

**T.C.**  
**BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**NÜKLEİK ASİT TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL**  
**GENOSENSÖR DİZAYNI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Murat BOZDAĞ**

**Balıkesir, Ağustos-2010**

T.C.  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

NÜKLEİK ASİT TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL  
GENOSENSÖR DİZAYNI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Murat BOZDAĞ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Sınav Tarihi: 06.08.2010

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER (Danışman-BAÜ)

Prof. Dr. Oktay ARSLAN (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Hatice BOZKURT YILDIRIM (BAÜ)

Balıkesir, Ağustos-2010

## ÖZET

### NÜKLEİK ASİT TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL GENOSENSÖR DİZAYNI

**Murat BOZDAĞ**

**Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı**

**(Yüksek lisans Tezi/Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER)**

**Balıkesir, 2010**

Günümüzde, LNA problemlerinin elektrokimyasal hibridizasyon analizi geliştirmesinde kullanımı giderek artmaktadır. RNA benzeri bir nükleik asit olan LNA, riboz şekerinin furanoz halkasının kimyasal olarak 2'oksijeni ile 4' karbon atomunu bağlayan bir metilen köprüsü içerir. LNA problemler mikro RNA'ların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Mikro RNA'lar (miRNA yada miR) ufak, tek zincirli kodlama yapmayan ~18-24 nükleotidlik RNA'lardır ve miRNA'ların çeşitli kanserlerle ilişkileri keşfedilmiştir. Dizideki tek bir bazın farklılaşması ile miRNA'lar birbirlerinden ayrılırlar. Tek bir miRNA'yı belirlemek için yüksek seçicilikte prob dizaynı önemlidir.

Bu çalışmada, mikro RNA dizilerinin belirlenmesi için prob altın perde baskılı elektroda kovalent olarak immobilize edilerek elektrokimyasal genosensör dizaynı amaçlanmıştır. Immobilizasyon sonucunda, streptavidin-enzim kompleksi ile hibritin etiketlenmesiyle enzimatik ürünün elektrokimyasal olarak belirlenmesi tek kullanımlık elektrot yüzeyinde gerçekleştirilmiştir. DNA ve LNA problemlerinin biyotinlenmiş DNA ve RNA hedeflerle hibridizasyonu araştırılmıştır. Kronik lenfositik lösemi'nin (CLL) belirlenmesi için dizayn edilen genosensörde tek kullanımlık perde baskılı elektrotlar, differansiyel puls voltametri yöntemi

kullanılarak elde edildi. Spektrofotometrik deneyler ile DNA ve LNA problemlerinin çözelti içerisindeki davranışları incelendi.

Spektrofotometrik erime noktası tayinlerinde tam eşleşen hibritler ile bir bazın yanlış eşleştiği hibritlerin erime noktaları arasındaki farklar ( $\Delta T_m$ ) 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde DNA-DNA çiftleri için 11.53 °C, LNA-DNA çiftleri için 12.55 °C, DNA-RNA çiftleri için 12.71 °C olarak hesaplanmıştır. İyonik şiddeti azaltmak için tuz konsantrasyonunun 1 mM'a indirilmesiyle erime noktaları arasındaki farklar DNA-DNA çiftleri için 10.29 °C, LNA-DNA çiftleri için 11.51 °C, DNA-RNA çiftleri için 14.28 °C ve LNA-RNA çiftleri için 13.49 °C olarak hesaplanmıştır. Elektrokimyasal hibridizasyon analizlerinin tayin sınırları DNA-DNA, DNA-RNA, LNA-DNA ve LNA-RNA analizlerinde sırasıyla 70 pM, 80 pM, 70 pM, 70 pM olarak belirlenmiştir.

**ANAHTAR SÖZCÜKLER :** DNA, LNA, mikro RNA, altın perde baskılı elektrot, genosensör, kronik lenfositik lösemi, elektrokimyasal hibridizasyon analizi.

## **ABSTRACT**

### **AN ELECTROCHEMICAL GENOSENSOR DESIGN FOR DETECTION OF NUCLEIC ACIDS**

**MURAT BOZDAĞ**

**Balıkesir University, Institute of Science, Department of Chemistry**

**(M. Sc. Thesis / Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER)**

**Balıkesir-Turkey, 2010**

Development of electrochemical hybridization assay by using LNA capture probes are increasing nowadays. LNA is a nucleic acid analogue of RNA in which the furanose ring of the ribose sugar is chemically locked by the methylene linkage of 2'O and 4'C. LNA probes are used for detecting miRNAs. Micro RNAs (miRNAs or miRs) are small, single stranded, non-coding RNAs of ~18-24 nucleotides and miRNAs are related with many cancer diseases. They are characterized by a great variability of sequences, distinguishing only a single base from each other. It is particularly important to design high selective capture probes for discriminating only one miRNA.

In this study, we aimed to design a genosensor by covalent bonding probe immobilization on screen printed gold electrode. After having this immobilization, electrochemical detection of enzymatic product of the labeled hybrid with enzyme-streptavidine complex was performed onto the surface of a disposable electrode. The hybridization of DNA, LNA immobilized probes with biotinylated DNA and RNA targets were also investigated. Disposable screen printed electrodes were used as transducer and differential pulse voltammetry was used as an electrochemical technique to design genosensor for detecting chronic lymphocytic leukemia (CLL).

Spectrophotometric experiments were performed in order to investigate the hybridization behavior of DNA and LNA probes in solution.

Spectrophotometric melting point detections were performed to calculate the difference between perfect matched hybrids and one base mismatched hybrids ( $\Delta T_m$ ) in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0),  $\Delta T_m$ 's calculated 11.53 °C for DNA-DNA duplex, 12.55 °C for LNA-DNA duplex, 12.71 °C for DNA-RNA duplex.  $\Delta T_m$ 's were calculated as 10.29 °C for DNA-DNA duplexes, 11.51 °C for LNA-DNA duplexes, 14.28 °C for DNA-RNA duplexes and 13.49 °C for LNA RNA duplexes with decreasing the ionic strength by lower salt concentration as 1 mM. Detection limits of electrochemical hybridization assays were calculated for DNA-DNA, DNA-RNA, LNA-DNA and LNA-RNA assays as 70 pM, 80 pM, 70 pM, 70 pM, respectively.

**KEY WORDS:** DNA, LNA, micro RNA, screen printed gold electrode, genosensor, chronic lymphocytic leukemia, electrochemical hybridization assay.

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER</b>	ii
<b>ABSTRACT, KEYWORDS</b>	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vi
<b>SEMBOL LİSTESİ</b>	viii
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	ix
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b>	x
<b>ÖNSÖZ</b>	xi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1 Biyosensörler	1
1.1.1 Biyosensörlerde Kullanılan Biyo-tanıyıcı Elementler	2
1.1.2 DNA Biyosensörleri (Genosensörler)	3
1.1.2.1 Çevirici Sistemlere Göre DNA Biyosensörleri	4
1.1.3 Elektrokimyasal Biyosensörler	5
1.1.3.1 Elektrokimyasal Biyosensörlerde Kullanılan Elektrot Çeşitleri	6
1.1.3.1.1 Altın Elektrotlar	6
1.1.3.1.2 Perde Baskılı Altın Elektrotlar	6
1.1.3.2 Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerinde Hibridizasyon Olayının Belirlenmesi	7
1.1.3.3 Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerinin Önemi	7
1.1.4 İdeal Bir Elektrokimyasal Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler	8
1.1.5 Teknik Problemler ve Pazar Potansiyeli	11
1.2 Nükleik Asitler	12
1.2.1 DNA (Deoksiribonükleik Asit)	12
1.2.1.1 DNA'nın Replikasyonu	14
1.2.1.2 Çift Sarmal DNA'nın Denatürasyonu ve Renatürasyonu	15
1.2.2 RNA (Ribonükleik Asit)	16
1.2.3 Nükleik Asit Problar	17
1.2.4 Kilitlenmiş Nükleik Asit (LNA)	19
1.3 Mikro RNA	20
1.3.1 Mikro RNA 16	21
1.3.2 Mikro RNA'ların Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmalar	22
1.3.2.1 Kolorimetri Temelli Belirleme Yöntemleri	23
1.3.2.2 Floresan Temelli Belirleme Yöntemleri	23
1.3.2.3 Biyoluminesans Temelli Belirleme Yöntemleri	24
1.3.2.4 Enzim Temelli Belirleme Yöntemleri	25
1.3.2.5 Elektrokimyasal Temelli Belirleme Yöntemleri	26
1.4 Tek Nükleotid Polimorfizmleri	28
1.5 Amaç	28
<b>2. MATERYAL ve METOD</b>	30
2.1 Materyal	30

2.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
2.1.2	Kullanılan Alet ve Cihazlar	30
2.1.3	Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	31
2.1.4	Kullanılan Sentetik Oligonükleotidler	32
2.2	Metod	33
2.2.1	Hibritlerin Erime Noktalarının Spektrofotometrik Metod ile Belirlenmesi	33
2.2.1.1	Oligonükleotid Çözeltilerinin Hazırlanması ve Ön Hazırlık	33
2.2.1.2	Spektrofotometre ile Absorbans Değerlerinin Ölçülmesi ve Hibritlerin Erime Noktaları'nın Hesaplanması	34
2.2.2	Elektrokimyasal Metod ile Hibridizasyon Belirlenmesi	34
2.2.2.1	Elektrot Yüzeyinin Biyo-modifikasyonu	35
2.2.2.2	Sentetik Oligonükleotidler ile Hibridizasyon	36
2.2.2.3	Hibritlerin Alkalen Fosfataz ile İşaretlenmesi	36
2.2.2.4	Substrat Eklenmesi ve Diferansiyel Puls Voltametri ile Ölçüm	36
<b>3.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>38</b>
3.1	Spektrofotometrik Bulgular	38
3.2	Elektrokimyasal Bulgular	43
<b>4.</b>	<b>SONUÇ ve TARTIŞMA</b>	<b>48</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR</b>	<b>55</b>



## SEMBOL LİSTESİ

<b>Simge</b>	<b>Adı</b>
AP	Alkalen Fosfataz Enzimi
SELEX	Üstel Zenginleştirilmeyle Ligantların Sistemetik Evrimi
QCM	Kuvars Kristal Mikrobals
SPGE	Perde Baskılı Altın Elektrot
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
LNA	Kilitlenmiş Nükleik Asit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
HS-ssDNA	Tiyollenmiş tek zincirli Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
miR	Mikro Ribonükleik Asit
PNA	Peptid Nükleik Asit
CLL	Kronik Lenfositik Lösemi
MB	Moleküler Fener
BRET	Biyo-luminesent Resonans Enerji Transferi
QD	Kuantum Nokta
HRP	Yabancurpu peroksidaz
AA	Askorbik Asit
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
MCH	6-merkapt-1-hekzanol
BSA	Bovin Serum Albumin
DEPC	Dietilpirokarbonat
DEA	Dietanolamin
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi
SPGE	Perde Baskılı Altın Elektrotlar
UV	Ultra Viyole

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Adı	Sayfa No
Şekil 1.1	Sensör şeritleri kullanan glukoz ölçerler	2
Şekil 1.2	Moleküler fenerin hibridizasyonunun gösterimi	5
Şekil 1.3	Kuvars kristalin şematik gösterimi	5
Şekil 1.4	Perde baskılı altın elektrot	7
Şekil 1.5	DNA yapısında bulunan bazların hidrojen bağları ile hibridizasyonu	13
Şekil 1.6	DNA ve RNA'nın yapısında bulunan bazlar	14
Şekil 1.7	RNA ve DNA'nın yapısında bulunan 5 karbonlu şekerler	14
Şekil 1.8	DNA'nın denatürasyonu ve renatürasyonu sonucu hibridizasyonu	15
Şekil 1.9	Hücrelerde; DNA, RNA ve proteinleri içeren bilgi akışının basitleştirilmiş şekli	17
Şekil 1.10	Zhao ve yardımcıları tarafından incelenen farklı tiyol tipleri ile DNA'nın kovalent immobilizasyonu	18
Şekil 1.11	LNA ve RNA monomerlerinin karşılaştırılması	19
Şekil 2.1	Perde baskılı altın elektrotların biyomodifikasyonu ve sinyal üretimi prensibi	35
Şekil 2.2	$\alpha$ -naftil fosfatın enzimatik reaksiyonla $\alpha$ -naftole dönüşümü	37
Şekil 3.1	DNA ve LNA proplar ile DNA hedeflerin 100 mM sodyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) erime eğrileri	38
Şekil 3.2	DNA ve LNA proplar ile RNA hedeflerin 100 mM sodyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) erime eğrileri	39
Şekil 3.3	DNA ve LNA proplar ile DNA hedeflerin 1 mM sodyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) erime eğrileri	40
Şekil 3.4	DNA ve LNA proplar ile RNA hedeflerin 1 mM sodyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) erime eğrileri	41
Şekil 3.5	DNA prob ile farklı konsantrasyonlarda DNA hedef-1 ile kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve hedef-2 ile sinyalin karşılaştırılması	43
Şekil 3.6	LNA prob ile farklı konsantrasyonlarda DNA hedef-1 ile kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve hedef-2 ile sinyalin karşılaştırılması	44
Şekil 3.7	DNA prob ile farklı konsantrasyonlarda RNA hedef-1 ile kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve hedef-2 ile sinyalin karşılaştırılması	45
Şekil 3.8	LNA prob ile farklı konsantrasyonlarda RNA hedef-1 ile kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve hedef-2 ile sinyalin karşılaştırılması	46
Şekil 3.9	Diferansiyel puls voltametriyle elde edilen voltamogram	47

## ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No	Adı	Sayfa No
Çizelge 2.1	Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri	30
Çizelge 2.2	Kullanılan sentetik nükleik asitler probalar ve hedefler	33
Çizelge 3.1	DNA-DNA ve LNA-DNA hibritlerinin erime noktalarının ortalama değerleri, erime noktalarının standart sapmaları ve $\Delta T_m$ değerleri	39
Çizelge 3.2	DNA-RNA ve LNA-RNA hibritlerinin erime noktalarının ortalama değerleri, erime noktalarının standart sapmaları ve $\Delta T_m$ değerleri	40
Çizelge 3.3	DNA-DNA ve LNA-DNA hibritlerinin erime noktalarının ortalama değerleri, erime noktalarının standart sapmaları ve $\Delta T_m$ değerleri	41
Çizelge 3.4	DNA-RNA ve LNA-RNA hibritlerinin erime noktalarının ortalama değerleri, erime noktalarının standart sapmaları ve $\Delta T_m$ değerleri	42
Çizelge 3.5	Spektroskopik yöntemle hesaplanan $\Delta T_m$ değerleri	42
Çizelge 3.6	SPGE yüzeyinde DNA-DNA hibridizasyonunda elde edilen elektrokimyasal sinyaller ve standart sapmaları	43
Çizelge 3.7	SPGE yüzeyinde LNA-DNA hibridizasyonunda elde edilen elektrokimyasal sinyaller ve standart sapmaları	44
Çizelge 3.8	SPGE yüzeyinde DNA-RNA hibridizasyonundan elde edilen elektrokimyasal sinyaller ve standart sapmaları	45
Çizelge 3.9	SPGE yüzeyinde LNA-RNA hibridizasyonundan elde edilen elektrokimyasal sinyaller ve standart sapmaları	46

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım süresince bana her zaman güvenen ve destekleyen ve kendimi geliştirmemde en büyük role sahip olan danışman hocam Doç. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER'e en derin minnet ve şükranlarımı sunarım. Sahip olduğu engin bilgileriyle lisans eğitimimden bu yana eğitimimde büyük katkısı olan sayın hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN ve yüksek lisans süresince laboratuvar eğitimimde bana bıkmadan sıkılmadan yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında öğrenci değişim programıyla bulunduğum Floransa Üniversitesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Marco MASCINI'ye, Doç. Dr. Giovanna MARRAZZA'ya ve Dr. Ilaria PALCHETTI'ye deneysel çalışmalarımındaki yönlendirmelerinden dolayı teşekkür ederim. Laboratuvarda çalışmalarımında sorularımı bıkmadan cevaplayan ve yardımlarını esirgemeyen başta Dr. Francesca BERTI olmak üzere tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans süresince yardımlarından dolayı tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren ve her türlü maddi ve manevi desteği sunan sevgili annem Melek BOZDAĞ ve babam AHMET NECATİ BOZDAĞ'a ve gerektiğinde kendi işini bırakıp bana yardım eden sevgili kardeşim Özhan'a en içten sevgi ve saygılarımı sunarım.

**Balıkesir, 2010**

**Murat BOZDAĞ**

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Biyosensörler

Biyosensörler biyoaktif bir tanıma yüzeyi ile fizikokimyasal çeviriden oluşan analitik cihazlar olarak tanımlanabilir. Biosensör, hedef molekülün biyolojik tanıma yüzeyi ile etkileşimi sonucu elde edilen sinyalin çeviricide kullanılabilir bir sinyale çevrilmesiyle belirlenmesine dayanır. Çeviriciler genel olarak; optik, elektrokimyasal ve kütle duyarlı cihazlardır ve sırasıyla ışık, akım yada frekans sinyalleri üretirler [1].

Biosensörün ABD Ulusal Bilimler Akademisinin bir parçası olan ulusal araştırma konseyi tarafından yapılan tanımında belirleme cihazı; yaşayan bir organizma veya canlı sistemlerinden elde edilen ürün (enzim veya antikor vb.) ve bir işaret, sinyal veya ortamda spesifik maddenin varlığının tanınmasının farklı biçimde gösteren bir çeviriciden meydana gelir. Kendi kendine çalışan bağımsız reseptör-çevirici cihazı olarak biyosensörde biyolojik tanıyıcı element çeviriciyle yakın temas halinde veya çeviriciyle bütünleşmiştir [2].

Biyosensörleri tarihsel olarak incelediğimizde ilk olarak 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından enzim içeren biyomembranlar kullanılarak, glukoz elektrodu yapılmıştır [3]. Sonrasında, 1967 yılında Updike ve Hicks bir oksijen elektrodu yüzeyine glukoz oksidaz enzimini içeren bir polimer jel tabakası kaplayarak bir enzim elektrodu hazırlamışlardır [4]. Bu elektrodun glukoz ve oksijen içeren biyolojik bir ortama yerleştirilmesiyle her iki bileşende membran içerisine difüze olmakta ve glukozun oksijen vasıtasıyla glukonik asite oksidasyonu gerçekleşmektedir. Böylece oksijen elektrodu, glukoz konsantrasyonu ile orantılı gerçekleşen kısmi oksijen basıncındaki indirgenmeyi ölçmektedir.

Günümüzde biyosensörlerin tıp, ziraat, gıda güvenliği, ulusal güvenlik, biyoproses, çevresel ve endüstriyel gözlemlerde önemli bir analitik rolü vardır. 11 Eylül 2001'deki olaydan sonra Amerika Birleşik Devletleri ve diğer birkaç ülkede ulusal güvenlik için elde tutulabilen biyosensör teknolojisi için mali kaynakta artış gözlenmiştir [2, 5, 6].

Tanıma olayına göre iki tip biyosensör vardır. Biyoafinite cihazları, hedef analitin yüzeyde hapsedilmiş ligant eşine (antikor, oligonükleotid) seçimli bağlanmasına dayanır. Biyokatalitik cihazlarda bunun aksine hedef analiti tanımak için immobilize enzim kullanılmıştır. Örneğin, glukoz oksidaz immobilize edilmiş sensör şeritleri şeker hastalığının bireysel olarak incelenmesinde kullanılmaktadır.



**Şekil 1.1** Sensör şeritleri kullanan glukoz ölçerler

### **1.1.1 Biyosensörlerde Kullanılan Biyo-tanıyıcı Elementler**

Enzimler, antikorlar, hücre reseptörleri, dokular, nükleik asitler biyosensörlerde tanıyıcı birim olarak kullanılır. Enzim temelli biyosensörler literatürde birçok yayınlanmış makale ile popüler olmuşlardır ve bunun sebebi kandaki glukoz seviyesinin gözlenmesinin gereksinimi [7] ve böyle biyosensörlerin yapımının kolay olmasıdır. İlk nesil biyosensörlerde enzimlerin biyo-tanıyıcı element olarak kullanılmasının popüler olmasının sebebi ticari olarak bulunmaları veya farklı kaynaklardan kolayca izole edilebilmesi ve saflaştırılabilmesidir. Çeşitli oksidoredüktazlar arasından, glukoz oksidaz, yabanturpu peroksidaz (HRP) ve alkalin fosfat (AP) birçok biyosensör çalışmasında kullanılmıştır [8,9]. Birçok

uygulamada tayin sınırı tatmin edici veya bu sınırın ilerisindedir fakat enzim stabilitesi hala problemdir ve uzun bir süre zarfında enzimin aktivitesini sürdürmesi zorunlu görevidir. Günümüzde glukoz oksidaz yüksek oranda kolayca elde edilebilir ayrıca en kararlı ve spesifik enzimdir.

Antikorların antijenlere, hücre reseptörlerinin ligantlarına, DNA (deoksiribonükleik asit) veya RNA'nın (ribonükleik asit) komplementer nükleik asit dizilerine bağlanmasına dayanan afinite biyosensörleri büyük ilgi çekmektedir. DNA biyosensörleri kısa sentetik oligonükleotidleri aynı uzunluktaki hedef DNA'yı belirlemek için kullanır [10]. Ayrıca yüksek seçicilikteki antikor-antijen reaksiyonuna dayanan, bulaşıcı hastalılar için avuçta tutulabilen immunosensörlerin geliştirilmesi büyük ilgi çekmiştir. Bunun nedenleri; laboratuvar dışında ölçüm yapabilmeleri, ulusal güvenlik ve çevresel izlemelerde kullanılmalarıdır. Protein karışımı içeren analitler herhangi bir analiz biçiminde antikor kaplı destek materyalinin yüzeyine immobilize edilebilir ve protein miktarı nicel olarak analizlenebilir [11]. Sensör yüzeyinde kullanılan bir diğer molekül çeşiti aptamerlerdir. Aptamerler nükleik asit ligantlarıdır ve SELEX (üstel zenginleştirilmeyle ligantların sistemetik evrimi) denilen *in vitro* seçim işlemi için dizayn edilmişlerdir. Aptamerler proteinler, karbohidratlar, lipitler ya da küçük molekülleri içeren geniş bir hedef yelpazesinin analizine hitap ederler. Aptamerler antikorlara göre bazı üstünlüklere sahiptir. *In vivo* koşullarda tamamen düzenlenebilirler, kimyasal sentezle üretilebilirler ve işaretlenebilirler. Ayrıca iyi saklama koşullarına sahiptirler.

### **1.1.2 DNA Biyosensörleri (Genosensörler)**

Çevirici birim yüzeyinde immobilize oligonükleotid dizisini prob olarak kullanan biyosensöre *genosensör* denir. Prob biyo-tanıyıcı molekül olarak görev alır ve spesifik komplementer diziyi (hedefi) hibridizasyon ile tanır. Genosensörler için çevirici sistemler elektrokimyasal, piezoelektrik, optik olabilir.

### 1.1.2.1 Çevirici Sistemlere Göre DNA Biyosensörleri

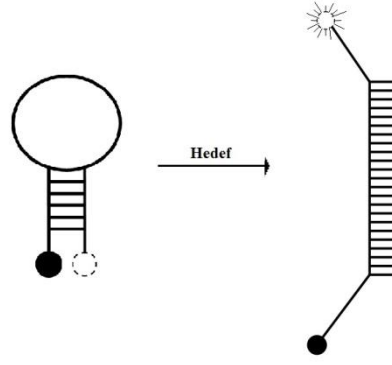
Çevirici sistemlere göre DNA biyosensörleri elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve termal biyosensörler olarak sınıflandırılır.

DNA optik biyosensörler floresan işaretin emisyon sinyalinin fiber optik tarafından dönüştürülmesine dayanır. Fiber optikler ışığı bir yerden bir yere taşıyan cihazlardır. Fiber optik DNA biyosensörlerin işleyişinde fiberin ucuna tek zincirli DNA probun yerleştirilmesi ve floresan bileşik (indikatör) ile işaretli çift zincirli DNA hibritin oluşması ile elde edilen floresan değişim incelenir. İlk DNA optik biyosensör Piunno ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir ve indikatör olarak etidyum bromür kullanılmasına dayanmaktadır [12]. Walt'un grubu eşzamanlı olarak farklı DNA dizilerinin analizine olanak sağlayan fiber-optik DNA biyosensör geliştirmiştir [13]. Farklı bir optik dönüştürücü sistemi DNA hibridizasyonunun gerçek zamanlı, işaretli olarak belirleyebilir. Bu biyosensörler yüzey bağlanma reaksiyonlarının sonucunda yüzey optik özelliklerindeki değişimin izlenmesine dayanır.

*In situ*, işaretli optik belirlenme diğer optik özelliklerdeki değişimlerle sağlanabilir. Örneğin, yeni bir nano tanecik temelli kolorimetrik tayin DNA'nın direk tayini için büyük umut vaat etmektedir [14]. Bu durumda, hibridizasyon olayı sonucu oluşan uzaklık değişimi, toplam fonksiyonel altın nano taneciklerin optik özelliklerindeki değişimler ile sonuçlanır. DNA hibridizasyonun direk floresan belirlenmesi için bir diğer yenilikçi yaklaşım moleküler fenerlerin prob olarak kullanımına dayanmaktadır [15].

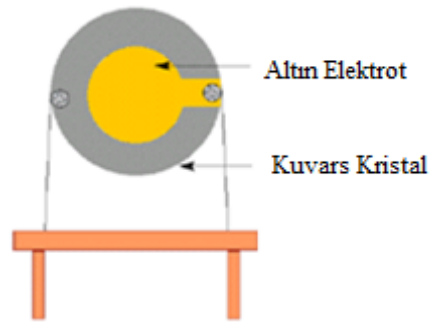
Moleküler fenerler (MB), fener şeklinde baş ve gövdeden oluşmaktadır. Gövde kısmının iki ucundan birinde floresan özellikli yapı olan florofor diğer ucunda da söndürücü (quencher) yer almaktadır. Bu yapı hibridizasyon sonucunda floresan haline gelir [16]. Direk izleme özelliklerinin yanında moleküler fener problemler yüksek hassaslık ve spesiflik sunar.





**Şekil 1.2** Moleküler fenerin hibridizasyonunun gösterimi

Kütle duyarlı cihazlar, bir diğer indikatörsüz belirleme metodu olan kuvars kristal mikrobalsan (QCM) çeviricinin kullanılmasına dayanır. QCM oldukça hassas kütle ölçüm cihazıdır ve hibridizasyon olayının dinamik olarak gözlenmesine izin verir [17]. QCM hibridizasyon biyosensörleri yüzeyine DNA probe immobilize edilmiş kuvars kristalden oluşur. Hibridizasyon reaksiyonu ile artan kütle kuvars frekansında değişmeye neden olur. QCM ile Tay-Sachs genetik bozukluğunun belirlenmesi için yüksek hassaslıkta mikrogravimetrik cihaz geliştirilmiştir [18].



**Şekil 1.3** Kuvars kristalin şematik gösterimi

### 1.1.3 Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal cihazlar dizi spesifik DNA biyoalgılayıcı olduklarını kanıtlamışlardır. Minyatürleşmeye uygun olmaları ve gelişmiş mikroüretim teknolojisiyle uyumları sayesinde DNA tanısı için mükemmel adaydırlar [19].

### **1.1.3.1 Elektrokimyasal Biyosensörlerde Kullanılan Elektrot Çeşitleri**

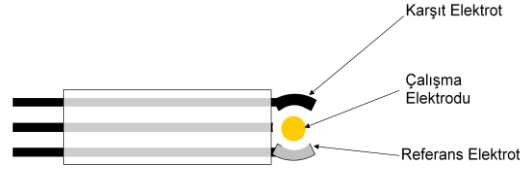
Karbon elektrotlar [20-24], platin elektrotlar [25], altın elektrotlar [26], silikon oksit elektrotlar'ın [27] dahil olduğu birçok türde elektrot genosensör yapımında destek materyali olarak kullanılmıştır. Altın, belirli bir derişime kadar oksijeni soğurmadiğı için, kimi çalışmalarda platine göre daha iyi bir elektrot malzemesidir.

#### **1.1.3.1.1 Altın Elektrotlar**

Elektrokimyasal genosensörleri tanımlayan hemen hemen tüm yayınlarda ticari olarak satılan elektrotlar altın teline destek materyalinin içine yerleştirilmesinden oluşmaktadır. Fakat birkaç ölçüm aldıktan sonra bu elektrotların yüzeyinin regenerasyonu can sıkıcı ve zaman alan mekanik ve kimyasal yöntemlerin uygulanmasını gerektirmektedir. Belli sayıda aynı yapıdaki elektrot pratik çalışmalarda gereklidir. Tek kullanımlık baskılı [28], fotolitografik [29, 30] ve perde baskılı [31] altın elektrotların elde edilmesi biyosensör protokollerini büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. Genosensörler perde baskılı karbon ve altın elektrotlar üzerinde geliştirilmektedir.

#### **1.1.3.1.2 Perde Baskılı Altın Elektrotlar**

Tek kullanımlık, düşük maliyetli perde baskılı altın elektrotlarda (SPGE), altın çalışma elektrodu, referans gümüş elektrodu ve karşıt elektrot sırasıyla altın bazlı (R-464(DPM-78)), gümüş bazlı (Electrodag PF-410) ve grafit bazlı (Electrodag 423 SS) polimerik mürekkeplerin (macun) esnek plastik materyalin üzerine perde baskısı yöntemiyle basılmasıyla elde edilmiştir. Elektrokimyasal hücreler düzlemsel üç elektrot şeritinden oluşur; altın çalışma elektrodu, karbon karşıt elektrot ve gümüş psödo-referans elektrot. Bu sensörlerin önemli bir yönü tiyollenmiş oligonükleotitlerin altın yüzeyde hiçbir ön hazırlık yapmadan kovalent ve tekrarlanabilir immobilizasyonudur [31].



**Şekil 1.4** Perde baskılı altın elektrot

Bu tip DNA biyosensörleri kısa tek zincirli DNA problemlerinin farklı elektrotlar üzerine immobilizasyonu ile hazırlanabilir ve DNA problemleri ile komplementer DNA (cDNA) fragmentleri arasındaki hibridizasyon elektrokimyasal olarak belirlenmesi kontrol altındaki potansiyel koşullarının akım yanıtının görüntülenmesini içerir. Hibridizasyon olayı genellikle bir redoks belirtecinin (DNA çiftini tanıyan) akım sinyalinin artması ile veya hibridizasyon sonucu elektrokimyasal parametrelerdeki değişikliklerle (örneğin iletkenlik veya direnç) gözlenir [1].

### **1.1.3.2 Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerinde Hibridizasyon Olayının Belirlenmesi**

Elektrokimyasal genosensörler baz çiftinin tanınmasını uygun elektrik sinyale çevirmesine dayanır. Bunlar guanin sinyali temelli olabilir (işaretsiz) veya elektrokatalitik mekanizmalı (işaret temelli); redoks indikatörünü (katyonik metal kompleksleri, daunomycin, elektrokimyasal boya, metilen mavisi) çift zincirin arasına girerek kullanan elektrokatalitik mekanizmalı veya hibridizasyon basamağından sonra tutturulabilen enzimle işaretleme yöntemini kullanabilirler. Enzim temelli metod enzimatik reaksiyon sonrasında sinyal elde edilmesine dayanır.

### **1.1.3.3 Elektrokimyasal DNA Biyosensörlerinin Önemi**

Diğer metodlarla karşılaştırıldığında elektrokimyasal metodların önemli üstünlükleri vardır. Bunlar; kolayca küçültülebilme, kolay, hızlı ve ucuz olmaları.

Böylece son yıllarda elektrokimyasal DNA genosensörlerin genetik hastalıkların teşhisi ve diğer biyolojik analizlerde hızlı ve ucuz olmalarından dolayı önemi artmıştır. Modifiye DNA elektrotlar elektrokimyasal biyosensör geliştirilmesinde ve DNA'nın diğer moleküllerle etkileşimlerinin çalışılmasında çok önemlidir. Fakat elektrot yüzeylerindeki DNA'nın geleneksel metodlarla immobilizasyonunda hibridizasyon verimi düşüktür [23].

Spesifik DNA prob ile hedef molekül arasındaki etkileşim DNA biyosensörün performansında kapsamlı olarak önemli role sahiptir. Sensörler için dizayn edilen çoğu tipik tek zincirli DNA problemler zayıf stabilite veya spesifiklik gösterirler. Bu nedenle DNA problemler ve onların cDNA fragmentleri arasındaki hibridizasyon analizlerinde duyarlı ve seçici DNA problemlerin geliştirilmesine halen ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda bazı makalelerde kilitlemiş nükleik asit (LNA) adı verilen yeni nükleotidin hibridizasyonu ve sentezi tanımlanmıştır. LNA'lar önemli antisens aktivitesi, *in vivo* ortamda toksisite gözlenmemesi ve nükleaz direnci dahil birçok avantaja sahiptir [23].

#### **1.1.4 İdeal Bir Elektrokimyasal Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler**

- Seçicilik

İdeal bir biyosensörde en önemli parametrelerden birisi olan seçicilik özelliğidir. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse bu eksikliği giderecek uzun ek işlemler eklenmesi gerekir.

- Kullanım Ömrü

Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör, biyolojik algılama yüzeyinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametreleri de etkilemektedir.

- Kalibrasyon Gereksinmesi

İdeal bir biyosensörün hiç kalibrasyona gerek duymaması ya da en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Fakat bu özellik, teorikte planladığı gibi değildir, pratikte gerçekleştirilememiştir. Kullanım ömürleri boyunca biyosensörler, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

- Tekrarlanabilirlik

Algılama yüzeyi içeren elektrodun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde hemen hemen aynı sonuçları elde edilmesi istenir. Pratikte pek mümkün olmayan bu durum göz önüne alınarak, yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa, biyosensörün uygulamalarının o denli iyi olduğundan söz edilebilir.

- Stabilité

Elektrot stabilitesinin (kararlılığının) yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Stabilité, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır. Ayrıca; pH, ısı, nem ve ortamın O<sub>2</sub> konsantrasyonu gibi parametrelerden de etkilenmektedir.

- Yüksek Duyarlılık

Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin yalnız belirli maddelere karşı duyarlı olması, ideal biyosensörlerin özelliklerindedir.

- Tayin Sınırı

Tasarımı yapılan bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir konsantrasyon değerinin altında olması gerekmektedir. Belirtilen bu sınır, elektrot yüzeyinin büyüklüğü, biyolojik materyalin tayin edilecek maddeye afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörlerden etkilenir.

- Geniş Ölçüm Aralığı

Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge biyosensörlerden alınan akım-konsantrasyon eğrilerinin lineer olduğu konsantrasyon aralığıdır.

- Hızlı Cevap Zamanı

Bir biyosensör elektrodunun cevap zamanı elde edilen akım-zaman eğrilerinden anlaşılabilir. Örneğin elde edilen eğride basamakların şekli yayvan ve genişse cevap zamanı uzun (yavaş), tersi söz konusu ise cevap zamanı kısa (hızlı)'dır.

- Hızlı Geriye Dönme Zamanı

Geriye dönme zamanı, örneğin amperometrik çalışmalarda, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnekte aynı süre sonra ilave edilebilecektir.

- Basitlik ve Ucuzluk

Tasarımı basit ve ucuz, kullanımı rahat biyosensörler ideal biyosensörlerdir. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar, daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da ucuzlaştırılmıştır.

- Küçültülebilirlik ve Steril olması

Elektrotlarının steril olması ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemlidir [32].

### 1.1.5 Teknik Problemler ve Pazar Potansiyeli

Biyosensörlerin pazardaki canlılığı geniş uygulama alanlarında çok yönlü olup olmaması ve ucuz olmasına bağlıdır. Hangi biyosensör platformunda olursa olsun birçok teknik konu problem oluşturmaktadır. Öncelikle, ticari olarak bulunan bir biyosensör en azından bir aylık raf ömrüne sahip olmalıdır. Glukoz ölçer dışında çoğu biyosensör bu sıkı gereksinimi yerine getiremez ve bunun sebebi biyo-tanıyıcı elementin narinliğidir. İkinci olarak yalnızca birkaç biyosensör birkaç dakikadan kısa sürede biyolojik örneği doğru tahlil edebilirken birçok cihaz 15 dakikadan birkaç saate uzanan tahlil sürelerine sahiptir. Matriks engellemesi, analizlenecek örnek içerisindeki birçok endojen bileşenin adsorbsiyonundan dolayı sensör bozulması, sinyal sapması, mikrobiyal kontaminasyon ile bağlantılı problemler bütün biyosensörler için ortaktır. Başarılı bir biyosensör farklı biyo-tanıyıcı elementleri destekleyecek kadar değişken, otomasyona izin verecek şekilde minyatürize ve makul ücrette işlem kolaylığı sağlamalıdır [2].

Medikal biyosensör pazarına 2008 yılında % 69.73 payla ABD ve Avrupa hakim olmaktadır. Dünya çapındaki biyosensörlerin yarısından fazlasını glukoz ölçerler oluşturmaktadır ve en geniş pazar payına Birleşik Devletler sahiptir [33].

Kamu güvenliği ve endişe, yeni kanunlar, bazı ülkelerdeki gıda kirlilikleri, çevresel ve gıda/ziraat endüstrilerini büyük araştırma girişimlerine teşvik etmiştir. Birleşik devletlerde her yıl yaklaşık 5000 insan *Salmonella* veya *E.coli*'ye bağlı zehirlenmelerden ölmektedir. Dünya çapında gıda üretim endüstrisi 578 milyar dolar çapında ve patojenlerin belirlenmesi ve yakın gelecekte artması beklenen gıda maddeleri içerisindeki kirlleticilerin belirlenmesi için biyosensörlere ihtiyaç duyar. Ayrıca önemli miktarda araştırma biyolojik savaş ajanlarının belirlenmesine odaklanmıştır. Toksikite, biyo-bulunma, çoklu kirlitici taraması alanlarındaki gelişmeler potansiel biyosensör pazarını geliştirecektir ve geleneksel laboratuvar tabanlı yöntemlerle rekabet edebilmesine izin verecektir [2].

## 1.2 Nükleik Asitler

Deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA), genetik bilgilerin korunması ve taşınması görevini üstlenen zincir şeklinde makromoleküllerdir.

### 1.2.1 DNA (Deoksiribonükleik Asit)

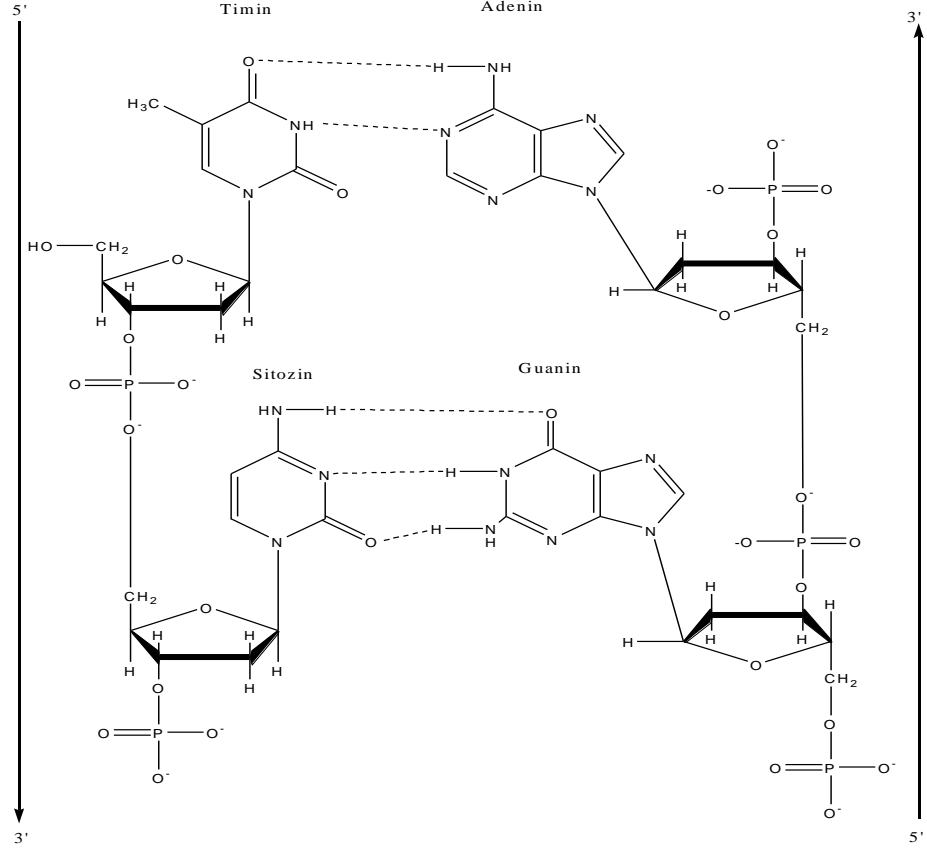
DNA'nın genetik işlemlerdeki öneminin kavranmasından sonra, yalnız DNA'nın yapısıyla ilgili değil, aynı zamanda yapı ve fonksiyonu arasındaki ilişkiyi açığa çıkarmayı amaçlayan çalışmalar da yoğunluk kazanmıştır. 1944 ve 1953 yılları arasında birçok bilim adamı, biyoloji tarihinde en önemli ve merak edilen sorulardan biri olan "DNA canlılarda genetiğin temelini nasıl oluşturur?" sorusunun cevabını aradı. Cevabın, karmaşık ancak düzenli işlevler gören DNA'nın kimyasal yapısında bulunacağı inancı güçlüydü.

Watson ve Crick'in 1953 yılında DNA'nın çift sarmal yapısıyla ilgili hipotezleriyle molekülün işlevinin daha kolay anlaşılması için, önce yapısının aydınlatılması gerektiği öngörüsünün doğruluğu açığa kavuşturulmuştur [34]. Bu modele göre:

- 1- İki uzun polinükleotid zinciri bir merkez zincir tarafından kıvrılarak, sağ el ikili sarmal yapısını oluşturur.
- 2- İki zincir birbirine anti paraleldir; yani, iki zincirin C-5' ucundan C-3' ucuna doğru olan yönleri birbirine terstir.
- 3- Her iki zincirin bazları düzlemsel yapıdadır ve düzlemleri eksene diktir; bazlar arasında 3,4 Å mesafe olacak şekilde birbiri ardına istiflenir ve sarmalın içinde yer alır.
- 4- Karşı zincirdeki azotlu bazlar, hidrojen bağları ile bağlanarak birbirleriyle eşleşirler; DNA da sadece, A=T ve G≡C eşleşmesi mümkündür.
- 5- Sarmalın her bir tam dönüşü 34 Å dur, böylece her bir dönüşte 10 baz yer alır. Sarmalın çapı da 20 Å dur.



- 6- Molekülün her hangi bir bölümünde, eksen üzerinde sıra ile daha geniş olan majör oluklar ve daha dar olan minör oluklar yer alır.



Şekil 1.5 DNA yapısında bulunan bazların hidrojen bağları ile hibridizasyonu

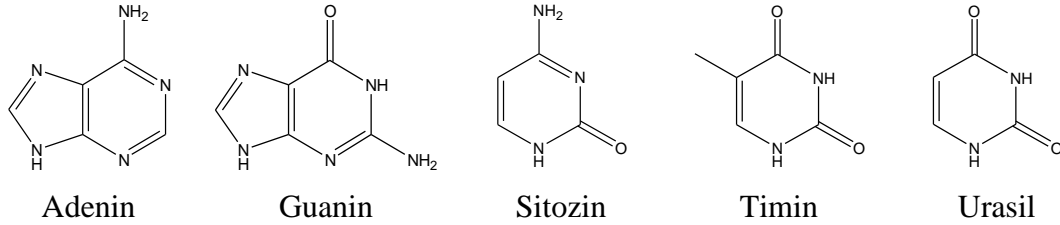
- Nükleotidlerin Yapısı ve Özellikleri

Nükleotidler bütün nükleik asit moleküllerinin yapı taşlarıdır. Yapısal birimler, bir azotlu baz, bir pentoz şekeri (5-karbonlu şeker) ve bir fosfat grubu olmak üzere 3 alt birimden meydana gelir.

- Pürin ve Pirimidin Bazları

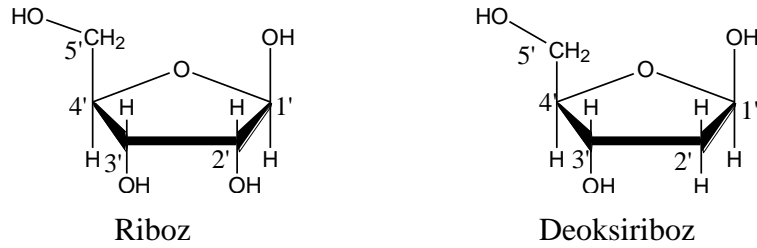
Azotlu bazlar iki çeşittir. Bunlar, dokuz atomlu iki halkalı pürinler ve altı atomlu tek halka içeren pirimidinlerdir. İki tip pürin ve üç tip pirimidin bulunur.

Pürinler, Adenin (A) ve Guanin (G). Pirimidinler ise, Sitozin (C), Timin (T) ve Urasil (U) dir.



**Şekil 1.6** DNA ve RNA'nın yapısında bulunan bazlar

Nükleik aside adını veren taşıdığı pentoz şekeridir. Ribonükleik asitlerde (RNA) riboz, deoksirobnükleik asitlerde (DNA) deoksiriboz bulunur.



**Şekil 1.7** RNA ve DNA'nın yapısında bulunan 5 karbonlu şekerler

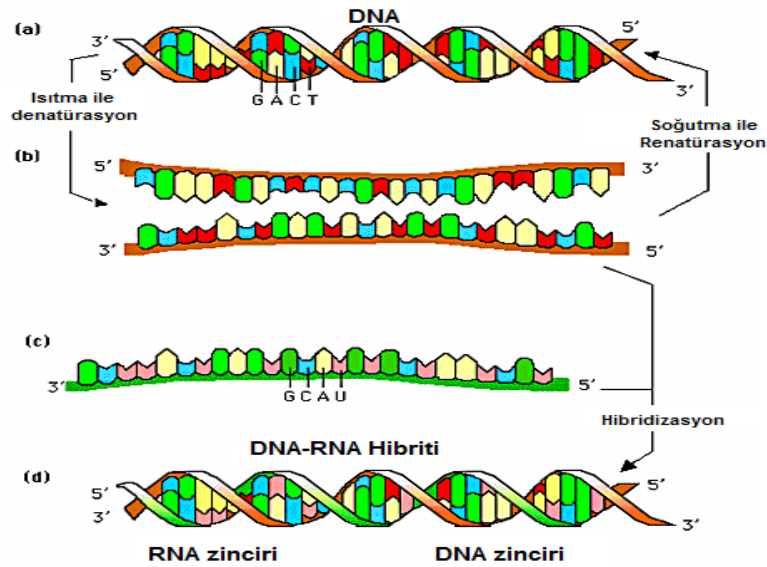
### 1.2.1.1 DNA'nın Replikasyonu

DNA çift sarmalında polinükleotid zincirleri birbirlerine zıt yönde tam komplementer olduklarından, sarmal açıldığında her biri yeni bir zincirin oluşumu (replikasyon) için kalıp görevi görmektedir. DNA replikasyonu semikonservatiftir, yani yeni bir iplik oluşurken diğer iplik eskisi olarak aynen kalır. DNA molekülünün replikasyonunda, hücrenin stoplazmasında bulunan çeşitli nükleotidlerin iki kol açıldıkça, kollarda bulunan uygun bazların karşılıklarına gelmeleriyle kendini eşleme başlamış olur. Replikasyonda polimeraz enzimleri görev alır. DNA'nın ikili sarmalı birbirinden ayrıldığı zaman, kural olarak adenin grubu timin grubuyla guanin

grubuyla sitozin grubuyla birleşerek yerlerini alırlar, diğerleri uymadıkları için geri çevrilirler. Yine aynı şekilde, eski zincirdeki adeninler timinlerle, sitozinler guanin gruplarıyla ikili sırayı tamamlamak için birleşirler. Bütün nükleotitler eşlendiğinde ise, yeni zincir oluşturulmuş, DNA kendini eşlemiştir. Kopyalanan yeni DNA iplikleri tamamen aynıdır [32, 35].

### 1.2.1.2 Çift Sarmal DNA'nın Denatürasyonu ve Renatürasyonu

Saflaştırılmış DNA çözeltisi pH 7.0 ve oda sıcaklığında (25 °C) oldukça yoğun bir haldedir. Bu çözeltiliye uygulanan pH uç değerlere çekilecek veya sıcaklık 80 °C'nin üzerine çıkarılacak olursa yoğunluğun hızla azaldığı görülecektir. Böylece uç pH ve ısı değerleri DNA'da denatürasyon (çözülme) veya çift sarmalın erimesini (iplikçiklerin birbirinden ayrılması) meydana getirecektir. Eşleşmiş baz çiftleri ve baz yığılımlarının oluşumundaki hidrojen bağlarının bozulması çift sarmalın bozulmasına, geri çözülmesine, tek iplikçik oluşturmaya, iplikçiklerin birbirinden tüm DNA uzunluğu boyunca ya da bir kısmında (kısmi denatürasyon) ayrılmasına neden olacaktır. Bütün bu oluşum sırasında DNA'nın kovalent bağları kırılmaz [36].



Şekil 1.8 DNA'nın denatürasyonu ve renatürasyonu sonucu hibridizasyonu [32]

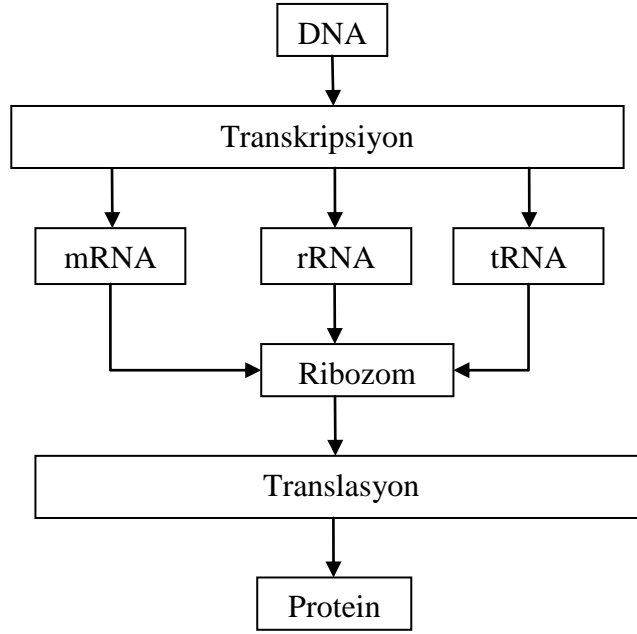
İki zinciri birbirine bağılı tutan bir düzine yada daha fazla baz kalıntısının bulunduğu durumda oluşan renatürasyon (tekrar birleşme) tek kademeli ve hızlı bir olaydır. Sıcaklık veya pH'ın birçok organizmanın yaşaması için gerekli sınırlara getirilmesiyle birbirinden ayrılmış iki iplikçik kendiliğinden eski haline gelir ve sarılır (anneal). İki iplikçiğin birbirinden tamamen ayrılması durumunda ise birleşme iki basamakta gerçekleşir. Birincisi oldukça yavaş bir kademe olup iki iplikçik birbiriyle rast gele çarpışarak, tümlenmiş kısa bir çift sarmal parçacığı oluşturur. İkinci basamak ise daha hızlı olup geriye kalan eşleşmemiş iki iplikçik kurallarına uygun olarak bir araya gelir ve bir fermuar gibi çift sarmalı oluşturur [36].

### 1.2.2 RNA (Ribonükleik Asit)

DNA yapısının içerdiği kodlanmış genetik bilginin işlevsel bir proteinin amino asit dizilimini oluşturmasında RNA bir ara bileşik gibi davranır. RNA DNA'ya benzer ancak önemli farkları bulunur. Her ne kadar RNA'da da nükleotid yapı taşları polinükleotid zincirlerini meydana getirirse de, RNA da deoksiriboz yerine riboz şekeri, azotlu baz timin yerine urasil bulunur. Diğer önemli bir fark, RNA'nın çoğunlukla tek zincirli olduğunun düşünülmesidir. Ancak; RNA molekülleri sentezlendikten sonra kendi üstüne katlanarak ikili sarmal bölgeler oluşturur, genetik materyali RNA olan bazı hayvan virüslerinde RNA ikili sarmal olarak bulunur. Böylece RNA'nın tam manası ile tek zincirli bir molekül olarak bulunmadığı çeşitli durumlar vardır. Genetik bilginin ifadesinde en az üç hücrel RNA molekülü işlevseldir:

Ribozomal RNA (rRNA), haberci RNA (mRNA), taşıyıcı RNA (tRNA). Bu moleküller DNA'nın bir zincirinin tamamlayıcı kopyası olarak transkripsiyon (okuma) sonucunda sentezlenir. Bunların içinden sadece mRNA'nın proteine translasyonu yapılır. Her bir mRNA özgül bir genin ürünüdür ve değişik bir proteinin sentezine yol açar. Translasyon (çeviri) rRNA içeren ribozomlarda, tRNA'nın da katılımıyla gerçekleşir. Burada tRNA, mRNA'daki kimyasal bilgiyi, proteinleri oluşturan aminoasitlere çevirerek adaptör rolü oynar. Bu işlemler,

moleküler genetiğin santral dogmasını oluşturur. DNA'dan RNA, RNA'dan protein sentezlenir.



**Şekil 1.9** Hücrelerde; DNA, RNA ve proteinleri içeren bilgi akışının basitleştirilmiş şekli [34]

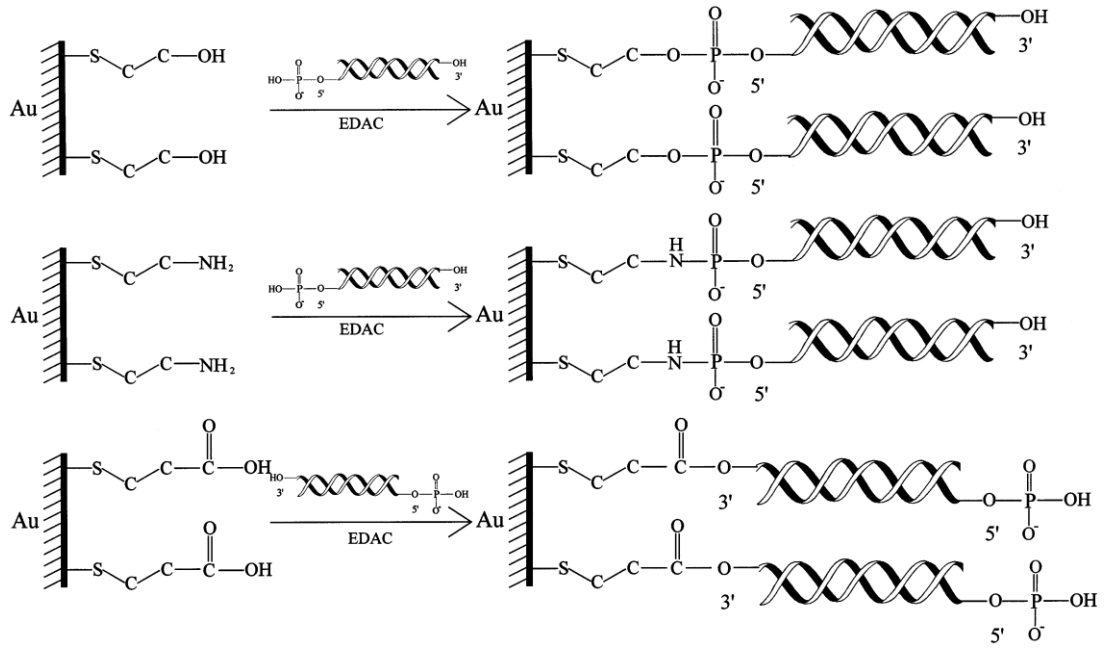
### 1.2.3 Nükleik Asit Problar

Nükleik asit problar biyolojik reseptörlerdir. Büyük çoğunlukta bu problar lineer olügonükleotidlerdir fakat biçimlendirilmiş (saç tokası) oligonükleotidlerin kullanımı giderek artmaktadır. Hedef gen dizisinin tanınması komplementer nükleik asit dizisi ile çift zincirli hibrit yapısı oluşturabilen oligonükleotid prob ile verimli ve yüksek seçicilikte birçok farklı ve komplementer olmayan hedefin varlığında olmalıdır.

Nükleik asit problar tek zincirli oligonükleotidlerdir, radyoaktif ve radyoaktif olmayan maddeler ile işaretlenmişlerdir. Problar hedef dizisiyle hibridizasyonu işaret eden belirlenebilir sinyaller sağlarlar. Radyoaktif işaretler yüksek derecede hassastırlar fakat kısa raf ömrü, bireysel radyasyona maruz kalma, maliyet, saklama ve atık problemi belli dezavantajlarıdır. Diğer taraftan enzimatik veya luminesans

işaretler gibi radyoaktif olmayan problemler dizayn ve uygulama açısından daha az hassas ve esnekler fakat açıkça güvenli ve çevre dostudurlar. Nükleik asit hibridizasyon kinetikleri direkt olarak DNA probun katı yüzeye erişimine bağlıdır. Nükleik asitlerin kovalent olarak elektrot yüzeyine prob zincirinin bir ucundan tutturulması arzulanır.

Daha çekici yaklaşımlar tiyollenmiş DNA problemlerin altın yüzeye kemisorbsiyonuna dayanır. Üç farklı tiyol tipi (hidroksil, amino ve karboksil uçu) Zhao ve yardımcıları tarafından DNA'nın optimum kovalent immobilizasyonu için incelenmiştir [37].

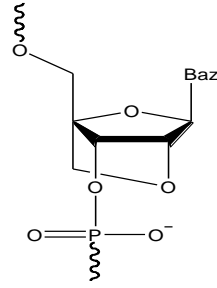


**Şekil 1.10** Zhao ve arkadaşları tarafından incelenen farklı tiyol tipleri ile DNA'nın kovalent immobilizasyonu [37]

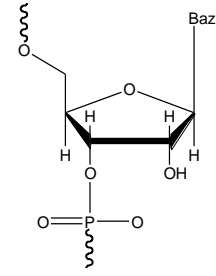
Prob ve hedef molekülün hibridizasyon koşulları sıcaklık, tuz konsantrasyonu ve tamponların pH değerleriyle bağlantılıdır. DNA probun kilitlenmiş nükleik asit (LNA) ve peptid nükleik asit (PNA) gibi alternatifleri vardır [38-40]. Bu alternatif nükleik asitler farklı koşullar altında daha iyi kararlılık göstermişlerdir.

### 1.2.4 Kilitlenmiş Nükleik Asit (LNA)

Wengel [41] ve Iminashi [42] laboratuvarlarında kilitlenmiş nükleik asit (LNA) adında yeni bir nükleotid sentezini ve hibridizasyonunu tanımladılar. LNA nükleotidleri riboz şekerinin 2'oksijeni ile 4' karbon atomunu bağlayan bir metilen köprüsü içerir. Bu köprü 3'endo konformasyonunda kilitlenmiş olarak sonuçlanır ve ribozun konformasyonel esnekliğini azaltır ve fosfat omurganın lokal organizasyonunu artırır [39].



**LNA monomeri**



**RNA monomeri**

**Şekil 1.11** LNA ve RNA monomerlerinin karşılaştırılması

LNA oligonükleotidler en az bir RNA benzeri konformasyonda bisiklik furanoz birimi içeren (LNA monomeri içeren) oligonükleotidler olarak tanımlanmıştır. LNA tek zincirleri komplementer DNA ve RNA tek zincirlerine karşı yüksek afinite gösterir. Bazların arasındaki bağlarla, Watson-Crick hidrojen bağlarıyla LNA-DNA ve LNA-RNA çift zincirleri oluşur. LNA-RNA ve LNA-DNA hibritlerinin erime noktaları ( $T_m$ ) onların DNA-RNA ve DNA-DNA hibritlerinden 2-10 °C ve 1-8 °C daha yüksektir [43]. Ayrıca LNA-RNA ve LNA-DNA hibritleri NMR spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir. Çiftler doğal nükleik asit çiftleriyle ortak özellikler göstermiştir [44].

LNA; komplementer DNA ve RNA moleküllerine yüksek spesifiklik ve afiniteyle bağlanmasından dolayı tek nükleotid polimorfizm genotipleme, antisens gen terapisi ve plazmit vektör işaretlenmesinin dahil olduğu geniş bir kullanım

yelpazesine sahiptir [38]. LNA'nın antisens etkileri *in vivo* olarak araştırılmıştır ve komplementer RNA ile yüksek afinite de hibridize olma kabiliyeti sayesinde tedavi edici potansiyeleri belirlenmiştir [45]. Nükleik asit hibridizasyon termodinamiklerinin kesin tahminleri temel olarak primer ve prob dizaynına dayanır. LNA temelli oligonükleotidlerin termodinamik karakterizasyonu LNA-DNA çifti formasyonu için basit UV-erime çalışmalarını termodinamik parametrelere bağlı dizilerin keşfinde kullanılır

### 1.3 Mikro RNA

Son zamanlarda gen ifadesinin düzenlenmesi hakkındaki büyük buluş mikro RNAların keşfidir. Mikro RNA'lar (miR, miRNA) 18-24 nükleotid uzunluğunda tek zincirli RNA molekülleridir. Olgun miRNA'lar protein translasyonunun kodlanmasını baskırlar. Virüsler, bitkiler ve hayvanları içeren türlerde yüksek oranda bulunurlar. Transkripsiyonel hedefleri tahmin edilmesine rağmen birçoğu halen onaylanmamıştır [46].

Bunlar filogenetik olarak korunmuş ve gelişim, hücresel çoğalma ve apoptosis gibi birçok temel hücresel işlemd e görev alırlar. 50 üzerinde türde toplamda 1500 üzerinde ve İnsan genomunda 700'ün üzerinde miRNA tanımlanmıştır [47]. miRNA'lar protein kodlayan genlerin komplementer dizisinin 3' çevrilmemiş bölgelerine (3'UTR) bağlanırlar ve mRNA degradasyonuna ya da hedef genlerin translasyonel baskılanmasına neden olurlar [46].

İlk miRNA lin-4 1993 yılında keşfedilmiştir ve *C elegans* gelişimini lin-14'ün protein ifadesinin mRNA'sının 3'UTR bağlanarak inhibe ederek düzenler [48]. İkinci olarak miRNA let-7 2000 yılında tanımlanmıştır ve 21 nükleotid uzunluğundadır [49]. Tek bir miRNA birçok hedef geni düzenler. Bu yüzden miRNAlar binlerce protein kodlayan geni düzenleyebilir [50].

miRNA'lar yalnızca sürdürülebilir hücresel fonksiyonlarda temel rol oynamaz ayrıca kanser gelişimiyle de ilgilidir. Geniş kapsamlı genom çalışmaları



sayesinde, miRNA genleri genellikle heterozigosite kaybı, amplifikasyon veya kanser kırılma noktaları gösteren genomik bölgelerde konumlanmıştır [51]. Diğer taraftan bazı miRNAlar insan kanserlerinde negatif düzenlenmiştir, bu da miRNA'ların tümör baskılayıcı olarak davranabileceklerini göstermektedir. Örneğin, onkogen Ras'ı hedefleyen let-7 akciğer kanserinde negatif düzenlenme göstermiştir [52]. Cyclin G1 i hedefleyen miR-222a insan hepatoselüler kanserinde genellikle negatif düzenlenmiştir [53]. Kanser hücrelerinde miRNAların ifade düzeni kanser tedavi edici ajanlardan etkilenmiş olabilir. Bunlar belirli bir miRNA grubunun kanser hücrelerinde antikanser ilaçlarına hedef olarak davranabilirler [54].

### **1.3.1 Mikro RNA 16**

Cimmino ve arkadaşları miR-15a ve miR-16-1'in BCL2 yi negatif düzenlediğini ve negatif düzenlenen bu apoptotik genin lösemiler ve lenfomaları da içeren birçok insan kanseri çeşidinde sıklıkla aşırı ifade olduğunu göstermiştir. 13q14 telomerikten RB1 kromozom bandı bölgesindeki silinme birçok tümör tipindeki genel genetik sapmadır. Bu da kronik lenfositik lösemide (CLL) en çok kromozomal kaybın yaşandığı bölgedir. 13q14 delesyonu baş, boyun ve prostat tümörlerin dahil olduğu birkaç katı tümörde bildirilmiştir [55]. İki miRNA, miR-15a ve miR-16-1 CLL'de 13q14 MDR etrafında konumlanmıştır. İnsanda bulunan miRNA 16 "UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG" 22 baz uzunluğundaki diziden oluşmaktadır [47].

miR-16-1 CLL'lerin çoğunda silinmiş veya negatif düzenlenmiştir. Kronik lenfositik lösemi (CLL) en yaygın insan lösemisidir ve ağırlıklı olarak bölünmeyen malign B hücrelerinin aşırı ifadesiyle antiapoptotik B hücre lenfoma 2 (Bcl2) protein ile karakterize edilmiştir. CLL'de miR-16-1 ifadesi ile Bcl2 ifadesinin ters korelasyonu Cimmino ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir ve miRNA-16 da Bcl2 yi posttranskripsiyonal seviyede negatif düzenlemiştir. Negatif düzenlenen bu apoptotik genin lösemiler ve lenfomaları da içeren birçok insan kanseri çeşidinde sıklıkla aşırı ifade olduğu gösterilmiştir [56].

miR-16 gibi tümör baskılayıcı miRNAların önemi gün geçtikçe açıklığa kavuşmaktadır. qRT-PCR çalışmalarıyla çeşitli kanser hastalarının tümörlerinde bu spesifik miRNAların ifade düzeylerinin azaldığı ortaya çıkmıştır. Bu miRNAların bir çoğu çoğalma, viabilite, hücre döngüsü veya apoptosisi ve birçok bilinen onkogenin ifadesini etkilemektedir.

Kanserde miRNA'ların kullanılma potansiyelleri günümüzde keşfedilmektedir. Sistemik sentetik miR-16 verilimiyle metastatik prostat tümörlerinin bazı hücre döngüsü genlerinin negatif düzenlenmesiyle engellenmiştir [57]. Bunun teorik gerekçesi miRNA'ların doğal antisens etkileşimciler olmasına dayanır ve ökaryotik hayatta kalma ve çoğalmanın dahil olduğu birçok geni düzenler. Gemcitabine ile tedavi sırasında miRNA ifade profillerinde değişim gözlenmiştir ve bazı miRNA'ların modülasyonu *in vitro* koşullarda kolanjiyokarsinom tümör hücrelerinin bu kemoterapötik ajana hassasiyetini artırır. Bu sonuçlar miRNA'ların tedavi edici hedefler olarak kullanılmasının deneysel temelini oluşturur. Daha uzun yarılanma süresine ve verime sahip modifiye miRNA moleküllerinin geliştirilmesi, örneğin LNA modifiye oligonükleotidlerin temel araştırmalarda elde edilen gelişmeleri tıbbi alandaki uygulanabilirliği için atılmış ilk adımdır [58].

### 1.3.2 Mikro RNA'ların Belirlenmesi İçin Yapılan Çalışmalar

Mikro RNAların ufak boyutlarından dolayı tayini ve karakterizasyonu geleneksel DNA temelli analizleri kullanarak gerekli hedef hassaslığına ulaşılmasına ihtiyaç duyar. Ayrıca birbiriyle yakından ilgili miRNA ailesi üyelerinin birbirinden bir baz farkıyla ayrılmasından dolayı yüksek spesifikliğe ihtiyaç duyulur.

DNA oligonükleotidlerinin farklı pozisyonlarda LNA rezidüleriyle substitüe olmasıyla ve bunların Northern blot analizinde kullanılmasıyla az bulunan miRNAların tayininde önemli artış gözlenmiştir. Northern blotta yüksek verimli prob olarak kullanılmalarının yanında LNA modifiye edilmiş oligonükleotidler *in situ* hibridizasyonda maya hücrelerinin üzerine sabitlenerek spesifik miRNA

taininde kullanılmıştır. Moleküler LNA proplar insanlarda miRNAların miktar tayini yapılmasına izin vermiştir. Microarray tabanlı miRNA profilizasyon analizinde LNA proplar kullanılmıştır ve büyük sayıda miRNAların ifadesinin paralel olarak izlenmesine olanak sunmuştur. Bu yeni analiz (miChip) LNA'nın biyofiziksel özelliklerini kullanmaktadır [45].

### **1.3.2.1 Kolorimetri Temelli Belirleme Yöntemleri**

Kolorimetri tabanlı miRNA belirlenmesi metodları çekicidir çünkü sistem diğer yöntemlere göre basittir. Birçok kolorimetrik yöntemde analiz için CCD kamera ve bilgisayar gibi ucuz görüntüleme mazemesi kullanılır. Bu yöntemler sistemin fiyatını ve prosedürün karmaşıklığını büyük ölçüde düşürdüklerinden ilgi uyandırır fakat genellikle düşük tayin sınırlarının sıkıntısını çekmektedirler. Durum her zaman böyle değildir, birçok kolorimetrik analizde rakip onların floresan karşılıklarıdır [59].

Basit katı-faz analizi Yang ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir ve miR122a'nın 1 fM dan 1 nM konsantrasyonlar kullanılarak yapılan kalibrasyon eğrisinde analizin tayin sınırı 10 fM olarak bulunmuştur [60].

### **1.3.2.2 Floresans Temelli Belirleme Yöntemleri**

Floresan çok hassas ve spektroskopinin uyarlanabilen formudur bu yüzden sık sık direk, *in situ* analizlerde kullanılır. Bu uygulamalarda organik boyalar, floresan proteinlerden inorganik nanoyapılara birçok türde floresan işaretçi kullanılmıştır. En çok göze çarpan floresan işaretleyici kuantum nokta ve altın nanopertiküller gibi inorganik nanoyapılardır. Bu yapılar geniş uyarılma aralıkları, oldukça keskin emisyon bantları tarafından tamamlanmak, üstün spektral kararlılık gibi üstün floresan özelliklere sahiptir [60].

Neely ve arkadaşları tarafından geliştirilen metotta çifte prob etiketleme sistemi floresan korelasyon spektroskopisi (FCS) sisteminde miRNA tek moleküllerinin sayılması ve miktarının belirlenmesi için kullanılmıştır. Her biri hedef dizisinin bir yarısının komplementeri olan iki kilitlenmiş nükleik asit (LNA) DNA probları floresan etiketlerle modifiye edilmiştir. Birisi Oyster 556 (yeşil prob) ve diğeri Oyster 656 (kırmızı prob). Veri elde etmek için kullanılan beş laserden oluşan aynı odaklı floresan detektör tek mikroakışkan akımda dört renk değişimini belirleme yeteneğine sahiptir. Arkaplan sinyalinin engellemek için, serbest problar floresan söndürücü içeren özel dizayn edilmiş oligonükleotidlerle tutuklanmıştır. *Escherichia coli* RNA matriksinin üzeri 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 pM sentetik miRNA ile kompleksinin foton patlaması ile yapılan kalibrasyon eğrilerinde analizin tayin sınırı 1 µg RNA dokusu için 15 fg olarak belirlenmiştir [59].

En önemli biyosensörlerden biri hala araştırılan moleküler fenerlerdir (MB). Bunlar aslında benzersiz oligonükleotidlerdir. MB'ler biyoanalitik floresan temelli belirleme sistemlerinde nispeten yeni (geliştirilmesi ilk olarak 1996 yılında bildirilmiştir) teknolojidir [67]. Moleküler fenerler şeklinde baş ve gövdeden oluşan DNA problardır. Hedef molekülün bulunmadığı durumlarda yandan saldıran diziler baş-gövde yapısı oluşturacak şekilde birleşmesiyle floresan boya ve söndürücü yakın duruma getirilir. Hedef bulunduğu durumlarda ise proba bağlanarak floresan boya ve söndürücünün ayrılmasına neden olan lineer konformasyona geçmesini sağlar. Bu dizaynın faydası probun yalnızca hedef dizisiyle direk hibridizasyonu ile sinyalin ortaya çıkmasıdır. Bu şekilde ölçüm almadan önce eşleşmemiş probların ortadan kaldırılmasına gerek kalmamaktadır.

### **1.3.2.3 Biyoluminesans Temelli Belirleme Yöntemleri**

Biyoluminesent proteinler ışığı kimyasal reaksiyonla yayarlar. O nedenle dış uyarıcı bir ışık kaynağının elimine edilmesiyle, arkaplan sinyallerinin azatılmasıyla bu proteinler avantaj sağlar. Bu biyo-luminesent proteinler miRNA tayininde kullanılır, *Renilla* luciferaz (Rluc) yalnız veya floresan nanopartiküller ile bir biyo-luminesent rezonans enerji transferi (BRET) ortağıyla kompetitif analiz meydana

getirir. Rluc 38-kDa proteindir ve coelenterazine substrat varlığında 485 nm de biyoluminesans yayar [59].

Cissel ve arkadaşları tarafından bildirilen çalışmada nükleik asit tayini ve miktarının belirlenmesinde BRET tabanlı kompetitif analiz kullanılmıştır [61]. Bu analiz nükleik asit hibridizasyonunda *Renilla* lusiferaz (Rluc) ve akseptör kuantum nokta (QD705) arasında enerji transferiyle sinyal üretimine dayanır. QD'lar bu analiz için yüksek kuantum ürünü, geniş molar ekstinksiyon katsayısı, fotostabilite gibi avantajlara sahiptir.

Cissel ve arkadaşlarının çalışmasında miR-21 le ilişkili oligonükleotid prob QD705 kullanılarak işaretlenmiştir, diğer prob ise Rluc ile işaretlenmiştir. Karıştırılan bu iki probun hibridizasyonu ortamda coelenterazine varlığında Rluc'tan QD705'e enerji transferiyle 710 nm de ölçülebilen sinyalle sonuçlanır. Bu aynı sistem hedef nükleik asitin varlığında, hedefin konsantrasyonundaki artışla 710 nm de emisyon sinyalinde azalma gözlenir. 485 nm den 710 nm ye sinyal BRET oranıyla ölçülmüş. Bir kalibrasyon eğrisi oluşturmak için hedef nükleik asitin konsantrasyonu, iki emisyon pikinin ( $I_{485}/I_{710}$ ) oranına karşı grafiği çizilmiştir. Bu analizde 30 dakikalık hbridizasyon süresinde tayin sınırı 4 pmol (20nM) olarak gözlenmiştir [61].

#### **1.3.2.4 Enzim Temelli Belirleme Yöntemleri**

Su ve arkadaşları tarafından geliştirilen enzim tabanlı kolorimetrik analizde immobilize peptid nükleik asit (PNA) probtan hedef DNA yada RNA molekülleri tutmak için faydalanılmıştır [62]. PNA DNA'ya benzerdir fakat şeker-fosfat omurgası nötr peptid zinciriyle yer değiştirmiştir. Bu nötr yüklenme prob ile hedef arasındaki elektrostatik etkileşmeyi azaltır böylece hibridizasyonu arttırmaktadır. Yabanturpu peroksidaz (HRP) hedef molekülün negatif yüklenmiş şeker-fosfat omurgasına adsorbe olur. Bu teknikte hedef etiketleme adımına gerek kalmamaktadır. HRP'nin substratları olan 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin ve hidrojen peroksitle etkileşim sonucu elde edilen mavi oksidasyon ürünü kuvvetli asitle

muamele sonucunda sarı daimine dönüştürülmüştür. Daha sonra 450 nM de absorbans okunmuştur. Bu yöntemle 22-bp PNA prob A549 akciğer kanser hücrelerinde let-7b miRNA belirlemek için kullanılmıştır. Tüm analizler 1 den 58 µg tüm RNAları içeren ekstrasyonlar kullanılarak yapılmıştır. Örnekler değişen konsantrasyonlarda (0.1-100 nM) 22-bp sentetik DNA örnekleri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrilerinden hesaplanmıştır. 0.1-100 nM kullanılarak yapılmıştır. Analiz için gerekli olan toplan RNA miktarı yaklaşık olarak 2 µg olarak belirlenmiştir. miRNA kullanılarak yapılan analiz ise çok daha hassastır ve sadece 50 ng'a ihtiyaç duyar.

### 1.3.2.5 Elektrokimyasal Temelli Belirleme Yöntemleri

Bir diğer belirleme metodu miRNA tayini için elektrokimyasal ölçümlere dayanır. Küçük moleküllerin daha önceki direk elektrokimyasal tayin metodları sistem tarafından üretilen okunabilen sinyallerin düşük olmasından ve küçük oligonükleotidlerin miRNA'ya bağlanma kabiliyetinin zayıf olmasından dolayı sınırlıdır.

Gao ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma çok düşük miktarda örnek hazırlamaya, düşük miktarda toplam RNA ve ucuz gereçler kullanarak basit analiz dizaynına odaklanılmıştır. Bu analiz elektrokatalitik parçacıklar kullanır ve ılımlı koşullar altında bunlar kimyasal olarak direk miRNA'ya bağlanmıştır. Sonrasında bağlanmış elektrokatalitik parçacıklar amperometrik olarak kaydedilen oksidasyon reaksiyonuna yardım eder. Bu analizlerin tayin sınırı fentomolar ölçüsünde belirlenmiştir.

Gao ve arkadaşları tarafından yapılan iki farklı çalışmada toplam RNA içerisinde miRNA'ya elektrokatalitik parçacık ile direk kimyasal bağlanmadan yararlanılmıştır. Bu çalışmalardan ilkinde isoniazid-substitute osmium kompleksinin elektrokatalitik özelliklerini kullanmıştır,  $(Os(dmpy)_2(IN)Cl^+)$  askorbik asit (AA) üzerindeki oksidasyonu [63]. Bu örneklerdeki miRNA basit bir kondenzasyon reaksiyonu ile kovalent bağ ile  $(Os(dmpy)_2(IN)Cl^+)$ 'a bağlanmıştır. Altın elektrot

üzerindeki komplementer immobilize oligonükleotid primerler ile işaretli miRNA'lar hibridize olmuştur ve AA'nın elektro-oksidasyon akımı ölçülmüştür. Gao ve arkadaşları tarafından aynı prensip kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada elektrokatalitik parçacık olarak Ru(PD)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> [PD, 1, 10-fenantrolin-5, 6-dion] hidrazin'in oksidasyonunu gözlemek için kullanmışlardır [64]. Elektrokatalitik parçacık tüm RNA içerisindeki miRNA'ya pürin bazları vasıtasıyla tutturulmuştur. İşaretlenmiş miRNA'nın immobilize komplementer oligonükleotid ile hibridizasyonu sonrasında oksidasyon sinyali hidrazinin eklenmesinden sonra kaydedilmiştir. Bu çalışmada bir önceki çalışmada kullanılan altın elektrot yerine indiyum kalay elektrot kullanılmıştır.

Yapılan bu çalışmalarda hibridize miRNA miktarı; miRNA konsantrasyonuna karşı kaydedilen akım korelasyonunun kalibrasyon grafiği oluşturulmasıyla belirlenmiştir. Analizin seçiciliği tek bazı yanlış eşleşen miRNA ve prob kullanılarak değerlendirilmiştir. Analiz miRNA varlığının miktarını belirlemek için basit, hızlı, verimli ve ucuz maliyetli bir yol göstermiştir. İki yöntemde 10 ng kadar ufak toplam RNA örnek boyutunda bile seçici olduğunu kanıtlamıştır. Tayin sınırları 500 fM (AA kullanarak) ve 0.20 pM (hidrazin kullanarak) olarak bulunmuştur.

Laschi ve arkadaşları tarafından kullanılan yöntemde grafit perde baskılı elektrot çevirici olarak kullanılmıştır ve sentetik DNA ve RNA dizilerini belirlenmesi hedeflenmiştir [65]. Manyetik bonuckların modifikasyonu ile yüzeylerine PNA, LNA ve DNA proplar tutturulmuştur ve komplementer DNA ve RNA dizisiyle hibridizasyon dan sonra HRP ile işaretlenmiştir. Substrat eklenmesi ile ürüne dönüşümü kronoamperometrik ölçüm ile belirlenmiş ve kalibrasyon eğrileri hazırlanmıştır. Maksimum hedef konsantrasyonu olarak 10 nM hedef konsantrasyonunun kullanıldığı analizde DNA hedef için tayin sınırı DNA ve PNA proplar için 152 pM ve 118 pM ve LNA prob kullanıldığında ise 91 nM'lık daha düşük bir tayin sınırı belirlenmiştir. Hedefin RNA olduğu durumda hesaplana tayin sınırları DNA ve PNA proplarda 51 pM ve 60 pM , LNA prob için ise 78 pM olarak belirlenmiştir. Ayrıca RNA hedef ile kullanıldıklarında üç prob da tayin sınırı ve tekrarlanabilirlikte benzer davranış göstermiştir. DNA hedefle gözlenen farklar daha

az belirgindir. Bunun sebebi PNA/LNA-RNA çiftinin konformasyon stabilitesinin PNA/LNA-DNA çiftinden daha yüksek olmasından olabilir.

#### **1.4 Tek Nükleotid Polimorfizmleri**

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) insan genomunda en çok rastlanan genetik değişimdir. Uzun DNA kısımlarındaki bireysel farklılaşmalar (DNA polimorfizmi denen) 1970'lerin ortasında bildirildiği halde 1980'lerin başlarına kadar potansiyelleri tamamen anlaşılamamıştır. Botstein ve arkadaşları DNA polimorfizmlerinin insan genomu haritası oluşturmak için işaret olarak kullanılabilmesinin nasıl mümkün olacağını tanımlamışlardır. Bireylerin genomlarının sahip olduğu birçok tek baz değişimi 1990'ların sonunda insan genom projesinden gelen bilgilerle belirli hale gelmiştir [66].

Alleller karşılaştırıldığında bir nükleotidteki değişim tek nükleotid polimorfizmi olarak adlandırılır. İnsan genomunda yaklaşık olarak 1330 bazda bir oluşur. SNP ile sınıflandırılırlarsa her insan benzersizdir [67].

2007 yılında 6197780 adet SNP onaylanmıştır. İnsan genomundaki SNP'ler gibi genetik farklılaşmaların analizi ve sağlık, hastalık, ilaca yanıt kişisel ilaç gelişimi için çok değerli bilgi sağlaması beklenmiştir. Asıl SNP genotipleme metodları DNA dizi ve PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) analizleridir. Bu metodlar zahmetli ve pahalıdır çünkü birçok adıma gereksinim duyarlar. Sonradan pek çok SNP genotipleme metodu geliştirilmiştir. Lucarelli ve arkadaşları elektrokimyasal olarak yanlış eşleşen bazın belirlenmesi için perde baskılı elektrotlar kullanarak prob dizaynı üzerine çalışmışlardır [68].

#### **1.5 Amaç**

Posttranskripsiyonel düzenleyici olan mikro RNAlar metabolik yollar, hücre proliferasyonu (yayılması), hücre farklılaşması ve karsinogenez gibi farklı



proseslerde görev alırlar. miRNA-16-1'in BCL2 yi negatif düzenlediğini ve negatif düzenlenen bu apoptotik genin lösemiler ve lenfomaları da içeren birçok insan kanser çeşidinde sıklıkla gözlendiği belirlenmiştir.

Çalışmamızın amacı tek kullanımlık perde baskılı elektrotların yüzeyinde DNA ve LNA problarla miRNA-16 ile ilgili sentetik DNA ve RNA dizilerin hibridizasyonunun belirlenmesi ve tek bir bazın yanlış eşleştiği dizi kullanarak sensörün seçiciliğinin araştırılmasıdır. Analiz altın perde baskılı elektrotlar üzerinde hibridizasyona dayanır ve diferansiyel puls voltametri elektrokimyasal teknik olarak kullanılmıştır. Ayrıca spektrofotometrik deneyler LNA ve DNA'nın DNA ve RNA hedefler ile çözelti içerisindeki davranışlarını incelemek için yapılmıştır.

## 2. MATERYAL ve METOD

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada 6-merkaptto-1-hekzanol (MCH), streptavidin-alkalen fosfataz enzim kompleksi, 1-naftil fosfat, sığır serum albumin (BSA), dietanolamin, dietil pirokarbonat, magnezyum klorür, RNaz Zap Sigma-Aldrich'ten sağlanmıştır.

Di sodyum hidrojen fosfat, hidroklorik asit Merck'ten sağlanmıştır. Sentetik DNA and RNA örnekleri Eurofins MWG Operon (İtalya) LNA Prob Eurogentec S.A.'dan (Belçika) sağlanmıştır. Çalışmanın tamamında mili Q su kullanılmıştır.

Ayrıca çalışmada steril sarsted tüpler ve falconlar ile DNA, RNaz ve ATP içermeyen sarsted biosphere steril, filtreli pipet uçları kullanılmıştır.

#### 2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

**Çizelge 2.1** Çalışmada kullanılan laboratuvar gereçleri

Otoklav	AUTOCLAVE 760, ASAL, İtalya
Masa santrifüjü	Minispin Eppendorf, Almanya
pH metre	AMEL, İtalya
Potansiyostat/galvanostat	AUTOLAB PGSTAT 10- Eco Chemie, Hollanda
UV-Spektrofotometre	CARY 100 Bio. UV-Visible Spectrophotometer- Varian, ABD
Hassas Terazı	SCALTEC, Denver Instruments, Almanya

### 2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Deneysel çalışma için kullanılan çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır

#### 1. Dietil pirokarbonat içeren su hazırlanması

Deneysel çalışmada RNaz'lara karşı tüm tamponların hazırlanması sırasında kullanılacak mili Q su % 0.1 dietilpirokarbonat (DEPC) içerecek şekilde hazırlanmıştır.

2 mL DEPC eklenerek mili Q su 2 L ye tamamlanır ve manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında gece boyunca (~25°C, ~16 saat) karıştırıldı. Hazırlanan DEPC içeren mili Q su 121 °C ve 1 atm. basınç altında 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

#### 2. 0.5 M Sodyum Fosfat tamponunun (pH 7.0) hazırlanması

0.5 M 500 mL sodyum fosfat tamponu hazırlamak için 35.49 g (0.25 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  450 mL % 0.1 DEPC içeren mili Q suda çözüldü ve 1 N HCl ile pH'ı 7.0'a getirildi ve son hacim % 0.1 DEPC içeren mili Q suyla 500 mL ye getirildi. Sarstedt steril şişe ve 0.20 µm por büyüklüğüne sahip filtre seti kullanılarak filtrelenip şişelenmiştir.

#### 3. 100 mM Sodyum Fosfat tamponunun (pH 7.0) hazırlanması

0.1 M 500 mL fosfat tamponu hazırlamak için 7.10 g (0.05 mol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  450 mL % 0.1 DEPC içeren mili Q suda çözüldü ve 1 N HCl ile pH'ı 7.0'a getirildi ve son hacim % 0.1 DEPC içeren mili Q suyla 500 mL ye getirildi. Sarstedt steril şişe ve 0.20 µm por büyüklüğüne sahip filtre seti kullanılarak filtrelenip şişelenmiştir.

#### **4. Dietanolamin Tamponu (pH 9.6) Hazırlanması**

0.1 M KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> içeren 0.1 M dietanolamin tamponu (pH 9.6) hazırlamak için 5.255 g dietanolamin, 3.728 g KCl ve 1 M'lık MgCl<sub>2</sub>'den 0.5 mL alınarak 450 mL ye DEPC su ile tamamlanır. Sonrasında pH 9.6 ya 1 N NaOH ile ayarlanıp 500 mL ye DEPC su ile tamamlanmıştır. Sarstedt steril şişe ve 0.20 µm por büyüklüğüne sahip filtre seti kullanılarak filtrelenip şişelenmiştir.

#### **5. Streptavidin-Alkalen fosfataz enzim çözeltisinin hazırlanması**

5 mg sığır serum albumin 0.5 mL dietanolamin tamponu (0.1 M, pH 9.6) içerisinde çözülür ve bu çözeltinin 180 µL ile 20 µL 10x konsantrasyonundaki streptavidin-alkalen fosfataz enzim stoğu 200 µL ye seyreltilir.

#### **6. Substratın hazırlanması**

1 mg mL<sup>-1</sup> 5 mL α-naftil fosfat çözeltisi dietanolamin tamponuyla (0.1 M, pH 9.6) hazırlanır.

##### **2.1.4 Kullanılan Sentetik Oligonükleotidler**

Kullanılan prob ve hedef molekülleri onaltışar bazdan oluşmaktadır, problar 3' yönünden tiyollenmiştir. Hedef molekülleri ise 3' yönünden biyotinlenmiştir. Liyofilize problar ve hedeflerden stok oligonükleotid çözeltileri 0.5 M fosfat tamponu (pH 7.0) kullanılarak hazırlanıp -20 °C' de saklanmıştır. LNA probtaki kilitlenmiş nükleik asit monomerleri altıçizili olarak belirtilmiştir. Tek bazı prob molekülündeki komplementlerinden farklı olan hedefler, DNA hedef-2 ve RNA hedef-2'deki prob'taki eşleniğiyle komplementer olmayan bazlar kalın yazılmıştır.

**Çizelge 2.2** Kullanılan sentetik nükleik asit proplar ve hedefler

DNA Prob	5'- TAT TTA CGT GCT GCT A-SH 3'
LNA Prob	5'- <u>TAT TTA CGT GCT GCT A</u> -SH 3'
DNA Hedef-1	5'- TAG CAG CAC GTA AAT A-biyotin 3'
RNA Hedef-1	5'- UAG CAG CAC GUA AAU A-biyotin 3'
DNA Hedef-2	5'- TAG CAG CAA GTA AAT A-biyotin 3'
RNA Hedef-2	5'- UAG CAG CAA GUA AAU A-biyotin 3'

## 2.2 Metod

### 2.2.1 Hibritlerin Erime Noktalarının Spektrofotometrik Metod ile Belirlenmesi

#### 2.2.1.1 Oligonükleotid Çözeltilerinin Hazırlanması ve Ön Hazırlık

Prob ve hedef stok çözeltileri 100 mmol L<sup>-1</sup> fosfat tamponun'dan (pH 7.0) 1 mmol L<sup>-1</sup> fosfat tamponu'na (pH 7.0) kadar azalan şekilde farklı konsantrasyonlarda fosfat tamponları kullanılarak 1 µmol L<sup>-1</sup>'ye son hacimleri 500 µL olacak şekilde seyreltildi. Her bir prob ve hedef'in 250 µL si (1:1 oranında) karıştırılarak DNA-DNA, DNA-RNA, LNA-DNA, LNA-RNA hibritleri hazırlandı.

Hazırlanan 500 µL hacmindeki hibritler vorteks ile karıştırıldıktan sonra kuvars küvetlere alınıp spektrofotometreye yerleştirildi. Referans küvet çözeltilerin seyreltildiği konsantrasyondaki sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) ile dolduruldu ve spektrofotometrenin termometresi bu referans küvet içerisine daldırılarak sıcaklık değişimi izlendi.

Ön hazırlık adımımda spektrofotometrenin sıcaklığı 95 °C'ye getirilerek denatürasyon gerçekleştirildi (10 dakika beklendi) ve sıcaklık 25 °C ye düşürüldü.

### **2.2.1.2 Spektrofotometre ile Absorbans Değerlerinin Ölçülmesi ve Hibritlerin Erime Noktaları'nın Hesaplanması**

Spektrofotometre 260 nm de 5 döngü boyunca 10° C den 100°C artan sıcaklıkta her 0.50°C de bir absorbans verilerini toplamak için ayarlandı. Erime noktaları Cary 100 Bio UV Visible spektrofotometre ve Cary WinUV Thermal Application Software Version 3.00 bilgisayar program kullanılarak hesaplanmıştır.

### **2.2.2 Elektrokimyasal Metod ile Hibridizasyon Belirlenmesi**

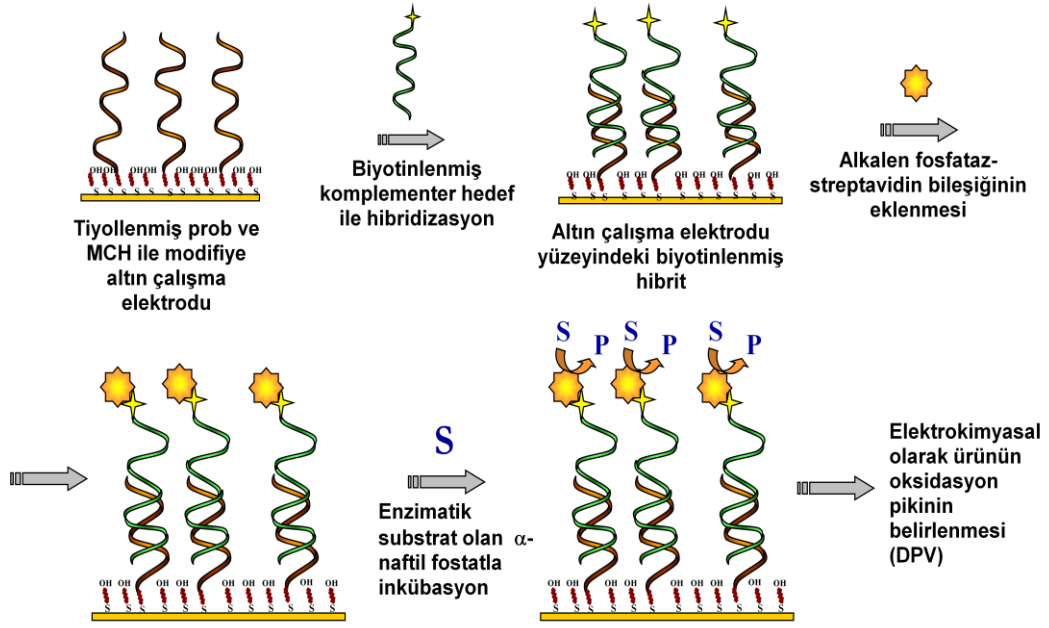
#### **Deney Ortamının ve Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması**

Kullanılan tamponlar kontaminasyonu engellemek için 50 mL' lik steril falconlar içerisinde saklandı. RNA hedef ile çalışılırken çalışılan alan, kullanılan pipetler, petri kapları RNaz zap ile temizlenmiştir.

#### **Perde Baskılı Altın Elektrotlar**

Elektrokimyasal hücreler daha önce anlatıldığı gibi altın çalışma elektrodu, grafit karşıt elektrot ve gümüş psödo referans elektrottan oluşan üç elektrot şeridinden oluşmaktadır.

Kullanılacak elektrotlar her konsantrasyon için farklı petri kapları içerisinde, buharlaşmayı engellemek için neme doygun ortam sağlanarak hazırlanmıştır.



**Şekil 2.1** Perde baskılı altın elektrotların biyo-modifikasyonu ve sinyal üretim prensibi[31]

### 2.2.2.1 Elektrot Yüzeyinin Biyo-modifikasyonu

Perde baskılı altın elektrotlar petri kapları içerisine yerleştirilmiştir, 10  $\mu\text{L}$  tiyollenmiş oligonükleotid prob çözeltisi ( $0.5 \mu\text{mol L}^{-1}$   $0.5 \text{mol L}^{-1}$  sodyum fosfat tampon pH 7.0) ile altın çalışma elektrodu yüzeyi modifiye edilmiştir. Kemisorpsiyonun gerçekleşmesi için geceboyu inkübasyona bırakılmıştır ( $\sim 16 \text{ H}$ ). Bu süre zarfında çözeltilerin buharlaşmasını engellemek için elektrotlar içerisinde ıslak kağıt ile ortamın neme doyurulduğu petri kapları içerisinde muhafaza edilmiştir.

İmmobilizasyon adımını 6-merkapt 1-hekzanol ile muamele izler. Elektrot yüzeyindeki çözelti  $1 \text{mmol L}^{-1}$  MCH çözeltisinin  $10 \mu\text{L}$ 'si ile 30 dakika inkübasyona bırakılır. Sonrasında hibridizasyon öncesi, modifiye elektrotlar üç kez  $15 \mu\text{L}$ 'lik  $0.5 \text{M}$  sodyum fosfat tamponuyla yıkanır.

### 2.2.2.2 Sentetik Oligonükleotidler ile Hibridizasyon

Biyotinlenmiş komplementer hedef dizisi stoğu farklı konsantrasyonlara  $0.5 \text{ mol L}^{-1}$  sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) ile seyreltilmiştir. Prob modifiye altın elektrot yüzeylerine biyotinlenmiş hedefin  $10 \text{ }\mu\text{L}$ 'si proba hibridizasyon için 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Hibridizasyon sonrasında altın elektrotların yüzeyleri  $15 \text{ }\mu\text{L}$  dietanolamin (DEA) tamponuyla ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  dietanolamin,  $1 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl, pH 9.6) spesifik hibridizasyona uğramayan dizilerin uzaklaştırılması için yıkanmıştır.

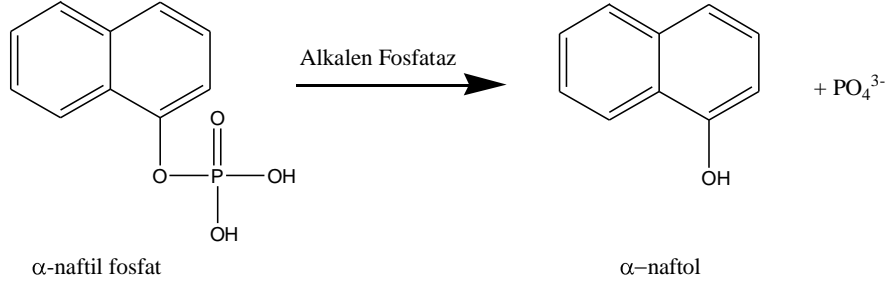
### 2.2.2.3 Hibritlerin Alkalen Fosfataz ile İşaretlenmesi

Altın elektrot yüzeyindeki biyotinlenmiş hibrit, DEA tamponuyla ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  dietanolamin,  $1 \text{ m mol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl; pH 9.6) hazırlanmış  $1 \text{ U mL}^{-1}$  streptavidin-alkalen fosfataz ve  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  sığır serum albumin (BSA) içeren çözeltinin  $10 \text{ }\mu\text{L}$ 'lik damlası ile etkileştirilmiştir. 20 dakikalık inkübasyondan sonra altın çalışma elektrodu yüzeyi 3 defa  $15 \text{ }\mu\text{L}$  lik DEA tamponu ile yıkanıp enzimin fazlası ortamdan uzaklaştırılmıştır.

### 2.2.2.4 Substrat Eklenmesi ve Diferansiyel Puls Voltametri ile Ölçüm

Enzim ile etiketlenmiş elektrotlar petri kaplarından çıkartılarak destek materyalinin üzerine yapıştırıldı ve perde baskılı altın elektrodun üzerindeki üç elektrodun yüzeyi de enzimin substratı olan  $\alpha$ -naftil fosfatın  $50 \text{ }\mu\text{L}$ 'lik damlasıyla kaplandı ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  DEA tamponu içerisinde).





**Şekil 2.2**  $\alpha$ -naftil fosfatın enzimatik reaksiyonla  $\alpha$ -naftol'e dönüşümü

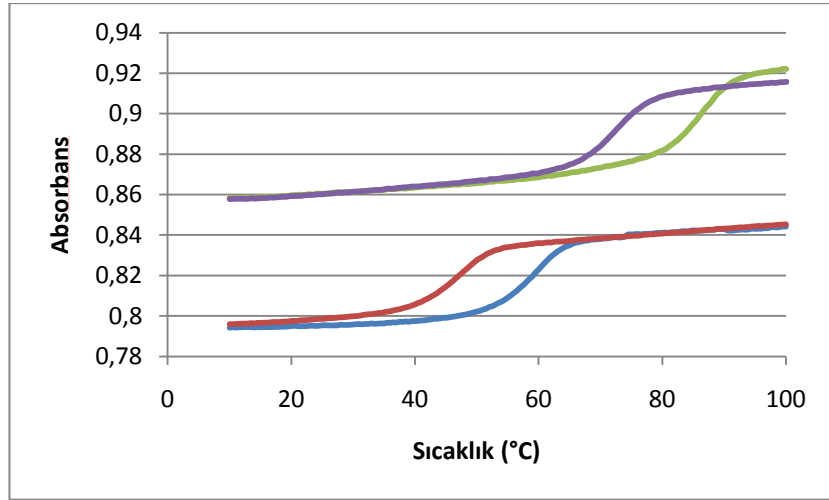
15 dakikalık enzimatik reaksiyondan sonra enzimatik ürün olan  $\alpha$ -naftol'ün oksidasyon sinyali DPV yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Naftol pikinin yüksekliği analitik sinyal olarak alınmıştır. Bütün potansiyeller gümüş referans elektroda göre ölçülmüştür.

Bütün elektrokimyasal ölçümler AUTOLAB PGSTAT 10 potensiyostat/gavanostat (eco Chemie) kullanılarak yapılmıştır. Pik ölçümleri GPES 4.9 software'i kullanılarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada gösterilen bütün sonuçlar üç ölçümün ortalamasıdır ve hata çubukları standart sapmaya karşılık gelmektedir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Spektrofotometrik Bulgular

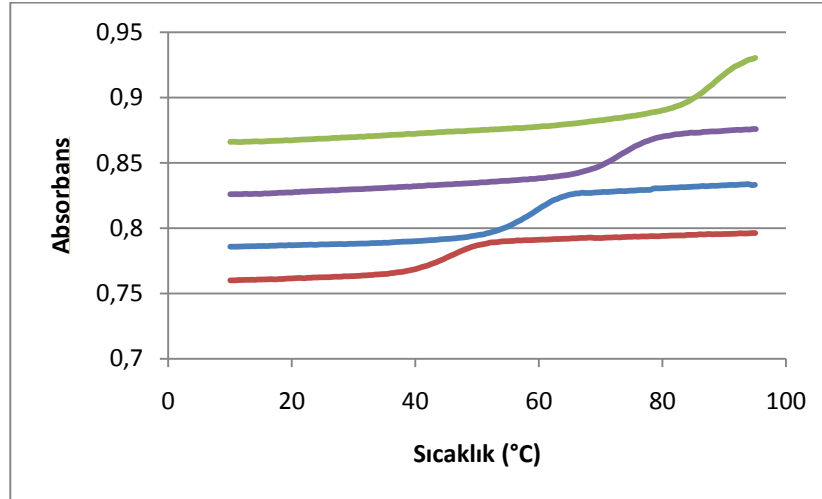
DNA-DNA, LNA-DNA, DNA-RNA, LNA-RNA hibritlerinin 1 mM ve 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisindeki erime noktaları spektroskopik olarak 260 nm’de hesaplanmıştır. Bu hesaplamalara ilişkin şekiller; Şekil 3.1-Şekil-3.4 arasında ve hesaplanan erime noktalarının ortalama değerleri, erime noktalarının standart sapmaları ve  $\Delta T_m$  değerlerine ait çizelgeler; Çizelge 3.1-Çizelge 3.4 arasında verilmiştir.



**Şekil 3.1** DNA ve LNA prob ile DNA hedeflerin 100 mM sodyum fosfat tamponundaki erime eğrileri (mavi; DNA-DNA hedef-1, kırmızı; DNA-DNA hedef-2, yeşil; LNA-DNA Hedef -1, mor; LNA-DNA hedef-2 çiftleri)

**Çizelge 3.1** DNA-DNA ve LNA-DNA hibritlerinin erime noktalarının ortalama değerleri, erime noktalarının standart sapmaları ve  $\Delta T_m$  değerleri (100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde)

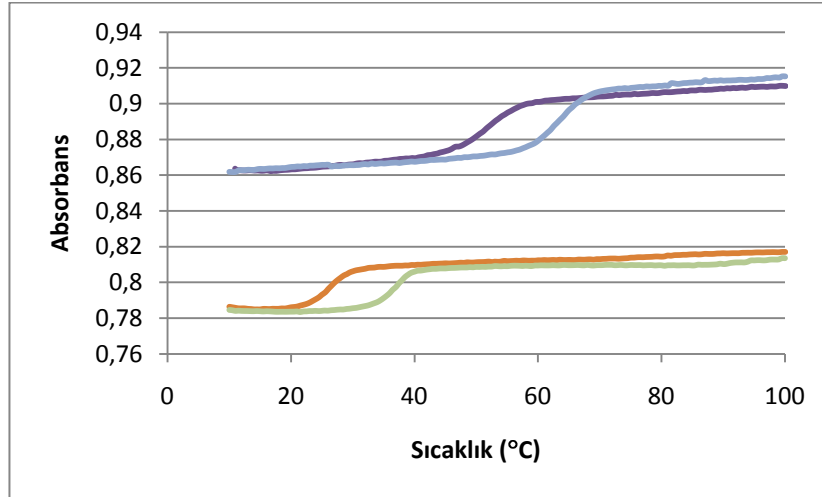
	$\bar{X}$ (°C) (n=3)	$\pm S$	$\Delta T_m$ (°C)
DNA-DNA Hedef-1	58.18	$\pm 0.41$	11.53
DNA-DNA Hedef-2	46.65	$\pm 0.07$	
LNA-DNA Hedef-1	84.43	$\pm 0.23$	12.55
LNA-DNA Hedef-2	71.88	$\pm 0.14$	



**Şekil 3.2** DNA ve LNA probolar ile RNA hedeflerin 100 mM sodyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) erime eğrileri (mavi; DNA-RNA hedef-1, kırmızı; DNA-RNA hedef-2, yeşil; LNA-RNA Hedef -1, mor; LNA-RNA hedef-2 çiftleri)

**Çizelge 3.2** DNA-RNA ve LNA-RNA hibritlerinin erime noktalarının ortalama değerleri, erime noktalarının standart sapmaları ve  $\Delta T_m$  değerleri (100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde)

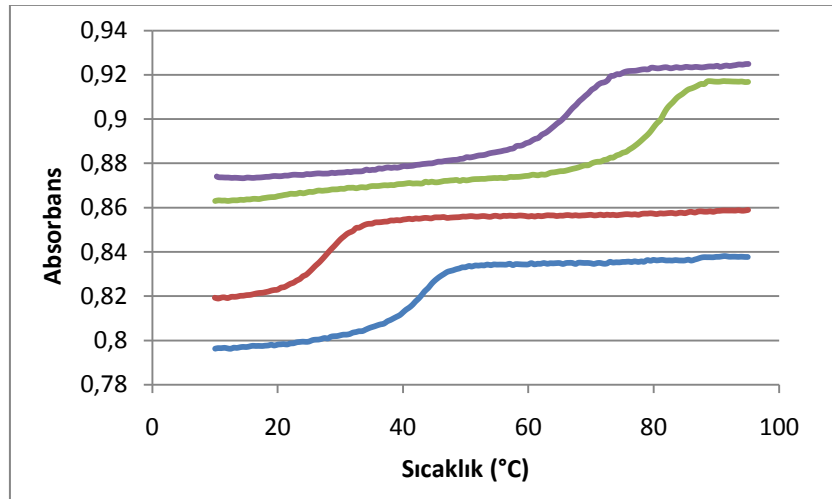
	$\bar{X}$ (°C) (n=3)	$\pm S$	$\Delta T_m$ (°C)
DNA-RNA Hedef-1	57.66	$\pm 0.13$	12.71
DNA-RNA Hedef-2	44.95	$\pm 0.23$	
LNA-RNA Hedef-1	-	-	-
LNA-RNA Hedef-2	72.57	$\pm 0.21$	



**Şekil 3.3** DNA ve LNA probalar ile DNA hedeflerin 1 mM sodyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) erime eğrileri (Yeşil; DNA-DNA hedef-1, turuncu; DNA-DNA hedef-2, mavi; LNA-DNA Hedef -1, mor; LNA-DNA hedef-2 çiftleri)

**Çizelge 3.3** DNA-DNA ve LNA-DNA hibritlerinin erime noktalarının ortalama değerleri, erime noktalarının standart sapmaları ve  $\Delta T_m$  değerleri (1 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde)

	$\bar{X}$ (°C) (n=3)	$\pm S$	$\Delta T_m$ (°C)
DNA-RNA Hedef-1	36.59	$\pm 0.05$	10.29
DNA-RNA Hedef-2	26.30	$\pm 0.11$	
LNA-RNA Hedef-1	63.10	$\pm 0.18$	11.51
LNA-RNA Hedef-2	51.59	$\pm 0.05$	



**Şekil 3.4** DNA ve LNA proplar ile RNA hedeflerin 1 mM sodyum fosfat tamponundaki (pH 7.0) erime eğrileri (mavi; DNA-RNA hedef-1, kırmızı; DNA-RNA hedef-2, yeşil; LNA-RNA Hedef -1, mor; LNA-RNA hedef-2 çiftleri)

**Çizelge 3.4** DNA-RNA ve LNA-RNA hibritlerinin erime noktalarının ortalama değerleri, erime noktalarının standart sapmaları ve  $\Delta T_m$  değerleri (1 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde)

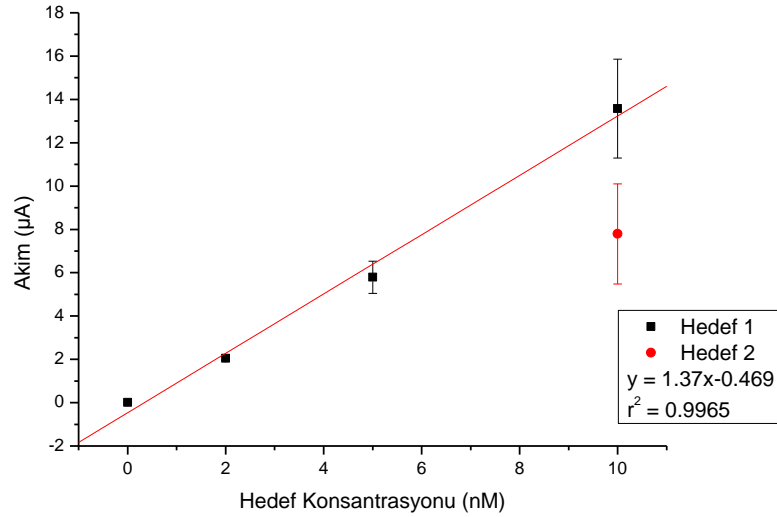
	$\bar{X}$ (°C) (n=3)	$\pm S$	$\Delta T_m$ (°C)
DNA-Hedef-1	42.07	$\pm 0,41$	14,28
DNA Hedef-2	27.79	$\pm 0,23$	
LNA Hedef-1	80.33	$\pm 0,09$	13,49
LNA Hedef-2	66.84	$\pm 0,55$	

**Çizelge 3.5** Spektroskopik yöntemle hesaplanan  $\Delta T_m$  değerleri

	$\Delta T_m$ (°C)
DNA-DNA 100 mmol/ L sodyum fosfat Tamponu içerisinde	11.53
LNA-DNA 100 mmol/ L sodyum fosfat Tamponu içerisinde	12.55
DNA-RNA 100 mmol/ L sodyum fosfat Tamponu içerisinde	12.71
LNA-RNA 100 mmol/ L sodyum fosfat Tamponu içerisinde	~15.43
DNA-DNA 1 mmol/ L sodyum fosfat Tamponu içerisinde	10.29
LNA-DNA 1 mmol/ L sodyum fosfat Tamponu içerisinde	11.51
DNA-RNA 1 mmol/ L sodyum fosfat Tamponu içerisinde	14.28
LNA-RNA 1 mmol/ L sodyum fosfat Tamponu içerisinde	13.49

### 3.2 Elektrokimyasal Bulgular

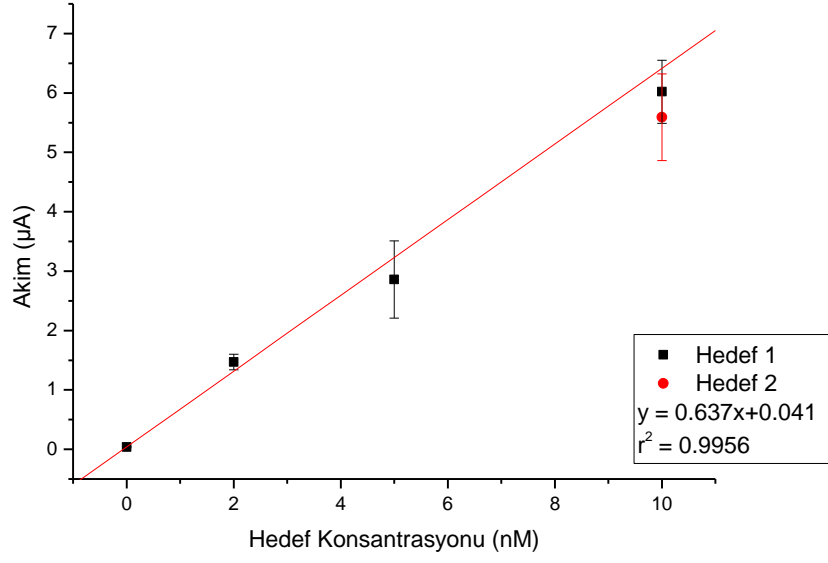
DNA-DNA, LNA-DNA, DNA-RNA ve LNA-RNA hibritlerin kalibrasyon eğrileri elektrokimyasal genosensörün analitik performansını aydınlatmak için yapıldı. Enzim etiketli sentetik oligonükleotidlerin elektroaktif substratla reaksiyonu sonucu oluşan elektroaktif ürünün sinyalleri diferansiyel puls voltametri kullanılarak belirlendi. Ayrıca biyosensör yüzeyine tutturulmuş prob yanlış eşleşen dizilerle etkileştirilerek biyosensörün seçiciliği araştırıldı.



**Şekil 3.5** DNA prob ile farklı konsantrasyonlarda DNA hedef-1 ile kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve hedef-2 ile sinyalin karşılaştırılması

**Çizelge 3.6** SPGE yüzeyinde DNA-DNA hibridizasyonunda elde edilen elektrokimyasal sinyaller ve standart sapmaları (tayin sınırı 0.07nM olarak belirlenmiştir. )

Hedef -1	$\bar{X}$ (µA)	±S
0 nM	0.01	± 0.02
2 nM	2.05	± 0.09
5 nM	5.79	± 0.74
10 nM	13.58	± 2.28
Hedef-2 10 nM	7.79	± 2.31

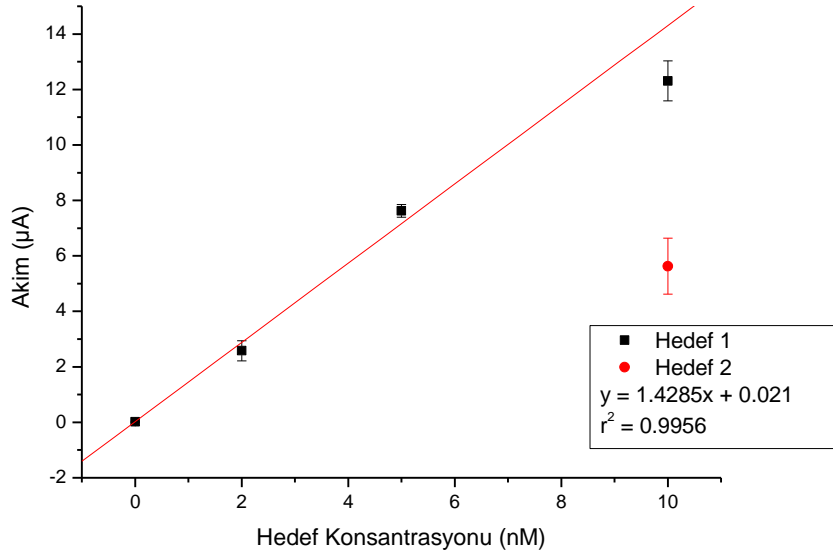


**Şekil 3.6** LNA prob ile farklı konsantrasyonlarda DNA hedef-1 ile kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve hedef-2 ile sinyalin karşılaştırılması

**Çizelge 3.7** SPGE yüzeyinde LNA-DNA hibridizasyonunda elde edilen elektrokimyasal sinyaller ve standart sapmaları (tayin sınırı 0.07 nM olarak belirlenmiştir)

Hedef -1	$\bar{X}$ (µA)	±S
0 nM	0.04	± 0.01
2 nM	1.47	± 0.13
5 nM	2.86	± 0.65
10 nM	6.02	± 0.53
Hedef-2 10 nM	5.59	± 0.73

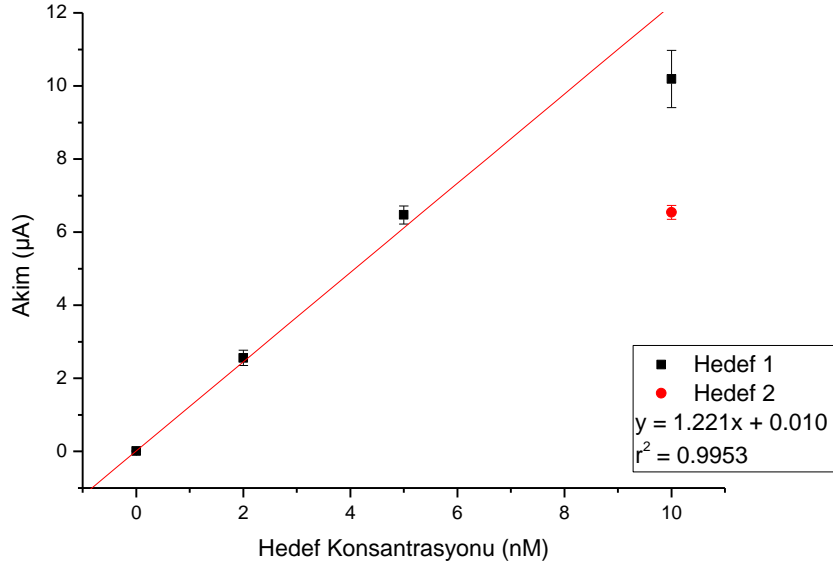




**Şekil 3.7** DNA prob ile farklı konsantrasyonlarda RNA hedef-1 ile kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve hedef-2 ile sinyalin karşılaştırılması

**Çizelge 3.8** SPGE yüzeyinde DNA-RNA hibridizasyonundan elde edilen elektrokimyasal sinyaller ve standart sapmaları (tayin sınırı 0.08 nM olarak belirlenmiştir)

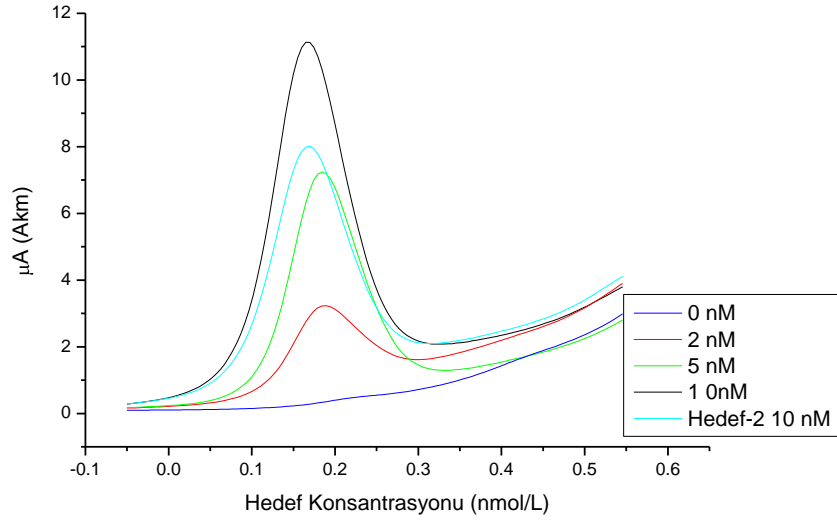
Hedef -1	$\bar{X}$ (µA)	±S
0 nM	0.02	± 0.02
2 nM	2.58	± 0.36
5 nM	7.62	± 0.23
10 nM	12.31	± 0.72
Hedef-2 10 nM	5.63	± 1.01



**Şekil 3.8** LNA prob ile farklı konsantrasyonlarda RNA hedef-1 ile kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve hedef-2 ile sinyalin karşılaştırılması

**Çizelge 3.9** SPGE yüzeyinde LNA-RNA hibridizasyonundan elde edilen elektrokimyasal sinyaller ve standart sapmaları (tayin sınırı 0.07 nM olarak belirlenmiştir)

Hedef -1	$\bar{X}$ (µA)	±S
0 nM	0.01	± 0.01
2 nM	2.56	± 0.21
5 nM	6.47	± 0.25
10 nM	10.19	± 0.78
Hedef-2 10 nM	6.54	± 0.19



**Şekil 3.9** Diferansiyel puls voltametriyle elde edilen voltamogram (farklı konsantrasyonda hedef-1 (0, 2, 5, 10 nM) ve 10 nM hedef-2 )

#### 4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Elektrokimyasal yöntemler optik ve piezoelektrik yöntemlerle karşılaştırıldığında kolay ufaltılabilme, basit, hızlı ve ucuza genetik hastalıkların belirlenmesi ve diğer biyolojik analizlerin yapılabilmesi gibi bazı üstünlüklere sahiptirler [2, 69]. Son derece hassas algılamaya sahip bir genosensör tek nükleotid polimorfizmleriyle bağlantılı birçok genetik hastalığın belirlenmesinde kullanılabilir, bu sebepten dolayı çalışmamızda tek baz eşleşmesini belirleyebilecek sensörün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Buna bağlı olarak ucuz perde baskılı elektrotları çevirici olarak kullanılarak elektrokimyasal hibridizasyon analizi yapılabilmektedir. Perde baskılı altın elektrotlar (SPGE) kullanılarak voltametrik ve enzimle güçlendirilmiş analitik yaklaşım kullanılarak DNA ve RNA hedeflerin belirlenmesi için DNA ve LNA problar kullanıldı. Kullanılan hedef dizileri miRNA-16 ile ilişkilidir, çalışmamızda birbirinden tek bir baz farkı ile ayrılabilen bu küçük hedefleri belirlemek için tasarlanan problar kullanarak tek bir baz çiftinin hibridizasyonunun belirlenmesidir. Mascini ve arkadaşlarının kullandığı 4 kilitlenmiş nükleik asit monomeri içeren DNA prob'un yapısına daha fazla sayıda kilitlenmiş nükleik asit içeren prob kullanımı amaçlanmıştır [65]. Söz konusu çalışmamızda, 11 adet kilitlenmiş nükleik asit içeren 16 baz uzunluğunda prob tasarlanmıştır. Tasarlanan DNA ve LNA problar DNA ve RNA hedefler ile hibridizasyonu araştırılmış ve hedef molekülündeki yanlış eşleşen bir baz dizisi ile analizin seçiciliği karşılaştırılmıştır. Kullanılan hedef dizilerindeki yanlış eşleşen baz çifti, termal olarak en kararlı yanlış eşleşmelerden biri olan A-G çifti olarak belirlenmiştir.

Perde baskılı altın elektrotlar ağır metallerin belirlenmesi [70], bakteriyel gıda kirleticilerin belirlenmesi [71] ve dizi spesifik DNA belirlenmesinde kullanılmaktadır [68]. Altın temelli polimerik mürekkebin esnek plastik substrat üzerine perde baskısıyla tek kullanımlık altın elektrotlar elde edilmiştir [31].

Kullanılan perde baskılı altın elektrotlar tek kullanımlık olmaları böylece hiçbir temizleme işlemi gerektirmeden kullanılmalarından dolayı avantaj sağlamaktadır. Çalışmada kullanılan 3' bölgesinden tiyollenmiş tek zincirli proplar altın elektrot yüzeyine kendiliğinden gerçekleşen kemisorbsiyon ile bağlanmıştır. Fakat bağlanan bu propların hepsi dik konumda kovalent immobilizasyona uğramadığı gözlenmiştir. Nötron yansıtma ölçümleri MCH ile muamele sonrasında DNA moleküllerinin kalıcı olarak dik konuma geçtiğini göstermektedir. Herne ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tiyollenmiş prob ve MCH karışımı tek tabakası yüksek verimde hibridizasyon sağlamaktadır. Hidroksille sonlanmış MCH yüzeyin negatif yüklenmiş dipolü etkili biçimde komplementer olmayan dizilerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu önlemiştir. Optimize edilmiş HS-ssDNA/MCH karışımı tek tabakasında hibridizasyon veriminin yaklaşık %100 olduğu tahmin edilmektedir [72].

miRNA-16 ile ilgili hedeflerle hibridizasyonun belirlenmesi için enzimle etiketleme tekniği kullanılmıştır ve bu teknik sayesinde alkalen fosfataz etiketinin yüksek biyokatalitik aktivitesi immobilize prob tarafından tanınan her hedef zinciri için yüksek sayıda elektroaktif molekül sağlamaktadır. Bu durum, işaretsiz yöntemlerle karşılaştırıldığında enzim etiketli analizin hassaslığını arttırmaktadır. Ayrıca çalışmamızdaki bir diğer sonuç  $\alpha$ -naftil fosfatın enzimatik substrat olarak kullanılması ve DPV'nin elektrokimyasal metod olarak seçilmesinden dolayı düşük tayin sınırları gözlenmiştir.

Mikro RNAların biyolojik önemi özellikle çeşitli kanser türlerinde ortaya çıkmıştır, ayrıca son zamanlarda Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, viral enfeksiyonlar, diyabet ve kas hastalıklarındaki önemi belirlenmiştir [73]. Mikro RNA'lar bitki, insan ve hayvan dokularında bulunabilen ve gen aktivitesini düzenleyici olarak hücrelerde birçok önemli fonksiyona sahiptir [74]. miRNA'ların kanserle ilişkili olduğunu gösteren ilk keşif, miR-15 ve miR-16'nın CLL hastalarının çoğunda negatif düzenlenmesi veya silinmesidir [73,75]. miRNA'ların normal ve tümör dokularındaki gen ifadesinin düzenlenmesi farklı olmaktadır, bu farklılık birincil tümörlerde ve metastazik dokularda da gözlenmektedir. Bu farklılıklar tümör

çeşidine spesifiktir ve bazı durumlarda hastalığın gelişimi ile ilişkilidir ve bazı miRNA'lar hem onkogen hem de tümör baskılayıcı olarak işlev görebilirler [73].

miRNA'ların belirlenmesindeki en büyük problem ufak boyutlarıdır, dolayısıyla miRNA'ların seçici eşleşimi ve kullanılan problemlerin tasarımı zordur. miRNA belirleme yöntemlerinin büyük çoğunluğu hedef miRNA molekülünün komplementer prob ile hibridizasyonuna dayanmaktadır [74]. Herhangi bir hibridizasyon probu ile oligonükleotid erime sıcaklığı düşük ise hibridizasyon miktarında azalma ve büyük ölçüde çapraz hibridizasyon riski görülmektedir. Eğer yöntem yeteri kadar seçici değilse yanlış eşleşmiş bir baz sinyal üretip yanlış pozitif sinyal verebilir [74]. Bir diğer problem de analizin duyarlılığıdır. miRNA konsantrasyonu hücre başına yaklaşık olarak 1000 molekül kadar az olabilmektedir. Analiz yöntemi miRNA izolasyonuna ihtiyaç duyuyorsa analizin duyarlılığı izolasyon yöntemine bağlıdır. Bir diğer zorluk *in situ* belirlemedir. Analizlenecek örnek öncü ve olgun miRNA karışımı olduğu durumda, oligonükleotid prob öncü miRNA'ya spesifik olmayan şekilde bağlanmıştır. Bu olgun miRNA ifade seviyelerinde yanlış okumaya neden olur çünkü öncü miRNA seviyeleri bunlara karşılık gelen olgun miRNA seviyelerinden farklıdır [74].

miRNA tayin yöntemleri hızlı, duyarlı, seçici olmalı ve minimum örnek miktarı gerektirmeli ayrıca *in situ* uygulamalarına uyarlanabilir olmalıdır.

miRNA tayin metodlarından PCR ve blotlama bu küçük RNA moleküllerinin keşfinde önemli bir role sahiptir. Belkide en çok kullanılan miRNA belirleme yöntemi nitroselüloz membranda tutuklanmış miRNA hedefin komplementer etiketlenmiş oligonükleotid prob ile bağlandığı Northern blotlama tekniğidir [76,77]. Bu teknik zaman alıcıdır, bazen tamamlanması günler alır ancak miRNA tayin ve doğrulamada altın standart olarak kabul görmüştür. Kolorimetrik metodların kullanıldığı miRNA analizlerinde; Yang ve arkadaşları tarafından geliştirilen katı faz analizinde tayin sınırı 10 nM olarak gözlenmiştir [60]. Neely ve arkadaşları tarafından geliştirilen floresan korelasyon spektroskopisi sisteminde tayin sınırı 1 µg RNA dokusu için 15 fg olarak belirlenmiştir [59]. Cissel ve arkadaşları tarafından bildirilen biyoluminesans temelli çalışmada biyoluminesent rezonans enerji transfer

(BRET) tabanlı analiz kullanılmıştır ve 4 pmol tayin sınırı gözlenmiştir [61]. Su ve arkadaşları tarafından geliştirilen enzim tabanlı kolorimetrik analizde ise analiz için gerekli olan miRNA miktarı yaklaşık olarak 50 ng olarak belirlenmiştir [62]. Elektrokimyasal temelli miRNA belirleme yöntemlerinde Gao ve arkadaşları tarafından askorbik asit kullanılarak yapılan çalışmada tayin sınırı 500 fM ve hidrazin kullanılarak 0.20 pM olarak bulunmuştur [63,64]. Laschi ve arkadaşları tarafından kullanılan elektrokimyasal yöntemde tayin sınırı DNA ve PNA problemler için 152 pM ve 118 pM ve LNA prob kullanıldığında 78 pM olarak belirlenmiştir [65]. RNA belirlenmesi için yaptığımız çalışmada tayin sınırları DNA prob kullandığımızda 80 pM ve LNA prob kullandığımızda 70 pM olarak belirlenmiştir.

LNA monomerleri içeren oligonükleotid problemlerin kullanımıyla daha yüksek performansa sahip analizlerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır [65]. LNA, RNA tanıması için ideal oligomer olarak tasarlanmıştır ve LNA tek zincirleri komplementer diziye sahip RNA ve DNA'ya yüksek afinite göstermektedir, LNA-DNA ve LNA-RNA çift zincirlerinin oluşumu bazlar arasındaki Watson-Crick hidrojen bağlarıyla oluşmaktadır.

Çalışmada sensör yüzeyindeki analize ek olarak oluşturulan hibritlerin davranışları çözelti içerisinde spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Nükleik asit çiftzincirinin denatürasyonu 260 nm de absorbansın ani yükselişinin gözlenmesi ile rahatlıkla izlenebilmektedir buna helikal yapının ayrılması da eşlik etmektedir. Bir erime eğrisi absorbansındaki artışın sıcaklıktaki artışa karşı grafiğinin çıkarılmasıyla elde edilir. Bu eğrinin orta noktasına denk gelen sıcaklık erime sıcaklığı ( $T_m$ ) olarak tanımlanır.  $T_m$  değeri nükleik asit heliksin termal stabilitesini gösterir ve önemli bir parametredir. Açıkça  $T_m$  sıkıca baz çiftlerine bağlıdır. Bulunan hidrojen bağlarının sayısı heliksin bozulmasını sağlamak için gerekli olan enerji miktarını etkiler. Fazladan sahip oldukları bir hidrojen bağından dolayı guanin-sitozin (G-C) baz çiftleri adenin-timin (A-T) baz çiftlerinden daha sıkı şekilde bağlanmıştır (Şekil 1.5).

Genellikle kısa DNA çiftlerinin erime sıcaklıklarının her yanlış eşleşme için % 1-1.5 °C azalması ile ayırte edilmesi öngörülmüştür. LNA-RNA ve LNA-DNA hibritlerin erime noktaları ( $T_m$ ) sırasıyla, bunların DNA-RNA ve DNA-DNA

çiftlerinden 2-10 °C ve 1-8 °C yüksektir [43]. Buna ek olarak oktamerik DNA-DNA ve DNA-LNA çift zincirlerinin erime noktası belirleme çalışmalarında yanlış eşleşen G-T çiftinin  $T_m$ 'yi 26°C azalttığı gözlenmiştir. Yanlış eşleşmenin sonucunda hesaplanan erime noktalarında LNA-DNA çiftinde  $T_m$  nin 26 °C azaldığı ve DNA-DNA çiftinde ise 10 °C lik azalma gözlenmiştir [44]. Bu LNA-DNA çiftindeki yanlış eşleşmenin hibridizasyon zayıflığı DNA-DNA çiftindeki yanlış eşleşmeden çok daha büyüktür. Böylece tek zincirli LNA yanlış eşleşmiş bazların belirlenmesinde aynı DNA dizisine göre daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Bu varsayımın kontrol edilmesi için en kararlı yanlış eşleşmiş baz çiftlerinden biri seçilmiştir. Tüm mümkün durumlar içinden G-G, G-A ve G-T yanlış eşleşmeleri en kararlı yanlış baz çiftleri olarak bilinir [68]. Spektrofotometrik hibridizasyon çalışmalarımızda tamamen eşleşen ve tek bazın eşleşmediği hibritlerin erime noktaları iyonik şiddeti değiştirerek incelenmiştir. 100 mM sodyum fosfat tamponu içerisindeki (pH 7.0) hibritlerin hesaplanan erime noktaları arasındaki farklar ( $\Delta T_m$  değerleri) DNA-DNA çiftleri için 11.53 °C, LNA-DNA çiftleri için 12.55 °C, DNA-RNA çiftleri için 12.71 olarak hesaplanmıştır ve LNA-RNA çiftleri için ise ~15.43°C olduğunu tahmin etmekteyiz. İyonik şiddeti azaltmak için tuz konsantrasyonunun 1 mM'a indirilmesiyle  $\Delta T_m$  değerleri DNA-DNA çiftleri için 10.29 °C, LNA-DNA çiftleri için 11.51 °C, DNA-RNA çiftleri için 14.28 °C ve LNA-RNA çiftleri için 13.49 °C olarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

- Perde baskılı altın elektrod yüzeyinde gerçekleşen hibridizasyonlarda tayin sınırları kör sinyal artı kör sinyalin standart sapmasının üç katı olarak hesaplanmıştır ve DNA-DNA analizinde tayin sınırı 70 pM, DNA-RNA analizinde 80 pM, LNA-DNA analizinde 70 pM ve LNA-RNA analizinde 70 pM olarak belirlenmiştir.
- Elektrot yüzeylerinde yapılan çalışmalarda elde edilen sinyalin enzimin ürüne dönüşümü ile ilgili olmasından dolayı tüm dizilerde birbirine yakın sinyal gözlenmesi beklenmiştir fakat LNA-DNA çiftinde elde edilen



verilerde hedef ile yanlış eşleşen dizi arasında fark ayırt etmek için yeterli görülmemiştir.

- Spektrofotometrik çalışmalarda ise 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde yapılan çalışmalarda  $\Delta T_m$  değerleri DNA-DNA çiftleri için 11.53 °C, LNA-DNA çiftleri için 12.55 °C, DNA-RNA çiftleri için 12.71 olarak hesaplanmıştır. LNA-RNA tam eşleşen hibritinde yapının çok kararlı olmasından dolayı 100 °C'ye kadar çıkılan sıcaklıklarda platoya ulaşamamıştır ve erime noktası hesaplanamamıştır. Tahmini olarak erime noktası  $\geq 88$  °C'dir ve  $\Delta T_m$  değeri  $\sim 15.43$ °C'dir. Sodyum fosfat tamponunun (pH 7.0) konsantrasyonunu düşürerek iyonik şiddetin azaltılmasıyla 1 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7.0) ile platoya ulaşılmış ve  $\Delta T_m$  değerleri DNA-DNA çiftleri için 10.29 °C, LNA-DNA çiftleri için 11.51 °C, DNA-RNA çiftleri için 14.28 °C ve LNA-RNA çiftleri için 13.49 °C olarak hesaplanmıştır.

- Literatürdeki diğer miRNA belirleme yöntemleriyle karşılaştırıldığında daha düşük tayin sınırlarına ulaşan çalışmalarda, katı faz analizinde 10 nM, floresan korelasyon spektroskopisi yöntemiyle 1 µg RNA dokusu için 15 fg, biyoluminesans temelli çalışmada 4 pmol tayin sınırı gözlenmiş. Elektrokimyasal temelli yöntemlerle ise altın ve indiyum kalay elektrotlar kullanılarak yapılan çalışmalarda sırasıyla 500 fM ve 0.20 pM tayin sınırları gözlenmiştir. Enzim ile etiketleme tekniği kullanılarak perde baskılı karbon elektrotlarla yapılan çalışmada yaban turpu peroksidaz enzimi kullanılmış, DNA prob kullanarak 152 pM ve LNA prob ile 78 pM tayin sınırı belirlenmiş. Bizim çalışmamızda alkalin fosfataz enzimi ile işaretleme tekniği kullanılarak perde baskılı altın elektrotlarla DNA prob ile 80 pM LNA prob ile 70 pM olmak üzere daha düşük tayin sınırı gözledik. Karşılaştırılan diğer yöntemlerin daha düşük tayin sınırına sahip olmasına rağmen bizim kullandığımız yöntemin avantajı maliyetinin düşük olması ve küçültülmeye elverişli olmasıdır.

- Kronik lenfositik lösemnin belirlenmesinde kullanıcının hiçbir uzmanlığa sahip olmadan kullanabileceği elektrokimyasal genosensörün en büyük avantajı kısa sürede bireyin miRNA-16 miktarını belirleyip standart değerlere göre kıyaslayabilecek olmasıdır. Geliştirilen tek kullanımlık genosensör diğer genosensör platformlarıyla karşılaştırıldığında, diferansiyel puls voltametri tekniğini kullanan küçültölmeye elverişli ucuz perde baskılı elektrotlar kullanan bu genosensör prob olarak LNA kullandığında 70 pM tayin sınırına ulaşabilmektedir.
- İleriki çalışmalarda dizayn edilen bu genosensörle kronik lenfositik lösemi tayini yapabilmek amaçlanmıştır.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Wang, J., "Survey and summary from DNA biosensors to gene chips.", *Nucleic Acids Research*, (2000), **28**, (16), 3011.
- [2] Luong, J.H.T., Male, K.B., Glennon, J.D., "Biosensor technology: technology push versus market pull.", *Biotechnol. Adv.*, (2008), **26**, (5), 492.
- [3] Clark, L.C., Lyons C., "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery.", *Ann N Y Acad Sci*, (1962), **102**, 29.
- [4] Updike, S.J., Hicks, G.P., "The enzyme electrode.", *Nature*, (1967.), **214**, (5092), 986.
- [5] Sabelnikov, A., Zhukov, V., Kempf R., " Probability of real-time detection versus probability of infection for aerosolized biowarfare agents: A model study", *Biosensors and Bioelectronics*, (2006), **21**, 2070.
- [6] Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M.J.L., Marco, M.P., Barcelo, D., "Biosensors for environmental monitoring A global perspective.", *Talanta*, (2005), **65**, (2), 291.
- [7] Tothill, I.E., "Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector.", *Computers and Electronics in Agriculture*, (2001), **30**, 205.
- [8] Rogers, K.R., Mascini, M., "Biosensors for field analytical monitoring.", *Field Analytical Chemistry and Technology*, (1998), **2**, (6), 317.
- [9] Laschi, S., Franek, M., Mascini, M., "Screen-printed electrochemical immunosensors for PCB detection.", *Electroanalysis*, (2000), **12**, (16), 1293.
- [10] Palecek, E., "Past, present and future of nucleic acids electrochemistry.", *Talanta*, (2002), **56**, (5), 809.
- [11] Huang, R.C., Lin, Y., Shi, Q., Flowers, L., Ramachandran, S., Horowitz, I.R., Parthasarathy, S., Huang, R.P., "Enhanced protein profiling arrays with ELISA-based amplification for high-throughput molecular changes of tumor patients' plasma.", *Clinical Cancer Research*, (2004), **10**, (2), 598.
- [12] Piunno, P.A.E., Krull, U.J., Hudson, R.H.E., Damha, M.J., Cohen, H., "Fiberoptic DNA Sensor for Fluorometric Nuclei Acid Determination.", *Analytical Chemistry*, (1995), **67**, (15), 2635.

- [13] Ferguson, J.A., Boles, T.J., Adams, C.P., Walt, D.R., "A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression.", *Nature Biotechnology*, (1996), **14**, (13), 1681.
- [14] Storhoff, J.J., Elghanian, R., Mucic, R.C., Mirkin, C.A., Letsinger, R.L., "One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes.", *Journal of the American Chemical Society*, (1998), **120**, (9), 1959.
- [15] Fang, X.H., Liu, X., Schuster, S., Tan, W., "Designing a novel molecular beacon for surface-immobilized DNA hybridization studies.", *Journal of the American Chemical Society*, (1999), **121**, (12), 2921.
- [16] Liu, X.J. and W.H. Tan, "A fiber-optic evanescent wave DNA biosensor based on novel molecular beacons.", *Analytical Chemistry*, (1999), **71**, (22): 5054.
- [17] Tombelli, S., Minunni, M., Mascini, M. "Piezoelectric biosensors: strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices." *Methods*, (2005), **37**, (1), 48.
- [18] Bardea, A., Dagan, A., Willner, I., "Amplified microgravimetric quartz crystal-microbalance analysis of oligonucleotide complexes: a route to a Tay-Sachs biosensor device.", *Chemical Communications*, (1998), **7**, 839.
- [19] Lucarelli, F., Capponcelli, S., Marrazza, G., Sangiorgi, L., Mascini, M., "Split hybridisation probes for electrochemical typing of single-nucleotide polymorphisms.", *Analyst*, (2009), **134**, (1) 52.
- [20] Wang, J., Cai, X., Rivas, G., Shiraishi, H., Farias, P.A.M., Dontha, N., "DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus.", *Analytical Chemistry*, (1996), **68**, (15), 2629.
- [21] Wang, J., Cai, X., Wang, J., Jonsson, C., Paleck, E., "Trace Measurements of Rna by Potentiometric Stripping Analysis at Carbon-Paste Electrodes.", *Analytical Chemistry*, (1995), **67**, (22), 4065.
- [22] Wang, J., Kawde, A.N., Sahlin, E., "Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA.", *Analyst*, (2000), **125**, (1), 5.
- [23] Chen, J.H., Zhang, J., Wang, K., Lin, X., Huang, L., Chen, G., "Electrochemical Biosensor for Detection of BCR/ABL Fusion Gene Using Locked Nucleic Acids on 4-Aminobenzenesulfonic Acid-Modified Glassy Carbon Electrode.", *Analytical Chemistry*, (2008), **80**, (21), 8028.

- [24] Cagnini, A., Palchetti, I., Lioni, I., Mascini, M., Turner, A.P.F., "Disposable Ruthenized Screen-Printed Biosensors for Pesticides Monitoring.", *Sensors and Actuators B-Chemical*, (1995), **24**, 85.
- [25] Hang, T.C., Guiseppi-Elie, A., "Frequency dependent and surface characterization of DNA immobilization and hybridization.", *Biosensors & Bioelectronics*, (2004), **19**, (11), 1537.
- [26] Lucarelli, F., Marrazza, G., Turner, A.P.F., Mascini, M., "Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors.", *Biosensors & Bioelectronics*, (2004), **19**, (6), 515.
- [27] Ingebrandt, S., Han, Y., Nakamura, F., Poghossian, A., Schöning, M.J., Offenhausser, A., "Label-free detection of single nucleotide polymorphisms utilizing the differential transfer function of field-effect transistors.", *Biosensors & Bioelectronics*, (2007), **22**, (12), 2834.
- [28] Umek, R.M., Lin, S.W., Vielmetter, J., Terbrueggen, R.H., Irvine, B., Yu, C.J., Kayyem, J.F., Yowanto, H., Blackburn, G.F., Farkas, D.H., Chen, Y.P., "Electronic detection of nucleic acids - A versatile platform for molecular diagnostics.", *Journal of Molecular Diagnostics*, (2001), **3**, (2), 74.
- [29] Hashimoto, K., Ito, K., Ishimori, Y., "Microfabricated disposable DNA sensor for detection of hepatitis B virus DNA.", *Sensors and Actuators B-Chemical*, (1998), **46**, (3), 220.
- [30] Xu, D., Huang, K., Liu, Z., Liu, Y., Ma, L., "Microfabricated disposable DNA sensors based on enzymatic amplification electrochemical detection.", *Electroanalysis*, 2001. **13**, (10), 882.
- [31] Carpini, G., Lucarelli, F., Marrazza, G., Mascini, M., "Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids.", *Biosensors & Bioelectronics*, (2004), **20**, (2), 167.
- [32] Arıksoysal, D., DNA'da meydana gelen bazı mutasyonların ve hibridizasyonun tayinine yönelik elektrokimyasal DNA biyosensörlerinin tasarımı, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, İzmir, (2006).
- [33] <http://www.azonano.com/news.asp?NewsID=8571>.
- [34] Klug, W.S., Cummings, M.R., Genetik Kavramlar, ed. C. Öner, *Palme yayıncılık*, Ankara, (2003), s 283-319.
- [35] <http://www.wikipedia.org>.
- [36] Nelson, D.L., Cox M.M., Lehninger biyokimyanın ilkeleri, ed. N.Kılıç, *Palme yayıncılık*, Ankara, (2005), s 325-347.

- [37] Zhao, Y.D., Pang, D.W., Hu, S., Wang, Z.L., Cheng, J.K., Dai, H.P., "DNA-modified electrodes; part 4: optimization of covalent immobilization of DNA on self-assembled monolayers.", *Talanta*, (1999), **49**, (4), 751.
- [38] Ng, P.S., Bergstrom, D.E., "Alternative nucleic acid analogues for programmable assembly: hybridization of LNA to PNA.", *Nano Lett*, (2005) **5**, (1), 107.
- [39] Braasch, D.A., Corey, D.R., "Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA.", *Chem Biol*, (2001), **8**, (1),1.
- [40] Uno, T., Tabata, H., Kawai, T., "Peptide-nucleic acid-modified ion-sensitive field-effect transistor-based biosensor for direct detection of DNA hybridization.", *Anal Chem*, (2007), **79**, (1), 52.
- [41] Vester, B., Wengel, J., "LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA.", *Biochemistry*, (2004), **43**, (42), 13233.
- [42] Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Andoh, J., Morio, K., Doi, T., Imanishi, T., "Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-C-methylene ribonucleosides.", *Tetrahedron Letters*, (1998), **39**, (30),5401.
- [43] Petersen, M., Wengel, J., "LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics.", *Trends in Biotechnology*, (2003), **21**, (2), 74.
- [44] Natsume, T., Ishikawa, Y., Dedachi, K., Tsukamoto, T., Kurita, N., "Effect of base mismatch on the electronic properties of DNA-DNA and LNA-DNA double strands: Density-functional theoretical calculations.", *Chemical Physics Letters*, (2007), **446**, 151.
- [45] Kaur, H., Babu, B.R., Maiti, S., "Perspectives on chemistry and therapeutic applications of Locked Nucleic Acid (LNA).", *Chem Rev*, (2007), **107**, (11), 4672.
- [46] Okada, H., Kohanbash, G., Lotze, M.T., "MicroRNAs in immune regulation opportunities for cancer immunotherapy.", *Int J Biochem Cell Biol*, (2010). **42**, (8), 1256.
- [47] <http://www.mirbase.org>.
- [48] Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G., "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*.", *Cell*, (1993), **75**, (5), 855.
- [49] Pasquinelli, A.E., et al., "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA.", *Nature*, (2000), **408**, (6808), 86.

- [50] Tsang, W.P. Kwok, T.T., "Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and induction of apoptosis in human cancer cells.", *Journal of Nutritional Biochemistry*, (2010). **21**, (2), 140.
- [51] Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G.A., Croce, C.M., "MicroRNA expression and function in cancer.", *Trends Mol Med*, (2006), **12**, (12), 580.
- [52] Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheang, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., Slack, F.J., "RAS is regulated by the let-7 MicroRNA family.", *Cell*, (2005), **120**, (5), 635.
- [53] Gramantieri, L., Ferracin, M., Fornari, F., Veronese, A., Sabbioni, S., Liu, C.G., Calin, G.A., Giovannini, C., Ferrazzi, E., Grazi, G.L., Croce, C.M., Bolondi, L., Negrini, M., "Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma.", *Cancer Res*, (2007), **67**, (13), 6092.
- [54] Rossi, L., Bonmassar, E., Faraoni, I., "Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro.", *Pharmacological Research*, (2007), **56**, (3), 248.
- [55] Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J., "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." *Nat Rev Cancer*, (2006), **6**, (4), 259.
- [56] Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C., Kipps, T.J., Negrini, M., Croce, C.M., "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2.", *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2005), **102**, (39), 13944.
- [57] Takeshita, F., Patrawala, L., Osaki, M., Takahashi, R.U., Yamamoto, Y., Kosaka, N., Kawamata, M., Kelnar, K., Bader, A.G., Brown, D., Ochiya, T., "Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes.", *Mol Ther*, (2010), **18**, (1), 181.
- [58] Calin, G.A., Croce, C.M., "MicroRNA signatures in human cancers.", *Nat Rev Cancer*, (2006), **6**, (11), 857.
- [59] Hunt, E.A., Goulding, A.M., Deo, S.K., "Direct detection and quantification of microRNAs.", *Anal Biochem*, (2009), **387**, (1), 1.
- [60] Yang, W.J., Li, X.B., Li, Y.Y., Zhao, L.F., He, W.L., Gao, Y.Q., Wan, Y.J., Xia, W., Chen, T., Zheng, H., Li, M., Su, S.Q., "Quantification of microRNA by gold nanoparticle probes.", *Anal Biochem*, (2008), **376**, (2), 183.
- [61] Cissel, K.A., Campbell, S., Deo, S.K., "Rapid, single-step nucleic acid detection.", *Anal. Bioanal. Chem*, (2008), **391**, 2577.

- [62] Su, X., Teh, H.F., Lieu, X., Gao, Z., "Enzyme-based colorimetric detection of nucleic acids using peptide nucleic acid-immobilized microwell plates.", *Anal. Chem.*, (2007), **79**, 7192.
- [63] Gao, Z., Yu, Y.H., " A microRNA biosensor based on direct chemical ligation and electrochemically amplified detection.", *Sensor Actuator B*, (2007), **121**, 552.
- [64] Gao, Z., Yu, Y.H., "Direct labeling microRNA with an electrocatalytic moiety and its application in ultrasensitive microRNA assay.", *Biosens. Bioelectron.*, (2007), **22**, 933.
- [65] Laschi, S., Palchetti I., Marrazza, G., Mascini, M., " Enzyme-amplified electrochemical hybridization assay based on PNA, LNA and DNA probe-modified micro-magnetic beads", *Bioelectrochemistry*, (2009), **76**, 214.
- [66] Trent, J.R., Molecular Medicine 3th edition, *Elsevier Academic Press.*, USA (2005), s 4-13.
- [67] Lewin, B. Genes VIII, *Pearson Prentice Hall*, USA, (2004), s 53-55
- [68] Lucarelli, F., Marrazza, G., Mascini, M., " Design of an optimal allele-specific oligonucleotide probe for the efficient discrimination of a thermodynamically stable (G·T) mismatch", *Analytica Chimica Acta*, (2007), **603**, 82.
- [69] Wang, J., Li, S., Zhang, Y., "A sensitive DNA biosensor fabricated from gold nanoparticles, carbon nanotubes, and zinc oxide nanowires on a glassy carbon electrode", *Electrochimica Acta*, (2010), **55**, 4436.
- [70] Turyan I., Mandler, D., "Selective Determination of Cr(VI) by a Self-Assembled Monolayer-Based Electrode", *Anal. Chem.*, (1997), **69**, 894.
- [71] Farabullini, F., Lucarelli, F., Palchetti, I., Marrazza, G., Mascini, M., "Disposable electrochemical genosensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants.", *Biosensors and Bioelectronics*, (2007), **22**, 1544.
- [72] Herne, T.M., Tarlov, M.J., "Characterisation of DNA probes immobilised on gold surfaces.", *J. Am. Chem. Soc.*, (1997), **119**, 8916.
- [73] Garofalo, M., Condorelli, G., Croce, C.M., "MicroRNAs in diseases and drug response", *Current Opinion in Pharmacology*, (2008), **8**, 661.
- [74] Cissell, K.A., Shrestha, S., Deo, S.K., "MicroRNA Detection: Challenges for the Analytical Chemist", *Anal. Chem.*, (2007), **79**, 4754.



- [75] Love, T.M., Moffett, H.F., Novina, C.D., "Not miR-ly small RNAs: big potential for microRNAs in therapy", *J Allergy Clin Immunol.*, (2008), **121**, 309.
- [76] Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., Ruvkun, G., "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, (2000), **403**, 901.
- [77] Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T., "Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs" *Science*, (2001), **294**, 853.