



## ARAŞTIRMA / RESEARCH

# Genosensör ile yeni bir girişimsel olmayan doğum öncesi tanı yöntemi

A novel non-invasive prenatal test technique with genosensor

Umut Kökbaş<sup>1</sup>, Abdullah Tuli<sup>2</sup>, Levent Kayrın<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Girne Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Girne/KKTC

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana, Turkey

*Cukurova Medical Journal 2021;46(1):208-215*

### Abstract

**Purpose:** The aim of this study is to develop a new procedure with nanopolymer based genosensor for the determination of paternal mutation from cell-free fetal DNA in maternal blood.

**Materials and Methods:**  $\beta$ -thalassemia IVS1-110 mutation analysis was performed using quartz-crystal microbalance (QCM) and biosensor technologies. For this purpose, the probes of the mutation were immobilized on the genosensor electrode surface by means of Poly Hema-MAC nanopolymer and then samples were added to the working cell for detection. Optimization, characterization, sensitivity and specificity studies of the genosensor were performed.

**Results:** Biosensor measurements were obtained between -0.6 and 0.8 V in a constant current range by cyclic voltammetry. Common results were obtained with ARMS method in fetuses who had non-invasive prenatal diagnosis tests. When the ARMS results were compared with the genosensor results statistically, a 99% concordance rate was obtained in the ROC curve drawn.

**Conclusions:** The developed biosensor can detect the presence of paternal mutation of the fetus specific to the probe on its surface. Compared with the traditional methods used in routine, it was found to be more cost-effective, faster, with high specificity and detection efficiency.

**Keywords:** Genosensor, cell-free fetal dna, nanopolymer

### Öz

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, maternal kandaki "cell-free" fetal DNA'dan paternal mutasyon tayini için nanopolymer bazlı genosensör ile yeni bir prosedür geliştirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Kuvars-kristal mikrobalaans (QCM) ve biyosensör teknolojilerini kullanarak  $\beta$ -talasemi IVS1-110 mutasyonunun analizine uygulanmıştır. Bu amaçla, mutasyona ait problemler genosensör elektrodu üzerine PoliHema-MAC nanopolymeri aracılığıyla bağlandı ve daha sonra örnekler tespit amacıyla çalışma hücrelerine eklendi. Genosensörün optimizasyon, karakterizasyon, duyarlılık ve özgüllük çalışmaları yapıldı.

**Bulgular:** Biyosensör ölçümleri -0,6 - 0,8 V sabit akım aralığında döngüsel volatmetriyle elde edildi. Girişimsel olmayan doğum öncesi tanı testi yapılan fetüslerde ARMS yöntemiyle ortak sonuçlar elde edilmiştir. ARMS sonuçları genosensör sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında çizilen ROC eğrisinde %99 uyumluluk oranı elde edilmiştir.

**Sonuç:** Geliştirilen biyosensör, yüzeyinde bulunan proba özgül olarak, fetüsün paternal mutasyonunun varlığını ortaya koyabilmektedir. Rutinde kullanılan geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, daha düşük maliyetli, hızlı sonuç verebilen, özgüllüğü ve saptama etkinliği yüksek olarak bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Genosensör, "cell-free" fetal dna, nanopolymer

## GİRİŞ

Teknolojinin hayatımızın her alanına girdiği 21. yüzyılda, teknolojik gelişmelerden tıp alanında erken tanı ve hastalık takibinde yararlanılmaktadır<sup>1,2</sup>.

Günümüz biyokimyasında yeni yaklaşım, geleneksel laboratuvar düzeninden dijital laboratuvar çalışmalarına geçilmesi yönündedir<sup>3,4</sup>. Dijital laboratuvar çalışmalarının öncülüğünü biyokimyasal çalışmaların özgüllüğü ile dijital sistemlerin hassaslığını birleştiren biyosensörler yapmaktadır<sup>4,5</sup>.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Umut Kökbaş, Girne Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Girne/KKTC E-mail: umut.kokbas@kyrenia.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 07.09.2020 Kabul tarihi/Accepted: 30.11.2020 Çevrimiçi yayın/Published online: 15.01.2021

Biyosensörlerin en önemli avantajları yüksek özgüllükte olmaları, ön işlem gerektirmemeleri ve geleneksel laboratuvar yöntemlerinde tayin sınırı altında kalan derişimlerde ölçüm yapılmasına olanak vermesidir<sup>6,7</sup>. Biyosensörler bu avantajlarından dolayı genetik çalışmalarda tercih sebebi olmaktadır<sup>8</sup>. Genetik çalışmalarda kullanılan biyosensörlere genosensör adı verilmektedir<sup>7,9</sup>. Genosensörler yakın zamanda genetik çalışmalarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve jel elektroforezi gibi zaman alıcı yöntemlerin yerine geçecektir.

Fetüs gereksinim duyduğu maddeleri göbek kordonu aracılığıyla anneden alırken, kendi Cell-free DNA'sını anne kanına vermektedir<sup>4,10</sup>. Cell-free fetal DNA tayini fetüsün sahip olabileceği muhtemel genetik bozukluklar hakkında erken tanı imkanı vermektedir<sup>11,12</sup>. Erken tanı, tedavi imkanı bulunan hastalıkların ilerlemeden tedavi edilmesini sağlarken, tedavi imkanı olmayan moleküler bozukluk tespiti halinde önleyici tıp çalışmalarının uygulanmasına olanak vermektedir<sup>8,13</sup>.

Ülkemizde özellikle de Akdeniz bölgesinde en sık görülen genetik bozukluk talasemi hastalığıdır<sup>14</sup>. Günümüzde talasemi tedavisinin yapılamaması prenatal tanı yöntemlerinin uygulanması gereksinimini ortaya koymaktadır<sup>8</sup>. Bu gibi durumlarda fetüsün genetik yapısının en kısa zamanda belirlenmesi büyük önem arz etmektedir<sup>15</sup>. Genosensörler ön işlem gerektirmediğinden dolayı prenatal tanı için kullanılan yöntemlerden daha hızlı sonuç vermektedir<sup>16,17</sup>. Bu çalışmada Cell-free fetal DNA tayini amacıyla nanopolimer tabanlı genosensör çalışması yapılmıştır. Genosensör çalışmasında örnek olarak beta talasemi IVS1-110 mutasyonu çalışılmış olup, bu çalışma alanında ülkemizde yapılan ilk genosensörle girişimsel olmayan doğum öncesi tanı çalışmasıdır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Kimyasal malzemeler

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal malzemeler (agaroz, etidyum bromür, Disodyumhidrojenfosfat, Sodyum asetat trihidrat, HCl, NaOH, Etanol) analitik saflıkta olup, Merck (USA) firmasından temin edilmiştir ve tüm çözeltiler çalışma öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. Deneylerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Milipore MilliQ ultrafiltrasyonundan elde edilmiştir. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm'dir.

### Örneklem

$\beta$ -talasemi prenatal tanısı için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'ye 2017-2019 tarihleri arasında başvurmuş, paternal moleküler tanısı IVS1-110 (G→C) mutasyonu konmuş ve koriyonikvilüs materyalinde IVS1-110 mutasyonu taşıdığı saptanmış 37 aile çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen ebeveynlere onam formu imzalatılmıştır. Ç.Ü. Tıp Fakültesi Girişimsel olmayan Etik Kurulu'nun 03.03.2017 tarihinde yapılan 62 sayılı oturumunda alına 39 nolu kararı ile etik onay alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen anne adaylarından genosensör çalışmaları için 5 ml tam kan alınmıştır. Maternal kontaminasyonu önlemek amacıyla maternal ve paternal mutasyonları aynı olan aileler çalışmaya dahil edilmemiştir.

### Yöntem

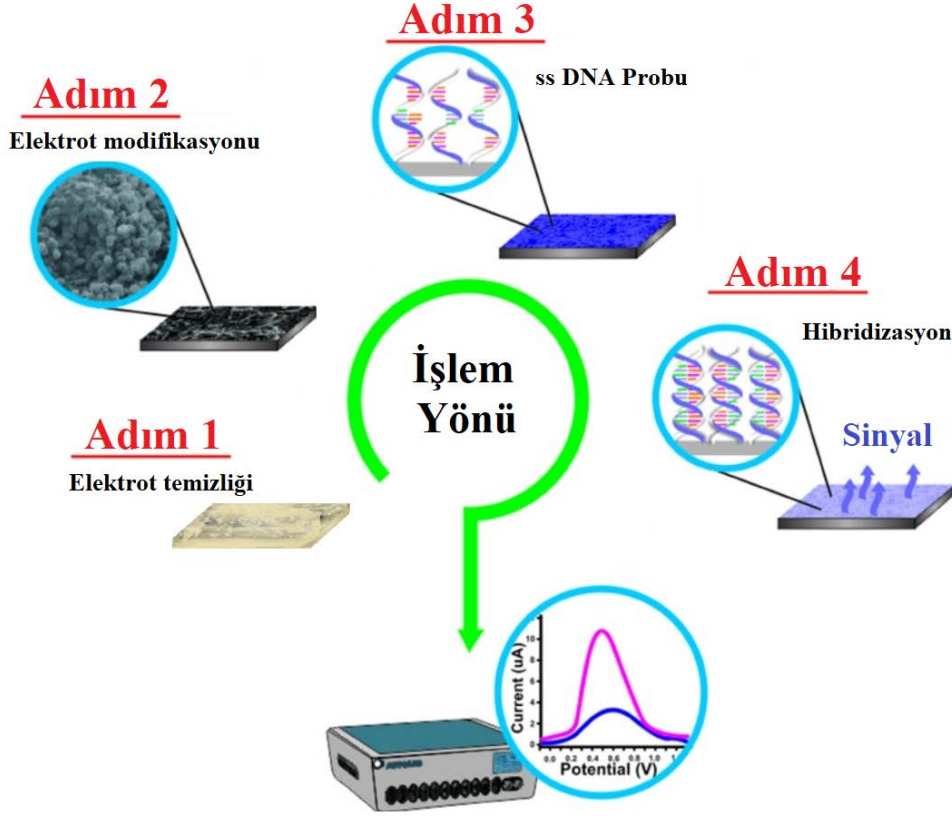
Genosensör çalışmaları hassas çalışmalar olduğundan, öncelikle çalışma elektrodunun her çalışma için temizlenmesi gerekmektedir. Temizlik aşamasında, nanopolimerin tiyol(-SH) gruplarıyla bağ kurabilecek olan, altın çalışma elektrotu fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle temizlendi. Temiz altın kaplı quartz çalışma elektrotunun yüzeyinin PolyHema-Mac nanopolimeriyle bağ yapması amacıyla; 5 saat süresince laboratuvar koşullarında nanopolimer ile kendiliğinden oluşan tek tabaka oluşturması için nanopolimer içerisinde bekletildi. Bekleme süresi sonunda bağlanmayan polimerlerin uzaklaştırılması amacıyla 3 defa pH 7.5 sodyum-fosfat tamponuyla yıkama yapıldı. Nanopolimer ile modifiye edilmiş çalışma elektrotunun yüzeyindeki nanopolimerin serbest tiyol gruplarıyla, tiyole DNA probu disülfid köprüsü kurarak bağlanmıştır.

Sistem, elektrot yüzeyinde bağlı olan primere eşlenik Fetal Cell-Free DNA bağlanması ile oluşan kuvars kristal rezonansının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır<sup>4</sup>. Kuvars çalışma elektrotu sabit koşullarda yalıtkan olup, yüzeyinde bir bağlanma gerçekleştiğinde ağırlık değişiminden dolayı oluşan rezonansla doğru orantılı olarak elektrik akımı üretmektedir. Çalışmada üretilen elektrik akımı ve rezonans genosensör aracılığıyla ölçülmüştür.

Ölçüm için hazır olan çalışma elektrotunda en iyi yanıtın elde edilebileceği immobilizasyon ve çalışma koşullarının tespit edilmesi amacıyla optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

Bu amaçla genosensörün her bir değişkeninin en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi için, bir değişkenin farklı değerleri denenirken diğer değişkenler sabit tutularak hazırlanan genosensörle ölçümler alındı.

Alınan ölçüm sonuçları irdelendiğinde örnek ayırma gücü en iyi olan değerler elde edilen veriler incelenerek seçilmiştir. Bu amaçla yapılan işlemler şekil 1 de şematize edilmiştir.



Şekil 1. Genosensörün çalışma şeması.

Elde edilen sonuçlar ARMS<sup>18</sup> yöntemi standart doğru kabul edilerek, sonuçların karşılaştırması yapılmıştır. Genosensör çalışmaları ve ARMS yönteminde kullanılan prob dizileri: Prob dizi DNA tayininde büyük önem taşıdığından tasarımlarının iyi yapılması gerekmektedir. Prob tasarımı NCBI veri tabanında insan globin gen dizisinden FASTA formatında elde edilen diziler ile primerblast platformu üzerinden tasarımı gerçekleştirilmiştir.

- 1) Mutant Prob Dizisi  
SH-5'- ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA  
AAA TAC ACC 3'
- 2) Normal Prob Dizisi  
SH-5'- ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA  
AAA TAC AGC -3'

### İstatistiksel analiz

ROC eğrisi özgüllük (seçicilik) ve hassasiyet (duyarlılık) arasındaki ilişkinin grafiksel bir gösterimidir. ROC eğrisi yardımıyla farklı tanı testlerinin doğru klinik tanı koymadaki başarısının karşılaştırılmasına olanak sağlanır. ROC eğrileri farklı tanı testlerinin doğru tanı koymadaki başarısının karşılaştırılmasına olanak sağlarlar. ROC eğrisinde eğrinin altında kalan alan yüzde cinsinden hesaplanarak özgüllük ve hassasiyet bulunur<sup>19,20</sup>.

İstatistik çalışmaları için SPSS 20.0 programı kullanıldı. Genosensör ve ARMS yöntemi ile elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında,

yöntem karşılaştırma çalışmalarında yeni yöntemin performansını gösteren ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrisi çizildi.

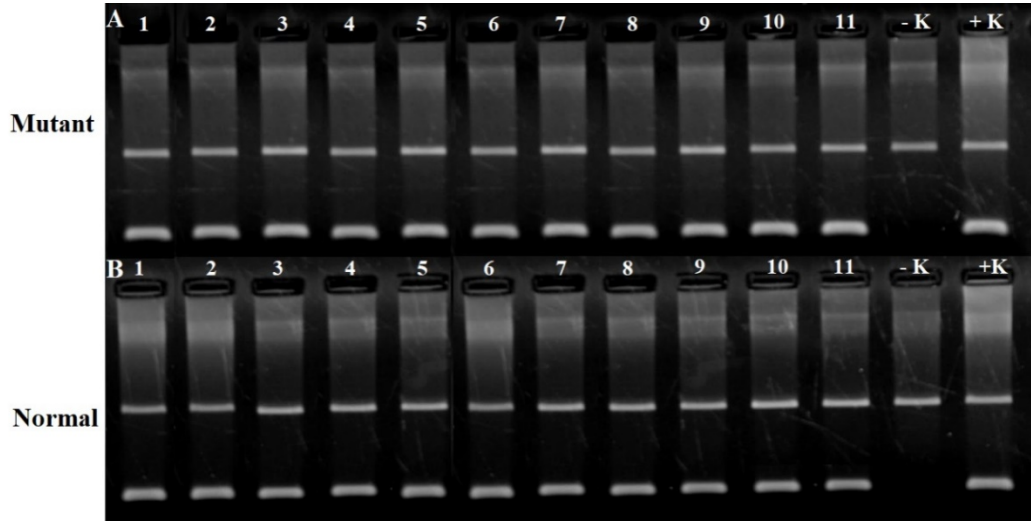
## BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen örneklerden heterozigot olanların ARMS sonuçları Şekil 2'de verilmiştir. Şekil 2'de görülen ARMS sonuçlarında üst satır IVS1-110

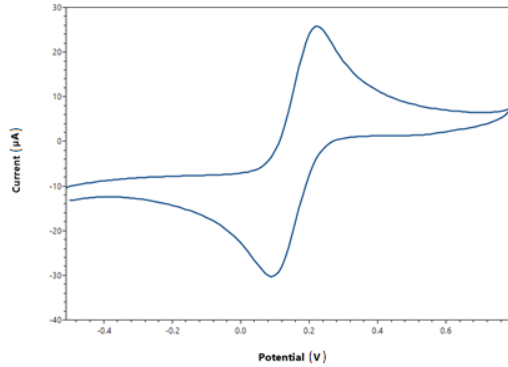
(G→C) mutasyonu yönünden mutant alleli içerip içermediğini, alt satır ise normal (wild type) alleli içerip içermediğini göstermektedir.

## Çalışma aralığının belirlenmesi

Geniş dalga boyu taramaları yapıldı. Döngüsel voltamogramdan alınan sonuçlar doğrultusunda çalışma aralığı -0,6 - 0,8 V sabit akım aralığında bulundu. (Şekil 3 )



Şekil 2. Çalışmalarda kullanılan örneklerin IVS1-110 (G→C) mutasyonu açısından heterozigot olarak taşıyıcı olduğunu göstermektedir. Alınan örneklerin ARMS yöntemiyle mutasyonları belirlendikten sonra genosensör çalışmalarına dahil edilmiştir. (A. Paternal mutasyona sahip örnekler. B. Paternal mutasyona sahip olmayan örnekler. -K negatif kontrol, +K pozitif kontrol)



Şekil 3. Döngüsel voltamogram

## Nanopolimer miktarının optimizasyonu

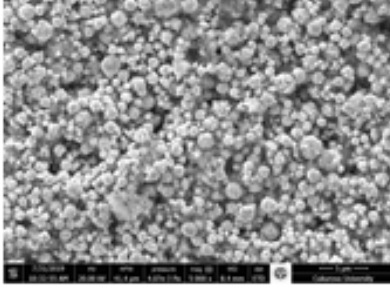
Değişik derişimlerde PolyHema-Mac nanopolimerine (5, 10, 20 ve 40 nmol) sahip çözeltiler kullanarak hazırlanan genosensör ile denemeler yapılmıştır. Elde edilen değerlere göre en yüksek salınım farkına sahip nanopolimer miktarının 20 nmol olduğu saptanmıştır. 20 nmol nanopolimerle modifiye elektrot yüzeyi Şekil 4 te gösterilmektedir.

## Çalışma tamponu ve en iyi pH değerinin belirlenmesi

Çalışma tamponu ve en iyi pH değerinin belirlenmesi için pH4.0 ile 9.5 arasında değişik pH ve tamponlarda denemeler yapıldı en iyi sonuç pH 7.5 sodyum fosfat tamponu olduğu bulundu.

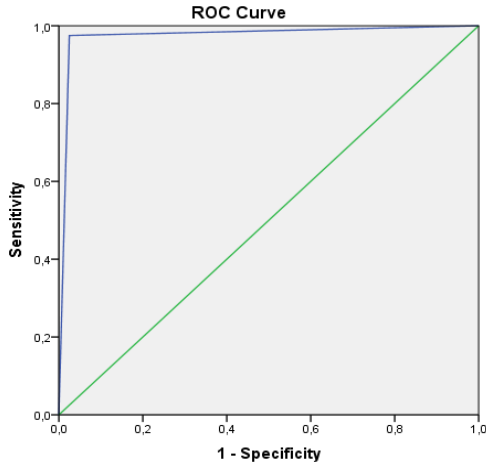
### En iyi Prob derişiminin belirlenmesi

Biyoaktif tabaka üzerinde en iyi prob derişiminin belirlenmesi amacıyla pH 7,5'te derişimi 50 nmol, 100 nmol ve 200 nmol olan prob miktarları kullanıldı. Elde edilen sonuçlara göre optimum prob derişiminin 100 nmol olduğu bulundu.



Şekil 4. Nanopolimer(poly Hema-MAC) ile modifiye elektrot yüzeyi

### ROC analizi



Şekil 5. Genosensör ve ARMS yöntemlerinin performanslarının karşılaştırıldığı ROC eğrisi.

Genosensör ve ARMS yöntemi ile elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, yöntem karşılaştırma çalışmalarında yeni yöntemin performansını gösteren ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrisi çizildi. (Şekil 5) Çizilen ROC eğrisinde genosensör yönteminin özgülüğü %99 ve hassasiyeti %99 olarak belirlenmiştir.

### 4. TARTIŞMA

Günümüzde halen fetal genetik hastalıkların tanısında fetal örnekleme, girişimsel olarak elde edilen koryonik vilüs ve amniyosentez örneklerinden yapılmaktadır<sup>21</sup>. Bu yöntemlerin hem anneye hem de fetüse önemli yan etkileri bulunmaktadır<sup>8</sup>. Anne kanında bulunan “cell-free” fetal genetik materyallerle yapılan işlemlerde düşük gibi risklerin en aza indirilmesi, çalışmaların girişimsel olmayan yöntemler yönünde ilerlemesine neden olmuştur<sup>22</sup>. Genetik çalışmalarda rutin olarak girişimsel yöntemlerin yanı sıra PCR temelli geleneksel yöntemler kullanılmaktadır<sup>23</sup>. Ancak bunlar genel olarak zaman alıcı ve pahalı yöntemlerdir<sup>24</sup>. Bu nedenle fetüsün genetik profilinin belirlenebilmesi için daha kısa sürede, daha düşük maliyetle daha doğru ölçüm yapan sistemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir<sup>25,26</sup>.

Tıbbın kullanımına hizmet eden neredeyse tüm yöntem ve cihazlar, her gün evrilir iken tanısız yöntemlerin rutin kullanımındaki yeri tamamen değişmeye de güncelleme gerektirir. Bu nedenle dünya genelinde yapılan çalışmalar, laboratuvar tıbbının da diğer tüm alanlar gibi, yenilemesi yönündedir. Bu yenilikler, eski sistemlerin güncellenerek daha hızlı sonuç verebilen, daha küçük, daha az sarf malzeme harcayan ve daha az maliyetli sistemlerin üretilmesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Tüm saydığımız bu özellikleri bir araya getiren ve laboratuvar tıbbının geleceğini oluşturan, yüksek ivme ile ilerleyen bilimsel gelişmelerin yardımıyla biyosensör teknolojisi, yakın gelecekte yerini alacaktır.

Biyosensörler genel olarak üç temel bileşenden oluşur. Bunlar, seçici tanıma mekanizmasına sahip “biyobileşen”, bu biyobileşenin analit ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürülebilen çevirici ve bu sinyalleri ileten ileticilerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli, fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren biyobileşendir<sup>27</sup>.

Biyobileşen, biyoaktif tabaka üzerinde değişime ve dönüşüme neden olmakta ve bu dönüşüm sonucu, ortamda oluşan uyarı izlenerek sonuca gidilmektedir. Bu amaçla saf enzim sistemleri, mikroorganizmalar ve bitkisel ya da hayvansal doku parçaları, genetik materyal gibi birçok biyomolekül kullanılmaktadır. Biyobileşen olarak genetik materyalin kullanıldığı biyosensörlere genosensör adı verilmektedir<sup>1,27</sup>.

Bu çalışmada, hibridizasyona yönelik genosensör, bir biyosensörde bulunması gereken parametreler göz önünde bulundurularak tasarlanmıştır<sup>28,29</sup>. Bu parametrelerden en önemlileri geliştirilen biyosensörün hassasiyeti ile özgüllüğü yüksek ve düşük maliyetle kısa sürede tayin yapabilmeye elverişli olmasıdır. Herhangi bir ön işlem gerektirmeyen, maternal tam kandan hibridizasyon tayin yöntemi kullanılarak tasarımı yapılan, genosensör çalışmaları yapılmıştır. Çalışılan genosensör girişimsel olmayan prenatal tanı uygulamalarında kullanılmak üzere, “cell-free” fetal DNA tayinine yönelik kullanılmıştır<sup>15,30</sup>.

Literatürde  $\beta$ -talasemi tayinine yönelik sensör çalışmaları incelendiğinde, örneklere ön işlem uygulandığı ve biyosensörlerde tam kan yerine amplikon kullanıldığı görülmektedir<sup>31,32</sup>. Çalışmamızın literatüre göre en büyük katkısı, “cell-free” fetal DNA’da mutasyon tayinini ön işlem gereksinimi olmadan yapmış olmamızdır. Bu avantaja sahip olunabilmesinde en büyük etmen biyoaktif tabaka hazırlaması sırasında nanopolimer kullanılmasıdır. Nanopolimer kullanılması sensör çalışmalarında saptama etkinliğini arttırmaktadır<sup>33-35</sup>.

Onam formu imzalayıp çalışmaya dahil edilen 37 örneğin 20 tanesinin paternal mutasyona sahip olduğu, 17 tanesinin ise paternal mutasyona sahip olmadığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar ARMS yöntemiyle de teyit edilmiş ve çalışmamızın yüksek başarılı (%99) olarak çalıştığı çizilen ROC eğrisinde istatistiksel olarak ortaya konmuştur.

Genosensörde kullanılan biyoaktif tabakanın taramalı elektron mikroskopunun nano boyutta görüntüleme özelliğinden yararlanarak biyoaktif tabakanın morfolojik özelliklerinin gözlemlenebilmesi sağlanmıştır. (Şekil 4) Nano boyutlu biyoaktif tabaka yapısı yüzey alanını arttırarak aynı elektrodun birden fazla ölçüm için kullanılmasına olanak vermektedir. Ayrıca disülfid köprülerinin kararlılığı ve elektrobiyokimyanın tersinir etkileşim özellikleri yardımıyla elektrot tekrar tekrar kullanılabilir<sup>17</sup>.

Çalışmayı kısıtlayan en önemli unsur maternal kontaminasyon ihtimalidir. Çalışmada maternal kontaminasyonu önlemek amacıyla materyal ve paternal mutasyonları farklı olan fetüslerin paternal mutasyon tayini yapılmıştır. Maternal kontaminasyonun önlenmesi için VNTR (Variable Number Tandem Repeat) gibi

kimliklendirme analizleriyle desteklemek gerekmektedir.

Geliştirilen yöntemde paternal mutasyonun varlığının veya yokluğunun belirlenmesi genetik konsültasyon için hekime önemli derecede bilgi sağlamaktadır. Elde edilen veriler ışığında fetüsün prenatal tanısı girişimsel olmadan yapılmış olacaktır.

Çeşitli biyokimyasal analizlerde ve özellikle de klinik süreçte tepkime gerçekleşmesi için analitik kimyasallar biyolojik materyallerle karıştırılır ve ölçüm yapıldıktan sonra analiz materyalleri geri kazanılamamaktadır<sup>1</sup>. Bu sürece ekonomik açıdan bakıldığında hali hazırda rutin analizlerde kullanılan yöntemlerin oldukça maliyetli olduğu görülmektedir. Bu nedenle DNA primerlerinin immobilize edilerek defalarca kullanılmaları oldukça ekonomik olmaktadır. Buna bağlı olarak DNA primerlerinin immobilizasyonu ile elde edilen biyoaktif tabaka; genosensörlerin kararlılığı ve tekrar kullanılabilmesi açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Kullandığımız yöntemde yaklaşık olarak ARMS yönteminde 1 örnek için kullanılan primer ve sarf malzeme ile 20 örnek çalışıldı. Bütün bu veriler ışığında genosensörün diğer yöntemlerden kullanım kolaylığı, girişimsel olmaması, maliyeti, doğruluğu, hızı ve duyarlılığı açısından avantajlı olduğu söylenebilir.

---

**Yazar Katkıları:** Çalışma konsepti/Tasarımı: UK, LK, AT; Veri toplama: UK; Veri analizi ve yorumlama: UK; Yazı taslağı: UK; İçeriğin eleştirel incelenmesi: LK, AT; Son onay ve sorumluluk: UK, AT, LK; Teknik ve malzeme desteği: UK; Süpervizyon: AT, LK; Fon sağlama (mevcut ise): yok.

**Etik Onay:** Bu çalışma için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 03.03.2017 tarih ve 62/39 sayılı karar ile etik onay alınmıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Çıkar Çatışması:** Yazarların herhangi bir çıkar dayalı ilişkisi yoktur.

**Finansal Destek:** Yazarlar finansal destek beyan etmemişlerdir.

**Yazarın Notu:** Çalışmamızı TDK-2017-8841 proje numarasıyla destekleyen Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederiz.

---

**Author Contributions:** Concept/Design : UK, LK, AT; Data acquisition: UK; Data analysis and interpretation: UK; Drafting manuscript: UK; Critical revision of manuscript: LK, AT; Final approval and accountability: UK, AT, LK; Technical or material support: UK; Supervision: AT, LK; Securing funding (if available): n/a.

**Ethical Approval:** Ethical approval was obtained for this study from the Non-Invasive Clinical Research Ethics Committee of Çukurova University Faculty of Medicine with the decision number 62/39 dated 03.03.2017.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Conflict of Interest:** The authors do not have any interest based relationships

**Financial Disclosure:** Authors declared no financial support

**Acknowledgement:** We would like to thank Çukurova University Scientific Research Projects Unit for supporting our study with the project number TDK-2017-8841.

---

**KAYNAKLAR**

1. Beattie KL, Beattie WG, Meng L, Turner SL, Coral-Vazquez R, Smith DD et al. Advances in genosensor research. *Clin Chem.* 1995;41:700-6.
2. Sabahi A, Salahandish R, Ghaffarinejad A, Omidinia E. Electrochemical nano-genosensor for highly sensitive detection of miR-21 biomarker based on SWCNT-grafted dendritic Au nanostructure for early detection of prostate cancer. *Talanta.* 2020;209:120595.
3. Daneshpour M, Moradi LS, Izadi P, Omidfar K. Femtomolar level detection of RASSF1A tumor suppressor gene methylation by electrochemical nano-genosensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/TMC/Au nanocomposite and PT-modified electrode. *Biosens Bioelectron.* 2016;77:1095-1103.
4. Kokbas U, Kayrin L, Tuli A. Lab-on-a-chip based biosensor for the real-time multiplex analysis of alpha thalassemia mutations from cell-free DNA. *Febs Open Bio.* 2019;9:374.
5. Semsı R, Kokbas U, Arslan B, Dincel AS, Ergunol E, Kayrin L. Comparison of chemiluminescence immunoassay and biosensor methods for measurement of saliva glucose levels in adults. *Febs Open Bio.* 2019;9:129.
6. Fernandes AM, Abdalhai MH, Ji J, Xi BW, Xie J, Sun J et al. Development of highly sensitive electrochemical genosensor based on multiwalled carbon nanotubes-chitosan-bismuth and lead sulfide nanoparticles for the detection of pathogenic *Aeromonas*. *Biosens Bioelectron.* 2015;63:399-406.
7. Malecka K, Swieton E, Verwilt P, Stachyra A, Sirko A, Dehaen W et al. Ultrasensitive electrochemical genosensor for direct detection of specific RNA sequences derived from avian influenza viruses present in biological samples. *Acta Biochim Pol.* 2019;66:299-304.
8. Kanwal S, Bukhari S, Perveen S. Molecular genetics and prenatal diagnosis of beta thalassemia to control transfusion dependent births in carrier Pakistani couples. *J Pak Med Assoc.* 2017;67:1030-4.
9. Fortunati S, Rozzi A, Curti F, Giannetto M, Corradini R, Careri M. Novel amperometric genosensor based on peptide nucleic acid (PNA) probes immobilized on carbon nanotubes-screen printed electrodes for the determination of trace levels of non-amplified DNA in genetically modified (GM) soy. *Biosens Bioelectron.* 2019;129:7-14.
10. Yenilmez ED, Kokbas U, Kartlasmis K, Kayrin L, Tuli A. A new biosensor for noninvasive determination of fetal RHD status in maternal blood of RhD negative pregnant women. *Plos One.* 2018;13:e0197855.
11. Fries N, Le Garrec S, Egloff M, Sault C, Dreux S, Mangione R et al. Non-invasive prenatal testing: what are we missing? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2020.
12. Park AL, Huang T, Meschino WS, Iqbal J, Ray JG. Prenatal Biochemical Screening and a woman's long-term risk of cancer: a population-based cohort study. *JNCI Cancer Spectr.* 2020;4:pkz077.
13. van Campen J, Silcock L, Yau S, Daniel Y, Ahn JW, Ogilvie C et al. A novel non-invasive prenatal sickle cell disease test for all at-risk pregnancies. *Br J Haematol.* 2020;190:119-24.
14. İparslan MM, Yenilmez ED, Sanna B, Kokbas U, Tuli A. Alpha/Beta globin mRNA ratio informs the gene function for personalized mutation data in molecular screening of thalassemia carriers. *Febs J.* 2016;283:182-3.
15. Zafari M, Kosaryan M, Gill P, Alipour A, Shiran M, Jalali H et al. Non-invasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia by detection of the cell-free fetal DNA in maternal circulation: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol.* 2016;95:1341-50.
16. Farzin L, Sadjadi S, Shamsipur M, Sheibani S. Electrochemical genosensor based on carbon nanotube/amine-ionic liquid functionalized reduced graphene oxide nanoplateform for detection of human papillomavirus (HPV16)-related head and neck cancer. *J Pharm Biomed Anal.* 2020;179:112989.
17. Ye Y, Mao S, He S, Xu X, Cao X, Wei Z et al. Ultrasensitive electrochemical genosensor for detection of CaMV35S gene with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au@Ag nanoprobe. *Talanta.* 2020;206:120205.
18. Newton C, Graham A, Heptinstall L, Powell S, Summers C, Kalsheker N et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). 1989;17:2503-16.
19. Bahn E, Alber M. On the limitations of the area under the ROC curve for NTCP modelling. *Radiother Oncol.* 2020;144:148-51.
20. Cheng W, Tang N. Smoothed empirical likelihood inference for ROC curve in the presence of missing biomarker values. *Biom J.* 2020;62:1038-59.
21. Lv W, Linpeng S, Li Z, Liang D, Jia Z, Meng D et al. Non-invasive prenatal diagnosis for pregnancies at risk for beta-thalassemia: a retrospective study. *BJOG.* 2020; doi: 10.1111/1471-0528.
22. Liang D, Lin Y, Li H, Hu P, Xu ZF. [Analysis of follow-up information and pregnancy outcomes of cell free DNA prenatal screening]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2020;55:106-11.
23. Wong P, Suannum P, Jermnim S, Charoenporn P, Chan-In M, Tapprom A et al. Lessons learned from a prenatal diagnosis program for thalassemia in Thailand. *Prenat Diagn.* 2020;doi: 10.1002/pd.5723.
24. Tang J, Zhou C, Shi H, Mo Y, Tan W, Sun T et al. Prenatal diagnosis of skeletal dysplasias using whole exome sequencing in China. *Clin Chim Acta.* 2020;507:187-93.
25. Togneri FS, Kilby MD, Young E, Court S, Williams D, Griffiths MJ et al. Implementation of cell-free DNA-based non-invasive prenatal testing in a

- National Health Service Regional Genetics Laboratory. *Genet Res (Camb)*. 2019;101:e11.
26. Wang Y, Li S, Wang W, Dong Y, Zhang M, Wang X et al. Cell-free DNA screening for sex chromosome aneuploidies by non-invasive prenatal testing in maternal plasma. *Mol Cytogenet*. 2020;13:10.
  27. Kökbaşı U, KAYRIN L, Abdullah TJAKTİD. Biyosensörler ve tıpta kullanım alanları. 2013;22:499-513.
  28. Chen PQ, Liang QN, Huang TS, Liu TC, Li M. A Simple, Rapid, and Highly Sensitive Electrochemical DNA Sensor for the Detection of alpha- and beta-Thalassemia in China. *J Clin Lab Anal*. 2016;30:719-726.
  29. Chomean S, Potipitak T, Promptmas C, Ittarat W. Quartz crystal microbalance-based biosensor for the detection of alpha-thalassemia 1 (SEA deletion). *Clin Chem Lab Med*. 2010;48:1247-54.
  30. Chau MHK, Lam YMD, Zhu X, Kwok YKY, Ting YH, Chan WP et al. The utility of genome-wide cell-free DNA screening in the prenatal diagnosis of Pallister-Killian syndrome. *Prenat Diagn*. 2020.
  31. Feriotto G, Breveglieri G, Gardenghi S, Carandina G, Gambari R. Surface plasmon resonance and biosensor technology for real-time molecular diagnosis of beta o 39 thalassemia mutation. *Mol Diagn*. 2004;8:33-41.
  32. Wangmaung N, Promptmas C, Chomean S, Sanchomphu C, Ittarat W. Low cost biosensor-based molecular differential diagnosis of alpha-thalassemia (Southeast Asia deletion). *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:1199-205.
  33. Hussain KK, Gurudatt NG, Akhtar MH, Seo KD, Park DS, Shim YB. Nano-biosensor for the in vitro lactate detection using bi-functionalized conducting polymer/N, S-doped carbon; the effect of alphaCHC inhibitor on lactate level in cancer cell lines. *Biosens Bioelectron*. 2020;155:112094.
  34. Liu F, Lin Z, Jin Q, Wu Q, Yang C, Chen HJ et al. Protection of Nanostructures-Integrated Microneedle Biosensor Using Dissolvable Polymer Coating. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019;11:4809-19.
  35. Zhang P, Sun T, Rong S, Zeng D, Yu H, Zhang Z et al. A sensitive amperometric AChE-biosensor for organophosphate pesticides detection based on conjugated polymer and Ag-rGO-NH2 nanocomposite. *Bioelectrochemistry*. 2019;127:163-70.