

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

**DNA HASARI TAYİNİ İÇİN GRAFENE DAYALI
ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI**

SELMA TUNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2017

TEZ ONAY

Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Selma TUNÇ tarafından hazırlanan ve Doç. Dr. Filiz KURALAY danışmanlığında yürütülen “DNA Hasarı Tayini için Grafene Dayalı Elektrokimyasal Biyosensörlerin Hazırlanması” adlı bu tez, jürimiz tarafından 24/03/2017 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Filiz KURALAY

Başkan : Doç. Dr. Emine BAĞDATLI
Kimya, Ordu Üniversitesi

İmza :

Üye : Doç. Dr. Filiz KURALAY
Kimya, Ordu Üniversitesi

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Batur ERCAN
Metalürji ve Malzeme Mühendisliği,
Orta Doğu Teknik Üniversitesi

İmza :

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 26/05/2017..tarih ve 2017/234..sayılı kararı ile onaylanmıştır.

25..105..2017

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Kutsal KORKMAZ

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.


Selma TUNÇ

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

DNA HASARI TAYİNİ İÇİN GRAFENE DAYALI ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

Selma TUNÇ

Ordu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı, 2017
Yüksek Lisans Tezi, 59s.

Danışman: Doç. Dr. Filiz KURALAY

Bu tez çalışmasında, son yıllarda kullanımı sayısız avantajlarından dolayı oldukça artan tek kullanımlık perde baskılı karbon ve kalem grafit elektrotlar grafen ile modifiye edilerek elektrokimyasal DNA hasar tayininde kullanılmıştır. Grafen üstün fiziksel ve kimyasal özellikleriyle elektrot malzemelerinin duyarlılığını arttırmıştır. Tek kullanımlık elektrot teknolojisi ise DNA hasar tayinini seri ve hızlı bir sisteme oturtup pratiklik ve ucuz maliyet sağlamıştır. Ayrıca antioksidan bir madde olan askorbik asidin DNA hasarını azaltıcı etkisi incelenmiştir. Çalışmada, çift sarmal DNA (dsDNA) ve tek sarmal DNA (ssDNA), Fenton reaktifi (Fe^{2+}/H_2O_2) varlığında hasara uğratıldıktan sonra grafen modifiye perde baskılı karbon elektrot (SPCE) ve grafen modifiye kalem grafit elektrot (PGE) kullanılarak bu hasarın elektrokimyasal tayini gerçekleştirilmiştir. Hasar tayini Fenton reaktifi varlığında ve yokluğunda guanin (G), adenin (A), timin (T) ve sitozin (C) bazlarının yükseltgenme sinyallerinde meydana gelen değişimler diferansiyel puls voltametri (DPV) ile incelenerek gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, grafen modifiye tek kullanımlık elektrotların performansı camı karbon elektrodun (GCE) performansı ile kıyaslanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, DNA, DNA hasarı, Elektrokimyasal biyosensör, Grafen.

ABSTRACT

PREPARATION OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS BASED ON GRAPHENE FOR DNA DAMAGE DETECTION

Selma TUNÇ

Ordu University

Institute for Graduate Studies in Science and Technology

Department of Chemistry, 2017

MSc. Thesis, 59p.

Supervisor: Assoc. Prof. Filiz KURALAY

In this thesis, disposable screen-printed carbon and pencil graphite electrodes, which uses nowadays are in demand due to their numerous advantages, were used for the electrochemical DNA damage detection after graphene modification. Graphene increased the sensitivity of the electrode materials because of its unique physical and chemical properties. Besides this, disposable electrode technology provides a serial and fast system with practicability and low-cost. Furthermore, the inhibition effect of an antioxidant, ascorbic acid, was examined. In the study, electrochemical DNA damage detection was performed with graphene modified screen printed carbon electrode (SPCE) and graphene modified pencil graphite electrode (PGE) after double stranded DNA (dsDNA) and single stranded DNA (ssDNA) were interacted with Fenton's reagent ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$). The damage was examined in the presence and absence of Fenton's reagent by monitoring the changes in the oxidation signals of guanine (G), adenine (A), thymine (T) and cytosine (C) with differential pulse voltammetry (DPV). Additionally, the performances of the disposable electrodes were compared with the performance of the glassy carbon electrode (GCE).

Keywords: Biosensors, DNA, DNA damage, Electrochemical biosensors, Graphene.

TEŞEKKÜR

Konu bilim olduğunda yılmadan usanmadan çalışan, yeri gelince laboratuvarında sabahlayan, bizlere daima bilim etiğini aşıl原因 ve bizlere her anlamda en güzel rol modeli Sayın Doç. Dr. Filiz KURALAY'a emeğinden ve desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca bursiyeri olduğum 114M867 no'lu TÜBİTAK projesi kapsamında Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) ve proje deneylerini destekleyen UNESCO-L'ORÉAL Bilim Kadını Programı'na teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, varlıklarıyla güven ve huzur veren, dualarını eksik etmeyen canım anneme, babaanneme ve dedeme, maddi manevi her anlamda desteğini esirgemeyen babama ve motivasyon kaynağım olan kardeşlerime teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca kararlılığımı sürdürmemde bana yardımcı olan, başarımı, mutluluğumu yeri geldiğinde stresimi paylaştığım Sefa TAŞKIN'a teşekkür ederim.

Tez deneylerinin tamamlanmasında ve tezin yazım aşamasındaki yardımlarından dolayı Nilgün DÜKAR'a teşekkür ederim. Her aşamada yanımda olan tüm arkadaşlarıma ve yardımlarını eksik etmeyen Dr. Yaşar BAYRAMLI'ya ve Hicret CÜR'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER LİSTESİ	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Elektrokimya	3
2.1.1. Dönüşümlü Voltametri	4
2.1.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi	5
2.1.3.4. Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi	5
2.2. Kullanılan Diğer Yöntemler	6
2.2.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	6
2.2.2. Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-Vis) Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi	7
2.3. Biyosensörler	7
2.3.1. Biyosensörlerin Tarihi	8
2.3.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	9
2.3.3. Elektrokimyasal Biyosensörler	10
2.3.3.1. Amperometrik Biyosensörler	11
2.3.3.2. Potansiyometrik Biyosensörler	11
2.3.3.3. İletkenlik Biyosensörleri	11
2.3.3.4. İmpedimetrik Biyosensörler	11
2.3.4. Elektrokimyasal Biyosensörlerin Uygulama Alanları	12

2.4.	DNA	12
2.4.1.	DNA'nın Yapısı ve Fonksiyonu	12
2.4.2.	DNA Hasarı	14
2.4.3.	DNA Hasarına Neden Olan Etkenler	14
2.5.	Nanoteknoloji ve Nanomalzemeler	15
2.5.1.	Grafen	16
2.6.	Literatürdeki Elektrokimyasal DNA Hasar Tayini Çalışmaları	17
3.	MATERYAL ve YÖNTEM	21
3.1.	Kullanılan Cihazlar ve Elektrotlar	21
3.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
3.3.	Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Deneysel Ortam	22
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA	24
4.1.	Grafen Sentez Ve Karakterizasyonu	25
4.2.	Sentezlenen Grafenin Elektrotlar Yüzeyine Modifikasyonu ve Elektrokimyasal Davranışları	29
4.3.	Fenton Reaktifleri ile DNA Hasar Çalışmaları	36
4.4.	Camsı Karbon Elektrot ile Kıyaslama	49
5.	SONUÇLAR	51
6.	KAYNAKLAR	52
	ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1.	Dönüşümlü voltamogram	4
Şekil 2.2.	Diferansiyel puls voltamogramı	5
Şekil 2.3.	İmpedans spektrumu	6
Şekil 2.4.	Bir biyosensör çalışma prensibi	8
Şekil 2.5.	DNA çift sarmalı	13
Şekil 2.6.	Grafit ve grafen oksit yapıları.	17
Şekil 3.1.	Kullanılan elektrot malzemeleri	21
Şekil 3.2.	Kullanılan çalışma elektrotları	22
Şekil 4.1.	Grafen sentez basamakları	26
Şekil 4.2.	Sentezlenen grafene ait SEM görüntüsü	27
Şekil 4.3.	SPCE için dsDNA kullanılarak yapılan deneysel çalışmaların şematik gösterimi	28
Şekil 4.4.	PGE için dsDNA kullanılarak yapılan deneysel çalışmaların şematik gösterimi	28
Şekil 4.5.	(a) Grafen modifiye SPCE, (b) çok duvarlı karbon nanotüp modifiye SPCE'un 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} içeren 0.1 M KCl'deki dönüşümlü voltametrik davranışları	30
Şekil 4.6.	(a) Grafen modifiye PGE, (b) çok duvarlı karbon nanotüp modifiye PGE, (c) çıplak PGE'un 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} içeren 0.1 M KCl'deki dönüşümlü voltametrik davranışları.....	31
Şekil 4.7.	(a) 2 mg/mL grafen modifiye SPCE, (b) 1 mg/mL grafen modifiye SPCE, (c) 0.5 mg/mL grafen modifiye SPCE, (d) 0.25 mg/mL grafen modifiye SPCE, (e) çıplak SPCE'un 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} içeren 0.1 M KCl'deki dönüşümlü voltametrik davranışları (modifikasyon süresi: 30 dk, tarama hızı: 100 mV/s)	32
Şekil 4.8.	Farklı modifikasyon sürelerinin SPCE elektrodun elektrokimyasal cevabına etkisi (a) 30 dk, (b) 15 dk, (c) 5 dk, (d) çıplak SPCE'un 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 0.1 M KCl çözeltisi içerisindeki davranışı (1 mg/mL grafen, Tarama hızı: 100mV/s).....	32
Şekil 4.9.	Farklı modifikasyon sürelerinin PGE elektrodun elektrokimyasal cevabına etkis (a) 30 dk, (b) 15 dk, (c) çıplak PGE'un 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 0.1 M KCl çözeltisi içerisindeki davranışı (1 mg/mL grafen, tarama hızı: 100 mV/s).....	33

Şekil 4.10.	(a) 30 dk grafen modifiye PGE, (b) 15 dk grafen modifiye, (c) çıplak PGE'un 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} 0.1 M KCl çözeltisi içerisindeki EIS Spektrumları (Frekans aralığı: 10 ⁵ -10 ⁻¹ Hz, Genlik: 5 mV).....	34
Şekil 4.11.	Çıplak PGE'un SEM görüntüsü, (b) grafen modifiye PGE.....	35
Şekil 4.12.	Grafen modifiye PGE'un SEM görüntüsü.....	35
Şekil 4.13.	50 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde (a) grafen modifiye, (b) çıplak perde baskılı karbon elektrotların 50 mM pH 4.8 asetat tamponu içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı:10 mV/s) (n=3)	37
Şekil 4.14.	(a) 50 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde grafen modifiye perde baskılı elektrot, (b) 50 mg/L dsDNA immobilize grafen modifiye perde baskılı elektrodun 50 mM pH 4.8 asetat tamponu içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları(Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)	38
Şekil 4.15.	(a) 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde grafen modifiye perde baskılı elektrot, (b) 250 mg/L dsDNA immobilize grafen modifiye perde baskılı elektrodun 50 mM pH 4.8 asetat tamponu içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)	38
Şekil 4.16.	(a) 1000 mg/L, (b) 750 mg/L, (c) 500 mg/L, (d) 250 mg/L, (e) 125 mg/L dsDNA çözeltileri içerisinde kalem grafit elektroda ait diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)	39
Şekil 4.17.	(a) 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde grafen modifiye kalem grafit elektrot, (b) grafen modifiye kalem grafit elektrodun 50 mM pH 4.8 asetat tamponu içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı:10 mV/s) (n=3)	40
Şekil 4.18.	(a) 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde çıplak kalem grafit elektrot (b) çıplak kalem grafit elektrodun 50 mM pH 4.8 asetat tamponu içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)	41
Şekil 4.19.	250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde (a) grafen modifiye kalem grafit elektrot, (b) çıplak kalem grafit elektrodun diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)	41
Şekil 4.20.	(a) 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde grafen modifiye kalem grafit elektrot, (b) 250 mg/L dsDNA immobilize grafen modifiye kalem grafit elektrodun 50 mM pH 4.8 asetat tamponu içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)	42
Şekil 4.21.	250 mg/L dsDNA ile Fenton reaktifinin farklı sürelerde etkileşimine ait voltamogramlar (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)	44
Şekil 4.22.	Grafen modifiye kalem grafit elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) etkileşim öncesi, (b) 100 µM FeSO ₄ + 0.1 mM H ₂ O ₂ ile 5 dk etkileşim sonrası, (c) 100 µM FeSO ₄ + 0.5 mM H ₂ O ₂ ile 5 dk etkileşim sonrası (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)	44

Şekil 4.23.	Grafen modifiye kalem grafit elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) etkileşim öncesi, (b) 50 µM FeSO ₄ + 0.5 mM H ₂ O ₂ ile 5 dk etkileşim sonrası, (c) 100 µM FeSO ₄ + 0.5 mM H ₂ O ₂ ile 5 dk etkileşim sonrası, (d) 250 µM FeSO ₄ + 0.5 mM H ₂ O ₂ ile 5 dk etkileşim sonrası, (Tarama hızı:10 mV/s) (n=3).....	45
Şekil 4.24.	Grafen modifiye perde baskılı karbon elektroda ait 250 mg/L ssDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) etkileşim öncesi, (b) 250 µM FeSO ₄ + 0.5 mM H ₂ O ₂ ile 5 dk etkileşim sonrası (Tarama hızı: 10mV/s) (n=3)	46
Şekil 4.25.	Grafen modifiye kalem grafit elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) etkileşim önce, (b) 250 µM FeSO ₄ + 0.5 mM H ₂ O ₂ ile 5 dk etkileşim sonrası, (c) b'deki çözelti 5 dk 0.5 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)	47
Şekil 4.26.	Grafen modifiye kalem grafit elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) 250 µM FeSO ₄ + 0.5 mM H ₂ O ₂ ile 5 dk etkileşim sonrası, (b) a'daki çözelti 5 dk 2.0 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra, (c) a'daki çözelti 5 dk 1.0 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra, (d) a'daki çözelti 5 dk 0.5 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra, (e) a'daki çözelti 5 dk 0.1 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra, (f) a'daki çözelti 5 dk 0.05 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3).....	48
Şekil 4.27.	UV-Vis spektrumları: etkileşim öncesi (siyah) ve etkileşim sonrası (kırmızı) (a) dsDNA çözeltisi, (b) ssDNA çözeltisi	49
Şekil 4.28.	Grafen modifiye camı karbon elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) etkileşim öncesi, (b) 250 µM FeSO ₄ + 0.5 mM H ₂ O ₂ ile 5 dk etkileşim sonrası, (c) Çıplak camı karbon elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)	50

SİMGELER ve KISALTMALAR

A	: Adenin
AA	: Askorbik asit
ABS	: Asetat tamponu
C	: Sitozin
CV	: Dönüşümlü voltametri
DA	: Dopamin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPV	: Diferansiyel puls voltametrisi
dsDNA	: Çift sarmal DNA
GCE	: Camsı karbon elektrot
GO	: Grafen oksit
GR	: Grafen
G	: Guanin
PGE	: Kalem grafit elektrot
PBS	: Fosfat tamponu
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopisi
SPCE	: Perde baskılı karbon elektrot
ssDNA	: Tek sarmal DNA
T	: Timin

1. GİRİŞ

Nükleik asitler, birden çok nükleotidin birleşmesiyle meydana gelirler. Genetik bilginin ifade edilmesi ve depolanmasından sorumlu moleküllerdir. Kimyasal olarak birbirinden farklı iki tip nükleik asit vardır. Bunlar (RNA) ribonükleik asit ve (DNA) deoksiribonükleik asit'dir. İki tip nükleik asit de nükleotitlerin polimerize olması sonucu meydana gelmektedir: Ana omurgayı makromoleküler yapıdaki fosfat ve şeker birimleri fosfodiester bağı ile bağlanarak oluşturur (Wang, 2000; Gooding, 2002). DNA, yapısı aydınlatılmış bilinen en önemli moleküllerden biridir. Genetik bilginin kodlandığı ve nesilden nesile aktarılma işlemi gerçekleştiren DNA molekülünde meydana gelen hasarlar mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, kanser gibi ölümcül hastalıklara neden olmaktadır. Günümüzde çevresel faktörlerin stresle beraber genetik faktörleri kolaylıkla tetikleyebildiği bilinmektedir. Bu nedenle, DNA hasarını tayin etmek amacıyla kullanılacak hızlı, güvenilir, duyarlı, seçici ve ekonomik analiz sistemlerinin tasarlanması ve kullanımı oldukça önem kazanmaktadır. Bu bağlamda biyosensörler çoğu zaman alıcı klasik analiz sistemine göre üstün avantajlar sağlar.

Biyosensörler, seçici, duyarlı ve güvenilir analiz sistemleri olmaları nedeniyle günümüzde tayin amaçlı olarak oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Bir biyosensör, tayini gerçekleştirecek olan analitle spesifik olarak etkileşime giren bir biyomolekül varlığında etkileşim sonucunu elektriksel bir sinyale dönüştürür. Biyosensörler, diğer zaman alıcı klasik analiz sistemlerine göre birçok üstün avantajlar sağlamaktadır. Biyosensör çalışmaları ve uygulamaları, özellikle son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmelerin sisteme dahil olmasıyla oldukça önem kazanmıştır (Wang, 2001, 2005; Kuralay ve ark., 2009). Elektrokimyasal biyosensörler, biyosensör türleri içerisinde en çok kullanılan türlerden biridir.

2004 yılında Andre Geim ve Konstantin Novoselov'a Nobel Ödülü kazandıran grafen, karbon atomunun sp^2 hibritleşmesi yapan bal peteği örgülü yapılarından bir tanesine verilen isimdir. Çağımızın malzemelerinden biri olan grafen, eşsiz özelliklerinden dolayı son yıllarda oldukça ilgi görmektedir. Bu nedenle grafen temelli DNA çalışmaları günümüzde önemli bir yer tutar (Zhou ve ark., 2009).

Bu tez çalışmasında, grafen modifiye perde baskılı karbon elektrot (SPCE) ve kalem grafit elektrot (PGE) kullanılarak DNA hasar tayin biyosensörleri geliştirilmiştir. Bu amaçla çift sarmal DNA (dsDNA) ve tek sarmal DNA (ssDNA), Fenton reaktifi (Fe^{2+}/H_2O_2) varlığında hasara uğratılmış ve bu hasar grafen modifiye tek kullanımlık elektrotlarla tespit edilmiştir. Grafen sentezi modifiye Hummers' metodu kullanılarak yapılmıştır. Hasar tayini Fenton reaktifi varlığında ve yokluğunda guanin (G), adenin (A), timin (T) ve sitozin bazlarının yükseltgenme sinyallerinde meydana gelen değişimler ile incelenmiştir. Hasarlı DNA'nın varlığı diferansiyel puls voltametri (DPV) ile kontrol edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen DNA hasarı sonuçları, grafen modifiye edilmiş camı karbon elektrot ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

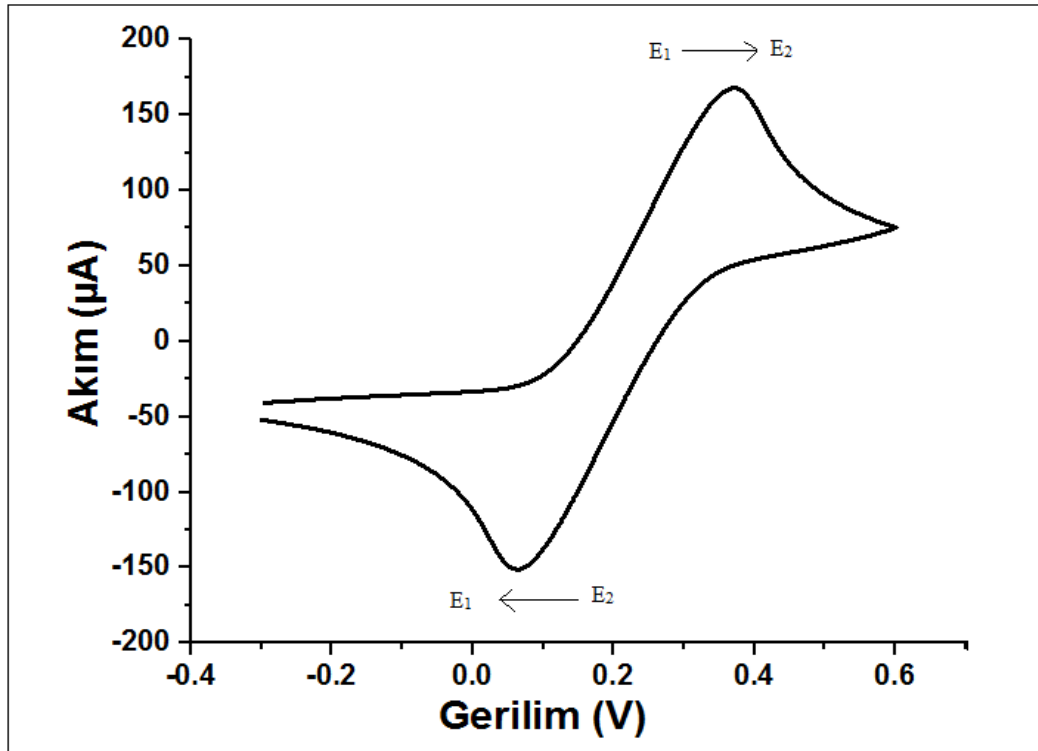
2.1. Elektrokimya

Elektrokimya, maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesi sonucu ortaya çıkan kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişiklikleri ve aynı zamanda kimyasal enerjinin elektrik enerjisine çevrilmesini inceleyen kimyanın bir alt bilim dalıdır. Elektrokimyasal tepkimeler, yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir. Genel olarak, elektrokimya, elektronik bir iletken (grafit, yarı iletken veya metal) ile iyonik bir iletken (elektrolit) arayüzeyinde oluşan reaksiyonları inceler. Elektrokimyasal işlemler, elektrokimyasal hücre adını alan bir düzenekte yürütülür ve analit çözeltisi bir elektrokimyasal hücrenin elemanı olduğunda elektrokimyasal özelliklere dayanan bir takım kantitatif (nicel) ve kalitatif (nitel) analitiksel metodu kapsar. Elektrokimyasal bir hücre, incelenen maddeyi içeren bir çözelti, maddenin dönüşüme uğradığı elektrotlar ve bu elektrotları birbirine bağlayan bir dış devreden oluşmaktadır (Palecek ve ark., 1998). Elektrokimyasal hücrede, iyon veya molekül halindeki madde katot adı verilen elektrotta indirgenirken, anot adı verilen diğer bir elektrotta ise ortaya çıkan yükseltgenme tepkimesi sırasında iyon veya molekül halindeki madde ya da elektrot malzemesinin kendisi elektron verir. Elektrotlarda tepkimeye giren her bir madde, dış devrede belli sayıda elektronun geçişine sebep olur. Bu sırada, elektrik yükünün akışı nedeniyle elektrik akımı oluşur. Elektrotları birbirine bağlayan devredeki metalik kısımlarda elektrik yükü elektronlar tarafından taşınmaktadır.

Elektroanalitik yöntemler ile çok düşük tayin sınırlarına ulaşılabilir. Elektrokimyasal teknikler, ara yüzeylerdeki kütle aktarım hızı, yük aktarımının stokiyometrisi ve hızı, kimyasal reaksiyonların hız ve denge sabitleri, kemisorpsiyonun ve adsorpsiyonun derecesi hakkında önemli bilgiler verir (Skoog, 1981). Elektrokimyanın avantajlarından belki de en önemlisi, elektrokimyasal ölçümlerin çoğu zaman bir elementin farklı bir yükseltgenme basamağı için spesifik olmasıdır. Başka bir avantajı ise kullanılan cihazların diğer cihazlara göre daha maliyetsiz olmasıdır. Başka bir özellik ise, elektrokimyasal yöntemlerin, kimyasal türlerin konsantrasyonundan daha çok aktiviteleriyle ilgili bilgi veriyor olmasıdır (Skoog ve ark., 1996).

2.1.1. Dönüşümlü Voltametri

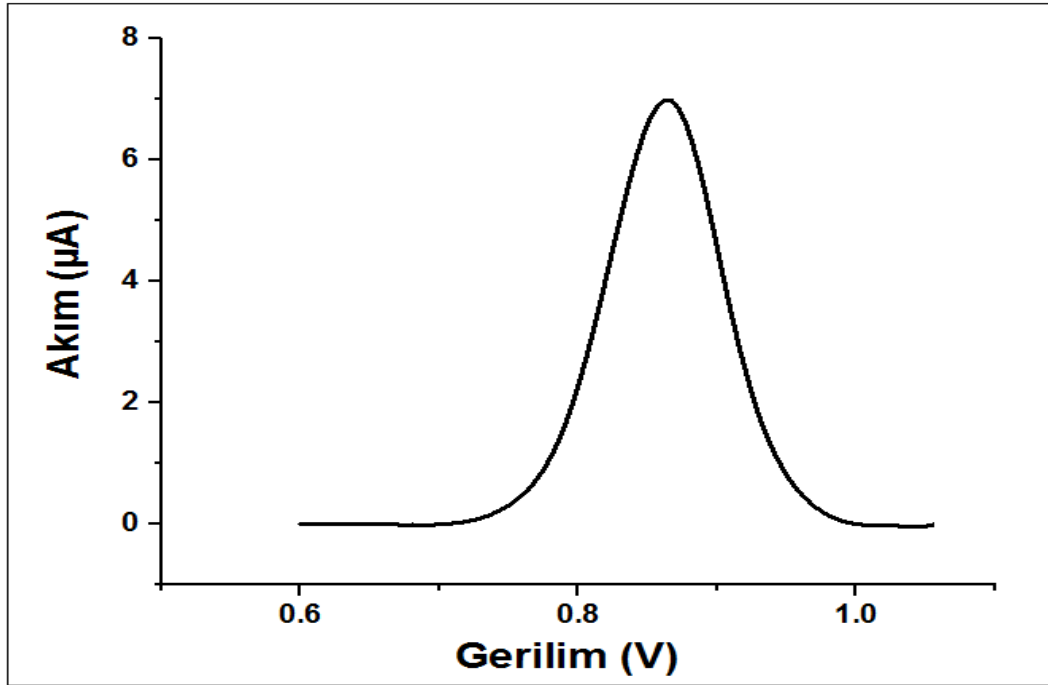
Voltametri, bir mikro çalışma elektrodu ile referans elektrot (karşılaştırma elektrodu) arasına uygulanan ve değeri zamanla değiştirilen gerilime karşı, hücrede çalışma elektrodu ile karşıt elektrot arasındaki akımın ölçüldüğü bir yöntemdir. Gerilim taraması ileri yönde belli bir gerilim değerine ulaştıktan sonra yine doğrusal olarak azalacak biçimde terse çevrilirse bu yönteme dönüşümlü voltametri adı verilir. Dönüşümlü voltametri (CV), elektrokimyasal yöntemler arasında en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Dönüşümlü voltamogramların detaylı incelenmesiyle, bir sistemin hangi potansiyelde indirgenip yükseltgendiği, elektrot tepkimesinin çözeltide bir kimyasal tepkime ile ilgili olup olmadığı, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığı ve tepkime ürünlerinin kararlılığı hakkında sonuç elde edilebilir (Şekil 2.1). Bu sebeple, çoğu elektroanalitik çalışmanın başında yapılan ilk deneysel çalışmalar ve karakterizasyon çalışmaları dönüşümlü voltametrimin kullanıldığı çalışmalardır. Bir yarım döngü ve bir tek tam döngü, ya da birden fazla döngü farklı çalışmalar için kullanılabilir.



Şekil 2.1. Tipik bir dönüşümlü voltamogram

2.1.2. Diferansiyel Puls Voltametrisi

Diferansiyel puls voltametrisi (DPV), voltametrik çalışmalarda tayin sınırının düşürülmesi için kullanılan teknikler arasında önemli bir yere sahiptir. Diferansiyel puls voltametrisinde, kapasitif akımın düşük, faradayik akımın ise yüksek değerlerde olmasıyla bu iki akım arasındaki duyarlılık ve oran artmış ve düşük tayin sınırlarına ulaşılmıştır. Diferansiyel puls voltametrisi anorganik ve organik çeşitlerin eser miktarlarının ölçülmesinde önemli ölçüde elverişli bir yöntemdir (Wang, 2000). Voltamogramlardaki pik akımları analitin derişimiyle doğru orantılıdır. Şekil 2.2’de karakteristik bir diferansiyel puls voltamogramı gösterilmektedir.

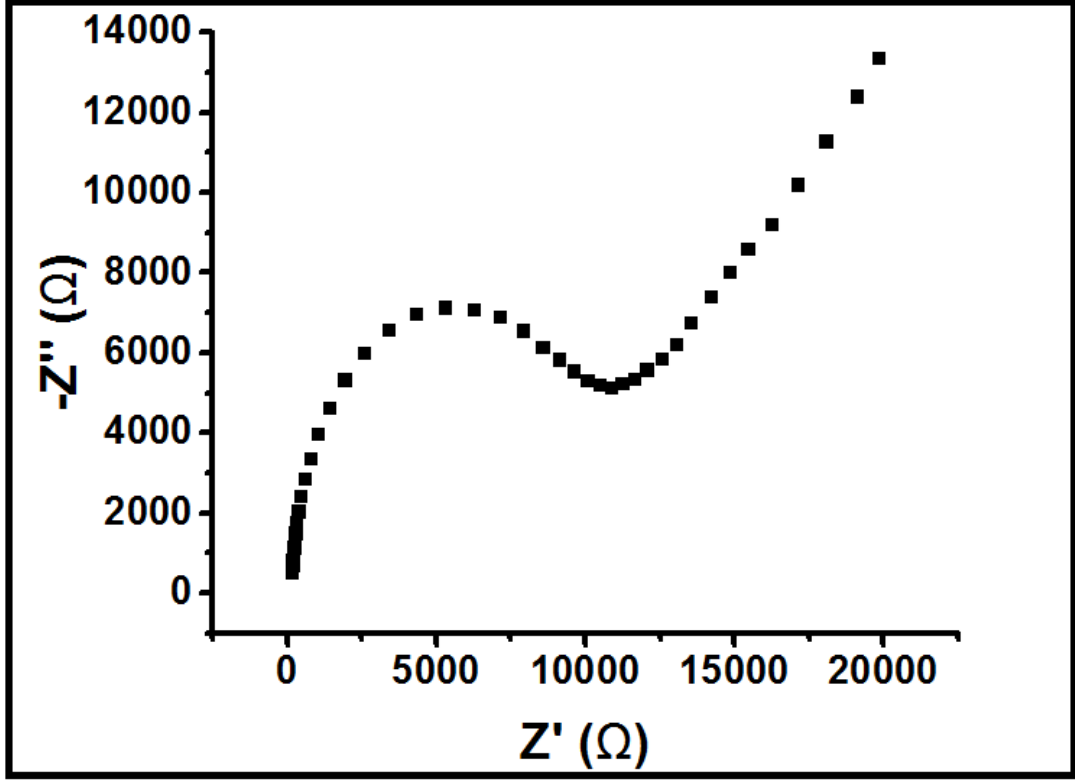


Şekil 2.2. Tipik bir diferansiyel puls voltamogramı

2.1.3. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), elektrokimyasal sistemlerin mekanik ve kinetik özellikleri hakkında bilgi veren bir yöntemdir. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi zaman sabitleriyle ilişkili olarak elektrot-çözelti arayüzeyi hakkında bilgi edinmeyi amaçlar ve bu özelliğinden dolayı diğer elektrokimyasal tekniklerden farklıdır. Bir devredeki toplam direncin ölçüsü olan empedansın zamanla ilişkisi, belirli frekans aralıkları kullanılarak indüktif ve kapasitans değişimlerden etkilenen direncin ölçümüne dayanmaktadır. Empedans ölçümleri bir

karakterizasyon yöntemi olarak başlı başına kullanılabilceği gibi farklı amaçlara yönelik olarak bir analiz yöntemi olarak da kullanılabilir. Bu teknik, özellikle korozyon, biyosensörler, metal kaplama ve iletken polimer karakterizasyonu gibi alanlarda rağbet görmektedir (Bard ve Faulkner, 2001).



Şekil 2.3. Tipik bir elektrokimyasal impedans spektrumu

2.2. Kullanılan Diğer Yöntemler

2.2.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), yüksek enerjili elektronlarla küçük bir alan yüzeyinin taranması prensibi ile çalışan bir görüntü alma tekniğidir. Taramalı elektron mikroskopunun çalışma prensibi, yüksek enerjili elektronların numune atomlarının dış yörünge elektronları ile elastik olmayan girişimi sonucunda düşük enerjili Auger elektronları oluşturmasıdır. Bu elektronlar numune yüzeyi hakkında bilgi taşır. Yine yörünge elektronları ile olan girişimler sonucunda yörüngelerinden atılan veya enerjisi azalan elektronlar numune yüzeyine doğru hareket ederek yüzeyde toplanırlar. İkincil elektronlar olarak adlandırılan bu türler numune odasında bulunan sintilatörde toplanarak ikincil elektron görüntüsü sinyaline çevrilir.

İkincil elektronlar numune yüzeyinin 10 nm veya daha düşük bir derinliğinden geldiği için numunenin yüksek çözünürlüğe sahip topografik görüntüsünün elde edilmesinde kullanılır (Karakaya, 2013).

2.2.2. Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-Vis) Moleküler Absorpsiyon Spektroskopisi

Maddenin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan düzeneğe absorpsiyon spektrometresi adı verilmektedir. Ultraviyole (morötesi) ve görünür bölge (UV-Vis) moleküler absorpsiyon spektroskopisi genel olarak 160-780 nm dalgaboyları arasındaki ışığın belirli bir ışın yoluna sahip bir hücreden geçmesi aşamasında hücredeki çözeltinin geçirgenliğinin (T) veya absorbansının (A) ölçülmesi temeline dayanır. Absorpsiyon daha çok moleküllerdeki bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle ultraviyole ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve aynı zamanda fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin nicel tayininde kullanılır. Çeşitli kromoforların (belli bir dalgaboyu aralığındaki ışığın absorpsiyonundan sorumlu olan fonksiyonel grup) absorpsiyon bantlarının birbiri ile örtüşmesi ve absorpsiyon bantlarının genellikle oldukça geniş olması nedeni ile, ultraviyole ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi ile nitel analiz pek yapılamaz.

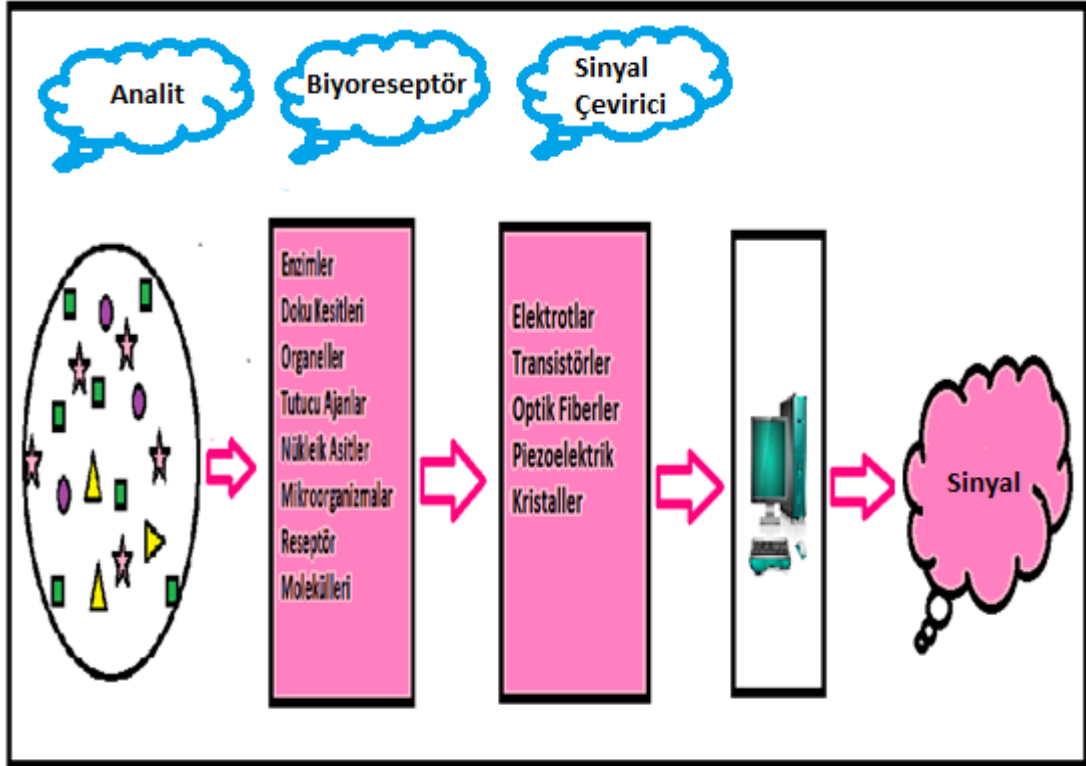
Bir spektrometrede ışık kaynağından çıkan ışık, çözücü ve örnekle etkileştikten sonra dedektöre ulaşır ve değişen ışık şiddetinin ölçümü yapılarak kaydedilir. Bu safhadan sonra elde edilen veriler dalgaboyuna karşı absorbans grafiğine geçirilir ve gerekli hesaplamalar, yorumlar yapılır (Yıldız ve ark., 1997).

2.3. Biyosensörler

Bir biyosensör, ölçümü istenen analit ile spesifik olarak etkileşime giren uygun bir biyobileşen (biyoreseptör) arasındaki etkileşimin sinyal çeviriciler (transduser) yardımı ile elektriksel sinyallere dönüştürüldüğü analitik cihazlardır. Genel olarak biyosensör sistemleri üç temel bileşenden oluşur. Bunlar, seçici olarak analiti tanıma kapasitesine sahip biyobileşen (biyoreseptör), bu biyobileşenin analit ile etkileşimi sonucu oluşan sinyali elektronik sinyale dönüştüren çevirici (transduser) ve bu sinyalin işlendiği elektronik bölümlerdir. Biyobileşenler, enzimler, antikorlar,

antibodiler, mikroorganizmalar, nükleik asitler, aptamerler, hücreler, bakteriler veya organeller olabilir (Kuralay ve ark., 2008).

Biyobileşenler ve analit arasındaki etkileşim analit derişimine bağı olarak sinyal çevirici yardımıyla akım, potansiyel, sıcaklık değişimi, ışık absorpsiyonu ya da bir kütle değişimi gibi ölçülebilir sinyallere dönüşür (Wang, 2005; Kuralay ve ark., 2011).



Şekil 2.4. Bir biyosensör çalışma prensibi

2.3.1. Biyosensörlerin Tarihi

Biyosensörlerin tarihçesi 1950’li yılların ortalarında L.C. Clark’ın Cincinnati Hastanesi’nde (Ohio, ABD) bir ameliyat esnasında kanın oksijen miktarını bir elektrot yardımı ile izlemesiyle başlar. Clark’ın geliştirdiği bu çalışma kalp ameliyatlarında kullanılan ilk biyosensör olmuştur (Clark Jr, 1956). Sonrasında ise yine Clark ve arkadaşları 1962 yılında glukoz oksidaz (GOx) enzimini ve oksijen elektrodunu bir arada kullanarak kanın glukoz seviyesini ölçmeyi başardılar. Bu çalışmalar biyosensör araştırmalarının başlangıcı olmuştur (Wang, 1999).

2.3.2. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Genel anlamda biyosensörler sinyal çevirici ve biyobileşenin türüne göre sınıflara ayrılmaktadırlar.

Bir biyosensör sinyal çeviricinin türüne göre genellikle 4 farklı grupta incelenir (Cornell ve ark., 1997).

- Optik Biyosensörler
- Piezoelektrik Biyosensörler
- Kalorimetrik Biyosensörler
- Elektrokimyasal Biyosensörler

Optik biyosensörler, etkileşim sonucunda meydana gelen absorplanan ya da açığa çıkan ışık şiddetinin ölçülmesi temeline dayanır. Bu biyosensörler temelde absorpsiyon, floresans, biyoluminesans gibi prensipler çerçevesinde çalışırlar. Piezoelektrik biyosensörler, analit ile biyobileşen arasındaki etkileşim sonrası meydana gelen kütle değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Piezoelektrik bir kristal yüzeyinde analit biriktiği zaman kristalin rezonans frekansında farklanma meydana gelir ve bu farklanmanın ölçülmesi sinyal olarak kabul edilir. Kalorimetrik (termal) biyosensörler, analit ile biyobileşen arasında meydana gelen enzimatik reaksiyondaki ısı değişiminin belirlenmesi prensibine dayanır. Enzimatik reaksiyonların ekzotermik özelliğinden faydalanılır. Elektrokimyasal biyosensörler, etkileşim sırasında elektrokimyasal türlerin harcanıp oluşurken ortaya çıkan elektroaktif sinyalin ölçülmesi temeline dayanır. Literatüre ilk kazandırılan biyosensör bir elektrokimyasal biyosensördür (Clark Jr, 1956).

Farklı biyosensör türlerinin kullanım alanlarına göre farklı dezavantajları ortaya çıkmaktadır. Örneğin, optik sensörler bulanık ortamlarda kullanılamazlar. Piezoelektrik biyosensörlerin kullanım alanı dardır. Termal biyosensörler ise küçük ısı değişimlerinin meydana geldiği sistemlerde yüksek hassasiyette kullanılamazlar. Bu tip olumsuzlukların çoğu elektrokimyasal biyosensörlerde yaşanmamaktadır. Özellikle, tek kullanımlık elektrot teknolojisi kullanım kolaylığını oldukça artırmaktadır. Bu elektrotlar düşük maliyet ve seri analiz sistemlerinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Ayrıca, elektrokimyasal ölçüm sistemleri küçük boyutlarda, taşınabilir ve ekonomiktir. Bulanık ortamlarda çalışılabilme elektrokimyasal sensörlerin en önemli avantajlarından biridir (Thevenot ve ark., 2001). Bu

sebeplerden dolayı elektrokimyasal biyosensörler oldukça ilgi çekmektedir (Kuralay ve Demirci, 2014).

Bir diğer sınıflandırma biçimi ise biyobileşenin türüne bağlıdır. Bu sınıflandırma ise şu şekilde yapılabilir:

- Enzim Sensörleri
- İmmuno Sensörler
- Nükleik Asit Sensörler
- Hücre Esaslı Sensörler
- Doku Esaslı ve Organel Esaslı Sensörler
- Biyomimetrik Sensörler

Örneğin, biyobileşen enzim ise biyosensör enzim elektrodu, DNA ise DNA biyosensörü gibi isimler alabilir (Wang, 2008).

2.3.3. Elektrokimyasal Biyosensörler

Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları tayin eden sensör sistemlerinin hazırlanması mümkün iken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini gerçekleştirilebilir. Elektrokimyasal bir biyosensörün sahip olması gereken temel özellikler diğer biyosensör türlerinin çoğuyla aynıdır. Seçicilik, duyarlılık, tekrarlanabilirlik, hızlı cevap zamanı, düşük tayin sınırı, geniş ölçüm aralığı, kararlılık, kullanım ömrü, küçültülebilirlik, hızlı geri dönme zamanı ve düşük maliyet bir elektrokimyasal biyosensörün olmazsa olmazıdır.

Sinyal çeviricinin türüne göre elektrokimyasal biyosensörler 4 gruba ayrılır:

- Amperometrik Biyosensörler
- Potansiyometrik Biyosensörler
- İletkenlik Biyosensörleri
- İmpedimetrik Biyosensörler

2.3.3.1. Amperometrik Biyosensörler

Amperometrik biyosensörler en çok tercih edilen edilen biyosensör çeşitlerinden bir tanesidir. Clark oksijen elektrodu bir amperometrik biyosensördür. Genel anlamda amperometri belli bir potansiyeldeki akım değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Amperometrik biyosensörler, analit ile biyobileşen arasındaki biyoetkileşim sonucu oluşan türlerin yükseltgenmesine ya da indirgenmesine bağlı olarak çalışma elektrodunda oluşan akımın ölçüldüğü biyosensör çeşitleridir (Kuralay ve ark., 2006; Huang ve ark., 2009; Campuzona ve ark., 2012).

2.3.3.2. Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometri bir çalışma elektrodu ve referans elektrot arasında oluşan gerilim değerlerinin ölçüldüğü elektrokimyasal bir yöntemdir (Bard ve Faulkner, 2001). Potansiyometrik biyosensörlerin çalışma prensibi analit konsantrasyonuna bağlı olarak referans elektroduna karşı çalışma elektrodundaki gerilim değerinin ölçülmesine dayanmaktadır (Kuralay ve ark., 2005).

2.3.3.3. İletkenlik Biyosensörleri

İletkenlik biyosensörleri, analit ile biyobileşen arasında oluşan etkileşimden sonra meydana gelen elektriksel iletkenlikteki değişimin ölçülmesi temeline dayanır (Mello ve Kubota, 2002). Çoğu etkileşim çözeltinin kompozisyonunda bir değişiklik meydana getirir. Bu yüzden iletkenlik biyosensörleri bir çözeltideki her türlü değişikliği kolaylıkla tespit edebilir.

2.3.3.4. İmpedimetrik Biyosensörler

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi frekans düzleminde elektriksel bilgiler sağlayan bir yöntemdir (Khan ve Dhayal, 2009). Bu elektrokimyasal yöntem karakterizasyon amaçlı çalışmalar haricinde günümüzde amperometrik, potansiyometrik ve iletkenlik temelli elektrokimyasal biyosensörlere alternatif olarak oldukça sık kullanılmaya başlanmıştır. İmpedimetrik biyosensörler farklı modifikasyonlardan sonra elektrot-çözelti arayüzeyinde elektron aktarımına karşı olan direncin ölçülmesi temeline dayanır.

2.3.4. Elektrokimyasal Biyosensörlerin Uygulama Alanları

Elektrokimyasal biyosensörler nicel ve nitel amaçlı olarak birçok farklı disiplinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda nanomalzemelerin (karbon nanotüpler, grafen, peptit nanotüpler, nanopartiküller, biyoyumlu polimerler) biyosensör sistemine dahil edilmesi, uygulama alanlarını genişletmiştir. Daha duyarlı ve seçici hale gelen bu biyosensörler özellikle hastalıkların teşhis-tanı ve tedavisi için hızlı, pratik, tekrarlanabilir ve doğru analiz sonuçları veren küçük, portatif veya tek kullanımlık ölçüm sistemlerinin hazırlanmasına olanak sağlamıştır. Elektrokimyasal biyosensörlerin tıp, eczacılık, tarım, gıda, adli kimya, çevre analizleri başta olmak üzere farklı uygulama alanları vardır (Telefoncu, 1999; Egi, 2009).

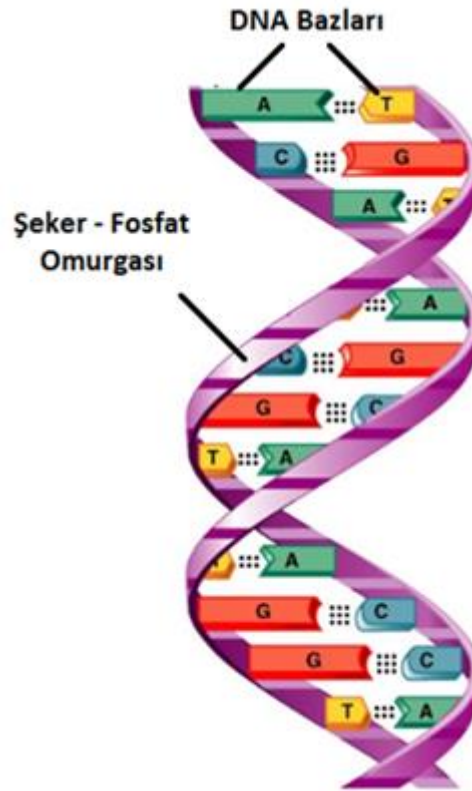
2.4. DNA

Deoksiribonükleik asit (DNA), yapısı aydınlatılmış bilinen en önemli biyomoleküllerden biridir. Bu biyomolekül bir canlıya ait tüm genetik bilgiyi taşımakta ve nesilden nesile aktarmaktadır. Canlı organizmaların ve birçok virüsün genetik bilgisinin replikasyon ve transkripsiyonu süreci boyunca protein ve enzimlerin biyolojik sentezini başlatması açısından DNA yaşam sürecinde büyük rol oynar (Wang, 2000, 2002; Gooding, 2002).

2.4.1. DNA'nın Yapısı ve Fonksiyonu

Nükleik asitler, 1868'de Friedrich Miescher tarafından keşfedilmiştir. 1937'de ise William Astbury DNA'nın düzenli bir yapı içerdiğini belirten ilk X ışını difraksiyon bulgularını elde etti. DNA'nın yapısıyla alakalı önemli bir diğer bilgi de 1940'lı yılların sonlarına doğru Erwin Chargaff ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar sonucunda elde edildi. Bu araştırmalarda farklı canlılarda dört nükleotidin aynı oranda bulunmadıkları ve kimi bazların oranlarının birbirleriyle alakalı olduğu ortaya çıkarıldı. Bu çalışmalar DNA'nın üç boyutlu yapısını inceleyip kalıtım materyalinin DNA'da kodlanarak kuşaktan kuşağa nasıl aktarıldığının temelini oluşturmuştur. 1953'te Francis Crick ve James Watson DNA'nın günümüzde kullanılan yapısını ileri sürmüşlerdir (David ve Michael, 2013). DNA molekülü monomerik nükleotit birimlerinden oluşan 2 tane antiparalel polinükleotit zincirinden meydana gelmektedir. Her nükleotit 3 çeşit kimyasal komponentten oluşmuştur: Fosfat grubu,

deoksiriboz denilen şeker grubu ve 4 farklı azot bazı. Fosfat-deoksiriboz şekerden oluşan polimerik kısım DNA iskeleti olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.5). Hücresel genetik bilgi ise pürin bazları; Adenin (A), Guanin (G) ve pirimidin bazları; Sitozin (C), Timin (T) olarak adlandırılan ardışık zincirde kodlanmaktadır. İki nükleotit dizisi çift sarmal olarak kıvrılmıştır ve her dizide bulunan bazlar A•T ve G•C şeklinde hidrojen bağlarıyla tutulmaktadır (Palecek ve Fojta, 2001; Palecek, 2002; Palecek ve Jelen, 2002). DNA'da bulunan şeker bir pentoz olan 2-deoksiribozdur. Birleşik iki şekerden birinin 3 numaralı karbonu ile diğerinin 5 numaralı karbon atomu arasındaki fosfat grubu, fosfodiester bağı kurarak şekerleri birbirine bağlar. Fosfodiester bağı asimetric olduğu için DNA ipliğinin tek bir yönü bulunmaktadır. DNA zincirinde bir iplikteki nükleotitlerin birbirine bağlandığı yönü, diğer ipliktekilerin yönünün tersidir. Antiparalel DNA ipliklerinin bu görünümüne verilen isimdir. DNA ipliklerin asimetric olan uçları 5' (beş üssü) ve 3' (üç üssü) olarak isimlendirilir, 5' uç bir fosfat grubu, 3' uç ise bir hidroksil grubu içerir (David ve Michael, 2013).



Şekil 2.5. DNA çift sarmalı (Cummings, 2004; Fojta ve ark., 2016)

2.4.2. DNA Hasarı

Bir canlıya ait tüm kalıtsal bilgiyi içeren DNA molekülü doğal olarak ya da çevresel etkenlerin etkisiyle devamlı hasara maruz kalmaktadır. İnsan hücrelerinde metabolik aktiviteler ve çevresel etkenlerle (UV ışığı gibi) günde 1 milyon hücre hasar görmektedir. Bu hasarlar DNA'nın yapısının ve diğer nesillere aktarılan genetik bilginin değişmesine neden olabilir. Bu nedenle, bütün canlı hücreleri DNA molekülünü koruma mekanizmaları geliştirmişlerdir.

DNA onarım sistemleri tarafından küçük hasarlar genellikle onarılır. Yüksek düzeydeki hasarlar apoptozisi uyararak hücre ölümüne sebep olur. Orta düzeydeki hasarlar ise genetik materyalde kalıcı değişimlere sebep olabilir. Orta düzeydeki bu hasarlar mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, kansere, Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklara ve yaşlanmaya sebep olmaktadır (Palecek ve ark., 1998; Fojta, 2002; Liu ve Hu, 2007).

Ayrıca, DNA molekülünün yapısında meydana gelen herhangi bir değişiklik genetik şifrede değişikliğe yol açacağından hatalı protein üretilmesine ve buna bağlı olarak farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olur. Sonuç olarak hasara uğrayan bir DNA molekülünde DNA bazları hasardan etkilenmekte ve bazların yapısında değişiklikler meydana gelmektedir (Kuralay ve ark., 2011). Bununla beraber iplikçik kırıkları (zincir kırıkları) görülebilir.

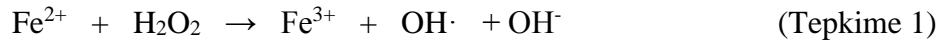
2.4.3. DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

İnsan sağlığı üzerinde ciddi etkilere ve DNA'nın yapısında değişikliklere neden olabilecek etkenler genel olarak endojen, ekzojen, kimyasal veya fiziksel etkiler olarak gruplandırılabilir (Fojta ve ark., 2016). Aşağıda bütün etkenler sırasıyla verilmektedir:

- 1. Spontan veya kalıtsal oluşan gen mutasyonları**
- 2. Doğal hücresel metabolizmadan kaynaklanan faktörler**
 - a. Mitokondriden enerji üretimi esnasında oluşan serbest radikaller
 - b. Enflamasyon
 - c. Detoksifikasyon işlemleri
- 3. Çevresel faktörler**
 - a. Ultraviyole ışık

- b. İyonize radyasyon
- c. Elektromanyetik dalgalar
- d. Kimyasal ajanlar: Aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinilkrolid gibi kimyasal maddeler
- e. Sigara, alkol kullanımı
- f. Hava kirliliği

Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri ve reaktif karbonil türlerinin DNA'ya zarar veren radikaller oluşturduğu bilinmektedir. Özellikle reaktif oksijen türleri mutagenез ve karsinogenез gibi önemli DNA lezyonlarına sebep olmaktadır ve bu durum oksidatif DNA hasarı olarak adlandırılmaktadır (Oliveria-Brett ve ark., 2002). Genel olarak, hücrelerde üretilen reaktif oksijen türleri hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH\cdot$) ve süperoksit anyonu (O_2^-) gibi serbest radikalleri içerir. Özellikle hidroksil radikali oldukça kararsızdır ve çoğu biyolojik molekül ile hızla ve spesifik olmayan bir şekilde reaksiyona girer. Bu tür, Fenton reaksiyonu gibi metal katalizli redoks reaksiyonlarında hidrojen peroksitten üretilmektedir. Fenton reaksiyonu hidrojen peroksitin, Fe^{2+} veya diğer geçiş elementleri (Cu, Zn Mn, Cr, Ni, Mo, Co) varlığında indirgenerek hidroksil radikali oluşturduğu reaksiyonlardır:



Sonuç olarak, bu tür oksidan maddeler kimyasal zincir reaksiyonları başlatarak hücrelere zarar verebilir (Fojta, 2002; Sancar, 2003). DNA'ya verilen bu hasar, DNA tamir mekanizmaları tarafından tersine çevrilmezse, mutasyonlara ve muhtemelen kansere neden olabilir. Antioksidan moleküllerin ise bu DNA hasarını engelleyebileceği üzerine araştırmalar yapılmıştır (Yang ve ark., 2013). Bu nedenlerden dolayı DNA hasarını hızlı, hassas ve kolay bir biçimde düşük maliyetli tayin edebilen analitik sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

2.5. Nanoteknoloji ve Nanomalzemeler

Nanoteknoloji, bir maddenin atomik, moleküler ve supramoleküler seviyede kontrol edilebilmesidir. En az bir boyutunun büyüklüğü 1-100 nanometre (nm) arası olan maddelerin kontrolü olarak da tanımlanabilir. Anlaşılacağı üzere, büyüklükle tanımlanan bir teknoloji olarak bu alan çok farklı disiplinleri içerisine alır (organik kimya, yarı iletken fiziği, moleküler biyoloji ve mikro fabrikasyon, vb.). Uygulama

alanları ise nanoölçekte yeni malzemelerin geliştirilmesinden atomik boyutta maddenin direkt kontrolüne kadar çeşitlilikler gösterebilir.

Nanomalzemelerin (grafen, karbon nanotüp, nanopartiküller gibi) sisteme dahil edilmesiyle özellikle biyosensör çalışmalarında eser miktarda maddelerin tayini mümkün olmakta ve aynı zamanda çok karmaşık matrislerde girişim yapan türlerden analit kolaylıkla ayrılabilir. Bu gibi çalışmalar nanomalzeme temelli çalışmalara olan ilgiyi artırmıştır. Nanomalzemeler, üstün fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olup oldukça kararlı yapılarda olan malzemelerdir. Özellikle grafen ile yapılan biyosensör çalışmaları günümüzde dikkat çekmektedir.

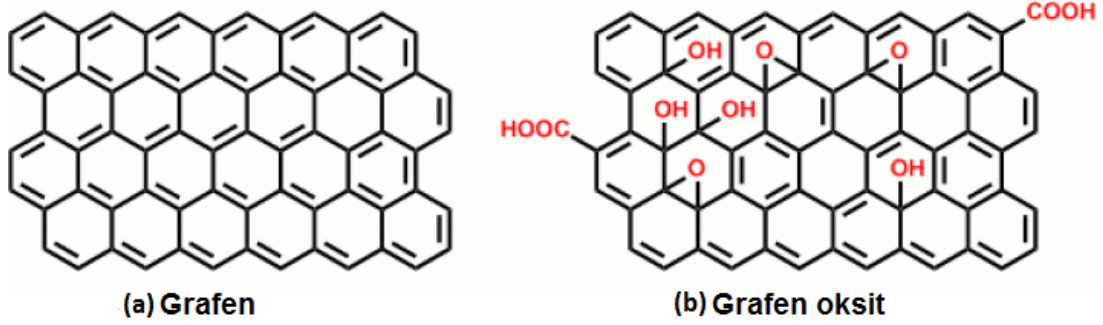
2.5.1. Grafen

2004 yılında Andre Geim ve Konstantin Novoselov tarafından literatüre kazandırılan ve bu bilim insanlarına 2010 yılında Nobel Fizik Ödülü kazandırmış olan “grafen” bilinen en dayanıklı malzemelerden biri olup üstün mekanik, termal, optik ve elektriksel özellikleri, şeffaf ve esnek bir malzeme olması nedeniyle oldukça ilgi çekmektedir (Zhu ve ark., 2007; Alwarappan ve ark., 2009; Bae ve ark., 2010). Çağımızın malzemelerinden biri olarak gösterilen grafen, karbon atomunun sp^2 hibritleşmesi yapan bal peteği örgülü yapılarından bir tanesine verilen isimdir: Karbonun gündelik hayatta çok iyi bilinen allotroplarından biri olan grafitin 1 atom kalınlığında ayrılmış halidir ve ısıyı en iyi ileten malzeme olarak bilinen grafen çelikten bile 100 kat daha kuvvetlidir. Bütün bu özelliklerinden dolayı elektronik cihazlarda, süper kapasitörlerde, (biyo)sensörlerde, pillerde, yakıt hücrelerinde, kompozitlerde ve fotonik biliminde son yıllarda oldukça rağbet görmektedir (Zhou ve ark., 2009; Moon ve ark., 2010; Zhu ve ark., 2011; Erdem ve ark., 2012).

Grafen tabakaları, mükemmel elektron taşıma özelliğine sahiptir ve birçok biyomolekülün ve ilacın oksidasyonuna yönelik yüksek elektrokatalitik özellikler sergiler. Bu nedenle, grafen modifiye elektrotlar çeşitli elektrokimyasal uygulamalar için yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Dahası, grafen temelli nanokompozitler, grafenin diğer malzemenin özelliklerini iyileştirmesi nedeniyle güçlü özelliklere sahiptir (Grosan ve ark., 2015).

Farklı grafen elde etme yöntemlerine bağlı olarak oluşan grafenin özellikleri ve kullanım alanları değişmektedir. Grafen birçok teknik kullanılarak sentezlenebilir.

Grafenin büyük ölçekte üretiminde sıkça kullanılan yöntemlerden biri verimin yüksek olması nedeniyle kimyasal indirgenme yöntemidir. Bu yöntem grafit oksidin grafene indirgenme basamaklarını içermektedir (Hummers ve ark., 1958). Bu yöntemde elde edilen grafen oksit sonrasında hidrazin kullanılarak grafene indirgenir (Zhou ve ark., 2009). Şekil 2.6'da grafen ve grafen oksitin kimyasal yapıları gösterilmektedir.



Şekil 2.6. (a) Grafen ve (b) grafen oksit yapıları

2.6. Literatürdeki Elektrokimyasal DNA Hasar Tayini Çalışmaları

Keşfedilen ilk biyosensör türünün elektrokimyasal olması ve karmaşık, gerçek bir matrikste kolaylıkla çalışması oldukça önemlidir. DNA tayini ve DNA-ilaç etkileşimi için tasarlanmış ve kullanılmış farklı elektrokimyasal sensörler bulunmaktadır (Erdem, 2007; Kuralay ve ark., 2009; Canavar ve ark., 2011). Elektrokimyasal DNA hasarı yaklaşımları genel olarak DNA immobilizasyonundan sonra DNA bazlarının veya redoks aktif prop olarak kullanılan türün sinyallerinin ölçümünü ve sonrasında ise DNA'yla hasar verici türlerin kovalent veya kovalent olmayan etkileşiminden sonra baştaki türlere veya ortaya çıkan yeni elektroaktif türlere ait elektrokimyasal sinyallerin ölçülmesi temeline dayanır (Wang , 2006; Liang ve Guo, 2007; Zatloukalova ve ark., 2011; Xiong ve ark., 2013). Anlaşılacağı üzere klasik bir elektrokimyasal DNA biyosensörü rahatlıkla DNA hasar tayini biyosensörlerinin tasarımında kullanılabilir. Elektrokimyasal analiz, DNA hasar tayini için oldukça avantajlı farklı yaklaşımlar sağlayabileceği gibi hasara sebep olan türlerin çevre, gıda ve klinik analizlerinde de önemli avantajlar sağlar.

Bu sebeplerle elektrokimyasal DNA hasar tayini çalışmaları oldukça önemli araştırmalar arasına girmiş ve çıktılar özellikle son 10 yıldır nanomalzemelerin de sisteme eklenmesi ile oldukça ses getirmeye başlamıştır. Bununla birlikte farklı

nanomalzemelere dayalı daha hassas, ucuz ve pratik ölçüm sistemlerinin geliştirilmesine halen ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde farklı elektrokimyasal DNA hasar çalışmaları bulunmaktadır. Farklı gruplar farklı elektrot malzemeleri geliştirerek farklı hasar reaktifleri ile DNA molekülünü hasara uğratmış ve bu hasarlı DNA'nın tespitini ve hasarın giderilmesini çalışmışlardır. Antrasilin ailesine ait bir antibiyotik olan Adriamisin'in dsDNA'ya yaptığı oksidatif hasar diferansiyel puls voltametri ile camsı karbon elektrot (GCE)'ta Oliveria-Brett ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır (Oliveria-Brett ve ark., 2002). Deneysel bulgular kanserli hücrelerde reaktif oksijen türleri ve yüksek dozda 8-oksoguanin oluşturması sebebiyle Adriamisin'in oksidatif DNA hasarına sebep olduğunu göstermiştir. Bilindiği gibi *in vitro* çalışmalarda oksidatif stresin bilinen bir belirteci olarak kullanılan 8-oksoguanin (8-oxoG) oldukça mutajeniktir. Yine Oliveria-Brett ve arkadaşları dsDNA ile yükseltgenmiş formdaki kuersetini kullanarak hasar çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Oluşan radikaller dsDNA'daki hidrojen bağlarını kırarak 8-oksoguanin ortaya çıkarmaktadır. Kuersetin ile indüklenmiş DNA hasarı camsı karbon elektrotta diferansiyel puls voltametri ile incelenmiştir (Oliveria-Brett ve Diclesu, 2004). Chen ve arkadaşları dopaminin Fenton reaktifleri varlığında yükseltgenmesi ile ortaya çıkan $\cdot\text{OH}$ radikalinin sebep olduğu DNA hasarını $[\text{Co}(\text{bpy})_3]^{3+}$ redoks probu varlığında incelemişlerdir. Camsı karbon elektrot üzerine modifiye edilen dsDNA ve ssDNA'daki hasar dopamine/ Fe^{+3} reaksiyonu ile diferansiyel puls voltametri ile araştırılmıştır (Chen ve ark., 2013). Chen ve arkadaşları ayrıca oksidatif DNA hasarını hidrofobik bir iyonik sıvı olan 1-bütül-3-metilimidazolyum hekzaflorofosfat varlığında tespit etmişlerdir. Bu iyonik sıvı serbest radikallerin oluşumu için susuz çözücü ortamı sağlamıştır (Chen, Xiong, Wen ve ark., 2013).

Tang ve arkadaşları polianilin/kitosan modifiye camsı karbon elektrotlar üzerine dsDNA immobilize ederek hidrokinonun DNA'ya verdiği zararı diferansiyel puls voltametri ile tayin etmişlerdir (Tang ve ark., 2014). Çalışmada guanin yükseltgenme sinyallerinde azalma gözlenirken hidrokinon yükseltgenme sinyalinde artış gözlenmiştir. Yine Tang ve arkadaşları başka bir çalışmada çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNTs)/kitosan modifiye camsı karbon elektrotlar üzerine dsDNA immobilize ederek 6-merkaptopürinin DNA'ya verdiği zararı diferansiyel puls

voltametrisi ile incelemişlerdir. Adenindeki hasarın guanine oranla daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Tang ve ark., 2015). Lu ve arkadaşları perflorooktan sülfonat ile indüklenmiş DNA hasarını aşırı yükseltgenmiş polipirol filmlerinde metilen mavisi redoks probu kullanarak diferansiyel puls voltametrisi ve elektrokimyasal empedans yöntemleri ile incelemişlerdir (Lu ve ark., 2013). Krom/glutasyon/H₂O₂ sistemi ile indüklenmiş DNA hasarı Ensafi ve arkadaşları tarafından çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNTs)/poli(dialildimetilamonyum klorür) modifiye kalem grafit elektrotlarla metilen mavisi redoks probunun diferansiyel puls voltamogramlarını inceleyerek araştırılmıştır (Ensafi ve ark., 2013). Ziyatdinova ve Labuda perde baskılı karbon elektrotları tek duvarlı karbon nanotüp ve kitosan ile modifiye ederek Fenton tipi reaktifler kullanarak DNA hasar tayini gerçekleştirmişlerdir. Kare dalga puls voltametrisi, dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemleri ile hasar tayini izlenmiştir (Ziyatdinova ve Labuda, 2011). dsDNA'nın hasardan sonra heliks yapısında açılma olduğu belirtilmektedir. İndikatör olarak kullanılan tiyoridazinin cevabında hasardan sonra azalma meydana gelmesi heliks yapının degradasyonunu desteklemektedir. CdTe kuantum noktaları varlığında camsı karbon elektrot kullanılarak dsDNA'ya UV-C ışığının yaptığı zarar dönüşümlü voltametri ve kare dalga puls voltametrisi ile incelenmiştir (Hlavata ve ark., 2015). Lin ve arkadaşları bisfenol A ile indüklenen DNA hasarını grafen oksit-kitosan/altın nanopartikül (AuNP) modifiye camsı karbon elektrotlarda metilen mavisi redoks probunun elektrokimyasal sinyallerinin diferansiyel puls voltametrisi ile incelemesi ile tayin etmişlerdir (Lin ve ark., 2015). dsDNA ve ssDNA'ya 1,2-naftakinon türevi olan biflorinin zararı diferansiyel puls voltametrisi ile incelenmiştir. Deneyler spektrofotometri çalışmaları ile de desteklenmiştir (Vasconcellos ve ark., 2016). Gu ve arkadaşları camsı karbon elektrotlara çok duvarlı karbon nanotüp modifiye ederek 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) biyosensörü geliştirmişlerdir. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin genellikle oksidatif DNA hasarının biyobelirteci olarak tanımlanır (Guo ve ark., 2016).

Grafen ve grafen oksit temelli DNA hasarı biyosensör çalışmaları günümüzde oldukça ilgi çekmektedir (Jia ve Wang, 2013; Gao ve ark., 2014). Zhou ve arkadaşlarının çalışmasında grafen oksit iyi bir floresans söndürücü özelliğe sahip olduğu için karboksifluoresein ile işaretli prop DNA, tamamlayıcı (hedef) DNA'nın

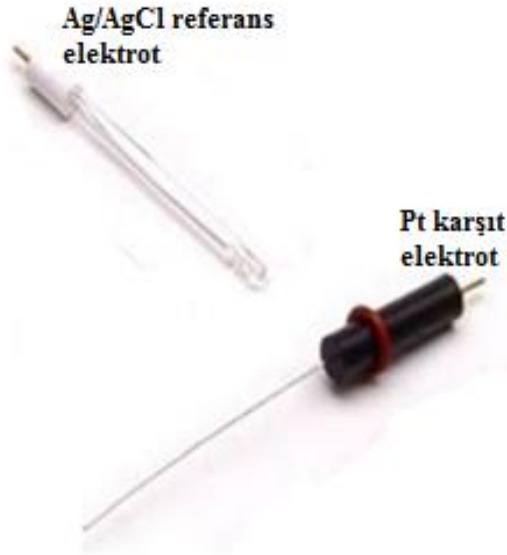
klorpirifos-metil varlığında hasar görmesinden dolayı hedef dizi ile eşleşemez ve floresan sinyallerindeki değişim izlenir (Zhou ve ark., 2012). Yine grafen oksidin bu özelliğinden faydalanarak Zhou ve arkadaşları tarafından farklı sönme kapasitelerine bağlı olarak DNA hasarı klorpirifos-metil ve stiren bileşikleri varlığında tespit edilmiştir (Zhou ve ark., 2012). Liu ve arkadaşları grafen yüzeyler üzerinde Fenton reaksiyonu kullanarak oksidatif DNA hasarını floresans temelli tayin etmişlerdir (Liu ve ark., 2011). Jia ve arkadaşları grafen/Nafyon nanokompozitleri camsı karbon elektrot üzerine yeşil elektrokimya indirgenme tekniği ile kaplamışlar ve bu oluşturulan elektrodu 8-hidroksi-2'-deoksiguanozinin dönüşümlü voltametri yöntemi ile tayininde kullanmışlardır (Jia ve Wang, 2013). Yang ve arkadaşları, gerçek örnek (meyve suyu)'te grafen modifiye camsı karbon elektrotlarla Fenton tipi reaksiyonlara dayalı DNA hasarı çalışmışlardır (Yang ve ark., 2013).

Yapılan makale taramalarında da görüldüğü üzere DNA hasarının belirlenmesi çok önemli bir konu olup, bu alanda hızlı, güvenilir, duyarlı, seçici ve ekonomik tayin platformlarına olan ihtiyaç artmaktadır. Özellikle karbon bazlı bir elektrot materyali ile DNA immobilizasyonu elektrot üzerine kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Fakat bu çıplak elektrotlarda duyarlılık oldukça düşüktür. Bu nedenle yüzeyin elektrokimyasal özelliklerini artıracak modifikasyonlara ihtiyaç olmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak özellikle grafenin kullanıldığı yeni nesil elektrokimyasal çalışmalar oldukça yeni ve azdır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Elektrotlar

Dönüşümlü voltametri, empedans spektroskopisi ve diferansiyel puls voltametrisi AUTOLAB-PGSTAT 204 cihazı ile gerçekleştirildi. Bu cihazda NOVA 1.11 yazılım sistemi kullanıldı (Metrohm, Hollanda). Üçlü elektrot sistemi, çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrot (BASi, Lafeyette, ABD) ve platin (Pt) (BASi, Lafeyette, ABD) karşıt elektrottan oluşmaktadır. Deneylerde çalışma elektrodu olarak tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrot (SPCE) (Dropsens, İspanya), kalem grafit elektrot (PGE) ve camsı karbon elektrot (GCE) (3 mm çapında, Metrohm, Hollanda) kullanılmıştır. Şekil 3.1’de kullanılan referans ve karşıt elektrotlar, Şekil 3.2’de ise kullanılan çalışma elektrotları gösterilmektedir. Kalem grafit elektrot laboratuvarında Rotring 0.5 mm kaleme bir bakır tel sarılarak yapılmıştır. Deneylerde elektrot yüzeyi olarak Tombow HB 0.5 kalem ucu kullanıldı. Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri Zeiss Ultra Plus FESEM (Zeiss, Almanya) ile alınmıştır. UV-Vis ölçümleri için BioSpec-nano spektrofotometresi (Shimadzu, Japonya) kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Kullanılan referans ve karşıt elektrotlar



Şekil 3.2. Kullanılan çalışma elektrotları

Camsı karbon elektrotu (GCE) 0.05 μm 'lık alümina (Al_2O_3) çamuru ile her defasında temizlenmiştir. Daha sonra 5 dakika sonikatörde bekletilip kurutulmuştur. Referans elektrot doygun 3 M'lık KCl çözeltisi içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.2. Kullanılan Kimyasallar Maddeler

Deneyleerde kullanılan hidrojen peroksit (H_2O_2) (%30), demir sülfat (FeSO_4), askorbik asit, sodyum asetat, asetik asit (CH_3COOH), sodyum hidrojen fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), potasyum ferrisiyanür ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), potasyum ferrosiyanür ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), potasyum klorür (KCl) ve sodyum klorür (NaCl) Sigma-Aldrich'ten alınmıştır. Çift sarmal DNA (dsDNA, fish sperm) Serva'dan temin edilmiştir. Diğer kimyasal maddeler, Sigma-Aldrich, Fluka ve Merck'ten sağlanmıştır. Kullanılan kimyasal maddeler analitik safliktadır.

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Deneysel Ortam

Deneyleerde kullanılan tüm çözeltiler deney öncesinde oksijen gazının girişimini engellemek için %99.99 saflıkta azot gazı (BOS, Türkiye) ile 5 dakika doyurulmuştur. Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (n=3).

5 mM ferri-ferrosiyanür $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$ çözeltisinin hazırlanması: Potasyum ferrisiyanür ve potasyum ferrosiyanür 5 mM olacak şekilde 0.1 M KCl ortamında saf su (destile su) ile hazırlandı.

50 mM asetat tampon çözeltisi (ABS)'nin hazırlanması: 50 mM olacak şekilde sodyum asetat ve asetik asitten hazırlanmıştır. Çözeltinin pH'ı 4.8 olacak şekilde gerekli pH ayarlamaları NaOH ile gerçekleştirilmiştir.

50 mM fosfat tampon çözeltisinin hazırlanması: 50 mM olacak şekilde sodyum hidrojen fosfat ve sodyum dihidrojen fosfattan saf su ile hazırlandı. Çözeltinin pH'ı 8.5 olacak şekilde gerekli pH ayarlamaları NaOH ile gerçekleştirilmiştir.

dsDNA çözeltisinin hazırlanması: 250 mg/L stok dsDNA çözeltisi iyonik şiddeti dengelemek adına 20 mM NaCl içeren 50 mM pH 4.8 asetat tamponunda hazırlanmıştır. Kullanılan tampon çözelti ultra saf su ile hazırlanmıştır.

ssDNA çözeltisinin hazırlanması: Bu çözelti 250 mg/L dsDNA'dan hazırlanmıştır. 250 mg/L dsDNA çözeltisi kaynayan su banyosunda 15 dakika bekletildi. Sonrasında hemen buz banyosuna alındı ve 15 dakika bu ortamda tutularak sonrasında deneylerde kullanıldı.

Fenton reaktiflerin hazırlanması: Fe^{2+} ve H_2O_2 kullanılarak farklı derişimlerdeki çözeltiler 50 mM pH 8.5 fosfat tamponunda hazırlanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

DNA bazlarının elektrokimyasal aktivite göstermesi, ekonomik ve hassas analiz sağlayan elektrokimyasal DNA sensör teknolojilerinin geliştirilmesi adına oldukça önemli avantajlar sağlar. Özellikle karbon bazlı elektrot materyalleri kullanarak DNA bazlarına ait elektrokimyasal sinyaller herhangi bir indikatör kullanmadan takip edilebilir. Fakat bu elektrotlarda düşük hassasiyetten dolayı birbirine yakın bölgelerde yükseltgenen veya indirgenen DNA bazlarının birbirinden tam olarak ayrılması her zaman mümkün olamamaktadır. Ayrıca, klasik karbon bazlı elektrot materyalleri (camsı karbon elektrot, karbon pastası elektrodu, pirolitik grafit elektrot, vb.) pahalı olmakla birlikte analiz sonrası farklı temizleme, ön muamele basamakları içermekte ve çoğu zaman bu işlemler oldukça zaman almaktadır. Temizleme işlemlerinden sonra bile çoğu elektrotta tekrarlanabilirlik problemi yaşanmaktadır. Tek kullanımlık ucuz, pratik elektrot teknolojisi bu problemlerin üstesinden gelmekle birlikte farklı materyallerin (nanomalzeme gibi) bu elektrot yüzeylerine kolayca modifikasyonu ile çok farklı uygulamalara yönelik seçici sensör sistemlerinin hazırlanması mümkün olmaktadır. Bu tez çalışmasında, tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrot ve kalem grafit elektrot üzerine çağın malzemelerinden biri olarak kabul edilen grafen modifiye edilerek elektrot malzemeleri daha duyarlı hale getirilmiş ve genetik bilgiyi taşıyan nükleotitleri oluşturan dört DNA bazının elektrokimyasal sinyalleri DNA hasarına yol açan reaktifler varlığında (Fenton reaktifi, Fe^{2+}/H_2O_2) ve yokluğunda incelenmiştir. Ayrıca antioksidan maddelerin DNA hasarını azaltıcı etkileri bilinmektedir. Askorbik asit varlığında, hazırlanan DNA hasar tayini elektrodunun cevabı araştırılmıştır. Grafen temelli DNA hasarı çalışmaları oldukça yeni ve az olup bu teknolojiye yine tek kullanımlık elektrot teknolojisinin eklenmesi yüksek kalitede ve kullanımı son derece pratik elektrot materyallerinin hazırlanmasına olanak sağlamaktadır.

Tez çalışmaları aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

- Grafen sentezi ve karakterizasyonu
- Hazırlanan grafenin elektrot yüzeyine modifikasyonu ve elektrokimyasal karakterizasyon
- Fenton reaktifleri ile DNA hasar çalışmaları

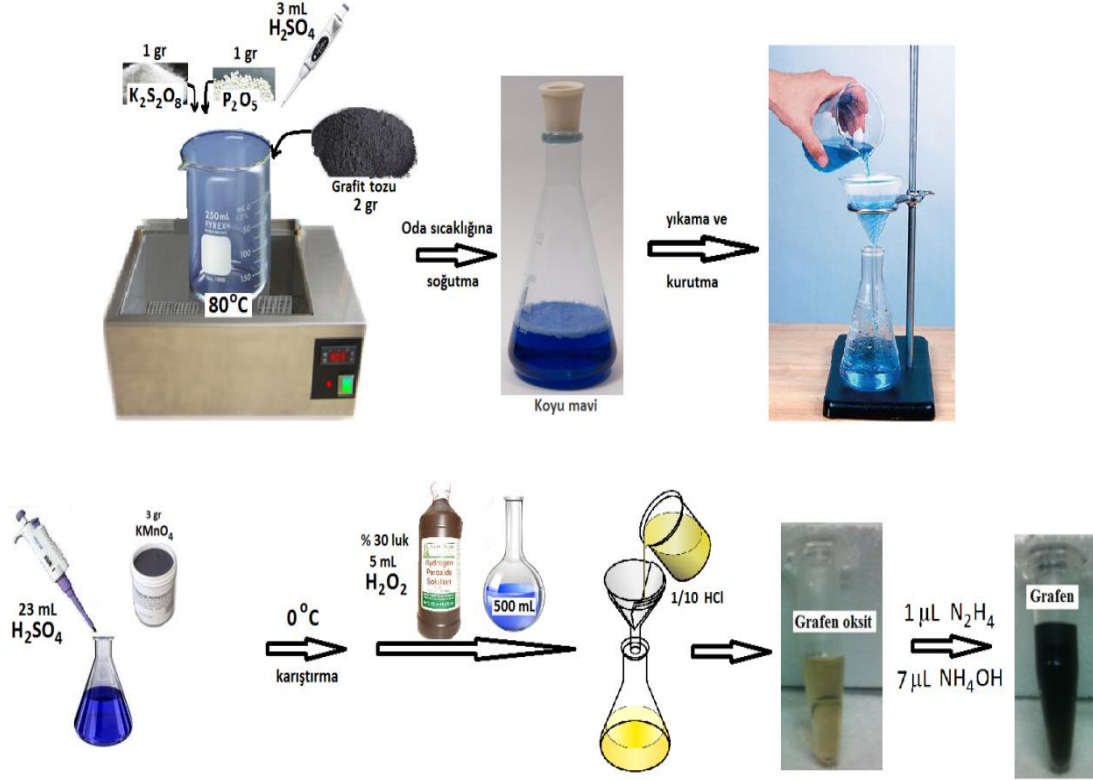
- Grafen modifiye elektrotlar ile yapılan DNA hasarı çalışmalarının camı karbon elektrot ile kıyaslanması

4.1. Grafen Sentezi ve Karakterizasyonu

Grafen sentezi ekonomik, kolay ve veriminin yüksek olması nedeniyle en çok kullanılan yöntemlerden biri olan grafit oksidin grafene indirgenme basamaklarını içeren kimyasal indirgenme yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. İlk olarak grafit kullanılarak modifiye Hummers' metodu ile grafen oksit hazırlanmıştır (Hummers ve Offeman 1958; Zhou ve ark., 2009). Daha sonra hidrazin kullanılarak grafen oksit, grafene indirgenmiştir. Elde edilen grafen SEM ile karakterize edilmiştir. Grafen hazırlama basamakları aşağıdaki şekilde basamak basamak gösterilmektedir (Şekil 4.1). Son basamaktaki ürün olan grafenin verimi grafen oksit eldesine giden basamakta kullanılan sonikatör (ultrasound)'ün gücüne ve bekletme süresine göre değişebilmektedir (Zhou ve ark., 2009).

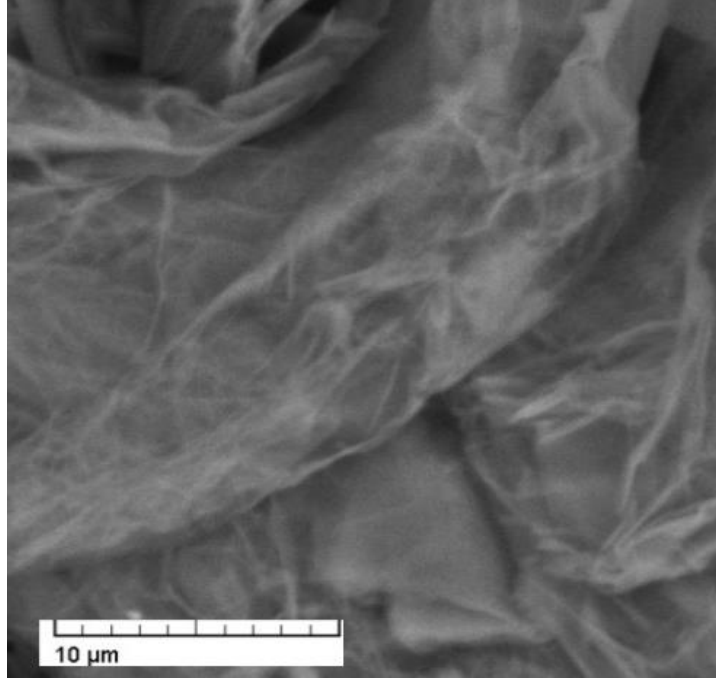
Grafen sentezi şu şekilde gerçekleştirilmiştir: 1 g $K_2S_2O_8$ ve 1 g P_2O_5 bir beherin içerisine kondu ve üzerlerine yavaş yavaş 3 mL H_2SO_4 eklendi. Beher su banyosu üzerine konuldu ve 80 °C'de sabit tutularak yavaş yavaş 2 g grafit eklendi. 1 saat sonra su banyosundan alınarak yaklaşık 6 saat boyunca oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Elde edilen çözelti, koyu mavi (lacivert) renkte idi. Soğuduktan sonra siyah bantlı bir süzgeç kağıdı yardımı ile süzme ve destile su ile yıkama işlemleri yapıldı. Yıkama işlemine nötr pH elde edilene kadar devam edildi. Daha sonra elde edilen katı oda koşullarında 1 gece kurumaya bırakıldı. Ertesi gün elde edilen grafit oksite 23 mL H_2SO_4 eklendi. Üzerine yavaş yavaş 3 g $KMnO_4$ ilave edildi. Karıştırma işlemi 0 °C'de yavaş yavaş gerçekleştirildi ve sıcaklığın 20 °C'yi geçmemesi için sürekli olarak sıcaklık kontrol edildi. Sonrasında 92 mL H_2O ilavesi yapılarak 35 °C'de 2 saat karıştırılmaya devam edildi. Peşinden 15 dakika beklendikten sonra 500 mL H_2O ve 5 mL H_2O_2 (%30'luk) eklendi. Süzme işlemi yapıldıktan sonra 1:10 HCl ile metal iyonlarının uzaklaştırılması için yıkama yapıldı. Elde edilen çökelek sarı veya turuncu renk olmalıdır. Elde edilen ürün suda çözüldü ve bu çözelti sarı renk idi. Daha sonra çözelti sonikatöre konuldu ve en az 1 saat beklendi. Grafit oksit tabakaları sonikasyon ile birbirinden ayrılmaktadır.

Sarı renkteki süpernatant (grafen oksit) alınarak üzerine 1 μL hidrazin ve 7 μL NH_4OH eklendi. Bu çözelti 95 $^\circ\text{C}$ 'de 1 saat tutularak indirgenme işlemi dolayısıyla grafen eldesi gerçekleştirildi. İşlem sonunda çözeltinin rengi siyahi bir renk aldı.



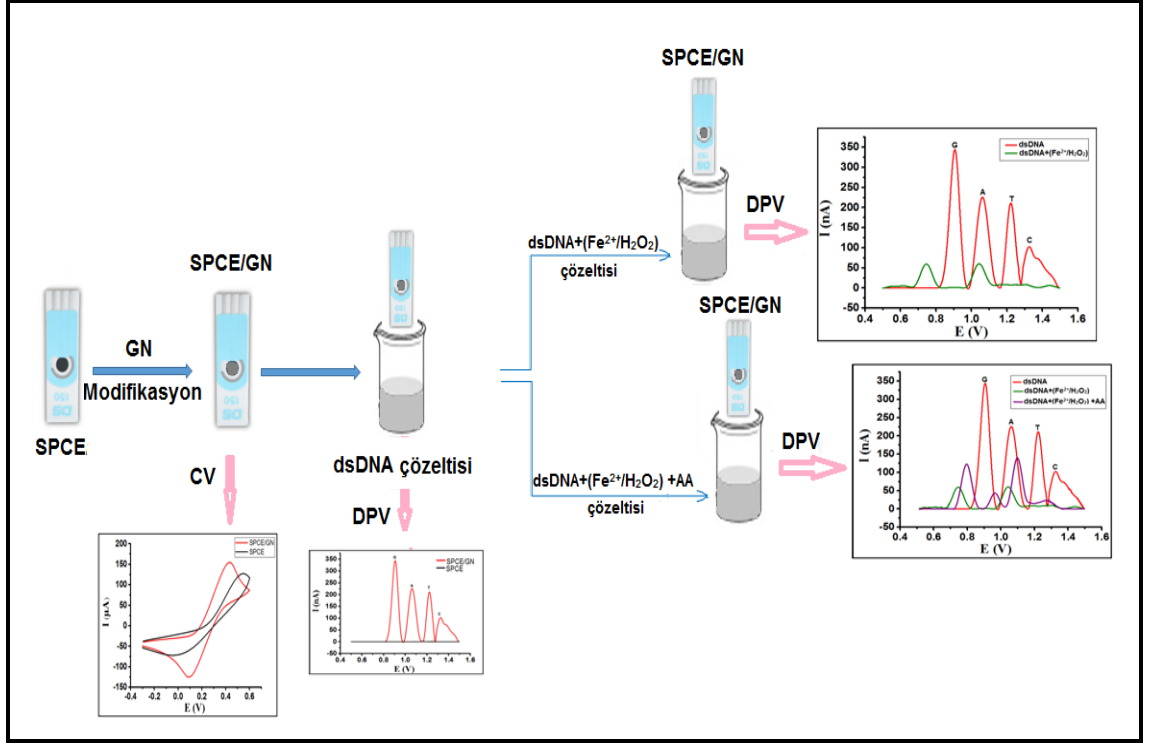
Şekil 4. 1. Grafen sentez basamakları

Elde edilen grafen taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile karakterize edilmiştir. Şekil 4.2'de sentezlenen grafene ait SEM görüntüsünü gösterilmektedir. Bu şekilde grafene ait tabakalar rahatlıkla görülmektedir.

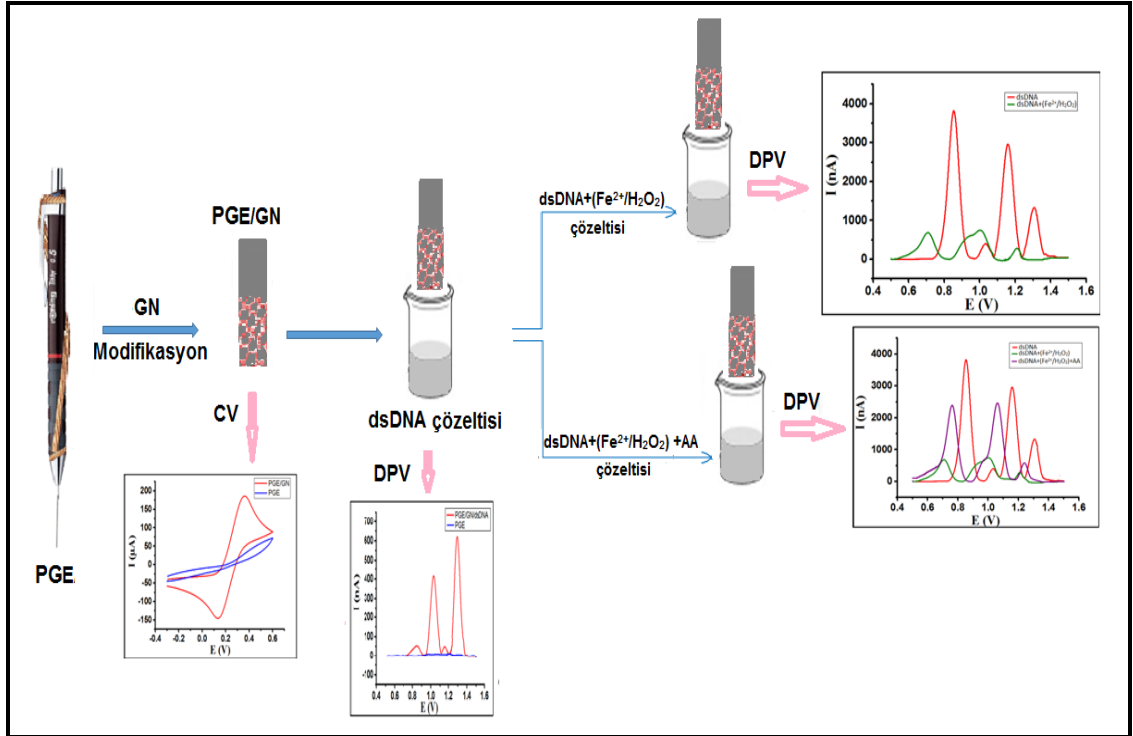


Şekil 4.2. Sentezlenen grafene ait SEM görüntüsü

Çalışmanın devamında sentezlenen grafen, elektrot yüzeylerine modifiye edilerek elektrokimyasal DNA hasar tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir. dsDNA ve ssDNA için grafen modifiye karbon elektrot (SPCE/GN) ve grafen modifiye kalem grafit elektrot (PGE/GN) kullanılarak yapılan deneyler aşağıdaki şekillerde özetlenmekte ve şematize edilmektedir (Şekil 4.3, Şekil 4.4). Hasarı giderici etkisi olan askorbik asitle de hasar gören DNA çözeltisi etkileştirilmiştir ve onarıcı etki takip edilmiştir.



Şekil 4.3. SPCE için dsDNA kullanılarak yapılan deneysel çalışmaların şematik gösterimi

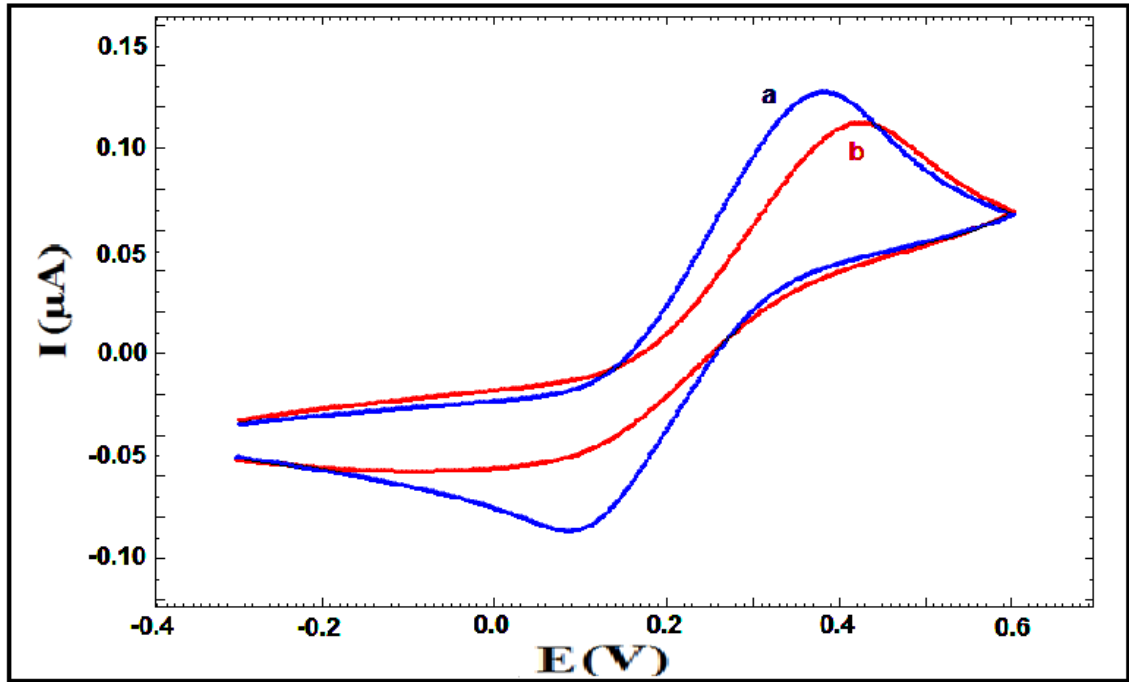


Şekil 4.4. PGE için dsDNA kullanılarak yapılan deneysel çalışmaların şematik gösterimi

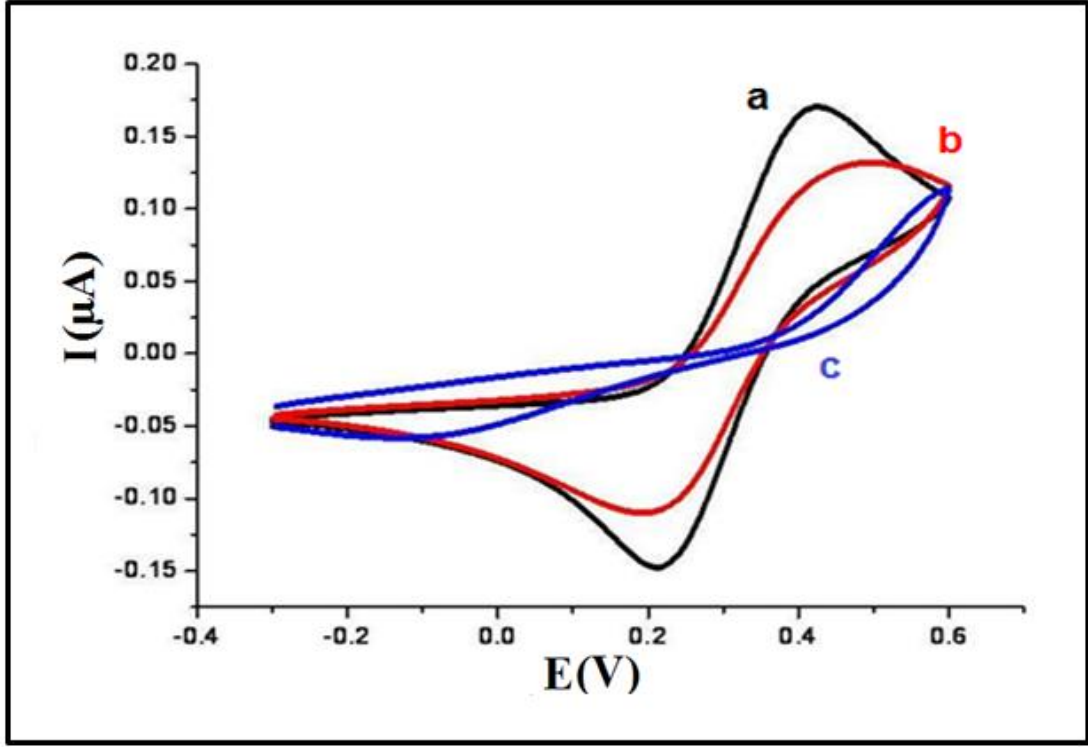
4.2. Sentezlenen Grafenin Elektrot Yüzeylerine Modifikasyonu ve Karakterizasyon Çalışmaları

Sentezlenen ve karakterize edilen grafen (2.5 mg/mL), perde baskılı karbon elektrot üzerine (sadece çalışma elektrodunu örtecek şekilde, 10 µL) bir mikropipet yardımı ile damlatılmış, 15 dk bekletilmiş ve sonrasında etüvde 35 °C’de kurutularak grafenin SPCE üzerine modifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bir eppendorf tüp içerisine alınan aynı derişimdeki grafen çözeltisine ise 0.5 mm Tombow HB kalem ucu 15 dk daldırılmış ve sonrasında etüvde 35 °C’de kurutulmuştur (Zhou ve ark., 2009). Bu şekilde hazırlanan grafen modifiye elektrotlar dönüşümlü voltametri (CV) yöntemi ile 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ redoks probu içeren 0.1 M KCl çözeltisi içerisinde karakterize edilmiştir. CV ölçümleri -0.3 V ile +0.6 V arasında Ag/AgCl referans elektroda karşı 100 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Deneyleerde karşıt elektrot olarak ise bir platin (Pt) tel kullanılmıştır. Dönüşümlü voltamogramlar yine çok iyi elektrokimyasal özellikleri olan başka bir nanomalzeme (karbon nanotüp) varlığında da alınmıştır. Bunun için önce 2.5 mg/mL çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) çözeltisi hazırlanmıştır. Karbon nanotüpün çözücüsü olarak dimetilformamid (DMF) kullanılmıştır. Karbon nanotüpün modifikasyonu da her iki elektrot için grafen modifikasyonunda anlatıldığı şekilde yapılmıştır: Karbon nanotüp çözeltisi (2.5 mg/mL) SPCE üzerine (sadece çalışma elektrodunu örtecek şekilde, 10 µL) bir mikropipet yardımı ile damlatılmış, 15 dk bekletilmiş ve sonrasında etüvde 35 °C’de kurutularak karbon nanotüpün SPCE üzerine modifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bir eppendorf tüp içerisine alınan aynı derişimdeki karbon nanotüp çözeltisine ise 0.5 mm Tombow HB kalem ucu 15 dk daldırılmış ve sonrasında etüvde 35 °C’de kurutulmuştur. Şekil 4.5-a,b ve Şekil 4.6-a,b’de sırasıyla grafen ve karbon nanotüp modifiye SPCE ve PGE’ a ait dönüşümlü voltamogramlar görülmektedir. Şekil 4.5-a’da +0.38 V’da (Ag/AgCl referans elektroda karşı) gözlenen yükseltgenme piki redoks probunun ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) yapısında bulunan Fe^{2+} ’nin Fe^{3+} ’e yükseltgenmesini göstermektedir. +0.10 V civarında görülen indirgenme piki ise Fe^{3+} ’ün Fe^{2+} ’ye indirgenmesine aittir. Bu redoks pikleri karbon nanotüp modifiye elektroda ait dönüşümlü voltamogramda daha pozitif ve negatif değerlere kaymıştır. Yani elektrokimyasal tersinirlik biraz daha azalmıştır. Ayrıca grafen modifiye elektrotta redoks çiftine ait yükseltgenme ve

indirgenme pik akımları daha yüksek çıkmıştır. Aynı elektrokimyasal cevaplar PGE varlığında Şekil 4.6-a ve b'de aynı şekilde elde edilmiştir. Çıplak yani modifiye olmayan PGE'un cevabı da nanomalzeme modifiye elektrotların cevaplarına örtüştürüldüğünde (Şekil 4.6-c) elektrokimyasal cevabın oldukça düşük olduğu gözlenmektedir. Ayrıca bu voltamogram elektrot malzemesinin bu aralıkta başka herhangi bir elektroaktivite göstermediğini ortaya çıkarmaktadır. Sonuç olarak nanomalzeme varlığında artan elektriksel iletkenlik ve kolay elektron aktarım hızına bağlı olarak dönüşümlü voltamogramların daha tersinir ve daha yüksek pik akımlarına sahip olduğu görülmüştür. Grafen modifiye ve karbon nanotüp modifiye elektrotlara ait dönüşümlü voltamogramlar kıyaslandığında grafen modifiye elektrodun elektrokimyasal davranışının daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Grafen modifiye yüzey, ekonomik olması ve pratik hazırlanması nedeniyle oldukça avantajlı olan atılabilir elektrot malzemelerinin özelliklerini iyileştirmektedir.

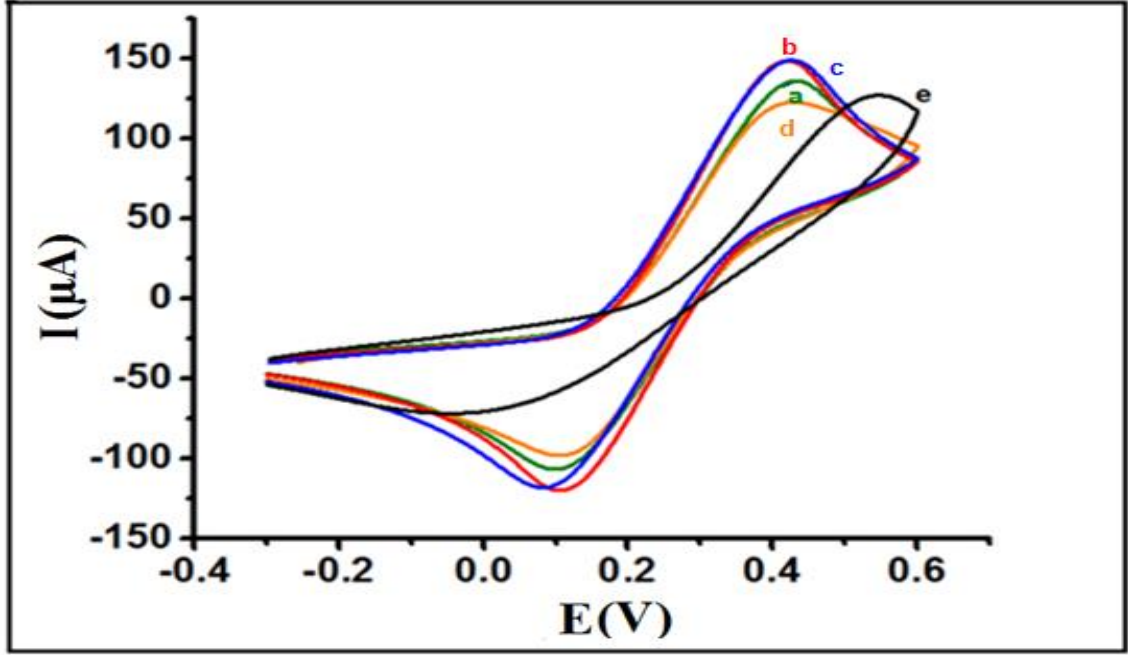


Şekil 4.5. (a) Grafen modifiye SPCE, (b) çok duvarlı karbon nanotüp modifiye SPCE'un 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0.1 M KCl'deki dönüşümlü voltametik davranışları

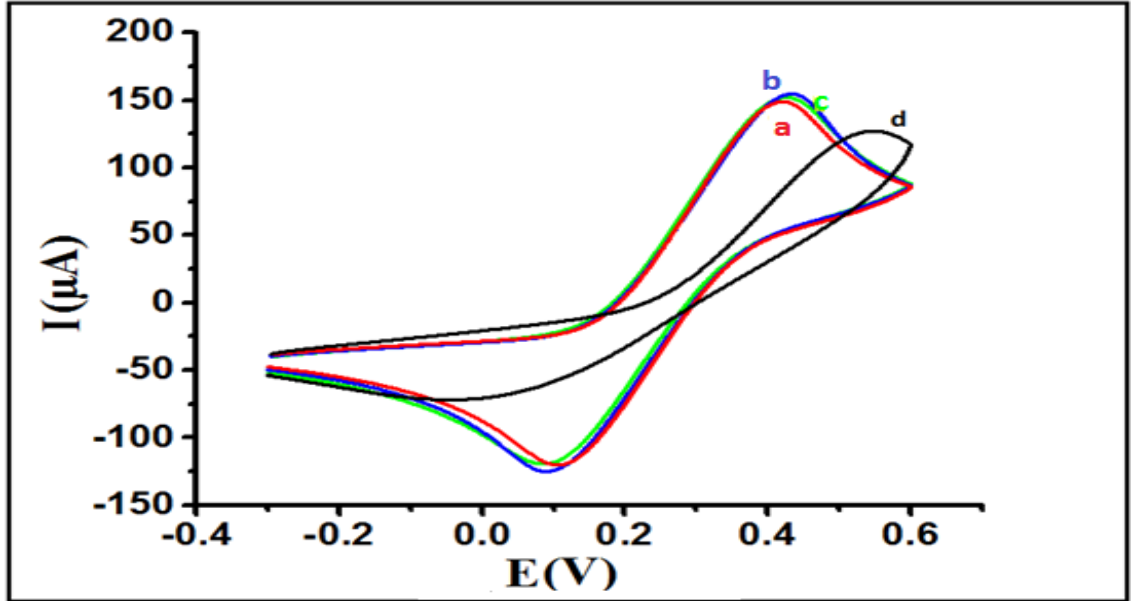


Şekil 4.6. (a) Grafen modifiye PGE, (b) çok duvarlı karbon nanotüp modifiye PGE, (c) çıplak PGE'nin 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0.1 M KCl'deki dönüşümlü voltametrik davranışları

Grafen modifiye elektrotların karbon nanotüp modifiye ve çıplak elektrotlara göre elektrokimyasal davranışlarının daha iyi olduğu tespit edildikten sonra grafen derişiminin elektrokimyasal cevapları nasıl etkilediği araştırılmıştır. Şekil 4.7'de farklı derişimdeki grafen (2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL) modifikasyonlarına ait SPCE'ta alınan dönüşümlü voltamogramlar gösterilmektedir. Çıplak yani modifiye olmayan SPCE'un cevabı grafen modifiye elektrotların cevapları ile örtüştürüldüğünde çıplak elektrodun davranışının yine çok düşük olduğu gözlenmektedir. Şekil incelendiğinde en iyi elektrokimyasal cevabın (yüksek redoks pik akımları ve yakın pik potansiyelleri) 1 mg/mL grafen çözeltisi modifiye SPCE'ta elde edildiği görülmüştür. Sonrasında ise farklı grafen modifikasyon süreleri (5 dk, 15 dk, 30 dk) çalışılmıştır. Şekil 4.8 incelendiğinde 3 modifikasyon süresinin etkisinin de birbirine çok yakın olduğu tespit edilmiştir. 15 dk'lık modifikasyon süresinde daha yüksek yükseltgenme ve indirgenme pikleri elde edildiği için 15 dk modifikasyon süresi bu elektrot için optimum seçilmiştir.



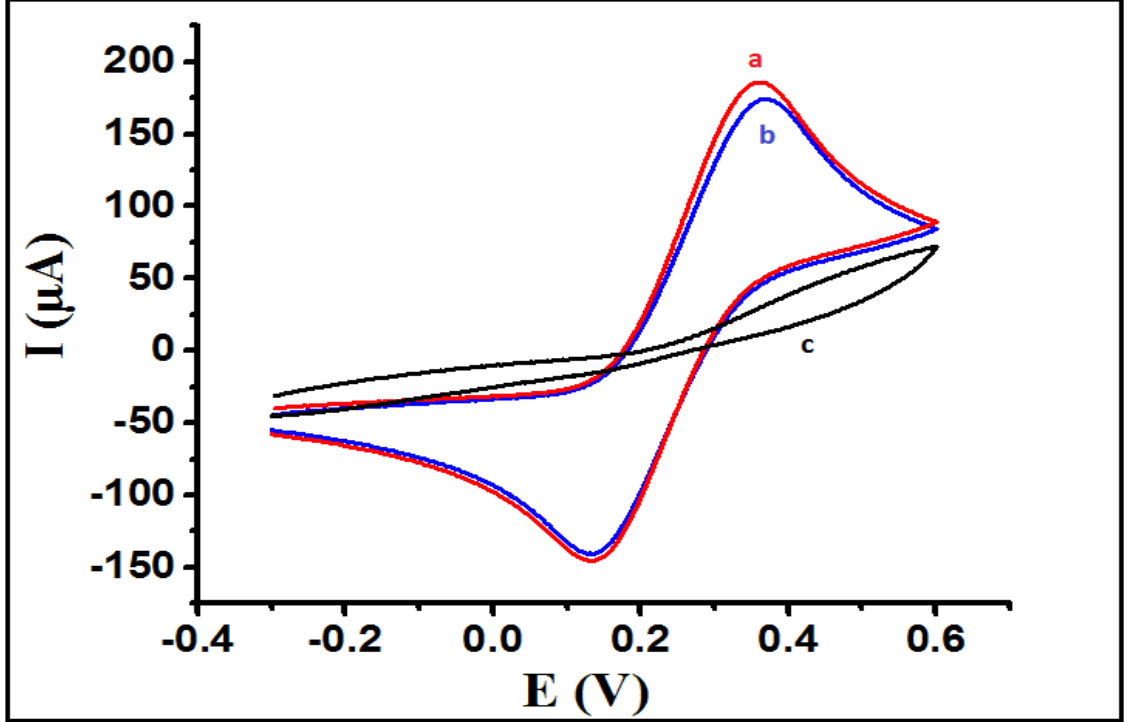
Şekil 4.7. (a) 2 mg/mL grafen modifiye SPCE, (b) 1 mg/mL grafen modifiye SPCE, (c) 0.5 mg/mL grafen modifiye SPCE, (d) 0.25 mg/mL grafen modifiye SPCE, (e) çıplak SPCE'un 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ içeren 0.1 M KCl'deki dönüşümlü voltametik davranışları (modifikasyon süresi: 30 dk, tarama hızı: 100 mV/s)



Şekil 4.8. Farklı modifikasyon sürelerinin SPCE elektrodun elektrokimyasal cevabına etkisi (a) 30 dk, (b) 15 dk, (c) 5 dk, (d) çıplak SPCE'un 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 0.1 M KCl çözeltisi içerisindeki davranışı (1 mg/mL grafen, tarama hızı: 100 mV/s)

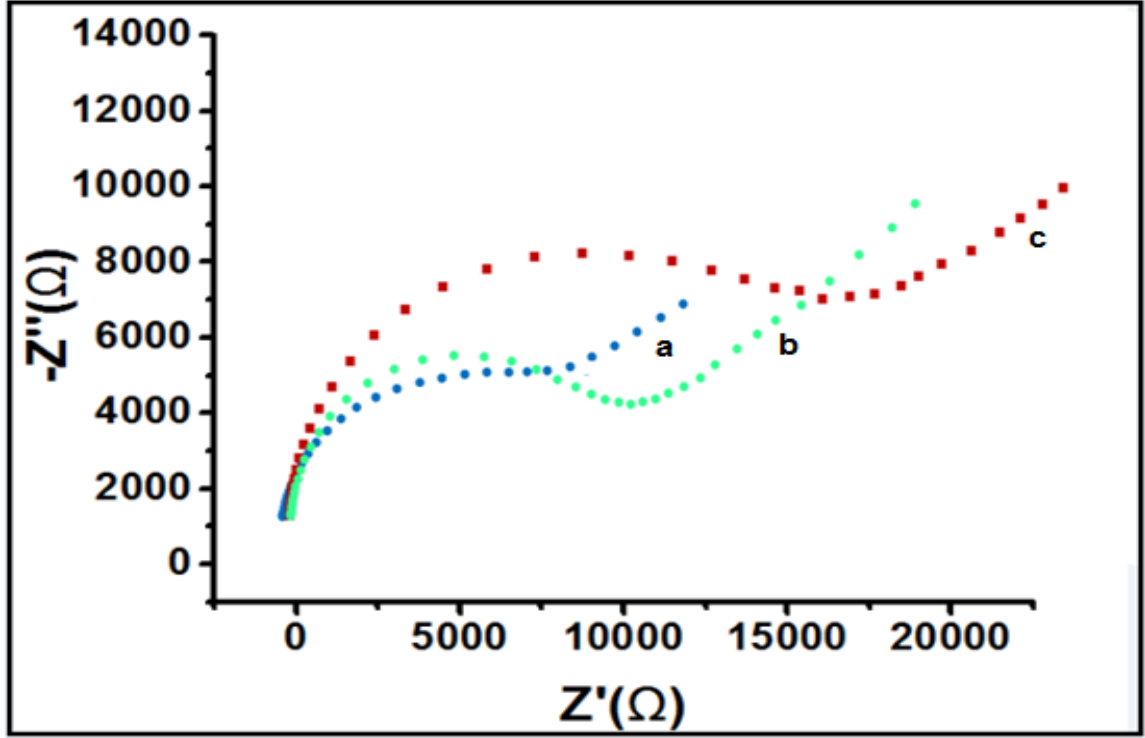
Kalem grafit elektrot için ise 1 mg/mL grafen çözeltisi kullanılarak 30 dk ve 15 dk grafen modifikasyon sürelerinin modifiye kalem grafitin elektrokimyasal cevabı üzerine etkisi araştırıldı (Şekil 4.9). 30 dk modifikasyon süresinde daha tersinir bir sistem elde edildiği için 30 dk bu elektrot için optimum koşul seçildi. Ayrıca bu

modifikasyon süresinde $Fe^{2+/3+}$ redoks çifti için daha yüksek yükseltgenme ve indirgenme akımları görülmüştür. Çıplak elektrodun davranışına bakıldığında grafen modifikasyonunun bu elektrodun elektrokimyasal özelliklerini önemli bir ölçüde iyileştirdiği görülmektedir.



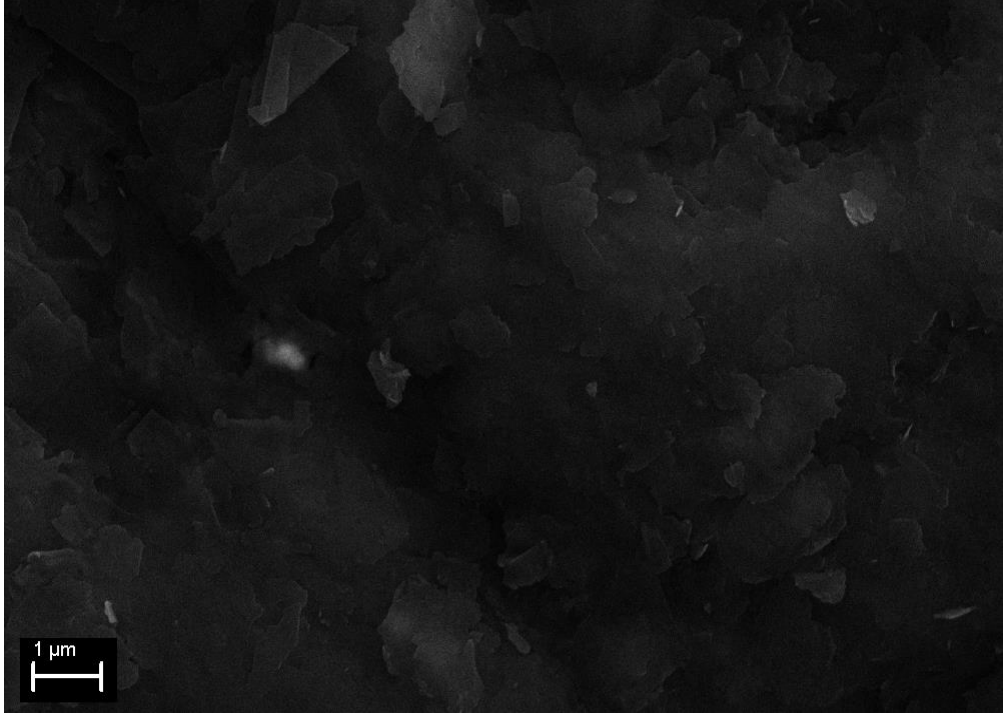
Şekil 4.9. Farklı modifikasyon sürelerinin PGE'un elektrokimyasal cevabına etkisi (a) 30 dk, (b) 15 dk, (c) çıplak PGE'un 5 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 0.1 M KCl çözeltisi içerisindeki davranışı (1 mg/mL grafen, tarama hızı: 100 mV/s)

Elektrot yüzeyindeki farklı modifikasyonları karakterize edebilme yöntemlerinden biri de elektrokimyasal empedans spektroskopisidir. Bu yöntem elektrot-çözelti arayüzeyinde elektron aktarımının hızı hakkında bilgi verir (Campuzano ve ark., 2011). Daha iletken bir yüzey varlığında elektron transfer hızı (R_{ct}) değerlerinde azalmalar meydana gelir. Şekil 4.10'da grafen modifiye elektrotlar ve modifiye edilmemiş PGE'un elektrokimyasal empedans spektrumları verilmektedir. 30 dk ve 15 dk grafen modifikasyonu sonucu elde edilen grafen modifiye elektrotlarda R_{ct} değerlerinin çıplak kalem elektroda ($R_{ct}=15750 \Omega$) göre daha az olduğu görülmüştür. Bu değer 30 dk modifikasyon için (7520Ω) 15 dk modifikasyon sonucunda elde edilen değere ($R_{ct}=10200 \Omega$) göre daha düşük bir değer olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar CV yöntemi ile elde edilen sonuçları desteklemiştir. Nanomalzeme, çıplak elektrodun iletkenliğini artırmakta ve elektrokimyasal özelliklerini iyileştirmektedir.

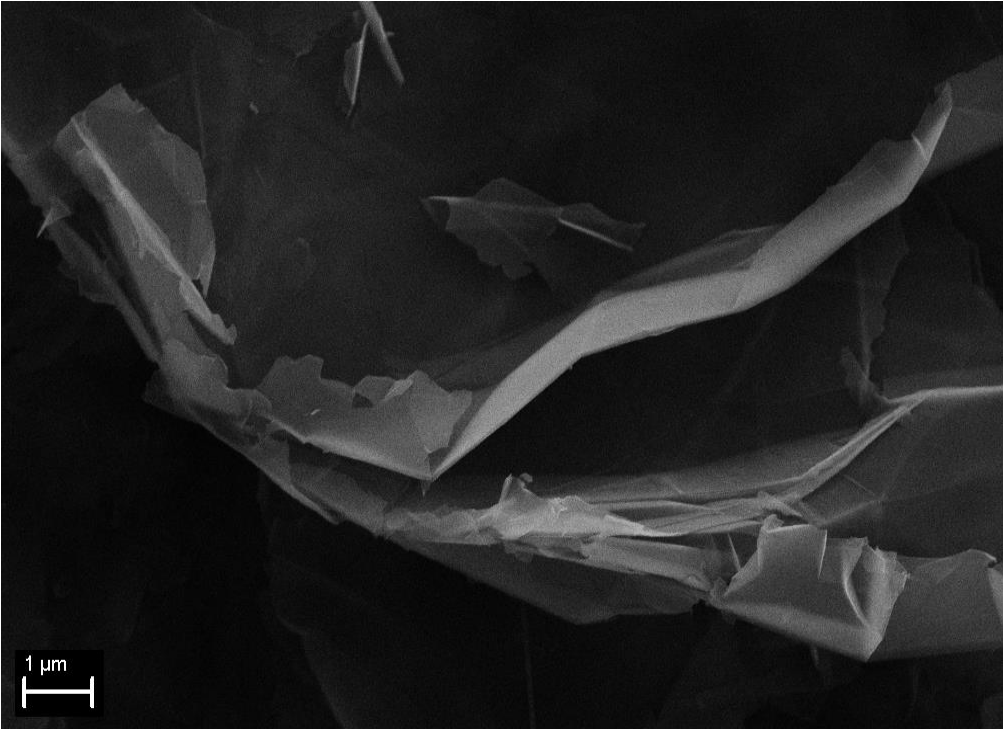


Şekil 4.10. (a) 30 dk grafen modifiye PGE, (b) 15 dk grafen modifiye PGE, (c) çıplak PGE'un 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 0.1 M KCl çözeltisi içerisindeki EIS spektrumları (Frekans aralığı: 10^5 - 10^{-1} Hz, Genlik: 5 mV)

Elektrot yüzeyine modifiye edilen grafenin karakterizasyonu elektrokimyasal yöntemler haricinde bir yüzey görüntüleme tekniği olan elektron mikroskopisi tekniği ile de gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.11 ve 12'de sırasıyla çıplak PGE ve 30 dk grafen modifiye PGE'ye ait SEM görüntüleri bulunmaktadır. SEM görüntülerinden anlaşıldığı üzere yüzey modifikasyonundan sonra elektrodun yüzeyinin özelliklerinin değiştiği ve yüzeyin tabaka halinde grafen ile kaplandığı görülmektedir. Grafen modifikasyonundan sonra yüzey homojen bir şekilde grafen tabakasıyla kaplanmıştır. Çıplak elektrodun yüzeyi ise pürüzlü bir yapıya sahiptir.



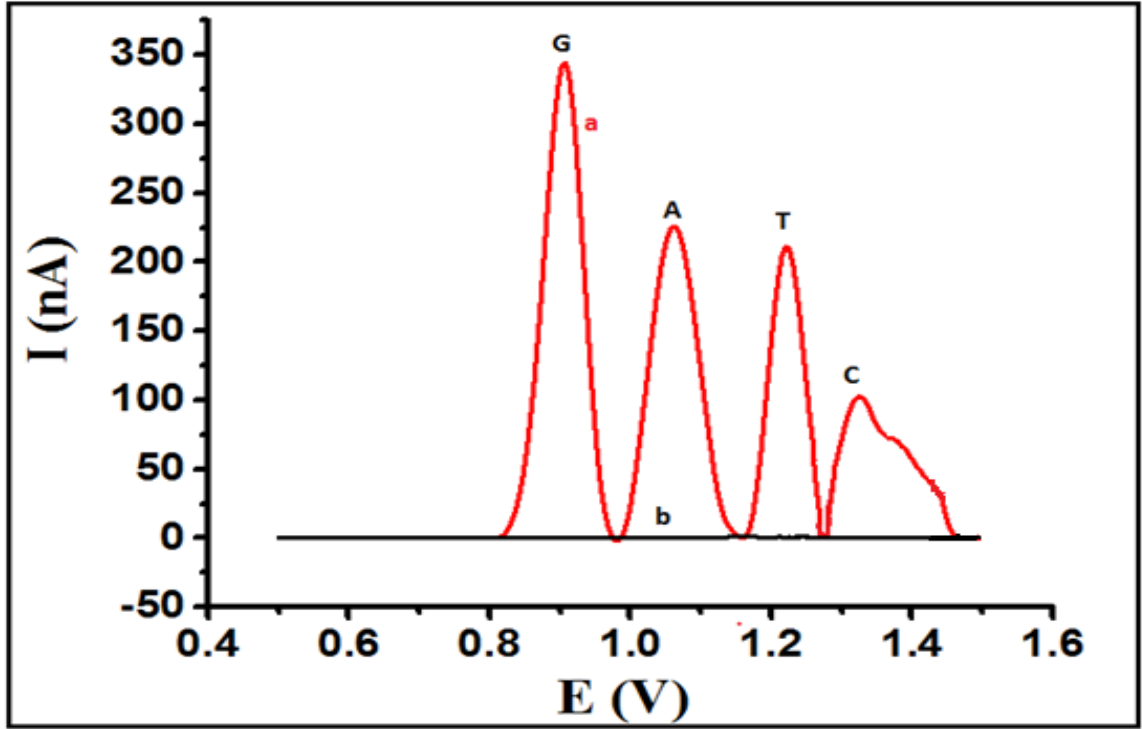
Şekil 4.11. Çıplak PGE'un SEM görüntüsü



Şekil 4.12. Grafen modifiye PGE'un SEM görüntüsü

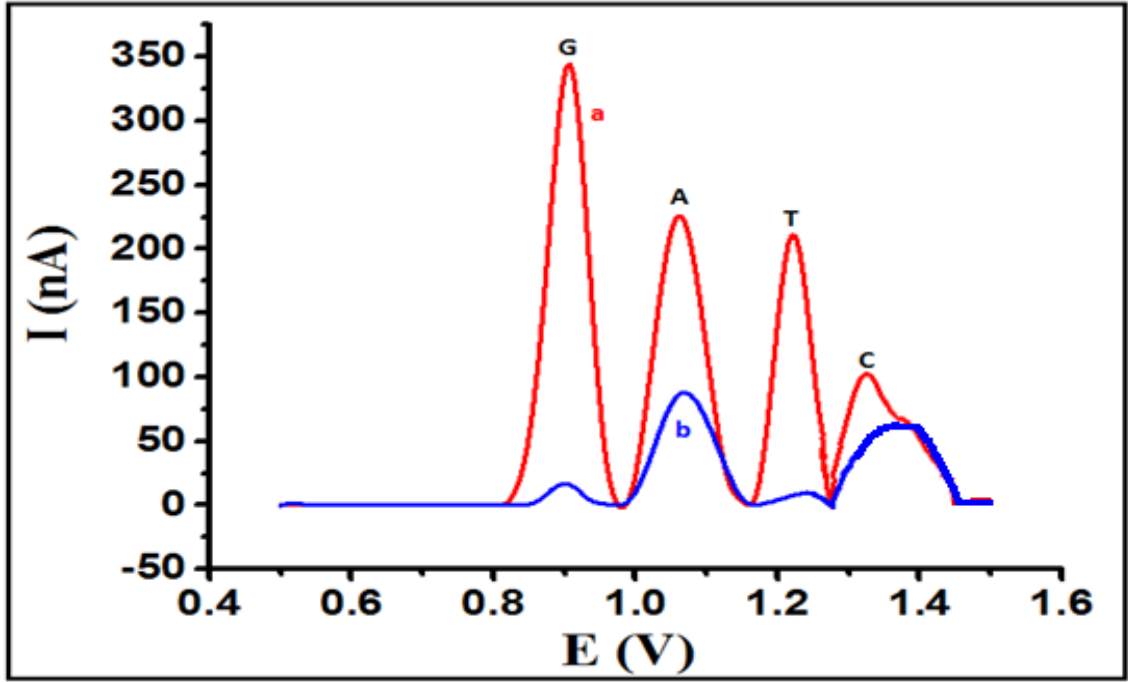
4.3. Fenton Reaktifleri ile DNA Hasar Çalışmaları

DNA hasar çalışmaları bir Fenton reaktifi olan Fe^{2+}/H_2O_2 varlığında gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk önce belirli derişimlerde dsDNA ve ssDNA çözeltileri hazırlanmıştır. DNA molekölü hasara uğradığında bunu tespit edebilmenin en önemli yollarından biri elektrokimyasal özellik gösteren DNA bazlarındaki değişikliklerin takip edilmesidir. DNA bazlarının elektroaktif olması elektrokimyasal çalışmaların önemini bu nedenle artırmaktadır. Bununla birlikte literatür özetinden de anlaşılacağı üzere dört DNA bazının aynı potansiyel ve akım skalasında birbirinden ayrı ve hassas bir biçimde tayin edilebildiği biyosensör çalışmaları azdır. Tez deneylerinin bu aşamasında ilk amaç hasarı daha doğru ve hassas tayin edebilmek adına dört DNA bazının hazırlanan grafen modifiye yüzeylerde tayin edilebilmesidir. Şekil 4.13'de grafen modifiye perde baskılı elektrot ile çıplak perde baskılı elektrodun 50 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde alınmış diferansiyel puls voltamogramları görölmektedir. Görüldüğü üzere dört DNA bazı (G, A, T, C) grafen modifiye elektrot varlığında birbirinden kolaylıkla ayrılarak ve yüksek akım değerlerinde elde edilmiştir. Çıplak elektrot varlığında ise böyle bir ayırıcılıktan bahsetmek mümkün değildir. Baz sinyalleri birbiri ile örtüşmüş bir şekilde ve çok düşük bir hassasiyette elde edilmiştir. Bu durum grafen modifiye elektrodun üstün performansını göstermektedir. Ag/AgCl referans elektroda karşı yapılan bu deneylerde guanin bazına ait yükseltgenme piki +0.90 V'da, adenine ait yükseltgenme piki +0.108 V'da, timine ait yükseltgenme piki +1.24 V'da ve sitozine ait yükseltgenme piki ise +1.34 V'da elde edilmiştir. Bu yükseltgenme pik potansiyel değerlerine bakıldığında nanomalzeme varlığında elektrokatalitik bir etkinin söz konusu olduğu ve DNA bazlarının düşük potansiyel değerlerinde duyarlı bir biçimde birbirinden ayrılabilirdiği söylenebilir (Erdem ve ark., 2011).

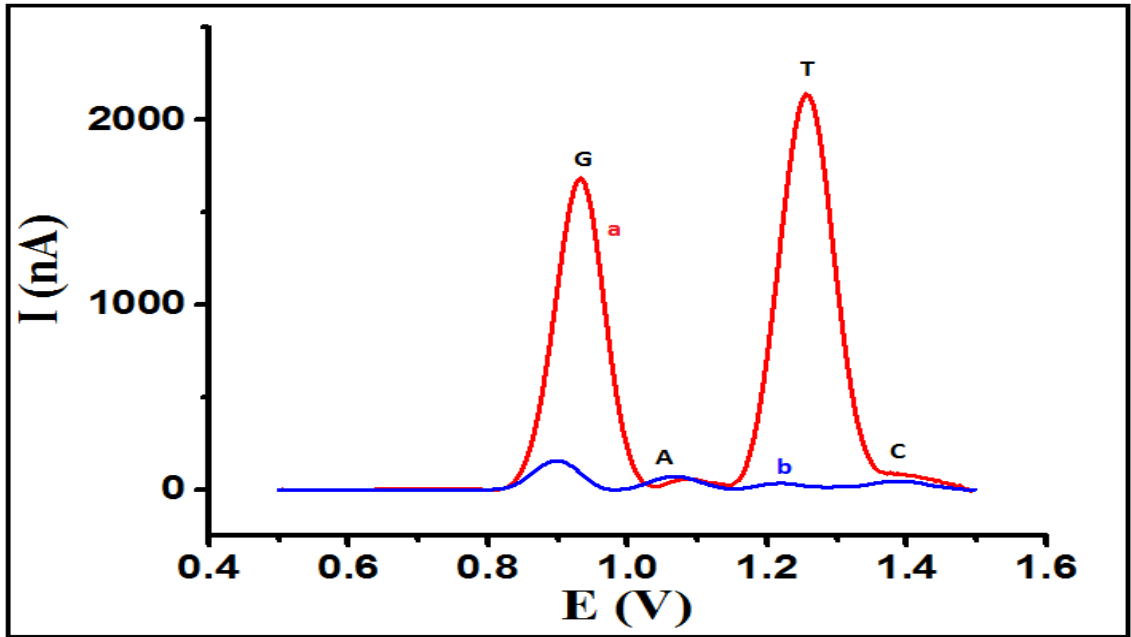


Şekil 4.13. 50 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde (a) grafen modifiye, (b) çıplak perde baskılı karbon elektrotların diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

Ayrıca, 50 mg/L dsDNA grafen modifiye elektrot üzerinde +0.0 V'da 60 sn biriktirilerek asetat tamponu içerisinde +0.5 V ile 1.5 V arasında sıyırma yapıldı. Çözelti içerisinde alınan DNA pikleri ile yüzeye immobilize DNA elektrodun cevabı örtüştüğünde her iki sistemde de dört DNA bazına ait piklerin rahatlıkla grafen modifiye perde baskılı karbon elektrotlarla tespit edilebildiği gözlemlendi (Şekil 4.14). Daha yüksek bir DNA derişimi için deneyler tekrarlandı. Şekil 4.15'de 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde grafen modifiye elektroda ait diferansiyel puls voltamogramı (Şekil 4.15-a) ve 250 mg/L dsDNA immobilize grafen modifiye elektrodun asetat tamponu içerisinde alınan diferansiyel puls voltamogramı (Şekil 4.15-b) örtüştürüldü. Yüksek bir derişim olan 250 mg/L DNA çözeltisine ait diferansiyel puls voltamogramında sitozine ait yükseltgenme sinyalinin istenilen potansiyelde olmakla beraber düşük bir hassasiyette elde edildiği görüldü. Her iki durumda da dört DNA bazı birbirinden ayrı ayrı tayin edilebilmiştir.

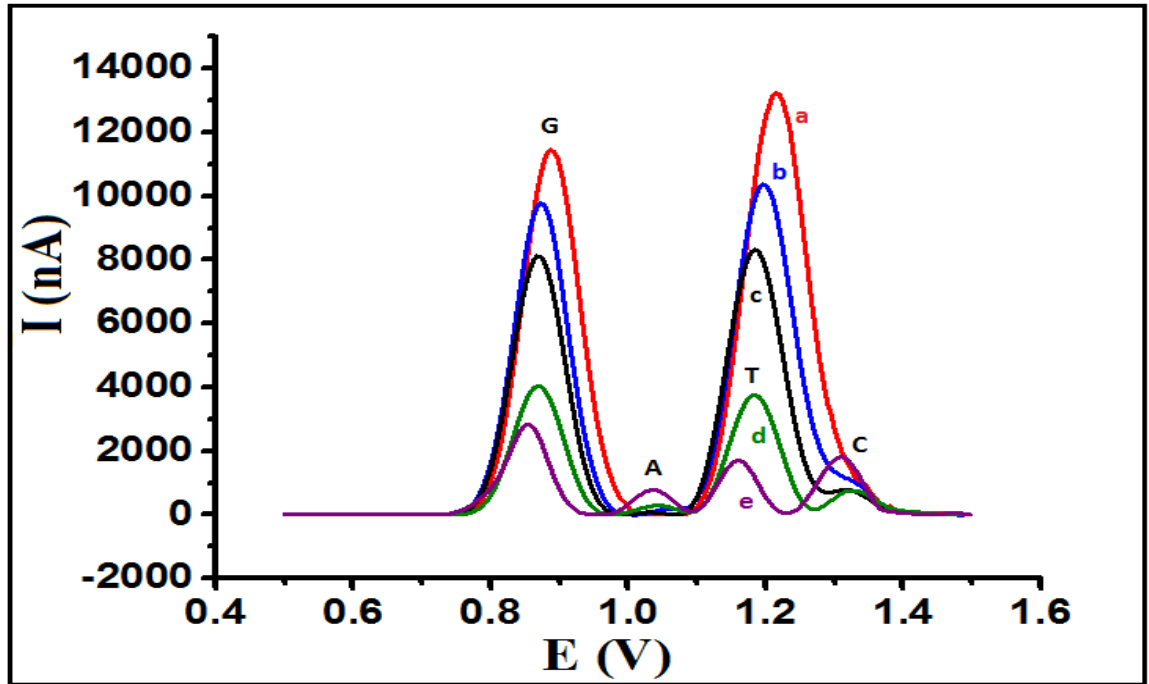


Şekil 4.14. (a) 50 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde grafen modifiye perde baskılı elektrot, (b) 50 mg/L dsDNA immobilize grafen modifiye perde baskılı elektrodun 50 mM pH 4.8 asetat tamponu içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

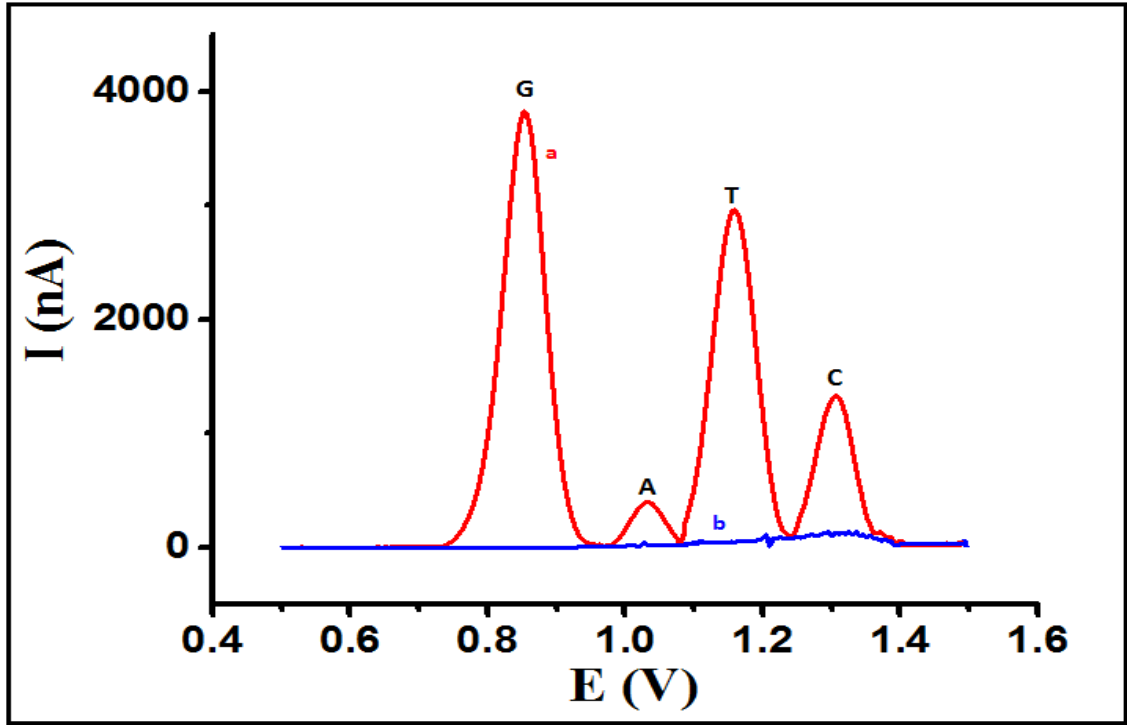


Şekil 4.15. (a) 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde grafen modifiye perde baskılı elektrot, (b) 250 mg/L dsDNA immobilize grafen modifiye perde baskılı elektrodun 50 mM pH 4.8 asetat tamponu içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

Yüksek DNA derişimlerinde sitozine ait yükseltgenme piklerinin düşük hassasiyette çıkması üzerine deneylerde kullanılan diğer bir elektrot olan kalem grafit elektrot ile yapılan çalışmalarda ilk önce ayrıntılı bir dsDNA derişim çalışması yapıldı. Şekil 4.16'da farklı dsDNA çözeltilerinde (125 mg/L-1000 mg/L) grafen modifiye kalem grafit elektroda ait diferansiyel puls voltamogramları verilmektedir. Grafen modifiye kalem grafit elektrotlar ile düşük DNA derişimlerinde DNA bazlarının kolaylıkla ve yüksek hassasiyette birbirinden ayrıldığı görüldü. Yüksek derişimlerde (750 mg/L ve 1000 mg/L) bu hassasiyetin düştüğü tespit edildi. Bu durum elektrot yüzeyine difüzyon kontrollü olarak taşınan analit (DNA)'in yüzeyde doyunluğa ulaşması ile açıklanabilir. 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde alınan diferansiyel puls voltamogramı, grafen modifiye elektrodun asetat tamponu içerisinde alınan davranışı ile Şekil 4.17'de örtüştürülmüştür. Boş çözelti davranışında (Şekil 4.17-b) herhangi bir elektroaktif türe rastlanmamıştır.

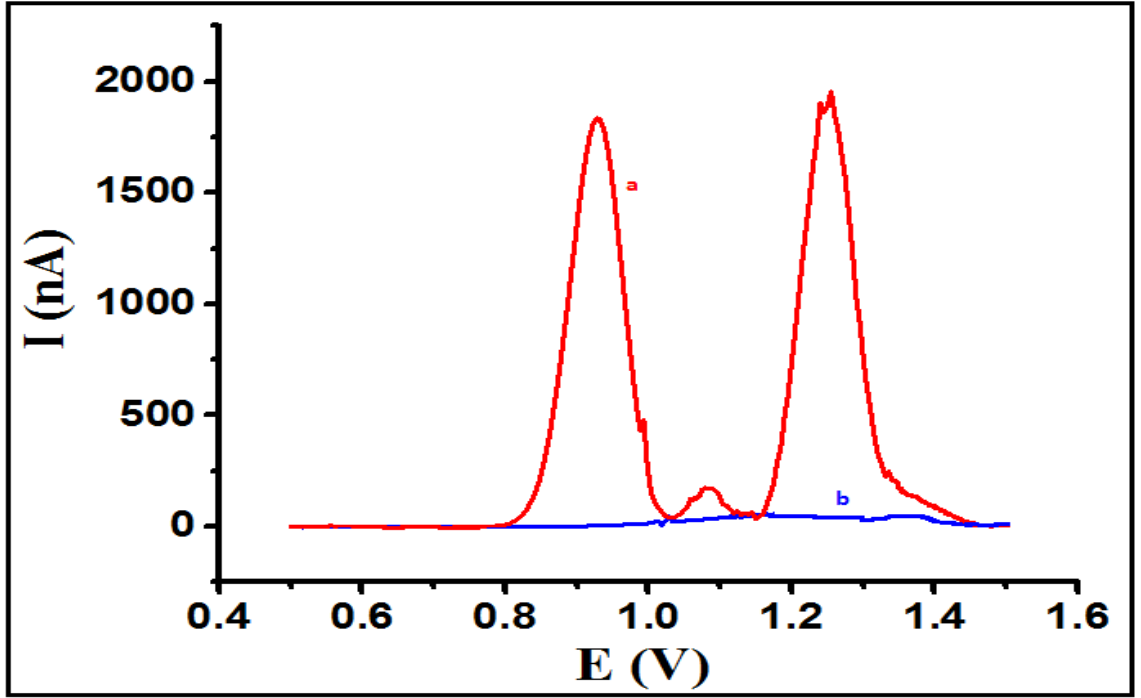


Şekil 4.16. (a) 1000 mg/L, (b) 750 mg/L, (c) 500 mg/L, (d) 250 mg/L, (e) 125 mg/L dsDNA çözeltileri içerisinde grafen modifiye kalem grafit elektroda ait diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

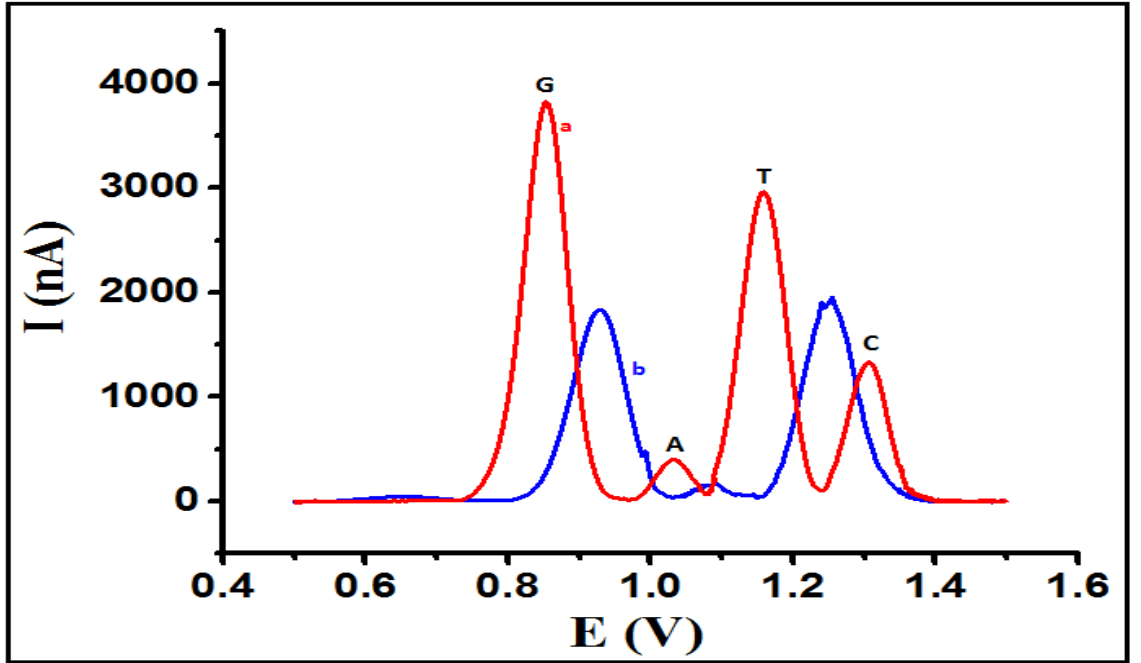


Şekil 4.17. (a) 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde grafen modifiye kalem grafit elektrot, (b) grafen modifiye kalem grafit elektrodun 50 mM pH 4.8 asetat tamponu içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

Grafen modifiye edilmemiş çıplak kalem grafit elektroda ait diferansiyel puls voltamogramı da 250 mg/L dsDNA içerisinde alınmıştır. Bu voltamogram çıplak elektrodun asetat tamponu içerisinde alınan davranışı ile örtüştürülmüştür (Şekil 4.18). Boş çözelti davranışında (Şekil 4.18-b) herhangi bir elektroaktif türe rastlanmamıştır. Bununla birlikte DNA bazları çıplak elektrotta düşük hassasiyet nedeni ile birbirinden tam olarak ayıramamıştır. Bu sonuç modifiye edilmemiş çıplak perde baskılı elektrot ile alınan sonuçları desteklemektedir. Modifiye edilmemiş perde baskılı karbon elektroda göre çıplak kalem grafit elektrotta daha yüksek pik akımlarında yükseltgenme sinyalleri elde edilmiştir. Şekil 4.19'da grafen modifiye elektrodun (Şekil 4.19-a) ve çıplak elektrodun (Şekil 4.19-b) dsDNA içerisindeki davranışları örtüştürülmüştür. Grafen modifikasyonunun hassasiyet haricinde sisteme kattığı elektrokatalitik etki bazların yükseltgenme potansiyellerinden rahatlıkla anlaşılmaktadır.

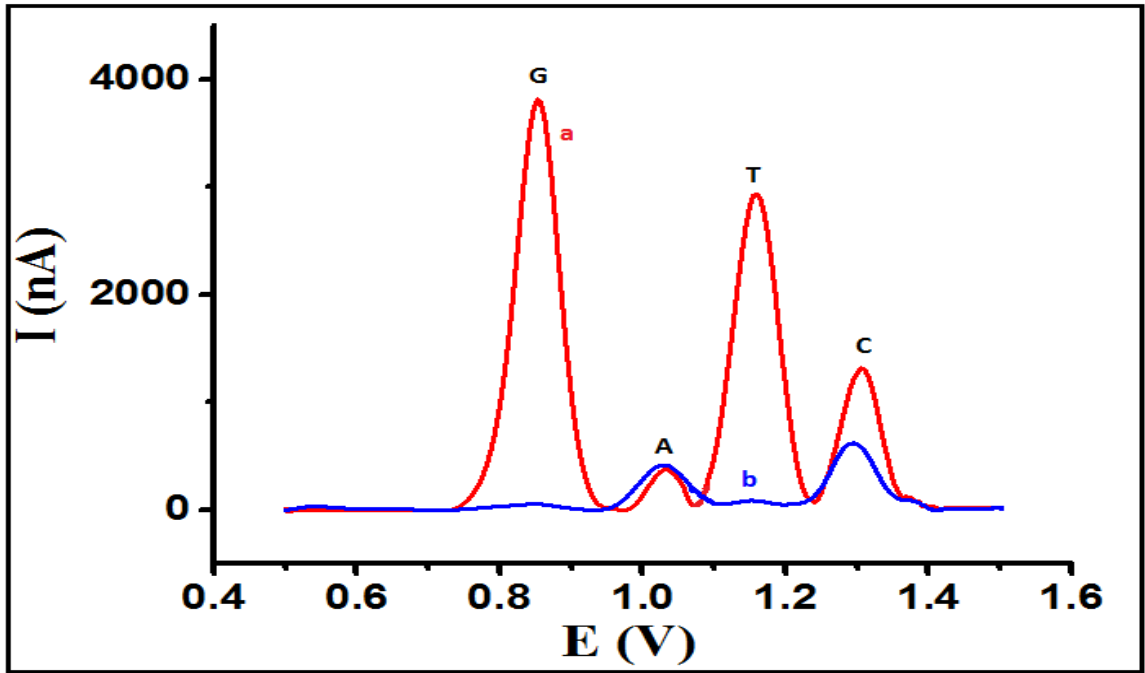


Şekil 4.18. (a) 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde çıplak kalem grafit elektrot, (b) çıplak kalem grafit elektrodun 50 mM pH 4.8 asetat tamponu içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)



Şekil 4.19. 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde (a) grafen modifiye kalem grafit elektrot, (b) çıplak kalem grafit elektrodun diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

Sonrasında ise grafen modifiye kalem grafit elektrotta 0.0 V'da 60 s 250 mg/L dsDNA çözeltisinde biriktirme yapılarak asetat tamponunda sıyırılma yapılmıştır. Bu diferansiyel puls voltamogramı 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde alınan diferansiyel puls voltamogramı ile örtüştürülmüştür (Şekil 4.20). Şekilde görüldüğü üzere iki durumda da bazlara ait pikler hassas bir biçimde birbirinden ayrılabilmiştir. Grafen modifiye perde baskılı ve grafen modifiye kalem grafit elektrotların sonuçları birbiri ile uyum içerisindedir. Bu sonuçlar DNA hasar tayininin çözelti içerisinde grafen modifiye perde baskılı karbon ve grafen modifiye kalem grafit elektrotlar ve aynı zamanda DNA immobilize grafen modifiye perde baskılı karbon ve grafen modifiye kalem grafit elektrotlar ile eş zamanlı bir şekilde yapılabileceğini göstermektedir. Bu durum, hazırlanan tek kullanımlık grafen modifiye elektrot teknolojisinin en önemli avantajlarından biridir.

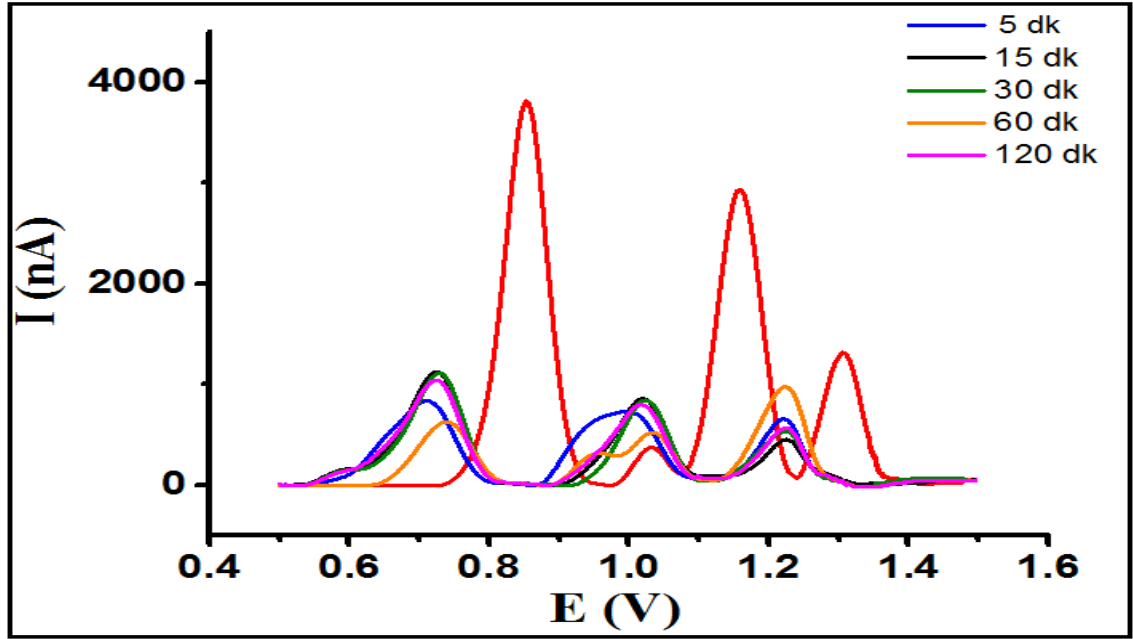


Şekil 4.20. (a) 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde grafen modifiye kalem grafit elektrot, (b) 250 mg/L dsDNA immobilize grafen modifiye kalem grafit elektrodun 50 mM pH 4.8 asetat tamponu içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

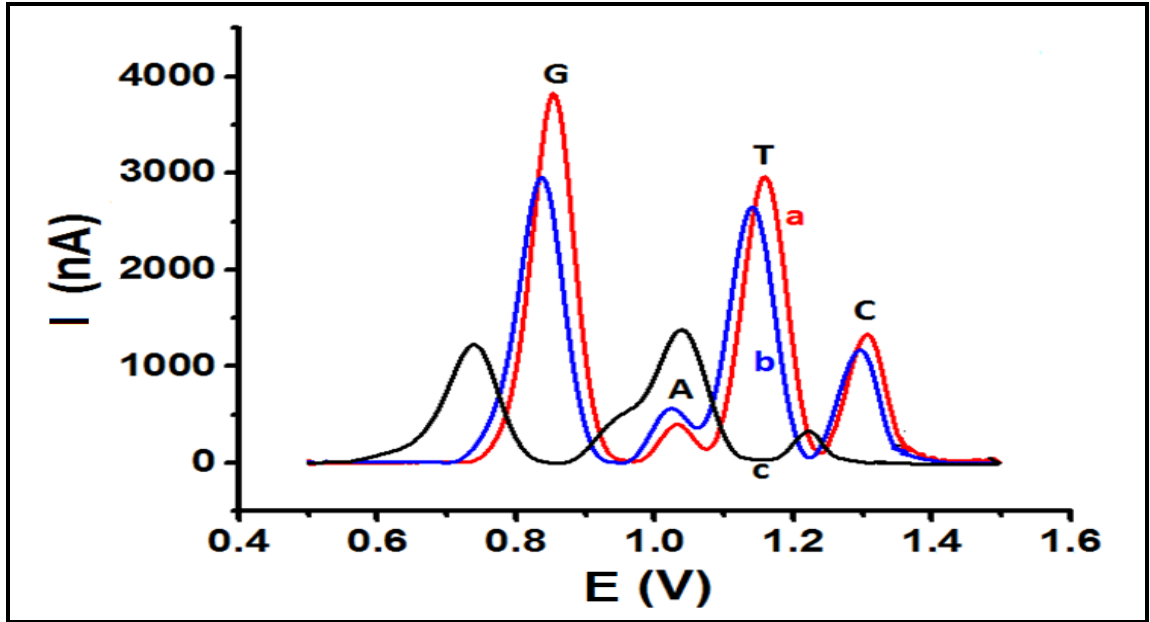
DNA hasarını tespit etmek için, hazırlanan DNA çözeltilerine (250 mg/L) 50 mM pH 8.5 sodyum fosfat tamponunda hazırlanmış belirli miktarlarda FeSO_4 ve H_2O_2 eklenmiştir. Deneyleerde hasarın tespiti, elektrot yüzeyine DNA immobilizasyonu için

ayrı bir modifikasyon basamağına olan gerekliliği ortadan kaldırmak ve klinik, in-situ analizlere daha uygun olması nedeniyle çözelti halindeki durumda incelenmiştir. Ayrıca, hasar deneylerine DNA bazlarına ait yükseltgenme pik akımlarının perde baskılı karbon elektroda göre daha iyi olması, bu elektrodun maliyetinin daha ucuz olması ve bir eppendorf tüp içerisinde seri bir biçimde aynı özelliklere sahip grafen modifiye elektrotların hazırlanmasına olanak sağlaması gibi avantajlarından dolayı ilk önce kalem grafit elektrotlar ile başlanmıştır. Fenton reaktifi ile farklı etkileşim sürelerinden (0, 5, 15, 30, 60 ve 120 dk) sonra DNA bazlarındaki değişiklikler incelenmiştir. Şekil 4.21’de farklı bekletme sürelerinden sonra dsDNA çözeltisi içerisinde grafen modifiye kalem grafit elektroda ait diferansiyel puls voltamogramları verilmektedir. Deneylerde, 100 µM FeSO₄+1 mM H₂O₂ kullanılmıştır. Voltamogramlardan görüldüğü üzere 5 dk’lık etkileşimde bile dsDNA hasar görmekte ve DNA bazlarına ait yükseltgenme pik akımlarında ve pik potansiyellerinde değişiklikler meydana gelmektedir. 100 µM FeSO₄ + 1 mM H₂O₂ ile etkileşen dsDNA’ya ait bazların oksidasyon sonuçları uzun süreli etkileşim ve kısa süreli etkileşim sonunda genel olarak aynı pik akım skalası ve potansiyel aralığında gözlemlenmiştir. Bazlara ait yükseltgenmenin tam olarak nasıl bir mekanizma ile çalıştığını anlayabilmek için Fenton reaktifi olarak kullanılan FeSO₄ ve H₂O₂’in miktarları değiştirilerek bazların yükseltgenme sinyalleri takip edilmiştir. Şekil 4.22 ve Şekil 4.23’de ilgili sonuçlar verilmektedir. Şekil 4.22’de FeSO₄ miktarı sabit tutularak (100 µM) H₂O₂’in miktarı değiştirilmiştir. 0.1 mM H₂O₂ ve 0.5 mM H₂O₂ derişimlerinde DNA hasarı farklı bir biçimde takip edilmiştir. 0.1 mM H₂O₂ varlığında dört DNA bazına ait yükseltgenme pik akımında azalma meydana gelmiştir. DNA hasarının bazlardaki oksidasyonu azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, yükseltgenme pik potansiyellerinde negatif bölgeye doğru bir kayma bulunmaktadır. 0.5 mM H₂O₂ varlığında ise potansiyellerdeki kaymalar artmakla beraber guanin ve sitozinin yükseltgenme pik akımlarında bariz azalış görülmüştür. Adenin ve timin bazlarının yükseltgenmeleri ise birarada tespit edilmiş olup bu bazlar birbirinden ayrılamamakla beraber 2 omuz şeklinde görülmektedir. Şekil 4.23’de H₂O₂ derişimi sabit tutulmuştur. FeSO₄ derişimi yükseldikçe Şekil 4.22’deki sonuçlara ek olarak adenin ve timin piklerinin iç içe girdiği gözlenmektedir. Bu sonuçlar Fenton reaktiflerinin DNA bazlarının oksidasyona açık gruplarının oksidasyonunu

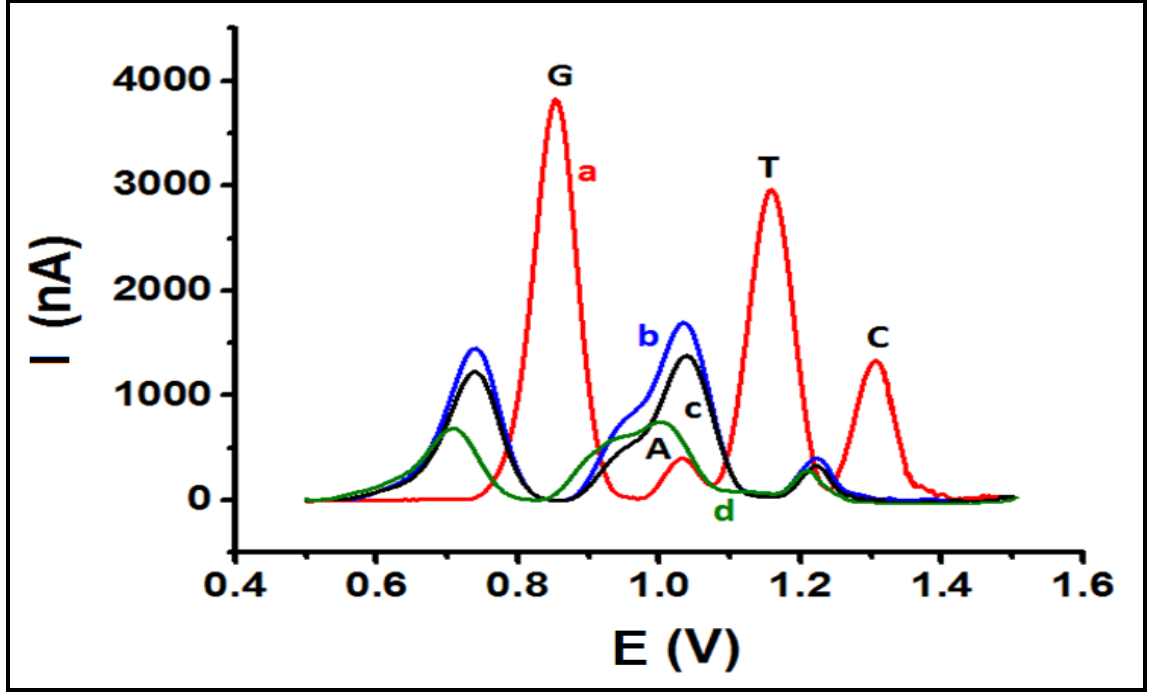
zorlaştırdığı ve bunun kolaylıkla elektrokimyasal olarak tespitinin mümkün olduğunu ortaya koymaktadır (Fojta ve ark., 2002, Fojta, 2016).



Şekil 4.21. 250 mg/L dsDNA ile Fenton reaktifinin farklı sürelerde etkileşimine ait voltamogramlar (kırmızı: 250 mg/L dsDNA içerisinde alınan diferansiyel puls voltamogramı) (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

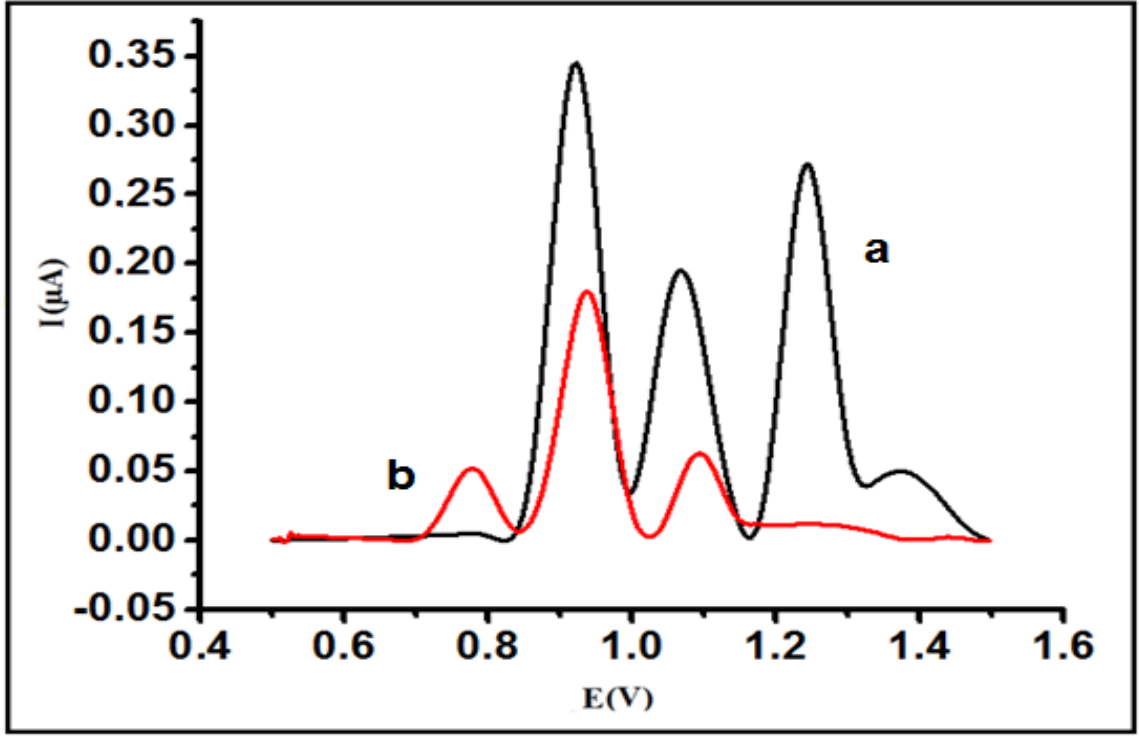


Şekil 4.22. Grafen modifiye kalem grafit elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) etkileşim öncesi, (b) 100 µM FeSO₄ + 0.1 mM H₂O₂ ile 5 dk etkileşim sonrası, (c) 100 µM FeSO₄ + 0.5 mM H₂O₂ ile 5 dk etkileşim sonrası (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)



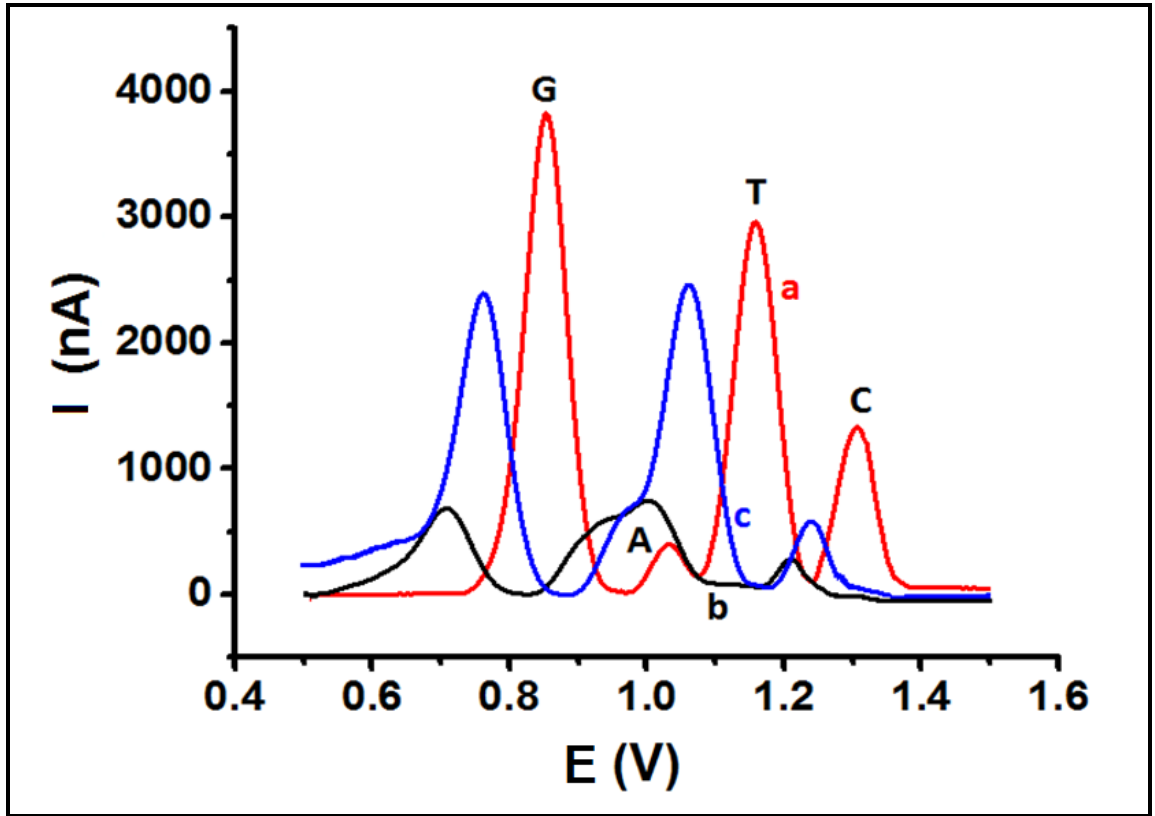
Şekil 4.23. Grafen modifiye kalem grafit elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) etkileşim öncesi, (b) 50 μM FeSO_4 + 0.5 mM H_2O_2 ile 5 dk etkileşim sonrası, (c) 100 μM FeSO_4 + 0.5 mM H_2O_2 ile 5 dk etkileşim sonrası, (d) 250 μM FeSO_4 + 0.5 mM H_2O_2 ile 5 dk etkileşim sonrası, (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

Grafen modifiye perde baskılı elektrodun DNA hasar tayininde kullanımı ise ssDNA çözeltisi hasara uğratılarak gösterilmiştir. Şekil 4.24’de hasar öncesi ve sonrası değişim görülmektedir. 250 μM FeSO_4 + 0.5 mM H_2O_2 ile 5 dk etkileşim sonrası DNA bazlarına ait yükseltgenme pik akımlarında azalış ve pik potansiyellerinde kaymalar görülmüştür. Bu sonuç farklı DNA’larda grafen modifiye tek kullanımlık elektrotların hasar tayininde rahatlıkla kullanılabileceğini göstermektedir.

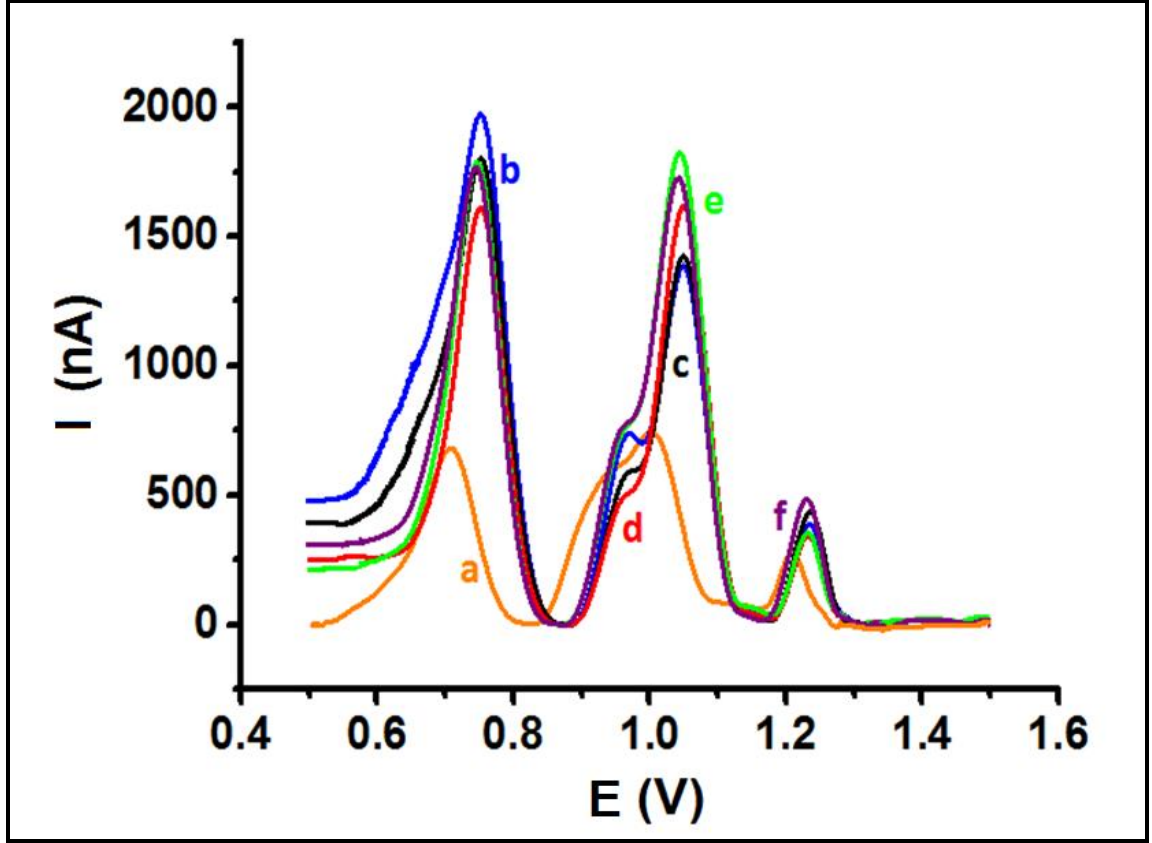


Şekil 4.24. Grafen modifiye perde baskılı karbon elektroda ait 250 mg/L ssDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) etkileşim öncesi, (b) 250 μ M FeSO_4 + 0.5 mM H_2O_2 ile 5 dk etkileşim sonrası (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

Literatür özetinde de verildiği üzere askorbik asit gibi antioksidanların DNA hasarını azaltıcı etkisi bulunmaktadır. Hasara uğrayan dsDNA çözeltisi 5 dk 0.5 mM askorbik asitle etkileştirildikten sonra grafen modifiye kalem elektrotta diferansiyel puls voltamogramı alınmıştır. Gerekli veriler Şekil 4.25’de örtüştürülmüştür. Şekilden de görüldüğü üzere askorbik asit varlığında DNA bazlarına ait yükseltgenme sinyallerinde iyileşmeler görülmüştür. Yükseltgenme pik akımları artmış ve adenin, timin ayrımı farklılanmaya başlamıştır. Şekil 4.26’da ise farklı derişimdeki askorbik asitin etkisi incelenmektedir. Yüksek ve düşük askorbik asit derişimlerinde DNA hasarında iyileşmeler meydana gelmiştir. Askorbik asit derişimi arttıkça dört DNA bazına ait farklılanma daha net ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar antioksidanların DNA hasar onarımında kullanılabileceğini göstermektedir.

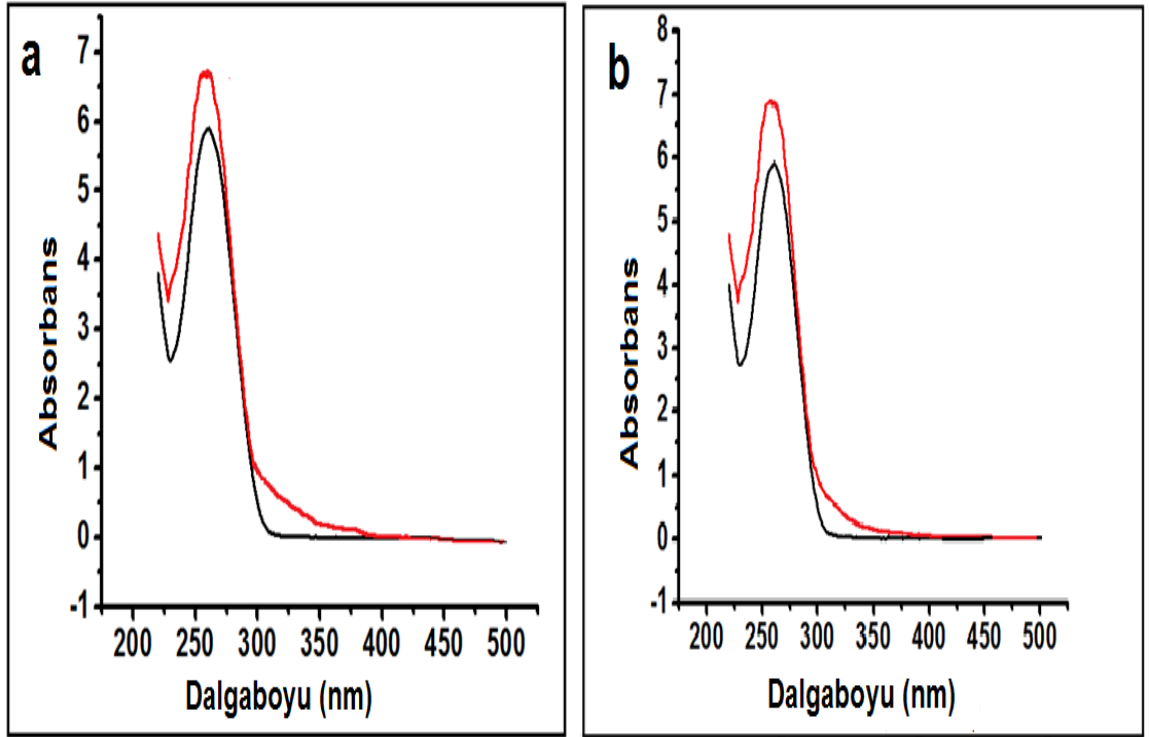


Şekil 4.25. Grafen modifiye kalem grafit elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) etkileşim öncesi, (b) 250 μ M FeSO_4 + 0.5 mM H_2O_2 ile 5 dk etkileşim sonrası, (c) b’deki çözelti 5 dk 0.5 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)



Şekil 4.26. Grafen modifiye kalem grafit elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) 250 μM FeSO_4 + 0.5 mM H_2O_2 ile 5 dk etkileşim sonrası, (b) a'daki çözelti 5 dk 2.0 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra, (c) a'daki çözelti 5 dk 1.0 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra, (d) a'daki çözelti 5 dk 0.5 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra, (e) a'daki çözelti 5 dk 0.1 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra, (f) a'daki çözelti 5 dk 0.05 mM askorbik asit ile etkileştikten sonra (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

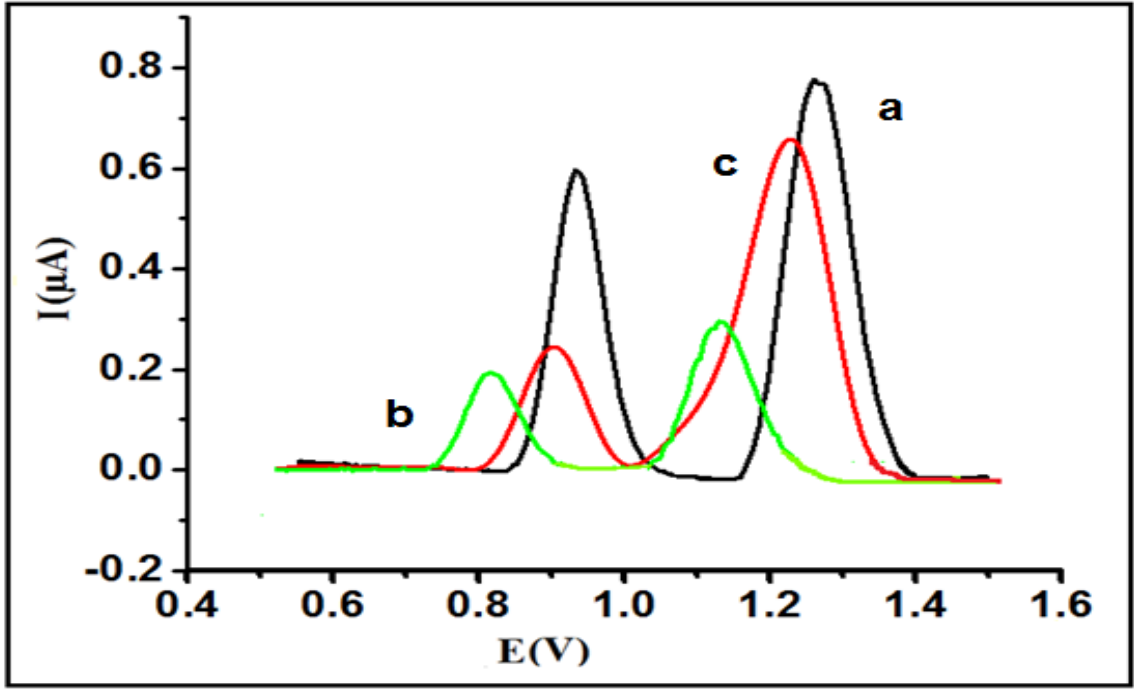
Kullanılan Fenton reaktifi varlığında DNA'nın hasara uğradığı ayrıca başka bir yöntemle de desteklenmektedir. 5 dk Fenton reaktifi (250 μM FeSO_4 + 0.5 mM H_2O_2) ile muamale edilen 250 mg/L dsDNA ve ssDNA'ya ait UV-Vis spektrumları Şekil 4.26-a ve b'de sırasıyla verilmiştir. İki durumda da DNA'ya ait karakteristik 260 nm dalgaboyundaki absorbans değerlerinde etkileşim sonrası farklılaşma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar elektrokimyasal deney sonuçlarımızı desteklemektedir.



Şekil 4.27. UV-Vis spektrumları: etkileşim öncesi (siyah) ve etkileşim sonrası (kırmızı) (a) dsDNA çözeltisi, (b) ssDNA çözeltisi

4.4. Camı Karbon Elektrot ile Kıyaslama

DNA hasarı grafen modifiye camı karbon elektrot ile de incelenmiştir. Şekil 4.28'de 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisinde grafen modifiye camı karbon elektroda ait diferansiyel puls voltamogramı verilmiştir (Şekil 4.28-a). Şekil incelendiğinde bu modifiye elektrot materyalinde yeterli hassasiyet elde edilememiştir ve dört DNA bazı birbirinden ayıramamıştır. Bununla birlikte DNA hasara uğratılmış ve bu sonuçlara ait diferansiyel puls voltamogramı Şekil 4.28-b'de verilmiştir. Hasardan sonra pik akımlarında azalma ve potansiyellerde kayma meydana gelmiştir. Bu yukarıda verilen hasar sonuçları ile uyum içerisindedir. Şekil 4.28-c de ise çıplak camı karbon elektroda ait 250 mg/L dsDNA içerisindeki elektrokimyasal davranış bulunmaktadır. Bu sonuca bakıldığında grafenin camı karbon elektrodun elektrokimyasal davranışını az da olsa iyileştirdiği söylenebilir.



Şekil 4.28. Grafen modifiye camsı karbon elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (a) etkileşim öncesi, (b) 250 μ M FeSO_4 + 0.5 mM H_2O_2 ile 5 dk etkileşim sonrası, (c) Çıplak camsı karbon elektroda ait 250 mg/L dsDNA çözeltisi içerisindeki diferansiyel puls voltamogramları (Tarama hızı: 10 mV/s) (n=3)

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, tek kullanımlık perde baskılı karbon elektrot ve kalem grafit elektrot üzerine grafen modifiye edilerek, bu kullanımı pratik ve ekonomik elektrot malzemeleri daha duyarlı hale getirildi ve genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülüne zarar veren etkenler varlığında ve yokluğunda dört DNA bazının elektrokimyasal sinyalleri incelendi.

Grafen, modifiye Hummers' yöntemi kullanılarak kimyasal indirgenme yolu ile sentezlendi. SEM ile karakterize edilen grafen belirli sürelerde ve belirli derişimlerde elektrot yüzeylerine modifiye edildi. Nanomalzeme varlığında elektrotların elektrokimyasal davranışlarının iyileştiği tespit edildi. Grafen yüksek yüzey alanı/hacim oranı sayesinde elektroaktif yüzey alanını artırmaktadır. Ayrıca yüzeyin iletkenliğini ve elektron transfer hızını artırmıştır.

Grafen modifiye elektrotlarla çıplak elektrotlara göre daha duyarlı ve hassas DNA tayini gerçekleştirilmiştir. DNA çözeltisinde ve elektrot yüzeyine immobilize DNA durumunda grafen modifiye elektrotlarda dört DNA bazı kolaylıkla birbirinden ayrılmış ve aynı skalada elde edilebilmiştir. Çıplak elektrotlarda aynı hassasiyet elde edilememiştir.

DNA molekülüne hasar Fenton reaktifi (Fe^{2+}/H_2O_2) varlığında gerçekleştirildi. Hasara uğrayan DNA molekülüne ait elektroaktif dört DNA bazının yükseltgenme pik akımlarında ve potansiyellerinde değişiklikler meydana geldi. Bir antioksidan olan askorbik asidin ise bu hasarı onarıcı etkisi olduğu tespit edildi.

Elektrokimyasal DNA hasarı çalışmaları UV-Vis yöntemi ile de desteklendi. Hasar sonrası dsDNA ve ssDNA absorpsiyonunda değişiklikler meydana geldi.

Grafen modifiye elektrotların performansı grafen modifiye camsı karbon elektrot ile kıyaslandı. Grafen modifiye camsı karbon elektrot ile çalışma koşullarında dört DNA bazı aynı skalada ve ayrı ayrı elde edilemedi.

Yapılan çalışmalar, tek kullanımlık pratik ve ekonomik elektrot teknolojisinin DNA hasarının tespitinde yüksek duyarlılık ve seçicilikte kullanılabileceğini işaret etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Alwarappan, S., Erdem, A., Liu, C., Li, C.Z. 2009. Probing the electrochemical properties of graphene nanosheets for biosensing applications. *The Journal of Physical Chemistry*, 113: 8853-8857.
- Bard, J., Faulkner, L.R. 2001. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. *Analytical Chemistry*, 73: 60-64.
- Bae, S., Kim, H., Lee, Y., Xu, X., Park, J., Zheng, Y., Balakrishnan, J., Lei, T., Kim, H. R., Song, Y., Kim, Y., Kim, K., Özyilmaz, B., Ahn, J. H., Hong, B. H., Lijima, S. 2010. Roll-to-roll production of 30-inch graphene films for transparent electrodes. *Nature Nanotechnology*, 5: 574-578.
- Campuzano, S., Kuralay, F., Castanon, M., Bartosik, M., Vyavahare, K., Palecek, E., Haake, D., Wang, J. 2011. Ternary monolayers as DNA recognition interfaces for direct and sensitive electrochemical detection in untreated clinical samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 3577-3583.
- Campuzano, S., Kuralay, F., Wang, J. 2012. Ternary monolayer interfaces for ultrasensitive and direct bioelectronic detection of nucleic acids in complex matrices. *Electroanalysis*, 24: 483-493.
- Canavar, E., Kuralay, F., Erdem A. 2011. Interaction of mitomycin C with DNA immobilized onto single-walled carbon nanotube/polymer modified pencil graphite electrode. *Electroanalysis*, 23: 2343-2349.
- Chen, M., Xiong, H., Zhang, X., Gu, H., Wang, S. 2013. Electrochemical biosensors for the monitoring of DNA damage induced by ferric ions mediated oxidation of dopamine. *Electrochemistry Communications*, 28: 91-94.
- Chen, M., Xiong, H., Wen, W., Zhang, X., Gu, H., Wang, S. 2013. Electrochemical biosensors for the assay of DNA damage initiated by ferric ions catalyzed oxidation of dopamine in room temperature ionic liquid. *Electrochimica Acta*, 114: 265-270.
- Clark Jr, L. 1956. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Transactions - American Society for Artificial Internal Organs*, 2: 41-42.
- Clark Jr, L., Lyons, C. 1962. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102: 29-45.
- Clark Jr, L. 1970. Membrane polarographic electrode system and method with electrochemical compensation. *US Patent*, 3: 539-455.
- Cornell, B.A., Braac-Maksvytis, V.L., King, L., Osman, P.D., Raguse, B., Wiecezorek, L., Pace, R.J. 1997. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature*, 387: 574-580.
- Çelikkan, H. 2001. Polipirol ile modifiye edilmiş karbon elektrot kullanılarak ASV yöntemiyle Pb ve Cu tayini. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.

- David, L. N., Michael M. C. 2013. Lehninger biyokimyanın ilkeleri. Editör: Yalçın, M., Palme Yayıncılık, Ankara, 5: 271-287.
- DeMarzo, P. 1990. Blood glucose monitoring system, US Patent, 4: 953-552.
- Dornelles Mello, L., Tatsuo Kubota, L. 2002. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77: 237-256.
- Egi, Y. 2009. Çapraz bağlı baskılanmış glukoz oksidazın hazırlanması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İzmir.
- Ensafi, A., Amini, M., Rezaei, B. 2013. Detection of DNA damage induced by chromium/glutathione/H₂O₂ system at MWCNTs–poly(diallyldimethylammonium chloride) modified pencil graphite electrode using methylene blue as an electroactive probe. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 177: 862-870.
- Erdem, A. 2007. Nanomaterial-based electrochemical DNA sensing strategies. *Talanta*, 74: 318-325.
- Erdem, A., Muti, M., Papakonstantinou, P., Canavar, E., Karadeniz, H., Congur, G. ve Sharma, S. 2012. Graphene oxide integrated sensor for electrochemical monitoring of mitomycin C–DNA interaction. *Analyst*, 137: 2129-2135.
- Fojta, M. 2002. Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. *Electroanalysis*, 14: 1449-1463.
- Fojta, M., Danhel, A., Havran, L., Vyskocil, V. 2016. Recent progress in electrochemical sensors and assays for DNA damage and repair. *Trends in Analytical Chemistry*, 79: 160–167.
- Gao, L., Lian, C., Zhou, Y., Yan, L., Li, Q., Zhang, C., Chen, L., Chen, K. 2014. Graphene oxide-DNA based sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 60: 22-29.
- Gooding, J. J. 2002. Electrochemical DNA hybridization biosensors. *Electroanalysis*, 14: 1149–1156.
- Grosan, C., Biris, A., Coros, M., Pogacean, F., Pruneanu, S. 2015. Electrochemical and spectroscopic studies of ssDNA damage induced by hydrogen peroxide using graphene based nanomaterials. *Talanta*, 138: 209–217.
- Guo, Z., Liu, X., Liu, Y., Wu, G., Lu, X. 2016. Constructing a novel 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine electrochemical sensor and application in evaluating the oxidative damages of DNA and guanine. *Biosensors and Bioelectronics*, 86: 671–676.
- Huang, X.J., Mahony, A., Compton, R.G. 2009. Microelectrode arrays for electrochemistry: approaches to fabrication. *Small*, 5: 776-788.
- Hummers, W.S., Offeman, R.E. 1958. Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80: 1339.
- Jia, L., Wang, H. 2013. Electrochemical reduction synthesis of graphene/Nafion nanocomposite film and its performance on the detection of 8-hydroxy-20-deoxyguanosine in the presence of uric acid. *Electroanalytical Chemistry*, 705: 37-43.

- Karakaya, M. 2013. Grafenle modifiye edilmiş camı karbon elektrot kullanılarak altının anodik ve katodik sıyırma voltametriyi yöntemleriyle tayini. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
- Keleşoğlu, B. 2012. Siyah ve yeşil çay ile atıklarının oksidatif DNA hasarına yönelik etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Rize Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Rize.
- Khan, R., Dhayal, M. 2009. Chitosan/polyaniline hybrid conducting biopolymer base impedimetric immunosensor to detect ochratoxin-a. *Biosensors and Bioelectronics*, 24: 1700-1705.
- Kuralay, F., Özyörük, H., Yıldız, A. 2005. Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 109: 194-199.
- Kuralay, F., Özyörük, H., Yıldız, A. 2006. Amperometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly (vinylferrocenium) film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114: 500-506.
- Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Özyörük, H., Yıldız, A. 2008. Electrochemical biosensing of DNA immobilized poly (vinylferrocenium) modified electrode. *Electroanalysis*, 20: 2563-2570.
- Kuralay, F., Erdem, A., Abacı, S., Özyörük, H., Yıldız, A. 2009. Characterization of redox polymer based electrode and electrochemical behavior for DNA detection. *Analytica Chimica Acta*, 643: 83-89.
- Kuralay, F., Campuzano, S., Haake, D., Wang, J. 2011. Highly sensitive disposable nucleic acid biosensors for direct bioelectronic detection in raw biological samples. *Talanta*, 85: 1330-1337.
- Kuralay, F., Demirci S. 2016. Elektrokimyasal biyosensörler: Afinite biyosensörleri, Editör: Denizli, A., Kukla Yayıncılık, Ankara, s: 12-20.
- Lenka Hlavata, L., Striesova, I., Ignat, T., Blaskovisova J., Ruttkay-Nedecky, B., Pavel Kopel, P., Adam, V., Kizek, R. 2015. An electrochemical DNA-based biosensor to study the effects of CdTe quantum dots on UV-induced damage of DNA. *Microchimica Acta*, 182: 1715.
- Liang, M., Guo, L. H. 2007. Photoelectrochemical DNA sensor for the rapid detection of DNA damage induced by styrene oxide and the fenton reaction. *Environmental Science Technology*, 41: 658-664.
- Liu, Y., Hu, N. 2007. Loading/release behavior of (chitosan/DNA)_n layer-by-layer films toward negatively charged anthraquinone and its application in electrochemical detection of natural DNA damage. *Biosensors and Bioelectronics*, 23: 661-667.
- Lu, L., Xu, L., Kang, T., Cheng, S. 2013. DNA damage due to perfluorooctane sulfonate based on nano-gold embedded in nano-porous poly-pyrrole film. *Applied Surface Science*, 284: 258-262.

- Moon, I. K., Lee, J., Ruoff, R. S., Lee, H. 2010. Reduced graphene oxide by chemical graphitization. *Nature Communications*, 73: 664.
- Muti, M., Sharma, S., Erdem, A., Papakonstantinou, P. 2011. Electrochemical monitoring of nucleic acid hybridization by single-use graphene oxide-based sensor. *Electroanalysis*, 23: 272-279.
- Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S.V., Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S.V., Grigorieva, I.V., Firsov, A.A. 2004. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 306: 666–669.
- Oliveria-Brett, A. M., Vivan, M., Fernandes, I. R., Piedade, J. A. P. 2002. Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA. *Talanta*, 56: 959-970.
- Oliveria-Brett, A. M., Diclesu, V. C. 2004. Electrochemical study of quercetin-DNA interactions: Part II. In situ sensing with DNA biosensors. *Bioelectrochemistry*, 64: 143-150.
- Onur, E., Tuğrul B., Bozyiğit, F. 2009. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 7(2): 61.
- Öztürk Doğan. H., 2014. Grafit oksitin elektrokimyasal indirgenmesi ile grafen ve metal-grafen kompozit sentezi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum.
- Palecek, E., Fojta, M., Tomschik, M., Wang, J. 1998. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA Damage. *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 621–628.
- Palecek, E., Fojta, M. 2001. Detecting DNA hybridization and damage. *Analytical Chemistry*, 73: 74A-83A.
- Palecek, E. 2002. Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. Review paper. *Talanta*, 56: 809-819.
- Palecek, E., Jelen, F. 2002. Electrochemistry of nucleic acids and development of DNA sensors. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 32 (3): 261-270.
- Rao, C.N.R., Sood, A.K., Voggu, R., Subrahmanyam, K.S. 2010. Some novel attributes of graphene. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 1: 572-580.
- Skotheim, T.A., Yoshiyuki, O., Hale, P.D. 1992. Electrochemical biosensor based on immobilized enzymes and redox polymers. *US Patent*, 5: 89-112.
- Sancar, A. 2003. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chemical reviews*, 103: 2203.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. 1998. Elektroanalitik kimyaya giriş: enstrümantal analiz. Editörler : Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Bilim Kitap Kirtasiye, Ankara, s: 639-673.
- Tang W., Zhang M., Li W., Zeng X. 2014. An electrochemical sensor based on polyaniline for monitoring hydroquinone and its damage on DNA. *Talanta*, 127: 262-268.

- Tang, W., Li, W., Li, Y., Zhang, M., Zeng, X. 2015. Electrochemical sensors based on multi-walled nanotubes for investigating the damage and action of 6-mercaptopurine on double-stranded DNA. *New J. Chemistry*, 39: 8454-846.
- Tekin, S. 2008. Platin elektrot yüzeylerine tutturulmuş organik Moleküllerin elektrokimyasal tekniklerle pKa değerlerinin tayini. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim, Dalı Ankara.
- Telefoncu, A. 1999. Biyosensörlere genel bakış. *Biyokimya Lisans Üstü Yaz okulu*, 1-9.
- Thevenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. 2001. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 121-131.
- Vasconcellos, M.C., Costa, C.O., Terto, E.G.S., Moura, M.A., Vasconcelos, C.C., Abreu, F.C., Lemos, T.G., Lotufo, L.C., Montenegro, R.C., Goulart, M. 2016. Electrochemical, spectroscopic and pharmacological approaches toward the understanding of biflorin DNA damage effects. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 765: 168–178.
- Wang, J. 2000. Flux-averaging analysis of type Ia supernova Data. *The Astrophysical Journal*, 536: 531-539.
- Wang, J. 2001. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. *Electroanalysis*, 13: 975-983.
- Wang, J. 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3: 430-440.
- Wang, J. 2005. Carbon-nanotube based electrochemical biosensors: A review. *Electroanalysis*, 17: 7-14.
- Wang, X., Li, X., Zhang, L., Yoon, Y., Weber, P., Wang, H., Guo, J., Dai, H. 2009. N-doping of graphene through electrothermal reactions with ammonia. *Science*, 324: 768-761.
- Zhou, X., Huang X., Qi, X., Wu, S., Xue C., Boey, F., Yan, Q., Chen P., Zhang H. 2009. In situ synthesis of metal nanoparticles on single-layer graphene oxide and reduced graphene oxide surfaces. *The Journal of Physical Chemistry*, 113: 10842-10846.
- Zhu, Y., Murali, S., Stoller, M. Ganesh, K., Cai, W., Ferreira, P., Pirkle, A., Wall, R. 2011. Carbon-based supercapacitors produced by activation of graphene. *Science*, 332: 1537-1541.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Selma TUNÇ
Doğum Yeri : Vezirköprü
Doğum Tarihi : 06.06.1993
Yabancı Dili : İngilizce
E-mail : selma_tnc@hotmail.com
İletişim Bilgileri : Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite	Yıl
Lisans (Bölüm 1.si)	Kimya	Ordu Üniversitesi	2010- 2014
Y. Lisans	Analitik Kimya	Ordu Üniversitesi	2014- 2017

İş Deneyimi:

Görev	Görev Yeri	Yıl
TÜBİTAK (Bursiyer Öğrenci)	Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya/Analitik Kimya	2015- 2017

Yayınlar:

1. Filiz Kuralay, Mehmet Dumangöz, **Selma Tunç**, 2015. Polymer/carbon nanotubes coated graphite surface for highly sensitive nitrite detection, *Talanta*, 144, 1133-1138.
2. Filiz Kuralay, **Selma Tunç**, Ferhat Bozduman, Lutfi Oksuz, Aysegul Uygun Oksuz, 2016. Biosensing applications of titanium dioxide coated graphene modified disposable electrodes, *Talanta*, 160, 325-331.
3. Nilgün Dükar, **Selma Tunç**, Kübra Öztürk, Serpil Demirci, Mehmet Dumangöz, Mutlu Sönmez Çelebi, Filiz Kuralay, One-pot preparation of graphene/poly(*o*-phenylenediamine) modified electrode and its application for highly sensitive and selective dopamine electroensing, under review.
4. Nilgün Dükar, **Selma Tunç**, Mehmet Dumangöz, Serpil Demirci, Kübra Öztürk, Mutlu Sönmez Çelebi, Filiz Kuralay, Electrochemical preparation of graphene/poly(pyrrole) nanocomposite for dopamine detection, under review.

Bildiriler:

1. **Selma Tunç**, Mehmet Dumangöz, Filiz Kuralay, 2015. Polymer/Carbon nanotubes coated electrodes for nitrite detection. 2. Uluslararası Biyosensör Kongresi, İzmir.
2. Filiz Kuralay, **Selma Tunç**, Ferhat Bozduman, Lutfi Oksuz, Aysegul Uygun Oksuz, 2015. RF-titanium dioxide plasma modified graphene coated electrodes for protein sensing. 2015 IEEE International Conference on Plasma Sciences (ICOPS), Antalya.
3. **Selma Tunç**, Filiz Kuralay, 2016. Nanomaterials-based DNA damage detection. 3. Uluslararası Biyosensör Kongresi, Ankara.
4. **Selma Tunç**, Filiz Kuralay, 2016. Electrochemical investigation of the effect of antioxidants on DNA damage. 3. Uluslararası Biyosensör Kongresi, Ankara.

5. Gamze Celik Cogal, Sadik Cogal, Filiz Kuralay, **Selma Tunç**, Maria Omastova, Matej Micusik, Lutfi Oksuz, Aysegul Uygun Oksuz, 2016. Plasma enhanced preparation of graphene/polyfuran nanocomposites. 3. Uluslararası Biyosensör Kongresi, Ankara.

6. **Selma Tunç**, Filiz Kuralay, 2016. DNA damage detection using carbon nanotubes modified electrodes. 10. Uluslararası Ege Analitik Kimya Günleri, Çanakkale.

7. **Selma Tunç**, Filiz Kuralay, 2016. Probing the effect of antioxidants on DNA damage. 10. Uluslararası Ege Analitik Kimya Günleri, Çanakkale.