

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ELEKTROKİMYASAL HİBRİDİZASYON
İNDİKATÖRLERİ VE DNA BİYOSENSÖRLERİNDE
KULLANILMASININ İNCELENMESİ**

124055

Analitik Kimya Programı

Yüksek Lisans Tezi

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
124055**

Eczacı

Dilşat ÖZKAN

Danışman

Prof. Dr. M. E. Şengün ÖZSÖZ

İZMİR

2003

ÖNSÖZ

Çalışmalarımdeki değerli katkılarından dolayı başta, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, danışmanım, Sayın *Prof. Dr. Mehmet Emin Şengün ÖZSÖZ*'e, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü ve Analitik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Öğretim Üyesi, hocam, Sayın *Prof. Dr. Aycıl KAYALP* ya, Anabilim Dalımızdaki öğretim üyelerinden *Yard. Doç. Dr. K. Arzum ERDEM*'e ve diğer tüm *Öğretim Üyelerine* ve İtalya Floransa Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın *Profesör Marco Mascini*'ye teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteği için bursiyeri olduğum *Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (Kimyasal Silahların Yasaklanması Örgütü OPCW)*'a, *HİPOKRAT A.Ş.*'ye ve *Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı*'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında her zaman desteklerini gördüğüm *tüm değerli çalışma arkadaşlarıma* ve her zaman olduğu gibi maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan *aileme* ve başarımda katkısı olan herkese,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I	1
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	8
1. ELEKTROKİMYA	8
1.1. Elektrokimyasal tabakalar:.....	9
1.2. Elektrokimyasal tabakaların elektrisel olarak incelenmesi :.....	10
1.3. Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları	11
1.4. Voltametri ve esasları.....	12
1.4.1. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri:.....	12
1.4.2. Voltametrik cihazlar:.....	14
1.4.3. Voltametrizde kullanılan referans(karşılaştırma) elektrotları :.....	14
1.4.4. Voltametrizde kullanılan çalışma elektrotları :	16
1.4.4.1. Karbon elektrotlar :.....	16
1.4.4.2. Civa elektrotlar :	19
1.4.4.3. Metal elektrotlar :	20
1.4.4.4. Diğer elektrotlar :	21
1.4.5. Voltamogramlar:.....	21
1.4.6. Voltametrik akımlar.....	22
1.4.7. Elektrokimyasal bir olayda Fradayik işlemler.....	23
1.4.8. Polarografi.....	24
1.4.9. Voltametrik teknikler :.....	25
1.4.9.1. Dönüşümlü Voltametri :.....	25
1.4.9.2. Diferansiyel Puls Polarografisi :	27
1.4.9.3. Kare Dalga Polarografisi ve Voltametrisi:	28
1.4.10. Puls polarografisinin uygulamaları :	30
2. BİYOSENSÖR	30
2.1. Biyosensör Çeşitleri:	31
2.2. İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler.....	32
2.3. Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapıları.....	34
2.3.1 NÜKLEİK ASİTLER ve DNA:.....	34
2.3.1.1. DNA ile ilgili bazı terimlerin tanımlamaları.....	36
2.3.1.1.1. İnterkalasyon.....	36
2.3.1.1.2. DNA baz dizilişlerinin yazılımı ile ilgili genel bilgiler.....	36

2.3.1.1.3. Nükleik asit hibridizasyonu.....	37
2.3.1.2. DNA hibridizasyonunun kinetiğini etkileyen faktörler.....	38
2.3.2. PEPTİK NÜKLEİK ASİTLER (PNA):.....	40
2.4. DNA biyosensörleri:.....	41
2.4.1. İlaç-DNA etkileşmesine dayalı DNA biyosensörleri.....	42
2.4.2. DNA hibridizasyonuna dayalı DNA biyosensörleri.....	43
2.4.3. DNA Biyosensörlerinde prob dizilerinin elektrot yüzeyine modifiye edilme yolları:.....	45
2.4.3.1. Elektrostatik bağlanma.....	46
2.4.3.2. Kovalent bağlanma.....	46
2.4.3.3. -SH grubu ile işaretli oligonükleotitlerin bağlanması.....	47
2.4.3.4. Avidin-biyotin etkileşimi yolu ile bağlanma.....	48
BÖLÜM II	49
GEREÇ VE YÖNTEM	49
2.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	49
2.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER.....	49
2.2.1 Metilen Mavisi ile yapılan çalışmalarda kullanılan oligonükleotidler ve hazırlanmaları.....	50
2.2.1.1 Metilen mavisi - DNA etkileşimi çalışmasında Altın elektrod (AuE) ve Karbon pastası elektrodu (CPE) ile kullanılan oligonükleotidler.....	50
2.2.1.2 Metilen mavisi - DNA etkileşimi çalışmasında perde baskılı altın elektrodlar (Au-SCPE) ile kullanılan oligonükleotidler:	51
2.2.1.3 Metilen mavisi - DNA etkileşimi çalışmasında karbon pastası elektrodu (CPE) ile ilk seri deneylerde kullanılan oligonükleotidler :	52
2.2.1.4 Metilen mavisi - DNA etkileşimi çalışmasında karbon pastası elektrodu (CPE) ile ikinci seri deneylerde kullanılan peptik nükleik asit(PNA) ve DNA yapısındaki oligonükleotidler:	53
2.2.2 Meldola Mavisi- DNA etkileşmesi çalışmalarında kullanılan oligonükleotid dizileri ve hazırlanmaları:	53
2.2.3 Benzo[a]piren(BaP), fenol ftalein(PPT), mitomycin C(MC) ile DNA etkileşim çalışmalarında kullanılan DNA çözeltilerinin hazırlanışı ve saflık kontrollerinin yapılması:	54
2.2.4. Tampon çözeltilerin hazırlanışı:	54
2.2.4.1. 0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 7,4):	54
2.2.4.2. 0,50 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 4,8):	55

2.2.4.3. 0,02 M Tris HCl tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 7,0):	55
2.2.4.4. 0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 8,0):	55
2.2.5. <i>Altın elektrotlarla yapılan deneylerde DNA'nın yüzeye tutturulması amacıyla kullanılan</i>	
<i>çözeltilerin hazırlanışı:</i>	55
2.2.5.1. 3-Merkapto propiyonik asit (MPA) çözeltisinin hazırlanışı:	55
2.2.5.2 Kovalent bağlanmayı sağlayan çözeltinin hazırlanışı:	56
2.2.6 <i>DNA ile etkileşimi incelenen tüm maddelerin hazırlanışı:</i>	56
2.2.6.1 Benzo[a]piren (BaP) çözeltisinin hazırlanışı:	56
2.2.6.2 Metilen mavisi (MB) çözeltisinin hazırlanışı:	56
2.2.6.3 Meldola mavisi (MDB) çözeltisinin hazırlanışı:	56
2.2.6.4 Fenol ftalein (PPT) çözeltisinin hazırlanışı:	56
2.2.6.5 Mitomisin C (MC) çözeltisinin hazırlanışı:	56
2.3. DNA İLE ETKİLEŞİMİ İNCELENEN VE HİBRİDİZASYON İNDİKATÖRÜ OLARAK	
KULLANILABİLECEK MADDELER HAKKINDA GENEL BİLGİLER :	57
2.3.1 Benzo[a]piren (BaP):	57
2.3.2 Metilen Mavisi (MB):	59
2.3.3. Meldola Mavisi (MDB) :	60
2.3.4. Fenolftalein (PPT):	60
2.3.5 Mitomycin C (MC):.....	61
2.4. KULLANILAN YÖNTEM.....	62
2.4.1 <i>Benzo[a]piren(BaP)-DNA etkileşmesine dayalı biyosensör tasarımında kullanılan</i>	
<i>yöntemler:</i>	63
2.4.1.1 Camsı karbon elektrod(GCE) ile yapılan BaP derişiminin artışına bağlı olarak dsDNA	
sinyalinde meydana gelen değişimin incelenmesi çalışmada kullanılan yöntem:	63
2.4.1.2 Karbon pastası elektrodu (CPE) ile yapılan dsDNA-BaP etkileşmesi ve yan ürün	
oluşumunun incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:	64
2.4.1.3 Karbon pastası elektrodu (CPE) ile BaP konsantrasyonu artışına bağlı olarak elde edilen	
yan ürünün incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:	65
2.4.2 <i>Metilen mavisi çalışmalarında kullanılan yöntemler:</i>	65
2.4.2.1 CPE ile yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemler:	65

2.4.2.1.1 ssDNA ve dsDNA'nın MB ile olan etkileşimleri çalışmalarında kullanılan yöntem:.....	65
2.4.2.1.2 ssDNA konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:	66
2.4.2.1.3 15-bazlık prob dizi konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:	67
2.4.2.1.4 15-bazlık hedef dizi konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:	67
2.4.2.1.5 Peptik nükleik asit(PNA) yapısındaki oligonükleotidler ve normal DNA yapısındaki oligonükleotidlerin kıyaslanması çalışmasında kullanılan yöntem:	68
2.4.2.2 Altın elektrot (AuE) ile MB etkileşim çalışmaları:	69
2.4.2.2.1. Hibridizasyon çalışmalarında kullanılan yöntem:	69
2.4.2.2.2. DNA probu ile yapılan hibridizasyon çalışmaları için en uygun hedef konsantrasyonunun bulunması çalışmasında kullanılan yöntem:	71
2.4.2.2.3 PNA probu ile DNA probu kullanılarak karşılaştırmalı olarak yapılan hibridizasyon tayini çalışmalarında kullanılan yöntem:	71
2.4.2.3 Tek kullanımlık perde baskılı altın elektrotlarla (Au-SCPE) yapılan hibridizasyon tayini çalışmalarında kullanılan yöntem:	72
2.4.3 <i>Meldola mavisii</i> (MDB) ile yapılan çalışmalar:	73
2.4.3.1 Sentetik oligonükleotidlerle yapılan hibridizasyon tayini çalışmasında kullanılan yöntem:.....	73
2.4.3.2 Sentetik oligonükleotidler kullanılarak hibridizasyon tayini için en iyi hedef konsantrasyonunun bulunması çalışmasında kullanılan yöntem:	74
2.4.4 <i>Fenol Ftalein</i> (PPT) ile yapılan çalışmada kullanılan yöntem:	75
2.4.4.1 Fenol ftalein- DNA etkileşim çalışmasında kullanılan yöntem:	76
2.4.4.2 Fenol ftalein konsantrasyon artışına bağlı olarak elde edilen serbest haldeki PPT sinyalindeki değişikliklerin izlenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:	76
2.4.4.3 dsDNA ile PPT etkileşimine artan PPT konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:	77
2.4.4.4. ssDNA ile PPT etkileşimine artan PPT konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:	77
2.4.5 <i>Mitomisin C</i> (MC)çalışmaları:	78
2.4.5.1 Mitomisin C– dsDNA etkilşimi çalışmasında uygulanan yöntem:	78
2.4.5.2 Mitomisin C konsantrasyon artışına bağımlı olarak elde edilen guanin sinyalindeki değişimin izlenmesi çalışmasında uygulanan yöntem:	79

2.4.5.3 Mitomisin C etkileşim süresi çalışmasında uygulanan yöntem:80

BÖLÜM III - IV 81

BULGULAR VE TARTIŞMA..... 81

3.1. Benzo[a]piren (BaP) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin

bulguların değerlendirilmesi:81

3.1.1. BaP'in dsDNA ile etkileşmesinin camı karbon elektrodu(GCE) kullanılarak incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:81

3.1.2 BaP – dsDNA etkileşmesinde CPE kullanılarak yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara ilişkin bulguların değerlendirilmesi:82

3.1.3 BaP konsantrasyonu artışına bağlı olarak elde edilen yan ürünün incelenmesi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi :83

3.2. Metilen mavisi çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....84

3.2.1. CPE ile yapılan çalışmalarda elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....84

3.2.1.1. ssDNA ve dsDNA ile MB etkileşimleri çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....84

3.2.1.2. ssDNA konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....84

3.2.1.3. 15-bazlık kısa DNA dizisi (prob) konsantrasyonu artışına bağlı olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....85

3.2.1.4. Hedef dizi (target) konsantrasyonu artışına bağlı olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:86

3.2.1.5. Peptik nükleik asit(PNA) yapısındaki oligonükleotidler ve normal DNA yapısındaki oligonükleotidlerin kıyaslanması çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:88

3.2.2. Altın elektrod ve MB ile yapılan hibridizasyon çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:90

3.2.2.1. DNA probu ile yapılan hibridizasyon çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:90

3.2.2.2. DNA probu ile yapılan hibridizasyon çalışmaları için en uygun hedef konsantrasyonunun bulunması deneylerinde elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....92

3.2.2.3. PNA probu ile DNA probu kullanılarak karşılaştırmalı olarak yapılan hibridizasyon çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....

**TEK YÖRSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

3.2.3. Tek kullanımlık perde baskılı altın elektrodlarla (Au-SCPE) MB kullanılarak yapılan hibridizasyon çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....	97
3.3. <i>Meldola mavisii</i> (MDB) ile yapılan hibridizasyon tayini çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....	101
3.3.1. Sentetik oligonükleotidler kullanılarak hedef, tek bazı hedeften farklı dizi (MM) ve baz dizisi hedeften farklı olan dizi (NC) ile yapılan hibridizasyon çalışmalarda elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....	101
3.3.2. Sentetik oligonükleotidler kullanılarak en iyi hedef konsantrasyonun tayini için yapılan çalışmada elde edilen bulguların değerlendirilmesi:	103
3.4. <i>Fenol Ftalein</i> (PPT) ile yapılan çalışmada elde edilen bulgular:.....	104
3.4.1. Fenol ftalein- DNA etkileşim çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:..	104
3.4.2. Fenol ftalein konsantrasyon artışına bağlı olarak elde edilen serbest haldeki PPT sinyali, ssDNA ya bağlı haldeki PPT sinyali ve dsDNA'ya bağlı haldeki PPT sinyallerindeki değişikliklerin izlenmesi çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....	105
3.5. <i>Mitomisin C</i> çalışmalarında elde edilen bulgular:.....	107
3.5.1. dsDNA-Mitomycin C etkileşimi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....	107
3.5.2. Mitomisin C konsantrasyon artışı çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....	108
3.5.3. Mitomisin C etkileşim süresi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:.....	109
BÖLÜM V	110
SONUÇ VE ÖNERİLER	110
ÖZET	114
ABSTRACT	116
YARARLANILAN KAYNAKLAR	118
ÖZGEÇMİŞ	134

BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ

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

"Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir bir şekilde cevap veren ve konsantrasyona bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlara elektrokimyasal sensörler denir " (16). Bu sensörler, yapılarına enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb. biyolojik maddelerin eklenmesiyle *BIYONSENSÖR* adını almışlardır. (110).

Nitel ve nicel analiz yapabilen kompleks cihazlar olan biyosensörler, "biyo" (=biyolojik kökenli) ve "sensör" (= algılayıcı) kelimelerinden oluşmaktadır (21). Diğer bir tanım ise; "Biri biyokimyasal, diğeri ise elektrokimyasal özellikte, birbirini içine geçmiş iki çeviriciden oluşan algılayıcı cihazdır" denilebilir. Biyokimyasal çevirici analizlenecek madde ile etkileşerek onu tanır. Bu etkileşme sonucunda oluşan madde (biyokimyasal ürün), elektrokimyasal çevirici tarafından okunabilir bir sayısal değere çevirilir.

Nükleik asitlerden oluşan tanıma yüzeyleri, Analitik Kimya alanında her geçen gün daha ilgi çekici konular halini almaktadır (126). Bu tür tanıma yüzeyleri, bilinen elektrokimyasal biyosensörlere yeni ve ender boyutlarda özellikler eklemektedir. Bu gelişme ile, elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin gelecekte hasta başında yapılacak doktor gözetimindeki analizlerde çok önemli bir rol oynayacağı kesindir (114).

Elektrokimyasal yöntemlerle birlikte DNA'nın nitel ve nicel analizini yapma amacına yönelik tasarlanan(6-8,13,14, 36, 45, 46, 82, 83, 85, 86, 118) biyosensörlerde tanıma yüzey katmanı olarak DNA kullanılmasına ilgi artmaktadır (15, 66, 67, 80, 98, 127, 131).

Nükleik asit(DNA) tanıma yüzeyi içeren biyosensörler, bu yüzey ile etkileşime giren analitin (karsinojen maddeler, ilaçlar vb.) etkileşim mekanizmasının aydınlatılması veya miktarının tayininde veya DNA'daki baz dizisi belli bölgelerdeki hibridizasyon olaylarının izlenmesi (67, 120) gibi amaçlarla kullanılabilir. Analitin, DNA ile etkileşmesi sonucunda, incelenen maddenin veya DNA'daki bir bazın sinyalinde meydana gelecek değişiklikler sayesinde tayini yapılabilmektedir (64, 74, 9, 80, 91, 100, 102, 121, 123, 129, 130, 133).

Bazı ilaç molekülleriyle DNA'nın etkileşmesi (özellikle de antikanser özellik taşıyan ilaç molekülleri ile etkileşim) ve bu etkileşimin geliştirilen yeni yöntemlerle tayin edilmesi; yeni ilaç tasarımları için çok önemlidir (52,55,58). Yine bazı maddelerin (çevresel kirlilik ajanları, toksik molekül, vb.) çift sarmal DNA ile interkalasyon (düzlemsel yapıdaki maddenin DNA çift sarmalı arasına girerek yerleşmesi), baza seçimli bağlanma vb. yollarla etkileşimi sonucu bir ürünün oluşması, bu ürüne duyarlı elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımını getirmiştir.(87-89,53,106) Bir kimyasalın ya da metabolitinin DNA ile etkileşimi sonrasında DNA'da oluşabilecek yan ürünlerin (=adduct) kısa zamanda tespiti kanser araştırmaları için çok önemlidir (2,23).

Madde-DNA etkileşiminin sonucunda, çalışmanın türüne göre elde edilen madde sinyali ya da DNA'daki bir bazın sinyalindeki artma veya azalmaya bağlı olarak elektrokimyasal tayin gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla kullanılan DNA modifiye edilmiş camı karbon elektrotlar (GCE), karbon pastası elektrotlar (CPE), perde baskılı karbon (SCPE) ve altın elektrotlar (Au-SCPE), Altın elektrotlar (AuE) ve asılı

civa damla elektrodu (HMDE) incelenen maddelerin mikromolar ve hatta nanomolar konsantrasyonlarının dahi, kısa bir biriktirme aşaması sonrası güvenli ölçümlerini mümkün kılmaktadır (64,74, 9, 91, 87, 93, 121, 123, 129, 130,65,60,19, 63, 54,78).

Günümüzde çok sayıda kalıtsal hastalığa neden olan mutasyonlar artık tespit edilmektedir ve bu konu hakkındaki bilgilerimiz insan genom projesi devam ettikçe artmaktadır. 2003 yılında bitirilmesi planlanan genom projesiyle (20) birlikte, insan genomunun tüm genleri haritalanabilecek, ayrıca tüm varyasyonların baz dizilimi belirlendiği ve farmakogenomik araştırmaların bitirildiği zaman, sağlık sisteminin hızlı sonuç verebilen, düşük maliyetli DNA testlerine ihtiyacı olacaktır.

Çeşitli biyolojik örneklerde (kan, serum, doku ve vücut sıvıları vb.) DNA dizisi saptanması ve bu örneklerden hastalık tayini yapılması tıbbi analizler ve uygulamalarında çok önemli bir yer tutmaktadır. Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörleri klasik analiz yöntemlerine yeni bir alternatif olup genetik ve bulaşıcı hastalıkların hızlı, basit ve ucuz yoldan teşhis edilebilmesi, DNA hasar ve etkileşimlerinin tespit edilebilmesi gibi amaçlarla büyük hızla geliştirilmektedir.

Çeşitli bulaşıcı ve kalıtsal hastalıklara ait DNA dizi tanımlanması, genomik DNA çiplerinin tasarımı nükleik asit hibridizasyonuna dayalıdır(97). DNA'daki hibridizasyonun tayin edilmesi elektrokimyasal DNA biyosensörünün tasarlanmasındaki ana nedenlerden biridir.

Diziye özgün ve seçimli olarak tayin yapabilen DNA biyosensörleri, bir DNA probu içeren kısım ve tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştüren çevirim sisteminden oluşmuştur (59, 61, 81, 125, 128).

Elektrokimyasal DNA çiplerinin bir ön tasarımı olan elektrokimyasal DNA hibridizasyon biyosensörlerinde mevcut olan elektrokimyasal ileticiler, DNA hibridizasyonunu doğrudan veya DNA interkalatörleri (metal koordinasyon kompleksleri, antibiyotikler vb.) yardımıyla analitik sinyale dönüştürür (67,111).

Bilinen bir DNA dizisine karşılık gelen hedef diziyle bilinen bir DNA örneği içerisinde oluşturduğu baz çiftinin biyokimyasal yapısı bu olayı mümkün kılmaktadır(4). Fiziksel sinyal çeviricilerinin yüksek duyarlılığı ve DNA hibridizasyonunun yüksek seçiciliği elektrokimyasal biyosensörlerini çevre analizlerinin de vazgeçilmez bir parçası kılmaktadır (30, 28, 120, 29,53,134).

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile E. coli (124), HIV (108) ve Mycobacterium tuberculosis'e (125) ait DNA dizilerini J. Wang ve arkadaşları tayin etmiştir.

Elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle Sistik Fibrozis'e ait DNA dizileri kullanılarak bu hastalığın tayini K. Millan ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (71). Ayrıca S. Mikkelsen'in 1994 yılında yapmış olduğu, kalıtsal hastalıkların dizi seçici DNA biyosensörleri ile tayini projesi (68), Amerika Birleşik Devletleri tarafından korumaya alınmıştır (A.B.D Patent No: 5.312.527- 05/17/1994).

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

Klinikte kullanım için, küçük boyutlarda ve tüm sağlık ekibinin kolayca kullanabileceği bu yeni cihazların tasarımları Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bazı

büyük firmalar tarafından başlatılmıştır. S. Mikkelsen'in kullandığı teknolojinin lisansını Clinical Micro Sensors Inc. (CMS) adlı Amerikan şirketi satın almış ve böylelikle DNA biyoçiplerinin hayata geçirilmesi için ilk çalışmalar başlamış olup halen devam etmektedir.

Çalışmamızın ilk bölümünde, önemli bir çevresel kirlilik ajanı ve potansiyel karsinojen madde olan Benzo [a]piren (BaP) üzerinde deneyler yapıldı. Polisiklik aromatik hidrokarbon yapısındaki BaP, metabolizması esnasında çeşitli ürünlere dönüşmektedir. BaP'nin en önemli ve bu çalışmada incelediğimiz karsinojenik yan ürünü, anti - 7,8,9,10-tetrahidrobenzo[a]piren-7,8-diol 9,10-epoksit (BPDE)'tir (2). Bu kovalent trans yan ürün, guaninin ekzosiklik amino grubu ile epoksitin benzilik karbonu arasında olan tepkime sonucu oluşmaktadır(23).

BaP, bilinen en eski karsinojenik maddelerden biridir. Bu maddenin yan ürünü olan BPDE de karsinojenik özellik taşımaktadır. BaP'nin de dahil olduğu polisiklik aromatik hidrokarbonların neden olduğu mutasyonlar, akciğer kanserine yol açan mutajenezi oluşturmaktadır. Akciğer kanseri için en önemli risk faktörü sigara içilmesidir(2) ve sigara dumanı içerisindeki binlerce zararlı maddeden biri de BaP ve oluşturduğu yan ürün BPDE'dir.

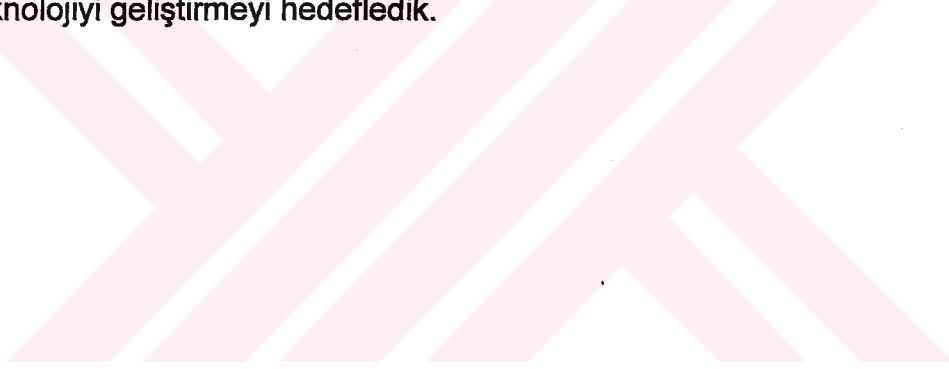
Daha önce BaP ile gerçekleştirilen çalışmalardan farklı olarak bu çalışmada BaP'nin çift sarmal DNA ile etkileşimi sonucunda guanin bazının sinyalindeki azalma üzerinden inceleme yapılmıştır. Ayrıca yeni bir yan ürünün (adduct) oluşumu nedeniyle yeni bir sinyal gözlenmiştir. İlk kez elektrokimyasal DNA biyosensörü kullanılarak bu yan ürünün ve BaP-DNA ile etkileşiminin tayini gerçekleştirilmiş ve çalışma dünya literatürüne girmiştir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde, bir boyar madde olan MB'nun üç farklı elektrot ile incelemesi yapıldı. MB'nun DNA'daki guanin bazlarına büyük oranda özgül olarak

bağlandığı ve ayrıca interkalatör özelliğinin de olduğu grubumuzca daha önceden tespit edilmişti (29,31). Bu çalışmada MB, tüm kinetiği ile hem karbon pastası hem perde baskılı elektrotlar hem de altın elektrotlar kullanılarak incelendi. Çalışmamızın altın elektrotlarla yapılan kısmında hedef dizinin farklı konsantrasyonlardaki davranışı, hedef dizi yerine tek bazı(mismatch) veya tüm bazıları hedeften farklı dizi(non-complementary) kullanıldığında elde edilen yanıtlar ve bu yanıtların tekrarlanabilirliği incelendi. Ayrıca PNA (peptik nükleik asit) molekülü ile de MB indikatörlüğünde çalışmalar yapıldı. (29,34,47,50,51,53,75,109,112,114) Interkalatör (DNA'daki baz çiftleri arasına yerleşme) özelliği olan meldola mavisi (MDB)(56) nin ve yine tek sarmal DNA'ya bağlanma yaptığı tespit edilen fenol ftalein (PPT)(44) gibi maddelerin - DNA ve oligonükleotidlerle olan etkileşimleri incelenerek bu kimyasalların DNA'da meydana gelecek değişiklikleri (hibridizasyon, yan ürün oluşumu, hasar oluşumu v.b.) algılamada belirteç (indikatör) olarak kullanılıp kullanılmayacağı biyosensör tasarımı yapılarak araştırıldı. Tüm bu çalışmalarda elektrokimyasal tayin yöntemleri olarak dönüşümlü voltametri, diferansiyel puls voltametrisi, kare dalga voltametrisi teknikleri kullanıldı.

İlaç molekülü - DNA etkileşmesine dayalı son bölümde ise klinikte antikanser kemoterapisinde kullanılan bir ilaç molekülü olan Mitomisin C(MC)(90) ile, kare dalga voltametri tekniği ve tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrot sistemi kullanılarak yapılan araştırmada ; ilaç(MC) ile yüzeye tutturulmuş DNA'nın etkileşme süresi, ilaç konsantrasyonu, pH farklılığı, ve tekrarlanabilirlik gibi bazı deneysel parametreler incelendi. Literatürde daha önce belirtilen çalışmalardan farklı olarak (64,91,102) bu çalışmada, tek kullanımlık elektrot yüzeyinde ve çok düşük madde sarfiyatıyla MC-DNA etkileşim tayininin gerçekleştirildi. Aynı zamanda oldukça toksik olan bu madde için biyosensör tasarımı yapıldı.

Sonuç olarak çalışmamızda tasarımı yaptıığımız DNA-madde etkileşmesine dayalı biyosensörle, gelecekte de birçok maddenin kısa sürede tayin edilebilmesi için yapılacak çalışmalara yeni bir boyut getirmeyi ve ayrıca DNA hibridizasyonuna yönelik biyosensörlerin tasarımında yeni hibridizasyon indikatörleri bulmak, yeni hibridizasyon tayin yöntemleri geliştirmek; indikatöre dayalı hibridizasyon tayininde tek nokta mutasyonunun tayinini gerçekleştirmek, antikanser ilaç-DNA etkileşimini tayin etmek gibi çok çeşitli nedenlerle elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımı yapmayı amaçladık. Aynı zamanda bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların daha kısa sürede tayinini mümkün kılacak ve yakın gelecekte piyasaya sürülecek olan DNA biyoçiplerinin teknolojisini oluşturan DNA hibridizasyon biyosensörlerinin(genosensör) bir prototipini oluşturacak bu teknolojiyi geliştirmeyi hedefledik.



GENEL BİLGİLER

1. ELEKTROKİMYA

Maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesini ve bunun sonucunda oluşan kimyasal dönüşümleri, fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalı, elektrokimya olarak tanımlanır. Elektrokimyasal tepkimeler, yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir; elektron transferi veya geçişi söz konusudur ve elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede yürütülür.

Analizi yapılacak çözelti, bir elektrokimyasal hücrenin parçası olduğunda çözeltinin elektrokimyasal özelliklerine dayanan bir grup kantitatif analitik yöntemin incelenmesi "elektroanalitik kimya"nın kapsamına girmektedir. Elektroanalitik teknikler çok düşük tayin sınırlarına ulaşabilirler ve elektrokimyasal yöntemlerin uygulanabildiği sistemler hakkında, bilgileri de içeren çok fazla sistemi karakterize eden bilgiler verirler.

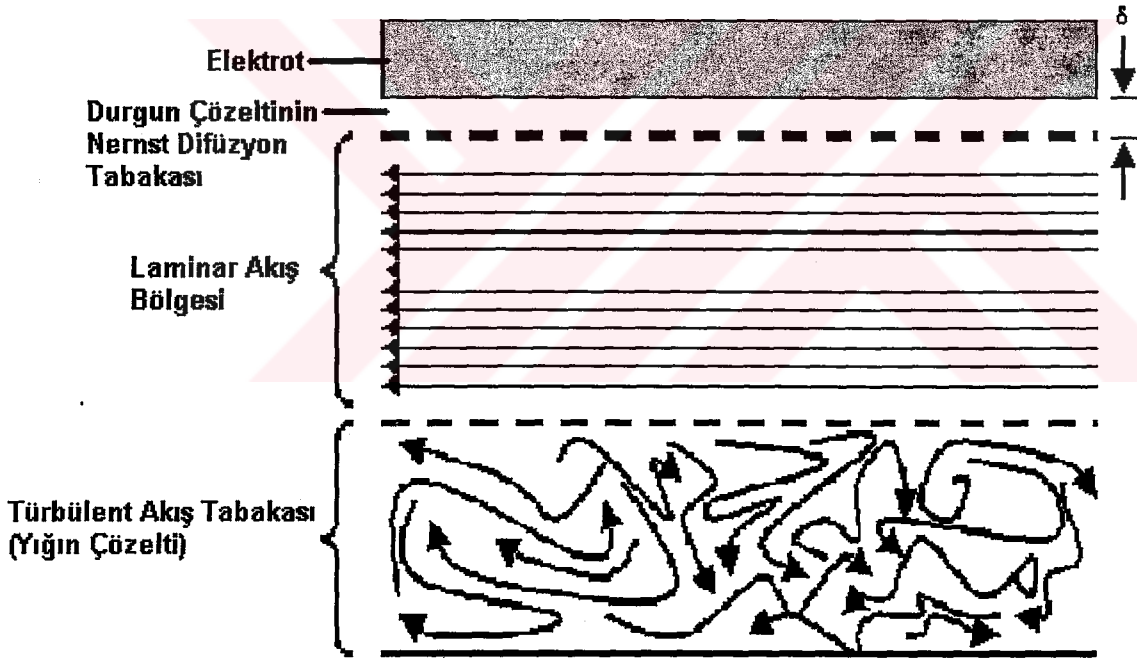
Elektroanalitik yöntemler diğer analiz yöntemlerine göre bazı üstünlüklere sahiptirler. Birincisi, elektrokimyasal ölçümler çoğu kez bir elemente, moleküle veya tepkime sonunda oluşan ürüne özel bir yükseltgenme basamağı için spesifikdir. Elektroanalitik yöntemlerin ikinci bir önemli üstünlüğü de, kullanılan cihazların nispeten ucuz olmasıdır(1).

Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi için, incelenen maddeyi içeren bir çözelti, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrot sistemi (genellikle üçlü elektrot sistemi) ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir çevirim sistemi (transducer) gereklidir. Çözelti olarak elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla tampon çözelti kullanılır. Çeşitli elektrolitik yöntemler ile Doğru akım (DC), Diferansiyel Puls (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.

1.1 Elektrokimyasal tabakalar

Elektrokimyasal ölçüm yapılırken elektrod yüzeyi ile analit sıvısı arasında heterojen tabakalar meydana gelmektedir. Bunun nedeni, elektrot, kendisine bitişik olan çözelti tabakasındaki bir türe elektron verir veya o tabakadan elektron alabilir. Genel olarak karıştırılan sistemlerdeki heterojen tabakaların bileşimi Şekil 1'de



görülmektedir:

Şekil 1: Elektrod yüzeyindeki tabakaların şematize olarak gösterilmesi.

Türbülent akış tabakası: Elektrottan uzak çözelti yığnında gözlenir.

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

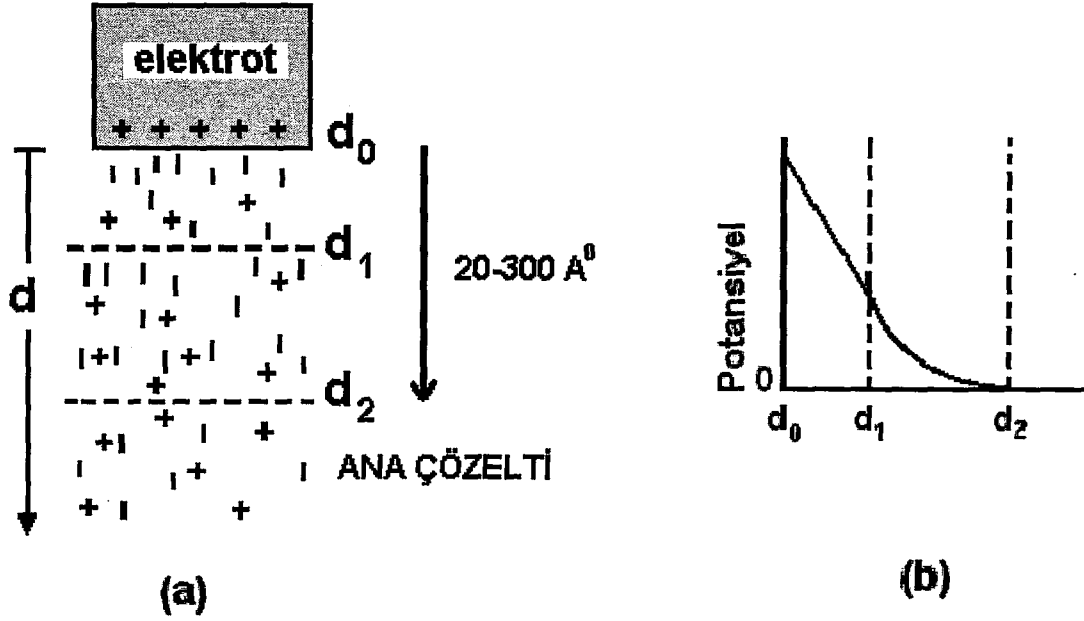
Nernst difüzyon tabakası: Elektrot yüzeyinden δ cm uzakta, laminar akımının hızı sıvı ile elektrot arasındaki sürtünmeden dolayı sıfıra yaklaşır ve bunun sonucunda da elektrot çevresindeki ince, durgun bir çözelti tabakası oluşur. Genellikle bu çözelti tabakası, $10^{-2} - 10^{-3}$ cm kalınlığında olabilir.

1.2. Elektrokimyasal tabakaların elektriksel olarak incelenmesi:

Elektroda pozitif bir potansiyel uygulandıktan hemen sonra eğer elektrodun yüzeyinde reaksiyona girebilecek aktif bir tür yoksa, hızlı olarak sıfıra düşecek anlık bir akım dalgası oluşacaktır. Bu akım her iki elektrodun da yüzeyinde bir negatif yük fazlalığı (veya eksikliği) yaratan bir yükleme akımıdır. Fakat, iyonik hareketliliğin bir sonucu olarak elektrotlara bitişik olan çözelti tabakalarında derhal bir zıt yüklenme oluşur. Bu etkileşim Şekil-1a 'da gösterilmektedir. Elektrodun yüzeyinde, uygulanan pozitif potansiyelin bir sonucu olarak pozitif yük fazlalığı oluşmuştur. Yüklü çözelti tabakası iki kısımdan oluşmaktadır :

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

2- bir difüze tabaka (d_1 'dan d_2 ' e), burada elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça ortaya çıkan potansiyel üstel olarak azalır (Şekil-1b). Elektrot yüzeyindeki ve yüzeye bitişik çözültideki bu yük topluluğu bir *elektriksel çift tabaka* olarak adlandırılır.



Şekil - 2 : Elektrot yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabaka

1.3. Elektrokimyasal bir olayda kütle aktarım yolları:

Bir elektrokimyasal hücrenin çalışması sırasında maddenin elektrot yüzeyine aktarım yolları, üç şekilde gerçekleşmektedir (27). Bu kütle aktarım yolları:

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

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

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

DeneySEL koşullara bağlı olarak bunlardan bir tanesi veya birkaçı kütle aktarımına katkıda bulunabilir.

1.4. Voltametri ve esasları : (1)

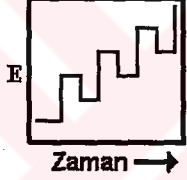
Elektroda uygulanan gerilimin(potansiyelin) bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesine dayanan elektrokimyasal yöntem voltametri denir. Uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine voltamogram denir. Voltametride, herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektroda uygulanabilecek gerilim aralığının sınırları, kullanılan çalışma elektrodunun ve kullanılan çözücü ve elektrolit türlerine bağlıdır.

Tarihsel olarak, voltametri Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920 'lerin başında geliştirilen ve voltametrimin özel bir tipi olan polarografi tekniğine dayanarak geliştirilmiştir. Voltametrimin hala önemli bir kolu olan polarografinin diğer voltametrik tekniklerden en büyük farkı çalışma elektrodu olarak bir damlayan civa elektrotun (DCE) kullanılmasıdır.

Voltametri, inorganik, fiziko ve biyokimyacılar tarafından çeşitli ortamlarda oluşan yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi analitik olmayan amaçlar için de oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

1.4.1. Voltametride kullanılan uyarma sinyalleri: (1)

Elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyelde sinyaller uygulanır. Bu uyarma sinyalleri, karakteristik akım cevaplarını oluşturur. Voltametride en çok kullanılan dört uyarma sinyalinin şekli, şekil-1' de verilmiştir. Bunlar; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır. Bunlardan ilk üçü sıklıkla kullanılmaktadır.

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

Şekil-3: Voltametri de kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

1.4.2 Voltametrik Cihazlar:

Voltametrik analizde kullanılacak cihazlar, elektrokimyasal hücre, analit 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 yükseltildiği veya indirildiği elektrottur.

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

3) Yardımcı elektrot; Pt 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.

1.4.3 Voltametri de kullanılan referans elektrotlar (Karşılaştırma elektrotları) (1,27, 32, 86, 92)

Çalışılan çözeltinin bileşimine duyarlı olan 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.

Referans elektrotların çeşitleri :

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

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

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

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

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

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

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

1.4.4 Voltametrde 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 H₂SO₄ çalışma ortamında, (-0,8 V) ile (+0,4 V) aralığı ve 1 M KCl çalışma ortamında, (-1,6 V) ile (+0,2 V) aralığıdır. Karbon elektrodu için ise, 1 M HClO₄ ortamında, (+0,2 V) ile (+1,8 V) aralığı ile, 0,1 M KCl ortamında (-1,0 V) ile (+1,2 V) aralığıdır.

1.4.4.1 Karbon elektrotlar :

Karbon elektrotlar, özellikle çok ucuz olmaları ve geniş bir potansiyel aralığında çalışma yapılmasına olanak verdiği için dolayı elektrokimyasal analizlerde sık kullanılır. Ancak, karbonun, yüksek bir yüzey aktivitesi vardır ve bu nedenle organik bileşikler tarafından kolayca kirletilebilir. Hidrojen, hidroksil ve karboksil grupları ve

hatta kinonlar ile karbon yüzeyinde bağlar oluşabilmektedir. Bu fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle karbon yüzeyine birçok değişik madde tutturulabilir.

Karbon elektrotların çeşitleri:

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

Son yıllarda tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar çok yaygın şekilde kullanım alanı bulmuştur. Özellikle biyosensör teknolojisinin geleceği olan DNA mikroçip teknolojisine uygulanabilirliği açısından oldukça başarılı sonuçlar veren bu elektrotlar geleceğin elektrotları olarak gösterilmektedir (60,63).



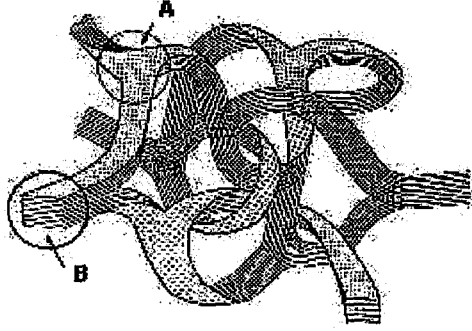
Şekil 4: Perde baskılı karbon (grafit) elektrodun şematik gösterimi.

Elektrokimya alanında çok önemli olan karbon elektrotlarının tüm çeşitlerinde yüzeylerinin düzgün bir şekilde hazırlanması gereklidir.

* Camsı Karbon Elektrot (GCE) :

GCE, ticari olarak elektrot üretimine uygun olmamasına rağmen, çok iyi mekanik ve elektriksel özelliklere sahip olması ve geniş bir potansiyel aralığı olması, kimyasal tepkimelere girmemesi ve genellikle tekrarlanabilir yüzeyler sağlaması nedeniyle sıkça kullanılmaktadır. Kolayca kırılabilen ve sert bir madde olması dolayısıyla, Camsı karbon, fenol / formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin 1000°C - 3000°C arasında basınç altında karbonizasyona uğratılması ile elde edilir. Şekil 5'ten de görüldüğü gibi camsı karbon yüksek yoğunluğa sahip, küçük porlar

içeren amorf bir yapıdır. Birbirinin içine geçmiş, ince, grafitte benzer şeritlerden oluşmuştur.

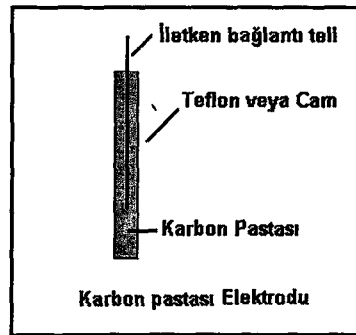
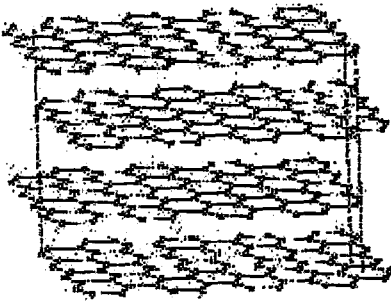


Şekil 5. GCE'nin amorf yapısı (A) Kuvvetli bağlar, (B) Zayıf bağlar.

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

*** Karbon Pastası Elektrodu (CPE):**

Grafit tozunda bulunan karbon moleküllerinin düzlemsel ve aromatik halkalar halinde dizilimi Şekil 6' da görülmektedir. Zayıf π bağları ile birbirine bağlanmış olan bu tabakalar arasında hızlı bir elektron alışverişi olabilmektedir.



Şekil 6. Grafit tozunda bulunan karbon moleküllerinin dizilimi. **Şekil 7.** 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 çözügen içeren çözeltilerde kullanıldığı zaman, karbon pastası çözeltide dağılmaktadır.

1.4.4.2 Civa elektrotlar:

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

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

Civa elektrotlarının çeşitleri:

- 1- Disk elektrot
- 2- Asılı civa damla elektrot (HMDE)
- 3- Damlayan civa elektrot
- 4- Durgun civa damla elektrot

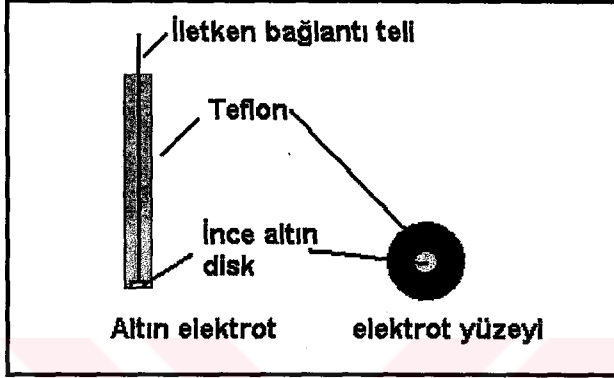
Bu elektrotlardan HMDE, en sık olarak dönüşümlü voltametrde ve sıyırma analizlerinde kullanılan çalışma elektrodudur, dezavantajı ise, yükseltgenebilir bileşiklerin analizleri için kullanılamamasıdır.

1.4.4.3 Metal Elektrotlar:

Platin ve altın en çok tercih edilen elektrot tipleridir.

Metal elektrotların çeşitleri:

* Altın elektrot:



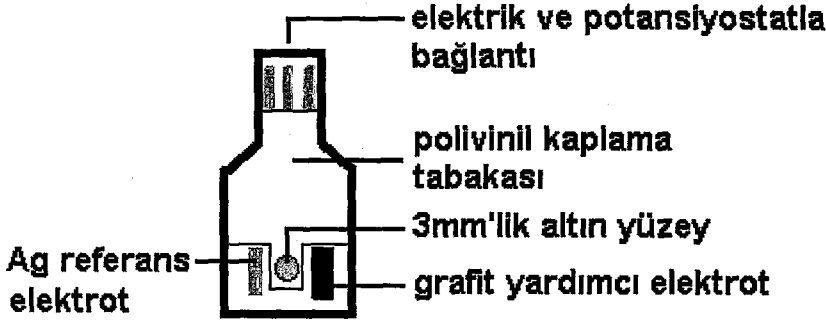
Şekil 8: Katı altın elektrodun yapısı.

Bu elektrotlar yüksek elektron transfer kinetiklerine ve geniş bir pozitif potansiyel aralığına sahiptirler. Kullanılan çözeltinin pH'sına bağlı olarak (-0,2) - (-0,5) V aralığında çalışılabilir.

Bakır ve nikel elektrotlar ise amino asitlerin ve karbonhidratların tayininde kullanılmaktadır.

* Tek kullanımlık perde baskılı altın elektrotlar (Au-SCPE):

Tek kullanımlık metal elektrotlar da son yıllarda gündeme gelmiş ve başarıyla kullanılmaktadır. Özellikle toz haldeki altın partiküllerinin uygun bir polimer yardımı ile plastik zemine tutturulması ve üzerininin polivinil bir kaplama tabakasıyla örtülmesi sonucu altın perde baskılı elektrotların elde edilme yollarından biridir(60,63,65,124).



Şekil 9: Perde baskılı altın elektrodun yapısı.

1.4.4.4 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.

1.4.5 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 **Hidrokinamik Voltametri** adı verilir. Damlayan civa elektrodunun kullanıldığı voltametriye **Polarografi** denir.

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

1-Kapasitif akım (i_c) : Bir elektrodun bir elektrolit çözeltisine daldırılması ve negatif yükü yüklenmesiyle çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin ara yüzeyin iki tarafında birikmesi ile bu bölgede bir elektriksel çift tabaka oluşur. Oluşan bu çift tabaka, bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek veya indirgenecek madde olmasa dahi bir akım oluşur. Bu akım reaksiyona bağlı değildir; sistemden kaynaklanır ki bu akıma kapasitif akım denir. Ne kadar düşük olursa, o kadar doğru ölçüm yapılır. Kapasitif akım fon 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 azalır ise duyarlılık artar.

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

1.4.6 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 = cm² cinsinden elektrot yüzey alanını,

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

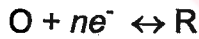
C_A = mol/cm³ cinsinden A'nın konsantrasyonunu göstermektedir.

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

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

1.4.7 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.

$$E = E^0 + \frac{2,3 R.T}{nF} \log \frac{C_o(0,t)}{C_R(0,t)} \quad (1.1)$$

E⁰ = Redoks tepkimesi için standart potansiyel

R = Gaz sabiti (8,314 JK⁻¹mol⁻¹)

T = Sıcaklık (°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.

1.4.8. Polarografi : (1, 27)

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

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

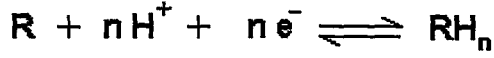
Sınır akımları, akımın büyüklüğü analizlenecek maddenin elektrot yüzeyine taşınma hızı ile sınırlı olduğu zaman gözlenir. Difüzyonla kütle aktarımı olduğu için polarografik sınır akımlarına genellikle *difüzyon akımları* denir ve i_d ile gösterilir. Bu, difüzyon akımı ile artık akımlar arasındaki farktır.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

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

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

Polarografide pH'nın etkisi: (1)

Bazı organik ve inorganik madde reaksiyonları aşağıdaki gibi ifade edilir:

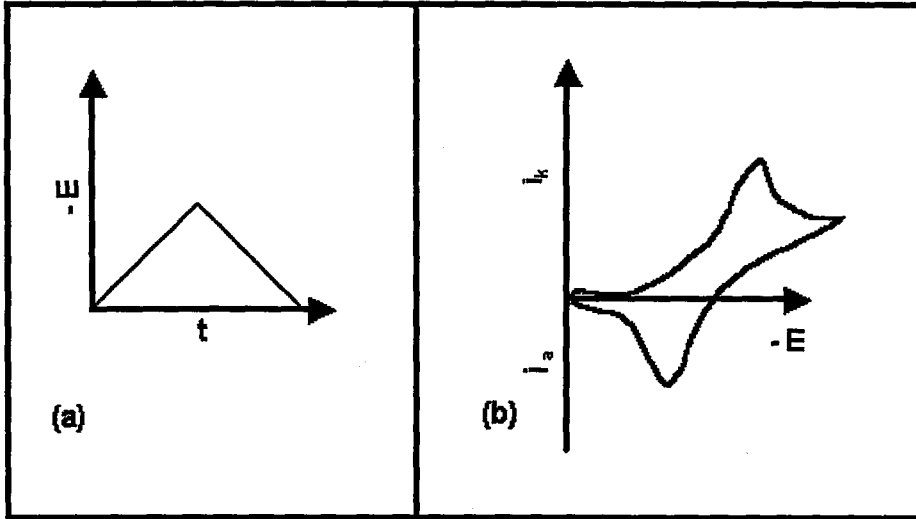


R, analitin yükseltgenmiş şekli ve RH_n de indirgenmiş şeklini göstermektedir. Bu tip bileşiklerin yarı-dalga potansiyelleri denklemden de anlaşılacağı gibi önemli ölçüde pH' ya bağlıdır; pH'nın değişimi, reaksiyon sonucunda oluşan ürünün değişmesine bile sebep olabilir. Bu nedenle analit çözelti çok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

1.4.9 VOLTAMETRİK TEKNİKLER:

1.4.9.1 Dönüşümlü Voltametri:

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



Şekil-10: (a) Dönüşümlü voltametrde elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği ; (b) Dönüşümlü voltametrde 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 gerilim farkı ΔE_p ile ifade edilir.

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

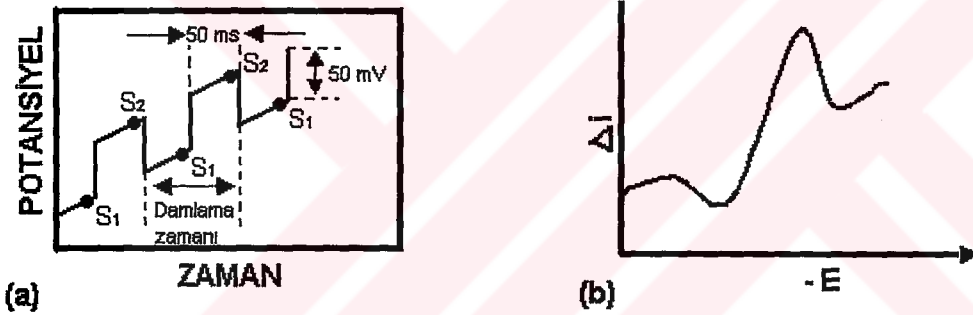
ΔE_p bu değere ne kadar yakın ise, reversible (dönüşümlü); ne kadar uzaksa irreversible (dönüşümsüz) olarak adlandırılır.

1.4.9.2 Diferansiyel Puls Polarografisi:

Bu teknikle, 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-11: Diferansiyel puls polarografisi için uyarma sinyalleri; (a) Analog cihazlarda diferansiyel puls voltametri için kullanılan uyarma sinyali; (b) Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen bir voltamogram.

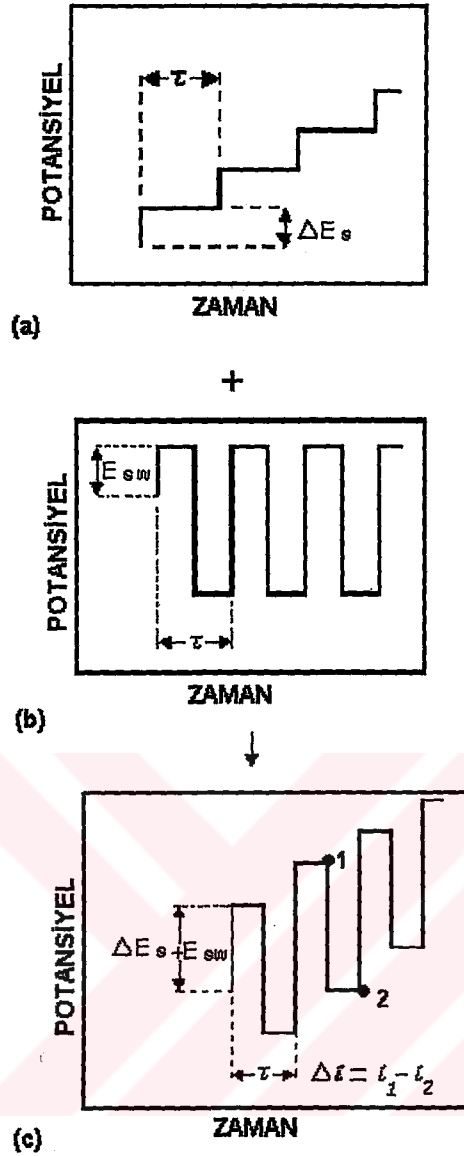
Faradayik akımın yüksek, faradayik olmayan yükleme akımının ise düşük değerde olması duyarlılığın artmasıyla açıklanabilir. Örneğin potansiyel aniden 50 mV arttırıldığında, elektrodu çevreleyen yüzey tabakasında, eğer elektroaktif bir tür varsa, analit konsantrasyonunu yeni potansiyel tarafından istenen seviyeye düşürecek bir akım artışı gözlenir. Ancak bu potansiyel için gerekli olan denge konsantrasyonuna erişilince, akım difüzyonu karşılayacak bir seviyeye düşer ki bu

akım denir. Puls polarografisinde akım ölçümü, bu akım artışı tamamen sona ermeden önce yapılır. Toplam akım, difüzyon akımından büyüktür. Damla değiştiğinde, çözelti yeniden analizlenecek madde yönünden homojen hale gelmektedir.

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

1.4.9.3 Kare Dalga Polarografisi ve Voltametrisi:

Son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir puls polarografi tekniğidir. Bir kare-dalga voltametresinde uyarma sinyalinin oluşumu Şekil-12'de görülmektedir. Elde edilen akımlar arasındaki fark, Δi ; 1 gerilimindeki akımdan, 2 gerilimindeki akım değeri çıkarılarak bulunur. 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.



Şekil-12: Bir kare-dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumu [(a) daki uyarma sinyali (b)'deki puls taraması ile (c)'deki kare-dalga uyarma sinyalini elde edecek şekilde toplanıyor].

Kare dalga voltametrisinde, voltamogramın tamamı 10 ms'den daha az sürede elde edilir. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından, analizin kesinliğini arttırmak için birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınmalıdır. Kare dalga voltametrisinin tayin sınırları 10^{-7} ile 10^{-8} M arasındadır.

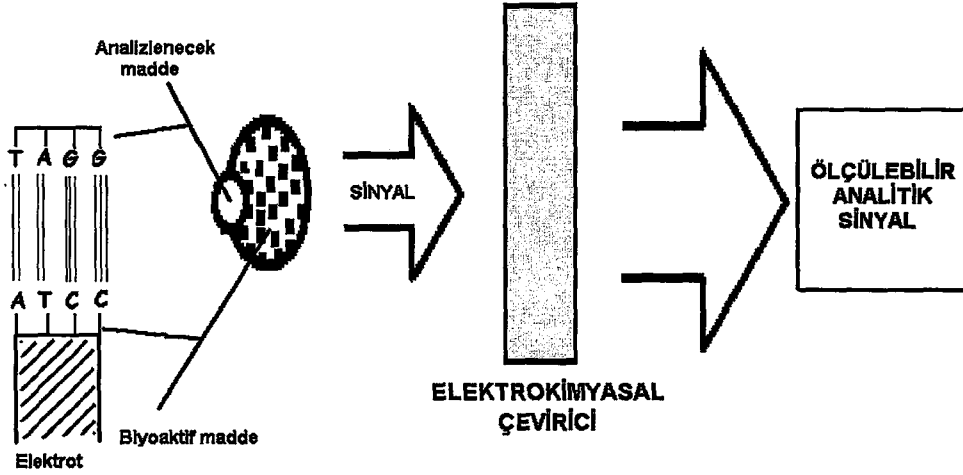
1.4.10 Puls Polarografisinin Uygulamaları: (1)

Günümüzde yüksek duyarlılığı, kolaylığı ve seçiciliğinden dolayı, puls yöntemleri kantitatif uygulamalarda, genellikle pik yüksekliklerinin analizlenecek madde konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildiği kalibrasyon eğrileri çizilmesi çalışmalarında kullanılır.

Elektrokimya'nın pek çok uygulama alanı vardır. Bunlardan biri olan **Biyosensörler** hakkında bilgi verecek olursak;

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).



Şema-1: Biyosensörün yapısı.

2.1 Biyosensör Çeşitleri:

Biyosensör tasarımı için çeşitli yöntemler kullanılabilir :

ÇEVİRİCİ SİSTEMİ	Ölçülen özellik ve kullanılan ölçüm sistemi
OPTİK	Fluoresans, Absorpsiyon, Yansıma, Luminesans, Kırılma İndeksi
MANYETİK	Paramanyetizm
ELEKTROKİMYASAL	Voltametri, Potansiyometri, Amperometri ve Alan etkili (ISFET, chem FET)
ELEKTRİKSEL	Yüzey etkinliği (MOS), Elektrolit İletkenliği
KÜTLEYE DUYARLI	Piezoelektrik kristallerinin rezonans frekansı, Yüzey akustik dalgaları
TERMAL	Reaksiyon ısısı, Adsorpsiyon ısısı

2.2 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler: (40)

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

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

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

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

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

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

Yeterli Düzeyde Tayin Sınırı: Tasarlanan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir konsantrasyon değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot

yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

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

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

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

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

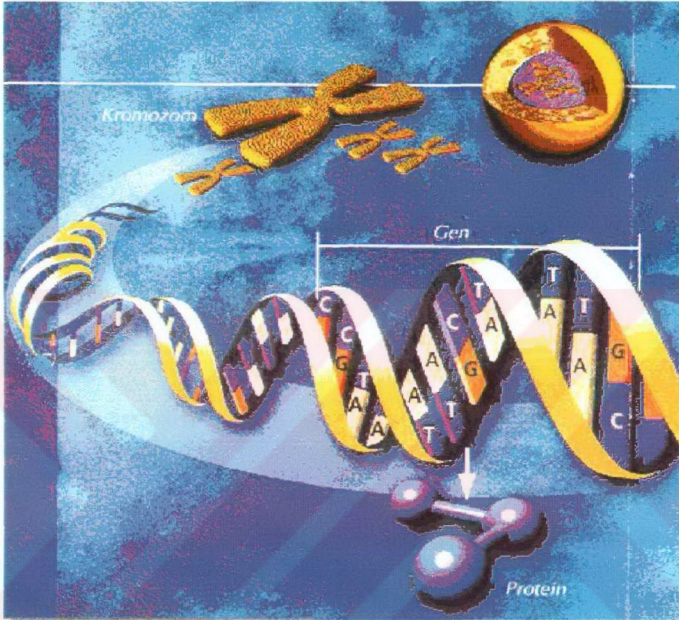
Küçültülebilirlik ve Sterilize edilebilirlik: Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

2.3 Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapıları:

2.3.1 Nükleik Asitler ve DNA : (26,103)

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 enzimlerden nükleazlara **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 miktarları ile guanin (G) ve sitozin (C) miktarlarının eşit olduğunun belirlenmiştir. Buna dayanılarak Watson, Crick ve Wilkins tarafından 1950 yıllarında DNA yapısı için çift zincirli heliks şeklindeki yapı modeli ortaya önerilmiştir. Bazları arasında yer alan hidrojen bağları tarafından çift sarmal DNA molekülünün iki zinciri, bir arada tutulmaktadır. Çift zincirli sarmalda bazlar sarmal iç kısmında, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısmında yer aldığı için sarmalın iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Pürin ve pirimidin nükleotidleri arasındaki eşleşmeler son derece spesifiktir (A-T ve G-C şeklinde). Bu sayede, DNA yapısında yer alan bir polinükleotid zinciri daima ikinci zincirin tamamlayıcısı olduğu için bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde ikinci zincirdeki baz dizisi bulunabilmektedir. 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 konsantrasyonda G ve C taşıyan DNA, iki hidrojen bağı taşıyan A ve T ($A = T$) bulunduran DNA yapısına göre

daha yüksek sıcaklıkta denatüre olmaktadır. Uygun şartlar altında çift zincirli DNA tekrar oluşabilir, bu işlem renatürasyon olarak isimlendirilir.



Şekil-13: DNA çift 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 yüzeyinde bulunmakta ve bu zincirlerden her biri kovalent bağlılığı sağlayan fosfodiester köprülerinin bulunduğu fosfat ve pentoz gruplarından oluşmuştur. DNA çift sarmalın

Tekrarlayan oligonükleotidler: Polimer içindeki tekrarlayan oligonükleotidler, tekrarlayan tek bir bazı, tekrarlayan iki bazı ya ya üç bazı ifade eder. Örneğin, poly (A), dinükleotid'e poly (AT), trinükleotid'e 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.

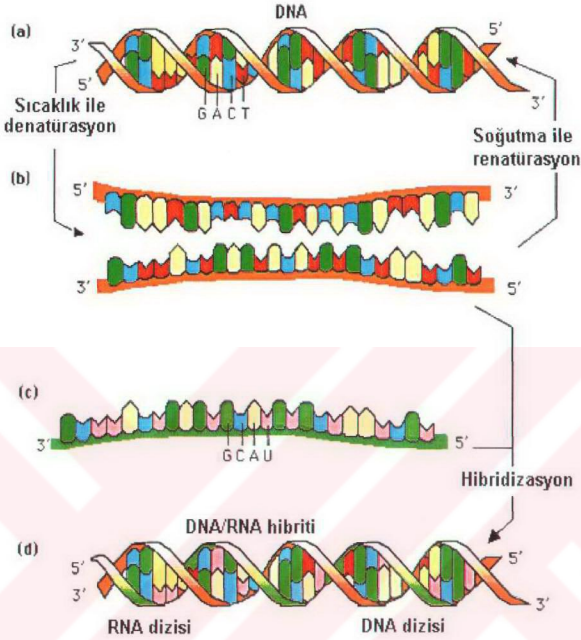
Hedef dizi (Target) : Prob dizisinin karşılığını içeren oligonükleotid.

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.

2.3.1.1.3 Nükleik asit (DNA) hibridizasyonu:

Nükleik asit hibridizasyonu, baz çiftlerinin özel hibridizasyon koşullarına bağlı olarak kararlı bir dupleks molekülü oluşturmasıdır (4).



Şekil-14: Nükleik asit hibridizasyonu

2.3.1.2. DNA hibridizasyonunun kinetiğini etkileyen faktörler: (4)

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

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

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

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

Tuz konsantrasyonu : 1.2 M'a kadar artan NaCl konsantrasyonu ile hibritleşme hızı artışı göstermektedir.

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

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

İyonik kuvvet : İyonik kuvvetin artışına bağlı olarak, hibridizasyonun hızı artmaktadır. Örneğin, sodyum derişimi < 0.1 M'ın üstünde iki kat arttırıldığı zaman, hız 5 - 10 kat artmaktadır . Ancak, daha fazla arttırmalardan sonra ve 1.5 M'a kadar hız yavaşça yükselmektedir .

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

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

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

2.3.2 Peptik Nükleik Asitler (PNA):



Şekil-15: PNA ve DNA'nın yapılarının karşılaştırmalı olarak gösterilmesi.

PNA, DNA'nın eksi yüklü deoksiriboz-fosfat omurgasının, amit bağlarıyla bağlanmış, tekrarlanan N-(2-aminoetil)glisin birimlerinden oluşan nötral bir yapıyla değiştirilmesiyle elde edilir. Bu yapı, DNA molekülünün analogu olup, nötral yükü ve bazlar arası uygun uzaklıklarıyla komplementer DNA'ya, normal DNA dizilerine göre çok daha fazla afinite duymakta ve daha özgün şekilde bağlanabilmektedir. PNA yapısı nükleazlar ve proteazlar tarafından yıkıma uğramadığı için çok daha yüksek biyolojik kararlılık göstermektedirler. Kısa PNA problemleri kullanılarak DNA ile sadece

tamamen birbirlerinin tamamlayıcısı(komplementeri) oldukları zaman, çok daha seçimli hibritleşebilmektedirler. Eğer hedef dizinin tek bazı farklı ise, prob ile hedef arasında hibridizasyon oluşmamaktadır. PNA'lar ile oluşturulan hibritler yüksek sıcaklıkta dahi çift sarmal yapısını kaybetmemektedir (76-78,112,114,120,122). Yüksek sıcaklıkta stabil olan bu hibritler düşük iyonik kuvvette oluşmaktadırlar.

Günümüzde ise çeşitli hastalıkların tanısı için önemli olan nokta mutasyonlarının yüksek duyarlılıkla tayini, peptid nükleik asit problemlerinin, DNA hedef dizileriyle hibridizasyona uğratılmasıyla başarılı şekilde geliştirilmeye devam etmektedir (79,38).

2.4 DNA BİYOSENSÖRLERİ

Çeşitli mutasyonlar, bazı DNA'ya hedeflenmiş ilaçların mekanizmaları, bazı hastalıkların tayini, bazı sentetik kimyasal nükleazların hareket mekanizmalarının açıklanabilmesi, DNA ve diğer moleküllerin arasındaki etkileşimin aydınlatılmasıyla mümkün olabilecek önemli bir ana konudur (67).

DNA'ya dayalı elektrokimyasal biyosensörler için son yıllarda moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanında görülen gelişmeler, heyecan vericidir (126). Nükleik asit tanıma tabakası, çok stabil ve kolaylıkla oluşturulabilen ve tekrar kullanım için yenilenebilen bir tabakadır (67).

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri geçmişte tasarımı yapılmış ve kullanılmış diğer algılayıcı sistemlere, yeni bir alternatiftir ve gelecekte planlanan tek nokta mutasyon analizlerinde de çok önemli bir rol oynayacaktır (114). DNA'ya dayalı tanıma yüzeyleri, dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (67, 70, 71, 120) veya bu yüzey ile etkileşime giren maddelerin (karsinojenler, ilaçlar, vb.) tayininde kullanılabilir (9, 64, 80, 91, 102, 123, 129, 130, 133).

2.4.1 İlaç-DNA etkileşmesine dayalı DNA Biyosensörleri:

Çeşitli maddeler, dsDNA ile ; nükleik asit yapısındaki negatif yüklü şeker-fosfat grubu ile elektrostatik bağlanarak, DNA çift sarmalının yapısının 2 oluklarına (küçük ve büyük oluklarına) bağlanarak veya doğal yapılı DNA'nın baz çiftleri arasına interkalasyon yaparak etkileşir (133).

İlaç, çevresel atıklar, metal kompleksleri gibi kimyasal maddelerle DNA'nın etkileşmesi ve bu etkileşimin tayini, eczacılık alanında yeni ilaç tasarımını gündeme getirmiştir. Ayrıca çevre kirliliğine yol açan bazı atıkların tayini gibi çevresel analizlere imkan sağlayacak yeni bir yöntemin geliştirilmesi açısından da önem kazanmaktadır (22,24,25,50,53,58,64,74,75, 80,91,102,123,129,130,133).

DNA'nın birim parçasını oluşturan oligonükleotidler tedavide kullanılmaya aday bir madde olarak bulunmuştur (95). Antisense ilaçların gelecekteki faydaları düşünülecek olursa yeni ilaç tasarımları sırasında DNA ile etkileşimlerinin incelenmesi ve bunun yanında bir takım hastalıkların tedavisinde bu oligonükleotidlerle tedavi yoluna gidilmesi, örneğin Vitravene-ilk antisense ilaç (73); bu yolda atılmış önemli adımlardır. Ayrıca son yıllarda peptik nükleik asitlerin (PNA) antisense teknolojisinde ve ilaç geliştirilmesine yönelik çalışmalarda kullanımları ümit vericidir (76,77).

İlaç-DNA etkileşmesine dayalı elektrokimyasal çalışmalarda (9,64, 91,102, 123,129,133) , DNA ile etkileşen ilaçlardan elde edilen sinyalde bir azalma veya artış gözlenmesiyle tayin yapılmıştır. Bazı biyosensörlerle, incelenen ilaçların miktar tayinini daha duyarlı bir şekilde yapmak mümkündür (10,11, 123) .

İlaç-DNA etkileşmesine dayalı DNA biyosensörlerinin tasarımında amaç gelecekte yeni antibiyotik, antiviral, antitümör ilaç ve antisense oligonükleotitlerine dayalı ilaç hedefleme çalışmalarına katkıda bulunmak (24, 73) veya bir ilaç

hammaddesinin kantitatif tayininin daha duyarlı bir şekilde gerçekleştirilmesini mümkün kılabilir (9-11, 123, 133).

2.4.2 DNA hibridizasyonuna dayalı DNA Biyosensörleri:

Çeşitli biyolojik örneklerde çeşitli yöntemlerle özgün DNA dizisi saptanması biyomedikal alanda çok önemlidir (104). Hastalık teşhislerinde insan, virüs ve bakteri baz diziliminin tayini ile pek çok kalıtsal hastalığa sebep olan mutasyonlar artık tespit edilebilmektedir.

Hibridizasyon tayinlerinde kullanılan çeşitli immünokimyasal ve voltametrik metodlar karşılaştırıldığında, birkaç örneğin çalışıldığı durumda voltametrik yöntemlerin daha hızlı yanıt verdiği söylenebilir, ancak büyük miktarda bir seri benzer örnek analizlenecekse, iyi bir otomasyona sahip Elisa gibi immünokimyasal tekniklerin kullanılması daha uygundur (84).

PCR yöntemiyle hedef genlerin tayin edilmesi zordur, bu nedenle yüksek duyarlılıkta diziye özgün ve nicel gen tayini yapabilecek bir yöntem ihtiyacı vardır.

Diziye özgün DNA biyosensörleri, bir çevirim sistemi ile beraber DNA probundan oluşmuştur. DNA biyosensörlerinin esası, DNA bazlarının hibridizasyonuna dayanır (41, 125, 128).

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 hibritin olduğu elektrot, bir elektroaktif indikatör içeren (örneğin bir redoks-aktif katyonik metal kompleksi) bir çözeltiye daldırılır ve indikatörün hibrite bağlanma düzeyi belirlenir (126).

Hibridizasyon oluşumundan sonra bu hibritle etkileşen indikatörün neden olduğu artan veya azalan elektrokimyasal yanıt, hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kabul edilir (58, 60, 108, 117).

Hibridizasyon indikatörü, ölçülebilir ve değişik bir şekilde tek sarmal ve çift sarmal DNA ile etkileşebilen bileşiktir. Örneğin, *Co(III)* (15, 17, 18, 49, 70, 72,122); *Fe(II)* (18, 47); *Ru(II)* (3, 35, 47, 48) ; *Os(II)*, *Os(IV)* (61, 62, 101) 'nin 1,10-fenantrolin ve 2,2'- bipiridin DNA'ya bağlı klatları voltametrik olarak çalışılmaktadır.

J. Wang ve arkadaşları, karbon pastası kullanarak geliştirdikleri elektrokimyasal DNA hibridizasyon biyosensörleri ile *E. coli* (124) , HIV (108) ve *Mycobacterium tuberculosis* (125)'e ait DNA dizilerini tayin edebilmişlerdir.

Tek nokta mutasyon tayinlerinde yeterli derecede hassas sonuçlar veremeyen DNA yerine kullanabileceğimiz PNA 'dan yararlanarak daha özgün ölçümler, PNA'ya dayalı biyosensörlerle gerçekleştirilmiştir. DNA ile çift sarmal oluşturabilen peptik nükleik asitler (PNA) " prob " olarak kullanılabilir; hedef DNA'ya daha seçici olarak bağlanırlar. Böylelikle PNA problemleri çeşitli hastalıklara sebep olabilecek nokta mutasyonları (mismatch) kolaylıkla tayin edilebilmektedir (76,78,108, 114, 122).

J. Wang ve arkadaşları ayrıca elektroaktif indikatör kullanılmayan bir DNA biyosensörü tasarımı yapmışlar; guanin bazının oksidasyona uğramasına bağlı signale ilişkin bir tayin gerçekleştirmişlerdir (128).

K. Millan ve arkadaşları da DNA hibridizasyonuna yönelik çalışmalarında karbon pastası elektrodu kullanmaktadır. Prob hazırlama tekniği farklı olmasına rağmen; elektrokimyasal tayin yöntemi, J. Wang ve arkadaşlarınıninkine ayırdır. Sistik fibrozis'e (71) ait DNA dizilerini kullanarak elektrokimyasal tayinlerini başarıyla gerçekleştirmiştir. Ayrıca aynı çalışma grubundan S. Mikkelsen, 1994 yılında kalıtsal hastalıkların dizi seçici DNA biyosensörleri ile tayini projesiyle (68),

Amerika Birleşik Devletleri'nden patent hakkı kazanmıştır (A.B.D Patent No: 5.312.527- 05/17/1994).

Clinical Micro Sensors firması (CMS), Mart 1998'de Massachutes Teknoloji Enstitüsü'ndeki bir fuarda ilk DNA çip prototiplerini sunmuştur (132). Hoffman La Roche firmasının, DNA testlerini üretime sokmaya çalışan Affimetrix (CA.) adlı firmayla anlaşma yapmıştır (43).

2.4.3 DNA Biyosensörlerinde prob dizilerinin elektrot yüzeyine modifiye edilme yolları:

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri geliştirilmesindeki temel aşamalardan birisi prob olarak kullanılacak DNA parçasının elektrod yüzeyine sağlam şekilde tutturulması basamağıdır. Eğer yüzeye probun en kolay ve sağlam şekilde tutturulması sağlanırsa, bu probun daha sonra hedefi ile hibridizasyonu daha kolay olacak ve oluşan hibritin çeşitli fiziksel veya kimyasal etkenlerden etkilenip yüzeyden kopması gibi olumsuz etkiler de ortadan kalkacaktır. Tüm dünyada araştırmacılar bu teknikler üzerinde deneyler yapmakta ve en düşük maliyetle ve en uygun spesifik bağlanmayı sağlayacak tekniği bulmaya çalışmaktadırlar. DNA çiplerine uygulanabilirliği araştırılan bu temel aşama çok büyük önem taşımaktadır.

Elektrot yüzeyine DNA bağlama(modifikasyon,immobilizasyon) teknikleri:

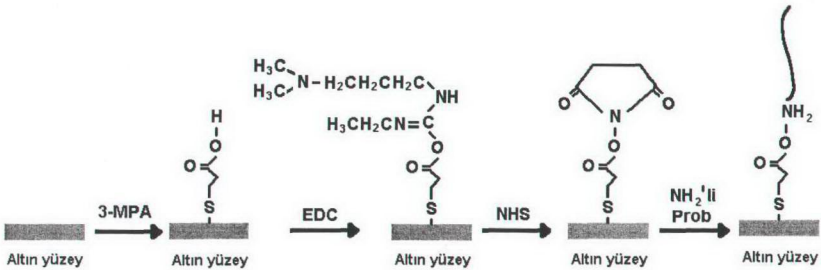
- 1) Elektrostatik bağlanma
- 2) Kovalent bağlanma (Altın elektrotlar ve karbon elektrotlar için)
- 3) -SH grubu ile işaretli oligonükleotitin altın elektrod yüzeyine afinitesi nedeniyle tutturulması

- 4) Avidin-biyotin etkileşimi nedeni ile streptavidinle kaplı yüzeye biyotinin işaretlenmiş problemlerin tutturulması

2.4.3.1 Elektrostatik bağlanma: Elektrod yüzeyine (+) pozitif potansiyel uygulanması (-) yüklü fosfat omurgasına sahip olan DNA'nın yüzeye elektriksel çekim kuvvetleri sayesinde tutunmasını sağlar (121, 125).

2.4.3.2 Kovalent bağlanma: Altın elektrotlar (solid altın elektrotları, tek kullanımlık perde baskılı altın elektrotlar) ve altın nanopartiküller için ilk olarak 3-merkaptopropiyonik asit veya L-sistein ile -SH gruplarının elektrod yüzeyine tutunması sağlanır. Burada

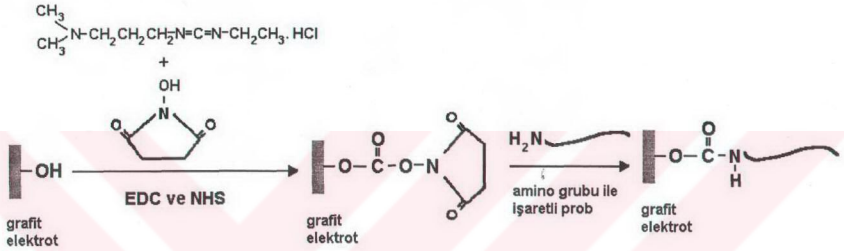
-SH gruplarının altın meteline olan güçlü afinitesinden yararlanılır. Daha sonra N-Hidroksi süksinimit (NHS) ve etil karbodiimitt (EDC) gibi kovalent ajanlar kullanılarak NH_2 grubu ile işaretli probun yüzeyde güçlü şekilde tutunmasına imkan sağlayan zemin oluşturulur (39,42). Bu metod, özellikle de altın elektrot için spesifik olan yüzey kaplama metodudur. Çalışmalarımızın altın elektrotlar ile olan bölümünde, aşağıda şematize edilmiş olan bu metod kullanıldı.



Şekil 16: Altın elektrot yüzeylerinde kimyasal ajanlarla kovalent bağlanma. Ayrıca bu teknikle düzenli şekilde propiyonik asit gibi gruplar sayesinde DNA elektrod yüzeyine dikey olarak tutturulduğu için hibritleşme çok daha rahat ve spesifik

olarak gerçekleştirilmektedir. Elektrod yüzeyinde düzenli bir tabakalanma oluşturulmaktadır.

Eğer elektrot olarak altın değil de çeşitli karbon(grafit) elektrodlar kullanılırsa bu durumda 3-merkaptopropiyonik asit gibi bir ajana gereksinim duyulmamaktadır. Sadece kovalent ajanlarla yapılan kaplama yüzeye NH_2 grubu ile işaretli prob direkt olarak güçlü şekilde bağlanmaktadır. (135)



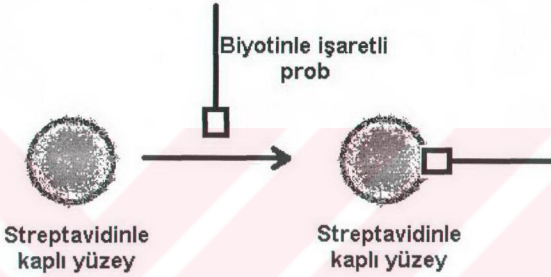
Şekil 16: Grafit elektrot yüzeyinde kovalent ajanlarla yapılan NH_2 grubu ile işaretli DNA probu modifikasyonu.

2.4.3.3 -SH grubu ile işaretli oligonükleotilerin altın elektrod yüzeyine afinitesi nedeniyle tutturulması:

Bu teknik altın elektrodlar için kullanılmaktadır. $-\text{SH}$ grubu içeren moleküllerin altın elementine olan güçlü afinitesi esastır ve problemler $-\text{SH}$ ile işaretlenerek sentezlenir. Böylece hiçbir ajana gereksinim duyulmadan prob yüzeye yerleştirilmiş olur. Sentezin pahalı oluşu ve tutunmanın kovalent ajanlar kullanıldığında kadar başarılı olmayışı başlıca dezavantajlarıdır.

2.4.3.4 Avidin-biyotin etkileşimi nedeni ile streptavidinle kaplı yüzeye biyotinle işaretlenmiş problemlerin tutturulması:

Streptavidin ile kaplanmış çeşitli elektrot yüzeylerine ya da yine streptavidinle kaplanmış manyetik boncuklar üzerine, biyotin ile işaretlenmiş problemler, elektrod yüzeyine streptavidin ve biyotinin birbirine olan güçlü afinitesi nedeniyle spesifik şekilde tutturulmaktadır (94,119).



Şekil 17: Biyotinle işaretli probun streptavidin kaplı yüzeye tutturulması.

BÖLÜM II

GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Kullanılan cihazlar

Terazi (Sartorius-Analytic A-200)

Ses titreşimli temizleyici (Ultrasonic LC 30 H)

pH-metre (Schott-Mainz CG 710)

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

Potansiyostat:

AUTOLAB 30 (Eco Chemie, Hollanda)

Spektrofotometre (UV 160 A-Shimadzu)

Ag/AgCl referans elektot

Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı.)

DeneYlerde kullanılan Karbon Pastası Elektrodunun (CPE) hazırlanışı:

Çalışma elektodu, çapı 3 mm olan cam borudan hazırlandı ve 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 hazırlandı. Elektrot (CPE) hazırlandıktan sonra elektrot yüzeyi, yağlı kağıt ile homojen bir yüzey haline çevrildi (14, 15, 121, 123,125).

2.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Benzo[a]piren (BaP) (Sigma)

Metilen Mavisi (LaPine Scientific Inc.)

Meldola Mavisi (Sigma)

Fenol Ftalein (Sigma)

Mitomycin C (Sigma)

Asetik asit (%99-100) (Merck)

Hidroklorik asit (%37) (Merck)

Sodyum Hidroksit (Merck)

Di potasyum mono hidrojen fosfat (Riedel-de Haen)

Potasyum dihidrojen fosfat (Riedel-de Haen)

Grafit tozu (Fisher)

Mineral yağ (Acheson 38)

Tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorür (Sigma)

Sodyum klorür (Sigma)

Buzağı timus bezinden elde edilen DNA [=Calf Thymus DNA; çift sarmal DNA (dsDNA) ve tek sarmal DNA (ss DNA)] (Sigma)

Etilen dinitrilotetraasetik asit disodyum tuzu (Merck)

Alümina tozu (0.1 µ ve 0.3µ) South bay Technology Inc.

BaP : Sigma

THF (Tetrahidrofuran): Fluka

Tüm çalışmalarda sterilize edilmiş deiyonize su kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında ($25,0 \pm 0,5$) °C' de gerçekleştirildi.

2.2.1 Metilen Mavisi ile yapılan çalışmalarda kullanılan oligonükleotidler ve hazırlanmaları

2.2.1.1 Metilen mavisi - DNA etkileşimi çalışmasında Altın elektrod (AuE) ve Karbon pastası elektrodu (CPE) ile kullanılan oligonükleotidler :

14-baz sentetik DNA oligonükleotitleri Genset oligos (Sydney, Australia) firmasından (liyofilize toz halinde) satın alındı. 14 bazlık sentetik peptid nükleik asit

(PNA) oligonükleotidleri Danimarka'da Department of Medical Biochemistry and Genetics, Center for Biomolecular Recognition, The Panum Institute, IMBG' de çalışan Profesör Peter E. Nielsen tarafından deneylerimiz için hazırlandı.

Deneylerimizde kullandığımız PNA ve DNA oligonükleotidlerinin baz dizilimi aşağıdaki gibidir:

Hedef dizileri (14-baz DNA dizi A):

3'- GGG GGG CAG AGC AT-5'

PNA ve DNA Prob dizileri (14-baz PNA dizi B ve DNA dizi B):

H-(3'-) ATG CTC TGC CCC CC (-5') - Lys- NH₂

Tek bazı hedeften farklı dizi (14-baz DNA dizi A'):

3'- GGG GGG GAG AGC AT-5'

Bu oligonükleotid çözeltilerinin hazırlanışı:

Tüm DNA oligonükleotid stok çözeltileri (100mg/L) TE çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ile hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı. PNA oligonükleotid stok çözeltisi (100mg/L) PBS (50mM fosfat tamponu, pH 7,4) ile hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı. PNA ve DNA oligonükleotidlerinin seyreltik çözeltileri, hibridizasyon aşamalarına bağlı olarak 0,5M asetat tamponu (pH:4,8) veya 20mM TE çözeltisiyle hazırlandı.

2.2.1.2 Metilen mavisi - DNA etkileşimi çalışmasında perde baskılı altın elektrodlar (Au-SCPE) ile kullanılan oligonükleotidler:

25-baz sentetik DNA oligonükleotidleri Sigma firmasından hazırlandı. Bu oligonükleotidlerden prob ve hedef dizi Genetically modified organisms

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
BİLİMSEL VE TEKNİK UZMANLIK MERKEZİ

(GMO) genetik olarak modifiye edilmiş organizmalara ait olup baz dizilimleri aşağıdaki gibidir:

DNA Prob dizisi:

5'- GGC CAT CGT TGA AGA TGC CTC TGC C -3'

DNA hedef dizisi:

5'- GGC AGA GGC ATC TTC AAC GAT GGC C -3'

Tüm bazları hedeften farklı dizi (ApoE proteini dizisi): (Hibridizasyonun kontrolü için kullanıldı).

5'- CAC TGC CAG GCA CCT CTG CAG GT -3'

Bu oligonükleotid çözeltilerinin hazırlanışı:

Tüm oligonükleotit stok çözeltileri Mili Q distile su ile (1000 mg/L) konsantrasyonda hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı.

2.2.1.3 Metilen mavisi - DNA etkileşimi çalışmasında karbon pastası elektrodu (CPE) ile ilk seri deneylerde kullanılan oligonükleotidler :

İlk seri deneylerde kullanılan 15- bazlık aşağıda belirtilen sentetik oligonükleotid dizileri Sigma'dan alındı.

Probe dizisi:

5'- TAC GGG GGA GGC AAG -3'

Hedef (target) dizisi:

5'- CTT GCC TCC CCC GTA -3'

Bu oligonükleotidlerin hazırlanışı:

Bu çözeltilerden prob, 1862ppm($\mu\text{g/ml}$)'lik, hedef çözeltisi ise 1458ppm($\mu\text{g/ml}$)'lik stoklar halinde, TE çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ile hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı.

2.2.1.4 Metilen mavisi - DNA etkileşimi çalışmasında karbon pastası elektrodu (CPE) ile ikinci seri deneylerde kullanılan peptik nükleik asit(PNA) ve DNA yapısındaki oligonükleotidler:

MB ile ikinci seri deneylerde kullanılan 14-baz sentetik DNA ve PNA oligonükleotit dizilerinin hazırlanışı 2.2.1.1'de anlatıldığı gibidir.

2.2.2 Meldola Mavisi- DNA etkileşmesi çalışmalarında kullanılan oligonükleotid dizileri ve hazırlanmaları:

Microcystis spp.'e ait olan 17-baz sentetik oligonükleotitler (liyofilize toz halinde) Synthegen, LLC Mod. Oligo. (Houston, TX, Amerika Birleşik Devletleri) 'dan sağlandı.

Bu oligonükleotitlerin baz dizilimi aşağıdaki gibidir:

Probe (Oligo-2A) dizisi:

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

Hedef (target) (oligo-2B) dizisi:

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

İki bazı hedeften farklı (mismatch)(oligo-2C) dizi:

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

Tüm bazları hedeften farklı (non complementary) dizi:

5'- AAC GTG TGA ATG ACC CAG TAC - 3'

Bu oligonükleotid çözeltilerinin hazırlanışı:

17- baz dizi oligo 2A, 17-baz dizi oligo 2B'nin karşılığıdır. Oligo 2A stok çözeltisi, 1458 µg/mL, Oligo 2B stok çözeltisi, 1855 µg/mL; oligo2C stok çözeltisi, 1885(µg/ml) ve tüm bazları hedeften farklı dizi stokları, TE çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ile hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı. (124,125). Oligonükleotitlerin seyreltik çözeltileri, 0,5 M Asetat tamponu (pH 4,8), ile hazırlandı.

2.2.3 Benzo[a]piren(BaP), fenol ftalein(PPT), mitomycin C(MC) ile DNA etkileşim çalışmalarında kullanılan DNA çözeltilerinin hazırlanışı ve saflık kontrollerinin yapılması:

Buzağı timus bezinden elde edilen DNA (=Calf Thymus DNA); çift sarmal DNA (dsDNA) stok çözeltileri; 1000 µg/mL , TE çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ile hazırlandı ve sıfır derecenin altında saklandı (115, 116). Denatüre edilmiş DNA (tek sarmal DNA = ssDNA) çözeltisi de dsDNA çözeltisi ile aynı koşullarda hazırlandı.

dsDNA ve ssDNA seyreltik çözeltileri deneyden kısa bir süre önce 0,5 M Asetat tamponu (pH 4,8) ile hazırlandı.

Her iki çözeltinin de saflık kontrolü için; 5 ppm konsantrasyonunda dsDNA seyreltik çözeltisinin UV'de 260 nm ve 280 nm'de okunan absorbans A_{260} ve A_{280} değerleri oranlandı ve bu değerler 1,6 ile 1,8 arasında olduğu saptandı. 50 ppm DNA, 0,5 cm genişliğe sahip kuartz küvetlerde 0.5 A absorbans göstermektedir. 100 ppm DNA, 1 cm genişliğe sahip kuartz küvetlerde 1 A absorbans göstermektedir (70).

2.2.4. Tampon çözeltilerin hazırlanışı:

Tüm tampon çözeltilerin hazırlanışında distile su kullanılmıştır. Tampon çözeltiler hazırlandıktan sonra plastik şişelerde, buzdolabında saklanmıştır. İyonik kuvveti sağlamak için Tris-EDTA tamponu hariç tüm tampon çözeltilerinin litresine derişimi 0,02 M olacak şekilde 1,168 g NaCl eklenmiştir.

2.2.4.1. 0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 7,4):

Ölçümler sırasında 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. Hazırlanan tampon

çözültüsünün pH değeri yaklaşık 7,4 olmaktadır. pH kontrolü, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle pHmetre ile gerçekleştirilir.

2.2.4.2. 0,50 M asetat tampon çözültüsünün hazırlanışı (pH 4,8):

Kullanılan 0,50 M asetat tampon çözültüsü litresinde 0,2722 g sodyum asetat trihidrat ve 0,1154 mL asetik asit içermektedir. Çözültünün pH'sının 4,8 değerine ulaşması için gerekli kontrol, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle pHmetre ile gerçekleştirilir.

2.2.4.3 0,02 M Tris HCl tampon çözültüsünün hazırlanışı (pH 7,0):

Kullanılan 0,02 M Tris HCl tampon çözültüsü litresinde 3,152 g Trizma HCl içermektedir. Çözültünün pH'sının 4,8 değerine ulaşması için gerekli kontrol, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle pHmetre ile gerçekleştirilir.

2.2.4.4. 0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözültüsünün hazırlanışı (pH 8,0):

Kullanılan 0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA tampon çözültüsü litresinde 1,576 g Trizma HCl ve 0,372g EDTA içermektedir. Çözültünün pH'sının 8,0 değerine ulaşması için gerekli kontrol, 0,1 N NaOH ve / veya 0,1 N HCl ilavesiyle pHmetre ile gerçekleştirilir.

2.2.5 Altın elektrotlarla yapılan deneylerde DNA'nın yüzeye tutturulması amacıyla kullanılan çözültülerin hazırlanışı:

2.2.5.1 3-Merkapto propiyonik asit (MPA) çözültüsünün hazırlanışı: (39)

Normal altın elektrotlar için (75:25) Etanol-su karışımı içerisinde 0,02M olacak şekilde hazırlandı.

Perde baskılı elektrotlar için ise distile su içerisinde 0,02M'lık MPA hazırlandı.

MPA moleküler ağırlığı: 106,1 g/mol ve d=9,89 g/L

2.2.5.2 Kovalent bağlanmayı sağlayan çözeltinin hazırlanışı: (39)

Bu çözelti karışımı için 5mM N-hidroksi süksinimid (NHS) ve 2mM'lık Etil karbodiimid (EDC) maddeleri 50mM'lık fosfat tamponunda(pH:7,4) içerisinde hazırlandı.

EDC= 191,71 g/mol NHS= 115,1 g/mol

2.2.6 DNA ile etkileşimi incelenen tüm maddelerin hazırlanışı:**2.2.6.1 Benzo[a]piren (BaP) çözeltisinin hazırlanışı:**

Stok çözelti tetrahidrofurana(THF) çözücüsü içerisinde 1mM konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. Seyreltik çözelti ise asetat tamponu (pH:4,8) içerisinde 20µM'lık konsantrasyonda hazırlandı.

2.2.6.2 Metilen mavisi (MB) çözeltisinin hazırlanışı:

1mM'lık stok, distile su ile hazırlandı. Seyreltik stok ise tris-HCl tamponu(pH:7,0) içerisinde 20µM olacak şekilde hazırlandı.

2.2.6.3 Meldola mavisi (MDB) çözeltisinin hazırlanışı:

1mM'lık stok, distile su ile hazırlandı. Seyreltik stok ise tris-HCl tamponu(pH:7,0) içerisinde 20µM olacak şekilde hazırlandı.

2.2.6.4 Fenol ftalein (PPT) çözeltisinin hazırlanışı:

1mM'lık stok, alkol su ile hazırlandı. Seyreltik stok ise asetat tamponu (pH:4,8) içerisinde 20µM'lık konsantrasyonda hazırlandı.

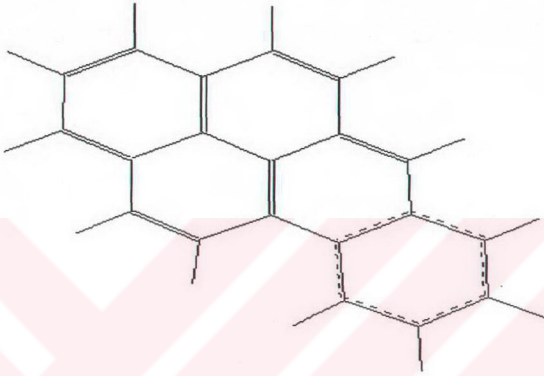
2.2.6.5 Mitomisin C (MC) çözeltisinin hazırlanışı:

1000ppm'lik 50µL'lik ana stok mili Q su ile hazırlandı. Seyreltik stok ise 1ppm konsantrasyonda ve tris-HCl tamponu(pH:7,0) içerisinde hazırlandı.

2.3. DNA ile etkileşimi incelenen ve hibridizasyon indikatörü olarak kullanılabilen maddeler hakkında genel bilgiler :

2.3.1 Benzo[a]piren

Açık Kimyasal Formül:



Kapalı Kimyasal Formül: $C_{20}H_{12}$

Kimyasal Adlandırma: 3,4-Benzopyrene

Diğer isimlendirmeleri: B[A]P; 6,7-Benzopyrene; Benzo[a]pyrene; 3,4-Benzopyrene

Kimyasal Özellikleri: Sarı renkte kristallerden oluşmuştur. Çözeltisi ışıktan korunmalıdır. Benzen, toluen, ksilen ve tetrahidro furan (THF) gibi organik çözücülerde çözünür. Molekül ağırlığı, 252,3 g / mol'dur.

Farmakolojik özellikleri: Polisiklik aromatik hidrokarbonların bir üyesi olan BaP, önemli bir çevresel kirlilik ajanı ve potansiyel insan karsinojenidir. BaP, metabolizması esnasında çeşitli ürünlere dönüşmektedir. Bazı ürünler, çok reaktif mutajenik diol epoksit türevleridir. BaP'in en önemli ve karsinojenik yan ürünü, anti - 7, 8, 9, 10 - tetrahidrobenzo[a]piren - 7, 8 - diol 9, 10 - epoksit (BPDE)'dir. Bu kovalent trans yan

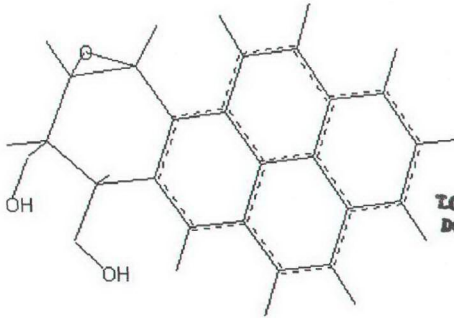
ürün, guaninin N7 konumundaki azot ile tepkime sonucu oluşmaktadır (2,23). Aşağıda BaP molekülünün guanin bazıyla oluşturduğu adduct'ın (yan ürün) kimyasal formülü gösterilmektedir (2,99).

BaP yan ürünlerinin doğrudan miktar tayini, kanser araştırmalarında önemli yer tutmaktadır. Özellikle, akciğer kanseri, Amerika Birleşik Devletleri'nde kanserden kaynaklanan ölümlerin en önemli sebeplerinden biridir ve tüm dünyada en sık karşılaşılan tümör oluşumlarından biridir. Akciğer kanseri için en önemli risk faktörü, sigara içilmesidir (23). Sigara dumanı içerisindeki binlerce zararlı maddeden biri olan BaP, sigara başına 20 - 40 ng miktarında bulunmaktadır ve bilinen en güçlü karsinojen maddelerden biridir.

İnsan akciğer kanseri teşhislerinin yaklaşık %60'ında, p53 tümör baskılayıcı geninde mutasyonlara rastlanmaktadır (23). BaP'nin de dahil olduğu polisiklik aromatik hidrokarbonların görev aldığı mutasyonlar, akciğer kanserine yol açan mutasyonların oluşumuna (mutajenezis) yol açmaktadır (99).

Bu çalışmada tayini yapılan yan ürünün BPDE:

Açık Kimyasal Formül:

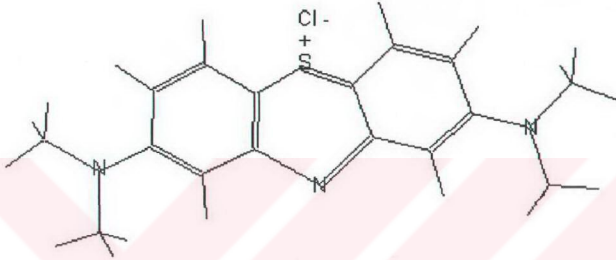


**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Kimyasal Adlandırma: anti-7,8,9,10 tetrahydrobenzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-epoxide(BPDE).

2.3.2 Metilen Mavisı:

Açık kimyasal formülü :



Kapalı kimyasal formül: C₁₆H₁₈ClN₃S. 3H₂O

Kimyasal adlandırma: 3,7- Bis(dimetilamino) - 5 -fenotiyazinyum klorür

Diğer isimleri: Basic Blue, Swiss blue

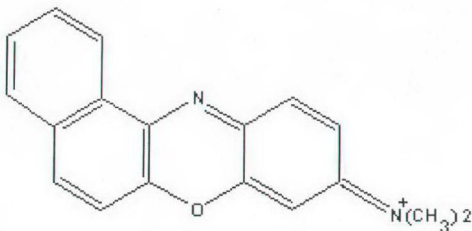
Kimyasal özellikleri: Koyu yeşil kristallerden oluşmuştur. 1 g'ı yaklaşık 25 mL suda çözünür. Molekül ağırlığı, 319,85 g / mol'dur.

MB, fenotiyazin sınıfına ait düzlemsel bir aromatik halka içeren katyonik yüklü bir moleküldür. ssDNA'da guanin bazlarına özgül bağlanma yapabilmektedir ve dsDNA'ya interkalasyon yapabilmektedir (29,31,51,109). Bakteriyolojide boyar madde olarak kullanılmaktadır. Yükseltgenme - indirgenme indikatörü olarak analizlerde kullanılmaktadır.

Farmakolojik özellikleri: Antimethemoglobinemi tedavisinde ve siyanüre karşı antidot olarak kullanılmaktadır.

2.3.3. MeIdola Mavisi (MDB) hakkında genel bilgi :

Açık kimyasal formül :



Kapalı kimyasal formül: $C_{18}H_{15}N_2OCl$

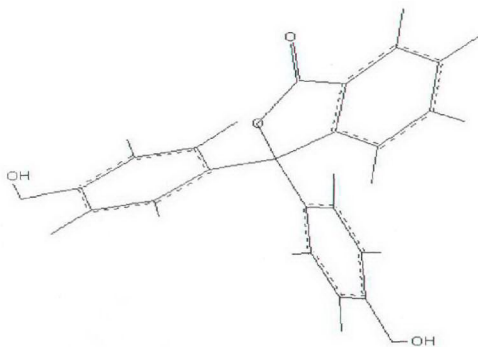
Kimyasal adlandırma: 8 – dimetilamino – 2,3 - benzofenoksazin.

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

Molekül ağırlığı, 378,9 g / mol'dur. MDB, fenoksazin sınıfına ait düzlemsel bir aromatik halka içeren katyonik yüklü bir moleküldür. Enzimlere dayalı elektrokimyasal biyosensörlerde yükseltgenme - indirgenme belirteci olarak kullanılmaktadır (56).

2.3.4. Fenolftalein (PPT) hakkında genel bilgi :

Açık kimyasal formül:



Kapalı kimyasal formül: $C_{20}H_{14}O_4$

Kimyasal adlandırma: 3,3 – Bis(4 –hidroksifenil) – 1 – (3H) – izobenzofuranon

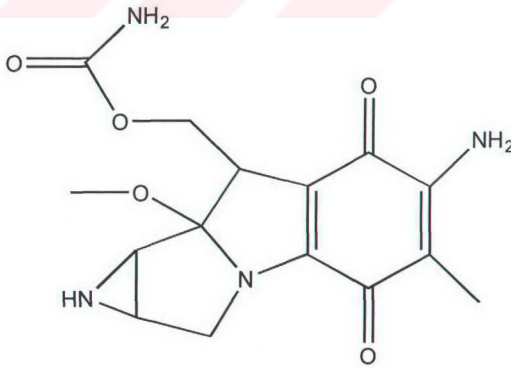
Diğer isimleri: Kokolaks, Darmol, Laksin.

Kimyasal özellikleri: Beyaz veya sarımtırak beyaz renkte kristallerden oluşmuştur. Hemen hemen suda çözünmez. 1 g'ı 12 mL alkolde veya yaklaşık 100 mL eterde çözünür. Molekül ağırlığı, 318,3 g / mol'dur.

Alkol ile hazırlanmış %1'lik çözeltisi mineral ve organik asitlerin ve birçok bazın titrasyonlarında belirteç olarak kullanılmaktadır. pH 8,5 civarında renksiz iken, pH 9 ve ötesinde pembe renkten koyu kırmızı renge dönüşmektedir. Terapötik olarak katartik etkisinden faydalanılmaktadır. FDA'nın 2000 yılında bildirdiği insan karsinojenleri listesine girmiştir (107).

2.3.5 Mitomycin C (MC) hakkında genel bilgi :

Açık kimyasal formül:



Kapalı kimyasal formül: C₁₅H₁₈N₄O₅

Kimyasal adlandırma: [1aS-(1aα,8β,8aα,8bα)]-6-amino-8-[[amino karbonil) oksil metil]-1,1a,2,8,8a,8b,-hekza-hidro-8a-metoksi-5-metilazirinol[2',3':3,4]pirolo[1,2-a]-indol-4,7-dion,Ametisin

Kimyasal Özellikleri: Su, metanol, aseton, bütül asetat, sikloheksanon içinde güç, benzen, karbondioksit ve eterde ise kolay çözünür. Molekül ağırlığı, 334 g/mol'dür.

Farmakolojik özellikleri: Mitomycin C, klinikte solid tümörlere karşı kullanılan antikanser etkili bir antibiyotiktir. Bu ilaç molekülü sitotoksik karakter taşır ve ayrıca çeşitli etkenlerle (deriden penetrasyon (temas etmesi) ya da solunum yolları vb.) bu moleküle maruziyet sonucu normal insan hücreleri de hasar görmektedir. İlaç, DNA molekülündeki guanin bazlarına mono ve bifonksiyonel şekilde alkilasyon yaparak etki gösterir ve çok toksik bir maddedir. Letal doz (İ.V.) 5 - 9 mg / kg Farelerdeki gecikmeli toksisitesi enjeksiyondan 2 gün ila 2 hafta sonra görülmektedir (64,90,91,102,105,113).

2.4. Kullanılan yöntem

CPE'nun aktivasyonu, yüzeyine dsDNA, ssDNA ya da sentetik oligonükleotidlerden oluşan prob dizilerinin modifiye edilmesi, CPE yüzeyine tutturulmuş prob ile hedefin bu yüzeyde hibrit oluşturması ve yüzeye modifiye edilmiş DNA'nın veya oligonükleotidin madde ile etkileşmesine ilişkin yapılan deneylerin tamamında J. Wang ve arkadaşlarının çalışmalarında (121, 125) rapor edilen yol izlenmiştir.

2.4.1 Benzo[a]piren(BaP)-DNA etkileşmesine dayalı biyosensör tasarımında kullanılan yöntemler:

2.4.1.1 Camsı karbon elektrod ile yapılan BaP derişiminin artışına bağılı olarak dsDNA sinyalinde meydana gelen değişimin incelenmesi çalışmada kullanılan yöntem:

Diferansiyel puls voltametri tekniğinde kullanılmak üzere 10ppm dsDNA ve çeşitli konsantrasyonlarda (0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 μM 'lık) BaP karışımları 0,5M'lık asetat tamponu (pH:4,8) içerisinde hazırlandı. 1mM'lık BaP stok çözeltisi tetrahidrofuran (THF) içerisinde hazırlandı. Bu çözeltinin seyreltmeleri ise 0,5M'lık asetat tamponu (pH:4,8) ile yapıldı.

GCE'un temizlenmesi: 0.3 μ partikül büyüklüğüne sahip alümina tozu ile özel bir bez üzerinde 2 dk süreyle dairesel hareketler çizilerek yüzey temizledi. Ultrasonik banyo içerisinde de 2 dakika süreyle tutularak temizliğin ikinci aşaması gerçekleştirildi. Her seri deneye başlanırken işlem tekrarlandı.

GCE Aktivasyonu: +0,5 V potansiyel uygulanarak 1 dakika fosfat tamponu (pH: 7,4) içerisinde bekletildi.

dsDNA ve BaP içeren karışım ile etkileşim: her seferinde yeniden hazırlanan 10ppm dsDNA çözeltisi içerisine sırasıyla 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 μM 'lık konsantrasyonlarda hazırlanan seyreltik BaP çözeltileri enjekte edildi. +0.5V potansiyel uygulanarak ve karışan ortamda 5dk. süreyle etkilştirildi. Yıkama işlemi asetat tamponu (pH:4,8) kullanılarak 5 sn süreyle yapıldı.

Ölçüm: Asetat tamponu içerisinde elektroda diferansiyel puls tekniğine göre +0,7V dan +1,3V'a kadar değişen gerilimler uygulandı. DNA'daki Guanin bazının maddesinin sinyalindeki değişim incelendi.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON BİRİMİ

Önemli not:

Madde karışımı ile etkileşme aşamasına geçilmeden önce ilk olarak sadece dsDNA'daki guanin sinyali gözlemlendi. Ayrıca karışım yapılmaksızın sadece 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 μM ' lık konsantrasyonlarda hazırlanan seyreltik BaP çözeltilerinin de yalnız başlarına verdikleri sinyaller incelendi. Bu değerler ışığında serbest haldeki BaP ve dsDNA ile etkileşmiş haldeki (bağlı haldeki) BaP yanıtlarına göre partiyon (dağılım) katsayısı hesaplandı.

Çalışmada Millan and Mikkelsen'in uyguladığı formül kullanıldı (70).

$$\frac{\text{Bağlı haldeki madde}}{\text{Serbest haldeki madde}} = \frac{\text{Bağlı haldeki maddenin akım değeri-serbest haldeki madde akım değeri}}{\text{serbest haldeki maddenin ölçülen akım değeri}}$$

2.4.1.2 Karbon pastası elektrodu (CPE) ile yapılan dsDNA-BaP etkileşmesi

ve yan ürün oluşumunun incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:

CPE Aktivasyonu: CPE , 0.05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7,4) +1,7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

dsDNA veya dsDNA içeren BPDE'nin CPE yüzeyine tutturulması: Aktive edilmiş CPE, 10 ppm dsDNA içeren bu çözeltiler içinde, +0,5 V 'da, 5 dakika ve karışan ortamda bekletilmesiyle elektrod yüzeyine tutturuldu. Sonra CPE, 5 saniye süreyle asetat tamponu ile yıkandı.

Ölçüm: Elektroda diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak +0,75V ile +1,40V arasında değişen gerilimler uygulandı. 20mM NaCl içeren 0,50M'lık asetat tamponunda (pH:4,8) karıştırma işlemi uygulanmadan ölçüm yapıldı.

2.4.1.3 Karbon pastası elektrodu (CPE) ile BaP konsantrasyonu artışına bağlı olarak elde edilen yan ürünün incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:

BPDE yan ürünü oluşurken artan konsantrasyonlarda BaP kullanıldığında guanin sinyalinde ve BPDE yan ürününün sinyalinde meydana gelen değişimler incelendi.

CPE Aktivasyonu: CPE , 0.05 M fosfat tamponu çözeltisinde (pH 7,4) +1,7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.

0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 μ M' konsantrasyonlarda BaP içeren BPDE'nin CPE yüzeyine tutturulması: Aktive edilmiş CPE, 10 ppm dsDNA içeren bu çözeltiler içinde, +0,5 V 'da, 5 dakika ve karışan ortamda bekletilerek elektrod yüzeyine tutturuldu. Sonra CPE, 5 saniye süreyle asetat tamponu ile yıkandı.

Ölçüm: Elektroda diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak +0,75V ile +1,40V arasında değişen gerilimler uygulandı. 20mM NaCl içeren 0,50M'lık asetat tamponunda (pH:4,8) karıştırma işlemi uygulanmadan ölçüm yapıldı.

2.4.2 Metilen mavisi çalışmaları kullanılan yöntemler:

2.4.2.1 CPE ile yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemler:

2.4.2.1.1 ssDNA ve dsDNA'nın MB ile olan etkileşimleri çalışmaları kullanılan yöntem:

29 ve 31 nolu referans çalışmalarında kullanılan yöntem uygulandı. Burada amaç, daha önce gözlenen metilen mavisi sinyalinin ssDNA ve dsDNA ile olan etkileşimden sonra daha önceki deney sonuçlarıyla uyum gösterip göstermediğinin tespit etme.

- *CPE ' nun aktivasyonu:* CPE, 0.05M fosfat tamponu çözeltisinde (pH:7,4) +1,7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.
- *DNA immobilizasyonu:* Asetat tamponu içerisinde (pH:4,8) hazırlanan 10ppm'lik ssDNA veya dsDNA çözeltisi aktive edilmiş elektrod yüzeyine +0,5V gerilim uygulanarak 5 dk. süreyle karışan ortamda tutturuldu.
- *MB ile etkileşim:* Potansiyel uygulanmaksızın 5dk. süreyle karışan ortamda 20µM'lık ve tris-HCl içerisinde hazırlanmış MB çözeltisi içerisinde bekletildi.
- *Ölçüm:* Asetat tamponu içerisinde -0,5V ile +1,4V arasında potansiyel uygulanarak kare dalga voltametri tekniği ile 50mV puls genliğinde ölçüm yapıldı.-0,2V civarındaki MB pikinin sinyalindeki değişim incelendi.

Önemli not: Bu çalışmada ilk olarak yüzeyine DNA tuturulmamış elektrod ile sadece MB sinyali de kontrol edildi.

2.4.2.1.2 ssDNA konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:

- *CPE ' nun aktivasyonu:* CPE, 0,05M fosfat tamponu çözeltisinde (pH:7,4) +1,7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.
- *ssDNA immobilizasyonu:* Asetat tamponu içerisinde (pH:4,8) hazırlanan 1, 3, 5, 10, 20ppm'lik ssDNA çözeltileri aktive edilmiş elektrod yüzeyine +0.5V gerilim uygulanarak 5 dk. süreyle karışan ortamda tutturuldu. Yıkama işlemi boş asetat tamponu (pH:4,8) ile yapıldı.
- *MB ile etkileşim:* Potansiyel uygulanmaksızın 5dk. süreyle karışan ortamda 20µM'lık ve tris-HCl içerisinde hazırlanmış MB çözeltisi içerisinde bekletildi.
- *Ölçüm:* Asetat tamponu içerisinde +0,1V'dan -0.5V arasında potansiyel uygulanarak dönüşümlü voltametri tekniğine göre ölçüm yapıldı.-0,2V civarındaki MB pikinin sinyalindeki değişim incelendi.

2.4.2.1.3 15-bazlık prob dizi konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:

- *CPE ' nun aktivasyonu:* CPE, 0.05M fosfat tamponu çözeltisinde (pH:7.4) +1.7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.
- *Oligonükleotid immobilizasyonu:* Asetat tamponu içerisinde (pH:4,8) hazırlanan 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 1, 5, 10, 15, 20ppm'lik oligonükleotid çözeltileri aktive edilmiş elektrod yüzeyine +0.5V gerilim uygulanarak 5 dk. süreyle karışan ortamda tutturuldu. Yıkama işlemi boş asetat tamponu (pH:4.8) ile yapıldı.
- *MB ile etkileşim:* Potansiyel uygulanmaksızın 5dk. süreyle karışan ortamda 20µM'lık ve tris-HCl (pH:7,0) içerisinde hazırlanmış MB çözeltisi içerisinde bekletildi.
- *Ölçüm:* Asetat tamponu içerisinde +0,1V'dan -0,5V arasında potansiyel uygulanarak siklik voltametri tekniğine göre ölçüm yapıldı. -0,2V civarındaki MB pikinin sinyalindeki değişim incelendi.

2.4.2.1.4 15-bazlık oligonükleotid hedef dizi konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:

- *CPE ' nun aktivasyonu:* CPE, 0,05M fosfat tamponu çözeltisinde (pH:7,4) +1,7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.
- *Oligonükleotid prob immobilizasyonu:* Asetat tamponu içerisinde (pH:4.8) hazırlanan 10ppm'lik prob içeren çözelti aktive edilmiş elektrod yüzeyi ile +0.5V gerilim uygulanarak 5 dk. süreyle karışan ortamda etkileştirildi. Yıkama işlemi boş asetat tamponu (pH:4,8) ile yapıldı.
- *Hedef dizi ile hibridizasyon:* Çeşitli konsantrasyonlarda (5, 10, 15 ve 20ppm) tris -HCl tamponu (pH:7,0) içerisinde hazırlanmış hedef çözeltileri ile +0,5V'luk

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

gerilim altında karışan ortamda hibridizasyon yapıldı. Yıkama işlemi de yine aynı tampon ile yapıldı.

- *MB ile etkileşim:* Potansiyel uygulanmaksızın 5dk. süreyle karışan ortamda 20 μ M'lık ve tris-HCl (pH:7,0) içerisinde hazırlanmış MB çözeltisi içerisinde bekletildi.
- *Ölçüm:* Asetat tamponu içerisinde +0,1V'dan -0,5V arasında potansiyel uygulanarak dönüşümlü voltametri tekniğine göre ölçüm yapıldı.-0,2V civarındaki MB pikinin sinyalindeki değişim incelendi.

2.4.2.1.5 Peptik nükleik asit(PNA) yapısındaki oligonükleotidler ve normal DNA yapısındaki oligonükleotidlerin kıyaslanması çalışmasında kullanılan yöntem:

- *CPE ' nun aktivasyonu:* CPE, 0,05M fosfat tamponu çözeltisinde (pH:7,4) +1,7 V uygulanarak 1 dakika süre ile karıştırılmayan sistemde aktive edildi.
- *PNA veya DNA prob immobilizasyonu:* Asetat tamponu içerisinde (pH:4,8) hazırlanan 10ppm'lik oligonükleotid çözeltileri aktive edilmiş elektrod yüzeyine +0,5V gerilim uygulanarak 5 dk. süreyle karışan ortamda tutturuldu. Yıkama işlemi boş asetat tamponu (pH:4,8) ile yapıldı.
- *DNA hedef dizisi veya tek bazı hedeften farklı dizi ile hibridizasyon:* 20mM'lık ve tris-HCl tamponu (pH:7,0) içerisinde hazırlanmış 15ppmlik diziler +0,5V uygulanarak karışan ortamda yüzeyinde prob dizisi içeren diziyile etkileştirildi. Yıkama işlemi boş 20mM'lık tris-HCl tamponu (pH:7,4) ile yapıldı.
- *MB ile etkileşim:* Potansiyel uygulanmaksızın 5dk. süreyle karışan ortamda 20mM'lık ve tris-HCl (pH:7,0) içerisinde hazırlanmış MB çözeltisi içerisinde bekletildi. Yıkama işlemi boş 20mM'lık tris-HCl tamponu (pH:7,4) ile yapıldı.

- *Ölçüm:* 20µM'lık ve tris-HCl (pH:7,0) içerisinde +0,1V ile -0,50V arasında potansiyel uygulanarak diferansiyel puls voltametri tekniğine göre ölçüm yapıldı.-0.2V civarındaki MB pikinin sinyalindeki değişim incelendi.

2.4.2.2 Altın elektrod(AuE) ve MB etkileşim çalışmaları:

2.4.2.2.1. Hibridizasyon çalışmalarında kullanılan yöntem:

Altın elektrod yüzeyinin temizlenmesi:

Fiziksel temizlik aşaması: 0,05 µm partikül büyüklüğüne sahip Alümina tozu birkaç damla distile su ile karıştırılarak altın elektrod yüzeyi 2 dakika süreyle bu karışımı içeren bez üzerinde dairesel şekilde hareket ettirilir.

Elektrokimyasal temizlik aşaması: Elektroda 0,05M H₂SO₄ çözeltisi içerisinde -0,3V ile +1,5V arasında tarama hızı 100mV/s olacak şekilde 30 dakika süreyle dönüşümlü voltametri tekniği uygulandı.

Yüzey kaplanması: Altın elektrod ile yapılan çalışmalar için özel bir yüzey kaplama yöntemi kullanıldı (39).

Bu tekniğe göre,

Kükürtlü grupların bağlanması:

Elektrodlar ; 0.02M'lık 75/25 (v/v) oranında etanol-su karışımında hazırlanmış olan 3-merkaptopropiyonik asit çözeltisi içerisinde yaklaşık 15 saat bekletildi. Bu sayede elektrod yüzeyine altın elementine afinitesi yüksek olan kükürt grupları bağlanmış oldu. Yıkama işlemi 15 saat sonunda 75/25 (v/v) oranında etanol-su içeren çözelti ile yapıldı.

Kovalent bağlanma solüsyonu ile etkileşim:

Elektrodlar 2mM Etil karbodiimid ve 5mM N-hidroksi süksünimit içeren 50mM'lık fosfat tamponu(pH:7,4) içerisinde 1 saat süreyle tutuldu. Yıkama işlemi 50mM'lık

fosfat tamponu ile yapıldı. Bu sayede yüzeye DNA'yı kovalent olarak güçlü şekilde tutturmak için gerekli işlemler tamamlanmış oldu.

DNA ya da PNA dizilerinin(problarının) immobilizasyonu:

Elektrod ters çevrildi ve altın kısmın yüzeyine yaklaşık 12µl asetat tamponu(pH:4,8) içerisinde hazırlanan prob çözeltisi damlatıldı ve bu çözelti kuruyana dek açık havada bekletildi.

Hibridizasyon:

Prob tutturulan yüzeye yine 12µl tris-HCl tamponu içerisinde hazırlanmış ve hibridizasyon şartlarını sağlayacak pH'da(pH:7,0) hedef / hedeften tamamen farklı oligonükleotid içeren çözelti / tek bazı hedeften farklı diziyi içeren çözeltiler konuldu. Yine aynı şekilde açık havada tam kuruma gerçekleşinceye dek bekletildi.

MB ile etkileşim:

Elektrodlar 20µM tris-HCl içerisinde hazırlanmış(pH:7,0) MB çözeltisi içerisinde voltaj uygulanmadan 5 dakika süreyle karışan ortamda bekletildi. Yıkama işlemi tris-HCl tamponu ile yapıldı.

Ölçüm:

Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak 10mV'luk amplitüd ve 20mV'luk tarama hızı ile metilen mavisi içermeyen(kör) tris-HCl tamponu içerisinde 0,2V ile – 0,6V potansiyel aralığında ölçüm alındı ve –0,2V'daki MB sinyalindeki değişim izlendi.

2.4.2.2.2. DNA probu ile yapılan hibridizasyon çalışmaları için en uygun hedef konsantrasyonunun bulunması çalışmasında kullanılan yöntem:

DNA problelerinin immobilizasyonu:

Elektrot ters çevrildi ve altın kısmın yüzeyine yaklaşık 12µl asetat tamponu(pH:4,8) içerisinde hazırlanan prob çözeltisi damlatıldı ve bu çözelti kuruyana dek açık havada bekletildi.

Hibridizasyon:

Prob tutturulan yüzeye yine 12µl tris-HCl tamponu içerisinde hazırlanmış ve hibridizasyon şartlarını sağlayacak pH'da(pH:7,0) çeşitli konsantrasyonlarda (50ppm, 100ppm, 150ppm, 200ppm) hedef dizileri içeren çözeltiler konuldu. Yine aynı şekilde açık havada tam kuruma gerçekleşinceye dek bekletildi.

MB ile etkileşim:

Elektrodlar 20µM tris-HCl içerisinde hazırlanmış(pH:7,0) MB çözeltisi içerisinde voltaj uygulanmadan 5 dakika süreyle karışan ortamda bekletildi. Yıkama işlemi tris-HCl tamponu ile yapıldı.

Ölçüm:

Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak 10mV'luk amplitüd ve 20mV'luk tarama hızı ile metilen mavisi içermeyen(kör) tris-HCl tamponu içerisinde 0,2V ile – 0,6V potansiyel aralığında ölçüm alındı ve –0,2V'daki MB sinyalindeki değişim izlendi.

2.4.2.2.3. PNA probu ile DNA probu kullanılarak karşılaştırmalı olarak yapılan hibridizasyon tayini çalışmalarında kullanılan yöntem:

Hem PNA probu hem de DNA probu için daha önce 2.4.2.2.1 bölümünde çalışılan yöntem kullanıldı. PNA probu ile ilk olarak 100ppm'lik konsantrasyon denendi. Ayrıca bu konsantrasyondan sonra bir de her iki molekül için yine yöntem

2.4.2.2.1'de anlatıldığı şekilde 10ppm'lik konsantrasyonda hedef/hedeften tüm bazları farklı dizi/hedeften tek bazı farklı dizilerle hibridizasyon çalışmaları yapıldı.

2.4.2.3 Tek kullanımlık perde baskılı altın elektrodlarla (Au-SCPE) yapılan hibridizasyon tayini çalışmalarında kullanılan yöntem:

Temel olarak yine altın elektrod ile yapılan çalışmalar için genel bir yöntem olan (39) nolu referansta belirtilen yüzey kaplama metodu kullanıldı.

Yüzey kaplanması:

SH gruplarının modifiye edilmesi:

3mm çapındaki altın elektrot yüzeylerine 8µl 0.02M'lık 75/25 (v/v) oranında etanol-su karışımında hazırlanmış olan 3-merkaptopropiyonik asit çözeltisi Yaklaşık 15 saat petri kabı içerisinde kurumaya izin verilmeden bekletildi. Bu sayede elektrod yüzeyine altın elementine afinitesi yüksek olan kükürt grupları bağlanmış oldu. Yıkama işlemi 15 saat sonunda 75/25 (v/v) oranında etanol-su içeren çözeltiliye 2 kez daldırmak suretiyle yapıldı.

Kovalent bağlanma solüsyonu ile etkileşim:

Elektrodlar üzerine 8µl 2mM Etil karbodiimid ve 5mM N-hidroksi süksünümid içeren 50mM'lık fosfat tamponu(pH:7,4) koyularak yine petri kabı içerisinde kurumalarına izin verilmeden 1 saat süreyle tutuldu. Yıkama işlemi 50mM'lık fosfat tamponu ile yapıldı. Bu sayede yüzeye DNA kovalent olarak bağlanmaya hazır hale getirilmiş oldu.

Genetik olarak modifiye edilmiş organizmalara ait (GMO) DNA problemlerinin immobilizasyonu:

Elektrodların altın yüzeyine yaklaşık 8µl asetat tamponu(pH:4.8) içerisinde hazırlanan değişik konsantrasyonlardaki prob çözeltisi damlatıldı ve bu çözelti kuruyana dek açık havada bekletildi. Değişik konsantrasyonlarda prob kullanımının

nedeni, ilk kez tek kullanımlık elektrodulara uygulaması gerçekleştirilen bu metod için optimum prob konsantrasyonunu belirlemektir.

Hibridizasyon:

Prob tutturulan yüzeye yine 8µl tris-HCl tamponu içerisinde hazırlanmış ve hibridizasyon şartlarını sağlayacak pH'da(pH:7,0) değişik konsantrasyonlardaki hedef /hedeften tamamen farklı çözelti konuldu. Yine aynı şekilde açık havada tam kuruma gerçekleşinceye dek bekletildi.

MB ile etkileşim:

Elektrodlar 20µM tris-HCl içerisinde hazırlanmış(pH:7,0) MB çözeltisi içerisine daldırılarak voltaj uygulanmadan 5 dakika süreyle karışan ortamda bekletildi. Yıkama işlemi tris-HCl tamponu ile yapıldı.

Ölçüm:

Diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak 10mV'luk amplitüd ve 20mV'luk tarama hızı ile metilen mavisi içermeyen(kör) tris-HCl tamponu içerisinde 0.2V ile – 0.6V potansiyel aralığında ölçüm alındı ve ~ -0,2V'daki MB sinyalindeki değişim izlendi.

2.4.3 Meldola mavisi(MDB) ile yapılan çalışmalar

Meldola mavisi ile yapılan çalışmaların tamamında karbon pastası elektrodu(CPE) kullanıldı.

2.4.3.1 Sentetik oligonükleotidlerle yapılan hibridizasyon tayini çalışmasında kullanılan yöntem:

CPE aktivasyonu:

CPE yüzeyine 1,7V potansiyel(gerilim) uygulanarak 1 dakika süreyle fosfat tamponu içerisinde tutuldu.(pH: 7,4) Böylece yüzeydeki kimyasal kirlilikler yükseltgenerek elimine edilmiş oldu.

Prob oligonükleotid immobilizasyonu:

+0,5V gerilim uygulanan ve karıştırılan ortamda 5dk. süreyle asetat tamponunda(pH:4,8) hazırlanan kısa oligonükleotid dizisine sahip prob, elektrostatik şekilde elektrod yüzeyine tutturuldu. Bu aşama sonrasında boş asetat tamponuyla(pH: 4,8) 5 sn. yıkama işlemi yapıldı.

Hedef / iki bazı hedeften farklı dizi / tüm bazıları hedeften farklı dizi ile hibridizasyon:

Yüzeyine prob tuturulan elektrodlar bu kez hedef / iki bazı hedeften farklı dizi / tüm bazıları hedeften farklı dizi içeren çözeltilere daldırıldı.+0,5V'da 5 dk. süreyle tris-HCl tamponu (pH:7,0) içerisinde hazırlanan bu çözeltiler içerisinde karışan ortamda hibridizasyon gerçekleştirildi. Yüzeye tam olarak tutunmayan dizilerin uzaklaştırılması amacıyla boş tris HCl tamponu(pH:7,0) ile 5 sn. yıkama yapıldı.

MDB ile etkileşim:

20µM konsantrasyonda ve tris-HCl tamponu içerisinde hazırlanan (pH: 7,0) MDB içerisinde voltaj uygulanmadan ve karıştırılan ortamda etkileşim gerçekleştirildi. Yıkama işlemi ise bu biriktirme aşamasının ardından boş tris-HCl tamponu (pH: 7,0) ile yapıldı.

Ölçüm:

Diferansiyel puls voltametri tekniği uygulanarak +0,1 den -0,5 V' a kadar boş tris-HCl tamponu (pH: 7,0) içerisinde ölçüm yapıldı.

2.4.3.2 Sentetik oligonükleotidler kullanılarak hibridizasyon tayini için en

iyi hedef konsantrasyonun bulunması çalışmasında kullanılan yöntem:

CPE aktivasyonu:

Hibridizasyon, mismatch ve non-complementary çalışmalarında da uygulanan şekilde CPE aktivasyonu yapıldı. Elektrod, yüzeyine 1,7V potansiyel(gerilim) uygulanarak 1 dakika süreyle fosfat tamponu içerisinde tutuldu.(pH: 7,4)

Prob oligonükleotid immobilizasyonu:

+0.5V gerilim uygulanan ve karıştırılan ortamda 5dk. süreyle asetat tamponunda(pH:4,8) hazırlanan kısa oligonükleotid dizisine sahip prob, elektrostatik şekilde elektrod yüzeyine tutturuldu. Bu aşama sonrasında boş asetat tamponuyla(pH: 4,8) 5 sn. yıkama işlemi yapıldı.

Değişik konsantrasyonlardaki hedef çözelti ile hibridizasyon:

Yüzeyine prob tuturulan elektrodlar bu kez karşılığı olan diziyi (hedefi) içeren ve 5ppm, 10ppm, 15ppm, 20ppm, 30ppm konsantrasyonlarında hazırlanmış çözeltilerle etkileştirildi. +0,5V'da 5 dk. süreyle tris-HCl tamponu (pH:7,0) içerisinde hazırlanan bu çözeltilerle karışan ortamda hibridizasyon gerçekleştirildi. Boş tris-HCl tamponu(pH:7,0) ile 5 sn. yıkama yapıldı.

MDB ile etkileşim:

20µM konsantrasyonda ve tris-HCl tamponu içerisinde hazırlanan (pH: 7,0) MDB içerisinde voltaj uygulanmadan ve karıştırılan ortamda etkileşim gerçekleştirildi. Yıkama işlemi ise bu biriktirme aşamasının ardından boş tris-HCl tamponu (pH: 7,0) ile yapıldı.

Ölçüm:

Diferansiyel puls voltametri tekniği uygulanarak +0,1 den -0,5 V' a kadar boş tris-HCl tamponu (pH: 7,0) içerisinde ölçüm yapıldı.

2.4.4 Fenol Ftalein(PPT) ile yapılan çalışmada kullanılan yöntem:

Fenol ftaleinle ilgili çalışmaların tamamında camı karbon elektrod(GCE) kullanıldı.

2.4.4.1 Fenol ftalein- DNA etkileşim çalışmasında kullanılan yöntem:

Camsı karbon elektrodunun aktive edilmesi:

Elektroda, +0,5V gerilim uygulanarak fosfat tamponu(pH: 7,4) içerisinde 1dk. bekletildi.

dsDNA veya ssDNA içeren ve her birine 20 μ M PPT eklenen karışımın GCE yüzeyine immobilizasyonu:

Herhangi bir gerilim uygulanmaksızın elektrodlar, karışan ortamda 5dk. süreyle etanol içinde çözünürleştirilmiş ve asetat tamponu (pH:4,8) ile hazırlanan 20 μ M PPT ve asetat tamponu(pH:4,8) içerisinde hazırlanmış dsDNA /ssDNA karışımı ile etkileştirildi. Yıkama işlemi boş asetat tamponunda(pH:4,8) yapıldı.

Ölçüm:

Boş asetat tamponu (pH:4,8) içerisinde diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak +0,5V ile 1,2V arasında ölçümler alındı ve etkileşim sonrasında ~+0,8V civarında gözlenen PPT pikindeki değişim incelendi.

2.4.4.2 Fenol ftalein konsantrasyon artışına bağlı olarak elde edilen serbest haldeki PPT sinyalindeki değişikliklerin izlenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:

Camsı karbon elektrodunun aktive edilmesi:

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Elektroda, +0,5V gerilim uygulanarak fosfat tamponu(pH: 7,4) içerisinde 1dk. bekletildi.

PPT biriktirilmesi:

Herhangi bir gerilim uygulanmaksızın elektrodlar, karışan ortamda 5dk. süreyle etanol içinde çözünürleştirilmiş ve asetat tamponu (pH:4,8) ile 10 μ M, 20 μ M , 40 μ M , 80 μ M , 100 μ M konsantrasyonlarında hazırlanmış PPT çözeltileri içerisinde bekletildi. Boş asetat tamponu (pH:4,8) ile yıkama yapıldı.

Ölçüm:

Boş asetat tamponu (pH:4,8) içerisinde diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak +0,5V ile 1,2V arasında ölçümler alındı ve PPT pikindeki değişim incelendi.

2.4.4.3 dsDNA ile PPT etkileşimine artan PPT konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:

Camsı karbon elektrodunun aktive edilmesi:

Elektrod, +0,5V gerilim uygulanarak fosfat tamponu(pH: 7,4) içerisinde 1dk. bekletildi.

dsDNA içerisine çeşitli derişimlerde PPT eklenmesiyle elde edilen karışımın GCE yüzeyine immobilizasyonu:

Herhangi bir gerilim uygulanmaksızın dsDNA ve 10 μ M, 20 μ M , 40 μ M , 80 μ M , 100 μ M PPT içeren karışım çözeltileri içerisinde GCE'lar karışan ortamda 5dk. süreyle bekletildi. Yıkama işlemi boş asetat tamponunda(pH:4,8) yapıldı.

Ölçüm:

Boş asetat tamponu (pH:4,8) içerisinde diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak +0,5V ile 1,2V arasında ölçümler alındı ve PPT yanıtında dsDNA'ya etkileşim sonucu oluşan değişim incelendi.

2.4.4.4. ssDNA ile PPT etkileşimine artan PPT konsantrasyonunun

etkisinin incelenmesi çalışmasında kullanılan yöntem:

Camsı karbon elektrodunun aktive edilmesi:

Elektrod yüzeyine, +0,5V gerilim uygulanarak fosfat tamponu(pH: 7,4)

içerisinde 1dk. bekletildi.

ssDNA içerisine çeşitli derişimlerde PPT eklenmesiyle elde edilen karışımın

GCE yüzeyine immobilizasyonu:

Herhangi bir gerilim uygulanmaksızın ssDNA ve 10 μ M, 20 μ M , 40 μ M , 80 μ M ,

100 μ M PPT içeren karışım çözeltileri içerisinde GCE'lar karışan ortamda 5dk. süreyle

bekletildi. Yıkama işlemi boş asetat tamponunda(pH:4,8) yapıldı.

Ölçüm:

Boş asetat tamponu (pH:4,8) içerisinde diferansiyel puls voltametri tekniği

kullanılarak +0,5V ile 1,2V arasında ölçümler alındı ve sonuç olarak PPT pikinde ssDNA'ya etkileşim sonucu oluşan değişim incelendi.

*****Tüm bu etkileşim ve bağlanma sonuçları göz önüne alınarak fenol ftalein için partiyon katsayısı (dağılım katsayısı) hesaplaması yapıldı. Çalışmada Millan and Mikkelsen'in uyguladığı formül kullanıldı. (70)**

$$\frac{\text{Bağlı haldeki madde}}{\text{Serbest haldeki madde}} = \frac{\text{Bağlı haldeki maddenin akım değeri-serbest haldeki madde akım değeri}}{\text{serbest haldeki maddenin ölçülen akım değeri}}$$

2.4.5 Mitomycin C çalışmaları:

Mitomycin C çalışmalarının tamamında tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrodlar (karbon-SCPE) kullanıldı.

2.4.5.1 Mitomisin C – dsDNA etkileşimi çalışmasında uygulanan yöntem:

SCPE aktivasyonu: +1,8V potansiyel altında elektrod yüzeyine 80µl asetat tamponu(pH:4.8) konularak 1dk bekletildi. Damla yüzeyden alındı.

dsDNA tutturulması: Aktive edilmiş SCPE yüzeyine 60µl, 20 ppm dsDNA damlası konulduktan sonra, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilerek dsDNA tutturuldu. Sonra SCPE, yüzeyinden damla alındı.

Mitomycin C ile etkileşim: 1ppm'lik konsantrasyonda tris-HCl tamponu(pH:7.0)

içerisinde hazırlanan madde solüsyonunun 60µl'si elektrod yüzeyine konularak +0,75V potansiyel uygulanmaksızın 5dk.süreyle petri kabı içerisinde bekletildi. Damla yüzeyden alındı.

Ölçüm: Kare dalga voltametri tekniği ile +0,75V ile 1,35V arasında gerilim uygulanarak yüzeyine 80µl tris-HCl tamponu(pH:7,0) koyulan SCPE ölçüldü.

2.4.5.2 Mitomisin C konsantrasyon artışına bağımlı olarak elde edilen

guanin sinyalindeki değişimin izlenmesi çalışmasında uygulanan yöntem:

SCPE aktivasyonu: +1.8V potansiyel altında elektrod yüzeyine 80µl asetat tamponu(pH:4.8) konularak 1dk bekletildi. Damla yüzeyden alındı.

dsDNA tutturulması: Aktive edilmiş SCPE yüzeyine 60µl, 20 ppm dsDNA damlası konulduktan sonra, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilerek dsDNA tutturuldu. Sonra SCPE, yüzeyinden damla alındı.

Mitomycin C ile etkileşim: Çeşitli konsantrasyonlarda tris-HCl tamponu(pH:7.0)

içerisinde hazırlanan madde solüsyonlarının 60µl'si elektrod yüzeyine konularak

potansiyel uygulanmaksızın 5dk.süreyle petri kabı içerisinde bekletildi. Damla yüzeyden alındı.

Ölçüm: Kare dalga voltametri tekniği ile +0,75V ile 1,35V arasında gerilim uygulanarak yüzeyine 80µl tris-HCl tamponu(pH:7.0) koyulan SCPE ölçüldü.

2.4.5.3 Mitomisin C etkileşim süresi çalışmasında uygulanan yöntem:

SCPE aktivasyonu: +1.8V potansiyel altında elektrod yüzeyine 80µl asetat tamponu(pH:4,8) konularak 1dk bekletildi. Damla yüzeyden alındı.

dsDNA tutturulması: Aktive edilmiş SCPE yüzeyine 60µl, 20 ppm dsDNA damlası konulduktan sonra, +0,5 V 'da, 5 dakika bekletilerek dsDNA tutturuldu. Sonra SCPE, yüzeyinden damla alındı.

Mitomycin C ile etkileşim: 1ppm'lik konsantrasyonda ve tris-HCl tamponu(pH:7,0) içerisinde hazırlanan madde solüsyonunun 60µl'si elektrod yüzeyine konularak potansiyel uygulanmaksızın 5dk.süreyle petri kabı içerisinde bekletildi. Damla yüzeyden alındı.

Ölçüm: Kare dalga voltametri tekniği ile +0,75V ile 1,35V arasında gerilim uygulanarak yüzeyine 80µl tris-HCl tamponu(pH:7.0) koyulan SCPE ölçüldü.

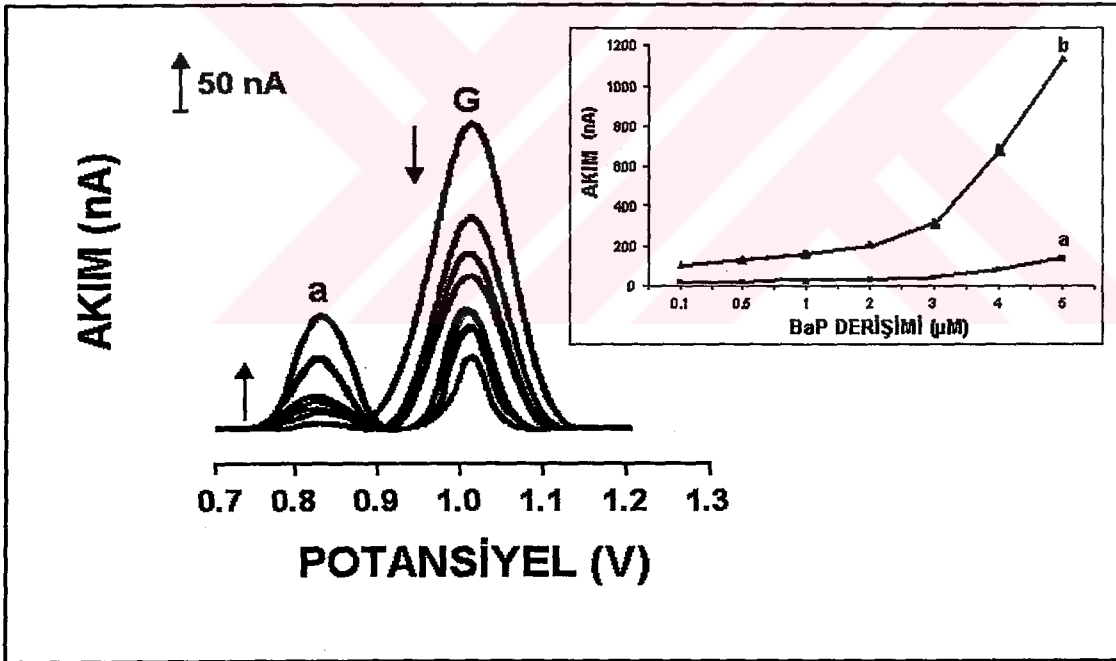
BÖLÜM III - IV

BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1. Benzo[a]piren (BaP) ile DNA etkileşmesinin elektrokimyasal olarak incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

3.1.1. BaP'in dsDNA ile etkileşmesinin camı karbon elektrodu(GCE) kullanarak incelenmesine ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.1.1. 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



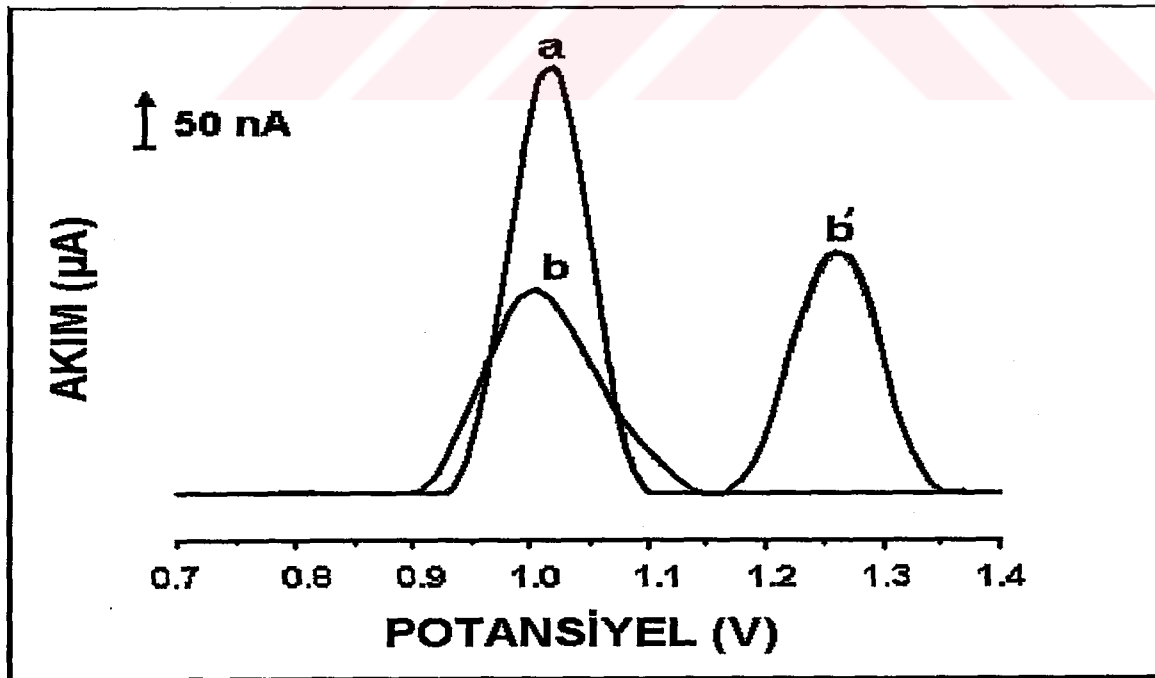
Şekil 1: BaP'nin ds DNA ile etkileşiminde elde edilen karşılaştırmalı voltamogram, (a) dsDNA içerisinde 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 µM'lık konsantrasyonlarda BaP ilavesinden sonra elde edilen bağlı haldeki ve artan BaP sinyali, (G) BaP ilavesi sonrası azalan guanin oksidasyon sinyali; grafikteki

(a) bağılı haldeki BaP sinyali ; (b) Yalnızca 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 μM ' lik konsantrasyonlarda BaP tutturulmuş elektrottan elde edilen BaP sinyali.

Artan konsantrasyonlarda BaP, dsDNA ile çözelti içerisinde etkileştiği zaman, dsDNA'daki guanin sinyalinde konsantrasyonla orantılı şekilde bir azalma gözlenmektedir. Aynı şekilde artan BaP konsantrasyonu ile birlikte dsDNA'ya bağlanan BaP'nin de sinyalinde artış gözlenmektedir. dsDNA'ya bağılı haldeki BaP 'den elde edilen sinyaller ve serbest halde yine aynı konsantrasyonlarda yapılan deney sonucu elde edilen BaP sinyallerindeki kademeli artış ise voltamogramın sağındaki grafikte gösterilmiştir. Bu çalışmada BaP'nin dağılma katsayısı 0.88 olarak hesaplanmıştır. Tekrarlanabilirlik ise %9,14 bulundu.

3.1.2 BaP – dsDNA etkileşmesinde CPE kullanılarak yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara ilişkin bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.1.2. 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



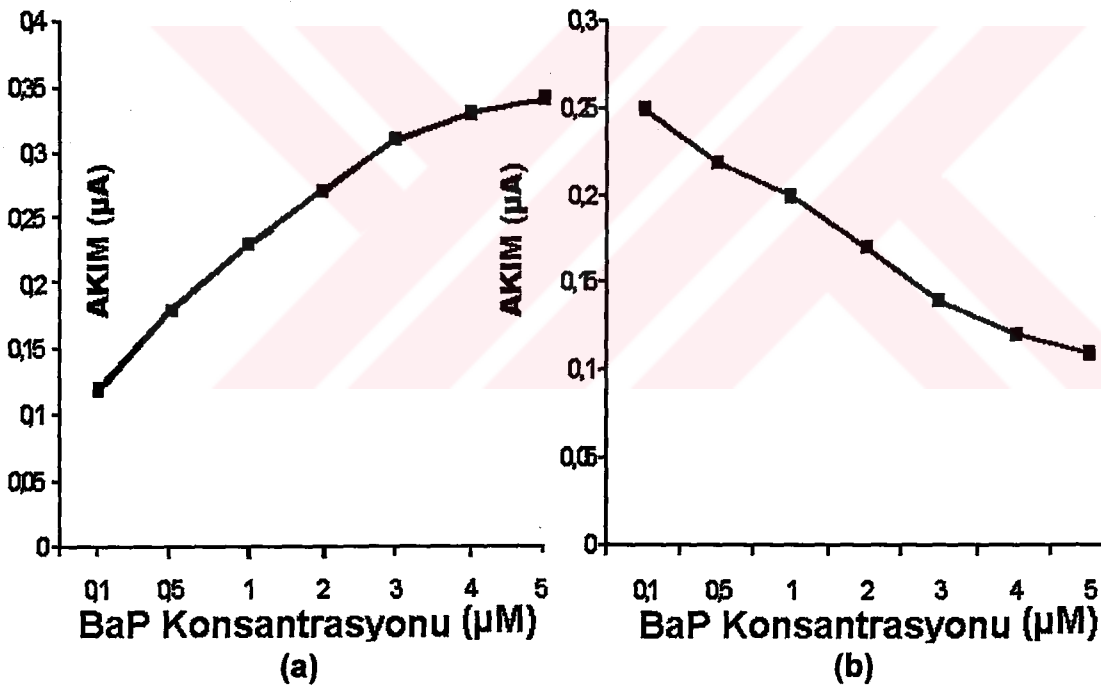
Şekil 2: BPDE (anti-7,8,9,10 tetrahydrobenzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-epoxide) yan ürünü oluşturulduktan sonra ve önce elde edilen diferansiyel puls voltamogramı (a) Elektrod yüzeyinde sadece dsDNA varken elde edilen sinyal; (b') 20 dakikalık BaP-

dsDNA etkileşimiyle oluşan BPDE yan ürününün sinyali, BPDE oluşumundan sonra dsDNA'dan elde edilen guanin sinyali (b).

CPE yüzeyinde sadece dsDNA varken elde edilen guanin sinyali yan ürün oluşuktan sonra yüzeye tutturulan dsDNA'daki guanin sinyalinin yaklaşık iki katıdır. Yan ürün oluşumu ile birlikte guanin sinyalinde azalma gözlenmiştir. Ayrıca yaklaşık 1.26V'da etkileşim sonucu oluşan yeni madde BPDE'ye ait bir pik gözlenmiştir.

3.1.3 BaP konsantrasyonu artışına bağlı olarak elde edilen yan ürünün incelenmesi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi :

Yöntem 2.4.1.3. 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 3: (a) Artan BaP konsantrasyonuna bağlı olarak CPE'den elde edilen ve artan BPDE(yan ürün) sinyali; **(b)** artan BaP konsantrasyonuna bağlı olarak azalan guanin sinyali.

BPDE yan ürünü içeriğinde kullanılan BaP konsantrasyonunun artışına bağlı olarak elde edilen BPDE'nin sinyalinde düzenli bir artış gözlenirken, dsDNA'daki guanin sinyalinde de kademeli bir azalma gözlenmiştir. BPDE'nin dsDNA ile

etkileşimi, BaP konsantrasyonuna bağlı olarak daha fazla olmaktadır. CPE çalışmalarındaki ölçümlerde bağıl standart sapma (=BSS) %8,9 olarak bulunmuştur.

3.2. Metilen mavisi çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

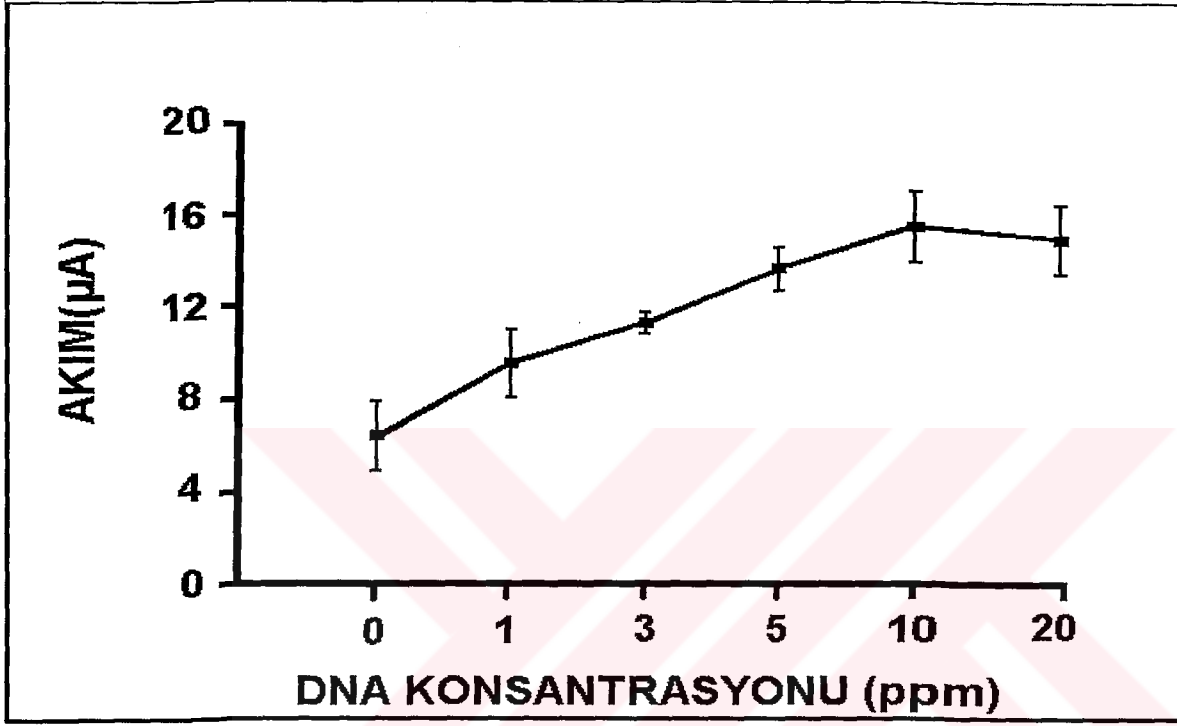
3.2.1.CPE ile yapılan çalışmalarda elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

3.2.1.1. ssDNA ve dsDNA ile MB etkileşimleri çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Bu konuda daha önce yapılmış ve yayınlanmış çalışmalarımız (29,31) değerlendirilerek, MB'nin ssDNA'da ya da prob dizileriyle serbest halde bulunan guanin bazları üzerinden olan etkileşimi dolayısıyla daha çok biriktiği ve daha yüksek sinyal verdiği açıklaması ile yorumlamıştık. Bu çalışmada MB'nin CPE ile yapılan kinetik çalışmaların sonuçları yer almaktadır. Yine tekrarlanabilirliğin görülmesi amacıyla ssDNA ve dsDNA ile de MB etkileştirildi fakat sonuçlar burada yer almamaktadır. MB çalışmalarında aynı zamanda hiçbir potansiyel uygulanmamasına rağmen (açık devre), MB'nin düzlemsel aromatik halkası, dsDNA' ya da hibrit oluşturmuş prob ve hedef dizinin baz çiftleri arasına girerek interkalasyon yaptığı için dsDNA ile de sinyaller alındığı gözlemlendi. Açık devrede dahi elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan Nernst tabakası ile yaklaşık + 0.40 V'luk potansiyel elde edilmektedir. Oluşan bu pozitif akım ile negatif yüklü DNA elektrot yüzeyine elektrostatik olarak tutunmaktadır.

3.2.1.2. ssDNA konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.2.1.2. 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



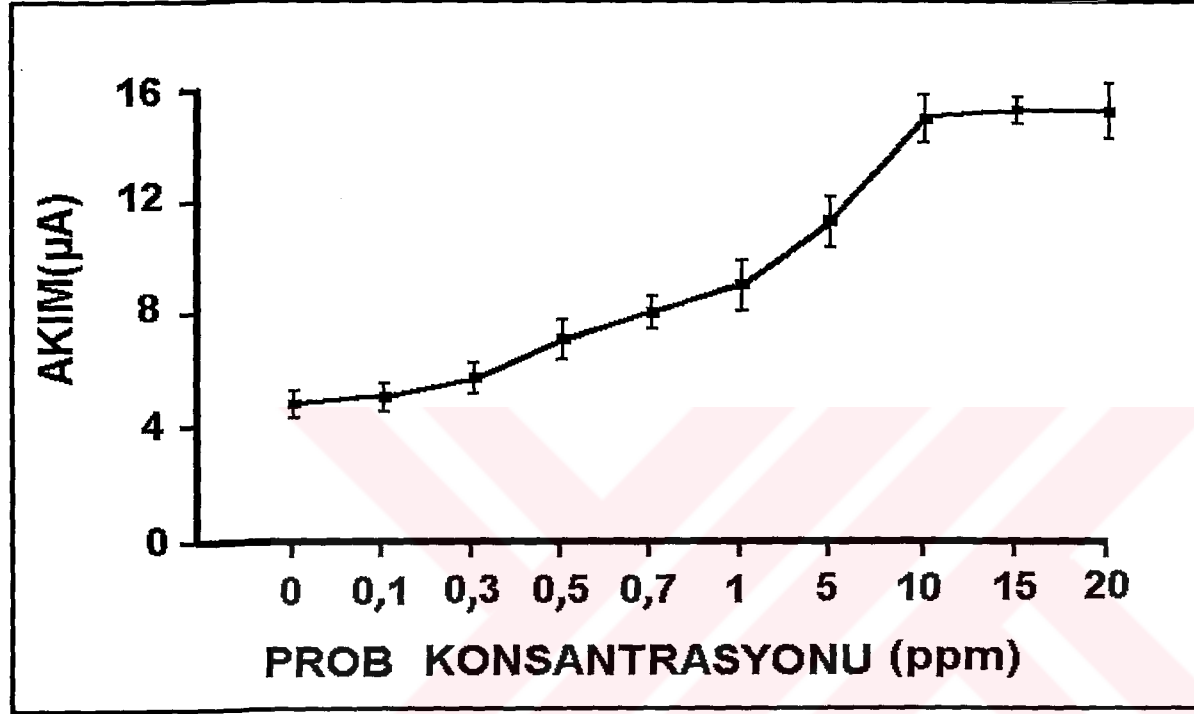
Şekil 4: ssDNA konsantrasyonunun artışının elde edilen MB yanıtına etkisi.

MB'nin ssDNA'da serbest halde bulunan guanin bazları ile olan etkileşimi artan ssDNA konsantrasyonları ile MB sinyali artmaktadır (29,31,51). 10ppm'lik konsantrasyondan sonra sinyalde artış gözlenmemiştir.

3.2.1.3. 15-bazlık kısa DNA dizisi (prob) konsantrasyonu artışına bağlı

olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.2.1.3. 'de anlatıldığı gibi yapıldı.

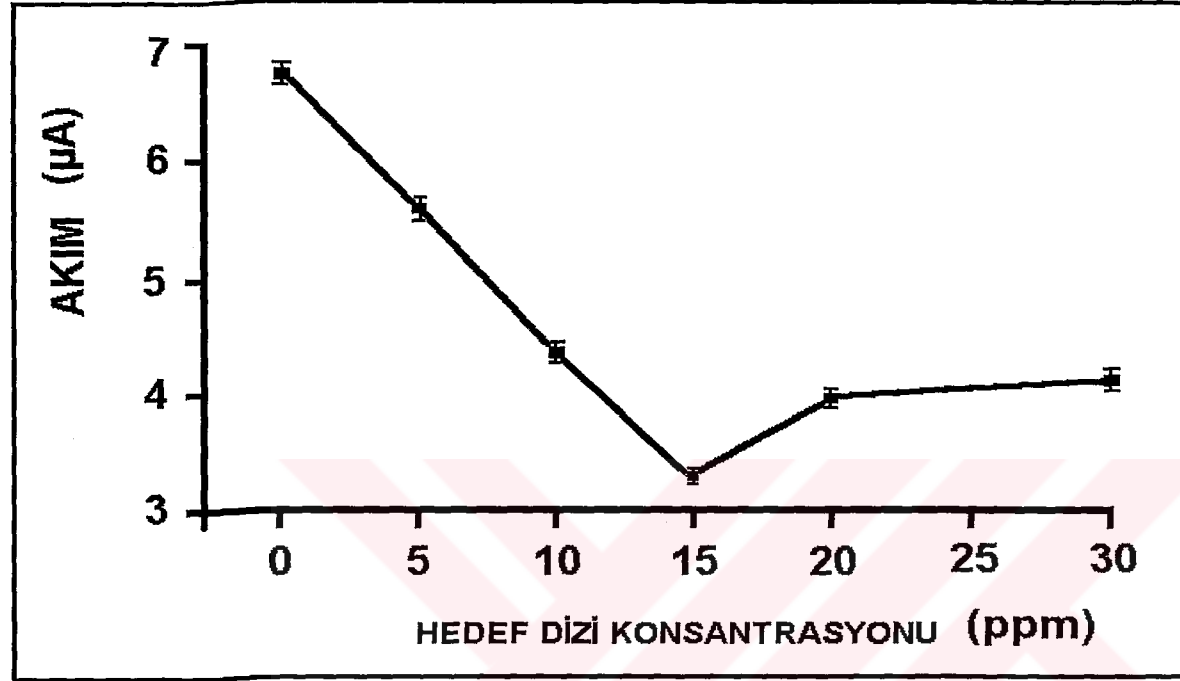


Şekil 5: Prob konsantrasyonunun artışının elde edilen MB yanıtına etkisi.

MB'nun DNA ile etkileşim çalışmaları sonrasında, sentetik olarak hazırlanmış kısa DNA dizileriyle olan etkileşimi incelenmiştir. Gelecekteki mikroçip teknolojilerine uygunluk açısından bu çalışmalar çok önemlidir. Çalışma sonucunda beklendiği gibi prob konsantrasyonu artırıldığında, MB sinyalinde artış gözlemlendi ve 10ppm'lik konsantrasyonda prob kullanıldıktan sonra doygunluk seviyesine ulaşıldığından MB sinyalinde artış gözlenmedi. DNA hibridizasyonunun tayininde kullanacağımız optimum prob konsantrasyonu 10ppm olarak tayin edildi.

3.2.1.4. Hedef dizi (target) konsantrasyonu artışına bağlı olarak MB yanıtındaki değişimin incelenmesi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.2.1.4. 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



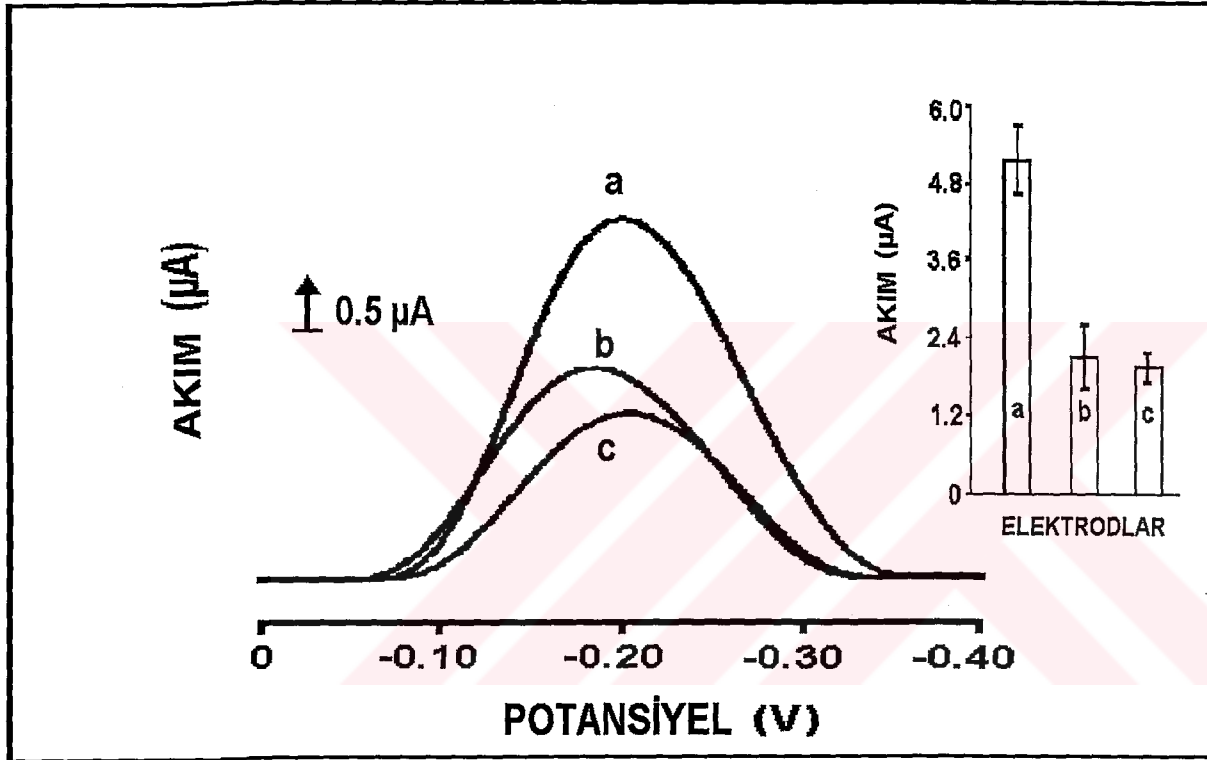
Şekil 6: Hedef dizi (target) konsantrasyonunun artışının elde edilen MB yanıtına etkisi.

MB-CPE çalışmaları için optimum konsantrasyon olduğu bir önceki çalışmada tayin edilen 10ppm'lik prob çözeltisi bulunan CPE ile artan hedef konsantrasyonlarında gerçekleştirilen hibridizasyon çalışmaları sonucunda, en düşük MB sinyalinin 15ppm'lik hedef konsantrasyonunda elde edildiği gözlemlendi. Bu iki çalışma ile yüzeyde 10ppm prob varken en yüksek değerde MB sinyali, yüzeyde 10ppm prob ve 15ppm hedef içeren hibrit bulunduğu anda ise en düşük MB sinyali elde edildi ve bu iki sinyal arasındaki fark göz önüne alınarak hibridizasyonun tayini yapıldı. MB'nin düzlemsel aromatik halkası, G-C baz çiftleri arasına girerek interkalasyon yaptığı için (29,31,34,37,50,53) yüzeyde hibridizasyon gerçekleştiğinde de MB ile olan

etkileşim sonrası düşük de olsa bir sinyal elde edildi. Hibrit ile prob ile elde edilen MB sinyallerine oranla daha düşük sinyaller alındığı gözlemlendi.

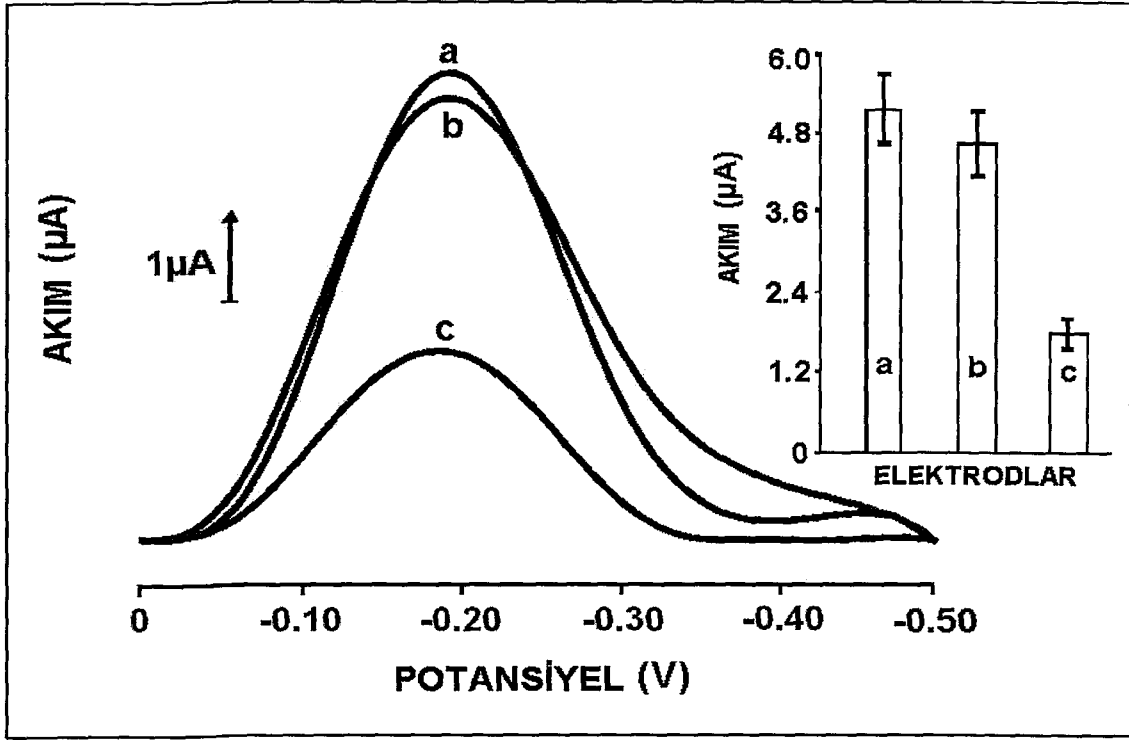
3.2.1.5. Peptik nükleik asit (PNA) yapısındaki oligonükleotidler ve normal DNA yapısındaki oligonükleotidlerin kıyaslanması çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.2.1.5. 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 7: MB indirgenme sinyallerini gösteren diferansiyel puls voltamogramında,

- a) DNA prob dizisi tutturulmuş yüzey ile MB etkileşimi sonrasında alınan yanıt, b) tek bazı hedeften farklı dizi ile hibritleşme sonrasında MB ile alınan yanıt c) Hedef dizi ile hibridizasyon sonrasında MB'den alınan yanıt.



Şekil 8: MB indirgenme sinyallerini gösteren diferansiyel puls voltamogramında,

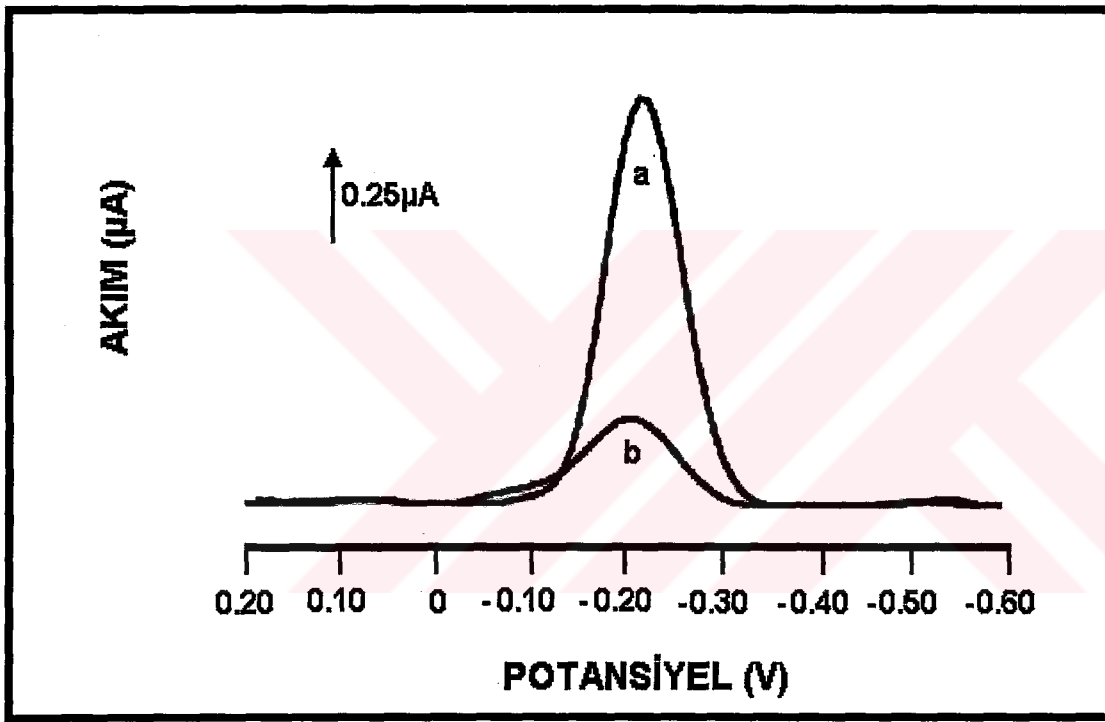
a) PNA prob tutturulmuş yüzey ile MB etkileşimi sonrasında alınan yanıt, b) tek bazı hedeften farklı dizi ile hibritleşme sonrasında MB ile alınan yanıt c) Hedef dizi ile hibridizasyon sonrasında MB ile alınan yanıt.

Şekil 7'de elektrod yüzeyinde DNA prob varken ve MB ile etkileşim sonrasında elde edilen yanıtlar, Şekil 8'de ise aynı metod ile yüzeyde PNA probu varken elde edilen yanıtlar görülmektedir. PNA probunun yüzeye tutunmasının DNA probuna göre daha güçlü olduğu gözlemlendi. Ayrıca PNA probunun tek bazı hedef diziden farklı olan dizi ile hibritleşme yapmayarak hedefe seçimli olarak bağlanma özelliğine sahip olduğu tespit edildi. DNA probu kullanıldığında, tek bazı hedeften farklı dizi ile MB sinyalinde azalma gözlenmesi bu probun seçimliliğinin biyosensör teknolojisi için uygun olmadığı görülmüştür. Buna karşın DNA probu, tüm bazıları hedeften farklı dizi ile hibridizasyon tayininde başarılı sonuçlar vermiştir. PNA probu ile yapılan çalışmalarda bağıl standart sapma, %9,5, DNA probu ile yapılan çalışmalarda ise %10,85 bulunmuştur.

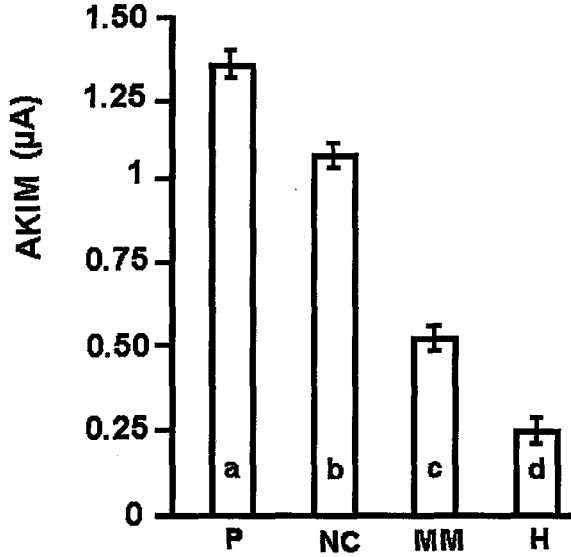
3.2.2. Altın elektrod ve MB ile yapılan hibridizasyon çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

3.2.2.1. DNA probu ile yapılan hibridizasyon çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.2.2. 'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 9: MB indikatörlüğünde elde edilen diferansiyel puls voltamogramında, a) 100ppmDNA probu tutturulmuş altın elektrod ile alınan MB sinyali, b) DNA probu ile karşılığını içeren çözelti etkileştirildikten sonra elde edilen MB sinyali.

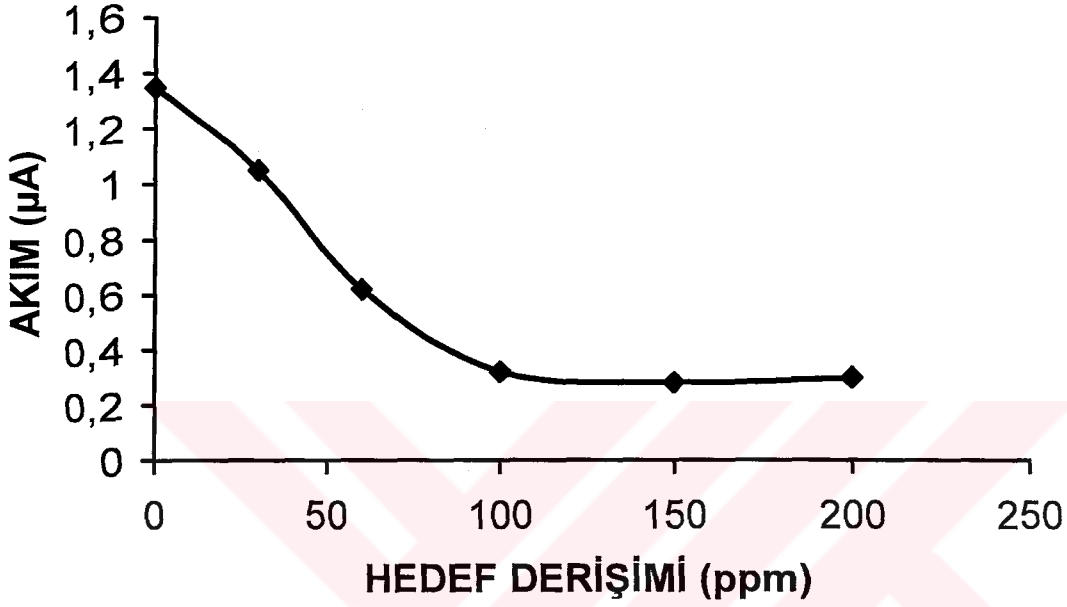


Şekil 10: Altın elektrotla MB ile yapılan diğer hibridizasyon kontrolü çalışmaları sonucunda elde edilen grafikte; a) Yalnızca 100 ppm DNA prob(P) modifiye edilen AuE ile alınan MB sinyali, b) DNA probu ve 100ppm tüm bazları hedeften farklı dizi(NC) ile hibridizasyonu, c) DNA probu ve 100 ppm tek bazı hedeften farklı dizi(MM) ile hibridizasyonu, d) DNA probunun 100 ppm'lik hedefini içeren çözelti ile hibridizasyonu(H) sonucu alınan MB sinyali.

Bu çalışmada AuE yüzeyinin tamamen DNA ile kaplanabilmesi için 100 ppm gibi yüksek bir DNA dizi konsantrasyonu seçildi. Şekil 10'deki grafikte a'daki DNA probundan alınan yüksek yanıt daha önce de MB ile elde ettiğimiz diğer sonuçlarla birbirini doğruladı (29,31). Ardından yapılan DNA probu ile tüm bazları hedeften farklı dizinin hibridizasyonu çalışmasında (b) elde edilen MB yanıtının prob sinyaline yakın şekilde yüksek olması hibridizasyon çalışmasının bu prob ile seçimli şekilde yapılabileceğini gösterdi. Tek bazı hedeften farklı dizi ile hibridizasyonda(c) sinyalin düşmüş olması kısmen de olsa hibridizasyon olduğu sonucuna ulaşıldı. Hedefle yapılan hibridizasyon sonunda da (d) beklenildiği gibi MB ile düşük sinyal gözlemlendi.

3.2.2.2. DNA probu ile yapılan hibridizasyon çalışmaları için en uygun

hedef konsantrasyonunun bulunması çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:



Şekil 11: 100 ppm DNA probuna karşı artan hedef konsantrasyonlarında

hibridizasyon sonrası elde edilen MB sinyalini gösteren grafik.

Şekil 11'deki grafikten anlaşıldığı gibi, 100ppm'lik hedef konsantrasyonu

optimum hedef konsantrasyonu olduğu bulundu. Prob ve hedef konsantrasyonunun

100 ppm gibi yüksek ve birbiri ile aynı olması, AuE yüzeyine daha stabil bir prob

modifikasyonu ve daha seçimli bir hibridizasyon olması için gerekli olduğu sonucunu

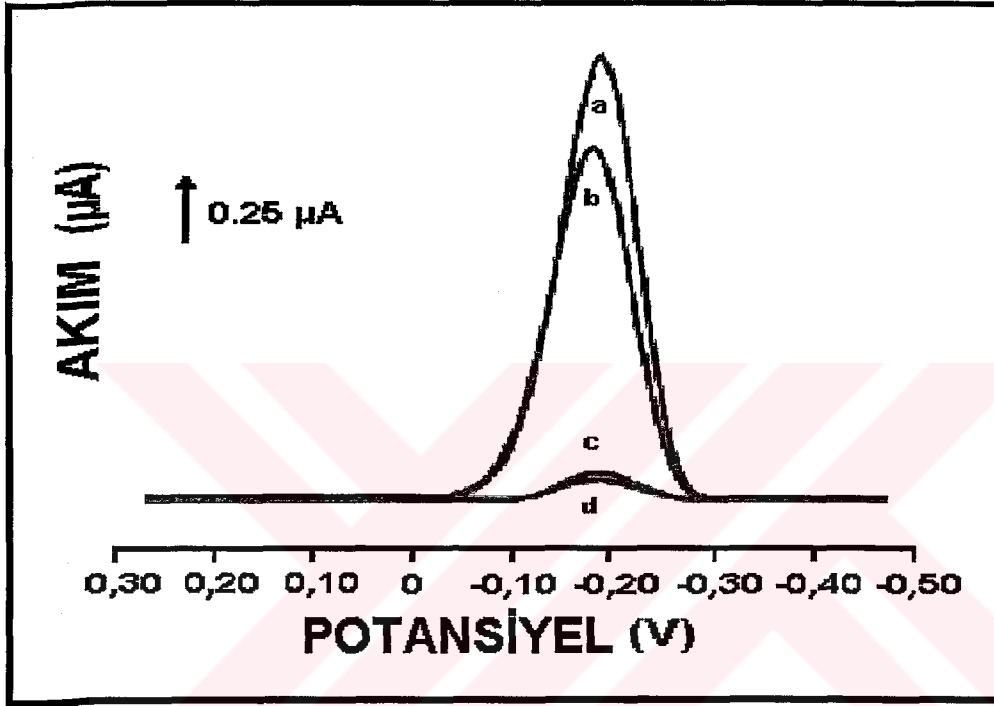
getirdi.

3.2.2.3. PNA probu ile DNA probu kullanılarak karşılaştırmalı olarak yapılan hibridizasyon tayini çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

100ppm PNA probu ile hibridizasyon çalışmalarında elde edilen bulguların

değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.2.2.1' de anlatıldığı gibi yapıldı.



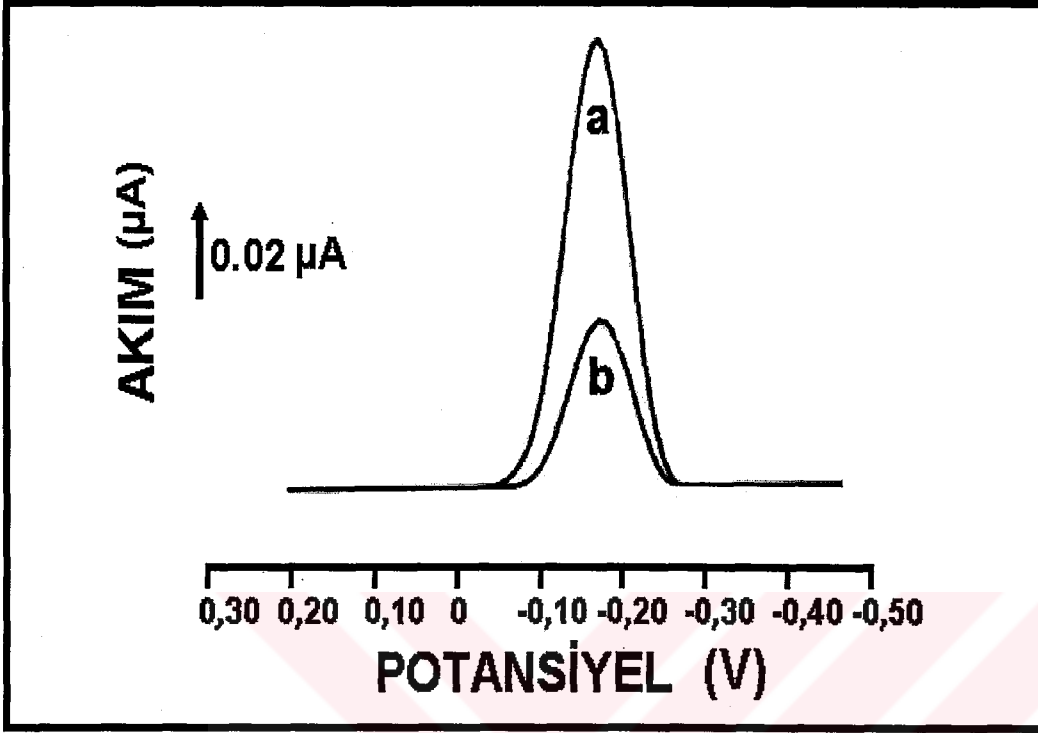
Şekil 12: Diferansiyel puls voltamogramında; a) 100ppm PNA probu, b)PNA probu ile tek bazı hedeften farklı sentetik DNA dizisiyle hibridizasyon, c) PNA probu ile hedef DNA dizisinin hibridizasyonu, d) PNA probunun tek bazı hedeften farklı DNA dizisi ile hedef DNA dizisini içeren karışım çözeltisiyle hibridizasyonu sonrasında elde edilen MB sinyalleri.

Metilen mavisi(MB) sahip olduğu düzlemsel aromatik halkası sayesinde DNA'ya interkalatif ve guanine özgü bağlanma yapabilmektedir.(29,53,134). Çalışmamızda hibridizasyon indikatörü olarak MB kullanıldı.14 bazlık sentetik PNA prob dizisi kullanılarak, 5' ucunda bulunan serbest amino grubu ve N-(3-dimetilamino)propil)-N'-etilkarbodiimit(EDC) ve N-hidroksisülfosüksinimit(NHS)

ajanlarının oluşturduğu kovalent bağ sayesinde, PNA probun altın elektrot yüzeyine tek tabaka halinde yerleşmesi sağlandı(38,39,42). AuE yüzeyine kovalent olarak yerleştirilen PNA probları, hedef DNA ile seçici bir şekilde hibrit oluşturabilmektedirler. İndikatör olarak kullanılan MB molekülünün indirgenme sinyalinde meydana gelen farklanmaya dayanarak hibridizasyon tayini gerçekleştirilmektedir(29,31,54,78). Şekil 12'de PNA probunun çeşitli dizilerle hibridizasyonu sonrasındaki seçiciliğini gösteren sinyaller elde edilmiştir. Bu çalışmada yine altın elektroda uygunluğu açısından tam bir yüzey kaplaması için, 100ppm prob ve hedef dizi / tek bazı hedeften farklı dizi(MM) / tüm bazıları hedeften farklı dizi(NC) konsantrasyonları tercih edildi. a'da yüzeyde sadece 100ppm PNA probu varken elde edilen MB'nun sinyali görülmektedir. Tek sarmal halindeki bu dizideki guanin bazılarına güçlü bağlanma özelliği nedeniyle yüksek sinyal elde edildi. Hedefle diğer çalışmalarda olduğu gibi düşük bir sinyal elde edilmesinin yanısıra bu çalışmada hedefi ve tek bazı hedeften farklı diziyi karışım halinde içeren çözelti ile de 100ppm'lik PNA prob seçimli şekilde hedefiyle hibritleşmiştir.(Şekil12, d) Ayrıca yüzeyde prob varken sadece tek bazı hedeften farklı dizi(MM) ile hibridizasyon yapıldığında elde edilen MB sinyali ile proba elde edilen MB sinyaline yakın bir sinyal elde edilmesi, bu biyosensörün seçimliliğinin çok iyi olduğunu gösterdi.

PNA probu ile 10ppm konsantrasyonda yapılan çalışma ile elde edilen bulgular:

Yöntem 2.4.2.2.1' de anlatıldığı gibi yapıldı.

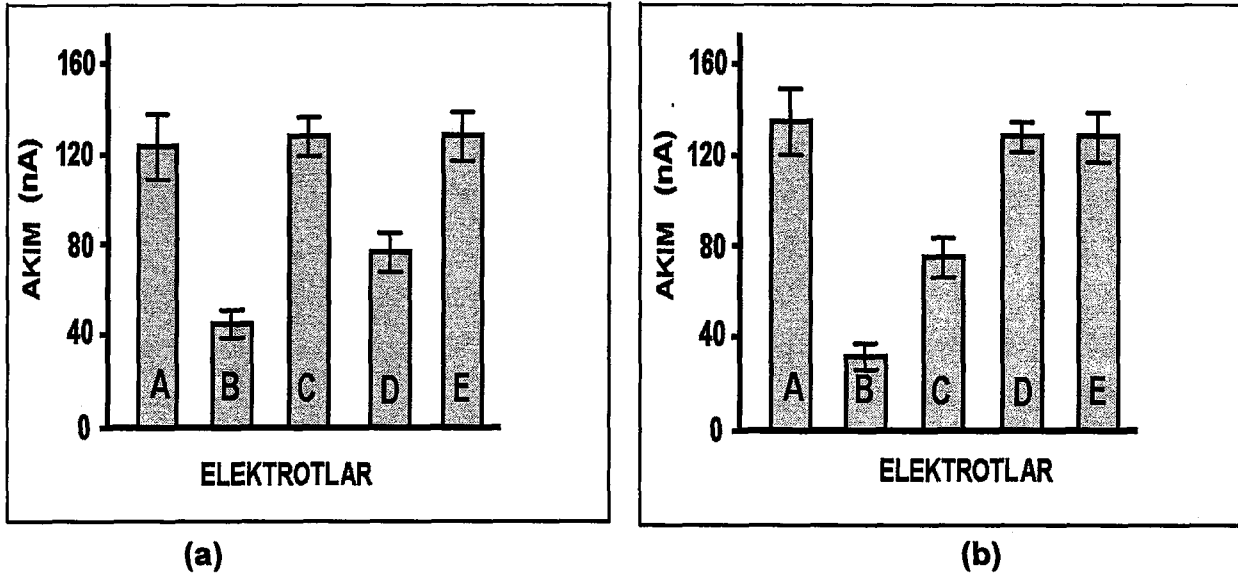


Şekil 13: Diferansiyel puls voltamogramında, a)10ppm PNA prob ile MB'dan alınan yanıt, b) 10ppm PNA probu ile 10ppm hedef çözeltisinin hibridizasyonu sonrasında MB'dan alınan yanıt.

Şekil 13'de 10ppm'lik PNA probu çalışıldığında bile hibridizasyonun tayininin iyi şekilde yapılabileceği tespit edildi. Fakat AuE ile aynı konsantrasyonda DNA probu kullanıldığında hibridizasyon tayininin seçimliliği, PNA probu kadar başarılı olarak elde edilemedi (78).

10ppm PNA ve DNA probu kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.2.2.1' de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 14: (a) nolu şekilde DNA probu ile yapılan çalışmalar, (b) nolu şekilde ise PNA probu ile yapılan çalışmaların grafiklerinde; (A) 10ppm'lik prob yanıtını, (B) DNA hedefle hibridizasyondan sonra elde edilen MB yanıtı, (C) hedef ile hibridizasyondan sonra yapılan denatürasyon işlemi sonrası alınan yanıtı, (D) tek bazı hedeften farklı dizi(MM) ile hibridizasyondan sonra elde edilen yanıtı, (E) ise Tüm bazları hedeften farklı dizi(NC) ile hibridizasyondan sonra elde edilen yanıtı.

Şekil 14'de karşılaştırmalı olarak değerlendirilen (a)'da DNA ve (b)'de PNA problemlerine ait grafiklerde, A'daki yanıtlardan (a) 'da PNA probu ile alınan yanıt, PNA probunun yüzeye daha iyi şekilde modifiye edilebilmesi nedeniyle daha büyük olarak elde edildi. B'de hibridizasyondan sonraki sinyallerde azalmalar gözlemlendi. Her iki probun da hibridizasyon sonucunda hibridizasyon tayini belirtilebilmektedir. Fakat PNA probu ile elde edilen farklanma DNA probuna göre daha büyüktür. Hibrit oluşumunu ardından yapılan denatürasyon işlemi sonrasında (C) yapısı ısı ve enzim etkisiyle bozulmayan PNA probu ile (b)'de açıkça görüleceği gibi düşük sinyal elde edilmiştir. Bu hibrit sinyaline yakın olan düşük sinyalin anlamı hibrit yapısının bozulmamış olmasıdır. Fakat (a)'da DNA probu ile yapılan hibritin denatürasyonu sonucunda prob sinyaline yakın, yüksek bir sinyal elde edilmiştir. Isı etkisine karşı DNA probu ile

oluşturulan hibritin sağlam olmadığı buradan da görülmüştür. D'de tek bazı hedeften farklı olan dizi ile yapılan hibridizasyon çalışmasında ise (b) 'de PNA probunun bu diziyle hibrit yapmadığı gözlemlendi. DNA probu ise kısmen de olsa bu hedeften tek bazı farklı dizi ile hibrit oluşturmuştur. Hedefe olan seçimlilik değerlendirildiğinde PNA probunun daha seçimli şekilde karşılığını yakaladığı görüldü. E'de her iki prob ile de tüm bazları hedeften farklı dizilerle yapılan çalışma sonuçlarına göre, her iki probun da tüm bazları hedeften farklı dizilerle hibrit oluşturmadığı, dolayısıyla bu biyosensörün seçimli bir şekilde kullanılabileceği belirtilmiş oldu. PNA probu kullanılan çalışmalarda Au elektrodla alınan ölçümlerde bağıl standart sapma, %7,92, DNA probu kullanılan çalışmalarda ise %8,73 olarak bulunmuştur.

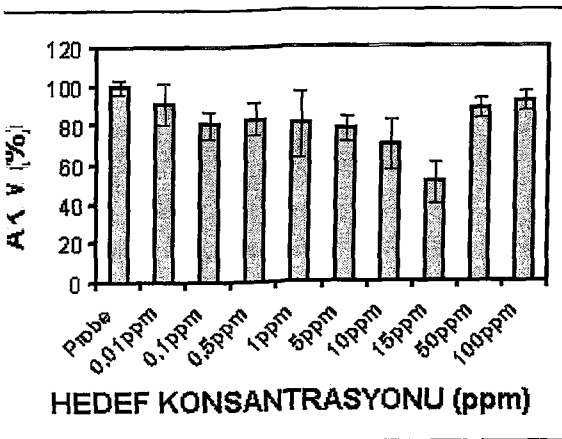
3.2.3. Tek kullanımlık perde baskılı altın elektrodlarla (Au-SCPE) MB

kullanılarak yapılan hibridizasyon tayini çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

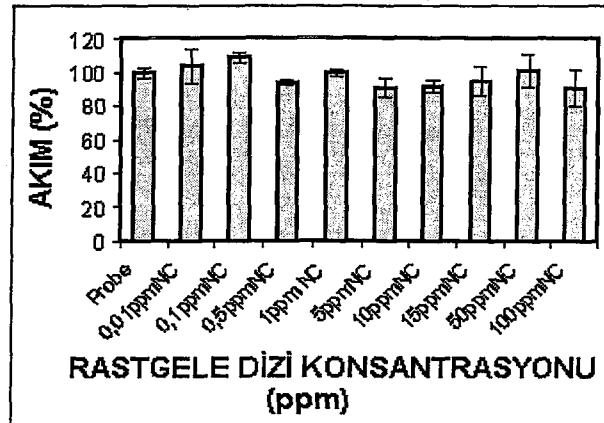
Yöntem 2.4.2.3'da anlatıldığı gibi yapıldı.

10ppm prob konsantrasyonuna karşılık artan hedef dizi/ tüm bazları hedeften

farklı dizi konsantrasyonlarında elde edilen bulgular:



A



B

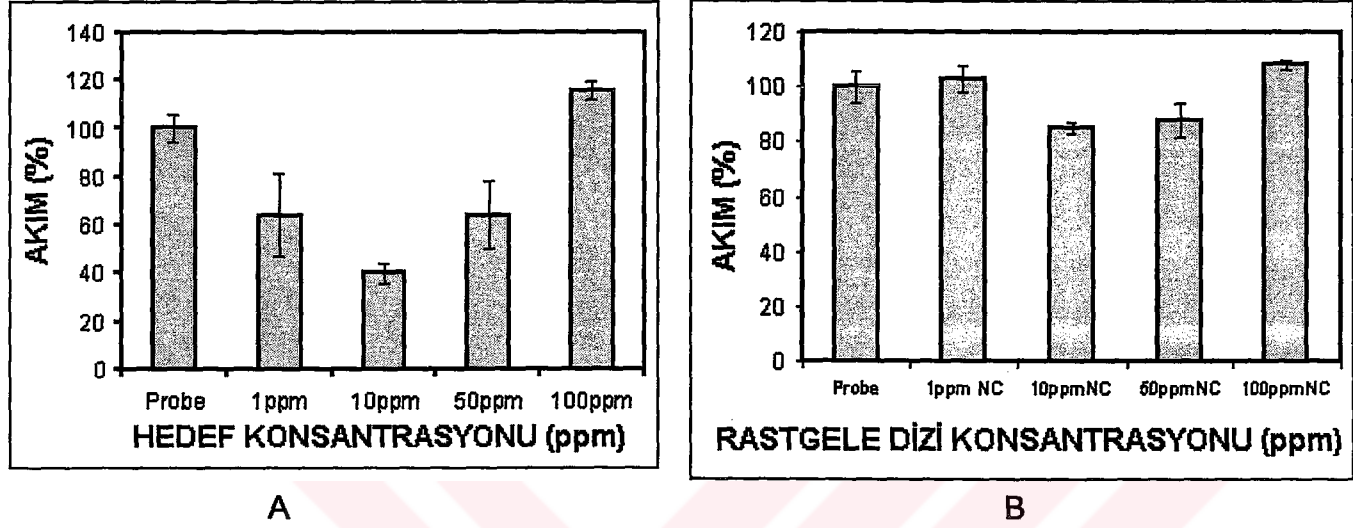
Şekil 15: 10ppm prob tutturulmuş yüzeyde(A) çeşitli konsantrasyonlarda hedef dizi ile hibridizasyon sonucu elde edilen MB yanıtı ; (B) çeşitli konsantrasyonlarda tüm bazları hedeften farklı dizi (NC) ile hibridizasyon sonucunda elde edilen MB yanıtı.

Perde baskılı tek kullanımlık altın elektrod(Au-SCPE) sisteminde ve yeni çalışma metodunda kullanılabilecek en uygun prob ve hedef konsantrasyonunun tespiti için bir dizi çalışma yapıldı. İlk olarak CPE çalışmaları için optimum olduğu tespit edilen 10ppm prob ve 15 ppm hedef konsantrasyonu denendi. A grafiğinde artan hedef konsantrasyonlarına karşı 10ppm'lik prob ile oluşan hibritlerin MB ile verdiği yanıtlar görülmektedir. Grafikler, bu çalışmada arka arkaya alınan 3 ölçüm sonucu değerlendirilerek çizilmiştir. En düşük MB sinyali değerine 10ppm prob ile 50ppm hedefin oluşturduğu hibritte ulaşılmıştır. Bu iki değer arasındaki MB sinyal farkı, %45-50'ye varan bir azalma şeklindedir. Aynı şekilde biyosensörün seçimli bir şekilde çalışıp çalışmadığının tespit edilmesi için hedef ile aynı konsantrasyon değerlerine sahip tüm bazları hedeften farklı olan dizi (rastgele dizi,NC) de kullanılarak bu koşullarda herhangi bir hibritleşmenin olup olmadığı araştırıldı (Grafik B).

50ppm prob konsantrasyonuna karşılık artan hedef dizi/ tüm bazları hedeften farklı

dizi konsantrasyonlarında elde edilen bulgular:

Yöntem 2.4.2.3'da anlatıldığı gibi yapıldı.

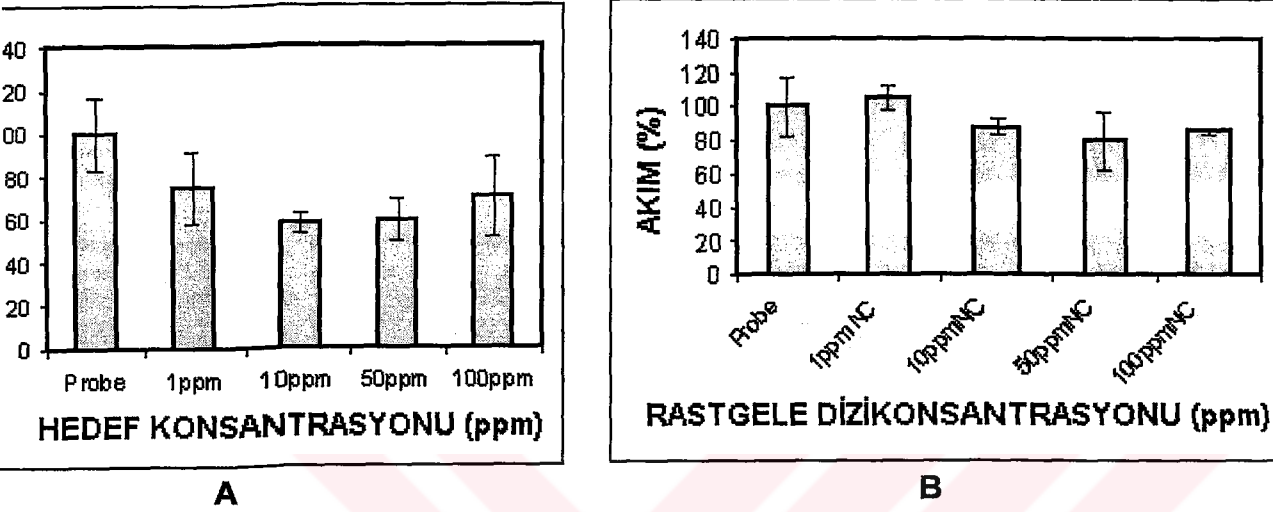


Şekil 16: 50ppm prob dizisi tutturulmuş Au-SCPE yüzeyinde(A) çeşitli konsantrasyonlarda hedef dizisi ile hibridizasyon sonucu elde edilen MB yanıtı ; (B) çeşitli konsantrasyonlarda tüm bazları hedeften farklı dizi (rastgele dizi, NC) ile hibridizasyon sonucunda elde edilen MB yanıtı.

Perde baskılı tek kullanımlık altın elektrodlarla yapılan ikinci çalışmada, A grafiğinde artan hedef konsantrasyonlarına karşı 50ppm'lik prob ile oluşan hibritlerin MB ile verdiği yanıtlar görülmektedir. Grafikler, bu çalışmada arka arkaya alınan 3 ölçüm sonucu değerlendirilerek çizilmiştir. En düşük MB sinyali değerine 50ppm prob ile 10ppm hedefin oluşturduğu hibritte ulaşılmıştır. Bu iki değer arasındaki MB sinyal farkı, hibridizasyondan sonra MB sinyalinde yaklaşık %60 azalma şeklindedir. Aynı şekilde 50ppm prob kullanılarak tüm bazları hedeften farklı dizi,(NC) ile aynı çalışma yapılmıştır ve herhangi bir hibritleşme olmadığı gösterilmiştir.

100 ppm prob konsantrasyonuna karşılık artan hedef dizi/ tüm bazları hedeften farklı dizi konsantrasyonlarında elde edilen bulgular:

Yöntem 2.4.2.3'da anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 17: 100ppm prob tutturulmuş yüzeyde(A) çeşitli konsantrasyonlarda target ile hibridizasyon sonucu elde edilen MB yanıtı ; (B) çeşitli konsantrasyonlarda tüm bazları hedeften farklı dizi, (rastgele dizi, NC) ile hibridizasyon sonucunda elde edilen MB yanıtı.

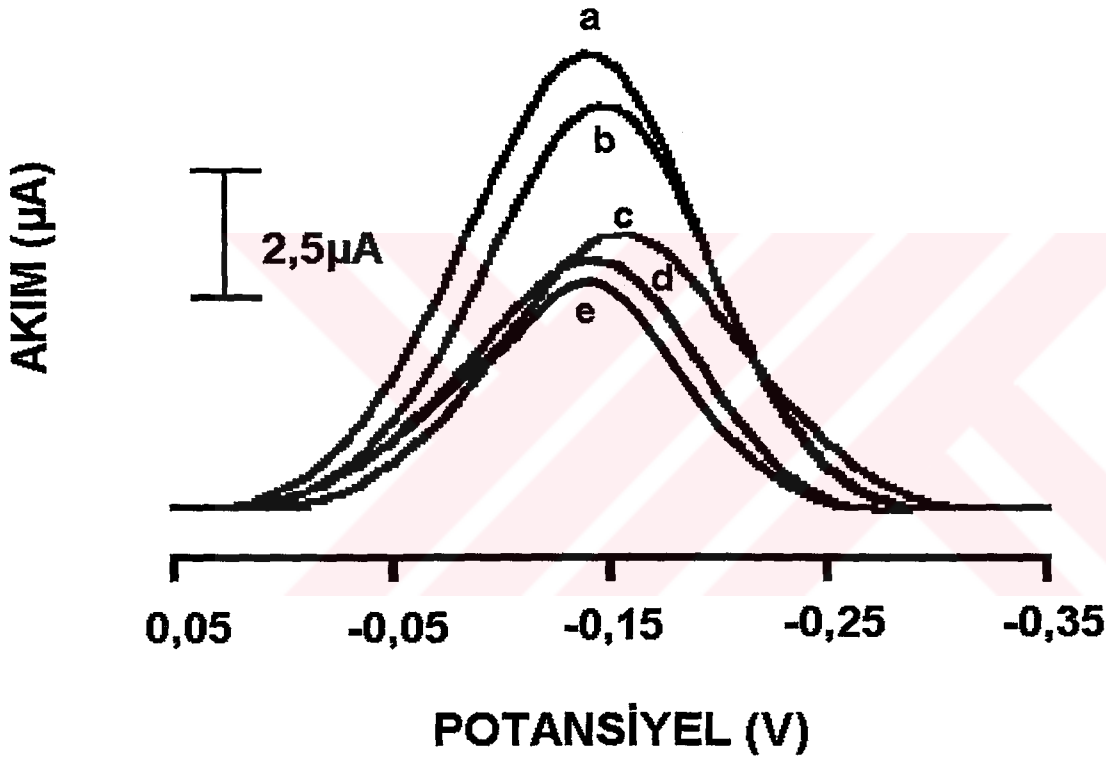
Perde baskılı tek kullanımlık altın elektrodlarla(Au-SCPE) yapılan üçüncü çalışmada, A grafiğinde artan hedef konsantrasyonlarına karşı 100ppm'lik prob ile oluşan hibritlerin MB ile verdiği yanıtlar görülmektedir. A ve B grafikleri, bu çalışmada arka arkaya alınan 3 ölçüm sonucu değerlendirilerek çizilmiştir. En düşük MB sinyali değerine 100ppm prob ile 10ppm ve 50ppm hedeflerin oluşturduğu hibritlerde ulaşılmıştır. Bu değerlerde elde edilen yanıt ve prob ile elde edilen yanıt kıyaslandığında %43-45'e varan bir azalma gözlenmiştir. Aynı şekilde 100ppm prob kullanılarak tüm bazları hedeften farklı dizi(NC) ile aynı çalışma yapılmıştır ve herhangi bir hibritleşme olmadığı gösterilmiştir. Au-SCPE ile bu çalışmalarda bağlı standart sapma %6,7 olarak bulunmuştur.

3.2.4. Meldola mavisi (MDB) ile yapılan hibridizasyon tayini çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Bu çalışmaların tamamında CPE kullanılmıştır.

3.3.1. Sentetik oligonükleotidler kullanılarak hedef, tek bazı hedeften farklı dizi (MM) ve baz dizisi hedeften farklı olan dizi (NC) ile yapılan hibridizasyon tayini çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.3.1'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 18: Diferansiyel puls voltamogramında, (a) 10ppm'lik prob ile 15ppm'lik hedefin yapmış olduğu hibritten sonra elde edilen MDB yanıtı. (b) 10ppm'lik prob ile 15ppm'lik iki bazı hedeften farklı dizi(MM) ile hibridizasyondan sonra elde edilen MDB yanıtı. (c) elektrod yüzeyi sadece MDB ile etkileştirildikten sonra elde edilen yanıt. (d) Tüm bazıları hedeften farklı olan dizi(NC) ile probun hibridizasyonu sonrasında elde edilen MDB yanıtı. (e) Yüzeyde sadece prob varken MDB ile etkileşimden sonra elde edilen yanıt.

Şekil 18' da hedef ile hibritleşmenin sonrasında MDB'dan yüksek bir sinyal elde edildi. Buna karşın, yüzeyde sadece prob varken(e) düşük sinyal gözlemlendi. Sadece bu farklanmaya dayanılarak MDB'nun DNA'daki hibridizasyonu tayin etmede kullanılabilirliği görülmüş oldu. Bunun dışında MDB, ayrıca iki bazı hedeften farklı dizi(MM) ile oluşturulan hibrit (b) ve tüm bazıları hedeften farklı dizi(NC) ile oluşturulan hibrit(d)'ler ile de etkileştirildi. İki bazı hedeften farklı dizi(MM) ile oluşturulan hibritten yüksek yanıt,tüm bazıları hedeften farklı dizi(NC) ile ise düşük bir yanıt elde edildi. Buna göre, sözkonusu olan mutasyon eğer tek ya da çift bazı hedeften farklı olan diziyi içeriyorsa, MDB bu durumda seçimli şekilde hibritleşmeyi tayin edememekte fakat, tüm bazıları hedeften farklı dizi(NC) ile çalışıldığında elde edilen küçük sinyalden hareketle hibritleşmenin olmadığını ve bu indikatörün hedef dizi ile tüm bazıları hedeften farklı olan diziyi(NC) ayırt edebildiği görüldü.

Yeni bir hibridizasyon indikatörü olarak incelenen MDB adlı maddenin DNA ile etkileşimi, CPE kullanılarak incelendi. MDB indikatörü, interkalasyon yapan yani DNA'da baz çiftleri arasına yerleşen ve bu nedenle yüzeyde prob dizisi varken düşük, hibrit oluştuğunda ise baz çiftleri arasında birikim yapması nedeniyle yüksek sinyal veren bir madde olduğu tespit edildi. Maddenin sinyali $-0,14V$ 'da gözlemlendi.

3.3.2. Sentetik oligonükleotidler kullanılarak en iyi hedef konsantrasyonun tayini için yapılan çalışmada elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.3.2'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 19: 10ppm'lik prob dizisi ile çeşitli hedef dizi konsantrasyonlarındaki hedefin hibridizasyonu sonucu elde edilen MDB yanıtındaki değişim.

MDB-CPE çalışmaları için optimum hedef derişiminin bulunması için yapılan bu çalışmada yüzeyine 10ppm prob tutturulmuş elektrod artan konsantrasyonlarda hedef çözeltilerine daldırılarak hibridizasyon çalışması yapıldı. Bu çalışmaların sonucunda MDB sinyali artan hedef konsantrasyonu ile arttı ve en yüksek değerine 15ppm'lik hedef konsantrasyonunda ulaştığı gözlemlendi. Ayrıca, yüzeyde 10ppm prob varken en düşük değerde MDB sinyali, yüzeyde 10ppm prob ve 15ppm hedef içeren hibrit bulunduğu ise en yüksek değerde MDB sinyali elde edildi ve bu iki sinyal arasındaki fark göz önüne alınarak hibridizasyonun tayini yapıldı. MDB'nin düzlemsel

aromatik halkası, yüzeyde hibrit olduğunda baz çiftleri arasına girerek interkalasyon yaptığı için yüksek sinyaller alındığı gözlemlendi. CPE ile yapılan çalışmada bağıl standart sapma %9,74 olarak bulunmuştur.

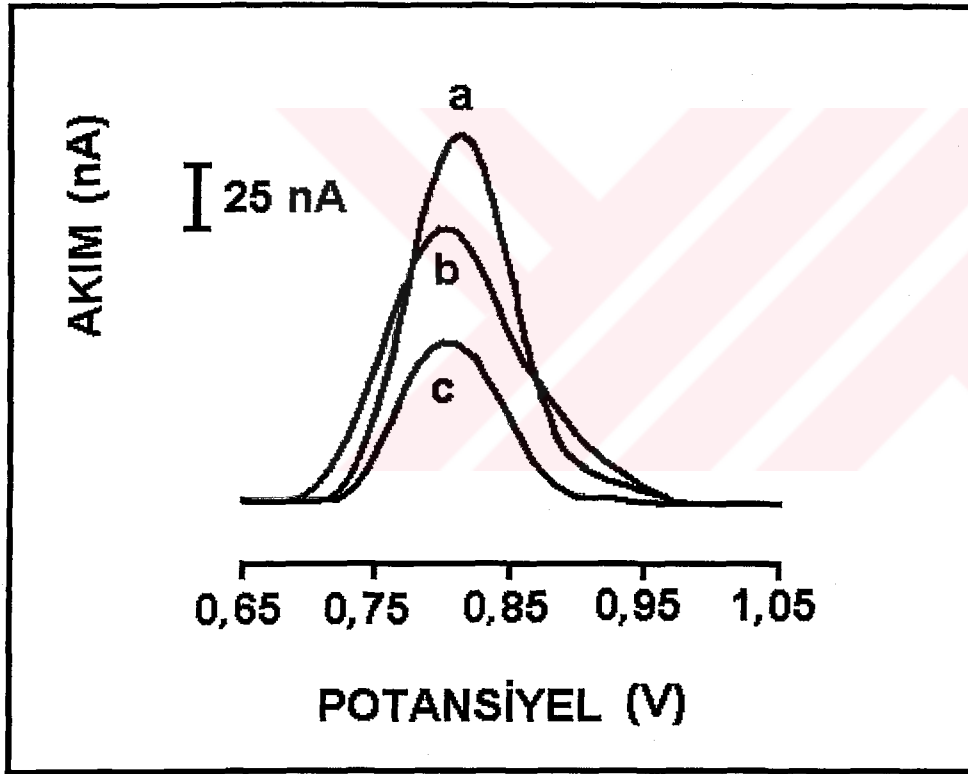
3.4. Fenol Ftalein(PPT) ile yapılan çalışmada elde edilen bulgular:

Bu çalışmaların tamamında GCE ile kullanıldı.

3.4.1. Fenol ftalein- DNA etkileşim çalışmasında elde edilen bulguların

değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.4.1'de anlatıldığı gibi yapıldı.



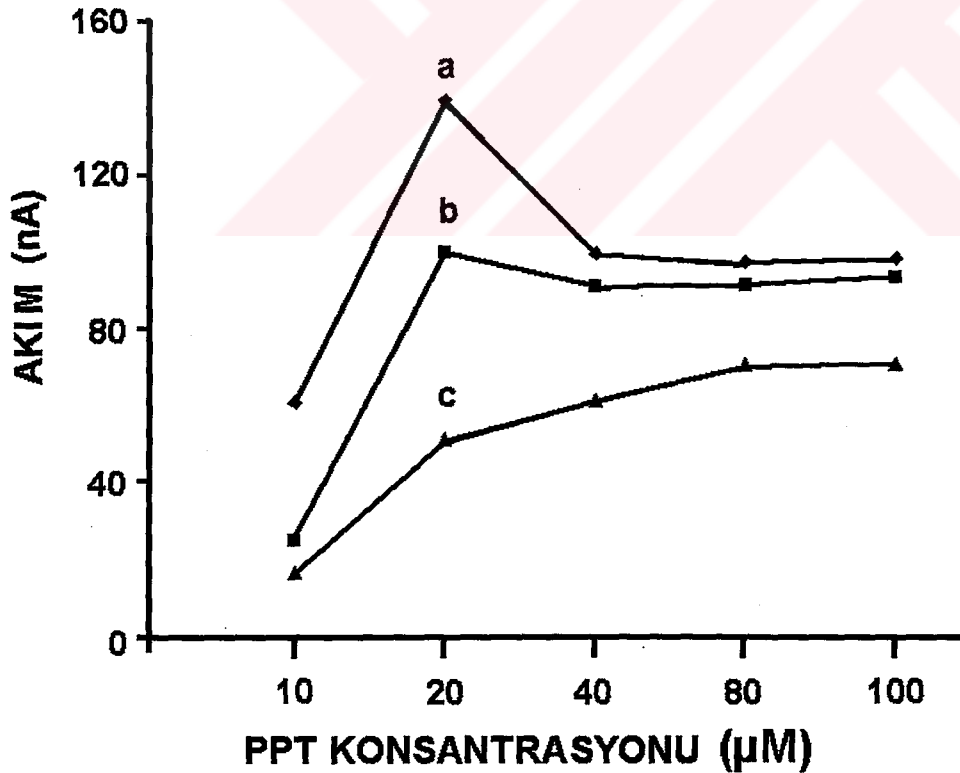
Şekil 20: Diferansiyel puls voltamogramında; (a) 10ppm ssDNA ile 20 μ M PPT'nin etkileşimi sonrasında elde edilen PPT yanıtı, (b) Yalnızca 20 μ M PPT'den elde edilen yanıt, (c) 10ppm dsDNA ile 20 μ M PPT'nin etkileşimi sonrasında elde edilen PPT yanıtı.

Aynı çözelti içinde bulunan DNA ve PPT belirli süre etkileşime bırakıldıktan sonra alınan diferansiyel puls voltamogramları incelendi ve 20 μ M PPT için elde edilen

voltamogram Şekil 20'de gösterildi. Bu sonuçlara göre, PPT'nin ssDNA ile yüksek yanıt vermesi açıkta bulunan DNA bazlarına spesifik bağlanarak tutunduğu şeklinde yorumlandı.(a) dsDNA ile PPT'nin nispeten düşük yanıt vermesi ise yüzeyde dsDNA varken PPT'nin az da olsa tutunabildiği gözlemlendi(c). Fakat yüzey boşken PPT'nin yüzeye adsorbsiyonu (b), yüzeyde dsDNA varken olan PPT adsorbsiyonundan daha fazla şekilde gözlemlendi.

3.4.2. Fenol ftalein konsantrasyon artışına bağlı olarak elde edilen serbest haldeki PPT sinyali, ssDNA ya bağlı haldeki PPT sinyali ve dsDNA'ya bağlı haldeki PPT sinyallerindeki değişikliklerin izlenmesi çalışmalarında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.4.2, yöntem 2.4.4.3 ve yöntem 2.4.4.4.'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 21: Grafik artan fenol ftalein(PPT) konsantrasyonlarına karşı GCE ile elde edilen yanıtları göstermektedir: (a) 10ppm ssDNA içerisine artan konsantrasyonlarda

PPT ilavesinden sonra elde edilen PPT yanıtı. (b) Sadece PPT içeren çözeltilerden elde edilen PPT yanıtları, (c) 10ppm dsDNA içerisine artan konsantrasyonlarda PPT ilavesi sonrası elde edilen PPT yanıtı.

PPT de MB gibi ssDNA ile etkileşimi dsDNA ile olan etkileşimine göre daha fazla olan bir maddedir. Bu özellik tespit edildikten sonra yine çözelti içerisinde yapılan ikinci bir çalışmada ise DNA derişimi sabit tutularak PPT derişimi arttırıldı ve yaklaşık +0,81 V'da elde edilen PPT sinyaline bağlı karşılaştırmalar yapılarak, Akım (nA) – konsantrasyon (μM) kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 21). PPT, ssDNA ile çözelti içinde etkileştiği zaman, aynı koşullarda dsDNA ile olan etkileşimine göre daha yüksek sinyaller vermektedir. Elde edilen bu sonuçlara göre PPT'nin ssDNA'ya daha fazla bağlanmayı tercih ettiği gözlenmiştir. Sonuç olarak 20 μM 'lık PPT ile hibridizasyon tayininin en iyi şekilde yapılabildiği bulundu.

Ayrıca sadece PPT içeren ve +0.81V civarında pik veren bu maddenin artan konsantrasyonlarda verdiği yanıtların pik yükseklikleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi.(Şekil 21,b)

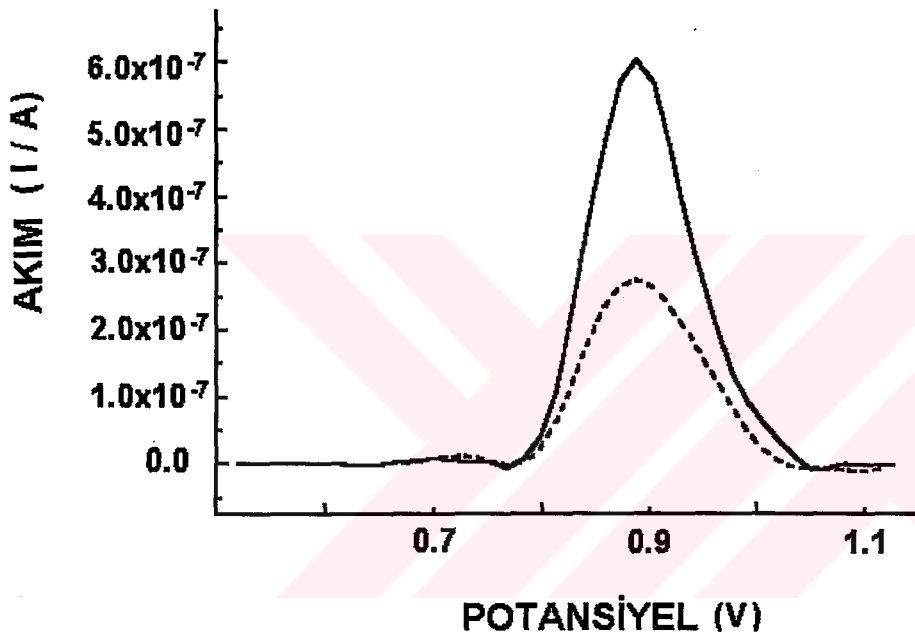
ssDNA veya dsDNA'ya bağlı haldeki PPT yanıtları ve serbest haldeki PPT yanıtları toplu olarak değerlendirilerek PPT için partiyon(dağılım katsayısı) hesaplanmış ve ssDNA ile PPT etkileşimi için partiyon katsayısı 0.41, dsDNA ile PPT etkileşimi için ise partiyon katsayısı 0.32 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada GCE ile alınan ölçümlerin bağıl standart sapması %9,2 olarak bulunmuştur.

3.5. Mitomisin C çalışmalarında elde edilen bulgular:

Tüm çalışmalarda SCPE (tek kullanımlık perde baskılı elektrod) kullanıldı.

3.5.1. dsDNA-Mitomycin C etkileşimi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.5.1'de anlatıldığı gibi yapıldı.



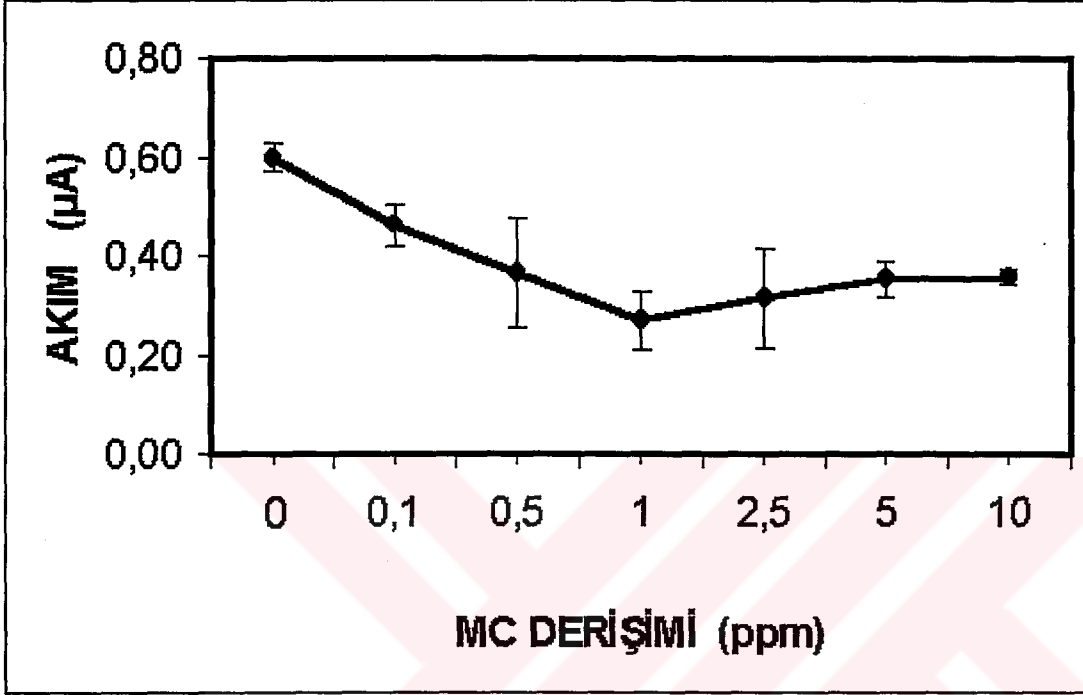
Şekil 22: Kare dalga voltamogramı, (—) ile gösterilen 20ppm dsDNA'dan elde edilen guanin yükseltgenme sinyali, (-----) ile gösterilen 1ppm Mitomisin C ile etkileşimden sonra 20ppm dsDNA'dan elde edilen guanin yükseltgenme sinyali.

MC ile yapılan ilk çalışmada yüzeyine 20ppm dsDNA tutturulmuş SCPE üzerine eklenen 60µl, 1ppm MC ile elektroda gerilim uygulanmadan sadece 2dk. etkileştirildiğinde, guanin bazından elde edilen sinyalde yarı yarıya azalma gözlemlendi.

3.5.2. Mitomisin C konsantrasyon artışı çalışmasında elde edilen

bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.5.2'de anlatıldığı gibi yapıldı.

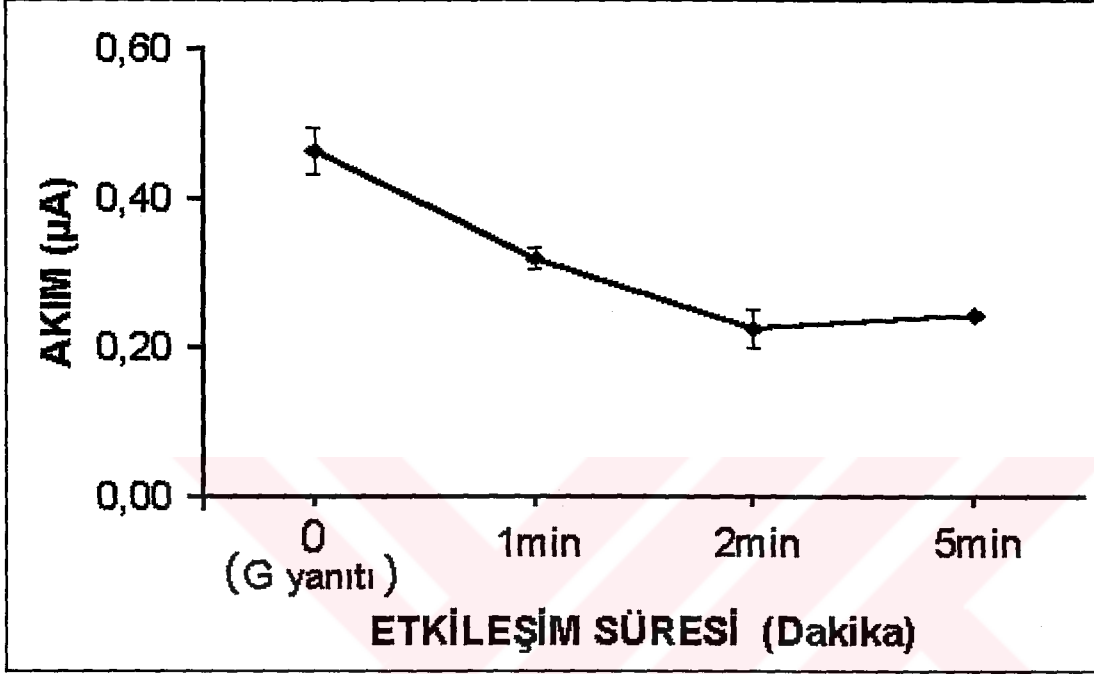


Şekil 23: Artan MC konsantrasyonlarına bağlı olarak dsDNA'daki guanin sinyalindeki azalma.

MC-DNA etkileşimi, artan MC konsantrasyonları ile de çalışıldı. Yüzeyine 20ppm dsDNA tutturulan SCPE'ler, 0,1 , 0,5 , 1, 2,5, 5 ve 10ppm konsantrasyonundaki MC çözeltileriyle sırayla etkileştirildi ve 1ppm konsantrasyonunda guanin sinyalinde yarı yarıya azalmaya neden olduğu bir kez daha gösterildi. 1ppm'lik MC konsantrasyonu ile etkileşimden sonra mitomisin C yanıtında doygunluk seviyesine ulaşıldı.

3.5.3. Mitomisin C etkileşim süresi çalışmasında elde edilen bulguların değerlendirilmesi:

Yöntem 2.4.5.3'de anlatıldığı gibi yapıldı.



Şekil 24: MC ile etkileşme süresine bağlı olarak dsDNA'daki guanin sinyalindeki azalma.

Optimum etkileşme zamanın belirlenmesi için etkileşim süresi tayini çalışması yapıldı; ve bu çalışma başlangıcında seçilen 2dk.'lık etkileşim süresinin guanin sinyalinde yarı yarıya azalma yapan etkileşim süresi olduğu görüldü.

Mitomisin C çalışmalarında SCPE ile tekrarlanabilirlik %5,9 bulunmuştur.

BÖLÜM IV

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada, ilk olarak çeşitli maddelerin DNA ile etkileşmesini incelemek amacıyla elektrokimyasal biyosensör tasarımını gerçekleştirildi. Bu amaçla yüzeyine dsDNA tutturulmuş karbon pastası elektrodu (CPE) ve camı karbon elektrodu(GCE) kullanarak, benzo[a]piren (BaP)'ın DNA ile etkileşim çalışması yapıldı. Karsinojenik bir bileşik olan BaP'ın guanin bazlarıyla oluşturduğu yan ürün (adduct) oluşumu da elektrokimyasal yöntemlerle tayin edildi. Ayrıca Mitomisin C(MC) adlı antikanser özellikte ve aynı zamanda çok toksik olan maddeyle de tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar (SCPE) kullanarak yine aynı şekilde dsDNA ile olan etkileşimi incelendi. Mitomisin C'nin DNA ile etkileşmesi, elektrokimyasal yolla ve tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar(SCPE) kullanılarak ilk defa tespit edilmiştir.

Çift sarmal DNA'daki guanin bazının oksidasyon sinyali üzerinden yapılan DNA-madde etkileşmesi çalışmalarında (BaP ve MC), madde ile etkileşimden sonra guanin sinyalindeki değişikliklere göre maddenin DNA'ya olan etkisi hakkında yorum yapıldı. Elektrokimyasal tayin yöntemi olarak diferansiyel puls voltametri (DPV) ve kare dalga voltametri (SWV) kullanıldı.

Çalışmada hibridizasyon indikatörü olarak kullanılabilir çeşitli boyar maddelerin DNA ile etkileşimi de karbon pastası elektrodu (CPE), camı karbon elektrodu(GCE), altın elektrod(AuE) ve tek kullanımlık perde baskılı altın elektrod (Au-SCPE) kullanılarak incelendi. Hibridizasyonun tayinindeki amaç, eğer sentetik oligonükleotit dizileriyle bu tayin yapılabilirse, genetik dizisi belirlenmiş bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların tayini de mümkün olacaktır.

Çalışılan maddeler, metilen mavisi (MB), meldola mavisi (MDB) ve fenolftalein (PPT)'dir. Bu maddelerin DNA ile etkileşimi çözelti içinde ve adsorptif transfer sıyırma CV (ATSCV) yöntemi kullanılarak incelendi. ATSCV yöntemi maddelerin hiçbir potansiyel uygulanmadan (açık devre) veya kovalent bağlar gibi yardımcı madde kullanmadan DNA'yla etkileşimine dayalıdır. Ayrıca MB ile ve altın elektrodlarla yapılan tayinlerde DNA'yı elektrot yüzeyine çok daha güçlü şekilde tutturabilmek amacıyla çeşitli kovalent bağlanma ajanları kullanıldı. MB'nin guanin bazına özgün olarak bağlanma yapması nedeniyle, tek sarmal DNA ve ayrıca prob dizisi ile daha yüksek yanıtlar verdiği gözlemlendi. Düzlemsel bir aromatik halkaya sahip olan MDB'nin hibrit oluştuğunda bazlar arasına yerleşerek interkalasyon yaptığı ve böylece elektrot yüzeyinde hibrit oluşumu gerçekleştiği zaman daha yüksek yanıtlar verdiği gözlemlendi.

2001 yılında FDA tarafından karsinojen maddeler listesine alınan PPT'nin DNA ile etkileşimi elektrokimyasal yöntemle kapsamlı olarak incelemesi yapıldı. PPT'nin ssDNA ile olan etkileşiminden sonra dsDNA ile olan etkileşimine göre çok daha yüksek bir PPT sinyali elde edilmesi bu maddenin de etkileşim mekanizmasının MB'ya benzer şekilde olduğu bulundu;(yüzeyde ssDNA ya da prob dizisi varken PPT açıkta olan guanin bazlarına bağlanarak birikme yaptığı ve dolayısı ile elde edilen PPT sinyalinin arttığı gözlemlendi.)

MB, MDB ve PPT'in tüm bu çalışmalar sonucunda DNA'daki hibridizasyonun tayin edilmesinde elektrokimyasal DNA hibridizasyon indikatörü olarak kullanılabileceği gösterildi.

Sonuç olarak, baz dizilimi belli olan sentetik oligonükleotitlerin kullanılmasıyla DNA hibridizasyonunun, elektrokimyasal indikatörlerin varlığında tayinini olanaklı kılan bu yöntem, mevcut yöntemlerle kıyaslandığında çok daha kısa sürede ve düşük maliyetle hibridizasyon tayini yapabilen ve yakın gelecekte piyasaya sürülecek olan

DNA mikroçiplerinin altında yatan teknolojiyi oluşturan bir yöntemdir. Hibridizasyon tayini için elektrokimyasal indikatör amaçlı olarak incelenen maddelerin her biri ile başarılı sonuçlar elde edildi. Özellikle de MB'nun altın elektrotlarla, kovalent ajanlar ve PNA kullanılarak hazırlanan sistemde kullanılması, nokta mutasyonunun tayinini mümkün kılması açısından çok önemlidir. MB, prob dizisinde bulunan serbest guanin bazları ile etkileştiği zaman, hedef dizilerde bulunan nokta mutasyonlarına karşı güvenilir ve ayırt edici ölçümler yapılabilir. Biyosensör teknolojisindeki en temel ve önemli amaçları seçicilik ve güvenilirlik olduğundan MB'nun bu yönden de incelenmesi yapılmış oldu. MB, MDB ve PPT'nin elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde indikatör olarak kullanılmasının iyi sonuçlar vereceğine ve ileride bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların tayininde kullanılabileceğine inanıyoruz.

Ayrıca bu çalışma ile hibridizasyon tayini dışında çeşitli toksik moleküllerin de DNA ile olan etkileşimi elektrokimyasal yöntemle, farklı elektrotlar kullanılarak tayin edildi ve çeşitli maddelerle DNA'nın etkileşiminin tayininin yine tasarımı yapılan bu biyosensörle mümkün olacağı gösterilmiş oldu.

Çalışmada elde edilen tüm bulguların sonuçları, Tablo 1'de özetlenmiştir:

Madde türü	İncelemenin yapıldığı sinyal		Sinyalin voltamogramdaki yeri (V)	İncelemede kullanılan DNA materyalinin türü			SONUÇ
	Madde sinyali	DNA'daki G bazının sinyali		dsDNA	ssDNA	Sentetik oligonükleotid dizisi (prob ve hedef)	
BaP	-	+	+1,0 V (yükselfgenme sinyali)	+	-	-	dsDNA(G _{sinyali}) > BaP ile etkileşmiş dsDNA(G _{sinyali})
MB	+	-	-0,20 V (indirgenme sinyali)	+	+	+	1) MB sinyali _(ssDNA+MB) > MB sinyali _(yalnız MB) > MB sinyali _(dsDNA+MB) (29,31) 2) MB sinyali _(PROB+MB) > MB sinyali _(yalnız MB) > MB sinyali _(HBRIT+MB)
MDB	+	-	-0,14 V (indirgenme sinyali)	-	-	+	MDB sinyali _(HBRIT+MDB) > MDB sinyali _(yalnız MDB) > MDB sinyali _(PROB+MDB)
PPT	+	-	+0,81 V (yükselfgenme sinyali)	+	+	-	PPT sinyali _(ssDNA+PPT) > PPT sinyali _(yalnız PPT) > PPT sinyali _(dsDNA+PPT)
MC	-	+	+1,0 V (yükselfgenme sinyali)	+	-	-	dsDNA(G _{sinyali}) > MC ile etkileşmiş dsDNA(G _{sinyali})

ÖZET

Çalışmamızda ilk olarak polisiklik aromatik hidrokarbon yapısındaki benzo[a]piren (BaP)'nin DNA ile olan etkileşmesi, elektrokimyasal yöntemle, karbon pastası elektrodu(CPE) ve camı karbon elektrot(GCE) kullanılarak incelendi. Metilen mavisi (MB), meldola mavisi (MDB) ve fenolftalein (PPT) gibi organik boyar maddelerin elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde hibridizasyon indikatörü olarak kullanılıp kullanılmayacağı, CPE, GCE, altın elektrot (AuE) ve tek kullanımlık perde baskılı altın elektrotlar (Au-SCPE) kullanılarak incelendi. Çift sarmal DNA (dsDNA), tek sarmal DNA (ssDNA) ile etkileşme çalışmaları tamamlandıktan sonra çeşitli kısa DNA dizileriyle(oligonükleotitlerle) yapılan hibridizasyon ve hibridizasyonun seçimliliği gibi çalışmaların sonucunda bu maddelerin verdiği yanıtlar arasındaki farklılıklar elektrokimyasal tayin yöntemlerinden diferansiyel puls voltametri tekniği (DPV), dönüşümlü voltametri tekniği (CV) veya kare dalga voltametri tekniği (SWV) kullanılarak incelendi. Ayrıca antikanser özellikte ve aynı zamanda çok toksik olan Mitomisin C maddesinin dsDNA ile etkileşim çalışmasını tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar (SCPE) kullanarak SWV ile incelendi.

Deneysel parametrelerdeki farklılıklar (ortam ve pH, madde konsantrasyonu, DNA derişimi, madde-DNA etkileşme süresi) DPV veya SWV teknikleriyle incelendi.

BaP'in dsDNA ile etkileşim çalışmasında madde konsantrasyonunun artışına bağlı olarak BaP sinyalinde, yan ürün sinyalinde ve guanin bazının sinyalinde meydana gelen değişiklikler CPE kullanılarak DPV yöntemiyle incelendi. BaP'nin DNA'nın guanin bazlarına seçimli bağlanarak etkileşimde bulunduğu saptanmıştır.

MB'nin ssDNA ve dsDNA ile etkileşiminin yanısıra özellikle çeşitli oligonükleotidlerle yapılan ve hedef konsantrasyonunun artışına bağlı olarak elde edilen yanıtlar incelenmiştir. MB ve altın elektrotlarla yapılan bu çalışmada denenen yüzey modifikasyon tekniği ile DNA'nın sentetik analogu olan PNA dizileri kullanılarak daha seçimli bir şekilde hibridizasyon tayini gerçekleştirilmiştir. MB'nin DNA ile etkileşmesi sonucunda elde edilen voltametrik sinyallere bakıldığında ssDNA tutturulmuş elektrot ile en yüksek MB sinyali gözlenmiştir. Sadece elektrot ve dsDNA tutturulmuş elektrot ile elde edilen MB sinyalleri ssDNA tutturulmuş elektrottan elde edilen sinyalden sırasıyla daha küçüktür. *interpret:*

PPT'nin DNA ile etkileşiminin MB'ya benzer olduğu bulunmuştur. Buna karşın MDB ile DNA'nın etkileşmesi sonucunda elde edilen voltametrik sinyaller azalan şekilde sırasıyla; hibrit tutturulmuş CPE, CPE, prob dizisi tutturulmuş CPE olarak bulunmuştur.

MB, MDB ve PPT'nin belirli koşullar altında elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımında hibridizasyon indikatörü olarak kullanılabileceği bulunmuştur. *pab*

Mitomisin C'nin DNA ile etkileşmesine dayalı çalışmada ise dsDNA ile maddenin etkileşimi guanin sinyalindeki değişim üzerinden incelenmiştir. Bu çalışmada ayrıca madde konsantrasyonunun ve etkileşim süresinin guanin sinyaline olan etkisi de incelenmiştir. Bu çalışmaya ait sonuçlara bakıldığında, MC ile sadece 1ppm'lik madde konsantrasyonunda ve 2dk'lık etkileşim sonrasında guanin sinyalinde yarı yarıya azalma meydana geldiği gözlenmiştir.

ABSTRACT

In our investigations firstly the interaction of BaP which is in polycyclic aromatic hydrocarbon structure with DNA, by electrochemical method, by using carbon paste electrode(CPE) and glassy carbon electrode(GCE), is observed. As to whether some materials like methylene blue (MB), meldola blue (MDB) and phenolphthalein (PPT) can be used in DNA biosensors as hybridization indicator is investigated by CPE, GCE, gold electrode (AuE), gold screen-printed electrode (Au-SCPE). The interaction of double stranded DNA (dsDNA), single stranded DNA (ssDNA) and some short DNA oligonucleotides with these compounds were studied by using voltammetric methods such as differential pulse voltammetry (DPV), cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV). Furthermore, the interaction of Mitomycin C(MC), which is anti-carcinogenic and toxic agent, with dsDNA by using disposable carbon screen-printed electrodes (SCPE) is studied.

The difference in the experimental parameters for these studies, (buffer solution and pH, the concentration of compound, the concentration of DNA and the interaction time of DNA with the compound) was studied by using DPV, CV, SWV techniques.

In this study, the interaction of BaP with dsDNA, the character of BaP signal depending on the substance molarity increase, the changes that occur in adduct signal and guanine base signal are observed by using DPV technique and CPE. At the end of this study, it is found that BaP can interact by bounding guanine bases selectively. Besides the interaction of MB with ssDNA, dsDNA especially results that obtained from certain oligonucleotides and increase of target concentration are

observed. In addition, with the surface modification technique that was tried in this MB and gold electrode study, more selectively hybridization detection is performed by using PNA which is synthetic analogue of DNA.

When the voltametric signals are examined that resulted from the interaction of MB and DNA, the highest signal of MB is observed from ssDNA modified electrode. MB signals that result from only electrode and dsDNA modified electrode are smaller than the preceding signal orderly.

It was found that the interaction of PPT with dsDNA is similar to MB. However, the voltammetric signals that result from the interaction of MDB and DNA are observed to be hybrid modified CPE, CPE and probe modified CPE in decreasing order.

It was found that MB, MDB and PPT can be used in electrochemical DNA biosensor design as a hybridization indicator under certain conditions.

In the study of the interaction of MC and DNA, the interaction of dsDNA with this compound is observed on guanine signal. Also in this study the effect of the concentration of compound and the interaction time on guanine signal is examined. When the results of this study is determined, double fold decrease in guanine signal occur due to the interaction of MC and only 1ppm substance molarity in 2 minutes.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. 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.
2. Barry, J.P., Barry, J.P., Norwood, C., Vouros, P., (1996). Detection and identification of Benzo[a]pyrene diol epoxide adducts to DNA utilizing capillary electrophoresis- electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 68: 1432-1438.
3. Barton, J.K., Goldberg, J.M., Kumar, C.V. , Turro, N.J., (1986). Binding modes and base specificity of tris (phenantroline) ruthenium (II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity", *J. Am. Chem. Soc.*, 108: 2081-2088.
4. 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.
5. Bertino, J.R. (1992). Antineoplastic Drugs, *Textbook of Pharmacology*, Smith, C.M. and Reynard, A.M., *Section IX - Cancer Chemotherapy*; W. B. Saunders Company, USA; 957-958.
6. Brabec, V. (1983). Conformational changes in DNA induced by its adsorption at negatively charged surfaces - The effects of base composition in DNA and the chemical nature of the adsorbent, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 11: 245-255.

7. Brabec, V., Dryhurst, G. (1978). Electrochemical behaviour of natural and biosynthetic polynucleotides at the pyrolytic graphite electrode a new probe for studies of polynucleotide structure and reactions, *Electroanal. Chem.*, 89: 161-173.
8. Brabec, V., Koudelka, J. (1980). Oxidation of deoxyribonucleic acid at carbon electrodes. The effect of the quality of the deoxyribonucleic acid sample, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 7: 793-805.
9. 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.
10. Brett, A.M. Oliveira, Serrano, S.H.P., Gutz, I., La-Scalea, M.A., Cruz, M.L. (1997). Voltammetric behaviour of nitroimidazoles at a DNA-biosensor, *Electroanalysis*, 9: 1132-1137.
11. Brett, A.M. Oliveira, Serrano, S.H.P., Macedo, T.A., Raimundo, D., Marques, M. H., La-Scalea, M.A. (1996). Electrochemical determination of Carboplatin in serum using a DNA-modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis*, 8: 992-995.
12. Brett, C.M.A., Brett, A.M.O. (1992). *Electrochemistry*, Oxford University Press, 3.baskı
13. 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.
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 electrodes", *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 40: 41-47.

15. Cai, X., Rivas, G., Shirashi, H., Farias, P., Wang, J., Tomschik, M., Jelen, F., Palecek, E. (1997). Electrochemical analysis of formation of polynucleotide complexes in solution and at electrode surfaces, *Anal. Chim. Acta*, 344: 65-76.
16. Camman, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B. (1991). Chemical Sensors and Biosensors-Principles and Applications, *Angew. Chem. Int. De.Engl.*, 30: 516-539.
17. 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.
18. Carter, M.T., Rodriguez, M., Bard, A.J. (1989) Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris chelated complexes of Cobalt (III) and Iron (II) with 1,10-phenanthroline and 2, 2'-Bipyridine, *J. Am. Chem. Soc.*, 111: 8901-8911.
19. Chiti, G., Marazza, G., Mascini, M. (2001). Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring, *Anal. Chim. Acta*, 427: 155-164.
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. (1991). What is a Biosensor?, *Chapter 1; Biosensor principles and applications*, Editörler; L.J.Blum, P.R. Coulet, Marcel Dekker Inc., New York, 1-6.
22. Deforce, D.L.D., Ryniers, F.P.K., Van den Eeckhout, E.G., Lemiere, F. Esmans, E.L.(1996). Analysis of DNA adducts in DNA hydrolysates by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 68: 3575-3584.

23. Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M.S., Pfeifer, G.P. (1996). Preferential formation of Benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in p53, *Science*, 274: 430-432.
24. Dervan, P.B. (1986). Design of Sequence-specific DNA-binding molecules, *Science*, 232: 464-471.
25. 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.
26. DNA structure and Function; Chapter 1- Introduction to the Structure, properties, and reactions of DNA; Editör, R. R. Sinden, Academic Press, California, 1994, sayfa 1-57.
27. Enstrümental Analiz, Prof. Dr. Atilla Yıldız ve Prof. Dr. Ömer Genç, Hacettepe Yayınları A-64, 1993, sayfa;289-384.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
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. Evans; A.(1991). Potentiometry and ISE , ACOL, London, s.106-198.

33. Farmakoloji - İlaç uygulamalarında temel kavramlar, (1992). 63.Bölüm: Antikanser İlaçlar, Editör, Prof. Dr. İsmet Dökmeci, Nobel Tıp Kitabevleri, 819-848.
34. Firedman, T., Borown, D.M. (1978). Base specific reactions useful for DNA sequencing: methylene blue – sensitized photooxidation of guanine and osmium tetroxidemodification of thymine, *Nucl. Acids Res.*, 5: 615-623.
35. Fleisher, M.B., Mei, H.-Y. and Barton, J.K. (1998). Metal complexes which target DNA sites: coupling recognition to reactivity, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2: Ed. Eckstein, F. and Lilley, D.M.J., Springer-Verlag, Berlin, s.65-84.
36. 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.
37. Fujimoto, B.S., Clendenning, J.B., Delrow, J.J., Heath, P.J., Schurr, M. (1994). Fluorescence and photobleaching studies of methylene blue binding to DNA, *J. Phys. Chem.*, 98: 6633-6643.
38. Gooding J.J. (2002). Electrochemical DNA hybridization biosensors, *Electroanal.* 14: 1149.
39. Gooding, J.J., Pugliano, L., Hibbert, D.B., Erokhin, P. (2000). Amperometric biosensor with enzyme amplification fabricated using self-assembled monolayers of alkanethiols: the influence of spatial distribution of enzymes, *Electrochemistry Communications*, 2: 217-221.
40. Hall, E.A.H.(1990). Biosensors, Ch.1: Biosensors in context , Open University Press, İngiltere; s.3-30.
41. Herne, T.M., Tarlov, M.J.(1997). Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 8916-8920.

42. Hibbert, D.B., Gooding, J.J., Erokhin, P.(2002). Kinetics of irreversible adsorption with diffusion: application to biomolecule immobilization" *Langmuir*, 18: 1770-1776
43. Hodgson, J. ,(1998). Shrinking DNA diagnostics to fill the markets of the future, *Nature Biotech.*, 16: 725-727.
44. Hogue, C.(2000). Identifying carcinogens, *Chem.&Eng. News*, 76: 8-9.
45. Jelen, F., Fojta, M., Palecek, E. (1997). Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNAs, *J. Electroanal. Chem.*, 427: 49-56.
46. Jelen, F., Tomschik, M., Palecek, E.(1997). Adsorptive stripping square-wave voltammetry of DNA, *J. Electroanal. Chem.*, 423: 141-148.
47. 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.
48. Johnston, D.H., Thorp, H.H.(1996). Cyclic voltammetry studies of polynucleotide binding and oxidation by metal complexes: Homogeneous electron-transfer kinetics, *J. Physc. Chem.*, 100: 13837-13843.
49. Johnston, D.H., Welch, T.W., Thorp, H.H.(1996). Electrochemically activated nucleic acid oxidation; Metal Ions in Biological systems, Ed. Sigel, A., Sigel, H.; Vol. 33: Marcel Dekker, Inc, NY; 299-324.
50. Ju, H., Zhou, J., Cai, C., Chen, H. (1995). The electrochemical behavior of methylene blue at a microcylinder carbon fiber electrode, *Electroanal.*, 7: 1165-1170.
51. Kelley, S. O., Barton, J.K. (1997). Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode, *Bioconjugate Chem.*, 8: 1997, 31-37.

52. Kelley, S. O., Holmlin, R. E., Stemp, E.D.A. and Barton, J.K. (1997). Photoinduced electron transfer in Ethidium-modified DNA duplexes: dependence on distance and base stacking, *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 9861-9870.
53. 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.
54. Kerman et al. (2002). Voltametric determination of DNA hybridization using methylene blue and self assembled monolayer on gold electrodes, *Anal. Chim. Acta*, 462: 39-47.
55. Kolakowski, B., Battaglini, F., Lee, Y.S., Giannoula, K., Mikkelsen, S.R. (1996). Comparison of an intercalating dye and an intercalant-enzyme conjugate for DNA detection in a microtiter-based assay", *Anal. Chem.*, 68: 1197-1200.
56. Kulys, J., Hansen, H.E., Buch-Rasmussen, T., Wang, J., Ozsoz, M. (1994). Glucose biosensor based on the incorporation of Meldola Blue and glucose oxidase within carbon paste, *Anal. Chim. Acta*, 288: 193-196.
57. 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.
58. Liu, J., Abid, S., Hail, M.E., Lee, M.S., Hangeland, J., Zein, N. (1998). Use of affinity capillary electrophoresis for the study of protein and drug interactions, *Analyst*, 123: 1455-1459.
59. Liu, S., Ye, J., He, P. ve Fang, Y. (1996). Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode", *Anal. Chim. Acta*, 335: 239-243.

60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Marazza, G., Chianella, I., Mascini, M. (1999). *Anal. Chim. Acta*, 387: 297-307.
64. Marin, D., Perez, P., Teijeiro, C., Palecek, E. (1998). Interactions of surface-confined DNA with acid-activated mitomycin C , *Biophysical Chemistry*, 75: 87-95.
65. Mascini, M. (2001). Affinity electrochemical biosensors for the pollution control, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 73: No. 1, pp.23-30
66. 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.
67. Mikkelsen, S.R. (1996). Electrochemical biosensors for DNA sequence detection- a review , *Electroanalysis*, 8 (1): 15-19.
68. 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)*.
69. Millan K.M., Mikkelsen, S.R. (1993) *Anal. Chem.* 65: 2317.
70. Millan, K.M., Mikkelsen, S.R. (1993). Sequence-selective biosensor for DNA Based on electroactive hybridization indicators, *Anal. Chem.*, 65: 2317-2323.

71. 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.
72. Millan, K.M., Spurmanis, A. J., Mikkelsen, S.R.(1992). Covalent immobilization of DNA onto glassy carbon electrodes, *Electroanalysis*, 4: 929-932.
73. Modern Drug Discovery (1999) Milestones of antisense oligonucleotide therapeutics, Editör, J.F. Ryan, Washington DC, 1-2: sayfa 68.
74. Molinier-Jumel, C., Malfoy, B., Reynaud, J. A. and Aubel-Sadron, G. (1978). Electrochemical study of DNA-Anthracyclines interactions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 84(2): 441-449.
75. Müller, W., Crothers, D.M. (1975). Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids", *Eur. J. Biochem.*, 54: 267-277.
76. Nielsen, P. E. (1999). Peptide nucleic acids as therapeutic agents, *Current Opinion in Structural Biology*, 9(3): 353-357.
77. Nielsen, P.E. (1999). Applications of peptide nucleic acids, *Current Opinion in Biotechnology*, 10(1): 71-75 .
78. Ozkan et al.(2002). Electrochemical detection of hybridization using peptid nucleic acids and methylene blue on self assembled monolayer modified gold electrodes, *Electrochemistry Communications*, 4: 796-802.
79. Palecek E., Fojta M. (2001) Detecting DNA hybridization and damage, *Anal. Chem.*, 73: 74A
80. Palecek, E. (1996). From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid Modified Electrodes, *Electroanalysis*, 8 (1): 7-14.

81. Palecek, E.(1994). Probing of DNA structure with osmium tetroxide complexes in vitro and in cells, Editörler; F. Eckstein ve D.M.J. Lilley, *Nucleic acids and Molecular Biology*, Vol. 8: Springer-Verlag Berlin, 1994, 1-13.
82. Palecek, E. (1988). Adsorptive transfer stripping voltammetry: determination of nanogram quantities of DNA immobilized at the electrode surface, *Anal. Biochem.*, 170: 421-431.
83. Palecek, E.(1988). New trends in electrochemical analysis of nucleic acids, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 20: 179-194.
84. Palecek, E.(1995). Nucleic acids: electrochemical and immunochemical methods, *Encyclopedia of Analytical Science* (ed. by Alan Townshend), London, *Academic press*, Vol. 6: 3600-3609.
85. Palecek, E., Jelen, F. (1980). Interaction of nucleic acids with electrically charged surface. VIII. Dependence of changes in DNA double helical structure on pH and on potential of the mercury electrode, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 7: 317-332.
86. Palecek, E., Postbieglova, I. (1986). Adsorptive stripping voltammetry of biomacromolecules with transfer of the adsorbed layer, *J. Electroanal. Chem.*, 214: 359-371.
87. Pandey, P.C., Weetall, H.H. (1994). Application of photochemical reaction in electrochemical detection of DNA intercalation, *Anal. Chem.*, 66: 1236-1241.
88. Pandey, P.C., Weetall, H.H. (1995). Detection of aromatic compounds based on DNA intercalation using an evanescent wave sensor, *Anal. Chem.*, 67: 787-792.
89. Pang, D. and Abruna, H.D.(1998). Micromethod for the investigation of the interaction between DNA and redox-active molecules, *Anal. Chem.*, 70: 3162-3169.

90. Paz, M.M., Das, A., Tomasz, M. (1999). Mitomycin C linked to DNA minor groove binding and cross-linking properties and in vitro antitumor activity, *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, 7: 2713-2726.
91. Perez, P., Teijeiro, C., Marin, D.(1999). Interactions of surface-confined DNA with electroreduced mitomycin C comparison with acid-activated mitomycin C , *Chemico-Biological Interactions*, 117: 65-81.
92. Pietrzyk, D.J.; Frank, C.W.(1979). *Analytical Chemistry*, 2.Baskı, *Academic press*: s.226- 239.
93. Plambeck, J.A., Lown, J.W.(1984). Electrochemical Studies of antitumor antibiotics: V. An electrochemical method of measurement of the binding of Doxorubicin and Daunorubicin derivatives to DNA, *J.Electrochem. Soc.*, 131 (11): 2556-2563.
94. Pvidori, M.I., Merkoçi, A., Alegret, S. (2000). Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods, *Biosensors and Bioelectronics*, 15: 291-303.
95. Reyderman, L. ve Stavchansky, S.(1997). Quantitative determination of short single-stranded oligonucleotides from blood plasma using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence, *Anal. Chem.*, 69: 3218-3222.
96. Richardson, C. L., Springfield, G.E.S. et al., Intercalation inhibition assay for compounds that interact with DNA or RNA, *Amerikan patent no; 4,257,774* / 24 Mart 1981).
97. Service R.F.(1998). New focus: Microchip arrays put DNA on the spot, *Science*, 282: 396.
98. Steel, A. B., Herne, T.M. , Tarlov, M.J.(1998). Electrochemical Quantitation of DNA immobilized on gold, *Anal. Chem.*, 70: 4670-4677.

99. Steinbach, P.B., Hurtubise, R.J.(2000). Fluorescence of tetrols, tetrols complexed with DNA and benzo[a]pyrene-DNA adducts in methanol / water solutions, *Appl. Spect.*, 54: 287-293.
100. Takenaka, S., Ihara, T., Takagi, M.(1990). Bis-9 acridinyl derivative containing a viologen linker chain: electrochemically active intercalator for reversible labelling of DNA, *J. Chem. Soc., Chem. Communications*, 21: 1485-1487.
101. 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.
102. Teijeiro, C., Perez, P., Marin, D., Palecek, E.(1995). Cyclic voltammetry of mitomycin C and DNA , *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 38: 77-83.
103. 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.
104. Thayer, A.M. (30 Ağustos 1999). Deciphering Diseases, Chemical & Engineering News, Ed. by M. Jacobs, American Chemical Society, North Carolina, 19-28.
105. The Merck Index, (1989). Editör S. Budavari, Merck and Co. Inc., 11. baskı(Eleventh edition).
106. Thorp, H.Holden.(1998). Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation, *Trends in Biotechnology*, 16: 117-121.
107. Tice, R. R., Furedi-Machacek, M., Satterfield, D., Udumudi, A., Vasquez, M., Dunnick, J. K.(1998). Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the p53 gene, *Enviro. & Molec. Mutagenesis*, 31:113-124.

108. Tomschik, M., Jelen, F., Havran, L., Trnkova, L., Nielsen, P.E., Palecek, E.(1999). Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes, *J. Electroanal. Chem.*, 476: 71-80.
109. Tuite, E., Norden, B.(1994). Sequence-specific interactions of methylene blue with polynucleotides and DNA : A spectroscopic study, *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 7548-7556.
110. Turner, A.P.F.(1987). Biosensors: Fundamentals and Applications, Editörler; Turner, A.P.F., Karube, I. and Wilson, G.S.; Oxford University Press, Oxford, sayfa v-vii.
111. Wang et al. (1997). DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A Review, *Anal. Chim.Acta* , 347: 1.
112. Wang et al.(1996). Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors, *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 7667-7670.
113. Wang, A.H.-J.(1987). Interactions between antitumor drugs and DNA, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.1: 52-69. (Editörleri; Eckstein, F., Lilley, D.M.J., Springer-Verlag Berlin Heidelberg - Germany)
114. Wang, J.(1998). DNA biosensors based on Peptide nucleic acid (PNA) recognition layers. A review , *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 757-762.
115. Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H.(1996). Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes, *Anal. Chim. Acta*, 326: 141-147.
116. 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.
117. Wang, J., Fernandes, J.R., Kubota, L.T.(1998). Polishable and renewable DNA hybridization biosensors, *Anal. Chem.*, 70: 3699-3702.

118. 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-...
119. Wang, J., Kawde, A.N., Erdem, A., Salazar, M.(2001). Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Analyst*, 126: 2020-2024.
120. 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.
121. 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.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. 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.

126. 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 enviromental monitoring-A review , *Anal. Chim. Acta*, 347: 1-8.
127. 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.
128. 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.
129. Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F.S., Dontha, N., "DNA-modified electrode for the detection of aromatic amines", *Anal. Chem.*, 68, (1996), 4365-4369.
130. 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.
131. Wang, J., Rivas, G., Ozsoz, M., Grant, D.H., Cai, X., Parrodo, C.(1997). Microfabricated electrochemical sensor for the detection of radiation-induced DNA damage, *Anal. Chem.*, 69: 1457-1460.
132. Wilson, E.K. (1998). Instant DNA detection, *Chem. & Eng. News*, 76 (21): 47.
133. Xia, C., Guoli, S., Jianhui, J., Ruqin, Y.(1999). Intercalation of Pharmorubicin anticancer drug to DNA studied by cyclic voltammetry with analytical applications, *Anal. Lett.*, 32 (4): 717-727.

134. Yan F., Erdem A., Meric B., Kerman K., Ozsoz M., Sadik O.A. (2001). Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to microcystis species, *Electrochem. Commun.*, 3: 224.
135. Yang, M., McGovern, M.E., Thompson, M.(1997). Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry", *Anal. Chim. Acta*, 346: 259-275.



ÖZGEÇMİŞ VE YAYIN LİSTESİ

Arş. Gör. Dilşat ÖZKAN

Doğum Tarihi: 31 / 08 / 1978

Doğum Yeri: Erzincan

Yabancı Dil: İngilizce (iyi)

Medeni hali: Bekar

Eğitim:

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

Lisans Eğitimi:

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

Yüksek Lisans Eğitimi:

Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı (Ekim 1999).

Görevleri:

- Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalında Arastırma Görevlisi (15 / 12 / 2000)

Yürüttüğü Tez Çalışmaları:

- **Y.Lisans Tez Konusu:** Elektrokimyasal hibridizasyon indikatörleri ve DNA biyosensörlerinde kullanılmasının incelenmesi (Ekim 1999).

Tamamladığı ve Halen Yürüttüğü Proje Çalışmaları:

- Elektrokimyasal hibridizasyon indikatörleri ve DNA biyosensörlerinde kullanılmasının incelenmesi (Ege Üniversitesi Proje Koordinatörlüğü, Proje No:95/ECZ/010); 2000 - halen devam etmektedir.
- Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri (EBİLTEM projesi - Proje No: 2000 / BİL / 031); 2000- halen devam etmektedir.
- Genetik ve bazı bulaşıcı hastalıkların tanınması için elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımı (DPT Projesi), Ocak 2002- Halen devam etmektedir.

YAYINLAR

1. ARZUM ERDEM, DILSAT OZKAN, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, TAYFUN DALBASTI, MEHMET OZSOZ, " Ion-selective Membrane Electrode for the Determination of A Novel Phenylpiperazine Anti-Depressant, Nefazodone ", **TURKISH JOURNAL of CHEMISTRY**, 2000, 24, 353-360.
2. ARZUM ERDEM, DILSAT OZKAN, BURCU MERIC, KAGAN KERMAN, MEHMET OZSOZ, " Incorporation of EDTA for the elimination of metal inhibitory effects in an amperometric biosensor based on mushroom tissue polyphenol oxidase", **TURKISH JOURNAL of CHEMISTRY**, 2001, 25, 231-239.
3. KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, DILSAT OZKAN, PINAR KARA ARZUM ERDEM and MEHMET OZSOZ, "Electrochemical DNA biosensor for the determination of Benzo[a]pyrene - DNA adducts", **ANALYTICA CHIMICA ACTA**, 2001, 450, 45-52.
4. BURCU MERIC, NAZIFE KILICARSLAN, KAGAN KERMAN, DILSAT OZKAN, UMRAN KURUN, NEJAT AKSU, MEHMET OZSOZ, " A Clinical Evaluation of Precision G Blood Glucose Analyzer with a New Test Strip G2b in a Neonatal Unit ", **CLINICAL CHEMISTRY**, 2000, 48, 176-179.
5. ERDEM ARZUM, KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, KUCUKOGLU OZLEM, ERCIYAS ERCIN, OZSOZ MEHMET, "Electrochemical Determination of Interaction Between An Alkylating Anticancer Agent and DNA In Solution and At The Electrode Surface", **Electrochemical Society Proceedings Volume (the 200 th Meeting of the Electrochemical Society and the 52 th meeting of the International Society of Electrochemistry, 2-7 September 2001, San Francisco, CA, USA)**, Editor by M. Butler, P. Vanysek, N. Yamazoe, 2001-18, 563-572.
6. MERIC BURCU, KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, KARA PINAR, OZSOZ MEHMET, Indicator-free electrochemical DNA hybridisation biosensor based on guanine and adenine signals, **ELECTROANALYSIS**, *baskıda*, 2002.
7. MERIC BURCU, KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, KARA PINAR, ERENDOY SELDA, AKARCA U. S., MASCINI MARCO, OZSOZ MEHMET, Electrochemical DNA biosensor for the detection TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using Methylene Blue, **TALANTA**, 56, 837-846, 2002.
8. ARZUM ERDEM, BURCU MERIC, KAGAN KERMAN, DILSAT OZKAN, PINAR KARA, MEHMET OZSOZ, DNA biosensor for *Microcystis* spp. Sequence detection by using methylene blue and ruthenium complex as electrochemical hybridisation labels, **TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY**, *basımda*, 2002.

9. KERMAN KAGAN, MERIC BURCU, OZKAN DILSAT, KARA PINAR, JELEN FRANTISEK, OZSOZ MEHMET, "DNA sensing on mercury and carbon electrodes by using Meldola blue as the electrochemically active intercalator", **ELECTROANALYSIS**, gönderildi, 2002.
10. KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, KARA PINAR, MERIC BURCU, ERDEM ARZUM, NIELSEN P. E., OZSOZ MEHMET, Label - free bioelectronic detection of point mutation by using peptide nucleic acid probes and methylene blue, **ELECTROANALYSIS**, basımda, 2002.
11. OZKAN DILSAT, KERMAN KAGAN, MERIC BURCU, KARA PINAR, DEMIRKAN HASAN, POLVEREJAN MIHAI, PNNAVAIA THOMAS J., OZSOZ MEHMET, Heterostructured Fluorohectorite clay as an Electrochemical Sensor for the Detection of 2,4-Dichlorophenol and the Herbicide 2,4-D – **CHEMISTRY OF MATERIALS**, 14, 1555-1561, 2002.
12. PINAR KARA, DILSAT OZKAN, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, ERDEM ARZUM, MEHMET OZSOZ, DNA sensing on glassy carbon electrodes by using hemin as the electrochemical, **ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY**, 373, 710-716 , 2002.
13. KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, KARA PINAR, MERIC BURCU, GOODING JUSTIN, OZSOZ MEHMET, Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes, **ANAL.CHIM.ACTA**, 462, 39-47 , 2002.
14. PINAR KARA, KAGAN KERMAN, DILSAT OZKAN, BURCU MERIC, ARZUM ERDEM, PETER E. NIELSEN, MEHMET OZSOZ, Label free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes, **ELECTROANALYSIS**, baskıda, 2002.
15. OZKAN DILSAT, KARA PINAR, KERMAN KAGAN, MERIC BURCU, ERDEM ARZUM, JELEN FRANTISEK, OZSOZ MEHMET, DNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label, **BIOELECTROCHEMISTRY**, 58, 119-126, 2002.
16. ERDEM ARZUM, KARA PINAR, KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, OZSOZ MEHMET, Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on guanine signal, **ELECTROANALYSIS**, düzeltimde, 2002.
17. MERIC BURCU, KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, KARA PINAR, ERDEM ARZUM, KUCUKOGLU OZLEM, ERCİYAS ERCIN, OZSOZ MEHMET, "Electrochemical biosensor for the interaction of DNA with the alkylating agent, 4,4' – dihydroxychalcone based on guanine and adenine signals", **JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS**, 30, 1339-1346, 2002.

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

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

20. OZKAN DILSAT, ERDEM ARZUM, KARA PINAR, KERMAN KAGAN, MERIC BURCU, HASSMANN JÖRG, OZSOZ MEHMET, The allele specific genotype detection of Factor V Leiden mutation from PCR amplicons based on label free electrochemical genosensor, **ANALYTICAL CHEMISTRY**, basımda, 2002.

BİLDİRİLER

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

5. ARZUM ERDEM, KAGAN KERMAN, BURCU MERİÇ, DİLŞAT ÖZKAN, ULUS S. AKARCA, MEHMET ÖZSÖZ, " Electrochemical DNA biosensors ", Poster presentation, **BIOMED 2000, The 7th International Symposium on Biomedical Science and Technology, 25-27 Eylül 2000, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Poster sunumu, Bildiri Özetleri Kitabı PW14.**
6. ARZUM ERDEM, BURCU MERİÇ, KAGAN KERMAN, DİLŞAT ÖZKAN, MEHMET ÖZSÖZ, "Çevre kirliliğine neden olan Microcystis spp. Mikroorganizmalarının tayini için elektrokimyasal DNA biyosensörü tasarımı ", **Proje Sergisi 2000, Ege Üniversitesi, EBİLTEM, İzmir, 23-27 EKİM 2000.**

Bu çalışma Proje Sergisi-2000 'de Temel Bilimler Dalında ikincilik ödülüne layık görülmüştür.

7. BURCU MERIC, NAZIFE KILICARSLAN, DILSAT OZKAN, UMRAN KURUN, NEJAT AKSU, MEHMET OZSOZ, " A Clinical Evaluation of Precision G Blood Glucose Analyzer with a New Test Strip G2b in a Neonatal Unit ", **XVI. Ulusal Biyokimya Kongresi, II. Uluslar arası Biyobilim Günleri, Türk Biyokimya Derneği, Poster sunumu, Bildiri Özetleri Kitabı P-24, 23-27 Ekim 2000, Efes Sürmeli Hotel, Selçuk - İzmir.**
8. ARZUM ERDEM, DILSAT OZKAN, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC AND MEHMET OZSOZ , " DNA biosensors and DNA microarray system in Future",**XVI. Ulusal Biyokimya Kongresi, II. Uluslar arası Biyobilim Günleri, Türk Biyokimya Derneği, Sözlü sunumu S-9, Bildiri Özetleri Kitabı, 23-27 Ekim 2000, Efes Sürmeli Hotel, Selçuk - İzmir.**
9. DILSAT OZKAN, **Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) – Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA) İşbirliği ile hazırlanan ve DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nce düzenlenen "Bilimsel Araştırma Projelerinin Planlanması, Hazırlanması ve Desteklenmesi" Sempozyumu, 12 Ocak 2001, İzmir.**
10. SINEM GUNGOR, NURI KARAKAYA, KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, DILSAT OZKAN, PINAR KARA AND MEHMET OZSOZ, "Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri", **III.ULUSAL Veteriner Hekimliği Öğrencileri Araştırma Kongresi, Bildiri Özetleri Kitabı, 28, Posterli Bildiri, 10-12 Mayıs 2001, İstanbul.**
11. KAGAN KERMAN, BURCU MERIC, DILSAT OZKAN, PINAR KARA, ARZUM ERDEM AND MEHMET OZSOZ , "Determination of Benzo[a]pyrene – DNA Adducts by Using Electrochemical DNA Biosensor", **BIOMED 8, 8th Biomedical Science and Technology Symposium, Eylül 5-8, 2001, ODTÜ , Ankara. SÖZLÜ SUNUMU (İngilizce), Bildiri Özetleri Kitabı, O-14.**

12. ERDEM ARZUM, KERMAN KAGAN, OZKAN DILSAT, KUCUKOGLU OZLEM, ERCİYAS ERCIN, OZSOZ MEHMET, "Electrochemical Determination of Interaction Between An Alkylating Anticancer Agent and DNA In Solution and At The Electrode Surface", The 200 th Meeting of the Electrochemical Society and the 52 th meeting of the International Society of Electrochemistry, 2-7 Eylül 2001, San Francisco, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri, Posterli bildiri.
13. BURCU MERİÇ, KAĞAN KERMAN, DİLŞAT ÖZKAN, PINAR KARA, ARZUM ERDEM, ULUS S. AKARCA, SELDA ERNESOY AND MEHMET ÖZSÖZ, "Elektrokimyasal DNA biyosensörleri kullanarak PCR ürünü örneklerden bulaşıcı ve kalıtsal hastalıkların tanısı",Proje Sergisi 2001, Ege Üniversitesi, EBİLTEM, İzmir, 15-26 Ekim 2001.

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

14. OZKAN DILSAT, KARA PINAR, KERMAN KAGAN, MERIC BURCU, ERDEM ARZUM, JELEN FRANTISEK, NIELSEN E. PETER, OZSOZ MEHMET,Altın elektrot üzerinde düzenli peptid nükleik asit tabakası ve metilen mavisine dayalı elektrokimyasal DNA hibridizasyon tayini, Proje Sergisi,2002, Ege Üniversitesi, EBİLTEM,İzmir.

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

15. Pınar KARA, Dilşat ÖZKAN, Arzum ERDEM, Kağan KERMAN, Sacide PEHLİVAN, Ferda ÖZKINAY, Duygu ÜNÜVAR, Gülçin ITIRLI, Hakan KARADENİZ, Mehmet ÖZSÖZ, İndikatörsüz elektrokimyasal genosensör ile akondroplazi g380r mutasyonunun allel özgül genotip tayini, Proje Sergisi,2002, Ege Üniversitesi, EBİLTEM,İzmir.

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

KATILDIĞI KURSLAR :

**TC YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

1. "Rekombinant Antikor Üretiminde Faj Gösterim Teknolojisi" adlı lisans üstü uygulamalı ve teorik eğitim kursu, 1 – 5 Temmuz 2002, TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Gebze / KOCAELİ