

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
2016-YL-045

**TEK KULLANIMLIK MODİFİYE EDİLMİŞ VE
EDİLMEMİŞ GRAFİT ELEKTROTLARIN DNA
HİBRİDİZASYON SENSÖRÜ OLARAK
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

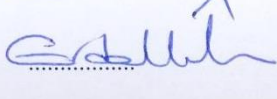
Hakan ŞİRANLI

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Mihrican ERDEM

AYDIN

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

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Hakan ŞİRANLI tarafından hazırlanan “Tek Kullanımlık Modifiye Edilmiş ve Edilmemiş Grafit Elektrotların DNA Hibridizasyon Sensörü Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması” başlıklı tez, 18.08.2016 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Mustafa DEMİR	ADÜ	
Üye : Prof. Dr. Sinan AKGÖL	Ege Üniv.	
Üye : Doç. Dr. Mihrican ERDEM	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. AYDIN ÜNAY

Enstitü Müdürü

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

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

18/08/2016

Hakan ŞİRANLI

ÖZET

TEK KULLANIMLIK MODİFİYE EDİLMİŞ VE EDİLMEMİŞ GRAFİT ELEKTROTLARIN DNA HİBRİDİZASYON SENSÖRÜ OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Hakan ŞİRANLI

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışman Doç. Dr. Mihrican ERDEM

2016, 70 sayfa

Bu tezde, tek kullanımlık kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyine 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-tiyol (AMT) elektropolimerizasyonla ince film şeklinde kaplanmış ve elde edilen yeni yüzey (poli-AMT-PGE) DNA hibridizasyonunun tayininde kullanılmıştır. Elektrot yüzeyini poli-AMT ile kaplamak için, AMT, elektrot yüzeyinde dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak polimerleştirilmiştir.

Polimerle modifiye edilen elektrotlar kullanılarak, DNA hibridizasyonunun düşük tayin sınırı ve yüksek seçimlilikle aynı zamanda tekrarlanabilir bir şekilde tayin edilebilmesi amaçlanmıştır.

Yüzeyi poli-AMT ile modifiye edilmiş olan elektrotların (p-AMT-PGE), yüzey ve elektrokimyasal karakterizasyonları taramalı elektron mikroskopi ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. p-AMT-PGE ile modifiye edilmiş ve edilmemiş olan elektrotlar (PGE), DNA prob immobilizasyonu açısından karşılaştırılmış ve p-AMT-PGE yüzeyinde DNA hibridizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan elektrodun seçimliliği, hedef DNA dizisi, tek bazı hedeften farklı DNA dizisi (MM), rastgele DNA dizisi (NC) kullanılarak test edilmiş ve elektrodun tayin sınırı belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-tiyol, kalem grafit elektrot, altın nanopatikül, elektrokimyasal biyosensör.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE USABILITY OF MODIFIED AND UNMODIFIED DISPOSABLE GRAPHITE ELECTRODES AS DNA HYBRIDIZATION SENSOR

Hakan ŞİRANLI

M.Sc. Thesis, Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Mihrican ERDEM

2016, 70 pages

In this thesis, 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-thiol (AMT) was covered onto the disposable pencil graphite electrode as a thin film by electropolymerization and this surface of the modified electrode (poly-AMT-PGE) was used for the detection of DNA hybridization. AMT was polymerized onto the electrode surface by using cyclic voltammetry technique for the full coverage of the electrode surface by poly-AMT.

By using polymer modified electrode it was aimed to detect DNA hybridization with low detection limit, high selectivity and repeatability.

The surface and electrochemical characterization of poly-AMT modified PGE (p-AMT-PGE) was performed by using scanning electron microscopy and electrochemical impedans spectroscopy. Bare-PGE and p-AMT-PGE were compared in terms of DNA probe immobilization and DNA hybridization was carried out onto the surface of p-AMT-PGE.

The selectivity of the prepared electrode was tested by target DNA (complementary), one base mismatch (MM) and noncomplementary (NC) DNA sequences and the detection limit was determined.

Keywords: 5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-thiol, pencil graphite electrode, gold nanoparticle, electrochemical biosensor.

ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans tez çalışmasında elektrokimyanın deneysel uygulama alanlarıyla beni tanıştırdığı için, ayrıca çalışmalarımın her aşamasında değerli bilgileri ve önerileri ile beni yönlendiren ve her konuda bana destek olup yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Mihrican ERDEM'e

Aynı laboratuvarı paylaştığım ve gerektiğinde çalışmalarımda yardımcı olan Öğr. Grv. Dr. Mert SOYSAL ve doktora öğrencisi Kübra GENÇDAĞ'a

Yüksek Lisans eğitimim boyunca, her eğitim ve uygulama günü olduğunda bana hiç tartışmadan izin veren, iş hayatımdaki çok değerli müdürlerim ve biricik abilerim Y. Çevre Müh. Alper DOST'a ve Y. Kimya Müh. Sever CAN'a

Hayatım boyunca attığım her adımda ilgi, sabır ve her türlü desteğiyle yanımda olan, en zor şartlarda bile varlıklarından aldığım güç ile dimdik ayakta durduğum aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hakan ŞİRANLI

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
1.1. Elektrokimya	3
1.1.1. Elektrokimyasal Analiz Yöntemleri.....	4
1.2. Voltametri	5
1.2.1. Voltametride Akımlar	6
1.2.2. Voltametride Uyarma Sinyalleri	7
1.2.3. Voltametrik cihazlar	7
1.2.4. Voltametride Kullanılan Karşılaştırma Elektrotları	8
1.2.5. Voltametride Kullanılan Çalışma Elektrotları.....	10
1.2.5.1. Civa elektrotlar.....	11
1.2.5.2. Katı elektrotlar.....	12
1.2.5.3. Metal elektrotlar	12
1.2.5.4. Karbon elektrotlar	13
1.2.5.5. Kimyasal modifiye elektrotlar.....	17
1.2.5.6. Mikroelektrotlar	17
1.2.6. Voltamogramlar	17
1.2.7. Voltametrik Teknikler	18
1.2.7.1. Dönüşümlü voltametri.....	18
1.2.7.2. Puls voltametrik teknikler	20
1.2.7.3. Diferansiyel puls voltametrisi	21
1.2.7.4. Kare dalga voltametrisi	22
1.3. Biyosensör.....	24

1.3.1. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler	25
1.3.2. Biyosensör Çeşitleri.....	26
1.3.3. Elektrokimyasal Biyosensörler.....	27
1.3.3.1.Elektrokimyasal biyosensörlerin çevirici ölçüm türüne göre sınıflandırılması.....	27
1.3.3.2. Elektrokimyasal biyosensörlerin biyolojik tanıma unsuruna göre sınıflandırılması.....	28
1.4. Deoksiribonükleik Asit (DNA)	31
1.4.1. Nükleik Asitler ve Nükleik Asitlerin Yapı Taşları	32
1.4.2. DNA Molekülünün Yapısı	34
1.4.3. Nükleik Asit Hibritleşmesi	36
1.4.4. İnterkalasyon	37
1.5. DNA Biyosensörleri	38
1.5.1. DNA Biyosensörlerinde DNA ya da Prob Dizilerinin Elektrot Yüzeyine İmmobilize Edilme (Tutturulma) Yolları.....	38
1.5.2. DNA Biyosensörleriyle Dizi Algılama Yöntemleri	40
1.5.2.1 İndikatöre dayalı DNA dizi algılama yöntemleri	41
1.5.2.2. İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemleri	43
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	45
3. MATERYAL VE YÖNTEM	48
3.1 Deneylerde Kullanılan Kimyasallar	48
3.2. Deneyde Kullanılan Cihazlar	48
3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	48
3.3.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanması.....	48
3.3.2. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.....	50
3.3.3. Redoks Çözeltisinin Hazırlanması	50
3.4. Voltametrik Ölçümler.....	50
3.5. Deneylerde Kullanılan Çalışma Elektrotların Hazırlanması	51
3.5.1. Kullanılan Kalem Grafit Elektrodun (PGE) Hazırlanması.....	51
3.5.2. Elektrotların AMT ile Modifikasyonu.....	52
3.5.2.1. Elektrot modifikasyonunda döngü sayısının optimizasyonu.....	52
3.6. Poli-AMT ile Modifiye Edilmiş Elektrot Yüzeyine DNA İmmobilizasyonu. 52	

3.6.1. Modifiye Sensör ile Yalın Sensörün DNA Sinyali Açısından Karşılaştırılması	52
3.6.2. Elektrot Yüzeyine İmmobilize Edilecek Optimum DNA Derişiminin Saptanması	52
3.6.3. Modifiye Sensör ile Seçimlilik Çalışmaları	53
3.7. Poli-AMT ile Modifiye Edilmiş PGE ile HBV-DNA Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Empedans Spektrometri Tekniğı İle İncelenmesi	53
3.8. Yalın ve Modifiye Elektrotların Spektroskopik Karakterizasyonu	54
3.8.1 AMT ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Karakterizasyonu	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	55
4.1. AMT'nin Elektrokimyasal Davranışının Belirlenmesine İlişkin Elde Edilen Bulgular	55
4.2. Yalın ve Modifiye Elektrotların Spektroskopik Karakterizasyonuna İlişkin Elde Edilen Bulgular	55
4.3. Yüzeyi AMT ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeyinde DNA Tayini	56
4.3.1. Poli-AMT PGE ile Yalın PGE'nin Adenin Yükseltgenme Sinyalleri Açısından Karşılaştırılması	56
4.3.2. Elektrot Modifikasyonunda Döngü Sayısının Optimize Edilmesine İlişkin Elde Edilen Bulgular	58
4.3.3. Poli-AMT PGE Yüzeyine İmmobilize Edilecek Optimum DNA Derişiminin Saptanması	60
4.3.4. Poli-AMT PGE Yüzeyinde HBV Hibridizasyonunun Gerçekleştiğı Optimum Hedef DNA Derişiminin Saptanması	61
4.3.5. Poli-AMT PGE yüzeyinde HBV DNA Hibridizasyonunda Seçimlilik Çalışması	62
5. SONUÇ	63
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABS	Acetate Buffer Solution (Asetat Tampon Çözeltisi)
AMT	5-amino-1,3,4-thiadiazole-2-tiyol
CV	Çevrimli voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy (Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi)
PGE	Pencil Graphite Electrode (Kalem Grafit Elektrot)
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
PBS	Phosphate Buffer Solution (Fosfat Tampon Çözeltisi)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Elektrokimyasal analiz yöntemleri.....	5
Şekil 1.2. Voltametrinde kullanılan uyarma sinyalleri.....	7
Şekil 1.3. Voltametrinde üç elektrotlu potansiyostatik sistem diyagramı	8
Şekil 1.4. Potansiyostatik üç elektrotlu dogrusal taramalı voltametri için bir sistem	11
Şekil 1.5. Grafit tozunda bulunan karbon atomlarının dizilimi.....	13
Şekil 1.6. Karbon pasta elektrot.	15
Şekil 1.7. Kalem grafit elektrot	16
Şekil 1.8. Doğrusal taramalı bir voltamogram	18
Şekil 1.9. Dönüşümlü voltametrinde elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği.....	19
Şekil 1.10. Tersinir bir redoks işlemi için dönüşümlü voltametrinde elde edilen akım-gerilim eğrisi.....	19
Şekil 1.11. Dijital cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali.....	22
Şekil 1.12. Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen bir voltamogram	22
Şekil 1.13. Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyali.....	23
Şekil 1.14.Kare dalga voltametrisinde elde edilen bir voltamogram.	23
Şekil 1.15. Biyosensörün yapısı	24
Şekil 1.16. DNA’da bulunan 2-deoksiribozun kimyasal halka yapısı.....	32
Şekil 1.17. DNA ve RNA’da bulunan pirimidin ve pürin türevi bazlarının kimyasal yapıları	32
Şekil 1.18. Primer yapıdaki DNA nükleotiti.	34
Şekil 1.19. DNA çift sarmal yapısı.	35
Şekil 1.20. Nükleik asit hibritleşmesi.....	37
Şekil 1.21. İnterkalasyon.....	37
Şekil 1.22. Altın elektrot yüzeylerinde kimyasal ajanlarla kovalent bağlanma	39
Şekil 1.23. Grafit elektrot yüzeyinde kovalent ajanlarla yapılan NH ₂ grubu ile işaretli DNA probu modifikasyonu.....	40
Şekil 1.24. İnterkalatör bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması.....	42
Şekil 1.26. İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi	44
Şekil 1.27. Guanin bazının yükseltgenmesi	44

Şekil 1.28. Adenin bazının yükseltgenmesi.....	44
Şekil 3.1. EIS devre modeli.....	54
Şekil 4.1. AMT'nin dönüşümlü voltamogramı	55
Şekil 4.2. Yalın PGE, poli-AMT PGE ve DNA immobilize edilmiş poli-AMT PGE'ye ait SEM fotoğrafları.....	56
Şekil 4.3. Poli-AMT PGE ile yalın PGE'nin adenin yükseltgenme sinyalleri açısından karşılaştırılması.....	57
Şekil 4.4. Farklı döngü sayıları uygulanarak elde edilmiş poli-AMT PGE'lerin Rct değerlerindeki farklanmayı ve AMT ile Adenin yükseltgenme sinyallerini gösteren histogram.	59
Şekil 4.5. Yüzeyine farklı derşimlerde DNA immobilize edilmiş poli-AMT PGE ile elde edilen adenin yükseltgenme sinyallerini gösteren voltamogram ve histogram.....	60
Şekil 4.6. poli-AMT PGE yüzeyine immobilize edilmiş tiyol işaretli HBV prob ile hibridizasyon sonrası elde edilen guanin yükseltgenme sinyalleri kullanılarak hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği.....	61
Şekil 4.7. Poli-AMT ile modifiye edilmiş PGE'nin HBV DNA ile hibridizasyon öncesi ve sonrasındaki Rct değerlerinin ortalamasında hazırlanmış olan histogram.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Elektrokimyasal biyosensörlerle belirlenebilen türler, kullanılan reseptörler ve ölçüm teknikleri 31

Çizelge 2.1. Modifiye elektrotlarla yapılmış çalışmalar 47



1. GİRİŞ

Tek kullanımlık sensör teknolojisine dayalı DNA analizlerine yönelik çalışmalar günümüzde giderek yaygınlık kazanmaktadır. Özellikle DNA'nın immobilize edileceği yüzeylerin polimer, nanopartiküller, manyetik partiküller, karbon nanotüpler ile modifikasyonu, çok daha düşük tayin sınırı ile DNA analizlerinin yapılabilmesine ayrıca modifiye edilen yüzeye immobilize edilen DNA'nın çok daha kararlı bir şekilde yüzeye bağlanmasına böylece kendi tamamlayıcısı olan DNA dizisine çok daha yüksek seçicilikle hibridize olmasına olanak sağlamaktadır.

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

DNA biyosensör çalışmalarında polimerler elektrot modifikasyon malzemesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle iletken polimerler hem elektrot elektrolit ara yüzeyinde yüksek bir elektron transfer direncine sahip olmaması hem de içerdiği aktif bölgeler sayesinde analit ile arasında daha spesifik bağlanmalar gerçekleştirilebilmesi nedeniyle özellikle sensör çalışmalarında daha çok tercih edilmektedir.

Sensörler fiziksel olguları elektrik sinyallerine dönüştüren cihazlardır. Mekanik duyu organları da diyebileceğimiz bu cihazlar, çalışma şekillerine göre ve dönüştürücü (ing: transducer) adı verilen yapılarına göre çeşitlere ayrılmaktadır. Termal, mekanik, kimyasal, akustik, radyoaktif sensörler ve biyosensörler bunlardan bazılarıdır.

Bir sensör üç temel bileşenden oluşur.

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

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

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

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

Çalışmamızın Konusu

Çalışmamızın amacı, polimer ile modifiye edilmiş tek kullanımlık sensörlerle Hepatit B virüsünün (HBV) tayini için duyarlılığı yüksek, seçimli, kararlı ve tekrarlanabilir DNA biyosensörlerin tasarlanmasıdır. Bu amaçla elektrot yüzeyinde 5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiadiazol (AMT) dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak polimerleştirilmiş ve elde edilen polimer modifiye yüzey, DNA biyosensör tasarımında kullanılmıştır. AMT, yapısında bulunan tiyol grubu sayesinde, tiyol işaretli DNA prob ile disülfid bağı vasıtasıyla spesifik olarak ve aynı zamanda daha yüksek miktar ve kararlılıkta DNA’nın elektrot yüzeyine tutunmasına, bunun sonucunda da HBV tayini için kararlı, seçimli sensör yüzeylerinin elde edilmesine olanak sağlamıştır.

Çalışmanın ilk bölümünde elektrot yüzeyini poli-AMT ile modifiye etmek için gerekli dönüşümlü voltametri parametreleri incelenmiş bu kapsamda döngü sayısını belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Çevrimsel voltametri de tarama hızı literatürde belirtildiği şekilde uygulanmıştır (Muti vd., 2013). Yüzeyi poli-AMT ile modifiye edilmiş elektrodun yüzey ve elektrokimyasal karakterizasyonları yapılmış elde edilen yeni yüzeyde prob DNA konsantrasyon çalışması gerçekleştirilerek HBV DNA dizisinin tayini için DNA probu hazırlanmıştır.

Çalışmanın ikinci bölümü, yüzeyine prob immobilize edilmiş poli-AMT-PGE ile HBV DNA hibridizasyon tayinine yönelik çalışmaları içermektedir. Bu kapsamda hedef konsantrasyon çalışması yapılmış, elektrodun tayin sınırı belirlenmiştir. Geliştirilen biyosensörün seçimliliği test edilmiş ve tek bazı hedef DNA dizisinden farklı mutasyonlu dizi (MM) ve tamamlayıcı olmayan rastgele DNA dizisi (NC)

varlığında seçicilik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tüm elektrokimyasal tayinler diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada özellikle hepatit B virüsünün (HBV) tayini için sensör geliştirilmesinin en önemli sebebi, HBV enfeksiyonunun dünyada yaygın olması ve ana sağlık problemlerinden biri olmasıdır. Aynı zamanda hepatitin kronikleşmesi siroz ve primer karaciğer kanserine yol açabilir. Günümüzde HBV virüsünün tayini için, biyosensörler ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılmaktadır. PCR yöntemi pahalı kit ve toksik madde kullanımını gerektirmektedir. Biyosensörler ise basit, kullanımı kolay, hızlı ve ucuz tayine olanak sağlaması nedeniyle HBV tayini için son yıllarda tercih edilen aygıtlar olmuştur.

1.1. Elektrokimya

Maddenin elektrik enerjisi ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen bilim dalı elektrokimya'dır (Skoog vd., 1998).

Elektrokimyasal Hücre, incelenen maddeyi içeren bir çözelti ya da erimiş tuz, maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı elektrotlar ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir dış devreden oluşur. Bu elektrotlardan indirgenmenin olduğu elektroda katot yükseltgenmenin olduğu elektroda anot denir. Böylece meydana gelen elektron iletimi sonucu elektrik akımı oluşur. Metallerde metalik iletkenlik çözeltilerde ise iyonik iletkenlik söz konusudur (Yıldız ve Genç, 1993).

Elektroanalitik kimya, bir çözeltinin elektriksel özelliklerine dayanan bir grup kantitatif analitik yöntemleri içerir. Elektroanalitik yöntemler üç grupta toplanabilir:

1. Çözeltinin konsantrasyonu ile potansiyel, akım, direnç (veya iletkenlik), kapasitans veya elektrik miktarı gibi herhangi bir elektrik parametresi arasındaki doğrudan ilişkiye dayanan yöntemler.
2. Bir titrasyonun eşdeğerlik noktasının elektrik parametrelerinden birine göre saptanmasına dayanan yöntemler.
3. Bir elektrik akımı ile çözeltideki maddenin tartılabilir bir şekle dönüştürülerek ayrılmasına dayanan yöntemler.

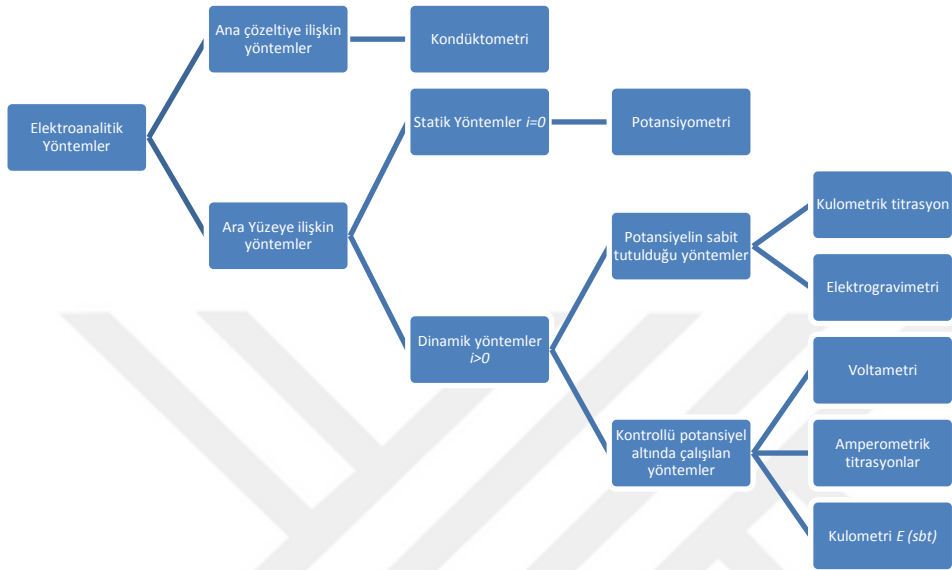
Elektrokimyasal hücreler, elektrik enerjisi üretiminde kullanılıyorsa "galvanik", bir dış kaynaktan elektrik alıp harcıyorsa "elektrolitik" olarak sınıflandırılırlar. Analitik kimyada iki tür hücre de kullanılır. Hücrelerin çoğu, deney koşulları değiştirilerek galvanik veya elektrolitik amaçlarla çalıştırılabilir. Elektrokimyasal bir hücrede, uygun bir elektrolit çözeltisine daldırılmış, iki metalik iletken (elektrot) bulunur. Elektrik akımı elde edilmesi için elektrotların dıştan iletken bir tel ile bağlanması ve iki elektrolit çözeltisinin, iyonların birinden diğerine hareketini sağlayacak şekilde birbirleriyle bağlantı halinde bulunması gerekir. Bir elektrokimyasal hücrenin katodunda indirgenme, anodunda yükseltgenme reaksiyonu olur. Tanım galvanik ve elektrolitik hücreler için aynıdır (Skoog vd., 1981).

1.1.1. Elektrokimyasal Analiz Yöntemleri

Elektrokimyasal analiz yöntemleri genel olarak yığınsal (bulk) ve yüzeyler arası (interfacial) olarak ikiye ayrılabilir. Yığınsal yöntemlerde elde edilen elektrokimyasal sinyal, ortamdaki her çeşit iyonun toplam derişiminden etkilenmektedir. Yüzeyler arası yöntemlerde ise elde edilen sinyaller elektrot ve ortamın temas yüzeylerinden oluşmakta ve iyon ya da bileşene özgü olabilmektedir.

Örneğin kondüktometrik (iletkenlik ölçen) yöntemler bulk analizlerdir ve ortamdaki her çeşit iyonun toplam derisimi iletkenlik üzerine etkindir.

Bir pH elektrot kullanılarak ortamın pH'sının ölçülmesi, yüzeyler arası bir elektro kimyasal yöntemdir (Skoog, 1998).



Şekil 1.1. Elektrokimyasal analiz yöntemleri (Skoog, 1998).

1.2. Voltametri

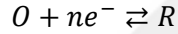
Voltametri, çeşitli ortamlarda oluşan yükseltgenme-indirgenme olaylarının, yüzeydeki adsorpsiyon olaylarının ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerindeki elektron aktarım mekanizmalarının temel çalışmalarını kapsayan ve analitik olmayan amaçlarla da (anorganik kimya, fizikokimya, biyokimya, vb alanında) yaygın olarak kullanılmaktadır. Voltametri özellikle eczacılık, tıp, çevre ve biyoloji açısından önemli türlerin tayini için kullanılmaktadır.

Voltametri, çalışma (indikatör) elektrodunun polarize olduğu koşullar altında elektroda uygulanan gerilimin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden yararlanılarak analit hakkında bilgi edinilen elektrokimyasal yöntemdir. Uygulanan gerilimin ölçülen akım değerine karşı çizilen grafiğine ise “voltamogram” adı verilir. Voltametrde herhangi bir maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için elektroda uygulanabilecek gerilim aralığının sınırları, kullanılacak çalışma elektrodu, kullanılan çözelti ve elektrolitin türleri belirlenmelidir. Genel olarak voltametrde kullanılan çalışma elektrotları polarizasyonu arttırmak için, yüzey alanları çoğunlukla birkaç milimetre kare ve bazı uygulamalarda ise birkaç mikrometrekare ya da daha küçük olan mikroelettrotlardır. Voltametrinin tarihsel gelişim süreci, 1920’lerin başında Çekoslovak Kimyacı Jaroslav Heyrovsky’nin “polarografi” tekniği üzerine yaptığı çalışmalarla başlamıştır. Voltametrinin önemli

bir dalı olan polarografinin diğer voltametrik yöntemlerden farkı, çalışma elektrodu olarak damlayan civa elektrodu (DCE) kullanılmasıdır (Skoog vd., 1998).

1.2.1. Voltametrinde Akımlar

Voltametrik bir yöntemde, çözeltide bulunan yükseltgenmiş tür (O) potansiyel altında elektrot yüzeyinde,



tepkimesine göre n sayıda elektron alarak yüzeyde indirgenmiş türü (R) oluşturur. Potansiyel negatife doğru taranırsa elektrot yüzeyinde indirgenme başlar ve potansiyelin değişimine bağlı olarak derişim eğimi (gradienti) (dC/dx) hızla artar ve sınır akıma ulaşıldığında elektroda gelen aktif tür anında indirgenmeye uğrar. Bu durumda akım ancak difüzyonla taşınan madde miktarına bağlı olur. Bu nedenle bu akıma difüzyon kontrollü anlamında difüzyon akımı denir. Bunun dışında elektrot yüzeyinde elektroaktif tür bir kimyasal tepkime ile oluşuyor ve bu tepkimenin hızı elektrot tepkimesinin hızını belirliyorsa elde edilen akım kinetik kontrollü (kinetik akım, i_k) olur. Benzer şekilde adsorpsiyon akımından da söz edilebilir. Yukarıdaki redoks tepkimesi sonucu oluşan akıma, Faraday yasalarına uyumlu olduğu için faradayik akım denir (Yenilgül vd., 2001).

Elektroaktif bir madde içermeyen ve sadece çözücü ile iletkenliği sağlamak üzere eklenmiş destek elektroliti içeren bir çözeltide oluşan akıma artık akım denir. Artık akım, elektriksel çift tabakanın yüklenme akımı (kapasitif akım) ile çözeltide bulunan elektroaktif safsızlıkların meydana getirdiği akımın toplamıdır (Yıldız vd., 1997).

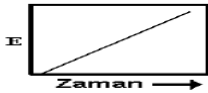
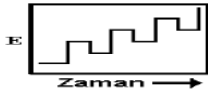
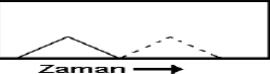
Kapasitif akım (I_c): Bir elektrodun, bir elektrolit çözeltisine daldırılması ve negatif yükü yüklenmesiyle çözeltideki pozitif yüklü iyonlar elektroda doğru çekilir. Böylece ara yüzeyde bir gerilim farkı oluşur. Ters işaretli yüklerin ara yüzeyin iki tarafında birikmesi ile bu bölgede bir elektriksel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

Faradayik akım (I_f): Çözelti ve elektrot arasındaki yüzeyden akımın iletimi sırasında, elektrotlardan birinde yükseltgenme reaksiyonu olurken diğerinde

indirgenme reaksiyonu meydana gelir, bu sırada elektrotların doğrudan aktarımı ile akım iletilir. Bu şekilde oluşan akımlara faradayik akım denir.

1.2.2. Voltametrinde Uyarma Sinyalleri

Voltametrinde, bir mikroelettrot içeren elektrokimyasal hücreye değıştirilebilir bir gerilim uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali, özel bir akım yanıtı oluşturur. Voltametrinde en çok kullanılan dört uyarılma sinyali (doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgen) Şekil 1.2’de verilmiştir.

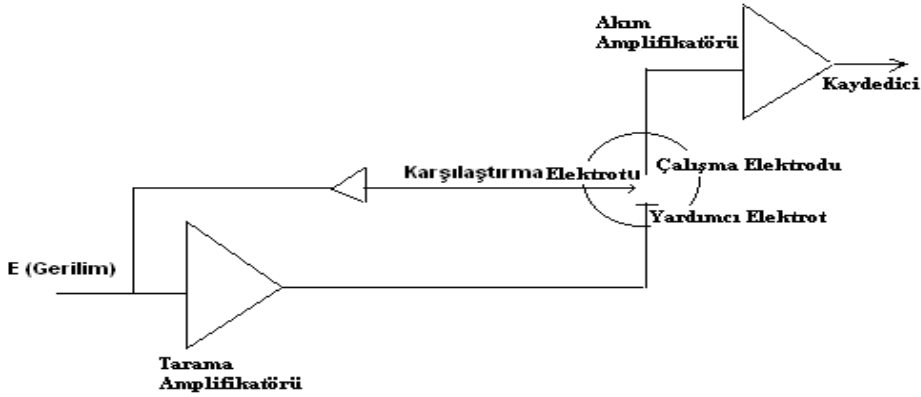
İsim	Dalga Şekli	Voltametrinin tipi
(a) Doğrusal taramalı		POLAROGRAFI HİDRODİNAMİK VOLTAMETRİ
(b) Diferansiyel puls		DİFERANSİYEL PULS POLAROGRAFİSİ
(c) Kare dalga		KARE DALGA VOLTAMETRİSİ
(d) Üçgen		DÖNÜŞÜMLÜ VOLTAMETRİ

Şekil 1.2. Voltametrinde kullanılan uyarma sinyalleri (Wang vd., 2000).

1.2.3. Voltametrik Cihazlar

Voltametrik analizde kullanılacak cihazların elektrokimyasal hücre kısmı, analit ve destek elektrolitini içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan yapılmıştır. Üç elektrottan biri, zamanla gerilimi doğrusal olarak değışen çalışma elektrodudur. İkinci elektrot, gerilimi ölçüm süresince sabit kalan karşılaştırma (referans) elektrodudur. Üçüncü elektrot ise elektriğin, sinyal kaynağından çözeltinin içinden geçerek çalışma elektroduna aktarılmasını sağlayan yardımcı (karşıt) elektrottur.

Şekil 1.3’de modern voltametrik cihazlardaki potansiyostatik sistem diyagramı gösterilmiştir.



Şekil 1. 3. Voltametrde üç elektrotlu potansiyostatik sistem diyagramı (Wang vd., 2000).

Potansiyostatik cihazlarda iki akım söz konusudur. Hücreye gerilim uygulayan bir polarize akım ve hücre akımının izlenmesi ile ölçülen akım. Çalışma elektrodunun potansiyostatik kontrolüyle, hücre direncinden kaynaklanan hatalar en aza indirilebilmektedir. Potansiyostatik kontrollü üç elektrot sistemi ile hücre direncinin büyük bir bölümü ortadan kaldırılmıştır. Burada karşılaştırma elektrodu çalışma elektroduna mümkün oldukça yakın olmalıdır.

Yardımcı elektrot, akım yolunun tamamlanması için çözeltiye yerleştirilmiş akımın taşınmasını sağlayan elektrottur. Böylece akım yardımcı elektrot ve çalışma elektrot arasında çözelti boyunca akar. Çalışma elektrodundaki bütün noktalarda akım yolunun eşit olması için bu elektrotların simetrik olarak hücreye yerleştirilmesi önemlidir. Karşılaştırma elektrodunun çalışma elektroduna çok yakın olması nedeniyle karşılaştırma elektrodundan hiçbir akım geçmez; bu da hücre direncinin dolayısıyla omik gerilimin (IR) en aza inmesini sağlar. Yalnız tüm çalışmalara karşın hücre direnci tam olarak yok edilemediğinden ölçülen gerilimlerde IR'nin de katkısı bulunmaktadır. (Skoog vd., 1998; Wang, 2000).

1.2.4. Voltametrde Kullanılan Karşılaştırma Elektrotları

Birçok elektroanalitik uygulamada, elektrotlardan birinin yarı-hücre geriliminin çalışılan çözeltinin bileşiminden bağımsız olması ve değerinin bilinmesi istenir. Bu

tanıma uyan elektrot, karşılaştırma elektrodu olarak isimlendirilir. İdeal bir karşılaştırma (referans) elektrodunun sahip olması gereken özellikler:

1-Tersinir olmalı ve Nernst eşitliğine uymalıdır.

2-Zamanla gerilimi değişmemeli ve tekrarlanabilir olmalıdır.

3-Gerilimin sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olmalıdır.

4-Küçük bir akıma maruz kaldıktan kısa bir süre sonra orijinal gerilimine geri dönmeli ve polarize edilemeyen bir elektrot olmalıdır.

Elektrokimyasal çalışmalarda ilk olarak “standart hidrojen elektrot (SHE)” karşılaştırma elektrotu olarak kullanılmıştır. Ancak SHE yukarıdaki özelliklerin çoğuna sahip olmayışı ve uygulamalarda kullanımının zor olması nedeniyle günümüzde yerini kalomel ve gümüş-gümüş klorür elektrotlara bırakmıştır. Karşılaştırma elektrotları kullanılırken, elektrot çözeltisinin kirlenmesini ve iç çözeltiden gelen gümüş ya da civa (I) iyonları ile analit çözeltisinin tepkimesini önlemek için iç sıvı düzeyinin örnek çözeltisinin üstünde olması gerekmektedir.

En çok kullanılan karşılaştırma (referans) elektrotları:

Doygun Kalomel Referans Elektrot (DKE): Kalomel elektrotlar, doymuş civa (I) klorür (Hg_2Cl_2) ile etkileşimde olan civadan oluşur ve bilinen derişimde potasyum klorür (KCl) içerir. Bu elektrodun yarı tepkimesi;

$\frac{1}{2} \text{Hg}_2\text{Cl}_2 + e^- \leftrightarrow \text{Hg}(k) + \text{Cl}^-$ şeklinde olup şematik olarak aşağıdaki şekilde gösterilir.

$\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2(\text{doygun}), \text{KCl}(x\text{M}) //$

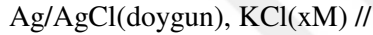
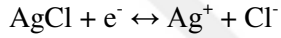
Elektrodun 25°C için yarı tepkime gerilimi,

$$E = E^\circ (\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}) - 0.0592 \log a\text{Cl}^-$$

eşitliği ile verilir.

Bu elektrodun gerilimi yalnızca elektrot içerisindeki klorür iyonunun aktifliğine, çok az olmakla birlikte sıcaklığa bağlı olarak değişir. DKE'nin SHE'a karşı 25°C de ölçülen gerilimi + 0.244 V olarak bulunmuştur.

Gümüş/Gümüş Klorür Referans Elektrot: Bu elektrot gümüş klorür ile kaplanmış bir gümüş telin, belli derişimdeki klorür çözeltisine daldırılması ile elde edilir. Bu elektrodun yarı tepkimesi ve şematik gösterimi aşağıdaki gibidir:



Elektrodun 25°C için yarı tepkime gerilimi ise

$$E = E^\circ(\text{AgCl/Ag}) - 0.0592 \log a_{\text{Cl}^-}$$

eşitliği ile verilir (Erdem, 2000; Yıldız ve ark., 1997).

1.2.5. Voltametrde Kullanılan Çalışma Elektrotları

Voltametrde; civa, altın, platin, bizmut, grafit, camımsı karbon, pirolitik karbon, lif karbon ve modifiye elektrotlar çalışma elektrodu olarak kullanılır. Voltametrde kullanılan elektrot türlerinin sınıflandırılması Şekil 1.4'te verilmektedir. Voltametrik yöntemlerde kullanılan çalışma elektrotları polarlanmanın olabilmesi için küçük yüzey alanına sahip olmalıdır. Küçük yüzey alanına sahip bu elektrotlara mikro elektrotlar denir.

Mikro elektrotların kullanılması sonucunda örnekteki elektroaktif türlerin çok küçük bir miktarı elektrokimyasal tepkimeye girer. Böylece örneğin bileşimi hemen hemen aynı kalır. Bunun sonucunda aynı örneğin defalarca voltamogramı alınabilir (Yıldız vd., 1997; Tural vd., 2003).



Şekil 1.4. Potansiyostatik üç elektrotlu dogrusal taramalı voltametri için bir sistem (Tural vd., 2006).

1.2.5.1. Cıva elektrotlar

Cıva kökenli elektrotlar, cıva elektrodunun negatif potansiyellerde kullanılabilmesi, sürekli yeni bir yüzey oluşturabilmesiyle önceki işlemlerden kalan safsızlıkların cıva yüzeyinden uzaklaştırılabilmesi, tekrarlanabilir cıva damlalarının oluşması sonucu tekrarlanabilir akımların elde edilmesi, geniş bir potansiyel aralığında uygulanabilmesi ve bir çok metalin cıva yüzeyinde indirgenerek cıva ile amalgam oluşturabilmesi gibi avantajlarından dolayı yaygın olarak kullanılır. Cıva kökenli elektrotların dezavantajları ise cıvanın kolayca yükseltgenmesinden dolayı anodik sınırın küçük olması ve cıva film elektrodu hariç cıvanın toksik etkisidir. Cıva kökenli elektrotlar; damlayan cıva elektrodu, asılı cıva damla elektrodu, durgun cıva damla elektrodu ve cıva film elektrodudur. Cıva akış hızı, cıva haznesinin yüksekliği değiştirilerek yer çekimi etkisi ile veya manyetik etki ile kontrol edilen bir iğne aracılığıyla mekanik olarak ayarlanır. Akış hızı mekanik olarak kontrol edildiğinde cıva damlasının düşürülmesi mekanik bir çekiç aracılığıyla yapılır (Tural vd., 2006).

Cıva elektrodun en çok kullanılan çeşitleri:

1-Damlayan cıva elektrot (DCE)

2-Asılı cıva damla elektrot (ACDE)

3-Cıva film elektrot (CFE)

DCE, polarografik teknikte kullanılır. ACDE, dönüşümlü voltametri ve sıyırma yöntemleri için çalışma elektrodu olarak kullanılmaktadır. CFE, iletken bir materyalin 10–100 µm inceliğinde bir civa filmiyle kaplanmasıyla oluşur ve özellikle sıyırma yöntemlerinde çok kullanılır (Skoog vd., 1998; Wang vd., 2000).

1.2.5.2. Katı elektrotlar

Civa elektrotların anodik gerilim aralıklarında kullanımının sınırlı olması nedeniyle yükseltgenebilen bileşiklerin davranışlarının incelenmesi için daha geniş bir anodik gerilimde çalışma olanağı sağlayan katı elektrotlar kullanılmaktadır. Çalışma elektrodu olarak birçok farklı katı materyalden yararlanılır. Katı elektrotların durgun (karışmayan çözeltide, karıştırılan çözeltide, akış sistemlerinde), dönen ve titreşen tipleri; tel, levha ya da sıklıkla disk biçiminde olabilir.

Katı elektrotların kullanımındaki en önemli sınırlama, elektrot yanıtının elektrodun yüzey durumuna bağlı olmasıdır. Katı elektrotlar, civa elektrotların aksine elektrokimyasal aktivite açısından heterojen yüzeye sahiptirler. Tekrar edilebilir sonuçlar alabilmek için bu elektrotlara kullanılmadan önce duyarlı bir “elektrot temizleme ön-işlemi” ve “parlatma” uygulanmalıdır. Ön işlem basamakları elektrot materyaline bağlı olarak değişir. Mekanik parlatma ve dönüşümlü gerilim taraması uygulamak sıklıkla kullanılan teknikler olmakla birlikte kimyasal, elektrokimyasal ve termal yüzey yöntemleri kullanılarak yüzey aktivasyonu da sağlanır (Wang vd., 2000).

Katı elektrotlar yaygın kullanımları açısından aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1-Metal elektrotlar

2-Karbon elektrotlar

1.2.5.3. Metal elektrotlar

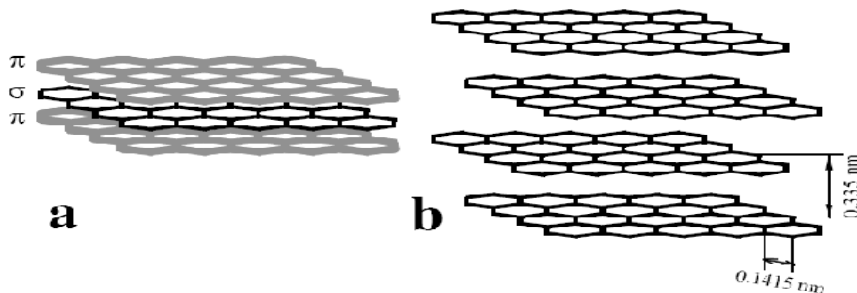
Çeşitli soy metallerden yapılmış olan elektrotlar metal elektrot olarak kullanılır. Altın ve platin elektrot en yaygın kullanılan metal elektrotlardır. Bazı özel uygulamalarda bakır, nikel, gümüş de çalışma elektrodu olarak kullanılabilir. Ayrıca çinko, indiyum, iridyum, rutenyum oksit gibi metal oksitlerin kullanıldığı çalışmalar da vardır. Metal elektrotlar, istenilen bir elektron aktarım kinetiği ve geniş bir anodik gerilim aralığında çalışma sağlar. Düşük hidrojen aşırı gerilimine sahip

olmaları, bu elektrotlarla katodik gerilim aralığında çalışılmasını sınırlamıştır. Ancak çalışma ortamının pH değerine bağlı olarak -0.2 V ve -0.5 V aralığındaki daha az negatif gerilimlerde kullanılabilirler. Metal elektrotlar elektrokimyasal ya da kimyasal işlemlerle modifiye edilebilir. Özellikle tiyol gruplarının altın ve platine olan ilgisi ve yüksek akım yanıtı nedeniyle son yıllarda biyosensör teknolojisinde kullanımı artmıştır (Wang, 2000).

1.2.5.4. Karbon elektrotlar

Karbon temelli katı elektrotlar; geniş bir gerilim aralığında çalışmaya olanak sağlaması, zengin yüzey kimyasının olması, ucuzluğu, kimyasal inertliği, düşük artık akım vermesi, yüksek duyarlılığı nedeniyle elektrokimyasal analizlerde sık olarak kullanılır. Elektron aktarım hızları metal elektrotlardan daha yavaştır. Karbon, yüksek yüzey aktivitesi olması nedeniyle organik bileşikler tarafından kolayca kirletilebilir. Grafit tozundaki aromatik halkaların aktif oksijen grupları içermesine bağlı olarak çeşitli fonksiyonel gruplar (hidrojen, hidroksil, karboksil grupları ve hatta kinonlar) karbon yüzeyinde bağlar oluşturabilmektedir. Bu fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle karbon yüzeyine birçok değişik madde tutturulabilir (Wang., 2000; Kadayıfçılar, 2003).

Karbon elektrotlar; camı karbon, karbon pasta, perde baskılı karbon, karbon-fiber ve kalem grafit olmak üzere beş başlık altında incelenebilir. Şekil 1.5’de grafit tozunda bulunan karbon atomları dizilimi görülmektedir.



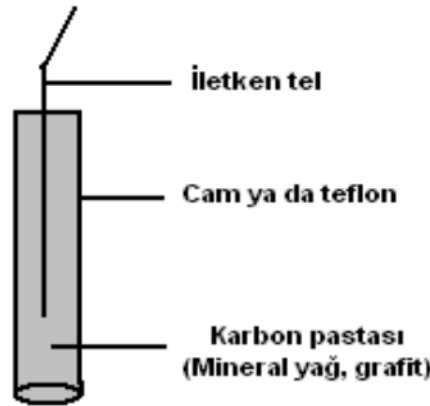
Şekil 1.5. Grafit tozunda bulunan karbon atomlarının dizilimi (Wang, 2000).

Camsı karbon elektrot (glassy carbon electrode, GCE):

Camsı karbon elektrot, çok yüksek mekaniksel ve elektriksel özellikleri, geniş gerilim çalışma aralığı, kimyasal inertliği ve tekrar edilebilirlik performansı nedeniyle kullanımı oldukça yaygın olan bir elektrottur. GCE, inert bir malzemeden yapılmış elektrot gövdesi içerisine camsı karbonun elektrot yüzeyinden sadece 1–2 mm konuma sıkıştırılması ile elde edilir. Camsı karbon materyali ya fenol-formaldehit polimerlerinin kontrollü ısı programlarıyla (300–1200 °C) ya da poliakrilonitrilin 1000–3000 °C sıcaklık aralığında basınç altında karbonizasyona uğratılması ile elde edilir. Camsı karbon elektroda uygulanacak olan yüzey ön işlemleri, elektrotta tekrar edilebilirliği ve aktivasyonu sağlayarak analitik performansı artırır. Karbon pastası elektroda göre fiziksel dayanıklılığı daha fazla olup yüzeyinin çok daha pürüzsüz ve düzgün olması nedeniyle elektrot yanıtı daha tekrar edilebilirdir (Wang, 2000; Şahinçi, 2005).

Karbon pasta elektrot (carbon paste electrode, CPE):

Karbon pastası, grafit tozunun, suda karışmayan çeşitli organik bağlayıcılarla karıştırılması ile hazırlanır. Hazırlanan karışım 2–4 mm çapında teflon ya da camdan yapılmış elektrot gövdesi içerisine sıkıştırıldıktan sonra elektriksel iletkenlik, iletken bir telin, gövdenin 2/3'ne kadar yerleştirilmesi ile elektriksel iletkenlik sağlanır. Karbon pasta elektrotlar; kolaylıkla yenilenebilir ve modifiye edilebilir bir yüzeye sahip olmaları, düşük artık akım oluşturmaları, ucuz olmaları nedeniyle tercih edilmektedir. Organik bağlayıcı olarak pek çok bileşik kullanılabilir olmakla birlikte bu bağlayıcıların saflıkları, ucuz ve kolay bulunabilme özellikleri dikkate alındığında geriye birkaç seçenek kalmaktadır. Bunlar mineral yağ (Nujol), parafin yağı, silikon yağı ve bromonaftalindir. Karbon pastası olarak en iyi performansı mineral yağ ve grafit karışımı sağlar. Karbon pastasının bileşimi, elektrot aktivitesini oldukça fazla etkilemektedir. Organik bağlayıcı sıvı oranı arttıkça elektron aktarım hızı azalmaktadır. CPE'nin en önemli sakıncası, yüksek oranda organik çözücü içeren çözeltilerde kullanıldığı zaman karbon pastasının çözeltide dağılmasıdır. CPE, farklı ve geniş gerilim aralıklarında çalışmaya olanak sağlayan, kısa sürede ve kolaylıkla hazırlanabilen bir elektrot olmasına karşın diğer elektrotlara göre tekrar edilebilirliği kötüdür (Urbaniczky ve Lundstrom, 1984; Wang, 2000; Kalcher, 1990). Karbon pasta elektrodunun genel bir görünüm ve içeriği Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1.6. Karbon pasta elektrot (Wang, 2000)

Perde baskılı karbon elektrot (screen printed carbon electrode, SPCE):

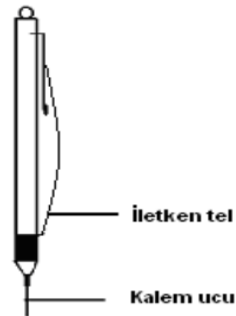
Perde baskı teknolojisi; çeşitli mürekkeplerin, poliester esnek film, seramik ya da plastik materyaller üzerine baskısından oluşur. Karbon ve platin mürekkep formülasyonları, çalışma elektrodunun baskısında, gümüşe dayalı formülasyonlar ise karşılaştırma elektrodunun baskısında sıklıkla kullanılmaktadır. Karbon mürekkepleri, ucuz olmaları ve ölçümlerin geniş gerilim aralığında yapılmasını sağlamaları nedeniyle SPCE hazırlamada sıklıkla kullanılmaktadır (Hart, 1997; Prudenziati, 1994; Meriç, 2001). Özellikle biyosensör teknolojisinin geleceği olan DNA mikroçip teknolojisinde uygulanabilirliği açısından oldukça başarılı sonuçlar veren bu elektrotlar geleceğin elektrotları olarak gösterilmektedir (Lucarelli vd., 2002).

Karbon-fiber elektrot (carbon fiber electrode, CFE):

Ultramikro elektrotlara artan ilgi, elektrokimyasal analizlerde karbon fiberlerin geniş bir alanda kullanılmasına yol açmıştır. Bu tür materyaller, polimer tekstil prolizlerinin yüksek sıcaklığa dayanıklı bileşiklere katalitik kimyasal gaz biriktirilmesi yoluyla bağlanmasıyla üretilmektedir. Birçok elektroanalitik uygulamada çapları 5–20 µm fiberler kullanılmakta ve bunlar istenilen radyal difüzyona olanak sağlamaktadır. CFE'nin en önemli üstünlüğü, küçük ölçütleri nedeniyle çeşitli mikro çevresel (beyin gibi) ölçümlere olanak sağlamalarıdır (Wang, 2000).

Kalem grafit elektrot (pencil graphite electrode, PGE):

Karbon elektrotlarda olduğu gibi tüm katı elektrotlarla çalışılırken en bilinen sorun, analiz sırasında bazı bileşiklerin yükseltgenme ürünlerinin elektrot üzerinde ince bir film olarak birikmesi sonucu analitik yanıtın büyüklüğünün azalması, elektrot temizleme işlemleri uygulansa bile tekrarlanabilirlik kayıplarının oluşmasıdır. Bu nedenle elektrot temizliği, elektrokimyasal tekniklerin, analizlerde geniş çapta kullanılmasını kısıtlayıcı en önemli sorundur. 1990'lı yılların sonundan başlayarak el-yapımı kalem grafit (kalem ucu) elektrotlar (PGE) camısı karbon ve karbon pasta elektrotlara tek kullanımlık özelliklerinin yanısıra çok düşük maliyetlerinden dolayı alternatif olmuşlardır (Bond vd., 1997; Wang vd., 2000; Wang ve Kawde, 2001). Elektrot olarak farklı sertlik ve çapta her yerde bulunabilen ticari mekanik kurşun kalem uçlarından yararlanılır. Kalem uçları, doğal grafitin kil ve balmumu karışımı içerisine dispersiyonu (dağılması) ve ardından ısıtılma işlemi uygulanması ile üretilir. Kil yerine selüloz gibi organik temelli materyal kullanılıp oksijensiz atmosferde yakıldığı zaman selüloz karbon şekline dönüşür. Oluşan yapı son derece elastiktir. PGE'ler, ne karbon pasta ve pirolitik karbon kadar kırılğan, ne de camısı karbon kadar serttir. Tek kullanımlık olmaları nedeniyle elektrot temizleme işlemlerine gerek yoktur; dolayısıyla yeni bir elektrot yüzeyi oluşturmak çok daha basit ve hızlı olup tekrar edilebilirlik yüksektir. Literatürde PGE'lerin pek çok uygulaması görülmektedir. İz metal analizleri (Demetriades vd., 2004), hepatit B virus DNA'sının saptanması (Erdem vd., 2005), kafein analizi (Ly vd., 2004), titre edilebilir asitlik tayini (Kotani vd., 2003), nitrit, serotonin ve dopaminin eş zamanlı tayini (Miyazaki vd., 1999), ilaç analizleri (Masawat vd., 2002; Gao vd., 2005), likörin-DNA etkileşim çalışması (Karadeniz vd., 2003), DNA hibridizasyon çalışması (Fojta vd., 2003) ve sıvı kromatografisinde elektrokimyasal dedektör olarak fenol ve klorofenol analizi (Jin vd., 2002), kalem grafit elektrotunun kullanıldığı araştırmalara örnek olarak verilebilir.



Şekil 1.7. Kalem grafit elektrot (Erdem vd., 2005).

1.2.5.5. Kimyasal modifiye elektrotlar

Elektrot yüzeyine bir kimyasal belirtecin tutturulması temeline dayanan bu elektrotların analitik uygulamalarda yararlanılan birçok yönleri vardır. Bu elektrotlar, elektron aktarım tepkimelerini katalizlemeleri, seçimli bir akümülyasyon ve membran sağlamaları nedeniyle elektrokimyasal cihazlar için kararlılık, duyarlılık ve seçiciliği artırmaktadır. Elektrosentez, korozyondan korunma, elektrot yüzeyinin radyal tasarımı ve ilaçların kontrollü salınım çalışmalarında bu modifiye elektrotlar çok kullanılmaktadır (Wang, 2000).

1.2.5.6. Mikroelektrotlar

Mikroelektrot ifadesi, elektrot çapı 25 µm'den daha büyük olmayan elektrotlar için kullanılmaktadır. Minyatürizasyona analitik kimyada artan bir ilgi vardır. Bu elektrotların uygulamadaki üstünlükleri arasında; mikroskobik alanların incelenmesinde, bölgesel derişim profillerinin ölçülmesinde, elektroforez kapilerinin içindeki mikroakım sistemlerinin belirlenmesinde ve çok küçük hacimli örneklerin analizinde kullanılmaları sayılabilir (Wang, 2000).

1.2.6. Voltamogramlar

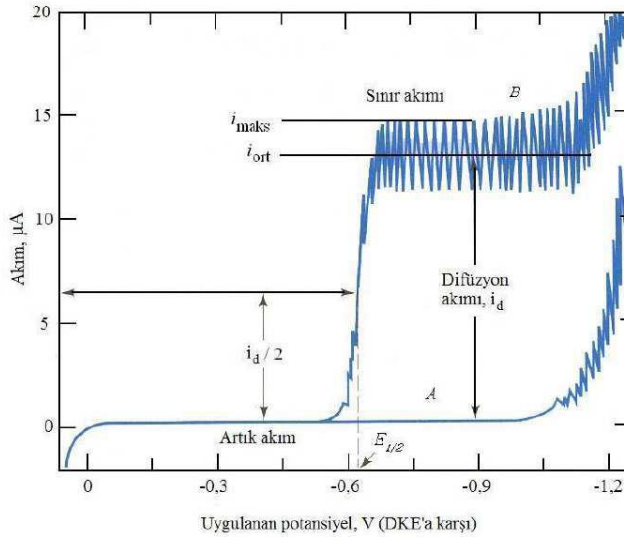
Potansiyele karşı çizilen akım grafiklerine voltamogram denir. Doğrusal taramalı voltamogramlar, genelde “voltametrik dalga” adı verilen sigmoidal şekilli (S şeklinde) eğrilerdir (Şekil 1.8). Dik bir artıştan sonra gelen sabit akıma difüzyon kontrollü akım ya da sınır akımı (i_s) adı verilir. Çünkü bu akım, analizlenecek maddenin kütle aktarım işlemiyle elektrot yüzeyine taşınma hızıyla sınırlıdır. Sınır akımları analizlenecek maddenin derişimi ile doğru orantılı olup

$$i_s = k C_A$$

eşitliği ile verilir. Burada, C_A analit derişimi, k ise bir sabittir. Nicel doğrusal taramalı voltametri bu ilişkiye dayanır. Difüzyon tabakasını aşırı basitleştiren varsayımlara dayanarak türetilmiş bu eşitlik; hareketli ve durgun tabakalar arasındaki arayüzeyin, konveksiyonla taşınmanın son bulunduğu, difüzyonla taşınmanın başladığı keskin bir kenar olduğu varsayımı temeline dayandırılmıştır.

Yarı-dalga gerilimi, akımın sınır akımının yarısına eşit olduğu gerilime denir ve $E_{1/2}$ ile gösterilir. Yarı-dalga gerilimi, yarı-tepkimenin standart gerilimi ile yakından

ilgili olmakla birlikte genellikle ona eşit değildir. Yarı dalga gerilimi, çözeltideki bileşenlerin belirlenmesinde (nitel analiz) kullanılabilir.



Şekil 1.8. Doğrusal taramalı bir voltamogram (Skoog vd. 1998)

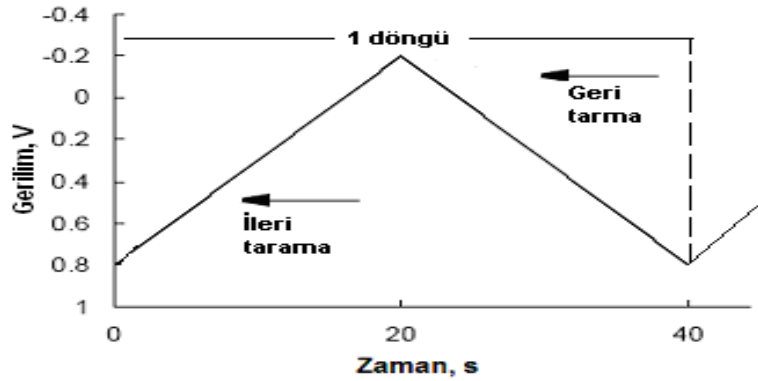
1.2.7. Voltametrik Teknikler

1.2.7.1. Dönüşümlü voltametri

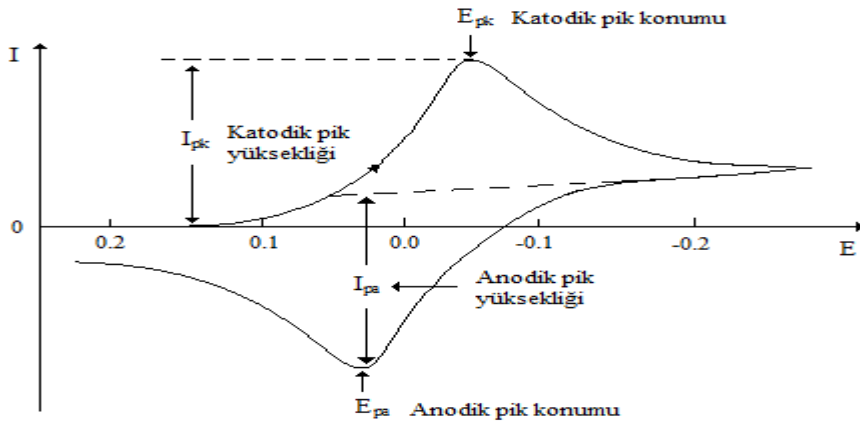
Dönüşümlü voltametri (cyclic voltammetry, CV) tekniğinde, gerilim ilk olarak bir değere kadar artar, daha sonra başlangıç değerine yine doğrusal olarak geri döner (Şekil 1.9.). Bu işlem zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilen akımla defalarca tekrar edilebilir. Sürekli değişen gerilim değerlerine karşı belirli bir aralıkta akımdaki değişim grafiğe geçirilerek “dönüşümlü voltamogram” elde edilir (Şekil 1.10). CV tekniği ile, karıştırılmayan durgun sistemde ve üçlü elektrot sistemlerinde çalışılır. Burada hızı difüzyon belirler. Analitin yükseltgenmesi ve indirgenmesi voltamogram üzerinde gözlenebilmektedir. Başlangıç gerilim taramasının yönü, analiz örneğinin bileşimine bağlı olarak negatif ya da pozitif olabilir.

Dönüşümlü voltamogramların şekli ve yapısında seçilen gerilim aralığının yanısıra, seçilen tarama hızının, kaç defa tarama yapıldığının da etkisi vardır. Duyarlılığın 10^{-5} M ile sınırlı olduğu bu yöntem, miktar tayinine dayalı bir yöntem değildir ama özellikle organik ve metalorganik sistemlerde yükseltgenme/indirgenme işlemlerin

hız ve mekanizma çalışmaları için önemli bilgi sağlar. Bir dönüşümlü voltamogramın önemli parametreleri; katodik pik gerilimi (E_{pc}), anodik pik gerilimi (E_{pa}), katodik pik akımı (i_{pc}) ve anodik pik akımı (i_{pa}) dır. Bu teknikte ileri yöndeki gerilim tarama sırasında bir indirgenme olmuşsa, gerilim taraması tersine çevrildiğinde indirgenme sırasında oluşan ürünün elektrotta yeniden yükseltgenmesi nedeniyle bu yönde de bir pik gözlenebilir.



Şekil 1.9. Dönüşümlü voltametriye elektroda uygulanan gerilimin zamana karşı grafiği (Wang, 2000).



Şekil 1.10. Tersinir bir redoks işlemi için dönüşümlü voltametriye elde edilen akım-gerilim eğrisi (Wang, 2000).

“Tersinir” bir elektrot tepkimesinde anodik ve katodik akımlar mutlak değer olarak yaklaşık eşittir ama zıt işaretlidir. Pik gerilimleri farkı ise $0.059 / n$ dir. Bu pik

ayırımı, aktarılan elektron sayısının belirlenmesinde kullanılır. Elektrot tepkimesinin tersinirliği azaldıkça anodik ve katodik pikler birbirinden daha farklı gerilimlerde ve daha yayvan olarak gözlenir. “Tam tersinmez” bir elektrot tepkimesinde ise ürünün çok hızlı bir şekilde tüketilmesinden dolayı geri pik tamamen kaybolur (Wang, 2000; Erdem, 2000).

Tersinir bir elektrokimyasal tepkime için elde edilen pikin maksimum akım değeri aşağıdaki eşitlikle verilir:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$$

i_p = Anodik ya da katodik pik akımı (amper)

n = Aktarılan elektron sayısı

A = Elektrot yüzey alanı (cm^2)

D = Elektroaktif türlerin difüzyon katsayısı ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

v = Gerilim tarama hızı (V s^{-1})

C = Elektroaktif türlerin derişimi (mol cm^{-3})

Tersinmez bir elektrokimyasal tepkime için eşitlik, aşağıdaki ifadeye dönüşür:

$$i_p = (2.99 \times 10^5) n (\alpha n_a)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2}$$

α = Aktarım katsayısı

n_a = Yük aktarım basamağındaki elektron sayısı

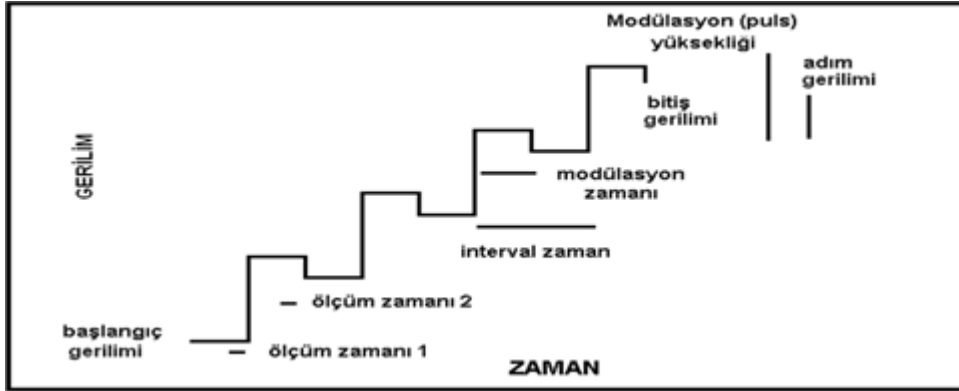
1.2.7.2. Puls voltametrik teknikler

Puls voltametrik tekniklerle voltametrik ölçümlerin tayin sınırlarının daha düşük derişimlere çekilmesi amaçlanmıştır. Bu tekniklerle faradayik olan ve faradayik olmayan akımlar arasındaki oran artırılmış ve duyarlılık 10^{-8} M düzeyine indirilmiştir. Bu tekniklerde çalışma elektroduna yaklaşık 50 ms zaman aralıklarıyla bir dizi gerilim adımı uygulanır. Her aralıklı gerilim uygulamasından sonra kapasitif akım hızlı bir şekilde azalarak yok sayılabilecek bir düzeye gelir; bu arada faradayik akımda azalma ise çok küçüktür. Böylece tayin sınırı daha düşük ölçümler

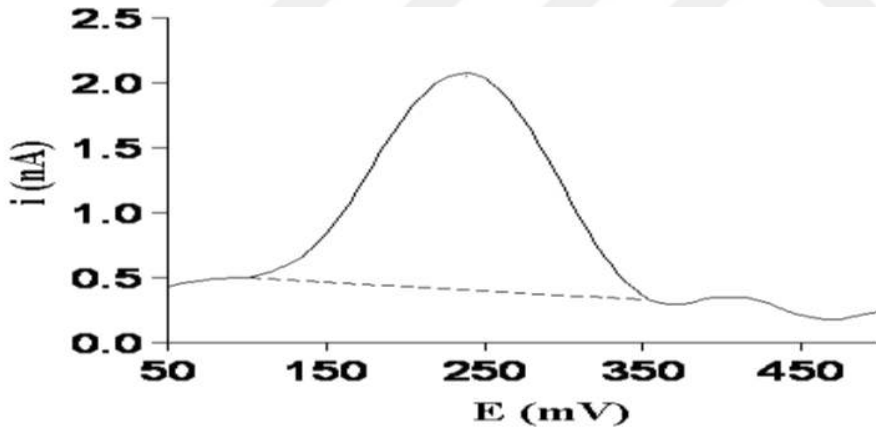
gerçekleştirilir. Puls voltametrik teknikler; “normal puls”, “diferansiyel puls” ve “kare-dalga” voltametrik teknikler olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir. Bu tekniklerden diferansiyel puls ve kare-dalga voltametrik teknikler günümüzde daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

1.2.7.3. Diferansiyel puls voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisi (differential pulse voltammetry, DPV), organik ve inorganik türlerin iz analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte, çalışma elektroduna sabit büyüklükteki pulslar (periyodik darbeler) doğrusal gerilim basamaklarının üzerine yerleştirilerek uygulanır (Şekil 1.11). Puls uygulamadan hemen önceki bir zamanda ölçülen bir akım ile puls uygulamasının bitimine yakın belli bir zamandaki akımlar ölçülür ve bu akımlar arasındaki fark doğrusal olarak artan gerilimin fonksiyonu olarak kaydedilir. Uygulanan gerilime karşı elde edilen akımdaki fark grafiğe geçirildiğinde elde edilen diferansiyel eğri pik şeklinde olup (Şekil 1.12), yüksekliği analitin derişimiyle doğru orantılıdır. Elde edilen voltamogramdaki pik gerilimi (E_p), türlerin tanımlanmasında kullanılabilir; bu pik gerilimi, yarı dalga gerilimine yakın bir değerdir. Faradayik akımın yüksek, faradayik olmayan yükleme akımının ise düşük değerde olması yani sinyal/gürültü oranının artması sonucu duyarlılık artmıştır. DPV tekniği, 10^{-8} M'dan daha düşük derişimlerdeki ölçümlere olanak tanıyan duyarlı bir yöntem olup yarı dalga gerilimleri 0.04 - 0.05 V kadar farklı olan maddeler için bile özgün pik maksimumları elde edilmektedir (Wang, 2000; Skoog vd., 1998).



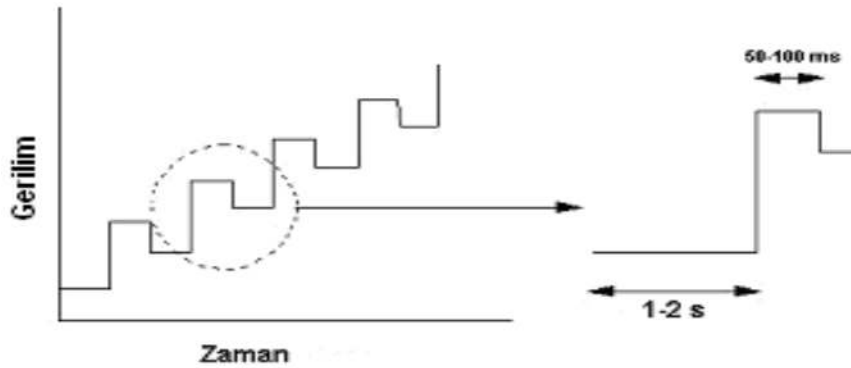
Şekil 1.11. Dijital cihazlarda diferansiyel puls voltametrisi için kullanılan uyarma sinyali (Wang, 2000).



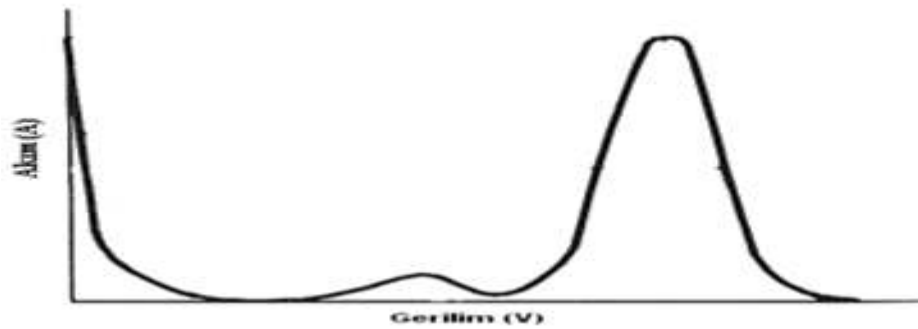
Şekil 1.12. Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen bir voltamogram (Wang, 2000).

1.2.7.4. Kare dalga voltametrisi

Kare dalga voltametrisi (square-wave voltammetry, SWV), son derece hızlı ve duyarlı bir teknik olup, voltamogramın tamamı 10 ms daha az bir sürede elde edilebilir. SWV, basamaklı bir gerilim taraması sırasında çalışma elektroduna kare dalga şeklinde darbenin uygulandığı diferansiyel bir tekniktir (Şekil 1.13). Basamaklı sinyalde her basamağın boyu ve darbe periyodu eşit olup 5 ms'dir. Ölçüm sırasında akım, darbe uygulanmasından hemen önce ve hemen sonra olmak üzere iki kere ölçülür ve iki ölçüm arasındaki akım farkı uygulanan gerilime karşı grafiğe geçirilir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Kare dalga voltametrisinde uyarma sinyali (Wang, 2000).



Şekil 1.14. Kare dalga voltametrisinde elde edilen bir voltamogram (Wang, 2000).

Şekil 1.14’de kare dalga voltametrisinde uyarma sinyalinin oluşumunda elde edilen akım farkı (Δi), birinci gerilimdeki akım değerinden ikinci gerilimdeki akım değerinin çıkarılması ile bulunur. Tersinir bir indirgenme tepkimesinde bir pulsun boyutu, ileri tarama sırasında oluşan ürünün geri tarama sırasında yükseltgenmesini sağlamaya yetecek kadar büyüktür. İleri puls bir katodik akım (i_1), geri puls bir anodik akım (i_2) oluşturur. Genellikle voltamogramları elde etmek için Δi grafiğe geçirilir. Bu fark derişimle doğru orantılıdır.

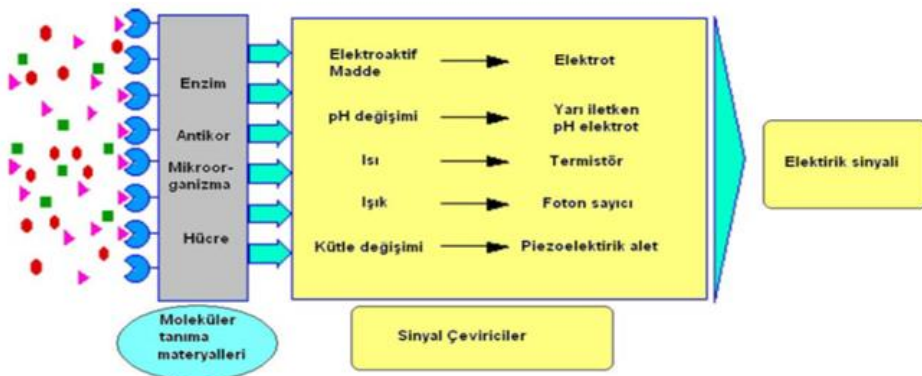
Diferansiyel puls ve kare dalga voltametrisi karşılaştırıldığında kare dalga voltametrisi ile elde edilen akımların, diferansiyel puls ile elde edilenlerden daha büyük olduğu gözlemlenmiştir. Kare dalga voltametrisinin en önemli üstünlüğü, hızının yüksek olmasıdır. Ölçüm son derece hızlı yapıldığından, birkaç voltametrik taramanın sinyal ortalaması alınarak analizin kesinliğinin artırılması olasıdır. (Wang, 2000; Skoog vd., 1998).

1.3. Biyosensör

Fiziksel bir büyüklüğü elektriksel bir veriye çeviren sisteme “sensör” denir. Kimyasal sensör (algılayıcı), kimyasal bir bilgiyi (genelde analitin derişimi) analitiksel olarak yararlanılacak bir elektrik sinyaline çeviren küçük düzeneklerdir.

Kimyasal sensörler genellikle iki temel unsurdan meydana gelir, 1-Kimyasal tanıma sistemi (reseptör) 2-Fizikokimyasal çevirici (transistör). Kimyasal tanıma sistemi (reseptör), analit ile etkileşerek onu tanır ve bu tanıma sonucu oluşan kimyasal değişiklikler fizikokimyasal çevirici (taransistör) tarafından elektrik sinyaline dönüştürülür.

Biyosensörler; biyolojik bir molekül (biyokimyasal reseptör) ve bir çeviriciden oluşurlar. Biyolojik molekül (bitki ve hayvan dokuları, enzim, hücre, organeller, antikolar, nöron reseptörler, nükleik asitler) analizlenecek madde (analit) ile etkileşir, onu tanır ve çevirici sistem tanıma olayını ölçülebilir bir elektrik sinyaline çevirir. Kısaca sensörlerde tanıma tabakası (reseptör) olarak biyolojik maddeler kullanıldığında biyosensör oluşur. Şekil 1.15’de genel olarak bir biyosensörün yapısı gösterilmiştir. Biyosensörlerde reseptör ve çevirici doğrudan iletişim halindedir yani birbirini içine geçmiştir. Biyosensörler hem biyolojik hem de biyolojik olmayan ortamların izlenmesinde kullanılırlar. Biyosensörlerde amaç örnek içinde bulunan bir kimyasalın derişimi ile doğru orantılı bir elektronik sinyal elde etmektir. (Camman vd., 1991; Coulet, 1991; Gronow vd., 1992; Sharma ve Rogers, 1994).



Şekil 1.15. Biyosensörün yapısı (Camman vd., 1991).

1.3.1. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler

1. Seçimlilik: İdeal bir biyosensörde en önemli özelliklerden biri seçimlilik özelliğidir. Bir biyosensör yeterince seçimli değil ise, girişim yapan türleri uzun ek işlemlerin yapılmasına gerek vardır.

2. Kullanım Ömrü: Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli unsur, biyoloji çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca biyosensörün, kalibrasyon sıklığı, kararlılık, tekrarlanabilirlik gibi diğer ölçütlerini de etkilemektedir.

3. Kalibrasyon Gereksinimi: İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gerek duyması istenir. Fakat bu özellik uygulamada gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

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

5. Kararlılık: Elektrot kararlılığının (stabilitesinin) yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca biyosensörler, pH, sıcaklık, nem, ortam, O₂ değişimi gibi değişkenlerden de etkilenmektedir. Kararlılık, hem günden güne hem de uzun zamanlı olmalıdır.

6. Yüksek duyarlılık: Biyosensöre tutturulmuş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması, ideal biyosensörlerin özelliklerindendir.

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

8. Geniş Ölçüm Aralığı: Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörden alınan akım-derişim eğrilerinin doğrusal olduğu derişim aralığı olup bunun geniş olması beklenir.

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

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

11. Basitlik ve Ucuzluk: Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı kolay biyosensörler, ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve pahalı olan yapılar daha sonra basitleştirilmiş ve olabildiğince maliyeti düşürülmüştür.

12. Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik: Elektrotların sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir (Hall, 1990).

1.3.2. Biyosensör Çeşitleri

Biyosensörleri, birçok kaynakta farklı sınıflandırılmasına karşın, genel olarak aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

i. Elektrokimyasal sensörler

Çevirici unsur olarak genelde bir elektrodun kullanıldığı ve elektrot yüzeyinde ortamdaki elektroaktif (yükseltgenebilen ya da indirgenebilen) türün değişikliğinden yararlanılarak yapılan ölçüm sistemini kapsar.

ii. Optik sensörler

Işık ve tutturulmuş (immobilize) tabaka arasındaki etkileşim sonucunda ışığın değişik özelliklerinden (genelde floresans ve absorpsiyon) yararlanılarak yapılan ölçümleri kapsar.

iii. Kütle duyarlı sensörler

Piezoelektrik kristallerin rezonans frekansının ölçümü temeline dayandırılmış sensörlerdir. Piezoelektrik madde, elektriksel bir güç uygulandığında maddedeki yükün ilerlemesi ile bir magnetik alan oluşturan maddedir. Birçok seramik madde (PbTiO_2 , BaTiO_3) bu özelliği gösterir.

iv. Isıl (termal) sensörler

Sıcaklığın değişimi üzerine kurulmuş olan sensörlerdir. Genellikle reaksiyon sıcaklığı ve adsorpsiyon sıcaklığı ölçüm temeli üzerine kurulmuşlardır.

1.3.3. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, özel biyolojik tanıma unsuru ile elektrokimyasal tekniklerin analitiksel gücünü birleştirir. Amaç; analitin derişimine bağı olarak biyolojik bir işleme bir elektrik sinyali elde etmektir.

1.3.3.1. Elektrokimyasal biyosensörlerin çevirici ölçüm türüne göre sınıflandırılması

Elektrokimyasal biyosensörler, çevirici (transistör) ölçüm türüne göre üç ana başlık altında toplanabilir:

1-Amperometrik

2-Potansiyometrik

3-Kondüktometrik

Amperometrik elektrokimyasal biyosensörler

Karşılaştırma elektroduna göre sabit gerilimde çalışan, bu biyosensörlerde ölçülen sinyal, biyosensör yüzeyinde indirgenen ya da yükseltgenen tür tarafından çalışma elektrodunda meydana gelen akımdır. Bir elektrokimyasal türün, elektrokimyasal indirgenmesi/yükseltgenmesi ile meydana gelen akımın ölçülmesine dayanır. Genelde çalışma elektrodu üzerinde sabit bir gerilim değeri uygulanır. Akım değeri en az 10 - 6 amper olmalıdır. Amperometrik ölçümler uygulanan tek bir gerilim değerinde hücredeki akım akışının kaydedilmesi ile gerçekleştirilir. Elde edilen

elektrik sinyalinin büyüklüğü elektroaktif türün derişimi ile doğrudan orantılıdır. Amperometrik biyosensörler oldukça duyarlı, hızlı ve ucuz olmaları gibi üstünlüklere sahiptirler.

Potansiyometrik elektrokimyasal biyosensörler

Potansiyometrik ölçümler ya çalışma veya karşılaştırma elektrodu arasındaki gerilim farkının ya da iki karşılaştırma elektrotu arasına geçirgen bir membranın yerleştirilmesi ile meydana gelen gerilim farkının ölçülmesine dayanır. Potansiyometride sensör ara yüzeyinde bölgesel bir denge kurulur; ara yüzeydeki elektrot ya da membran gerilimi ölçülür. Gerilim farkından örnek bileşimi hakkında bilgi elde edilir.

Kondüktometrik elektrokimyasal biyosensörler

Ana çözeltideki ya da ince film üzerindeki elektrik iletkenliğinin değişimi üzerine kurulmuştur. Bu iletkenlikte analitin bulunma miktarı etkilidir. Kondüktometrik yöntemler temel olarak seçici değildir; ancak yüzey modifikasyonu ve aletsel gelişmeler, seçiciliği artırmış ve sensör tasarımına bu yöntemin girmesini sağlamıştır (Thevenot vd.,1999; Stradiotto vd., 2003).

1.3.3.2. Elektrokimyasal biyosensörlerin biyolojik tanıma unsuruna göre sınıflandırılması

Elektrokimyasal biyosensörler biyolojik tanıma unsuruna göre iki başlık altında toplanabilir:

1-Biokatalitik biyosensörler

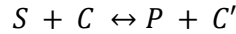
2-Afinite biyosensörleri

Biyokatalitik Biyosensörler: Tanıma tabakası (reseptör) olarak enzim, doku, bakteri ve hücrelerin kullanıldığı biyosensörlerdir. Enzim temelli elektrotlar ile doku ve bakteri elektrotları olarak iki başlıkta incelenir.

a- Enzim temelli elektrotlar: Enzimler canlı sistemlerde kimyasal tepkimeleri katalizleyen proteinlerdir. Bu tür katalizörler yalnızca etkili değil aynı zamanda oldukça seçicidirler. Böylece enzimler birçok duyarlı uygulama alanında tanıma yüzeyi olarak kullanılırlar. Enzim elektrotlar, uygun bir elektrotla enzim tabakasının

birleştirilmesi temeline dayanmaktadır. Enzimler, substratlara (enzimle tepkimeye giren madde) oldukça yüksek seçicilikte yanıt verirler.

İmmobilize enzim tabakası bir tepkimeyi katalizlemek için seçilir ve bu tabaka analizlenecek türü üretir ya da tüketir.



S = Substrat

C = Koreaktif

P ve C' = Oluşan ürünler

Uygun elektrodun seçimi, temel olarak enzimatik sistemin işleyişi üzerine kurulur. Enzim elektrotların en genel anlamıyla tasarımı bir diyaliz membran ve elektrot arasına enzim çözeltisinin immobilizasyonudur.

b- Doku ve bakteri elektrotları: İzole edilen enzimlerin sınırlandırılmış kararlılığı, bazı enzimlerin saf halde bulunamaması, bazı enzimlerin pahalı oluşu hücre materyallerin (bitki dokuları, bakteriyel hücreler vb.) kullanılmasına yol açmıştır. Bu biyokatalitik elektrotların fonksiyonu geleneksel enzim elektrotlar ile benzerlik gösterir. Doku ya da hücrede bulunan enzim belirlenecek türü harcar ya da üretir. Örneğin muz dokuları, polifenol oksidaz enziminin zengindir; karbon pasta matrise karıştırılarak elektrot yüzeyine immobilize edilir.

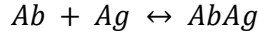
Afinite biyosensörleri: Afinite biyosensörleri, belirli biyomoleküllerin (antikor, reseptör, polinükleotitler) özel hedef analitlere seçici bağlanmasında kullanılır. Bu sensörler, bağlanma sürecinin sonucu olarak oluşan elektrokimyasal sinyallerin ölçülmesine dayanır. Biyokimyasal bağlama tepkimelerinin afinitesi ve yüksek spesifikliği oldukça duyarlı ve seçici aletlerin yapılmasına olanak sağlamaktadır. Afinite biyosensörleri üç ana başlık altında toplanabilir.

a-İmmüno-sensörler

b-Reseptör temelli biyosensörler

c- Nükleik asit temelli biyosensörler

a- İmmunosensörler (antikor temelli sensörler): Antikor/antijen (AbAg) kompleksinin oluşumunu içeren immünojikal tepkimelere dayanır.



Antikor, yabancı molekülleri bağlaması için (antijen vb.) organizma tarafından üretilen proteinlerdir. İmmunosensörler bağlanma olayının ya da yer değiştirme olayının sonucunda antikor ya da antijen derişimindeki doğrudan değışikliğin kaydedilmesi üzerine kurulmuştur. Bu sensörlerin büyük bir çoğunluğunun tepkimesi tersinmez olduğundan yeniden kullanılamaz ve pahalıdırlar.

b- Reseptör temelli biyosensörler: Reseptörler, protein molekülleridir, hedef analiti özel olarak bağlayan hücresel membrana yerleştirilmişlerdir. Membran reseptör ve hedef analit arasındaki seçici bağlanma olayı sonucunda membrandaki iletkenliğin değışimi ölçülerek tayin yapılır. Membran reseptör ve hedef analit arasındaki basit ve seçici bir bağlanma olayı binlerce iyonu içine alan çevirici membranın iletkenliğindeki artmanın sonucunda gerçekleşir.

c- Nükleik asit temelli biyosensörler: Nükleik asitler tanıma tabakası olarak elektrokimyasal bir çevirici ile birleştirilerek afinite biyosensörlerin önemli ve yeni bir türünü oluşturlar. RNA ve DNA temelli biyosensörlerdir. DNA biyosensörler ile hedef analitin belirlenmesinde iki yaklaşım geliştirilmiştir. Birincisi DNA'nın çift iplikçik yapısı arasına analitin girmesi, ikincisi DNA yapısının en elektroaktif türü olan guaninin doğrudan ölçülmesi şeklindedir. Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha hızlı ve ucuzdur. Bu analizlerle genetik bilgilere ışık tutulmaktadır (Thevenot vd., 1999; Wang, 2000; Stradiotto vd., 2003).

Aşağıdaki çizelgede elektrokimyasal biyosensörlerle belirlenebilen türlere, kullanılan reseptörlere ve ölçüm tekniklerine örnekler görölmektedir.

Çizelge 1.1. Elektrokimyasal biyosensörlerle belirlenebilen türler, kullanılan reseptörler ve ölçüm teknikleri

Analit	Reseptör	Ölçüm Tekniği
İyonlar	Metal Oksitler	Potansiyometrik Voltametrik
	İyon iletken inorganik kristaller	
	İmmobilize sentetikler	
	İyon değiştirici camlar	
	Enzimler	
Çözülmüş Gazlar	Hidrofobik membran	Potansiyometrik
Buharlar	İnert Metal Elektrot	Voltametrik
Kokular	Enzimler	Amperometrik
	Antikor	
	Reseptör	
Substratlar	Enzimler	Potansiyometrik Amperometrik Kondüktometrik
	Hücreler	
	Membran Reseptörler	
	Bitki veya Hayvan Dokuları	
Antikor	Antikor	Potansiyometrik
Antijen	Antijen	Amperometrik
	Nükleik Asitler	
Çeşitli Proteinler	Spesifik Ligandlar	Potansiyometrik
Düşük mol kütleli substratlar	Protein Reseptör ve Kanallar	Amperometrik

1.4. Deoksiribonükleik Asit (DNA)

Bir molekülün genetik materyal olarak davranması için dört özelliği bulunmalıdır. Kendini eşleme (replikasyon), bilgi depolama, bu bilgiyi ifade etme, mutasyonla çeşitleme (varyasyon). Genetik materyalin kimyasal dili bilgi depolarken, bilgiyi yavru hücrelere ve organizmalara aktarırken bu potansiyel görevi yerine getirebilecek yetenekte olmalıdır.

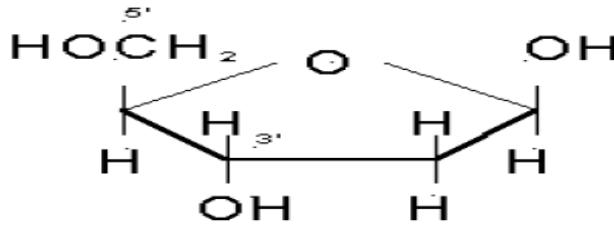
İlk olarak 1868 yılında İsviçreli kimyacı Friedrich Miescher tarafından balık hücrelerinin çekirdeğinden yalıtılan DNA'nın 1944–1952 yılları arasında yapılan deneylerle bir genetik madde olduğu kesinlikle ortaya konmuştur. DNA molekülleri

dünya üzerindeki bütün canlı organizmaların (bazı virüsler dışında) özelliklerini belirleyen kimyasal maddelerdir. DNA, hücre çekirdeklerinin hepsinde bulunan kromozomları oluşturmaktadır. Her kromozomda tek ve uzun bir DNA zinciri bulunmaktadır. Bir DNA molekülünün belirli bir genetik özellik içeren kesitine “gen” adı verilmektedir. DNA’nın yapısını kavramak için nükleik asit kimyasını bilmek gerekir (Klug ve Cumming, 2007).

1.4.1. Nükleik Asitler ve Nükleik Asitlerin Yapı Taşları

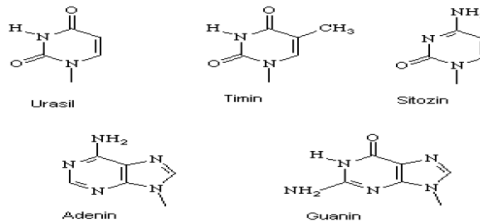
Nükleik asitler, diğer organik biyomoleküller gibi (proteinler, karbonhidratlar, lipitler) çeşitli uzunluklarda polimer zincirleri oluşturmak üzere polimerleşmiş, birtakım yapı taşlarından oluşmuş olup canlı organizmaların temel yaşamsal olayları üzerinde rol oynayan moleküllerdir. İki tip nükleik asit bilinmektedir; DNA (Deoksiribonükleik asit), RNA (Ribonükleik asit). Bütün nükleik asit moleküllerinin yapı taşları nükleotitlerdir. Her nükleotid üç kısımdan oluşmuştur:

1-Beş karbonlu bir şeker olan deoksiriboz ve riboz (Şekil 1.16)



Şekil 1.16. DNA’da bulunan 2-deoksiribozun kimyasal halka yapısı (Klug ve Cumming, 2007).

2- Azot içeren pürin ve pirimidin türevi bazlar (Şekil 1.17)



Şekil 1.17. DNA ve RNA’da bulunan pirimidin ve pürin türevi bazlarının kimyasal yapıları (Klug ve Cumming, 2007).

3-Fosforik Asit (H_3PO_4)

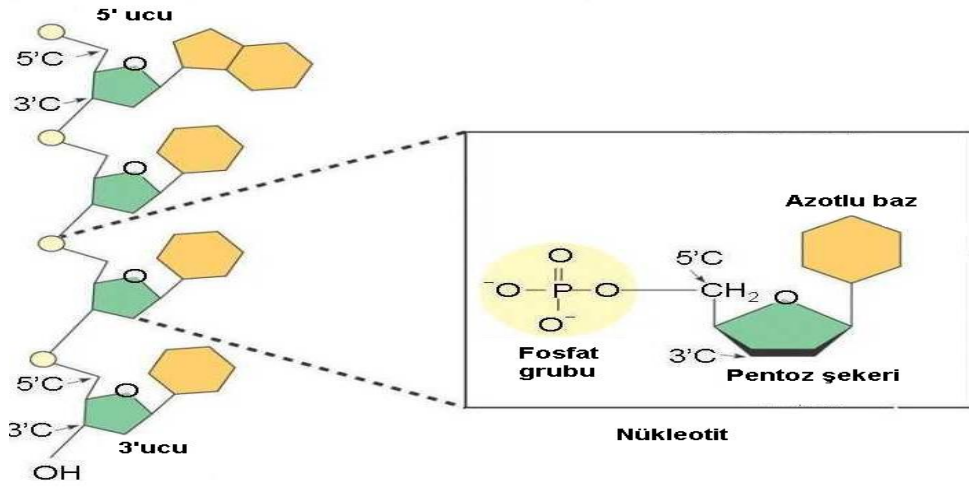
Bütün nükleotidlerde şeker ve fosfat aynıdır. Nükleotidler arasındaki fark, bazların farklı olmasından ileri gelir. DNA’da sadece iki çeşit pürin türevi baz bulunur; Adenin (A) ve Guanin (G). Pirimidin türevi bazların sayısı biraz fazla olmakla birlikte en fazla Sitozin (C) ve Timin (T) yer alır.

Nükleotitler, yapı taşlarını oluşturan özel azot bazlarına göre (A,T,G,C ya da U) adlandırılırlar. DNA’da T bulunurken, RNA’da bunun yerini U alır. DNA ve RNA’daki nükleotitlerin isimlendirilmeleri bu bazlara göre düzenlenir (örn. guanin nükleotidi).

Nükleotidlerin yapısında yer alan bileşiklerin kurdukları bağlar son derece özgündür. Şekerin C-1’ atomu, azotlu bazla kimyasal bağ yapar. Eğer baz pürinse, N-9 atomu şekere kovalent olarak bağlanır. Eğer baz pirimidin ise, N-1 atomu şekerin C-1’ atomu ile bağ yapar. Bir nükleotitte, fosfat grubu, şekerin C-3’ ya da C-5’ atomu ile bağlanır. Şekil 1.18’de DNA’daki nükleotid yapısı görülmektedir.

İki mononükleotit arasında kurulan bağ yapısında, iki şekere bağlı fosfat grubu yer alır. Oluşan bağ, fosfodiester bağıdır çünkü fosforik asit her iki taraftaki alkol grubu (şekerdeki hidroksil grubu) ile ester bağ yapmıştır. Bağlanma sırasında pentozun 1 numaralı karbon atomuna bazlardan biri tutunur. 3’ ve 5’ numaralı karbon atomlarından her biri de iki komşu nükleotidin fosfat köklerinden birine bağlanır (Şekil 1.19).

DNA ipliğinden 5’ numaralı karbonlar hep aynı yöne bakarken 3’ numaralı karbon atomları da aksi yöne bakar. Buna dayanarak bir DNA ipliğinin bir ucuna 5’ ucu diğerine 3’ ucu adı verilmektedir. DNA’nın molekül ağırlığının 106-109 dalton arasında olduğu saptanmıştır. Bu değer DNA’nın çok uzun bir polinükleotit zincirine sahip olduğunu göstermektedir (Klug ve Cumming, 2007).



Şekil 1. 18. Primer yapıdaki DNA nükleotiti (Klug ve Cumming, 2007).

1.4.2. DNA Molekülünün Yapısı

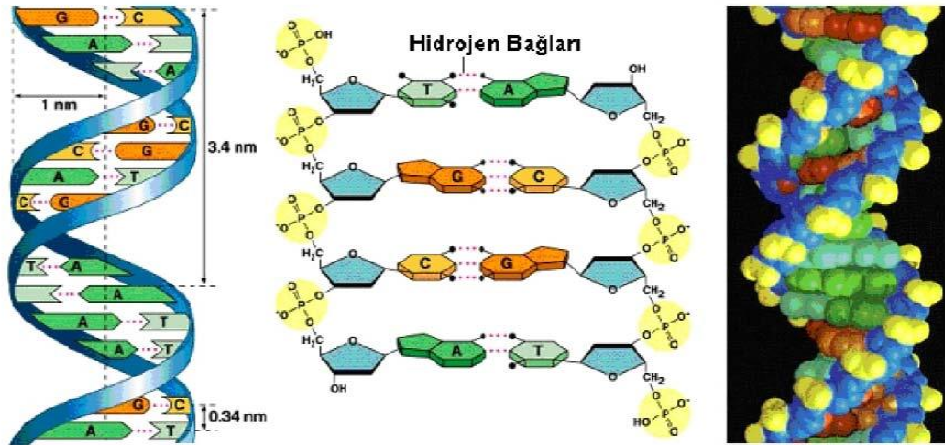
J.D. Watson ve F.H.C. Crick, 1953 yılında DNA üzerinde hiçbir deney yapmamış olmalarına karşın yapılan deneylerden yola çıkarak molekülün yapısını açıklamak için bir model öne sürdüler. Watson ve Crick'in DNA modelini oluştururken kabul ettikleri varsayımlar aşağıda sıralanmıştır:

- 1- Her DNA molekülü, bir merkez eksen etrafında bir çift heliks (iplikçik oluşturacak) şekilde birbirlerine zıt yönlerde giden iki uzun polinükleotid zincirinden yapılmıştır.
- 2- Her bir nükleosid (şeker ve fosfat bileşikleri), polinükleotid zincirine dikey olan bir düzlemde bulunur.
- 3- Baz çiftleri iki zincir arasında bulunur ve hidrojen bağları aracılığı ile bağlanır.
- 4- İki zincir çok özel olarak birbiriyle birleşir (A-T, C-G, T-A, G-C). Primer yapı; DNA deoksिनükleotidlerin 5'-3' yerlerinden birbirine bağlanmasıyla

oluşmuş büyük polimerlerdir. Sekonder yapıda, uygun pirimidin ve pürin bazları hidrojen bağları ile birbirine bağlanarak eşleşirler. Sekonder yapının oluşumunda baz eşleşmeleri en büyük etmen olup bu eşleşmeler oldukça özeldir. A=T ve G=C baz eşleşmesi; baz eşlenikliği (tamamlayıcılığı, komplementeri) kavramının

temelidir. Bazlar arasındaki hidrojen bağı ile azotlu bazlar iplikçiğın içinde hemen hemen yatay biçimde istiflenerek su ile temas etmezler buna karşın şeker-fosfat iskeletinin su ile teması bulunmaktadır.

DNA'nın içinde bulunduğu ortamın pH değeri değıştirilirse ya da ortamın sıcaklığı artırılırsa bazlar arasındaki hidrojen bağları etkilenerek çift iplikçık yapı açılabilir. Şeker üniteleri arasındaki fosfodiester bağları ise hafif değışikliklerden etkilenmezler. Heliks yapısının yarısının açıldığı sıcaklığa, DNA'nın erime derecesi (T_m), DNA zincirinin tamamıyla açılarak çift heliks yapısının tamamıyla bozulmasına "denatürasyon" denir. G ve C arasında üç, A ve T arasında iki hidrojen bağı bulunduğundan yüksek derişimde G ve C taşıyan DNA diğerlerine göre daha yüksek sıcaklıklarda denatüre olur. Ilımlı koşullarda birbirinden ayrılan DNA zincirleri koşullar eskiye döndüğünde tekrar eski haline dönüşebilir; bu işlem, "renatürasyon" olarak adlandırılır. Tersiyer yapıda 2 DNA iplikçiğı uzayda sağ iplikçık şekilde bükülmüştür. Çift iplikli zincirdede biri küçük diğeri büyük olmak üzere iki zincir adımı vardır. Büyük zincir adımı 3.4 nm'dir ve 10 deoksınükleotit içerir. Şekil 1.19'de DNA'nın çift sarmal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1. 19. DNA çift sarmal yapısı (Klug ve Cumming, 2007).

Çift iplikçık şeklindeki molekülün bir zinciri $5' \rightarrow 3'$ yönüne doğru, diğeri ise $3' \rightarrow 5'$ yönüne doğru olduğu için ters yönde paraleldir. Heliks içinde, iki zincirin arasındaki üç boyutlu sistemdeki ilişki, büyük oluk (majör) ve küçük oluk (minör) oluşturmak şeklindedir. DNA'nın başlıca üç değışik şekli vardır. A, B ve Z olarak

adlandırılan bu türlerin çift iplikçik yapılarında farklılıklar mevcuttur. DNA heliksinin en sık rastlanan formu klasik B şeklidir (Dervan, 1998; Klug ve Cumming, 2007; Sinden, 1994).

1.4.3. Nükleik Asit Hibritleşmesi

Birbirini tamamlayan bazların (A-T, G-C) arasında oluşan hidrojen bağları yoluyla nükleik asit moleküllerinin ikisinin özel birleşmesine “hibritleşme (melezleme)” denir. Diğer bir deyişle; nükleik asit hibridizasyonu, baz çiftlerinin özel hibritleşme koşullarına bağlı olarak kararlı bir dubleks molekül oluşturmaktır. Hibritleşmede tekrar bir araya gelen tek zincirlerin aynı nükleik asitten kaynaklanma zorunluluğu olmadığı gibi DNA-RNA hibridizasyonu da gerçekleşebilir. Şekil 1.20’de DNA-RNA hibritleşmesi gösterilmiştir. Hibritleşme olayının dikkatli kontrolü için aşağıdaki değişkenlerin en iyi koşulları saptanmalıdır.

* Tuz derişimi

* Sıcaklık

* Vizkozite

* Katalizörler

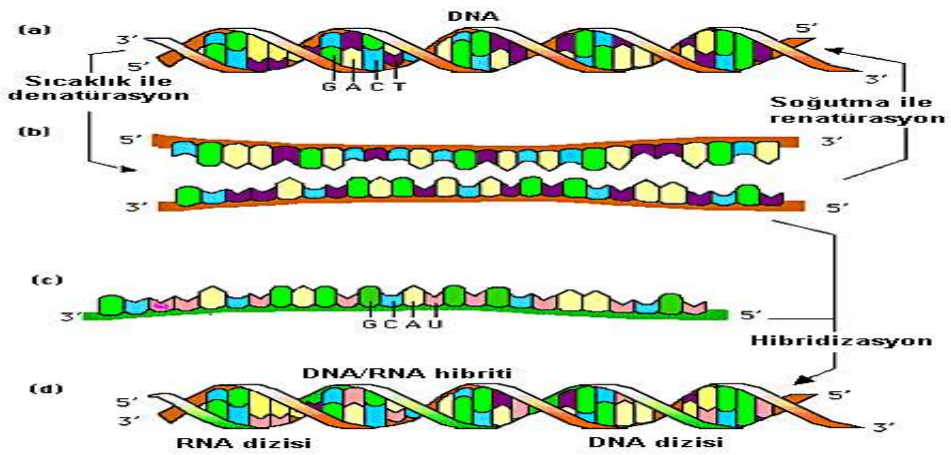
* Hibritleşme zamanı

* Baz bileşimi

* DNA dizisinin uzunluğu

* Ortamın pH değeri

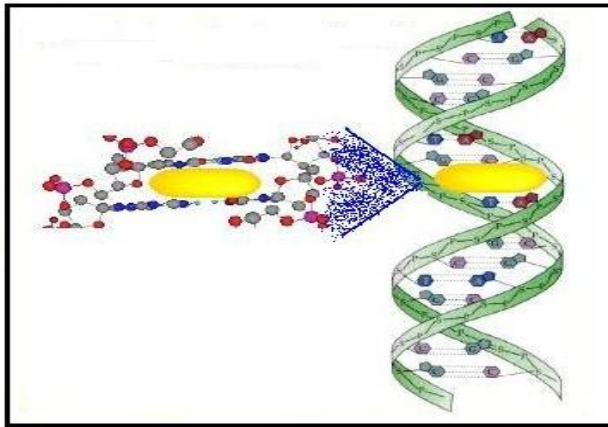
Bu değişkenlere dikkat edilmemesi bir ya da daha fazla bazın yanlış eşleşmelerine (mismatch) neden olacak ve zayıf hibridizasyon gerçekleşecektir (Bej, 1996).



Şekil 1. 20. Nükleik asit hibritleşmesi (Bej, 1996).

1.4.4. İnterkalasyon

Düzlemsel bir halka sistemine sahip olan bazı maddeler, DNA baz çiftleri arasına girerek, güçlü bir şekilde bağlanırlar (Bertino, 1992). Bu olaya “interkalasyon” denir (Şekil 1.21). Maddenin yapısına bağlı olarak, bu etkileşim tersinir ya da tersinmez şekilde gerçekleşebilir (Walkelin vd., 1976). İnterkalasyon, DNA' da zincir kırılmasına yol açarak DNA senteziyle birlikte DNA'ya bağımlı RNA sentezini de bozmaktadır. İnterkale olabilen bazı ilaçların etki mekanizmaları bu şekilde açıklanmaktadır (Gülmez, 2005).



Şekil 1. 21. İnterkalasyon (Gülmez, 2005).

1.5. DNA Biyosensörleri

DNA biosensörleri, bir çevirici sistem ile nükleik asit tanıma tabakasının birleştirilmesine dayanır. Bütün biosensörlerde olduğu gibi aletsel düzenek en azından moleküler bir tanıma tabakası, sinyal çevirici ve uygun bir okuyucu sistemden meydana gelir. Alaşılmış bir tasarıma göre; tek iplikçik prob (baz dizisi belli oligonükleotid) dizisi tanıma tabakasına (elektrot, kristal, çip) immobilize edilir, tanıma tabakasında baz çifti etkileşimi ile yüzeyde hedef DNA dizisi oluşturulur (Drummond vd., 2003).

Genelde hedef, DNA tanıma yüzeyine tutturulur, hibritleşme sonucu oluşan elektrik sinyalinden yararlanılarak analiz yapılır. DNA hibridizasyon biosensörleri genelde tek iplikçik bir oligonükleotid probunun çevirici yüzeye immobilizasyonu temeline dayanır. Burada amaç, hibritleşme ile hedef dizisinin belirlenmesidir (Tomschik vd., 1999; Molinier-Jumel vd., 1978).

DNA ve diğer moleküllerin arasındaki etkileşim, in-vivo DNA'nın transkripsiyonu ve replikasyonu, genlerin ve türlerin mutasyonu, bazı DNA'ya hedeflenmiş ilaçların mekanizmaları, bazı hastalıkların tayini, bazı sentetik kimyasal nükleazların hareket mekanizmalarının açıklanması açısından çok önemli bir konudur. Moleküler biyoloji ve biyoteknolojide son yıllarda görülen gelişmeler, DNA'ya dayalı elektrokimyasal biyosensörler için oldukça önemlidir. Antikor ve enzimlerden farklı olan nükleik asit tanıma tabakası, çok kararlı olan, kolaylıkla oluşturulabilen ve tekrar kullanım için yenilenebilen bir tabakadır (Brett vd., 1998; Steinbach ve Hurtubise , 2000; Özsöz vd., 2002; Wang vd., 2005).

1.5.1. DNA Biyosensörlerinde DNA ya da Prob Dizilerinin Elektrot Yüzeyine İmmobilize Edilme (Tutturulma) Yolları

Elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin geliştirilmesindeki temel aşamalardan birisi prob olarak kullanılacak DNA parçasının elektrot yüzeyine sağlam şekilde tutturulması basamağıdır. Eğer yüzeye probun en kolay ve sağlam şekilde tutturulması sağlanırsa, bu probun daha sonra hedefi ile hibritleşmesi daha kolay olacak ve oluşan hibritin çeşitli fiziksel ya da kimyasal etkenlerden etkilenip yüzeyden kopması gibi olumsuz etkiler de ortadan kalkacaktır.

Elektrot yüzeyine DNA bağlama (modifikasyon, immobilizasyon, tutturma) teknikleri:

1-Elektrostatik bağlanma

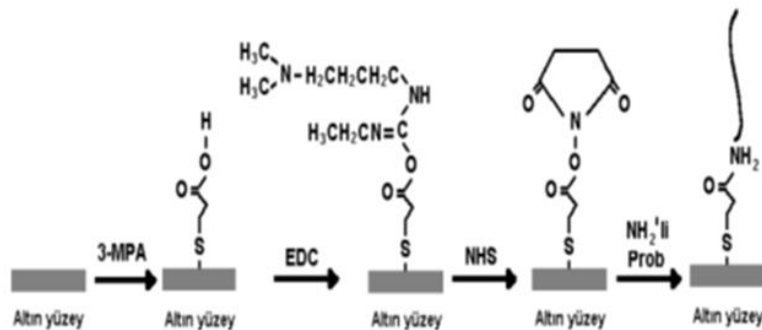
2-Kovalent bağlanma (altın elektrotlar ve karbon elektrotlar için)

3-Tiyol (-SH) grubu ile işaretli oligonükleotitin altın elektrod yüzeyine afinitesi nedeniyle tutturulması

Elektrostatik bağlanmada; elektrot yüzeyine pozitif gerilim uygulanması, negatif yüklü fosfat omurgasına sahip olan DNA'nın yüzeye elektriksel çekim kuvvetleri sayesinde tutunmasını sağlar.

Kovalent bağlanmada, altın elektrotlar (tek kullanımlık perde baskılı altın elektrotlar da olmak üzere) ve altın nanopartiküller için ilk olarak 3-merkaptopropiyonik asit ya da 1 sistein ile -SH gruplarının elektrot yüzeyine tutunması sağlanır. Burada -SH gruplarının altın metaline olan güçlü afinitesinden yararlanılır. Daha sonra N-hidroksisüksinimit (NHS) ve etil karbodiimmit (EDC) gibi kovalent ajanlar kullanılarak -NH₂ grubu ile işaretli probun yüzeyde güçlü şekilde tutunmasına olanak sağlayan zemin oluşturulur (Şekil 1.22). Bu yöntem, özellikle de altın elektrot için özel olan yüzey kaplama yöntemidir.

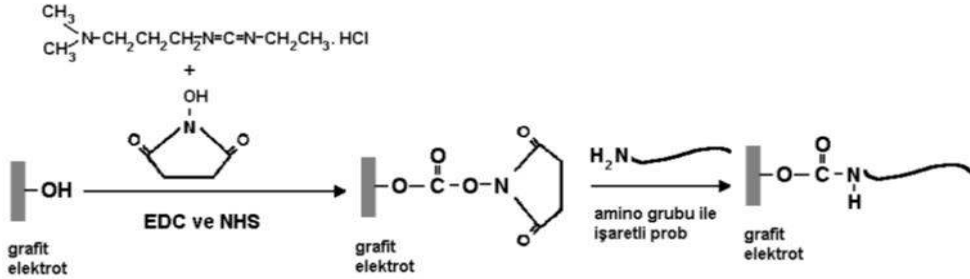
Ayrıca bu teknikle propiyonik asit gibi gruplar sayesinde DNA, elektrot yüzeyine dikey olarak düzenli şekilde tutturulduğu için hibritleşme çok daha rahat gerçekleşmektedir. Elektrot yüzeyinde düzenli bir tabakalanma oluşturulmaktadır.



Şekil 1.22. Altın elektrot yüzeylerinde kimyasal ajanlarla kovalent bağlanma (Gülmez, 2005).

Eğer elektrot olarak altın değil de çeşitli karbon (grafit) elektrodlar kullanılırsa bu durumda 3-merkaptopropiyonik asit gibi bir ajana gereksinim duyulmamaktadır (Şekil 1.23).

Sadece kovalent ajanlarla yapılan kaplamada $-NH_2$ grubu ile işaretli prob yüzeye doğrudan güçlü şekilde bağlanmaktadır (Coulet, 1991; Erdem ve Ozsoz, 2001, Gülmez, 2005).



Şekil 1.23. Grafit elektrot yüzeyinde kovalent ajanlarla yapılan NH_2 grubu ile işaretli DNA probu modifikasyonu (Gülmez, 2005).

1.5.2. DNA Biyosensörleriyle Dizi Algılama Yöntemleri

Çeşitli yöntemlerle biyolojik örneklerden özgün DNA dizisinin saptanması, moleküler tıp alanında çok önemlidir (Thayer, 1999). Hastalık tanısında insan, virüs ve bakteri baz diziliminin tayini ile pek çok kalıtsal hastalıklara neden olan mutasyonlar artık saptanabilmektedir. Hibritleşme tayinlerinde kullanılan çeşitli immünokimyasal ve voltametrik yöntemler karşılaştırıldığında voltametrik yöntemlerin daha hızlı yanıt verdiği gözlenir; ancak büyük miktarlarda bir seri örnek analizlenecekse iyi bir otomasyona sahip EIA (Enzyme Immuno Assay) gibi immünokimyasal tekniklerin kullanılması daha uygun olmaktadır (Palecek, 1996). Diziye özgü DNA biyosensörleri, bir çevrim sistemi ile beraber DNA probundan oluşmuştur. DNA biyosensörlerin esası, DNA bazlarının hibridizasyonuna dayanır (Herne ve Tarlov, 1997; Wang vd, 1998a). Elektrokimyasal DNA biyosensörleri, aranan hedef dizinin karşılığı olan 20–40 baz gibi kısa bir baz dizilimine sahip olan sentetik tek iplikçikli DNA (ssDNA) oligomerin (ya da ‘prob’ olarak isimlendirilir), elektrot yüzeyine bağlanmasına dayanmaktadır. Hedefi içeren bir örnek çözeltisine sensörün uygulanması ile elektrot yüzeyinde hibrit oluşur. Elektrokimyasal ölçümlerde elektrot yüzeyinde oluşan hibrit, iki yöntemle tayin edilir; bunlardan ilki bir elektroaktif indikatör aracılığıyla (örn. bir redoksaktif katyonik metal kompleksi)

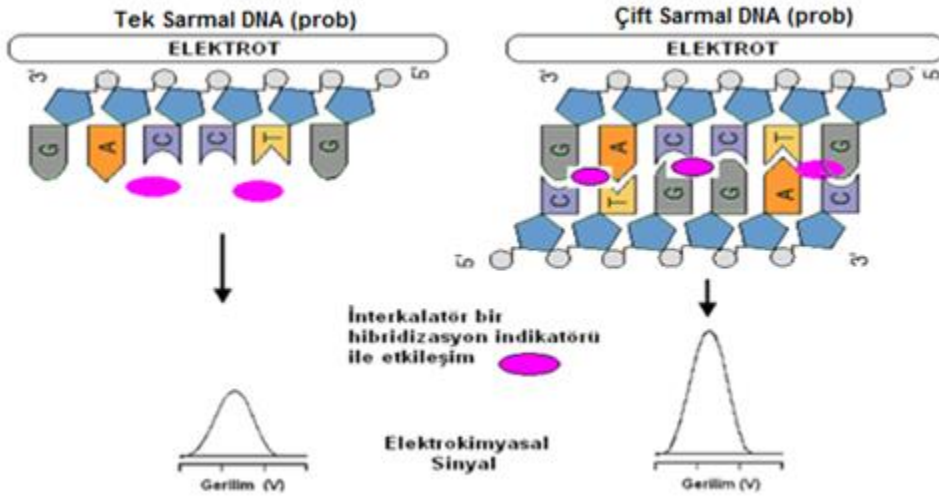
yapılan tayindir. Bu yöntemde yüzeyinde hibrit oluşan elektrot, indikatörü içeren çözeltiye daldırılır ve indikatörün hibrite bağlanma düzeyi belirlenir (Del Pozo ve ark., 2005; Millan ve Mikkelsen, 1993; Kadayıfcılar, 2003). Diğer yöntem ise DNA bazlarından elektroaktif olan Guanin bazının +1.0 V'da verdiği yükseltgenme sinyalinin farklılanmasından yola çıkılarak yapılan tayindir (Brett vd., 2000; Wang vd., 1998).

1.5.2.1 İndikatöre dayalı DNA dizi algılama yöntemleri

İndikatöre dayalı DNA dizi algılanması, ya DNA'ya interkale olabilen (metal kompleksleri, antibiyotikler) ya da DNA dizisindeki bazlarla özgün olarak etkileşen (Meldola mavisi, $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$, vb.) elektroaktif maddeler (indikatör) ile tayin edilebilmektedir. Elektrokimyasal çeviriciler, hibritleşme olayını analitik sinyale çevirmede etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Elektrot yüzeyinde oluşan hibrit ile etkileşen indikatörün neden olduğu artan ya da azalan elektrokimyasal yanıt, hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır.

Elektroaktif bir maddenin, indikatör olarak kullanılabilmesi için ssDNA (tek iplikçik) ve dsDNA (çift iplikçik) ile etkileşimi sonucu alınan yanıtlar arasında anlamlı bir fark olması gerekmektedir. $\text{Ru}(\text{II})$, $\text{Co}(\text{III})$, $\text{Os}(\text{II})$, $\text{Os}(\text{IV})$ 'ün 1,10-fenantrolin ve 2,2'-piridin kelatları hibridizasyon indikatörü olarak sıklıkla kullanılan maddelerdir (Kadayıfcılar, 2003).

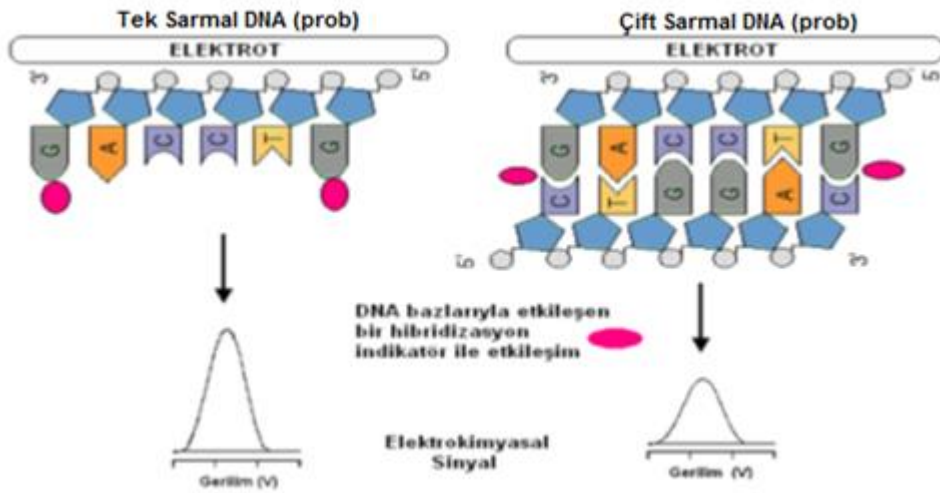
İnterkalatör madde ile DNA dizi algılama yöntemi: İnterkalasyon; bir maddenin DNA çift iplikçikli arasına girip birikmesidir. Bu durumda; Şekil 1.24'te gözlendiği gibi; dsDNA ile etkileşimden sonra alınan madde sinyali maddenin birikmesinden ssDNA ile etkileşimden sonra alınan madde sinyaline göre oldukça yüksektir.



Şekil 1.24. İnterkalatör bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması (Kadayıfçılar, 2003).

DNA bazlarının en az biriyle etkileşen bir indikatör ile DNA dizi algılama yöntemi:

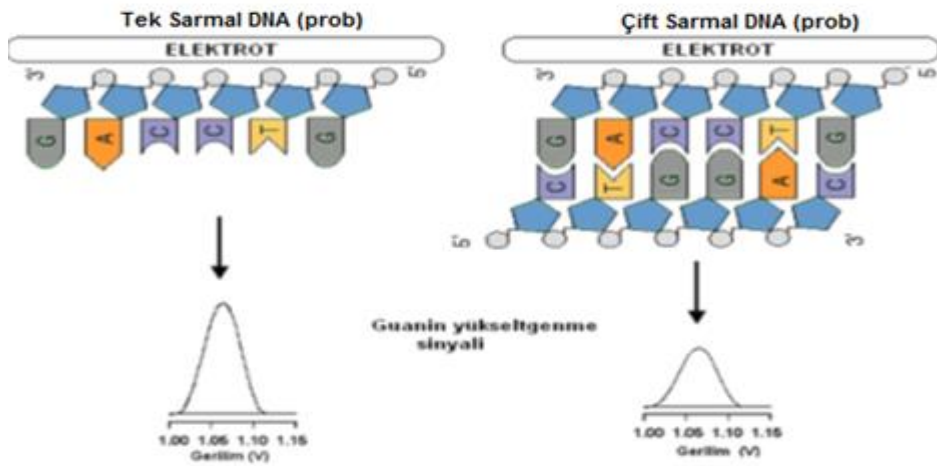
Hibridizasyon indikatörü olarak kullanılan madde DNA'nın bazlarından biriyle (özellikle Guanin) etkileşiyor olabilir. Bu durumda; Şekil 1.25'te gözlendiği gibi; ssDNA'da alınan madde sinyali (bazların açıkta olması nedeniyle), hibridizasyondan sonra oluşan dsDNA'da (bazlar kapalı olduğundan) alınan madde sinyaline oranla oldukça yüksektir. (Kadayıfçılar, 2003).



Şekil 1.25. DNA bazlarından biriyle etkileşen bir hibridizasyon indikatörü ile DNA dizi algılanması (Kadayıfçılar, 2003).

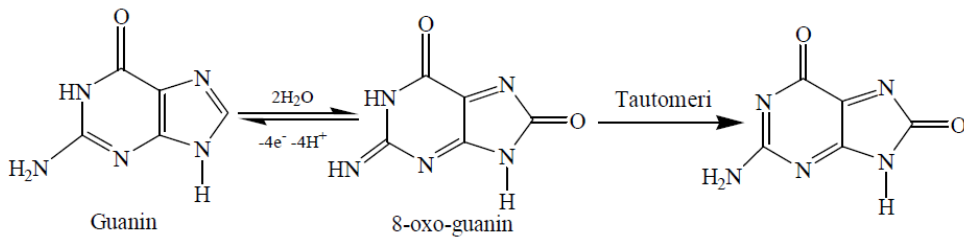
1.5.2.2. İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemleri

Elektrot yüzeyine tutturulan tek iplikçik prob dizisine (ssDNA) ait guaninlerin verdiği elektrokimyasal yanıt ile probun komplementeriyle birleşmesinden sonra oluşan çift iplikçik DNA'ya ait guaninlerden alınan elektrokimyasal yanıt arasında Şekil 1.26'de gözlendiği gibi önemli bir farklılık vardır. Bu farklılık hibridizasyonun tayinine yönelik bir sinyal olarak kullanılır.

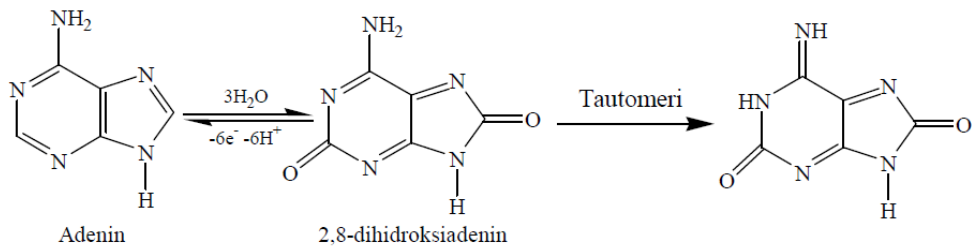


Şekil 1.26. İndikatörsüz DNA dizi algılama yöntemi (Kadayıfçılar, 2003).

Guanin ve adenine ait yükseltgenme şemaları şekil 1.27 ve 1.28’de verilmiştir.



Şekil 1.27. Guanin bazının yükseltgenmesi (Kadayıfçılar, 2003).



Şekil 1.28. Adenin bazının yükseltgenmesi (Kadayıfçılar, 2003).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Elektrokimyasal biyosensörler, kolay hazırlanması, hızlı yanıt vermesi, çok az miktarda numuneyle bile ölçüm yapılabilmesi gibi avantajları nedeniyle son yıllarda özellikle DNA biyosensörlerinin çok yaygın bir şekilde kullanılmasına neden olmuştur. Elektrot yüzeyinin çeşitli malzemelerle modifikasyonu, gerek yüzey alanını büyütmek, gerek spesifik bağlanmaları sağlamak, gerekse elektrokimyasal reaksiyonları katalizlemesi nedeniyle gün geçtikçe daha yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Modifiye elektrotlarla DNA hibridizasyonuna dayalı çalışmalar kısaca özetlenmiş ve ayrıca tablo halinde verilmiştir.

Kuralay ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, kalem grafit elektrot yüzeyi polivinilferrosenyum ile modifiye edilmiş ve bu modifiye elektrot DNA hibridizasyonun elektrokimyasal tayininde kullanılmıştır (Kuralay vd. 2009).

Muti ve arkadaşları tarafından geliştirilen benzer bir çalışmada kalayoksit nanopartikülleri (SNP) ile desteklenmiş polivinil ferrosen modifiye tek kullanımlık elektrotlar DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayininde kullanılmıştır (Muti vd., 2010)

Tek kullanımlık kalem grafit elektrotların grafen (GRP) ile modifiye edildiği diğer çalışmada kalem grafit elektrot ile camı karbon elektrot yüzeyinde DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayini gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar her iki elektrot açısından karşılaştırılmıştır (Muti vd., 2011).

Muti ve arkadaşları DNA hibridizasyonuna dayalı bir diğer çalışmasında tek duvarlı karbon nanotüp tutuklanmış polivinil ferrosen modifiye tek kullanımlık kalem grafit elektrotları etiketsiz DNA hibridizasyon tayininde kullanmışlardır (Muti vd., 2012).

Diazonyum ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyinde DNA hibridizasyonunun tayin edildiği bir başka çalışma Mashhadizadeh ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Altın elektrot önce 5-amino-2-mercapto-1, 3, 4-thiadiazol (AMT) içeren çözeltiye daldırılmak suretiyle elektrot yüzeyinde kendiliğinden biriktirilmiştir. Sonra basit diazonizasyon reaksiyonu ile diazonyum modifiye elektrot elde edilmiştir. Elektrodun DNA hibridizasyon tayininde kullanılabilirliğinin araştırıldığı çalışmada, doğrusal çalışma derişim aralığı 7.9×10^{-11} – 1.2×10^{-7} mol/L olarak bildirilmiş, tayin sınırı ise 1.4×10^{-11} mol/L olarak hesaplanmıştır (Mashhadizadeh vd., 2013).

Camsı karbon elektrodun poli(5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiadiazol) (PAMT) ile modifiye edildiği bir başka çalışmada ilaç maddesi nitrofurantoin ile çift sarmal DNA arasındaki etkileşim incelenmiştir. Modifiye elektrot yüzeyinde nitrofurantoin ile dsDNA arasındaki etkileşim diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak incelenmiş ayrıca elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu, elektrokimyasal empedans spektrometri (EIS) tekniği ile karakterize edilmiştir (Aydoğdu vd., 2014).

Ferreira ve arkadaşları grafit elektrot yüzeyini elektropolimerizasyon yoluyla poli 3-hidroksibenzoik asid ile modifiye ettikleri çalışmada modifikasyon koşullarını optimize ettikten sonra elde edilen yüzeyi DNA hibridizasyon tayininde kullanmışlardır (Ferreira vd., 2014).

İletken polimer ve iyonik sıvı ile modifiye edilerek hazırlanan kompozit elektrot yüzeyinde DNA hibridizasyonunun tayin edildiği bir başka çalışma Dülgerbaki ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. İyonik sıvı içeren ortamda poli alkil dioksi tiyofen ile modifiye edilmiş fluorene katkılı kalay oksit kaplı cam elektrot yüzeyi modifiye edilmiş, söz konusu yüzeyin biyolojik yeteneği literatürdeki diğer çalışmalarla kıyaslanmıştır (Dulgerbaki vd. 2014).

Elektrokimyasal olarak polimerleştirilmiş Eriochrome Black T ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrot yüzeyinde DNA hibridizasyonunu tayin ettikleri çalışmada Wang ve arkadaşları sensörün tayin sınırını 0.11 fM olarak bulmuşlar ve çalışma doğrusal derişim aralığını 5.0 fM- 5.0 pM olarak bildirmişlerdir (Wang vd., 2014).

Zhu ve arkadaşlarının DNA hibridizasyonunun elektrokimyasal tayini için geliştirdikleri bizmut sülfid (Bi_2S_3) nano malzeme ile desteklenmiş polianilin modifiye iyonik sıvı karbon pasta elektrotlar DNA hibridizasyonunun impedimetrik tayini için kullanılmıştır (Zhu vd., 2015).

Molekül baskılı polimer modifiye karbon pasta elektrodun DNA hibridizasyonunda kullanıldığı bir diğer çalışmada, metilen mavisi baskılanmış polimer modifiye elektrot yüzeyine, MB geri bağlanmış ve katyonik boya olması nedeniyle pozitif yüklü olan MB ile fosfat grupları nedeniyle negatif yüklü DNA arasındaki elektrostatik etkileşimle DNA elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Elde edilen sensör, DNA hibridizasyonunda kullanılmış, sensörün kendi tamamlayıcısı olan hedef DNA dizisine yüksek seçicilikle bağlandığı bildirilmiştir (Muti vd., 2015)

Çizelge 2.1. Modifiye elektrotlarla DAN hibridizasyonuna dayalı yapılmış çalışmalar

Elektrot	Modifikasyon	Analit	Teknik	Literatür
PGE ⁽¹⁾	(PVF ⁺) ⁽²⁾	DNA Hibridizasyonu	CV ⁽³⁾ , DPV ⁽⁴⁾	Kuralay vd., 2009)
PGE	PVF ⁺ -SNP ⁽⁵⁾	DNA Hibridizasyonu	DPV, EIS ⁽⁶⁾	Muti vd., 2010
PGE, GCE ⁽⁷⁾	GRP ⁽⁸⁾	DNA Hibridizasyonu	DPV, EIS	Muti vd., 2011
PGE	PVF ⁺ -SWCNT ⁽⁹⁾	DNA Hibridizasyonu	DPV, EIS	Muti vd., 2012
AuE ⁽¹⁰⁾	AMT ⁽¹¹⁾	DNA Hibridizasyonu	CV, DPV, EIS	Mashhadizadeh vd., 2013
GCE	(PAMT) ⁽¹²⁾	DNA Hibridizasyonu	CV, DPV, EIS	Aydoğdu vd., 2014)
GCE	Poly 3-HBA ⁽¹³⁾	DNA Hibridizasyonu	CV, DPV	Ferreira vd., 2014
Flüoren kalay oksit (FTO) kaplı cam	PProDOT ⁽¹⁴⁾ Me ₂ -PProDOT ⁽¹⁵⁾ Et ₂ -PProDOT ⁽¹⁶⁾	DNA Hibridizasyonu	CV	Dulgerbaki vd., 2014
GCE	pEBT ⁽¹⁷⁾	DNA Hibridizasyonu	CV, DPV, EIS	Wang vd., 2014
GCE	PANI ⁽¹⁸⁾ /Bi ₂ S ₃	DNA Hibridizasyonu	CV, EIS	Zhu vd., 2015
CPE ⁽¹⁹⁾	MB ⁽²⁰⁾ imprinted polymer	DNA Hibridizasyonu	DPV	Muti vd., 2015

1: Kalem grafit elektrod 2: Polivinilferronsiyum 3: Dönüşümlü voltametri 4: Diferansiyel puls voltametri 5: Kalayoksit nanopartikül 6: Elektrokimyasal Empedans Spektrometri 7: Camsı karbon elektrod 8: Grafen 9: Tek duvarlı karbon nanotüp 10: Altın elektrot 11: 5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiadiazol 12: poli 5-amino-2-merkapt-1,3,4-tiadiazol 13: Hidroksibenzoik asit 14: Poly (3,4-propylenedioxythiophene) 15: poly(3,4-dimethylpropylenedioxythiophene) 16: poly(3,4-diethylpropylenedioxythiophene) 17: Poli Eriochrome Black T 18: Poli anilin 19: Karbon pasta elektrot 20: Metilen mavisi.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan Kimyasal	Marka
5-amino 1,3,4-tiyadiazol 2-tiyol (AMT)	Sigma-Aldrich
Potasyum hegza siyano ferrat ($K_4[Fe(CN)_6]$)	Sigma-Aldrich
Potasyum hegza siyano ferrit ($K_3[Fe(CN)_6]$)	Sigma-Aldrich
Sülfirik Asit (H_2SO_4)	Merck
Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür ($C_4H_{12}ClNO_3$)	Sigma-Aldrich
Asetik Asit (%99-100) (CH_3COOH)	Merck
Sodyum hidroksit ($Na(OH)$)	Merck

3.2. Deneyde Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihaz	Üretici Firma
Ivium Compact Stat (Elektrokimyasal analizör)	Ivium Technologies B.V.
Ultra saf su cihazı	LABCONCO WaterPro PS
Ag/AgCl referans elektrot	BASI
Pt karşıt elektrot	BASI
Vorteks	Classic, Velp Scientifica
Manyetik karıştırıcı	MS 3000 serisi, Misung Scientific Co.
Sonikatör	Bandelin Sonorex
pH metre	Orion

3.3. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

5-amino 1,3,4-tiyadiazol 2-tiyol (AMT): Günlük olarak 1 mM derişiminde hazırlandı. 0.133 g AMT, 10 mL 0.5 M fosfat tamponu içerisinde (PBS) 30 dakika sonikatörde bekletilerek çözüldü.

Stok Oligonükleotid Çözeltileri: Sentetik oligonükleotidler TIB MOLBIOL (Almanya) firmasından satın alındı. Bu çalışmada Hepatit B virüsünü (HBV) temsil

eden prob dizisi kullanılmıştır. Söz konusu bu prob dizileri daha önce hibridizasyonla ilgili yapılan çalışmalarda (Erdem vd., 2005) olduğu gibi HBV'yi temsil eden gen haritasından seçildi ve guanin bazı içermeyen prob dizisinin kullanılması, indikatörsüz hibridizasyon tayinini sağlaması açısından çalışmamıza önemli bir avantaj kazandırdı.

Oligonükleotidlerin baz dizilimi aşağıdaki gibidir:

- ✓ *Tiyol işaretli poly adenin DNA: (21 baz; poly A):*

5'-SH-(CH₂)₆-AAA AAA AAA AAA AAA AAA-3'

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

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

- ✓ *Hedef DNA (20 baz):*

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

- ✓ *Tek-bazı farklı dizi (mismatch) (20-baz; MM):*

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

- ✓ *Rastgele dizi (Noncomplementary) (23-baz; NC):*

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

DNA stok çözeltileri 500 µg/mL olacak şekilde Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH:8.00; TE) tampon çözeltisi içinde hazırlandı. Stok çözeltiler -20°C'de saklandı.

Tüm prob DNA çözeltisi seyreltmeleri 20 mM NaCl içeren 0.5 M asetat tampon çözeltisinde (pH:4.80; ABS) yapıldı.

Hedef – NC - MM DNA seyreltmeleri ise 20 mM NaCl içeren 0.02 M Tris HCl tampon çözeltisi (pH:7.0, TBS) içinde yapıldı.

3.3.2. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

0.5 M Asetat (ABS) tampon çözeltisi:

Kullanılan 0.50 M asetat tampon çözeltisi litresinde 28.9 mL asetik asit ve 1.168 g NaCl (0.02 mol) içermektedir. Asetat tamponunun oluşturulması ve çözeltinin pH'sının 4.8 değerine ayarlanması 0.1 N NaOH ilavesiyle pH metre ile ölçülerek gerçekleştirildi.

0.5 M Fosfat (PBS) tampon çözeltisi:

Kullanılan 0.5 M PBS litresinde 1.36g KH_2PO_4 , 6.96g K_2HPO_4 ve 1.168g NaCl içermektedir. Çözeltinin pH'sı gerektiğinde 1N NaOH ya da 1N HCl ilavesiyle pH metre kullanılarak pH 7.4 e ayarlandı.

10 mM TRIS-EDTA Oligo stok çözeltisi:

Tris-EDTA oligo stok çözeltisi 50 mL'sinde 0.0788g (78.8 mg) Tris-HCl (Trisma Hidroklorür) ve 0.0186g (18.6 mg) EDTA içermektedir. pH metre ile gerektiğinde 0.1 N HCl ya da 0.1 N NaOH ilavesiyle pH 8.0 e ayarlandı.

0.02 M Tris-HCl tampon çözeltisinin hazırlanması (TBS)

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

3.3.3. Redoks Çözeltisinin Hazırlanması

Empedans ölçümlerinde kullanılan redoks çözeltisi, litresinde 0.822 g $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1.040 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ve 7.45 g KCl içerecek şekilde ultra saf suda hazırlandı.

3.4. Voltametik Ölçümler

Tüm elektrokimyasal ölçümlerde üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Çalışma elektrodu olarak kalem grafit elektrot (Tombow uç), referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot, yardımcı elektrot olarak ise platin tel kullanılmıştır. Tüm voltametik ölçümler ABS (0.5 M pH:4.8) içinde, elektrokimyasal empedans

spektrometri ölçümleri ise 0.1 M KCl içeren 2.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ (1:1) karışımı içinde Faraday kafesinde gerçekleştirilmiştir.

Çevrimli Voltametri (CV) Koşulları:

$E_{\text{başlangıç}}$: -0.400 V

$E_{\text{çevrim}}$: 1.700 V

E_{son} : -0.400 V

$E_{\text{adım}}$: 5 mV

Tarama hızı : 100 mV/s

Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Koşulları:

$E_{\text{başlangıç}}$: 0.000 V

E_{son} : 1,500 V

Puls süresi : 50 ms

Puls genliği : 50 mV

$E_{\text{adım}}$: 5 mV

Tarama hızı : 50 mV/s

3.5. Deneylerde Kullanılan Çalışma Elektrotların Hazırlanması

3.5.1. Kullanılan Kalem Grafit Elektrodun (PGE) Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan kalem grafit elektrot, Live firmasından satın alındı. (Tombow, HB, 0.5 mm). Elektrotlar Tombo marka kalem uçlarının 3.0 cm boyutunda kesilmesiyle hazırlandı (Özsöz vd., 2002; Wang vd., 2001) Elektrokimyasal hücre içerisinde 1.0 cm kalacak şekilde kalem içerisine yerleştirildi.

3.5.2. Elektrotların AMT ile Modifikasyonu

3.5.2.1. Elektrot modifikasyonunda döngü sayısının optimizasyonu

Yüzeyi modifiye edilmemiş yalın elektrotlar 0.1 M H_2SO_4 içeren 1mM AMT çözeltisi içerisinde -0,4 ile +1,7 V potansiyel aralığında, 50 mV/s tarama hızında, farklı döngü sayıları (5, 10, 15) uygulanarak dönüşümlü voltammetri tekniği ile modifiye edildi. Farklı döngü sayıları uygulanarak kaplanmış olan elektrotların elektron transfer direncindeki değişim elektrokimyasal empedans spektrometri (EIS) tekniği kullanılarak ölçüldü. Ayrıca farklı döngü sayıları uygulanarak kaplanmış elektrotların yüzeyine poli-Adenin DNA immobilize edilerek adenin yükseltgenme sinyalleri diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak ölçüldü. Dönüşümlü voltametri tekniğinde tarama hızı, daha önceki çalışmada optimize edildiği şekilde 100 mV/s olarak uygulandı (Muti vd. 2013)

3.6. Poli-AMT ile Modifiye Edilmiş Elektrot Yüzeyine DNA İmmobilizasyonu

3.6.1. Modifiye Sensör ile Yalın Sensörün DNA Sinyali Açısından Karşılaştırılması

Yüzeyi modifiye edilmemiş (yalın) ve poli-AMT ile modifiye edilmiş PGE'ler, 8 $\mu\text{g/mL}$ tiyol (SH) işaretli DNA (poli adenin) çözeltisi içeren viyallere daldırıldı ve pasif adsorbsiyon yöntemine göre bu viyaller içinde 1 saat süreyle bekletildi. Daha sonra, PGE'ler spesifik olmayan adsorbsiyonun uzaklaştırılması için 10 saniye boyunca ABS ile yıkandı. DNA yanıtları, adenin yükseltgenme sinyali diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak ölçüldü ve yalın ve poli-AMT modifiye elektrotlar açısından karşılaştırıldı.

3.6.2. Elektrot Yüzeyine İmmobilize Edilecek Optimum DNA Derişiminin Saptanması

Yüzeyi poli-AMT ile modifiye edilmiş PGE'ler farklı derişimlerde (1, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$) tiyol (SH) ile işaretli DNA çözeltisine (poli-adenin) çözeltisine 1 saat süre ile daldırıldı. 1 saatin sonunda elektrotlar 10 saniye boyunca asetat tampon çözeltisine daldırılarak yıkandı ve adenin yükseltgenme sinyali DPV tekniği ile ölçüldü.

3.6.3. Modifiye Sensör ile Seçimlilik Çalışmaları

Poli-AMT PGE yüzeyine önce 8 µg/mL guanin bazı içermeyen SH işaretli HBV prob dizisi immobilize edildi. Elektrotlar 10 saniye ABS içerisine daldırılarak yıkandı ve bu kez 8 µg/mL hedef DNA, bir bazı hedef diziden farklı olan dizi (MM) ve rastgele DNA dizisi (NC)'ne yine 1 saat süre ile daldırıldı. 1 ssatin sonunda elektrotlar bu kez TBS ile yıkanarak spesifik olmayan bağlanmalar uzaklaştırıldı ve elektrotlar ölçüme hazır hale getirildi.

3.7. Poli-AMT ile Modifiye Edilmiş PGE ile HBV-DNA Hibridizasyonunun Elektrokimyasal Empedans Spektrometri Tekniği İle İncelenmesi

Kalem grafit elektrotların;

Yalın halde,

Poli-AMT ile modifikasyondan sonra,

Poli-AMT yüzeyine 8 µg/mL DNA immobilizasyonundan sonra,

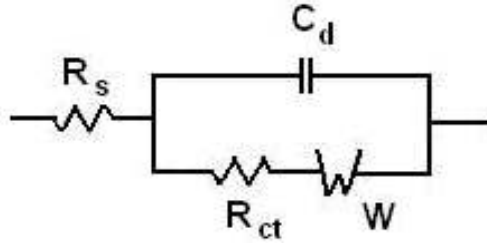
Poli-AMT yüzeyinde prob DNA'nın;

8 µg/mL hedef DNA,

8 µg/mL MM ve

8 µg/mL NC ile

hibridizasyonundan sonra redoks çözeltisi (0.1 M KCl içeren 2.5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ (1:1) karışımı) içerisinde elektron transferine karşı gösterdikleri direnç, açık devre potansiyelinde (0.24 V) adım adım yukarıdaki sırayla ölçüldü. Ayrıca tüm empedans çalışmalarında elektron transfer direnci (R_{ct})'lerin ölçülmesinde kullanılan devre modeli aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Şekil 3.1. EIS devre modeli

Yukarıdaki şekilde;

R_s , çözelti direncini,

C_d , DNA/ elektrot ara yüzeyindeki ara yük kapasitansını,

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

W : Elektrot yüzeyindeki kütle transferinden kaynaklanan Warburg empedansını göstermektedir.

3.8. Yalın ve Modifiye Elektrotların Spektroskopik Karakterizasyonu

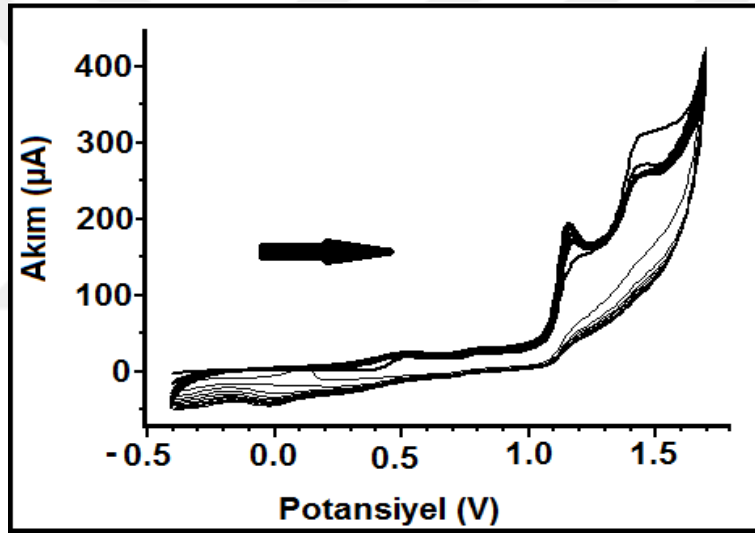
3.8.1. AMT ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeylerinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile Karakterizasyonu

Yalın PGE, poli-AMT ile modifiye edilmiş PGE ve yüzeyine DNA immobilize edilmiş PGE yüzeylerinin mikroskobik karakterizasyonu, alan emisyonu taramalı elektron mikroskobu ile (hızlandırma potansiyeli 5.0 KV) İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde uzman personel tarafından gerçekleştirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. AMT'nin Elektrokimyasal Davranışının Belirlenmesine İlişkin Elde Edilen Bulgular

Elektrokimyasal davranışının dönüşümlü voltametri tekniği ile belirlendiği çalışmada AMT'nin 0.505 V, 0.775 V, 1.18 V ve 1.43 V'ta olmak üzere 4 adet yükseltgenme ve - 0.015 V'ta 1 adet indirgenme sinyali verdiği gözlenmiştir.

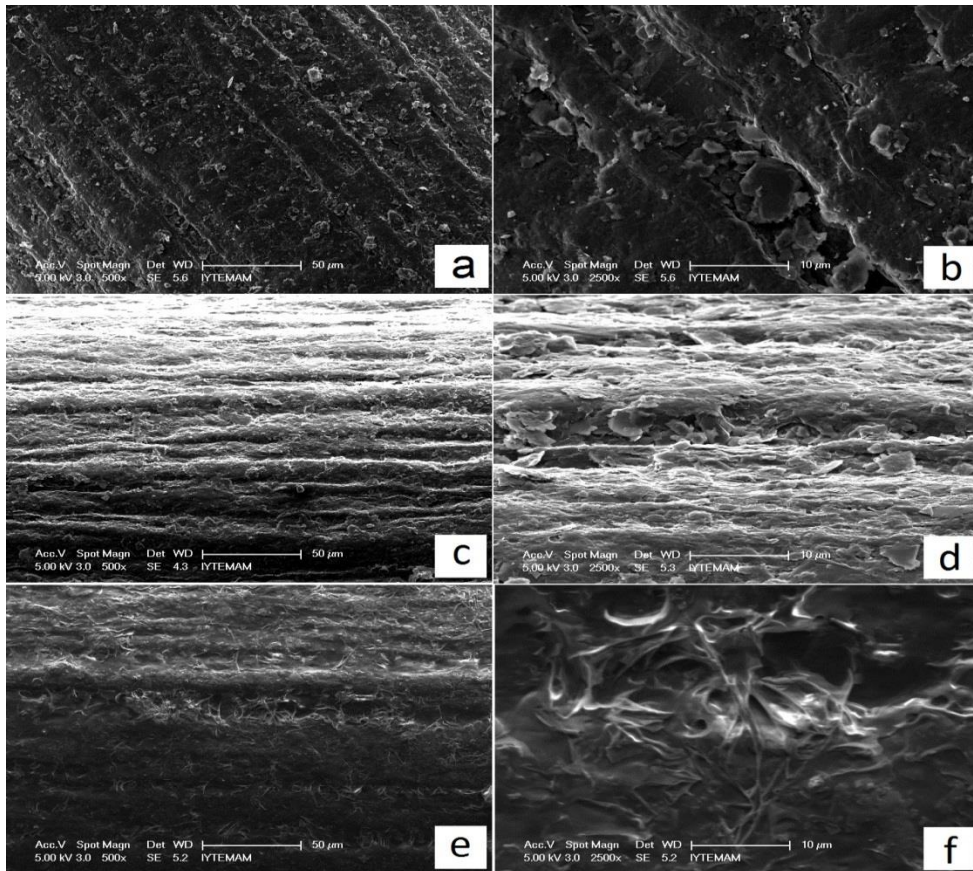


Şekil 4. 1. AMT'nin dönüşümlü voltamogramı

4.2. Yalın ve Modifiye Elektrotların Spektroskopik Karakterizasyonuna İlişkin Elde Edilen Bulgular

Yalın PGE, poli-AMT ile modifiye edilmiş PGE ve yüzeyine DNA immobilize edilmiş PGE yüzeylerinin mikroskobik karakterizasyonu iki farklı büyütme için 500 (a, c, e) ve 2500 (b, d, f) şekil 4.2 de görülmektedir. Modifiye olmamış (yalın) PGE'nin pürüzlü yüzeyi şekil 4.2 (a,b)'de görülmektedir. Elektrot yüzeyinin elektroaktif poli-AMT ile modifiye edildiğinde (c,d) yalın elektroda (a,b) kıyasla daha pürüzsüz olması yüzeyin polimer film ile kaplanması nedeniyledir. Ayrıca poli-AMT ile modifiye edilmiş yüzeyin (c,d) daha parlak görülmesi, elektrot yüzeyinin elektroaktif bir molekül tarafından modifiye edildiğinin bir kanıtı olarak görülebilir. Poli-AMT ile modifiye edilmiş elektrot

yüzeylerindeki parlak görüntünün e ve f resimlerinde kaybolmasının, yüzeye DNA immobilize olması nedeniyle olduğu düşünülebilir.

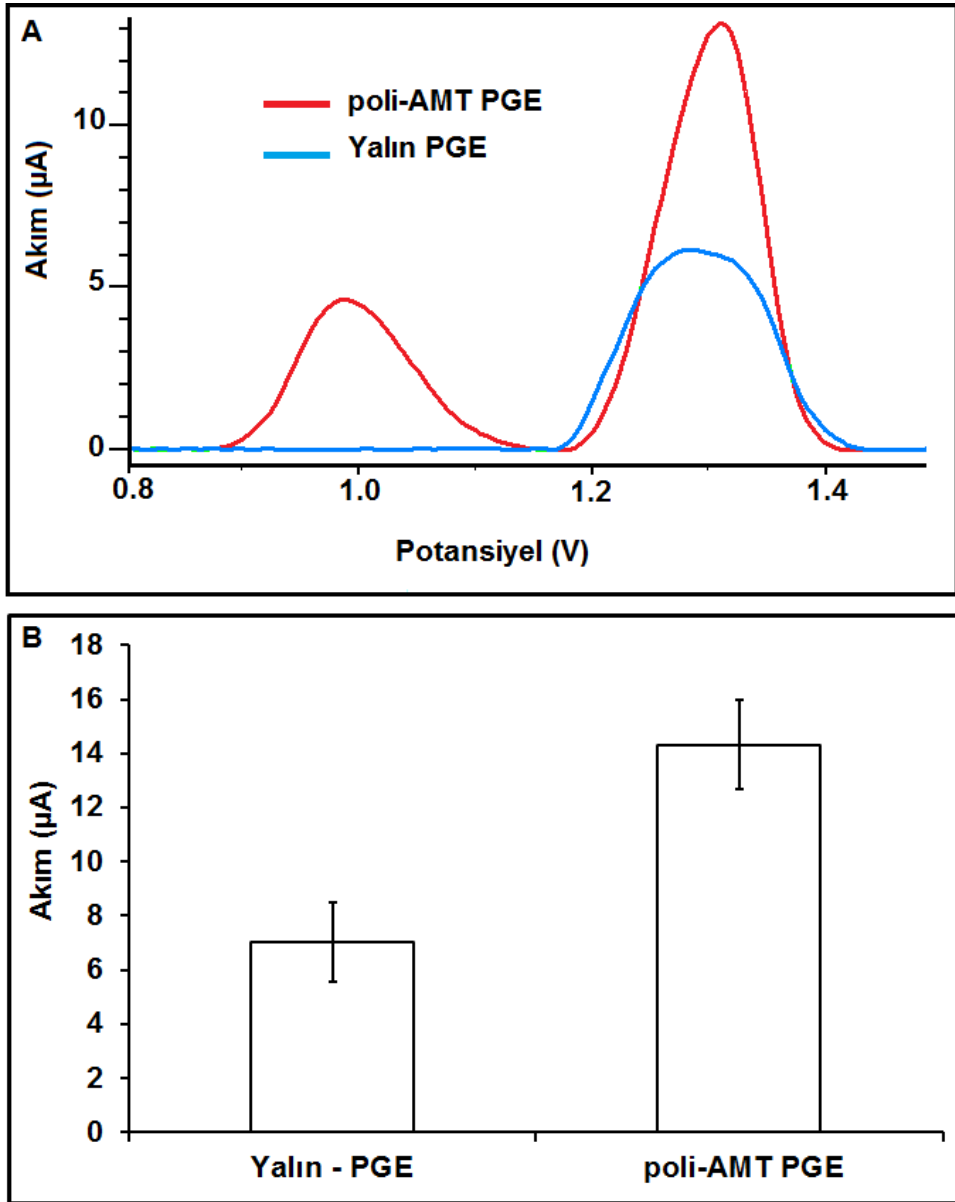


Şekil 4. 2. Yalın PGE (a,b), poli-AMT PGE (c,d) ve DNA immobilize edilmiş poli-AMT PGE'ye (e,f) ait SEM fotoğrafları. 500 büyütme (a,c,e) ve 2500 büyütme (b,d,f).

4.3. Yüzeyi AMT ile Modifiye Edilmiş PGE Yüzeyinde DNA Tayini

4.3.1. Poli-AMT PGE ile Yalın PGE'nin Adenin Yükseltgenme Sinyalleri Açısından Karşılaştırılması

Yüzeyine 20 $\mu\text{g/mL}$ DNA çözeltisi (SH işaretli poli adenin) immobilize edilmiş Yalın-PGE ve poli-AMT ile modifiye edilmiş PGE'lerin adenin yükseltgenme sinyalleri 0.5 M ABS tamponunda ölçüldü. Yüzeyi poli-AMT ile modifiye edilmiş elektrotla (14.3 μA , RSD=%11.5) yalın elektrotla (7.02 μA , RSD=%21.1) kıyasla 2 kat yüksek adenin sinyali elde edildi.

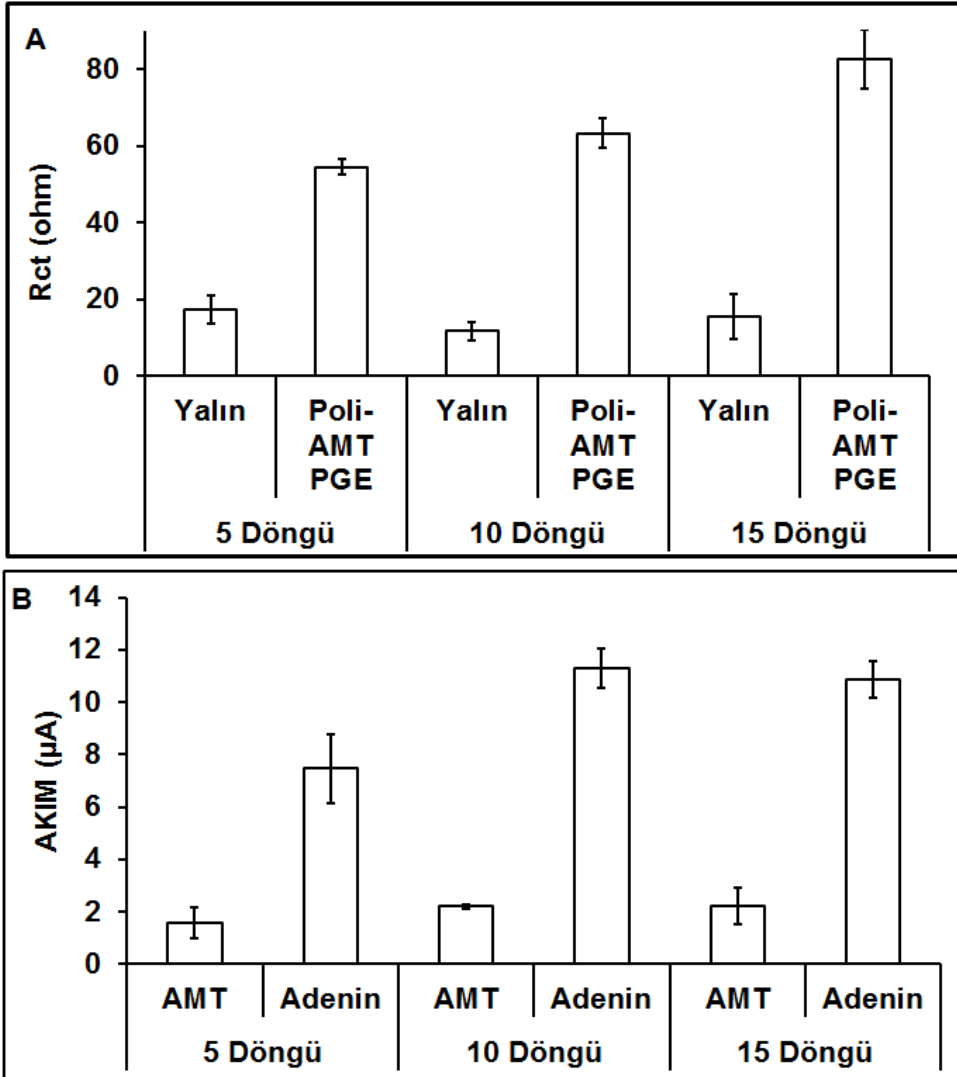


Şekil 4.3. Poli-AMT PGE ile yalın PGE'nin Adenin yükseltgenme sinyalleri açısından karşılaştırılması, Adenin yükseltgenme sinyaline ait A) diferansiyel puls voltamogramı ve B) histogram

4.3.2. Elektrot Modifikasyonunda Döngü Sayısının Optimize Edilmesine İlişkin Elde Edilen Bulgular

Elektrot yüzeyini poli-AMT ile modifiye etmede dönüşümlü voltametri tekniği kullanıldı. Elektrot yüzeyini en yüksek miktar ve kararlılıkta poli-AMT film ile kaplamak için uygulanacak döngü sayısını belirlemek amacıyla, 5, 10 ve 15 döngü uygulanarak kaplanan elektrotların elektron transfer direnci EIS tekniği kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlar şekil 4.4 A da görülmektedir. Hazırlanan 3 farklı grup elektrodun poli-AMT ile modifiye edilmeden önce ve sonra elektrot ile elektrolit ara yüzeyinde gerçekleşen elektron transfer direnci (R_{ct}) ölçüldü. R_{ct} değerlerindeki en yüksek farklanma (5.43 kat) 10 döngü uygulanarak kaplanan elektrotlarda ölçüldü.

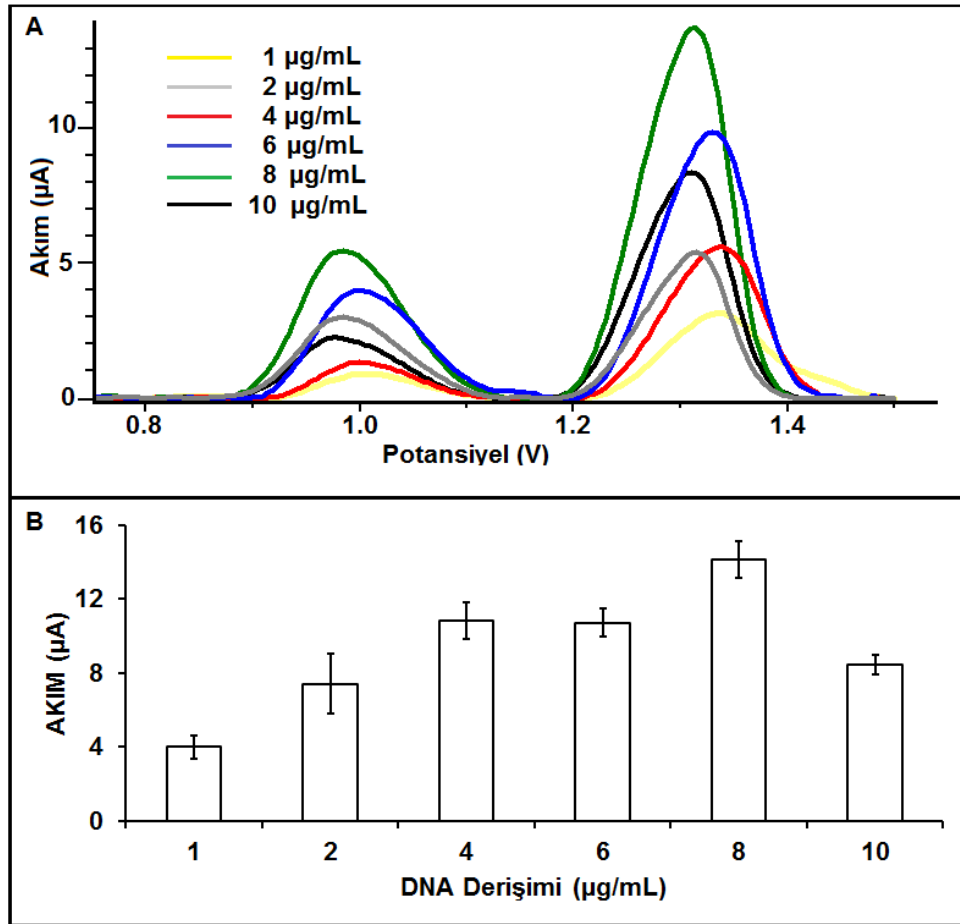
Ayrıca farklı döngü sayıları uygulanarak modifiye edilen elektrotlar ile adenin yükseltgenme sinyalleri ölçüldü (şekil 4.4 B). En yüksek sinyal yine 10 döngü uygulanarak modifiye edilen elektrotlar ile elde edildi (11.3 μA , RSD=% 6.6). Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda elektrotların dönüşümlü voltametri tekniği ile modifiye edilmesinde 10 döngünün uygulanmasına karar verildi.



Şekil 4.4. Farklı döngü sayıları uygulanarak elde edilmiş poli-AMT PGE'lerin A) Rct değerlerindeki farklanmayı B) AMT ve Adenin yükseltgenme sinyallerini gösteren histogram.

4.3.3. Poli-AMT PGE Yüzeyine İmmobilize Edilecek Optimum DNA Derişiminin Saptanması

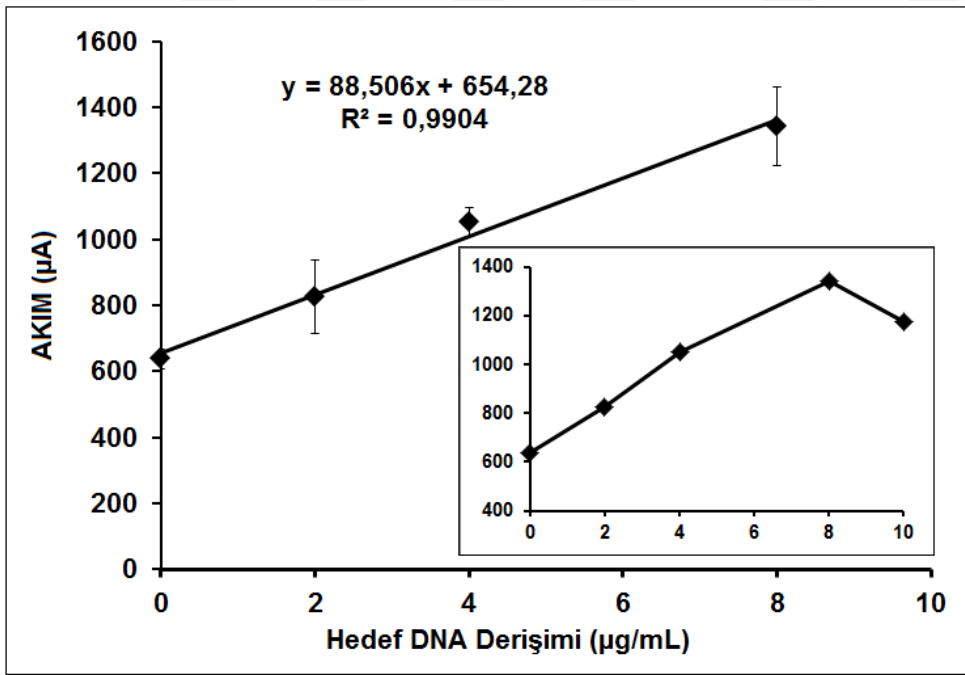
Poli-AMT PGE yüzeyine immobilize edilecek optimum DNA derişiminin saptanması için yapılan deneyde 1, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g/mL}$ poli adenin immobilize edilmiş elektrotlar ile elde edilen adenin yükseltgenme sinyalleri şekil 4.5'te görülmektedir. En yüksek adenin sinyalinin 8 $\mu\text{g/mL}$ DNA immobilizasyonu sonucu elde edilmesi, modifiye elektrot yüzeyine en yüksek miktarda bağlanacak DNA derişiminin 8 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5. Yüzeyine farklı derişimlerde DNA immobilize edilmiş poli-AMT PGE ile elde edilen adenin yükseltgenme sinyallerini gösteren A) voltamogram B) histogram.

4.3.4. Poli-AMT PGE Yüzeyinde HBV Hibridizasyonunun Gerçekleştiği Optimum Hedef DNA Derişiminin Saptanması

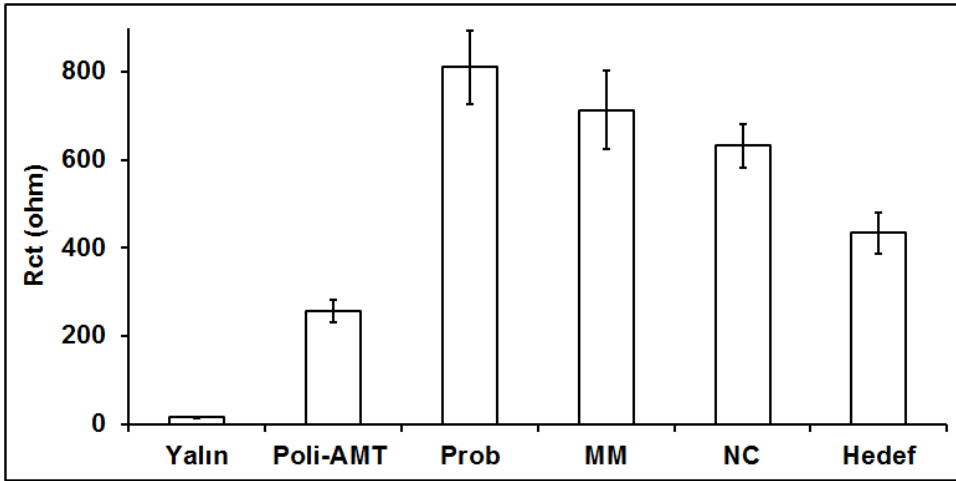
Yüzeyine 8 µg/mL HBV prob immobilize edilmiş poli-AMT PGE yüzeyinde prob ile hibritleşecek optimum hedef DNA konsantrasyonunun belirlendiği bu çalışmada 2 µg/mL'den 10 µg/mL'ye kadar değişen derişimlerde hedef DNA kullanılarak hibridizasyon sonrası guanin bazının yükseltgenme sinyalleri ölçüldü. Çalışmada kullanılan hedef DNA dizisi, 3. bölümde belirtilen, hepatit B virüsünü temsil eden ve guanin bazı içermeyen dizidir. Bu dizi hedef dizi ile hibridize olduğunda, hibridizasyonun derecesine bağlı olarak, hedef dizideki guanin yükseltgenme sinyalinde artışlar ortaya çıkmaktadır. Elde elden kalibrasyon grafiği şekil 4.6'da görülmektedir. Kalibrasyon grafiğinden hesaplanan tayin sınırı (LOD) 7,1 µM (42,11 µg/mL) olarak, Miller (2000)'deki yönteme göre hesaplandı.



Şekil 4.6. poli-AMT PGE yüzeyine immobilize edilmiş tiyol işaretli HBV prob ile hibridizasyon sonrası elde edilen guanin yükseltgenme sinyalleri kullanılarak hazırlanmış olan kalibrasyon grafiği.

4.3.5. Poli-AMT PGE yüzeyinde HBV DNA Hibridizasyonunda Seçimlilik Çalışması

Poli-AMT PGE yüzeyine immobilize edilmiş probun seçimliliğini test etmek için yapılan bu çalışmada yalın PGE, poli-AMT PGE, yüzeyine 8 µg/mL DNA prob (guanin içermeyen tiyol işaretli) immobilize edilmiş PGE ve probun hedef, NC ve MM DNA dizileri ile hibridizasyonu sonrası elektron transfer direncindeki farklanma ölçüldü. Elde edilen sonuçlar şekil 4.7’de görülmektedir. Yalın elektrot yüzeyinin elektron transfer direnci (15 Ω, RSD=% 6.2) elektrodun poli AMT ile modifiye edilmesi sonucu yüzeyin polimer film ile kaplanması nedeniyle artmaktadır (257 Ω, RSD=% 9.7). Poli-AMT PGE yüzeye prob yani tek sarmal DNA immobilize edildiğinde elektron transfer direnci daha da artarak 810 Ω (RSD=% 10.2) olmaktadır. Elektron transfer direnci MM ve NC ile hibridizasyondan sonra bir takım spesifik olmayan bağlanmalar nedeniyle azalmakta fakat hedef DNA ile hibridizasyon sonucunda oluşan çift sarmal DNA’nın bazıları arasında bulunan H bağları üzerinden elektron transferinin gerçekleşmesi nedeniyle neredeyse yarıya düşmektedir (434 Ω, RSD=%10.9) tekrar düşmektedir



Şekil 4.7. Poli-AMT ile modifiye edilmiş PGE’nin HBV DNA ile hibridizasyon öncesi ve sonrasındaki Rct değerlerinin ortalamasında hazırlanmış olan histogram.

5. SONUÇ

Genetik hastalıkların basit, hızlı ve ucuz yoldan tayini, hastalıkların erken teşhisi ve tedavisi açısından son derece önemlidir. Hepatit B virüsünü (HBV) temsil eden DNA dizisinin elektrokimyasal olarak tayin edilmesi için sensör geliştirilmesini amaçlayan çalışmamızda, tek kullanımlık kalem grafit elektrot yüzeyi, iletken bir monomer olan AMT ile dönüşümlü voltametri tekniği kullanılarak polimer film şeklinde modifiye edilmiştir. Çalışmanın birinci bölümünde elektrot yüzeyini poli-AMT ile modifiye etmede uygulanacak döngü sayısı, hem elektrokimyasal empedans spektrometri tekniği ile yüzeyde meydana gelen elektron transfer direncindeki farklanma ölçülerek hem de diferansiyel puls voltametri tekniği kullanılarak adenin yükseltgenme sinyali ölçülerek optimize edilmiştir. İkinci bölümde modifiye elektrot yüzeyine immobilize edilecek prob derişimi optimize edilmiş ve HBV DNA sensörü tasarlanmıştır. Çalışmamızın üçüncü bölümünde ise tasarlanan sensörün tayin sınırı ve seçimliliği gibi özellikleri incelenmiştir. Yalın PGE, yüzeyine poli-AMT modifiye edilmiş PGE ve DNA immobilize edilmiş poli-AMT PGE'nin yüzeyi taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılarak karakterize edilmiştir.

Poli-AMT modifiye PGE ile yüzeye DNA prob immobilizasyonunda yalın PGE'ye kıyasla 2.02 kat yüksek adenin sinyali elde edilmesi poli-AMT ile modifikasyon sonucu elektrot yüzeyinde bulunan SH gruplarıyla, SH işaretli DNA prob arasında meydana gelen disülfid bağlarının oluşumu nedeniyledir (Muti vd. 2012). Poli-AMT ile elektrot modifikasyonu kolay, hızlı ve nanomalzelerle modifiye edilmiş elektrotlarla kıyaslandığında daha ucuzdur.

Geliştirdiğimiz sensörün tayin sınırı 7.1 μM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen sensör kendi tamamlayıcısına yüksek seçimlilikle bağlanmıştır. Çalışmada ayrıca, $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2]^+$, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$, metilen mavisi, ekinomisin gibi hibridizasyon indikatörleri kullanılmaması hibridizasyonun indikatörsüz yapılması çalışmaya bir üstünlük kazandırmaktadır.

Çalışmamızın diğer bir avantajı ise elde edilen yüzeye immobilize edilen DNA'nın yüksek kararlılıkta yüzeye bağlanması bunun sonucu kendi tamamlayıcısı olan hedef DNA dizisini yüksek seçimlilikte algılayabilen bir yüzey oluşturulabilmiş olmasıdır.

KAYNAKLAR

- Aydoğdu, G., G nendi, G., D. K., Zeybek, Zeybek, B., Pekyardımcı, Ő. 2014. A novel electrochemical DNA biosensor based onpoly-(5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole) modified glassy carbonelectrode for the determination of nitrofurantoin. **Sensors and Actuators B**, 197: 211–219.
- Bej, A.K. 1996. Nucleic acid analysis: Principles and Bioapplications, Chapter 1: Nucleic acid hybridizations: principles and strategies. Wiley-Liss, Inc., USA.
- Bond, A.M., Mahon, P.J., Schiewe, J., Vicente-Beckett, V. 1997. An inexpensive and renewable pencil electrode for use in field-based stripping voltammetry. **Anal. Chim. Acta**, 345: 67-74.
- Brett, A. M., Oliveira, Macedo, T. R. A., Raimundo, D., Marques, M. H., Serrano, S. H. P. 1998. Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA– biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**. 13: 861–867.
- Brett, A.M.O., Piedade, J.A.P., Serrano, S.H.P. 2000. Electrochemical oxidation of 8- oxoguanine. **Electroanalysis**, 12: 969-973.
- Camman, K., Lemke, U., Rohen, A., Sander, J., Wilken, H., Winter, B. 1991. Chemical Sensors and Biosensors-Principles and Application. **Angew. Chem. Int. De. Engl.**, 30: 516-539.
- Coulet, P. R., 1991. What is a Biosensor?, Chapter 1; Biosensor principles and applications, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Del Pozo, M.V., Alonso, C., Pariente, F., Lorenzo, E. 2005. Electrochemical DNA sensing using osmium complexes as hybridization indicators. **Biosens. Bioelectron.**, 20: 1549- 1558.
- Demetriades, D., Economou, A., Voulgaropoulos, A. 2004. A study of pencil-lead bismuth- film electrodes for the determination of trace metals by anodic stripping voltammetry. **Anal. Chim. Acta**, 519: 167-172.
- Dervan, P.B. 1998. Sequence specific recognition of double helical DNA. A synthetic approach, Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol.2: Ed. Eckstein,F. and Lilley, D.M.J., Springer-Verlag, Berlin, Almanya.
- Drummond, T.G., Hill, M.G., Barton, J.K. 2003. Electrochemical DNA sensors. **Nature Biotechnolog**, 10 (21): 1192-1199.
- Dulgerbaki,  ., Oksuz, A.U., Ahmad, S. 2014. Electrochemically determined biosensing ability of DNA probed by using poly(propylenedioxythiophene). **Electrochimica Acta**, 122: 87– 92.

- Erdem A., Ozsoz M. 2001. Voltammetry of the anticancer drug mitoxantrone and DNA. **Turk. J. Chem.**, 25: 469-475.
- Erdem, A., Ariksoysal, D. Ö., Karadeniz, H., Kara, P., Sengönül, A., Sayiner, A. A., Özsöz, M. 2005. Electrochemical genomagnetic assay for the detection of hepatitis B virus DNA in polymerase chain reaction amplicons by using disposable sensor technology. **Electrochem. Commun.**, 7: 815–820.
- Erdem, A., Kerman, K., Meriç, B., Akarca, U., Özsöz, M. 2000. Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. **Anal. Chim. Acta**, 422: 139–149.
- Erdem, K. A. 2000. İlaç ve DNA (Biyo) Sensörlerinin Tasarımı ve Uygulamaları. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.
- Ferreira, D.C., Rodrigues, L.P., Madurro, J. M., Madurro, A.G.B., Oliveira, R. T. S., Abrahão, J. 2014. Graphite Electrodes Modified with poly(3-hydroxybenzoic acid) for Oligonucleotides Sensors. **Int. J. Electrochem. Sci.**, 9: 6246 – 6257.
- Fojta, M., Havran, L., Billova, S., Kostecka, P., Masarik, M., Kizek, R. 2003. Two-surface strategy in electrochemical DNA hybridization assays: detection of osmium-labeled target DNA at carbon electrodes. **Electroanalysis**, 15: 431-440.
- Gao, W., Song, J., Wu, N. 2005. Voltammetric behavior and square-wave voltammetric determination of trepibutone at a pencil graphite electrode. **J. Electroanal. Chem.** 576:1-7.
- Gronow, M., Mullen, W.H., Russel, L.J., Anderton, D.J. 1992. Biosensors, Chapter, 15. Molecular Biology and Biotechnology, (Walker, J.M., Gingold, E.B.) 2nd ed. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Gülmez, A.B. 2005. DNA'nın Elektrokimyasal Algılanmasında Kullanılan Yeni Sensör Tasarımları. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Hall, E.A.H. 1990. Biosensors, Ch.1: Biosensors in context, Open University Press, İngiltere.
- Hart, J.P. 1997. Recent developments in the design and application of screen printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses. **TrAC**, 16: 89-103.
- Herne, T.M., Tarlov, M.J. 1997. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. **J. Am. Chem. Soc.**, 119: 8916-8920.

- Jin, J., Hirió, T., Sato, K., Miwa, T., Takeuchi, T. 2002. Use of disposable GRC electrodes for the detection of phenol and chlorophenols in liquid chromatography. **Anal. Sci.** 18: 549-554.
- Kadayıfcılar, K.P. 2003. Çeşitli Bulaşıcı ve Kalıtsal Hastalıklara Neden Olan Gen Dizilerini İçeren PCR Ürünü Örnekler Kullanarak Elektrokimyasal DNA Biyosensörleriyle Bu Hastalıkların Saptanması. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Kalcher, K. 1990. Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis. **Electroanalysis**, 2: 419-433.
- Karadeniz, H., Gulmez, B., Sahinci, F., Erdem, A., Kaya, G.I., Unver, N., Kivcak, B., Ozsoz, M. 2003. Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 33:295-296.
- Kerman, K., Meric, B., Ozkan, D., Kara., P., Erdem, A., Ozsoz M. 2001. Electrochemical DNA biosensor for the determination of Benzo[a]pyrene – DNA adducts. **Anal. Chim. Acta**, 450: 45-52.
- Klug, W.S., Cumming, M.R. 2007. Concepts of Genetics (Çeviri Editörü: Cihan Öner, Genetik Kavramlar) Palme yayınevi, Ankara.
- Kotani, A., Miyaguchi, Y., Harada, D., Kusu, F. 2003. A disposable voltammetric cell for determining the titratable acidity in vinegar. **Anal. Sci.**, 19: 1473-1476.
- Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Ozyoruk, H., Yıldız, A. 2009. Poly(vinylferrocenium) coated disposable pencil graphite electrode for DNA hybridization. **Electrochemistry Communications** 11: 1242–1246.
- Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G., Mascini, M. 2002. Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples. **Talanta**, 56: 949–957.
- Lucarelli, F., Palchetti, I., Marazza, G., Mascini, M. 2002. Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples. **Talanta**, 56: 949–957.
- Masawat, P., Liawruangrath, S., Vaneesorn, Y., Liawruangrath, B. 2002. Design and fabrication of a low-cost flow-through cell for the determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations by flow injection cyclic voltammetry. **Talanta**, 58: 1221- 1234.

- Mashhadizadeh, M.H., Talemi, R.P. 2013, A new methodology for electrostatic immobilization of a non-labeled single strand DNA onto a self-assembled diazonium modified gold electrode and detection of its hybridization by differential pulse voltammetry. **Talanta**, 103: 344–348.
- Millan, K.M., Mikkelsen, S.R. 1993. Sequence-selective biosensor for DNA Based on electroactive hybridization indicators, **Anal. Chem.**, 65: 2317-2323.
- Miller, J. N., Miller, J. C. 2000. Statistics And Chemometrics For Analytical Chemistry, Pearson Education, 271, London.
- Miyazaki, K., Matsumoto, G., Yamada, M., Yasui, S., Kaneko, H. 1999. Simultaneous voltammetric measurement of nitrite ion, dopamine, serotonin with ascorbic acid on the GRC electrode. **Electrochim Acta**, 44: 3809-3820.
- Molinier-Jumel, C., Malfoy, B., Reynaud, J.A., Aubel-Sadron, G. 1978. Electrochemical study of DNA-Anthracyclines interaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 84 (2): 441–449.
- Muti, M., Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Yumak, T. ve Sinag, A. 2010. Tin oxide nanoparticles-polymer modified single use sensors for elektrochemical monitoring of label-free DNA hybridization. **Talanta**, 82: 1680-1686.
- Muti, M., Sharma, S., Erdem, A. and Papakonstantinou, P. 2011. Electrochemical monitoring of nucleic acid hybridization by single-use graphene oxide-based sensor. **Electroanalysis**, 23: 272-279.
- Muti, M., Erdem, A., Karagözler, A.E. and Soysal M. 2012. 5-Amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole modified single-use sensors for electrochemical DNA analysis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 93: 116-120.
- Muti, M., Gençdağ, K., Nacak, F.M. ve Aslan, A. 2013. Electrochemical polymerized 5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole modified single use sensors for detection of quercetin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 106: 181-186.
- Muti, M., Soysal, M., Nacak, F. M., Gençdağ, K., Karagözler, A.E. 2015. A Novel DNA Probe Based on Molecularly Imprinted Polymer Modified Electrode for the Electrochemical Monitoring of DNA. **Electroanalysis**, 27: 1368 – 1377.
- Özsoz, M., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Özkan, D. 2002. Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on guanine signal. **Electroanalysis**, 15 (7): 613–619.
- Palecek, E. 1996. From polarography of DNA to microanalysis with nucleic acid modified electrodes. **Electroanalysis**, 8 (1): 7-14.

- Prudenziati, M. 1994. Handbook of Sensors and Actuators 1; Volume-1: Thick film sensors. **Elsevier Science B.V**, Oxford, UK.
- Sharma, A., Rogers, K.M., 1994. A Fiber-Optic Cocaine Biosensor. **Biosensors. Meas. Sci. Technol.**, 5: 461-472.
- Sinden, R.R. 1994. DNA structure and Function; Chapter 1- Introduction to the Structure, properties, and reactions of DNA. Academic Press, California, USA.
- Skoog, D.A., West, D.M. 1981. Principles of Instrumental Analysis, (second ed), 1981.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. Çeviri editörleri; Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H. 1998. Enstrumantal Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, 5. Baskı, 940, Ankara.
- Steinbach, P.B., Hurtubise, R.J. 2000. Fluorescence of tetrols, tetrols complexed with DNA and benzo[a]pyrene-DNA adducts in methanol / water solutions. **Appl. Spect.**, 54: 287- 293.
- Stradiotto, N.R., Yamanaka, H., Zaroni, M.V.B. 2003. Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, 14: 159-173.
- Şahinçi, F. 2005. İlaç-DNA Etkileşmesinin Elektrokimyasal Algılanmasına Dayalı Tasarımlar. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Thayer, A.M. 1999. Deciphering Diseases, Chemical and Engineering News, Ed. By M. Jacobs, American Chemical Society, North Caroline, USA.
- Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson G.S. 1999. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Pure Appl. Chem.**, 71: 2333-2348.
- Tomschik, M., Jelen, F., Havran, L., Trnkova, L., Nielsen, P.E., Palecek, E. 1999. Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes. **J. Electroanal. Chem.**, 476: 71-80.
- Tural, H., Gökçel, H. İ., Ertaş, F. N. 2006. Enstrumantal Analiz I Elektroanalitik Yöntemler. Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi Yayın No: 186, 2. Baskı, 336, İzmir.
- Urbaniczky, C., Lundstrom, K. 1984. Voltammetric studies on carbon paste electrodes- the influence of paste composition on electrode capacity and kinetics. **J. Electroanal. Chem.**, 176: 169-182.
- Walkelin, G., Laurence, P., Waring, M. J. W., 1976. The binding Echinomycin to Deoxyribonucleic acid. **Biochem J.**, 157: 721-740.

- Wang, J., Ozsoz, M., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Grant, D.H., Chicarro, M., Fernandes, J.R., Palecek, E. 1998a. Interaction of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface. **Bioelectrochem. and Bioenerg.**, 45: 33-40.
- Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R. 1998b. Indicator- free electrochemical DNA hybridization biosensor. **Anal. Chim. Acta**, 375: 197-203.
- Wang, J., 2000. Analytical Electrochemistry. Second Edition. John Wiley & Sons., Inc., New York, USA.
- 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., Kawde, A. N. , Erdem, A., Salazar, M. 2001. Magnetic bead-based label-free electrochemical detection of DNA hybridization. **Analyst**, 126: 2020–2024.
- 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, L., Liao, X., Ding, Y., Gao, F., Wang, Q. 2014. DNA biosensor based on a glassy carbon electrode modified with electropolymerized Eriochrome Black T. **Microchim Acta**, 181:155–162.
- Wang, L.R., Wang, R.X., Yang, L.Z., Lu, G.H. 2005. Study of the interaction of CTZAMB- Cu(II) with DNA and determination of DNA. **J. Electroanal. Chem.**, 585: 214-219.
- Yenigül, B, Ertaş, F.N. 2001. Voltametric Analiz Yöntemleri I. Eser Analiz Yaz Okulu Kitabı Ed. Henden E, Gökçel İ, Ertaş F.N. Ege Üniversitesi, 154.
- Yıldız, A., Genç, Ö. 1993. Enstrumantal Analiz. Hacettepe Yayınları, A-64, s. 289-384, Ankara.
- Yıldız A, Genç Ö, Bektaş S. 1997. Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları A-64, 17: 331-372. Ankara
- Zhu, Q., Gao, F., Yang, Y., Zhang, B., Wang, W., Hu, Z., Wang, Q. 2015. Electrochemical preparation of polyaniline capped Bi₂S₃ nanocomposite and its application in impedimetric DNA biosensor. **Sensors and Actuators B**, 207: 819–826.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hakan ŞİRANLI

Doğum Yeri ve Tarihi : Erzincan, 04.04.1988

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 2007-2012

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üni., Fen Bilimleri Ens., Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı, 2012-2016.

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- a) Tek Kullanımlık Modifiye Edilmiş Ve Edilmemiş Grafit Elektrotların DNA Hibridizasyon Sensörü Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Y. Lisans Tezi

İLETİŞİM

E-posta Adresi : hakansiranli@gmail.com

Tarih : 18.08.2016