyi taşımak için, difüzyon, göç veya konveksiyonun etkileri Eşitlik 1'deki akımı elde etmeye yeterli değilse istenmeyen konsantrasyon polarizasyonu oluşur. Bu durumda beklenen akımın elde edilmesi için reaksiyon türüne göre çok daha negatif veya pozitif potansiyel uygulanması gerekmektedir. Buna rağmen polarizasyon bazı reaksiyonlarda istenen durum olabilmekte ve analitik metodun temelini oluşturabilmektedir (Ör: Voltametik reaksiyonlar).

1.1.3.2.2. Kinetik Polarizasyon

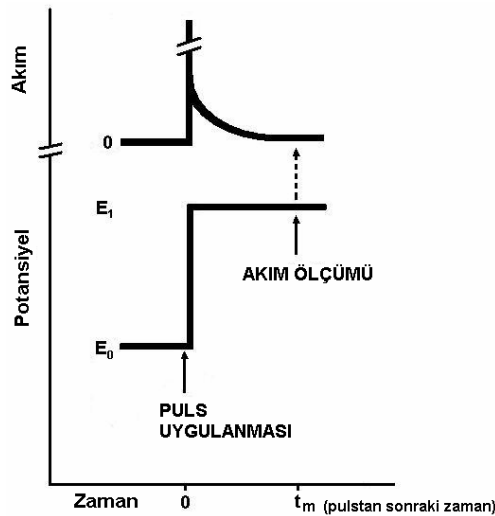
Elektrokimyasal hücredeki reaktiflerle elektrotlar arasındaki elektron aktarım hızı ile ilgilidir. Polarizasyonu önlemek için ilave bir potansiyel veya aşırı gerilim uygulamak gerekir. Genellikle gazların olduğu reaksiyonlarda gözlenen kinetik polarizasyon, civa gibi yumuşak metalleri içeren elektrotların kullanıldığı sistemlerinde de sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Kinetik etkiler, sıcaklığın artırılması veya elektrot yüzeyinin cm^2 'si başına düşen akımın azaltılması ile azaltılabilir.

Aşırı gerilimin etkileri ohmik direnç ile birleşince galvanik bir hücrenin potansiyelinin teorikte beklenilenden çok daha küçük olmasına ve hücrede istenilen akımın elde edilmesi için bu duruma paralel şekilde çok daha büyük potansiyellerin uygulanmasını gerektirir. Elektrokimyasal hücrede hidrojen veya oksijenin oluşumu 1Volt veya bazen daha fazla aşırı gerilim yaratır, bu durum bir metalin birikmesi veya çözünmesi ile ilgili reaksiyonlarda ihmal edilebilirken, moleküler düzeydeki elektrokimyasal reaksiyonlarda önem taşımaktadır.

1.1.4. Voltametri ve Esasları [86]

1920'li yılların başında Çekoslovak Kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından bulunan ve polarografiden geliştirilen voltametri, bir indikatör veya çalışma elektrodu polarize olduğunda, akımın uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanılarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik metoda denir. Genellikle polarizasyonu sağlamak için voltametride yüzey alanı birkaç milimetrekare veya bazılarında birkaç mikrometrekare olan mikroelektrotlar çalışma elektrodu olarak kullanılır. Analit ölçüm sırasında minimum miktarda harcanır ve elektrokimyasal hücrede *tam konsantrasyon polarizasyonu* şartları altında akım ölçülür. Gerilimin ölçülen akım değerine karşı grafiklenmesi ile voltamogram elde edilir. Potansiyel ölçümüne dayanan bir elektrokimyasal yöntem olan potansiyometride ise ölçümler akımın sıfıra yaklaştığı ve konsantrasyon polarizasyonunun olmadığı şartlarda gerçekleştirilir.

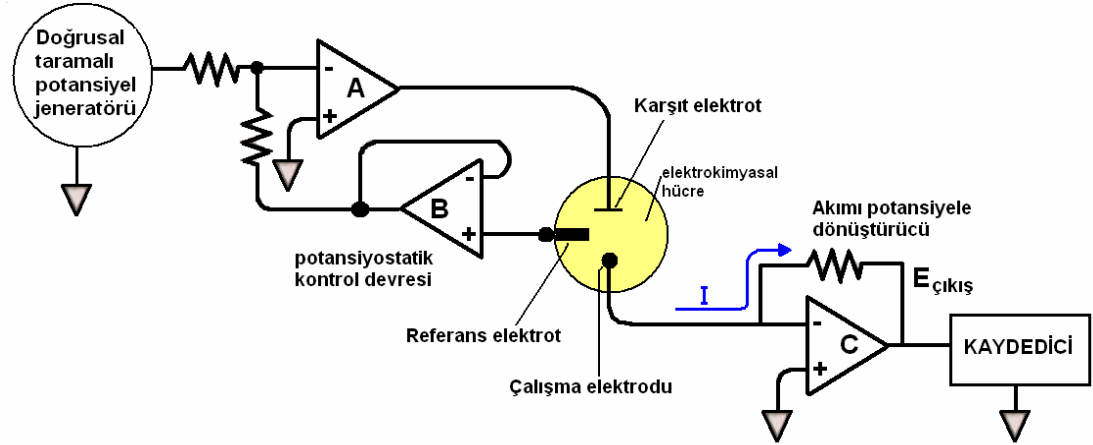
Voltametride ölçümler puls potansiyelinin uygulanmasından sonra, akım sabit değere ulaştığında gerçekleştirilir [259].



Şekil 8: Diferansiyel puls voltametrisinde akım ölçümü.

1.1.4.1. Voltametrik Cihazlar:

Voltametrik ölçümler yapılmasında kullanılan modern bir cihazın bileşenleri Şekil 9’da görülmektedir[6,86].



Şekil 9: Voltametrik ölçümlerde kullanılan modern bir cihazın elektriksel yapısı.

Şekildeki üç-elektrotlu potansiyostattaki elektrokimyasal hücre, analit ve reaktif olmayan destek elektroliti içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan oluşmaktadır. Akım ölçme devresi hücrenin çalışma elektroduna bağlanmıştır. Referans elektrot bir potansiyel izleyicisi ile irtibatlandırılmıştır. Bu potansiyel izleyicisi hücreden hiçbir akım çekmeden referans elektrodun potansiyelini sürekli olarak gösterir. Üçgen şekli ile ifade edilen işlemsel yükselteçlerin görevleri; elektrokimyasal hücredeki sayım ve çalışma elektrotları arasındaki akımı sağlamak, referans elektrot ile çalışma elektrodu arasında akım sağlamak ve referans elektrot ile çalışma elektrodu arasındaki potansiyel farkını doğrusal-taramalı potansiyel üreticinin belirlediği potansiyelde tutmaktır.

Sistemin çalışmasında, doğrusal-taramalı potansiyel jeneratörü, referans ve çalışma elektrotları arasındaki potansiyeli doğrusal olarak tarar. Hücredeki akım 3.

işlemsel yükseltici (en sağda) tarafından sürekli olarak izlenir. Kaydediciden hemen önceki $E_{\text{çıkış}}$ potansiyeli kaydedici tarafından bilgisayara sunuş için gönderilir [193].

Voltametricde destek elektrolit, analit çözeltisine fazla miktarda eklenen tuzdur. En çok tercih edilen tuzlar analit tayininde kullanılan potansiyelde elektrotla reaksiyona girmeyen alkali metal tuzlarıdır. Elektrotlardan biri olan **çalışma elektrodu (indikatör elektrot)**, analitik reaksiyonun meydana geldiği ve zamanla potansiyeli analit konsantrasyonundaki değişimlerle beklenen şekilde değişen elektrottur. **Referans elektrot**, analit çözeltisinin bileşiminden bağımsız sabit bir elektrot potansiyeline sahip yarı hücredir ve anot olarak ele alınır (Genellikle doymuş kalomel veya bir gümüş/gümüş klorür elektrot). Referans elektrodu içeren kontrol devresinin elektrik direnci çok büyüktür ($>10^{11} \Omega$), bu nedenle bu devreden hemen hemen hiç akım geçmez. İdeal bir referans elektrot, tersinirdir ve Nernst eşitliğine uyar, zamanla potansiyeli değişmez, sıcaklık değişimlerinde küçük bir değişim gösterir. Ayrıca elektrotta küçük bir akım değişimi olduğunda kısa bir süre sonra orijinal potansiyeline geri döner.

Diğer bir elektrot olan **karşıt elektrodun** çalışma elektrodunda oluşan reaksiyona ve ölçüme etkisi yoktur, bu elektrot çalışma elektroduyla bir çift oluşturur onu elektronlarla besler, ayrıca ortamda oluşabilecek istenmeyen akımların üzerinden geçmesine izin verir. Sinyal kaynağından çıkan elektriğin çözeltiden geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlamaktadır. **Potansiyostat** ise, çalışma elektrodunun potansiyelini istenen değerde tutan bir cihazdır.

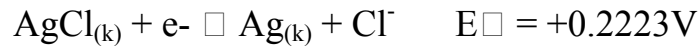
1.1.4.2. Voltametri de Kullanılan Referans Elektrotlar (Karşılaştırma Elektrotları) [6, 86, 96, 291, 344]

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

* **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.

En yaygın olan ve içersinde doymuş KCl çözeltisi bulunan *Doygun Kalomel Elektrot* (DKE)'tur. Potansiyeli, Standart Hidrojen elektroduna(SHE) göre $25^{\circ}C$ de + 0.244 V olarak bulunmuştur. Diğer kalomel elektrotlara oranla sıcaklık katsayısı daha büyüktür.

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



şeklinde olup yarı tepkime potansiyeli;

$$E = E^{\circ}_{AgCl/Ag} - (RT/nF) \log a_{Cl^-} \text{ şeklinde yazılır.}$$

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

*** Civa-Civa(1)Sülfat Referans Elektrot:**

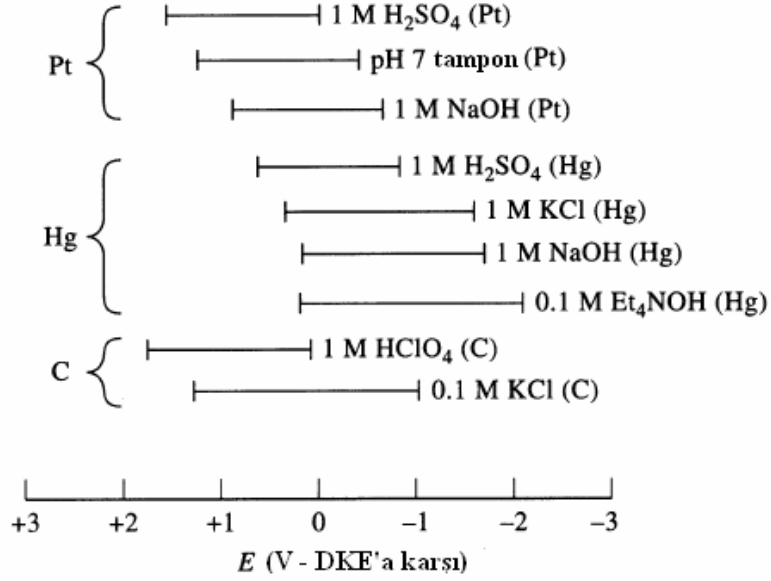
Bu elektrot, doygun kalomel elektroda benzemektedir. Potansiyeli, sülfat iyonlarının aktifliği ile tayin edilir.

Bir referans elektrot, kolay hazırlanabilmeli, potansiyelin sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olmalı, belli bir akım aralığında tersinir davranmalı, yani içinden küçük akımlar geçtiğinde bile gerilimi sabit kalmalıdır. Polarize edilemeyen bir elektrot olmalı, potansiyeli zamanla değişmemeli, doğru ve tekrarlanabilen bir potansiyel değeri hızlı bir şekilde okunmalıdır.

1.1.4.3. Voltametricde Kullanılan Çalışma Elektrotları (İndikatör Elektrotlar):

Voltametric 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 biyosensör tasarımları için en uygun şekilde geliştirilmektedir. Yaygın olarak civa, karbon ve metal elektrotlar (platin ve altın) voltametricde kullanılmaktadır.

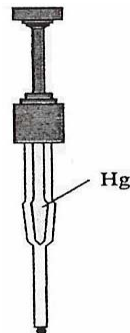
Bu tür elektrotların kullanıldığı potansiyel aralığının tespiti çok önemlidir. Özellikle de bu potansiyel aralığı, sulu çözeltilerde sadece elektrot malzemesine değil, aynı zamanda bu elektrotların daldırıldığı çözeltilerin bileşimine bağlı olarak da değişir. Pozitif potansiyel sınırları genellikle moleküler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



Şekil 10: Çeşitli çözeltiler içerisinde platin, civa ve karbon elektrotların güvenle kullanılabildiği potansiyel aralıkları [7, 16].

1.1.4.3.1. Civa Elektrotlar [6]:

Civa elektrotlarının voltametrde çalışma elektrodu olarak kullanılma nedenleri arasında, negatif potansiyel sınırının çok yüksek olması, kolayca oluşturulabilen yeni bir civa damlası ile taze bir metalik yüzey oluşturulabilmesi ve pekçok metal iyonunun bir civa elektrodunun yüzeyinde amalgam oluşturmak suretiyle tersinir olarak indirgenbilmesini mümkün kılması sayılabilir.



Şekil 11: Damlayan civa elektrodu.

Sakıncaları ise, civanın +0,4V gerilimde kolayca yükseltgenmesidir; bu özelliğinden dolayı bu metalin anot olarak kullanılması son derece sınırlıdır. Ayrıca, civa toksik bir metal olması nedeniyle, kullanımını zahmetlidir.

Civa elektrotlarının çeşitleri:

Disk elektrot

Asılı civa damla elektrot (HMDE)

Damlayan civa elektrot

Durgun civa damla elektrot

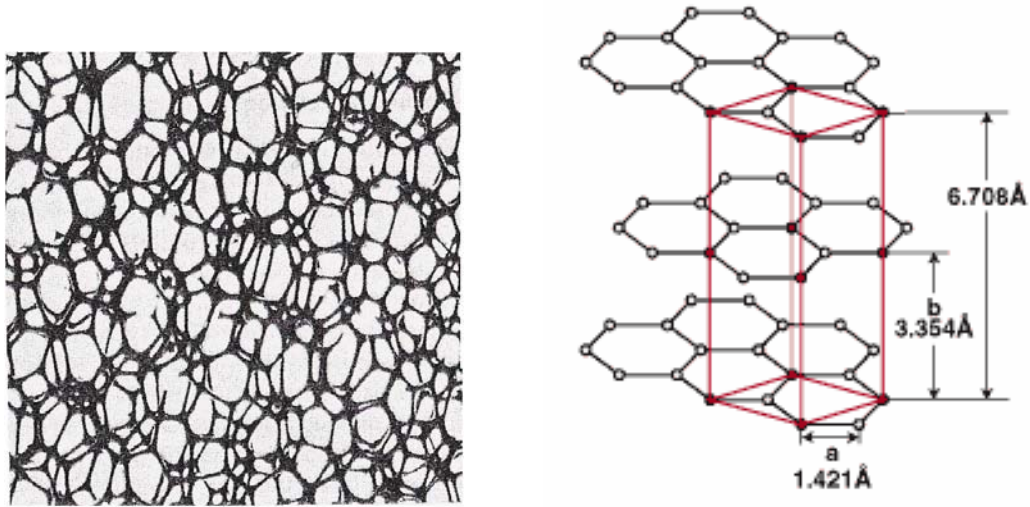
Bu elektrotlardan HMDE, en sık olarak dönüşümlü voltametrde ve sıyırma analizlerinde kullanılan çalışma elektrodudur, sakıncası ise, yükseltgenebilir bileşiklerin analizleri için kullanılamamasıdır.

1.1.4.3.2. Karbon Elektrotlar

Elektrokimyasal analizlerde geniş potansiyel aralığı, düşük zemin akımı, ucuzluk, kimyasal inertlik ve çeşitli algılama ve tayinlere uyarlanabilirlik gibi özelliklere sahip olan karbon elektrotlar, katı elektrotlar içerisinde çok yaygın bir kullanım alanına sahiptirler. Buna karşın, elektron transfer oranı metal elektrotlara oranla düşüktür çünkü bu oran elektrot yüzeyinin yapısal özelliğinden etkilenmektedir [16, 225]. En yaygın kullanılan karbon elektrot materyalleri, camsı karbon(glassy carbon), karbon pastası, karbon fiber, karbon filmler, karbon kompozit (grafit epoksi, ... vb.) dir.

1.1.4.3.2.1. Karbon Pastası Elektrodu (CPE)

Grafit tozu ile mineral yağın(nujol, parafin yağı, silikon yağı ve bromonaftalen vb.) çeşitli oranlarda karıştırılması ile elde edilen karbon pastasının 3mm çapında cam boru içerisine yerleştirilmesi ve içerisinden iletken tel geçirilmesiyle elektrot elde edilir. Kolaylıkla yüzeyinin yenilenebilmesi ve çeşitli tür maddelerin modifiye edilebilmesi, çok düşük maliyetli olması, düşük zemin akımına sahip olması nedenleriyle tercih edilmektedir [256, 260, 302, 380]. Grafit tozunda bulunan karbon moleküllerinin düzlemsel ve aromatik halkalar halinde dizilimi Şekil 12' de görülmektedir. Zayıf π bağları ile birbirine bağlanmış olan bu tabakalar arasında hızlı bir elektron alışverişi olabilmektedir.

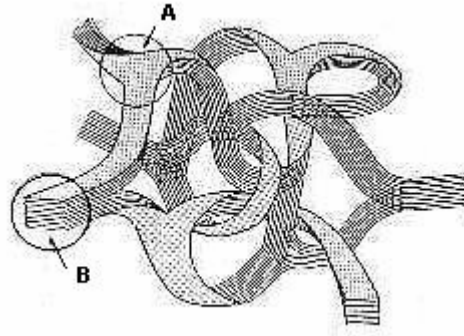


Şekil 12: Grafit'in moleküler kimyasal yapısı [154].

CPE'nin en önemli sakıncası, yeterli miktarda organik çözügen içeren çözeltilerde kullanıldığı zaman, karbon pastası çözeltide dağılmaktadır. Laboratuvarımızda 7:3 ; grafit : yağ oranı kullanılmaktadır.

1.1.4.3.2.2. Camsı Karbon Elektrotlar (GCE): [68, 235]

GCE, ticari olarak elektrot üretimine uygun olmamasına rağmen, çok iyi mekanik ve elektriksel özelliklere sahip olması ve geniş bir potansiyel aralığı olması, kimyasal tepkimelere girmemesi ve genellikle tekrarlanabilir yüzeyler sağlaması nedeniyle sıkça kullanılmaktadır. Kolayca kırılabilen ve sert bir madde olması dolayısıyla, Camsı karbon, fenol / formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin 1000°C - 3000°C arasında basınç altında karbonizasyona uğratılması ile elde edilir. Şekil 13'te de görüldüğü gibi camsı karbon yüksek yoğunluğa sahip, küçük porlar içeren amorf bir yapıdır. Birbirinin içine geçmiş, ince, grafit benzer şeritlerden oluşmuştur.

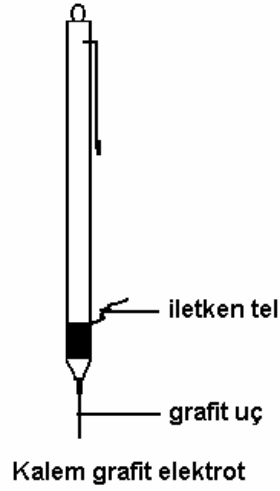


Şekil 13. GCE'nin amorf yapısı (A) Kuvvetli bağlar, (B) Zayıf bağlar.

Karbon pastası elektroduna göre elektrokimyasal yanıt özellikleri yüzeyin çok daha pürüzsüz ve düzgün olması nedeniyle daha iyidir. Bunun yanısıra GCE yüzeyinin fiziksel dayanıklılığı daha yüksektir.

Elektrodun performansı elektrokimyasal, kimyasal, ısı veya lazer yöntemleriyle yüzey aktivasyonu yapılarak artırılabilir.

1.1.4.3.2.3. Tek Kullanımlık Kalem Grafit Elektrotlar (PGE): [359]

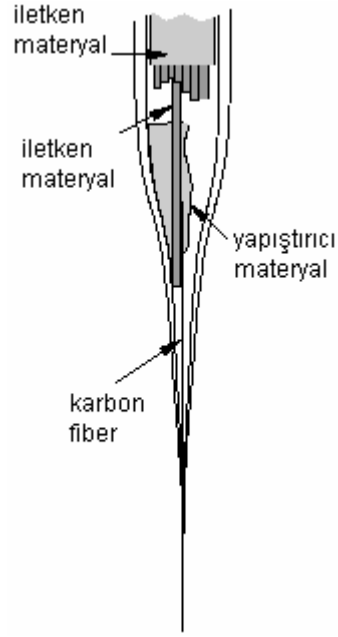


Şekil 14: Kalem grafit elektrodun şematik olarak yapısı.

Geleneksel ve yaygın kullanıma sahip karbon pastası elektrodu ile karşılaştırıldığında kalem grafit elektrot, tek kullanımlık olması ve kolayca yenilenebilen yüzey sağlaması gibi yararları sahiptir (mekanik yenilenebilirlik). Özellikle son yıllarda tekrarlanabilirliğinin daha iyi olması, daha düşük tayin sınırı, ucuzluk ve mikroçip teknolojisine uygulanabilirlik özellikleri nedeniyle bu elektrodun kullanılmasına artan bir ilgi bulunmaktadır.

1.1.4.3.2.4. Karbon fiber elektrotlar: [54]

Günümüzde ultramikroelektrot kullanımına artan ilgi, karbon fiber elektrotlarının yaygın şekilde elektrokimyasal analizlerde kullanılmasına yol açmıştır.

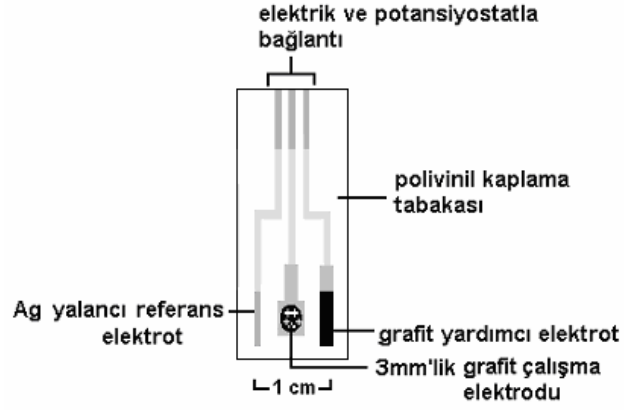


Şekil 15: Karbon fiber elektrodun yapısı [405].

Karbon fiber, yüzde doksandan fazla oranda karbon atomlarından oluşur. Voltametrik tayinlerde karbon fiber elektrotlar, özellikle elektriği çok iyi iletmeleri ve çok düşük gürültü sinyali gibi yararları olması nedeniyle kullanılırlar. Ayrıca in-vivo analizlerde de kullanılabilirler.

1.1.4.3.2.5. Tek kullanımlık perde baskılı karbon(grafit)elektrotlar(SPCE):

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 [213, 219, 220].

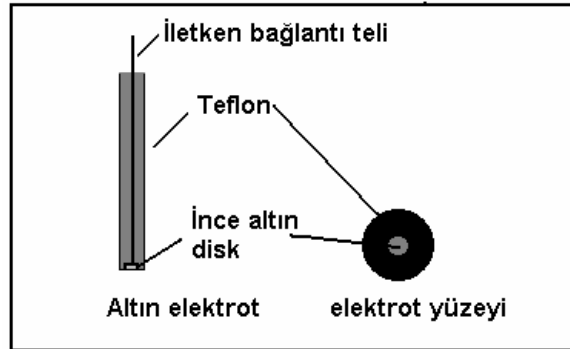


Şekil 16: Tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrodun (SPCE) yapısı.

1.1.4.3.3. Metal Elektrotlar:

Platin ve altın en çok tercih edilen elektrot tipleridir.

1.1.4.3.3.1. Altın Elektrot:

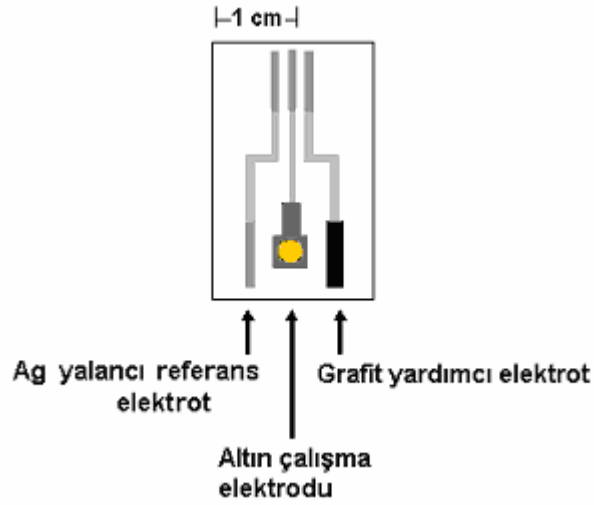


Şekil 17: Katı altın elektrodun yapısı.

Bu elektrotlar yüksek elektron transfer kinetiklerine ve geniş bir pozitif potansiyel aralığına sahiptirler. Bakır ve nikel elektrotlar ise amino asitlerin ve karbonhidratların tayininde kullanılmaktadır.

1.4.3.3.2. Tek Kullanımlık Perde Baskılı Altın Elektrotlar (Au-SPE) [51]

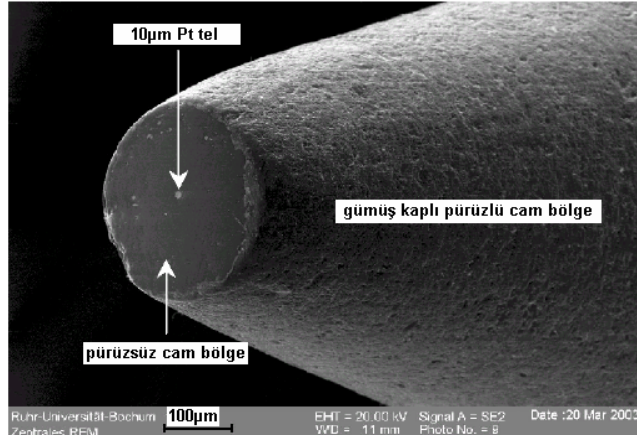
Tek kullanımlık metal elektrotlar da tayinlerde başarıyla kullanılmaktadır. Toz haldeki altın partiküllerinin uygun bir polimer yardımı ile plastik zemine tutturulması ve üzerininin polivinil bir kaplama tabakasıyla örtülmesi ile altın perde baskılı elektrotlar elde edilir [386].



Şekil 18: Perde baskılı altın elektrodun yapısı.

1.1.4.3.4. Mikro Elektrotlar: [347-349]

Son on yıl içerisinde, boyutları mikroeletrotlardan daha küçük olan elektrotların tasarımı gerçekleştirilmiştir. Çapları 50 μm 'den daha küçük olan bu tip elektrotlara ultramikroeletrotlar denilmektedir. Çeşitli elektrokimyasal amaçlar için kullanılmaktadırlar.



Şekil 19: Ultramikroelektrodun mikroskoptaki görüntüsü [349].

1.1.4.3.5. Membran Elektrotlar (İyon Seçici Elektrotlar):

İlk olarak 1906'da pH tayini için farklı hidrojen iyonu konsantrasyonlarına sahip iki çözeltiyi ayıran ince cam membranın iki cam yüzeyi arasında oluşan potansiyelin ölçümüne dayalı elektrot geliştirilmiştir. Halen bu konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir [119]. Hidrojen iyonuna karşı cam membranların seçiciliği ve duyarlılığının anlaşılmasından sonra diğer iyonlara karşı seçici davranan başka tip cam membranların geliştirilmesine yol açmıştır [41, 63, 95, 189].

1.1.4.3.5.1. Sıvı Membran Elektrotlar: [6]

Bazı anyonların ve birçok katyonun doğrudan potansiyometrik ölçümü için bu elektrotlar geliştirilmiştir. Bir sıvı membran elektrodun potansiyeli, analit çözeltisi ve analitin iyonu seçici olarak bağlayan bir sıvı iyon değiştirici arasındaki ara yüzeyde ortaya çıkar. Örneğin, kalsiyum iyon sıvı-membran elektrodu, fizyolojik araştırmalar için oldukça değerli bir araçtır çünkü bu iyon sinir sinyallerinin iletiminden sorumludur, iletim sinir hücrelerinden bu iyonun taşınmasıyla gerçekleşmektedir.

Ayrıca kemik oluşumu, kas erimesi, kalp büyümesi ve kasılma, böbrek boşaltım fonksiyonu, hipertansiyon gibi olaylarda çok önemli rol oynar. Bu olayların pek çoğu kalsiyum iyon konsantrasyonundan çok aktivitesinden etkilenir, aktivite membran elektroduyla ölçülebilen bir parametredir.

1.1.4.3.5.2. Kristalin-Membran Elektrotlar: [6]

Bazı camların katyonlara gösterdiği ilgi göz önüne alınarak benzer şekilde anyonlara karşı seçici özellik gösteren katı membranların geliştirilmesi çalışmaları yapılmıştır. Cam yüzeyindeki anyonik merkezlerin katyonlara göstermiş olduğu seçimliliğe dayanılarak katyonik merkezlere sahip membranların anyonlara karşı seçici davranması da beklenmiştir. Örneğin, gümüş halojenürün preslenmesiyle hazırlanmış membranlar klörür, bromür ve iyodür anyonlarının seçimli tayini için kullanılmaktadır.

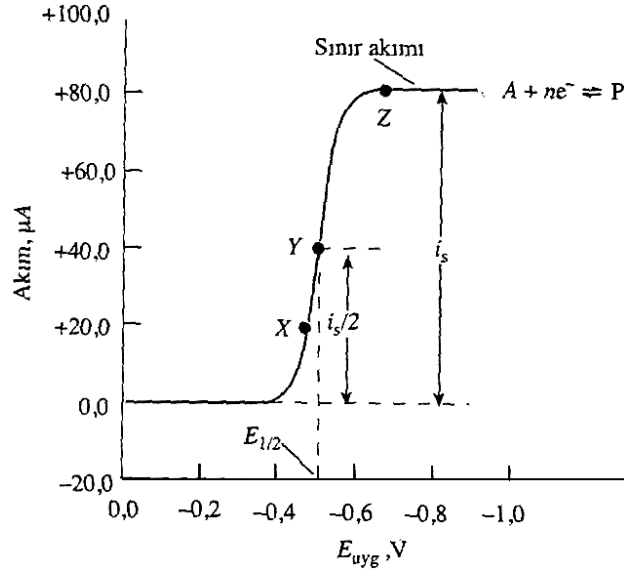
1.1.4.4. Voltamogramlar: [6]

Mikroelektrot yüzeyinde bir A türünün P türüne indirgendiği bir elektroliz için tipik bir doğrusal taramalı voltamogram görülmektedir. Geleneksel olarak katodik akımlar daima pozitif, anodik akımlarsa negatif işaretle gösterilir.

Mikroelektrottaki yarı-reaksiyon;



Genellikle doğrusal taramalı voltamogramlar sigmoidal eğriler (S şeklinde) şeklindedir. Bunlar voltametrik dalga olarak bilinir. Keskin artıştan sonraki sabit akıma *sınır akımı*, i_s , denir.



Şekil 20: Doğrusal taramalı voltamogram eğrisi [6].

Akım, analizlenecek maddenin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızıyla sınırlıdır. Sınır akımları genellikle analizlenecek madde konsantrasyonuyla doğru orantılıdır ve bu yüzden

$i_s = k \cdot C_A$ şeklinde yazılabilir. Burada C_A , analit konsantrasyonu ve k ise bir sabittir. Kantitatif doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye dayanır.

Yarı-dalga potansiyeli, akımın sınır akımının yarısına eşit olduğu potansiyele denir ve $E_{1/2}$ ile gösterilir. Yarı-dalga potansiyeli, yarı-reaksiyonun standart potansiyeli ile yakından ilgilidir fakat genellikle ona eşit değildir.

Çözelti veya elektrodun sürekli hareket içinde olduğu doğrusal taramalı voltametriye **Hidrokinamik Voltametri** adı verilir. Damlayan civa elektrodunun kullanıldığı voltametriye **Polarografi** denir.

Elektrot sistemine gerilim uygulandığında kapasitif akım ve Faradayik akım olmak üzere 2 çeşit akım oluşur [6].

1-Faradayik olmayan akım (Kapasitif akım) (i_c) : Elektrot/çözelti ara yüzeyindeki yüklü bir çift tabakada oluşan bir yükleme akımıdır. Bir elektrodun bir

elektrolit çözeltisine daldırılması ve negatif yükle yüklenmesiyle çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin ara yüzeyin 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 dahi bir akım oluşur. Bu akım reaksiyona bağlı değildir; sistemden kaynaklanır ki bu akıma kapasitif akım denir. Ne kadar düşük olursa, o kadar doğru ölçüm yapılır. Kapasitif akım fon akımın oluşmasına neden olan etkenlerden biridir.

2-Faradayik akım (i_f): Bir elektrokimyasal hücrede elektrot/çözelti ara yüzeyi boyunca bir yükseltgenme/indirgenme işlemiyle taşınan akımdır. Reaksiyondan (analiz edilecek maddeden) kaynaklanan akımdır.

$i = i_f + i_c$ 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.

1.1.4.5. Voltametrik Akımlar:

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

$$i = nFD_A (\partial C_A / \partial X)$$

şeklinde bir ifade ile verileceği gösterilebilir. Burada:

I = Amper cinsinden akımı,

n = Analitin molü başına elektronların mol sayısını,

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

A = cm² cinsinden elektrot yüzey alanını,

D_A = A' nin cm²s⁻¹ cinsinden difüzyon katsayısını,

C_A = mol/cm³ cinsinden A'nın konsantrasyonunu göstermektedir.

Oluşan difüzyon akımın zamana karşı fonksiyonu **COTTRELL denklemini**

$$i = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}}$$

verir.

n = reaksiyonda alınan/verilen elektron sayısı

F = Faraday sabiti (96,500 C mol⁻¹)

A = elektrot alanı (cm²)

D = difüzyon katsayısı (cm² s⁻¹)

C = konsantrasyon (mol cm⁻³)

Taramalı voltametrinde katı elektrot kullanılarak elde edilen anodik veya katodik pikin maksimum akım değerinin hesaplanması: [16, 86]

Taramalı voltametrinde elde edilen pikin maksimum akım değeri , i_p ,Randles-Sevcik eşitliği ile verilir .Tersinir bir elektrokimyasal tepkime için bu eşitlik verilmiştir.

$$\dot{I}_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C$$

\dot{I}_p = Anodik veya katodik pik akımı (A)

n = transfer edilen elektron sayısı

A = Elektrot yüzey alanı (cm²)

D = Elektroaktif türlerin difüzyon katsayısı (cm²/sn)

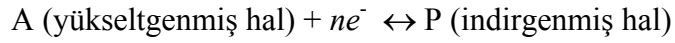
V = Tarama hızı(V/sn)

C = Elektroaktif türlerin konsantrasyonu (mol/cm³)

Uygulanan sabit bir tarama hızında, i_p değeri analit derişimi ile doğru orantılıdır, bu sayede nicel analiz yapılabilir. Tarama hızı arttırıldığında, faradayik akım tarama hızının karekökü ile, yükleme akımı ise tarama hızı ile orantılı olarak artar. Özetlenecek olursa, tarama hızının arttırılmasıyla yüksek duyarlılığın elde edilmesi mümkün değildir.

1.1.4.6. Elektrokimyasal bir tepkimede Faradayik işlemler

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



A ve P, sırasıyla, tepkimede redoks çiftinin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade etmektedir. Elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişimi $[C_A(0,t)$ ve $C_P(0,t)]$, Nernst denkleminde göre saptanmaktadır.

$$E = E^0 + \frac{2,3 RT}{nF} \log \frac{C_A}{C_P}$$

E^0 = Redoks tepkimesi için standart potansiyel

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

T = Sıcaklık (^0K)

n = Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

F = Faraday sabiti (96,487 coulombs)

Elektrot ara yüzeyinde 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.

1.1.4.7. Polarografi : [6, 86]

Polarografi, ilk bulunan ve kullanılan voltametri tipidir ve elektrot olarak damlayan civa elektrodunun kullanılmaktadır.

Destek elektrolite ait polarogramın incelenmesi, ortamda analizlenecek madde yokken bile hücrede *artık akım* adı verilen küçük bir akımın oluştuğunu gösterir.

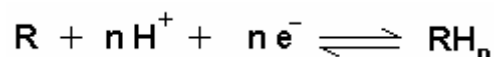
Sınır akımları; akımın büyüklüğü analizlenecek maddenin elektrot yüzeyine taşınma hızı ile sınırlı olduğu zaman gözlenir. Difüzyonla kütle aktarımı olduğu için polarografik sınır akımlarına genellikle *difüzyon akımları* denir ve i_d ile gösterilir. Difüzyon akımı analizlenecek madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Artık akımların oluşma sebeplerinden biri olarak safsızlıkların indirgenmesi ve bu safsızlıkların içinde az miktarda çözünmüş oksijen, damıtık sudan gelen ağır metal iyonları ve destek elektrolit olarak kullanılan tuzdaki safsızlıklar sayılabilir.

Polarografik yöntemlerde doğruluk ve duyarlık, faradayik olmayan artık akımın büyüklüğüne bağlıdır ve doğru bir sonuç elde etmek için artık akımın etkisini giderme yoluna gidilir.

Polarografide pH'nın etkisi:

Bazı organik ve inorganik madde reaksiyonları aşağıdaki gibi ifade edilir:



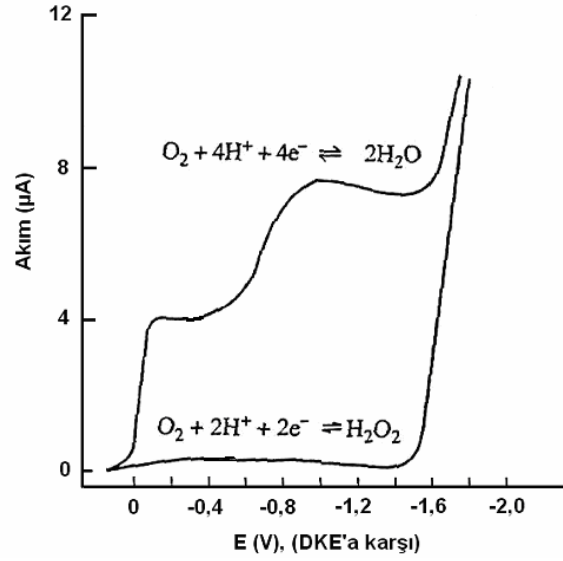
R, analitin yükseltgenmiş şekli ve RH_n de indirgenmiş şeklini göstermektedir. Bu tip bileşiklerin yarı-dalga potansiyelleri denklemden de anlaşılacağı gibi önemli ölçüde pH' ya bağlıdır; pH'nın değişimi, reaksiyon sonucunda oluşan ürününün değişmesine bile sebep olabilir. Bu nedenle analit çözelti çok iyi şekilde tamponlanmalıdır. Eğer bu işlem yapılmazsa, elektrot yüzeyindeki çözeltinin pH' sı büyük oranda değişebilmektedir. Bu değişimler, reaksiyonun indirgenme potansiyelini etkiler ve iyi bir görünümü olmayan yayvan eğrilerinin elde edilmesine neden olur. Ayrıca, özellikle organik maddelerle yapılan polarografide tekrarlanabilir yarı-dalga potansiyelleri ve difüzyon akımları elde etmek için iyi bir tamponlama yapmak genellikle çok önemlidir.

Puls Polarografisinin Uygulamaları:

Doğrusal taramalı polarografi, geçmişte birçok biyolojik ve biyokimyasal madde ile çok sayıda inorganik ve organik türün nicel analizinde kullanılmıştır. Günümüzde ise yüksek duyarlılık, kolay uygulanabilirlik ve seçicilik gibi özelliklere sahip olan puls yöntemleri, klasik doğrusal taramalı yöntemin tamamen yerini almış durumdadır. Kantitatif analizlerde, kalibrasyon eğrileri, elde edilen pik yüksekliklerinin analit derişimine karşı grafiğe geçirilerek elde edilir. Bazı durumlarda kalibrasyon eğrileri yerine standart katma yöntemleri kullanılmaktadır.

Oksijen Dalgaları [6]

Çözünmüş oksijen, çeşitli mikroelektrotlarda kolaylıkla indirgenir; hava ile temasta olan (hava ile doyurulmuş) sulu çözeltide oksijene ait iki ayrı pik gözlenir (-0,1V ve -0,9V civarında); bunlardan birincisi oksijenin peroksite indirgenmesinden oluşur, diğeri ise hidrojen peroksitin indirgenmesine aittir.



Şekil 21: Hava ile temasta olan (hava ile doyurulmuş) sulu çözeltide oksijene ait pikler.

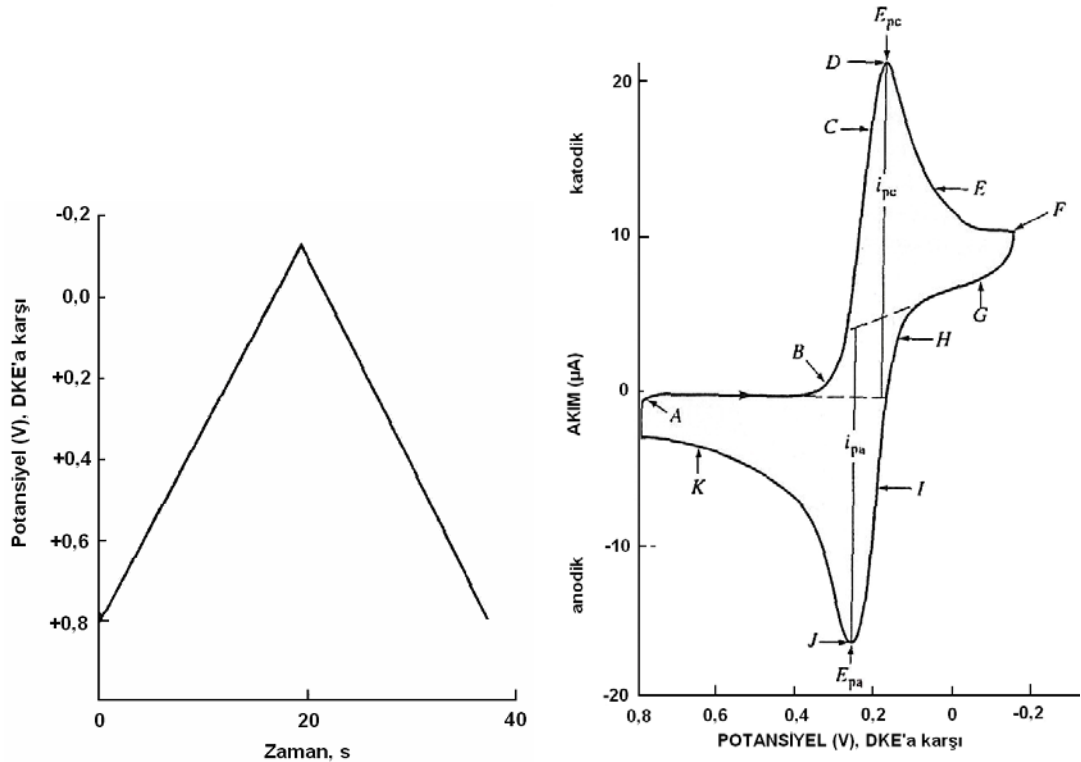
Voltametik olarak çözeltide çözülmüş oksijenin tayini için bu reaksiyonlara dayalı yaygın olarak kullanılan metod geliştirilmiştir. Fakat oksijenin varlığı diğer türlerin doğru olarak tayininde sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenle çözeltiden inert bir gaz (ör: azot) geçirilerek çözeltide çözülmüş gazların uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirilir. Oksijenin yeniden absorpsiyonunun önlemek için analiz süresince azot gazı çözelti yüzeyinden geçirilir.

1.1.4.8. Voltametricte kullanılan uyarma sinyalleri ve teknikler:

Çalışma elektrodu içeren elektrokimyasal bir hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali, yöntemin dayandığı karakteristik bir akım cevabını oluşturur. En çok kullanılan tekniklerden üçü detaylı olarak aşağıda açıklanmıştır.

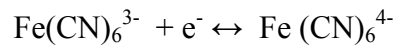
1.1.4.8.1. Dönüşümlü voltametri (CV): [86, 227]

Dönüşümlü voltametri, günümüze kadar katı elektrotlarla yapılan çalışmalarda en çok kullanılmış olan tekniktir. Uygulanan uyarma sinyali ile önce üçgen şeklinde dalga hareketi ile bir maksimuma kadar doğrusal olarak artar sonra aynı eğimle orijinal değerine doğrusal olarak azalır. Başlangıç taramasının yönü, numunenin bileşimine bağlı olarak, negatif veya pozitif olabilir. Daha negatif potansiyeller yönündeki tarama *ileri tarama*, zıt yöndeki tarama da *ters tarama* olarak adlandırılır. Genelde çevrim hızı, 1ms - 100 s arasında veya daha uzun süre gibi geniş bir aralıktadır. Sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı belirli bir aralıkta akımdaki değişim grafiğe geçirilerek **Dönüşümlü Voltamogram** elde edilir.



Şekil 22: Dönüşümlü voltametri uyarma sinyali ve elde edilen yanıt.

Dönüşümlü voltametri ile karıştırılmayan bir çözeltide (durgun sistemde) elektrodun akım cevabı üçgen dalga şekilli potansiyel ile uyarılır. Potansiyel önce doymuş kalomel elektroda karşı $-0,15V$ 'a kadar doğrusal olarak değiştirilir, sonra tarama yönü tersine çevrilerek ilk potansiyel değerine $+0,8V$ 'a kadar getirilir. Burada hızı difüzyon tayin eder. Analitin yükseltgenmesi ve indirgenmesi Şekil 22'de sağdaki voltamogramda gözlenebilmektedir. Burada $6mM$ potasyum ferrisiyanür ($K_3Fe(CN)_6$) ve $1M$ potasyum nitrat (KNO_3) çözeltisinin dönüşümlü uyarma sinyaline verdiği akım cevabı görülmektedir. Çalışma elektrodu durgun bir platin mikroelektrot ve referans elektrot da bir doymuş kalomel elektrottur. $+0,8V$ 'luk başlangıç potansiyelinde zayıf bir anodik akım gözlenmiş ve tarama devam ettikçe hemen sıfıra düşmüştür. Bu ilk negatif akım, suyun yükseltgenerek oksijen vermesi sonucu oluşur. $+0,7$ ve $+0,4V$ potansiyelleri arasında hiç akım gözlenmez çünkü bu potansiyel aralığında indirgenebilir veya yükseltgenebilir türler yoktur. Potansiyel biraz daha düşük pozitif değere ($0,4V$) geldiğinde, heksasiyanoferrat (III) iyonunun heksasiyanoferrat (II) iyonuna indirgenmesi nedeniyle bir katodik akım gözlenir (B noktası). Burada, katotta aşağıdaki reaksiyon gerçekleşir:



B'den D'ye kadarki bölgede $Fe(CN)_6^{3-}$ nin yüzey derişimi gittikçe azalırken, akımda hızlı bir artış olur. Katodik pikin en yüksek değere ulaştığı potansiyel (E_{pc}) yaklaşık olarak $+0,18V$ 'tur. Pik akımı iki bileşenden meydana gelir. Biri, başlangıçtaki yükleme akımı artışıdır. İkincisi ise normal difüzyon kontrollü akımdır. Sonra ilk akım, difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça hızla azalır (D noktasından F noktasına). $-0,15V$ 'luk noktada (F) tarama yönü çevrilir. Bununla beraber, tarama daha pozitif potansiyellere doğru olduğu halde akım katodik olmaya devam eder. Çünkü, potansiyeller halen $Fe(CN)_6^{3-}$ 'nin indirgenmesine yetecek kadar

negatiftir. Potansiyel yeteri kadar pozitif olduğunda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 'nin indirgenmesi daha fazla devam etmez, akım sifıra gider ve sonra da anodik olur. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey yakınlarında biriken $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'nin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik yapar ve sonra biriken $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 'nin anodik reaksiyon yoluyla kullanılmasıyla azalır.

Bir dönüşümlü voltamogramın önemli parametreleri , katodik pik potansiyeli E_{pc} , anodik pik potansiyeli E_{pa} , katodik pik akımı i_{pc} ve anodik pik akımı i_{pa} 'dır. Bu parametrelerin nasıl bulunacağı Şekil 22'de sağ kısımda gösterilmektedir.

Yarı dalga potansiyeli $E_{1/2} = (E_{pa} + E_{pc})/2$ olarak hesaplanmaktadır.

Tersinir bir elektrot reaksiyonu için anodik ve katodik pik akımları mutlak değer olarak yaklaşık eşittir, fakat zıt işaretlidir ve pik potansiyellerinin farkı $0,0592/n$ 'dir. Burada n, yarı-reaksiyonda yer alan elektron sayısıdır.

Dönüşümlü voltametri doğru akımdaki gibi kapasitif akımın en küçük olduğu bölgede çalışılır. Fakat sistemin duyarlılık 10^{-5} M ile sınırlıdır. Dönüşümlü voltametri, miktar tayinine dayalı bir yöntem değildir ama analizlenecek maddenin hangi potansiyelde nasıl davranış gösterdiği hakkında bilgi verir. Elde edilen bilgiler doğrultusunda maddenin en iyi yanıtı verdiği bölge (potansiyel) bulunur.

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 gerilim farkı ΔE_p ile ifade edilir.

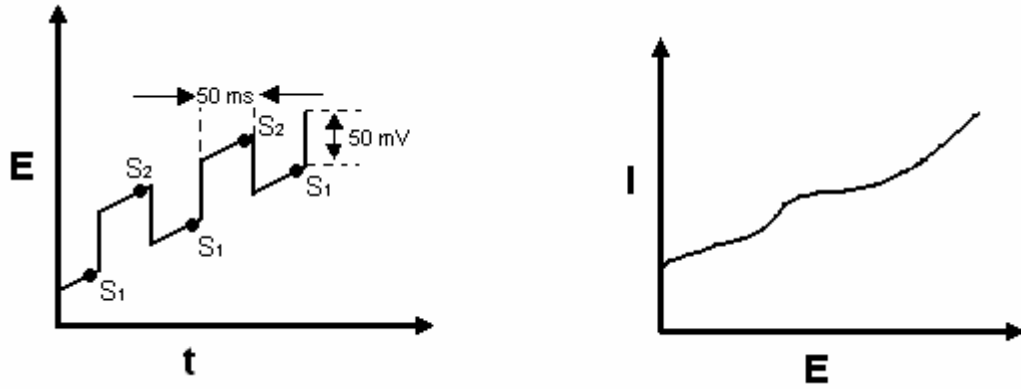
$$\Delta E_p = \frac{57}{n} mV$$

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

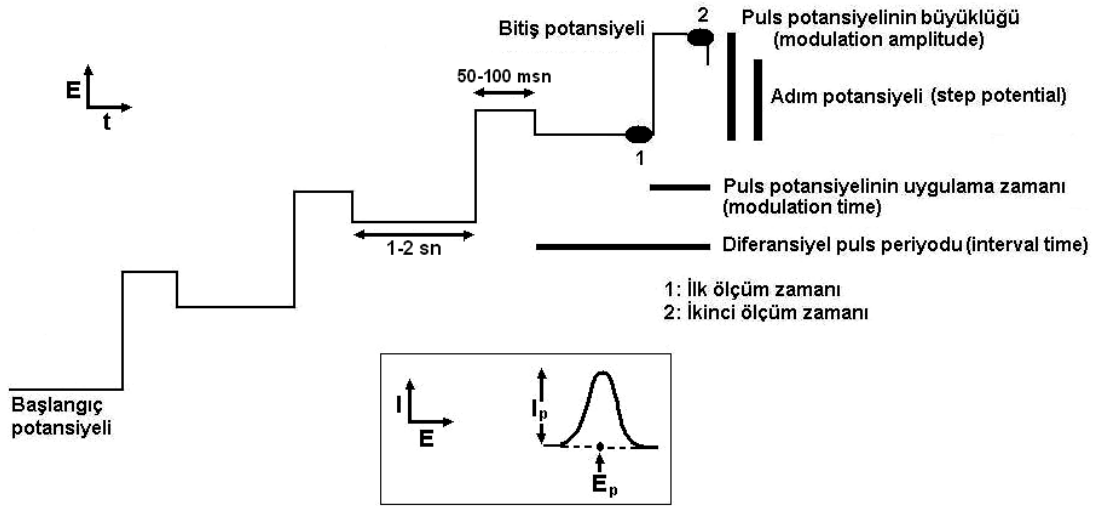
Dönüşümlü voltamogram alınırken zemin akımı, analitle elde edilen akımdan çıkartılır. Yükseltgenme/indirgenme olayları elektrot yüzeyinin hemen yakınındaki Nernst difüzyon tabakasında gerçekleşir. Difüzyon tabakasındaki bu olaylar ana çözeltideki analit konsantrasyonuna bağlıdır (çözelti fazı). Analit elektrot yüzeyine kaplandığında ise yükseltgenme/indirgenme olayları analitin tamamını ifade etmektedir (elektrot yüzeyi). Bu durumda tarama hızı mümkün olduğunca yavaş olmalıdır.

1.1.4.8.2. Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) [6]:

Bu teknikte, yarı-dalga potansiyelleri 0,04-0,05 V kadar farklı olan maddeler için bile pik maksimumları elde edilebilmektedir.



Şekil 23-A Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali.



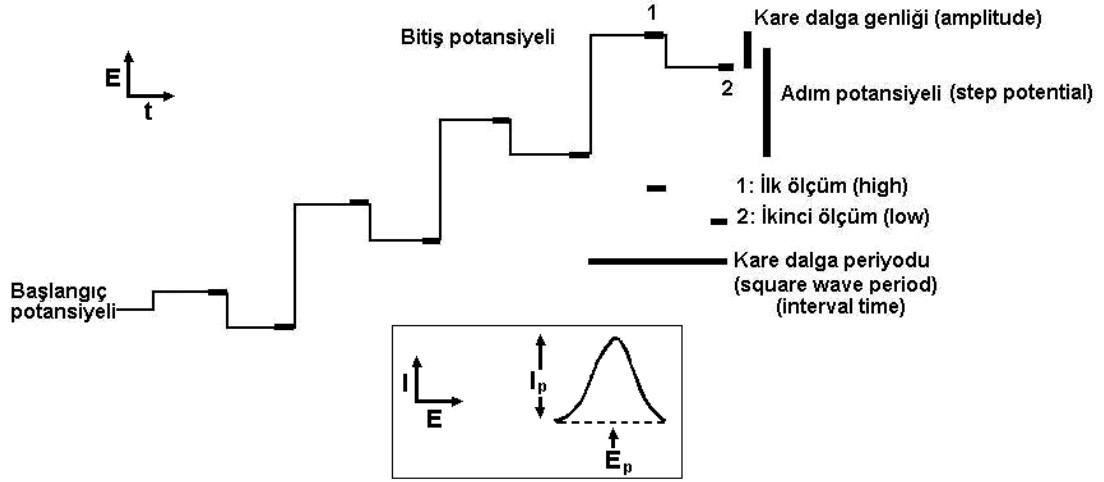
Şekil 23-B Dijital cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali [11].

Şekil 23-A analog, Şekil 23-B ise dijital cihazlarda kullanılan diferansiyel puls uygulamasını göstermektedir. Şekil 23-B’de bir puls ile basamaklı sinyal üst üste bindirilmiş durumdadır. Her iki sistemde, diferansiyel puls voltamtrisinde akım ölçümü iki bölgede yapılmaktadır. Dijital sistemde bunlardan birincisi doğru akım (dc) puls uygulamasından 16,7 ms önce (1), diğeri ise pulsun sonundan 16,7 ms sonra (2) yapılır. Puls başına akımdaki fark(ΔI_p) doğrusal olarak artan potansiyelin bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Elde edilen diferansiyel eğri pik şeklinde olup yüksekliği konsantrasyonla orantılıdır. Tayin sınırı bu yöntemde $10^{-8}M$ ’dır. Bu yüksek duyarlılığın sebebi faradayik akımın artması, faradayik olmayan yüklem akımının ise azalmasıdır. Puls uygulandığı anda faradayik olmayan akımda görülen ilk dalgalanmanın ölçüme etkisini en aza indirmek için iki akım ölçümü alınır. Böylece sinyal/gürültü oranı artar ve duyarlılık artar.

$$\text{Modülasyon (puls) potansiyelinin uygulama zamanı} = \frac{\text{adım potansiyeli}}{\text{tarama hızı}}$$

Diferansiyel puls voltametri tekniği, ağır metal iyonlarının eser derişimlerinin tayini gibi bir çok alanda kullanılmaktadır.

1.1.4.8.3. Kare Dalga Voltametri (SWV):



Şekil 24: Dijital cihazlarda kare dalga voltametri için kullanılan uyarma sinyali [11].

Kare dalga voltametri son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğüne sahip bir tekniktir. Voltamogramın tamamı 10ms den daha az sürede elde edilir. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından birkaç voltametrik ölçümün ortalaması alınarak analizin kesinliğini arttırmak mümkündür. Tayin sınırları 10^{-7} - 10^{-8} M arasındadır. Elde edilen akımlar arasındaki fark, Δi ; 1 gerilimindeki akımdan, 2 gerilimindeki akım değeri çıkarılarak bulunur. İleri puls bir katodik akımını (i_1) geri puls da bir anodik akımını (i_2) oluşturur. Genellikle voltamogramları elde etmek için Δi 'ler ile grafik çizilir. Akımlar arasındaki bu fark, konsantrasyonla doğru orantılıdır. Daha ayrıntılı puls ve kare dalga voltametri bilgileri için Eccles G.N. ve Osteryoung J.'nin yapmış olduğu çalışmalar incelenebilir [258].

Sıyırma Yöntemleri:

Yöntemde önce analizlenecek madde, karıştırılan bir çözeltide 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 yöntemleri* adını almıştır.

Anodik sıyırma işleminde elektrot, biriktirme basamağında katot olarak, analizlenecek maddenin başlangıçtaki haline yükselttiği sıyırma basamağında ise, anot olarak davranır. Katodik sıyırma yönteminde ise anodik sıyırmanın tersine bir durum söz konusudur.

Eser element tayininde sıyırma yöntemleri önemli yer tutmaktadır, çünkü elektrolizdeki önderiştirme basamağı sayesinde eser miktardaki bir analizlenecek madde tayini başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilir. Böylece 10^{-6} - 10^{-9} M derişimine sahip çözeltilerin analizi yapılabilir.

1.2. Biyosensörler

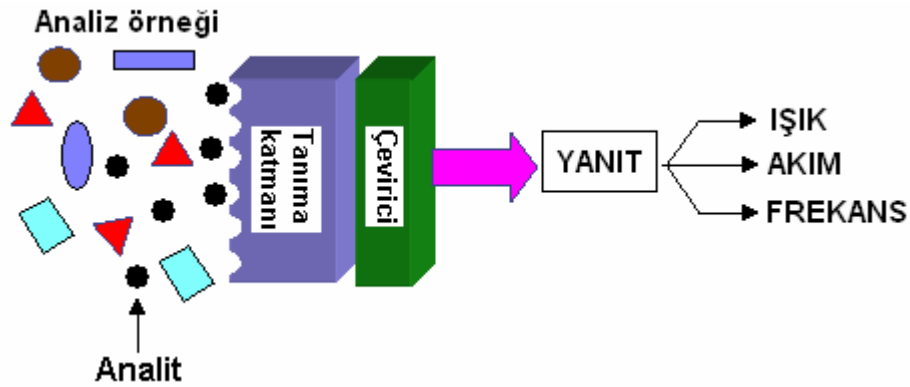
Biyosensörler (biyo-alıcılar, biyolojik dedektörler), biyolojik kaynaklı bir tanıma yüzeyi ve fizikokimyasal çevirici sisteminden oluşan, biyolojik moleküller kullanılarak diğer biyolojik molekülleri, direkt veya indirekt olarak saptayabilen cihazlardır. Diğer bir tanımla, biyoaktif materyaller içeren ve biyolojik ortamlarda bulunan çeşitli maddelerin analizi için kullanılan analitik cihazlardır.

Elektrokimyasal sensörler (elektrokimyasal algılayıcı sistemler) Analitik Kimya'da oldukça yaygın kullanımı olan cihazlardır. Bu cihazlara IUPAC tarafından literatürde getirilen tanım ise şu şekildedir:

“Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlara elektrokimyasal sensörler denir ” [48]. Bu sensörler, yapılarına enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb. biyolojik maddelerin eklenmesiyle *BIYONSENSÖR* adını almışlardır [350].

Nitel ve nicel analiz yapabilen kompleks cihazlar olan biyosensörler, “biyo” (=biyolojik kökenli) ve “sensör” (= algılayıcı) kelimelerinden oluşmaktadır [62]. Diğer bir tanım ise; “Biri biyokimyasal, diğeri ise elektrokimyasal özellikte, birbiri içine geçmiş iki çeviriciden oluşan algılayıcı cihazdır” denilebilir.

Tayin genel olarak, analizlenecek molekül ile dedektör molekül bağlandığında, bağlanmanın çevirici sistemi ve bilgisayar tarafından ölçülebilen/ görüntülenebilen elektrik sinyaline dönüştürülmesi ile gerçekleşir [13, 55, 61, 65, 182, 293, 303, 307, 356, 421].



Şekil 25: Biyosensörün yapısı

Tüm biyosensörler, moleküler düzeyde algılama ve sinyal çevirimi olarak iki temel görevi yerine getirmektedirler.

Algılama Birimi (tanıma katmanı): Ortamda bulunan ve algılanması gereken kimyasal/biyolojik maddeyle etkileşerek, sinyal oluşmasına neden olan "biyolojik

arayüzey" algılama birimi olarak tanımlanır. Algılama birimi biyosensör için son derece önem taşıdığından seçici ve kararlı yapıda olması gereklidir. Biyosensörlere uygun şekilde tutuklanan enzim, antikor, hücre-membran reseptörleri, doku parçaları veya DNA gibi biyolojik maddeler, özgül şekilde bağlanacakları hedefle etkileşecek arayüzeyi oluşturur. Bu biyolojik materyallerden enzimler, DNA ve antikorlar nispeten uygulama kolaylığı sağlayan moleküllerdir. Doku parçaları canlı tutulmaları, beslenmeleri ve atıklarının uzaklaştırılması gereksinimi nedeniyle biyosensörlere spesifik olarak immobilize edilmeleri zordur.

Çevirici Birimi: Etkileşme sonucunda oluşan biyokimyasal ürün çevirici birimi tarafından okunabilir sayısal bir değere çevirilir Çevirici cihazlar, potansiyel, akım, ışık şiddeti, kütle veya ısı ölçerek biyosensör yüzeyinde meydana gelen biyokimyasal reaksiyon hakkında bilgi vermektedirler.

Biyolojik sensör tasarımında algılama biriminin niteliklerine göre çevirici teknolojisi üretmek gerekmektedir. Bu teknolojiler, iletkenlik, potansiyel, kapasite, ısı, kütle, ve optik sabit gibi özelliklerin kimyasal etkileşim sonucu değişimine uygun olarak seçilmektedir.

Çevirici alt birimi:

Elektronik Birimi: Çeviricilerin elektrik sinyal üretmesi için gerekli osilatör, fark devresi, işlemsel yükselteç devresi, besleme devresi gibi devrelerdir.

Biyosensörler spesifik olarak; her türlü biyolojik ajanın tayini, tıbbi/medikal analizler, çevresel kirlilik nedeni olan ajanların ve toksinlerin analizi gibi alanlarda kullanılmaktadırlar.

1.2.1. Biyosensörün yapısını oluşturan biyomateryaller ve çevirici sistemleri

Pek çok materyal biyosensör algılayıcı malzemesi olarak kullanılmıştır (Tablo 1). Bu malzemeler metallere, yarı-iletkenlere, iyonik bileşiklerden, moleküler kristallere, polimerlere ve enzim, antikor gibi biyolojik malzemelere pek geniş bir spektrum içermektedir.

Tablo 1. Biyosensörün yapısını oluşturan biyomateryaller ve çevirici sistemleri

Algılama biriminde kullanılabilir materyal	Çevirici sistemi
* Çeşitli enzimler (Enzim sensörleri)	* Elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, voltametrik yöntemlere dayalı, ve alan etkili (ISFET, chem FET))
* Antikorlar (İmmunosensörler)	
* DNA (DNA biyo/genosensörleri)	
* Peptidler	
* Bitki-Hayvan hücre veya dokuları (mikrobiyal sensör) [13, 55, 61, 293, 356]	* Optik (Surface plasmon resonance, floresans, yansıma, luminesans, kırılma indeksi)
	* Elektriksel (Yüzey etkinliği (MOS), Elektrolit iletkenliği)
	* Kütle duyarlı (piezoelektrik) (Piezoelektrik kristallerinin rezonans frekansı, yüzey akustik dalgaları)
	* Manyetik (paramanyetik)
	* Termal (Reaksiyon ısısı, Adsorpsiyon ısısı) [55, 61, 65, 209, 303, 307, 356]

İlk biyosensör 1962 yılında Clark ve Lyons [60] tarafından enzim elektrot yardımı ile glukoz tayinine yönelik olarak yapılmıştır. Biyosensörlerin o yıllarda başlayan gelişimi halen devam etmektedir. Biyosensör araştırmalarının adeta patlama yapmasının arkasındaki yönlendirici güç, ağırlıklı olarak dünyadaki önemli şirketlerin biyosensör teknolojisine yoğun ticari ilgi göstermesi ve bu alanda dünya pazarında yer almak istemeleridir.

Biyosensörlerin diğer geleneksel analitik cihazlardan çok daha yararlı yönleri bulunmaktadır:

- 1- Küçültülebilme özellikleri (taşınabilir cihaz haline getirilebilme, az miktarda örnekle analiz bölgesinde çalışma olanağı)
- 2- Hızlı cevap zamanı
- 3- Yüksek seçicilik (kompleks yapılı karışımlarda ayırma/saflaştırma yapılmaksızın analiz)
- 4- Kullanım kolaylığı (kullanımda uzman gerektirmemesi)
- 5- Ucuzluk [55, 61]

Tüm bu yararlar nedeniyle günümüzde kan glukoz ölçümü için kullanılan glukometreler dünya pazarının %85'ini oluşturmuştur [209, 246] ve piyasada birbiriyle yarışan 40 değişik firmanın glukometrelerine ulaşılması mümkündür (ROCHE Diagnostics, Bayer, Cygnus, Abbott Laboratories, LifeScan Inc., MiniMed, I-STAT Corp., Home Diagnostics bunlar arasındadır).

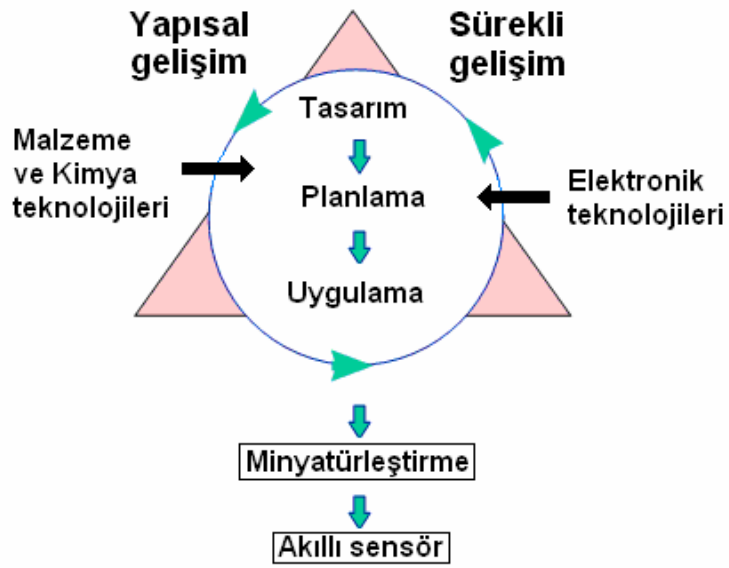
Günümüzde ulaşılması mümkün olan diğer ticari biyosensörler Affymetrix [1] ve Nanogen [230] firmalarınca geliştirilen nükleik asit tayinlerine yönelik biyosensörlerdir. Ayrıca kolesterol ölçümüne dayalı biyosensörler Oxford Biosensors ve Life Scan Inc. tarafından geliştirilmiştir.

Biyosensör teknolojisi ağırlıklı olarak tıp ve eczacılık alanlarına yönelik geliştirilmektedir fakat günümüzde çevresel, adli ve gıda kalitesinin araştırılması gibi pek çok alandaki analizler için de biyosensör tasarımları yapılmaktadır.

1.2.2. Biyosensör Tasarımı

Biyosensördeki algılama biriminde kullanılmak üzere geliştirilen materyallerin özelliklerine göre tasarımlar da farklılıklar göstermektedir [416].

Biyosensör tasarımını aşağıdaki tabloda özetlemek mümkündür:



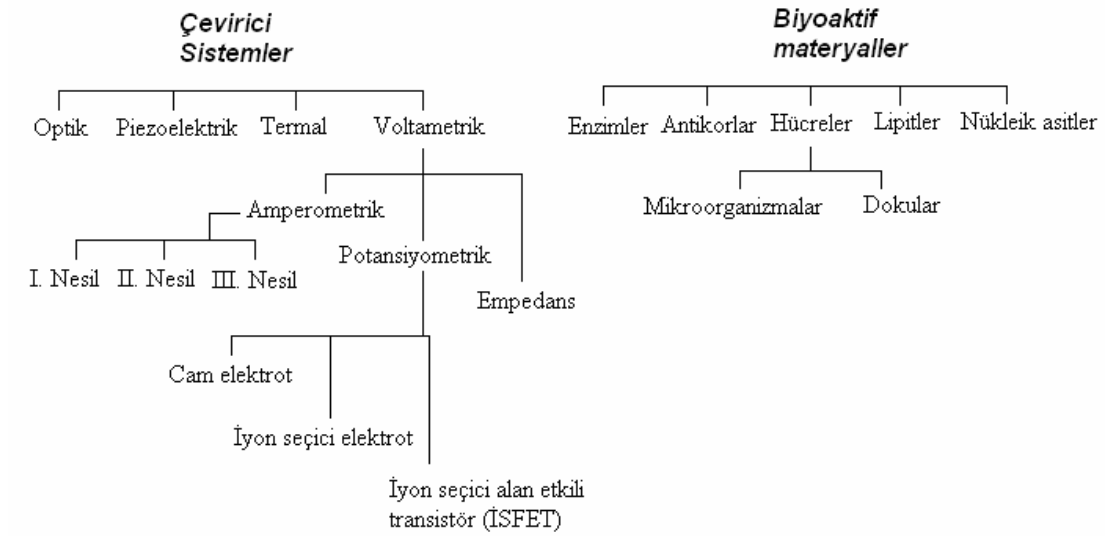
Şekil 26: Biyosensör sistemlerine genel bakış.

1.2.3. Biyosensörlerde Önemli Kriterler

Maliyet : Aletin maliyeti, reaktiflerin maliyeti.

Hassasiyet ve seçicilik: Hassas ve seçici aletlerin daha büyük, daha pahalı, daha yavaş olması.

Kullanım kolaylığı : Taşınabilir basit aletler Ar-Ge aşamasındadır, ayrıca bu cihazlar nispeten daha az hassas, daha az seçici, daha yüksek maliyetlidirler.



Şekil 27: Biosensör tasarımında günümüze dek kullanılmış olan çevirici sistemleri ve biyomoleküller.

1.2.4. Biosensörlerde algılama biriminde kullanılan fiziksel materyaller

1.2.4.1. Nanomateryaller ve nanoteknoloji [107, 175, 298]

Nanometre boyutlarında (1-100 nm) çeşitli özelliklere sahip malzemelerin, araçların ve sistemlerin geliştirilmesi/üretimi ile fiziksel, kimyasal, biyolojik olayların anlaşılması ve kontrol edilmesi nanoteknolojinin kapsamını oluşturmaktadır. Nanometre ölçekli olayların değerlendirilmesine yönelik algılayıcı cihazların geliştirilmesi ile bilim dünyası yeni ufuklara açılmaktadır. Nano boyutlardaki yapıların fiziksel analizi, nanometre büyüklüğünde malzemelerin fabrikasyonu, duyarlılığı nano seviyesine inebilen alet tasarımlarının yapılması,

bilimde makro dünya ve nano dünya arasında bağ kurulmasına yardımcı olacak yöntemlerin bulunması/ geliştirilmesi nanoteknolojinin başlıca konuları arasındadır.

Analitik kimya, her türlü analiz işleminde kullanılacak yöntemleri geliştirmeyi ve yöntemlerin çeşitli alanlardaki uygulamalarını kapsadığından analizlerde kullanılacak tüm malzemeleri konu edinir. Bilim dünyası yüksek kalitede, gittikçe küçülen, nano boyutlarda ileri teknoloji ürünleri ile moleküler düzeyde DNA analiz işlemleri yapma noktasına ulaşmıştır. Bu nedenle analitik kimyacılar nano-endüstrinin yapısına yönelik sorularına cevap verebilmek için eski analiz yöntemlerini değiştirirken, bir yandan da yeni teknolojiyle uyumlu analiz yöntemleri üretmektedir.

Gen teknolojisindeki gelişmelerle birlikte, nano-teknoloji de analitik tayin yöntemlerinin gelişme yönünü tayin etmeye devam edecektir.

Son yıllarda yapılan geniş çaplı araştırmalara bakıldığında nanoteknoloji alanında meydana gelen hızlı ilerlemeler çeşitli nano boyutlardaki materyallerin, sahip oldukları optik [40, 320] kimyasal [192] elektriksel [118, 137, 181] manyetik [362] ve mekanik [331] özelliklerinin değerlendirilmesine ve bilim dünyasında yepyeni tayin yöntemlerinin bulunmasına yol açmıştır.

Nanomateryallerin bileşimlerinin (inorganik-organik, metal-yarı iletken vs.) ve şekillerinin (partikül, çubuk, kablo, tüp, küp) farklı oluşu, yüzeylerinin fiziksel, kimyasal ya da biyolojik modifikasyonlara hazır oluşu, çeşitli fonksiyonel nano-ölçekli cihazların üretilmesini sağlamıştır [59, 66, 105, 282, 320, 345, 376, 394]. Bu üretim moleküler tanı, ilaç araştırma geliştirme, moleküler biyoloji ve hücre biyolojisi gibi alanlarda nanoteknoloji, biyoloji ve tıp bilimlerinin bütünleştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yeni tanı yöntemleri, klasik yöntemlere alternatifler getirmekle kalmayıp, tıp bilimine çok farklı bir bakış açısı kazandırmıştır

[4, 230, 285]. Genetik tanıya yönelik nanopartikül içeren biyosensörlerin geliştirilmesinden [71, 84, 203, 284, 364, 419] kuantum noktaların ve manyetik boncukların kullanımına [14, 366, 376, 414] kadar birçok alternatif malzeme bilim dünyasında yerini almıştır. Bunların yanı sıra çeşitli araştırmalar sayesinde farklı yöntemler kullanılarak tek boyutlu moleküler-kablolar ve karbon nanotüpler son birkaç yılda geliştirilmiştir [159, 313, 320, 327, 408, 418]. Biyosensörler bu iletken/ yarı iletken materyallerle birleştirildiğinde biyomateryal algılayıcı cihazların tasarımlarına imkan vermiştir.

1.2.4.2. Altın nanopartiküller

Altın nanopartiküller özellikle nanobiyoteknoloji alanında 40 yıldır kullanılmaktadır [66]. DNA analizlerinde ise son 10 yılda artan bir ilgi ile kullanılmaktadır [285]. Bu tip analizlerde genellikle nanopartikül yüzeyi oligonükleotitlerle kaplanarak biyotayinler gerçekleştirilmektedir [84, 237, 251, 280]. Dünyada bu çalışmaların öncüsü Chad Mirkin'dir. Mirkin ve arkadaşları altın nanopartikül immobilize edilmiş oligonükleotit kullanarak DNA analizleri gerçekleştirmişlerdir [132].

Nanopartiküllerin üretimi ve karakterizasyon işlemleri ise üzerinde hassasiyetle durulan diğer konulardır [138, 355].

Elektrokimyasal tayinlerde genellikle metalik nanopartikülün tayini esas alınmıştır [361]. Authier ve arkadaşları [10], yükseltgenmeyle altın nanopartikülün salınımını anodik sıyırma voltametriyle, Özsöz ve arkadaşları [263], tek kullanımlık kalem elektrot yüzeyinde hibridizasyonla bağlanan altın işaretli probun altın grubunun yükseltgenmesine dayalı tayinler yapmışlardır. Altın nanopartikül

yüzeyine gümüş çöktürülmesiyle elektrokimyasal analizler ise Wang ve arkadaşlarınca gerçekleştirilmiştir [111, 360, 361, 362].

Mirkin ve arkadaşları çip teknolojisine uygulanabilir şekilde oligonükleotit tutturulmuş altın nanopartiküller kullanarak elektriksel tayin gerçekleştirmişlerdir. İki mikroelektrot arası boşluk bölgesinde iletkenlik değişimine göre 0,5pM tayin sınırında analiz mümkün olmuştur [281].

1.2.4.3. Karbon Nanotüpler (CNTs)

Karbon nanotüpler, grafit tabakaların tüp şekline dönüşmüş halidir. Çapları birkaç nanometreden 10-20 nanometreye kadar değişebilen, boyları ise mikrometre seviyesinde olan hegzagonal karbon atom ağı olarak ifade edilebilecek materyallerdir [2,152, 159].

Karbon nanotüpler, çelikten 5 kat daha sert ve güçlü olmalarına rağmen aynı zamanda esnek yapıya sahip ve elektriği ileten yeni bir karbon türüdür. 1991 yılında Japon fizikçi Sumio Iijima'nın [158] rastlantı sonucu keşfettiği nanotüpler, taşıdıkları tüm bu özellikler nedeniyle günümüzde nanoteknoloji çalışmalarında kimyasal/biyolojik algılayıcılardan ilaç iletim sistemlerine kadar pek çok alanda kullanılmaktadırlar. Tek duvarlı ve çoklu duvarlı yapı özelliklerine sahip tüm karbon nanotüp türleri medikal biyoteknoloji alanındaki biyosensörlerin tasarımında yer almış durumdadırlar. Burada amaç yeni yaklaşımlarla hedef molekülün algılanması ve elde edilen yanıtın nanotüp yardımıyla zenginleştirilmesidir [15, 113, 204, 207, 323, 418].

1.2.4.4. Kuantum noktalar (Quantum dots)

1980'lerin ortalarında geliştirilen, yarı iletken özelliğe sahip, 2-100nm boyutlarında “Nanokristaller” olarak da bilinen kuantum noktalar; periyodik tablodaki II-VI, III-V veya VI-VIA gruplarındaki elementlerin atomlarından oluşan özel materyallerdir. Kuantum noktaları inorganik yarı iletken maddelerin yüzlerce veya binlerce atomundan oluşur. Boyutları kimyasal sentezleri sırasında nanometrik olarak düzenlenir. Yarı iletkenler, günümüzde özellikle elektrik-elektronik mühendisliği alanında çok önemli yere sahiptir ve türevlerinin elektriksel iletkenlikleri dışarıdan bir uyarı ile önemli miktarda değiştirilebilir. Taşıdıkları bu özelliklere bağlı olarak nanokristaller optik uygulamalarda ve çeşitli elektrik devrelerinin tasarımında kritik parçalar haline gelmiştir. Bu büyüklükte materyallerin davranışları da farklı olmaktadır ve bu da kuantum noktalarla yapılacak araştırmaları her geçen gün daha küçük materyallerle analiz yapmaya yönelik bilim ve teknoloji dünyasında bugüne dek görülmemiş çalışmalar arasına sokmaktadır.

Kuantum noktalarının toksisitesinin olmaması ve hücrelerde veya organizmalarda belli hedeflere yönlendirilebilme özelliklerinden dolayı biyolojik sistemlerde kullanılmaktadırlar. Hedeflerine bağlandıklarında ışık yayma floresans özelliği gösterirler. Kuantum noktalarının, biyolojik olarak en önemli özelliği, hücre içinde veya mikroskop altında çeşitli renklerde görünebilmeleridir.

Modern biyolojik analizlerde, sahip oldukları optik ve boyama özelliklerinin sayesinde birçok araştırma laboratuvarında işaretleyici olarak, hücre analizleri, gen ekspresyonları, medikal tanımlar, kanserli hücrelerin yapılarının aydınlatılması ve bir kanser ilacının hedeflenmesi gibi biyomedikal amaçlarla kullanılmaktadırlar [4, 14, 40, 124, 304, 362, 365, 366, 368, 376, 395, 403, 404, 406, 414].

1.2.4.5. Manyetik boncuklar (Magnetic beads):

Manyetik boncuk kullanılarak DNA analizleri de son dönemde ilgi gösterilen diğer bir konudur [87, 139, 269, 274, 367, 370, 374].

Belirli çap boyutuna sahip mikro manyetik boncuklar sıvı ortamda mıknatıs yardımıyla manyetik olarak ayrılmaya elverişlidirler. Mıknatısın manyetik etkisi uzaklaştırıldığında ise manyetik boncukların tekrar çözelti içerisine dağılmaları mümkündür [322]. Bu üstün ayırım özellikleri sayesinde manyetik boncuklar elektrokimyasal immunosensörlerde [108] ve floresans [73] yardımı ile DNA hibridizasyon tanısı uygulamalarında kullanılmaktadır. Manyetik boncuklar sahip oldukları manyetik özellik sayesinde ayrıca, tüm bazları hedeften farklı (rastgele) dizi ve bazı bazları hedeften farklı dizilerin hedef diziden ayırımını yüksek duyarlılıkla gerçekleştirirler [269, 367]. Elektrokimyasal DNA biyosensöründe manyetik boncuk kullanımına ilişkin Wang ve arkadaşlarının [367] çalışmasında meme kanserinin bir türünden sorumlu BRCA1 geninin tayini potansiyometrik sıyırma analizi ile gerçekleştirilmiştir. Streptavidin kaplı manyetik boncuklar ve biyotinle işaretli, inozin içeren DNA dizileri kullanılarak kalem grafit elektrot yüzeyinde işaretlemesiz tayin sistemi kullanılarak hibridizasyon öncesi ve sonrasında elde edilen guanin yanıtındaki değişim üzerinden tayin gerçekleştirilmiştir. Manyetik boncuklarla yapılan bir diğer çalışma ise Palecek ve arkadaşları [269] tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada enzimle işaretli ve manyetik boncukla bağlantılı olan immunosensör sistemi ile DNA hibridizasyonunun tayini pirolitik grafit elektrot kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 1-naftol sinyali, enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ve DNA hibridizasyonunu tayin eden elektroaktif ürün olarak ölçülmüştür. Manyetik boncukların HBV tayininde kullanıldığı çalışma ise Erdem ve

arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [87]. İndikatörsüz tayin sistemine dayalı bu çalışmada, manyetik boncuklar ilk defa HBV PCR örneklerinin tayininde kullanılmıştır.

1.2.5. Biyosensörde algılama biriminde kullanılan biyolojik materyaller

1.2.5.1. Enzimler

Canlı hücrelerdeki metabolik olayların tamamında yönetici rolü olan ve yüksek derecede özgüllüğe sahip protein katalizörlere enzim denilmektedir. Doğru enzimlerin varlığında, reaksiyonlar yüksek özgüllükle ve kolayca başarılabilir. Bu da enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek biyolojik tanıma yüzeyi olarak çeşitli biyosensörlerde kullanımı yönündeki çalışmaları ön plana çıkarmıştır. Biyosensörlerde enzimlerin kullanılması 1960'lı yıllarda glukoz tayinin yapılmasına ilişkin çalışmalarla başlamıştır. Enzimlerin kullanılması uygun sıcaklık ve pH koşullarına bağlı olduğundan ve enzimlerin kararlılıklarının düşük olması nedeniyle zordur. Ayrıca enzimin biyosensöre tutuklanmasının ve tutuklanma sonrasında kararlılığını sürdürmesinin de zorluğu tasarımı yapılacak biyosensörde dikkate alınması gereken en önemli unsurlardır [184]. Enzim biyosensöründe kullanılacak doğru tutuklama tekniğinin bulunmasıyla biyosensörün sağlamlığı arttırılabilmektedir. Organik çözelti ortamında gerçekleştirilen bazı çalışmalarda [190, 378, 384] enzim yanıtının çözelti cinsine ve konsantrasyonuna bağlı olduğu bulunmuştur. Uygun şartlar altında sıcaklığa karşı kararlılık gösteren enzim biyosensörleri de yapılmıştır [117]. Enzimle işaretli immunosensörler de günümüz bilim dünyasında yerlerini almışlardır [269].

1.2.5.2. Antikorlar [145, 150, 151]

Hayvansal organizmaların vücutlarına organik yabancı maddelerin(antijen) girmesi ve bu maddelerin bağışıklık sistemini harekete geçirmesi nedeniyle organizma tarafından maddeye karşı üretilen glikoprotein (şeker ve aminoasitlerden oluşmuş organik molekül) yapısında moleküllere antikor (İmmünglobulinler) denilmektedir. Bağışıklık sisteminin özgül hücreleri olan B-hücreleri tarafından üretilirler. Genel olarak antikor, İki kısa (L zinciri), iki uzun (H zinciri) olmak üzere dört polipeptid zincirinden oluşmuşlardır, Y harfi şekline sahiptirler ve zincirler disülfid bağları ile bir arada tutulmaktadır. Y'nin kolları antijen bağlama özelliğindedir. Antijen ve antikor birleşmesi özgüdür; bir antijen ancak oluşumuna neden olduğu antikor ile birleşebilir.

Antikor üretimi multidisipliner çalışma gerektiren bir konudur. Antikorlar, genellikle fare bağışıklanması, hücre izolasyonlarını ve antikor sentezleyen klonlama işlemini içeren işlemler ile üretilirler. Sağlık alanına 1975'te sunulan en eski biyoteknolojik ürünler olan monoklonal antikorlar hibridoma teknolojisi ile üretilmişlerdir. Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi ile insan kaynaklı veya insana özgü bölgeler içeren antikorlar üretilebilmektedir. Vektör olarak plazmitlerin kullanıldığı yöntem ise faj gösterim teknolojisidir. Ayrıca transgenik bitkilerde de antikor üretilebilmektedir.

Antikorlar özellikle SPR sistemlerinde tanıma katmanı olarak kullanılmaktadır. Çip yüzeyine tutturulmuş antikorlar ilgili antijenle etkileşirler ve etkileşimin özgün tayini cihaz ölçümüyle tespit edilir. Bu tip immunosensör çalışmaları halen devam etmektedir.

1.2.5.3. Aptamerler

Aptamerler, moleküler düzeyde bir hedefe bağlanma özelliğine sahip, RNA veya DNA gibi nükleik asitlerden oluşan makromoleküllerdir. Bu makromoleküller, protein veya oligonükleotid yapısında olabilirler ve hedef molekülünü diğer molekülden ayırmak için çok küçük yapısal farklılıklardan yararlanırlar.

Aptamerler laboratuvarlarda klasik moleküler biyoloji teknikleri ile üretiltikleri gibi kimyasal olarak sentezlenmeleri de mümkün olan moleküldür.

Nükleik asit kütüphanelerinden nükleik asitlerin seçilmesi ve üretilmeleri ise SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) adını almıştır. SELEX yönteminin üç ana basamağı vardır. Kütüphane oluşturulması, istenen aptamerin seçilmesi ve aptamer-hedef kompleksinin yapısal analizi [187].

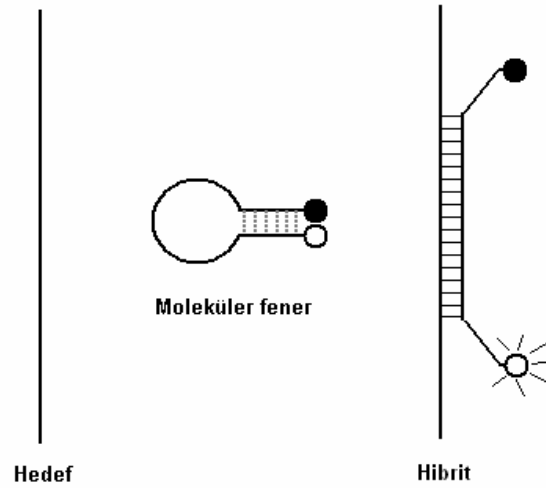
Aptamerler günümüzde biyoteknoloji uygulamalarına hizmet etmektedirler. Bunlar arasında; Biyosensör yapımı [43, 134, 255] tedaviye yönelik ilaç üretimi gibi konular yer almaktadır.

1.2.5.4. Moleküler Fenerler (Molecular Beacons): [39, 98, 99, 134, 160, 205, 287, 346]

Moleküler fenerler, ilk kez 1996 yılında [353] dünya literatürüne girmiş olan ve DNA'nın bir bölümünü temsil eden "prob" dizileri sınıfında yer alan fener şeklindeki baş ve gövde kısımlarından oluşmuş yapılardır [335]. Gövde kısmının sonlandığı iki uç bölgeden birinde floresan özellikte bir yapı (fluorophore) diğer uca ise söndürücü (quencher) bir yapı yer almaktadır. Kimya, biyoloji, biyoteknoloji ve tıbbi alanlarda biyomoleküler algılama işleminde geniş çapta kullanılan bu

hibridizasyon problemlerinin sentezinin kolaylaştırılması, moleküler seçiciliğinin ve yapısal toleransının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çözelti içerisinde aşağıda belirtilen serbest moleküler kendilerine özgü yapıyı oluştururlar. Uygun şartlar altında örneğin yeterli bağlanma derecesine ulaşıldığında ve ortamda hedef dizi varlığında fiziksel yapıları değişikliğe uğrar. DNA'ya spesifik bağlanma yapıları ve düşük zemin akımına sahip oluşları yararlıdır.

Bir moleküler fenerin çalışma mekanizması bir prize benzetilebilir. Başlangıçta floresans gözlenmez (kapalı konum). Hedef DNA parçasına özgül olarak bağlanma durumunda ise yapısal değişimle floresans yayınımlı olur (açık konum). DNA, RNA ve protein analizlerinde moleküler fener kullanımı yaygınlaşmaktadır [336].



Şekil 28: Moleküler fenerin çalışması

Moleküler fenerler özellikle moleküler tanı testlerinde yararlılığı arttıracak ve maliyeti düşürecek yeni bir araç olarak görülmektedir [352, 375, 415].

1.2.5.5. Nükleik asitler ve DNA: [27,81, 108]

İnsan genomu yaklaşık üç milyar DNA baz çiftinden oluşur. Genetik bilgiyi taşıyan DNA ve RNA'nın yapı taşlarını oluşturan nükleotitler hemen hemen tüm biyolojik olaylara katılırlar. Nükleotidler ve türevleri hücrede birçok molekülün biyo-sentezine katılırlar, enerji taşırlar, temel koenzimlerin parçasıdırlar ve birçok metabolik işlevi düzenlerler. Tüm bu önemli olaylar hücrenin genetik bilgisine dayandığından, nükleotidler genetik açıdan en temel molekül grubunu oluştururlar [81]. Nükleotidler pürin/primidin bazı, fosfat ve şeker gruplarından oluşan üç ana parçadan meydana gelmiştir.

Pirimidin halkasına sahip nükleotid bazları: Sitozin (C), timin (T) ve urasil (U) pirimidinli üç nükleotid bazıdır. Sitozinde C4'te $-NH_2$, timinde C5'te $-CH_3$, urasilde C4'te O ve N3 ile C4 atomları arasında çift bağ olup olmamasına göre birbirlerinden ayrılırlar.

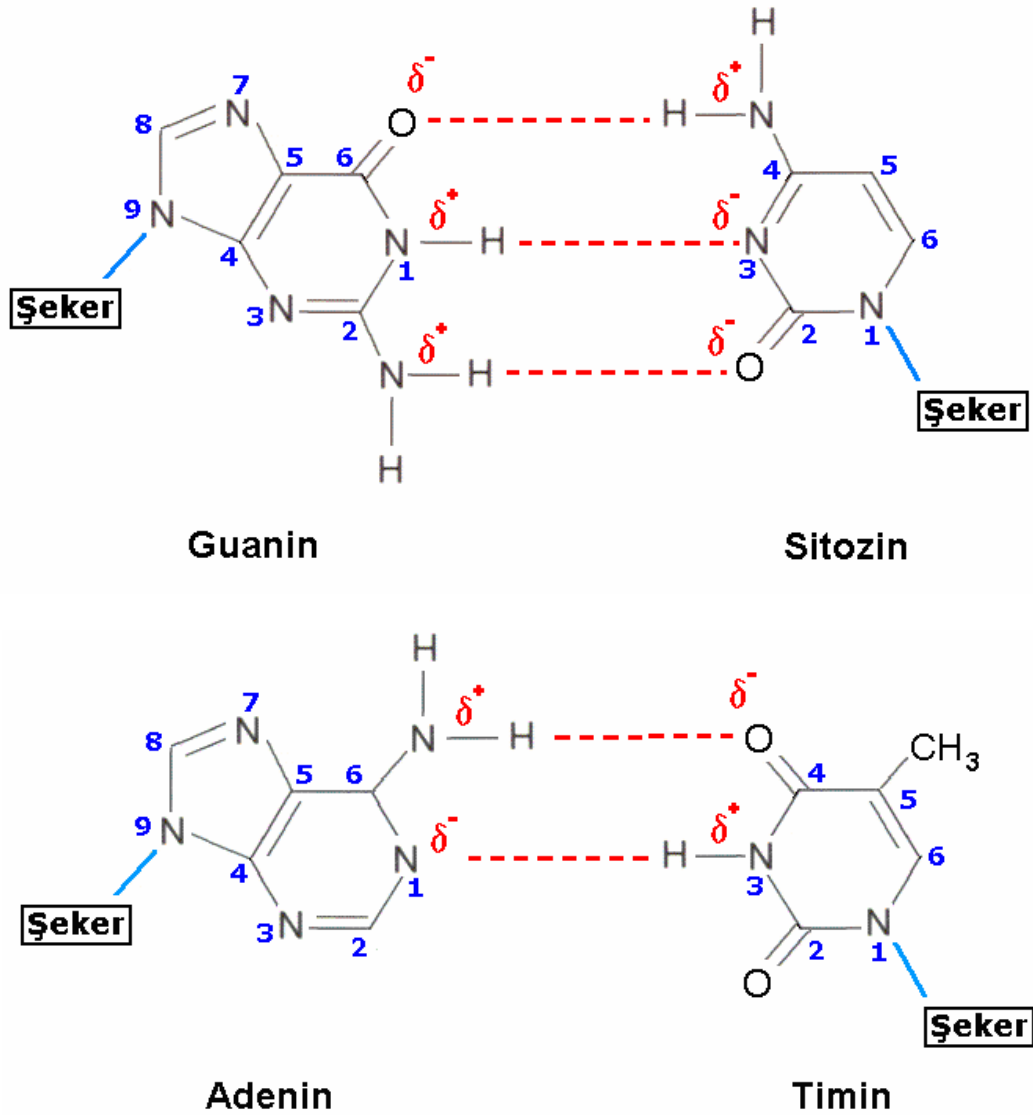
Pürin halkasına sahip nükleotid bazları: Adenin (A) ve guanin (G) iki pürinli nükleotid bazıdır. Yan dalları ve N1 ve C6 arasındaki bir çift bağ yönünden birbirlerinden farklılık taşımaktadırlar.

Fosfat grupları: Monofosfat (tek), difosfat (ikili) veya trifosfat (üçlü) olarak bulunabilmektedirler. Fosfat grupları pentoz (5C'lu) şekerlerin 5 numaralı karbon atomlarındaki hidroksil gruplarına bağlanırlar.

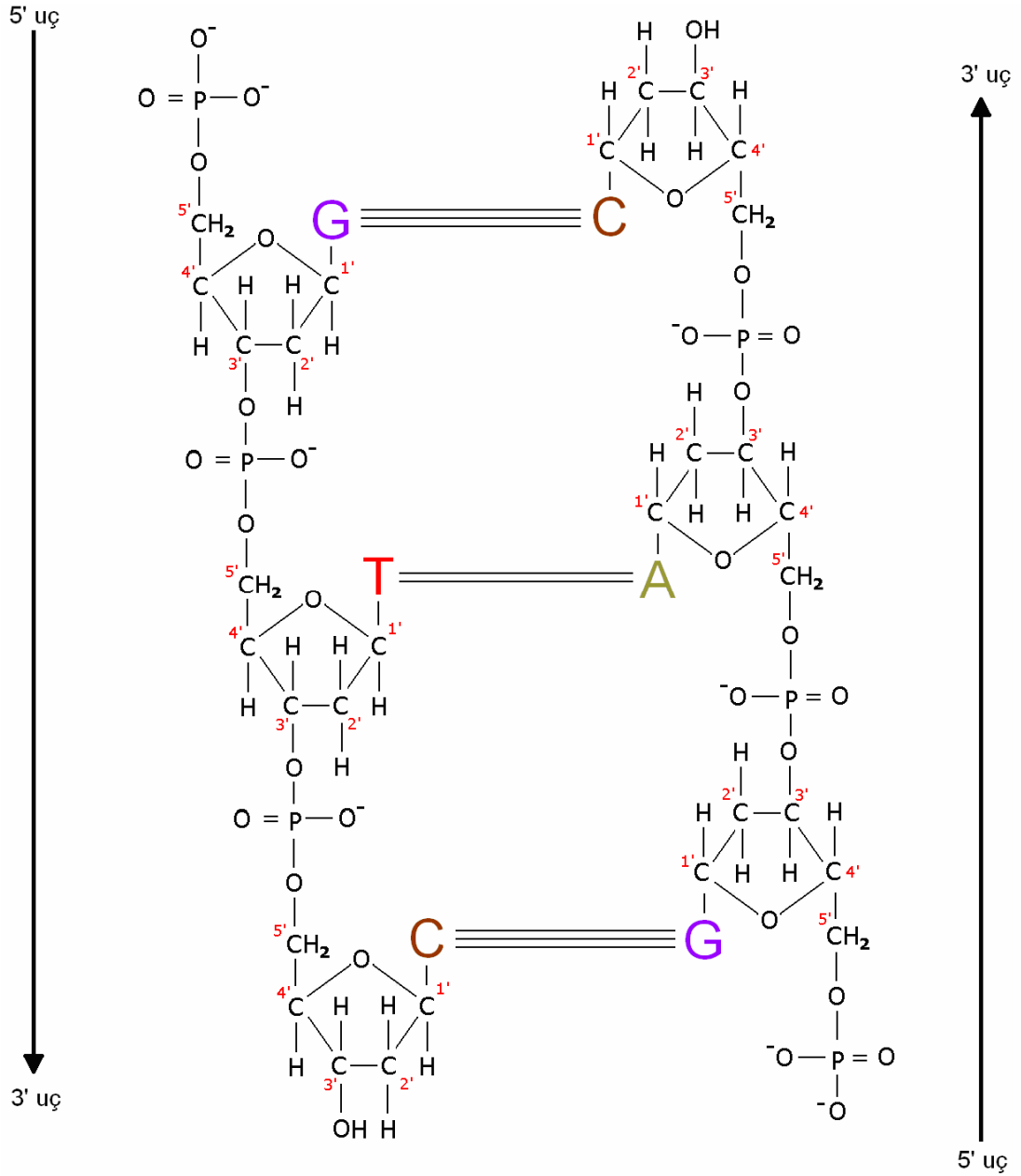
Şeker grupları: Nükleotidlerdeki şeker birimleri genellikle ya ribozdan (RNA) veya deoksiribozdan(DNA) türemiştir.

Nükleozidler: Bir bazla şekerin (riboz, deoksiriboz) oluşturduğu yapıdır. Şekerin 1 konumundaki C atomu ile bazdaki bir N atomu arasında bağ meydana gelir. (Ör: adenzin, deoksiguanozin... vb.)

Nükleotidler: Bir nükleotide ve fosfat grubuna bağlı 5C'lu şeker biriminden oluşan yapıdır. Nükleik asitlerin(DNA'nın) alt birimleridirler. Adenin ve guanindeki 9 nolu veya timin, stozin ve urasildeki 1 konumundaki N atomu, şekerin 1 nolu C atomuna bağlanır (N-glikozidik bağ).



Şekil 29: DNA'daki 4 bazın kimyasal yapısı ve omurga ile olan bağlantıları.



Şekil 30: DNA çift sarmalındaki şeker-fosfat omurga yapısı ve sarmalın yönü (Strachan T. ve Read A.P., Human Molecular Genetics-2 kitabından uyarlanmıştır).

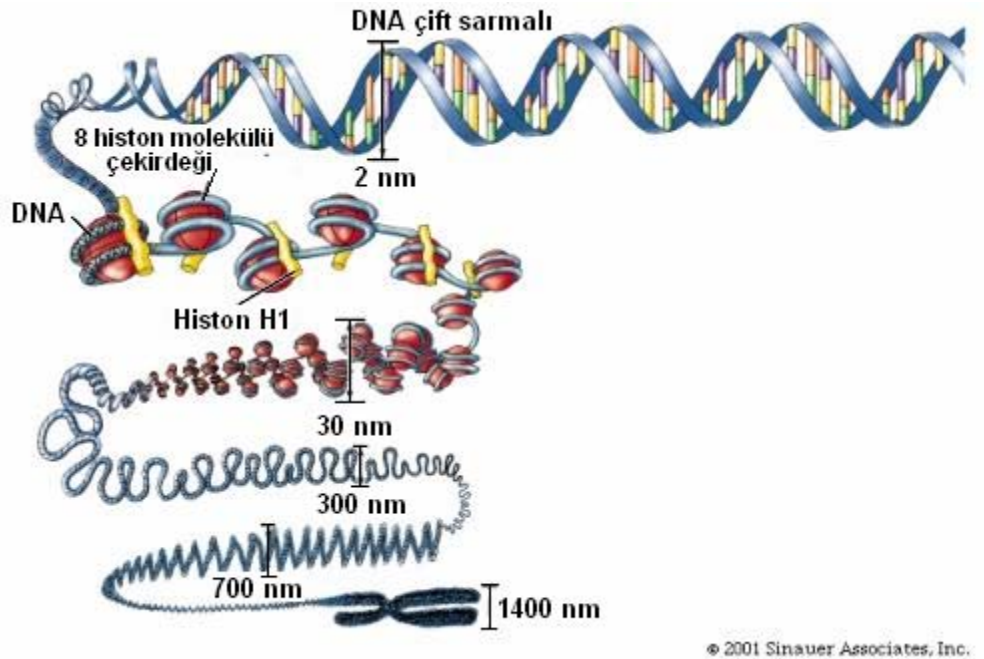
Nükleik asitler: Bir nükleotidin 3' C atomu ile diğerinin 5' C atomu arasında fosfodiester bağı kurularak şeker ve fosfat gruplarının ardı ardına sıralandığı serilerden oluşan omurgaya sahip uzun polinükleotid zincirleri meydana gelmiştir.

Kovalent ester bağları (=fosfodiester bağları) olarak bilinen bu bağlar son derece

kuvvetlidir. Bu bağlar DNA molekülünü tek zincirli halde bile dayanıklı ve kararlı(stabil) halde tutmaktadır.

Nükleotidler yapıcı bazik olmalarına karşın omurgadaki fosfat grupları polinükleotid zincirlerine asidik özellik kazandırır, nükleik asit terimi de bu özellikten kaynaklanmaktadır.

Molekül içerisindeki nükleotid bağlarını parçalayan enzimlerden nükleazlara **endonükleaz**, iki uçtan parçalayanlara ise **ekzonükleaz** adı verilmektedir. DNA moleküllerine ait X-ışınları difraksiyon verileri ve Chargaff tarafından DNA molekülünde adenin (A) ve timin miktarları ile guanin (G) ve sitozin (C) miktarlarının eşit olduğunun belirlenmiştir. **Chargaff kuralı**'na göre doğal DNA moleküllerinde adenin sayısının timine veya guan sayısının sitozine oranı daima 1'e eşittir. ($A/T=1$ ve $G/C=1$). Buna dayanılarak Watson, Crick ve Wilkins tarafından 1953 yılında DNA'nın çift sarmal yapıda olması gerektiği bulunmuş ve yapısı için çift zincirli heliks şeklindeki yapı modeli önerilmiştir.



Şekil 31: Kromozomdan DNA'ya uzanan yapı [144].

DNA her hücrede bulunur. Hücre çekirdeğinin (Nukleus) içinde bulunan çift zincirli yapıdaki DNA zinciri oldukça uzundur. Özel enzimler ve proteinler ile DNA hücre içinde paketlenmiş halde bulunur. İki polinükleotid zinciri, ortak bir eksen boyunca birbirinin etrafında sarılmıştır. Nükleotid baz çiftleri (bp), A-T veya C-G olarak sarmalın iç kısımda yer alırlar. Sarmalın çapı 20Å dur. Komşu bazlar arası uzaklık $3,4\text{ Å}$ dur. Sarmal yapı kendini 34 Å da bir veya 10 baz çiftinde bir tekrarlar. Çift sarmalın içinde ve karşılıklı yer alan nükleotid bazlarının kesin uzaysal ilişkilerinden dolayı çift sarmalın iki ipliği tam anlamı ile birbirini tamamlar (komplementerdir). Bu DNA şekline B formuna sahip DNA (B-DNA) denir. Bazları arasında yer alan hidrojen bağları tarafından çift sarmal DNA molekülünün iki zinciri, bir arada tutulmaktadır. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmalın iç kısmında, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısmında 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 olduğu için bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde ikinci zincirdeki baz dizisi bulunabilmektedir.

Çift sarmal DNA molekülünü oluşturan zincirler, birbirlerinden kolayca ayrılma ve birleşme özelliğine sahiptirler. Bu özellik sayesinde DNA replikasyonu (DNA'nın kendi kopyasını oluşturması) ve protein sentezi gibi önemli olaylar gerçekleşmektedir.

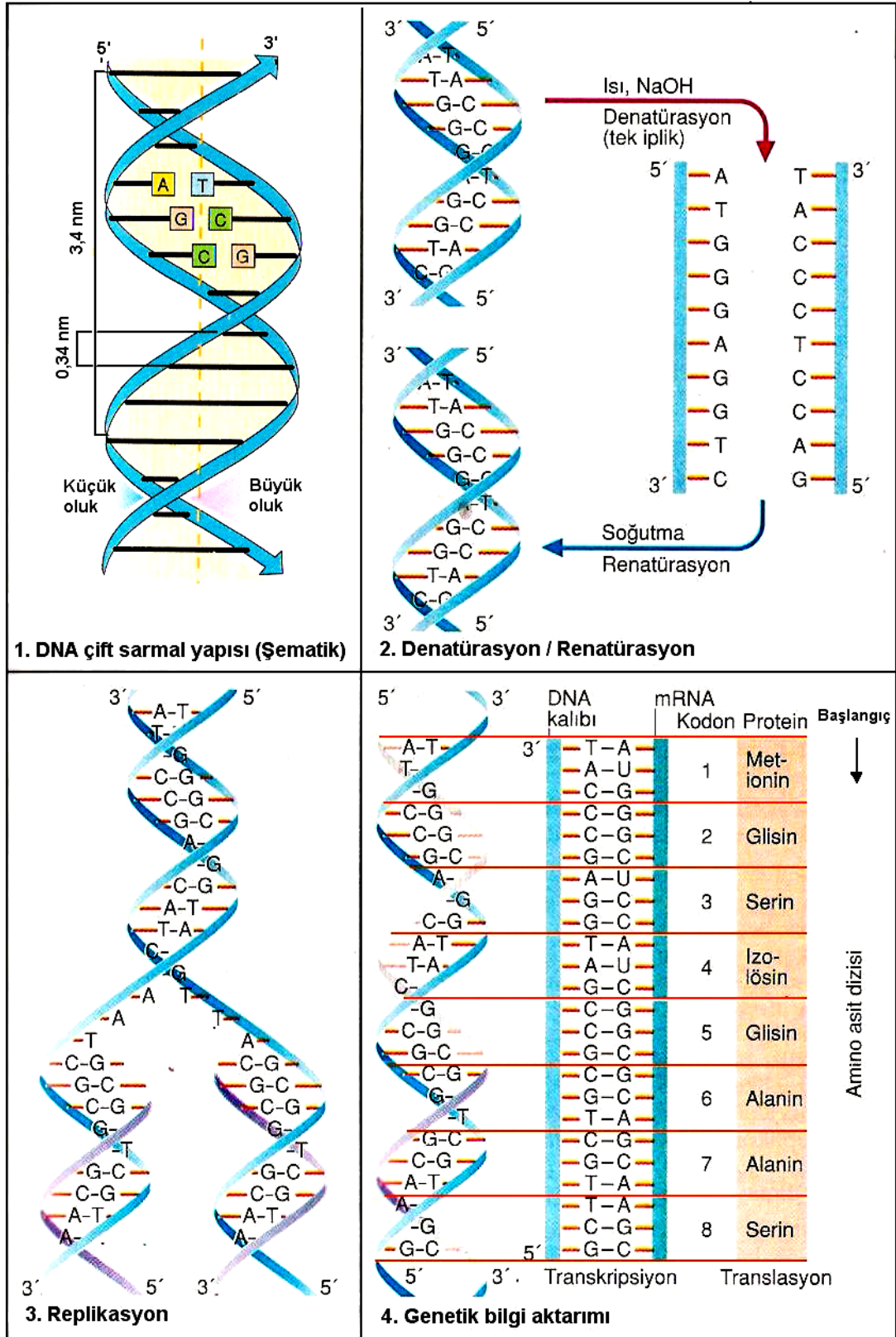
Replikasyon:

DNA çift sarmalında polinükleotid zincirleri birbirlerine zıt yönde tam komplementer olduklarından, sarmal açıldığında her biri yeni bir zincirin oluşumu

(replikasyon) için kalıp görevi görmektedir. DNA replikasyonu semikonservatiftir, yani, yeni bir iplik oluşurken, diğer iplik eskisi olarak aynen kalır.

Denatürasyon ve Renatürasyon:

Nükleotid baz çiftleri arasında zayıf hidrojen bağları yer almaktadır. G ve C arasında üç hidrojen bağı ($G\equiv C$); A ve T ($A=T$) arasında iki hidrojen bağı bulunmaktadır. DNA uzunluğu ve bu bağlar sonucu fizyolojik sıcaklıklarda stabil kalmaktadır. Birbirine sadece hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerle bağlı olan DNA'nın iki zinciri, nükleotidleri arasındaki kovalent bağlardaki herhangi bir kopma olmaksızın basınç, zayıf kimyasal ayırıcılar aracılığıyla (Ör: alkali, formamit veya üre) veya dikkatlice ısıtıldığında, heliks yapısını kaybederek ikiye ayrılır. Denatürasyon adı verilen DNA heliks yapısının bozulması, 260nm dalga boyunda absorpsiyon ölçülerek gözlenebilmektedir. Yüksek derişimde G ve C taşıyan DNA, yüksek konsantrasyonda A ve T taşıyan DNA'ya göre hidrojen bağlarının fazla olması nedeniyle daha yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır. Denatürasyon sonrası oluşan tek iplikli moleküller oldukça dayanıklıdır. Soğutma ile komplementer tek iplikler, zincirleri tamamlayıcı bazları arasında hidrojen bağlarının oluşumu ile birleşip çift sarmal yapıyı yeniden oluşturmak üzere tekrar bir araya gelebilirler (renatürasyon). Birbirine komplementer olmayan tek iplikler birleşemezler. Bu da nükleik asitlerin ayırt edilmesinde önemli bir yöntemin temelini oluşturmaktadır. İçeriği bilinen tek bir iplikle, diğer ipliklerden hangisinin bağlanacağı saptanabilir (hibridizasyon). DNA'nın komplementer parçalarının hibridizasyonu, gen analizlerinde çok önemli bir ilkedir [81].



Şekil 32: Şematik olarak DNA yapısı, denatürasyon/renatürasyon, replikasyon ve genetik bilgi aktarımı [81].

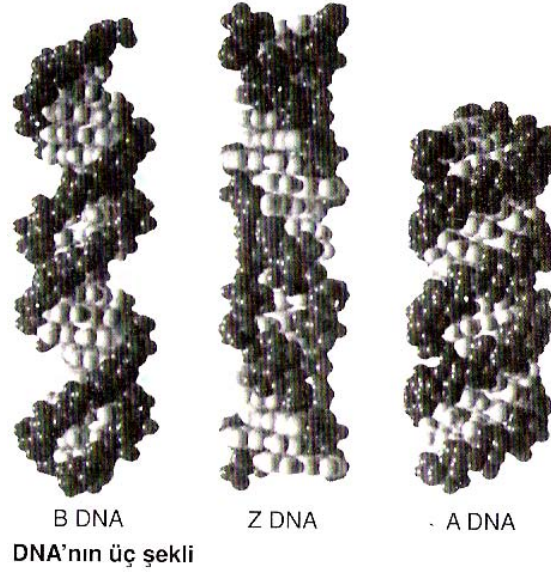
DNA çift sarmalının farklı tipleri bulunmaktadır. 1953'te Watson ve Crick tarafından tanımlanmış olan klasik form B-DNA'dır. B-DNA'nın temel yapısal özelliği, biri büyük (majör) oluk ve biri küçük (minör) oluklar oluşturmasıdır.

B-DNA'daki büyük ve küçük oluklar:

Nükleotid bazlarının eşleşmesi(adenin-timin, sitozin-guanin) büyük ve küçük olukların oluşumuna neden olur; çünkü deoksiribozla glikozid bağlar tam dik değildir. B-DNA'da bir tam dönüşten diğerine tam uzaklık 3,4nm'dir. Şöyleki; iki zincirin şeker fosfat omurgaları, bir eksen çevresinde sağ yöne doğru ve eşit çaplı dönüşler yapmıştır. Bazlar iç kısımda ve konumları sarmalın eksenine 90 derece açı yapacak şekildedir. İki komşu baz çiftinin dönüşleri arası mesafe 0,34nm'dir. (Şekil 32) Birbirine komşu her baz çifti arasında 36 derecelik açı mevcuttur. Yani, 10 baz çifti 360 derecelik tam bir dönüş yapmaktadır ve her bir tam dönüşün boyu da 3,4nm dir.

Bu şekilde çift sarmalda biraz büyük biraz da küçük olukların oluşumuyla sonuçlanan belirgin kıvrımlar ortaya çıkmaktadır [149, 239, 328, 412].

DNA çift sarmalının iki alternatif formu daha vardır; Z-DNA ve nadir görülen A-DNA. B-DNA sağ el dönüşlü sarmal oluştururken, Z-DNA sol el dönüşlü konformasyon gösterir. Bu da baz çiftleri arasında B-DNA'dakine göre daha büyük mesafe (0,77nm) ve zikzak yapı oluşmasına neden olur. A-DNA seyrek olarak sadece su kaybının olduğu durumlarda görülür ve sarmalın dikey eksenindeki 20 derecelik sapma ile B-DNA'dan ayrılır. A-DNA, derin bir büyük oluk ve düz bir küçük oluğa sahiptir.



Şekil 33: DNA'nın 3 değişik formu [81].

Genetik Bilgini Aktarımı:

Genetik bilgi nükleotit baz çiftlerinin (A-T veya G-C) kısmında bulunmaktadır. Üç baz çiftinin oluşturduğu mesajcı RNA (mRNA)'ya aktarılan diziye kodon denir ve bu dizi, ilgili gen ürününü oluşturacak bir amino asidi ifade eder (şifreler).

Nükleotid baz dizisi önce, DNA ipliklerinden birisinden 3' → 5' yönünde, bilgi taşıyan başka bir moleküle (mRNA;) aktarılır (**Transkripsiyon**). Daha sonra mRNA'daki nükleotid baz dizisi, kendi kodon dizilimine göre sentezi yapılacak ilgili amino asitlerin dizisi için kalıp görevi yapar(**Translasyon**) (Şekil 32 genetik bilgi aktarımı).

Protein sentezi: Her gen kendine özgü ve diğerlerinden farklı bir nükleotid dizilimi (şifre) içerir ve farklı bir proteini kodlar. Vücutta bir proteine gereksinim olduğunda o proteini kodlayan gen aktif hale geçerek(gen ekspresyonu) üzerindeki şifre, m-RNA adı verilen bir yapı şeklinde kopyalanır. Bu yapı hücre sitoplazmasındaki ilgili birimlere gelerek kalıp vazifesi görür ve kalıp üzerinden yapımı istenen protein üretilir.

1.2.5.5.1. DNA ile ilgili bazı önemli terimler ve açıklamalar

Mutasyon

Fosfodiester bağlarının çeşitli etkilerle kopması ve nükleotidlerin yerine başka nükleotid veya nükleotid dizisinin geçmesi sonucunda oluşan DNA değişikliğine **mutasyon** denir. Bu değişiklik gen fonksiyonlarını etkiler ve bireyde de değişiklikler meydana gelir. Neticeleri ölümcül olabilir. Mutasyonların tek zincirli RNA molekülünde oluşma olasılığı çift zincirli DNA molekülüne göre daha fazladır. Mutasyonlar geçirerek kendini sürekli yenileyen virüsler çağımızda önüne geçilemeyen hastalıkların sebepleridir.(Ör: AIDS)

Mutasyonlar "nokta" mutasyonu ve "kromozom" mutasyonu olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. "Nokta" mutasyonları, DNA'nın çok kısıtlı bir bölümünde meydana gelen mutasyonlardır. Bir veya birkaç nükleotid baz sırasının kopması veya yerlerinin değişmesi nokta mutasyonlarına neden olurken, kromozomun bir parçasında kopma veya yanlış bir kromozomla parça değiş tokuşu ise kromozom mutasyonu ile sonuçlanmaktadır. Kromozom mutasyonları, nokta mutasyonlarından daha ağır hasarlara neden olmaktadır. Üreme (germ) hücrelerindeki mutasyonlar kalıtsaldır ancak vücut (somatik) hücrelerindeki kalıtsal değildir.

Tek nükleotid polimorfizmleri (single nucleotide polymorphisms, SNPs)

Tek nükleotid polimorfizmleri, genomik DNA dizisi içerisinde G, A, C ya da T bazlarından birinin değişmesiyle meydana gelen DNA dizi farklılıklarıdır. Belirli bir SNP' den söz edilebilmesi için, o SNP' in populasyonda en az %1 oranında görülmesi gerekmektedir [319]. Hastalık gelişiminde SNP' lerin her zaman tek

başlarına ve kesin olarak belirleyici rolleri bulunmamaktadır. Genellikle organizmanın sağlığını veya fonksiyonunu etkilemezler. Bazı SNP'ler, bir proteindeki aminoasit dizisini veya ekspresyonunu değiştirerek, insanda hastalıklara olan yatkınlığı veya dayanıklılığı ve ilaç tedavilerine verdiği yanıtı değiştirebilmektedir.

Sekans (Sequence)

Baz çiftlerinin dizilimidir. Bu dizilimin bulunması işlemine "sekanslama" adı verilmektedir.

Klonlama (Cloning)

Bir baz çifti veya DNA'nın belirlenen bir bölümü enzim yardımıyla kesilerek uygun bir vektöre aktarılır. Daha sonra kolayca üreyen mikroorganizmalar yardımı ile çoğaltılır, böylece istenen dizilime sahip çok miktarda DNA parçası elde edilir(klonlanır). Birbirinin tamamen kopyası olan organizmalar, hücreler veya genler klon olarak adlandırılır. Özetle klonlama, bir canlının genetik materyalinin kopyasının çıkarılması işlemidir. Çoğaltma işleminde genellikle plazmitlerden ve kolayca bölünen bakterilerden faydalanılır. Belli konularda özelleşmiş hücrelerin bölünerek kendilerini tekrar oluşturmasına ve ayrıca tek hücreli canlıların üreme şekline ise klonal çoğalma denilmektedir.

Gen Haritaları

Genetik haritalama metodu, lokalizasyonu bilinen bir genetik belirleyici (marker) kullanılarak lokalizasyonu aranan genin bulunması işlemidir ve kuşaklar arasında birlikte kalıtımının test edilmesi esasına dayanmaktadır. Böylelikle, marker

alelin kromozom üzerindeki yeri bilindiğinden, ilgilenilen genin ya da hastalığın lokalizasyonu da saptanmış olacaktır [308].

Mayoz bölünmede, homolog kromozomlar karşı karşıya gelerek parça değişimine uğrarlar (crossing-over). Böylelikle yavru kuşaklarda, ebeveynlerde olmayan yeni yapılanmalar ortaya çıkmaktadır (rekombinasyon). Ortaya çıkan ürünlere de rekombinant denmektedir. Rekombinasyon kavramı, genetik haritalamanın temelini oluşturmaktadır.

Özetlenecek olursa, genlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu yerlerin (lokus) tespit edilmesi işlemine gen haritalanması adı verilmiştir. İnsan genomunun anatomisi ortaya çıkarılması, insan vücudu fonksiyonlarının bilinmesi için gereklidir. İnsan genom haritası tüm dünyada binlerce bilim adamının yaklaşık 15 yıl süren çabaları sonucunda hemen hemen tamamlanmış durumdadır. Gen haritası kullanılarak genetik hastalıklarının, farklılıkların ve mutasyonların analizleri yapılarak bu bilgiler ışığında ve kişiye özgü genetik tedavi yapılabilecektir.

Haritalama işlemi

Nükleotid baz dizisi bilinen prob ile uygun koşullarda yapılan hibridizasyon sonucunda elde edilen sinyal, ilgili DNA dizisinin haritasının çıkarılmasında kullanılır. Günümüzde sıkça kullanılan floresan in situ hibridizasyon (FISH) teknikleri ile belirli bir DNA bölgesi kullanılarak tüm kromozomlar içinde eşdeğer bölgenin bulunması mümkün olmaktadır. Belirlenen kısa DNA bölgesi, radyoizotopla veya floresanla işaretlendikten sonra ısıtma ve soğutma işlemlerini takiben tek iplik haline getirilir(prob). Hazırlanan prob, boyanmamış ve lam üzerinde yayılmış metafaz safhasındaki kromozomlarla etkileşir ve kendi ile eşdeğer bölge ile birleşir. DNA baz dizisinin çıkarılması bu işlemin son aşamasını oluşturur. Floresan

kullanılarak geliştirilen bu yöntemlerle, çok kısa sürede klonlanmış DNA dizilerinin haritalaması/sekanslanması mümkün olmaktadır. Son yıllarda birden fazla farklı renkli floresan işaretli problemlerle, kısa sürede daha fazla bölge incelenebilmektedir. Dideoksi nükleotitler kullanılarak PCR ile çoğaltılan DNA parçasının sekanslanması da son yıllarda ilgi gösterilen bir tekniktir [314].

Genomik DNA parçalarının klonlanması ve karakterizasyonu ile detaylı bir gen haritası elde edilmesi Rekombinant DNA teknolojisindeki son gelişmelerle birlikte mümkün hale gelmiştir. Genomların haritalanması, analizi ve dizi analizi ile ilgili disipline “**genomiks**”, adı verilmiştir.

Gen:

Bir DNA zincirindeki belirli bir genetik özelliği simgeleyen ve belli uzunluğa sahip birimdir.

Kromozom:

Genetik materyalin (DNA)'nın yardımcı proteinlerle birlikte dönüşüm yapıp katlanmasıyla ve kısalmasıyla oluşan yoğunlaşmış yapılardır. Her kromozomda çok sayıda gen (uzun bir DNA molekülü) vardır. Her bir insan kromozomundaki DNA 19.000-73000 μm uzunluğa sahip olup proteinlerle 5-10 μm çapındaki çekirdeğe sığmaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisi [147]

1970'li yılların başlarında temelleri atılan rekombinant DNA teknolojisi ile milyonlarca baz çiftinden oluşan bir genomik DNA'dan spesifik bir bölgeyi izole etmek mümkün hale gelmiştir. Bu teknikle, herhangi bir DNA parçasının, kendini

eşleme yeteneği olan plazmid ya da fajmid gibi bir başka DNA parçası içine (vektör) yerleştirilmesi ve vektörün çoğaltılması işlemleri gerçekleştirilebilmektedir. Günümüzün biyoloji dünyasında rekombinant DNA teknolojisi neredeyse her alanda çok önemli kullanım alanına sahiptir.

1.2.5.5.2. DNA baz dizilişinin yazılımı ile ilgili genel bilgiler[83]

Oligonükleotid: Birden fazla baz yan yana geldiğinde oligonükleotidleri oluşturur. *Dinükleotidler;* İki bazın yanyana gelmesiyle, *Trinükleotidler;* üç bazın yanyana gelmesiyle oluşur.

Tekrarlayan oligonükleotidler: Polinükleotid yapısı içinde tekrarlayan tek, tekrarlayan iki veya üç bazı ifade eder. Örneğin, poly (A), dinükleotid'e poly (AT), trinükleotid'e poly (GAT) örnek verilebilir.

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

Prob : Baz dizisi belirli olan ve genellikle hibridizasyonun tanısı için sentezlenen oligonükleotid.

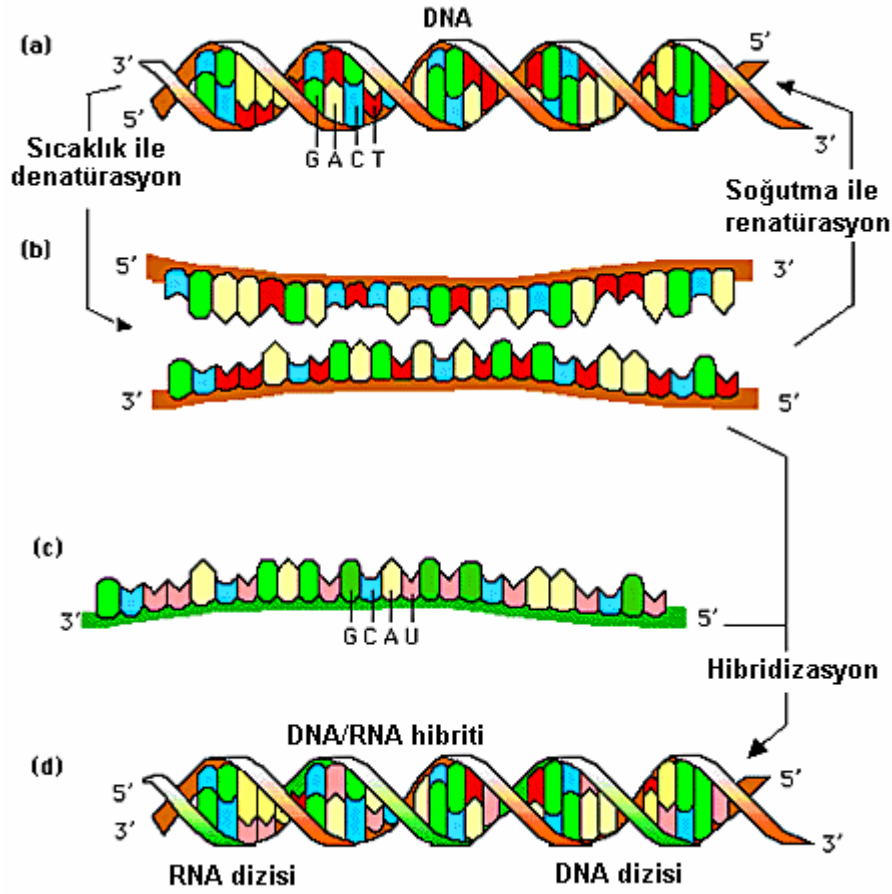
Hedef dizi (Target) : Prob dizisinin karşılığını içeren sentetik oligonükleotid, klonlanmış DNA parçası, PCR'ı yapılmış ürün veya tüm DNA'yı ifade eder.

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

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

1.2.5.5.3. Nükleik asit (DNA) hibridizasyonu:

Nükleik asit hibridizasyonu, baz çiftlerinin özel hibridizasyon koşullarına bağlı olarak kararlı bir dupleks molekülü oluşturmasıdır [22, 289].



Şekil-14: Nükleik asit hibridizasyonu

Birbiriyle komplementer iki DNA dizisinin hibritleşmesi, baz çiftlerinin, sarmalın merkezinde birleşerek yığın oluşturmasıyla gerçekleşir. Adeta istiflenmiş yığın şeklindeki ikili sarmal yapı, tek sarmal dizilere göre çok daha kararlıdır [94] ve bu güçlü yapı ikili sarmaldaki uzunluğu sabit(kararlı halde) tutar [121, 202].

İnterkalasyon: [90, 129, 164, 177, 219]

Düzlemsel halka sistemi yapısına sahip bazı maddelerin DNA baz çiftleri arasına yerleşmesi olayıdır. Maddenin özelliğine bağlı olarak, bu etkileşim tersinir ya da tersinmez şekilde gerçekleşmektedir. İnterkalasyon, DNA' da zincir kırılmasına yol açabilir ve DNA senteziyle DNA' ya bağımlı RNA sentezini bozabilir. Bu maddeler Topoizomeraz (II) enzimini inhibe ederler.

1.2.5.5.4. DNA hibridizasyonunun kinetiğini etkileyen faktörler: [22]

Nükleik asitlerin yapısı : DNA yapısının kompleksliği ve hibrit oluşturan dizilerin uzunluğu ile hibridizasyon hızı, ters orantılıdır.

Baz Kompozisyonu : GC baz çiftlerinin, ısıya karşı dayanıklılığı AT baz çiftlerinden daha büyüktür. Bu yüzden, dizilerde GC yüzdesinin arttığında, hibridizasyon hızı artmaktadır.

DNA dizi uzunluğu : Hedef dizinin, prob dizisinden kısa olduğu durumda, bağlanma hızında belirgin bir düşüş gözlenirken, prob dizinin uzunluğu < hedef dizinin uzunluğu olduğu durumda, bağlanma hızı hedef dizinin uzunluğuna bağlı olarak artmaktadır.

Sıcaklık : DNA, erime sıcaklığının 25°C altında hibrit oluşturmaktadır ve bu sıcaklık hibridizasyon için *en iyi sıcaklık* olarak nitelendirilir.

Tuz konsantrasyonu : Artan NaCl konsantrasyonu ile hibritleşme hızı artış göstermektedir. Her çalışma için en uygun derişimin ayrıca bulunması gerekir.

Formamit : Hibridizasyon tepkimelerinde, % 30 - % 50 aralığında formamit kullanımı, bağlanma hızını etkilememektedir.

Dekstran sülfat : İnerit polimerin hibridizasyon tepkimelerinde kullanımı, tepkime hızını yaklaşık on kat arttırmaktadır. Polimer kullanımı, DNA'nın çözelti içinde toplanarak yoğunlaşmalarına ve bu yoğun ortamda prob dizilerin hibridizasyona açık kalmasını sağlamaktadır. Bir arada bulunan bu problemlerin, hedef dizilerle hibridizasyonu sonucu, daha kuvvetli hibridizasyon sinyalleri gözlenmektedir. Aynı zamanda, dekstran sülfat yüksek yükleme akımlarına da sebep olmaktadır.

İyonik kuvvet : İyonik kuvvetin artışına bağlı olarak, hibridizasyonun hızı artmaktadır. Örneğin, sodyum derişimi 0.1 M'ın üstünde iki kat arttırıldığı zaman, hız 5 - 10 kat artmaktadır.

Baz değişimleri : Birbirinin tam karşılığı olmayan prob ve hedef diziler ile de hibridizasyon olabilmektedir. Baz değişimine uğramış diziler arasındaki hibridizasyon, tepkime hızını ve erime sıcaklığını (T_m) azaltmaktadır.

pH : 6,8–7,4 arasındaki nötr pH' lar hibridizasyon tepkimeleri için idealdir.

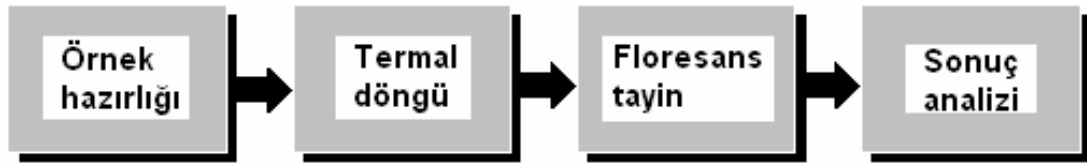
Viskozite : Hibridizasyon çözeltisinin viskozitesinin artışı, hibridizasyon hızını azaltmaktadır. Örneğin, viskoz bir ajan kullanılıyorsa bazı durumlarda yüksek bir sıcaklıkta çalışılması ($60^0 - 65^0C$) önerilmektedir.

1.2.5.5.5. Polimeraz Zincir reaksiyonu (PCR): [64, 153]

İlk kez 1985 yılında bulunan, tüpte nükleik asitlerin çoğaltılmasına imkan veren ve bu buluşu ile Karry Mullis'e 1993 yılı Nobel Kimya Ödülünü kazandıran tekniktir. Deney tüpünde in-vitro koşullarda gerçekleştirilen çoğaltma işlemi ile hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonu taklit edilir. Bu buluş ile bilim dünyasında yepyeni bir dönem başlamıştır.

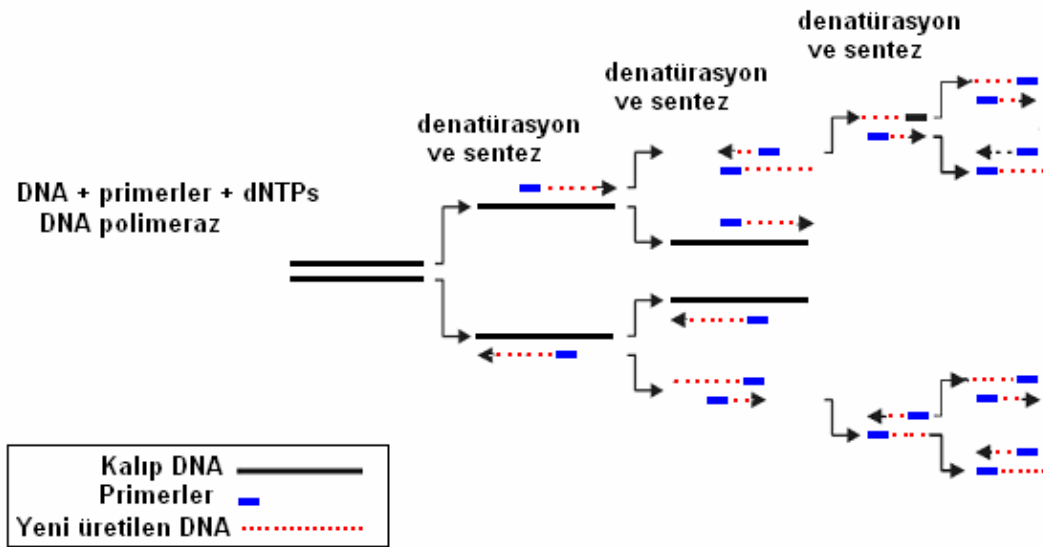
Konakçı hücreler kullanılarak genetik materyalin klonlanması ile genetikçilerin ve moleküler biyologların araştırmalarında devrim yaratan Rekombinant DNA teknolojisi 1970'li yıllarda geliştirilmesinden kısa süre sonra 1985 yılında geliştirilen PCR tekniği, bilim dnyasında daha hızlı yerini almış ve halen birçok alanda başarıyla kullanılmaktadır.

PCR'IN AŐAMALARI



Şekil 35: Polimeraz zincir reaksiyonuna genel bakış.

PCR reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon) ile başlar ve Sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon) ile devam eder. Teknik daha sonra zincirin uzamasına (polimerizasyon-çift iplikli DNA sentezi) ve bu döngünün belli sayıda tekrarlanmasına dayanır.



Şekil 36: Polimeraz zincir reaksiyonu ile kalıp DNA'nın çoğaltılması işlemi.

PCR reaksiyonu için; genomik DNA, çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer, dNTP(deoksi nükleotit trifosfat)ler (A,T,C,G), ısıya dayanıklı DNA-polimeraz enzimi, uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{2+}) sağlayan tampon karışımı gerekmektedir.

PCR işleminin basamakları:

Klasik olarak bir PCR işlemi üç temel aşamadan oluşur ve işlem üç temel aşamanın arka arkaya yirmi-otuz kez tekrarlanması ile sonlanır. Bu aşamalar; denatürasyon, primer bağlanması ve uzama'dır.

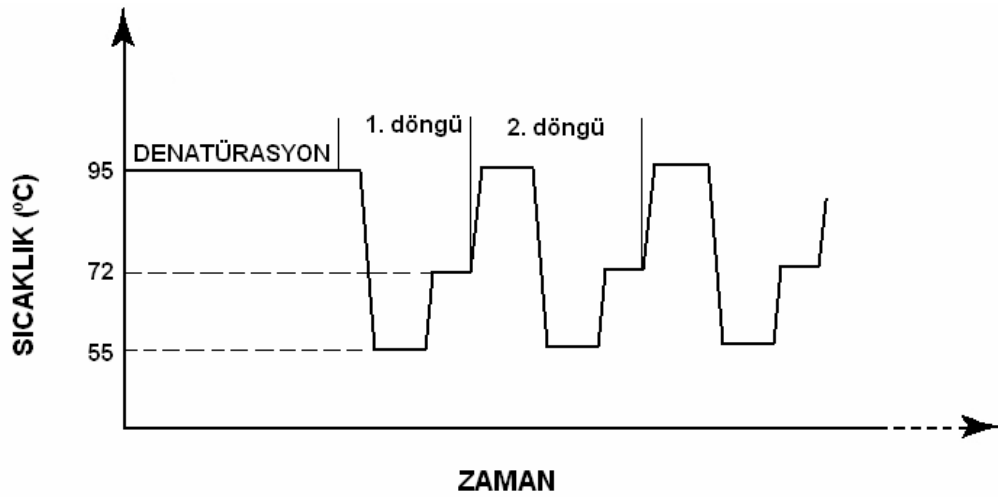
1. Denatürasyon: Çoğaltılacak çift zincirli DNA bölgesi, tek zincirli hale gelene kadar ($90-95^{\circ}C$ 'de yaklaşık 5 dakika) ısıtılır.

2. Primer bağlanması: Sıcaklık $50 - 70^{\circ}C$ arasında bir değere düşürülür ve primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır(annealing). Bu primerler 15-30 nükleotid uzunluğunda sentetik oligonükleotidlerdir. Bu primerler, kalıp DNA'nın sentezi için, başlangıç noktası olarak görev yaparlar.

3. Uzama(sentez): Sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteriden (*Thermus Aquaticus*) elde edilen, DNA polimeraz'ın ısıya dayanıklı bir şekli olan *Taq polimeraz* nükleotitleri 5' den 3' yönüne doğru ekleyerek uzatmaya başlar. DNA sentezi 70-75 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir. Polimeraz enzimi nükleotitleri 5'den 3'ne doğru bağlayarak, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyası oluşturur.

Bu üç adım denatürasyon, primer bağlanması, DNA sentezi bir PCR döngüsünü (siklusunu) oluşturur. Başlangıçtaki birkaç döngü, spesifik DNA parçalarının hedef DNA ile hibritleşebilecekleri yerleri tarama fazıdır. Çoğaltım daha sonra başlar. PCR'in tüm siklusları, bir önceki siklusda sentezlenen örneklerin denatürasyonu ile başlar ve önceki üç basamağın tekrarlanmasıyla devam eder.

İşlemler önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla, otomatik olarak ısı döngücüsü adlı cihazla (Thermocycler) gerçekleştirilir.



Şekil 37: PCR döngüleri.

Oluşan ürün, PCR siklusları ile üstel olarak artış gösterir.

$$P = (2)^n T$$

P: Ürün (*Product*)

n: Döngü sayısı

T: Başlangıçtaki DNA sayısı(*Template*)

PCR ürünleri her döngü sonunda tam olarak iki katına ulaşamazlar. Verimlilik yaklaşık olarak % 80-90'dır. Kısa PCR ürünleri daha yüksek verimle çoğalır.

Amplifikasyonun görüntülenmesi:

Hedef DNA molekülünün PCR sonrası çoğaltılmasıyla elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforezine tabi tutulur. UV Transluminator'de görüntülenir ve fotoğraflanır. Bu amaçla floresan işaretli probalar veya interkalatör boyalar (syber green, etidyum bromür) kullanılır. Üretilen DNA (amplikon) miktarı ile doğru orantılı olarak floresan meydana gelir.

Kullanım alanları

1. Kalıtsal ve bulaşıcı hastalık tanısında
2. Bilinmeyen DNA dizilerinin tayininde
3. Biyosensör araştırmalarında
4. Yüksek miktarda DNA örneklerinin üretilmesinde
5. Kanserli hücre oluşumunun araştırılmasında
6. Prenatal tanıda
7. Klonlamada ve gen ekspresyonu araştırma çalışmalarında
8. Adli tıpta
9. RFLP (Restriction Fragment Length Polimorfizm) analizinde
10. Klinik örneklerde patojen mikroorganizmaların tanısında
11. Geçmişteki DNA dizilerinin analizi ve evrim sürecinin aydınlatılmasında
12. DNA-Protein etkileşiminin araştırılmasında (Footprinting)

Primer seçiminde dikkat edilmesi gereken bazı noktalar:

- * Primer uzunluğu 18-25 baz olmalı
- * G/C içeriği % 45-55 olmalı
- * Primerin 3' ucundaki son 5 nükleotitteki total G-C içeriği 2'yi aşmamalı
- * Oligonükleotid dizisi "özgül" olmalı
- * Primerler komplementer olmamalı
- * Uygun T_m olmalı (58-60°C)

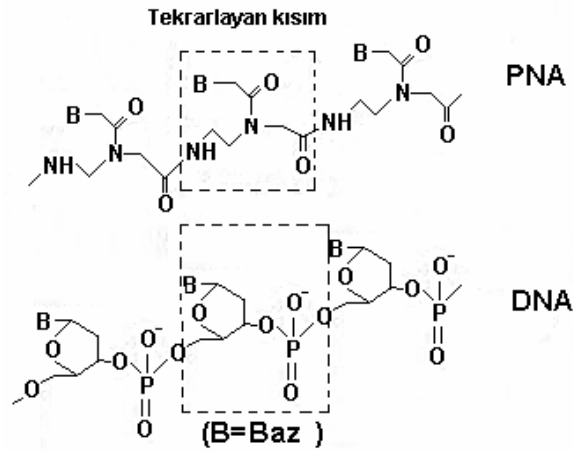
(18 nükleotitten kısa diziler için T_m ; her A ve T için 2 °C, her G ve C için 4 °C'nin toplanması ile bulunur ($T_m = [(A + T) \times 2] + [(G+C) \times 4]$). 18 den uzun diziler için $T_m = 81,5 - 16,6(\text{Log}_{10} [\text{Na}^+] + 0,41 (\%G+C) - (600/N))$ formülüyle bulunur. (N: zincir uzunluğu)

PCR tekniğinin genel olarak değerlendirilmesi

Tablo 2: PCR metodunun avantaj ve sınırlarının değerlendirilmesi

Avantajları	Sınırları
* Çok az miktarda DNA kullanımı	* Hedef DNA'nın nükleotit dizisi hakkında bilgi gereksinimi
* Laboratuvar tanısında yüksek hız ve kesinlik	* Nispeten kısa bir ürün elde edilmesi
* Radyoaktivite kullanımını elimine etmesi	* Diğer DNA kaynaklarının (deri döküntüsü vb.) neden olabileceği kontaminasyon
* Konakçı hücreye ihtiyaç duyulmaması	* Kanserojenik ajan etidyum bromürün kullanımı
* PCR primerlerinin ticari olarak sentezinin ekonomikliği	

1.2.5.6. Peptid Nükleik Asitler (PNA): [248, 358]



Şekil 34: PNA ve DNA yapılarının karşılaştırmalı olarak gösterilmesi.

PNA, DNA'nın eksi yüklü deoksiriboz-fosfat omurgasının, amit bağlarıyla bağlanmış, tekrarlanan N-(2-aminoetil)glisin birimlerinden oluşan nötral bir yapıyla değiştirilmesiyle elde edilir. Bu yapı, DNA molekülünün analoğu olup, nötral yükü ve bazlar arası uygun uzaklıklarıyla komplementer DNA'ya, normal DNA dizilerine göre çok daha fazla afinite duymakta ve daha özgül şekilde bağlanabilmektedir. PNA yapısı nükleazlar ve proteazlar tarafından yıkıma uğramadığı için çok daha yüksek biyolojik kararlılık göstermektedirler. Kısa PNA problemleri kullanılarak DNA ile sadece tamamen birbirlerinin tamamlayıcısı(komplementeri) oldukları zaman, çok daha seçimli hibritleşebilmektedirler. Eğer hedef dizinin tek bazı farklı ise, prob ile hedef arasında hibridizasyon oluşmamaktadır. PNA'lar ile oluşturulan hibritler yüksek sıcaklıkta dahi çift sarmal yapısını kaybetmemektedir [102, 250, 262, 358, 363, 379, 385]. Yüksek sıcaklıkta stabil olan bu hibritler düşük iyonik kuvvette oluşmaktadır.

Günümüzde ise çeşitli hastalıkların tanısı için önemli olan nokta mutasyonlarının yüksek duyarlılıkla tayini, peptid nükleik asit problemlerinin, DNA

hedef dizileriyle hibridizasyona uğratılmasıyla başarılı şekilde geliştirilmeye devam etmektedir [112, 273].

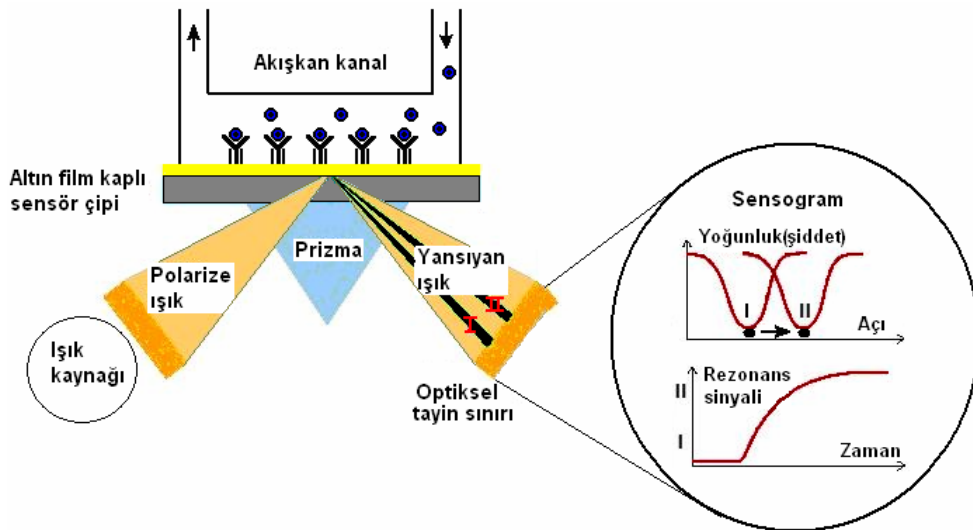
Ayrıca son yıllarda antisense peptik nükleik asitlerin (PNA), tanıya yönelik çalışmalarda kullanımları da gündemdedir [247, 248]. DNA’da belirli bir bölgeye hedeflenen “antisense” ilaçların(oligonükleotidlerin) gelecekteki faydaları düşünüldüğünde ilk antisense ilaç Vitravene [238]’in bu yolda atılmış önemli bir adım olduğu anlaşılmaktadır.

1.2.6. Çevirici Birimini Oluşturan Sistemlere Göre Biyosensörler:

1.2.6.1. Optik (Biyosensörler

Yüzey Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance = SPR)

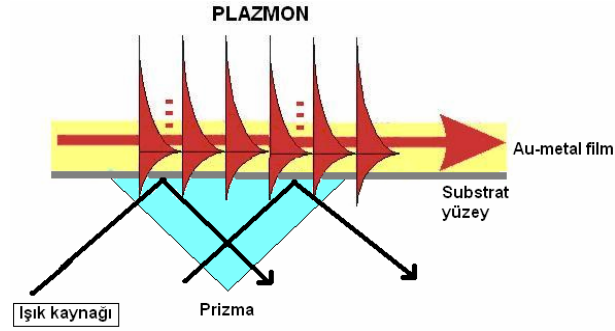
Yüzey plazmon rezonans SPR, optik kökenli bir biyosensör olup, saf metal filmler üzerinde organik tabakaların biyomoleküler etkileşimlerinin tayinini sağlayan yüzeye duyarlı optik bir tekniktir.



Şekil 38: Yüzey plazmon rezonans sistemi ve çalışma ilkesi (www.biotech.uiuc.edu)

Etkileşime girecek organik moleküllerden biri, sensördeki metal film (genellikle altın film kullanılmaktadır) yüzeyine tutturulurken, diğeri sistemde hareket halinde olan çözelti içerisinde serbest bırakılır ve akışkan sistem sayesinde çözelti içerisindeki bu molekül sensör yüzeyindeki karşılığı ile etkileşir. Çözeltilerin belirli şartlar altında ışığı kırma güçlerinin sabit olması prensibinden hareketle bir organik tabakanın metal yüzeye bağlanmasıyla değişen refraktif indeksin ölçümüne dayalı bir yöntemdir. Birleşme ve ayrılma çevirici cihaz sayesinde bilgisayarda sensogram grafiği şeklinde görüntülenir. Genellikle sensörde metal film olarak 50nm kalınlığında altın kullanılır. Bu metal yükseltgenmeye ve diğere atmosferik kontaminantlara çok dirençlidir. Ayrıca altın çözeltileri, biyokimyasal maddeler için de inert bir maddedir.

Cihazda, gönderilen ışık hüzmesi yoğun ortamdan az yoğun ortama geçtiğinde belli oranda kırılır. Işığın geliş açısı değiştiğinde çıkış açısı da değişecektir. Belli değerlerde kritik geliş açısına ulaşmış olan bir ışık demeti, prizma merkezinden aynı açıyla geri döner. Buna toplam iç yansıma (total internal reflection, TIR) denir. Aynı zamanda ışık bir elektromanyetik alan oluşturmaktadır. Metal yüzeyindeki serbest elektronlar(yüzey plazmonları) bu elektromanyetik alan içinde ışığın gelişiyile birlikte rezonans hareketi yapmaya başlar. Bu olaya yüzey plazmon rezonansı denilmektedir. Yüzey plazmonlarının hızı, ortam bileşiminin değişmesiyle değişir.



Şekil 39: Yüzey plazmon hareketleri. www.biochem.mpg.de/oesterhelt/xlab/Kretschmann.jpg 'den uyarlanmıştır.

Özetlenecek olursa, belirli bir miktardaki ışık çip yüzeyine belli bir açıyla gönderildiği zaman tamamen yansımaktadır ve çip yüzeyindeki elektronlara hareket kazandırmaktadır. Işığın tam olarak yansıdığı bu açıya yüzey plazmon rezonans açısı denmektedir. Bu rezonans açısı, çip yüzeyindeki kütle arttıkça doğru orantılı olarak artmaktadır.

SPR etkisi ışığın elektromanyetik dalgaları ile iletken yüzey tabakasının serbest elektronları arasındaki etkileşime dayalıdır.

Yüzey plazmon rezonansı; metal film tabakasının özelliklerine (örneğin kalınlık), gelen ışığın dalga boyuna ve metal film tabakasının her iki tarafındaki ortamdaki yayılma hızına bağlıdır. Yayılma hızının sıcaklığa da duyarlı olduğu göz önüne alınarak ölçümler, belirlenen sıcaklıkta yapılmaktadır.

Çevirici sistemler açısından değerlendirildiğinde, SPR sisteminin analizlerdeki duyarlılık (hassasiyet) sınırı sürekli bir gelişme göstermektedir. Son zamanlarda popüler olan bu teknik, analitle cihaz yüzeyine tutturulmuş antikörler arasındaki etkileşimin spesifik tayinini sağlar. Bu tip immunosensör çalışmaları halen devam etmektedir.

SPR teknolojisi ile protein ve nükleotit düzeyinde sensör tasarımları da son yıllarda önem kazanmıştır [23, 110, 343, 288]. Ayrıca PCR ürünlerinin SPR sistemiyle analizi mümkündür [173].

Bu cihaz ayrıca akışkan bir sistem içerisinde reseptör-ligand etkileşimine benzer şekildeki çeşitli bağlanma olayları gibi biyomoleküler etkileşimlerin pikomol düzeyinde duyarlı bir şekilde algılanmasında kullanılmaktadır. Biyomoleküler etkileşimlere örnekler aşağıda yer almaktadır:

- Peptid-antikor etkileşimleri
- Protein-antikor etkileşimleri
- Protein-DNA etkileşimleri
- Protein-polisakkarit etkileşimleri
- Protein-virüs etkileşimleri
- Protein-hücre etkileşimleri
- Protein-T-hücre reseptörü etkileşimleri
- Antikor-antikor etkileşimleri
- DNA-DNA etkileşimleri

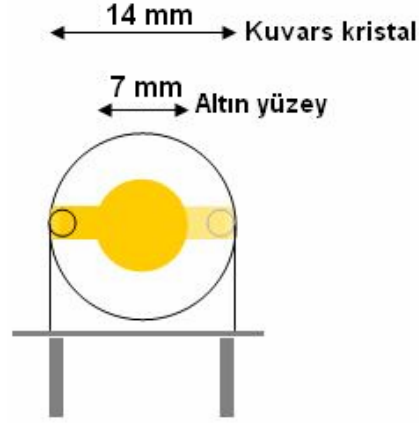
SPR teknolojisi gıda kalite ve güvenliği çalışmalarının yanı sıra, yaşam bilimlerini kapsayan araştırmalarda, ilaç geliştirme çalışmalarına da güvenle uygulanabilir.

1.2.6.2. Piezoelektrik (biyo)sensörler:

Kuvars Kristal Mikrobalans (Quartz crystal microbalance = QCM): [163]

Kuvars kristal mikrobalans (QCM) tekniği, kristal yüzeyinde biriken ince tabakaların meydana getirdiği mikro kütle değişimlerini belirlemek amacıyla

kullanılır. QCM'in aktif elementi iki köşesine metal elektrotlar yerleştirilmiş ince kuvars kristal plakasıdır [210].



Şekil 40: Kuvars kristalin şematik gösterimi.

Kuvarsın kristal yapılanmasına ve kristalin piezoelektrik özelliklerine bağlı olarak elektrotlar arasında uygulanan potansiyel bir deformasyona sebep olur. Sistemde metal yüzeyindeki kütle değişimi, kuvarsın frekansında değişime neden olur. Yüzeyde kütle değişimi ile frekans değişimi arasında doğru orantı vardır. Kütle baskısına karşı frekans değişimi 'Saurbery' eşitliği ile tanımlanmıştır [210].

Sensör teknolojisi açısından değerlendirildiğinde kuvars kristaller (QC) hızlı, hassas çeviricilerdir [343]. Ayrıca akış hücresine bağlanabilme özellikleri sayesinde akışkan sistemlerde analiz yapılması mümkündür [44]. Bu çeviriciler günümüze kadar Salmonella [402] Hepatit B [305] ve Eschericia coli O157:H7 [324, 332] gibi bir çok mikroorganizma tayini için kullanılmıştır.

1.2.6.3. Elektrokimyasal (biyo)sensörler

1.2.6.3.1. İyon-Seçici Alan Etkili Transistörler (ISFET) [120, 143, 148, 183, 311]

Transistör, yarı iletken malzemeden yapılmış elektronik devre elemanıdır. Alan etkili transistör veya metal oksit alan etkili transistör (MOSFET), devrelerde akım akışını kontrol eden bir anahtar olarak kullanılan küçük katı haldeki yarı iletken alettir. MOSFET'ler iyonik yüzey safsızlıklarına çok duyarlı olduklarından bu özelliklerinden yararlanılarak iyon-seçici alan etkili transistörler (ISFET) geliştirilmiştir. Membran elektrotlarına göre küçüklük, sağlamlık, hızlı cevap verme, olumsuz çevre şartlarına dayanıklılık, düşük elektriksel dirence sahip olma gibi üstünlükleri vardır [6]. ISFET'in farklılığı, ilgili iyonların konsantrasyonunda meydana gelen değişikliğin değişken giriş potansiyeli sağlayarak sistemin kanal bölümündeki iletkenli kontrol etmektedir. Hidrojen iyonuna duyarlı ISFET sensörüne örnek, pH sensörüdür.

İlk olarak 1970 yılında Bergveld [25] tarafından tanımlanan alan etkili transistörlerin elektrokimyasal sensör olarak kullanımları devam etmektedir [120, 310].

Örneğin,

- pH veya iyon-konsantrasyon değişimleri,
- enzimatik reaksiyonlar,
- birbirine ilgi (afinite) göstererek bağlanan moleküllerin tayininde (antijen-antikor reaksiyonu veya DNA hibridizasyonu gibi)
- yaşayan biyolojik sistemlerde karmaşık biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesi sonucu oluşan potansiyel değişimler (sinir hücrelerinde potansiyel değişimi vb.). tayin edilebilmektedir.

Mikrometre boyutundaki alan etkili sensörlerin DNA analizlerinde, nanomolar düzeyde DNA konsantrasyonlarının tespiti ve bazı bazıları mutasyona uğramış dizilerin analizi için İSFET'lerin kullanımı ise oldukça yeni ve ilgi çekici bir konudur [104]. Hibridizasyon öncesi ve sonrasında elde edilen yanıtlardaki farklılık esasına göre tayin gerçekleştirilmektedir.

1.2.6.3.2. Taramalı elektrokimyasal mikroskopi (Scanning electrochemical microscopy, SECM)

Taramalı elektrokimyasal mikroskopi tekniği, ultramikroelektrot kullanılarak çeşitli yüzeylerdeki modifikasyonların taranması işlemlerini kapsamaktadır. Ultramikroelektrot yüzeyinde oluşan ve elektrolit çözeltisinden kaynaklanan geri bildirim (feed-back) yanıtı sayesinde tayin gerçekleştirilir. Bu şekilde çeşitli biyolojik maddelerin analizleri yapılabilmektedir. [347-349].

1.2.6.3.3. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) [371]

Elektriksel bir devreden akımın geçişine karşı gösterilen direnç Ohm kanununa göre açıklanmaktadır:

$$R = V / I$$

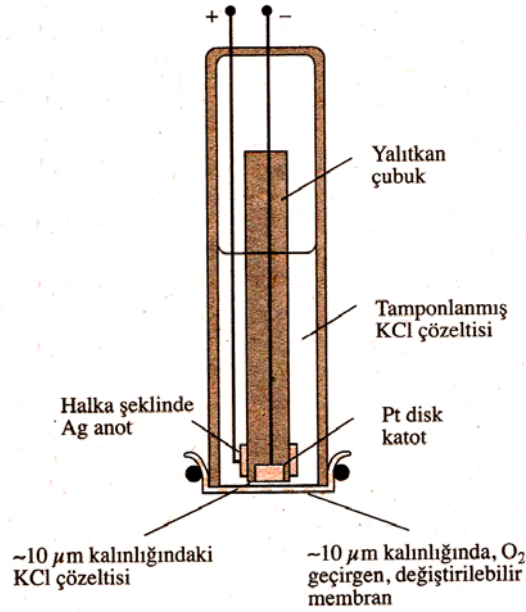
Elektrokimyasal empedans, genellikle alternatif akım potansiyeli uygulanan devrelerde elektrokimyasal hücredeki akımın ölçümüdür. Alternatif akım yanıtı, uyarılmayı ve frekansı da içermektedir.

Elektrokimyasal empedans ve kapasitans biyosensörler DNA hibridizasyonu ve antijen-antikor bağlanması gibi çalışmalarda da ölçümde yüksek hassasiyete sahip

olmaları nedeniyle son yıllarda de bilim dünyasında tercih edilmektedirler. Ölçümlerde, bağlanma gerçekleştiğinde empedans yanıtındaki değişime göre tayinler gerçekleştirilir.

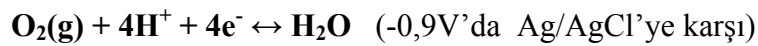
1.2.6.3.4. Voltametrik sensörler:

Günümüze kadar çok sayıda voltametrik sistemin sanayi ve araştırma çalışmaları için ticari olarak geliştirilmiştir. Özellikle kan, evsel atık, deniz suyu, kimyasal atık, toprak gibi sulu ortamlarda çözünmüş oksijenin tayini, son derece önemlidir. İlk voltametrik sensör 1956 yılında L. C. Clark tarafından geliştirilen *Clark oksijen sensörü*'dür [140].

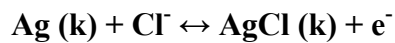


Şekil 41: Clark oksijen sensörü [6].

Katot reaksiyonu:



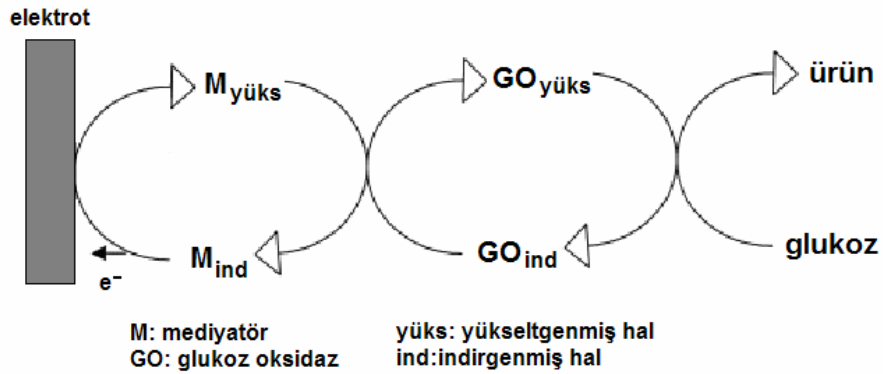
Anot reaksiyonu:



Akan veya karıştırılan bir analiz çözeltisine sensör daldırılınca çözeltideki oksijen önce membran içinden disk katodun hemen yanındaki ince elektrolit tabakasına ve oradan da elektroda difüze olur ve suya indirgenir. Burada iki farklı difüzyon durumu söz konusudur. Birincisi difüzyon membranı boyunca, ikincisi de membran ile elektrot yüzeyi arasındaki çözeltiden olur. 10-20 sn gibi kısa bir sürede kararlı bir duruma ulaşılması için membran ve elektrolit filminin kalınlığı 20µm veya daha az olmalıdır. Kararlı bir akıma ulaşma hızını membran boyunca oksijen aktarımı ile ilgili dengenin hızı belirlemektedir.

Clark oksijen sensörü, kan ve diğer vücut sıvılarındaki O₂'nin tayini için klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

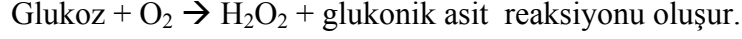
Ticari olarak çok sayıda enzim esaslı voltametrik sensörler de klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle klinik laboratuvarlarında kan serumu örneklerinde rutin glukoz tayininde glukoz sensörü kullanılmaktadır.



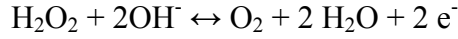
Şekil 42: 2. nesil glukoz biyosensörünün çalışma ilkesi.

Oksijen sensörü yapısına benzer yapıya sahip olan bu sensörde membran üç ayrı tabakadan oluşmuştur. Dış tabaka polikarbonat bir film den oluşur ve sadece glukozu karşı geçirgenlik özelliğine sahiptir, protein ve diğer kan bileşenlerini geçirmez. Orta tabakaya glukoz oksidaz enzimi immobilize edilmiştir. En içteki

tabaka ise selüloz asetat yapısında ve hidrojen peroksit gibi küçük molekülleri geçiren bir membrandır. Sensör glukoz içeren bir çözeltiliye daldırıldığında, dış membrandan difüze olan glukoz enzime geçer ve



Oluşan hidrojen peroksit, membranın en iç tabakasına, oradan da elektrot yüzeyine difüze olur ve oksijen vermek üzere yükseltgenir.



Oluşan akım analit çözeltilisinin glukoz konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Klinik açıdan önemli diğer türlerin (Ör: sakaroz, laktoz, etanol ve L-laktat vb.) enzimatik yükseltgenmesiyle oluşan hidrojen peroksitin voltametrik ölçümüne dayalı başka sensörler de mevcuttur. Her tür için sensördeki enzim farklıdır.

1.2.7. DNA Biyosensörleri

Genetik ve bulaşıcı hastalıkların moleküler düzeyde tayini, DNA'da meydana gelen çeşitli mutasyonların analizi, DNA'ya hedeflenmiş ilaçların etki mekanizmalarının aydınlatılması, DNA ile etkileşime giren toksik moleküllerin analizi, çevresel kirliliğe neden olan mikroorganizmaların tayini, genetik yapısı değiştirilmiş gıdaların analizi son yıllarda moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanında görülen gelişmelerle gerçekleştirilebilecek önemli konular arasında yer almıştır [231].

Geniş kapsamlı genetik testler, kolay kullanımı olan, hızlı cevap veren, ucuz ve küçültülebilir analitik cihazlar gerektirmektedir. DNA analizi temelde DNA hibridizasyonu esasına dayanmaktadır. Bu nedenle günümüze dek kullanımları devam eden jel elektroforezi, membran blot gibi yavaş ve yoğun bilgi gerektiren

klasik tekniklere yeni alternatifler getirilmektedir (klasik yöntemlerin sakıncalarına ilişkin ayrıntılı açıklama giriş ve amaç kısmında yer almaktadır.) Son 10 yıl içerisinde bu alanda geliştirilen DNA'ya dayalı elektrokimyasal biyosensörler (genosensörler) ilgiyle izlenen gelişmelere yol açmaktadır. [364]. Günümüze kadar yapılmış DNA biyosensörü çalışmalarında yer alan algılama metodları temel olarak 5 grupta toplanabilir:

1. İşaretli sentetik hedef dizi kullanımı [1, 79, 274]
2. İşaretli sinyal probu varlığında sandviç hibridizasyon tekniği kullanımı [132, 157, 354, 368, 369]
3. Mediyatör/interkalatör maddenin tek sarmal ve çift sarmal DNA'ya olan farklı ilgisi üzerinden [79, 92, 234, 297, 325].
4. Mevcut yüzey özelliklerinin değişmesi üzerinden [218]
5. DNA bazlarının elektroaktiflik özelliklerinin kullanımı [267]

Tüm metodlarda genel olarak izlenen yol, ilk olarak bakteri, virüs veya insan DNA'sında, aranılan özelliğe ait ve genom çalışmalarıyla dizisi belirlenmiş kısa bir DNA parçasının (oligonükleotit) hibridizasyon için gerekli ilk zinciri oluşturması için seçilmesi(bu zincire prob adı verilmektedir) ile başlar. Örneklerden çeşitli yöntemlerle izole edilen ve polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan çift sarmal DNA, yüksek ısı uygulanması gibi çeşitli yöntemlerle tek sarmal DNA haline getirilir(denatürasyon). Bu şekilde tek sarmal hale getirilen hedef zincir ile prob, eğer birbirlerinin tam karşılığı olan baz dizilimi içeriyorlarsa (birbirlerinin karşılığı iseler) birleşerek çift sarmal oluşturmaktadırlar. Oluşan çift sarmal DNA'ya hibrit, olaya ise hibridizasyon denilmektedir [22, 271, 275].

Özetle; daha kolay, daha hızlı ve daha ucuz analiz vadeden elektrokimyasal biyosensörler, kısa ve tek sarmal yapıda oligonükleotid dizisinden oluşmuş nükleik

asit tanıma tabakası (prob) içerirler. Kolaylıkla oluşturulabilen ve tekrar kullanım için yenilenebilen bu tabaka ile hedeflenen çözelti etkileştirildiğinde hibridizasyon gerçekleşir ve böylece biyosensörün tanıma işlevi gerçekleşir. Prob dizi ile proba özgü hedef dizinin bağlanması biyosensördeki çevirici sistemi sayesinde ölçülebilen bir analitik sinyale (elektrik sinyaline) dönüştürülür [231, 364].

Çevirici sistemler optik [19, 20, 21, 74, 75] elektrokimyasal [91, 93, 219, 271, 272, 275, 341] veya kütleyle duyarlı (piezoelektrik) [44] olabilmektedir.

Spektrofotometrik yöntemlerin esası, hedef diziye tutturulan bir maddenin, hibrit oluşumundan önceki ve sonraki absorbans ölçümüne dayanmaktadır. Elektrokimyasal yöntemlerin esası ise, prob ile etkileştiği zaman farklı, hibrit ile etkileştiği zaman farklı sinyal (akım yanıtı) veren bir maddenin indirgenme veya yükseltgenme sinyalinin veya madde kullanmaksızın doğrudan DNA sinyalinin(guanin bazına ait olan yükseltgenme sinyalinin) ölçülmesine dayanmaktadır. Kütleyle duyarlı sistemlerde ise hibridizasyon öncesi ve sonrası değişen frekans üzerinden tayinler gerçekleştirilir.

Elektrokimyasal çeviricilerin kullanıldığı DNA biyosensörleri geçmişte tasarımı yapılmış ve kullanılmış diğer algılayıcı sistemlere, yeni bir alternatiftir ve tek nokta mutasyon analizlerinde de başarılı sonuçlar vermektedir [28, 157, 177, 208, 262, 400]. Yüksek hassasiyete sahip bu genosensörlerin ayrıca küçültülebilir (mikro-fabrikasyona uygun) olmaları, taşınabilir ve tek kullanımlık modellerinin tasarlanabilmesi, ucuz olmaları, düşük miktarda güç ve ürün gereksinimleri olması gibi çok önemli yararları da bulunmaktadır. Tüm bu nedenlerle son yıllarda elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarımıyla DNA analizlerinde büyük artış olmuştur [364].

Tipik bir elektrokimyasal DNA biyosensörünün üç aşamada tasarımı yapılır:

- 1- Prob tutturulması (immobilizasyon)
- 2- Hedef dizi ile hibridizasyon
- 3- İşaretlemeye dayalı veya işaretlemesiz tekniklerin kullanımıyla tayinin yapılması.

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri tasarımında en önemli basamak prob olarak kullanılacak DNA parçasının elektrot yüzeyine tutturulması basamağıdır.

1.2.7.1. DNA Biyosensörlerinde prob dizilerinin elektrot yüzeyine modifiye edilme yolları (prob dizi tutturulması):

DNA biyosensörlerinde 18-40 mer oligonükleotitler prob olarak elektrot yüzeyine tutturulmaktadır [212]. Prob dizisi elektrot yüzeyine güçlü ve düzenli şekilde bağlandığında, hibridizasyonun tayini daha kolay gerçekleşecektir [133, 202, 290] ve oluşan hibritin çeşitli fiziksel veya kimyasal etkenlerden etkilenip yüzeyden kopması gibi olumsuz etkiler de nispeten ortadan kalkacaktır. Günümüzde araştırmacılar DNA tanıma yüzeyinin kararlılığını arttırmak için deneyler yapmakta ve en düşük maliyetle, uygulama kolaylığı ve spesifik immobilizasyon sağlayacak tekniği bulmaya çalışmaktadırlar [71]. Kullanılacak tekniğe göre elektrot yüzeyinde yatay veya düşey olarak tutturulmuş DNA tanıma katmanı elde edilmektedir. Prob tutturma yönteminin DNA çiplerine uygulanabilirliği de göz önünde bulundurulmaktadır.

1.2.7.1.1. Adsorbsiyon yoluyla prob tutturulması (ıslak adsorbsiyon tekniği):

Kısa DNA dizisi (prob) içeren analizlenecek çözeltinin elektroda uygulanması [88, 260] ile elektrot yüzeyine prob immobilizasyonu gerçekleştirilir. DNA, elektrot yüzeyine adsorbe olur. Prob immobilizasyonu açısından en basit yöntem olup, otomasyona uygulanabilirliği çok kolaydır. Yöntem, pahalı kimyasal madde kullanımını ve elektrokimyasal potansiyel uygulaması gibi basamakları ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle ucuzdur ve tayin süresini de kısaltmaktadır.

1.2.7.1.2. Elektrostatik yolla prob tutturulması:

Elektrot yüzeyine (+) pozitif potansiyel uygulanması (-) yüklü fosfat omurgasına sahip olan DNA'nın elektriksel çekim kuvvetleri sayesinde yüzeye paralel olarak tutunmasını sağlar [91, 221, 223, 297, 310, 373, 380, 382]. Yöntem pahalı kimyasal kullanımını gerektirmemektedir.

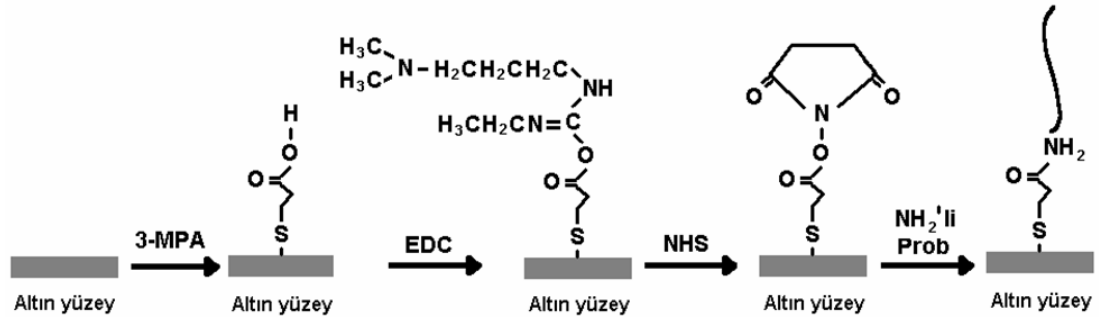
1.2.7.1.3. Kovalent yolla prob tutturulması:

DNA dizilerinin elektrot yüzeyine kovalent olarak tutturulmasında karbodiimit [133,156, 202, 231, 234, 235, 262] ve silan kimyası [83] sıklıkla kullanılmaktadır.

Altın elektrotlar (solid altın elektrotları, tek kullanımlık perde baskılı altın elektrotlar) ve altın nanopartiküller için ilk olarak 3-merkaptopropiyonik asit [179, 262] veya L-sistein/sisteamin [17, 24, 263] kullanılarak tiyol gruplarının elektrot yüzeyine tutunması sağlanır. Burada -SH gruplarının altın metaline olan güçlü afinitesinden yararlanır [56, 57, 254, 397]. Daha sonra N-Hidroksi süksinimit (NHS) ve etil

karbodiimit (EDC) gibi kovalent ajanlar kullanılarak amino grubu içeren DNA probunun yüzeyde sıkı bir şekilde tutunmasına imkan sağlayan zemin oluşturulur [115, 136, 263].

Bu metod, altın elektroda özgü olan yüzey kaplama metodudur.

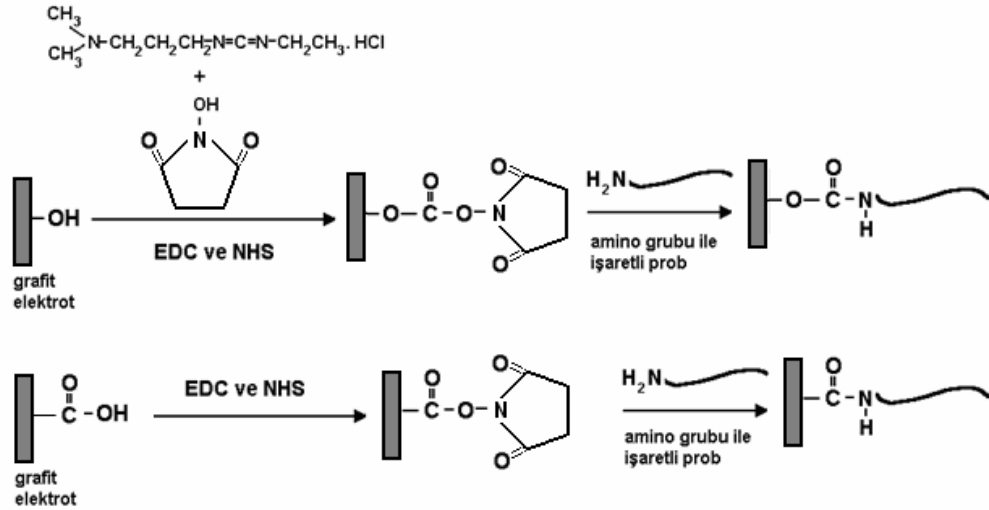


Şekil 43: Altın elektrot yüzeylerinde kimyasal ajanlarla kovalent bağlanma.

Ayrıca bu teknikle elektrot yüzeyinde merkaptopropiyonik asit kullanımıyla elde edilen tiyol grupları sayesinde DNA probları, elektrot yüzeyine dikey olarak ve düzenli şekilde tutturulduğu için hibridizasyon basamağında, yatay şekilde prob tutturulması yöntemine oranla daha yüksek başarı elde edilmektedir [133, 290]. Elektrot yüzeyinde oluşturulan prob tabakasının düzenli oluşunun hibridizasyon tayininde önemli bir görevi vardır.

Tiyol veya disülfid ucuna sahip (bu gruplarla işaretli) problar da altın elektrot yüzeyine kovalent yolla oligonükleotit bağlamada kullanılabilir [8, 10, 133, 155, 176, 180, 202, 227, 334]. Sentezin nispeten pahalı oluşu yöntemin tek sakıncasıdır.

Karbon(grafit) elektrot yüzeyine kovalent yolla prob bağlanması, 3-merkaptopropiyonik asit gibi ajanlara olan gereksinimi ortadan kaldırmaktadır. Sadece kovalent bağlama kimyasalları ile yapılan veya elektrot ön hazırlık işleminden sonra kovalent ajanlarla yapılan kaplamada, yüzeye amino grubu ile işaretli prob güçlü şekilde bağlanmaktadır [410].



Şekil 44: Grafit elektrot yüzeyinde kovalent ajanlarla yapılan NH_2 grubu ile işaretli DNA probu modifikasyonu.

1.2.7.1.4. Avidin-Biyotin Etkileşimi Nedeni ile Streptavidinle Kaplı Yüzeye Biyotinle İşaretlenmiş Probların Tutturulması

Streptavidin ile kaplanmış çeşitli elektrot yüzeylerine ya da manyetik boncuklar gibi yüzeyler üzerine, biyotin ile işaretlenmiş problemler, streptavidin ve biyotinin birbirine olan güçlü afinitesi nedeniyle spesifik şekilde tutturulmaktadır [51, 76, 82, 221, 222, 295, 337, 367].

1.2.7.2. Hibridizasyon

Prob tutturulmuş elektrot hedefini içeren çözeltiyle etkileştirildiğinde birbirinin karşılığı olan iki DNA dizisi birbirine hidrojen bağı köprüleri kurulmasıyla bağlanır. Hibridizasyon işlemi çözelti içerisinde veya elektrot yüzeyinde nötr pH'da gerçekleştirilebilir [123]. Hibridizasyon işleminde hibrit ölçümü alınacak elektrotlar

dışındaki elektrotlar, hedef içermeyen tampon ile etkileştirilir (hibridizasyon süresince bekletilir).

1.2.7.3. İstenmeyen Bağlanmaların Önlenmesi

Tasarımı yapılan biyosensörün seçimli şekilde hedefine bağlanması beklenmektedir. Bu nedenle hem hedef dizi ile, hem de hedef diziden farklı baz dizilimine sahip dizilerle hibridizasyon işlemi gerçekleştirilir. Hedeflenen dizi dışındaki dizilerle bağlanmanın en az seviyeye indirilmesi için kimyasal maddeler kullanılır. En sık tercih edilen deterjan çözeltileridir [260].

1.2.7.4. Tayin

Elektrokimyasal tayinler, DNA'nın elektroaktif bazlarının sinyalleri üzerinden işaretlemesiz olarak [114, 135, 165, 214, 268, 312, 341, 367, 373, 381, 390] veya hibridizasyon indikatörü/interkalatör maddelerin kullanımıyla ve bu maddelerin yükseltgenme/indirgenme sinyalleri üzerinden işaretlemeye dayalı olarak [91, 92, 129, 219, 231, 233, 333, 386] veya enzimle işaretleme yapılarak oluşan ürün üzerinden [12, 49, 54, 68] gerçekleştirilebilir.

1.2.7.4.1. İşaretlemeye Dayalı DNA Dizi Algılama Yöntemleri

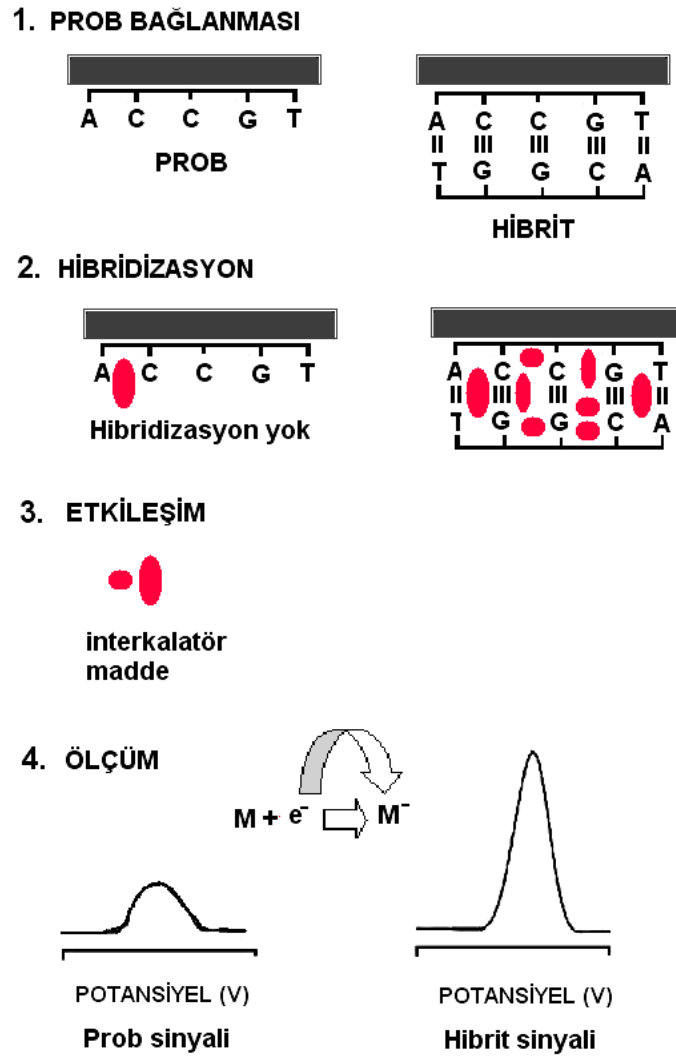
1.2.7.4.1.1. Mediyatör/İndikatör/Enzim Aracılığı ile Tayin

Tayinlerde mediyatör veya indikatör maddelerin veya oluşan ürünün [51, 269] elektroaktif sinyalleri incelenir. Bu maddeler, elektrot yüzeyinde tek sarmal DNA

varken farklı, çift sarmal DNA varken farklı yanıt verirler [411]. Bu sayede maddeler hibridizasyon belirteci olarak kullanılabilirler.

1.2.7.4.1.2. İnterkalatör Aracılığı ile Tayin

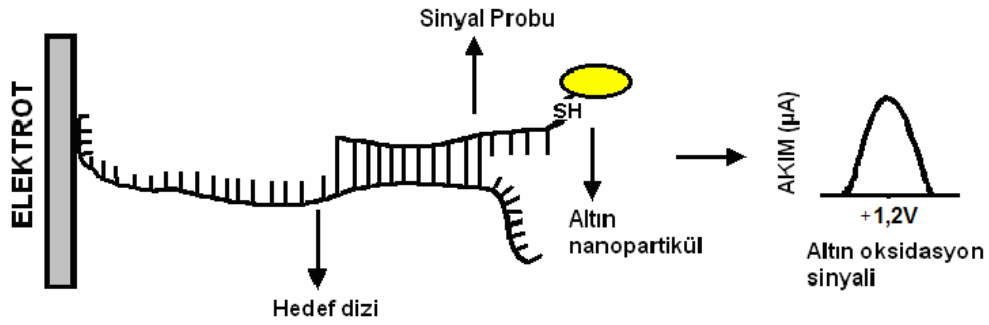
DNA çift sarmalı arasına girerek birikme özelliğine sahip olan interkalatörler, elektrot yüzeyinde çift sarmal yapı varken yüksek elektroaktif yanıt verirler.



Şekil 45: İnterkalatörlü tayin sisteminin çalışma ilkesi

1.2.7.4.1.3. Elektroaktif Madde ile veya Nanopartikülle İşaretleme Yoluyla Tayin [242, 365]

Elektrot yüzeyinde hibridizasyon gerçekleştiğinde sinyal probundaki elektroaktif işaretin yükseltgenmesi veya indirgenmesiyle elektrokimyasal yanıt elde edilmektedir.



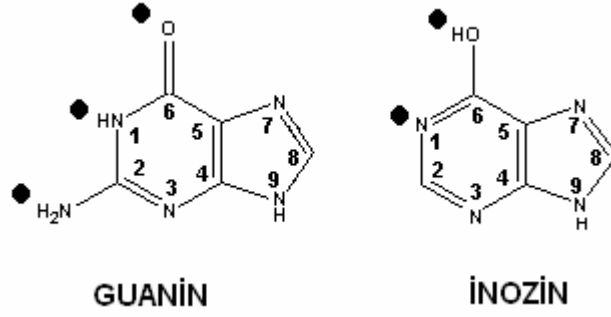
Şekil 46: Elektroaktif madde ile işaretli oligonükleotit kullanımı ile tayin.

1.2.7.4.2. İşaretlemelessiz DNA Dizi Algılama Yöntemleri

1.2.7.4.2. 1. Elektroaktif DNA Bazlarının Sinyali ile Tayin [272, 381]

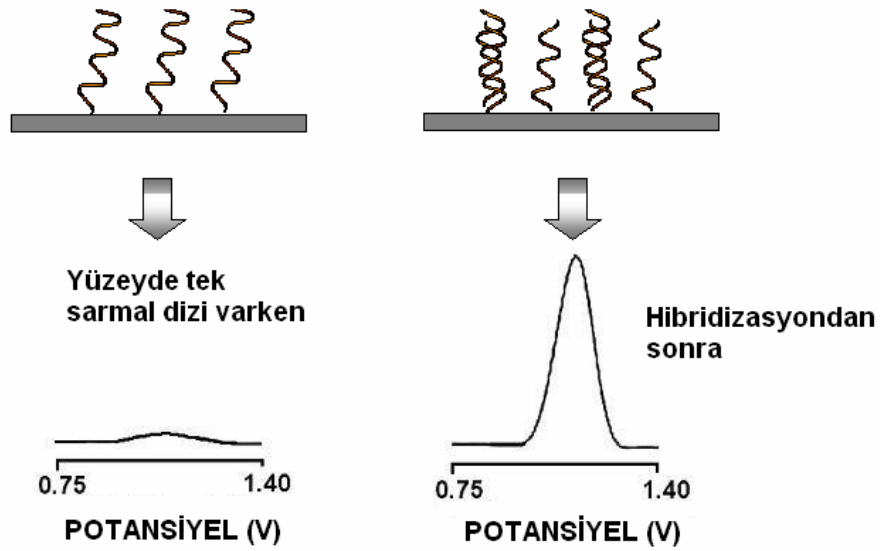
DNA'daki en elektroaktif bazlar guanin ve adenindir. Guanin bazı yaklaşık olarak +1,0V civarında, adenin ise +1,3V civarında yükseltgenir. Bu bazların elektro-yükseltgenmeleri ile elde edilen yanıtlar, elektrot yüzeyinde tek sarmal dizi varken bu bazlar yükseltgenmeye açık halde bulunduğundan yüksektir. Hibridizasyon gerçekleştiğinde ise kurulan hidrojen bağı köprüleri nedeniyle bazlar kısmen yükseltgenmeye kapalı konuma gelir, bu nedenle yanıtta azalma gözlenir.

Diğer bir tayin sistemi ise evet/hayır sistemi adı verilen ve prob dizinin içeriğinde bulunan guaninlerin inozin şeklinde sentezlettilmesi ile oluşturulur.



Şekil 47: Guanin ve inozinin kimyasal yapıları.

İnozün guanin analogudur. Guanine yapıca benzemesine ve sitozinle hibritleşme göstermesine rağmen, +1,0V civarında yükseltgenme sinyali vermemektedir. Bu nedenle yalnızca inozinli prob dizi elektrot yüzeyindeyken herhangi bir yanıt alınmazken hibridizasyondan sonra hedeften gelen guaninlerden dolayı yanıt elde edilir.



Şekil 48: İnozlinli prob ile tayin sisteminin çalışma ilkesi.

1.2.7.5. Madde-DNA Etkileşmesinin ve DNA Hibridizasyonunun Tayinine Yönelik Biyosensör Tasarımı [114, 260, 273, 295]

Günümüze dek tasarımı yapılan genosensörlerde iki temel konu üzerine yoğunlaşma görülmektedir; madde DNA etkileşimine dayalı genosensörler ve DNA hibridizasyonuna dayalı genosensörler.

Kimyasal maddeler veya radyasyonla DNA'nın etkileşmesi, maddelerin DNA bazlarına/ şeker-fosfat omurgasına kovalent bağlanması, omurganın bağlanma sonucu kesilmesi veya kovalent olmayan bağlanmalar (interkalasyon, DNA'da büyük ve küçük oluklara bağlanma, elektrostatik tutunma) ile sonuçlanabilir [268]. DNA hasarı ölümcül değişimlere, mutasyonlara ve hücre hayatının değişmesine neden olabileceğinden, erken tanısı önem taşımaktadır. Hibridizasyon tanısına yönelik genosensörler ise çeşitli bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların, mutasyonların, mikroorganizmaların tayininde önemli rol oynamaktadır.

1.2.7.5.1. Madde -DNA Etkileşmesine Dayalı DNA Biyosensörleri

Bazı kimyasal maddelerin (ilaç, çevresel atıklar, vb.) DNA ile olan etkileşmesinin geliştirilen yeni biyosensörlerle incelenmesi;

- i. yeni ilaç tasarımı,
- ii. çevresel toksik madde analizleri,
- iii. çeşitli kimyasal silahların (kimyasal savaş ajanlarının) tayinini gündeme getirmiştir.

Tüm bu gelişmeler ilaç ve savunma sanayileri, çevre mühendisliği açısından önem taşımaktadır.

Çeşitli maddeler, dsDNA ile ; elektrostatik bağlanarak, DNA çift sarmal yapısının küçük ve büyük oluklarına bağlanarak [130] veya doğal yapı DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyon yaparak etkileşir [26, 131, 164, 407].

1.2.7.5.1.1. İlaç-DNA Etkileşmesine Dayalı DNA Biyosensörleri

İlaç molekülleri ile DNA'nın etkileşmesi ve bu etkileşimin tayini [74, 266, 268, 273], elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımlarına yeni bir boyut getirmiştir. Özellikle eczacılık alanında geliştirilen yeni ilaçların DNA ile etkileşmesinin tayini, kısa sürede ve hassas şekilde biyosensörlerle gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca antisens ilaçla tedavi için DNA'nın belirli uzunluktaki parçasını oluşturan oligonükleotidler kullanılmaktadır [301]. Bu gibi etkileşimler DNA biyosensörleriyle algılanabilmektedir.

İlaç molekülünün çift sarmal DNA ile etkileşimi; negatif yüklü şeker-fosfat grubu ile elektrostatik olarak etkileşim, çift sarmalin büyük ve küçük oluklarına bağlanma veya interkalasyonla olabilmektedir. Bilindiği gibi birçok antikanser ilaç etkisini DNA'ya bağlanarak göstermektedir. Bu bağlanmanın tayini sayesinde yeni sentezlenen antikanser ilaçların etki mekanizmasının aydınlatılması mümkün olmaktadır.

Elektrokimyasal biyosensörlerle yapılan ilaç-DNA etkileşmesine dayalı çalışmalarda DNA ile etkileşen ilaçlardan elde edilen sinyalde bir azalma veya artış gözlenmesiyle [38, 217] veya DNA'daki bazlarının (adenin veya guanin) sinyalindeki değişim üzerinden [90, 261] duyarlı tayinler yapılmaktadır. Bazı ilaç molekülleri ise sadece DNA tutturulmuş yüzeyle etkileştiklerinde sinyal azalması/artışı göstermektedir [387]. Yeni antibiyotik, antiviral, antitümör ilaç ve

antisens oligonükleotitlerine dayalı ilaç hedefleme çalışmalarına yön vermek [74, 238] veya bir ilaç hammaddesinin detaylı analizinin duyarlı şekilde gerçekleştirilmesini sağlamak gibi amaçlarla madde-DNA etkileşimine dayalı biyosensörler geliştirme çalışmaları devam etmektedir [38, 387].

1.2.7.5.1.2. Toksik Madde-DNA Etkileşimine Yönelik DNA Biyosensörleri (Çevresel Analizlerde):

Su, toprak, hava analizlerinde DNA biyosensörü kullanımı son yıllarda ilgi çeken bir konudur [58, 90, 194, 213]. Toksikitesi incelenen madde ile tanıma katmanı olarak DNA tutturulmuş biyosensör etkileştirilerek elde edilen madde veya DNA redoks özelliklerindeki değişime dayalı yanıtlardaki farklanmalar incelenmektedir [178].

1.2.7.5.1.3. Kimyasal Savaş Ajanlarının Tayinine Yönelik Biyosensörler

Kimyasal silah amacıyla kullanılan maddeler de benzer şekilde biyosensör tasarımlarına uygulanabilir [264]. Özellikle organofosfat bileşimine sahip maddelerin DNA'ya verdikleri büyük hasar biyosensör teknolojisi kullanılarak saptanabilmektedir. Simonian ve arkadaşları, optik biyosensör kullanarak organofosfatlı savaş ajanları ve pestisit tayinini [302], Wang ve arkadaşları ise akışkan enjeksiyon yöntemini kullanarak nitroaromatik patlayıcılar ve organofosfatlı sinir gazlarının tayinini tek kanal mikroçip sisteminde gerçekleştirmişlerdir [372]. Yine organofosfatlı bileşiklerin tayini için Tusarova ve arkadaşları asetilkolinesteraz enzim inhibisyonuna dayalı teknik geliştirmişlerdir [351]. Bu konuda yapılmış diğer

bir çalışma ise asetilkolin esteraz enzim biyosensörü kullanarak organik çözeltilerde pestisit tayini Mionetto ve arkadaşları tarafından [236] yapılmıştır.

1.2.7.5.2. DNA Hibridizasyonuna Dayalı DNA Biyosensörleri

DNA hibridizasyon tayini için tasarımı yapılacak biyosensörlerin iki önemli görevi yerine getirmesi gerekmektedir:

- 1) Hedefteki tek bazdaki farklılığı yakalamaya imkan verecek şekilde seçimlilik (hedefe özgül bağlanma; hedef diziyile rastgele / bir veya birkaç bazı hedeften farklı dizileri seçimli olarak ayırt etme)
- 2) Düşük tayin sınırı (yüksek hassasiyet)

1.2.7.5.2.1. Bulaşıcı ve Kalıtsal Hastalıkların /Mutasyonların Tanısına Yönelik DNA Biyosensörleri

Biyolojik örneklerde çeşitli yöntemlerle özgün DNA dizisi saptanması biyomedikal alanda çok önemlidir. İnsan, virüs ve bakteri DNA'sının bazı dizilimlerinin aydınlatılmasıyla pek çok kalıtsal hastalığa sebep olan mutasyonlar artık saptanabilmektedir.

Diziye özgü DNA biyosensörleri, bir çevirim sistemi ile beraber DNA probundan oluşmuştur. Tek sarmal kısa oligonükleotit içeren ve aranan hedefin bazı dizisinin karşılığı olan proplar çözelti içerisinde kendisine seçimli bağlanacak kısmı seçerler ve hibritleşirler [133]. Bu bağlanmanın tasarımı yapılan biyosensörlerle kısa sürede ve yüksek duyarlılıkta algılanması mümkün olmaktadır.

İnsan genom projesindeki gelişmelerle birlikte kalıtsal hastalıklara ait genom dizilimlerinin bulunması hibridizasyona dayalı DNA biyosensörlerinin gelişimlerini hızlandırmıştır. DNA’da meydana gelen mutasyonların (tek nokta mutasyonları dahil) da günümüz biyosensör teknolojisi ile tayini olanaklıdır [79, 170, 212, 297].

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanılarak gerçekleştirilen elektrokimyasal ölçümlerde hibritin olduğu elektrot, bir elektroaktif indikatör içeren (örneğin bir redoks-aktif katyonik metal kompleksi) bir çözeltiliye daldırılır ve indikatörün hibrite bağlanma düzeyi belirlenir. Hibridizasyon oluşumundan sonra bu hibritle etkileşen indikatörün neden olduğu artan veya azalan elektrokimyasal yanıt, hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kabul edilir [213, 344, 383]. Hibridizasyon indikatörü, ölçülebilir şekilde tek sarmal ve çift sarmal DNA ile etkileşen bileşiktir. Örneğin, *Co(III)* [47, 52, 53, 169, 234, 235, 358]; *Fe (II)* [53, 167]; *Ru(II)* [20, 167, 168] ; *Os (II)*, *Os(IV)* [67, 215] 'nin 1,10-fenantrolin ve 2,2'-bipiridin komplekslerinin DNA ile etkileşmesi voltametrik olarak çalışılabilmektedir.

J. Wang ve arkadaşları, karbon pastası kullanarak geliştirdikleri elektrokimyasal DNA hibridizasyon biyosensörleri ile HIV [380] ve *Mycobacterium tuberculosis* [388]'e ait DNA dizilerini kobalt içeren indikatörle tayin etmişlerdir.

Tek nokta mutasyon tayinlerinde DNA’ya göre daha hassas sonuçlar veren PNA 'dan yararlanarak daha özgül tayinler, PNA’ya dayalı biyosensörlerle gerçekleştirilmektedir. DNA ile çift sarmal oluşturabilen PNA’lar “prob” olarak kullanıldığında; hedef DNA’ya daha seçici olarak bağlanırlar. Böylelikle PNA problemleri, çeşitli hastalıklara neden olan nokta mutasyonlarını kolaylıkla tayin edilebilmektedirler [262]. Tek nokta mutasyonlarının tayini için biyosensör teknolojisinde kullanılacak yöntemler geleceğin hastalıklarının kısa sürede tayininde önemli rol oynayacaklardır [112,170, 212].

Çeşitli DNA analizlerinde işaretlemesiz teknikler de kullanılmaktadır [88, 114, 165, 214, 260, 349, 368, 390, 391, 394].

Hepatit B ve TT Virüslerinin tayinine yönelik indikatörlü genosensör tasarımları laboratuvarımızda gerçekleştirilmiştir. Kanın pıhtılaşma faktörlerinden biri olan Faktör V'e ait gen dizisinde gözlenen mutasyona yönelik tayin çalışmaları ise altın nanopartiküller kullanılarak ve ayrıca indikatörsüz genosensör tasarımıyla iki değişik yolla tayin edilmiştir [228, 260, 263].

Günümüze kadar, gerek indikatör madde kullanımıyla, gerekse guanin bazının yükseltgenmesine dayalı işaretlemesiz yolla gerçekleştirilen tanıya yönelik biyosensör çalışmaları [212, 364] mikroçip firmalarınca yakından izlenmektedir.

1.2.7.5.2.2. Gıdalarda İstenmeyen Mikroorganizmaların ve Çevre/İnsan Sağlığını Olumsuz Etkileyen Mikroorganizmaların Tayinine Yönelik DNA Biyosensörleri:

Su, toprak, hava ve gıdalar içine karışan, hem doğal kaynakları hem de insan sağlığını tehdit ederek çeşitli hastalıklara yol açan mikroorganizmaların tayini için birçok biyosensör tasarımı yapılmıştır [106, 174, 318, 339]. Biyosensör sisteminin sahip olduğu fiziksel çeviricilerin yüksek duyarlılığı ile DNA hibridizasyonunun hassasiyetle algılanması, çevre analizlerindeki giderek artan elektrokimyasal biyosensörler kullanımını açıklamaktadır [364]. Elektrokimyasal DNA hibridizasyon tayini hastalık tayinlerine benzer şekilde gıda maddelerindeki mikroorganizmaların tanısı indikatörlü veya indikatörsüz olarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu amaçla tayini yapılacak mikroorganizmanın gen haritasına göre problemler seçilir [220]. Çözelti

ortamında prob ve hedef birbirini tanıyarak hibritleşir. Hibridizasyon olayı biyosensör çeviricisi tarafından ölçülebilir bir sinyale çevrilir.

Mikroorganizma tayinine yönelik çalışmalardan biri, sulara yaşayan Cyanobacteria sınıfından Microcystis'in tayinidir. Microcystis halka yapılı heptapeptidler(Mycrocystin) üreterek, yaşadığı suları içen insanlarda ve hayvanlarda karaciğer hasarına varan akut zehirlenmelere neden olmaktadır. Çalışmada hibridizasyon indikatörü Metilen mavisi (MB) ve rutenyum komplekslerinin çift sarmal DNA (dsDNA) ve tek sarmal DNA (ssDNA) ile farklı şekillerde etkileşmesi esasına dayalı şekilde tayin gerçekleştirilmiştir [89].

1.2.7.5.2.3. Biyolojik Silah Olarak Kullanılabilecek Mikroorganizmaların Tayinine Yönelik DNA Biyosensörleri

Biyolojik silah olarak kullanılabilecek, genetik yapısı modifikasyona uğratılmış/uğratılmamış mikroorganizmalar, hibridizasyon tayini esasına dayalı olarak bölüm 2.7.5.2.1. ve 2.7.5.2.2.' de anlatıldığı gibi tayin edilebilmektedir. Elektrokimyasal sinyal farklılaşmasına dayanılarak analiz gerçekleştirilmektedir [217, 318].

Gerçekleştirilen tüm biyosensör çalışmaları değerlendirildiğinde, elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin seçiciliğinin en az diğer geleneksel metodlar kadar olması ayrıca mevcut sorunları nispeten çözmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. Örneğin kompleks yapıya sahip bazı örneklerin, birtakım ayırma tekniklerini içeren ön analiz işleminden geçirilmesi işlemi günümüzde halen ihtiyaç duyulan diğer bir analiz öncesi işlemdir. Bu durum, toplam analiz süresini ve kullanılan çok çeşitli ekipmanlardan ötürü maliyeti arttırmaktadır. Bu nedenle, geleceğin sensörlerinde ayırma işlemini gerçekleştirecek cihaz parçasının sensör üzerine yerleştirilmesi fikri doğmuştur.

2.7.6. İdeal Bir Elektrokimyasal Biyosensörün Sahip Olması Gereken

Özellikler: [122]

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

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

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

Tekrarlanabilirlik: Algılama yüzeyi içeren elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçların elde edilmesi istenir. Pratikte bu pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak, yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün uygulamalarının 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 konsantrasyonu gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

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

Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı: Tasarımı yapılan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir konsantrasyon 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-konsantrasyon eğrilerinin lineer olduğu konsantrasyon 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 çalışmalarda, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnekte 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 ucuzlaştırılmıştır.

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.

BÖLÜM II

GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar

2.1.1. Elektrokimyasal Sistemler

Tez çalışmamızın 1. bölümünde kullanılan ana elektrokimyasal sistem AUTOLAB 30 (Eco Chemie, Hollanda) ve 2. bölüm çalışmalarında μ -AUTOLAB tip II (Eco Chemie, Hollanda) potansiyostat cihazlarıdır. μ -AUTOLAB cihazında elektrot sistemini VA-standı (Metrohm) taşımaktadır. AUTOLAB cihazları, bilgisayar bağlantılı olarak ve GPES 4.8 yazılım programı (software) ile kullanılmaktadır. Elektrokimyasal analizör ara birim olarak elektrokimyasal hücre içermektedir; hücre ile cihaz arasındaki bağlantıyı genel amaçlı elektrik kabloları sağlamaktadır.

Elektrokimyasal hücre çalışma elektrodu (kalem grafit elektrot-PGE veya perde baskılı karbon elektrot-SPCE), platin karşıt elektrot ve Ag/AgCl referans elektrodundan oluşan “üçlü elektrot sistemini” içermektedir. Hücreyle bağlantılı kablolardan üçü bu elektrotlara bağlıdır, bir kablo ise topraklama için ayrılmıştır. Üçlü elektrot sisteminin içine daldırıldığı ölçüm çözeltisinin hacmi 3-4 ml civarında tutulmuştur.

Çalışmamızın ilk bölümünde kullanılan kalem grafit çalışma elektrodu (Noki kalem model 2000, Japonya) 0,5mm çapında grafit çubuğun (Tombo HB model 0.5mm, Japonya) kalem ve uç kısımları lehimli iletken tel yardımı ile sisteme bağlanması ile oluşturuldu [263]. Grafit çubuk, 10mm'lik kısmı analit çözeltisi içerisine daldırılabilir şekilde kalem içine yerleştirildi. Her ölçüm işlemi öncesinde grafit çubuğun boyu ve ölçüm alınacak çözeltinin deney hücresindeki yüksekliği tekrarlanabilir sonuç elde edilmesi amacıyla ölçüldü. Referans elektrot BAS (Bioanalytical Systems, Inc., ABD.) firmasından temin edildi. Platin karşıt elektrot için 0,5mm çapında platin tel kullanıldı. Elektrokimyasal hücre içerisindeki kütle aktarımı ve karıştırma işlemi için manyetik karıştırıcı sistemi (Termal Laboratuvar Aletleri- Türkiye) ve manyetik mıknatıslar (Roth-Almanya) kullanıldı.

İkinci bölümde kullanılan düzlemsel yapıya sahip perde baskılı üçlü elektrot sistemi 1,5x3,0 ebatlarında olup karbon çalışma elektrodu, karbon karşıt elektrot (Electrodag 423SS) ve Ag yalancı referans elektrot (Electrodag PF-410) içeriğine sahiptir. Polimer bağlayıcı içeren karbon ve gümüş boyalar Acheson Italiana (Milan, İtalya) firmasından temin edildi (boyaların tam içeriği hakkında firma tarafından bilgi verilmemektedir). Önce gümüş referans elektrot, daha sonra karbon çalışma ve karşıt elektrodun basımı DEK 248 perde baskı makinesi (DEK, Weymouth, İngiltere) ile gerçekleştirildi [51]. Çalışma elektrodu 3mm çapında dairesel bir alana sahiptir.

Her iki çalışma elektrodu da tek kullanımlık özelliğe sahiptir. Bu özellikleri ile mikro-üretim (mikroçip) teknolojisine uygulanma altyapısını içermektedirler.

2.1.2. Diğer Cihazlar

Terazi (Sartorius-Analytic A-200)

Ses titreşimli temizleyici (Ultrasonic LC 30 H)

pH-metre (InoLab-Almanya)

Manyetik karıştırıcı (Elektro-mag ve ARE 2-Velp)

Spektrofotometre (UV 160 A-Shimadzu)

PCR cihazı DNA Thermal Cycler PTC-150 (MJ. Research Inc., ABD.)

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde adı	Maddenin satın alındığı firma
α -naftil fosfat	Sigma-Aldrich
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Di potasyum mono hidrojen fosfat	Riedel-de Haen
Dietanolamin	Sigma-Aldrich
Etil karbodiimid 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)	
karbodiimit hidroklorür (EDC)	Sigma
Etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu	Merck
Glasiyel asetik asit (%99-100)	Merck
Hidroklorik asit (%37)	Merck
Mağnezyum klorür	Sigma-Aldrich
N-hidroksi süksinimit (NHS)	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat	Riedel-de Haen
Potasyum klorür	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum klorür	Sigma
Soya fasülyesi tozu	Fluka
Streptavidin-alkalen fosfataz	Sigma-Aldrich
Taq polimeraz enzimi	Amersham Pharmacia Biotech.
Tris(hidroksimetil)aminometan	Sigma
hidroklorür/Trizma hidroklorür	

Tüm çalışmalarda yüksek saflıkta (Millipore su saflaştırma sistemi ve ELGA-STAT Maxima ultrapure water- İngiltere) deiyonize su kullanıldı (18 Mega-ohm'luk) ve çalışmalar oda sıcaklığında ($25,0 \pm 0,5$) °C' de gerçekleştirildi.

2.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Tampon Çözeltiler

Tampon çözeltilerin hazırlanışında ultra saf su kullanılmıştır. Tamponlar hazırlık sonrasında plastik şişelerde, buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltilerinin pH'larının istenilen değere getirilebilmesi, hazırlanan 0,1 N'lik NaOH veya 0,1 N HCl çözeltilerinin ve pH-metre cihazının kullanımıyla gerçekleştirildi.

Tampon adı	İçeriği
Tris-EDTA tamponu (TE)	10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0
Asetat tamponu (ACB)	20mM NaCl, 0,5M glasiyel asetik asit, pH 4,8
Tris-HCl tamponu (TBS)	20mM NaCl, 20mM trizma HCl, pH 7,0
Fosfat tamponu (PBS)	20mM NaCl, 50mM fosfat (KH ₂ PO ₄ ve K ₂ HPO ₄), pH: 7,4
Fosfat tamponu (PBS)	0,5M fosfat (KH ₂ PO ₄ ve K ₂ HPO ₄), pH: 7,0
Dietanolamin tamponu (DEA)	0,1M dietanolamin, 1mM MgCl ₂ , 0,1M KCl, pH 9,6

Tampon çözeltilerin her biri prob tutturulması, hibridizasyon, kovalent bağlanmayı sağlayan kimyasalların hazırlanması vb. gibi amaçlarla kullanılmıştır. Bu konuda ayrıntılı bilgi ilerleyen bölümlerde verilmiştir.

2.2.2. Hepatit B – Lamivudin Direnç Mutasyonlarının Tayini Çalışmasında Kullanılan Oligonükleotitler, Hazırlanışları Ve Saflık Kontrolleri

Hepatit B virüsünün PCR ile çoğaltılarak çalışmada kullanılan bölümüne ait gen haritası:

Tablo 3. 5'→ 3' yönünde HBV genom haritasının Lamivudin'e direnç gelişen bölgesini içeren kısmı.

5' - (372)	<p><i>tcgctggat ggtctgagg cgtttatca tattcctctt catcctgctg ctatgcctca</i> <i>tctcttggt ggtctctctg gattatcaag gtagttgcc cgtttgtcct ctaattccag gatcaacaac</i> <i>aaccagtagg ggaccatgca aaacctgcac gactcctgct caaggcaact ctatgtttcc ctcattgtgc</i> <i>tgtacaaaac ctacggatgg aaattgcacc tgtattccca tcccatcgct ctgggcttcc gcaaaatacc</i> <i>tatgggagtg ggctcagtc cgtttctctt ggctcagttt actagtgcca ttgttcagt ggttcgtagg</i> <i>gctttccccc actgtttggc ttcagc(<u>tat atggatgatg tggatt</u>)ggg ggccaagact gtacagcatc</i> <i>gtgagtcctt ttataccgct gttaccaa</i> (808) - 3'</p>
------------	--

Genom haritasının 372. ve 808. bazları arasında kalan bölge tayini yapılan hedef bölgedir. Haritanın her iki ucunda kalın italik karakterle belirtilen parçalar polimeraz zincir reaksiyonu veya klonlama yöntemiyle DNA çoğaltma işlemi için kullanılan primer dizileri göstermektedir. İlaça karşı direnç gelişiminden sorumlu mutasyonun görüldüğü hedef bölgeye (parantez içinde altı çizili bölümde belirtilmiştir) karşılık olan diziler, elektrot yüzeyine tutturulmak üzere prob olarak seçildi.

Çalışmada kullanılan liyofilize toz halindeki sentetik oligonükleotitlerden problar Thermo Hybrid Interactiva (Almanya)'dan ve hedefler de TIB Molbiol (Almanya) şirketinden sağlandı. Bu oligonükleotitlerin baz dizilimi diğer sayfadaki tabloda belirtilmektedir.

Tablo 4 : Tez çalışmasının 1. bölümünde kullanılan diziler ve içerikleri

DNA dizisinin adı	Dizi içeriği
Prob 1 (Sağlıklı virüs tayini için)	5'- AAT ACC ACA TCA TCC ATA TA -3'
Prob 2 (Mutant-1 tip virüs tayini için)	5'- AAT ACC ACA TCA TCC AcA TA -3'
Prob 3 (Mutant-2 tip virüs tayini için)	5'- AAT ACC ACA TCA TCa ATA TA -3'
<u>Hedef-1 (Sağlıklı tip hedef-YMDD)</u>	<u>5'- TAT ATG GAT GAT GTG GTA TT -3'</u>
Hedef-2 (Mutant-1 tip hedef-YVDD)	5'- TAT <u>gTG</u> GAT GAT GTG GTA TT -3'
Hedef-3 (Mutant-2 tip hedef-YIDD)	5'- TAT <u>ATt</u> GAT GAT GTG GTA TT -3'
Tüm bazları hedeften farklı rastgele (Non complementary) dizi	5'- AAT ACC TGT ATT CCT CGC CTG TC-3'
Tek bazı hedeften farklı(Mismatch) diziler	Prob 1'e karşı hedef 2 ve 3, Prob 2'ye karşı hedef 1 ve 3, Prob 3'e karşı hedef 1 ve 2 nolu diziler

Sentetik dizilerin karakteristik özellikleri:

Bu çalışmada PCR haritasında belirtilen hedef bölgenin tam karşılığı olan dizi prob olarak alınmıştır. PCR haritasındaki sağlıklı (yabanıl tip) HBV virüsüne ait 20 baz uzunluğundaki bölge, hedef-1/YMDD [330] olarak ifade edilen bölgedir. Bu bölgenin tam karşılığı olan dizi, sağlıklı tipteki probu ifade etmektedir (prob-1). Mutant tipteki HBV virüs genomuna ait bölgeler (hedef-2/YVDD ve hedef-3/YIDD) ile hibritleşecek prob-2 ve prob-3 de ilgili dizilerin tam karşılığındırlar. Yakalayıcı problemlerin her biri kendi karşılığı ile tam hibridizasyon yaparken diğer problemlerin karşılıklarıyla prob-tek bazı hedeften farklı dizi etkileşimi ile bağlanırlar (Tek nokta mutasyonu içerdiklerinden dolayı). Biyosensörün seçimliliğinin tespiti için tek bazı hedeften farklı ve tüm bazları hedeften farklı diziler kullanılmıştır.

PCR örneklerinin karakteristik özellikleri

Yabanıl tipteki hedef HBV genomunda (YMDD) Lamivudin kullanımına bağlı olarak oluşan mutasyonlardan biri gen haritasında 743. bazın A'dan G'ye değişmesi

(YVDD), diğeri ise 745. bazın G'den T'ye değişmesidir (YIDD) [257]. Bu değişim nedeniyle hedef bölgede tirozin (Y), metiyonin (M), aspartat (D), ve aspartat (D) olarak adlandırılan sağlıklı (yabani) tipteki HBV aminoasit dizilimi, 1. tip nokta mutasyonun görölmesi durumunda YVDD (metiyonin yerine valin kodonu), 2. tip nokta mutasyonun görölmesi durumunda ise YIDD (metiyonin yerine izolösin kodonu) şekline dönüşür.

Çeşitli HBV varyasyonlarına sahip klonlanmış PCR örnekleri ve gerçek HBV PCR örnekleri (hedef / tek bazı hedeften farklı dizi türlerinde) Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlandı. Toplam 10 adet gerçek PCR ürünü ile mutasyon analizi yapıldı. Analizde, elde edilen sonuçların karşılaştırılmasına yönelik deneyler %1.5 agaroz jel elektroforezi standart alınarak gerçekleştirildi.

Bu oligonükleotid çözeltilerinin hazırlanışı:

Çalışmamızın ilk bölümünde kullanılan liyofilize DNA oligonükleotidlerin stok çözeltileri, derişimleri 1000ppm (mg/L) olacak şekilde 10 mmol/L Tris-HCl ve 1 mmol/L EDTA içeren TE çözeltisi (pH 8,0) ile hazırlandı ve 50µl'lik hacimlerde sterilize edilmiş plastik PCR tüplerine paylaşırılarak -20 ° C de buzlukta saklandı. Bu oligonükleotidlerin seyreltik çözeltileri, uygulama aşamasında kullanılmak üzere problemler 0,5M asetat tamponu (pH:4,8) içerisinde, hedefler 0,02 M Tris-HCl tampon çözeltisi içerisinde hazırlandı.

Sentetik oligonükleotidler ve PCR ürünlerinin Spektrofotometre ile kantitatif miktar tayini

UV-görünür bölge spektrofotometre (UV-vis spectrophotometer, Shimadzu, Japonya) ve 1 mL'lik ve 10 mm uzunluğunda kuvars küvetler (Starna, İngiltere)

kullanılarak yapılan konsantrasyon ölçümünde bir A_{260} birimi çift sarmal DNA 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve bir A_{260} birimi tek sarmal DNA 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ kabul edilerek hesaplama yapılmıştır [260, 263].

2.2.3. *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* Tayini İçin Geliştirilen Biyosensörde Kullanılan Oligonükleotitler, Hazırlanışları ve Saflık Kontrolleri

Salmonella DNA'sında tayini istenen bölgenin genomik haritası:

Salmonella choleraesuis subsp. *choleraesuis* Weldon serotipi Typhimurium LT2 genomik DNA, LGC PROMOCHEM (Milan, Italy) firmasından sağlandı. Bu çalışmada prob diziler doğrudan PCR haritasından seçilmiştir.

Tablo 5. 5' → 3' yönünde gösterilen haritada altı çizili kısımlar primerlerin bağlandığı bölgeleri ifade etmektedir. 5' yönünde kalın olarak işaretlenen bölge yakalayıcı prob, orta kısımda kalın olarak işaretli bölge ise sinyal probu olarak seçilmiştir.

5'GCCGCGCGCGAACGGCGAAGCGTACTGGAAAGGGAAAGCCAGCTT
TACGGTTCCTTTGACGGTGCGATGAAGTTTATCAAAGGTGACGCTATT
GCCGGCATTATTATCTTTGTGAACTTTATTGGCGGTATTTCCGGTG
GGGATGACTCGCCATGGTATGGATTTGTCCTCCGCCCTGTCTACTTATA
CCATGCTGACCATTGGTGATGGTCTTGTCGCCAGATCCCCGCATTGTT
GATTGCGATTAGTGCCGGTTTTATCGTGACCCGCGTAAATGGCGATAG
CGATAATATGGGGCGGAATATCATGACGCAGCTGTTGAACAACCCATT
TGTATTGGTTGTTACGGCTATTTGACCATTTCAATGGGAACTCTGCCG
GGAT 3'

Sentetik kısa oligonükleotitler MWG Biotech AG (Almanya) tarafından sentezlendi ve firmadan liyofilize toz halinde satın alındı. Bu oligonükleotitlerin baz dizilimi aşağıdaki gibidir.

Tablo 6 : Tez çalışmasının 2. bölümünde kullanılan diziler ve içerikleri

DNA dizisinin adı	Dizi içeriği
Prob A	5' GCG CGC GAA CGG 3'
Prob B	5' H ₂ N-(CH ₂) ₁₂ - GCG CGC GAA CGG 3'
Prob C	5'SH-(CH ₂) ₆ - GCG CGC GAA CGG 3'
prob D	5'CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -GCG CGC GAA CGG 3'
Hedef dizi	<u>5'CCG CCA ATA AAG TTC ACA AAA CGC CGT TCG CGC GC 3'</u>
Tüm bazları hedeften farklı rastgele (Non-komplementer) dizi	5' GGC AGA GGC ATC TTC AAC GAT GGC 3'
Biyotinle işaretli sinyal probu (hedefe bağlanan ikinci prob)	5' TTT GTG AAC TTT ATT GGC GG-Biyotin 3'

Bu oligonükleotitlerin hazırlanışı:

Çalışmada kullanılacak tüm oligonükleotitlerin stok çözeltileri 0,5 mol/L(0,5M) NaCl içermeyen fosfat tamponu içerisinde(pH:7,0), 1000µg/ml derişimde olacak şekilde hazırlandı ve -20C'de buzlukta saklandı. Deneyler öncesinde, stok çözeltilerden hareketle hazırlanan seyreltik oligonükleotit çözeltileri fosfat tamponu içerisinde hazırlandı(PBS).

2.2.3.1. *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* Tayininde Kullanılan PCR

Ürünlerinin Elde Edilmesi

Salmonella invA geni ve lektin geni aşağıda dizilimi belirtilen primer diziler kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Lektin geni, çalışmada PCR ürünlerinin kullanıldığı tayinlerde rastgele dizi olarak işlem gördü.

Salmonella Primer 1: 5' GCCGCGCGCGAACGGCGAAG 3'

Salmonella Primer 2: 5'-ATCCCGGCAGAGTTCCCATT 3'

Lektin Primer 1: : 5' TGC CGA AGC AAC CCA AAC ATG ATC C 3'

Lektin Primer 2: 5' GCC CAT CTG CAA GCC TTT TTG TG 3'

388 baz çifti uzunluğundaki *Salmonella* gen *invA* bölgesi, DNA Thermal Cycler PTC-150 cihazı ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonunda hazırlanan karışım ilk olarak; 95°C'de 5dk süreyle bekletildi. İzleyen 35 siklusk döngülerde sırasıyla denatürasyon (95°C'de 1 dk 30 sn süreyle), primer bağlanması (58°C'de 1dk 20 sn süreyle) ve zincir uzaması (72°C'de 2 dk süreyle) işlemleri gerçekleştirildi. Son basamakta ise ürün 72°C'de 7 dk bekletilerek kararlı hale getirildi. Jel elektroforezi ile elde edilen PCR üretiminin başarısı test edildi.

Soya fasülyesi tozundan ekstre edilen 217 baz çifti uzunluğundaki lektin geni DNA'sı Pietsch ve arkadaşlarının 1997'de kullandığı yöntemle göre çoğaltıldı [293].

PCR çözeltilerinin saflık kontrolü

Saflık kontrolü için; hazırlanan dsDNA seyreltik çözeltilerinin UV'de 260 nm ve 280 nm'de okunan absorbans A_{260} ve A_{280} değerleri oranlandı ve bu değerlerin 1,6 ile 1,8 arasında olduğu saptandı [234].

1.2.2.4. Kovalent bağlanmayı sağlayan çözeltinin hazırlanışı:

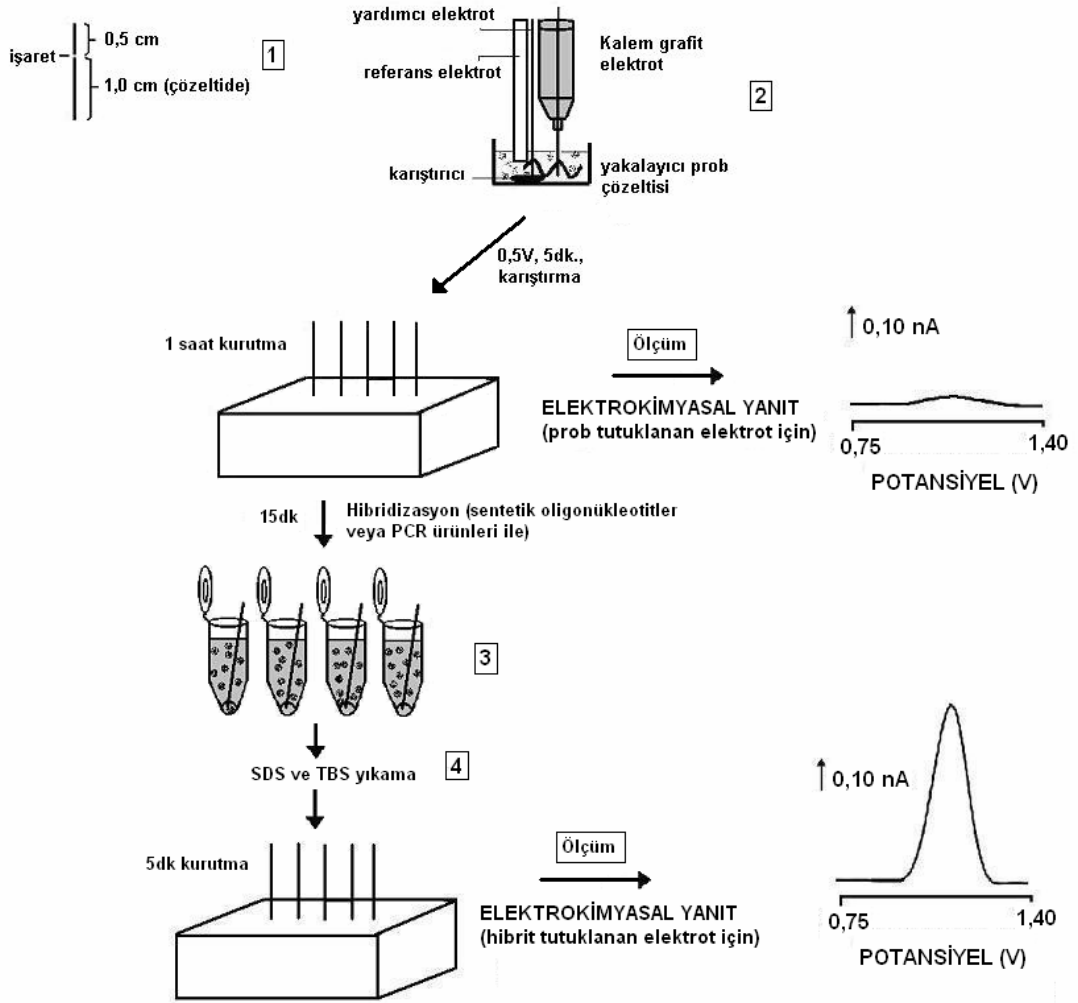
Kovalent bağlanma kimyasallarını içeren çözelti karışımı için 8mM N-hidroksi süksinimid (NHS) ve 5mM'lık Etil karbodiimid (EDC) maddeleri 50mM'lık fosfat tamponu (pH:7,4) içerisinde taze olarak hazırlandı [234, 235].

1.2.3. Kullanılan yöntem

Günümüze dek yapılan elektrokimyasal biyosensör tasarımı çalışmalarında kullanılan yöntemler [212, 364] değerlendirilerek her iki çalışmada kullanılacak yeni yöntemlerin planlaması yapıldı.

1.2.3.1. Hepatit B- Lamivudin direnç mutasyonlarının tayini çalışmasında kullanılan yöntem:

Mutasyon tayini için elektrot yüzeyine uygulanan işlemler basamaklar halinde Şema-1'de özetlenmiştir. Bunlar elektrot yüzeyinin aktive edilmesi, prob immobilizasyonu, hibridizasyon, yıkamalar ve ölçüm olmak üzere beş ana basamakta toplanmıştır. Yönteme ait basamaklarda uygulanan işlemler hakkında ayrıntılı bilgilerleyen bölümlerde verilmiştir.



Şema 1: Elektrokimyasal yolla HBV ve türlerinin(motiflerinin) tayininde izlenen yol.

Yöntem basamakları

Elektrot yüzeyi deney öncesinde 0,5M asetat tampon çözeltisi (pH: 4,8) içine daldırılarak 30sn süreyle +1,4V gerilim uygulandı. Böylece elektrokimyasal olarak aktivasyon işlemi gerçekleştirildi.

1.2.3.1.1. Elektrot Yüzeyine Prob Tutturulması

5µg/mL derişiminde sağlıklı veya mutasyonlu türlerde hazırlanan prob çözeltileri 5dk süreyle karışan ortamda +0,5V potansiyel uygulaması altında

elektrostatik olarak elektrot yüzeyine tutturuldu. ACB tamponuna daldırılarak yıkanan elektrotlar daha sonra 1 saat süreyle kurutuldu.

2.3.1.2. Hibridizasyon

2.3.1.2.1. Sentetik Hedef Dizilerle Hibridizasyon

Probla kaplı elektrot yüzeyleri, 6µg/mL derişimde sentetik hedef (karşılık dizi), tek bazı hedeften farklı ve rastgele diziler ile 15dk süreyle ıslak adsorbsiyon tekniğı [88] kullanılarak etkileştirildi. 5dk süreyle kurutulan elektrotlar daha sonra hedeften farklı dizilerden kaynaklanabilecek istenmeyen bağlanmaları azaltmak amacıyla %5'lik sodyum dodesil sülfat çözeltisiyle [171, 260, 413] 10dk süreyle yıkandıktan sonra tris-HCl tamponu ile 15sn daha karıştırılarak yıkandı. Elektrotlar 5 dk süreyle kurutuldu. İşlemlerin tamamı tek bazı hedeften farklı diziler ve rastgele dizilerle de gerçekleştirildi.

2.3.1.2.2. Klonlanmış PCR Ürünleri ile Hibridizasyon (Klonlama ve PCR İşleminde Geçirilerek Saflaştırılmış HBV Ürünleri)

Örnekler TBS tamponu ile derişimi 6µg/mL olacak şekilde seyreltildi ve denatüre edildi. Denatürasyon işlemi için 95 °C'de 6dk kaynar su banyosunda, 2dk buz banyosunda tutuldu. Yüzeyi proba kaplanmış grafit çubuklar denatüre edilmiş hedef çözeltiler (YMDD, YVDD, YIDD) içerisine daldırılarak 15dk bekletildi. 5dk süreyle kurutulan elektrotlar daha sonra %5'lik sodyum dodesil sülfat çözeltisiyle 10dk süreyle yıkandıktan sonra TBS tamponu ile 15sn daha karıştırılarak yıkandı.

Elektrotlar 5dk süreyle kurutuldu. Tek bazı hedeften farklı ve tüm bazları hedeften farklı (rastgele) PCR ürünleri de aynı işlemlerden geçirildi. PCR işleminde kullanılan kör çözelti de örnek olarak değerlendirildi ve her 2 farklı türde proba kaplı elektrotların bu çözeltiyle verdiği yanıtlar incelendi. (PCR kör çözeltisi primerleri ve diğer PCR bileşenlerini içerir fakat kalıp DNA içermez. Bu işlemler tasarımı yapılan biyosensörün seçimliliğinin ölçülmesi için gerçekleştirildi.)

2.3.1.2.3. Gerçek PCR Ürünleri ile Hibridizasyon

PCR ürünleri TBS tamponu ile derişimi 6µg/mL olacak şekilde seyreltildi ve denatüre edildi. Denatürasyon işlemi için ürünler sadece 95 °C'de 6dk kaynar su banyosunda tutuldu ve hemen sonra yüzeyi proba kaplı elektrotlar denatüre edilmiş hedef çözeltilerle (YMDD,YVDD,YIDD) 15dk hibridizasyona bırakıldı (ıslak adsorbsiyon tekniği). 5dk süreyle kurutulan elektrotlar daha sonra %1'lik sodyum dodesil sülfat çözeltisiyle 3dk süreyle yıkandıktan sonra tris-HCl tamponu ile 5sn daha karıştırılarak yıkandı. Elektrotlar 5dk süreyle kurutuldu. Açıklanan işlemler tek bazı hedeften farklı, tüm bazları hedeften farklı (rastgele) PCR ürünleri ve belirli oranlarda sağlıklı-mutasyonlu türlerdeki hedef karışımını içeren ürünler (örneğin, YVDD(%50) ve YIDD(%50) karışımı gibi.) için de uygulandı. Ayrıca PCR kör çözeltisinin de proba kaplı elektrotlarla verdiği yanıtlar incelendi. Bu işlemler tasarımı yapılan biyosensörün gerçek PCR ürünleriyle olan seçimliliğini tayin etmek için gerçekleştirildi.

2.3.1.3. Ölçümlerde Kullanılan Voltametrik Yöntem

Differansiyel Puls Voltametri tekniği ile +0,75V dan +1,40V'a kadar, 15mV/sn tarama hızında, 50mV amplitütte ve 8mV adım potansiyeli uygulanarak hibridizasyon öncesi ve sonrasında elde edilen guanin yükseltgenme sinyalleri ölçüldü. Elde edilen ham eğriler, potansiyostatdaki GPES yazılım sistemi ile tanımlanabilir pikler haline dönüştürülerek pik yükseklikleri değerlendirildi.

Tayin için belirtilen aşamaların uygulanması için yaklaşık 101 dakikalık süre gerekmektedir. Deneysel aşamalardaki süreler aşağıda özetlenmiştir:

- a) PGE aktivasyonu 30sn.
- b) Prob tutturulması 5dk.
- c) Elektrotların yıkanması ve kurutulması 60dk.
- d) Hibridizasyon 15dk.
- e) Kurutma 5dk.
- f) SDS ve Tris-HCl ile yıkama 10dk ve 15sn.
- g) Kurutma 5dk.
- h) Ölçüm 20sn.

PCR ürünleriyle yapılan analizlerde denatürasyon için 6dk.'lık daha zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Prob tutturulmuş elektrotların önceden hazırlanması ile toplam analiz süresinin 33dk.'ya kadar indirilmesi mümkündür.

2.3.2. *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* Tayini Çalışmasında Kullanılan Yöntem

2.3.2.1. Biyosensör Yüzeyine Prob Tutturulması

DNA immobilizasyonu için iki değişik yöntem kullanılmıştır. Uygulanan bu yöntemlerin detayları aşağıda açıklanmıştır.

2.3.2.1.1. Kovalent Yolla Prob Tutturulması

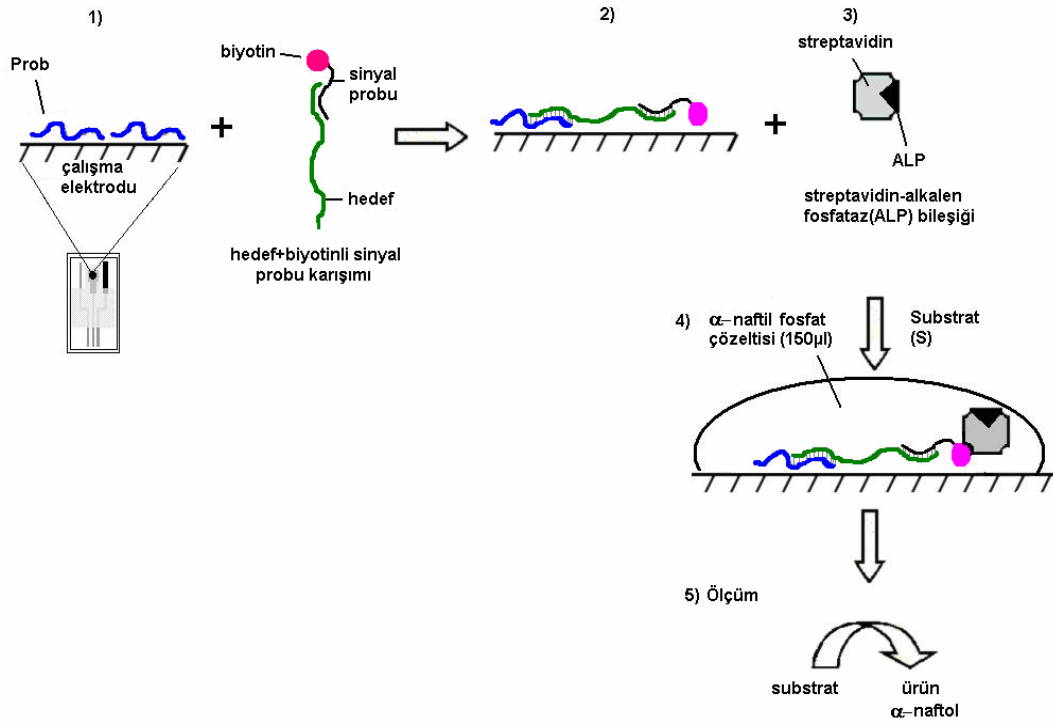
Amino grubu içeren oligonükleotit (prob B) için, perde baskılı karbon çalışma elektrodunu yüzeyine önce 10µl kovalent ajanları içeren çözelti (50mM fosfat tamponunda pH: 7,4 taze hazırlanmış 5 mmol/L EDC ve 8 mmol/L NHS) 1 saat süreyle tutturuldu [234, 235]. 1 saat sonunda kuruyan elektrotların yüzeylerine 10µl hacimde (10 µmol/L konsantrasyonda fosfat tamponunda hazırlanmış) prob DNA konuldu ve 1 gece (~16 saat) bekletildi. Adsorbsiyonla yüzeye prob tutturma işlemi için daha önce denenmiş olan 1 gecelik süre tercih edildi [51]. Prob tutturulmuş yüzey ardı ardına 3 kez 15µl hacimde PBS kullanılarak yıkandı.

2.3.2.1.2. Adsorbsiyon Yolu ile Prob Tutturulması

Karbon elektrot yüzeyine 10 µmol/L konsantrasyonda 0,5 mol/L PBS'de hazırlanan 10µl prob çözeltileri konularak 1 gece (~16 saat) bekletildi. Prob tutturulmuş yüzey ardı ardına 3 kez 15µl hacimde PBS kullanılarak yıkandı.

2.3.2.2. Genosensör Yüzeyinde Hibridizasyon

Hem sentetik oligonükleotitler hem de PCR ürünleri için sandviç biçimine sahip tayin tekniği kullanılarak hibridizasyon gerçekleştirildi. Teknik, hedeflenen DNA parçasının iki bölgesine bağlanan iki ayrı probun kullanılması nedeniyle güvenilir sonuçlar vermektedir (İkili hibridizasyon kontrol sistemi). Sistemde, streptavidin-alkalen fosfataz enzim konjugatının ve biyotinli sinyal probunun tayin sırasında bağlantısı Şema 2’de özetlenmiştir.



Şema 2 : *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis*'in tayinine yönelik çalışmada izlenen yöntem.

Hedef örnekler, 0,15 µmol/L konsantrasyonda biyotinli sinyal probu içerecek şekilde 0,5 mol/L PBS ile seyreltildi. Çift sarmal PCR ürünleri seyreltikten sonra ısı ile denatüre edildi. Bu işlem için örnekler kaynar su banyosunda 100°C’de 5dk ve

hemen ardından iki zincirin tekrar birbirine bağlanmasını önlemek için buz banyosunda 5dk süreyle tutuldu. Hazırlanan karışımın 10 μ L'si elektrot yüzeylerine tutturulmuş olan prob dizisi ile 30dk süreyle etkileştirildi(hibridizasyon).

Hibridizasyon işleminden sonra genosensör yüzeyi 150 μ l hacimde DEA tamponu (diatanolamin 0,1 mol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, KCl 100 mmol/L; pH 9,6) ile yıkandı. Rastgele dizi lektin PCR ürünü ise negatif ürün olarak aynı işlemlerden geçirildi.

2.3.2.3. Enzimle İşaretleme ve Ölçüm

Elektrot yüzeyinde oluşturulan biyotinli hibrit, DEA tamponu ile hazırlanmış 0,75 U/mL derişimde streptavidin-alkalen fosfataz bileşiği ve 10 mg/mL derişimde BSA (Bovin serum albümin) içeren 10 μ L hacmindeki çözelti ile etkileştirildi [97]. 10 dakika sonra genosensör yüzeyi 3 kez ardı ardına 15 μ l'lik hacimlerde DEA ile yıkandıktan sonra enzim tutturulmuş yüzey DEA tamponu içerisinde hazırlanmış 1mg/mL derişimindeki α -naftil fosfat çözeltisiyle 10dk reaksiyona bırakıldı. Elektroaktif özelliğe sahip ve reaksiyon sonunda oluşan enzimatik ürün α -naftol' ün sinyali DPV tekniği ile ölçüldü.

BÖLÜM III

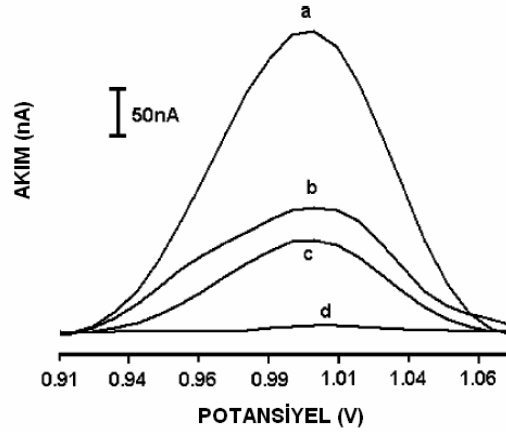
BULGULAR

3.1. Hepatit B- Lamivudin Direnç Mutasyonlarının Tayini Çalışmasında Elde Edilen Bulgular

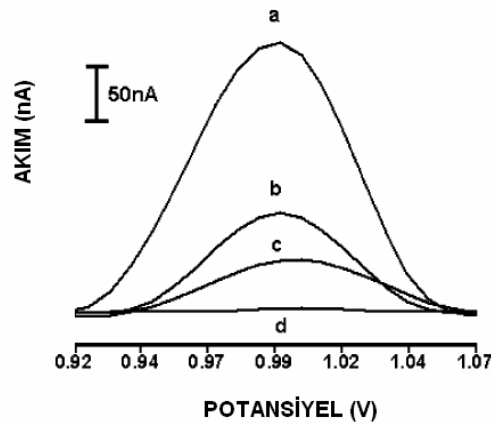
Bu çalışma kapsamında elde edilen her ölçüm sonucu, üç kez tekrarlanarak grafik ve voltamogramlara yansıtılmıştır.

3.1.1. Sentetik Dizilerle Hibridizasyon ve Biyosensör Özgüllüğünün (Seçimlilik) Tayini

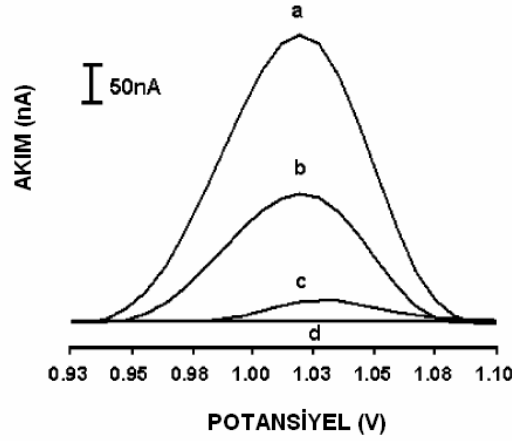
Geliştirilen biyosensör sistemiyle hibridizasyon tayinleri, ilk olarak sentetik diziler kullanılarak gerçekleştirildi. Yabancıl (sağlıklı) tip Hepatit B virüsünün ve iki farklı türdeki varyasyonunun tayini yapılacağından, çalışmalarda bu niteliklere sahip üç farklı prob dizisi kullanıldı ve her bir prob için ayrı ayrı hibridizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Tayinde problemler ve ilgili hedef diziler arasında gerçekleşen hibridizasyon sonrasında elde edilen guanin yanıtları incelendi. Hedef dizinin yanısıra ayrıca prob tutturulmuş biyosensörle, tek bazı hedeften farklı ve tüm bazıları hedeften farklı (rastgele) diziler de etkileştirildi. Bu etkileşmelerin incelenmesi, biyosensör sisteminin seçimliliğinin araştırılması için gereklidir. Bu çalışmada, biyosensörün hedef diziyile en yüksek hibridizasyon yanıtını vermesi, diğer dizilerle ise düşük yanıtlar vermesi beklendi.



Şekil 49: Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak sağlıklı tip prob (P1) tutturulmuş elektrot ile hibridizasyon öncesinde ve sonrasında elde edilen guanin sinyalleri; a) prob-hedef hibridizasyonu sonrasında, b) prob ile tek bazı hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra, c) prob ile tüm bazıları hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra d) yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi) elde edilen guanin sinyali.



Şekil 50: Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak mutant-1 tip prob (P2) tutturulmuş elektrot ile hibridizasyon öncesinde ve sonrasında elde edilen guanin sinyalleri; a) prob-hedef hibridizasyonu sonrasında, b) prob ile tek bazı hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra, c) prob ile tüm bazıları hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra d) yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi) elde edilen guanin sinyali.

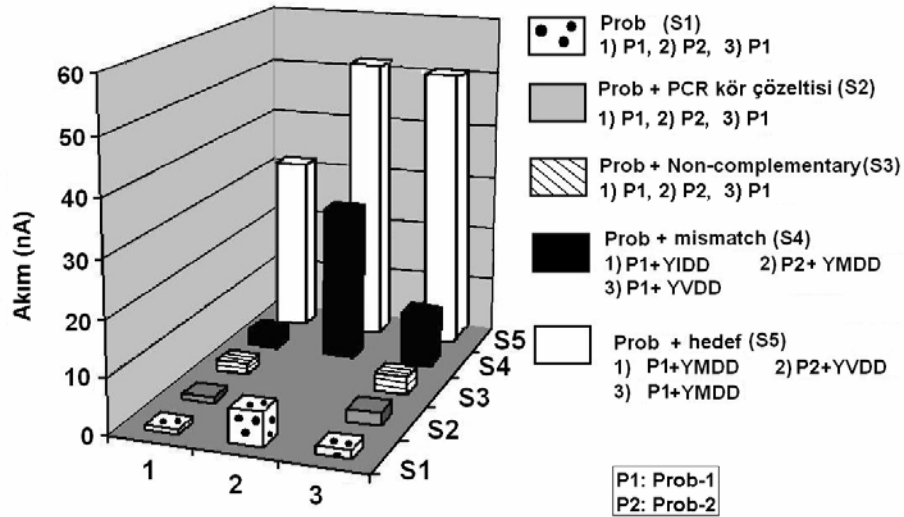


Şekil 51: Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak mutant-2 tip prob (P3) tutturulmuş elektrot ile hibridizasyon öncesinde ve sonrasında elde edilen guanin sinyalleri; a) prob-hedef hibridizasyonu sonrasında, b) prob ile tek bazı hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra, c) prob ile tüm bazları hedeften farklı dizi arasındaki hibridizasyondan sonra d) yüzeyde sadece prob varken (hibridizasyon öncesi) elde edilen guanin sinyali.

Şekil 49, 50 ve 51 sırasıyla sağlıklı, mutant-1 ve mutant-2 türlerinde prob tutturulmuş elektrotlarla yapılan hibridizasyon çalışmalarını göstermektedir. Her üç tip prob tutturulan elektrotlardan hibridizasyon öncesinde beklendiği gibi guanin sinyali alınmamıştır.(Şekil 49, 50 ve 51’de d.) Problar ile bunların karşılığını içeren diziler arasında uygun koşullar altında oluşan tam hibridizasyondan sonra elde edilen guanin sinyallerinin (Şekil 49, 50 ve 51’de a), bu problemlerle tüm bazları hedeften farklı (49, 50 ve 51’de c) ve tek bazı hedeften farklı (Şekil 49, 50 ve 51’de b) diziler etkileştirildiğinde elde edilen sinyallerden yüksek olduğu gözlemlendi. Her üç prob kullanılarak gerçekleştirilen bu deneylerde her ölçüm üç kez tekrarlanmıştır. Yanıtlardaki bu farklanmalar, tasarımı yapılan biyosensörün seçimli şekilde hedefine bağlandığını göstermektedir.

3.1.2. Klonlanmış PCR Ürünleriyle (KPCR) Hibridizasyon ve Seçimliliğin Tayini

Klonlama ile bölüm II'de belirtilen HBV genomuna ait bölgenin çoğaltılması amaçlanmıştır. E. coli bu amaçla kullanılan bakteri türüdür. Klonlama ile elde edilen ürünler PCR işleminden de geçirilip miktarları arttırıldıktan sonra saflaştırılarak deneylerde kullanılmıştır. KPCR ürünleriyle yapılan bu çalışmadaki amaç, hasta PCR ürünlerine de uygulanabilecek tayin koşullarının bulunmasıdır. Diğer bir ifadeyle bu çalışma, hasta PCR örneklerinin tayini öncesinde gerçekleştirilen bir ara çalışmadır.



Şekil 52: Klonlanmış PCR (KPCR) ürünleri ile sağlıklı tip prob (P1) / mutant-1 tip prob (P2) tutturulan elektrotların etkileşimini gösteren üç boyutlu histogram; 1, 2 ve 3 şeklinde belirtilen numaralardan 1; sağlıklı tip prob tutturulmuş elektrot yüzeyini, 2; mutant-1 tip prob tutturulmuş elektrot yüzeyini, 3; sağlıklı tip prob tutturulmuş elektrot yüzeyini ifade etmektedir. (1 ve 3 sağlıklı özellikte problardır, fakat deneyler farklı günlerde gerçekleştirilmiştir.) S1 serisi sadece problardan elde edilen sinyalleri, S2 serisi prob tutturulan elektrotlarla PCR kör çözültüsü etkileştirildiğinde elde edilen sinyalleri, S3 serisi prob tutturulan elektrotlar ile tüm bazları hedeften farklı dizi ile hibridizasyondan sonra elde edilen sinyalleri, S4 serisi prob tutturulan elektrotların tek bazı hedeften farklı diziler ile hibridizasyonu sonrasında elde edilen sinyalleri, S5 serisi prob lar ile hedefleri arasındaki hibridizasyondan sonra elde edilen guanin sinyallerini göstermektedir.

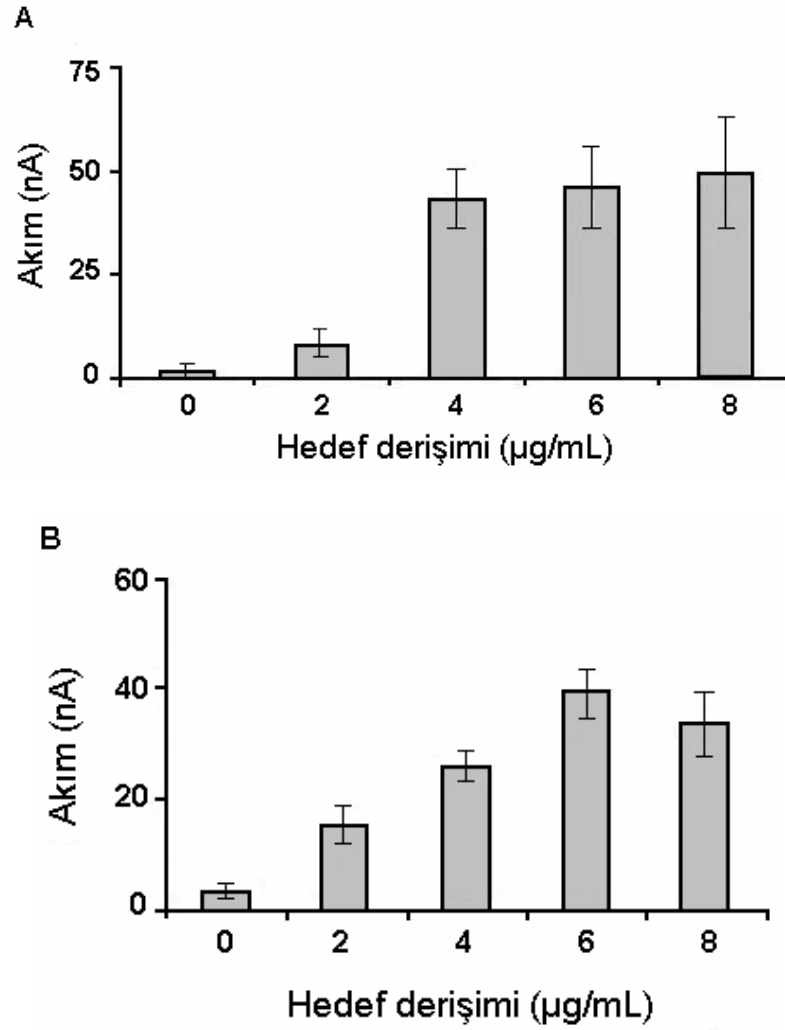
KPCR ürünleri denatüre edilerek gerçekleştirilen hibridizasyon çalışmasında, sağlıklı tip prob tutturulan elektrotla sağlıklı tip(YMDD) klon ürünü etkileştirildiğinde yüksek guanin sinyalleri elde edilmiştir (S5 serisi 1 ve 3). Benzer şekilde mutant-1 tip prob ile bunun karşılığını içeren YVDD tip KPCR ürünü arasında gerçekleşen tam hibridizasyon sinyali de yüksektir(S5 serisi 2). Sağlıklı tip prob ile tek bazı hedeften farklı KPCR ürünleri (YVDD ve YIDD) arasında gerçekleşen hibridizasyon sonucu elde edilen sinyallerde hedef diziyle elde edilen hibrit sinyaline göre belirgin bir azalma gözlenmiştir (S4 serisi 1 ve3). Benzer şekilde mutant-1 tip prob ile sağlıklı tip(YMDD) KPCR ürünü arasında oluşan hibridizasyonda da elde edilen guanin sinyali yarı yarıya azalma göstermiştir. (S4 serisi 2). Rastgele PCR ürününün ilgili problarla etkileşmesi sonucu elde edilen guanin sinyallerinin ise çok düşük olduğu gözlenmiştir (S3 serisi 1 ve 3). Yüzeide problar varken PCR kör çözeltisi ile gerçekleştirilen hibridizasyon işlemi sonrasında elde edilen sinyaller beklendiği gibi düşüktür (S2 serisi). Guanin içermeyen problardan beklendiği gibi çok düşük sinyaller elde edilmiştir (S1 serisi).

KPCR ürünleriyle de sentetik dizilerle elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sentetik dizilerle kıyaslandığında elde edilen guanin sinyalleri daha düşüktür. Bu durum 20 bazlık prob dizisi ve sentetik tam karşılığı arasında gerçekleşen hibridizasyon oranının, prob dizisi ve 436 bazlık uzun KPCR ürünü ile gerçekleşen hibridizasyon oranından çok daha yüksek olmasıyla açıklanabilmektedir.

3.1.3. Hibridizasyon İçin En Uygun Hedef Konsantrasyonunun Bulunması

Çalışmada, 5µg/mL olan prob konsantrasyonu sabit tutularak hedef konsantrasyonu arttırılmıştır. Sağlıklı ve mutant-1 tip prob dizileri ve KPCR ürünleri

kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde hibridizasyondan sonra elde edilen yanıtlar Şekil 53’de görülmektedir.

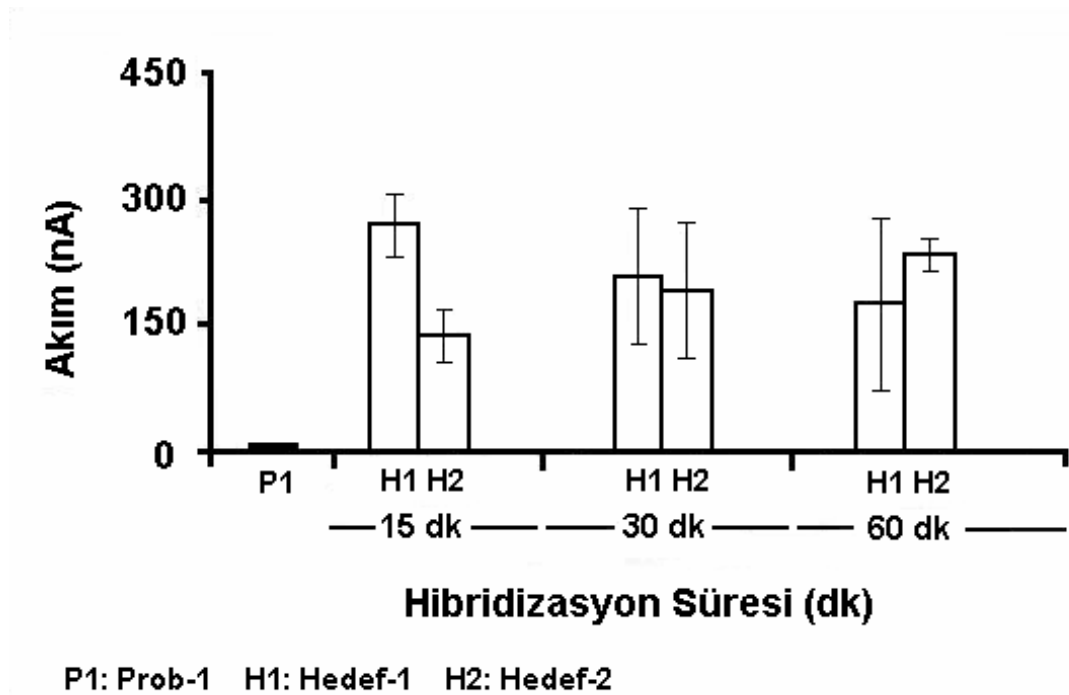


Şekil 53: Sabit derişimdeki (5µg/mL) prob dizisi ile artan derişimlerdeki hedefleri (KPCR) arasında gerçekleştirilen hibridizasyondan sonra elde edilen guanin yanıtları; A) Sağlıklı tip prob kullanıldığında, B) mutant-1 tip prob kullanıldığında.

Şekil 53A ve 53B’de KPCR ürünleriyle yapılan çalışmalarda, tayinde kullanılabilen en uygun hedef konsantrasyonunu bulmak amaçlanmıştır. Hibridizasyon için en uygun konsantrasyonun 6µg/ml olduğu bulunmuştur.

3.1.4. Hibridizasyon Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi

Çalışmada sentetik oligonükleotit dizileri kullanılmıştır. Uygun hibridizasyon süresinin saptanmasında, prob ve ilgili hedefi arasındaki hibritleşme ile birlikte, prob ile tek bazı hedeften farklı dizi arasındaki hibritleşme de incelenmiştir.



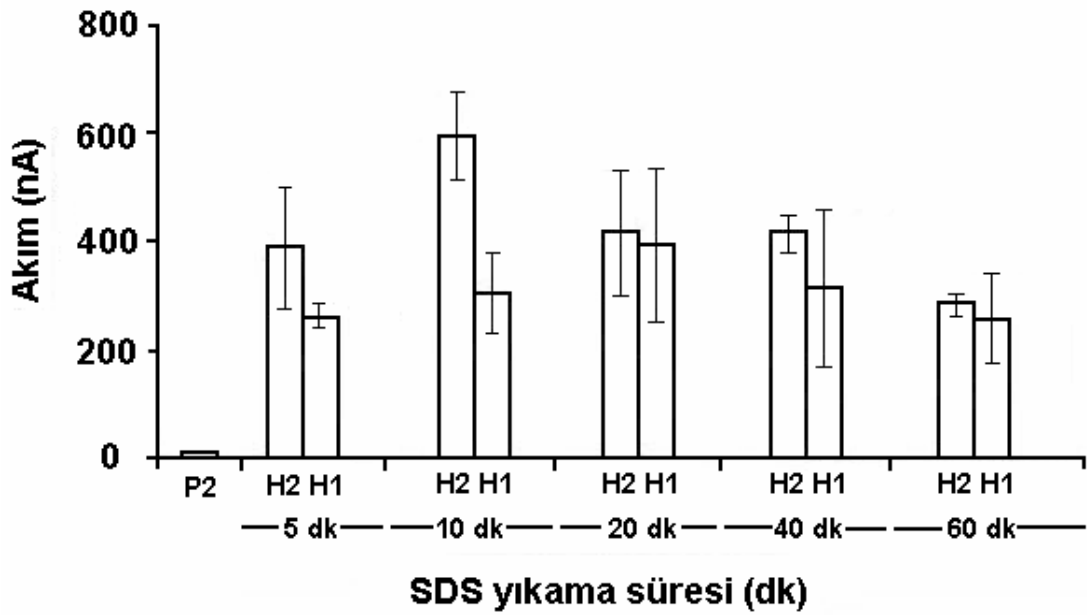
Şekil 54: Hibritleşme zamanının, hibridizasyona ve seçimlilik üzerine olan etkisinin sentetik dizilerle incelenmesine ait histogram; sırasıyla; yalnız sağlıklı tip prob(P1), P1 probunun tam karşılığı olan H1 hedefi ve tek bazı hedeften farklı H2 dizisiyle 15, 30 ve 60 dakika süreyle etkileşmesi.

En uygun hibridizasyon zamanının bulunması çalışmasında, sağlıklı tip prob ve bunun sentetik karşılığı hibridizasyonda kullanılmıştır. Hibridizasyon zamanının uygunluğunun ölçülmesinde; prob dizinin; kendisinin tam karşılığı olan diziyile verdiği hibridizasyon sinyalinin en yüksek seviyede, tek bazı hedeften farklı dizi ile

verdiği hibridizasyon sinyalinin ise mümkün olan en düşük seviyede olması esas alınmıştır. Çalışma sonucunda 15 dakikalık sürenin en uygun hibridizasyon zamanı olduğu tespit edilmiştir.

3.1.5. Hibridizasyon Sonrası Yıkama Süresinin Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi

Çalışmada istenmeyen bağlanmaların azaltılması amacıyla kullanılan yıkama çözeltisinin uygulanma süresinin biyosensör seçimliliğine olan etkisi araştırıldı.



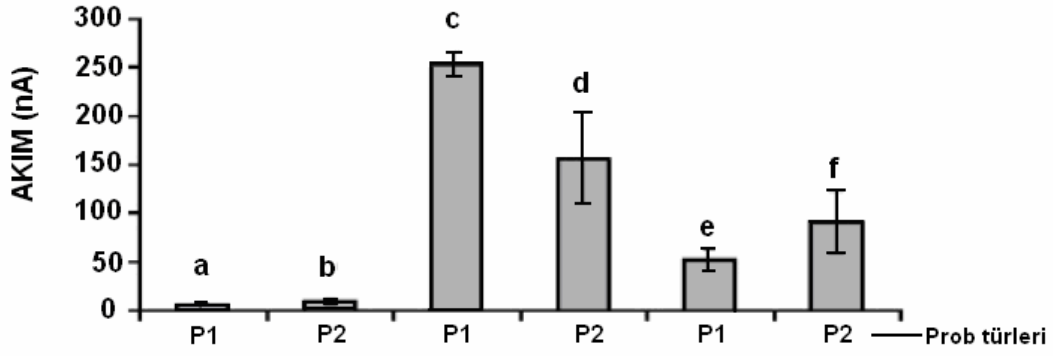
P1: Prob-2 H2: Hedef-2 H1: Hedef-1

Şekil 55: Prob olarak P2 (mutant-1 tip prob), hedef olarak H2 ve H1 kullanılarak elde edilen hibritlerin deterjan çözeltisiyle zamana bağlı olarak yıkanmasını gösteren histogram. H2; P2'nin tam karşılığı, H1 ise H2'den 1 baz farklı hedeftir.

Mutant-1 tip prob(P2) kullanılarak gerçekleştirilen en uygun yıkama zamanının bulunması için yapılan çalışmada yıkama zamanının uygunluğunun ölçülmesinde önceki çalışmadakine benzer şekilde prob dizinin; kendisine karşılık olan diziyle verdiği hibridizasyon sinyalinin en yüksek seviyede, tek bazı hedeften farklı dizi ile verdiği hibridizasyon sinyalinin ise en düşük seviyede olması esas alınmıştır. Literatürde SDS'nin yıkama çözeltisi olarak kullanıldığı diğer çalışmalar [171, 260, 413] incelenerek ve sentetik dizilerin yüksek oranda istenmeyen bağlanma göstereceği düşünülerek SDS yüzdesi %5 olarak seçilmiştir. %5'lik SDS çözeltisi ile 10 dakikalık yıkama süresinin, hem sentetik diziler hem de saflaştırılmış KPCR ürünleri ile gerçekleştirilen deneylerde hedef ve tek bazı hedeften farklı dizi ayrımı için uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

3.1.6. Karışım Halindeki Hedef Çözeltilere Uygulanan Biyosensörün Seçimliliğinin İncelenmesi

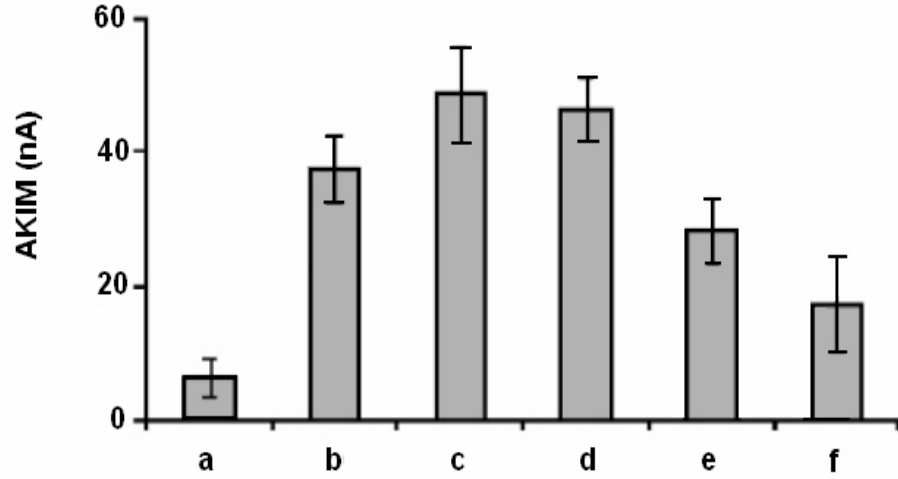
Tasarımı yapılan biyosensörün seçimliliğinin ölçülmesinde, karışım içeren örneklerle de çalışmalar gerçekleştirildi. Bu tayin, hasta kanından elde edilen virüse ait genomda, mutasyonun hangi oranda geliştiğinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Bu sayede tasarımı yapılan biyosensörün, mutasyon gelişiminin başladığı dönemdeki yeterliliği araştırıldı.



Şekil 56A: Sentetik diziler kullanılarak oluşturulan 1:1 oranındaki karışımların sağlıklı(P1) ve mutant-1 tip(P2) problarla etkileşimi sonrasında elde edilen guanin sinyalleri; a) yalnızca P1 probu tutturulmuş elektrot, b) yalnızca P2 probu tutturulmuş elektrot, c) P1 tip prob tutturulmuş elektrodun sağlıklı ve mutant-1 tip hedefler karışımını içeren çözelti ile hibridizasyonundan sonra, d) P2 probu tutturulmuş elektrodun sağlıklı tip ve mutant-1 tip hedefler karışımını içeren çözelti ile hibridizasyonundan sonra, e) P1 tip prob tutturulmuş elektrodun mutant-1 tip ve tüm bazları hedeften farklı dizi karışımı ile hibridizasyonundan sonra, f) P2 tip prob tutturulmuş elektrodun mutant-1 tip ve tüm bazları hedeften farklı dizi karışımı ile hibridizasyonundan sonra elde edilen guanin sinyalleri.

Sentetik dizilerle yapılan karışım çalışmasında, yalnızca sağlıklı tip/mutant-1 tip prob tutturulmuş elektrotlardan düşük bir sinyal elde edilmiştir (Şekil 56A'da a ve b). Sağlıklı tip prob tutturulmuş elektrodun sağlıklı tip ve mutant-1 tip hedefler karışımına uygulanmasıyla gerçekleşen hibridizasyondan sonra, sağlıklı tip prob ile karşılığının hibritleşmesi sonucu yüksek guanin sinyali elde edilmiştir (Şekil 56A'da c). Mutant-1 tip prob içeren elektrodun sağlıklı tip ve mutant-1 tip hedefler karışımını içeren çözelti ile etkileştirilmesiyle, mutant-1 tip prob ile karşılığının hibritleşmesi sonucu yine yüksek bir sinyal elde edilmiştir (Şekil 56A'da d). Sağlıklı tip prob içeren elektrodun mutant-1 tip ve tüm bazları hedeften farklı dizi karışımı ile etkileşmesinden sonra beklendiği gibi düşük bir sinyal elde edilmiştir (Şekil 56A'da

e). Mutant-1 tip prob içeren elektrodun mutant-1 tip ve tüm bazları hedeften farklı dizi karışımı ile etkileşmesinden sonra elde edilen guanin sinyalinde hibritleşmeden dolayı nispeten artış gözlemlendi, fakat bu ölçümün tekrarlanabilirliğinin iyi olmadığı saptandı (Şekil 56A'da f).



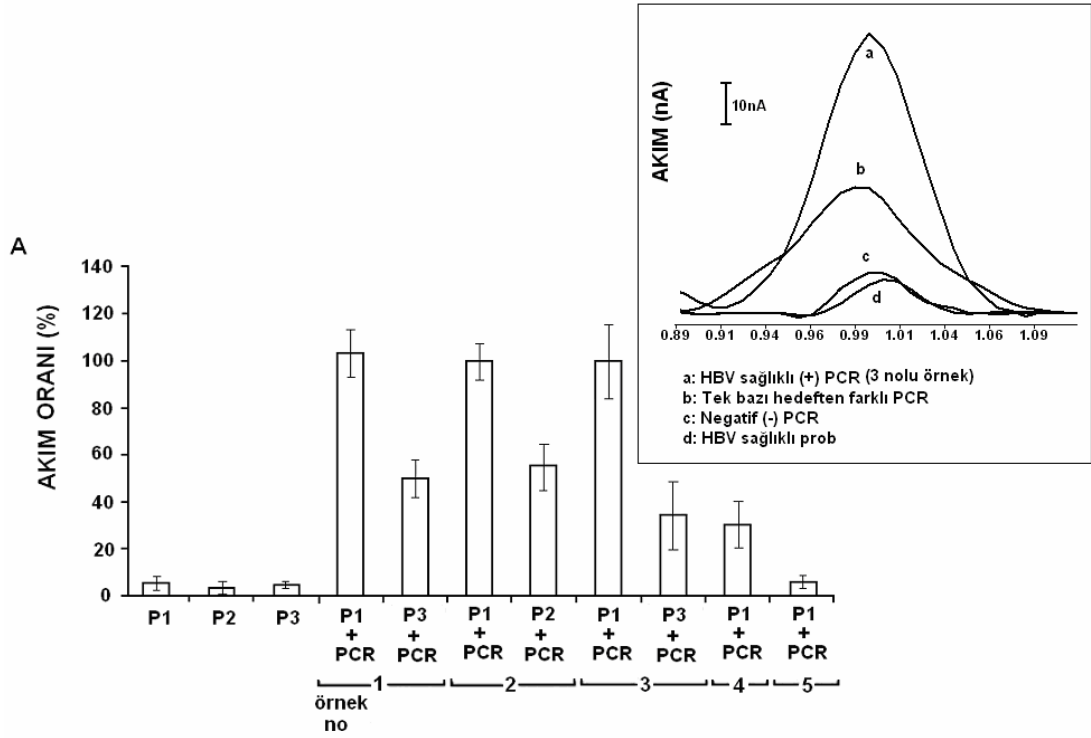
Şekil 56B: Mutant-1 tip prob ile farklı KPCR hedef karışımlarının etkileşmesiyle oluşan hibritlerden elde edilen guanin sinyalleri; a) Yalnızca mutant-1 tip prob, b) mutant-1 tip KPCR ve tüm bazları hedeften farklı PCR ürün karışımı, c) mutant-1 tip ve sağlıklı tip KPCR ürünleri karışımı, d) iki kat konsantrasyonda mutant-1 tip KPCR içeren hedef çözelti, e) sağlıklı tip ve mutant-2 tip KPCR ürün karışımı, f) mutant-2 tip KPCR ve tüm bazları hedeften farklı PCR ürünü karışımı.

Klonlanmış ürünlerle yapılan karışım çalışmasında, yalnızca mutant-1 tip prob tutturulmuş elektrottan düşük bir sinyal elde edilmiştir (Şekil 56B'de a). Mutant-1 tip prob tutturulmuş elektrodun tüm bazları hedeften farklı dizi ve mutant-1 tip dizi karışımını içeren çözeltiliye uygulanmasıyla gerçekleşen hibridizasyondan sonra (Şekil 56B'de b) yüksek bir sinyal elde edilmiştir. Benzer şekilde mutant-1 tip prob içeren elektrodun mutant-1 tip ve sağlıklı tip KPCR ürünleri karışımı ile hibridizasyonundan sonra da tam hibridizasyon nedeniyle yüksek yanıt elde

edilmiştir (Şekil 56B'de c). Mutant-1 tip prob içeren elektrodun iki kat konsantrasyonda mutant-1 tip hedef içeren çözelti ile hibridizasyonundan sonra elde edilen sinyal yüksekliği b ve c'dekine benzer şekilde elde edilmiştir (Şekil 56B'de d). Elektrot yüzeyinde iki kat konsantrasyona sahip hedefle bile b ve c'dekilere benzer hibrit sinyalinin elde edilmesi, biyosensör sisteminin tutarlılığını göstermektedir. Mutant-1 tip prob içeren elektrodun sağlıklı tip ve mutant-2 tip KPCR ürün karışımı ile hibridizasyonundan sonra elde edilen sinyal azalmıştır (Şekil 56B'de e). Mutant-1 tip prob içeren elektrodun mutant-2 tip KPCR ürünü ve tüm bazları hedeften farklı PCR ürünü karışımı ile hibridizasyonundan sonra elde edilen sinyal de tam hibritlerden elde edilen sinyallerden yarı yarıya düşük olarak elde edilmiştir (Şekil 56B'de f).

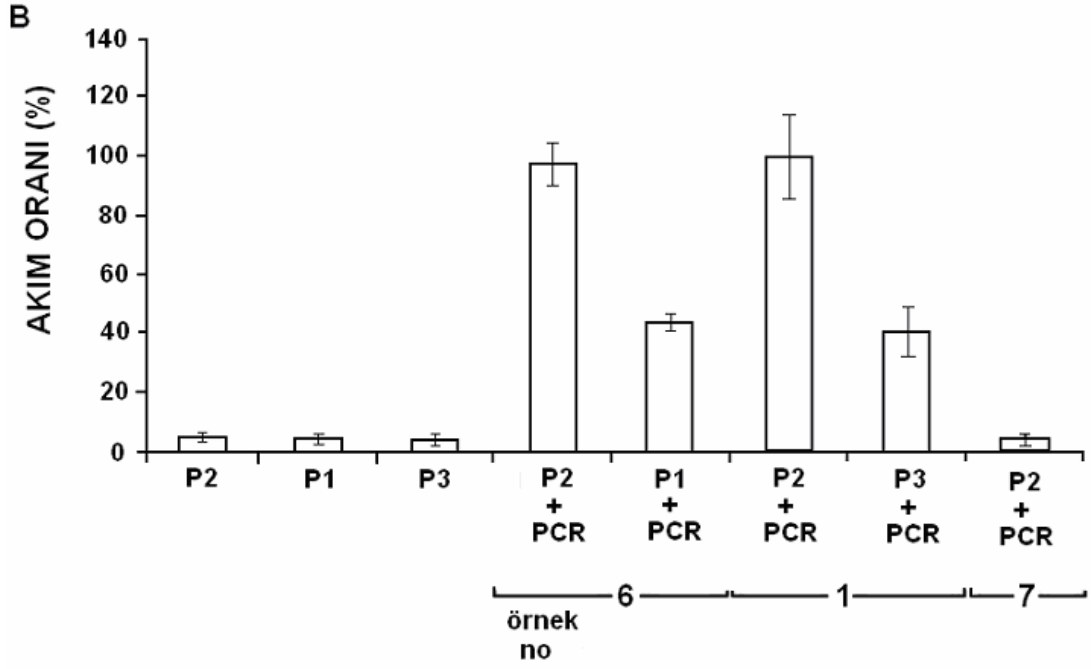
3.1.7. PCR Ürünleri ile Gerçekleştirilen Tayin Çalışmaları

Gerçek hasta PCR ürünlerinin kullanıldığı bu çalışmaların sonuçları değerlendirilirken günler arası değerlerin aynı grafikte gösterilebilmesi amacıyla elde edilen akım değerleri normalize edilerek akım oranı(%) olarak ifade edilmiştir. Deneylede örneklerin analizi, hibridizasyon sonrasında yüksek yanıt verdikleri proba göre yapılmıştır.



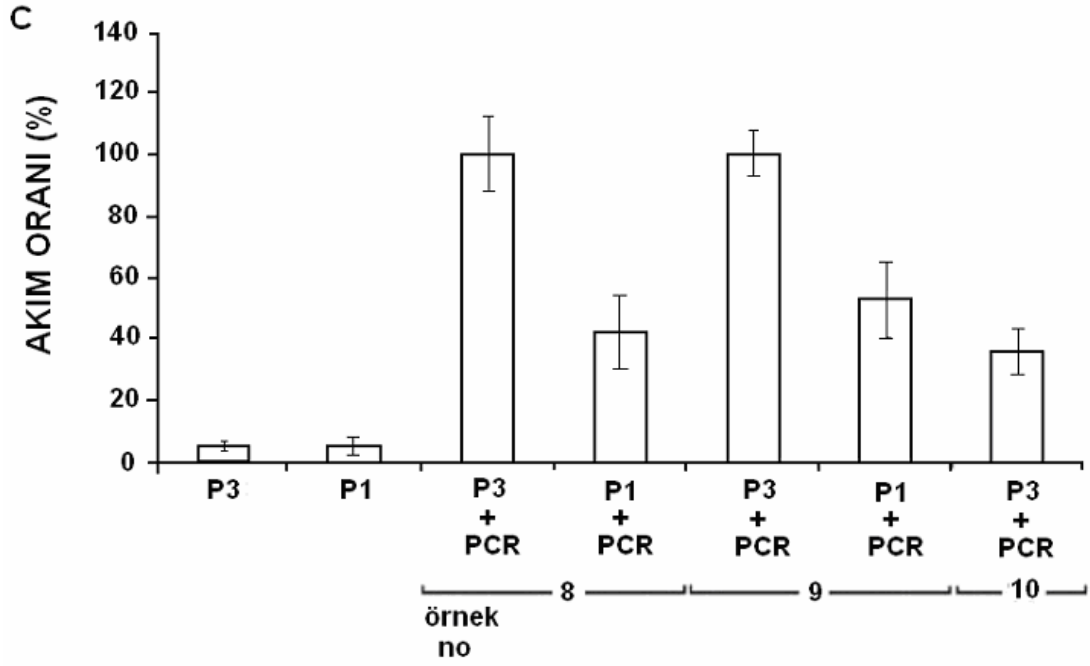
Şekil 57A: Hastalardan elde edilen PCR örnekleriyle yapılan çalışmada elde edilen guanin sinyallerini gösteren histogram; İlk 3 kolon sırasıyla yalnızca sağlıklı tip (P1), mutant-1 tip (P2), mutant-2 (P3) tip prob tutturulmuş elektrotlardan alınan yanıt, 1 nolu hasta örneğine, P1 ve P3 problemleri tutturulmuş elektrotlar uygulandığında, 2 nolu hasta örneğine P1 ve P2 problemleri tutturulmuş elektrotlar uygulandığında, 3 nolu hasta örneğine P1 ve P3 problemleri tutturulmuş elektrotlar uygulandığında, tüm bazları hedeften farklı PCR ürünü içeren 4 nolu hasta örneğine P1 probu tutturulmuş elektrodun uygulanmasıyla ve 5 nolu negatif PCR örneğine P1 probu tutturulmuş elektrodun uygulanmasıyla elde edilen sinyaller.

Gerçek hasta örnekleriyle gerçekleştirilen ilk çalışmalarda, 1,2 ve 3 nolu örneklerin, sağlıklı tip prob tutturulmuş elektrotla yüksek hibridizasyon sinyali vermeleri bu örneklerin sağlıklı (yabani) tip HBV genomuna sahip olduklarını gösterdi. Elde edilen guanin yanıtlarının yüksekliği değerlendirildiğinde, 4 nolu örneğin HBV'ne ait olmadığı ve 5 nolu örneğin ise negatif olduğu sonucuna ulaşıldı.



Şekil 57B: Hasta örneklerinden ilgili problemlerle hibridizasyon sonrası alınan guanin sinyalleri; İlk 3 kolon sırasıyla yalnızca sağlıklı tip (P1), mutant-1 tip (P2), mutant-2 (P3) tip prob tutturulmuş elektrot; 6 nolu hasta örneğine P1 ve P2 problemleri tutturulmuş elektrotlar uygulandığında, 1 nolu hasta örneğine P2 ve P3 problemleri tutturulmuş elektrotlar uygulandığında, 7 nolu hasta örneğine, P2 probu tutturulmuş elektrot uygulandığında alınan yanıtlar.

1 ve 6 nolu hasta PCR örneklerinin mutant-1 tip karakterde olduğu sonucuna, mutant-1 tip prob tutturulmuş elektrotla gerçekleştirilen etkileşim sonrasında elde edilen yüksek sinyal sayesinde ulaşılmıştır. 1 nolu örneğin bir önceki çalışmada sağlıklı tip proba da yüksek sinyal vermesi, örneğin hem sağlıklı, hem de mutant-1 tip genomun özelliklerini taşıyan baz dizilimine sahip olduğu sonucuna varıldı (“karışım örneği”). Her iki tip hedefi içeren örneklerdeki beklentimiz, her iki özelliği taşıyan proba da benzer yükseklikte yanıtlar vermesidir. Elde edilen bu sonuç beklentimizi doğrulamıştır. 7 nolu hasta örneğinin ise negatif özellikte olduğu gözlemlendi.



Şekil 57C: Hasta örneklerinden ilgili problemlerle hibridizasyon sonrası alınan guanin sinyalleri; İlk 2 kolon sırasıyla yalnızca mutant-2 (P3) tip ve sağlıklı tip (P1) prob tutturulmuş elektrotlar; 8 nolu hasta örneğine P3 ve P1 problemleri tutturulan elektrotların uygulanması ile, 9 nolu hasta örneğine P3 ve P1 problemleri tutturulmuş elektrotların uygulanması ile, tüm bazları hedeften farklı olan 10 nolu hasta örneğine P3 probu tutturulmuş elektrodun uygulanması ile alınan yanıtlar.

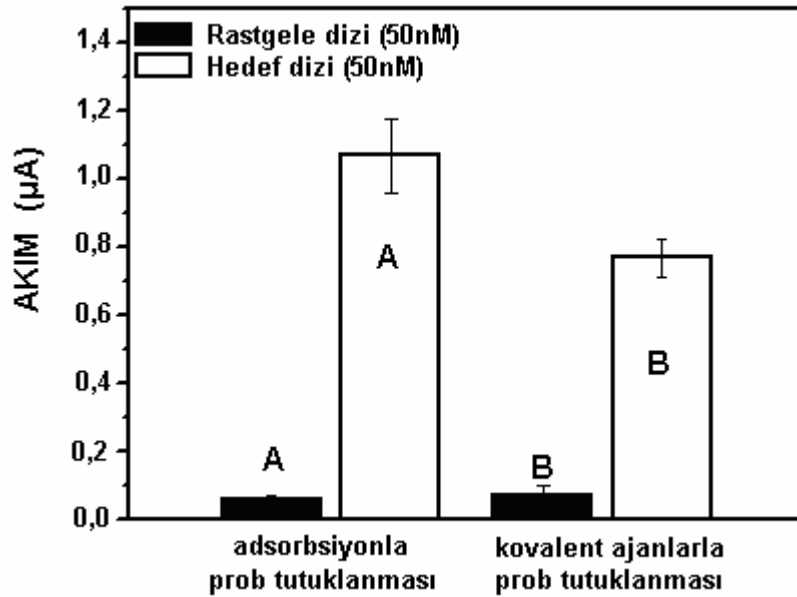
Elde edilen sonuçlar, 8 ve 9 nolu hasta örneklerinin mutant-2 tipindeki mutasyonu içerdiği saptandı. 10 nolu örneğin ise HBV olmadığı sonucuna ulaşıldı.

3.2. *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* Tayini Çalışmasında Elde Edilen Bulgular

Tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrodu içeren biyosensörün en uygun deneysel parametrelerinin bulunması için bir seri deney gerçekleştirildi.

3.2.1. Prob Tutturma Yönteminin Hibridizasyona Olan Etkisinin İncelenmesi

Salmonella genomunu tanıyacak özellikteki probun, biyosensör yüzeyine tutturulması işlemi, geliştirilen yeni biyosensördeki en önemli basamağı oluşturmaktadır. Bu nedenle uygun prob tutturma tekniğinin bulunabilmesi için amino(NH₂) grubu ile işaretli prob (prob B), ıslak adsorpsiyon ve kovalent tutturma teknikleri kullanılarak elektrot yüzeyine iki farklı şekilde tutturuldu. Bu işlemlerden sonra biyosensör, hedef ve tüm bazları hedeften farklı dizilerle etkileştirildi. Hibridizasyon sonrasında DPV yöntemiyle elde edilen sonuçlar Şekil 63'te görülmektedir.



Şekil 58: Adsorbsiyon [A] veya kovalent yolla [B] prob tutturma yöntemlerinin rastgele ve hedef dizilerle olan hibridizasyona olan etkisini gösteren grafik.

10µmol/L konsantrasyonda prob tutturulan biyosensör yüzeyleri 10µl, 50nmol/L konsantrasyona sahip hedef ve rastgele dizilerle 30dk süreyle

hibritleştirilmiştir. Ardışık üç ölçümün ortalaması ve ilgili hata çubukları, standart sapma doğrultusunda grafiklenmiştir.

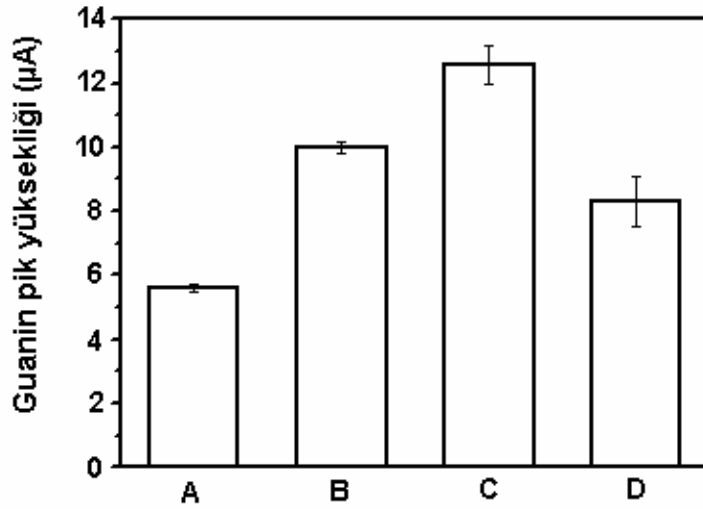
Tasarımı yapılan biyosensörde kullanılan ıslak adsorbsiyon ve kovalent yolla prob bağlama tekniklerinin her ikisinin de hedef ve rastgele dizileri seçimli şekilde ayırdığı gözlemlendi. Prob ve rastgele dizi arasında gerçekleşen hibridizasyondan sonra elde edilen α -naftol sinyalinin, prob ve hedef dizi hibridizasyonu sonrasında elde edilen sinyale göre 15 kat (ıslak adsorbsiyon tekniğinde) / 9 kat (kovalent yolla tutturma tekniğinde) daha düşük olduğu saptandı.

Biyosensör tasarım çalışmalarında genellikle yalnız basına prob yanıtının ölçümü “kör yanıt” olarak değerlendirilir. Burada beklenen çok düşük bir yanıtın elde edilmesidir. Bu çalışmada ise, iki ayrı türde prob kullanılarak, örnekte hedef dizi veya tüm bazları hedeften farklı dizi bulunduğunda, bu problemlerle olan bağlanmalar ölçülmüştür. Diğer bir deyişle, örnek ortamında aranan hedefin olup olmadığı araştırılmıştır. Tasarımı yapılan biyosensörün hedef ve tüm bazları hedeften farklı diziyi ayırması amaçlandığından, kör sinyal olarak tüm bazları hedeften farklı dizinin, problemlere beklendiği gibi düşük oranda bağlanması sonucunda elde edilen α -naftol yanıtları değerlendirilmiştir.

Herhangi bir aracı kimyasal madde (kovalent bağlanma ajanı vb.) kullanmaksızın gerçekleştirilen ıslak adsorbsiyon işlemi ile de hedefe özgül bağlanma gerçekleştiğinden, çalışmanın diğer aşamalarında bu yöntemin kullanılması uygun bulundu.

3.2.2. İşaretli Prob Kullanılmasının Elektrot Yüzeyindeki Tutunmaya Olan Etkisinin İncelenmesi

Çalışmada çeşitli özelliklere ve işaretlere sahip problemlerin (prob A,B,C,D) hibridizasyon tayinine olan etkisi incelendi. Bu amaçla elektrot yüzeylerine 10 μ L hacimde, 10 μ mol/L konsantrasyonda 0.25 mol/L asetat tamponunda hazırlanan değişik türde problemler konularak ıslak adsorbsiyon yöntemiyle tutturma işlemi yapıldı. Yıkama işlemi sonrası sadece problemlerin tutturulmuş olduğu yüzeylerden elde edilen guanin sinyalleri kare dalga voltametri tekniği kullanılarak (SWV) ölçüldü. Sadece asetat tamponunun kullanıldığı, prob dizi içermeyen çalışma ortamında herhangi bir guanin yanıtı elde edilmemiştir.



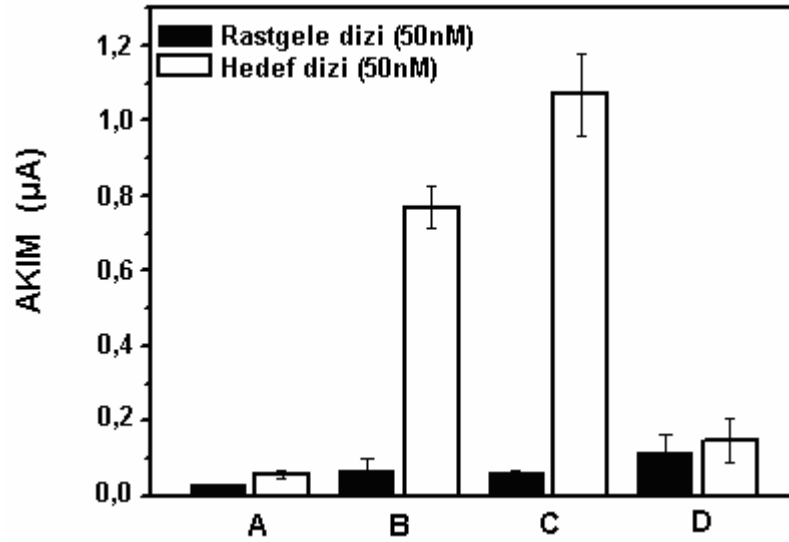
Şekil 59: Çeşitli özelliklere sahip problemlerin elektrot yüzeyine tutunma oranlarını guanin sinyali üzerinden gösteren histogram. Prob A: işaretsiz prob; Prob B amino-işaretli prob; Prob C tiyol- işaretli prob; Prob D: alkil- işaretli prob.

Ölçülen guanin sinyalleri; tiyol (-SH) grubu ile işaretli prob > amino (-NH₂) grubu ile işaretli prob > alkil grubu eklenmiş prob > işaretsiz prob sırasını izleyen

şekilde azalmıştır. Tiyol (-SH) grubu ile işaretli probun en yüksek guanin sinyalinin vermesi ve yüzeye diğer problemlerden daha fazla miktarda bağlanması grafit ve polimer karışımından oluşan elektroda ilgisinin yüksek olduğunu gösterdi.

İşaretli prob kullanılmasının hibridizasyona etkisi:

Bir önceki çalışmanın devamı niteliğindeki bu çalışmada, aynı prob dizileri kullanılmıştır. Bu problemleri taşıyan yüzeylerde, hedef ve rastgele dizilerle gerçekleşen hibridizasyondan sonra elde edilen α -naftol sinyalleri Şekil 60'da gösterilmiştir. Ortamda hedef veya rastgele dizilerin varlığında problemlerle olan bağlanmalar ölçülmüş, rastgele dizi ile problemlerin bağlanması sonucu elde edilen α -naftol yanıtı önceki sayfada da belirtildiği gibi kör sinyali olarak değerlendirilmiştir.



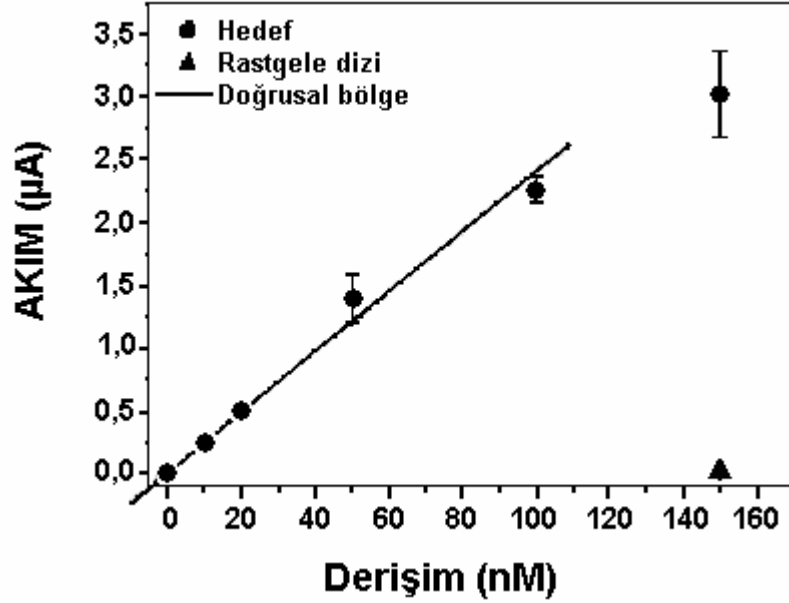
Şekil 60: Çeşitli özelliklere sahip problemlerin rastgele/hedef dizi ile hibridizasyonu sonrasında elde edilen α -naftol sinyalleri; Prob A: işaretsiz prob; Prob B amino-ışaretli prob; Prob C tiyol- işaretli prob; Prob D: alkil- işaretli prob.

Çalışmada elde edilen sinyaller incelendiğinde, amino ve tiyol işaretli problemlerin hedefleriyle yüksek, rastgele dizilerle ise düşük hibridizasyon sinyali verdikleri görüldü. Elde edilen bu sinyaller birbirine oranlandığında en iyi ayrımı sağlayan probun tiyol (-SH) grubu ile işaretli prob olduğu saptandı. Daha sonraki deneylerde -SH işaretli probun kullanılması uygun bulundu. Bu sonuç, bir önceki çalışmayı doğrulamıştır.

Her iki çalışmada gerçekleştirilen ölçümler 4'er kez tekrarlanmıştır. Ölçülen pik yüksekliklerinin ortalamasına ve standart sapmaya bağlı olarak hata çubukları belirtilmiştir.

3.2.3. Hedef Derişimdeki Artışın Hibridizasyon ve Biyosensör Seçimliliğine Olan Etkisinin İncelenmesi

Voltametik yanıtların kalibre edilmesi için gerçekleştirilen bu çalışmada 10µmol/L'lik prob konsantrasyonu sabit tutularak, hedef dizinin konsantrasyonu 150nmol/L'ye kadar arttırıldı. Rastgele dizi için sadece 150nmol/L sabit konsantrasyon kullanıldı. Hibridizasyondan sonra elde edilen α-naftol sinyalleri ve biyosensör sisteminin hedef ve rastgele diziyi ayırmadaki başarısı Şekil 61'de görülmektedir.

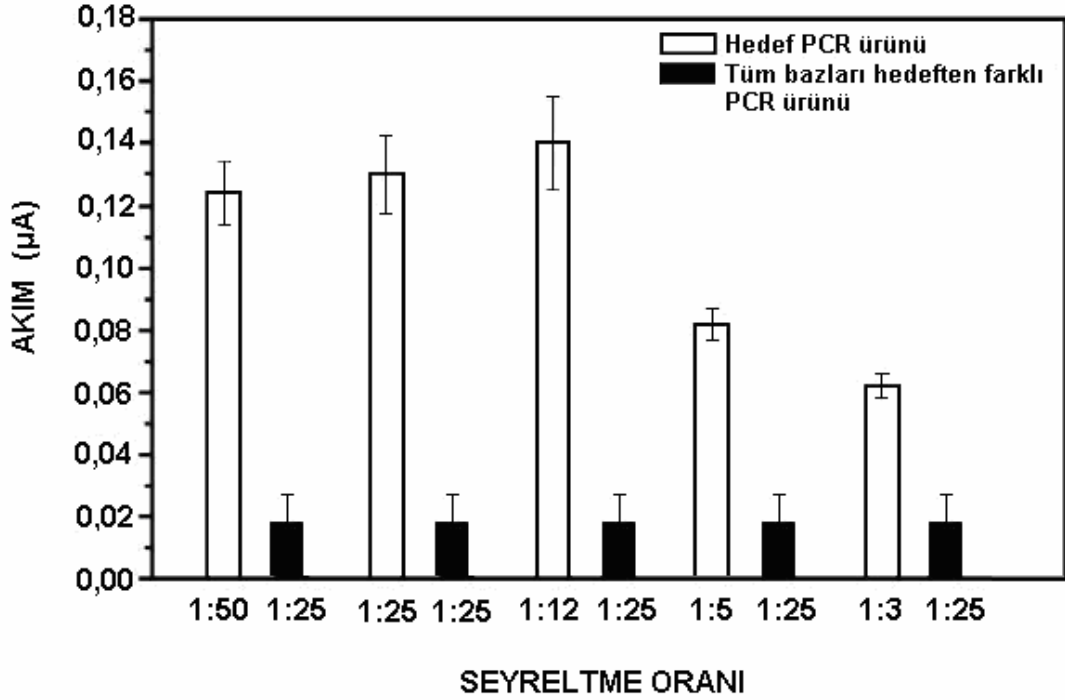


Şekil 61: Sentetik dizilerle hibridizasyona ait kalibrasyon grafiği.

Tayin sisteminde yüksek konsantrasyonda rastgele dizi kullanılması, biyosensörün seçiciliğini göstermesi açısından önemlidir. Birbirini izleyen 4'ten fazla ölçüm sonucu değerlendirildiğinde, 50 nmol/L konsantrasyonda hedef dizi ile elde edilen hibrit sinyalindeki bağıl standart sapma değeri %10 olarak bulundu. Bu hedef konsantrasyonundaki en düşük tayin sınırı 0,3 nmol/L olarak hesaplandı. (Sinyal/Gürültü oranı=3).

3.2.4. PCR Ürünleri ile Gerçekleştirilen Çalışmalar

Bölüm II'de belirtilen 388 baz çifti uzunluğundaki Salmonella genomuna ait bölge çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri seyreltilip denatüre edildikten sonra prob tutturulan biyosensör yüzeyi ile etkileştirildi. Şekil 62A'da belirli oranlarda seyreltilmiş Salmonella PCR ürünleri ile rastgele PCR ürününün, proba hibridizasyonu sonrasında elde edilen α -naftol sinyalleri incelenmiştir.

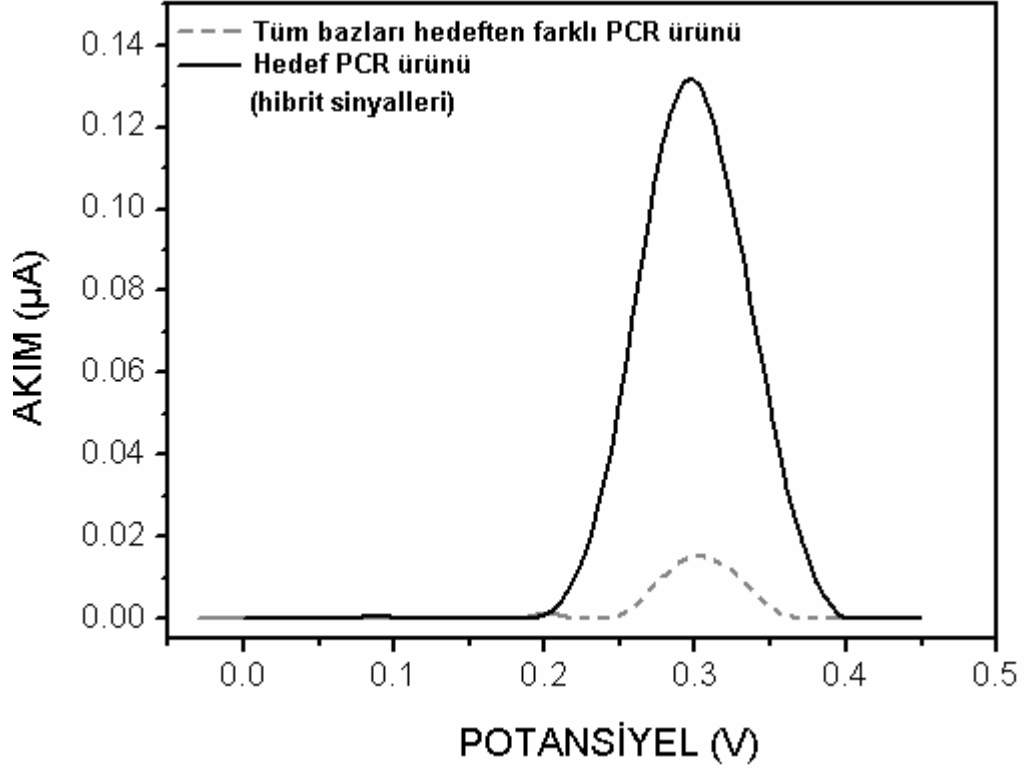


Şekil 62A: Belirli oranlarda seyreltilen hedef ve rastgele PCR ürünlerinin proba etkileşimi sonrasında elde edilen α -naftol sinyalleri.

PCR ürünleriyle hibridizasyon tayininde elde edilen sonuçlar, tasarımı yapılan genosensörün seçimliliğinin çok yüksek olduğunu göstermiştir. PCR ürünleriyle hibridizasyondan sonra elde edilen α -naftol sinyalinin sentetik dizilere oranla daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu durum PCR dizilerinin sentetik dizilere oranla çok daha uzun olması ve denatürasyon işleminin etkileriyle açıklanabilmektedir.

Çalışma sonuçlarından, kullanılan seyreltme oranlarının hepsinin tayinlerde kullanılabileceği görülmektedir. Fakat 1:50, 1:25 ve 1:12 oranlarında seyreltme yapılması, geliştirilen yeni biyosensörle daha seçimli ve daha ekonomik tayinler yapılması açısından önemlidir. PCR ürünü 1:50 oranında seyreltilse bile genosensör sisteminin hibridizasyon tayinini seçimli şekilde yapabilmesi çalışmada elde edilen diğer önemli bulgudur.

1:25 oranında seyreltilmiş hedef ve rastgele PCR dizilerine ait voltamogram Şekil 62B’de görülmektedir.



Şekil 62B: 1:25 oranında seyreltilen hedef ve rastgele PCR ürünlerinden diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak hibridizasyondan sonrasında elde edilen α -naftol sinyalleri.

Gıdalarda Salmonella tayini için geliştirilen bu yeni biyosensör sisteminde en iyi sinyal yüksekliği ve tekrarlanabilir sonuçlar, 1:25 oranında seyreltme yapıldığında elde edilmiştir.

%20 bağıl standart sapma ile elde edilen sonuçlar, biyosensör seçiciliğinin de yüksek olduğunu göstermiştir.

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

4.1. Hepatit B-Lamivudin Direnç Mutasyonlarının Tayini Çalışmasında Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

Hepatit B hastalarında ilaç kullanımı ile ilaca karşı gelişen direncin klinik olarak hızlı tayininin yapılması önem taşımaktadır. Direnç gelişimi, kan serumundaki virüs DNA'sının ve karaciğer enzimlerinin(ALT) seviyelerini arttırmaktadır ve bu da hastaların %10-25'inin karaciğerinde hasara neden olmaktadır [216, 300].

Tez çalışmamızın birinci bölümünde tek nokta mutasyonunun tayinine yönelik biyosensör geliştirildi. İşaretleme-siz hibridizasyon tayin yöntemi kullanılarak tasarımı yapılan genosensörle, yabancı (sağlıklı) tipteki ve ilaca karşı direnç gelişmiş tipteki Hepatit B virüslerinin tayini; diferansiyel puls voltametri tekniğiyle guanin yükseltgenme sinyalindeki değişimler üzerinden ve 3 farklı özellikte prob dizisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tayinde, hibridizasyon öncesinde genosensör yüzeyine yalnızca gen haritasından seçilen bölge (guanin içermeyen prob dizi) tutturulmuş ve beklendiği gibi çok düşük bir sinyal alınmıştır. Elektrot yüzeyinin taranması sırasında, yaklaşık +1.00 V [364] civarında guanine ait pikin ortaya çıkışı, hibridizasyonun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Guanin bazının yükseltgenme yanıtındaki değişimler, elektrot yüzeyine tutturulan probun niteliğine göre örnekte HBV'ye özgü

veya direnç gelişmiş HBV'ye özgü dizi bulunduğuna ilişkin bilgi vermiştir. Ayrıca tayinde kullanılan diferansiyel puls voltametri tekniği; potansiyometrik sıyırma analizi ve kare dalga voltametrisi gibi diğer elektrokimyasal tayin teknikleri ile kıyaslandığında daha düşük tayin sınırına sahip analiz sağlamıştır [276].

HIV (human immunodeficiency virus) ve hemokromatozis gibi çeşitli bulaşıcı ve kalıtsal hastalıklar için alternatif akım voltametrisi, altın çip yüzeyi ve PCR ile çoğaltılmış ürünler kullanılarak başarılı tayin çalışmaları gerçekleştirilmiştir [354]. Özkan ve arkadaşları [260], Faktör V Leiden mutasyonunun tayini için herhangi bir işaretleme basamağı içermeyen yöntem geliştirmişlerdir. Bu tayinde tek nokta mutasyonunun tayini, 2 farklı prob DNA dizisi kullanılarak yapılmıştır. Birbirinin tam karşılığı olmayan dizilerin elektrot yüzeyine istenmeyen bağlanmalarının etkilerini azaltmak için yöntemde sodyum dodesil sülfat çözeltisi kullanılmıştır. Karbon pastası elektrodunun kullanıldığı çalışmada 15µg/ml hedef DNA'ya karşı bağıl standart sapma %9,3 ve tayin sınırı 52 femtomol/ml olarak hesaplanmıştır.

Hepatit B virüsünün tayini için sentetik DNA dizilerinin veya PCR ürünlerinin kullanıldığı elektrokimyasal çalışmalar rapor edilmiştir. Erdem ve arkadaşları [91, 92] HBV tayini için geliştirdikleri biyosensörde sentetik oligonükleotitler, redoks indikatörleri kobalt fenantrolin $[Co(phen)_3^{3+}]$ /metilen mavisi, karbon pastası elektrodu ve diferansiyel puls voltametri tekniği kullanmışlardır. Kare dalga voltametri tekniğinin ve PCR ürünlerinin kullanıldığı diğer HBV tayin çalışmasında metilen mavisi hibridizasyon indikatörü kullanılmıştır [228]. Ye ve arkadaşlarının geliştirdiği HBV biyosensöründe ise altın elektrot yüzeyinde düzenli nükleik asit tabakası oluşturularak gerçek PCR ürünleriyle tayin yapılmıştır [413]. HBV tayini için çalışmada hibridizasyon indikatörü olarak ferrosen hekzaflorofosfat, dönüşümlü ve diferansiyel puls voltametri teknikleri, empedans ve spektral metodlar

kullanılmıştır. Benzer bir elektrokimyasal çalışma osmiyum bipiridin [Os(bpy)₂Cl₂] indikatörü ile gerçekleştirilmiştir [171]. HBV ve varyasyonlarının tayini için tez çalışması kapsamında geliştirdiğimiz biyosensörün herhangi bir işaretleme basamağı ve hibridizasyon indikatörü (karsinojenik antitümör ilaç, metal kompleksi, organik boya vb.) içermemesi nedeniyle daha ekonomik ve daha hızlı sonuç vermesi en önemli yararlarıdır. İndikatöre dayalı tayinlerde indikatörle etkileşim için ayrıca deneysel işlemlere ve bu nedenle ekstra süreye ihtiyaç duyulmaktadır [91, 92, 171, 177, 228, 262, 413].

Lamivudin'e direnç gelişimiyle sonuçlanan HBV varyasyonlarının (mutasyonlarının) tanısında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Genellikle kullanılan yöntem, doğrudan doğruya mutasyon görülen bölgenin baz diziliminin ortaya çıkarıldığı sekans analizine dayanmaktadır [29, 252]. Fakat bu yöntem, hem zaman alıcı hem de oldukça pahalı cihaz ve ekipman gerektiren bir yöntemdir. Bunların yanısıra, eğitilmiş personele ve çok miktarda klinik örneğe gereksinim duyulmaktadır. HBV varyasyonlarının tayininde, uygulama kolaylığı olan diğer yöntemler RFLP ve PCR yöntemleridir [50, 329]. Her iki yöntemden PCR, nispeten hızlı analiz sağlamaktadır fakat pahalı analiz kitlerinin ve toksik kimyasal maddelerin kullanımını gerektirmektedir [50].

Çalışmamızda, sentetik dizilerle gerçekleştirilen ilk bölümde hibridizasyon/mutasyon tayini gerçekleştirilerek, biyosensör sisteminin çalışması incelenmiştir. İlgili prob diziyle hibridizasyon sonrasında ortaya çıkan guanin sinyalindeki değişimler üzerinden, elektrot yüzeyine bağlanan hedefin, özgül hedef dizi veya nokta mutasyonu içeren HBV dizisi olduğu tayin edilmiştir. Her üç prob dizi ile hibridizasyon çalışması ve hedefe özgül bağlanma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen genosensör, prob ve hedef dizi arasında meydana

gelen hibridizasyondan sonra en yüksek guanin yanıtını vermiştir. İstenmeyen bağlanmaların azaltılması için sodyum dodesil sülfat çözeltisi kullanılmıştır. Bu sayede prob diziler kendilerinin tam karşılığı olan dizilerle eşleştiklerinde en yüksek guanin yanıtları elde edilmiş, tek nokta mutasyonunu içeren dizilerle ve rastgele dizilerle eşleşme sonucunda ise elde edilen yanıt sırasıyla azalmıştır.

Çalışmada hastalardan elde edilen PCR ürünlerinin tayini yapılmadan önce klonlanmış, PCR'ı yapılmış ve saflaştırılmış (KPCR) ürünleriyle uygun tayin koşulları bulunmuştur. KPCR ürünleriyle hasta PCR ürünleri benzer özelliktedir fakat KPCR ürünleri saflaştırıldığı için biyosensörün hedefine seçimli olarak bağlanması, yıkama işlemine rağmen daha kolay olmuştur. Bu çalışma, tayini yapılacak hasta PCR örnekleri için ön çalışma niteliği taşımaktadır.

Sentetik proplar ve KPCR ürünleri arasında hibridizasyon ve seçimlilik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Nokta mutasyonu içeren KPCR ürünlerinin ve rastgele dizilerin proplarla istenmeyen hibridizasyonu, sodyum dodesil sülfat çözeltisi kullanılarak azaltılmıştır. Tüm çalışmalarda, tayin sisteminin davranışını incelemek amacıyla guanin içermeyen propların yalnız başına sinyalleri ölçüldü. Bu sinyallerin beklendiği gibi sifıra yakın olması, daha sonra elde edilecek sinyallerin hibridizasyondan kaynaklandığını belirtmesi açısından önemlidir.

KPCR ürünleriyle elde edilen guanin yanıtları sentetik dizilerle yapılan çalışmalardaki sonuçlara paralellik göstermektedir fakat pik akımlarında yaklaşık 6 kat azalma gözlenmiştir. Sentetik ve kısa dizilerle gerçekleştirilen hibridizasyonla karşılaştırıldığında, uzun KPCR ürünleriyle gerçekleştirilen hibridizasyonun sterik engellemeden daha fazla etkilendiği sonucuna ulaşılmıştır.

En uygun hedef konsantrasyonunun tayinin çalışmasında artan derişimlerde hedef KPCR ürünleri kullanılmıştır. Çalışmada, elektrot yüzeyinde prob ve hedef

arasında gerçekleşen hibridizasyondan sonra elde edilen yanıtlar değerlendirilerek, en yüksek guanin yanıtının 6µg/mL'lik hedef derişimiyle sağlandığı bulunmuştur. Mutant-1 tipte prob kullanıldığında hedef derişiminin 6µg/mL'den 8µg/mL'ye arttırılması durumunda ortalama hibridizasyon yanıtında biraz azalma gözlenmiştir. Bu durum derişimin artışı ile hibridizasyon yanıtının aynı oranda artmaması ve hibridizasyonun güçleşmesi ile açıklanabilmektedir.

En uygun hibridizasyon zamanı ve yıkama süresinin tayinlerinde, birbirinin tam karşılığı olan dizilerle elde edilen yanıtların en yüksek olması, tek nokta mutasyonu içeren dizilerle olan istenmeyen eşleşmelerin ise aynı koşullarda düşük olması esas alınmıştır. Mümkün olan en belirgin ayrımın sağlandığı koşullar en iyi tayin koşulları olarak belirlenmiştir. En uygun hedef konsantrasyonu olan 6 µg/mL ile, en uygun hibridizasyon zamanı 15 dakika, istenmeyen bağlanmaların azaltılması için en uygun yıkama süresi ise 10 dakika olarak bulunmuştur. Hibridizasyon zamanının artmasıyla istenmeyen bağlanmalarda da artış gözlenmiştir. Örneğin, hibritleşme için sistemde 60dk.'lık süre kullanıldığında, istenmeyen bağlanmadan kaynaklanan yanıtın, hibrit yanıtından daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum, süre artışıyla birlikte tek bazı hedeften farklı dizinin, elektrot yüzeyindeki prob üzerinde "birikim" yapması ve yükseltgenmeye açık olmasıyla açıklanabilir.

Önceki çalışmalarda belirlenen deneysel parametreler kullanılarak hedef karışımlarını içeren örneklerle tayinler gerçekleştirildi. Bu tayin, hastalardan elde edilen virüse ait DNA'da mutasyonun hangi oranda geliştiğinin saptanması amacıyla gerçekleştirildi. Biyosensör sisteminin mutasyon gelişiminin başladığı dönemde yapılacak tayinlerdeki yeterliliği araştırıldı. Bu amaçla önce sentetik hedef diziler 1:1 oranında karıştırıldı ve ilgili problarla hibridizasyon çalışmaları yapıldı. Ardından KPCR ürünleri ile benzer şekilde karışımlar hazırlanarak tayinler

gerçekleştirildi. Sentetik DNA dizileri ve KPCR ürünlerin kullanıldığı bu çalışmalarda seçimli tayinler gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler, tasarımı yapılan biyosensörün tayindeki etkinliğini göstermiştir.

Çeşitli hastaların kanından elde edilen 10 değişik özelliğe sahip PCR ürünüyle hibridizasyon ve mutasyon tayini çalışmaları gerçekleştirildi. HBV ve varyasyonlarını tanıyan problarla PCR ürünleri arasında tam eşleşme gerçekleştiğinde, en yüksek guanin yanıtı elde edilmiştir. En yüksek yanıtın elde edildiği durumda kullanılmış olan probun niteliğine göre bu proba eşleşen hasta ürününün niteliği saptanmıştır. Örneklerden birinin, iki farklı özelliği taşıyan proba da yüksek yanıt vermesi, bu örneğin her iki proba ait niteliği taşıdığını, yani karışım örneği olduğunu gösterdi. Diğer bir ifadeyle, örnekte belli oranda mutasyon gelişimi olduğu sonucuna ulaşıldı. Sistemin en iyi koşullarının bulunması için rastgele, nokta mutasyonu içeren ve negatif örneklerle, ayrıca PCR kör çözeltisiyle hibridizasyon çalışmaları yapıldı.

Tasarımı yapılan biyosensörle önce sentetik olarak, ardından gerçek PCR ürünlerine yakınlığı nedeniyle saflaştırılmış KPCR ürünleriyle sistemin en uygun koşullarının bulunması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sentetik dizilerle hibridizasyondan sonra elde edilen, guanine ait yükseltgenme sinyali ~300nA olarak bulunmuştur. Mutasyon tayininde elde edilen sonuçların bağıl standart sapması yaklaşık olarak %10 bulunmuştur. Sentetik dizilerin (prob ve hedef) kısa olmaları nedeniyle özellikle tek nokta mutasyonu içeren dizi ile istenmeyen bağlanmaların önlenmesi daha güç olmuştur. Bu nedenle SDS yıkama çözeltisi %5'lik hazırlanmıştır.

Guanin bazının yükseltgenmesinden kaynaklanan pik akımı yüksekliği KPCR ve hasta örneklerinde yaklaşık olarak ~50nA olarak bulunmuştur. KPCR ürünleri ile

yapılan çalışmalarda da %5'lik SDS kullanılmıştır fakat kullanılan sentetik prob dizisinin kısa, hedefin ise uzun PCR zinciri olmasından dolayı sentetik dizilerin kullanıldığı çalışmalardakinden daha düşük sinyaller elde edilmiştir. Hasta PCR ürünleriyle yapılan çalışmalarda gözlenen sinyaller klonlanmış ürünlere benzer yükseklikte elde edilmiştir. Bu çalışmalarda %1'lik SDS yıkama çözeltisinin kullanılması, tekrarlanabilir sonuçlar alınması açısından uygun bulunmuştur. PCR ürünleriyle olan çalışmalarda elde edilen sonuçların bağıl standart sapması ortalama olarak % 6,0-10,2 arasında bulunmuştur (n=3). Genosensör sisteminin en düşük tayin sınırı, birbirini izleyen 3 ölçüm değerlendirildiğinde 457 femtomol/ml olarak hesaplanmıştır (sinyal/gürültü oranı 3, hedef DNA konsantrasyonu ise 6µg/mL'dir.).

Tekrarlanabilirlik ve tayin sınırı açısından Wong ve Gooding tarafından gerçekleştirilen %1,3-7,2 (n=6) bağıl standart sapma ve 0,5M'lık tayin sınırına sahip tek nokta mutasyonu analizi çalışması [400] ile karşılaştırıldığında çalışmamız tek nokta mutasyonu tayininde daha düşük tayin sınırına (yüksek duyarlılığa) sahiptir.

DNA hibridizasyonunun tayinine yönelik Kelley ve arkadaşlarının [177] altın elektrot ve metilen mavisi hibridizasyon indikatörü kullanarak yapmış olduğu çalışma ile karşılaştırıldığında çalışmamız, indikatör gerektirmediğinden dolayı daha ekonomiktir. Ayrıca Kelley ve arkadaşlarının çalışmasına benzer bir tayin yöntemine sahip Özkan ve arkadaşlarının [262] çalışmasıyla karşılaştırıldığında, işaretlemesiz tayin yöntemini içeren çalışmamızın toplam tayin süresi, kullanılan malzemelerin ekonomikliği ve indikatör gerektirmemesi gibi özellikleri nedeniyle önemli yararları bulunmaktadır.

Mutasyon tayininin işaretlemesiz sistemle gerçekleştirildiği diğer bir çalışma Özkan ve arkadaşları tarafından Faktör V Leiden mutasyonu için yapılmıştır. Bu çalışma ile kıyaslandığında, tez çalışmamızda kullanılan kalem grafit elektrot

sisteminin, tekrarlanabilirliğinin daha iyi oluşu, uygulama kolaylığı sağlaması ve fabrikasyona uygunluk gibi yararları bulunmaktadır. Ayrıca çalışmamızla 15µg/mL'lik hedef konsantrasyonu 6µg/mL'ye düşürülmüştür.

Sonuç olarak, günümüze kadar gerçekleştirilen literatürde yer almış elektrokimyasal DNA analizi, kalıtsal hastalık ve mutasyon tayini çalışmalarına bakıldığında [28, 88, 90, 177, 185, 208, 219, 220, 260, 262, 273, 295, 341, 358, 367, 379, 390, 393, 400] yöntem olarak birtakım benzerlikler gösteren çalışmamız, Lamivudine karşı gelişen direnç mutasyonunun, ilk defa isaretsiz elektrokimyasal biyosensörle gerçek örneklerden tayin edilmesi açısından farklılık göstermektedir. Ayrıca çalışmamızın literatüre getirdiği yenilikler, tayinin tek kullanımlık elektrot yüzeyinde kısa sürede gerçekleştirilmesi, çok daha az miktarda örnek gerektirmesi, ucuz bir metod olması, PGE genosensör sisteminin kullanım kolaylığı sağlaması ve fabrika üretimine uygun olmasıdır.

4.2. *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* Tayini Çalışmasında Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

Bilindiği gibi gıdalardan kaynaklanan hastalıklar özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunudur. Bu hastalıklara neden olan patojen bakterilerin hızlı tayini için geleneksel yöntemlere alternatif olabilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Klasik yöntemlerden immunolojik tayin yöntemi, örneklerin kolaylıkla hazırlanabilmesi nedeniyle tercih edilmektedir. Fakat, bakteri kültürlerinin hazırlanması gibi işlemler zaman alıcı olmaktadır. Çok daha hızlı sonuç veren ve daha kolay örnek hazırlama olanağı sağlayan nükleik asitlerin kullanıldığı bakteri tayin sistemleri ise son yıllarda tercih edilmektedir [162]. Bu

çalışmalarda bakterileri tanımlayan DNA parçaları kullanılmakta ve tayin biyosensör sistemiyle gerçekleştirilmektedir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde gıda kaynaklı hastalıkların nedenlerinden biri olan Salmonella bakterisinin tayinine yönelik biyosensör tasarımı yapılmıştır. Salmonella bakterisini tanımlayan DNA parçasının (Salmonella genomunun) tayini, enzime dayalı genosensör ile özgül şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tasarımı yapılan biyosensörde öncelikli olarak en uygun deneysel parametreler bulunmuştur. Bu amaçla gerçekleştirilen ilk çalışmada, prob tutturma (immobilizasyon) tekniğinin hibridizasyona olan etkisi incelendi. Adsorbsiyon ve kovalent yolla prob tutturma yöntemlerinin değerlendirildiği çalışmada hedefle hibridizasyondan sonra elde edilen α -naftol yanıtları ortalama olarak $\sim 1\mu A$ olarak bulunmuştur. Hibridizasyon ve seçimlilik açısından her iki prob immobilizasyon yöntemi değerlendirildiğinde, elektrot yüzeyinin kovalent ajanlarla etkileştirilerek, problemlerin düzenli olarak tutturulmasının, adsorbsiyon yoluyla yatay olarak tutturulmasına göre büyük bir yarar sağlamadığı sonucuna ulaşılmıştır. Adsorbsiyonla elde edilen α -naftol yanıtının daha yüksek olması, prob dizinin elektrot yüzeyine yüksek oranda birikme yaparak tutunduğu şeklinde yorumlanabilir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda çalışmada ıslak adsorbsiyon [93] tekniğinin kullanılması uygun bulunmuştur. Yöntemin kolay uygulanabilirliği, toplam tayin süresini kısaltması ve toplam maliyeti azaltması gibi yararları da göz önüne alınmıştır.

Çeşitli işaretlere sahip problemlerin elektrot yüzeyine olan bağlanmasının guanin yanıtı üzerinden ve SWV tekniği ile ölçüldüğü diğer çalışmada, tiyol grubuyla işaretili problemlerin elektrot yüzeyine olan ilgisinin en yüksek olduğu bulunmuştur. Bu

durum, grafit ve polimer karışımından oluşan elektroda tiyol grubunun ilgisinin yüksek olduğu göstermiştir.

Çeşitli özelliklere sahip problemlerin ayrıca hibridizasyona ve özgül olmayan bağlanmalara karşı davranışlarının α -naftol yanıtı üzerinden DPV yöntemiyle incelendiği diğer çalışmada da tiyol grubuna sahip proba elde edilen yanıtların, diğer problemlerle elde edilenlerle kıyaslandığında daha iyi olduğu görülmüştür. Her iki deneyde elde edilen bu sonuçların yorumlanması, polimer bileşiminin firmaca gizli tutulması nedeniyle güçtür. Sadece tiyol grubuna sahip probun, elektrotta kullanılan karbon malzeme içinde %64 oranına sahip olan polimerle etkileştiği şeklinde açıklama yapılabilir.

α -naftol'ün voltametrik sinyallerinin kalibre edilmesi için gerçekleştirilen konsantrasyon çalışmasında, hedef konsantrasyonu 150nmol/L'ye kadar artırıldığında tasarımı yapılan biyosensör sisteminin hibridizasyon ve istenmeyen bağlanma ile oluşan yanıtları birbirinden seçimli şekilde ayırdığı gözlemlendi. Rastgele dizi için sadece 150nmol/L sabit konsantrasyon kullanılmasına rağmen ayırım çok iyi şekilde gerçekleştirilmiştir. Yüksek konsantrasyonda rastgele dizi kullanılması biyosensörün seçimliliğini göstermesi açısından önemlidir. Birbirini izleyen 4'ten fazla ölçüm sonucu değerlendirildiğinde, 50 nmol/L konsantrasyonda hedef dizi ile elde edilen hibrit sinyali yaklaşık olarak 1,1 μ A, bağıl standart sapma %10, en düşük tayin sınırı ise 0,3 nmol/L olarak bulundu (Sinyal/Gürültü oranı=3).

388 baz çifti uzunluğundaki Salmonella PCR ürünlerinin tayini için üretilen PCR ürünleri belirli oranlarda (1:50, 1:25, 1:12, 1:5, 1:3) seyreltilerek hibridizasyon çalışmaları yapıldığında elde edilen sonuçların sentetik dizilerle elde edilenlere göre daha düşük olduğu gözlemlendi (~0,14 μ A). Bu durum sentetik dizilerin kısa, PCR ürünlerinin ise oldukça uzun olması ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada, 1:50

oranında seyreltilen örnekle bile geliştirilen biyosensör sisteminin seçimli olarak hedefine bağlandığı saptanmıştır. Ayrıca 1:25 oranında seyreltilen hedef ve rastgele dizi ile yapılan çalışma da seçimli sonuçlar elde edildi. Sonuçların bağıl standart sapma değeri, yapılan çok sayıda ölçüm değerlendirildiğinde %20 olarak hesaplanmıştır. 1:25 oranında seyreltilen hedef dizinin, aynı oranda seyreltilen rastgele diziden 7 kat daha yüksek hibridizasyon sinyali vermesi, nispeten yüksek olan bağıl standart sapma değerine rağmen tasarımı yapılan biyosensörle hedef / rastgele dizi ayrımının belirgin olarak gerçekleştiğini göstermiştir.

Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrot kullanılarak geliştirilen biyosensörün, kullanım kolaylığı sağlaması, ekonomik oluşu ve ayrıca mikro ölçekli fabrikasyona uygulanabilir olması çalışmamızın en önemli yararlarıdır. Ayrıca tayinin yaklaşık 1 saat gibi kısa bir sürede gerçekleştirilebilmesi sistemin diğer bir yararlarıdır. Hedef ve rastgele dizi ayrımının belirgin olarak gerçekleştirilmesi tasarımı yapılan biosensörün yüksek duyarlılığa sahip olduğunu gösterdi. Ayrıca tayinde sandviç hibridizasyon tekniğinin kullanılmasının biyosensörün seçimliliğini olumlu yönde etkilediği saptandı.

İşaretlemelessiz hibridizasyon tayin yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarla [214, 260] karşılaştırıldığında yöntemimizdeki enzimle işaretleme basamağı, hibridizasyon yanıtını büyük ölçüde arttırmaktadır. Günümüze dek geliştirilen nükleik asit hibridizasyonu ve enzimle işaretlemeyle dayalı değişik biyosensör sistemleri bulunmaktadır [12, 269, 374]. Geliştirilen yeni biosensör, literatürdeki tüm bu çalışmalara alternatif bir yöntem içermektedir ve amaçlandığı şekilde ucuz, hızlı, kesin ve doğru analiz yapabilmektedir. Ayrıca kullanım kolaylığı sağlaması ve fabrika üretimine uygulanabilir olması gibi yararları bulunmaktadır.

Salmonella bakterisinin tayinini için tasarımı yapılan bu biyosensörün, gıdalarda tayin edilmesi gerekli diğer bakterilere de uygulanması mümkün olabilecektir. Geliştirdiğimiz yeni tayin yöntemi, ayrıca klasik analiz yöntemlerinde bulunan bakteri kültürlerinin oluşturulması, besi yerlerinin hazırlanması gibi birçok zaman alıcı işlemi ortadan kaldırmaktadır.

BÖLÜM V

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada tasarımı yapılan biyosensörler ile tez kapsamında yer alan amaçlara uygun olarak gerçek hasta örnekleriyle tayinler yapılması mümkün olmuştur. Yeni bir genotipleme metodunu içeren birinci bölümde, ilk kez elektrokimyasal DNA biyosensörü kullanılarak Hepatit B hastalarında tedavi için kullanılan lamivudin adlı ilaca karşı gelişen direncin (mutasyonun) tayini yapılmıştır. Tayinde HBV varyasyonlarının (YVDD-YIDD) ayırımı, diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak DNA'daki guanin bazının yükseltgenme yanıtı üzerinde, hızlı, ekonomik, güvenilir ve tekrarlanabilir şekilde gerçekleştirilmiştir. Literatürde HBV varyasyonlarının tayinini için PCR ile çoğaltılan hasta örnekleri ve işaretlemesiz elektrokimyasal tayin yönteminin kullanıldığı çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada tasarımı yapılan biyosensör ile tayin yaklaşık 33 dakika sürmektedir. Geliştirilen biyosensör sisteminin küçültülmesi ve mikroarray cihazı haline dönüştürülmesi halinde hasta başı analizlerinde kullanımı mümkün olabilecektir.

Antikanser ilaç, metal kompleksi veya organik boya gibi harici hibridizasyon indikatörü [91, 92, 171, 177, 228, 262, 413] kullanımını ortadan kaldırdığı için geliştirilen bu yeni biyosensör, ucuz ve hızlı bir biyosensördür. Analizin kalem grafit elektrotla yapılması, kalem elektrodun yüzeyinin kolaylıkla yenilenebilmesi, tayin süresinin kısa olması, biyosensörün kullanım kolaylığı sağlaması, hassas ve seçimli şekilde gerçekleştirilen tayin ise çalışmanın diğer yararlarıdır.

Çalışmamızda tasarımı yapılan enzime dayalı diğer voltametrik genosensörle *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* tayini tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrot ve sandviç hibridizasyon modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal ölçümlerde diferansiyel puls ve kare dalga voltametri teknikleri kullanılmıştır. *Salmonella* PCR ürünleri ve negatif kontrollere karşı biyosensörün verdiği yanıtlar incelenerek, genosensörün hedef dizi ve rastgele diziyi birbirinden seçimli olarak ayırdığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın yararları, geliştirilen DNA biyosensörünün, kullanım kolaylığı sağlaması, ekonomik olması, hızlı analiz yapabilmesi ve mikro düzeyde üretime izin verecek altyapıyı içermesidir. Ayrıca, sandviç hibridizasyon tekniği, biyosensör sisteminin seçimliliğinin iki bölgeden kontrolü ve hassas sonuçlar elde edilmesi açısından, önem taşımaktadır. Tayinde biyosensör sisteminin rastgele dizi ile hedef diziyi birbirinden belirgin şekilde ayırmıştır. Geliştirilen sistemin tek nokta mutasyonlarının tayininde kullanılması önerilebilir. Bu deneyler, biyosensörün gelecekteki mikroçip tasarımlarına uygulanabilmesi için gereklidir.

Tez çalışmalarında kullanılan her iki çalışma elektrodu da tek kullanımlık özelliğe sahiptir. Tasarımı yapılan her iki genosensör sistemi de, mikro-üretim (mikroçip) teknolojisine uygulanabilecek altyapıya sahiptir.

Sonuç olarak, tez kapsamında belirtilen amaçlar gerçekleştirilmiştir. Gelecekte bu iki sistemin fabrikasyona uygulanabilmesi, sanayi-üniversite işbirliğini gerektirmektedir.

ÖZET

DNA'DA MEYDANA GELEN BAZI MUTASYONLARIN VE HİBRİDİZASYONUN TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL DNA BİYOSENSÖRLERİNİN TASARIMI

DNA'da meydana gelen bazı mutasyonların ve hibridizasyonun tayinine yönelik elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımı

DNA'nın çift sarmal yapısının keşfinden yarım asır sonra, 21. yüzyılın başlarında bilim dünyası biyolojik araştırmalarda izlenen çok çeşitli yöntemlerle karşı karşıya bulunmaktadır ve araştırmacılar özellikle moleküler biyoloji ve nanoteknoloji alanlarındaki hızlı gelişmelerden etkilenmektedir. Gen teknolojisindeki gelişmelerle birlikte, analitik tayin yöntemlerinin gelişme yönü de yüksek kalitede, gittikçe küçülen boyutlarda ileri teknoloji ürünlerinin moleküler DNA analizleri için geliştirilmesi doğrultusunda ilerlemektedir.

Çalışmamızda DNA hibridizasyonunun ve mutasyonlarının tayinine yönelik farklı özelliklere sahip iki elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarımı gerçekleştirildi. Moleküler biyoloji alanındaki tüm bu gelişmeler paralelinde, ilk bölümde Hepatit B hastalığı tedavisinde yoğun olarak kullanılan Lamivudin adlı ilacın, bu hastalığın etkeni olan Hepatit B virüs genomunda meydana getirdiği nokta mutasyonlarının tayini yapıldı. Kalem grafit elektrot, sentetik oligonükleotitler, klon ürünleri ve polimeraz zincir reaksiyonu ile üretilen ürünler ile yapılan tayinlerde

diferansiyel puls voltametri tekniği kullanıldı. Biyosensör tasarımında çeşitli deneysel parametrelerin (hedef konsantrasyonu, hibridizasyon süresi, hibridizasyon sonrası sensör yüzeyinin yıkanma süresi, sensör seçimliliği, en düşük tayin sınırı ve tekrarlanabilirlik) tayine olan etkileri incelendi. Asetat tamponu (pH: 4,8) içerisinde gerçekleştirilen ölçümlerde, elektrot yüzeyinden hibridizasyondan önce yanıt alınmazken, hedef dizi ile hibritleşme sonrasında elde edilen yanıtın (guanin yükseltgenme sinyali) yüksek olduğu gözlenmiştir. Prob dizinin hedeften tek bazı farklı ve rastgele dizilerle olan hibridizasyonu ile elde edilen yanıtların ise sırasıyla azaldığı gözlenmiştir. Hassas şekilde hasta örneklerinde de mutasyon tayini gerçekleştirilmiştir. Kalem elektrot yüzeyinin kolayca yenilenebilir olması, kalem elektrot sisteminin çoklu analizlere uygulanabileceği hatta mikroçip cihaz üretiminde kullanılabileceği fikrini düşündürmüştür. Lamuvudin'in uzun süreli kullanımında virüs genomunda oluşan nokta mutasyonları, virüsün ilaca karşı direnç geliştirmesine neden olduğundan mutasyon tayininin tedaviye yeni bir yön verilmesi açısından önemi büyüktür. Tasarımı yapılan biyosensörle kısa sürede yapılan mutasyon tayini, klasik tayin yöntemlerine farklı bir alternatif getirmiştir. Bu yeni biyosensör yalnızca hızlı, ucuz ve kolay analiz sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda iki ayrı türdeki lamivudin direnç mutasyonu hakkında bilgi vermektedir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde gıda kaynaklı hastalıklara neden olan *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* bakterisinin tayinine yönelik biyosensör tasarımı yapılmıştır. Salmonella bakterisini tanımlayan DNA parçasının (Salmonella genomunun) tayini, enzime dayalı genosensör ile gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon tayini, biotin-streptavidin etkileşiminin kullanıldığı, sandviç modeli hibridizasyon tekniğiyle spesifik olarak oluşan ürün " α -naftol" üzerinden yapılmıştır. Diferansiyel puls ve kare dalga voltametri tekniklerinin kullanıldığı ölçümlerde, tek kullanımlık

perde baskılı karbon elektrot yüzeyinde gerçekleşen ikili hibrit yapısı (sandviç hibrit) en yüksek yanıtı vermiştir. Hedef dizi yerine rastgele dizi kullanıldığında ise yanıtta büyük bir azalma olmuştur. Çeşitli özellikte problemlerin hibridizasyona etkisi, prob tutturma metodu, hedef konsantrasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu ile üretilen ürünlerin seyrelme oranı gibi deneysel parametreler incelendi. Ayrıca en düşük tayin sınırı ve bağıl standart sapma gibi parametreler de hesaplandı. Bu elektrokimyasal genosensörle 50 kez seyreltilmiş PCR ürünleriyle bile hedefe özgül olarak hibridizasyon tayini yapılabileceği bulundu. Geliştirilen bu biyosensörle kısa sürede yapılan bakteri tayini klasik tayin yöntemlerine yeni bir alternatif getirmiştir.

Tasarımı yapılan her iki biyosensörün de ileride DNA çiplerinde kullanılacak teknolojik altyapıyı içerdiği bulundu.

ABSTRACT

THE DESIGN OF ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSORS FOR THE DETECTION OF SOME DNA MUTATIONS AND HYBRIDISATION

After half century of the discovery of double-stranded DNA structure, in 21st century, science world has faced with many kinds of diagnosis methods in biological research area so researchers have been influenced on fast advancement in molecular biology and nanotechnology. The direction of analytical determination methods have advanced with gene technology, nano-scale device technology and nanomaterial usage in biosensors.

In this thesis study, two different electrochemical DNA biosensors were designed for the detection of DNA hybridization and DNA mutations.

In parallel with molecular biological advancement firstly, we described an electrochemical DNA genosensor for the detection of HBV (YMDD) and the discrimination of the point mutation types (YVDD and YIDD) by using the oxidation signal of guanine and a disposable pencil graphite electrode in connection with DPV. The detection scheme contained synthetic oligonucleotides, cloned products and polymerase chain reaction products. In the biosensor design, different experimental parameters were examined such as optimum target concentration, optimum hybridisation and washing time, specificity of the biosensor, detection limit, reproducibility... etc. in order to understand the influence of these parameters on the

hybridisation/mutation detection. Before the hybridisation, no signal observed because of guanine-free probe but after the hybridization the highest guanine signal were obtained because of target sequence. (Measurement were performed in acetate buffer pH: 4.8) After hybridisation between probe modified surface and mismatch/non-complementary sequences, guanine oxidation signals decrease alternately.

In terms of the detection of Lamuvidine resistance, this study is of importance because fast and sensitive electrochemical detection of mismatch analysis was performed. With the help of the experimental results reported here, a microarray device may be produced. Additionally, Lamuvidine resistance can be detected from patient samples using this device.

The resistance analysis related to the hepatitis B virus (HBV) genotyping and treatment procured key information for the study of infected patients. Consequently, the biosensor which was designed in this thesis, is provides an alternative detection in comparison to traditional detection schemes for mutation analysis. This new biosensor not only provides a rapid, cost-effective, simple analysis but also gives information concerning both genotyping and lamivudine resistance.

In the second part of this thesis study, we developed a biosensor for the detection of *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis* bacteria which is caused by food-borne diseases. In this work, oligonucleotide modified screen-printed carbon electrodes were used for the enzyme-amplified sensing of DNA sequences that identify the Salmonella bacteria. The capture probe was immobilized onto screen-printed carbon electrodes using the adsorption method. Hybridization reaction was detected through the sandwich format, based on the coupling of biotin-streptavidin interaction using a streptavidin conjugated to alkaline phosphatase. The enzyme

catalyzed the conversion of electroinactive α -naphthyl phosphate to α -naphthol; this product is electroactive and has been detected by differential pulse voltammetry. Measurements were performed before and after the hybridisation reaction. When the sandwich hybrid structure was occurred onto electrode surface, the highest α -naphthol signal was observed. When the non complementary oligonucleotide was used as a target α -naphthol signal decreased sharply. Additionally, different experimental parameters were examined such as different types of probe usage, different probe immobilization methods, optimum target concentration, optimum dilution rate of PCR products, detection limit and reproducibility in order to understand the influence of these parameters on the hybridisation. The electrochemical assay allowed specific detection of the polymerase chain reaction (PCR) amplified targets, even diluting the sample of interest about 50-fold. This new biosensor provides an alternative detection scheme for bacterial analysis in food.

Both electrochemical biosensors which were designed in this thesis have substructure of DNA microchip technology.

KAYNAKLAR

1. Affymetrix web site” <http://www.affymetrix.com/products/instruments/index.affx>. 4 Temmuz 2006
2. Ajayan P.M., Iijima S., (1993).Capillarity induced filling in carbon nanotubes, *Nature*, 361: 333-334.
3. Alivisatos A. P., (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots, *Science* 271: 933-937.
4. Alivisatos P., (2004). The use of nanocrystals in biological detection, *Nat. Biotechnol* 22:47- 52.
5. Allen, M.I.; Deslauriers, M.; Andrews, C.W.; Tipples, G.A.; Walters, K.A.; Tyrrell, D.L.J.; Brown, N.; Condreay, L. D., (1998). Identification and characterisation of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine, *Hepatology* 27: 1670-1677.
6. 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, 303-495.
7. Analytical Electrochemistry (2nd edition), J. Wang, Wiley-VCH , New York, 2000.
8. Aoki H., Bühlmann P., Umezawa Y., (2000). Electrochemical detection of a one-base mismatch in an oligonucleotide using ion-channel sensors with self-assembled PNA monolayers, *Electroanalysis* 12 (16), 1272– 1276.
9. 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 : 4908-4917.

10. Authier L., Grossiord C., Brossier P., Limoges B., (2001). Gold nanoparticles-based quantitative electrochemical detection of amplified human cytomegalovirus DNA using disposable microband electrodes, *Anal. Chem.* *73*:4450-4456.
11. AUTOLAB User Manual, (2005). Eco Chemie, The Netherlands.
12. Azek, F., Grossiord, C., Joannes, M., Limoges, B., Brossier, P., (2000). Hybridisation assay at a disposable electrochemical biosensor for the attomole detection of amplified human cytomegalovirus DNA, *Anal. Biochem.* *284*, 107–113.
13. Baird C.L., Myszka D.G., (2001). Current and emerging commercial optical biosensors, *Journal of Molecular Recognition*, *14*, 261-268.
14. Bakker E., (2004). Electrochemical sensors, *Anal. Chem.* *76* (2004) 3285.
15. Balavoine F., Schultz P., Richard C., Malluoh V., Ebbesen T. W., Mioskowski C., (1999). Helical crystallization of proteins on carbon nanotubes: A first step towards the development of new biosensors, *Angew. Chem. Int. Ed.*, *38*: 1912.
16. Bard A.J., Faulkner L.R., (1980). *Electrochemical Methods*, New York: Wiley, Chapter.
17. Bardea, A., Dagan, A., Willner, I., (1999). Amplified electronic transduction of oligonucleotide interactions: novel routes for Tay-Sachs biosensors. *Anal. Chim. Acta* *385*: 33–43.
18. Barry J.P., Barry J.P., Norwood C., Vouros P., (1996). Detection and identification of Benzo[a]pyrene diol epoxide adducts to DNA utilizing capillary electrophoresis- electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, *68*: 1432-1438.
19. Barton J. K., (1986). Metals and DNA : Molecular left-handed complements, *Science*, *233*: 727-734.
20. Barton J. K., Goldberg J. M., Kumar C. V., Turro N. J., (1986). Binding modes and base specificity of Tris (phenanthroline) ruthenium (II) enantiomers with nucleic acids: Tuning the stereoselectivity, *J. Am. Chem. Soc.*, *108*: 2081-2088.
21. Barton, J. K., Danishefsky, A. T., Goldberg, J. M., (1984). Tris (phenanthroline) ruthenium (II) : Stereoselectivity in binding to DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, *106*: 2172-2176.

22. Bej A. K., (1996). Nucleic acid analysis: Principles and Bioapplications; Chapter 1: Nucleic acid hybridizations: principles and strategies, Ed. Dangler, C.A., Wiley-Liss, Inc., s. 1-29.
23. Berger C.E.H., Beumer T.A.M., Koyman R.P.H., Greve J., (1998). Surface Plasmon Resonance Multisensing, *Anal. Chem.* 70 703–706.
24. Berggren, C., Stalhandske, P., Brundell, J., Johansson, G., (1999). A feasibility study of a capacitive biosensor for direct detection of DNA hybridisation. *Electroanalysis* 11 (3): 156–160.
25. Bergveld P., (1970). Development of an ion-sensitive solid-state device for europsychological measurements, *IEEE Trans. Biomed. Engineering*, 17: 70.
26. Blackburn M.G., Gait M.J., Nucleic acids in Chemistry and Biology, IRL Pres, New York, 1990.
27. Boon E.M., Barton J.K., (2003). DNA Electrochemistry as a probe of base pair stacking in A-, B-, and Z-form DNA *Bioconjugate Chemistry*, 14(6), 1140-1147.
28. Boon E.M., Ceres D.M., Drummond T.G., Hill M.G., Barton J.K., (2000). Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes. *Nat. Biotechnol.* 18, 1096–1100.
29. Bozdayi A.M.; Uzunalimoglu O., Turkyilmaz A.R., et al., (2003). YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J. Viral Hepat.*, 10(4): 256-265.
30. Brabec V., Kleinwachter V., Butour J.L., Johnson N.P., (1990). Biophysical studies of the modification of DNA by antitumour platinum coordination complexes. *Biophys. Chem.*, 35:129-141.
31. Brabec, V. (1983). Conformational changes in DNA induced by its adsorption at negatively charged surfaces - The effects of base composition in DNA and the chemical nature of the adsorbent, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11: 245-255.
32. Brabec, V., Dryhurst, G. (1978). Electrochemical behaviour of natural and biosynthetic polynucleotides at the pyrolytic graphite electrode a new probe for studies of polynucleotide structure and reactions, *Electroanal. Chem.*, 89: 161-173.
33. Brabec, V., Koudelka, J. (1980). Oxidation of deoxyribonucleic acid at carbon electrodes. The effect of the quality of the deoxyribonucleic acid sample, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 7: 793-805.

34. Brett A.M. Oliveira, Serrano S.H.P., Gutz I., La-Scala M.A., Cruz M.L., (1997). Voltammetric behaviour of nitroimidazoles at a DNA-biosensor, *Electroanalysis*, 9: 1132-1137.
35. Brett A.M. Oliveira, Serrano S.H.P., Macedo T.A., Raimundo D., Marques M. H., La-Scala M.A., (1996). Electrochemical determination of Carboplatin in serum using a DNA-modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 8: 992-995.
36. Brett A.M.O., Piedade J.A.P., Serrano S.H.P., (2000). Electrochemical oxidation of 8-oxoguanine. *Electroanalysis*, 12: 969-973.
37. Brett A.M.O., Vivan M., Fernandes I.R., Piedade J.A.P., (2002). Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA *Talanta*, 56: 959-970.
38. 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, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 861-867.
39. Broude N.E., (2002). Stem-loop oligonucleotides: a robust tool for molecular biology and biotechnology, *Trends Biotechnol.*, 20,249-256.
40. Bruchez M., Jr., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A. P., (1998). Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels *Science*, 281: 2013-2016.
41. Buck R.P., in *Comprehensive Treatise of Electrochemistry*, J. D. M. Bockris, B. C. Conway, H.E. Yeager, Eds., Vol. 8 Chapter 3. New York: Plenum Pres, 1984.
42. Buckova M., Labuda J., Sandula J., Krizkova L., Stepanek I., Durackova Z., (2002). Detection of damage to DNA and antioxidative activity of yeast polysaccharides at the DNA-modified screen-printed electrode, *Talanta*, 56: 939-947.
43. Buerger C., Groner EB., (2003). Bifunctional recombinant proteins in cancer therapy: cell penetrating peptide aptamers as inhibitors of growth factor signaling, *J Cancer Res Clin Oncol*, 129: 669-675
44. Bunde R.L., Jarvi E.J., Rosentreter J.J., (1998). Piezoelectric quartz crystal biosensors, *Talanta* 46 :1223-1236

45. Cai H., Xu Y., Zhu N., He P., Fang Y., (2002). An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label, *Analyst*, 127: 803-808.
46. Cai, X., Rivas, G., Farias, P.A.M., Shiraishi, H., Wang, J., Palecek, E., (1996). Evaluation of different carbon electrodes for adsorptive stripping analysis of nucleic acids. *Electroanalysis* 8 (8-9): 753–758.
47. Cai, X., Rivas, G., Shirashi, 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.
48. Camman, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B. (1991). Chemical Sensors and Biosensors-Principles and Applications, *Angew. Chem. Int. De.Engl.*, 30: 516-539.
49. Campbell C.N., Gal D., Cristler N., Banditrat C., Heller A., (2002). Enzyme-Amplified amperometric Sandwich Test for RNA and DNA, *Anal. Chem.*, 74: 158-162.
50. Cane P.A., Cook P., et al., (1999). Use of real time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. *Antimicrob. Agents Chemoter*, 43:1600
51. Carpini G., Lucarelli F., Marrazza G., Mascini M., (2004). Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids *Biosensors and Bioelectronics* 20: 167–175.
52. 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.
53. Carter, M.T., Rodriguez, M., Bard, A.J. (1989) Voltammetric studies of the 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.
54. Caruana, D.J., Heller, A., (1999). Enzyme-amplified amperometric detection of hybridisation and of a single-base pair mutation in an 18-base oligonucleotide on a 7- μ M-diameter microelectrode. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 769–774.
55. Castillo, J.; Gaspar, S.; Leth, S.; Niculescu, M.; Mortari, A.; Bontidean, I.; Soukharev, V.; Domeanu, S. A.; Ryabov, A. D.; Csoregi, E., (2004). Biosensors for life quality - Design, development and applications *Sensors and Actuators B*, 102: 179-194.

56. Chaki, N.K., Vijayamohanan, K., (2002). Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* 17, 1–12.
57. Chidsey, C.E.D., Loiacono, D.N., (1990). Chemical functionality in self-assembled monolayers: structural and electrochemical properties. *Langmuir* 6, 682–691.
58. Chiti G., Marrazza G., Mascini M., (2001). Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring *Anal. Chim. Acta*, 427:155.
59. Clapp, A.R., Medintz IL, Mauro JM, Fisher BR, Bawendi MG, Mattoussi H, (2004). Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (1): 301-310.
60. Clark, L.C., Lyons, C., (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY. Acad. Sci.* 102, 29–45
61. Collings A.F., Caruso F., (1997). Biosensors: recent advances. *Reports on Progress in Physics*, 60: 1397-1445.
62. Coulet, P. R. (1991). What is a Biosensor?, Chapter 1; Biosensor principles and applications, Editörler; L.J.Blum, P.R. Coulet, Marcel Dekker Inc., New York, 1-6.
63. Covington A.K., Ion Selective Methodology, Ed., Boca Raton, FL: CRC Pres, 1979.
64. Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 15: Polymerase Chain Reaction & Chapter 2: Analysis of DNA, John Wiley & Sons Inc. 2005 (<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/mrwhome/104554809/HOME>)
65. D’Orazio P., (2003). Biosensors in clinical chemistry *Clinica Chimica Acta*, 334: 41-69.
66. Daniel M-C, Astruc D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev*, 104:293–346.
67. De Lumbe-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.
68. De Lumley-Woodyear, T., Campbell, C.N., Heller, A., (1996). Direct enzyme-amplified electrical recognition of a 30-base model oligonucleotide. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 5504–5505.

69. Deforce, D.L.D., Ryniers, F.P.K., Van den Eeckhout, E.G., Lemiere, F. Esmans, E.L.(1996). Analysis of DNA adducts in DNA hydrolysates by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 68: 3575-3584.
70. Del Giallo M.L., Ariksoysal D.O., Marrazza G., Mascini M., Ozsoz M., (2005). Disposable Electrochemical Enzyme-Amplified Genosensor for Salmonella Bacteria Detection, *Analytical Letters*, 38: 2509–2523.
71. Demers L.M., Mirkin C.A., Mucic R.C., Reynolds R.A., Letsinger R.L., Elghanian R., Viswanadham G., (2000), A florescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Anal Chem.*, 72: 5535-5541.
72. Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M.S., Pfeifer, G.P. (1996). Preferential formation of Benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53, *Science*, 274: 430-432.
73. Dequaire M., Degrand C., Limoges B., (1999). An immunomagnetic electrochemical sensor based an a perfluorosulfonate-coated screen-printed electrode for the determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid *Anal. Chem.* 71: 2571-2577.
74. Dervan, P. B., (1986). Design of Sequence-specific DNA-binding molecules, *Science*, 232: 464-471.
75. Dervan, P. B., (1986). Sequence specific recognition of double helical DNA. A synthetic approach”, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2, Ed. Eckstein, F. and Lilley, D. M. J., Springer-Verlag, Berlin, 49-64.
76. Diamandis E.P, Christopoulos T.K., (1991). The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology, *Clin. Chem.*, 37/5: 625-636.
77. Dienstag JL, Schiff ER, Wright TL, Perrillo RP, Hann HW, Goodman Z, Crowther L, Condreay LD, Woessner M, Rubin M, Brown NA. (1999). Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 341:1256-1263.
78. DNA structure and Function; Chapter 1- Introduction to the Structure, properties, and reactions of DNA; Editör, R. R. Sinden, Academic Press, California, 1994, p.1-57.

79. Drummond T.G., Hill M.G., Barton J.K., (2003). Electrochemical DNA sensors *Nature Biotechnology*, 21: 1192-1199.
80. Dusheiko, G. (1991). In Oxford Textbook of Clinical Hepatology McIntyre N. Eds. Oxford University Press New York, pp 571.
81. Eberhard Passarge, Jürgen Wirth, Color atlas of Genetics, 2000.
82. Ebersole R., Miller J., Moran J., Ward M., (1990). Spontaneously Formed Functionally Active Avidin Monolayers on Metal Surfaces: A Strategy for Immobilizing Biological Reagents and Design of Piezoelectric Biosensors, *J. Am. Chem. Soc.*, 112: 3239-3241.
83. Eckhard E., Espenhanh M., Napier N., Popovich N.D., Thorp H.H., Witver R., in DNA Arrays: Technologies and Experimental Strategies (Editör: Grigonenko E.V.), CRC Pres, Boca Raton, 2001, 39-60.
84. Elghanian R, Storhoff JJ, Mucic RC, Letsinger RL, Mirkin CA., (1997). Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. *Science*, 277:1078– 81.
85. Encyclopedia of Biological Chemistry, Volume Three, PCR (Polymerase Chain Reaction), 2002
86. Enstrümental Analiz, Prof. Dr. Atilla Yıldız ve Prof. Dr. Ömer Genç, Hacettepe Yayınları A-64, 1993, sayfa;289-384.
87. 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, *Electrochem. Commun.* 7: 815–820.
88. Erdem A., Isabel Pividori M., Del Valle M., Alegret S. (2004). Rigid carbon composites: a new transducing material for label-free electrochemical genosensing, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 567: 29-37.
89. 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.
90. Erdem A., Ozsoz M., (2002). Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interactions, A. Review, *Electroanalysis* 14: 965–974.
91. Erdem, A., Kerman, K., Meric, 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.

92. Erdem, A., Kerman, K., Meric, B., Akarca, U.S., Ozsoz, M., (2000). Novel hybridisation indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. *Anal. Chim. Acta* 422: 139–149.
93. 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: 1372-1376.
94. Erts D., Polyakov B., Olin H., Tuite E., (2003). Spatial and mechanical properties of dilute DNA monolayers on gold imaged by AFM, *Journal of Physical Chemistry B*, 107: 3591-3597
95. Evans A., Potentiometry and Ion-selective Electrodes, New York: wiley, 1987
96. Evans; A.(1991). Potentiometry and ISE , ACOL, London, s.106-198.
97. Fähnrich, K.A., Pravda, M., Guilbault, G., (2003). Disposable amperometric immunosensor for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using screen-printed electrodes, *Biosens. Bioelectron.* 18 (1), 73–82.
98. Fan CH., Plaxco K.W., Heeger A.J., (2003). Electrochemical interrogation of conformational changes as reagentless method for the sequence-specific detection of DNA, *PNAS*, 100(16): 9134-9137.
99. Fang XH, Li J, Perlette J, Wang K, Tan W., (2000). Molecular beacons: novel fluorescent probes, *Anal Chem.*, 72:747A-753A.
100. Fattovich G., Brollo L., Aliberti A., Pontisso P., Giustina G., Realdi G. (1988). Long term follow-up of anti-HBe positive chronic active hepatitis B. *Hepatology*, 8: 1651-1654
101. Fleischer, M.B., Mei, H.-Y. and Barton, J.K. (1998). Metal complexes which target DNA sites: coupling recognition to reactivity, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2: Ed. Eckstein,F. and Lilley, D.M.J., Springer-Verlag, Berlin, s.65-84.
102. Fojta M., Vetterl V., (1997). Tomschik M, Jelen F., Nielsen P., Wang J., Palecek E., Adsorption of peptide nucleic acid and DNA decamers at electrically charged surfaces, *Biophys. J.*, 72: 2285-2293.
103. 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, *Electroanalysis*, 8(5): 420-426.

104. Fritz J., Cooper E. B., Gaudet S., Sorger P. K., Manalis S. R. (2002). Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge, *PNAS*, 99(22): 14142–14146.
105. Gangopadhyay, R., and De, A., (2000). Conducting polymer nanocomposites: A brief overview *Chem. Mater.*, 12 (3): 608.
106. Garcia-Canas V., Cifuentes A., Gonzales R., (2004). Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 425-436.
107. Gates B.D., Xu Q., Stewart M., Ryan D., Willson C.G., Whitesides G.M., (2004). New Approaches to Nanofabrication, *Chem. Rev.* 105: 1171-1196.
108. Gehring A.G., Brewster J.D., Irwin P.L., Tu S.I., Van Houten L.J., (1999). 1-Naphthyl phosphate as an enzymatic substrate for enzyme-linked immunomagnetic electrochemistry, *J. Electroanal. Chem.* 469: 27.
109. GeneOhm web site: <http://geneohm.com/> 4 Temmuz 2006
110. Georgiadis R., Peterlinz K.P., Peterson A.W., (2000). Quantitative measurements and modeling of kinetics in nucleic acid monolayer films using SPR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 7837-7838.
111. Goldman ER, Balighain ED, Mattoussi H, Kuno MK, Mauro JM, Taton TA, Lu G, Mirkin CA., (2001). Two color labeling of oligonucleotides arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *J Am Chem Soc.*, 123:5164-5165.
112. Gooding J.J., (2002). Electrochemical DNA hybridization biosensor. *Electroanalysis*, 14, 1149-1156.
113. Gooding J.J., (2005). Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing, *Electrochimica Acta* 50: 3049–3060.
114. Gooding J.J., Chou A., Mearns F.J., Wong E., Jericho K.L., (2003). The ion gating effect: using a cchange flexibility to allow label free electrochemical detection of DNA hybridization, *Chem. Commun.*, 1938-1939.
115. Gooding, J.J., Pugliano, L., Hibbert, D.B., Erokhin, P. (2000). Amperometric biosensor with enzyme amplification fabricated using self-assembled monolayers of alkanethiols: the influence of spatial distribution of enzymes, *Electrochemistry Communications*, 2: 217-221.

116. Gore, M. R.; Szalai, V. A.; Ropp, P. A.; Yang, I. V.; Silverman, J. S.; Thorp, H. H., (2003). Detection of Attomole Quantities of DNA Targets on Gold Microelectrodes by Electrocatalytic Nucleobase Oxidation, *Anal. Chem.*, 75: 6586-6592.
117. Gorton, L., Csöregi, E., Domínguez, E., Emnéus, J., Jonsson-Pettersson, G., Marko-Varga, G., and Persson, B., (1991). Selective detection in flow analysis based on the combination of immobilized enzymes and chemically modified electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 250: 203–248.
118. Gucci L., Peto G., Beck A., Pászti, Z., (2004). Electronic structure and catalytic properties of transition metal nanoparticles: the effect of size reduction. *Topics in Catalysis*. 29: 129.
119. Haber F., Klemensiewicz Z.,(1909). Glass electrode. *Phys. Chem.*, 67:385-431.
120. Hafeman D.G.; Parce J.W.; McConnel H.M., (1988). Light-addressable potentiometric sensor for biochemical systems, *Science*, 240: 1182.
121. Hagerman P.J., (1988). Flexibility of DNA. *Annual Reviews in Biophysics and Biophysical Chemistry*, 17: 265-286.
122. Hall, E.A.H.(1990). Biosensors, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere; s.3-30.
123. Hames, B.D., Higgins, S.J., 1985. Nucleic Acid Hybridisation—A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, p. 78.
124. Han M., Gao X., Su J., Nie S., (2001). Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat. Biotechnol.*, 19, 631-635.
125. Han, J.H.; Hwang, S.G.; Chung, K.W.; Oh, S.W.; Hong, S.P.; Park, P.W.; Rim, K.S.; Oh, D.; Kim, N. K., (2002). YMDD motif mutants in hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy. *Korean. J. Genet.*, 24: 219-226.
126. HapMap Project (www.hapmap.org) 4 Temmuz 2006
127. Hashimoto K, Ishimori Y., (2001). Preliminary evaluation of electrochemical PNA array for detection of single base mismatch mutations. *Lab on a Chip* 1:61-63.
128. Hashimoto K, Ito K, Ishimori Y. (1998). Microfabricated disposable DNA sensor for detection of hepatitis B virus DNA. *Sens Actuators B Chem.*, 46: 220-225.
129. Hashimoto K, Ito K, Ishimori Y., (1994). Novel DNA sensor for electrochemical gene detection. *Anal Chim Acta*, 286: 219-224.

130. Hashimoto K, Ito K, Ishimori Y., (1994). Sequence-specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye. *Anal Chem* 66: 3830-3833.
131. Hason S., Dvorak J., Jelen F., Vetterl V., (2002). Interaction of DNA with echinomycin at the mercury electrode surface as detected by impedance and chronopotentiometric measurements. *Talanta*, 56, 905-913.
132. He L, Musick MD, Nicewarner SR, et al., (2000). Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization. *J Am Chem Soc.*, 122: 9071 – 9077.
133. Herne T.M., Tarlov M.J., (1997). Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 8916-8920.
134. Heyduk E., Heyduk T., (2005). Nucleic acid-based fluorescence sensors for detecting proteins, *Anal. Chem.*, 77: 1147- 1156.
135. Hianik, T., Gajdos, V., Krivanek, R., Oretskaya, T., Metelev, V., Volkov, E., Vadgama, P., (2001). Amperometric detection of DNA hybridisation on a gold surface depends on the orientation of oligonucleotide chains. *Bioelectrochemistry* 53, 199–204.
136. Hibbert, D.B., Gooding, J.J., Erokhin, P.(2002). Kinetics of irreversible adsorption with diffusion: application to biomolecule immobilization, *Langmuir*, 18: 1770-1776
137. Hicks, J. F., F.P. Zamborini; R.W. Murray., (2002). Dynamics of Electron Transfers Between Electrodes and Monolayers of Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 106 (32): 7751-7757.
138. Hiramatsu, H.; Osterloh, F. E., (2004). A Simple Large-Scale Synthesis of Nearly Monodisperse Gold and Silver Nanoparticles with Adjustable Sizes and with Exchangeable Surfactants, *Chem. Mater.; (Communication)*, 16(13): 2509-2511.
139. Hirsch R., Katz E., Willner I., (2000). Magneto-switchable bioelectrocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.*,122, 12053-12054.
140. Hitchman M.L., Measurement of dissolved oxygen, Chapters 3-5. New York Wiley, 1978.
141. Hodgson, J. ,(1998). Shrinking DNA diagnostics to fill the markets of the future, *Nature Biotech.*, 16: 725-727.

142. Hong, S.P.; Kim, N.K.; Hwang, S.G.; Chung, H.J.; Kim, S.; Han, J. H.; Kim, H. T.; Rim, K.S.; Kang, M.S.; Yoo, W.; Kim, S. O., (2004). Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J. Hepatol.*, 40: 837-844.
143. <http://csrg.ch.pw.edu.pl/tutorials/isfet/> 4 Temmuz 2006
144. http://distancelearning.ksi.edu/demo/bio378/DNA_files/image023.jpg 4 Tem. 2006
145. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Antikor> 4 Temmuz 2006
146. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Elektroliz> 4 Temmuz 2006
147. http://tr.wikipedia.org/wiki/Klonlama#Rekombinant_DNA_teknolojisi 4 Tem. 2006
148. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Transistör> 4 Temmuz 2006
149. <http://www.afyuksel.com/> 4 Temmuz 2006
150. <http://www.aof.edu.tr/kitap/EHSM/1213/unite11.pdf> 4 Temmuz 2006
151. <http://www.aof.edu.tr/kitap/EHSM/1213/unite16.pdf> 4 Temmuz 2006
152. <http://www.biltek.tubitak.gov.tr/haberler/teknoloji/S-445-14.pdf> 4 Temmuz 2006
153. <http://www.gazete.itu.edu.tr/mart/4genetik.pdf> 4 Temmuz 2006
154. <http://www.n-kokuen.com/j/whatis/> 4 Temmuz 2006
155. Huang E., Satjapipat M., Han S.B., Zhou F.M., (2001). Surface Structure and Coverage of an Oligonucleotide Probe Tethered onto a Gold Substrate and Its Hybridization Efficiency for a Polynucleotide Target. *Langmuir*, 17: 1215-1224.
156. Huang E., Zhou F., Deng L., (2000). Studies of surface coverage and orientation of DNA molecules Immobilized onto performed alkanethiol self-assembled monolayers, *Langmuir*, 16: 3272-3280.
157. Huang T.J., Liu M., Knight L.D., Grody W.W., Miller J.F., Ho C-M., (2002). An electrochemical detection scheme for identification of single nucleotide polymorphisms using hairpin-forming probes, *Nucleic Acids Research*, 30(12), 1-6.
158. Iijima S., (1991). Discovery of multi-wall carbon nanotubes. "Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*, 354, 56-58.
159. Iijima S.,T. Ichihashi, (1993). Single shell carbon nanotubes of one nanometer diameter, *Nature*, 363: 603-605.

160. Immoos C. E., Lee S.J., Grinstaff M.W., (2004). Conformationally gated electrochemical gene detection, *ChemBioChem*, 5: 1100-1103.
161. Ingelman-Sundberg M., (2001). Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient pharmacotherapy. *J Intern Med*, 250: 186-200
162. Iqbal S.S., Mayo M.W., Bruno J.G., Bron B.V., Batt C.A., Chambers J.P., (2000). A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents, *Biosensors & Bioelectronics* 15 :549–578
163. Ito K., Hashimoto K., Ishimori Y., (1996). Quantitative analysis for solid-phase hybridization reaction and binding reaction of DNA binder to hybrids using a quartz crystal microbalance, *Anal.Chim.Acta*, 327: 29-35.
164. Jelen F., Erdem A., Palecek E., (2002). Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode. *Bioelectrochemistry*, 55: 165-167.
165. Jelen F., Yosypchuk B., Kourilova A., Novotny L., Palecek E., (2002). Label-free determination of picogram quantities of DNA by stripping voltammetry with solid copper amalgam or mercury electrodes in the presence of copper. *Anal.Chem.*, 74: 4788-4793.
166. Jelen, F., Fojta, M., Palecek, E. (1997). Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNAs, *J. Electroanal. Chem.*, 427: 49-56.
167. 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.
168. Johnston, D.H., Thorp, H.H.(1996). Cyclic voltammetry studies of polynucleotide binding and oxidation by metal complexes: Homogeneous electron-transfer kinetics, *J. Physc. Chem.*, 100: 13837-13843.
169. 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.; Vol. 33: Marcel Dekker, Inc, NY; 299-324.
170. Ju H.-X., Zhao H., (2005). Electrochemical biosensors for DNA analysis. *Frontiers in Bioscience*, 10, 37-46.
171. Ju, H. X.; Ye, Y. K.; Zhao, J. H.; Zhu, Y.L., (2003). Hybridization biosensor using di(2,2'-bipyridine)osmium (III) as electrochemical indicator for detection of polymerase chain reaction product of Hepatitis B virus DNA, *Anal. Biochem.*, 313: 255.

172. Ju, H., Zhou, J., Cai, C., Chen, H. (1995). The electrochemical behavior of methylene blue at a microcylinder carbon fiber electrode, *Electroanal.*, 7: 1165-1170.
173. Kai E., Sawata S., Ikebukuro K., Iida T., Honda T., Karube I., (1999). Detection of PCR products in solution using surface plasmon resonance, *Anal. Chem.*, 71, 796-800.
174. Kalogianni DP, Koraki T, Christopoulos TK, Ioannou PC, (2006). Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms., *Biosens Bioelectron.*, 21(7):1069-1076.
175. Katz E., Willner I., (2004). Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties and applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 6042-6108.
176. Kelley S.O., Barton J.K., (1997). Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode, *Bioconjugate Chem.*, 8, 31-37.
177. Kelley, S. O., Boon, E.M., Barton, J.K., Jackson, N.M., Hill, M.G. (1999). Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA, *Nucl. Acids Res.*, 27: 4830-4837.
178. Kerman K., Meric B., Ozkan D., Kara P., Erdem A., Ozsoz M., (2001). Electrochemical DNA biosensor for the determination of benzo[a]pyrene-DNA adducts, *Analytica Chimica Acta* 450: 45-52.
179. Kerman K., Ozkan D., Kara P., Meric B., Gooding 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.
180. Kertesz, V., Whittemore, N.A., Chambers, J.Q., McKinney, M.S., Baker, D.C., (2000). Surface tritiation of DNA-modified gold electrodes with a thiol-tethered anthraquinone. *J. Electroanal. Chem.* 493, 28-36.
181. Khairutdinov, R. F., (1997). Physical chemistry of nanocrystalline semiconductors *Colloid J.* 59 (5), 535-548.
182. Kissinger P.T., (2005). Biosensors -a perspective. *Biosensors & Bioelectronics*, 20: 2512-2516.
183. Klein M., (1990). Characterization of ion-sensitive layer systems with a C(V) measurement method operating at constant capacitance, *Sens. Actuators B*, 1: 354

184. Klibanov, A. M. Enzyme stabilization by immobilization. *Anal. Biochem.* (1979), 93: 1–25
185. Kobayashi, M.; Mizukami, T.; Morita, Y.; Murakami, Y.; Yokoyama, K.; Tamiya, E., (2001). Electrochemical gene detection using microelectrode array on a DNA chip, *Electrochem.* 69: 1013-1016.
186. Kobayashi, S.; Shimada, K.; Suzuki, H.; Tanikawa, K.; Sata, M., (2000). Development of a new method for detecting a mutation in the gene encoding hepatitis B virus reverse transcriptase active site (YMDD motif). *Hepatol. Res.*, 17: 31-42.
187. Kopylov, A.M. and Spiridonova, V.A., (2000). Combinatorial chemistry of nucleic acids: SELEX, *Molecular Biology*, 34 (6): 1097-1113.
188. Korbout O., Buckova M., Labuda J., Grundler P., (2003). Voltammetric Detection of Antioxidative Properties of Flavonoids Using Electrically Heated DNA Modified Carbon Paste Electrode. *Sensors*, 3: 1-10.
189. Koryta J., Ions, Electrodes and Membranes, 2nd ed. New York: Wiley, 1991.
190. Kröger, S., Setford, S. J., and Turner, A.P.F., (1998). Assessment of glucose oxidase behaviour in alcoholic solutions using disposable electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 368: 219–231.
191. Kuhr W.G., (2000). Electrochemical DNA analysis comes of age, *Nature Biotech.*, 18:1042-1043.
192. Kumar A., Mandal S., Selvakannan P.R., Pasricha R., Mandale A.B., Sastry M., (2003). Investigation into the interaction between surface-bound alkylamines and gold nanoparticles. *Langmuir*, 19: 6277-6282.
193. Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, P. T. Kissinger and W. R. Heineman, Eds., pp.171-186. New York: Marcel Dekker, 1984.
194. Labuda J., Bubnicova K., Kovalova L., Vanickova M., Mattusch J., Wennrich R., (2005). Voltammetric Detection of Damage to DNA by Arsenic Compounds at a DNA Biosensor. *Sensors*, 5: 411-423.
195. Labuda J., Buckova M., Heilerova L., Silhar S., Stepanek I., (2003). Evaluation of redox properties and anti-/prooxidant effects of selected flavonoids by DNA-based electrochemical biosensor. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376: 168-173.
196. Labuda J., Buckova M., Vanickova M., Mattusch J., Wennrich R., (1999). Voltammetric detection of DNA-Interaction with copper complex compounds and damage to DNA. *Electroanalysis*, 11: 101-107.

197. Lai, C.L., Chien, R.N., Leung, N.W., Chang, T.T., Guan, R., Tai, D.I., Ng, K.Y., Wu, P.C., Dent, J.C., Barber, J., Stephenson, S.L., Gray, D.F.A. (1998). One-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N. Engl. J. Med.* 339(2): 61-68.
198. Lai R.Y., Lagally E.T., Lee S-H., Soh H. T., Plaxco K.W., Alan J. Heeger A.J., (2006). Rapid, sequence-specific detection of unpurified PCR amplicons via a reusable, electrochemical sensor, *PNAS*, 103:4017-4021.
199. Lee T.M.H, Hong Cai, I-Ming Hsing, (2004). Gold Nanoparticle-Catalyzed Silver Electrodeposition on an Indium Tin Oxide Electrode and Its Application in DNA hybridization Transduction, *Electroanalysis*, 16(19): 1628-1631.
200. Lee W.M., (1997). Hepatitis B Virus Infection, *N. Engl. J. Med.*, 337: 1733-1745.
201. Lee,T.M.H., Carles M.C., Hsing I.M., (2003). Microfabricated PCR-electrochemical device for simultaneous DNA amplification and detection, *Lab Chip(The Royal Society of Chemistry)*, 3, 100–105.
202. Levicky, R., Herne, T.M., Tarlov, M.J., Satija, S.K., (1998). Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: a neutron reflectivity study. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 9787–9792.
203. Li HX, Rothberg L., (2004). Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 101: 14036- 9.
204. Li J., H.T. Ng, A. Cassell, W. Fan, H. Chen, Q. Ye, J. Koehne, J. Han, M. Meyyappan, (2003). Carbon Nanotube Nanoelectrode Array for Ultrasensitive DNA Detection, *Nano Lett.*, 3(5): 597-602.
205. Li JJ, Geyer R, Tan W., (2003). Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, 28:e52.
206. Li, L.L., Cai H., Lee, T.M.H., Barford J., Hsing I.M., (2004). Electrochemical Detection of PCR Amplicons Using Electroconductive Polymer Modified Electrode and Multiple Nanoparticle Labels, *Electroanalysis*, 16, No. 1-2, 81-87.
207. Lin Y., Lu F., Wang J., (2004). Disposable Carbon Nanotube Modified Screen-Printed Biosensor for Amperometric Detection of Organophosphorus Pesticides and Nerve Agents, *Electroanalysis*, 16(1-2): 145-149.

208. Long, Y.T.; Li, C. Z., Sutherland, T.C., Kraatz, H.B., Lee, J. S., (2004). Electrochemical detection of single-nucleotide mismatches: application of M-DNA., *Anal. Chem.* 76: 4059-4065.
209. Lowe C.R., (1999). Chemoselective biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3: 106-111.
210. Lu F. , Lee H.P., Lim S.P., (2004). Quartz crystal microbalance with rigid mass partially attached on electrode surfaces. *Sensors and Actuators A: Physical*, 112: 203-210.
211. Lucarelli F., Kicela A., Palchetti I., Marrazza G., Mascini M., (2002). Electrochemical DNA biosensor for analysis of wastewater samples, *Bioelectrochemistry*, 58: 113-118.
212. Lucarelli F., Marrazza G., Turner A.P.F., Mascini M., (2004). Carbon and gold electrochemical transducers for DNA hybridization sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 515-530.
213. Lucarelli F., Palchetti I., Marrazza 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.
214. Lucarelli, F., Marrazza, G., Palchetti, I., Cesaretti, S., Mascini, 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.
215. Lukasova, E., Jelen, F. and Palecek, E., (1982). Electrochemistry of Osmium-Nucleic acid complexes: A probe for single-stranded and distorted double-stranded regions in DNA, *Gen. Physiol., Biophys.*, 1: 53-70.
216. Maddrey W.C., (2001). Hepatitis B-an important public health issue. *Clin. Lab.*, 47: 51-55.
217. Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E. (1998). Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C, *Biophysical Chemistry*, 75: 87-95.
218. Mariotti, E., Minunni, M., Mascini, M., (2002), Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection, *Anal. Chim. Acta*, 453(2): 165-172.

219. Marrazza G, Chiti G, Mascini M, Anichini M., (2000). Detection of human apolipoprotein E genotypes by DNA electrochemical biosensor coupled with PCR, *Clinical Chemistry*, 46(1): 31-37.
220. Marrazza G., Chianella I., Mascini M., (1999). Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring, *Anal. Chim. Acta*, 387: 297-307.
221. Marrazza, G., Chianella, I., Mascini, M., (1999). Disposable DNA electrochemical DNA sensor for hybridisation detection. *Biosens. Bioelectron.* 14, 43–51.
222. Masarik M., Kizek R., Kramer K.J., Billova S., Brazdova M., Vacek J., Bailey M., Jelen F., Howard J.A., (2003). Application of avidin-biotin technology and adsorptive transfer stripping square-wave voltammetry for detection of DNA hybridization and avidin in transgenic avidin maize. *Anal.Chem.*, 75: 2663-2669.
223. Mascini M., Palchetti I., Marrazza G., (2001). DNA electrochemical biosensors, *Fresenius' J. Anal.Chem.*, 369: 15-22.
224. Mast, E.E.; Alter, M.J.; Margolis, H.S., (1999). Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global Perspective, *Vaccine* 17(13-14): 1730-1733
225. McCreery, R. L., Carbon Electrodes; Structural effects on electron transfer kinetics, In *Electroanalytical Chemistry*, vol. 18, ed. Bard, A.J. (Marcel Dekker, New York, 1991).
226. 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.
227. Mearns, F.J., Doktora tezi, A Study of hybridisation of DNA immobilised on gold: strategies for DNA biosensing, January, 2006.
228. Meric B., Kerman K., Ozkan D., Kara P., Erensoy S., Akarca U.S., Mascini M., Ozsoz M., (2002). Electrochemical DNA biosensor for the detection TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using Methylene Blue, *Talanta*, 56, 837-846.
229. Merle, P.; Trepo, C. (2001). Therapeutic management of hepatitis B-related cirrhosis, *J. Viral. Hepat.*, 8, 391-399.

230. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, et al. (2005). Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 307: 538- 44.
231. Mikkelsen, S.R., (1996). Electrochemical biosensors for DNA sequence detection- a review , *Electroanalysis*, 8 (1): 15-19.
232. 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).
233. Millan, K.L., Saraullo, A., Mikkelsen, S.R., (1994). Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode. *Anal. Chem.* 66, 2943–2948.
234. Millan, K.M., Mikkelsen, S.R.(1993). Sequence-selective biosensor for DNA Based on electroactive hybridization indicators, *Anal. Chem.*, 65: 2317-2323.
235. Millan, K.M., Spurmanis, A. J., Mikkelsen, S.R.(1992). Covalent immobilization of DNA onto glassy carbon electrodes, *Electroanalysis*, 4: 929-932.
236. Mionetto N., Marty L., Karube I. (1994), Acetylcholine esterase in organic solvents for the detection of pesticides: Biosensor applications, *Biosensors&Bioelectronics*, 9:463-470
237. Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC, Storhoff JJ. (1996). A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature*, 382: 607– 9.
238. Modern Drug Discovery (1999) Milestones of antisense oligonucleotide therapeutics, Editör, J.F. Ryan, Washington DC, 1-2: sayfa 68.
239. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Ed. Güler Temizkan, Nazlı Arda. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 1999, S:69-106.
240. Molinier-Jumel, C., Malfroy, B., Reynaud, J. A. and Aubel-Sadron, G. (1978). Electrochemical study of DNA-Anthracyclines interactions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 84(2): 441-449.
241. Müller, W., Crothers, D.M. (1975). Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids, *Eur. J. Biochem.*, 54: 267-277.
242. Nakayama, M., Ihara, T., Nakano, K., Maeda, M., (2002). DNA sensors using a ferrocene-oligonucleotide conjugate. *Talanta* 56, 857–866.
243. Nanogen web site” <http://www.nanogen.com/> 4 Temmuz 2006

244. Nelson B.P, Grimsrud T.E., Mark R. Liles, Robert M. Goodman, Robert M. Corn, (2001). Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays, *Anal. Chem.*, 73,1-7.
245. Neufeld, T.; Mittelman, A. S.; Buchner, V.; Rishpon, J., (2005). Electrochemical Phagemid Assay for the Specific Detection of Bacteria Using Escherichia coli TG-1 and the M13KO7 Phagemid in a Model System. *Analytical Chemistry*, 77,652-657.
246. Newman J.D., Turner A.P.F., (2005). Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors & Bioelectronics*, 20, 2435-2453.
247. Nielsen P.E., (2000). Antisense peptide nucleic acids, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2: 282-287.
248. Nielsen P.E., (2001). Peptide nucleic acid : a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology, *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 16-20.
249. Nielsen, P. E. (1999). Peptide nucleic acids as therapeutic agents, *Current Opinion in Structural Biology*, 9(3): 353-357.
250. Nielsen, P.E. (1999). Applications of peptide nucleic acids, *Current Opinion in Biotechnology*, 10(1): 71-75.
251. Niemeyer CM. (2001). Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angew Chem Int Ed*, 40:4128–4158.
252. Niesters H.G.M., De Man R.A., et al., (2002). Identification of a new variant in the YMDD motif of the Hepatitis B virus polymerase gene selected during Lamivudine therapy. *J. Med. Microbiol.*, 51:695.
253. Novoa, S.R.; Tato, A.G.; Guirao, A.A.; Castroagudin, J.; Quintela, A.G.; Riestra, C.G.; Regueiro, B.J., (2004). Hepatitis B virus genotyping based on cluster analysis of the region involved in Lamivudine resistance. *J. Virol. Methods*. 115, 9-17.
254. Nuzzo, R.G., Allara, D.L., (1983). Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 105: 4481–4483.
255. O’Sullivan, C.K., (2002). Aptasensors-the future of biosensing, *Anal Bioanal Chem*, 372: 44-48.
256. Olson C, Adams R. N., (1960). *Anal. Chim. Acta*, 22: 582-589.

257. Ono, Y.; Onda, H.; Sasada, R.; Igarashi, K.; Sugino, Y.; Nishioka, K., (1983). The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw. *Nucleic Acids Res.* 11(6): 1747–1757.
258. Osteryoung J., (1993). Voltammetry for the future. *Acc. Chem. Res.*, 26, 77-83.; Eccles, G.N., (1991). *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 22, 45.
259. Osteryoung, J., Pulse Voltammetry, *Journal of Chemical Education* (1983), 60, 296-298.
260. Ozkan D., Erdem A., Kara P., Kerman K., Meric B., Hassmann J., Ozsoz M.,(2002). Allele-Specific Genotype Detection of Factor V Leiden Mutation from Polymerase Chain Reaction Amplicons Based on Label-Free Electrochemical Genosensor, *Anal. Chem.*,74: 5931-5936.
261. Ozkan D., Karadeniz H., Erdem A., Mascini M., Ozsoz M., (2004). Electrochemical genosensor for Mitomycin C- DNA interaction based on guanine signal, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35(4): 905-912.
262. 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: 796-802.
263. Ozsoz M, Erdem A, Kerman K, Ozkan D, Tugrul B, Topcuoglu N, Ekren H., Taylan M., (2003). Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes. *Anal Chem*, 75:2181-2187.
264. Palchetti I., Cagnini A., Carlo M.D., Coppi C., Mascini M., Turner A.P.F., (1997). Determination of anticholinesterase pesticides in real samples using a disposable biosensor. *Anal.Chim.Acta*, 337: 315-321.
265. Palecek E., (1986). *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 15: 275-295.
266. Palecek E., (2002). Past, presence and future of nucleic acids electrochemistry. *Talanta*, 56: 809-821.
267. Palecek E., Fojta M., Jelen F., Vetterl V., in *The Encyclopedia of electrochemistry*, vol 9, *Bioelectrochemistry* (Editörler Bard A.J., Stratsmann M.), Wiley-VCH, Weinheim, 2002, 365-429
268. Palecek E., Fojta, M., Tomschik M., Wang J., (1998). Electrochemical biosensors for DNA damage, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 621-628.

269. Palecek E., Kizek R., Havran L., Billova S., Fojta M., (2002). Electrochemical Enzyme –linked immunoassay in a DNA hybridization sensor, *Anal.Chim.Acta*, 469, 73-83.
270. Palecek, E. (1996). From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid Modified Electrodes, *Electroanalysis*, 8 (1): 7-14.
271. Palecek, E.(1988). New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 20: 179-194.
272. Palecek, E., (1960). Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid, *Nature*, 188: 656-657.
273. Palecek, E., Fojta, M., (2001). Detecting DNA hybridisation and damage. *Anal. Chem.* 73, 75A–83A.
274. Palecek, E., Fojta, M., Jelen, F., (2002). New approaches in the development of DNA sensors: hybridisation and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces. *Bioelectrochemistry* 56, 85–90.
275. Palecek, E., Nucleic acids: electrochemical and immunochemical methods, *Encyclopedia of Analytical Science* (Ed. Alan Townshend), London, Academic Press, 1995; 6: 3600-3609.
276. Palecek, E.; Fojta, M. (1994). Differential pulse voltammetric determination of RNA at the picomole level in the presence of DNA and nucleic acid component. *Anal. Chem.* 66, 1566-1571.
277. Pandey, P.C., Weetall, H.H. (1994). Application of photochemical reaction in electrochemical detection of DNA intercalation, *Anal. Chem.*, 66: 1236-1241.
278. Pandey, P.C., Weetall, H.H. (1995). Detection of aromatic compounds based on DNA intercalation using an evanescent wave sensor, *Anal. Chem.*, 67: 787-792.
279. Pang, D. and Abruna, H.D.(1998). Micromethod for the investigation of the interaction between DNA and redox-active molecules, *Anal. Chem.*, 70: 3162-3169.
280. Parak WJ, Gerion D, Pellegrino T, et al., (2003). Biological applications of colloidal nanocrystals. *Nanotechnology*, 14:R15– 27.
281. Park S., Taton T.A., Mirkin C.A, (2002). Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes *Science*, 29:1503-1506.
282. Patolsky, F., Gill R., Weizmann Y., Mokari T., Banin U., Willner I., (2003). Lighting-Up the Dynamics of Telomerization and DNA Replication by CdSe-ZnS Quantum Dots *J. Am. Chem. Soc.* 125 (46): 13918.

283. Patolsky, F., Katz, E., Bardea, A., and Willner, I. 1999. Enzyme-linked amplified electrochemical sensing of oligonucleotide-DNA interactions by means of the precipitation of an insoluble product and using impedance spectroscopy. *Langmuir*, 15: 3703–3706.
284. Paunescu T., Rajh T., Wiederrecht G., Master J., Vogt S., Stojicevic N., Protic M., Lai B., Oryhon J., Thurnauer M., Woloschak G., (2003). Biology of TiO₂-Oligonucleotide Nanocomposites. *Nature Materials*, 2 : 343.
285. Penn SG, He L, Natan M., (2003). Nanoparticles for bioanalysis. *Curr Opin Chem Biol*, 7:609– 15.
286. Perez, P., Teijeiro, C., Marin, D.(1999). Interactions of surface-confined DNA with electroreduced mitomycin C comparison with acid-activated mitomycin C , *Chemico-Biological Interactions*, 117: 65-81.
287. Perlette J, Li J, Fang X, Schuster S, Lou J, Tan W., (2002). Novel DNA probes for detection and quantification of protein molecules. *Rev Anal Chem*, 21:1-14.
288. Peterson A.W, Wolf L.K., and Georgiadis R.M., (2002). Hybridization of Mismatched or Partially Matched DNA at Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 124, 14601-14607.
289. Peterson A.W., Heaton R.J., and Georgiadis R., (2000). Kinetic Control of Hybridization in Surface Immobilized DNA Monolayer Films. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 7837-7838.
290. Peterson A.W., Heaton R.J., Georgiadis R.M., (2001). The effect of surface probe density on DNA hybridization, *Nucleic Acid Research*, 29(24), 5163-5168.
291. Pietrzyk, D.J.; Frank, C.W.(1979). *Analytical Chemistry*, 2.Bask₁, Academic press: s.226- 239.
292. Pietsch, K., Waiblinger, U., Brodmann, P., Wurlz, A., 1997. Screeningverfahren zur identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher lebensmittel. *Deutsche Lebensmittel RundschauHelf* 2: 35-38
293. Piuanno P.A.E, Krull U.J., (2005). Trends in the development of nucleic acid biosensors for medical diagnostics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381: 1004-1011.
294. Pividori M.I., Alegret S., (2003). Graphite-epoxy platforms for electrochemical genosensing, *Anal. Lett.*, 36(9): 1669-1695.

295. Pividori M.I., Merkoçi A., Alegret S., Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosen. Bioelectron.* 15: 291-303.
296. Pividori, M.I., Merkoçi, A., and Alegret, S. 2001. Classical dot-blot format implemented as an amperometric hybridisation genosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 16: 1133–1142.
297. Popovich N., Thorp H., (2002). New Strategies for electrochemical nucleic acid detection, *Interface*, 11: 30-34.
298. Popüler bilim dergisi, Ekim 2004, sayı 128, sayfa 32-36.
299. Purcell, R.H. (1993). The discovery of the hepatitis. viruses. *Gastroenterology*, 104: 955-963.
300. Regev A., Schiff E.R., (2001). Drug therapy for Hepatitis B. *Adv. Intern. Med.*, 46,107-135.
301. Reyderman, L. ve Stavchansky, S.(1997). Quantitative determination of short single-stranded oligonucleotides from blood plasma using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence, *Anal. Chem.*, 69: 3218-3222.
302. Rice M., Galus Z. ,Adams R. N., (1983). Graphite paste electrodes. Effects of paste composition and *J. Electroanal. Chem.*, 143: 89.
303. Rogers K.R., Mascini M., (1998). Biosensors for Field Analytical Monitoring *Field Analytical Chemistry and Technology*, 2: 317-331.
304. Rosenthal, S. J., (2001). Bar-coding biomolecules with fluorescent. Nanocrystals. *Nat. Biotechnol.* 19 (7), 621-622.
305. Saber R., Mutlu S., Pişkin E., (2002). Glow-discharge treated piezoelectric quartz crystals as immunosensors for HSA detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, Sf 727- 734.
306. Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S., Kakol, J., Stein, L., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J., Mortimore, B., Willey, D., Hunt, S., Cole, C., Coggill, P., Rice, C., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D., Kwok, P., Mardis, E., Yeh, R., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R., McPherson, J., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W., Reich, D., Higgins, J., Daly, M., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M., Linton, L., Lander, E. and Altshuler, D. The International SNP Map Working Group. (2001). A Map of Human Genome Sequence Variation Containing 1.42 Million Single Nucleotide Polymorphisms., *Nature*, 409: 928–933.

307. Sadik O.A., Wanekaya A.K., Andreescu S., (2004). Advances in analytical technologies for environmental protection and public safety. *Journal of environmental monitoring*, 6, 513-522.
308. Sanders AR, Rusu I, Duan J, Vander Molen JE, Hou C, Schwab SG, Wildenauer DB, Martinez M, Gejman PV (2005). Haplotypic association spanning the 22q11.21 genes COMT and ARVCF with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. Apr;10(4):353-65.
309. Sato K, Sawayanagi M, Hosokawa K, Maeda M. (2004). Single-base mutation detection using neutravidin-modified polystyrene nanoparticle aggregation. *Anal Sci* 20:893 -894.
310. Schöning M.J., (2005). Playing around with Field-Effect Sensors on the Basis of EIS Structures, LAPS and ISFETs, *Sensors*, 5, 126-138.
311. Schöning, M.J.; Poghossian, A., (2002). Recent advances in biologically sensitive field-effect transistors (BioFETs), *Analyst*, 127, 1137.
312. Schülein B., Grabl B., Krause J., Schulze C., Kugler C., Müller P., Bertling W.M., Hassmann J., (2002). Solid composite electrodes for DNA enrichment and detection. *Talanta*, 56: 875-885.
313. Seo, J. W., E Couteau, P Umek, K Hernadi, P Marcoux, B Lukic, Cs Mikó, M Milas, R Gaál and L Forró, (2003). Synthesis and manipulation of carbon nanotubes, *New J. Phys.* 5: 1.
314. Sequencing, <http://www.supamac.com/education/> 4 Temmuz 2006
315. Service, R. F., (1998). New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science*, 282: 396-399.
316. Sharma A., Rogers K.R., (1994). Biosensors, *Meas. Sci. Technol.* 5: 461-472.
317. Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S, (2006). HBV drug resistance: Mechanisms, detection and interpretation, *Journal of Hepatology*, 44 (3): 593-606.
318. Shehata M.M., (2005). Genetically modified organisms (GMOs), food and feed: Current status and detection. *Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.3 (2) : 43 – 55.*
319. Sherry, S.T. et al. (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.*29: 308-311.
320. Shipway A. N., E. Katz, I. Willner, (2000). Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical and sensoric applications, *Chem. Phys. Chem.*, 1: 18-52.

321. Simonian A.L, Good T.A., Wang S.S., Wild J.R., (2005), Nanoparticle based optical biosensor for the direct detection of organophosphate chemical warfare agents and pesticides, *Anal. Chim. Acta*, 534: 69-77.
322. Sole S., Merkoci A., Alegret S., (2001). New materials for electrochemical sensing III. Beads. *Trends Anal. Chem.* 20: 102-110.
323. Sotiropoulou S., Chaniotakis N. A., (2003). Carbon nanotube array-based biosensor *Anal. Bioanal. Chem.*, 375: 103-105.
324. Spangler B.D., Wilkinson E.A., Murphy J. T., Tyler B.J. (2001). Comparison of the surface plasmon resonance sensor and a quartz crystal microbalance for detection of *Escherichia coli* heat labile enterotoxin. *Anal. Chim. Acta* 444, 149-161.
325. Steel, A. B., Herne, T.M. , Tarlov, M.J.(1998). Electrochemical Quantitation of DNA immobilized on gold, *Anal. Chem.*, 70: 4670-4677.
326. Stoneking, M. (2001). Single Nucleotide Polymorphisms. From the Evolutionary Past, *Nature*, 15: 821-822
327. Strong, K. L., Anderson, D. P.; Lafdi, K.; Kuhn, J. N, (2003). Purification process for single-wall carbon nanotubes. *Carbon*, 41 (8), 1477-1488
328. Stryer L. *Biochemistry*, 3rd edition., 1988. Watson J.D., et al. *Molecular Biology of the Gene.*, 3rd edition., 1987.
329. Stuyver L., Van Geyt C., De Gent S., Van Reybroeck G., Zoulim F., Leroux-Roels G., Rossau R., (2000). Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 702-707.
330. Stuyver. L.J.; Locarnini, S.A.; Lok, A.; Richman, D.D.; Carman, W.F.; Dienstag, J.L.; Schinazi, R.F., (2001). Nomenclature for antiviral- resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology*, 33, 751-757.
331. Su M, Li SU, Dravid VP. (2003). Microcantilever resonance-based DNA detection with nanoparticle probes. *Appl Phys Lett*, 82: 3562-3564.
332. Su X.L., Li Y., (2004). A self-assembled monolayer- based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 563-574.

333. Szalai V.A., Thorp H.H., (2000). Electrocatalysis of Guanine Electron Transfer: New Insights from Submillimeter Carbon Electrodes, *J. Phys. Chem. B.*, 104: 6851-6859.
334. Takenaka, S., Yamashita, K., Takagi, M., Uto, Y., Kondo, H., (2000). DNA sensing on a DNA probe-modified electrode using ferrocenylnaphthalene diimide as the electrochemical active ligand, *Anal. Chem.* 72, 1334–1341.
335. Tan W., Fang X., Li J., Liu X., (2000). Molecular Beacons : A novel DNA probe for nucleic acid and protein studies, *Chem. Eur. J.*, 6(7), 1107-1111.
336. Tan W., Wang K., Drake T.J., (2004). Molecular Beacons, *Current Opinion in Chemical Biology*, 8: 547-553.
337. Tarlov M.J., Steel A.B., in *Biomolecular Films. Design, Function, and Applications* (Editör: Ruslind J.F.), Marcel Deccer, new York, 2003, 545-608.
338. Teijeiro, C., Perez, P., Marin, D., Palecek, E.(1995). Cyclic voltammetry of mitomycin C and DNA , *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 38: 77-83.
339. Terry L.A., White S.F., T,gwell L.J., (2005). The application of biosensors to fresh produce and the wider food industry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1309-1316.
340. Thiel A.J., Frutos A.G., Jordan C.E., Corn R.M., Smith L.M., (1997). In situ Surface Plasmon Resonance Imaging Detection of DNA Hybridization to Oligonucleotide Arrays on Gold Surfaces, *Anal. Chem.* 69: 4948–4956.
341. Thorp, H. H., (1998). Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation, *TIB TECH*, 16: 117-121.
342. Tipples, G.A.; Ma, M.M.; Fischer, K.P.; Bain, V.G.; Kneteman, N.M.; Tyrell, D.L.J. (1996). Mutation in the HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo, *Hepatology* 24: 714-717
343. Tombelli S., Mascini M., Braccini L., Anichini M., Turner A.P.F., (2000). Coupling of a DNA piezoelectric biosensor and polymerase chain reaction to detect apolipoprotein E polymorphisms, *Biosensor & Bioelectronics*, 15: 363-370.
344. Tomschik, M., Jelen, F., Havran, L., Trnkova, L., Nielsen, P.E., Palecek, E.(1999). Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 476: 71-80.

345. Trindade, T. O'Brien, P. and Pickett, N. L., (2001). Nanocrystalline semi-conductors: synthesis, properties and perspectives. *Chem. Mater.* 13 (11), 3843-3858.
346. Tsourkas A, Behlke MA, Rose SD, Bao G., (2003). Hybridization kinetics and thermodynamics of molecular beacons, *Nucleic Acids Research*, 31 (4): 1319-1330.
347. Turcu F., Schulte A., Hartwich G., and Schuhmann W., (2004). Imaging immobilised ssDNA and detecting DNA hybridisation by means of the repelling mode of scanning electrochemical microscopy (SECM) *Biosensors and Bioelectronics*, 20(5): 925-932.
348. Turcu F., Schulte A., Hartwich G., and Schuhmann W., (2004). Label-Free Electrochemical Recognition of DNA Hybridization by Means of Modulation of the Feedback Current in SECM, *Angewandte Chemie International Edition, Volume 43(26): 3482-3485.*
349. Turcu, E.F., Micropatterning and microelectrochemical characterisation of biological recognition elements, tez çalışması, Bochum, Haziran 2004.
350. Turner, A.P.F.(1987). Biosensors: Fundamentals and Applications, Editörler; Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G.S.; Oxford University Press, Oxford, sayfa v-vii.
351. Tusarova I., Halamek E., Koblíha Zbynek, (1999), Study on reactivation of enzyme inhibitor complexes by oximes using acetylcholine esterase inhibited by organophosphate chemical warfare agents, *Enzyme and Microbial Technology*, 25:400-403.
352. Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR., (1998). Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol.* 16:49-53.
353. Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14: 303- 308.
354. Umek R.M., Lin S.W., Vielmetter J., Terbrueggen R.H., Irvine B., Yu C.Y., Kayyem J.F., Yowanto H., Blackburn G.F., Farkas D.H., Chen Y.P., (2001). Electronic Detection of Nucleic Acids, *J. Mol. Diagn.*, 3(2), 74-84.
355. Vanden Bout, D. A. Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications Edited by Daniel L. Feldheim (North Carolina State University) and Colby A. Foss, Jr. (Georgetown University). Marcel Dekker, Inc.: New York and Basel. *J. Am. Chem. Soc.*; (Book Review); 2002 124(26); 7874-7875.

356. Vo-Dinh T., Cullum B., (2000). Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 366, 540-551.
357. Vorlickova M., Palecek E., (1974). A Study of Changes in DNA Conformation Caused by Ionizing and Ultra-violet Radiation by Means of Pulse Polarography and Circular Dichroism, *Int. J. Radiat. Biol.*, 26: 363-372.
358. Wang et al.(1996). Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors, *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 7667-7670.
359. Wang J, Kawde AN, Sahlin E., (2000). Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA., *Analyst*, 125(1):5-7.
360. Wang J, Polsky R, Xu D., (2001). Silver-enhanced colloidal gold electrochemical stripping detection of DNA hybridization. *Langmuir*, 17: 5739-5741.
361. Wang J, Xu D, Kawde A, Polsky R., (2001). Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization. *Anal Chem*, 73:5576-5581.
362. Wang J, Xu D, Polsky R., (2002). Magnetically-induced solid-state electrochemical detection of DNA hybridization, *J Am Chem Soc*, 124:4208-4209.
363. Wang J., (1998). DNA biosensors based on Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. *Biosensors & Bioelectronics* 13: 757–762
364. Wang J., (2002). Electrochemical Nucleic acid biosensors, *Anal. Chim. Acta*, 469: 63-71.
365. Wang J., (2003). Nanoparticle-based electrochemical DNA detection. *Anal.Chim Acta*, 500: 247-257.
366. Wang J., G.D. Liu, G. Rivas., (2003). Encoded beads for electrochemical identification, *Anal. Chem.* 75: 4667-4671.
367. Wang J., Kawde A.N., Erdem A., Salazar M., (2001). Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 126: 2020-2024.
368. Wang J., Liu G., Merkoci A., (2003). Electrochemical Coding Technology for Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets, *J.Am.Chem.Soc.*, 125: 3214-3215.

369. Wang J., Liu, G.; Jan, M.R., (2004). Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3010-3011.
370. Wang J., Polysky R., Merkoci A., Turner K.L., (2003). "Electroactive Beads" for Ultrasensitive DNA Detection, *Langmuir*, 19: 989-991.
371. Wang J., Profitt J.A., Pugia M.J., Suni I.I., (2006). Au Nanoparticle Conjugation for Impedance and Capacitance Signal Amplification in Biosensors, *Anal. Chem*, 78: 1769-1773.
372. Wang J., Pumera M., Chatrathi M.P., Escarpa A., Musameh M., (2002), Single channel microchip for fast screening and detailed of nitroaromatic explosives or organophosphate nerve agents, *Anal. Chem.*, 74: 1187-1191.
373. Wang J., Rivas G., Cai X., Palecek E., Nielsen P., Shiraishi H., Donthe N., Luo D., Parrado C., Chicharro M., Farias P.A.M., Valera F.S., Grant D.H., Ozsoz M., Flair M.N., (1997). DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Anal.Chim.Acta*, 347: 1-8.
374. Wang J., Xu D., Erdem A., Polsky R., Salazar M.A., (2002). Genomagnetic electrochemical assays of DNA hybridization, *Talanta*, 56(5), 931-938.
375. Wang K, Li J, Fang X, Schuster S, Vicens M, Kelley S, Lou S, Li JJ, Beck T, Hogrefe R, Tan W: Novel fluorescent molecular beacon DNA probes for biomolecular recognition. In *Biomedical Photonics Handbook*. Edited by Vo-Dinh T. Washington: CRC Press; 2003:57.1-57.2.
376. Wang Y, Tang Z., and Kotov N.A., (2005). Bioapplication of nanosemiconductors, *Nanotoday*, May 20-31.
377. Wang, A.H.-J.(1987). Interactions between antitumor drugs and DNA, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.1: 52-69. (Editörleri; Eckstein, F., Lilley, D.M.J., Springer-Verlag Berlin Heidelberg - Germany)
378. Wang, B. Q., and Dong, S. J., (2000). Organic-phase enzyme electrode for phenolic determination based on a functionalized sol-gel composite. *J. Electroanal. Chem.*, 487: 45-50.
379. Wang, J. Towards Genoelectronics: Electrochemical Biosensing of DNA Hybridization. *Chem. Eur. J.* 1999; 5(6): 1681-1685.
380. 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.

381. Wang, J., Cai, X., Tian, B., Shiraishi, H., (1996). Microfabricated thick-film electrochemical sensor for nucleic acid determination, *Analyst* 121, 965–970.
382. Wang, J., Cai, X., Wang, J., Jonsson, C., Palecek, E., (1995). Trace measurements of RNA by potentiometric stripping analysis at carbon paste electrodes. *Anal. Chem.* 67, 4065–4070.
383. Wang, J., Fernandes, J.R., Kubota, L.T.(1998). Polishable and renewable DNA hybridization biosensors, *Anal. Chem.*, 70: 3699-3702.
384. Wang, J., Naser, N., and Lopez, D. (1994). Organic-phase biosensing of secondary alcohols with a Ta. Brockii alcohol dehydrogenase electrode. *Biosens. Bioelectron.*, 9: 225–230.
385. Wang, J., Nielsen, P., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Ozsoz, M., Beglieter, A., Mowat, M.(1997). Mismatch sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance, *Anal. Chem.*, 69: 5200-5202.
386. Wang, J., Rivas, G., Cai, X.(1997). Screen-printed electrochemical hybridization biosensor for the detection of DNA sequences from the Escherichia coli pathogen, *Electroanalysis*, 9(5): 395-398.
387. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., , Shiraishi, H., Farias, A.M.P., Dontha, N., Luo, D.(1996). Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes, *Anal. Chim. Acta.* 332: 139-144.
388. 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.
389. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Jiang, M., Paz, J.L.L., Waymire, R., Nielsen, T.W., Getts, R.C., (1998). Adsorption and detection of DNA dendrimers at carbon electrodes, *Electroanalysis*, 10(8): 553-556.
390. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R., 1998. Indicator-free electrochemical DNA hybridisation biosensor. *Anal. Chim. Acta* 375, 197–203.
391. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F.S., Dontha, N., Farias, P. A. M., Shiraishi, H. (1996). DNA Biosensor for the detection of hydrazines, *Anal. Chem.*, 68: 2251-2254.

392. 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.
393. 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.
394. Wang, S., et al., (2002). Antigen/Antibody Immunocomplex from CdTe Nanoparticle Bioconjugates. *Nano Lett.*, *2 (8)*, 817-822.
395. Willard, D. M.; Carillo, L. L.; Jung, J., Van Orden, A., (2001). -ZnS quantum dots as resonance energy transfer donors in a model protein–protein binding assay *NanoLett.* *1*, 469-474.
396. Wilson, E. K., (1998). “Instant DNA detection”, *Chem. & Eng. News*, *76*: 47.
397. Wink, Th., van Zuilen, S.J., Bult, A., van Bennkom, W.P., (1997). Self-assembled monolayers for biosensors. *Analyst* *122*, 43R–50R.
398. Wojciechowski, M., Sundseth, R., Moreno, M., Henkens, R., (1999). Multichannel electrochemical detection system for quantitative monitoring of PCR amplification. *Clin. Chem.* *45 (9)*, 1690–1693.
399. Wong E.L.S., Erokhin P., Gooding J.J., (2004). A Comparison of Intercalators for the Electrochemical Transduction of DNA Hybridization via Long Range Electron Transfer *Electrochemistry Communications*, *6*, 648-654.
400. Wong E.L.S., Gooding J.J., (2003). Electronic Detection Of Target Nucleic Acids by A 2,6-Disulfonic Acid Anthraquinone Intercalator. *Anal Chem.*, *75*: 3845-3852.
401. Wong E.L.S., Gooding J.J., (2005). Transduction of DNA Hybridization via long-range electron transfer, *Australian Journal of Chemistry*, *58*: 280-287.
402. Wong Y.Y., Ng S.P., Ng M.H., Si S.H., Yao S.Z., Fung Y.S., (2002). Immunosensor for the differentiation and detection of Salmonella species based on quartz crystal microbalance, *Biosensors and Bioelectronics*, *17*, 76-684.
403. www.bio.itworld.com 4 Temmuz 2006
404. www.physics.web.htm. 4 Temmuz 2006
405. www.qmw.ac.uk/~physiol/MPBindex.html 4 Temmuz 2006
406. www.wikidipedia.com 4 Temmuz 2006

407. Xia, C., Guoli, S., Jianhui, J., Ruqin, Y., (1999). Intercalation of Pharmorubicin anticancer drug to DNA studied by cyclic voltammetry with analytical applications, *Anal. Lett.*, 32 (4): 717-727.
408. Xia, Y., et al., (2003). One-dimensional nanostructures: Synthesis, characterization, and applications, *Adv. Mater.* 15 (5): 353-389.
409. Xu D.K., Huang K.; Liu Z. ,Liu Y., Ma L., (2001). Microfabricated disposable DNA sensors based on enzymatic amplification electrochemical detection, *Electroanalysis*, 13(10): 882-887.
410. Yang, M., McGovern, M.E., Thompson, M., (1997). Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry, *Anal. Chim. Acta*, 346: 259-275.
411. Yang, WR; Ozsoz, M; Hibbert, DB; Gooding, JJ, (2002). Evidence for the direct interaction between methylene blue and guanine bases using DNA-Modified carbon paste electrodes, *Electroanalysis*, 14 (18): 1299-1302.
412. Yaşamın temel kuralları Cilt 1/kısım 1 (Prof. Dr. Ali Demirsoy)
413. Ye, Y. K.; Zhao, J. H.; Yan, F.; Zhu, Y. L.; Ju, X.H., (2003). Electrochemical behavior and detection of hepatitis B virus DNA PCR production at gold electrode *Biosens. Bioelectron.*, 18: 1501-1508.
414. Yeh H.-C., Ho Y.-P., Wang T.-H., (2005). Quantum dot-mediated biosensing assays for specific nucleic acid detection, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 1: 115– 121.
415. Zhang C, Chao SY, Wang TH., (2005). Comparative quantification of nucleic acids using single-molecule detection and molecular beacons. *Analyst*, 130:483 - 8.
416. Zhang S., G. Wright, Y. Yang, (2000). Materials and techniques for electrochemical biosensor design and Construction, *Biosensors & Bioelectronics* 15: 273–282.
417. Zhang, Y., Kim, H.H., and Heller, A. 2003. Enzyme-amplified amperometric detection of 3000 copies of DNA in a 10 μ L droplet at 0.5 fM concentration. *Anal. Chem.*, 75: 3267–3269.
418. Zhao Q, Z. Gan, Q. Zhuang, (2002). Electrochemical sensors based on carbon nanotubes, *Electroanalysis* 14, 1609-1613.

419. Zhao X., Tapeç-Dytioco R., Tan W., (2003). Ultrasensitive DNA detection using highly fluorescent bioconjugated nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 11474-11475.
420. Zhou, G., Kamahori, M., Okano, K., Chuan, G., Harada, K., Kambara, H. (2001). Quantitative Detection of Single Nucleotide Polymorphisms for a Pooled Sample by a Bioluminometric Assay Coupled with Modified Primer Extension Reactions (BAMPER), *Nucleic Acids Res.*, 29: E93
421. Ziegler C., Gopel W., (1998). Biosensor development, *Clinical Opinion in Chemical Biology*, 2: 585-591.

ÖZGEÇMİŞ

Arş. Gör. Uzm. Ecz. Dilşat (ÖZKAN) ARIKSOYSAL

Doğum Tarihi: 31 / 08 / 1978

Doğum Yeri: Erzincan

Yabancı Dil: İngilizce (iyi) ÜDS: 63,75

Medeni hali: Evli

Eğitim:

- *İlk öğrenimi:* Necati Bey İlkokulu - İzmit (Eylül 1983- Haziran 1988)
- *Orta ve lise öğrenimi:* İzmit 19 Mayıs Lisesi (Eylül 1988- Haziran 1994)

Lisans Eğitimi:

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (Eylül 1995 - Ekim 1999).

Yüksek Lisans Eğitimi:

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı (Ekim 1999-Ocak 2003).

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. M.E.Şengün ÖZSÖZ

Doktora Eğitimi:

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı Doktora Programı (Şubat 2003- Halen devam etmektedir).

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. M.E.Şengün ÖZSÖZ

Yürüttüğü Tez Çalışmaları:

- **Yüksek Lisans Tez Konusu:** Elektrokimyasal hibridizasyon indikatörleri ve DNA biyosensörlerinde kullanılmasının incelenmesi (Ekim 1999-Ocak 2003).
- **Doktora Tez konusu:** DNA'da meydana gelen bazı mutasyonların ve hibridizasyonun tayinine yönelik elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımı (Şubat 2003- Halen devam etmektedir).

Aldığı Burslar:

Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (Kimyasal Silahların Yasaklanması Örgütü OPCW Lahey- Hollanda)'dan 3 aylık yurt dışı eğitim bursu (2002).

Görevli Olduğu Proje Çalışmaları:

- Elektrokimyasal hibridizasyon indikatörleri ve DNA biyosensörlerinde kullanılmasının incelenmesi (Ege Üniversitesi Proje Koordinatörlüğü, Proje No:95/ECZ/010; Aralık 2000- Şubat 2003).
- Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri (EBİLTEM projesi - Proje No: 2000 / BİL / 031); 2000-2002.
- Genetik ve bazı bulaşıcı hastalıkların tanınması için elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımı (DPT Projesi), Ocak 2002- Ocak 2004.
- Halk sağlığı ve çevreyi etkileyen bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların tayini için elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımı, TÜBİTAK-GSRT Projesi-Proje No: TBAG-U/36 (101T179); Şubat 2002- Ağustos 2005.
- Kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle saptanması (TÜBİTAK projesi - TBAG-2161 (102T051) ; Ağustos 2002-2005.
- Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (Genosensörlerin) tasarımında kullanılan yeni teknikler ve uygulamaları (TÜBİTAK projesi - Proje No: TBAG-2233; Ocak 2003- Ağustos 2005.
- DNA'da meydana gelen bazı mutasyonların ve hibridizasyonun tayinine yönelik elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımı (Ege Üniversitesi Proje Koordinatörlüğü, Proje No:04/ECZ/013; Eylül 2004- Halen devam etmektedir).

Yurt dışında katıldığı projeler:

- 1) **1 Eylül 2002 - 30 Ekim 2002** tarihleri arasında İtalya'nın Floransa Üniversitesi Kimya Bölümü'ndeki "Biyosensör Laboratuvarı"nda Prof. Dr. Marco Mascini gözetiminde "Toksik moleküllerin tayini için elektrokimyasal DNA biyosensörünün tasarımı" konusunda 2 ay süreyle çalışma.
- 2) **20 Eylül 2003-11 Ekim 2003** tarihleri arasında Yunanistan'nın Selanik şehrindeki Aristo Üniversitesi Kimya Bölümü'nde Dr. Stella Girusi ile birlikte "Biyosensör Mekanizmaları" konusunda 21 gün süreyle çalışma.
- 3) **4 Eylül 2002 - 30 Kasım 2004** tarihleri arasında İtalya'nın Floransa Üniversitesi Kimya Bölümü'ndeki "Biyosensör Laboratuvarı"nda Prof. Dr. Marco Mascini gözetiminde "Elektrokimyasal DNA biyosensörleri tasarımı ve uygulamaları" konusunda 3 ay süreyle çalışma.

4) **1 Ekim 2005- 30 Kasım 2005** tarihleri arasında Almanya'nın Ruhr Üniversitit Bochum Üniversitesi Kimya Fakültesi, Analitik Kimya Bölümü'ndeki "Elektroanalitik ve sensörler Laboratuvarı"nda Prof. Dr. Wolfgang Schuhmann gözetiminde 2 ay süreyle çalışma.

5) **11-25 Şubat 2006** tarihleri arasında Malezya Sains Üniversitesi, Tıp Bilimleri Okulu, Mikrobiyoloji ve Parazitoloji Bölümü'nde Doç. Dr. Madya M. Ravichandran'ın laboratuvarlarında bilimsel araştırmalarda bulunmak üzere 15 gün süreyle çalışma.

YAYINLAR

1. ARZUM ERDEM, **DILSAT OZKAN**, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, TAYFUN DALBASTI, MEHMET OZSOZ, " Ion-selective Membrane Electrode for the Determination of A Novel Phenylpiperazine Anti-Depressant, Nefazodone ", **TURKISH JOURNAL of CHEMISTRY**, 24, 353-360, **2000**.

2. BURCU MERIC, NAZIFE KILICARSLAN, KAGAN KERMAN, **DILSAT OZKAN**, UMRAN KURUN, NEJAT AKSU, MEHMET OZSOZ, " A Clinical Evaluation of Precision G Blood Glucose Analyzer with a New Test Strip G2b in a Neonatal Unit ", **CLINICAL CHEMISTRY**, 48, 176-179. **2000**.

3. ARZUM ERDEM, **DILSAT OZKAN**, BURCU MERIC, KAGAN KERMAN, MEHMET OZSOZ, " Incorporation of EDTA for the elimination of metal inhibitory effects in an amperometric biosensor based on mushroom tissue polyphenol oxidase", **TURKISH JOURNAL of CHEMISTRY**, 25, 231-239, **2001**.

4. KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, **DILSAT OZKAN**, PINAR KARA ARZUM ERDEM and MEHMET OZSOZ, "Electrochemical DNA biosensor for the determination of Benzo[a]pyrene - DNA adducts", **ANALYTICA CHIMICA ACTA**, **2001**, 450, 45-52.

5. MERIC BURCU, KERMAN KAGAN, **OZKAN DILSAT**, KARA PINAR, OZSOZ MEHMET, Indicator-free electrochemical DNA hybridisation biosensor based on guanine and adenine signals, **ELECTROANALYSIS**, 14,1245-1250, **2002**.

6. MERIC BURCU, KERMAN KAGAN, **OZKAN DILSAT**, KARA PINAR, ERENDOY SELDA, AKARCA U. S., MASCINI MARCO, OZSOZ MEHMET, Electrochemical DNA biosensor for the detection TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using Methylene Blue, **TALANTA**, 56, 837-846, **2002**.

7. ARZUM ERDEM, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, **DILSAT OZKAN**, PINAR KARA, MEHMET OZSOZ, DNA biosensor for *Microcystis* spp. sequence detection by using methylene blue and ruthenium bipyridine as electrochemical hybridization labels, **TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY**, 26, 851-862, **2002**.

8. MERIC BURCU, KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, KARA PINAR, ERDEM ARZUM, KUCUKOGLU OZLEM, ERCIYAS ERCIN, OZSOZ MEHMET, "Electrochemical Biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent, 4,4'-dihydroxy chalcone based on guanine and adenine signals", **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 30,1339-1346, **2002**.

9. KERMAN KAGAN, **OZKAN DILSAT**, KARA PINAR, MERIC BURCU, ERDEM ARZUM, NIELSEN P. E., OZSOZ MEHMET, Label - free bioelectronic detection of point mutation by using peptide nucleic acid probes and methylene blue, **ELECTROANALYSIS**, 15, No: 7, 1-4, **2003**.

10. **OZKAN DILSAT**, KERMAN KAGAN, MERIC BURCU, KARA PINAR, DEMIRKAN HASAN, POLVEREJAN MIHAI, PNNAVAIA THOMAS J., OZSOZ MEHMET, 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, **2002**.

11. PINAR KARA, **DILSAT OZKAN**, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, ERDEM ARZUM, MEHMET OZSOZ, DNA sensing on glassy carbon electrodes by using hemin as the electrochemical, **ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY**, 373, 710-716, **2002**.

12. KERMAN KAGAN, **OZKAN DILSAT**, KARA PINAR, MERIC BURCU, GOODING JUSTIN, OZSOZ MEHMET, Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, **ANAL.CHIM.ACTA**, 462, 39-47, **2002**.

13. OZKAN DILSAT, KARA PINAR, KERMAN KAGAN, MERIC BURCU, ERDEM ARZUM, JELEN FRANTISEK, NIELSEN E. PETER, OZSOZ MEHMET, DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label, **BIOELECTROCHEMISTRY**, 58, 119-126, **2002**.

14. PINAR KARA, KAGAN KERMAN, **DILSAT OZKAN**, BURCU MERIC, ERDEM ARZUM, PETER E. NIELSEN, MEHMET OZSOZ, Label free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic

acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes, **ELECTROANALYSIS**, 14(24), 1685-1690, **2002**.

15. KARA PINAR, KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, MERIC BURCU, ERDEM ARZUM, OZKAN ZEYNEP, OZSOZ MEHMET, - Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA, *Electrochem. Commun.*, 4, 705-709, **2002**.

16. OZKAN DILSAT, ERDEM ARZUM, KARA PINAR, KERMAN KAGAN, GOODING J. JUSTIN, NIELSEN E. PETER., OZSOZ MEHMET, - Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes, **Electrochem. Commun.**, 4,796-802, **2002**.

17. DILSAT OZKAN, ARZUM ERDEM, PINAR KARA, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, JORG HASSMANN, MEHMET OZSOZ- Allele Specific Genotype Detection of Mutations from Polymerase Chain Reaction Amplicons Based on Label-Free Electrochemical Genosensor, **ANALYTICAL CHEMISTRY**, 74 (23), 5931-5936, **2002**.

18. MEHMET OZSOZ, ARZUM ERDEM, KAGAN KERMAN, DILSAT OZKAN, BERRIN TUGRUL, NEJAT TOPÇUOĞLU, HAYATI EKREN, MUZAFFER TAYLAN, Electrochemical Genosensor Based on Colloidal Gold Nanoparticules for the Detection of Factor V Leiden Mutation Using Disposable Pencil Graphite Electrodes- **ANALYTICAL CHEMISTRY**, 75, 2181-2187, **2003**.

19. ARZUM ERDEM, PINAR KARA, KAGAN KERMAN, DILSAT OZKAN, MEHMET OZSOZ, Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on guanine signal, **ELECTROANALYSIS**, 15 (7), 613-619, **2003**.

20. MEHMET OZSOZ, ARZUM ERDEM, DILSAT OZKAN, KAGAN KERMAN, THOMAS J. PINNAVAIA- Clay / Sol-gel Modified Electrodes for the Selective Electrochemical Monitoring of 2,4 Dichlorophenol, **LANGMUIR**, 19, 4728-4732, **2003**.

21. P. KARA, D. OZKAN, A. ERDEM, K. KERMAN, S. PEHLIVAN, F. OZKINAY, D. UNUVAR, G. ITIRLI, M. OZSOZ, "Detection of Achondroplasia G380R Mutation From PCR Amplicons By Using Inosine Modified carbon Electrodes Based on electrochemical DNA Chip technology", **Clinica Chimica Acta**, 33(2),295-302, **2003**.

22. Dilsat OZKAN, Hakan KARADENIZ, Arzum ERDEM, Marco MASCINI, Mehmet OZSOZ, "Electrochemical genosensor for Mitomycin C- DNA interaction based on guanine signal" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35(4)**, 905-912, 2004.

23. **KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, KARA PINAR, KARADENİZ HAKAN, OZKAN ZEYNEP, ERDEM ARZUM, JELEN FRANTİSEK, OZSOZ MEHMET**, Electrochemical detection of specific DNA sequences from PCR amplicons on carbon and mercury electrodes using Meldola's Blue as an intercalator, *TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY* **28 (5): 523-533**, 2004.

24. **Dilsat Ozkan Ariksoysal**, Hakan Karadeniz, Arzum Erdem, Aylin Sengonul, A. Arzu Sayiner, Mehmet Ozsoz, Label Free Electrochemical Hybridization Genosensor for the Detection of Hepatitis B Virus Genotype on the Development of Lamivudine Resistance, *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **77** : 4908-4917, **2005**.

25. Mehmet Ozsoz, Arzum Erdem, **Dilsat Ozkan**, Pinar Kara, Hakan Karadeniz, Burcu Meric, Kagan Kerman."Allele –specific genotyping by using guanine and gold electrochemical oxidation signals" *Bioelectrochemistry*, **67**, 199-203, **2005**.

26. Arzum Erdem, **Dilsat Ozkan Ariksoysal**, Hakan Karadeniz, Pinar Kara, Aylin Sengonul, A. Arzu Sayiner and Mehmet Ozsoz, Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology, *Electrochemistry Communications*, **7** : 815–820, **2005**.

27. Maria Lisa Del Giallo, **Dilsat Ozkan Ariksoysal**, Giovanna Marrazza, Marco Mascini, Mehmet Ozsoz, "Disposable Electrochemical Enzyme-Amplified Genosensor for *Salmonella* Bacteria Detection", *Analytical Letters(Special issue)* Vol.38 (15), 2509-2523, **2005**.

Diğer hakemli dergilerdeki yayınlar:

1. ERDEM ARZUM, KERMAN KAGAN,**OZKAN DILSAT**,KUCUKOGLU OZLEM,ERCİYAS ERCIN, OZSOZ MEHMET, "Electrochemical Determination of Interaction Between An Alkylating Anticancer Agent and DNA In Solution and At The Electrode Surface", *Electrochemical Society Proceedings Volume (the 200 th Meeting of the Electrochemical Society and the 52 th meeting of the International Society of Electrochemistry, 2-7 September 2001, San Francisco, CA,USA)*, Editor by M. Butler, P. Vanysek, N. Yamazoe, 2001-18, 563-572.

BİLDİRİLER

1. ARZUM ERDEM, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, DILSAT OZKAN, MEHMET OZSOZ, *VOLKAN ARMAGAN, SECIL GUR, HAKAN KARADENİZ, ZEYNEP AY, HALE TURKAN, DENİZ YURDAKUL*, " Polifenol Oksidaz İçeren Mantar Dokusunu Enzim Kaynağı Olarak Kullanan Biyosensör ile Amperometrik Fenol Tayini ve Metal İnhibisyonunun EDTA ile Eliminasyonu ", *E. Ü. Eczacılık Fakültesi 2inci Sınıf Öğrencileri*, **Biyomed-6 – 6. Uluslar arası Katılımlı Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, 06-08 Ekim 1999, Otel Ege Sağlık, İzmir, posterli bildiri, Bildiri Özetleri Kitabı, P-47.**
2. *Hakan KARADENİZ, Volkan ARMAGAN, Arzum ERDEM, Kagan KERMAN, Burcu MERIC, Dilsat OZKAN, Mehmet OZSOZ*, "Elektrokimyasal DNA biyosensörleri" , *E. Ü. Eczacılık Fakültesi 2inci Sınıf Öğrencileri*, **2inci Ulusal Veterinerlik Hekimlik Öğrenci Kongresi, İstanbul Üniversitesi, Veteriner Hekimlik Fakültesi, 13-15 Mayıs 2000, İstanbul, sözlü bildiri, Bildiri Özetleri Kitabı.**
3. Arzum ERDEM, Burcu MERIC, Kagan KERMAN, Dilsat OZKAN, Pinar KARA, Mehmet OZSOZ and *Pinar ALCIL, Burcu KARASAHİN, Zeynep OZKAN, Nese PALANDUZ, Isil SARIKAN*, "Electrochemical Determination of Benzo[a]pyrene-DNA adducts by using DNA biosensor", *E. Ü. Eczacılık Fakültesi 1inci Sınıf Öğrencileri* **IPORSIP-2000, The 2nd International Postgraduate research Symposium on Pharmaceutics, Posterli bildiri, 6-8 Eylül 2000, İstanbul.**
4. ERDEM ARZUM, KERMAN KAGAN, MERIC BURCU, OZKAN DILSAT, OZSOZ MEHMET, "Methylene Blue as a novel Electrochemical Hybridization Indicator for DNA biosensor" ; **posterli bildiri (C-8); MENDEL Brno 2000, Brno, Çek Cumhuriyeti, 19-23 Haziran 2000.**
5. ARZUM ERDEM, KAGAN KERMAN, BURCU MERİÇ, DİLŞAT ÖZKAN, ULUS S. AKARCA, MEHMET ÖZSÖZ, " Electrochemical DNA biosensors", Poster presentation, **BIOMED 2000, The 7th International Symposium on**

Biomedical Science and Technology, 25-27 Eylül 2000, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Poster sunumu, Bildiri Özetleri Kitabı PW14.

6. ARZUM ERDEM, BURCU MERİÇ, KAGAN KERMAN, DİLŞAT ÖZKAN, MEHMET ÖZSÖZ, “Çevre kirliliğine neden olan Microcystis spp. Mikroorganizmalarının tayini için elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarımı “, **Proje Sergisi 2000, Ege Üniversitesi, EBİLTEM, İzmir, 23-27 EKİM 2000.**
Bu çalışma Proje Sergisi-2000 'de Temel Bilimler Dalında ikincilik ödülüne layık görülmüştür.
7. BURCU MERIC, NAZIFE KILICARSLAN, DILSAT OZKAN, UMRAN KURUN, NEJAT AKSU, MEHMET OZSOZ, “ A Clinical Evaluation of Precision G Blood Glucose Analyzer with a New Test Strip G2b in a Neonatal Unit “, **XVI. Ulusal Biyokimya Kongresi, II. Uluslar arası Biyobilim Günleri, Türk Biyokimya Derneği, Poster sunumu, Bildiri Özetleri Kitabı P-24, 23-27 Ekim 2000, Efes Sürmeli Hotel, Selçuk - İzmir.**
8. ARZUM ERDEM, DILSAT OZKAN, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC AND MEHMET OZSOZ ,“ DNA biosensors and DNA microarray system in Future“,**XVI. Ulusal Biyokimya Kongresi, II. Uluslar arası Biyobilim Günleri, Türk Biyokimya Derneği, Sözlü sunumu S-9, Bildiri Özetleri Kitabı, 23-27 Ekim 2000, Efes Sürmeli Hotel, Selçuk - İzmir.**
9. DILSAT OZKAN, **Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) – Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA) İşbirliği ile hazırlanan ve DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nce** düzenlenen “Bilimsel Araştırma Projelerinin Planlanması, Hazırlanması ve Desteklenmesi” Sempozyumu, **12 Ocak 2001, İzmir.**
10. SINEM GUNGOR, NURI KARAKAYA, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, DILSAT OZKAN, PINAR KARA AND MEHMET OZSOZ, “Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri”, **III.ULUSAL Veteriner Hekimliği Öğrencileri Araştırma Kongresi, Bildiri Özetleri Kitabı, 28, Posterli Bildiri, 10-12 Mayıs 2001, İstanbul.**

11. KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, **DILSAT OZKAN**, PINAR KARA, ARZUM ERDEM AND MEHMET 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 SUNUMU (İngilizce), Bildiri Özetleri Kitabı, O-14.**

12. BURCU MERİÇ, KAĞAN KERMAN, DİLŞAT ÖZKAN, PINAR KARA, ARZUM ERDEM, ULUS S. AKARCA, SELDA ERNESOY AND MEHMET ÖZSÖZ, "Elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanarak PCR ürünü örneklerden bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların tanısı",**Proje Sergisi 2001, Ege Üniversitesi, EBİLTEM, İzmir, 15-26 Ekim 2001.**

- ***Bu çalışma Proje Sergisi 2001'de Biyolojik Bilimler Dalında birincilik ödülüne layık görülmüştür.***

13. **DILSAT OZKAN**, ARZUM ERDEM, PINAR KARA, KAGAN KERMAN, J. JUSTIN GOODING, PETER E. NIELSEN, MEHMET OZSOZ, “Altın elektrot yüzeyinde düzenli peptid nükleik asit tabakası ve metilen mavisine dayalı elektrokimyasal DNA hibridizasyonu tayini” **Proje Sergisi 02-Ege Üniversitesi Bilim–Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi(EBİLTEM), 04-15 Kasım 2002, İzmir, proje sergisi.**

Bu çalışma Proje Sergisi 2002'de Biyolojik Bilimler Dalında ikincilik ödülüne layık görülmüştür.

14. PINAR KARA, **DILSAT OZKAN**, ARZUM ERDEM, KAGAN KERMAN, SACIDE PEHLIVAN, FERDA OZKINAY, DUYGU UNUVAR, GULCIN ITIRLI, HAKAN KARADENİZ, MEHMET OZSOZ, “İndikatörsüz elektrokimyasal genosensör ile akondroplazi G380R mutasyonunun allel özgül genotip tayini, **Proje Sergisi 02-Ege Üniversitesi Bilim–Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi(EBİLTEM), 04-15 Kasım 2002, İzmir, proje sergisi.**

Bu çalışma Proje Sergisi 2002'de Biyolojik Bilimler Dalında birincilik ödülüne layık görülmüştür.

15. **DILSAT OZKAN**, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nin 1-5 Temmuz 2002 tarihleri arasında düzenlediği "Rekombinant antikor üretiminde Phage Display Teknolojisi" konulu lisans üstü uygulamalı eğitim kursu'na katılmıştır.

16. PINAR KARA, DILSAT OZKAN, ARZUM ERDEM, KAGAN KERMAN, SACIDE PEHLIVAN, FERDA OZKINAY, DUYGU UNUVAR, GULCIN ITIRLI, **HAKAN KARADENİZ**, MEHMET OZSOZ, "İndikatörsüz elektrokimyasal genosensör ile akondroplazi G380R mutasyonunun allel özgül genotip tayini, **III. Bilimsel Araştırma Forumu, Ege Üniversitesi Tıp fakültesi, Bornova-İzmir, 10-14 Mart 2003.**

* *Bu çalışma III. Bilimsel Araştırma Forumu'nda Prof. Dr. Ramazan AKŞİT onuruna verilen Bilimsel Araştırma Ödülüne layık görülmüştür.*

17. P. KARA, **D. OZKAN**, A. ERDEM, K. KERMAN, S. PEHLİVAN, F. OZKINAY, D. UNUVAR, G. ITIRLI, M. OZSOZ," "İndikatörsüz elektrokimyasal genosensör ile akondroplazi G380R mutasyonunun allel özgül genotip tayini" Posterli bildiri, **7. Uluslararası Farmasötik Bilimler Sempozyumu, 24-27 Haziran 2003, Ankara Üniversitesi, Ankara.**

18. **DILSAT OZKAN**, ARZUM ERDEM, PINAR KARA, HAKAN KARADENİZ, BESTE GÜLMEZ, FERİT ŞAHİNCİ, MEHMET ÖZSÖZ, "Hepatit B virüsünün tayini için tek kullanımlık kalem elektrotlar ve altın nanopartiküller kullanılarak tasarlanan sandwich-elektrokimyasal DNA biyosensörü" Posterli bildiri, **7. Uluslararası Farmasötik Bilimler Sempozyumu, 24-27 Haziran 2003, Ankara Üniversitesi, Ankara.**

19. M. OZSOZ, A. ERDEM, K. KERMAN, **D. OZKAN**, P. KARA, BURCU MERİÇ, BERRİN TUĞRUL, NEJAT TOPÇUOĞLU, HAYATI EKREN, MUZAFFER TAYLAN "DNA Hibridizasyonunun altın nanopartiküllere dayalı elektrokimyasal biyosensörlerle algılanması" **Ege Üniversitesi Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi(EBİLTEM), Proje Yarışması 2003, İzmir.**

- *Bu çalışma Proje Yarışması 2003'de Biyolojik Bilimler Dalında ikincilik ödülüne layık görülmüştür.*

20. **M. OZSOZ**, A. ERDEM, D. OZKAN, P. KARA, H. KARADENİZ, "Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri, sözlü bildiri(Davetli Konuşmacı),

Uluslararası Biyomühendislik; Problemler ve Perspektifler Çalıştayı, 20-23 Ekim 2004, Bildiri özetleri kitabı sayfa: 111, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.

21. Filiz Sayar, Güldem Güven, Arzum Erdem, Hakan Karadeniz, Dilşat Özkan, Erhan Pişkin, Mehmet Özsöz, “Moleküler Tanıda Kullanılmak Üzere Manyetik Polimer Nanopartiküllerin Sentezlenmesi Ve Karakterizasyonu”, **II. Uluslar arası katılımlı Moleküler tanı sempozyumu, Posterli bildiri, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İzmir, 10-14 Mayıs 2004.**
22. Filiz Sayar, Güldem Güven, Arzum Erdem, Hakan Karadeniz, Dilşat Özkan, Mehmet Özsöz, Erhan Pişkin, “Synthesis and Characterization of Magnetic Poly(MMA/AAc) Nanoparticle For Electrochemical DNA Biosensors”, **BIOMED 2004, posterli bildiri, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara, 6-10 Eylül 2004,**
23. Ferit Sahinci, Halise Inci Gul, Dilsat Ozkan, Mehmet Ozsoz, Ercin Erciyas, Kaan Kucukoglu, “Determination of the interaction between some mannich bases and DNA at the carbon paste electrode surface using electrochemical biosensor” IMMPC-2, 2nd International Meeting on Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 10-14 October 2004, Antalya, Turkey.
24. MEHMET OZSOZ, PINAR KARA, AYŞİN ZEYTİNOĞLU, ARZUM ERDEM, DİLŞAT ÖZKAN, HAKAN KARADENİZ, “Elektrokimyasal Genosensör Teknolojisi ile Herpes Symplex Tip1 ve Tip2 Virüslerinin Birbirinden Ayırımı”, **Proje Sergisi 04-Ege Üniversitesi Bilim–Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM), 01-12 Kasım 2004, İzmir, proje yarışması.**
 - ***Bu çalışma Proje Sergisi 2004'de Biyolojik Bilimler Dalında birincilik ödülüne layık görülmüştür.***
25. MEHMET OZSOZ, ARZUM ERDEM, DİLŞAT OZKAN, PINAR KARA, HAKAN KARADENİZ, “Antikanser İlaç Mitomisin C'nin DNA ile Etkileşmesinin Elektrokimyasal Genosensörlerle Tayini”, **Proje Sergisi 04-Ege Üniversitesi Bilim–Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (EBİLTEM), 01-12 Kasım 2004, İzmir, proje yarışması.**
 - ***Bu çalışma Proje Sergisi 2004'de Biyolojik Bilimler Dalında mansiyon ödülüne layık görülmüştür.***

26. MEHMET OZSOZ, ARZUM ERDEM, DİLŞAT ÖZKAN, PINAR KARA, HAKAN KARADENİZ, BURCU KARAŞAHİN, “Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ve Yeni Gelişmeler ‘’, **II. Uluslar arası katılımlı Moleküler Tanı ve Uygulamaları Sempozyumu**, sözlü bildiri, **Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Bornova-İzmir, 10-14 Mayıs 2004.**
27. MEHMET OZSOZ, ARZUM ERDEM, **DİLŞAT ÖZKAN ARIKSOYSAL**, PINAR KARA, HAKAN KARADENİZ, “Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri”, 6.Elektrokimya Günleri toplantısı, **Sözlü bildiri**, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 29 Haziran- 1 Temmuz 2005.
28. Mehmet Ozsoz, Arzum Erdem, **Dilsat Ozkan Ariksoysal**, Pinar Kara Kadayifcilar, Hakan Karadeniz, A. Arzu Sayiner, Aylin Sengonul, “Hepatit B hastalarında uzun süreli Lamivudin kullanımı ile virüs genomunda oluşan direnç etkeni mutasyonların işaretli elektrokimyasal DNA genosensörle algılanması” Teknoloji, Yenilik ve Girişim Sermayesi Günleri ve Proje Pazarı, Proje No: **213**. ESBAŞ Teknoloji Merkezi, Ege Serbest Bölgesi, Gazimur, İzmir, 1-2 Aralık 2005.
29. Mehmet Ozsoz, **Arzum Erdem**, Dilsat Ozkan Ariksoysal, Pinar Kara Kadayifcilar, Hakan Karadeniz, A. Arzu Sayiner, Aylin Sengonul, “Tek kullanımlık sensör teknolojisi ve manyetik partiküllere dayalı elektrokimyasal yöntemle gerçek hasta örneklerinde Hepatit B virüs (HBV) DNA’sının tayini” Teknoloji, Yenilik ve Girişim Sermayesi Günleri ve Proje Pazarı, Proje No: **215**. ESBAŞ Teknoloji Merkezi, Ege Serbest Bölgesi, Gazimur, İzmir, 1-2 Aralık 2005.
30. Mehmet Ozsoz, Arzum Erdem, Dilsat Ozkan Ariksoysal, Pinar Kara Kadayifcilar, Hakan Karadeniz, Gorkem Yalcin, Seda Cavdar, Buket Meric, “Electrochemical DNA Biosensors”, ISOPS, 8thInternational Symposium on Pharmaceutical Sciences, Sözlü bildiri, O-34 Ankara University, Faculty of Pharmacy, Ankara, 13-16 June 2006.

- 31. Dilsat Ozkan Ariksoysal**, Mehmet Ozsoz, Pinar Kara Kadayifcilar, Gorkem Yalcin, Seda Cavdar, Buket Meric, “Use of carbon nanotubes in biosensor systems for signal enhancement, ISOPS, 8thInternational Symposium on Pharmaceutical Sciences, posterli bildiri, P-163, Ankara University, Faculty of Pharmacy, Ankara, 13-16 June 2006.
- 32.** Gorkem Yalcin, Murat Cizmecioglu, Pinar Kara Kadayifcilar, Dilsat Ariksoysal, Seda Cavdar, Buket Meric, Ozlem Sogut, Mehmet Ozsoz, “Electrochemical biosensor fort he interaction of DNA and antitumoral and cytotoxic chalcone derivatives, ISOPS, 8thInternational Symposium on Pharmaceutical Sciences, posterli bildiri, P-182, Ankara University, Faculty of Pharmacy, Ankara, 13-16 June 2006.
- 33.** Maria Lisa Del Giallo, **Dilsat Ozkan Ariksoysal**, Giovanna Marrazza, Marco Mascini, Mehmet Özsöz, “*Salmonella choleraesuis* subsp. *Choleraesuis*bakterisinin moleküler tayinine yönelik elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarımı”, **Sözlü Bildiri**, 7.Elektrokimya Günleri toplantısı, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 28-30 Haziran 2006.
- 34.** Mehmet Ozsoz, Arzum Erdem, Dilsat Ozkan Ariksoysal, Pinar Kara Kadayifcilar, Hakan Karadeniz, Gorkem Yalcin, Seda Cavdar, Buket Meric, “Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri”, Sözlü Bildiri, 7.Elektrokimya Günleri toplantısı, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 28-30 Haziran 2006.

BİLDİRİLER (Yurt dışı)

1. ERDEM ARZUM, KERMAN KAGAN, MERIC BURCU, **OZKAN DILSAT**, OZSOZ MEHMET, “Methylene Blue as a Novel Electrochemical Hybridization Indicator for DNA biosensor” ; DNA Structure and interactions Their Biological Roles and Implications in Biomedicine and Biotechnologies, **posterli bildiri (C-8); MENDEL Brno 2000, Çek Cumhuriyeti, 19-23 Haziran 2000.**
2. ERDEM ARZUM, KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, KUCUKOGLU OZLEM, ERCİYAS ERCIN, OZSOZ MEHMET, “Electrochemical Determination of Interaction Between An Alkylating Anticancer Agent and DNA In Solution and At The Electrode Surface”, **The 200 th Meeting of the Electrochemical Society and the 52 th meeting of the International Society of Electrochemistry, 2-7 Eylül 2001, San Francisco, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri, Posterli bildiri.**
3. **M OZSOZ**, ARZUM ERDEM, K. KERMAN, **D.OZKAN**, B.MERIC, P.KARA “Altın nanopartiküllere dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarımı” 3rd International Conference Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications” **Bildiri Özetleri Kitabı, 195, İngilizce sözlü bildiri, 23-27 Eylül 2003, Aristo Üniversitesi, Selanik, Yunanistan.**
4. **DILSAT OZKAN**, “Toksik moleküllerin tayini için elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarımı ve mitomisin C” Kimyasal Silahlar Sözleşmesi 5. Ulusal Makamlar Yıllık Toplantısı’nda **İngilizce Sözlü bildiri, 17 Ekim 2003, Kimyasal Silahların Yasaklanması Örgütü(KSYÖ), Lahey-Hollanda.**
5. A ERDEM, **D. OZKAN**, T.J. PINNAVAIA and M. OZSOZ “ Electrochemical Monitoring of 2,4 Dichlorophenol Based on Clay Modified Electrodes”, **İngilizce sözlü bildiri**, The 6th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ -Techniques in Environmental and Clinical Analysis, **8th-12th October 2004**, Bildiri Özetleri Kitabı, P: O-11 **ENEA-University of Rome(La Sapienza), Rome, ITALY.**

6. M. OZSOZ, A ERDEM, **D. OZKAN**, H. KARADENİZ and K. KERMAN
“Electrochemical genosensor based on colloidal gold an titanium dioxide nanoparticles for the DNA hybridization detection”, sözlü bildiri, The 6th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ -Techniques in Environmental and Clinical Analysis, **8th-12th October 2004**, Bildiri Özetleri Kitabı, P: O-33 **ENEA-University of Rome(La Sapienza), Rome, ITALY.**
7. S. Girousi, **D. Ozkan**, M. Ozsoz, “Electrochemical DNA biosensors for the detection of infectious and inherited diseases considering public health and environment”, International Society of Electrochemistry – **55th Annual Meeting – Thessaloniki – Yunanistan, 19-24 September 2004.**
8. ARZUM ERDEM, **HAKAN KARADENİZ**, DİLŞAT ÖZKAN, PINAR KARA, MEHMET OZSOZ, “An overview to electrochemical genosensors combined with particles, FEBS International Summer School, Chemistry meets Biology, **Spetses, Greece, 17-29 July 2005.**

KATILDIĞI KURSLAR :

1. “**Rekombinant Antikor Üretiminde Faj Gösterim Teknolojisi**” adlı lisans üstü uygulamalı ve teorik eğitim kursu, 1 – 5 Temmuz 2002, **TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Gebze / KOCAELİ**

Düzenlediği toplantılar

1. Moleküler Tanı ve Uygulamaları Yaz Okulu, **Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Bornova-İzmir, 28-31 Mayıs 2002.**

Organizasyon Komitesi: Prof. Dr. Erçin Erciyas, Prof. Dr. Mehmet Şengün Özsöz, Yrd. Doç. Dr. K. Arzum Erdem, Arş. Gör. Kağan Kerman, **Arş. Gör. Dilşat Özkan**, Arş. Gör. Pınar Kara.

2. II. Uluslar arası katılımlı Moleküler Tanı ve Uygulamaları Sempozyumu, **Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Bornova-İzmir, 10-14 Mayıs 2004.**

Organizasyon Komitesi: Prof. Dr. Erçin Erciyas, Prof. Dr. Mehmet Şengün Özsöz, Doç. Dr. K. Arzum Erdem, **Arş. Gör. Dilşat Özkan**, Arş. Gör. Pınar Kara, Arş. Gör. Hakan Karadeniz, Arş. Gör. Burcu Karaşahin.

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**, Eskişehir.

4. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde Prof. Dr. Esmâ Kılıç tarafından düzenlenen Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri konulu çalıştay. (öğretici olarak), **21-22 Mart 2005**, Ankara.

SÖZLÜK

Analit:	Analizi yapılacak madde.
Hibridizasyon:	Birbirinin tam karşılığı iki DNA dizisinin birleşmesi, baz çiftlerinin, özel hibridizasyon koşullarına bağlı olarak sarmalın merkezinde yığın oluşturması.
İnterkalasyon:	Düzlemsel halka sistemi yapısına sahip bazı maddelerin DNA baz çiftleri arasına yerleşmesi olayıdır.
Sentetik Prob:	Tayini yapılacak hedef DNA bölgesine tam karşılık olan baz dizilimine sahip dizi.
Sentetik hedef:	Çalışmalarda tayini yapılacak hedef bölgenin baz dizilimine sahip sentetik (sentezlettirilmiş) dizi.
Klonlanmış PCR ürünü:	HBV genom haritasının, tayini yapılacak gen bölgesini içeren belirli bir bölümünün kesilerek uygun bir vektör yardımı ile klonlanması ve ardından bu çoğaltılan DNA parçasının polimeraz zincir reaksiyonuyla tekrar çoğaltılması.
PCR ürünü:	HBV genom haritasının, tayini yapılacak gen bölgesini içeren belirli bir bölümünün kesilerek polimeraz zincir reaksiyonuyla çoğaltılması.
PCR kör çözültisi:	Kalıp DNA haricindeki diğer PCR bileşenlerini içeren çözülti.