



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



KANSER VE NÖROLOJİK HASTALIKLARA YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Göksu ÖZÇELİKAY

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN**

ANKARA

2022

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KANSER VE NÖROLOJİK HASTALIKLARA YÖNELİK
ELEKTROKİMYASAL BİYSENSÖR SİSTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Göksu ÖZÇELİKAY

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
BAP 21L0237001 proje numarasıyla desteklenmiştir.**

**ANKARA
2022**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kanser ve Nörolojik Hastalıklara Yönelik Elektrokimyasal Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi” başlıklı tez, bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan hazırlanmıştır. Tezimin fikri tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Göksu ÖZÇELİKAY

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalında Göksu ÖZÇELİKAY tarafından hazırlanan “Kanser ve Nörolojik Hastalıklara Yönelik Elektrokimyasal Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xv
1.GİRİŞ	1
1.1.Onkovirüsler	1
1.1.1.İnsan Papilloma Virüsü	2
1.2.Glial Fibriler Asidik Protein Biyobelirteci	6
1.3.Elektrokimya	9
1.3.1.Elektrokimyasal Tabakalar	10
1.3.2.Kütle Aktarım İşlemleri	11
1.3.3.Elektrokimyasal Akımlar	12
1.3.4.Elektroanalitik Yöntemler	13
1.3.4.1.Voltametri	15
1.3.4.2.Voltametride Kullanılan Uyarma Sinyalleri	15
1.3.4.2.1.Dönüşümlü Voltametri	16
1.3.4.2.2.Diferansiyel Puls Voltametri	17
1.3.4.2.3.Kare Dalga Voltametri	17
1.3.4.2.4.Doğrusal Taramalı Voltametri	18
1.3.4.3.Amperometri	18
1.3.5.Elektrokimyasal Hücre Bileşenleri	20
1.3.5.1.Çalışma (indikatör) Elektrotu	20
1.3.5.1.1.Civa Elektrot	21
1.3.5.1.2.Katı Elektrot	21
1.3.5.2.Referans Elektrot	23
1.3.5.3.Karşıt (Yardımcı) Elektrot	23
1.4.Biyosensörler	24
1.4.1.Biyosensörün Tarihi	24
1.4.2.Biyosensörün Yapısı	24
1.4.3.Biyolojik Algılayıcılar	25
1.4.3.1.Biyolojik Algılayıcı Çeşitlerine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması	26
1.4.3.1.1.Enzim Biyosensörleri	26
1.4.3.1.1.1.Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	26
1.4.3.1.2.İmmüno-sensörler	28
1.4.3.1.3.Nükleik Asit Biyosensörü	30
1.4.3.1.3.1.Oligonükleotid Prob Dizisinin Yüzeye İmmobilizasyonu	31
1.4.3.1.3.2.Sentetik Hedef DNA Dizisi ile Hibridizasyon	32
1.4.3.1.3.3.Spesifik Olmayan Bağlanmaların Engellenmesi	33
1.4.3.1.3.4.Enzim Etiketinin Etkisi	33

1.4.4.Manyetik Tabanlı Elektrokimyasal Biyosensörler	34
1.4.5.Biyosensör Validasyon Parametreleri	37
1.4.5.1.Duyarlılık	37
1.4.5.2.Seçicilik	37
1.4.5.3.Doğrusallık ve Doğrusal Aralık	38
1.4.5.4.Doğruluk	38
1.4.5.5.Teşhis Sınırı	39
1.4.5.6.Tayin Alt Sınırı	40
1.4.5.7.Raf Ömrü	40
1.4.5.8.Kesinlik	41
1.4.6.Yapılmış Elektrokimyasal Çalışmalar	42
1.4.6.1.GFAP Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar	42
1.4.6.2.HPV16 DNA Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar	46
2.GEREÇ VE YÖNTEM	49
2.1.Deneyde Kullanılan Elektrokimyasal Sistemler ve Laboratuvar Cihazları	49
2.2.Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	49
2.3.Deneylerde Kullanılan Çözeltiler	51
2.4.Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	51
2.5.Deneyde Kullanılan Manyetik Mikroboncuklar	53
2.6.Deneyde Kullanılan Oligonükleotid Dizileri	54
2.7.Deneyde Kullanılan Oligonükleotidlerin Hazırlanması	54
2.8.Deneyde Kullanılan Enzim Substratları	55
2.9.Nükleik Asit Biyosensör Geliştirme Basamakları	55
2.9.1.Manyetik Mikroboncukların Seçimi	55
2.9.2.Manyetik Mikroboncukların B&W Çözeltisi ile Yıkanması	56
2.9.3.Biotinlenmiş RNA Probunun Bağlanması	56
2.9.4.Manyetik Mikroboncukların PBS Çözeltisi ile Yıkanması	56
2.9.5.DNA Hibridizasyonu	56
2.9.6.Manyetik Mikroboncukların BB Çözeltisi ile Yıkanması	57
2.9.7.Antikoru Bağlanması	57
2.9.8.Manyetik Mikroboncukların BB Çözeltisi ile Yıkanması	57
2.9.9.Enzim Etiketinin Bağlanması	58
2.9.10.Manyetik Mikroboncukların BB Çözeltisi ile Yıkanması	58
2.9.11.Kronoamperometrik Ölçüm	58
2.10.GFAP İmmunosensör Geliştirme Basamakları	60
2.10.1.Karboksil Gruplu Manyetik Mikroboncukların MES Tamponu ile Yıkanması	61
2.10.2.Mikroboncukların Karboksil Gruplarının EDC/sulfo-NHS ile Aktifleştirme	61
2.10.3.MES Tamponu ile Yıkanması	61
2.10.4.Yakalama Antikoru Yüzeye Bağlanması	61
2.10.5.MES Tamponu ile Yıkanması	62
2.10.6.Etanolamin ile Yüzeyin Bloke Edilmesi	62
2.10.7.TRIS-HCl ve PBS Çözeltileri ile Yıkanması	62
2.10.8.GFAP Standartı ve Tespit Antikor Karışımının Yüzeye Bağlanması	62
2.10.9.BB Çözeltisi ile Yıkanması	63
2.10.10.Strep-HRP Çözeltisinin Yüzeye Bağlanması	63
2.10.11.BB Çözeltisi ile Yıkanması	63
2.10.12.Kronoamperometrik Ölçüm	63

2.11.Deneyde Kullanılan Örneklerin Hazırlanması	64
2.11.1.Ticari İnsan Serumunun Hazırlanması	64
2.11.2.Beyin Doku Protein Analizi	64
2.12.ELISA Yöntemi ile GFAP Analizi	65
3.BULGULAR	66
3.1.Hedef HPV16 DNA'sının Belirlenmesi için Nükleik Asit Bazlı Biyosensör Geliştirilmesine Dayalı Elde Edilen Bulgular	66
3.1.1.Fonksiyonlaştırılmış Manyetik Mikrobuncukların HPV16 DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	66
3.1.2.Biotinlenmiş RNA Prob Konsantrasyonunun HPV16 DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	67
3.1.3.Biotinlenmiş RNA Prob İmmobilizasyon Süresinin HPV16 DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	68
3.1.4.Hedef HPV 16 DNA Dizi İmmobilizasyon Süresinin Biyosensör Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	70
3.1.5.DNA/RNA Antikor Konsantrasyonunun DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	71
3.1.6.DNA/RNA Antikor İmmobilizasyon Süresinin HPV16 DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	72
3.1.7.Enzim Etiket Seçiminin İncelenmesi	73
3.1.8.AntiIgG-HRP ve Prot-A-Poly-HRP80 Enzim Etiketlerinin Karşılaştırılması	74
3.1.9.Enzim Etiket Konsantrasyonunun HPV16 DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	75
3.1.10.Enzim Etiketinin İmmobilizasyon Süresinin DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	76
3.1.11.Elektrokimyasal Nükleik Asit Biyosensör Protokolünün DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	78
3.1.12.Anti-DNA/RNA Antikoru ve Enzim Etiket Karışımı İmmobilizasyon Süresinin DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	79
3.1.13.Hedef DNA için Nükleik Asit Biyosensörü ile Yapılan Analiz Çalışmalarına İlişkin Bulgular	80
3.1.14.Hedef DNA için Nükleik Asit Biyosensörü ile Yapılan Stabilesinin Çalışmalarına İlişkin Bulgular	83
3.2.GFAP Tespiti için Antikor/Antijen Bazlı Biyosensör (İmmünosensör) Geliştirilmesine Dayalı Elde Edilen Bulgular	84
3.2.1.Cab Antikor Konsantrasyonunun GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	84
3.2.2.CAb Antikorumun İnkübasyon Süresinin GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	85
3.2.3.Protokollerin GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	86
3.2.4.Btn-DAb Konsantrasyonunun GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	88
3.2.5.[GFAP]+ [Btn-DAb] İnkübasyon Süresinin GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	89
3.2.6.Strep-HRP Seyreltme Oranının GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	90
3.2.7.Strep-HRP İnkübasyon Süresinin GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi	91
3.2.8.GFAP İçin İmmünosensör ile Yapılan Analiz Çalışmalarına İlişkin Bulgular	92
3.2.9.Stabilite Çalışması	93
3.2.10.Seçicilik Çalışması	94
3.2.11.Beyin Dokusu Protein Ekstraktının Analizi	96

3.2.12.Ticari Serum Örneğinde GFAP analizi	100
4.TARTIŞMA	102
5.SONUÇ ve ÖNERİLER	112
ÖZET	116
SUMMARY	117
KAYNAKLAR	118
ÖZGEÇMİŞ	118
HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.	



ÖNSÖZ

Tez kapsamında kanser ve nörolojik hastalıkların erken teşhisine yönelik immunosensör ve nükleik asit biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Rahim ağzı kanserine neden olan HPV'nin en yüksek riskli HPV16 tipine ait bir elektrokimyasal HPV16 DNA biyosensörü geliştirilmiştir. Ek olarak, nörolojik hastalıkların tespitinde kullanılan GFAP biyobelirtecinin immünosensörü geliştirilmiştir. Her iki biyosensör çalışmasında manyetik mikrobuncuklar kullanılmıştır ve hızlı, tekraredilebilir, ucuz ve duyarlı alternatif bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Akademik kariyerimde yönümü çizen, yüksek lisans ve doktora eğitimimin her aşamasında bilimsel desteğini, diğer zamanlarda da manevi desteğini benden esirgemeyen, çalışkanlığını her daim örnek aldığım ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışman hocam Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a en içten duygularımla sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

During research stay, I further knowledge and skills in nucleic acid-based biosensors and immunosensors. I also gained new knowledge and experience in the development of novel and competitive electrochemical biosensing platforms for the determination of clinically relevant analytes as a part of my intended studies at GEBE research group.

I am very grateful to Prof. José M. Pingarrón and my co-supervisor, Dr. Susana Campuzano, for accepting me into their research group. I feel very honored to do research under the supervision of Dr. Susana Campuzano. I am very grateful for all the support that Dr. Susana Campuzano has given me during my stay in the GEBE research group. I would like to thank Dr. Susana Campuzano and Dr. Maria Gamella for teaching their valuable knowledge and sharing their valuable time with me. In addition, I would like to thank Dr. María Pedrero, Dr. Veronica Serafin other members of the GEBE group for their kind hosting and support.

Kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak çalışmalarımın her safhasında bana destek veren değerli hocam Prof. Dr. Bengi USLU'ya teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Analitik Kimya Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Nevin ERK'e, Anabilim dalımızın birbirinden değerli öğretim üyelerine ve araştırma görevlilerine destekleri nedeniyle teşekkür ederim.

Doktora öğrenimime değerli katkılar sağlayan ve vizyonumu arttıran Prof. Dr. Frieder SCHELLER, Prof. Dr. Ulla WOLLENBERGER, Doç. Dr. Burcu DOĞAN-TOPAL, Doç. Dr. Nurgül KARADAŞ-BAKIRHAN, Doç. Dr. Mehmet GÜMÜŞTAŞ, Doç. Dr. Sevinç KURBANOĞLU, Doç. Dr. M. Gökhan ÇAĞLAYAN'a, Doç. Dr. Aysu YARMAN, Doç. Dr. Mehmet Emin ÇORMAN, Dr. Öğretim Üyesi Mehmet Altay ÜNAL, Dr. Burçin BOZAL-PALABIYIK, Dr. Leyla KARADURMUŞ, sevgili S. İrem KAYA ve Ahmet ÇETİNKAYA ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım sırasında bana yurtdışı burs desteği veren TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (BİDEB) teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarına proje desteği ile katkıda bulunan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Beni her zaman destekleyen, sevincimi ve üzüntümü paylaştığım Madrid'de başlayan dostluğumuzun sonsuza kadar devam edeceğine inandığım canım dostum Emel TÜTEN SEVİM'e teşekkür ederim.

Doktora tez süresince desteğini, ilgisini ve sevgisini eksik etmeyen erkek arkadaşım Mehmet Olcay AKYILDIZ'a, bana inandığı, güvendiği ve yalnız bırakmadığı için çok teşekkür ederim.

Son olarak, beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olan, tüm hayatım boyunca sonsuz sevgileri ile ideallerimin gerçekleşmesi için bana her zaman destek olan, inanan ve güvenen, her zaman ailem oldukları için gurur duyduğum canım annem Gülbin ÖZÇELİKAY, babam Arif Tanju ÖZÇELİKAY ve kardeşim Barış ÖZÇELİKAY'a sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AD	Alzheimer hastalığı
B&W	Bağlama yıkama çözeltisi
BB	Yüzeyi bloke eden tampon
BOS	Beyin omurilik sıvısı
BSA	Sığır serum albümin
BSS	Bağlı standart sapma
Btn-DAb	Biyotinlenmiş koyun anti-insan GFAP tayin antikor
CAb	Fare anti-insan GFAP yakalama antikor
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
DIG	Digoksinin
DNA	Deoksirübo nükleik asit
DPV	Diferansiyel puls voltametri
DSP	Ditiyobis (süksinimid propiyonat)
Ea	Etanolamin
EBV	Epstein-Barr virüs
EDC	1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) karbodiimid
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EIS	Elektrokimyasal empedans yöntemi
GFAP	Rekombinant insan Glial Fibriler Asidik Proteini
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
Hb	Hemoglobin
HBV	Hepatit B virüs
HCl	Hidroklorik asit
HCV	Hepatit C virüs
HHV-8	İnsan Uçuk Virüsü
HIE	Hipoksik-iskemik ensefalopati
HIV	İnsan bağışıklık eksikliği virüsü
HPV	İnsan Papilloma Virüs
HQ	Hidrokinon
HRP	Horseradish peroksidaz
HSA	İnsan Serum Albumin

HTLV-1	İnsan Lenfotropik virüs-1
IgG	İmmünoglobülin G
KCl	Potasyum klorür
KH ₂ PO ₄	Monopotasyum fosfat
KSHV	Kaposi Sarcoma–Herpes virüsü
LAMP	Döngü aracılı amplifikasyonu
m	Eğim
MB	Manyetik mikrobuncuk
MB-COOH	Karboksil ile fonksiyonlaştırılmış manyetik boncuklar
MB-Neut	Neutravidin ile fonksiyonlaştırılmış manyetik boncuklar
MB-Strep	Streptavidin ile fonksiyonlaştırılmış manyetik boncuklar
MCI	Hafif bilişsel bozukluk
MCV	Merkel Hücresi Polyomavirus
MES	2-(N-morfin) etanosülfonik asit
MIP	Baskılanmış polimerik film
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MWCNT	Çok duvarlı karbon nanotüp
Na ₂ HPO ₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	Monobazik sodyum fosfat
NDD	Nörodejeneratif bozukluklar
NHS	N-hidroksisüksinimid
PBS	Fosfat tampon tuzu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
Prot A-HRP	Protein A- Horseradish Peroksidaz
Prot A-PolyHRP-40	Protein A- Poly-Horseradish Peroksidaz -40
Prot A-PolyHRP-80	Protein A- Poly-Horseradish Peroksidaz -80
ProtA	Protein A
ProtG	Protein G
RNA	Ribonükleik asit
S100B	S100 kalsiyum bağlayıcı protein B
SPCE	Perde baskılı karbon elektrot
ss	Standart Sapma
Strep-HRP	Streptavidin- Horseradish Peroksidaz
TAS	Tayin alt sınırı

TBI	Travmatik beyin hasarı
TRIS-HCl	Tris hidroksimetil aminometan hidroklorür
TS	Teşhis sınırı
VD	Vasküler demans
VNW	Dikey nanotel



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. HPV genomun yapısı	4
Şekil 1.2. Elektrokimyasal tabakaların şematik gösterimi	10
Şekil 1.3. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması	14
Şekil 1.4. Biyosensörün temel bileşenleri	25
Şekil 1.5. Fonksiyonelleşmiş manyetik mikrobuncuk çeşitleri	36
Şekil 2.1. GFAP immünosensör şematik gösterimi	60
Şekil 3.1. Manyetik mikrobuncukların kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etkisinin karşılaştırma grafiği	67
Şekil 3.2. B-Cp-RNA prob konsantrasyonunun kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği	68
Şekil 3.3. B-Cp-RNA prob immobilizasyon süresinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği	69
Şekil 3.4. Hedef HPV16 DNA immobilizasyon süresinin biyosensör sinyaline etki grafiği	71
Şekil 3.5. DNA/RNA antikör konsantrasyonunun kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.	72
Şekil 3.6. DNA/RNA antikör immobilizasyon süresinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.	73
Şekil 3.7. Farklı enzim etiketlerinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.	74
Şekil 3.8. AntiIgG-HRP ve Prot-A-Poly-HRP80 enzim etiketleri ile geliştirilen nükleik asit biyosensörlerin kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılması.	75
Şekil 3.9. AntiIgG-HRP seyrelme oranlarının kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.	76
Şekil 3.10. AntiIgG-HRP inkübasyon süresinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.	77
Şekil 3.11. Nükleik asit biyosensör protokollerinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.	79
Şekil 3.12. DNA/RNA antikoru ve enzim etiket karışımının inkübasyon süresinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.	80
Şekil 3.13. Hedef HPV 16 DNA için elde edilen kalibrasyon doğrusu.	81
Şekil 3.14. Farklı konsantrasyonlarda Hedef HPV 16 DNA için elde edilen amperogramlar.	82
Şekil 3.15. Geliştirilen nükleik asit biyosensörün stabilitesi.	83
Şekil 3.16. CAb antikör konsantrasyonunun kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği...	85
Şekil 3.17. CAb antikör inkübasyon süresinin kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.	86
Şekil 3.18. İmmünosensör protokollerinin kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği..	87
Şekil 3.19. btn-DAb antikör konsantrasyonunun kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.	88
Şekil 3.20. [GFAP]+ [Btn-Dab] İnkübasyon Süresinin kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.	89
Şekil 3.21. Strep-HRP seyreltme oranının kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği. .	90
Şekil 3.22. Strep-HRP İnkübasyon Süresinin kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.	91

Şekil 3.23. GFAP biyobelirteci için elde edilen kalibrasyon doğrusu ve farklı konsantrasyonlarda GFAP için elde edilen amperogramlar	93
Şekil 3.24. GFAP immunosensörü için stabilite çalışması.	94
Şekil 3.25. Geliştirilen immünoplatformun amperometrik cevapları ((A) GFAP standart (B) 10 mg mL ⁻¹ BSA, (C) 10 ng mL ⁻¹ S100β, (D) 5 mg mL ⁻¹ HSA, (E) 0,01 mg mL ⁻¹ , (F) 0,1 mg mL ⁻¹ , (G) 1,0 mg mL ⁻¹ hlgG ve (H) 5 mg mL ⁻¹ Hb.)	95
Şekil 3.26. Beyin doku miktarının kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.	97
Şekil 3.27. Kontrol grubu (turuncu) ve AD V havuzu (siyah)’ a ait amperogramları	98
Şekil 3.28. AD hastalarından ve AD havuzundan alınan örneklerdeki GFAP seviyeleri	98
Şekil 3.29. ELISA ve immunosensör korelasyon grafiği.	100
Şekil 3.30. Ticari Serumda GFAP biyobelirteçi için elde edilen kalibrasyon doğrusu	101



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Kansere neden olan virüsler ve kanser türleri.	2
Çizelge 1.2. Voltametrde kullanılan uyarma sinyalleri.	16
Çizelge 1.3. Diğer tayin yöntemleri ve biyosensör karşılaştırması.	43
Çizelge 1.4. GFAP tayini için geliştirilen biyosensör / sensör tipleri ve performansları.	46
Çizelge 2.1. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.	50
Çizelge 2.2. Deneyde kullanılan GFAP ELISA kit içerisindeki kimyasal maddeler	50
Çizelge 2.3. Modifikasyon sırasında kullanılan çeşitli manyetik mikrobuncuklar	54
Çizelge 2.4. Oligonükleotid dizileri.	54
Çizelge 2.5. Enzim Substratları.	55
Çizelge 3.1. Nükleik asit biyosensör protokollerinin DNA sinyaline etkisinin incelenmesi.	78
Çizelge 3.2. Hedef HPV 16 DNA için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri.	82
Çizelge 3.3. İmmünosensör protokollerinin GFAP sinyaline etkisinin incelenmesi.	87
Çizelge 3.4. Test edilen çalışma aralığı ve seçilen değer çizelgesi.	92
Çizelge 3.5. MB tabanlı immunoplatform ve ELISA ile elde edilen veriler.	99

1. GİRİŞ

1.1. Onkovirüsler

Kanser, dünyada yaşamı tehdit eden en ölümcül hastalıklardan biridir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 2018 yılında dünyada yaklaşık 18,1 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkarken, 9,6 milyon kişi de kanserden yaşamını yitirmiştir (McGuire, 2016). Kanser, vücudumuzda çeşitli bölgelerdeki (organ veya doku) hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren bir hastalık grubudur. Kanser hücreleri, kontrol dışında büyümelerine ve istilacı hale gelmelerine imkan tanıyan birçok yolla normal hücrelerden farklılık gösterirler. Kanserli hücreler, Deoksirübo nükleik asit (DNA) iplikçisindeki hasardan dolayı oluşur. Hücrenin normal yaşam siklusunda DNA hasarı olsa da hücre ya bunu onarır ya da ölür. Kanserli hücrelerde hasarlanmış DNA onarılamaz ve kontrolsüz çoğalma başlar. DNA, çevresel etkenler (kimyasallar, virüsler, tütün ürünleri veya aşırı güneş ışını vs gibi) nedeniyle hasar görebilir.

İnsanlarda görülen kanserlerin yaklaşık %40'ında tümör virüsleri etkindir. Tümör virüsleri başlıca Ribonükleik asit (RNA) ve DNA virüsleri olmak üzere iki kategoriye ayrılırlar. Onkovirüsler veya tümör virüsleri, kansere neden olabilen virüsler için kullanılan genel bir terimdir. Virüslerin kanserojen etkilerini nasıl oluşturduklarına dair mekanizmalar kesin olarak bilinmemekle beraber, deney hayvanlarından elde edilen verilere göre şu şekilde açıklanmaktadır. Onkovirüsler, hücre üreme döngüsünü kontrol eden uyarıcı ya da baskılayıcı genlerden birinin kopyasına sahiptirler. Kanser ile ilişkisi, bu genlerden herhangi birinin ekspresyonunu değiştirmelerine bağlıdır (Toyoshima, 1989). DNA virüsleri doğal olarak konakladıkları hücreye girdiğinde çoğalarak hücre ölümüne sebep olur. Ancak doğal olarak konaklamadıkları hücrelere girdiklerinde kendine benzer virüsleri oluşturamazlar. Koşullar uygun ise, hücrelerin çekirdeğinde bulunan genetik yapıya katılır ve birlikte çoğalırlar. Bu şekilde değişime uğrayan hücre, tümör hücresi özelliği

kazanır. Onkojenik RNA virüsleri ise, ters transkriptaz enzimi (RNA'dan DNA yapan enzim) içerirler ve böylece kendi RNA'larının DNA örneğini çıkarırlar.

Çizelge 1.1. Kansere neden olan virüsler ve kanser türleri.

Kansere Neden Olan Başlıca Virüsler	Kanser Türü
HPV	Rahim ağzı kanseri
EBV	Burkitt lenfoma
HBV ve HCV	Karaciğer kanseri
HIV	Kaposi sarkomu, Agresif B hücreli lenfoma, Rahim ağzı kanseri
HHV-8 KSHV	Kaposi sarkomu Castleman hastalığı
MCV	Cilt kanseri
HTLV-1	Lösemi/Lenfoma

Çeşitli kansere neden olan virüslerin başında insan papilloma virüs (HPV), Epstein-Barr virüs (EBV), hepatitis B virüs (HBV) ve hepatitis C virüs (HCV), insan bağışıklık eksikliği virüsü (HIV), insan uçuk virüsü (HHV-8), insan lenfotropik virüs-1 (HTLV-1), merkel hücresi polyomavirus (MCV) gelmektedir (Mui ve ark., 2017). Kansere neden olan virüsler ve kanser türleri Çizelge 1.1 'de verilmiştir.

1.1.1. İnsan Papilloma Virüsü

İnsan papilloma virüsü, cinsel yolla bulaşan en yaygın enfeksiyon hastalıklarının başında gelmektedir (Wang, Sparano, and Palefsky, 2017). Kadın ve erkeklerin genital bölgelerinde kalıcı enfeksiyon sonucu malign değişiklikler gözlenmektedir. Deri ve mukoza hücreleri enfekte etmektedir. Ayrıca, vajina, vulva, penis ve anüs kanserine de yol açtığı; baş ve boyun bölgesi, göz konjunktivası, kulak kanalları, nazal sinüsler, oral kavite gibi diğer bölgelere de bulaşabildiği bilinmektedir (Satterwhite ve ark., 2013).

Alphapapillomavirüs (*Alfa*-PV) tipi HPV'ler oral ve genital mukoza yüzeylerini enfekte ederken; Betapapillomavirüs (*Beta*-PV), Gammapapillomavirüs (*Gama*-PV), Mupapillomavirüs (*Mu*-PV) ve Nupapillomavirüs (*Nu*-PV) tipine ait HPV'ler genital olmayan mukoza ve cildi enfekte ederler (Bernard ve ark., 2010). Özellikle rahim ağzı (serviks) kanseri, genç kadınları etkileyen ciddi bir sorun haline gelmiştir (Chow ve ark., 2010). Dünya'da genç kadınlarda yaygın olarak görülen ikinci kanser hastalığı olan rahim ağzı kanseri, gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek sıklıkta görülmekte ve ölümlere neden olmaktadır (Woodman ve ark., 2007).

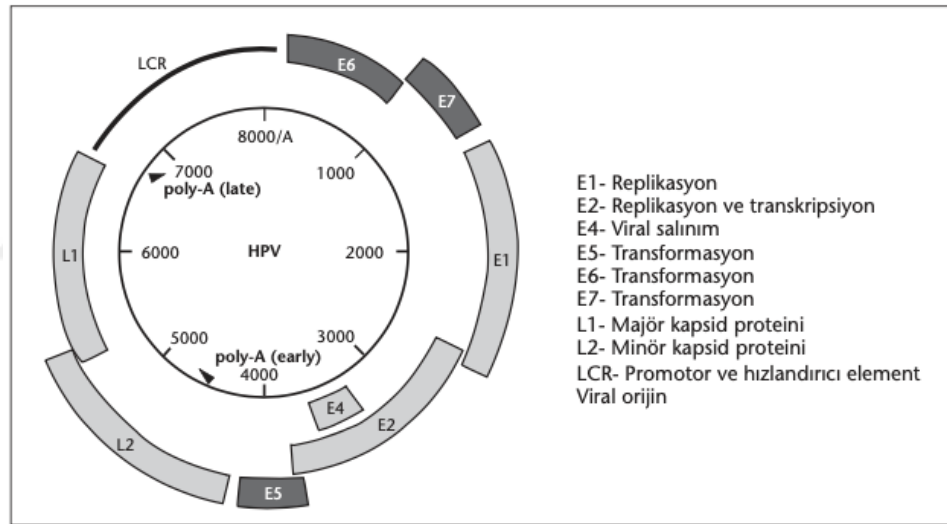
Kanserli hücreleri tetikleme açısından ve bulaşma eğilimi gösterdiği vücut bölgesine göre HPV'ler sınıflandırılmaktadır. Düşük riskli HPV'ler genital siğillere ve yüksek riskli HPV'ler ise rahim ağzı, vulva, anüs gibi genital bölgedeki hücrelerin anormal değişikliği sonucu kansere neden olmaktadır.

Günümüzde 200'den fazla papillomavirüs genotipi tanımlanmış olup, yaklaşık olarak 120 tipi insanlardan izole edilmiştir (Bernard ve ark., 2010). Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC), yüksek riskli HPV tipini (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 tipi) (Harari ve ark., 2014); düşük riskli HPV tipini ise anogenital siğil ve lezyonlarla ilişkili olan HPV 6 ve 11 olduğunu bildirmiştir (Bernard ve ark., 2010).

Yüksek riskli HPV 16 ve 18 rahim ağzı kanser olgularının %99'undan sorumlu olduğu en sık görülen genotiplerdir (Bernard ve ark., 2010). Yapılan çalışmalar sonucunda Hausen ve ark 1976'da rahim ağzı kanserinin Papillomavirüs ile ilişkisini tespit etmiş ve 1983'te %50-60'ında HPV 16 genotipi, 1984'te %10-12'sinde ise HPV 18 genotipini saptamışlardır (Gissmann ve ark., 1977). Hausen'in bu çalışmaları kendisine 2008 yılında Nobel Tıp Ödülünü kazandırmış ve kanser önleyici sentetik aşılarda yapılandırılmasına da öncülük etmiştir. Rahim ağzı kanseri ile birlikte, vulva, anüs, orofaringeal kanserlerine de sebep olan HPV 16 ve 18 genotipi virüslerinin aşı çalışmaları da hız kazanmıştır (Lindenbach ve ark., 2007).

Memeli, balık, sürüngen, kuş gibi farklı omurgalıları enfekte edebilen papillomavirüs cinsi, Papillomaviridae ailesi içinde sınıflandırılır. HPV, yaklaşık 7-8 kb uzunluğunda, çembersel çift sarmallı DNA yapısında, 50-60 nm çapında olan, 72 kapsomerli zarfsız, ikosahedral simetrik bir genoma sahiptir (Boscolo-Rizzo ve ark., 2013). Çift sarmallı HPV DNA'sının yalnızca bir ipliği, viral gen ekspresyonu için birçok gene ait bilgiyi taşıyan polisistronik mRNA transkriptini oluşturur.

HPV genomu fonksiyonel olarak 3 bölgeye ayrılır: replikasyonundan ve hücre transformasyonundan sorumlu proteinleri şifreleyen bir “erken” bölgesi (E1, E2 E4, E5, E6, E7); viral kapsid proteinleri şifreleyen bir “Geç” bölgesi (L1 ve L2) ve şifre olmayan “non-coding region (NCR)” bölge olmak üzere üç bölgeden oluşur.



Şekil 1.1. HPV genomun yapısı.

HPV genomunun yapısı Şekil 1.1’de verilmiştir. Erken gen bölgesindeki E6 ve E7 viral genlerin transkripsiyonunu düzenlerken, geç gen bölgesindeki L1, majör kapsid proteinini ve L2 ise minör kapsid proteinini kodlamaktadır. Erken gen bölgesinde yer alan ve bazı HPV tiplerinde bulunan E3 ve E8, son yıllarda keşfedilmiştir (Berg, 2010). E8’in E2 bölgesinin delesyonu sırasında ortaya çıktığı düşünülmekte olup reseptör protein replikasyonundan sorumludur (Sanclemente ve ark., 2002). HPV genotipi ve tip sayı sistemi, L1 protein dizileri arasındaki biyolojik homolojilerine göre belirlenmiştir.

HPV genotipler, 1970’li yıllarda bilim adamlarının papillomavirüs genomunu klonlamayı başarmaları ile ortaya çıkmıştır. Böylece yüksek riskli HPV tipi ile rahim ağzı kanser arasında güçlü bir ilişki tespit edilmiştir. Bu nedenle HPV DNA’yı tespit edilip belirlemesinin klinik ve epidemiyolojik açıdan önemi açıkça görülmektedir. Yüksek riskli HPV tipleriyle oluşan enfeksiyonların tespit edilememesi, uygun tedavinin yapılmaması gibi durumlarda, enfeksiyon- özellikle genital bölgede- invaziv karsinoma kadar ilerleyebilir. Rahim ağzından alınan sürüntü örneklerinde ileri ve orta derecede onkojenik risk taşıyan HPV tiplerinin DNA’sının tespit edilmesi, rahim ağzı kanserinin tahmininde büyük önem taşımaktadır. Bu durum rahim ağzı kanser taramasında ve prekürsör lezyonların tespitinde, HPV DNA testlerinin sitolojiye ilaveten yardımcı bir tarama testi olarak veya PAP (Papanicolau) Smear testi yerine alternatif olarak tek başına bir tarama testi olarak kullanılmasına yol açmıştır.

Kanser taramalarında PAP Smear testi oldukça önemlidir ama rahim ağzı lezyonlarında klinik olarak spesifikliğı oldukça düşüktür ve hatalı sonuç verme olasılığı yüksektir. Kolposkopik biyopsi rahim ağzı lezyonlarının %33-50’sini tanı veya örnekleme hatalarından dolayı yanlış sonuç verebilir. Bu sebeple moleküler tanı yöntemlerinin uygulanmasına yüksek dereceli lezyonların ve karsinomların tespiti açısından gereklidir. Böylece, sitolojinin duyarlılığı rahim ağzı bölgede artırılabilir ve yanlış sonuçlar en aza indirgenmiş olur.

Rahim ağzı kanser tarama programları, bu kanserin görülme sıklığını ve ölüm oranlarını azaltmak için son derece önemlidir. Ülkemizde de PAP smear, HPV DNA taraması gibi çeşitli yöntemlerle rahim ağzı kanser tarama programlarının geliştirilmesi ve taramaların toplumun geneline yayılması amaçlanmıştır (Aydoğdu ve ark., 2018). Erken tanıda kullanılan PAP smear testi hastaya zarar vermeden, maliyeti düşük, ayrıca tedavi yükünü, morbidite ve mortaliteyi azaltan bir testtir. Fakat, HPV DNA’sının saptanmasının, PAP ile karşılaştırıldığında daha yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip olduğu görülmektedir. Bu sınırlamalar, yeni kullanılabilir teknolojiler için araştırmacıları nükleik asit biyosensöre yönlendirmiştir.

1.2.Glial Fibriler Asidik Protein Biyobelirteci

ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri biyobelirteçleri “nesnel olarak ölçülebilen ve normal veya hastalık süreçlerinin göstergeleri ve terapötik müdahaleye farmakolojik tepkiler olarak değerlendirilebilen moleküller” olarak tanımlamıştır (Atkinson, ve ark., 2001).

Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP); astrositlerde bulunan ve astrositlerin fizyolojik ve patolojik durumları hakkında bilgi veren bir proteindir (Florio ve ark., 2010). Serumdaki GFAP konsantrasyonundaki değişiklikler hem serebral dokudaki astrosit değişikliklerini hem de kan beyin bariyerindeki harabiyeti gösterirler. Hipoksik-iskemik yenidoğan bebeklerde yapılan bir çalışmada periventriküler beyaz cevherdeki astrositlerin hem hacimlerinde hem sayılarında hem de GFAP düzeylerinde azalma görülmüş ve hipoksi-iskeminin astrosit harabiyeti yaparak hücre ölümünü arttırdığı belirtilmiştir (Sullivan ve ark., 2010). Serum GFAP düzeylerindeki artışın hipoksik-iskemik ensefalopati (HIE)’nin ağırlığı ile yakın ilişkide olduğu bildirilmiştir. Doğumda yüksek serum GFAP konsantrasyonu sebat ediyorsa bu ağır veya orta derecede neonatal HIE olduğunun düşündürmektedir. Serum GFAP konsantrasyonu $>0,08 \text{ pg mL}^{-1}$ ise anormal prognoz için pozitif prediktif değeri %100 dür (Chalak ve ark., 2014). Çalışmalara göre; neonatal HIE tanısı için GFAP düzeyinin eşik değeri $0,007 \text{ ng mL}^{-1}$ olarak alındığında duyarlılık ve özgüllük %77 ve %78 olarak belirtilmiştir (Jiang ve ark., 2014). Neonatal HIE takibinde; klinik pratikte doğumdan sonraki ilk 96 saatte serum GFAP konsantrasyonundaki değişikliklerin bilinmesi bazal gangliyon ve beyaz cevher harabiyetinin ve ilerideki motor gelişimin nasıl olacağının belirlenmesinde de önemlidir. Böyle olgularda doktorlar en erken dönemde hipotermi tedavisini ve diğer nöro-koruyucu tedavileri başlamaktan çekinmeyeceklerdir. Ennen ve arkadaşları; MRI normal HIE’li bebeklerde, HIE ve MRI anormallikleri olan bebeklerde ve sağlıklı kontrollerde doğumdan bir hafta sonra serumda GFAP düzeylerine bakmışlar; sağlam kontrol bebeklerin değerleri ile kıyaslandığında en yüksek düzeyler HIE ve MRI bozuk olanlarda, ikinci yüksek MRI normal HIE’li bebeklerde bulunmuştur. Bu çalışma doğumdan sonraki ilk bir haftada artmış serum GFAP düzeylerinin beyin harabiyetinin derecesi yanı sıra bu hastaların

tedavilerinin sonuçlarının da takip edilmesini sağlayacağını göstermiştir (Ennen ve ark., 2011). Tüm bu araştırmaların sonuçları GFAP'ın neonatal HIE de oldukça önemli bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir.

Kafa içinde kanama olduğunu gösteren biyobelirteç verileri çok nadirdir ve genelde glial hücrelerden daha çok salınan GFAP gibi proteinleri içerir. GFAP astroglial hücrelerden salınan, 50 kDa ağırlığında intraselüler bir proteindir. Yapı ve hücre göçünden sorumlu filament yapıda beyin dokusuna spesifik bir proteindir. GFAP, sadece 50-52 kDa büyüklüğündeki çözünmüş maddelerin geçebildiği kan-beyin bariyerinin korunmasına yardımcı olur. Bu etkenlere bağlı olarak, GFAP, önerilen bir biyolojik belirteç olarak merkezi sinir sistemi hastalıklarının çalışmalarında çok dikkat çekmektedir (Missler ve ark., 1999). Eng ve arkadaşları tarafından 1969 yılında astrositlerin karakterizasyonu ve izolasyon çalışmaları yapılmış ve astrositler ayrı bir yapısal protein olan GFAP ile saptanmıştır (Bignami ve ark., 1972).

GFAP, astrositlerde bulunan ana yapısal tip III ara filament proteinidir ve astrosit proliferasyonun, astrogliosis'in bir göstergesidir. Orta filament (IF) III proteini olarak, GFAP, periferik sinir sistemi, mide-bağırsak hücreleri ve merkezi sinir sistemindeki astrositlerdeki miyelinsiz Schwann hücrelerinde bulunurlar (Wang ve ark., 2017). GFAP, hücre iskeletinin oluşumu, mitoz, sinyal iletimi, KBB yapısının korunması ve hücre hareketlerinin sağlanmasında önemlidir. Ayrıca, bu protein sinir hücre aksonlarının yalıtımını sağlayan miyelinin üretim ve korunmasını sağlayan astrositlerin diğer hücrelerle etkileşiminde önemli bir rol oynar. Biyolojik sıvıya GFAP'ın ve GFAP'ın parçalanma ürününün hızlı salımı, beyin travması, omurilik yaralamaları ve inmeden sonra gözlenmiştir. GFAP'ın miyelinizasyonun devamlılığında da rol oynadığı düşünülmektedir (Sugaya-Fukasawa ve ark., 2011).

Nörodejeneratif bozuklukların (NDD) doğru teşhisi, yoğun bir araştırma konusudur. NDD arasında, Alzheimer hastalığı (AD) ve vasküler demans (VD), yaşlılar arasında bilişsel bozulmanın yaygın nedenleridir. Histopatolojik olarak AD,

hücre dışı amiloid- β (A β) plak oluşumu ve beyinde anormal fosforile tau proteini üreten hücre içi nöronal yumakların varlığı ile tanımlanabilir (Osborn, Kamphuis, Wadman, and Hol, 2016). Bununla birlikte, AD ve VD arasındaki paralel sonuçlar, AD'nin klasik nöropatolojik değişiklikleri (plaklar ve yumaklar) VD'de gözlemlenebilir olduğunu doğrulamıştır (MacLin ve ark., 2019).

Pozitron emisyon tomografi (PET) teknolojisi ve beyin omurilik sıvısı (BOS) analizi kullanılarak belirlenmiş biyobelirteçlerin tanısal doğrulanmasına yardımcı olmak adına ölüm sonrası parametreler klinik açıdan değerlendirilir (Jack ve ark., 2018)(Chatterjee ve ark., 2021). Ayrıca PET görüntülemenin maliyeti ve lomber ponksiyonun invazivliği bu yöntemlerin standart klinik uygulamada kullanılmasını zorlaştırmaktadır (Reiman ve ark., 2012; Cicognola ve ark., 2021). Bu anlamda, kan bazlı biyobelirteçlerin daha az zarar verici doku oluşumları nedeniyle, ilk klinik tanı testleri için farklı bir alternatiftir. Fosforile edilmiş tau türleri (Janelidze ve ark., 2020; Lantero ve ark., 2020) ve A β 42/40 oranı (Nakamura ve ark., 2018), AD'yi saptamak için umut verici kan biyobelirteçleri olsa da, diğer kan biyobelirteçleri demansın teşhisinde elde edilen sonucun doğruluk oranını artırmaya yardımcı olabilir.

Nörodejeneratif rahatsızlıklar, reaktif astrogliosis olarak bilinen bir süreç olan astrositlerin, moleküler, morfolojik ve fonksiyonel yeniden şekillenmesi ile ilgilidir (Escartin ve ark., 2021). Astrositler, sinaps modülasyonu, homeostaz, besinlerin taşınması, beyin sinyalleri ve yapısal destek ile ilişkili glial hücrelerdir (Osborn ve ark., 2016).

Bir tür beyin hasarı meydana geldiğinde, astroglial hücrelerinin belirli belirteçlerin ifadesini yükselterek beyin hasarını kontrol altına almaya çalışan astrogliosis adı verilen bir reaksiyonu gerçekleştirir. Astrogliosis, AD, VD ve frontotemporal demans gibi beyin bozukluklarında yaygın bir nöropatolojik bulgudur (Wallin ve ark., 1996). Astrogliosis genellikle, astrositlerin ara filamentlerinin ana protein bileşeni olan (Escartin ve ark., 2021) ve beyin dokusuna özgü olan (Eng ve ark., 2000) yüksek seviyelerde GFAP ekspresyonu ile kendini gösterir. Sadece

astrositlerin ölümünden sonra interstisyel sıvıya salınır (Pelinka ve ark., 2004) ve ardından kan-beyin bariyerini geçerek kan dolaşımına girer (Huebschmann ve ark., 2020). GFAP, hastanın lomber ponksiyonundan sonra BOS'ta genellikle ölçülen bir biyobelirteçtir ve AD ve VD hastalarında yükseldiği bulunmuştur (Petzold ve ark., 2004; Bellaver ve ark., 2021). Kan plazmasındaki GFAP ölçümü, etkilenen kişinin içinde olabileceği AD aşamasının doğru ve daha az invaziv olarak tanımlanması için BOS'tan GFAP ölçümünden daha iyi sonuç verir. Plazmadaki GFAP konsantrasyonunun AD'nin erken evresinde tespit edildiği ve hastalığın ilerlemesi sırasında arttığı gözlenmiştir bu da onu erken evre ve minimal invaziv AD teşhisi için özellikle umut verici bir biyobelirteç yapmıştır (Benedet ve ark., 2021; Chatterjee ve ark., 2021).

ND biyobelirteçleri tespit etmek için mevcut yöntemler arasında, biyosensörler, özellikle elektrokimyasal biyosensörler, yüksek hassasiyetleri, düşük maliyetleri, basit kullanımları, hızlı tepkileri ve sahada operasyonları nedeniyle bir alternatif analiz yöntemi oluşturmaktadır. Şimdiye kadar GFAP tayininde kullanılan elektrokimyasal immünosensörler (Arya ve ark., 2013; Khetani ve ark., 2018; González-López ve ark., 2020; Timilsina ve ark., 2021), geleneksel yöntem olarak kullanılan yöntemlere (enzim bağlı immünosorbent analizi (ELISA), immunohistokimya ve western blot analizi) uyumlu bir alternatif olduğunu kanıtlamıştır. Geleneksel yöntemlerde pahalı cihaz, uzman kullanım sınırlaması ve taşıma zorluğu gibi sorunlar yaşanmaktadır (Petzold ve ark., 2004; Weigel ve ark., 2010; Vos ve ark., 2010; Papa ve ark., 2012; Simani ve ark., 2018).

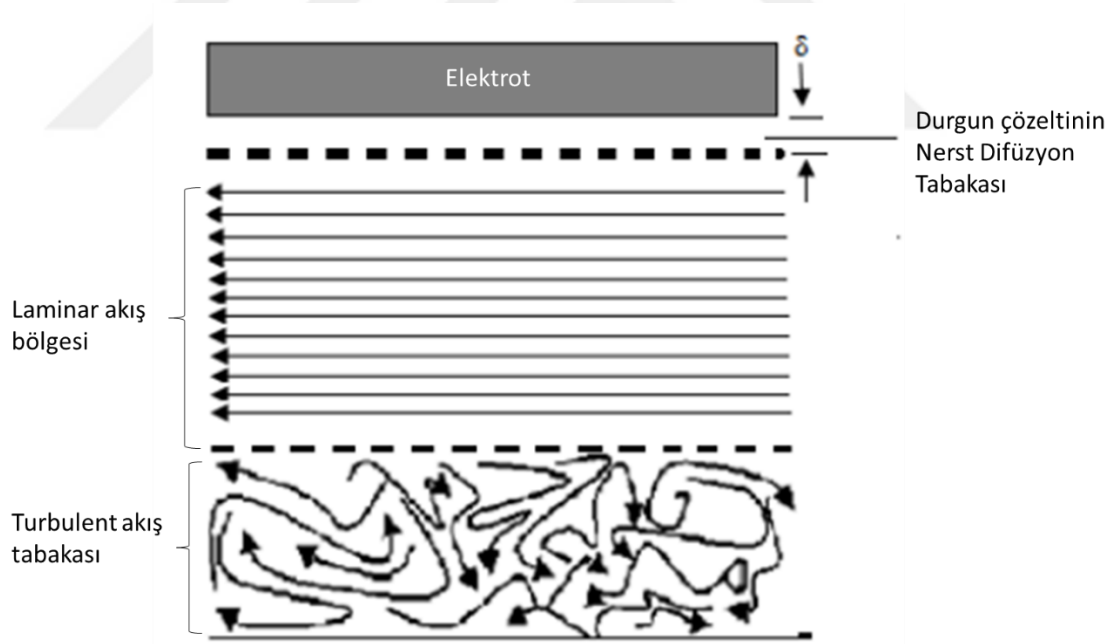
1.3.Elektrokimya

Elektrik enerjisi ile kimyasal enerji arasındaki dönüşüm sonucunda fiziksel değişiklikleri inceleyen bilim dalına elektrokimya denir. Elektrokimya bilim dalının keşfi, 1793 yılında Alessandro Volta'nın elektrik bilimi ve kimya bilimi arasındaki ilişkinin araştırmasına dayanmaktadır. Tuzlu su çözeltisi içerisinde uç kısımlarında bulunan çinko ve bakır metal elektrotlar arasındaki kimyasal tepkime sonucunda

elektrik üretilmiştir. Böylece volt, ilk elektrokimyasal hücreyi geliştiren bilim adamı olmuştur (Kelter ve ark., 2019).

1.3.1. Elektrokimyasal Tabakalar

Elektrokimyasal çalışmalarda, elektron alışverişini oluşmasını sağlayan heterojen tabakalar meydana gelir. Bu heterojen tabakalar, çözeltinin karıştırılmasıyla oluşur. Karıştırma hızına bağlı olarak iki farklı akış alanı oluşur. Karıştırma hızı daha az olan bölge laminar akış bölge iken, karıştırma hızı daha yüksek olan bölgede çalkantılı akış bölgesi oluşur. Laminar akış bölgesinde akış daha yumuşak düzgündür fakat çalkantılı akış bölgesinde akış dalgalı ve düzensizdir. Laminar akış bölgesi, elektrokimyasal hücre içerisinde elektrot yüzeyine daha yakındır. Heterojen tabaka sistemleri Şekil 1.2’de gösterilmiştir (Skoog ve ark., 1998).



Şekil 1.2. Elektrokimyasal tabakaların şematik gösterimi.

Elektrot yüzeyinden δ cm uzaklıktaki akış bölgesi arasında “Nernst difüzyon tabakası” bölgesi oluşmaktadır. Bu bölgede, akış hızı neredeyse sıfırdır, bu bölgede durgun ve sabit bir çözelti tabakası oluşur. Tabaka kalınlığı yaklaşık 10^{-2} - 10^{-3} cm

arasındadır. Kütle aktarım, bu tabakada difüzyon veya göç yoluyla oluşur (Bard ve ark., 2001).

1.3.2. Kütle Aktarım İşlemleri

Elektrokimyasal hücre içerisinde analiz edilecek bir maddenin, bir yerden başka bir yere hareket etmesi sırasında aktarım mekanizmasına dayanmaktadır. Bu mekanizmalar 3 farklı şekilde gerçekleşir (Grinberg ve ark., 2019):

Difüzyon: İki farklı çözelti arasındaki konsantrasyon farkından meydana gelen aktarım türüdür. İyon veya molekül çok yoğun bölgeden az yoğun bölgeye doğru hareketi ile gerçekleşir ve konsantrasyon dengeye gelinceye kadar devam etmektedir. Difüzyon hızı, konsantrasyon farkı ile doğru orantılıdır.

Göç: Çözelti içerisindeki iyonların ve elektrotların elektrostatik etkileşimine dayanan bir yöntemdir. Böylece, bir potansiyel değişimi nedeniyle iyonların elektrota doğru yönelmesi gerçekleşir. Elektrokimyasal hücrede anyonlar anoda, katyonlar katoda doğru hareket eder.

Konveksiyon: Mekanik bir güç uygulanması sonucunda çözelti içerisindeki hareketlenmeyi sağlar. Karıştırma, titreşim, elektrotun hareket ettirilmesi, sıcaklık değişimi ya da yoğunluk değişimi gibi ortamda hareketlilik sağlar. Doğal konveksiyonun, kütle aktarımı üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır.

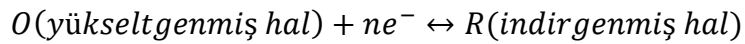
1.3.3. Elektrokimyasal Akımlar

Elektrokimyasal yöntemlerde bir gerilim uygulanması durumunda kapasitif akım ve faradayik akım olmak üzere iki farklı akım gerçekleşir(Wang, 2006):

Kapasitif akım (I_c): Bir elektrokimyasal hücre içerisinde elektrot daldırıldığında, elektrolit çözeltisinde negatif yükle yüklenir ve pozitif yüklü iyonları kendine doğru çekmeye başlar. Negatif ve pozitif iyonlarının etkileşimi ile elektrot ve elektrolit çözeltisi arasında bir elektriksel çift tabaka meydana gelir. Bu elektriksel çift tabaka bir kapasitör gibi davranış gösterir ve yükseltgenme-indirgenme reaksiyondan bağımsız bir akım oluşur. Bu akıma kapasitif akım denir. Bu akımın var olması, doğru bir ölçüm yapılmasını engellemektedir.

Faradayik akım (I_f): Bir elektrolit çözeltisi içerisinde analiz edilecek bir maddenin bir elektrotun yüzeyi ile yükseltgenme-indirgenme tepkimesi sonucunda ortaya çıkan akıma denir. Reaksiyon sonucunda elektrottaki değişen maddenin miktarı, elektrolit çözeltisi içerisinde geçen akım ile doğru orantılıdır. Bu kurala Faraday kanunu denmektedir. Nernst tabakası içerisinde, analiz edilecek madde ve ürünlerin konsantrasyonları yalnızca elektrot yüzeyinden uzaklığın bir fonksiyonu olarak değişiklik göstermektedir.

Çözelti ile elektrot arasında akım ilerlerken elektrotlardan birinde yükseltgenme diğerinde indirgenme tepkimesi meydana gelir.



Alman bilim adamı W. Nernst tarafından ortaya konulan denklemde elektroaktif türün elektrot yüzeyindeki derişime bağlı olarak elektrot potansiyeli belirlenmektedir. Nernst denklemi şu şekilde açıklanır (Skoog ve ark.,1998):

$$E = E^0 + \frac{2,3 RT}{nF} \log \frac{C_O}{C_R}$$

E^0 : Yükseltgenme-indirgenme tepkimesi için standart potansiyel

R: Gaz sabiti (8,314 JK⁻¹mol⁻¹)

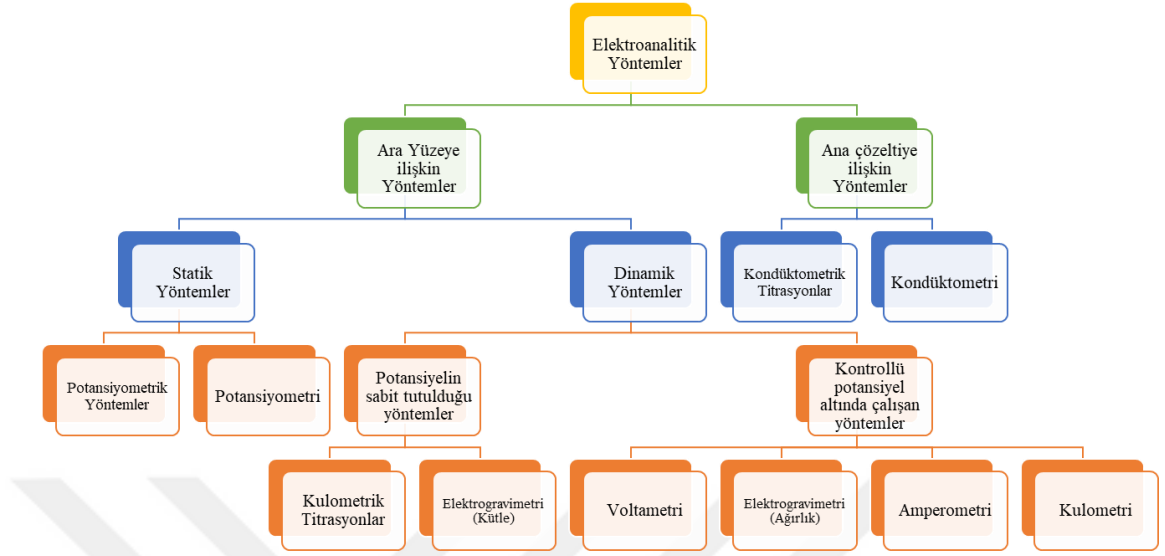
T: Sıcaklık (°K)

n: Tepkimede transfer edilen elektron sayısı

F: Faraday sabiti (96487 kulomb)

1.3.4. Elektroanalitik Yöntemler

Elektrokimya prensibi, çözelti/elektrolit içerisindeki elektron verme (yükseltgenme) ve/veya elektron alma (indirgenme) (redoks) tepkimeleri sonucunda elektron transferine dayanmaktadır. Bu tepkimeler, elektrokimyasal hücre içinde gerçekleşmektedir. Elektrokimyasal hücre içerisinde analiz edilecek maddenin elektrokimyasal davranışını incelemek için yapılan kantitatif analiz yöntemine “Elektroanalitik yöntem” adı verilmektedir. Elektroanalitik yöntemler ile akım, potansiyel ve zamana karşılık elektrik sinyalleri elde edilmektedir. Elektroanalitik yöntemler ölçülen elektrik sinyaline göre alt gruplar halinde sınıflandırılmaktadır (Newman ve Thomas-Alyea, 2004):



Şekil 1.3. Elektroanalitik yöntemlerin sınıflandırılması.

Elektroanalitik yöntemlerde, çalışma elektrotunun polarize olup olmamasına bağlı olarak yöntemler ikiye ayrılır: Polarize olmayan elektrotlar ile yapılan çalışmalarda tepkime dengededir ve en yaygın kullanılan yöntem potansiyel ölçümüne dayanan potansiyometridir. Polarize olan çalışma elektrotunda ise dışarıdan gerilim uygulanması halinde tepkime gerçekleşir. Polarize elektrotların kullanıldığı en yaygın yöntem voltametri ve amperometridir (Bard ve Ketelaar, 1976).

Voltametri yönteminde, uygulanan gerilime bağlı olarak hücreden geçen elektrik akımı ölçülür. Elde edilen akım değeri, analiz edilen maddenin derişimi ile doğrusal bir orantıya sahiptir. Amperometrik yöntem de ise, uygulanan sabit bir potansiyel de zamana bağlı olarak elde edilen akım değeri ölçülür. Kondüktometri ise, iletkenlik ölçümüne dayanan bir elektroanalitik yöntemdir (Bard ve Ketelaar, 1976).

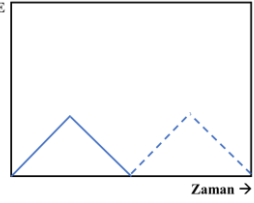
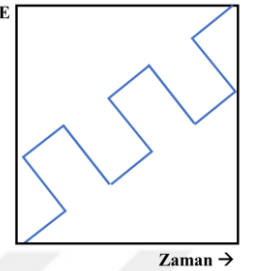
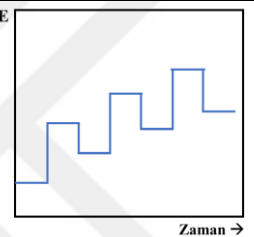
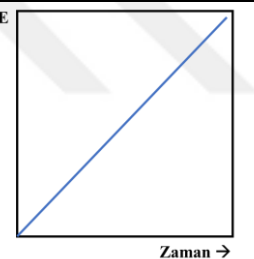
1.3.4.1. Voltametri

Elektroanalitik yöntemler arasında en yaygın kullanılan voltametrik yöntem, 1920 yılının başlarında Çekoslovak Kimyacı J. Heyrovsky tarafından bulunan polarografik yöntemin çalışma prensibine dayanarak geliştirilmiştir. Bir elektrokimyasal hücre içerisinde polarize halde bulunan çalışma(indikatör) elektrotunun, uygulanan sabit olmayan potansiyele karşılık elde edilen sinyalin ölçülmesinden faydalananarak elektroaktif maddelerin incelendiği bir yöntemdir. Bu yöntem ile gerileme karşılık elde edilen akım değerinin sinyal eğrisine “voltamogram” adı verilmektedir (Skoog ve ark., 1998).

1.3.4.2. Voltametrizde Kullanılan Uyarıma Sinyalleri

Voltametrik yöntemde, çalışma elektrotuna zamanın fonksiyonu olarak farklı potansiyellerin uygulanması sonucunda farklı dalga şekillerinde uyarıcı sinyaller elde edilmektedir. Verilen sinyallere göre karakteristik akım meydana gelir. Voltametrizde en sık kullanılan farklı şekildeki uyarıcı sinyaller Çizelge 1.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Voltametrizde kullanılan uyarma sinyalleri.

İsim	Voltametri	Uyarı Sinyali
Üçgen	Dönüşümlü Voltametri	
Diferansiyel Puls	Diferansiyel Puls Voltametri	
Kare Dalga	Kare Dalga Voltametri	
Doğrusal Taramalı	Hidrodinamik Voltametri	

1.3.4.2.1. Dönüşümlü Voltametri

Elektroaktif maddenin mekanizmasını aydınlatırken, optimizasyon çalışmalarında ve tepkimeye giren maddelerin tayininde kullanılan en yaygın voltametrik yöntemdir. Çalışma elektrotuna doğrusal olarak artan bir potansiyel uygulanıp, bitiş potansiyeline geldiğinde bu sefer azalan bir potansiyel uygulanır. Bu yöntem, akım gerilimin bir fonksiyonu olarak ölçülür. Akım cevabı potansiyel ile doğrusal olarak artar ve azalırken potansiyel dönüşümü gerçekleşir. İleri ve geri yönde tarama, birden fazla uygulanabilmektedir. İleri yönde tarama sırasında bir indirgenme

tepkimesi olmuşsa, geri yöndeki pik indirgenme sırasında oluşan ürünün elektrotta yeniden yükseltgenmesinden dolayı oluşur (Bard ve Faulkner, 2001).

1.3.4.2.2. Diferansiyel Puls Voltametri

Diferansiyel puls voltametrisi, periyodik olarak sabit büyüklükteki pulsun çalışma elektrotuna uygulanması ile gerçekleşir. Doğrusal bir tarama sırasında iki defa akım ölçülür: ilk olarak pulsun tam başladığı esnada; ikinci olarak pulsun bitmesine yakın bir sürede ölçülür. Bu iki akım arasındaki fark ΔI puls olarak verilir. Uygulanan potansiyele karşı akım farkı arasındaki ilişki ile bir grafik elde edilir. Bu grafik diferansiyel puls voltamogramı olarak adlandırılır. Bu yöntemin en büyük üstünlüğü yüksek hassasiyete sahip olmasıdır, böylece daha düşük duyarlılık sınırına (10^{-7} M- 10^{-8} M) kadar ölçüm yapabilirler. Bunun nedenlerinden biri iki yarı dalga potansiyeli arasındaki 0,04-0,05 V fark olması durumunda bile pik maksimumları elde edilebilmesi; ikincisi ise kapasitif akım en düşük, faradayik akımın en yüksek olduğu anda ölçümün yapılmasından kaynaklanır. Bu yöntem, aynı zamanda çok küçük miktarlardaki maddelerin analizine de olanak sağlamaktadır (Skoog ve ark., 1998).

1.3.4.2.3. Kare Dalga Voltametri

Kare dalga voltametresiyle, göreceli olarak geniş dikdörtgensel dalgaların çalışma elektrotuna uygulanması ile gerçekleşir. Gerilim, merdiven basamakları şeklinde uygulanır. Bu dalgaların döngü süresi, gerilim basamaklarının süresine eşittir ve ortalama 5-10 ms arasındadır. Dikdörtgensel dalgaının pozitif ucunda ve negatif ucunda olmak üzere iki akım elde edilir. Bu iki akım arasındaki farka karşılık uygulanan potansiyel grafiği ile kare dalga voltamogramı elde edilir. Elde edilen akım pikinin yüksekliği ile analit derişimi arasında doğrusal bir orantı vardır.

Kare dalga voltametresiyle, çok hızlı bir gerilim tarama hızı ile kısa sürede ölçümü tamamlanır. Bu yöntem ile ölçüm çok hızlı olduğu için hassasiyeti azaltarak daha düşük konsantrasyonlarda belirgin bir akım sinyali elde edilemeyebilir. Bunun nedeni kısa puls aralıklarının kullanılması daha düşük faradayik akım/kapasitif akım oranına sebep olur (Skoog ve ark., 1998).

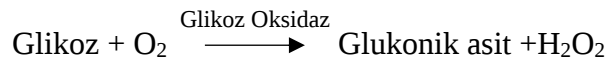
1.3.4.2.4. Doğrusal Taramalı Voltametri

Doğrusal taramalı voltametresiyle, belirli bir hızla elektrot potansiyelinin artırılması ve azaltılmasıyla ile gerçekleşir. En basit voltametrik yöntemde, uygulanan potansiyel sonrasında elde edilen akımın fonksiyonu olarak voltametrik dalga (sigmoidal şeklinde) oluşur. Belirgin bir pik görebilmek için potansiyel tarama hızı 5-20 mVs⁻¹ aralığında, yarı dalga potansiyel farkı en az 0,2 V civarında olmalıdır.

Dikdörtgensel dalganın pozitif ucunda ve negatif ucunda olmak üzere iki akım elde edilir. Bu iki akım arasındaki farka karşılık uygulanan potansiyel grafiği ile kare dalga voltamogramı elde edilir (Wang, 1948).

1.3.4.3. Amperometri

Clark ve Lyons, 1962 yılında enzim katalizörlüğünde kandaki oksijen miktarının ölçülmesine dayanan bir amperometrik biyosensör geliştirmiştir. Yükselgenen veya indirgenen elektroaktif maddenin akım farkının ölçülmesiyle analit konsantrasyonun belirlendiği en eski sensördür (Clark ve Lyons, 2006). Daha sonra, 1973 yılında Guilbault ve Lubranove tarafından hidrojen peroksit ölçümüne dayanan glikoz oksidaz enzimi ile hazırlanmış glikoz biyosensörü geliştirilmiştir (Guilbault ve Montalvo, 2002).



Glikoz tayini için üç farklı amperometrik nesilden bahsedilmektedir;

- *Birinci nesil amperometrik biyosensör:*

Bu biyosensör tipi ile oksijen ve hidrojen peroksit tayini esasına dayanır. Birinci nesil yöntemde, hidrojen peroksitin yüksek seçicilik elde etmesi için yüksek potansiyel uygulanmaktadır fakat yüksek çalışma potansiyelinin uygulanması dezavantajdır. Diğer bir dezavantajı ise oksijen açığıdır (Turner, 1989).

- *İkinci nesil amperometrik biyosensör:*

Birinci nesilde yüksek potansiyel uygulamasını engellemek için, enzimin aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferini sağlayan yapay elektron taşıyıcı kullanılmıştır. Yapay elektron taşıyıcı olarak; organik, inorganik kompleksler ve polimerler kullanılmaktadır. Ferrosiyanid, kinonlar, ferrosen türevleri, iletken organik tuzlar örnek olarak verilebilir. Bu taşıyıcılar, oksijen değişiminden bağımsız olarak çalışır ve oksijenden daha kolay indirgenebilirler (Turner, 1989).

- *Üçüncü nesil amperometrik biyosensör:*

İkinci nesilde toksik maddelerin kullanımını önlemek için yapay elektron taşıyıcı kullanılmadan doğrudan akım uygulanarak enzim aktif merkezi ile elektrot yüzeyi arasında bir elektron transferi gerçekleşmektedir. Böylece kan numunesindeki oksijen konsantrasyondan kaynaklanan hatalar giderilmiş olur (Turner, 1989).

Amperometri, biyoanalizde en yaygın kullanılan tekniklerden biridir. Sabit uygulanan potansiyelde akımın ölçülmesi prensibine dayanan bir yöntemdir. Elektroaktif maddenin redoks potansiyele bağlı olarak, yöntemin duyarlılığı değişir. Potansiyel, analitin indirgenip-yükseltgendiği pikin alt seviyesine göre seçilir. Konveksiyon koşullarında, potansiyel uygulandığında tampon çözeltisi içerisinde

akım sabitlendikten sonra analit eklenmesiyle değişen akımın zamana karşı grafiğine amperogram denir. Amperogramda analitin eklendiği ilk akım değeri ile, eklendikten sonra sabitlenen akım değeri arasındaki akım farkı hesaplanır (Patel, 2020).

Akım (nA, μ A), dönüştürücüde meydana gelen elektrokimyasal tepkinin hızı ile tanımlanır. Amperometrik lmlerin çoğunlukla çalışma elektrotu perde baskılı elektrotlardır. Amperometrik teknik, biyolojik maddelerin analizinde yaygın olarak kullanılan akım duyarlılığı ve tekrar edilebilirliği yüksek, kısa sürede cevap elde edilebilen biyosensörler için yaygın olarak kullanılır.

1.3.5. Elektrokimyasal Hücre Bileşenleri

Elektrokimyasal hücre içerisinde genellikle l elektrot sistemi kullanılmaktadır. Bir alışma elektrot, bir referans elektrot ve karşıt elektrottan meydana gelmektedir. Elektrokimyasal hücre içerisinde elektroaktif maddelerin yükseltgenme-indirgenme reaksiyonu sonucunda yük transferinin olduğu elektrot çalışma (indikatör) elektrottur. Referans elektrot, analiz suresinde potansiyeli değişmeyen metal ve metal tuzundan oluşan elektrotlardır. Karşıt elektrot ise, ortamda istenmeyen akımları onlemek ve elektriğin zltenen geçerek çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlamaktadır. Elektrotlar, bağlantı kablosuyla potansiyostata bağlanır. Elektrokimyasal hücre, elektrokimyasal tepkimelerin gerçekleştiği hücredir. Hücre içerisinde, akım iletimini destekleyebilecek destek elektroliti olarak adlandırılan bir zltenen bulunmaktadır. Elektrokimyasal sistem, yukarıda bahsedilen  elektrotun destek elektroliti içerisine daldırılması ve elektriksel bağlantı kablosuyla potansiyostata bağlanmasıyla oluşur (Skoog ve ark., 1998).

1.3.5.1. Çalışma (indikatör) Elektrotu

Yüzeyinde yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinin gerçekleştiği polarize olabilen elektrotlardır. Çalışma elektrotu, elektrot malzemesine göre civa, katı ve

modifiye elektrot olarak çeşitlilik göstermektedir. Katı elektrotlar karbon ve metal temelli elektrotlar olarak sınıflandırılmaktadır. Elektrot seçiminde; çalışma gerilim aralığı, analit ve çözücünün özelliği önemlidir. Günümüzde perde baskılı elektrotlar, tek kullanımlık, küçük hacimli çözeltilerde kullanım kolaylığı nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır.

İdeal bir çalışma elektrotu; düşük artık akıma ve geniş potansiyel aralığına sahip olmalı, elektrot yüzeyi kolayca tekrar kullanılabilir olmalı, düşük maliyetli ve toksik olmayan malzemelerden üretilmelidir (Merkoçi ve Alegret, 2007).

1.3.5.1.1. Civa Elektrot

1959 yılında Nobel bilim ödülü almış Heyrovský tarafından bulunmuş voltametrorenin öncüsü olan polarografi tekniğinde kullanılan ilk çalışma elektrotudur. Damlayan civa, asılı damlayan civa, durağan civa damla ve civa ince film elektrot alt başlıklarını oluşturur. Civa elektrotunun en büyük avantajı, hidrojen iyonlarının indirgenebilmesi için yüksek bir aşırı gerilime ihtiyaç duyulmasıdır. Dezavantajı ise civa olduğu için, kullanımı sakıncalıdır.

1.3.5.1.2. Katı Elektrot

Elektroaktif maddelerin, civa ile etkileşime girmesi nedeniyle 1950 yılında katı elektrotlar yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca civa elektrotlar sınırlı çalışma potansiyel aralığına sahip iken, katı elektrotlar $\pm 2,0$ V çalışma aralığına sahiptir. Mekanik olarak, katı elektrotlar daha kararlıdır. Katı elektrotların dezavantajı ise safsızlıkların yüzeye yapışması nedeniyle tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır. Bu nedene, katı elektrotların homojen bir yüzeye sahip olması için parlatma ve cilalama gibi ön işlemler gerekir. Metal ve karbon elektrot olarak alt başlıkta sınıflandırılır.

- Metal Elektrot:

Soy metaller, metal elektrotların üretiminde kullanılır. Altın, platin, gümüş, nikel ve bakır elektrotları metal çalışma elektrotuna örnek olarak verilebilir. Metal elektrotların avantajı, yüksek iletken bir yüzeye sahip olmalarıdır. Dezavantajı ise, elektrot yüzeyindeki metalin, analiz edilecek madde ile beklenmeyen etkileşime girmesi ve sistematik hata oluşturabilmesidir.

- Karbon Elektrot:

Karbon elektrotlar, elektriği iyi iletmesi, inert olması, zemin akımları düşük olması ve geniş bir potansiyele sahip olması nedeniyle günümüzde yaygın kullanılan bir katı elektrot grubudur.

Camsı Karbon Elektrot:

Yüksek sıcaklık direncine ve mekanik özelliğe sahip camsı saf karbon yüzeyi ince grafit tabakaların birbirine kurdele gibi geçmesiyle oluşur. Yüksek elektrik iletkenliğine sahiptir, bu nedenle elektrokimyasal yöntemlerde yaygın olarak kullanılır. Elektrot yüzeyinin temizlenmesi ve aktive etmek için alümina yardımıyla parlatma işlemi gerekir.

Karbon Pasta Elektrot:

Yüksek saflıkta ve düşük mikron boyutuna sahip olması nedeniyle grafit tozu, inert organik bir bağlayıcı sıvı (nujol, mineral yağ, parafin) ile karıştırılıp karbon yüzeyi oluşturulur. Hazırlana karbon yüzeyi, teflon yüzeyindeki yuvarlak boşluğa doldurulur. Elektrotun dezavantajı elde edilen sonuçların tekrar edilebilirliğin düşük olmasıdır.

Perde Baskılı Karbon Elektrot:

Üç elektrotlu konveksiyonel elektrot sistemine alternatif olarak tek bir yüzeyde üç elektrotun bulunduğu bir elektrot türüdür. Perde baskılı karbon elektrotlar, sert bir seramik ya da polimer yapılı yüzeyde referans, karşıt ve çalışma elektrotu birlikte bulunurlar. Bir püskürtme mürekkep yardımıyla perde baskı tekniği kullanılarak yüzey oluşturulur. Karbon ve platin mürekkep çalışma elektrotu için, gümüş mürekkep referans elektrot için kullanılır. İsteğe bağlı olarak çalışma elektrotu için altın ya da sentezlenmiş nanomateryal mürekkebi de kullanılabilir. Küçük hacimlerde (40-50 μL) damlatma miktarı ile numune analiz edilebilir. Tek kullanımlık olması nedeniyle yüzey kirliliği ile yaşanan sorunlar en aza indirgenmiş olur. Son yıllarda yaygın olarak nükleik asit biyosensörü ve immunosensör geliştirmek için kullanılmaktadır. Uzun üretim süreci ve pahalı maliyete sahip olması gibi dezavantajları vardır.

1.3.5.2. Referans Elektrot

Bir elektrokimyasal hücre içerisinde elektrik akımı iletimi sırasında çalışma potansiyeli, sabit bir potansiyele karşılık net değeri belirlenir. Bu nedenle potansiyeli sabit, Nernst eşitliğine uyumlu, ideal polarize olmayan bir referans elektrot kullanılır. Metal ve metal tuzundan oluşan elektrotlar kullanılır. Ag/AgCl ve doygun kalomel elektrot ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$) en yaygın kullanılan referans elektrotlardır.

1.3.5.3. Karşıt (Yardımcı) Elektrot

Elektrokimyasal hücre içerisinde ikili elektrot sistemlerinde polarizasyon potansiyelinin kayması akım potansiyel eğrisinde bazı piklerin okunmamasına neden olmaktadır. Bu nedenle ölçüm hatalarını ortadan kaldırmak için karşıt elektrot kullanılması gerekmektedir. Elektrokimyasal hücre içerisinde elektrik akımının çalışma elektrotuna iletilmesi için gerekli elektrottur. Elektrokimyasal hücre içerisinde analit ile kimyasal reaksiyona girmez, fakat elektriği iyi iletir. Hücre içerisinde

referans elektrot ile çalışma elektrotu arasında konumlandırılır. Karşıt elektrotun yüzey alanı, çalışma elektrotuna göre daha geniş olması beklenir. Platin tel en yaygın kullanılan karşıt elektrottur.

1.4. Biyosensörler

1.4.1. Biyosensörün Tarihi

İlk biyosensör, 1950’li yıllarda ameliyat esnasında kandaki oksijen miktarını bir elektrot ile takip edilmesiyle başlamıştır. Yarı-geçirgen bir diyaliz membranı yardımıyla standart bir oksijen elektrotunun glikoz oksidaz ile ince bir tabaka halinde kaplanmasıyla ilk enzim elektrotu hazırlanmıştır. 1975 yılında Yelloy Springs Instruments tarafından ilk ticarileştirilmiş biyosensör ile kan ve idrardaki glikoz tayinine yönelik ürün geliştirilmiştir. Bu glikoz biyosensörü, glikoz oksidazın katalizlediği bir tepkime sonucunda hidrojen peroksitin amperometrik ölçümü esasına dayanmaktadır. Clark ve Lyons tarafından ilk keşfedilen ve giderek artan yoğun çalışmalar sonucunda günümüzde biyoteknoloji, biyomedikal, eczacılık, savunma sanayi, çevre analizi ve gıda alanında önemli katkılarda bulunmaktadır.

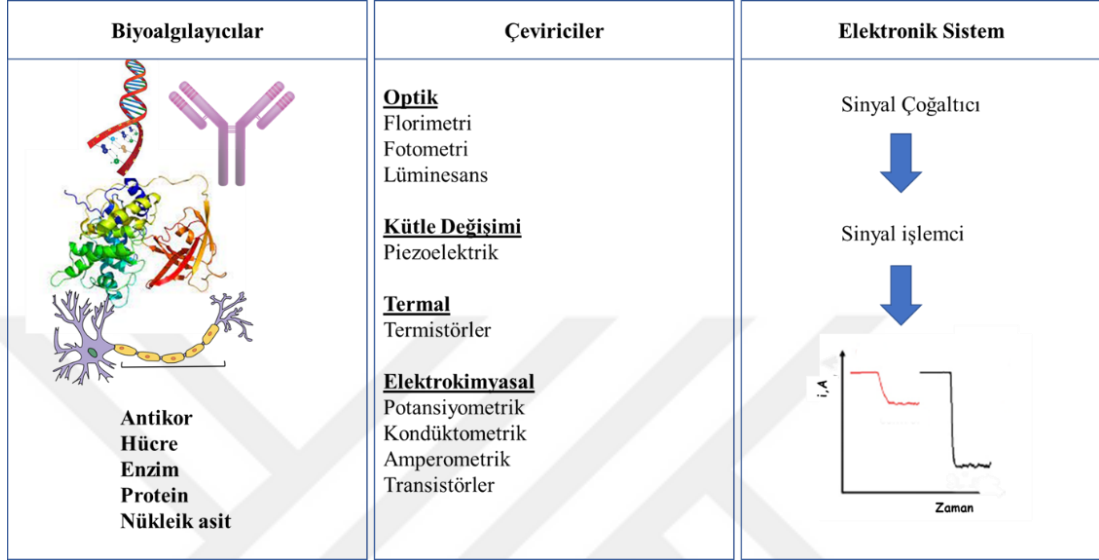
1.4.2. Biyosensörün Yapısı

Biyosensörler, analiz edilecek maddeyi tanıyacak biyolojik tanıma yüzeyi (biyoalgılayıcı) ve bu etkileşimi fizikokimyasal çevirici (transducer) yardımıyla ölçülebilir elektronik sinyale çeviren sistemin birleştirilmesiyle oluşan analitik biyodedektörlerdir. Aynı zamanda biyolojik bir ortamda, biyoalgılayıcı varlığında biyolojik analitin indirekt ve direkt ölçülmesi esasına dayanır.

Biyosensör sistemler, herhangi bir hastalık türüne ilişkin spesifik ve yüksek hassasiyet gösteren biyobelirteçleri, vücuttaki serum, tükürük, BOS gibi çok az

hacimlerdeki vücut sıvılarından alınan örneklerde tayin edebilme özelliği ile klinik uygulamalarda öne çıkmaktadırlar.

Biyosensörler; biyolojik/ kimyasal ve çevirici olarak iki kısımdan oluşur (Şekil 1.4);



Şekil 1.4. Biyosensörün temel bileşenleri.

1.4.3. Biyolojik Bileşenler

Ortamda analiz edilmesi istenilen biyolojik/kimyasal madde, biyolojik/ kimyasal ile etkileşmesi sonucu sinyal oluşur. Biyolojik/ kimyasal bileşenler, seçici ve kararlı bir yapıda olması istenir. Tanıma yüzeyi; enzim, antikor, nükleik asit, hücre ve doku parçalarından oluşur. Enzim, antikor ve nükleik asitlerin yüzeye immobilizasyonu kolay iken, nispeten hücre ve doku parçalarının immobilizasyonu zordur.

1.4.3.1. Biyolojik Çeşitlerine Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması

1.4.3.1.1. Enzim Biyosensörleri

Kandaki glikoz ölçümü nedeniyle en eski ve en yaygın kullanılan biyosensör türüdür. Ticarileştirme yönünden de piyasadaki ürünlerin yaklaşık %85'ini enzim biyosensörleri oluşturmaktadır. Enzim, ortamdaki substrat ile katalizlenerek kimyasal bir reaksiyon oluşur. Enzim, substratına karşı yüksek seçiciliğe sahiptir. Enzimin yüzeye immobilizasyon için kullanılan yöntemler, adsorpsiyon (kovalent olmayan bağlama), kovalent bağlama, tutuklama, çapraz bağlamadır. Enzim immobilizasyonun amacı, katalitik aktivitesini kaybetmeden, fiziksel olarak hareketini sınırlamaktır. Böylece tekrar kullanılabilir olması, uygun olmayan koşullara karşı dayanıklı olması, enzimi ortamdan uzaklaştırarak reaksiyonun sonlandırılabilmesi ve ürünlerden kolayca ayrılabilir olması nedeniyle enzimin yüzeye immobilizasyonun birçok üstünlüğü vardır.

1.4.3.1.1.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

- *Adsorpsiyon:*

Enzimin elektrot yüzeyine hidrojen bağları, elektron geçiş kompleksleri, Van der Waals bağları gibi kovalent olmayan etkileşimler ile tutunması esasına dayanır. Streptavidin, doğada bilinen en kuvvetli non-kovalent bağ ile biyotine bağlanmaktadır. Streptavidin-biyotin bağlanması; yüksek pH, sıcaklık, organik çözücüler, deterjanlar (sodyum dodesil sülfat-SDS, Triton gibi) ve proteolitik enzimlerden etkilenmediği için kullanımı yaygındır. Birçok biyosensör çalışmasında bu bağlanmadan faydalanılmaktadır.

- *Kovalent bağlama:*

Karboksil(-COOH), hidroksil(-OH), amin (-NH₂), tiyol (-SH) gibi çeşitli reaktif grupları yüzey üzerine bağlanması gerekmektedir. Aksi takdirde reaktif grupları kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) yöntemiyle yüzeyde oluşturulur. Biyomolekül kovalent bağ ile yüzeye bağlanır ya da biyomolekül önceden uygun bir materyal ile kovalent bağ oluşturur ve bu biyokomposit elektrot yüzeyinde film halinde kaplanır. Kovalent bağ ile enzimin yüzeye tutturulması pH, sıcaklık, iyon şiddetindeki değişkenliklere karşı oldukça dirençlidir, böylece biyosensörün ömrünü uzatır. Fakat, aktivasyon kaybına neden olabilir.

Biyotin, protein ve nükleik asitlere kovalent olarak bağlanabilme özelliğinden dolayı proteinleri ve nükleik asitleri işaretleme işleminde kullanılır. Bağlanma özelliğinden faydalanılarak biyotinlenmiş proplar hazırlanır ve bu biyotinlenmiş hibritlerin tayini, enzimatik veya kimyasal ışıltama (kemiluminesans) ile yapılabilir.

- *Tutuklama:*

Yüksek moleküler ağırlıklı biyomoleküller, doğal jel maktrişleri ile yüzeyde tutuklanarak immobilize olurlar.

- *Çapraz Bağlama:*

Küçük molekül yapısına sahip iki ya da daha fazla fonksiyonel grup içeren reaktiflerin enzim molekülleri arasında suda çözünmeyen biyokompozitlerin oluşmasını sağlar. En yaygın kullanılan çapraz bağlayıcı iki fonksiyonel grup içeren gluteraldehittir.

1.4.3.1.2. İmmünosensörler

İmmünosensörler, antikor ile antijen arasındaki biyoafinite esasına dayanan bir yöntemdir. Antikorlar, plazma proteinin %20'sini oluşturmaktadır ve çoğu antikor glikoprotein (karbonhidrat ve aminoasit yapılı) grubu olan immünoglobulinler (Ig) olarak adlandırılırlar. Antikor, vücut içerisine dışarıdan giren yabancı bileşiklere (mikroorganizmalar) karşı bağışıklık sistemi tarafından üretilen protein yapılı bileşiklerdir. Antijen ise, vücuda giren toksinler, bakteriler, virüsler, yabancı kan hücreleri gibi antikor oluşumuna neden olan yabancı moleküllerdir. Antijenler, spesifik bir antikorun ortamda bulunması durumunda spesifik olarak bağlanır. Böylece immünosensör kullanımı ile yüksek seçicilikte antijen tayin edilebilir.

Antijen ile antikor arasındaki reaksiyonu temel alan üç farklı immünosensör yöntemi vardır. Bunlar:

- *Direk immünosensörler:*

Biyoalgılayıcı olarak yüzeye tutturulan antikorun, antijeni tanıyarak, birbiriyle etkileşime girmesi esasına dayanır. Bir diğer adıyla etiketsiz immünosensörler, doğrudan antijen-antikor kompleksi oluşumundan kaynaklanan fiziksel veya kimyasal değişimini, etiketleme işlemine gerek kalmadan tespit edebilmektedir. Ancak etiketsiz immünosensörlerde, elde edilen cevaplar üzerinde spesifik olmayan adsorpsiyonun olumsuz etkileri vardır.

Bu olay, immünosensör duyarlılığının azalmasına neden olur. Bu nedenle, uygun bir bloke edici ajanın kullanılması gereklidir. Sürfaktanlar gibi bloke edici ajanlar (Tween 20, polietilen glikol), kazein, sığır serum albümini (BSA) ve altın yüzey için tiyonik bileşikler) kullanılır.

- *İndirekt immünosensörler:*

Bir diğer adıyla etiketli immünosensörler, hassas ve çok yönlü algılama yeteneğine sahip olmasının nedeni bir veya birkaç etiketten üretilmiş olmasıdır. İndirekt ölçümlerde, enzim (Horseradish peroksidaz, katalaz ve glikoz oksidaz, alkalın fosfat) ve elektroaktif bileşikler (ferrosen, prusya mavisi (özellikle antijen ya da antikör elektroaktif olmadığı durumlarda)) yaygın olarak kullanılır. Etiketli immünosensörlerde, etiketler bir elektron transferi elde etmek için bir antikora veya antijene bağlanabilir ve ölçüm sırasında tespit edilen etiket sayısının hedef analitlerin sayısına karşılık geldiği varsayılır (Mollarasouli ve ark., 2019). Etiketli immünosensörlerin, yüksek hassasiyet ve düşük adsorpsiyonun etkisi gibi bazı avantajlara sahip iken biyomoleküllerin etiketleme reaksiyonundaki farklılık antijen antikör bağlanma etkinliği üzerinde olumsuz sonuçlar gösterebilir.

- *Sandviç İmmünosensör:*

Birden fazla epitopu olan büyük antijenlerin tayini için sandviç immünosensörler kullanılır. Bu yöntem, fazla miktarda birincil ve ikincil antikör ve iki antikör arasında antijenden oluşmaktadır. Katı substrat yüzeyine immobilize edilen antikora yakalama antikoru (birincil antikör), antikör-antijen kompleksine bağlanan ve elde edilen sinyalin tespitine neden olan antikora da tespit antikoru (ikincil antikör) denir. Prob olarak enzimle etiketlenmiş tespit antikörünün katalitik reaksiyonundan bu sinyaller meydana gelmiştir.

Bir "tek bölge" analizi, hareketsizleştirilmiş bir antijen ile etiketli bir antikör arasındaki immünoreaksiyona dayanır. Bağlanma olayında çökmeyi önlemek için bağlanmamış etiketli antikör yıkanarak uzaklaştırılır, böylece bağlı antikör tarafından elde edilen sinyal ölçülebilir. Sandviç immünosensörler, yüksek hassasiyet, geniş dinamik aralığı gibi avantajlara sahip olmasına rağmen, küçük molekül ağırlığına (<1000 kDa) sahip analitlerin analizinde kullanışlı değildir.

- *Yarışmalı immünosensör:*

Sınırlı sayıdaki antikor bağlanma bölgelerine erişebilmek için birbirleri ile yarışan enzim etiketli ve etiketi olmayan analitlerdeki bir epitopa sahip küçük antijenlerin tayini için kullanılır. Biyoalgılayıcı olarak antikor yüzeye bağlanır.

1.4.3.1.3. Nükleik Asit Biyosensörü

E. Paleček tarafından 1960 yılında nükleik asitlerin elektroaktif olduğu keşfedildikten (Paleček, 1960) sonra 1996 yılında J. Wang ve çalışma grubu DNA hibridizasyon tayinine yönelik ilk elektrokimyasal DNA biyosensörünü tasarlamışlardır (Wang ve ark., 1996). Günümüze kadar nükleik asit biyosensör çalışmaları hız kesmeden devam etmektedir. Mutasyona uğramış DNA diziliminin analizi, DNA-ilaç etkileşim mekanizmasını aydınlatmak, bulaşıcı hastalıklara neden olan virüslerin DNA diziliminin analizi gibi pek çok çalışma yapılmıştır. DNA analizleri için günümüzde jel elektroforezi, membran blot gibi yavaş ve yoğun bilgi gerektiren pek çok analiz yöntemi vardır. Fakat, klasik yöntemlere alternatif olarak elektrokimyasal yöntemler son zamanlarda geniş bir çalışma potansiyeline sahiptir.

Elektrokimyasal DNA biyosensörleri, genosensör olarak da ifade edilmektedir. Hastanın genetik bozukluğu ya da bulaşıcı hastalıkların kısa bir süre içerisinde belirlenmesiyle ilgili çalışmalara yeni bir boyut kazanmıştır. Tüm çalışma ekibinin hastalıkların erken tanısına yönelik klinikte rahatlıkla kullanabileceği, ucuz, hızlı, küçük boyutta cihaz tasarımı Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bazı büyük firmalar tarafından başlatılmıştır.

Biyomedikal ve çevre araştırmalarında, nükleik asit analizi temelde DNA hibridizasyonuna bağlıdır. Tanıma yüzeyine tutturulan kısa ve tek sarmal yapıda oligonükleotid prob dizisi ile sentetik hedef DNA dizisinin birleşerek, çift sarmal oluşturması esasına dayanır. Oluşan çift sarmal DNA'ya hibrit, bu etkileşime

hibridizasyon denir. Oligonükleotid dizisinden oluşan prob ile hedef dizisi arasındaki etkileşim, çevirici sistem sayesinde ölçülebilen bir elektrik sinyaline dönüştürülür.

- Tipik bir genosensörün dört basamakta tasarımı yapılır:
 - Oligonükleotid prob dizisinin yüzeye immobilizasyonu
 - Sentetik hedef DNA dizisi ile hibridizasyon
 - Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi
 - Enzim etiketinin etkisi

1.4.3.1.3.1. Oligonükleotid Prob Dizisinin Yüzeye İmmobilizasyonu

Yüzeye tutturulan oligonükleotid proplar, bütün bir DNA zincirinden ziyade, polimeraz zincir reaksiyonu ile sentezlenen dizi sayısı 18-40 bazlık kısa DNA parçalarıdır. İmmobilizasyon ne kadar güçlü ve düzenli olursa, hibridizasyon o kadar kolay olacaktır. Böylece bağlanmaları kimyasal ya da fiziksel olumsuz etkenlerden en az seviye de etkilenecektir. Oligonükleotid proplar çeşitli yöntemler ile yüzeye immobilize edilebilir:

-Adsorpsiyon ile probun yüzeye immobilizasyonu:

Adsorpsiyon yöntemi, kısa DNA ya da RNA dizi probunun yüzeye kolayca tutturulması için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Elektrot yüzeyine DNA ya da RNA dizisi adsorbe olur. Elektrokimyasal ön işlem gerektirmeksizin ucuz ve kısa immobilizasyon süresi içerisinde gerçekleşir.

-Elektrostatik ile probun yüzeye immobilizasyonu:

DNA ya da RNA dizi probunun elektrostatik kuvvet özelliğinden faydalanarak, elektrot yüzeyine tutunur. Elektrot yüzeyine pozitif potansiyel uygulanarak, negatif yüklü fosfat yapısına sahip DNA'nın elektriksel çekim kuvveti esasına dayanır.

-Kovalent bağ ile probun yüzeye immobilizasyonu:

Karbodiimit ve silan yapıları, DNA ya da RNA dizi probunun kovalent bağ ile elektrot yüzeyine tutturulmasında kullanılır. Altın elektrot (altın nanopartikül ile modifiye edilmiş elektrot ya da tek kullanımlık perde baskılı altın elektrotlar) yüzeyine, altın—SH (tiyol) arasındaki güçlü afinite etkisinden yararlanarak, 3-merkaptopropiyonik asit ya da L-sistein/sisteamin yapılarında bulunan –SH (tiyol) grubunun yüzeye tutunması sağlanır. Molekülün diğer ucunda kalan -OH (hidroksil) grubunun etil karbodiimit (EDC)/ N-Hidroksi süksinimit (NHS) gibi kovalent ajanlar kullanılarak aktive edilmesi ile amino grubu içeren DNA probunun yüzeye kuvvetli bir şekilde bağlanması sağlanır.

- Avidin-Biyotin Etkileşimi Nedeni ile Streptavidinle Kaplı Yüzeye Biyotinle İşaretlenmiş Probların Tutturulması:

Biyotin ile işaretlenmiş problemler, streptavidin kaplı manyetik boncuklar ile modifiye edilmiş elektrotlar ile streptavidin ve biyotinin birbirine olan güçlü afinitesi nedeniyle spesifik şekilde etkileşime girerler.

1.4.3.1.3.2. Sentetik Hedef DNA Dizisi ile Hibridizasyon

Nükleik asit hibridizasyonu, elektrot yüzeyindeki tek zincirli probun, belirlenmek istenen hastalığa yönelik tek zincirli hedef DNA dizisi ile kararlı hidrojen bağı oluşturarak, kararlı bir dubleks molekülün oluşturulmasıdır. Hibridizasyon işlemi belli bir süre içerisinde nötr pH ortamında gerçekleştirilir.

1.4.3.1.3.3. Spesifik Olmayan Bağlanmaların Engellenmesi

Nükleik asit biyosensörlerde hedef DNA dizisinin proba sabitlenmiş elektrot yüzeyleri hem hedef dizi ile hem de hedef diziden farklı baz dizilimine sahip dizilerle hibritleşme koşullarında aktif rol oynar. Spesifik olmayan bağlanmaların en aza indirgenmesi için her bir immobilizasyon basamağının ardından yıkama işlemi yapılmaktadır.

1.4.3.1.3.4. Enzim Etiketinin Etkisi

Biyoalgılama yaklaşımların sinyal amplifikasyon stratejilerinde kullanılan nanomalzemelere alternatif olarak, çoklu etiketler veya çoklu enzim etiketleri son zamanlarda çok sık kullanılmaktadır (Munge ve ark., 2005; Mani ve ark., 2009; Chikkaveeraiah ve ark., 2012). Sinyal amplifikasyonu, uygun dedektör biyoalgılayıcılarına (oligonükleotidler veya spesifik antikorlar) daha fazla sayıda çoklu etiket veya çoklu enzim etiketleri bağlanarak nükleik asit biyosensörün hassasiyetini artırır. Geleneksel enzimetik etiketleri, spesifik antikor fragmanlarını, tek bir enzim molekülü veya birden fazla enzim birimi içeren bir homopolimer ile konjuge edilmiş immünoglobulinler (Valat, Limoges ve ark., 2000) hem de bir enzim molekülü ile konjuge edilmiş sekonder antikorları, geniş bir Fc bölgesini bağlayabilen bakteriyel antikor bağlayıcı proteinleri kullanarak farklı etiketleme stratejileri kullanılmaktadır (Ruiz-Valdepenas Montiel ve ark., 2018).

Horseradish peroksidaz (HRP) yaban turpu bitkisinin kökünden ekstrakte edilir. HRP enzimi, demir (III) ve protoporphirin IX (genellikle hem grubu olarak adlandırılan) farklı türde metal merkezleri ve iki kalsiyum atomu içerir (Azevedo ve ark., 2003). H_2O_2 'in indirgenmesini katalizleyen bir metaloenzimdir. HRP içeren biyosensörler kullanıldığında, H_2O_2 'in düşük potansiyellerde tayinini gerçekleştirerek girişim etkilerini azaltmak mümkündür (Veitch, 2004).

Geleneksel Strep-HRP, HRP'ye özgü etiketli antikorlar ve tek bir HRP molekülü veya birden fazla HRP molekülü içeren bir homopolimer ile konjuge edilmiş bakteriyel antikor bağlayıcı proteinlerin kullanımını içeren farklı etiketleme stratejileri karşılaştırılmıştır. Protein A-HRP, Prot A-Poly-HRP 40, Prot A-Poly-HRP80, AntiIgG-HRP ve Histostar enzim etiketleri bu çalışmada kullanılmıştır.

1.4.4. Manyetik Tabanlı Elektrokimyasal Biyosensörler

Manyetik boncuklar, kanser teşhisi için önemli olan çoklu protein tespiti için hassas ve kolay bir metodolojiye sahiptir. Polimer kaplamalı manyetik boncuklar, hemen hemen her biyomolekülün bağlanmasına uygun yüzey kimyası ile 0,5 ila 10 µm arasındaki çaplarda ticari olarak temin edilebilir.

Yüzey fonksiyonel grupları, aktifleştirilmiş karboksil, amin, epoksi, hidroksil, tosil ve N-hidroksi süksinimit (NHS) içerir. Boncuklar ayrıca streptavidin, biyotin, protein A (ProtA), protein G (ProtG), IgG, IgE ve IgM gibi yüzey molekülleri ile de bulunmaktadır.

Paramanyetik boncuklar en çok protein yakalama, ayırma ve taşıma için faydalıdır, ancak agregasyon meydana gelebilir. Manyetik boncuklara veya ortak nanopartiküllere bağlı enzimler, polinükleotitler veya metal kompleksler gibi çoklu etiketlerin kullanımı, optik ve elektrokimyasal immünoanalizlerde duyarlılığı büyük ölçüde arttırmak için kullanılabilir. Antikorlarla veya diğer protein yakalama ajanlarıyla konjuge edilmiş manyetik boncuklar, bu analitik işlemleri gerçekleştirmenin basit ama etkili bir yolunu sağlamaktadırlar. Manyetik boncuklar, birim hacim başına yüksek yüzey alanlarına ve iyi stabiliteye sahiptir ve katı yüzeylere kıyasla çözelti türlerini içeren hızlı kinetik işlemlerine olanak sağlarlar. Manyetik olmayan nanoparçacıkların aksine manyetik mikroboncukların büyük bir avantajı, basit, ucuz miknatıslarla yönlendirme kolaylığıdır.

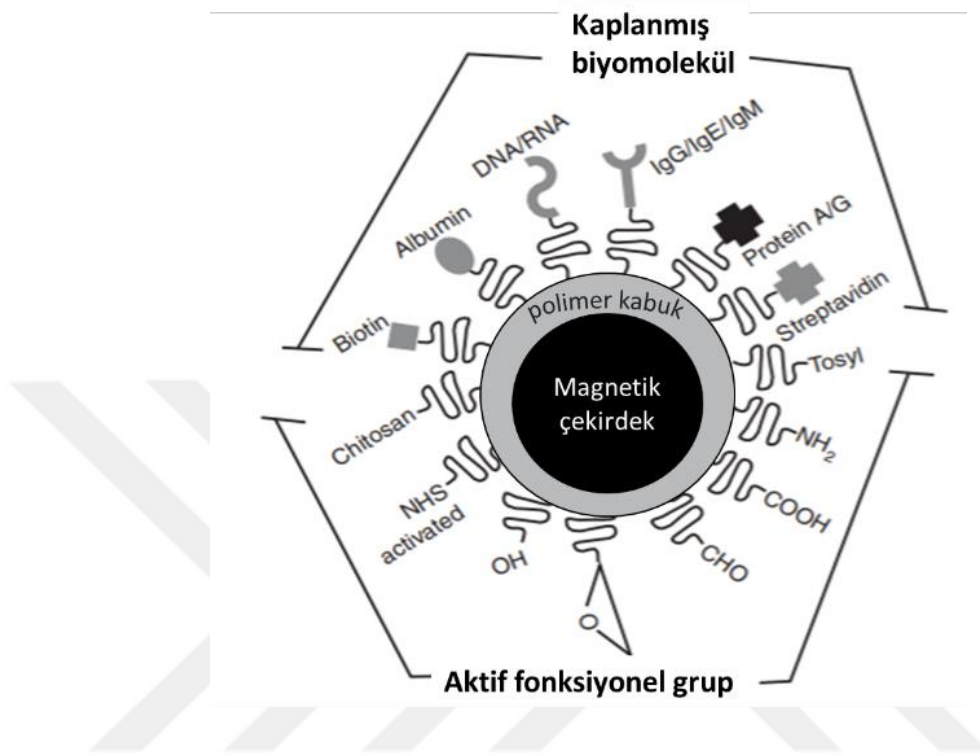
Manyetik mikrobuncuk (MB)'ların geliştirilmesi ve uygulanması ayırma ve tespit metodolojilerinde son yıllarda büyük ilgi görmektedir (Kuramitz, 2009). Bunun başlıca nedeni, MB'lerin sergilediği çok yönlülük, yüksek yüzey alanı, kimyasal ve fiziksel kararlılık, düşük toksisite ve yüksek biyouyumluluktur (Afkhami ve ark., 2013). MB'ler, biyomoleküllerin immobilizasyonu için uygun polimerik bir dış katmanla çevrili bir paramanyetik veya süperparamanyetik çekirdekten oluşur (Pedrero ve ark., 2012). Manyetik mikrobuncukların fonksiyonelleştirilmesi, biyoalgılama ve nükleotid dizilerin tanıma yüzeyine bağlanması açısından MB'lerin performansını artırır. Günümüzde, ticari olarak temin edilen MB'ler, farklı biyolojik türlerin analizinde yaygın olarak kullanılır.

Böylece, MB'ler farklı şekilde işlevselleştirilebilir: (a) biyotinlenmiş nükleik asitleri, aptamerleri, peptitleri, proteinleri vb. yakalamak için uygun streptavidin; (b) antikorları spesifik olarak bağlayan protA veya protG; (c) oligonükleotidler; veya (d) etiketli rekombinant proteinlerin vb. spesifik olarak yakalanması için afinite ligandlar (Paleček ve Fojta, 2007).

MB'lerin modifikasyonu, (a) çözünmüş türler ve buncukların yüzeyinde hareketsiz hale getirilmiş biyomoleküller arasında daha kısa reaksiyon süreleri, (b) katı platform olarak MB'ler kullanılarak sensör sisteminin kolayca minyatürleştirilmesi, (c) gerekli reaktif hacimlerinin ve üretilen atıkların azaltılması, (d) daha kısa analiz süreleriyle daha düşük tespit limitleri elde etmek (Kuramitz, 2009) dahil olmak üzere analitik açıdan önemli avantajlar sağlamıştır. Tüm bu özellikleri nedeniyle MB'ler, minyatürleştirme, düşük maliyet ve kullanım kolaylığı gibi avantajları olan elektrokimyasal biyosensörlerin tasarımı için ilgi çekici bir platform oluşturur. Elektrokimyasal enzim bazlı biyosensörler, immünosensörler ve nükleik asit bazlı biyosensörlerde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Hsing ve ark., 2007; de Dios ve Díaz-García, 2010; Albers ve ark., 2003).

Yüzey tosil-, NHS-aktif ve epoksit grupları, biyomolekülleri çapraz bağlama maddeleri olmadan doğrudan bağlamak için kullanılabilir. Manyetik mikrobuncuklar

streptavidin ile kaplanmıştır, biyotin etiketli biyomolekülleri yakalayabilir. ProtA kaplı partiküller, yönlendirilmiş immobilizasyon için antikorların Fc bölgelerine seçici olarak bağlanabilir.



Şekil 1.5. Fonksiyonelleştirilmiş manyetik mikrobuncuk çeşitleri.

Birincil antikorlarla konjuge edilmiş manyetik mikrobuncuklar, bir manyetik alan tarafından bir sensör yüzeyinde tutulabilir. Hedef antijenler daha sonra manyetik mikrobuncuklar üzerinde yakalanabilir ve ardından enzim etiketli ikincil antikorlar eklenebilir. Protein konsantrasyonu ile orantılı bir akım, enzim etiketi için bir substrat içeren bir çözelti eklenerek ve enzim ürününü elektroliz etme potansiyeli kullanılarak veya enzimle elektron alışverişi yapan bir aracı kullanılarak üretim prensibine dayanır.

MB'ler yalnızca ayırma için değil, aynı zamanda optimize edilmiş DNA hibridizasyonu için bir platform olarak da hizmet eder (Paleček ve Fojta, 2007). Bir hibridizasyon olayı diğer elektrot yüzeyinde ayrı ayrı tespit edilir. Tespit ya içsel DNA elektroaktivitesine ya da kimyasal modifikasyon, enzim etiketleri, nanopartiküller,

elektroaktif boncuklar vb. dahil olmak üzere çeşitli DNA etiketlemelerine dayanır ve ölçülen sinyalleri büyük ölçüde yükseltir.

DNA hibridizasyon sensörlerinde, tanımlanmış bir nükleotid dizisine (prob DNA) sahip ssDNA, bir yüzey üzerine immobilize edilir. Prob, dizisi analiz edilen (hedef DNA, tDNA) çözeltideki başka bir ssDNA ile birleştirilir. Dizi, DNA probunun tamamlayıcı ise, hibrit dsDNA oluşur.

1.4.5. Biyosensör Validasyon Parametreleri

İdeal bir biyosensör geliştirmek için belli fiziksel özelliklere sahip olması gerekmektedir. İdeal bir biyosensörün validasyon parametreleri aşağıda sıralanmaktadır:

1.4.5.1. Duyarlılık

Biyosensörler, analitte meydana gelen değişime karşılık anında elde edilen cevap vermesi duyarlılığı gösterir. Yüksek duyarlılığa sahip bir biyosensör, analit miktarındaki değişim ile doğru bir orantı gösterir. Duyarlılık çalışma analitinin derişimi değiştiğinde cevabın ne kadar değiştiğini gösteren bir parametredir. Bir yöntemin duyarlılığı ne kadar yüksekse seçiciliği o kadar düşüktür. İyi bir analitik yöntemde duyarlılık orta seviyelerde tutulurken seçiciliğin yüksek seviyede olması beklenir.

1.4.5.2. Seçicilik

İdeal biyosensörlerin, en önemli parametrelerinden biri seçiciliktir. Bir kompleks içerisinde tek başına analiz edilecek maddenin belirlenmesi oldukça

önemlidir. Geliştirilen biyosensörler sadece hedef analit derişimindeki değışime cevap vermelidir, aksi takdirde analiz sonucunda hata meydana gelmektedir.

1.4.5.3. Doğrusallık ve Doğrusal Aralık

Belli bir aralıkta bir analitin miktarı veya derişimi ile elde edilen sinyalin doğru orantılı olarak değışmesi ve kantitatif tayin çalışmalarında gerekli bir parametredir. Doğrusallık, analit derişimin, sinyale olan karşılığı grafiksel olarak ifade edilir. Kalibrasyonun grafiğı doğrusal bir çizgi oluşturuyorsa, oluşturduğu konsantrasyon aralığına “doğrusal aralık” denir. Bu doğrusal aralık ile elde edilen denklemdaki korelasyon katsayısının 1’e yaklaşması durumunda biyosensörün doğrusallığı değerlendirilir.

1.4.5.4. Doğruluk

Doğruluk, analiz sonucunda elde edilen değerin gerçek değere yakınlığı olarak tanımlanabilir; bir diğer tanımda da doğruluk analiz sonucunda elde edilen değerin referans değer olarak tanımlanmış değere yakınlığı olarak ifade edilir. Doğruluk ve kesinlik arasında çok yakın bir ilişki vardır; doğruluk kesinliğe bağlıdır. Doğruluk geri kazanım çalışmaları ile belirlenir ve geri kazanım sonuçları %100’e ne kadar yakınsa yöntemin o kadar doğru olduğu düşünülür.

Doğruluk hakkında bilgi sahibi olabilmek için aşağıdaki yöntemlerden biri ya da birkaçı kullanılır:

- *Referans standart ile karşılaştırma:*

Bir elektroanalitik yöntemin doğruluğunu test etmek için, referans olarak kullanılan bir standart maddenin de analiz edilmesi gerekir. Standart maddenin

sonuçları referans olarak alınabilir. Yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için üç farklı konsantrasyon seviyesi belirlenerek, en az 9 ölçüm alınır ve elde edilen sonuçlar %geri kazanım sonuçlarına dönüştürerek doğruluk değeri elde edilir.

- *Kör matriks ortamında bileşiğin geri kazanımı:*

Bu yöntemde ise destek çözeltisine farklı derişimlerde analiz edilecek maddenin etken madde eklenir. Doğrusal olarak artan oranla (%50, 75, 100, 125 ve 150) ekleme yapılır. Her seviyede en az 3 ölçüm yapılır. %bağıl standart sapma ve %bağıl hata sonuçları ile değerlendirilir.

- *Başka bir referans yöntemi kullanarak sonuçların kıyaslanması:*

Bu yöntemde geliştirilen yöntem ile 3 farklı derişimde, üçer ölçüm alır ve bu değerler % geri kazanım olarak ifade edildikten sonra, sonuçlar referans olarak kabul edilen değerler ile istatistiksel olarak karşılaştırılır. Bunun için student t ve F testleri kullanılır. t testi ile iki yöntemle elde edilen sonuçların ortalama değerleri arasında fark, F testi ile de iki yöntemle elde edilen sonuçların standart sapmaları arasındaki fark karşılaştırılır. Hesaplanarak bulunan değer, teorik çizelgede yer alan değerden küçük ise geliştirilen yöntemin, referans yöntem kadar hassas olduğunu gösterir. Sonuçlar %bağıl standart sapma ve %bağıl hata ile ifade edilir.

1.4.5.5. Teşhis Sınırı

Teşhis sınırı (TS), geliştirilen biyosensörler ile analitin teorik olarak tespit edebileceği en düşük derişimi ifade etmektedir. Sinyal/gürültü oranı yöntemi kullanıldığında genellikle 3:1 oranı kullanılır. Teşhis sınırı aşağıda denklem ile hesaplanabilir;

$$TS = 3 \ S/m$$

Bu denklemde s standart sapmayı, m ise ilgili kalibrasyon çizgisinin eğimini ifade etmektedir. TS ve duyarlılık arasında doğrusal bir bağlantı bulunmaktadır.

1.4.5.6. Tayin Alt Sınırı

Kesin olarak tayin edebileceği en düşük seviyedeki konsantrasyonun saptanmasıyla Tayin alt sınırı (TAS) değeri bulunur. Sinyal/gürültü oranı yöntemi kullanıldığında genellikle 10:1 oranı kullanılır. Tayin alt sınırı aşağıda denklem ile hesaplanabilir;

$$TAS = 10 \text{ }^S/m$$

TAS değerinin her zaman TS'den daha büyük olması beklenir. TAS ve TS arasında aşağıda belirtilen bir ilişki bulunmaktadır.

$$TAS=3,3 \times TS$$

1.4.5.7. Raf Ömrü

Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli unsur, biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca biyosensörün, kalibrasyon sıklığı, kararlılık, tekrarlanabilirlik gibi diğer ölçütlerini de etkilemektedir. Biyosensörün önemli bir özelliği, normal koşullar altında duyarlılığını koruyabildiği uzun bir kullanım ömrüne sahip olmasıdır. Kullanım ömrü, yapılan toplam ölçüm sayısına veya ölçülen analit derişiminin büyüklüğüne bağlıdır. Yüksek derişimler duyarlılığın daha hızlı bir şekilde düşmesine sebep olabilir. Ayrıca, analit derişimine bağlı olmaksızın, numunelerin içinde deaktivasyon işlemini hızlandıran diğer kimyasal türler de bulunabilir. Bir diğer önemli özellik ise biyosensörün muhafaza edilmesi ve kullanılması arasında geçen zamanın uzunluğudur.

1.4.5.8. Kesinlik

Kesinlik rastgele ve orta seviyedeki hataların sıklığını veren son derece önemli bir analitik niteliklidir ve bir numuneye aynı yöntem birden çok sayıda uygulandığında analitin tayini için elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı şeklinde tanımlanabilir.

Kesinlik belirlenen değer çevresinde dağılan rastgele hataları ölçer ve genellikle tekrar eden analizlerin standart veya bağıl standart sapması şeklinde ifade edilir. Kesinlik üç seviyede incelenir;

Tekrar edilebilirlik: Gün içi kesinlik olarak da ifade edilebilir. Gün içerisinde en az 5 defa tekrarlanmış sonuçların bağıl standart sapmalarının %1'den küçük veya ona eşit olması beklenir, ancak biyolojik analizlerde bu oran %5'e kadar kabul edilebilir seviyededir.

Orta kesinlik: Laboratuvar içerisinde deneysel farklılıklarını belirtir; deney günleri, deneyi yapan analizci, cihaz farklılığı sayılabilir. Ayrıca aynı laboratuvar da farklı zamanlarda alınan ölçümlerin birbirine yakınlığı orta kesinlik olarak ifade edilir ve bağıl standart sapmalarının %2'den küçük veya ona eşit olması istenir, biyolojik madde analizlerinde bu oran %5'e kadar kabul edilebilir seviyededir.

Tekrar elde edilebilirlik: Farklı laboratuvarlarda, laboratuvar arasında elde edilen sonuçların birbirine yakınlığı tekrar elde edilebilirlik ile ifade edilir. Bağıl standart sapmalarının %2'den küçük ya da eşit olması istenir, biyolojik madde analizlerinde bu oran %10'a kadar kabul edilebilir seviyededir.

1.4.6. Yapılmış Elektrokimyasal Çalışmalar

1.4.6.1. GFAP Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar

GFAP gibi birçok biyobelirteç tayini için yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında sıvı kromatografi, ELISA, western blot, enzim immunoassay (EIA) ve radyoimmunoassayler bulunmaktadır. Kromatografik yöntemlerden olan sıvı kromatografi ise, çok düşük konsantrasyonlarda çözünmüş bileşenleri bile yüksek hassasiyetle ayırıp analiz eden bir yöntemdir. Modern bir kromatografi yöntemi olan yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), yüksek ayırım gücü ve birçok laboratuvarında bulunması açısından yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayırma yöntemlerinden olan elektroforez ve kromatografi temelli yöntemlerdeki zaman alan numune hazırlığı, yüksek maliyetli cihazlar ve nitelikli personel ihtiyacı dezavantaj oluşturmaktadır. Bu teknikler arasında en yaygın kullanılanı, kullanımı kolay olması nedeniyle ELISA testidir. ELISA testinin hızlı cevap süresi ve kolay kullanım avantajlarına rağmen geniş yüzey alanı nedeniyle, büyük miktardaki örnekler için uygun olmakla beraber küçük miktardaki örnekler için uygun değildir (Çizelge 1.3) (Ganau ve ark., 2015).

Diğer taraftan elektrokimyasal yöntemler, biyobelirteçleri teşhis etmek için biyosensör ve aptasensörlerde yaygın olarak kullanılırlar. Biyomolekül ve elektrokimya arasındaki uyum yüksek seçiciliğe sahip cihazlar ile biyobelirteçlerin hassas tayinini sağlar. Katalitik özellikte olan nanomateriyaller ile modifiye edilmiş katı elektrotların kullanımı, biyomoleküllerin tespitinde önemli bir yere sahiptir (Eivazzadeh-Keihan ve ark., 2018).

İmmünosensörler, dönüştürücü yüzeyindeki antikor ve antijen arasındaki etkileşime dayanan biyosensörlerdir. Antijen veya antikoru teşhis etmek için çevirici-tanıyıcı tabakaya immobilize edilmiş türler sırasıyla antikor ve antijendir. Bu moleküller arasındaki kuvvetli bağlanma nedeniyle immünosensörler, bilimsel alanda çok yüksek seçicilik ve çok yüksek hassasiyet ile uygulama sunarlar. Elektrokimyasal

çevirici tarafından üretilen elektriksel sinyallerin ölçümünü elektrokimyasal immünosensörler gerçekleştirir. Bu sinyaller voltametrik, kondüktometrik, impedimetrik, potansiyometrik olabilir. Spesifik, basit, taşınabilir ve tek kullanım özelliğinden dolayı immünosensör birçok teşhis de kullanılmaktadır (Felix ve Angnes, 2018).

Çizelge 1.3.Diğer tayin yöntemleri ve biyosensör karşılaştırması.

Biyosensör	Üstünlükleri	Dezavantajları
	Hızlı eş zamanlı teşhis	Sınırlı uygulama
	Düşük maliyet	
	Taşınabilir	
	Kolay Hazırlanabilir	
	Tekrar Kullanılabilir	
	Düşük organik çözücü tüketimi	
	Seçicilik	
Klasik Analiz Yöntemler	Üstünlükleri	Dezavantajları
	Seçicilik	Yüksek Maliyet
	Duyarlılık	Numune hazırlama süresi
		Yüksek organik çözücü tüketimi
		Yüksek teknolojik cihazlar
		Uzman eleman eksikliği
		Uzun süren çalışma
		Tekrar kullanılabilir olmaması

GFAP tayini için yapılan biyosensörleri incelediğimizde manyetik mikrobuncuklar ile yapılmış GFAP çalışması olmaması tezin özgünlüğünü gösterir niteliktedir (Çizelge 1.4). Wang T. ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış olduğu bir çalışmada perde baskılı elektrot (SPCE) yüzeyini GFAP ile baskılanmış polimerik film kaplayarak GFAP tespiti için biyosensör geliştirmişlerdir. Biyosensörün daha hassas olabilmesi için çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ile yüzey modifiye edilmiştir. GFAP ile baskılanmış polimerik film (MIP) kaplı biyosensör kolayca, düşük maliyet

ile hızlı ve basit bir şekilde hazırlanmış ve bu şekilde porlu yüzey oluşturulmuştur. Perde baskılı karbon elektrotlar ile taşınabilir boyutta biyosensör geliştirilerek diferansiyel puls voltametri (DPV) tekniği kullanılmıştır. Tayin alt sınırı $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuş ve tüm ölçümler $\mu\text{g mL}^{-1}$ seviyesinde elde edilen hassas ve doğru verilerle gerçekleştirilmiştir (Wang ve ark., 2017).

Nasr B. ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada GFAP bağlı fonksiyonelleştirilmiş dikey nanotel (VNW) elektrotların, fizyolojik kompleks ve serum ortamında GFAP antikorunun (Ab) $2,9 \text{ ng mL}^{-1}$ - $290 \mu\text{g mL}^{-1}$ aralığındaki konsantrasyonuna duyarlılığında oldukça hassas bir sensör geliştirmişlerdir. Bu geliştirilen immunosensör tavşan serumunda uygulanmıştır (Nasr ve ark., 2015). GFAP'ın tespiti için nano-immünosensör tasarlamak amacıyla, DNA-protein konjugatlarının biyolojik tahlillerini ve DNA yönlendirmeli immobilizasyonu (DDI) çoğaltma için DNA barkodlama kombinasyonu kullanılmıştır. Nanograft tekniği ile en uygun aygıt duyarlılığı için DNA prob yoğunluğunun kontrolü ile minyatür bir cihaz üretilmiştir. Buradaki sonuçlar, kritik önem taşıyan biyolojik belirteçlerin tespiti için tasarlanmış nano-immünoarraylerin duyarlılık ve özgüllüğünü test etmek için ilk adım atılmıştır. Bu teknik ile ELISA tabanlı proteomiklerin karşılaştırılması için bir alternatif immünosensör oluşturulmuştur (Ganau ve ark., 2015).

Arya ve ark., 2013'te yapmış olduğu çalışmada travmatik beyin biyobelirteç teşhisi için etiketsiz elektrokimyasal biyosensör tasarlamışlardır. Mikrodisk elektrot, tarak yapısına sahip makroelektrotlar ve altın elektrotun anti-GFAP ile yüzey modifikasyonu sağlanmıştır. Ditiyobis (süksinimid propiyonat) (DSP) yüzey bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır. Serbest halde bulunan DSP'i engellemek için etanolamin (Ea) kullanılmıştır. Elektrokimyasal empedans yöntemi (EIS) ile GFAP tayini yapılmıştır. Geliştirilen bu elektrokimyasal biyosensör ile 1 pg mL^{-1} - 100 ng mL^{-1} aralığında GFAP tayini yapabildiklerini çalışmalarında belirtmişlerdir (Arya ve ark., 2013).

Abeyrathne ve ark., 2016'da yayınladıkları çalışmalarında farklı ve dolaylı bir GFAP tayini yaklaşım sunmuştur. Tümör varlığında veya travma sonrasında artan GFAP miktarına bağlı olarak üretilen GFAP oto-antikoru tayini için bir immünoassay temelli dielektrik biyosensör geliştirmişlerdir. Dielektrik sensörler, ortamdaki bir molekülün konsantrasyon farkını sensör empedansındaki farka dayanarak ölçen sistemlerdir. Ekip bu sensör sisteminin hassasiyetini $2,9 \text{ pgmL}^{-1}$ olarak bildirmiştir (Abeyrathne ve ark., 2016).

Kang ve ark., 2016 yılında fareler ile yapılmış çalışmada beyine implante edilebilir silikon basınç sensörünü geliştirmişlerdir. Geliştirilen sistemin ileriki çalışmalar için GFAP ve benzeri biyobelirteçlerin tayininde ümit vadeden bir sistem olduğu belirtilmiştir (Kang ve ark., 2016). Khetani ve ark., GFAP için polietilenimin kaplı grafen perde baskılı elektrot kullanarak bir impedimetrik immünosensör geliştirmişlerdir (Khetani ve ark., 2018). Doğrusal aralık, 1 pgmL^{-1} ila 100 ngmL^{-1} arasında bulunmuştur. Ayrıca, yerinde incelenen GFAP belirteci, tek kullanımlık immünoelektrokimyasal hücre olarak kullanılan mikrosantrifüj tüpünde analizi gerçekleşmiştir, ve kronoamperometri ile GFAP'ın yokluğu ve varlığı arasında ayırım yapmak mümkündür (González-López ve ark., 2020). GFAP tayini için nanokompozit bazlı bir elektrokimyasal immünosensör rapor edilmiştir. Altın nanoteller, karbon nanotüpler ve indirgenmiş grafen oksit nano parçacıklardan oluşan nanogözenekli bir kompozit malzemeden oluşmuştur. $0,01\text{-}10 \text{ ngmL}^{-1}$ aralığında GFAP tayini için geliştirilmiştir (Timilsina ve ark., 2021).

Agostini ve ark., 35 pM ($1,75 \text{ } \mu\text{gmL}^{-1}$) konsantrasyon seviyesinde GFAP'ı tespit edebilen çip üzerinde ultra yüksek frekanslı bir yüzey akustik dalga lab-on-chip sistemleri geliştirmişlerdir (Agostini ve ark., 2021). Ma ve ark., GFAP biyobelirtecini tayin etmek için GFAP'a özgü antikorlarla modifiye edilmiş karbon noktaları kullanarak bir floresan sandviç immün testi geliştirmişlerdir. Ticari serum örneğinde GFAP'ın TS değerini 25 pgmL^{-1} olarak bulunmuştur (Ma ve Su, 2011). Enzim etiketi kullanmaksızın, GFAP tespiti için organik alan etkili transistör (OFET) tabanlı bir biyosensör geliştirilmiş ve TS değeri 1 ngmL^{-1} bulunmuştur (Song ve ark., 2017).

Günümüzde, GFAP biyobelirtecinin belirlenmesi için TS değerleri 10-1500 pgmL⁻¹ arasında değişen ve test süreleri 60 ila 240 dakika arasında geliştirilmiş çeşitli ticari ELISA kitleri de mevcuttur. Fakat, ELISA yöntemi, nispeten maliyetli ekipman (ELISA plaka okuyucuları), zor taşınabilir ve minyatürleştirme gibi dezavantajlara sahiptir.

Ayrıca, GFAP biyobelirtecinin 20 dakika ile 3 saat 30 dakika arasında test süresi ve TS değerlerine 0,2 ile 15 pg mL⁻¹ arasında ulaştığını iddia eden Simoa® (Quanterix) ve prototipler I STATM (Abbott) ve ARCHITECT® (Abbott) gibi ticarileşmiş otomatik immüno analiz yöntemleri vardır (Korley ve ark., 2021).

Çizelge 1.4. GFAP tayini için geliştirilen biyosensör / sensör tipleri ve performansları.

Çevirici Tipi	Tanıyıcı Tabaka	Tespit Limiti /Performansı	Referans
Elektrokimyasal	MIP/MWCNTs/SPCE/DPV	0,04 µLmL ⁻¹	(Wang ve ark, 2017)
Elektrokimyasal	Ea/anti-GFAP/DSP/Au/EIS	1,0 pgmL ⁻¹	(Arya ve ark., 2017)
Elektrokimyasal	Planar interdijital dielektrik prob/GFAP	2,9 pgmL ⁻¹	(Abeyrathne ve ark., 2016)
Elektrokimyasal	VNW/etiketsiz immunosensör	2,9 ngmL ⁻¹	(Nasr ve ark., 2015)

Yukarıda görüldüğü üzere, GFAP tayini için üretilen sensör ya da biyosensörlerde yapılan tüm yılları kapsayan taramamızda görüldüğü üzere, sensör çalışmaları elektrokimyasal ağırlıklı olmakla birlikte oldukça az sayıdadır. Bu tez kapsamında GFAP tayinine yönelik geliştirilecek biyosensörün performans parametresi olarak da hassasiyet dışında, tekrarlanabilir, taşınabilir ve kolay uygulanabilir olması önem arz etmektedir.

1.4.6.2. HPV16 DNA Tayinine Yönelik Yapılmış Çalışmalar

HPV DNA biyosensörleri ile yapılmış çalışmaların bir kısmı özetlenmiştir. Danielly S. Campos-Ferreira ve çalışma arkadaşları (2013), rahim ağzı kanseri olan

hastalardan DNA ekstrakte ederek ve sentetik DNA HPV 16 virüsü üzerinde çalışarak elektrokimyasal biyosensör geliştirmişlerdir. 18,13 nM'nin tespit sınır (TS) değeri ile 18,75 nM ile 250 nM arasında bir doğrusal kalibrasyon aralığı elde edilmiştir. Bu sonuçlar, HPV'ler için yeni küçük, taşınabilir bir algılama sistemi geliştirerek, erken evrede enfeksiyonu tespit edip tanı konulmasında var olan analiz yöntemlerine bir alternatif sunmaktadır (Campos-Ferreira ve ark., 2013).

Martin Bartosik ve arkadaşları (2016), hedef HPV DNA'nın manyetik mikrobuncukla modifiye edilmiş DNA problemleri ile etkileşime girdiği elektrokimyasal çip geliştirmişlerdir. Geliştirilen sistemde antidioksijenin-peroksidaz cevabını takip etmişlerdir (Bartosik ve ark., 2016a). Bartosik M. ve ark., elektrokimyasal amperometrik ölçümle manyetik boncuk ile modifiye edilmiş perde baskılı elektrot kullanılarak döngü aracılı amplifikasyonu (LAMP) ile paralel HPV16 ve HPV18 DNA zincirinin analizini yapmışlardır. HPV pozitif hasta örnekleri ve kanser hücre hattına uygulanmıştır (Bartosik ve ark., 2018). Bartosik M. araştırma grubundan bir başka araştırmacı ise, streptavidin ile işlevselleştirilmiş manyetik mikrobuncuk yüzeyine biyotinlenmiş HPV16 DNA immobilize etmişlerdir. Daha sonra dioksijenin (DIG) etiketli döngü aracılı amplifikasyonu yüzeye immobilize edildikten sonra antiDIG-HRP etiketi yüzeye tutturulmuş ve amperometrik ölçüm alınmıştır. 61 adet serviks doku örneğinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Anton ve ark., 2020).

Qingfeng Lv ve arkadaşları 2019 yılında karbodiimidazol ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyini tasarlayarak, HPV16-E7 DNA sekansının tayin alt sınırı 1 fM olarak bulmuşlardır. Duyarlılığı arttırmak için, hedef HPV16-E7 DNA dizisi altın nanoparçacık (GNP) üzerine konjuge edilmiştir (Lv ve ark., 2019). Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında, anti-DNA/RNA antikor kullanılmadığı ve *Horseradish peroksidaz homopolimeri* ile konjuge edilmiş bir enzim ile sinyal hassasiyetine yönelik bir çalışma yapılmadığı görülmüştür.

Avelino K. ve ark. HPV tayini için polipirol film ve Altın nanopartikül ile nükleik asit biyosensörü geliştirmişler ve kalibrasyon aralığı 100 pgmL^{-1} - 1 fgmL^{-1} olarak bulmuşlardır. TS ve TAS değeri $0,89 \text{ pgmL}^{-1}$ ve $2,70 \text{ pgmL}^{-1}$ olarak elde

edilmiştir (Avelino ve ark., 2021). Aynı ekibin bir başka çalışmasında ise, altın nanopartikül içerisindeki polianilin matriksine dayanan bir nanoyapılı platform geliştirmişlerdir. HPV16 için kalibrasyon aralığı 1 pgmL^{-1} - 100 pgmL^{-1} ve TS değeri $7,43 \text{ pgmL}^{-1}$ bulunmuştur (Avelino ve ark., 2020).

Campos-Ferreira S. ve ark., altın elektrot yüzeyine l-sistein elektropolimerizasyonu uygulayarak, elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirmişlerdir. HPV16 probu yüzeye immobilize edilmiştir. Ölçüm, HPV16 probu ve hedef DNA arasında hibridizasyondan önce ve sonra metilen mavisi indirgenme DPV sinyaline dayanmaktadır. Geliştirmiş oldukları elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile çalışma aralığı $18,75\text{-}250 \text{ nM}$, TS değeri $18,13 \text{ nM}$ bulunmuştur (Campos-Ferreira ve ark., 2013). Aynı ekip 2016 yılında, kalem grafit elektrot ile plasmidden klonlanmış guaninsiz 23 mer HPV16 dizisini yüzeye immobilize etmişlerdir. HPV16 DNA biyosensörü $40\text{-}5000 \text{ pgmL}^{-1}$ çalışma aralığında ve teşhis sınırı 500 nM bulunmuştur (Campos-Ferreira ve ark., 2016).

Farzin L. ve ark. amin-iyonik sıvılar ile işlevselleştirilmiş indirgenmiş grafen oksit immunosensör platformu ile elektrokimyasal HPV16 DNA tayini yapılmıştır. Geliştirilen immunosensör ile HPV16 pozitif baş-boyun kanser hastalarına uygulanmıştır. Lineer aralık $8,5\text{-}10,7 \text{ nM}$ ve TS değeri $1,3 \text{ nM}$ olarak bulunmuştur (Farzin ve ark., 2020). L. Civit ve ark. altın çalışma elektrotlarının modifikasyonu için bir tiyollenmiş prob ve bir bipodal alkanetiyoleden oluşan bir immobilizasyon stratejisi kullanmışlardır. HPV16, HPV18 ve HPV45 tayini için HRP etiketli sandviç yöntemi ile çalışmışlardır. Çalışma aralığı $0,1\text{-}10 \text{ nM}$, TS değeri 200 pM olarak bulmuşlardır (Civit ve ark., 2012). Jimenez A.M. ve ark., ticari streptavidin ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik mikroboncuklara alternatif olarak kendileri manyetik mikroboncukları sentezlemişlerdir. Elektrokimyasal ve PCR yöntemi ile HPV16 DNA zincir analizi ile geliştirilen biyosensörün karşılaştırmasını yapmışlardır ve elektrokimyasal yöntemin performansını daha yüksek bulmuşlardır (Jimenez ve ark., 2016).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deneyde Kullanılan Elektrokimyasal Sistemler ve Laboratuvar Cihazları

- a) Potansiyostat: CHI812B cihazı ve Autolab PGSTAT302N cihazı
- b) Yazılım: CHI programı ve Nova 2.1
- c) Elektrokimyasal deney hücresi
- d) Elektrot bağlantı kablosu (Dropsens CAC)
- e) Elektrotlar:
 - I. Çalışma Elektrot: Perde baskılı karbon elektrot (DropSens DRP-110)
 - II. Referans Elektrot: Ag/AgCl elektrot (3 M NaCl) (BASi MF 2052)
- f) Manyetik Toparlama Standı (Invitrogen, Thermo-Scientific, ABD)
- g) Teflon Manyetik yatak (El yapımı)
- h) Hassas Terazî (Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Almanya)
- i) Termal-Çalkalayıcı İnkübatör (UnivortempMT100 (Universal Labortechnik Leipzig, Almanya))
- j) pH Metre (Hanna instruments, ABD)
- k) Santrifüj (Thermo-Scientific, ABD)
- l) Ultrasonik Banyo (Selecta, İsviçre)
- m) Otoklav (HICLAVE, HV-85L, HIRAYAMA, Almanya)
- n) Çeşitli hacimlerde kapaklı cam balon jojeler, beherler, mezür
- o) Otomatik mikro pipetler ve uygun pipet uçları
- p) Farklı hacimlerde (0,2mL, 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL) santrifüj mikrotüpler

2.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Deneylerde kullanılan biyolojik malzemelerden dolayı kromatografik ve/veya analitik saflıkta kimyasal maddeler kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Madde	Firma
Tris hidroksimetil aminometan	Sigma-Aldrich
Etilendiamin tetraasetik asit	Sigma-Aldrich
Sodyum Klorür	Scharlau
Hidroklorik Asit	Sigma-Aldrich
Hidrokinon	Sigma-Aldrich
Hidrojen Peroksit	Sigma-Aldrich
Disodyum fosfat	PanReac
Mono bazik sodyum fosfat	Scharlau
Yüzeyi bloke eden tampon	Thermo-scientific
Ultrasonik Saf Su	
Potasyum Klorür	Scharlau
Mono potasyum fosfat	Labkem
2-(N-morfin) etanosülfonik asit	Sigma-Aldrich
1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) karbodiimid	Sigma-Aldrich
N-hidroksisüksinimid	Sigma-Aldrich
Etanolamin	Sigma-Aldrich
Tris (hidroksimetil) aminometan	Sigma-Aldrich
Sığır serum albümin	Sigma-Aldrich
Kalsiyum Klorür	Sigma-Aldrich
GFAP ELISA kit	R&D Systems
S100 kalsiyum bağlayıcı protein B	Sigma-Aldrich
Hemoglobin	Sigma-Aldrich
İnsan serum albümin	Sigma-Aldrich
Ticari İnsan Serumu	Sigma-Aldrich
İmmünoglobülin G	Sigma-Aldrich

Çizelge 2.2. Deneyde kullanılan GFAP ELISA kit içerisindeki kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Firma
Fare anti-insan GFAP yakalama antikoru	R&D Systems
Biyotinlenmiş koyun anti-insan GFAP tayin antikoru	R&D Systems
Rekombinant İnsan GFAP standartı	R&D Systems
Streptavidin-HRP	R&D Systems

2.3.Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

- a) pH 7,4 bağlama-yıkama Çözeltisi (B&W)
- b) pH 7,4 fosfat tampon tuzu (PBS)(1X)
- c) 0,05 M fosfat tamponu (pH 6,0)
- d) 0,1 M fosfat tamponu (pH 8,0)
- e) 10 mM hidrokinon (HQ)
- f) 0,1 M hidrojen peroksit (H_2O_2) (%30)
- g) Bloke eden tampon (%1 kasein)
- h) 0,025 M MES tamponu
- i) EDC/NHS karışım çözeltisi
- j) 1 M etanolamin çözeltisi
- k) 10 mM TRIS-HCl çözeltisi
- l) Reaktif seyreltme çözeltisi
- m) Substrat çözeltisi
- n) Yıkama Çözeltisi
- o) Durdurma Çözeltisi

2.4.Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Deneyisel çalışmalarda, oligonükleotid/proteinleri ve manyetik mikrobuncukların kolayca yüzeye immobilize eden, spesifik olmayan analitlerin bağlanmasını engelleyen ve kolayca oligonükleotidler/proteinleri çözebilen çözeltiler seçilmiştir.

Bağlama-Yıkama Çözeltisinin (B&W) Hazırlanması (pH 7,4):

B&W tamponu için 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA ve 2 mM NaCl aynı balon joje içinde hazırlanmıştır. 5 M HCl çözeltisi ile pH 7,4 değerine ayarlanmıştır. Otoklav yardımıyla steril hale getirilmiştir.

Fosfat Tampon Tuzunun Hazırlanması (PBS)(1X):

PBS tamponu için 0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,01 M Na₂HPO₄ ve 0,0018 M KH₂PO₄ aynı balon joje içinde hazırlanmıştır. 5 M HCl çözeltisi ile pH 7,4 değerine ayarlanmıştır. Otoklav yardımıyla steril hale getirilmiştir.

0.05 M Fosfat Tamponunun Hazırlanması (pH 6,0):

Fosfat tamponu için 10X stok fosfat tamponundan 50 mL mezür yardımıyla balon jojeye aktarılıp, ultrasonik saf su ile 1 L ye tamamlanmıştır. 5 M HCl çözeltisi ile pH 6,0 değerine ayarlanmıştır.

0,1 M Fosfat Tamponunun Hazırlanması (pH 8,0):

Fosfat tamponu için Na₂HPO₄ ve NaH₂PO₄ kimyasal maddeleri hassas terazide tartılarak, aynı balon joje içinde hazırlanmıştır. 5 M HCl çözeltisi ile pH 8,0 değerine ayarlanmıştır.

10 mM Hidrokinon (HQ) Çözeltisinin Hazırlanması:

11 mg hidrokinon kimyasal maddesi hassas terazide tartılıp, 1 mL mikrosantrifüj tüp içerisinde pH 6,0 fosfat tamponu ile hazırlanmıştır.

0,1 M %30 Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Çözeltisinin Hazırlanması:

50 µL H₂O₂ çözeltisi mikro pipet ile alınıp, 5 mL hacminde balon joje içerisinde pH 6,0 fosfat tamponu ile hazırlanmıştır.

0,025 M MES Tamponunun Hazırlanması:

0,490 gram MES kimyasal maddesi hassas terazide tartılıp, 100 mL balon joje içerisinde distile su ile hazırlanmıştır ve pH 5,0 değerine ayarlanmıştır.

EDC/NHS Karışım Çözeltisinin Hazırlanması:

EDC ve NHS kimyasal maddesi hassas terazide 1:1 oranında tartılıp 1 mL mikrosantrifüj tüp içerisinde pH 5,0 MES tamponu ile hazırlanmıştır.

1,0 M Etanolamin Çözeltisinin Hazırlanması:

Etanolamin çözeltisinden 30 µL alınıp, 0,5 mL mikrosantrifüj tüp içinde pH 8,0 fosfat tamponu ile hazırlanmıştır.

0,1 M TRIS-HCl Çözeltisinin Hazırlanması:

1,211 gram TRIS-baz kimyasal maddesi hassas terazide tartılır, 100 mL balon joje içerisinde distile su ile hazırlanmıştır ve pH 7,2 değerine ayarlanmıştır.

Reaktif Seyreltme çözeltisi:

Reaktif seyreltme çözeltisi olarak 1% BSA içeren PBS çözeltisi hazırlanmıştır.

Yıkama Çözeltisi:

Yıkama çözeltisi olarak 0,05% Tween® 20 içeren PBS çözeltisi hazırlanmıştır.

Durdurma Çözeltisi:

Durdurma çözeltisi olarak 2N H₂SO₄ kullanılmıştır.

2.5.Deneyde Kullanılan Manyetik Mikroboncuklar

Elektrot yüzeyinde bir manyetik taban oluşturmak amacıyla çeşitli manyetik mikroboncuklar kullanılmıştır.

Çizelge 2. 3. Modifikasyon sırasında kullanılan çeşitli manyetik mikrobuncuklar

Kimyasal Madde	Kısaltması	Firma
Streptavidin ile fonksiyonlaştırılmış manyetik buncuklar	MB-Strep	Invitrogen
Neutravidin ile fonksiyonlaştırılmış manyetik buncuklar	MB-Neut	SpeedBeads™
Karboksil ile fonksiyonlaştırılmış manyetik buncuklar	MB-COOH	Invitrogen

2.6. Deneyde Kullanılan Oligonükleotid Dizileri

Deneyde her biri 40 mer olan B-Cp-RNA ve HPV-16-1753-DNA oligonükleotid dizileri kullanılmıştır.

Çizelge 2.4. Oligonükleotid dizileri.

Oligonükleotid dizileri	Kısaltması	Firma
5'-Biotin- UACGCAAUUUUGGAGGCUCUA UCAUCAUACACA UUGGAGA-3 (40 mer)	B-Cp- RNA	IDT Technologies
5'TCTCCAATGTGTATGATGATAGA GCCTCCAAAATTGCGTA (40 mer)	HPV-16- 1753-DNA	IDT Technologies

2.7. Deneyde Kullanılan Oligonükleotidlerin Hazırlanması

B-Cp-RNA ve HPV-16-1753 DNA oligonükleotid stok çözeltileri, 100 mM olarak PBS (pH 7,40) tamponunda hazırlanmıştır. Stok çözeltiler, küçük hacimlerde 200 µL'lik mikrosantrifüj tüplere ayrılarak, -80°C derin dondurucu da muhafaza edilmiştir. B-Cp-RNA B&W tamponu ile seyreltilirken; HPV-16-1753-DNA PBS ile seyreltilmiştir.

2.8. Deneyde Kullanılan Enzim Substratları

Sensörün kararlılığını, tekrar kullanılabilirliğini ve verimliliğini arttırmak amacıyla çeşitli enzim substratları kullanılmıştır.

Çizelge 2.5. Enzim Substratları.

Enzim Substratları	Firma
Streptavidin- Horseradish Peroksidaz	R&D Systems
Protein A- Horseradish Peroksidaz	Sigma-Aldrich
Protein A- Poly-Horseradish Peroksidaz -40	Antibodies-online
Protein A- Poly-Horseradish Peroksidaz -80	Fitzgerald
İmmünoglobülin G- Horseradish Peroksidaz	Abcam
Histostar	MBL Life Science

2.9.Nükleik Asit Biyosensör Geliştirme Basamakları

- ⊕ Manyetik mikrobuncuk seçimi
- ⊕ Manyetik mikrobuncukların B&W çözeltisi ile yıkanması
- ⊕ Biotinlenmiş RNA probunun bağlanması
- ⊕ Manyetik mikrobuncukların PBS çözeltisi ile yıkanması
- ⊕ DNA hibridizasyonu
- ⊕ Manyetik mikrobuncukların BB çözeltisi ile yıkanması
- ⊕ Antikörün bağlanması
- ⊕ Manyetik mikrobuncukların BB çözeltisi ile yıkanması
- ⊕ Enzim etiketinin bağlanması
- ⊕ Manyetik mikrobuncukların BB çözeltisi ile yıkanması
- ⊕ Kronoamperometrik ölçüm

2.9.1.Manyetik Mikrobuncukların Seçimi

5 µL Streptavidin ile fonksiyonlaştırılmış manyetik mikrobuncuk (MB-Strep) süspansiyonu ve 4 µL Neutravidin ile fonksiyonlaştırılmış manyetik mikrobuncuk süspansiyonu (MB-Neut) kullanılmıştır.

2.9.2. Manyetik Mikroboncukların B&W Çözeltisi ile Yıkama

Manyetik mikroboncuklar 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne eklenir, 50 µL B&W çözeltisi içerisinde süspansiyon haline gelir. Manyetik boncukların ayrılması için mikrosantrifüj tüpler manyetik toplama standında 2 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Bu yıkama işlemi 2 defa gerçekleştirilir.

2.9.3. Biotinlenmiş RNA Probonun Bağlanması

MB-Strep üzerine 25 µL Biotin ile işaretli RNA prob dizisi (B-Cp-RNA), termal-çalkalayıcı inkübatörde (950 rpm, 37°C koşullarda) belli süre aralığında yüzeye immobilize edilmiştir.

2.9.4. Manyetik Mikroboncukların PBS Çözeltisi ile Yıkama

İnkübasyondan sonra B-Cp-RNA/MB-Strep süspansiyonun yıkanması için mikrosantrifüj tüpler manyetik toplama standına yerleştirilir ve 2 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Daha sonra 50 µL PBS çözeltisi eklenir ve 2 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. PBS ile yıkama işlemi 2 defa gerçekleştirilir. Bu yıkama işlemi yüzeye bağlanmayan prob dizileri uzaklaştırmak için yapılır.

2.9.5. DNA Hibridizasyonu

MB üzerine immobilize olan Biotin ile işaretli RNA prob dizisi, 25 µL PBS'de hazırlanmış hedef HPV16 DNA dizisi ile termal-çalkalayıcı inkübatörde (950 rpm, 37°C koşullarda) belli süre aralığında adsorpsiyon yoluyla hibridizasyonu gerçekleşmiştir.

2.9.6. Manyetik Mikroboncukların BB Çözeltisi ile Yıkaması

Hibridizasyon işleminden sonra Hedef HPV16 DNA/B-Cp-RNA/MB-Strep süspansiyonun yıkanması için mikrosantrifüj tüpler manyetik toplama standına yerleştirilir ve 2 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Daha sonra 50 µL BB çözeltisi eklenir ve 2 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. BB ile yıkama işlemi 2 defa gerçekleştirilir. Bu yıkama işlemi hibrit olmayan hedef DNA dizilerini uzaklaştırmak için yapılır.

2.9.7. Antikorum Bağlanması

DNA/RNA hibridizasyon çalışmalarında, benzersiz bağlanma özelliklerine sahip spesifik ve çok yönlü biyoalgılayıcılar olması nedeniyle antikör içeren protokoller nükleik asitlerin belirlenmesine oldukça fayda sağlamaktadır.

Hibridizasyon sonrası 25 µL BB' de hazırlanmış anti-DNA/RNA antikoru, termal-çalkalayıcı inkübatörde (950 rpm, 37⁰C koşullarda) Hedef HPV16 DNA/B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine immobilize edilmiştir.

2.9.8. Manyetik Mikroboncukların BB Çözeltisi ile Yıkaması

İmmobilizasyon işleminden sonra anti-DNA/RNA/Hedef HPV16 DNA /B-Cp-RNA/MB-Strep süspansiyonun yıkanması için mikrosantrifüj tüpler manyetik toplama standına yerleştirilir ve 2 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Daha sonra 50 µL BB çözeltisi eklenir ve 2 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. BB ile yıkama işlemi 2 defa gerçekleştirilir. Bu yıkama işlemi yüzeye bağlanmayan anti-DNA/RNA antikoru uzaklaştırmak için yapılır.

2.9.9. Enzim Etiketinin Bağlanması

Poly-HRP, kovalent HRP homopolimeri içeren geliştirilmiş bir enzimatik etikettir. Sulu çözeltilerde stabildir. Enzimin aktivitesini artırır. Poly-HRP kovalent bağ ile proteinlere bağlanır. Tek ya da birden fazla HRP içeren homopolimer ile konjuge edilmiş proteinler yöntemin duyarlılığını ve seçiciliğini artırır.

Anti-DNA/RNA antikoruna bağlanıp, bağlanmayan antikor uzaklaştırdıktan sonra 25 µL BB çözeltisi ile hazırlanmış Protein A-HRP, Prot A-Poly-HRP 40, Prot A-Poly-HRP80, AntiIgG-HRP ve Histostar enzim etiketleri kullanılmıştır. Termal-çalkalayıcı inkübatörde (950 rpm, 37°C koşullarda) belli bir süre immobilize edilmiştir.

2.9.10. Manyetik Mikroboncukların BB Çözeltisi ile Yıkama

İmmobilizasyon işleminden sonra enzim etiketi/anti-DNA/RNA/Hedef HPV16 DNA /B-Cp-RNA/MB süspansiyonun yıkama için mikrosantrifüj tüpler manyetik toplama standına yerleştirilir ve 2 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Daha sonra 50 µL BB çözeltisi eklenir ve 2 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. BB ile yıkama işlemi 2 defa gerçekleştirilir. Bu yıkama işlemi yüzeye bağlanmayan enzim etiketini uzaklaştırmak için yapılır.

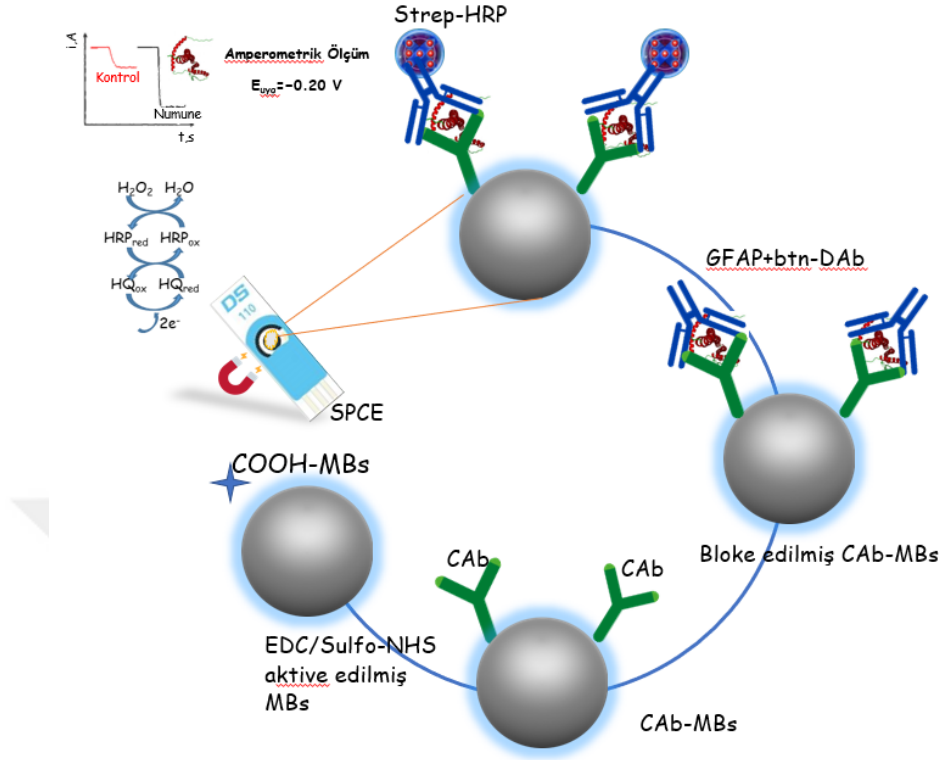
2.9.11. Kronoamperometrik Ölçüm

Elektrot yüzeyine bağlanan DNA/RNA homokonjugatları, H₂O₂/HQ sistemi kullanılarak amperometrik ölçümlerde bir HRP-konjuge sekonder antikor ile etiketlenen proteinler tarafından tanınır. HQ elektron transfer aracına, H₂O₂ enzim substratı eklenerek yükseltgenme mekanizmasına dayanır. H₂O₂'nin HRP tarafından enzimatik indirgenmesini ve HQ tarafından HRP'nin oksitlenmesini içerir.

Manyetik mikrobuncuklar 50 µL BB çözeltisi ile yıkama işlemi tamamlandıktan sonra her amperometrik ölçümden önce 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0) ile süspansiyon hale gelmiştir. Manyetik mikrobuncuk süspansiyonu, çalışma elektrotunun yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde (50 µL) damlatılır ve manyetik yatak yardımıyla potansiyostata bağlanır. Manyetik mikrobuncuklar ile yüzeyi kaplanmış elektrot, elektrokimyasal hücreye daldırılır.

Elektrokimyasal hücre içerisinde bulunan ölçüm çözeltisi, 1 mM HQ varlığında 50 mM pH 6,0 fosfat tamponu içermektedir. Amperometrik ölçüm sırasında -0,2 V teşhis potansiyeli uygulanmış ve harici gümüş/gümüş klorür referans elektrotu kullanılmıştır. Akım sabitlendiğinde 50 µL 0,1 M H₂O₂ (%30) enzim substrat çözeltisi elektrokimyasal hücreye eklenmiştir. Amperometrik cevap, enzim substratı eklenmeden hemen önceki akım değeri ile eklendikten sonra akım sabitlendiğindeki değerin arasındaki fark alınır. Amperometrik cevapların S/B değerleri kıyaslanarak optimum sonuçlar elde edilir. B değeri kontrol ve S değeri hedef HPV16 DNA akım değerini göstermektedir.

2.10. GFAP İmmunosensör Geliştirme Basamakları



Şekil 2.1. GFAP immünosensör şematik gösterimi.

- ⊕ Karboksil gruplu manyetik mikrobuncukların MES tamponu ile yıkanması
- ⊕ Mikrobuncukların karboksil gruplarının EDC/sulfo-NHS ile aktifleştirme
- ⊕ MES tamponu ile yıkanması
- ⊕ Yakalama antikorunun yüzeye bağlanması
- ⊕ MES tamponu ile yıkanması
- ⊕ Etanolamin ile yüzeyin bloke edilmesi
- ⊕ TRIS-HCl ve PBS çözeltileri ile yıkanması
- ⊕ GFAP standartı ve tayin antikor karışımının yüzeye bağlanması
- ⊕ BB çözeltisi ile yıkanması
- ⊕ Strep-HRP çözeltisinin yüzeye bağlanması
- ⊕ BB çözeltisi ile yıkanması
- ⊕ Krontamperometrik ölçüm

2.10.1. Karboksil Gruplu Manyetik Mikroboncukların MES Tamponu ile Yıkaması

Karboksil gruplu manyetik mikroboncuklar (MB-COOH) 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılır, 50 µL MES tamponu içerisinde süspansiyon haline gelir. Manyetik mikroboncukların yıkaması için önce termal-çalkalayıcı (25°C, 950 rpm koşullarda)'da 10 dk çalkalanır, ardından mikrosantrifüj tüpler manyetik toplama standında 3 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Bu yıkama işlemi 2 defa gerçekleştirilir.

2.10.2. Mikroboncukların Karboksil Gruplarının EDC/sulfo-NHS ile Aktifleştirme

Manyetik mikroboncukların yüzeyindeki karboksil grupların aktive edilmesi için, yeni hazırlanmış bir EDC/sulfo-NHS karışım çözeltisi 1:1 oranında hazırlanmış ve termal-çalkalayıcıda (950 rpm, 25 °C koşullarda) 35 dakika inkübasyonu sağlanmıştır.

2.10.3. MES Tamponu ile Yıkaması

Yüzeyi aktive edilmiş karboksil gruplu manyetik mikroboncukların süpernatantı mikropipet yardımıyla uzaklaştırılır ve 50 µL MES tamponu ile süspansiyon haline gelir. Manyetik boncukların yıkaması mikrosantrifüj tüpler manyetik toplama standında 3 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Bu yıkama işlemi 2 defa gerçekleştirilir.

2.10.4. Yakalama Antikoru Yüzeye Bağlanması

MB-COOH üzerine yakalama antikoru (CAb), termal-çalkalayıcı inkübatörde (950 rpm, 25 °C koşullarda) belli süre aralığında yüzeye immobilize edilmiştir.

2.10.5. MES Tamponu ile Yıkanması

İmmobilizasyon işleminden sonra CAb/MB-COOH süspansiyonu yıkanması için mikrosantrifüj tüpler manyetik toplama standına yerleştirilir ve 3 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Daha sonra 50 µL MES çözeltisi eklenir ve 3 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Bu yıkama işlemi 2 defa gerçekleştirilir.

2.10.6. Etanolamin ile Yüzeyin Bloke Edilmesi

CAb/MB-COOH yüzeyindeki antikörlerin bağlanma yönleri farklılık gösterebilir. GFAP standartının yüzeye bağlanma problemini engellemek ve yana doğru eğik halde bulunan antikörleri bloke etmek için etanolamin kullanılmıştır. 1 M etanolamin, 60 dakika termal-çalkalayıcı inkübatörde (950 rpm, 25 °C koşullarda) CAb/MB-COOH yüzeyine immobilize edilmiştir.

2.10.7. TRIS-HCl ve PBS Çözeltileri ile Yıkanması

Yüzeyin bloke edilmesi işleminden sonra CAb/MB-COOH süspansiyonu yıkanması için mikrosantrifüj tüpler manyetik toplama standına yerleştirilir ve 3 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Daha sonra 50 µL 0,1 M TRIS-HCl çözeltisi eklenir ve 3 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. En son 50 µL PBS çözeltisi eklenir ve 3 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Bu yıkama işlemi 2 defa gerçekleştirilir.

2.10.8. GFAP Standartı ve Tespit Antikor Karışımının Yüzeye Bağlanması

CAb/MB-COOH yüzeyi bloke edildikten sonra GFAP standartı ve btn-DAb antikör karışımı, termal-çalkalayıcı inkübatörde (950 rpm, 25 °C koşullarda) belli süre aralığında yüzeye immobilize edilmiştir.

2.10.9. BB Çözeltisi ile Yıkanması

İmmobilizasyon işleminden sonra GFAP+btn-DAb/CAb/MB-COOH süspansiyonu yıkanması için mikrosantrifüj tüpler manyetik toplama standına yerleştirilir ve 3 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Daha sonra 50 µL BB çözeltisi eklenir ve 3 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Bu yıkama işlemi 2 defa gerçekleştirilir.

2.10.10. Strep-HRP Çözeltisinin Yüzeye Bağlanması

Strep-HRP çözeltisi belli oranlarda BB çözeltisi ile seyreltilmiştir. 25 µL BB çözeltisi ile hazırlanmış Strep-HRP, termal-çalkalayıcı inkübatörde (950 rpm, 37°C koşullarda) belli bir süre immobilize edilmiştir.

2.10.11. BB Çözeltisi ile Yıkanması

İmmobilizasyon işleminden sonra Strep-HRP/GFAP+DAb/CAb/MB-COOH süspansiyonun yıkanması için mikrosantrifüj tüpler manyetik toplama standına yerleştirilir ve 3 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Daha sonra 50 µL BB çözeltisi eklenir ve 3 dk bekletildikten sonra, mikropipet yardımıyla çözelti uzaklaştırılır. Bu yıkama işlemi 2 defa gerçekleştirilir.

2.10.12. Kronoamperometrik Ölçüm

Elektrot yüzeyindeki Strep-HRP/GFAP+btn-DAb/CAb/MB-COOH, H₂O₂/HQ sistemi kullanılarak amperometrik ölçümlerde bir HRP-konjuge sekonder antikor ile etiketlenen proteinler tarafından tanınır. HQ elektron transfer aracına, H₂O₂ enzim substratı eklenerek yükseltgenme mekanizmasına dayanır. H₂O₂'nin HRP tarafından enzimatik indirgenmesini ve HQ tarafından HRP'nin oksitlenmesini içerir.

Manyetik mikrobuncuklar 50 µL BB çözeltisi ile yıkama işlemi tamamlandıktan sonra her amperometrik ölçümden önce 50 mM fosfat tamponu (pH 6,0) ile süspansiyon hale gelmiştir. Manyetik mikrobuncuk süspansiyonu, çalışma elektrotunun yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde (50µL) damlatılır ve manyetik yatak yardımıyla yatak yardımıyla potansiyostata bağlanır. Manyetik mikrobuncuklar ile yüzeyi kaplanmış elektrot, elektrokimyasal hücreye daldırılır. Elektrokimyasal hücre içerisinde bulunan ölçüm çözeltisi, 1 mM HQ varlığında 50 mM pH 6,0 fosfat tamponu içermektedir. Amperometrik ölçüm sırasında -0,2 V teşhis potansiyeli uygulanmış ve harici gümüş/gümüş klorür referans elektrotu kullanılmıştır. Akım sabitlendiğinde 50 µL 0,1 M H₂O₂ (%30) enzim substrat çözeltisi elektrokimyasal hücreye eklenmiştir. Amperometrik cevap, enzim substratı eklenmeden hemen önceki akım değeri ile eklendikten sonra akım sabitlendiğindeki değerin arasındaki fark alınır. Amperometrik cevapların S/B değerleri kıyaslanarak optimum sonuçlar elde edilecektir. B değeri kontrol ve S değeri GFAP akım değerini göstermektedir.

2.11. Deneyde Kullanılan Örneklerin Hazırlanması

2.11.1. Ticari İnsan Serumunun Hazırlanması

ABD insan erkek plazmasından hazırlanmış serum çözeltisi satın alınmıştır. Ticari sentetik serum çözeltisi içerisindeki diğer biyolojik moleküllerin çökmesi için asetonitril ilave edilerek 25 dk 3500 rpm ultrasantrifüj işlemi yapılmıştır. Süpernatantı alınarak, GFAP çözeltisi belli miktarda ilave edilmiştir.

2.11.2. Beyin Doku Protein Analizi

Analiz edilen beyin dokusu örnekleri, CIEN Vakfı'nın Doku Bankası (BT-CIEN)'nden alınmıştır. Beyin doku bankasının protokolüne göre, vakaların nöropatolojik teşhisi ve sınıflandırılması uluslararası konsensüs kriterlerine göre yapılmıştır ve tüm bireylerden yazılı aydınlatılmış onamları alınmıştır. Beyin doku ekstraksiyonu, belirtilen protokole göre yapılmıştır (Barderas ve ark., 2012)(Barderas

ve ark., 2013). Kısaca, doku örnekleri, bir proteaz inhibitör kokteyli (Sigma) ile PBS içinde %0,5 SDS ile mekanik olarak küçük parçalar halinde hazırlanmıştır ve hazırlama sürecinde kuru buz içerisinde muhafaza edilmiştir. Son olarak 10.000 rpm'de santrifüj edilerek fazlara ayrılmıştır. Elde edilen beyin doku ekstraktları kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır. Protein ekstraktları, önce SDS PAGE %10 jellerinin Coomassie boyamasıyla, örneğin kalitesi değerlendirilmiştir (Razzino ve ark., 2020).

2.12. ELISA Yöntemi ile GFAP Analizi

Standart bir yöntem olan ELISA tekniği ile GFAP analizi yapılarak, geliştirilen immunosensörün, standart bir analiz yöntemiyle karşılaştırılması yapılmıştır. ELISA ve biyosensör hazırlanırken aynı immunokonjugatlar kullanılmıştır. Öncelikle ELISA plakası hazırlanmıştır. Taşıyıcı protein olmaksızın PBS ile CAb antikor (4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) seyreltilmiştir. Mikroplakaların kuyucukları 50 μL CAb antikor çözeltisi ile kaplanıp, gece boyunca inkübasyonu gerçekleştirilmiştir. Çözelti uzaklaştırdıktan sonra, yıkama çözeltisi ile üç kez yıkanır. Ardından yüzeyi bloke etmek için 300 μL reaktif seyreltme çözeltisi ile kaplanır ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir. Çözeltiyi uzaklaştırdıktan sonra, tekrar yıkama çözeltisi ile üç kez yıkanır. Reaktif çözeltisi ile seyreltilmiş GFAP ve/veya beyin doku ekstraktları, 50 μL , ile kaplanır ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilir. Çözeltiyi uzaklaştırdıktan sonra, tekrar yıkama çözeltisi ile üç kez yıkanır. Reaktif çözeltisi ile seyreltilmiş Strep-HRP, 50 μL , ile kaplanır ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilir. Çözeltiyi uzaklaştırdıktan sonra, tekrar yıkama çözeltisi ile üç kez yıkanır. Substrat çözeltisi, 50 μL , ile kaplanır ve oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilir. Ardından durdurma çözeltisi, 25 μL , ile kaplanır. İnkübasyon süresince ışığa maruz bırakılmamıştır. ELISA Mikroplaka okuyucuda, 450 nm dalga boyunda ölçümler alınmıştır.

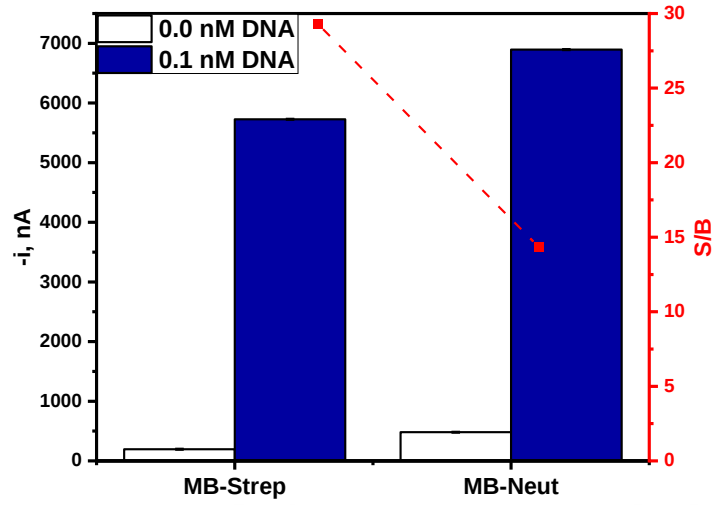
3. BULGULAR

3.1. Hedef HPV16 DNA'sının Belirlenmesi için Nükleik Asit Bazlı Biyosensör Geliştirilmesine Dayalı Elde Edilen Bulgular

3.1.1. Fonksiyonlaştırılmış Manyetik Mikrobuncukların HPV16 DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

MB-Strep ve MB-Neut manyetik mikrobuncuklar, mikrosantrifüj tüp içerisinde yöntem 2.9.1' de anlatıldığı gibi uygulanmış ve optimizasyon çalışması yapılmıştır. MB-Strep, B&W çözeltisi ile yıkandıktan sonra 25 µL 0,1 µM B-Cp-RNA probu 30 dk inkübe edilmiştir. 50 µL PBS ile 2 defa manyetik mikrobuncuklar yıkandıktan sonra 25 µL PBS ve 0,1 nM hedef HPV16 DNA dizisi 30 dk inkübasyon işlemi yapılmıştır. 50 µL BB ile 2 defa MB-Strep yıkandıktan sonra 25 µL 2 µgmL⁻¹ anti-DNA/RNA antikoru 15 dk inkübasyon işlemi yapılmıştır. Son olarak, 50 µL BB ile 2 defa MB-Strep yıkandıktan sonra 25 µL BB ile 1/1000 seyreltilmiş AntiIgG-HRP 15 dk inkübasyon işlemi yapılmıştır. İnkübasyon işlemi termal-çalkalayıcıda 950 rpm, 37°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir.

Hedef DNA sinyali üzerine farklı fonksiyonlaştırılmış manyetik mikrobuncukların etkisi yöntem 2.9.11'de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Amperometrik cevap ve S/B oranı Şekil 3.1'de yer almaktadır. MB-Strep ile modifiye edilmiş nükleik asit biyosensörü ile elde edilen S/B oranı 29,30 iken, MB-Neut ile hazırlanan nükleik asit biyosensörün S/B oranı 14,35 olarak bulunmuştur. Her iki fonksiyonlaştırılmış manyetik mikrobuncuklar ile hazırlanan nükleik asit biyosensörün S/B oranı incelendiğinde MB-Strep ile hazırlananla daha yüksek değer elde edilmiştir.



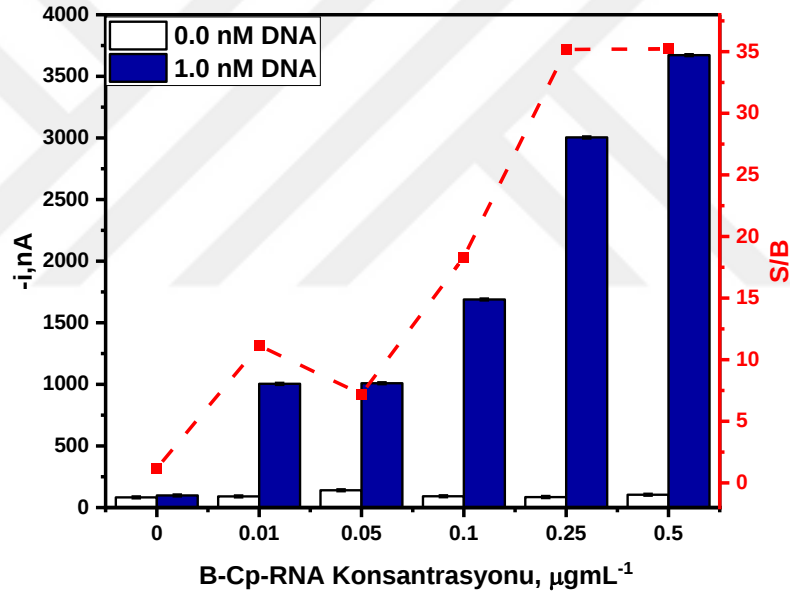
Şekil 3.1. Manyetik mikrobuncukların kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etkisinin karşılaştırma grafiği.

3.1.2. Biotinlenmiş RNA Prob Konsantrasyonunun HPV16 DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

5 μ L MB-Strep mikrobuncuklar yöntem 2.9.2’de belirtildiği gibi yıkanmıştır. MB-Strep yıkandıktan sonra biyotin ile işaretli RNA (B-Cp-RNA) prob dizisinin MB-Strep yüzeyine yöntem 2.9.3’te anlatıldığı gibi uygulanmış ve farklı konsantrasyonlardaki B-Cp-RNA prob dizisinin optimizasyon çalışması yapılmıştır. 25 μ L farklı konsantrasyonlardaki (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 μ g mL^{-1}) B-Cp-RNA probu 30 dk inkübe edilmiştir. 50 μ L PBS ile 2 defa mikrobuncuklar yıkandıktan sonra 25 μ L PBS ve 1,0 nM hedef HPV16 DNA dizisi 30 dk inkübasyon işlemi yapılmıştır. 50 μ L BB ile 2 defa mikrobuncuklar yıkandıktan sonra 25 μ L 2 μ g mL^{-1} anti-DNA/RNA antikoru 15 dk inkübasyon işlemi yapılmıştır. Son olarak, 50 μ L BB ile 2 defa MB-Strep yıkandıktan sonra 25 μ L BB ile 1/1000 seyreltilmiş AntiIgG-HRP 15 dk inkübasyonu yapılmıştır. İnkübasyon işlemi termal-çalkalayıcıda 950 rpm, 37°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir.

B&W tampon çözeltisinde hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki B-Cp-RNA prob dizisinin hedef DNA sinyali üzerine etkisi yöntem 2.9.11’de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki B-Cp-RNA prob dizisine karşılık elde edilen amperometrik cevap ve S/B oranı Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

MB-Strep mikrobuncuklara 30 dk boyunca inkübasyonu sağlanmış farklı konsantrasyondaki (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) B-Cp-RNA prob dizisinin S/B oranı sırasıyla; 1,20; 11,14; 7,20; 18,33; 35,17; 35,24 bulunmuştur. Şekil 3.2’deki verilere göre 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ B-Cp-RNA prob sinyali ile en iyi nükleik asit biyosensör cevabı elde edilmiştir.



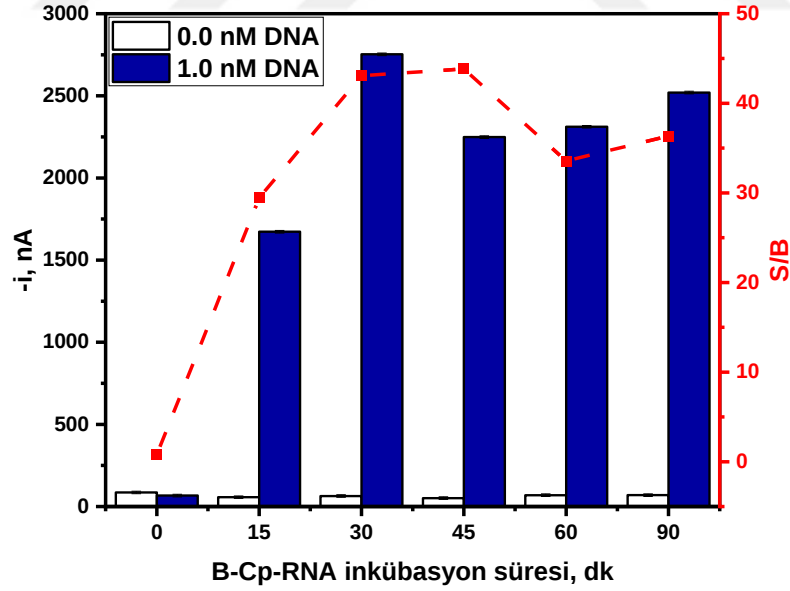
Şekil 3.2. B-Cp-RNA prob konsantrasyonunun kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.

3.1.3. Biotinlenmiş RNA Prob İmmobilizasyon Süresinin HPV16 DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

MB-Strep yıkandıktan sonra Biotin ile işaretli RNA prob dizisinin MB-Strep yüzeyine yöntem 2.9.3’ te anlatıldığı gibi uygulanmış ve 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ B-Cp-RNA prob dizisinin inkübasyon süresinin optimizasyon çalışması yapılmıştır. 25 μL 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$

¹ B-Cp-RNA probu farklı sürelerde (0; 15; 30; 45; 60; 90 dk) inkübe edilmiştir. 50 µL PBS ile 2 defa mikrobuncuklar yıkandıktan sonra 25 µL PBS ve 1,0 nM hedef HPV16 DNA dizisi 30 dk inkübasyon işlemi yapılmıştır. 50 µL BB ile 2 defa MB-Strep yıkandıktan sonra 25 µL 2 µgmL⁻¹ anti-DNA/RNA antikoru 15 dk boyunca inkübasyon işlemi yapılmıştır. Son olarak, 50 µL BB ile 2 defa MB-Strep yıkandıktan sonra 25 µL BB ile 1/1000 seyreltilmiş AntiIgG-HRP 15 dk boyunca inkübasyon işlemi yapılmıştır. İnkübasyon işlemi termal-çalkalayıcıda 950 rpm, 37°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir.

0,25 µgmL⁻¹ B-Cp-RNA prob dizisinin MB-Strep yüzeyine farklı sürelerdeki inkübasyonu, hedef HPV16 DNA dizisinin sinyaline etkisi yöntem 2.9.11’de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Şekil 3.3’te verilen 0; 15 dk; 30 dk; 45 dk; 60 dk; 90 dk inkübasyon süreleri için S/B oranları sırasıyla 0,78; 29,4; 43,0;43,84; 33,55; 36,6 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 30 dk inkübasyon süresi B-Cp-RNA probunun yüzeye immobilizasyonu için yeterli olmuştur.

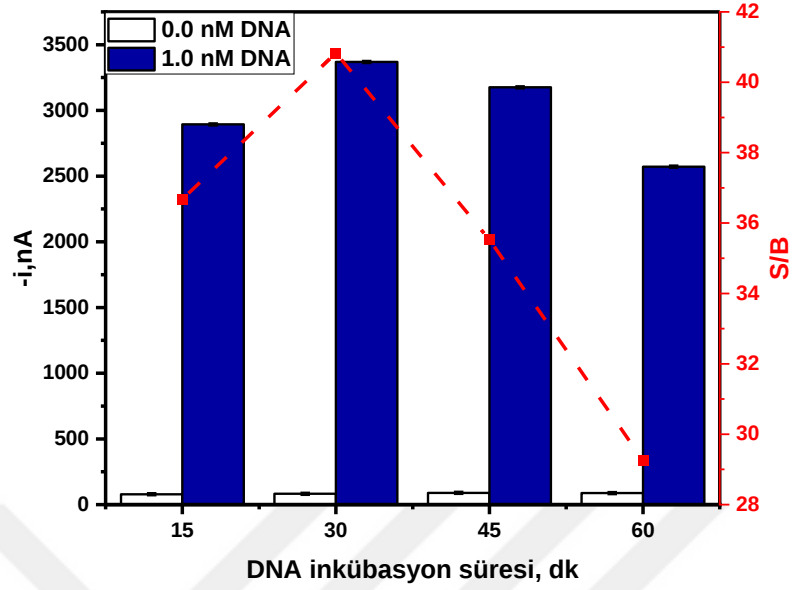


Şekil 3.3. B-Cp-RNA prob immobilizasyon süresinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.

3.1.4. Hedef HPV 16 DNA Dizi İmmobilizasyon Süresinin Biyosensör Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

5 µL MB-Strep mikrobuncuk yüzeyine 0,25 µgmL⁻¹ B-Cp-RNA probu 30 dk inkübe edildikten sonra mikrobuncuklar 2.9.4'te açıklanan yöntem ile yıkanmıştır. MB-Strep yıkandıktan sonra hedef HPV16 DNA dizisi B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine yöntem 2.9.5'te anlatıldığı gibi uygulanmış ardından PBS ve 1,0 nM hedef HPV16 DNA dizisinin inkübasyon süre optimizasyon çalışması yapılmıştır. 25 µL PBS ve 1,0 nM Hedef HPV16 DNA dizisinin farklı sürelerde (0; 15 dk; 30 dk; 45 dk; 60 dk; 90 dk) inkübasyon işlemi yapılmıştır. 50 µL BB ile 2 defa mikrobuncuklar yıkandıktan sonra 25 µL 2 µgmL⁻¹ anti-DNA/RNA antikoru 15 dk inkübasyon işlemi yapılmıştır. Son olarak, 50 µL BB ile 2 defa mikrobuncuklar yıkandıktan sonra 25 µL BB ile 1/1000 seyreltilmiş AntiIgG-HRP 15 dk boyunca inkübe edilmiştir.

PBS çözeltisinde hazırlanmış 1,0 nM Hedef HPV16 DNA dizisinin B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine inkübasyon süresinin, hedef DNA sinyaline etkisi yöntem 2.9.11'de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Farklı HPV16 DNA inkübasyon sürelerine (0; 15; 30; 45; 60 dk) karşılık S/B oranı sırasıyla 36,68; 40,83; 35,53; 29,26 bulunmuştur. Şekil 3.4'teki verilere göre Hedef HPV16 DNA dizisinin yüzeye immobilizasyonu için 30 dk inkübasyon süresi yeterli olmuştur.



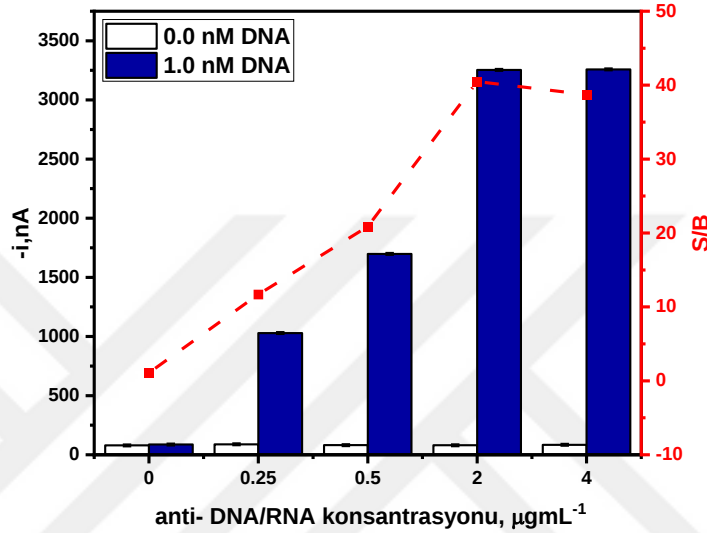
Şekil 3.4. Hedef HPV16 DNA immobilizasyon süresinin biyosensör sinyaline etki grafiği.

3.1.5. DNA/RNA Antikor Konsantrasyonunun DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

5 µL MB-Strep mikrobuncuk yüzeyine 30 dk 0,25 µgmL⁻¹ B-Cp-RNA probu inkübe edildikten sonra 30 dk boyunca PBS ve 1,0 nM Hedef HPV16 DNA dizisi B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine immobilize edilmiştir. MB-Strep mikrobuncuklar Yöntem 2.9.6’da açıklandığı şekilde yıkandıktan sonra anti-DNA/RNA antikorunu Hedef HPV16 DNA/B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine yöntem 2.9.7’ de anlatıldığı gibi uygulanmış ve farklı konsantrasyonlardaki anti-DNA/RNA antikor optimizasyon çalışması yapılmıştır. 25 µL farklı konsantrasyonlardaki (0; 0,25; 0,5; 2; 4 µgmL⁻¹) anti-DNA/RNA antikorunu 15 dk boyunca inkübasyon işlemi yapılmıştır. Son olarak, 50 µL BB ile 2 defa MB-Strep yıkandıktan sonra 25 µL BB ile 1/1000 seyreltilmiş AntiIgG-HRP 15 dk inkübasyon işlemi yapılmıştır.

BB çözeltisinde hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki anti-DNA/RNA antikorunun, hedef DNA sinyaline etkisi yöntem 2.9.11’de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki anti-DNA/RNA antikoruna karşılık elde

edilen amperometrik cevap ve S/B oranı Şekil 3.5'te gösterilmiştir. Farklı konsantrasyondaki (0; 0,25; 0,5; 2; 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) anti-DNA/RNA antikoruna karşılık S/B oranı sırasıyla; 1,09; 11,68; 20,88; 40,47; 38,73 bulunmuştur. Şekil 3.5'teki verilere göre 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ anti-DNA/RNA sinyali ile en iyi nükleik asit biyosensör cevabı elde edilmiştir.

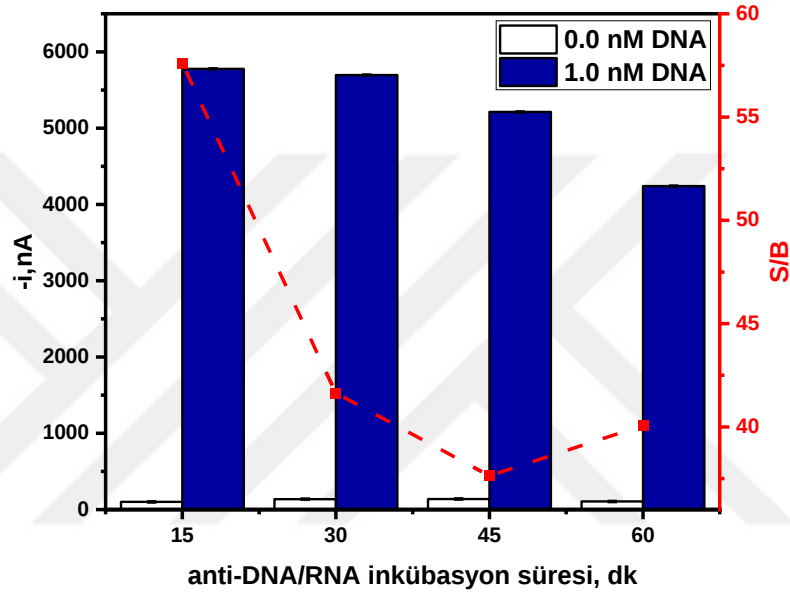


Şekil 3.5. DNA/RNA antikor konsantrasyonunun kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.

3.1.6. DNA/RNA Antikor İmmobilizasyon Süresinin HPV16 DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

5 μL MB-Strep mikrobuncuk yüzeyine 30 dk 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ B-Cp-RNA probu inkübe edildikten sonra 30 dk PBS ve 1,0 nM Hedef HPV16 DNA dizisi B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine immobilize edilmiştir. Mikrobuncuklar yıkandıktan sonra anti-DNA/RNA antikoruna Hedef HPV16 DNA/B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine yöntem 2.9.7'de anlatıldığı gibi uygulanmış ve 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DNA/RNA antikorunun inkübasyon süresinin optimizasyon çalışması yapılmıştır. 25 μL 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ anti-DNA/RNA farklı sürelerde (15; 30; 45; 60 dk) inkübasyon işlemi yapılmıştır. Son olarak, 50 μL BB ile 2 defa MB-Strep yıkandıktan sonra 25 μL BB ile 1/1000 seyreltilmiş AntiIgG-HRP 15 dk inkübasyon işlemi yapılmıştır. İnkübasyon işlemi termal-çalkalayıcıda 950 rpm, 37°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir.

2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DNA/RNA antikorunun Hedef HPV16 DNA/B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine farklı sürelerdeki inkübasyonun, hedef DNA sinyaline etkisi yöntem 2.9.11’de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Şekil 3.6’ da verilen 15 dk; 30 dk; 45 dk; 60 dk inkübasyon süreleri için S/B oranları sırasıyla 57,60; 41,63; 37,6; 40,0 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 15 dk inkübasyon süresi DNA/RNA antikorunun yüzeye immobilizasyonu için yeterli olmuştur.



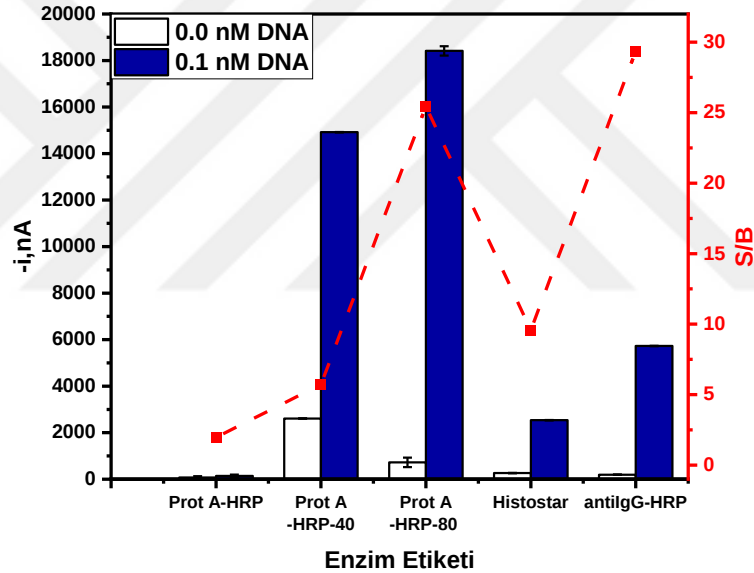
Şekil 3.6. DNA/RNA antikor immobilizasyon süresinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.

3.1.7. Enzim Etiket Seçiminin İncelenmesi

5 μL MB-Strep mikrobuncuk yüzeyine 30 dk 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ B-Cp-RNA probu inkübe edildikten sonra 30 dk PBS ve 0,1 nM Hedef HPV16 DNA dizisi B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine immobilize edilmiştir. Ardından, 15 dk 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DNA/RNA antikorunu Hedef HPV16 DNA /B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine immobilize edilmiştir. MB-Strep mikrobuncuklar 2.9.8’de açıklanan yöntem ile yıkandıktan sonra enzim etiket seçimi için yöntem 2.9.9’da anlatıldığı gibi farklı enzim etiketleri ile optimizasyon çalışması yapılmıştır. Son olarak, 25 μL farklı enzim etiketleri (Protein

A-HRP, Prot A-Poly-HRP 40, Prot A-Poly-HRP80, AntiIgG-HRP ve Histostar) 15 dk boyunca inkübasyon işlemi yapılmıştır.

BB çözeltisinde hazırlanmış farklı enzim etiketlerinin, hedef HPV16 DNA sinyaline etkisi yöntem 2.9.11’de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Enzim etiketlerine karşılık elde edilen amperometrik cevap ve S/B oranı Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Farklı enzim etiketlerine (Protein A-HRP, ProtA-Poly-HRP40, ProtA-Poly-HRP80, antiIgG-HRP ve Histostar) karşılık S/B oranı sırasıyla; 1,96; 5,71; 25,4; 9,57; 29,36 bulunmuştur. Şekil 3.7’deki verilere göre antiIgG-HRP sinyali ile en iyi nükleik asit biyosensör cevabı elde edilmiştir.

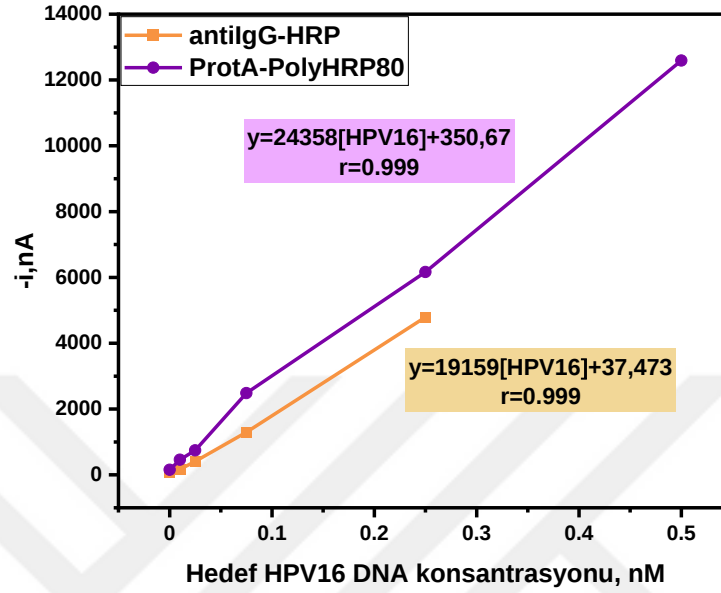


Şekil 3.7. Farklı enzim etiketlerinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.

3.1.8. AntiIgG-HRP ve Prot-A-Poly-HRP80 Enzim Etiketlerinin Karşılaştırılması

AntiIgG-HRP ve Prot-A-Poly-HRP80 enzim etiketleri ile geliştirilen nükleik asit biyosensörlerin birbirine yakın S/B değerleri elde edildiği için farklı konsantrasyonlarda Hedef HPV16 DNA dizisi için kalibrasyon denklemi oluşturulmuştur. Eğim değerleri de birbirine yakın çıkmıştır fakat Prot A-Poly-HRP80

enzim etiketi ile kontrol sinyal değeri yüksek çıktığı için AntiIgG-HRP ile devam edilmiştir.



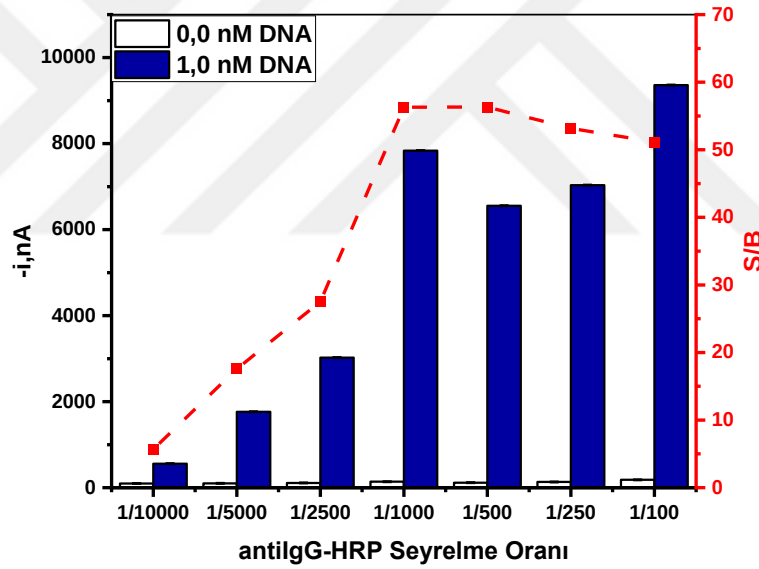
Şekil 3.8. AntiIgG-HRP ve Prot-A-Poly-HRP80 enzim etiketleri ile geliştirilen nükleik asit biyosensörlerin kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılması.

3.1.9. Enzim Etiket Konsantrasyonunun HPV16 DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

5 μL MB-Strep mikrobuncuk yüzeyine 30 dk $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ B-Cp-RNA probu inkübe edildikten sonra 30 dk PBS ve 1,0 nM Hedef HPV16 DNA dizisi B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine immobilize edilmiştir. Mikrobuncukların yıkama işleminin ardından 15 dk $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ DNA/RNA antikor, Hedef HPV16 DNA /B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine immobilize edilmiştir. Mikrobuncuklar yıkandıktan sonra BB ile seyreltilmiş AntiIgG-HRP enzim etiketi, anti-DNA/RNA/Hedef HPV16 DNA/B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine yöntem 2.9.9'da anlatıldığı gibi uygulanmış ve farklı seyrelme oranları ile AntiIgG-HRP enzim etiket optimizasyon çalışması yapılmıştır. 25 μL farklı AntiIgG-HRP enzim etiket seyrelme oranları (1/100; 1/250; 1/500; 1/1000; 1/2500; 1/5000; 1/10000) ile 15 dk boyunca inkübasyon işlemi yapılmıştır.

Son olarak, yöntem 2.9.10’da anlatıldığı gibi 50 µL BB ile 2 defa mikrobuncuklar yıkanmıştır.

AntiIgG-HRP enzim etiketi seyrelme oranı, hedef HPV16 DNA sinyaline etkisi yöntem 2.9.11’de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Farklı seyrelme oranlarındaki AntiIgG-HRP enzim etiketi kullanılarak kontrol ve 1,0 nM hedef DNA sinyallerini ve S/B oranlarını gösteren grafik Şekil 3.9’da verilmiştir. Farklı seyrelme oranlarındaki (1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2500, 1/5000, 1/10000) AntiIgG-HRP enzim etiketine karşılık S/B oranı sırasıyla 5,70; 17,60; 27,53; 56,30; 56,32; 53,17; 51,15 bulunmuştur. Şekil 3.9’daki verilere göre 1/1000 antiIgG-HRP enzim etiketi sinyali ile en iyi nükleik asit biyosensör cevabı elde edilmiştir.



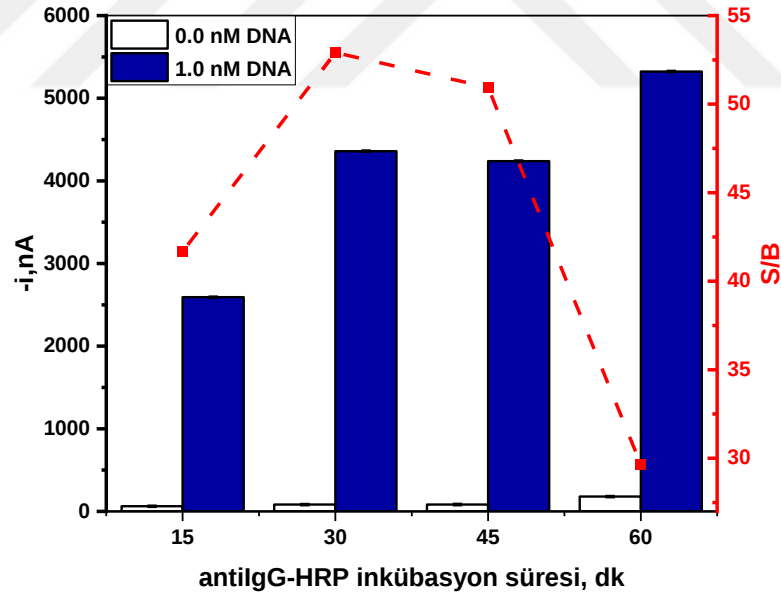
Şekil 3.9. AntiIgG-HRP seyrelme oranlarının kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.

3.1.10. Enzim Etiketinin İmmobilizasyon Süresinin DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

5 µL MB-Strep mikrobuncuk yüzeyine 30 dk 0,25 µgmL⁻¹ B-Cp-RNA probu inkübe edildikten sonra 30 dk PBS ve 1,0 nM Hedef HPV16 DNA dizisi B-Cp-

RNA/MB-Strep yüzeyine immobilize edilmiştir. Ardından, 15 dk $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ DNA/RNA antikoru, Hedef HPV16 DNA /B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine immobilize edilmiştir. MB-Strep mikrobuncuklar yıkandıktan sonra BB ile 1/1000 oranında seyreltilmiş AntiIgG-HRP enzim etiketi, anti-DNA/RNA/Hedef HPV16 DNA/B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine yöntem 2.9.9’ da anlatıldığı gibi uygulanmış ve AntiIgG-HRP inkübasyon süresinin optimizasyon çalışması yapılmıştır. Son olarak, yöntem 2.9.10’ da anlatıldığı gibi 50 μL BB ile 2 defa MB-Strep yıkanmıştır.

AntiIgG-HRP enzim etiketinin, anti-DNA/RNA/Hedef HPV16 DNA/B-Cp-RNA/MB-Strep yüzeyine farklı sürelerdeki inkübasyonun, hedef HPV16 DNA sinyaline etkisi yöntem 2.9.11’ de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Şekil 3.10’ da verilen 15 dk; 30 dk; 45 dk; 60 dk inkübasyon süreleri için S/B oranları sırasıyla 41,67; 52,91; 50,95; 29,65 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 30 dk inkübasyon süresi AntiIgG-HRP enzim etiketinin yüzeye immobilizasyonu için yeterli olmuştur.



Şekil 3.10. AntiIgG-HRP inkübasyon süresinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.

3.1.11. Elektrokimyasal Nükleik Asit Biyosensör Protokolünün DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

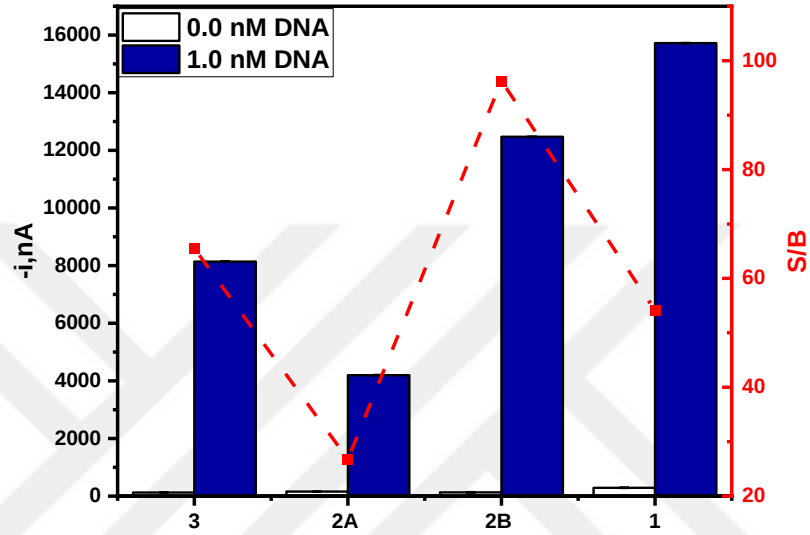
Nükleik asit biyosensörün gerekli optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra protokol basamaklarının optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Protokoller, Tablo 3.1’ de açıklanmaktadır.

Çizelge 3.1.Nükleik asit biyosensör protokollerinin DNA sinyaline etkisinin incelenmesi.

Protokol	B-Cp-RNA,	Hedef HPV16 DNA	anti-DNA/RNA antikoru (İnkübasyon süresi 30 dk)	AntiIgG-HRP
	(İnkübasyon Süresi 30dk)	(İnkübasyon süresi 30 dk)		(İnkübasyon süresi 30 dk)
3	0,25 µM	0 nM	2 µgmL ⁻¹ (30 dk)	1/1000 (30 dk)
		1 nM		
2A		0 nM + 2 µgmL ⁻¹ (30 dk)		1/1000 (30 dk)
		1 nM + 2 µgmL ⁻¹ (30 dk)		
2B		0 nM	2 µgmL ⁻¹ +1/1000 (30 dk)	
		1 nM		
1		0 nM + 2 µgmL ⁻¹ +1/1000 (30 dk)		
		1 nM + 2 µgmL ⁻¹ +1/1000 (30 dk)		

Nükleik asit biyosensörün HPV16 DNA, anti-DNA/RNA antikoru, AntiIgG-HRP enzim etiketi konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinin optimizasyon çalışmaları Protokol 3 ile yapılmıştır. MB-Strep mikrobuncuk yüzeyine 30 dk boyunca 0,25 μ g mL^{-1} B-Cp-RNA probu inkübe edildikten sonra protokol optimizasyon çalışması yapılmıştır. Üç basamaklı protokolde (Protokol 3) sırasıyla HPV16 DNA, anti-DNA/RNA antikoru ve AntiIgG-HRP enzim etiketi yüzeye immobilize edilmiştir. 2A basamaklı protokolde (Protokol 2A) öncelikle hedef HPV16 DNA ve anti-DNA/RNA antikor karışımı, ardından AntiIgG-HRP enzim etiketi yüzeye immobilize edilmiştir. 2B basamaklı protokolde (Protokol 2B) öncelikle HPV16 DNA, ardından anti-DNA/RNA antikoru ve AntiIgG-HRP enzim etiket karışımı yüzeye immobilize edilmiştir. 1 basamaklı protokolde (Protokol 1) HPV16 DNA, anti-DNA/RNA antikoru ve AntiIgG-HRP enzim etiket karışımı tek bir immobilizasyon ile yüzeye tutturulmuştur.

Uygulanan protokolün, hedef HPV16 DNA sinyaline etkisi yöntem 2.9.11’de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Şekil 3.11’ de verilen Protokol 3; Protokol 2A, Protokol 2B ve Protokol 1 için S/B oranları sırasıyla 65,48; 26,78; 96,30; 54,15 olarak bulunmuştur. Sonuçlara göre Protokol 2B ile en iyi nükleik asit biyosensör cevabı elde edilmiştir.

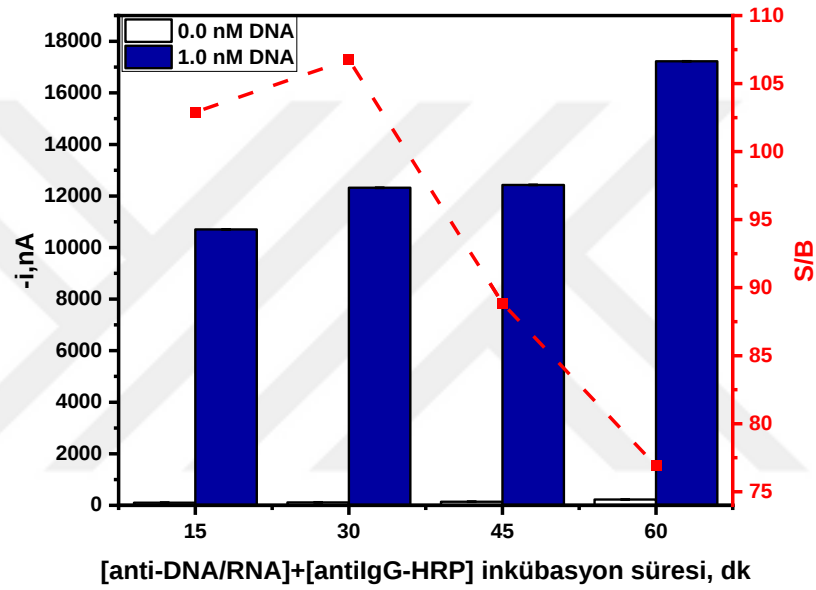


Şekil 3.11. Nükleik asit biyosensör protokollerinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.

3.1.12. Anti-DNA/RNA Antikoru ve Enzim Etiket Karışımı İmmobilizasyon Süresinin DNA Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

Bölüm 3.1.11’de verilen bulgulara göre protokol 2B ile en iyi nükleik asit biyosensörü elde edilmiştir. Manyetik mikrobuncuk yüzeyine $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ b-Cp-RNA probu 30 dk immobilize edildikten sonra Protokol 2B’ e göre önce Hedef HPV16 DNA dizisi 30 dk immobilize edilmiştir. Ardından $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ anti-DNA/RNA antikoru ve 1/1000 AntiIgG-HRP enzim etiket karışımı inkübasyon süresi optimizasyon çalışması yapılmıştır.

2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ anti-DNA/RNA antikor ve 1/1000 AntiIgG-HRP enzim etiket karışımının MB-Strep yüzeyine farklı sürelerdeki inkübasyonun, hedef DNA sinyaline etkisi yöntem 2.9.11’de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Şekil 3.12’ de verilen 15 dk; 30 dk; 45 dk; 60 dk inkübasyon süreleri için S/B oranları sırasıyla 102,90; 106,76; 88,85; 76,90 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 30 dk inkübasyon süresi anti-DNA/RNA antikor ve AntiIgG-HRP enzim etiketi karışımının yüzeye immobilizasyonu için yeterli olmuştur.



Şekil 3.12. DNA/RNA antikor ve enzim etiket karışımının inkübasyon süresinin kontrol ve HPV16 DNA sinyaline etki grafiği.

3.1.13. Hedef DNA için Nükleik Asit Biyosensörü ile Yapılan Analiz Çalışmalarına İlişkin Bulgular

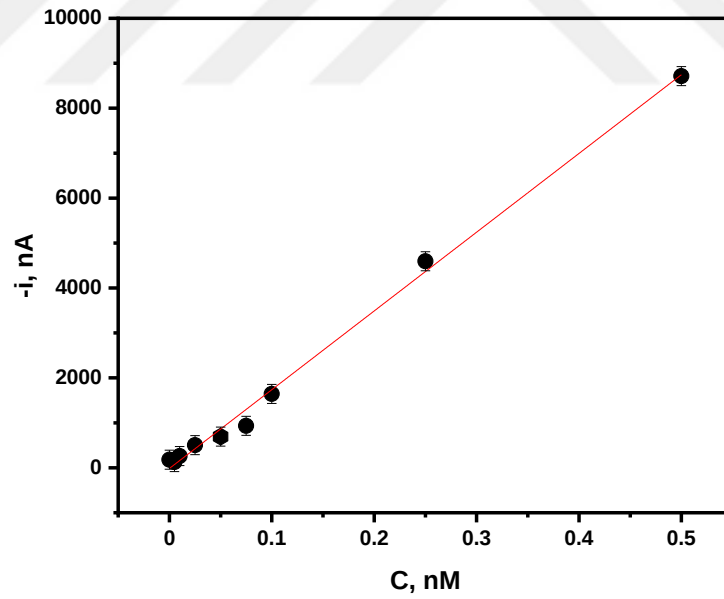
Nükleik asit biyosensörünün her aşaması için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen optimum nükleik asit biyosensörü şu şekilde tasarlanmıştır: 5 μL Manyetik mikrobuncuk yüzeyine 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ b-Cp-RNA probu 30 dk immobilize edildikten sonra Protokol 2B’ e göre önce Hedef HPV16 DNA dizisi 30 dk immobilize edilmiştir. Ardından 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ anti-DNA/RNA antikor ve 1/1000

AntiIgG-HRP enzim etiketi karışımı 30 dk immobilize edilmiştir. Her aşama arasında manyetik mikrobuncuklar yıkanmıştır.

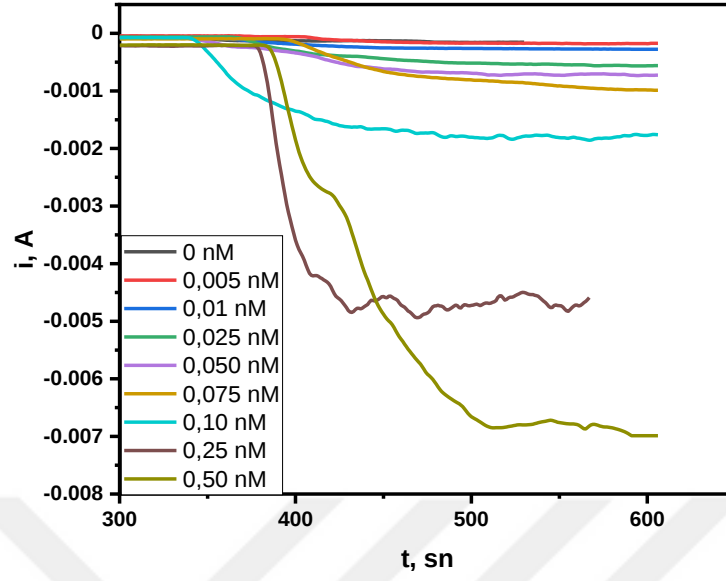
Elde edilen optimum verilere göre geliştirilen nükleik asit biyosensörü hedef HPV 16 DNA'nın tayini için uygulanmıştır. Hedef DNA 0,002-0,5 nM derişim aralığında doğrusal bir eğri göstermiştir. Amperometrik teknik ile hedef HPV16 DNA derişimi – sinyal arasında elde edilen doğru denklemi ve korelasyon katsayısı değeri aşağıdaki gibidir:

$$i_p \text{ (nA)} = 17521C \text{ (nM)} - 14,877; r = 0,999 \text{ (n=9)}$$

9 farklı konsantrasyon değerlerinin amperometrik yöntem ile ölçümleri alınarak hedef HPV 16 DNA için elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 3.13'te ve amperogramlar Şekil 3.14'te verilmiştir.



Şekil 3.13. Hedef HPV 16 DNA için elde edilen kalibrasyon doğrusu.



Şekil 3.14. Farklı konsantrasyonlarda Hedef HPV 16 DNA için elde edilen amperogramlar.

Amperometri tekniği ile elde edilen veriler kullanılarak kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve hesaplanan validasyon parametreleri Çizelge 3.2’de özetlenmiştir.

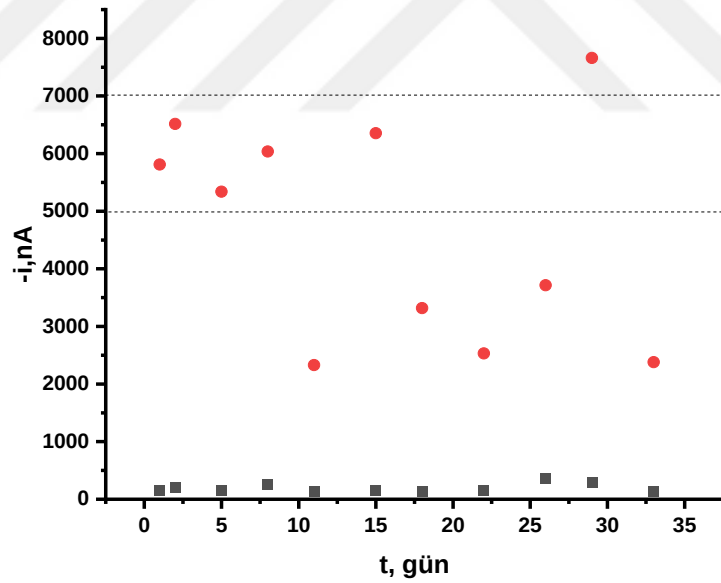
Çizelge 3.2. Hedef HPV 16 DNA için elde edilen kalibrasyon eğrisine ait regresyon analizi sonuçları ve gerekli validasyon parametreleri

	Amperometri
Doğrusal Aralığı(nM)	0,002-0,5 nM
Eğim (nA M ⁻¹)	17521
Kesişim(nA)	- 14,877
Korelasyon Katsayısı	0,999
Eğimin Standart Hatası	430,67
Kesişimin Standart Hatası	82,63
Yakalama Sınırı(nM)	0,000519
Tayin Alt Sınırı(nM)	0,001731
Akımın gün içi tekrarlanabilirliği (%BSS)	7,99

Yakalama sınırı 3 ss/m ve tayin alt sınırı 10 ss/m formülleri ile hesaplanmıştır (Ozkan, 2012). Formüllerde bulunan ss, kontrol sinyallerinden elde edilen on tekrarlı ölçümün standart sapmasını, m ise kalibrasyon eğrisinin eğimini ifade etmektedir. Yakalama sınırı ve tayin alt sınır değerleri de sırasıyla 0,519 pM ve 1,731 pM olarak hesaplanmıştır.

3.1.14. Hedef DNA için Nükleik Asit Biyosensörü ile Yapılan Stabilitenin Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Bu çalışmada, geliştirilen nükleik asit biyosensörünün stabilitesinin incelenmesi için 1., 4., 7., 14., 21., 28. günlerde 0,1 nM Hedef HPV16 DNA dizisinin amperometrik cevapları elde edilmiştir. Elde edilen verilere göre stabilite çalışması Şekil 3.15'te verilmiştir.



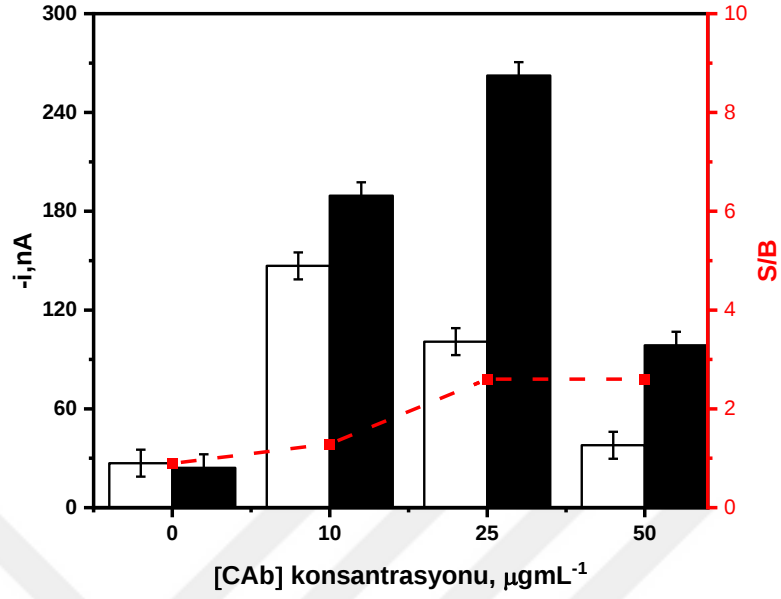
Şekil 3.15. Geliştirilen nükleik asit biyosensörün stabilitesi.

3.2. GFAP Tespiti için Antikor/Antijen Bazlı Biyosensör (İmmünosensör) Geliştirilmesine Dayalı Elde Edilen Bulgular

3.2.1. CAb Antikor Konsantrasyonunun GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

Karboksil gruplu manyetik mikrobuncuklar (MB-COOH), öncelikle santrifüj mikrotüp içerisinde yöntem 2.10.1’de anlatıldığı gibi yıkanmıştır. MB-COOH, MES çözeltisi ile yıkandıktan sonra karboksil gruplarının aktive edilmesi için yöntem 2.10.2.’de anlatıldığı gibi EDC/sulfo-NHS karışım çözeltisine 35 dk maruz bırakılmıştır. 50 µL MES ile 2 defa MB-COOH yıkandıktan sonra farklı konsantrasyonlardaki CAb çözeltisinin optimizasyon çalışması yapılmıştır. 25 µL farklı konsantrasyonlardaki (0; 10; 25; 50 µgmL⁻¹) CAb çözeltisi 15 dk yüzeye inkübe edilmiştir. Sonra yüzeyin bloke edilebilmesi için 1 M etanolamin çözeltisi ile 60 dk inkübe edilmiştir. CAb/MB-COOH mikrobuncuklar TRIS-HCl ve PBS ile yıkandıktan sonra GFAP/btn-DAb antikor karışım çözeltisiyle 60 dk inkübe edilmiştir. 50 µL BB ile 2 defa MB-COOH mikrobuncuklar yıkandıktan sonra BB ile seyreltilmiş 1/250 Strep-HRP çözeltisi ile 60 dk inkübasyon işlemi yapılmıştır. İnkübasyon işlemi termal-çalkalayıcıda 950 rpm, 25°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir.

GFAP standartının sinyali üzerine farklı konsantrasyondaki CAb çözeltisinin etkisi yöntem 2.10.4’te anlatıldığı gibi incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki CAb çözeltisine karşılık elde edilen amperometrik cevap ve S/B oranı Şekil 3.16’da yer almaktadır. MB-COOH mikrobuncuklara 15 dk boyunca inkübasyonu sağlanmış farklı konsantrasyondaki (0; 10; 25; 50 µgmL⁻¹) CAb çözeltisinin S/B oranı sırasıyla; 0,89; 1,29; 2,60; 2,60 bulunmuştur. Şekil 3.16’daki verilere göre 25 µgmL⁻¹ CAb sinyali ile en iyi immünosensör cevabı elde edilmiştir.



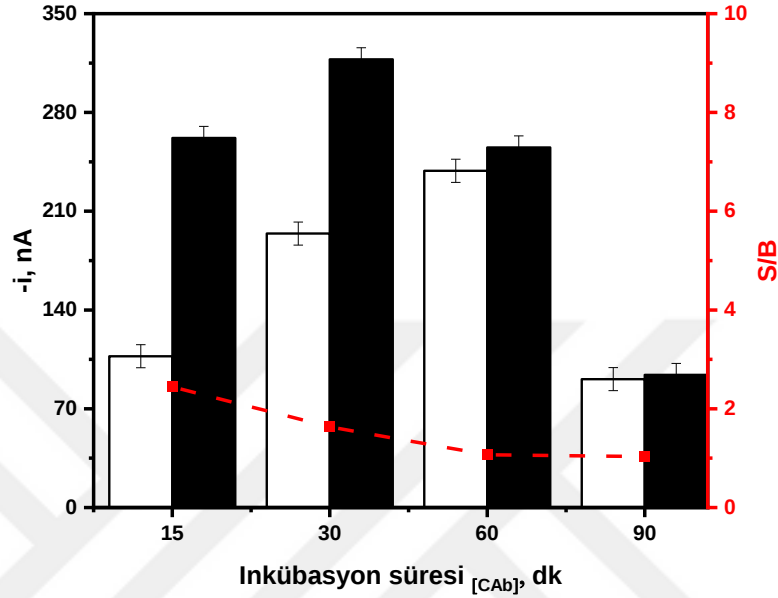
Şekil 3.16. CAb antikor konsantrasyonunun kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.

3.2.2. CAb Antikorumun İnkübasyon Süresinin GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

MB-COOH mikrobuncuklar yıkanıp ve aktive edildikten sonra CAb çözeltisi MB-COOH yüzeyine yöntem 2.10.4' te anlatıldığı gibi uygulanmış ve $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CAb inkübasyon süresinin optimizasyon çalışması yapılmıştır. $25 \mu\text{L}$ $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CAb çözeltisi farklı sürelerde (15 dk; 30 dk; 60 dk; 90 dk) inkübasyon işlemi yapılmıştır. CAb/MB-COOH mikrobuncukların yüzeyi bloke edilip, yıkandıktan sonra GFAP/btn-DAb antikor karışım çözeltisi yüzeye immobilize edilmiştir. Btn-DAb/GFAP/CAb/MB-COOH yüzeyi yıkandıktan sonra Strep-HRP immobilize edilmiştir. İnkübasyon işlemi termal-çalkalayıcıda 950 rpm, 25°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir.

$25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CAb çözeltisinin, MB-COOH yüzeyine farklı sürelerdeki inkübasyonun, GFAP standart sinyaline etkisi yöntem 2.10.4'te anlatıldığı gibi incelenmiştir. Şekil 3.17' de verilen 15 dk; 30 dk; 60 dk; 90 dk inkübasyon süreleri

için S/B oranları sırasıyla 2,44; 1,63; 1,06; 1,03 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 15 dk inkübasyon süresi CAb'ın yüzeye immobilizasyonu için yeterli olmuştur.



Şekil 3.17. CAb antikor inkübasyon süresinin kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.

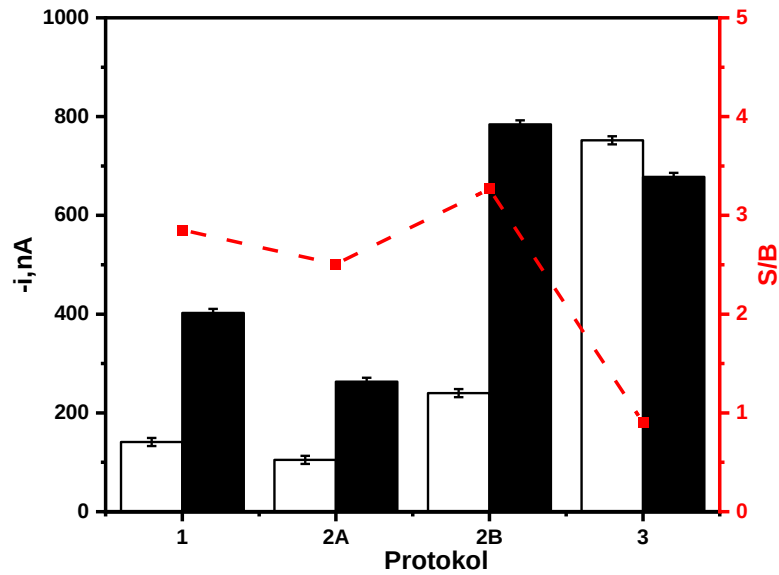
3.2.3. Protokollerin GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

MB-COOH mikrobuncuklar yıkanıp ve aktive edildikten sonra $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CAb çözeltisi MB-COOH yüzeyine 15 dk inkübe edilmiştir. CAb/MB-COOH mikrobuncukların yüzeyi bloke edilip, yıkandıktan sonra protokol optimizasyon çalışması yapılmıştır. GFAP immunosensörün CAb, GFAP, btn-DAb, Strep-HRP konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinin optimizasyon çalışmalarına ait veriler Protokol 3' e göre yapılmıştır. Üç basamaklı protokolde (Protokol 3) sırasıyla GFAP, btn-DAb ve Strep-HRP yüzeye immobilize edilmiştir. 2B basamaklı protokolde (Protokol 2B) öncelikle GFAP standartı ve btn-DAb karışımı, ardından Strep-HRP yüzeye immobilize edilmiştir. 2A basamaklı protokolde (Protokol 2A) öncelikle GFAP, ardından btn-DAb ve Strep-HRP karışımı yüzeye immobilize edilmiştir. 1 basamaklı protokolde (Protokol 1) GFAP, btn-DAb ve Strep-HRP karışımı tek bir immobilizasyon basamağı ile yüzeye tutturulmuştur.

Uygulanan protokoller, Çizelge 3.3'te özetlenmiştir. Şekil 3.18'de verilen Protokol 3; Protokol 2A, Protokol 2B ve Protokol 1 için S/B oranları sırasıyla 0,90; 2,5; 3,2; 2,8 olarak bulunmuştur. Sonuçlara göre Protokol 2B ile en iyi immünosensör cevabı elde edilmiştir.

Çizelge 3.3. Immünosensör protokollerinin GFAP sinyaline etkisinin incelenmesi.

Protokol	CAb (İnkübasyon Süresi 30dk)	GFAP standartı (İnkübasyon süresi 30 dk)	Btn-DAb (İnkübasyon süresi 30 dk)	Strep-HRP (İnkübasyon süresi 30 dk)
3	25 µgmL ⁻¹	0 ngmL ⁻¹	0,50 µgmL ⁻¹ (30 dk)	1/1000
		7,8 ngmL ⁻¹		(30 dk)
2B		0 ngmL ⁻¹ + 0,50 µgmL ⁻¹ (30 dk)		1/1000
		7,8 ngmL ⁻¹ + 0,50 µgmL ⁻¹ (30 dk)		(30 dk)
2A		0 ngmL ⁻¹	0,50 µgmL ⁻¹ +1/1000 (30 dk)	
		7,8 ngmL ⁻¹		
1		0 ngmL ⁻¹ GFAP + 0,50 µgmL ⁻¹ +1/1000 (30 dk)		
		7,8 ngmL ⁻¹ GFAP + 0,50 µgmL ⁻¹ +1/1000 (30 dk)		

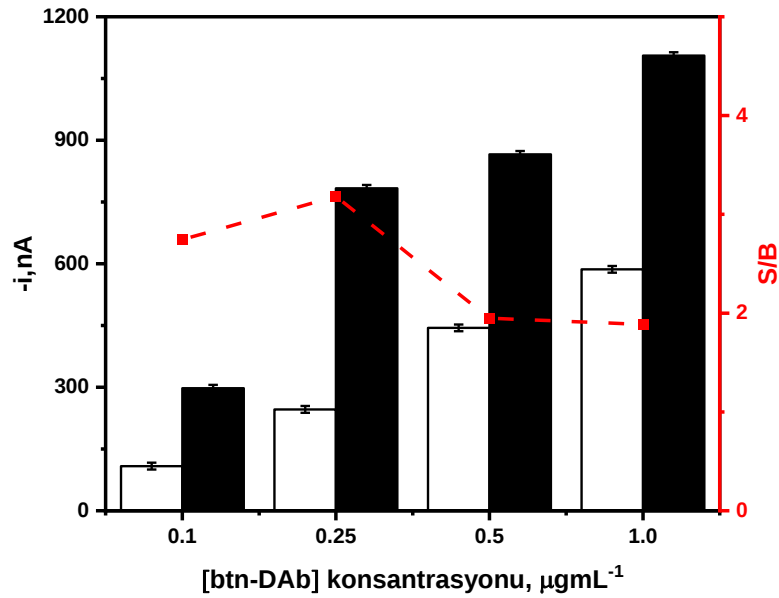


Şekil 3.18. İmmünosensör protokollerinin kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.

3.2.4. Btn-DAb Konsantrasyonunun GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

MB-COOH mikrobuncuklar yıkanıp ve aktive edildikten sonra $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CAb çözeltisi MB-COOH yüzeyine 15 dk inkübe edilmiştir. CAb/MB-COOH mikrobuncukların yüzeyi bloke edilip, yıkandıktan sonra GFAP/ btn-DAb karışım çözeltisi farklı konsantrasyonlarda btn-DAb ($0,1; 0,25; 0,5; 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Btn-DAb/GFAP/CAb/MB-COOH yüzeyi yıkandıktan sonra Strep-HRP immobilize edilmiştir. İnkübasyon işlemi termal-çalkalayıcıda 950 rpm, 25°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir.

Btn-DAb çözeltisinin MB-COOH mikrobuncuk yüzeyine farklı konsantrasyonlardaki inkübasyonun, GFAP standart sinyaline etkisi incelenmiştir. Şekil 3.19’ da verilen $0,1; 0,25; 0,5; 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ btn-DAb konsantrasyonu için S/B oranları sırasıyla 2,74; 3,18; 1,94; 1,88 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ btn-DAb konsantrasyonu btn-DAb’ın yüzeye immobilizasyonu için yeterli olmuştur.

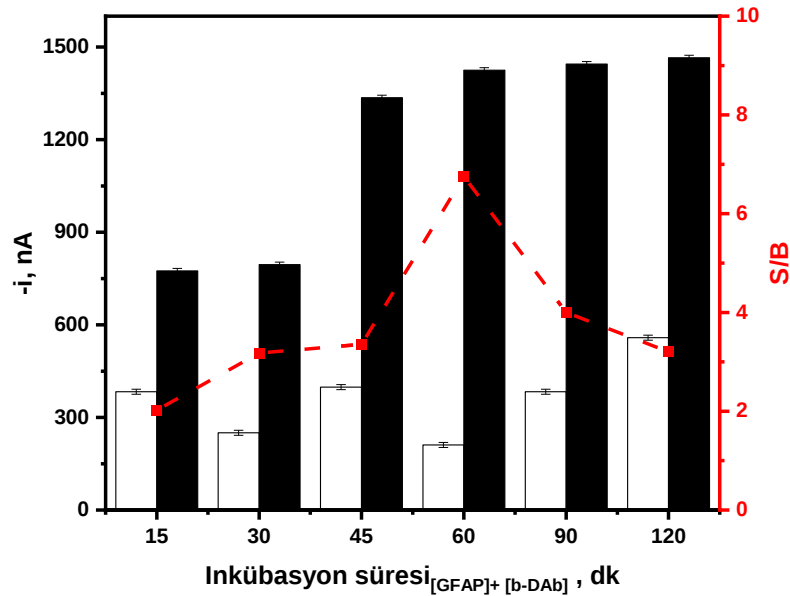


Şekil 3.19. Btn-DAb antikor konsantrasyonunun kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.

3.2.5.[GFAP]+ [Btn-DAb] İnkübasyon Süresinin GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

MB-COOH mikrobuncuk yıkanıp ve aktive edildikten sonra $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CAb çözeltisi MB-COOH yüzeyine 15 dk inkübe edilmiştir. CAb/MB-COOH mikrobuncukların yüzeyi bloke edilip, yıkandıktan sonra GFAP/btn-DAb karışım çözeltisi farklı sürelerde (15, 30, 45, 60, 90, 120 dk) optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Btn-DAb/GFAP/CAb/MB-COOH yüzeyi yıkandıktan sonra Strep-HRP immobilize edilmiştir. İnkübasyon işlemi termal-çalkalayıcıda 950 rpm, 25°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir.

Btn-DAb/GFAP karışım çözeltisinin MB-COOH mikrobuncuk yüzeyine farklı sürelerdeki inkübasyonun, GFAP standart sinyaline etkisi gibi incelenmiştir. Şekil 3.20’ de verilen 15, 30, 45, 60, 90, 120 dk inkübasyon süreleri için S/B oranları sırasıyla 2,02; 3,17; 3,35; 6,75; 4,0; 3,2 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre btn-DAb/GFAP karışım çözeltisinin 60 dk immobilizasyon süresi yeterli olmuştur.

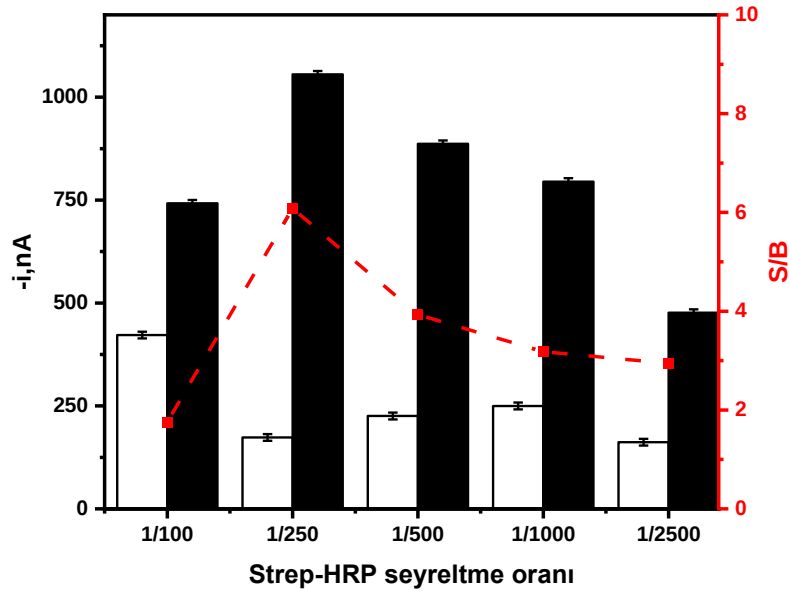


Şekil 3.20. [GFAP]+ [Btn-DAb] İnkübasyon Süresinin kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.

3.2.6. Strep-HRP Seyreltme Oranının GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

MB-COOH mikrobuncuk yıkanıp ve aktive edildikten sonra $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CAb çözeltisi MB-COOH yüzeyine 15 dk inkübe edilmiştir. CAb/MB-COOH mikrobuncukların yüzeyi bloke edilip, yıkandıktan sonra GFAP/btn-DAb karışım çözeltisi 60 dk inkübe edilmiştir. Btn-DAb/GFAP/CAb/MB-COOH yüzeyi yıkandıktan sonra Strep-HRP immobilize edilmiştir ve farklı konsantrasyonlarda Strep-HRP (1/100; 1/250; 1/500; 1/1000; 1/2500) optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. İnkübasyon işlemi termal-çalkalayıcıda 950 rpm, 25°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir.

Strep-HRP çözeltisinin Btn-DAb/GFAP/CAb/MB-COOH mikrobuncuk yüzeyine farklı konsantrasyonlardaki inkübasyonun, GFAP standart sinyaline etkisi incelenmiştir. Şekil 3.21’ de verilen BB ile seyreltilmiş 1/100; 1/250; 1/500; 1/1000; 1/2500 btn-DAb konsantrasyonu için S/B oranları sırasıyla 1,75; 6,08; 3,93; 3,18; 2,94 olarak bulunmuştur. BB ile seyreltilmiş 1/250 Strep-HRP çözeltisi ile en iyi sonuç elde edilmiştir.

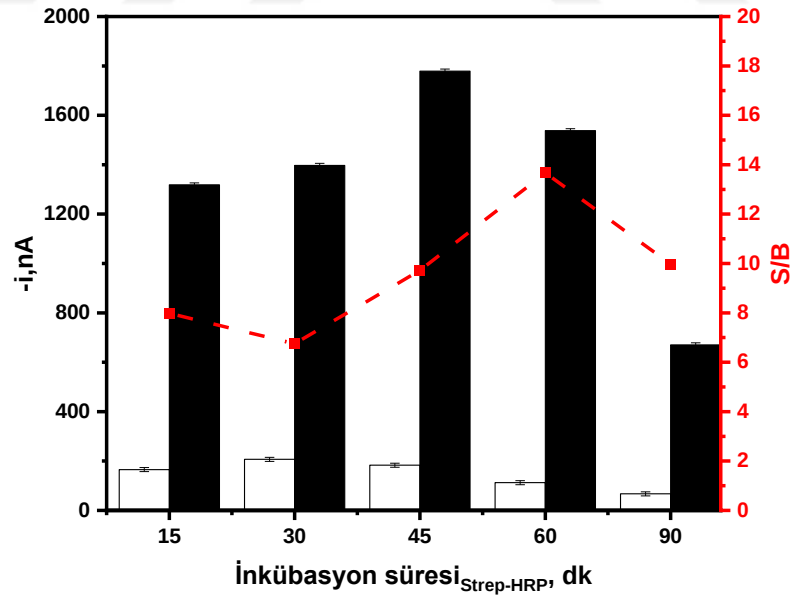


Şekil 3.21. Strep-HRP seyreltme oranının kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.

3.2.7. Strep-HRP İnkübasyon Süresinin GFAP Sinyaline Etkisinin İncelenmesi

MB-COOH mikrobuncuk yıkanıp ve aktive edildikten sonra $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ CAb çözeltisi MB-COOH yüzeyine 15 dk inkübe edilmiştir. CAb/MB-COOH mikrobuncukların yüzeyi bloke edilip, yıkandıktan sonra GFAP/btn-DAb karışım çözeltisi 60 dk inkübe edilmiştir. Btn-DAb/GFAP/CAb/MB-COOH yüzeyi yıkandıktan sonra Strep-HRP inkübasyon süresi optimize edilmiştir. İnkübasyon işlemi termal-çalkalayıcıda 950 rpm, 25°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir.

Strep-HRP çözeltisinin Btn-DAb/GFAP/CAb/MB-COOH mikrobuncuk yüzeyine farklı sürelerdeki inkübasyonun, GFAP standart sinyaline etkisi incelenmiştir. Şekil 3.22’ de verilen 15, 30, 45, 60, 90 dk inkübasyon süreleri için S/B oranları sırasıyla 7,97; 6,75; 9,71; 13,67; 9,97 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre Strep-HRP çözeltisinin 60 dk immobilizasyon süresi yeterli olmuştur.



Şekil 3.22. Strep-HRP İnkübasyon Süresinin kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.

Çizelge 3.4. Test edilen çalışma aralığı ve seçilen değer çizelgesi.

Parametreler	Çalışma Aralığı	Seçilen değer
CAb konsantrasyonu, $\mu\text{g mL}^{-1}$	0–50	25
CAB inkübasyon süresi, dk	15–90	15
Protokol	1–3	2B
GFAP/btn-DAb karışım inkübasyon süresi, dk	15–120	60
Btn-DAb konsantrasyonu, $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,1–1,0	0,25
Strep-HRP seyrelme oranı	1/50–1/2500	1/250
Strep-HRP inkübasyon süresi, dk	15–120	60

Bu deneysel parametreler için test edilen çalışma aralığı ve her parametre için en uygun değer Çizelge 3.4’te verilmiştir.

3.2.8. GFAP İçin İmmunosensör ile Yapılan Analiz Çalışmalarına İlişkin Bulgular

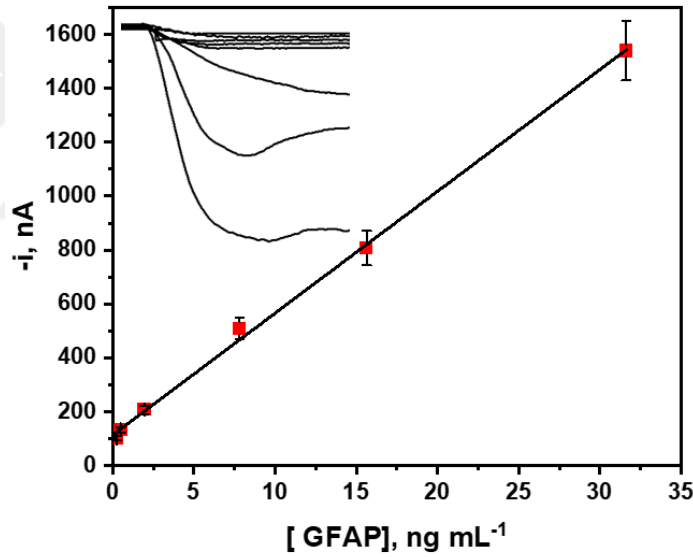
Elde edilen sinyal ile GFAP standart konsantrasyonu arasında 0,24 – 31,6 ng mL⁻¹ aralığında doğrusal bir kalibrasyon grafiği ($r = 0,999$) gözlemlenmiştir. Eğim ve kesişim değerleri sırasıyla 45 ± 2 nA mL ng⁻¹ ve 114 ± 28 nA olarak bulunmuştur.

TS ve TAS, sırasıyla 3sb/m ve 10sb/m eşitliklerine göre hesaplanarak bulunur; standart sapma (ss), GFAP yokluğunda 10 amperometrik ölçüm ile hesaplanırken, m lineer denklemin eğimine eşittir.

Buna göre elde edilen TS ve TAS değerleri sırasıyla 67 pg mL⁻¹ ve 203 pg mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Plazmada GFAP, Alzheimer patolojisini tespit eder ve hafif bilişsel bozukluğu olan hastalarda gelecekte Alzheimer demansına ilişkin öngörü sunmaktadır (Teitsdottir ve ark., 2021).

Elde edilen duyarlılık, Hafif Bilişsel Bozukluk (MCI)-AD durumunda plazmada $54,1 \text{ pg mL}^{-1}$ bir eşik değeri belirlenmiş olan GFAP' ı ayırt etmek için yeterli değildir (Cicognola ve ark., 2021). Bununla birlikte, bu tip hastaların omurilik sıvısı analiz edilerek 1 ng mL^{-1} 'in üzerindeki konsantrasyonların immünoplatform ile ayırt edilebildiği rapor edilmiştir. Ulaşılan TS'nin, Travmatik beyin hasarı (TBI) oluşan hastalardan alınan serumda GFAP için bulunan eşik değerinden ($1.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) yaklaşık altı kat daha küçük olması dikkat çekicidir (Pelika ve ark., 2004).

İmmunosensörün tekrarlanabilirliği, $7,8 \text{ ng mL}^{-1}$ GFAP için aynı gün içerisinde aynı şekilde 7 farklı immünoplatformun amperometrik cevaplarından elde edilen bağıl standart sapma (BSS) değeri ile incelenmiştir. Elde edilen BSS değeri, %8,2, geliştirilen immunosensörün kabul edilebilir tekrarlanabilirliğini doğrulamıştır.

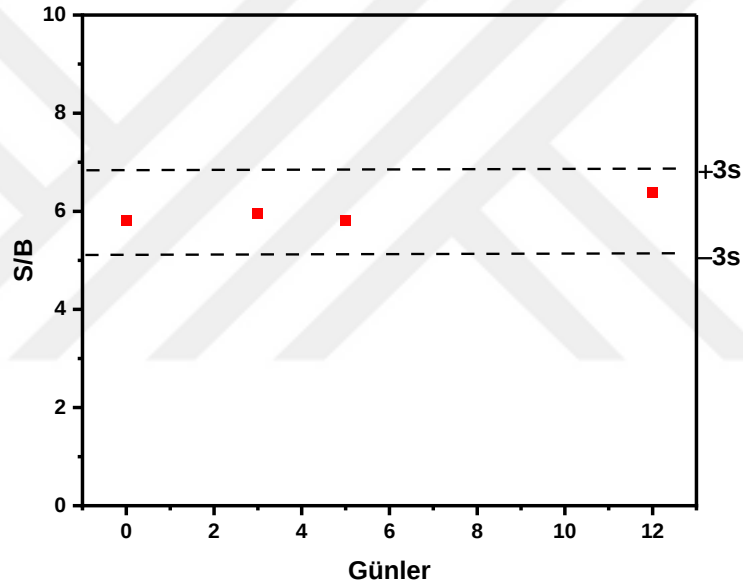


Şekil 3.23. GFAP biyobelirteci için elde edilen kalibrasyon doğrusu ve farklı konsantrasyonlarda GFAP için elde edilen amperogramlar

3.2.9. Stabilité Çalışması

GFAP için immunosensörün stabilité çalışması, MB-COOH mikrobuncuk yıkanıp ve aktive edildikten sonra $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ CAb çözeltisi MB-COOH yüzeyine 15 dk inkübe edilmiştir. CAb/MB-COOH mikrobuncukların yüzeyi bloke edilip,

yıkandıktan sonra CAb/MB-COOH immunokonjugatları 0,01 mol L⁻¹ PBS pH 7,5'te hazırlanarak, 4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. CAb/MB-COOH immünokonjugatları stabilite çalışmasının yapıldığı belli günlerde 0 ve 7,8 ng mL⁻¹ GFAP/ 0,25 µgmL⁻¹ DAb karışım çözeltisi yüzeye 60 dk immobilize edilmiştir. Ardından 1/250 Strep-HRP çözeltisi yüzeye 60 dk immobilize edilmiştir. İnkübasyon işlemi termal-çalkalayıcıda 950 rpm, 25°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir. 12 gün boyunca elde edilen amperometrik sinyaller için ölçülen S/B oranı değeri açısından anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Böylece daha önceden hazırlanan CAb/MB-COOH immunokonjugatları, analiz günü daha kısa sürede cevap alınmasına imkan sağlar.

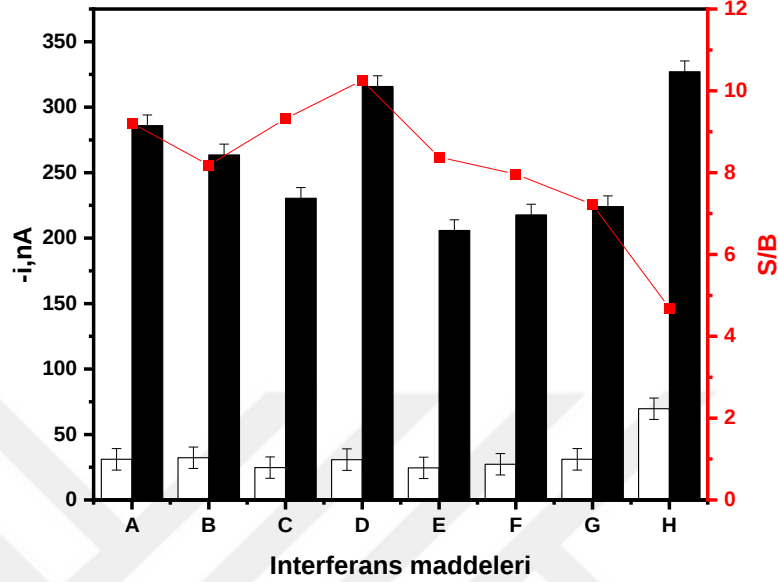


Şekil 3.24. GFAP immünosensörü için stabilite çalışması.

3.2.10. Seçicilik Çalışması

Geliştirilen immünosensörün, insan vücudundaki sıvılarda bulunan bazı potansiyel girişim yapabilen maddeler varlığında GFAP sinyali incelenmiştir. 5 mg mL⁻¹ insan serum albümini (HSA), 10 mg mL⁻¹ bovin serumu albümin (BSA), 10 ng mL⁻¹ S100 kalsiyum bağlayıcı protein β (S100β), 5 mg mL⁻¹ hemoglobin (Hb) ve 0,01 mg mL⁻¹, 0,1 mg mL⁻¹ ve 1,0 mg mL⁻¹ insan immünoglobulin (hIgG) yokluğunda ve

varlığında yapılan 0,0 (B) ve 7,8 ng mL⁻¹ GFAP standartları için amperometrik sinyal elde edilmiştir.



Şekil 3.25. Geliştirilen immünoplatformun amperometrik cevapları ((A) GFAP standart (B) 10 mg mL⁻¹ BSA, (C) 10 ng mL⁻¹ S100β, (D) 5 mg mL⁻¹ HSA, (E) 0,01 mg mL⁻¹, (F) 0,1 mg mL⁻¹, (G) 1,0 mg mL⁻¹ hIgG ve (H) 5 mg mL⁻¹ Hb.)

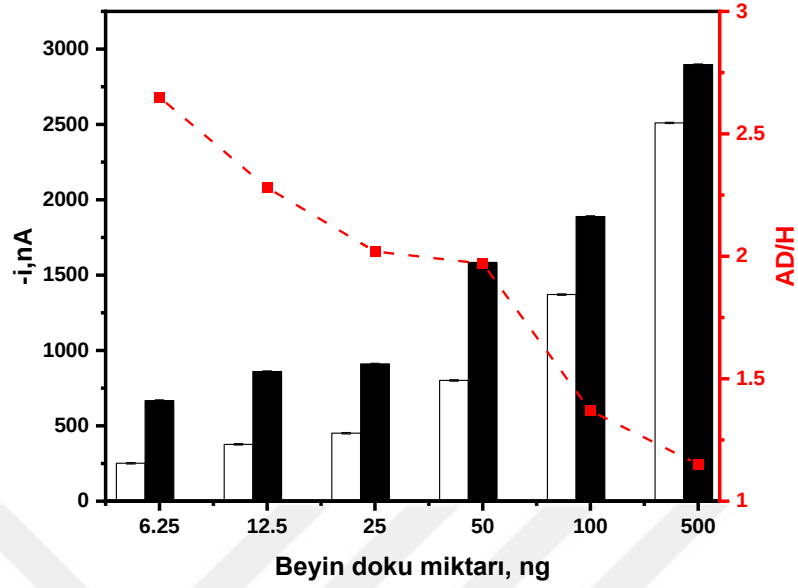
GFAP için geliştirilen immunosensörlerin diğer interferans maddeleri varlığında tespit edilmesi mümkün olmasına rağmen hem hIgG (G çubukları) hem de Hb (H çubukları) varlığında S/B oranını önemli ölçüde değiştirmiştir. hIgG varlığında, yabancı immünoglobulinlerin Fc kısmındaki epitoplara bağlayabilen hayvan proteinleri (insan anti-hayvan antikorları, HAAA) ile reaksiyona giren mevcut insan antikorlarını etkileyebilir (Korley ve ark., 2021). Hemoglobinin varlığında elde edilen daha büyük sinyaller, intrinsik peroksidaz aktivitesi ile açıklanabilir (Grigorieva ve ark., 2013). Ek olarak, kullanılan GFAP ELISA spesifikasyonlarına göre, 200 ng mL⁻¹ rekombinant insan proteini (lamin B1, menin, presenilin-1 N-terminal fragmanı, S100A1 ve S100B) test edildiğinde GFAP immünosensörlerde yer alan antikorlarla çapraz reaktivite göstermezler.

3.2.11. Beyin Dokusu Protein Ekstraktının Analizi

Sağlıklı bireylerden ve bunama teşhisi konan hastalardan alınan beyin dokusu protein ekstraktlarında endojen GFAP içeriğinin belirlenmesi için geliştirilen immünoensör kullanılmıştır. Bu tür bireyler şu şekilde sınıflandırıldı: demansı olmayan kontrol havuzu (Havuz Kontrol), vasküler demans (VD) veya Alzheimer hastalığı (AD Braak IV, AD Braak V ve AD Braak VI) teşhisi konan hastalar ve AD hastalığı teşhisi konan hastaların havuzu (Havuz AD Braak IV ve Havuz AD Braak V). Bu havuz aynı Braak evresinde hastalık teşhisi konan 4 hastadan alınan numunelerin birleştirilmesi ile hazırlanmıştır.

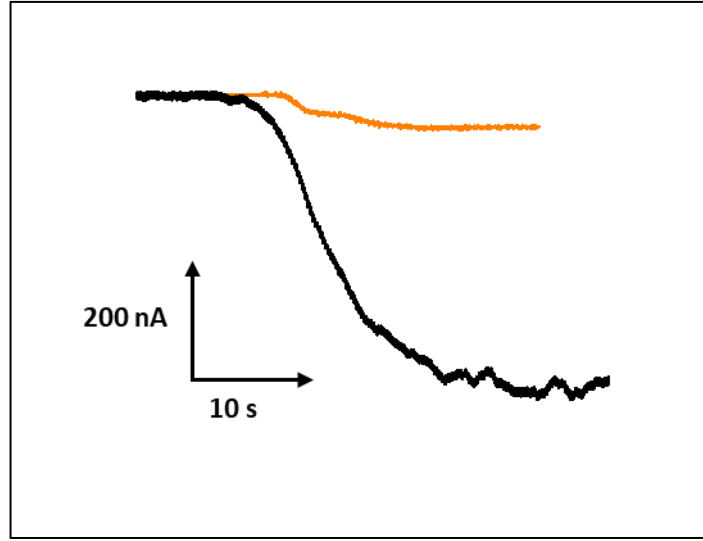
6,25 ile 500 ng arasındaki beyin dokusu protein ekstraktı kullanılarak AD Braak V hasta havuzu ve kontrol grubu için elde edilen amperometrik sinyallerin karşılaştırılması ile tespiti gerçekleştirmek için gereken beyin dokusu protein ekstrakte miktarı optimize edilmiştir.

Şekil 3.26'da gösterilen sonuçlar, daha küçük miktarlarda beyin dokusu protein ekstraktının, AD Braak V hastaları ve sağlıklı bireyler arasında daha iyi bir ayırım (AD/H oranı) sağladığını göstermiştir. Bu nedenle, seçilen örneklerde GFAP tayinini gerçekleştirmek için 6,25 ng seçilmiştir.



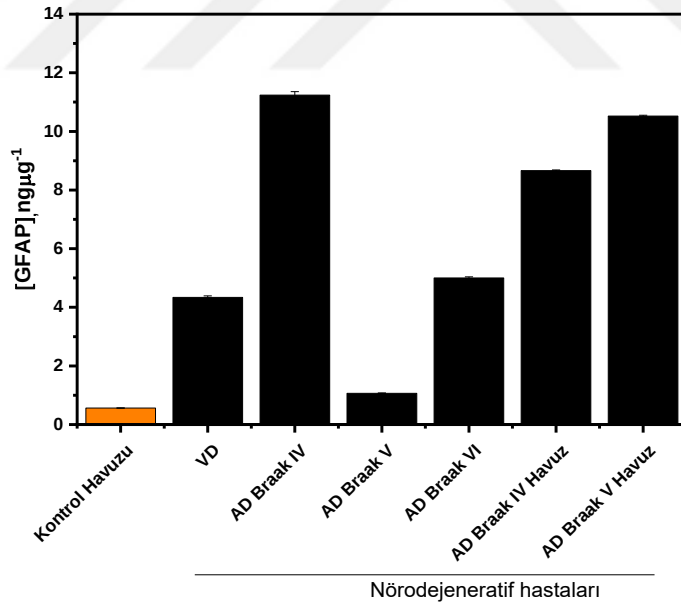
Şekil 3.26. Beyin doku miktarının kontrol ve GFAP sinyaline etki grafiği.

Beyin doku ekstraktlarında var olan potansiyel matris etkisi, 6,25 ng protein doku ekstraktına standart ekleme yöntemiyle artan konsantrasyonlarda GFAP standart çözeltisi ($5\text{--}25\text{ ng mL}^{-1}$) eklenerek test edilmiştir. GFAP standartlarıyla ($45 \pm 2\text{ nA mL ng}^{-1}$) hazırlanan lineer kalibrasyon grafiklerinin eğim değerleri ile standart ekleme kalibrasyon grafiği ($50 \pm 3\text{ nA mL ng}^{-1}$) karşılaştırıldığında, önemli bir fark tespit edilememiştir ($t_{\text{exp}} = 0,903 < t_{\text{tab}} = 4,303$), böylece bu ekstrakt miktarı kullanılarak hiçbir belirgin matris etkisinin gözlemlenmediği sonucu ortaya çıkmıştır. GFAP proteini, GFAP standartlarının kalibrasyon grafiğine 6,25 ng beyin doku ekstraktlarında ölçülen amperometrik cevapların interpolasyonu ile tayin edilmiştir.



Şekil 3.27.Kontrol grubu (turuncu) ve AD V havuzu (siyah)' a ait amperogramları

Şekil 3.27'de, kontrol grubu (turuncu) ve AD V havuzu (siyah)' a ait amperogramlar göstermektedir.



Şekil 3.28. AD hastalarından ve AD havuzundan alınan örneklerdeki GFAP seviyeleri

Şekil 3.28'de gösterildiği gibi, AD hastalarından ve AD havuzundan alınan örneklerdeki GFAP seviyeleri, literatürde bildirilenlerle uyumlu olarak, sağlıklı

bireylerden alınan örneklerden önemli ölçüde daha yüksektir (Cicognola ve ark., 2021; Chatterjee ve ark., 2021; Benedet ve ark., 2021). AD Braak V numunesi için elde edilen önemli ölçüde düşük sinyalin nedeni, bireyler arasındaki heterojenlik olarak açıklanabilir.

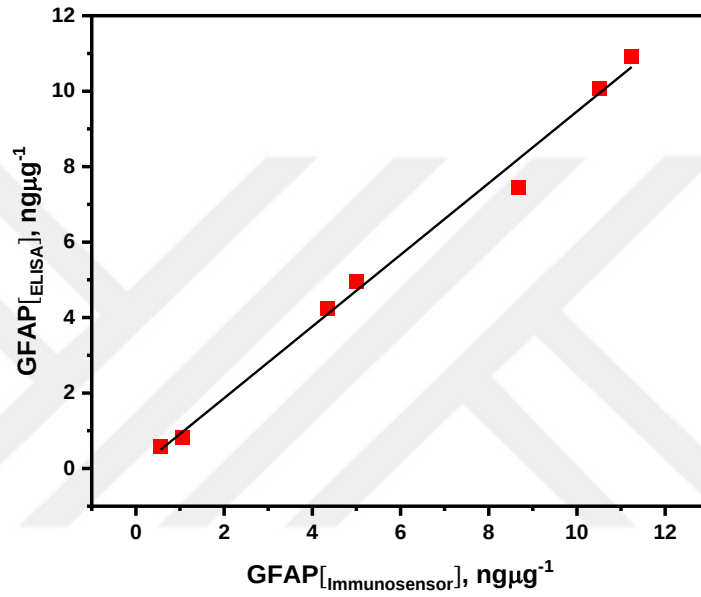
Ek olarak, VD hastası ayrıca daha önce beyin omur ilik sıvısının analizinde bildirildiği gibi kontrol hasta havuzundan daha büyük bir GFAP konsantrasyonu elde edilmiştir (Wallin ve ark., 1996). Çizelge 3.5'te, aynı immünoaktifleri içeren ELISA metodolojisiyle ve geliştirilen immünoplatform kullanılarak GFAP'nin belirlenmesi için elde edilen verileri özetlemektedir.

Çizelge 3.5. MB tabanlı immünoplatform ve ELISA ile elde edilen veriler.

Örnek	MBs-tabanlı immünoplatform		ELISA		t_{exp}
	[GFAP]*	BSS, %	[GFAP]*	BSS %	
Kontrol	$0,56 \pm 0,01$	4,9	$0,58 \pm 0,03$	8,2	0,591
VD	$4,3 \pm 0,2$	8,4	$4,2 \pm 0,1$	3,4	0,445
AD Braak IV	$5,0 \pm 0,2$	5,4	$5,0 \pm 0,3$	11,0	0,151
AD Braak V	$1,06 \pm 0,05$	7,8	$0,82 \pm 0,01$	1,2	5,208
AD Braak VI	$11,2 \pm 0,5$	7,2	$10,9 \pm 0,2$	3,2	0,601
AD Braak IV Havuz	$8,7 \pm 0,1$	1,6	$7,5 \pm 0,1$	2,5	8,900
AD Braak V Havuz	$10,5 \pm 0,1$	2,0	$10,1 \pm 0,2$	2,8	2,159

Çizelge 3.5'teki istatistiksel karşılaştırma, 8 örneğin 6'sında $t_{exp} < t_{tab} = 2,776$ olarak göstermektedir.

Ek olarak, Şekil 3.29.'de gösterilen korelasyon grafiğinin eğim değeri ($(0,9 \pm 0,1)$ ve kesişme noktası ($0,0 \pm 0,6$); $r= 0,998$), analiz edilen numunelerin yüksek karmaşıklığına rağmen her iki metodoloji ile sağlanan sonuçlar arasındaki büyük korelasyonu doğrulamıştır. Bu nedenle, bu sonuçlar, yalnızca 6,25 ng ham ekstrat kullanılarak ve 2 saat içinde bu tür numunelerdeki GFAP içeriğini ölçmek için geliştirilen metodolojinin alternatif bir yöntem olacağını kanıtlamıştır.

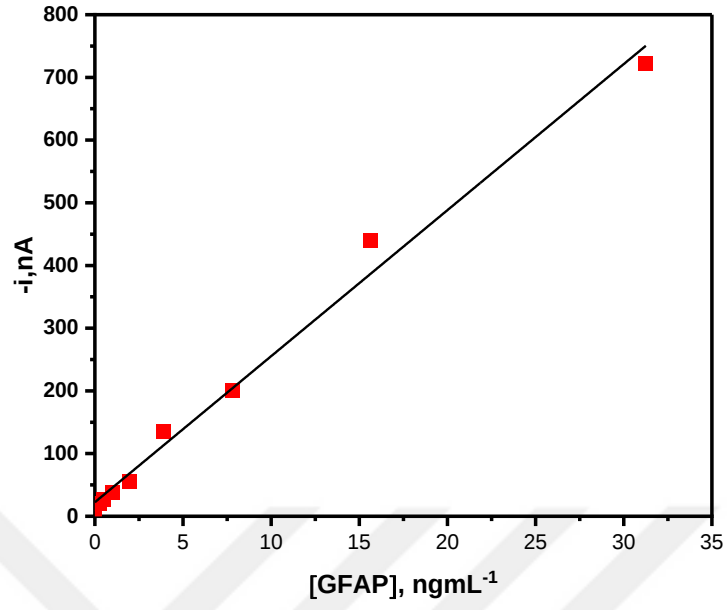


Şekil 3.29. ELISA ve immunosensör korelasyon grafiği.

3.2.12. Ticari Serum Örneğinde GFAP analizi

Geliştirilen immünosensörün uygulanabilirliği, ticari insan serumundaki farklı GFAP konsantrasyonlarında Şekil 3.30'da gösterilen bir kalibrasyon eğrisi ile değerlendirilmiştir. Optimize edilmiş çalışma koşulları altında, GFAP konsantrasyon değeri $0,24\text{--}31,2\text{ ng mL}^{-1}$ arasında doğrusal bir eğri elde edilmiştir ($r= 0,997$). TS ve TAS sırasıyla 71 ng mL^{-1} ve 217 ng mL^{-1} olarak bulunmuştur.

$$I_c \text{ (nA)} = (23 \pm 2) \text{ (nA mL ng}^{-1}) [\text{GFAP}] \text{ (ng mL}^{-1}) + (22 \pm 24) \text{ (nA)}$$



Şekil 3.30. Ticari Serumda GFAP biyobelirteçi için elde edilen kalibrasyon doğrusu

4.TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında hedef HPV16 DNA dizisi için nükleik asit biyosensörü geliştirilmiştir. Geliştirilen nükleik asit biyosensörünün öncelikle optimizasyon basamakları incelenmiştir. Ardından optimum koşullarda geliştirilen biyosensörün analitik performansı değerlendirilmiştir.

Nükleik asit biyosensör çalışmasında öncelikle manyetik mikrobuncuk optimizasyon çalışması yapılmıştır. Biyosensör için çalışma elektrotu olarak perde baskılı karbon elektrot (SPCE) kullanılmıştır. İki farklı manyetik mikrobuncuk ile hazırlanmış biyosensörlerin, destek ve hedef HPV16 DNA dizisinin sinyallerinden elde edilen sinyal/kontrol (S/B) oranı dikkate alınarak, sonuçlar değerlendirilmiştir.

MB-Neut ile hazırlanan biyosensör, MB-Strep ile hazırlanan biyosensöre kıyasla spesifik olmayan daha yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. Bu nedenle, S/B değeri incelendiğinde MB-Strep mikrobuncuk kullanılmış biyosensör ile daha yüksek S/B değeri elde edilmiştir.

Mikrosantrifüj tüpüne eklenen 5 µL MB-Strep mikrobuncuk miktarı, daha önce streptavidin kaplı manyetik mikrobuncuk ile geliştirilen nükleik asit biyosensörlerinde kullanılan referans miktarı dikkate alınarak, belirlenmiştir (Ruiz-Valdepenas Montiel ve ark., 2018)(Ruiz-Valdepeñas Montiel ve ark., 2017).

MB-Strep mikrobuncuklar her bir aşamadan önce mikrosantrifüj tüp içerisinde yıkanması gerekir. Bunun nedeni, yüzeye tutunamayan biyolojik maddelerin uzaklaşması ve magnet yardımıyla hedef DNA zincirinin, mikrobuncuklara bağlanmasını kuvvetlendirmektir. Böylece, manyetik mikrobuncuk yüzeyine tutunan biyolojik maddeler ile geliştirilen biyosensörün hızlı ve verimli sinyal vermesine olanak sağlar. Her aşamadan sonra manyetik mikrobuncukların iki defa yıkanması

önerilmektedir. Yıkama çözeltisi uzaklaştırılıp, yüzeye tutturulacak biyolojik madde çözeltisi mikrobuncuklar resüspande edilir.

B-Cp-RNA prob, biyotin-streptavidin etkileşimi yoluyla streptavidin kaplı MB'ler üzerinde spesifik bir etkileşime girerler. Streptavidin ve biyotin arasındaki etkileşim, en güçlü non-kovalent etkileşimlerinden biridir. B-Cp-RNA probunun farklı konsantrasyonda (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) kontrol ve hedef sinyalleri incelenmiştir. S/B oranı incelendiğinde, en iyi sonuç 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ B-Cp-RNA probu kullanılarak elde edilmiştir.

B-Cp-RNA prob konsantrasyonları için kontrol (B) sinyalleri arasında belirgin bir fark yoktur sadece 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ B-Cp-RNA ile elde edilen B sinyali diğer konsantrasyon değerlerine göre daha düşük okunmuştur, bu yüzden de S/B değeri yüksek gözükmemektedir. Ancak, hedef DNA'nın 1,0 nM 'si için ölçülen akımın, 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'ye kadar b-Cp-RNA konsantrasyonu ile önemli ölçüde arttığını göstermektedir. 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ B-Cp-RNA probu immobilize edildiğinde kısıtlı hibridizasyon verimliliğinden dolayı S/B oranı sabit kalmıştır. Ayrıca, yüksek B-Cp-RNA konsantrasyonu hassasiyeti engelleyebilir.

B-Cp-RNA probunun MB-Strep yüzeyine immobilizasyonu için 0-90 dk inkübasyon süresi optimize edilmiştir. S/B oranı değerlendirildiğinde, 30 dakika yeterli bir inkübasyon süresi olarak kabul edildi.

MB-Strep mikrobuncuklar spesifik bir biyotinlenmiş RNA probu ile modifiye edilmiş ve sentetik hedef HPV16 DNA'yı doğrudan hibridizasyon yoluyla yüksek seçicilikte yakalamak için kullanılmıştır. B-Cp-RNA probu hedef HPV16 ile tam eşleşecek şekilde sentezlenmiştir. Ruiz-Valdepenas Montiel, V. ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 24 mer ve 40 mer'lik iki farklı zincir uzunluğu ile nükleik asit biyosensörü geliştirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre 40 mer zincir uzunluğuna sahip DNA ve RNA zincirleri ile daha hassas bir biyosensör geliştirdiklerini ifade etmişlerdir (Ruiz-Valdepenas Montiel ve ark., 2017).

Tez çalışmasında HPV16 tam genom dizileri, NCBI veri tabanından alındı (National Center for Biotechnology Information, 2022). Hedef zincir için HPV16 DNA genomu 1753 nükleotidinden 40 mer fragmanını Bartosik M. ve ark., elektrokimyasal çalışmasında kullanmıştır (Bartosik ve ark., 2016b). Tez çalışmasında da belirtilen (5'TCTCCAATGTGTATGATGATAGAGCCTCCAAAATTGCGTA) HPV16 DNA zinciri referans alınmıştır. HPV16 DNA dizisinin farklı immobilizasyon süreleri 0- 90 dk arasında incelenmiştir. 30 dakika immobilizasyon süresi, en yüksek spesifik akıma ve S/B oranına ulaşmak için yeterli olmuştur. Daha uzun inkübasyon süreleri için spesifik tepkilerde gözlenen kademeli azalma, sterik etki ve aglomerasyondan kaynaklanabilir.

Antikor olarak kullanılan DNA/RNA hibritlerine karşı yüksek afiniteye sahip ticari bir antikorun kullanımı ile doğrudan DNA/RNA hibridizasyon yapılmıştır. Belirli bir dubleks tipine yönelik seçiciliklerinden ayrı olarak, bu spesifik antikorlar, herhangi bir hedef nükleik asitten saptanması için çok yönlü tanıma elemanlarıdır. Bununla birlikte, küçük epitopları (boyut olarak ~6 baz çifti), DNA/RNA heteroduplekslerinin uzunluğunu değiştirerek analitik duyarlılığını arttırmaktadır.

Daha sonra, farklı konsantrasyonlardaki DNA/RNA antikorun HPV16 DNA sinyaline etkisi incelenmiştir. 0; 0,25; 0,5; 2; 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ anti-DNA/RNA değerleri arasında en iyi HPV16 DNA sinyali 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ile elde edilmiştir. 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ anti-DNA/RNA'nın 15-60 dk arasında immobilizasyon süresinin HPV16 DNA sinyaline etkisi incelenmiştir ve 15 dk inkübasyon süresi yeterli olmuştur.

Hem geleneksel enzim etiketleri (Strep-HRP gibi) hem de spesifik antikor fragmanları ve bir enzim molekülü veya bakteriyel antikor bağlayıcı proteinler ile konjuge edilmiş ikincil antikorlar gibi nükleik asit biyoalgılamasında çok yaygın kullanılmayan enzim etiketleri kullanılarak farklı etiketleme stratejileri karşılaştırılmıştır. Anti-DNA/RNA antikor etiketlemesinin tek bir HRP molekülüyle veya birden fazla HRP molekülü içeren bir polimerle konjuge edilmiş ikincil antikorlar veya bakteriyel antikor bağlayıcı proteinlerle karşılaştırılmasında elde edilen sonuçlar,

ProtA-HRP80 ve antiIgG-HRP enzim etiketleri ile daha yüksek hassasiyet elde edildiğini göstermiştir. ProtA-HRP80 ve antiIgG-HRP enzim etiketlerinin amplifikasyon faktörü 1,27 olarak bulunmuştur. AntiIgG-HRP enzim etiketiyle birlikte geliştirilen nükleik asit biyosensörü ile elde edilen sinyal(S) değeri ProtA-HRP80 ile hazırlanan nükleik asit biyosensörüne göre düşüktür. ProtA-HRP80 enzim etiketinin daha yüksek hassasiyete sahip olmasının nedeni, enzim bağlanma bölgesinin fazla olmasıdır. Fakat ProtA-HRP40 ve ProtA-HRP80 ile geliştirilen nükleik asit biyosensörün spesifik olmayan adsorpsiyon oldukça yüksektir. Bu yüzden, S/B oranı değerlendirildiğinde, antiIgG-HRP enzim etiketi tercih edilmiştir.

En uygun enzim etiketi antiIgG-HRP seçildikten sonra, enzim etiketi seyrelme oranları (1/100; 1/250; 1/500; 1/1000; 1/2500; 1/5000; 1/10000) incelenmiştir. S/B değeri, antiIgG-HRP'nin seyrelme oranı küçük konsantrasyon (1/10000)'dan 1/1000'e kadar bir artış gözlenmiştir ve 1/1000 oranında en yüksek S/B değerini elde ettikten sonra daha yüksek konsantrasyonda S/B değeri sabit kalmıştır. 1/1000 antiIgG-HRP'nin 15-60 dk arasında immobilizasyon süresinin HPV16 DNA sinyaline etkisi incelenmiştir ve 30 dk inkübasyon süresi yeterli olmuştur.

Nükleik asit biyosensör parametrelerinin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, HPV16 DNA biyosensör protokol çalışması incelenmiştir.

Nükleik asit biyosensörü için, streptavidin kaplı manyetik mikrobuncuk yüzeyine öncelikle biyotinlenmiş RNA probu immobilize edilir. Devamında, Tablo 3.1.'de belirtilen farklı protokol çalışmaları yapılmıştır. Birincisi (1); Hedef HPV16 DNA, anti-DNA/RNA antikoru ve antiIgG-HRP karışımı; ikincisi(2B); ilk basamak Hedef HPV16 DNA, ikinci basamak anti-DNA/RNA antikoru ve antiIgG-HRP karışımı, üçüncüsü (2A); ilk basamak Hedef HPV16 DNA ve anti-DNA/RNA antikoru karışımı, ikinci basamak antiIgG-HRP enzim etiketi, dördüncüsü (3); sırasıyla Hedef HPV16 DNA, anti-DNA/RNA antikoru ve antiIgG-HRP immobilize edilmiştir. S/B oranı değerlendirildiğinde, en iyi sonuç Protokol 2B ile elde edilmiştir.

Manyetik mikrobuncuk üzerinde immobilize edilen heterodupleksler, önceden bir HRP homopolimeri ile konjuge edilmiş bir antikor ile etiketlenmiş spesifik bir DNA/RNA antikor karışımı immobilize edilir. Böylece duyarlılık artmış olur. DNA/RNA antikoru ve enzim etiket karışımının inkübasyon süresinin hedef HPV16 DNA zincirine etkisi incelenmiştir. Spesifik olmayan cevap(B), inkübasyon süresi arttıkça artmıştır. Bu nedenle 30 dakika inkübasyon süresi ile immobilize edilmiş heterohibritlerin verimli bir şekilde etiketlenmesi yeterli olmuş ve daha sonraki çalışmalar için bu inkübasyon süresi seçilmiştir.

Sonuç olarak geliştirilen HPV16 DNA nükleik asit biyosensörü için, 5 µL MB-Strep yüzeyine 0,25 µgmL⁻¹ B-Cp-RNA 30 dk immobilize edilmiştir. Hedef HPV16 dizisi 30 dk yüzeye immobilize edilmiştir. Ardından optimize edilmiş 2 µgmL⁻¹ anti-DNA/RNA ve 1/1000 anti-IgG-HRP karışımı 30 dk boyunca yüzeye immobilize edilmiştir. Elektrokimyasal HPV16 DNA biyosensörün analiz süresi yıkama ve ölçüm süresiyle birlikte yaklaşık 60 dk olduğunu ifade edebiliriz.

Manyetik mikrobuncuklar 1,5 mL mikrosantrifüj tüpünde hazırlanmıştır. Amperometrik ölçüm için manyetik mikrobuncuklar fosfat tamponu ile resuspande edilip, manyetik teflon yatak üzerindeki SPCE yüzeyine damlatılmıştır. H₂O₂/HQ sistemi kullanılarak amperometrik ölçüm alınmıştır.

Geliştirdiğimiz HPV16 DNA nükleik asit biyosensörün analitik performansı değerlendirilmiştir. Kalibrasyon aralığı 0,002-0,5 nM derişim arasında doğrusal bir eğri göstermiştir, TS ve TAS değerleri de 0,5 pM ve 1,7 pM olarak bulunmuştur.

Geliştirilen nükleik asit biyosensörün stabilite çalışması yapılmıştır. Stabilite çalışmasında, streptavidin ile işlevselleştirilmiş manyetik mikrobuncuklar yüzeyine biyotinlenmiş RNA probu bağlanıp, manyetik mikrobuncuklar PBS ile resuspande edilerek buzdolabında muhafaza edilmiştir. Belli aralıklarda alınan ölçümler için aynı gün önce kontrol ve hedef HPV16 DNA immobilize edilip sonra antiDNA/RNA ve antiIgG-HRP karışım çözelti immobilize edilerek H₂O₂/HQ aracılığıyla amperometrik

ölçüm alınmıştır. Kontrol sinyalinde 30 gün boyunca bir düşüş gözlenmemiştir fakat hedef HPV16 DNA sinyallerin 15 gün stabil kaldığı sonrasında sinyalde bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir.

Tez kapsamında geliştirilen immunosensör ile GFAP biyobelirtecinin analizi yapılmıştır. Karboksil ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik mikrobuncuklar (MB-COOH) kullanılmıştır. Karboksil manyetik mikrobuncuklar, streptavidin ile fonksiyonelleştirilmiş manyetik mikrobuncuklara (MB-Strep) göre daha dayanıklıdır. MB-COOH, MB-Strep manyetik mikrobuncuklarda olduğu gibi her bir immobilizasyon basamağı arasında belli çözeltiler ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. MB-COOH manyetik mikrobuncuklar daha önce yapılmış çalışmalarda belirtildiği gibi mikrosantrifüj tüpüne 3 µL ilave edilmiştir (Muñoz-San Martín ve ark., 2020; Arévalo ve ark., 2021; Valverde ve ark., 2021). Daha sonra karboksil gruplarının aktive edilmesi için EDC/NHS karışım çözeltisine belli bir süre maruz bırakılmıştır. Yüzeye CAb antikoru farklı konsantrasyonda (0; 10; 25; 50 µgmL⁻¹) immobilizasyonu ile kontrol ve 7,8 ngmL⁻¹ GFAP belirtecinin sinyali üzerindeki etkisi incelenmiştir. En iyi sinyal 25 µgmL⁻¹ CAb antikoru ile elde edilmiştir. 25,0 µg mL⁻¹'den küçük cAb konsantrasyonları, sınırlı CAb yüklemesi nedeniyle düşük amperometrik cevap vermiştir.

Farklı sürelerde (15; 30; 60; 90 dk) CAb antikoru'nun GFAP sinyali üzerine etkisi incelendiğinde 15 dk immobilizasyon için yeterli olmuştur. 25 µgmL⁻¹'den daha büyük CAb konsantrasyonlar ve 15 dakikadan uzun inkübasyon süresinde daha düşük GFAP sinyali gözlenmiştir. Bunun nedeni, daha uzun sürede ve yüksek konsantrasyonda immobilize edilen CAb antikoru, GFAP antijenini tanımasını zorlaştığı ve sterik engel gözlemlendiği için daha küçük S/B oranlarına neden olmuştur. CAb/MB-COOH yüzeyinde CAb immobilizasyonundan sonra kalan aktif grupları bloke etmek için etanolamin kullanılmıştır.

Geliştirilen immunosensörün protokol çalışması yapılmıştır. 4 farklı protokolün kontrol ve GFAP sinyaline etkisi incelenmiştir. GFAP immunosensörü için, karboksil

kaplı manyetik mikrobuncuk yüzeyine öncelikle CAb immobilize edilir. Devamında, Çizelge 3.3.'de belirtilen farklı protokol çalışmaları yapılmıştır. Birincisi (1); GFAP, Btn-DAb antikoru ve Strep-HRP karışımı; ikincisi(2B); ilk basamak GFAP ve Btn-DAb antikoru karışımı, ikinci basamak Strep-HRP, üçüncüsü (2A); ilk basamak GFAP, ikinci basamak Btn-DAb ve Strep-HRP karışımı, dördüncüsü (3); sırasıyla GFAP, Btn-DAb ve Strep-HRP immobilize edilmiştir. S/B oranı değerlendirildiğinde, en iyi sonuç Protokol 2B ile elde edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda btn-DAb (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ btn-DAb antikoru ile hazırlanan biyosensörün, S/B oranı en yüksek bulunmuştur. 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'den yüksek btn-DAb konsantrasyonu ile, kontrol sinyaldeki kademeli artış S/B oranında düşüşe ve sabitlenmeye neden oldu. Bu davranış, daha güçlü spesifik olmayan adsorpsiyon ve sterik engellemeden kaynaklı olduğunu ifade edebiliriz.

GFAP/btn-DAb karışım çözeltisi farklı sürelerde (15, 30, 45, 60, 90, 120 dk) immobilizasyon çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre GFAP/btn-DAb karışım çözeltisinin 60 dk immobilizasyon süresi yeterli olmuştur.

Farklı seyrelme oranlarında (1/100; 1/250; 1/500; 1/1000; 1/2500) Strep-HRP enzim etiketinin, S/B sinyaline etkisi incelenmiştir. 1/250 seyreltme oranı ile en iyi sonuç elde edilmiştir. Daha sonra farklı sürelerde 1/250 Strep-HRP enzim etiketinin S/B oranı incelendiğinde 60 dk immobilizasyon süresi ile en iyi sonuç elde edilmiştir.

Sonuç olarak geliştirilen GFAP immunosensörü için, 3 μL MB-COOH yüzeyi önce aktive edilmiştir daha sonra, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ CAb antikoru yüzeye 15 dk immobilize edilmiştir. Yüzey bloke edildikten sonra, GFAP/btn-DAb karışımı 60 dk yüzeye tutturulur. Ardından optimize edilmiş 1/250 Strep-HRP 60 dk boyunca yüzeye immobilize edilmiştir. Böylece sandviç immunokonjugatlarıyla bir elektrokimyasal immunosensör geliştirilmiştir. Elektrokimyasal GFAP immunosensörün hazırlık ve analiz süresi yaklaşık 2 saat olduğunu ifade edebiliriz.

Manyetik mikrobuncuklar 1,5 mL mikrosantrifüj tüpünde hazırlanmıştır. Amperometrik ölçüm için manyetik mikrobuncuklar fosfat tamponu ile resuspande edilip, manyetik teflon yatak üzerindeki SPCE yüzeyine damlatılmıştır. -0,2 V potansiyel uygulayarak, H₂O₂/HQ sistemi kullanılarak amperometrik ölçüm alınmıştır.

Geliştirdiğimiz GFAP immunosensörün analitik performansı değerlendirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi, 0,24 – 31,6 ng mL⁻¹ GFAP arasında doğrusal bir eğri göstermiştir. TS ve TAS değerleri de sırasıyla, 67 pgmL⁻¹ ve 203 pgmL⁻¹ olarak bulunmuştur. Yöntemin kabul edilebilir tekrarlanabilirliği %BSS, %8,2, ile doğrulanmıştır. Geliştirilen GFAP biyosensörün serumdaki analizi, ticari serum çözeltilisine dışarıdan GFAP biyobelirteci ekleyerek gerçekleştirilmiştir. GFAP konsantrasyonu 0,24-31,2 ngmL⁻¹ arasında doğrusal bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. TS ve TAS sırasıyla 71 pgmL⁻¹ ve 217 pgmL⁻¹ olarak bulunmuştur. Fakat, elde ettiğimiz tayin sınırı, Alzheimer hastalığına sahip bireylerin plazmasındaki eşik değeri (54,1 pg mL⁻¹) için yeterli değil iken (Cicognola ve ark., 2021), Alzheimer hastalarının omurilik sıvısından alınmış örneklerde, 1 ngmL⁻¹'in üzerindeki GFAP konsantrasyonunun ayırt edilebildiği rapor edilmiştir. Ayrıca, travmatik beyin hasarı gerçekleşmiş hastaların serumunda, GFAP için eşik değeri 1,5 µg mL⁻¹ bulunmuştur (Pelika ve ark., 2004). Bizim elde ettiğimiz TS'nin, bu eşik değerinden yaklaşık altı kat küçük olması, geliştirilen biyosensörün uygulanabilir olduğunun bir göstergesidir.

GFAP immunosensörünün stabilitesi değerlendirmek için, belli sürelerde ölçüm almak için immunokonjugatları aynı gün hazırlanmıştır. CAb/MB-COOH immunokonjugatı, PBS ile resuspande edilip, buzdolabında ölçüm alınacağı güne kadar muhafaza edilmiş ve belli ölçüm aralıklarında sırasıyla GFAP/btn-DAb karışımı sonrasında Strep-HRP immobilize edilmesiyle kontrol ve 7,8 ngmL⁻¹ GFAP sinyalleri elde edilerek S/B oranı değerlendirildiğinde 12 gün boyunca elde edilen amperometrik sinyaller için ölçülen S/B oranında anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Böylece daha önceden hazırlanan CAb/MB-COOH immunokonjugatları, analiz günü daha kısa sürede cevap alınmasına olanak sağlamıştır.

İmmunosensörün seçicilik çalışmasında, insan vücudunda bulunan bazı potansiyel girişim yapabilen biyomoleküllerin, GFAP biyobelirteç sinyali üzerinde bir etkisi olup olmadığı incelenmiştir. hIgG ve Hb maddeleri varlığında GFAP sinyalinde farklılık gözlenmiştir. Bunun nedeni hIgG varlığında insan anti-hayvan antikolları ile reaksiyona girebilir olması; Hb varlığında GFAP sinyalindeki artışın intrinsik peroksidaz aktivesinden kaynaklanabilir olmasıdır (Grigorieva ve ark., 2013). Diğer interferans maddeleri (BSA, S100 β , HSA), varlığında GFAP sinyalinde önemli bir değişim gözlenmemiştir.

İmmünoensör parametreleri optimize edildikten sonra, analitik performansı değerlendirilmiştir. Sağlıklı bireylerden ve Alzheimer teşhisi konan hastalardan alınan beyin doku örneklerinde GFAP analizi yapılmıştır. GFAP tespiti için kullanılan beyin doku ekstraktları 6,25 ile 500 ng arasında optimize edilmiştir. En düşük beyin doku ekstrakt konsantrasyonu (6,25 ng), GFAP tayini için seçilmiştir. Geliştirilen immunosensörün kalibrasyon denkleminde elde edilen eğim ($45 \pm 2 \text{ nA mL ng}^{-1}$) ile, standart ekleme yöntemiyle beyin doku ekstraktına eklenen GFAP'ın kalibrasyon denkleminde elde edilen eğim ($50 \pm 3 \text{ nA mL ng}^{-1}$) arasında önemli bir fark tespit edilememiştir ($t_{\text{exp}} = 0,903 < t_{\text{tab}} = 4,303$). Elde edilen sonuca göre belirgin bir matriks etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

GFAP standartlarının kalibrasyon grafiği 6,25 ng beyin doku ekstraktlarında ölçülen amperometrik cevapların interpolasyonu ile tayin edilmiştir. Şekil 3.27' e bakıldığında kontrol grubuna ait sinyalin, Alzheimer teşhisi konan hastalardan alınan örneklerin sinyalinden daha küçük olduğu gözlemlenmiştir. Alzheimer teşhisi konan hastalardan AD Braak V numunesi için elde edilen sinyalin düşük olmasının nedeni, bireyler arasındaki heterojenlikten olabilir.

Geliştirilen immunosensör, rutin bir analiz yöntemi olan ELISA ile karşılaştırması yapılmıştır. 8 farklı sağlıklı ve AD hastalığı teşhisi olan hastaların beyin

doku ekstraktlarından alınan örneklerin konsantrasyon değerleri Çizelge 3.5'te incelenmiştir. Geliştirilen immunosensör ve ELISA yöntemleriyle elde edilen konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması $t_{exp} < t_{tab} = 2,776$ ile her iki metodoloji arasında güçlü bir korelasyon olduğunu göstermiştir. Ek olarak Şekil 3.29'da belirtilen GFAP ile immunosensör arasındaki korelasyon grafiğindeki eğim değeri ve kesişme noktası da bu korelasyonu desteklemektedir.

Geliştirdiğimiz GFAP immunosensörü, daha önce yapılmış çalışmalar ile benzer doğrusal aralıklar ve TS değerleri bulunmuştur. Giriş 1.4.6.1. kısmında bahsedilen daha önce geliştirilmiş elektrokimyasal sensörlerin hiçbirinde beyin doku ekstraktında GFAP analizi yapılmamıştır.

Bu yöntemlerin yüksek duyarlılığına rağmen, bu çalışmada bildirilen metodoloji GFAP'nin belirlenmesi için uygundur ve uygun bir maliyetle ve farklı numunelerde GFAP analizi için umut vadetmektedir.

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez kapsamında kanser ve nörolojik hastalıkların erken teşhisine yönelik immunosensör ve nükleik asit biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Rahim ağzı kanserine neden olan HPV'nin en yüksek riskli HPV16 tipine ait bir elektrokimyasal HPV16 DNA biyosensörü geliştirilmiştir. Ek olarak, nörolojik hastalıkların tespitinde kullanılan GFAP biyobelirtecinin immunosensörü geliştirilmiştir. Her iki biyosensör çalışmasında manyetik mikrobuncuklar kullanılmıştır ve hızlı, tekraredilebilir, ucuz ve duyarlı alternatif bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Tezin ilk kısmında elektrokimyasal HPV16 DNA biyosensörü geliştirilirken gerekli belli parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Manyetik mikrobuncuk seçimi, b-Cp-RNA prob konsantrasyonu ve immobilizasyon süresi, hedef DNA immobilizasyon süresi, anti-DNA/RNA antikor konsantrasyonu ve immobilizasyon süresi, enzim etiketinin belirlenmesi, enzim etiketinin seyrelme oranı ve immobilizasyon süresi, biyosensör protokolü incelenmiştir. Nükleik asit biyosensör çalışmasında biyotin-streptavidin etkileşiminden faydalanmak amacıyla MB-Strep kullanılmıştır. Hedef HPV16 DNA sentetik genomu 1753 nükleotidinden 40 mer fragmanı kullanılmıştır ve belirtilen zincirin b-Cp-RNA probu kullanılmıştır. Enzim etiket seçimi, geliştirilen nükleik asittin duyarlılığı için oldukça önemlidir. IgG-HRP enzim etiketinin anti-DNA/RNA antikoru ile etkileşimi biyosensörün performansını da oldukça arttırdığını göstermiştir.

İmmobilizasyon ortamı 950 rpm, 37°C'de optimize edilen koşullar altında termal çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. Her immobilizasyon aşamasından önce manyetik mikrobuncuklar belli tamponlar ile yıkanmıştır.

Sonuç olarak geliştirilen HPV16 DNA nükleik asit biyosensörü için, 5 µL MB-Strep yüzeyine 0,25 µg mL⁻¹ b-Cp-RNA 30 dk immobilize edilmiştir. Hedef HPV16 dizisi 30 dk yüzeye immobilize edilmiştir. Ardından optimize edilmiş 2 µg mL⁻¹ anti-

DNA/RNA ve 1/1000 anti-IgG-HRP karışımı 30 dk boyunca yüzeye immobilize edilmiştir. Elektrokimyasal HPV16 DNA biyosensörün analiz süresi yaklaşık 60 dk olduğunu ifade edebiliriz.

Optimum koşullar altında geliştirilen elektrokimyasal HPV16 DNA biyosensörün, analitik performansı değerlendirilmiştir. Hedef DNA 0,002-0,5 nM derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla 0,5 pM ve 1,7 pM olarak bulunmuştur.

Bu değerler, tez kapsamında geliştirilen HPV16 DNA biyosensörünün, literatürdeki elektrokimyasal çalışmalarda elde edilen teşhis sınırlarından daha düşük olup, duyarlı bir biyosensör geliştirildiği ifade edilmiştir. Geliştirilen HPV16 DNA biyosensörün stabilite çalışması yapılmıştır. 15 gün boyunca sinyallerde önemli bir farklılık görünmez iken, 15 günün sonunda bir azalma gözlemlenmiştir.

Tezin ikinci kısmında, elektrokimyasal GFAP immunosensörün geliştirilmesi için gerekli parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. CAb konsantrasyonu ve immobilizasyon süresi, biyosensör protokolü, btn-DAb konsantrasyonu, Strep-HRP seyrelme oranı ve inkübasyon süresi, biyosensör protokolü incelenmiştir. Bu çalışmada MB-COOH manyetik mikrobuncuklar kullanılmıştır. Karboksil grupları EDC/NHS ile aktive edilmesi sonucu, CAb antikorunun yüzeye daha kuvvetli bağlanmasına neden olmuştur. CAb antikoru immobilize edildikten sonra, yüzeyin bloke edilmesi için etanolamin kullanılmıştır. İmmobilizasyon ortamı, 950 rpm, 25°C’de optimize edilen koşullar altında termal çalkalayıcıda gerçekleştirilmiştir. Her immobilizasyon aşamasından önce manyetik mikrobuncuklar belli tamponlar ile yıkanmıştır.

Sonuç olarak geliştirilen GFAP immunosensörü için, 3 µL MB-COOH yüzeyi önce aktive edilmiştir daha sonra, 25 µg mL⁻¹ CAb antikoru yüzeye 15 dk immobilize edilmiştir. Yüzey bloke edildikten sonra, GFAP/btn-DAb karışımı 60 dk yüzeye tutturulmuştur. Ardından optimize edilmiş 1/250 Strep-HRP 60 dk boyunca yüzeye

bağlanmıştır. Böylece sandviç immunokonjugatlarıyla bir elektrokimyasal immunosensör geliştirilmiştir. Elektrokimyasal GFAP immunosensörün analiz süresi yaklaşık 2 saat olduğunu ifade edebiliriz.

Optimum koşullar altında geliştirilen elektrokimyasal GFAP immunosensörün, analitik performansı değerlendirilmiştir. GFAP biyobelirteci, $0,24 - 31,6 \text{ ng mL}^{-1}$ derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla 67 pg mL^{-1} ve 203 pg mL^{-1} olarak bulunmuştur. Elde edilen teşhis sınırı, nörolojik rahatsızlığı olan hastaların plazmasındaki GFAP eşik değeri için yeterli değildir. Bu tip hastaların omurilik sıvısından alınacak numuneden elde edilecek GFAP miktarı için yeterli bir duyarlılıkta olabilir. Tez kapsamında çalıştığımız beyin doku ekstraktlarında GFAP analizi ile oldukça olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Geliştirilen biyosensör aynı zamanda, standart ELISA yöntemiyle de karşılaştırılmıştır ve istatistiksel verilere göre yüksek korelasyonu sahip bir biyosensör geliştirilmiştir.

Geliştirilen GFAP immunosensör ile, HSA, BSA, S100 β biyomoleküllerinin varlığında GFAP sinyalinde önemli bir değişiklik gözlemlenmediği, fakat hIgG ve Hb varlığında GFAP sinyalinde değişiklik gözlemlenmiştir. GFAP ELISA spesifikasyonlarına göre rekombinant insan proteini test edildiğinde GFAP immünosensörlerde yer alan antikorlarla çapraz reaktivite göstermezler.

GFAP immunosensörün stabilitesi incelendiğinde, 12 gün boyunca elde edilen sinyallerde anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Böylece, daha önce hazırlanmış immunokonjugatları hazırlanması durumunda, analiz süresinin daha kısa olmasına imkan sağlamıştır.

Geliştirilen her iki biyosensör ölçümleri, $-0,2 \text{ V}$ teşhis potansiyeli uygulanmış ve harici gümüş/gümüş klorür referans elektrotu kullanarak, amperometrik teknik ile gerçekleştirilmiştir. Perde baskılı karbon elektrot yüzeyine, hazırlanan manyetik mikrobuncuk damlatılır ve manyetik yatak üzerine tutturulur ve elektrokimyasal hücre

içerisine daldırılır. $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HQ}$ sistemi kullanılarak, 50 mM pH 6,0 fosfat tamponu içerisinde ölçüm gerçekleştirilmiştir.



ÖZET

Kanser ve Nörolojik Hastalıklara Yönelik Elektrokimyasal Biyosensör Sistemlerinin Geliştirilmesi

Tez kapsamında, nükleik asit biyosensörü ve immunosensör elektrokimyasal sistemleri geliştirilmiştir. Rahim ağzı kanserine neden olduğu bilinen yüksek riskli HPV16 tipi DNA zincirinin ve nörolojik hastalıkların erken teşhisinde kullanılan GFAP biyobelirtecinin elektrokimyasal analizi yapılmıştır. Basit, hızlı, ucuz, hassas, kolay ve uygulanabilirlik bakımından varolan yöntemler ile karşılaştırmak için, HQ/H₂O₂ sistem kullanılarak HRP enzim etiketi ve manyetik mikrobuncuk ile kaplanmış tek kullanımlık elektrot yüzeyinde amperometrik ölçüm ile her iki biyolojik platformu geliştirmek tez kapsamında amaçlanmıştır.

Hedef DNA dizisine uygun yakalama ve tespit problemleri kullanarak sandviç hibridizasyon yöntemi ile HPV16 DNA tayini ve HRP ile konjuge edilmiş ticari bir ikincil antikor ile enzim etiketinin bağlanmasıyla bu heterohibritlerdeki 6-baz çiftte sahip epitoplara tanıyabilen amperometrik ölçüm ile RNA heterohibritlerinin analizi için biyolojik platform geliştirilmiştir.

Optimum koşullar altında geliştirilen elektrokimyasal HPV16 DNA biyosensörün, analitik performansı değerlendirilmiştir. Hedef DNA 0,002-0,5 nM derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla 0,5 pM ve 1,7 pM olarak bulunmuştur.

HRP ile etiketlenmiş sandviç immünoplatformun ilk GFAP tayini için manyetik mikrobuncuk tabanlı immunosensör geliştirilmiştir. Optimum koşullar altında geliştirilen elektrokimyasal GFAP immunosensörün, analitik performansı değerlendirilmiştir. GFAP biyobelirteci, 0,24 – 31,6 ng mL⁻¹ derişim aralığında doğrusallık elde edilmiştir. Teşhis sınırı ve tayin alt sınırı değerleri sırasıyla 67 pg mL⁻¹ ve 203 pg mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

Bu immünoplatform, matriks etkisi olmadan yalnızca 6,25 ng protein beyin ekstraktlarında sağlıklı denekler ile nörodejeneratif hastalık teşhisi konan hastalarda sadece 2 saat içinde GFAP biyobelirteç konsantrasyonu belirlendi ve ayırt edildi aynı zamanda uzun süren ELISA metodolojisi ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler GFAP, HPV, İmmunosensör, Nükleik asit biyosensör, Manyetik mikrobuncuk

SUMMARY

Development of Electrochemical Biosensor Systems for Cancer and Neurological Diseases

During the thesis, electrochemical bioplatfroms of nucleic acids and immunosensors were developed. Electrochemical analysis of the high-risk DNA strand of HPV16, known to cause cervical cancer, and of the biomarker GFAP, used in the early diagnosis of neurological diseases, was performed. To develop competitive tools compared to existing ones in terms of simplicity, speed, affordability, sensitivity and point-of-care application, the objective pursued in this PhD thesis, both bioplatfroms are based on the implementation of the corresponding bioassays on the surface of magnetic microparticles, enzymatic labeling with the HRP enzyme, and amperometric transduction on disposable electrodes using the system HQ/H₂O₂.

The bioplatfrom developed for HPV16 DNA determination involves the formation of a sandwich hybridization assay using RNA capture and detection probes complementary to the target DNA sequence to be determined and the recognition of RNA heterohybrids formed by a commercial antibody capable of recognizing 6-base pair epitopes in these heterohybrids, which is enzymatically labeled prior to amperometric transduction with an HRP-conjugated secondary antibody.

The analytical performance of the electrochemical HPV16 DNA biosensor was evaluated under optimum conditions. The concentration range was obtained 0.002-0.5 nM of target DNA. Limit of detection and limit of quantification were found 0.5 pM and 1.7 pM, respectively.

The immunoplatfrom for GFAP determination, the first one developed so far based on magnetic microbeads, comprises a sandwich immunoassay and enzymatic labeling with HRP. In the optimal experimental conditions, also exhaustively evaluated, this immunoplatfrom offered a limit of detection of 67 pgmL⁻¹ for the amperometric detection of standards and selectivity compatible with clinical applicability to assist in minimally invasive neurodegenerative diagnosis and prognosis. This immunoplatfrom demonstrated the ability to differentiate between healthy subjects and patients diagnosed with neurodegenerative diseases in only 2 h by determining the concentration of the target biomarker in protein brain extracts without matrix effect and using only 6.25 ng of sample per determination, providing accurate results in line with those obtained by the long-established ELISA methodology.

Keywords: GFAP, HPV, immunosensor, magnetic microbeads, nucleic acid biosensor

KAYNAKLAR

- ABEYRATHNE, CD, HUYNH, DH, LEE, TT, NGUYEN, TC, NASR, B, CHANA, G, SKAFIDAS, E (2016) GFAP Antibody Detection Using Interdigital Coplanar Waveguide Immunosensor. *IEEE Sens. J.*, **16**: 2898–2905.
- AFKHAMI, A, MOOSAVI, R, MADRAKIAN, T (2013) Maghemite-Nanoparticles Enhanced Effects in Electrochemical Determination of Dipyrindamole Utilizing Simultaneous Statistical Based Experimental Design Optimization. *J. Electrochem. Soc.*, **160**: H775–H781.
- AGOSTINI, M, AMATO, F, VIERI, ML, GRECO, G, TONAZZINI, I, BARONCELLI, L, CALEO, M, VANNINI, E, SANTI, M, SIGNORE, G, CECCHINI, M (2021) Glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP) biomarker detection in serum-matrix: Functionalization strategies and detection by an ultra-high-frequency surface-acoustic-wave (UHF-SAW) lab-on-chip. *Biosens. Bioelectron.*, **172**: 112774.
- ALBERS, J, GRUNWALD, T, NEBLING, E, PIECHOTTA, G, HINTSCHE, R (2003) Electrical biochip technology - A tool for microarrays and continuous monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.*, **377**: 521–527.
- ANTON, M, MORANOVA, L, HRSTKA, R, BARTOSIK, M (2020) Application of an electrochemical LAMP-based assay for screening of HPV16/HPV18 infection in cervical samples. *Anal. Methods*, **12**: 822–829.
- ARÉVALO, B, BEN HASSINE, A, VALVERDE, A, SERAFÍN, V, MONTERO-CALLE, A, RAOUAFI, N, CAMPS, J, ARENAS, M, BARDERAS, R, YÁÑEZ-SEDEÑO, P, CAMPUZANO, S, PINGARRÓN, JM (2021) Electrochemical immunoplatfrom to assist in the diagnosis and classification of breast cancer through the determination of matrix-metalloproteinase-9. *Talanta*, **225**: 1–9.
- ARYA, SK, KONGSUPHOL, P, PARK, MK (2017) Off surface matrix based on-chip electrochemical biosensor platform for protein biomarker detection in undiluted serum. *Biosens. Bioelectron.*, **92**: 542–548.
- ARYA, SK, PUI, TS, WONG, CC, KUMAR, S, RAHMAN, ARA (2013) Effects of the electrode size and modification protocol on a label-free electrochemical biosensor. *Langmuir*, **29**: 6770–6777.
- ATKINSON, AJ, COLBURN, WA, DEGRUTTOLA, VG, DEMETS, DL, DOWNING, GJ, HOTH, DF, OATES, JA, PECK, CC, SCHOOLEY, RT, SPILKER, BA, WOODCOCK, J, ZEGER, SL (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **69**: 89–95.
- AVELINO, KYPS, OLIVEIRA, LS, LUCENA-SILVA, N, ANDRADE, CAS, OLIVEIRA, MDL (2021) Flexible sensor based on conducting polymer and gold nanoparticles for electrochemical screening of HPV families in cervical specimens. *Talanta*, **226**: 122118.

- AVELINO, KYPS, OLIVEIRA, LS, LUCENA-SILVA, N, PINTO, C, MELO, D, ANDRADE, CAS, OLIVEIRA, MDL (2020) Metal-polymer hybrid nanomaterial for impedimetric detection of human papillomavirus in cervical specimens. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **185**.. doi:10.1016/j.jpba.2020.113249.
- AYDOĞDU, SGM, ÖZSOY, Ü (2018) Serviks kanseri ve HPV Cervical cancer and HPV. *Androl Bul*, **20**: 25–29.
- AZEVEDO, AM, MARTINS, VC, PRAZERES, DMF, VOJINOVIĆ, V, CABRAL, JMS, FONSECA, LP (2003) Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.*, **9**: 199–247.
- BARD, AJ, FAULKNER, LR (2001) Electrochemical methods: fundamentals and applications. Wiley.
- BARD, AJ, KETELAAR, A (1976) Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements. *J. Electrochem. Soc.*, **123**: 348C.
- BARDERAS, R, BABEL, I, DÍAZ-URIARTE, R, MORENO, V, SUÁREZ, A, BONILLA, F, VILLAR-VÁZQUEZ, R, CAPELLÁ, G, CASAL, JI (2012) An optimized predictor panel for colorectal cancer diagnosis based on the combination of tumor-associated antigens obtained from protein and phage microarrays. *J. Proteomics*, **75**: 4647–4655.
- BARDERAS, R, VILLAR-VAZQUEZ, R, FERNANDEZ-ACENERO, MJ, BABEL, I, PELAEZ-GARCIA, A, TORRES, S, IGNACIO CASAL, J (2013) Sporadic colon cancer murine models demonstrate the value of autoantibody detection for preclinical cancer diagnosis. *Sci. Rep.*, **3**: 1–7.
- BARTOSIK, M, DURIKOVA, H, VOJTESEK, B, ANTON, M, JANDAKOVA, E, HRSTKA, R (2016a) Electrochemical chip-based genomagnetic assay for detection of high-risk human papillomavirus DNA. *Biosens. Bioelectron.*, **83**: 300–305.
- BARTOSIK, M, JIRAKOVA, L, ANTON, M, VOJTESEK, B, HRSTKA, R (2018) Genomagnetic LAMP-based electrochemical test for determination of high-risk HPV16 and HPV18 in clinical samples. *Anal. Chim. Acta*, **1042**: 37–43.
- BELLAVER, B, FERRARI-SOUZA, JP, ROS, LU da, CARTER, SF, RODRIGUEZ-VIEITEZ, E, NORDBERG, A, PELLERIN, L, ROSA-NETO, P, LEFFA, DT, ZIMMER, ER (2021) Astrocyte Biomarkers in Alzheimer Disease. *Neurology*, **96**: e2944–e2955.
- BENEDET, AL, MILÀ-ALOMÀ, M, VRILLON, A, ASHTON, NJ, PASCOAL, TA, LUSSIER, F, KARIKARI, TK, HOURREGUE, C, COGNAT, E, DUMURGIER, J, STEVENSON, J, RAHMOUNI, N, PALLÉN, V, POLTRONETTI, NM, SALVADÓ, G, SHEKARI, M, OPERTO, G, GISPERT, JD, MINGUILLON, C, FAURIA, K, KOLLMORGEN, G, SURIDJAN, I, ZIMMER, ER, ZETTERBERG, H, MOLINUEVO, JL, PAQUET, C, ROSA-NETO, P, BLENNOW, K, SUÁREZ-CALVET, M (2021) Differences between Plasma and Cerebrospinal Fluid Glial Fibrillary Acidic Protein

Levels across the Alzheimer Disease Continuum. *JAMA Neurol.*; 1–13.

BERG, T (2010) Small-molecule inhibitors of protein–protein interactions. *Protein-Protein Complexes Anal. Model. Drug Des.*; 318–339.

BERNARD, HU, BURK, RD, CHEN, Z, VAN DOORSLAER, K, HAUSEN, H zur, DE VILLIERS, EM (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, **401**: 70–79.

BIGNAMI, A, ENG, LF, DAHL, D, UYEDA, CT (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.*, **43**: 429–435.

BOSCOLO-RIZZO, P, DEL MISTRO, A, BUSSU, F, LUPATO, V, BABOCI, L, ALMADORI, G, DA MOSTO, MC, PALUDETTI, G (2013) New insights into human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.*, **33**: 77–87.

CAMPOS-FERREIRA, DS, NASCIMENTO, GA, SOUZA, EVM, SOUTO-MAIOR, MA, ARRUDA, MS, ZANFORLIN, DML, EKERT, MHF, BRUNESKA, D, LIMA-FILHO, JL (2013) Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. *Anal. Chim. Acta*, **804**: 258–263.

CAMPOS-FERREIRA, DS, SOUZA, EVM, NASCIMENTO, GA, ZANFORLIN, DML, ARRUDA, MS, BELTRÃO, MFS, MELO, AL, BRUNESKA, D, LIMA-FILHO, JL (2016) Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid. *Arab. J. Chem.*, **9**: 443–450.

CHALAK, LF, SÁNCHEZ, PJ, ADAMS-HUET, B, LAPTOOK, AR, HEYNE, RJ, ROSENFELD, CR (2014) Biomarkers for severity of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and outcomes in newborns receiving hypothermia therapy. *J. Pediatr.*, **164**..

CHATTERJEE, P, PEDRINI, S, STOOPS, E, GOOZEE, K, VILLEMAGNE, VL, ASIH, PR, VERBERK, IMW, DAVE, P, TADDEI, K, SOHRABI, HR, ZETTERBERG, H, BLENNOW, K, TEUNISSEN, CE, VANDERSTICHELE, HM, MARTINS, RN (2021) Plasma glial fibrillary acidic protein is elevated in cognitively normal older adults at risk of Alzheimer’s disease. *Transl. Psychiatry*, **11**: 1–10.

CHIKKAVEERAIAH, B V, BHIRDE, AA, MORGAN, NY, EDEN, HS, CHEN, X (2012) Electrochemical Immunosensors for Detection of Cancer Protein Biomarkers. *ACS Nano*, **6**: 6546–6561.

CHOW, LT, BROKER, TR, STEINBERG, BM (2010) The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *Apmis*, **118**: 422–449.

CICOGNOLA, C, JANELIDZE, S, HERTZE, J, ZETTERBERG, H, BLENNOW, K, MATTSSON-CARLGREN, N, HANSSON, O (2021) Plasma glial fibrillary acidic protein detects Alzheimer pathology and predicts future conversion to Alzheimer

dementia in patients with mild cognitive impairment. *Alzheimer's Res. Ther.*, **13**: 1–9.

CIVIT, L, FRAGOSO, A, HÖLTERS, S, DÜRST, M, O'SULLIVAN, CK (2012) Electrochemical genosensor array for the simultaneous detection of multiple high-risk human papillomavirus sequences in clinical samples. *Anal. Chim. Acta*, **715**: 93–98.

CLARK, LC, LYONS, C (2006) Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**: 29–45.

DE DIOS, AS, DÍAZ-GARCÍA, ME (2010) Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. *Anal. Chim. Acta*, **666**: 1–22.

EIVAZZADEH-KEIHAN, R, PASHAZADEH-PANAHI, P, BARADARAN, B, MALEKI, A, HEJAZI, M, MOKHTARZADEH, A, DE LA GUARDIA, M (2018) Recent advances on nanomaterial based electrochemical and optical aptasensors for detection of cancer biomarkers. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **100**: 103–115.

ENG, LF, GHIRNIKAR, RS, LEE, YL (2000) Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969-2000). *Neurochem. Res.*, **25**: 1439–1451.

ENNEN, CS, HUISMAN, TAGM, SAVAGE, WJ, NORTINGTON, FJ, JENNINGS, JM, EVERETT, AD, GRAHAM, EM (2011) Glial fibrillary acidic protein as a biomarker for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with whole-body cooling. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **205**: 251.e1-251.e7.

ESCARTIN, C, GALEA, E, LAKATOS, A, O'CALLAGHAN, JP, PETZOLD, GC, SERRANO-POZO, A, STEINHÄUSER, C, VOLTERRA, A, CARMIGNOTO, G, AGARWAL, A, ALLEN, NJ, ARAQUE, A, BARBEITO, L, BARZILAI, A, BERGLES, DE, BONVENTO, G, BUTT, AM, CHEN, WT, COHEN-SALMON, M, CUNNINGHAM, C, DENEEN, B, DE STROOPER, B, DÍAZ-CASTRO, B, FARINA, C, FREEMAN, M, GALLO, V, GOLDMAN, JE, GOLDMAN, SA, GÖTZ, M, GUTIÉRREZ, A, HAYDON, PG, HEILAND, DH, HOL, EM, HOLT, MG, IINO, M, KASTANENKA, K V., KETTENMANN, H, KHAKH, BS, KOIZUMI, S, LEE, CJ, LIDDELOW, SA, MACVICAR, BA, MAGISTRETTI, P, MESSING, A, MISHRA, A, MOLOFSKY, A V., MURAI, KK, NORRIS, CM, OKADA, S, OLIET, SHR, OLIVEIRA, JF, PANATIER, A, PARPURA, V, PEKNA, M, PEKNY, M, PELLERIN, L, PEREA, G, PÉREZ-NIEVAS, BG, PFRIEGER, FW, POSKANZER, KE, QUINTANA, FJ, RANSOHOFF, RM, RIQUELME-PÉREZ, M, ROBEL, S, ROSE, CR, ROTHSTEIN, JD, ROUACH, N, ROWITCH, DH, SEMYANOV, A, SIRKO, S, SONTHEIMER, H, SWANSON, RA, VITORICA, J, WANNER, IB, WOOD, LB, WU, J, ZHENG, B, ZIMMER, ER, ZOREC, R, SOFRONIEW, M V., VERKHRATSKY, A (2021) Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat. Neurosci.*, **24**: 312–325.

FARZIN, L, SADJADI, S, SHAMSIPUR, M, SHEIBANI, S (2020) Electrochemical genosensor based on carbon nanotube/amine-ionic liquid functionalized reduced graphene oxide nanoplatfrom for detection of human papillomavirus (HPV16)-related head and neck cancer. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **179**: 112989.

- FELIX, FS, ANGNES, L (2018) Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. *Biosens. Bioelectron.*, **102**: 470–478.
- FLORIO, P, ABELLA, R, MARINONI, E, DI IORIO, R, LI VOLTI, G, GALVANO, F, PONGIGLIONE, G, FRIGIOLA, A, PINZAUTI, S, PETRAGLIA, F, GAZZOLO, D (2010) Biochemical markers of perinatal brain damage. *Front. Biosci. - Sch.*, **2 S**: 47–72.
- GANAU, M, BOSCO, A, PALMA, A, CORVAGLIA, S, PARISSE, P, FRUK, L, BELTRAMI, AP, CESSSELLI, D, CASALIS, L, SCOLES, G (2015) A DNA-based nano-immunoassay for the label-free detection of glial fibrillary acidic protein in multicell lysates. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, **11**: 293–300.
- GISSMANN, L, PFISTER, H, ZUR HAUSEN, H (1977) Human papilloma viruses (HPV): Characterization of four different isolates. *Virology*, **76**: 569–580.
- GONZÁLEZ-LÓPEZ, A, COSTA-RAMA, E, GARCÍA-CABO FERNÁNDEZ, C, BENAVENTE FERNÁNDEZ, L, CALLEJA-PUERTA, S, FERNÁNDEZ-GARCÍA, B, PEREIRO, R, FERNÁNDEZ-ABEDUL, MT (2020) Microcentrifuge tubes as disposable immunoelectrochemical cells for the on-site detection of GFAP, biomarker of hemorrhagic stroke. *Proceedings of The 1st International Electronic Conference on Biosensors*, 7060.
- GRIGORIEVA, D V., GORUDKO, I V., SOKOLOV, A V., KOSMACHEVSKAYA, O V., TOPUNOV, AF, BUKO, I V., KONSTANTINOVA, EE, CHERENKEVICH, SN, PANASENKO, OM (2013) Measurement of plasma hemoglobin peroxidase activity. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **155**: 118–121.
- GRINBERG, N, RODRIGUEZ, S (Chemist) (2019) Ewing's analytical instrumentation handbook. CRC Press. <https://www.routledge.com/Ewings-Analytical-Instrumentation-Handbook-Fourth-Edition/Grinberg-Rodriguez/p/book/9781482218671>. Accessed February 21, 2022.
- GUILBAULT, GG, MONTALVO, JG (2002) Urea-specific enzyme electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**: 2164–2165.
- HARARI, A, CHEN, Z, BURK, RD (2014) Human papillomavirus genomics: Past, present and future. *Curr. Probl. Dermatology*, **45**: 1–18.
- HSING, IM, XU, Y, ZHAO, W (2007) Micro- and nano- magnetic particles for applications in biosensing. *Electroanalysis*, **19**: 755–768.
- HUEBSCHMANN, NA, LUOTO, TM, KARR, JE, BERGHEM, K, BLENNOW, K, ZETTERBERG, H, ASHTON, NJ, SIMRÉN, J, POSTI, JP, GILL, JM, IVERSON, GL (2020) Comparing Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Serum and Plasma Following Mild Traumatic Brain Injury in Older Adults. *Front. Neurol.*, **11**: 1–12.
- J.WANG (1948) Analytical electrochemistry 3rd Edition. Wiley-VCH, New York,.. <https://www.wiley.com/en-us/Analytical+Electrochemistry%2C+3rd+Edition-p->

- JACK, CR, BENNETT, DA, BLENNOW, K, CARRILLO, MC, DUNN, B, HAEBERLEIN, SB, HOLTZMAN, DM, JAGUST, W, JESSEN, F, KARLAWISH, J, LIU, E, MOLINUEVO, JL, MONTINE, T, PHELPS, C, RANKIN, KP, ROWE, CC, SCHELTENS, P, SIEMERS, E, SNYDER, HM, SPERLING, R, ELLIOTT, C, MASLIAH, E, RYAN, L, SILVERBERG, N (2018) NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.*, **14**: 535–562.
- JANELIDZE, S, MATTSSON, N, PALMQVIST, S, SMITH, R, BEACH, TG, SERRANO, GE, CHAI, X, PROCTOR, NK, EICHENLAUB, U, ZETTERBERG, H, BLENNOW, K, REIMAN, EM, STOMRUD, E, DAGE, JL, HANSSON, O (2020) Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nat. Med.*, **26**: 379–386.
- JIANG, HL, CUI, PF, XIE, RL, CHO, CS (2014) Chemical modification of chitosan for efficient gene therapy. 1st ed. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-800268-1.00006-8.
- JIMENEZ, AMJ, RUTTKAY-NEDECKY, B, DOSTALOVA, S, KREJCOVA, L, MICHALEK, P, RICHTER, L, ADAM, V (2016) Specific magnetic isolation of E6 HPV16 modified magnetizable particles coupled with PCR and electrochemical detection. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**.. doi:10.3390/ijms17050585.
- KANG, DJ, BETRAPALLY, NS, GHOSH, SA, SARTOR, RB, HYLEMON, PB, GILLEVET, PM, SANYAL, AJ, HEUMAN, DM, CARL, D, ZHOU, H, LIU, R, WANG, X, YANG, J, JIAO, C, HERZOG, J, LIPPMAN, HR, SIKAROODI, M, BROWN, RR, BAJAJ, JS (2016) Gut microbiota drive the development of neuroinflammatory response in cirrhosis in mice. **64**: 1232–1248.
- KELTER, P, MOSHER, M, SCOTT, A (2019) Chemistry: The Practical Science. Media Enha. Houghton Mifflin Company.
- KHETANI, S, OZHUKIL KOLLATH, V, KUNDRA, V, NGUYEN, MD, DEBERT, C, SEN, A, KARAN, K, SANATI-NEZHAD, A (2018) Polyethylenimine Modified Graphene-Oxide Electrochemical Immunosensor for the Detection of Glial Fibrillary Acidic Protein in Central Nervous System Injury. *ACS Sensors*, **3**: 844–851.
- KORLEY, FK, DATWYLER, SA, JAIN, S, SUN, X, BELIGERE, G, CHANDRAN, R, MARINO, JA, MCQUISTON, B, ZHANG, H, CAUDLE, KL, WANG, KKW, PUCCIO, AM, OKONKWO, DO, YUE, JK, TAYLOR, SR, MARKOWITZ, A, MANLEY, GT, DIAZ-ARRASTIA, R (2021) Comparison of GFAP and UCH-L1 Measurements from Two Prototype Assays: The Abbott i-STAT and ARCHITECT Assays. **2**: 193–199.
- KURAMITZ, H (2009) Magnetic microbead-based electrochemical immunoassays. *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**: 61–69.

- LANTERO RODRIGUEZ, J, KARIKARI, TK, SUÁREZ-CALVET, M, TROAKES, C, KING, A, EMERSIC, A, AARSLAND, D, HYE, A, ZETTERBERG, H, BLENNOW, K, ASHTON, NJ (2020) Plasma p-tau181 accurately predicts Alzheimer's disease pathology at least 8 years prior to post-mortem and improves the clinical characterisation of cognitive decline. *Acta Neuropathol.*, **140**: 267–278.
- LINDENBACH, BD, RICE, CM (2007) Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virol.*,: 1101–1151.
- LV, Q, WANG, Y, SU, C, LAKSHMIPRIYA, T, GOPINATH, SCB, PANDIAN, K, PERUMAL, V, LIU, Y (2019) Human papilloma virus DNA-biomarker analysis for cervical cancer: Signal enhancement by gold nanoparticle-coupled tetravalent streptavidin-biotin strategy. *Int. J. Biol. Macromol.*, **134**: 354–360.
- MA, Q, SU, X (2011) Recent advances and applications in QDs-based sensors. *Analyst*, **136**: 4883–4893.
- MACLIN, JMA, WANG, T, XIAO, S (2019) Biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease, dementia Lewy body, frontotemporal dementia and vascular dementia. *Gen. Psychiatry*, **32**: 5–13.
- MANI, V, CHIKKAVEERAI, B V., PATEL, V, GUTKIND, JS, RUSLING, JF (2009) Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and Multienzyme-Particle Amplification. *ACS Nano*, **3**: 585–594.
- MCGUIRE, S (2016) World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv. Nutr.*, **7**: 418–419.
- MERKOÇI, A, ALEGRET, S (2007) Chapter 7 Graphite-epoxy electrodes for stripping analysis. *Compr. Anal. Chem.*, **49**: 143–161.
- MISSLER, U., WIESMANN, M, WITTMANN, G, MAGERKURTH, O, HAGENSTRÖM, H (1999) Measurement of glial fibrillary acidic protein in human blood: analytical method and preliminary clinical results. *Clin. Chim. Acta*, **45**: 138–141.
- MOLLARASOULI, F, KURBANOGU, S, OZKAN, SA (2019) The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. *Biosensors*, **9**: 1–19.
- MUI, U, HALEY, C, TYRING, S (2017) Viral Oncology: Molecular Biology and Pathogenesis. *J. Clin. Med.*, **6**: 111.
- MUNGE, B, LIU, G, COLLINS, G, WANG, J (2005) Multiple Enzyme Layers on Carbon Nanotubes for Electrochemical Detection Down to 80 DNA Copies. doi:10.1021/ac050132g.
- MUÑOZ-SAN MARTÍN, C, GAMELLA, M, PEDRERO, M, MONTERO-CALLE, A, BARDERAS, R, CAMPUZANO, S, PINGARRÓN, JM (2020) Magnetic beads-based

electrochemical immunosensing of HIF-1 α , a biomarker of tumoral hypoxia. *Sensors Actuators, B Chem.*, **307**: 127623.

NAKAMURA, A, KANEKO, N, VILLEMAGNE, VL, KATO, T, DOECKE, J, DORÉ, V, FOWLER, C, LI, QX, MARTINS, R, ROWE, C, TOMITA, T, MATSUZAKI, K, ISHII, K, ISHII, K, ARAHATA, Y, IWAMOTO, S, ITO, K, TANAKA, K, MASTERS, CL, YANAGISAWA, K (2018) High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, **554**: 249–254.

NASR, B, CHANA, G, LEE, TT, NGUYEN, T, ABEYRATHNE, C, D'ABACO, GM, DOTTORI, M, SKAFIDAS, E (2015) Vertical Nanowire Electrode Arrays as Novel Electrochemical Label-Free Immunosensors. **11**: 2862–2868.

National Center for Biotechnology Information (2022). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed February 15, 2022.

NEWMAN, JS, THOMAS-ALYEA, KE (2004) *Electrochemical systems*. J. Wiley.

OSBORN, LM, KAMPHUIS, W, WADMAN, WJ, HOL, EM (2016) Astroglialosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.*, **144**: 121–141.

OZKAN, SA (2012) *Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation*. 350.

PALEČEK, E (1960) Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid. *Nat. 1960 1884751*, **188**: 656–657.

PALEČEK, E, FOJTA, M (2007) Magnetic beads as versatile tools for electrochemical DNA and protein biosensing. *Talanta*, **74**: 276–290.

PAPA, L, LEWIS, LM, FALK, JL, ZHANG, Z, SILVESTRI, S, GIORDANO, P, BROPHY, GM, DEMERY, JA, DIXIT, NK, FERGUSON, I, LIU, MC, MO, J, AKINYI, L, SCHMID, K, MONDELLO, S, ROBERTSON, CS, TORTELLA, FC, HAYES, RL, WANG, KKW (2012) Elevated levels of serum glial fibrillary acidic protein breakdown products in mild and moderate traumatic brain injury are associated with intracranial lesions and neurosurgical intervention. *Ann. Emerg. Med.*, **59**: 471–483.

PATEL, BA (2020) Amperometry and potential step techniques. *Electrochem. Bioanal.*,: 9–26.

PEDRERO, M, CAMPUZANO, S, PINGARRÓN, JM (2012) Magnetic Beads-Based Electrochemical Sensors Applied to the Detection and Quantification of Bioterrorism/Biohazard Agents. *Electroanalysis*, **24**: 470–482.

PELIKA, LE, KROEPFL, A, LEIXNERING, M, BUCHINGER, W, RAABE, A, REDL, H (2004) GFAP versus S100B in serum after traumatic brain injury: Relationship to brain damage and outcome. *J. Neurotrauma*, **21**: 1553–1561.

- PELINKA, LE, KROEPFL, A, SCHMIDHAMMER, R, KRENN, M, BUCHINGER, W, REDL, H, RAABE, A (2004) Glial fibrillary acidic protein in serum after traumatic brain injury and multiple trauma. *J. Trauma - Inj. Infect. Crit. Care*, **57**: 1006–1012.
- PETZOLD, A, KEIR, G, GREEN, AJE, GIOVANNONI, G, THOMPSON, EJ (2004) An ELISA for glial fibrillary acidic protein. *J. Immunol. Methods*, **287**: 169–177.
- RAZZINO, CA, SERAFÍN, V, GAMELLA, M, PEDRERO, M, MONTERO-CALLE, A, BARDERAS, R, CALERO, M, LOBO, AO, YÁÑEZ-SEDEÑO, P, CAMPUZANO, S, PINGARRÓN, JM (2020) An electrochemical immunosensor using gold nanoparticles-PAMAM-nanostructured screen-printed carbon electrodes for tau protein determination in plasma and brain tissues from Alzheimer patients. *Biosens. Bioelectron.*, **163**: 1–8.
- REIMAN, EM, QUIROZ, YT, FLEISHER, AS, CHEN, K, VELEZ-PARDO, C, JIMENEZ-DEL-RIO, M, FAGAN, AM, SHAH, AR, ALVAREZ, S, ARBELAEZ, A, GIRALDO, M, ACOSTA-BAENA, N, SPERLING, RA, DICKERSON, B, STERN, CE, TIRADO, V, MUNOZ, C, REIMAN, RA, HUENTELMAN, MJ, ALEXANDER, GE, LANGBAUM, JBS, KOSIK, KS, TARIOT, PN, LOPERA, F (2012) Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: A case-control study. *Lancet Neurol.*, **11**: 1048–1056.
- RUIZ-VALDEPEÑAS MONTIEL, V, GUTIÉRREZ, ML, TORRENTE-RODRÍGUEZ, RM, POVEDANO, E, VARGAS, E, REVIEJO, J, LINACERO, R, GALLEGU, FJ, CAMPUZANO, S, PINGARRÓN, JM (2017) Disposable Amperometric Polymerase Chain Reaction-Free Biosensor for Direct Detection of Adulteration with Horsemeat in Raw Lysates Targeting Mitochondrial DNA. *Anal. Chem.*, **89**: 9474–9482.
- RUIZ-VALDEPENAS MONTIEL, V, POVEDANO, E, VARGAS, E, TORRENTE-RODRÍGUEZ, RM, PEDRERO, M, REVIEJO, AJ, CAMPUZANO, S, PINGARRÓN, JM (2018) Comparison of Different Strategies for the Development of Highly Sensitive Electrochemical Nucleic Acid Biosensors Using Neither Nanomaterials nor Nucleic Acid Amplification. *ACS Sensors*, **3**: 211–221.
- RUIZ-VALDEPENAS MONTIEL, V, POVEDANO, E, VARGAS, E, TORRENTE-RODRÍGUEZ, RM, PEDRERO, M, REVIEJO, AJ, CAMPUZANO, S, PINGARRÓN, JM, RUIZ-VALDEPEÑAS MONTIEL, V, POVEDANO, E, VARGAS, E, TORRENTE-RODRÍGUEZ, RM, PEDRERO, M, REVIEJO, AJ, CAMPUZANO, S, PINGARRÓN, JM, RUIZ-VALDEPENAS MONTIEL, V, POVEDANO, E, VARGAS, E, TORRENTE-RODRÍGUEZ, RM, PEDRERO, M, REVIEJO, AJ, CAMPUZANO, S, PINGARRÓN, JM (2018) Comparison of Different Strategies for the Development of Highly Sensitive Electrochemical Nucleic Acid Biosensors Using Neither Nanomaterials nor Nucleic Acid Amplification. *ACS Sensors*, **3**: 211–221.
- SANCLEMENTE, G, GILL, DK (2002) Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, **16**: 231–240.
- SATTERWHITE, CL, TORRONE, DE, MEITES, E, DUNNE, EF, MAHAJAN, R, SU, J, BAN, MC, XU, F, WEINSTOCK, H (2013) and Men: Prevalence and Incidence

- Estimates , 2008. **40**: 187–193.
- SIMANI, L, ELMI, M, ASADOLLAHI, M (2018) Serum GFAP level: A novel adjunctive diagnostic test in differentiate epileptic seizures from psychogenic attacks. **61**: 41–44.
- SKOOG, DA, HOLLER, FJ, NIEMAN, TA (1998) Principles of instrumental analysis.
- SONG, J, DAILEY, J, LI, H, JANG, H-J, ZHANG, P, WANG, JT-H, EVERETT, AD, KATZ, HE (2017) Extended Solution Gate OFET-Based Biosensor for Label-Free Glial Fibrillary Acidic Protein Detection with Polyethylene Glycol-Containing Bioreceptor Layer. *Adv. Funct. Mater.*, **27**: 1606506.
- SUGAYA-FUKASAWA, M, WATANABE, T, TAMURA, M, EGASHIRA, S, HISATOMI, H (2011) Glial fibrillary acidic protein is one of the key factors underlying neuron-like elongation in PC12 cells. *Exp. Ther. Med.*, **2**: 85–87.
- SULLIVAN, SM, BJÖRKMAN, ST, MILLER, SM, COLDITZ, PB, POW, D V. (2010) Morphological changes in white matter astrocytes in response to hypoxia/ischemia in the neonatal pig. *Brain Res.*, **1319**: 164–174.
- TEITSDOTTIR, UD, HALLDORSSON, S, ROLFSSON, O, LUND, SH, JONSDOTTIR, MK, SNAEDAL, J, PETERSEN, PH (2021) Cerebrospinal Fluid C18 Ceramide Associates with Markers of Alzheimer’s Disease and Inflammation at the Pre- And Early Stages of Dementia. *J. Alzheimer’s Dis.*, **81**: 231–244.
- TIMILSINA, SS, JOLLY, P, DURR, N, YAFIA, M, INGBER, DE (2021) Enabling Multiplexed Electrochemical Detection of Biomarkers with High Sensitivity in Complex Biological Samples. *Acc. Chem. Res.*, **54**: 3529–3539.
- TOYOSHIMA, K (1989) Oncogenes and cancer. *Nippon Geka Gakkai zasshi*, **90**: 805–809.
- TURNER, APF (1989) Current trends in biosensor research and development. **17**: 433–450.
- VALAT, C, LIMOGES, B, HUET, D, ROMETTE, JL (2000) A disposable Protein A-based immunosensor for flow-injection assay with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta*, **404**: 187–194.
- VALVERDE, A, MONTERO-CALLE, A, BARDERAS, R, CALERO, M, YÁÑEZ-SEDEÑO, P, CAMPUZANO, S, PINGARRÓN, JM (2021) Electrochemical immunoplatfrom to unravel neurodegeneration and Alzheimer’s disease through the determination of neurofilament light protein. *Electrochim. Acta*, **371**: 137815.
- VEITCH, NC (2004) Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, **65**: 249–259.
- VOS, PE, JACOBS, B, ANDRIESEN, TMJC, LAMERS, KJB, BORM, GF, BEEMS, T, EDWARDS, M, ROSMALEN, CF, VISSERS, JLM (2010) GFAP and S100B are

- biomarkers of traumatic brain injury. *Neurology*, **75**: 1786–1793.
- WALLIN, A, BLENNOW, K, ROSENGREN, LE (1996) Glial fibrillary acidic protein in the cerebrospinal fluid of patients with dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **7**: 267–272.
- WANG, C ching J, SPARANO, J, PALEFSKY, JM (2017) Human Immunodeficiency Virus/AIDS, Human Papillomavirus, and Anal Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, **26**: 17–31.
- WANG, J (2006) Analytical Electrochemistry. Third Edition. doi:10.1002/0471790303.
- WANG, J, CAI, X, TIAN, B, SHIRAISHI, H (1996) Microfabricated thick-film electrochemical sensor for nucleic acid determination. *Analyst*, **121**: 965–969.
- WANG, T, FANG, Y, HE, Z (2017) Electrochemical Quantitative Detection of Glial Fibrillary Acidic Protein Based on Molecularly Imprinted Polymer Sensor. *Int. J. Electrochem. Sci.*, **12**: 7341–7350.
- WEIGEL, I, SCHULZE, G, PISCHETSRIEDER, M (2010) Immunochemical detection of tissue from the central nervous system via myelin proteolipid protein: Adaptation for food inspection and development of recombinant bivalent fab mini-antibodies. *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 6587–6593.
- WOODMAN, CBJ, COLLINS, SI, YOUNG, LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer*, **7**: 11–22.

