



**NANOLIF KAPLI KALEM GRAFİT BİYOSENSÖR
YÜZEYİNDE SPESİFİK NÜKLEİK ASİT DİZİLERİNİN
HİBRİDİZASYONUNUN
ELEKTROKİMYASAL OLARAK TESPİTİ**

Nilay ALADAĞ TANIK



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NANOLİF KAPLI KALEM GRAFİT BİYOSENSÖR YÜZEYİNDE SPESİFİK
NÜKLEİK ASİT DİZİLERİNİN HİBRİDİZASYONUNUN
ELEKTROKİMYASAL OLARAK TESPİTİ**

Nilay ALADAĞ TANİK

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
(Danışman)

Doç. Dr. Yakup AYKUT
(İkinci Danışman)
Uludağ Üniversitesi

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2016

Her Hakkı Saklıdır

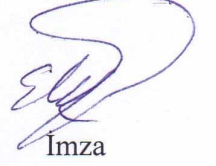
TEZ ONAYI

Nilay ALADAĞ TANIK tarafından hazırlanan “Nanolif Kaplı Kalem Grafit Biyosensör Yüzeyinde Spesifik Nükleik Asit Dizilerinin Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Olarak Tespiti” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

İkinci Danışman : Doç. Dr. Yakup AYKUT, Uludağ Üniversitesi

Başkan : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN
Uludağ Üniversitesi Fen-Ebebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı



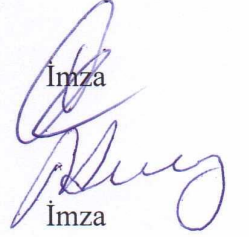
İmza

Üye : Doç. Dr. Yakup AYKUT
Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı



İmza

Üye : Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ
Uludağ Üniversitesi Fen-Ebebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı



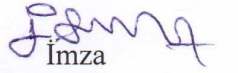
İmza

Üye : Prof.Dr.Münevver ARISOY
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi
Temel Sağlık Bilimleri Anabilim Dalı



İmza

Üye : Doç. Dr. İdris ÇERKEZ
Bursa Teknik Üniversitesi
Doğa Bilimleri, Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi
Lif ve Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı



İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım




Prof. Dr. Ali OSMAN DEMİR
Enstitü Müdürü
22.06/2016

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

22/06/2016

İmza



Nilay ALADAĞ TANİK

ÖZET

Doktora Tezi

NANOLIF KAPLI KALEM GRAFİT BİYOSENSÖR YÜZEYİNDE SPESİFİK NÜKLEİK ASİT DİZİLERİNİN HİBRİDİZASYONUNUN ELEKTROKİMYASAL OLARAK TESPİTİ

Nilay ALADAĞ TANİK

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr.Elif DEMİRKAN

İkinci Danışman: Doç.Dr. Yakup AYKUT(Uludağ Üniversitesi)

Bu çalışmada, nanolif kaplı grafit biyosensör yüzeyinde spesifik nükleik asit dizilerinin hibridizasyonunun elektrokimyasal olarak tespiti amaçlanmıştır. Bu amaçla, Alzheimer, Parkinson, Bipolar Bozukluk gibi nörodejeneratif hastalıklarda sıklıkla gözlenen nörotrofik faktörler ailesinden BDNF geninde meydana gelen Val66Met tek nokta mutasyonunun ilk kez elektrokimyasal tayinine yönelik bir biyosensör geliştirilmiştir. Bu polimorfizminin tayini için genelde kullanılmakta olan yöntemler, RFLP, RT-PCR ve DNA sekanslama yöntemleridir. Ancak bunlar pahalı yöntemler olup aynı zamanda oldukça zaman alan örnek hazırlama süreçleri gerektirmektedir. Tez kapsamında yapılan ön çalışmalarda, guanine dayalı yani indikatörsüz bir ayırımın mümkün olduğu görülmüş ve yöntem olarak DNA'daki en elektroaktif ve kararlı yanıt veren baz olan guanin bazının yaklaşık +1,0 V civarında verdiği yükseltgenme sinyaline dayalı indikatörsüz hibridizasyon algılama yöntemi kullanılmıştır. Literatürde ilk defa PGE yüzeyi elektrosipin yöntemi ile nanolifle kaplanmıştır. Nanolif kaplı elektrot yüzeyine prob tutturmadan önce CV uygulanması, yüzeyden alınan guanin sinyalinin CV uygulanmamış ve nanolif kaplı olmayan PGE yüzeyine göre 4 kat artışına sebep olmuştur. Çalışmada optimum koşulların belirlenmesinde tek sarmal DNA'da gözlenen guaninin oksidasyon sinyalinin, dsDNA(hibrit) ve tek bazı eşleşmemiş DNA(MM)'dan daha fazla olması esas alınmıştır ve mümkün olan en iyi ayırımın sağlandığı koşullar en iyi tayin koşulları olarak belirlenmiştir. Buna göre en uygun prob ve hedef tamponu 5X SSC, ölçüm tamponu ABS, prob konsantrasyonu 10µg/ml, hedef konsantrasyonu 15µg/ml, prob tutturma ve hibridizasyon süresi 30dk, hibridizasyondan sonraki yıkama süresinin 20sn olduğu görülmüştür. Tek sarmal DNA da yani hibridizasyon meydana gelmemiş dizilerde (prob, NC ve MM dizilerinde) guaninler açık olduğu için yükseltgenme sinyali yüksek, hibridizasyondan sonra ise sitozinle aralarında oluşturdukları hidrojen bağı köprüleri nedeniyle yükseltgenmesi kısmen kapalı duruma geldiğinden tek sarmala göre daha düşük sinyal vermesi beklenmiştir. Sonuç olarak tek sarmal olan prob diziden alınan sinyal en yüksek, hibrit diziden alınan sinyal en düşük, NC ve MM dizilerinden alınan sinyalin de hibridizasyon meydana gelmediği için prob dizisine yakın bir değerde olduğu görülmüştür. Ayrıca bu sonuç, geliştirilen biyosensörün seçimli şekilde hedefine bağlandığını ve polimorfizm tayininin mümkün olduğunu göstermiştir. Yöntemimizin kolay uygulanabilir olması, pahalı ekipmanlara gerek duyulmaması, hızlı cevap veren bir sistem olması (yaklaşık 65dk'da) ve herhangi bir toksik veya radyoaktif ajanın kullanılmaması nedenleriyle klasik yöntemlere güçlü bir alternatif yöntem geliştirilmiştir. Bu prototip biyosensör ile sadece bu gibi polimorfizmlerin ve mutasyonların tespiti değil, çevre, gıda, tıbbi tanı ve klinik uygulamalarda da kullanılabilecek mikroçip teknolojisinin altyapısı oluşturulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Elektrokimyasal DNA biyosensör, SNP, nanolif, elektrosipin

2016, x + 84 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

ELECTROCHEMICALLY DETERMINATION OF SPECIFIC NUCLEIC ACID SEQUENCES HYBRIDIZATION ON THE NANOFIBER COATED PENCIL GRAPHITE BIOSENSOR SURFACE

Nilay ALADAĞ TANIK

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr.Elif DEMİRKAN

Second Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yakup AYKUT(Uludağ University)

In this study, specific nucleic acid sequences hybridization on the nanofiber coated pencil graphite biosensor surface is intended to detect by electrochemically. For this purpose, biosensor has been developed at the first time for the electrochemical detection of Val66Met single point mutations occurred in the BDNF gene which is frequently observed neurodegenerative diseases such as Alzheimer, Parkinson, and bipolar disorder. For determining this polymorphism, these methods are generally used: RFLP, RT-PCR, and DNA sequencing. But, these methods are expensive and they also requires expertise and quite time-consuming sample preparation processes. It was found that to be possible the detection of hybridization with label-free methods which are based on a guanine signal in the preliminary studies of these thesis. In this method, the oxidation signal of most electroactive and stable DNA's base, guanine, approximately at about +1.0V is used. It is the first time that PGE surface is coated with nanofibers with electrospinning method in the literature. Application of CV to the nanofiber coated electrode surfaces before the probe attachment has led to a 4-fold increase in oxidation signal of guanine when compared with the untreated and uncoated surface of PGE. For the determining of optimum operation conditions, it was based on that the oxidation signal of guanin signal at the ssDNA is more than the signal at the dsDNA and MM DNA. The conditions which give the best possible distinction between the ssDNA, dsDNA and MM DNA were determined as the optimum conditions of assay. Accordingly, optimum probe, target, and measurement buffer were found 5X SSC, 5X SSC and ABS, respectively, probe and target concentration were found 10µg/ml and 15µg/ml, probe immobilization and hybridization time were found 30min, and washing time after the hybridization was found 20s. ssDNA is the meaning of sequences which are not occur hybridization (probe, NC, and MM) had higher oxidation signal of guanin. Because, when the hybridization occurs, there is a decrease in electrochemical signals due to the interaction of free guanines of the probe with complementary cytosine bases present in the target sequence. This is because of the guanine bases are closed with the cytosine bases in the target sequences. Consequently, signal received from the probe was high, signal received from the hybrid was low, since the signals received from the NC and MM sequences, in which hybridization not occur, were found to be close to the value of the probe signal. Moreover, these results showed that the developed biosensor selectively connect to the target and showed that it is possible to determination of polymorphisms. Our method is easy to apply, no need to expensive equipment, fast response system (about 65min), and no using of any toxic or radioactive agents. For these reasons, it is powerful alternative to classical methods. This prototype biosensor can be used not only the detection of polymorphisms and mutations and also can be used environment, food, medical diagnostics and in clinical applications to create the infrastructure of the microchip technology.

Key words: Electrochemical DNA biosensor, SNP, nanofiber, electrospinning

2016, x + 84 pages.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocalarım Prof. Dr. Elif Demirkan ve Doç. Dr. Yakup AYKUT'a,

Tezimin her aşamasında bilgi, görüş ve önerileriyle beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyesi değerli hocalarım Prof. Dr. Tolga ÇAVAŞ'a, Doç. Dr. İdris Çerkez'e,

Akademik hayatım boyunca her zaman örnek aldığım ve alacağım Sayın Prof. Dr. Mehmet Emin Şengün ÖZSÖZ'e,

Tezim süresince dostluklarını ve desteklerini esirgemeyen, çalışmalarımı keyifli hale getiren Araş.Gör.Tuba SEVGİ ve Ezginur ÇAM başta olmak üzere, tüm Biyoteknoloji Laboratuvarı yüksek lisans ve doktora öğrencilerine,

OUAP(MH)-2014/23 no'lu proje olarak bu çalışmayı destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne,

Bu süreç içerisinde desteklerini esirgemeyen SACEM Hayat Teknolojileri A.Ş. patronlarım ve iş arkadaşlarıma,

Tanıdığım günden itibaren hep yanımda olan ve tezimin daha kısa sürede bitmesinde ve başarıya ulaşmasında büyük katkı sağlayan sevgili eşim Cenk TANİK'e ve bir nebze de olsa ilgimi esirgediğim sevgili kızım Ceren'e,

Hem hayatım boyunca hem de bu zorlu süreçte yanımda olan, maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, hakkını bir ömür ödeyemeyeceğim canım annem Neriman ALADAĞ ve uzakta da olsa her zaman yanımda olduğunu hissettiren biricik kardeşim Aylin ALADAĞ başta olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Nilay ALADAĞ TANİK
22/06/2016

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Biyosensörler	4
2.1.1. Biyosensörü oluşturan bileşenler.....	4
2.1.2. Biyosensör teknolojisinin tarihçesi.....	6
2.1.3. Biyosensörlerin avantajları ve kullanım alanları.....	8
2.2. Nükleik Asitler.....	9
2.2.1. DNA'nın moleküler yapısı.....	13
2.2.2. DNA hibridizasyonu.....	15
2.3. Mutasyon	16
2.3.1. Mutasyonun moleküler değişim tipine göre sınıflandırılması.....	18
2.3.2. Tek nokta polimorfizmi (SNP).....	19
2.3.3. Mutasyon Tarama Yöntemleri.....	20
2.3.3.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	21
2.3.3.2. RT-PCR (Real-Time PCR).....	22
2.3.3.3. DNA dizi analizi.....	23
2.3.3.4. DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography).....	27
2.3.3.5. HRM (High Resolution Melting) Analizi.....	28
2.4. Elektrokimya.....	29
2.4.1. Voltametri.....	30
2.4.1.1. Voltametrik cihazlar.....	31
2.4.1.2. Voltametride kullanılan bazı önemli tanımlamalar.....	33
2.4.1.3. Voltametrik yöntemler.....	36
2.4.1.3.1. Dönüşümlü voltametri.....	37
2.4.1.3.2. Diferansiyel darbe voltametrisi.....	39
2.4.1.3.3. Doğrusal taramalı voltametri.....	40
2.4.1.3.4. Kare dalga voltametrisi.....	40
2.5. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri.....	41
2.5.1. Prob immobilizasyonu.....	42
2.5.2. Sensör yüzeyinde hibridizasyon.....	44
2.5.3. Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde DNA dizi algılama yöntemleri... ..	44
2.5.3.1. İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemleri.....	45
2.5.3.2. İndikatöre Dayalı DNA dizi algılama yöntemleri.....	46
2.6. Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF) ve Val66Met Polimorfizmi.....	47
2.7. Nanolif ve Nanolif Üretimi.....	49
2.7.1. Elektrospin yöntemi ile nanolif üretimi.....	51
2.7.1.1. Elektrospin yöntemini etkileyen parametreler.....	53
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	55

	Sayfa
3.1. Materyal.....	55
3.1.1. Kullanılan cihazlar ve kimyasallar.....	55
3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.....	56
3.1.3. Kullanılan DNA dizileri ve hazırlanışı.....	56
3.1.4. Deney düzeneğinin ve elektrotların hazırlanışı.....	58
3.2. Yöntem.....	59
3.2.1. Elektrot yüzeyinin PAN nanoliflerle kaplanması.....	61
3.2.2. Elektrot yüzeyine prob tutturulması.....	63
3.2.3. Hibridizasyon.....	63
3.2.4. Elektrokimyasal ölçüm.....	63
4. BULGULAR.....	64
4.1. Çalışmaya Uygun Nanolif Polimerinin Bulunması.....	64
4.2. Nanolif Kaplı Yüzeye CV Uygulaması.....	65
4.3. Prob ve Hibridizasyon Tamponu Çözeltilerinin Bulunması.....	68
4.4. Ölçüm Tamponu Çözeltisinin Bulunması.....	69
4.5. Prob Konsantrasyonunun Bulunması.....	70
4.6. Hedef Konsantrasyonunun Bulunması.....	70
4.7. Prob Tuturma ve Hibridizasyon Sürelerinin Bulunması.....	71
4.8. Hibridizasyondan Sonraki Yıkama Süresinin Belirlenmesi.....	72
4.9. Geliştirilen Biyosensörün Özgünlüğünün Tayini.....	73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	74
KAYNAKLAR.....	80
ÖZGEÇMİŞ.....	84

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μA	Mikroamper
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
Å	Angstrom
C_A	Analit derişimi
cm	Santimetre
dk	Dakika
i_c	Kapasitif akım
i_f	Faradayik akım
i_s	Sınır akımı
k	Sabit
kV	Kilovolt
M	Molarite
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mV	Milivolt
N	Normalite
nm	Nanometre
s	Saniye
V	Potansiyel (Volt)
ΔE_p	Gerilim farkı

Kısaltmalar

A	Adenin
ABS	Asetat Tampon Çözeltisi
ACN	Asetonitril
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş Klorür
ASA	Allele Specific Amplification
BDNF	Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör
C	Cytosine (Sitozin)
CPE	Karbon Pastası Elektodu
CV	Dönüşümlü Voltametri
DCE	Damlayan Civa Elektrodu
ddNTP	Dideoksinükleotidtrifosfat
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DMF	N,N-Dimethylformamide
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
DPV	Diferansiyel Darbe Voltametrisi
dsDNA	Çift sarmal DNA
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
G	Guanin

GCE	Camsı Karbon Elektrot
GOx	Glikoz oksidaz
H	Hidrojen
HCl	Hydrochloric acid
HRM	High Resolution Melting
K ₂ HPO ₄	Potassium phosphate dibasic
KCl	Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	Potassium phosphate monobasic
MDB	Meldola's Blue
MM	bir bazı hedeften farklı dizi (Mis-Match-Yanlış Eşleşen)
mRNA	Mesajcı RNA
MTP	mutant prob dizisi (Mutant-Type Probe)
MTT	mutant hedef dizisi (Mutant-Type Target)
NaCl	Sodium chloride
NaOH	Sodium hydroxide
NC	hedeften tamamen farklı dizi (Non-Complementray)
NGF	Sinir Büyüme Faktörü
PA	Poliamid
PAN	Poliakrilonitril
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PEA	Primer Extension Assay
PGE	Kalem grafit elektrot
PS-DVB	Polistirendivinilbenzen
PVA	Polivinil alkol
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal RNA
RT-PCR	Real-Time PCR
SCPE	Perde Baskılı Karbon (grafit) Elektrotlar
SEM	Screen Electron Microscope
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nokta Polimorfizmi)
SSC	Saline-Sodium Citrate
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
ssDNA	Tek sarmal DNA
T	Timin
TBS	Tris-HCl Tampon Çözeltisi
TEAA	Trietilamonyumasetat
TGCE	Temperature Gradient Capillary Electrophoresis
Tm	Erime derecesi
Tris-HCl	Tris-Hydrochloride
Trk	Tirozin Kinaz
tRNA	Taşıyıcı RNA
U	Urasil
WTP	sağlıklı prob dizisi (Wild-Type Probe)
WTT	sağlıklı hedef dizisi (Wild-Type Target)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi.....	6
Şekil 2.2.	Clark'ın enzim elektrodu.....	7
Şekil 2.3.	İlk ticari biyosensör (YSI 23A, ABD).....	8
Şekil 2.4.	Deoksiriboz ve riboz şekerleri.....	10
Şekil 2.5.	Nükleik asitlerin yapısındaki pürin ve pirimidin bazları.....	11
Şekil 2.6.	Sitozinin Urasil'e dönüşüm mekanizması.....	11
Şekil 2.7.	Nükleosit ve nükleotid yapısı.....	12
Şekil 2.8.	Polinükleotidlerin ve fosfodiester bağlarının oluşumunun şematik olarak gösterimi.....	13
Şekil 2.9.	DNA'nın moleküler yapısı.....	14
Şekil 2.10.	DNA hibridizasyonu.....	15
Şekil 2.11.	Mutasyonun moleküler değişim tipine göre sınıflandırılması.....	18
Şekil 2.12.	RFLP analizi ile mutasyon analizi.....	22
Şekil 2.13.	Sanger ve Coulson metodu ile DNA dizi analizi.....	24
Şekil 2.14.	Maxam-Gilbert metodu ile DNA dizi analizi.....	25
Şekil 2.15.	Otomatik DNA dizi analizi.....	26
Şekil 2.16.	DHPLC yöntemi ile mutasyon analizi.....	27
Şekil 2.17.	HRM analizi.....	28
Şekil 2.18.	Üçlü elektrot sistemi.....	31
Şekil 2.19.	Doğrusal taramalı voltammogram eğrisi.....	33
Şekil 2.20.	Elektrot yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabaka.....	36
Şekil 2.21.	Voltametrde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri.....	37
Şekil 2.22.	Dönüşümlü voltametrde kullanılan uyarılma sinyali.....	37
Şekil 2.23.	Pik potansiyellerini ve akımlarını gösteren klasik bir dönüşümlü voltamogram.....	38
Şekil 2.24.	A) Analog cihazlarda diferansiyel darbe voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali, B) Diferansiyel darbe voltametrisine ait bir voltamogram.....	40
Şekil 2.25.	Kare dalga voltametrde kullanılan uyarılma sinyali.....	41
Şekil 2.26.	DNA biyosensörünün şematik gösterimi.....	42
Şekil 2.27.	DNA biyosensörlerinde prob immobilizasyon yöntemleri.....	43
Şekil 2.28.	A-Guanin bazının yükseltgenmesine dayalı indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi, B- İnozinli prob ilkesine dayalı indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi.....	45
Şekil 2.29.	A-İnterkalatör madde ile DNA dizi algılama yöntemi, B- DNA bazlarının en az biriyle etkileşen bir indikatör ile DNA dizi algılama yöntemi.....	46
Şekil 2.30.	Nanopartikülle işaretlemeye dayalı DNA dizi algılama yöntemi...	47
Şekil 2.31.	Nörotrofinler ve reseptörleri.....	48
Şekil 2.32.	İnsan saçının nanolifile karşılaştırılması.....	50
Şekil 2.33.	Elektrospin yöntemi ile nanolif üretiminin şematik gösterimi.....	52
Şekil 3.1.	Deney düzeneği ve PGE'nin hazırlanışı.....	58

Şekil 3.2	Nanolif kaplı PGE yüzeyinde, BDNF genindeki Val66Met polimorfizminin elektrokimyasal olarak saptanmasına ait deneysel aşamaların şematik olarak gösterimi.....	
Şekil 3.3.	Elektrospin düzeneği.....	60
Şekil 3.4.	PAN nanolif ile kaplanmış PGE yüzeyinin SEM görüntüsü.....	61
Şekil 3.5.	PGE yüzeyindeki PAN nanoliflerin SEM görüntüsü.....	62
Şekil 4.1.	PAN, PA ve PVA'nın kimyasal yapısı.....	62
Şekil 4.2.	PGE yüzeyine kaplanan çeşitli nanoliflere tutturulan DNA'dan alınan guanin sinyallerine ait voltamogram.....	64
Şekil 4.3	Nanolif kaplı ve boş PGE yüzeyinde CV uygulanmadan ve CV uygulandıktan sonra alınan guanin sinyallerine ait histogram ve voltamogram.....	65
Şekil 4.4.	Nanolif kaplı PGE yüzeyinde CV uygulamasındaki döngü sayısına göre alınan guanin sinyallerine ait grafik ve voltamogram	66
Şekil 4.5.	Nanolif kaplı PGE yüzeyinde CV uygulamasındaki tarama hızına göre alınan guanin sinyallerine ait histogram.....	66
Şekil 4.6.	PGE yüzeyindeki CV uygulanmamış PAN nanoliflerin SEM görüntüsü.....	67
Şekil 4.7.	PGE yüzeyindeki CV uygulanmış PAN nanoliflerin SEM görüntüsü.....	67
Şekil 4.8.	a) Hiçbir yere tutturulmamış, herhangi birşeye maruz bırakılmamış PAN nanoliften, b) PGE yüzeyine tutturulmuş ve CV uygulanmış PAN nanoliften c) PGE yüzeyine tutturulmuş ve CV uygulanmamış PAN nanoliften alınan FTIR sonuçları.....	68
Şekil 4.9.	a) Prob ve hibridizasyon tamponu çözeltilerinin bulunması çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram b) 5X SSC de alınan voltamogram.....	69
Şekil 4.10.	a) Ölçüm tamponu çözeltilisinin bulunması çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram b) ABS'de alınan voltamogram.....	69
Şekil 4.11.	a) Prob konsantrasyonu çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram b) 10µg ml ⁻¹ probe konsantrasyonunda alınan voltamogram.....	70
Şekil 4.12.	a) Hedef konsantrasyonu çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram b) 15µg ml ⁻¹ hedef konsantrasyonu ile alınan voltamogram.....	71
Şekil 4.13.	a) Prob tutturma ve hibridizasyon sürelerinin bulunması çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram b) 30dk'da alınan voltamogram.....	71
Şekil 4.14.	Hibridizasyondan sonraki yıkama süresinin belirlenmesi çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram....	72
Şekil 4.15.	Geliştirilen biyosensörün özgünlüğünü gösteren voltamogram.....	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan sentetik prob ve hedef dizileri.....	62
--	----



1. GİRİŞ

Sensörler, fiziksel, kimyasal veya biyokimyasal bir özelliği veya değişimi algılayan, ölçen ve sonra kayıt altına alan, gösteren ya da başka bir şekilde cevap oluşturan cihazlardır. Sensörleri basınç, sıcaklık, kütle, uzaklık gibi özellikleri ölçen fiziksel sensörler, kimyasal veya biyokimyasal maddeleri ve değişimleri ölçen kimyasal sensörler olarak sınıflandırabiliriz. Kimyasal sensörler toplam bileşimin içerisindeki spesifik örnek bileşenin (analitin) konsantrasyonu ile orantılı olarak değişen kimyasal bilgiyi yararlı bir analitik sinyale dönüştüren cihazlardır. Kimyasal sensörler, genellikle seri bağlı iki temel bileşenden oluşur: kimyasal tanıma sistemi ve fizikokimyasal dönüştürücü. Biyosensörler ise tanıma sistemi olarak biyokimyasal mekanizma kullanan kimyasal sensörlerdir (Thevenot ve ark. 1999). Spesifik “bio” kısım spesifik olduğu analiti tanıyıp ve gelen yanıt “sensör” kısmına sinyal (elektriksel, optik vb. gibi) olarak iletilir. Biyosensörleri kimyasal sensörlerden ayıran en önemli farklılık biyolojik bir tanıma mekanizmasına sahip olmalarıdır.

DNA biyosensörlerinde tanıma yüzeyi olarak DNA kullanılır. DNA biyosensörlerinin esası, DNA bazlarının hibridizasyonuna dayanır. DNA hibridizasyonu; iki adet tek sarmal nükleik asit dizisinin çift sarmallı bir yapı haline gelmesidir. DNA'da yapısında bulunan nükleotidlerden, Guanin ile Sitozin ve Adenin ile Timin birbirine komplementerdir. Böylece birbirinin tam karşılığı olan iki adet tek sarmal nükleik asit dizisi kolaylıkla birbirleriyle eşleşir. Tek nükleotit farklılığı bile bu eşleşmeyi zorlaştırır.

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri yöntemlerinin esası, prob ile etkileştiği zaman farklı, hibrit ile etkileştiği zaman farklı sinyal veren bir maddenin indirgenme veya yükseltgenme sinyalinin veya madde kullanmaksızın doğrudan DNA'ya ait bazı yükseltgenme sinyallerinin ölçülmesine dayanmaktadır. Günümüzde, dizisi belli hibridizasyon olaylarının izlenmesinde, DNA ile etkileşime giren analitlerin (karsinojen maddeler, ilaçlar, vb.) tayininde, kalıtsal ve bulaşıcı hastalıkların tanısında, gıdayı ve çevreyi tehdit eden mikroorganizma tayinlerinde, biyolojik ve kimyasal silahların

taininde elektrokimyasal DNA biyosensörlerinden yararlanılmaktadır (Ozkan 2006, Ozsoz 2012).

Tez çalışması kapsamında, Alzheimer, Parkinson, Bipolar Bozukluk gibi nörodejeneratif hastalıklarda sıklıkla gözlenen nörotrofik faktörler ailesinin bir üyesi olan BDNF geninde meydana gelen guanin bazının adeninle yer değiştirmesi sonucu BDNF geninin 66. kodonundaki valin aminoasidinin metionine yer değiştirmesine (Val66Met) sebep olan tek nokta mutasyonunun elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile algılanması amaçlanmıştır.

Kanser, diabetes, alzheimer, bazı kardiyovasküler hastalıklar ve migren gibi hastalıkların tek nokta mutasyonları (SNP) ile bağlantılıdır. Tanıyı kolaylaştırmak için bugüne kadar, RT-PCR, RFLP, DNA sekanslama gibi bir çok mutasyon tespit yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin tercihinde, pratiklik, tayin süresi, maliyet gibi özellikler göz önünde bulundurulur.

Val66Met polimorfizminin tayinine yönelik literatürlerde genelde kullanılmakta olan yöntemler, RFLP (restriction fragment length polymorphism), RT-PCR ve DNA sekanslama yöntemleridir (Clarke ve ark. 2016, Iamjan ve ark. 2015, Tonacci ve ark. 2013). Ancak, bu yöntemler, pahalı, uzmanlık gerektiren ve oldukça zaman alan örnek hazırlama süreçleri gerektirmektedir. Tez kapsamında ilk kez bu polimorfizmin sentetik dizilerle de olsa DNA biyosensörleri kullanılarak elektrokimyasal olarak tespiti gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

Tez kapsamında yapılan ön çalışmalarda, guanine dayalı yani indikatörsüz bir ayırımın mümkün olduğu görülmüş ve yöntem olarak indikatörsüz hibridizasyon algılama yöntemi kullanılmaya karar verilmiştir. Herhangi bir indikatör kullanmadan yapılacak bu tayin ile, indikatör gereksinimini ortadan kaldırılarak tayin süresi en aza indirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için de DNA'daki en elektroaktif ve kararlı yanıt veren baz olan guanin bazının yaklaşık +1,0 V civarında verdiği yükseltgenme sinyali değerleri göz önünde bulundurulacaktır. Tek sarmal DNA da yani hibridizasyon meydana gelmemiş dizilerde (prob, NC ve MM dizilerinde) guaninler açık olduğu için yükseltgenme sinyali

yüksek, hibridizasyondan sonra ise sitozinle aralarında oluşturdukları hidrojen bağı köprüleri nedeniyle yükseltgenmesi kısmen kapalı duruma geldiğinden tek sarmala göre daha düşük sinyal vermesi beklenmiştir (Mascini ve ark. 2001, Lucarelli ve ark. 2008, Aladağ ve ark. 2010). Sonuç olarak tek sarmal olan prob diziden alınan sinyal en yüksek, hibrit diziden alınan sinyal en düşük, NC ve MM dizilerinden alınan sinyalin de hibridizasyon meydana gelmediği için prob dizisine yakın bir değerde olması beklenmiştir. Ayrıca bu sonuç, geliştirilen biyosensörün seçimli şekilde hedefine bağlandığını ve polimorfizm tayinin mümkün olacağını da gösterecektir.

Çalışmada, literatürdeki biyosensör yüzeyinden alınan sinyali arttırmaya yönelik yapılan çalışmalardan farklı olarak ilk defa kalem grafit elektrot yüzeyine elektrospin yöntemi ile nanolif kaplanması sağlanacaktır (Liu ve ark. 2009, Pardo ve ark. 2015). Elektrot yüzeyindeki bu yapının nanoboyutta olması elektrodun spesifik yüzey alanını arttıracığından, minimum yüzey alanından maksimum sinyal alınması sağlanarak sistemin çip teknolojisine de uygulanabilirliği gösterilmek istenmektedir.

Literatürde BDNF geninde görülen Val66Met polimorfizminin elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle tayinine yönelik herhangi bir kayıta rastlanmamıştır. Yöntemimizin kolay uygulanabilir olması, pahalı ekipmanlara gerek duyulmaması, hızlı cevap veren bir sistem olması ve herhangi bir toksik veya radyoaktif ajanın kullanılmaması nedenleriyle klasik yöntemlere güçlü bir alternatif yöntem olması ve bu konuda çalışma yapacak araştırmacılara basamak oluşturacağı düşünülmektedir.

Çalışmada günümüzde sıkça kullanılan nanoteknolojik yüzeylerin kullanılması ile hibridizasyon tayinini en yüksek hassasiyette gerçekleştirebilen, kullanılan yöntemlere alternatif hızlı ve ileride ticari olarak da üretilebilecek bir sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu prototip biyosensör ile sadece bu gibi polimorfizmlerin ve mutasyonların tespiti değil, çevre, gıda, tıbbi tanı ve klinik uygulamalarda da kullanılacak mikroçip teknolojisinin altyapısı oluşturulması ise en önemli amaçlar arasında yer almaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensörler

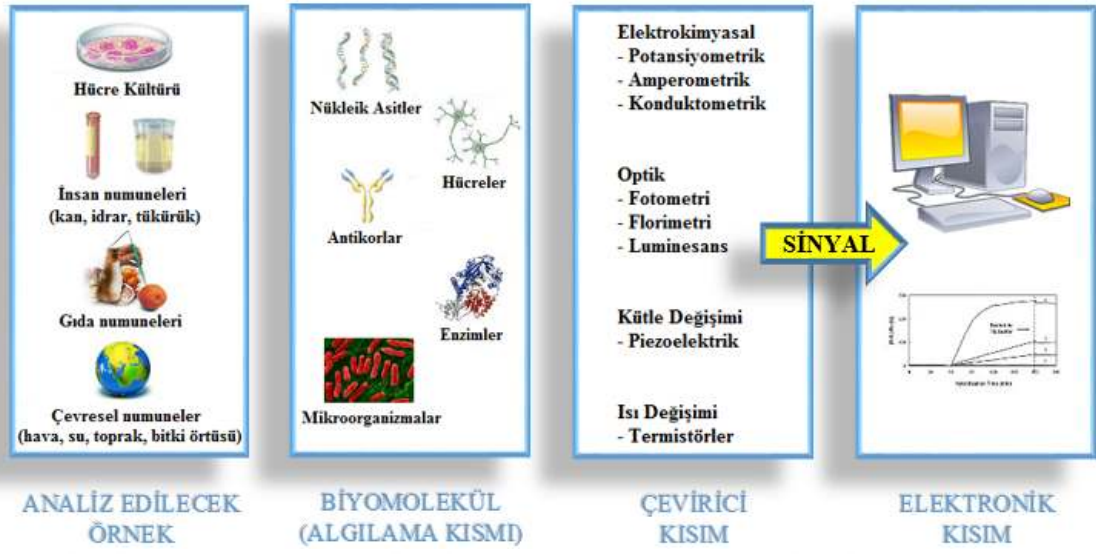
Sensörler, fiziksel, kimyasal veya biyokimyasal bir özelliği veya değişimi algılayan, ölçen ve sonra kayıt altına alan, gösteren ya da başka bir şekilde cevap oluşturan cihazlardır. Sensörleri basınç, sıcaklık, kütle, uzaklık gibi özellikleri ölçen **fiziksel sensörler**, kimyasal veya biyokimyasal maddeleri ve değişimleri ölçen **kimyasal sensörler** olarak sınıflandırabiliriz.

Kimyasal sensörler toplam bileşimin içerisindeki spesifik örnek bileşenin (analitin) konsantrasyonu ile orantılı olarak değişen kimyasal bilgiyi yararlı bir analitik sinyale dönüştüren cihazlardır. Kimyasal sensörler, genellikle seri bağlı iki temel bileşenden oluşur: **kimyasal tanıma sistemi** ve **fizikokimyasal dönüştürücü**. **Biyosensörler** ise tanıma sistemi olarak biyokimyasal mekanizma kullanan kimyasal sensörlerdir (Thevenot ve ark. 1999). Spesifik “bio” kısım spesifik olduğu analiti tanıyıp ve gelen yanıt “sensör” kısmına sinyal (elektriksel, optik vb. gibi) olarak iletilir.

2.1.1. Biyosensörü oluşturan bileşenler

Biyosensör sistemleri, seçici tanıma mekanizmasına sahip ve hedef analitin bağlandığı **biyomolekül (algılama kısmı)**, bu biyomolekülün hedef analitle etkileşmesi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen **çevirici kısım** ve **elektronik kısım** olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır (Şekil 2.1).

Biyosensör sistemini oluşturan bileşenlerden en önemlisi olan biyomolekül kısmı antikor, enzim, protein, nükleik asitler ya da hücre, doku ve mikroorganizmalar gibi canlı biyolojik sistemler olabilir. Algılama kısmı olarak kullanılacak biyomoleküllerin en önemli özelliği tespit edilmesi istenen analite karşı yüksek afinite ve seçicilik göstermeleridir (Rasooly 2005). Bunların içinde en yaygın kullanılanlar enzimler, antikorlar ve nükleik asitlerdir.



Şekil 2.1. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi

Enzimlerin hedef moleküle karşı oldukça özgül olmaları ve kimyasal tepkimelere katıldıklarında elektron, proton, ısı ve ışık gibi birçok ölçülebilir reaksiyon ürünü meydana getirdiklerinden dolayı, biyosensörlerde sıklıkla biyomolekül olarak kullanılırlar (Chambers ve ark. 2008). Enzimlerin kullanılması sıcaklık ve pH gibi koşullarına bağlı olduğundan ve enzimlerin kararlılıklarının düşük olması gibi nedenlerden dolayı zordur. Ayrıca enzimin biyosensöre immobilizasyonu ve bunun sonrasında kararlılığını sürdürmesinin de zorluğu tasarımı yapılacak biyosensörde dikkate alınması gereken en önemli unsurlardır.

Antikorlar ve antijenler arasındaki spesifik etkileşim ve hedef analitin ön saflaştırma işlemlerini elimine etmesinden dolayı antikorlar uygun çevirici kısımlar ile birlikte bakteri, virüs, ilaç, hormon ve pestisit gibi çevresel kirletici olan diğer moleküllerin tayini için kullanılabilirler (Chambers ve ark. 2008).

Nükleik asitlerin kullanıldığı sistemlerde aranan hastalığa, bakteriye veya virüse ait nükleik asit yüzeye genelde tek zincirli olarak immobilize edilir ve bu dizinin örnekteki analitle hibridizasyonuna göre analiz gerçekleştirilir. Kullanılan nükleik asit dizileri genellikle 20-30 bazlık kısa tek zincirli DNA veya RNA'dır. Bu tez kapsamında da biyomolekül olarak DNA'dan yararlanıldı.

Çevirici kısım, biyokimyasal reaksiyonun özelliğine göre elektrokimyasal, optik, kütleye duyarlı veya termal sisteme dayalı olarak seçilir (Sassolas ve ark. 2009).

Elektronik kısım ise çevirici kısmın elektrik sinyali üretebilmesi için gerekli osilatör, fark devresi, işlemsel yükselteç devresi, besleme devresi, analog-digital dönüştürücü vb. kısımlardan oluşmaktadır.

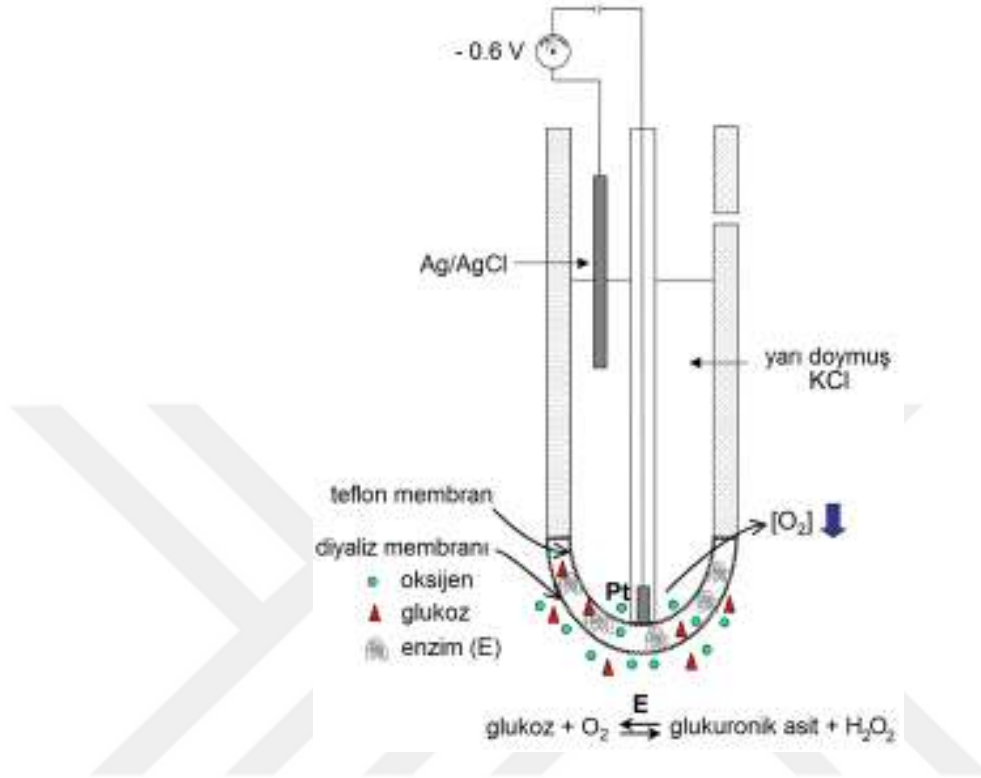
Biyosensörler, kullanılan biyolojik materyal veya çeviriciye bağlı olarak farklı şekilde sınıflandırılabilir. Örneğin; çevirici türüne bağlı olarak, elektrokimyasal biyosensörler, optik biyosensörler, pizoelektrik biyosensörler vb. olarak sınıflandırılmaktadır. Kullanılan biyolojik materyale bağlı olarak ise; enzim sensörleri, immüno-sensörler, DNA biyosensörleri (genosensörler), mikrobiyal sensörler şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Elektrokimyasal biyosensörler yüksek spesifiklik, duyarlılık, doğrusallık ve basitlik parametreleri yanında geniş ölçüm alanı ve düşük tayin sınırı sağlaması, küçültülebilir olmaları, taşınabilir ve tek kullanımlık modellerinin tasarlanabilmesi, ucuz olmaları, düşük miktarda güç ve ürün gereksinimleri, hızlı cevap verebilmeleri, bulanık ortamda kullanılabilirliği gibi özelliklerinden dolayı tercih edilmektedirler (Sassolas ve ark. 2009). Tez kapsamında yapılan ölçümlerde de elektrokimyasal yöntemle dayalı ölçümler gerçekleştirildi.

2.1.2. Biyosensör teknolojisinin tarihçesi

Biyosensör teknolojisi alanındaki ilk çalışmalar 1950'li yıllarda yapılmıştır. Leland C. Clark (1918–2005) 15 Nisan 1956'da, daha sonra "Clark elektrodu" olarak adlandırılan oksijen elektrodu ile ilgili ilk makalesini sundu. 1962'de ise Clark ve Ann Lyons Cincinnati Çocuk Hastanesinde Glikoz oksidaz (GOx) enzimini ve O₂ elektrodunu kullanarak ilk kez kanın glikoz düzeyini ölçmeyi başardılar (Şekil 2.2). Oksijen elektrodu ve üzerinde ince bir glukoz oksidaz katmanı içeren bu sistemde, glukoz oksidaz enziminin substratı glukoz ile enzimatik reaksiyonu sırasında tüketilen O₂

miktarı ölçülmüştür. Yaptıkları bu çalışma yaşam bilimlerinde birçok atıf almıştır ve Clark'ın "biyosensörün babası" olarak anılmasını sağlamıştır (Borgmann ve ark. 2012).



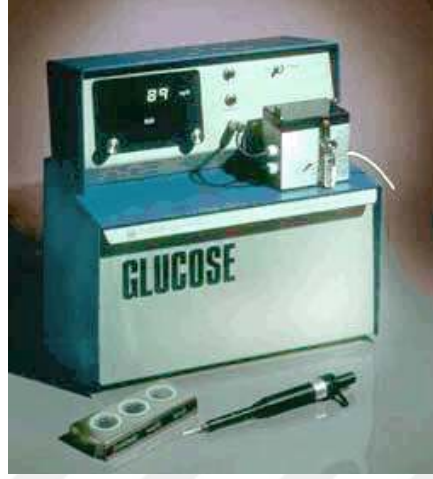
Şekil 2.2. Clark'ın enzim elektrodu (Belluzo ve ark. 2008)

1963 yılında Garry A. Rechnitz, S. Katz ile birlikte ilk defa biyosensör alanında üreaz hidrolizi sonrası potansiyometrik olarak üre tayini ile ilgili yayınlarını çıkardılar. Bu dönemde biyosensör terimi henüz kullanılmadığı için bu cihazlara enzim elektrodu veya biyokatalitik membran elektrotları denilmiştir (Katz ve Rechnitz 1963).

1967'de G.P. Hicks ve S.J. Updike enzimi jele immobilize ederek ilk pratik enzim elektrodunu yapmışlardır (Updike ve Hicks 1967 (a) ve (b)). 1969 yılında George Guilbault amperometrik elektrotların yanı sıra potansiyometrik elektrotların da kullanılabilceğini göstermiştir. Bu çalışmada, amonyum seçici sıvı membran elektrot üzerine üreaz tutuklanarak bir üre sensörü geliştirilmiştir (Guilbault ve Montalvo 1969).

İlk ticari biyosensör ise 1975 yılında Yellow Springs Instruments (Ohio, ABD) tarafından piyasaya sürülmüştür (Şekil 2.3). Bu cihazın ölçüm prensibi glikoz oksidazın

katalizlediği tepkime sonucu oluşan hidrojen peroksitin amperometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır.



Şekil 2.3. İlk ticari biyosensör (YSI 23A, ABD) (Newman ve Turner 2005)

1976'da ise ilk mikrobiyal tabanlı biyosensörler geliştirilmeye başlanmıştır. 1977 de ise Karl Cammann "biyosensor" kavramını tanıtmıştır.

1960 yılında Emil Palecek'in nükleik asitlerin elektroaktivitesini keşfi ve 1996'da Joseph Wang ve ekibinin DNA (deoksiribonükleik asit) hibridizasyonu biyosensörünü geliştirmeleri bu alanda yapılan en önemli çalışmalardır (Palecek 1960, Wang ve ark. 1996).

2.1.3. Biyosensörlerin avantajları ve kullanım alanları

En başta ucuz, basit, pratik ve yanıt sürelerinin kısa olması sebebiyle ve ayrıca sürekli ölçüm olanağı sunmaları, biyoalgılayacı bileşenlerinden dolayı yüksek seçicilikleri, hem polar hem de non-polar özellikteki molekülleri ölçebilmeleri, analiz öncesi numunelere ön işlem gerektirmemeleri, düşük analit derişimlerini tayin edebilmeleri, küçültülebilir olmaları, rutin analizlerde kişinin kendi kendine ölçüm yapabilme olanağını sağlayabilmeleri, tek kullanımlık olarak da tasarlanabilmeleri, aynı anda birden fazla analit derişimini ölçme imkânı sunmaları, düşük numune hacmi gereksinimleri,

üretimlerinin kolay olması gibi özellik ve avantajlarından dolayı günümüzde tıp, gıda, çevre, savunma, tarım vb. gibi birçok alanda biyosensörlerden yararlanılmaktadır.

Tıpta şeker, üre, kreatin, kolesterol pek çok biyolojik bileşenin *in vivo* tayininde, çevreyle ilgili olarak toprak, hava ve sudaki pestisit ve mikotoksin gibi toksiklerin tayinlerinde, patojen tayinlerinde, organofosfatların tayin ve tespitinde, ilaç sanayinde, gıda endüstrisinde, kimyasal ve biyolojik silahların algılanmasında kullanılmak üzere biyosensörler geliştirilmektedir. Biyosensörler en fazla tıp ve biyomedikal sektörde uygulama imkânı bulmuştur.

Tabi ki biyosensörlerinde biyolojik materyalin denatürasyonundan dolayı ısı ile sterilizasyonun mümkün olmaması, biyolojik materyalin (enzim, hücre, antikor, doku, vb.) kararlılığının ortam şartlarından (pH, sıcaklık, iyonlar, vb.) etkilenmesi ve biyoyumluluk sorunları gibi bir takım dezavantajları bulunmaktadır. Biyosensörlerin tasarımı sırasında en çok bu parametrelerin bir şekilde elimine edilmesi amaçlanmaktadır.

2.2. Nükleik Asitler

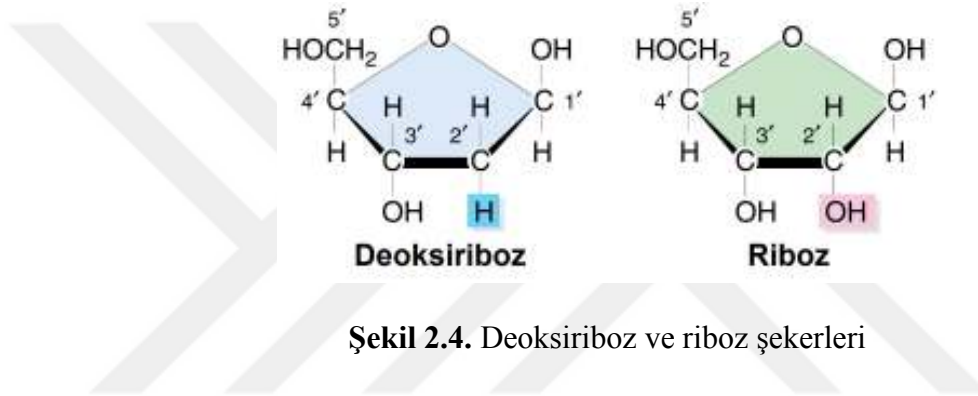
Çalışmada biyolojik tanıma yüzeyi olarak DNA'dan yararlanıldığı için bu bölümde nükleik asitler hakkında da bilgi verilmek istenmiştir.

Nükleik asitler, birçok nükleotidin birleşmesi ile meydana gelen genetik bilginin depolanması, tanımlanması ve iletilmesinden sorumlu moleküllerdir.

Deoksiribonükleik asit (DNA) ve **ribonükleik asit (RNA)** olmak üzere kimyasal olarak birbirinden farklı iki değişik nükleik asit vardır. DNA çift ipliklidir ve hücrenin kromozomlarında, mitokondrilerinde ve bitkilerin kloroplastlarında bulunur. Hücrelerde ayrıca, plazmit adı verilen kromozom yapısında olmayan sitoplazmik DNA'lara da rastlanır. RNA ise tek iplikçikli olup, kromozomlarda, ribozomlarda, çekirdekçikte ve sitoplazmanın her yerinde bulunur. Protein sentezinde görevlidir. Görevlerine göre RNA'lar üç çeşide ayrılırlar: Ribozomal RNA(rRNA-ribozomların yapısına katılır),

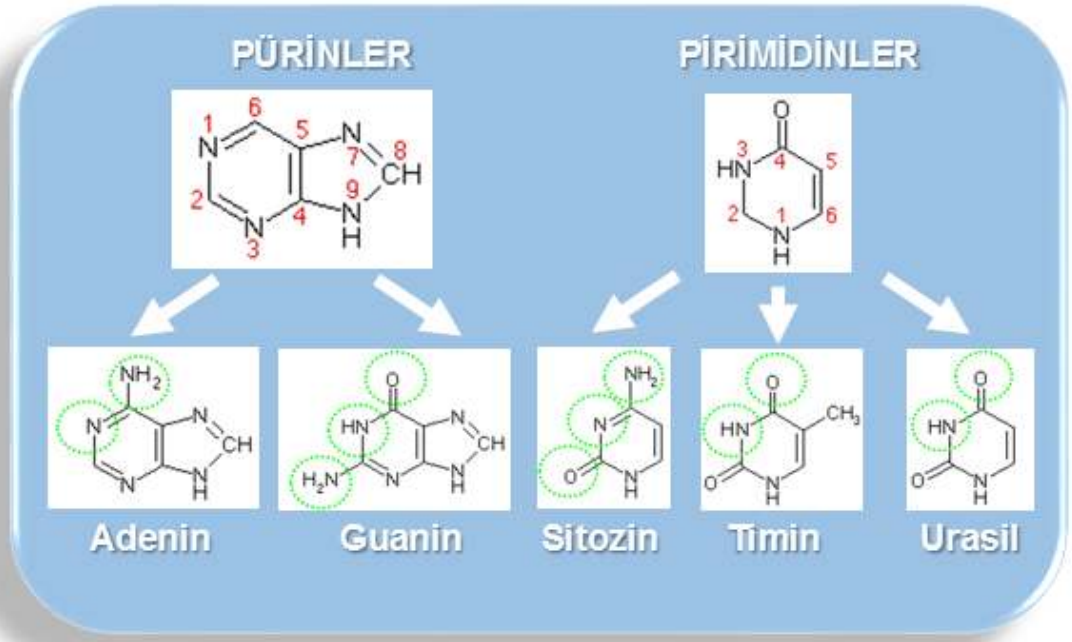
mesajcı RNA(mRNA-protein sentezinde kalıp görevi görür) ve taşıyıcı RNA(tRNA-aminoasitleri taşır).

Şekerler nükleik asitlerin en önemli ana elemanlarından biridir. Hem RNA hem de DNA'da pentozlar nükleik asitlerin ana omurgalarını oluşturur. RNA'da riboz, DNA'da ise deoksiriboz şekeri bulunur (Şekil 2.4). RNA'daki 2' ve 3' ündeki hidroksil grupları RNA'yı hidrolize daha duyarlı hale getirir. Bu nedenle tek 3'-OH içeren DNA daha karardır. Genetik materyal olarak DNA daha kararlı olmalıdır. RNA ise kullanıldıktan sonra yıkılmalıdır.



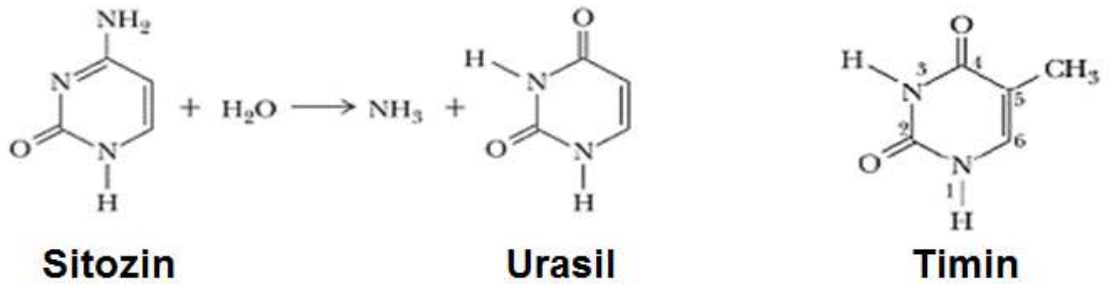
Şekil 2.4. Deoksiriboz ve riboz şekerleri

Azotlu bazlar olarak da bilinen pürin ve pirimidinler nükleik asitlerin yapısına katılan önemli organik bileşiklerdir. **Pürinler** biri altı diğeri beş atomdan oluşan iki halkalı yapının kaynaşmasından ortaya çıkmıştır. **Pirimidinler** ise yalnızca altı üyeli bir tek halkadan ibarettir. Nükleik asitlerin yapısında bulunan pürinler Adenin(A) ve Guanin(G), pirimidinler ise Sitozin(C), Timin(T) ve Urasil(U)'dir (Şekil 2.5). A, G ve C hem DNA hem de RNA'nın yapısında bulunurken, U ise yalnızca RNA'da bulunmaktadır. Bazen tRNA T de içerebilir (Passarge 2000).



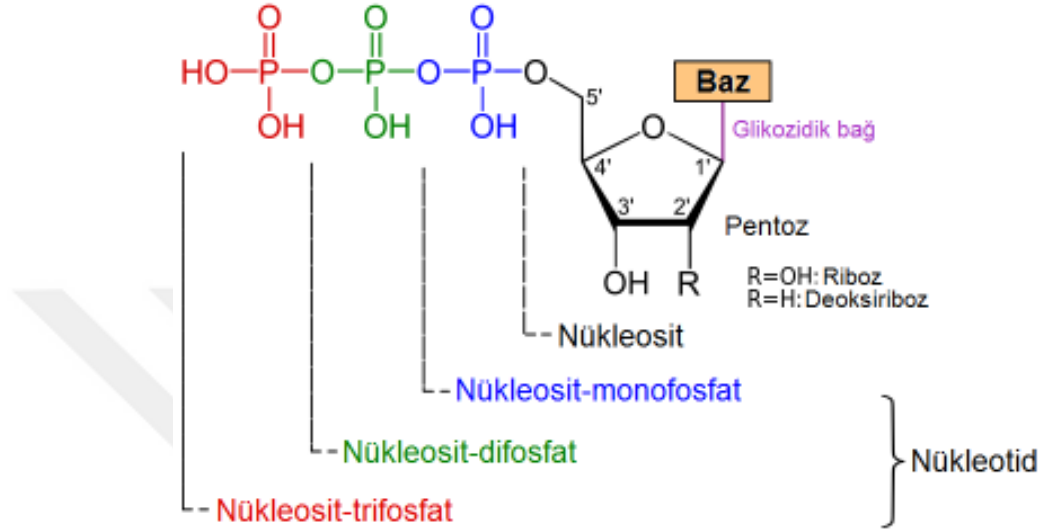
Şekil 2.5. Nükleik asitlerin yapısındaki pürin ve pirimidin bazları

Timin, Urasil'e göre daha stabil ve dayanıklıdır. Zamanla Sitozin kendiliğinden (deaminasyonla) Urasil'e dönüşür (Şekil 2.6). Hücrelerdeki onarım mekanizmaları bu değişimleri tanıyarak ve bu Urasil'leri tekrar Sitozin'lere dönüştürür. DNA'da Timin yerine Urasil olsaydı, onarım enzimleri bu mutant Urasil'leri doğal Urasillerden ayıramazdı. Bunun sonucunda DNA sırasında rastgele dizi değişiklikleri olurdu. Bunun üstesinden gelebilmek için doğa Urasil yerine Timinleri(5-metil-U) koymuştur.



Şekil 2.6. Sitozinin Urasil'e dönüşüm mekanizması

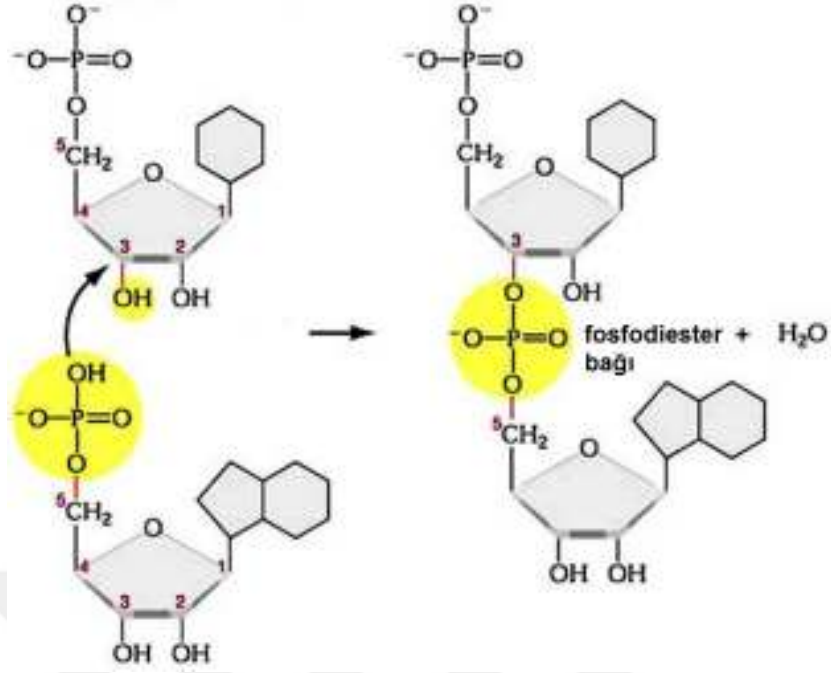
Pürinin 9 numaralı pozisyonundaki veya pirimidinin 1 numaralı pozisyonundaki azot atomu, şekerin 1 numaralı pozisyonundaki karbon atomuna bağlanarak (N-glikozidik bağ) **nükleosit**leri oluştururlar. Nükleosit yapısındaki şeker atomunun 5' ucuna fosfat grubunun da eklenmesiyle **nükleotid** yapısı oluşur (Şekil 2.7).



	Nükleosit		Nükleotid	
	DNA	RNA	DNA	RNA
A	Deoksiadenozin	Adenozin	Deoksiadenozin(n)fosfat	Adenozin(n)fosfat
G	Deoksiguanozin	Guanozin	Deoksiguanozin(n)fosfat	Guanozin(n)fosfat
C	Deoksitidin	Sitidin	Deoksitidin(n)fosfat	Sitidin(n)fosfat
T	Deoksitimidin	X	Deoksitimidin(n)fosfat	X
U	X	Uridin	X	Uridin(n)fosfat

Şekil 2.7. Nükleosit ve nükleotid yapısı

Polinükleotidler birden fazla nükleotidin polimerizasyonu ile meydana gelmektedirler. Bu polimerizasyon nükleotidlerin 3'-5' fosfodiester bağları ile oluşur (Şekil 2.8). Sadece birkaç nükleotid kalıntısından oluşan kısa polimerlere ise **oligonükleotid** denir (Passarge 2000).



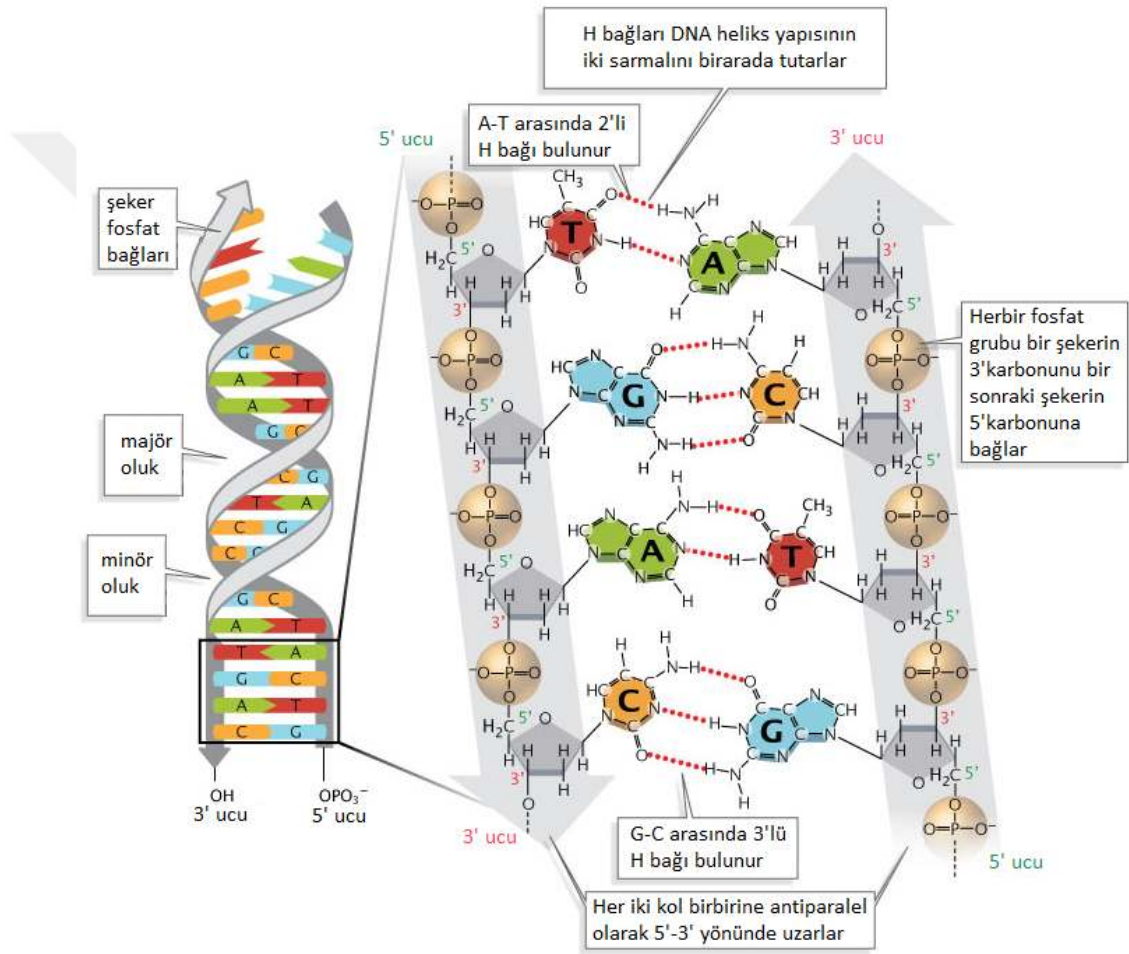
Şekil 2.8. Polinükleotidlerin ve fosfodiester bağlarının oluşumunun şematik olarak gösterimi (<http://biology4isc.weebly.com/nucleic-acid.html>)

2.2.1. DNA'nın moleküler yapısı

DNA molekülü, heliks (=sarmal) şeklinde kıvrılmış, iki kollu merdiven şeklindedir. Kollarını, yani merdivenin kenarlarını, şeker (deoksiriboz) ve fosfat molekülleri meydana getirir. Deoksiriboz ile fosfat grupları ester bağlarıyla birbirlerine bağlanmıştır. Kovalent ester bağları veya fosfodiester bağları olarak da bilinen bu bağlar son derece kuvvetlidir. Fosfodiester bağlarının varlığı DNA molekülünün tek zincirli yapı halinde iken bile dayanıklı ve stabil yapıda olmasını sağlar. RNA ve DNA'daki fosfodiester bağlarının kesimini nükleazlar katalizler.

DNA heliksinin sekonder yapısının A, B, Z ve H formu olarak nitelendirilen bazı formları bulunmaktadır. DNA heliksinin sulu ortamlarda en sık rastlanan şekli "B" şeklindedir. Bu formda iki zincir birbirine zıt yönde paraleldir. Biri 5'-3' yönünde, diğeri, 3'-5' yönündedir. Şeker-fosfat omurgası fosfodiester bağı ile bağlanmıştır. İki zincirdeki bazlar birbirinin tamamlayıcısıdır. Adenin (A) Timin (T) ile 2'li hidrojen bağı ve Guanin (G) Sitozin (C) ile de 3'lü hidrojen bağı kurarak eşleşir. Aslında bu tür bir eşleşme rastlantı değil bazların stereo-kimyasal yapılarına bağlı bir zorunluluktan

kaynaklanmaktadır. Sarmalın kararlılığı ise bazların kendilerine ait hidrofobik özellikten kaynaklanan çekim güçleri vasıtasıyla sağlanmaktadır. Bu özellik molekülün dış kısmının sıvı ortam ile ilişkisini sağlar ve çift sarmalı bir arada tutar. Bu bağ fosfor bağları kadar kuvvetli olmadığı için pH değişikliği, sıcaklık, basınç gibi faktörlerde kolaylıkla birbirlerinden ayrılabilir. DNA'nın kendi kopyasını yapması ve gen anlatımı, nükleotidler arasındaki hidrojen bağlarının ayrılması ile gerçekleşmektedir (Passarge 2000).



Şekil 2.9. DNA'nın moleküler yapısı

(<https://burningscience.wordpress.com/biology/dna-structure-and-replication/>)

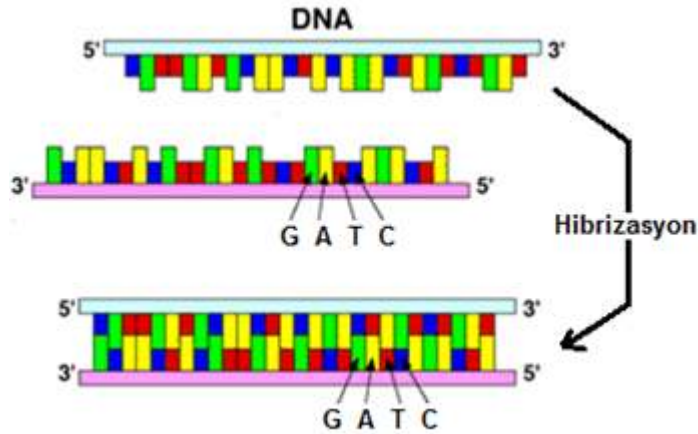
Sarmalın her bir dönümünde on baz çifti bulunur. Her baz çifti komşusuna göre 36°'lik açı yapacak şekilde yerleşmiştir. Birbirine komşu baz çiftlerinin dönümleri arasındaki uzaklık 3.4 Angstrom (A°), on baz çiftinin yer aldığı her bir dönüm 34 A°'dur. Zincirlerdeki şekerleri bazlara bağlayan glikozidik bağlar tam olarak karşılıklı

gelmediğinden şeker fosfat omurgasında majör (büyük, geniş) oluklar ile minör (küçük, dar) oluklar meydana gelir. Burada zincirlerin hidrofilik deoksiriboz fosfat ana iskeleti molekülün dış kısmında bulunur. Hidrofobik bazlar ise içe doğru, heliks eksenine dik olarak yerleşmişlerdir.

Nükleotidlerin yapısında baz olmasına karşın omurgadaki fosfat grubunun varlığı polinükleotid zincirlerin asit özellikte olmalarına yol açar ve nükleik asit terimi de bu özellikten kaynaklanır. Ayrıca fosfat negatif (-) değerli olduğundan DNA molekülü de bu nedenle negatif yük kazanmaktadır.

2.2.2. DNA hibridizasyonu

DNA hibridizasyonu; iki adet tek sarmal nükleik asit dizisinin çift sarmallı bir yapı haline gelmesidir. DNA'da yapısında bulunan nükleotidlerden, Guanin ile Sitozin ve Adenin ile Timin birbirine komplementerdir. Böylece birbirinin tam karşılığı olan iki adet tek sarmal nükleik asit dizisi kolaylıkla birbirleriyle eşleşir. Tek nükleotit farklılığı bile bu eşleşmeyi zorlaştırır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. DNA hibridizasyonu

Hibridizasyonun kinetiğini etkileyen faktörlerden en önemlilerini belirtecek olursak:
(Özkan 2006)

Baz kompozisyonu: Aralarında üç hidrojen bağı bulunan GC baz çiftinin ısıya karşı dayanıklılığı aralarında iki hidrojen bağı bulunan AT baz çiftine göre daha yüksektir. Bu yüzden dizilerde GC oranı arttığında hibridizasyon hızı artar.

DNA dizi uzunluğu: Hibridizasyona tabi olacak olan dizilerin uzunluğu ile hibridizasyon hızı ile ters orantılıdır. Ayrıca hedef dizinin, prob dizisinden kısa olduğu durumda, bağlanma hızında belirgin bir düşüş gözlenirken, prob dizinin uzunluğu eğer hedef dizinin uzunluğundan az olduğu durumda, bağlanma hızı hedef dizinin uzunluğuna bağlı olarak artmaktadır.

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

İyonik kuvvet: İyonik kuvvetin artışına bağlı olarak, hibridizasyonun hızı da artış gösterir. Her çalışma için en uygun iyonik kuvvetin ve tuz derişiminin bulunması çalışmaları yapılmalıdır.

Baz değişimleri: Birbirinin tam karşılığı olmayan prob ve hedef diziler de kendi aralarında hibrit oluşturabilirler (yanlış eşleşme). Baz değişimine uğramış diziler arasındaki hibridizasyon, tepkime hızını ve erime derecesini (T_m) azaltmaktadır.

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

2.3. Mutasyon

Canlı organizmanın kalıtım materyali olan nükleik asitlerde meydana gelen değişimlere **mutasyon** denir. Bir mutasyon tek baz çifti değişimini, bir veya daha fazla baz çiftinin eklenmesini yada silinmesini yada kromozom yapısındaki önemli bir değişimi içerebilir. Mutasyonlar bir genin protein kodlayan bölgesinde olabileceği gibi, intron ve düzenleyici sekansların yer aldığı kodlanmayan bölgelerde de görülebilir. Mutasyonlar fenotipte algılanabilir bir değişime sebep olabilir de olmayabilir de. Bir mutasyonun organizmanın özelliklerini değiştirebilir olması, mutasyonun hangi hücre tipinde

olduğuna, gen ürününü mü yoksa gen düzenleyici bölgenin işlevini ne derece etkilediğine göre değişir.

Genetik varyasyon kaynağıdırlar ve doğal seleksiyon için hammadde sağlarlar. Doğal biyolojik ve kimyasal süreçlerin bir sonucu olarak kendiliğinden oluşabileceği gibi, kimyasallar veya radyasyon gibi dış faktörler tarafından da tetiklenebilir. DNA onarımı, mayoz bölünme veya DNA replikasyonu sırasında meydana gelen hatalar, transpozonlar, virüsler, X ışını, radyasyon, ultraviyole, bazı ilaç ve mutajen kimyasallar, ani sıcaklık değişimleri vb. etkenlerle mutasyon oluşabilir. Bunun yanında hipermutasyon gibi hüresel süreçlerde organizmanın kendisi tarafından da tetiklenebilir. Bu durumda DNA'nın sentezlediği protein veya enzim bozulur. Böylece canlının, proteinden dolayı yapısı, enzimlerinden dolayı metabolizması değişebilir. Örneğin virüsler bu mutasyonlar sayesinde insan bağışıklık sistemi ve ilaçlar gibi savunma mekanizmalarını atlatabilmektedirler.

Mutasyonlar somatik hücrelerde de, üreme hücrelerinde de görülebilir. Üreme hücrelerinde meydana gelenler kalıtsaldır ve genetik hastalıklar gibi evrim ve çeşitliliğin aktarılmasının temelini oluşturur. Somatik hücrelerde meydana gelenler bir sonraki kuşağa aktarılmaz ancak hücre fonksiyonu değişimine ve tümörlere sebep olabilir. Örneğin, orak hücre anemisinde hemoglobinin polipeptit zincirini sentezleyen geninde meydana gelen nokta mutasyonu sonucu timin yerine adenin girmesi, mRNA'da adenin yerine urasilin gelmesine ve bu da translasyonda valin adlı amino asitin proteinin yapısına girmesine sebep olur ve bu da bu hastalığın temelini oluşturur.

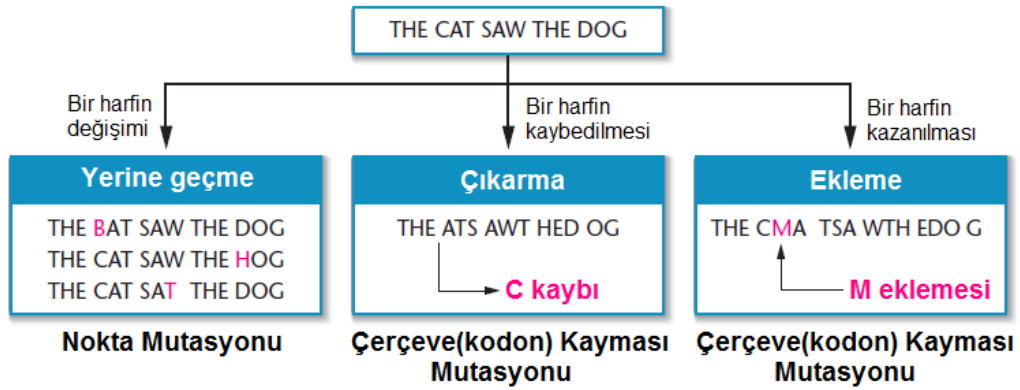
Organizmalar mutasyonları ortadan kaldırmak için bir dizi DNA tamir mekanizması kullanırlar. Bu mekanizmalar baz eksizyonu ve homolog rekombinasyon tamirinden replikasyon hatalarının tekrar okunup düzeltilmesine kadar geniş bir yelpazeye sahiptir (Klug ve ark. 2012).

2.3.1. Mutasyonun moleküler değişim tipine göre sınıflandırılması

Birçok etkisi ve çeşidi olduğu için genetikçiler mutasyonları birkaç farklı şekilde sınıflandırır. Genellikle mutasyon oluşturan nükleotid değişikliklerine göre sınıflandırılırlar. DNA molekülünde bir bazın başka bir baza değişimine **nokta mutasyonu** denir. Protein kodlama bölgesinde olan böyle bir değişiklik farklı bir üçlü kodon oluşumuna sebep olabilir ve protein ürünündeki farklı bir aminoasidi kodlayabilir. Bu durumda, bu mutasyona **yanlış anlamlı mutasyon** denir. İkinci olası sonuç ise proteinin translasyonunun sonlanmasıyla sonuçlanan kodonun durdurma kodonuna dönüşmesi olabilir. Bu mutasyona ise **anlamsız mutasyon** denir. Eğer nokta mutasyonu bir kodonu değiştirir, ancak protein içerisindeki pozisyonundan dolayı aminoasitte herhangi bir değişikliğe sebep olmaz ise bu da **sessiz mutasyon** olarak kabul edilebilir.

Baz değişimlerini tanımlamak için iki terim sıkça kullanılır. Pürin yerine pürin, pirimidin yerine pirimidin geldiyse **transizyon (geçiş)**, pürin yerine pirimidin, pirimidin yerine pürin geldiyse de **transversiyon** terimleri kullanılır.

Diğer bir değişim türü ise genin herhangi bir noktasına bir veya daha fazla nükleotidin eklenmesi veya çıkarılması olabilir. Şekil 2.11’de görüldüğü gibi, bir nükleotidin kaybı veya eklenmesi sonraki üçlü kodonun değişimine sebep olur. Translasyon sırasında üçlü okuma kodonunu değiştirdiği için, buna **frame-shift mutasyonu** denir.



Şekil 2.11. Mutasyonun moleküler değişim tipine göre sınıflandırılması (Klug ve ark. 2012)

Frame-shift mutasyonu, okumanın ilk üçlüsünü belirleyecek üçlü nükleotidlerin eklenmesi veya çıkarılması hariç, herhangi bir sayıda baz eklenmesinde veya çıkarılmasında görülebilir. Değişen üçlü kodonlar translasyonu sonlandıran UAA, UAG veya UGA olabilir. Translasyon sırasında bu üçlü kodonlardan herhangi biri ile karşılaşıldığında polipeptid sentezi bu noktada sona erer. Açıkçası frame-shift mutasyonlarının sonuçları özellikle erken kodlama bölgelerinde olursa çok keskin olabilir (Klug ve ark. 2012).

2.3.2. Tek nokta polimorfizmi (SNP)

Mutant hale gelen birey, ana bireyden genotip olarak farklılık arzeder. Genotipte ortaya çıkan farklılık bireyde görünür olarak fenotipte değişimlere de yol açabilir. Yapılan çalışmalar sonucu farklı insan genomlarında yaklaşık her 500 nükleotidde bir nükleotid farklıdır. Bu farklılığa **polimorfizm** denir. Fenotipte oluşacak değişim bazen gözle görülür olmayabilir. İnsan DNA'sında gen diziliminin %99,9'u birbirine benzemektedir. İnsanlar arasındaki genetik çeşitlilik bu %0,1'lik farklılıktan ileri gelmektedir.

DNA'daki bir veya birkaç baz ile ortaya çıkan mutasyona nokta mutasyonu adı verilir. En yaygın ve basit görülen mutasyon şekli tek bir bazda oluşan **nokta mutasyonudur**. Belirli bir baz pozisyonunda meydana gelen tek nükleotid değişiklikleridir. Bu değişiklikler eklenmeler veya eksilmeler olabilir. SNP, genom boyunca ve mitokondriyal DNA'da rastgele her 500 ile 100 nükleotidde bir görülür. Bu da demek oluyor ki, insan genomundaki milyonlarca lokusda profil oluşturma potansiyeli olduğu anlamına gelir. Ancak SNP'ler genellikle iki allele sahiptirler, iki birey arasında STR (short tandem repeats-kısa ardarda tekrarlar)'da olduğu kadar verimli bir ayrımın yapılabilmesi için 50 veya daha fazla SNP'nin DNA profili oluşturmak için kullanılması gerekmektedir (Klug ve ark. 2012).

Kanser, diabetes, alzheimer, bazı kardiyovasküler hastalıklar ve migren gibi hastalıklar SNP ile yakın ilişkilidir. SNP taramalarında, hangi varyant allellerin hastalıkla yakın ilişkili olduğu belirlenebilmektedir. Çeşitli hastalıklara özgü SNP profilleri

belirlenmiştir. DNA örneklerinde spesifik SNP allelleri incelenerek bireylerin hastalıklara yatkınlıklarını belirlemek amacıyla tarama yapılabilmektedir.

Bilim adamları SNP'leri analiz etmek için, ilgilendikleri bölgeleri amplifiye etmek için spesifik primerler kullanırlar. Bu tek nükleotid farklılığı içeren DNA moleküllerini ayırt etmek için, daha sonra bu amplifiye edilen bölgeleri DNA sekanslama veya DNA mikroarray gibi bir dizi yöntem kullanarak analiz ederler. Adli SNP profillemenin STR profillemeye üzerinde büyük bir avantaja sahiptir. SNP, DNA molekülündeki tek nükleotidi içerdiği için, PCR reaksiyonu için teorik olarak gerekli DNA boyutu iki primer ve bir nükleotid kadardır (yani yaklaşık 50 baz). Bu özellik önemli derecede bozulmuş olan DNA örneklerinin analizi için SNP analizini uygun hale getirir. Bu avantajına rağmen, SNP profillemeye henüz adli uygulamalarda rutin hale gelmemiştir. Daha sık olarak araştırmacılar soy ve evrim çalışmaları için Y-kromozomu ve mitokondriyal DNA lokuslarının SNP profillemesini kullanmaktadırlar (Klug ve ark. 2012). Ayrıca bir nüfusun en az %1'inde mevcut bulduklarında, SNP'den genetik işaretleyici olarak yararlanılabilir.

2.3.3. Mutasyon tarama yöntemleri

Tanıyı kolaylaştırmak için bugüne kadar, pek çok mutasyon tarama yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemler, süre, pratik uygulanabilirlik, maliyet gibi özellikleri göz önünde tutularak kullanılmaktadır.

Mutasyon taraması için kullanılan yöntemlerden bazıları RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), ASA (Allele Specific Amplification), Primer Extension Assay, RT-PCR (Real-Time PCR), DNA dizi analizi, heterodupleks analizi, TGCE (Temperature Gradient Capillary Electrophoresis), DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) ve HRM (High Resolution Melting)'dir.

Mutasyon taraması için hangi yöntemin kullanılacağı biyolojik materyal çeşidine, nükleik asite, saptanacak mutasyonun daha önceden bilinip bilinmediğine, saptanacak potansiyel mutasyonların ne kadar fazla olduğuna, kullanılacak metodun ne kadar

güvenilir olduğuna ve ne ölçüde standardize edilebileceğine, testin nasıl uygulanacağına, rutin tanı için uygun olup olmadığına, ne kadar sürede yanıt vereceğine ve testin maliyetine göre değişmektedir.

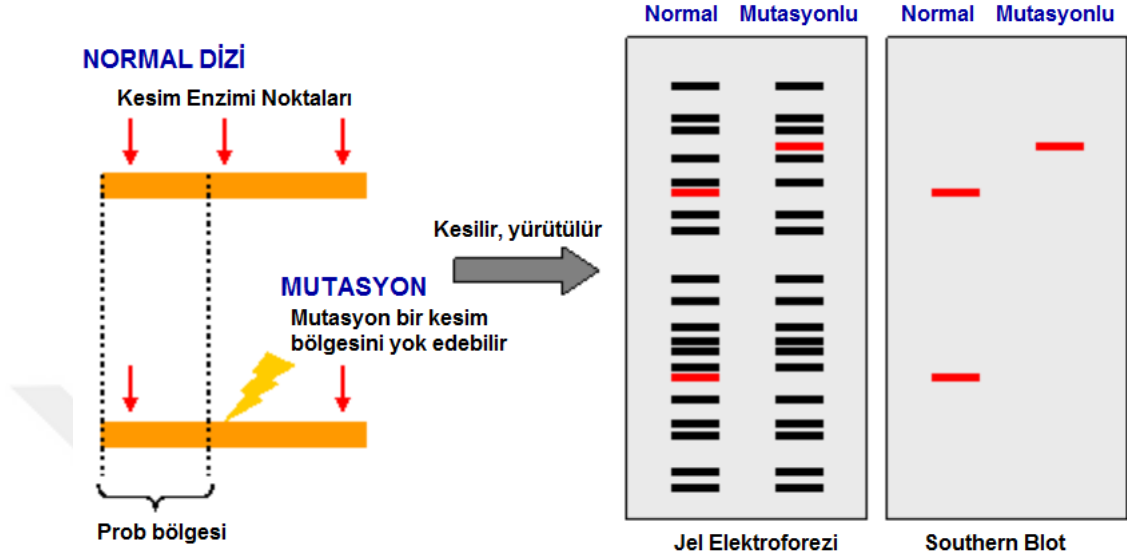
Ancak bu yöntemlerin çoğu pahalı, uzmanlık gerektiren ve oldukça zaman alan örnek hazırlama süreçleri gerektirmektedir. Tez kapsamında tek nokta polimorfizminin DNA biyosensörleri kullanılarak elektrokimyasal olarak tespiti gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Yöntemimizin kolay uygulanabilir olması, pahalı ekipmanlara gerek duyulmaması, hızlı cevap veren bir sistem olması ve herhangi bir toksik veya radyoaktif ajanın kullanılmaması nedenleriyle klasik yöntemlere güçlü bir alternatif yöntem olması ve bu konuda çalışma yapacak araştırmacılara basamak oluşturacağı düşünülmektedir. Aşağıda genelde kullanılan bazı yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarından bahsedilmiştir. Daha sonraki bölümlerde de mutasyon tayinine yönelik olarak elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin kullanımı ve avantajlarından bahsedilecektir.

2.3.3.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP analizi restriksiyon endonükleazların çift zincirli DNA'yı spesifik tanıma bölgelerinden kesmesi temeline dayanmaktadır. Her bir restriksiyon endonükleaz spesifik palindromik kısa DNA dizisini tanır ve keser. Mutasyon tarama amacıyla yapılan RFLP analizlerinde, incelenen mutasyon noktasını içine alan kesim noktasına sahip restriksiyon enzimleri ile kesilen PCR fragmentleri jel elektroforezi ile fragment büyüklüklerine göre ayrılırlar. DNA dizisinde meydana gelen değişimler var olan restriksiyon enzimi kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni bir kesim noktası oluşturabilir. Böylece kesim sonucu oluşan fragment sayısını değiştirirler. Kesim sonucu oluşan bantlar agaroz jelde yürütüldüğü zaman elde edilen bant profiline bakılarak mutasyon taşıyıp taşımadığı söylenebilmektedir (Şekil 2.12).

RFLP uygulaması kolay bir yöntem olmakla birlikte ayırım gücü çok yüksek değildir. Her mutasyon restriksiyon enzimi kesim noktası oluşturamayacağı veya yok edemeyeceği için tüm mutasyonların bu teknikle belirlenmesi mümkün değildir. Ayrıca

çok fazla DNA'ya ihtiyaç duyulması, pahalı ve fazla zaman alması da diğer bir dezavantajdır.



Şekil 2.12. RFLP analizi ile mutasyon analizi
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrflp/>)

2.3.3.2. RT-PCR (Real-Time PCR)

Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kalitatif veya kantitatif sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Real-time PCR yöntemi, standart PCR yönteminden ayıran iki önemli özellik vardır: Bunlar, real-time-PCR yönteminde termal döngü cihazıyla birleştirilmiş bir optik okuma sisteminin ve PCR işlemi sırasında amplifikasyonu bilgisayar ekranına yansıtan bir probun olmasıdır.

RT-PCR'da sıcaklık döngüleri ve floresan okunması cihaz içerisinde gerçekleştiği için hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir sürede tespit edilebilmektedir. Bu da yöntemi pratik kılmakta ve kontaminasyon riskini de azaltmaktadır.

Real-time PCR'da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanması için ya çift zincirli DNA boyaları ya da floresan işaretli probalar kullanılmaktadır.

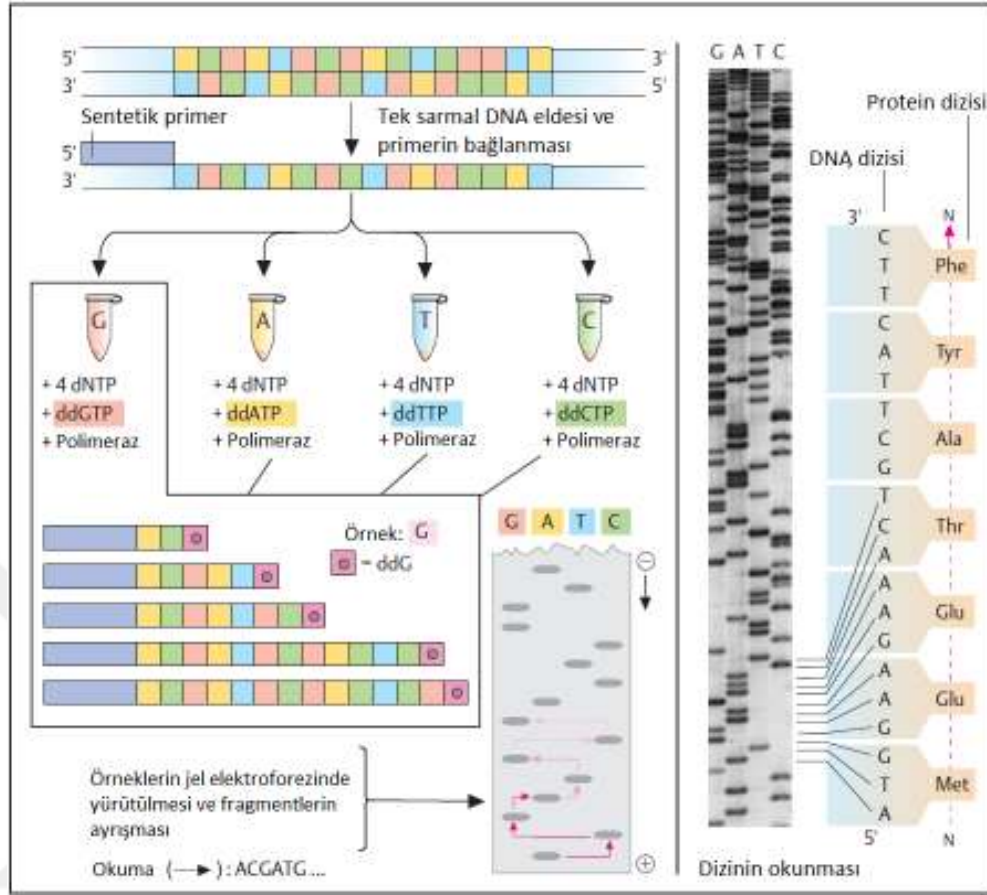
Real-time PCR günümüzde yaygın kullanım alanı bulan, ucuz, kolay, hızlı, güvenilir bir yöntemdir. Amplifikasyon ürünün gözlenmesinin yanısıra kantitatif PCR sonucu alınmasına olanak sağlaması, mutasyonların gösterilebilmesi yöntemin önemli avantajlarıdır. Mutasyonların saptanması, hastalıkların tanısında, diziler arası farklılıkların gösterilmesiyle epidemiyolojik verilerin elde edilmesinde, tür ayrımı yapılmasında, dirençli mikroorganizmaların saptanmasında kullanılmaktadır (Alp ve ark. 2012).

RT-PCR yönteminin teknik donanım, alt yapı, beceri ve tecrübe gerektirmesi, yüksek ekipman ihtiyacı, aynı ve farklı laboratuvarlar arasında sonuçlar arası farklılıklar ve standardizasyon problemi gibi bir takım dezavantajları bulunmaktadır.

2.3.3.3. DNA dizi analizi

Sanger ve Coulson Metodu (enzimatik DNA sentezi) 1975’de Frederick Sanger ve A.R. Coulson’un geliştirdiği ve günümüzde halen kullanılmakta olan en yaygın kullanılan dizi analiz tekniğidir. Bu metot DNA zincirinin enzimatik sentezine (polimerizasyon) ve sentezin **2’,3’-dideoksinükleotidtrifosfatlar (ddNTP’ler)** kullanılarak belli bazlarda sonlandırılması prensibine dayanmaktadır. ddNTP’leri normal dNTP’lerden ayıran özellik bunun 3’ karbonunda bir oksijenin eksik olmasıdır. Bu tür bir nükleotidin bağlandığı noktadan bir sonraki nükleotid ile fosfodiester bağı oluşamayacağından sentez durdurulmuş olur. Bu metot için, gen DNA’sını oluşturan çift iplikçik sıcaklık veya alkali ortamda birbirinden ayrıştırılır. Ayrılan ipliklerden herhangi biri baz tespitinde kullanılmak üzere bir bakteriyofaja ait tek iplikçikli ve M13 adı verilen vektöre (6.4 kilobazdan oluşan tek iplikçikli plazmid) klonlanır. Bu yöntem için dört ayrı deoksinükleotid (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), dideoksinükleotid (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) ve ³²P ile radyoaktifleştirilmiş primerler kullanılır.

G, A, C ve T olarak işaretlenen dört ayrı tüpün her birine ³²P ile işaretlenmiş primerler, dört tür dNTP, Taq DNA polimeraz enzimi ve eşit oranlarda baz dizisi belirlenecek DNA iplikçığı ilave edilir.

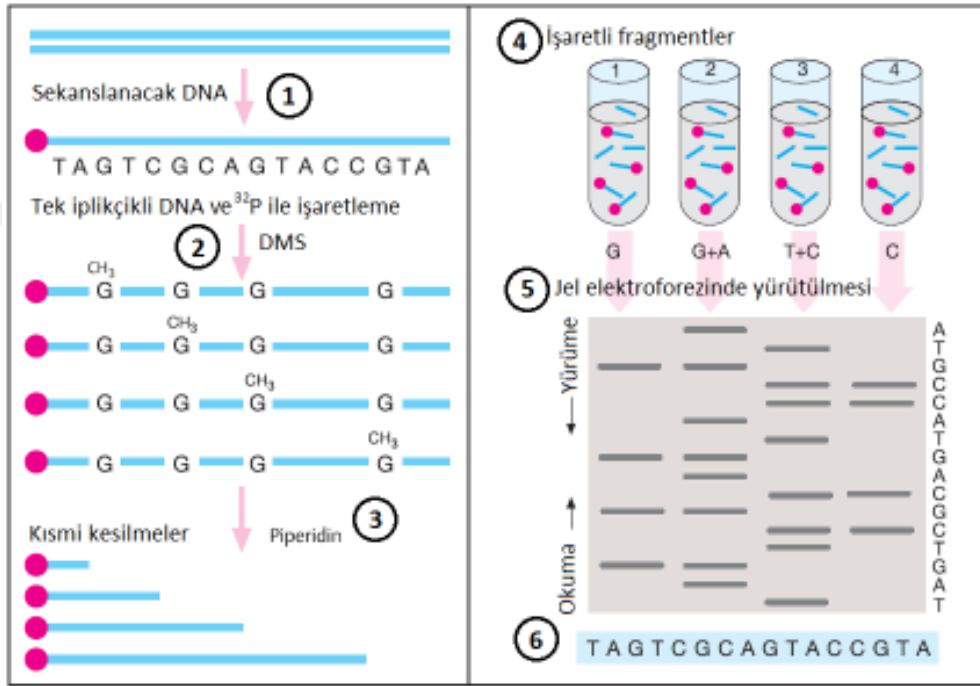


Şekil 2.13. Sanger ve Coulson metodu ile DNA dizi analizi (Koolman ve Roehm, 2005)

Daha sonra tüplerden her birine farklı tek bir ddNTP konularak reaksiyon başlatılır. Reaksiyonda her bir ddNTP, kendine uyumlu olan nükleotidin deoksiribozundaki hidroksil grubunu bloke ederek iplikçiğin uzamasını durdurur. Örneğin ddGTP konulan tüpte oluşacak polimerizasyon sırasında DNA iplikçiğinde yer alan bir C bazının varlığında, C'e karşılık gelmesi gereken dGTP yerine ddGTP'nin gelmesi ile polimerizasyon bu noktada sonlanır ve buza kadar olan gen bantı ortaya çıkar. Bu durum her bir baz için dört tüpte ayrı ayrı tekrarlanır. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra oluşan fragmentler ısıtma ile kaynak DNA ipliklerinden ayrılır. Ayrılan iplikle 70°C'lik ortamda üre deterjanını içeren poliakrilamid jelde yürütülür. Bir jelde 500 baz uzunluğuna kadar olan DNA dizisi görüntülenebilmektedir. Baz sayısına bağlı olarak oluşan değişik uzunluklardaki tek iplikçikli DNA bantları mobilite hızlarına bağlı olarak hareket ederler. Böylece 5'-3' yönüne doğru olan baz dizilimi belirlenmiş olur (Dilsiz 2009) (Şekil 2.13).

Birinci nesil Sanger dizileme yöntemi radyoaktif işaretlemeyi kullandığı, en fazla 500 baza kadar dizilemeyi mümkün kılabilirdiği ve ayrıca uzun zaman ve iş gücü gerektirmesi nedeniyle geniş ölçekli DNA dizileme çalışmalarında kullanımı mümkün olmamıştır.

1977’de dizi analizi için geliştirilen yöntemlerden biri de Allan Maxam ve Walter Gilbert’in geliştirmiş olduğu **Maxam-Gilbert** dizileme yöntemidir. Bu metodu diğer metottan ayıran özelliklerin başında, tek iplikçik oluşturma zorunluluğuna ve yeni iplikçiklerin sentezlenmesine gerek olmayışı gelir. Ayrıca bu metotta kullanılan kimyasal ayıraçlar oldukça toksik maddelerdir. Dolayısıyla tekniğin kullanımı dikkat gerektirmektedir. Bu metot özellikle kısa DNA segmentlerine uygulanmaktadır. Metodun uygulanabilmesi için dizi tespiti yapılacak DNA örneğinin fazla miktarda bulunması gerekir.

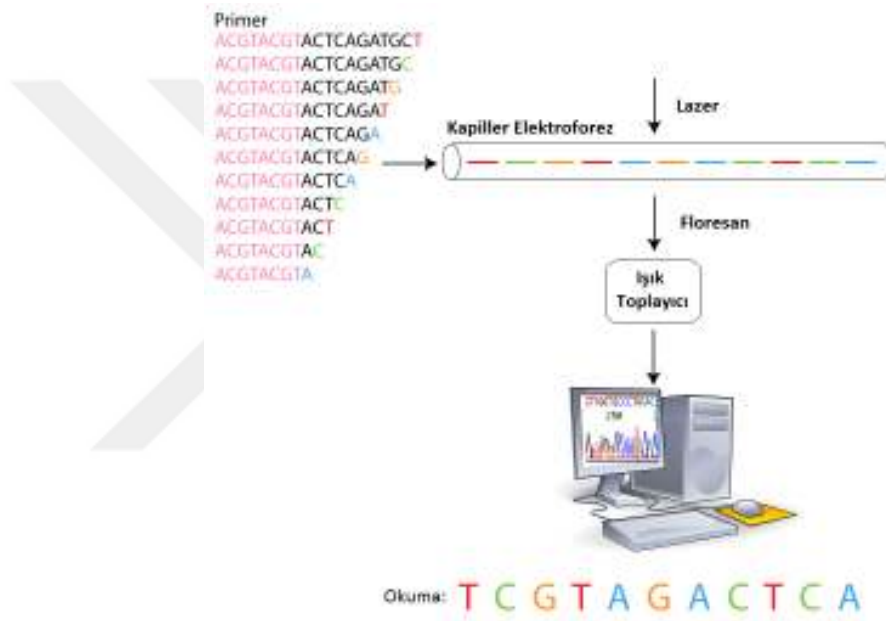


Şekil 2.14. Maxam-Gilbert metodu ile DNA dizi analizi (Passarge 2000)

Çift iplikçikli DNA'nın 5' uçları radyoaktif bir madde olan ^{32}P ile işaretlenir. Isı veya alkali ortamda birbirinden ayrıştırılan tek iplikçiklerden yeterli miktarda ve eşit olarak dört ayrı tüpe aktarılır. Tüplerin her birine dimetil sülfat, formik asit, hidrazin ve NaCl

gibi kimyasal maddelerden biri ilave edilir ve daha sonra piperidinin ilave edilmesi ile belli boylarda kesilmiş DNA bantları elde edilir (Dilsiz 2009)(Şekil 2.14).

Yukarıda belirtilen iki metoda ilave olarak günümüzde nükleotid dizilerinin okunması elektroforez yerine yaklaşık 1000 nükleotidi bir anda okuyabilecek ve otomatize edilmiş bilgisayar bağlantılı DNA sekans makinaları kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca radyoaktif işaretleme yerine daha çok floresans olarak boyanabilen oligonükleotid primerler kullanılmaktadır.



Şekil 2.15. Otomatik DNA dizi analizi

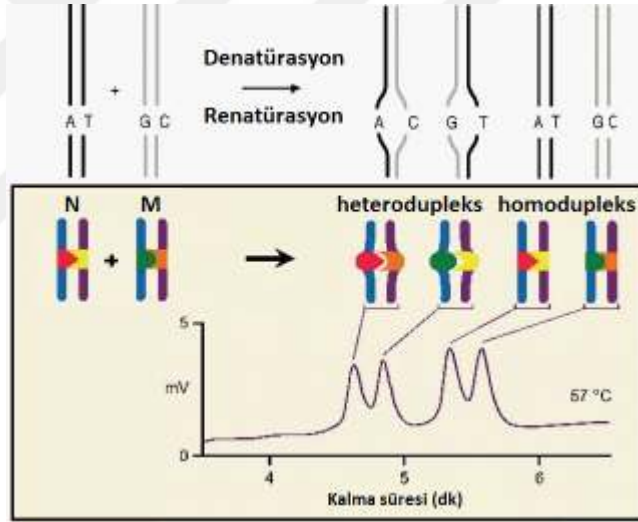
Otomatik DNA dizi analiz sistemlerinde ise farklı renkte floresan boyayla işaretlenmiş olan dört farklı ddNTP, dört farklı dNTP, hedef bölgeye özgül primer ve DNA polimeraz kullanılarak reaksiyon kurulur. Reaksiyon ürünü lazer dedektörüne sahip bir kapiller elektroforez sisteminde yürütülerek analiz edilir. (Şekil 2.15). DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir.

Bu yöntemin kullanılabilmesi için uygun laboratuvar alt yapısına gereksinim duyulması ve maliyetinin yüksek olması, tüm örneklerin dizi analiziyle incelenmesini zorlaştırmaktadır.

2.3.3.4. DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)

DHPLC belirli sıcaklık koşullarında heterodupleks DNA'ların homodupleks DNA'lardan ayrılması esasına dayanan analiz yöntemlerinden biridir. DHPLC mutasyon saptamada yüksek özgüllük ve hassasiyete sahip bir indirekt mutasyon analiz yöntemi olarak kullanılmaktadır.

Sistemin temeli heterozigot PCR ürünlerinin ısıtılıp soğutulduktan sonra hibridizasyonla heterodupleks oluşturmalarına ve bu heteroduplekslerin saptanmasına dayanır. Heterodupleksler termal olarak homoduplekslerden daha kararsızdır bu yüzden erime ısıları daha düşüktür. Cihazda bulunan ultraviyole saptayıcısı kartuştan ayrılan DNA parçacıklarını saptar ve pikler şeklinde değerlendirir (Şekil 2.16).



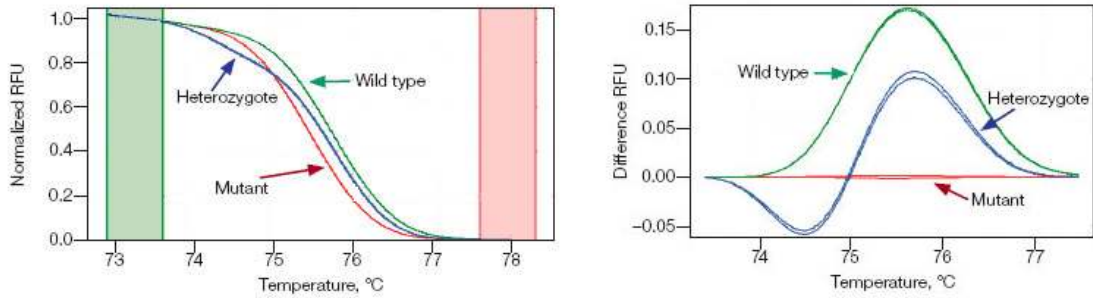
Şekil 2.16. DHPLC yöntemi ile mutasyon analizi

Mutasyon saptanmasında DHPLC'nin hassasiyetini etkileyen en önemli parametre sıcaklıktır. Her bir DNA fragmenti farklı bir baz kompozisyonuna sahip olduğu için fragmentin erimesi birkaç farklı sıcaklık gerektirebilir. Örnekler cihaza yüklenmeden önce melting domain analizi yapılarak örneklerin hangi sıcaklıklarda yürütülmesi gerektiği belirlenir. Sistemin dezavantajı, heterodupleksleri saptadığı için homodupleks oluşturan homozygot mutant genotipteki değişimlerin saptanamamasıdır (Demir 2011).

2.3.3.5. HRM (High Resolution Melting) Analizi

HRM analizi DNA'nın sıcaklıkla denatürasyonunun floresan boya ölçümü ile takibi esasına dayanır.

Yüksek çözünürlüklü erime analizinde öncelikle çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliği olan floresan boya varlığında hedef DNA bölgesi özgül primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlanarak ışımaya vermekte tek zincirli DNA ile etkileşim göstermemektedir. Floresan özellikteki boya ile hem amplifikasyon sırasında DNA konsantrasyonundaki artış hem de HRM analiziyle DNA'nın erimesi görüntülenmektedir. Amplifikasyon basamağından sonra gerçekleşen erime analizinde başlangıçta floresan ışımaya yüksektir. Sıcaklığın artmasıyla çift zincirli DNA'ya satüre olmuş floresan boya ortamdaki solüsyona geçeceği için floresan şiddetinde azalma görülecektir.



Şekil 2.17. HRM analizi (<http://www.bio-rad.com/en-tr/applications-technologies/real-time-pcr-data-analysis>)

Homozigot DNA örneğindeki değişiklik genellikle erime sıcaklığında (T_m) bir değişim olarak gözlenirken heterozigot DNA örneklerindeki değişimler ise erime eğrilerinde farklı bir profil oluşturarak kendini gösterir. Heterozigot DNA örneklerinde PCR sonrasında iki homodupleks ve iki heterodupleks olmak üzere dört farklı dupleks oluşmaktadır. Bununla birlikte yabancı tip veya homozigot mutant DNA örnekleri ise tek bir homodupleks içermektedir. Her dupleks kendine özgü bir erime davranışı göstermektedir. HRM analiziyle bu erime eğrisi sıcaklığa bağlı floresan şiddetindeki değişim grafiği şeklinde oluşturulmaktadır. Homozigot DNA örnekleri keskin ve

simetrik erime eğrileri oluştururken, heterozigot örnekler homodupleks ve heteroduplekslerin varlığına bağlı olarak kademeli ve kompleks eğriler oluştururlar (Şekil 2.17).

HRM'nin gücü, cihazın sıcaklık kontrolüne, sıcaklık ve floresan ölçümüne, floresan boyalara ve PCR ürününün saflığına bağlıdır (Sümer 2008).

2.4. Elektrokimya

Maddelerin elektriksel davranışlarını ve elektrik enerjisi ile kimyasal tepkimeler arasındaki ilişkileri inceleyen bilim dalına elektrokimya, maddelerin elektrokimyasal özelliklerini analiz amacıyla kullanılan yöntemlere de elektroanalitik yöntemler adı verilir.

Elektrokimyasal tepkimelerde, yükseltgenme(elektron verme) - indirgenme (elektron alma) reaksiyonları söz konusudur ve elektrokimyasal hücre adı verilen bir hücrede gerçekleşir.

Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi için, incelenecek maddeyi içeren ve elektriksel iletkenliği sağlayan bir çözelti(tampon çözelti), maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrot sistemi (genellikle üçlü elektrot sistemi) ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir çevirim sistemi (transducer) gereklidir.

Elektroanalitik yöntemlerin avantajlarını sıralayacak olursak;

- Hızlı ve tekrar edilebilirlikleri yüksektir,
- Kullanılan cihazlar diğer yöntemlerde kullanılan cihazlara göre daha ucuzdur,
- Analizi yapılacak maddenin çok düşük tayin sınırlarına kadar ulaşılabilir,
- Elde edilen elektrokimyasal ölçümler çoğu kez bir elementin ya da molekülün özel bir yükseltgenme basamağı için spesifiktirler.

Bütün elektrokimyasal tekniklerde, elektrot-çözelti sistemine bir elektriksel etki yapılarak sistemin verdiği cevap ölçülür. Hemen hemen bütün elektrokimyasal

tekniklerde potansiyel, akım ve zaman parametreleri bulunur ve bu parametrelere tekniğin adında yer verilir. Mesela, voltametri, kronoamperometri, kronokulometri gibi adlandırmalarda sırasıyla potansiyel-akım, zaman-akım ve zaman-yük parametrelerinden teknik hakkında kabaca bilgi edinilebilir (Skoog ve ark. 1996, Skoog ve ark. 1998, Tural ve ark. 2006, Yıldız ve Genç 1993).

Çeşitli elektrokimyasal yöntemler ile Doğru akım (DC), Difarensiyel Puls (DP), Dönüşümlü voltametri (CV) vb. de belirli potansiyel aralığında tarama yapılarak meydana gelen akım şiddeti ölçülür. Akım, difüzyona bağlı olarak oluştuğundan dolayı burada ölçülen difüzyon akımıdır. Difüzyon hızı akım ile doğru orantılıdır. Difüzyon, elektrot yüzeyinin yakınındaki difüzyon tabakasından oluşur.

2.4.1. Voltametri

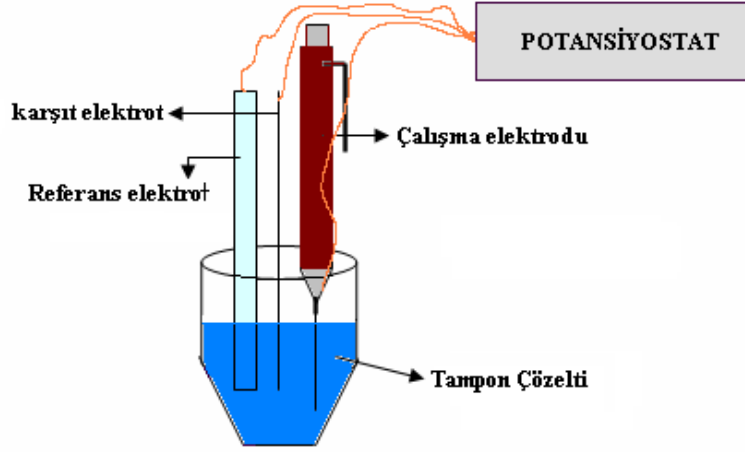
Voltametri, elektrot potansiyelinin değiştirilmesi ile elektrolitik hücreden geçen akımın değişmesine dayanan elektroanalitik metotların genel adıdır. Voltametri, Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında bulunan voltametrimin özel bir tipi olan polarografiden geliştirilmiştir. Voltametrimin önemli bir dalı olan *polarografi*, diğer voltametri tiplerinden çalışma elektrodu olarak bir damlayan civa elektrodu (DCE) kullanılması bakımından farklılık gösterir.

Voltametri, çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme-indirgenme olaylarının, yüzeylerdeki adsorpsiyon olaylarının ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerindeki elektron aktarım mekanizmalarının temel çalışmalarını kapsayan ve çok başvurulan duyarlı ve güvenilir bir yöntem durumuna gelmiştir.

Voltametrizde, bir çalışma elektrodu içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali yöntemin dayandığı karakteristik bir akım cevabı oluşturur. Uygulanan potansiyele karşı akım grafiğine de **voltamogram** adı verilir (Skoog ve ark. 1996, Skoog ve ark. 1998, Tural ve ark. 2006, Yıldız ve Genç 1993).

2.4.1.1. Voltametrik cihazlar

Voltametrik analizde kullanılacak cihazlar, elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Üçlü elektrot sistemi (Aladag 2008)

Çalışma elektrodu: Yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği ve zamanla potansiyeli analit konsantrasyonundaki değişimlerle beklenen şekilde değişen elektrottur. Çok çeşitli tür ve şekilde çalışma elektrot kullanılır. Bunlar civa, platin, altın, camısı karbon vb. elektrotlardır. Bu tür elektrotların kullanıldığı potansiyel aralığının tespiti çok önemlidir. Özellikle de bu potansiyel aralığı, sulu çözeltilerde sadece elektrot malzemesine değil, aynı zamanda bu elektrotların daldırıldığı çözeltinin bileşimine bağlı olarak da değişir. Genel olarak, kullanılan çalışma elektrotları polarizasyonu arttırmak için yüzey alanları küçük tutulur.

Geniş bir potansiyel aralığında çalışma yapılmasına imkân sağlaması, kimyasal inertlik, düşük maliyet, çeşitli algılama ve saptama uygulamaları için uygunluğundan dolayı karbon elektrotların çeşitli formları elektroanalitiksel uygulamalar için kullanılmaktadır. Hidrojen, hidroksil ve karboksil grupları ve hatta kinonlar ile karbon yüzeyinde bağlar oluşabilmektedir. Bu fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle karbon yüzeyin birçok değişik madde tutturulabilir.

Karbon pastası elektrodu (CPE), camı karbon elektrot (GCE) ve perde baskılı karbon (grafit) elektrotlar (SCPE) gibi karbon elektrotların arasında kalem grafit elektrodun ucuzluk, kolay ulaşılabilirlik, yüksek elektrokimyasal reaktivite, modifikasyon ve minyatürize edilebilme kolaylığı sayesinde elektrokimyasal sensör tasarımında ve DNA etkileşimlerine dayalı biyosensör tasarımlarında sıklıkla kullanılmıştır. Bu nedenle çalışmamızda oldukça kolay hazırlanması, tek kullanımlık ve ucuz olması nedeniyle kalem grafit elektrot çalışma elektrodu olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda bu elektrotlarla alınan sonuçların daha tekrarlanabilir olduğu ve daha düşük tayin sınırlarına ulaşılabildiği gözlenmiştir.

Referans elektrot: Analit çözeltisinin bileşiminden bağımsız sabit bir elektrot potansiyeline sahip bir yarı hücredir ve anot olarak ele alınır. Elektrik direnci çok büyük olduğu için hemen hemen hiç akım geçmez. Referans elektrot genellikle Ag/AgCl veya doymuş kalomel elektrottur.

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

Çalışmada Ag/AgCl referans elektrodu kullanılmıştır. Gümüş–gümüş klorür referans elektrotları, doymuş kalomel elektrotlar gibi oldukça yaygın kullanım alanına sahip olan elektrotlardır. Doymuş kalomel elektrottan üstünlüğü gümüş–gümüş klorür elektrodun doymuş kalomel elektroda göre daha yüksek sıcaklıklarda kullanılabilmesidir. Aynı zamanda gümüş iyonları civa (I) iyonlarına göre daha az sayıda analitle reaksiyona girerler. Bir gümüş–gümüş klorür referans elektrot gümüş bir telin, elektrolitik yoldan AgCl ile kaplanarak Cl⁻ iyonu içeren bir çözeltiye daldırılmasıyla elde edilir. Doymuş KCl çözeltisi kullanıldığı zaman 25°C’ de standart hidrojen elektrota göre potansiyeli +0,222 V’ dur.

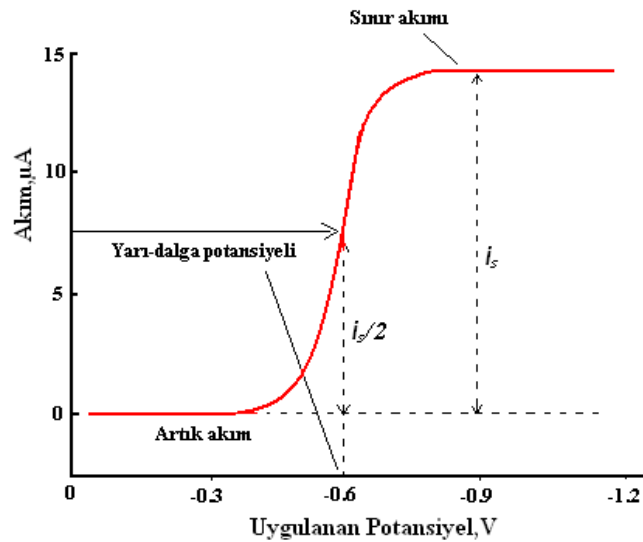
Karşıt elektrot: Bu elektrot çalışma elektroduyla bir çift oluşturur onu elektronlarla besler, ayrıca ortamda oluşabilecek istenmeyen akımların üzerinden geçmesine izin verir. Sinyal kaynağından çıkan elektriğin çözültiden geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlamaktadır. Karşıt elektrotta genellikle helezon şeklinde bir platin tel veya bir civa havuzudur. Çalışmada platin tel karşıt elektrot olarak kullanılmıştır.

Tampon çözelti: Elektriksel iletkenliği sağlar.

Potansiyostat: Çalışma elektrodunun potansiyelini sabit tutar.

2.4.1.2. Voltametri de kullanılan bazı önemli tanımlamalar

Voltametri de akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan akıma **katodik akım**, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise **anodik akım** adı verilir. Geleneksel olarak, katodik akımlar daima pozitif, anodik akımlar ise negatif işaretlerle gösterilir (Skoog ve ark. 1996, Skoog ve ark. 1998, Tural ve ark. 2006, Yıldız ve Genç 1993).



Şekil 2.19. Doğrusal taramalı voltammogram eğrisi

Bir voltammogramı niteleyen üç temel büyüklük **artık akım**, **sınır(limit akım)** ve **yarı dalga potansiyelidir**.

Belli bir potansiyelden sonra akımın sabit kaldığı bir plato bölgesine ulaşılır. Bu akıma **sınır akımı (i_s)** adı verilir (Şekil 2.19). Bu akım elektrot yüzeyinde elektroetkin türün derişiminin sifira gittiği andaki akım değeridir ve potansiyelden hemen hemen bağımsızdır.

Sınır akımı, analitin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızındaki sınırlamadan kaynaklanır. Sınır akımları genellikle analitin derişimi ile doğru orantılıdır.

$$i_s = k \cdot C_A$$

Burada, C_A analit derişimi ve k ise bir sabittir.

Bu akımın büyüklüğü elektroetkin maddenin derişimine ve elektrot yüzeyine kütle taşınım hızına bağlıdır. Kütle taşınımı göç, difüzyon ve konveksiyon olayları ile gerçekleşir.

Bir elektrolitteki herhangi bir taneciğin bir yerden başka bir yere taşınabilmesi için, o taneciğe bir kuvvetin etkimesi gerekir. Bu kuvvet kimyasal, elektriksel yada mekanik bir kuvvet olabilir. Derişim farkından kaynaklanan kimyasal kuvvetin oluşturduğu taşınmaya **difüzyon**, elektriksel kuvvetlerin neden olduğu taşınmaya **göç(migrasyon)**, karıştırma ve elektrodun dönmesi gibi mekanik kuvvetlerin neden olduğu taşınmaya da **yığınsal taşınma(konveksiyon)** denir.

Ayrıca elektrot tepkimesine eşlik eden kimyasal tepkime hızları, adsorpsiyon ve desorpsiyon hızları gibi olaylar da kütle taşınım hızında etkin olabilmektedir. Bu olayların tümü gerçekleşiyorsa, her birinin sınır akımda katkısı olacaktır. Eğer taşınım olaylarından yalnızca biri sınır akımı belirlemede egemense, sınır akım bu olayın adıyla anılır (Göç akımı, difüzyon akımı, adsorpsiyon akımı, kinetik akım gibi).

Elektrot üzerinde henüz reaksiyon olmadığı zaman küçük de olsa bir akım gözlenir. Bu akıma **artık akım** denir (Şekil 2.19). Artık akımın büyüklüğü yöntemin duyarlılığını belirler. Bu akım giderildiği veya en aza indirildiği oranda duyarlılık artar. Duyarlılık arttırma doğrusal tarama dışındaki kimi özel tekniklerle olasıdır (darbe, diferansiyel darbe, kare dalga, alternatif akım voltmetreleri gibi).

Sınır akımı ile artık akım arasındaki yükseklik dalga yüksekliğidir. Dalga yüksekliği, elektroaktif maddenin konsantrasyonu ile doğrusal olarak artar.

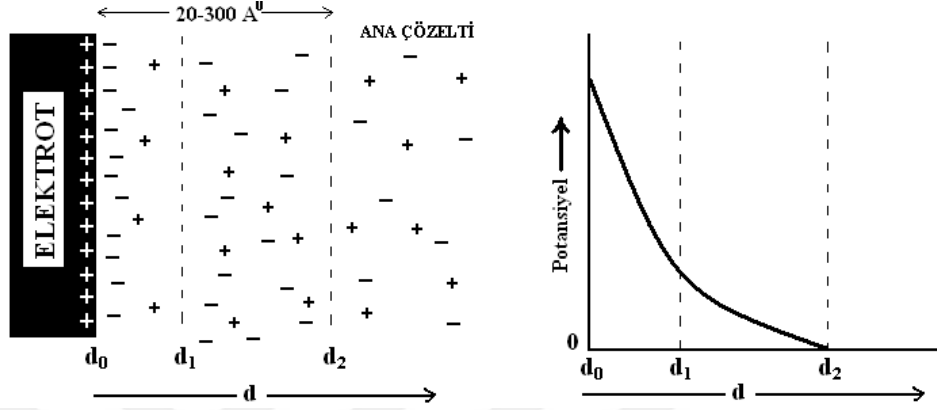
Yarı dalga potansiyeli terimi ise sınır akımının yarısına ($i_s/2$) karşılık gelen potansiyel değeridir ve $E_{1/2}$ ile gösterilir (Şekil 2.19). Genellikle derişimden bağımsız olan bu değer elektroaktif maddenin türüne ve ortama bağılı sabit bir değerdir. Bu nedenle türleri nitelemede kullanılan bir büyüklüktür. Ayrıca, standart yarı hücre potansiyeli ile yakından ilişkilidir.

Gerilim uygulanan bir elektrot sisteminden Kapasitif ve Faradayik olmak üzere iki tür akım geçer:

Faradayik akım (i_f): Elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonu olurken diğerinde indirgenme reaksiyonu olur, bu sırada elektronların doğrudan aktarımı ile akım iletilir. Bu tip işlemlere, bir elektrottaki kimyasal reaksiyon miktarının geçen akımla orantılı olduğunu ifade eden Faraday yasalarına uygun olması nedeniyle **Faradayik işlemler** adı verilir, bu şekilde oluşan akımlara **Faradayik akımlar** denir. Kısacası; bir elektrokimyasal hücrede elektrot/çözelti ara yüzeyi boyunca bir yükseltgenme/indirgenme işlemiyle taşınan akımdır. Reaksiyondan (analiz edilecek maddeden) kaynaklanan akımdır.

Faradayik olmayan akım (kapasitif akım) (i_c), elektrot/çözelti ara yüzeyindeki yüklü bir çift tabakada oluşan bir yükleme akımıdır. Bir elektrotun bir elektrolit çözeltisine daldırılması ve negatif yüklenmesi ile 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 (Şekil 2.20). Oluşan bu çift tabaka, bir kapasitör gibi davranır. Bu kapasitörü yüklemek için ortamda yükseltgenecek ve 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.



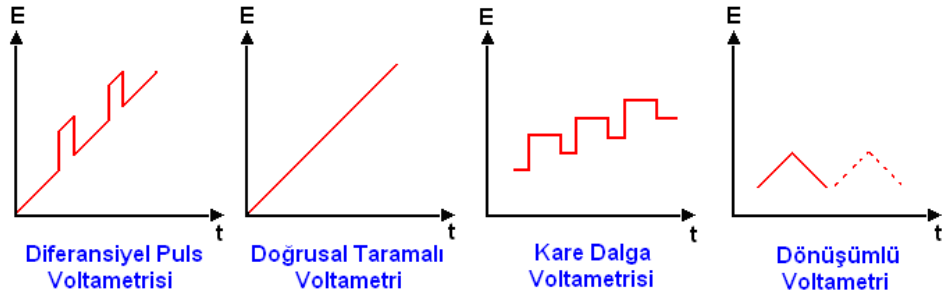
Şekil 2.20. Elektrot yüzeyinde oluşan elektriksel çift tabaka

Toplam akım(i)=faradayik akım(i_r)+kapasitif akım(i_c) olduğundan kapasitif akım azalırsa duyarlılık artar.

Genellikle $10^{-3}M$ ve üstünde kapasitif akım faradayik akımdan küçüktür ve çalışılabilir. $10^{-4}M$ da kısmen iyi sonuç alınır. 10^{-5} ve üzerinde kapasitif akım faradayik akımdan çok büyük olacağı için çalışılmaz.

2.4.1.3. Voltametrik yöntemler

Voltametricde, bir mikroelektrot içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarılma sinyali uygulanır. Bu uyarılma sinyali yönteminin dayandığı karakteristik bir akım cevabı oluşturur. Voltametricde en çok kullanılan dört uyarılma sinyali Şekil 2.21’de verildiği gibi doğrusal taramalı, diferansiyel darbe, kare dalga ve üçgen dalgadır. Yöntemlere verilen isimlerde buna göre değişir.

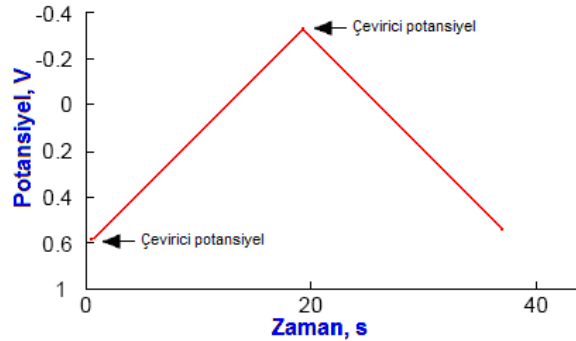


Şekil 2.21. Voltametri de kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri

2.4.1.3.1. Dönüşümlü voltametri

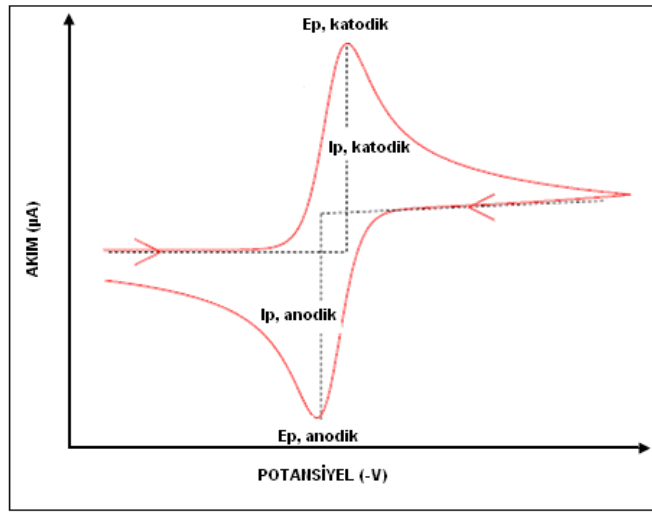
Dönüşümlü voltametri (CV) , sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı belirli bir aralıkta, karıştırılmayan ortamda çalışma elektrodunun verdiği akım cevabı olarak tanımlanabilir. Elektrokimyasal bir analizde elektroaktif maddenin yükseltgenme – indirgenme tepkime mekanizmalarının aydınlatılmasında ve elektrokimyasal bir analize başlamadan önce sistemdeki maddelerin elektriksel davranışlarının saptanmasında sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Fakat miktar tayinine dayalı analizlerde kullanım alanları daha sınırlıdır.

Şekil 2.22’de gösterildiği gibi potansiyel doğrusal olarak değiştirilir daha sonra tarama yönü tersine çevrilir ve orijinal değerine geri döner (üçgen dalga şekilli potansiyel). Başlangıç taramasının yönü numunenin bileşimine bağlı olarak negatif ya da pozitif olabilir.



Şekil 2.22. Dönüşümlü voltametri de kullanılan uyarılma sinyali

Bu yöntemde, örnek çözeltisine potansiyel uygulandığında, elektrot yüzeyi uygulanan potansiyele göre pozitif ya da negatif bir karakter gösterir ve çevresindeki çözeltiden elektron alır ya da çözeltiliye elektron verir bu da ölçülebilir bir akım oluşmasına neden olur. Çalışma ortamında karıştırma yapılmadığı için elektron transferi elektrot yüzeyi ve çevresinde olur, bu nedenle elektrot çevresindeki bileşen miktarı zamanla azalır sonuç olarak oluşan akımda zamanla bir pik yapar ve azalmaya başlar bu pikler indirgenme ve yükseltgenme pikleridir (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Pik potansiyellerini ve akımlarını gösteren klasik bir dönüşümlü voltamogram

Dönüşümlü voltametri uygulamalarında potansiyel iki değer arasında devreder. Önce bir maksimuma doğru doğrusal olarak artar ve sonra aynı eğimle orijinal değerine doğrusal olarak azalır. Bu işlem, akım zamanının bir fonksiyonu olarak kaydedilirken defalarca tekrarlanabilir. İleri ve geri yöndeki gerilim hızları aynı tutulabildiği gibi farklı tarama hızları da kullanılabilir. Dönüşümlü voltamogramların şeklinde seçilen potansiyel aralığının yanısıra, seçilen tarama hızının, kaç defa tarama yapıldığının da etkisi vardır.

Dönüşümlü bir voltamogramdaki indirgenme ve yükseltgenme arasındaki gerilim farkı ΔE_p ile ifade edilir. ΔE_p bu değere ne kadar yakın ise, tersinir; ne kadar uzaksa tersinmez olarak ifade edilir. Kısacası, tersinir bir reaksiyon için anodik ve katodik pik akımları mutlak değer olarak yaklaşık olarak eşittir.

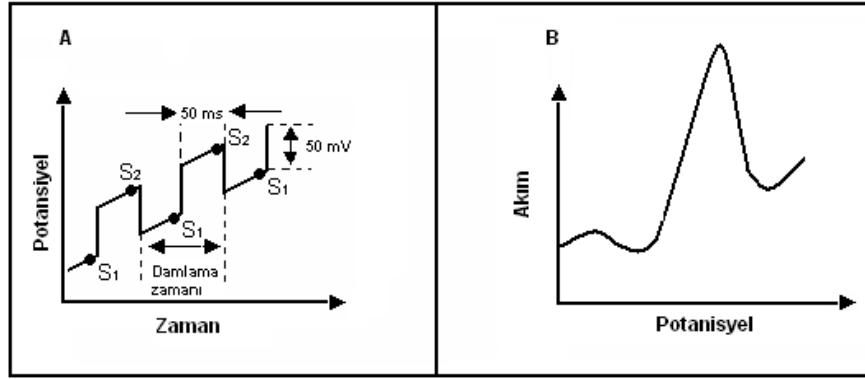
Dönüşümlü voltametri analitin duyarlılık sınırı 10^{-5} M'dır. Dönüşümlü voltametri rutin kantitatif analizlerde kullanılmadığı halde, özellikle organik ve metal organik sistemlerde yükseltgenme - indirgenme işlemlerin mekanizma ve hız çalışmaları için önemli bir araçtır. Bu yöntem, normal olarak elektrokimyasal olarak belirtilebilen bir sistemin araştırılması için seçilen ilk yöntemdir.

Dönüşümlü voltametri aynı zamanda, elektroaktif türlerin arayüzeydeki davranışının değerlendirilmesinde de kullanılır. Reaktif ve ürünün her ikisi de, adsorpsiyon-desorpsiyon olayında yer alabilir. Bu durumda, alınan çoklu voltamogramlarda, katodik ve anodik pik akımlarının dereceli olarak artması, elektrot yüzeyinde adsorpsiyonun göstergesidir. Reaktant veya ürünün sadece biri elektrot yüzeyine kuvvetli adsorbe olabilir. Bu durumda, reaktantın elektrot yüzeyine kuvvetli adsorpsiyonu varsa difüzyon pikinden daha negatif bir potansiyelde bir arka pik gözlenirken, ürünün elektrot yüzeyine kuvvetli adsorpsiyonu varsa difüzyon pikinden daha pozitif bir potansiyelde bir ön pik gözlenir (Skoog ve ark. 1996, Skoog ve ark. 1998, Tural ve ark. 2006, Yıldız ve Genç 1993).

2.4.1.3.2. Diferansiyel darbe voltametri

Diferansiyel darbe voltametrisinde uyarma sinyalleri; doğrusal bir tarama esnasında periyodik darbelerin oluşturulmasıyla gerçekleştirilir. Bu yöntemle, yarı – dalga potansiyelleri arasında yaklaşık 0,05 V fark olan maddelerin bile pik maksimumları elde edilebilmektedir. Duyarlılık sınırı 10^{-7} – 10^{-8} M'dır. Duyarlılığın yüksek olmasının nedeni; ölçümün, faradayik akımın en yüksek, kapasitif akımın en düşük olduğu anda yapılmasından kaynaklanır.

DPV tekniğinde, doğrusal bir tarama sırasında çalışma elektroduna periyodik darbeler uygulanır. Darbe uygulamadan önce ve sonra olmak üzere iki kez akım ölçülür. Darbe başına elde edilen akımdaki fark uygulanan potansiyele karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen diferansiyel darbe voltamogramı yüksekliği analizi yapılan maddelerin derişimi ile orantılı akım piklerinden oluşmaktadır.



Şekil 2.24. A) Analog cihazlarda diferansiyel darbe voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali, B) Diferansiyel darbe voltametrisine ait bir voltamogram

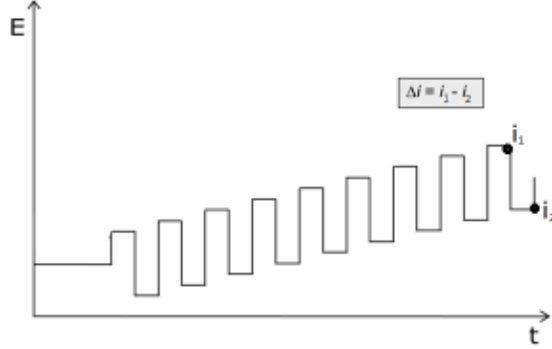
2.4.1.3.3. Doğrusal taramalı voltametri

Bu yöntemde uyarma sinyali; çalışma elektrodunun potansiyelinin zamanla doğrusal bir şekilde arttırılmasıyla elde edilir. Uygulanan bu potansiyel sonrasında analizlenen maddeye özgü akım cevapları potansiyelin bir fonksiyonu olarak voltamogramlarda incelenir. Doğrusal taramalı voltamogramlar, genelde voltametrik dalga adı verilen sigmoidal şekilli (S şeklinde) eğrilerdir. Doğrusal taramalı voltametri, iyi pik maksimumları elde edebilmek için yarı – dalga potansiyel farkı en az 0,2 V civarında olmalıdır.

2.4.1.3.4. Kare dalga voltametrisi

Kare dalga voltametrisinde, puls uyarma sinyali ile akımlar pulsların ömrü süresince çeşitli anlarda ölçülür. Uygulanan gerilim şekil olarak pulslara benziyor olsa da, bu yöntem bir puls tekniği değildir. Potansiyel periyodun yarısında pozitif değer alırken, diğer yarısında negatif değer alır. İleri puls katodik akımını (i_1), geri puls “anodik akımı (i_2) oluşturur. İki akım arasındaki fark alınarak Δi değerleri bulunur ve bu sonuçlarla voltamogram grafiği çizilir (Şekil 2.25). Son derece hızlı ve duyarlı olma üstünlüğü olan bir darbe polarografi tekniğidir. Voltamogramın tamamı 10 milisaniyeden daha az bir sürede yapılır. Ölçüm son derece hızlı yapıldığı için analizin kesinliğini artırmak için birkaç voltametrik taramanın ortalaması alınarak kesinlik artırılabilir. Kare dalga voltametrisinin tayin sınırları 10^{-7} ile 10^{-8} arasındadır. Akımlar arasındaki fark arttıkça

derişimler de artar. Yani akımlar arasındaki fark ile derişimler doğru orantılıdır (Skoog ve ark. 1996, Skoog ve ark. 1998, Tural ve ark. 2006, Yıldız ve Genç 1993).

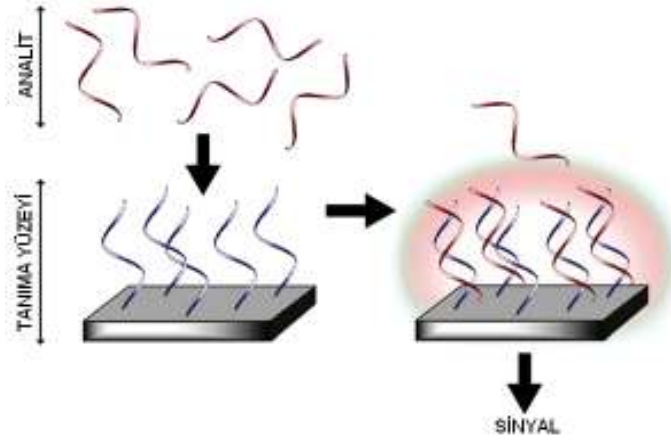


Şekil 2.25. Kare dalga voltametri kullanılarak elde edilen uyarılma sinyali

2.5. Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri

DNA biyosensörlerinin çalışma prensibi, çevirici yüzeye immobilize edilmiş özgül tek-zincirli DNA dizilerinin (prob), analit içinde eşlenik olan tek-zincirli DNA (ssDNA) dizilerinin eşleşmesine (hibridizasyonuna) dayanır (Şekil 2.26). DNA dizilerini, özgül ve seçici olarak (tek baz uyumsuzluğunu belirleyecek düzeyde) belirleyebilme kabiliyeti, bir DNA biyosensöründe aranan en önemli özelliktir. Bu nedenle DNA biyosensörleri, genetik hastalıklarla ilişkili olarak tek nokta polimorfizmi veya farklı tipte mutasyonlarının belirlenmesi mümkün olmaktadır. Bunun dışında ilaç etki mekanizmalarının aydınlatılmasında, klinik araştırmalarda, adli tıpta, çevre ile ilgili araştırmalarda, toksik madde tayini analizleri gibi birçok alanda DNA biyosensörlerinden yararlanılmaktadır (Ozkan 2006).

Bir önceki kısımda belirtilen günümüzde mutasyonların taranmasında kullanılan yöntemlerin en başta pahalı olmaları, sonuç verme sürelerinin en az bir gün sürmesi, cihazları kullanabilmek için bilgi ve deneyim gerektirmesi gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin ise en başta çok fazla maliyet gerektirmemesi, kısa sürede yanıt vermeleri, yüksek hassasiyetli olmaları, taşınabilir ve tek kullanımlık modellerinin tasarlanabilmesi, kullanımı kolay ve pratik olması gibi birçok avantajı bulunmaktadır.



Şekil 2.26. DNA biyosensörünün şematik gösterimi

Elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle yapılan analizlerde temel prensip; çoğunlukla sensör-örnek matris arayüzünde meydana gelen etkileşimler nedeniyle, akım veya potansiyelde meydana gelen değişikliklere dayanmaktadır.

Tipik bir elektrokimyasal DNA biyosensörünün tasarımı 3 aşamada yapılır:

- 1- Proben sensör yüzeyine tutturulması (immobilizasyonu),
- 2- Proben analit içerisindeki hedef dizisi ile hibridizasyonu,
- 3- İndikatörlü veya indikatörsüz teknikler kullanılarak tayin.

2.5.1. Prob immobilizasyonu

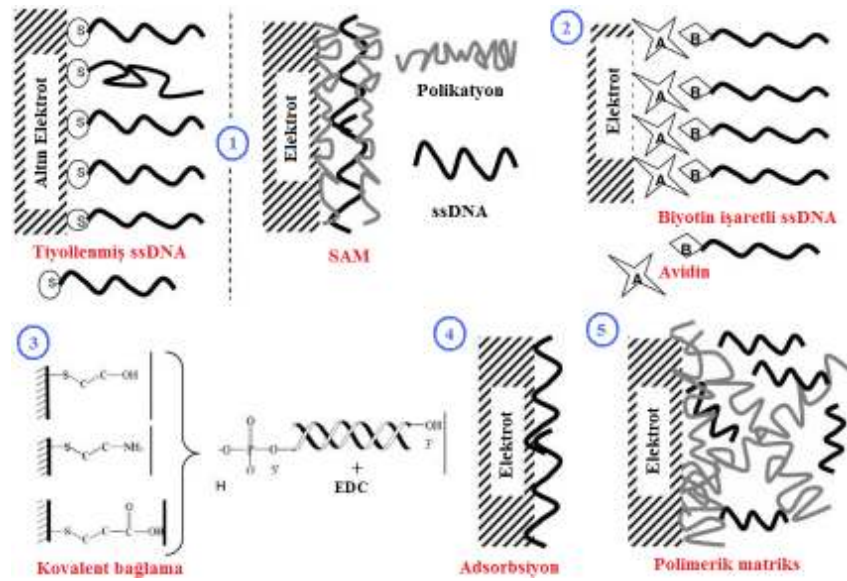
Biyosensör tasarımında, en önemli basamaklardan biri probun yüzeye tutturulması işlemidir. Düzgün olarak yüzeye tutturulan prob, daha sonra hedef ile hibridize olur. Bu aşamada probun uzunluğu ve konsantrasyonu sensör yüzeyinin yükü ve hidrofobiklik durumu, probun hangi yöntemle yüzeye immobilize edildiği, kimyasal ve fizikokimyasal koşullar önem taşır.

Prob uzunluğunun genelde 20-25 baz geçmemesi istenir. Çünkü 25 bazdan sonra probun kendi üzerine katlanarak sekonder yapıya dönüşmesi olasılığı daha yüksektir. Ayrıca yüzeydeki prob konsantrasyonu da hibridizasyon verimliliğini bakımından oldukça önemlidir. Yüzeyde oligonükleotitlerin sıkışması sonucunda oluşan sterik engeller hibridizasyon verimliliğinde doğrudan sorun oluşturacaklardır.

Negatif yüklü yüzeyler, negatif yüklü fosfat gruplarından dolayı oligonükleotitleri yüzeyden iterken, pozitif yüklü yüzeyler, fosfat gruplarıyla bağlantıya geçerek, oligonükleotidin yatay konuma gelmesine neden olur. Hidrofobik yüzeyler, oligonükleotitlerin bazlarıyla etkileşime girerek, oligoları hibridizasyon için uygun olmayan bir konuma getirir.

DNA biyosensörlerinde analizi yapılacak maddenin etkin bir şekilde tanınması için tanımayı gerçekleştirecek biyolojik materyal DNA'nın elektrot yüzeyine sağlam bir şekilde tutturulmalıdır. DNA'nın elektrot yüzeyine immobilizasyonunda aşağıdaki yöntemlerden yararlanılabilmektedir (Rivas ve ark. 2005):

1. Tiyollenmiş veya düz oligonükleotid dizilerinin SAM (self-assembly multilayers) ile altın yüzeyine tutunması,
2. Avidin muamele edilmiş yüzeye biotinlenmiş oligonükleotidlerin bağlanması,
3. Kovalent ajanlar kullanılarak oligonükleotidlerin kovalent yolla yüzeye bağlanması,
4. Adsorbsiyonla oligonükleotidlerin yüzeye bağlanması,
5. Polimerik matrisler aracılığıyla yüzeye bağlanma



Şekil 2.27. DNA biyosensörlerinde prob immobilizasyon yöntemleri (Rivas ve ark. 2005)

2.5.2. Sensör yüzeyinde hibridizasyon

DNA biyosensörlerinde maksimum duyarlılık için en yüksek hibridizasyon verimliliğini oluşturmak üzere gereken koşulların belirlenmesi biyosensör tasarımında çok önemli bir basamaktır.

Hibridizasyon, prob ve analit çözelti içerisindeki hedef diziye ait bazlar arasında oluşan hidrojen bağları ile olur. Eğer oluşan hibrid tamamıyla eşlenik ise hibrid kararlı olur. Baz dizilimleri tamamıyla eşlenik olmasa bile yine de hibrid oluşabilir. Fakat bu hibridler tamamen eşlenik hibridler kadar kararlı değildir. Eşlenik ve eşlenik-olmayan hibridlerin oluşumu için gerekli koşullar (pH, iyonik kuvvet, sıcaklık vb.) belirlenerek ayırımları yapılabilir. İki zinciri bir arada tutan bu güçlerin oluşumu, özellikle bazlar arasındaki hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler, deneysel olarak fizikokimyasal parametrelerle değiştirilebilir. Bu parametreler bir bakıma bu zayıf etkileşimlerin oluşumunu veya bozulmasını etkileyerek yüzey üzerinde hangi hibridlerin kalacağını belirleyebilir.

Optimum hibridizasyon için prob ve hedef konsantrasyonları, probun yüzeye immobilizasyon yöntemi, prob ile hedef dizinin etkileşim süresi, hibridizasyonun meydana geldiği analit çözeltisinin sıcaklığı, pH'sı, iyonik kuvveti gibi kimyasal ve fizikokimyasal parametreler önem taşır.

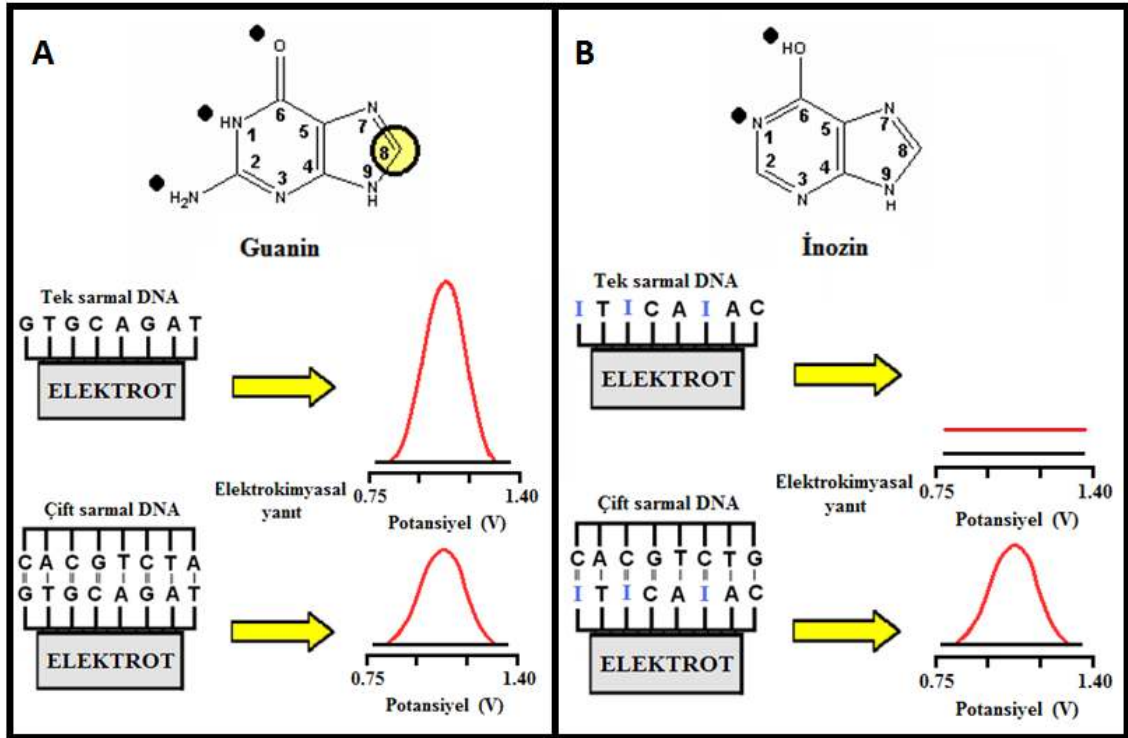
2.5.3. Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde DNA dizi algılama yöntemleri

Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinde elektrot yüzeyinde oluşan hibrit DNA'nın elektroaktif bazlarının sinyalleri üzerinden indikatörsüz olarak veya hibridizasyon indikatörü/interkalatör maddelerin kullanımıyla ve bu maddelerin yükseltgenme/indirgenme sinyalleri üzerinden indikatörlü olarak iki yöntemle tayin edilir.

2.5.3.1. İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemleri

DNA'daki en elektroaktif ve kararlı yanıt veren baz guanin bazıdır ve yaklaşık +1,0V civarında yükseltgenir. Elektrot yüzeyine tutturulan tek sarmal DNA dizisindeki guaninler açık olduğu için yükseltgenme sinyali yüksek, hibridizasyondan sonra ise sitozinle aralarında oluşturdukları hidrojen bağı köprüleri nedeniyle yükseltgenmesi kısmen kapalı duruma gelir ve bu nedenle tek sarmala göre daha düşük sinyal verir (Kerman ve ark. 2004)(Şekil 2.28 A).

Diğer bir tayin yöntemi ise EVET/HAYIR SİSTEMİ adı verilen ve prob dizisinde bulunan guanin bazları yerine bir guanin analogu olan inozinlerin sentezlettilmesidir. İnozin guanine yapıca benzemesine ve sitozinle ikili bağ oluşturmasına rağmen herhangi bir yükseltgenme sinyali vermemektedir. Bu nedenle elektrot yüzeyinde tek sarmal DNA dizisi varken +1,0V'da herhangi bir yükseltgenme sinyali alınmazken, hibridizasyondan sonra hedef diziden gelen guaninlerden dolayı bir yükseltgenme sinyali gözlenir (Şekil 2.28 B).

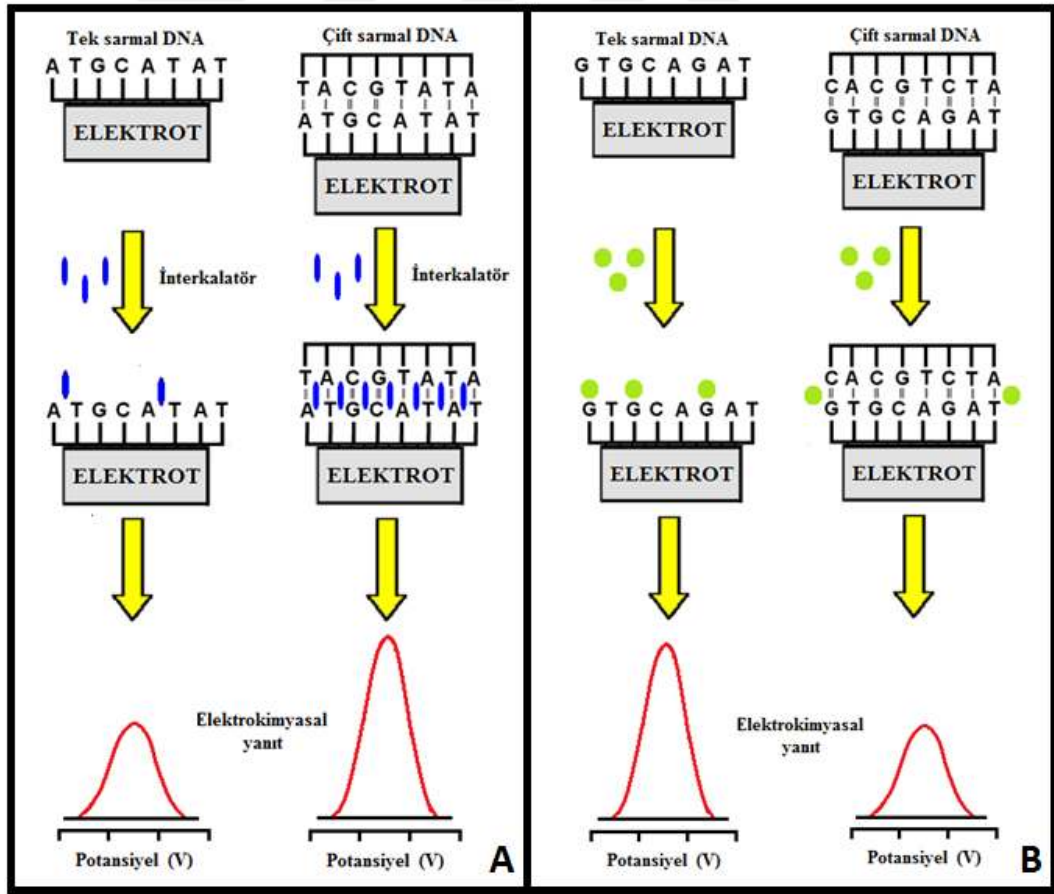


Şekil 2.28. A-Guanin bazının yükseltgenmesine dayalı indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi, B- İnozlinli prob ilkesine dayalı indikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi

2.5.3.2. İndikatöre Dayalı DNA dizi algılama yöntemleri

İndikatöre dayalı DNA dizi algılanması, ya DNA'ya interkale olabilen (metal kompleksleri, antibiyotikler), ya DNA dizisindeki bazlarla özgül olarak etkileşen (MB, Ru(bpy)₃³⁺, vb.) elektroaktif maddeler (indikatör) veya nanopartikül sinyali ile tayin edilebilmektedir.

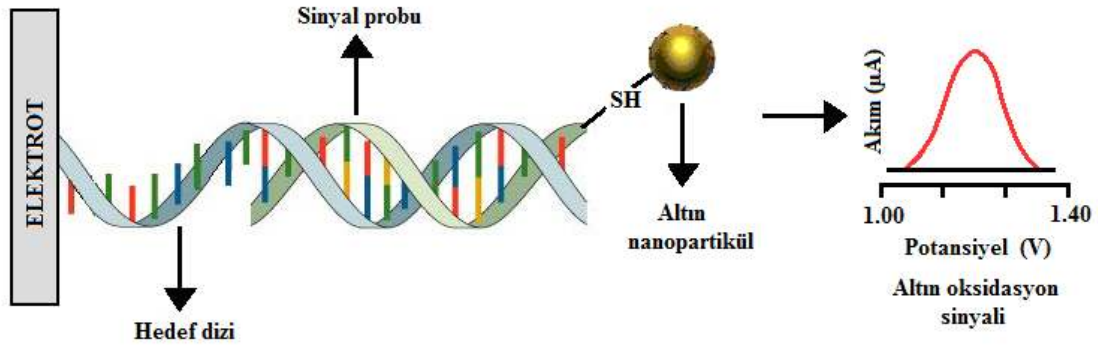
Elektrot yüzeyinde oluşan hibrit ile etkileşen indikatörün neden olduğu artan veya azalan elektrokimyasal yanıt hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır. Elektroaktif bir maddenin indikatör olarak kullanılabilmesi için ssDNA ve dsDNA ile etkileşimi sonucu alınan yanıtlar arasında anlamlı bir fark olması gerekmektedir. Meldola Mavisi (MDB), Ru(II), Co(III), Os(II), Os(IV), 1,10-fenantrolin ve 2,2'-piridin kelatları hibridizasyon indikatörü olarak sıklıkla kullanılan maddelerdir.



Şekil 2.29. A-İnterkalatör madde ile DNA dizi algılama yöntemi, B- DNA bazlarının en az biriyle etkileşen bir indikatör ile DNA dizi algılama yöntemi

İnterkalasyon; bir maddenin DNA çift sarmalı arasına girip birikmesidir. Bu durumda; Şekil 2.29 (A)'da gözlendiği gibi; maddenin birikmesinden dolayı çift sarmal DNA (dsDNA) ile etkileşimden sonra alınan madde sinyali tek sarmal DNA (ssDNA) ile etkileşimden sonra alınan madde sinyaline göre oldukça yüksektir. Bunun yanında, hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan madde DNA'nın bazlarından biriyle (özellikle Guanin) etkileşiyor olabilir. Bu durumda; Şekil 2.29 (B)'de gözlendiği gibi; tek sarmal DNA (ssDNA)'da bazlar açıkta olduğundan dolayı alınan madde sinyali, hibridizasyondan sonra oluşan çift sarmal DNA (dsDNA)'da bazlar kapalı olduğundan dolayı alınan madde sinyaline oranla oldukça yüksektir (Ozsoz 2012).

Nanopartikülle işaretlemeye dayalı DNA dizi algılama yönteminde genellikle metalik nanopartikülün verdiği sinyal esas olarak alınmıştır. Bu amaçla özellikle altın nanopartiküllerden yararlanılmaktadır (Ozsoz ve ark 2003, 2012).

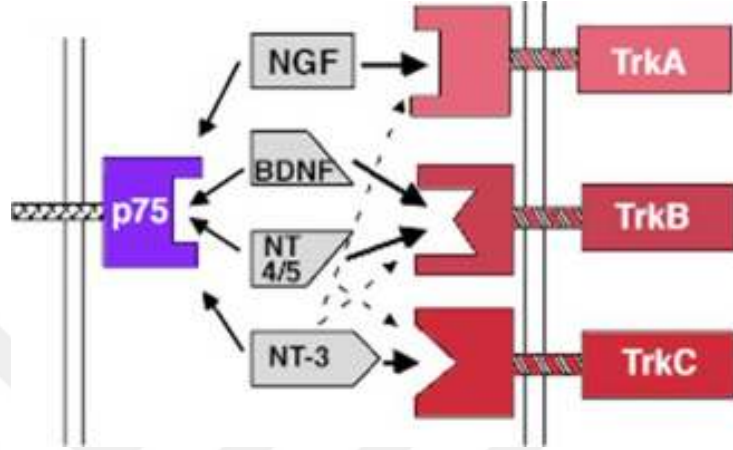


Şekil 2.30. Nanopartikülle işaretlemeye dayalı DNA dizi algılama yöntemi

2.6. Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF) ve Val66Met Polimorfizmi

Nörotrofik faktörler, nöronların gelişimi ve korunması için büyük öneme sahip olan moleküllerdir. Nörotrofinler; Sinir Büyüme Faktörü (NGF), Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF), Nörotrofin-3 (NT-3), Nörotrofin-4 (NT-4), Nörotrofin-5 (NT-5)'i içeren bir salgı proteini ailesine dahildirler. Bu proteinler fonksiyonlarını, kendilerine özgü reseptörlerine bağlandıklarında gerçekleştirirler. Bütün nörotrofinler, p75 nörotrofin reseptörüne (p75NR) ve kendilerine özgü tirozin kinaz (Trk) reseptörlerine bağlanırlar. Şekil 2.31'de görüldüğü gibi;

- NGF; Trk A reseptörüne
- BDNF ve NT-4/5; Trk B reseptörüne
- NT-3 ise Trk C reseptörüne bağlanır.



Şekil 2.31. Nörotrofinler ve reseptörleri

Bağlanma sonucu Trk reseptörlerinin dimerizasyon ve otofosforilasyonu gerçekleşir. Böylece aktifleşmiş reseptörler sinyal iletimini başlatır. Bu sinyaller nukleusa geçip, transkripsiyon faktörlerini uyarır ve gen ekspresyonu böylece kontrol edilmiş olur. Ayrıca nörotrofinler, embriyonik dönemde nöronal gelişim ve yetişkin dönemde nöron canlılığının sürdürülmesinden sorumludurlar.

Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, 11. kromozomun 13. kısa kolunda (11p13) 27 633 016 baz çifti ile 27 699 872 baz çifti arasında bulunmakta olup, ilk kez 1989 da nörotropin ailesinin ikinci bir üyesi olarak tanımlanmıştır. BDNF nöronların büyümesini sağlayan dimerik küçük bir proteindir. BDNF öncelikle bir prekürsör protein olarak endoplazmik retikulumda sentezlenir. Sinyal peptidinin ayrılmasının ardından proBDNF golgi cisimciğine gelir ve hücre içi ya da hücre dışı süreçlerde BDNF oluşumu tamamlanır. BDNF, beyinde fazla miktarda bulunur ve yaygın olarak nöronlarda sentezlenir. Ancak özellikle nöron dışı hücrelerde mesane, kolon ve akciğerde de ekspresyonu vardır (Merighi ve ark. 2004, Zhou ve ark. 1996, Pinto ve ark. 2010).

BDNF üretiminin ve sekresyonunun çeşitli hastalıklarda değiştiği gözlenmiştir. Nörodejeneratif hastalıklarda azalırken (Alzheimer, Parkinson gibi), inflamatuvar

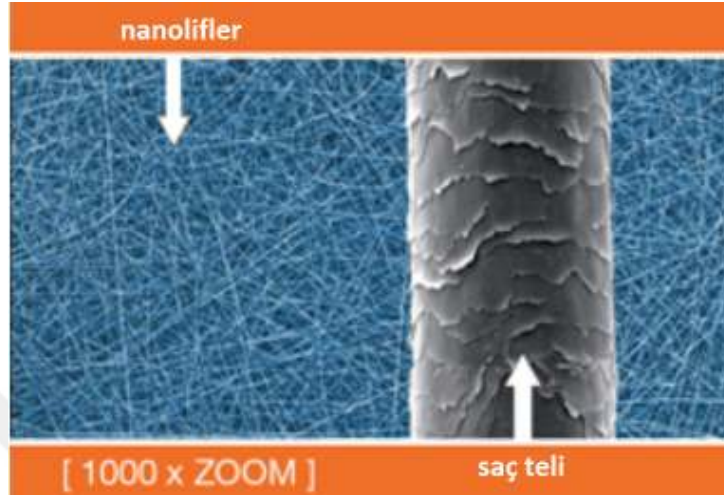
hastalıklarda inflamasyon dokusunda yüksek miktarda bulunmuştur (Gielen ve ark. 2003). Artmış olan BDNF sentezinin inflamatuvar durumlarda sinir hücrelerini koruduğu düşünülmektedir (Hohlfeld ve ark. 2006). Bu noktada BDNF'nin antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'yi artırıcı etkileri bulunmaktadır. BDNF, Trk B alıcılarına bağlanarak MAPK/ERK döngüsünü aktive etmekte ve bunun sonucunda artan CREB transkripsiyonu sinaptik plastisite ve nöron hayatta kalımı için gereken Bcl-2 sentezini artırmaktadır. Ayrıca psikiyatri literatüründe bipolar hastalık, şizofreni, anksiyete bozuklukları ve internet bağımlılığı gibi durumlarda serum BDNF düzeylerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Ayrıca BDNF'nin diğer görevleri de; nöronal canlılık ve farklılaşma, sinaptik iletişim ve esneklik, transmitter sentezi, metabolize edilmesi ve salgılanması, postsinaptik iyon kanalı akışı, dopaminerjik ve serotonerjik nöronların gelişimi ve canlılığının sağlanmasıdır (Jönsson ve ark. 2006).

BDNF geni üzerinde, birçok tek nükleotid polimorfizmi bulunmaktadır. Bu polimorfizmler popülasyona özgüdür ve hastalıklarla ilişkileri buna göre değişkenlik gösterir. Bu gende saptanmış olan Val66Met tek nükleotid polimorfizmi, alanin ve guanin allellerinde değişiklik göstermekle beraber, 66. kodonda valin ve metioninde yer değişikliğine yol açmaktadır. Bu polimorfizmde 196 numaralı nükleotidde Guanin>Adenin değişimi gerçekleştiğinden G196A şeklinde de adlandırılmaktadır. Bu gendeki fonksiyonel değişim (Val66Met), BDNF salınımına bağlı aktivite ve hücrelerarası trafiği etkilemektedir. Bu nedenle bu polimorfizmin başta şizofrenide olmak üzere, bipolar hastalığı vb. diğer psikiyatrik bozukluklarda incelenmesi gerekmektedir (Egan et al. 2003).

2.7. Nanolif ve Nanolif Üretimi

Nanoteknoloji, maddenin atomik-moleküler boyutta mühendisliğinin yapılarak yepyeni özelliklerinin açığa çıkarılması; nanometre ölçeğindeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması, kontrolü ve üretimi amacıyla, fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesidir (Bhardwaj ve Kundu 2010, Ramakrishna ve ark. 2005, Süpüren ve ark. 2007).

Bir nanometre, metrenin milyarda biridir. İnsan saç teli çapının yaklaşık 100 000 nanometre olduğu düşünülürse ne kadar küçük bir ölçekten bahsedildiği daha rahat anlaşılmaktadır (Şekil 2.32).



Şekil 2.32. İnsan saçının nanolifle karşılaştırılması
(<http://hemcon.com/Technologies/NanofiberSpinningTechnology.aspx>)

Nanolifler, çapları 1,0 mikrondan daha az olan lifler için kullanılan terimdir. Tipik nanoliflerin çapları 50 ile 300 nanometre arasındadır. Nanolifler yüksek moleküler oryantasyona sahiplerdir, küçük boyutları sayesinde daha az yapısal kusur taşırlar, bu sayede oldukça iyi mekanik özellikleri vardır, küçük çaplarından ötürü yüzey/hacim oranları veya yüzey/kütle oranları yüksektir, dolayısıyla yüksek spesifik yüzey alanlarına sahiplerdir.

Nanoliflerin geniş yüzey alanına sahip yapılar oluşturmaları, fonksiyonel grupları, iyonları ve çok çeşitli nano seviyedeki partikülleri tutma veya yayma kapasitelerinin yüksek olmasını sağlamaktadır.

Nanoliflerin biyomedikal ve sağlık alanında kullanımı konusundaki araştırma ve çalışmalar oldukça fazladır. Nanolifler, doğal dokular oluşmadan önce bu dokuların yerine geçebilecek geçici doku destekleri olarak kullanılabilirler. Ayrıca, kırık kemik, atardamar, kalp ve sinir dokuları için yapay doku destek yapısı olarak da kullanılabilirler. Kemik dokusu olarak kullanılacak materyalin vücut hücreleri

ile biyolojik uyumu çok önemlidir. Nanoliflerin yüksek yüzey/hacim oranı, diğer liflerden daha fazla hücre eklenebilmesini sağlamaktadır. Nanoliflerin bir diğer kullanım alanı da, ilaçların veya diğer fonksiyonel maddelerin, nanoliflerin veya nanotüplerin içerisine katılmasıdır. Böylece nanolifler, hem ilaç taşıyıcı, hem de ilaç salınım sistemi olarak görev yapmaktadırlar. Yüksek gaz geçirgenliği, yaranın enfeksiyon ve dehidratasyona karşı korunması gibi ihtiyaçlara cevap verdikleri için nanolif membranlar yanık ve yaralanma ile hasar görmüş cildi onarmak için kullanılan yara örtücü olarak kullanılmaktadırlar. Şimdiye kadar nanolifler gaz sensörleri, kimyasal sensörler, optik sensörler ve biyosensörlerde kullanılmıştır. Hacim başına düşen yüksek yüzey alanları nedeniyle nanoliflerden yüksek duyarlılığa ve hızlı tepki süresine sahip sensörler elde edilebilir (Agarwal ve ark. 2008).

Günümüzde nanolif üretimi, şablon sentezi, faz ayırımı, kendiliğinden düzenlenme, biyokomponent çekim, meltblowing, ani çekim ve elektrospın yöntemleri kullanılmak suretiyle gerçekleştirilebilmektedir.

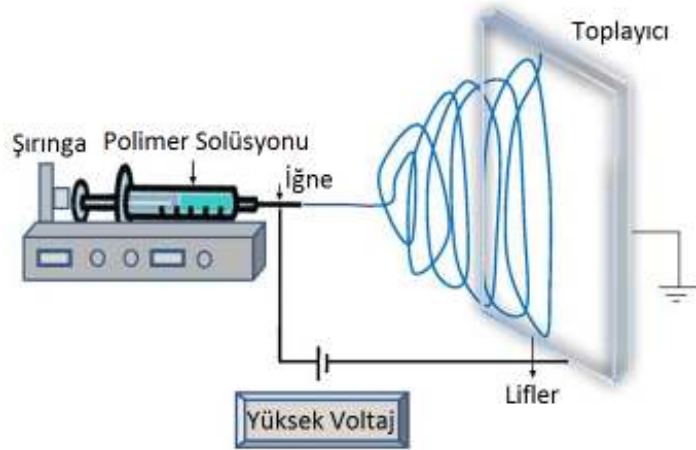
Elektrospın dışındaki lif üretim yöntemlerinde, lif üretiminde mekanik kuvvetleri esas etken olarak kullanılır. Öte yandan elektrospın yönteminde, elektrik alan kuvvetleri yardımı ile polimerden lif oluşumu sağlanır.

Elektrospın yöntemi, minimum ekipman gerektirmesi, oldukça ince lif çaplarının oluşumuna imkan vermesi, birçok farklı polimer ile çalışılabilmesi gibi avantajları nedeni ile tercih edilen nanolif üretim yöntemlerinden birisidir.

2.7.1. Elektrospın yöntemi ile nanolif üretimi

Polimer esaslı nanoliflerin üretimi için en etkin yöntem elektrospın yöntemidir. Bu teknikte, polimer uygun bir çözücüde çözüldükten veya ısı ile eritildikten sonra bir ucu kapalı ve daralan, öbür ucunda küçük bir delik bulunan cam bir pipetin (veya şırınganın) içine yerleştirilir. Elektrospın sistemi 3 temel bileşenden oluşur: pompa, yüksek voltaj güç kaynağı ve toplayıcı yüzeyi. Elektrospın işlemi sırasında polimer çözeltisinin yeterince yavaş ve kontrollü beslenmesini sağlamak amacıyla şırınganın arka kısmına

yerleştirilmiş otomatik bir pompa bulunmaktadır. Otomatik pompa, şırınga içerisinde bulunan polimer çözeltisini istenilen hızla gönderecek şekilde ayarlanır. Polimer çözeltisine verilen elektrik akımı ile elektriksel alan oluşturulur ve çözeltinin yüzeyinde bir elektriksel yüklenme meydana gelir. Başlangıçta, polimer çözeltisi kapiler uçta yüzey gerilimi sayesinde bir damla olarak durmaktadır. Gerilim yükseltildikçe, damlaya elektriksel yükler de etki etmeye başlar ve bu elektriksel kuvvetler yüzey gerilimini yenecek büyüklüğe ulaştığında, yüklü polimer çözeltisi veya eriyiği, kapiler uçtan topraklanmış levhaya doğru harekete başlar. Polimer çözeltisi veya eriyiğinin harekete başladığı noktada “Taylor konisi” olarak adlandırılan bir şekil oluşur. Elektrik alandaki bir miktar artış sonunda yüzey gerilimi daha fazla elektrostatik kuvveti dengeleyemez ve Taylor konisinden yüklü ince bir jet fırlatılır. Polimer jetinin levhaya doğru hareketi sırasında, çözgenin buharlaşmasıyla polimer jeti katılaşır ve topraklanmış levha üzerinde nano liflerden oluşan bir ağimsı tabaka elde edilir. Sonuç olarak toplayıcı levhada oluşan ağimsı yüzeyde çapları 30 nm' den 1 mikronun üzerindeki değerlere kadar değişen lifler üretilmektedir (Şekil 2.33) (Bhardwaj ve Kundu 2010, Ramakrishna ve ark. 2005, Süpüren ve ark. 2007).



Şekil 2.33. Elektrospin yöntemi ile nanolif üretiminin şematik gösterimi (Bhardwaj ve Kundu 2010)

Yüksek yüzey alanına/ hacim oranına ve nanometre mertebesinde çapa sahip çok ince fiber yapı elde edebilmek, çeşitli amaçlara yönelik işlevselleştirmede kolaylık sağlamak, işlem kolaylığı, ucuz ve üretim hızının yüksek olması, üstün mekaniksel özellikler gibi özellikleri elektrospin yönteminin önemli avantajlarıdır. Bu avantajlarının yanında,

kullanılan organik çözücülerden kaynaklanan toksisite ve ağ yapısının mekanik gücü gibi dezavantajları olduğu söylenebilir. Ayrıca oluşan lifin özelliklerini etkileyen birçok faktör olması da bir diğer dezavantajdır.

Elektrospinning yöntemiyle iletken polimerler, metaller, yarı iletkenler ve karbonlar ile çalışılarak nanometre mertebesinde çaplara sahip nanolif ve nanotüplerin üretimi gerçekleştirilir.

Doku mühendisliğinde, ilaç taşınım uygulamalarında, elektriksel ve optik uygulamalarda olmak üzere pek çok alanda elektrospinning yöntemiyle çalışmalar yapılmaktadır.

2.7.1.1. Elektrospinning yöntemini etkileyen parametreler

Elektrospinning sisteminde, son ürünün morfolojisi ve yapısı elektrostatik kuvvetlerin ve çözelti parametrelerinin sinerjik etkisinden etkilenmektedir (Ramakrishna ve ark. 2005). Bu parametreler arasında çözeltinin moleküler ağırlığı, viskozitesi, iletkenliği, yüzey gerilimi, pH'sı, uygulanan gerilim, akış hızı, toplayıcı levha ile iğne arasındaki mesafe, iğnenin çapı ve sıcaklık, nem, basınç gibi çevresel faktörler sayılabilir (Bhardwaj ve Kundu 2010, Ramakrishna ve ark. 2005, Süpüren ve ark. 2007).

- Konsantrasyonun çok düşük olması liflerde boncukların oluşmasına sebep olurken, çok yüksek konsantrasyonlarda yapılan üretim lif düzensizliğiyle sonuçlanmaktadır.
- Elektrospinning yönteminde yüksek dielektrik sabitli çözeltiler tercih edilir. Çünkü çözeltinin iletkenliği artarsa, polimer jetinde daha fazla yük taşınabilir. İletkenliği artırmak amacıyla çözelti içerisine iletken çözücüler, iyonik ya da non-iyonik yüzey aktif maddelerin ilavesi, organik ya da inorganik tuz ilavesi yapılabilir.
- İğne ile toplayıcı levha arasındaki mesafe arttıkça lif çapı azalmakta, lif çapı varyasyonu da azalmakta ve ayrıca liflerdeki boncuk boyutu azalmaktadır.
- İğne çapının azalması tıkanmaya, boncuk sayısında ve lif çapında azalmaya neden olur.

- Polimer eriyiğine ya da çözeltilisine uygulanan elektriksel gerilimin artması polimer jeti üzerindeki elektriksel ivme kuvvetini ve life uygulanan çekimi arttırarak, lif çapının azalmasına neden olmaktadır. Ancak uygulanan voltaj kritik bir değeri geçtiğinde stabil bir polimer jeti elde edilebilmektedir. Uygulanan elektrik alanı çok güçlü olduğunda stabilite azalmakta ve lif düzgünsüzlüğü artmaktadır.
- Sabit gerilim, konsantrasyon ve iğne-toplayıcı levha mesafesinde polimer besleme debisi arttıkça lif çapı da artmaktadır. Ancak, besleme debisinin çok artması lif düzgünsüzlüklerine sebebiyet vermektedir. Bunun nedeni, liflerin topraklanmış levhaya ulaşmadan önce kurumalarının zor olmasıdır. Polimer besleme debisi çok düşük olduğunda ise, lif çapları çok geniş bir dağılım göstermektedir.
- Viskozite arttıkça lif çapının da arttığı; ancak viskozitenin çok yüksek veya çok düşük olması durumlarında lif düzgünsüzlüğünün kötü etkilendiği, boncuklar ve damlacıkların oluştuğu saptanmıştır.
- Sıcaklık arttıkça çözücünün buharlaşma hızı artar. Ayrıca viskozitenin azalmasına ve çözünürlüğün artmasına neden olur. Tüm bunlar polimer jetinin uzamasına yardımcı olur ve daha düzgün dağılımlı nanolif yapıları elde edilir.
- Nemli ortamda gerçekleştirilen bir elektrospin işleminde, su moleküllerinin lif üzerinde yoğunlaşması ile gözenekli yapı meydana gelir. Aynı zamanda nem, çözelti içerisinde çözücünün buharlaşma hızını da azaltır.
- Elektrospin işlemi sırasında ortamdaki havanın bileşimi de çok önemlidir. Gazların elektrik alandaki davranışları birbirlerinden farklılık gösterir. Örneğin, helyum elektrik alanda bozulur ve elektroçekimi engeller. Basınç değeri atmosferik değerin altına düştüğünde iğnenin içindeki polimer çözeltisi dışarı akma eğiliminde olacaktır. Bu durumda karasız bir jet oluşmasına sebep olacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışması Uludağ Üniversitesi Bilim Araştırmalar Proje Birimi tarafından “Core/Sheat Nanolif Biyosensörler Yüzeyinde Farklı Spesifik Nükleik Asit Dizilerinin Hibridasyonunun Elektrokimyasal Olarak Tespiti” konulu OUAP(MH)-2014/23 no’lu proje ile desteklenmiştir.

Tez çalışması sırasında gerekli olan cihaz, sarf ve kimyasalların alımları bu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar ve kimyasallar

Tez çalışmaları sırasında kullanılan cihaz, donanım ve yazılımlar şunlardır;

- Potansiyostat - AUTOLAB AUT204 (Eco Chemie, Hollanda)
- Yazılım programı (software) – NOVA 1.11
- Referans elektrot - Ag/AgCl – BASI marka
- Yardımcı elektrot - Platin tel – BASI marka
- Çalışma elektrodu - Kalem grafit elektrot (PGE) (Rotring T 0,5, Tombo HB model 0.5mm)
- Çeker ocak
- Şırınga pompa sistemi – New Era Pump System
- Yüksek voltaj güç kaynağı – Gamma High Voltage Research
- Otomatik pipet seti

Tez çalışmaları sırasında kullanılan kimyasal maddeler ve sağlandığı firmalar şunlardır:

- | | |
|--|----------|
| • Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4), analytical-grade | SIGMA |
| • Potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4), analytical-grade | SCHARLAU |
| • Acetic acid(glacial) %100, analytical-grade | SIGMA |

• Sodium chloride, NaCl, analytical-grade	SCHARLAU
• Tris-Hydrochloride, Tris-HCl, analytical-grade	WISENT
• Sodium hydroxide, NaOH, analytical-grade	SIGMA
• Hydrochloric acid, HCl, 0,1N, analytical-grade	JT BAKER
• Trisodium citrate dihydrate, analytical-grade	SCHARLAU
• Primer-200nmol-21 baz-HPLC purified	ALPHA DNA
• Poliakrilonitril (PAN) (MW: 150 000)	SIGMA
• N,N-Dimethylformamide (DMF), analytical-grade	CARLO ERBA

Ayrıca çalışma sırasında kullanılacak çözeltilerin ve malzemelerin hazırlanmasında bölüm alt yapısında olan hassas terazi, manyetik karıştırıcı, pH metre, saf su cihazı, vorteks ve çözeltilerin saklanması buzdolabı kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çalışmada tampon çözelti olarak 0,05M Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) (pH:7,4), 0,50M Asetat Tampon Çözeltisi (ABS) (pH: 4,8) ve 0,02M Tris-HCl tampon çözeltisi (TBS) (pH:7,0), Saline-Sodium Citrate (SSC) Tampon Çözeltisi (20X, pH 7,0) kullanılmıştır. Tampon çözeltilerinin hazırlanmasında 18 Mega-ohm'luk ultra saf su kullanılmıştır. Hazırlanan tampon çözeltilerinin pH'ları, hazırlanan 0,1N'lik NaOH veya 0,1N'lik HCl çözeltilerinin eklenmesiyle istenilen değerlere getirilmiştir. Tamponlar hazırlık sonrasında cam şişelerde, buzdolabında +4°C'de saklanmıştır (Aladag 2008).

Elektrospin yöntemi ile nanolif üretimi için stok PAN çözeltisi kütlece %8'lik olacak şekilde DMF içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır (Aykut ve ark. 2013).

3.1.3. Kullanılan DNA dizileri ve hazırlanışı

Çalışmada model oluşturması açısından Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör (BDNF) geninin aşağıda kırmızı renkle belirtilen 196. pozisyonundaki Guanin bazının, Adenin Bazına transisyonu sonucunda, genin 66. kodonundaki valin aminoasidinin, Metionin'e

değişimine sebep olan val66met, tek nükleotid polimorfizmini (SNP) saptamaya yönelik olarak sentetik oligomerler kullanılmıştır (Anonim 2015(a), Anonim 2015(b)). Literatürde bu mutasyonun elektrokimyasal biyosensörle tayinine yönelik kayıta rastlanmamıştır.

```

1201    cccatgggac tctggagagc gtgaatgggc ccaaggcagg ttcaagaggc ttgacatcat
1261    tgctgacac tttcgaacac gtgatagaag agctgttga tgaggaccag aaagttcggc
1321    ccaatgaaga aaacaataag gacgcagact tgtacacgct cagggtgatg cttagtagtc
1381    aagtccttt ggagcctcct cttctctttc tgctggagga atacaaaaat tacctagatg
1421    ctgcaaacat gtccatgagg gtccggcgcc actctgaccc tgcccgccga ggggagctga

```

Yukarıda altı çizgili olan ve koyu harflerle gösterilen, Val66Met polimorfizmini içeren bölge biyosensör yüzeyine tutturulacak prob dizisi (WTP), bu dizinin karşılığı olan komplementer dizi de hedef dizi (WTT), aynı şekilde polimorfizm görünen diziler için de prob (MTP) ve hedef (MTT) olarak belirlenmişlerdir. Ayrıca geliştirilecek biyosensör sisteminin seçiciliği bakımından da hedef diziden tamamen farklı bir komplementer olmayan dizi (NC) de belirlenmiştir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan sentetik prob ve hedef dizileri

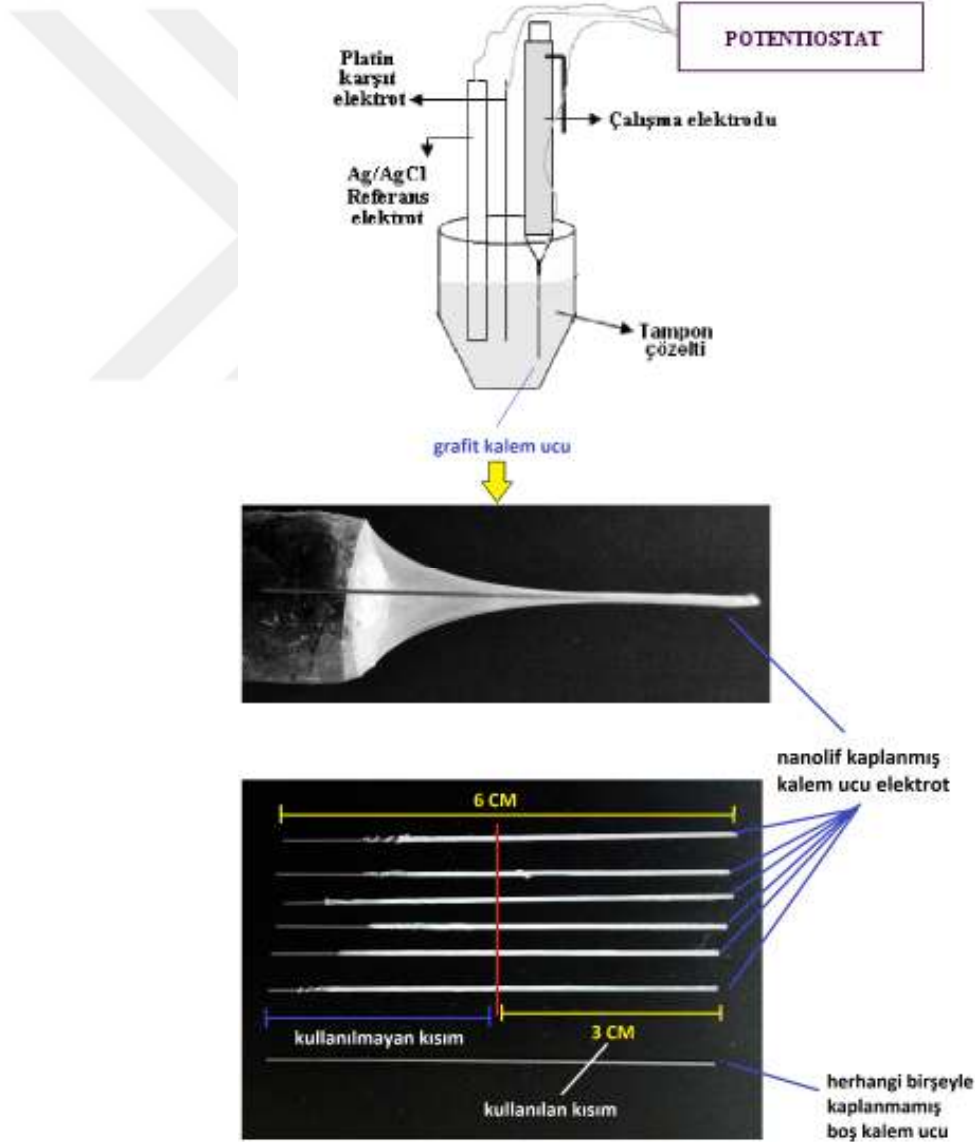
WTP	5'-GAA CAC GTG ATA GAA GAG-3'
WTT	5'-CTC TTC TAT CAC GTG TTC-3'
NC-1	5'-ATT GAG CAG TGA AGT GCA-3'
MTP	5'-GAA CAC ATG ATA GAA GAG-3'
MTT	5'-CTC TTC TAT CAC ATG TTC-3'

Çalışmada kullanılan tüm bu sentetik diziler liyofilize olarak ALPHA DNA(Kanada)'dan sağlanmıştır. Prob ve hedef dizi stok çözeltileri 1000µg mL⁻¹ derişiminde olacak şekilde deoksiribonükleaz (DNAz) ve ribonükleaz (RNAz) içermeyen ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır ve DNAz ve RNAz içermeyen 0,2ml'lik tüplere 50µL'lik hacimlerde olacak şekilde paylaştırılarak -20°C'de saklanmıştır.

3.1.4. Deney düzeneğinin ve elektrotların hazırlanışı

Ölçümü DPV tekniğinden yararlanılarak yapılan bu çalışmada, potansiyostat cihazı olarak AUTOLAB AUT204 model (Eco Chemie, Hollanda) ve yazılım programı olarak NOVA 1.11 kullanılmıştır.

Üçlü elektrot sistemi olarak ise, kalem grafit elektrot çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrot ve platin de karşıt elektrot olarak kullanılmıştır. Bu üçlü elektrot sistemin daldırıldığı ölçüm çözeltisinin hacmi 10ml olacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 3.1. Deney düzeneği ve PGE'nin hazırlanışı

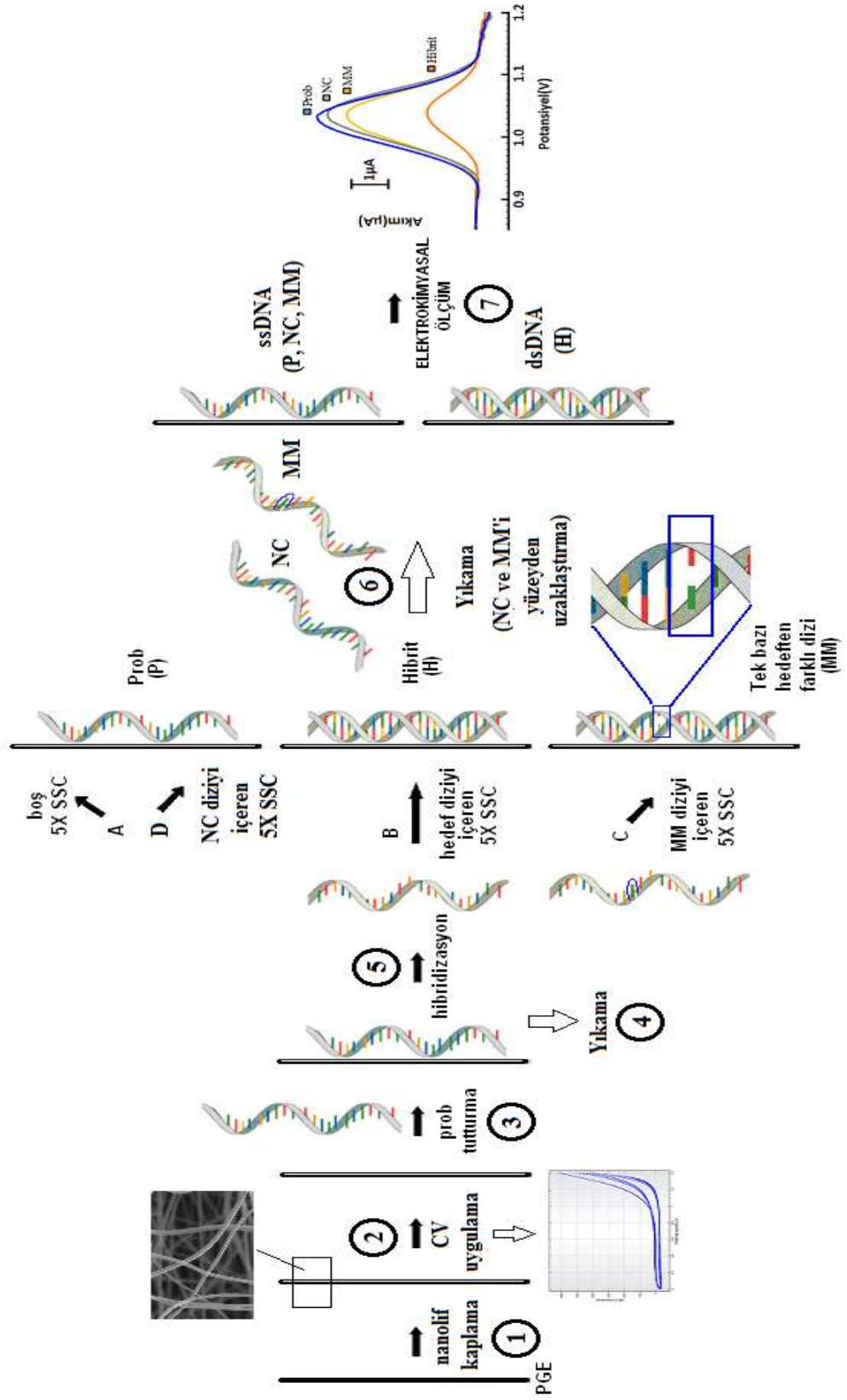
Çalışmamızda çalışma elektrodu olarak kullanılan, kalem grafit elektrotun (Rotring Rotring T 0,5 kalem, Tombo HB model 0,5mm uç) elektrosin yöntemi ile nanolif kaplandıktan sonra, 6cm olan grafit uçları tekrarlanabilirliğin sağlanması açısından nanolif kaplanan kısımdan 3cm olacak şekilde kesildi. Bu 3cm'nin 1,5cm'lik kısmı işaretlenerek, 1cm'lik kısmı çözelti içine daldırılacak şekilde sisteme yerleştirildi (Şekil 3.1.). Her bir deneme için farklı grafit uç yüzeyleri oluşturularak tek kullanımlık elektrot sistemi sağlanmış oldu.

3.2. Yöntem

Yapılan ön çalışmalara göre yöntem olarak indikatörsüz olarak DNA'daki Guanin bazının yükseltme sinyaline dayalı yöntemin kullanılmasına karar verilmiştir. DNA'daki en elektroaktif ve kararlı yanıt veren baz guanin bazıdır ve yaklaşık +1,0V civarında yükseltgenir. Bu yöntemin prensibinde elektrot yüzeyine tutturulan tek sarmal DNA dizisindeki guaninler açık olduğu için yükseltgenme sinyali yüksek, hibridizasyondan sonra ise sitozinle aralarında oluşturdukları hidrojen bağı köprüleri nedeniyle yükseltgenmesi kısmen kapalı duruma gelir ve bu nedenle tek sarmala göre daha düşük sinyal verir (Mascini ve ark. 2001, Lucarelli ve ark. 2008, Aladağ ve ark. 2010). Buna bağlı olarak alınan sinyal tek sarmal sinyali değerinde veya buna yakın ise hibridizasyonun olmadığı, çift sarmal sinyali değerinde veya buna yakın bir değer ise de hibridizasyonun olduğunu gösterir. Çalışmada sensör yüzeyine tutturulan prob dizisi sağlıklı dizi olduğu için hibridizasyonun gözlemlenmesi hastalığın arandığı örnekte bize mutasyonun olmadığını, hibridizasyonun gözlemlenmemesi ise mutasyonun varlığını göstermektedir. Çalışma süresince alınan sonuçlar buna göre değerlendirilmiştir.

Deneysel aşamalar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 3.2):

- PGE yüzeyinin PAN nanoliflerle kaplanması
- PAN kaplı PGE yüzeyinin CV ile önışleme tabi tutulması
- Prob tutturma (adsorbsiyon)
- Yıkama
- Hibridizasyon
- Yıkama
- Elektrokimyasal Ölçüm



Şekil 3.2. Nanolif kaplı PGE yüzeyinde, BDNF genindeki Val66Met polimorfizminin elektrokimyasal olarak saptanmasına ait deneysel aşamaların şematik olarak gösterimi

3.2.1. Elektrot yüzeyinin PAN nanoliflerle kaplanması

Kütlece %8 oranında hazırlanan PAN çözeltisinden şırınga ile 5ml çekilerek elektrospin düzeneğine yerleştirilmiştir. Elektrospin düzeneği şırınga pompası, güç kaynağı ve alüminyum folyo ile kaplı topraklanmış levhadan meydana gelmiştir (Şekil 3.3).

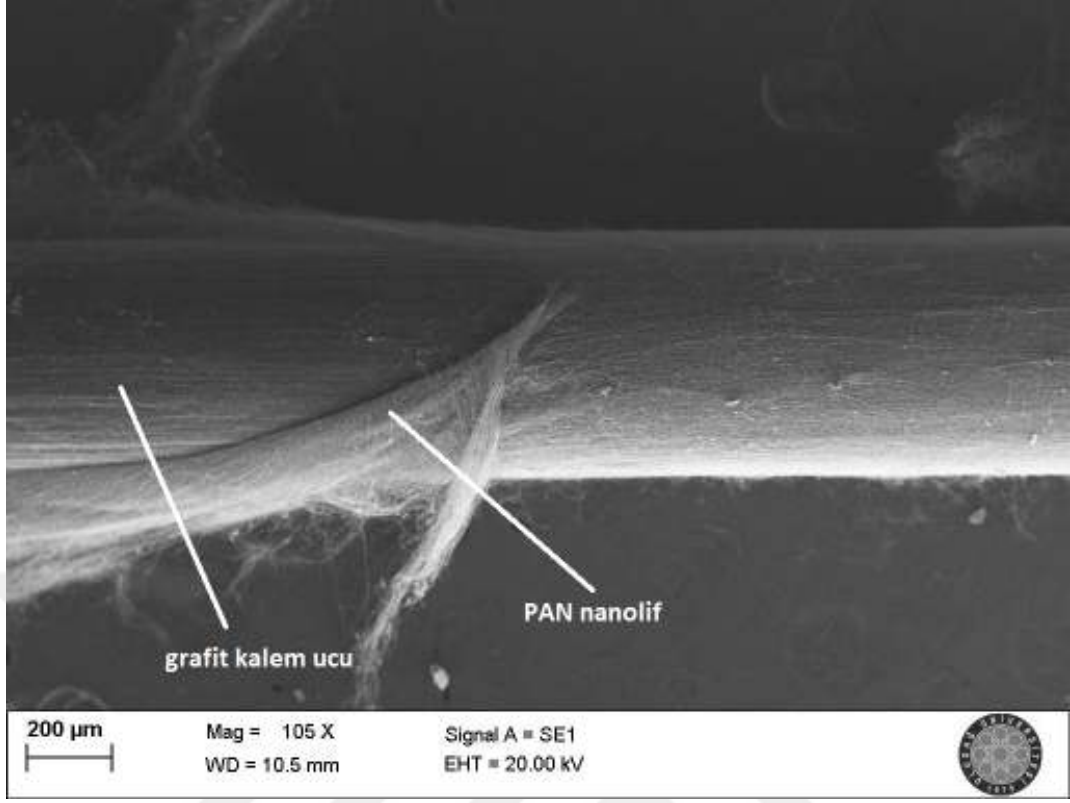


Şekil 3.3. Elektrospin düzeneği

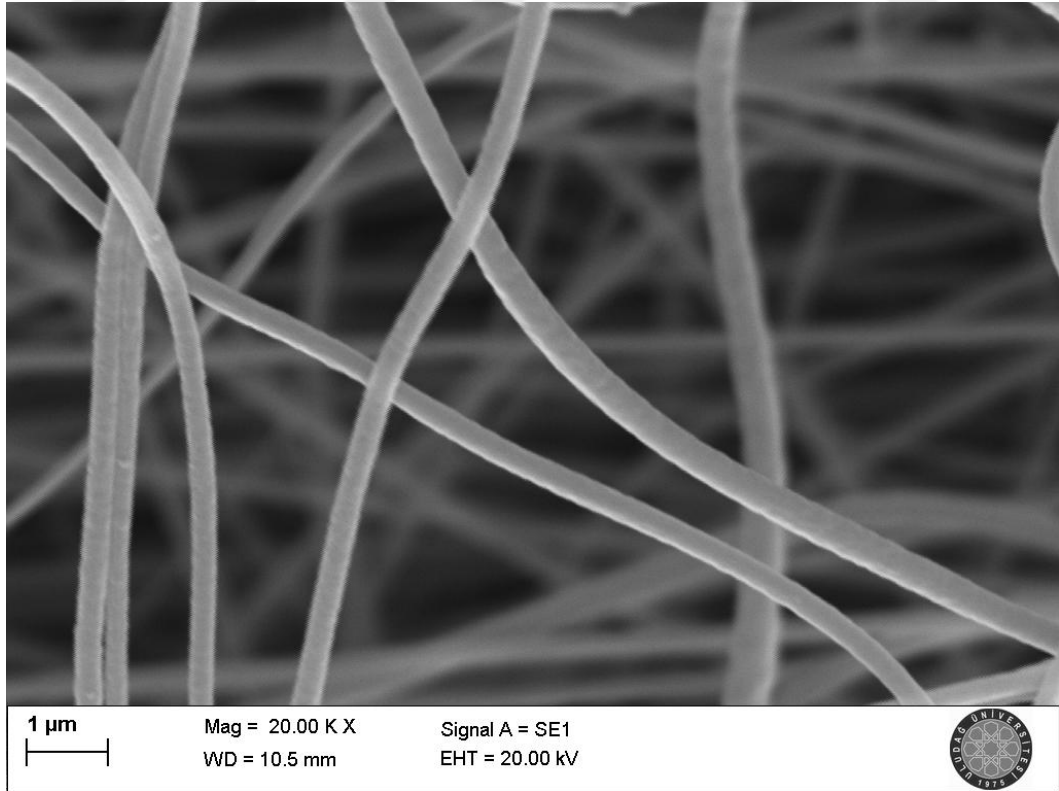
Elektro çekim yöntemiyle PAN nanoliflerin topraklanmış levhada oluşumu gözlemlendikten sonra, kalem uçları tek tek topraklanmış levhanın önünde tutulup, sabit hızda döndürülerek tüm yüzeyinin nanolifle kaplanması sağlanmıştır (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).

Elektro çekim işlemi sırasında uygulanan proses parametreleri aşağıda verilmiştir:

- Çözelti konsantrasyonu: %8
- Uygulanan gerilim: 10kV
- Şırınga-toplayıcı arası mesafe: 10cm
- Çözelti besleme oranı: 1,5 μ l/s



Şekil 3.4. PAN nanolif ile kaplanmış PGE yüzeyinin SEM görüntüsü



Şekil 3.5. PGE yüzeyindeki PAN nanoliflerin SEM görüntüsü

3.2.2. Elektrot yüzeyine prob tutturulması

Tüm PAN kaplanmış elektrot yüzeyleri deney öncesinde 0,5M asetat tampon çözeltisi (pH: 4,8) içine daldırılarak 100mV/s tarama hızında 0,5V ile 1,2V arasında siklik voltametri de 5 kez taranmıştır. Böylece elektrokimyasal olarak elektrot yüzeyinin temizlenmesi hem de aktivasyon işlemi gerçekleşti.

5X SSC çözeltisi (pH: 7,0) içerisinde çeşitli derişimlerde hazırlanan ve 75µl olacak şekilde PCR tüplerine dağıtılan prob çözeltileri içerisinde, aktive edilmiş PAN kaplı elektrotlar belirli sürelerle daldırılarak yüzeye adsorbsiyon yoluyla prob tutturulması sağlanmıştır. Bağlanmadan sonra, yüzey bir kez boş 5X SSC çözeltisi içerisinde daldırılıp çıkarılarak elektrot yüzeyine bağlanmayan prob dizilerinin yüzeyden uzaklaştırılması sağlanmıştır.

3.2.3. Hibridizasyon

Prob tutturulduktan sonra yıkanan elektrotlar 15µg ml⁻¹ konsantrasyonunda ayrı ayrı hedef dizi (WTT), tek bazı farklı hedef dizi (MTT) ve hedef olmayan dizi (NC) içeren 5X SSC çözeltilerine belli sürelerde daldırılarak elektrot yüzeyinde hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon işleminden sonra elektrotlar, yüzeye spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için karıştırmalı olarak 5X SSC çözeltisi (pH: 7,0) içerisinde yıkanmıştır.

3.2.4. Elektrokimyasal ölçüm

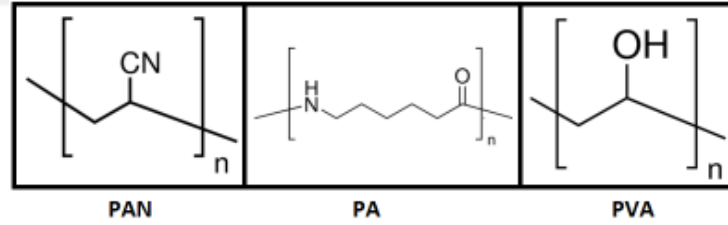
DPV tekniği kullanılarak, boş ABS çözeltisi (pH: 4,8) içerisinde, +0.85V'dan +1.2V'a kadar, 50mV amplitütte ve 8mV adım potansiyeli uygulanarak DNA'nın Gaunin bazının yükseltgenme sinyali ölçülmüştür. Elde edilen ham eğriler potansiyostattaki NOVA 1.11 yazılım sistemi kullanılarak her bir örneğe ait pik yükseklikleri değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

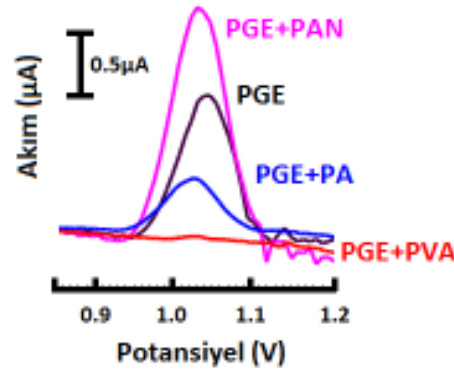
Bu çalışmada her bir ölçüm en az üç kez tekrarlanarak elde edilen sonuçlar histogram ve voltamogramlarla gösterilmiştir.

4.1. Çalışmaya Uygun Nanolif Polimerinin Bulunması

Çalışmamızda Poliamid (PA), Polivinil alkol (PVA) ve poliakrilonitril (PAN) polimer çözeltileri kullanılarak elektrospin yöntemi ile grafit yapısındaki kalem ucu elektrot yüzeyimizde nanolifler oluşturulmuştur. Daha sonra nanolif kaplı elektrot yüzeyine adsorbsiyonla prob dizisi tutturulmuş ve guanin bazının yükseltgenme sinyali değerlerine bakılmıştır. PVA kaplı yüzeyden hiç sinyal alınmazken, PA kaplı olandan çok az guanin sinyali alınabilmiştir (Şekil 4.2). PAN kaplı yüzeyden ise oldukça yüksek guanin sinyali alınmıştır ve projemizdeki amaç PGE yüzeyini nanolif kaplayarak yüzey alanını arttırıp daha yüksek guanin sinyali almak olduğu için çalışmaya PAN nanolifle devam edilmiştir.



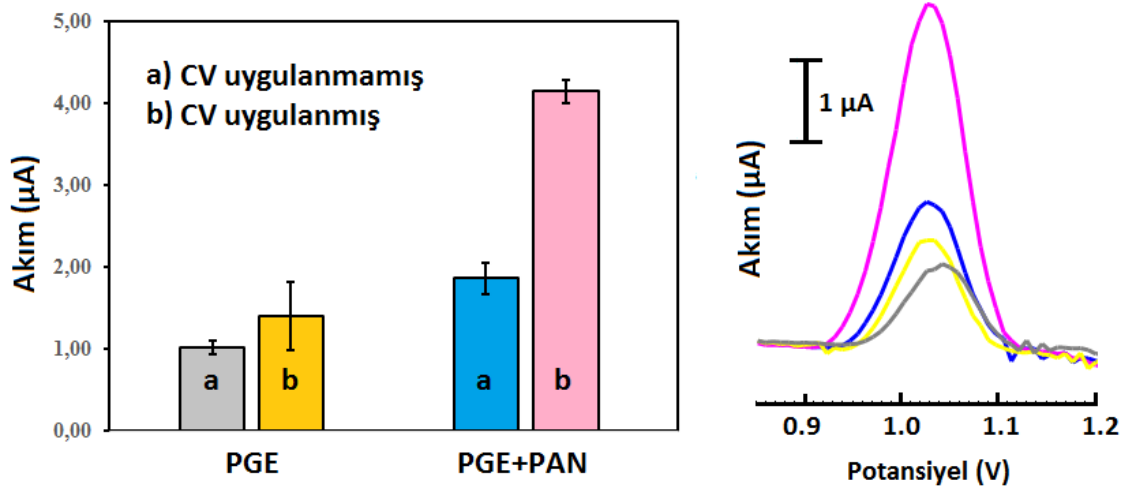
Şekil 4.1. PAN, PA ve PVA'nın kimyasal yapısı



Şekil 4.2. PGE yüzeyine kaplanan çeşitli nanoliflere tutturulan DNA'dan alınan guanin sinyallerine ait voltamogram

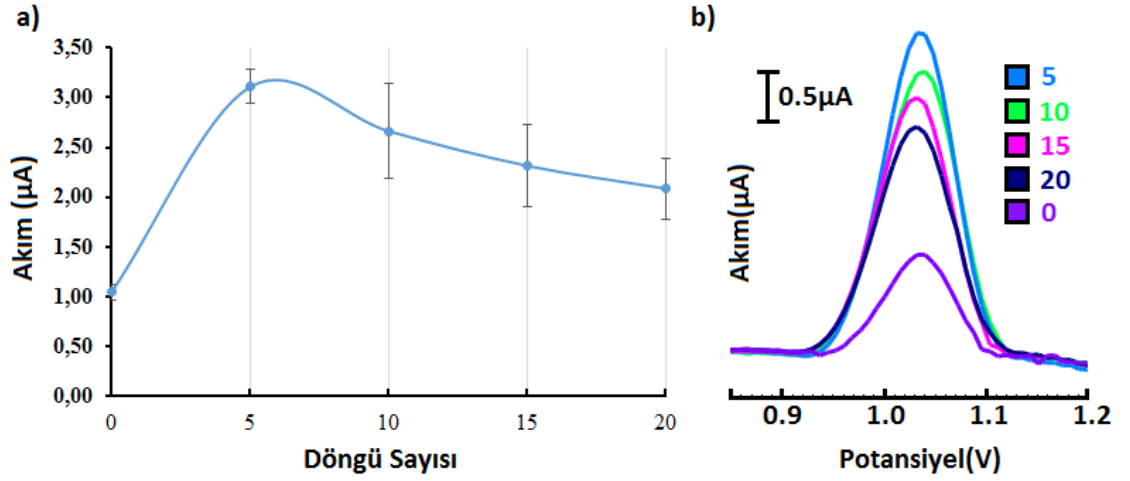
4.2. Nanolif Kaplı Yüzeve CV Uygulaması

Boş PGE yüzeyi ve PAN kaplanmış PGE yüzeyleri prob tutturulmadan önce 0,5M asetat tampon çözeltisi (pH: 4,8) içine daldırılarak 100mV/s tarama hızında 0,0V ile 1,2V arasında siklik voltametri 5 kez tarandı ve daha sonra yüzeve prob immobilizasyonu sağlandı. Siklik voltametri yapıp prob tutturulan yüzeylerle, siklik voltametri yapılmadan prob tutturulan yüzeylerden alınan guanin sinyalleri karşılaştırıldı. Böylece elektrokimyasal olarak elektrot yüzeyinin temizlenmesi hem de aktivasyon işlemi gerçekleştirilmiş oldu. CV uygulaması, nanolif kaplı olmayan PGE yüzeyinde yaklaşık %40'lik bir sinyal artışına sebep olurken, PAN nanolif kaplı PGE yüzeyinde ise %125'lik bir sinyal artışına sebep olduğu görüldü. Hiçbirşey uygulanmamış PGE yüzeyinden alınan guanin sinyali ile nanolif kaplı ve CV uygulanmış PGE yüzeyinden alınan guanin sinyalleri karşılaştırıldığında ise yaklaşık 4 katlık bir sinyal artışı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).

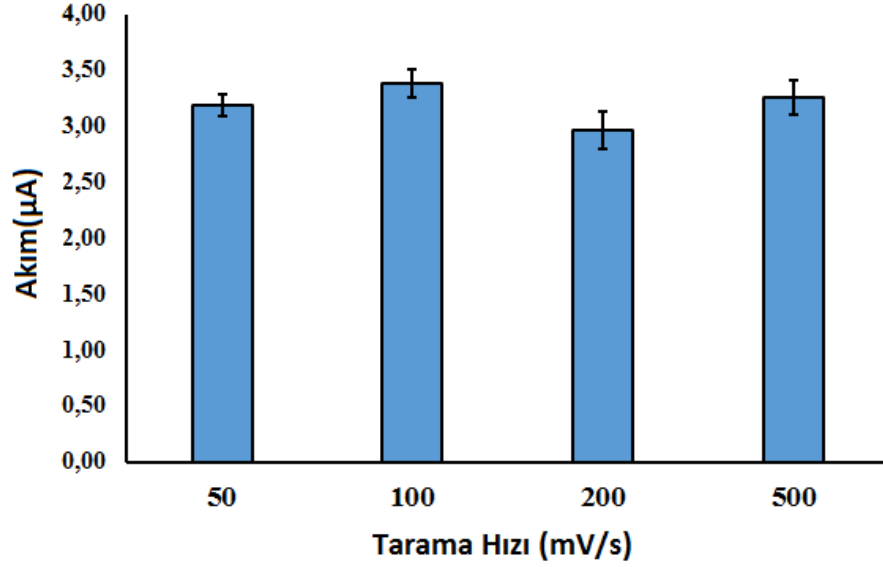


Şekil 4.3. Nanolif kaplı ve boş PGE yüzeyinde CV uygulanmadan ve CV uygulandıktan sonra alınan guanin sinyallerine ait histogram ve voltamogram

CV uygulanmasından sonra görülen artış doğrultusunda CV de uygulanan tarama sayısı ve hızı çalışmaları da yapıldı. Tarama sayısı olarak 0-5-10-15-20 döngü sayısı ve tarama hızı olarak 50-100-200-500mV/s denendi. En iyi sinyal artışı 5 tarama sayısında gözlemlendi (Şekil 4.4). Tarama hızının çok etkisi olmadığı gözlemlendi ve tekrarlanabilirliğinin iyi olması sebebiyle çalışmalara 100mV/s tarama hızında devam edildi (Şekil 4.5).

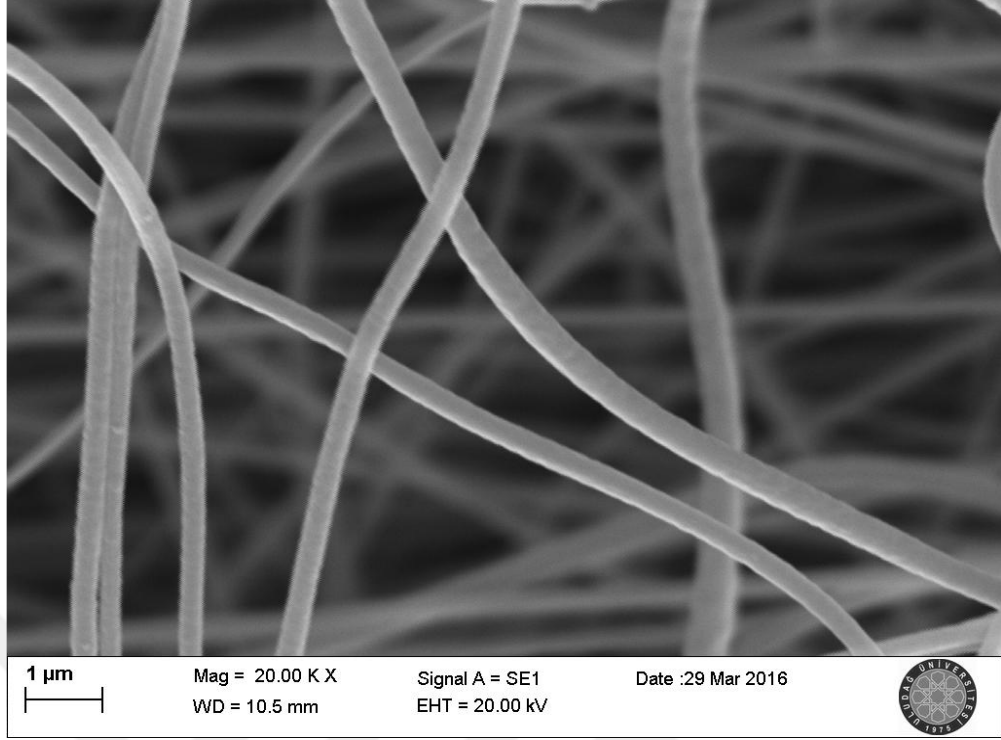


Şekil 4.4. Nanolif kaplı PGE yüzeyinde CV uygulamasındaki döngü sayısına göre alınan guanin sinyallerine ait grafik ve voltamogram

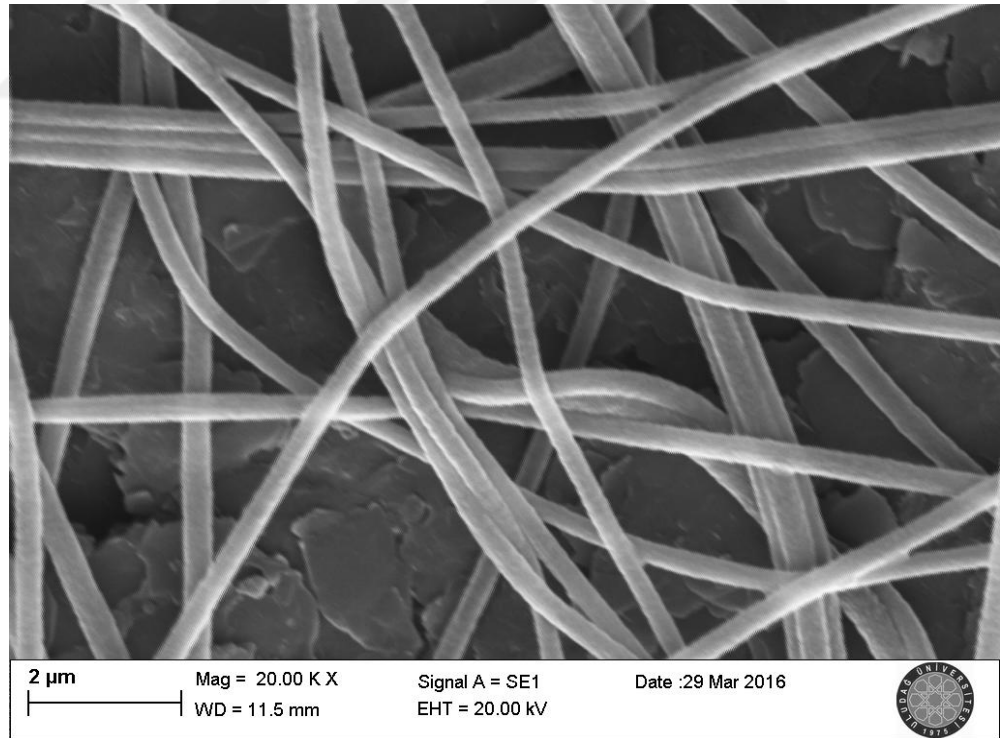


Şekil 4.5. Nanolif kaplı PGE yüzeyinde CV uygulamasındaki tarama hızına göre alınan guanin sinyallerine ait histogram

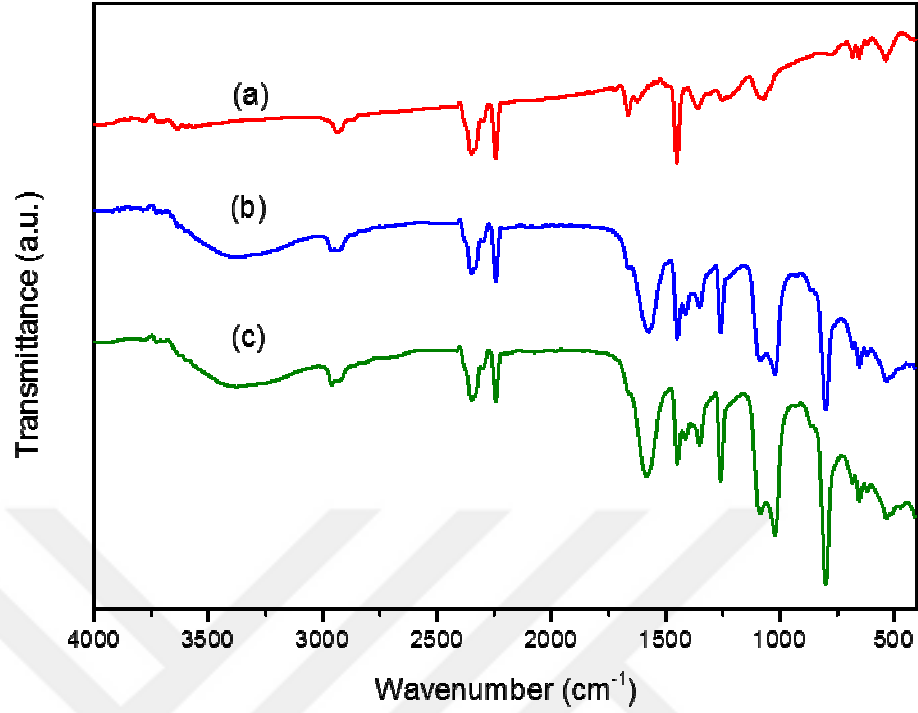
CV uygulamasının yüzeyde ne tür bir değişikliğe sebep olduğunu görebilmek amacıyla CV uygulanmış ve CV uygulanmamış yüzeylerin SEM ve FTIR analizleri de yapıldı. SEM görüntülerinde herhangi bir farklılık gözlemlenmedi. FTIR analizlerinde ise yine CV uygulanan ve uygulanmayan yüzey arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmezken, kalem ucuna tutturulan ve kalem ucuna tutturulmayan PAN arasında farklılıklar gözlemlendi.



Şekil 4.6. PGE yüzeyindeki CV uygulanmamış PAN nanoliflerin SEM görüntüsü



Şekil 4.7. PGE yüzeyindeki CV uygulanmış PAN nanoliflerin SEM görüntüsü

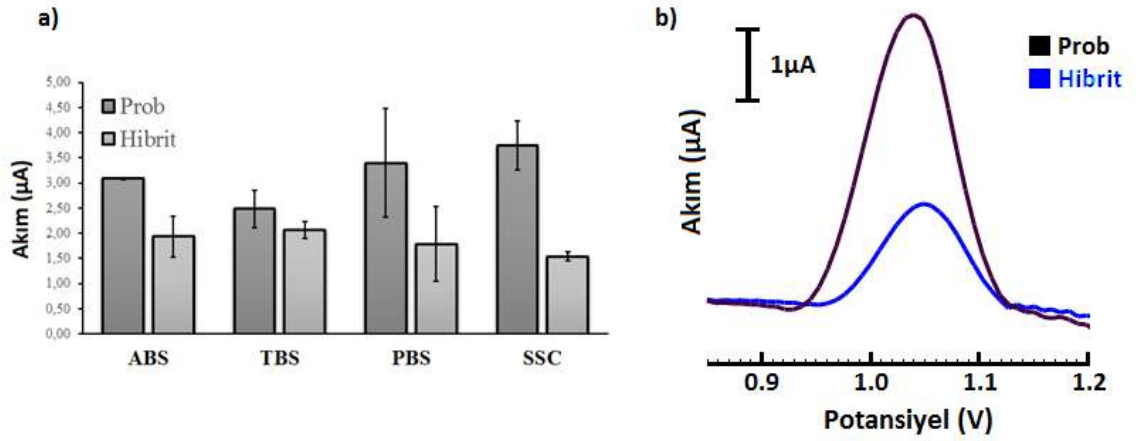


Şekil 4.8. a) Hiçbir yere tutturulmamış, herhangi birşeye maruz bırakılmamış PAN nanoliften, b) PGE yüzeyine tutturulmuş ve CV uygulanmış PAN nanoliften c) PGE yüzeyine tutturulmuş ve CV uygulanmamış PAN nanoliften alınan FTIR sonuçları

Alınan sonuçlar doğrultusunda tüm nanolif kaplı PGE'lere prob tutturma işleminden önce 100mV/s tarama hızında 0,5V ile 1,2V arasında siklik voltametricde 5 kez taranarak CV işlemi uygulandı.

4.3. Prob ve Hibridizasyon Tamponu Çözeltilerinin Bulunması

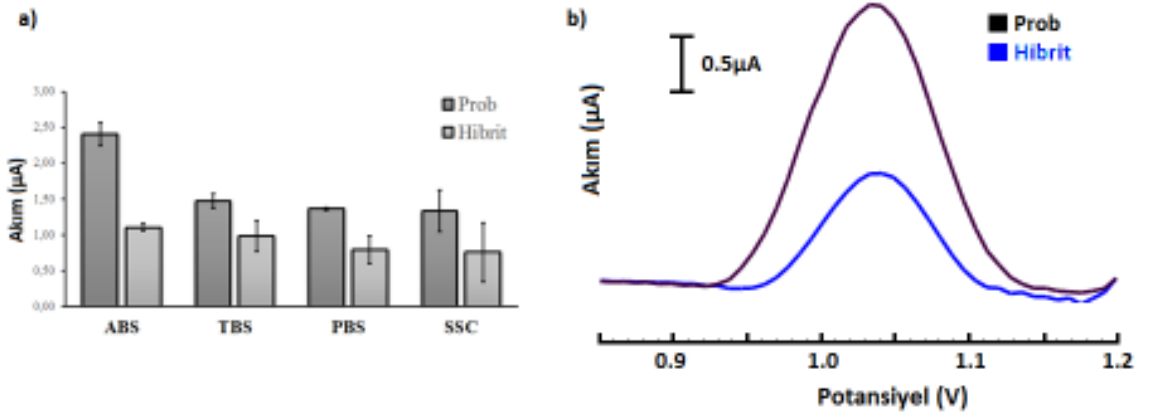
Çalışmada ölçüm tamponu olarak ABS çözeltisi sabit olarak tutulup, prob çözeltileri ve hibridizasyon çözeltileri ayrı ayrı 5X SSC, TBS, ABS ve PBS kullanılarak hazırlanmıştır. Çalışmada, prob diziden alınan sinyalinin olduğunca yüksek, hibrit diziden alınan sinyalin de mümkün olduğu kadar düşük ve tekrarlanabilir olması esas alınarak en uygun prob ve hibridizasyon çözeltisinin 5X SSC tampon çözeltisi (pH: 7,0) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. a) Prob ve hibridizasyon tamponu çözeltilerinin bulunması çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram b) 5X SSC de alınan voltamogram

4.4. Ölçüm Tamponu Çözeltilsinin Bulunması

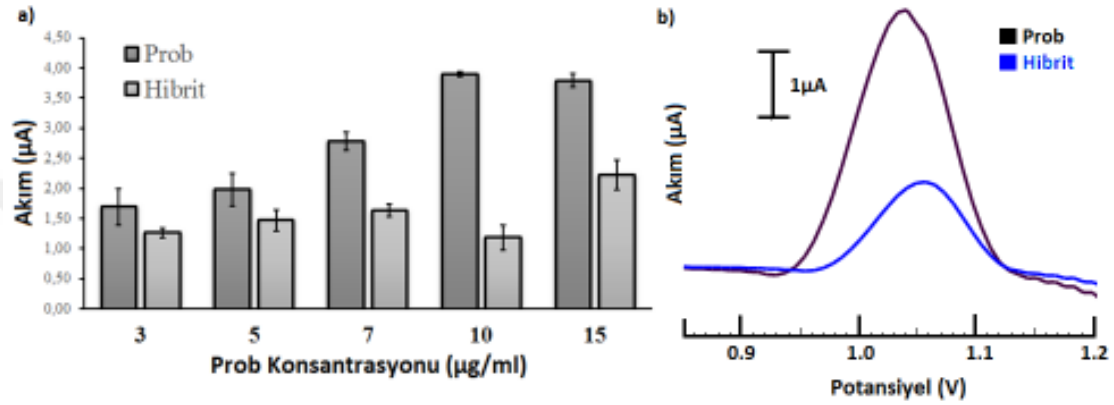
Çalışmada prob ve hibridizasyon tampon çözeltisi olarak 5X SSC sabit olarak tutulup, ölçümler ayrı ayrı 5X SSC, TBS, ABS ve PBS tampon çözeltilerinde yapılmıştır. Çalışmada, prob diziden alınan sinyalinin olduğunca yüksek, hibrit diziden alınan sinyalin de mümkün olduğu kadar düşük olması esas alınarak en uygun ölçüm tampon çözeltisinin ABS tampon çözeltisi (pH: 4,8) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. a) Ölçüm tamponu çözeltisinin bulunması çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram b) ABS'de alınan voltamogram

4.5. Prob Konsantrasyonunun Bulunması

Çalışmada, prob dizinin (WTP) tam karşılığı olan hedef dizinin (WTT) konsantrasyonu $15\mu\text{g ml}^{-1}$ sabit tutulurken, prob dizinin konsantrasyonu $3 - 15\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonları arasında arttırılmıştır. Bu diziler arasındaki hibridizasyondan sonra alınan Guanin sinyal değerleri Şekil 4.11’de görülmektedir.



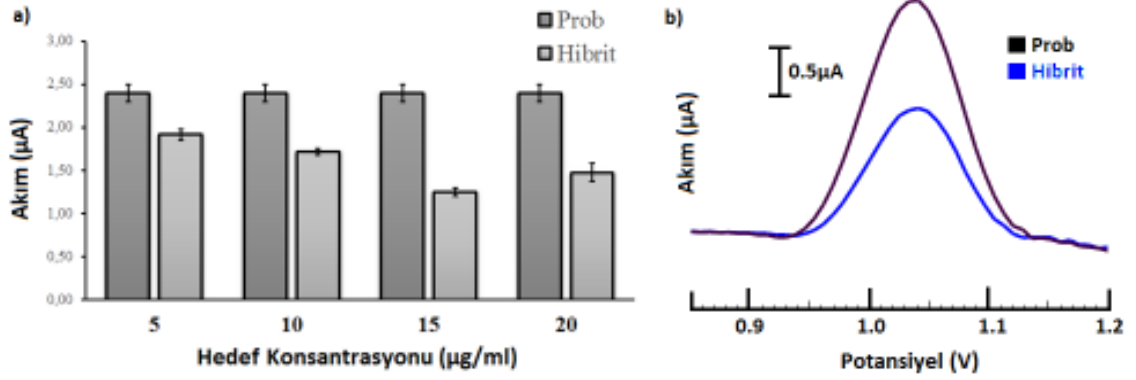
Şekil 4.11. a) Prob konsantrasyonu çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram b) $10\mu\text{g ml}^{-1}$ probe konsantrasyonunda alınan voltamogram

Çalışmada, prob diziden alınan sinyalinin olduğunca yüksek, hibrit diziden alınan sinyalin de mümkün olduğu kadar düşük olması esas alınarak en uygun prob konsantrasyonunun $10\mu\text{g ml}^{-1}$ olduğu tespit edilmiştir.

4.6. Hedef Konsantrasyonunun Bulunması

Çalışmada, prob dizinin (WTP) konsantrasyonu $10\mu\text{g ml}^{-1}$ sabit tutulurken, tam karşılığı olan hedef dizinin konsantrasyonu $5 - 20\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonları arasında arttırılmıştır. Bu diziler arasındaki hibridizasyon aşamasından sonra Guanin sinyal değerleri Şekil 4.12’de görülmektedir.

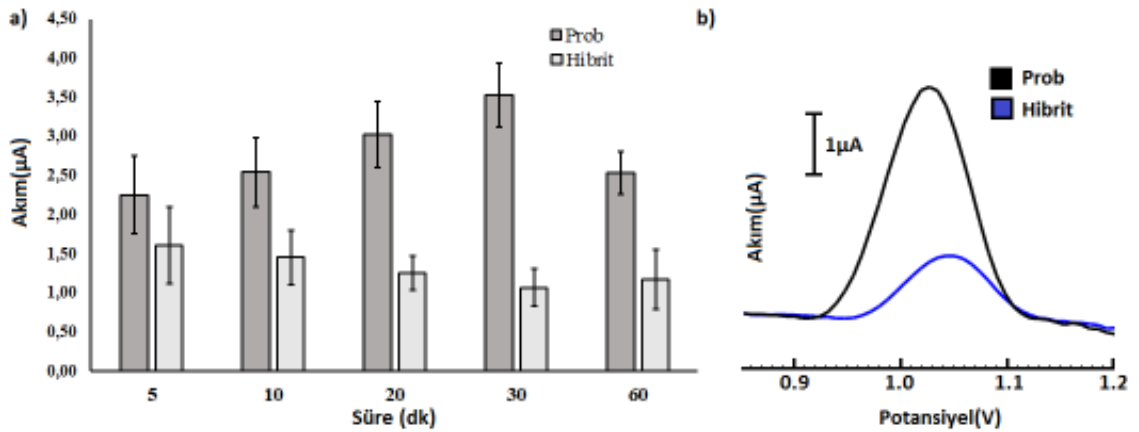
Çalışmada, prob diziden alınan sinyalinin olduğunca yüksek, hibrit diziden alınan sinyalin de mümkün olduğu kadar düşük olması esas alınarak en uygun hedef konsantrasyonunun $15\mu\text{g mL}^{-1}$ olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. a) Hedef konsantrasyonu çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram b) 15µg ml⁻¹ hedef konsantrasyonu ile alınan voltamogram

4.7. Prob Tuturma ve Hibridizasyon Sürelerinin Bulunması

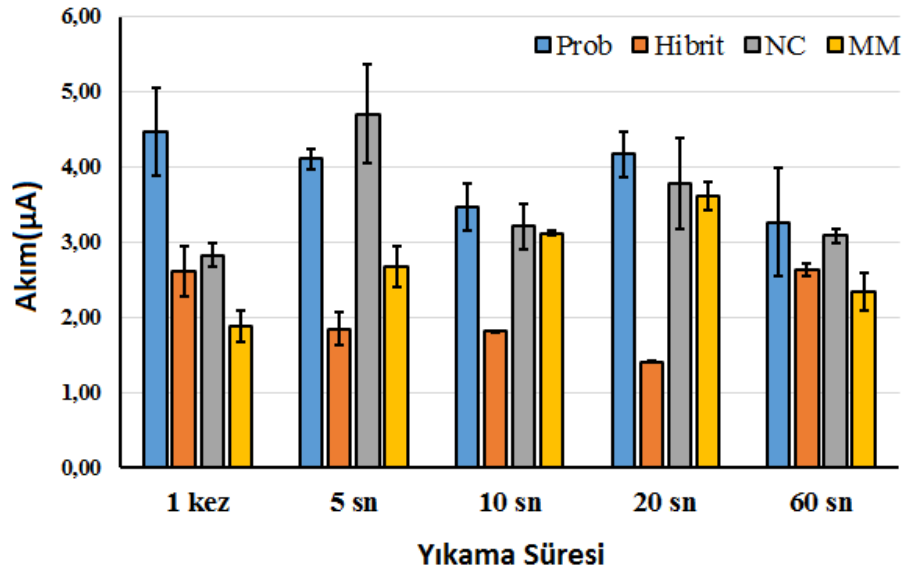
Çalışmada 5X SSC tamponu içerisinde 10µg mL⁻¹ prob (WTP) ve 15µg mL⁻¹ hedef (WTT) dizi içeren çözeltiler hazırlanarak, prob tuturma süresinin saptandığı çalışmada hibridizasyon süresi 30dk olacak şekilde sabit tutulup, prob tuturma süresi 5–60dk arasında değiştirilirken, hibridizasyon süresinin saptandığı çalışmada ise prob tuturma süresi 30dk olacak şekilde sabit tutulup, hibridizasyon süresi 5–60dk arasında değiştirilerek nanolif kaplı PGE yüzeyinde hibridizasyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Bu çalışmada da, prob diziden alınan sinyalinin olduğunca yüksek, hibrit diziden alınan sinyalin de mümkün olduğu kadar düşük olması esas alınarak en uygun prob tuturma ve hibridizasyon sürelerinin 30dk olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. a) Prob tuturma ve hibridizasyon sürelerinin bulunması çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram b) 30dk’da alınan voltamogram

4.8. Hibridizasyondan Sonraki Yıkama Süresinin Belirlenmesi

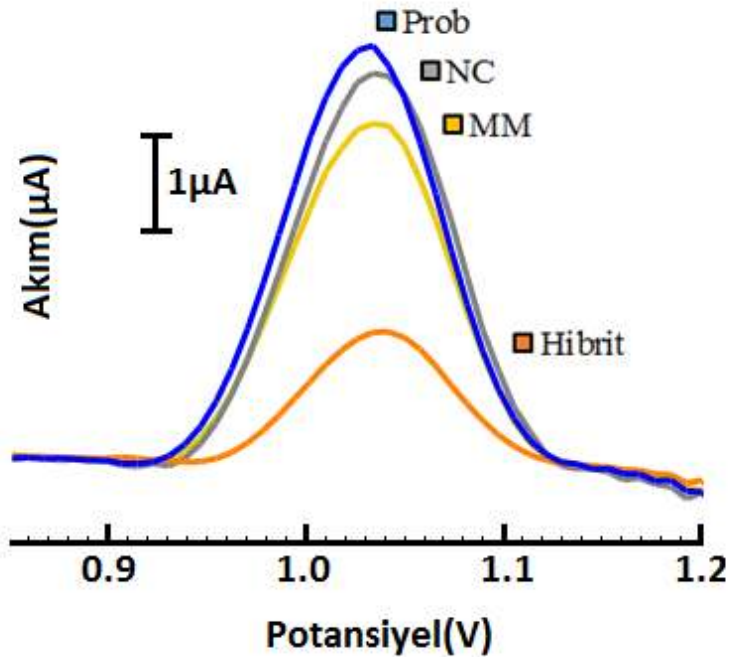
Çalışmada ayrıca spesifik olmayan bağlanmaların azaltılması ve biyosensör seçimliliğini arttırmak amacıyla hibridizasyondan sonraki yıkama süreleri de değerlendirildi. Bunun için ilk olarak CV işlemi uygulanmış PAN nanolif kaplı PGE elektrotlar $10\mu\text{g ml}^{-1}$ prob dizi (WTP) içeren 5X SSC çözeltisi içerisinde daldırılarak 30dk boyunca yüzeye prob dizilerinin tutunması sağlandı. Daha sonra tutunmayan dizilerin yüzeyden ayrılmasını sağlamak amacıyla, probu hazırladığımız tampon çözeltisi olan 5X SSC içerisinde 1 kez daldırılıp çıkarılarak yıkandı. Daha sonra yıkanan elektrotlar $15\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonunda ayrı ayrı hedef dizi (WTT), tek bazı farklı hedef dizi (MTT) ve hedef olmayan dizi (NC) içeren 5X SSC çözeltilerine 30dk boyunca daldırılarak elektrot yüzeyinde hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon işleminden sonra elektrotlar, yüzeye spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için 1 kez daldırılıp çıkarılarak ve 5 – 10 – 20 – 30 – 60s karıştırmalı olarak 5X SSC çözeltisi (pH: 7,0) içerisinde yıkanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada da, prob diziden alınan sinyalinin olduğunca yüksek, hibrit diziden alınan sinyalin de mümkün olduğu kadar düşük, NC ve MM dizilerinden alınan sinyalin prob dizisine yakın bir değerde olması esas alınarak en uygun yıkama süresinin 20s olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Hibridizasyondan sonraki yıkama süresinin belirlenmesi çalışmasında elde edilen guanin bazı sinyallerine ait histogram

4.8. Geliştirilen Biyosensörün Özgünlüğünün Tayini:

Geliştirilen biyosensör sistemiyle hibridizasyon tayinleri sentetik diziler kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için, CV işlemi uygulanmış PAN nanolif kaplı PGE elektrotlar $10\mu\text{g ml}^{-1}$ prob dizi (WTP) içeren 5X SSC çözeltisi içerisinde daldırılarak 30dk boyunca yüzeye prob dizilerinin tutunması sağlandı. Daha sonra tutunmayan dizilerin yüzeyden ayrılmasını sağlamak amacıyla, probu hazırladığımız tampon çözeltisi olan 5X SSC içerisine 1 kez daldırılıp çıkarılarak yıkandı. Daha sonra yıkanan elektrotlar $15\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonunda ayrı ayrı hedef dizi (WTT), tek bazı farklı hedef dizi (MTT) ve hedef olmayan dizi (NC) içeren 5X SSC çözeltilerine 30dk boyunca daldırılarak elektrot yüzeyinde hibridizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon işleminden sonra elektrotlar, yüzeye spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için 20s karıştırılmalı olarak 5X SSC çözeltisi (pH: 7,0) içerisinde yıkanmış ve prob, hibrit, NC ve MM dizilerinin ayırımı sensör yüzeyinde gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak tek sarmal olan prob diziden alınan sinyal en yüksek, hibrit diziden alınan sinyal en düşük, NC ve MM dizilerinden alınan sinyalin de hibridizasyon meydana gelmediği için prob dizisine yakın bir değerde olduğu görülmüştür (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Geliştirilen biyosensörün özgünlüğünü gösteren voltamogram

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışması kapsamında, Alzheimer, Parkinson, Bipolar Bozukluk gibi nörodejeneratif hastalıklarda sıklıkla gözlenen nörotrofik faktörler ailesinin bir üyesi olan BDNF geninde meydana gelen guanin bazının adeninle yer değiştirmesi sonucu BDNF geninin 66. kodonundaki valin aminoasidinin metionine yer değiştirmesine (Val66Met) sebep olan tek nokta mutasyonunun elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile algılanması amaçlanmıştır.

Kanser, diabetes, alzheimer, bazı kardiyovasküler hastalıklar ve migren gibi hastalıkların tek nokta mutasyonları (SNP) ile bağlantılıdır. DNA örneklerinde spesifik SNP allelleri incelenerek bireylerin hastalıklara yatkınlıklarını belirlemek amacıyla tarama yapılabilmektedir. Günümüzde SNP'leri analiz etmede, ilgili bölgeleri amplifiye etmek için spesifik primerler kullanılır. Daha sonra bu amplifiye edilen bölgeler DNA sekanslama veya DNA mikroarray gibi bir dizi yöntem kullanılarak analiz edilir. Tanıyı kolaylaştırmak için bugüne kadar, pek çok mutasyon tarama yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemler, süre, pratik uygulanabilirlik, maliyet gibi özellikleri göz önünde tutularak kullanılmaktadır.

Mutasyon taraması için hangi yöntemin kullanılacağı biyolojik materyal çeşidine, nükleik asite, saptanacak mutasyonun daha önceden bilinip bilinmediğine, saptanacak potansiyel mutasyonların ne kadar fazla olduğuna, kullanılacak metodun ne kadar güvenilir olduğuna ve ne ölçüde standardize edilebileceğine, testin nasıl uygulanacağına, rutin tanı için uygun olup olmadığına, ne kadar sürede yanıt vereceğine ve testin maliyetine göre değişmektedir.

Val66Met polimorfizminin tayinine yönelik literatürlerde genelde kullanılmakta olan yöntemler, RFLP (restriction fragment length polymorphism), RT-PCR ve DNA sekanslama yöntemleridir (Clarke ve ark. 2016, İamjan ve ark. 2015, Tonacci ve ark. 2013). Ancak, bu pahalı, zaman alıcı teknikler uzmanlık ve oldukça zaman alan örnek hazırlama süreçleri gerektirmektedir. Tez kapsamında ilk kez bu polimorfizmin sentetik dizilerle de olsa DNA biyosensörleri kullanılarak elektrokimyasal olarak tespiti gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında yapılan ön çalışmalarda, guanine dayalı yani indikatörsüz bir ayırımın mümkün olduğu görülmüş ve yöntem olarak indikatörsüz hibridizasyon algılama yöntemi kullanılmıştır. Herhangi bir indikatör kullanmadan yapılan bu tayin ile, indikatör gereksinimini ortadan kaldırılarak tayin süresi en aza indirilmiştir (yaklaşık 65dk). Bunun için de DNA'daki en elektroaktif ve kararlı yanıt veren baz olan guanine bazının yaklaşık +1,0 V civarında verdiği yükseltgenme sinyali değerlerine bakılmıştır. Hibridizasyon olmadıysa, elektrot yüzeyine tutturulan tek sarmal DNA dizisindeki guaninler açık olduğu için yükseltgenme sinyali yüksek, hibridizasyon olduysa ise de sitozinle aralarında oluşturdukları hidrojen bağı köprüleri nedeniyle guaninin yükseltgenmesi kısmen kapalı duruma gelir ve bu nedenle tek sarmala göre daha düşük sinyal verir.

Çalışmada, literatürdeki biyosensör yüzeyinden alınan sinyali arttırmaya yönelik yapılan çalışmalardan farklı olarak ilk defa kalem grafit elektrot yüzeyine elektrospin yöntemi ile nanolif kaplanması sağlanmıştır (Liu ve ark. 2009, Pardo ve ark. 2015).

İlk olarak nanolif olarak kullanılacak polimerin karar verilmesi amacıyla PA, PVA, PAN polimerlerinden elektrospin yöntemi ile kalem grafit elektrot yüzeyine nanolif kaplanması sağlanmış ve bu yüzeylere tek sarmal WTP dizisi adsorbsiyon yöntemi ile tutturularak yüzeyden alınan guanine sinyalleri değerlendirilmiştir. PVA kaplı yüzeyden hiç sinyal alınmazken, PA kaplı olandan çok az guanine sinyali alınabilmiştir (Şekil 4.2). PVA kaplı elektrot yüzeyinde guanine sinyali alınamamasının sebebi suda çözünen bir polimer olduğu için tampon çözeltisi içerisindeyken çözünüp elektrot yüzeyinden ayrılmış olması olabilir. PAN kaplı yüzeyden ise oldukça yüksek guanine sinyali alınmıştır ve projemizdeki amaç PGE yüzeyini nanolif kaplayarak yüzey alanını arttırıp daha yüksek guanine sinyali almak olduğu için çalışmaya PAN nanolifle devam edilmiştir.

Sistemin hassasiyetini arttırmaya yönelik yapılan çalışmalarda, nanolif kaplı elektrot yüzeyine prob tutturmadan önce CV uygulaması yapıp, daha sonra yüzeye DNA tutturulduğunda yüzeyden alınan guanine sinyalinin CV uygulanmamış ve nanolif kaplı olmayan PGE yüzeyine göre 4 kat arttığı gözlemlendi. Aynı şekilde nanolif kaplı

olmayan PGE yüzeyine CV uygulanıp DNA tutturulduğunda da yüzeyden alınan guanin sinyalinde yaklaşık %40 lık bir artışa sebep olduğu görülmüştür (Şekil 4.3). Literatürde böyle bir çalışmaya veya sonuca rastlanmamıştır. Bunun sebebinin CV uygulaması sırasında yüzeydeki fonksiyonel grupların ortaya çıkarak veya tampon çözeltisindeki iyonların yüzeyde toplanmasını sağlayarak DNA'nın yüzeye daha iyi tutunmasını sağlaması olduğu düşünülmektedir. Böylece elektrot yüzeyinin hem temizlenmesi sağlanmış hem de yüzey aktivasyonu gerçekleştirilmiştir.

CV uygulanmasından sonra görülen artış doğrultusunda CV de uygulanan tarama sayısı ve hızı çalışmaları da yapıldı. Tarama sayısı olarak en iyi sinyal artışı 5 tarama sayısında gözlemlendi (Şekil 4.4). Tarama sayısının 5 ten fazla olduğu zaman yüzeyde alınan guanin sinyalinde düşüş olduğu görüldü. Bunun sebebinin belli bir taramadan sonra yüzeyin bozularak DNA'yı tutma kapasitesinin azalması olduğu düşünülmektedir. Tarama hızının ise çok etkisinin olmadığı, PAN kaplı yüzey hızlı da taransa yavaş da taransa herhangi bir değişimin olmadığı gözlemlendi.

CV uygulamasının yüzeyde ne tür bir değişikliğe sebep olduğunu görebilmek amacıyla CV uygulanmış ve CV uygulanmamış yüzeylerin SEM ve FTIR analizleri de yapıldı. SEM görüntülerinde herhangi bir farklılık gözlemlenmemesi PAN yapısında herhangi bir fiziksel değişimin meydana gelmediğini göstermiştir. FTIR analizlerinde ise yine CV uygulanan ve uygulanmayan yüzey arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmezken, kalem ucuna tutturulan ve kalem ucuna tutturulmayan PAN arasında farklılıklar gözlemlendi. Bu da kalem ucu ile PAN arasında kimyasal bir etkileşimin olabileceğini göstermiştir.

Bir diğer çalışmada; ABS (pH:4,8), TBS (pH:7,0), PBS (pH:7,4) ve 5X SSC (pH:7,00) prob ve hibridizasyon tamponlarının, hibridizasyona etkisi incelenmiştir (Şekil 4.9). Hibridizasyon sonrasında guanin sinyallerinde meydana gelen azalma miktarları göz önüne alındığında en uygun yanıt 5X SSC (pH:7,00) tampon çözeltisi ile alınmıştır. Bunun sebebi SCC tamponu içerisinde bulunan fazla tuz miktarı olabilir (3M). Çünkü iyonik güç çift sarmal yapının stabilizasyonu için önemli bir faktördür. Aynı şekilde ölçüm tamponu için yapılan çalışmada da en iyi farklanmanın ABS (pH:4,8)'de olduğu

görülmüştür (Şekil 4.10). Bunun nedeni ise asidik pH da DNA'nın kendi üzerine katlanma durumunun azalması ile guaninden daha iyi sinyal alınmasıdır. Bu üç tampon çözeltisinde de 20 mM konsantrasyonunda NaCl tuzu bulunmaktadır. Bunun sebebi Li^+ , Na^+ , K^+ ve Mg^{2+} gibi pozitif yüklü iyonlar DNA'nın negatif yüklü fosfat grupları ile etkileşime girerek DNA'nın yükünü nötralize ederler ve DNA molekülleri arasındaki elektrostatik itme kuvvetini azaltırlar.

Prob konsantrasyonu için yapılan çalışmada en uygun prob konsantrasyonu değeri olarak, elektrot yüzeyinde doyumluğa ulaşılan konsantrasyon olan ve prob-hibrit arasında en iyi farklanmanın yakalandığı $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ bulunmuştur (Şekil 4.11). Elektrot yüzeylerindeki düşük prob konsantrasyonlarında alınan düşük sinyal değeri sınırlı sayıda biyolojik tanıma yüzeyi oluşturarak az miktarda tek sarmal DNA'nın yakalanmış olduğunu gösterirken, belli bir konsantrasyondan sonra ise yüzeyde yoğun olarak bulunan prob ve hedef DNA arasında sterik ve elektrostatik etkileşime neden olduğu görülmüştür. Hedef konsantrasyonu için yapılan çalışmada ise prob-hibrit arasında en iyi ayırımın olduğu $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ tercih edilmiştir (Şekil 4.12). Bu çalışmada da yine belli bir hedef konsantrasyonunun altında tam bir hibridizasyon görülmezken, belli bir konsantrasyonun üzerine çıktığında da sterik etkiden dolayı hibridizasyon oranının düştüğü gözlemlenmiştir.

Prob tutturma ve hibridizasyon sürelerinin belirlenmesinde de yine pprob ve hibritten alınan sinyallere göre 30dk en iyi süre olarak seçilmiştir. Süre arttıkça probun yüzeye tutunması ve hibridizasyon artarken, belli bir süre sonunda DNA'nın kendi üzerine katlanma eğiliminden dolayı sinyallerde düşüş gözlemlenmiştir (Şekil 4.13).

Çalışmada ayrıca spesifik olmayan bağlanmaların azaltılması ve biyosensör seçimliliğini arttırmak amacıyla hibridizasyondan sonraki yıkama süreleri de değerlendirildi. Yıkama koşullarının optimize edilmesi ile spesifik olmayan bağlanmalar önlenmiş ve hibrit ile tamamen farklı dizi(NC) ve tek bazı hedeften farklı dizi (MM) arasında anlamlı bir fark elde edilmiştir. En iyi sonuç 20s karışan ortamda yıkama ile elde edilmiştir. Belli bir süreden sonra guanin sinyallerinin düşmesi ve

birbirine yaklaşması, fazla yıkamadan dolayı DNA dizilerinin yüzeyden uzaklaşmaya başladıklarını göstermektedir (Şekil 4.14).

Kısaca özetleyecek olursak, çalışmada kullanılacak en uygun prob, hedef ve ölçüm tamponu çözeltilerinin belirlenmesinde, en uygun prob ve hedef konsantrasyonlarının belirlenmesinde, en uygun prob tutturma ve hibridizasyon sürelerinin belirlenmesinde ve en uygun yıkama süresinin belirlenmesinde tek sarmal DNA'da gözlenen guaninin oksidasyon sinyalinin, dsDNA(hibrit) ve tek bazı eşleşmemiş DNA(MM)'dan daha fazla olması esas alınmıştır ve mümkün olan en iyi ayırımın sağlandığı koşullar en iyi tayin koşulları olarak belirlenmiştir. Buna göre en uygun prob ve hedef tamponu 5X SSC (pH: 7,00), ölçüm tamponu ABS (pH: 4,8), prob konsantrasyonu 10 µg mL⁻¹, hedef konsantrasyonu 15 µg mL⁻¹, prob tutturma ve hibridizasyon süresi 30 dakika, hibridizasyondan sonraki yıkama süresinin 20 saniye olduğu görülmüştür. Bu koşullar altında yapılan analizde elde edilen voltamogram Şekil 4.15'de görülmektedir. Tek sarmal DNA da yani hibridizasyon meydana gelmemiş dizilerde (prob, NC ve MM dizilerinde) guaninler açık olduğu için yükseltgenme sinyali yüksek, hibridizasyondan sonra ise sitozinle aralarında oluşturdukları hidrojen bağı köprüleri nedeniyle yükseltgenmesi kısmen kapalı duruma geldiğinden tek sarmala göre daha düşük sinyal vermesi beklenmiştir (Mascini ve ark. 2001, Lucarelli ve ark. 2008, Aladağ ve ark. 2010). Sonuç olarak tek sarmal olan prob diziden alınan sinyal en yüksek, hibrit diziden alınan sinyal en düşük, NC ve MM dizilerinden alınan sinyalin de hibridizasyon meydana gelmediği için prob dizisine yakın bir değerde olduğu görülmüştür. Ayrıca bu sonuç, geliştirilen biyosensörün seçimli şekilde hedefine bağlandığını ve polimorfizm tayininin mümkün olduğunu göstermiştir.

Literatürde BDNF geninde görülen Val66Met polimorfizminin elektrokimyasal DNA biyosensörleriyle tayinine yönelik herhangi bir kayıta rastlanmamıştır. Yöntemimizin kolay uygulanabilir olması, pahalı ekipmanlara gerek duyulmaması, hızlı cevap veren bir sistem olması ve herhangi bir toksik veya radyoaktif ajanın kullanılmaması nedenleriyle klasik yöntemlere güçlü bir alternatif yöntem olması ve bu konuda çalışma yapacak araştırmacılara basamak oluşturacağı düşünülmektedir.

Nanolif kaplı yüzeye CV uygulanarak sinyal artışının gözlemlenmesi ile ilgili literatürde herhangi bir bilgiye ulaşılmamıştır. Bundan sonraki çalışmalarda bu uygulamayla ilgili daha farklı çalışmalar planlanıp, farklı yüzeylerde de uygulanabilirliğinin kontrolü sağlanacaktır.

Çalışmada günümüzde sıkça kullanılan nanoteknolojik yüzeylerin kullanılması ile hibridizasyon tayinini en yüksek hassasiyette gerçekleştirebilen, kullanılan yöntemlere alternatif hızlı ve ileride ticari olarak da üretilebilecek bir sistem geliştirilmiştir.

Literatürde ilk defa PGE yüzeyi elektrospin yöntemi ile nanolifle kaplanmış oldu. Elektrot yüzeyindeki bu yapının nanoboyutta olması elektrodun spesifik yüzey alanını arttırdığından, minimum yüzey alanından maksimum sinyal alınması sağlanarak sistemin çip teknolojisine de uygulanabilirliğini göstermiştir.

Bu prototip biyosensör ile sadece bu gibi polimorfizmlerin ve mutasyonların tespiti değil, çevre, gıda, tıbbi tanı ve klinik uygulamalarda da kullanılacak mikroçip teknolojisinin altyapısı oluşturulmuş oldu.

KAYNAKLAR

- Agarwal, S., Wendorff, J.H., Greiner, A., 2008.** Use of Electrospinning Technique for Biomedical Applications, *Polymer*, 49, 5603–5621.
- Aladağ, N. 2008.** Elektrokimyasal DNA Biyosensörleri ile Vitamin D Reseptör Genindeki Polimorfizmlerin Saptanması. *Yüksek Lisans Tezi*. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, İzmir.
- Alp, A., Pınar, A., Eser, Ö., Sarıbaş, Z., Ergünay, K. 2012.** Real-Time PCR Kursu, 04-05 Haziran 2012, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Anonim, 2015(a).** Homo sapiens brain-derived neurotrophic factor (BDNF), transcript variant 1, mRNA. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_170735.5 - (Erişim tarihi: 05.01.2015)
- Anonim, 2015(b).** Annotations for Variant c.1281G>A in Transcript NM_170735.5. http://www.mutdb.org/substitutions/card/NM_170735A1281 - (Erişim tarihi: 05.01.2015)
- Aykut, Y., Pourdeyhimi B., Khan. S.A., 2013.** Effects of Surfactants on the Microstructures of Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibers and Their Carbonized Analogs. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(5): 3726–3735.
- Aladag, N., Ozkan-Ariksoysal, D., Gezen-Ak, D., Yilmazer, S., Ozsoz, M. 2010.** An Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of the Apa I Polymorphism in the Vitamin D Receptor Gene Using Meldola's Blue as a Hybridization Indicator. *Electroanalysis*, 22(5): 590–598.
- Belluzo, M.S., Ribone, M.E., Lagier, C.M. 2008.** Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics. *Sensors*, 8: 1366-1399.
- Bhardwaj, N., Kundu, S.C., 2010.** Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances*, 28: 325–347
- Borgmann, S., Schulte, A., Neugebauer, S., Schuhmann, W. 2012.** Amperometric Biosensors. *Advances in Electrochemical Science and Engineering: Bioelectrochemistry*, 13: 1-83.
- Chambers, J.P., Arulanandam, B.P, Matta, L.L., Weis, A., Valdes, J.J. 2008.** Biosensor Recognition Elements. *Curr. Issues Mol. Biol.*,10: 1–12.
- Clarke, J., Ramoz, N., Fladung, A.K., Gorwood, P., 2016.** Higher reward value of starvation imagery in anorexia nervosa and association with the Val66Met BDNF polymorphism. *Translational Psychiatry*, 1-7.
- Demir, N.B. 2011.** Plazminojen (Plg) Geninin Denatüre Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (dHPLC) İle Mutasyon Analizi ve Olası Mutasyonlu Örneklerin DNA Dizi Analizi ile Değerlendirilmesi. *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Dilsiz, N. 2009.** Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara, 75-81.
- Egan M.F., Kojima M., Callicott J.H., Goldberg T.E., et al. 2003.** The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, 112: 257–269.
- Gielen A., Khademi M., Muhallab S., Olsson T., et al., 2003.** Increased brain derived neurotrophic factor expression in white blood cells of relapsingremitting multiple sclerosis patients. *Scand J Immunol*, 57: 493- 497.
- Guilbault, G.G., Montalvo, J.G., 1969.** A urea-specific enzyme electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 91(8), 2164-2165.

- Gooding, J.J., 2002.** Electrochemical DNA hybridization biosensors, *Electroanalysis*, 14: 1149–1156.
- Hohlfeld R., Kerschensteiner M., Stadelmann C., Lassmann H., et al., 2006.** The neuroprotective effect of inflammation: Implications for the therapy of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol*, 107: 161- 166.
- Hsia, A.P., Wen, T.J., Chen, H.D., Liu, Z., Yandeu-Nelson, M.D., Wei, Y., Guo, L., Schnable, P.S., 2005.** Temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE)—a tool for the high-throughput discovery and mapping of SNPs and IDPs. *Theor. Appl. Genet.* 111: 218–225.
- Iamjan, S.A., Thanoi, S., Watiktinkorn, P., Nudmamud-Thanoi, S., Reynolds, G.P., 2015.** BDNF (Val66Met) genetic polymorphism is associated with vulnerability for methamphetamine dependence. *Pharmacogenomics*, 16(14):1541-1545
- Jönsson, E.G., Edman-Ahlbom, B., Sillén, A., Gunnar, A., Kulle, B., Frigessi, A., Vares, M., Ekholm, B., Wode-Helgodt, B., Schumacher, J., Cichon, S., Agartz, I., Sedvall, G.C., Hall, H., Terenius, H., 2006.** Brain-derived neurotrophic factor gene (BDNF) variants and schizophrenia: An association study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 30: 924–933.
- Katz, S.A., Rechnitz, G.A., 1963.** Direct potentiometric determination of urea after urease hydrolysis. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*, 196(4): 248-251.
- Kerman, K., Morita, Y., Takamura, Y., Ozsoz, M., Tamiya, E. 2004.** DNA-directed attachment of carbon nanotubes for enhanced label-free electrochemical detection of DNA hybridization, *Electroanalysis*, 16(20):1667-1672.
- Kerman, K., ; Ozkan, D., Kara, P., Karadeniz, H., Özkan, Z., Erdem, A., Jelen, F., Özsöz, M. 2004.** Electrochemical Detection of Specific DNA Sequences From PCR Amplicons on Carbon and Mercury Electrodes Using Meldola's Blue as an Intercalator. *Turkish Journal of Chemistry*, 28(5): 523-533.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C.A., Palladino, M.A., 2012.** Concepts of Genetics. California, ABD. 377-378, 499-500.
- Koolman, J., Roehm, K.H., 2005.** Color Atlas of Biochemistry, Thieme, New York. 261.
- Liu, J., Liu, J., Yang, L., Chen, X., Zhang, M., Meng, F., Luo, T., Li, M., 2009.** Nanomaterial-Assisted Signal Enhancement of Hybridization for DNA Biosensors: A Review. *Sensors*, 9:7343-7364.
- Lucarelli, F., Tombelli, S., Minunni, M., Marrazza, G., Mascini, M., 2008.** Electrochemical and Piezoelectric DNA Biosensors for Hybridisation Detection. *Anal Chim Acta*, 609(2): 139-59.
- Mascini, M., Palchetti, I., Marrazza, G., 2001.** DNA Electrochemical Biosensors. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 369: 15-22.
- Merighi, A., Carmignoto, G., Goboo, S., Lossi L., Salio C., Vergnano A.M., Zonta M., 2004.** Neurotrophins in spinal cord nociceptive pathways. *Prog. Brain. Res.*, 146: 291-321.
- Newman, J. D., Turner, A. P. F., 2005.** Home Blood Glucose Biosensors: A Commercial Perspective. *Biosensors & Bioelectronics*, 20 (12): 2435–2453.
- Ozkan, D.A., 2006.** DNA'da Meydana Gelen Bazı Mutasyonların Ve Hibridizasyonun Tayinine Yönelik Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerinin Tasarımı, *Doktora Tezi*, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Ozsoz, M. 2012.** Electrochemical DNA Biosensors, Pan Stanford Publishing, USA, 408.

- Ozsoz, M., Erdem, A., Kerman, K., Ozkan, D., Tugrul, B., Topcuoglu, N., Erken, H., Taylan, M., 2003.** Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of Factor V leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes, *Analytical Chemistry*, 75: 2181-2187.
- Passarge, E., 2000.** Renkli Genetik Atlası, Editörler: Lüleci, G., Sakızlı, M., Alper, Ö., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 34–39, 44–47, 72–73.
- Pinto, R., Frias, B., Allen, S., Dawbarn, D. 2010.** Sequestration of brain derived nerve factor by intravenous delivery of TrkB-Ig2 reduces bladder overactivity and noxious input in animals with chronic cystitis. *Neuroscience*, 166: 907-916.
- Pardo, W.A., Mir, M., Samitier, J., 2015.** Signal enhancement in ultraflat electrochemical DNA biosensors. *Electrophoresis*, 36: 1905–1911.
- Ramakrishna, S., Kazutoshi, F., Wee-Eong, T., Teik-Cheng, L., Zuwei, M., 2005.** An Introduction to Electrospinning and Nanofibers, World Scientific Publishing Company, Singapore. 1-382.
- Rasooly, A., 2005.** Biosensor Technologies. *Methods*, 37 (1): 1-3.
- Rivas, G.A., Pedano, M.L., Ferreyra, N.F. 2005.** Electrochemical DNA Biosensors: Electrochemical Biosensors for Sequence-Specific DNA Detection, *Analytical Letters*, 38: 2653–2703.
- Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier, B.D. 2009.** Electrochemical Aptasensors. *Electroanalysis*, 21(11): 1237 – 1250.
- Singh, J., Birbian, N., Sinha, S., Goswami, A. 2014.** A critical review on PCR, its types and applications. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 1(7): 65–80.
- Sevane, N., Crespo, I., Cañón, J., Dunner, S. 2011.** A Primer-Extension Assay for simultaneous use in cattle Genotype Assisted Selection, parentage and traceability analysis. *Livestock Science*, 137: 141-150.
- Skoog, D. A., West, D. A., Holler, F. J., 1996.** Analitik Kimyanın Temelleri: Kılınç E., Köseoğlu, F., Bilim Yayıncılık, Ankara: 303-495.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., 1998.** Enstrümantal Analiz İlkeleri: Kılınç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H. Bilim Yayıncılık, Ankara: 563-670.
- Suceveanu, A.J., Mazilu, L., Suceveanu, A.P. 2014.** COL11A1 - Genetic Biomarker Targeted in Stool Samples for Early Diagnosis of Colorectal Cancer in Patients at Risk. *Colorectal Cancer - Surgery, Diagnostics and Treatment*. Chapter 16: 403-431.
- Sümer, H. 2008.** Nokta Mutasyonlarının Saptanmasında Yüksek Çözünürlüklü Erime Tekniğinin Verim ve Hassasiyetinin Değerlendirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara.
- Süpüren, G., Çay, A., Kanat, E., Kırıcı, T., Gülümser, T., Tarakçıoğlu, I., 2007.** Nano Lifler (Bölüm 1), *Tekstil ve Konfeksiyon*, Sayı 1, s. 15-17.
- Süpüren, G., Çay, A., Kanat, E., Kırıcı, T., Gülümser, T., Tarakçıoğlu, I., 2007.** Nano Lifler (Bölüm 2), *Tekstil ve Konfeksiyon*, Sayı 2, s. 83-89.
- Thevenot, D.R., Toth, K.; Durst R.A., Wilson, G.S., 1999.** Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, 71(12): 2333-2348.
- Tonacci, A., Borghini, A., Mercuri, A., Pioggia, G., Andreassi, M.G., 2013.** *Journal of Biomedical Science*, 20(57): 1-5.
- Tural, H., Gökçel, H.İ., Ertaş, F.N., 2006.** Enstrümantal Analiz I Elektroanalitik Yöntemler. Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi Yayın No:186, 2. Baskı :131-206.

- Updike, S.J., Hicks, G.P., 1967(a).** Reagentless substrate analysis with immobilized enzymes. *Science*, 158: 270-272.
- Updike, S.J., Hicks, G.P., 1967(b).** The enzyme electrode. *Nature*, 214: 986-988.
- Wang, J., Cai, X., Tian, B., Shiraishi, H., 1996.** Microfabricated thick-film electrochemical sensor for nucleic acid determination, *Analyst*, 121: 965-970.
- Waterfall, C.M., Cobb, B.D., 2001.** Single tube genotyping of sickle cell anemia using PCR-based SNP analysis, *Nucleic Acids Research*, 29 (23): 1-8.
- Yıldız, A., Genç, Ö., 1993.** Enstrümental Analiz, Hacettepe Yayınları, A-64 :289-384.
- Zhou, X. F., Rush, R.A., 1996.** Endogenous brain-derived neurotrophic factor is anterogradely transported in primary sensory neurons. *Neuroscience*, 74: 945-951.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nilay ALADAĞ TANİK
Doğum Yeri ve Tarihi : İZMİR / 1983
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Buca Lisesi (2001)
Lisans : Ege Üniversitesi (2006)
Yüksek Lisans : Ege Üniversitesi (2008)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: SACEM Hayat Teknolojileri A.Ş. (2010 - ...)

İletişim (e-posta) : naladag@gmail.com

Yayınları :

Aladag, N., Ozkan-Ariksoysal, D., Gezen-Ak, D., Yilmazer, S., Ozsoz, M. 2010. An Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of the Apa I Polymorphism in the Vitamin D Receptor Gene Using Meldola's Blue as a Hybridization Indicator. *Electroanalysis*, 22(5): 590–598.

Aladag, N., Trnkova, L., Kourilova, A., Ozsoz, M., Jelen, F. 2010. Voltammetric Study of Aminopurines on Pencil Graphite Electrode in the Presence of Copper Ions. *Electroanalysis*, 22(15): 1675–1681.

Topkaya, S.N., Aydinlik, S., Aladag, N., Ozsoz, M., Ozkan-Ariksoysal, D. 2010. Different DNA immobilization strategies for the interaction of anticancer drug irinotecan with DNA based on electrochemical DNA biosensors. *Comb Chem High Throughput Screen*. 13(7): 582-9.

Ozkan-Ariksoysal, D., Akgul, O., Aydinlik, S., Topkaya, S.N., Aladag, N., Ozsoz, M. 2010. New Electroactive Hybridization Indicators 2-Phthalimido-N Substitutedphenylethanesulfonamide Derivatives for Biosensor Applications: Ring Substituent Effect on Interaction between Compound and DNA. *Electroanalysis*, 22(19): 2225–2234.