

**T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MikroRNA-133a'ya DUYARLI ELEKTROKİMYASAL
BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Öğrencinin Adı SOYADI : Ahmet KARAÇELİK

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 31.01.2022

Enstitü Anabilim Dalı : Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Saim TOPÇU

**Ocak 2022
GİRESUN**

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MikroRNA-133a'ya DUYARLI ELEKTROKİMYASAL
BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Ahmet KARAÇELİK

Enstitü Anabilim Dalı

:

Kimya Anabilim Dalı

Bu tez 19/ 01 /2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Necati MENEK
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Temel ÖZTÜRK
Üye

Prof. Dr. Saim TOPÇU
Üye

Prof. Dr. Yeliz KARAMAN
Üye

Doç. Dr. Seydahmet ÇAY
Üye

Enstitü Müdürü

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Ahmet KARAÇELİK

TEŞEKKÜR

Doktora Tez çalışmam süresince destek ve yardımlarını esirgemedi tecrübe ve bilgi birikimi paylaşımıyla fedakâr bir şekilde tezi yönlendiren saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Saim TOPÇU'ya, gösterdikleri sabır, anlayış ve iyi niyetlerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi her konudaki desteklerinden dolayı kıymetvari aileme ve lütufkar tutumuyla yanımda olan sevgili eşim Dr. Öğr. Üyesi Ayça AKTAŞ KARAÇELİK'e tüm içtenliğimle teşekkür ederim. Ayrıca yazım esnasında yorulup, bunalıp, daraldığımda enerjisi ve oyunlarımla kafamı dağıtan, yorgunluğumu alan canım oğlum Eymen KARAÇELİK'e canı gönülden teşekkür ederim.

Ayrıca Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: FEN-BAP-C-201218-93) çalışmaya katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ	XI
ÖZET.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
 BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	 1
 BÖLÜM 2. GENEL BİLGİ	 4
2.1. Elektrokimya.....	4
2.1.1. Elektrokimyasal hücrede kütle aktarımı.....	4
2.2. Elektroanalitik Kimya ve Voltametry	7
2.2.1. Voltametrik sinyaller.....	8
2.2.2. Voltametride kullanılan elektrotlar	9
2.2.3. Karbon çalışma elektrotları	11
2.3. Voltametrik Teknikler.....	13
2.3.1. Kronoamperometri (CA).....	13
2.3.2. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS).....	14
2.4. Biyosensörler	18
2.4.1. Biyosensör türleri ve özellikleri	19
2.4.2. Nükleik asitler ve aptamerler (oligonükleitler)	22
2.4.3. Aptamer temelli biyosensörler	24
2.4.4. miRNA, miRNA’ların biyooluşumu ve fonksiyonu	26
2.4.5. miRNA ve kanser	28
2.4.6. miRNA tayini için geliştirilmiş elektrokimyasal biyosensörler.....	29

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT	35
3.1. Kullanılan Cihazlar	35
3.1.1. Potanstiyostat- galvanostat.....	35
3.2. Kimyasallar ve DNA-RNA Oligonükleotidleri	36
3.2.1. Kimyasallar	36
3.2.2. DNA ve miRNA oligonükleotidleri ve baz dizilimleri.....	37
3.3. Çözeltiler ve Hazırlanmaları	38
3.3.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması	38
3.3.2. Çözeltilerin Hazırlanması.....	38
3.3.3. DNA oligonükleotid (CpDNA) ve hedef miRNA çözeltilerinin hazırlanışı....	39
3.4. Deneysel Teknik.....	39
3.4.1. Kalem grafit elektrodun (PGE) hazırlanışı ve aktivasyonu	41
3.4.2. Elektrokimyasal empedans (EIS) ölçümleri.....	41
3.4.3. miRNA-133a sensörü fiziksel adsorpsiyon yüzey optimizasyonu	42
3.4.3.1. CpDNA-PGE immobilizasyonunda konsantrasyon optimizasyonu	42
3.4.3.2. CpDNA-PGE immobilizasyonunda zaman optimizasyonu.....	43
3.4.3.3. CpDNA-TRGT eşleşmesinde TRGT konsantrasyon optimizasyonu	43
3.4.3.4. CpDNA-TRGT eşleşmesinde zaman optimizasyonu.....	43
3.4.4. miRNA-133a sensörü kimyasal adsorpsiyon yüzey optimizasyonu.....	43
3.4.4.1. CpDNANH ₂ -PGE immobilizasyonunda konsantrasyon optimizasyonu	44
3.4.4.2. CpDNANH ₂ -PGE immobilizasyonunda zaman optimizasyonu.....	44
3.4.4.3. CpDNANH ₂ -TRGT eşleşmesinde konsantrasyon optimizasyonu.....	44
3.4.4.4. CpDNANH ₂ -TRGT eşleşmesinde zaman optimizasyonu	45
3.4.5. Fiziksel adsorpsiyon tayin sınırı ve kalibrasyon çalışması	45
3.4.6. Kimyasal adsorpsiyon tayin sınırı ve kalibrasyon çalışması.....	45
3.4.7. Fiziksel adsorpsiyonda CpDNA Prob ve miRNA-133a hedef dizi TRGT hibridizasyonu seçimlilik çalışması	46
3.4.8. Kimyasal adsorpsiyonda CpDNANH ₂ prob ve miRNA-133a hedef dizi TRGT hibridizasyonu seçimlilik çalışması	46

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve YORUMLAR	47
4.1. PGE'nin Aktivasyon, İmmobilizasyon ve Hibridizasyon Aşamalarına Ait Bulgular.....	47
4.1.1. PGE aktivasyon bulguları	47
4.1.2. İmmobilizasyon ve hibridizasyon sürecinde yüzey değişimi.....	48
4.2. Fiziksel Adsorpsiyonda İmmobilizasyon ve Hibridizasyon Aşamalarına Ait Bulgular ve Yorumlar	50
4.2.1. CpDNA-PGE immobilizasyonunda konsantrasyon optimizasyonu bulgular ve yorumlar	50
4.2.2. CpDNA-PGE immobilizasyonunda zaman optimizasyonu bulgular ve yorumlar	52
4.2.3. CpDNA-TRGT hibridizasyonunda TRGT konsantrasyon optimizasyonu bulgular ve yorumlar	55
4.2.4. CpDNA-TRGT hibridizasyonunda zaman optimizasyonu bulgular ve yorumlar	57
4.3. Kimyasal Adsorpsiyonda İmmobilizasyon ve Hibridizasyon Aşamalarına Ait Bulgular ve Yorumlar	60
4.3.1. CpDNANH ₂ -PGE immobilizasyonunda konsantrasyon optimizasyonu bulgular ve yorum.....	60
4.3.2. CpDNANH ₂ -PGE immobilizasyonunda zaman optimizasyonu bulgular ve yorumlar	62
4.3.3. CpDNANH ₂ -TRGT hibridizasyonunda TRGT konsantrasyon optimizasyonu bulgular ve yorumlar	65
4.3.4. CpDNANH ₂ -TRGT hibridizasyonunda zaman optimizasyonu bulgular ve yorumlar	67
4.4. Fiziksel Adsorpsiyon Tayin Sınırı ve Kalibrasyon Çalışması Bulgular ve Yorumlar	69
4.5. Kimyasal Adsorpsiyon Tayin Sınırı ve Kalibrasyon Çalışması Bulgular ve Yorumlar	73
4.6. Fiziksel Adsorpsiyonda CpDNA Prob ve miRNA-133a Hedef Dizi TRGT Hibridizasyonu Seçimlilik Çalışması Bulgular ve Yorumlar	75

4.7. Kimyasal Adsorpsiyonda CpDNA Prob ve miRNA-133a Hedef Dizi TRGT Hibridizasyonu Seçimlilik Çalışması Bulgular ve Yorumlar	76
BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ	79
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	96



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
µg	mikrogram
µL	mikrolitre
mL	mililitre
µM	mikromolar
mV	milivolt
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
CV	Dönüşümlü voltametri
CA	Kronoamperometri
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
PGE	Kalem grafit elektrot
CPE	Karbon pasta elektrot
SPE	Perde baskılı elektrot
GCE	Camsı karbon elektrot
DKE	Doymuş kalomel elektrot
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
ABS	Asetat tamponu
BRT	Britton-Robinson tamponu
M	Molarite
V	Volt
NA	Nükleik asit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
RNA	Ribonükleik asid
miRNA	MikroRNA
DC	Doğru akım
AC	Alternatif Akım
TRGT	Hedef mikro RNA

NHS

N – Hidroksisüksinimit

EDC

1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Elektrokimyasal hücrede kütle aktarım mekanizmaları.....	5
Şekil 2.2. Elektrot yüzeyinde oluşan kütle aktarım tabakaları.....	6
Şekil 2.3. (a) Helmholtz modeli, (b) Gouy-Chapman-Stern modeli.....	7
Şekil 2.4. Voltametri de kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri	9
Şekil 2.5. Kalem grafit elektrodun şematik gösterimi	12
Şekil 2.6. CA’da uygulanan potansiyelin zamana bağlı değişimi.....	14
Şekil 2.7. EIS (A) Bode, (B) Nyquist diyagramı	16
Şekil 2.8. Randles- Ershler eşdeğer devresi ve Nyquist diyagramı	17
Şekil 2.9. Bir biyosensörün ana bileşenlerinin şematize gösterimi.....	18
Şekil 2.10. SELEX zenginleştirme sürecinin şematik gösterimi.	24
Şekil 2.11. miRNA biyogenez yolu	28
Şekil 3.1. Gamry interface 1000 model potansiyostat ve empedans analizörü.....	36
Şekil 3.2. Kullanılan elektrokimyasal hücre	36
Şekil 3.3. Fiziksel adsorpsiyon şeması.....	40
Şekil 3.4. Kimyasal adsorpsiyon şeması	41
Şekil 3.5. EIS eşdeğer devresi.....	42
Şekil 4.1. PGE yüzey değişimi A: Empedans (●yalın elektrot, ▲ aktive elektrot), B: Döngüsel voltamogram C: Rct değişimi ve D: Eşdeğer devre	47
Şekil 4.2. ● Yalın PGE yüzeyi ■ Aktive PGE yüzeyi ▼ CpDNA immobilize PGE yüzeyi ▲ TRGT hibridize PGE yüzeyi empedans eğrileri.....	48
Şekil 4.3. Yüzey değişimi ile Rct değerleri (n=5) histogramı	49
Şekil 4.4. ● 1 µg/mL CpDNA ■ 3 µg/mL CpDNA ♦ 5 µg/mL CpDNA ▲ 7 µg/mL CpDNA ve ▼ 9 µg/mL CpDNA immobilizasyonu EIS eğrileri	50
Şekil 4.5. CpDNA immobilizasyonunda konsantrasyona karşı Rct değişim grafiği .	51
Şekil 4.6. CpDNA konsantrasyon -Rct değişimi histogram grafiği (n=5).....	52
Şekil 4.7. ● 5dk, ■ 10dk, ♦ 20dk, ▲ 40dk, ▼ 80dk ve + 160dk immobilizasyon süreleri EIS eğrileri	53

Şekil 4.8. CpDNA immobilizasyon süresine karşı Rct değişim grafiği.....	54
Şekil 4.9. CpDNA immobilizasyon süresi Rct değişim histogram grafiği (n=5)	54
Şekil 4.10. ● 1 µg/mL TRGT, ■ 5 µg/mL TRGT, ◆ 10 µg/mL TRGT, ▲ 15 µg/mL TRGT, ▼ 20 µg/mL TRGT ve + 40 µg/mL TRGT hibridizasyonu EIS eğrileri	55
Şekil 4.11. TRGT hibridizasyonunda konsantrasyona karşı Rct fark değişim grafiği	56
Şekil 4.12. TRGT konsantrasyonu Rct fark değişimi histogram grafiği (n=5).....	57
Şekil 4.13. ● 5dk TRGT, ■ 10dk TRGT, ◆ 20dk TRGT, ▲ 40dk TRGT, ▼ 80dk TRGT ve + 180dk TRGT hibridizasyonu EIS eğrileri	58
Şekil 4.14. TRGT hibridizasyon süresine karşı Rct fark değişim grafiği	58
Şekil 4.15. TRGT hibridizasyon süresi Rct fark değişimi histogram grafiği (n=5)...	59
Şekil 4.16 ● 1 µg/mL CpDNANH ₂ ■ 3 µg/mL CpDNANH ₂ ◆ 5 µg/mL CpDNANH ₂ ▲ 7 µg/mL CpDNANH ₂ ve ▼ 9 µg/mL CpDNANH ₂ immobilizasyonu EIS eğrileri	60
Şekil 4.17. CpDNANH ₂ immobilizasyonunda konsantrasyona karşı Rct değişim grafiği	61
Şekil 4.18. CpDNANH ₂ konsantrasyon -Rct değişimi histogram grafiği (n=5).....	62
Şekil 4.19. ● 5dk, ■ 10dk, ◆ 20dk, ▲ 40dk, ▼ 80dk ve + 160dk immobilizasyon süreleri EIS eğrileri	63
Şekil 4.20. CpDNANH ₂ immobilizasyon süresine karşı Rct değişim grafiği	64
Şekil 4.21. CpDNANH ₂ immobilizasyon süresi Rct değişim histogram grafiği (n=5)	64
Şekil 4.22. ● 1 µg/mL TRGT, ■ 5 µg/mL TRGT, ◆ 10 µg/mL TRGT, ▲ 15 µg/mL TRGT, ▼ 20 µg/mL TRGT ve + 40 µg/mL TRGT hibridizasyonu EIS eğrileri	65
Şekil 4.23. TRGT hibridizasyonunda konsantrasyona karşı Rct fark değişim grafiği	66
Şekil 4.24. TRGT konsantrasyonu Rct fark değişimi histogram grafiği (n=5).....	67
Şekil 4.25. ● 5dk TRGT, ■ 10dk TRGT, ◆ 20dk TRGT, ▲ 40dk TRGT, ▼ 80dk TRGT ve + 180dk TRGT hibridizasyonu EIS eğrileri	68
Şekil 4.26. TRGT hibridizasyon süresine karşı Rct fark değişim grafiği	68
Şekil 4.27. TRGT hibridizasyon süresi Rct fark değişimi histogram grafiği (n=5)...	69

Şekil 4.28. ● 2 µg/mL TRGT, ■ 4 µg/mL TRGT, ◆ 6 µg/mL TRGT, ▲ 8 µg/mL TRGT EIS eğrileri.....	70
Şekil 4.29. PBS’de TRGT konsantrasyonu-Rct kalibrasyon grafiği.....	71
Şekil 4.30. ● 0,25 µg/mL TRGT, ■ 0,5 µg/mL TRGT, ◆ 1 µg/mL TRGT, ▲ 2 µg/mL TRGT, ▼ 4 µg/mL TRGT, + 6 µg/mL TRGT ve -8 µg/mL TRGT EIS eğrileri.....	71
Şekil 4.31. ABS’de TRGT konsantrasyonu-Rct kalibrasyon grafiği.....	72
Şekil 4.32. ● 1 µg/mL TRGT, ■ 2 µg/mL TRGT, ◆ 4 µg/mL TRGT, ▲ 6 µg/mL TRGT ve ▼ 8 µg/mL TRGT EIS eğrileri.....	73
Şekil 4.33. ABS’de TRGT konsantrasyonu-Rct kalibrasyon grafiği.....	74
Şekil 4.34. ● ABS, ■ 10 µg/mL miRNA-31, ◆ 10 µg/mL miRNA-let7d, ▲ 10 µg/mL TRGT, let7d ve miRNA-31 ve ▼ 10 µg/mL TRGT EIS eğrileri.....	75
Şekil 4.35. TRGT seçimlilik çalışması ortam değişikliği Rct fark değerleri histogram grafiği (n=5).....	76
Şekil 4.36. ● ABS, ■ 15 µg/mL miRNA-31, ◆ 15 µg/mL miRNA-let7d, ▲ 15 µg/mL TRGT, let7d ve miRNA-31 ve ▼ 15 µg/mL TRGT EIS eğrileri.....	77
Şekil 4.37. TRGT seçimlilik çalışması ortam değişikliği Rct fark değerleri histogram grafiği (n=5).....	78

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 4. 1. PBS’de TRGT konsantrasyonlarına karşılık gelen yük transfer direnci değerleri.....	70
Tablo 4. 2. ABS’de TRGT konsantrasyonlarına karşılık gelen yük transfer direnci değerleri.....	72
Tablo 4. 3. ABS’de TRGT konsantrasyonlarına karşılık gelen yük transfer direnci değerleri.....	74
Tablo 4. 4. TRGT seçimlilik çalışması ortam değişikliği Rct değerleri	75
Tablo 4. 5. TRGT seçimlilik çalışması ortam değişikliği Rct değerleri	77
Tablo 4. 6. miRNA-133a tayinine yönelik güncel çalışmaların tez çalışması ile kıyaslanması.....	83

MikroRNA-133a'ya DUYARLI ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Tez çalışmasında bir kanser biyobelirteci olan mikroRNA-133a'nın (Target-miR-133a) kantitatif tayini için elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Nükleik asit hibridizasyon prensibine göre tasarlanmış, sensör seçiciliği yüksek, duyarlı, hızlı, ucuz ve pratik bir biyosensör geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla tek kullanımlık, düşük maliyetli ve pratik bir kalem grafit elektrot (PGE) kullanılmıştır. PGE elektrodunun yüzeyi elektrokimyasal yöntemle aktive edilmiştir. Hedef molekül miRNA-133a'nın tamamlayıcı konjugatı olan anti-miR-DNA ipliği, bir yakalama probu (Cp) olarak PGE'nin yüzeyine adsorbe edilmiştir. Anti-miR-DNA/Target-miR-133a hibridizasyonu, hazırlanan elektrodun hedef molekül çözeltisinde bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Elektrot yüzeyinde gerçekleşen bütün işlemler her aşamada elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile karakterize edilmiştir. Elektrot yüzeyine immobilize edilen yakalama ucu (cp-DNA-miR-133a) konsantrasyonu, adsorpsiyon süresi, hedef molekül konsantrasyonu ve hibridizasyon süresi optimizasyonları ayrı ayrı çalışılmıştır.

Yakalama ucu ile hedef molekül arasındaki güçlü hidrojen bağları nedeniyle, moleküller birbirine kenetlendikten sonra elektrot yüzeyinin yük transfer direncinde bir artış gözlemlenmiştir. Başlangıçta iyi iletken olan PGE elektrot yüzeyi yalıtkan biyomoleküllerle kaplandığından, PGE elektrodunun yük transfer direnci sırasıyla yakalama probunun adsorpsiyonu ve hibridizasyon sebebi ile artmıştır.

Ayrıca biyosensörün farklı tampon ortamlarında uygulanabilirliğini değerlendirmek üzere fosfat tamponu (PBS) ve asetat tamponu (ABS) ortamında çalışılmıştır. Biyosensörün seçicilik çalışmalarında değişik baz dizilerine sahip yalancı hedef moleküllerin varlığında biyosensörün performansı asetat tamponunda test edilmiştir.

Anahtar kelimeler: hedef mikroRNA, DNA Prob, elektrokimyasal biyosensörler, immunosensörler, kanser

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS SENSITIVE TO microRNA-133a

ABSTRACT

In the thesis study, an electrochemical biosensor was developed for the quantitative determination of microRNA-133a (Target-miR-133a), a cancer biomarker. It is aimed to develop a sensitive, fast, cheap and practical biosensor with high sensor selectivity, designed according to the nucleic acid hybridization principle. For this purpose, a disposable, low-cost and practical pencil graphite electrode (PGE) was used. The surface of the PGE electrode was activated by electrochemical method. The anti-miR-DNA strand, the complementary conjugate of the target molecule miRNA-133a, was adsorbed to the surface of the PGE as a capture probe (cp). Anti-miR-DNA/Target-miR-133a hybridization was carried out by keeping the prepared electrode in the target molecule solution. All processes that occurring on the electrode surface were characterized by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) at each stage. Optimization of capture tip (cp-DNA-miR-133a) concentration immobilized on the electrode surface, adsorption time, target molecule concentration and hybridization time were studied separately.

Due to the strong hydrogen bonds between the capture probe and the target molecule, an increase in the charge transfer resistance of the electrode surface was observed after the molecules were hybridized. Since the initially well-conducting PGE electrode surface was covered with insulating biomolecules, the charge transfer resistance of the PGE electrode increased with adsorption of the capture probe and hybridization, respectively.

In addition, the biosensor was studied in phosphate buffer (PBS) and acetate buffer (ABS) media to evaluate its applicability in different buffer environments. In the selectivity studies of the biosensor, the performance of the biosensor was tested in acetate buffer in the presence of pseudotarget molecules with different base sequences.

Keywords: target microRNA, DNA Probe, electrochemical biosensors, immunosensors, cancer

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Yaşamsal faaliyetleri bulunan bütün organizmalar hayatlarını sürdürmek için yaşadıkları ortamdaki anlık değişimleri algılayıp refleks gösterme kabiliyetine sahiptirler. Bu algılama canlının türüne göre farklılık göstermektedir. Örneğin köpeklerde koku algılamasının insandan kat kat daha hassas olması, yılanların dillerini kullanarak çevrelerindeki canlıları algılamaları, algilerin zehirli maddelere duyarlılık göstermesi ve yırtıcıların bölge belirlemede koku bırakmaları gibi birçok örnek doğal yaşamda mevcuttur. Doğadaki bu temel algılama mantığının laboratuvar ortamında yapay koşullarda (*in vitro*) biyolojik, kimyasal veya fiziksel etkileşimin saniyeler içinde algılanabilir bir sinyale (elektrik, ışık, ses, görüntü) dönüştürülmesi ve tanımlanmasını sağlayan teknolojiye “biyosensör” denilmektedir.

Biyosensörler genel anlamda, analizi yapılacak madde ile seçimli etkileşimi bulunan biyoaktif bileşenin etkileşimi sonucu meydana gelen biyolojik, kimyasal veya biyokimyasal sinyalin fiziksel veya kimyasal dönüştürücü aracılığı ile ölçülebilir ve işlenebilir bir hale dönüştürüldüğü cihaz veya aygıt olarak tanımlanmaktadır. Daha temel prensiple, biyosensör; istenilen maddenin analizinde biyolojik bir ajanla modifiye edilmiş fizikokimyasal algılayıcı içeren bir araçtır (Turner ve ark., 1987; Coulet, 1991). Biyosensörler, farklı yapısal bileşenlere sahip olmalarına rağmen biyomateryal (biyoreseptör), dönüştürücü (transdüser) ve sinyal işleyici olmak üzere temelde üç kısımdan oluşur. Biyomateryal kısmı enzim, antikor, nükleik asit, mikrop, hücre veya dokulardan, dönüştürücü kısmı elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, termal ya da manyetik birimlerden oluşabilmektedir (Coulet, 1991).

Biyosensör gelişimindeki aşamalar, biyosensörlerde kullanılan biyomateryalin değişimi ile izlenebilir. 1950’li yıllarda enzimlerin kullanımıyla elde edilen enzimatik sensörler, 1980’lerde antijen-antikor etkileşimi temeline dayanan immünosensörler, kandaki medikal önemde hormonların tespitini yapan hormon sensörleri, sitotoksiste

ve hücre fonksiyonu temelli sitosensörler ve nükleik asit tabanlı DNA sensörleri günümüze kadar olan biyosensör gelişim silsilesi olarak özetlenebilir.

Elektrokimyasal nükleik asit (NA) temelli biyosensörler, biyolojik tanıma elemanı olarak bir nükleik asidi (yakalama probu) ve elektrokimyasal sinyal dönüştürücü olarak bir elektrodu içeren biyosensörlerdir. NA'nın tanıma kısmı olan yakalama probunun rolü, yakalama probu ve hedef molekülü arasındaki etkileşim gerçekleştiğinde ya da belirli bir hedef dizinin (DNA, RNA, virüs, bakteri, miRNA ve ilaç ve benzeri yapılar) tayini yapılırken gerçekleşen değişimleri algılamaktır. Bu sistemin diğer kısmı olan sinyal dönüştürücünün rolü ise tanıma kısmında gerçekleşen değişimleri, bağlayıcı moleküller veya hibritleşme nezdinde kayıt altına almak ve elde edilmiş sinyali, sinyal dönüştürücüye aktarmak şartıyla ölçülebilir bir sinyale dönüştürmektir (Labuda ve ark., 2010).

Elektrokimyasal NA biyosensörleri ile genellikle NA ile seçimli hedef olup etkileşebilen yapıların tayini yapılmaktadır. Bu tayinler genellikle dönüştürücü sisteme sahip NA probun, kendi dizisine özgü hedef molekül ile hibritleşmesi temelinde gerçekleşir. Hibritleşme elektrot yüzeyine immobilize tek iplik oligonükleotid (yakalama probu) dizi ve hedef baz dizisinin çözelti içerisinde seçimli olarak birleşmeleri ile gerçekleşir. Bu şekilde tasarlanmış biyosensörlerle yüksek hız, seçimlilik ve duyarlılıkta algılama mümkün olmaktadır. Özellikle son on yılda bu şekilde dizi seçimli hibridizasyon temeline dayandırılarak başarılı bir şekilde elektrokimyasal biyosensörler tasarlanmakta ve kullanılmaktadır.

Gen düzenlenmesinde önemli rol oynayan mikroRNA'lar (miRNA) 19-25 nükleotit uzunluğunda tek sarmal yapıda ve kodlayıcı özellikte olmayan RNA türü moleküllerindendir. Yani DNA'dan transkripsiyonu yapılmasına rağmen, proteine çevirisi olmayan genler tarafından kodlanırlar. miRNA'ların keşfi ve ne işe yaradıkları anlaşıldıktan sonra hastalıklarla yakından ilişkileri tespit edildiğinden önemleri gün geçtikçe artmaktadır. miRNA'ların temel hücresel süreçler (apoptoz, hücre farklılaşması) üzerindeki etkileri yanı sıra kanser, diyabet, vasküler hastalıklar, kalp yetmezliği, Alzheimer hastalığı gibi hastalıklarla bağlantıları bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı bu hastalıkların tespiti ve tedavisi süreçlerinde miRNA'lar son

dönemlerde yoğun bir şekilde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Özellikle miRNA'ya göre sentezlenmiş yakalama probu (anti-miRNA) ve hedef miRNA (Target-miRNA) dizileri arası hibritleşme temelinde düşünüldüğünde hızlı, seçimli ve duyarlı bir elektrokimyasal NA biyosensörü için çok ideal bir yapı sunduğu görülmektedir.

Tez çalışmasında biyomoleküler etkileşim temelinde geliştirilmiş elektrokimyasal biyosensör ile miR-133a olarak tanımlanmış biyobelirtecini tayini amaçlanmıştır. miR-133a tümör baskılayıcıdır ve osteosarkom tümörü (kötü huylu kemik tümörü) (Qu ve Li, 2020), özofagus kanseri (yemek borusu kanseri) (Yang ve ark., 2017), kolorektal kanser (CRC) (Zhou ve ark., 2018) gibi çeşitli kanserlerin prognozu (ön görü) için bir biyobelirteç olarak kabul edilmiştir. Ayrıca küçük hücreli akciğer kanseri (KHDAK) (Shen ve ark., 2019), mesane kanseri (Uchida ve ark., 2013), meme kanseri (Ji ve ark., 2016) ve mide kanseri (GC) (Dong ve ark., 2018) içinde biyobelirteç olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda miR-133a'nın tayini için tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) kullanılmıştır. PGE yüzeyine yakalama probu fiziksel ve kimyasal immobilizasyon yöntemiyle iki farklı şekilde immobilize edilmiş ve hedef molekül tayini için iki farklı yapıda biyosensör geliştirilmiştir. Her iki biyosensör için yüzey aktivasyonu, immobilizasyon ve hibridizasyon aşamaları elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile takip edilmiş ve iki farklı impedimetrik sensör geliştirilmiştir.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİ

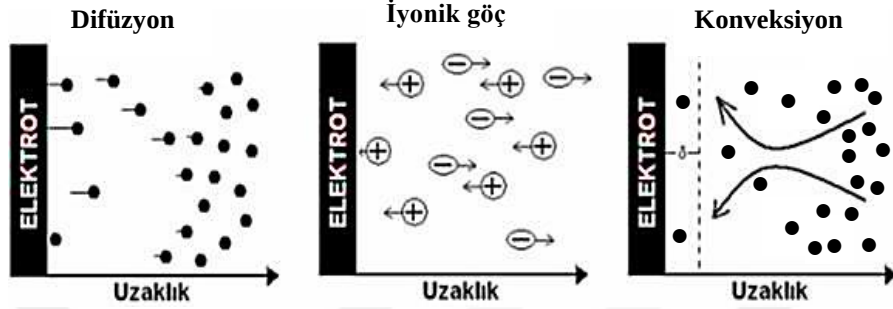
2.1. Elektrokimya

Elektrokimya, elektrik akımının geçişinin neden olduğu kimyasal değişikliklerin ve kimyasal reaksiyonlarla elektrik enerjisinin üretilmesinin incelenmesiyle ilgilenen kimyanın bir alt dalıdır. Bazı metallerin saf olarak elde edilmesi veya yüzeylerinin başka bir metal ile kaplanması elektrokimyasal yöntemlerle yapılır. Bir kimyasal reaksiyon, elektrolizde olduğu gibi bir potansiyel farkından etkileniyorsa veya bir pil ya da yakıt hücresinde olduğu gibi elektriksel potansiyel bir kimyasal reaksiyondan kaynaklanıyorsa buna elektrokimyasal reaksiyon denir. Elektrokimyasal reaksiyonlar yani yükseltgenme-indirgenme reaksiyonları elektrokimyasal hücre adı verilen bir düzenekte gerçekleştirilir. Bu hücre içerisinde yükseltgenme reaksiyonunun gerçekleştiği elektrot anot iken, indirgenme reaksiyonunun gerçekleştiği elektrot ise katottur. Elektrotlar, metaller, yarı iletkenler, grafit ve hatta iletken polimerler gibi yeterince iletken herhangi bir malzemedan yapılabilir. Bu elektrotlar arasında serbestçe hareket edebilen iyonlar içeren elektrolit (sıvı çözeltiler, erimiş katılar ya da iyonik olarak iletken katılar) bulunur (Skoog ve ark., 1996). Elektrokimyasal hücrede gerçekleşen elektron aktarımı sayesinde elektrik akımı oluşur.

2.1.1. Elektrokimyasal hücrede kütle aktarımı

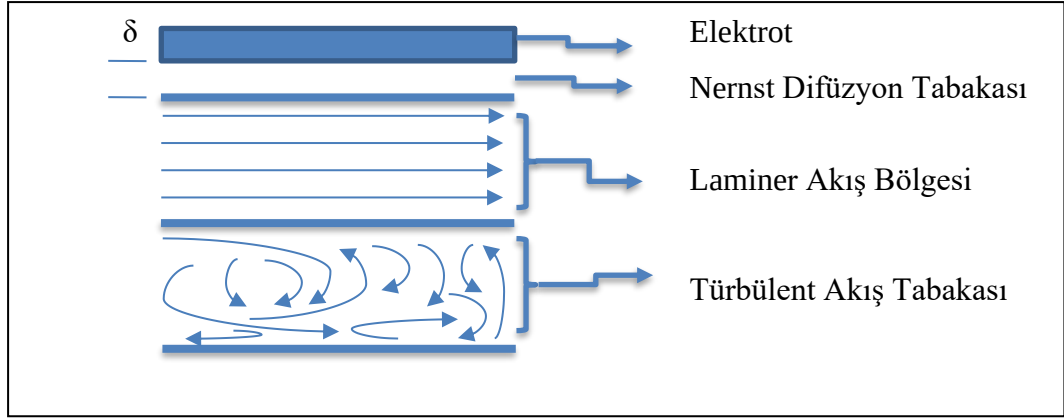
Elektrokimyasal hücre ortamında maddenin elektrot yüzeyine aktarılması iyonik göç (migrasyon), konveksiyon (karıştırma) ve difüzyon olmak üzere üç farklı şekilde gerçekleşmektedir. Elektrokimyasal hücredeki anot ile katot arasındaki gerilim farkının oluşturduğu elektriksel alanın etkisiyle iyonlar ters yüklü elektrotlara doğru hareket etme eğilimine girerler. Böylece iyonik göç denilen olayla madde aktarımı gerçekleşir. Konveksiyon, çözeltinin karıştırıldığı durumlarda elektrot arayüzeyine madde aktarımı olan diğer bir yöntemdir. Çözelti ile elektrot yüzeyi arasında oluşan

konsantrasyon farkından dolayı (derişik ortamdan seyreltik ortama) elektrot yüzeyinde azalan elektroaktif maddenin çözelti/elektrot arayüzeyinde derişimini arttırmak üzere elektrot yüzeyine doğal olarak hareketlenmesi olayına difüzyon (madde aktarımı) denir. Belirtilmiş kütle aktarım yolları ait görsel Şekil 2.1.'de verilmiştir.



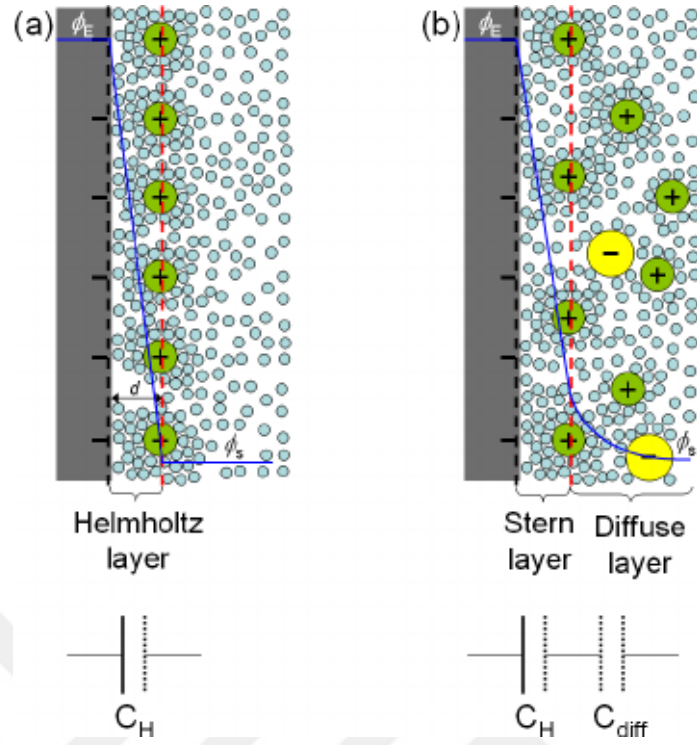
Şekil 2.1. Elektrokimyasal hücrede kütle aktarım mekanizmaları (Skoog ve ark., 1996)

Konveksiyonda çözeltinin karıştırılması veya elektrodun hareket ettirilmesi gibi bir durumda elektrot yüzeyinde üç çeşit düzenli olmayan sıvı akış tipi meydana gelir ve her biri farklı birer tabaka olarak isimlendirilir (Skoog ve ark., 1996). Türbülent akış tabakası, laminar akış bölgesi ve Nernst difüzyon tabakası elektrot yüzeyinde oluşan tabakalardır. Türbülent akış tabakası, elektrot ara yüzeyindeki çözeltide oluşur ve elektrottan uzak çözelti yığımında gözlenir. Laminar akış bölgesi, elektrot yüzeyine yakın bölgelerde gerçekleşir. Bu bölge sıvı tabakaların elektrot yüzeyine paralel bir yönde birbiri üzerinde kaydığı bölgedir. Nernst difüzyon tabakasında elektrot yüzeyinden δ cm uzakta laminar akımın hızı, sıvı ile elektrot arasındaki sürtünme sebebiyle sıfıra yaklaşır. Bunun sonucunda, elektrot çevresinde 10^{-2} - 10^{-3} cm kalınlığında ince, durgun bir çözelti tabakası meydana gelir. Elektrot yüzeyinde oluşan tabakalar Şekil 2.2.'de şematik olarak verilmiştir.



Şekil 2.2. Elektrot yüzeyinde oluşan kütle aktarım tabakaları

Bir elektrokimyasal hücrede elektrot ve onu çevreleyen elektrolit arasındaki arayüzde elektriksel bir çift tabaka, çözeltilen iyonların elektrot yüzeyine adsorbe edilmesiyle oluşur. Yüklü elektrot, genellikle angstrom boyutunda bir yalıtkan boşluk ile yüklü iyonlardan ayrılır. Bir yalıtkan tarafından ayrılan yükler bir kapasitör oluşturur, bu nedenle elektrot yüzeyi ile çözelti arasında oluşan çift tabaka kapasitör gibi davranış sergiler. Elektrot ile elektrolit arasında oluşan bu kapasitör çift tabaka kapasitansı olarak adlandırılır. Elektrot ile elektrolit arayüzeyinde oluşan çift tabaka üç farklı model ile açıklanabilir. Bu modellerin ilki Helmholtz (1879) çift tabakasıdır. Bu ilk teorik model, yüklü metal yüzeyle temas halinde olan yoğun bir iyon tabakasının varlığını varsaymaktadır. Gouy ve Chapman'ın bir sonraki modeli, Boltzmann dağılımı nedeniyle birikmiş iyonların katı yüzeyden belirli bir mesafeye kadar uzandığı dağınık bir çift tabaka içermektedir (Sudhakar ve ark., 2018). Üçüncü teorik modelde Stern, elektronik katı-sıvı ara yüzeyinin hem katı Helmholtz tabakasını hem de Gouy ve Chapman'ın dağınık tabakasını içerdiğini öne sürmüştür (Sudhakar ve ark., 2018). Çift tabaka modelleri için şematik gösterimler Şekil 2.3.'te verilmiştir.



Şekil 2.3. (a) Helmholtz modeli, (b) Gouy-Chapman-Stern modeli (Sudhakar ve ark., 2018)

2.2. Elektroanalitik Kimya ve Voltametry

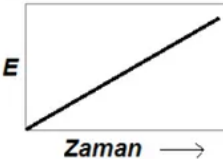
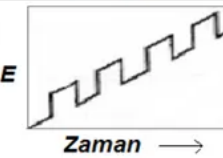
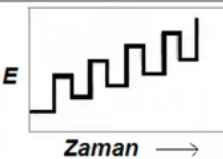
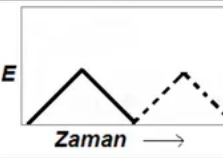
Elektroanalitik kimya, çözeltilerin elektrokimyasal bir hücrede elektriksel özelliklerinin ölçülmesini inceleyen kimyanın alt dalıdır. Ayrıca ölçülen bu elektrokimyasal özelliklerinden yararlanılarak maddelerin tüm kalitatif ve kantitatif analizine dayanan teknikleri içerir. Elektroanalitik yöntemler diğer analitik tekniklere kıyasla bazı avantajları nedeni ile son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. En önemli avantajlarından biri analiz metodunun hedef analite spesifik olmasıdır. Bu yöntem ayrıca çok düşük tayin sınırı sağlamasının yanı sıra yüksek doğruluk, kesinlik, duyarlılık, hassaslık ve seçiciliğe sahiptir (Topçu, 2004).

Voltametri; akımın, elektroda uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesine dayanan elektrokimyasal yöntemdir. Uygulanan potansiyele karşılık ölçülen akım değerlerine karşı bir eğri çizilir ve bu eğriye voltamogram denir. Voltamogramlar, çözeltideki elektroaktif maddelerin kalitatif ve kantitatif özelliklerini yansıtır. Genel olarak voltametride yüzey alanı birkaç mm^2 'den daha küçük

mikroelektrotlar ve μm^2 'den daha küçük ultra mikroelektrotlar çalışma elektrotları olarak kullanılmaktadır. Voltametrde elektroda uygulanabilecek potansiyel çalışma aralığı kullanılan elektrodun ve elektrolitin türüne, çözücüye ve pH'ya bağlıdır. Metal elektrotlara ilişkin anodik bölgede daralma gözlenmesi, kullanılan elektrolitin metal iyonu ile kompleks oluşturan bir iyon ya da molekül içermesi kaynaklıdır. Katodik bölgedeki daralma genellikle ortamın pH'sının artması ile gerçekleşir (Skoog ve ark., 1996).

2.2.1. Voltametrik sinyaller

Voltametrde, içerisinde mikroelektrot bulunduran bir elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir bir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali, yöntemin dayandığı spesifik bir akım cevabı oluşturur (Skoog ve ark., 1996). Genel olarak voltametrde kullanılan dört uyarma sinyalinin (doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare ve üçgen) dalga şekli Şekil 2.4.'te gösterilmiştir. Klasik voltametrik uyarma sinyali hücreye uygulanan doğru akım potansiyelinin zamanın bir fonksiyonu olarak arttığı doğrusal bir taramadır. Böylece hücrede oluşan akım zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilir. Diferansiyel ve kare dalgada puls tipi uyarma sinyali gönderilmektedir. Akımlar pulsların ömrü sürecinde çeşitli zamanlarda kaydedilir. Üçgen şeklindeki uyarma sinyalinde potansiyel iki değer arasında devreder. Dönüşümlü voltametrde uyarma sinyali önce bir maksimuma kadar doğrusal olarak artar, ardından aynı eğimle orijinal değerine doğru doğrusal olarak azalır. Bu işlem, akımın zamana doğru bir fonksiyonu olarak kaydedilirken sürekli tekrarlanabilir. Bir tam devir bir saniyeden daha az sürede ya da 100 veya daha fazla saniyede tamamlanabilir.

İsim	Dalga Şekli	Voltametrinin Tipi
Doğrusal taramalı		Polarografi Hidrodinamik voltametri
Diferansiyel puls		Diferansiyel puls polarografisi
Kare dalga		Kare dalga voltametrisi
Üçgen		Dönüşümlü voltametri

Şekil 2.4. Voltametrizde kullanılan potansiyel uyarma sinyalleri (Skoog ve ark., 1996).

Voltametrik sistem elektrokimyasal hücre, analiz edilecek madde ve bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan oluşur. Elektrokimyasal hücre bir referans elektrot, bir yardımcı elektrot ve bir çalışma elektrodundan oluşur. Elektrokimyasal potansiyeller her zaman iki elektrot arasındaki potansiyel farktır. Çalışma elektrodu, üzerinde ilgilenilen reaksiyonun meydana geldiği elektrottur. Bu elektrodun boyutları polarize olma eğilimini arttırmak amacıyla küçük tutulur ve yüzeyinde analit indirgenir veya yükseltgenir. Referans elektrot genellikle gümüş/gümüş klorür veya doymuş kalomel elektrot olup amacı, çalışma elektrodunun ayarlanabileceği görece bir potansiyel oluşturmaktır. Akım akışı, referans ve çalışma elektrotları arasındaki potansiyeli azaltacağından, hücreye üçüncü bir elektrot eklenir. Yardımcı elektrot olarak adlandırılan bu elektrot, hücrede akım akarken referans ve çalışma elektrotları arasındaki potansiyel farkı korur.

2.2.2. Voltametrizde kullanılan elektrotlar

Voltametrizde referans elektrot olarak ikinci sınıftan metal-metal iyonu elektrotları kullanılır. Referans elektrot küçük akım şiddetlerinde polarlanmayıp akım şiddeti

arttıkça ideal konumlarından saparlar. Voltametrde kullanılan referans elektrotlar standart hidrojen, cıva-cıvalı sülfat, kalomel ve gümüş-gümüş klorür elektrotlarıdır. Bunlar arasında en fazla kullanılanlar kalomel ve Ag/AgCl elektrotlarıdır. Standart hidrojen elektrotlarının hazırlanması zaman aldığı için çok fazla kullanışlı değildir. Bu elektrotlar referans elektrot olarak kullanımın yanı sıra pH tayinlerinde indikatör elektrot olarak da kullanılmaktadır. Genel olarak standart hidrojen elektrodun potansiyeli bütün sıcaklıklarda sıfır volt olarak kabul edilir (Tural ve ark., 2006). Cıva-cıvalı sülfat referans elektrodun potansiyeli sülfat iyonlarının aktifliği ile belirlenir. Reaksiyonu $\text{Hg}_2\text{SO}_4 (k) + 2e^- \leftrightarrow 2\text{Hg}(k) + \text{SO}_4^{2-}$ şeklindedir. Bu elektrot cıva içermesi sebebiyle çok yaygın olarak kullanılmaz. Kalomel referans elektrotta gerçekleşen, $\text{Hg}_2\text{Cl}_2 + 2e^- \leftrightarrow 2\text{Hg} + 2\text{Cl}^-$ bu tepkimenin potansiyeli ortamdaki klor iyonu derişimi ile orantılır. Sıcaklık farklılıklarından kolaylıkla etkilenen kalomel referans elektrotlarının dengeye gelmesi için hazırlandıktan sonra birkaç gün bekletilmesi gerekir. Ag/AgCl referans elektrotları, $\text{AgCl} + e^- \leftrightarrow \text{Ag} + \text{Cl}^-$ tepkimesini esas alır. Bu elektrot, 0,1 M HCl'ye gümüş bir tel yerleştirilerek kolayca yapılır. Tel, bir voltaj kaynağının pozitif ucuna bağlanırken, negatif ucuna paslanmaz çelik veya platin tel bağlanarak katodu oluşturur. Akım hücre içinden geçerken, katotta hidrojen gazı oluşurken, gümüş metal anotta gümüş iyonuna oksitlenir. Gümüş iyonları hemen gümüş klorür olarak gümüş tel üzerinde birikir. Hidrojen gazının gelişimi, gümüş tel üzerindeki kaplamanın eksiksizliğinin bir göstergesi olarak kullanılabilir. Bu elektrotlar, çok yüksek sıcaklıklarda kullanılabildiğinden çok yaygın olarak kullanılırlar. Kalomel ve Ag/AgCl elektrotlardan anodik akım geçtiğinde metaller yükseltgenir ve ortamdaki aşırı klorürle çökeldiklerinden, elektrot yüzeyindeki derişimleri değişmez. Böylece potansiyelleri akımdan bağımsız olur. Bu elektrotlardan katodik akım geçtiğinde ise, çözünürlükten gelen metal iyonları indirgenir, elektrot yüzeyinde çökelek ayrışarak tekrar aynı denge düzeyinde metal iyonu oluşturur. Sonuç olarak potansiyel yine değişmeden kalır.

Voltametrde kullanılan yardımcı elektrodun görevi elektronlar için kaynak oluşturarak hücreden akım geçmesini sağlamaktır. Yardımcı elektrot, çalışma elektrodu ile bir çift oluşturur ancak ölçülen potansiyelin büyüklüğünün tespit edilmesinde etkisizdir. Akım yardımcı elektrot üzerinden geçtiği için bu elektrot için

en uygun malzeme soy metallerdir. Bu nedenle daha çok platin, grafit, tantal ya da tungsten tel çubuklar kullanılır (Öztekin, 2008).

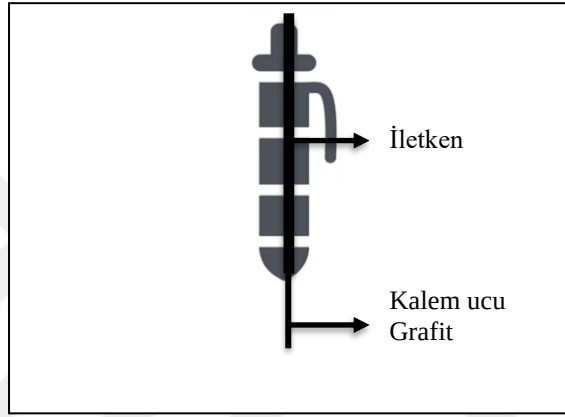
Çalışma elektrodu, analizi yapılacak iyonun aktivitesinde meydana gelen değişikliğe çok kısa sürede cevap vermelidir. Ayrıca yüksek sinyal ve düşük gürültü özelliklerinin yanı sıra tekrarlanabilir bir yanıt sağlamalıdır. Voltametrik işlemin performansı, çalışma elektrodunun yapıldığı maddeye bağlıdır. Her elektrodun potansiyel çalışma aralığı farklı olup bu aralık elektrot türüne, çözücüye, elektrolit türüne ve pH' a göre değişir (Gündüz, 2004). Çalışma elektrotları olarak cıva, platin, altın, paladyum, karbon (grafit, karbon pasta, camısı karbon) gibi çeşitli elektrotlar kullanılmaktadır.

2.2.3. Karbon çalışma elektrotları

Geniş bir potansiyel aralığında çalışma imkânı sağlayan karbon bazlı elektrotlar aynı zamanda düşük artık akımı, zengin yüzey kimyası, düşük maliyet, kimyasal eylemsizlik ve çeşitli algılama ve tespit uygulamalarına sahiptirler (Wang ve Kawde, 2001; Palecek ve Bartosik, 2012). Bu özelliklerinden dolayı günümüzde elektrokimyasal tayinlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Karbon tabanlı elektrotlar, yüzeylerinde hidroksil ve karboksil grupları içerebildiğinden elektrot modifikasyonunda çokça kullanılmaktadırlar. Karbon temelli elektrotlara camısı karbon elektrot (GCE), kalem grafit elektrot (PGE), yüzey baskılı karbon elektrot (SPCE), karbon pasta elektrot (CPE) ve karbon fiber elektrodu örnek olarak verilebilir. Bu çalışmada kalem grafit elektrot kullanılmıştır.

Son yıllarda, kalem-ucu grafit elektrotlar özellikle toksik özellik taşıyan moleküllerin basit ve hassas analizlerinde hem çok ucuz olmaları hem de yüksek tekrarlanabilirlik, tayin sınırının düşük olması, kolay hazırlanabilme ve tek kullanımlık özelliklerine sahip oldukları için biyosensör uygulamalarında ilgi uyandırmaktadır (Wang ve ark., 2000; Wang ve ark., 2001; David ve ark., 2017). Grafit ve kilin bal mumu içerisinde karıştırılması ve daha sonra ısıtılarak işleme maruz bırakılması ile kalem uçları üretilir. Kalem-ucu grafit elektrot kullanılması ile yapılan tayinlerde doğru kalem sertliğinin seçimi oldukça önemlidir (Tavares ve Barbeira, 2008). Sıcaklık ile birlikte grafit ve kil

miktarlarının değiştirilmesiyle kalem ucunun yumuşaklığı ve siyah olması sağlanmaktadır. Ayrıca, grafit miktarı arttıkça hem daha yumuşak hem de daha kalın kalem ucu üretilebilmektedir. Kalem üzerinde yazılı 3 farklı harf (B, H ve F) kalemin sertlik ve yumuşaklık durumunu gösterir. Koyu ve yumuşak uçlu kalemler B grubunda (BLACK), açık ve sert uçlu kalemler H grubunda (HARD) ve ne açık ne koyu ne de sert uçlu kalemler F grubunda (FINE) yer alır. Harfin yanında yer alan sayılar ise koyuluk derecesini gösterir ve 2 ile 9 arası bir sayı kodlaması ile ifade edilir. Kalem grafit elektrodun şematik gösterimi şekil 2.5.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Kalem grafit elektrodun şematik gösterimi

Yüksek yoğunluğu ve küçük gözenek boyutu nedeniyle, aşılama işlemi gerektirmeyen camsı karbonun yapısı çapraz bağlı grafit benzeri tabakaların ince ve karışık şeritlerinden oluşur (Engstrom, 1984). Cam benzeri bir görünüşü olması nedeniyle “camsı karbon” olarak isimlendirilen materyal inert bir atmosferde önceden modellenmiş bir polimerik (fenolformaldehit) reçine gövdesinin dikkatli ve kontrollü bir ısıtma sistemi ile hazırlanır (Adams, 1969). Karbonizasyon işlemi oksijen, azot ve hidrojeni uzaklaştırmak için 300 °C -1200 °C aralığında oldukça yavaş bir şekilde yapılır. Camsı karbon elektrot kullanmadan önce deiyonize su ile yıkanmalıdır. Elektrodun performansını artırmak için elektrokimyasal, kimyasal, ısı veya lazer işlemleri gibi ek aktivasyon adımları da kullanılmaktadır (McCreery, 1991).

Karbon pasta elektrotlar, suya karışmayan ve iletken olmayan çeşitli yapıştırma sıvıları ile karıştırılmış grafit tozu kullanılan elektrotlardır. Bu elektrotlar düşük maliyetli, yenilenebilir ve modifiye edilmiş bir yüzey ve çok düşük artık akım avantajlarına

sahiptir. Düşük uçuculuk, saflık ve ekonomi konusundaki pratik uygulamaları olan Nujol (mineral yağ), parafin yağı, silikon gresi ve bromo naftalin bu alanda kullanılan yaygın yapıştırma sıvılarıdır. Yapıştırma sıvısı içeriğindeki artış, elektron aktarım hızlarını ve ayrıca artık akım katkılarını azaltır. Tersine yapıştırma sıvısının yokluğunda kuru grafit elektrot elektron aktarım hızını arttırır (Rice ve ark., 1983).

Elektroanalizde karbon fiber elektrotların yaygın olarak kullanılmasının nedeni ultra mikroelektrotlara duyulan yoğun ilgi kaynaklıdır. Karbon fiber malzemeler, yüksek polimer tekstillerin yüksek sıcaklıktaki pirolizi, dayanımlı kompozitlerin hazırlanması veya katalitik kimyasal buhar biriktirme yoluyla üretilir. Üretim sürecine bağlı olarak düşük, orta ve yüksek modüllü farklı karbon fiber mikro yapıları ortaya çıkar. Karbon fiber yapı, düşük gözenekliliği ve iyi düzenlenmiş grafit benzeri yapısı nedeniyle elektrokimyasal çalışmalar için çok uygundur (Csöregi ve ark., 1993). Fiberin alev veya iyon ışını altında aşındırılmasıyla nanometre boyutunda karbon fiber hazırlanabilir (Edmonds, 1985).

2.3. Voltametrik Teknikler

Bu çalışmada PGE'nin aktivasyonu sırasında elektrokimyasal ölçüm yöntemlerinden kronoamperometri (CA) ve elektrodun yalın halinden sensör aşamasına kadar gerçekleşen yüzey değişimlerinin izlenmesi, sensörün tayin aralığı ve tayin sınırı çalışmalarına EIS yöntemleri ile bakılmıştır.

2.3.1. Kronoamperometri (CA)

Elektrokimyasal hücre içerisindeki durgun çözeltiye daldırılmış karışıt elektrot ile çalışma elektrodu arasına kontrol edilebilen sabit bir potansiyel uygulanarak akımın zamanla değişiminin izlendiği bir ölçüm tekniğidir (Mengü, 2017). Çalışma elektroduna uygulanan potansiyelin zamana bağlı değişim grafiği Şekil 2.6.'da verilmiştir. Difüzyon akımı ile konsantrasyon arasındaki ilişki aşağıda verilen Cottrell eşitliği ile verilir (Denklem 2.1). Bu eşitliğe göre akım, geçen sürenin karekökü ile ters orantılı olarak değişir.

$$i(t) = \frac{nFACD^{\frac{1}{2}}}{\pi^{\frac{1}{2}}t^{\frac{1}{2}}} \quad (2.1)$$

n: elektron sayısı

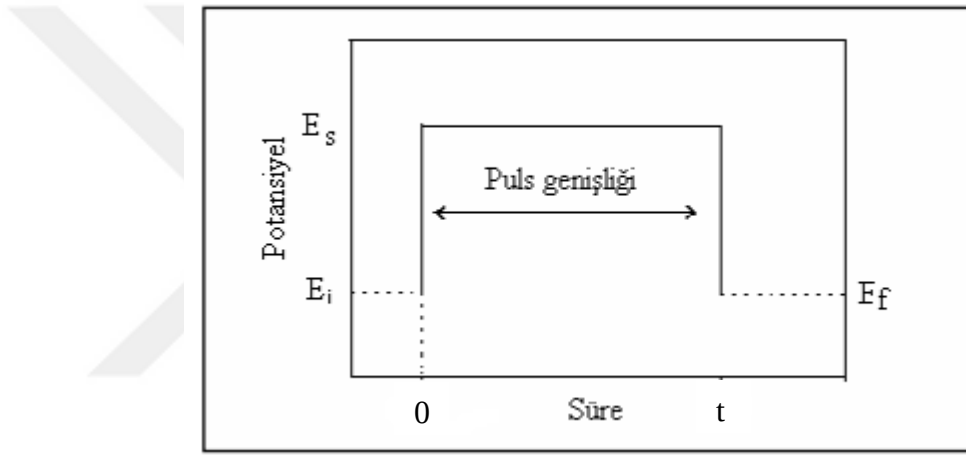
A: Yüzey alanı

F: Faraday sabiti

D: Difüzyon sabiti

C: Derişim

t: Zaman



Şekil 2.6. CA'da uygulanan potansiyelin zamana bağlı değişimi

Grafikte belirtilmiş E_i başlangıç, E_f bitiş ve E_s ise basamak potansiyeli anlamı taşımaktadır. Kronoamperometri, elektroaktif bir maddenin difüzyon katsayısının hesaplanmasında, çalışma elektrodunun yüzey alanının hesaplanmasında ve elektrodun reaksiyon mekanizmasının aydınlatılmasında kullanılır (Wang, 2000; Büyükkaya, 2011).

2.3.2. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)

EIS elektrot-elektrolit ara yüzeylerinin incelenmesi, elektrot reaksiyonlarının araştırılması ve kütle transfer oranlarının ölçülmesinde son yıllarda etkin bir şekilde kullanılan bir ölçüm tekniğidir. Ayrıca EIS tekniği; korozyon mekanizmaları

aydınlatmada, membranlarda yük transferini aydınlatılmada ve çözelti ara yüzey karakterizasyon-optimizasyon işlemlerinde çoğunlukla kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra biyosensör hazırlanmasındaki her aşamada, biyo-tanımda spesifik etkileşimlerin izlenmesi aşamasında ve kantitatif tespitin yapılması aşamasında kullanılabilecek eşsiz bir yöntemdir. EIS yöntemi, biyoreseptör ile hedef analiti arasındaki etkileşimin belirlenmesi, elektrot yüzey modifikasyon aşamalarının (aktivasyon, immobilizasyon, hibridizasyon vb.) izlenmesi ve takibi için oldukça avantajlı bir metottur. Empedans bir frekansın yanı sıra başka frekansları da belirleme özelliği taşıdığından “empedans spektroskopisi” ismini almıştır. EIS ile birden fazla frekans tayin edilebildiğinden dolayı yukarıda belirtilmiş tüm işlemlerde etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Liedberg ve ark., 1983).

EIS elektriksel devre temelinde bileşenler üzerine inşa edilmiş çok duyarlı ve hassas sonuçlar veren elektrokimyasal bir tekniktir. Bu teknik elektriksel devre temeli üzerine kurulduğundan, impedimetrik analizlerde elektrokimyasal hücre temelli bütün çalışmalar bir devreye uydurularak analiz edilmektedir. Elektrot-elektrolit ara yüzeyinde gerçekleşen fiziksel ve kimyasal olaylar normal devre elemanları olan direnç, kapasitans ve empedans gibi davranış sergilediğinden fiziksel anlamda bir eşdeğer devreye uyarlanan sistem ohm kanunu temeline dayanmaktadır (Bard ve Faulkner, 2001). Ohm kanununda doğru akım devresi için (DC) ohmik direnç R, potansiyel V ve akım I olarak tanımlanmış ve aralarındaki ilişki denklem 2.2’de verilmiştir.

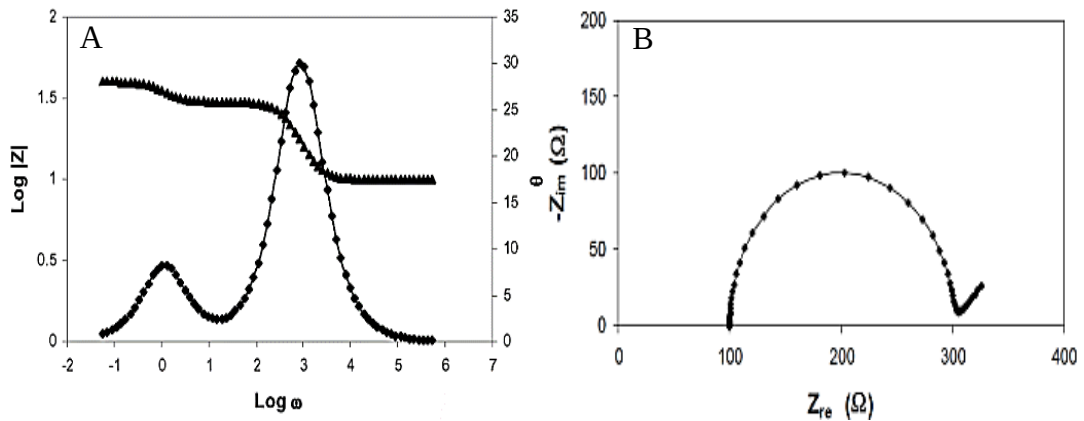
$$R = \frac{V}{I} \quad (2.2)$$

Fiziksel devrelerde bu kadar basit bir bağıntı ile verilen Ohm kanunu elektrokimyasal sistemlerde çok daha karmaşık bir hal almaktadır. Bunun sebeplerinden biri elektrot-elektrolit ara yüzeyinde meydana gelen çift tabaka yapısının devreye kapasitans olarak eklenmesidir. Diğer sebep ise yük transferinin zamana bağımlı difüzyonundan kaynaklanan dirençtir. Bundan dolayı ohmik direnç yerine devrede karmaşık yapıya sahip kapasitif, indüktif ve ohmik direnç bileşkesi ve eşdeğeri olan empedans kullanılır. Ayrıca sistemde zamanla değişen alternatif akım (AC) kullanıldığından

frekans ölçümü sistemin ana kriteri olarak ele alınır. Bu nedenle Ohm kanununda basit bir şekilde potansiyelin akıma oranı olarak ifade edilen direnç, zamanın fonksiyonu olan sinüzoidal değişen potansiyel ve akımla ilişkili empedans'a dönüşür (denklem 2.3).

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(wt)}{I_0 \sin(wt+\phi)} = Z_0 \frac{\sin(wt)}{\sin(wt+\phi)} \quad (2.3)$$

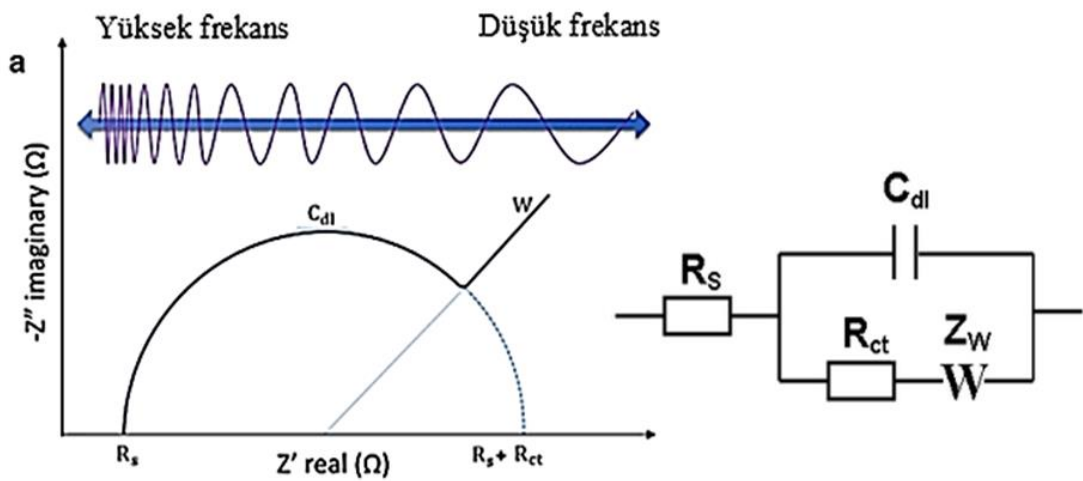
Burada Z empedans, E potansiyel, I akım ve t zaman fonksiyonu olarak ele alınmaktadır. AC sinüzoidal bir karakter taşıdığından akım ile potansiyel arasındaki zamana bağlı fark sinüs fonksiyonu ile açıklanmaktadır. Buna göre belirtilmiş devrede AC empedansı ölçülmekte ve ölçülen empedans iki farklı diyagram ile ifade edilmektedir. Bu diyagramlardan ilki frekansın logaritmik karşılığı olan Bode diyagramıdır (Şekil 2.7.A) İkincisi ise ölçümün her noktasında ölçülen empedansın gerçek ve sanal değerlerine karşılık gelen Nyquist diyagramıdır (Şekil 2.7.B). Ölçümler Bode ve Nyquist diyagramlarında yüksek frekanstan düşük frekansa (1 Mhz'den 10 μ Hz'e) doğru yapılmaktadır. Bu durum başlangıç yüzey direncinin bulunabilmesini sağlamaktadır. Nyquist diyagramları, Bode diyagramlarına göre çok daha fazla veri içerdiğinden ve yorumlamalarda daha doğru sonuçların elde edilmesine olanak sağladığından dolayı analizlerde daha fazla tercih edilmektedir. (Yuan ve ark., 2010).



Şekil 2.7. EIS (A) Bode, (B) Nyquist diyagramı

EIS’de empedans davranışı genellikle ohmik direnç, kapasitans, sabit faz elemanı ve Warburg impedansı olarak bilinen dört bileşen ile tanımlanır. Bu bileşenler seri veya paralel bağlanarak bir eşdeğer devre çizilir ve deneysel EIS verilerine uydurulmaya çalışılır. Eşdeğer devrenin doğru çizilebilmesi ve empedans diyagramının eşdeğer devre üzerine oturtulabilmesi için arayüzeyin karakterizasyonunun doğru bir şekilde yapılabilmesi elzem bir durumdur. Ayrıca hangi tabaka veya arayüzeyde gerçekleşen hangi olayın hangi devre elemanına karşılık geldiği büyük önem taşır. Elektrokimyasal hücrede empedans analizlerinde genellikle kolay ve anlaşılır olmasından dolayı Randles-Ershler eşdeğer devresi Nyquist diyagramına uydurularak kullanılır. Bu eşdeğer devre; kullanılan çözeltinin direncini (R_s), elektrot-elektrolit arayüzünde yük transfer direncini (R_{ct}), çift tabaka kapasitansını (C_{dl}) ve Warburg empedansını (W) içermektedir (Bahadır ve ark. 2016). Randles-Ershler eşdeğer devresi ve Nyquist diyagramı Şekil 2.8.’de verilmiştir.

EIS tekniği ile yapılan analizlerde ölçümler sırasında elektrot veya sensör yüzeyinde neredeyse hiç tahribat yaşanmazken analitteki tahribat yok denecek kadar azdır. Bu yüzden kullanılan elektrotların hem ömrü hem de tekrarlanabilirliği ihtimali artacağından bu tekniğin kullanımı büyük avantaj sunmaktadır (Gupta ve ark., 2014).

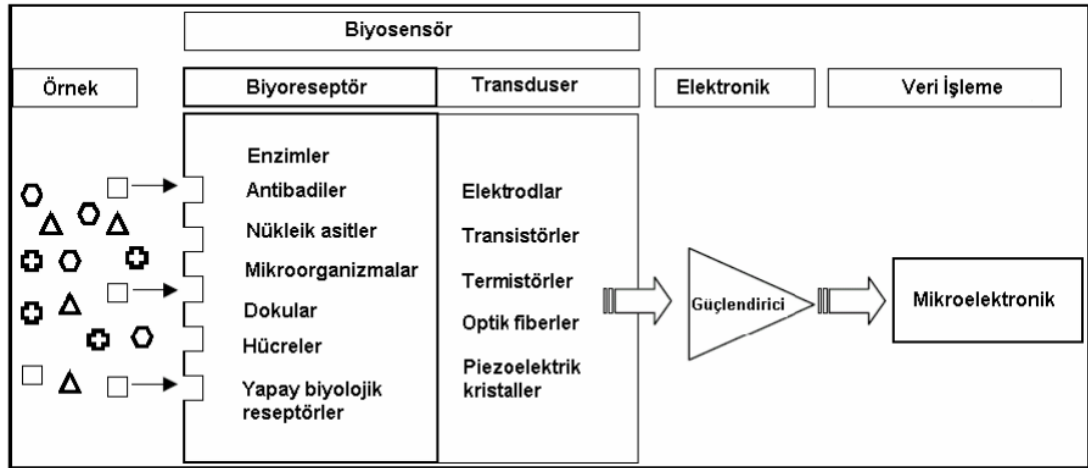


Şekil 2.8. Randles- Ershler eşdeğer devresi ve Nyquist diyagramı

2.4. Biyosensörler

Biyosensörler, bir transdüksiyon elemanı ile birlikte biyolojik tanıma elemanlarını kullanabilen ve kantitatif veya yarı kantitatif analize dayalı bilgi sağlama yeteneğine sahip cihazlardır. Biyosensör, biyolojik bir tanıma elemanını bir dedektör sistemiyle birleştirir.

Biyosensörün üç temel parçası: tanıma materyali, dönüştürücü veya dedektör sistemi ve sinyal işlemcisidir (Şekil 2.9.). Biyosensörlerde tanıma materyali olarak kullanılan algılama elemanları doku, organeller, mikroorganizmalar, nükleik asitler, antikorlar, hücre reseptörleri ve enzimler olabilir.



Şekil 2.9. Bir biyosensörün ana bileşenlerinin şematize gösterimi.

İlk olarak 1950’li yıllarda Clark tarafından ameliyat esnasında kandaki oksijen miktarının izlenmesiyle keşfi yapılan biyosensörler günümüze kadar geliştirilerek yoğun bir çalışma alanı bulmuştur. Biyosensör gelişimindeki aşamalar, biyosensörlerde kullanılan biyomateryalin değişimi ile izlenebilir. 1950’li yıllarda enzimlerin kullanımıyla elde edilen enzimatik sensörler, 1980’lerde antijen-antikor etkileşimi temeline dayanan immünosensörler (Rechnitz ve ark., 1977; Rechnitz, 1978), kandaki medikal önemde hormonların tespitini yapan hormon sensörleri (Savan ve ark., 2016), sitotoksosite ve hücre fonksiyonu temelli sitosensörler (Wu ve ark., 2013) ve nükleik asit tabanlı DNA sensörleri (Kung ve ark., 1990; Rowe ve ark., 2011)

günümüze kadar olan biyosensör gelişim silsilesi olarak özetlenebilir. Bunlara ek olarak DNA dizilerinin yapay olarak sentezlenmesinin keşfi yani aptamerlerin keşfi biyosensör teknolojisinde yoğun ilgi gören yeni bir alan olarak literatürde yerini almıştır. Apta-sensörler, biyoreseptör (tanıyıcı) kısmı aptamer zinciri içeren ve bu zincir ile etkileşime girecek olan biyolojik yapının (peptidler, vitaminler, ilaçlar, mikroorganizmalar, bakteri sporları, RNAlar) yüksek affinite ve özgülükte etkileşimini temel alan biyosensör sınıfıdır.

1960'ların başında nükleik asit elektroaktivitesinin keşfinden sonra nükleik asitlerin analizi için çeşitli elektrokimyasal yaklaşımlar gerçekleştirilmiştir (Trnkova ve ark., 2005). Analitik olarak ilgi çeken birçok bileşiğin nükleik asitler kullanılarak saptanması ve incelenmesi son on yılda artmıştır. Doğrudan DNA elektrokimyası, DNA'ya özgü redoks raportör elektrokimyası, nanopartiküller kullanılarak elektrokimyasal amplifikasyonlar ve polimer modifiye elektrotlar elektrokimyasal DNA tespiti için geliştirilmiş farklı yaklaşımlardır.

2.4.1. Biyosensör türleri ve özellikleri

Biyosensörler, kullanılan biyoreseptör veya dönüştürücü tipine göre sınıflandırılabilir (Sawant, 2017). Biyoreseptörler, dönüştürücü tarafından ölçülebilir bir sinyal üretmek için ilgili analitlerin bağlanmasına izin verir. Kullanılan biyoreseptör tipine bağlı olarak biyosensörler genel olarak dört sınıfa ayrılabilir: nükleik asit/DNA (Chamber ve ark., 2008; Li ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2012), enzimler (Newman ve Setford, 2006; Sassolas ve ark., 2012), antikor-antijen (Dai ve ark., 2005; Hoa ve ark., 2009; Omidfar ve ark., 2013) ve hücreler (Banerjee ve Bhunia, 2009; Graham ve ark., 2011; Sharma ve ark., 2013). Kullanılan dönüştürücü tipine göre biyosensörler optik, termal, piezoelektrik, kuvars kristal mikroterazi (QCM) ve elektrokimyasal olarak sınıflandırılabilir. Ek olarak, elektrokimyasal biyosensör ayrıca kondüktometrik, amperometrik ve potansiyometrik olarak sınıflandırılabilir (Fabre ve Taillebois, 2003; Gabrovskaya ve ark., 2011; Hamidi-Asi ve ark., 2013; Psychoyios ve ark., 2013).

Biyo-tanıma ilkesine dayanan iki genel biyosensör sınıfı vardır: enzim biyosensörlerine özgü (i) katalitik biyosensör ve DNA'ya özgü (ii) afinite biyosensörü ve antikorlar. Bu nedenle, elektrokimyasal transdüksiyon yöntemine sahip bir biyosensör ve biyoreseptör olarak enzimler, bir enzim biyosensörü veya katalitik biyosensör olarak adlandırılabilir. Hem biyoreseptör hem de dönüştürücüye dayalı olarak, enzim bazlı elektrokimyasal biyosensörler olarak da bilinirler. Enzim biyosensörleri, biyoreseptör olarak kullanılan spesifik enzimlere göre de kategorize edilebilir (glikoz biyosensörü, üre biyosensörü, kolesterol biyosensörü vb.). Diğer biyosensörler, DNA biyosensörü (biyoreseptör olarak DNA) ve immünosensör (biyoreseptör olarak antikor) olarak da adlandırılabilir.

Enzimler biyolojik katalizörler olup biyosensörlerde en yaygın kullanılan biyoalgılama materyalleridir. Örneğin, glikoz ölçümü için biyosensörde kullanılan glikoz oksidaz enzimi, üzerinde en çok çalışılan ve ticari olarak en fazla geliştirilen enzimdir. Biyosensörlerde kullanılan yirmi farklı enzim arasından alkalen fosfataz (ALP), karaturp peroksidaz (HRP) ve *E. coli* β -D-galaktosidaz (BG) önemli olanlarıdır. Enzim biyosensörler için kullanılan immobilizasyon metotları, enzimlerin Van der Waals kuvvetleri, iyonik bağlama veya difüzyon bariyerleriyle adsorbsiyon veya fiziksel olarak tutulması ve enzimlerin fonksiyonel protein gruplarının ve destek materyallerinin arasında gerçekleşen reaksiyon yoluyla transdüser kovalent bağlama yoluyla bağlanması olarak iki ana grupta sınıflandırılabilir (Bilitewski ve ark., 1993). Fakat, enzimler transdüserin yüzeyinde sabitlendiği zaman genellikle aktivite kaybı yaşanmıştır. Enzim sensörlerinde, enzimler genellikle amperometrik, potansiyometrik, kimyasal ışımaya ve termal transdüserlerle birlikte kullanılır (Jenkins ve Delwiche, 2002; Bilitewski ve ark., 2003; Soldatkin ve ark., 2005).

Antikorlar, önemli bir protein sınıfını olup belirli antijenlere reaksiyon olarak üretilir. Etkilere karşı toksinleri nötralize ederek, bakteri veya hücrelere yapışarak ve çözünebilir antijenleri çökeltirerek harekete geçerler. Bunlar, kendi substratlarını yapmak için özellikle ilgili antijene enzimlerden daha güçlü şekilde bağlanırlar. Antikorlar, enzimlerin katalitik aktivitelerine sahip olmasalarda son derece hassastırlar. Bir antikor, transdüser içindeki bir elektrodun veya bir optik dalga

kılavuzunun yüzeyine analite bağlandıkları zaman tespit edilebilir sinyal sağlaması için doğrudan sabitlenebilir. İmmuno sensörlerin tasarımında kullanılan üç temel format vardır. Bunlar, doğrudan immunoassay, sandviç immunoassay ve kompetitif immunoassay testleridir. Immunoassay testleri, çözeltideki her iki tepkinin konsantrasyonunu ölçmek için antijen ve antikor arasındaki reaksiyonu temel alan teknikler olarak tanımlanabilir. İmmuno biyosensörlerdeki hem birincil hem de ikincil antikorlar genel olarak elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik transdüserler aracılığı ile birleşirler (Delwiche ve ark., 2001; Sanaikone ve ark., 2004; Su ve Li, 2004; Tschmelak ve ark., 2005).

Tek dizilimli nükleik asit molekülü, numunedeki kendi tamamlayıcı partnerini tanıma ve ona bağlanma kabiliyetine sahiptir. Nükleik asit molekülünün bu özelliği bir biyosensörde gen proplarında kullanılabilir. Bu proplar, bireyin genetik yapısının araştırılmasında veya genetik hastalıklarla bağdaştırılan mutant genlerin görünümünün belirlenmesinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda hayvanlar, bitkiler, gıdalar ya da sudan gelen numunelerdeki patojenik bakteri veya virüslerin tespitinde kullanılabilirler. Son zamanlarda, biyosensörlerde biyoalgılama materyali olarak aptamerler de (diziliş havuzlarından rastgele seçilen belirli nükleik asitler) kullanılmıştır. Literatürde bazı DNA, RNA ve aptamer prob çalışmalarında, biyosensörlerde tipik olarak elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve manyetik transdüserler ile birleştirilmiştir (McCauley ve ark., 2003; Kalogianni ve ark., 2006; Zhao ve ark., 2006).

Hücre esaslı biyosensörler genelde gıda güvenliğinde patojenlerin ve toksinlerin çevresel izleme ve tespitinde biyolojik oksijen ihtiyacı (BOD) ölçümü için geliştirilmişlerdir (Chang ve ark., 2004; Goto ve ark., 2005; Kumar ve ark., 2006). Literatürde Davis tarafından yapılan çalışmada, etanol *Acetobacter xylynum* hücrelerini kullanarak etanolün tespiti için ilk mikrobiyal biyosensör geliştirilmiştir (Davis, 1975). Mikrobiyal biyosensörde, solunum temelli transdüser ile bağlantılı sabitlenmiş canlı mikrobiyal hücreler ve hücrelerin metabolik fonksiyonları bulunmaktadır. Takip edilmek istenen analit, substrat ya da inhibitor olabilir. Bu

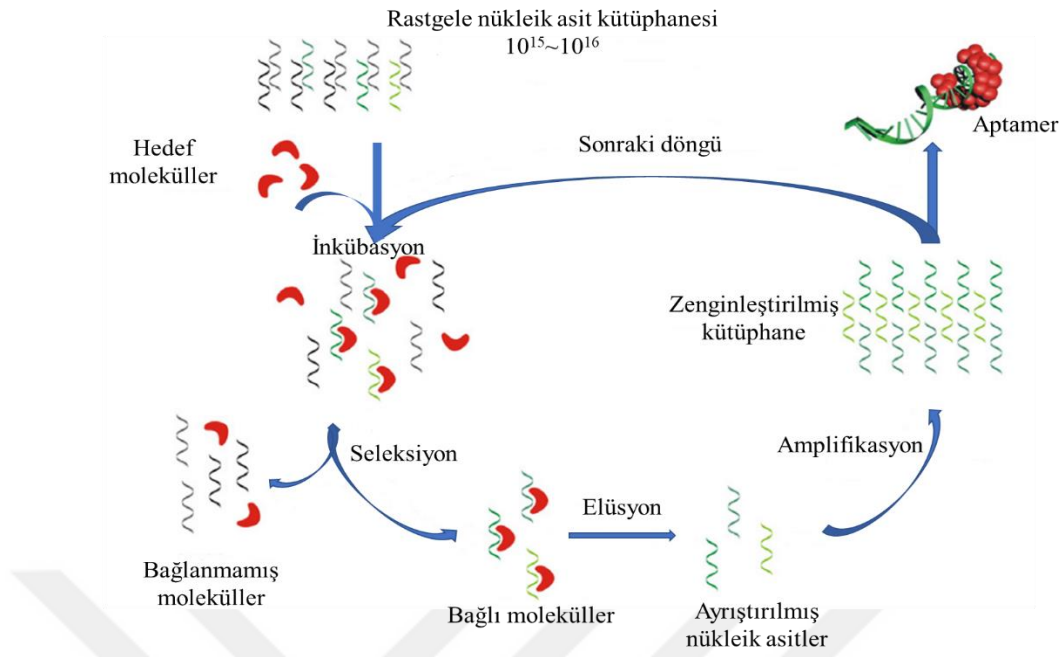
yüzden, mikrobiyal biyosensörler, algılama ve solunum aktivitesi veya elektrokimyasal aktif metabolitler olarak sınıflandırılır.

İdeal bir biyosensör oluşturmak için birtakım koşulların karşılanması gerekir. Biyosensörler küçük, taşınabilir, ucuz ve kullanımı kolay olmalıdır. Analiz amacıyla, testler arasında düşük bir varyasyon gösterebilen normal saklama koşulları altında son derece spesifik ve kararlı olmalıdır. Reaksiyon, sıcaklık ve pH gibi benzeri fiziksel parametrelerden bağımsız ve pratik olmalıdır. Biyosensörün yanıtı, seyreltme veya konsantrasyon olmaksızın ilgili konsantrasyon aralığında doğru, tekrarlanabilir, kesin ve doğrusal olmalıdır. Klinik durumların izlenmesi için prob toksik olmayan, küçük ve biyouyumlu olmalıdır. Biyosensörler, inaktivasyona veya proteolize kolayca dayanmamalıdır. Aynı zamanda insan numunelerinden alınan analitlerin hızlı ölçümlerini sağlamalıdır.

2.4.2. Nükleik asitler ve aptamerler (oligonükleitler)

Nükleik asitler, hücrelerde birincil bilgi taşıyan moleküller olarak görev yapan ve genetik materyali oluşturan doğal olarak oluşan kimyasal bileşiklerdir. Nükleotitler, nükleik asitlerin yapı taşlarıdır. Bu monomerler birleştiğinde oluşan zincire polinükleotit denir. Her nükleotid, azotlu baz olarak adlandırılan azot içeren halka yapısı, beş karbonlu şeker ve en az bir fosfat grubundan oluşur. İki ana nükleik asit sınıfı, deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asittir (RNA). DNA'daki nükleotidler ile RNA'daki nükleotidler arasındaki temel fark, şekerin doğasıdır. DNA'daki beş karbonlu şekere deoksiriboz, RNA'da şeker ribozdur. Bu ikisi yapı olarak çok benzer, sadece bir farkla, ribozun ikinci karbonu bir hidroksil grubu taşıırken, deoksiribozun eşdeğer karbonu bunun yerine bir hidrojene sahiptir. DNA'daki her nükleotid, dört olası ve guanin pürinlerdir, yapıları iki kaynaşmış karbon-azot halkası içerir. Sitozin ve timin pirimidinlerdir ve tek bir karbon-azot halkasına sahiptir. RNA nükleotidleri ayrıca adenin, guanin ve sitozin bazları da taşıyabilir, ancak timin yerine urasil (U) adı verilen başka bir pirimidin bazına sahiptirler. Bir nükleotitte şeker, baz 1' karbonuna ve fosfat grubu (veya grupları) 5' karbonuna bağlı olarak merkezi bir pozisyonda bulunur.

Aptamerler, klinik kullanım için araştırılmaya başlanan özel bir nükleik asit molekülü sınıfıdır. Bu küçük RNA/DNA molekülleri, proteinleri veya diğer hücresel hedefleri spesifik olarak bağlayabilen ikincil ve üçüncül yapılar oluşturabilir. Latince aptus (uyum) ve meros (parçacık) sözcüklerinden türetilen “aptamer” terimi, kısa RNA veya tek sarmallı DNA sentetik oligonükleotitlerinin yanı sıra yüksek afinite, seçicilik ve özgüllük ile bir hedef moleküle bağlanan peptitleri tanımlamak için kullanılır (Razmi ve ark., 2018). Aptamerler, *in vitro* olarak seçilen fonksiyonel moleküllerin mükemmel bir örneğidir. Aptamerlerin bazıları, bu oligonükleotitleri biyogölgeleme için olduğu kadar biyomedikal görüntüleme, hedefe yönelik ilaç dağıtımı ve biyobelirteç keşfi gibi diğer uygulamalar için mükemmel afinite biyoreseptörleri yapan antikorlara benzer veya hatta onlardan daha iyidir. Bu yapay biyoreseptörler, organik boyaları ve T4 DNA polimerazı bağlayan RNA moleküllerini hazırlayan iki bağımsız araştırmacı grup tarafından 1990 yılında keşfedildi (Ellington ve Szostak, 1990; Tuerk ve Gold, 1990). Aptamerler, “Eksponansiyel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi” (SELEX) adı verilen bir *in vitro* kombinatoriyal süreçle üretilir (Darmstadt ve ark., 2015; Wu ve Kwon, 2016). SELEX, belirli bir fonksiyonla sınırlandırılmış çok sayıda tek sarmallı DNA veya RNA oligonükleotidi ile başlar. Rastgele sekansın bir bölümünü içeren bir DNA oligonükleotitleri kütüphanesi sentezlenir. Oligonükleotitler, bir kombinatoriyal kimyasal sentez tekniği ile sentezlenir. Kütüphane daha sonra PCR ile dsDNA’ya ve T7 RNA polimeraz kullanılarak *in vitro* transkripsiyon ile RNA’ya dönüştürülür. Hedef analitin nükleik asit havuzunun inkübasyonundan sonra, spesifik olmayan veya düşük afiniteli bağlayıcı nükleik asit molekülleri, yıkama adımları ile uzaklaştırılır. Yakalanan RNA molekülleri, yeni bir zenginleştirilmiş DNA kütüphanesi elde etmek için RT-PCR ile ayrıştırılır, geri kazanılır ve amplifiye edilir. Tüm döngü, sonunda izole edilen ve karakterize edilen spesifik bir RNA popülasyonu elde edilene kadar tekrarlanır. Selex mekanizması şematik olarak Şekil 2.10.’da verilmiştir.



Şekil 2.10. SELEX zenginleştirme sürecinin şematik gösterimi.

Son 30 yılda, aptamer uygulamalarına artan ilgiden dolayı daha hızlı ve daha verimli yöntemlerle yüksek afiniteye sahip aptamerler üretmeye yönelik birkaç SELEX varyantı rapor edilmiştir (Darmostuk ve ark., 2015; Wu ve Kwon, 2016; Bayat ve ark., 2018).

2.4.3. Aptamer temelli biyosensörler

Aptamerler, ilaçlar, proteinler veya diğer organik veya inorganik moleküller gibi çok çeşitli hedef moleküllere yüksek afinite ve özgüllük ile bağlanabilen oligonükleotitlerdir (DNA veya RNA) (Clark ve Remcho, 2002; Luzi ve ark., 2003). Aptamer kullanılan biyosensörlere aptasensör denilmektedir. Aptamerler, teşhis ve tedavi için giderek daha önemli moleküler araçlar haline gelmiştir. Özellikle aptamer bazlı biyosensörler, antikorlar ve enzimler gibi doğal reseptörler kullanan biyosensörlere kıyasla benzeri görülmemiş avantajlara sahiptir. İlk olarak, yüksek özgüllüğe ve afiniteye sahip aptamerler, prensipte, küçük moleküllerden büyük proteinlere ve hatta hücrelere kadar değişen herhangi bir verili hedef için *in vitro* seçilebilir. Böylelikle çok çeşitli aptamer bazlı biyosensörler geliştirmeyi mümkün kılar. İkincisi, aptamerler bir kez seçildiklerinde ticari kaynaklardan yüksek

tekrarlanabilirlik ve saflıkla sentezlenebilirler. Ayrıca, protein bazlı antikorların veya enzimlerin aksine, DNA aptamerleri genellikle kimyasal olarak oldukça karardır. Üçüncüsü, aptamerler genellikle hedef bağlanması üzerine önemli konformasyonel değişikliklere uğrarlar. Bu durum, yüksek algılama hassasiyeti ve seçiciliği ile yeni biyosensörlerin tasarımında büyük esneklik sunar. Son yıllarda, konformasyonel ve ligand bağlama özellikleri açısından nükleik asit aptamerlerinin derinlemesine anlaşılması, araştırmacılarda yoğun ilgi uyandırmıştır ve aptamer reseptörlerine dayanan bir dizi biyo-tahlil yönteminin geliştirilmesini sağlamıştır (Clark ve Remcho, 2002; Tombelli ve ark., 2005; Willner ve ark., 2007; Mairal ve ark., 2008).

Aptamer bazlı biyoanalizler, sinyal toplama yöntemlerine göre elektrokimyasal, optik ve kütleyle duyarlı olmak üzere temelde üç grupta sınıflandırılmıştır. Bu çalışmada, elektrokimyasal sensörlerde, sıklıkla kullanılan elektroanalitik yöntemlerden EIS ve kronoamperometri teknikleri kullanılmıştır. Bu tekniklerde, elektron aktarımı söz konusu olup yükseltgenme ve indirgenme tepkimeleri daima bir arada yürür. Ölçümler, ikili ya da üçlü elektrot sistemi varlığı ile elektrokimyasal hücre denilen bir düzenekte gerçekleştirilir. İkili elektrot sisteminde, çalışma ve karşıt elektrot bulunur. Üçlü elektrot sisteminde ise ek olarak bir referans elektrot bulunur. Yüzeyinde analitin yükseltgendiği ya da indirgendiği çalışma elektrotları çeşitli şekil ve büyüklükte olabilir. Çalışma elektrotları, karbon, pirolitik grafit ya da camı karbon, altın ya da platin gibi inert bir metal olabilir (Liu ve ark., 2010).

Ölçüm sırasında potansiyeli dış ortamdan etkilenmeden sabit kalan elektrotlara referans elektrotlar denir. Genellikle cıva ve gümüş gibi bir metal ile o metalin az çözünen bir tuzundan yapılmıştır. Örneğin; kalomel elektrot ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$), gümüş-gümüş klorür (Ag/AgCl), cıva sülfat elektrot ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4$), bakır-bakır (II) sülfat elektrodu (Cu/CuSO_4) ve benzeri (Yıldız ve Genç, 1993; Skoog ve ark., 1996; Service, 1998).

Genellikle platin tel ya da cıva havuzu şeklinde olan ve çalışma elektrodu ile referans elektrodu arasındaki gerilim farkını koruyan elektrotlara yardımcı elektrot denir. Bunlar inertsdir ve ölçülen akım üzerinde bir etkisi yoktur (Grieshaber ve ark., 2008).

2.4.4. miRNA, miRNA'ların biyooluşumu ve fonksiyonu

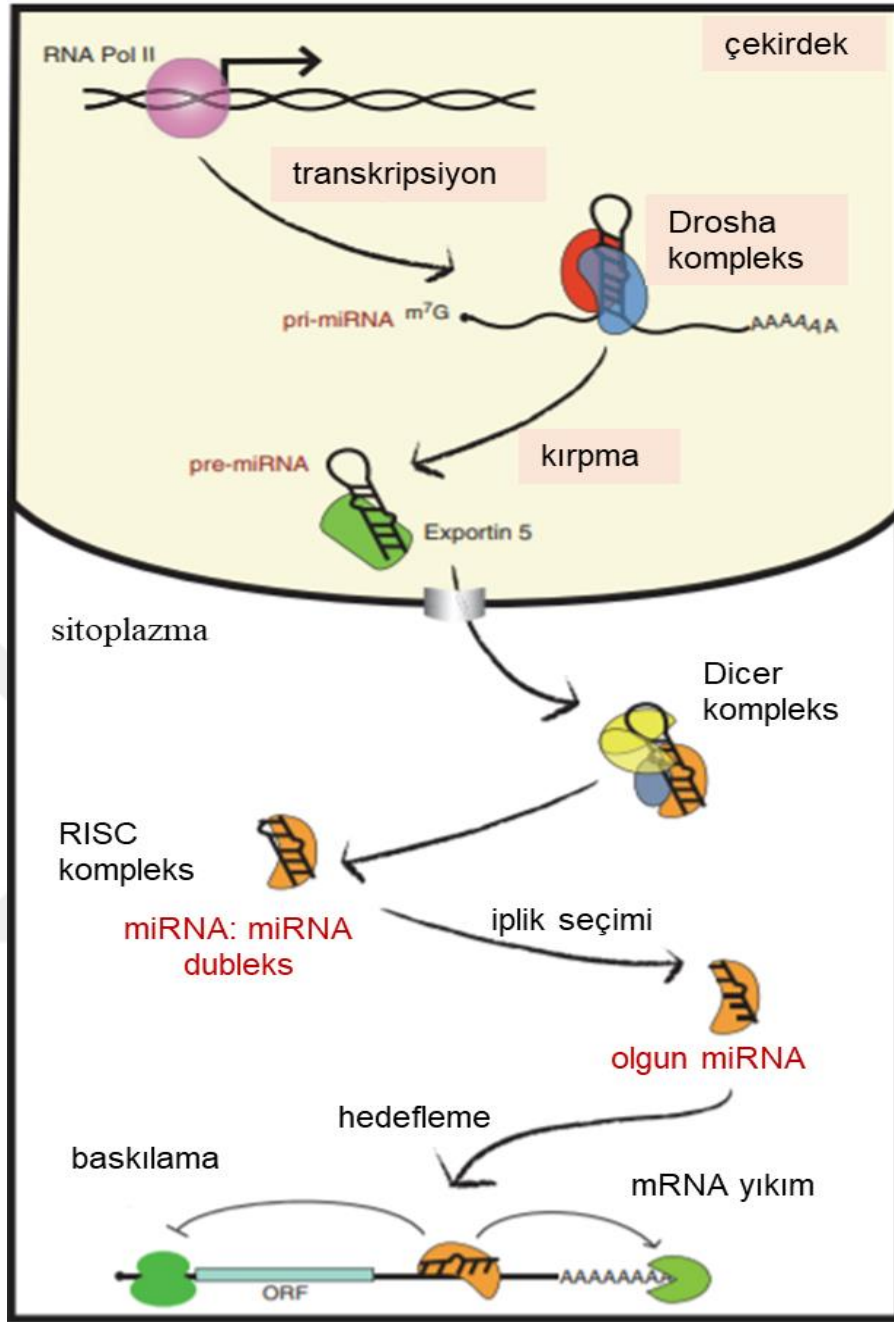
İlk miRNA (mikroRNA), Lee ve arkadaşları tarafından 1993 yılında Victor Ambros laboratuvarında *Caenorhabditis elegans* yuvarlak solucanında keşfedilmiştir (Lee ve ark., 1993). Daha sonrasında miRNA terimi ilk 2001 yılında literatürde yer almıştır (Ruvkun, 2001). Yapılan alışmada *C. elegans* solucanının gen içeriği taranarak lin-4 olarak adlandırılan genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotit uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiği görülmüştür (Lee ve ark., 1993). Lin-4'n belirlenmesinin ardından, 2000 yılında yapılan başka bir çalışmada *C. elegans* solucanında 21 nükleotit uzunluğunda ve let-7 olarak adlandırılan ikinci bir miRNA ileri yönlü genetik kullanılarak keşfedilmiştir (Reinhart ve ark., 2000). Pasquinelli ve arkadaşları, let-7'nin insanları da içine alan türler arasında korunmuş olduğunu keşfederek let-7'nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermişlerdir (Pasquinelli ve ark., 2000). Literatürde daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda let-4 ve let-7'ye benzeyen birçok kk RNA molekülü, çeşitli bitki ve hayvanlarda keşfedilmiştir (Lagos-Quintana ve ark., 2001; Saxena ve ark., 2003; Saydam ve ark., 2011).

miRNA'lar yaklaşık 21-23 nükleotit uzunluğunda olup yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan fakat proteine translasyonu gerçekleşmeyen tek iplikli RNA molekülleridir (Saydam ve ark., 2011). miRNA'lar hücre proliferasyonu, apoptoz, farklılaşma, gelişme ve hematopoez metabolizması gibi birçok önemli biyolojik olayda işlev görmektedir (Cheng ve ark., 2005; Bandiera ve ark., 2010). Birbirini izleyen üç adımlık işlem süreci sonucunda miRNA'ların sentez süreçleri gerçekleşmektedir. İlk olarak miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. Ardından pri-miRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA) adlı kısa sap-ilmik yapılarına nükleus içinde dönüştürülür. Son olarak, olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (Denli ve ark., 2004).

RNA polimeraz II enzimi, miRNA'ları pri-miRNA olarak genomik DNA'dan sentezler. Bu transkriptler 500-3000 baz, "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır. Çekirdek içerisinde bulunan pri-miRNA, Drosha adlı bir nükleaz ve

Pasha adlı çift iplikli RNA bağlayıcı proteinden oluşan mikroişlemci kompleks (microprocessor complex) tarafından 70 nükleotid uzunluğunda olan sap-ilmik şekilli pre-miRNA'ya dönüştürülür. Pre-miRNA molekülü, Exportin 5 (nüklear taşıma reseptörü) ve RAN-GTP (nüklear bir protein)'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır. Ardından, pre-miRNA'lar sitoplazmada Dicer adlı endonükleaz tarafından kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksine dönüşürler. Dicer aynı zamanda miRNA ifadesi ve RNA interferanstan kaynaklanan gen susturmasından sorumlu olan RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RISC) oluşumunu başlatır. Daha sonra RISC kompleksinde yer alan bir RNAz olan Argonaute proteini, daha kararlı olan miRNA: miRNA dubleksinden sadece birini seçerek RISC kompleksine dahil eder. Bu iplik kılavuz iplik (guide strand) olarak adlandırılırken diğer iplik anti-kılavuz olarak adlandırılır ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. Tek zincirli miRNA'yı içeren aktif RISC kompleksi baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanarak ya protein translasyonunun baskılanmasına (inhibisyonuna) ya da mRNA'nın yıkımına neden olur (Şekil 2.11.) (Bernstein ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2002; Lund ve ark., 2004; Gregory ve ark., 2005).

Bir miRNA baz çiftleşme özelliği ile mRNA'ya bağlanır. miRNA'ların çoğu, hedef mRNA'nın 3' ucundaki UTR (translasyona uğramayan bölge) bölgesine bağlanır. Bu bağlanma kusurlu, mükemmel olmayan ve eksik komplementerliği içerir ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. miRNA'ların diğer bir bağlanma bölgesi olan hedef mRNA'nın ORF (open reading frame) bölgesidir. Bu bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği gösterir ve Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır (Pillai, 2005; Sun ve ark., 2010). miRNA'lar kendi nükleotid dizilerine komplementer hedef genleri tanıma özelliğine sahiptir. miRNA'ların her biri birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebilir ve mRNA'ların her biri de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebilir.



Şekil 2.11. miRNA biyogenez yolu (Davis-Dusenbery ve Hata, 2010)

2.4.5. miRNA ve kanser

Araştırmacılar, miRNA'ların çok farklı hücresel ve metabolik yolları kontrol eden gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu ve hücrede miRNA seviyelerinin normal koşulların dışına çıkmasının insanlarda kanser gelişimi ile bağlantılı olduğunu rapor etmişlerdir (Wijnhoven ve ark., 2007; Shenouda ve Alahari,

2009). miRNA'ların tümör gelişiminde onkogen veya tümör süpresörler olarak fonksiyon gösterdiğinden kanserin erken teşhisi ve tedavisi için önemli olabileceği çok açıktır. mir-17-92 gibi kanserde ekspresyon seviyesi artmış miRNA'lar, onkogen olarak görev yapmaktadır. Hücre farklılaşması ve apoptozu kontrol eden tümör baskılayıcı gen veya genleri negatif olarak etkileyerek kanser gelişimini desteklemektedirler (Koralov ve ark., 2008).

Calin ve arkadaşlarının 2002 yılında Kronik Lenfositik Lösemili (KLL) hastalarda yaptıkları moleküler çalışma ile kanserleşme sürecine miRNA'ların katkıda bulunduğu ortaya konulmuştur (Calin ve ark., 2002). 245 insan ve fare miRNA probu içeren miRNA mikroarray çalışması ile mir-15-a ve mir-16-1'in ekspresyon düzeylerinin B hücreli KLL hastalarında belirgin şekilde azaldığı rapor edilmiştir. Aynı araştırma grubunun 2004 yılındaki, 186 adet insan miRNA geninin DNA üzerindeki pozisyonunu haritalandırma çalışmasında miRNA genlerinin çoğunlukla, heterozigozitenin kaybolduğu bölgeler olan kırılma kısımlara yerleşik olduğu rapor edilmiştir (Calin ve ark., 2004). Bu moleküler lezyonlar sonucu oluşan genetik hasar spesifik kanserlere neden olmaktadır. Michael ve arkadaşları, normal dokular ile karşılaştırıldığında insanlardaki katı tümörlerde (kolonik ve rektal adenom karsinomlar) ekspresyon seviyeleri değişmiş olan miRNA'ları tespit ettiler (Michael ve ark., 2003). Literatürde, değişikliğe uğramış miRNA seviyeleri malign beyin tümörlerinde (Chan ve ark., 2005), tiroid kanserinde (He ve ark., 2005), meme kanserinde (Le Quesne ve Caldas, 2010), prostat kanserinde (Hayashita ve ark., 2005), hepatosellüler karsinomda (Murakami ve ark., 2006), Burkitt's lenfomada (Metzler ve ark., 2010) ve akciğer kanserinde (Sevli ve ark., 2010) keşfedilmiştir.

2.4.6. miRNA tayini için geliştirilmiş elektrokimyasal biyosensörler

Geleneksel miRNA belirleme tekniklerinin aksine biyosensör teknolojileriyle birlikte elektrokimyasal algılama teknikleri zamandan tasarruf, belirli bir tanıma süreci sunarak basit analiz ve az miktarda numune gerektirmesi gibi daha fazla avantaja sahiptir. Elektrokimyasal teknikler, hassas, seçici algılama, elde etmek ve üretilmiş biyosensörleri minyatürleştirmek için güvenilir ve hızlı bir yanıt sunar.

Elektrokimyasal miRNA biyosensörlerinde altın, camsı karbon, indium kalay oksit (ITO) ve grafit gibi farklı elektrotlar transdüksiyon elementi olarak kullanılmaktadır. Nükleik asit probu ile miRNA hedefi arasındaki hibridizasyona bağlı değişimlerin ölçümüyle algılama olmaktadır.

Amperometrik, voltametrik, potansiyometrik, kondüktometrik, impedimetrik ve alan etkili transistör tabanlı biyosensörler dahil miRNA analizi için geliştirilmiş farklı elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Amperometri, uygulanan sabit bir potansiyelde akımı ölçerek ve ölçülen akımı analit konsantrasyonuyla ilişkilendirerek bir analitin saptanmasını sağlar. Voltametri ise potansiyel belirli bir oranda artırıldığında akımın ölçülmesine izin verir. Her iki teknik de birkaç durumda aynı anda bile miRNA analizi için yaygın olarak kullanılmıştır. miRNA'ların küçük boyutu nedeniyle, elektrokatalitik amplifikasyon ile birleştirilmiş hedef miRNA'ların doğrudan etiketlenmesi, diğer geleneksel tekniklere kıyasla algılama hassasiyetini artırmak için uygun bir yaklaşımdır. Bir veya daha fazla analitin konsantrasyonunu belirlemek için iki elektrot arasındaki bir çözeltinin potansiyelini ölçen potansiyometri, ilk olarak 2011 yılında nükleik asit dizilimi için Rothberg ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur (Rothberg ve ark., 2011). Bir kimyasal reaksiyonun ilerlemesini değerlendirmek için elektrolitik iletkenliği ölçen kondüktometri, 2007 yılında Fan ve arkadaşları tarafından nano-aralıklı mikroelettrot tabanlı bir sensör ile miRNA'ların ultrahassas tespiti için başarıyla kullanılmıştır (Fan ve ark., 2007).

Bir elektrik devresinin veya bileşeninin, ohmik direnç ve reaktansın birleşik etkilerinden kaynaklanan farklı frekanslardaki alternatif akım sinyaline karşı etkin direncini ölçen EIS, miRNA analizi için kullanılmıştır. Bu çalışmada da elektrokimyasal miRNA biyosensörlerinde transdüksiyon mekanizması empedans temelli yaklaşım ile incelenmiştir. EIS, bir dönüştürücü kullanarak ve bir amplifikatör ile sinyali büyüterek reaktif yüzeylerdeki küçük değişiklikleri hızla tespit edebilen hassas analitik tekniklerden biridir. Bu özellik EIS'yi nükleik asit biyosensörleri için daha uygun tespit yöntemlerinden biri haline getirmektedir. Ayrıca EIS serum gibi karmaşık çözeltilerde analiz yapılmasına da imkân sağlar.

Literatürde, miRNA biyosensörlerinin geliştirilmesinde birkaç EIS yaklaşımı denenmiştir. 2011 yılında Peng ve Gao, 3,3'-dimetoksibenzidinin (DB) RuO₂ nanoparçacıkları ile katalizlenmiş polimerizasyonunu ve bir poli (3,3'-dimetoksibenzidin) (PDB) yalıtkan filminin miRNA şablonlu birikimini kullanan etiketsiz bir impedimetrik miRNA biyosensörünü bildirmişlerdir (Peng ve Gao, 2011). Bu çalışmada, altın elektrot yüzeyinde oligonükleotid yakalama problemleri ve 4-merkaptan anilin karışımı bir SAM oluşturulmuştur. RuO₂ etiketli hedef miRNA ile hibridizasyon üzerine, oluşturulan hibrit bir DB/H₂O₂ karışımı ile inkübe edilmiştir. Biriken PDB miktarı ve izolasyon etkisinin miRNA konsantrasyonu ile doğru orantı olduğu tespit edilmiştir. EIS ölçümleri, 3 fM'lik bir saptama limiti ile miRNA seviyesinin doğrusal olarak tespitine imkân vermiştir.

İlgili bir çalışmada, indiyum kalay oksit (ITO) kaplı cam elektrot yüzeyinde yük-nötr morfolino yakalama problemlerinin SAM'ı oluşturulmuştur (Gao ve ark., 2013). Hedef miRNA ile hibridizasyon üzerine, biyosensörün nötr yüzeyi miRNA ipliklerinin negatif yüklü fosfat grupları sayesinde anyonik hale getirilmiştir. Daha sonra, yalıtkan polimer film PDB'nin depozisyonu, H₂O₂ varlığında DB'nin yaban turpu peroksidaz katalizli polimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Birikmiş PDB miktarı ve bunun yalıtkan etkisi, doğrudan hedef miRNA'nın seviyesi ile ilişkilidir. Optimize edilmiş bu koşul altında, 2 fM'lik bir saptama limiti ile miRNA ekspresyon profili oluşturma için EIS kullanılmıştır.

Başka bir çalışmada, altın elektrodun yüzeyine sabitlenmiş bir yakalama probu olarak tiyol ile modifiye edilmiş DNA'nın bir SAM'ına dayanan bir impedimetrik biyosensör Ren ve arkadaşları tarafından sunulmuştur (Ren ve ark., 2013). Çalışmada, hedef miRNA ile hibridizasyondan sonra, oluşturulan hibrit, daha fazla hibridizasyon için hedef ipliği numune solüsyona geri salan dupleks spesifik bir nükleaz enzimi kullanılarak bölünmüştür. Böylece bir izotermal sinyal amplifikasyon döngüsü oluşturulmuştur. Kontrol ve nükleazla muamele edilmiş biyosensör arasındaki empedanstaki belirgin fark, 1 fM'lik bir saptama limiti ile miRNA'nın hassas bir analizine imkân sağlamıştır.

Literatürde ilk kez Shen ve arkadaşları tarafından miRNA'ların gelişmiş hassasiyetle etiketsiz tespitini sağlayan polimer biriktirme tabanlı bir amplifikasyon protokolü ile birlikte bir impedimetrik miRNA biyosensörünü tanımlanmıştır. Hedef miRNA ile hibridizasyondan sonra hibritlenmemiş yakalama iplikleri nükleaz enzimi ile sindirilmiştir. Ardından, bir oligonükleotit kuyruklu DNAzim kullanılarak ikinci bir hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Bir DB/H₂O₂ karışımı ile inkübasyon üzerine, DNAzim, DB'nin polimerizasyonunu tetiklenmiş ve hibrit, PDB'nin birikmesini yönlendirmek için bir şablon görevi görmüştür. Oluşturulan PDB, 2 fM'lik bir saptama limiti ile miRNA konsantrasyonu ile orantılı olarak arayüzey direncinde bir değişikliğe neden olmuştur. Biyosensör performansı hücre kültürlerinden ekstrakte edilen örneklerde test edilmiştir (Shen ve ark., 2013).

Aynı çalışma grubu, kümülatif bir sinyal amplifikasyon mekanizması dahil ederek, hibritleştirilmiş hedef miRNA güdümlü polianilin (PAn) kaplamayla, EIS'de biyosensörün yük transfer direncinin ölçülmesiyle miRNA'ların etiketsiz tespitini gerçekleştirmiştir (Deng ve ark., 2014).

Voccia ve arkadaşları, camı karbon elektrotlar ve ekran baskılı karbon elektrotlar üzerinde faradaik EIS ölçümleri ile etiketsiz miRNA belirleme ön sonuçlarını rapor etmişlerdir. Tamamlayıcı miRNA'ya göre ortaya çıkan biyosensörün saptanabilirliği 100 pM'nin altında tespit edilmiştir (Voccia ve ark., 2015).

Li ve arkadaşları, grafen oksit kaplı bir elektrot kullanılarak EIS ve floresan teknikleri ile miRNA-21 için basit ve hassas çift kontrollü bir biyosensör geliştirmiştir (Li ve ark., 2015). Bu çift kontrol algılama yöntemi, miRNA, RNA, DNA ve diğer biyomolekülleri tespit etmek için kullanılabilir.

Daneshpour ve arkadaşları, sinyal etiketi olarak altın-manyetik nanopartiküllerin elektrokimyasal özelliklerinden yararlanarak miR-106a ekspresyon seviyesini ölçebilen ultra hassas bir miRNA nanobiyosensörü geliştirmiştir. Çalışmada, elektrodun başarılı modifikasyonu ve hedef miRNA ile hibridizasyonu, EIS ve döngüsel voltametri (CV) yöntemleri ile doğrulanmıştır. Önerilen nanobiyosensör,

gerçek serum örneklerinde miRNA hedeflerini doğru bir şekilde izlemiştir (Daneshpour ve ark., 2016).

Yammouri ve arkadaşları, EIS temelli etiketsiz miRNA-125a tespiti için PGE elektrotları karbon siyahı, çok duvarlı karbon nanotüpler ve grafen oksit nanomalzemeler ile modifiye etmiştir. Bu çalışmada, miRNA tespiti için karbon siyahı nanoparçacıklara sahip modifiye elektrotlar ilk kez kullanılmıştır ve 10 pM'ye (1 pg/mL) eşit olan en düşük miRNA-125a saptama limiti, karbon siyahı ile elektromodifiye edilmiş PGE'de elde edilmiştir (Yammouri ve ark., 2017).

Azzouzi ve arkadaşları, altın nanoparçacıklar (AuNP) ve yüzey supramoleküler etkileşiminin kombinasyonuna dayanan miRNA-21 tespiti için impedimetrik bir biyosensör geliştirmişlerdir. Çalışmada, son derece spesifik, çift işlevli (biyotin ve tiyol) DNA/LNA oligonükleotit problemleri (moleküler beacons-MB), entegre biyolojik tanıma elemanı / elektro aktif etiket (biotin-MB-AuNP'ler) oluşturmak için AuNP'ler ile konjuge edilmiştir. Bu, tek adımlı bir hedef tanımayı ve dönüştürücü üzerinde yakalamayı ve ardından miRNA-21'in son derece hassas impedimetrik algılamasını kolaylaştırmıştır (Azzouzi ve ark., 2017).

Erdem ve arkadaşları, kimyasal olarak aktiveleştirilmiş PGE elektrotların yüzeyleri üzerine grafen oksit (GO) modifikasyonu yapmış ve CA-GO ile modifiye edilmiş PGE, Alzheimer hastalığı ve farklı kanser türleri ile ilgili miRNA-34a'nın impedimetrik tespiti için kullanılmışlardır. PGE yüzeyinin kimyasal aktivasyonu, ilk olarak GO'nun elektrot yüzeyinde etkin modifikasyonu için kovalent ajanlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada miRNA-34a'nın dedeksiyon limiti 0,29 µg/mL bulunmuştur. Ayrıca, miRNA-34 için impedimetrik biyosensörün seçiciliği de diğer tamamlayıcı olmayan miRNA dizilerine (miRNA-15a, miRNA-16, miRNA-155 ve miRNA-660 tamponda (PBS; pH 7.40) veya yapay serum ortamında; örneğin, fetal sığır serumu) karşı test edilmiştir (Erdem ve ark., 2017).

Eksin ve Erdem tarafından ilk kez yapılan çalışmada, grafen oksit (GO) modifiye tek kullanımlık PGE'de CpDNA ve hedef moleküllerin guanin oksidasyon sinyalini ölçerek miRNA tespiti için geliştirilmiştir (Eskin ve Erdem, 2018).

Asadi ve Ramasamy, prostat kanserinin erken evresi için iyi bilinen bir biyobelirteç olan miRNA-21'in tespiti için grafen modifiye camı karbon elektrota dayalı bir elektrokimyasal biyosensör geliştirmiştir. Tek iplikli prob DNA'nın elektrot yüzeyi üzerine immobilizasyonu için yeni bir moleküler bağlama maddesi kullanmışlardır. Biyosensör, gerçek plazma numunelerinde kabul edilebilir tekrarlanabilirlik, rejenerasyon yeteneği ve stabilitenin yanı sıra dikkate değer bir yanıt (%90-116 geri kazanım) göstermiştir (Asadi ve Ramasamy, 2020).

Eksin ve arkadaşları 2021 yılında, EIS ölçümleri yoluyla hedef miRNA 155'i tespit etmek için altın nanopartiküller ile modifiye edilmiş kağıt bazlı elektrot montaj sistemi geliştirilmiş ve taramalı elektron mikroskobu (SEM), döngüsel voltametri (CV) ve EIS ölçümleri ile karakterize etmişlerdir (Eksin ve ark., 2021).

Bolat ve arkadaşları, kanserle ilişkili miRNA-192'nin hibridizasyonunu ve tespiti için destekleyici bir matris olarak tek adımda tek kullanımlık PGE'ler üzerinde grafen oksitin kurşun kalem grafit elektrotlar (PNT-GO/PGE) kombinasyonuna dayalı biyoyumlu, etiketsiz biyosensör yapısını örnekleyen ilk çalışmayı yapmışlardır (Bolat ve ark., 2021).

Mujica ve arkadaşları, hibridizasyon olayını dönüştürmek için redoks probu olarak $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ kullanarak miRNA-21'in kantitatif tayini için impedimetrik bir genosensör rapor etmişlerdir. Bu biyolojik platformu için kitosan (CHIT) ile modifiye edilmiş indirgenmiş grafen oksitin (RGO) kovalent bağı ve aminli DNA probunun daha fazla kovalent bağlanmasıyla tiyollenmiş altın bir elektrot kullanılmıştır (Mujica ve ark., 2021).

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Cihazlar

Potansiyostat: Gamry marka potentiostat interface 1000 model potansiyostat ve empedans analizörü

Analitik Terazi: Shimadzu (model AUX220)

Manyetik karıştırıcı: IKA (C Mag HS 7)

Sonikasyon Cihazı: Weightlab Instruments (WF-UD2)

Saf su Cihazı: Sartorius Stedim (Arium 611UV)

pH-metre: Eutech Cyberscan 500 model pH metre

Kalem grafit elektrot: 0.5 2B Tombow Mono Lead uç, Japonya

Ag/AgCl (3M KCl) referans elektrot: BASi MF-2056-1,6mm

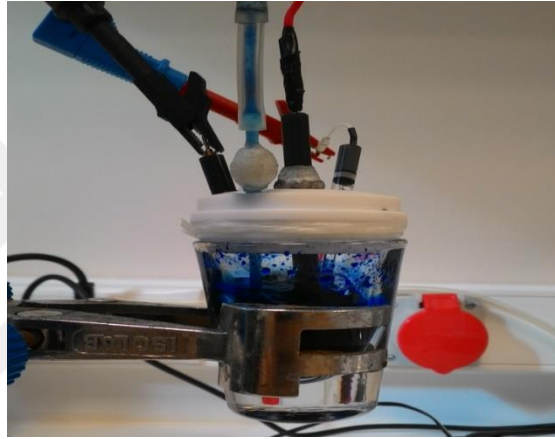
Platin tel: Yardımcı elektrot

3.1.1. Potanstiyostat- galvanostat

Elektrokimyasal ölçümler, elektrot yüzey aktivasyonu ve yüzey karakterizasyon işlemleri Gamry marka potentiostat-galvanostat interface 1000 cihazı ile yapılmıştır (Şekil 3.1). Çalışmalar üç elektrotlu çalışma hücresinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Bu üç elektrotlu çalışma hücresinde Kalem grafit elektrot (PGE) çalışma elektrodu, platin tel karşıt elektrot ve Ag/AgCl (3M KCl) elektrodu referans elektrot olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Gamry interface 1000 model potansiyostat ve empedans analizörü



Şekil 3.2. Kullanılan elektrokimyasal hücre

3.2. Kimyasallar ve DNA-RNA Oligonükleotidleri

3.2.1. Kimyasallar

N-hidroksisüksinimid (NHS) (Sigma-Aldrich)

N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil karbodiimid (EDC) (Sigma-Aldrich)

Sodyum klorür (Sigma-Aldrich)

Potasyum klorür (Sigma-Aldrich)

Hidroklorik Asit (%37) (Merck)

Asetik Asit (%99-100) (Sigma-Aldrich)

Sodyum Hidroksit (Merck)

Sodyum Asetat Trihidrat (Sigma-Aldrich)

Potasyum Dihidrojen Fosfat (Sigma-Aldrich)
Yapay fetal sıgır serumu (FBS) (Sigma-Aldrich)
Potasyum Ferrosiyanür (Sigma-Aldrich)
Potasyum Ferrisiyanür (Sigma-Aldrich)

3.2.2. DNA ve miRNA oligonükleotidleri ve baz dizilimleri

DNA Oligo: CP-DNA-miR-31

Baz Dizilimi: 5'-AGC TAT GCC AGC ATC TTG CCT-3' (21 Nükleotid)

DNA Oligo: CP-DNA-let-7d

Baz Dizilimi: 5'-AAC TAT GCA ACC TAC TAC CTC T-3' (22 Nükleotid)

DNA Oligo: CP-DNA-miR-133a

Baz Dizilimi: 5'-ATT TGG TTC CAT TTT ACC AGC T-3' (22 Nükleotid)

DNA Oligo: CP-DNA-miR-133aNH₂

Baz Dizilimi: 5'-ATT TGG TTC CAT TTT ACC AGC TTT TTT TTT TTT-3'-NH₂
(Amin uçlu)

RNA Oligo: Target-hsa-miR-31

Baz Dizilimi: 5'-AGG CAA GAT GCT GGC ATA GCT-3' (21 Nükleotid) (DNA tabanlı)

RNA Oligo: Target-hsa-let-7d

Baz Dizilimi: 5'-AGA GGT AGT AGG TTG CAT AGT T-3' (22 Nükleotid) (DNA tabanlı)

RNA Oligo: Target-hsa-let-7d

Baz Dizilimi: 5'-aga ggu agu agg uug cau agu u-3' (22 Nükleotid) (u: urasil) (RNA tabanlı)

RNA Oligo: Target-hsa-miR-133a

Baz Dizilimi: 5'-agc ugg uaa aau gga acc aaa u-3' (22 Nükleotid) (u: urasil) (RNA tabanlı)

RNA Oligo: Target-hsa-miR-31

Baz Dizilimi: 5'-agg caa gau gcu ggc aua gcu-3' (21 Nükleotid) (u: urasil) (RNA tabanlı)

3.3. Çözeltiler ve Hazırlanmaları

3.3.1. Tampon çözeltilerin hazırlanması

Asetat (ABS) Tamponunun Hazırlanışı: 500 mL 0,05 M asetat tamponu 0,1361 g sodyum asetat trihidrat ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$), 1,445 mL asetik asit (CH_3COOH) ve 0,5845 g sodyum klorür ($NaCl$) kullanılarak hazırlanmıştır. $NaCl$ 'nin konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde ayarlanmıştır. Çözeltinin pH' sı derişik $NaOH$ ve/veya derişik HCl eklenmesiyle 4,8 değerine pH metre ile kontrol edilerek ayarlanmıştır.

Fosfat (PBS) Tamponunun Hazırlanışı: 500 mL 0,05 M fosfat tamponu 3,4 g potasyum dihidrojen fosfat ($KH_2(PO_4)$) ve 0,5845 g sodyum klorür ($NaCl$) kullanılarak hazırlanmıştır. $NaCl$ 'nin konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde ayarlanmıştır. Çözeltinin pH'sı derişik $NaOH$ ve/veya derişik HCl eklenmesiyle 7,8 değerine pH metre ile kontrol edilerek ayarlanmıştır.

3.3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Redoks Çifti Çözeltisinin Hazırlanışı: 100 mL 5 mM potasyum ferrosiyanür- 100 mM potasyum klorür çözeltisi 0,211 g $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ve 0,745 g KCl kullanılarak hazırlanmıştır. 100 mL 5mM potasyum ferrisiyanür- 100 mM potasyum klorür çözeltisi 0,165 g $K_3[Fe(CN)_6]$ ve 0,745 g KCl kullanılarak hazırlanmıştır. EIS ölçümlerinde kullanılacak redoks çifti $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ çözeltisinde potasyum ferrosiyanür-ferrisiyanürün son konsantrasyonları 2,5 mM ve potasyum klorürün konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde her çalışmada taze hazırlanmıştır.

N-hidroksisüksinimid (NHS) Çözeltisinin Hazırlanışı: 50 mL 10 mM NHS çözeltisi 0,058 g NHS kullanılarak Dnaz ve Rnaz enzimlerinden arındırılmış ultra saf su ile hazırlanmıştır.

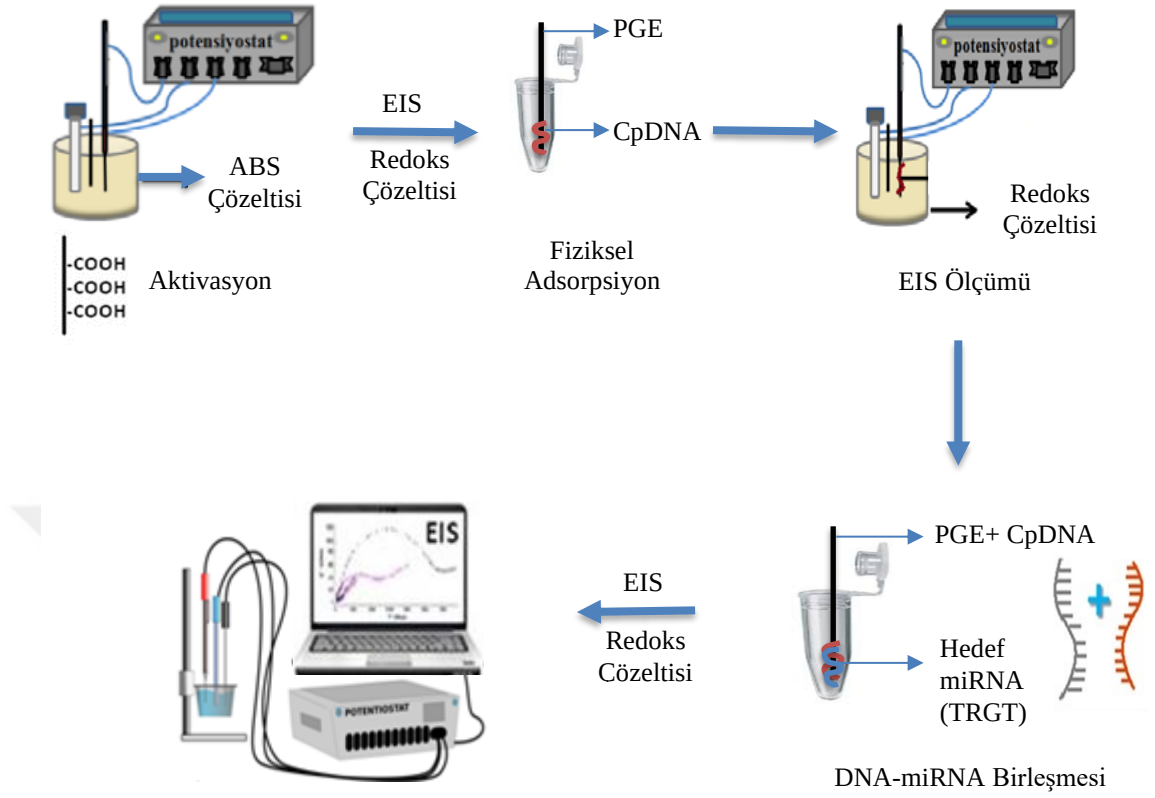
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil karbodiimid (EDC) Çözeltisinin Hazırlanışı: 50 mL 10 mM EDC çözeltisi 0,096 g madde kullanılarak Dnaz ve Rnaz enzimlerinden arındırılmış ultra saf su ile hazırlanmıştır.

3.3.3. DNA oligonükleotid (CpDNA) ve hedef miRNA çözeltilerinin hazırlanışı

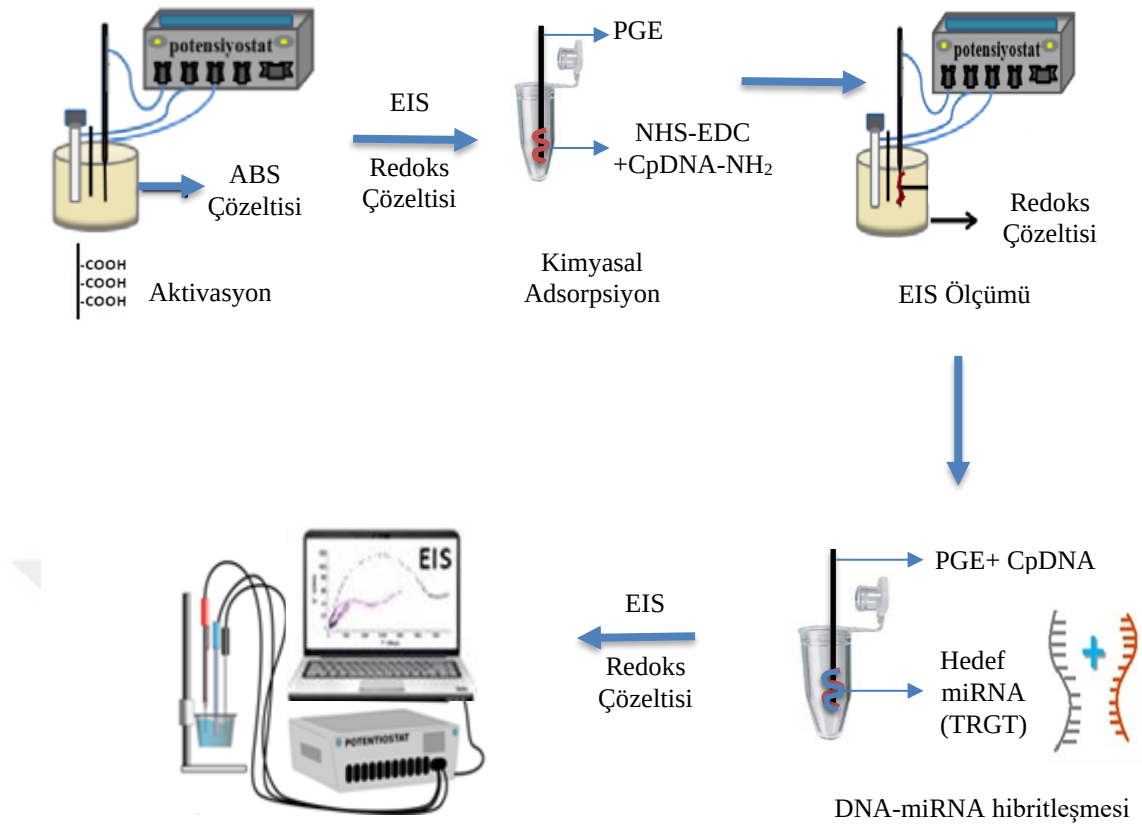
Bütün DNA ve miRNA dizileri, 1000 µg/mL konsantrasyonunda Dnaz ve Rnaz enzimlerinden arındırılmış ultra saf su ile hazırlanarak ve -30 °C’de dondurularak muhafaza edilmiştir. 1000 µg/mL stok çözeltisinden 50 µg/mL konsantrasyonda ara stoklar hazırlanmış ve çalışmalarda parça parça kullanılmıştır. Deneylerde kullanılacak seyreltilmiş çözeltileri ABS tamponunda (pH 4,80) hazırlanmıştır.

3.4. Deneysel Teknik

Deneysel çalışmalarda elektrot aktivasyonu, CpDNA’ların elektrot yüzeyine immobilizasyonu ve EIS ölçümleri literatürde yer alan prosedürler doğrultusunda yapılmıştır (Erdem ve Ozsoz, 2001; Erdem ve ark., 2009; Yapasan ve ark., 2010). Elektrot aktivasyonu 60 s boyunca + 1,4 V sabit potansiyelde asetat tamponunda yapılmıştır. CpDNA’ların aktifleşmiş elektrot yüzeyine immobilize edilmesi fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki farklı yolla yapılmıştır. Fiziksel yöntemde aktive edilmiş elektrot uygun konsantrasyonda CpDNA içeren asetat tamponunda uygun sürede bekletilerek fiziksel adsorpsiyon (pasif adsorpsiyon) yöntemi ile immobilize edilmiştir. Kimyasal yöntemde ise aktive elektrot, uygun oranlarda NHS, EDC ve amin uçlu DNA oligo (CpDNA-NH₂) içeren çözeltide uygun süre bekletilerek kovalent bağlanma ile immobilize edilmiştir. Her iki yöntemde de DNA oligonükleotidin yüzeye immobilize edilmesiyle hazırlanmış elektrot, uygun konsantrasyonda hedef miRNA (TRGT) içeren çözeltiye daldırılarak sekans eşleşmesi (hibritleşmesi) gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneylerde her aşamada yüzey değişimi empedans ölçümleri alınıp analiz aşaması için kaydedilmiştir. Her iki yöntemin aşamaları, hedef molekülün elektrot yüzeyine immobilize DNA oligo ile zincir eşleşmesi adımı dahil Şekil 3.3. ve 3.4.’te ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Fiziksel adsorpsiyon şeması



Şekil 3.4. Kimyasal adsorpsiyon şeması

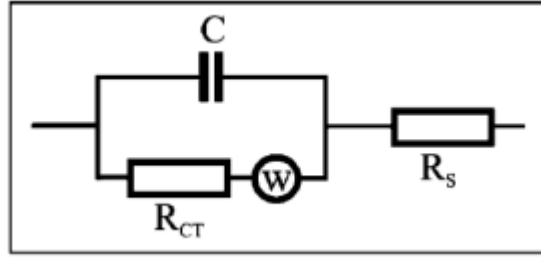
3.4.1. Kalem grafit elektrodun (PGE) hazırlanışı ve aktivasyonu

Deneysel çalışmalarda kullanılan Tombow marka tüm PGE'ler iki eşit parçaya ayrılarak 1,0 cm'lik kısmı çözelti içine daldırılacak şekilde kullanılmıştır. Aktivasyon işlemi pH=4,8'de 0,05 M ABS'de + 1,4 V sabit potansiyelde 60 s üçlü elektrot hücresinde krontamperometri tekniği ile yapılmıştır.

3.4.2. Elektrokimyasal empedans (EIS) ölçümleri

Tüm EIS ölçümleri Bölüm 3.3.2.'de belirtilmiş redoks çifti çözeltisinde yapılmıştır. EIS ölçümleri ile elektrodun ilk yüzeyi dahil tüm yüzey değişimleri incelenmiştir. Bu inceleme yük transfer direncinin değişimi ile gerçekleştirilmiştir. Elektrodun ilk yüzey empedansı çekilerek işleme başlanmış ve her aşamada (aktivasyon, fiziksel ve kimyasal oligo adsorpsiyonu, oligo-hedef hibritleşmesi) yüzey değişimi için çekilmiş

empedans verisi kaydedilmiştir. EIS ölçümleri 10^5 Hz ile 10^{-1} Hz aralığında düzenli azalan frekansta, değişken açık devre potansiyelinde Ag/AgCl referans elektroda karşı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Nyquist eğrileri, eğriye uygun Randles eşdeğer devre modeline göre fit edilerek sonuçlar analiz amaçlı kayıt altına alınmıştır. Kullanılan eşdeğer devrede; kapasitans (C), yük transfer direnci (R_{ct}), çözelti direnci (R_s) ve Warburg empedansı (W) gibi devre elemanları kullanılmıştır. Kullanılan eşdeğer devre Şekil 3.5.'te verilmiştir.



Şekil 3.5. EIS eşdeğer devresi

3.4.3. miRNA-133a sensörü fiziksel adsorpsiyon yüzey optimizasyonu

Fiziksel adsorpsiyonda CpDNA-PGE yüzey immobilizasyonu ve CpDNA-TRGT eşleşmesinde CpDNA ile TRGT konsantrasyon optimizasyonu ve ayrıca immobilizasyon ile eşleşmede zaman optimizasyonları yapılmıştır.

3.4.3.1. CpDNA-PGE immobilizasyonunda konsantrasyon optimizasyonu

Asetat tamponunda aktivasyon işleminden sonra PGE'lerin aktifleştirilmiş ucu 60 dakika boyunca CpDNA prob çözeltisinde probun yüzeye fiziksel adsorpsiyonunun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Optimum konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla bu işlem 1, 3, 5, 7 ve 9 $\mu\text{g/mL}$ CpDNA konsantrasyonları içeren pH=4,8 0,05 M ABS'de 2 mL'lik viyallerde yapılmıştır. Her bir konsantrasyon için deneyler 5 kez tekrarlanmıştır. Yapılan çalışmalarda yüzeyi prob ile kaplanmış elektrotlar 0,05 M ABS tamponunda 5 s yıkanarak tam bağlanmamış CpDNA'ların yüzeyden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra CpDNA-PGE'lerin redoks çifti çözeltisinde empedans ölçümleri alınarak analiz amacıyla kaydedilmiştir.

3.4.3.2. CpDNA-PGE immobilizasyonunda zaman optimizasyonu

Aktive edilmiş elektrotlar 5 µg/mL CpDNA çözeltisine 5, 10, 20, 40, 80 ve 160 dakika gibi farklı bekleme zamanlarında immobilize edilmiştir. Optimum bekleme süresinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu deneyler her bir bekleme süresi için 5'er kez tekrarlanmıştır. İşlem sonrasında elektrotlar 5 s süresince ABS tamponunda yıkanmış ve EIS çözeltisinde empedansları çekilerek kaydedilmiştir.

3.4.3.3. CpDNA-TRGT eşleşmesinde TRGT konsantrasyon optimizasyonu

Yüzeyi CpDNA kaplı PGE'ler ABS tamponunda seyreltilmiş farklı TRGT konsantrasyonlarına (1, 5, 10, 15, 20 ve 40 µg/mL) daldırılarak optimum hibritleşme konsantrasyonu belirlenmiştir. Deneylerde EIS ölçümlerinden önce her bir çalışmada hibritleşmiş yüzey ABS tamponunda 5 s yıkanmıştır. Yıkama sonrasında redoks çifti çözeltisinde yüzey değişimi analizi için EIS ölçümleri alınarak kaydedilmiştir.

3.4.3.4. CpDNA-TRGT eşleşmesinde zaman optimizasyonu

CpDNA kaplı PGE'ler 10 µg/mL TRGT çözeltisine 5, 10, 20, 40, 80 ve 160 dakika gibi farklı bekleme sürelerince oda sıcaklığında viyaller içinde hibritleşmeye bırakılmıştır. Optimum bekleme süresinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu deneyler her bir bekleme süresi için 5'er kez tekrarlanmıştır. İşlem sonrasında elektrotlar 5 s süresince ABS tamponunda yıkanmış ve Bölüm 3.3.2.'de belirtilmiş redoks çifti çözeltisinde empedansları çekilerek analiz amacıyla kaydedilmiştir.

3.4.4. miRNA-133a sensörü kimyasal adsorpsiyon yüzey optimizasyonu

Kimyasal adsorpsiyonda CpDNANH₂-PGE yüzey immobilizasyonu ve CpDNANH₂-TRGT eşleşmesinde konsantrasyon ve zaman optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.4.4.1. CpDNANH₂-PGE immobilizasyonunda konsantrasyon optimizasyonu

Aktivasyonu yapılmış PGE elektrotların aktifleştirilmiş ucu 60 dakika boyunca CpDNANH₂ içeren 5 mM NHS-EDC konsantrasyonlu çözeltide probun yüzeye kimyasal bağlanmasının gerçekleşmesi için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Optimum konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla bu işlem 1, 3, 5, 7 ve 9 µg/mL CpDNANH₂ konsantrasyonları içeren 0,05 M ABS'de 2 mL'lik viyallerde yapılmıştır. Deneyler her bir konsantrasyon için 5 defa tekrarlanmıştır. Yapılan çalışmalarda yüzeyi prob ile kaplanmış elektrotlar 0,05 M ABS tamponunda 5 s yıkanarak tam bağlanmamış CpDNANH₂'lerin yüzeyden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra CpDNANH₂-PGE'lerin EIS çözeltisinde empedans ölçümleri alınarak analiz amacıyla kaydedilmiştir.

3.4.4.2. CpDNANH₂-PGE immobilizasyonunda zaman optimizasyonu

0,05 M ABS'de aktive edilmiş elektrotlar 5 µg/mL CpDNANH₂ ve 5 mM NHS-EDC içeren 0,05 M ABS çözeltisine 5, 10, 20, 40, 80 ve 160 dakika gibi farklı bekleme zamanlarında immobilize edilmiştir. Optimum bekleme süresinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmalar her bir bekleme süresi için 5'er kez tekrarlanmıştır. İşlem sonrasında elektrotlar 5 s süresince 0,05 M ABS tamponunda yıkanmış ve EIS çözeltisinde empedansları çekilerek kaydedilmiştir.

3.4.4.3. CpDNANH₂-TRGT eşleşmesinde konsantrasyon optimizasyonu

CpDNANH₂ immobilize PGE'ler pH=4.8 0,05 M ABS tamponunda seyreltilmiş farklı TRGT konsantrasyonlarına (1, 5, 10, 15, 20 ve 40 µg/mL) daldırılarak hibritleşmede optimum konsantrasyon belirlenmiştir. Deneylerde EIS ölçümlerinden önce her bir çalışmada hibritleşmiş elektrotlar ABS tamponunda 5 s yıkanmıştır. Yıkama sonrasında redoks çifti çözeltisinde yüzey değişimi analizi için EIS ölçümleri alınarak kaydedilmiştir.

3.4.4.4. CpDNANH₂-TRGT eşleşmesinde zaman optimizasyonu

CpDNANH₂ immobilize PGE'ler 15 µg/mL TRGT çözeltisine 5, 10, 20, 40 ve 80 dakika gibi farklı bekleme sürelerinde oda sıcaklığında viyaller içinde hibritleşmeye bırakılmıştır. Optimum hibridizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu deneyler her bir bekleme süresi için 5'er kez tekrarlanmıştır. İşlem sonrasında elektrotlar 5 s süresince ABS tamponunda yıkanmış ve Bölüm 3.3.2.'de belirtilmiş EIS çözeltisinde empedansları Bölüm 3.4.2.'ye göre çekilerek kaydedilmiştir.

3.4.5. Fiziksel adsorpsiyon tayin sınırı ve kalibrasyon çalışması

ABS'de aktive edilmiş PGE'ler 5 µg/mL CpDNA çözeltisinde immobilize edildikten sonra 0,05 M PBS/ABS'de yıkanarak farklı TRGT çözeltilerinde (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 µg/mL içeren 0,05 M PBS/ABS) 20 dakika süresince hibridizasyon gerçekleşmesi amacıyla viyallerde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Her bir TRGT konsantrasyonu için 5 adet deney yapılmıştır. Daha sonra spesifik olmayan bağlanmalar ve sensör yüzeyinde kalmış TRGT fazlalıklarından kurtulmak amacıyla PBS/ABS'de 5 s yıkama işlemi yapılmıştır. Bu aşamadan sonra EIS çözeltisinde empedans ölçümleri yapılmıştır. Empedans eğrileri fit edilerek elde edilen yük transfer direncine (R_{ct}) karşılık TRGT konsantrasyonu grafiği çizilerek lineerlik kontrolü, tayin sınırı belirlenmesi ve kalibrasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada sensörün TRGT'a hassasiyetinin incelenmesi amacıyla deneyler TRGT içeren PBS ve ABS tamponlarında ayrı ayrı yapılmıştır.

3.4.6. Kimyasal adsorpsiyon tayin sınırı ve kalibrasyon çalışması

0,05 M ABS'de aktive edilmiş PGE'ler 5 µg/mL CpDNANH₂ çözeltisinde amino işaretli prob ile immobilize edildikten sonra 0,05 M PBS/ABS'de yıkanarak farklı TRGT çözeltilerinde (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 µg/mL 0,05 M içeren PBS/ABS) 20 dakika süresince hibridizasyon gerçekleşmesi amacıyla viyallerde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Her bir TRGT konsantrasyonu için 5 ayrı deney yapılmıştır. Daha sonra spesifik olmayan bağlanmalar ve sensör yüzeyinde kalmış TRGT fazlalıklarından

kurtulmak amacıyla PBS/ABS'de 5 s yıkama işlemi yapılmıştır. Bu aşamadan sonra EIS çözeltisinde empedans ölçümleri alınmıştır. Empedans eğrileri fit edilerek elde edilen yük transfer direncine (R_{ct}) karşılık TRGT konsantrasyonu grafiği çizilerek lineerlik kontrolü, tayin sınırı belirlenmesi ve kalibrasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmalar TRGT tayininde tampon çözeltisi farkının incelenmesi amacıyla TRGT içeren PBS ve ABS tamponlarında ayrı ayrı yapılmıştır.

3.4.7. Fiziksel adsorpsiyonda CpDNA Prob ve miRNA-133a hedef dizi TRGT hibridizasyonu seçimlilik çalışması

5 µg/mL CpDNA probu immobilize edilmiş PGE'ler, ilk önce içinde TRGT bulunmayan ABS tamponunda bekletilerek yüzey değişimi EIS ile ölçülmüştür. Daha sonra aynı şartlarda hazırlanmış PGE'ler sadece 10 µg/mL hedef miRNA-133a'nın bulunduğu, 10 µg/mL hedef miRNA-133a'nın bulunmayıp 10 µg/mL diğer miRNA dizilerin (miRNA-let7d ve miRNA-31) bulunduğu ve son olarak 10 µg/mL konsantrasyona sahip bütün miRNA dizilerinin bir arada bulunduğu viyallerde hibridizasyona tabi tutulmuştur. Her bir çalışma için 5'er tekrar yapılmıştır ve EIS ölçümleri alınarak analiz amacıyla kaydedilmiştir.

3.4.8. Kimyasal adsorpsiyonda CpDNANH₂ prob ve miRNA-133a hedef dizi TRGT hibridizasyonu seçimlilik çalışması

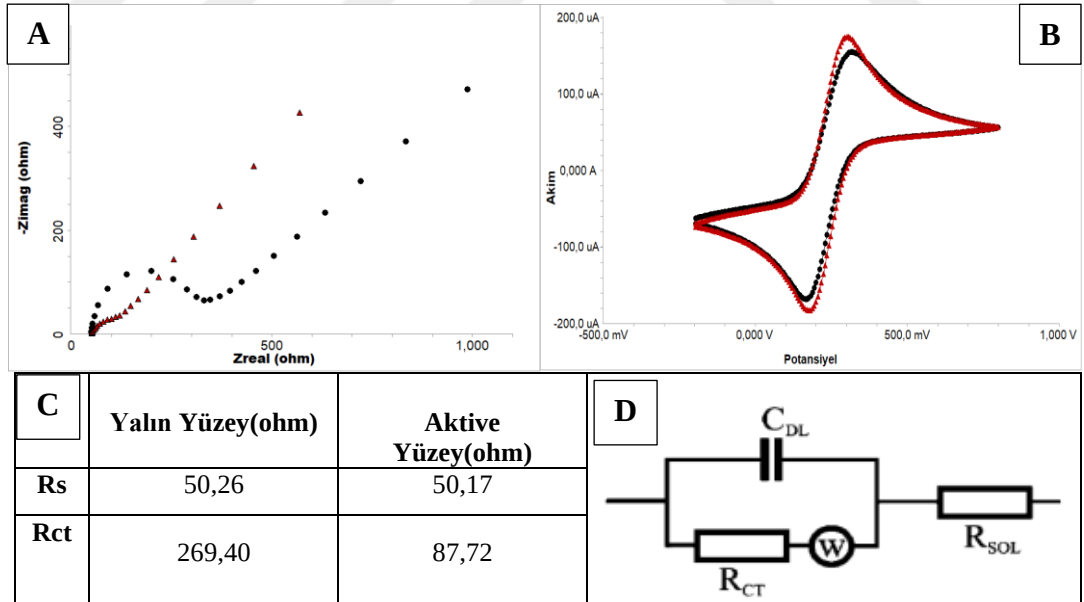
5 mM NHS-EDC çözeltisinde 5 µg/mL CpDNANH₂ probu immobilize edilmiş PGE'ler, seçimlilik çalışması amacıyla dört farklı ortamda hibridizasyona tabi tutulmuştur. İlk hibridizasyon (yalancı hibridizasyon) içinde TRGT bulunmayan ABS tamponunda bekletilerek yapılmış ve yüzey değişimi EIS ile ölçülmüştür. Daha sonra aynı şartlarda hazırlanmış PGE'ler sadece 15 µg/mL hedef miRNA-133a'nın bulunduğu, 15 µg/mL hedef miRNA-133a'nın bulunmayıp 15 µg/mL diğer miRNA dizilerin (miRNA-let7d ve miRNA-31) bulunduğu ve son olarak 15 µg/mL konsantrasyona sahip hedef ve diğer miRNA dizilerinin bir arada bulunduğu viyallerde hibridizasyona tabi tutulmuştur. Her bir deney 5'er kez tekrarlanarak yapılmış ve EIS ölçümleri alınarak analiz amacıyla kaydedilmiştir.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve YORUMLAR

4.1. PGE'nin Aktivasyon, İmmobilizasyon ve Hibridizasyon Aşamalarına Ait Bulgular

4.1.1. PGE aktivasyon bulguları

Kalem grafit elektrot Bölüm 3.4.1.'e göre aktive edilmiş ve yüzey değişimi Bölüm 3.4.2.'de belirtilmiş ortam ve koşullarda EIS ölçümleri alınarak kaydedilmiş ve Şekil 4.1A'da verilmiştir. Ayrıca PGE'nin yüzey aktivasyonu sonrasında iletkenliğinin arttığını belirlemek amacıyla redoks çifti çözeltisinde döngüsel voltamogramı alınmış ve Şekil 4.1B'de verilmiştir.

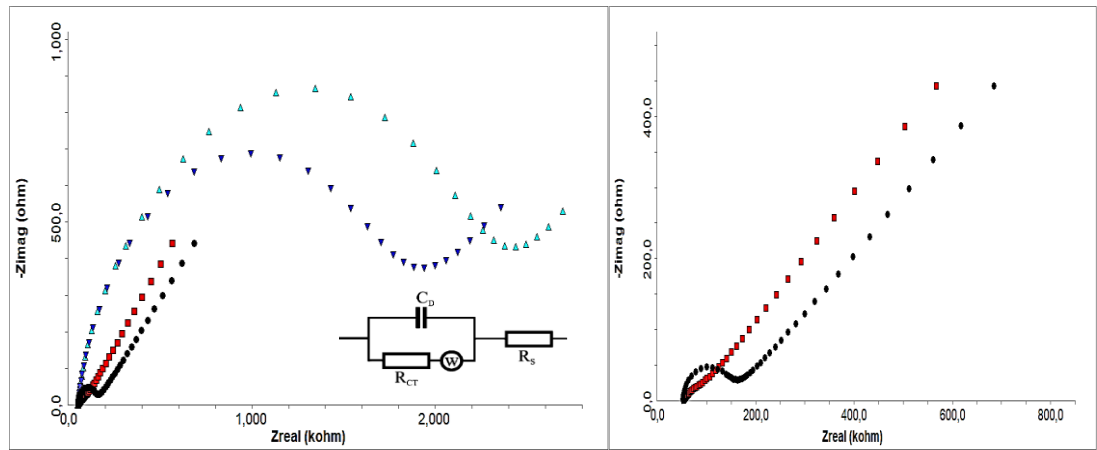


Şekil 4.1. PGE yüzey değişimi A: Empedans (●yalın elektrot, ▲ aktive elektrot), B: Döngüsel voltamogram C: R_{ct} değişimi ve D: Eşdeğer devre

Şekil 4.1A'da EIS eğrilerinden nokta simge ile belirtilmiş olan elektrodun yalın yüzeyini üçgen simge ile belirtilmiş olan ise elektrodun ABS'de aktifleşmiş yüzeyini göstermektedir. Burada empedans eğrilerinde yük transfer direnci (R_{ct}) anlamına gelen ilk yarım dairenin küçüldüğü direncin 269,40 ohm'dan 87,72 ohm'a düştüğü görülmektedir. Bu durum yüzeyin iletkenliğinin arttığını göstermektedir. Ayrıca Şekil 4.1B'deki CV voltamogramlarda akımın artması PGE yüzeyinin iletkenliğinin arttığını, direncinin azaldığını desteklemektedir. CV diyagramlarında siyah noktalar ile belirtilmiş olan eğri elektrodun yalın yüzeyini belirtirken, üçgen simgeli eğri aktive yüzeyi belirtmektedir. Ayrıca çözelti direnci anlamına gelen R_s 'nin sabit kalması (50,26'dan 50,17'ye değişimi) değişimin elektrot yüzeyinde gerçekleştiğini belirtmektedir. R_{ct} değerleri, ölçüm sonucu elde edilmiş EIS eğrilerinin Şekil 4.1D'de verilmiş devreye uydurularak fit edilmesi sonucunda elde edilmektedir.

4.1.2. İmmobilizasyon ve hibridizasyon sürecinde yüzey değişimi

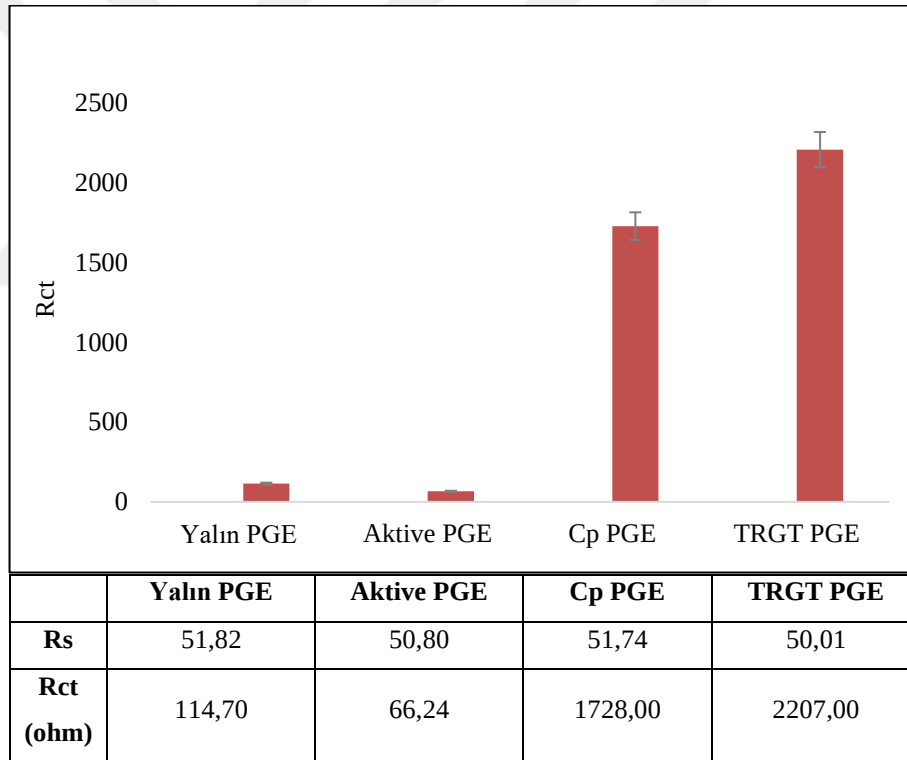
PGE'lerin her aşamada (yalın elektrot, aktive elektrot, CpDNA/CpDNANH₂ prob immobilize elektrot ve TRGT hibridize elektrot) empedans ölçümleri alınmış ve yüzey değişimine bağlı olarak R_{ct} direnci değişimi kaydedilmiştir.



Şekil 4.2. ● Yalın PGE yüzeyi ■ Aktive PGE yüzeyi ▼ CpDNA immobilize PGE yüzeyi ▲ TRGT hibridize PGE yüzeyi empedans eğrileri

Şekil 4.2.'deki verilen empedans verilerine göre, yalın PGE yüzeyinin R_{ct} değeri (EIS eğrisindeki ilk yarım daire) yüzey aktifleştirildikten sonra azalmıştır. Bu azalma ABS

tamponunda Bölüm 3.4.1.'de belirtilmiş koşullarda yapılmış olan aktivasyon sonrasında yüzeyin karboksilik asit (-COOH) gruplarınca zenginleştiği ve iletkenliğin arttığı anlamı taşımaktadır. Buna bağlı olarak yük transfer direnci azalmıştır. Fakat aktif PGE yüzeyine prob immobilize edildikten sonra daha yalıtkan bir yapıyla kaplandığından R_{ct} artmış ve aynı oranda iletkenlik azalmıştır. Diyagramlarda ▼ simgesi ile verilmiş EIS eğrisinde R_{ct} anlamına gelen ilk yarım dairenin aktive yüzeye göre oldukça büyümüş olması yüzeyin yalıtkan bir malzeme ile kaplandığını yani CpDNA veya CpDNANH₂'nin fiziksel veya kimyasal adsorpsiyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca bir sonraki aşamada TRGT hibridizasyonunda yüzey daha da yalıtkan bir hal almış ve R_{ct} bir miktar daha artmıştır. Buda hibritleşmenin gerçekleştiğini ispatlamaktadır.



Şekil 4.3. Yüzey değişimi ile R_{ct} değerleri (n=5) histogramı

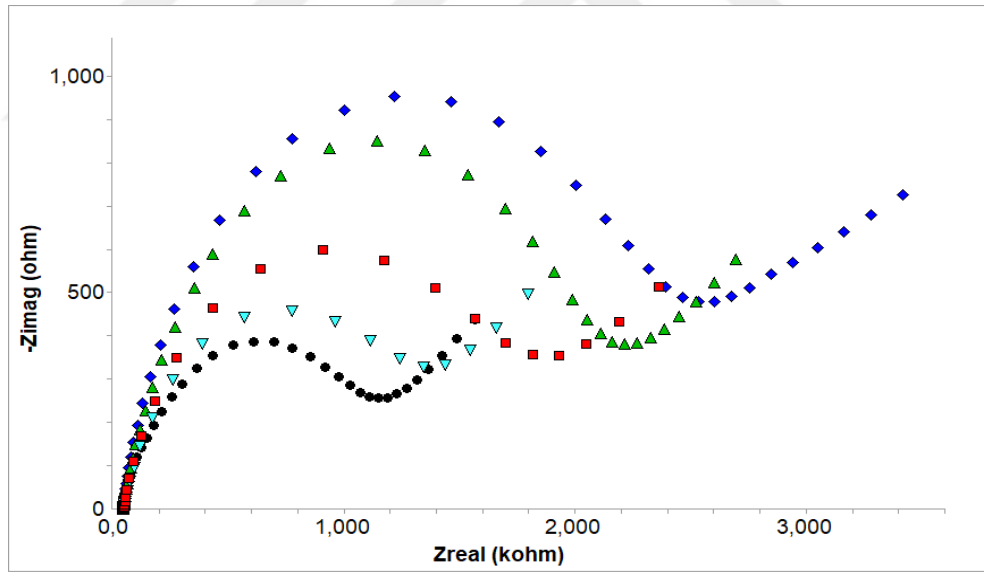
Yapılan çalışmada deneyler beşer kez tekrarlanarak ortalamalar alınmış ve histogram diyagramları R_{ct} değişimleri ile birlikte Şekil 4.3.'te verilmiştir. Elde edilmiş bulgular incelendiğinde EIS eğrilerini destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir. Yalın PGE yüzeyinde R_{ct} değeri 114,70 ohm iken aktivasyon sonrasında 66,24 ohm'a düşmüş

olup yüzeyin iletkenliğinin arttığı tespit edilmiştir. Daha sonra aktive edilmiş PGE DNA prob ile immobilize edilmiş ve R_{ct} 'de 66,24 ohm'dan 1728,00 ohm'a ve hibridizasyon sonrasında ise R_{ct} 'nin daha da artarak 2207,00 ohm'a yükseldiği tespit edilmiştir. R_{ct} 'deki bu yükselme elektrot yüzeyinin değişimini ve değişiminde yapılan işlemlere uygun gerçekleştiğini göstermektedir.

4.2. Fiziksel Adsorpsiyonda İmmobilizasyon ve Hibridizasyon Aşamalarına Ait Bulgular ve Yorumlar

4.2.1. CpDNA-PGE immobilizasyonunda konsantrasyon optimizasyonu bulgular ve yorumlar

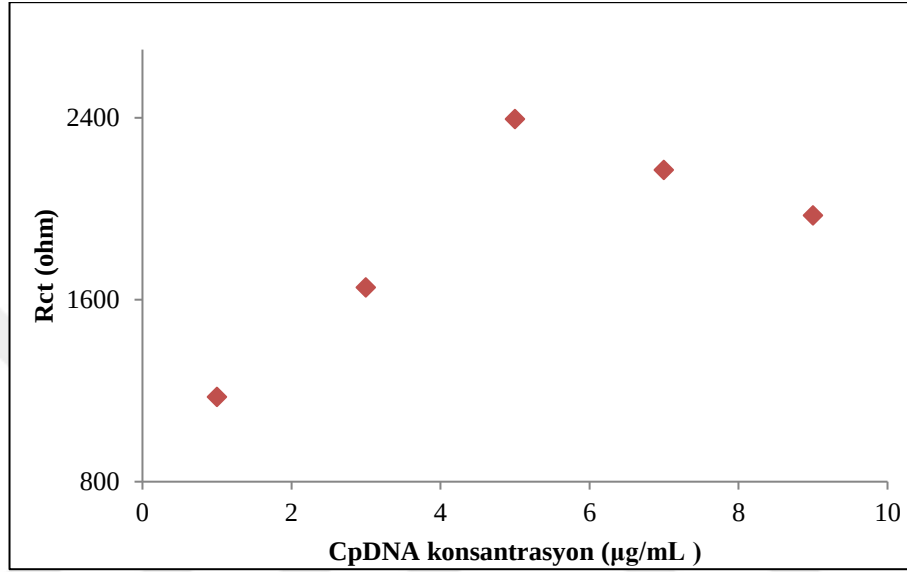
Bölüm 3.4.3.1.'de belirtilmiş koşullarda alınmış empedans eğrileri Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. ● 1 µg/mL CpDNA ■ 3 µg/mL CpDNA ◆ 5 µg/mL CpDNA ▲ 7 µg/mL CpDNA ve ▼ 9 µg/mL CpDNA immobilizasyonu EIS eğrileri

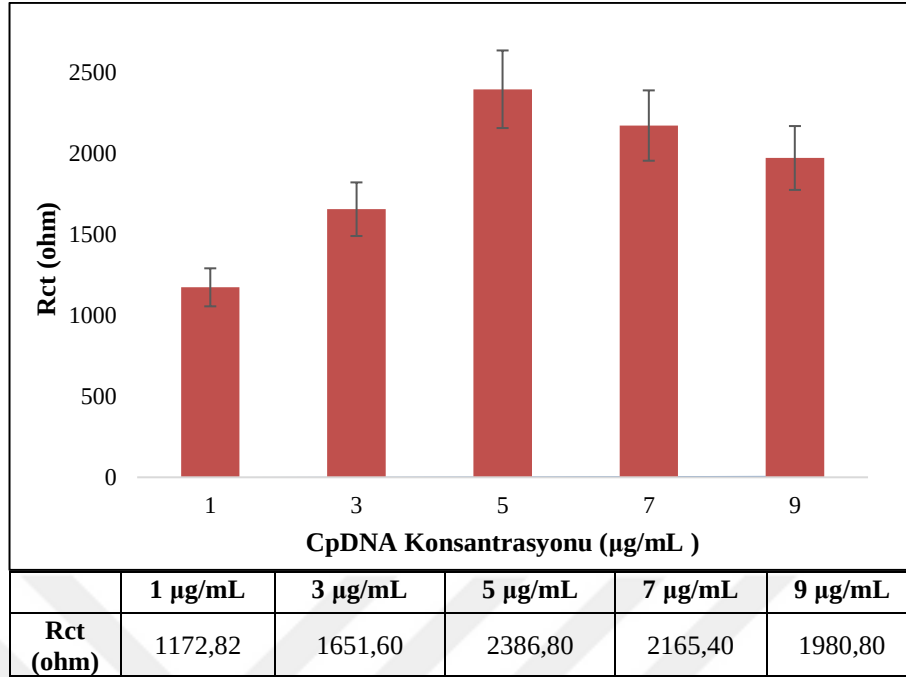
CpDNA konsantrasyon optimizasyonunda 1, 3, 5, 7 ve 9 µg/mL CpDNA'nın farklı konsantrasyonlarından 60 dakikalık immobilizasyon sürecinde en iyi sonuç 5 µg/mL CpDNA ile elde edilmiştir. 1 µg/mL CpDNA immobilizasyonunda küçük yarıçaplı olarak gözlenen eğri (● simgeli eğri) konsantrasyonun 3 µg/mL'ye çıkarılması ile

artmış (■ simgeli eğri), 5 $\mu\text{g/mL}$ 'ye çıkarılması ile maksimum büyüklüğe ulaşmıştır (♦ simgeli eğri). Daha sonra prob konsantrasyonunun 7 $\mu\text{g/mL}$ (▲ simgeli eğri) ve 9 $\mu\text{g/mL}$ 'ye (▼ simgeli eğri) arttırılmasıyla Rct anlamına gelen yarım daireler küçülmüştür. Bu durum probun aktive PGE yüzeyine pasif adsorpsiyonda optimum konsantrasyonun 5 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu gösterir.



Şekil 4.5. CpDNA immobilizasyonunda konsantrasyona karşı Rct değişim grafiği

CpDNA konsantrasyonuna karşı Rct değişim grafiği çizilmiş olup Şekil 4.5.'de verilmiştir. Konsantrasyonuna karşı Rct grafiği PGE yüzey değişimini gösteren EIS eğrilerini doğrular niteliktedir. Bu yüzden pasif adsorpsiyon için belirtilmiş çalışma şartlarında optimum CpDNA konsantrasyonu 5 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir.

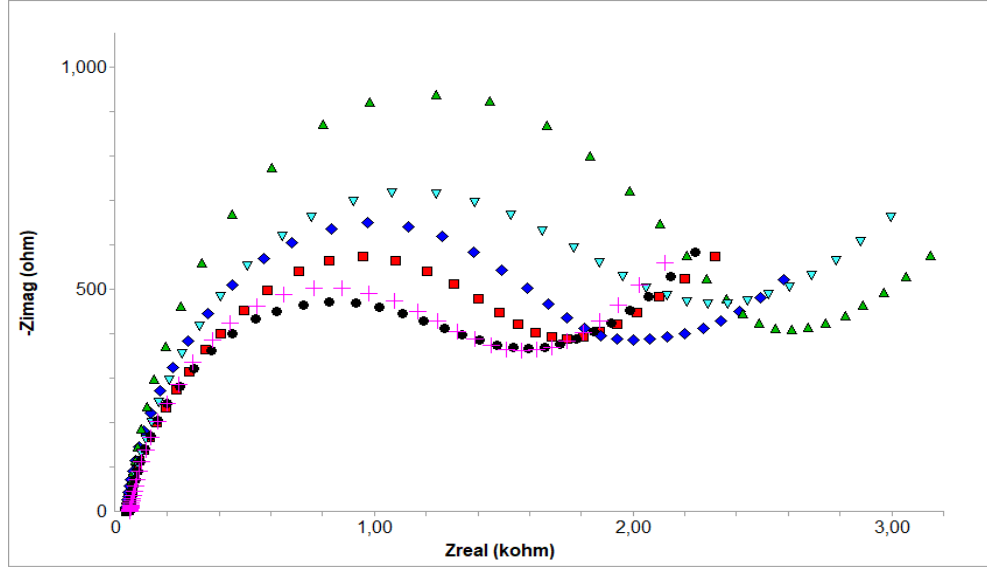


Şekil 4.6. CpDNA konsantrasyon -Rct değişimi histogram grafiği (n=5)

CpDNA konsantrasyon değişimine karşılık Rct değerleri, her bir konsantrasyon için yapılmış olan beş deney sonucundan elde edilmiş, histogram grafiği çizilmiş ve Şekil 4.6.'da verilmiştir. Bu veriler elektrot yüzey değişimini gösteren EIS eğrilerini desteklemektedir. Bu durumda pasif adsorpsiyon için belirtilmiş çalışma şartlarında optimum CpDNA konsantrasyonu 5 µg/mL olarak belirlenmiş ve çalışmanın devamında yapılacak deneylerde 5 µg/mL CpDNA konsantrasyonu PGE-CpDNA immobilizasyonunda sabit tutulmuştur.

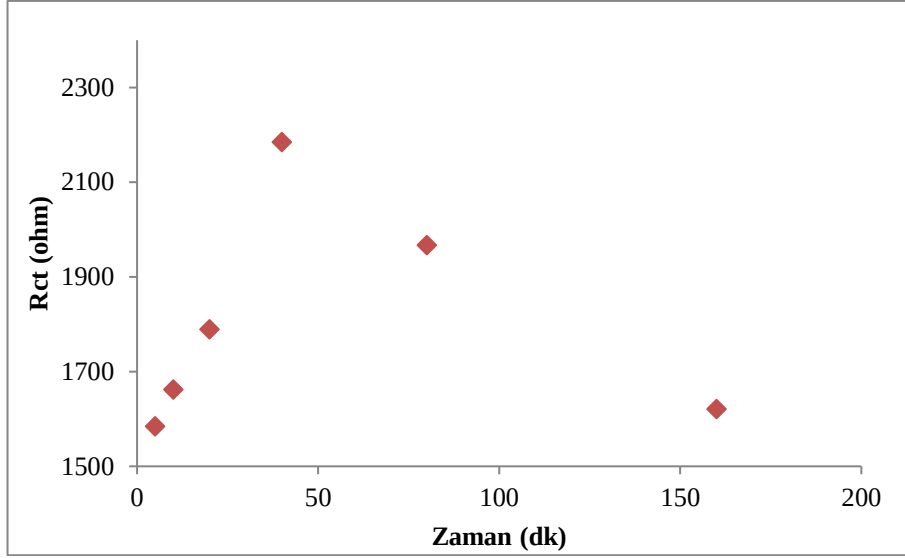
4.2.2. CpDNA-PGE immobilizasyonunda zaman optimizasyonu bulgular ve yorumlar

Bölüm 3.4.3.2.'de belirtilmiş koşullarda optimum CpDNA konsantrasyonunda hazırlanmış çözeltilerde ideal bekleme süresinin belirlenmesi çalışmasında en yüksek adsorpsiyon miktarı yani en yüksek Rct değeri aktive PGE nin 40 dakika immobilize edilmesinden elde edilmiştir. Optimum immobilizasyon süresi 40 dakika olarak belirlenmiş ve sonrasında yapılacak çalışmalarda uygulanmıştır.



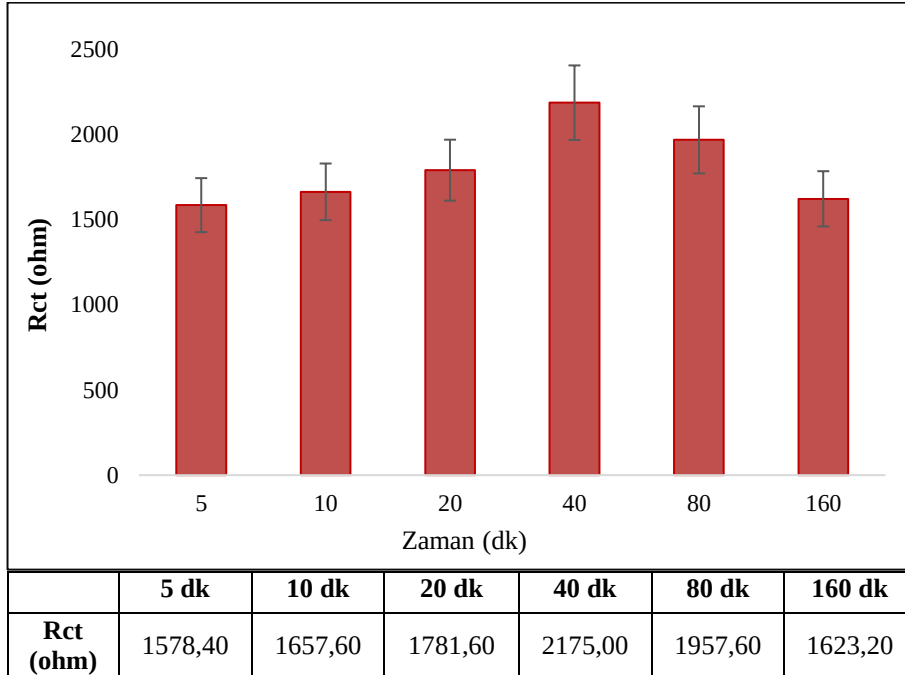
Şekil 4.7. ● 5dk, ■ 10dk, ◆ 20dk, ▲ 40dk, ▼ 80dk ve + 160dk immobilizasyon süreleri EIS eğrileri

Şekil 4.7. EIS verileri incelendiğinde 5 dakika immobilizasyon süresinden 160 dakika immobilizasyon süresine doğru gidildikçe, R_{ct} 'nin 40 dakikaya kadar artış gösterdiği ve sonrasında düşmeye başladığı tespit edilmiştir. Bundan dolayı CpDNA için 40 dakika optimum değer olarak belirlenmiştir. Bekleme süresi uzadıkça adsorpsiyon desorpsiyon dengesinin bozulduğu ve CpDNA'nın yüzeyden desorbe olabildiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla PGE yüzeyinden yalıtkan karakterli prob ayrıldıkça yüzeyin iletkenliğinin arttığı bununla ters orantılı şekilde R_{ct} 'nin azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. CpDNA immobilizasyon süresine karşı Rct değişim grafiği

Şekil 4.7.'deki empedans eğrilerinin fit edilmesi sonucu elde edilmiş Rct değerlerine karşılık zaman grafiği çizilmiş olup Şekil 4.8.'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde zaman optimizasyonunda ideal bekleme süresi en yüksek Rct değeri ile 40 dakika olarak belirlenmiştir.

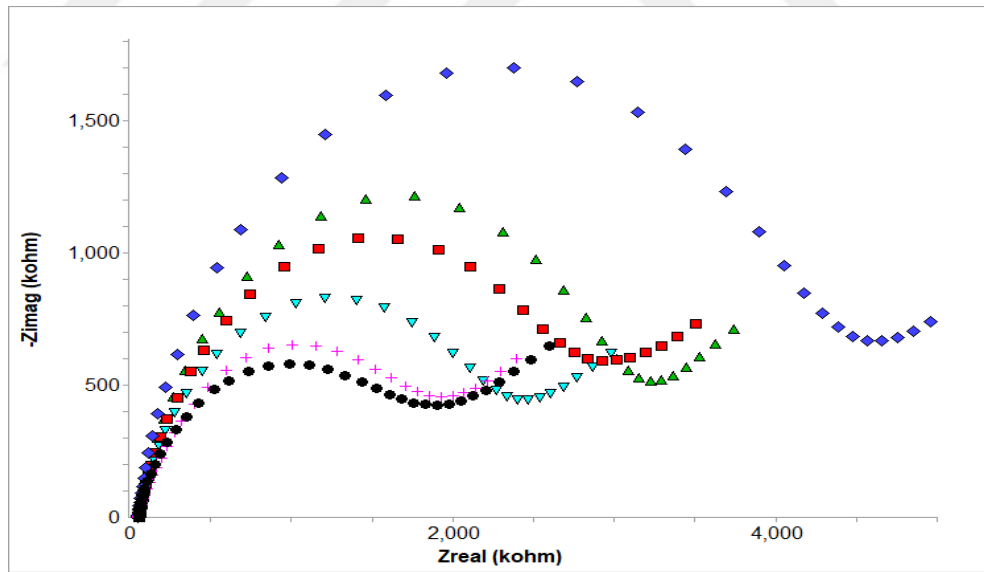


Şekil 4.9. CpDNA immobilizasyon süresi Rct değişim histogram grafiği (n=5)

Şekil 4.7. yer alan EIS eğrisi ile bağlantılı olarak elde edilmiş ve şekil 4.9.'da verilmiş R_{ct} -Zaman değişim değerleri, her bir bekleme süresi için yapılmış beşer deneyin sonucundan elde edilmiş histogram grafiği empedans verilerinin doğruluğunu kanıtlar niteliktedir. Bu sebeple CpDNA immobilizasyonunda 40 dk bekleme süresi ideal bekleme süresi olarak belirlenmiştir.

4.2.3. CpDNA-TRGT hibridizasyonunda TRGT konsantrasyon optimizasyonu bulgular ve yorumlar

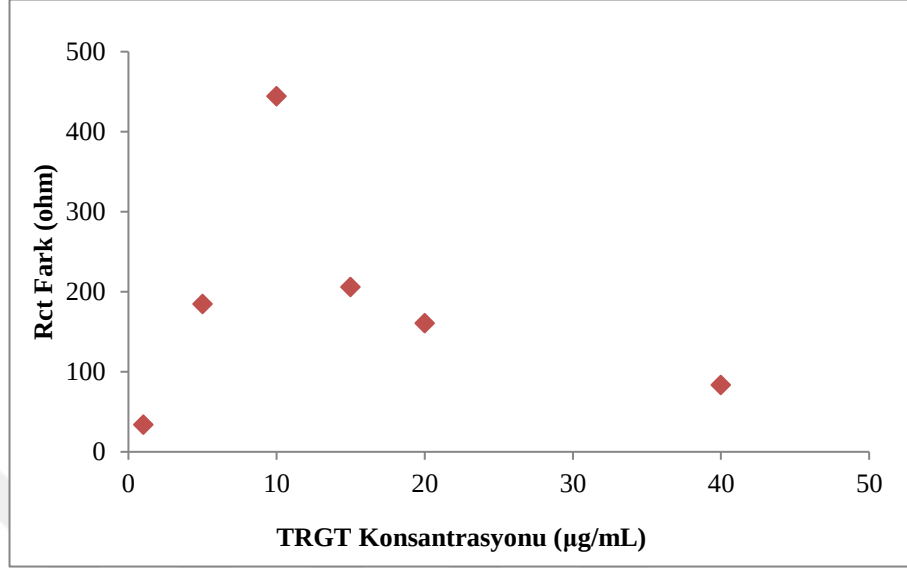
Bölüm 3.4.3.3.'te belirtilen koşullarda gerçekleştirilen çalışmalarda 5 $\mu\text{g/mL}$ prob immobilize PGE'nin TRGT ile hibridizasyonunda optimum TRGT konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 1, 5, 10, 15, 20 ve 40 $\mu\text{g/mL}$ TRGT miRNA içeren çözeltilerle yapılmıştır. Her bir konsantrasyon için yapılmış deneylerin EIS bulguları Şekil 4.10.'da verilmiştir.



Şekil 4.10. ● 1 $\mu\text{g/mL}$ TRGT, ■ 5 $\mu\text{g/mL}$ TRGT, ◆ 10 $\mu\text{g/mL}$ TRGT, ▲ 15 $\mu\text{g/mL}$ TRGT, ▼ 20 $\mu\text{g/mL}$ TRGT ve + 40 $\mu\text{g/mL}$ TRGT hibridizasyonu EIS eğrileri

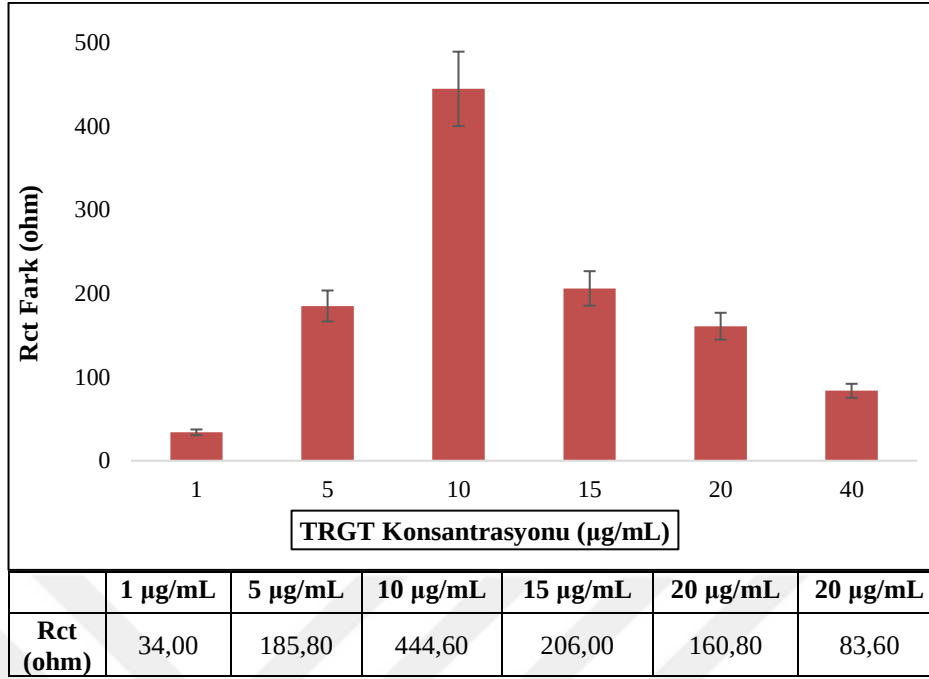
Şekil 4.10.'da Nyquist eğrileri incelendiğinde CpDNA-TRGT miRNA hibridizasyonunda en yüksek R_{ct} değeri 10 $\mu\text{g/mL}$ TRGT konsantrasyonu kullanıldığında elde edilmiştir. Bu durumda 5 $\mu\text{g/mL}$ CpDNA immobilize PGE için

hibridizasyon çözeltisinin 10 µg/mL TRGT içermesi gerektiği tespit edilmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılacak olan optimum TRGT konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.11. TRGT hibridizasyonunda konsantrasyona karşı Rct fark değişim grafiği

CpDNA immobilize PGE'nin TRGT hibridizasyonundan sonra TRGT konsantrasyonuna karşı yüzey değişiminden meydana gelen direnç farkı (Rct fark) grafiği çizilmiş ve Şekil 4.11.'de verilmiştir. Elde edilen veriler ışığında 10 µg/mL TRGT konsantrasyonu içeren çözeltide yapılmış hibridizasyon en yüksek Rct degerini ve en düşük iletkenliği impedimetrik ölçüm sonucunda vermiştir. Bu sonuç ile geliştirilmiş miRNA sensörü için ideal TRGT konsantrasyonunun 10 µg/mL TRGT içeren ABS tampon çözeltisi olduğu belirlenmiştir.

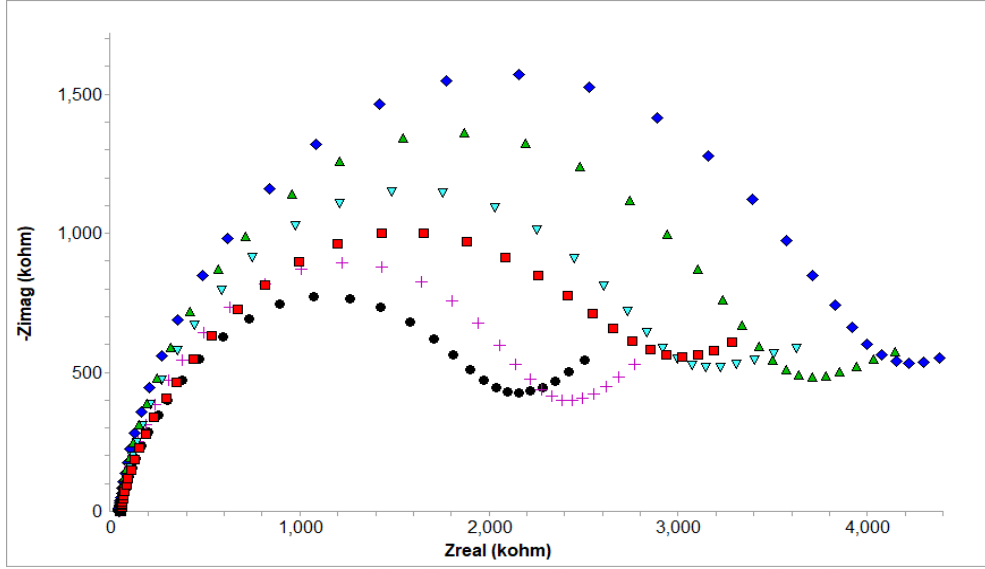


Şekil 4.12. TRGT konsantrasyonu Rct fark değişimi histogram grafiği (n=5)

Her bir TRGT konsantrasyonu için 5 kez tekrarlanan deney sonuçları için Nyquist eğrileri eşdeğer devreye uyarlanmış ve Rct değerleri bulunmuştur. Bu değerler için çizilmiş histogram grafiği ve sapma miktarı Şekil 4.12.'de verilmiştir. Elde edilmiş veriler analiz edildiğinde miRNA tayini için geliştirilmiş impedimetrik PGE sensörü 10 µg/mL TRGT konsantrasyonundaki hibritleşmede en iyi sonucu vermiştir.

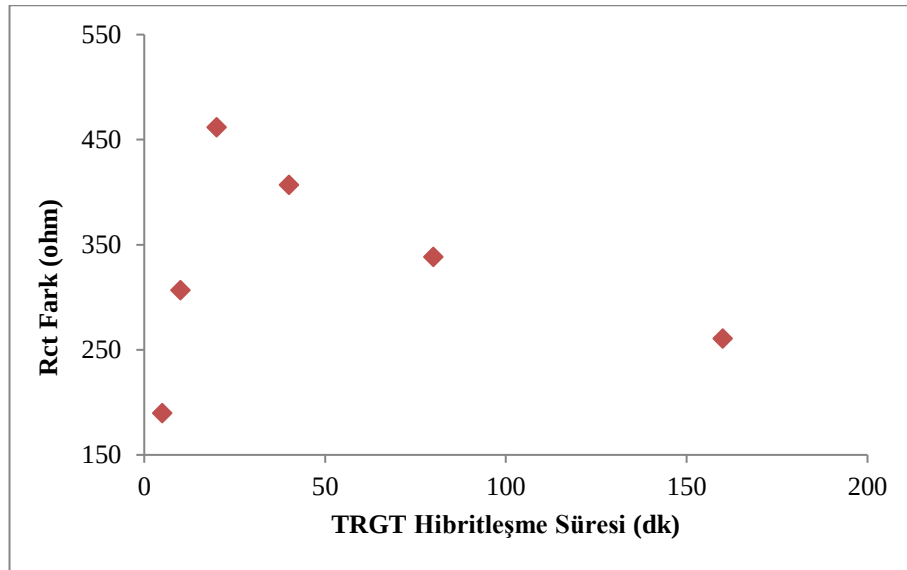
4.2.4. CpDNA-TRGT hibridizasyonunda zaman optimizasyonu bulgular ve yorumlar

Bu kısımda CpDNA-TRGT hibridizasyonu için optimum süreyi belirlemek amacıyla Bölüm 3.4.3.4.'te belirtilen koşullarda deneyler yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen EIS eğrileri Şekil 4.13.'te, EIS eğrilerinin eşdeğer devreye uyarlanarak fit edilmesi sonucu elde edilmiş Rct değerlerinin hibritleşme süresine karşı çizilmiş grafiği Şekil 4.14.'te ve son olarak her bir bekleme süresi için yapılmış beş deney sonucunda elde edilmiş Rct değerlerinin histogram grafiği Şekil 4.15.'te verilmiştir.



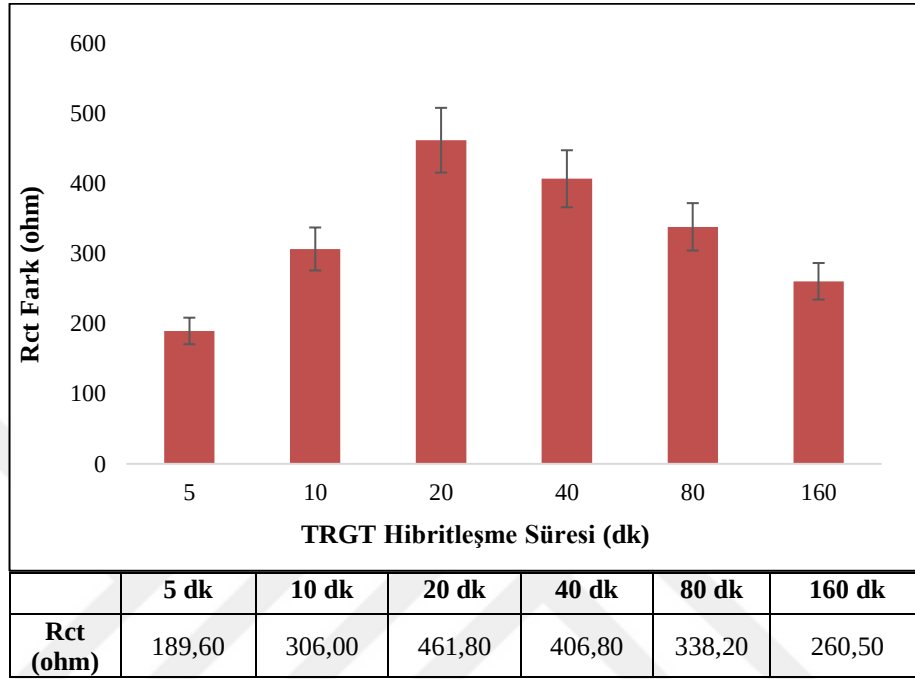
Şekil 4.13. ● 5dk TRGT, ■ 10dk TRGT, ◆ 20dk TRGT, ▲ 40dk TRGT, ▼ 80dk TRGT ve + 180dk TRGT hibridizasyonu EIS eğrileri

Şekil 4.13.'te farklı hibridizasyon sürelerinde elde edilmiş EIS eğrileri karşılaştırıldığında, Rct anlamına gelen ilk yarım dairenin 5 dakikalık hibritleşme süresinden 20 dakikalık hibritleşme süresine kadar yükseldiği ve sonrası hibritleşme sürelerinde azaldığı tespit edilmiştir. 20 dakikalık hibridizasyon süresi sonucunda en büyük Rct değeri elde edildiğinden bu süre optimum hibridizasyon süresi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.14. TRGT hibridizasyon süresine karşı Rct fark değişim grafiği

EIS eğrilerinin eşdeğer devreye uyarlanması sonucu elde edilen R_{ct} fark değerlerinin hibritleşme sürelerine karşılık grafiği çizildiğinde sonucun EIS eğrilerinde elde edilen optimum hibritleşme süresini (20 dakika) desteklediği görülmektedir.



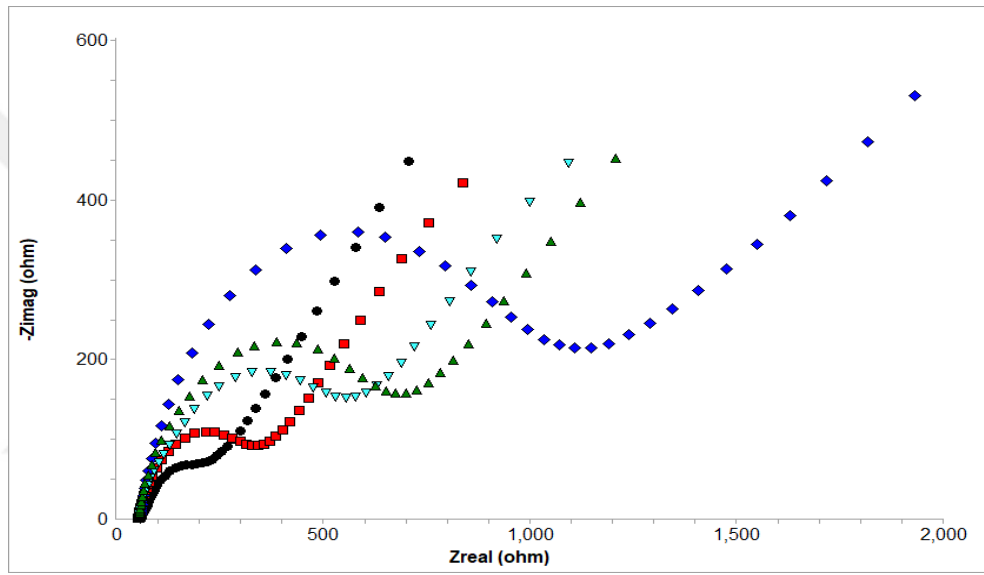
Şekil 4.15. TRGT hibridizasyon süresi R_{ct} fark değişimi histogram grafiği (n=5)

Şekil 4.15.'te geliştirilmiş impedimetrik sensörün CpDNA immobilizasyonu sonucu elde edilmiş R_{ct} değerleri ile TRGT hibridizasyonu sonucu elde edilmiş R_{ct} değerlerinin farkları alınarak histogram grafiği oluşturulmuştur. Beş deneyin ortalmalarının analizi ile elde edilmiş bu grafik sonucunda da ideal hibritleşme süresinin 20 dakika olduğu belirlenmiş ve sonraki çalışmalarda bu sürede hibridizasyon yapılmıştır.

4.3. Kimyasal Adsorpsiyonda İmmobilizasyon ve Hibridizasyon Aşamalarına Ait Bulgular ve Yorumlar

4.3.1. CpDNANH₂-PGE immobilizasyonunda konsantrasyon optimizasyonu bulgular ve yorum

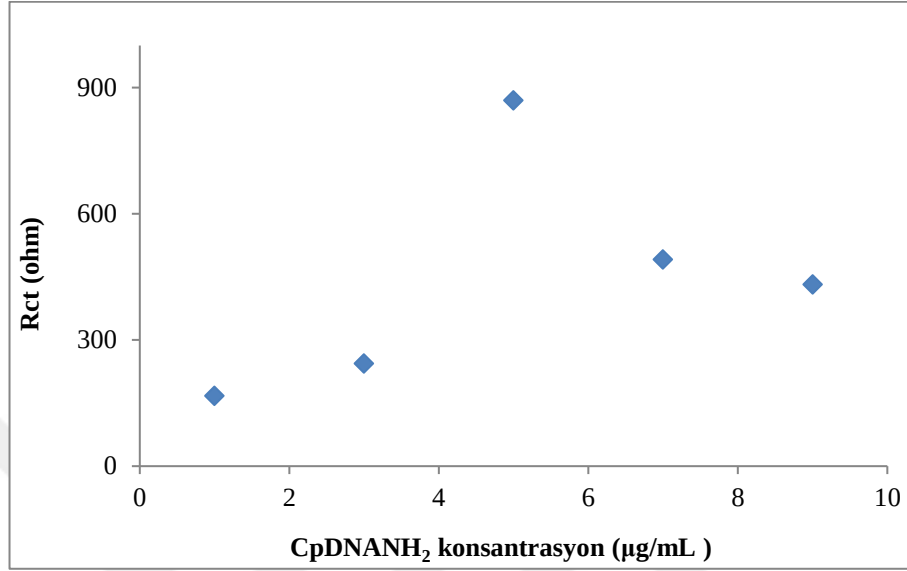
Bölüm 3.4.4.1.'de belirtilmiş koşullarda CpDNANH₂-PGE immobilizasyon çalışmasında her bir deney için çekilmiş empedans eğrileri Şekil 4.16.'da verilmiştir.



Şekil 4.16 ● 1 µg/mL CpDNANH₂ ■ 3 µg/mL CpDNANH₂ ◆ 5 µg/mL CpDNANH₂ ▲ 7 µg/mL CpDNANH₂ ve ▼ 9 µg/mL CpDNANH₂ immobilizasyonu EIS eğrileri

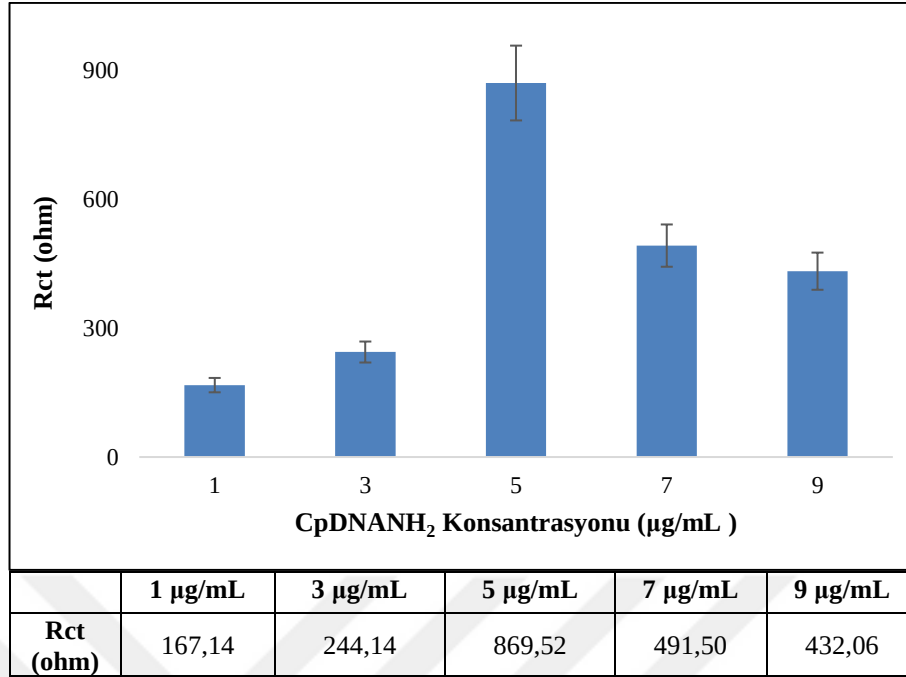
CpDNANH₂ konsantrasyon optimizasyonunda 5 mM NHS-EDC ve ayrı ayrı 1, 3, 5, 7 ve 9 µg/mL CpDNANH₂ içeren 0,05 M ABS tamponunda 60 dakikalık immobilizasyon gerçekleştirilmiş ve yapılmış her deney sonucunda PGE'nin yüzey değişimini incelemek amacıyla redoks çifti çözeltisinde EIS ölçümleri yapılmış eğrileri Şekil 4.16.'da verilmiştir. EIS sonuçlarına göre en yüksek Rct değerinden dolayı en iyi sonuç 5 µg/mL CpDNANH₂ ile elde edilmiştir. 1 µg/mL CpDNANH₂ immobilizasyonunda küçük yarım daire olarak gözlenen eğri (● simgeli eğri) konsantrasyonun 3 µg/mL'ye çıkarılması ile artmış (■ simgeli eğri), 5 µg/mL'ye çıkarılması ile maksimum büyüklüğe ulaşmıştır (◆ simgeli eğri). Daha sonra prob konsantrasyonunun 7 µg/mL (▲ simgeli eğri) ve 9 µg/mL'ye (▼ simgeli eğri)

arttırılmasıyla R_{ct} anlamına gelen yarımlar küçülmüştür. Bu durum probun aktive PGE yüzeyine kimyasal adsorpsiyonunda optimum konsantrasyonun $5 \mu\text{g/mL}$ olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.17. CpDNANH₂ immobilizasyonunda konsantrasyona karşı R_{ct} değişim grafiği

Şekil 4.16.'da verilmiş EIS eğrilerinin eşdeğer devreye göre fit edilmesi ile elde edilmiş R_{ct} değerlerine karşılık CpDNANH₂ konsantrasyonu grafiği çizilmiş olup Şekil 4.17.'de verilmiştir. Konsantrasyona karşı R_{ct} grafiği PGE yüzey değişimini gösteren EIS eğrilerini doğrulamaktadır. Bu yüzden kimyasal adsorpsiyon için belirtilmiş çalışma şartlarında optimum CpDNANH₂ konsantrasyonu $5 \mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir.



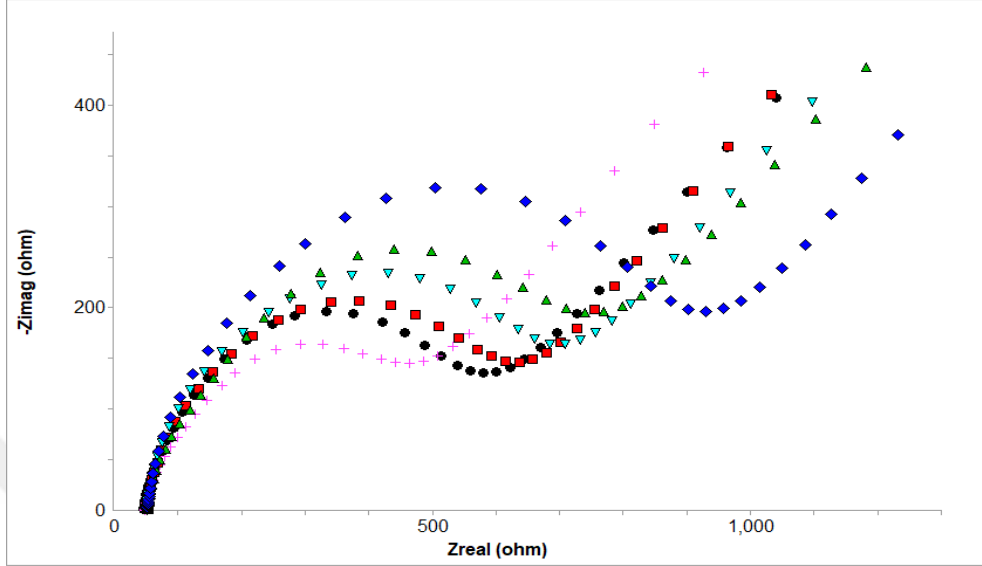
Şekil 4.18. CpDNANH₂ konsantrasyon -Rct değişimi histogram grafiği (n=5)

CpDNANH₂ optimum konsantrasyon çalışması için Rct değişimi, her bir konsantrasyon için yapılmış olan beş deney sonucundan elde edilmiş histogram grafiği Şekil 4.18.'de verilmiştir. Histogram grafiği verileri PGE yüzey değişimini gösteren EIS eğrilerini ve CpDNANH₂ immobilizasyonunda konsantrasyona karşı Rct değişim grafiğini desteklemektedir. Bu durumda kimyasal adsorpsiyon için belirtilmiş çalışma şartlarında optimum CpDNANH₂ konsantrasyonu 5 µg/mL olarak belirlenmiş ve çalışmanın devamında yapılacak kimyasal adsorpsiyon deneylerinde 5 µg/mL CpDNANH₂ konsantrasyonu PGE-CpDNANH₂ immobilizasyonunda sabit tutulmuştur.

4.3.2. CpDNANH₂-PGE immobilizasyonunda zaman optimizasyonu bulgular ve yorumlar

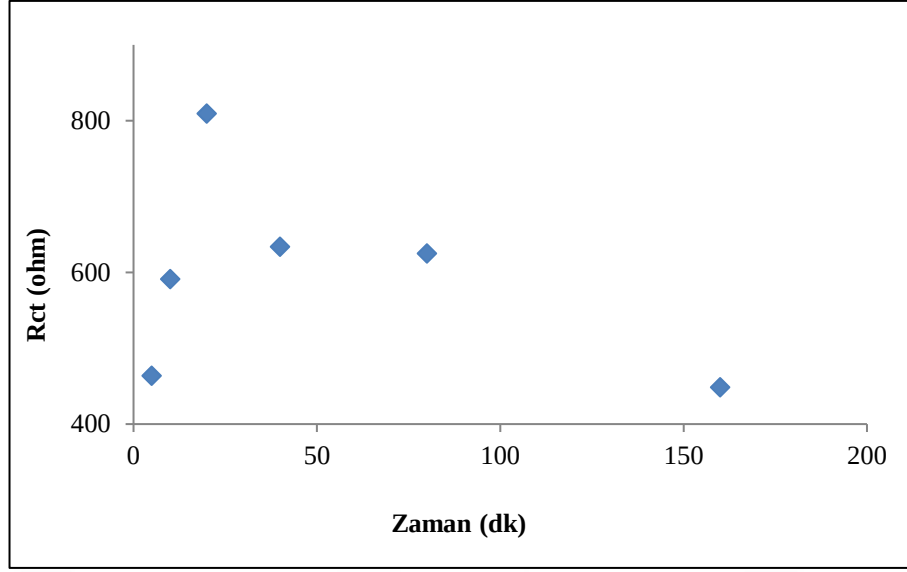
Bölüm 3.4.4.2.'de belirtilmiş koşullarda 5 µg/mL CpDNANH₂ konsantrasyonu içeren çözeltilerde optimum immobilizasyon süresinin belirlenmesi için yapılan deneylerde en yüksek adsorpsiyon miktarı yani en yüksek Rct değeri aktive PGE'nin 5 mM NHS-

EDC içeren çözeltide 20 dakika immobilize edilmesinden elde edilmiştir. Optimum immobilizasyon süresi 20 dakika olarak belirlenmiştir.



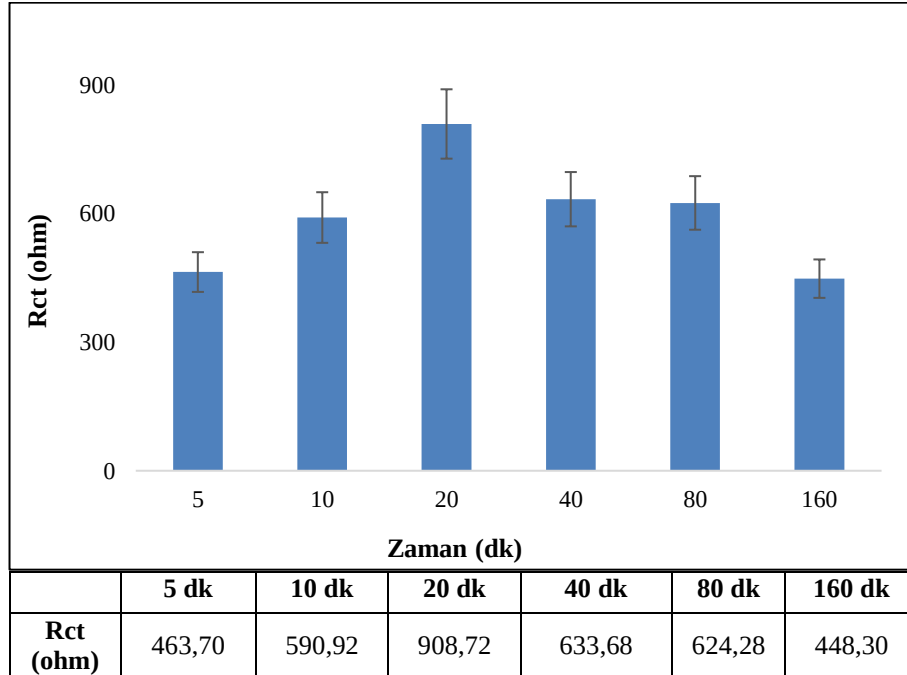
Şekil 4.19. ● 5dk, ■ 10dk, ◆ 20dk, ▲ 40dk, ▼ 80dk ve + 160dk immobilizasyon süreleri EIS eğrileri

Şekil 4.19.'da verilmiş EIS eğrileri incelendiğinde 5 dakika immobilizasyon süresinden 160 dk immobilizasyon süresine doğru gidildikçe, R_{ct} 'nin 20 dakikaya kadar artış gösterdiği ve sonrasında düşmeye başladığı tespit edilmiştir. Bundan dolayı CpDNANH₂'nın aktive PGE yüzeyine kimyasal adsorpsiyonu için 20 dakika optimum değer olarak belirlenmiştir. Bekleme süresi uzadıkça adsorpsiyon desorpsiyon dengesinin bozulduğu ve CpDNANH₂'nin yüzeyden desorbe olabildiği gözlemlenmiştir. Dolayısıyla PGE yüzeyinden yalıtkan karakterli prob ayrıldıkça yüzeyin iletkenliğinin arttığı bununla ters orantılı şekilde R_{ct} 'nin azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. CpDNANH₂ immobilizasyon süresine karşı Rct değişim grafiği

Şekil 4.19.'daki empedans eğrilerinin fit edilmesi sonucu elde edilmiş Rct değerlerine karşılık zaman grafiği çizilmiş olup Şekil 4.20.'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde zaman optimizasyonunda ideal bekleme süresi en yüksek Rct değerinin elde edildiği 20 dakika olarak belirlenmiştir.

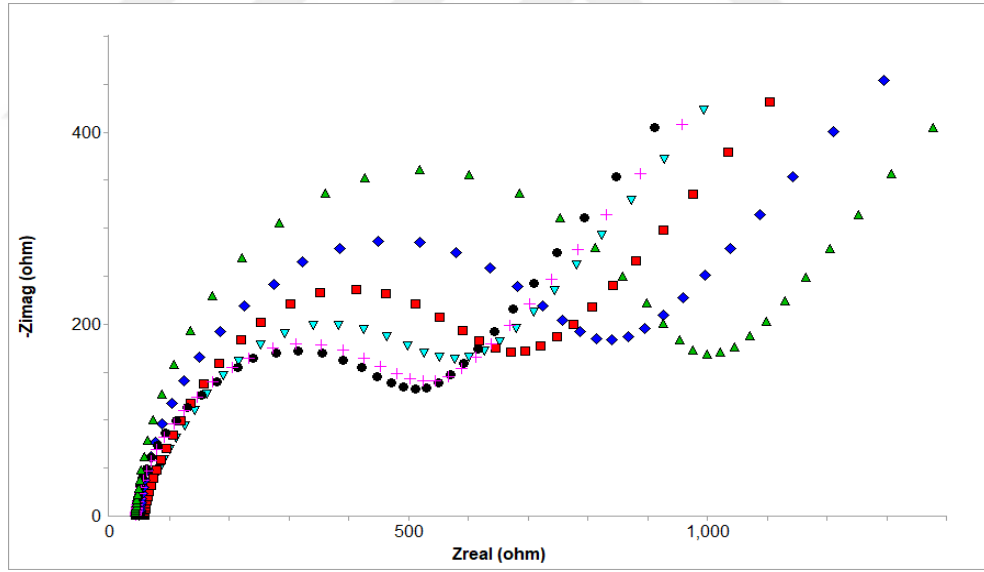


Şekil 4.21. CpDNANH₂ immobilizasyon süresi Rct değişim histogram grafiği (n=5)

Şekil 4.19.'da yer alan EIS eğrilerinin eşdeğer devreye uyarlanması sonucunda elde edilmiş Rct verileri ve şekil 4.21.'de verilmiş Rct-Zaman değişim değerleri, her bir bekleme süresi için yapılmış beşer deneyin sonucundan elde edilmiş histogram grafiği empedans verilerinin doğruluğunu kanıtlar niteliktedir. Bu sebeple CpDNANH₂ immobilizasyonunda 20 dakika bekleme süresi optimum bekleme süresi olarak belirlenmiştir.

4.3.3. CpDNANH₂-TRGT hibridizasyonunda TRGT konsantrasyon optimizasyonu bulgular ve yorumlar

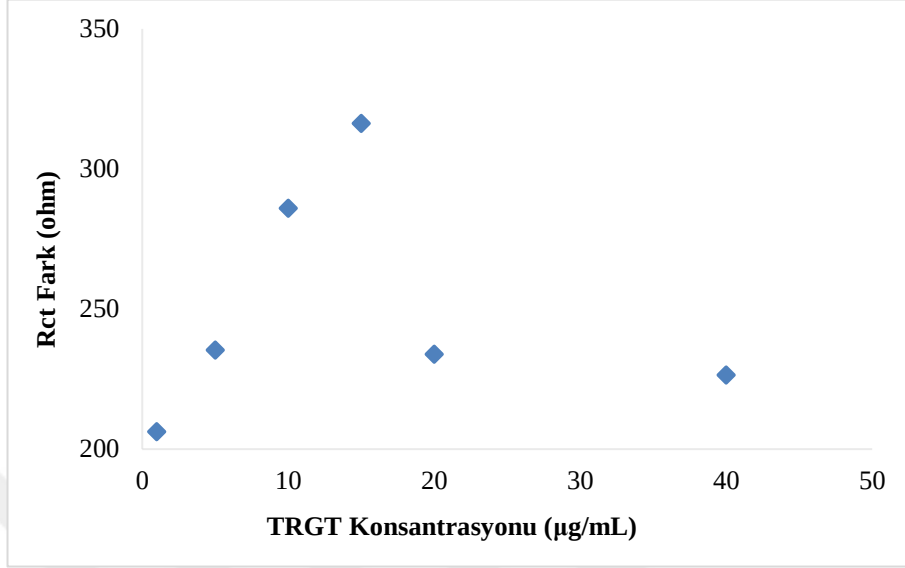
Bölüm 3.4.4.3.'e göre yapılmış çalışmalarda 5 µg/mL prob immobilize PGE'nin TRGT ile hibridizasyonunda optimum TRGT konsantrasyonunun belirlenmesi 1, 5, 10, 15, 20 ve 40 µg/mL TRGT miRNA içeren çözeltileriyle yapılmıştır. Her bir konsantrasyon için yapılmış deneylerin EIS bulguları Şekil 4.22.'de verilmiştir.



Şekil 4.22. ● 1 µg/mL TRGT, ■ 5 µg/mL TRGT, ◆ 10 µg/mL TRGT, ▲ 15 µg/mL TRGT, ▼ 20 µg/mL TRGT ve + 40 µg/mL TRGT hibridizasyonu EIS eğrileri

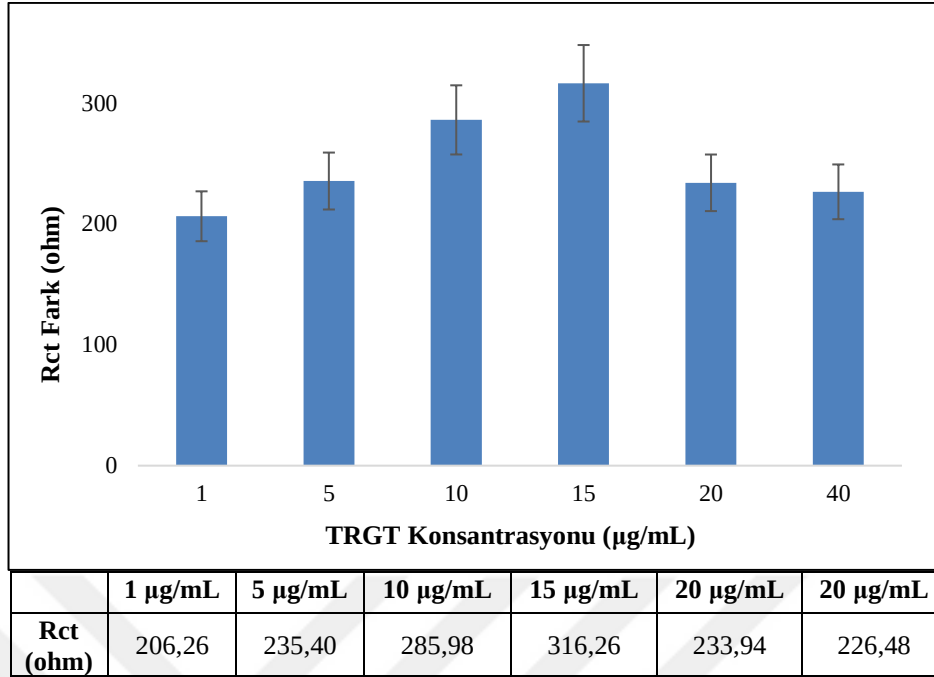
Şekil 4.22.'de verilmiş Nyquist eğrileri incelendiğinde CpDNANH₂ -TRGT miRNA hibridizasyonunda en yüksek Rct değeri 15 µg/mL TRGT konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bu durumda 5 µg/mL CpDNANH₂ immobilize aktive PGE için hibridizasyon çözeltisinin 15 µg/mL TRGT içermesi gerektiği tespit edilmiş ve

kimyasal adsorpsiyonda kullanılacak olan optimum TRGT konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.23. TRGT hibridizasyonunda konsantrasyona karşı Rct fark değişim grafiği

CpDNANH₂ immobilize aktive PGE'nin TRGT hibridizasyonundan sonra TRGT konsantrasyonuna karşı yüzey değişiminde meydana gelen direnç farkının (Rct fark) grafiği çizilmiş ve Şekil 4.23.'te verilmiştir. Şekil 4.23. incelendiğinde 15 µg/mL TRGT konsantrasyonu içeren çözeltide yapılmış hibridizasyon en yüksek Rct degerini ve en düşük iletkenliği impedimetrik ölçüm sonucunda göstermiştir. Bu sonuç geliştirilmiş miRNA sensörü için ideal TRGT konsantrasyonunun 15 µg/mL TRGT içeren 0,05 M ABS tampon çözeltisi olduğu belirlenmiştir. Burada dikkat edilmesi gereken husus fiziksel adsorpsiyon çalışmasında 10 µg/mL olarak belirlenmiş optimum TRGT konsantrasyonunun kimyasal adsorpsiyonda 15 µg/mL olarak belirlenmiş olmasıdır.

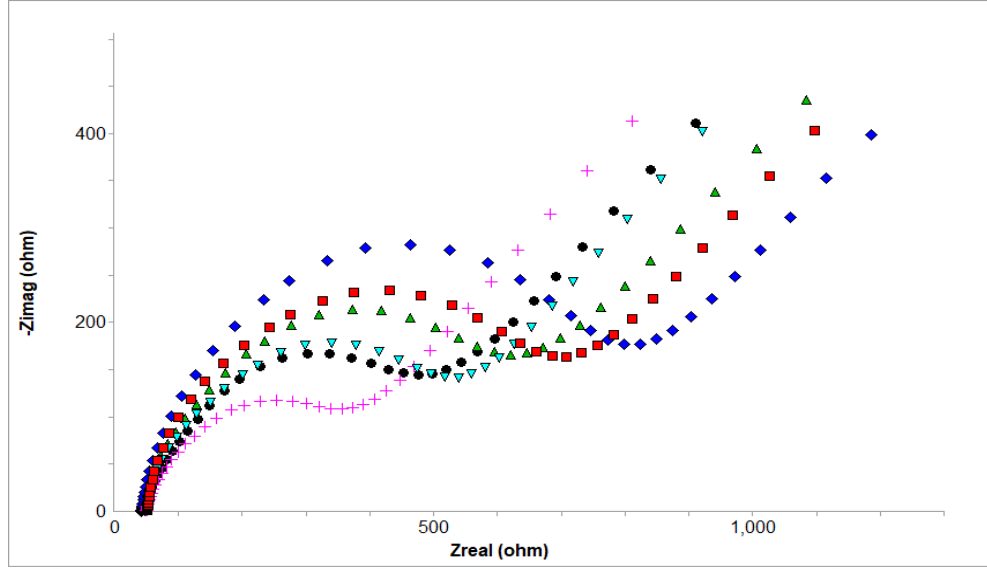


Şekil 4.24. TRGT konsantrasyonu Rct fark değişimi histogram grafiği (n=5)

Her bir TRGT konsantrasyonu için 5 kez tekrarlanan deney sonuçları için Nyquist eğrileri eşdeğer devreye uyarlanmış ve Rct değerleri bulunmuştur. Bu değerler için çizilmiş histogram grafiği çizilmiş ve sapma miktarı Şekil 4.24.'te verilmiştir. Elde edilmiş veriler analiz edildiğinde miRNA tayini için geliştirilmiş impedimetrik PGE sensörü Şekil 4.22.'de verilmiş empedans eğrilerine ve Şekil 4.23.'te verilmiş TRGT konsantrasyonuna karşı Rct fark grafiği verilerine paralellik göstererek 15 µg/mL TRGT konsantrasyonundaki hibritleşmede en iyi sonucu vermiştir.

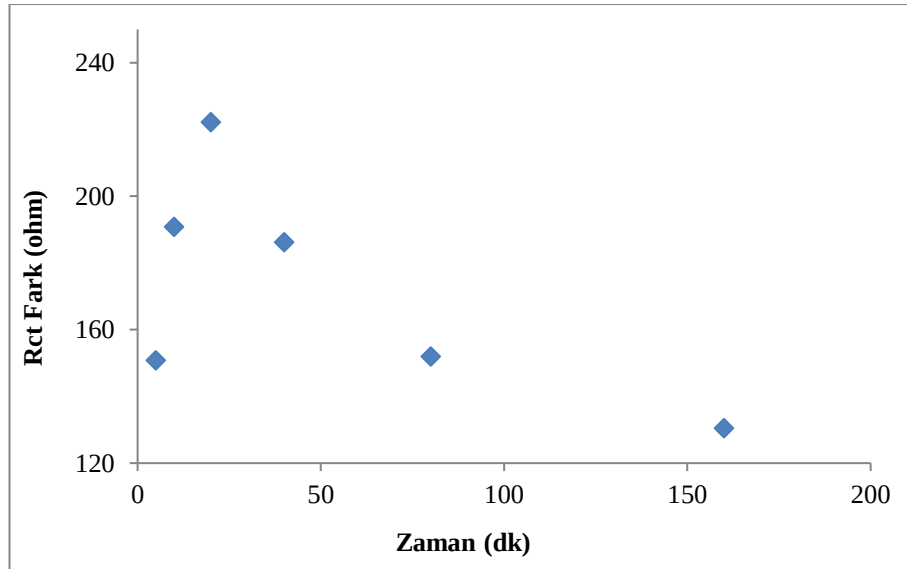
4.3.4. CpDNANH₂-TRGT hibridizasyonunda zaman optimizasyonu bulgular ve yorumlar

Kimyasal adsorpsiyon işlemi ile elde edilmiş PGE-CpDNANH₂ biyosensörünün CpDNANH₂-TRGT hibridizasyonunda optimum süreyi belirlemek amacıyla Bölüm 3.4.4.4.'te belirtilen koşullarda deneyler yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 4.25.'te, EIS eğrilerinin eşdeğer devreye uyarlanarak fit edilmesi sonucu elde edilmiş Rct değerlerinin hibritleşme süresine karşı çizilmiş grafiği Şekil 4.26.'da ve son olarak her bir bekleme süresi için yapılmış beş deney sonucunda elde edilmiş Rct değerlerinin histogram grafiği Şekil 4.27.'de verilmiştir.



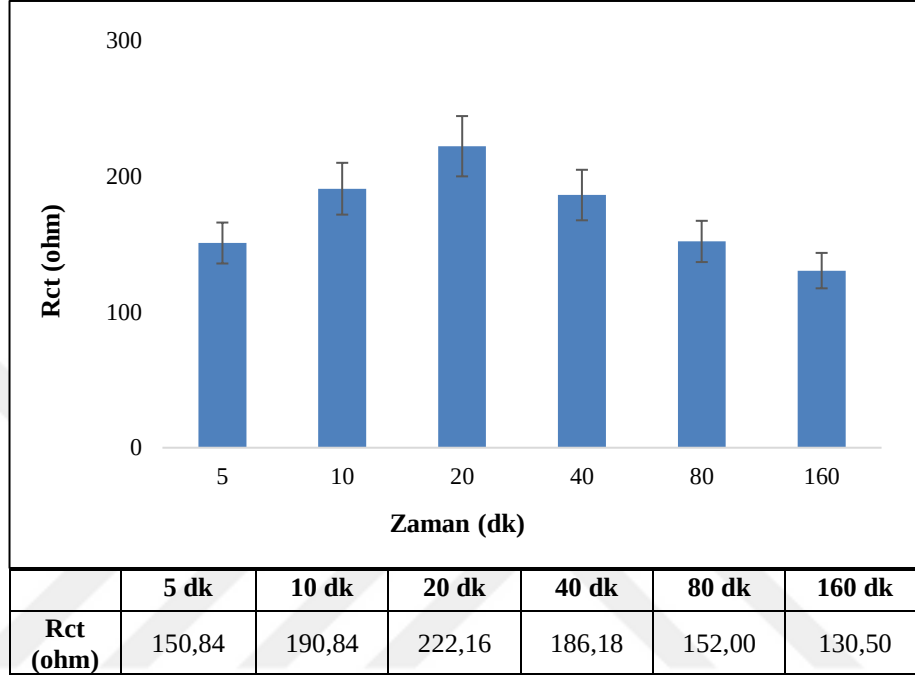
Şekil 4.25. ● 5dk TRGT, ■ 10dk TRGT, ◆ 20dk TRGT, ▲ 40dk TRGT, ▼ 80dk TRGT ve + 180dk TRGT hibridizasyonu EIS eğrileri

Şekil 4.25.'te farklı hibridizasyon sürelerinde elde edilmiş Nyquist eğrileri analiz edildiğinde, Rct anlamına gelen ilk yarım dairenin 5 dakikalık hibritleşme süresinden 20 dakikalık hibritleşme süresine kadar yükseldiği ve sonrası hibritleşme sürelerinde azaldığı tespit edilmiştir. 20 dakikalık hibridizasyon süresi sonucunda en büyük Rct değeri elde edildiğinden bu süre optimum hibridizasyon süresi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.26. TRGT hibridizasyon süresine karşı Rct fark değişim grafiği

Her bekleme süresi için tekrarlanmış 5 deneyin EIS eğrilerinin eşdeğer devreye uyarlanması sonucu elde edilen R_{ct} fark değerleri ortalamasının hibritleşme sürelerine karşılık grafiği çizildiğinde (Şekil 4.26.), sonucun EIS eğrilerinde elde edilen optimum hibritleşme süresini (20 dakika) desteklediği görülmektedir.



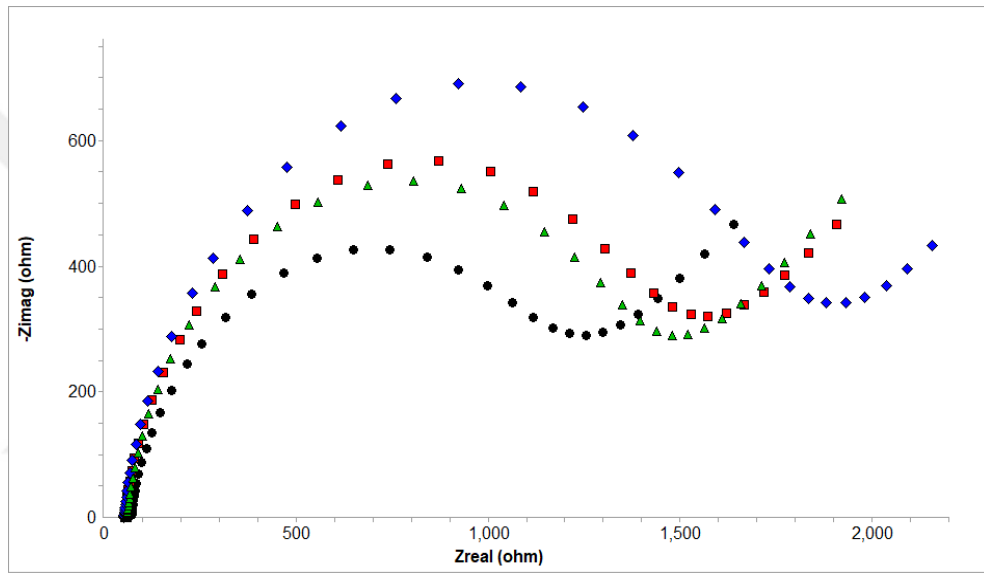
Şekil 4.27. TRGT hibridizasyon süresi R_{ct} fark değişimi histogram grafiği (n=5)

Geliştirilmiş impedimetrik sensörün NHS-EDC ile $CpDNANH_2$ immobilizasyonu sonucu elde edilmiş R_{ct} değerleri ile $CpDNANH_2$ -TRGT hibridizasyonu sonucu elde edilmiş R_{ct} değerlerinin farkları alınarak histogram grafiği Şekil 4.27.'de oluşturulmuştur. Beş deneyin ortalamalarının analizi ile elde edilmiş bu grafik sonucunda da ideal hibritleşme süresinin 20 dakika olduğu belirlenmiş ve kimyasal adsorpsiyon ile elde edilmiş impedimetrik biyosensörlerin sonraki deneylerde bu sürede hibridizasyonu yapılmıştır.

4.4. Fiziksel Adsorpsiyon Tayin Sınırı ve Kalibrasyon Çalışması Bulgular ve Yorumlar

Bölüm 3.4.5.'te belirtilen koşullarda geliştirilmiş biyosensörün hedef TRGT tayinine yönelik deneylerde elde edilmiş EIS verileri eşdeğer devreye uydurularak fit edilmiş

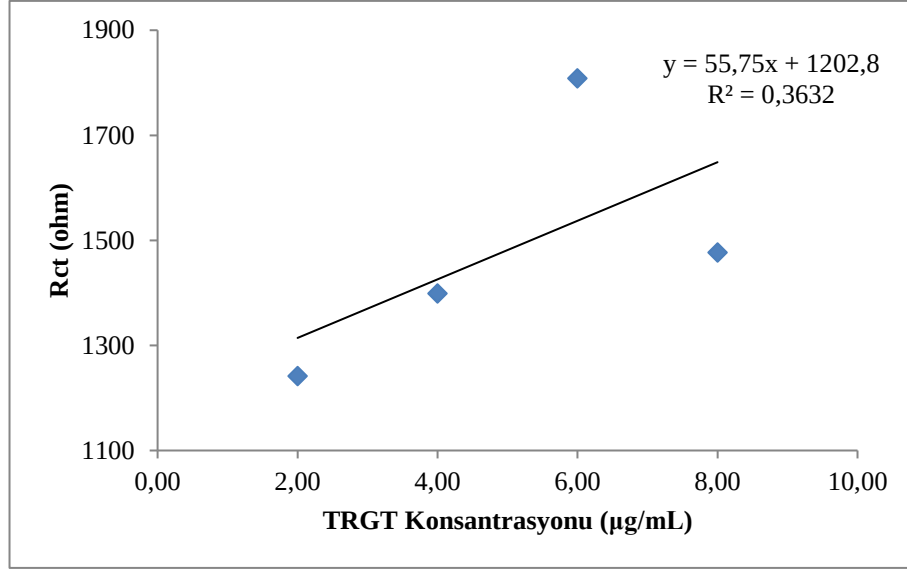
ve R_{ct} verileri analiz amaçlı kaydedilmiştir. PBS tamponunda yapılmış çalışmada her bir konsantrasyon için alınan Nyquist eğrileri Şekil 4.28.'de, bu eğrilerin fit edilmesi sonucunda elde edilmiş yük transfer direnci değerlerinin konsantrasyona karşı ortalama değerleri Tablo 4.1.'de ve bu verilerden elde edilmiş kalibrasyon grafiği Şekil 4.29.'da verilmiştir. Ayrıca ABS tamponunda yapılmış deneyler sonucunda elde edilmiş EIS eğrileri Şekil 4.30.'da bu eğrilerin fit edilmesi sonucunda elde edilmiş yük transfer direnci değerlerinin konsantrasyona karşı ortalama değerleri Tablo 4.2.'de ve bu verilerden elde edilmiş kalibrasyon grafiği Şekil 4.31.'de verilmiştir.



Şekil 4.28. ● 2 µg/mL TRGT, ■ 4 µg/mL TRGT, ◆ 6 µg/mL TRGT, ▲ 8 µg/mL TRGT EIS eğrileri

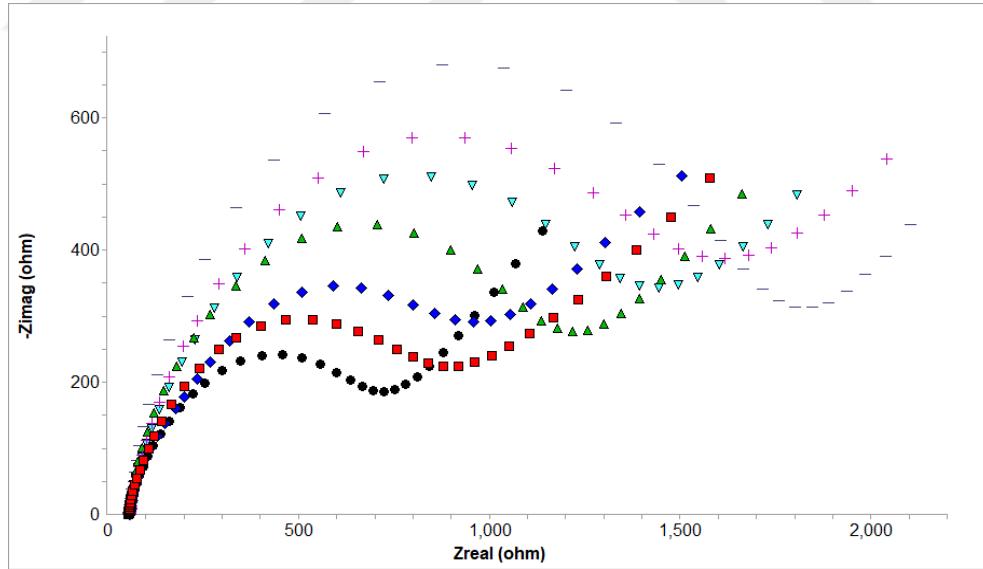
Tablo 4. 1. PBS'de TRGT konsantrasyonlarına karşılık gelen yük transfer direnci değerleri

TRGT Konsantrasyonu (µg/mL)	Yük Transfer Direnci (R_{ct} , ohm)
2,00	1241,80
4,00	1399,00
6,00	1808,40
8,00	1477,00



Şekil 4.29. PBS’de TRGT konsantrasyonu-Rct kalibrasyon grafiği

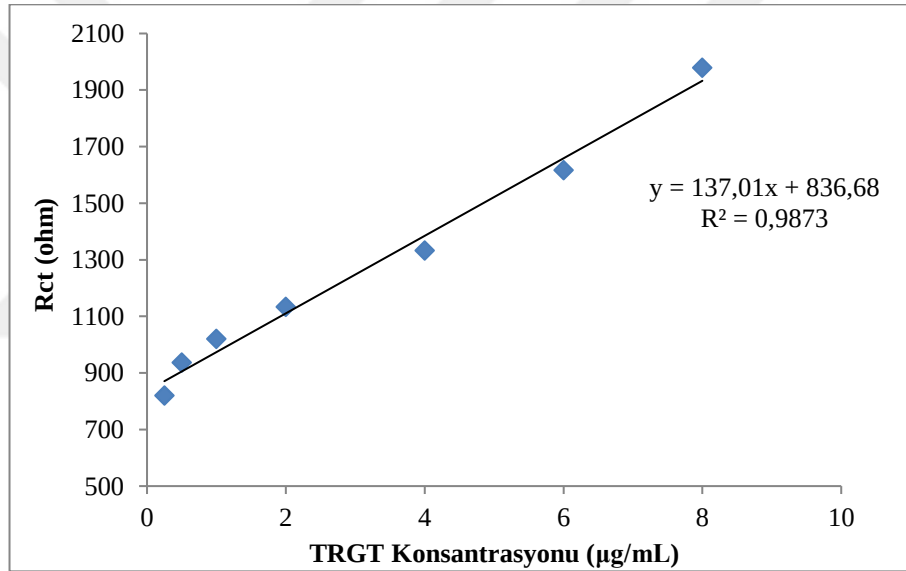
PBS tamponunda yapılan çalışmada belirtilmiş TRGT konsantrasyonları aralığında (0,25 - 10 µg/mL) sensör lineerlik göstermemiş ve 2 µg/mL’nin altı ile 8 µg/mL’nin üstünde konsantrasyonlarda duyarlı çalışmamıştır.



Şekil 4.30. ● 0,25 µg/mL TRGT, ■ 0,5 µg/mL TRGT, ◆ 1 µg/mL TRGT, ▲ 2 µg/mL TRGT, ▼ 4 µg/mL TRGT, + 6 µg/mL TRGT ve - 8 µg/mL TRGT EIS eğrileri

Tablo 4. 2. ABS’de TRGT konsantrasyonlarına karşılık gelen yük transfer direnci değerleri

TRGT Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Yük Transfer Direnci (Rct, ohm)
0,25	819,24
0,50	936,36
1,00	1020,04
2,00	1133,20
4,00	1333,00
6,00	1616,00
8,00	1979,00

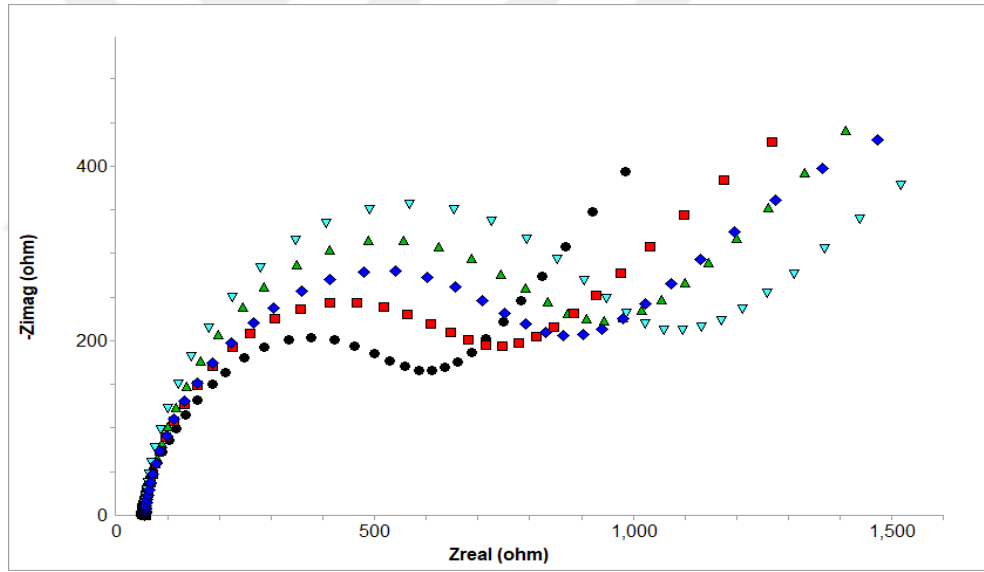


Şekil 4.31. ABS’de TRGT konsantrasyonu-Rct kalibrasyon grafiği

ABS tamponunda TRGT tayini çalışmasında geliştirilmiş sensör 0,25 - 8 $\mu\text{g/mL}$ TRGT konsantrasyon aralığında lineerlik göstermiştir. Fiziksel adsorpsiyon ile PBS ve ABS tamponlarında yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında biyosensörler hem duyarlılık hem de tayin sınırı değerlerinde farklılık göstermiştir. ABS tamponu çalışmasında elde edilen veriler sensörün bu tamponda daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

4.5. Kimyasal Adsorpsiyon Tayin Sınırı ve Kalibrasyon Çalışması Bulgular ve Yorumlar

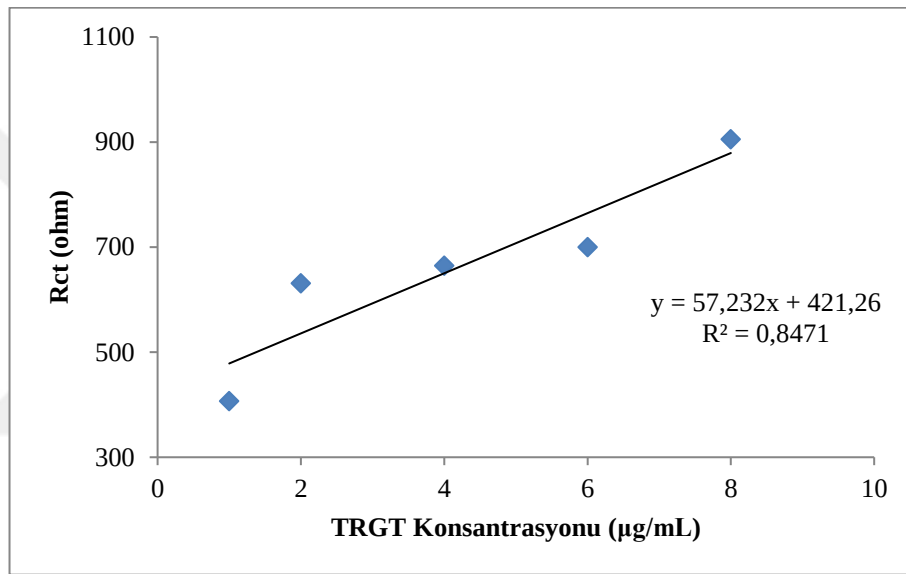
Kimyasal adsorpsiyonda biyosensör Bölüm 3.4.6.'da belirtilen koşullara göre geliştirilmiş ve hedef TRGT tayininde kullanılmıştır. Çalışmalarda elde edilmiş EIS verileri eşdeğer devreye göre fit edilmiş ve R_{ct} verileri analiz amaçlı kaydedilmiştir. PBS tamponunda yapılmış çalışmada belirtilmiş TRGT konsantrasyonları (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 $\mu\text{g/mL}$) için tutarlı bir sonuç elde edilmediğinden teze eklememiştir. Fakat ABS tamponunda yapılmış çalışmalar sonucunda elde edilmiş Nyquist eğrileri Şekil 4.32.'de, bu eğrilerin eşdeğer devreye uydurularak fit edilmesi sonucunda elde edilmiş yük transfer direnci değerlerinin TRGT konsantrasyonuna karşı ortalama değerleri Tablo 4.3.'te ve bu verilere ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.33.'te verilmiştir.



Şekil 4.32. ● 1 $\mu\text{g/mL}$ TRGT, ■ 2 $\mu\text{g/mL}$ TRGT, ◆ 4 $\mu\text{g/mL}$ TRGT, ▲ 6 $\mu\text{g/mL}$ TRGT ve ▼ 8 $\mu\text{g/mL}$ TRGT EIS eğrileri

Tablo 4. 3. ABS’de TRGT konsantrasyonlarına karşılık gelen yük transfer direnci değerleri

TRGT Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Yük Transfer Direnci (R_{ct} , ohm)
1,00	406,66
2,00	631,38
4,00	664,76
6,00	700,00
8,00	905,40



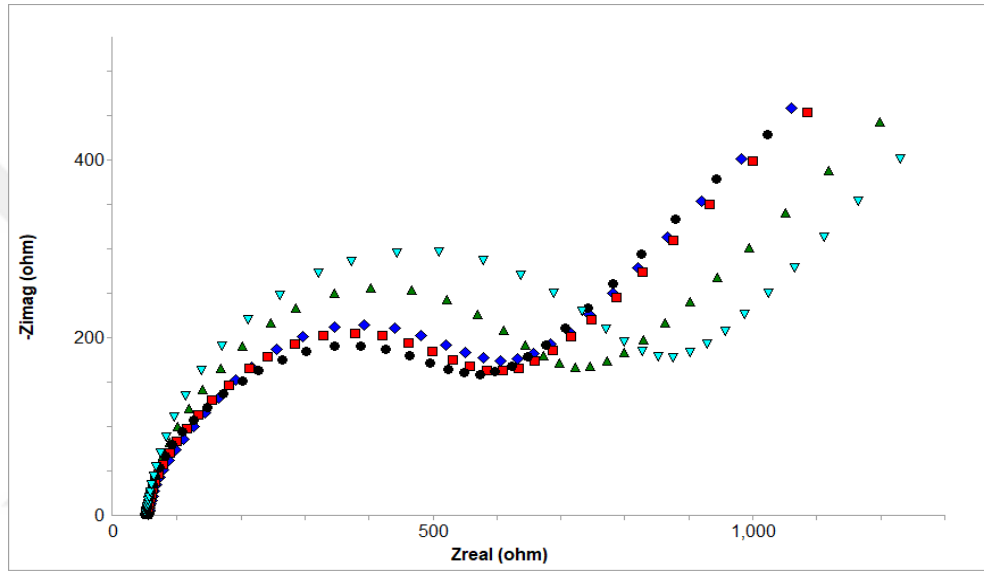
Şekil 4.33. ABS’de TRGT konsantrasyonu- R_{ct} kalibrasyon grafiği

ABS tamponunda TRGT tayini çalışmasında geliştirilmiş sensör 1- 8 $\mu\text{g/mL}$ TRGT konsantrasyon aralığında lineerlik göstermiştir. Kimyasal adsorpsiyon ile elde edilmiş sensörler PBS ortamında bulunan hedef TRGT duyarlı ve tutarlı bir şekilde tayin edilememiştir. Fakat ABS ortamındaki hedef molekülün tayini daha duyarlı yapılabilmektedir.

Ayrıca yapılan hedef tayini çalışmalarında fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon ile elde edilmiş biyosensörler karşılaştırıldığında fiziksel asorpsiyon yöntemi ile geliştirilmiş sensörün ABS tamponunda kimyasal adsorpsiyon ile geliştirilen sensörden daha hassas olduğu ayrıca tayin sınırının daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

4.6. Fiziksel Adsorpsiyonda CpDNA Prob ve miRNA-133a Hedef Dizi TRGT Hibridizasyonu Seçimlilik Çalışması Bulgular ve Yorumlar

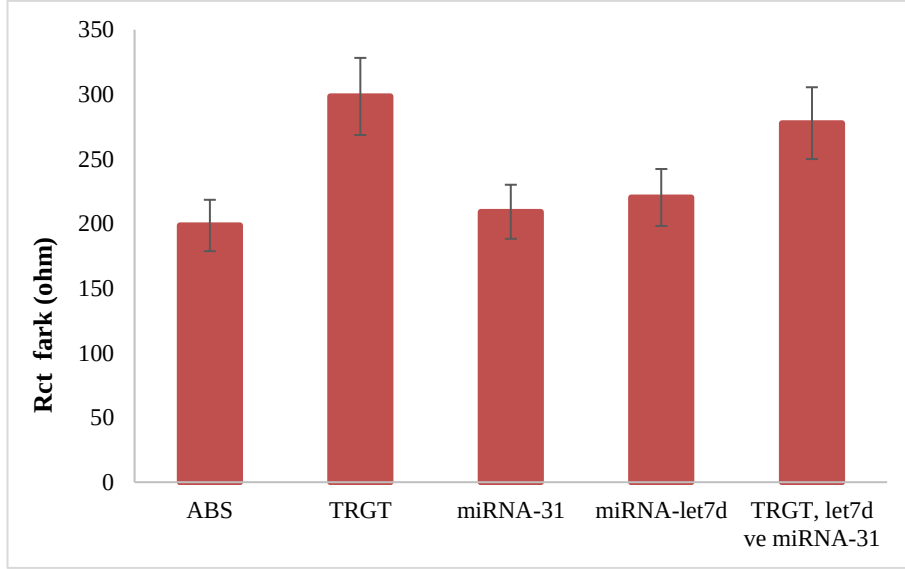
Bölüm 3.4.7.'te belirtilmiş şartlara göre yapılmış çalışmalar sonucunda elde edilmiş veriler için EIS eğrileri Şekil 4.34.'te, eğrilerin fit edilmesinden elde edilmiş R_{ct} değerlerinin ortam değişikliğine karşı çizilmiş grafiği Şekil 4.35.'te verilmiştir. Ayrıca ortam değişikliğine karşılık gelen R_{ct} değerleri Tablo 4.4.'te verilmiştir.



Şekil 4.34. ● ABS, ■ 10 µg/mL miRNA-31, ◆ 10 µg/mL miRNA-let7d, ▲ 10 µg/mL TRGT, let7d ve miRNA-31 ve ▼ 10 µg/mL TRGT EIS eğrileri

Tablo 4. 4. TRGT seçimlilik çalışması ortam değişikliği R_{ct} değerleri

Ortam (µg/mL)	Yük Transfer Direnci (R_{ct} , ohm)
ABS	198,60
TRGT (10 µg/mL)	298,40
miRNA-31 (10 µg/mL)	209,18
miRNA-let7d (10 µg/mL)	220,26
TRGT, let7d ve miRNA-31 (10 µg/mL)	277,76

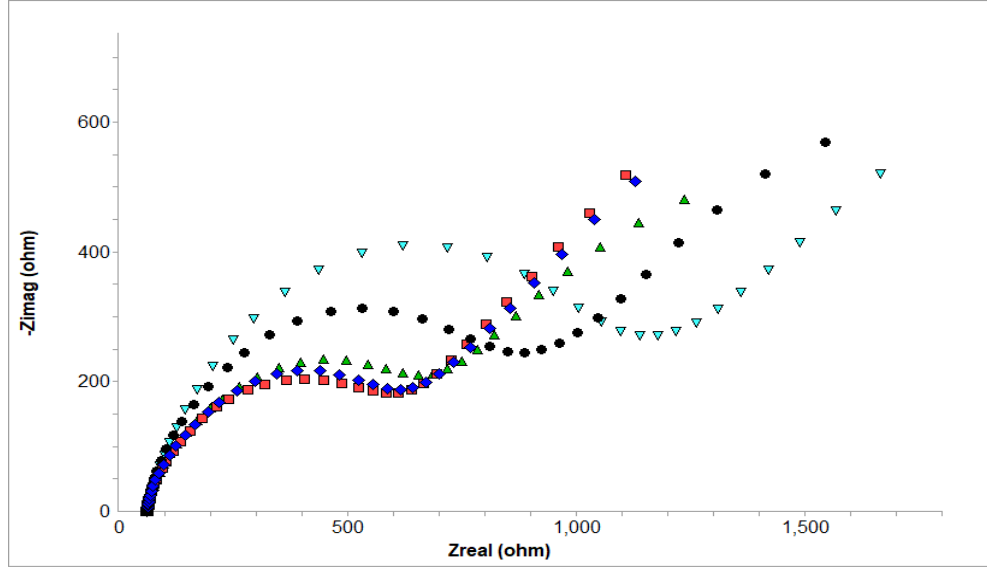


Şekil 4.35. TRGT seçicilik çalışması ortam değişikliği Rct fark değerleri histogram grafiği (n=5)

Tablo 4.4.’teki veriler ve bu verilerden elde edilmiş Şekil 4.35.’teki histogram grafiği incelendiğinde fiziksel adsorpsiyon ile geliştirilmiş sensörün sadece ABS ortamında ve ayrı ayrı miRNA-31 ile let7d içeren ABS ortamlarında Rct değişimleri yaklaşık olarak aynı kalmış ve sensör farklı molekülleri tayin etmemiş yani seçici davranmamıştır. Ancak sadece TRGT içeren ABS tamponunda ve TRGT, let7d ve miRNA-31 içeren ABS tamponunda sensör seçici davranış göstererek hedef miRNA tayini gerçekleştirmiştir. Bu durum fiziksel adsorpsiyon tekniği ile geliştirilen sensörün hedef molekülün tayini için seçici ve duyarlı bir sensör olduğunu ispatlamaktadır.

4.7. Kimyasal Adsorpsiyonda CpDNA Prob ve miRNA-133a Hedef Dizi TRGT Hibridizasyonu Seçicilik Çalışması Bulgular ve Yorumlar

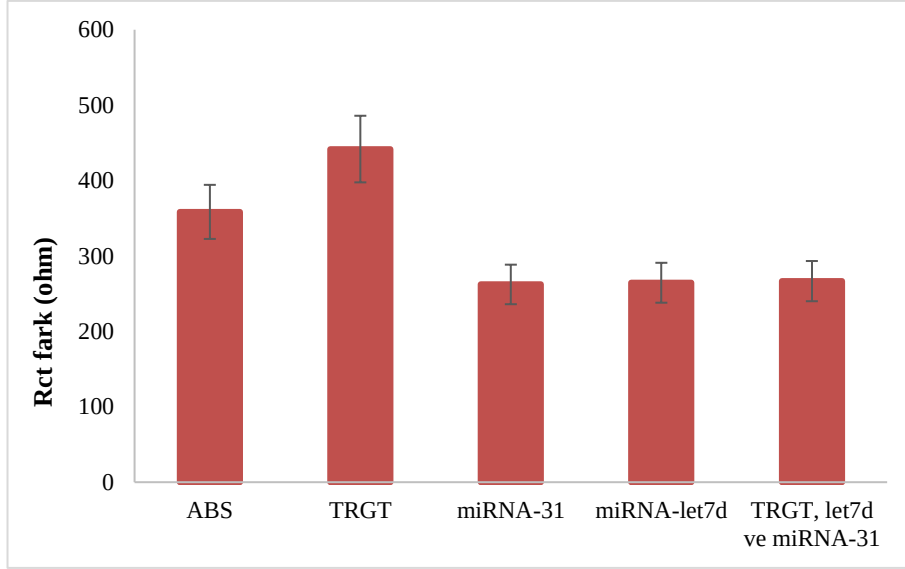
Kimyasal adsorpsiyon ile elde edilmiş PGE’ler Bölüm 3.4.8.’e göre seçicilik çalışmasına tabi tutulmuştur. Yapılmış çalışmalar sonucunda elde edilmiş veriler için EIS eğrileri Şekil 4.36.’te, eğrilerin fit edilmesinden elde edilmiş Rct değerlerinin ortam değişikliğine karşı çizilmiş grafiği Şekil 4.37.’te verilmiştir. Ayrıca ortam değişikliğine karşılık gelen Rct değerleri Tablo 4.5.’te verilmiştir.



Şekil 4.36. ● ABS, ■ 15 µg/mL miRNA-31, ◆ 15 µg/mL miRNA-let7d, ▲ 15 µg/mL TRGT, let7d ve miRNA-31 ve ▼ 15 µg/mL TRGT EIS eğrileri

Tablo 4. 5. TRGT seçimlilik çalışması ortam değişikliği Rct değerleri

Ortam (µg/mL)	Yük Transfer Direnci (Rct, ohm)
ABS	358,46
TRGT (15 µg/mL)	441,78
miRNA-31 (15 µg/mL)	262,25
miRNA-let7d (15 µg/mL)	264,48
TRGT, let7d ve miRNA-31 (15 µg/mL)	266,66



Şekil 4.37. TRGT seçicilik çalışması ortam değişikliği Rct fark değerleri histogram grafiği (n=5)

Kimyasal adsorpsiyon tekniği ile geliştirilmiş sensöre ait veriler Tablo 4.5.'te ve Şekil 4.37.'de verilmiştir. Histogram grafiği ve veriler incelendiğinde kimyasal adsorpsiyon ile geliştirilmiş sensörün sadece ABS ortamında ve hedef TRGT içeren ABS ortamında duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Yalancı hibridizasyon anlamına gelen ve sadece tampon çözeltisinin bulunduğu ortamda sensörün Rct değerinin artması sensörün düzgün çalışmadığını göstermektedir. Ayrıca ayrı ayrı miRNA-31 ile let7d içeren ABS ortamlarında duyarsız kalması ve TRGT, let7d ve miRNA-31 içeren ABS tamponu ortamında duyarlılık göstermesi beklenen sensör seçici davranış göstermemiş hedef miRNA tayini gerçekleşmemiştir. Bu durum kimyasal adsorpsiyon tekniği ile geliştirilen sensörün hedef molekülün tayini için seçici ve duyarlı bir sensör olmadığını göstermektedir.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser biyobelirteci olan miR-133a'nın tayini için PGE'nin ilk aşamada kutudan çıkar çıkmaz kullanımı (yüzey özellikleri, R_{ct} değerleri vb. kriterler) değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda kalem ucu elektrotları karşılaştırmak üzere standart bir yöntem benimsenmiştir. Bu yöntemde 0,1 M KCl destek elektroliti ortamında $[Fe(CN)_6]^{2-}/[Fe(CV)_6]^{-3}$ redoks çifti potasyum tuzlarının son konsantrasyonları 2,5 mM olmak koşulu ile hücreye 10 ml çözeltileri eklenmiştir ve döngüsel voltamogramları ile elektrokimyasal empedans spektrumları bölüm 3.4.2.'de açıklanan şartlar altında alınmıştır. Kutudan çıkan bazı kalem uçlarının standart olarak seçilen bu redoks çiftinin voltamogramını doğru bir şekilde yansıtamadığı ve empedans ölçümlerinde ortalama değerlerin çok üzerinde yük aktarım direnci gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca PGE'lere literatürde çokça karşılaşıldığı gibi ABS tamponunda + 1,4 V ve 60 s süre ile elektrokimyasal işlem uygulanmıştır. Literatürde çoğunlukla (Erdem, Sengiz, Isin, Akbarnia ve Yaralı) 30 s yapılmış olan aktivasyon işlemi daha iyi sonuç alındığından bu çalışmada 60 s süresince yapılmıştır (Erdem ve ark., 2013; Sengiz ve ark., 2015; Erdem ve ark., 2017; Isin ve ark., 2017; Akbarnia ve ark., 2019; Yaralı ve ark., 2020; Yaralı ve Erdem, 2021). Fakat Yammouri 2017 yılında yapmış olduğu çalışmada PGE yüzey aktivasyonunu 60 s'de yapmıştır (Yammouri ve ark., 2017). Bu işlem sonucunda elektrodun redoks çiftine verdiği yanıtı geliştirmiş ve pik akımlarının artmasına neden olmuştur. Ayrıca EIS analizi ile bu işlemin elektrot yüzeyindeki yük transfer direncini azaltması sonucu daha iletken bir elektrot yüzeyi elde edildiği ve elektrot-çözelti arayüzeyinde elektron aktarımının kolaylaştığı sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.1. A, B). Yüzeyin yük transfer direnci 270 ohm'dan 88 ohm'a düşmüştür (Şekil 4.1. C). Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda elektrokimyasal olarak aktive edilmiş PGE'lerin kullanımı ile deneylere devam edilmiştir.

Bölüm 4.1.2.'de PGE elektrotların yakalama ucu olarak görev yapan DNA oligonükleotid zinciri (cp-DNA-anti-miR-133a) ve hedef molekül olan miRNA-133a'ya maruz bırakılması durumunda bu moleküllerin yüzeye adsorbe oldukları

belirlenmiştir. Yalın haldeki elektrotta 10-200 ohm aralığında değişen PGE yük transfer direncinin aktivasyondan sonra 10-100 ohm aralığına düştüğü tespit edilmiştir. İmmobilizasyon ve hiridizasyon işlemlerinde PGE yük transfer dirençleri yaklaşık 1700 ile 2300 ohm aralığına çıkmıştır. Şekil 4.2.'de Nyquist diyagramları ile verilen empedans spektrumları incelendiğinde yük transfer direncinin büyüklüğünü gösteren yarım daire şekillerinin çaplarının büyüdüğü görülmektedir. 5 tekrar ile yapılan deneylerde Şekil 4.3.'te bu artış miktarı hataları ile birlikte gösterilmiştir. DNA zincirinin elektrot yüzeyine adsorpsiyonu ve ardından hedef molekül ile kenetlenmesi sonucu elektrot yüzeyi yalıtkan bir tabaka ile kaplandığından yük transfer direncinin arttığı belirlenmiştir. Yük transfer direncindenki bu artışların konsantrasyonla orantılı olup-olmadığı ve hangi aralıkta doğrusal olduğunun tespiti için fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon yolu ile DNA yakalama uçlarının PGE elektrot yüzeyine immobilizasyonu ve optimum koşulların belirlenmesi çalışmalarına geçilmiştir.

Bölüm 4.2.'de fiziksel adsorpsiyona dayalı çalışma bulguları verilirken Bölüm 4.3.'te kimyasal adsorpsiyona dayalı çalışmalara ilişkin bilgiler yer almaktadır. Şekil 4.4.'te 60 dakika süre sonucunda yakalama ucu konsantrasyonu değişiminin elektrodun Rct etkisi incelendiğinde 1, 3, 5, 7 ve 9 µg/mL konsantrasyonu ile yapılan ölçümlerde 5 ppm konsantrasyonun Rct değeri üzerinde en fazla değişimi oluşturduğu 7 ve 9 µg/mL gibi daha fazla yakalayıcı zincir kullanımının elektrodun yük transfer direncini daha fazla artırmadığı hatta azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). DNA zincirinin negatif yüklü olması nedeniyle fazladan madde miktarının yüzey üzerinde adsorbe olmuş moleküller arası etkileşimleri artırdığı bu nedenle yüzey üzerinden desorpsiyona yol açtığı şeklinde yorumlanmıştır. Böylece daha sonraki fiziksel adsorpsiyon çalışmaları için 5 µg/mL'lik DNA zincir konsantrasyonu optimum değer olarak devam edilmiştir. Kilic ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sentetik oligonükleotid (antimir-21) ile meme kanseri biyobelirteci olan mir-21'in tayininde antimir-21 prob konsantrasyonunu 5 µg/mL optimum olarak belirlemiştir (Kilic ve ark., 2015).

Bölüm 4.2.2.'de optimum olarak belirlenen 5 µg/mL zincir konsantrasyonunda PGE elektrot üzerine adsorpsiyon süresi çalışılmıştır. 5, 10, 20, 40, 80 ve 160 dk süre ile

yapılan adsorpsiyon sonucunda elde edilen empedans spektrumları Şekil 4.7’de verilmiştir. Şekil dikkatle incelendiğinde 160 dk ile 5 dk süre ile elde edilen Nyquist diyagramının hemen hemen aynı olduğu 20 ile 80 dk verilerinin yakın olduğu ve en fazla Rct artışına 40 dakika sürenin neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.8). Şekil 4.9.’da hata miktarları ile birlikte değerlendirildiğinde optimum adsorpsiyon süresinin 40 dk olduğu değerlendirilmiştir.

Bölüm 4.2.3.’te hedef molekülün yakalayıcı uç ile hibritleşme en iyi koşullarda yapabilmek için daha önce belirlenen 5 µg/mL yakalama probu konsantrasyonu ve 40 dk adsorpsiyon süresi ile hazırlanmış PGE’ler ile hedef molekülün hibritleşmesi için en uygun hedef konsantrasyonu belirlenmiştir. PGE elektrotlar 1, 5, 10, 15, 20 ve 40 ppm hedef molekül içeren çözeltilerde 60 dk hibridizasyon (kenetlenme) süresi verilerek en uygun hedef konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda 10 µg/mL hedef konsantrasyonu en fazla Rct değişimine yol açmıştır (Şekil 4.10., 4.11. ve 4.12.).

Bölüm 4.2.4.’te en kritik optimizasyonlardan biri yapılmıştır. Yakalayıcı zincir optimizasyonları 5 µg/mL ve 40 dk süre ile tamamlanmıştır. Bu aşamada hibridizasyon için verilmesi gereken süre en iyi hedef konsantrasyonunda ölçülmüştür. Hazırlanan PGE’ler 10 µg/mL miRNA-133a içeren çözeltilere daldırılmış ve farklı sürelerde çıkarıldıktan sonra durulanmış ve elektrodun empedans spektrumundaki değişimin gözlemlenmesi için standart olan kullanılan çözeltilere daldırılarak elektrokimyasal hücrede ölçüm işlemi yapılmıştır. Şekil 4.13.’te 5, 10, 20, 40, 80 ve 180 dakika hibridizasyon süresi sonucunda meydana gelen değişim gösterilmiştir. Şekil 4.14. ve 4.15.’te ilk 20 dk kadar Rct değerinin arttığı daha sonra azalma trendine girdiği belirlenmiştir. Bu ölçüm sonucunda optimum hibritleşme süresi 20 dakika olarak değerlendirilmiştir.

Bölüm 4.3. içinde yer alan kimyasal adsorpsiyon verileri incelendiğine yakalama ucu konsantrasyonu 5 µg/mL, yakalama ucu adsorpsiyon süresi 20 dakika bu şartlarda optimum hedef konsantrasyonu 15 µg/mL ve hibritleşme süresi 20 dakika olarak belirlenmiştir.

Fiziksel adsorpsiyon ile yapılan çalışmada hedef molekül konsantrasyonu 0,25 ile 8 µg/mL aralığında doğrusal olarak belirlenebildiği ($y = 137,01x + 836,68$) ve regresyon katsayısının $r^2 = 0,9873$ olduğu bulunmuştur.

Kimyasal olarak PGE yüzeyine yerleştirilen yakalayıcı uç ile 1-8 µg/mL aralığında doğrusal tayin yapılabildiği regresyon katsayısının $r^2 = 0,8471$ olduğu bulunmuştur.

Yapılan bu çalışma ile oligonükleotid yakalacı uç kullanılarak miRNA-133a'nın başarılı bir şekilde 0,25 µg/mL düzeyine kadar tayin edilebileceği ortaya konulmuştur. Beklenmedik bir şekilde fiziksel adsorpsiyon yöntemi kimyasal adsorpsiyondan daha başarılı kalibrasyon eğrisi ve daha düşük tayin limiti sunmuştur. Ayrıca optimize değerler karşılaştırıldığında kimyasal ve fiziksel adsorpsiyon arasında belirgin bir tayin süresi avantajı da olmadığı görülmüştür. Yapılan çalışmalarda immobilizasyon ve hibridizasyon işlemleri her iki adsorpsiyon deneylerinde literatürde yer aldığı üzere ilk önce pH=7,8 0,05 M PBS tamponunda yapılmıştır. Fakat hem tayin sınırı hem de doğrusallık sonuçları kayda değer olmamıştır. Daha sonra aynı çalışmalar 0,05 M (pH=4,8) ABS tamponunda tekrarlanmış ve yaklaşık olarak 8 kat daha hassas veriler elde edilmiştir. Bundan dolayı çalışmaların tamamı ABS tamponunda yapılarak sonuçlandırılmıştır.

Bölüm 4.6.'da fiziksel ve 4.7.'de kimyasal adsorpsiyonda seçimlilik verileri incelendiğinde miRNA-133a tayininde fiziksel adsorpsiyonla elde edilmiş sensörün hedef molekülü hem tek başına hemde farklı miRNA yapıları içinde başarılı şekilde tayin ettiği görülmüştür (Tablo 4.4. ve Şekil 4.35.). Fakat kimyasal adsorpsiyon ile elde edilmiş sensör hedef miRNA-133a tek başına iken tayin edebilsede diğer miRNA'ların bulunduğu ortamda hedef moleküle duyarsız kalmıştır (Tablo 4.5. ve Şekil 4.37.). Ayrıca fiziksel adsorpsiyon ile hazırlanan elektrodun yalancı hedef moleküllere karşı daha zayıf tepki verdiği ve miRNA-133'yı başarılı bir şekilde tayin edebildiği belirlenmiştir.

Tablo 4. 6. miRNA-133a tayinine yönelik güncel çalışmaların tez çalışması ile kıyaslanması

Yöntem	Kullanılan Materyal	Tayin sınırı	Kaynaklar
U-Şekli Fiber Biyosensör	AuNP/SiO ₂ fiber yüzey	0.5 nM	(Wen ve ark., 2020)
ELC (elektrokimyasal lüminesans)	Grafit karbon nitrür nanosheets	0.41 pM	(Zhu ve ark., 2021)
SERS (Surface-enhanced Raman spectroscopy)	Au/Ag alaşımı nanoparçacık	0.15 pM	(Si ve ark., 2021)
SERS (Yüzeyi geliştirilmiş Raman spektroskopisi)	Ag/Au nanosfer tabanlı SERS probları	0.306 fM	(Sun ve ark., 2018)
ECL-EC hibrit	Altın elektrot (Au)	12.17 aM	(Zhu ve ark., 2019)
ECL	Camsı karbon Elektrot (GCE)	0.33 fM	(Yu ve ark., 2021)
ECL	Karbon nanodots (CDs)	60 fM	(Ye ve ark., 2019)
ECL	FTO cam elektrot	48.0 aM.	(Wang ve ark., 2020)
Floresans	DNA molecular beacons	40 pM.	(Cheng ve ark., 2021)
Floresans	MoS ₂ nanosheets	100 fM	(Zhu ve ark., 2019)
ECL	Karbon nitrür nanosheets	0.87 aM	(Kitte ve ark., 2022)
CL (kemilüminesans)	AuNP tiyollenmiş yakalama DNA probu	0.3 pM	(Sun ve ark., 2019)
CL	AuNP@hairpin-DNA nanoprobe	10 fM	(Shi ve ark., 2019)
ECL	Zn-MOFs	35.8 aM	(Wang ve ark., 2021)
Elektrokimyasal (İmpidimetrik)	PGE	F. Ads. 37,5 nM K. Ads. 150 nM	Tez çalışması

Tablo 4.6.'da miRNA-133a tayinine yönelik özetlenen literatürdeki çalışmalar farklı yöntemlerle yapılmıştır. Bu yöntemler arasında ECL, SERS, Floresans ve CL olmasına rağmen hali hazırda miRNA-133a'nın tayini için elektrokimyasal bir biyosensör tanımlanmamıştır. Tayin limiti belirtilmiş çalışmalar kadar düşük olmasada tayin yöntemi olarak elektrokimyasal ilk sensör olarak literatürde yer alacağı düşünülmektedir. Ayrıca diğer yöntemlerin aksine oldukça düşük maliyetli ve hızlı bir analize imkân sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adams, R.N., 1969. *Electrochemistry at solid electrodes*. Dekker, M. Analytical Electrochemistry. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 262, New York.
- Akbarnia, A., Zare, H. R., Moshtaghioun, S. M., Benvidi, A. 2019. Highly selective sensing and measurement of microRNA-541 based on its sequence-specific digestion by the restriction enzyme Hinf1. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 182, 110360.
- Asadi, H., Ramasamy, R.P. 2020. Graphene-based electrochemical biosensor for impedimetric detection of miRNAs as potential cancer biomarkers. *J. Electrochem. Soc*, 167(16): 167523.
- Azzouzi, S., Mak, W.C., Kor, K., Turner, A.P.F., Ali, M.B., Beni, V. 2017. An integrated dual functional recognition/amplification bio-label for the one-step impedimetric detection of micro-RNA-21. *Biosens. Bioelectron*, 92:154-161.
- Bahadır, E.B., Sezgentürk, M.K. 2016. A review on impedimetric biosensors, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 44:1, 248-262.
- Bandiera, S., Hatem, E., Lyonnet, S., Henrion-Caude, A. 2010. microRNAs in diseases: from candidate to modifier genes. *Clin. Genet.*, 77(4): 306-313.
- Banerjee, P., Bhunia, A.K. 2009. Mammalian cell based biosensor for pathogen and toxins. *Trends Biotechnol.*, 27(3): 179-188.
- Bayat, P., Nosrati, R., Alibolandi, M., Rafatpanah, H., Abnous, K., Khedri, M., Ramezani, M. 2018. SELEX methods on the road to protein targeting with nucleic acid aptamers. *Biochimie.*, 154: 132-155.
- Bard A.J., Faulkner L.R. 2001. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications* 2nd edn. Wiley, New York.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., Hannon, G.J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818): 363-366.
- Bilitewski, U., Drewes, W., Neermann, J., Schrader, J., Surkow, R., Schmid, R.D., Bradley, J. 1993. Comparison of different biosensor systems suitable for bioprocess monitoring. *J Biotechnol.*, 31(3): 257-266.
- Bilitewski, U., Genrich, M., Kadow, S., Mersal, G. 2003. Biochemical analysis with microfluidic systems. *Anal Bioanal Chem.*, 377(3): 556-69.
- Bolat, G., Akbal Vural, O., Tugce Yaman, Y., Abaci, S. 2021. Label-free impedimetric miRNA-192 genosensor platform using graphene oxide decorated peptide nanotubes composite. *Microchem. J*, 166: 106218.

- Büyükkaya, F. 2011. Ferrosenli fosfazen bileşiklerinin elektrokimyasal davranışları. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD, Yüksek Lisans Tezi.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C.M. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99(24):15524-15529.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C.M. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 101(9): 2999-3004.
- Chamber, J.P., Arulanandam, B.P., Matta, L.L., Weis, A. Valdes, J.J. 2008. Biosensors recognition element. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 10(1-2): 1-12.
- Chan, J.A., Krichevsky, A.M., Kosik, K.S. 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 65(14): 6029-6033.
- Chang, I.S., Jang, J.K., Gil, G.C., Kim, M., Kim, H.J., Cho, B.W., Kim, B.H. 2004. Continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor. *Biosens Bioelectron.*, 19(6): 607-613.
- Cheng, A.M., Byrom, M.W., Shelton, J., Ford, L.P. 2005. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.*, 33(4):1290-1297.
- Cheng, X., Ren, D., Xu, G., Wei, F., Yang, J., Xu, J., Wang, L., Hu, Q., Cen, Y. (2021). Metal-organic frameworks-assisted nonenzymatic cascade amplification multiplexed strategy for sensing acute myocardial infarction related microRNAs. *Biosensors & bioelectronics*, 196, 113706.
- Clark, S.L., Remcho, V.T. 2002. Aptamers as analytical reagents. *Electrophoresis*, 23(9): 1335-1340.
- Csöregi, E., Gorton, L., Varga, G.M. 1993. Carbon fibres as electrode materials for the construction of peroxidase-modified amperometric biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 273 (1- 2): 59-70.
- Coulet, P.R., 1991. What is a Biosensor? Marcel Dekker Inc., New York, 1-6p.
- Dai, Z., Chen, J. Yan, F., Ju, H. 2005. Electrochemical sensor for immunoassay of carcinoembryonic antigen based on thionine monolayer modified gold electrode. *Cancer Detect. Prev.*, 29(3): 233-240.
- Daneshpour, M., Omidfar, K., Ghanbarian, H. 2016. A novel electrochemical nanobiosensor for the ultrasensitive and specific detection of femtomolar-level gastric cancer biomarker miRNA-106a. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 7: 2023-2036.
- Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H., Ruml, T. 2015. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol. Adv.*, 33(6 Pt 2): 1141-61. 17.
- David, I.G., Popa, D.E., Bulendra, M. 2017. Pencil Graphite Electrodes: A versatile tool in electroanalysis. *J. Anal. Methods Chem.*, 2017:1905968.

- Davis, C. 1975. *Annals Microbiol.* 126A: 175-186.
- Davis-Dusenbery, B.N., Hata, A. 2010. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J. Biochem.*, 148(4): 381-392.
- Delwiche, M., Tang, X., BonDurant, R., Munro, C. 2001. Improved biosensor for measurement of progesterone in bovine milk. *Trans. ASAE* 44(6): 1997-2002.
- Deng, H., Shen, W., Ren, Y., Gao, Z. 2014. A highly sensitive microRNA biosensor based on hybridized microRNA-guided deposition of polyaniline. *Biosens. Bioelectron.*, 60:195-200.
- Dong, X., Su, H., Jiang, F., Li, H., Shi, G., Fan, L. 2018. miR-133a, directly targeted USP39, suppresses cell proliferation and predicts prognosis of gastric cancer. *Oncol Lett.*, 15(6): 8311-8318.
- Edmonds, T.E. 1985. Electroanalytical applications of carbon fibre electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 175: 1-22.
- Eksin, E., Erdem, A. 2018. Electrochemical detection of microRNAs by graphene oxide modified disposable graphite electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 810: 232-238.
- Eksin, E., Torul, H., Yarali, E., Tamer, U., Papakonstantinou, P., Erdem, A. 2021. Paper-based electrode assemble for impedimetric detection of miRNA. *Talanta* 225: 122043.
- Ellington, A.D., Szostak, J.W. 1990. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346: 818-822.
- Engstrom, R. C. 1984. Spatial resolution of electrode heterogeneity using iontophoresis. *Anal. Chem.*, 56(6): 890-894.
- Erdem, A., Congur, G., Eksin, E., 2013. Multi channel screen printed array of electrodes for enzyme-linked voltammetric detection of microRNA., *Sens. Act. B*, 188:1089–1095 pp.
- Erdem, A., Eksin, E., Isin, D., Polat, D. 2017. Graphene oxide modified chemically activated graphite electrodes for detection of microRNA. *Electroanalysis*, 29(5): 1350-1358.
- Erdem, A., Karadeniz, H., Caliskan, A. 2009. Single-walled carbon nanotubes modified graphite electrodes for electrochemical monitoring of nucleic acids and biomolecular interactions. *Electroanalysis*, 21(3-5): 464-471.
- Erdem, A., Ozsoz, M. 2001. Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA. *Turk. J. Chem.*, 25(4): 469-475.
- Fabre, B., Taillebois, L. 2003. Poly(aniline boronic acid)-based conductimetric sensor of dopamine. *Chem. Commun.*, 24: 2982-2983.
- Fan, Y., Chen, X., Trigg, A.D., Tung, C., Kong, J., Gao, Z. 2007. Detection of microRNAs using target-guided formation of conducting polymer nanowires in nanogaps. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(17): 5437-5443.

- Gabrovska, K., Ivanov, J., Vasileva, I., Dimova, N., Godjevargova, T. 2011. Immobilization of urease on nanostructured polymer membrane and preparation of urea amperometric biosensor. *Int. J. Biol. Macromol.*, 48(4): 620-626.
- Gao, Z., Deng, H., Shen, W., Ren, Y. 2013. A label-free biosensor for electrochemical detection of femtomolar microRNAs. *Anal. Chem.*, 85(3): 1624-1630.
- Goto, M., Sato, K., Murakami, A., Tokeshi, M., Kitamori, T. 2005. Development of a microchip-based bioassay system using cultured cells. *Anal. Chem.* 77(7): 2125-2131.
- Graham, A.H.D. Robbins, J. Bowen, C.R. Taylor, J. 2011. Commercialization of CMOS integrated circuit technology in multi-electrode arrays for neurosciences and cell-based biosensors. *Sensors*, 11(5): 4943-4971.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., Shiekhattar, R. 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4): 631-640.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., Reimhult, E. 2008. Electrochemical biosensors – principles and architectures. *Sensors*, 8(3): 1400-1458.
- Gündüz, T. 2004. *İnstrümental Analiz*, 7. Baskı. Ankara, Türkiye.
- Gupta, V. K., Yola, M. L., Atar, N., Üstündağ, Z., Solak, A. O. 2014. Electrochemical studies on graphene oxide-supported metallic and bimetallic nanoparticles for fuel cell applications. *J. Mol. Liq.*, 191: 172-176.
- Hamidi-Asi, E., Palchetti, I., Hasheminejad, E. Mascini, M. 2013. A review on the electrochemical biosensors for determination of microRNA. *Talanta*, 115: 74-83.
- Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., Takahashi, T. 2005. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.*, 65(21): 9628-9632.
- He, H., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Franssila, K., Suster, S., Kloos, R.T., Croce, C.M., de la Chapelle, A. 2005. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.*, 102(52): 19075-19080.
- Hoa, X.D., Krik, A.G., Tabrizian, M. 2009. Enhanced SPR response from patterned immobilization of surface bioreceptor on nano-gratings. *Biosens. Bioelectron.*, 24(10): 3043-3048.
- Isin, D., Eksin, E., Erdem, A., 2017. Graphene oxide modified single use electrodes and their application for voltammetric miRNA analysis. *Mater. Sci. Eng., C*, 75:1242–1249.
- Jenkins, D.M., Delwiche, M. J. 2002. Manometric biosensor for on-line measurement of milk urea. *Biosens. Bioelectron.* 17(6-7): 557-563.
- Ji, Y., Han, Z., Shao, L., Zhao, Y. 2016. Evaluation of in vivo antitumor effects of low-frequency ultrasound-mediated miRNA-133a microbubble delivery in breast cancer. *Cancer Med.*, 5(9): 2534-2543.

- Kalogianni, D. P., Koraki, T., Christopoulos, T. K., Ioannou, P. C. 2006. Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms. *Biosens. Bioelectron.* 21(7): 1069-1076.
- Kilic, T., Erdem, A., Eraç, Y., Seydibeyoğlu, M.Ö., Okur, S., Ozsoz, M. 2015. Electrochemical detection of a cancer biomarker mir-21 in cell lysates using graphene modified sensors. *Electroanalysis*, 27: 317-326.
- Kitte, S.A., Bushira, F.A., Xu, C., Wang, Y., Li, H., Jin, Y. 2022. Plasmon-enhanced nitrogen vacancy-rich carbon nitride electrochemiluminescence aptasensor for highly sensitive detection of miRNA. *Anal. Chem.*, 94(2): 1406-1414.
- Koralov, S.B., Muljo, S.A., Galler, G.R., Krek, A., Chakraborty, T., Kanellopoulou, C., Jensen, K., Cobb, B.S., Merckenschlager, M., Rajewsky, N., Rajewsky, K. 2008. Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell*. 132(5): 860-874.
- Kumar, J., Jha, S. K., D'Souza, S. F. 2006. Optical microbial biosensor for detection of methyl parathion pesticide using *Flavobacterium* sp. whole cells adsorbed on glass fiber filters as disposable biocomponent. *Biosens. Bioelectron.*, 21(11): 2100-2155.
- Kung, V.T., Panfili, P.R., Sheldon, E.L., King, R.S., Nagainis, P.A., Gomez, B., Jr, Ross, D.A., Briggs, J., Zuk, R.F. 1990. Picogram quantitation of total DNA using DNA-binding proteins in a silicon sensor-based system. *Anal Biochem.*, 187(2): 220-227.
- Labuda, J., Brett, A.M., Evtugyn, G.A., Fojta, M., Mascini, M., Ozsoz, M., Palchetti, I., Paleček, E., Wang, J. 2010. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 82(5): 1161-1187.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543): 853-858.
- Le Quesne, J., Caldas, C. 2010. Micro-RNAs and breast cancer. *Mol. Oncol.*, 4(3): 230-241.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75(5): 843-854.
- Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I. 1983. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators*. B4, 239-304.
- Li, K., Lai, Y., Zhang, W., Jin, L. 2011. Fe₂O₃@Au core/shell nanoparticle-based electrochemical DNA biosensor for Escherichia coli detection. *Talanta*, 84(3): 607-613.
- Liu, S., Liu, J., Wang, L. and Zhao, F. 2010. Development of electrochemical DNA biosensor based on gold nanoparticle modified electrode by electroless deposition. *Bioelectrochemistry*, 79(1): 37-42.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654): 95-98.

- Luzi, E., Minunni, M., Tombelli, S., Mascini, M. 2003. New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding. *Trends Anal. Chem.*, 22(11): 810-818.
- Mairal, T., Ozalp, V.C., Lozano Sánchez, P., Mir, M., Katakis, I., O'Sullivan, C.K. 2008. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390(4): 989-1007.
- McCauley, T.G., Hamaguchi, N. Stanton, M. 2003. Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules. *Anal. Biochem.*, 319(2): 244-250.
- McCreery, R. L. 1991. Carbon electrodes: Structural effects on electron transfer kinetics. Bard, A. J. *Electroanalytical Chemistry*. Vol. 18. Marcel Dekker, New York.
- Mengü, D. 2017. Camsı karbon ve modifiye edilmiş camsı karbon elektrotlar kullanılarak sülfametoksazol'ün elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD, Yüksek Lisans Tezi.
- Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., Viehmann, S., Borkhardt, A. 2004. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosom. Cancer*, 39(2): 167-169.
- Michael, M.Z., O'Connor S.M., van Holst Pellekaan, N.G., Young, G.P., James, R. J. 2003. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.*, 1(12): 882-891.
- Mujica, M.L., Zhang, Y., Gutiérrez, F., Bedioui, F., Rivas, G. 2021. Non-amplified impedimetric genosensor for quantification of miRNA-21 based on the use of reduced graphene oxide modified with chitosan. *Microchemical Journal*, Elsevier, In press, ff10.1016/j.microc.2020.105596ff. fffal-03021261f
- Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., Urashima, T., Toyoda, H., Okanoue, T., Shimotohno, K. 2006. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, 25(17): 2537-2545.
- Newman, J.D., Setford, S.J. 2006. Enzymatic biosensors. *Mol. Biotechnol.*, 32(3): 249-268.
- Omidfar, K., Khorsand, F. Azizi, M.D. 2013. New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors. *Biosens. Bioelectron.*, 43: 336-347.
- Öztekin, Y. 2008. Camsı elektrot yüzeyine çeşitli fenantrolin türevlerinin modifikasyonu, yüzey karakterizasyonu, elektrokimyasal ve spektroskopik özelliklerinin incelenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD, Doktora Lisans Tezi.
- Palecek, E., Bartosik, M. 2012. Electrochemistry of nucleic acids. *Chem. Rev.*, 112: 3427-3481.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., Ruvkun,

- G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408 (6808): 86-89.
- Peng, Y., Gao, Z. 2011. Amplified detection of microRNA based on ruthenium oxide nanoparticle-initiated deposition of an insulating film. *Anal. Chem.*, 83(3): 820-827.
- Pillai, R.S. 2005. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?. *RNA*, 11(12):1753-1761.
- Psychoyios, V.N., Nikoleli, G., Tzamtzis, N.E., Nikolelis, D.P., Psaroudakis, N., Danielsson, B., Israr, M., Willander, M. 2013. Potentiometric cholesterol biosensor based on ZnO nanowalls and stabilized polymerized lipid film. *Electroanalysis*, 25(2): 367-372.
- Qu Z, Li S. 2020. Long noncoding RNA LINC01278 favors the progression of osteosarcoma via modulating miR-133a-3p/PTHr1 signaling. *J. Cell Physiol.*, Epub ahead of print. PMID: 31994731.
- Razmi, N., Baradaran, B., Hejazi, M., Hasanzadeh, M., Mosafer, J., Mokhtarzadeh, A., de la Guardia, M. 2018. Recent advances on aptamer-based biosensors to detection of platelet-derived growth factor. *Biosens Bioelectron.*, 113: 58-71.
- Rechnitz, G. A., 1978. Biochemical electrodes uses tissues slice. *Chem. Eng. News.*, 56: 16–21 pp.
- Rechnitz, G.A., Kobosa, R.K., Riechela, S.J., Gebauer, C.R., 1977, A bio-selective membrane electrode prepared with living bacterial cells. *Analytica Chimica Acta.*, 94: 357-365pp.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772): 901-906.
- Ren, Y., Deng, H., Shen, W., Gao, Z. 2013. A highly sensitive and selective electrochemical biosensor for direct detection of microRNAs in serum. *Anal. Chem.*, 85(9):4784-4789.
- Rice, M., Galus, Z., Adams, R. N. 1983. Graphite paste electrodes: Effects of paste composition and surface states on electron-transfer rates. *J. Electroanal. Chem. Interf. Electrochem.*, 143(1-2): 89-102.
- Rothberg, J.M., Hinz, W., Rearick, T.M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J.H., Johnson, K., Milgrew, M.J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J.F., Marran, D., Myers, J.W., Davidson, J.F., Branting, A., Nobile, J.R, Puc, B.P., Light, D., Clark, T.A., Huber, M., Branciforte, J.T., Stoner, I.B., Cawley, S.E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J.A., Namsaraev, E., McKernan, K.J., Williams, A., Roth, G.T., Bustillo, J. 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475(7356): 348–352.
- Rowe, A.A., Chuh, K.N., Lubin, A.A., Miller, E.A., Cook, B., Hollis, D., Plaxco, K.W. 2011. Electrochemical biosensors employing an internal electrode attachment site

- and achieving reversible, high gain detection of specific nucleic acid sequences. *Anal. Chem.*, 83(24):9462-9466.
- Ruvkun, G. 2001. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, 294(5543): 797-799.
- Sanaikone, K., Delwiche, M. J., BonDurant, R.H., Munro, C. J. 2004. Quantitative lateral flow immunoassay for measuring progesterone in bovine milk. *Trans. ASAE* 47(4): 1357-1365.
- Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier, B.D. 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensor. *Biotechnol. Adv.*, 30(3): 489-511.
- Sawant S.N. 2017. Development Of Biosensors From Biopolymer Composites. *Biopolymer Composites in Electronics*. 353-383.
- Savan, E.K., Paşahan, A., Aksoy, B., Güngör, Ö., Köytepe, S., Seçkin, T. (2016). *Int J Polym Mater Polym Bio.*, 65: 402-408.
- Saxena, S., Jonsson, Z. O., Dutta, A. 2003. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 278(45): 44312- 44319.
- Saydam, F., Değirmenci, İ., Güneş, H. V. 2011. MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Dergisi*, 38 (1): 113-120.
- Sengiz, C., Congur, C., Erdem, A., 2015. Development of Ionic Liquid Modified Disposable Graphit Electrodes for Label-Free Electrochemical Detection of DNA Hybridization Related to *Microcystis* spp. *Sensors*, 15:22737–22749 pp.
- Service, R. F. 1998. New focus: Microchip arrays put DNA on the spot. *Science*, 282: 396-399.
- Sevli, S., Uzumcu, A., Solak, M., Ittmann, M., Ozen, M. 2010. The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 13(3): 208-217.
- Sharma, H., Agarwal, M., Goswami, M., Sharma, A., Roy, S.K., Rai, R., Murugan, M.S. 2013. Biosensors: tool for food borne pathogen detection. *Vet. World*, 6(12): 968-973.
- Shen, W., Deng, H., Ren, Y., Gao, Z. 2013. A label-free microRNA biosensor based on DNzyme-catalyzed and microRNA-guided formation of a thin insulating polymer film. *Biosens Bioelectron.*, 44:171-176.
- Shen, Y., Chen, F., Liang, Y. 2019. MicroRNA-133a inhibits the proliferation of non-small cell lung cancer by targeting YES1. *Oncol Lett.*, 18(6): 6759-6765.
- Shenouda, S.K., Alahari, S.K. 2009. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev.*, 28(3-4): 369-378.
- Shi, L., Sun, Y., Mi, L., Li, T. 2019. Target-Catalyzed Self-Growing Spherical Nucleic Acid Enzyme (SNAzyme) as a Double Amplifier for Ultrasensitive Chemiluminescence MicroRNA Detection. *ACS sensors*.

- Si, Y., Xu, L., Deng, T., Zheng, J., Li, J. 2020. Catalytic Hairpin Self-Assembly-Based SERS Sensor Array for the Simultaneous Measurement of Multiple Cancer-Associated miRNAs. *ACS sensors*.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. 1996. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Florida: Sunders College Publishing.
- Soldatkin, A.P., Arkhypova, V.N., Dzyadevch, S.V., El'skaya, A.V., Gravouelle, J.-M., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C. 2005. Analysis of potato glycoalkaloids by using of enzyme biosensor based on pH-ISFETs. *Talanta*, 66(1): 28-33.
- Su, X.L., Li, Y. 2004. A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of Escherichia coli O157:H7. *Biosens. Bioelectron.*, 19(6): 563-574.
- Sudhakar, Y.N., Selvakumar, M., Krishna Bhat, D. 2018. *Biopolymer Electrolytes: Fundamentals and Applications in Energy Storage*. Oxford, UK: Elsevier.
- Sun, W., Li, Y.S.J., Huang, H.D., Shyy, J..YJ., Chien, S. 2010. microRNA: A master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 12:1-27.
- Sun, Y., Li, T. 2018. Composition-tunable hollow Au/Ag SERS nanoprobe coupled with target-catalyzed hairpin assembly for triple-amplification detection of miRNA. *Anal. Chem.*, 90(19): 11614-11621.
- Sun, Y., Shi, L., Wang, Q., Mi, L., Li, T. 2019. Spherical nucleic acid enzyme (SNAzyme) boosted chemiluminescence miRNA imaging using a smartphone. *Anal. Chem.*, 91(5): 3652-3658.
- Tavares, P.H.C.P., Barbeira, P.J.S. 2008. Influence of pencil lead hardness on voltammetric response of graphite reinforcement carbon electrodes. *J. Appl. Electrochem.*, 38: 827-832.
- Tombelli, S., Minunni, M., Mascini, M. 2005. Analytical applications of aptamers. *Biosens Bioelectron.*, 20(12): 2424-2434.
- Topçu, S. 2004. Bazı organik boyarmaddelerin ve oluşturdukları komplekslerin termodinamik özelliklerinin belirlenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya ABD, Doktora Lisans Tezi.
- Trnkova, L., Jelen, F., Petrova, J., Adam, V., Potesil, D., Kizek, R. 2005. Elimination voltammetry with linear scan as a new detection method for DNA sensors. *Sensors*, 5(6): 448-464.
- Tschmelak, J., Proll, G., Gauglitz, G. 2005. Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example. *Talanta* 65(2): 313-323.
- Tuerk, C., Gold, L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968): 505-510.
- Tural, H., Gökçel, İ., Ertaş, N. 2006. Enstrümental Analiz I elektroanalitik yöntemler, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, No:186, 2. Baskı, 131-206.

- Turner, A.P.F., Karube, I., Wilson, G.S. 1987. *Biosensors, Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 770p.
- Uchida, Y., Chiyomaru, T., Enokida, H., Kawakami, K., Tatarano, S., Kawahara, K., Nishiyama, K., Seki, N., Nakagawa, M. 2013. miR-133a induces apoptosis through direct regulation of GSTP1 in bladder cancer cell lines. *Urol Oncol.*, 31(1): 115-123.
- Voccia, D., Sosnowska, M., Bettazzi, F., Palchetti, I., Kutner, W. 2015. Label-Free Impedimetric Determination of miRNA Using Biotinylated Conducting Polymer Modified Carbon Electrodes. In: Compagnone D., Baldini F., Di Natale C., Betta G., Siciliano P. (eds) *Sensors. Lecture Notes in Electrical Engineering*, vol 319. Springer, Cham.
- Wang, J. 2000. *Analytical Electrochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Wang, J., Kawde, A.N. 2001. Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Anal. Chim. Acta*, 431: 219-224.
- Wang, J., Kawde, A.N., Sahlin, E. 2000. Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA. *Analyst*, 125: 5-7.
- Wang, J., Haghighatbin, M.A., Shen, W., Mi, L., Cui, H. 2020. Metal ion-mediated potential-resolved ratiometric electrochemiluminescence bioassay for efficient determination of miR-133a in early diagnosis of acute myocardial infarction. *Anal. Chem.*, 92(10): 7062-7070.
- Wang, X., Xiao, S., Yang, C., Hu, C.Y., Wang, X., Zhen, S.J., Huang, C., Li, Y. 2021. Zinc-metal organic frameworks: A coreactant-free electrochemiluminescence luminophore for ratiometric detection of miRNA-133a. *Anal. Chem.*, 93(42): 14178-14186.
- Wen, H., Huang, C., Li, Y., Chen, J., Yeh, Y., Chiang, C. 2020. A lamping U-shaped fiber biosensor detector for microRNA. *Sensors*, 20(5): 1509.
- Wijnhoven, B.P., Michael, M.Z., Watson, D.I. 2007. MicroRNAs and cancer. *Br. J. Surg.*, 94(1): 23-30.
- Willner, I., Zayats, M. 2007. Electronic aptamer-based sensors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 46(34): 6408-6418.
- Wu, Y.X., Kwon, Y.J. 2016. Aptamers: The “evolution” of SELEX. *Methods*, 106: 21-28.
- Wu, S., Duan, N., Li, X., Tan, G., Ma, X., Xia, Y., Wang, H. 2013. Homogenous detection of fumonisin B(1) with a molecular beacon based on fluorescence resonance energy transfer between NaYF₄: Yb, Ho upconversion nanoparticles and gold nanoparticles. *Talanta*, 116: 611-618.
- Yammouri, G., Mandli, J., Mohammadi, H., Amine, A. 2017. Development of an electrochemical label-free biosensor for microRNA-125a detection using pencil graphite electrode modified with different carbon nanomaterials. *J. Electroanal. Chem.*, 806: 75-81.

- Yang, Q.S., Jiang, L.P., He, C.Y., Tong, Y.N., Liu, Y.Y. 2017. Up-regulation of microRNA-133a inhibits the MEK/ERK signaling pathway to promote cell apoptosis and enhance radio-sensitivity by targeting EGFR in esophageal cancer in vivo and in vitro. *J Cell Biochem.*, 118(9): 2625-2634.
- Yapasan, E., Caliskan, A., Karadeniz, H., Erdem, A. 2010. Electrochemical investigation of biomolecular interactions between platinum derivatives and DNA by carbon nanotubes modified sensors. *Mater. Sci. Eng. B*, 169: 169-173.
- Yaralı, E.; Kanat, E.; Erac, Y.; Erdem, A. 2020. Ionic liquid modified single-use electrode developed for voltammetric detection of miRNA-34a and its application to real samples. *Electroanalysis*, 32, 384–393.
- Yaralı, E., Erdem, A. 2021. Cobalt phthalocyanine-ionic liquid composite modified electrodes for the voltammetric detection of DNA hybridization related to hepatitis B virus. *Micromachines*, 12(7): 753.
- Ye, J., Liu, G., Yan, M., Zhu, Q., Zhu, L., Huang, J., Yang, X. 2019. Highly luminescent and self-enhanced electrochemiluminescence of tris(bipyridine) ruthenium (II) nanohybrid and its sensing application for label-free detection of microRNA. *Anal. Chem.*, 91(20): 13237–13243.
- Yıldız, A., Genç, Ö. 1993. *Enstrümental Analiz*, Hacettepe Yayınları, A-64, s. 289-384.
- Yu, L., Zhu, L., Yan, M., Feng, S., Huang, J., Yang, X. 2021. Electrochemiluminescence Biosensor Based on Entropy-Driven Amplification and a Tetrahedral DNA Nanostructure for miRNA-133a Detection. *Anal. Chem.*, 93(34): 11809-11815.
- Yuan X-Z., Song C., Wang H., Zhang J., 2010. *Electrochemical Impedance Spectroscopy in PEM Fuel Cells*. Springer-Verlag London.
- Zhang, D., Yan, Y., Li, Q., Yu, T. Cheng, W., Wang, L., Ju, H., Ding, S. 2012. Label-free and high-sensitive detection of Salmonella using a surface plasmon resonance DNA-based biosensor. *J. Biotechnol.*, 160(3-4): 123-128.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E., Filipowicz, W. 2002. Human dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*, 21(21): 5875- 5885.
- Zhao, W., Yao, S., Hsing, I.M. 2006. A microsystem compatible strategy for viable Escherichia coli detection. *Biosens Bioelectron.*, 21(7): 1163-1170.
- Zhou, G.Q., Han, F., Shi, Z.L., Yu, L., Li, X.F., Yu, C., Shen, C.L., Wan, D.W., Zhu, X.G., Li, R., He, S.B. 2018. miR-133a-3p targets SUMO-specific protease 1 to inhibit cell proliferation and cell cycle progress in colorectal cancer. *Oncol Res.*, 26(5):795-800.
- Zhu, L., Ye, J., Wang, S., Yan, M., Zhu, Q., Huang, J., Yang, X. 2019. Dual amplification ratiometric biosensor based on a DNA tetrahedron nanostructure and hybridization chain reaction for the ultrasensitive detection of microRNA-133a. *Chem. Commun.*, 77(55): 11551-11554.
- Zhu, X., Wang, K., Jin, Y., Wang, S., Liu, X., Liu, H., Zhou, P., Yang, C., Han, Z. 2019. Multiplexed fluorometric determination for three microRNAs in acute

myocardial infarction by using duplex-specific nuclease and MoS₂ nanosheets. *Mikrochim. Acta*, 187(1): 15.

Zhu, L., Yu, L., Ye, J., Yan, M., Peng, Y., Huang, J., Yang, X. 2021. A ratiometric electrochemiluminescence strategy based on two-dimensional nanomaterial-nucleic acid interactions for biosensing and logic gates operation. *Biosens. Bioelectron.*, 178: 113022.



ÖZGEÇMİŞ

2000 yılında Iğdır Tuzluca 100. Yıl Lisesi'nden mezun oldu. 2003 yılında girdiği Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Fizik (İng) Bölümü'nden 2009 yılında Fizikçi unvanıyla mezun oldu. 2013 yılında Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Fizikokimya Bilim Dalında Yüksek Lisans programına başladı ve 2015 yılında Yüksek Kimyager unvanıyla mezun oldu. Ara vermeden Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Fizikokimya Bilim Dalında Doktora programına başladı. 2020 yılında KOSGEB ileri girişimci destek programı ile stratejik ürün kategorisinde yer alan aktif karbon üretimi projesi desteklenmiştir. İyi derecede İngilizce bilmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.