

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ BULAŞICI VE KALITSAL HASTALIKLARA
NEDEN OLAN GEN DİZİLERİNİ İÇEREN
PCR ÜRÜNÜ ÖRNEKLER KULLANILARAK
ELEKTROKİMYASAL DNA BİYOSENSÖRLERİYLE BU
HASTALIKLARIN SAPTANMASI**

Analitik Kimya Programı

Yüksek Lisans Tezi

138497

Eczacı

Pınar KARA KADAYIFÇILAR

EGE ÜNİVERSİTESİ ENSTİTÜSÜ
DOKÜMANLAMA MERKEZİ

Danışman

Prof. Dr. M. E. Şengün ÖZSÖZ

İZMİR

2003

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	5
I.BÖLÜM	6
GİRİŞ ve AMAÇ	6
GENEL BİLGİLER.....	13
1.ELEKTROKİMYA.....	13
1.1. Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları:	14
Elektroanalitik Yöntemler:	15
1.2. Voltametri:.....	15
1.2.1. Voltametrinde kullanılan uyarma sinyalleri:	16
1.2.2. Voltametrik Cihazlar:	16
1.2.3.1 Referans elektrotların çeşitleri:	17
1.2.4 Voltametrinde kullanılan çalışma elektrotları	18
1.2.4.1 Karbon elektrotlar :	19
1.2.4.2 Civa elektrotlar:	21
1.2.4.3 Metal Elektrotlar:	21
1.2.4.4 Diğer elektrotlar:.....	21
1.2.5 Voltamogramlar:.....	22
1.2.6 Voltametrik Akımlar:	23
1.2.7 Elektrokimyasal Bir Olayda Faradayik işlemler	23
1.2.8 VOLTAMETRİK TEKNİKLER:	25
1.2.8.1 Dönüşümlü Voltametri (CV):	25
1.2.8.2 Diferansiyel Puls Polarografisi:	26
1.2.8.3 Kare Dalga Polarografisi ve Voltametrisi:	28
2. BİYOSENSÖR	28
2.2 DNA BİYOSENSÖRLERİ.....	31
2.2 Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapıları:	31
2.2.1 Nükleik Asitler ve DNA : (24, 94).....	31
2.2.1.1 DNA ile ilgili bazı terimlerin tanımlamaları:	34
2.2.1.1.1 DNA baz dizilerinin yazılımı ile ilgili temel bilgiler: (24).....	34
2.2.1.1.3 Nükleik asit (DNA) hibridizasyonu:.....	35
3.POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)	35
3.1 PCR'ın Temel Bileşenleri.....	38
3.1.1 Çoğaltılacak olan kalıp DNA	38
3.1.2 Taq DNA Polimerazlar	38
3.1.3 DNA primerleri	39
3.1.4 Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTP).....	40
3.1.5 Tamponlar ve MgCl ₂	40
3.2 Günümüzde En Çok Kullanılan PCR tipleri.....	41
3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonunun İşleyişi	41
3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Modifikasyonları	43
3.5 PCR' ı ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	43
3.6 Amplifiye Edilmiş Ürünlerin Saptanması	45
3.6.3 Solusyon Hibridizasyon Tekniği.....	46
3.6.4 Diğer Teknikler	46
4. DNA Biyosensörleriyle DNA Dizi Algılama Yöntemleri:	47
4.1 İndikatöre Dayalı DNA Dizi Algılama Yöntemleri:	48

4.1.1	İnterkalatör Madde ile DNA Dizi Algılama Yöntemi:	48
4.1.2	DNA bazlarının en az biriyle etkileşen bir indikatör ile:	49
4.2	İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemleri:	51
II.	BÖLÜM	52
	GEREÇ VE YÖNTEM	52
2.1	Kullanılan Kimyasallar	52
2.1.1.	Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan Meldola Mavisi hakkında..... genel bilgi:.....	52
2.2	Hibridizasyon Tayininde Kullanılan Sentetik Oligonükleotitler:	53
2.2.1	Herpes Simpleks Virüs (HSV) tayinine ait oligonükleotit dizileri:	53
2.2.2.	İndikatörsüz DNA dizi algılamasına yönelik deneylere ait oligonükleotit dizileri: 54	
2.2.3.	Akondroplazi G380R mutasyon tayinine ait oligonükleotit dizileri:	54
2.2.4.	Oligonükleotit çözeltilerinin hazırlanışı:	55
2.2.5	PCR ürünü örnek çözeltilerinin hazırlanışı:	56
2.3	Kullanılan Cihazlar	56
2.4	Kullanılan Yöntem	57
2.4.1.	Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı	57
2.4.2.	Kullanılan elektrotların hazırlanışı	58
2.4.3.1.	HSV polimeraz gen bölgesi tip1 ve tip2 ayırımında PCR ürünü örneklerinden prob dizi seçimi:	59
2.4.3.2.	Çalışma Basamakları:	59
2.4.3.3.	Prob dizisinin elektrot yüzeyine kovalent olarak modifiye edilmesi:	62
2.4.3.4	Diferansiyel puls voltametri tekniği ile MDB indikatörlüğünde hibridizasyon tayini incelenmesi:	62
2.4.3.4.1.	MDB indikatörlüğünde hibridizasyonun tayini:	63
2.4.3.4.2.	Prob derişimindeki değişimin MDB yanıtına etkisinin incelenmesi:	64
2.4.3.4.3.	Hibridizasyon zamanının MDB yanıtına etkisinin incelenmesi:	64
2.4.3.5	MDB indikatörlüğünde gerçek hasta örnekleri (PCR ürünü örnekler) kullanılarak HSV tip1 ve tip2 ayırımı:	65
2.4.3.5.1	PCR ürünü örneklerin seyrelme oranındaki değişimin HSV tip1 ve tip2 ayırımına etkisinin incelenmesi:	65
2.4.3.5.2	HSV Tip1 ve Tip2'ye ait diziyi içeren PCR ürünü örneklerde dizi tayin çalışmaları:	65
2.4.4.	İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemi:	66
2.4.4.1	CPE ile indikatörsüz DNA Hibridizasyon Tayini:	66
2.4.5.	İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemiyle Akondroplazi G380R Mutasyonunun Tayini:	67
2.4.5.1	Akondroplazi G380R Hastalığına ait PCR ürünü haritasından prob dizilerin seçimi: 67	
2.4.5.2	İnozin İçeren Prob Diziler Kullanarak Hibridizasyonun Tayini:	69
2.4.5.3	Akondroplazi G380R mutasyonunun sentetik oligonükleotitlerle tayini:	69
2.4.5.3.1	Prob derişimindeki değişimin indikatörsüz mutasyon tayinine etkisinin incelenmesi:	69
2.4.5.3.2	Akondroplazi G380R mutasyonunun hasta örnekleriyle tayini:	70
	BÖLÜM III ve IV	71
	BULGULAR ve TARTIŞMA	71
3.1.	Meldola Mavisi İndikatörlüğünde Herpes Simplex tip 1 ve tip 2 virüslerinin tayini ve ayırımı:	71

3.1.1	MDB indikatörlüğünde yapılan dizi tayin çalışmasına ait bulguların değerlendirilmesi:	71
3.1.1.1	Diferansiyel puls voltametri tekniği ile MDB indikatörlüğünde hibridizasyon tayini incelenmesi:	71
3.1.1.2	Prob derişimindeki değişimin MDB yanıtına etkisinin incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:.....	73
3.1.1.3	Hibridizasyon zamanının MDB yanıtına etkisinin incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:.....	74
3.1.2.	MDB indikatörlüğünde gerçek hasta örnekleriyle HSV tip1 ve tip2 ayırımına ilişkin bulguların değerlendirilmesi:	75
3.1.2.1	PCR ürünü örneklerin seyrelme oranındaki değişimin HSV tip1 ve tip2 ayırımına etkisinin incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:	75
3.1.2.2	HSV tip1 ve tip2'ye ait diziyi içeren PCR ürünü örneklerde dizi tayini çalışmalarına ilişkin bulguların değerlendirilmesi:	77
3.1.3.	HSV Tip1 ve Tip2 ayırımının genel değerlendirilmesi:.....	79
3.2.	İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemi:	80
3.2.1.	CPE ile indikatörsüz DNA hibridizasyon tayinine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:	80
3.3.	İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemiyle Akondroplazi G380R Mutasyonunun Tayini:	81
3.3.1	Akondroplazi G380R mutasyonunun sentetik dizilerle çalışmasına ilişkin bulguların değerlendirilmesi:.....	81
3.3.2	Prob derişimindeki değişimin indikatörsüz mutasyon tayinine etkisinin incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:	82
3.3.2.2.	Hasta örnekleri kullanarak Akondroplazi G380R mutasyonunun tayini ve Heterozigot / Homozigot ayırımına ilişkin bulguların değerlendirilmesi:.....	83
3.3.2.3	İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemi ile İnozinli Sistemde Akondroplazi G380R Mutasyonunun Saptanması:.....	84
	BÖLÜM V.....	86
	SONUÇ ve ÖNERİLER	86
	ÖZET	90
	Abstract.....	92
	Yaralanılan Kaynaklar.....	94
	Arş. Gör. Pınar KARA KADAYIFCILAR 'ın Özgeçmişi	109

ÖNSÖZ

Çalışmalarımdeki değerli katkılarından dolayı başta, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı, danışmanım, Sayın *Prof. Dr. Mehmet Emin Şengün ÖZSÖZ*'e, Anabilim Dalımızdaki diğer tüm *Öğretim Üyelerine* teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında maddi desteği için *Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı*'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her zaman desteklerini gördüğüm *tüm değerli çalışma arkadaşlarıma, ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem Hatice KARA ve eşim Fatih KADAYIFCILAR'a* teşekkür ederim.

30. 11. 2003 tarihinde kaybettiğimiz hocamız *Aycıl KAYALI* anısına.....

Ecz. Pınar KARA KADAYIFCILAR

İNCELENEN HASTALIK	KULLANILAN DNA DİZİ ALGILAMA YÖNTEMİ	KULLANILAN İNDİKATÖR MADDE	SİNYALİN VOLTAMOGRAMDA Kİ YERİ	KULLANILAN DNA MATERYALİ	SONUÇ
HERPES SİMPLKS TİP 1 VE TİP 2 VİRÜSLERİNİN BİRBİRİNDEN AYRIMI	İNDİKATÖRLÜ DNA DİZİ ALGILAMA YÖNTEMİ	MELDOLA BLUE (MDB)	- 0,12 V (MDB)	Sentetik Oligonükl eotitler + + +	MDB sinyali (prob1) < MDB sinyali (prob1+header1) MDB sinyali (prob1) ~ MDB sinyali (prob1+header2) MDB sinyali (prob2) < MDB sinyali (prob2+header2) MDB sinyali (prob2) ~ MDB sinyali (prob2+header1) MDB sinyali (prob1) < MDB sinyali (prob1+PCR ürünü) Hastada HSV tip 1 var MDB sinyali (prob2) < MDB sinyali (prob2+PCR ürünü) Hastada HSV tip 2 var
AKONDROPLAZİ G380R MUTASYONU TAYİNİ	İNDİKATÖRSÜZ DNA DİZİ ALGILAMA YÖNTEMİ	-----	1.0 V (Guanin)	+ +	Guanin sinyali (WT,MT prob) sinyal yok Guanin sinyali (WT prob+WT header) + Guanin sinyali (MT prob+WT header) sinyal yok a)Guanin sinyali (WT prob+PCR ürünü) + Guanin sinyali (MT prob+PCR ürünü) sinyal yok Sağlıklı Birey b)Guanin sinyali (WT prob+PCR ürünü) + Guanin sinyali (MT prob+PCR ürünü) sinyal yok Hasta Birey c)Guanin sinyali (WT prob+PCR ürünü) + Guanin sinyali (WT prob+PCR ürünü) + Heterozigot Birey

I.BÖLÜM

GİRİŞ ve AMAÇ

Analitik Kimyada yaygın kullanım alanı olan elektrokimyasal sensörler (elektrokimyasal algılayıcı sistemler), IUPAC tarafından şu şekilde tanımlanmıştır;

“Elektrokimyasal sensörler kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlardır” (4, 9, 23, 100).

Elektrokimyasal sensörler, yapılarına biyolojik maddeler eklendiği zaman; örneğin, enzim, hücre, doku, antikor, nükleik asit vb. elektrokimyasal sensörlerin en yaygın kullanım alanlarından biri olan BİYOSENSÖRLER oluşur (12, 23, 100, 101).

Biyosensörler, “biyo” (biyolojik kökenli) ve “sensör” (algılayıcı) kelimelerinden oluşan nitel ve nicel analiz yapabilen kompleks cihazlardır. Tanım olarak ise; “Birbiri içine geçmiş, biri biyokimyasal, diğeri elektrokimyasal iki çevirici sistemden oluşur. Biyokimyasal çevirici, analizlenecek madde ile etkileşerek onu tanır. Bu etkileşme sonucunda oluşan biyokimyasal ürün, elektrokimyasal çevirici tarafından okunabilir bir sayısal değere çevrilir (23).

Son yıllarda biyosensör tasarımında nükleik asitlerden oluşan tanıma yüzeylerinin kullanılması oldukça yaygınlaşmış ve Analitik Kimya alanında çip teknolojisine doğru önemli adımlar atılmıştır (78, 90, 91, 102). Bu çalışmalar Analitik Kimya alanı ve diğer bilimlere yeni ve ender boyutlarda özellikler eklemektedir ve gelecekte hasta başında ve doktor gözetimindeki analizlerde çok önemli rol oynayacaktır (40, 45, 50, 64, 70, 99,118).

DNA tanıma yüzeyleri içeren elektrokimyasal biyosensörler, dizisi belli genlerin hibridizasyon tayininde bu dizilere ilişkin kalıtsal ve enfeksiyon hastalıklarının tayininde ve bu yüzeyle etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojenik

maddeler, ilaçlar vs) tayininde kullanılabilir (52, 57, 58, 62, 67, 71, 76, 82). Tayinler, DNA bazlarının birinin yükseltgenme sinyalindeki (indikatörsüz yöntem) ya da bu bazlardan en az biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörünün ve ya interkalatör özellikteki bir hibridizasyon indikatörünün yükseltgenme ve ya indirgenme sinyalindeki değişikliklerden (indikatörlü yöntem) yola çıkarak yapılır (3,9-11,14, 18, 27-29, 41,47, 48, 84-86,99-102).

DNA'nın bazı kimyasal maddelerle etkileşmesi, (ilaç, radyasyon, çevresel atıklar, yiyecek katkı maddeleri, vb.) ve geliştirilen yeni yöntemlerle bunun incelenmesi; ilaç tasarımı ve tayine yönelik yeni yöntem geliştirme açısından önemlidir (5,8, 22, 39, 66, 74, 111).

Günümüzde kalıtsal ve infeksiyon hastalıkların indikatöre dayalı tanısında DNA bazlarından biriyle etkileşen örneğin Metilen Mavisi, ya da DNA çift sarmalında baz çiftleri arasına yerleşerek interkalasyon yapan örneğin Meldola Mavisi, etidyum bromür, rutenyum bipiridin, kobalt fenantrolin, akridin türevleri (9-aminoakridin, proflavin, akridin oranj vb) hibridizasyon indikatörü olarak kullanılmaktadır (27, 29-36, 53, 54, 58, 71, 73, 76, 83).

Bazı maddelerin çift sarmal DNA ile interkalasyon yapma yeteneği, yapısında bulunan düzlemsel fonksiyonel grubun DNA'nın baz çiftlerinin arasına girip yerleşmesi ile mümkündür. Bunun sonucunda oluşan ürüne duyarlı elektrokimyasal DNA biyosensörleri çeşitli hibridizasyon tayinlerinde kullanılmıştır (32, 58, 60).

DNA ile hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan madde etkileşiminin elektrokimyasal tayini; etkileşimden sonra madde sinyalindeki artma veya azalma ile tayin edilir. Bu amaçla kullanılan DNA modifiye edilmiş camsı karbon elektrotlar (GCE), kalem elektrotlar (PGE), karbon pastası elektrotlar (CPE), altın elektrotlar (AuE), perde baskılı elektrotlar (SCPE) ve asılı civa damla elektrotlar (HMDE),

incelenen maddelerin mikromolar hatta nanomolar konsantrasyonlarında bile, kısa bir biriktirme süresiyle güvenli ölçümlerini mümkün kılar (3,9-11,13-16,18, 27-29, 41, 56, 63, 69, 84-86, 97-103, 106-110, 112, 114-121).

Son yıllarda elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde, herhangi bir indikatör kullanmadan DNA bazlarından biri olan Guanin ve Adenin yükseltgenme sinyallerinden yararlanarak hibridizasyon tayini çalışmaları başlamış ve hızla ilerlemiştir. İndikatörsüz DNA hibridizasyon tayini yöntemi ile çeşitli infeksiyon ve kalıtsal hastalıkların tanısına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (11, 51, 62, 72, 73, 82, 103-106, 117).

Günümüzde çok sayıda kalıtsal hastalığa neden olan mutasyonlar artık tespit edilebilmektedir. Bu konudaki bilgilerimiz insan genom projesi devam ettikçe artmaktadır (20, 45). Bu projeye birlikte insan genomunun tüm genleri haritalanabilecek ayrıca tüm varyasyonlar belirlendiği ve farmakogenomik çalışmalar sonuçlandığı zaman, sağlık sisteminde de hızlı sonuç verebilen düşük maliyetli DNA testlerine ihtiyaç olacaktır.

Kan, serum, doku, hücre vb. gibi biyolojik materyallerden belirli bir hastalık, mutasyon gibi kalıtsal bir davranışı simgeleyen özgün DNA dizilerinin saptanma çalışmaları, son yıllarda tıp ve diğer bilimlerde önem kazanmış ve bu çalışmalar bakteri, virüs, parazit ve mantar kökenli hastalıklar ve pek çok kalıtsal hastalıklara neden olan mutasyonların saptanmasında kullanılmaya başlanmıştır.

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

Son yıllarda, çeşitli kalıtsal ve infeksiyon hastalıkların tanısı amacıyla tasarlanan ve klinik uygulamalara hazır hale gelen genomik DNA çiplerinin tasarımı nükleik asit hibridizasyonuna dayanır (90).

Dizi seçimli DNA biyosensörleri, tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştüren bir çevirim sistemi ve diziye özgün bir DNA probundan oluşur (43, 56, 66, 67, 74, 76, 95, 113-116).

Herhangi bir hastalığı, kalıtsal bir davranışı ya da bakteri ve virüslerinin patojenitesini simgeleyen bir prob DNA dizisinin, bu diziye karşılık gelen hedef diziyle oluşturduğu çift sarmalın biyokimyasal yapısı tanıma olayını mümkün kılmaktadır (7). Bu olayı ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştüren çeviricinin yüksek duyarlılığı ve hibridizasyonun yüksek seçiciliği elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin çevre analizlerinde, DNA-ilaç etkileşim tayinlerinde ve bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların tanısında kullanımını gerektirmektedir (33-36, 41, 52, 54, 63, 65 - 68, 71, 73, 82).

Elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle K. Millan ve arkadaşları tarafından, kistik fibrozis'e ait DNA dizileri kullanılarak bu hastalığın tayini yapılmıştır (77). Bu tekniği kullanarak, J. Wang ve arkadaşları *E. coli*, (112) ve *Mycobacterium tuberculosis*'e (113) ait DNA dizilerini tayin etmişlerdir.

S. Mikkelsen'in 1994 yılında yapmış olduğu, kalıtsal hastalıkların dizi seçici DNA biyosensörleriyle tayin projesi (75), Amerika Birleşik Devletleri tarafından korumaya alınmıştır (A.B.D. Patent No: 5.312.527-05/17/1994).

Son zamanlarda laboratuvarımızda yaptığımız çalışmalarla, Hepatit B ve TT Virüsüne ait gen dizilerinin, bir hibridizasyon indikatörü yardımıyla tayini gerçek hasta örnekleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (71).

DNA bazlarından en elektroaktif olan Guanin bazının yükseltgenme sinyaline dayalı İndikatörsüz DNA hibridizasyon tayini çalışmaları, J. Wang, E. Palecek, M. Mascini ve arkadaşlarının tarafından literatüre girmiştir (62, 103, 104, 106, 117).

Kanın pıhtılaşma faktörlerinden biri olan Faktör V'e ait gen dizisinin mutasyonuna yönelik laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda herhangi bir hibridizasyon indikatörü kullanmaksızın hastalık tayini gerçekleştirilmiştir (82).

Son yıllarda dünyada Çip Üzerinde Laboratuar Teknolojisi (Laboratory on a Chip) olarak adlandırılan teknik üzerinde önemli çalışmalar yapılmaktadır. Bu yeni teknolojinin amacı; tek bir çipte tüm genomun izlenmesini ve binlerce gen arasındaki etkileşmenin aynı zamanda belirlenmesini sağlayabilmektir. Bu teknolojinin esası biyosensörlere dayanmaktadır ve bu çipler küçültülmüş DNA biyosensörleridir.

Klinikte kullanım için küçük boyutlarda kullanılacak bu cihazların tasarımına ait ilk çalışmalar, Amerika Birleşik Devletlerindeki Clinical Micro Sensors (CMS) adlı Amerikan şirketi S. Mikkelsen'in kullandığı teknolojinin lisansını alması ile başlamıştır. Böylece DNA mikroçiplerinin klinikte kullanımının ilk adımları atılmış ve hizmete sunulmuştur.

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

Çalışmamızın ilk bölümünde; bir hibridizasyon indikatörü olan Meldola Mavisini (MDB) kullanarak herpes simpleks adlı virüsün (HSV) birbirinden farklı iki tipinin tip

1 ve Tip 2 tayini hem sentetik oligonükleotid dizileri kullanarak hem de polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile hasta örneklerinden kullanarak gerçekleştirildi.

Meldola Mavisinin DNA bazları arasına girip birikerek interkalasyon yapma özelliği ile hibridizasyon indikatörü olarak kullanılabilirliği grubumuzca daha önceki çalışmalarımızda tespit edilmişti (29, 31, 58).

Herpes simpleks virüsleri (HSV), büyük DNA virüsleridir, morfolojileri ve replikasyon şekilleri birbirine benzer, özellikle HSV tip 1 ve HSV tip 2' nin patojenez mekanizmaları çok benzerdir. Genom düzeyinde %50 homoloji vardır. Her iki virüs de öncelikle mukoeptilyel hücreleri infekte eder ve replike olur, sonra nöronlarda latent infeksiyon oluşturur. HSV tip 1, genellikle vücudun üst bölgesinde (ağız ve çevresi), HSV tip 2 ise alt bölgesinde (genital) infeksiyonlara neden olur (37, 59).

Çalışmamızda, bu iki tipe ait virüsün polimeraz gen bölgelerini içeren PCR ürünü örnekler E.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü tarafından çoğaltılıp, bu PCR dizisinde 4 noktada baz farklılığı gösteren 22- bp'lik bölge seçilerek prob dizi olarak dizayn edilmiştir (59).

Gerçek hasta örneklerinden tayine geçmeden önce sentetik oligonükleotidler ile en uygun koşullarda hibridizasyon ve iki ayrı tipin en iyi şekilde ayırt edilmesini sağlayacak en uygun koşullar tayin edildi. Bu koşullar saptandıktan sonra PCR ürünü örnekler kullanılarak gerçek hastalara ait tayin sağlandı.

Buna yönelik yaptığımız çalışmamızda, kalem ucu elektrodu (PGE) kullanıldı ve oligonükleotid dizilerinin elektrot yüzeyine bağlanması kovalent bağlanmayla gerçekleştirildi. Bu amaçla N-hidroksisüksinimit ve etilendiamin karbodiimid kovalent bağlayıcı ajan olarak kullanıldı.

Çalışmamızın ikinci bölümünde hibridizasyon indikatöründen bağımsız olarak DNA bazlarından biri olan guanin bazının elektrokimyasal verdiği yükseltgenme

sinyalinden yola çıkarak indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi ve bu yöntem kullanılarak Akondroplazi G380R mutasyonunun tayini hem sentetik oligonükleotitlerle hem de gerçek hasta örnekleriyle gerçekleştirildi.

Akondroplazi; otozomal dominant geçiş gösteren, ileri derecede boy kısalığı yapan ve tüm toplumlarda sıkça rastlanan bir iskelet displazisidir. Akondroplazili hastaların %90'ından fazlasında hastalığın, 4 numaralı kromozomun p kolunun 16.3 bölgesinde yer alan fibroblast büyüme faktörü reseptör 3 (FGFR3) geninin 1138. nükleotidinde yer alan guanin bazının adenin ve ya sitozine dönüşümü sonucunda mutasyonun ortaya çıktığı gözlenmiştir (88). Her iki mutasyon 380 pozisyonundaki glisin yerine arginin gelmesiyle sonuçlanır. Bu çalışmada guaninden adenine dönüşen mutasyon izlenirken sitozine dönüşen mutasyon hiçbir hastada saptanmadı. Ayrıca yapılan çalışmalarda homozigot mutasyon letal (ölümcül) olduğundan hiçbir hastada saptanmamıştır.

Çalışmada hem sağlıklı hem de mutasyonlu geni temsil eden iki tip prob dizayn edilmiştir. Bu problemler guanin yerine inozin adlı guanin analogu olan molekül içermektedir ve bu analog, kimyasal yapılarının farklılığından dolayı guaninin verdiği elektrokimyasal yanıtı vermez (103, 104). Buradan yola çıkarak bir EVET-HAYIR sistemi ile hibridizasyon ve tek nokta mutasyon tayini yapıldı. Bunun yanı sıra alınan iki tip prob kullanılmasıyla heterozigot ve homozigot ayırımı da yapıldı (51, 81).

Günümüzde kalıtsal ve infeksiyon hastalıklarının tanısı; PCR ile çoğaltma basamağının ardından; jel elektroforezi, "restriction fragment length polymorfism =RFLP" ve elektroforez basamağı, çok pahalı bir yöntem olan sekanslama yöntemiyle yada Southern Blott tekniği ile yapılmaktadır. Son yıllarda kalıtsal ve infeksiyon hastalıklarının tayininde elektrokimyasal DNA biyosensörleri de

kullanılmaya başlanmış, başta yurt dışında olmak üzere bizim laboratuvarımızda da gerçek hasta örnekleriyle tayin çalışmaları hızlanmıştır. İndikatöre dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörleri tasarımında HBV ve TTV hastalıklarının; indikatörsüz elektrokimyasal DNA biyosensörleri tasarımında ise Factor V Leiden mutasyon analizi bunlara örnektir.

Tasarımı yapılan indikatöre dayalı ve indikatörsüz elektrokimyasal DNA biyosensörünün seçimliliği, hedef dizi yerine hiçbir bazı uymayan rastgele bir oligonükleotit dizisi (nonkomplementer), PCR kör çözeltileri (hastaya ait genomik DNA hariç primerler, Taq DNA polimeraz enzimi, MgCl₂, gibi diğer tüm PCR içeriği bulunan çözelti) kullanılarak incelendi. Biyosensörün prob ve PCR ürünlerinin farklı derişimlerindeki davranışları ve tekrarlanabilirlik parametreleri incelendi.

Sonuç olarak çalışmamızın birinci bölümünde MDB kullanarak indikatöre dayalı elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle bulaşıcı bir hastalığa neden olan HSV'nin tanısı ve HSV tip 1 ve HSV tip 2 genomlarının PCR ürünü örnekleri kullanarak birbirinden ayırımı incelenmiştir. Çalışmamızın diğer bölümünde, indikatörsüz elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımı yapılmış ve bu tasarıma göre Akondroplazi G380R mutasyonu inozin kullanarak EVET-HAYIR sistemi ile heterozigot ve homozigot ayırımını tayin ederek yapılmıştır.

GENEL BİLGİLER

1.ELEKTROKİMYA

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesini ve bunun sonucunda oluşan kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalıdır (18). Elektrokimyasal tepkimeler, elektron transferi veya geçişi olan yükseltgenme - indirgenme türü tepkimeler olup

elektrokimyasal hücre adı verilen bir kapta yapılır. Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi için, incelenen maddeyi içeren bir çözelti, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrot sistemi (genellikle üçlü elektrot sistemi) ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir çevirim sistemi (transducer) gereklidir. Çözelti olarak elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla tampon çözelti kullanılır. Çeşitli elektroanalitik yöntemler ile Doğru akım (DC), Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV), Dönüşümlü Voltametri (CV) vb. de belirli potansiyel aralığında tarama yapılarak meydana gelen akım şiddeti ölçülür. Akım, difüzyona bağlı olarak oluştuğundan dolayı burada ölçülen difüzyon akımıdır. Difüzyon hızı akım ile doğru orantılıdır. Difüzyon, elektrot yüzeyinin yakınındaki difüzyon tabakasında oluşur (25).

1.1. Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları:

Bir elektrokimyasal hücrenin çalışması sırasında maddenin elektrot yüzeyine aktarımı üç şekilde gerçekleşmektedir (19). Bu kütle aktarım yolları:

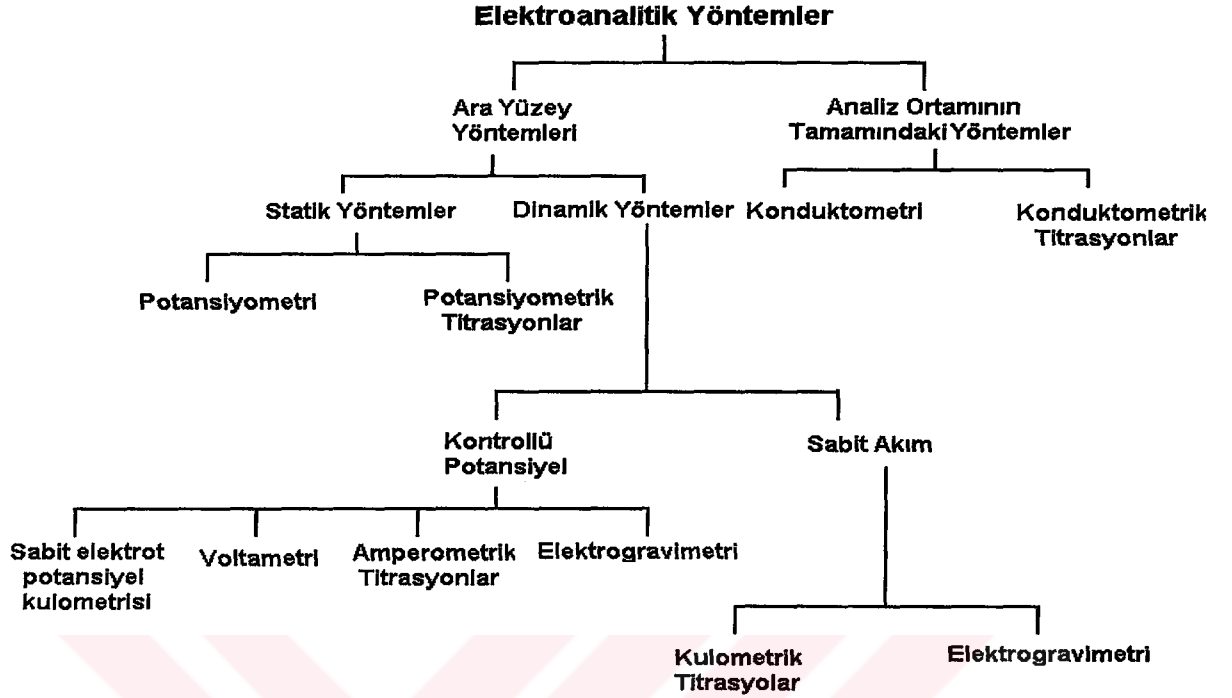
1- **Elektriksel göç (MİGRASYON):** Elektriksel alanın etkisi ile oluşan bir aktarım yoludur.

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

3- **Difüzyon:** Elektrot yüzeyindeki sıvı filmi ile çözelti arasındaki derişim farklarından kaynaklanan bir kütle aktarım yoludur.

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

Elektroanalitik Yöntemler:



1.2. Voltametri:

Elektroda uygulanan gerilimin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesine dayanan elektrokimyasal yöntem **voltametri**; uygulanan gerilimin ölçülen akım değerine karşı çizilen grafiğe **voltamogram** denir. Voltametride herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektroda uygulanabilecek gerilim aralığının sınırları, kullanılacak çalışma elektrodu, kullanılan çözelti ve elektrolitin türlerine bağlıdır.

Voltametri ilk olarak Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında voltametrinin özel bir tipi olan polarografi tekniğine dayanarak geliştirilmiştir.

Voltametri, analitik kimya, inorganik kimya, fizikokimya ve biyokimyacılar tarafından çeşitli ortamlarda oluşan yükseltgenme / indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorbsiyon işlemlerinin incelenmesi, kimyasal olarak

modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi analitik olmayan amaçlar içinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

1.2.1. Voltametricde kullanılan uyarma sinyalleri:

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

1.2.2. Voltametric Cihazlar:

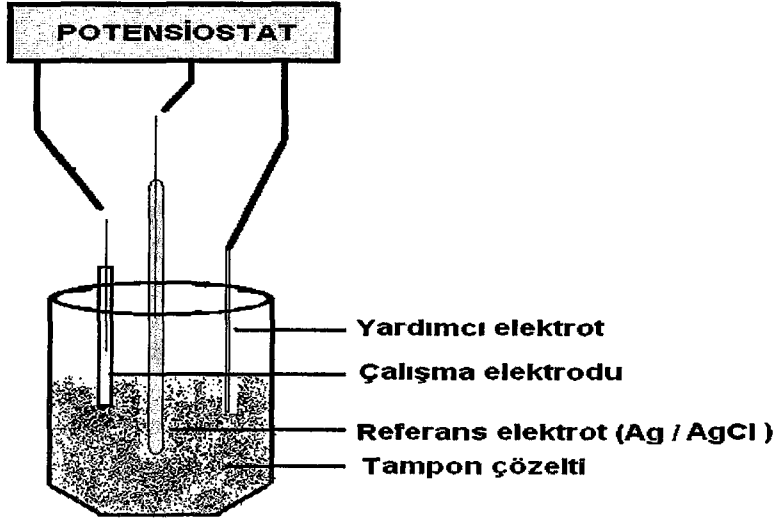
Voltametric analizde kullanılacak cihazlar, elektrokimyasal hücre, analit (incelenecek madde) ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır.

Tanım olarak;

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

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

3) Yardımcı elektrot; Platin bir tel veya bir civa havuzu şeklinde olan ve elektriğin çözelti içinden çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlayan karşıt elektrottur. Bu elektrot, çalışma elektrotu ile bir çift oluşturan fakat ölçülen potansiyelin büyüklüğünün tayininde rol oynamayan bir elektrottur. Şekil 1 üçlü elektrot sistemini göstermektedir.



ŞEKİL 1 : Üçlü elektrot sistemi

1.2.3 Voltametricde kullanılan referans elektrotlar (Karşılaştırma elektrotları) (2, 26, 38, 88, 90)

Çalışılan çözeltinin bileşimine duyarlı olmayan ve elektrokimyasal çalışmalar sırasında potansiyeli dış ortamdan etkilenmeyen elektrotlardır.

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

1.2.3.1 Referans elektrotların çeşitleri:

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

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

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

* **Civa-Civa(1)Sülfat Referans Elektrot:** Bu elektrot, doymuş kalomel elektroda benzemektedir. Potansiyeli, sülfat iyonlarının aktifliği ile tayin edilir.

1.2.4 Voltametri de kullanılan çalışma elektrotları

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

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

Kullanılan çalışma ortamına göre çalışma elektrotları için seçilen potansiyel aralıkları ; civa elektrodu için 1 M H_2SO_4 çalışma ortamında, (-0,8 V) ile (+0,4 V) aralığı ve 1 M KCl çalışma ortamında, (-1,6 V) ile (+0,2 V) aralığıdır. Karbon elektrodu için ise, 1 M HClO_4 ortamında, (+0,2 V) ile (+1,8 V) aralığı ile, 0,1 M KCl ortamında (-1,0 V) ile (+1,2 V) aralığıdır.

1.2.4.1 Karbon elektrotlar :

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

Karbon elektrotların çeşitleri:

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

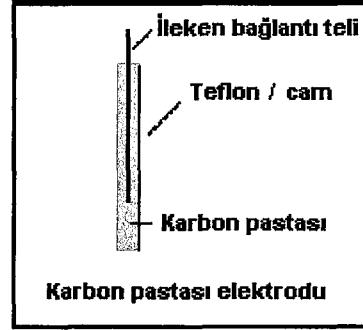
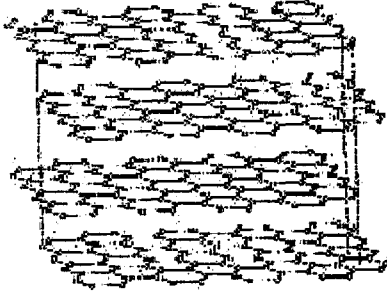
Son yıllarda tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar çok yaygın şekilde kullanım alanı bulmuştur. Özellikle biyosensör teknolojisinin geleceği olan DNA mikroçip teknolojisine uygulanabilirliği açısından oldukça başarılı sonuçlar veren bu elektrotlar geleceğin elektrotları olarak gösterilmektedir (63, 69).

*** Camsı Karbon Elektrot (GCE) :**

Camsı karbon fenol / formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin 1000°C - 3000°C arasında basınç altında karbonizasyona uğratılması ile elde edilir. Yüksek yoğunluğa sahip, küçük porlar içeren amorf bir yapıdır. Birbirinin içine geçmiş, ince, grafit benzer şeritlerden oluşmuştur. Karbon pastası elektrotlarına göre elektrokimyasal yanıt özellikleri yüzeyin çok daha pürüzsüz ve düzgün olması nedeniyle daha iyidir. Bunun yanı sıra GCE yüzeyinin fiziksel dayanıklılığı daha yüksektir.

* Karbon Pastası Elektrodu (CPE):

Grafit tozunda bulunan karbon moleküllerinin düzlemsel ve aromatik halkalar halinde dizilimi Şekil 2' de görülmektedir. Zayıf π bağları ile birbirine bağlanmış olan bu tabakalar arasında hızlı bir elektron alışverişi olabilmektedir.



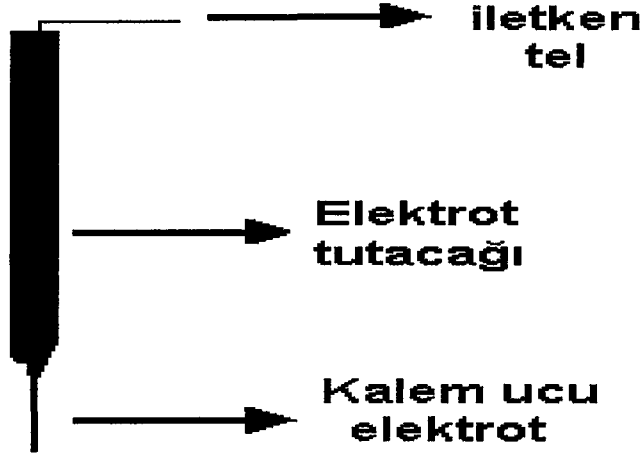
Şekil 2. Grafit tozunda bulunan karbon **Şekil 3.** Karbon pastası elektrodu.

moleküllerinin dizilimi.

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

- **Kalem Ucu Elektrodu:**

Çalışmada kullanılan kalem ucu elektrot; grafitten oluşmuş olup, Tombo HB kalem uçlarınının 3 cm boyutunda kesilmesiyle hazırlandı (108).



Şekil 4: Kalem ucu elektrot.

1.2.4.2 Civa elektrotlar:

Civa elektrotlarının voltametricde 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 pek çok metal iyonunun bir civa elektrodunun yüzeyinde amalgam oluşturmak suretiyle tersinir olarak indirgenebilmesini mümkün kılması sayılabilir.

Ancak, civanın kolayca yükseltgenmesi ve toksik bir metal olması nedeniyle, kullanımı sınırlıdır (1).

1.2.4.3 Metal Elektrotlar:

Platin ve altın en çok tercih edilen elektrot tipleridir.

1.2.4.4 Diğer elektrotlar:

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

1.2.5 Voltamogramlar:

Doğrusal taramalı voltamogramlar genellikle sigmoidal eğriler (S şeklinde) verir. Bunlar voltametrik dalga olarak bilinir. Keskin artıştan sonraki sabit akıma **sınır akımı**, i_s denir. Çünkü akım, analizlenecek maddenin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızıyla sınırlıdır. Sınır akımları genellikle analizlenecek madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve bu yüzden $i_s = k C_A$ 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 **Hidrodinamik 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.

1-Kapasitif akım (i_c) : 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 hassas ölçüm yapılır. Kapasitif akım fon akımının oluşmasına neden olan etkenlerden biridir.

2-Faradayik akım (i_f): Reaksiyondan kaynaklanan (analiz edilecek maddeden) akımdır.

$i = i_f + i_c$ olduğundan i_c azalırse 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.

1.2.6 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 = cm^2 cinsinden elektrot yüzey alanını,

D_A = A ' nın cm^2s^{-1} cinsinden difüzyon katsayısını,

C_A = mol/cm^3 cinsinden A 'nın konsantrasyonunu göstermektedir.

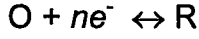
Oluşan difüzyon akımın zamana karşı fonksiyonu **COTTRELL denklemini** verir.

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

1.2.7 Elektrokimyasal Bir Olayda Faradayik İşlemler

Çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akımın iletimi sırasında, elektrotlardan

birinde yükseltgenme reaksiyonları olurken diğerinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir. Bu reaksiyonlarda ;



O ve R'nin, sırasıyla, redoks çiftinin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade ettiği tepkime ile gösterilmektedir. Termodinamik kurallarla kontrol edilen sistemlerde, elektrot potansiyeli, elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişiminin [$C_o(0,t)$ ve $C_R(0,t)$], Nernst Denkleminde (eşitlik 1.1) göre saptanmasında kullanılabilir.

$$E = E^0 + \frac{2,3 R.T}{n.F} \log \frac{C_o (0,t)}{C_R (0,t)}$$

1.1 Denklemi

E^0 = Redoks tepkimesi için standart potansiyel

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

T = Sıcaklık ($^{\circ}\text{K}$)

n = Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

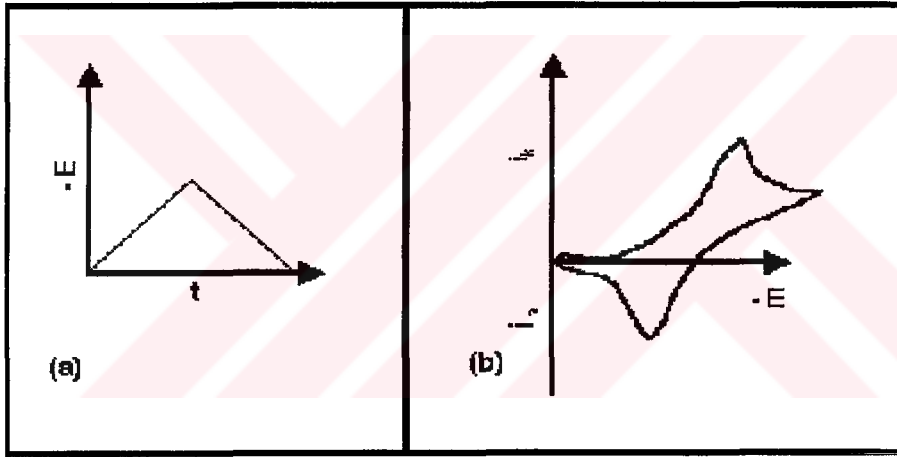
F = Faraday sabiti (96,487 coulombs)

Elektrot 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 Nerst tabakası içinde değişir.

1.2.8 VOLTAMETRİK TEKNİKLER:

1.2.8.1 Dönüşümlü Voltametri (CV):

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



Şekil- 5: (a) Dönüşümlü voltametricde elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği ; (b) Dönüşümlü voltametricde elde edilen akım-gerilim eğrisi.

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

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

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

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

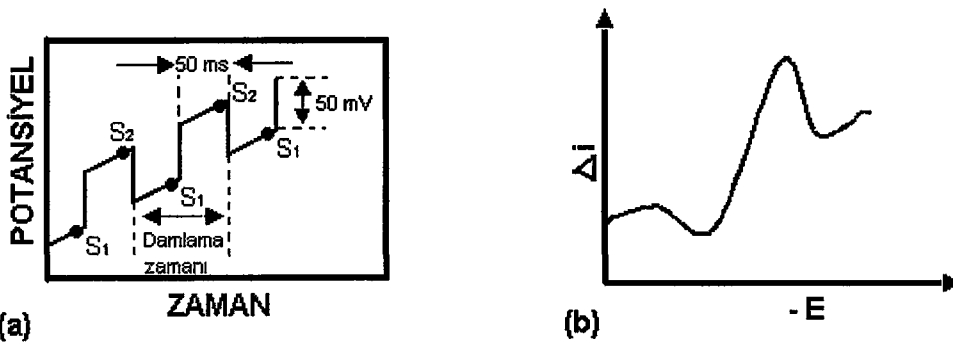
ΔE_p bu değere ne kadar yakın ise, reversible (dönüşümlü); ne kadar uzaksa irreversible (dönüşümsüz) olarak adlandırılır.

1.2.8.2 Diferansiyel Puls Polarografisi:

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

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

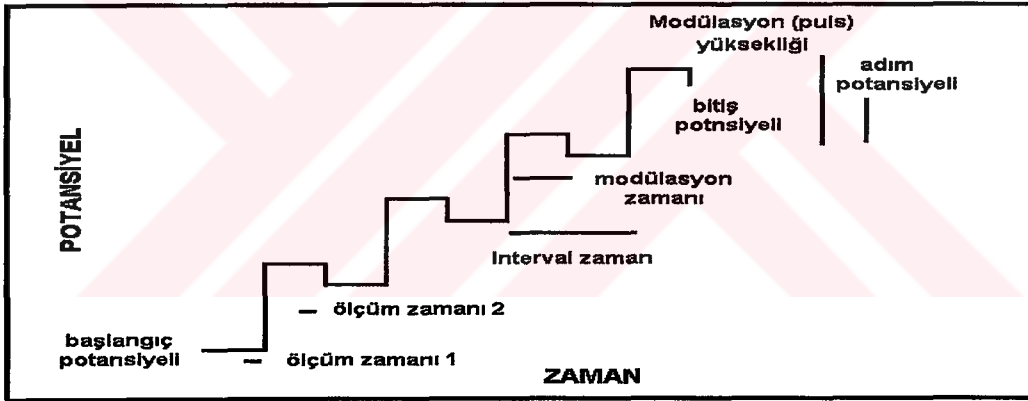
Gözlenen diferansiyel eğri pik şeklinde olup, yüksekliği konsantrasyonla doğru orantılıdır.



Şekil- 6: Diferansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri; (a) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali; (b) Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen bir voltamogram.

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

Şekil 7' de dijital cihazlarda diferansiyel puls voltametri için uyarma sinyalleri yer almaktadır.



Şekil 7: Dijital cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali.

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

Gerilim pulsu ilk uygulandığı zaman damla üzerinde yük artışı nedeniyle faradayik olmayan akımda da bir dalgalanma olur. Bu akım zamanla azalır ve yüzey alanının çok az değiştği damla ömrünün sonuna doğru sifıra yaklaşır. Dolayısıyla

akımı bu anda ölçmek suretiyle faradayik olmayan artık akım büyük oranda azaltılır ve sinyal / gürültü oranı artar. Bunun sonucunda duyarlılık da artar.

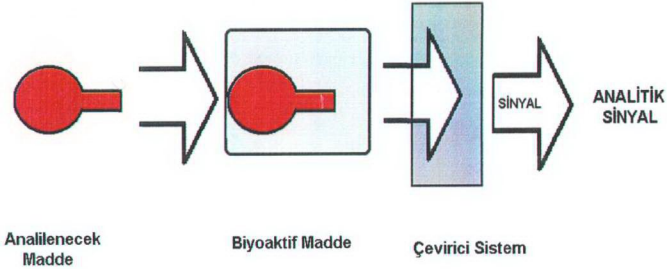
Pulsun başlangıcından önce ve puls bitiminden önce akım değerleri alınır ve farkları kaydedilir. Tayin sınırı $10^{-8}M$ 'dir. Modülasyon gerilimi sabit olduğundan dolayı kapasitif akım yaklaşık sabit baseline sahip olur ve yükseltgenip indirgenen maddeler de pik olarak görülür.

1.2.8.3 Kare Dalga Polarografisi ve Voltametrisi:

Son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir puls polarografi tekniğidir. Tersinir bir indirgenme reaksiyonunda bir pulsun boyutu, ileri tarama sırasında oluşan ürünün geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek kadar büyüktür. İleri puls bir katodik akımını (i_1), geri puls da bir anodik akımını (i_2) oluşturur. Genellikle voltamogramları elde etmek için Δi 'ler ile grafik çizilir. Akımlar arasındaki bu fark konsantrasyonla doğru orantılıdır.

2. BİYOSENSÖR

Biyosensörler biyolojik tepkimelerde hedef analitleri denetlemek için kullanılan küçük algılayıcı cihazlardır. Birbiri içine geçmiş biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi analizlenecek maddeyle etkileşerek onu tanımadır. Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Biyosensörün ikinci kısmı olan elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını okunabilir (ölçülebilir) bir sayısal değere çevirmekle görevlidir (21, 96).



Şekil 8: Biosensörün yapısı.

2.1 İdeal bir biosensörün sahip olması gereken özellikler: (42)

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

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

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

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

Stabilite: Elektrot stabilitesinin (kararlılığının) yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilite, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, ısı, nem, ortam, O₂ derişimi gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

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

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

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

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

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

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

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

2.2 DNA BİYOSENSÖRLERİ

Biyosensör tasarımında kullanılan dizi tanıma yüzeyleri, Analitik Kimya alanında yeni ve ilgi çekicidir (111). Bu tür tanıma yüzeyleri, sahip olduğumuz bilinen elektrokimyasal biyosensörlere yeni boyutlar kazandıracak ve gelecekte hasta başında veya doktor gözetimindeki analizlerde önemli bir rol oynayacaktır (113).

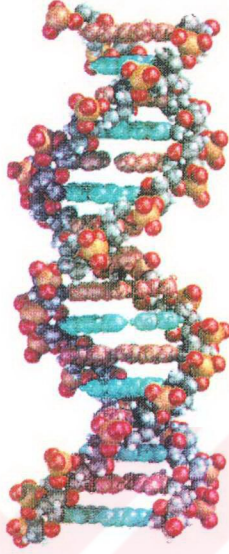
Tanıma yüzeyi olarak DNA'nın kullanıldığı biyosensörlere DNA biyosensörleri adı verilir (70, 74, 84, 91, 116). DNA tanıma yüzeyleri, dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (74, 108) veya bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinogen maddeler, ilaçlar, vb.) tayininde kullanılabilir (10, 108).

2.2 Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapıları:

2.2.1 Nükleik Asitler ve DNA : (24, 93)

Nükleik asitlerin primer yapısı, belirli tür ve sayıdaki nükleotidlerin belirli bir diziliş sırasına göre 3'-5' fosfodiester bağları ile birbirlerine bağlanarak polinükleotid zinciri oluşturmaları sonucu oluşmaktadır. Molekül içerisindeki nükleotid bağlarını parçalayan nükleaz enzimlerine **endonükleaz**, iki uçtan parçalayanlara ise **ekzonükleaz** adı verilmektedir. DNA (Deoksiribonükleik asit) moleküllerine ait X-ışınları difraksiyon verileri ve Chargaff tarafından DNA molekülünde adenin (A) ve timin (T) miktarları ile guanin (G) ve sitozin (C) miktarlarının eşit olduğu belirlenmiştir. Buna dayanarak Watson, Crick ve Wilkins tarafından 1950 yıllarında DNA yapısı için çift zincirli heliks şeklindeki yapı modeli önerilmiştir. Bazları arasında yer alan

hidrojen bağları tarafından çift sarmal DNA molekülünün iki zinciri birarada tutulmaktadır. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmal iç kısımda fosfat ve şeker omurgası ise dış kısımda yer aldığı için sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Pürin ve pirimidin nükleotidleri arasındaki eşleşmeler son derece spesifiktir (A-T ve G-C şeklinde). Bu sayede, DNA yapısında yer alan bir polinükleotid zinciri daima ikinci zincirin tamamlayıcısı olduğundan, bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde ikinci zincirdeki baz dizisi bulunabilmektedir. DNA ısıtıldığında, heliks yapısı bozularak ikiye ayrılır. Denatürasyon adı verilen DNA heliks yapısının bozulması 260 nm dalga boyunda absorpsiyon ölçülerek gözlemlenebilmektedir. G ve C arasında üç hidrojen bağı ($G\equiv C$) bulunduğundan yüksek derişimde G ve C içeren DNA iki hidrojen bağı taşıyan A ve T ($A=T$) bulunduran DNA yapısına göre daha yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır. Uygun şartlar altında çift zincirli DNA tekrar oluşabilir, bu işlem renatürasyon olarak isimlendirilir.



Şekil-9: DNA çift sarmal yapısı

Çift sarmal şeklindeki molekülün bir zinciri 5' → 3' yönüne doğru, diğeri ise 3' → 5' yönüne doğru olduğu için ters yönde paraleldir. Heliks içinde, iki zincirin arasındaki üç boyutlu sistemdeki ilişki, büyük oluk (majör) ve küçük oluk (minör) oluşturmak şeklindedir. Molekülündeki zincirler, çift sarmalın dış yüzeyindedir. Bu zincirlerden her biri kovalent bağlılığı sağlayan fosfodiester köprülerinin bulunduğu fosfat ve pentoz gruplarından oluşmuştur. DNA çift sarmalın her iki zinciri, pürin ve pirimidin bazlarının arasındaki hidrojen bağları ile bir arada tutulmaktadır.

Watson ve Crick tarafından 1953 yılında önerilen ilk DNA yapısı, sağa doğru yönelmiş, her dönüşte 10 nükleotidi bulunan ve küçük oluğa mükemmel yerleşen bağlı su ile stabilize olabilen yapıya sahiptir. DNA dehidrate edildiği zaman, yapısal değişikliğe uğrayarak A-DNA adını almaktadır. A-DNA da sağa doğru yöneliktir ve

her dönüşünde 11 nükleotid bulunmaktadır. Çift sarmalın çapı, pentoz gruplarının yapılanmasıyla genişlemektedir. Bu durumun bir sonucu olarak DNA'nın boyu kısalmaktadır (10).

2.2.1.1 DNA ile ilgili bazı terimlerin tanımlamaları:

2.2.1.1.1 DNA baz dizilerinin yazılımı ile ilgili temel bilgiler: (24)

Oligonükleotid: Birden fazla bazın yan yana gelmesiyle oluşur.

Dinükleotidler; İki bazın yanyana gelmesiyle,

Trinükleotidler; üç bazın yanyana gelmesiyle oluşur.

Tekrarlayan oligonükleotidler: Polimer içindeki tekrarlayan oligonükleotidler, tekrarlayan tek bir bazı, tekrarlayan iki bazı ve ya üç bazı ifade eder. Tekrarlayan mononükleotide poly (A), dinükleotide poly (AT), trinükleotide poly (GAT) örnek verilebilir.

Çift sarmal tekrarlayan polimerler: Nokta ile ayrılarak ifade edilen baz çiftlerinden oluşan ve 5' → 3' polaritesine sahip polimerlerdir.

Örneğin mononükleotid gösterilişine, **poly(A).poly(T)** (veya **poly(dA).poly(dT)** şeklinde gösterilebilir), dinükleotid'e **poly(AT).poly(AT)**, trinükleotid'e **poly (GAT).poly (ATC)** örnek verilebilir.

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

Prob : Baz dizisi belli olan oligonükleotid.

Hedef dizi (Target) : Prob dizisinin karşılığını içeren oligonükleotid.

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

Rastgele dizi (Non complementary) : Hedef diziden tamamen farklı baz

dizilimine sahip dizi içeren oligonükleotid.

2.2.1.1.2 İnterkalasyon:

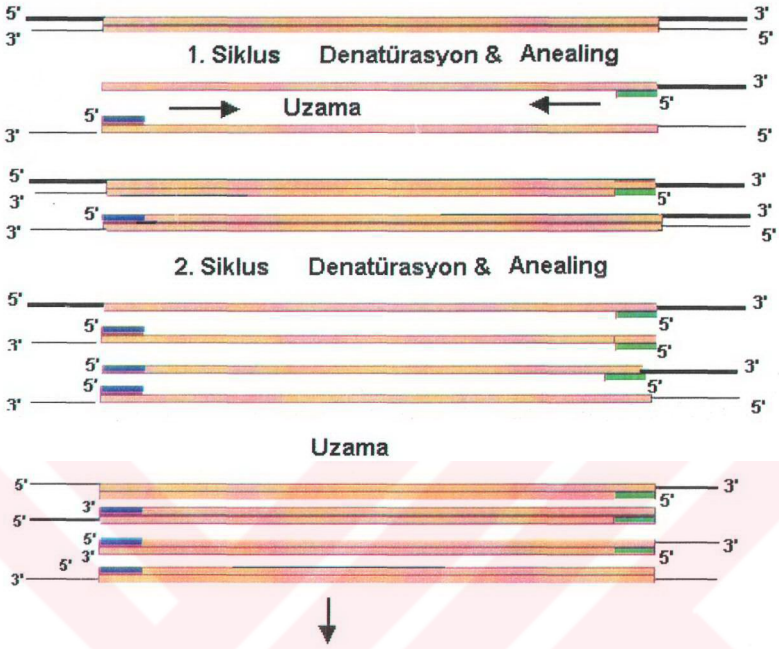
Düzensel bir halka sistemine sahip olan bazı maddelerin DNA baz çiftleri arasında yerleşerek, güçlü bir şekilde bağlanması olayıdır (5, 33). Maddenin yapısına bağlı olarak, bu etkileşim tersinir ya da tersinmez şekilde gerçekleşmektedir. İnterkalasyon, DNA' da zincir kırılmasına yol açarak ve DNA senteziyle DNA' ya bağımlı RNA sentezini bozmaktadır. Bu maddeler Topoizomeraz (II) enzimini inhibe ederler. İnterkale olabilen bazı ilaçların etki mekanizmaları da bu şekilde açıklanmaktadır.

2.2.1.1.3 Nükleik asit (DNA) hibridizasyonu:

Nükleik asit hibridizasyonu, baz çiftlerinin özel hibridizasyon koşullarına bağlı olarak kararlı bir dupleks molekülü oluşturmasıdır (7).

3.POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

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



Şekil 10: Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik gösterimi.

In vitro koşullarda, istenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin, çok sayıda kopyasının elde edilebilmesi için, 1985 yılında Cetus firması araştırmacılarından Kary Mullis, mevcut yöntemlerin duyarlılıklarının artırılmasından ziyade, DNA ve RNA baz sıralarının amplifikasyon teknolojisine yani baz sıralarının sayısal olarak artırılmasına dayanan ve dolayısıyla da mevcut yöntemlerle analiz edilebilmelerini sağlayan, '**Polimeraz Zincir Reaksiyonu**' (**Polymerase Chain Reaction, PCR**) 'nu geliştirmiştir.

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

bir şekilde çoğaltmak mümkündür (46, 79-80).

PCR, hücre içinde oluşan DNA replikasyonunda olduğu gibi, replikasyon sürecini taklit ederek yaklaşık 30 jenerasyon sonra, seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katını kopyalar. Aslında PCR'a, DNA çoğaltma yöntemi demek daha doğru olur. Çünkü bu yöntem ile RNA çoğaltılması yapılmak istenirse, önce Revers Transkriptaz kullanılarak hücre içerisinde (sitoplazmada) cDNA (komplementer DNA) oluşturulur. Yani revers transkripsiyon gerçekleşikten sonra PCR gerçekleşir (46).

Günümüzde polimeraz zincir reaksiyonu;

• Allelik dizi varyasyonlarının gösterilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesi,

• Doğum öncesi dönemde fetusta genetik hastalıkların araştırılması,

• Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi(analık-babalık tayini) gibi tıbbın diğer kollarında,

• Genomik foot printing denilen genomik ayak izi analizlerinde,

• Tarımda; tohum saflığının belirlenmesinde,

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

• DNA'nın in vitro mutagenezi yöntemiyle DNA'da mutasyon oluşturup etkisinin araştırılmasında,

• İnfeksiyon hastalıklarının teşhis ve tedavisinde,

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

• Global gen ekspresyonlarında ve RNA transcript yapısı analizlerinde,

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

3.1 PCR'in Temel Bileşenleri

Polimeraz zincir reaksiyonu'nun çalışma prensibi oldukça basittir ve özetle, çeşitli materyallerden izole edilen çift iplikli bir DNA molekülünün denatürasyonu, hedef dizilerine iki oligonükleotid primerinin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra primer adı verilen spesifik kısa zincirli oligonükleotidler, tek iplikli DNA molekülü üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin, spesifik olduğu hedef dizilere bağlanması ve uzaması daha düşük sıcaklıkta gerçekleşir. Böylece hedef bölgelerin sayısal çoğaltılması (amplifikasyon) sağlanır.

PCR'in çalışma prensibini daha iyi anlayabilmek için, PCR'in temel bileşenlerini bilmek gerekmektedir. PCR'in temel bileşenleri şunlardır:

3.1.1 Çoğaltılacak olan kalıp DNA

PCR için her türlü biyoloji kaynaktan temin edilmiş genomik DNA'lar, plazmid ve faj DNA'ları, çeşitli genler ve hatta herhangi bir DNA parçası kalıp olarak kullanılabilir.

3.1.2 Taq DNA Polimerazlar

DNA polimeraz enzimleri, kalıp ipliğın karşısına tamamlayıcı bir DNA ipliğini meydana getirmek üzere, orijinal kalıp iplikteki baz bilgisini kullanarak, dört çeşit deoksiribonükleotid trifosfattan, uzun polinükleotid zincirin sentezini katalizler. Bu enzimler, sentezi başlatmak primerlere gerek duyarlar. Sentezin yönü 5'→3' şeklinde olup, primerin serbest 3'-hidroksil ucuna ortamdaki dNTP'lerin nükleofilik etki yapmalarıyla, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır.

Termostabil DNA polimeraz enziminin PCR'da kullanılmaya başlanması

araştırma ve klinik laboratuvarında rutin olarak yapılan deneylere teknolojik olarak büyük bir avantaj sağlamıştır. Termostabil enzimlerden ilki ve en yaygın olarak kullanılanı *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA Polimeraz 'dır. Taq polimeraz'ın 95°C'de yarı ömrü yaklaşık 40 dakikadır.

Bunun dışında;*T.aquaticus*'dan Amplitaq Polimeraz, *T.flavis*'ten Hot Tub Polimeraz ve Pyrotase Polimeraz, *T.thrmophilus*'dan TTh Polimeraz, *Pyrococcus furiosus*'dan Pfu Polimeraz, *Thermococcus litoralis*'ten Vent Polimeraz gibi diğer termostabil enzimlerde kullanılmaktadır.

3.1.3 DNA primerleri

Sentetik olarak kolayca hazırlanabilen tek iplikli spesifik DNA segmentleridir. Kullanılma amaçlarına göre, 10-40 oligonükleotidden oluşmuştur. Bunlar, hedef DNA üzerinde kendine komplementer olan baz sıralarını bularak onlara bağlanır ve 3'OH ucundan DNA sentezinin ilerlemesini sağlarlar. Primerlerin yapısında %50-60 kadar G+C bazları bulunmaktadır. Bu da hedef DNA ile daha kuvvetli bağların kurulmasına yardımcı olur. Primerlerin 5' ucu, hedef DNA'nın 3'-ucu ile birleşerek, polimerizasyon için 5'→3' yönünde uygun bir ortam sağlamaktadır. Yeni bazlar, primerin 3'-ucuna kalıp DNA örnek alınarak seçilir ve ilave edilir. Bu uçtaki tek bir uyumsuzluk polimerizasyonun etkinliğini azaltır.

Konvansiyonel PCR'da ideal bir primer hazırlığında uyulması gereken basit kurallar:

- Primerlerin uzunluğu 17-28 arasında olmalıdır.
- Baz içeriğinin %50-60'ı (G+C) olmalıdır.
- Primerlerin 3' ucu (ya G), ya (C) veya (ya CG), ya (GC) ile bitmelidir.

Böylece DNA uçlarının açılıp özgüllüğü azaltmasını engeller.

- Tm değerleri 55-80°C arasında olmaları tercih edilir.
- 3' uçlarında primerlerin birbirlerine komplementer olmamalıdır.
- Primerin kendi içinde eşleşmesine (hibridizasyon) yol açabilecek baz dizileri olmamalıdır. Aksi halde ikincil yapılar oluşarak PCR'ı engeller.
- 3' uçta 3 tane C yada G olması durumunda primer nonspesifik bile olsa, DNA'ya stabil bir şekilde bağlanır ve istenmeyen amplifikasyonlar oluşur.

3.1.4 Deoksinükleotid Trifosfatlar (dNTP)

Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP,dGTP,dTTP,dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek ya da dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanır. Her deoksinükleotid derişiminin 20-200 µM arasında olması ürün, özgünlük ve doğru sonuç açısından optimal denge sağlar. Taq DNA polimeraz düşük dNTP derişimlerinde (10-100 µM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı olmakla birlikte, normal koşullarda PCR 100µM dNTP derişimi ile gerçekleştirilir.

3.1.5 Tamponlar ve MgCl₂

PCR'da kullanılan çeşitli tamponlar arasında genelde önerilen PCR tamponu 20°C 'de 10-50mM Tris-HCL'dir.Tris bir dipolar iyonik tampondur ve ısıl döngüsü sırasında pH'ı 6.8-7.8 arasındadır.

Magnezyum derişimi, primer eşleşmesini, ürün özelliğini, primer-dimer formasyonunu etkileyebilir. Ayrıca, Mg²⁺ iyonları dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluştururlar, polimeraz aktivitesini stimüle ederler, çift iplikli DNA'nın Tm değerini (denatürasyon sıcaklığı) artırırılar. Düşük Mg²⁺ derişimi, ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg²⁺ derişimi ise spesifik olmayan ürün birikimine yol açar.

3.2. *Günümüzde En Çok Kullanılan PCR tipleri*

- Konvansiyonel PCR
- Multipleks PCR
- Reverse transkriptaz-PCR
- AP-PCR yada RAPD-PCR
- Asimetrik PCR
- PCR-RFLP
- Species-Spesific-PCR
- Long-Distance-PCR vs. sayılabilir.

3.3 *Polimeraz Zincir Reaksiyonunun İşleyişi*

Termostabil DNA polimerazlarının ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süreler için otomatik olarak ayarlayabilen PCR aletlerinin (Thermal Cycler) kullanıma sunulması önemli gelişmelere yol açmıştır. PCR, 0.2 veya 0.5 ml'lik mikro tüplerde gerçekleştirilir. Bir PCR döngüsü denatürasyon, Primerin bağlanması (Annealing), ve Uzama (Extension) olarak adlandırılan 3 aşamadan oluşur.

3.3.1 Hedef DNA'nın Denatürasyonu: Denatürasyon, nükleik astin iki iplikçığının birbirinden ayrılarak tek iplikçik haline gelmesi işlemidir. Başlangıç denatürasyonu için tüm genomik DNA gibi kompleks kalıpların denatüre olmasını sağlamak üzere, ısı 95°C 'ye yükseltilecek bu ısıda hedef DNA'ların denatürasyonu sağlanır. Ancak PCR sırasında genellikle etkin denatürasyon sıcaklığının 92-95 °C olduğu saptanmıştır. Bu ısı işlemi için, materyalin türüne göre değişmek üzere 3-5 dakika kadar bir süre yeterli olmaktadır.

3.3.2 Primerlerin Bağlanması (Annealing): Denatürasyon işlemi bittikten sonra; ısı 55-60°C'ye düşürülür ve primerlerin her biri komplementeri olduğu tek iplik

hedef DNA üzerindeki spesifik bölgelerine bağlanırlar. Böylece, primerlerin kendine ait 5'-ucu ile hedef DNA'lardan birinin 3'-ucuna bağlanarak, polimerizasyon için 5'→3' yönünde uygun bir ortam oluşur.

Eşleşme için birkaç saniye yeterlidir. Primer eşleşmesi için gereken ısı ve süre, amplifikasyon primerlerinin konsantrasyon ve uzunluklarına bağlıdır. Primerlerin bağlanması aşamasında **Tm (Denatürasyon Sıcaklığı)** 'in, **Ta (Bağlanma Sıcaklığı)** 'ya oranın saptanması, PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle başarılı bir PCR için (Tm / Ta)'nın doğru hesaplanması gerekir. Primerin Tm değerlerinin hesaplanması için kullanılan çeşitli formüller arasında en yaygın kullanılan aşağıdaki formüldür.

$$Tm = [(A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2^{\circ}C + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4^{\circ}C]$$

Uygulanabilir eşleşme ısı, amplifikasyon primerlerinin doğru Tm değerlerinin 5°C altındadır ve daha sonra optimim sıcaklık değeri denenerek saptanır.

3.3.3 UZAMA (“Extension”) : Kalıp DNA'ya primerlerin bağlanması gerçekleştikten sonra ısı hemen 70-72°C'ye çıkarılır. Bu ısıda çalışan Taq DNA polimeraz, primerlerin 3'- ucuna nükleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA dizisinin bir kopyası elde edilir. Reaksiyonda, hedef DNA'nın tek iplikçik dizileri kalıp ödevi görür. Uzama, bağlanma olduğu anda başlar. Sıcaklık 70°C'ye yaklaştığında termal DNA polimerazlar en aktif hallerine geçerler ve baz uzaması 100 baz/saniye'ye ulaşır.

Uzama süresi, hedef dizinin konsantrasyonu ve uzunluğuna bağlıdır. Uzama aşamasında genellikle Taq/Amplitaq DNA Polimerazların polimerizasyon aktivitesi için en uygun sıcaklık derecesi olan 72°C kullanılır.

Bu üç aşamanın defalarca tekrarlanmasıyla DNA fragmanları üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni bir döngü sonucu sentezlenen ürünün ardışık döngüde diğer

primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PCR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır.

Potansiyel olarak her döngünün %100 verimle gerçekleştiği varsayılırsa, örneğin 20 döngü sonucu 2^{20} kat ürün meydana gelir.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Modifikasyonları

Polimeraz zincir reaksiyonunun bir çok modifikasyonları yapılmıştır. Bunlardan çok önemli bazılarının çok kısa olarak çalışma mekanizmaları aşağıda bildirilmiştir.

- Invers (Tersine Dönmüş) Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- Asimetrik Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- In Situ Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- Hot Start Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- Nested Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- RNA'nın Amplifikasyonu

3.5. PCR' İ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

PCR' ın çok yaygın kullanılmasına karşın, reaksiyon sırasında oluşan bazı hatalar negatif veya pozitif yanlış değerlendirmelere neden olmaktadır. Bunların en düşük düzeye indirilmesi araştırmacıların ve laboratuarda çalışan teknik elemanın esas görevleri arasında olmalıdır. Ancak bunların bir kısmı temiz çalışmamaktan kaynaklanmakta, diğer bir bölümü de çalışanların bilgisi dışında oluşmaktadır. Bu hataların neler olabileceğini iyi bilen teknik kadro böyle olumsuz durumları en az

düzeve indirebilir. PCR' ı etkileyen faktörleri gruplara ayıracak olursak :

- Denatürasyon Sıcaklığı ve Zamanı
- Bağlanma Sıcaklığı ve Süresi
- Primerler ve Primer Uzunluğu
- Mg^{+2} Derişimi
- Döngü Sayısı

PCR'ı Etkileyen Diğer Etmenler

Laboratuvarda kullanılan bir çok bileşikler PCR'da amplifikasyonu önlemekte veya olumsuz yönde gelişmesini sağlamaktadır. Bunlar arasında deterjanlar, chelating ajanlar (EDTA), proteinazlar, kanser kematerapötik ajanları, belli başları arasındadır. Bunlar reaksiyon sırasında DNA veya RNA ile bağlanabilir veya bazlar arasına girerek sonucu olumsuz yönde etkileyebilir.

Her ne kadar PCR'da ısıya dayanıklı termostabil enzimler kullanılmakta ise de, bunların etkinliklerinin, yüksek ısıdaki yarı ömürlerinin çok iyi saptanması ve ondan sonra kullanılmaları şarttır.

PCR'da en fazla görülen hatalardan biri de; nonspesifik DNA'ların amplifiye olması ve sonuca etkilemesidir.

Kontaminasyon problemini minimal düzeve indirebilmek ve bu düzeyde tutabilmek için fiziksel, kimyasal ve enzimatik kontrollere ve özel önlemlere gereksinim vardır.

Primerlerin yanısıra reaksiyon ortamına katılan nükleotidler ve solüsyonların da dikkatle seçilmesi ve kullanılmasına azami özen gösterilmelidir. Bunlar kesinlikle kontamine olmamalıdır.

Hedef DNA'ların amplifikasyonunda iyi seçilmemiş bazlara sahip prob'ların hazırlanmasının da rolü büyük olmaktadır. Son yıllarda amplifiye edilen ürünlerin

sterilizasyonuna yönelik bazı teknikler geliştirilmiş ve başarı ile kullanıldığı anlaşılmıştır.

Laboratuvarlarda steril koşullara uyulmadığı durumlarda kontaminasyonlar olmakta ve fazla kullanılan pipet, solüsyon, reagent, kimyasal, vs.'de bulaşmalar görülmektedir. Bunlar da, işaretli prob'lar veya primerler aracılığı ile amplifiye olmaktadır.

3.6 Amplifiye Edilmiş Ürünlerin Saptanması

PCR 'dan amplifiye edilmiş ürünlerin ortaya konulması önemli ve yapılması gereken bir işlemdir. Bu amaçla başlıca 4 tür uygulama kullanılmaktadır.

3.6.1 Ethidium Bromide 'le Bantların Boyanması: Reaksiyon tüplerinde bulunan amplifikasyon ürünleri, burada direkt olarak agaroz jel elektroforezine tatbik edilir. Bu ortamda, ürünler molekül kütlelerine göre bir ayırma tabi tutulur. Bu işlem sonunda, jel, Ethidium Bromide solüsyonuna daldırılarak, oluşan bantlar görülür hale getirilirler. Meydana gelen bantlar, bilinen marker'larla karşılaştırılarak bir değerlendirme yapılır. Çok basit ve aynı zamanda kolay olmasına karşın bu tekniğin bazı dezavantajları vardır. Bunlardan biri, boyama tekniğinin sekans spesifitesi zayıftır. Çünkü, istenmeyen veya ilgisi olmayan DNA'nın amplifikasyon bantlarını ortaya koymamaktadır. Spesifik olmayan DNA'lar da amplifiye olabileceğinden bunlar bant analizleri ile belirlenememektedir. Her ne kadar, kontrol setler kullanılsa bile yine de böyle sorunlar ortaya çıkmaktadır.

3.6.2 Southern Blot Analizi: Amplifiye olmuş ürünler agaroz jel elektroforezine tabi tutularak molekül kütlelerine göre bir ayırma tabi tutulur. Bu aşamadan sonra ürünler; agaroz jel'den katı ortama (nitrosellüloz filtre veya naylona) transfer edilir (elektrotransfer). Bu katı ortam üzerinde denatüre ve fikse edildikten

sonra işaretli (^{32}P , biotin, vs.) spesifik prob'larla hibridizasyona tabi tutulur ve sonuçlar otoradiografi veya biotin kullanılmış ise renk indeksine göre değerlendirilir. Film üzerinde siyah lekelerin (bant'lar) bulunması hedef DNA'nın amplifiye olduğunu ortaya koyar. Southern Blotting tekniğinin hassasiyeti ve spesifitesi daha yüksektir. Ancak bu teknoloji de zaman alıcı ve fazla iş gerektirir.

3.6.3 Solusyon Hibridizasyon Tekniği

Daha az olarak baş vurulan bu teknikte amplifiye edilmiş DNA ürünleri işaretli prob'lar , uygun NaCl yoğunluğuna sahip bir hibridizasyon solüsyonu içinde bir araya getirilirler. Karışım 95°C de denatüre edilerek DNA iplikçikleri birbirinden ayrılır. Isı $50-60^{\circ}\text{C}$ 'ye düşürülerek spesifik problemlerin sekanslara bağlanması sağlanır. Bu karışım poliakrilamid jel elektroforezine (PAGE) tabi tutularak ayrılır. Jel içerisinde DNA - DNA hibrid molekülleri büyük olduğundan ve yavaş harekete sahip olduklarından başlangıçta yer alırken, küçük moleküller (birleşmemiş prob'lar, tek iplikçik DNA, vs) daha hızlı olduklarından karşı uçta lokalize olur. Bundan sonraki işlemler aynen Southern Botting'de olduğu gibi yürütülür ve değerlendirilir.

3.6.4 Diğer Teknikler

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

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

Hibridizasyon Proteksiyon Testi de aynı amaç için denenmiştir. Bunda, ayrıca, dijital okuma sistemleri de bulunmakta ve süre çok kısalmaktadır. PCR ürünlerini

saptamada son yıllarda nonizotopik problemlerin kullanılması yönünde bir eğilim bulunmaktadır. Biotin veya digoxigenin'le işaretlenmiş problemleri hazırlamak daha kolay ve daha uzun süre de kullanıma olanağı sağlamaktadır.

Amplifiye edilmiş PCR ürünleri laboratuvarımızda DNA Biyosensörleriyle tayin edilmektedir.

4. DNA Biyosensörleriyle DNA Dizi Algılama Yöntemleri:

Çeşitli yöntemlerle biyolojik örneklerden özgün DNA dizisi saptanması biyomedikal alanda çok önemlidir (94). Hastalık tanısında insan, virüs ve bakteri baz diziliminin tayini ile pek çok kalıtsal hastalıklara neden olan mutasyonlar artık saptanabilmektedir.

Hibridizasyon tayinlerinde kullanılan çeşitli immünokimyasal ve voltametrik metodlar karşılaştırıldığında birkaç örneğin çalışıldığı durumda voltametrik yöntemlerin daha hızlı yanıt verdiği gözlenir, ancak büyük miktarda bir seri benzer örnek analizlenecekse, iyi bir otomasyona sahip EIA gibi immünokimyasal tekniklerin kullanılması daha uygun olmaktadır (86).

Diziye özgün DNA biyosensörleri, bir çevirim sistemi ile beraber DNA probundan oluşmuştur. DNA biyosensörlerinin esası, DNA bazlarının hibridizasyonuna dayanır (44, 113, 117).

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri, aranan hedefin baz dizisinin karşılığı olan 20-40 baz gibi kısa bir baz dizimine sahip olan sentetik tek sarmallı DNA (ssDNA) oligomerin (veya "PROB" olarak isimlendirilir), elektrot yüzeyine bağlanmasına dayanmaktadır. Hedefi içeren bir örnek çözeltisine sensörün uygulanması, ile elektrot yüzeyinde hibrit oluşur. Elektrokimyasal ölçümlerde elektrot yüzeyinde oluşan hibrit iki yöntemle tayin edilir; bunlardan ilki bir elektroaktif indikatör aracılığıyla (örneğin bir redoks-aktif katyonik metal kompleksi) yapılan tayindir. Bu yöntemde yüzeyinde hibrit

oluşan elektrot indikatörü içeren çözeltiye daldırılır ve indikatörün hibrite bağlanma düzeyi belirlenir (26-32, 58, 76, 81, 114).

Diğer yöntem ise DNA bazlarından en elektroaktif olan Guanin bazının 1.0 V' da verdiği yükseltgenme sinyalinin farklılanmasından yola çıkılarak yapılan tayindir (11, 62, 72, 73, 117).

4.1 İndikatöre Dayalı DNA Dizi Algılama Yöntemleri:

İndikatöre dayalı DNA dizi algılanması, ya DNA'ya interkale olabilen (metal kompleksleri, antibiyotikler) (6, 15-17, 49, 64, 65, 76, 113) veya DNA dizisindeki bazlarla özgün olarak etkileşen (MB, Ru(bpy)₃³⁺, vb.) elektroaktif maddeler (indikatör) ile tayin edilebilmektedir (30-33, 41, 58, 92, 112). Elektrokimyasal çeviriciler, hibridizasyon olayını analitik sinyale çevirmede etkin bir şekilde kullanılmaktadır (16,17, 20, 21, 23, 53).

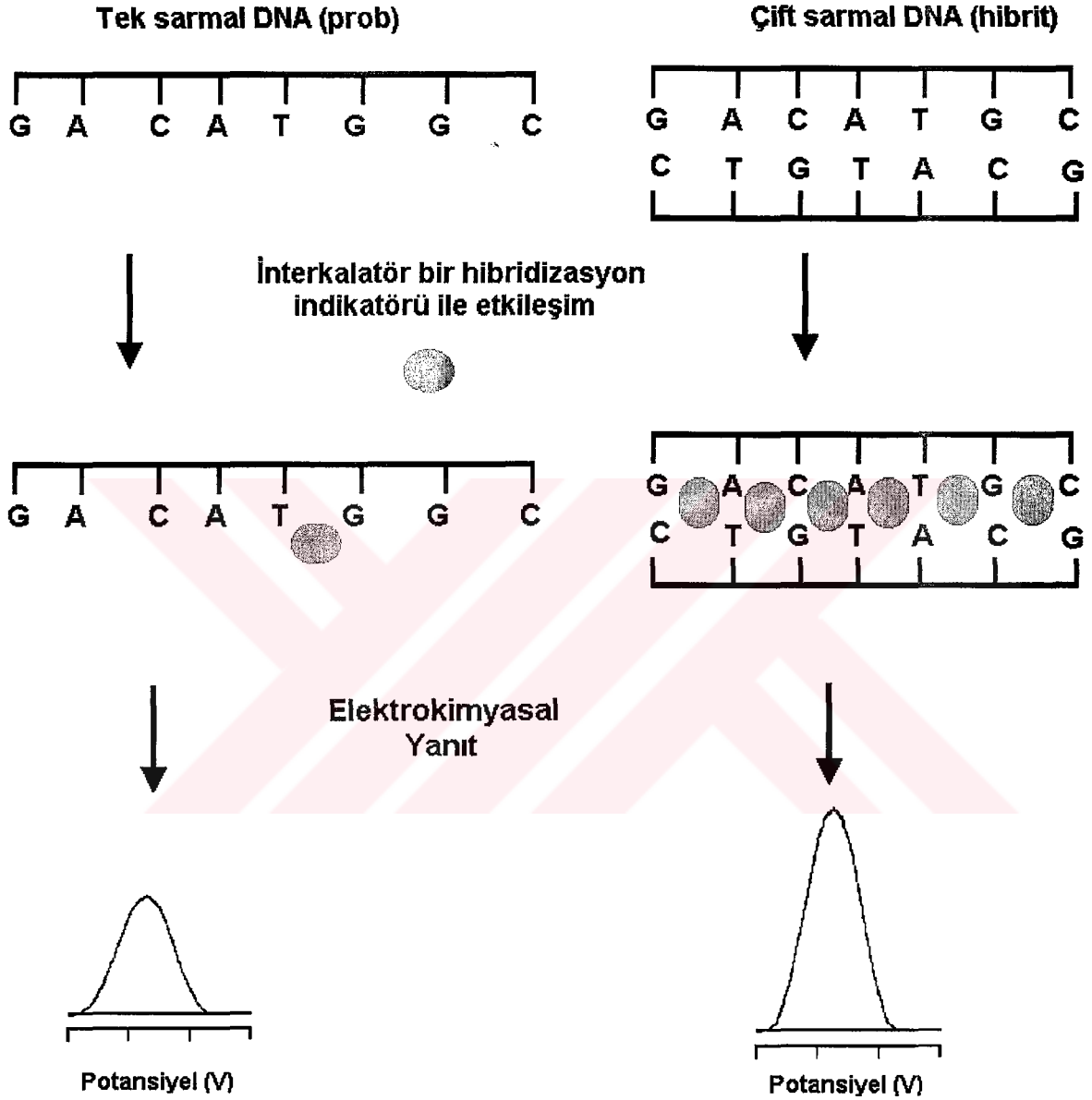
Elektrot yüzeyinde oluşan hibrit ile etkileşen indikatörün neden olduğu artan veya azalan elektrokimyasal yanıt hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır (27, 28, 53, 74, 77, 100, 111).

Elektroaktif bir maddenin indikatör olarak kullanılabilmesi için ssDNA ve dsDNA ile etkileşimi sonucu alınan yanıtlar arasında anlamlı bir fark olması gerekmektedir. Ru(II) (6, 48, 49), Co(III) (15-17, 92), Os(II), Os(IV) (64, 65, 92)' ün 1,10-fenantrolin ve 2,2'-piridin kelatları hibridizasyon indikatörü olarak sıklıkla kullanılan maddelerdir.

4.1.1 İnterkalatör Madde ile DNA Dizi Algılama Yöntemi:

İnterkalasyon; bir maddenin DNA çift sarmalı arasına girip birikmesidir. Bu durumda; Şekil 11' de gözlendiği gibi; çift sarmal DNA (dsDNA) ile etkileşimden sonra alınan madde sinyali maddenin birikmesinden dolayı tek sarmal DNA (ssDNA) ile

etkileşimden sonra alınan madde sinyaline göre oldukça yüksektir (6, 15-17, 32, 48, 49, 58).

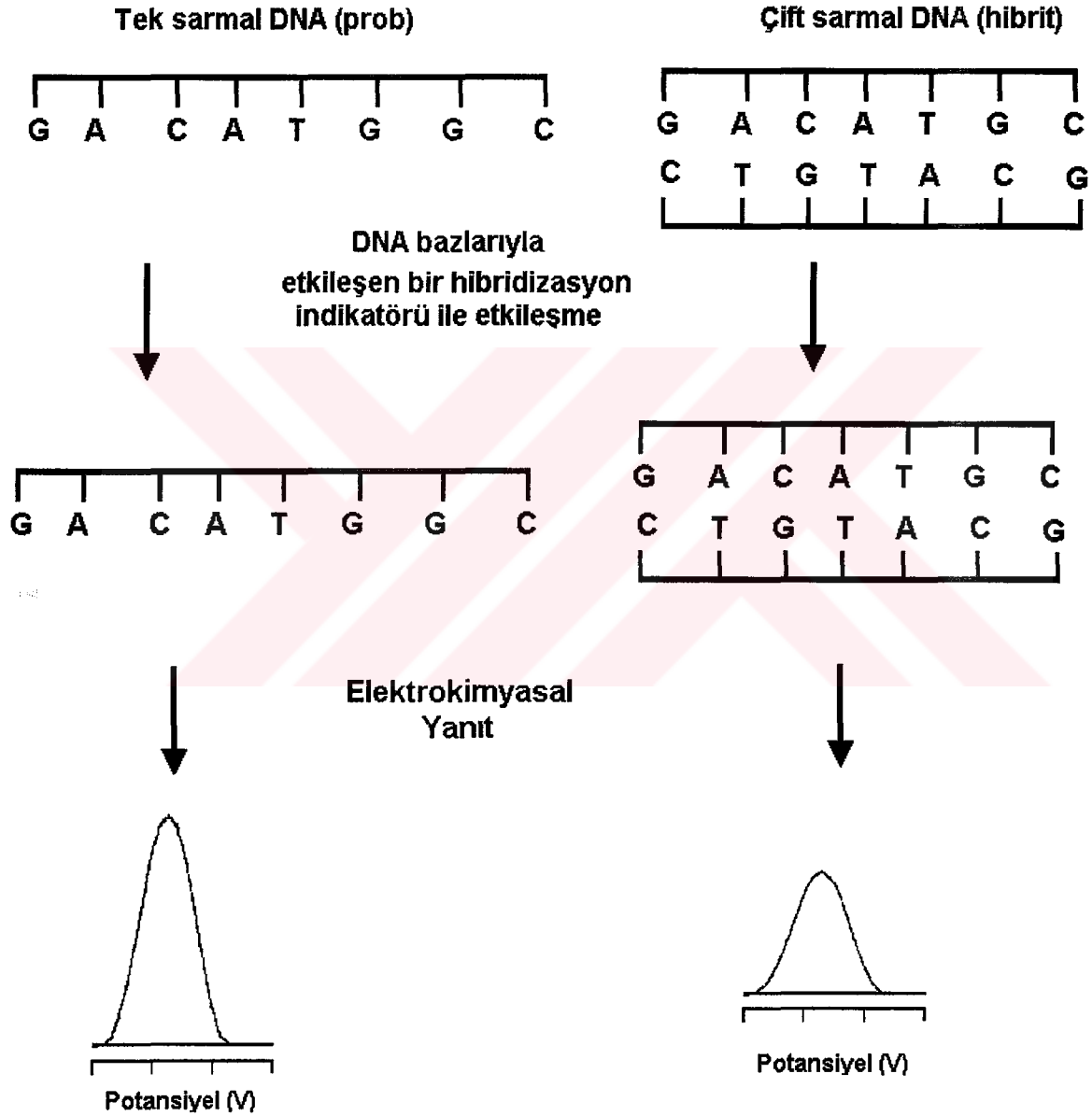


Şekil 11: İnterkakatör bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması

4.1.2 DNA bazlarının en az biriyle etkileşen bir indikatör ile:

Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan madde DNA'nın bazlarından biriyle (özellikle Guanin) etkileşiyor olabilir. Bu durumda; Şekil 12 'de görüldüğü gibi; tek sarmal DNA (ssDNA) 'da bazlar açıkta olduğundan dolayı alınan madde sinyali,

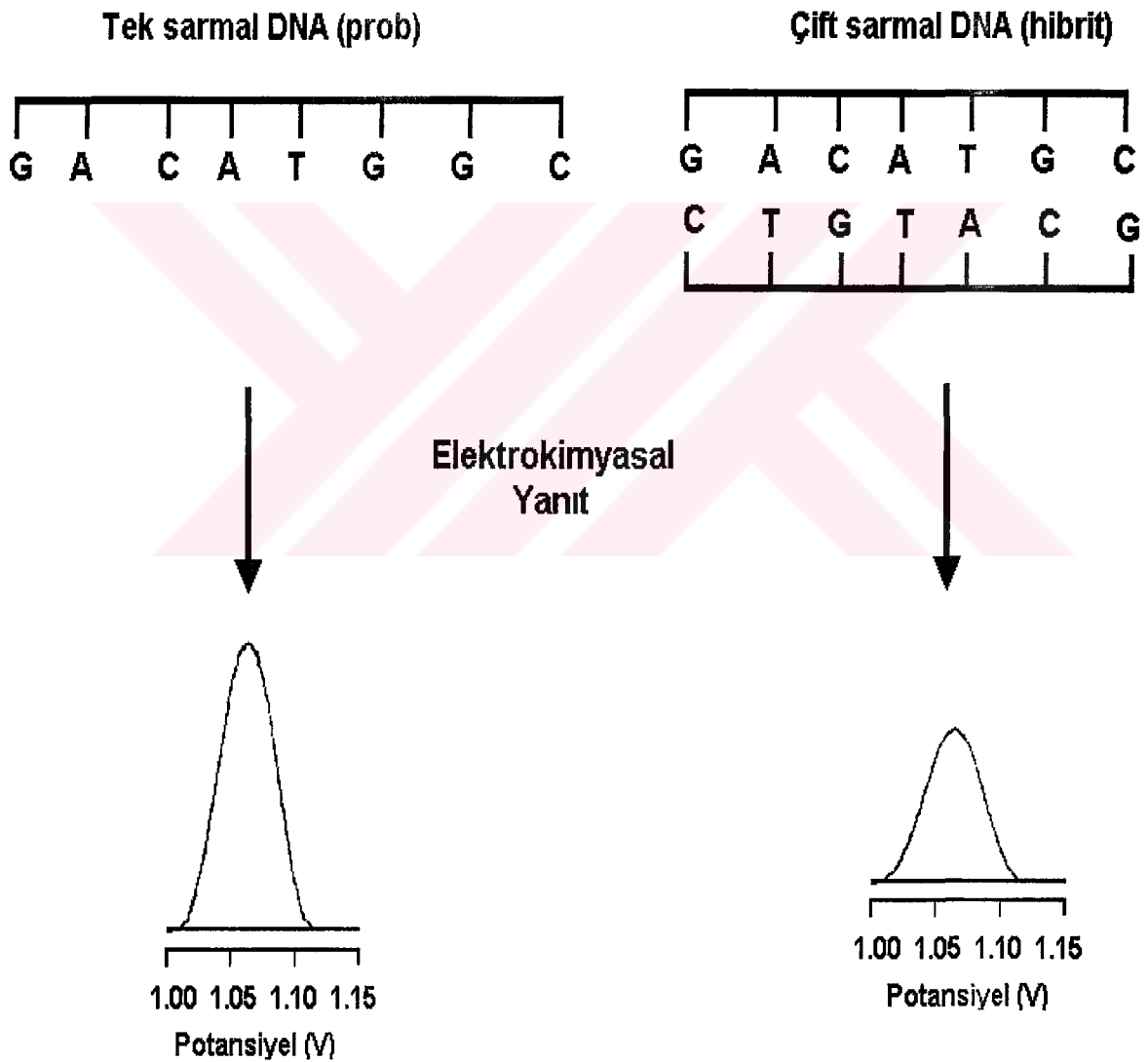
hibridizasyondan sonra oluşan çift sarmal DNA (dsDNA) 'da bazlar kapalı olduğundan dolayı alınan madde sinyaline oranla oldukça yüksektir (51, 53, 56, 71,76).



Şekil 12: DNA bazlarından biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması.

4.2 İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemleri:

Elektrot yüzeyine tutturulan tek sarmal prob dizisine (ssDNA) ait Guaninlerin verdiği elektrokimyasal yanıt ile, probun komplementeriyle birleşmesinden sonra oluşan çift sarmal DNA'ya ait guaninlerden alınan elektrokimyasal yanıt arasında Şekil 13' de görüldüğü gibi önemli bir farklılık vardır. Bu farklılık hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır (62, 72, 82, 103-106, 117).



Şekil 13: İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi

II. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Kimyasallar

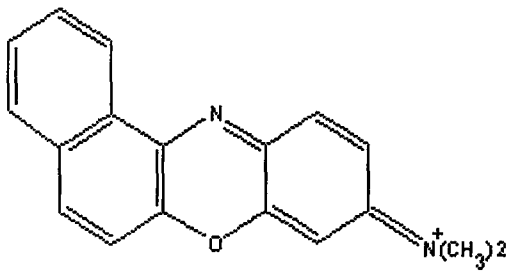
Meldola Mavisi	(Sigma)
Asetik Asit (%99-100)	(Merck)
Hidroklorik asit (%37)	(Merck)
Sodyum Hidroksit	(Merck)
Di sodyum mono hidrojen fosfat	(Riedel de Haen)
Potasyum di hidrojen fosfat	(Riedel de Haen)
Grafit tozu	(Fisher)
Mineral yağ	(Acheson 38)
Tris (hidroksimetil)aminometan hidroklorür	(Sigma)
Sodyum klorür	(Sigma)
Sodyum asetat trihidrat (CH ₃ COONa.3H ₂ O)	(Sigma)

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

2.1.1. Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan Meldola Mavisi hakkında

genel bilgi:

Açık kimyasal formül :



Kapalı kimyasal formül: C₁₈H₁₅N₂OCl

Kimyasal adlandırma: 8 – dimetilamino – 2,3 - benzofenoksazin.

Kimyasal özellikleri: Koyu mavi renkte kristallerden oluşmuştur. Suda çözünür.

Molekül ağırlığı, 378.9 g / mol'dur. Meldola Mavisi (MDB), fenoksazin sınıfına ait düzlemsel bir aromatik halka içeren katyonik yüklü bir moleküldür. Enzimlere dayalı elektrokimyasal biyosensörlerde yükseltgenme - indirgenme belirteci olarak kullanılmaktadır.

MDB, sahip olduğu düzlemsel aromatik halkası sayesinde, DNA'ya interkalatif (30, 32, 58, 92) olarak bağlanarak DNA çift sarmalının içinde birikir. Bu özelliğine bağlı olarak tek sarmal (ssDNA) ve çift sarma (dsDNA) ile etkileşmesindeki farklılık, MDB'nin güvenilir bir hibridizasyon indikatörü olarak kullanılmasını sağlamaktadır.

2.2 Hibridizasyon Tayininde Kullanılan Sentetik Oligonükleotitler:

2.2.1 Herpes Simpleks Virüs (HSV)tayinine ait oligonükleotit dizileri:

HSV' ye ait PCR ürünü dizisi; virüs genomunun polimeraz gen bölgesinin HSV tip 1 için; 64208-64367 numaralı, HSV tip 2 için; 64669-64828 numaralı bazları arasındaki kısmın çoğaltılmasıyla elde edilmiştir. (59)

HSV tip 1 ve tip 2'yi temsil eden proplar ve bu çalışmada kullanılan tüm 22-baz sentetik oligonükleotitler (liyofilize toz halinde) TIB Molbiol (Almanya)'dan sağlandı. Ayrıca PCR ürünü örneklerle dayalı hibridizasyon tayini çalışmalarında kullanılan hasta örnekleri, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlandı. Bu oligonükleotitlerin baz dizilimi aşağıdaki gibidir;

Prob 1 (HSV tip 1 için 22-baz dizi)

5'NH₂- ITG CTG GCC AAG CTG ACG GAC A 3'

Hedef 1 (HSV tip 1 için 22-baz dizi)

5' TGT CCG TCA GCT TGG CCA GCA A 3'

Prob 2 (HSV tip 1 için 22-baz dizi)5' NH₂ GTC CTG ACC AAG CTG ACG GAG A 3'**Hedef 2 (HSV tip 2 için 22-baz dizi)**

5' TCT CCG TCA GCT TGG TCA GGA C 3'

Prob 1 HSV Tip 1'e, prob 2 HSV Tip 2'ye ait problemlerdir. hedef 1 ve hedef 2 bunların sentetik karşılıklarıdır. Birbirlerine göre 4 nükleotidleri farklıdır bu nükleotidler altı çizilerek belirtilmiştir.

2.2.2. İndikatörsüz DNA dizi algılamasına yönelik deneylere ait oligonükleotit dizileri:

Bu çalışmada kullanılan tüm 17-baz sentetik oligonükleotitler liyofilize toz halinde Synthegen LLC (Houston Texas, USA) 'dan sağlandı.

Prob Dizi (17-baz dizi)

5' -TCA-AAT-CAG-GTT-GCT-TA- 3'

Hedef dizi (17-baz dizi)

5' -TAA-GCA-ACC-TGA-TTT-GA- 3'

2.2.3. Akondroplazi G380R mutasyon tayinine ait oligonükleotit dizileri:

Bu çalışmada kullanılan tüm 12-baz sentetik oligonükleotitler liyofilize toz halinde Thermo Hybrid Interactiva (Almanya)'dan sağlandı. PCR ürünü hasta örnekleri, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Bölümü ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Bölümü'nden sağlandı. Sentetik oligonükleotitlerin baz dizilimi aşağıdaki gibidir;

Sağlıklı Tip Prob (12-baz dizi)5' - CAC CCC C ITA ICT- 3'**Sağlıklı Tip Hedef (12-baz dizi)**5' – AGC TAC GGG GTG- 3'**Mutant Tip Prob (12-baz dizi)**5' - CAC CCT T ITA ICT- 3'**Mutant Tip Hedef (12-baz dizi)**5' - AGC TAC AGG GTG- 3'

(I= İnozin)

Bu çalışmada kullanılan iki tip prob ; hem sağlıklı hem de mutasyonu içeren geni temsil eden prob dizilerdir. Hedef diziler bunların karşılığıdır. Prob diziler guanin yerine bir guanin analogu olan inozin içerirler. Her iki tip arasında guaninden adenine bir mutasyon vardır. Mutasyon noktası altı çizilerek belirtilmiştir.

2.2.4. Oligonükleotit çözeltilerinin hazırlanışı:

HSV tayininde kullanılan 22-baz dizisine sahip oligonükleotit stok çözeltileri, 500 µg/mL derişiminde TE çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) ile hazırlandı ve 0°C 'nin altında saklandı (113, 114). Prob olarak kullanılan oligonükleotitlerin 20 mM NaCl içeren 0,5 M Asetat tamponu (pH 4,8) ile, hedef olarak kullanılan oligonükleotitlerin seyreltik çözeltileri ise 20 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 7,0) ile hazırlandı.

İndikatörsüz DNA dizi algılama yönteminde kullanılan 18-baz dizisine sahip oligonükleotit stok çözeltileri, 100 µg/mL derişiminde TE çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) ile hazırlandı ve aynı koşullarda saklandı. Prob olarak kullanılan oligonükleotitlerin 20 mM NaCl içeren 0,5 M Asetat tamponu (pH 4,8) ile, hedef

olarak kullanılan oligonükleotitlerin seyreltik çözeltileri ise 20 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 7,0) ile hazırlandı.

Akondroplazi G 380R tayininde kullanılan 12-baz dizisine sahip oligonükleotit stok çözeltileri, 100 µg/mL derişiminde TE çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) ile hazırlandı ve aynı koşullarda saklandı. Prob olarak kullanılan oligonükleotitlerin 20 mM NaCl içeren 0,5 M Asetat tamponu (pH 4,8) ile, hedef olarak kullanılan oligonükleotitlerin seyreltik çözeltileri ise 20 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 7,0) ile hazırlandı.

2.2.5 PCR ürünü örnek çözeltilerinin hazırlanışı:

PCR ürünü örneklerinden, HSV' ye ait diziyi içerenler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda, Akondroplazi'ye ait diziyi içerenler Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda hastalardan alınan kanlardan izole edilen DNA'nın, PCR tekniği kullanılarak çoğaltılması ile elde edildi.

HSV ve Akondroplazi 'ye ait hasta örneklerini içeren 10 µL PCR ürünü örnekler, 20 mM NaCl içeren 20 mM Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 7,0) ile seyreltildi. Seyreltilen örnekler kullanılmadan önce, tek sarmal hedef oligonükleotidi elde etmek üzere, 95 °C' de su banyosunda 5 dakika, ardından buz banyosunda 2 dakika bekletilmek suretiyle denatüre edildi (53, 72, 83).

2.3 Kullanılan Cihazlar

- Ölçümler ve deneyler esnasında kullanılan tüm cihaz, donanım ve yazılımlar ;
- Terazi (Saritorious-Analytic A-200)
- Ses titreşimli temizleyici (Ultrasonic LC 30 H)

- Ph-metre (Schott-Mainz CG 710)
- Manyetik karıştırıcı (Elektro-mag ve ARE 2-Velp)
- Potensiyostat
- Autolab PGSTAT 30 (GPES 4,8 yazılımı ile birlikte)
- Autolab PGSTAT 12 (GPES 4,5 yazılımı ile birlikte)
- Spektrofotometre (UV 160 A-Shimadzu)
- Ag/AgCl referans elektrot
- Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı).

2.4 Kullanılan Yöntem

2.4.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

2.4.1.1. Meldola Mavisi çözeltisinin hazırlanışı

Çalışmalar süresince kullanılan MDB çözeltisi 1 mM derişimde 20 mM NaCl içeren 20mM Tris- HCl tampon çözeltisi (pH 7,0) içerisinde hazırlandı.

2.4.1.2. Fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı

Karbon pastası elektrodunun aktivasyonu esnasında kullanılan 0,05 M fosfat tampon çözeltisi litresinde 1.36 g (0,01 mol) KH_2PO_4 ve 6,96 g (0,04 mol) K_2HPO_4 içermektedir. NaCl derişimi 20 mM olacak şekilde 1,17 g NaCl ilave edilmiştir. Hazırlanan fosfat tamponun pH değeri 7,4 ' tür.

2.4.1.3. Asetat tampon çözeltisinin hazırlanışı

Kullanılan 0,5 M asetat tampon çözeltisi litresinde 2,722 g. $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ve 1,154 mL CH_3COOH (%99, 1.05 g/mL) içermektedir. NaCl derişimi 20 mM olacak şekilde 1,17 g NaCl ilave edilmiştir. Hazırlanan asetat tamponunun pH değeri 4,8 ' dir.

2.4.2. Kullanılan elektrotların hazırlanışı

2.4.2.1. Karbon Pastası Elektrodunun (CPE) hazırlanışı

Çalışma elektrodu olarak kullanılan karbon pastası elektrodu, çapı 3 mm olan cam borudan hazırlanmıştır. Bu elektrot, iç kısmında karbon pastası içermekte ve elektriksel iletkenlik ise bakır tel ile sağlanmaktadır. Karbon pastası, grafit tozu ile mineral yağın 70:30 oranında homojen bir şekilde karıştırılmasıyla hazırlanmış ve hazırlandıktan sonra elektrot yüzeyi yağlı kağıt ile homojen bir yüzey haline çevrilmiştir.

2.4.2.2. Kalem Ucu Grafit Elektrot (PGE) hazırlanışı:

Çalışmada kullanılan kalem ucu elektrot; Tombo kalem uçlarınının 3 cm boyutunda kesilmesiyle hazırlandı (106, 107).

Çalışmalar esnasında, CPE kullanılarak yapılan çalışmada; CPE aktivasyonu, CPE yüzeyine Akondroplazi hastalığını temsil eden prob tutturulması, CPE yüzeyine tutturulmuş prob ile hedefin CPE yüzeyinde hibrit oluşturması ve elektrokimyasal ölçümlerine ilişkin yöntemde laboratuvarımızda önceki çalışmalarımızda rapor edilen yol izlenmiştir (82).

PGE ile yapılan çalışmada ise PGE için herhangi bir kimyasal ya da elektriksel aktivasyon yapmadan HSV virüsüne ait prob dizisinin kovalent olarak elektrot yüzeyine bağlanması, PGE yüzeyine tutturulmuş prob ile hedefin PGE yüzeyinde hibrit oluşturması, bu hibritin indikatör madde ile etkileşimi ve elektrokimyasal ölçümlerine ilişkin yöntem kullanılmıştır.

2.4.3 *Meldola Mavisi İndikatörlüğünde Herpes Simplex tip 1 ve tip 2 virüslerinin tayini ve ayırımı:*

2.4.3.1. HSV polimeraz gen bölgesi tip1 ve tip2 ayırımında PCR ürünü örneklerinden prob dizi seçimi:

HSV Tip1 PCR Ürünü:

5' ATC AAC TTC GAC TGG CCC TTC ITG CTG GCC AAG CTG ACG GAC ATI
 TAC AAG GTC CCC CTG GAC GGG TAC GGC CGC ATG AAC GGC CGG GGC
 GTG TTI CGC GTG TGG GAC ATA GGC CAG AGC CAC TTC CAG AAG CGC
 AGC AAG ATA AAG GTG AAC GGC ATG GTG AGC ATC GAC ATG TAC GG 3'

HSV Tip2 PCR Ürünü:

5' ATC AAC TTC GAC TGG CCC TTC GTC CTG ACC AAG CTG ACG GAG ATC
 TAC AAG GTC CCG CTC GAC GGG TAC GGC CGC ATG AAC GGC CGG GGT
 GTG TTC CGC GTG TGG GAC ATC GGC CAG AGC CAC TTC CAG AAG CGC
 AGC AAG ATA AAG GTG AAC GGC ATG GTG AAC ATC GAC ATG TAC GG 3'

Altı çizili olan kısımlar primerler, kalın ve italik olan kısım ise prob dizilerdir. Prob için baz değişiminin en sık olan ve primere en yakın kısmı alındı. Prob dizilerde birbirlerine göre 4 adet baz farkı vardır, tüm baz farklılıkları da altı çizili olarak gösterilmiştir.

2.4.3.2. Çalışma Basamakları:

Çalışmada kalem ucu elektrot kullanıldı ve elektrot yüzeyine prob dizi kovalent bağlama yöntemiyle bağlandı. Çalışma prosedürü Şekil 15' de şematize olarak gösterilmiştir.

Elektrot hazırlanması: 3cm uzunluğunda kesilmiş elektrotlar, 1.5cm uzunluğunda işaretlendi ve yüzeyi pürüzsüz olan kısımları kullanıldı.

Elektrot yüzeyinin kaplanması: fosfat tamponu içinde hazırlanmış; 5mM NHS, 8mM EDC içeren yüzey kaplama çözeltisi içine elektrotlar daldırılarak 1saat bekletildi (54, 76).

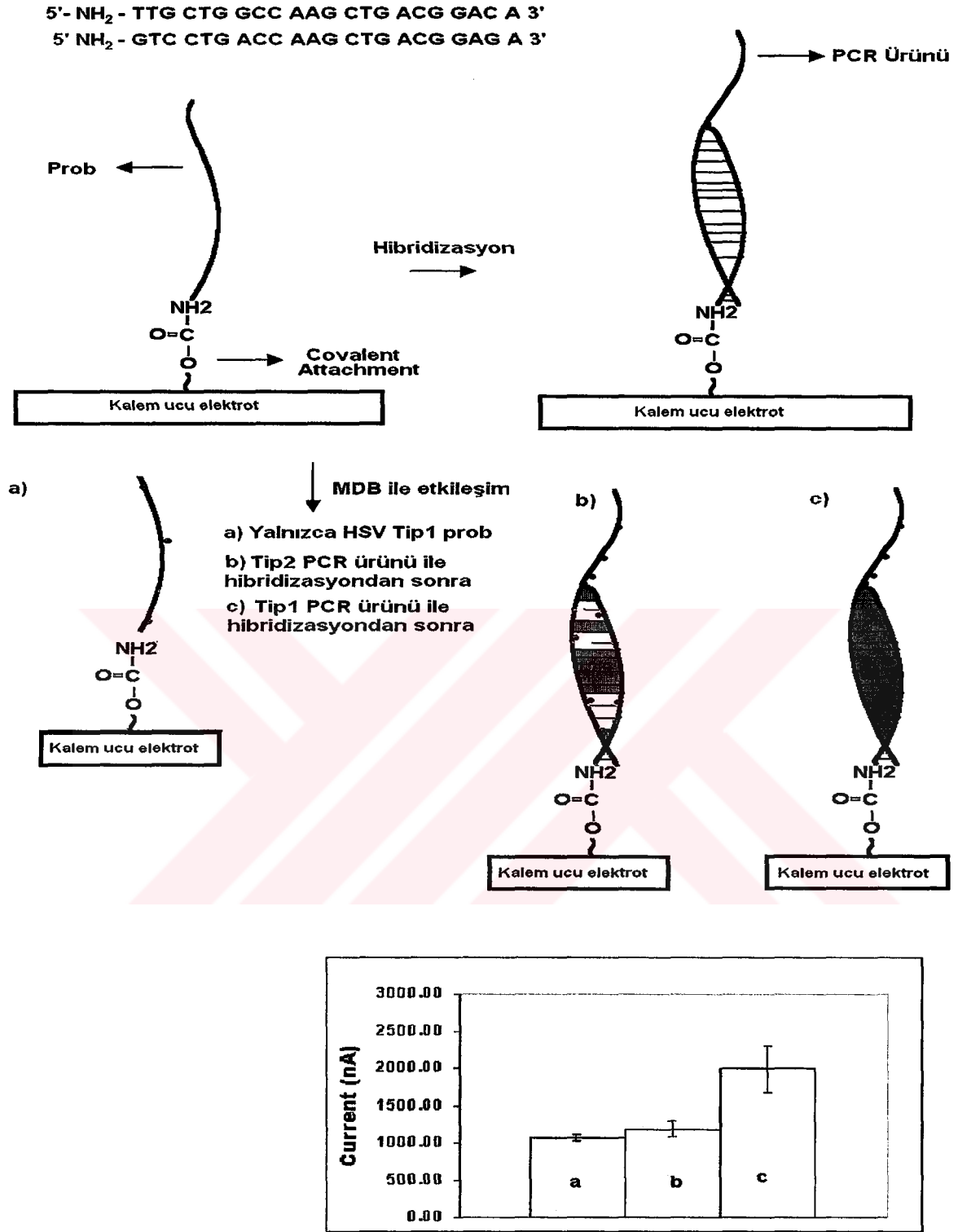
PGE yüzeyine prob tutturulması: 0.05M asetat tamponu (pH 4.8) içinde hazırlanmış 10ppm derişimindeki her iki tipe ait prob çözeltileri hazırlandı. Yüzeyi kaplanmış olan elektrotlar prob çözeltisi içinde 1 saat bekletildi.

Hibridizasyon: Yüzeylerine prob tutturulmuş elektrotlar, Tris-HCl tamponu (pH 7) 'nda hazırlanmış 15ppm derişimindeki hedef dizi çözeltileri içinde 30 dakika bekletildi.

Yıkama: Elektrot yüzeylerinden bağlanmayan ya da diğer tip ile hibridizasyon sonucu iyi bağlanmamış hibritleri yüzeyden uzaklaştırmak için elektrotlar, %0.1 SDS içeren çözeltilerde 10 dakika bekletildi (52, 82).

MDB biriktirmesi: 20 μ M derişimindeki MDB çözeltisi karışan ortamda 5 dakika boyunca hiçbir gerilim uygulanmadan akümüle edildi (53, 58).

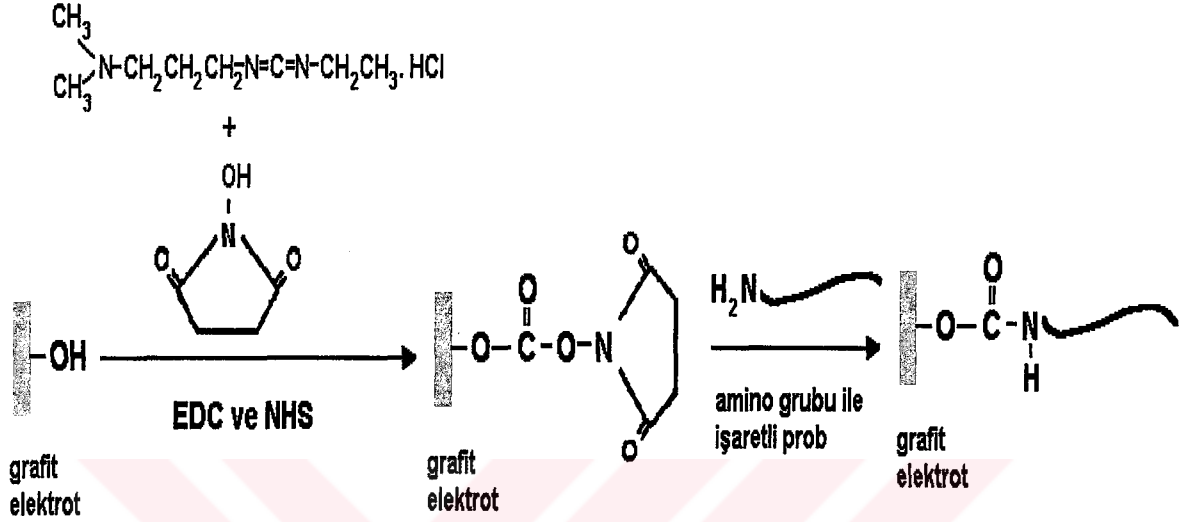
Ölçüm: Akümüle olan MDB, DPV tekniği (10 mV genlik) kullanarak (+0,2 V) – (-0,5 V) arasında, 20 mM Tris-HCl tampon çözeltisinde (pH 7,0) ölçüldü.



Şekil 14: HSV Tip1 ve Tip2 ayırımı için kullanılan çalışma prosedürü.

2.4.3.3. Prob dizisinin elektrot yüzeyine kovalent olarak modifiye edilmesi:

Yalnızca kalem ucu elektrotlarda değil çeşitli karbon(grafit) elektrotlar kullanıldığında da kovalent ajanlarla yapılan kaplama yüzeye NH_2 grubu ile işaretli prob direkt olarak güçlü şekilde bağlanmaktadır.



Şekil 15: Grafit elektrot yüzeyinde kovalent ajanlarla yapılan NH_2 grubu ile işaretli DNA probu modifikasyonu.

2.4.3.4 Diferansiyel puls voltametri tekniği ile MDB indikatörlüğünde hibridizasyon tayini incelenmesi:

MDB-DNA etkileşmesinin DPV tekniği ile incelenmesi için yapılan çalışmalarda, Şekil 15'de gösterilen aşamalar uygulandı. Çalışma elektrodu olarak PGE kullanıldı.

MDB' nin biriktirilmesi sırasında, $20 \mu\text{M}$ MDB içeren $0,05 \text{ M}$ tris-HCl tampon çözeltisi (pH 7) kullanıldı. Ölçüm, DPV tekniği (10 mV genlik) kullanılarak ($+0,1 \text{ V}$) – ($-0,5 \text{ V}$) arasında, 5 mV/s' lik tarama hızıyla, 20 mM NaCl içeren $0,05 \text{ M}$ tris-HCl tampon çözeltisinde (pH 7) yapıldı.

Elektrot yüzeyine prob dizinin kovalent olarak bağlanması için, elektrot, kovalent ajanlar olan NHS-EDC karışımı içinde 1 saat bekletilerek yüzeyin kaplanması

sağlandı. Bu sırada bu kovalent ajanlar elektrot yüzeyini NH_2 grubu bağlanacak şekilde kaplar (53).

Elektrot yüzeyinin prob dizi ile kaplanması sırasında 10ppm derişimindeki tip1 ve tip2'e ait 5' ucundan NH_2 bağlı oligonükleotit dizi çözeltileri 1 saat boyunca, elektrotun çözelti içine daldırılması suretiyle bağlanırlar.

Yüzeyine yalnızca prob dizi tutturulan elektrot ile MDB tayininde hibridizasyon aşamasında içinde hedef dizi bulunmayan tris-HCl tampon çözeltisi (pH 7) kullanıldı. Diğer aşamalarda belirtilen koşullar uygulandı.

2.4.3.4.1. MDB indikatörlüğünde hibridizasyonun tayini:

Elektrot hazırlanması: 3cm uzunluğunda kesilmiş elektrotlar, 1.5cm uzunluğunda işaretlendir ve yüzeyi pürüzsüz olan kısımları kullanıldı.

Elektrot yüzeyinin kaplanması: Fosfat tamponu içinde hazırlanmış; 5mM NHS, 8mM EDC içeren yüzey kaplama çözeltisi içine elektrotlar daldırılarak 1saat bekletildi.

PGE yüzeyine prob tutturulması: 0.05M asetat tamponu (pH 4.8) içinde hazırlanmış 10ppm derişimindeki her iki tipe ait prob çözeltileri hazırlandı. Yüzeyi kaplanmış olan elektrotlar bu prob çözeltisi içinde 1 saat bekletildi.

Hibridizasyon: Yüzeylerine prob tutturulmuş elektrotlar, Tris-HCl tamponu (pH 7)'nda hazırlanmış 15ppm derişimindeki hedef dizi çözeltileri içinde 30 dakika bekletildi.

Yıkama: Elektrot yüzeylerinden bağlanmayan ya da diğer tip ile hibridizasyon sonucu iyi bağlanmamış hibritleri yüzeyden uzaklaştırmak için elektrotlar, % 0.1 SDS içeren çözeltide 10 dakika bekletildi.

MDB biriktirmesi: 20 μM derişimindeki MDB çözeltisi karışan ortamda 5 dakika boyunca hiçbir gerilim uygulanmadan akümüle edildi.

Ölçüm: Elektrot yüzeyinde biriktirilen olan MDB, DPV tekniği (10 mV genlik) kullanarak (+0,1 V) – (-0,5 V) arasında, 20 mM Tris-HCl tampon çözeltisinde (pH 7,0) ölçüldü.

Bu çalışmada prob tutturulan PGE kullanarak DPV tekniği ile, 2.4.3.4' de belirtilen koşullarda çalışıldı. Hibridizasyon sırasında prob kaplı elektrotlar; yalnızca tek sarmal olan prob tayini için herhangi bir hedef DNA içermeyen Tris-HCl tamponunda, hibridizasyonun tayini için 15ppm derişimindeki hedef dizi çözeltisinde ve tip 1 ve tip 2 ayırımının tayini için diğer tipe ait hedef dizi çözeltisinde 30 dakika bekletildi. İyi bağlanmayan oligonükleotitleri yüzeyden uzaklaştırmak ve aynı zamanda tip 1 ve tip 2 ayırımının net olarak yapılabilmesi için, elektrotlar, Tris-HCl tamponunda çözülmüş %0.1SDS içinde 10 dakika bekletilerek yıkandı. MDB biriktirmesi sonunda alınan yanıtlar arasındaki farklılık incelendi.

2.4.3.4.2. Prob derişimindeki değişimin MDB yanıtına etkisinin incelenmesi:

Bu çalışmada, artan prob derişimine karşı, sabit derişimdeki hedef ile hibridizasyondan sonra alınan MDB yanıtı DPV tekniği ile 2.4.3.4.1'de belirtilen koşullarda incelendi.

2.4.3.4.3. Hibridizasyon zamanının MDB yanıtına etkisinin incelenmesi:

Bu çalışmada, hibridizasyon zamanındaki değişimin, hedef dizinin yüzeye tutturulan prob ile hibridizasyonundan sonra alınan MDB sinyali üzerine etkisi DPV tekniği ile 2.4.3.1' de belirtilen koşullarda incelendi.

2.4.3.5 MDB indikatörlüğünde gerçek hasta örnekleri (PCR ürünü örnekler) kullanılarak HSV tip1 ve tip2 ayırımı:

2.4.3.5.1 PCR ürünü örneklerin seyrelme oranındaki değişimin HSV tip1 ve tip2 ayırımına etkisinin incelenmesi:

Hastalara ait PCR ürünü örneklerinden tayin çalışmalarına başlamadan önce, tip 1 ve tip 2 ayırımının en iyi şekilde saptandığı ürün seyrelme oranının saptanması için, farklı seyrelme oranlarının hibridizasyondan sonra alınan MDB yanıtına etkisi DPV tekniği ile 2.4.3.1' de belirtildiği gibi incelendi. Ancak, sentetik oligonükleotitler ile yapılan çalışmadan farklı olarak, çift sarmal halinde bulunan gerçek hasta örneklerinin prob diziler ile hibridizasyon yapabilmesi için, hibridizasyondan önce bu örnekler denatüre edilip tek sarmal haline getirildi. Denatürasyon işlemi için PCR ürünü örnekleri, 95 °C'de 6 dakika su banyosu içinde ve renatürasyonun önlenmesi için 2 dakika buz banyosu içinde bekletildi (71). Diğer tüm koşullar 2.4.3.1' de belirtildiği gibidir.

2.4.3.5.2 HSV Tip1 ve Tip2'ye ait diziyi içeren PCR ürünü örneklerde dizi tayin çalışmaları:

Hastalara ait PCR örnekleri 2.4.3.5.1'de anlatıldığı şekilde çalışıldı.

Aynı çalışma basamakları tüm hasta örnekleri için ve en az üçer defa olmak koşulu ile ve kontrol amaçlı olarak boş PCR kör çözeltisi ve nonkomplementer (Hepatit B) dizi içeren örneklerle tekrarlandı.

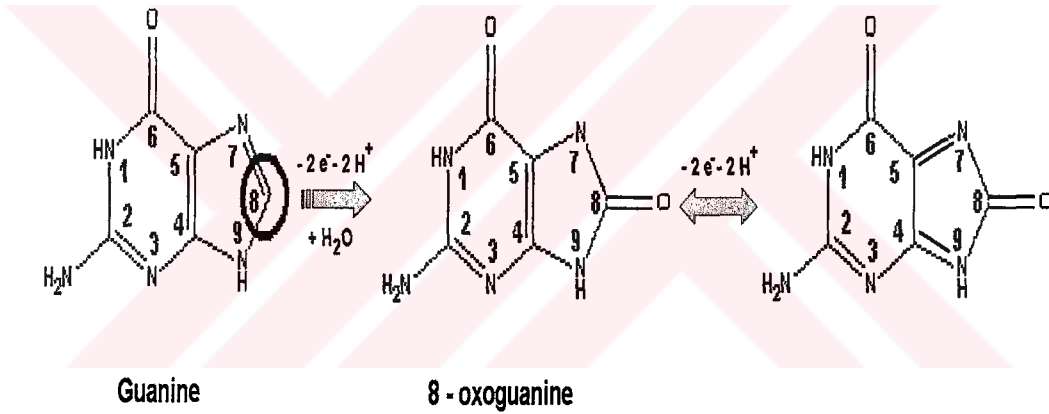
PCR kör çözeltisi içinde gerçek hasta örneğine ait DNA hariç tüm PCR içeriği bulunur (primerler, Taq DNA polimeraz, dNTP, MgCl₂ vs). Bu çözeltiyi hibridizasyon

için kullanmakta amaç; aldığımız sinyallerin; çözelti içeriğindeki özellikle primerler ve dNTP 'lerden kaynaklanmadığını, tayinin diziye özgün olduğunu kanıtlamaktır. Aynı şekilde farklı bir hastalığı temsil eden (HBV) PCR ürünü örnekleri de bu amaçla kullanıldı.

2.4.4. İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemi:

Guanin DNA'nın dört bazının (adenin, guanin, sitozin, timin) içinde en elektroaktif olanıdır. Elektrot yüzeyine elektrostatik olarak bağlanan DNA dizilerine ait alınan sonuçlarda Guanin'in 1.0 V'da yükseltgenme sinyali verdiği gözlemlendi. Çalışmada elektrot olarak karbon pastası elektrodu (CPE) kullanıldı.

Guanine ait yükseltgenme şeması şekil 16' da gösterilmiştir.



Şekil 16: Guanin bazının yükseltgenmesi.

2.4.4.1 CPE ile indikatörsüz DNA Hibridizasyon Tayini:

CPE'nun Aktivasyonu: 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süreyle karıştırılmayan ortamda aktive edildi.

Prob dizinin CPE yüzeyine tutturulması: Aktive edilmiş CPE yüzeyine tutturma işlemi, + 0,5 V potansiyel uygulanarak, 20 mM NaCl içeren ve karışan 10 ppm oligonükleotit çözeltisi içerisinde 5 dakika tutulmak suretiyle yapıldı.

Hibridizasyon: 15 ppm hedef dizi çözeltisinden 10µL'si prob ile kaplı elektrot yüzeyine damlatıldı ve 6 dakika boyunca hibridizasyona tabi tutuldu.

Ölçüm: Elektrot yüzeyinde oluşan çift sarmal yapı asetat tamponu (pH 4.8) içinde diferansiyel puls voltametri tekniği ile 0.5V – 1.5 V arasında ölçüldü.

Bu çalışma, hem tek sarmal prob tutturulmuş hem de hibridizasyon sonrası çift sarmal oluşmuş CPE ile yapıldı. Her bir elektrot ile elde edilen pik akımları karşılaştırıldı.

İndikatörsüz DNA dizi algılama sistemi tam olarak uygulandığı için bundan sonraki hastalık tayinlerini herhangi bir indikatör kullanmadan çalışıldı.

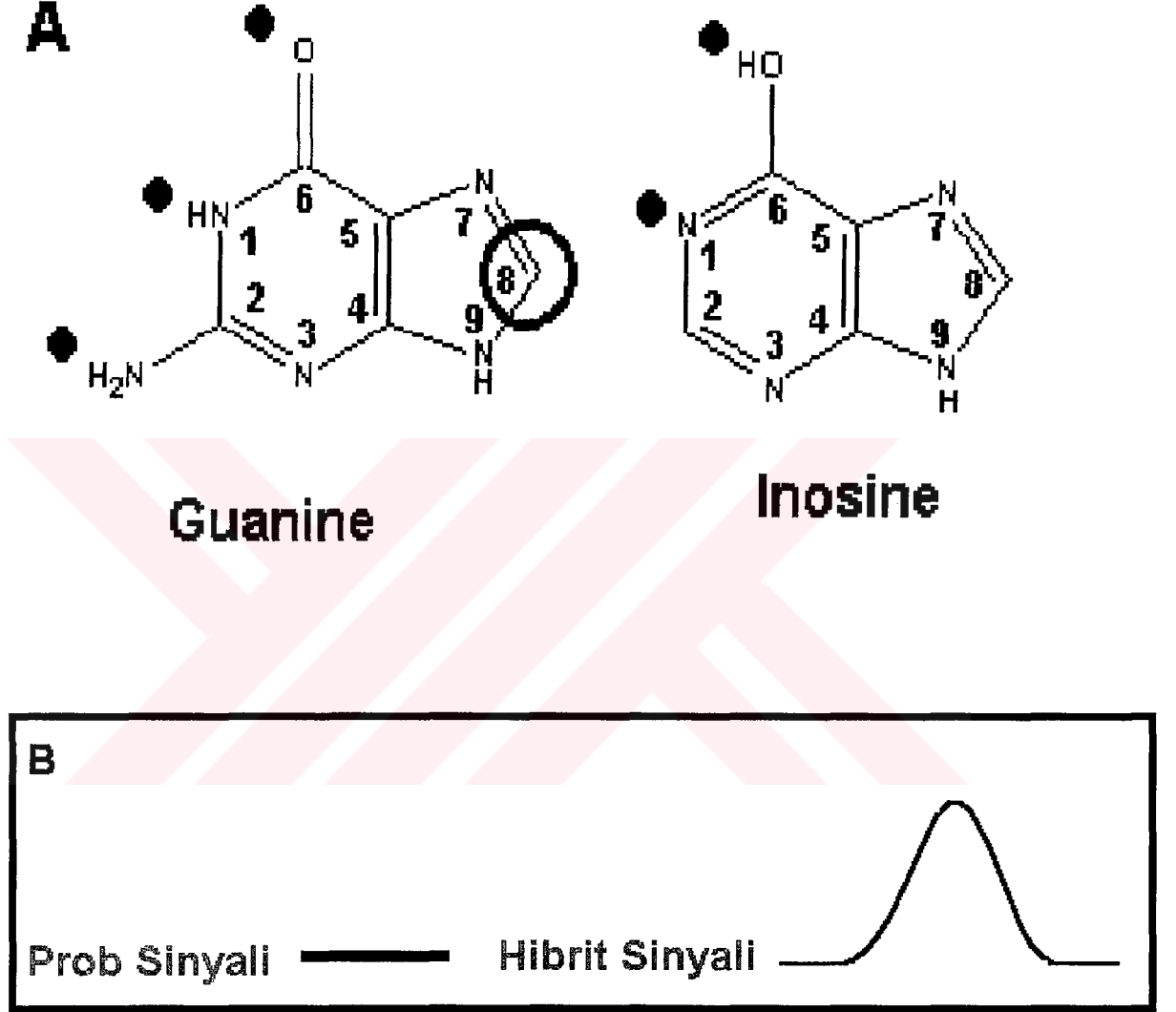
2.4.5. İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemiyle Akondroplazi G380R Mutasyonunun Tayini:

Akondroplazi, otozomal geçiş gösteren bir iskelet displazisi hastalığıdır. 4 numaralı kromozomun p kolunun 16.3 bölgesinde yer alan fibroblast büyüme faktörü reseptör 3 (FGFR3) geninin 1138. nükleotidinde yer alan guanin bazının adenin ve ya sitozine dönüşümü sonucunda mutasyonun ortaya çıktığı gözlenmiştir Bu hastalığın tayininde inozinli DNA algılama sistemi kullanıldı ve bir EVET / HAYIR sistemine dayalı olarak heterozigot homozigot ayırımı yapıldı. Bunun için ilk önce mutasyon bölgesini içeren PCR ürünü örneklerin haritasından yola çıkarak hem sağlıklı kişiye hem de mutasyon taşıyan iki tip prob sentezlendi.

2.4.5.1 Akondroplazi G380R Hastalığına ait PCR ürünü haritasından prob dizilerin seçimi:

Bu çalışmada Akondroplazi hastalığına ait G-A' e dönüşen tek nokta mutasyonu çalışıldı. Bunun için prob dizilerde Guanin yerine bir Guanin analogu olan Inozin kullanıldı. Guanin Inozin analogu bir moleküldür bir oligonükleotit dizisinde Guanin

yerine geçerek Sitozin ile bağ yapar ancak bu bağ üçlü yerine ikili Hidrojen bağıdır. İnozin farklı olarak sahip olduğu kimyasal yapısındaki farklılıktan kaynaklanarak Guaninin yükseltgenmediği bölgede yükseltgenemez ve böylece 1.0 V 'da sinyal vermez. Guanin ve İnozinin kimyasal yapıları Şekil 17' de gösterilmiştir.



Şekil 17: A) Guanin ve İnozinin kimyasal yapıları, B) Guanin ve İnozinin elektrokimyasal yanıtları arasındaki fark.

Şekil 18'de inozine ve inozinli diziyle hibridizasyon sonucu alınan Guanine ait sinyaller gözlenmektedir. Bu EVET / HAYIR sisteminin temelini oluşturur.

2.4.5.2 İnozin İçeren Prob Diziler Kullanarak Hibridizasyonun Tayini:

İnozin içeren prob kullanılarak yapılan hibridizasyon sonucu alınan guanin sinyalleri incelendi. 2.4.4.1'de anlatıldığı koşullarda çalışıldı.

2.4.5.3 Akondroplazi G380R mutasyonunun sentetik oligonükleotitlerle tayini:

CPE'nın Aktivasyonu: 0,05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süreyle karıştırılmayan ortamda aktive edildi.

Prob dizisinin CPE yüzeyine tutturulması: Aktive edilmiş CPE yüzeyine inozin içeren prob dizinin tutturma işlemi, + 0,5 V potansiyel uygulanarak, 20 mM NaCl içeren ve karışan ortamda 10 ppm derişiminde prob çözeltisi içerisinde 5 dakika tutulmak suretiyle yapıldı.

Hibridizasyon: 15 ppm hedef dizi çözeltisinden 10 μ L'si prob ile kaplı elektrot yüzeyine damlatılır ve 6 dakika boyunca hibridizasyona tabi tutuldu.

Yıkama: Yüzeyde iyi bağlanmamış ve ya nokta mutasyonu ile hibridizasyonu sonucu zayıf bağlanma yapmış oligonükleotitleri yüzeyden uzaklaştırmak amacıyla %1 SDS çözeltisi içerisinde 5 sn yıkandı (82).

Ölçüm: Elektrot yüzeyinde oluşan çift sarmal yapı asetat tamponu (pH 4.8) içinde diferansiyel puls voltametri tekniği ile 0.5V – 1.5 V arasında ölçülür.

Aynı çalışma, her iki tip prob (sağlıklı ve mutant tip) dizi ve bunların karşılıkları ile, sentetik diziler arasında tek nokta mutasyon tayini için gerekli koşulları sağlamak amacıyla yapıldı.

2.4.5.3.1 Prob derişimindeki değişimin indikatörsüz mutasyon tayinine etkisinin incelenmesi:

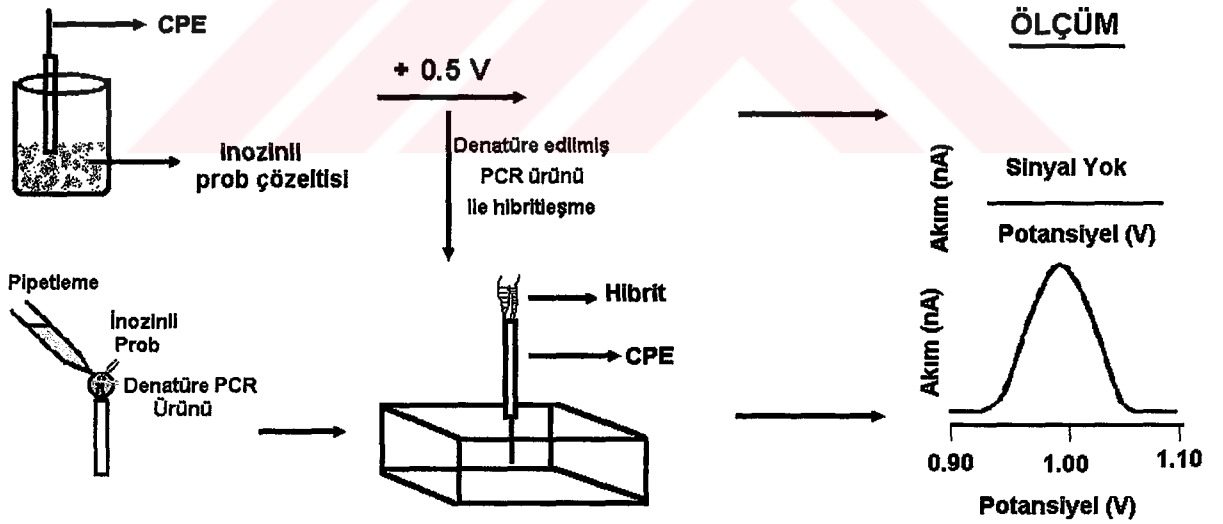
Bu çalışmada, PGE yüzeyine tutturulan prob derişimi arttırılarak DPV tekniği

ile 2.4.5.3.'de belirtilen koşullarda çalışıldı. Prob derişiminin arttırılmasıyla, sabit derişimdeki karşılığı olan hedef ve mutasyon içeren hedef dizilerle hibridizasyondan sonra PGE ile alınan yanıtlar arasındaki farklılık incelendi.

2.4.5.3.2 Akondroplazi G380R mutasyonunun hasta örnekleriyle tayini:

Hastalara ait PCR ürünü örnekler kullanılarak 2.4.5.3.'de belirtilen koşullarda çalışıldı. Ancak, sentetik oligonükleotitler ile yapılan çalışmadan farklı olarak, çift sarmal halinde bulunan gerçek hasta örneklerinin prob diziler ile hibridizasyon yapabilmesi için, hibridizasyondan önce bu örnekler denatüre edilip tek sarmal haline getirildi. Denatürasyon işlemi için PCR ürünü örnekleri, 95 C'de 6 dakika su banyosu içinde ve renatrasyonun önlenmesi için 2 dakika buz banyosu içinde bekletildi.

Çalışma basamakları Şekil 18'de Şematize edilmiştir.



Şekil 18: İnozinli prob kullanarak indikatörsüz dizi algılamasına yönelik mutasyon tayini aşamaları

BÖLÜM III ve IV

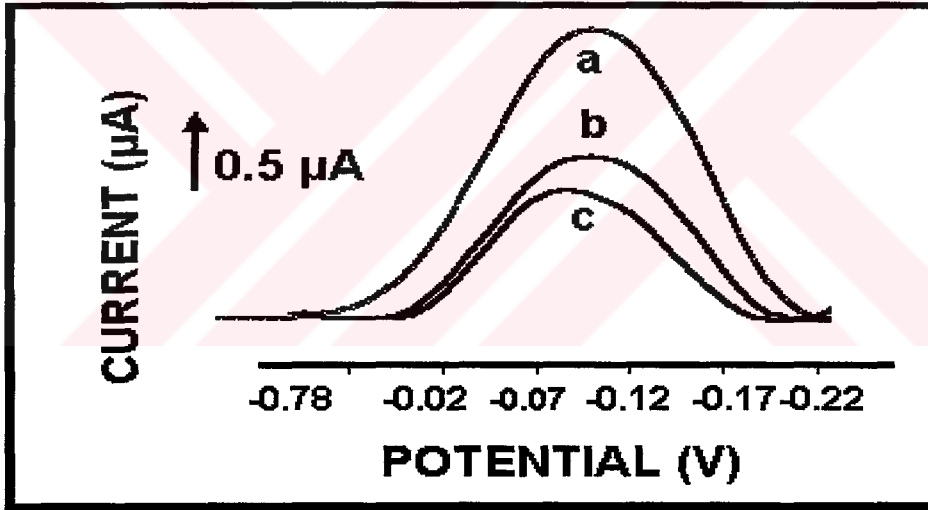
BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. *Meldola Mavisi İndikatörlüğünde Herpes Simplex tip 1 ve tip 2 virüslerinin tayini ve ayırımı:*

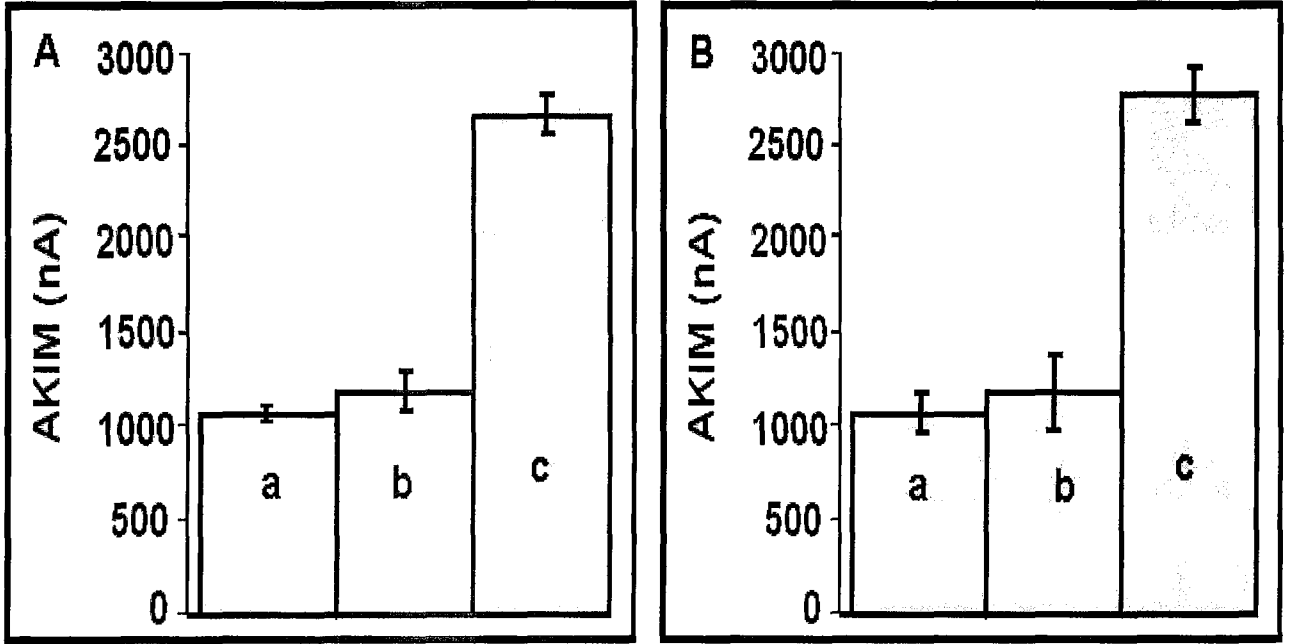
3.1.1 *MDB indikatörlüğünde yapılan dizi tayin çalışmasına ait bulguların değerlendirilmesi:*

3.1.1.1 *Diferansiyel puls voltametri tekniği ile MDB indikatörlüğünde hibridizasyon tayini incelenmesi:*

Yöntem 2.4.3.4.1'de belirtildiği gibi yapıldı.



Şekil 19: Diferansiyel puls voltametri tekniği ile MDB indikatörlüğünde hibridizasyon tayini incelenmesi; prob 1 tutturulmuş PGE yüzeyinde; a) hedef 1 ile hibridizasyondan sonra, b) hedef 2 ile hibridizasyondan sonra, c) yalnızca prob 1 tutturulmuş yüzeyden alınan MDB sinyallerine ait voltamogram.



Şekil 20: Diferansiyel puls voltametri tekniği ile MDB indikatörlüğünde hibridizasyon tayini incelenmesi; **A)** prob1 tutturulmuş, **B)** prob 2 tutturulmuş PGE yüzeyinde **a)** hibridizasyondan önce elektrot yüzeyinde yalnızca prob var iken, **b)** 4 bazı farklı hedef dizi ile, **c)** komplementer hedef dizi ile hibridizasyondan sonra ölçülen MDB sinyalleri.

Şekil 19 ve 20' de yüzeyine prob 1 ve prob 2 tutturulmuş elektrotların, bunların karşılıkları olan komplementer hedef diziler ve 4 bazı farklı hedef diziler ile hibridizasyonlarından sonra 20 μ M MDB ile etkileştirilmeleri sonucu elde edilen pik akımlarının ölçümleri gösterildi. Buna göre, MDB' nin - 0,12 V' da indirgenme sinyali verdiği ve bu sinyallerin iyi tanımlanmış olduğu gözlemlendi.

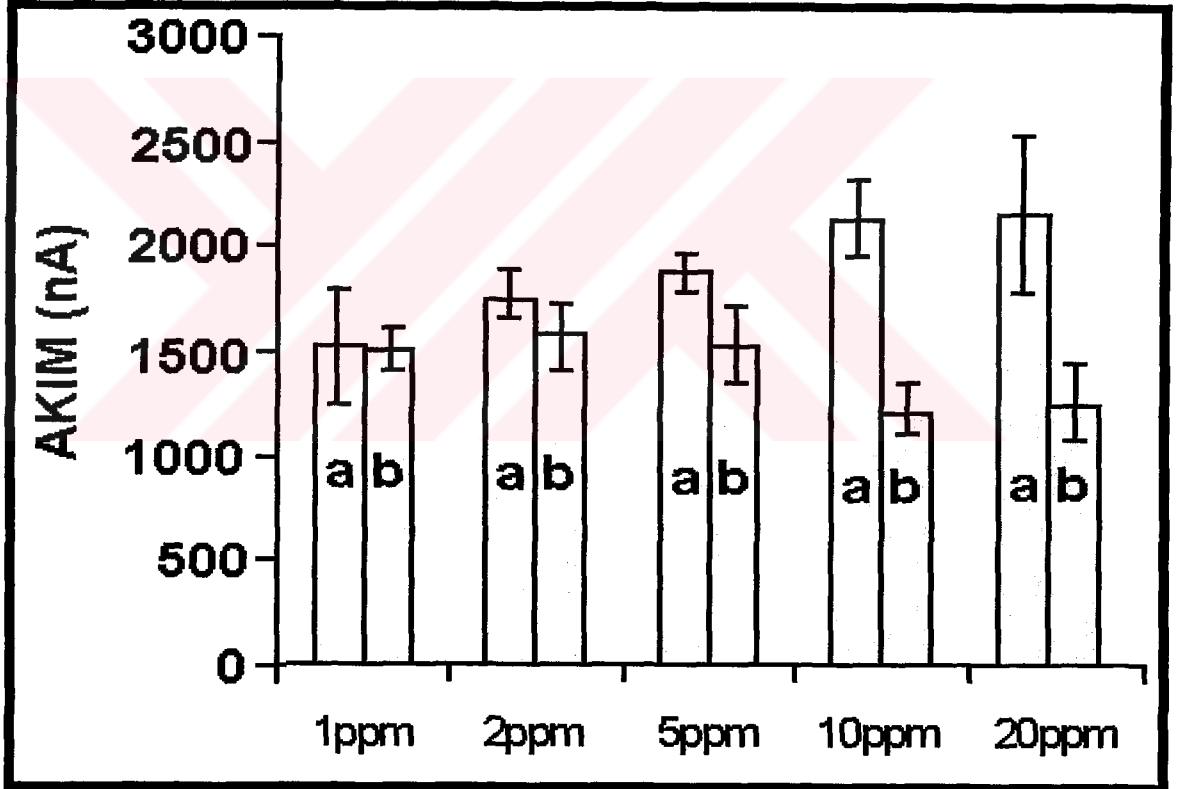
Her iki tip prob tutturulan elektrot yüzeyinde, bu problemlerin karşılıkları ile hibridizasyondan sonra alınan MDB sinyali, elektrot yüzeyinde yalnızca prob varken ve 4 bazı farklı hedef ile hibridizasyondan sonra alınan MDB sinyalinden oldukça yüksektir. Proben kendi karşılığı olan hedef ile oluşturduğu çift sarmalın yapısına MDB interkalatör özelliğinden dolayı rahatça girip birikebilir ve iyi tanımlanmış yüksek bir voltametrik sinyal elde edilir. Ancak yüzeyde yalnızca prob varken ve ya 4 bazı

farklı hedef ile hibridizasyondan sonra yüzeyde iyi tanımlı bir çift sarmal oluşamayacağı için MDB birikemez ve düşük bir MDB sinyali alınır.

Tüm parametrelerin MDB etkileşmesine ait üçer ardışık ölçüm tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir.

3.1.1.2 Prob derişimindeki değişimin MDB yanıtına etkisinin incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.3.4'de anlatıldığı gibi, her iki tip prob tutturulmuş PGE kullanarak yapıldı. Sadece elektrot yüzeyine bağlanan prob derişimi (1ppm, 2ppm, 5ppm, 10ppm, 20ppm) artırılarak çalışıldı.



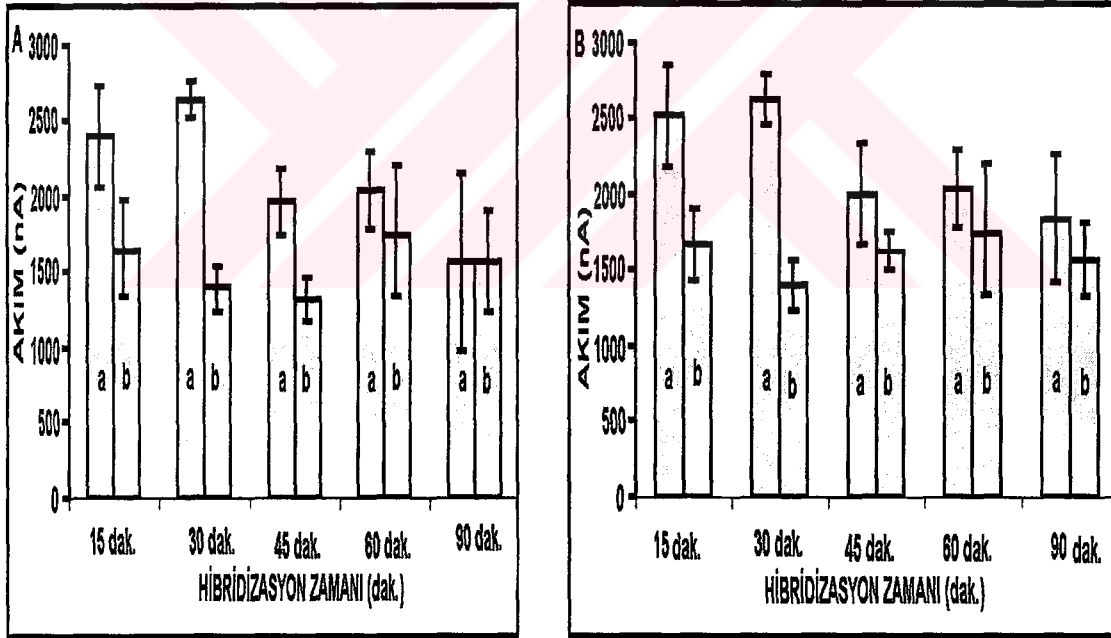
Şekil - 21 : Prob derişiminin hibridizasyondan sonra PGE ile alınan MDB yanıtına etkisi. Artan derişimlerde prob 1 tutturulmuş elektrot yüzeyinde, a) hedef 1 ile , b) hedef 2 ile hibridizasyondan sonra alınan MDB sinyalleri.

Her iki tip virüse ait prob derişimleri artırılarak MDB' deki yanıt değişimleri incelendi. Şekil - 21' deki prob derişimi - akım grafiğinde görüldüğü gibi, alınan yanıt

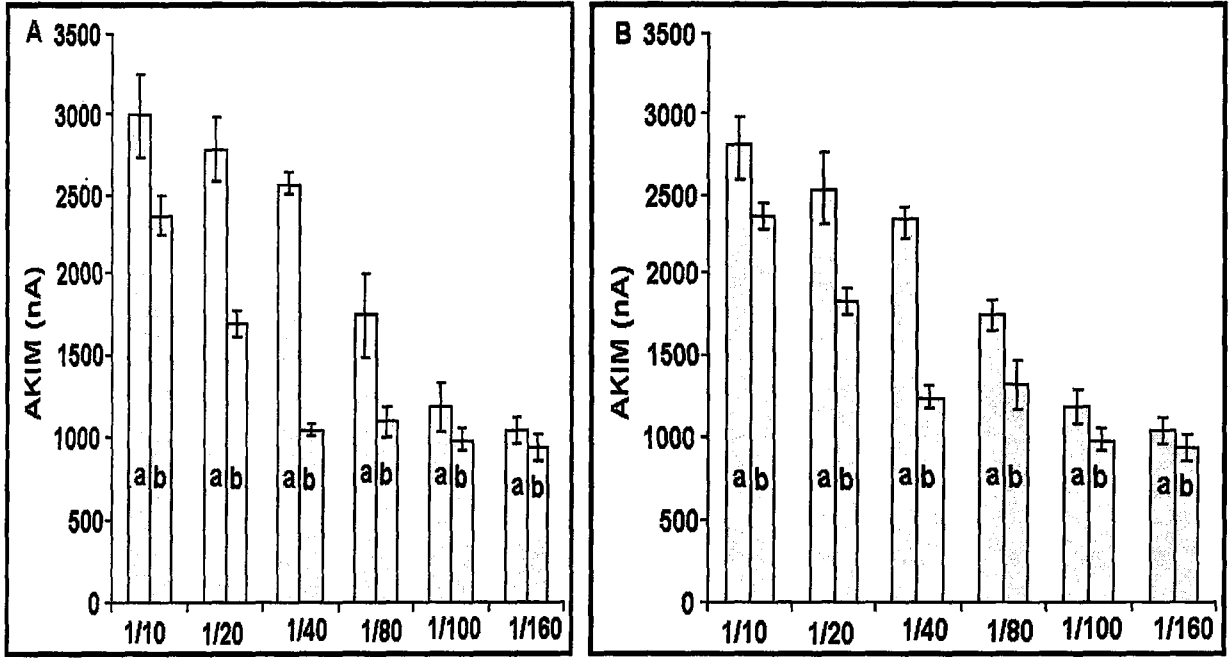
ait pik akımları; hem çift sarmalda hem de 4 bazı farklı diğer tipe ait hedef ile hibridizasyonunda 10ppm derişimine kadar artmakta, bunun üzerideki derişimlerde sabitlenmekte aynı zamanda bu derişimden itibaren HSV tip 1 ve tip 2 ayırımı daha iyi gözlenmektedir. Dolayısıyla çalışmamızda en uygun prob derişimi olarak 10ppm kullanılmıştır. Belli bir derişimden sonra akımdaki azalma yüzey doygunluğuna erişilmesinden kaynaklanmaktadır.

3.1.1.3 Hibridizasyon zamanının MDB yanıtına etkisinin incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.3.4'de anlatıldığı gibi, her iki tip prob tutturulmuş PGE kullanarak yapıldı. Hedef dizilerle olan hibridizasyon zamanları (15 dak., 30 dak., 45 dak., 60 dak., 90 dak.) artırılarak çalışıldı.



Şekil 22: Diferansiyel puls voltametri tekniği ile MDB indikatörlüğünde hibridizasyon zamanının etkisinin incelenmesi; **A)** prob 1 tutturulmuş, **B)** prob 2 tutturulmuş PGE yüzeyinde; a) probun komplementeri olan hedef ile hibridizasyonu, b) 4 bazı farklı hedef dizi ile hibridizasyonu sonucu alınan MDB sinyalleri.



Şekil 23: Diferansiyel puls voltametri tekniği ile MDB indikatörlüğünde PCR ürünü örneklerinin seyrelme oranının incelenmesi. **A)** Prob 1, **B)** Prob 2 kullanıldığında; **a)** probun komplementeri olan hedef ile hibridizasyonu, **b)** 4 bazı farklı hedef dizi ile hibridizasyonu sonucu alınan MDB sinyalleri.

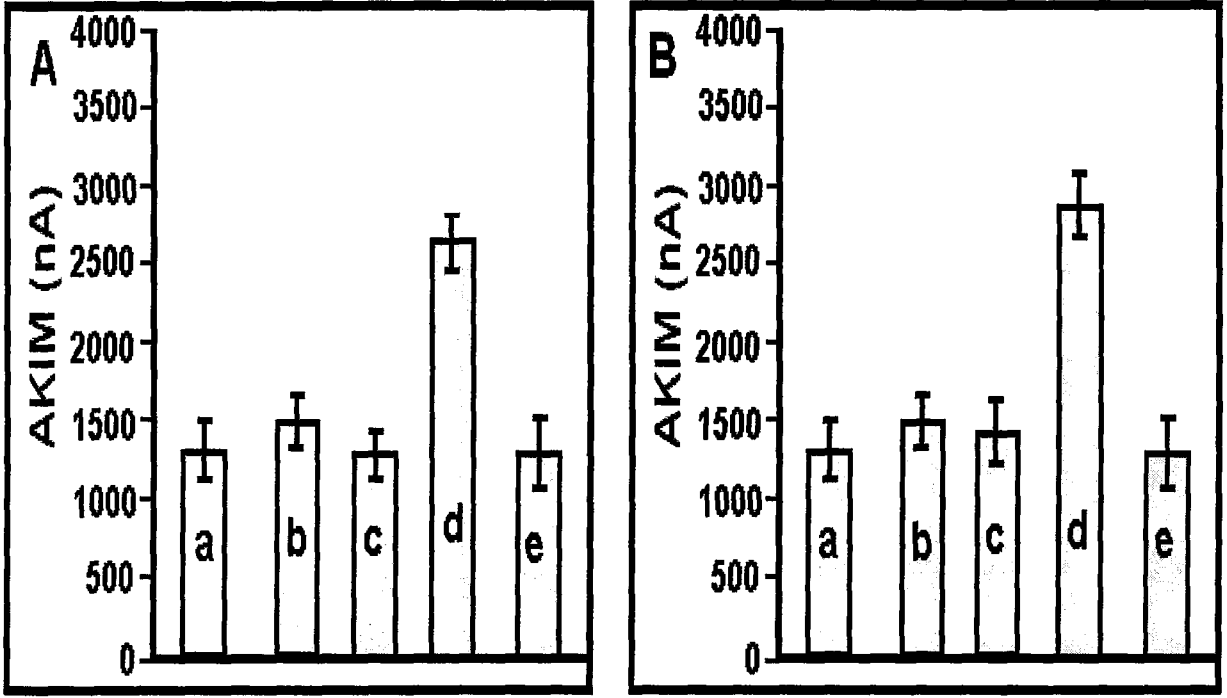
PCR ürünü örneklerinin seyrelme oranının HSV tip1 ve tip2 ayırımına etkisi incelenmiştir. Şekil - 23' de örneğin seyrelme oranındaki değişimin MDB yanıtına etkisini gösteren seyrelme oranı - akım grafiği yer almaktadır. Grafikten de anlaşıldığı gibi, seyrelme oranı arttıkça, alınan hibridizasyon yanıtına ait pik akımı azalmakta, ancak 1/40 oranına kadar iki tipin birbirinden ayırımı daha net gözlenmektedir. Bu orandan sonra ayırım net gözlenmemektedir. Yüksek derişimde, elektrot yüzeyine tutunan hedef dizi miktarındaki artış, elektrot yüzeyi ile çözelti ara yüzeyindeki elektriksel çift tabakanın yükünü ve buna bağlı olarak fon akımını arttırmaktadır. Fon akımının artması iyi tanımlanamayan piklerin elde edilmesine neden olmaktadır (68). Ayrıca, ortamda hedef dizi derişiminin probdan daha fazla olması durumunda, yüzeyde hibrit oluşumu yanında tek sarmal hedef dizinin de yüzeye tutunması söz konusudur. Yüzeyde bulunan hem çift sarmal hibritten hem de tek sarmal hedef

diziden dolayı, MDB yanıtında hibrite oranla bir artış gözlenmesi normaldir. Yüksek derişimde PCR ürünü örnek (1/40' in altındaki seyrelme oranında) kullanıldığında elde edilen MDB yanıtının, prob tutturulan elektrot ile alınan yanıtı yakın olması bu durumdan kaynaklanmaktadır. 1/40' in üzerindeki seyrelme oranında ayırımın iyi gözlenememesi, hedef dizi derişiminin düşük olmasından dolayı yüzeyde hibridizasyonun tam olarak gerçekleşmemesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle PCR ürünü örneklerle dayalı dizi tayini çalışmalarında, en uygun seyrelme oranı olarak, hibridizasyon tayininin en iyi şekilde yapılabildiği 1/40 kullanılmıştır. Bu oranda, prob tutturulan elektrot ile yüzeyinde hibrit oluşturulan elektrot yanıtları arasındaki fark en fazladır. Seyrelme oranı için paralel sonuçlar, G. Marrazza ve grubu tarafından da rapor edilmiştir (68).

3.1.2.2 HSV tip1 ve tip2'ye ait diziyi içeren PCR ürünü örneklerde dizi tayini çalışmalarına ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

2.4.3.5.2'de anlatıldığı şekilde yapıldı.

Şekil 24 A ve B' de 10 ppm prob 1 ve prob 2 tutturulan PGE kullanarak, her iki tipe ait hedef diziyi içeren PCR ürünü örnekler ile hibridizasyondan önce ve hibridizasyondan sonra, MDB için elde edilen diferansiyel puls voltamogramlarına ait sonuçlar yer almaktadır.



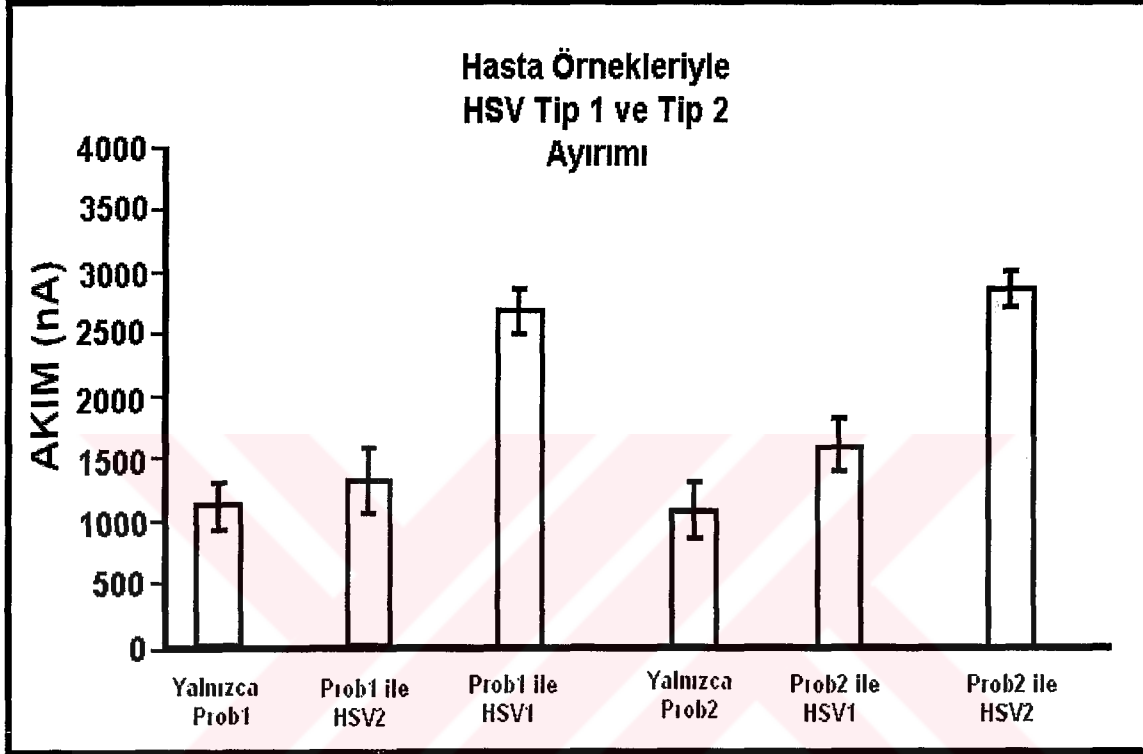
Şekil 24: Diferansiyel puls voltametri tekniği ile HSV tip1 ve tip2 ayırımının PCR ürünü hasta örneklerinden tayini:

A) prob 1 tutturulmuş PGE ile ; **a)** hibridizasyondan önce, **b)** HSV tip2 içeren PCR ürünü ile, **c)** rastgele dizi içeren (nonkomplementer) PCR ürünü örnek ile, **d)** HSV tip1 içeren PCR ürünü ile, **e)** herhangi bir PCR ürünü içermeyen boş PCR blank tamponu ile hibridizasyondan sonra, **B)** prob 2 tutturulmuş PGE ile; **a)** hibridizasyondna önce, **b)** HSV tip1 içeren PCR ürünü ile, **c)** rastgele dizi içeren (nonkomplementer) PCR ürünü örnek ile, **d)** HSV tip2 içeren PCR ürünü ile, **e)** herhangi bir PCR ürünü içermeyen boş PCR blank tamponu ile hibridizasyondan sonra elde edilen MDB sinyallerine ait histogram.

Pozitif örneklerle hibridizasyondan sonra elde edilen voltametrik pikin, prob tutturulan elektrot ile elde edilen pikten çok daha küçük olduğu gözlenmiştir. Bunun yanısıra, HSV tip1 ve tip2 ayırımına yönelik yapılan biyosensör tasarımının diziye özgül olduğunu kontrol etmek amacıyla, her iki tip prob, herhangi bir PCR ürünü içermeyen boş PCR blank çözeltisi ve farklı bir hastalığı temsil eden (Hepatit B) PCR

ürünü örnekleri ile hibridizasyona tabi tutulmuştur (71). Elde edilen sonuçlar tasarımı yapılan biosensörün özgül olduğunu ve PCR blank çözeltisinin hibridizasyon yanıtına etkisi olmadığını göstermektedir (Şekil 24)

3.1.3. HSV Tip1 ve Tip2 ayırımının genel değerlendirilmesi:



HSV PCR ÜRÜNÜ

5'

ATCAACTTCGACTGGCCCTTC(T/G)T(G/C)CTG(G/A)CCAAGCTGACGGA(C/G)AT(T/C)TACAAGGTCC
C(C/G)CT(G/C)GACGGGTACGG(C/G)CGCATGAACGGCCGGGG(C/T)GTGTT(T/C)CGCGTGTGGGAC
AT(A/C)GGCCAGAGCCACTTCCAGAAGCGCAGCAAGATAAAGGTGAACGGCATGGTGA(G/A)CATCGAC
ATGTACGG 3'

(HSV 1 PCR ÜRÜNÜ / HSV2 PCR ÜRÜNÜ)

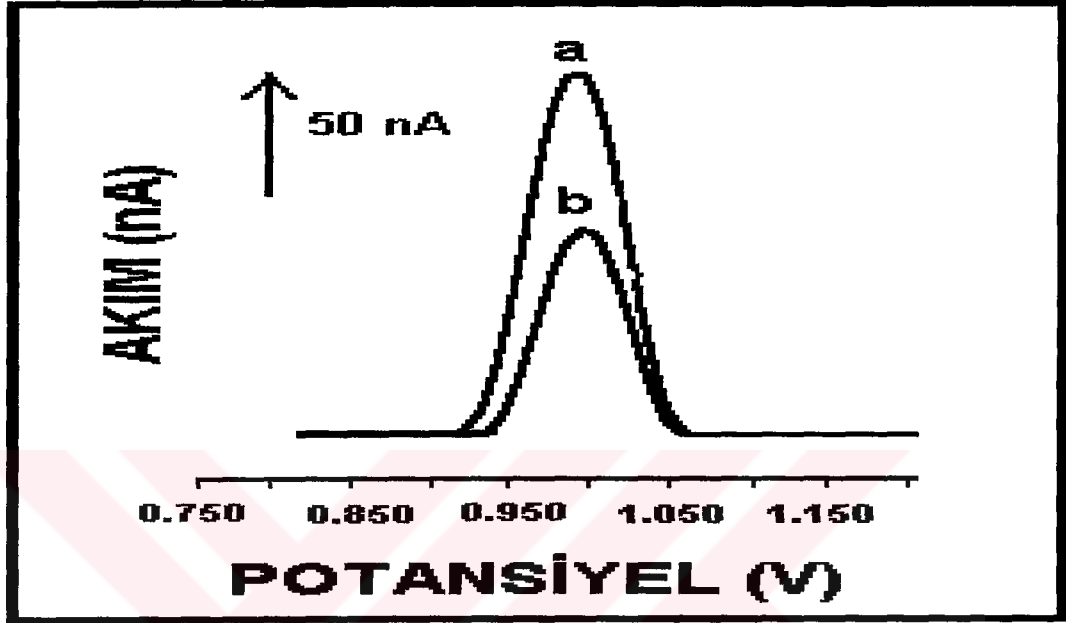
— Prob (prob Tip1 / Prob Tip2)

Şekil 25: HSV Tip1 ve Tip2 ayırımının genel olarak değerlendirilmesi.

3.2. İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemi:

3.2.1. CPE ile indikatörsüz DNA hibridizasyon tayinine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

2.4.4.1' de anlatıldığı şekilde yapıldı.



Şekil 26: Diferansiyel puls voltametri ile a) tek sarmal DNA, b) çift sarmal DNA'da Guanin bazının yükseltgenme sinyali.

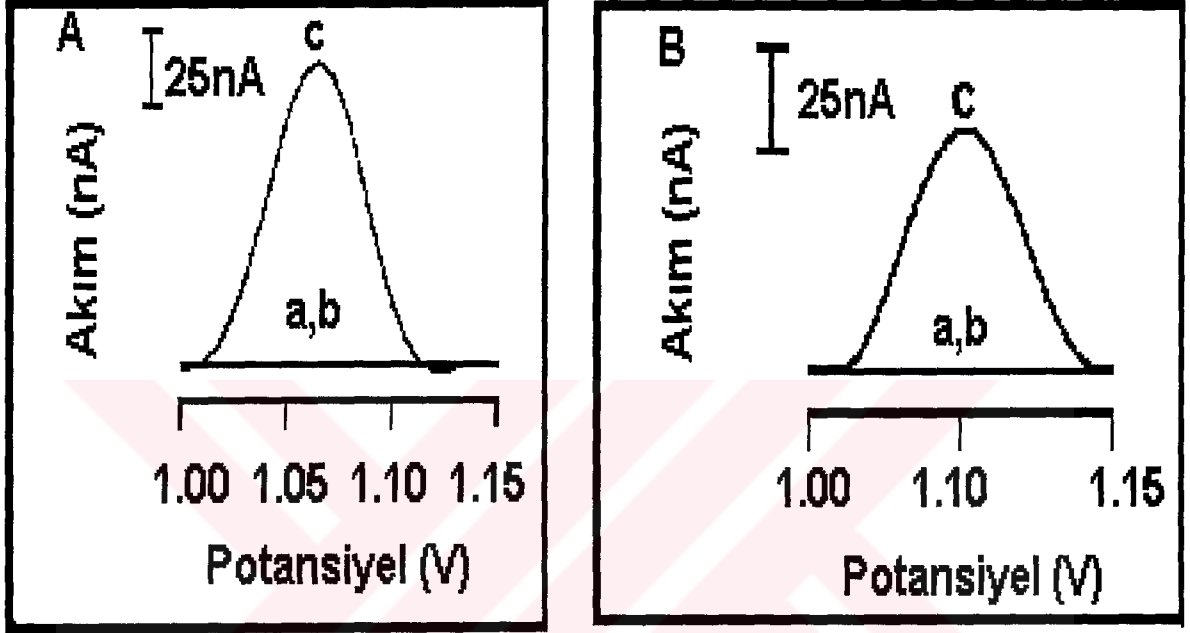
Şekil 26' da görüldüğü gibi Guanin 1.0 V' da bir yükseltgenme sinyali vermiş ve a'daki tek sarmal sinyali, b'deki çift sarmal sinyalinden oldukça yüksektir. Bunun nedeni; tek sarmal dizide, tüm guaninlerin açıkta olmasından, çift sarmalda ise hibridizasyon ile bunların kapanmasından kaynaklanır.

3.3. İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemiyle Akondroplazi G380R

Mutasyonunun Tayini:

3.3.1 Akondroplazi G380R mutasyonunun sentetik dizilerle çalışmasına ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

2.4.5.3'de anlatıldığı şekilde yapıldı.



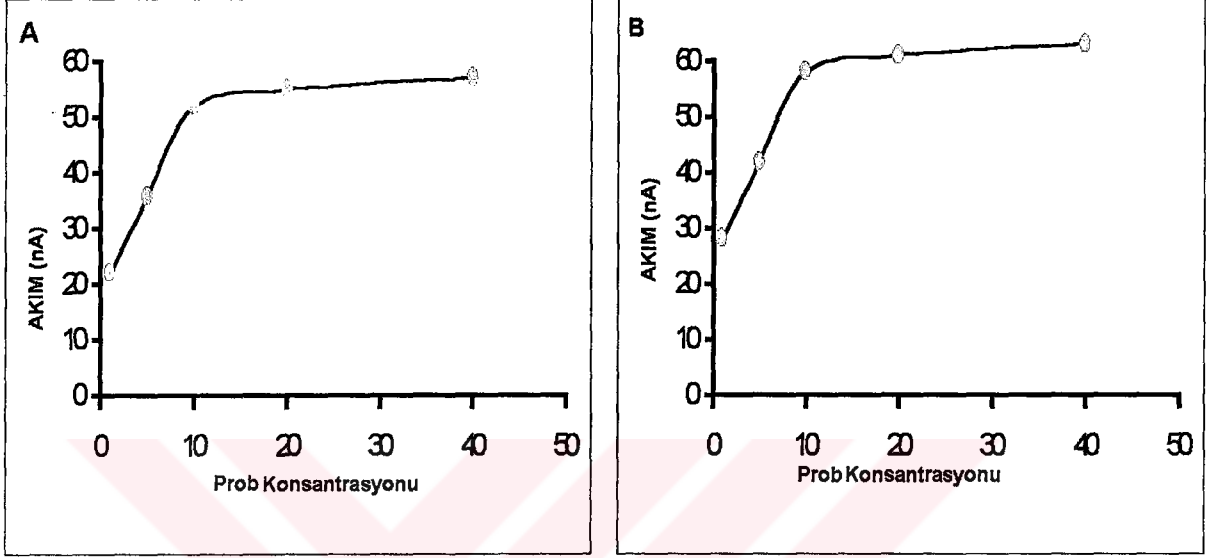
Şekil 27: Sentetik oligonükleotit dizileri kullanılarak 10ppm A) sağlıklı tip, B) mutasyonlu tip prob ile a) hibridizasyondan önce, b) 1/40 seyreltilmiş PCR kör çözeltisi ile, c) 15ppm komplementer hedef dizi ile hibridizasyondan sonra DPV ile alınan guanin yükseltgenme sinyalleri.

Şekil 27' de görüldüğü üzere sentetik oligonükleotitler kullanılarak yapılan hibridizasyon tayini çalışması olumlu sonuç vermiştir. Buna göre elektrot yüzeyinde yalnızca inozin içeren prob dizi bulunduğu herhangi bir sinyal alınmazken komplementer hedef dizi ile hibridizasyondan sonra guanin sinyali net olarak görülmüştür. Sistemi kontrol amaçlı ve PCR ürünleri ile yapılacak olan çalışmada PCR kör çözeltisinden herhangi bir kirlilik olup olmadığını anlamak için, bu çözeltiyle

hibridizasyona tutuldu. Bunun sonucunda da hiçbir Guanin sinyali gözlenmedi.

3.3.2 Prob derişimindeki değişimin indikatörsüz mutasyon tayinine etkisinin incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

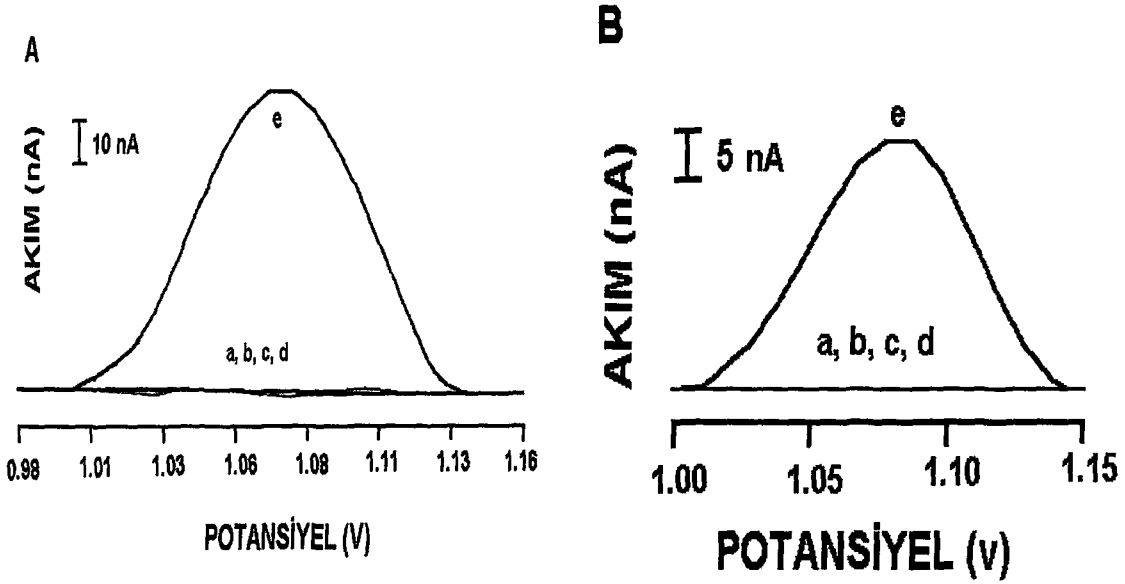
2.4.5.3.1 'de anlatıldığı şekilde yapıldı.



Şekil 28: Artan derişimlerde A: Sağlıklı tip, B: Mutasyonlu tip probun 15ppm komplementer hedef ile hibridizasyonunun tayini.

Şekil 28' de sabit derişimdeki hedef diziye karşı artan derişimlerde prob hibridizasyona tabi tutulmuştur. Burada gözlenen sonuca göre 10ppm prob derişimine kadar alınan hibridizasyon sinyalleri, derişimin artmasıyla birlikte artmaktadır ancak 10ppm derişimden sonra elektrot yüzeyinin doygunluğa ulaşmasıyla sinyaldeki artış durur.

3.3.2.2. Hasta örnekleri kullanarak Akondroplazi G380R mutasyonunun tayini ve Heterozigot / Homozigot ayırımına ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

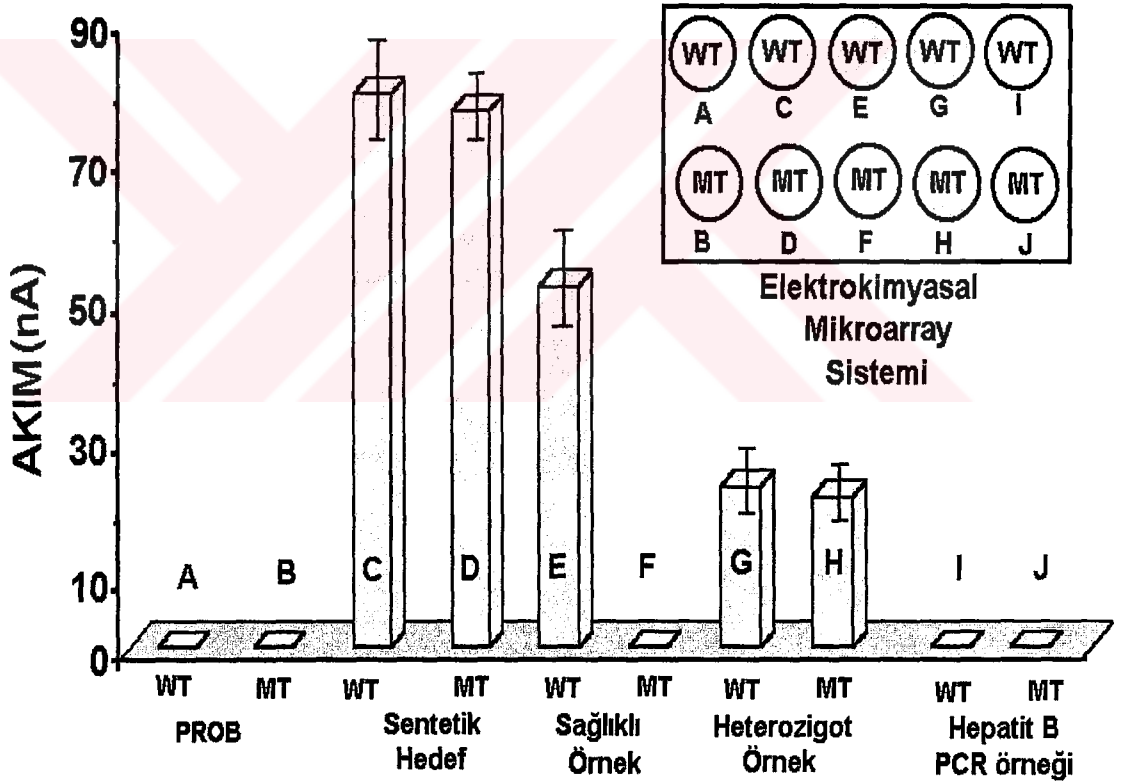


Şekil 29: DPV ile, **A)** sağlıklı tip prob tutturulmuş CPE kullanarak, **a)** hibridizasyondan önce, **b)** PCR blank çözeltisi ile, **c)** Faktör V Leiden (FcV) PCR ürünü içeren dizi ile (nonkomplementer) **d)** Hepatit B PCR ürünü içeren dizi ile (nonkomplementer), **e)** sağlıklı kişiye ait PCR ürünü ile hibridizasyondan sonra; **B)** mutasyonlu tip prob tutturulmuş CPE kullanarak, **a)** hibridizasyondan önce, **b)** PCR blank çözeltisi ile, **c)** FcV PCR ürünü içeren dizi ile (nonkomplementer), **d)** sağlıklı kişiye ait PCR ürünü ile, **e)** heterozigot kişiye ait PCR ürünü ile hibridizasyondan sonra elde edilen guanin sinyalleri.

Şekil 29' da, her iki tip probun CPE yüzeyine tutturulmasından sonra çeşitli hasta örnekleriyle yapılan sonuçlar yer almaktadır. Şekil 29A' da sağlıklı tip prob tutturulmuş elektrot yüzeyinde sağlıklı bir kişiye ait PCR örneği ile hibridizasyondan sonra oluşan hibrite ait guanin sinyali gözlenmiştir. Şekil 29B' de ise mutasyonlu tip prob tutturulmuş elektrot yüzeyinde heterozigot bir hastaya ait PCR örneği ile hibridizasyondan sonra oluşan hibrite ait guanin sinyali elde edilmiştir, ancak sağlıklı

kişiyeye ait olan sinyale oranla yarı yarıya bir düşme olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi heterozigot hastaya ait PCR örneğinde hem sağlıklı hem de mutasyonlu genden eşit oranda varken sağlıklı kişiyeye ait PCR ürününün tümünün aynı tip sağlıklı geni taşımasıdır. Sistemi kanıtlamak için, CPE' na tutturulmuş prob rastgele bir dizi olan HBV ve FcV hastalarına ait denatüre edilmiş PCR örneği ile hibridizasyondan sonra ölçüldüğünde herhangi bir guanin sinyali gözlenmemiştir. Bu da sistemimizin doğruluğunu ve özgünlüğünü kanıtlar.

3.3.2.3 İndikatörsüz DNA Dizi Algılama Yöntemi ile İnozinli Sistemde Akondroplazi G380R Mutasyonunun Saptanması:



Şekil 30: Elektrokimyasal mikroarray sistemine yönelik EVET / HAYIR sistemiyle homozigot – heterozigot ayırımı

Şekil 30 Akondroplazi hastalığında kullanılan EVET / HAYIR sistemini gösteren histogramdır. Buna göre A ve B yalnızca prob dizilere, C ve D sentetik oligonükleotitlerle, E ve F sağlıklı kişiye ait PCR ürünü ile, G ve H heterozigot kişilere ait PCR ürünü ile, I ve J ise Hepatit B'li hastaların PCR ürünü ile hibridizasyonu sonucu alınan guanin sinyalleridir. Bunun sonucunda gözleendiği üzere, prob dizilerde hiçbir sinyal gözlenmezken sentetik oligonükleotitlerle yapılan hibridizasyon çalışmasında oldukça yüksek bir guanin sinyali elde edildi. Bunun yanında PCR ürünleriyle yapılan çalışmalarda ise, sağlıklı kişiye ait PCR ürünü ile hibridizasyondan sonra elde edilen guanin sinyali, heterozigot kişiye ait PCR ürünü ile hibridizasyondan sonra elde edilen guanin sinyalinden yüksektir. Ancak mutasyonlu tip prob kullanıldığında sağlıklı kişiye ait örnekten hiçbir sinyal alınmazken, heterozigot hastada her iki tip prob ile sinyal alındı. Sistemi kontrol amaçlı, bu dizileri taşımayan HBV' ye ait PCR ürünü ile hibridizasyondan sonra probta olduğu gibi hiç bir sinyal alınmadı.

BÖLÜM V

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada, ilk olarak indikatörlü DNA dizi algılama yöntemi ile genomları birbirine çok benzeyen Herpes Simpleks tip 1 ve tip 2 virüslerinin birbirinden ayrılmasına yönelik bir elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımı gerçekleştirildi. Bu amaçla tasarlanan biyosensörde çalışma elektrodu olarak bir grafit elektrot olan kalem ucu elektrot kullanıldı (PGE).

Bu amaçla tasarlanan biyosensör her iki tipi temsil eden prob dizilerin, elektrot yüzeyine kovalent olarak tutturulması ve hedef dizi ile oluşan hibridizasyonun interkalatör özellikteki Meldola Mavisi (MDB)' den alınan sinyal farklılaşması ile saptanması esasına dayanır. Çalışmada prob olarak, her iki tipe ait kullanılan PCR haritasında birbirlerine göre yakın 4 noktada baz farklılığı olan 22 bp'lik gen bölgesi seçildi.

Elektrot yüzeyine bağlanan prob dizinin indikatör MDB ile etkileşmesinden sonra probun tek sarmal yapıda olmasından dolayı düşük, karşılığı olan hedef dizi ile hibridizasyondan sonra MDB ile etkileşimden sonra; elektrot yüzeyinde çift sarmal oluşumuyla MDB' nin bu çift sarmala girip birikmesi sonucu, yüksek MDB sinyali gözlemlendi. Ancak prob dizilerin diğer tip proba ait hedef diziler ile hibridizasyonundan sonra, 4 noktada farklılık göstermesi ile prob sinyaline yakın düşük bir MDB sinyali gözlemlendi.

Gerçek hasta örnekleriyle çalışmalara geçmeden önce en uygun hibridizasyon ve ayırım koşullarının sağlanması için sentetik dizilerle tayin gerçekleştirildi. Optimum

ayırımı ve hibridizasyon koşulları sağlandıktan sonra hasta örneklerinden hazırlanan PCR ürünü örnekler ile tayin gerçekleştirildi.

Tüm bu çalışmanın sonucunda, ilk defa elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanılarak Herpes Simpleks tip 1 ve tip 2'nin birbirinden ayırımı, diğer yöntemlere göre daha kolay ve ucuz olarak gösterildi.

Çalışmamızın ikinci bölümünde indikatörsüz elektrokimyasal DNA dizi algılama yöntemi geliştirilip indikatörsüz dizi algılamasına yönelik elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımı gerçekleştirildi. Buna göre yapılan ilk deneylerde DNA bazlarından guaninin 1.0 V' da yükseltgenmesine bağlı olarak elektrokimyasal bir yanıt verdiği gözlemlendi. Buna bağlı olarak prob diziler gibi tek sarmal DNA' ya ait guanin'den alınan yanıt guanin' in açıkta olmasından dolayı oldukça yüksektir. Ancak hibridizasyondan sonra oluşan çift sarmala ait guanin sinyallerinde guanin'in kapanmasından dolayı alınan yanıtta önemli oranda düşme gözlenir. Buna yönelik yapılan çalışmada karbon pastası elektrodu (CPE) yüzeyine elektrostatik olarak tutturulmuş tek sarmal prob dizi ve hibridizasyondan sonra oluşan çift sarmal DNA ile tayin yapıldı ve böylece laboratuvarımızda ilk defa indikatörsüz dizi algılamasına yönelik çalışmalar başladı.

Çalışmamızın son kısmında indikatörsüz DNA dizi algılamasına yönelik tasarlanan elektrokimyasal DNA biyosensörü ile Akondroplazi G380Rmutasyonu tayini gerçekleştirildi. En uygun hibridizasyon, mutasyon ayırımı ve tayin koşulları sentetik oligonükleotit dizileriyle sağlandıktan sonra gerçek hasta örneklerinden elde edilen PCR ürünleri kullanılarak tek nokta mutasyon tayini yapıldı.

Bunun için hem mutasyonu içeren hem de sağlıklı gene ait iki tip seçilen prob dizileri guanin yerine bir guanin analogu olan, inozin içeriyordu. Inozin, guanin bazının yükseltgenebilir grubu olan serbest amino grubunu içermeyen analogudur.

Sitozin bazları ile iki hidrojen bağı yapabilmektedir ancak guanin gibi redoks tepkimelerine girmemektedir. Böylece inozinden 1.0 V civarında hiçbir sinyal gözlenmemektedir. Prob dizisinden herhangi bir guanin sinyali alınmazken hibridizasyondan sonra ortamdaki guaninlerin varlığıyla sinyal alınır. Bu da EVET / HAYIR sisteminin temelini oluşturur.

Çalışma, karbon pastası elektrodunun yüzeyine elektrostatik olarak tutturulan prob dizinin denatüre edilmiş hedef PCR ürünün ile hibridizasyonu sonucu alınan guanin yükseltgenme sinyallerine dayanmaktadır. Elektrot yüzeyine tutturulmuş inozinli prob hiçbir sinyal vermezken hibridizasyondan sonra probun kendi karşılığı ile oluşan çift sarmaldan guanin sinyali alınır ancak aynı koşullarda diğer tip PCR ürünü ile hibridizasyondan sonra prob gibi hiçbir sinyal alınmadı. Bu şekilde sağlıklı tip prob ile yapılan deneylerde sağlıklı kişilerden alınan örnekler, yalnızca sağlıklı tip prob ile sinyal verip, mutasyonlu tip prob ile hiçbir sinyal gözlenmezken, heterozigot kişilerden alınan örneklerde her iki tip prob ile de sinyal gözlenmiştir. Böylece homozigot-heterozigot ayırımı da net olarak gözlemlendi.

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

Çalışmalarımız sonucunda, elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle, gerek indikatör kullanarak, gerek indikatörsüz dizi algılama yöntemleri ile çeşitli kalıtsal ve enfeksiyon hastalıklarının tayinlerinde, günümüzde rutin olarak kullanılan pahalı ve

kanserojen ajan kullanılan yöntemlere alternatif olarak daha kolay ve ucuz bir yöntem olan ve DNA mikroarray teknolojisinin temeli olan biyosensör teknolojisini geliştirildi.



ÖZET

Bu çalışmada, elektrokimyasal DNA biyosensörlerine dayalı indikatörlü ve indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemleri geliştirildi, bu yöntemlerin kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların tayininde klinik olarak uygulanabilirliği gerçek hasta örnekleri kullanılarak gösterildi.

Çalışmada ilk olarak interkalatif özelliği ile hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan Meldola Blue (MDB) ile, indikatörlü DNA dizi algılama yöntemine dayalı; genomları bakımından birbirlerine çok benzeyen, vücutta oluşturduğu enfeksiyon bölgeleri bakımından farklılık gösteren Herpes Simplex (HSV) Tip I ve Tip II virüslerinin tayini ve birbirlerinden ayırımı gerçekleştirildi. Hastalığın tayini ve iki tip virüsün birbirinden ayırımı, her iki tipe ait prob kullanılarak, hem sentetik oligonükleotitler ile hem de hasta örneklerinden hazırlanmış PCR ürünleri ile gerçekleştirildi. Çalışma elektrot yüzeyine kovalent olarak bağlanan prob dizilerin hedef diziler (sentetik oligonükleotitler ve denatüre edilmiş PCR ürünleri) ile hibridizasyonundan sonra MDB ile etkileşimlerinin ardından MDB sinyallerindeki farklılıkların diferansiyel puls voltametri (DPV) ile ölçülmesine dayandırıldı. PCR ürünleriyle yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde yöntemin klinik alanda uygulanabilirliği gözlemlendi.

Çalışmanın ikinci bölümünde indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemine yönelik elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarlandı ve bu yöntemle ileri derecede boy kısalığı yapan ve tüm toplumlarda sıkça rastlanan bir iskelet displazisi hastalığı olan, 4 numaralı kromozomun p kolunun 16.3 bölgesinde yer alan fibroblast büyüme faktörü reseptör 3 (FGFR3) geninin 1138. nükleotidinde yer alan guanin bazının adenin ve ya sitozine dönüşümü ile ortaya çıkan Akondroplazi G 380R mutasyonunun tayini yapıldı. Yöntem elektrot yüzeyine elektrostatik olarak bağlanan

inozinli probun ve hibridizasyondan sonra diferansiyel puls voltametriyle alınan Guanin sinyallerinin farklılanması esasına dayandırıldı. Guanin analogu olan inozinli probun ile hiçbir elektrokimyasal yanıt alınmaz iken karşılığı olan hedef dizi ile, hedef dizinin sahip olduğu guaninler sayesinde 1.0 V' da guanin sinyali alındı ancak, tek bazı farklı olan hedef ile hibridizasyondan sonra prob gibi hiçbir sinyal gözlenmedi. Bu da EVET/ HAYIR SİSTEMİ' nin esasını oluşturdu. Çalışma hem sentetik oligonükleotitler ile hem de hasta örneklerinden hazırlanmış PCR ürünleri ile gerçekleştirildi. Çalışmada iki tip prob kullanılmasıyla, tek nokta mutasyonunun tayini yanısıra heterozigot - homozigot ayırımı da yapıldı. Böylece tüm sonuçlar değerlendirildiğinde çalışmanın kliniğe uygulanabilirliği saptandı.



Abstract

In this study, indicator-free and indicator based DNA detection methods are developed by using DNA biosensors. The applicability of these methods on detection of genetic and inherited diseases is showed by using real samples from patients.

In the first part, the detection and discrimination of Herpes Simplex (HSV) type I and type II viruses, which have similar genomes but differ with infection regions on body, are performed by using indicator based DNA detection method and Meldola Blue (MDB) which intercalates into DNA double strand as a hybridization indicator. The detection and discrimination of these two types are studied with synthetic oligonucleotides and PCR real samples by using both of its probes. Probes are attached to the electrode surface covalently. The probe-modified electrode is hybridized with target synthetic oligonucleotides and PCR real samples. Hybrid, which has occurred on the electrode surface, is interacted with MDB and the differences on the MDB signals are measured with differential pulse voltammetry (DPV).

In the second part, an electrochemical DNA biosensor based on indicator-free DNA detection method is designed. Achondroplasia G380R mutation which is occurred with a change of guanine base at the position of 1138 on fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3) gene to adenine or cytosine bases, is detected with this method. Method is based on the electrostatic immobilization of inosine-modified probe on the electrode surface and the detection of differences on guanine signals with DPV after hybridization. Inosine is an analog base for guanine and it has no signal at the potential of guanine. The advantage of this method is no signal is detected with inosine substitute probe but guanine signal at 1.0 V is detected after hybridization with target because of the guanine bases on target sequence. This is

the basis of YES / NO system. The study is performed with synthetic oligonucleotides as well as real samples. The discrimination of heterozygous and homozygous genes is performed as well as point mutation by using two different probes.

Observed results are showed the applicability of this study on clinical diagnosis.



Yaralanılan Kaynaklar

1. Alvarez-Lueje A, Lopez C, Nunez-Vergara LJ, Squella J.A., (2001), Voltammetric behavior and analytical applications of lomefloxacin, an antibacterial fluorquinolone, *J. AOAC. Int.*, 84(3): 649-58.
2. Analitik Kimyanın Temelleri, Skoog, D. A., West, D.A., Holler, F.J., Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, (1996), Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 303-495.
3. Arkin, M.R., Stemp, E.D.A., Holmlin, R.E., Barton, J.K., Hörmann, A., Olson, E. J. O., Barbara, P.F., (1996), Rates of DNA mediated electron transfer between metallointercalators, *Science*, 273: 475-480.
4. Bard, A. J., "Chemical modification of Electrodes", (1983), *J. Chem. Edu.*, 60: 302-304.
5. Barton, J.K., (1986), Metals and DNA: Molecular left-handed complements, *Science*, 233: 727- 734.
6. Barton, J.K., Goldberg, J.M., Kumar, C.V., Turro, N.J., (1986), Binding modes and base spesificity of tris (phenantroline) ruthenium (II) enantiomers with nucleic acids tuning the stereoselectivity, *J. Am. Chem. Soc.*, 108: 2081-2088.
7. Bej, A.K. (1996), Chapter 1: Nucleic acid hybridizations: principles and strategies, *Nucleic acid analysis: Principles and Bioapplications*; Ed. Dangler, C.A., Wiley-Liss, Inc., s. 1-29.
8. Bertino, J.R. (1992), Antineoplastic Drugs, *Textbook of Pharmacology*, Smith, C.M. and Reynard, A.M., *Section IX - Cancer Chemotheraphy*; W. B. Saunders Company, USA; 957-958.
9. Brabec, V., Koudelka, J. (1980), Oxidation of DNA at carbon electrodes the effect of the quality of the DNA sample, *J. Electroanal. Chem.*, 116:

10. Brett, A.M. Oliveira, Macedo, T.R.A., Raimundo, D., Marques, M.H., Serrano, S.H.P. (1998). Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 861-867.
11. Brett, A.M.O., Piedade, J.A.P., Serrano, S.H.P., (2000), Electrochemical oxidation of 8-oxoguanine, *Electroanalysis*, 12, 969-973.
12. 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.
13. Cai, X., Rivas, G., Farias, P., Shiraishi, H., Wang, J., Palecek, E., (1996), Potentiometric stripping analysis of bioactive peptides at carbon electrodes down to subnanomolar concentrations, *Anal. Chim. Acta.*, 332:49-57.
14. Cai, X., Rivas, G., Farias, P.A.M., Shiraishi, H., Wang, J., Fojta, M., Palecek, E. (1996), Trace measurements of plasmid DNAs by adsorptive stripping potentiometry at carbon paste electrode, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 40: 41-47.
15. Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P., Wang, J., Tomschik, M., Jelen, F., Palecek, E. (1997), Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces, *Anal. Chim. Acta*, 344: 65-76.
16. Carter, M.T. and Bard, A. J. (1987). Voltammetric studies of the interaction of tris (1,10-phenanthroline) cobalt (III) with DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 7528-7530.
17. Carter, M.T., Rodriguez, M., Bard, A.J., (1989), Voltammetric studies of interaction of metal chelates with DNA 2. tris chelated complexes of Cobalt (III) and Iron (II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine, *J. Am. Chem. Soc.*, 111:8901-8911.

18. Cheng, C.C., Goll, J.G., Neyhart, G.A., Welch, T.W., Singh, P., Thorp, H.H., (1995), Relative rates and potentials of competing redox process during DNA cleavage: oxidation mechanism and sequence specific catalysis of the self inactivation of oxometal oxidants by DNA, *J.AM.Chem. Soc.*, 117: 2970-2980.
19. Chi, Q., Gopel, W., Ruzgas, T., Gorton, L., Heiduschka, P., (1995), Effects of pretreatments and modifiers on electrochemical properties of carbon paste electrodes, *Electroanal.*, 9: 357-365.
20. Collins, F.S., Patrinos, A., Jordan, E., Chakravarti, A. Gesteland, R., Walters, L. and the members of the DOE and NIH planning groups. (1998). New goals for the U.S. Human Project: 1998-2003, *Science*, 282: 682-689.
21. Coulet, P. R., "What is a Biosensor?" Chapter 1; " Biosensor principles and applications", Ed: Blum, L. J., Coulet, P. R., (1991), Marcel Dekker Inc., New York, sayfa 1-6.
22. Dervan, P.B. (1986). Design of Sequence-specific DNA-binding molecules, *Science*, 232: 464-471.
23. Dervan, P.B. (1998). Sequence specific recognition of double helical DNA. A synthetic approach, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2: Ed. Eckstein, F. and Lilley, D.M.J., Springer-Verlag, Berlin, s.49-64.
24. DNA structure and Function; Chapter 1- Introduction to the Structure, properties, and reactions od DNA; Editör, R. R. Sinden, Academic Press, California, 1994, sayfa 1-57.
25. Electrochemistry, C. M. A., Brett, A. M. O., (1992), Oxford University Press, 3. Baskı.
26. Enstrümental Analiz, Prof. Dr. Atilla Yıldız ve Prof. Dr. Ömer Genç, Hacettepe Yayınları A-64, 1993, sayfa; 289-384.

27. Erdem A, Meriç B., Kerman K., Dalbastı T., Ozsoz M. (1999), Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor, *Electroanal.*, 11: 1372-1376.
28. 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.
29. Erdem A., Kerman K., Meriç B., Akarca U.S., Ozsoz M. (1999), DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Electroanalysis*, 11: 586-588.
30. Erdem A., Kerman K., Meriç B., Akarca U.S., Ozsoz M. (2000), Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus, *Anal. Chim. Acta*, 422: 139-149.
31. Erdem A., Kerman K., Meriç B., Ozsoz, M. (2001). Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator, *Electroanalysis*, 13: No. 3, 219-223.
32. Erdem, A, Meric, B., Kerman, K., Dalbastı, T., Ozsoz, M., (1999), Detection of interaction between metal complex indicator and DNA by using electrochemical biosensor, *Electroanalysis*, 11 (18): 1372-1376.
33. Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Ozsoz, M., (2003), Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on Guanine signal, *Electroanalysis*, 15 (7): 1-7.
34. Erdem, A., Ozsoz, M., (2000), Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA, *Turk. J. Chem.*, 25: 469-475
35. Erdem, A., Ozsoz, M., (2001), Interaction of anticancer drug epirubicin with DNA, *Anal. Chim. Acta*, 437: 107-114.
36. Erdem, A., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical DNA biosensor based

on DNA drug interactions, *Electroanal.*, 14 (14): 965-974.

37. Erensoy, S., (2003), İnsan Herpes Virusları, E.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ders notları.

38. Evans; A. (1991). Potentiometry and ISE, ACOL, London, s.106-198.

39. Farmakoloji - İlaç uygulamalarında temel kavramlar, (1992). 63.Bölüm: Antikanser İlaçlar, Editör, Prof. Dr. İsmet Dökmeci, Nobel Tıp Kitabevleri, 819-848.

40. 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.

41. Fojta, M., Havran, L., Fulneckova, J., Kubicaova, T., (2000), Adsorptive transfer stripping AC voltammetry DNA complexes with intercalators, *Electroanal.*, 12: 926-934.

42. Hall, E.A.H. (1990). Biosensors, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere; s.3-30.

43. Hashimoto, K., Ito, K., Ishimori, Y., (1994), Novel DNA sensor for electrochemical gene detection, *Anal. Chim. Acta*, 286: 219-224.

44. Herne, T.M., Tarlov, M.J.(1997). Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 8916-8920.

45. Hodgson, J., "Shrinking DNA diagnostics to fill the markets of the future", *Nature Biotech.*, 16, (1998), 725-727.

46. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., Thomas, J.W., PCR Protocols: A Guide to methods and applications, Academic Press INC., San Diego-California.

47. Jelen, F., Fojta, M., Palecek, E. (1997). Voltammetry of native double-

stranded, denatured and degraded DNAs, *J. Electroanal. Chem.*, 427: 49-56.

48. 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.

49. Johnston, D.H., Thorp, H.H., (1996), Cyclic voltammetry studies of polynucleotide binding and oxidations by metal complexes Homogeneous electron transfer kinetics, *J. Physic., Chem.*, 100: 13837-13843.

50. Johnston, D.H., Welch, T.W., Thorp, H.H. (1996). Electrochemically activated nucleic acid oxidation; Metal Ions in Biological systems, Ed. Sigel, A., Sigel, H.; 33: Marcel Dekker, Inc, NY; 299-324.

51. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002), Label free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes, *Electroanal.*, 14 (23), 1-6.

52. Kara, P., Ozkan, D., Erdem, A., Kerman, K., Pehlivan, S., Ozkinay, F., Unuvar, D., Itirli G., and Ozsoz, M., (2003), Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology, *Clinica Chimica Acta*, 336(1-2): 57-64

53. Kara,P, Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA , *Electrochemistry Communications*, 4: 705-709

54. Kara,P, Ozkan, D., Kerman, K., Meric, B, Erdem, A., Ozsoz, M., (2002), DNA sensing on glassy carbon electrodes by using hemin as electrochemical hybridisation label, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373: 710-716.

55. 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.

56. Kerman K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, B., Gooding, J.J., Ozsoz, M., (2002), Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 462: 39-47.

57. Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara., P., Erdem, A., Ozsoz M., (2001), Electrochemical DNA biosensor for the determination of Benzo[a]pyrene - DNA adducts, *Anal. Chim. Acta.*,450: 45-52.

58. Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara., P., Jelen F., Karadeniz H., Ozkan Z., Ozsoz M., (2003), Dna Sensing On Mercury And Carbon Electrodes By Using Meldola Blue As The Electrochemically Active Intercalator, *Turkish Journal Of Chemistry*, basımda.

59. Lakeman, F.D., Whitley, R.J., National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group, (1995), Diagnosis of Herpes Simplex encephalitis: Application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease, *The Journal of Infectious Diseases*, 171: 857-863.

60. Levison, P.R., Dennis, J.W., Jones, K.D., Philpott, R.W., Taylor, S.L., Grimm, V. (1998). New approaches in the binding of DNA for clinical applications", *Clin. Chem.*, 44: 2060-2061.

61. Locatelli, G., Ursu, V., Malnati, M., (2000), Quantitative analysis of GMO food contaminations using real time PCR, *Ital. J. Biochem.*, 49(3-4): 61-3.

62. Lucarelli, F., Marazza, G., Palchetti, I., Cesaretti, S., Mascici, M., (2002), Coupling of an indicator-free electrochemical DNA biosensor with polymerase

chain reaction for the detection of DNA sequences related to the apolipoprotein E, *Anal. Chim. Acta*, 469: 93-99.

63. Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G., Mascini, M.(2002). Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples, *Talanta*, 56: 949-957.

64. 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.

65. Lumbey-Woodyear, T., Campbell, C.N., Freeman, E. Freeman, Georgiou, G. Heller, A. (1999). Rapid Amperometric verification of PCR amplification of DNA, *Anal. Chem.*, 71: 535-538.

66. Marazza, G., Chianella, I., Macsini, M. (1999), Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring, *Anal. Chim. Acta*, 387: 297-307.

67. Marazza, G., Chianella, I., Macsini, M., Anichini, M., (2000), Detection of human apolipoprotein E genotypes with DNA electrochemical biosensor coupled with PCR, *Clin. Chim.*, 46: 31-37.

68. Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E. (1998). Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C, *Biophysical Chemistry*, 75: 87-95.

69. Mascini, M., Palchetti, I., Marazza, G., (2001), DNA electrochemical biosensors., *Fresenius J Anal Chem*, 369(1):15-22.

70. 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.

71. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erensoy, S., Akarca, U.S., Mascini, M., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue, *Talanta*, 56 (5): 939-947.
72. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz, M., (2002), Indicator-free DNA biosensor based on adenine and guanine signals, *Electroanalysis*, 14(18): 1245-1250.
73. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erdem, A., Kucukoglu, O., Erciyas, E., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4-4' dihydroxy chalcone based on guanine and adenine signals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(4): 1339-1346
74. Mikkelsen S.R. (1996), Electrochemical Biosensor for DNA sequence Detection A Review, *Electroanalysis*, 8(1): 15-19.
75. 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)*.
76. Millan K.M., Mikkelsen, S.R. (1993), Sequence selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators, *Anal. Chem.* 65: 2317-2323.
77. Millan, K.M., Saraullo, A., Mikkelsen, S.R., (1994), Voltammetric DNA Biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode, *Anal. Chem.*, 66: 2943-2948.
78. Motti, C., Dainese, E., Mascini, M., Minnuni, M., De Santis, P., Cozzani, I., (2000), The use of biotechnology in agriculture and the methods for the detection of genetically modified organisms (GMOS) in food, Meeting of the Italian Biochemical Society, sözlü bildiri.

79. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., (1986), Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51(1): 263-73.
80. Mullis, K.B., (1990), Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction, *Ann Biol Clin*, 48(8): 579-82.
81. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman K, Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes, *Electrochemistry Communications*, 4: 795-802
82. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Hassmann, J., Ozsoz, M., (2002), Allele spesific genotype detection of FactorV Leiden mutation, from polymerase chain reaction amplicons based on label free electrochemical genosensor, *Analytical Chemistry*, 74: 5931-5936.
83. Ozkan, D., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Jelen, F., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002), DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label. *Bioelectrochemistry*, 58(1): 119-126.
84. Palecek, E., (1988), New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 20: 179-194.
85. Palecek, E., (1995), Nucleic acids: electrochemical and immunochemical methods, *Encyclopedia of Analytical Science* (Ed. Alan Townshend), London, Academic Press, Vol. 6, 3600-3609.
86. Palecek, E., (1996), From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid Modified Electrodes, *Electroanal.*, 8: 7-14.
87. Palecek, E., Postbieglova, I. (1986). Adsorptive stripping voltammetry

of biomacromolecules with transfer of the adsorbed layer, *J. Electroanal. Chem.*, 214: 359-371.

88. Pehlivan S, Ozkinay F, Okutman O, Cogulu O, Ozcan A, Cankaya T, Ulgenalp A., (2003), Achondroplasia in Turkey is defined by recurrent G380R mutation of the FGFR3 gene, *Turk J Pediatr.* 45(2): 99-101.

89. Pietrzyk, D.J.; Frank, C.W. (1979). *Analytical Chemistry*, 2.Baskı, and *Academic press*: s.226- 239.

90. Service, R. F., (1998), New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science*, 282: 396-399.

91. Steel, A. B., Herne, T.M., Tarlov, M.J.(1998). Electrochemical Quantitation of DNA immobilized on gold, *Anal. Chem.*, 70: 4670-4677.

92. Takeuchi, K.J., Thompson, M.S., Pipes, D.W., Meyer, T. J. (1984). Redox and spectral properties of monooxo polypyridyl complexes of ruthenium and osmium in Aqueous media, *Inorg. Chem.*, 23: 1845-1851.

93. Temel Biyokimya 2, (1997). B ölüm 8: Bilgi Kaynağı olan Makromoleküller; Editörler, Prof. Dr. Taner Onat, Prof. Dr. Kaya Emerk; Saray Medikal Yayıncılık, 2. Baskı: sayfa 565-567.

94. Thayer, A.M. (30 Ağustos 1999). Deciphering Diseases, *Chemical & Engineering News*, Ed. by M. Jacobs, American Chemical Society, North Carolina, 19-28.

95. Thorp, H. H., (1998), Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation, *TIB TECH*, 16: 117-121.

96. Turner, A. P. F., "Biosensors: Fundamentals and Applications", Ed: Turner, A. P. F., Karube, I. and Wilson, G. S.; Oxford University Press, (1987), Oxford, sayfa 5-7.

97. Wang, J.(1998). DNA biosensors based on Peptide nucleic acid (PNA) recognition layers. A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 757-762.
98. Wang, J.(2000)., From DNA biosensors to gene chips: Survey & Summary, *Nuc. Acids Res.*, 28: 3011-3016.
99. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H.(1996). Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes, *Anal. Chim. Acta*, 326: 141-147.
100. 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.
101. Wang, J., Fernandes, J.R., Kubota, L.T.(1998), Polishable and renewable DNA hybridization biosensors, *Anal. Chem.*, 70: 3699-3702.
102. Wang, J., Grant, D.H., Ozsoz, M., Cai, X., Tian, B., Fernandes, J.R. (1997). Adsorptive potentiometric stripping analysis of nucleic acids at mercury electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 349: 77-...
103. Wang, J., Kawde, A.N., (2001), Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analytica Chimica Acta*, 431(2): 219-224
104. Wang, J., Kawde, A.N., (2002), Amplified label-free electrical detection of DNA hybridisation, *Analyst.*, 127(3):383-386.
105. Wang, J., Kawde, A.N., Erdem, A., Salasar, M., (2001), Magnetic beads based label free electrochemical detection of DNA hybridisation, *Analyst*, 120: 2020-2024.
106. Wang, J., Kawde, A.N., Musameh, M., (2003), Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes for amplified label-free electrochemical detection

of DNA hybridisation, *Analyst*, 128(7): 912-916.

107. Wang, J., Kawde, A.N., Sahlin, E., (200), Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA. *Analyst*, 125(1):5-7.

108. 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.

109. Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D.H., Chicarro, M., Fernandes, J. R. and Palecek, E.(1998). Interactions of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface, *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, 45: 33 – 40.

110. Wang, J., Palecek, E., Nielsen, P.E., Rivas, G., Cai, X., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Farias, P.A.M. (1996). Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors, *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 7667-7670.

111. Wang, J., Rivas, Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shirashi, H., Dontha, 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. A Review, *Anal. Chim.Acta* , 347: 1-8.

112. 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.

113. 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.

114. Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D., Parrado, C., Chicharro, M., Farias, P. A. M., Valera, F.S., Grant, D.H., Ozsoz, M., Flair, M.N. (1997). DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring-A review, *Anal. Chim. Acta*, 347: 1-8.
115. 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.
116. 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.
117. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R., (1998). Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor, *Anal. Chim. Acta*, 375: 197-203.
118. 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.
119. 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.
120. Wang, J., Rivas, G., Ozsoz, M., Grant, D.H., Cai, X., Parrado, C.(1997). Microfabricated electrochemical sensor for the detection of radiation-induced DNA damage, *Anal. Chem.*, 69: 1457-1460.
121. Wilson, E.K. (1998). Instant DNA detection, *Chem.& Eng. News*, 76 (21): 47.

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

Doğum Tarihi: 3 Aralık 1978

Doğum Yeri: Manisa

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dil : İngilizce (iyi)

Adres: Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Bornova, 35100 Türkiye

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

Faks: +90 - 232 - 388 52 58

E-mail. pnrkara@hotmail.com

Lisans Eğitimi:

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

Yüksek Lisans Eğitimi:

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı (Şubat 2001).

Görevleri:

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

Yürüttüğü Tez Çalışmaları:

- **Y.Lisans Tez Konusu:** Çeşitli Bulaşıcı ve Kalıtsal Hastalıklara Neden Olan Gen Dizilerini İçeren PCR Ürünü Örnekler Kullanarak, Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile Bu Hastalıkların Saptanması (Şubat 2002)

Tamamladığı ve Halen Yürüttüğü Proje Çalışmaları:

1. Genetik ve Bazı Bulaşıcı Hastalıkların Tanınması İçin Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerinin Tasarımı (Devlet Planlama Teşkilatı Proje no: 02 / DPT / 001)-2000-2002.
2. Çeşitli Bulaşıcı ve Kalıtsal Hastalıklara Neden Olan Gen Dizilerini İçeren PCR Ürünü Örnekler Kullanarak, Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile Bu Hastalıkların Saptanması (Ege Üniversitesi Proje Koordinatörlüğü); 2002 - halen devam etmektedir.
3. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri (EBİLTEM projesi - Proje No: 2000 / BİL / 031); 2000-2002.
4. Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (Genosensörlerin) tasarımında kullanılan yeni teknikler ve uygulamaları (TÜBİTAK projesi - Proje No: TBAG-2233; Ocak 2003-Halen devam etmektedir.
5. Kalıtsal ve Bulaşıcı Hastalıkların Elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle Tayini (TUBİTAK Proje no:2161) Ağustos 2002-halen devam etmektedir.
6. Electrochemical DNA Biosensors for the Detection of Infectious and Inherited Diseases Considering Public Health and Environmental (GSRT-proje no: TBAG-U 36 / 101T179) 2002-halen devam etmektedir.

Yurt Dışında Katıldığı Projeler

Friedrich Alexander Üniversitesi Biyosensör Laboratuvarı'nda Laboratory on a Chip = Çip Teknolojisi üzerine 06 Temmuz – 06 Eylül 2002 tarihleri arasında Prof. Dr. Paul Müller ve Dr. Jörg Hassmann gözetiminde DNA mikroarray teknolojisi üzerinde çalışma yapmıştır.

Uluslararası Science Citation Index ve Social Science Citation Index'ce

Taranan Dergilerde Yayınlanmış Makaleleri:

1. Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Ozsoz, M., (2003),

Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on Guanine signal, *Electroanalysis*, 15 (7): 1-7.

2. Kerman K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, Erdem A., Nielsen P. E., Ozsoz M., (2003) Label - Free Bioelectronic detection of point mutation by using peptide nucleic acid probes *Electroanalysis*, 15(7): 1-4,

3. Kara, P., Ozkan, D., Erdem, A., Kerman, K., Pehlivan, S., Ozkinay, F., Unuvar, D., Itirli G., and Ozsoz, M., (2003), Detection of achondroplasia G380R mutation from PCR amplicons by using inosine modified carbon electrodes based on electrochemical DNA chip technology, *Clinica Chimica Acta*, 336(1-2): 57-64

4. Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara., P., Jelen F., Karadeniz H., Ozkan Z., Ozsoz M., (2003), Dna Sensing On Mercury And Carbon Electrodes By Using Meldola Blue As The Electrochemically Active Intercalator, *Turkish Journal Of Chemistry*, basimda.

5. Ozkan D., Kerman K., Meric B., Kara P., Demirhan H., Polverejan M., Pinnavaia T., Ozsoz M., (2002)- Heterostructured Fluorohectorite clay as an Electrochemical Sensor for the Detection of 2,4-Dichlorophenol and the Herbicide 2,4-D - *Chemistry of Materials*, 14, 1555-1561

6. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Erensoy, S., Akarca, U.S., Mascini, M., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue, *Talanta*, 56 (5): 939-947.

7. Kerman K., Ozkan, D., Kara, P., Meric, B., Gooding, J.J., Ozsoz, M., (2002), Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 462: 39-47.

8. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara, P., Ozsoz, M., (2002), Indicator-free DNA biosensor based on adenine and guanine signals, *Electroanalysis*, 14(18): 1245-1250.
9. Kara,P, Ozkan, D., Kerman, K., Meric, B, Erdem, A., Ozsoz, M., (2002), DNA sensing on glassy carbon electrodes by using hemin as electrochemical hybridisation label, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373: 710-716.
10. 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.
11. Ozkan, D., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Erdem, A., Jelen, F., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002), DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label. *Bioelectrochemistry*, 58(1): 119-126.
12. Kara, P., Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002), Label free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes, *Electroanal.*, 14 (23), 1-6.
13. Meric, B., Kerman, K., Ozkan, D., Kara,P, Erdem, A., Kucukoglu, O., Erciyas, E., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent 4-4' dihydroxy chalcone based on guanine and adenine signals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(4): 1339-1346.
14. Kara,P, Kerman, K., Ozkan, D., Meric, B., Erdem, A., Ozkan, Z., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA , *Electrochemistry Commnications*, 4: 705-709
2002, OZKAN DILSAT;ERDEM ARZUM; KARA PINAR; KERMAN KAGAN; MERIC

BURCU; HASSMANN JORG; OZSOZ MEHMET, - Allele-Specific Genotype of Mutations from Polymerase Chain Reaction Amplicons Based on Label-Free Electrochemical Genosensor, Anal. Chem., 74(23),5931-5936

15. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman K, Gooding, J.J., Nielsen, P.E., Ozsoz, M., (2002), Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes, Electrochemistry Communications, 4: 795-802

16. Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara., P., Erdem, A., Ozsoz M., (2001), Electrochemical DNA biosensor for the determination of Benzo[a]pyrene - DNA adducts, Anal. Chim. Acta.,450: 45-52.

Bildiriler ve Ödüller

1. A.Erdem, B.Meric, K.Kerman, D.Ozkan, P.Kara, M.Ozsoz, P.Alcil, B.Karasaşın, Z.Ozkan, N.Palanduz, I.Sarıkan, "Electrochemical Determination Of Benzo[A]Pyrene-DNA Adducts By Using DNA Biosensor", IPORSIP-2000, The 2nd International Postgraduate Research Symposium On Pharmaceutics, , 6-8 Eylül 2000, İstanbul Poster Bildiri.

2. S.Gungor, N.Karakaya, K.Kerman, B.Meric, D.Ozkan, P.Kara, M.Ozsoz, "Elektrokimyasal Dna Biyosensörleri", III.Ulusal Veteriner Hekimliği Öğrencileri Araştırma Kongresi, 10-12 Mayıs 2001, İstanbul, poster bildiri.

3. K.Kerman, B.Meric, D.Ozkan, P.Kara, A.Erdem M.Ozsoz , "Determination of Benzo [a]Pyrene – DNA Adducts By Using Electrochemical DNA Biosensor", BIOMED 8, 8th Biomedical Science And Technology Symposium, Eylül 5-8, 2001, ODTÜ , Ankara. Sözlü bildiri.

4. B.Meric, K.Kerman, D.Ozkan, P.Kara, A.Erdem, U. S. Akarca, S. Erensoy, M.Ozsoz "Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri Kullanarak PCR Ürünü

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

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

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

7. DNA Hibridizasyonunun Altın Nanopartiküllere Dayalı Elektrokimyasal Biyosensörlerle Algılanması, Ebiltem Proje Yarışması 2003 ikincilik ödülü

8. P. Kara, M. Ozsoz, "Elektrokimyasal DNA Biyosensörleriyle Kalıtsal ve Bulaşıcı Hastalıkların Tanısı", 1. Ulusal Viroloji Kongresi, 21-25 Eylül 2003, Kuşadası, sözlü bildiri.

9. P. Kara, M. Ozsoz, "Environmental in Turkey", Birleşmiş Milletler Endüstri Gelişim Organizasyon; Application of Remediation Technologies for Heavily Polluted Sites wit Focus on Water and Promotion of Projects for the Mediterranean Region, 29 – 30 Eylül 2003, Fez- Morocco, sözlü bildiri.

10. M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, B. Meric, F. Sahinci, B. Gulmez, "Novel approaches for electrochemical DNA biosensors", ISOPS 7th

International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 24-27 Haziran 2003, Ankara, sözlü bildiri.

11. P. Kara, A. Erdem, D. Ozkan, K. Kerman, S. Pehlivan, F. Ozkinay, D. Unuvar, G. Itirli, M. Ozsoz, "The detection of Achondroplasia G 380 R. mutation by using electrochemical DNA biosensor", ISOPS 7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 24-27 Haziran 2003, Ankara, poster bildiri.

12. D. Ozkan, A. Erdem, P. Kara, F. Sahinci, B. Gulmez, H. Karadeniz, M. Ozsoz, "Disposable electrochemical DNA biosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus using synthetic PCR and sandwich assay model", ISOPS 7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 24-27 Haziran 2003, Ankara, poster bildiri.

13. M.Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, D. Ozkan, P. Kara, "Novel advances in electrochemical genosensor based on gold nanoparticles", 3rd International Conference; Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Application (IMA 2003), 23-27 Eylül 2003, Selanik- Yunanistan, sözlü bildiri.

14. M. Ozsoz, A.Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Meric, P. Kara, H. Karadeniz, B. Tugrul, N. Yopcuoglu, H. Ekren, M. Taylan, "New trendson electrochemical genosensor based on gold nanoparticles and guanine signals", BilkentÜniversitesi, 21 Kasım 2003, Ankara, sözlü bildiri.

International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 24-27 Haziran 2003, Ankara, sözlü bildiri.

11. P. Kara, A. Erdem, D. Ozkan, K. Kerman, S. Pehlivan, F. Ozkinay, D. Unuvar, G. Itirli, M. Ozsoz, "The detection of Achondroplasia G 380 R. mutation by using electrochemical DNA biosensor", ISOPS 7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 24-27 Haziran 2003, Ankara, poster bildiri.

12. D. Ozkan, A. Erdem, P. Kara, F. Sahinci, B. Gulmez, H. Karadeniz, M. Ozsoz, "Disposable electrochemical DNA biosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus using synthetic PCR and sandwich assay model", ISOPS 7th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 24-27 Haziran 2003, Ankara, poster bildiri.

13. M.Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, B. Meric, D. Ozkan, P. Kara, "Novel advances in electrochemical genosensor based on gold nanoparticles", 3rd International Conference; Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Application (IMA 2003), 23-27 Eylül 2003, Selanik- Yunanistan, sözlü bildiri.

14. M. Ozsoz, A.Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Meric, P. Kara, H. Karadeniz, B. Tugrul, N. Yopcuoglu, H. Ekren, M. Taylan, "New trendson electrochemical genosensor based on gold nanoparticles and guanine signals", BilkentÜniversitesi, 21 Kasım 2003, Ankara, sözlü bildiri.

Kısaltmalar:

AuE: Altın elektrot

CPE : Carbon paste electrode = karbon pastası elektrodu

CV: Dönüşümlü voltametri

DC: Doğru akım

DKE: Doygun kalomel elektrot

DPV: Diferansiyel puls voltametrisi

EDC: etilendiamim karbodiimid

FcV: Faktör V

GCE: Glassy carbon electrode= camı karbon elektrot

HBV: Hepatit B virüsü

MDB: Meldola Blue

NHS: N-hidroksisüksinimit

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PGE: Pencil graphite electrode = kalem ucu elektrot

SCPE: Screen printed electrode = perde baskılı elektrot

SHE: Standart hidrojen elektrot