

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
KİM-DR-2010-0001**

**ELEKTROKİMYASAL DNA SENSÖRÜ İÇİN
NANOMALZEMELERE DAYALI ELEKTROT
MATERYALLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE
UYGULAMALARI**

Mihrican MUTİ ERDEM

Tez Danışmanları:

Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER

Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Kimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Mıhrıcan MUTİ ERDEM tarafından hazırlanan Elektrokımyasal DNA Sensörü için Nanomalzemelere Dayalı Elektrot Materyallerinin Geliştirilmesi ve Uygulamaları başlıklı tez, 26.07.2010 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER	Adnan Menderes Üniv.	
Üye:	Prof. Dr. Mustafa DEMİR	Adnan Menderes Üniv.	
Üye:	Prof. Dr. Fatma Nil ERTAŞ	Ege Üniversitesi	
Üye:	Doç. Dr. Serdar ABACI	Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Yrd. Doç. Dr. Kubilay METİN	Adnan Menderes Üniv.	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun sayılı kararıyla () tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde, tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kurallarının gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

26.07.2010

Mihrican MUTİ ERDEM

ÖZET

ELEKTROKİMYASAL DNA SENSÖRÜ İÇİN NANOMALZEMELERE DAYALI ELEKTROT MATERYALLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI

Mihrican MUTİ ERDEM

Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanları: Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER

Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN

2010, 112 sayfa

Nükleik asitlerden oluşan tanıma yüzeyleri, analitik kimya alanında her geçen gün daha ilgi çekici konular haline almaktadır. Elektrokimyasal DNA sensör teknolojilerinde, nanopartiküller ve karbon nanotüpler gibi farklı malzemelerin kullanımına artan bir ilgi bulunmaktadır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmaların amacı, farklı özellikteki nanomalzemelerin DNA sensör teknolojisinde kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Çalışmamızın ilk bölümünde SnO₂ nanopartiküllerin ve bu nanopartiküllere dayalı sensörün elektrokimyasal davranışları incelenmiş, ikinci bölümde kalem grafit elektrodun (PGE) SnO₂ nanopartikülleri ile zenginleştirilmiş polivinil ferrosen polimeri ile, üçüncü bölümde ise nanoboyutlu yükseltgenmiş grafin ile modifiye edilmiş sensörün DNA analizi ve dizi seçimli DNA hibridizasyonu için kullanılabilirliği, avantajları ve dezavantajları literatürde ilk kez bu çalışma ile incelenmiştir.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile gelecekte, nanomalzemelere dayalı yeni sensör teknolojileri ile elektrokimyasal DNA analizlerinin daha hızlı, daha seçimli ve daha duyarlı bir şekilde gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır. Yüksek duyarlılık ve iyi seçimliliğe sahip bu sensörlerle gelecekte PCR tekniği gerekmeksizin DNA analizlerinin daha kısa sürede ve daha ucuz bir şekilde yapılabilmesi planlanmaktadır.

Anahtar Sözcükler: DNA hibridizasyonu, nanopartiküller, modifiye elektrotlar, DNA çip teknolojisi, elektrokimyasal biyosensörler

ABSTRACT

DESIGN AND APPLICATIONS OF ELECTROCHEMICAL DNA SENSORS BASED ON NANOMATERIALS

Mihrican MUTİ ERDEM

Ph. D. Thesis, Department of Chemistry
Supervisors: Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER
Prof. Dr. K. Arzum ERDEM GÜRSAN
2010, 112 pages

There has been a growing interest in the recognition surfaces based on nucleic acids in analytical chemistry. The usage of nanomaterials such as nanoparticles, magnetic nanoparticles and carbon nanotubes in the electrochemical DNA sensor technologies has been increasing in recent years.

The aim of this study is to investigate the usage of nanomaterials having different properties in DNA sensor technology. For this reason, electrochemical properties of SnO₂ nanoparticles and SnO₂ nanoparticles based sensors were investigated in the first stage of our study. The new nano surfaces immobilized with DNA sequences were prepared, in the second stage, by modifying pencil graphite electrodes with SnO₂ nanoparticles embedded in poly vinyl ferrocene matrix and in the third stage, with oxidized graphene oxidized. Then the possible use of sensors, thus prepared, were examined together with the analytical advantages and disadvantages for detecting DNA hybridization at the first time in the literature.

It is thought that with this studies performed the new sensor technologies based on nanomaterials to detect in the future electrochemical DNA analysis with greater response, high selectivity and fast facilities. Thus, it's hoped that by the use of this kind of modified electrodes which has high selectivity and specificity it will be possible to analyse DNA without PCR technique with lower cost and with greater response and sensitivity.

Keywords: DNA hybridization, nanoparticles, modified electrodes, DNA chip technologies, electrochemical biosensor.

ÖNSÖZ

Engin bilgi ve tecrübeleriyle, çalışmalarımdeki çok değerli katkıları ve yol göstericiliğinden dolayı, bilim insanı olma yolunda tüm zorlukları kolaylaştıran, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER'e,

Kendisiyle bu tez dolayısıyla çalışma imkanı bulduğum, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, akademisyen olma yolunda kişiliği, karakteri ve başarısını her zaman örnek alacağım, hocam olmanın ötesinde bana gerçek bir abla olan II. danışman hocam Sayın Prof. Dr. Arzum ERDEM GÜRSAN'a,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne gitmem konusunda sonsuz hoşgörü gösteren Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mustafa DEMİR'e,

İngiltere (Proje yürütücüsü: Prof. Pagona PAPAKONSTANTINOU) ve Türkiye (Proje yürütücüsü: Prof. Dr. Arzum ERDEM GÜRSAN) ortaklığında yürütülen **The Royal Society** destekli **“International Joint Project”** kapsamında, Grafın ile ilgili çalışmaların bir kısmını Ulster Üniversitesi NIBEC Enstitüsü'nde (K. İrlanda-İngiltere) yürüttüğüm projenin bir bursiyeri olarak bana araştırma imkanı sağlayan Prof. Pagona PAPAKONSTANTINOU ve Prof. Dr. Arzum ERDEM GÜRSAN'a, ve projeye sağladığı desteklerden dolayı The Royal Society'e,

Elektrotların PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile başarılı bir şekilde kaplanmasında gösterdiği özveri ve dostluğundan dolayı sevgili Dr. Filiz KURALAY'a,

Başta Semiha KUNDAKÇI, Mert SOYSAL ve Dr. Hakan KARADENİZ olmak üzere tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim, her başarımda şüphesiz en büyük katkısı olan aileme,

Varlıklarıyla her zaman beni motive eden ve tüm sıkıntılarımı paylaşan, biricik oğlum Ömer Meriç ve sevgili eşim Yılmaz'a

teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası.....	iii
Bilimsel Etik Bildirim Sayfası	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Elektrokimya.....	5
1.1.1. Elektrokimyasal Tabakalar.....	5
1.1.2. Elektrokimyasal Tabakaların Elektriksel Olarak İncelenmesi	6
1.1.3. Elektrokimyasal Bir Olayda Kütle Aktarım Yolları	7
1.1.4. Voltametri ve Esasları (Skoog vd., 1996, 1998,; Yıldız ve Genç, 1993)	7
1.2. Sensör.....	18
1.2.1. Biyosensör.....	19
1.3. Nanoteknoloji.....	26
1.3.1. Nanopartiküller	28
1.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	30
1.3.3. DNA Çip Teknolojisi	30
2. KAYNAK ÖZETLERİ	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1 Kullanılan Cihazlar	39
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	40
3.3.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanışı	40

3.3.2 Redoks Çözeltilisinin Hazırlanması.....	41
3.3.3. Oligonükleotid Çözeltilerinin Hazırlanışı.....	41
3.4. Kullanılan Çalışma Elektrotların Hazırlanması.....	41
3.4.1. Karbon Pasta Elektrotların (CPE) Hazırlanması	41
3.4.2. Kalem Grafit Elektrot (PGE) Hazırlanması.....	42
3.4.3. Camsı Karbon Elektrotların (GCE) Hazırlanması.....	42
3.4.4. Elektrokimyasal Ölçümler	42
3.5. SnO ₂ Nanopartikülleri ile Modifiye Edilmiş Grafit Elektrotların Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesine Yönelik Çalışmalar.....	42
3.5.1. SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Karbon Pasta Elektrotların (CPE) Hazırlanması.....	42
3.5.2. SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Karbon Pasta Elektrotların Yüzey Aktivasyonu.....	43
3.5.3. SnO ₂ Nanopartiküllerin Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi	43
3.5.4. Karbon Pasta Matriksine Eklenecek SnO ₂ Nanopartikül Miktarının Belirlenmesi.....	43
3.5.5. Elektrot Aktivasyonu Öncesi/Sonrası SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş CPE'nin Elektrot Yüzeyindeki Değişimlerin Elektrokimyasal Empedans Spektrometri Tekniği ile İncelenmesi.....	43
3.6. PVF ⁺ -SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Kalem Grafit Elektrotlar (PGE) ile DNA Analizlerine Yönelik Yapılan Çalışmalar.....	44
3.6.1. Kalem Grafit Elektrotların PVF ⁺ -SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmesi.....	44
3.6.2. PVF ⁺ -SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyonu.....	44
3.6.3. SnO ₂ Nanopartiküllerin PVF ⁺ Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi.....	45
3.6.4. PVF ⁺ -SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeyine DNA İmmobilizasyonu	45
3.6.5. PVF ⁺ -SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeyine İmmobilize Edilecek DNA Dizisinin Seçimi.....	46
3.6.6. DNA Çözeltilisinin Derişimindeki Değişimin Guanin Yükseltgenme Sinyaline Olan Etkisinin İncelenmesi.....	46

3.6.7. PVF ⁺ -SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeyinde DNA Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Tayini.....	47
3.7. Yükseltgenmiş Grafin ile Modifiye Edilmiş Elektrotlar ile DNA Analizlerine Yönelik Yapılan Çalışmalar	47
3.7.1. Camsı Karbon Elektrotların (GCE) Yükseltgenmiş Grafin ile Modifiye Edilmesi	48
3.7.2. Kalem Grafit Elektrotların (PGE) Yükseltgenmiş Grafin ile Modifiye Edilmesi	48
3.7.3. PGE ve GRPox-PGE Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyonu.....	48
3.7.4. Kalem Grafit Elektrotların Aktivasyonu	48
3.7.5. GRPox ile Modifikasyon Öncesi Elektrot Aktivasyonunun Guanin Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	49
3.7.6. Elektrot Yüzeyine DNA İmmobilizasyonu	49
3.7.7. Yüzeyine DNA İmmobilize Edilmiş Grafin (GRP) ve Yükseltgenmiş Grafin (GRPox) ile Modifiye Edilmiş PGE'lerin Guanin Yükseltgenme Sinyali Açısından Karşılaştırılması	49
3.7.8. PGE Yüzeyine İmmobilize Edilen GRPox Derişiminin Guanin Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	50
3.7.9. DNA Çözeltisinin Derişiminin Guanin Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	50
3.7.10. Geliştirilen Sensör Yüzeyinde Hibridizasyon	50
BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1. SnO ₂ Nanopartiküllerin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesine İlişkin Elde Edilen Bulgular ve Tartışma	53
4.1.1. SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş-CPE'nin Dönüşümlü Voltametri ile Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	53
4.1.2. CPE Matriksine Eklenecek Optimum SnO ₂ Nanopartikül Miktarının Belirlenmesi	54
4.1.3. Elektrot Aktivasyonunun, SnO ₂ Nanopartikülün İndirgenme Sinyali Üzerine Etkisinin Elektrokimyasal Empedans Spektrometri ile İncelenmesi.....	54
4.2. PVF ⁺ -SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Elektrotların DNA Analizlerine Yönelik Uygulamalarına İlişkin Elde Edilen Bulgular ve Tartışma...57	

4.2.1. PVF ⁺ -SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Elektrot Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyonu	57
4.2.2. SnO ₂ Nanopartiküllerinin PVF ⁺ Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi.....	60
4.2.3. Yüzeye Tutturulacak DNA Dizisinin Seçimi	61
4.2.4. PVF ⁺ -SnO ₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Elektrot ile Etkileşecek En Yüksek DNA Derişiminin Saptanması.....	63
4.2.5. PVF-SnO ₂ Nanopartikül Modifiye Edilmiş PGE ile HBV DNA Hibridizasyonunda Seçimlilik Çalışması.....	63
4.2.6. Modifiye Edilmiş Elektrot Yüzeyinde HBV Hibridizasyonunun Gerçekleştiği Optimum Hedef DNA Derişiminin Saptanması.....	65
4.3. Yükseltgenmiş Grafın (GRPox) ile Modifiye Edilmiş Elektrotların DNA Analizlerine Yönelik Uygulamalarına İlişkin Elde Edilen Bulgular	66
4.3.1. Yükseltgenmiş Grafın ile Modifiye Edilmiş Elektrot Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyonu	66
4.3.2. Farklı Elektrotlara Yapılan Modifikasyonların Guanin Yükseltgenme Sinyali Üzerine Etkisinin İncelenmesi	69
4.3.3. Yüzeyine DNA İmmobilize Edilmiş Grafın ve Yükseltgenmiş Grafın ile Modifiye Edilmiş PGE'lerin Guanin Yükseltgenme Sinyallerinin Karşılaştırılması70	
4.3.4. GRPox ile Modifikasyon Öncesi Elektrot Aktivasyonunun Guanin Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	71
4.3.5. PGE Yüzeyi Modifiye Edilecek Optimum GRPox Derişiminin Saptanması72	
4.3.6. DNA Prob Derişiminin Guanin Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi.....	73
4.3.7. GRPox ile Modifiye Edilmiş PGE ile HBV DNA Hibridizasyonunda Seçimlilik Çalışması.....	73
4.3.8. Modifiye Edilmiş Elektrot Yüzeyinde HBV Hibridizasyonunun Gerçekleştiği Optimum Hedef DNA Derişiminin Saptanması.....	75
4.3.9. GRPox ile Modifiye Edilmiş PGE ile HBV DNA Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Empedans Spektrometri Tekniği ile İncelenmesi	75
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ.....	96

SİMGELER DİZİNİ

ABS	Acetate Buffer Solution (asetat tampon çözeltisi)
CPE	Karbon Pasta Elektrot
CV	Cyclic Voltammetry (Dönüşümlü voltametri)
DKE	Doygun Kalomel Elektrot
DMF	Di metil formamid
DPV	Diferansiyel Puls Voltametri
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy (Elektrokimyasal Empedans spektroskopisi)
fsDNA	fish sperm DNA (balık spermi DNA'sı)
GCE	Glassy Carbon Electrode (camsı karbon elektrot)
GRP	Graphene (grafin)
GRPOx	Graphene oxidized (yükseltgenmiş grafin)
GRPOx-GCE	GRPOx ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrot
GRPOx-PGE	GRPOx ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrot
HBV	Hepatit B Virüs
MDE	Mercury Drop Electrode (civa damla elektrot)
MM	Mismatch (mutasyonlu dizi)
NC	Non Complementary (tamamlayıcı olmayan dizi)
ODN	Oligonükleotid
PBS	Phosphate Buffer Solution (fosfat tampon çözeltisi)
PCR	Polimeraz Chain Reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
PGE	Pencil Graphite Electrode (kalem grafit elektrot)
PVF	Poli Vinil Ferrosen
PtE	Platin Elektrot
Rct	Charge Transfer Rezistans (yük transfer direnci)
SEM	Scanning Electron Microscopy (taramalı elektron mikroskobu)
SHE	Standart Hidrojen Elektrodu
SNP	SnO ₂ nanopartikül
SNP-CPE	SnO ₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot
SPCE	Screen Printed Carbon Electrode (Perde baskılı karbon elektrot)
SPE	Screen Printed Electrode (Perde baskılı elektrot)
TBS	Tris HCl Buffer Solution (Tris HCl tampon çözeltisi)
TE	Tris EDTA

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Modifiye Edilmiş Elektrokimyasal DNA Biyosensörü ile Yapılmış Çalışmalar	35
---	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Elektrot yüzeyindeki tabakaların şematik olarak gösterilmesi.....	6
Şekil 1.2. Voltametri de kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri	9
Şekil 1.3. Üçlü elektrot sisteminin şematize edilmesi.....	10
Şekil 1.4. Biyosensörün yapısı	19
Şekil 1.5. DNA molekülünün çift sarmal yapısı	22
Şekil 1.6. Oligonükleotid probunun ataçlanması hibridizasyonu.....	23
Şekil 3.1. PVF ⁺ -SnO ₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş-PGE Yüzeyine DNA İmmobilizasyonunun şematik gösterimi.	46
Şekil 4.1. SnO ₂ nanopartikül içeren CPE'un elektrokimyasal davranışını gösteren dönüşümlü voltamogramları. e (b) %10 SnO ₂ içeren CPE.	53
Şekil 4.2. Farklı yüzde oranlarında SnO ₂ nanopartikül içeren CPE kullanılarak elde edilmiş olan indirgenme sinyallerinin (A) Voltamogram ve (B) Histogram göstermektedir. (a) 0 %, (b) 5 %, (c) 10 %, (d) 20 %, (e) 30 %, (f) 40 % ve (g) % 50.....	54
Şekil 4.3. A) Nyquist diagramı (B) Histogram. a) Aktive edilmemiş CPE, b) Aktive edilmemiş SnO ₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş CPE c) Aktive edilmiş CPE ve d) Aktive edilmiş SnO ₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş CPE kullanılarak ölçülmüş R _{ct} değerlerini göstermektedir.	56
Şekil 4.4. a) Modifiye edilmemiş, b) PVF ⁺ ile, c) PVF ⁺ -SnO ₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE yüzeylerinin SEM görüntüleri (hızlandırma potansiyeli 20 KV, çözünürlük 1 µm).	58
Şekil 4.5. a) Modifiye edilmemiş, b) PVF ⁺ ile, c) PVF ⁺ -SnO ₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE yüzeylerinin SEM görüntüleri (hızlandırma potansiyeli 50 KV, çözünürlük 200 nm).....	59
Şekil 4.6. PVF yükseltgenme sinyaline ait A) DPV, B) Histogram. (a) çıplak elektrot, (b) PVF ⁺ modifiye elektrot, (c) PVF ⁺ -SnO ₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş elektrot.....	61

- Şekil 4.7. (A) PVF⁺ modifiye PGE kullanılarak , (B) PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE kullanılarak elde edilmiş guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren DP voltamogramları. (a) DNA yokken, (b) 100 µg/mL tiyol ile işaretli DNA, (c) 100 µg/mL amino işaretli DNA..... 62
- Şekil 4.8. (A) PVF⁺ ile modifiye edilmiş PGE ile ve (B) PVF⁺-SnO₂ nanopartikül modifiye edilmiş PGE ile elde edilmiş olan guanin yükseltgenme sinyalini gösteren histogram. (a) çıplak elektrot, (b) tiyol işaretli, (c) amino işaretli DNA. Ölçümler ABS içinde yapıldı. 62
- Şekil 4.9. PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş farklı DNA derişimlerdeki guanin yükseltgenme sinyalleri, A) DPV ve B) Histogram. DNA derişimleri, a) 10, b) 25, c) 50, d) 100, e) 150 µg/mL..... 63
- Şekil 4.10. PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş 150 µg/mL amino işaretli DNA kullanılarak hibridizasyon sonrası ölçülmüş guanin yükseltgenme sinyali için kalibrasyon grafiği. 65
- Şekil 4.11. a) Modifiye edilmemiş, b) GRPox ile modifiye edilmiş PGE yüzeylerinin SEM görüntüleri (hızlandırma potansiyeli 10 KV, çözünürlük 2 µm) 67
- Şekil 4.12. a) Modifiye edilmemiş, b) GRPox ile modifiye edilmiş PGE yüzeylerinin SEM görüntüleri (hızlandırma potansiyeli 5.00 KV, çözünürlük 500 nm)..... 68
- Şekil 4.13. A) GRP-PGE ve B) GRP-GCE yüzeyine immobilize edilmiş DNA'ya ait guanin ve adenin yükseltgenme sinyalleri. GRP derişimi 750 µg/mL ve DNA derişimi GRPox-PGE için 50 µg/mL ve GRPox-GCE için 100 µg/mL..... 69
- Şekil 4.14. 50 µg/mL DNA immobilize edilmiş elektrot yüzeyinde guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren DPV a) çıplak PGE, b) 500 µg/mL GRP-PGE ve c) 500 µg/mL GRPox-PGE..... 70
- Şekil 4.15. Aktive edilmiş PGE üzerine immobilize edilmiş fsDNA ile elde edilen guanin (G) ve adeninin (A) yükseltgenme sinyallerini gösteren DP voltamogram. a) aktive edilmemiş, b) aktive edilmiş PGE. 71
- Şekil 4.16. GRPox ile modifiye edilmiş PGE üzerine immobilize edilmiş 50 µg/mL fsDNA kullanılarak elde edilmiş guanin yükseltgenme pik şiddetlerini gösteren histogram..... 72
- Şekil 4.17. 3000 µg/mL GRPox- PGE yüzeyine farklı derişimlerde DNA immobilize edilerek ölçülmüş guanin yükseltgenme pik şiddetleri A) DPV, B) Histogramı, a) 5, b) 10, c) 20, d) 25, e) 40, f) 50, g) 100 µg/mL. 73

Şekil 4.18. GRPox ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş 40 µg/mL amino işaretli DNA kullanılarak hibridizasyon sonrası ölçülmüş guanin yükseltgenme sinyalleri için kalibrasyon grafiği.75

Şekil 4.19. GRPox ile modifiye edilmiş PGE'nin HBV DNA ile hibridizasyon öncesi ve sonrasındaki Nyquist diyagramı, a) çıplak PGE, b) GRPox ile modifiye edilmiş PGE, c) modifiye yüzeye prob immobilize edilmiş PGE, d) hedef DNA ile hibridize olmuş prob, e) NC ile hibridize olmuş prob.....76

1. GİRİŞ

Nükleik asitlerden oluşan tanıma yüzeyleri analitik kimyada her geçen gün daha ilgi çekici konular haline gelmektedir. Nükleik asit analizine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin (genosensörlerin) gelecekte hasta başında yapılacak doktor gözetimindeki analizlerde çok önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir.

Günümüzde DNA analizleri için kullanılan klasik metotlarla yapılan tayinlerde genellikle genlerin doğrudan baz dizisi analizi veya DNA hibridizasyonunun tespiti yapılmaktadır. Bu yöntemlerin bazılarında toksik özellikte olan radyoaktif boyar maddeler, bazılarında ise yüksek maliyetli ve zaman alıcı bir yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde kullanılan maddelerin toksik olması, kullanıldığı yöntemlerin pahalı ve zaman alıcı olması gibi nedenlerle (Service, 1998), kullanılan klasik yöntemlere alternatif olarak özellikle DNA'nın nitel ve nicel analizlerine yönelik geliştirilen elektrokimyasal DNA biyosensörlerine ait uygulamaların sayısı, son yıllarda oldukça artmıştır (Erdem vd., 2002, 2005, 2006b, 2007a; Karadeniz vd., 2007a,b; Palecek ve Fojta 2001; Wang vd., 2000, 2001a, 2002b, 2004b, 2005b).

Moleküler algılama konusunda teknolojiye meydana gelen son gelişmeler, özellikle biyomoleküler algılamaya yönelik yeni teknolojilerin oluşturulmasını gündeme getirmiştir. Elektrokimyasal DNA sensör teknolojilerinde, nanopartiküller (Authier vd., 2001; Bonanni vd., 2008; Cai vd., 2002a, b, 2003a; Katz vd., 2004; Luo vd., 2006; Özsöz vd., 2003; Wang vd., 2001b; Zhang vd., 2010), manyetik partiküller (Erdem vd.,2005, 2006b, 2007b; Hassena vd., 2008; Karadeniz vd., 2009; Salem vd., 2004; Wang vd., 2001a, 2002a, 2004a), karbon nanotüpler (Cai vd., 2003b; Cheng vd., 2005; Chen vd., 2001; Çalışkan vd., 2009; Erdem vd., 2006a, 2009; Galandova vd., 2009; Goyal ve Singh 2008; Guo vd., 2004; Hrapovic vd., 2004; Karadeniz vd., 2008; Li vd., 2005; Merkoçi vd., 2005; Ravindra vd., 2003; Zhang vd., 2008, 2010) gibi farklı malzemelerin kullanımına artan bir ilgi bulunmaktadır.

Nanoteknoloji ile üretilen üstün fiziksel özelliklere sahip nanopartikül, nanotüp, nanokablolar gibi nanomalzemelere dayanan sensör teknolojisi, biyomoleküler algılamaya yönelik olarak elektrokimyasal tekniklerin kullanıldığı yöntemlerde daha seçimli, daha hassas ve gözlenebilme sınırı çok daha düşük DNA analizlerini mümkün kılmaktadır (Alwarappan vd., 2009; Cai vd., 2003b; Chen vd., 2001; Erdem, 2006a, 2007a, 2007b; Guo vd., 2004; Hahm ve Liebber, 2004; Hassena vd., 2008; Karadeniz vd., 2007a; Koehne vd., 2004; Luo vd., 2006; Mathur vd., 2009; Mc Farland ve Duynes 2003; Merkoçi vd., 2005; Musameh vd., 2002; Özsöz vd., 2003; Ravindran vd., 2003; Salem vd., 2004; Wildgoose vd., 2006; Wu vd., 2003; Zhang ve Webster, 2009).

Moleküler tanı yöntemlerindeki gelişmelere mikrofabrikasyon tekniklerindeki gelişmelerin de eklenmesiyle, binlerce gen veya ürünleri (RNA, protein) arasındaki ilişkiyi bir çip üzerinde, eş zamanlı olarak araştırabilen ve genetik şifremizi taşıyan, nükleik asitlerin nasıl çalıştığını anlamamızı sağlayan mikroçip teknolojisi ortaya çıkmıştır.

Nükleik asitlerin çeşitli yöntemlerle nanomalzemelerin yüzeyine tutturularak elektrokimyasal sensör teknolojisinde kullanılması ve bu sensörlerin ilaç-DNA etkileşimi ve DNA hibridizasyonu analizlerine yönelik uygulamaları giderek yaygınlık kazanmaktadır. (Agüi vd., 2008; Authier vd., 2001; Cai vd., 1996; Dequaire vd., 2000; Erdem vd., 2005, 2006b; Guo vd., 2004; Karadeniz vd., 2008; Özsöz vd., 2003; Salem vd., 2003; Wang vd., 2001a, 2002a 2004a; Yang vd., 2007; Zhu vd., 2004).

Nanopartiküllere dayalı elektrokimyasal DNA analizlerine bakıldığı zaman, kadmiyum sülfür nanopartiküllerin (Wang vd., 2002), altın nanopartiküllerin (Özsöz vd., 2003), gümüş nanopartiküllerin (Karadeniz vd., 2007a), çinko nanopartiküllerin (Zhang vd., 2008), platin nanopartiküllerin (Zhu vd., 2005) başarıyla kullanıldıkları görülmüştür.

Karbon nanotüplere dayalı sensörler ile DNA analizlerine yönelik çalışmalarda yüksek duyarlılığın elde edildiği saptanmıştır. Çok duvarlı karbon nanotüp ve tek duvarlı karbon nanotüplerin kullanıldığı DNA analizine yönelik çalışmalarda ise düşük tayin sınırlı, seçimliliği ve duyarlılığı yüksek sonuçlar elde edilmiştir (Cai

vd., 2003b; Chen vd., 2001; Cheng vd., 2005; Çalışkan vd., 2009; Erdem vd., 2006a, 2009; Galandova vd., 2009; Goyal ve Singh 2008; Hrapovic vd., 2004; Li vd., 2005; Karadeniz vd., 2008; Guo vd., 2004; Merkoçi vd., 2005; Ravindra vd., 2003; Zhang vd., 2008, 2010).

Yüksek duyarlılığın yanında düşük maliyete de sahip olan çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) modifiye edilmiş tek kullanımlık kalem grafit elektrot (MWCNT-PGE) tasarımı, literatürde ilk defa Erdem ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Erdem vd., 2006a). Bu çalışmada elektrokimyasal DNA analizi ile birlikte dizi seçimli DNA hibridizasyonu, herhangi bir indikatör kullanılmadan, guanin sinyalindeki değişim izlenerek başarıyla tayin edilmiştir.

Çalışmamızın Konusu

Çalışmamızın ilk bölümünde karbon pastası matriksine karıştırılarak hazırlanan SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrotların (CPE) elektrokimyasal davranışları incelendi. SnO₂ nanopartikülleri ile modifiye edilen elektrotların yüzeyinde gerçekleşen elektron transfer mekanizması aydınlatılmaya çalışıldı.

Çalışmamızın ikinci bölümünde Polivinil ferrosen (PVF) matriksi içerisine dağıtılmış SnO₂ nanopartiküller ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların (Pol-SNP-PGE) DNA analizlerine yönelik optimizasyonu gerçekleştirildi. Nanopartikül kullanılarak PVF⁺ ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine immobilize edilen amino işaretli DNA dizisinin derişimi, hibridizasyon için hedef DNA dizisinin derişimi, ayrıca elde edilen yüzeyin seçimliliği incelenmiş, geliştirilen sensör teknolojisi ile daha tekrarlanabilir ve daha duyarlı sonuçlar elde edilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma ile ayrıca elde edilen yüzeye immobilize edilen DNA'nın yüksek kararlılıkta yüzeye bağlanabilmesi, böylece kendi tamamlayıcısı için seçimliliği yüksek bir yüzey oluşturulabilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızın üçüncü bölümünde kalem grafit elektrodun (PGE) karboksil gruplarınca zengin yükseltgenmiş grafin (GRPox) ile modifikasyonu ve geliştirilen bu elektrotların (GRPox-PGE) DNA analizlerine yönelik optimizasyonu gerçekleştirildi. GRPox varlığında ve yokluğunda hazırlanan tek kullanımlık

kalem grafit elektrotların mikroskobik karakterizasyonu, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendi. Daha sonra yüzeylerine DNA immobilize edilmiş GRPox-PGE' lerin elektrokimyasal davranışları, diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak guanin yükseltgenme sinyallerindeki değişim ölçülerek incelendi. GRPox derişimi, DNA derişimi ve yüzey aktivasyon işleminin yanıtta etkisi araştırıldı. Ayrıca, modifiye yüzeye immobilize edilen probun hedef DNA' sına olan seçimliliği, hibridizasyon sonrası guanin sinyalinin DPV ile ölçülmesiyle ve her bir aşamadan sonra yüzeyde meydana gelen elektron transfer mekanizmasındaki değişimin elektrokimyasal empedans spektrometri (EIS) ile ölçülmesiyle tayin edildi.

Elektrot yüzeyine optimum derişimdeki DNA'nın immobilizasyonu incelemek için, amino ile işaretli DNA prob derişiminin yanıt üzerindeki etkisi araştırıldı. Çalışmamızda yükseltgenmiş grafine dayalı geliştirilmiş elektrokimyasal sensör teknolojisinin dizi seçimli DNA hibridizasyonuna yönelik bir uygulamasını göstermek amacıyla, Hepatit B virüsünü (HBV) temsil eden spesifik kısa DNA dizileri (oligonükleotitler) kullanıldı. GRPox-PGE yüzeyinde gerçekleştirilen HBV DNA hibridizasyonunun tayini, HBV prob ile hedef dizi arasındaki hibridizasyon sonucunda guanin yükseltgenme sinyalinin, DPV tekniği ile ölçülmesiyle gerçekleştirildi. Ayrıca, gözlenebilme sınırı, seçimlilik ve tekrarlanabilirlik gibi deneysel parametreler de incelendi.

Çalışmamızın ikinci ve üçüncü bölümünde geliştirilen modifiye edilmiş kalem grafit elektrotlar (Pol-SNP-PGE ve GRPox-PGE) kullanılarak DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayini, herhangi bir elektroaktif indikatör kullanılmaksızın gerçekleştirildi.

Çalışmamız kapsamında, elektrokimyasal DNA analizleri için geliştirilen tek kullanımlık sensör teknolojisinde nanomalzemelerin kullanılmasıyla duyarlılığı ve seçimliliği yüksek, aynı zamanda kolay hazırlanabilen ve hızlı yanıt verme yeteneğinde olan sensörlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

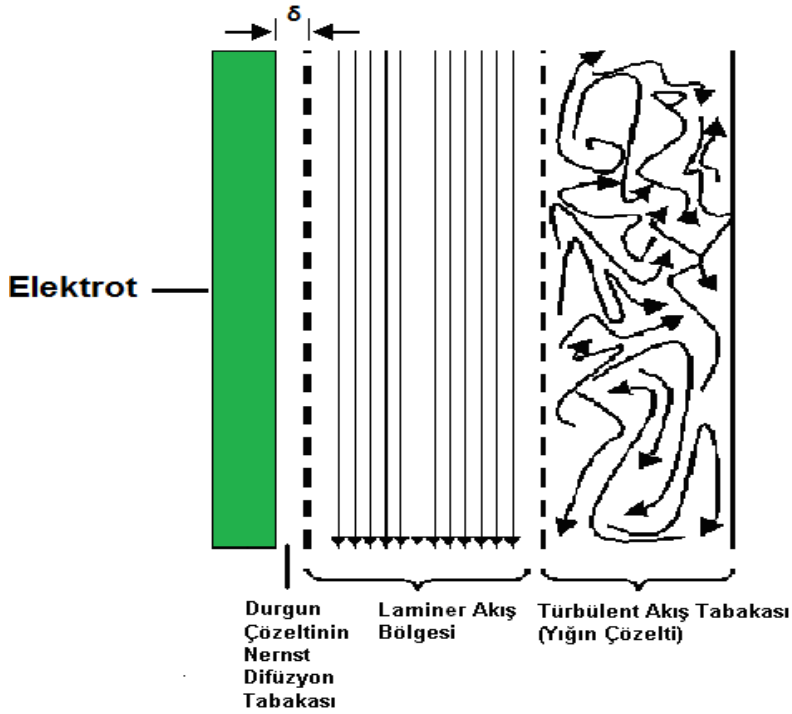
Nanomalzemeler kullanılarak geliştirilen, duyarlılığı yüksek sensörler ile aynı zamanda ileride DNA analizlerinde çoklukla ihtiyaç duyulan, pahalı ve zaman alıcı bir yöntem olan PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) tekniklerine gerek kalmaksızın DNA analizlerinin hızlı ve ucuz bir şekilde yapılabileceği düşünülmektedir.

1.1. Elektrokimya

Madde ile elektrik enerjisi arasında etkileşmeyi, bu etkileşmenin sonucunda oluşan kimyasal enerjinin fiziksel enerjiye dönüşümü gibi kimyasal ve fiziksel değişimleri inceleyen bilim dalı, elektrokimya olarak tanımlanır (Skoog vd. 1996). Elektrokimyasal tepkimeler, yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir; elektron transferi söz konusudur ve elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede yürütülür.

1.1.1. Elektrokimyasal Tabakalar

Elektrokimyasal ölçümler sırasında, elektrot döndürüldüğünde ya da elektrot üzerinden bir çözelti aktarıldığında elektrot yüzeyi ile analit sıvısı arasında elektrodun kendisine bitişik olan çözelti tabakasındaki bir türe elektron vermesinden ya da o tabakadan elektron almasından dolayı heterojen tabakalalar meydana gelmektedir. Karıştırmanın etkisini anlamak için küçük düzlemsel bir elektrot içeren, karıştırılan bir çözeltide sıvı akışının nasıl geliştiğini iyi kavramak gerekir. Şekil 1.1'de karıştırılan bir sistemdeki heterojen tabakaların bileşimi görülmektedir.



Şekil 1.1. Elektrot yüzeyindeki tabakaların şematik olarak gösterilmesi

Türbülent akış: Elektrottan uzak çözelti yığnında gözlenir ve sıvı hareketinin düzenli bir akış modeli yoktur.

Laminer akış: Laminer akışta sıvı tabakaları elektrot yüzeyine paralel bir yönde birbirini üzerine kayarlar. Nernst difüzyon tabakası elektroda en yakın olan tabaka olup, eğer akma ya da dönme hızı belli bir değerde sabit tutulursa, karışmayan ve difüzyonla taşımının gerçekleştiği bu katmanın kalınlığı (δ), Nernst'e göre sabit kalır ve Nernst difüzyon katmanı kalınlığı adını alır. Elektrot yüzeyinden δ cm uzakta, laminer akımının hızı, sıvı ile elektrot arasındaki sürtünmeden dolayı sıfıra yaklaşır ve bunun sonucunda da elektrot çevresinde ince, durgun bir çözelti tabakası oluşur. Bu çözelti tabakası yaklaşık, $10^{-2} - 10^{-3}$ cm kalınlığında olabilir.

1.1.2. Elektrokimyasal Tabakaların Elektriksel Olarak İncelenmesi

Elektroliz olayında devreden yalnızca faradayik akım geçmez. Bu akımla birlikte devreden sığasal (kapasitif) akım da geçer. Bunun nedeni, elektrot çözeltiye daldırıldığında, doymamış yüzey kuvvetleri nedeniyle, elektrot yüzeyinin

çözeltideki iyonları ve polar çözümleri adsorblamasıdır. Zıt yüklü iyonlar bunların karşısına dizilerek bir tabaka oluşturur. Elektrot yüzeyindeki ve yüzeye bitişik çözeltideki bu yük topluluğuna elektriksel çift tabaka denir.

1.1.3. Elektrokimyasal Bir Olayda Kütle Aktarım Yolları

Bir elektrolitteki herhangi bir taneciğin bir yerden başka bir yere taşınabilmesi için, o taneciğe bir kuvvetin etki etmesi gerekir. Bu kuvvet kimyasal, elektriksel ya da mekanik bir kuvvet olabilir (Tural vd. 2006). Bir elektrokimyasal hücrenin çalışması sırasında maddenin elektrot yüzeyine aktarım yolları, üç şekilde gerçekleşmektedir (Yıldız ve Genç, 1993). Bu kütle aktarım yolları:

Elektriksel göç (MİGRASYON): Elektriksel alan altında iyonlar, bu alandan kaynaklanan kuvvet etkisiyle hareket ederler. Bu hareket, dışarıdan elektriksel alan uygulandığında olduğu gibi, çözeltide herhangi bir nedenle yük denkliliği bozulduğunda da oluşabilir. Elektrotlara dışarıdan bir gerilim uygulandığında, bu kuvvet anyonları anoda, katyonları da katoda doğru sürükler. Bu tür taşınmaya Elektriksel göç (migrasyon) denir (Tural vd. 2006).

Karıştırma (KONVEKSİYON): Karıştırma ve elektrodun dönmesi gibi mekanik kuvvetlerin neden olduğu kütle aktarım yoludur (Tural vd. 2006).

Difüzyon: Derişim farkından kaynaklanan kimyasal kuvvetin oluşturduğu kütle aktarım yoludur (Tural vd. 2006). Deneysel koşullara bağlı olarak bunlardan bir tanesi veya birkaçı kütle aktarımına katkıda bulunabilir.

1.1.4. Voltametri ve Esasları (Skoog vd., 1996, 1998; Yıldız ve Genç, 1993)

Voltametri, bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik yöntemdir. Uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine voltamogram denir. Genel olarak, voltametride kullanılan çalışma elektrotları, polarizasyonu arttırmak için, yüzey alanları çoğunlukla bir kaç milimetre kare veya daha küçük olan mikroelektrotlardır.

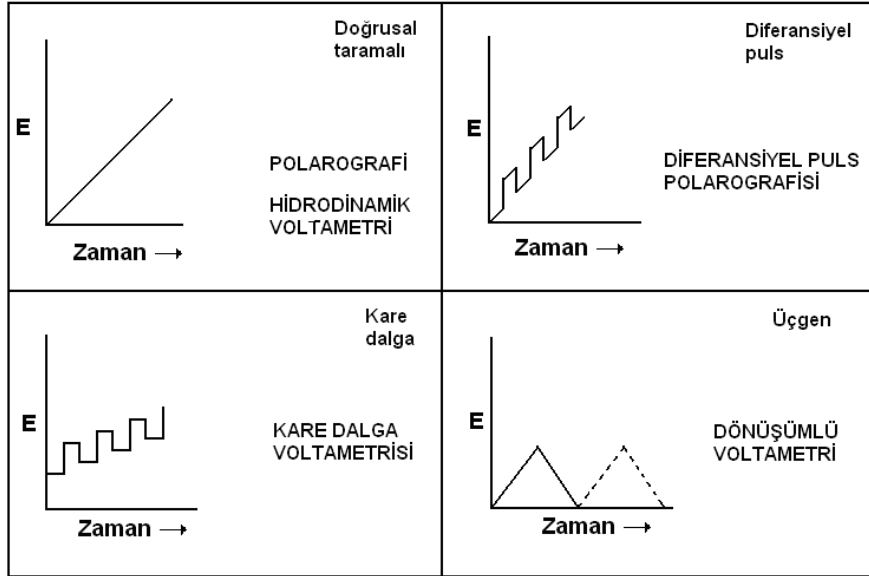
Voltametri yönteminde hücreye alanı çok küçük olan bir mikro çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasına uygulanan ve değeri zamanla değiştirilen gerilime karşı, hücrede çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasındaki akım ölçülür. Herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektroda uygulanabilecek gerilim aralığının sınırları, kullanılan çalışma elektrodunun ve kullanılan çözücü ve elektrolit türlerine bağlıdır.

Voltametri, 1920'lerin başında Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından ve voltametrimin özel bir tipi olan polarografi tekniğine dayanılarak geliştirilmiştir. Voltametrimin önemli bir kolu olan polarografi yönteminde çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodu (DCE) kullanılmaktadır. Polarografi bu yönüyle diğer voltametrik tekniklerden farklılık göstermektedir.

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

1.1.4.1. Voltametrinde Kullanılan Uyarma Sinyalleri (Skoog vd., 1996, 1998).

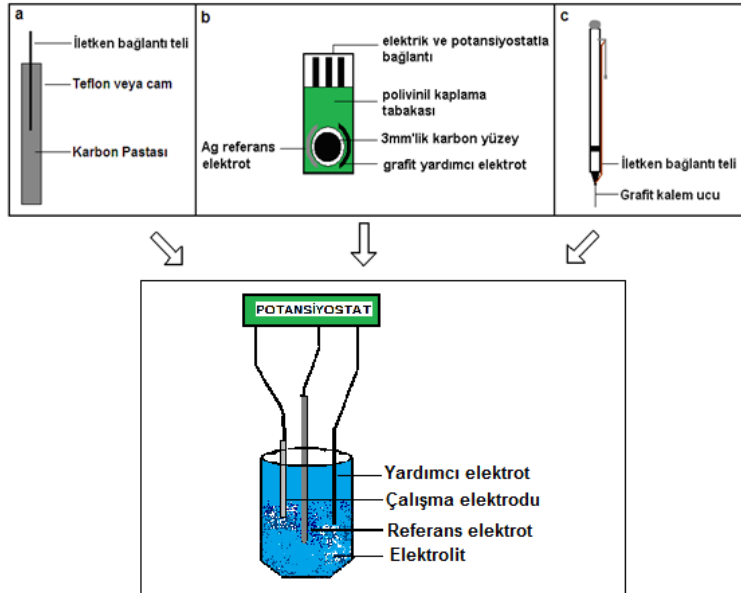
Bir mikroelektrot içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin dayandığı karakteristik bir akım cevabı oluşturur. Voltametrinde en çok kullanılan dört uyarma sinyalinin şekli, şekil 2'de verilmiştir. Bunlar; doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen dalgadır.



Şekil 1.2. Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

1.1.4.2. Voltametrik Cihazlar

Voltametrik analizde kullanılacak cihazlar, elektrokimyasal hücre ile içinde analiti içeren ve destek elektrolit adı verilen derişimi yüksek bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır.



Şekil 1.3. Üçlü elektrot sisteminin şematize edilmesi; a) Karbon pastası elektrodu (CPE), b) Perde baskılı karbon (grafit) elektrot (SPCE), c) Kalem grafit elektrot (PGE).

Çalışma elektrodu: Referans elektroda bağlı olarak çalışan ve cevabı (potansiyeli) analit derişimine bağlı olan elektrottur. Bu elektrot, yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur.

Referans elektrot: Potansiyeli çalışılan çözeltinin bileşiminden bağımsız ve deney süresince sabit kalan elektrottur. Referans elektrot olarak en çok Ag /AgCl veya doygun kalomel elektrot (DKE) kullanılmaktadır.

Referans elektrodun sahip olması gereken özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- Kolay hazırlanabilme,
- Potansiyelin sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olma,
- Belli bir akım aralığında tersinir davranma, yani içinden küçük akımlar geçtiğinde bile gerilimi sabit kalma,
- Polarize edilemeyen bir elektrot olma,
- Potansiyeli zamanla değişmeme,
- Doğru ve tekrarlanabilen bir potansiyel değeri hızlı bir şekilde okuma özelliklerine sahip olmalıdır.

Yardımcı elektrot: Genellikle helezon şeklinde bir platin tel veya bir civa havuzu 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.

1.1.4.3. Voltametrde kullanılan referans (karşılaştırma) elektrotları (Evans 1991; Skoog vd., 1996, 1998; Pietrzyk ve Frank 1979; Sevice 1998).

Referans elektrotların potansiyeli elektrokimyasal çalışmalar sırasında dış ortandan etkilenmez. İdeal bir referans elektrot tersinirdir ve Nernst eşitliğine uyar. Zamanla değişmeyen bir potansiyeli vardır, küçük bir akıma maruz kaldıktan sonra orijinal potansiyeline döner ve sıcaklık değişimi ile ufak bir histerisis gösterir.

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

Referans elektrotlar

Kalomel Referans Elektrot: Kalomel (Hg_2Cl_2) ile temasta olan metalik civadan oluşan karışım ile bilinen derişimde potasyum klorür (KCl) içerir.

Bu elektrodun hazırlanışı kolaydır ve potansiyeli, klorür iyonlarının aktifliğine bağlıdır. İçersinde doygun KCl çözeltisi bulunan doygun kalomel elektrot (DKE)'un standart hidrojen elektroduna (SHE) göre $25^{\circ}C$ de potansiyeli $+0,244 V$ 'dur. Diğer kalomel elektrotlarla kıyaslandığında, sıcaklık katsayısı daha büyüktür, ayrıca, sıcaklık değiştiğinde potansiyelinin yeni bir değere ulaşması çok yavaştır. Bunun nedeni ise potasyum klorür ile kalomelin çözünürlük dengesinin yeniden kurulmasının zaman almasıdır.

Gümüş-Gümüş Klorür Referans Elektrot: En yaygın kullanılan referans elektrotlardan biri olan gümüş-gümüş klorür referans elektrot, gümüş klorür ile doyurulmuş potasyum klorür çözeltisine gümüş elektrodun daldırılmasıyla elde edilir.

Doygun KCl çözeltisi kullanıldığı zaman standart hidrojen elektroduna göre potansiyeli, $+0,222 V$ dur.

Civa-Civa(1) Sülfat Referans Elektrot: Doygun kalomel elektroda benzeyen bu elektrodun potansiyeli, sülfat iyonlarının aktifliği ile tayin edilir.

1.1.4.4. Voltametrde kullanılan çalışma elektrotları

Çalışma elektrodu 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 metalden yapılmış olabilir.

Bu tip elektrotların her birinin çalışma potansiyel aralığı farklıdır ve bu potansiyel aralığının tespiti çok önemlidir. Bu aralık elektrot türüne, çözücüye, kullanılan destek elektrolit türüne ve pH'ye bağlı olarak 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 ile sınırlanır.

Kullanılan çalışma ortamına göre çalışma elektrotları için seçilen potansiyel aralıkları aşağıda verilmiştir.

Çalışma Elektrodu	Destek elektrolit	Çalışma potansiyel aralığı
Karbon elektrot	1 M HClO ₄	(+0.2 V) ile (+1.8 V)
	0,1 M KCl	(-1.0 V) ile (+1.2 V)
Civa Elektrot	1 M H ₂ SO ₄	(-0.8 V) ile (+0.4 V)
	1 M KCl	(-1.6 V) ile (+0.2 V)

Karbon Elektrotlar:

Geniş bir potansiyel aralığında çalışma yapılmasına imkan sağlaması ve maliyetlerinin çok az olmasından dolayı elektrokimyasal analizlerde sıkça kullanılmaktadırlar. Karbonun yüksek bir yüzey aktivitesine sahip olmasından dolayı organik bileşikler tarafından kolayca kirletilebilmesi bir dezavantajdır. Hidrojen, hidroksil ve karboksil grupları ve hatta kinonlar ile karbon yüzeyinde bağlar oluşabilmektedir. Ancak öte yandan bu fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle karbon yüzeyine birçok değişik madde tutturulabilir.

Karbon elektrotların çeşitleri:

a) Karbon Pastası Elektrodu (CPE):

Grafit tozunda bulunan karbon molekülleri düzlemsel ve aromatik halkalar halinde dizilmişlerdir. Bu tabakalar zayıf π bağları ile birbirine bağlanmıştır ve aralarında hızlı bir elektron alışverişi olabilmektedir.

CPE, yüzey yenilenmesinin kolay olması, ucuz olması, düşük artık akımlar oluşturması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. 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. Yeterli miktarda organik çözügen içeren çözeltilerde kullanıldığı zaman, karbon pastasının çözeltide dağılması CPE'nin en önemli dezavantajıdır.

b) Camsı Karbon Elektrot (GCE) :

Camsı karbon, fenol / formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin 1000-3000 °C arasında basınç altında karbonizasyona uğratılması ile elde edilir.

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, karbon pastası elektrotlarına göre elektrokimyasal yanıt özellikleri yüzeyin çok daha pürüzsüz ve düzgün olması nedeniyle daha iyidir. Bunun yanı sıra GCE yüzeyinin fiziksel dayanıklılığı da daha yüksektir.

c) Perde Baskılı Karbon (Grafit) Elektrotlar(SPCE):

Son yıllarda tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrotlar çok yaygın şekilde kullanım alanı bulmuştur. Özellikle biyosensör teknolojisinin geleceği olan DNA teknolojisine uygulanabilirliği açısından oldukça başarılı sonuçlar veren bu elektrotlar geleceğin elektrotları olarak gösterilmektedir (Lucarelli vd., 2002, Marazza vd.,1999).

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

d) Kalem Grafit Elektrot (PGE):

Kalem grafit elektrotların tekrarlanabilirliğinin diğer çalışma elektrotlarına kıyasla daha iyi olması, daha düşük belirtme alt sınırı, ucuz ve tek kullanımlık olması sebebiyle kullanımları gün geçtikçe artmaktadır (Karadeniz vd., 2003, Wang vd., 2001a).

e) Metal Elektrotlar:

Platin ve altın (Carpini vd. 2004; Herne ve Tarlov 1997; Özkan vd. 2002a,b) en çok tercih edilen elektrotlardır. Bu elektrotlar yüksek elektron transfer kinetiklerine ve geniş bir pozitif potansiyel aralığına sahiptirler.

1.1.4.5. Voltamogramlar

Uygulanan gerilime karşı ölçülen akım arasında çizilen eğrilere voltamogram denir. Doğrusal taramalı voltamogramlar sigmoidal (S şekilli) görünümündedir. Bunlar voltametik dalga olarak bilinir. Dik artıştan sonra akım sabit kalır bu sabit akıma sınır akımı, I_s denir. Çünkü akım, analizlenecek maddenin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızıyla sınırlıdır. Sınır akımları analizi yapılacak madde derişimiyle doğru orantılıdır. Aralarındaki bağlantı;

$$i_s = k C_A$$

şeklinde yazılabilir. Bu denklemde;

C_A analit derişimi ve k ise bir sabittir. Kantitatif doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye dayanır.

Sınır akımının yarısına eşit olan akıma karşılık gelen potansiyele yarı-dalga potansiyeli denir ve $E_{1/2}$ ile gösterilir ve derişimden bağımsızdır.

Çözelti veya elektrodun sürekli hareket içinde olduğu doğrusal taramalı voltametriye Hidrodinamik Voltametri adı verilir.

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 zemin akımının oluşmasına neden olan etkenlerden biridir.

Faradayik akım (I_f): Çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonu olurken diğerinde indirgenme reaksiyonu meydana gelir, bu sırada elektrotların doğrudan aktarımı ile akım iletilir. Bu şekilde oluşan akımlara faradayik akım denir.

$$I = I_f + I_c \text{ olduğundan } i_c \text{ azalırsa duyarlılık artar.}$$

Analit derişimi genellikle 10^{-3} M ve daha büyük ise; $I_c < I_f$ 'dir ve doğru bir kantitatif analiz yapılabilir. 10^{-4} M da kısmen iyi sonuç alınır. 10^{-5} M ve daha düşük ise; $I_c \gg I_f$ olacağı için doğru sonuç alınamaz.

1.1.4.6. Voltametrik akımlar

Voltametrde uygulanan gerilimin belli bir değerinde devreden geçen 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, akım

$$I = nFAD_A \left(\frac{\partial C_A}{\partial x} \right)$$

şeklinde ifade edilir.

I = Amper cinsinden akımı,

N = Analitin molü başına elektronların mol sayısını,

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

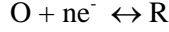
A = cm^2 cinsinden elektrot yüzey alanını,

D_A = A' nın difüzyon katsayısını, ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

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

1.1.4.7. Elektrokimyasal bir olayda faradayik işlemler

Elektrot çözelti ara yüzeyinden akım iki tip işlemle iletilir. Birincisinde, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonları olurken diğesinde indirgenme reaksiyonu olur. Bu tip işlemlere faradayik işlemler adı verilir. Bu reaksiyonlarda;



O ve R'nin, sırasıyla, redoks çiftinin, yükseltgenmiş ve indirgenmiş şeklini ifade ettiği tepkime ile gösterilmektedir. Çözeltideki elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişimi $[C_o]$ ve $[C_R]$ ile ölçülen gerilim arasındaki ilişki;

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

şeklinde ifade edilen Nernst denkleminde göre belirlenir.

E^0 = Redoks tepkimesi için standart potansiyel

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

T = Sıcaklık (K)

n = Reaksiyonda transfer edilen elektron sayısı

F = Faraday sabiti (96487 coulomb)

1.1.4.8. Polarografi (Skoog vd., 1996, 1998; Yıldız ve Genç, 1993).

Polarize elektrot olarak damlayan civanın kullanıldığı voltametrik bir yöntem olan polarografi ilk bulunan ve uygulanan voltametri tipidir. Bu yöntemle oluşturulan akım- potansiyel eğrilerine polarogram denir. Destek elektrolite ait polarogramın incelenmesi ile, ortamda analizlenecek madde yokken bile hücrede *artık akım* adı verilen küçük bir akımın oluştuğunu gösterir.

Akımın büyüklüğü analizlenecek maddenin elektrot yüzeyine taşınma hızı ile sınırlı olduğu zaman sınır akımları gözlenir. Ancak, polarografideki kütle aktarım yolu yalnızca difüzyondur. Bu nedenle polarografik sınır akımlarına, genellikle *difüzyon akımları* denir ve i_d ile gösterilir. Bu, difüzyon akımı ile artık akımlar arasındaki farktır. Difüzyon akımı analizlenecek madde derişimi ile doğru orantılıdır.

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

Polarografik yöntemlerde doğruluk ve duyarlık, faradayik olmayan artık akımın büyüklüğüne bağlıdır ve doğruluk artık akımın etkisini gidermek için yapılan bir düzeltme ile tayin edilebilir.

1.1.4.9. Voltametrik teknikler

Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri hızlı taramalı voltametriye benzer, fakat burada potansiyel tarama işlemi döngüselidir. Potansiyel E1 değerinden E2 değerine belli bir hızla tarandıktan sonra, taramanın yönü tersine çevrilerek çoğunlukla aynı hızla E1 değerine ulaşılır. Dönüşümlü voltametride, karıştırılmayan çözeltilerde üçlü elektrot sistemiyle çalışılır. Burada hızı, difüzyon hızı tayin eder. Analitin yükseltgenmesi ve indirgenmesi voltamogramda gözlemlenmektedir. Başlangıç taramanın yönü, numune bileşimine bağlı olarak negatif ya da pozitif yönde olabilir. Genel olarak çevrim süresi 1 ms veya daha kısa süreden 100 s veya daha uzun süre aralığındadır. Dönüşümlü voltamogramların ayrıntılı incelenmesiyle, bir sistemin hangi gerilimlerde ve kaç adımda indirgenip yükseltgendiğini, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığını, elektrot tepkimesinin bir kimyasal tepkime ile el ele gidip gitmediğini, indirgenme ya da yükseltgenme ürünlerinin kararlı olup olmadığını, elektrot tepkimesinde rol alan maddelerin yüzeye tutunup tutunmadıklarını anlamak mümkündür.

Diferansiyel Puls Voltametri ve Polarografisi

Normal puls voltametrisinde pulsun sonunda saptanan akım az da olsa kapasitif bileşen içerir. Bu bileşenin ölçülen akımdaki payını daha da azaltmak ve seçimliliği arttırmak için pulsun başında ve sonundaki akımları ölçüp, farklarını alma yoluna gidilmiştir. Bu teknikle çalışan yöntemle diferansiyel puls voltametri denir (Tural vd. 2006).

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 analitin derişimi ile doğru orantılıdır.

Tersinir bir reaksiyonda pik potansiyeli, yarı reaksiyonun standart potansiyeline yaklaşık eşittir.

Doğru akım ve normal puls polarografilerinde yan yana analizler için, genelde yarı dalga potansiyelleri arasındaki farkın 120–240 mV olması gerekirken, diferansiyel puls polarografisinde bu farkın, 30–60 mV olması yeterlidir. Bu teknik normal puls tekniğinden daha duyarlı olup, duyarlılığı 10^{-7} – 10^{-8} M düzeyindedir ve seçimliliği de yüksektir. Diferansiyel puls polarografisinin yüksek duyarlılığı iki şekilde açıklanabilir. Birincisi, faradayik akımın artması, ikincisi de faradayik olmayan yükleme akımının azalmasıdır.

Puls polarografisinin uygulamaları:

Puls yöntemleri günümüzde kullanım kolaylığı, yüksek duyarlılığı ve seçiciliğinden dolayı, çoğu klasik yöntemin yerini almıştır. Puls yöntemleri kantitatif uygulamalarda, genellikle pik yüksekliklerinin analizlenecek madde derişimine karşı grafiğe geçirildiği kalibrasyon eğrileri çizilmesi çalışmalarında kullanılır.

1.2. Sensör

Sensör, bir örnek matriksinde analitin doğrudan ölçümü için kullanılan küçük bir dedektördür. Böyle bir aygıt, incelenen örneği etkilemeden tersinir ve sürekli yanıt alma yeteneğinde olmalıdır. Bir sensör üç temel bileşenden oluşur.

- ✓ Tanıyıcı bölüm,
- ✓ Tanıyan ile tanınan arasındaki etkileşmeyi ölçülebilir sinyaline çeviren “çevirici” (transducer) bölüm,
- ✓ Elektronik bölüm.

Tanıyan ile tanınan arasındaki etkileşmeyi elektrokimyasal ölçülebilir sinyallere çeviren sensörler, elektrokimyasal sensörlerdir.

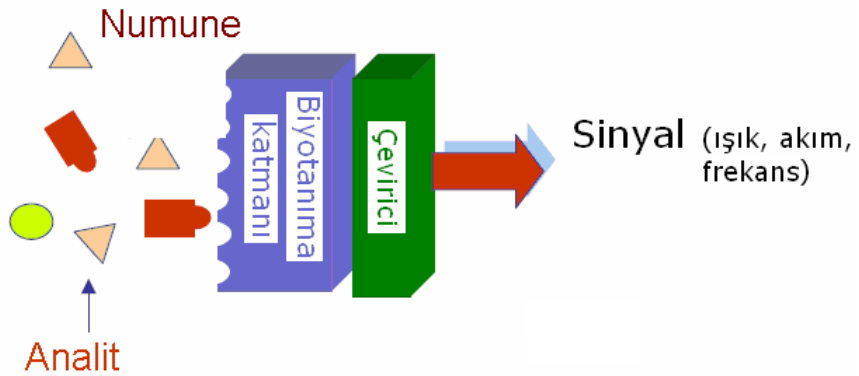
Elektrokimyasal sensörler (elektrokimyasal algılayıcı sistemler) Analitik Kimya’da oldukça yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Bu cihazlara IUPAC tarafından literatürde getirilen tanım şu şekildedir:

“Kimyasal bileşiklere ya da iyonlara seçici ve tersinir şekilde cevap veren ve derişime bağımlı elektriksel sinyaller oluşturan küçültülmüş cihazlara elektrokimyasal sensörler” denir (Camman, vd. 1991). Bu sensörler, yapılarına enzim, hücre, doku, antikor, DNA, vb. biyolojik maddelerin eklenmesiyle biyosensör adını almışlardır.

1.2.1. Biyosensör

Biyosensörler, biyolojik materyaller içeren ve/veya bunları çeşitli ortamlarda kalitatif ve/veya kantitatif tayin ve izlenmesinde kullanan aygıtlardır. Biyosensörde en önemli husus sistemde mutlaka bir biyolojik materyal kullanılıyor olmasıdır. Bu biyolojik materyaller kullanılarak, çok seçici, çok duyarlı, çoğu zaman da daha hızlı ölçüm yapmak mümkündür.

Genel anlamda bir biyosensörün şekli aşağıdaki gibidir.



Şekil 1.4. Biyosensörün yapısı

Tanıyıcı bölümde immobilize edilmiş ligandlar bulunmaktadır. Ligand herhangi bir kimyasal bileşik olabilir, ancak bu bir biyolojik materyal ise (örneğin bir enzim, bir antikor/antijen, bir oligopeptid, bir oligonükleotid, bir mikroorganizma veya bir hayvan/bitki hücresi/dokusu) bu sensör, bir biyosensör olarak tanımlanır.

Biyosensörün tanıyıcı tabakasına takılmış bulunan ligand (“tanyan”) ile tayini gerekleŖecek olan analit (“taninan”) arasında, sensör yzeyinde bir etkileŖme oluŖur. Bu etkileŖme, biyosensörlerde çoğu kez çok seçicidir. EtkileŖmenin sonucunda oluŖan deęiŖiklik, örneğin, ortaya çıkan bir kimyasal madde veya baŖlangıta ortamda bulunan ve etkileŖme ile kaybolan bir kimyasal madde, numunenin, bir elektrokimyasal deęiŖiklięe uğramasına (elektriksel potansiyel veya akım deęiŖimi gibi) neden olur. Alternatif olarak etkileŖim sonucu ortaya ısı çıkar veya kaybolur; optik özellikler deęiŖir veya kütle deęiŖimi gözlenir. Cihazdaki “evirici” birimi bu deęiŖimi algılar, ortaya çıkan deęiŖmeleri elektriksel, optik, kütle deęiŖimi veya termal sinyallere dönüŖtürür. Bu sinyal, elektronik bölüm tarafından değerlendirilir ve sayısal, okunabilir verilere dönüŖtürölür.

Biyosensörler, biyolojik iŖlemlerin yapısına bağlı olarak iki ana sınıfa ayrılır.

- 1) Enzimlerin, hücrelerin, bakteri veya dokuların immobilize bileŖenler olarak kullanıldığı aygıtlar, yani enzim metabolik sensörler,
- 2) Antikor/ antijen, membran alıcılar veya nükleik asitlerin kullanıldığı afinite sensörleri.

eviriciye göre biyosensörler;

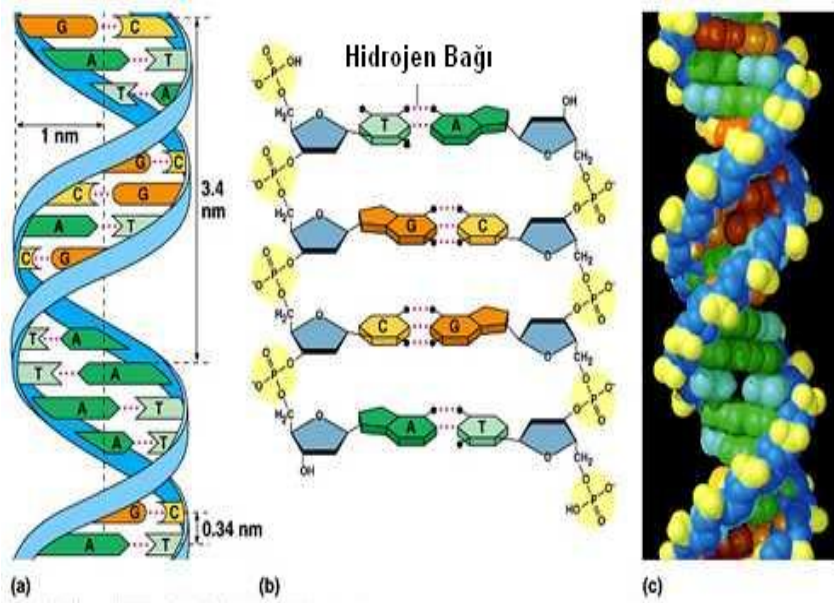
- 1) Optik,
- 2) Piezoelektrik,
- 3) Termal ve
- 4) Elektrokimyasal biyosensörler olarak dört gruba ayrılır.

Optik biyosensörler, biyokimyasal bir tepkime sonrasında adsorbe edilen veya yayılan ışığın ölçülmesi ilkesine dayanır. Bu tür biyosensörlerde ışık dalgaları dedektöre optik fiberlerle ilerler. Termal biyosensörler, analitin uygun bir biyokomponent ile biyokimyasal tepkimesi sonucu açığa çıkan ısıya bağlı olarak analitin tayinini yapar. Piezoelektrik biyosensörler, doğal bir anizotropik kristalin mekanik strese tabi tutulmasıyla oluŖan elektrik dipölü prensibine göre alıŖır. Analit adsorbsiyonu kristalin kütesini artırır ve temel salınım frakansını deęiŖtirir. Biyosensörlerin sahip olduğu bazı dezavantajları mevcuttur. Örneğin optik biyosensörler çok duyarlı olmasına karŖın bulanık ortamlarda, termal biyosensörler ise çok küçük ısı deęiŖiklięinin olduğu sistemlerde kullanılamaz (Chaubey ve Malhotra, 2002).

Elektrokimyasal biyosensörler günümüzde en çok kullanılan biyosensörler haline gelmiştir. Elektrokimyasal biyosensörler, üzerinde bir veya birden fazla biyolojik katalizör taşıyan elektrotların kullanıldığı sistemlerdir. Elektrokimyasal biyosensörlerde bir biyo-etkileşim sürecinde, elektrokimyasal türler, bir elektrokimyasal dedektör tarafından ölçülebilen bir elektriksel sinyal oluşturarak, harcanır veya üretilir. Elektrokimyasal biyosensörler diğer biyosensörlerde ortaya çıkan çoğu dezavantajın üstesinden gelmiştir. Bu biyosensörler, bulanık ortamlarda kullanılabilirler, oldukça düşük duyarlılığa sahiptirler, küçük boyutlardadırlar ve ucuzdurlar. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte elektroaktif özellik gösteren çeşitli kimyasal ve biyolojik maddeler, uygun biyosensörler geliştirilerek daha kolay, daha çabuk ve daha duyarlı tayin edilebilmişlerdir. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken, sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkün olmuştur. Bununla birlikte biyomateryalin pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi ortam koşullarından etkilenmesi, biyosensörün kullanım ömrünü kısalttığından bir dezavantajdır. Biyosensörlerin tanıyıcı katmanında görev alan biyomateryaller, çoğu kez biyoreseptör olarak da adlandırılırlar. Bunların içinde en yaygın olarak kullanılanlar, enzimler ve antikorlardır. Protein yapılı makromoleküllere ek olarak, hücre, doku, nükleik asitler ve DNA da biyoreseptör olarak kullanılmaktadır.

1.2.1.1. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri

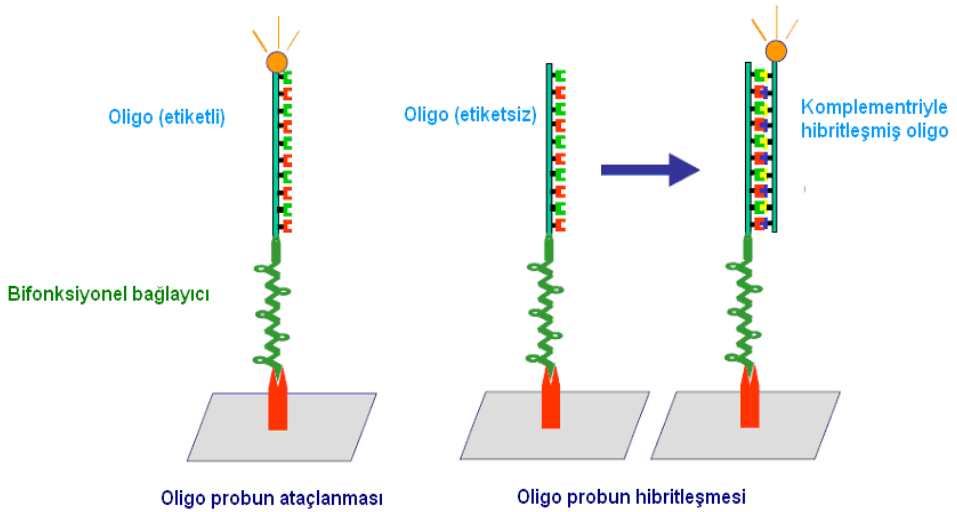
DNA, canlıların genetik şifresini taşıyan büyük bir moleküldür. Adenin, Guanin, Sitozin ve Timin bazlarıyla beş karbonlu şeker ve fosfat gruplarından oluşur. Pürin (Adenin, Guanin) ve pirimidin (Sitozin, Timin) bazları birbirine hidrojen bağlarıyla bağlıdır. Adenin ve timin arasında ikili, Guanin ve sitozin arasında üçlü hidrojen bağı vardır.



Şekil 1.5. DNA molekülünün çift sarmal yapısı

DNA molekülündeki bazı bazların (adenin, guanin) elektroaktif özelliği ilk kez 1960 yılında Palecek tarafından bulunmuştur (Palecek, 1960). Elektrokimyasal yöntemlerle birlikte DNA'nın nitel ve nicel analizini yapma amacına yönelik olarak tasarlanan biyosensörlerde tanıma yüzey katmanı olarak DNA kullanılmasına artan bir ilgi bulunmaktadır (Brabec, 1983, Brabec ve Koudelka, 1980, Cai vd., 1996).

Nükleik asit tanıma yüzeyi içeren biyosensörler (genosensörler; gene dayalı sensörler), bu yüzey ile etkileşime giren analitin (karsinojen maddeler, ilaçlar, vb.) etkileşim mekanizmasının aydınlatılması veya miktarının tayini veya DNA'daki baz dizisi belli bölgelerdeki hibridizasyon olaylarının izlenmesi gibi çeşitli amaçlarla kullanılabilirler (Erdem vd., 2000). Nükleik asit hibridizasyonu, baz çiftlerinin özel koşullara bağlı olarak kararlı bir dubleks molekülü oluşturmasıdır. Analitin DNA ile etkileşmesi sonucunda, incelenen maddenin veya DNA'daki bir bazın sinyalinde meydana gelecek değişiklikler sayesinde güvenilir tayinler yapılabilmektedir (Johnstone vd., 1995). Aşağıdaki şekilde bir oligonükleotid probunun hibridizasyonu gösterilmektedir.



Şekil 1.6. Oligonükleotid probunun ataçlanması hibridizasyonu

Bazı ilaç molekülleriyle (özellikle antikanser özellik taşıyan ilaç molekülleri) DNA'nın etkileşmesi ve bu etkileşmenin, geliştirilen yeni yöntemlerle tayin edilmesi, yeni ilaç tasarımları için büyük önem taşımaktadır (Jelen vd., 2002). 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 meydana gelmesi, bu ürüne duyarlı elektrokimyasal DNA biyosensör tasarımı getirmiştir (Kelley vd., 1999). Bir kimyasalın ya da metabolitinin DNA ile etkileşimi sonrasında DNA'da oluşabilecek yan ürünlerin kısa zamanda tespiti kanser araştırmalarında çok etkilidir.

Madde–DNA etkileşiminin sonucunda, çalışmanın türüne göre elde edilen madde sinyali ya da DNA'daki elektroaktif bir bazın sinyalindeki artma veya azalmaya bağlı olarak elektrokimyasal tayin gerçekleştirilmektedir.

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri, etiketli veya etiketsiz olarak tasarlanabilir. Analizlenecek DNA baz dizisine bağlı olarak hibridizasyondan sonra adenin ve guaninin pik şiddetleri artabilir veya azalabilir. Hibridizasyondan sonra pik şiddetinin azaldığı durumlarda kantitatif bir akım sinyali elde edebilmek için DNA molekülüne etiket adı verilen bir molekül bağlanır. Etiket, elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde elektroaktif, spektroskopik yöntemlerin kullanıldığı sensörlerde ise floresans özellikteki bir moleküldür.

Bu amaçla kullanılan DNA modifiye edilmiş camı karbon elektrotlar (GCE), karbon pastası elektrotlar (CPE), kalem grafit elektrotlar (PGE), perde baskılı karbon (SPCE) ve perde baskılı altın elektrotlar (Au-SCPE), altın elektrotlar (AuE) ve cıva damla elektrodu (DCE), incelenen maddelerin mikromolar ve hatta nanomolar gibi derişimlerinin, güvenli ölçümlerini mümkün kılmaktadır (Brett vd.,1998).

Günümüzde çok sayıda kalıtsal hastalığa neden olan mutasyonlar artık kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Bu konudaki bilgilerimiz insan genom projesi (Collins vd., 1998) devam ettiği sürece artmaktadır. Bu projeye birlikte insan genomunun tüm genlerinin haritalanabilmesi mümkün olabilecek, ayrıca tüm varyasyonlar belirlendiği ve farmakogenomik çalışmalar sonuçlandığı zaman, sağlık sisteminde hızlı sonuç verebilen düşük maliyetli DNA testlerine ihtiyaç duyulacaktır.

Çeşitli biyolojik materyallerde (kan, serum, doku ve vücut sıvıları vb.) belirli bir hastalık, mutasyon gibi kalıtsal bir olayı simgeleyen DNA dizisi saptanması ve bu örneklerden hastalık tayini yapılması, tıbbi analizler ve uygulamalarda çok önemlidir. Nükleik asit tanıma yöntemlerine dayanan elektrokimyasal DNA biyosensörleri rutin 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. Bazı bulaşıcı ve kalıtsal hastalıklara ait DNA dizilerinin tanımlanması, genomik DNA çiplerinin tasarımı, nükleik asit hibridizasyonuna dayanmaktadır. Elektrokimyasal DNA biyosensörünün tasarlanmasındaki amaçlardan biri de DNA'daki hibridizasyonun tayin edilmesidir. Diziye özgü ve seçimli olarak tayin yapabilen DNA biyosensörleri, bir DNA probu içeren kısım ve tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştüren çevirim sisteminden oluşmaktadır (Likhitwitayawuid vd., 1993).

DNA tanıma yüzeyleri (DNA Biyosensörleri, genosensörler), dizisi belli olan bölgelerdeki hibridizasyon olaylarının izlenmesinde (Molinier-Jumel, vd., 1978) veya bu yüzey ile etkileşime giren analizlenecek maddelerin (karsinojen maddeler, ilaçlar, vb.) tayininde kullanılabilir.

DNA biyosensörü yapmak için en önemli koşul, DNA'yı elektrot yüzeyine immobilize etmektir. DNA, elektrot yüzeyine farklı yöntemlerle bağlanabilir.

➤ Adsorbsiyon,

- Kovalent bağlama,
- Jel/polimer tutuklama,
- Çapraz bağlama

bu yöntemlerden bazılarıdır. DNA'yı elektrot yüzeyine immobilize etmek için yardımcı materyallerin kullanımı ile ilgili çalışmalar da mevcuttur. Elektrot yüzeyine DNA'yi immobilize etmek için özellikle polimerler, metal nano ve polimer nanopartiküllerin kullanımı giderek yaygınlık kazanmaktadır. DNA'yı immobilize etmek için kullanılan polimerler iletken olabilir. Kullanılan polimerin iletken olmadığı durumlarda, elektroaktif bir türle etiketlenmesi (labelling), veya streptavidin, metal nanopartiküller, manyetik partiküller, karbon nanotüpler gibi malzemelerin elektrot matriksine karıştırılması sonucunda DNA'nın tutturulacağı yeni sensör yüzeyleri tasarlanabilir.

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri ve uygulamaları günümüzde çok yaygın olarak kullanılmakla birlikte bu konu ile ilgili araştırmaların sayısı özellikle son 5 yıldır artarak devam etmektedir. DNA'nın redoks tepkimesi tersinmez olmakla birlikte, çok yüksek pozitif ve negatif potansiyellerde görüldüğünden, DNA molekülüne ait akımların ölçümü zor olmaktadır. Bu yüzden düşük potansiyellerde tersinir elektrot tepkimeleri veren elektroaktif DNA proplarının hazırlanması gereği duyulmuştur. Elektrokimyasal DNA biyosensörleri spesifik DNA dizilerinin hızlı ve doğrudan tayini için çok uygundur. DNA biyosensörlerinin uygulanabilirliği, nükleik asit sistemi ve elektronik sinyal çevirici arasında özel bir bağlantı gerektirmektedir. Örneğin elektroaktif redoks polimerleri DNA'yı elektrot yüzeyine immobilize etmek için uygun bir ara yüzey sağlayabilir. Elektrokimyasal tanı, çok yönlü kullanıma açık, taşınabilir ve kolay kullanılabilir ürünler oluşturulmasına olanak sağlar. Ayrıca çok çeşitli örnekler içinden hedef DNA analizi yapılabilmektedir. Elektrokimyasal tanının üstünlüğü, eser miktarlarda dahi, DNA'nın tayininin, örnek hazırlama ve amplifikasyon gibi zaman alıcı işlemlerden arındırarak ucuz bir şekilde yapılmasına olanak sağlamasıdır (Luong vd., 1988).

Literatürde farklı amaçlara yönelik çeşitli elektrokimyasal DNA biyosensörleri (elektrokimyasal gen sensörleri) bulunmaktadır.

Polimer Modifiye DNA Biyosensörleri: İletken polimerler DNA'nın immobilize olabileceği uygun bir platformdur. Özellikle polipirol (Ramanavicius vd., 2006)

polivinil ferrosen (Kuralay vd., 2008), poli[pirol-ko-4-(3-pirol)butanoik asit] (Peng vd., 2005, 2006), gibi iletken polimerler, DNA biyosensör tasarımıında oldukça sık kullanılmaktadır.

Karbon nanotüp Modifiye DNA Biyosensörleri: Son 10 yılda, nanopartiküller, karbon nanotüpler ve diğer nanomalzemelere dayalı sensörlere artan bir ilgi bulunmaktadır. DNA analizlerine yönelik, karbon nanotüp ile modifiye edilmiş perde baskılı elektrot (SPE) (Karadeniz vd., 2008), camsı karbon elektrot (GCE) (Wang vd., 2003) ve kalem grafit elektrotların (PGE) (Çalışkan vd., 2009; Erdem vd., 2009, 2010; Yapaşan 2010) kullanıldığı pek çok çalışma mevcuttur.

Nanopartikül Modifiye DNA Biyosensörleri: DNA analizlerine yönelik biyosensör çalışmalarında elektrot yüzeyinin nanopartiküllerle modifikasyonu son yıllarda çok sık kullanılan bir yöntemdir. Diğer nanomalzemelerin kullanımında olduğu gibi nanopartikül ile modifiye edilmiş sensör yüzeyi büyüdüğü için immobilize olan DNA miktarı artmakta ve DNA hibridizasyonu için daha düşük tayin sınırları, ayrıca nanopartiküller kullanılarak elde edilen kararlı yüzey nedeniyle tekrarlanabilirliği daha yüksek sonuçlar elde edilmektedir. Literatürde nanopartikül kullanımına dayalı DNA analizine yönelik pek çok çalışma mevcuttur ve kaynak özetleri bölümünde belirtilmiştir.

1.3. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, maddenin nanometre boyutunda, yani atomsal, moleküler ve supramoleküler yapılar düzeyinde denetlenmesi yoluyla yeni malzeme, cihaz ve sistemlerin tasarlanmasını ve üretilmesini konu alan bir teknoloji dalıdır. Maddeleri moleküler ya da nanometre düzeyinde ele alan bir mühendislik bilimi olan nanoteknoloji, daha güçlü ve daha hafif elektronik malzemelerin kullanıldığı yeni bir süreç vaat ederek bilim insanlarının son yıllarda umutlarını arttırmaya devam etmektedir. Bilim adamları gün geçtikçe çalışmalarında daha küçük boyutlara yönelmeye, daha az yer kaplayan, daha az enerji harcayarak daha hızlı çalışabilecek aygıtlar hazırlamaya çalışmışlardır.

Günümüzde birçok sektörde devrim niteliğinde bir potansiyele sahip olan ve heyecan verici bir hızla gelişen nanoteknoloji başka bir ifadeyle, çeşitli araçların, malzemelerin ve yapıların moleküler düzeyde işlenmesi, düzenlenmesi ve

tasarlanması olarak tanımlanmaktadır. Bugün bilim adamları bu nano-ölçekteki olguları ve yöntemleri öğrenmeye ve kendi kendini çoğaltabilen, denetleyebilen, kontrol edebilen, onarabilen araçlar, malzemeler ve yapılar oluşturmaya çalışmaktadırlar. Nano birimi ile 100 – 0.1 nanometre (nm) (10^{-7} metre ile 10^{-10} metre) arasındaki herhangi bir büyüklük ifade edilmektedir.

Nanomühendislik (Drexler, 1992), nanoelektronik (DeSilva vd., 1993) nanobiyoelektronik (Göpel, 1998) vs. disiplinlerin ortaya çıkması, bu disiplinler için uygun boyut ve fonksiyonel blok yapılarının sentezlenmesini gerekli kılar. Bu ihtiyaç, süper moleküller (Lehn, 1999), biyomoleküller (Niemeyer, 1997) ve dendrimer kimyası (Matthews vd., 1998) gibi çalışmalarda maddelerin angström ve nano boyutlardaki özelliklerinin geliştirilmesine imkan sağlamıştır. Bu teknolojiyle ilgili çeşitli uygulamalar (sensör, fotoelektrokimyasal, vb) mevcuttur.

Nanoteknoloji ayrıca, nanometre ölçeğindeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması, kontrolü ve üretimi amacıyla, fonksiyonel malzemelerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesini amaçlayan disiplinlerarası bir bilim dalıdır. Nanoteknolojinin günümüzde diğer bilim dallarına sağladığı avantajlar ve bunu takiben hemen hemen her alanda hızlı bir ilerlemenin kaydedilmesi sonucunda, bilim ve teknolojiye yeni ufuklar açılmaya başlamıştır. Nanoteknoloji ile üretilen nanopartikül, nanotüp ve nanokablolar gibi gelişmiş fizikokimyasal özelliklere sahip nanomalzemeler, biyomoleküler algılamaya yönelik elektrokimyasal sensörlerin daha seçici ve daha hassas bir şekilde geliştirilebilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. (Cai vd., 2003b; Chen vd., 2001; Çalışkan 2009; Erdem vd., 2006a, 2007a, b, 2010; Mc. Farland ve Duyne 2003; Guo vd., 2004; Hahm vd., 2004; Karadeniz vd., 2007a; Koehne vd., 2004; Luo vd., 2006; Merkoçi vd., 2005; Musameh vd., 2002; Özsöz vd., 2003; Ravindran vd., 2003; Salem vd., 2004; Yapaşan 2010; Wildgoose vd., 2006; Wu vd., 2003).

Nanometre büyüklüğündeki nanomalzemeler sensör tasarımlarında;

- ❖ enzim, DNA, protein vb. gibi biyolojik moleküllerin elektrot yüzeyine doğrudan bağlanmasını kolaylaştırmak,
- ❖ elektrokimyasal reaksiyonları hızlandırmak,
- ❖ biyomalzemeleri nanobarkotlarla etiketlemek,

- ❖ biyomoleküler etkileşim/tanım reaksiyonu sonucunda oluşan sinyalin duyarlılığını arttırmak,
- ❖ tanıma yüzeyi ve/veya çevirici bölümün küçültülebilmesi

gibi amaçlar için kullanılmakta, bu durum aynı zamanda, biyosensörlerin boyut olarak ta minyatürize edilebilmesine olanak sağlamaktadır (Erdem vd., 2006a, 2007a; Katz vd., 2004; Luo vd., 2006; Merkoçi vd., 2005; Musameh vd., 2002; Patolsky ve Lieber, 2005; Pumera vd., 2007; Vaseashta vd., 2005; Wang 2005a,b; Wildgoose vd., 2006).

1.3.1. Nanopartiküller

Nanokristaller, yüksek yüzey alanı ve farklı optik ve elektriksel özelliklere sahiptir (Alivisatos, 1996). Mikron boyutlarındaki çalışmaların nano boyutlara taşınabilmesi imkanı olduğundan artık mikron boyutlarında yapılan çalışmaların nano seviyesinde de denenebilme olanağı bulunmaktadır.

Nanopartiküller ise genellikle büyüklükleri, şekil ve kararlılık ajanları açısından çok farklı özellikler gösterirler. Kataliz, metallerin, özellikle soy metallerin yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle pek çok kimyasal reaksiyonda en popüler uygulamalarından biri olarak ele alınabilir. Nanopartiküller, aynı zamanda elektron transferini kolaylaştırır ve kimyasal ligandlar ve biyomoleküllerle geniş oranda kolayca modifiye edilebilir. Bu özellikler, nano boyutların minyatürleştirilmesi ve algılama cihazlarına uygulanmasının kolaylığı ile birleştirildiğinde, nanopartikülleri, kimyasal/biyokimyasal algılamadaki önemli uygulamalar için çok uygun hale getirir (Hrapovic vd., 2004).

Nanopartiküller sadece yapısal özellikleri ile değil fonksiyonel özellikleri ile de üstün malzemelerdir. Çeşitli yöntemler kullanılarak yığın özelliklerinin yanında fonksiyonel özelliklerinin değiştirilmesi sağlanabilir. Nanopartiküllerin elektronik (Khairutdinow, 1997), optik (Mulvaney, 1996) ve katalitik (Lewis, 1993) özellikleri, onların kuantum (Alivisatos, 1996) seviyesindeki boyutlarından kaynaklanmaktadır.

Nano boyutlu partiküller, geniş bir yüzey alanına ve farklı optik ve elektronik özelliklere sahip olduklarından dolayı modern teknolojik sistemlerde kullanılabilirliklerinin araştırılması önem kazanmıştır.

1.3.1.1. Nanometre boyutlu grafin yapılar (GRP)

Karbon nanotüplerin açılmış şekli olarak ta tanımlanan grafin, grafitik malzemenin yapı taşı olan sp^2 hibritleşmesi yapmış, karbonun iki boyutlu tabakalarından oluşmuştur (Novoselov vd., 2004). Bu, bir atom kalınlığındaki tek karbon tabaka, benzen gibi aromatik halka yapısının bir sonucu olarak yoğun şekilde doludur. Nano boyuttaki malzemelerde yararlı uygulamaları nedeniyle grafine yoğun bir ilgi bulunmaktadır. Yarı iletken maddelerin tam tersine, tekli grafin tabakaların, grafitten farklı olarak elektronik enerji farkı yoktur. Bu nedenle oda sıcaklığında bile metallerin iletkenliğine benzer bir iletkenlik gösterir (Novoselov, 2007).

Grafin, benzersiz mekanik ve elektriksel özellikleri nedeniyle sayısız uygulamalarda ilgi çekici bir materyal olarak ortaya çıkmıştır (Geim ve Novoselov, 2007; Wilson, 2006; Stampfer vd., 2008; Li ve Kaner, 2008; Peres vd., 2006).

Çoğu grafin çalışması, elektronik özelliklerinin yanısıra fiziksel özellikleri üzerine temellenir. Gaz ve pH sensörlerinin bazı uygulamalarında grafinin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Leenaerts vd.,2008; Huang vd., 2008; Ang vd., 2008). Bununla birlikte grafinin biyosensör çalışmalarında kullanımı henüz çok yaygın değildir. Grafin, mükemmel bir elektriksel iletkenlik, geniş yüzey alanı ve güçlü mekanik dayanım gösterir (Wilson, 2006; Li ve Kaner, 2008; Westervelt, 2008).

Yaygın olarak kullanılan modifiye edilmiş Hummers metoduna göre, grafit tozuna oksijen içeren fonksiyonel grupların eklenmesi ile grafin yükseltgenir. Tek katmanlı yükseltgenmiş grafin levhalar sulu ortamda iyi bir şekilde dağılıbilir ve filtrasyon sonucunda yükseltgenmiş grafin partikülleri elde edilir (Su vd., 2009). Grafinin süper mekanik özelliklerine ek olarak, her bir yükseltgenmiş grafin levha, düzgün bir şekilde kümelenebilme özelliği ile diğer materyallerin geliştirilmesinde ve özelliklerinin iyileştirilmesinde anahtar bir rol oynar (www.sciencedialy.com).

1.3.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

İnsan gözünün çok ince ayrıntıları görebilme olanağı sınırlıdır. Bu nedenle görüntü iletimini sağlayan ışık yollarının mercekle değiştirilerek, daha küçük ayrıntıların görüntülenmesine olanak sağlayan optik cihazlar geliştirilmiştir. Ancak bu cihazlar, gerek büyütme miktarlarının sınırlı oluşu gerekse elde edilen görüntü üzerinde işlem yapma imkânının olmayışı nedeniyle araştırmacıları bu temel üzerinde yeni sistemler geliştirmeye itmiştir. Elektronik ve optik sistemlerin birlikte kullanımı ile yüksek büyütmelerde, üzerinde işlem ve analiz yapılabilen görüntülerin elde edildiği cihazlar geliştirilmiştir.

Elektro-optik prensipler çerçevesinde tasarlanmış taramalı elektron mikroskopu (Scanning electron microscope-SEM), bu doğrultuda tasarlanmış cihazlardan birisidir (<http://www.mos.org/sin/SEM>). Taramalı elektron mikroskopu, birçok alanda, araştırma-geliştirme çalışmalarında kullanımının yanında, mikro elektronikte, sanayinin değişik kollarında hata analizlerinde, biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucu meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sistemler dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir. Gerek ayırım gücü (resolution), gerek odak derinliği (depth of focus) gerekse görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği, taramalı elektron mikroskopunun kullanım alanını genişletmektedir.

1.3.3. DNA Çip Teknolojisi

Moleküler tekniklerdeki ilerlemeler, faydalı yeni ürünlerin hızla ortaya çıkması ve problemlerin çözümünde, sağlık ve yaşam bilimlerinin yakın geleceğinde en önemli faktör olarak kabul edilmektedir.

Bilişim teknolojisindeki gelişmeye İnsan Genom Projesinin sonuçları da eklenince tıbbi tanı sistemlerinde olağanüstü bir dönemin eşğine gelindiği görülmektedir. Günümüzde insan hastalıklarına ait oluşum mekanizmalarının çözümlenmesinden

söz edilebilmekte ya da kişiye özgü ilaç sentezi gibi yeni kavramlar gündeme gelmektedir. Yeni gen teknolojileri arasında en dikkat çekici olanı DNA ‘chip’ teknolojisidir. Bu yöntem belki biyoteknolojinin de kavramsal olarak ulaşabileceği son noktadır.

İnsan genom dizisinin belirlenmesi sonrası moleküler tanı teknolojilerinde beklenen dramatik değişiklik ile fonksiyonel genomik araştırmalarda en belirgin artış son yıllarda başlamıştır. Biyoinformatik, nanoteknoloji ve minyatürleştirme, mikroelektronikteki gelişmeler klinik çalışmalara entegre olmuş ve enformasyon ve bilgisayar endüstrisi ile geleneksel medikal mühendisliği değişikliğe uğramıştır. Mikrodizin veya bioçip ürünleri, bu gelişmeler sonucu ortaya çıkmış, tıbbi araştırma ve ilaç geliştirilmesi konusundaki çalışmalarını hızlandırmıştır. Moleküler tıptaki gelişmelerle, tıbbi laboratuvarlarda nükleik asit ve proteinlere bağlı testler, insan ve patojen genom çalışmalarından gelen bilgiler ile invitro diagnostik (IVD) testler ve cihazlar için yeni kullanım alanları oluşmuştur.

Moleküler biyolojinin önemli adımlarından biri, bir zemin üzerinde sabitlenmiş sentetik gen dizileriyle serbest nükleik asitlerin hibridizasyonudur. DNA ‘chip’ analizlerinin geliştirilmesindeki amaç ise, sentetik gen dizileriyle nükleik asitlerin hibridizasyonunun birçok gen bölgesinde yüksek duyarlılıkla ölçülmesidir.

Bu konu ile ilgili ilk çalışmalar Schena (1995, 1996) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu teknoloji ile binlerce cDNA’nın aynı anda analiz edilebilmesi sağlanmıştır. Çiplerin yer aldığı zeminler ilk olarak Brown ve arkadaşlarınca oluşturulmuştur (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown>).

DNA çip teknolojisi günümüzde temel olarak gen anlatım analizlerinde kullanılmaktadır. Böylece, biyoinformatik ve istatistik bilimlerinin de yardımıyla geniş genom bölgelerinin taranmasına olanak sağlanmaktadır (Bassett vd., 1999).

Bu teknolojiyle aynı gene ait binlerce tek nükleotid değişikliği de eşzamanlı olarak saptanabilmektedir. Böylece mutant ya da polimorfik formlara ait bilgi çok zenginleşmektedir ve genom haritalama çalışmaları hızlanmaktadır (Cheung vd., 1999; Gerhold vd., 1999; Lipshutz vd., 1999; Yershov vd., 1996). Bununla birlikte insan genomuna ait mutasyon analizi için kullanılan bu yapıdaki DNA çiplerinin sayısı henüz sınırlıdır. Kullanıma giren p53 ya da BRCA1 ve BRCA2

gibi onkojenlere yönelik DNA çipleri ticari olarak mevcuttur (Ahrendt vd., 1999; Sapolsky vd., 1999).

İnsan Genom projesi dışında DNA çip teknolojisinin önemli bir katılımcısı farmasotik şirketlerdir. Birçok bioçip üreticisi, ilaç şirketleri ile stratejik ortaklık halindedir. İlaç geliştirmeye yönelik farmakogenomik çalışmalardaki hızlı ilerleme sayesinde, yakın gelecekte, bireysel farmakogenetik endüstrisi tarafından hastalıkların tanımlanması ve hastalıklarla ilişkili genlerdeki DNA değişikliklerinin saptanması (SNP analizleri) mümkün olabilecektir. Moleküler taramalar, bireylerin hastalık yatkınlığının önceden belirlenmesi, erken teşhis, hastalığın seyrinin tahmin edilebilmesi ve en uygun tedavi seçeneğinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bireyin doktor ofisinde veya hasta başında test yapılarak genetik profilinin belirlenmesi, bireye yönelik tedavi uygulamalarının da yakın gelecekte gerçekleşeceğini göstermektedir.

Moleküler tanı konusundaki çalışmalar ile önümüzdeki yıllarda özellikle moleküler mikrobiyoloji, viral patojen saptanması, genotiplendirme ve kan taraması alanlarında ilerlemeler beklenmektedir. Hastalık yapıcı etkenin erken ve hastalık durumunun hızlı saptanmasını ve erken tedavi kararı verilmesini sağlayacak, daha hızlı tekniklere ihtiyaç vardır. Moleküler tekniklerin kullanımını artıracak diğer faktörler ise, bu tekniklerin kolay ve otomatize edilebilir ve ayrıca, güvenilirliği ve geçerliliği yüksek sonuçlar veren teknikler olmasıdır (www.metisbio.com).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde elektrot yüzeyini modifiye etmek için çeşitli yardımcı materyaller (polimerler, metal nanopartiküller, polimer nanopartiküller vs.) kullanılmaktadır. Bu konuyla ilgili çalışmalar kısaca özetlenmiş ve ayrıca tablo halinde verilmiştir.

Yang vd. (2007) camı karbon elektrot yüzeyini polidikarboksilik asit ile modifiye etmişler ve elde ettikleri modifiye yüzeyi PAT gen fragmanını tayin etmek için kullanmışlardır. Yang ve arkadaşları bu çalışmada metilen mavisini indikatör olarak kullanmışlardır.

Nafyon ile modifiye ettikleri camı karbon elektrot yüzeyinde Zhu vd. (2005) daunomisin ile etkileştirdikleri DNA dizisinin tayini gerçekleştirmişlerdir.

Zhang vd. (2008), indikatör olarak metilen mavisini kullandıkları çalışmada gen dizisinin tayini için, camı karbon elektrot yüzeyini, zirkonyum ve altın nanopartikül ile modifiye etmişlerdir.

Nanomalzemeler ile modifiye edilmiş bir başka çalışma ise Yang vd. (2007)'nin karbon nanotüp/ nanozirkonyum di oksit/kitosan ile modifiye ettikleri elektrot yüzeyini, DNA hibridizasyonunda kullandıkları çalışmalarıdır.

Peng vd. (2006), oligonükleotid tayini için geliştirdikleri elektrotta yüzeyi polipirol ile modifiye etmişlerdir.

Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde çok yoğun olarak kullanılan karbon nanotüplerle camı karbon elektrot yüzeyini modifiye eden Cheng vd. (2005) daunomisin indikatörü yardımıyla DNA hibridizasyonu çalışmışlardır.

Polianilin nanotel ile elektrot yüzeyinin modifiye edildiği bir başka çalışmada ise Zhu vd. (2006) metilen mavisini indikatör olarak kullanmışlardır.

Au ve Ag nanopartikülerin birleştirilmesiyle elde edilen nanokompozit ile modifiye edilen platin elektrotla DNA hibridizasyonunu tayin eden Fu vd. (2006) bu tayinde elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniğini kullanmışlardır.

Streptavidin kaplı Au nanopartiküllerle modifiye ettikleri grafit epoksi kompozit elektrotları, biotin işaretli DNA analizinde kullanan Bonanni vd. (2008) bu çalışmada streptavidin ile biotin arasındaki etkileşimden yararlanmışlardır.

Zhang vd. (2010) Au/poli amino benzoik asit/karbon nanotüp ile modifiye ettikleri yüzeyde adriyamisinini indikatör olarak kullanmışlar ve DNA hibridizasyonu çalışmışlardır.

Doğal bir polimer olan kitosan birçok çalışmada yüzeyi nanopartiküller ile modifiye etmede yardımcı materyal olarak kullanılmıştır. (Cai vd., 2002; Galandova vd., 2009; Li, 2005; Zhang, 2008)

Cai vd. (2003a), polipirol ile modifiye ettikleri elektrot yüzeyine Cu ve Au nanopartiküller ile işaretlenmiş DNA probu immobilize ederek bu yüzeyi DNA hibridizasyonunda kullanmışlardır.

Tek ve çok duvarlı karbon nanotüple modifiye ettikleri kalem grafit elektrot ve perde baskılı elektrot yüzeyleri ODN (oligonükleotid) tayini ve DNA hibridizasyon tayini için kullanan Erdem vd (2009), Çalışkan vd. (2009), Erdem vd. (2006), Karadeniz vd. (2008) bu çalışmalarında birçok elektrokimyasal teknik kullanmışlardır.

Zhu vd. (2005) Pt nanopartiküller ve karbon nanotüpler ile modifiye ettikleri yüzeyde, daunomisin indikatörlüğünde DNA hibridizasyon çalışmışlardır.

Kuralay vd. (2009a, b) polivinil ferrosen polimeri ile modifiye ettikleri elektrot yüzeyini, ODN tayini ve DNA hibridizasyon çalışmaları için kullanmışlardır.

Çizelge 2.1: Modifiye Edilmiş Elektrokimyasal DNA Biyosensörü ile Yapılmış Çalışmalar

Elektrot	Modifikasyon	Etiket	Analit	Teknik	Literatür
GCE ⁽¹⁾	Poli dikarboksillik asit	Metilen mavisi	PAT gen fargmanı	DPV ⁽²⁾ -CV ⁽³⁾	(Yang vd., 2007)
GCE	Nafyon	Daunomisin	DNA	DPV	(Zhu vd., 2005)
GCE	Zirkonyum/nano altın film	Metilen mavisi	Gen dizisi	DPV-CV	(Zhang vd., 2008)
GCE	Karbon nanotüp/nanozirkonyum di oksit/kitosan	Daunomisin	DNA hibrit	DPV	(Yang vd., 2007)
Polipirol	CdS nanopartikül		ODN ⁽⁴⁾	CV-EIS ⁽⁵⁾	(Peng, vd., 2006)
GCE	Çok duvarlı karbon nanotüp	Daunomisin	DNA hibrit	DPV	(Cheng vd., 2005)
GCE	Polianilin nanotel	Metilen mavisi	DNA hibrit	DPV	(Zhu vd., 2006)
PtE ⁽⁶⁾	Au-Ag nanokompozit		DNA hibrid	EIS	(Fu vd., 2006)

GECE ⁽⁷⁾	Streptavidin kaplı Au nanopartikül		ODN	EIS	(Bonanni vd. 2008)
GCE	Au/poli amino benzoik asit/karbon nanotüp	Adriyamisin	DNA hibrit	CV, DPV, EIS	(Zhang vd., 2010)
Grafit elektrot	Kitosan-karbon nanotüp	Metilen mavisi	ODN	CV, DPV, UV ⁽⁸⁾	(Li vd., 2005)
GCE	ZnO nanopartikül/karbon nanotüp/kitosan	Metilen mavisi	PAT geni, NOS (nofalin sintaz) geni	DPV, EIS	(Zhang vd., 2008)
PGE ⁽⁹⁾	Tek duvarlı karbon nanotüp		DNA hibrit	DPV, EIS	(Çalışkan vd., 2009)

PGE	Tek duvarlı karbon nanotüp		ODN	DPV, EIS	(Erdem vd., 2009)
PGE	Çok duvarlı karbon nanotüp		DNA hibrit	DPV, Raman spektroskopisi	(Erdem vd., 2006)
SPE ⁽¹⁰⁾	Çok duvarlı karbon nanotüp		DNA hibrit	DPV	(Karadeniz vd., 2008)
SPCE ⁽¹¹⁾	Kitosan/karbon nanotüp		ODN	CV, EVLS ⁽¹²⁾	(Galandova vd., 2009)
GCE	Kitosan	Au nanopartikül	DNA hibrit	DPV, CV	(Cai vd., 2002a)

GCE	Pt nanopartikül/carbon nanotüp	Daunomisin	DNA hibrit	DPV, CV	(Zhu vd., 2005)
PGE	Polivinil ferrosen		DNA hibrit	CV, DPV	(Kuralay vd., 2009a).
PtE	Polivinil ferrosen		ODN	Raman Spek. CV, DPV, EIS	(Kuralay vd., 2009b).
GCE	Polipirol	Au-Cu nanopartikül	DNA Hibrit	DPV, ACV ^(1,3)	(Cai vd. 2003a)

1: Camsı karbon elektrod 2: Diferansiyel puls voltametri 3: Dönüşümlü voltametri 4: Oligonükleotit 5: Elektrokimyasal empedans spektroskopisi 6: Platin Elektrot 7: Grafit epoksi kompozit elektrot 8: Ultraviyole 9: Kalem grafit elektrod 10: Perde baskılı elektrot 11: Perde baskılı karbon elektrot, 12: Doğrusal taramalı eliminasyon voltametri, 13: Anodik sıyırma voltametri.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar

Deneyler ve ölçümler sırasında kullanılan tüm cihaz ve donanımlar:

Terazi (Mettler Toledo AB204-S)

Ses titreşimli temizleyici (Bandelin Sanorex)

pH-metre (Orion 420 A)

Manyetik karıştırıcı (Biosan MS 3000)

Vorteks (Yellowline TTS 2)

IR lambası (50 w. Heat-Glo Infrared Terranium Reflector Lamp.)

Potansiyostat (AUTOLAB 302-FRA 2.0, GPES 4.9 yazılımlı, Eco Chemie)

Ag/AgCl referans elektrot (BAS)

Platin tel (Yardımcı elektrot olarak kullanıldı)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik Asit (%99-100)	(Merck)
Sodyum hidroksit	(Merck)
Dipotasyum monohidrojen fosfat	(Merck)
Potasyum dihidrojen fosfat	(Merck)
Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür	(Sigma)
Sodyum klorür	(Sigma)
EDTA disodyum tuzu	(Sigma)
Potasyum hegza siyano ferrat	(Sigma-Aldrich)
Potasyum hegza siyano ferrit	(Sigma-Aldrich)
Potasyum klorür	(Merck)
Dimetil formamit	(Merck)
Balık sperm bezinden elde edilen DNA (Fish sperm DNA; çift sarmal DNA)	(Sigma)

Sentetik oligonükleotidler TIB MOLBIOL (Almanya) firmasından satın alındı.

Oligonükleotidlerin baz dizilimi:

Amino işaretli DNA: (21 baz; DNA-ODN)

5'- NH₂ -(CH₂)₆ -gAg ggT gTC TgA Agg Agg ggg- 3'

Amino işaretli HBV (*hepatit B virüsünü temsil eden kısa DNA dizisi*) DNA *prob*
(20 baz):

5' -NH₂-(CH₂)₆ -AAT ACC ACA TCA TCC ATA TA- 3'

Hedef (20 baz):

5' -TAT ATg gAT gAT gTg gTA TT- 3'

Tek-bazlı farklı dizi (mismatch) (20-baz; MM):

5' -TAT gTg gAT gAT gTg gTA TT- 3'

Tamamlayıcı olmayan dizi (Noncomplementary) (23-baz; NC):

5' -AAT ACC TgT ATT CCT CgC CTg TC-3'

Tüm çalışmalarda ultra saf su kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında (25.0±0.5) °C'de gerçekleştirildi.

Bu çalışmada kullanılan Hepatit B virüsünü (HBV) temsil eden prob dizisi daha önce hibridizasyonla ilgili yapılan çalışmalarda (Erdem vd., 2005, 2006a, 2007b) olduğu gibi HBV'yi temsil eden gen haritasından seçildi ve guanin bazı içermeyen prob dizisinin kullanılması, indikatörsüz hibridizasyon tayini açısından çalışmamıza önemli bir avantaj kazandırdı.

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

3.3.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanışı

Tüm tampon çözeltilerin hazırlanışında ultra saf su kullanıldı. Tampon çözeltiler hazırlandıktan sonra plastik şişelerde, buzdolabında saklandı.

3.3.1.1. Fosfat tampon çözeltisinin hazırlanması

Ölçümler sırasında kullanılan 0.05 M fosfat çözeltisi, litresinde 1.36 g (0.01 mol) KH₂PO₄, 6.96 g (0.04 mol) K₂HPO₄ ve 1.168 g NaCl (0.02 mol) içermektedir. Hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 7.4 olmaktadır. Çözeltinin pH'ı gerekliyse, 0.1 N NaOH ve/veya 0.1 N HCl ilavesiyle pH metre ile 7.4'e ayarlanır.

3.3.1.2. Asetat tampon çözeltisinin hazırlanması

Kullanılan 0.50 M asetat tampon çözeltisi litresinde 28.9 mL asetik asit ve 1.168 g NaCl (0.02 mol) içermektedir. Asetat tamponunun oluşturulması ve çözeltinin

pH'sının 4.8 değerine ayarlanması 0.1 N NaOH ilavesiyle pH metre ile ölçülerek gerçekleştirildi.

3.3.1.3. Tris HCl tampon çözeltisinin hazırlanması

Kullanılan 0.02 M Tris HCl tampon çözeltisi litresinde 3.152 g Trizma HCl ve 1.168 g NaCl (0.02 mol) içermektedir. Çözeltinin pH'sının 7.0 değerine ayarlanması 0.1 N NaOH ve /veya 0.1 N HCl ilavesiyle pH metre ile ölçülerek gerçekleştirildi.

3.3.1.4. Tris EDTA tampon çözeltisinin hazırlanması

Kullanılan Tris EDTA tampon çözeltisi litresinde 1.576 g Trizma HCl ve 0.372 g EDTA içermektedir. Çözeltinin pH'sının 8.0 değerine ayarlanması, 0.1 N NaOH ve /veya 0.1 N HCl ilavesiyle, pH metre ile ölçülerek gerçekleştirildi.

3.3.2 Redoks Çözeltisinin Hazırlanması

Empedans ölçümlerinde kullanılan redoks çözeltisi, litresinde 0.822 g $K_3Fe(CN)_6$, 1.040 g $K_4Fe(CN)_6$ ve 7.45 g KCl içerecek şekilde ultra saf suda hazırlandı.

3.3.3. Oligonükleotid Çözeltilerinin Hazırlanışı

Tüm oligonükleotid stok çözeltileri 500 µg/mL olacak şekilde Tris-EDTA tampon çözeltisi içinde (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH:8.00; TE) hazırlandı ve -20 °C'de saklandı. DNA-ODN ve HBV prob seyreltmeleri 20 mM NaCl içeren 0.5 M asetat tampon çözeltisinde (pH:4.80; ABS), hedef/NC/MM DNA seyreltmeler ise 20 mM NaCl içeren 0.05 M fosfat (pH:7.4, PBS) ve 20 mM NaCl içeren 0.02 M Tris HCl tampon çözeltisi (pH:7.0, TBS) içinde yapıldı.

3.4. Kullanılan Çalışma Elektrotların Hazırlanması

3.4.1. Karbon Pasta Elektrotların (CPE) Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan karbon pasta elektrotlar %70 grafit tozu ve %30 mineral yağı içerecek şekilde hazırlandı. Elektrot dik konumda tutularak, yüzeyi yağlı

kağıt üzerinde halkalar çizmek suretiyle zımparalandı ve ölçüme hazır hale getirildi.

3.4.2. Kalem Grafit Elektrot (PGE) Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan kalem grafit elektrot, Tombo marka kalem uçlarının 3.0 cm boyutunda kesilmesiyle hazırlandı (Özsöz vd., 2002; Wang vd., 2001a) Elektrokimyasal hücre içerisinde 1.0 cm kalacak şekilde kalem içerisine yerleştirildi.

3.4.3. Camsı Karbon Elektrotların (GCE) Hazırlanması

Herhangi bir hazırlama işlemi gerektirmeyen camsı karbon elektrotlar, kullanılmadan önce 0.5 µm partikül çapı olan alumina çözeltisiyle zımparalanarak temizlendi. Temizlenen elektrotlar 15 dakika ses titreşimli cihazda bekletilerek ölçüme hazır hale getirildi.

3.4.4. Elektrokimyasal Ölçümler

Tüm Elektrokimyasal ölçümlerde üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Çalışma elektrodu olarak bölüm 3.4'teki elektrotlar, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot, yardımcı elektrot olarak ise Pt tel kullanılmıştır. Tüm voltametik ölçümler asetat tampon çözeltisi içerisinde, empedans ölçümleri ise redoks çözeltisi (0.1 M KCl içeren 2.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ (1:1) karışımı) içerisinde Faraday kafesinde gerçekleştirilmiştir. Empedans spektrometrisinde, uygulanan 100 mHz - 100 kHz frekans aralığında 98 farklı frekansta elektrot yüzeyinde, elektron transferine karşı oluşan direnç ölçüldü.

3.5. SnO₂ Nanopartikülleri ile Modifiye Edilmiş Grafit Elektrotların Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesine Yönelik Çalışmalar

3.5.1. SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Karbon Pasta Elektrotların (CPE) Hazırlanması

Çalışmada kullanılan SnO₂ nanopartiküller (SNP) Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde hidrotermal sentez yöntemine göre sentezlenerek

(Gökdaı vd., 2010) tarafımıza temin edilmiştir. SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrotlar (SNP-CPE) %70 grafit tozu ve %30 mineral yağı içerecek şekilde hazırlandı. Modifikasyon sırasında grafit tozunun farklı oranlarında SnO₂ nanopartikül ilave edildi. Elektrot dik konumda tutularak, yüzeyi yağlı kağıt üzerinde halkalar çizmek suretiyle zımparalandı ve ölçüme hazır hale getirildi.

3.5.2. SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Karbon Pasta Elektrotların Yüzey Aktivasyonu

SNP-CPE, 0.05 M asetat tampon çözeltisi (ABS) içerisinde +1.4 V potansiyel uygulanarak 60 saniye süre ile karıştırılmayan ortamda aktive edildi. Bu işlemle karbon elektrotların yüzeyindeki gruplar karboksil gruplarına yükseltgendi.

3.5.3. SnO₂ Nanopartiküllerin Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi

Karbon pasta matriksine, grafit tozunun %10'u oranında SnO₂ nanopartikül eklenerek hazırlanan SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş CPE'nin yüzeyi zımpara kağıdı ile zımparalandıktan sonra 0.05 M ABS içerisinde dönüşümlü voltametri alındı.

3.5.4. Karbon Pasta Matriksine Eklenecek SnO₂ Nanopartikül Miktarının Belirlenmesi

Karbon pasta matriksine, grafit tozunun % 5, 10, 20, 30, 40, 50 oranında SnO₂ nanopartikül eklendi ve elektrot aktive edilerek SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş CPE'nin indirgenme sinyali DPV ile ölçüldü.

3.5.5. Elektrot Aktivasyonu Öncesi/Sonrası SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş CPE'nin Elektrot Yüzeyindeki Değişimlerin Elektrokimyasal Empedans Spektrometri Tekniği ile İncelenmesi

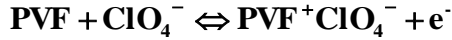
Aktive edilmiş çıplak CPE'nin,
 SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş, aktive edilmiş CPE'nin,
 Aktive edilmemiş CPE'nin ve
 SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş, aktive edilmemiş CPE'nin,

redoks probu (0.1 M KCl içeren 2.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ (1:1) karışımı) içerisinde empedans ölçümleri alındı.

3.6. PVF⁺-SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Kalem Grafit Elektrotlar (PGE) ile DNA Analizlerine Yönelik Yapılan Çalışmalar

3.6.1. Kalem Grafit Elektrotların PVF⁺-SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmesi

Polivinil ferrosen (PVF), metilen klorür/tetra-n-bütil amonyum perklorat (TBAP)/destek elektrolit sistemi içerisinde Hacettepe Üniversitesi'nde hazırlandı. PVF ile perklorat arasında gerçekleşen yükseltgenme tepkimesi aşağıda gösterilmektedir.



PVF⁺ ile modifiye edilmiş PGE, içerisinde PVF bulunan elektrolit ortamında, PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE ise, içerisinde PVF ve SnO₂ nanopartikül bulunan elektrolit ortamında +0.7 V potansiyelde Ag/AgCl referans elektroda karşı, potansiyel kontrollü kulometri yöntemi kullanılarak, kalem grafit elektrodun yüzeyinin kaplanmasıyla elde edildi ve Hacettepe Üniversitesi'nden tarafımıza temin edildi (Kuralay vd., 2008, 2009a,b).

3.6.2. PVF⁺-SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyonu

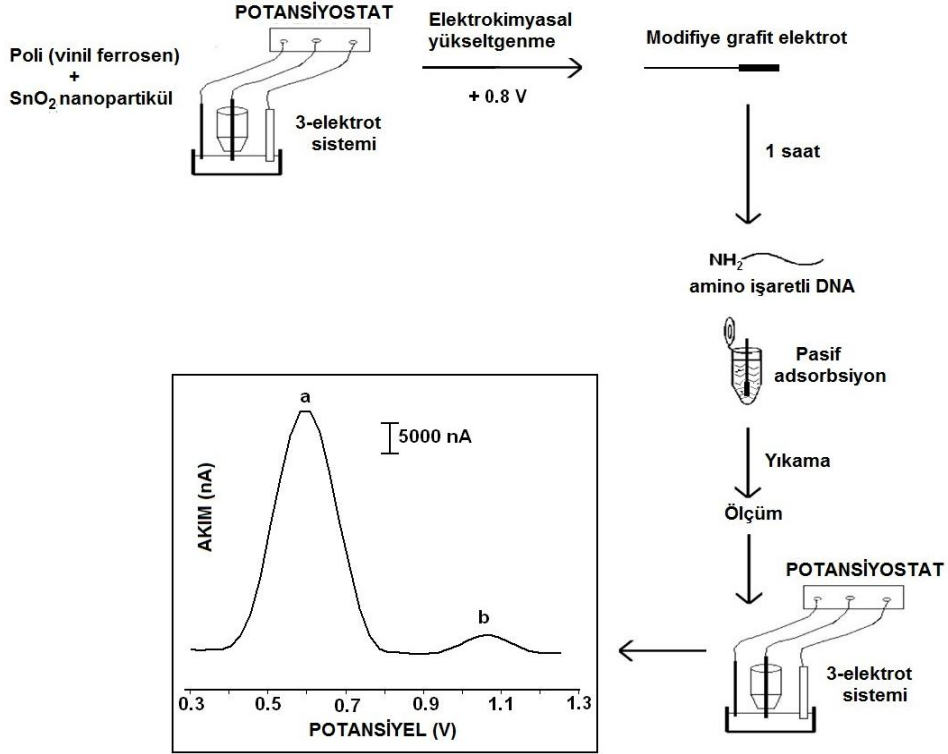
PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE yüzeylerinin mikroskobik karakterizasyonu, alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu ile (hızlandırma potansiyeli 2.5-50 KV) Hacettepe Üniversitesi'nde uzman personel tarafından gerçekleştirildi.

3.6.3. SnO₂ Nanopartiküllerin PVF⁺ Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

PVF'nin yükseltgenme sinyali PVF⁺ ile modifiye edilmiş PGE ve PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE ile 0.05 M ABS içerisinde DPV ile ölçüldü.

3.6.4. PVF⁺-SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeyine DNA İmmobilizasyonu

PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotlar, DNA çözeltisini içeren viyalere daldırıldı ve pasif adsorbsiyon yöntemine göre bu viyaller içinde 30 dakika süreyle bekletildi. (Erdem vd., 2005, 2006a; Karadeniz vd., 2003). Daha sonra PGE'ler, spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için 10 saniye boyunca ABS ile yıkandı. Şekil 3.1'de PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrot yüzeyine DNA immobilizasyonu şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 3.1. PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş-PGE Yüzeyine DNA İmmobilizasyonunun şematik gösterimi.

3.6.5. PVF⁺-SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeyine İmmobilize Edilecek DNA Dizisinin Seçimi

PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE, 100 µg/mL amino işaretli ve tiyol işaretli DNA çözeltilerini içeren viyallere daldırıldı ve pasif adsorpsiyon yöntemine göre bu viyaller içinde 30 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra PGE'ler, 10 saniye boyunca ABS ile yıkandı.

3.6.6. DNA Çözeltisinin Derişimindeki Değişimin Guanin Yükseltgenme Sinyaline Olan Etkisinin İncelenmesi

PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE, 10 µg/mL'den 150 µg/mL'e kadar değişen derişimlerde amino işaretli DNA çözeltilerini içeren viyallere daldırıldı ve pasif adsorpsiyon yöntemine göre bu viyaller içinde 30 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra PGE'ler, 10 saniye boyunca ABS ile yıkandı.

3.6.7. PVF⁺-SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeyinde DNA Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Tayini

3.6.7.1. Geliştirilen Sensör Yüzeyinde Hedef DNA Hibridizasyonunda Seçimlilik ile İlgili Çalışmalar

PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş ve yüzeyine 150 µg/mL prob DNA immobilize edilmiş PGE'ler, 100 µg/mL hedef DNA, aynı derişimde rastgele dizi (NC) ve bir bazı farklı dizi (MM) ve yine aynı derişimde 1:1 oranında hedef DNA ile MM karışımı içeren viyalere 30 dakika süreyle daldırıldı. 30 dakika sonrasında elektrotlar spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için 10 saniye boyunca TBS ile yıkandı.

3.6.7.2. Hedef DNA Çözeltisinin Derişimindeki Değişimin Guanin Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş ve yüzeyine 150 µg/mL prob DNA immobilize edilmiş PGE'ler, içerisinde 20, 40, 80, 100, 140 µg/mL hedef DNA çözeltisi içeren viyalere 30 dakika süreyle bekletildi. 30 dakika sonrasında elektrotlar spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için 10 saniye boyunca TBS ile yıkandı.

3.7. Yükseltgenmiş Grafin ile Modifiye Edilmiş Elektrotlar ile DNA Analizlerine Yönelik Yapılan Çalışmalar

Çalışmada kullanılan yükseltgenmiş grafin, Ulster Üniversitesi Nanoteknoloji Bütünleştirilmiş Biyomühendislik Merkezi'nde (NIBEC), Prof. Papakonstantinou ve araştırma ekibi tarafından, modifiye Hummers metoduna göre aşağıdaki işlem basamaklarıyla sentezlendi ve tarafımıza temin edildi.

Mikrokristal yapısındaki grafit (Aldrich 5 g) 120 mL 3:1 oranında H₂SO₄ (18 M) ve HNO₃ (17 M) karışımı içerisinde 2 saat boyunca 100 W gücünde Branson tipi ses titreştiricide, daha sonra 8 saat ses titreşimli su banyosunda bekletildikten sonra çözelti içerisinde dağılmış olan nano yapılar 4 gün boyunca oda

sıcaklığında, rengi morumsu kahverengiye dönene kadar bekletildi. Birkaç kez su ile yıkandı ve yıkama sonrasında yükseltgenmiş tabakalar, gözenek kalınlığı 0.2 µm olan PTFE (poli tetrafloroetilen) membrandan süzüldü. Süzüntü 1 gece boyunca vakum altında, rengi grimsi olana kadar kurutuldu.

3.7.1. Camsı Karbon Elektrotların (GCE) Yükseltgenmiş Grafin ile Modifiye Edilmesi

Camsı karbon elektrotların yüzeyi partikül çapı 0.5 µm olan alumina çözeltisiyle temizlendi. 15 dakika sonikatörde bekletildi. Temizlenen yüzeye modifikasyon için grafinin dimetil formamid (DMF) içerisindeki çözeltisinden 2 µL damlatıldı ve IR lambasının altında 30 dakika bekletilerek kurutuldu.

3.7.2. Kalem Grafit Elektrotların (PGE) Yükseltgenmiş Grafin ile Modifiye Edilmesi

Kalem grafit elektrotlar ABS içerisinde 30 saniye süreyle 1.4 V potansiyel uygulanarak aktif hale getirildikten sonra, dimetil formamid içerisinde 30 dk sonikatörde bekletilerek çözülmüş olan 3000 µg/mL grafin çözeltisi içerisine 1 saat süreyle daldırılarak modifiye edildi. 1 saat sonunda grafin ile modifiye edilmiş olan elektrotlar 30 dakika süreyle oda sıcaklığında kurutuldu.

3.7.3. PGE ve GRPox-PGE Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyonu

GRPox ile modifiye edilmiş PGE yüzeyinin mikroskobik karakterizasyonu, alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu ile (hızlandırma potansiyeli 5.00-10.0 KV) İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde uzman personel tarafından gerçekleştirildi.

3.7.4. Kalem Grafit Elektrotların Aktivasyonu

PGE'ler, 0.05 M asetat tampon çözeltisi (ABS) içerisinde, elektrot yüzeyine +1.4 V potansiyel uygulanarak 30 saniye süre ile karıştırılmayan ortamda aktive edildi.

3.7.5. GRPox ile Modifikasyon Öncesi Elektrot Aktivasyonunun Guanin Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

30 saniye boyunca yüzeyine 1.4 V potansiyel uygulanarak aktive edilmiş PGE ve herhangi bir aktivasyon işlemine tabi tutulmamış PGE'ler, 750 µg/mL GRPox içeren viyalere daldırıldı. 1 saat sonunda grafin ile modifiye edilmiş olan elektrotlar 30 dakika süreyle kurutuldu. Daha sonra yüzeyi modifiye edilmiş PGE'ler 50 µg/mL DNA içeren viyalere daldırıldı. 1 saat bekletildikten sonra ABS ile yıkandı ve guanin yükseltgenme sinyali DPV tekniği ile ölçüldü.

3.7.6. Elektrot Yüzeyine DNA İmmobilizasyonu

3.7.6.1. GRPox-GCE yüzeyine DNA immobilizasyonu

Yükseltgenmiş grafin ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot (GCE) yüzeyine 5 µL, 100 µg/mL DNA çözeltisi damlatıldı. Böylece yüzeyine DNA immobilize edilmiş GRPox-GCE'ler, spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için 10 saniye boyunca ABS ile yıkandı.

3.7.6.2. GRPox-PGE yüzeyine DNA immobilizasyonu

Yükseltgenmiş grafin ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotlar (PGE), DNA çözeltisini içeren viyalere daldırıldı ve pasif adsorbsiyon yöntemine göre bu viyaller içinde 60 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra, PGE'ler 10 saniye boyunca ABS ile yıkandı.

3.7.7. Yüzeyine DNA İmmobilize Edilmiş Grafin (GRP) ve Yükseltgenmiş Grafin (GRPox) ile Modifiye Edilmiş PGE'lerin Guanin Yükseltgenme Sinyali Açısından Karşılaştırılması

Önişlem görmüş ve yüzeyi 500 µg/mL GRP ve aynı derişimde GRPox ile modifiye edilmiş PGE'ler, 50 µg/mL DNA içeren viyalere daldırıldı ve pasif adsorbsiyon yöntemine göre bu viyaller içinde 60 dakika süreyle bekletildi. Daha sonra PGE'ler, 10 saniye boyunca ABS ile yıkandı.

3.7.8. PGE Yüzeyine İmmobilize Edilen GRPox Derişiminin Guanin Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

Aktive edilmiş PGE'ler, 10 µg/mL den 8000 µg/mL'ye kadar değişen derişimlerde GRPox içeren viyalere daldırıldı. Elektrot yüzeyi, 1 saat süreyle pasif adsorbsiyon yöntemiyle GRPox ile modifiye edildi. 1 saat sonunda elektrotlar yıkanmadan 30 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Modifiye olmuş PGE'ler daha sonra 50 µg/mL DNA içeren viyalere 1 saat süreyle daldırıldı. 1 saat sonunda yüzeyine DNA immobilize edilmiş GRPox ile modifiye edilmiş PGE'ler, spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için 10 saniye süreyle ABS ile yıkandı.

3.7.9. DNA Çözeltisinin Derişiminin Guanin Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

Yüzeyi 3000 µg/mL GRPox ile modifiye edilmiş PGE'ler, 1 saat süre ile 5, 10, 20, 25, 40, 50, 100 µg/mL DNA çözeltisi içeren viyalere daldırıldı. 1 saat sonunda yüzeyine DNA immobilize edilmiş PGE'ler spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için 10 saniye boyunca ABS ile yıkandı.

3.7.10. Geliştirilen Sensör Yüzeyinde Hibridizasyon

3.7.10.1. GRPox modifiye edilmiş PGE ile HBV DNA hibridizasyonunda seçimlilik çalışması

3000 µg/mL GRPox ile modifiye edilmiş ve yüzeyine 40 µg/mL DNA immobilize edilmiş PGE'ler, 160 µg/mL hedef DNA, rastgele dizi (NC) ve 1:1 oranında hedef DNA ile MM karışımı içeren viyalere 1 saat süre ile daldırıldı. 1 saat sonunda elektrotlar spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için 10 saniye boyunca TBS ile yıkandı.

3.7.10.2. Hedef DNA çözeltisinin derişiminin hibridizasyon yanıtına etkisinin incelenmesi

3000 µg/mL GRPox ile modifiye edilmiş ve yüzeyine 40 µg/mL DNA immobilize edilmiş PGE'ler, 10, 20, 40, 160, 200 µg/mL hedef DNA çözeltisi içeren viyalere 1 saat süreyle daldırıldı. 1 saat sonunda elektrotlar spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için 10 saniye boyunca TBS ile yıkandı.

3.7.11. GRPox ile Modifiye Edilmiş PGE ile HBV-DNA Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Empedans Spektrometri Tekniğı İle İncelenmesi

PGE'lerin;

önişlem sonrasında,

3000 µg/mL GRPox ile modifikasyondan sonra,

modifiye edilmiş yüzeye 40 µg/mL amino işaretli DNA immobilize edildikten sonra,

DNA immobilize edilmiş modifiye PGE'nin 160 µg/mL hedef ve 160 µg/mL NC ile hibridizasyonundan sonra,

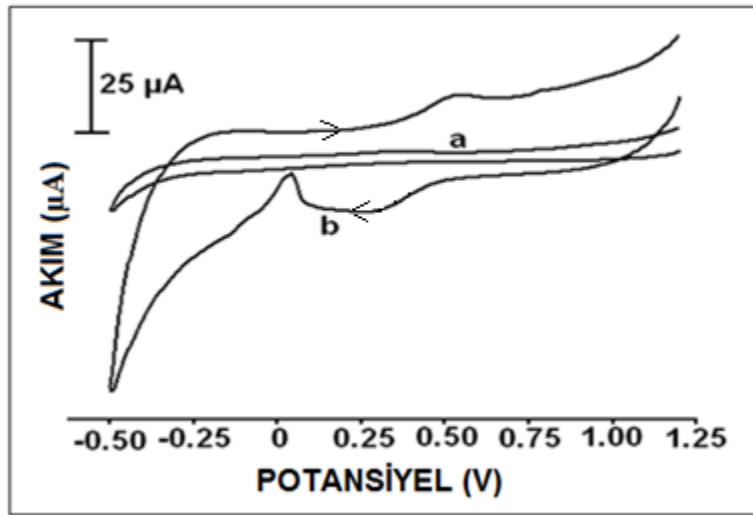
redoks çözeltisi (0.1 M KCl içeren 2.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ (1:1) karışımı) içerisinde elektron transferine karşı gösterdikleri direnç, yukarıdaki sırayla ölçüldü.

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. SnO₂ Nanopartiküllerin Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesine İlişkin Elde Edilen Bulgular ve Tartışma

4.1.1. SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş-CPE'nin Dönüşümlü Voltametri ile Elektrokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş ve edilmemiş karbon pasta elektrotların (CPE) elektrokimyasal davranışı, dönüşümlü voltamogramları alınarak karşılaştırıldı (Şekil 4.1). Ölçümler, aktive edilmiş elektrotlarla asetat tampon çözeltisi içerisinde yapıldı.

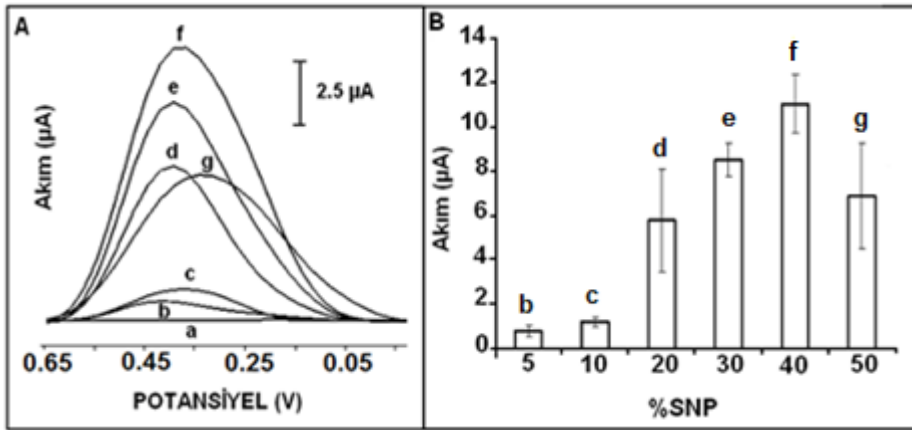


Şekil 4.1. SnO₂ nanopartikül içeren CPE'un elektrokimyasal davranışını gösteren dönüşümlü voltamogramları. (a) Çıplak CPE ve (b) %10 SnO₂ içeren CPE.

Elde edilen voltamogram incelendiğinde, kalay (IV)'ün, +0.250 volt civarında bir indirgenme piki, +0.520 volt civarında ise bir yükseltgenme piki verdiği görülmüştür.

4.1.2. CPE Matrisine Eklenecek Optimum SnO₂ Nanopartikül Miktarının Belirlenmesi

En yüksek indirgenme akımını veren SnO₂ nanopartikül/grafit oranını belirlemek amacıyla, SnO₂ nanopartikül yüzdesi %5 ile %50 arasında değişen bir seri karbon pasta elektrot hazırlanarak bunlarla asetat tamponu içerisinde, matriksteki SnO₂ nanopartikülün neden olduğu indirgenme pik şiddetleri diferansiyel puls voltametri tekniği ile incelendi. Elde edilen DP voltamogramı ile matriksteki SnO₂ nanopartikül yüzdesine karşı elde edilen indirgenme pik akımını gösteren histogram şekil 4.2’de gösterilmiştir.



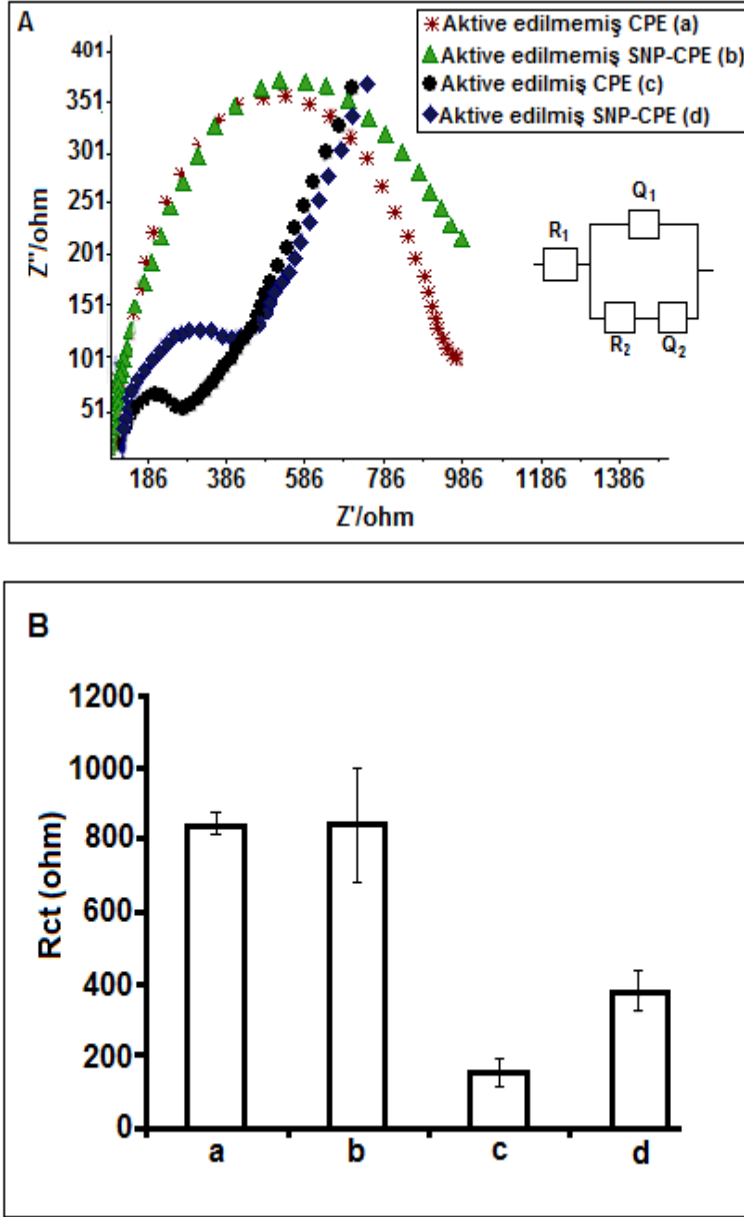
Şekil 4.2. Farklı yüzde oranlarında SnO₂ nanopartikül içeren CPE kullanılarak elde edilmiş olan indirgenme sinyallerinin (A) Voltamogram ve (B) Histogramı. (a) 0 %, (b) 5 %, (c) 10 %, (d) 20 %, (e) 30 % (f) 40 % ve (g) % 50.

SnO₂ nanopartiküllerin maksimum sinyal verdiği SnO₂ nanopartikül oranı % 40 olarak bulunmuştur.

4.1.3. Elektrot Aktivasyonunun, SnO₂ Nanopartikülün İndirgenme Sinyali Üzerine Etkisinin Elektrokimyasal Empedans Spektrometri ile İncelenmesi

Elektrot yüzeylerinin aktive edilmesinin elektron transferine etkisini anlamak üzere SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş ve edilmemiş karbon pasta elektrotların elektrokimyasal empedans spektrumları alındı. Karbon pastasındaki SnO₂ nanopartikül yüzdesi bir önceki deneyden esinlenerek, %40 olarak belirlendi.

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile elde edilen Nyquist eğrileri ile elektrot cinsine bağlı olarak ortaya çıkan yük transfer dirençlerine ait histogram Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Burada, R_1 zelti direncini, Q_1 : SnO₂/ elektrolit arayüzeyindeki ara yk kapasitansını, R_2 : SnO₂/ elektrolit arayüzeyindeki yük transfer direncini, Q_2 : Elektrot yüzeyindeki kütle transferinden kaynaklanan Warburg empedansını göstermektedir.



Şekil 4.3. A) Nyquist diagramı B) Histogram. a) Aktive edilmemiş CPE, b) Aktive edilmemiş, SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş CPE c) Aktive edilmiş CPE ve d) Aktive edilmiş, SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş CPE kullanılarak ölçülmüş Rct değerlerini göstermektedir.

Elektrot aktivasyonunun modifiye edilmemiş ve SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş CPE'lerde Rct değerlerinde bir düşmeye neden olduğu (Şekil 4.3 c ve d);

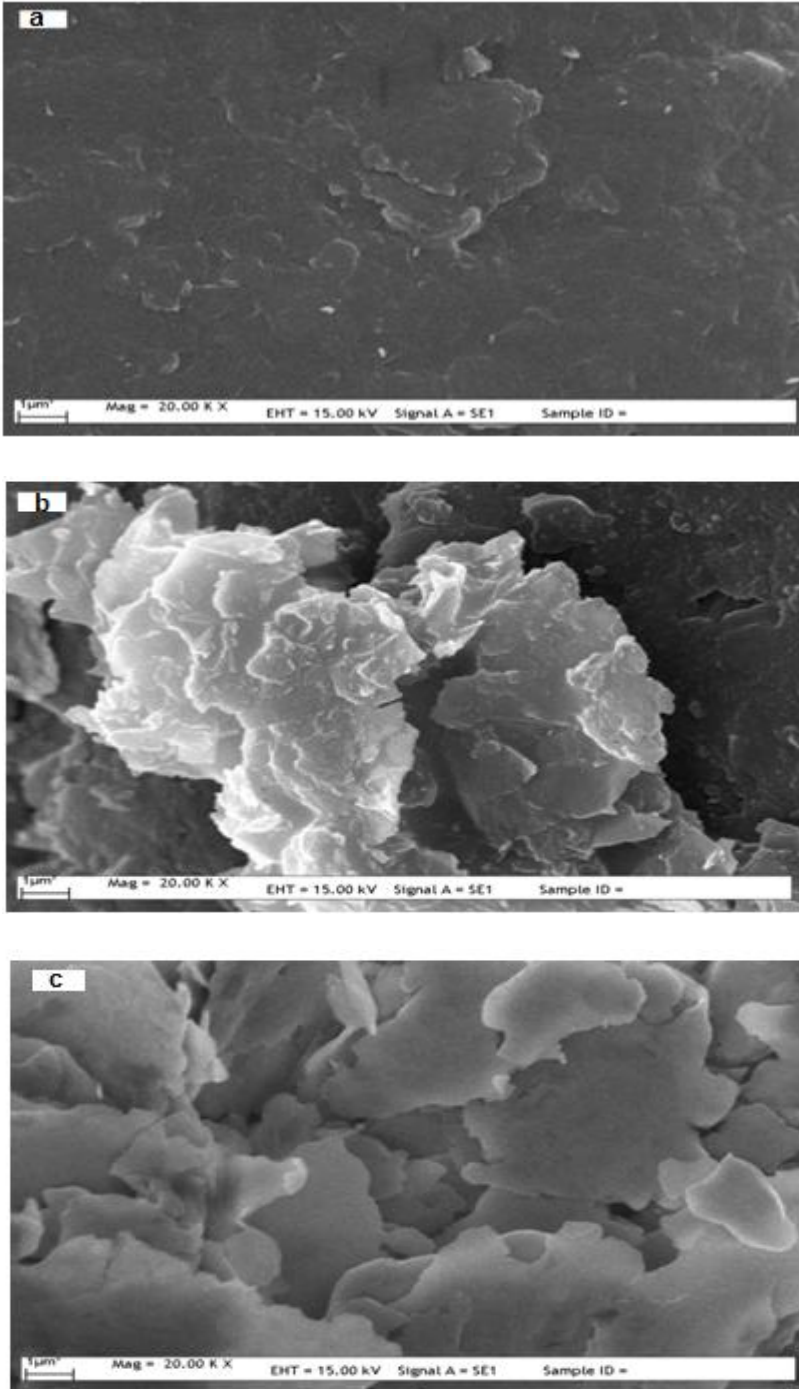
aktive edilmemiş yüzeylerde ise elektron transferinde yüksek dirençle karşılaştığı görülmektedir (Şekil 4.3.a ve b).

Rct değerlerindeki yükselme, SnO₂ nanopartiküllerin karbon pasta matrisine uygun bir şekilde yerleştiğini kuvvetlice kanıtlamaktadır. Aktive edilmiş elektrotlarla elde edilen Rct değerlerine kıyasla, aktive edilmemiş elektrotlarla gözlenen yaklaşık 1,5-2 kat daha büyük olan Rct değerleri, SnO₂ nanopartiküllerinin elektrot yüzeyine redoks çiftinin ulaşmasını engellemesiyle açıklanabilir. Bu durum, karbon nanotüp ile modifiye edilmiş grafit elektrot (Erdem vd., 2009) ve polimer modifiye elektrotlarla (Kuralay vd., 2009) yapılmış önceki çalışmaların sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

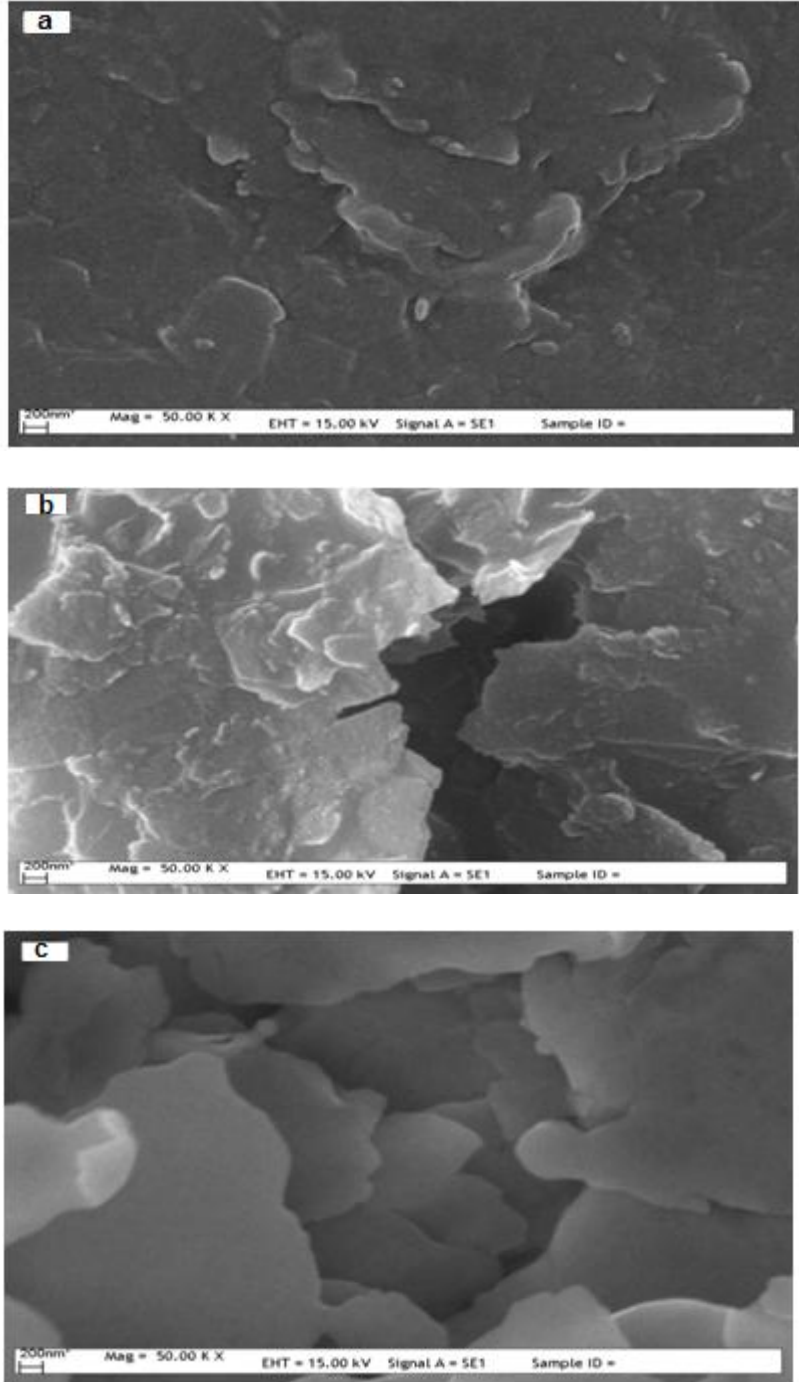
4.2. PVF⁺-SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Elektrotların DNA Analizlerine Yönelik Uygulamalarına İlişkin Elde Edilen Bulgular ve Tartışma

4.2.1. PVF⁺-SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Elektrot Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyonu

Bölüm 3.6.1’de anlatıldığı gibi yüzeyi, elektrokimyasal yükseltgeme yöntemiyle PVF⁺ ve PVF⁺-SNP ile kaplanmış olan PGE’lerin mikroskobik karakterizasyonu, alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu ile Hacettepe Üniversitesi’nde uzman personel tarafından gerçekleştirildi. Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6’da farklı hızlandırma potansiyellerinde alınmış, modifiye edilmemiş yüzey, PVF⁺ ile modifiye edilmiş yüzey ve PVF⁺-SNP ile modifiye edilmiş yüzeye ait SEM fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 4.4. a) Modifiye edilmemiş, b) PVF⁺ ile, c) PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE yüzeylerinin SEM görüntüleri (hızlandırma potansiyeli 20 KV, çözünürlük 1 µm).

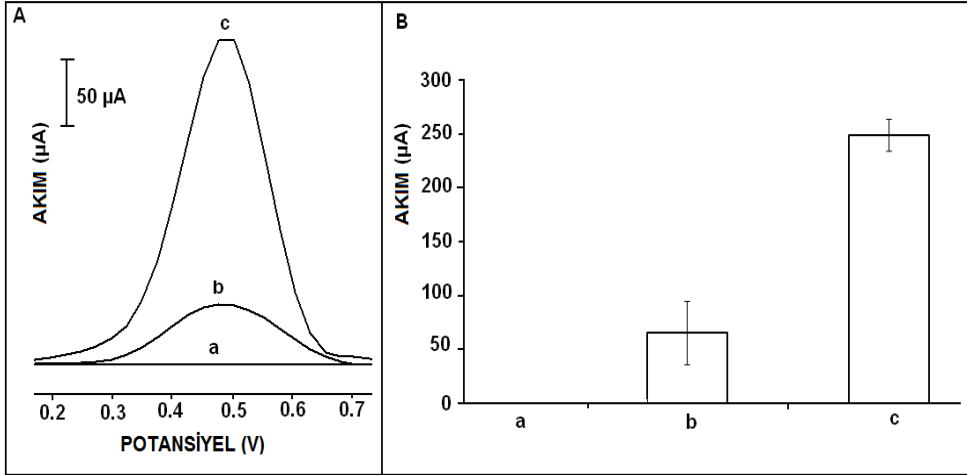


Şekil 4.5. a) Modifiye edilmemiş, b) PVF⁺ ile, c) PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE yüzeylerinin SEM görüntüleri. (hızlandırma potansiyeli 50 KV, çözünürlük 200 nm)

Modifiye olmamış, PVF⁺ ile modifiye edilmiş ve PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE'nin yüzey morfolojisi SEM tekniği ile incelendi (Şekil 4.4, 4.5). Modifiye olmamış PGE'nin pürüzlü yüzeyi şekil 4.4 a ve 4.5 a'da görülmektedir. PGE yüzeyinin polimer ile modifikasyonundan sonra PGE yüzeyinin bazı kısımları polimer film ile kaplanmıştır (Şekil 4.4 b, 4.5 b). Elektrot yüzeyine polimerin modifikasyonu daha yüksek çözünürlükte açık bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.5 b). PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE'nin SEM görüntüleri şekil 4.4 c ve 4.5 c'de verilmiştir. PVF⁺-SnO₂ nanopartikül olduğu durumda PGE yüzeyinin bazı kısımlarının PVF⁺-SNP ile kaplandığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.5 c). PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE (Şekil 4.4 d ve 4.5 d) PVF⁺ ile modifiye edilmiş PGE (şekil 4.4 b ve 4.5 b) ile kıyaslandığında farklı SEM görüntülerinin elde edilmesi PGE yüzeyinin farklı şekilde modifiye edildiğini göstermesi açısından önemlidir.

4.2.2. SnO₂ Nanopartiküllerinin PVF⁺ Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

Polimerizasyon ortamına eklenmiş olan SnO₂ nanopartiküllerinin PVF yükseltgenme sinyaline etkisini incelemek üzere yapılan çalışmada PVF⁺ ile modifiye edilmiş PGE ve PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE'lerdeki PVF yükseltgenme sinyalleri DPV tekniği ile ölçüldü. Şekil 4.6'da diferansiyel puls voltamogramı ve histogramlar, kalem grafit elektrot yüzeyindeki PVF⁺'nin yükseltgenme sinyalini göstermektedir.

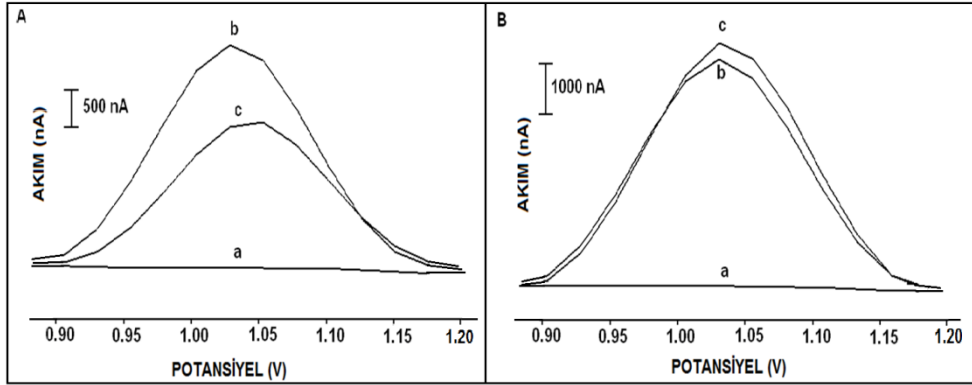


Şekil 4.6. PVF⁺ yükseltgenme sinyaline ait A) DPV, B) Histogram. a) çıplak elektrot, b) PVF⁺ modifiye elektrot, c) PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş elektrot.

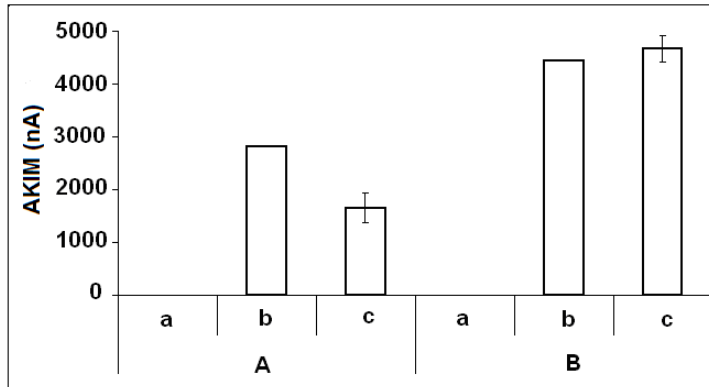
Bu çalışmada PVF⁺'nin PVF⁺'a yükseltgenme sinyalinin gözlemlendiği potansiyel, ortamda SnO₂ nanopartikül varlığına veya yokluğuna bağlı olmaksızın, +0.48 V'tur (Şekil 4.6 A). Ancak, polimer matriksindeki SnO₂ nanopartikül varlığı, PVF⁺'nin yükseltgenme sinyalini yaklaşık 4 kat artırmaktadır (Şekil 4.6 B). Bu sonuç SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş olan elektrodun yüzeyinde gerçekleşen elektron transferinin, mekanizması açıklanmamış olmakla birlikte, arttığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

4.2.3. Yüzeğe Tutturulacak DNA Dizisinin Seçimi

DNA dizilerinin, pozitif yüklü polimer matriksi ve SnO₂ nanopartikül içeren polimer matriksine bağlanma etkinliğini araştırmak için tiyol işaretli 12 guanin bazı içeren DNA ve amino işaretli 12 guanin bazı içeren DNA dizileri kullanılarak bu dizilerdeki guaninin yükseltgenme sinyalleri ölçüldü. PVF⁺ ile modifiye edilmiş PGE ve PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE kullanılarak elde edilmiş guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren DPV, Şekil 4.7, histogram ise Şekil 4.8'de görülmektedir.



Şekil 4.7. A) PVF⁺ modifiye PGE kullanılarak, B) PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE kullanılarak elde edilmiş guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren DP voltamogramları. a) DNA yokken, b) 100 µg/mL tiyol ile işaretli DNA, c) 100 µg/mL amino işaretli DNA.

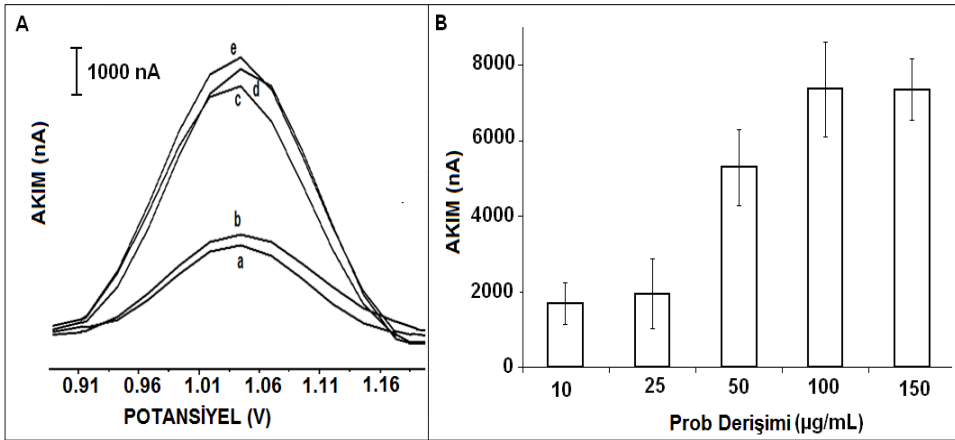


Şekil 4.8. A) PVF⁺ ile modifiye edilmiş PGE ile ve B) PVF⁺-SnO₂ nanopartikül modifiye edilmiş PGE ile elde edilmiş olan guanin yükseltgenme sinyalini gösteren histogram. a) çıplak elektrot, b) tiyol işaretli, c) amino işaretli DNA. Ölçümler ABS içinde yapıldı.

Şekillerden görüldüğü gibi hem tiyol hem de amino işaretli dizinin, PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş elektrotla etkileşimi, salt PVF⁺ ile modifiye edilmiş elektroda kıyasla daha yüksektir (Şekil 4.7.b). Bu, amino işaretli DNA dizisinin, elektrot yüzeyi ile, tiyol işaretli DNA dizisine kıyasla biraz daha kuvvetli bir şekilde etkileştiğini göstermektedir. Bu nedenle, PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş elektrotlarla yapılan sonraki çalışmalarda, daha yüksek hassasiyet ve seçimlilik için amino işaretli DNA ile çalışılmasına karar verilmiştir.

4.2.4. PVF⁺-SnO₂ Nanopartikül ile Modifiye Edilmiş Elektrot ile Etkileşecek En Yüksek DNA Derişiminin Saptanması

PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş elektrotun, etkin olarak bağlayabileceği DNA dizi derişimi, amino işaretli 12 guanin bazı içeren DNA dizisi kullanılarak ve dizideki guanin yükseltgenme sinyali izlenerek incelendi. Elde edilen sonuçlar şekil 4.9'da görülmektedir.



Şekil 4.9. PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş farklı DNA derişimlerdeki guanin yükseltgenme sinyalleri, A) DPV ve B) Histogram. DNA derişimleri, a) 10, b) 25, c) 50, d) 100, e) 150 µg/mL.

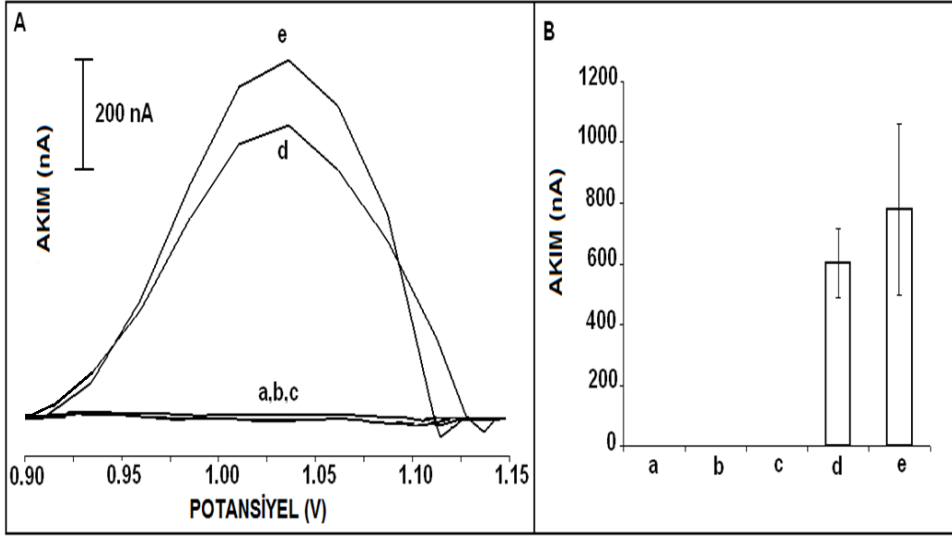
DNA'daki guanine ait DPV pik şiddetinin guanin derişimi ile arttığı, derişimin 100 µg/mL değerine yükseltilmesinden itibaren yanıtın doygunluğa ulaştığı görülmektedir. Bununla beraber, daha yüksek derişimde, mesela 150 µg/mL derişimde, pik şiddetindeki tekrarlanabilirlik daha yüksektir. Bu nedenle, PVF⁺-SnO₂ nanopartikül modifiye olmuş elektrot yüzeyini tamamen kaplayacak optimum prob derişimi olarak 150 µg/mL seçildi. 150 µg/mL DNA derişiminde ölçülen hibrit sinyali için bağıl standart sapma %13.4 (n=3) olarak hesaplandı.

4.2.5. PVF-SnO₂ Nanopartikül İle Modifiye Edilmiş PGE ile HBV DNA Hibridizasyonunda Seçimlilik Çalışması

DNA immobilize edilmiş, PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş elektrodun seçimliliğini incelemek için, probdaki guanin içermeyen amino işaretli DNA dizisinin, tamamlayıcı (hedef DNA), tamamlayıcı olmayan (NC:

noncomplementary) ve bir bazı farklı (MM: mismatch) diziler ile hibridizasyon sonrasındaki guanin yükseltgenme sinyalleri ölçüldü.

Hedef DNA, NC ve MM dizilerinin derişimi 100 µg/mL olarak, hedef DNA +MM karışımında her bir dizinin derişimi 100 µg/mL, toplamda ise 200 µg/mL olarak seçildi. Guanin yükseltgenme sinyalleri DP voltamogram ve histogram olarak şekil 4.11’de gösterilmiştir.

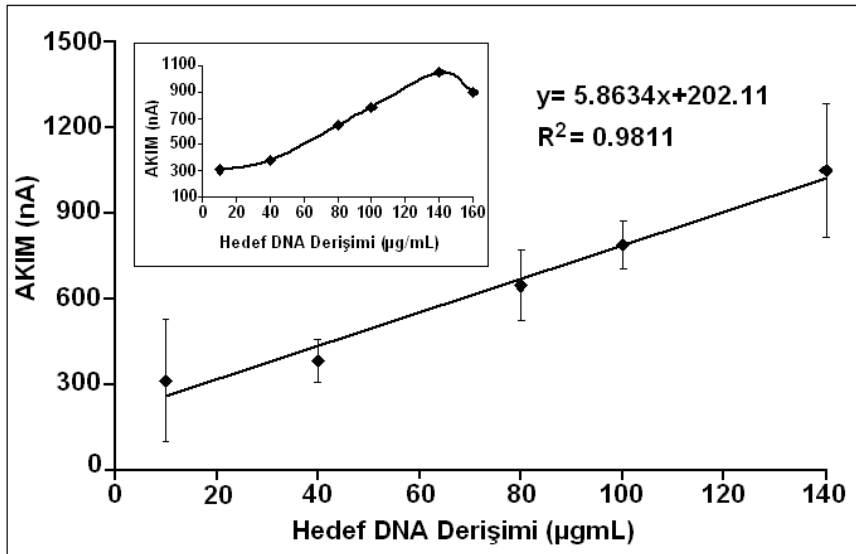


Şekil 4.10. PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş DNA prob ile hibridizasyon sonrası guanin yükseltgenme sinyalleri A) DPV, B) Histogram. a) sadece prob, b) 100 µg/mL NC, c) 100 µg/mL MM, d) 100 µg/mL Hedef, e) (1:1) oranında 100 µg/mL hedef DNA ve MM karışımı ile.

Şekilden 4.10.b ve c’deki voltamogram ve histogramdan, tamamlayıcı olmayan ve bir bazı farklı dizilerin, proba hibridize olmadığı anlaşılmaktadır. Tamamlayıcı dizi ise oldukça yüksek bir sinyale neden olmaktadır. Ancak bu deney, probun kendi tamamlayıcısına seçimliliğinin ne ölçüde yüksek olduğunu göstermez. Nitekim ortamda tamamlayıcı ve bir bazı farklı diziler eşit derişimde birlikte bulduklarında, probdaki guanin sinyalinin bir miktar arttığı (Şekil 4.10. e) görülmektedir. Yani probun kendi tamamlayıcı dizisine seçimliliğinin çok yüksek olduğu söylenemez. Ancak bu aşamada gözlenen bu sinyal artışını açıklayabilecek bir mekanizmanın, spekülatif bile olsa, önerilmesi mümkün değildir.

4.2.6. Modifiye Edilmiş Elektrot Yüzeyinde HBV Hibridizasyonunun Gerçekleştiği Optimum Hedef DNA Derişiminin Saptanması

150 µg/mL DNA ile hazırlanmış probun etkileştiği optimum hedef DNA derişimini belirlemek amacıyla, 20 µg/mL'den 160 µg/mL'ye değişen derişimlerde hedef DNA kullanılarak hibridizasyon sonrası guanin yükseltgenme sinyalleri ölçüldü. Bu çalışmada kullanılan hedef DNA dizisi, bölüm 3.2'de gösterilen, hepatit B virüsünü temsil eden ve guanin bazı içermeyen dizidir. Bu dizi hedef dizi ile hibridize olduğunda, hibridizasyonun derecesine bağlı olarak, hedef dizideki guanin yükseltgenme sinyalinde artışlar ortaya çıkmaktadır. Elde elden sonuç şekil 4.11'da görülmektedir.



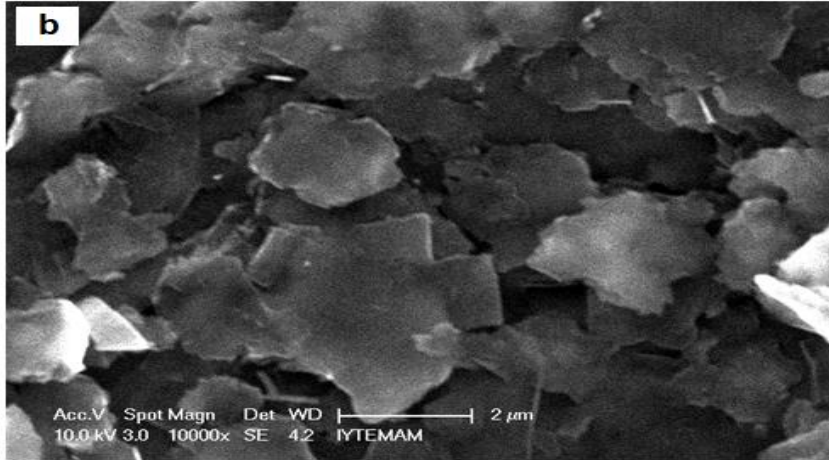
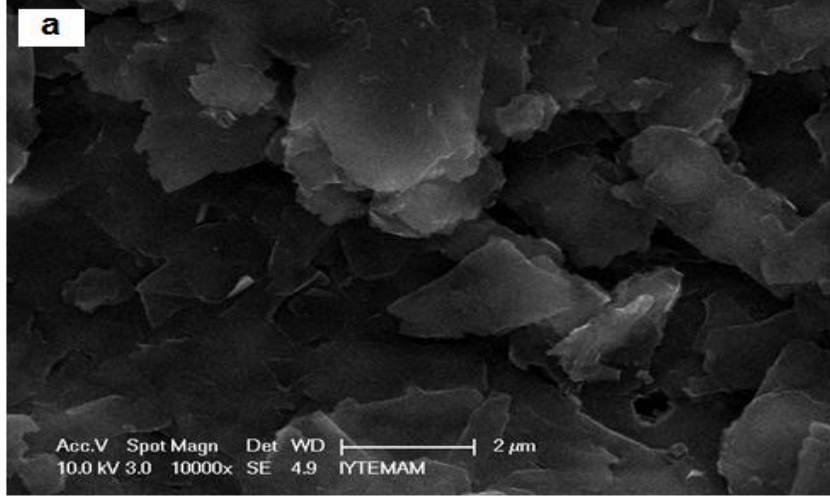
Şekil 4.11. PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş, 150 µg/mL amino işaretli DNA kullanılarak hibridizasyon sonrası ölçülmüş guanin yükseltgenme sinyali için kalibrasyon grafiği.

Guanin yükseltgenme sinyalinin hedef DNA derişiminin artmasıyla arttığı, 140 µg/mL'den daha yüksek derişimlerde guaninin yükseltgenme sinyalinin doygunluğa ulaştığı görülmektedir. Şekil 4.11'deki grafik dikkate alınarak hedef DNA optimum derişimi olarak 140 µg/mL seçildi. Bu değer için %99.75 güvenilirlikle gözlenebilme sınırı (LOD) 3.86 µM (24.4 ppm) olarak, Miller (2000)'deki yönteme göre hesaplandı.

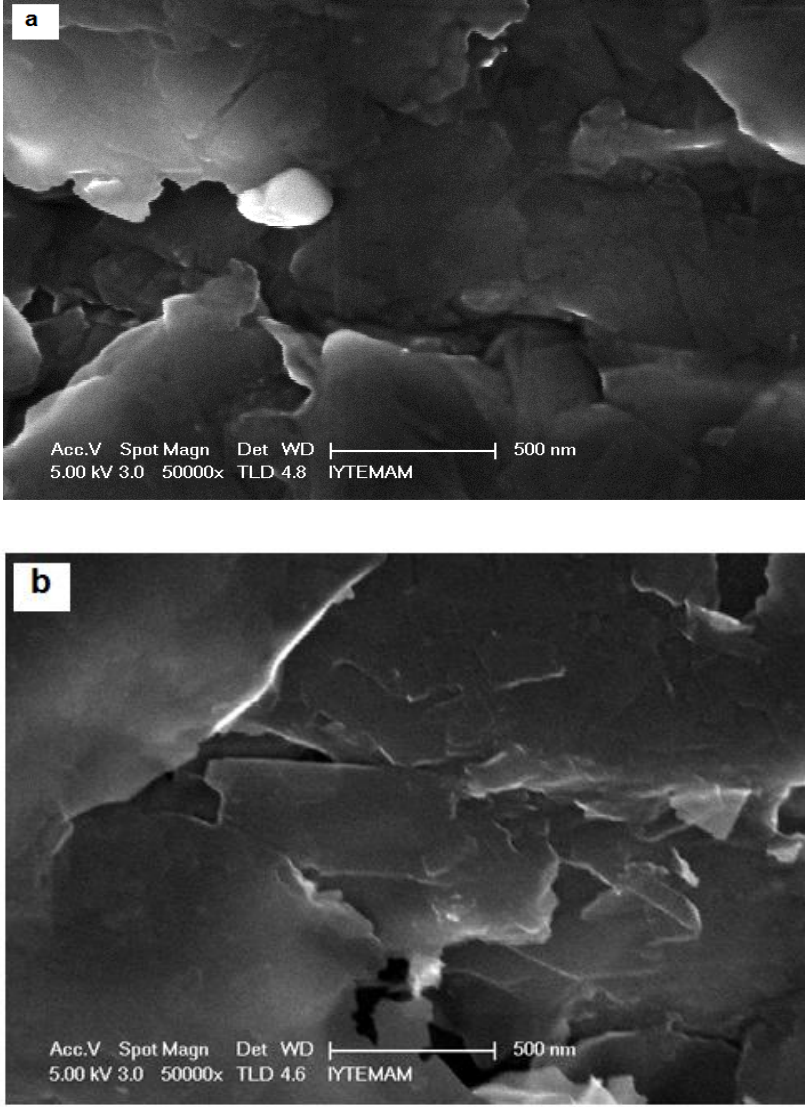
4.3. Yükseltgenmiş Grafin (GRPox) ile Modifiye Edilmiş Elektrotların DNA Analizlerine Yönelik Uygulamalarına İlişkin Elde Edilen Bulgular

4.3.1. Yükseltgenmiş Grafin ile Modifiye Edilmiş Elektrot Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Karakterizasyonu

Yüzeyi, yükseltgenmiş grafin ile modifiye edilmiş olan PGE'lerin mikroskobik karakterizasyonu, alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu ile İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde uzman personel tarafından gerçekleştirildi. Şekil 4.12 ve 4.13'de farklı hızlandırma potansiyellerinde alınmış, modifiye edilmemiş yüzey ve grafin ile modifiye edilmiş yüzeye ait SEM fotoğrafları görülmektedir.



Şekil 4.12. a) Modifiye edilmemiş, b) GRPox ile modifiye edilmiş PGE yüzeylerinin SEM görüntüleri (hızlandırma potansiyeli 10 KV, çözünürlük 2 μm).

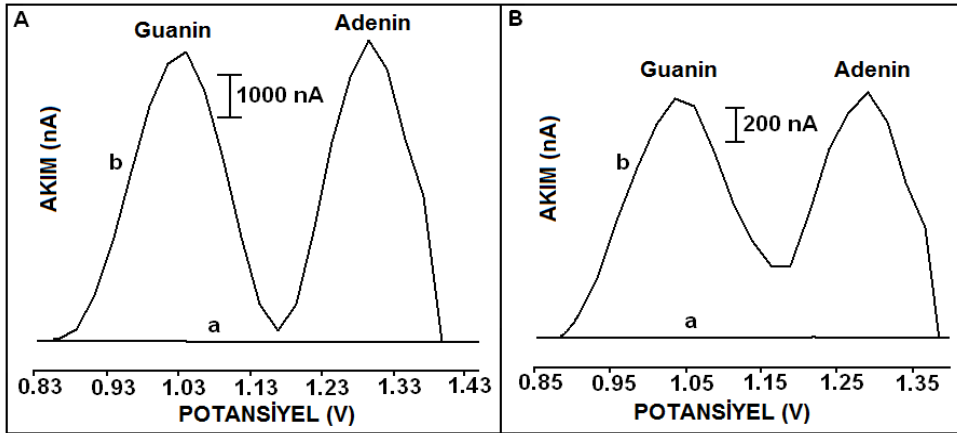


Şekil 4.13. a) Modifiye edilmemiş, b) GRPox ile modifiye edilmiş PGE yüzeylerinin SEM görüntüleri (hızlandırma potansiyeli 5.00 KV, çözünürlük 500 nm).

Modifikasyonun, PGE yüzeyinin bazı kısımlarının GRPox ile kaplanmasına neden olduğu görülmektedir. Modifikasyonun varlığı daha yüksek çözünürlükte daha açık görülmektedir (Şekil 4.13 b).

4.3.2. Farklı Elektrotlara Yapılan Modifikasyonların Guanin Yükseltgenme Sinyali Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Yükseltgenmiş grafin ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrot (GRPox-PGE) ve camısı karbon elektrodun (GRPox-GCE), guanin yükseltgenme sinyaline etkisi incelendi. Camısı karbon elektrot ile kıyaslandığında, kalem grafit elektrotlarla elde edilen guanin ve adenin yükseltgenme sinyallerinin daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.14). Yükseltgenmiş grafin (GRPox) ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş olan balık spermi DNA'sının (fsDNA) derişimi 50 µg/mL, GRPox ile modifiye edilmiş GCE yüzeyine immobilize edilmiş fsDNA derişimi ise 100 µg/mL'dir.

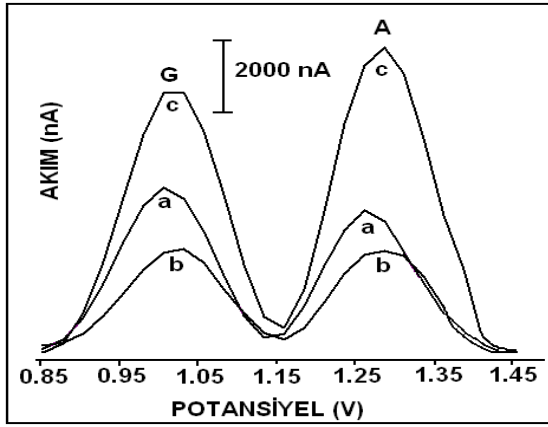


Şekil 4.104. A) GRPox-PGE ve B) GRPox-GCE yüzeyine immobilize edilmiş DNA'ya ait guanin ve adenin yükseltgenme sinyalleri. GRPox derişimi 750 µg/mL ve DNA derişimi GRPox-PGE için 50 µg/mL ve GRPox-GCE için 100 µg/mL.

Şekil 4.14 A ve B birlikte kıyaslandığında, akım eksenlerinin farklılığı yanında, modifiye camısı karbon elektrodun daldırıldığı çözeltideki DNA derişiminin (100 µg/mL), modifiye PGE'nin daldırıldığı çözeltideki DNA derişiminin (50 µg/mL) iki katı olduğu da dikkate alındığında modifiye PGE ile elde edilen gerek guanin gerekse adenin sinyallerinin yaklaşık 10 kat daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle bundan sonraki tüm çalışmalarda PGE kullanılmıştır.

4.3.3. Yüzeyine DNA İmmobilize Edilmiş Grafın ve Yükseltgenmiş Grafın ile Modifiye Edilmiş PGE'lerin Guanin Yükseltgenme Sinyallerinin Karşılaştırılması

DNA'nın daha etkin bir şekilde immobilize olacağı elektrot yüzeyini seçmek amacıyla, grafın ve yükseltgenmiş grafın ile modifiye edilmiş ve sabit miktarda amino işaretli 12 guanin içeren DNA (50 µg/mL) immobilize edilmiş PGE'lerin asetat tamponundaki guanin ve adenin yükseltgenme sinyalleri ölçülerek birbiriyle ve çıplak PGE ile karşılaştırıldı. Elde edilen DP voltamogram şekil 4.15'te görülmektedir.



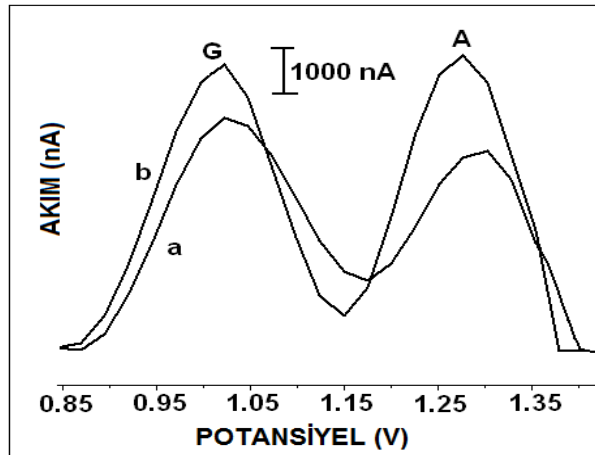
Şekil 4.15. 50 µg/mL DNA immobilize edilmiş elektrot yüzeyinde guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren DPV. a) çıplak PGE, b) 500 µg/mL GRP-PGE ve c) 500 µg/mL GRPox-PGE.

Çıplak elektrotla kıyaslandığında, grafın ile modifiye edilmiş elektrotla elde edilen guanin yükseltgenme sinyalinin daha düşük, yükseltgenmiş grafın ile modifiye edilmiş elektrot ile elde edilen sinyalin ise daha yüksek olduğu görülmektedir.

Grafın ile modifikasyonun neden olduğu sinyal düşüşünü açıklamak, bu aşamada mümkün görülmemektedir. Ancak, yükseltgenmiş grafın ile yapılan modifikasyonda, amino işaretli DNA'nın GRPox'ta aktif durumda bulunan karboksil gruplarıyla etkileşerek yüzeye kuvvetli bir şekilde bağlandığı öne sürülebilir.

4.3.4. GRPox ile Modifikasyon Öncesi Elektrot Aktivasyonunun Guanin Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

Elektrot yüzeyine 30 sn. boyunca 1.4 volt potansiyel uygulanması elektrot yüzeyini aktive etmektedir. Bu işlem literatürde önışlem (pretreatment) olarak ta adlandırılmaktadır. Bu işlemle elektrot yüzeyindeki tüm gruplar karboksil gruplarına yükseltgenir. GRPox'un önışlem görmüş elektrot yüzeyine bu karboksil grupları yardımıyla daha etkin bir şekilde tutunacağı düşünülmüş ve bu etki, GRPox ile modifiye edilmiş her iki durumdaki elektrot yüzeyine fsDNA immobilize edilerek incelenmiştir. Bu çalışma sonucu elde edilen voltamogram şekil 4.16'da görülmektedir.

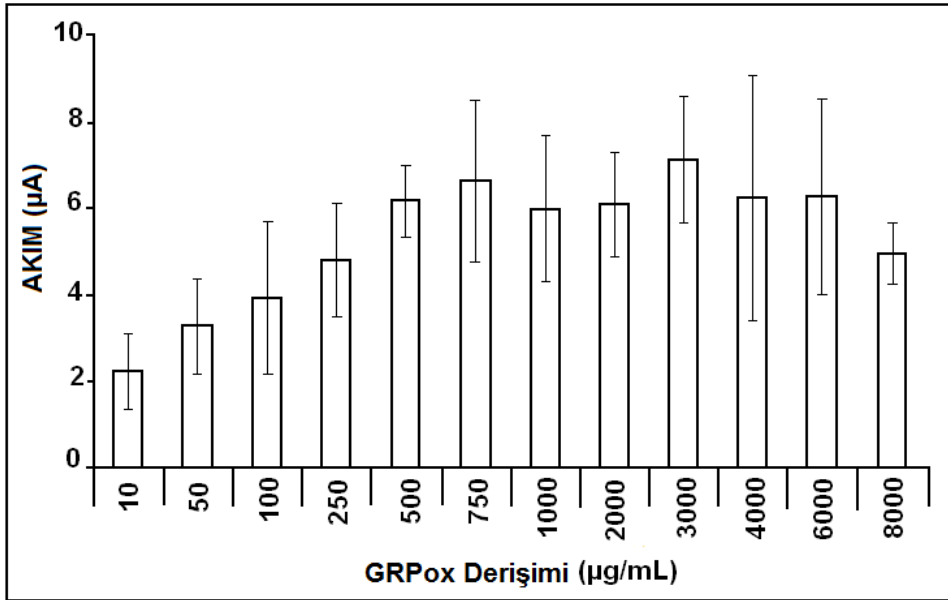


Şekil 4.11. Aktive edilmiş PGE üzerine immobilize edilmiş fsDNA ile elde edilen guanin (G) ve adeninin (A) yükseltgenme sinyallerini gösteren DP voltamogram. a) aktive edilmemiş, b) aktive edilmiş PGE.

Aktive edilmiş elektrodun, GRPox ile modifikasyonu sonucu yüzeye immobilize olan fsDNA'nın guanin yükseltgenme sinyali, aktive edilmeden modifiye edilmiş elektrodunkü ile karşılaştırıldığında, aktive edilmiş elektrotla elde edilen guanin yükseltgenme sinyalinin, aktive edilmemiş elektroda kıyasla biraz daha yüksek olduğu, ayrıca aktivasyon sonrası elde edilen guanin ve adenin yükseltgenme piklerinin rezolüsyonunun daha iyi olduğu görülmektedir. Bu nedenle, GRPox ile modifikasyonundan önce elektrodun aktivasyonuna karar verilmiştir.

4.3.5. PGE Yüzeyi Modifiye Edilecek Optimum GRPox Derişiminin Saptanması

Her defasında sabit derişimde (50 μ g/mL) DNA immobilize edilen, GRPox ile modifiye edilmiş PGE'lerin, immobilize fsDNA'daki guanin yükseltgenme sinyalinin, modifikasyon için kullanılan GRPox derişimine bağıllığı ölçülerek optimum GRPox derişimi belirlenmeye çalışıldı. Ölçülen guanin yükseltgenme sinyalleri ile elde edilen histogram şekil 4.17'de gösterilmiştir.



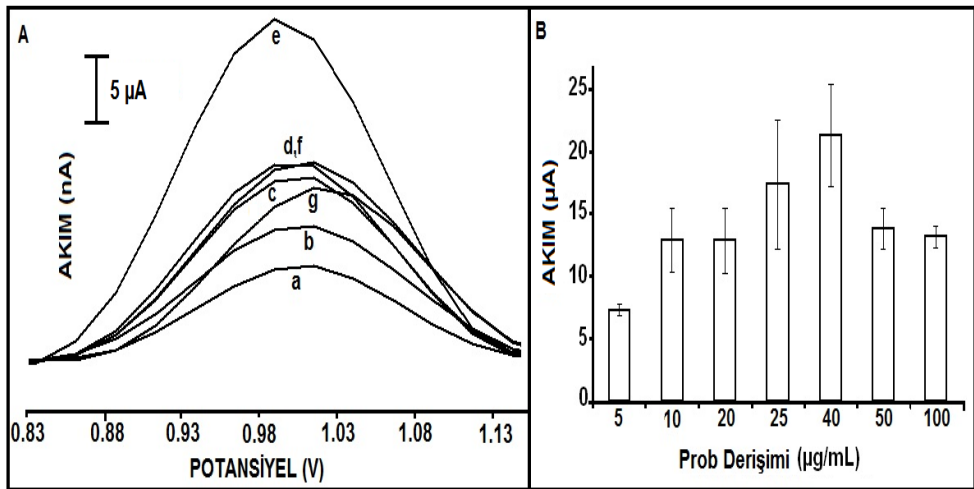
Şekil 4.17. GRPox ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilen 50 μ g/mL fsDNA kullanılarak elde edilmiş guanin yükseltgenme pik şiddetlerini gösteren histogram.

En yüksek sinyalin, modifikasyon için kullanılan GRPox derişiminin 3000 μ g/mL olduğu durumda elde edildiği görüldüğünden, bundan sonraki çalışmalarda PGE yüzeyinin 3000 μ g/mL GRPox ile modifiye edilmesine karar verilmiştir.

Grafın, karbon nanotüpün açılmış şeklidir. Bu nedenle, benzer büyüklükte, DNA elektrokimyasal sinyaline neden olan, modifikasyon için kullanılan karbon nanotüp ve yükseltgenmiş grafın derişimlerinin, farklı çalışmalarda bile, birbirine yakın olması beklenir. Benzer çalışmalarda modifikasyon için kullanılan karbon nanotüp optimum derişimi 3000 μ g/mL olarak bulunmuştur (Erdem vd., 2009; Çalışkan vd., 2009).

4.3.6. DNA Prob Derişiminin Guanin Yükseltgenme Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

Modifikasyondan önce aktive edilmiş ve modifikasyon ajanının optimum derişimi belirlenmiş elektrotlara immobilize edilecek optimum DNA derişimini belirlemek amacıyla, amino işaretli 12 guaninli DNA içeren, derişimi 5 µg/mL'den 100 µg/mL'ye değişen bir seri çözeltiye, modifiye elektrotların belli bir süre (1 saat) daldırılmasıyla elde edilen problemlerin, asetat tamponu içerisindeki guanin yükseltgenme sinyalleri DPV tekniği ile ölçüldü. Sonuçlar şekil 4.18'de gösterilmiştir.



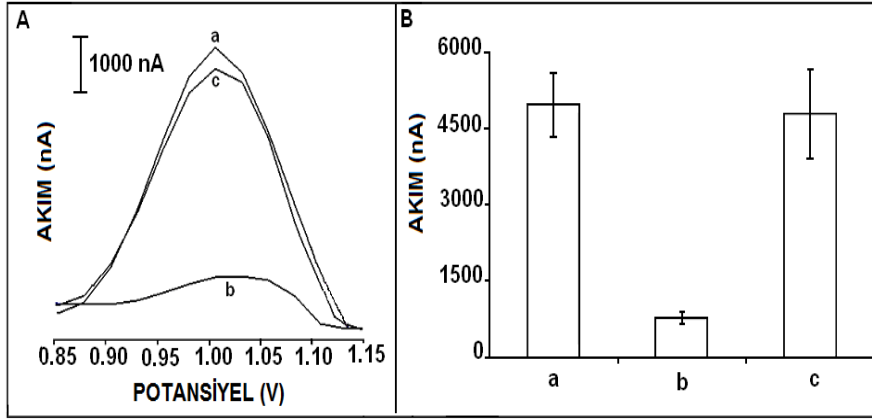
Şekil 4.18. 3000 µg/mL GRPox- PGE yüzeyine farklı derişimlerde DNA immobilize edilerek ölçülmüş guanin yükseltgenme pik şiddetleri. A) DPV, B) Histogramı, a) 5, b) 10, c) 20, d) 25, e) 40, f) 50, g) 100 µg/mL.

Histogramdan görüldüğü üzere guanin yükseltgenme sinyali, DNA derişimi 40 µg/mL olduğunda en yüksek değerine ulaşmıştır. Bu nedenle, bundan sonraki çalışmalarda, GRPox ile modifiye edilmiş PGE'lerin prob olarak hazırlanmasında kullanılacak olan DNA derişimi 40 µg/mL olarak belirlenmiştir.

4.3.7. GRPox ile Modifiye Edilmiş PGE ile HBV DNA Hibridizasyonunda Seçimlilik Çalışması

Hibridizasyondan sonra en yüksek guanin yükseltgenme sinyalini verecek olan, koşulları belirlenmiş ve bu şekilde hazırlanmış problemlerin, seçimliliğini ortaya koymak için yapılan çalışmada probun (guanin içermeyen amino işaretli) hedef,

NC ve MM DNA dizileri ile hibridizasyonu sonucu ortaya çıkan guanin yükseltgenme sinyalleri ölçüldü. Ölçüm için hedef ve tamamlayıcı olmayan DNA çözeltileri tek başlarına ve derişimleri 160 µg/mL olarak ve ayrıca hedef +MM (1:1) karışımı, karışımındaki her bir DNA derişimi 160 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. Elde edilen sonuçlar şekil 4.19'da görülmektedir.

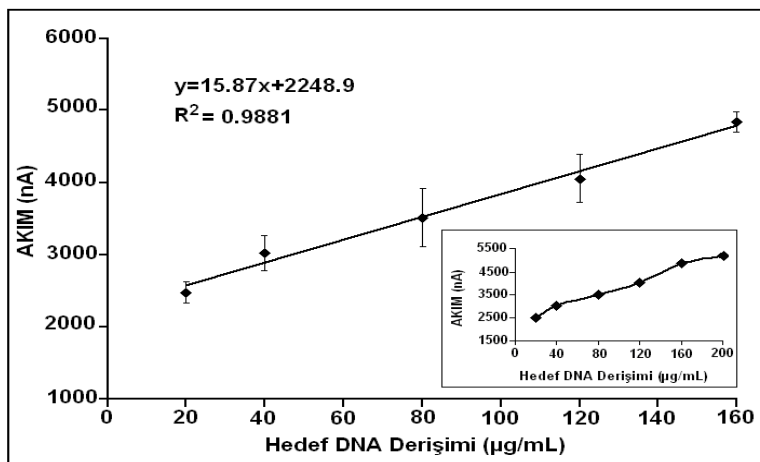


Şekil 4.19. GRPox ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş 40 µg/mL amino işaretli DNA'nın a) 160 µg/mL hedef DNA, b) 160 µg/mL tamamlayıcı olmayan DNA (NC), c) 160 µg/mL hedef DNA ve bir bazı farklı dizi (MM)'nin hacim olarak (1:1) karıştırılmasıyla elde edilmiş karışım ile hibridizasyonu sonucu elde edilmiş guanin yükseltgenme sinyallerini gösteren A) DPV, B) Histogram.

Proben, tamamlayıcısı olan hedef DNA ile hibridizasyonu sonucunda oldukça yüksek bir guanin sinyali elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.19 a). Bu durum, probun, hedef DNA'ya seçimliliğinin oldukça yüksek olduğuna işaret eder. NC ile elde edilen küçük bir sinyalin varlığı, bu DNA'nın prob ile spesifik olmayan etkileşimleri olduğunu düşündürmektedir. Hedef+MM içeren karışım ile elde edilen sinyalin büyüklüğü, aynı derişimdeki tek başına hedef DNA ile elde edilen sinyalin büyüklüğüne hemen hemen yakındır. Bu durum, ortamdaki MM'nin ölçülen sinyalde bir değişime neden olmadığını, dolayısıyla optimum koşullarla hazırlanmış olan probun, hedef DNA dizisine olan seçimliliğinin çok yüksek olduğunu göstermektedir.

4.3.8. Modifiye Edilmiş Elektrot Yüzeyinde HBV Hibridizasyonunun Gerçekleştiği Optimum Hedef DNA Derişiminin Saptanması

Modifikasyondan önce aktive edilmiş, modifikasyon ajanı ve immobilizasyonda kullanılacak DNA optimum derişimleri belirlenmiş problemlerin, hedef DNA ile hibridizasyonundan sonra, guanin yükseltgenme sinyalleri ölçülerek en yüksek sinyalin elde edileceği hedef DNA derişiminin belirlendiği bu çalışmada elde edilen sonuçlar şekil 4.20’de gösterilmiştir. Bu çalışmada yüzeye immobilize edilmiş olan amino işaretli HBV prob, guanin içermeyen DNA dizisidir.



Şekil 4.20. GRPox ile modifiye edilmiş PGE yüzeyine immobilize edilmiş 40 µg/mL amino işaretli DNA kullanılarak hibridizasyon sonrası ölçülmüş guanin yükseltgenme sinyalleri için kalibrasyon grafiği.

Hedef DNA derişimi 10 -200 µg/mL arasında olan bir seri çözelti ile elde edilen akım sinyalleri incelendiğinde en yüksek sinyale, hedef DNA derişimi 160 µg/mL iken ulaşmakta ve sinyal daha yüksek derişimlerde sabit kalmaktadır. Bu nedenle hibridizasyon çalışmaları için optimum hedef DNA derişimi olarak 160 µg/mL seçilmiştir. Bu değer için hesaplanan bağıl standart sapma n=4 için %2.97 ve % 99.75 güvenlilikle gözlenebilirlik sınırı (LOD) 3.95 µM (24.94 ppm) olarak Miller (2000)’deki yöntemle göre hesaplanmıştır.

4.3.9. GRPox ile Modifiye Edilmiş PGE ile HBV DNA Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Empedans Spektrometri Tekniği ile İncelenmesi

GRPox ile modifiye edilmiş PGE yüzeyindeki hibridizasyon olayında, yüzeyde gerçekleşen elektron transfer mekanizmasını aydınlatmak için elektrot

modifikasyonunun her aşamasında elektrot yüzeyinde meydana gelen elektron transfer hızındaki değişim, elektrokimyasal empedans spektrometri (EIS) tekniği ile incelendi. Bu amaçla, çıplak elektrot (a), GRPox ile modifiye edilmiş elektrot (b), yüzeyine amino işaretli guanin içermeyen DNA immobilize edilmiş modifiye elektrot (prob) (c), tamamlayıcısı ile hibridize olmuş prob (d) ve tamamlayıcısı olmayan DNA dizisi (Non complementary) ile hibridize olmuş prob (e) ile elde edilen Nyquist eğrileri şekil 4.21’de görülmektedir.

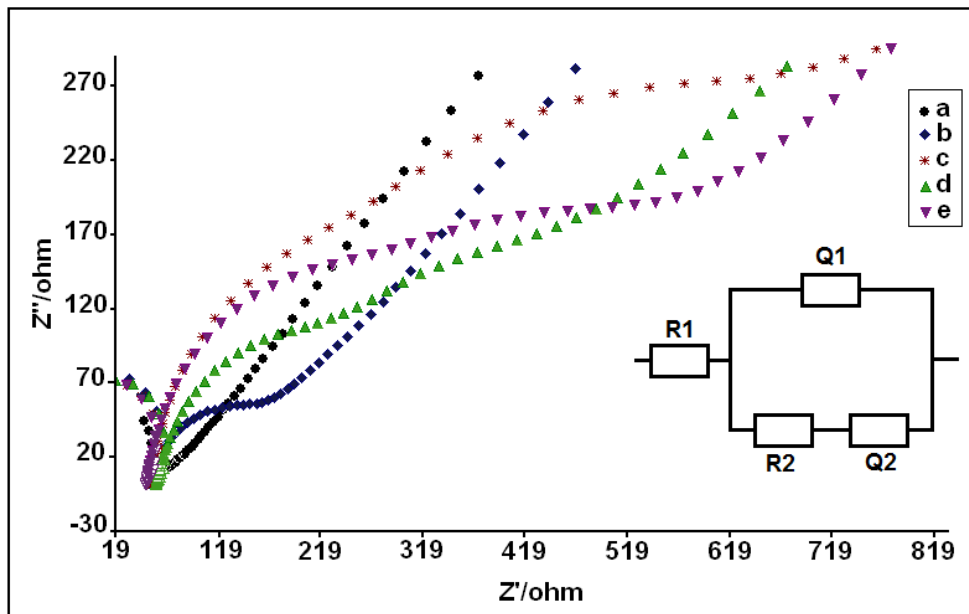
Empedans değerlerine uygun olan model şekil üzerinde gösterilmiştir. Burada;

R_1 , çözelti direncini,

Sabit faz elementi Q_1 , DNA/ elektrot ara yüzeyindeki ara yük kapasitansını,

R_2 , DNA/elektrolit ara yüzeyindeki yük transfer direncini (R_{ct}),

Q_2 : Elektrot yüzeyindeki kütle transferinden kaynaklanan Warburg empedansını göstermektedir.



Şekil 4.21. GRPox ile modifiye edilmiş PGE'nin HBV DNA ile hibridizasyon öncesi ve sonrasındaki Nyquist diyagramı, a) çıplak PGE, b) GRPox ile modifiye edilmiş PGE, c) modifiye yüzeye prob immobilize edilmiş PGE, d) hedef DNA ile hibridize olmuş prob, e) NC ile hibridize olmuş prob.

EIS, elektrot yüzeyinde modifikasyon nedeniyle meydana gelen empedans değerlerindeki değişimler hakkında bilgi veren bir tekniktir. Empedans spektrumunun Nyquist eğrisinde yarı halka çapı, elektrot yüzeyindeki elektron transferine karşı oluşan direnci (R_{ct}) göstermektedir. PGE'nin GRPox ile

modifikasyonundan sonra, elektrot yüzeyinde yükün transferine olan sınırlama (charge limitation) nedeniyle R_{ct} değerinin yükseldiği görülmektedir. (Şekil 4.21 b). Elektrot yüzeyine prob immobilize edildikten sonra da R_{ct} değerinde bir artış olduğu görülmektedir (Şekil 4.21 c). Bu artış, DNA'nın elektrot yüzeyinin, neredeyse tümünü kaplayacak şekilde yüzeye immobilize olduğunu göstermektedir. Probu, hedef DNA ile hibridizasyonundan sonra R_{ct} değerlerinde bir düşme görülmektedir (Şekil 4.21 d). R_{ct} değerindeki bu azalma, yüzeydeki tek sarmal DNA'nın hibridizasyon sonrası, baz çiftleri arasında kurulan H bağlarının elektron transferini kolaylaştırdığını düşündürmektedir. Probu, NC ile hibridizasyonu sonrasındaki R_{ct} değerlerindeki artış ise (Şekil 4.21 e), NC'nin proba bağlanmadığını, probun yük transfer özelliğinin, ortamdaki NC tarafından etkilenmediğini göstermektedir ki bu sonuçlar bir önceki bölümde gösterilen seçicilik çalışmasındaki sonuçları destekler mahiyettedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

DNA analizlerine yönelik, nanomalzemelere dayalı elektrot materyallerinin geliştirildiği çalışmamızın ilk bölümünde SnO₂ nanopartiküllerine dayalı grafit sensörün elektrokimyasal davranışlarını, ikinci bölümde elektrokimyasal davranışlarını bildiğimiz SnO₂ nanopartiküllerinin, iletken, ve elektroaktif bir polimer olan polivinil ferrosen matrisine içerisine karıştırılmasıyla elde ettiğimiz yeni nano yüzeyin, DNA hibridizasyon çalışmaları için grafitte dayalı sensör teknolojisinde kullanılabilirliğini, yükseltgenmiş grafit malzemesinin DNA sensör teknolojisinde kullanılabilirliğini araştırdığımız üçüncü bölümde ise yükseltgenmiş grafit ile modifiye sensörün elektrokimyasal özellikleri, sensör teknolojisinde optimum kullanım koşulları ve DNA hibridizasyonuna yönelik uygulamalarını inceledik.

SnO₂ nanopartiküllerine dayalı grafit sensörün elektrokimyasal davranışı, dönüşümlü voltametri (CV) tekniği, karbon pasta matrisine eklenecek olan nanopartikül oranı diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği, elektrot yüzeyinin aktivasyonunun, elektron transfer özelliklerinde meydana getireceği değişiklik ise elektrokimyasal empedans spektrometri (EIS) tekniği ile incelendi.

Tek kullanımlık sensör teknolojisinde elektrot yüzeyinin elektrokimyasal yükseltgeme yöntemi kullanılarak SnO₂ nanopartikülleri içeren PVF⁺ ile kaplanması ve bu yüzeyin DNA sensör teknolojisinde kullanılabilirliği ilk defa bu çalışmada incelenmiştir. PVF⁺ matrisine içerisine SnO₂ nanopartiküllerin dağıtılmasıyla elde edilen nanoyüzeyin, DNA sensör teknolojisine sağlayacağı avantajlar araştırılmıştır. Literatürde, sadece PVF⁺ ile modifiye edilmiş platin elektrotlar ile DNA analizi ve hibridizasyonuna ilişkin çalışmalar mevcuttur (Kuralay vd., 2008, 2009a). Ancak, SnO₂ nanopartiküllere dayalı elektrokimyasal DNA sensörüne ait bir çalışmaya literatürde henüz rastlanmamıştır. PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ve PVF⁺ ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrot kullanılarak yapılmış DNA hibridizasyon çalışmaları karşılaştırılmış ve elde edilen nano yüzey ile 3 kat daha yüksek guanin sinyali elde edilmiştir (Kuralay vd., 2008, 2009a,b). Ayrıca tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) ile hazırlanmış bu yeni yüzeyle hem PVF⁺'nin hem de DNA'nın elektroaktif bazı olan guaninin yükseltgenme sinyali, aynı ölçüm aralığında gösterilmiştir. PVF⁺-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinin mikroskopik karakterizasyonu, taramalı elektron

mikroskopisi (SEM), elektrokimyasal davranışları ise diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak incelenmiştir. Nanopartikül kullanılarak PVF⁺ ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyine immobilize edilen amino işaretli DNA dizisinin ve hibridizasyon için hedef DNA dizisinin optimum derişimleri belirlenmiş, ayrıca, elde edilen yüzeyin seçimliliği incelenmiştir. Geliştirilen sensör teknolojisi ile sadece daha tekrarlanabilir ve daha duyarlı sonuçlar elde edilmemiş, aynı zamanda, hedef DNA'sına birebir uyumlu seçimlilik gösteren yüzeyler de elde edilmiştir. Seçimlilik ile ilgili yapılan çalışmalarda probun kendi tamamlayıcısına seçimlilik derecesi (katsayısı) hakkında net birşey söylemek mümkün değildir. Ancak, her defasında hedef DNA+MM karışımında, hedef DNA derişimi sabit tutulurken MM derişiminin sistematik olarak artırıldığı bir seri deneyle, probun seçimlilik derecesinin açığa çıkarılabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada sunulan DNA algılamasına yönelik ve nanopartiküle dayalı elektrokimyasal sensör teknolojisi, daha önce literatürde rapor edilen diğer metal nanopartikülerin kullanıldığı yöntemlere kıyasla (Authier, 2001; Dequaire, 2000; Cai, 2002a,b, 2003a; Wang, 2001b; 2003; Zhu, 2004) daha kolay ve hızlıdır. Bu yöntemin en önemli avantajı elde edilen yüzeye immobilize edilen DNA'nın yüksek kararlılıkta yüzeye bağlanabilmesi böylece hedefini yüksek seçimlilikte algılayabilen bir yüzey oluşturulabilmiş olmasıdır. Diğer bir avantajı ise, aynı ölçüm skalasında hem PVF, hem de DNA'nın guanin bazına ait elektrokimyasal sinyallerin ölçülmesini mümkün kılmasıdır.

Grafın ile modifiye edilmiş tek kullanımlık PGE yüzeyine pasif adsorbsiyon yöntemiyle DNA immobilizasyonu ve elektrokimyasal tayininin basit ve hızlı bir şekilde yapılabilmesi, DNA analizlerinin daha duyarlı bir şekilde ve tekrarlanabilir sonuçlar elde ederek gerçekleştirilmesini mümkün kılmaktadır. Çalışmamızın üçüncü bölümünde, kalem grafit elektrotların karboksil gruplarınca zengin, yükseltgenmiş grafın (GRPox) ile modifikasyonu ve geliştirilen bu elektrotların (GRPox-PGE) DNA analizlerine yönelik optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. GRPox ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş tek kullanımlık kalem grafit elektrotların mikroskobik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskopi (SEM), elektrokimyasal davranışları ise diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılarak incelenmiştir. Farklı elektrot modifikasyonlarının guanin yüksektgenme sinyaline etkileri incelenmiş, ayrıca, GRPox derişiminin, elektrot yüzeyine immobilize edilecek olan DNA derişiminin ve yüzey aktivasyon işleminin yanıtı olan etkileri araştırılmış ve GRPox ile

modifiye edilerek geliştirilen tek kullanımlık kalem grafit elektrot ile daha tekrarlanabilir ve daha duyarlı sonuçlar elde edilmiştir.

Literatürde çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT-GCE) (Cheng, 2005) ve tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT-GCE) (Goyal, 2008) ile modifiye edilmiş camı karbon elektrotlar kullanılarak yapılmış çalışmalarla kıyaslandığında, çalışmamızda tek kullanımlık grafit elektrot kullanılmış olması, GRPox modifiye elektrot hazırlama aşamasının daha hızlı ve kolay olması, ayrıca MWCNT-GCE kullanılarak yapılan diğer bir çalışmaya kıyasla (Erdem, 2006) daha az DNA materyali kullanılarak daha kısa sürede sonuç vermesi sensörümüze üstünlük kazandırmıştır.

GRPox ile modifiye edilmiş PGE yüzeyinde gerçekleşen HBV DNA hibridizasyonunun dizi seçimli tayini, HBV prob ile hedef dizi arasındaki hibridizasyon sonucunda, guanin yükseltgenme sinyalinin, DPV tekniği ile ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, farklı derişimlerdeki hedef DNA dizisinin yanıt etkisi, belirtme alt sınırı ve tekrarlanabilirlik gibi deneysel parametreler incelenmiştir. DNA hibridizasyonunun seçimliliği, rastgele dizi (NC) ve bir bazı hedeften farklı dizilerin (MM) kullanılmasıyla araştırılmıştır.

Literatürde sensör tasarımında çoklukla kullanılan tek duvarlı karbon nanotüplere kimyasal özellikleri bakımından çok benzeyen grafin ile modifiye edilmiş tek kullanımlık kalem grafit elektrotların kullanıldığı çalışmamız, tek duvarlı karbon nanotüpler ile modifiye edilmiş kalem grafit elektrotların kullanıldığı çalışmalar (Çalışkan, 2009) ile karşılaştırıldığında, gerek belirtme alt sınırı gerek tekrarlanabilirlik ve gerekse seçimlilik açısından çok daha duyarlı, çok daha tekrarlanabilir ve gözlenebilir sınır açısından daha duyar, ayrıca, elde edilen probun kendi tamamlayıcısı olan hedef diziyi daha iyi bir seçimlilikle algılayabilen sensörler geliştirilmiştir.

Çalışmamızın ikinci ve üçüncü bölümünde, geliştirilen PVF^+-SnO_2 nanopartikül ve GRPox ile modifiye edilmiş grafit elektrotlar kullanılarak DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayini, herhangi bir elektroaktif indikatör kullanılmaksızın gerçekleştirilmiştir. Elektrot yüzeyine optimum derişimdeki DNA'nın immobilizasyonu incelemek için, amino ile işaretlenmiş DNA prob derişimindeki farklılığın yanıt üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Dizi seçimli DNA

hibridizasyonuna dayalı elektrokimyasal sensör teknolojisine yönelik bir uygulamasını göstermek amacıyla, Hepatit B virüsünü (HBV) temsil eden spesifik, kısa DNA dizileri (oligonükleotitler) kullanılmıştır. HBV prob dizisinin guanin bazı içermemesine bağlı olarak, guanin bazının sentetik analogu ve pahalı bir işaretleyici olan inosin bazının prob dizisinde yer almaması, geliştirilen sensör teknolojisine bir avantaj getirmiştir. Böylece, çalışmamızda kullandığımız HBV probun inosin veya metal nanopartikül gibi diğer ajanlarla işaretlenmesine gerek kalmadan (Özsöz, 2003; Wang, 2001a, b; 2004a) indikatörsüz sistemde duyarlı bir şekilde DNA hibridizasyon tayinini mümkün kılan daha hızlı bir sensör teknolojisi geliştirilmiştir.

Bu çalışma ile ayrıca, $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, metilen mavisi, ekinomisin gibi hibridizasyon indikatörleri (Erdem, 2000; Ju, 2003; Karadeniz, 2009; Mikkelsen, 1996; Ye, 2003) kullanılmaksızın yüksek duyarlılıkta DNA hibridizasyonunun tayin edilebileceği de gösterilmiştir.

Bu çalışmada geliştirilen nanomalzemelere dayalı sensörler kendi içerisinde, duyarlılık ve seçimlilik açısından karşılaştırıldığında GRPox ile modifiye edilmiş tek kullanımlık sensörlerin, PVF-SnO₂ nanopartikül ile modifiye edilmiş tek kullanımlık sensörlere kıyasla daha düşük gözlenebilme sınırı ile hedef DNA'ya çok daha yüksek seçimlilik sağladığı anlaşılmaktadır.

Elde edilen nanomalzemelere dayalı seçimliliği ve duyarlılığı yüksek sensörlerin, DNA çip teknolojisine uyarlanabilmesi ile düşük maliyetli, hızlı ve yüksek duyarlılıkta yanıt verebilecek çip tasarılarına yönelik sensörlerin geliştirilebileceği de ümit edilmektedir. Bu şekilde geliştirilen sensörlerle, ileride PCR tekniği gerekmeksizin DNA analizlerinin çok daha kısa sürede ve ucuz bir şekilde yapılabilmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Agüi, L., Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J. M. 2008. Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry. A review. **Analytica Chimica Acta**, 622: 11–47.
- Ahrendt, S. A., Halachmi, S., Chow, J. T., Wu, L., Halachmi, N., Yang, S. C., Wehage, S., Jen, J., Sidransky, D. 1999. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 96: 7382–7387.
- Alivisatos, A.P. 1996. Semiconductor clusters, Nanocrystals and Quantum Dots. **Science**, 271: 933–937.
- Alwarappan, S., Erdem, A., Liu, C., Li, C.Z. 2009. Probing the electrochemical properties of graphene nanosheets for biosensing applications. **J. Phys. Chem. C**, 113 (20): 8853–8857.
- Ang, P. K., Chen, W., Wee, A. T. S., Loh, K. P. 2008. Solution-Gated epitaxial graphene as pH sensor. **J. Am. Chem. Soc.** 130: 14392–14393.
- Authier, L., Grossiord, C., Brossier, P., Limoges, B. 2001. Gold nanoparticle-based quantitative electrochemical detection of amplified human cytomegalovirus DNA using disposable microband electrodes. **Anal. Chem.**, 73: 4450–4456.
- Basset, D. E. Jr., Eisen, M. B., Boguski, M. S. 1999. Gene expression informatics—it's all in your mine. Review. **Nat Genet.**,21: 51–55.
- Bonanni, A., Esplandiu, M. J., Valle, M. 2008. Signal amplification for impedimetric genosensing using gold-streptavidin nanoparticles. **Electrochimica Acta**, 53: 4022–4029.
- 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.
- 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.

- 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.
- Cai, H., Wang, Y., He, P., Fang, Y. 2002a. Electrochemical detection of DNA hybridization based on silver-enhanced gold nanoparticle label. **Analytica Chimica Acta**, 469: 165–172.
- Cai, H., Xu, Y., Zhu, N., He, P., Fang, Y. 2002b. An Electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label. **Analyst**, 127: 803–808.
- Cai, H., Zhu, N., Jiang, Y., He, P., Fang, Y. 2003a. Cu&Au alloy nanoparticles as oligonucleotides labels for electrochemical stripping detection of DNA hybridization. **Biosensors and Bioelectronics**, 18: 1311–1319.
- Cai, H., Cao, X., Jiang, Y., He, P., Fang, Y. 2003b. Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection. **Anal. Bioanal. Chem.**, 375(2): 287–293.
- 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.
- 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.
- Carpini, G., Lucarelli, F., Marrazza, G., Mascini, M. 2004. Oligonucleotide-modified screen printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids. **Biosens. Bioelectron.**, 20 (2): 167–175.
- Castillo, E, Marty, A., Condoret, J. S., Combes, D. 1996. Enzymatic Catalysis In Nonconventional Media Using High Polar Molecules As Substrates, In: *Annals of the New York Academy of Science* (Dordick, J. S. and Russell, A.J., eds.), The New York Academy of Science, pp. 206-211, New York.
- Chaubey, A. and Malhotra, B.D. 2002. Mediated biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, 17: 441-456.

- Chen, R. J., Zhang, Y., Wang, D., Dai, H. 2001. Nancovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. **J. Amer. Chem. Soc.**, 123: 3838–39.
- Cheng, G., Zhao, J., Tu, Y., He, P., Fang, Y. 2005. A sensitive DNA electrochemical biosensor based on magnetite with a glassy carbon electrode modified by multi-walled carbon nanotubes in polypyrrole. **Analytica Chimica Acta** 533: 11–16.
- Cheung, V. G., Morley, M., Aguilar, F., Massimi, A., Kucherlapati, R., Childs, G. 1999. Making and reading microarrays. **Nat Genet.** 21: 15–19.
- Collins, F. S., Patrinos, A., Jordan, E., Chakravati, 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.
- Çalışkan, A., Erdem, A., Karadeniz, H. 2009. Direct DNA hybridization on the single-walled carbon nanotubes modified sensors detected by voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. **Electroanalysis**, 19: 2116–2124.
- Dequaire, M., Degrand, C., Limoges, B. 2000. An Electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label. **Anal Chem.**, 72: 5521–5528.
- DeSilva, A. P. Gunaratne, H. Q. N. McCoy, C. P. 1993. A molecular photoionic AND gate based on fluorescent signaling. **Nature**, 364: 42–44.
- Drexler, K. E. 1992. Nanosystems, Molecular, Machinery. Manufacturing And Computation. Ed. Wiley, 576, New York.
- Erdem, A., Kerman, K., Meriç, B., Akarca, U., Özsöz, 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.
- Erdem, A., Özsöz, M. 2002. Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interactions. A review. **Electroanalysis**, 14 (14): 965–974.
- Erdem, A., Ariksoysal, D. Ö., Karadeniz, H., Kara, P., Sengönül, A., Sayiner, A. A., Özsöz, M. 2005. Electrochemical genomagnetic assay for the detection

- of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology. **Electrochem. Commun.**, 7: 815–820.
- Erdem, A., Papakonstantinou, P., Murphy, H. 2006a. Direct DNA Hybridization at disposable graphite electrodes modified with carbon nanotubes. **Anal Chem**, 78: 6656–6659.
- Erdem, A., Pividori, M. I., Lermo, A., Bonanni, A., del Valle, M., Alegret, S. 2006b. Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes. **Sensors and Actuators B-Chemical**, 114: 591–598.
- Erdem, A. 2007a. Nanometrial- based electrochemical DNA sensing strategies, A Review. **Talanta**, 74: 318–325.
- Erdem, A., Sayar, F., Karadeniz, H., Güven, G., Özsöz, M., Pişkin, E. 2007b. Development of streptavidin carrying magnetic nanoparticles and their applications in electrochemical nucleic acid ensor systems. **Electroanalysis**, 19: 798–804.
- Erdem, A., Karadeniz, H., Çalışkan, A. 2009. Single-walled carbon nanotubes modified graphite electrodes for electrochemical monitoring of nucleic acids and biomolecular interactions. **Electroanalysis**, 21: 464–471.
- Erdem, A., Papakonstantinou, P., Murphy, H., McMullan M., Karadeniz H., Sharma, S. 2010. Streptavidin Modified Carbon Nanotube Based Graphite Electrode for Label-Free Sequence Specific DNA Detection. **Electroanalysis**, 22: 611 – 617.
- Evans, A. 1991. Potentiometry and ISE, ACOL, s.106–198, London.
- Fu, Y., Yuan, R., Chai, Y., Zhou, L., Zhang, Y. 2006. Coupling of a reagentless electrochemical DNA biosensor with conducting polymer film and nanocomposite as matrices for the detection of the hiv dna sequences. **Analytical Letters**, 39: 467–482.
- Galandova, J., Trnkova, L., Mikelova, R., Labuda, J. 2009. Investigation of a DNA-based biosensor with chitosan-carbon nanotubes interface by cyclic and elimination voltammetry. **Electroanalysis**, 21: 563–572.
- Geim, A. K, Novoselov, K. S. 2007. The rise of graphene. **Nat. Mater.** 6 (3): 183–191.

- Gerhold, D., Rushmore, T., Caskey, C. T. 1999. DNA chips: Promising toys have become powerful tools. Review. **Trends Biochem Sci.**, 24: 168–173.
- Goyal, R. N., Singh, S. P. 2008. Simultaneous voltammetric determination of dopamine and adenosine using a single walled carbon nanotube – Modified glassy carbon electrode. **Carbon**, 46: 1556–1562.
- Gökdağ, Z., Smağ, A., Yumak, T. 2010. Comparison of the catalytic efficiency of synthesized nano tin oxide particles and various catalysis for the pyrolysis of hazelnut shell. **Biomass and Bioenergy**, 34: 402-410.
- Göpel, W. 1998. Bioelectronics and nanotechnologies. **Biosens, Bioelectron**, 13: 723–728.
- Guo, M., Chen, J., Liu, D, Nie, L., Yao, S. 2004. Electrochemical characteristics of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes. **Bioelectrochem.**, 62: 29–35.
- Hahn, J., Lieber, C. M. 2004. Direct ultrasensitive electrical detection of DNA and DNA sequence variations using nanowire nanosensors. **Nano Lett.**, 4: 51–54.
- Hassena, W.M., Chaixa, C., Abdelghanib, A., Bessueille, F., Leonarda, D., Jaffrezic-Renault, N. 2008. An impedimetric DNA sensor based on functionalized magnetic nanoparticles for HIV and HBV detection. **Sensors and Actuators B** 134: 755–760.
- Herne, T. M., Tarlov, M. J. 1997. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. **J. Am. Chem. Soc.**, 119: 8916–8920.
- Hrapovic, S, Liu, Y., Male, K. B., Luong, J. H. T. 2004. Electrochemical biosensing platforms using platinum nanoparticles and carbon nanotubes. **Anal. Chem.**, 76: 1083–1088.
- <http://www.mos.org/sin/SEM>. Erişim tarihi: 31/04/2010
- <http://www.sciencedialy.com/releases/2007/07/070725143625.htm>. Erişim tarihi: 05/06/2010

- Huang, B., Li, Z., Liu, Z., Zhou, G., Hao, S., Wu, J., Gu, B., Duan, W. H. 2008. Adsorption of gas molecules on graphene nanoribbons and implication for nanoscale molecule sensor. **J. Phys. Chem. C**, 112: 13442-12446.
- Jelen, F., Erdem, A., Palecek, E. 2002. Cyclic voltammetry of echinomycin and its interaction with double-stranded and single-stranded DNA adsorbed at the electrode. **Bioelectrochemistry**, 55: 165-167.
- Johnstone, 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.
- Ju, H. X., Ye, Y. K., Zhao, J. H., Zhu, Y. L. 2003. Hybridization biosensor using di(2,20-bipyridine) osmium (III) as electrochemical indicator for detection of polymerase chain reaction product of hepatitis B virus DNA. **Analytical Biochemistry**, 313:255-261.
- Karadeniz, H., Gülmez, B., Şahinci, F., Erdem, A., Kaya, G., Ünver, N., Kivçak, B., Özsöz, M. 2003. Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals. **J. Pharm. and Biomed. Anal.**, 33: 295-302.
- Karadeniz H., Erdem A., Çalışkan A., Pereira C. M., Pereira E. M., Ribiero J. A. 2007a. Electrochemical sensing of silver tags labelled DNA immobilized onto disposable graphite electrodes. **Electrohem. Commun.**, 9: 2167-2173.
- Karadeniz, H., Alparslan, L., Erdem, A., Karasulu, E. 2007b. Electrochemical investigation of interaction between mitomycin C and DNA in a novel drug-delivery system. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 45: 322-326.
- Karadeniz, H., Erdem, A., Çalışkan, A. 2008. Electrochemical monitoring of DNA hybridization by multiwalled carbon nanotube based screen printed electrodes. **Electroanalysis**, 17: 1932-1938.
- Karadeniz, H., Erdem, A., Kuralay, F., Jelen, F. 2009. Indicator-based and indicator-free magnetic assays connected with disposable electrochemical nucleic acid sensor system. **Talanta**, 78: 187-192.

- Katz, E., Willner, I., Wang, J. 2004. Electroanalytical and bioanalytical systems based on metal and semiconductor nanoparticles. **Electroanalysis**, 16: 19–44.
- 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.
- Khairutdinov, R. F. 1997. Physical chemistry of nanocrystalline semiconductors. **Colloid J**, 59: 535–548.
- Koehne, J. E., Chen, H., Cassell, A. M., Ye, Q., Han, J., Meyyappan, M., Li, J. 2004, Miniaturized multiplex label-free electronic chip for rapid nucleic acid analysis based on carbon nanotube nanoelectrode arrays, **Clin. Chem.**, 50: 1886–1893.
- Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Özyörük, H., Yıldız, A. 2008. Electrochemical biosensing of DNA immobilized Poly(Vinylferrocenium) modified electrode. **Electroanalysis**, 23: 2563–2570.
- Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Özyörük, H., Yıldız, A. 2009a. Poly(vinylferrocenium) coated disposable pencil graphite electrode for DNA hybridization. **Electrochemistry Communications**, 11: 1242–1246.
- Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Özyörük, H., Yıldız, A. 2009b. Characterization of redox polymer based electrode and electrochemical behavior for DNA detection. **Analytica Chimica Acta**, 643: 83–89.
- Leenaerts, O., Partoens, B., Peeters, F. M. 2008. Adsorption of H₂O, NH₃, CO, NO₂ and NO on graphene: A first principles study. **Phys. Rev. B** 77 (1–6): 125416–125422.
- Lehn, J. M. 1999. Supramolecular Chemistry/Science-Some Conjectures And Perspectives. 287–304, Kluwer, Dordrecht.
- Lewis, L. N. 1993. Chemical catalysis by colloids and clusters, **Chem. Rev.**, 93: 2693–2730.
- Li, D., Kaner, R. B. 2008. Graphene based materials. **Science**, 320: 1170–1171.

- Li, J., Liu, Q., Liu, Y., Liu, S., Yao, S. 2005. DNA biosensor based on chitosan film doped with carbon nanotubes. **Analytical Biochemistry**, 346: 107–114.
- Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C. K., Chai, H., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A. 1993. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. **J. Nat. Prod.**, 56: 1331–1338.
- Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R., Lockhart, D. J. 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. Review. **Nat Genet.**, 21: 20–24.
- 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.
- Luo, X. L., Morrin, A., Killard, A. J., Smyth, M. R. 2006. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. **Electroanalysis**, 18 (4): 319–326.
- Luong, J. H. T., Mulchandani, A., Guilbault, G. G. 1988. Developments and applications of biosensors. **Trends in Biotechnology**, 6 (12): 310-316.
- Marazza, G., Chianella, I., Mascini, M. 1999. Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. **Anal. Chim. Acta**, 387: 297–307.
- Mathews, O. A., Shipway, A. N., Stoddart, J. F. 1998. Dendrimers-branching out from curiosities into new Technologies. **J. F. Prog. Polym. Sci.**, 23: 1–56.
- Mathur, S., Erdem, A., Cavelius, C., Barth, S., Altmayer, J. (2009). Amplified electrochemical DNA-sensing of nanostructured metal oxide films deposited on disposable graphite electrodes functionalized by chemical vapor deposition, **Sensors And Actuators B: Chemical**, 136 (2): 432–437.
- Mc Farland, A. D., Van Duyne, R. P. 2003. Single silver nanoparticles as real-time optical sensors with zeptomole sensitivity. **Nano Lett.**, 3: 1057–1062.
- Merkoçi, A., Pumera, M., Llopi, X., Perez, B., Vale, M., Alegret, S. 2005. New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes. **Trends Anal. Chem.**, 24: 826–838.

- Mikkelsen, S.R. 1996. Electrochemical biosensors for DNA sequence detection. A Review. **Electroanalysis**, 8 (1): 15–19.
- Miller, J. N., Miller, J. C. 2000. *Statistics And Chemometrics For Analytical Chemistry*, Pearson Education, 271, London.
- Molinier–Jumel, C., Malfoy, B., Reynaud, J. A., Aubeil–Sadron, G. 1978. Electrochemical study of DNA–Anthracyclines interactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 84 (2): 441–449.
- Mulvaney, P. 1996. Surface Plasmon spectroscopy of nanosized particles. **Langmuir**, 12: 788–800.
- Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A., Lin, Y. 2002. Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. **Electrochem. Commun.**, 4: 743–746.
- Niemeyer, C. M. 1997. DNA as a material for nanotechnology. **Angew. Chem.**, 39: 585–587.
- Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V., Grigorieva, I. V., Firsov, A. A. 2004. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, 306: 666–669.
- Novoselov, K. 2007. Graphene: Mind the gap. **Nat. Mater.**, 6: 720–721.
- Özkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J. J., Nielsen, P. E., Özsöz, M. 2002a. Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes. **Anal. Chim. Acta**, 462 (1): 39–47.
- Özkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Gooding, J. J., Nielsen, P. E., Özsöz, M. 2002b. Electrochemical detection of hybridization using peptide nucleic acids and methylene blue on self-assembled alkanethiol monolayer modified gold electrodes. **Electrochem. Commun.**, 4 (10): 796–802.
- Özsoz, M., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Özkan, D. 2002. Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on guanine signal. **Electroanalysis**, 15 (7): 613–619.

- Özsoz, M., Erdem, A., Kerman, K., Özkan, D., Tuğrul, B., Topcuoglu, N., Erken H., Taylan, M. 2003. Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of factor v leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes. **Anal. Chem.**, 75: 2181–2187.
- Palecek, E. 1960. Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid. **Nature** 188: 656–657.
- Palecek, E., Fojta, M. 2001. DNA hybridization and damage. **Anal. Chem.**, 73: 75A–83A.
- Patolsky, F., Lieber, C.M. 2005. Nanowire nanosensors. **Materials Today**, 8(4), 20–28.
- Peng, H., Soeller, C., Vigar, N., Kilmartin, P. A., Cannell, M. B., Bowmaker, G. A., Cooney, R. P., Travas-Sejdic, J. 2005. Label-free electrochemical DNA sensor based on functionalised conducting copolymer. **Biosens. and Bioelec.**, 20: 1821-1828.
- Peng, H., Soeller, C., Cannell, M. B., Bowmaker, G. A., Cooney, R. P., Travas-Sejdic, J. 2006. Electrochemical detection of DNA hybridization amplified by nanoparticles. **Biosens. and Bioelec.**, 21: 1727-1736.
- Peres, N. M. R., Guinea, F., Neto, A. H. C. 2006. Electronic properties of disordered two-dimensional carbon. **Phys. Rev. B** 73: 125411–125434.
- Pietrzyk, D.J., Frank, C.W. 1979. Analytical Chemistry. Academic pres, 2.Baskı, 700, Newyork.
- Pumera, M., Sanchez, S., Ichinose, I., Tang, J. 2007. Electrochemical nanobiosensors. **Sensors and Actuators B Chem.**, 123: 1195–1205.
- Ramanavicius, A., Ramanaviciene, A., Malinauskas, A. 2006. Electrochemical sensors based on conducting polymer-polypyrrole. **Electrochim. Acta.** 51: 6025-6037.
- Ravindran, S., Chaudhary, S., Colburn, B., Özkan, M., Özkan, C. S. 2003. Covalent coupling of quantum dots to multiwalled carbon nanotubes for electronic device applications. **Nano. Lett.**, 3: 447–453.

- Salem, A. K., Chao, J., Leong, K. W., Searson, P. C. 2004. Receptor-mediated self-assembly of multi-component magnetic nanowires. **Adv. Mater.**, 16: 268–271.
- Sapolsky, R. J., Hsie, L., Berno, A., Ghandour, G., Mittmann, M., Fan, J. B. 1999. Highthroughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays. **Genet Anal.** 14: 187–192.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, 270: 477–470.
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O., Davis, R. W. 1996. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93: 10614–10619.
- Service, R. F. 1998. New focus: Microchip arrays put DNA on the spot. **Science**, 282: 396–399.
- Skoog, D. A., West, D. A., Holler F. J. Çeviri Editörleri; Prof. Dr. Esmâ Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu. 1996. Analitik Kimyanın Temelleri. Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, 550, Ankara.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. Çeviri editörleri; Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H. 1998. Enstrumantal Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, 5. Baskı, 940, Ankara.
- Stampfer, C., Schurtenberger, E., Molitor, F., Guttinger, J., Ihn, T., Ensslin, K. 2008. Tunable graphene single electron transistor. **Nano Lett.** 8: 2378–2383.
- Su, C. Y., Xu, Y., Zhang, W., Zhao, J., Tang, X., Tsai, C. H., Li, L. J., 2009. Electrical and spectroscopic characterizations of ultra-large reduced graphene oxide monolayers. **Chem. Mater.** 21: 5674–5680.
- Tural, H., Gökçel, H. İ., Ertuş, F. N. 2006. Enstrumantal Analiz I Elektroanalitik Yöntemler. Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi Yayın No: 186, 2. Baskı, 336, İzmir.
- Vaseashta, A. 2005. Nanostructured Materials Based Next Generation Devices and Sensors, nanostructured and Advanced materials. in A. Vaseashta D., Dimova-Malinovska, J. M. Marshall (Ed.), Springer, , s. 1–30, Netherlands.

- Wang, J., Fernandes, J. R., Kubota, L. T. 1998. Polishable and renewable DNA hybridization biosensors. **Anal. Chem.**, 70: 3699–3702.
- Wang, J. 2000. Survey And Summary: From DNA biosensors to gene chips. **Nucl. Acids. Res.**, 28: 3011-3016.
- Wang, J., Kawde, A. N. , Erdem, A., Salazar, M. 2001a. Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization. **Analyst**, 126: 2020–2024.
- Wang, J., Xu, D., Kawde, A. N., Polsky, R. 2001b. Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization. **Anal. Chem.**, 73: 5576–5581.
- Wang, J., Xu, D., Erdem, A., Polsky, R., Salazar, M. A. 2002a. Genomagnetic electrochemical assays of DNA hybridization. **Talanta**, 56: 931–938.
- Wang, J. 2002b. Electrochemical nucleic acid biosensors. **Anal. Chim. Acta**, 469: 63–71.
- Wang, J., Kawde, A. N., Musameh, M. 2003. Carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes for amplified label-free electrochemical detection of DNA hybridization. **Analyst**, 128: 912-916.
- Wang, J., Flechsig, G. U., Erdem, A., Korbut, O., Grundler, P. 2004a. Label-free DNA hybridization based on coupling of a heated carbon paste electrode with magnetic separations. **Electroanalysis**, 16: 928-931.
- Wang, J., Liu, G. D., Jan, M. R. 2004b. ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events. **J. Am. Chem. Soc.**, 126: 3010–3011.
- Wang, J. 2005a. Nanomaterial-based amplified transduction of biomolecular interactions. **Small**, 1(11): 1036–1043.
- Wang, J. 2005b. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. **Analyst**, 130: 421–426.
- Westervelt, R. M., 2008. Applied physics: graphene nanoelectronics. **Science** 320: 324-325.

- Wildgoose, G. G., Banks, C. E., Leventis, H. C., Compton, R. G. 2006. Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis. **Microchim. Acta**, 152: 187–193.
- Wilson, M. 2006. Electrons in atomically thin carbon sheets behave like massless particles. **Phys. Today** 59: 21-23.
- Wu, K., Fei, J., Bai, W., Hu, S. 2003. Direct electrochemistry of DNA, guanine and adenine at a nanostructured film-modified electrode. **Anal. Bioanal. Chem.**, 376: 205–209.
- www.metisbio.com/uploads/MIKROARRAY_serdartuncer.doc. Erişim Tarihi: 27 Aralık 2009.
- Yang, Y., Wang, Z., Yang, M., Li, J., Zheng, F., Shen, G., Yu, R. 2007. Electrical detection of deoxyribonucleic acid hybridization based on carbon-nanotubes/nano zirconium dioxide/chitosan-modified electrodes. **Analytica Chimica Acta**, 584: 268-274.
- Yapaşan, E., Çalışkan, A., Karadeniz, H., Erdem, A. 2010. Electrochemical investigation of biomolecular interactions between platinum derivatives and DNA by carbon nanotubes modified sensors. **Materials Science and Engineering B**, 169: 169–173.
- Ye, Y. K., Zhao, J. H., Yan, F., Zhu, Y. L., Ju, H. X. 2003. Electrochemical behavior and detection of hepatitis B virus DNA PCR production at gold electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, 18: 1501–1508.
- Yershov, G., Barsky, V., Belgovskiy, A., Kirillov, E., Kreindlin, E., Ivanov, I., Parinov, S., Guschin, D., Drobishev, A., Dubiley, S., Mirzabekov, A. 1996. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. **Proc Natl Acad. Sci USA**, 93: 4913–4918.
- Yıldız, A., Genç, Ö. 1993. Enstrumantal Analiz. Hacettepe Yayınları, A-64, s. 289-384, Ankara.
- Zhang, W., Yang, T., Huang, D., Jiao, K., Li, G. 2008. Synergistic effects of nano-Zno/multi-walled carbon nanotubes/chitosan nanocomposite membran for the sensitive detection of sequence-specific of PAT gene PCR amplification of NOS gene. **Journal of Membran Sciences**, 325: 245-251.

- Zhang, L., Webster, T. J. 2009. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. Review. **Nano Today**, 4: 66–80.
- Zhang, Y., Wang, J., Xu, M. 2010. A sensitive DNA biosensor fabricated with gold nanoparticles/poly (p-aminobenzoic acid)/carbon nanotubes modified electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 75: 179-185.
- Zhu, N., Zhang, A., Wang, Q., He, P., Fang, Y. 2004. Lead sulfide nanoparticle as oligonucleotides labels for electrochemical stripping detection of DNA hybridization. **Electroanalysis**, 16: 577-582.
- Zhu, N., Chang, Z., He, P., Fang, Y. 2005. Electrochemical DNA biosensors based on platinum nanoparticles combined carbon nanotubes. **Analytica Chimica Acta**, 545: 21–26.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Mihrican MUTİ ERDEM
Doğum Yeri ve Tarihi :Kiel Almanya 1977

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Ege Üniversitesi Fen Fak. Kimya Bölümü (1999)
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniv. Fen Bilimleri Ens. (2005)
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

-SCI

Muti, M., Kuralay, F., Erdem, A., Abaci, S., Yumak, T., Sinag, A. 2010. Tin Oxide Nanoparticles-Polymer Modified Single-Use Sensors For Electrochemical Monitoring of Label-Free DNA Hybridization. **Talanta**, Basımda. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.07.040

Muti, M., Sharma, S., Erdem, A., Papakonstantinou, P. 2010. Electrochemical Monitoring of Nucleic Acid Hybridization By Single-Use Graphene Oxide Based Sensor. Gönderildi.

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslararası

-Ulusal

XX. Ulusal Kimya Kongresi 4–8 Eylül 2006, Kayseri, (Sözlü Bildiri)

XIV. Ulusal Kimya Kongresi 29 Haziran–2 Temmuz 2010, Zonguldak, (Sözlü Bildiri)

c) Katıldığı Projeler

FEF 2003 BAP Y. Lisans Projesi

FEF 08001 BAP Projesi

FB 0915 BAP Doktora Projesi

TBAG 109T813 Tübitak Projesi

International Joint Project Grant of the Royal's Society scheme between UK (Dr. Pagona Papakonstantinou) and Turkey (Dr. Arzum Erdem

Gürsan) in Nanotechnology and Integrated Bioengineering Center
University of Ulster (3-31 Ağustos 2009).

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Adnan Menderes Üniversitesi 2000–

İLETİŞİM

E-posta Adresi : merdem@adu.edu.tr

Tarih : 26.07.2010