

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KAN VE BEYİN-OMURİLİK SIVISINDA İMMÜNOGLOBÜLİN G TAYİNİ
İÇİN İMPEDİMETRİK PROTEİN A İMMÜNOSENSÖRÜNÜN
GELİŞTİRİLMESİ VE ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Selin GEREKÇİ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

20.08.2014

Selin GEREKÇİ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KAN VE BEYİN-OMURİLİK SIVISINDA İMMÜNOGLOBÜLİN G TAYİNİ İÇİN İMPEDİMETRİK PROTEİN A İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ VE ELEKTROKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Selin GEREKÇİ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Bu tez çalışmasında İmmünoglobülin G (IgG)' nin tayinine yönelik impedimetrik immünosensörler geliştirilmiştir. Biyouyusabilirlikleri yüksek, biyokirlenmeleri az ve toksik olmamaları nedeniyle jelatin, aljinat doğal polimerleri ve bu polimerlerin kombinasyonları kullanılarak hazırlanan platin elektrotlara çapraz bağlayıcılar kullanılarak IgG' ye yüksek afinite gösteren Protein A (PrA) immobilize edilmiştir. Ayrıca yüksek yüzey alanları sayesinde immünosensörlerin duyarlılığını arttırmak ve tayin limitini düşürmek amacıyla çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörü için kullanılmıştır. Polimer ve nanopartikül miktarları, çapraz bağlayıcı konsantrasyonları ve PrA konsantrasyonları Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) kullanılarak optimize edilmiş ve Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) ile yüzey karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca polimer karakterizasyon çalışmaları amacıyla FTIR, DTA yöntemleri çalışılmıştır. Tasarlanan immünosensörler düşük tayin limitlerine sahiptir ve geniş konsantrasyon aralıklarında doğrusal yanıt göstermektedir. Geliştirilen immünosensörlerin en düşük tayin limitine sahip olanı MS'li hastalardan alınan Beyin-Omurilik Sıvısı (BOS) ve serum içerisinde IgG tayini için kullanılmış ve immünosensörlerin gerçek biyolojik örneklerle uygulanabilirliği test edilmiştir. Biyolojik numuneler için yapılan ölçümlerin referans ölçüm sonuçları ile oldukça uyumlu olduğu gösterilmiştir.

Ağustos 2014, 131 sayfa

Anahtar Kelimeler: Jelatin, Aljinat, ZnO nanopartikül, İmmünoglobülin G, Protein A, İmpedans Spektroskopisi, İmmünosensör.

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT AND INVESTIGATION OF ELECTROCHEMICAL PROPERTIES OF IMPEDIMETRIC PROTEIN A IMMUNOSENSOR FOR THE DETECTION OF IMMUNOGLOBULIN G IN BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID

Selin GEREKCI

Ankara University
Science Institute
Chemistry Department

Advisor: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

In this thesis, impedimetric immunosensors towards determination of Immunoglobulin G (IgG) have been developed. Platin electrodes prepared by utilizing gelatin and alginate, which are highly biocompatible and less biofouling polymer materials, and combination of this polymers and Protein A (PrA), which has a great affinity to IgG, immobilized by using crosslinkers. In order to increase surface area and decrease level of detection, zinc oxide (ZnO) nanoparticles utilized in Gelatin-Alginate-PrA immunosensor. Polymer and nanoparticle quantities, crosslinker concentrations and PrA amounts optimized using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS); surface characterizations achieved with Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM). Further, polymer characterizations carried out using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Differential Thermogravimetric Analysis (DTA). Developed immunosensors have low levels of detection and broad analysis range. Immunosensor which has lowest level of detection used for IgG detection in cerebrospinal fluid (CSF) and serum samples from Multiple Sclerosis patients and tested its applicability for real samples. Compatibility between biological sample detection and standard sample detection has been demonstrated.

August 2014, 131 pages

Key Words: Gelatin, Alginate, ZnO nanoparticle, Immunoglobulin G, Protein A, Impedance Spectroscopy, Immunosensor.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında ve tezimin hazırlanmasında bana her konuda yardımcı olan, bilgisini, tecrübesini, hoşgörüsünü esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Emel EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı),

Çalışmalarım sırasında bilgisinden ve tecrübesinden faydalandığım hocam Sayın Prof. Dr. Kaan Cebesoy EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı),

Okuduğum ve okuyacağım süre boyunca beni maddi ve manevi her türlü yönden destekleyen sevgili annem ve babama,

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca yol gösterici akademik tecrübesi ve değerli dostluğundan ötürü Burak DERKUŞ'a,

Sürekli desteklerini hissettiğim sevgili dostlarım ve çalışma arkadaşlarım Helin ELHAKAN, Ece ORUÇ, Gizem ÖZBEK, Ecem BOZTUNA, Mustafa ÖZKAN'a,

Tez hazırlığı sürecinde motivasyonunu ve enerjisini bana her daim hissettiren Doç. Dr. Can ÖZEN ve METU SYBORG ekibine,

Teşekkür eder ve sevgilerimi sunarım.

Selin GEREKÇİ

Ankara, Ağustos 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1 Elektrokimya	4
2.1.1 Elektriksel çift tabaka	6
2.2 Dönüşümlü Voltametri (CV).....	9
2.2.1 Tersinir reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı.....	13
2.2.2 Tersinmez reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı	16
2.2.3 Yarı-tersinir reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı	17
2.3 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)	18
2.4 Biyosensörler	25
2.4.1 Sinyal dönüştürücüler	26
2.4.2 İmmünosensörler	28
2.4.2.1 Optik İmmünosensörler	29
2.4.2.2 Piezoelektrik İmmünosensörler	29
2.4.2.3 Termal İmmünosensörler	30
2.4.2.4 Elektrokimyasal İmmünosensörler	31
2.4.3 Biyosensörlerin hazırlanmasında immobilizasyon metotları.....	32
2.4.3.1 Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri	35
2.4.3.2 Çözünür formda immobilizasyon yöntemleri.....	39
2.5 Antikorlar	40
2.5.1 İmmüoglobülin G	43

2.6 Çalışmada Kullanılan Biyomoleküller, Taşıyıcı Sistemler,	
Nanopartiküller, Çapraz Bağlayıcılar	46
2.6.1 Protein A	46
2.6.2 Taşıyıcılar	47
2.6.2.1 Jelatin.....	47
2.6.2.2. Aljinat.....	48
2.6.3 Çapraz bağlayıcılar	49
2.7 Çalışmada Geliştirilen Biyosensörün Karakterizasyonu için Kullanılan	
Metotlar	51
2.7.1 Taramalı elektron mikroskopu	51
2.7.2 Atomik kuvvet mikroskopu	53
2.8 Literatür Araştırması	55
3. ÇALIŞMANIN AMACI	60
4. MATERYAL YÖNTEM	61
4.1 Materyaller	61
4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler	61
4.1.2 Kullanılan cihazlar	61
4.1.3 Kullanılan elektrotlar	61
4.1.4 Kullanılan çözeltiler	62
4.2 Yöntem	63
4.2.1 İmmobilizasyon jellerinin hazırlanması	63
4.2.2 İmmünoşansörlerin hazırlanması	65
4.2.3 Elektrokimyasal ölçümlerin alınması.....	66
4.2.4 SEM ve AFM ölçümlerinin alınması	66
4.2.5 Termogravimetrik Analiz (TGA) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi	
Spektroskopisi (FTIR)	67
4.2.6 Optimizasyonlar	67
4.2.6.1 Polimer optimizasyonları	67
4.2.6.2 ZnO optimizasyonu	67
4.2.6.3 Protein A optimizasyonu	68
4.2.6.4 Çapraz bağlayıcı optimizasyonu	68
4.2.6.5 pH optimizasyonu	68

4.2.6.6 İnkübasyon sürelerinin immünoşensör sistemlerine etkisi	69
4.2.7 Tekrar üretilebilirlik ve raf ömrü	69
4.2.8 İmmünoşensörlerin elektrokimsal özelliklerinin incelenmesi	69
4.2.9 Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi	70
4.2.10 elıştırılan immünoşensörlerin BOS ve serumda denenmesi	70
4.2.11 Geliştirilen immünoşensörlerin BOS ve serumda denenmesi.....	70
5. BULGULAR	71
5.1 SEM Bulgularının Değerlendirilmesi.....	71
5.2 AFM Bulgularının Değerlendirilmesi	74
5.3 Termogravimetrik Analiz (TGA) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları.....	77
5.4 Optimizasyon Çalışmaları.....	80
5.4.1 Polimer konsantrasyonlarının immünoşensör cevabına etkisi	80
5.4.2 ZnO optimizasyonu	83
5.4.3 Protein A konsantrasyonunun immünoşensör cevabına etkisi.....	84
5.4.4 Çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun immünoşensör cevabına etkisi	87
5.4.5 İmmünoşensör cevabına pH'nın etkisi.....	90
5.4.6 İnkübasyon süresinin immünoşensör cevabına etkisi	92
5.5 Tekrar Üretilebilirlik ve Raf Ömrü	95
5.6 Farklı Antikorların Spesifik Olmayan Bağlanmalarının Yorumlanması	101
5.7 İmmünoşensörlerin Elektrokimyasal Davranışların İncelenmesi.....	103
5.8 Kalibrasyon Grafikleri	109
5.9 Geliştirilen İmmünoşensörlerin BOS ve Serumda Denenmesi.....	114
6. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	115
KAYNAKLAR	125
ÖZGEÇMİŞ.....	131

SİMGELER DİZİNİ

μA	Mikroamper
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
$\Delta\varphi$	Potansiyel düşüşü
Ω	Ohm
ϕ	Faz açısı
ω	Açısal frekans
Au	Altın
cm^2	Santimetre kare
E	Potansiyel
F	Faraday sabiti
Fe	Demir
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3}$	Potasyum ferrosiyanid ve potasyum ferrisiyanid
fg	Femptogram
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
I	Akım yoğunluğu
KCl	Potasyum klorür
L	Litre
<i>m</i>	Metal
mmol	Milimol
mmol L^{-1}	Milimolar
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
O_2	Moleküler Oksijen
pg	Pikogram
Pt	Platin
R	Direnç
R_{ct}	Yük transfer direnci
R_{s}	Çözelti direnci

s	Saniye
t	Süre
TiO ₂	Titanyum Dioksit
q	Yük yoğunluğu
V	Volt
Z	İmpedans

Kısaltmalar

Ag/AgCl	Gümüş/Gümüş klorür
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
BOS	Beyin-Omurilik Sıvısı
BSA	Bovin Serum Albumin
CFU	Koloni oluşturan ünite
CV	Döngüsel Voltametri
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
ELISA	Enzim-bağlı immünosorbant assay
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
GC	Camsı karbon
HRP	Yabanturbu peroksidaz
MPA	Merkaptopropiyonik Asit
MS	Multipl Skleroz
MBP	Miyelin Basic Protein
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
IHP	İç Helmholtz Tabakası
IgG	İmmünoglobülin G
NHS	N-hidroksisüksinimit
OHP	Dış Helmholtz Tabakası
QCM	Kuvarz kristal mikrobals
PrA	Protein A
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskobu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Helmholt elektriksel çift tabaka modeli	7
Şekil 2.2	Elektriksel çift tabaka modelleri..	8
Şekil 2.3	Dönüşümlü voltametrik uyarma sinyali	10
Şekil 2.4	Tarama hızındaki değişimin dönüşümlü voltamogram üzerine etkisi	12
Şekil 2.5	Dönüşümlü voltametrde akım- potansiyel eğrisi	12
Şekil 2.6	Karbon pasta elektrodun çıplak CV eğrisi ve nikel oksit nanopartiküller ile modifikasyonundan sonraki CV eğrisi.....	13
Şekil 2.7	Tersinir bir sistemin CV eğrisi	14
Şekil 2.8	Parasetamolün tarama hızlarından elde edilmiş dönüşümlü voltamogramı.....	16
Şekil 2.9	Tersinmez bir sistemden elde edilen CV voltamogramında farklı tarama hızlarında gözlenen anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması	17
Şekil 2.10	Doğrusal bir sistemde sinoidal akım cevabı eğrisi.....	19
Şekil 2.11	Lissajous eğrisi	20
Şekil 2.12	İmpedans vektörünün Nyquist grafiği şeklinde gösterimi	22
Şekil 2.13	Paralel rezistans ve kapasitanstan oluşan devre.....	22
Şekil 2.14	Elektriksel devreye göre elde edilmiş Nyquist eğrisi.....	23
Şekil 2.15	Örnek Bode eğrisi.....	23
Şekil 2.16	Warburg impedansının gösterimi.....	24
Şekil 2.17	Randles devre modeli üzerinde Warburg impedansının gösterimi	24
Şekil 2.18	Biyosensörün şematik gösterimi	25
Şekil 2.19	Enzim immobilizasyon yöntemleri	34
Şekil 2.20	Çapraz bağlama ile immobilizasyon	35
Şekil 2.21	Enzimin desteğe adsorpsiyon metoduyla bağlanması.....	36
Şekil 2.22	Reaktif aminoasit kalıntıları	36
Şekil 2.23	Biyospesifik bağlanma.....	37
Şekil 2.24	Enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu	37
Şekil 2.25	Enzimin polimerler arasında tutuklanması.....	38

Şekil 2.26	Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu	38
Şekil 2.27	Enzimlerin immobilizasyonu için lipozom kapsülü.....	39
Şekil 2.28	Çözünür formda immobilizasyon.....	39
Şekil 2.29	İmmünoglobülinin şematik yapısı.....	42
Şekil 2.30	Gluteraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi.....	50
Şekil 2.31	Bifonksiyonel gluteraldehitin bağlanması	50
Şekil 2.32	NHS/EDC çapraz bağlayıcı mekanizması	51
Şekil 2.33	SEM' in şematik yapısı.....	53
Şekil 2.34	Polen taneciklerinin SEM görüntüsü.....	53
Şekil 2.35	AFM' nin şematik gösterimi.....	54
Şekil 2.36	Yüzey topoğrafyasını gösteren bir AFM görüntüsü örneği	55
Şekil 5.1.a.	Jelatin, b. Jelatin-PrA filmlerinin SEM mikrografları	71
Şekil 5.2.a.	Aljinat, b. Aljinat-PrA filmlerinin SEM mikrografları	72
Şekil 5.3.a.	Jelatin-Aljinat, Jelatin-Aljinat-PrA (5.000x), Jelatin-Aljinat-PrA (10.000x) filmlerinin SEM mikrografları.....	73
Şekil 5.4.a.	Jelatin-Aljinat-ZnO, b. Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA filmlerinin SEM mikrografları.....	74
Şekil 5.5.a.	Jelatin, b. Jelatin-PrA filmlerinin AFM görüntüleri.....	75
Şekil 5.6.a.	Aljinat, b. Aljinat-PrA filmlerinin AFM görüntüleri	75
Şekil 5.7.a.	Aljinat-Jelatin, b. Aljinat-Jelatin-PrA filmlerinin AFM görüntüleri.....	76
Şekil 5.8.a.	Aljinat-Jelatin-ZnO, b. Aljinat-Jelatin-ZnO-PrA filmlerinin AFM görüntüleri.....	77
Şekil 5.9	Aljinatın Termogramı	78
Şekil 5.10	Jelatinin Termogramı	78
Şekil 5.11	Jelatin-Aljinat Kompozitinin Termogramı	79
Şekil 5.12	Aljinat, Jelatin, Jelatin-Aljinat için FTIR spektrumları	80
Şekil 5.13	Aljinat Konsantrasyonunun Aljinat-PrA İmmünoşansör cevabına etkisi	81
Şekil 5.14	Jelatin Konsantrasyonunun Jelatin-PrA İmmünoşansör cevabına etkisi	82
Şekil 5.15	Jelatin/Aljinat Oranının Jelatin-Aljinat-PrA İmmünoşansörüne etkisi	83
Şekil 5.16	Nanopartikül Konsantrasyonunun Jelatin-Aljinat-ZnO immünoşansör cevabına etkisi	84
Şekil 5.17	PrA Konsantrasyonunun Aljinat-PrA immünoşansörüne cevabına etkisi ...	85

Şekil 5.18 Protein A Konsantrasyonunun Jelatin-PrA immünosensör cevabına etkisi	86
Şekil 5.19 PrA Konsantrasyonunun Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörüne etkisi.....	87
Şekil 5.20 Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Aljinat-PrA immünosensör cevabına etkisi.....	88
Şekil 5.21 Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Jelatin-PrA immünosensör cevabına etkisi	89
Şekil 5.22 Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Jelatin-Aljinat-PrA immünosensör cevabına etkisi	90
Şekil 5.23 Aljinat-PrA İmmünosensör Cevabına pH' nın etkisi.....	91
Şekil 5.24 Jelatin-PrA İmmünosensör Cevabına pH' nın etkisi	91
Şekil 5.25 Jelatin-Aljinat-PrA İmmünosensör Cevabına pH' nın etkisi.....	92
Şekil 5.26 İnkübasyon Süresinin Aljinat-PrA İmmünosensörüne etkisi	93
Şekil 5.27 İnkübasyon Süresinin Jelatin-PrA immünosensör cevabına etkisi	94
Şekil 5.28 Jelatin-Aljinat-PrA immünosensör cevabına inkübasyon süresinin etkisi	95
Şekil 5.29 Aljinat-PrA immünosensörü için tekrar üretilebilirlik	96
Şekil 5.30 Aljinat-PrA immünosensörü için raf ömrü değerlendirmesi	97
Şekil 5.31 Jelatin-PrA immünosensörü için tekrar üretilebilirlik değerlendirmesi	98
Şekil 5.32 Jelatin-PrA immünosensörü için raf ömrü değerlendirmesi	99
Şekil 5.33 Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörü için tekrar üretilebilirlik değerlendirilmesi	100
Şekil 5.34 Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörü için raf ömrü değerlendirmesi	101
Şekil 5.35 Farklı Antikorların Aljinat-PrA immünosensörüne non-spesifik bağlanmalarının incelenmesi.....	102
Şekil 5.36 Jelatin-PrA İmmünosensörü için Non-Spesifik bağlanmanın incelenmesi.....	102
Şekil 5.37 Farklı Antikorların Jelatin-Aljinat-PrA İmmünosensörüne Non-Spesifik bağlanmalarının incelenmesi	103

Şekil 5.38	Aljinat İmmünoşensörünün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği.....	103
Şekil 5.39	Aljinat İmmünoşensörünün dönüşümlü voltamogramı.....	104
Şekil 5.40	Jelatin immünoşensörünün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği.....	105
Şekil 5.41	Jelatin İmmünoşensörünün dönüşümlü voltamogramı	106
Şekil 5.42	Jelatin-Aljinat ve Jelatin-Aljinat-ZnO immünoşensörünün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği..	107
Şekil 5.43	Jelatin-Aljinat ve Jelatin-Aljinat-ZnO İmmünoşensörünün dönüşümlü voltamogramı	108
Şekil 5.44	Aljinat-PrA İmmünoşensörü için 250-5000 ng.µL ⁻¹ aralığında IgG için Kalibrasyon Eğrisi	110
Şekil 5.45	Aljinat-PrA İmmünoşensörünün 7,8125-125 ng.µL ⁻¹ aralığında IgG için Kalibrasyon Grafiği	110
Şekil 5.46	Jelatin-PrA İmmünoşensörü için kalibrasyon grafiği	111
Şekil 5.47	Jelatin-Aljinat-PrA İmmünoşensörünün 1000-20000 ng.µL ⁻¹ aralığında IgG için kalibrasyon grafiği	112
Şekil 5.48	Jelatin-Aljinat-PrA İmmünoşensörünün 7,8125-750 ng.µL ⁻¹ aralığında IgG için kalibrasyon grafiği	112
Şekil 5.49	Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünoşensörünün 750-20000 ng.µL ⁻¹ IgG için kalibrasyon eğrisi	113
Şekil 5.50	Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünoşensörünün 500-3,90 ng.µL ⁻¹ IgG için kalibrasyon eğrisi	113

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Biyosensör sistemlerinde sinyal dönüştürücü örnekleri ve bu sistemler ile ölçülebilen sinyaller	27
Çizelge 2.2 Serum ve BOS numunelerinde yaşa bağlı IgG seviyeleri.....	47
Çizelge 6.1 Serum ve BOS numunelerinde referans teknik ile EIS sonuçlarının kıyaslanması.....	122
Çizelge 6.2 İmmünosensörlerin sahip olduğu özelliklerin genel gösterimi.....	123
Çizelge 6.3 Literatürdeki IgG tayinine yönelik immünosensörler ile geliştirilen immünosensörlerin kıyaslanması.....	124

1. GİRİŞ

Biyosensörler “...biyolojik materyal, biyolojik kökenli malzeme ya da biyotaklitçi malzeme ile birleştirilmiş, fizikokimyasal bir iletici ya da mikrosistem ile entegre olmuş ya da detaylı olarak bu tip sistemler ile ilişkili analitik cihazlar...” olarak The Journal Biosensors and Bioelectronics’in beşinci dünya geneli konferansında tanımlanmıştır (Higson vd. 2012). Aktif kömüre immobilize edilmiş proteinlerin raporlanması, ilk pH elektrodun geliştirilmesi ve 1962 yılında amperometrik glukoz tayini yapan ilk biyosensör geliştirilmiştir (Gobi vd. 2012). Pratik, duyarlı ve çoğu zaman da ekonomik analiz imkanları sunan biyosensörlerin gıdadan çevreye, savunma sanayiden tıpa uzanan geniş kullanım alanına sahip olması, günümüzde de bu teknolojinin önemini ve gelişmesini sürdürmektedir (Kumar ve Rani 2013).

İmmünosensörler, birbirine afinite gösteren antijen-antikorların ya da diğer immünoaktif moleküllerin etkileşimine dayanan, bu moleküller arasındaki immünokimyasal etkileşimin bir sinyal iletici yardımıyla ölçülebildiği biyosensör türüdür. İmmünosensör tekniğinin geliştirilmesi, klasik immünotest (immünoassay) yaklaşımından türetilmiştir (Hock 1997). İmmünosensörler genel olarak ölçüm prensibine göre sınıflandırılırlar. Elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik), optik, piezoelektrik, akustik ve termometrik duyar elementler immünosensörler için sensör platformları olarak kullanılır (Martin 2001). İmmünosensörlerin çoğu optik ya da elektrokimyasal esastır. Antijen-antikor etkileşimi sonucu açığa çıkan fizikokimyasal değişim elektrokimyasal olarak algılanabilen bir sinyal üretmez. Bu nedenle antijen-antikor sistemleri enzimler, floresan bileşikler, elektrokimyasal aktif moleküller, veya avidin-biotin kompleksleri ile etiketlenerek sinyal elde edilir.

İmmünosensörlerde antijen-antikor etkileşiminin spesifik ve seçici olması bu biyosensör türünün en büyük avantajı arasındadır (Luppa vd. 2001). Diğer avantajlar arasında çabuk ve yüksek duyarlılıkta yanıt verebilmeleri gösterilmektedir (Palleschi vd. 2012). İmmünosensörlerin bu avantajlarının yanı sıra en büyük problemi, bu sensörlerin tersinmez özellikte olmasıdır. Bu nedenle bir immünosensör çoğunlukla tek bir kez

kullanılabilmektedir (Buerk 1993). Yapılan araştırmalarda bu tip biyosensörlerin tekrar kullanılabılır özellikte sensör yüzeylerine sahip olması çalışılmaktadır (Gan vd. 2011).

Antikor aktivitesi gösteren ve proteinlerin globulinler kısmında yer alan, immünolojik etkileri olan bu biyolojik moleküllere Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından İmmünoglobulinler adı verilmiştir ve Ig şeklinde sembolize edilmiştir. Beş farklı Ig sınıfı tanımlanmıştır. Bunlar: IgA, IgD, IgE, IgM ve IgG'dir. Bu Ig'ler içinde IgG, vücuttaki tüm antikorların %70-90'ını oluşturmaları ve plasentadan geçebilen tek Ig olması sebebiyle önem arz etmektedir. İmmün yetmezliklerin tanısında, birçok enfeksiyon, alerji ve immün durumun tanımlanmasında, Ig ve Ig alt gruplarının tayini yapılmaktadır. Etnik kökene göre değişkenlik gösteren bu testlerin bölgesel referans aralıkları, bunların yaşa ve cinse bağılı değişimlerinin hassas, duyarlı ve spesifik bir şekilde ölçülmesi önemlidir (Baskın vd. 2010).

Protein A (PrA), *Staphylococcus aureus* cinsi bakterinin hücre duvarında bulunan bir yüzey proteindir. Protein A içerdiği 5 homolog Ig bağlama bölümü sayesinde pek çok memeli türünde bulunan IgG'yi yapısına bağlayıp kompleks oluşturabilmektedir. PrA'nın Ig'ler içinde özellikle IgG'ye olan yüksek afinitesinden dolayı biyokimyasal araştırmalarda kullanımı önem arz etmektedir (Graille vd. 2000).

Bu tez çalışmasında metabolizmanın temel antikorı olan IgG'nin tespitine yönelik impedimetrik immünosensör sisteminin geliştirilmesi çalışılmıştır. Taşıyıcı olarak Jelatin, Aljinat ve bu iki polimerin karışımı kullanılmıştır. Bu malzemeler ile modifiye edilen platin elektrotlar üzerine IgG'ye yüksek afinitesi olan PrA çapraz bağlayıcılar kullanılarak immobilize edilmiştir. Polimer, çapraz bağlayıcı ve Protein A, inkübasyon süreleri, uygun pH aralığı, tekrar üretilebilirlik gibi parametreler Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS) optimize ve karakterize edilmiştir. Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörü geliştirildikten sonra ayrıca Çinko oksit (ZnO) nanopartikülü ile modifiye edilmiş ve nanopartikülle modifiye edilen immünosensörden elde edilen kalibrasyon eğrisi ile nanopartikül kullanılmayan Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörünün kalibrasyon eğrisi karşılaştırılmıştır. Ayrıca Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu

(AFM) ile yüzey karakterizasyonu yapılmıştır. Geliştirilen immünosensörlerin raf ömrü belirlenmiştir. Ayrıca geliştirilen immünosensörlerden en düşük tayin sınırına sahip olanı ile BOS ve serum çalışmaları yapılarak immünosensörlerin biyolojik örneklerle uyarlanabilirliği üzerine çalışılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Elektrokimya

Elektroanalitik teknikler maddenin akım, potansiyel, yük gibi elektriksel parametreleri ile kimyasal parametrelerinin arasındaki ilişkiyi inceler. Elektriksel ölçümlerin analitik amaçlar için kullanılmaya başlanması sonucu çevresel görüntüleme, endüstriyel kalite kontrol, savunma sanayi, biyomedikal analizler gibi çok geniş bir uygulama alanı oluşmuştur. Mikroelektrotların ve elektrokimyasal dönüştürücülerin geliştirilmesi, ultraeser miktarda analit ile çalışmaya izin veren voltametrik yöntemlerin geliştirilmesi, moleküler cihazların mikrofabrikasyonu- gibi 1980'ler ve 1990'lardaki gelişmeler elektroanaliz tekniklerinin popülaritesini belirgin derecede arttırmıştır. Gerçekten de elektrokimyasal sistemler, kimyasal sensörlerin geliştirilmesindeki ilginin büyük bir payını tek başına almaktadır (Wang 2000).

Ölçümler için gerekli sinyalin türüne göre elektroanalitik ölçümler kendi içinde iki ana sınıfa ayrılmaktadır: Potansiyometrik ve Potansiyostatik. Bu iki ana türün iki sistemi de en az iki elektrot ve elektrolit çözeltisi içermektedir. Böylece elektrot yüzeyi iyonik iletici ve elektronik iletici arasında bağlantı görevi görmektedir. İki elektrottan biri ölçümü yapılacak hedef analite cevap vermektedir, bu yüzden çalışma elektrodu ya da indikatör elektrot olarak adlandırılmıştır. Referans elektrot olarak adlandırılan ikinci elektrot ise çözelti özelliklerinden bağımsız olarak sabit potansiyele sahiptir. Elektrokimyasal hücreler dış kaynaktan elektrik tüketiyorsa elektrolitik ya da elektrik enerjisi üretiyorsa galvanik olarak sınıflandırılabilir.

Kontrollü potansiyel teknikler elektrot-çözelti ara yüzeyindeki yük transfer işlemiyle ilgilenmektedir ve temeli dinamik durumlara dayanmaktadır (sıfır akım yok) . Elektron transfer reaksiyonu ve bunun sonucunda oluşan akımın ölçülmesi ile "elektrot potansiyeli" terimi türetilmiştir. Kontrollü potansiyel tekniklerinin amacı hedef analitin konsantrasyonu ile ilişkili akım değerinin elde edilmesidir. Analitin redoks tepkimesi ile oluşan elektron transferi verilerinin elde edilmesiyle bu amaca ulaşılır:



O ve R yükseltgenen ve indirgenen türler yani redoks çiftidir. Bu tip bir reaksiyon potansiyel alanda gerçekleşir ve termodinamiksel ya da kinetik olarak elektron transferi gerçekleşir. Termodinamik yasalarının etkisi altında olan bir sistem için elektrot potansiyeli Nernst Eşitliği ile bulunur. Nernst eşitliği tersinir reaksiyonlar içindir ve denge koşulu için geçerlidir:

$$E = E^o + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{C_o(0,t)}{C_o(0,t)} \quad (2.2)$$

E^o redoks tepkimesi için standart potansiyeli gösterirken, R evrensel gaz sabitini (8,314 JK⁻¹ mol⁻¹) göstermektedir. T Kelvin cinsinden sıcaklığı, n sistemdeki elektron transfer sayısını, F ise faraday sabitini (96,487 coulomb) ifade eder. Standart potansiyel redoks çiftinin yani yükseltgen ve indirgen türlerin konsantrasyonlarının 1 Molar (M) olduğu ya da etkinliklerinin eşit olduğu durumlar için geçerlidir. Tek başına bir elektrodun mutlak potansiyeli ölçülemediği için E ve E^o karşılaştırılmalı sistemler ile ölçülebilir.

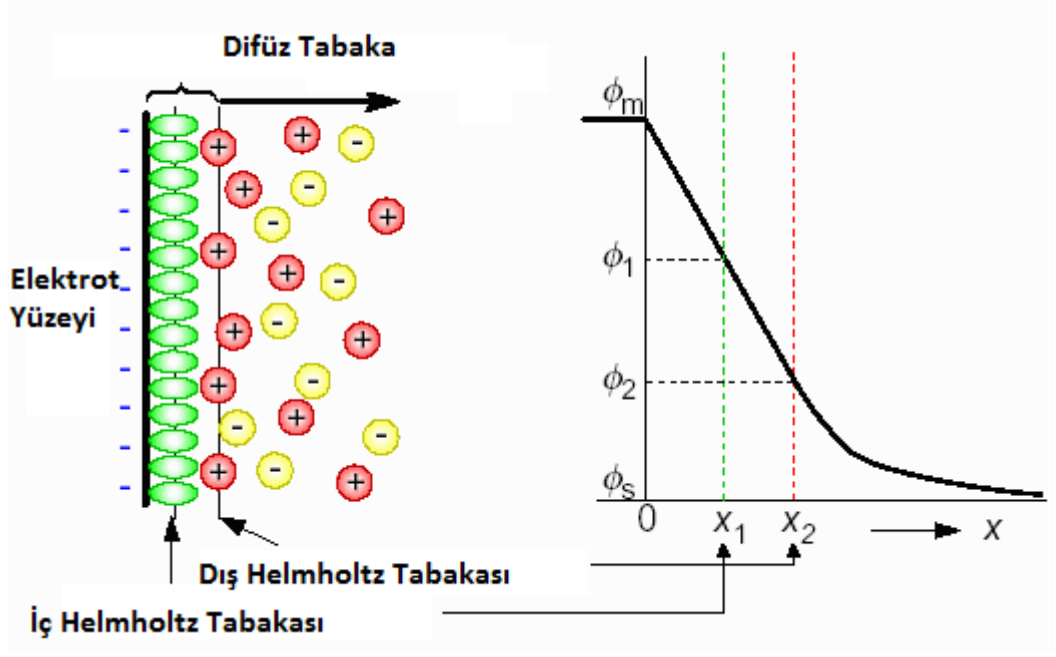
Elektrot reaksiyonlarının yolları bazen oldukça karmaşık ve çok basamaklı olabilir. Bu tip sistemlerin hızı en yavaş tepkime basamağına göre belirlenmektedir. Basit reaksiyonlara sahip elektrokimyasal sistemler elektroaktif türlerin elektrot yüzeyine kütle transferini, arayüzeye karşı elektron transferini ve ürünün elektrolit çözeltisine geri transfer basamaklarını içermektedir. Daha karmaşık sistemlerde ise ek olarak ilave kimyasal tepkimeler ve ilave elektrot yüzeyi proses basamakları bulunabilmektedir. Bu tip sistemlerin reaksiyon hızlarını-yani ölçülen akımı-hem kütle transferi hem de elektron transferi kısıtlayabilir.

2.1.1 Elektriksel çift tabaka

Elektriksel Çift Tabaka için 1879'da ilk modeli öne süren Helmholtz, elektriksel çift tabakayı bir kondansatöre benzeterek iyonların yüzeyde tek tabaka halinde adsorplanabileceğini fiziksel bir modele dayandırarak matematiksel olarak açıkladı. Elektriksel ara yüzey terimi bir elektrolitin sınırında fazlar arasındaki bölgeyi oluşturan iyonlar, yönelmiş dipoller ve elektronların sıralanışını anlatmak için kullanılır. Bu modele göre yüklerin elektrostatik güç ya da çözeltideki dipollerin yeniden düzenlenmesi ile bu şekilde yeniden dağılımı, elektriksel olarak nötral bir yüzeyin oluşmasını sağlıyordu.

$$q_m = -q_s \quad (2.3)$$

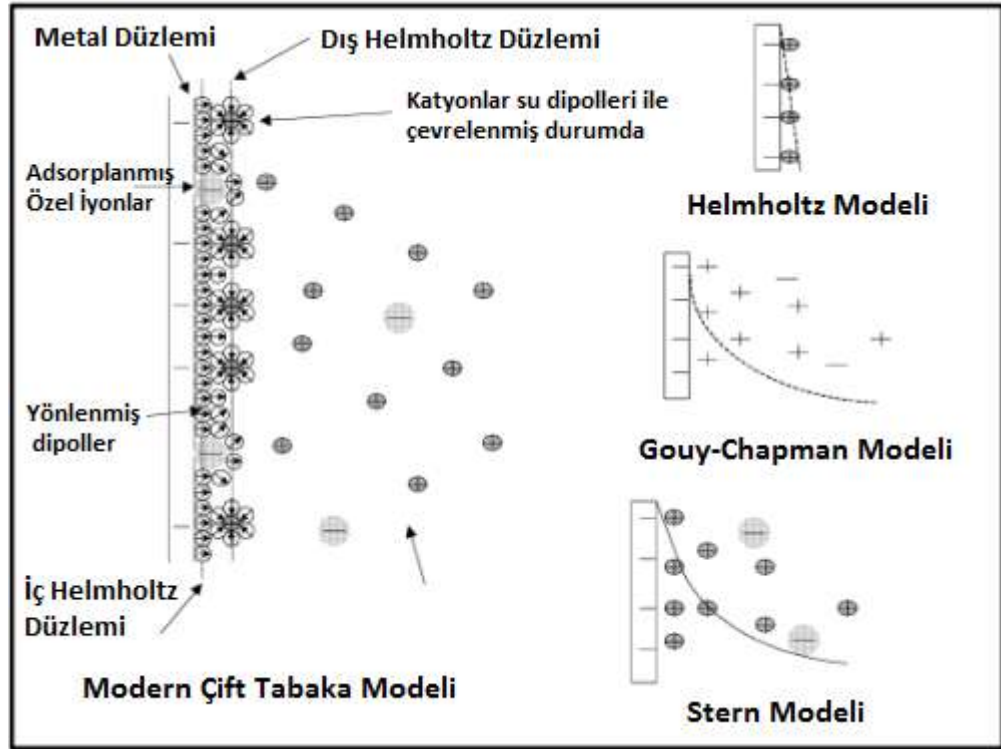
q_m metal yüzey üzerindeki yük yoğunluğunu; $-q_s$ ise monomoleküler çözelti tabakasının yük yoğunluğunu göstermektedir. Helmholtz, elektrot ile çözeltideki iyonlar arasında solvasyon tek tabakasının olabileceğini, böylelikle elektrot tarafından çekilen elektronların ara-yüzeye, bu iyonların solvasyon kabukları tarafından sınırlanan bir mesafeye kadar yaklaşabileceklerini ifade etmiştir. Bu nedenle, iyonların yeniden düzenlenmesi ile oluşan potansiyel düşüşü doğrusaldır ve yalnızca Dış Helmholtz Tabakası (Outer Helmholtz Plane, OHP) denilen, elektrot yüzeyi ile bu tek tabaka arasındaki bölgede gözlenir.



Şekil 2.1 Helmholtz elektriksel çift tabaka modeli

İlerleyen yıllarda Gouy ve Chapman elektriksel çift tabakanın tanecik yüzeyine dengeleyici (zıt yüklü) iyonların adsorpsiyonundan dolayı potansiyelin üstel olarak azalacağını ifade etti (Oldham 2008). Günümüzde geçerli olarak kullanılan klasik çift tabaka modeli Gouy-Chapman-Stern modelidir.

Metal yüzeyine en yakın tabaka yönlenmiş su dipolleri veya bazı özel iyonlarla kaplıdır ve bu elektrotun hidrasyon tabakasıdır. Genelde anyonlar ve büyük katyonlar çözeltide hidratize halde bulunmazlar. İkinci sıra hidratlaşma eğilimi daha fazla olan küçük artı yüklü iyonlardan oluşur. Metal yüzeyine adsorplanmış iyonların merkezinden geçirilen düzleme İç Helmholtz Düzlemi (IHP), hidratize iyonların merkezinden geçen düzleme ise Dış Helmholtz Düzlemi (OHP) denir. Bu durumda elektriksel ara yüzey kendi içinde iki katmandan oluşur: Metal ile dış Helmholtz düzlemi arasında kalan yoğun elektriksel çift tabaka ve Dış Helmholtz düzlemi ile çözelti içlerine doğru uzanan ve elektriksel yük yoğunluğu çözelti içine doğru gidildikçe azalan ve sıfıra düşen difüz tabaka.



Şekil 2.2 Elektriksel çift tabaka modelleri

Elektrot/elektrolit ara yüzeylerinde yürüyen tepkimeler başlıca beş kademede gerçekleşmektedir.

- Difüzlenme: Elektrolit içerisindeki iyon ve moleküller elektrot yüzeyine doğru difüzlenir.
- Adsorpsiyon: Yüzeyle ulaşan iyon ve moleküller yüzeyde adsorbe olurlar.
- Reaksiyon Basamağı: Yüzeyde adsorbe durumdaki maddeler elektrokimyasal tepkimeye uğrarlar.
- Desorpsiyon: Yüzeyde oluşan ürünler metal yüzeyinden ayrılırlar.
- Geriye Difüzlenme: Desorbe olan maddeler yüzeyden çözelti derinliklerine doğru difüzlenirler.

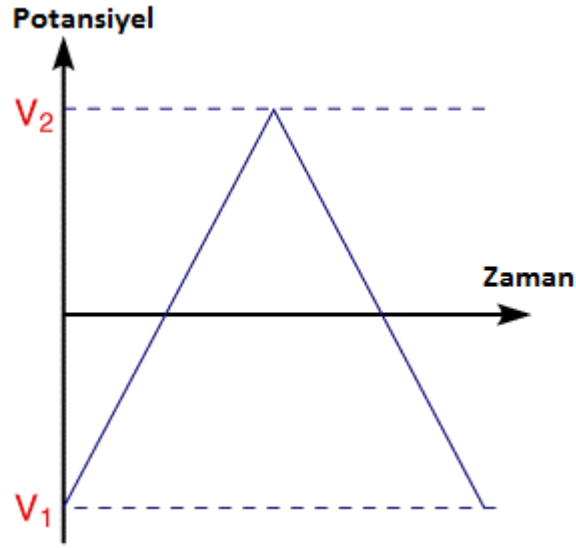
Son basamakta elektrot yüzeyinin serbest hale geçmesiyle yukarıda sıralanan basamaklar tekrarlanır.

Elektrot/elektrolit ara yüzeylerinde meydana gelen tepkimelerde en önemlisi adsorpsiyon basamağıdır. Fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki tür adsorpsiyon vardır. Fiziksel adsorplanmada iyon veya moleküller, yüzeyde Van der Waals kuvvetleri ile tutunurlar. Kimyasal adsorplanmada adsorbe olan iyonlar veya moleküller yüzeyde Valans kuvvetleri tarafından tutulmaktadır. Bu kuvvetler, fiziksel adsorpsiyon kuvvetlerinden daha güçlüdür.

2.2 Dönüşümlü Voltametri (Cyclic Voltammetry, CV)

Dönüşümlü voltametri önemli ve oldukça sık kullanılan bir elektroanalitik yöntemdir. Ağırlıklı olarak yükseltgenme/indirgenme reaksiyonlarının incelenmesinde, reaksiyon ara ürünlerinin gözlenmesinde ve elektrotlarda oluşan ürünlerin oluşum sonrası izleyeceği reaksiyonların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bir indikatör ya da çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanarak, analit hakkında (yükseltgenebilen ve/veya indirgenebilen, elektroaktif, elektrot tepkimesine giren, organik ve inorganik maddeler) bilgi edinilen bir grup elektroanalitik metotlara verilen isimdir. Bu yöntemde uygulanan potansiyel öncelikle bir yönde, daha sonra ters yönde taranırken akım ölçülür.

Dönüşümlü voltametri ölçümünde öncelikle bir elektrot durgun bir çözeltide belirli aralıkta potansiyel değişimi uygulanarak akım sinyali verilmesi sağlanır. Elde edilen üçgen şeklindeki dalga, ileri yön ve tersi yöndeki potansiyel taramasını gösterir (Şekil 2.3). Çoğu zaman bu döngü defalarca tekrarlanır.



Şekil 2.3 Dönüşümlü Voltametrik uyarma sinyali

Taramanın ters döndüğü potansiyellere dönüş potansiyeli denmektedir. Dönüşümlü voltametrinin uygulanacağı bir ölçümde bu potansiyeller çoğunlukla ilgili türün difüzyon kontrollü yükseltgenmesini ve indirgenmesini gözleyebilecek aralıkta seçilir.

Elektroanalitik metotlar genel olarak net akımın sıfır olduğu denge durumundaki statik metotlar ve denge durumundan uzakta net akımın gözlemlendiği dinamik metotlar olmak üzere ikiye ayrılır. Elektroanalitik tekniklerin çok büyük bir kısmı net akımın sıfır olmadığı dinamik metotlardır ve bunlar da potansiyel kontrollü veya akım kontrollüdür.

Voltametrde deneyler üçlü elektrot sisteminde gerçekleştirilmektedir. Üç elektrottan birisi zamanla potansiyeli değiştirilen indikatör elektrot veya çalışma elektrodudur. Voltametrik yöntemlerde çalışma elektrodu olarak, civa, platin (Pt), altın, paladyum, karbon elektrot (grafit, karbon pasta elektrot, camı karbon, karbon cloth elektrot) gibi elektrotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Elektrot sistemindeki ikinci elektrot, potansiyeli deney süresince sabit kalan referans elektrottur. Referans elektrot genellikle gümüş/gümüş klorür (Ag/AgCl) veya doymuş kalomel elektrottur. Elektrot sistemindeki üçüncü elektrot ise karşıt veya yardımcı elektrottur. Karşıt elektrot olarak ise genellikle Pt tel kullanılır. Voltametrde akım, çalışma elektrodu üzerinde maddelerin indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucunda oluşur. İndirgenmeden dolayı oluşan

akıma katodik akım, yükseltgenmeden dolayı oluşan akıma ise anodik akım denir.

Difüzyon kontrollü akım, çalışma elektroda uygulanan potansiyel, polarogramın sınır akımı bölgesinde ise ve elektron aktarım hızı elektrot yüzeyine gelen elektroaktif maddeyi hemen indirgeyecek veya yükseltgeyecek kadar büyük ise elektrot yüzeyine difüzyonla gelen elektroaktif madde miktarı ile belirlenir. Elektrot yüzeyinde oluşan akım, birim yüzeye gelen madde miktarı ile orantılıdır. Akım:

$$i = nFAq(0,t) \quad (2.4)$$

$q(0,t)$, elektrodun birim yüzeyine t anında gelen madde miktarıdır. Fick kanunları olarak ifade edilen diferansiyel denklemlerin genişleyen küresel elektrot için çözülüp q değerinin yukarıdaki eşitlikte yerine konulmasıyla İlkoviç eşitliği elde edilir:

$$i_d = 0,732nFCD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6} \quad (2.5)$$

Bu eşitlikte terimlerin açıklamaları aşağıdaki gibidir.

i : akım, A;

n : aktarılan elektron sayısı, mol e^- /mol;

F : Faraday sabiti, mol/mol e^- ;

C : ana çözeltideki elektroaktif madde konsantrasyonu, mol/cm³;

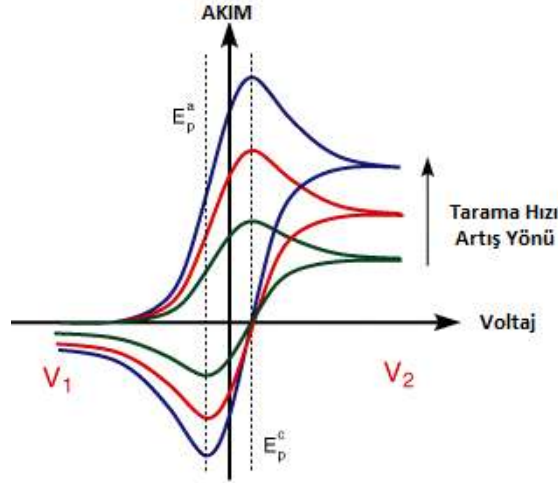
D : difüzyon katsayısı, cm²/s;

m : akış hızı, g/s;

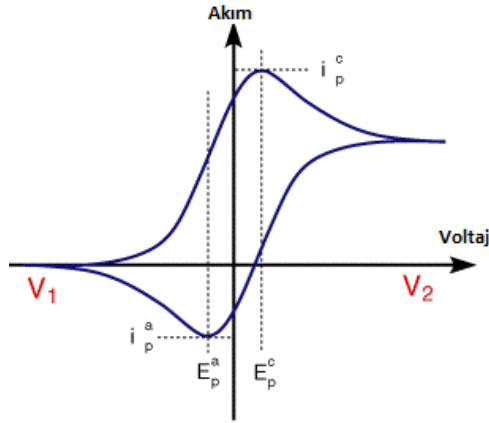
t : zaman, s.

Elektroda hızlı bir potansiyel taraması uygulandığı zaman potansiyel, standart indirgenme potansiyeli değerine yaklaşıncaya madde indirgenmeye başlar. Potansiyel negatifleştikçe elektrot yüzeyindeki maddenin indirgenme hızı ve buna bağlı olarak da akım artar. İndirgenme hızı yeterince büyükse akımı, elektrot yüzeyine difüzyonla gelen madde miktarı kontrol eder. Zamanla difüzyon tabakası kalınlaşacağından difüzyon hızı azalır ve akım da azalmaya başlar. Şekil 2.5’de dönüşümlü voltametri tekniği

kullanılarak elde edilen voltamogramda akım-potansiyel ilişkisi gösterilmiştir. CV’de elde edilen pik akımının büyüklüğü elektroaktif maddenin konsantrasyonu, aktarılan elektron sayısı, elektrot yüzey alanı ve difüzyon katsayısı ile değişir.



Şekil 2.4 Tarama hızındaki değişimin dönüşümlü voltamogram üzerine etkisi

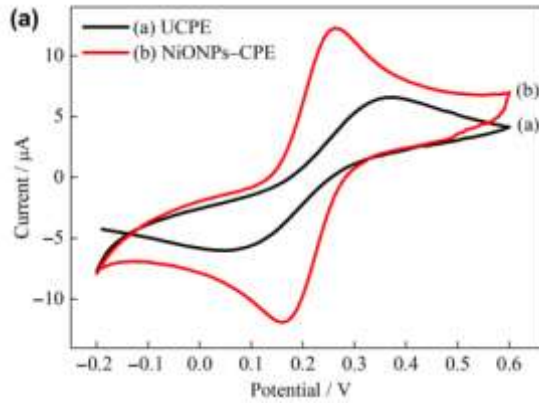


Şekil 2.5 Dönüşümlü voltametrde akım-potansiyel eğrisi

Biyosensör çalışmalarında dönüşümlü voltametrimin kullanımı elektrot yüzeyinde yapılan modifikasyonların gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için kullanılmaktadır. Modifikasyondan önce ve sonra alınan CV ölçümleri ile akım yoğunlukları kıyaslanarak modifikasyonun başarısı hakkında ve modifiye yüzeyde biriken türün elektrokimyasal davranışı hakkında bilgi sahibi olunabilir.

Modifikasyonların her aşamasında yapılan CV ölçümlerinin sonuçları, impedans sonuçlarını da büyük oranda doğrulamaktadır. CV eğrilerinden hesaplanan formal potansiyel ve pik ayrımları, biyosensör sisteminin tersinmez olup olmadığı hakkında bilgi vermektedir. Antijen-antikor etkileşimi sonucu açığa çıkan fizikokimyasal değişim elektrokimyasal olarak algılanabilen bir sinyal üretmez. Bu nedenle antijen-antikor sistemleri enzimler, floresan bileşikler, elektrokimyasal aktif moleküller, veya avidin-biotin kompleksleri ile etiketlenerek sinyal elde edilir. Bu tez çalışmasında elektrokimyasal aktif molekül olarak potasyum ferrosiyaniid ve potasyum ferrisiyaniid redoks problemleri kullanılmıştır.

Şekil 2.6'da çıplak karbon pasta elektrodun CV eğrisi ve bu elektrodun nikel oksit nanopartiküller ile modifikasyonundan sonra elde edilmiş CV eğrisi görülmektedir. Modifikasyondan sonra elde edilen eğrideki akım artışı nanopartiküllerin elektrot yüzeyine başarılı şekilde immobilize edildiğini, böylece elektrottan geçen yük yoğunluğunu arttırdığını göstermektedir.

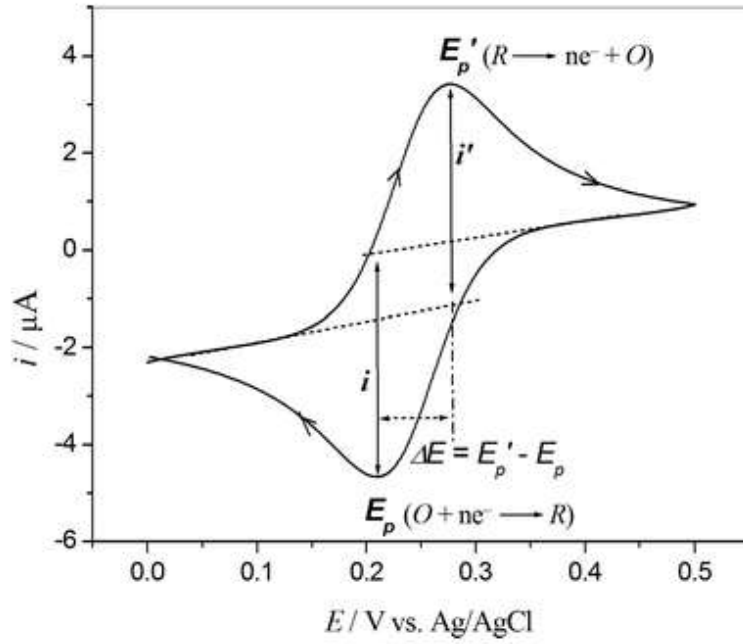


Şekil 2.6 Karbon pasta elektrodun çıplak CV eğrisi ve nikel oksit nanopartiküller ile modifikasyonundan sonraki CV eğrisi (Pekyardımcı vd. 2013) a. UCPE: modifiye edilmemiş karbon pasta elektrot b. NiO nanopartikül modifiye karbon pasta elektrot.

2.2.1 Tersinir reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı

Elektrot reaksiyonu $O + ne^- \leftrightarrow R$ şeklinde ise ve başlangıçta çözeltide yalnız O maddesi bulunuyor, ayrıca elektron aktarımı dışında herhangi bir kimyasal reaksiyon

bulunmuyor ve elektrot yüzeyinde adsorpsiyon olayı meydana gelmiyor ise $i - E$ grafiği pik şeklinde gözlenir ve tarama hızı arttıkça pik yüksekliği artar. Dönüşümlü voltametrde akımın maksimum olduğu noktadaki pik potansiyeli E_p olarak adlandırılır. Potansiyel taraması geriye doğru yapıldığı zaman tarama hızlı ise elektrot yüzeyinde yeteri kadar R bulunacağından E^0 değerinden itibaren daha pozitif potansiyellerde R yükseltgenmeye başlayacaktır. Bu nedenle ters taramada anodik pik oluşacaktır. Ters tarama esnasında E^0 değerine kadar O indirgenmeye yani R oluşmaya devam edecektir. Ters taramada potansiyel pozitifleştikçe Nernst eşitliğine göre R yüzey konsantrasyonu azalacak ve yeteri kadar pozitif değerlerde sıfıra gidecektir. Ancak deney sırasında yüzeyde oluşan R, çözeltiye doğru difüzleneceğinden ters tarama akımı katodik akımdan biraz daha düşük olacaktır. Tersinir $O + ne^- \leftrightarrow R$ reaksiyonunun CV voltamogramı şekil 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.7 Tersinir bir sistemin CV eğrisi

Tersinir bir elektrot reaksiyonunun pik akımı $25^\circ C$ sıcaklıkta aşağıdaki eşitlikle gösterilir (2.6). Bu eşitliğe Randles – Sevcik eşitliği adı verilir.

$$(i_p)_{ter} = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} C_0 v^{1/2} \quad (2.6)$$

Bu eşitlikteki terimlerin anlamları aşağıdaki gibidir;

i_p : Pik akımı, A;

D_o : O türünün difüzyon katsayısı, cm^2/s ;

v : Tarama hızı, V/s;

C_o : O türünün ana çözelti konsantrasyonu, mol/cm^3 ;

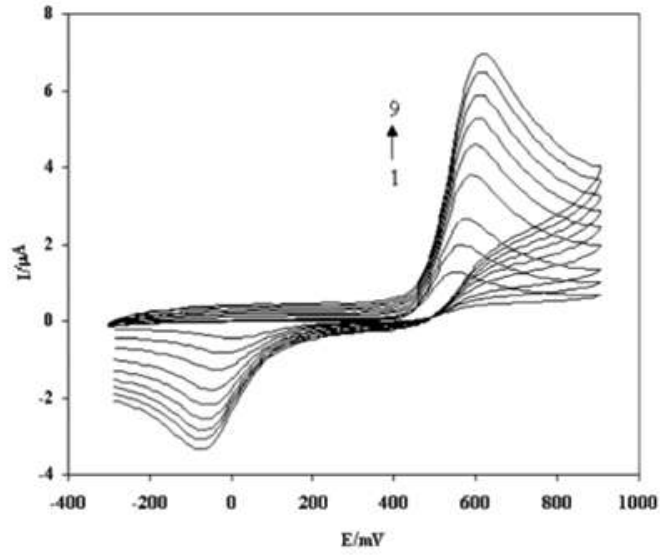
Tersinir durumda E_p tarama hızına bağlı değildir. Bir tersinir indirgenme reaksiyonunda E_p ile $E_{1/2}$ arasındaki ilişki şu şekildedir.

$$E_p = E_{1/2} - 1.1 \cdot \frac{RT}{nF} \quad (2.7)$$

CV tekniği ile sistemin tersinirlik testi yapılabilir. Bunun için sistemin bazı kriterlere uyması gerekmektedir. Bu kriterler şunlardır:

1. $i_p - v^{1/2}$ grafiği doğrusal olmalıdır.
2. $E_p^k - E_p^a = 59/n$ mV veya $E_p - E_{p/2} = 57/n$ mV olmalıdır.
3. E_p , tarama hızı ile değişmemelidir.
4. $i_p^a/i_p^k = 1$ olmalı ve bu oran tarama hızı ile değişmemelidir.
5. E_p 'den daha negatif potansiyellerde akım, $t^{-1/2}$ ile orantılı olmalıdır.

Bir sistemin tersinir olması için yukarıdaki kriterlerin hepsinin geçerli olması gereklidir. Şekil 2.8 tersinir bir sistemin davranışını göstermektedir. Bu şekilden artan tarama hızı ile pik akımının arttığı ve pik potansiyelinin değişmediği görülmektedir.

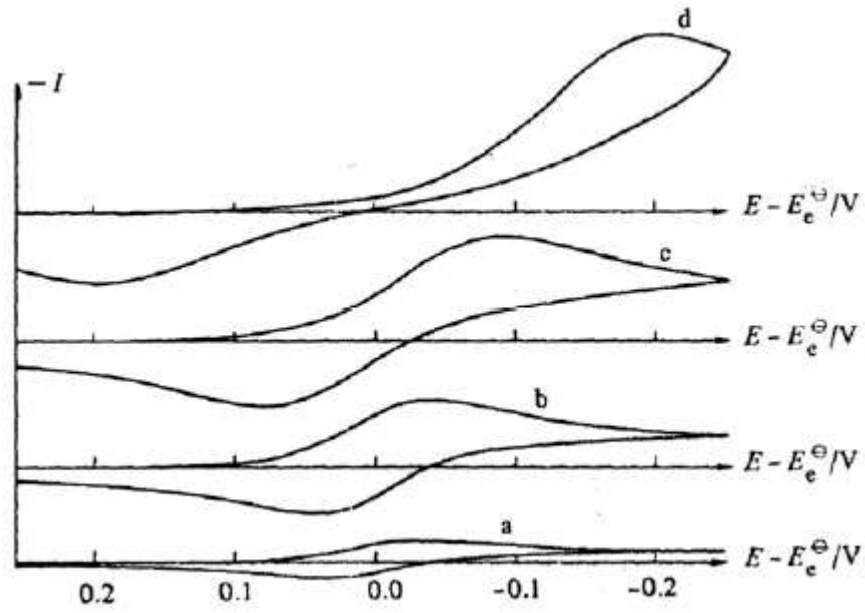


Şekil 2.8 Parasetamolün artan tarama hızlarından elde edilmiş dönüşümlü voltamogramı (Daneshegar vd. 2012)

Tersinir sistemlerde bütün potansiyellerde elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından büyük olduğu için elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerlidir.

2.2.2 Tersinmez reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı

Tersinmez sistemlerde elektron aktarım hızı yeteri kadar büyük olmadığından elektrot yüzeyinde Nernst eşitliği geçerli değildir. Tersinmez durumlarda tarama hızı çok düşük ise, elektron aktarım hızı kütle aktarım hızından daha yüksektir ve sistem tersinir gibi gözlenebilir. Tarama hızı arttıkça kütle aktarım hızı elektron aktarım hızı ile aynı seviyeye gelir. Bu durum tarama hızı arttıkça anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması ile belli olur (Şekil 2.9). Tamamen tersinmez sistemlerde anodik pik gözlenmez. Anodik pik gözlenmeyişi her zaman sistemin tersinmez olduğunu ispatlamaz. Elektron aktarım basamağını takip eden çok hızlı kimyasal bir reaksiyon varlığında yani oluşan ürün, hızlı bir şekilde başka bir maddeye dönüştüğünde de anodik pik gözlenmeyebilir.



Şekil 2.9 Tersinmez bir sistemden elde edilen CV voltamogramında farklı tarama hızlarında gözlenen anodik ve katodik pik potansiyellerinin birbirinden uzaklaşması

v; a) 0,13 V/s, b) 1,3 V/s, c) 4 V/s, d) 13 V/s

Dönüşümlü voltametri ile tersinmez bir reaksiyonun tanınma kriterleri:

1. Anodik pik gözlenmez
2. i_p^k , tarama hızının karekökü ile doğru orantılı olarak değişir.
3. E_p^k kayması tarama hızındaki 10 kat artmada $30/(\alpha n)$ kadardır.
4. $|E_p - E_{p/2}| = 48/(\alpha n)$ mV'dur.

2.2.3 Yarı-tersinir reaksiyonların dönüşümlü voltamogramı

Yarı tersinir reaksiyonlarda akım, difüzyon hızı ve elektron aktarım hızı ile birlikte kontrol edilir. Dönüşümlü voltametrde bir reaksiyonun yarı tersinirlik kriterleri;

1. $\dot{I}_p$, $v^{1/2}$ ile artar ancak doğrusal değildir.
2. E_p^k , tarama hızı ile değişir. Bu değişim genellikle tarama hızının artması ile negatif değerlere kayma yönündedir.
3. $i_p^a/i_p^k=1$ olmalıdır.

4. $E_p^k - E_p^a$ farkı düşük tarama hızlarında 59/n'e yaklaşmalıdır.

2.3 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal İmpedans spektroskopisi (EIS) maddelerin ve iletken elektrotların ara yüzeylerinin elektriksel özelliklerinin araştırılması için güçlü bir yöntemdir. EIS elektrokimyasal tekniklerden farklı olarak, hem hacim araştırmalarında hem de dakikalardan mikrosaniyelere uzanan zaman sabitleriyle bağlantılı arayüzey işlemlerinde kullanılabilmektedir.

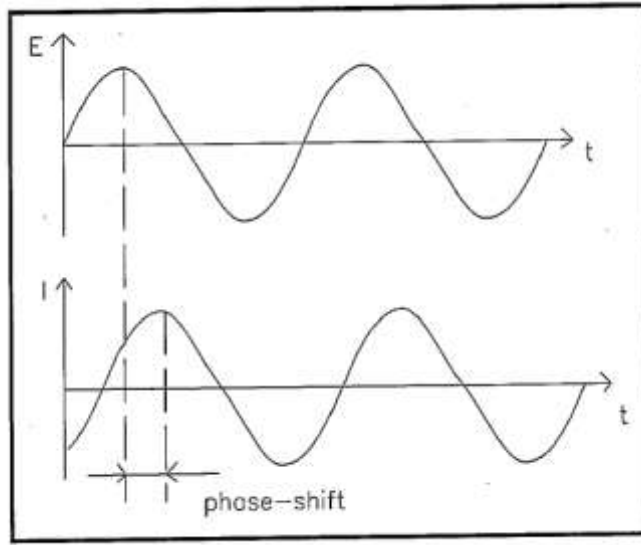
Elektriksel direnç kavramı neredeyse her birey tarafından bilinen bir kavramdır. Elektriksel direnç, devre elemanının elektriksel akım akışını engelleme yeteneğidir. Ohm kanunu direnç terimini voltaj (E) parametresinin akım (I) parametresine oranı olarak tanımlamıştır.

$$R = \frac{E}{I} \quad (2.8)$$

Yaygın olarak bilinen bu denklem sadece tek devre elemanı için kullanılmaktadır: İdeal rezistans. İdeal rezistansın bir kaç özelliği bulunmaktadır. Bu özellikler; tüm akım ve voltaj değerlerinde Ohm yasasını destekleme, frekanstan bağımsız rezistans değerleri, alternatif akım ve voltaj sinyallerinin birbirleri ile aynı faz içinde olmasıdır.

Gerçek dünyada devre elemanları bu koşullardan çok farklı davranış tabloları sergilerler. Bu devre elemanları elektrokimya ile uğraşan insanları bu basit denklemden uzaklaştırmaya sevk eder. Bu nedenlerden dolayı impedans terimi kullanılmaktadır. İmpedans tıpkı direnç gibi aynı şekilde devreden geçen akıma karşı koyma gücüdür. Dirençten farkı yukarıda bahsedilen koşullar gibi nedenlerden dolayı kısıtlamalara maruz kalmamasıdır.

EIS tekniğinde çoğunlukla elektrokimyasal hücreye alternatif akım (AC) potansiyeli uygulanarak hücreden geçen akım ölçülür. Bu durumda hücreye sinoidal potansiyel uyarımı uygulanmış oluruz. Böylece aldığımız cevap da AC akım sinyali olur. Elde edilen bu akım sinyali ise sinoidal fonksiyon denklemleri ile analiz edilebilmektedir. EIS tekniğinde genellikle küçük uyarım sinyalleri uygulanmaktadır ve hücre cevabı da lineer olmaktadır. Lineer sistemde sinoidal potansiyele gelen akım cevabı aynı frekansta sinoidal olacaktır fakat faz kayması gerçekleşecektir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Doğrusal sistemde sinoidal akım cevabı eğrisi

Uyarım sinyali zamanın fonksiyonu olarak belirtilirse şu şekilde verilebilir:

$$E_t = E_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (2.9)$$

E_t t anındaki potansiyel, E_0 sinyal genliği, ω ise radyal frekanstır. ω ile frekans (f) arasındaki ilişki ise şu şekilde verilmektedir:

$$\omega = 2 \pi f \quad (2.10)$$

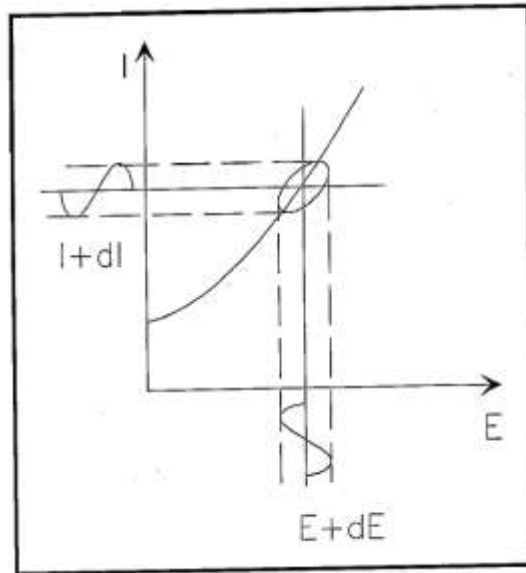
Lineer bir sistemde, potansiyele karşı oluşan cevap I_t , potansiyel ile aynı frekansta fakat farklı genlik ve faz açısına sahip zaman bağımlı bir AC akım sinyalidir. Φ faz kaymasını temsil etmektedir.

$$I_t = I_0 \cdot \sin(\omega t + \Phi) \quad (2.11)$$

Ohm yasasına benzer şekilde düzenlemeler yapıldığı takdirde elde edilen kavram sistemin impedansını hesaplamamızı sağlar:

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \phi)} \quad (2.12)$$

Eğer sinoidal uyarım sinyali E_t 'yi x eksenine, sinoidal cevap sinyali I_t 'yi y eksenine işaretlersek sonuç şekil 2.11'de görüldüğü üzere oval olur. Bu şekil Lissajous figürü olarak bilinir. Bu figürün değişik analizleri modern EIS cihazlarında kabul görmüş bir metottur.



Şekil 2.11 Lissajous figürü

Eulers denklemi ile

$$\exp(j\Phi) = \cos \Phi + j \sin \Phi \quad (2.13)$$

impedansı kompleks fonksiyon şeklinde vermek mümkündür. Potansiyel şu şekilde tanımlanabilir:

$$E_t = E_0 \exp(j\omega t) \quad (2.14)$$

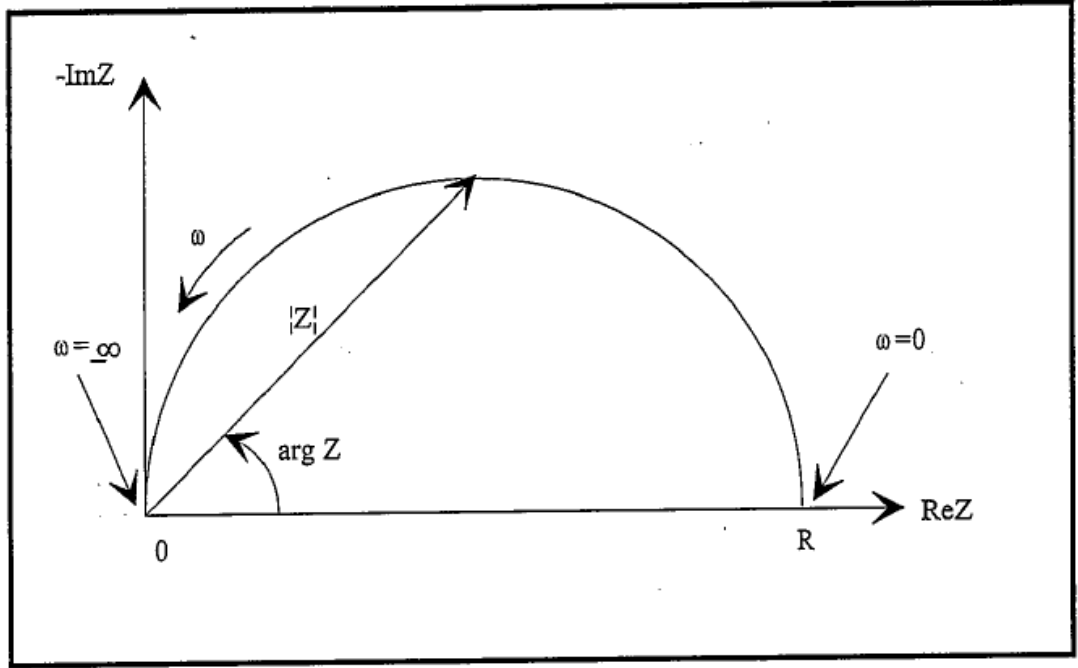
Akım cevabı ise şu şekilde tanımlanabilir.

$$I_t = I_0 \exp(j\omega t - \Phi) \quad (2.15)$$

İmpedans ise kompleks sayılar olarak şu şekilde verilebilir:

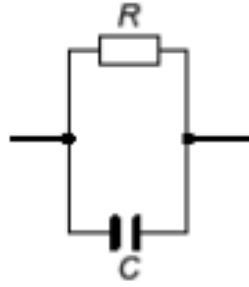
$$Z(\omega) = E/I = Z_0 \exp(j\Phi) = Z_0 (\cos \Phi + j \sin \Phi) \quad (2.16)$$

Yukarıdaki formülde verilen Z vektörü, sanal ve gerçek kısımdan oluşmaktadır. Gerçek kısım x eksenine, sanal kısım y eksenine işaretlenirse Nyquist eğrisi elde edilir (Şekil 2.12). Bu grafikteki her nokta tek frekansa sahip impedansı temsil etmektedir. Grafikte düşük frekanslı bölge eğrinin sağ tarafını, yüksek frekanslı bölge ise eğrinin sol tarafını temsil etmektedir.

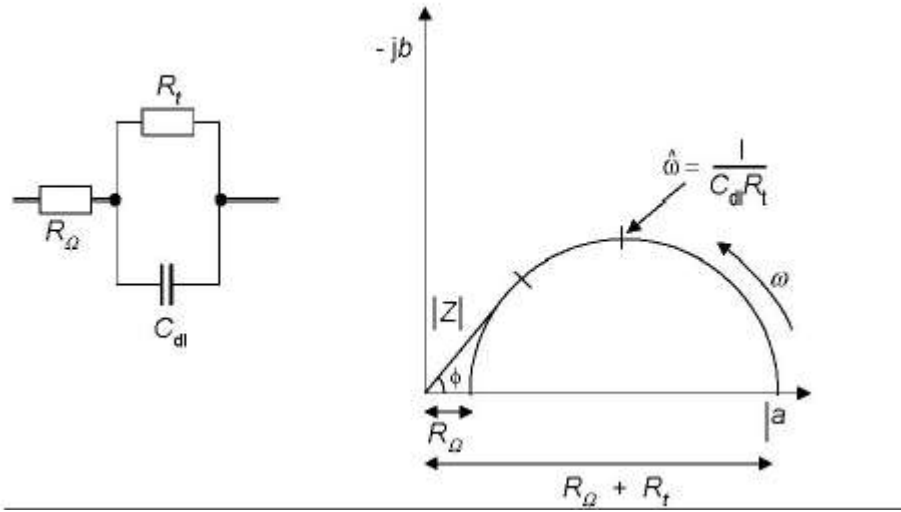


Şekil 2.12 İmpedans vektörünün Nyquist eğrisi şeklinde gösterimi

Nyquist eğrisinde impedans $|Z|$ vektörünün uzunluğu olarak verilmektedir. Bu vektör ile x eksenini arasındaki açı faz açısı (Φ) olarak adlandırılmaktadır. Şekil 2.12'nin temsil ettiği elektriksel devre şekil 2.13'de verilmiştir.



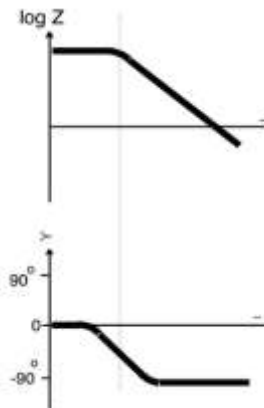
Şekil 2.13 Paralel rezistans ve kapasitanstan oluşan devre



Şekil 2.14 Elektriksel devreye göre elde edilmiş Nyquist eğrisi

İmpedimetrik ölçümlerin ilk anlarında yüksek frekans (düşük enerji) uygulanarak çözelti direnci ölçülür. Daha sonra frekans azalır, enerji yavaş yavaş artar ve tarama bölgesi elektrot yüzeyine doğru kayar. Bu kısımda direnç en fazla olduğu için Nyquist grafiklerde kapasitif direnç en üst değerlerde gözlenir.

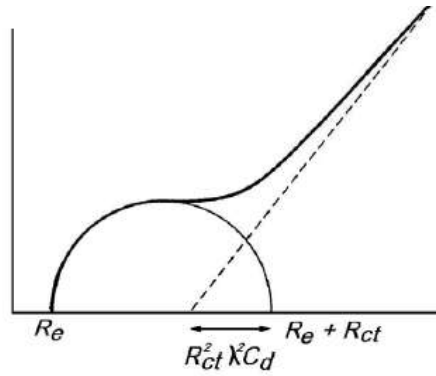
Nyquist eğrisi verisine bakıldığında eğrideki herhangi bir noktanın hangi frekansta elde edildiği bilgisine ulaşamayız. Fakat Bode eğrisi Nyquist eğrisinin aksine bize frekans hakkında bilgi verebilmektedir.



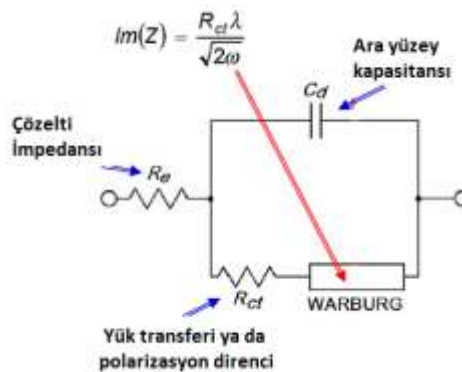
Şekil 2.15 Örnek Bode eğrisi

Elektrot yüzeyinde meydana gelen difüzyon sistemde Warburg impedansı olarak adlandırılan bir impedans yaratabilir. İmpedans, potansiyel geçirgenliğin frekansına bağlıdır. Yüksek frekanslarda difüzlenebilen reaktanlar çok mesafe alamadığı için Warburg impedansı küçüktür. Düşük frekanslarda ise difüzlenebilen reaktanlar harekete geçtiği için Warburg impedansı artmış olur (Şekil 2.16). Warburg impedansını Randles devresi üzerinden de açıklayabiliriz (Şekil 2.17). Randles devresi elektrot yüzeyindeki çift tabakanın rezistansına paralel bağlanmış kapasitörden (C) ve onlara seri olarak bağlanmış çözelti direncinden meydana gelir. Warburg impedansı (W) ise elektroda frekans bağımlı difüzlenen transportu temsil etmektedir.

Nyquist eğrisinin doğrusal olan son kısmı düşük frekansta taranan ve elektrot yüzeyi-çözelti arasında gerçekleşen kütle aktarımıyla ilgili olan bölgedir.



Şekil 2.16 Warburg impedansının gösterimi

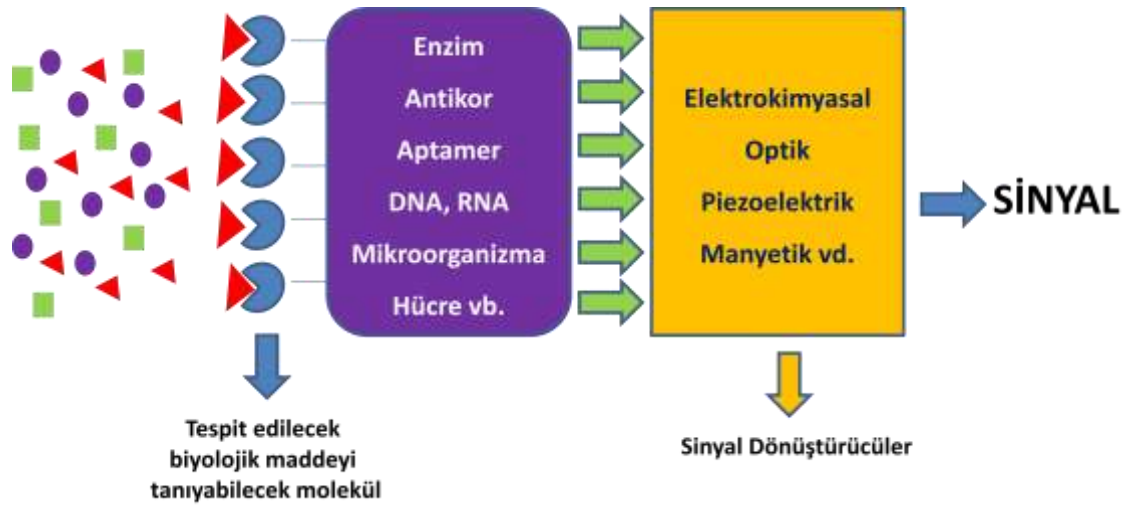


Şekil 2.17 Randles devresi üzerinden Warburg impedansının gösterimi

2.4 Biyosensörler

Biyolojik ve biyokimyasal süreçler ağırlıklı olarak tıp, biyoloji, biyoteknoloji alanlarında oldukça önemli role sahiptir. Biyosensör sistemleri günümüzdeki seviyesine ulaşana kadar biyolojik bir veriyi elektriksel bir sinyale dönüştürmek oldukça zordu. Fakat son yıllarda teknik, metot ve cihazların gelişmesiyle birlikte bu sistemlerin günlük yaşamda kullanımı da oldukça artmıştır.

Biyosensörler biyolojik tepkimelerde hedef analitleri tespit etmek için kullanılan küçük cihazlardır. Aynı sistem içerisinde biri biyokimyasal diğeri elektrokimyasal özellikteki iki çeviriciden oluşmaktadır. Biyokimyasal kısmın görevi tespiti yapılacak maddeyle etkileşerek onu tanımadır (Thevenot 2001). Bu tanıma olayının sonucunda bir biyokimyasal ürün de oluşabilmektedir. Elektrokimyasal kısım ise bu tanıma olayını ölçülebilir bir sayısal değere çevirmekle görevlidir. Aşağıda klasik bir biyosensörün temel elemanlarını içeren şematik bir gösterim görülmektedir (Şekil 2.18).



Şekil 2.18 Biyosensörün şematik gösterimi

İlk biyosensör Clark ve Lyons tarafından 1962 yılında amperometrik glukoz biyosensörü geliştirilerek rapor edilmiştir. Clark ve Lyons bir enzimin bir elektrot yüzeyine immobilizasyonu ile biyosensör sistemlerinin oluşturulabileceğini

göstermişlerdir. İlk biyosensörün geliştirilmesinden günümüze biyosensörler bugün sağlık (diagnostik, pronostik vb.), gıda, su, kalite kontrol, çevresel incelemeler gibi birçok alanda kullanılır hale gelmiştir.

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken seçicilik, kullanım ömrü, iyi bir kalibrasyon eğrisi, tekrarlanabilirlik, kararlılık, doğrusallık, uygun tayin sınırı aralığı, geniş ölçüm aralığı, hızlı cevap, biyouyumluluk, maliyetin ekonomik olması gibi bazı özellikleri vardır. Seçicilik bu özelliklerden en önemlisidir. İdeal bir biyosensör sadece hedef analitin değişimlerine cevap vermeli, diğer moleküllerin girişim etkisine izin vermemelidir.

Biyosensörlerin temel elemanlarından olan biyoreseptörler spesifikliğin anahtarıdır. Tespiti yapılacak analitin ilgili kısımlarının sensöre bağlanmasını sağlar. Biyoreseptörler pek çok türde olabilir. Bunlar başlıca antikor/antijen (Emregul vd. 2013), enzim (Gong vd. 2014), DNA/RNA (Zheng vd. 2014), aptamer (Topkaya vd. 2012), hücre (Zammit vd. 2013) olabilir. Biyosensörler, kullanılan biyoreseptör türüne göre, biyokatalitik esaslı ve biyoafinite esaslı olmak üzere iki şekilde gruplandırılabilir (Thevenot vd. 1999). Biyokatalitik reseptörlerde enzim yüzeyinde bulunan analitin makromoleküller tarafından katalizlenerek reaksiyona girmesi sağlanır. Substrat özelliği gösteren analitin bu yolla sürekli tüketimi sağlanmaktadır. En yaygın kullanılan biyokatalitik biyoreseptörlere enzimler, hücreler ve dokular örnek gösterilebilir (Thevenot vd. 1999). Biyoafinite temelli biyosensörlerde, biyosensörün biyolojik yapısında bulunan makromoleküller ile analitin etkileşmesi temeline dayanır. Genellikle bir dengeye ulaşılır ve böylece analit, kendisiyle kompleks oluşturan immobilize materyal tarafından daha fazla tüketilmez (Thevenot vd. 1999). Biyoafinite esaslı biyosensörlerde en çok kullanılan biyoreseptörler antikorlar/antijenlerdir.

2.4.1 Sinyal dönüştürücüler (Transduserlar)

Sinyal dönüştürücüler biyosensör sisteminde meydana gelen reaksiyonun tayin edilebilir bir sinyale çevrilmesi için gerekli temel elemanlardır. Çevirici yüzeyi,

reseptör immobilizasyonu için uygun olmalıdır. İdealde çevirici yalnız başına analiti izlemek için yeterli değildir fakat analit konsantrasyonunun azalması veya ürün oluşumu gibi biyokimyasal olayları algılar. Biyosensör sistemi için ölçülebilecek sinyaller; potansiyel değişimi, elektron transferi, ışığın ürün veya analit tarafından yayılması veya absorbe edilmesi, sıcaklık veya kütle değişimi gibi olayların sinyal dönüştürücüler tarafından algılanması ile belirlenebilir. Örneğin amperometrik bir biyosensör sisteminin sinyal dönüştürücüsü ile elde edilen sinyal akım olarak ölçülürken (Chauhan vd. 2014), potansiyometrik bir biyosensör sisteminde sinyal voltaj olarak (Zhang vd. 2014), floresans bir biyosensör sisteminde ise sinyal ışık şiddeti (Li vd. 2014) olarak belirlenecektir.

Çizelge 2.1 Biyosensör sistemlerinde sinyal dönüştürücü örnekleri ve bu sistemler ile ölçülebilen sinyaller

Sinyal Dönüştürücü Türü	Sinyal
Elektrokimyasal • Amperometrik • Konduktometrik • Potansiyometrik • İmpedimetrik	• Akım • İletkenlik • Voltaj • İmpedans
Optik • Kalorimetrik • Luminesans • Floresans • Yüzey plazmon rezonansı	• Renk • Işık şiddeti • Işık şiddeti • Işık şiddeti
Kütle • Piezoelektrik • Yüzey akustik dalgası	• Frekans değişimi • Frekans değişimi

Amperometrik biyosensörler bir substratın oksidasyon veya redüksiyonu sonucu oluşan akımı ölçer. Genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır (Telefoncu 1999). Amperometrik biyosensörlerdeki en önemli faktör biyokatalizator ile elektrot veya varsa iletken polimer arasındaki elektron akışıdır. Bu işlemi iletken polimerler en iyi şekilde başarırlar. Amperometrik biyosensör sistemlerine en uygun enzimler oksidazlar, dehidrogenazlar yani oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir (Clark 1987). Kondüktometrik biyosensörlerde; elektriksel alanın varlığında bir çözeltide elektrik yükü, iyonlar tarafından taşınır. Çözeltinin iletkenliği çözeltideki tüm iyonik türlerin katkısıyla oluşur. Optik biyosensörler iletici sistem olarak optik lifler üzerine uygun bir yöntemle uygun bir molekülün immobilize edilmesiyle hazırlanan aygıtlardır. Etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişimin ölçümünü esas alır. Piezoelektrik sensörler en genel anlamda karakteristik rezonans frekansındaki farklanmayı belirleyerek bir piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan örneğin kütesinin ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensörün seçiciliği, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik etkileşime sahip analitin birikimiyle ilişkilidir. Sensör yüzeyinde bir madde adsorblandığı veya biriktiği zaman piezoelektrik kristalin rezonans frekansındaki değişimin ölçülmesiyle sonuca ulaşılır.

2.4.2 İmmünosensörler

Antijenlerin antikorlar tarafından moleküler düzeyde tanınarak stabil bir kompleks oluşturması sıvı formdaki immünoassayler ve katı form immünosensörlerin temelini oluşturmaktadır. İki analitik teknik için de altı çizilmesi gerekli olan bilgi; iki tekniğinde ligand bağlama reaksiyonuna bağlı olduğudur. Tüm immünosensör sistemleri için analit ölçümünün spesifikliği bağlayıcı molekülün gücüne ve bağlayıcı molekülün sensöre ne şekilde uygulandığı ile alakalıdır.

Doğrudan immünosensörler, sinyalde doğrudan değişim meydana getiren antikor-antijen kompleksi oluşturan sistemlerdir. Çözeltide hedef analit vardır ve sensör matriksi üzerinde bulunan antikor ya da antijen ile spesifik olarak etkileşir. Bu kompleks form sistemde hedef analitin ölçülmesine olanak sağlayacak fiziksel bir

değişim oluşturur. Doğrudan olmayan immünosensörler, bağlanma olayının gözlenebilmesi için antikor ya da antijene konjuge edilen işaretleyicilere ihtiyaç duyar. İşaretleyici olarak glukoz oksidaz, peroksidaz gibi enzimler, ferrosen gibi elektrokimyasal aktif moleküller ya da fluorescein, rodamin, fosforesans porfirin boya ları gibi floresans işaretleyiciler kullanılabilir (Luppa vd. 2001).

İmmünosensörler ölçüm şekline göre 4 ana türe ayrılır: Elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, termometrik. Bu immünosensörler tasarımlarına göre direkt ölçüm ya da indirekt ölçüm özelliklerine sahip olabilir.

2.4.2.1 Optik İmmünosensörler

Optik immünosensörler günümüzdeki kullanım alanları itibariyle en çok kullanılan ve tercih edilen immünosensör türüdür. Hızlı sinyal üretimi ve okumasına sahip olması nedeniyle en önemli avantajıdır. Işık sensörün algılayıcı yüzeyinden yansıtıldığında adsorpsiyonda, floresans şiddette, luminesans şiddette, refraktif indekste (RI) değişim gözlemlenir. Sensörün çalışma prensibi bu değişimin ölçülmesine dayanır. Optik immünosensörler arasında en popüler olan metot Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) tekniğidir. SPR, metal yüzeyine yakın ortamın refraktif indeksindeki değişimleri ölçen optik bir tekniktir. Algılama ögesi genellikle altın ya da gümüş olan yaklaşık 50 nm kalınlığındaki ince film tabakasını kaplayan teşhis elementinden oluşmuştur. Katı ara yüzeyindeki etkileşimleri yerinde ölçen SPR hızlı, işaretlemeye gerek göstermeyen, yüksek duyarlılığa sahip, gerçek zamanlı ölçüm yapma gibi avantajlarından dolayı biyomoleküler etkileşimlerin karakterizasyonunda güçlü bir araç olma özelliğindedir (Luppa vd. 2001).

2.4.2.2 Piezoelektrik İmmünosensörler

“Piezo” kelimesi Yunanca sıkmak anlamına gelmektedir. Piezoelektrik elemanlar bir dış kuvvet altında kaldıkları zaman, karşılıklı yüzeyleri üzerinde bir elektrik yükü oluşur. Doğal ya da işlenmiş kuvartz kristali en hassas ve kararlı piezoelektrik malzemelerden

biridir. Doğal malzemelerin yanı sıra yüksek teknolojilerle üretilen polikristalin ve piezoseramik gibi malzemeler de yüksek elektrik alanına maruz bırakıldıklarında piezoelektrik özellik kazanmaları sağlanabilmektedir. Bu kristaller çok yüksek değerde yük çıkışı üretirler. Bu özellikleri sayesinde de özellikle düşük genlikli sinyallerin ölçülmesinde kullanılırlar.

Piezoelektrik immünosensör sınıfının en popüler metodu QCM (Kuartz Kristal Mikrobals) tekniğidir. Piezoelektrik biyosensör uygulamalarında genellikle analizi yapılacak madde ile spesifik olarak tanıma reaksiyonuna girecek molekül kristal yüzeyine immobilize edilir. İmmobilizasyondan sonra kristal yüzeyinde meydana gelen kütle artışından dolayı kristalin titreşim frekansı düşer. Bu mantıktan yola çıkarak analizi yapılacak maddenin ortamda bulunmadan önceki immobilizasyon ile analizi yapılacak maddenin ortamda bulunduğu immobilizasyon için ölçümler yapılır. Frekans değerleri arasındaki fark hesaplanarak kristal yüzeyine adsorplanan madde miktarı Sauerbrey eşitliğinden yola çıkılarak hesaplanır.

2.4.2.3 Termal İmmünosensörler

Çoğu kimyasal ve biyokimyasal proses, ısıнын absorpsiyonunu ve üretilmesini içerir. Bu ısı değişimi, ya bir termistörle ya da bir termofille ölçülebilir ve var olan maddenin miktarıyla ilgilidir. Bir termistör bir metal oksit, bir termofil bir silikon-altın materyal içerir. Cihaz, biyoreseptör ile kaplanır ve bu, analit ile etkileşime girdiğinde, bir sıcaklık değişimi olarak kaydedilen bir ekzotermik reaksiyon meydana gelir. Kalorimetrik esaslı bir biyosensör kullanılarak farklı moleküllerin enzimatik reaksiyonlarının mümkün olabileceğini belirlemişlerdir. Bu teknolojinin en belirgin avantajı, türbit örneklerde kullanılabilir olması, kolay minyatürize edilebilmesi ve direkt sistemde kullanılabilir olmasıdır.

2.4.2.4 Elektrokimyasal İmmünosensörler

Literatürde ölçüm türlerine göre immünosensörler incelendiğinde en büyük payın elektrokimyasal ölçüme dayalı immünosensörlere ait olduğu görülmektedir. Yüksek seçicilik, kullanım kolaylığı, düşük tayin limiti bu immünosensör türünün avantajları arasındadır. Elektrokimyasal sensörler 3 ana türde incelenmektedir: Potansiyometrik, Amperometrik ve İmpedimetrik.

Potansiyometrik biyosensörler, referans elektroda karşı çalışma elektrodundaki potansiyellerin ölçümü üzerine temellenir. Potansiyometrik sistemler iyon seçici elektrottaki, iyonik bir reaksiyon nedeniyle oluşan potansiyel değişimini ölçer. Çalışma elektrotunun elektrot yüzeyi seçicilik için modifiye edilmiştir. Potansiyel farkı, çalışma elektrodu ile referans elektrot arasında akımın geçmediği bir anda ölçülür. Ölçülen potansiyel farkı Nernst eşitliği ile ifade edilir ve tanımlanan iyonun aktivitesine bağlıdır. Nernst eşitliği bütün potansiyometrik ileticilerin temel prensiplerini oluşturur.

Amperometrik elektrotlar, biyosensörler arasında en yaygın olarak kullanılan ve en çok ticari örnekleri olan sınıftır. Biyosensörlerle özellikle de amperometrik transduserlerle ilgili çalışmalar Clark tarafından 1956 yılında yayınlanan bir çalışma ile başlamıştır. Bu çalışmada, Clark elektrodu olarak adlandırılan oksijen elektrodunun duyarlı yüzeyine glukoz oksidaz (GOx) enzimi yerleştirilmiş ve yarı-geçirgen diyaliz membranla bu elektrot kaplanmıştır. Aynı çalışmada Clark ve Lyons tarafından enzim elektrot terimi ilk kez kullanılmıştır. Amperometrik biyosensörler, genel olarak, sabit bir potansiyelde, elektrokimyasal bir hücrede ya akım değerinin ya da yoğunluğunun ölçümü üzerine temellenmektedir. Akım yoğunluğu, platin, altın ve karbon gibi bir çalışma elektrodu yüzeyinde indirgenen ya da yükseltgenen elektrokimyasal olarak aktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur (Thevenot vd. 1999). En çok kullanılan amperometrik biyosensörler enzim temelli amperometrik elektrotlardır (Castillo vd. 2004).

Bataillard vd. 1988 yılında antijen/antikor kompleks oluşumunu impedans kullanarak raporlayan ilk grup oldu (Lisdat ve Schafer, 2008). Bu kompleksin elektrot yüzeyinde

oluşumunun dielektrik tabakası kalınlığında artışa ve kapasitansta düşüşe neden olduğunu açıkladılar. Daha sonra diğer gruplar da kapasitif biyosensör çalışmalarıyla literatüre katkıda bulundular. Örneğin 1997 yılında Mirsky vd. tiyol modifiye altın elektrotlar kullanarak antikorları elektrot yüzeyine immobilize ettiler ve bu sistemi HSA (human serum albumin, insan serum albumin) ölçümü için kullandılar. Bütün elektrokimyasal biyosensörlerde olduğu gibi, impedimetrik biyosensörler biyomoleküllerin kondüktif bir (veya yarı kondüktif) transduser yüzeyiyle etkileşimini kullanan biyoelektronik cihazlardır. Ölçüm prosesleri, reseptör biyomolekül ile analit arasında oluşan algılama yüzeyinin, elektronik transduserin elektriksel özelliklerini direkt veya indirekt şekilde değiştirmesine dayanır. Antijen-antikor veya DNA-DNA etkileşimleri gibi sınırlı katalitik aktiviteye sahip bileşiklerin analizi için geliştirilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) temelli biyosensörlerin sayısı literatürde her geçen gün daha da artmaktadır. İmpedimetrik immünosensörlerin geliştirilmesinde itici güç, basit ekipmanların kullanıldığı tanı sistemlerine (*point of care diagnostics*) olan talep ve potansiyel moleküler etiketsiz analizler (*label free*)dir. İmmünsensörler için iki immobilizasyon stratejisi sıklıkla kullanılır. Sensör ilgili antijeni bağlayan antikorlarla modifiye edilebilir ya da antijenin kendisi immobilize edilebilir. Daha sonra bu antijen tamamlayıcı antikorunu bağlar. Her iki durumda da, bağlanma olayı elektriksel yüzey özelliklerinin değişimiyle sonuçlanacak olmasına rağmen, ikinci durumda (antijen immobilizasyonunda) antikorların yüksek molekül ağırlıkları ve düşük dielektrik katsayılarından ötürü daha büyük değişimler açığa çıkarabilir ki bu impedimetrik olarak çok daha etkili bir şekilde izlenebilir.

2.4.3 Biyosensörlerin hazırlanmasında immobilizasyon metotları

Enzimlerin, teknik kimya ve biyoteknolojide çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlaması ile bilim adamları, enzimlerin daha ekonomik ve daha kullanışlı hale getirilme olanaklarını araştırmaya yönelmişlerdir. Bu nedenle serbest enzimlerden daha fazla yararlanabilmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir.

Kelime anlamı olarak immobilizasyon, hareketi sınırlandırmak demektir. İmmobilize edilmiş enzimlerin hareketleri sınırlandırılmıştır. “İmmobilize” terimi yerine

“tutuklanmış”, “çözünmez hale getirilmiş”, “bağlanmış” gibi terimleri kullanmaktadır. İmmobilize enzim, genel bir isim olup, diğerleri yalnız alt bir immobilizasyon yöntemini ifade etmektedir.

Enzimler suda çözünen, spesifik katalizörlerdir ve endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirilir. Bu nedenle enzimler, suda çözünmeyen bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak, suda çözünmeyen ürün veren bir kopolimerizasyona enzim molekülünün monomer olarak katılmasıyla ve suda çözünmeyen bir matriks veya suda çözünmeyen mikrokapsüllerde tutuklanarak immobilize edilirler (Telefoncu 1997).

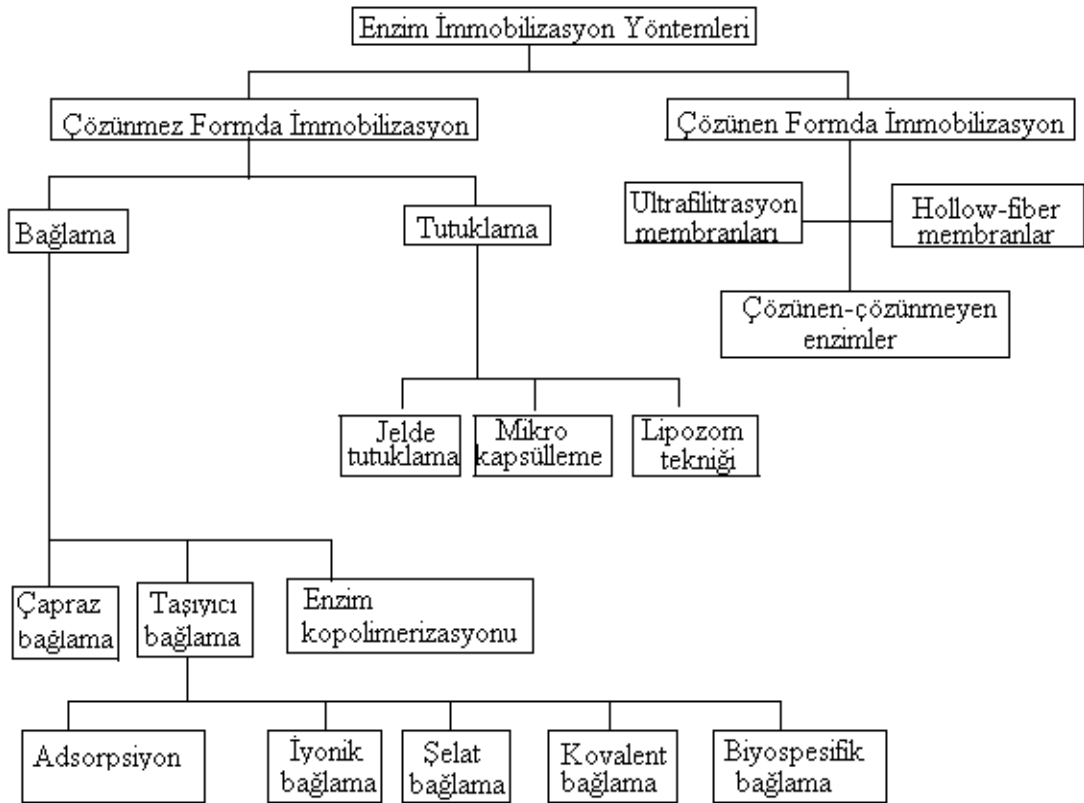
Enzimin üründen ayrılması daha kolaydır, multienzimli reaksiyon sistemleri geliştirilmiştir, dış etkilere karşı dayanıklıdır. Bunların yanında immobilize enzimin serbest enzime göre üstünlüklerini daha açık bir şekilde şu şekilde sıralayabiliriz;

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme vb.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık vs.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemler uygulanabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha karardır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır.

Enzim immobilizasyonunda doğal ve sentetik birçok organik ve inorganik materyal kullanılmaktadır. Taşıyıcı membran, suda çözünmeyen katı veya polimer olabilir. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak olan taşıyıcıda aranan özellikler aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

- Hidrofilik karakter,
- Gözenekli yapı,
- Suda çözünmeme,
- Mekanik kararlılık ve yeterli gözenek büyüklüğü,
- Kimyasal ve termal kararlılık,
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik,
- Rejenere olabilme,
- Ucuzluk,
- Biyouyumluluk,
- Kovalent bağlamada kullanılacak olan taşıyıcılar uygun koşullarda reaksiyon verebilen, fonksiyonel gruplar taşımalıdır.

İmmobilizasyon yöntemleri çeşitli şekillerde sınıflandırılmakla beraber şekil 2.19’da verildiği gibi sınıflandırmak mümkündür.

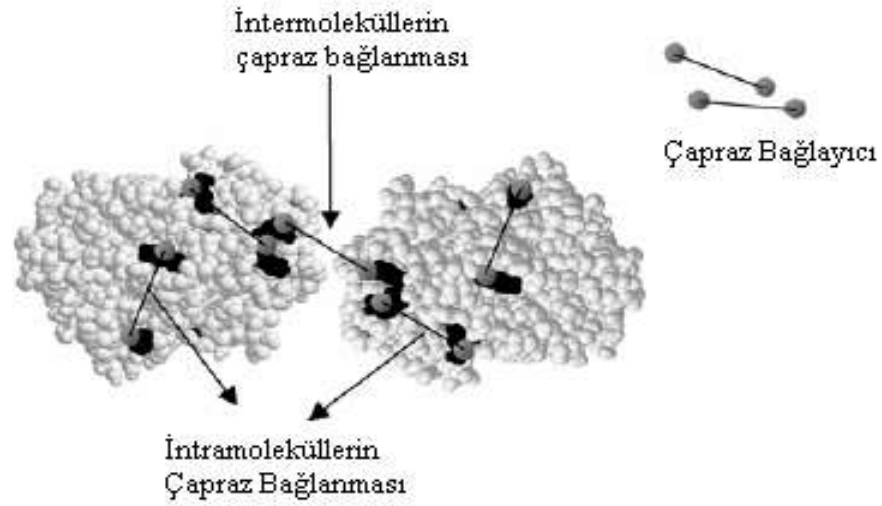


Şekil 2.19 Enzim immobilizasyon yöntemleri (Telefoncu 1997)

Enzim immobilizasyon yöntemleri; çözünmez formda immobilizasyon ve çözünen formda immobilizasyon olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.

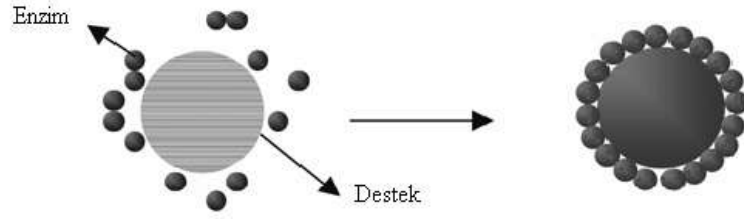
2.4.3.1 Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri

Çözünmez formda immobilizasyon yöntemleri, bağlama ve tutuklama olarak ikiye ayrılmaktadır. Çapraz bağlamada küçük molekülü iki veya daha çok fonksiyonel grupları olan reaktifler enzim molekülleri arasında çapraz bağ yapmaktadırlar (Şekil 2.20).



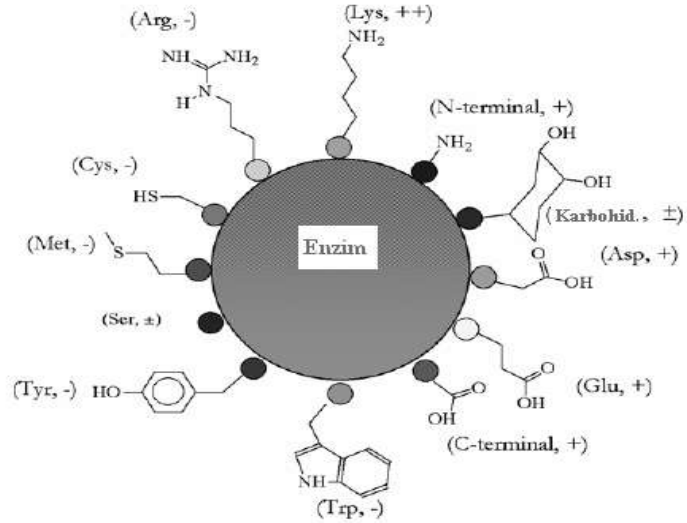
Şekil 2.20 Çapraz bağlama ile immobilizasyon

Enzim kopolimerizasyonunda enzimler, bir kopolimerizasyon reaksiyonunda monomerlerden biri gibi davranarak matrikse bağlanmaktadır. Taşıyıcıya bağlama ise kendi içinde adsorpsiyon, iyonik bağlama, şelat bağlama, kovalent bağlama ve biyospesifik bağlama olarak beş gruba ayrılmaktadır. Adsorpsiyon, yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın, enzim çözeltisi ile karıştırılması ve enzim fazlasının yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Şekil 2.21).



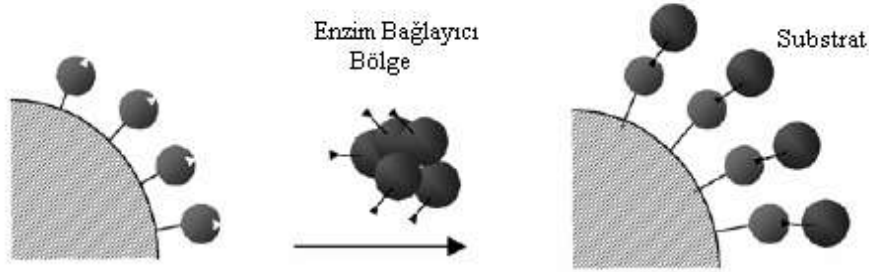
Şekil 2.21 Enzimin desteğe adsorpsiyon metoduyla bağlanması

İyonik bağlama, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanmasıdır. Şelat bağlama, bazı geçiş metallerinin (Titan (III), Titan (IV), Zirkonyum (IV)) şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin taşıyıcılara bağlanması sağlanmaktadır. Kovalent bağlamada enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanması, enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşmektedir (Şekil 2.22).



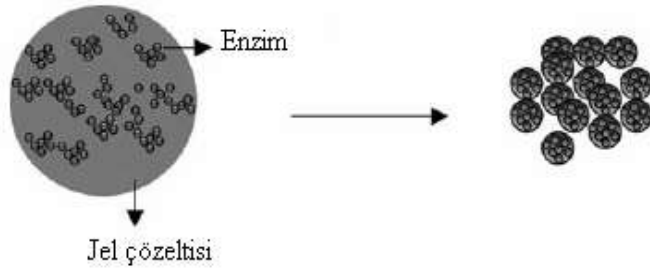
Şekil 2.22 Reaktif aminoasit kalıntıları: (+) enzim immobilizasyonunda sıkça kullanılır; (-) enzim immobilizasyonunda kullanılmaz; (±) enzim immobilizasyonunda çok sık kullanılmaz; (++) enzim immobilizasyonunda çok sık kullanılır.

Biyospesifik bağlama yönteminde, enzimlerin antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimler ile immobilizasyon yapılmaktadır (Şekil 2.22), (Telefoncu 1997).



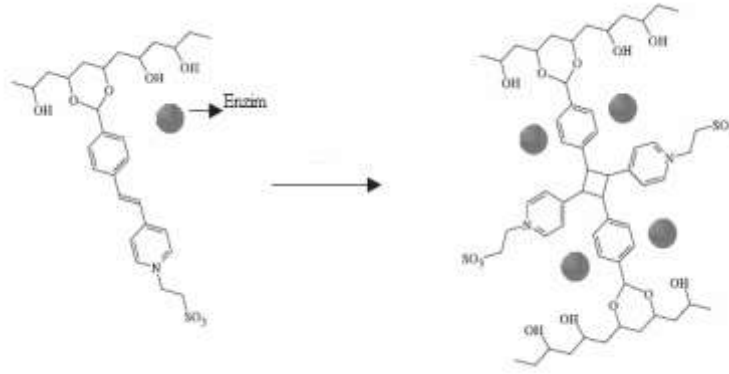
Şekil 2.23 Biyospesifik bağlanma ile immobilize edilen enzimin substratı ile etkileşimi daha fazladır

Tutuklama yönteminde enzim molekülü belirli bir ortamda durmaya zorlanmaktadır. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde yapıldığı gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve misellerle de yapılabilir (Şekil 2.23), (Telefoncu 1997).



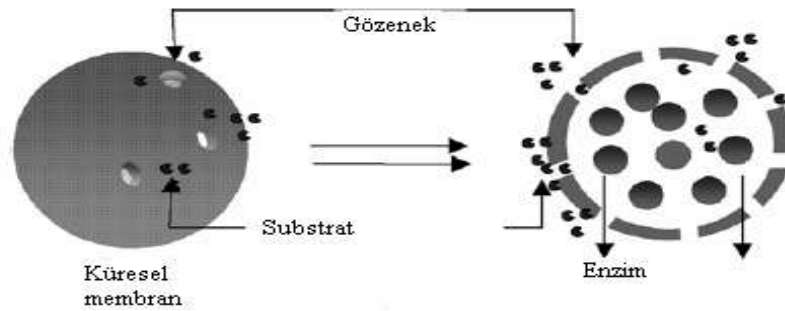
Şekil 2.24 Enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu

Tutuklama yöntemi polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olmak üzere üç alt grupta incelenmektedir. Polimer matrikse tutuklama, polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda enzimin de bulunması durumunda çapraz bağlama sonucu oluşan yapıda enzimin tutulmasıdır (Şekil 2.24).



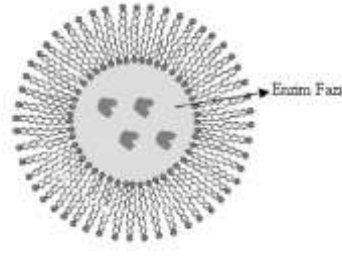
Şekil 2.25 Enzimin polimerler arasında tutuklanması

Mikrokapsülleme enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasıdır (Şekil 2.25). Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100 μ arasında değişmektedir. Yarı geçirgen membranın gözenek çapları, substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına izin verecek büyüklükte olmalıdır.



Şekil 2.26 Mikrokapsülleme ile enzim immobilizasyonu

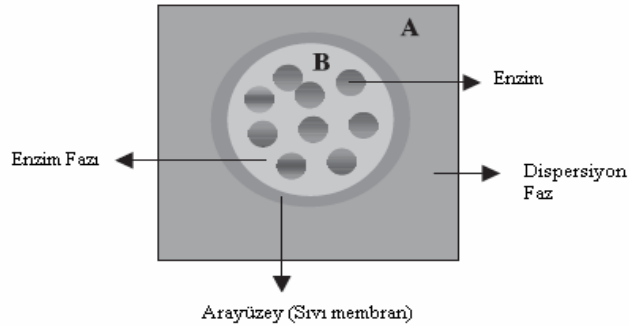
Lipozom tekniği sıvı-yüzey yapıcı membran temeline dayanmaktadır. Süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel bir yöntemdir (Şekil 2.26). Oldukça büyük bir temas yüzeyine sahip olup, aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak verir. Bunların yanında, substrat ve ürünün membrandan geçişinin çözünürlüğe bağımlı olması, işlem sırasında enzimin aktivite kaybetmesi ve sıvı olan membrandan enzim sızıntısı olasılığı bulunmaktadır.



Şekil 2.27 Enzimlerin immobilizasyonu için lipozom kapsül

2.4.3.2 Çözünen formda immobilizasyon yöntemi

Enzimin herhangi bir taşıyıcıyla fiziksel veya kimyasal etkileşiminden çok, yarı geçirgen bir zarla çevrelendiği ve enzime geniş bir hareket alanının sağlandığı yöntemdir. Enzim taşıyıcıya herhangi bir bölgesinden bağlanmadığı için moleküler geometrisi, esnekliği ve dolayısıyla katalitik etkinliği değişmemektedir. Ancak, substratın membrandan geçip enzime ulaşmasında kısıtlamalara rastlanmaktadır. Bu nedenle küçük moleküllü substrata sahip olan enzimlerin bu yöntemle immobilize edilmesi tercih edilebilir.



Şekil 2.28 Çözünür formda immobilizasyon

Kullanılan immobilizasyon tekniği ne olursa olsun immobilize edilen enzimden beklenen özellikler şunlardır:

- Yüksek kararlılık,
- Tekrar kullanılabilirlik,
- Sürekli üretime olanak vermesi,
- Reaksiyon kontrolüne olanak vermesi,
- Yüksek saflık,
- Yüksek ürün yüzdesi,
- Ekonomik olması.

2.5 Antikorlar

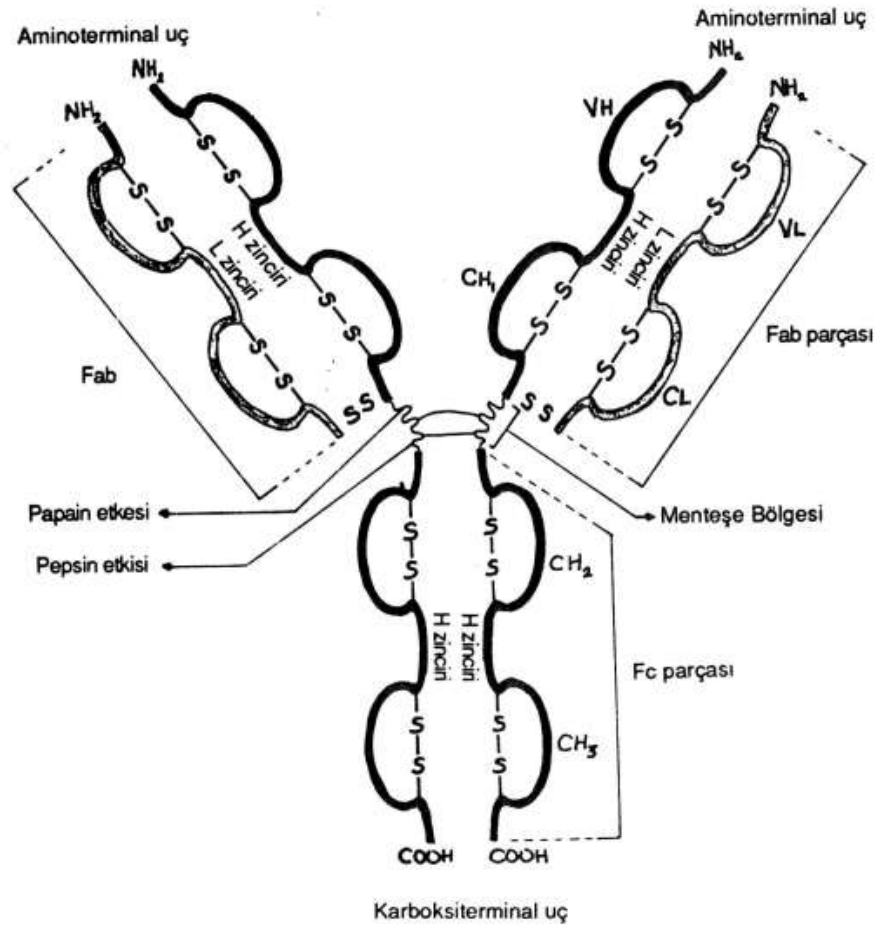
Antikorlar, vücuda giren yabancı moleküller, hücreler için üretilen glikoprotein yapısında moleküllerdir. Bu moleküller immün sistem elemanlarından olan B hücreleri tarafından üretilirler. Antikorların başlıca iki görevi vardır: Birincisi, vücuda giren yabancı moleküle (antijene) bağlanmak. İkincisi, bağlanma gerçekleştikten sonra antijenin mevcut yapısını bozmak ve antijeni yok etmek. Kanda ve hücre dışı sıvıda bulunan antikorlar, hastalıklara yol açabilen bakterilere veya virüslere bağlanırlar. Bağlandıkları yabancı molekülleri, bedenin savaşçı hücreleri için işaretleyip etkisiz hale getirmiş olurlar. Antikor bağlanacağı antijene üç boyutlu bir yapıda, tıpkı bir anahtarla kilit arasındaki uyum gibi tam olarak oturur. Her antijen için uygun bir antikor metabolizma tarafından sentezlenir. Her patojene uygun özel bir antikor üretilmesi için, B hücrelerinin karşılaştıkları her antijeni çok iyi tanımaları ve yapılarını çok iyi bilmeleri gerekir. Bu kadar çeşitli antikor yapabilmenin sırrı immünoglobülin genlerinin düzenlenmesi ile değişik kombinasyonlar yapabilmesinde saklıdır.

İmmünoglobulinler (Ig), serum proteinlerinin globuler-globulin kesiminde bulunan proteinlerdir ve toplam plazma proteinlerinin % 20'sini oluştururlar. İmmünoglobülinler ya da antikorlar antijenik uyarım sonucu B lenfositlerin değişimi ile oluşan plazma hücreleri tarafından sentezlenir. Antikorlar fiziksel, kimyasal, immünolojik olarak incelendiğinde farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farklılıklar antikor moleküllerinin karbonhidrat miktarları, elektroforez hızları, molekül ağırlıkları, aminoasit içerikleri, taşıdıkları polipeptid zinciri gibi özellikleri içermektedir. Bu farklılıklara göre de birbirinden ayrı 5 farklı immünoglobülin türü sınıflandırılmıştır. Bunlar:

İmmünoglobülin G (IgG), İmmünoglobülin A (IgA), İmmünoglobülin M (IgM), İmmünoglobülin D (IgD) ve İmmünoglobülin E (IgE)'dir.

İmmünoglobülinlerin yaklaşık % 90'ı polipeptid, % 10'u karbonhidrattır. Bir Ig molekülü monomer adı verilen en az bir temel birimden oluşmaktadır. Basit olarak bir Ig molekülü elektron mikroskopunda incelendiğinde "Y" harfi şeklinde gözlemlenir. Bir temel birimden oluşan Ig molekülünde iki çeşit polipeptit zinciri vardır ve her bir çeşitten ikişer adet bulunmaktadır: Hafif zincir (Light, L zincir) ve Ağır zincir (Heavy, H zinciri). Hafif zincir molekül ağırlığı daha az olan zincirdir. Kappa ve lambda olmak üzere iki tipi vardır. Her iki tip L zinciri de tüm Ig moleküllerinde bulunabilir. Ancak bir Ig molekülünde hafif zincirler özdeştir ve biri diğerinden farklı olamaz. Yani bir Ig molekülünde bu iki tip hafif zincir türü aynı anda bulunamaz. Ağır zincir ise molekül ağırlığı fazla olan zincirdir. Beş Ig türünün de ağır zinciri birbirinden farklıdır. IgG gamma zinciri, IgM mü zinciri, IgA alfa zinciri, IgD delta zinciri ve IgE epsilon ağır zincirini içerir.

Ig molekülünde hafif zincirler "Y" harfinin kol kısımlarında, ağır zincir ise hem kol hem de gövde kısmında bulunabilirler. Kollarda hafif ve ağır zincir arasında, gövdede ise iki ağır zincir arasında bulunan disülfid bağları polipeptit zincirleri bir arada tutarak Ig molekülünü oluştururlar. Ağır ve hafif zincirlerde her polipeptid zincirinde olduğu gibi bir amino terminal uç ve bir karboksi terminal uç bulunur. "Y" harfinin kol kısımlarının uçları amino terminal uçlardır ve antijenler bu kısımlara bağlanabilirler. Bu kol kısımlarının uç bölgelerindeki aminoasit dizilimleri değişkenlik gösterdiğinden bu kısımlar "variable" yani değişken, V bölgesi olarak adlandırılabilirler. İmmünoglobülinler spesifik bir antijen için sentezlendiği için bu kısımlar ilgili antijene spesifiklik gösterecek şekilde sentezlenir. İmmunoglobulin molekülü, ağır ve hafif zincirlerden oluşan Fab (antigen binding fragments) parçasından, antijenle spesifik olarak birleşir. Polipeptit kısımlarının geri kalan bölümlerinde değişkenlik göstermediğinden "constant" yani sabit, değişmez ya da C bölgesi olarak adlandırılır.



Şekil 2.29 İmmünoglobülinin şematik yapısı

Antijen-antikor birleşmesinin özelliklerine bakıldığında antijen-antikor bağlanması bu bölümün en başında da söylenildiği gibi özgüdür. Bir antijen sadece oluşumuna neden olduğu antikoru ile birleşebilir. Antijen-antikor birleşmesi antijen yüzeyindeki epitop ile antikor molekülünün Fab kısmının ucundaki V bölgesi arasında olur. Bu birleşmede çok kuvvetli olmayan, düşük enerjili bağlar rol oynar. Bunlar; hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimlerdir. Elektrostatik etkileşimler, polaritesi yüksek moleküller arasında dipol-dipol etkileşimleri veya yüklü moleküller arasında ya itici ya da çekici kuvvetler olabilirler. Proteinlerde polipeptit omurgasının karbonil grupları ve polar aminler kalıcı dipollere yol açar. Ayrıca polar ve yüklü zincir bölgeleri dipollere katkıda bulunur. Hidrojen bağları elektrostatik etkileşimlerin bir alt grubu olarak düşünülür. Hidrojen bağları elektronegatifliği yüksek bir proton alıcı üzerindeki bağlanmamış bir çift elektron ile elektronegatifliği yüksek bir proton verici arasında meydana gelir. Amin grupları proton verici olarak görev yapar ve

karbonil grupları bir proton alıcı olarak iş görür. Bu hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler bağlanmanın gücüne katkıda bulunurlar ve sulu çözeltide bu etkileşimler, moleküller arası kararlılık için oldukça fazla katkıya sahiptirler. Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimlerden daha zayıf dipoller arasında meydana gelir. Yakın moleküllerin elektrik alanları bu kuvvetlerden sorumlu geçici dipollerin oluşumuna sebep olur. Bu etkileşimler kısmen zayıf olmasına rağmen, birçok etkileşimden meydana geldiği için toplam bağlanma şiddetinin % 50'sini oluşturabilir (Martin 2001).

İmmün sistemin iki önemli elemanı olan B lenfosit ve T lenfositler kemik iliğindeki kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasıyla oluşurlar. B lenfositler kemik iliğinde olgunlaşırken, T lenfositler timusta olgunlaşır. Olgunlaşan B hücreleri kanda ve lenfatik sistemde dolaştıktan sonra dalak ve lenf düğümlerinde toplanırlar. Olgunlaşmış B hücresinde ağır ve hafif zincirlerin sentezinden sorumlu gen parçaları farklı kromozomlarda yerleşmişlerdir.

Antijen-antikor reaksiyonu tersinir bir reaksiyondur ve bu reaksiyon iki parametreye bağlıdır: Antikorum antijene olan afinitesi ve antikor miktarı. İmmün yanıtın gelişmesi sürecinde antikor miktarı hücre çoğalmasına paralel olarak artar. Antikorum afinitesi "afinite olgunlaşması" denilen bir süreçte gitgide artış gösterir. Bu olay, söz konusu antikorum sentezlenmesinde kullanılan "variable" V gen bölgesinde meydana gelen mutasyonların sonucudur. Böylece immün yanıt geliştikten 3-4 ay sonra sentezlenecek antikorum hem miktarı hem de afinitesi başta sentezlenen antikora göre oldukça yüksektir.

2.5.1 İmmünoglobülin G

IgG vücutta bulunan immünoglobülinlerin % 75'ini, serum proteinlerinin yaklaşık % 20'sini oluşturur. Bakteriyel ve viral etkenlere karşı plazma hücreleri tarafından üretilen IgG sınıfı immünoglobülinlerin toplam miktarının % 65'i ekstrasvasküler, geri kalan % 35'lik kısmı intravasküler kısımda bulunur.

IgG'nin dört polipeptid zinciri vardır: büyük olan ikisi ağır zincir olarak adlandırılır; iki hafif zincir, kovalent olmayan ve disülfid bağlarıyla bağlı 150 kDa molekül ağırlığında bir kompleks oluşturur. IgG molekülünün ağır zincirleri bir noktada etkileşir ve daha sonra hafif zincirlerle ayrıca etkileşmek için dallanır ve Y şeklinde bir molekül oluşturur. IgG tabanını dallarından ayıran menteşeler proteazlarla yarılabılır (Lehninger, 2014).

IgG B hücreleri tarafından başlatılan ikincil immün cevapta ana antikordur. B hücresi, humoral bağışıklık yanıtında büyük bir rol oynayan lenfositlerdir. Bu hücreler ilk defa 1960'larda kuşlarda tespit edilmişlerdir. 'B' kısaltması, kuşlarda bu hücrelerin olgunlaştığı organ olan Bursa Fabricius'dan gelmektedir. IgG daha önce karşılaşılan ve temas edilen antijenlere organizmanın süren immünitesini oluşturduğu için kanda en bol bulunan immünoglobülinidir. IgG, saldıran bir bakteri veya virüse bağlandığında saldırganı yok eden makrofajlar gibi belli lökositleri aktifleştirir. Makrofajların hücre yüzeyindeki başka reseptör sınıfları da IgG'nin Fc bölgesini tanır ve bağlar. Fc reseptörleri bir antikor-patojen kompleksine bağlandığında makrofaj, fagositozla kompleksi yok eder.

IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ olmak üzere 4 ana alt sınıfı vardır. IgG'nin %60-70'ini oluşturan IgG₁, plasentayı aşabilen temel immünglobülinidir. IgG sınıfı antikorlar vücudun bakteri, virüs, toksin gibi yabancı moleküllere karşı uzun süreli korunmasını sağlar. Bu nedenle IgG miktarındaki düşüş vücudun enfeksiyonlara karşı direncinde de azalma meydana getirir.

Yeni doğanlarda serum IgG konsantrasyonu annenin serumunda bulunan IgG konsantrasyonunun % 110' u civarındadır. Ancak doğumdan sonraki sürede düzenli bir şekilde seviyesi azalır. 2-4 aylar arasında 200-300 mg/dl seviyesine kadar indikten sonra yeniden yavaş yavaş yükselir ve 2-3 yaşlarında yetişkin insan konsantrasyonu seviyesine ulaşır.

IgG seviyesi, kronik veya tekrarlayan enfeksiyonlarda, kronik karaciğer hastalıklarında, Sjögren, Sistemik Lupus Eritematosus (SLE), romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklarda, sarkoidozda ve bazı parazitik hastalıklarda artar. Bazı genetik, konjenital immün yetmezlik durumlarında, AIDS gibi sonradan oluşan immün yetmezlik durumlarında, vücuttan nonselektif protein kaybına neden olan durumlarda serum IgG düşük bulunur.

Nörolojik hastalıkların araştırılmasında kan ve BOS numunelerinde IgG ölçümü yol göstericidir. Multiple Skleroz (MS) ve merkezi sinir sistemi sifilizinde IgG seviyesinde artış gözlenebilir. Ancak kesin tanımlar için daha detaylı analizler ve testler yapıldıktan sonra bu sonuçlar birbirleriyle kıyaslanır.

İmmün yetmezlik durumu olan kişilerde intravenöz yoldan Ig (IVIG) tedavisi uygulanır. IVIG tedavisi ilk kez Amerika'da 1981 yılında FDA onayı almış ve öncelikle hipogamaglobunemi ile seyreden immün yetmezlik tablolarının tedavisi için önerilmiştir. Ticari bir IVIG preparatı % 95 ve üzeri IgG, % 2.5'dan az oranda IgA içermektedir. IVIG tedavisi hastalara günümüzde kişinin sık enfeksiyon geçirmesini önleyecek en düşük dozda uygulanır. Ancak otoimmün hastalıklara sahip kişilerde kilogram başına 1-2 gramı bulabilen yüksek doz Ig tedavileri uygulanmaktadır. IVIG tedavisi uygulanan hastalarda serum IgG düzeyinin düzenli olarak takibi tedavide doz belirlenmesi ve hastalığın seyrini görmek açısından önemlidir (Schwartz 2000).

Çizelge 2.2'de normal kişilerin BOS ve serum numunelerinde belirli yaş grupları arasında sahip oldukları referans IgG değerleri gösterilmektedir. Referans değerler kalorimetrik yöntem ile tespit edilmiştir.

Çizelge 2.2 Serum ve BOS numunelerinde yaşa bağlı IgG seviyeleri

Serum	Yaş	Referans Aralık
	0-1	2.32-14.11 (g/L)
	1-3	4.53-9.16 (g/L)
	4-6	5.04-14.64 (g/L)
	7-9	5.72-14.74 (g/L)
	10-11	6.98-15.60 (g/L)
	12-13	7.59-15.49 (g/L)
	>20	7.00-16.00 (g/L)
BOS	<15	1.50-5.50 (mg/dl)
	15-60	3.30-6.10 (mg/dl)
	>60	4.20-5.50 (mg/dl)

2.6 Çalışmada Kullanılan Biyomoleküller, Taşıyıcı Sistemler, Nanopartiküller ve Çapraz Bağlayıcılar

2.6.1 Protein A (PrA)

Protein A (PrA) patojen özellikteki *Staphylococcus aureus* bakterisi tarafından üretilen oldukça kararlı hücre yüzey reseptörüdür. Moleküler ağırlığı 42 kDa olan, glutamik asit ve aspartik asit aminoasitlerince zengin, tekrarlayan dört bölgeyi içeren tek polipeptit zincirinden oluşur. PrA sadece dört tane tirozin rezidüsü içerirken, yapısında triptofan bulundurmamaktadır.

PrA immünoglobülinlere-özellikle IgG-Fc bölgesinden bağlanma özelliğine sahiptir. PrA yüksek düzeyde homolog özellik gösteren beş adet IgG bağlayıcı bölge içermektedir. Bu özelliğiyle *Staphylococcus aureus* IgG'yi kendine bağlayarak immüniteden kaçır. Bir PrA molekülü eş zamanlı olarak en az iki IgG molekülünü bağlayabilir. PrA molekülünün IgG bağlayan bölgesi üç adet anti paralel alfa heliks içermektedir. PrA IgG molekülünün Fc kısmından kompleks oluşturduğunda üçüncü

alfa heliks yapısı bozulur. PrA aynı zamanda maymun, tavşan, domuz, kedi, köpek gibi türlerin IgG moleküllerini de bağlayabilmektedir (Lindmark 1983).

PrA ısıya dayanıklı ve denatüre edici kimyasallara karşı (4 M üre, 4 M tiyosiyanat, 6 M guanidin) doğal konformasyonunu koruma özelliğine de sahiptir (Sjoholm 1975).

Aynı zamanda PrA anti-tümör, toksik, kardiyojenik aktivitelerinde dahil olduğu pek çok biyolojik fonksiyona dahil olmaktadır. PrA tüm bunların yanı sıra immün modülatör, antifungal ve antiparazitik özelliklere de sahiptir.

PrA antikor bağlayıcı bölgesi hasar görmeyecek şekilde enzim markırları, biyotin, kolloidal altın gibi moleküllerle konjuge edilebilmektedir (Salehi vd. 2014, Zhang vd. 2013, Yokota 2010). Bu konjugatlar Ig assaylerinde ve western blot, ELISA gibi immünokimyasal assaylerde kullanılabilmektedir (Dahlbom vd. 2008). Ayrıca PrA bu tez çalışmasında da olduğu gibi katı bir matriks yüzeyine immobilize edilip biyosensör çalışmalarında kullanılabilmektedir (Emregül vd. 2013). PrA aynı zamanda IgG saflaştırılması amacıyla agaroz jellere immobilize edilmektedir (Coligen 1991, Lao vd. 2013).

2.6.2 Taşıyıcılar

2.6.2.1 Jelatin

Jelatin, hayvanların deri, kemik, kıkırdak ve tendon gibi bağ dokularında bulunan kolajenin kısmi hidrolizi sonucu elde edilen polipeptid yapıda bir polimerdir. Kolajenin asit (tip A jelatin) ve alkali (tip B jelatin) özellikteki çözeltilerle muamelesi sonucu jelatin elde edilmektedir. Bu işlemle moleküller arasındaki H bağları ve diğer çapraz bağlar zayıfladığı gibi bazı amino asitler arasındaki kovalent bağlar da kopar ve daha küçük moleküllü yapılar ortaya çıkar. Böylece, ortalama 300 - 350 kDa olan kollojen molekülünün ağırlığı, jelatinde 10 - 65 kDa'a kadar düşmektedir. Jelatin üretiminde esas amaç, suda çözünmeyen kolajenin hidrolize edilerek daha küçük parçalara bölünmesiyle

suda çözünür hale getirmek ve en iyi jelleşme özelliklerine sahip jelatinin elde edilmesini sağlamaktır. Jelatinin protein içeriği % 85 ile % 92 arasında değişmektedir.

Jelatin, 3000 ile 20000 arasında değişen molekül ağırlığına sahip, kollojen hidroliz ürünlerinin heterojen bir karışımıdır. Polipeptit bağında sıralı şekilde lisin-prolin-prolin ve glisin-prolin-hidroksiprolin amino asitlerinin tekrarı ile oluşan lineer bir polimerdir. Karboksil, hidroksil ve amin yan gruplarına sahip olan jelatin, jelleşme özelliğine sahiptir ve oldukça kolay bir şekilde çapraz bağlanabilir. Jelatin, biyouyumlu, toksik olmama, biyoetkin ve biyobozunur olma gibi özelliklere sahip olması nedeni ile önemli bir biyomedikal malzemedir. İlaç kapsülleme, yara örtü zarı ve ilaç salınım sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Peng vd. 2008; Rahman vd. 2010).

Jelatinin ticari olarak ucuz, biyouyumlu, biyobozunur olması ve çeşitli formlarda bulunması jelatinle ilgili birçok araştırma yapılmasına olanak sağlamaktadır. Jelatin köpük oluşumu, kremsilik sağlama ve emülsiyon stabilizasyonu amacıyla gıda endüstrisinde de çok fazla kullanılmaktadır.

2.6.2.2 Aljinat

Sodyum aljinat, potasyum aljinat, amonyum aljinat ve kalsiyum aljinat aljinik asitin tuzlarıdır. Aljinik asit, kahverengi deniz yosununun (*Laminaria*, *Macrocystis*) hücre duvarından elde edilir. Kalsiyum aljinat $(C_6H_7Ca_{1/2}O_6)_n$, amonyum aljinat $(C_6H_7O_6NH_4)_n$, potasyum aljinat $(C_6H_7KO_6)_n$ ve sodyum aljinat $(C_6H_7NaO_6)_n$ polisakkarit yapıdadır ve molekül ağırlıkları yüksektir. Aljinat (1→4) α -L-guluronik asit ve (1→4) β -D-mannuronik asit birimlerinden oluşan lineer polimer zincirlerdir. Hidrokolloid yapıda ve suda çözünür özellikte olan aljinatların ilk tanımlamasını 12 Haziran 1881'de İngiliz kimyager E.C.C Standford yapmıştır ve patentini almıştır. Günümüzde ise birçok gıda alanında uygulamaları görülen aljinatlar kıvam arttırıcı, emülsiyon stabilitesini sağlayıcı, jel oluşturucu, su almayı engelleyici ve ağızda dolgunluk hissi oluşturucu olarak kullanılmaktadırlar.

Sodyum, potasyum ve amonyum tuzları suda iyi, kalsiyum tuzu ise az çözünür özelliktedir. Aljinat çözeltilerinin viskozitesi ortam sıcaklığına, iyon yoğunluğuna, molekül ağırlığına ve metal iyonlarının varlığına bağlıdır. Aljinatların tamamı jel oluşturmazlar, fakat soğuk suda, kalsiyum iyonlarının varlığında ortamda geri dönüşümsüz jel oluşturabilmektedirler. Az miktarlardaki kalsiyum iyonları aljinat çözeltilerinin viskozitesini yükseltir ve yüksek miktarlar jelleşmeye neden olur. Aljinatların yapısı jelleşmeyi, jellerin sertliğini ve jelleşme süresini etkiler. Aljinat jelleri ısıya oldukça dayanıklıdır.

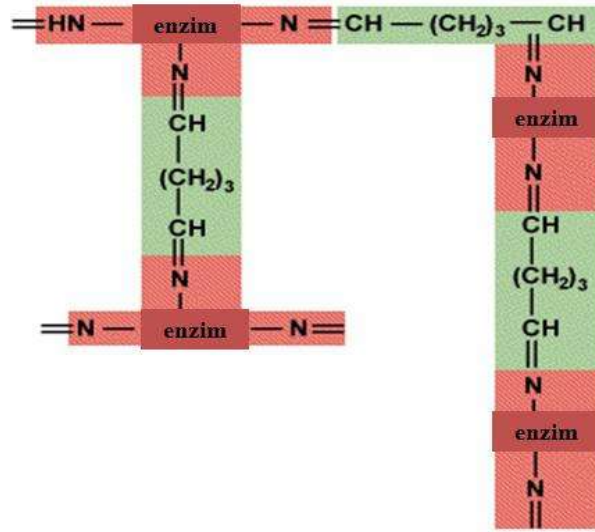
Aljinat moleküllerinde karboksil gruplarının iyonlaşma düzeyi pH düşürüldükçe azalır. Düşük pH da görülen iyonlaşmadaki azalma negatif yüklerin kaybına neden olur ve moleküller birbirleri ile reaksiyona girerek çözelti viskozitesini arttırmırlar. Çok düşük pH da ise arasındaki yaygın etkileşim sonucu aljinik asit çökerek çözeltiden ayrılır. Bu yüzden asitli ürünlerde aljinatlar kullanılmazlar.

2.6.3 Çapraz bağlayıcılar

Bu tez çalışmasında Jelatin-PrA immünosensörünün hazırlanmasında Glutaraldehit, Aljinat-PrA immünosensörünün hazırlanmasında ise N-hidroksisüksinimit/ 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit (EDC/NHS) çapraz bağlayıcıları kullanılmıştır.

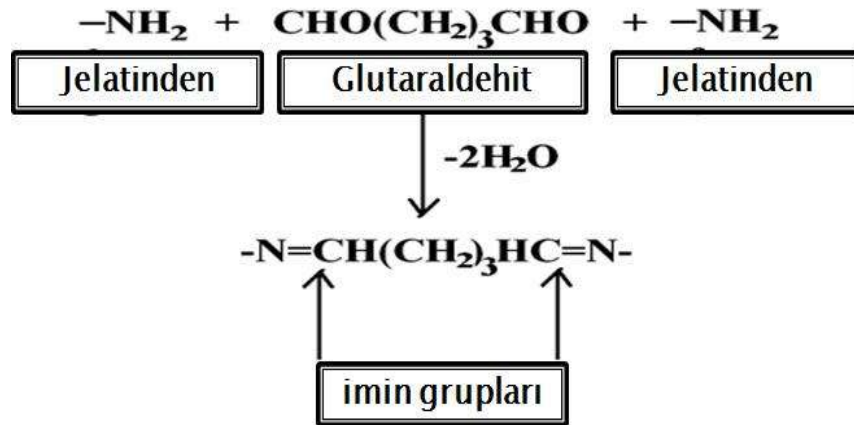
Glutaraldehit biyokimyasal çalışmalarda sık sık kullanılan keskin kokulu, renksiz bir sıvıdır. Biyokimyasal uygulamalarda amin-reaktif bifonksiyonel çapraz bağlayıcı olarak kullanılır. Proteinlerin oligomerik yapıları bu uygulamalarla incelenir.

Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi, serbest enzim molekülleri ile glutaraldehit homo çapraz bağlayıcı reaktifi kullanılarak çapraz bağlı enzim agregasyonları oluşturulur (Şekil 2.29).



Şekil 2.30 Glutaraldehit ile immobilizasyonun temel prensibi

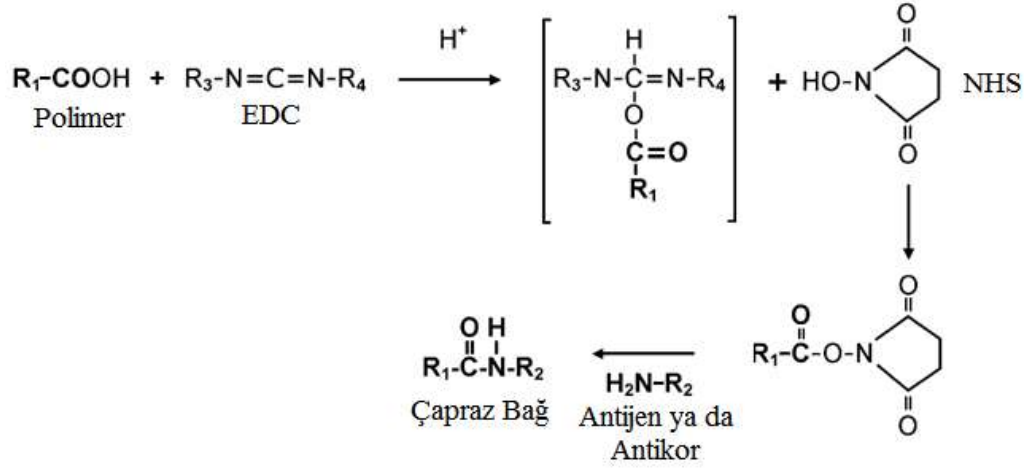
Glutaraldehitin her iki ucu da reaktiftir. Böylece bir çok enzim molekülünün bir arada bulunmasıyla çözünür yapı, çözünmez özellik kazanarak enzim molekülleri güçlü bir şekilde bağlanır (Şekil 2.30). Glutaraldehit ile çapraz bağlı agregasyon immobilizasyonu, çapraz bağlı immobilizasyon çeşidinin bir alt kümesi olarak düşünülebilir. Ayrıca zaman tasarrufu ve düşük maliyet imkanı sağlamaktadır.



Şekil 2.31 Bifonksiyonel glutaraldehitin bağlanması

Biyomoleküllerin taşıyıcı sistemlerine immobilizasyonu için kullanılan diğer bir reaktif ise NHS/EDC karışımıdır. EDC molekülünün her iki ucunda bulunan amin grupları

sayesinde NHS ilavesi ile karboksil grubu içeren bir polimer ile bir biyomolekülü birbirine bağlayabilmektedir (Şekil 2.31).



Şekil 2.32 NHS/EDC çapraz bağlama mekanizması

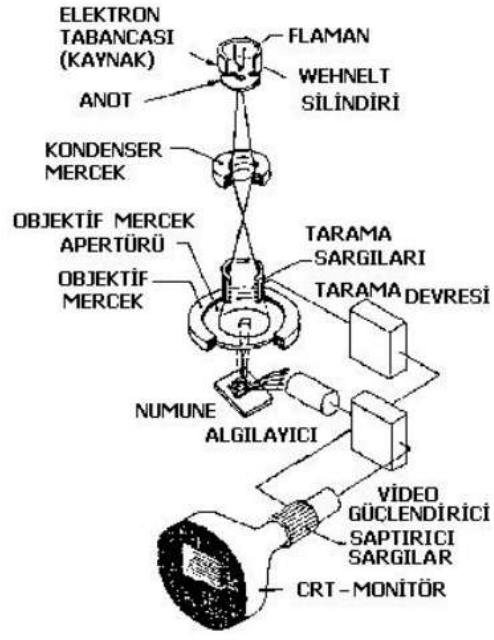
2.7 Çalışmada Geliştirilen Biyosensörün Karakterizasyonu için Kullanılan Metotlar

2.7.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

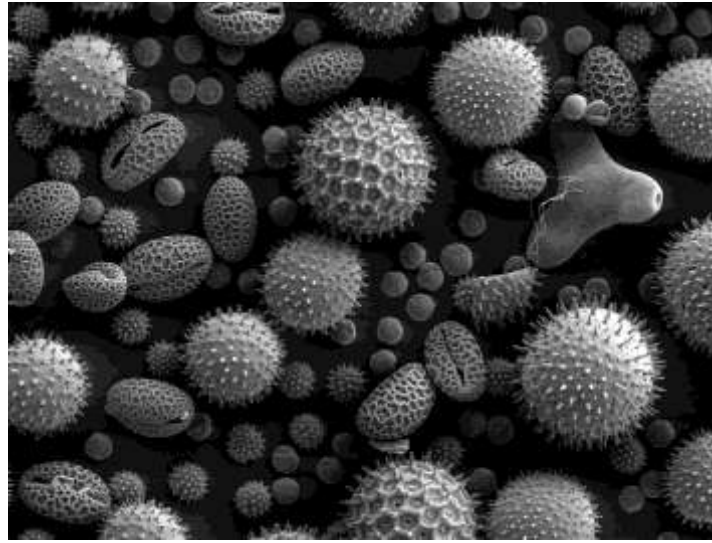
Elektron mikroskobu görüntü oluşturmak için ışıktan daha çok elektronları kullanan bir mikroskoptur. Elektron mikroskobu ışık mikroskobuyla karşılaştırıldığında bir çok avantajının olduğu görülür. Işık mikroskobunun ayırma gücünün yetersizliği ve büyütme gücünün buna bağlı olarak düşük olması, ışık mikroskobunda alan derinliğinin düşük olması nedeniyle, pürüzlü yüzeye sahip örneklerin yüksek büyütmelerde incelenmesindeki yetersizlik, ışık mikroskobunun sanayide incelenen malzemelerin kimyasal bileşenleri hakkında bilgi verememesi araştırmacıları SEM ile analiz yapmaya sevk eder. Görüntünün kalitesi, netliği ve detay zenginliği rezolüsyona bağlıdır ki ışık mikroskobunun rezolüsyon gücü 0,5-1 mikron iken elektron mikroskobunda bu oran 2-20 angstromdur ($\text{\AA}$) .

Taramalı Elektron Mikroskop, optik kolon,örnek haznesi ve görüntüleme sistemi olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Optik kolon kısmında, elektron demetinin kaynağı olan

elektron tabancası, elektronları örneğe doğru hızlandırmak için yüksek gerilimin uygulandığı anot plakası, ince elektron demeti elde etmek için yoğunlaştırıcı mercekler, demeti örnek üzerinde odaklamak için objektif merceği, bu merceğe bağlı çeşitli çapta apartürler ve elektron demetinin örnek yüzeyini taraması için tarama bobinleri yer almaktadır. Mercek sistemleri elektromanyetik alan ile elektron demetini inceltmekte veya örnek üzerine odaklamaktadır. Tüm optik kolon ve örnek belirli bir vakum seviyesinde tutulmaktadır. Örnek haznesinde , incelemek için uygun şartlara getirilen örnek bulunmaktadır. Görüntü sisteminde, elektron demeti ile örnek girişi sonucunda oluşan çeşitli elektron ve ışımaları toplayan dedektörler, bunların sinyal çoğaltıcıları ve örnek yüzeyinde elektron demetini görüntü ekranıyla senkronize tarayan manyetik bobinler bulunmaktadır. Elektron tabancası tarafından gönderilen birincil elektronlar, örnek yüzeyi ile çeşitli etkileşimlere girerler. Etkileşime giren birincil elektronlar, örnek yüzeyine çarpar ve enerjilerini neredeyse hiç kaybetmeden saçılırlarsa bu elektronlara gerçi saçılan elektronlar denir. Birincil elektronlar, örnek yüzeyine çarpar ve enerjisinin bir kısmını kaybederse ikincil elektron adını alır. İkincil elektronlar örnek haznesinde bulunan sintilatörde toplanarak ikincil elektron görüntüsüne çevrilir. İkincil elektronlar örnek yüzeyinin 10 nm veya daha düşük derinliğinden geldiği için örneğin yüksek çözünürlüğe sahip topoğrafik görüntüsü elde edilir. Gelen demetin diğer elektronları ise örnek tarafından absorbe edilerek toprağa verilir ve böylece oluşan akıma “ örnek akımı ”adı verilir. Birincil elektronlarla örneğin etkileşimi sırasında, örnekten X ışınları da yayınlanır.



Şekil 2.33 SEM'in şematik yapısı



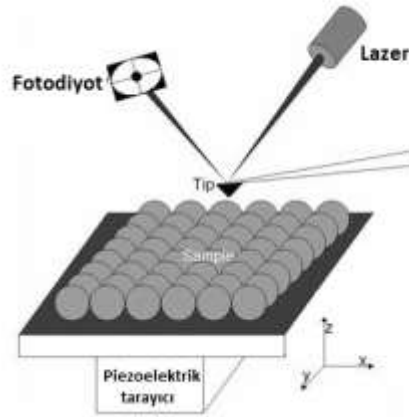
Şekil 2.34 Polen taneciklerinin SEM görüntüsü

2.7.2 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

Atomik kuvvet mikroskobu ya da taramalı kuvvet mikroskobu çok yüksek çözünürlüklü bir taramalı kuvvet mikroskobudur. Ulaşılmış çözünürlük birkaç nanometre ölçeğinde

olup optik tekniklerden en az 1000 kat fazladır. AFM'nin öncülü olan taramalı tünelleme mikroskobu 1980'lerin başında Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer tarafından IBM Research - Zürih'te geliştirilmiş, araştırmacılara 1986 Nobel ödülünü kazandırmıştır. Atomik boyutlara kadar sivriltilmiş bir iğne ucu yardımıyla atomlar arasındaki kuvvetlerin nanonewton düzeyinde incelenerek yüzeyin yüksek çözünürlükte üç boyutlu görüntülenmesini sağlar. Görüntülenme, iğne ucunun yüzey ile etkileşiminin incelenmesi sonucunda gerçekleşir.

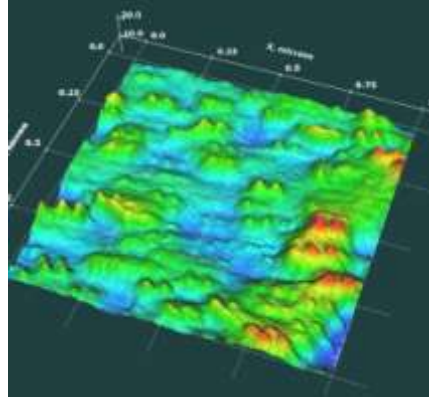
Sivri iğneler, mikrofabrikasyon teknolojisiyle çok küçük silikon yaylar üzerine yerleştirilir. İğne ile yüzey arasındaki kuvvetten dolayı bükülen yayın sapması, yayın arkasına odaklanan lazer ışığı yardımı ile bir foto detektör üzerine düşürülür ve çok duyarlı bir şekilde ölçülür. İğne ile yüzey arasındaki kuvvet, bir geri besleme devresiyle sabit tutulur ve iğne yüzeyi tararken ölçülen iğne hareketi, bize yüzeyin topografisini verir. Numune; Z yönünde hareket edip yüksekliği ayarlayan, X ve Y yönünde hareket edip taramayı sağlayan bir dizi piezoelektrik düzenek aracılığıyla taranır.



Şekil 2.35 AFM'nin şematik gösterimi

AFM ve SEM karşılaştırılması yapıldığında bazı farklar bulunmaktadır. AFM ölçümlerinde yer alan kontrast farkları numunedeki yükseklik farklılıklarının bir sonucudur. Ayrıca AFM ölçümleri için numunenin herhangi bir iletkenle kaplanmasına ihtiyaç duyulmamaktadır. SEM ölçümleri için numunenin vakum ortamı içinde bulunması gerekirken AFM ölçümleri bu ortama ihtiyaç duymaz. SEM görüntüleri iki

boyutlu bilgi sağlarken, AFM üç boyutlu görüntüler sağlar. SEM AFM'ye göre daha geniş bir yüzeyi tarama imkanı sağlar. SEM ölçümlerinin süresi AFM ölçümlerine göre daha hızlıdır.



Şekil 2.36 Yüzey topografyasını gösteren üç boyutlu bir AFM görüntüsü örneği

2.8 Literatür Araştırması

İmmünoassay teknolojilerinin geliştirilmesi klinik laboratuvarlar ve diğer araştırma alanları için oldukça önemli bir araştırma hikayesidir. İmmünoassaylerin yakın zamandaki gelişmeleri klinik bilimlerde immünoassay kullanımını günden güne arttırmaktadır. Klinik bilimlerin yanı sıra son yirmi yılda immünoassayler kullanılarak çevre analizleri ve gıda endüstrisinde gıda kontrolleri yapılmaktadır. Bu gelişmelerle birlikte pek çok immünolojik sistem molekülünün tespitine yönelik klinik amaçlı immünosensörler geliştirilmiştir (Luppa vd. 2001).

Hastalıkların teşhisi amacıyla immünosensörlerin geliştirilmesi son derece dikkat çekici bir konudur ve diyabet takibinde glikoz ölçümü yapan cihazlar gibi mikroelektrotlara sahip “*point of care*” ölçüm için taşınabilir aygıtların gelişimi hızla devam etmektedir (Liao vd. 2014).

Literatür araştırması yapıldığında 1979 yılından bu yana 1500’den fazla immünosensör araştırması rapor edilmiştir. Bu yayınların neredeyse yarısı elektrokimyasal metotla

ölçüm alan immünosensörlerdir. Maliyetinin ucuz olması, cihaz tasarımının kolay olması, mikro üretime uygun olma gibi özellikler elektrokimyasal immünosensörleri tercih sebebi yapmaktadır.

Rishpon ve Rosen'in geliştirdikleri elektrokimyasal immünosensör sisteminde (1989) laktat dehidrojenaz (LDH) izoenzimi olan LDH5 tayini yapılmıştır. Camsı karbon elektroda immobilize edilen LDH5 spesifik antikörler ile hazırlanan immünosensör ile ölçümler alınmıştır. Berggren ve Johansson'un yaptığı bir çalışmada (1997) insan koriyonik gonadotropin hormon tespiti amacıyla bu antijene spesifik antikoru kendiliğinden düzenlenen tiyotik asit filmine immobilize etmişlerdir. Elde edilen veriler neticesinde doğrusal tayin aralığı 1 pg.mL^{-1} – 1 ng.mL^{-1} , tayin sınırı 0.5 pg.mL^{-1} olarak bulunmuştur. Enein vd. (1999) tiroit hormonlarının takibinde önemli bir yol gösterici olan T3 hormonunun tespitine yönelik amperometrik temelli immünosensör geliştirmişlerdir. Grafit tozu ve parafin yağı kullanarak hazırladıkları grafit pasta matrisine fare monoklonal anti-T3 immobilizasyonu yapmışlardır. Geliştirdikleri immünosensörün kronoamperometrik teknikle alınan ölçümlerinde tayin limiti 34 ppt, doğrusal tayin aralığı ise 68 ppt-34 ppb olarak belirlenmiştir. Chaubey vd. (2000) elektrokimyasal olarak hazırlanan polipirol-polivinilsülfonat film üzerine laktat dehidrojenaz enziminin immobilizasyonu ile laktat biyosensörü hazırlamışlardır. Polipirol-polivinilsülfonat filmin karakterizasyonunu Fourier dönüştürücü infrared spektroskopisi ve dönüşümlü voltametri tekniği ile incelemişlerdir. Polipirol-polivinilsülfonat-LDH elektrodu için cevap süresini 40 s, doğrusal çalışma aralığını 0,5-60 mM olarak bulmuşlar ve raf ömrünün iki haftadan fazla olduğunu belirtmişlerdir. Choi vd. (2003) karaciğer fonksiyonlarının incelenmesinde önemli bir enzim olan Alanin Aminotransferaz (ALT) tespitine yönelik kronoamperometrik immünosensör geliştirmişlerdir. Bu amaçla insan karaciğeri cDNA kütüphanesinden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılarak ALT spesifik antikör sentezi yapılmıştır. Altın çalışma elektrodu üzerine Pirüvat Oksidaz ve anti-ALT immobilize edilmiştir. Alanin ve alfa keto glutaratın ALT ile enzimatik dönüşümü sonucu oluşan pirüvat, enzim üzerine immobilize edilmiş olan pirüvat oksidaz ile tekrar enzimatik dönüşüme uğramıştır. Sinyallerin numunede bulunan pirüvatın konsantrasyonuna bağlı olduğu CV ölçümleri ile belirtilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda doğrusal tayin aralığı 10 ng/mL- 100

$\mu\text{g/mL}$, tayin sınırı ise 10 ng/mL olarak belirlenmiştir. Karsinoembriyojenik antijenin (CEA) tespiti amacıyla Zong vd. (2004) camı karbon elektrodu elektron medyatörü olarak görev yapan tiyonin ile modifiye ederek yüzeye anti-CEA immobilize etmişlerdir. Ölçümün alındığı hücrede bulunan peroksidin HRP enzimi ile dönüşümünden elde edilen sinyaller sonucunda doğrusal tayin aralığı $0.5\text{-}167 \text{ ng/mL}$, tayin sınırı ise 0.1 ng/mL olarak tespit edilmiştir. İmmünoensör maliyetinin ucuz, analitik tayin süresinin oldukça kısa olduğu da belirtilmiştir.

2000'li yılların başında ivme kazanan EIS çalışmalarına bakıldığında Li vd. (2004) patojenik bir bakteri olan *Escherichia coli* O157:H7'nin impedimetrik tayinine yönelik immünoensör geliştirmişlerdir. Bu amaçla çalışma elektrodu olan indium mikroelettodu üzerine anti-E.coli antikoru immobilize edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda doğrusal tayin aralığı $4.36 \times 10^5 \text{ -} 4.36 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$, tayin sınırı ise 10^6 cfu/mL olarak bulunmuştur. Tang vd. (2004) EIS tekniği ile Hepatit B yüzey antijenini tayin etmek amacıyla kolloidal altın ve polivinil bütiral ile modifiye edilmiş platin elektrot üzerine Hepatit B yüzey antikorunu immobilize etmiş ve 7.8 ng.mL^{-1} seviyesinde ölçüm yapmışlardır. Li vd. 2008 yılında bir sitokin türü olan İnterlökin-5'in duyarlı tayinine yönelik impedimetrik immünoensör geliştirmişlerdir. Bu amaçla camı karbon elektrot yüzeyine elektropolimerizasyon yoluyla polipirol-polipirolpiropilikasit-altınnanopartikül nanokompoziti biriktirilmiştir. Nanokompozit karakterizasyonu için SEM ve TEM analizlerini kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlar neticesinde tayin sınırı oldukça düşük bir konsantrasyon olan 10 fg/mL olarak belirtilmiştir. Rezaei vd. (2009) insan büyüme hormonu (hGH) tespitine yönelik geliştirdikleri impedimetrik immünoensörde altın çalışma elektrodu tiyol ile modifiye edilerek modifiye elektrot üzerine altın nanopartikül immobilize edilmiştir. Anti-hGH ile inkübe edilen modifiye altın elektrodun immobilizasyon basamakları impedans ve CV ile kontrol edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda tayin sınırı 0.64 pg/mL , doğrusal tayin aralığı ise $3\text{-}100 \text{ pg mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bhavsar vd. (2009) fazla ekspresyonu MS ile ilişkili olduğu düşünülen bir serum sitokini olan interlökin-12'nin tayinine yönelik bir sistem geliştirmişlerdir. Monoklonal antikorların immobilizasyonu ile hazırlanan bu impedimetrik immünoensör 100 fM 'dan düşük düzeyde interlökin-12 tayini yapılmıştır.

ZnO kullanılarak geliştirilen biyosensörlere bakıldığında Shukla vd. (2012) ZnO kaplı kitosan-polivinilalkol nanokompoziti ile modifiye edilmiş indiyum-kalay oksit (ITO) elektrodu kullanarak potansiyometrik glukoz sensörü geliştirmişlerdir. Nanopartikül kullanılmadan elde edilen kalibrasyon eğrisi ve nanopartikül kullanılmış kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır. Nanopartikül kullanılarak geliştirilen biyosensörün potansiyel değerlerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda doğrusal tayin aralığı 2 μ M- 1.2 mM, en düşük tayin sınırı ise 0.2 μ M olarak bulunmuştur. Chawla ve Pundir altın çalışma elektrodu üzerine ZnO nanopartikülü, polipirrol ve fruktozil aminoasit oksidaz immobilize ederek diyabet takibinde önemli bir parametre olan hemogloblin a1c' nin ölçümünü amperometrik olarak gerçekleştirmişlerdir. Diyabetli ve sağlıklı insanlardan alınan tam kanları kullanarak yapılan ölçümlerin standart immünoassay ölçümleriyle tutarlı olduğu belirtilmiştir. Yine Pundir vd. (2012) balık etinde ksantin tespiti amacıyla ZnO, kitosan, çok duvarlı karbon nanotüp, polianilin içeren nanokompoziti Platin elektrot üzerine immobilize etmiştir. Modifiye edilen elektrodun ksantin oksidaz ile inkübasyonundan sonra EIS ile ölçümler alınmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde doğrusal tayin aralığı 0.1–100 μ M, tayin sınırı 0.1 μ M olarak bulunmuştur. Pundir vd. (2013) ayrıca amperometrik trigliserit biyosensörü geliştirmek amacıyla altın çalışma elektrodu üzerine elektrokimyasal yolla ZnO ve çinkohegzasiyanoferrat hibrit filmi biriktirilmiştir. Sonraki aşamada nikel oksit (NiO)-kitosan nanokompoziti modifiye altın elektrot üzerine immobilize edilmiştir. Modifikasyonlar EIS ve CV ile kontrol edilmiştir. Doğrusal tayin aralığı 50–700 mg/dl, tayin sınırı 10 mg/dl olarak belirlenmiştir. Pekyardımcı vd. (2013) glikoz tayini amacıyla insan serumu kullanarak ölçüm aldıkları glikoz oksidaz immobilize ZnO modifiye karbon pasta elektrot geliştirmiştir. Elde edilen amperometrik ölçümler sonucunda doğrusal tayin aralığı 9.1×10^{-3} - 14.5 mM olarak bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında kullanılan Protein A ve IgG'nin immobilizasyonuna dayanan sistemlere bakıldığında Mirhabibollahi vd. (1990) gıda örneklerinin kontaminasyonu sonucu oluşabilen patojenik bir bakteri olan Staphylococcus Aureus tarafından üretilen Protein A tayinine yönelik immünosensor geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri elektrokimyasal immünosensörü aynı zamanda mikropilaka temelli immünoassay yöntemle karşılaştırmışlar ve iki farklı yöntemle elde edilen sonuçların birbirleriyle

uyumlu olduklarını belirtmişlerdir. Susmel vd. (2000) insan sitomegalovirüs tayini amacıyla QCM immünosensör sistemi geliştirmişlerdir. Bu amaçla altın elektrot üzerinde Protein A ve tiyol/poli L-lizin içeren matriks üzerine virüse spesifik antijen immobilizasyonu yapılmıştır. Doğrusal tayin aralığı 2.5-5 $\mu\text{g/mL}$, tayin sınırı ise 1 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Yuan vd. (2005) IgG tayinine yönelik geliştirdikleri potansiyometrik sensörde tiyol modifiye altın çalışma elektrodu üzerine altın nanopartikül immobilize edilmiş ve modifiye sensör anti-IgG ile inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde IgG ancak 12 ng/mL'ye kadar tayin edilebilmiştir. Loo vd. (2012) kimyasal olarak modifiye edilmiş grafen kullanarak geliştirdikleri IgG tespitine yönelik immünosensörde doğrusal çalışma aralığı 0.3 $\mu\text{g/mL}$ - 7 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Cao vd. (2013) salkım benzeri kullandıkları ZnO kullanarak geliştirdikleri IgG tespitine yönelik immünosensörde camı karbon elektrot üzerine kitosan kaplı gümüş nanoçabuk immobilize edilmiştir. Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV) ile elde edilen sonuçlar neticesinde doğrusal tayin aralığı 0.01–200 ng/mL, tayin sınırı ise oldukça düşük bir konsantrasyon olan 4 pg/mL olarak tespit edilmiştir. Wang vd. (2013) IgG tespitine yönelik geliştirdikleri sandviç tipi elektrokimyasal immünosensör sisteminde camı karbon elektrot üzerine grafen modifikasyonu yapıldıktan sonra elektrokimyasal yöntemle altın nanopartikül biriktirilmiştir. DPV ile alınan ölçümler neticesinde doğrusal tayin aralığı m 1-300 ng/mL, tayin sınırı ise 0,4 ng/mL olarak belirlenmiştir.

3. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu tezin amacı alerjik hastalıklar, kronik enfeksiyonlar, kronik karaciğer hastalıkları, lösemi, myeloma, Multiple Skleroz (MS), çeşitli diğer otoimmün hastalıklar gibi durumlarda önemli bir parametre olan IgG tayinine yönelik EIS sensörünün geliştirilmesidir. Bu amaçla tez kapsamında kullanılacak polimerler olan jelatin, aljinat, jelatin-aljinat karışımı ve daha düşük tayin limiti ve hassasiyete ulaşabilmek için jelatin-aljinat karışımına ZnO nanopartikülünün eklenmesi ile hazırlanan kompozit ve nanokompozit yapılara IgG'ye yüksek afinite gösteren PrA eklenmiştir. Hazırlanan immobilizasyon jeli Platin elektrot üzerine immobilize edilmiş ve hazırlanan immünosensör sistemi EIS, CV kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyonu tamamlanan immünosensörlerin kalibrasyon eğimleri çizilmiştir. Nanopartikül kullanılarak hazırlanan jelatin-aljinat-PrA immünosensörü ile nanopartikül kullanılmadan hazırlanan jelatin-aljinat-PrA immünosensörünün sinyalleri karşılaştırılmıştır. Ayrıca geliştirilen immünosensör sistemlerine Anti-MOG, anti-MAG, anti-TNF gibi farklı antikörlerin girişim etkileri incelenmiştir. Ayrıca geliştirilen immünosensörün SEM, AFM, FTIR, TGA yöntemleriyle karakterizasyonu yapılmıştır. Geliştirilen immünosensörlerin kalibrasyon eğrileri elde edildikten sonra BOS ve serum numunelerinde IgG denemelerine geçilmiştir.

4. MATERİYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyaller

4.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

Tez çalışmasında kullanılan Jelatin (A tipi), Sodyum Aljinat, Protein A, insan İmmüoglobulin G (human Immunoglobulin G, hIgG), anti-MOG, anti-MAG, anti-TNF, glutaraldehit, N-hidroksisüksinimit (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit (EDC), Bovin Serum Albumin (BSA), sülfirik asit (H_2SO_4), sodyum hidroksit (NaOH), potasyum klorür (KCl), sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$), potasyum ferrosiyaniit ve potasyum ferrisiyaniit ($Fe(CN)_6^{4-/3-}$), hidroklorik asit (HCl), aminoasetik asit, tris(hidroksimetil)aminometan ve çinko oksit (ZnO) Sigma (St Louis, MO, USA)'dan; sodyum hidrojen fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) Merck'den temin edilmiştir.

Kullanılan de-iyonize su, MilliPore kullanılarak $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ direncinde olacak şekilde elde edilmiştir.

4.1.2 Kullanılan cihazlar

Çalışmalarda elektrokimyasal ölçümde “Gamry Instrument Impendace Analyzer-Framework Version 5.50 software” kullanılmıştır. İmmünosensör karakterizasyonu için yapılan analizler olan SEM (Quanta 200 FEG), AFM (XE-100E) ölçümleri Bilkent Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

4.1.3 Kullanılan elektrotlar

Elektrokimyasal tüm ölçümlerde üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Karşıt ve çalışma elektrodu olarak yüzey alanı 0.25 cm^2 olan platin elektrot, referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır.

Çıplak Pt elektrotlar kullanılmadan önce 0.05 µm alümina ile temizlenmiştir. Daha sonra kimyasal temizliği için H₂SO₄ (0.05 mol.L⁻¹) çözeltisinde 100 mVs⁻¹ tarama hızında 0.3 ile +1.2 V arası dönüşümlü voltametrileri alınmıştır. Son olarak elektrotların pH'ı 7.4 olan fosfat tamponunda (0.05 M) 100 mVs⁻¹ tarama hızında -0.5 ile +0.5 V arası dönüşümlü voltametrileri alınarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kullanılan tüm Pt elektrotların temizliği bu şekilde yapılmıştır.

4.1.4 Kullanılan çözeltiler

Fosfat tamponu 0.1 mol.L⁻¹ NaH₂PO₄.2H₂O ve 0.1 mol.L⁻¹ Na₂HPO₄.12H₂O çözeltilerinin ayrı ayrı hazırlanmasıyla (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4) oluşturulmuştur. Çalışmalarda kullanılan diğer çözeltiler fosfat tamponu kullanılarak hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılan çapraz bağlayıcılardan glutaraldehit çözeltisi fosfat tamponu (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4) kullanılarak 0.028 mol.L⁻¹ olarak hazırlanmıştır. Kullanılan diğer bir çapraz bağlayıcı sistemi olan NHS/EDC için fosfat tamponu (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4) kullanılarak 0.5 mol.L⁻¹'lık stok çözeltiler hazırlanarak istenilen konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

Nanopartikül içeren immünosensör sisteminin çalışmalarında 0.004 mol.L⁻¹ ZnO stok çözeltisi hazırlanmış ve istenilen konsantrasyonlarda kullanılmıştır.

IgG tayini amacıyla kullanılan PrA için 1.0 mg/mL'lik ana stok çözelti fosfat tamponu (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4) kullanılarak hazırlanmış ve istenilen konsantrasyonlar için belirli hacimlerde kullanılmıştır. 1.0 mg/mL'lik ana PrA stok çözeltisinden 5 µg/mL (1.stok) ve 50 µg/mL'lik (2.stok) iki ayrı stok çözelti, ana stok çözeltiden belirli hacimde kullanılarak fosfat tamponu ile seyreltilmiştir (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4).

PrA'ya yüksek afinite gösteren IgG için tüm optimizasyon çalışmalarında 1 µg/µL stok çözelti fosfat tamponu (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4) ile hazırlanarak immobilizasyon

yapılmıştır. Kalibrasyon çalışmalarında ise 10000 µg/ 200 µL’lik ana stok çözeltisinden istenilen konsantrasyonlarda belirli hacimler kullanılarak immobilizasyonlar yapılmıştır.

Elektrokimyasal hücrenin hazırlanılmasında 9.0 mL’lik hücre ortamı için ortamda 10 mM olacak şekilde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redoks çifti ve 1.0 mol.L⁻¹ KCl kullanılmıştır.

İmmünoensörler hazırlandıktan sonra PrA immobilize olmamış matriksin fonksiyonel gruplarına IgG’nin non-spesifik bağlanmasını önlemek amacıyla bidistile su ile hazırlanmış % 0.1’lik BSA kullanılmıştır.

Ayrıca optimize immünoensörlere non-spesifik bağlanmaları tespit etmek amacıyla yapılan immobilizasyonlarda anti-MAG (1.0 µg/µL) , anti-MOG (1.0 µg/µL), anti-TNF (1.0 µg/µL) kullanılmıştır. Çözeltiler fosfat tamponu (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4) kullanılarak hazırlanmıştır.

İmmünoensörlerin raf ömrünün araştırılmasında elüsyon çözeltisi olarak aminoasetik asit (0.1 mol.L⁻¹, pH 3.0) kullanılmıştır.

4.2 Yöntem

4.2.1 İmmobilizasyon jellerinin hazırlanması

Optimizasyonu tamamlanmış Jelatin-PrA immünoensörünün hazırlanması için 0.0007 g Jelatin hassas terazide tartılıp ependorfa alınmış, üzerine 14.5 µL fosfat tamponu (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4) ilave edilmiştir. Ependorf içerisindeki jelatin, fosfat tamponunda yarım saat şişirildikten sonra jelatinin çözünmesi için, sıcaklığı 50 °C olan sıcak su banyosuna daldırılmıştır. Jelatin çözündükten sonra sıcaklık 32 °C’ye düşürülmüştür. Şişirilmiş jelatin içeren ependorfa 1. stok PrA çözeltisinden 1.75 µL eklenmiştir ve jelatin ile PrA’nın homojenizasyonunun sağlanması için vortekslenmiştir. Son olarak çapraz bağlayıcı olarak kullanılan glutaraldehit (1.25 µL, 0,028 M) ependorfa eklenmiş,

homojenizasyon için tekrar vortekslenerek immobilizasyon jeli hazırlanmıştır. Jelatin-PrA immünosensörü için hazırlanan immobilizasyon jelinin toplam hacmi 17.5 µL'dir. Kimyasal olarak temizlenmiş Pt elektrodun her bir yüzeyine 6,25 µL immobilizasyon jeli immobilize edilmiş ve 24 saat +4°C'de bekletilmiştir.

Aljinat-PrA immünosensörünün hazırlanması için % 4'lük sodyum aljinat stok çözeltisi (0.8 g Aljinat, 20 mL bidistile su) hazırlanmıştır. Optimize Aljinat-PrA immünosensörü için immobilizasyon jelinin hazırlanmasında % 0.5 Aljinat (2.19 µL) ependorf içerisine alınmış ve üzerine fosfat tamponu ilave edilmiştir (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4, 9,81 µL). Hazırlanan bu ependorf sıcaklığı 50 °C olan sıcak su banyosuna daldırılmıştır. Aljinat çözündükten sonra sıcaklık 32 °C'ye düşürülmüştür. 1. stok PrA çözeltisinden 3.5 µL hazırlanan ependorfa ilave edilmiş ve homojenizasyon için vortekslenmiştir. Son aşamada taşıyıcı sistem ve PrA'nın çapraz bağlanması için NHS/EDC sistemi kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle fosfat tamponuyla hazırlanmış (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4) EDC çözeltisi ependorf içerisinde 0,0050 mol.L⁻¹ EDC olacak hacimde eklenmiş ve homojenizasyon için vortekslenmiştir. Daha sonra yine aynı şekilde fosfat tamponuyla hazırlanmış (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4) NHS çözeltisi ependorf içerisinde 0,0025 mol.L⁻¹ NHS olacak hacimde ilave edilmiş ve homojenizasyon için vortekslenmiştir. EDC reaktifi NHS ile gerçekleşen reaksiyonunun sitokiyometrisi gereği 2:1 oranında kullanılmaktadır. Jelatin-PrA immünosensörü için hazırlanan immobilizasyon jelinin toplam hacmi 17.5 µL'dir. Kimyasal olarak temizlenmiş Pt elektrodun her bir yüzeyine 6,25 µL immobilizasyon jeli immobilize edilmiş ve 24 saat +4°C'de bekletilmiştir.

Optimize Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörünün hazırlanmasında kullanılan immünosensör jelinin düşük hacimde immobilizasyon zorluğundan dolayı ependorf hacmi 35 µL'dir. Jelatin-Aljinat taşıyıcı sisteminin optimize polimer konsantrasyonu 2:1 oranında belirlendiğinden dolayı 0,0007 g Jelatin hassas terazi ile tartılarak ependorf içerisine alınmıştır. Ependorf içerisine fosfat tamponu (0.05 mol.L⁻¹, pH 7.4, 7.25 µL) ilave edilerek jelatinin 30 dakika şişmesi sağlanmıştır. Jelatinin çözünmesi için, ependorf, sıcaklığı 50 °C olan sıcak su banyosuna daldırılmıştır. Jelatin çözündükten sonra sıcaklık 32 °C'ye düşürülmüştür. Ependorf içerisine aljinat (%4'lük, 8,75 µL) ilave edilmiş ve homojenizasyonun sağlanması için vortekslenmiştir. Akabinde 1.stok

PrA çözeltisinden 14 µL ilave edilmiş ve tekrar vorteksleme işlemi yapılmıştır. Son olarak taşıyıcı sistem ve PrA'nın çapraz bağlanması için glutaraldehit (0.028 mol.L^{-1} , 5 µL) ilave edilmiş ve homojenizasyon için vorteksleme yapılmıştır. Kimyasal olarak temizlenmiş Pt elektrodun her bir yüzeyine 6,25 µL immobilizasyon jeli immobilize edilmiş ve 24 saat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir.

Optimize Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünosensörünün hazırlanmasında kullanılan immünosensör jelinin düşük hacimde immobilizasyon zorluğundan dolayı ependorf hacmi 35 µL'dir. Jelatin-Aljinat taşıyıcı sisteminin optimize polimer konsantrasyonu 2:1 oranında belirlendiğinden dolayı 0,0007 g Jelatin hassas terazi ile tartılarak ependorf içerisine alınmıştır. Fosfat tamponu (0.05 mol.L^{-1} , pH 7.4, 5.5 µL) ependorf içerisine ilave edilerek jelatinin 30 dakika şişmesi sağlanmıştır. Jelatinin çözünmesi için, ependorf, sıcaklığı 50°C olan sıcak su banyosuna daldırılmıştır. Jelatin çözündükten sonra sıcaklık 32°C 'ye düşürülmüştür. Ependorf içerisine aljinat (%4'lük, 8,75 µL) ilave edilmiş ve homojenizasyonun sağlanması için vortekslenmiştir. Hazırlanan polimer karşısına homojenize hale getirilmiş 0.004 mol.L^{-1} stok ZnO çözeltisinden (1.75 µL) ilave edilmiş ve vorteksleme işlemi yapılmıştır. Hazırlanan nanokompozit yapıya 1.stok PrA çözeltisinden 14 µL ilave edilmiş ve tekrar vorteksleme işlemi yapılmıştır. Son olarak taşıyıcı sistem ve PrA'nın çapraz bağlanması için glutaraldehit (0.028 mol.L^{-1} , 5 µL) ilave edilmiş ve homojenizasyon için vorteksleme yapılmıştır. Kimyasal olarak temizlenmiş Pt elektrodun her bir yüzeyine 6,25 µL immobilizasyon jeli immobilize edilmiş ve 24 saat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir.

4.2.2 İmmünosensörlerin hazırlanması

İmmobilizasyon jeli hazırlandıktan sonra, 0.25 cm^2 'lik yüzey alanına sahip Pt elektrodun her iki yüzeyine immobilizasyon jeli (6.25 µL) damlatılarak, bir Pt elektrotta toplam 12.5 µL jel olacak şekilde immobilizasyon işlemi yapılmıştır. Hazırlanan elektrotlar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat bekletilmiştir. Ölçüm alınmadan önce her bir elektrot bağlanmayan antijenlerin uzaklaştırılması için fosfat tamponu içeren tüpte 10 dakika bekletilmiş ve daha sonra non-spesifik bağlanmaları engellemek için % 0.1'lik BSA

çözeltisine daldırılmıştır. Son olarak fosfat tamponu ile elektrotlar yıkanarak ölçüme hazır hale getirilmiştir.

4.2.3 Elektrokimyasal ölçümlerin alınması

Elektrokimyasal hücrenin hazırlanılmasında 9.0 mL’lik hücre ortamı için ortamda 10 mM olacak şekilde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redoks çifti ve 1.0 mol.L^{-1} KCl kullanılmıştır.

Ölçüme hazır immünosensörler için EIS çalışmaları DC voltaj referans elektroda karşı 0 V’de, AC voltaj 5 mV rms’de alınmıştır. Ölçüm için çalışılan frekans aralığı 10000-0.1 Hz’dir.

Yapılan tüm optimizasyon ve kalibrasyon çalışmalarında sinyal olarak relatif impedans kullanılmıştır.

$$\text{Relatif impedans} = [\text{Rct}(i) - \text{Rct}(0)] / \text{Rct}(0)$$

$\text{Rct}(0)$, PrA immobilize elektrodun yük transfer direnci ve $\text{Rct}(i)$ ise IgG inkübe edilmiş elektrodun yük transfer direncidir.

4.2.4 SEM ve AFM ölçümlerinin alınması

Polimer, PrA immobilize polimer, ZnO ilaveli polimer ve PrA immobilize ZnO ilaveli polimer filmlerinin morfolojileri SEM ve AFM ile görüntülenmiş, yapılan immobilizasyonların başarısı incelenmiştir. SEM ve AFM ölçümleri Bilkent Üniversitesi UNAM’da alınmıştır.

4.2.5 Termogravimetrik Analiz (TGA) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Polimer karakterizasyonları amacıyla Jelatin, Aljinat ve Jelatin Aljinat taşıyıcı sistemlerinin TGA ve FTIR analizleri yapılmıştır.

4.2.6 Optimizasyon çalışmaları

4.2.6.1 Polimer optimizasyonları

Geliştirilecek immünosensör sistemlerinde öncelikli olarak polimer konsantrasyonlarının optimum değerlerinin belirlenmesi çalışılmıştır.

Jelatin optimizasyonu amacıyla ependorf içerisindeki PrA konsantrasyonu ($1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve glutaraldehit (0.004 mol.L^{-1}) sabit tutularak % 1-8 aralığında jelatin miktarları denenmiştir.

Aljinat optimizasyonu amacıyla ependorf içerisindeki PrA konsantrasyonu ($1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve NHS/EDC ($0.0075 \text{ mol.L}^{-1}$) sabit tutularak % 0.1-1.25 aralığında aljinat miktarları denenmiştir.

Jelatin-Aljinat polimer karışımından oluşan immünosensör sisteminin polimer optimizasyonu amacıyla her bir elektrot için hazırlanan immobilizasyon jellerinde polimer yüzdesi % 4'de sabit tutulmuştur. Ependorf içerisinde % 4'lük polimer konsantrasyonu sabit olacak şekilde 0.5-10 oranında Jelatin/Aljinat konsantrasyonları denenmiştir.

4.2.6.2 ZnO optimizasyonu

Nanopartikül ilavesi yalnızca optimizasyonları tamamlanmış Jelatin-Aljinat taşıyıcı sisteminden oluşan immünosensör için denenmiştir. Bu amaçla nanopartikül optimizasyonu için ependorf içerisinde Jelatin/Aljinat oranı (2:1), PrA konsantrasyonu

(1.0 µg/ mL) ve çapraz bağlayıcı glutaraldehit konsantrasyonu (0,004 mol.L⁻¹) sabit tutularak 0.0001, 0.00002, 0.0004, 0.0006, 0.0008 mol.L⁻¹ ZnO konsantrasyonları denenmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde ise optimum ZnO konsantrasyonu bulunmuştur.

4.2.6.3 Protein A optimizasyonu

Jelatin, Aljinat, Jelatin-Aljinat, Jelatin-Aljinat-ZnO immünosensörlerinde IgG'yi tayin edebilecek optimum PrA konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla ependorf içerisinde polimer, ZnO konsantrasyonları, çapraz bağlayıcı sabit tutularak 0.1-20 µg/mL aralığında PrA konsantrasyonları denenmiş ve immünosensör sistemleri için optimum PrA değeri belirlenmiştir.

4.2.6.4 Çapraz bağlayıcı optimizasyonu

İmmünosensör sistemlerinde PrA'nın taşıyıcı sisteme en uygun konsantrasyonda bağlanabilmesi için çapraz bağlayıcı optimizasyonları yapılmıştır. Bu amaçla PrA'nın Jelatin taşıyıcı sistemine immobilizasyonu için çapraz bağlayıcı olarak 0.0010, 0.0015, 0.0020, 0.0040, 0.0060, 0.0080 ve 0.010 mol.L⁻¹ konsantrasyonlarında glutaraldehit kullanarak immobilizasyonlar gerçekleştirilmiş ve en uygun taşıyıcı oranı araştırılmıştır. Aljinat taşıyıcı sistemine PrA immobilizasyonu için çapraz bağlayıcı olarak ependorf içerisinde toplam konsantrasyon 0.002, 0.003, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.02 mol.L⁻¹ olacak şekilde EDC/NHS denenmiştir. Jelatin-Aljinat ve Jelatin-Aljinat-ZnO taşıyıcı sistemlerine PrA immobilizasyonları için 0.001, 0.002, 0.004, 0.006 ve 0.008 mol.L⁻¹ glutaraldehit denenerek optimum çapraz bağlayıcı konsantrasyonu belirlenmiştir.

4.2.6.5 pH optimizasyonu

Elektrokimyasal ölçümün alınacağı hücre içerisinde en uygun pH ortamının belirlenmesi amacıyla pH optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla asetat, fosfat, karbonat tamponları kullanılarak pH (5.5-10) optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla

elektrokimyasal ölçümün alınacağı hücre içerisinde asetat tamponu (0.05 mol.L^{-1} , pH 5.5), fosfat tamponu (0.05 mol.L^{-1} , pH 7.4) , karbonat tamponu (0.05 mol.L^{-1} , pH 9 ve 10) denenmiştir.

4.2.6.6 İnkübasyon süresinin immünosensör sistemlerine etkisi

İnkübasyon süresinin immünosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi için ayrı ayrı jelatin, aljinat, jelatin-aljinat taşıyıcı sistemlerini içeren immobilizasyon jelleri ile kaplanmış her bir platin elektrot üzerinde IgG farklı sürelerde (5-90 dk) inkübe edilmiştir.

4.2.7 Tekrar üretilebilirlik ve raf ömrü

Geliştirilen immünosensör sistemlerinin tekrar üretilebilirlik performansının belirlenmesi amacıyla her bir taşıyıcı sistemi için optimize elektrotlar hazırlanmıştır. Her bir elektrot aynı konsantrasyonda (1.0 µg/µL) IgG ile optimum inkübasyon süresinde inkübe edilmiş ve impedimetrik olarak ölçümler alınmıştır.

Farklı taşıyıcı sistemleri içeren immünosensörlerin raf ömrü araştırılmıştır. Bu amaçla jelatin, aljinat, jelatin-aljinat taşıyıcı sistemlerini içeren optimize birer elektrot hazırlanmıştır. Her bir immünosensör kullanım sonrası aminoasetik asit tamponla (0.1 mol.L^{-1} , pH 3.0) desorbe edilmiş, fosfat tamponunda (0.05 mol.L^{-1} , pH 7.4) yıkanmış, 4 °C 'de fosfat tamponunda saklanmış ve 10 gün boyunca her gün ölçüm alınmıştır. İmmünosensörlerin impedimetrik yanıtlarındaki düşüş değerlendirilerek kullanım süresi belirlenmiştir.

4.2.8 İmmünosensörlere farklı antikorların spesifik olmayan bağlanmalarının incelenmesi

Farklı taşıyıcı sistemler içeren optimize immünosensörlere farklı antikorların spesifik olmayan bağlanma etkisi incelenmiştir. Bu amaçla optimize immünosensörler, IgG ile

aynı konsantrasyondaki anti-TNF α , anti-MOG, anti-MAG ile aynı optimize inkübasyon sürelerinde inkübe edilmiştir.

4.2.9 İmmünosensörlerin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi

Geliştirilen immünosensörlerin immobilizasyon basamaklarında EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Buna göre; elde edilen verilere neticesinde elektrot modifikasyonun etkinliği, PrA-IgG bağlanma reaksiyonunun elektrokimyasal kinetiği tarama hızları değiştirilerek CV voltamogramları ile incelenmiştir.

4.2.10 Kalibrasyon grafiklerinin çizilmesi

Optimizasyonları tamamlanmış her bir immünosensör sistemi için 0.975-20000 ng/ μ L aralığında IgG konsantrasyonları denenmiş ve elde edilen impedimetrik sinyaller neticesinde kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde Jelatin-Aljinat, Jelatin-Aljinat-ZnO immünosensörleri için oluşturulan kalibrasyon eğrilerinde nanopartikül etkisi tayin limitlerine göre kıyaslanmıştır.

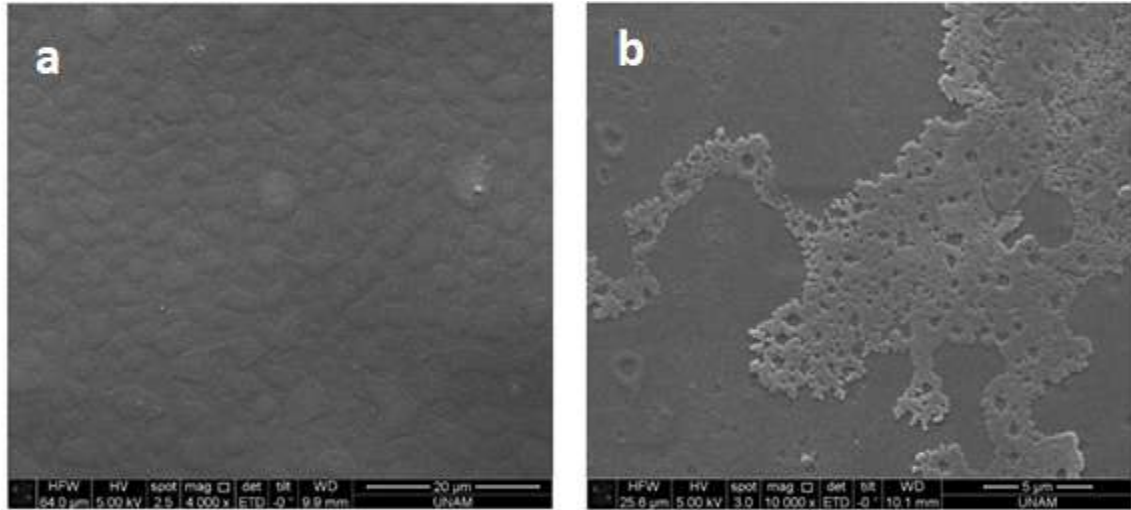
4.2.11 Geliştirilen immünosensörlerin BOS ve serumda denenmesi

Tayin limiti en düşük konsantrasyona sahip immünosensör sistemi, örnek konsantrasyonları farklı yöntemle önceden tespit edilmiş BOS ve serumda denenmiştir.

5. BULGULAR

5.1 SEM Bulgularının Değerlendirilmesi

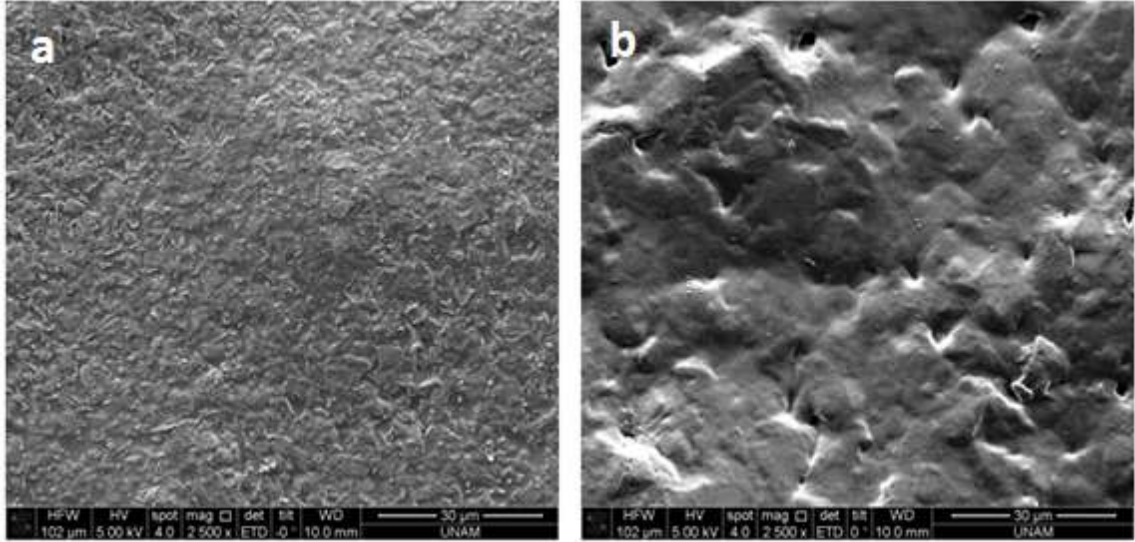
İmmünoensörlerin geliştirilmesinde immobilizasyonların başarısını fiziksel olarak denetlemek için Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkez (UNAM) biriminde SEM ve AFM ölçümleri alınmıştır. Bu amaçla Jelatin, Jelatin-PrA, Jelatin-ZnO-PrA, Aljinat, Aljinat-PrA, Aljinat-ZnO-PrA, Jelatin-Aljinat, Jelatin-Aljinat-ZnO, Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA filmlerinin bulguları şekil 5.1-4'de verilmektedir.



Şekil 5.1 a. Jelatin, b. Jelatin-PrA filmlerinin SEM mikrografları

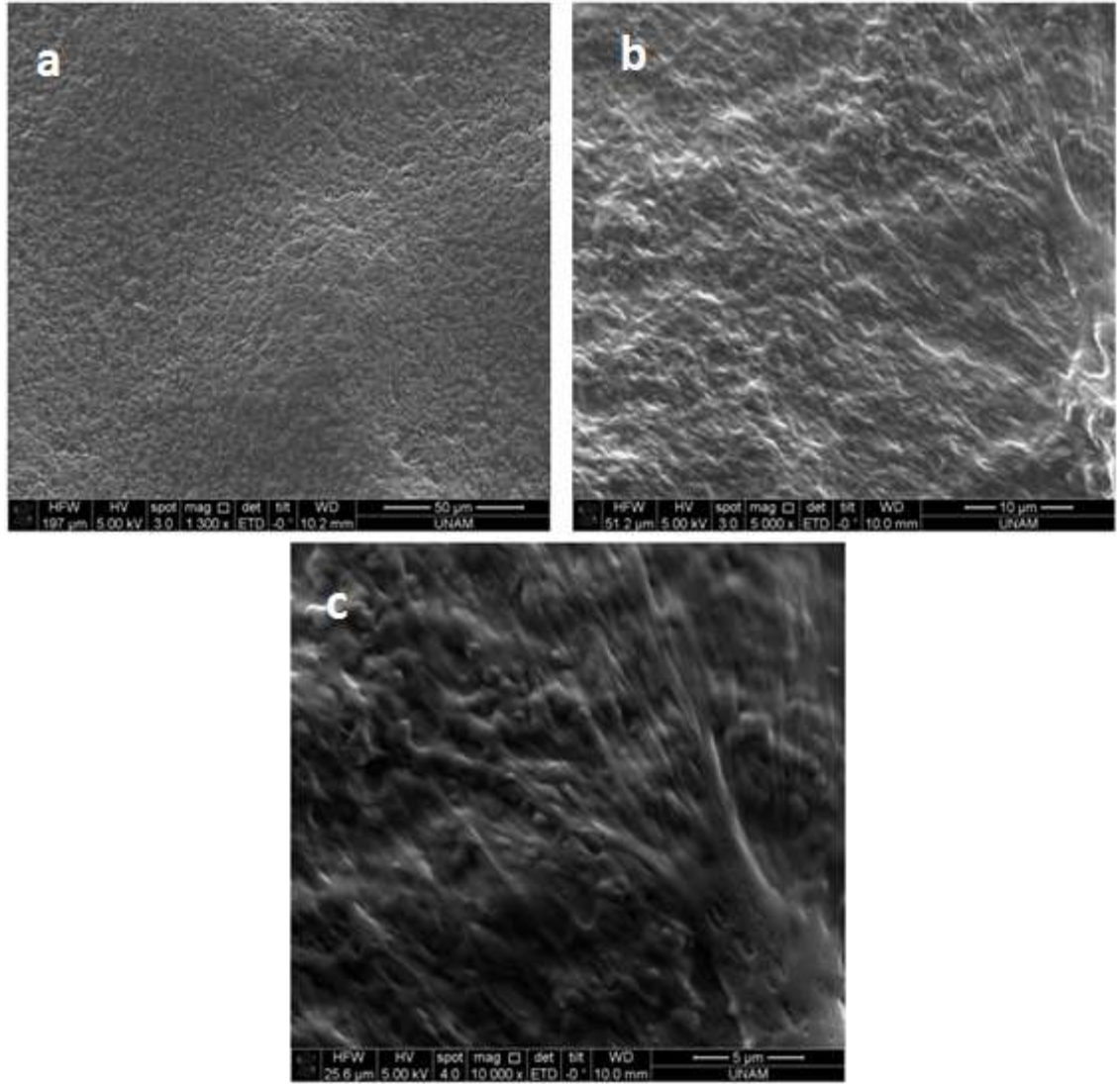
Şekil 5.1'de jelatin taşıyıcıdan oluşan elektrotların SEM mikrografları verilmiştir. Sadece jelatin içeren mikrografta bakıldığında (Şekil 5.1 a) mikroadacıklardan oluşan bir yapı göze çarpmaktadır. Bu yapı elektrot yüzeyinin tamamen polimer ile kaplanmadığını ve bu nedenle elektroda kısmen ve doğrudan elektron transferinin gerçekleştiğini göstermektedir. Fakat jelatin ile immobilize edilmiş Pt elektrot fosfat tamponundan oluşan elektrokimyasal ölçümün alınacağı hücre içerisine alındığında, jelatin şişerek şekil 5.1. a'daki boş yüzeylerin kapanmasına neden olmaktadır. Böylece elektrot yüzeyi polimer ile tamamen kaplanmış olup, elektroda doğrudan elektron

transferi gerçekleşmemektedir. Jelatin taşıyıcıya ait bir diğer mikrograf olan 5.1 b’de globüler PrA’nın immobilizasyonu kanıtlanmaktadır.



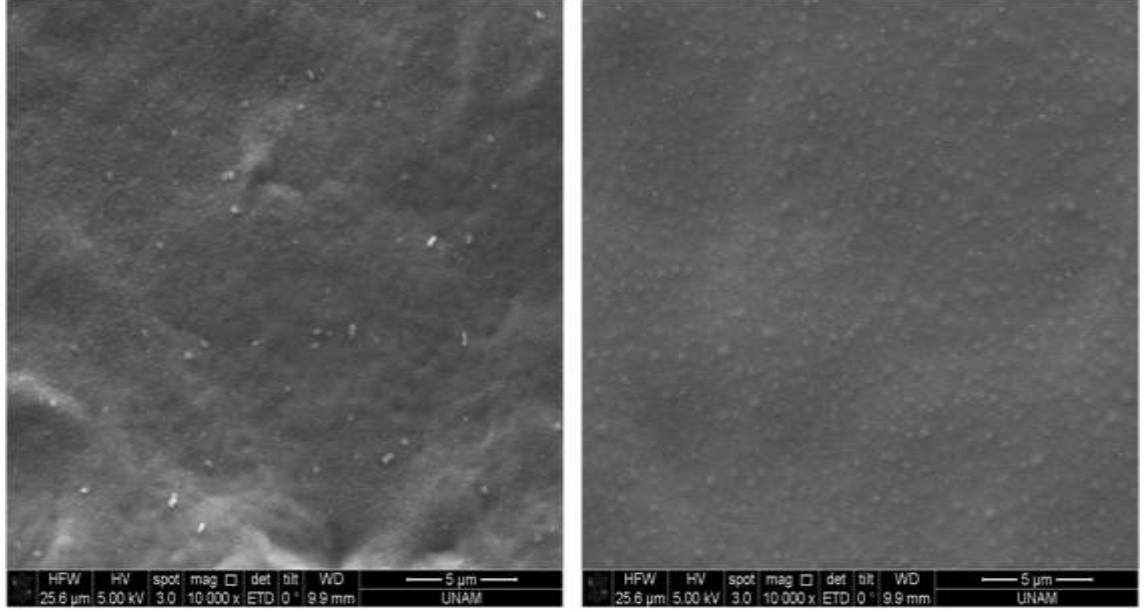
Şekil 5.2 a. Aljinat, b. Aljinat-PrA filmlerinin SEM mikrografları

Şekil 5.2’de aljinat taşıyıcıya ait mikrograflar verilmiştir. Şekil 5.2 a’da verilen mikrografta sadece aljinat içeren yapı görülmektedir. Elde edilen bu görüntü neticesinde kuru ortamda dahi aljinatın jelatine göre elektrot yüzeyini daha başarılı kapladığı söylenebilmektedir. Tez çalışması kapsamında film yapısının kararlılığına dayanan tekrar üretilebilirlik ve raf ömrü çalışmalarının sonucuna göre de Aljinat-PrA immünosensörü, Jelatin-PrA immünosensörüne göre daha karardır. Şekil 5.2 b’de verilen mikrografta ise aljinat polimerine gömülü globüler PrA yapısı görülmektedir.



Şekil 5.3 a. Jelatin-Aljimat, Jelatin-Aljimat-PrA (5.000x), Jelatin-Aljimat-PrA (10.000x) filmlerinin SEM mikrografları

Şekil 5.3’de Jelatin-Aljimat polimer karışımından oluşan taşıyıcı sisteme ait mikrograflar verilmiştir. Şekil 5.3 a’da verilen mikrografa göre Jelatin-Aljimat polimer karışımından oluşan mikrografın tek polimer mikrograflarına göre daha sıkı bir yapıya sahip olduğu gözlenmektedir. Bu yapı, PrA optimizasyon sonuçlarından da görüleceği üzere, diğer immünosensör sistemlerine göre immobilize edilen PrA miktarında belirgin bir artışa neden olmuştur. Şekil 5.3 b ve c’de globüler PrA’nın polimer sistemine immobilizasyonunun oldukça başarılı olduğu ve taşıyıcı sistem arasındaki ağ ilişkisi görülmektedir.

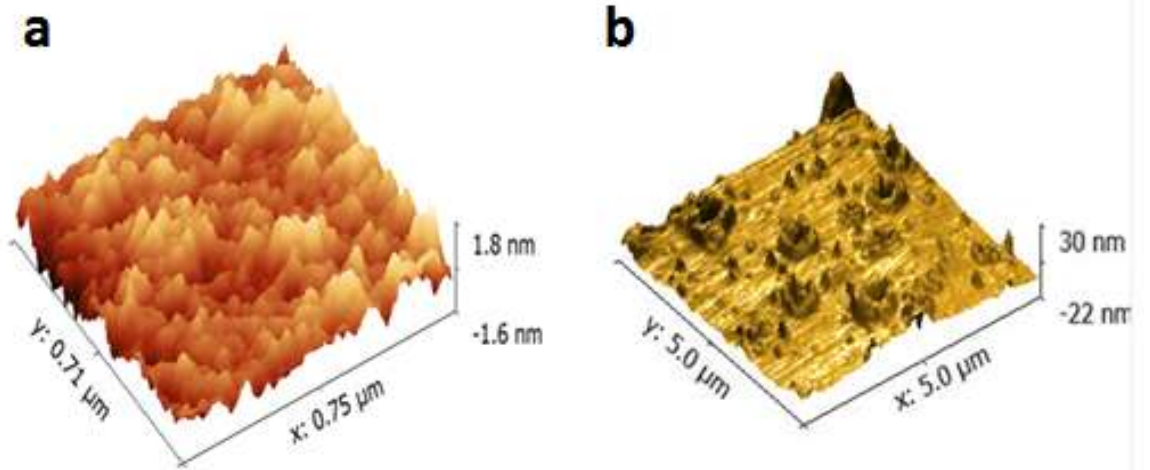


Şekil 5.4 a. Jelatin-Aljinat-ZnO, b. Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA filmlerinin SEM mikrografları

Şekil 5.4’de Jelatin-Aljinat taşıyıcı sistemine ZnO nanopartikül ilavesi sonucu elde edilen SEM mikrografları verilmiştir. Polimer karışımına nanopartikül ilavesi şekil 5.4 a’da açıkça görülmektedir. Şekil 5.4 b’de ise nanokompozit yapıya globüler PrA ilavesi sonucu elde edilen mikrograf verilmiştir. Polimer karışımına ZnO ilavesinin yüzey alanı arttırıcı etkisi, şekil 5.4 b’deki mikrografta immobilize edilen PrA miktarındaki artış sayesinde fark edilebilmektedir.

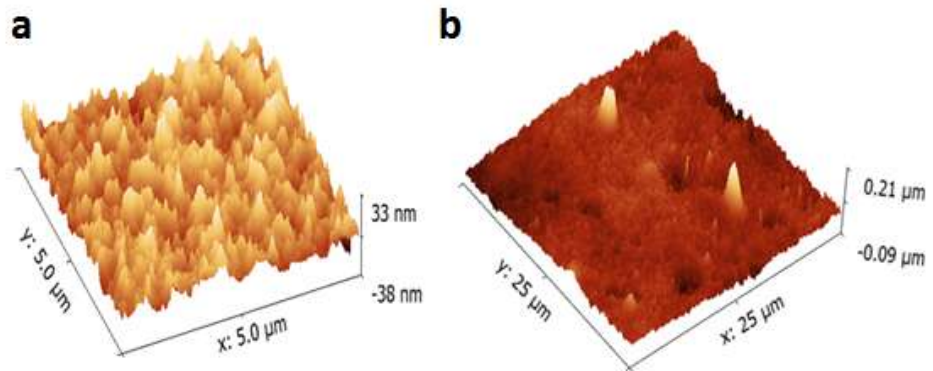
5.2 AFM Bulgularının Değerlendirilmesi

İmmünoşensör karakterizasyonunda SEM ve AFM ölçümleri birbirini tamamlayıcı tekniklerdir. SEM analizlerinde yüzeyin yüksek çözünürlüklü fakat üç boyutlu olmayan görüntüleri elde edilirken, AFM üç boyutlu görüntüler sağlayarak yüzey topografyası hakkında detaylı bilgi vermektedir. Şekil 5.5’de Jelatin ve Jelatin-PrA filmlerinin AFM görüntüleri verilmiştir. Taşıyıcı sistem jelatinin üzerine globüler şeklindeki PrA’nın immobilizasyonu açıkça görülmektedir.



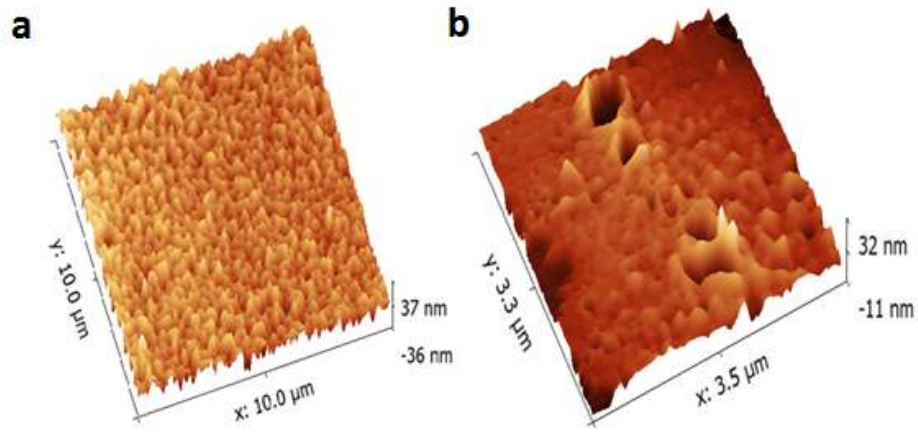
Şekil 5.5 a. Jelatin, b. Jelatin-PrA filmlerinin AFM görüntüleri

Aljinat ve Aljinat-PrA filmlerinin AFM görüntüleri ise şekil 5.6'da verilmiştir. Taşıyıcı sistem olan aljinata globüler şeklindeki PrA'nın immobilizasyonu jele gömülü şekilde görülmektedir. Taşıyıcı aljinat sistemine ilave edilen PrA'nın verildiği AFM görüntüsü (Şekil 5.6 b) Jelatin-PrA AFM görüntüsüyle (Şekil 5.5 b) karşılaştırıldığında Aljinat-PrA immünosensörünün daha sıkı bir yapı oluşturduğu görülebilmektedir. Böylece PrA immobilizasyonu için gerekli yüzey alanı artmıştır. Bu sonuç tez kapsamında yapılan PrA optimizasyon çalışmalarının sonucunu da desteklemektedir. Yapılan PrA optimizasyon çalışmasına göre aljinat immünosensörü için gerekli optimum PrA konsantrasyonu jelatine göre 2 kat daha fazladır.



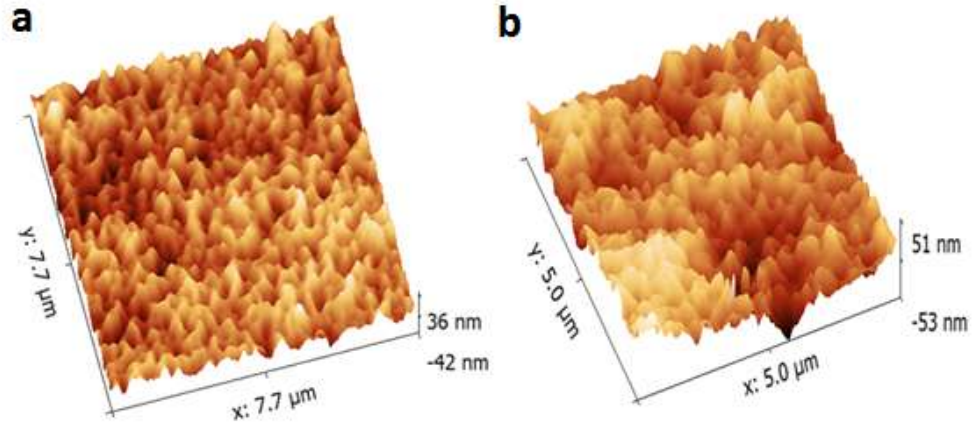
Şekil 5.6 a. Aljinat, b. Aljinat-PrA filmlerinin AFM görüntüleri

Aljinat-Jelatin taşıyıcı sistemin yüzey topografyası ve polimer kompozite gömülü haldeki PrA'ların oluşturduğu topografya ise şekil 5.7 a ve b'de görülmektedir. Aljinat-Jelatin taşıyıcı sisteminin AFM görüntüsü (Şekil 5.6 a) tek polimerlere ait AFM görüntüleriyle kıyaslandığında (5.5 a-5.6 a) polimer karışımının çok daha sıkı bir yapıya sahip olduğu ve elektrot yüzey alanını oldukça arttırdığı görülmektedir. Bu sonuç, tez kapsamında yapılan PrA optimizasyon çalışmasının verilerini de desteklemektedir. En yüksek optimum PrA konsantrasyonuna sahip immünosensör Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörüdür.



Şekil 5.7 Aljinat-Jelatin, Aljinat-Jelatin-PrA filmlerinin AFM görüntüleri

Şekil 5.8'de Aljinat-Jelatin-ZnO'dan oluşan nanokompozit yapı ve bu yapıya ilave edilmiş PrA'ların oluşturduğu topoğrafya görülmektedir. Aljinat-Jelatin taşıyıcı sistemine nanopartikül ilavesinin yüzey alanını oldukça genişlettiği şekil 5.8 a'da açıkça fark edilmektedir. Diğer taşıyıcı sistemlere göre elde edilen yüksek yüzey alanı etkisi, IgG için yapılan kalibrasyon çalışmasında daha düşük tayin sınırlarına inilebilmesini de desteklemektedir.

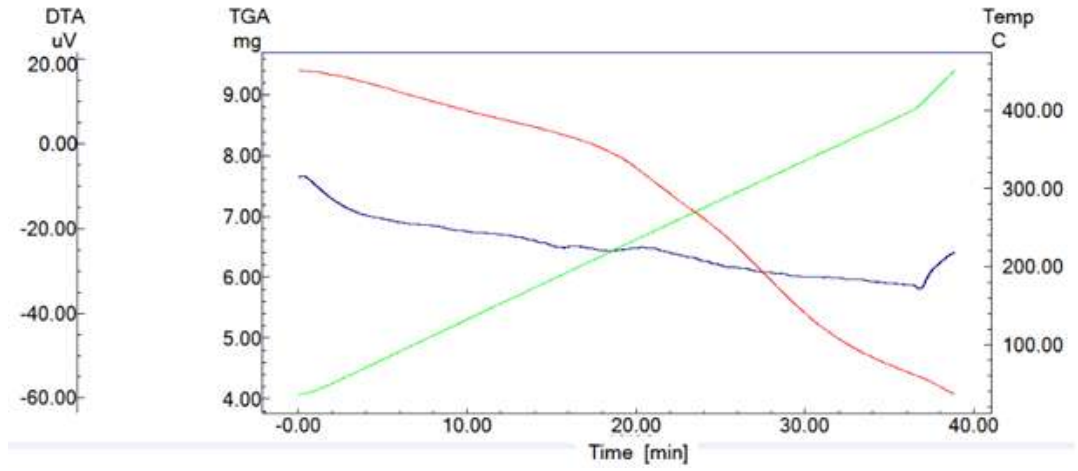


Şekil 5.8. a. Aljinat-Jelatin-ZnO, b. Aljinat-Jelatin-ZnO-PrA filmlerinin AFM görüntüleri

5.3 Termogravimetrik Analiz (TGA) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Sonuçları

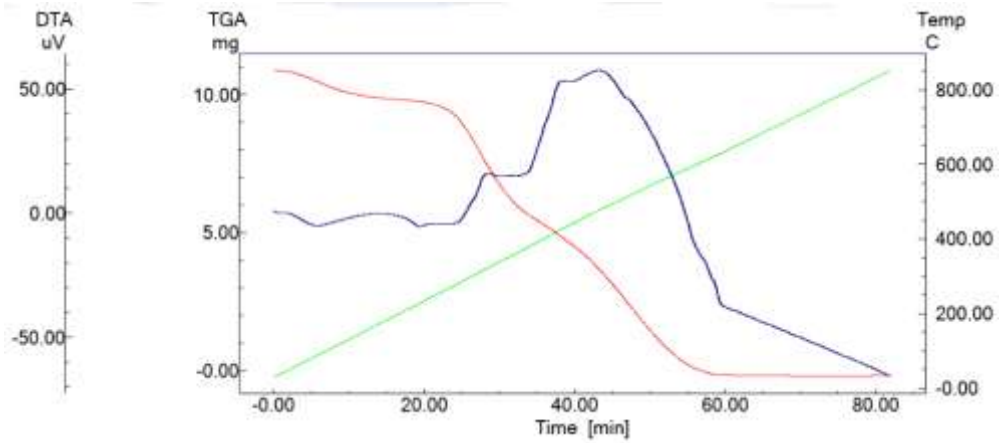
İmmünoşensör geliştirilirken Jelatin, kitosan, aljinat polimerleri ile jelatin-kitosan, jelatin-aljinat kompozitleri kullanılmıştır. Kullanılan bu polimer ve kompozitlerin karakterizasyonu termogravimetrik analiz (TGA), diferansiyel termal analiz (DTA) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Aljinat; deniz yosunları tarafından üretilen doğal bir polisakkarittir. Suda çözünürlüğü az olmasına rağmen, suyu iyi absorbe eden bir maddedir. Şekil 5.9’da görülen TG termograma bakıldığında aljinatın %52’sinin 40 dakikada tek aşamalı endotermik bir bozulma gerçekleştirdiği görülmektedir.



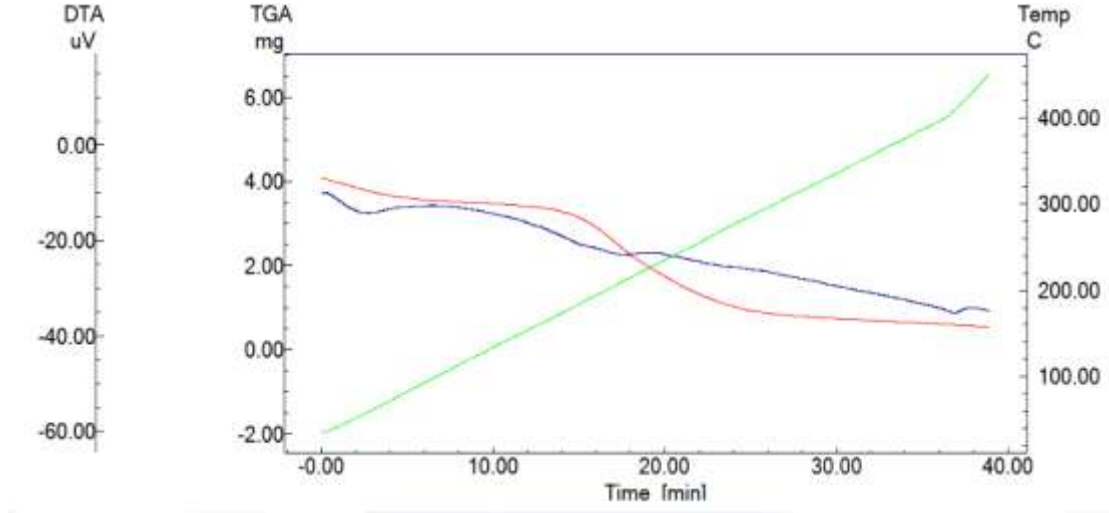
Şekil 5.9 Aljinatın Termogramı

Jelatin, hayvan kemik, bağ doku, bağırsak ve organlarındaki kollojenlerin kısmi hidrolize edilmesi ile üretilen, farklı zincir uzunlukları içeren, karboksil (-COOH), hidroksil (-OH) ve amin (-NH₂) fonksiyonel gruplarına sahip polipeptit bir yapıdır. Suda ve organik çözücülerde çözünmez, ancak su çeker. Bu özelliğinden dolayı kıvam artırıcı, jelleştirici, film oluşturu bir maddedir. Şekil 5.10'daki termogramda jelatinin tamamının endotermik bir reaksiyon ile 80 dakikada bozulduğu ancak bozulma sırasında ara ürünleri kararlı olmayan çoklu bozunum basamakları görülmüştür.



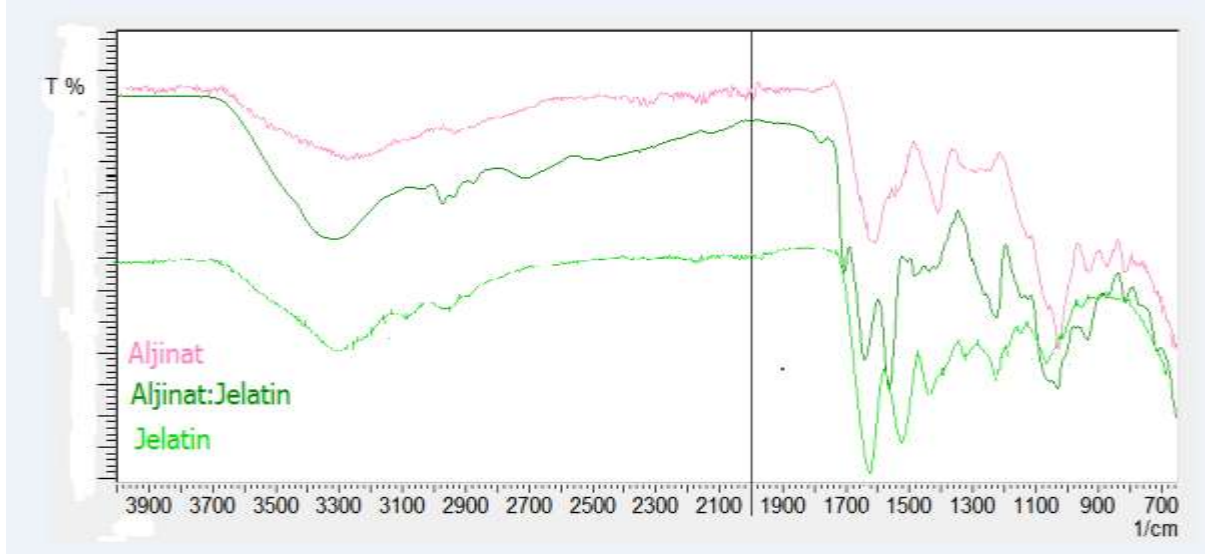
Şekil 5.10 Jelatinin Termogramı

Jelatin-aljinat kompozitinin termogramı incelendiğinde 40 dakikada kompozitin %62,5 i tekli bozulum basamağı ile kararlı bir ürün oluşturacak şekilde bozulduğu görülmüştür (Şekil 5.11).



Şekil 5.11 Jelatin-aljinat kompozitinin termogramı

Taşıyıcı sistem aljinata ait FTIR spektrumunda yaklaşık 1030 cm^{-1} 'de yer alan pik aljinatın polisakkarit yapısından kaynaklanan C-O-C gerilmesini yansıtmaktadır. Yaklaşık 1615 ve 1415 cm^{-1} 'de yer alan pikler ise aljinat yapısındaki karboksilat tuzunun asimmetrik ve asimmetrik olmayan piklerini temsil etmektedir. Jelatin/Aljinat polimer karışımında aljinat spektrumuna ait C-O-C gerilme bandı yerini korumuştur. Ayrıca Jelatin/Aljinat 1415 cm^{-1} 'deki pik transmittans şiddetini oldukça kaybetmiştir. Genel olarak polimer karışımı tek polimerlere ait spektrumlarla kıyaslandığında jelatine oldukça benzer bir profil vermiştir. Elde edilen bu bilgiyle polimer karışımının jelatine ait -OH ve -NH reaktif gruplarını ve aljinata ait polisakkarit yapıyı koruduğu sonucuna varılabilmektedir.



Şekil 5.12 Aljinat, Jelatin, Jelatin-Aljinat için FTIR spektrumları

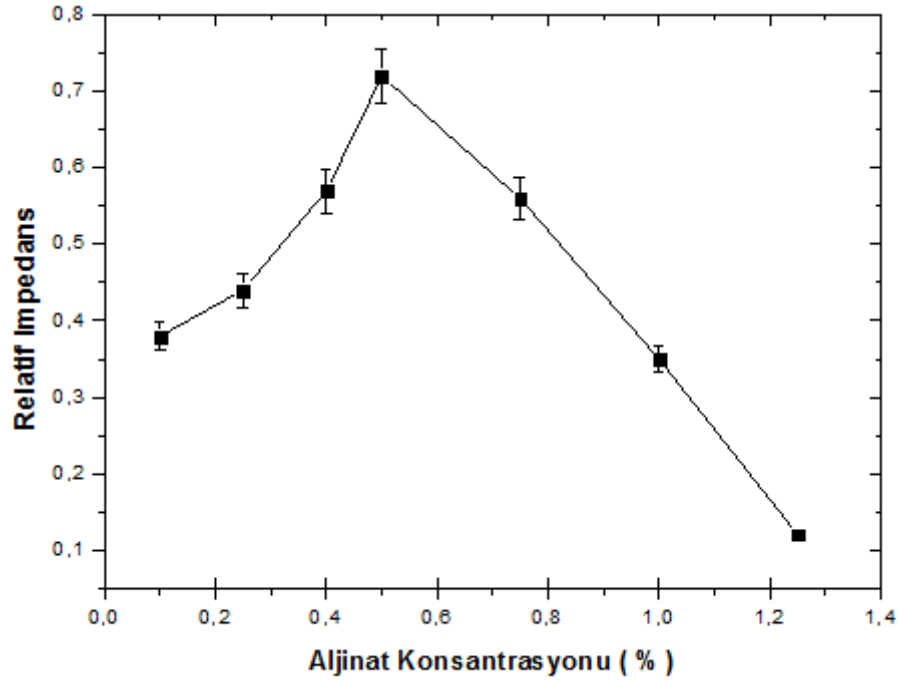
5.4 Optimizasyon Çalışmaları

5.4.1 Polimer konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisi

Geliştirilecek immünosensörler için optimizasyon çalışmalarında öncelikli olarak polimer konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla PrA ($1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonları (gluteraldehit 0.004 mol.L^{-1} , EDC/NHS 0.01 mol.L^{-1}) sabit tutulup farklı polimer konsantrasyonları denenmiştir. Farklı polimer konsantrasyonlarından elde edilen impedans sinyalleri ile impedans grafikleri çizilmiş ve optimize polimer konsantrasyonu bulunmuştur. Polimer optimizasyonlarının tamamında $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ IgG kullanılmıştır.

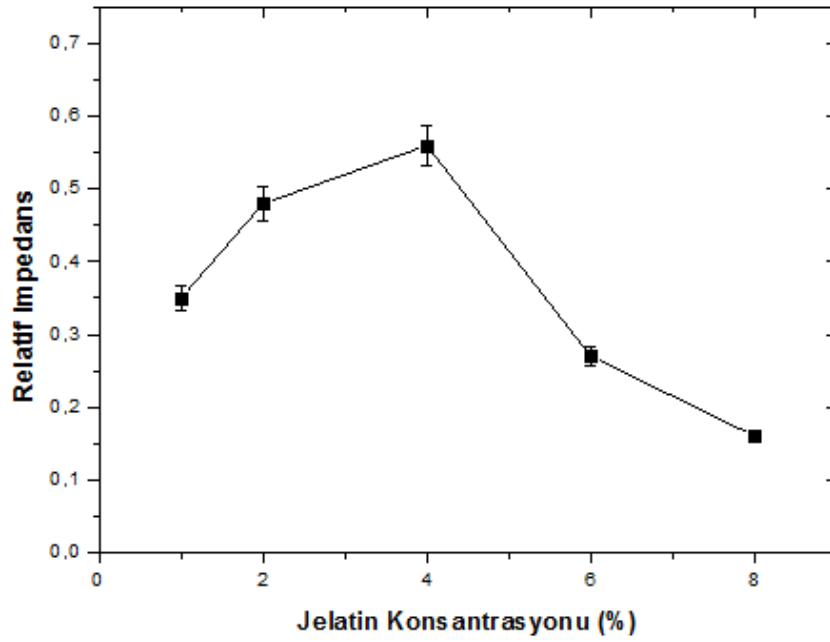
Aljinat konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisini belirlemek ve optimum aljinat konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla polimer optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla immobilizasyon jeli içerisinde PrA ($1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve çapraz bağlayıcı sistemi olan NHS/EDC konsantrasyonları (toplam 0.01 mol.L^{-1}) sabit olmak koşuluyla % 0.1-1.25 aralığında aljinat içeren jellerin her biri ayrı ayrı platin elektrotlara immobilize edilmiştir. Elde edilen impedimetrik sinyaller sonucunda optimum aljinat

konsantrasyonu % 0.5 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.13). Tüm Aljinat-PrA immünosensör optimizasyonlarında $1.0 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ IgG kullanılmıştır.



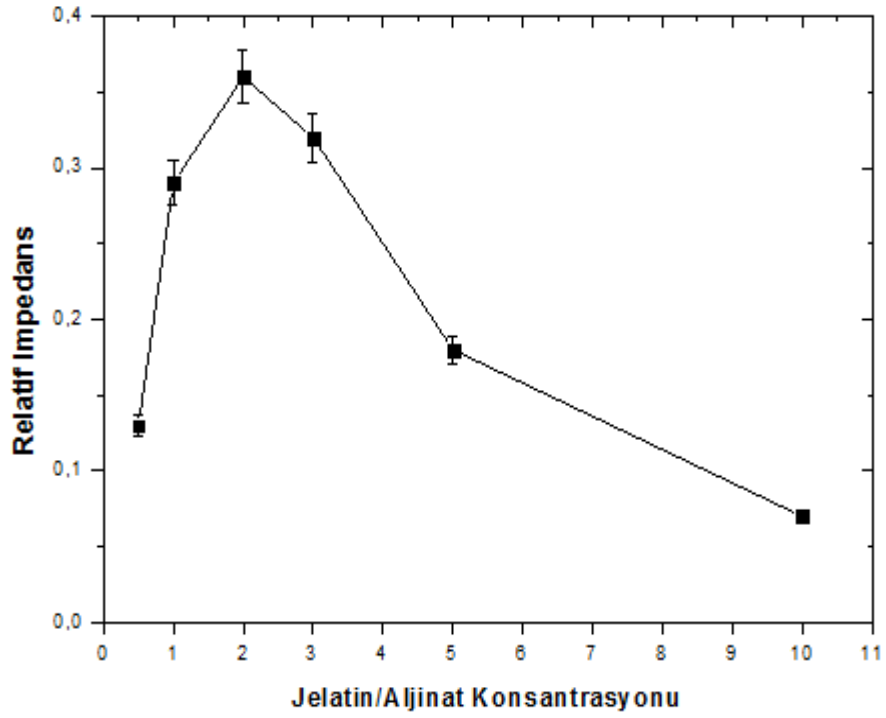
Şekil 5.13 Aljinat Konsantrasyonunun Aljinat-PrA İmmünosensör Cevabına Etkisi

Jelatin konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisini belirlemek ve optimum jelatin konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla polimer optimizasyonu yapılmıştır. İmmobilizasyon jeli içerisinde PrA ($1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) ve glutaraldehit ($0.004 \text{ mol}.\text{L}^{-1}$) konsantrasyonları sabit tutularak polimer konsantrasyonunun optimizasyonu Pt elektrotların yüzeyinde değişik konsantrasyonlarda gerçekleştirilmiştir. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan jelatin (% 1- 8) içeren immobilizasyon jelleri her bir platin elektrot yüzeyine immobilize edilmiştir. Değişen polimer konsantrasyonlarına karşı relatif impedans grafiği çizilmiştir. Optimizasyonların tamamında $1 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ IgG kullanılmıştır. Elde edilen veriler neticesinde geliştirilecek Jelatin-PrA immünosensörü için optimum jelatin konsantrasyonu % 4 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.14).



Şekil 5.14 Jelatin Konsantrasyonunun Jelatin-PrA İmmünosensör Cevabına Etkisi

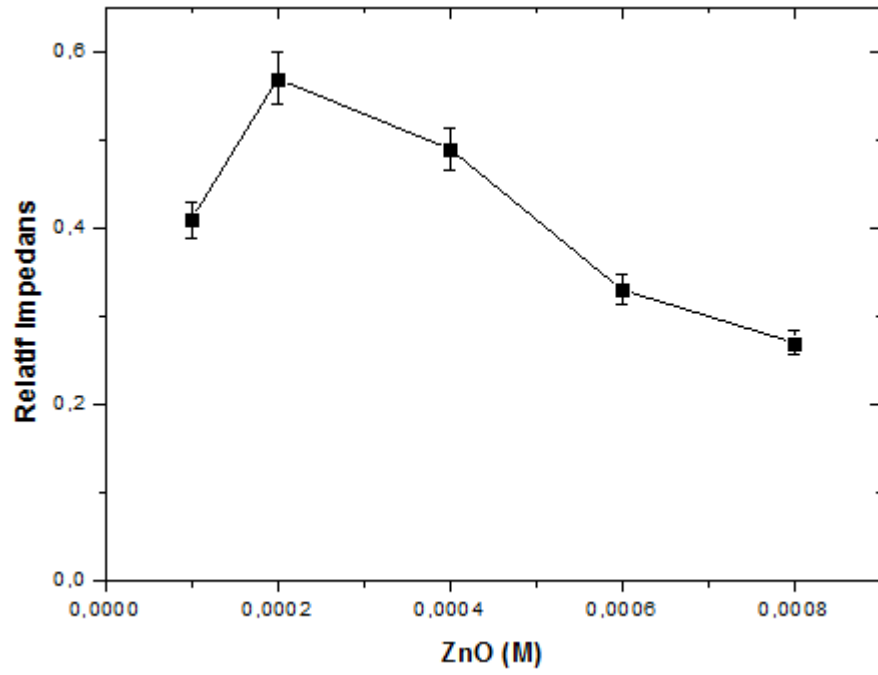
Jelatin/Aljinat konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisini belirlemek ve optimum aljinat konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla polimer optimizasyonu yapılmıştır. İmmobilizasyon jeli içerisinde PrA ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve Gluteraldehit (0.004 mol.L^{-1}) konsantrasyonları sabit tutularak polimer konsantrasyonunun optimizasyonu platin elektrotların yüzeyinde gerçekleştirilmiştir. Ependorf içerisinde sabit % 4 polimer konsantrasyonu olacak şekilde 0,5, 1, 2, 5, 10 jelatin/aljinat oranları içeren immobilizasyon jelleri ile her bir platin elektrot yüzeyi immobilize edilmiştir. Değişen polimer konsantrasyonlarına karşı relatif impedans grafiği çizilmiştir. Optimizasyonların tamamında $1 \mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ IgG kullanılmıştır. Elde edilen veriler neticesinde geliştirilecek Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörü için optimum polimer konsantrasyonu 2:1 jelatin/aljinat olarak belirlenmiştir (Şekil 5.15).



Şekil 5.15 Jelatin/Aljinat Oranının Jelatin-Aljinat-PrA İmmünosensör Cevabına Etkisi

5.4.2 ZnO optimizasyonu

Taşıyıcı sistemi Jelatin-Aljinat polimer kompozitinden oluşan immünosensör cevabına nanopartikül konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla ilave olarak Jelatin-Aljinat-ZnO immünosensörü geliştirilmiştir. Nanopartikül ilavesi yalnızca optimizasyonları tamamlanmış Jelatin-Aljinat taşıyıcı sisteminden oluşan immünosensör için denenmiştir. Bu amaçla nanopartikül optimizasyonu için ependorf içerisinde Jelatin/Aljinat oranı (2:1), PrA konsantrasyonu ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve çapraz bağlayıcı gluteraldehit konsantrasyonu ($0,004 \text{ mol.L}^{-1}$) sabit tutularak 0,0001, 0,0002, 0,0004, 0,0006, 0,0008 mol.L^{-1} ZnO konsantrasyonları denenmiştir. Elde edilen veriler neticesinde optimum ZnO konsantrasyonu $0,0002 \text{ mol.L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.16).

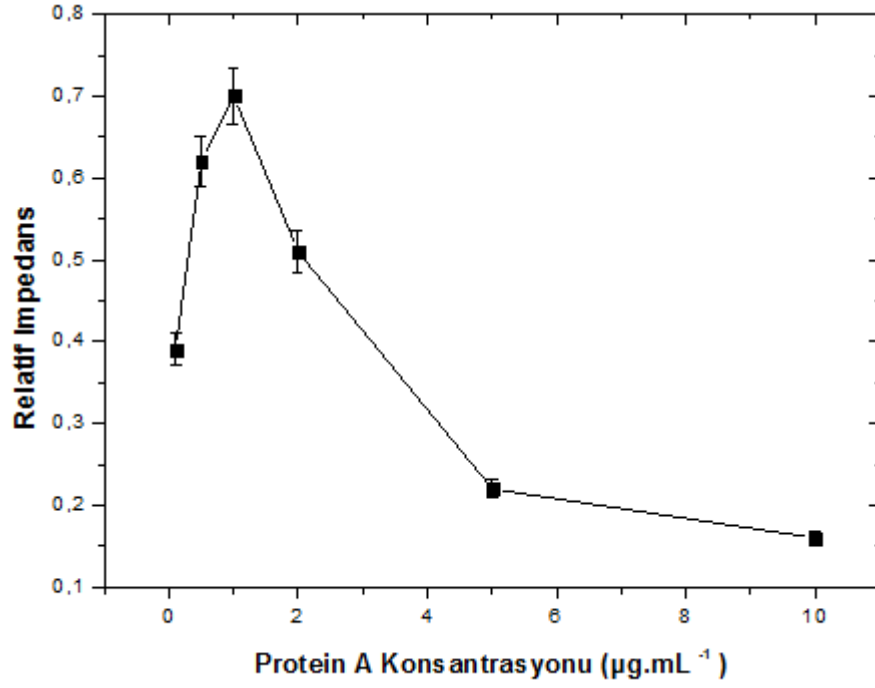


Şekil 5.16 Nanopartikül Konsantrasyonunun Jelatin-Aljinat-ZnO İmmünosensör cevabına etkisi

5.4.3 Protein A konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisi

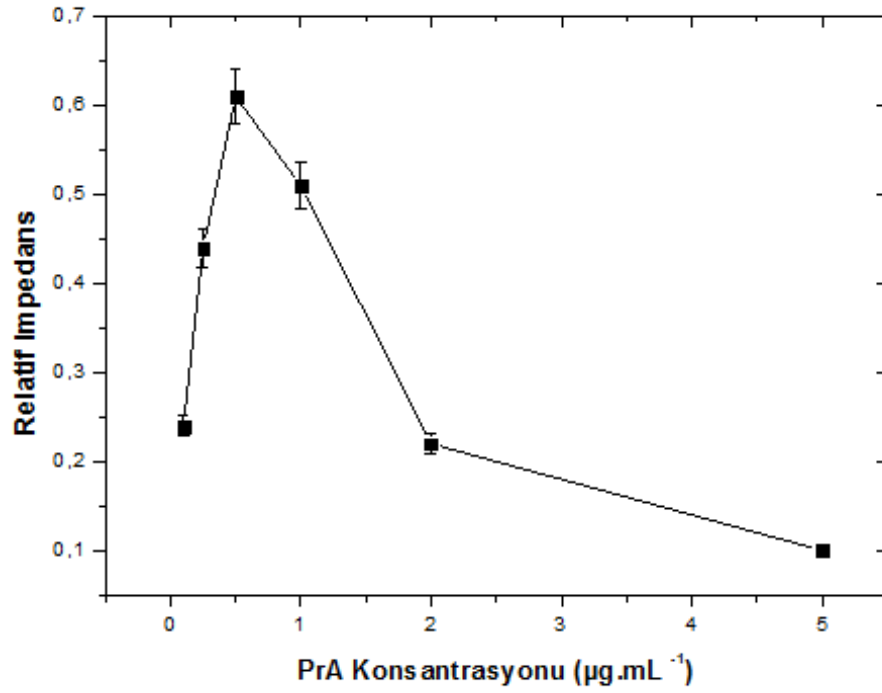
PrA konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisini belirlemek ve optimum PrA konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla PrA optimizasyonu yapılmıştır.

Aljinat-PrA immünosensörü için PrA optimizasyonunun yapılması amacıyla immobilizasyon jeli içerisinde aljinat (% 0,5) ve NHS/EDC (toplam $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$) konsantrasyonları sabit tutularak PrA optimizasyonları platin elektrotların yüzeyinde gerçekleştirilmiştir. $0,1 - 10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda PrA içeren immobilizasyon jelleri ile her bir platin elektrot yüzeyi kaplanmıştır. Optimizasyonların tamamında $1 \text{ } \mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ IgG kullanılmıştır. Değişen PrA konsantrasyonlarına karşı relatif impedans grafiği çizilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde optimum PrA konsantrasyonu $1,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.17).



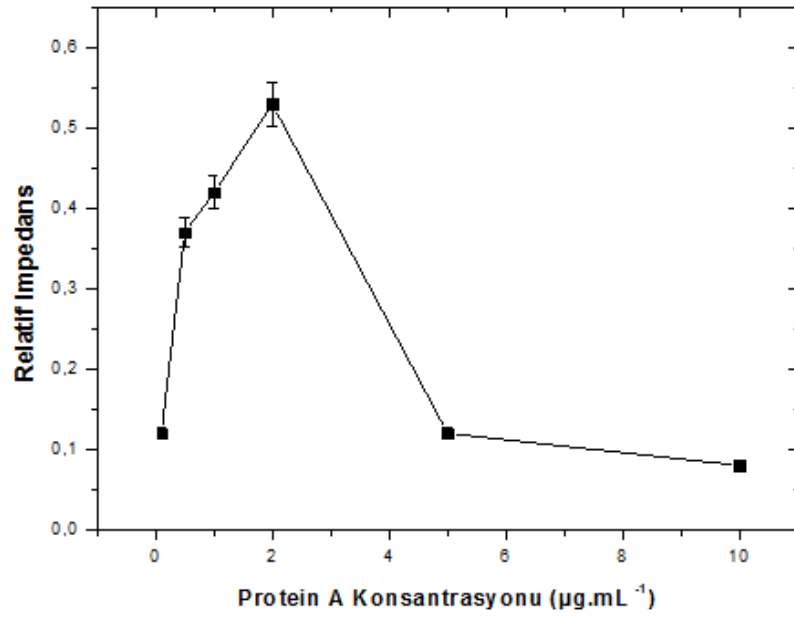
Şekil 5.17 PrA Konsantrasyonunun Aljinat-PrA İmmünosensörüne cevabına etkisi

Jelatin-PrA immünosensörü için PrA optimizasyonunun yapılması amacıyla immobilizasyon jeli içerisinde jelatin (%4) ve glutaraldehit (0.004 mol.L^{-1}) konsantrasyonları sabit tutularak PrA optimizasyonları platin elektrotların yüzeyinde gerçekleştirilmiştir. $0.1-5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda PrA içeren immobilizasyon jelleri ile her bir platin elektrot yüzeyi kaplanmıştır. Değişen PrA konsantrasyonlarına karşı relatif impedans grafiği çizilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde optimum PrA konsantrasyonu $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.18). Optimizasyonların tamamında $1 \mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ IgG kullanılmıştır.



Şekil 5.18 Protein A Konsantrasyonunun Jelatin-PrA İmmünosensör cevabına etkisi

Jelatin-Aljinat immünosensörü için PrA optimizasyonunun yapılması amacıyla immobilizasyon jeli içerisinde polimer oranı (2:1) ve glutaraldehit (0.004 mol.L^{-1}) konsantrasyonları sabit tutularak PrA optimizasyonları platin elektrotların yüzeyinde gerçekleştirilmiştir. $0.1-10 \text{ µg.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda PrA içeren immobilizasyon jelleri ile her bir platin elektrot yüzeyi kaplanmıştır. Optimizasyonların tamamında 1 µg.µL^{-1} IgG kullanılmıştır. Değişen PrA konsantrasyonlarına karşı relatif impedans grafiği çizilmiştir. Optimum PrA konsantrasyonu $2,0 \text{ µg.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil 5.19).

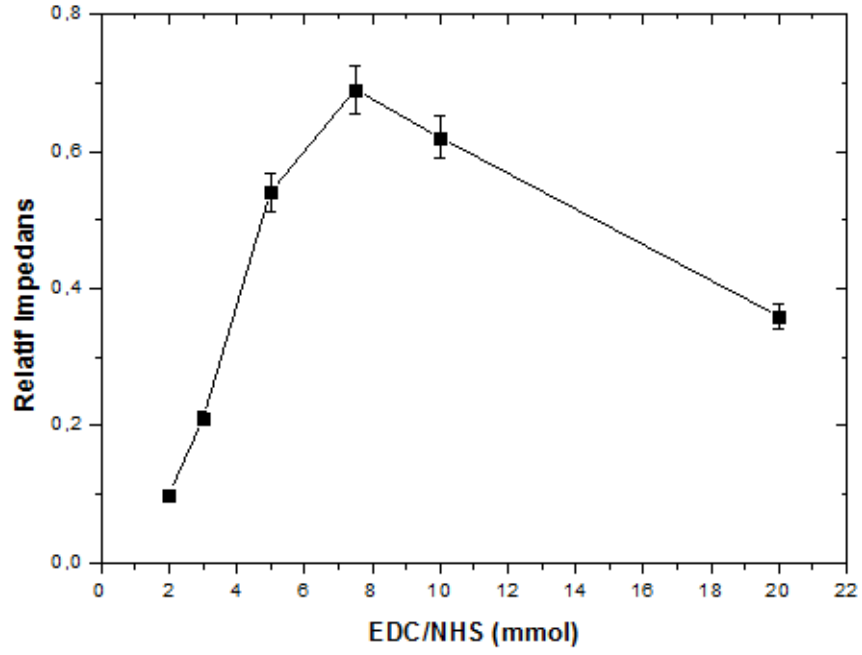


Şekil 5.19 PrA Konsantrasyonunun Jelatin-Aljinat-PrA İmmünosensör cevabına etkisi

5.4.4 Çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun immünosensör cevabına etkisi

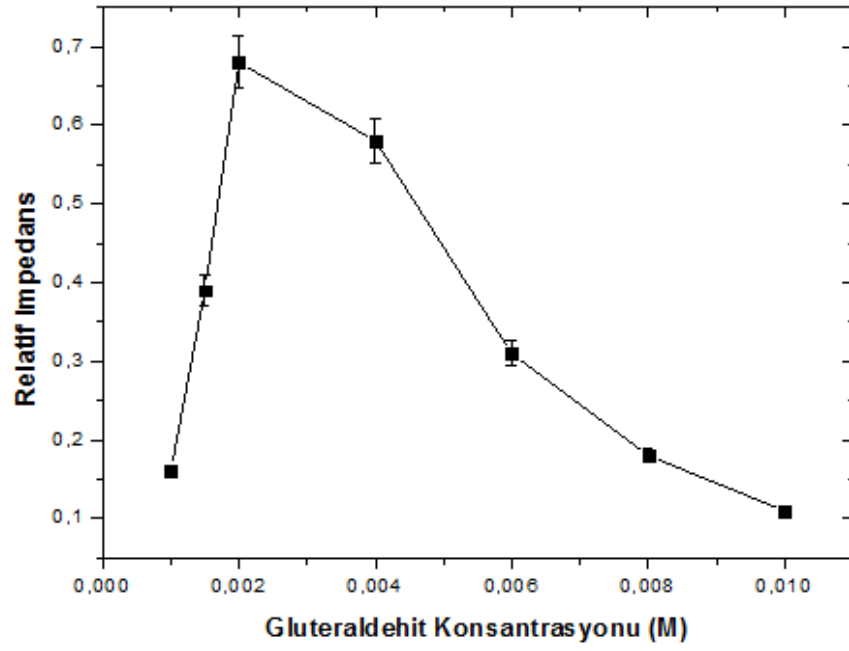
Farklı taşıyıcı sistemler içeren immünosensörlere çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisini tespit etmek için immobilizasyon jeli içerisinde polimer konsantrasyonu ve PrA konsantrasyonu sabit tutularak çapraz bağlayıcı optimizasyonları yapılmıştır.

Aljinat-PrA immünosensör sisteminde kullanılan çapraz bağlayıcı sistemi EDC/NHS, çapraz bağlayıcı reaksiyonunun sitokiyometrisi gereği immobilizasyon jeli içerisinde 2:1 konsantrasyon (mol.L⁻¹) oranında olacak şekilde ependorfa eklenmiştir. Optimum çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun tespiti için değişik konsantrasyonlarda EDC/NHS (Toplam 0,02-0,002 mol.L⁻¹) içeren immobilizasyon jelleri ile her bir platin elektrot yüzeyi kaplanmıştır. Aljinat (% 0,5) ve PrA (1,0 µg.mL⁻¹) konsantrasyonları sabit tutulmuştur. Optimizasyonların tamamında 1 µg.µL⁻¹ IgG kullanılmıştır. Değişen EDC/NHS konsantrasyonuna karşı relatif impedans grafiği çizilmiştir. Şekil 5.20’de görülebileceği gibi optimum çapraz bağlayıcı konsantrasyonu 0,0075 mol.L⁻¹ (7,5 mM) olarak belirlenmiştir.



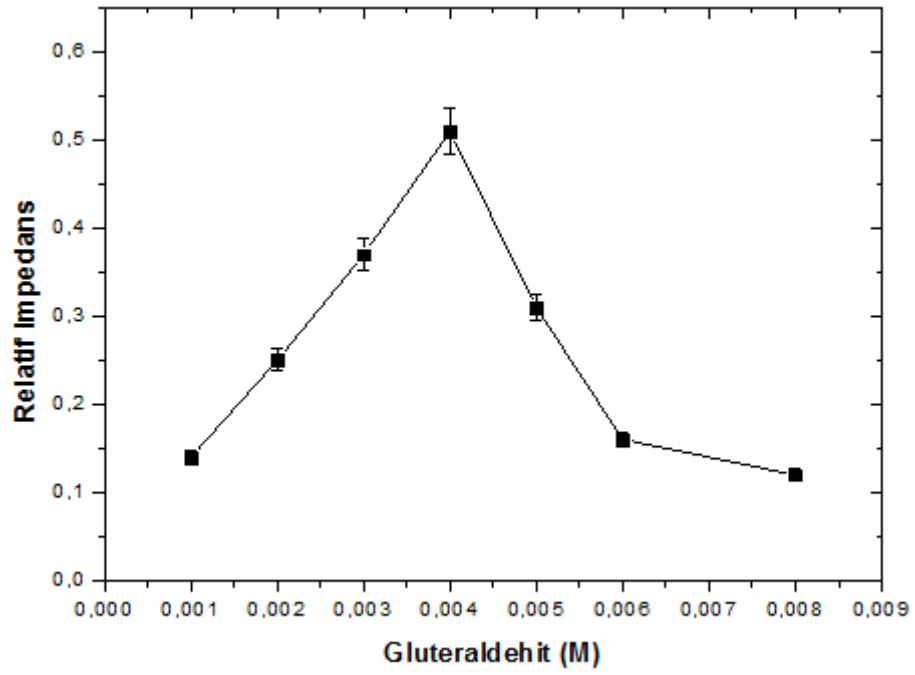
Şekil 5.20 Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Aljinat-PrA İmmünosensör cevabına etkisi

Jelatin-PrA immünosensörünün optimum çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun tayini için değişik konsantrasyonlarda gluteralehit ($0.001-0.01 \text{ mol.L}^{-1}$) içeren immobilizasyon jelleri ile her bir platin elektrot yüzeyi kaplanmıştır. Jelatin (%4) ve PrA ($0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) konsantrasyonları sabit tutulmuştur. Optimizasyonların tamamında $1 \mu\text{g.}\mu\text{L}^{-1}$ IgG kullanılmıştır. Değişen gluteralehit konsantrasyonuna karşı relatif impedans grafiği çizilmiştir. Şekil 5.21’de görülebileceği gibi optimum çapraz bağlayıcı konsantrasyonu 0.002 mol.L^{-1} olarak belirlenmiştir .



Şekil 5.21 Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Jelatin-PrA İmmünosensör cevabına etkisi

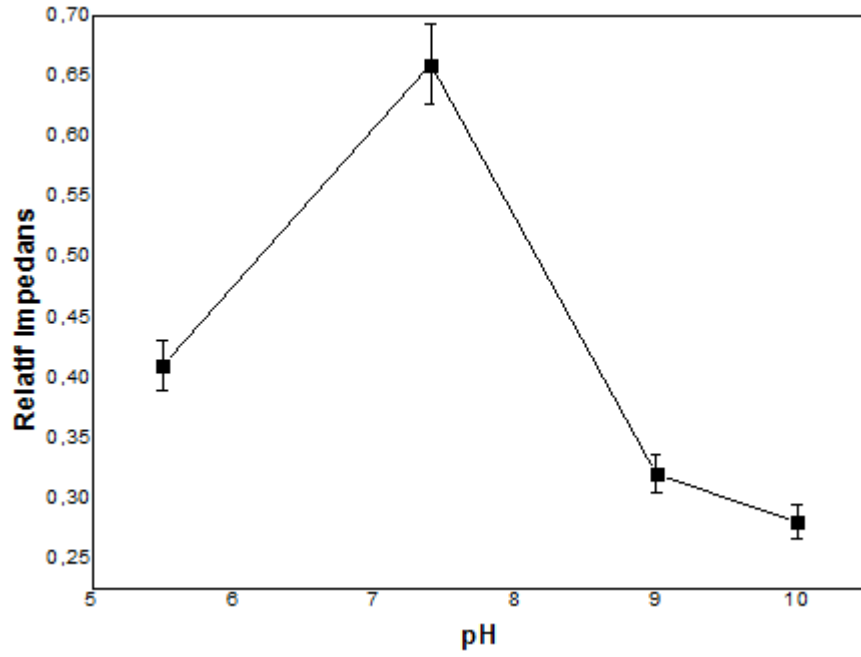
Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörünün optimum çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun tespiti için değişik konsantrasyonlarda 0.001- 0.008 mol.L⁻¹ aralığında glutaraldehit içeren immobilizasyon jelleri ile her bir platin elektrot yüzeyi kaplanmıştır. Jelatin-Aljinat (2:1) ve PrA (2,0 µg.mL⁻¹) konsantrasyonları sabit tutulmuştur. Optimizasyonların tamamında 1 µg.µL⁻¹ IgG kullanılmıştır. Değişen glutaraldehit konsantrasyonuna karşı relatif impedans grafiği çizilmiştir. Şekil 5.22’de görülebileceği gibi optimum çapraz bağlayıcı konsantrasyonu Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörü için 0.004 mol.L⁻¹ olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.22 Çapraz Bağlayıcı Konsantrasyonunun Jelatin-Aljinat-PrA İmmünönsensör cevabına etkisi

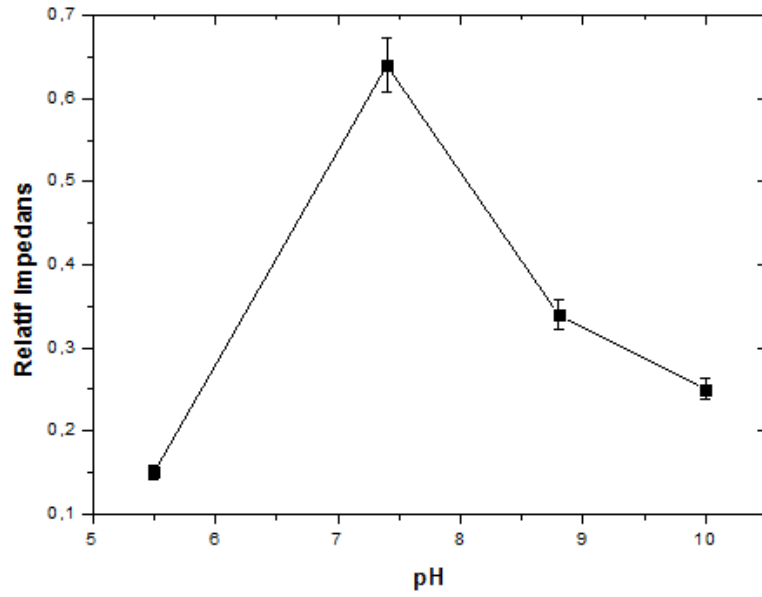
5.4.5 İmmünönsensör cevabına pH'nın etkisi

Farklı taşıyıcılardan oluşan mmünönsensörlerin geliştirilmesinde EIS ölçümünün alındığı elektrokimyasal hücre içerisinde asetat, fosfat, karbonat tamponları kullanılarak pH (5.5-10) optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Aljinat-PrA immünönsensörünün (% 0,5 aljinat, $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ PrA, toplam $0,0075 \text{ mol.L}^{-1}$ NHS/EDC) elektrokimyasal hücre içerisinde asetat tamponu (0.05 mol.L^{-1} , pH 5.5), fosfat tamponu (0.05 mol.L^{-1} , pH 7.4), karbonat tamponu (0.05 mol.L^{-1} , pH 9 ve 10) denenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda optimum pH 0.05 mol.L^{-1} , pH 7.4 fosfat tamponu olarak belirlenmiştir (Şekil 5.23).



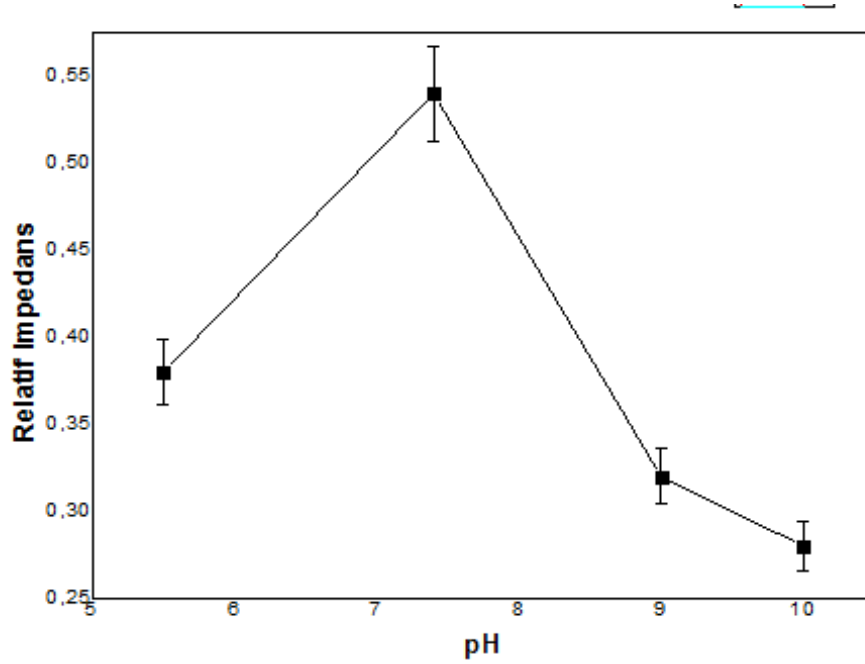
Şekil 5.23 Aljinat-PrA İmmünosensör Cevabına pH'nın etkisi

Jelatin-PrA immünosensörü için pH optimizasyonu aljinat immünosensörüyle aynı tamponlar kullanılarak optimize Jelatin-PrA elektrot ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda optimum pH 0.05 mol.L^{-1} , pH 7.4 fosfat tamponu olarak belirlenmiştir (Şekil 5.24).



Şekil 5.24 Jelatin-PrA İmmünosensör Cevabına pH'nın Etkisi

Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörü için pH optimizasyonu jelatin immünosensörüne benzer şekilde aynı tamponlar ve optimize Jelatin-Aljinat-PrA elektrodu ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda optimum pH 0.05 mol.L^{-1} , pH 7.4 fosfat tamponu olarak belirlenmiştir (Şekil 5.25).

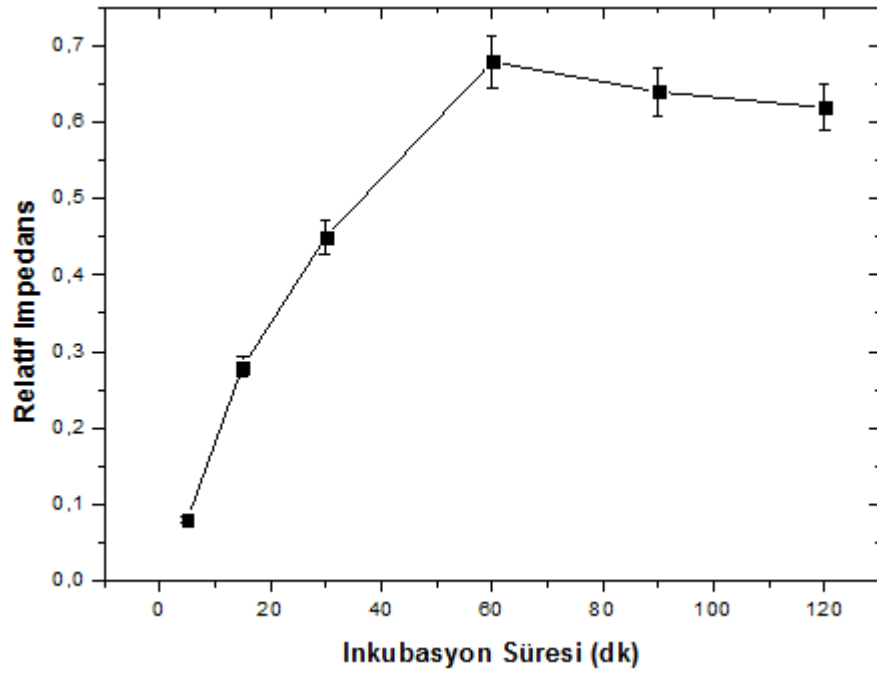


Şekil 5.25 Jelatin-Aljinat-PrA İmmünosensör Cevabına pH'nın Etkisi

5.4.6 İmmünosensör cevabına inkübasyon süresinin etkisi

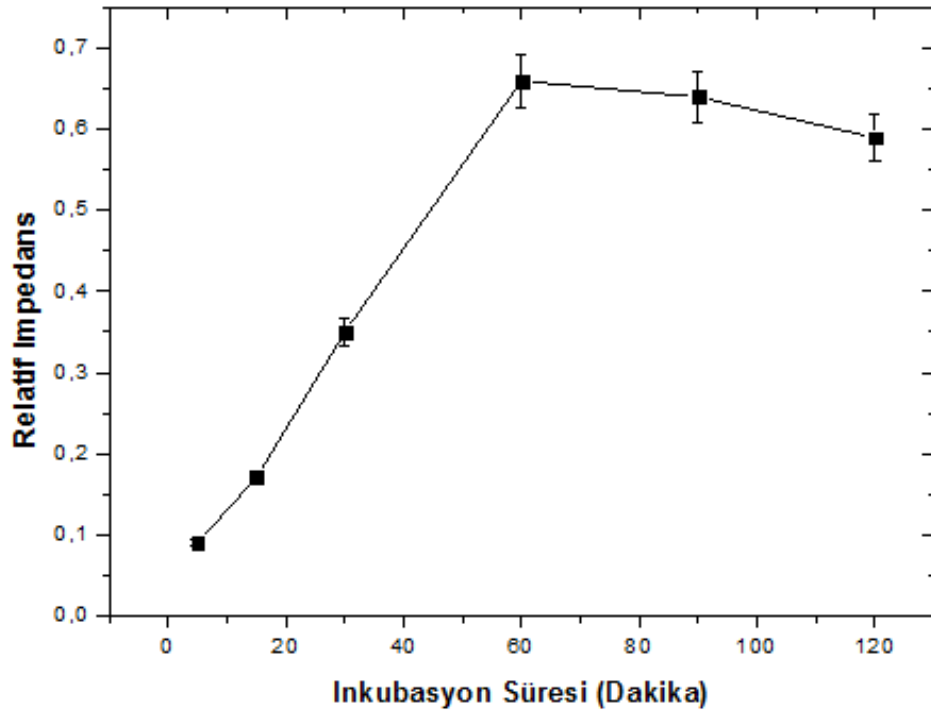
Farklı taşıyıcılardan oluşan immünosensörlerin cevabına IgG inkübasyon süresinin etkisini belirlemek amacıyla inkübasyon süresi optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon süresinin Aljinat-PrA immünosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi için immobilizasyon jeli ile kaplanmış her bir platin elektrot üzerinde IgG farklı sürelerde (5-120 dk) inkübe edilmiştir. Bu amaçla optimize Aljinat-PrA immünosensörüne inkübasyon süresinin etkisi impedimetrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler neticesinde optimum inkübasyon süresinin 60 dakika olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.26). Tüm Aljinat-PrA immünosensör optimizasyonlarında $1 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ IgG kullanılmıştır.



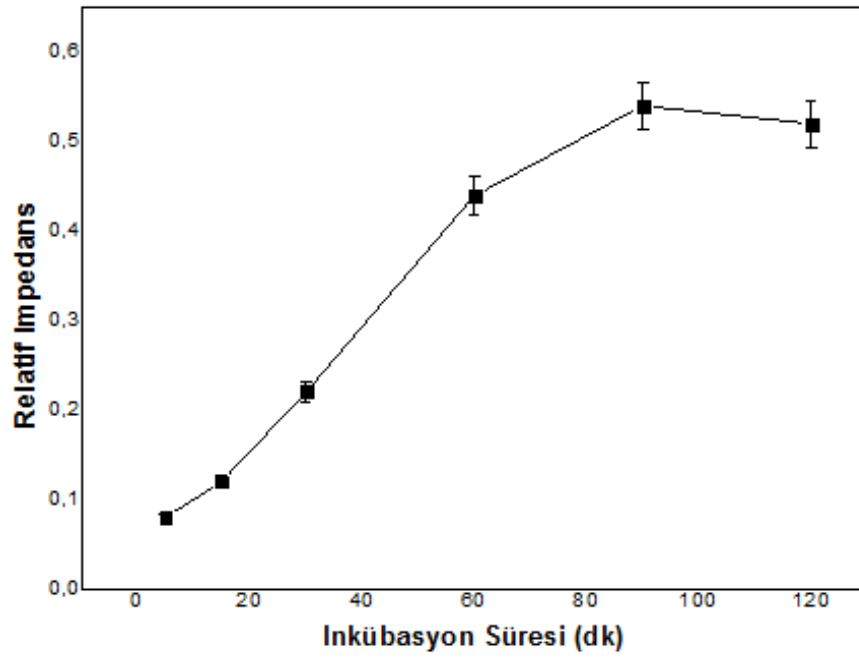
Şekil 5.26 İnkübasyon Süresinin Aljinat-PrA İmmünoşensörüne Etkisi

Jelatin-PrA içeren platin elektrot üzerinde IgG ($1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) farklı sürelerde (5-120 dk) inkübe edilmiştir ve inkübasyon süresinin etkisi impedimetrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler neticesinde optimum inkübasyon süresinin 60 dakika olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.27).



Şekil 5.27 İnkübasyon Süresinin Jelatin-PrA İmmünosensör Cevabına Etkisi

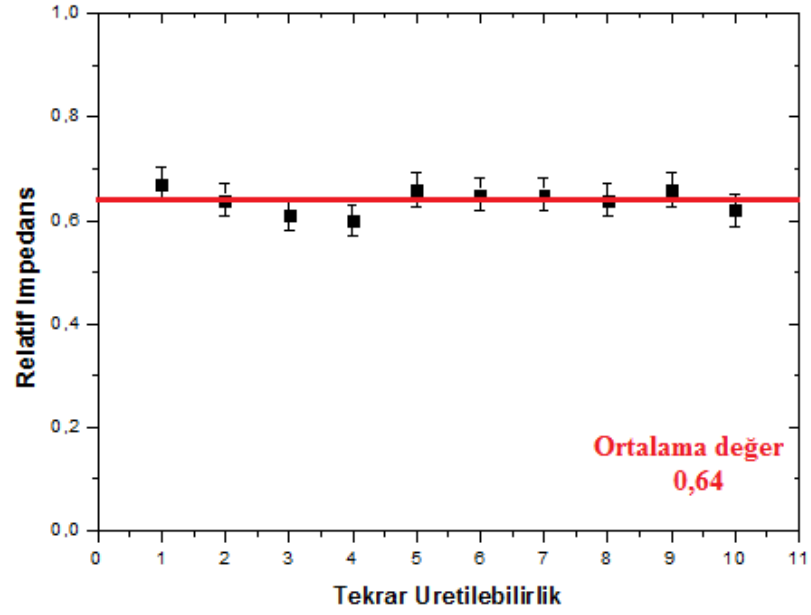
İnkübasyon süresinin Jelatin-Aljinat-PrA immünosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi için immobilizasyon jeli ile kaplanmış her bir platin elektrot üzerinde IgG farklı sürelerde (5-120 dk) inkübe edilmiştir. Bu amaçla optimize Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörüne inkübasyon süresinin etkisi impedimetrik olarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler neticesinde optimum inkübasyon süresinin 90 dakika olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.28).



Şekil 5.28 Jelatin-Aljinat-PrA İmmünosensör Cevabına İnkübasyon Süresinin Etkisi

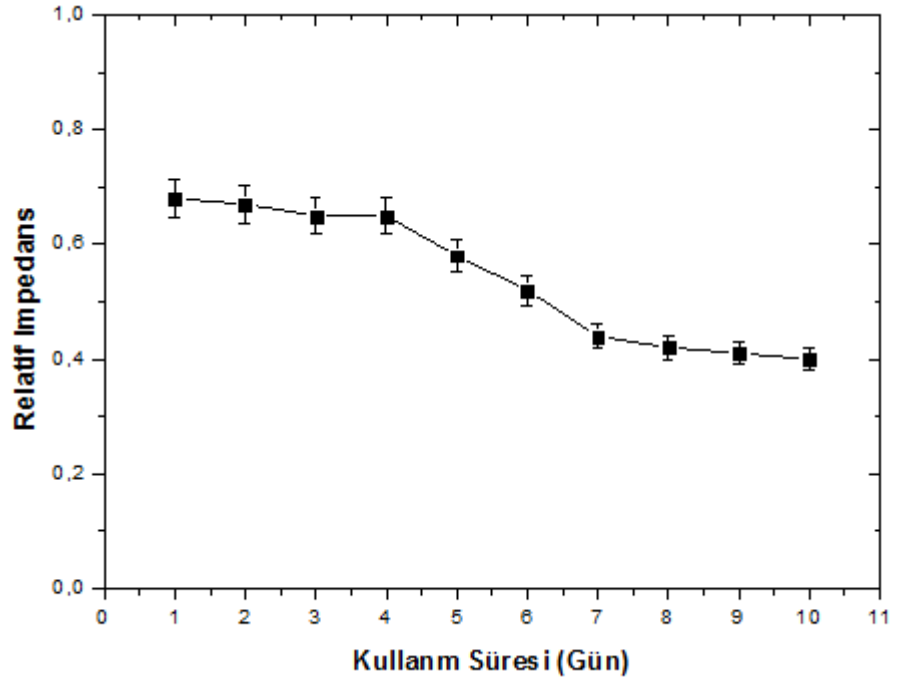
5.5 Tekrar Üretilirlik ve Raf Ömrü

Geliştirilen Aljinat-PrA immünosensörünün tekrar üretilebilirliğinin değerlendirilmesi için optimize edilmiş 10 elektrot hazırlanmıştır. Aynı içeriğe sahip 10 adet Aljinat-PrA immünosensörün aynı koşullar altında elektrokimyasal ölçümü alınmıştır. Elde edilen verilere göre geliştirilen Aljinat-PrA immünosensörünün tekrar üretilebilirlik verileri için standart sapma 0.028, Relatif Standart Sapma (RSD) 4.38 olarak hesaplanmıştır. Tekrar üretilebilirlik değerlendirmesi için $1,0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ konsantrasyonunda IgG kullanılmıştır (Şekil 5.29).



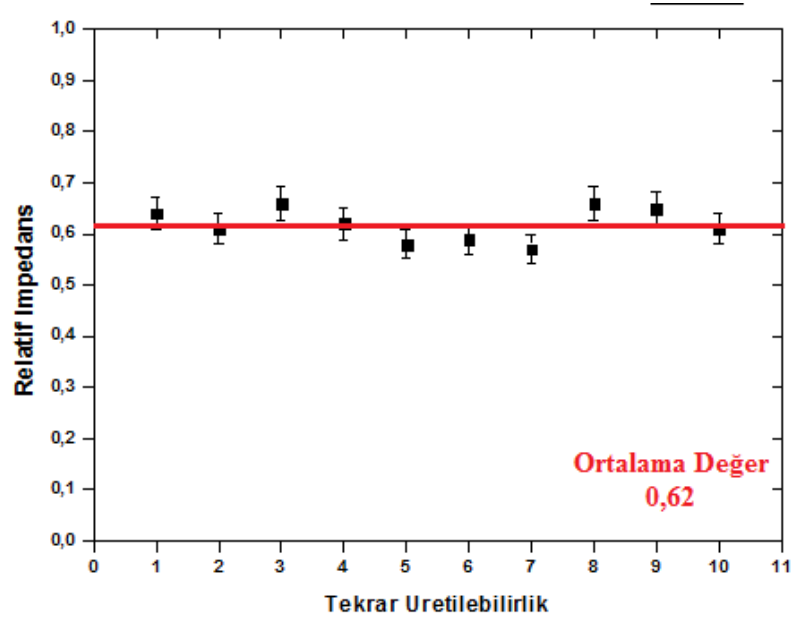
Şekil 5.29 Aljinat-PrA İmmünosensörü için Tekrar Üretilebilirlik

Aljinat-PrA immünosensör sistemi için raf ömrü değerlendirmesi amacıyla optimize üç adet elektrot hazırlanmıştır. 10 gün boyunca her gün birer kere ölçümü alınmış ve bir sonraki ölçüme kadar fosfat tamponunda + 4°C’ de bekletilmiştir. Raf ömrü değerlendirmesinde 1 µg/µL IgG kullanılmıştır. İmmünosensörlerin impedimetrik yanıtlarındaki düşüş değerlendirilerek kullanım süresi belirlenmiştir (Şekil 5.30).



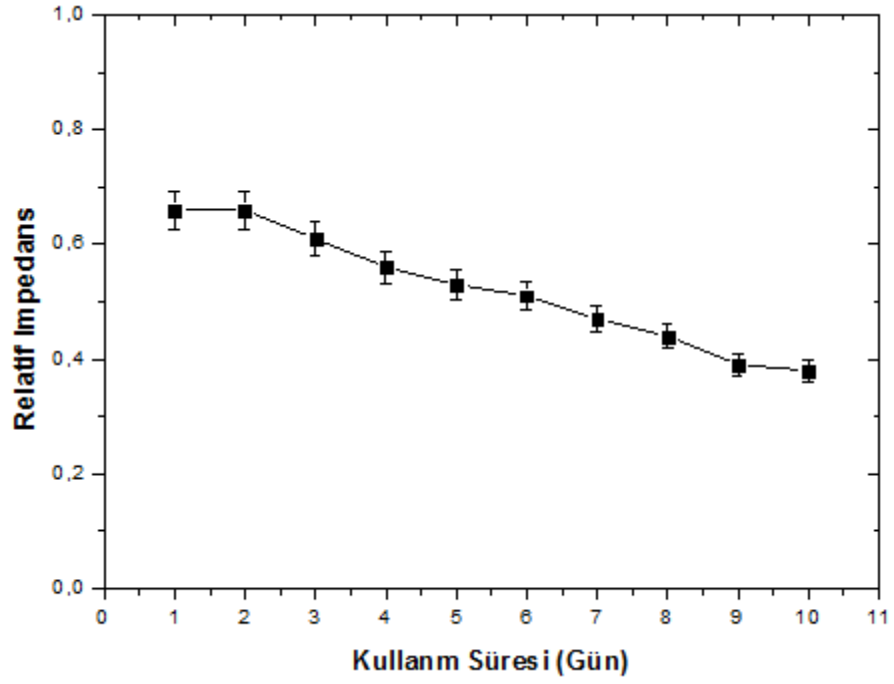
Şekil 5.30 Aljinat-PrA İmmünosensörü için raf ömrü değerlendirmesi

Geliştirilen Jelatin-PrA immünosensörünün tekrar üretilebilirliğinin değerlendirilmesi için optimize edilmiş 10 elektrot hazırlanmıştır. Aynı içeriğe sahip 10 adet Jelatin-PrA immünosensörün aynı koşullar altında elektrokimyasal ölçümü alınmıştır. Elde edilen verilere göre geliştirilen Jelatin- PrA immünosensörünün tekrar üretilebilirlik verileri için standart sapma 0.036, RSD 5.81 olarak hesaplanmıştır (Şekil 5.31). Tekrar üretilebilirlik değerlendirmesi için kullanılan IgG konsantrasyonu $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 'dir.



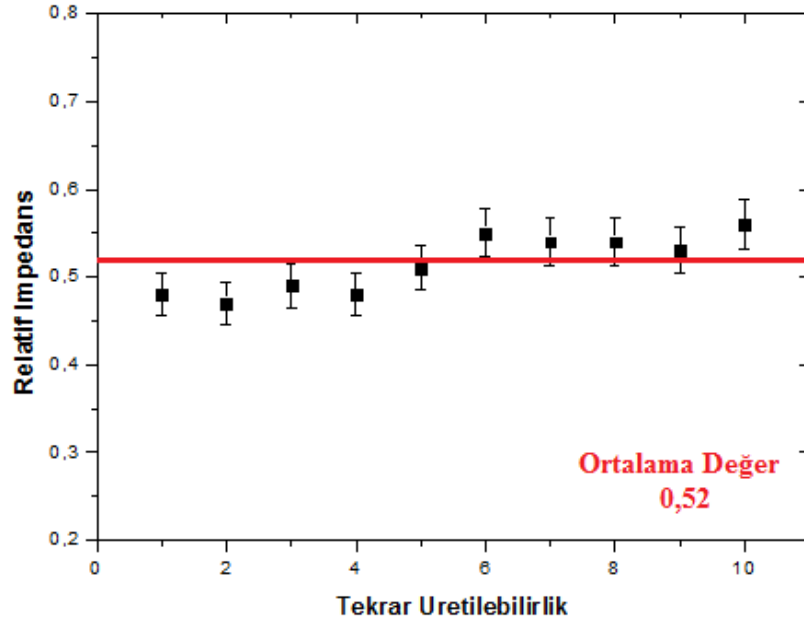
Şekil 5.31 Jelatin-PrA İmmünosensörü için tekrar üretilebilirlik değerlendirmesi

Jelatin-PrA immünosensör sistemi için raf ömrü değerlendirmesi amacıyla optimize üç adet elektrot hazırlanmıştır. 10 gün boyunca her gün birer kere ölçümü alınmış ve bir sonraki ölçüme kadar fosfat tamponunda + 4°C’de bekletilmiştir. Raf ömrü değerlendirmesinde 1 µg/µL IgG kullanılmıştır. İmmünosensörlerin impedimetrik yanıtlarındaki düşüş değerlendirilerek kullanım süresi belirlenmiştir (Şekil 5.32).



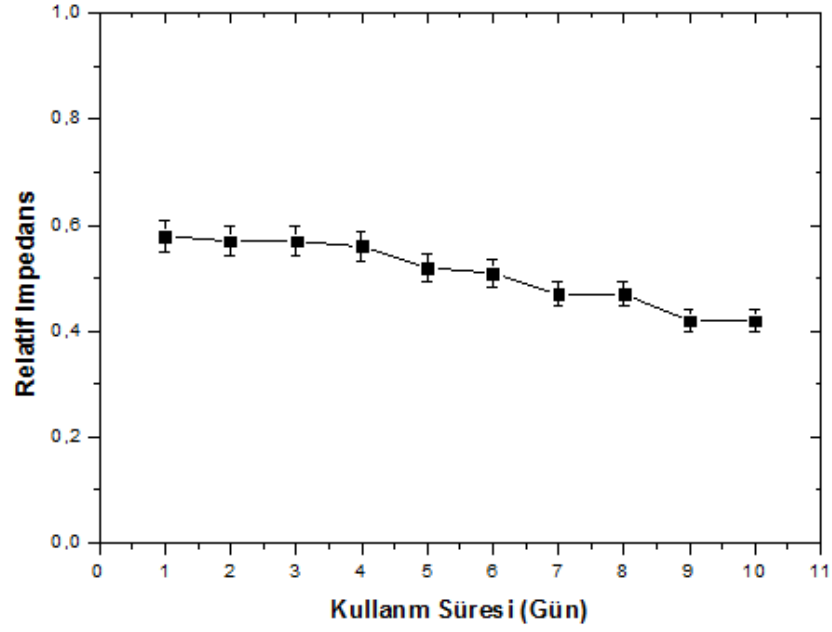
Şekil 5.32 Jelatin-PrA İmmünosensörü için raf ömrü değerlendirmesi

Geliştirilen Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörünün tekrar üretilebilirliğinin değerlendirilmesi için optimize edilmiş 10 elektrot hazırlanmıştır. Aynı içeriğe sahip 10 adet Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörün aynı koşullar altında elektrokimyasal ölçümü alınmıştır. Tekrar üretilebilirlik için kullanılan IgG konsantrasyonu $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 'dir. Elde edilen verilere göre geliştirilen immünosensörünün tekrar üretilebilirlik verileri için standart sapma olarak 0.033, RSD 6.35 olarak hesaplanmıştır (Şekil 5.33).



Şekil 5.33 Jelatin-Aljinat-PrA İmmünosensörü için tekrar üretilebilirlik değerlendirilmesi

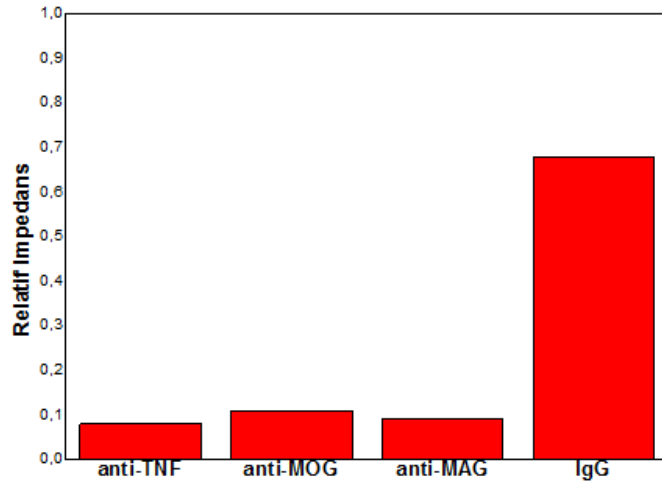
Jelatin-Aljinat-PrA immünosensör sistemi için raf ömrü değerlendirmesi amacıyla optimize üç adet elektrot hazırlanmıştır. 10 gün boyunca her gün birer kere ölçümü alınmış ve bir sonraki ölçüme kadar fosfat tamponunda + 4°C’de bekletilmiştir. Raf ömrü değerlendirmesinde $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ IgG kullanılmıştır. İmmünosensörlerin impedimetrik yanıtlarındaki düşüş değerlendirilerek kullanım süresi belirlenmiştir (Şekil 5.34).



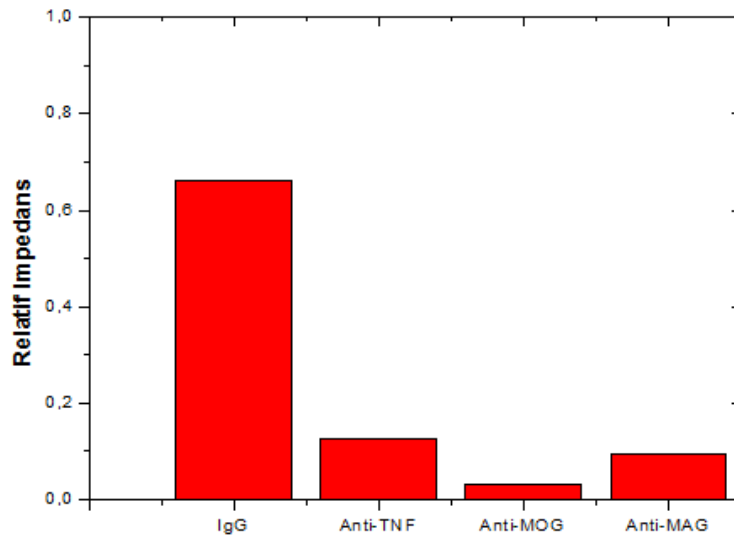
Şekil 5.34 Jelatin-Aljinat-PrA İmmünosensörü için raf ömrü değerlendirmesi

5.6 Farklı Antikorların Spesifik Olmayan Bağlanmalarının İncelenmesi

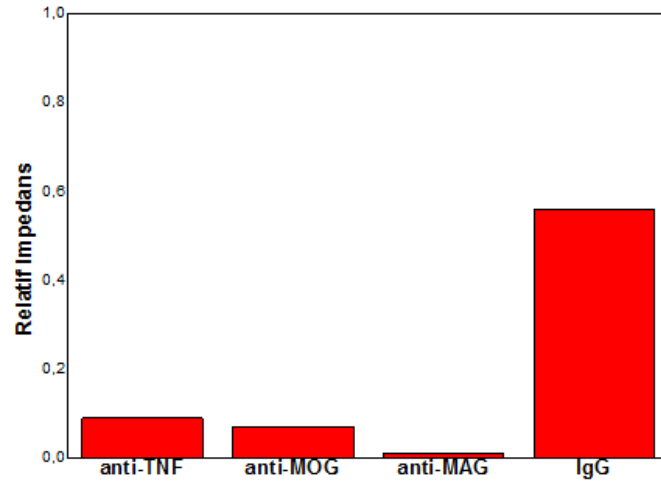
Farklı antikorların kovalent olmayan bağlanma etkisi optimize immünosensörler için incelenmiştir. Bu amaçla immünosensörler, IgG ile aynı konsantrasyondaki anti-TNF α , anti-MOG, anti-MAG IgG ile aynı optimize inkübasyon süresinde inkübe edilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda, geliştirilen immünosensörlerin belirgin ölçüde IgG için spesifik olduğu gösterilmiştir (Şekil 5.35-37).



Şekil 5.35 Farklı Antikorların Aljinat-PrA İmmünosensörüne Non-Spesifik bağlanmalarının incelenmesi

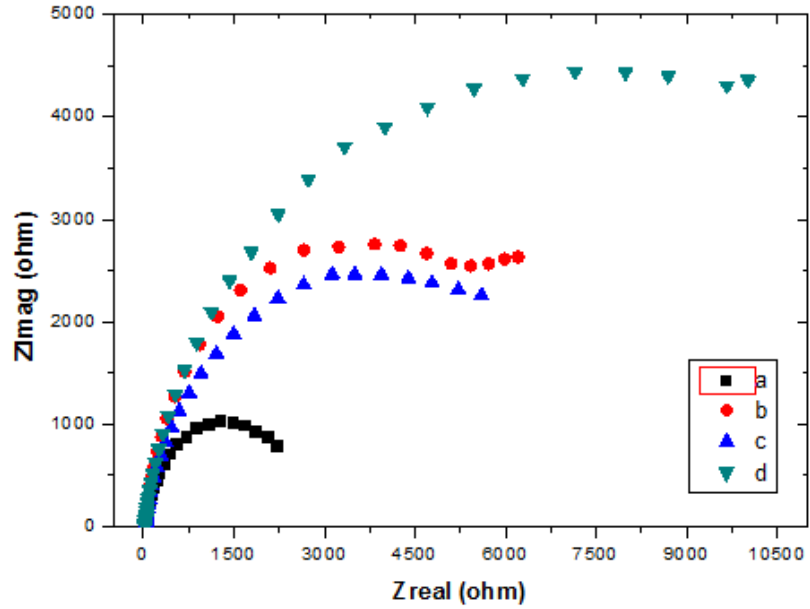


Şekil 5.36 Jelatin-PrA İmmünosensörü için Non-Spesifik bağlanmanın incelenmesi



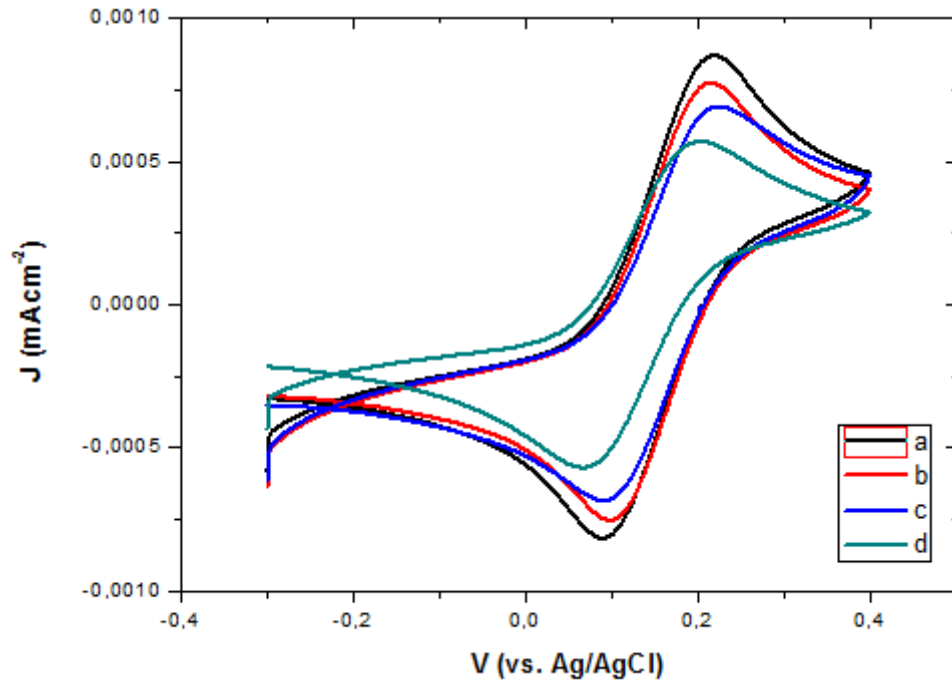
Şekil 5.37 Farklı Antikorların Jelatin-Aljinat-PrA İmmünosensörüne Non-Spesifik bağlanmalarının incelenmesi

5.7 İmmünosensörlerin Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi



Şekil 5.38 Aljinat İmmünosensörünün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği
a. Çıplak Pt elektrot, b. Aljinat-PrA elektrot, c. Aljinat elektrot, d. IgG inkübe Aljinat-PrA elektrot

Şekil 5.38’de Aljinat-PrA immünosensörüne ait modifikasyon basamaklarının impedans grafiği verilmiştir. Çıplak Pt elektrot (a) aljinat ile modifiye edildikten sonra (c) impedans oldukça artmıştır. Bu artış, elektrot yüzeyine aljinatın başarılı bir şekilde kaplandığını göstermektedir. Aljinat elektrot üzerine PrA immobilizasyonu ile de bir miktar impedans artışı gözlenmiştir (b). IgG immobilizasyonu aljinat ile kaplı Pt elektrot yüzeyinde ilave yalıtıcı etki yaratarak impedansın artmasına neden olmuştur (d). Bu durum IgG’nin PrA’ya spesifik bağlanmasını kanıtlar niteliktedir.



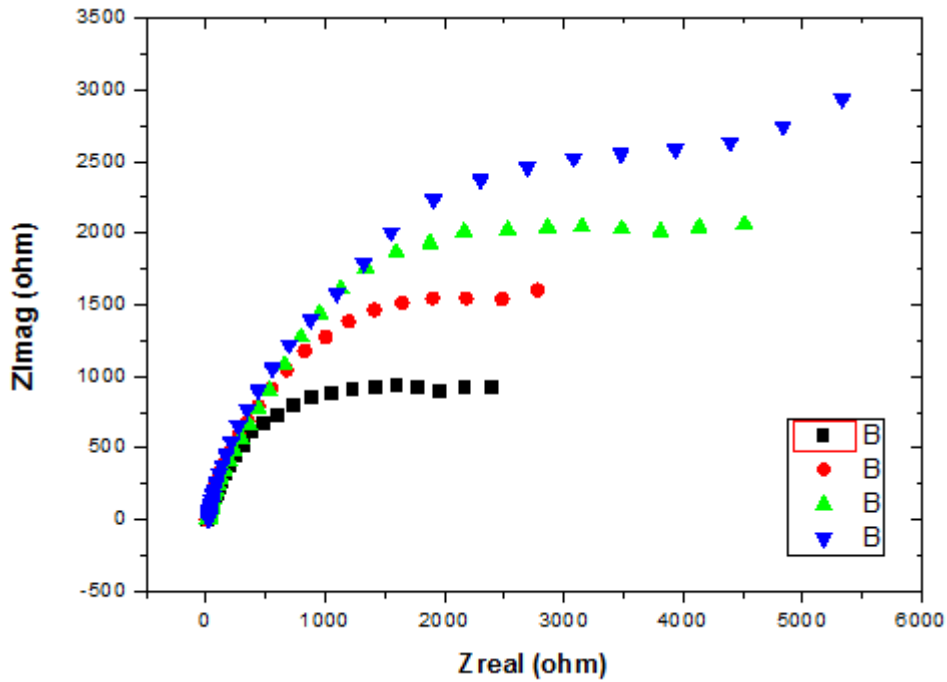
Şekil 5.39 Aljinat immünosensörünün dönüşümlü voltamogramı

a. Çıplak elektrot, b. Aljinat elektrot, c. Aljinat-PrA elektrot, d. IgG inkübe Aljinat-PrA elektrot

Şekil 5.39’da $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4/-3}$ içeren elektrokimyasal hücrede ölçümleri alınmış Aljinat-PrA immünosensörünün modifikasyon basamaklarını gösteren dönüşümlü voltamogramlar verilmiştir. Çıplak Pt elektrodun polimer ile modifikasyonundan sonra redoks probu olan $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4/-3}$ elektroaktif türüne ait pik şiddetlerinde düşüş gözlenmiştir. Çıplak elektrottan (a) geçen akım yoğunluğu yaklaşık olarak $0.00090 \text{ mA cm}^{-2}$ iken aljinat modifikasyonu sonucu (b) yaklaşık 0.00075 seviyesine inmiştir. Akım yoğunluğundaki azalma, aljinatın başarılı bir şekilde Pt elektrot yüzeyine kaplandığını göstermekteyse de çok düşük düzeylere inmemesi, çözelti ile elektrot arasında halen bir miktar elektron

aktarımının gerçekleştiğini göstermektedir. Aljinata PrA immobilize edildiğinde elektrottan geçen yük yoğunluğu daha da azalmıştır (c) ve IgG inkübasyonu ile en alt seviyeye ulaşmıştır (d). Elde edilen bu CV sonuçları, impedans sonuçlarını desteklemektedir. Elde edilen bu CV sonuçları, impedans sonuçlarını desteklemektedir.

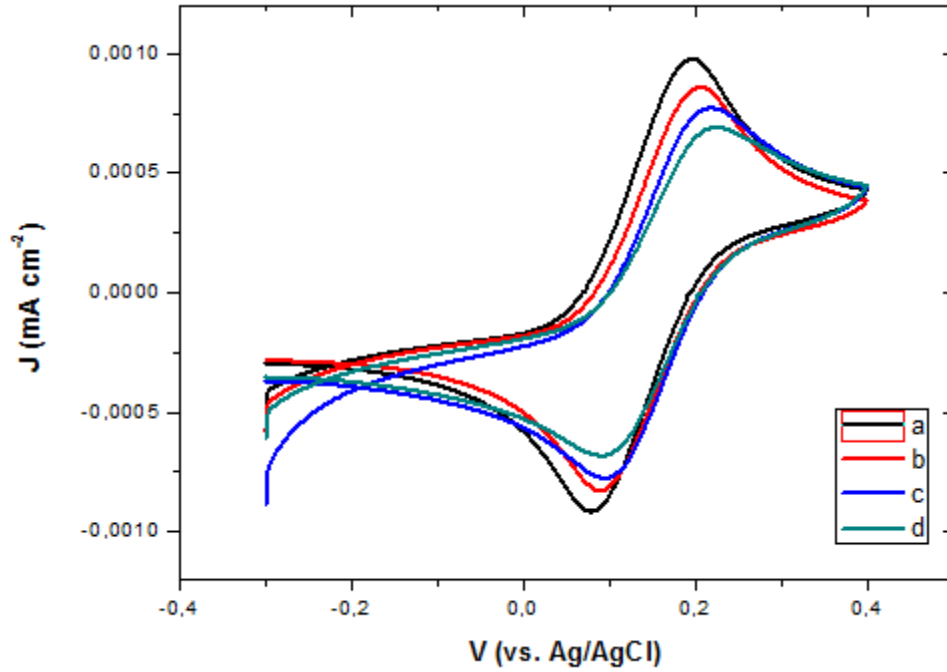
Anodik ve katodik pik potansiyelleri kullanılarak hesaplanan formal potansiyel ($E_0' = (E_{p,a} + E_{p,k})/2$) IgG inkübe edilmiş Aljinat-PrA elektrot için 138 mV olarak hesaplanmıştır. Ayrıca pik ayrımı ($\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,k}$) 125 mV olarak hesaplanmıştır. $\Delta E_p > 59.2/n$ mV şartı sağlandığı için ve asimetrik anodik/katodik pikler gözlemlendiğinden IgG ile Aljinat-PrA arasındaki elektron transferinin yarı tersinir olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 5.40 Jelatin immünosensörünün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği
a. Çıplak Pt elektrot, b. Jelatin elektrot, c. Jelatin-PrA elektrot, d. IgG inkübe Jelatin-PrA elektrot

Şekil 5.40'da Pt elektrot üzerine yapılan jelatin immobilizasyonu ve sonraki immobilizasyon basamaklarında impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği verilmiştir. Çıplak Pt elektrot (a) jelatin ile modifiye edildikten sonra (b) impedans artışı açıkça görülmektedir. Bu artış, elektrot yüzeyine jelatinin başarılı bir şekilde

kaplandığını ve jelatinin yalıtıcı etkisini göstermektedir. Taşıyıcı sisteme PrA immobilizasyonu ile impedans artışı gözlenmiş, c eğrisi elde edilmiştir. Jelatin-PrA elektrot IgG ile inkübe edildiğinde PrA ve IgG bağlanması gerçekleşmiş ve impedanslarda artış gözlenmiştir (d). Bu sonuç immobilizasyonun başarısını göstermektedir.

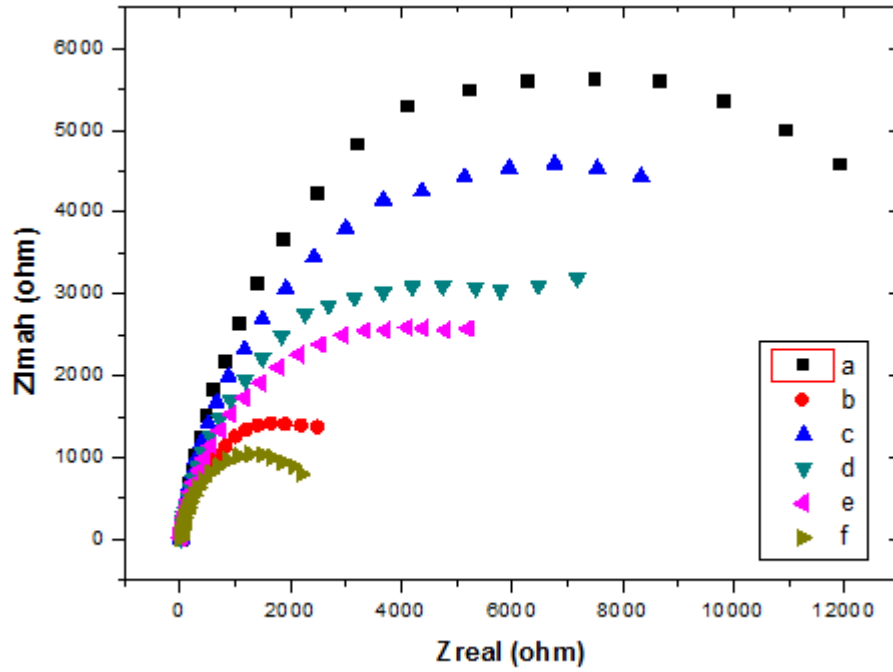


Şekil 5.41 Jelatin immünosensörünün dönüşümlü voltamogramı

a. Çıplak elektrot, b. Jelatin elektrot, c. Jelatin-PrA elektrot, d. IgG inkübe Jelatin-PrA elektrot

Şekil 5.41’de Jelatin-PrA immünosensörünün modifikasyon basamaklarında elde edilmiş dönüşümlü voltamogramların değişimi verilmiştir. Aljinat-PrA immünosensörüne benzer sonuçlar edilmiştir. IgG inkübe Jelatin-PrA elektrot (d) ile IgG inkübe Aljinat-PrA elektrot kıyaslandığında Jelatin-PrA elektrodun daha yüksek akım yoğunluğuna sahip olduğu görülmektedir. Bu sonuç Jelatin-PrA elektrodun Aljinat-PrA elektroda kıyasla çözelti-elektrot arasında daha fazla elektron aktarımının gerçekleştiğini göstermektedir. Elde edilen bu CV sonuçları, impedans sonuçlarını desteklemektedir.

Anodik ve katodik pik potansiyelleri kullanılarak hesaplanan formal potansiyel ($E_0' = (E_{p,a} + E_{p,k})/2$) IgG inkübe edilmiş Jelatin-PrA elektrot için 160 mV olarak hesaplanmıştır. Ayrıca pik ayrımı ($\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,k}$) 130 mV olarak hesaplanmıştır. $\Delta E_p > 59.2/n$ mV şartı sağlandığı için ve asimetrik anodik/katodik pikler gözlemlendiğinden IgG ile Jelatin-PrA arasındaki elektron transferinin yarı tersinir olduğu söylenebilmektedir.

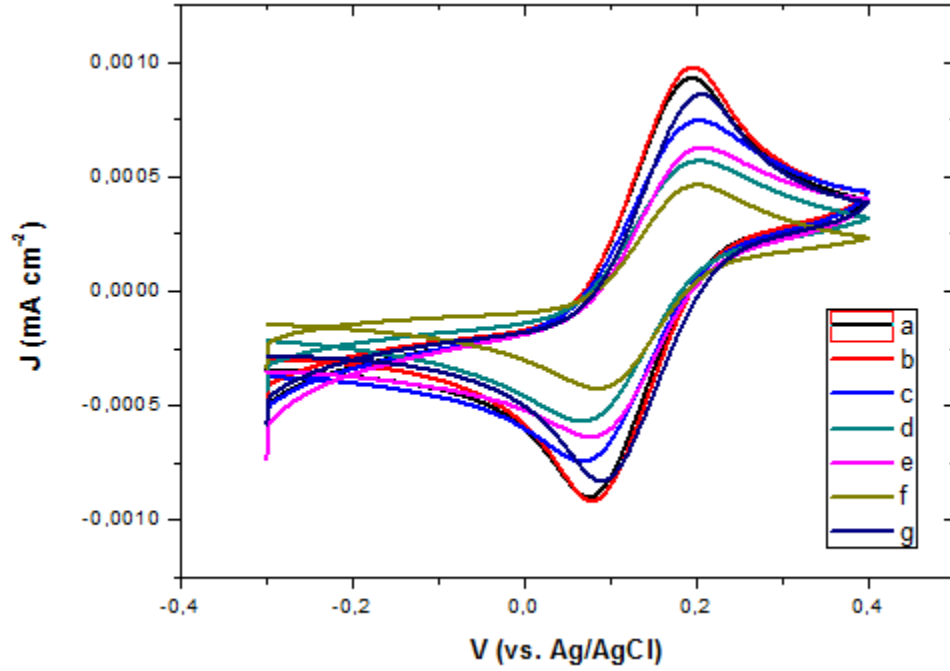


Şekil 5.42 Jelatin-Aljinate ve Jelatin-Aljinate-ZnO immünosensörünün impedans değişimini gösteren Nyquist grafiği

a. IgG inkübe Jelatin-Aljinate-PrA elektrot, b. Jelatin-Aljinate ZnO elektrot, c. IgG inkübe Jelatin-Aljinate-ZnO-PrA elektrot, d. Jelatin-Aljinate-PrA elektrot, e. Jelatin-Aljinate elektrot, f. Çıplak elektrot

Optimizasyonu tamamlanmış Jelatin-Aljinate immünosensör sistemine nanopartikül ilave edildiğinde ise şekil 5.42 grafiği elde edilmiştir. Çıplak Pt elektrodun Jelatin-Aljinate-ZnO modifikasyonunda yük transfer direnci çıplak Pt elektrodun yük transfer direncine oldukça yakın bir değer olarak gözlenmiştir. Nanopartikülsüz immünosensör sistemlerinin Pt elektrot üzerine polimer modifikasyonunda yük transfer direnci oldukça fazla olması nanopartiküllerin yüzey alanını ve yük transfer hızını arttırıcı etkisini

kanıtlar niteliktedir. Nanopartiküllerin bu artışından dolayı kalibrasyon eğrilerinin elde edilmesi bölümünde Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünosensörünün daha düşük tayin sınırına sahip olması vurgulanacaktır.



Şekil 5.43 Jelatin-Aljinat ve Jelatin-Aljinat-ZnO immünosensörünün dönüşümlü voltamogramı

a. Çıplak elektrot, b. Jelatin-Aljinat-ZnO elektrot, c. Jelatin-Aljinat elektrot, d. Jelatin-Aljinat-PrA elektrot, e. IgG inkübe Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA elektrot, f. IgG inkübe Jelatin-Aljinat-PrA elektrot, g. Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA elektrot

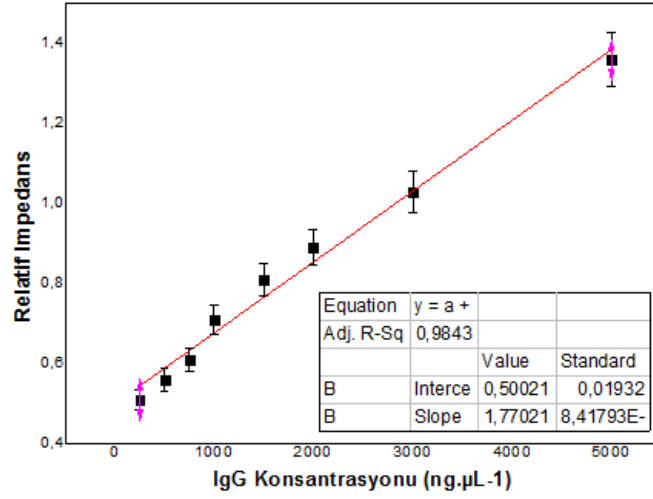
Şekil 5.43’de verilen grafikte ise Jelatin-Aljinat ve Jelatin-Aljinat-ZnO immünosensörlerinin dönüşümlü voltamogramları karşılaştırılmıştır. Jelatin-PrA ve Aljinat-PrA immünosensörlerine benzer şekilde çıplak elektrot polimer karışımı ile modifiye edildiğinde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4/-3}$ redoks probuna ait pik şiddetlerinde düşüş gözlenmiştir. Bu sonuç Jelatin ve Aljinat modifikasyonlarıyla aynı şekilde, Jelatin-Aljinat film tabakasının inert bir elektron transfer engelleyicisi olduğunu göstermektedir. Böylece $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4/-3}$ türlerinin elektrot yüzeyine elektron aktarımı engellenmiş olur. Buna karşılık; sisteme ZnO nanopartikülü dahil edildiğinde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4/-3}$ probuna ait voltametrik pikler artmıştır. Jelatin-Aljinat-ZnO elektrottan geçen yük yoğunluğu (b) çıplak Pt’den (a) fazladır. IgG inkübe Jelatin-Aljinat-PrA elektrot (f) ve IgG inkübe

Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA (g) elektrot kıyaslandığında nanopartikül içeren elektrodun daha fazla akım yoğunluğuna sahip olduğu açıkça görülmektedir. Bu sonuç sisteme nanopartikül etkisini açıkça göstermektedir. Nanopartiküllerin bu özelliği sayesinde daha düşük yük transfer direncine yani tayin sınırına inilebilmiştir. Elde edilen bu CV sonuçları, impedans sonuçlarını desteklemektedir.

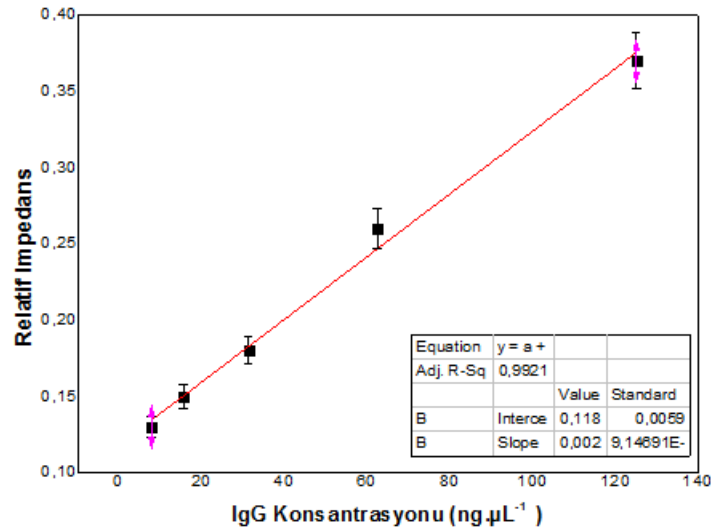
Anodik ve katodik pik potansiyelleri kullanılarak hesaplanan formal potansiyeller ($E_0' = (E_{p,a} + E_{p,k})/2$) IgG inkübe edilmiş Jelatin-Aljinat-PrA ve Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA elektrot için sırasıyla 143 ve 148 mV olarak hesaplanmıştır. Ayrıca pik ayrımları da sırasıyla ($\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,k}$) 116 ve 125 mV olarak hesaplanmıştır. $\Delta E_p > 59.2/n$ mV şartı sağlandığı için ve asimetrik anodik/katodik pikler gözlemlendiğinden IgG ile Jelatin-Aljinat-PrA ve Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA arasındaki elektron transferinin yarı tersinir olduğu söylenebilmektedir. Fakat nanopartikül ve nanopartikülsüz immünosensörlerin pik ayrımları kıyaslandığında elde edilen sonuç Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörünün daha tersinir olduğunu göstermektedir.

5.8 Kalibrasyon Grafikleri

Aljinat-PrA immünosensör sisteminin kalibrasyon grafiğinin hazırlanması amacıyla optimize edilmiş immünosensör sistemine $7,8125-20000 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ aralığında IgG inkübe edilmiştir. Yüksek konsantrasyon (Şekil 5.44 ve düşük konsantrasyon (Şekil 5.45) olmak üzere iki doğrusal aralık ($250-5000$ ve $7,8125-125 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$) belirlenmiştir. Bu aralığın alt ve üst konsantrasyonlarında immünosensörden sinyal alınamamıştır. Elde edilen veriler neticesinde yüksek ve düşük konsantrasyon kalibrasyon grafiğinin determinasyon katsayıları sırasıyla 0.9843 ve 0.9921 olarak belirlenmiştir. Tayin sınırı ise $250 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

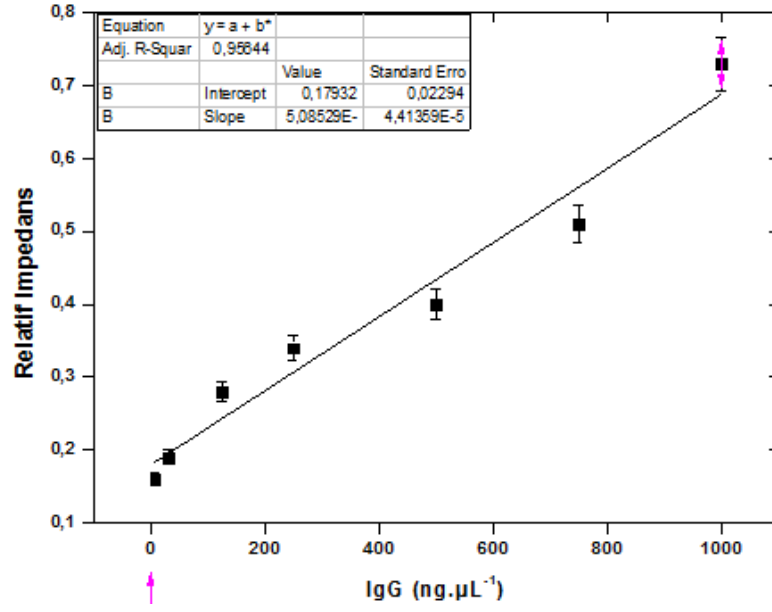


Şekil 5.44 Aljinat-PrA İmmünosensörü için 250-5000 ng.µL⁻¹ aralığında IgG için kalibrasyon eğrisi



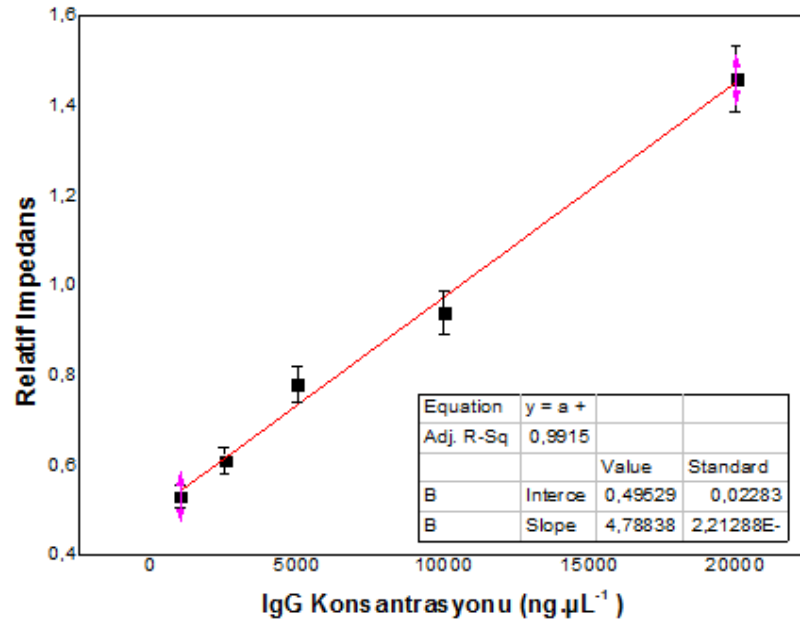
Şekil 5.45 Aljinat-PrA İmmünosensörünün 7,8125-125 ng.µL⁻¹ aralığında IgG için kalibrasyon grafiği

Jelatin-PrA sistemi için 15.625-1000 ng.µL⁻¹ aralığında IgG kullanılarak immünosensöre ait kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 5.46). Bu aralığın alt ve üst konsantrasyonlarında immünosensörden sinyal alınamamıştır. Elde edilen veriler neticesinde kalibrasyon grafiğinin determinasyon katsayısı 0.9564 olarak belirlenmiştir. Tayin sınırı 15.625 ng.µL⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

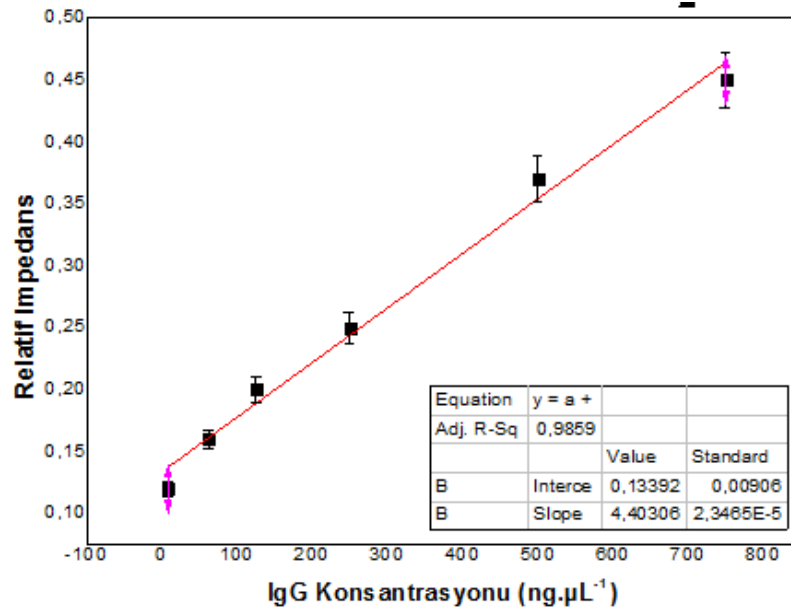


Şekil 5.46 Jelatin-PrA İmmünosensörü için kalibrasyon grafiği

Jelatin-Aljinat-PrA immünosensör sisteminin kalibrasyon grafiği 7,8125-20000 ng.µL⁻¹ aralığında IgG kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 5.47 - 5.48). Yüksek konsantrasyon ve düşük konsantrasyon olmak üzere iki doğrusal aralık (1000-20000 ve 7,8125-750 ng.µL⁻¹) belirlenmiştir. Bu aralığın alt ve üst konsantrasyonlarında immünosensörden sinyal alınamamıştır. Elde edilen veriler neticesinde kalibrasyon grafiğinin determinasyon katsayısı yüksek ve düşük konsantrasyon için 0.9915 ve 0.9859 olarak belirlenmiştir.



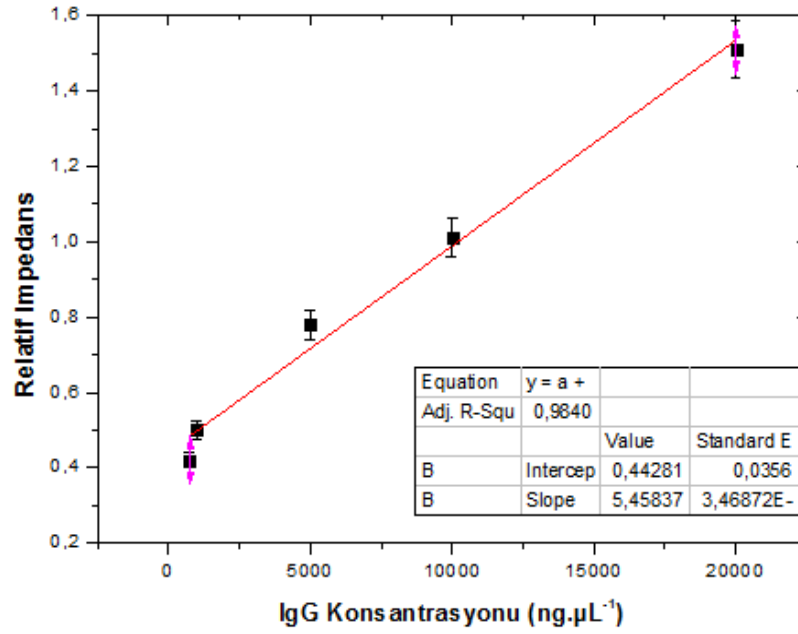
Şekil 5.47 Jelatin-Aljinat-PrA İmmünosensörünün 1000-20000 ng.µL⁻¹ aralığında IgG için kalibrasyon grafiği



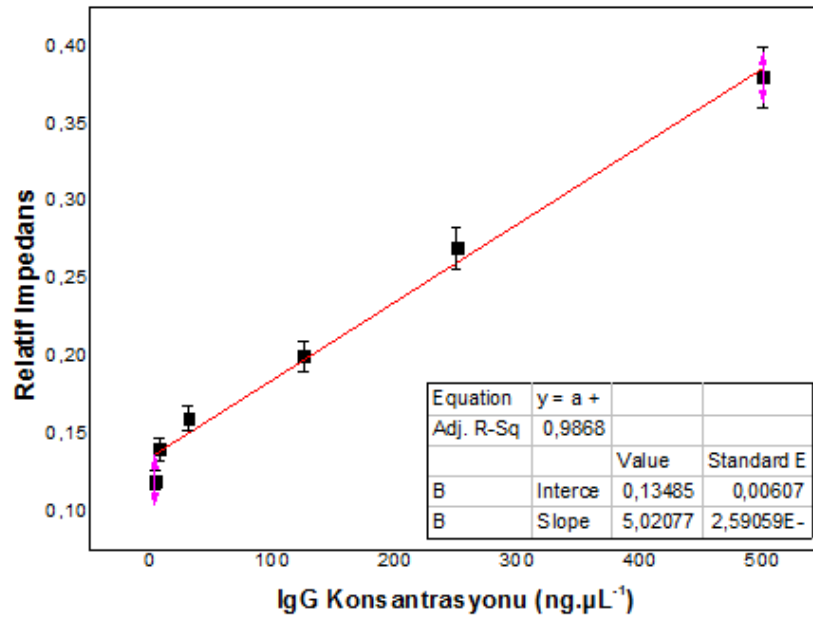
Şekil 5.48 Jelatin-Aljinat-PrA İmmünosensörünün 7,8125-750 ng.µL⁻¹ aralığında IgG için kalibrasyon grafiği

Optimizasyonları tamamlanmış Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünosensörünün kalibrasyon eğrisi 3,90-20000 ng.µL⁻¹ aralığında IgG kullanılarak çizilmiştir (Şekil 5.49)

- 5.50). Elde edilen veriler neticesinde yüksek ve düşük konsantrasyon kalibrasyon grafiğinin determinasyon katsayıları sırayla 0,9840 ve 0,9862 olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.49 Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünosensörünün 750-20000 ng.μL⁻¹ IgG için kalibrasyon eğrisi



Şekil 5.50 Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünosensörünün 500-3,90 ng.μL⁻¹ IgG için kalibrasyon eğrisi

5.9 Geliştirilen İmmünosensörlerin BOS ve Serumda Denenmesi

Bu tez kapsamında geliştirilen immünosensörlerden en düşük tayin sınırına sahip olan Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünosensörü, gerçek numunelerle çalışılarak kliniğe uyarlanılabilirliği denetlenmiştir. Bu amaçla hazırlanan Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünosensörüne kalibrasyon ve optimizasyonların tamamında kullanılan IgG ile aynı hacimde BOS ve serum immünosensöre damlatılarak alınan impedimetrik sinyaller yardımıyla kalibrasyon denklemlerinde yerine konarak IgG miktarları hesaplanmıştır. Tez çalışmasının son aşamasında en düşük tayin limitine sahip Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünosensör ile BOS ve serum çalışması yapılmıştır. BOS numunesi için elde edilen sinyal Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünosensörü kalibrasyon grafiğinin denkleminde yerine konulmuş ve karşılık gelen konsantrasyon $0,183 \text{ mg.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değer ELISA tekniği kullanılarak elde edilen referans ölçüm ile ($0,198 \text{ mg.mL}^{-1}$) elde edilen sonuca oldukça yakındır. Serum numunesi için elde edilen sinyal ise aynı şekilde kalibrasyon grafiğinde yerine konulmuş ve karşılık gelen konsantrasyon $0,266 \text{ mg.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur. ELISA tekniği kullanılarak elde edilen referans ölçüm ($0,274 \text{ mg.mL}^{-1}$) ile sonuçlar uyumludur.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

İmmün yetmezliklerin tanısında, birçok infeksiyon ve otoimmün durumun tanımlanmasında, immünoglobülinler ve immünoglobülin alt grupları değerlendirilir. Etnik kökene göre değişkenlik gösteren bu testlerin bölgesel referans aralıkları ve bunların yaşa ve cinse bağlı değişimleri önemlidir. Bu çalışmada immünoglobülin alt sınıflarından IgG tayini için spesifik, duyarlı, hızlı ve kolay sonuç verecek IgG'ye oldukça fazla afinite gösteren PrA immünosensörünün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla Pt elektrot üzerine PrA immobilizasyonu için taşıyıcı olarak jelatin, aljinat, bu polimerlerin karışımları ve bu polimerlerin karışımıyla birlikte ZnO nanopartikülleri kullanılmıştır. PrA'nın taşıyıcılara immobilizasyonu amacıyla çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit ve NHS/EDC kullanılmıştır.

Tez çalışmasında ilk olarak elektrodun çeşitli modifikasyon basamaklarında SEM ve AFM görüntüleri alınmış ve immobilizasyonların başarısı denetlenmiştir. İmmünosensörlerden maksimum performans alabilmek amacıyla taşıyıcı miktarları, nanopartikül miktarları, pH, çapraz bağlayıcı ve PrA konsantrasyonları, inkübasyon süreleri optimize edilmiştir. Daha sonra EIS ve farklı tarama hızlarında yapılan dönüşümlü voltametri sonuçları değerlendirilerek immünosensörlerin elektrokimyası incelenmiştir. Optimize immünosensörlere spesifik olmayan bağlanmalar Anti-MOG, Anti-MAG ve Anti TNF α kullanılarak denetlenmiştir. Her bir immünosensör için kalibrasyon grafikleri elde edildikten sonra ise immünosensörlerin klinik uygulamaları amacıyla MS'li hastalardan alınan BOS ve serum ile çalışmalar yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında yapılan karakterizasyon çalışmalarından SEM mikrograflarına bakıldığında Aljinat ve Jelatin-Aljinat taşıyıcı sistemlerine ait mikrografların Jelatin taşıyıcı sistemine göre daha sıkı bir film yapısı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu sıkı yapı Jelatin taşıyıcı sisteme kıyasla immobilize edilen PrA miktarında Aljinat için 2, Jelatin-Aljinat taşıyıcı sistemi için 4 katı kadar bir artışa neden olmuştur. Aljinat ve Jelatin-Aljinat filmlerinin Jelatine göre çok daha kararlı

olmaları tekrar üretilebilirlik ve kullanım süresi çalışmaları ile de desteklenmiştir. SEM çalışmalarından elde edilen yüksek çözünürlüklü fakat 2 boyutlu görüntüler, AFM çalışmalarından elde edilen 3 boyutlu görüntüler ile de kıyaslanmıştır. Her iki görüntüleme tekniğinden elde edilen bulgular birbirlerini destekler niteliktedir.

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında çapraz bağlayıcı kullanılarak Jelatin, Aljinat ve Jelatin-Aljinat taşıyıcı sistemlerinden oluşan örnekler hazırlanmış ve FTIR spektrumları alınmıştır. Genel olarak Jelatin-Aljinat polimer karışımı tek polimerlere ait spektrumlarla kıyaslandığında jelatine oldukça benzer bir profil vermiştir. Elde edilen bu bilgiyle polimer karışımının jelatine ait -OH ve -NH reaktif gruplarını ve aljinata ait polisakkarit yapıyı koruduğu sonucuna varılabilmektedir. Bu sonuç, polimer karışımının PrA immobilizasyonu için gerekli fonksiyonel grupları hala yapısında barındırdığını ifade etmektedir.

Değişik polimer miktarları kullanılarak hazırlanan immünosensörlerin impedimetrik cevapları değerlendirilerek en uygun taşıyıcı konsantrasyonları araştırılmıştır. Jelatin için % 1-8, aljinat için % 0.1-1.25, ve Jelatin/Aljinat için 0.5-10 (oran) aralıklarında polimerler kullanılarak hazırlanan immünosensörler ile yapılan optimizasyon çalışması sonucunda sırası ile % 4, % 0.5 ve 2 oranları en uygun taşıyıcı miktarları olarak tespit edilmiştir. Yüksek polimer oranları, bağlanan PrA miktarının artmasına, dolayısıyla immünosensör sinyalinin artmasına neden olurken çok yüksek polimer miktarı ise taşıyıcı gözeneklerinin küçülmesine neden olarak reaktif moleküller arasında elektron aktarımını azaltmıştır (Sungur vd. 2004). Optimum değerlerin altındaki düşük polimer konsantrasyonlarında mekanik dayanıksızlık söz konusudur. Literatür araştırması yapıldığında Emregül vd. (2013) tarafından geliştirilen MBP tayinine yönelik impedimetrik immünosensör çalışmasında da optimum Jelatin/Aljinat oranı 2:1 olarak belirtilmiştir. Literatürde jelatin ve aljinat polimerlerinin karışımını kullanan başka bir biyosensör yayınına rastlanmamıştır.

PrA'nın jelatine immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı olarak 0.001-0.01 mol.L⁻¹ aralığında; jelatin/aljinat sistemine immobilizasyonunda ise 0,001-0,008 mol.L⁻¹ glutaraldehit kullanılmıştır. PrA'nın aljinata immobilizasyonunda 0,02-0,002 mol.L⁻¹ EDC/NHS sistemi kullanılmıştır. En uygun çapraz bağlayıcı konsantrasyonları jelatin için 0.002 mol.L⁻¹, aljinat için 0.0075 mol.L⁻¹ ve Jelatin/Aljinat için 0.004 mol.L⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarındaki artış ile PrA'nın taşıyıcıya bağlanması artmıştır. Optimum değerden yüksek çapraz bağlayıcı konsantrasyonları polimer-protein arasında sık bağlanma nedeniyle elektron aktarımının azalmasına ve buna bağlı olarak da duyarlılıkta düşüşe neden olmuştur (Sungur vd. 2004). Optimum değerden düşük çapraz bağlayıcı konsantrasyonları ise taşıyıcı sistem ve PrA arasında yeterince sıkı bir jel yapısı oluşturamadığı için immünosensörde yeterli mekanik dayanıklılığa ulaşılmayı engellemiştir.

IgG'ye çok yüksek afinite gösteren PrA'nın optimizasyonu amacıyla jelatin için 0,1-5 µg.mL⁻¹, aljinat için 0,1-10 µg.mL⁻¹, jelatin/aljinat için 0,1-10 µg.mL⁻¹ konsantrasyon aralıklarında PrA kullanılarak optimizasyonlar yapılmış ve optimum PrA konsantrasyonları Jelatin-PrA elektrot için 0.5 µg.mL⁻¹, Aljinat-PrA elektrot için 1 µg.mL⁻¹, Jelatin/Aljinat-PrA için 2 µg.mL⁻¹ olarak bulunmuştur. Artan PrA yüklemesi taşıyıcı gözeneklerinin dolmasına neden olduğundan elektron difüzyonunu engellemekte ve elektron transfer hızını azaltarak sinyali düşürmektedir.

Geliştirilen immünosensörlerin elektrokimyasal ölçümleri sırasında hücre içerisindeki optimum pH'nın belirlenmesi için pH optimizasyonları gerçekleştirilmiştir (pH 5.5-10). Tüm immünosensörler için optimum pH 7.4 olarak belirlenmiştir. Optimum pH koşullarının dışında polimerlerin jel yapısında ya da proteinlerin 3 boyutlu kararlı yapılarında bozulma görülebilmektedir. Örneğin aljinat için düşük pH değerlerinde yapısındaki karboksilat gruplarının iyonlaşma derecesi azalmakta ve karboksilat grupları negatif yüklerini kaybetmektedir. Sonraki aşamada aljinik asit yapıdan ayrılarak jel yapısı bozulmaktadır. IgG ise pH değişimlerine duyarlı olarak konformasyon değiştirmektedir. Bu konformasyon değişimleri genellikle Fc bölgesinde olup, PrA'nın bağlanmasını engeller nitelikte olabilmektedir.

IgG'nin PrA'ya en etkili şekilde bağlanmasını sağlamak amacıyla inkübasyon süreleri optimize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde jelatin ve aljinat elektrot için 60 dakika, jelatin/aljinat elektrot için 90 dakika olarak bulunmuştur. İmmobilizasyon jelinde bulunan polimer yoğunluğunun Jelatin/Aljinat immünosensöründe fazla olmasının bu sonuç ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Tez önerisi kapsamı dışında ek bir çalışma olarak geliştirilen Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörüne nanopartikül etkisinin incelenmesi amacıyla çinko oksit (ZnO) nanopartikülü kullanılmıştır. Çinko metabolizmanın pek çok mekanizmasında katalitik ve regülatör özellik gösteren bir iyonudur. DNA replikasyon ve transkripsiyonunda rol oynayan DNA polimeraz gibi enzimlerin komponentlerinden biridir. İmmün sistem hücreleri hızlı bölünen hücreler olup bu durum özellikle enfeksiyon esnasında daha da belirgin hale geldiğinden, bu dönemde DNA replikasyonundaki bozukluklara duyarlılıkları artar. Çinko, DNA transkripsiyon faktörleri için gerekli olan çinko parmaklarının oluşumunda gereklidir. T hücre aktivasyonu ve T-B hücre etkileşiminde önemli olan sinyal proteinlerinin yapısında yer alır. Çinko ayrıca güçlü antioksidan özelliğe sahip olduğu için kan hücrelerinin ve proteinlerin kararlılığında etkilidir. Çinkonun metabolizma için en aktif formları çinko sülfat ve çinko oksit formlarıdır. Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörü için optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra nanopartikül etkisini kıyaslamak amacıyla yarıçapı maksimum 50 nm çapında olan ZnO nanopartikülü kullanılarak 0,0001-0,0008 mol.L⁻¹ aralığında optimizasyon çalışması yapılmıştır. Elde edilen impedans verileri neticesinde optimum ZnO konsantrasyonu 0,0002 mol.L⁻¹ olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum değer altındaki nanopartikül konsantrasyonları yüzey alanını yeteri kadar arttıramadığından sinyalde belirgin bir değişim gözlenmemiştir.

Geliştirilen immünosensörlerin tekrar üretilebilirlik değerlendirmesi amacıyla her bir elektrottan seri olarak hazırlanmış ve verdikleri impedimetrik yanıtların standart sapmaları hesaplanmıştır. Aljinat elektrot için standart sapma 0.028, jelatin için 0.036, jelatin/aljinat için 0.033 olarak bulunmuştur. En kararlı elektrotların aljinat ve jelatin/aljinat olarak belirlenmesi bu elektrotlara ait SEM mikrograflarının düzenli film yapısını da desteklemektedir.

Geliştirilen immünoşensörlerin raf ömürlerinin araştırılması amacıyla yapılan çalışmada Jelatin-PrA immünoşensörünün 10 günlük kullanım süresi sonunda aktivitesini yaklaşık % 58 oranında koruduğu görülmüştür. Bu değer Aljinat-PrA immünoşensör için yaklaşık % 64 ve Jelatin/Aljinat immünoşensör için yaklaşık %68'dir. En kararlı film yapılarının değerlendirilmesi, tekrar üretilebilirlik verileriyle birlikte tekrar göz önünde bulundurulduğunda Jelatin/Aljinat immünoşensörlerine ait olduğu anlaşılmaktadır. düşünülmektedir. Literatürde kullanım ömrü sonunda daha düşük (Li vd. 2011, Zhang vd. 2008) ve daha yüksek (Ordonez ve Fabregas 2007, Kong vd. 2011) aktivitelere sahip immünoşensör çalışmaları bulunmaktadır.

Biyosensörlerde kullanılan biyolojik moleküllerin analite olan seçiciliği biyolojik moleküllerin biyosensörlerde tanımlayıcı molekül olarak kullanılmasının en büyük avantajıdır. Spesifik olmayan bağlanmaların belirlenmesi amacıyla MS hastalarının serum ve BOS numunelerinde IgG ile birlikte yüksek bulunan biyobelirteçler olan Anti-MOG, Anti-MAG ve Anti-TNF α ile çalışmalar yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan optimum immünoşensörler, IgG ile aynı konsantrasyondaki belirtilen antikorlar ile optimum inkübasyon süresinde inkübe edilmiştir. Elde edilen veriler neticesinde tüm immünoşensörlerin IgG için oldukça yüksek spesifikliğe sahip olduğu belirtilmiştir.

Geliştirilen immünoşensörlerin modifikasyon başarılarını denetlemek amacıyla her modifikasyon basamağında CV ve EIS ölçümleri alınmıştır. Son yıllarda EIS, biyosensörlerin modifikasyonların başarısı ve biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinin izlenmesinde çok yoğun bir şekilde tercih edilmeye başlanmıştır. Bu özellikleri ile impedans aynı zamanda, yüzey morfolojisinin görüntüleme teknikleriyle aydınlatılmasında yardımcı bir tekniktir. CV ölçümlerinde çıplak elektrodun polimer ve PrA modifikasyonu ile akım yoğunluklarında azalma gözlenmiştir. ZnO ilavesinden sonra ise yüzey alanındaki ve elektrot transferi için gerekli aktif bölgelerin artışı sebebiyle akım yoğunluklarında artış gözlenmiştir. IgG ilavesiyle gerçekleşen antijen-antikor etkileşimi sonucu elektrot aktarımında yer alan aktif bölgelerin engellenmesi sebebiyle akım yoğunluklarında azalma gözlenmiştir. EIS ölçümlerinde ise yapılan modifikasyonlar ve IgG ile inkübasyon sonucu impedansta artış gözlenmiştir.

Modifikasyon basamaklarında alınan CV ve EIS ölçümleri birbirlerini desteklemekte ve immobilizasyonun başarısını kanıtlar niteliktedirler.

Geliştirilen immünosensörlerin CV voltamogramları kullanılarak formal potansiyelleri ve pik ayrımları hesaplanarak immünosensörlerin tersinirliği araştırılmıştır. Formal potansiyeller Aljinat-PrA, Jelatin-PrA, Jelatin-Aljinat-PrA, Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünosensörleri için sırasıyla 138, 160, 143, 148 mV olarak hesaplanmıştır. Pik ayrımlar ise sırasıyla 125, 130, 116, 125 mV olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar yorumlandığında, tüm immünosensörlerin tersinmezliğe yakın olduğunu fakat tüm immünosensörler içerisinde en tersinir özellikteki immünosensörün Jelatin-Aljinat-PrA olduğunu göstermektedir. Ayrıca Nyquist grafikler incelendiğinde, immünosensörlere ait devre modelinin Warburg direnci içerdiği söylenebilmektedir (Şekil 2.17).

Geliştirilen immünosensörlere çeşitli konsantrasyon aralıklarında IgG uygulanarak kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Jelatin-PrA immünosensörün $15.625-1000 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ aralığında tek bir doğrusal kalibrasyon eğrisi elde edilebilmiştir. Bu konsantrasyonun alt ve üst limitlerinde anlamlı sinyaller elde edilememiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiğinin determinasyon katsayısı 0,9564 olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçların SEM mikrograflarından da görüleceği üzere jelatinin düzensiz film yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca PrA optimizasyonu grafiğinden de anlaşılabileceği üzere Jelatin-PrA immünosensörü, Aljinat-PrA ve Jelatin-Aljinat-PrA immünosensörleri ile kıyaslandığında en düşük PrA konsantrasyonuna sahiptir. Bu nedenle diğer immünosensörlere kıyasla daha düşük konsantrasyonda IgG ile etkileşeceğinden daha dar bir tayin aralığına sahip olması beklenen bir sonuçtur.

Aljinat-PrA immünosensörü $7,8125-125 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ve $250-5000 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ aralığında iki doğrusal kalibrasyon grafiğine sahiptir. Determinasyon katsayıları sırasıyla 0,9921 ve 0,9843 olarak belirlenmiştir. Aljinat-PrA immünosensörü için yapılan PrA optimizasyonunun optimum değeri Jelatin-PrA immünosensörüne göre 2 kat daha fazladır. Bu artış Aljinat-PrA immünosensörünün Jelatin-PrA immünosensörüne göre çok daha yüksek konsantrasyonda IgG ile etkileşmesine neden olarak immünosensörün tayin aralığını daha geniş kılmıştır.

Jelatin-Aljinat-PrA immünoşensörü 7,8125-750 ng.µL⁻¹ ve 1000-20000 ng.µL⁻¹ aralığında iki doğrusal kalibrasyon grafiğine sahiptir. Determinasyon katsayıları sırasıyla 0,9589 ve 0,9915 olarak belirlenmiştir. Jelatin-Aljinat-PrA immünoşensörü için yapılan PrA optimizasyonunda optimum konsantrasyon Jelati-PrA immünoşensörünün optimum PrA değerine göre 4 kat daha fazladır. Bu artış Jelatin-Aljinat-PrA immünoşensörünün çok daha yüksek konsantrasyonda IgG ile etkileşmesine neden olarak diğer immünoşensörlere kıyasla çok daha geniş bir tayin aralığına sahip olmasını mümkün kılmıştır.

Nanopartikül etkisinin tayin limitine etkisini araştırmak amacıyla optimizasyonu tamamlanmış bu Jelatin-Aljinat-PrA sistemine optimum konsantrasyonda ZnO eklenerek yeni bir kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünoşensörü için 3,90-500 ng.µL⁻¹ ve 750-20000 ng.µL⁻¹ aralığında iki doğrusal kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Sonuçlardan anlaşılağı üzere nanopartikül ilavesiyle daha düşük tayin sınırlarına inilebilmiştir.

Tez çalışmasının son aşamasında en düşük tayin limitine sahip Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünoşensör ile BOS ve serum çalışması yapılmıştır. BOS numunesi için elde edilen sinyal, Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünoşensörü için elde edilen kalibrasyon grafiğinin denkleminde yerine konulmuş ve karşılık gelen konsantrasyon 0,183 mg.mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu değer ELISA tekniği kullanılarak elde edilen referans ölçüm ile (0,198 mg.mL⁻¹) elde edilen sonuca oldukça yakındır. Serum numunesi için elde edilen sinyal ise aynı şekilde kalibrasyon grafiğinde yerine konulmuş ve karşılık gelen konsantrasyon 0,266 mg.mL⁻¹ olarak bulunmuştur. ELISA tekniği kullanılarak elde edilen referans ölçüm (0,274 mg.mL⁻¹) ile sonuçlar uyumludur.

Çizelge 6.1 Serum ve BOS numunelerinde referans teknik ile EIS sonuçlarının kıyaslanması

Yöntem	SERUM (mg.ml ⁻¹)	BOS (mg.ml ⁻¹)
EIS İmmünoşensör	0,266	0,183
ELISA	0,274	0,198
Standart Sapma	-1,4814	-3,95

Geliştirilen bu immünoşensörlerin tüm verileri göz önünde bulundurulduğunda her immünoşensörün farklı parametrelerde avantaj ve dezavantajlara sahip olduğu görülmüştür. Örneğin Jelatin-Aljinat-PrA immünoşensörünün hazırlanması, geliştirilen diğer immünoşensörlere göre daha yüksek miktarda PrA gerektirirken ($2.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$), raf ömrü değerlendirmesi ve tekrar üretilebilirlik verileri göz önünde bulundurulduğunda en kararlı film yapısının Jelatin-Aljinat-PrA immünoşensörüne ait olduğu görülmektedir. Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA immünoşensörüne bakıldığında yüksek miktarda PrA kullanılması immünoşensörü daha az ekonomik kılarken, bu immünoşensörün en düşük tayin sınırına sahip olması da onu avantajlı hale getirmektedir.

Çizelge 6.2 İmmünosensörlerin sahip olduğu özelliklerin genel gösterimi

	Jelatin-PrA	Aljinat-PrA	Jelatin-Aljinat-PrA	Jelatin-Aljinat-ZnO-PrA
Polimer (%)	4	0,5	2:1	2:1
Protein A ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	0,5	1	2	2
Çapraz Bağlayıcı (M)	0,002	0,0075	0,004	0,004
İnkübasyon Süresi (dk)	60	60	90	90
pH	7,4	7,4	7,4	7,4
Tekrar Üretilebilirlik (Std. Sapma)	0,036	0,028	0,033	-
Kullanım Süresi (Sinyal Seviyesi)	% 58	% 64	% 68	-
Formal Potansiyel (mV)	160	138	143	148
Pik Ayrımı (mV)	130	125	116	125
Tayin Limiti	15.625 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	7,8125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	7,8125 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	3,90 $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Tez çalışması kapsamında geliştirilen immünosensörlerin IgG tayin aralıkları ve tayin sınırları literatürdeki IgG tayinine yönelik immünosensörler ile kıyaslandığında oldukça yüksek olduğu görülmektedir. IgG tayinine yönelik geliştirilmiş bu immünosensörler antijen-antikor etkileşimine dayanmaktadır. Bu nedenle bir antijen bir antikor ile etkileşebilmektedir. Fakat bu tez çalışması kapsamında kullanılan IgG'ye spesifik PrA molekülü aynı anda 5 adet IgG yi bağlayabilecek yüksek düzeyde homolog özellik gösteren bölgeler içermektedir. Dolayısıyla geliştirilen PrA immünosensörlerinin çok daha üst konsantrasyonda ve oldukça geniş aralıkta IgG tayinini mümkün kılan tayin aralıkları vardır. Literatürde geliştirilen immünosensörlerin tayin aralıkları ve tayin sınırları gerçek numuneler ile çalışılacağına oldukça düşük bir bölgede kalmakta ve bu

yüzden örneklerin büyük ölçüde seyreltilmesi gerekmektedir. Jelatin-PrA immünoşensörünü dışında diğer geliştirilen immünoşensörler ile normal bireylerin ve IgG seviyesi normal aralığın dışında bulunan hastalıklara sahip bireylerin serum ve BOS numunelerinde IgG tayini örneklerin seyreltilmesine gerek duyulmadan doğrudan bir şekilde yapılabilmektedir. Oysa ki literatürde geliştirilmiş immünoşensörlerde gerçek numuneler deneneceği zaman örnek içerisindeki IgG konsantrasyonunun, immünoşensörün tayin aralığına düşmesi için çeşitli oranlarda seyreltme işlemleri yapılması gerekmektedir. Örneklerin seyreltilmeden immünoşensör ölçümüne hazır olması tez kapsamında geliştirilen PrA immünoşensörlerinin en büyük avantajı arasındadır.

Çizelge 6.3 Literatürdeki IgG tayinine yönelik immünoşensörler ile geliştirilen immünoşensörlerin kıyaslanması

Yöntem	Tayin Sınırı ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	Tayin Aralığı ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	Referans
<u>Amperometrik</u>	0.18	0.51-30.17	<u>Liu vd. 2009</u>
<u>DPV</u>	4.0×10^{-6}	1.0×10^{-4} -0.2	<u>Cao vd. 2013</u>
<u>Floresans</u>	0.01	0.01-5	<u>Wang vd. 2012</u>
<u>İmpedans</u>	0.3	0.3-7	<u>Saha vd. 2009</u>
<u>İmpedans</u>	3.90	$3.90-2.0 \times 10^4$	Bu tez çalışması

KAYNAKLAR

- Aboul-Enein, H.Y., Stefan, R.I, Radu, G.L. and Baiulescu, G.E. 1999. The construction of an amperometric immunosensor for the thyroid hormone, L-T3. *Anal Lett*, Vol. 32; 447–455.
- An, Y., Tang, L., Jiang, X., Chen, H., Yang, M., Jin, L., Zhang, S., Wang, C. and Zhang, W. 2010. A photoelectrochemical immunosensor based on Au-doped TiO₂ nanotube arrays for the detection of α -synuclein. *Chemistry*, 16 (48); 14439-46.
- Aydođdu, G., Zeybek, D.K., Pekyardımcı, ř. and Kılıç, E. 2013. A novel amperometric biosensor based on ZnO nanoparticles-modified carbon paste electrode for determination of glucose in human serum. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 41; 332–338.
- Barsoukov, E. and Macdonald, J.R. 2005. *Impedance Spectroscopy; Theory, Experiment, and Applications*. 2nd edition, Wiley Interscience Publications.
- Baskın, Y., Yiğitbaşı, T., Afacan, G., Akgün F. ve Der, R. 2010. Sağlıklı Bireylerde İmmunoglobulin (IGA, IGG, IGM) ve IGG Alt Grupları Referans Aralıkları. *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*, 35 (4) ; 325–332.
- Berggren, C. and Johansson, G. 1997. Capacitance measurements of antibody-antigen interactions in a flow system. *Anal Chem.*, 15; 69(18); 3651-7.
- Bhavsara, K. Fairchild, A., Alonasa, E., Bishopa, D.K., La Bellea, J.T., Sweeneyb, J., Alford, T.L. and Joshi, L. 2009. A cytokine immunosensor for Multiple Sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy using electroplated printed circuit board electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, Vol.25; pp. 506–509.
- Buerk, D.G. 1993. *Biosensors: Theory & Applications*. Technomic Publishing Company.
- Cao, X., Liua, S., Feng, Q. and Wang, N. 2013. Silver nanowire-based electrochemical immunoassay for sensing immunoglobulin G with signal amplification using strawberry-like ZnO nanostructures as labels. *Biosensors and Bioelectronics*, 49; 256–262.
- Chawla, S. and Pundir, C.S. 2012. An amperometric hemoglobin A1c biosensor based on immobilization of fructosyl amino acid oxidase onto zinc oxide nanoparticles–polypyrrole film. *Analytical Biochemistry*, 430; 156–162.

- Chaubey, A., Gerard, M., Singhal, R., Singh, V.S. and Malhotra, B.D., Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors. *Electrochimica Acta.*, 46; 723-729.
- Chauhan, N. and Pundir C.S., 2014. Amperometric determination of acetylcholine-A neurotransmitter, by chitosan/gold-coated ferric oxide nanoparticles modified gold electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014 May 5;61 doi: 10.1016/j.bios.2014.04.048
- Chen, W., Lu, Z. and Li, C.M. 2008. Sensitive Human Interleukin 5 Impedimetric Sensor Based on Polypyrrole-Pyrrolepropyic Acid-Gold Nanocomposite. *Anal. Chem.*, 80; 8485–8492.
- Clark, L.C. 1987. *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Oxford Chap. 1; 3-12.
- Coligen, J. E. 1991. *John Wiley & Sons Current Protocols In Immunology*. New York sections 8.3.1-8.3.11.
- Dahlbom, I., Agardh, D. and Hansson, T. 2008. Protein A and protein G ELISA for the detection of IgG autoantibodies against tissue transglutaminase in childhood celiac disease. *Clin Chim Acta*, 395; 72-6.
- Daneshegar, P., Moosavi-Movahedi A.A., Norouzi, P., Reza Ganjali, M., Farhadi, M. and Sheibanid, N. 2012. Characterization of paracetamol binding with normal and glycated human serum albumin assayed by a new electrochemical method. *J. Braz. Chem. Soc.*, 23; 114-119.
- Derkus, B., Emregul, E., Yucesan, C. and Emregul, K. 2013. Myelin basic protein immunosensor for multiple sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 15; 53-60.
- Devi, R., Yadav, S. and Pundir, C.S. 2012. Amperometric determination of xanthine in fish meat by zinc oxide nanoparticle/chitosan/multiwalled carbon nanotube/polyaniline composite film bound xanthine oxidase. *Analyst*, 137; 754–759.
- Emregül, E. 2005. Development of a new biosensor for superoxide radicals. *Anal. Bioanal. Chem.*, 383; 947-954.
- Fu, Y., Yuan, R., Tang, D., Chai, Y. and Xu, L. 2005. Study on the immobilization of anti-IgG on Au-colloid modified gold electrode via potentiometric immunosensor, cyclic voltammetry, and electrochemical impedance techniques. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40; 61–66.

- Gan, N., Hou, J., Hu, F., Cao, Y., Li, T., Guo, Z. and Wang, J. 2011. A renewable and ultrasensitive electrochemiluminescence immunosensor based on magnetic RuL@SiO₂-Au~RuL-Ab₂ sandwich-type nano-immunocomplexes. *Sensors (Basel)*, 11(8); 7749-62.
- Gong, Z., Guo, Y., Sun, X., Cao, Y. and Wang, X. 2014. Acetylcholinesterase biosensor for carbaryl detection based on interdigitated array microelectrodes. *Bioprocess and biosystems engineering*, 2014 Apr 27.
- Graille M., Stura, E.A., Corper, A.L., Sutton, B.J., Taussig, M.J., Charbonnier, J.B. and Silverman, G.J. 2000. Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci*, 97 (10); 5399–404.
- Hock, B. 1997. Antibodies for immunosensors. *Analytica Chimica Acta*, 347; 177-186.
- Holford, T.R.J., Davis, F. and Higson, S.P.J. 2012. Recent Trends in Antibody Based Sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 34; 12-24.
- Wang, J. 2000. *Analytical Electrochemistry*. Wiley Electronics, Chapter 1,2.
- Oldham, K.B. 2008. A Gouy–Chapman–Stern model of the double layer at a (metal)/(ionic liquid) interface. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 613 (2); 131–138.
- Karabay, G., Akçayöz, D., Köken, K., Kunt, G., Müldür, İ.B. ve Saykal, S.G.. *Elektron Mikroskopunun Tıpta Kullanım Alanları*. <http://tip.baskent.edu.tr/egitim/mezuniyetoncesi/calismagrp/ogrsmpzsnm12/11.2.pdf>
- Kumar, H. and Rani, R. 2013. Development of biosensors for the detection of biological warfare agents: its issues and challenges. *Sci. Prog.*, 96 (3); 294-308.
- Lao, X. Z., Zhou, Y.L. and Zheng, H. 2013. Efficient expression and purification of Fc-fragment-binding domain and its application to immunoglobulin G purification. *Biomed Environ Sci.*, 26(11); 916-919.
- Li H, Guo Y, Xiao L. and Chen B, 2014. A fluorometric biosensor based on H₂O₂-sensitive nanoclusters for the detection of acetylcholine. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014 Apr 2;59C:289-292. doi: 10.1016/j.bios.2014.03.054.
- Liao, L.T., Liao, C.C., Liu, C.C., Yang, T.Y. and Wang, G.C. 2014. Evaluation of an electrochemical biosensor for uric acid measurement in human whole blood samples. *Clinical Chim Acta*, May 9. pii: S0009-8981(14)00210-1. doi: 10.1016/j.cca.2014.04.033.
- Liu, G.Z. and Gooding, J.J. 2009. Towards the fabrication of label-free amperometric immunosensors using SWNTs. *Electrochem. Commun*, 11; 1982–1985

- Lindmark, R. 1983. Binding of immunoglobulins to Protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera. *J. Immunol. Methods*, 62(1); 1-13.
- Lisdat, F. and Schafer, D. 2008. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391; 1555-1567.
- Loo, A.H., Bonanni, A., Ambrosi, A., Poh, H.L. and Pumera, M. 2012. Impedimetric immunoglobulin G immunosensor based on chemically modified graphenes. *Nanoscale*, 4; 921–925.
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J. and Chan, D.W. 2001. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 314; 1-26.
- Martin, E.J. 2001. Composite Films for Modifying Evanescent Wave Characteristics in Long-Period Grating, Master's Thesis. http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-02172001_014116/unrestricted/JEMartinETD.pdf
- Mirhabibollahi, B., Brooks, J.L. and Kroll, R.G. 1990. A semi-homogenous amperometric immunosensor for Protein A-bearin *S. aureus* in foods. *Appl Microbiol Biotechnol*, 34; 242-247.
- Narang, J., Chauhan, N. and Pundir, C.S. 2013. Construction of triglyceride biosensor based on nickel oxide–chitosan/zinc oxide/zinc hexacyanoferrate film. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60; 45–51.
- Nisha, S., Arun, S. and Gobi, N. 2012. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. *Chemical Science Review and Letters*, 1(3); 148-155.
- Peng, H.T., Martineau, L. and Shek, P.N. 2008. Hydrogel-elastomer composite biomaterials: 3. Effect of gelatin molecular weight and type on the preparation and physical properties of interpenetrating polymer networks. *Journal of Material Science*, 19; 997-1007.
- Rahman, A., Khan, M.A. and Tareq, S.M. 2010. Preparation and characterization of polyethylene oxide(PEO)/gelatin blen for biomedical application: Effect of gamma radiation. *Journal of Applied Polymer Science*, 117; 2075-2082.
- Rezaeia, B., Khayamiana, T., Majidia, N. and Rahmani, H. 2009. Immobilization of specific monoclonal antibody on Au nanoparticles for hGH detection by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 25; 395–399.
- Riccia, F., Adornetto, G. and Palleschi, G. 2012. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochimica Acta*, 84; 74-83.
- Saha, S., Arya, S.K., Singh, S.P., Sreenivas, K., Malhotra, B.D. and Gupta, V. 2009. Zinc oxide-potassium ferricyanide composite thin film matrix for biosensing applications. *Anal Chim Acta*, 653; 212–216

- Salehi, M., Schneider, L., Ströbel, P., Marx, A., Packeisen, J. and Schlücker, S. 2014. Two-color SERS microscopy for protein co-localization in prostate tissue with primary antibody-protein A/G-gold nanocluster conjugates. *Nanoscale*, 6 (4); 2361-7.
- Schwartz, S.A. 2000. Intravenous immunoglobulin treatment of immunodeficiency disorders. *Pediatr. Clin. North Am.*, 47(6); 1355-1369.
- Scully, J.R., Silverman, D.C. and Kendig, M.W. 1993. *Electrochemical Impedance: Analysis and Interpretation*. ASTM Publication.
- Shukla, S.K., Deshpande, S.R., Shukla, S.K. and Tiwari, A. 2012. Fabrication of a tunable glucose biosensor based on zinc oxide/chitosan-graft-poly(vinyl alcohol) core-shell nanocomposite. *Talanta*, 99; 283–287.
- Sjöholm, I. 1975. Protein A from *Staphylococcus aureus*. Spectropolarimetric and Spectrophotometric studies. *Eur. J. Biochem.*, 51; 55-61.
- Susmel, S., O'Sullivan, C.K. and Guilbault, G.G. 2000. Human cytomegalovirus detection by a quartz crystal microbalance immunosensor. *Enzyme Microb Technol.*, 127(9); 639-645.
- Sungur, S., Emregül, E., Günendi, G. and Numanoğlu, Y. 2004. New glucose biosensor based on glucose oxidase-immobilized gelatin film coated electrodes. *J Biomater. Appl.* 18(4); 265.
- Tang, D., Yuan, R., Chai, Y., Dai, J., Zang, X. and Liu, Y. 2004. A novel immunosensor based on immobilization of hepatitis B surface antibody on platinum electrode modified colloidal gold and polyvinyl butyral as matrices via electrochemical impedance spectroscopy. *Bioelectrochemistry*, 65; 15-22.
- Telefoncu, A., 1999. *Biyosensörler*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir.
- Thevenot, D., Toth, K., Durst, R. A. and Wilson, S. 1999. *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification (Technical Report)*. *Pure Appl. Chem.*, 71 (12); 2333-2348.
- Thevenot, D.R. 2001. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1-2); 121-131.
- Topkaya, S.N., Ariksoysal, D.O., Kosova, B., Ozel, R. and Ozsoz, M. 2012. Electrochemical DNA biosensor for detecting cancer biomarker related to glutathione S-transferase P1 (GSTP1) hypermethylation in real samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 31; 516– 522.
- Wang, J., Song, D., Zhang, H., Zhang, J., Jin, Y., Zhang, H., Zhou, H. and Sun, Y. 2012. Studies of Fe(3)O(4)/Ag/Au composites for immunoassay based on surface plasmon resonance biosensor. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 102; 165–170.

- Wanga, G., Ganga, X., Zhoua, X., Zhanga, G., Huang, H., Zhanga, X. and Wang, L., 2013. Electrochemical immunosensor with graphene/gold nanoparticles platform and ferrocene derivatives label. *Talanta*, 103; 75–80.
- Xuana, G.S., Oha, S.W and Choi, E.Y. 2003. Development of an electrochemical immunosensor for alanine aminotransferase. *Biosensors and Bioelectronics*, 19; 365-371.
- Vidal, J.C., Espuelas, J., Garcia-Ruiz, E. and Castillo, J.R. 2004. Amperometric cholesterol biosensor based on in situ reconstituted cholesterol oxidase on an immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor. *Analytical Biochemistry*, 333, 88-98.
- Yang, L., Li, Y. and Erf, G.F. 2004. Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal. Chem.*, 76; 1107-1113.
- Yokota, S. 2010. Preparation of Colloidal Gold Particles and Conjugation to Protein A, IgG, F(ab')₂, and Streptavidin. *Immunoelectron Microscopy Methods in Molecular Biology*, 657; 109-119.
- Zammit, C.M., Quaranta, D., Gibson, S., Zaitouna, A.J., Ta, C., Brugger, J., Lai, R.Y., Grass, G. and Reith, F. 2013. A whole-cell biosensor for the detection of gold. *Plos One*, 9 (8), doi: 10.1371/journal.pone.0069292.
- Zhang, J., Sun, Y., Wu, Q., Zhang, H., Bai Y. and Song, D. 2013. A protein A modified Au-graphene oxide composite as an enhanced sensing platform for SPR-based immunoassay. *Analyst*, 138(23); 7175-81.
- Zhang, Y., Li, Y., Wu, W., Jiang, Y. and Hu, B. 2014. Chitosan coated on the layers' glucose oxidase immobilized on cysteamine / Au electrode for use as glucose biosensor. 2014 Apr 30;60C:271-276. doi: 10.1016/j.bios.2014.04.035
- Zheng, D., Wang, Q., Gao, F., Wang, Q., Qiu, W. and Gao, F. 2014. Development of a novel electrochemical DNA biosensor based on elongated hexagonal-pyramid CdS and poly-isonicotinic acid composite film. *Biosensors and Bioelectronics*, doi: 10.1016/j.bios.2014.04.011
- Zong, D., Yang, F., Yua, H., Hub, X. and Huangxian, J. 2004. Novel amperometric immunosensor for rapid separation-free immunoassay of carcinoembryonic antigen. *Journal of Immunological Methods*, 287; 13 – 20.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyad : Selin GEREKÇİ

Doğum Yeri : ANTALYA

Doğum Tarihi : 30.07.1989

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Bilgileri:

Lise : Anafartalar Lisesi, Özel Ortadoğu Koleji (2006)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2012)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı
(Eylül 2012- Ağustos 2014)