

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**YENİ BİR YAKLAŞIMLA KUANTUM NOKTA ESASLI
İMMÜNOFLORESAN *İN VİTRO*
DİAGNOSTİK TESTLERİN
TASARIMI, GELİŞTİRİLMESİ
VE BİYOMEDİKAL UYGULAMALARI**

Özlet AKÇA ÖZDEMİR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi :06.02.2017

Bornova, İZMİR

2017

Sayın Özlet AKÇA ÖZDEMİR tarafından DOKTORA Tezi olarak sunulan “Yeni Bir Yaklaşımla Kuantum Nokta Esaslı İmmünofloresan *In vitro* Diagnostik Testlerin Tasarımı, Geliştirilmesi ve Biyomedikal Uygulamaları” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 06.02.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Üye : Prof. Dr. Serdar ÖZÇELİK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet BAYBURT

Üye : Prof. Dr. Serap TEKSÖZ

Üye : Prof. Dr. Uğur AVCIBAŞI

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Yeni Bir Yaklaşımla Kuantum Nokta Esaslı İmmüno Floresan *In vitro* Diagnostik Testlerin Tasarımı, Geliştirilmesi ve Biyomedikal Uygulamaları**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06 / 02 / 2017

Özlet AKÇA ÖZDEMİR

ÖZET**YENİ BİR YAKLAŞIMLA KUANTUM NOKTA ESASLI
İMMÜNOFLORESAN *IN VITRO* DİAGNOSTİK TESTLERİN
TASARIMI, GELİŞTİRİLMESİ VE
BİYOMEDİKAL UYGULAMALARI**

AKÇA ÖZDEMİR, Özlet

Doktora Tezi, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Şubat 2017, 107 sayfa

Tez çalışması ile HIV, HCV, HbsAg gibi enfeksiyonel hastalıkların, Troponin I, NT-proBNP, h-FABP gibi kardiyak belirteçlerin insan serum ve plazmasında yüksek hassasiyet ve seçicilik ile kalitatif olarak tespitinde kullanılacak kuantum nokta esaslı, tek aşamalı, immünofloresan hızlı tanı test kitlerinin tasarlanması amaçlanmıştır. Tasarlanan tanı kitleri uygun negatif/pozitif serum/plazma örnekleri ile *in vitro* olarak test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kolloidal gold temelli mevcut testler ile karşılaştırılmıştır.

Suda çözünebilen, etkin fonksiyonel gruplara sahip, biyokonjugasyona uyumlu, yüksek floresans kararlılığına sahip, kuantum verimi yüksek CdTe/CdS-TGA kuantum noktalar (Qdot) azot gazı altında geri soğutuculu sentez düzeneği içerisinde kimyasal yöntem ile sentezlenmiştir. Kuantum noktaların optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları Uv-Vis Absorbsiyon Spektroskopisi, Floresan Spektroskopisi, DLS, SEM, TEM, STEM, AFM, XRD ve EDX ile gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyonu gerçekleştirilen kuantum noktalar tasarlanacak teste uygun monoklonal/poliklonal antikor veya rekombinant antijenler ile EDC-NHS kimyası kullanılarak konjuge edilmiştir. Elde edilen antikor/antijen konjuge Qdot' ların karakterizasyonu Bradford protein tayini, Agaroze jel elektroforezi, Uv-Vis Absorbsiyon ve Floresan Spektroskopisi, DLS, HPLC, TEM ve Aglütinasyon test çalışması ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca rHCV-Qdot konjugatlar ¹³¹I ile iodojen yöntemine göre radyoiodotlanmış ve radyoiodinasyonun kalite kontrolü TLRC ile yapılmıştır. Bu yöntem konjugasyonun karakterizasyonu için alternatif bir yöntem olarak kullanılmıştır.

Testler immünokromatografi yöntemi ile çalışan tek aşamalı hızlı tanı kitleri örnek alınarak tasarlanmıştır. Test kiti temel olarak sırtlık üzerine lamine edilmiş örnek uygulama pedi, konjugat ped, nitroselüloz membran ve emici ped olmak üzere 4 komponentden oluşmuştur. Antikor/antijen konjuge Qdot ların konjugat ped yüzeyine immobilizasyonu dispenser ile spreyleme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nitroselüloz membrana, test çizgisini (T) ve kontrol çizgisini (C) oluşturabilmek için konjugat pede emdirilen antijen/antikor ile konjuge kuantum noktaların tutunabileceği spesifik rekombinant antijenler veya monoklonal antikorlar emdirilmiştir. Testler negatif/pozitif serum/plazma örnekleri ile denenmiştir.

Elde edilen sonuçlar Qdot temelli HIV, HCV, HbsAg, Troponin I, NT-proBNP ve h-FABP testlerinin mevcut koloidal gold temelli tanı testlerinden hassasiyet ve özgüllüğünün daha yüksek olduğunu göstermiştir. Farklı hastalıkların testlere hatalı girişimleri için yapılan denemeler de negatif yanıt vermiş ve herhangi bir çapraz reaksiyonun olmadığı tespit edilmiştir. Bu da hastalığın erken teşhis ve tedavisi için çok büyük önem taşımaktadır. Ayrıca tasarlanan testlerin koloidal gold temelli mevcut testlerle karşılaştırıldığında çok daha düşük maliyetlere elde edildiği görülmüştür. Hem etkinlik hem de maliyet açısından bir adım önde olan bu testler yakın gelecekte hastalıkların erken tanısında önemli rol oynayacaktır.

Anahtar sözcükler: Kuantum Nokta, HIV, HCV, HbsAg, Troponin I, NT-proBNP, h-FABP, Tanı kiti, İmmünokromatografi Yöntemi, Radyoiyodinasyon, ¹³¹I.

ABSTRACT**DESIGN, DEVELOPMENT AND BIOMEDICAL
APPLICATIONS OF QUANTUM DOT BASED
IMMUNOFLUORESCENCE *IN VITRO* DIAGNOSTIC TESTS
WITH A NEW APPROACH**

AKÇA ÖZDEMİR, Özlet

PhD. in Nuclear Application Department

Supervisor: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

February 2017, 107 pages

In this thesis project, our aim is to develop single-stage, highly sensitive and selective quantum dot-based-immunofluorescence rapid diagnostic test kits which will be used for the qualitative and quantitative determination of infectious diseases, such as HIV, HCV, HBsAg etc. and cardiac markers, such as Troponin I, NT-proBNP, h-FABP in human whole blood, serum and plasma. The designed diagnostic kits were tested *in vitro* with appropriate negative/positive serum/plasma samples. The results were compared with the existing on colloidal gold based tests.

Water-soluble, effective that group, bioconjugation compatible, high resolution fluorescence and high quantum yield CdTe/ CdS quantum dots-TGA (Qdot) was synthesized by chemical method for recycling in NH₃ atmosphere. Optimization and characterization studies of quantum dots were carried out with Uv-Vis Absorption Spectroscopy, Fluorescence Spectroscopy, DLS, SEM, TEM, STEM, AFM, XRD and EDX. Characterization of the quantum dots to be designed was designed to produce EDC-NHS chemistry with monoclonal/ polyclonal antibodies or recombinant antigens suitable for the test. Characterization of the obtained antibody/antigen conjugated Qdots was performed by Bradford protein assay, Agarose gel electrophoresis, Uv-Vis Absorption and Fluorescence Spectroscopy, DLS, HPLC, TEM and Agglutination test. In addition, the nanoconjugates were radiolabeled with ¹³¹I according to the

iodogen method. Alternatively Radioiodination quality control was done with TLRC.

The tests were designed by using immunochromatography as a single-step rapid diagnostic kits. The test kit consists of 4 components mainly consisting of sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane and absorbent pad laminated on the back. Immobilization of the antibody/antigen conjugate Qdots to the conjugate pad surface was performed using the dispenser spray method. In order to form the test line (T) and the control line (C), the nitrocellulose membrane is impregnated with conjugated antigens or specific recombinant antigens or monoclonal antibodies to which conjugated quantum dots can be attached with the antigen / antibody adsorbed on the conjugated pad. Tests were run with negative / positive serum / plasma samples.

The results have shown that Qdot-based HIV, HCV, HbsAg, Troponin I, NT-proBNP and h-FABP tests have higher sensitivity and specificity than current colloidal gold-based diagnostic tests. Experiments for erroneous attempts at different diseases have also been negative. No cross-reaction has been detected. It is very important for the early diagnosis and treatment of the disease. Furthermore, the designed tests were obtained at much lower costs compared to the existing tests based on colloidal gold. These tests will play an important role in the early diagnosis of diseases in the near future.

Keywords: Quantum Dot, HIV, HCV, HbsAg, Troponin I, NT-proBNP, h-FABP, Diagnostic kit, Immunochromatography Method, Radioiodination, ¹³¹I .

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca yılların bilgi birikimi ve deneyimlerini hem akademik ilerleyişimde hem de hayata dair bana her konuda model olurken, benimle özveri ve yüksek maneviyat ile hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan gerektiğinde mesai saatleri dışında da değerli zamanını ayıran sevgili ve çok kıymetli Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. **Perihan Ünak**'a, akademik ilerleyişime her zaman ışık tutan hem akademik hem manevi olan çok kıymetli ve sevgili ikinci danışmanım Sayın Prof. Dr. **Suna Timur**'a, bu süreçte, kazandığı tüm bilgi birikimini bana aktarmaya çalışan, her anlamda yol gösterici olan, her sorunumla özveri ile ilgilenen, bir işverenden çok dost tavrıyla iş hayatının tüm yönlerini bana öğreten, bana her zaman yanımda olduğunu hissettiren, profesyonelliği, dostluğu ve güveni için çok kıymetli Sayın Dr. **Şahin Yağlıdere** 'ye , tez yürütülmesi aşamasında altı aylık tez izlemelerde benimle değerli görüşlerini paylaşan tez izleme komitemdeki hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. **Mehmet Bayburt** ve Sayın Prof. Dr. **Serdar Özçelik**'e, deneyimlerini sabırla paylaşan çok değerli vaktini çekinmeden ayıran Sayın Dr. **Leyla Eral Doğan**'a deneysel çalışmalarda emek veren, kendi çalışmalarına rağmen her an yardımcı olan Sayın **Başak Seven**'e ve **Murat Karadağ**'a, Nükleer Bilimler Enstitüsü ve Biyokimya Bölümündeki değerli Hocalarım ve Arkadaşlarıma bu süreçte yanımda oldukları için çok teşekkür ederim. Ayrıca 2013BIL036 no'lu BAP ile maddi desteklerinden ötürü **Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Şube Müdürlüğü**'ne ve 01040.STZ.2011-2 no'lu SANTEZ ile maddi desteklerinden ötürü **Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığına** teşekkür ederim.

Tez sürecimde teknik, teşvik, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, gönüllü araştırmacılardan eşim **Çağlar Özdemir**'e, sabır, anlayış, heyecan ve özverileri için sevgili ve çok değerli annem **Narten Akça**'ya, övgüleri, motivasyonu, neşesi ve fedakarlıkları için sevgili ve çok değerli babam **Abdullah Akça**'ya, manevi desteklerini esirgemeyen ve bana inanan annem **Seçil Özdemir** ve babam **Hayati Özdemir**'e, neşe ve motivasyonları ile her zaman yanımda olan kardeşlerim **Görkem Akça** ve **Pınar Özdemir**'e ve tez yazım sırasında sabrı ve anlayışı için oğlum **Arda Özdemir**'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Özlet AKÇA ÖZDEMİR



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
TEŞEKKÜR	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XX
ÇİZELGELER DİZİNİ	XXV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XXVII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diagnostik (Tanı) Testleri	3
2.2. İmmünokromatografik Hızlı Tanı Kiti	6
2.3. Kuantum Noktalar	8
2.3.1. Kuantum Noktaların Genel Özellikleri	8
2.3.2. Kuantum Noktaların Sentez Yöntemleri	10
2.4. Sentezlenen Kuantum Noktaların Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler	12
2.4.1. UV-Vis Absorpsiyon Spektroskopisi	12
2.4.2. Floresans Spektroskopisi	13

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.4.3. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Tekniği ile Parçacık Boyut Ölçümü.....	14
2.4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını (EDX) Dedektörü.....	15
2.4.5. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	17
2.4.6. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM)	18
2.4.7. Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscopy -AFM)	18
2.4.8. X-Işınları Difraksiyonu (Kırınımı) (XRD).....	19
2.5. Konjugasyonun Kalite Kontrolünde Kullanılan Yöntemler.....	20
2.5.1. Bradford (Coomassie Blue) Yöntemi ile Protein Miktarının Tayini	20
2.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi.....	22
2.6. Radyoiyodinasyon	23
2.6.1. İodojen Yöntemi.....	23
2.6.2. I-131.....	24
2.6.3. Kromatografik Yöntemler	25
2.6.3.1. İnce tabaka kromatografi ve İnce tabaka radyo kromatografi yöntemleri (TLC-TLRC)	26
2.6.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi ve Yüksek performanslı sıvı radyokromatografi yöntemleri (HPLC-HPLRC).....	27
2.7. Enfeksiyonel Hastalıkların Tanısı.....	29

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.7.1. Hepatit B Virüs Yüzey Antijeni (HBsAg).....	29
2.7.2. Hepatit C Virüsü (HCV)	31
2.7.3. İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (HIV)	31
2.8. Akut Miyokardiyal Enfarktüs (AME) Tanısı	32
2.8.1. Troponin I (cTnI)	33
2.8.2. Kalp spesifik yağ asiti bağlayıcı proteini (h-FABP)	35
2.9. Konjestif Kalp Yetmezliği (KKY) Tanısı	35
2.9.1. NT-proBNP	37
3. MATERYAL METOD	38
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	38
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	38
3.1.2. Kullanılan cihazlar	41
3.2. Sentez ve Konjugasyonlar.....	43
3.2.1. CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların Sentezi	44
3.2.2. CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların Antikor/Antijen Konjugasyonu...46	
3.3. Sentezlenen CdTe/CdS-TGA Kuantum noktaların Optik Karakterizasyonu.....	47

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.3.1. UV-Vis Absorpsiyon Spektroskopisi.....	48
3.3.2. Floresans Spektroskopisi.....	48
3.4. Sentez CdTe/CdS-TGA Kuantum noktaların Yapısal Karakterizasyonu.....	48
3.4.1. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Tekniği ile Parçacık Boyut Ölçümü ve Zeta Potansiyel Analizi.....	48
3.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX).....	48
3.4.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM).....	49
3.4.4. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM).....	49
3.4.5. Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscopy –AFM).....	49
3.4.6. X-Işını Difraksiyonu (Kırınımı) (XRD)	49
3.5. Konjugasyonun Kalite Kontrolü.....	50
3.5.1. Bradford (Coomassie Blue) Yöntemi ile Protein Miktarının Tayini.....	50
3.5.2. Agaroz Jel Elektroforez.....	50
3.5.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC).....	51
3.5.4. ¹³¹ I ile Radyoişaretlenme Çalışmaları.....	51
3.5.4.1. İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC).....	52

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.5.5. Fotostabilite Çalışması.....	52
3.6. Tanı Kitinin Tasarlanması.....	53
3.6.1. Antikor/Antijen Konjuge Kuantum Noktaların Konjugat Ped Yüzeyine İmmobilizasyonu.....	53
3.6.2. Antikor/Antijenlerin Membran Yüzeyine İmmobilizasyonu.....	54
3.6.2.1. T çizgi Antikor/Antijenlerin İmmobilizasyonu.....	55
3.6.2.2. C çizgi Antikor/Antijenlerin İmmobilizasyonu.....	56
3.6.2.3. Nitroselüloz Membranın Bloklanması.....	56
3.6.3. Test Komponentlerinin Birleştirilmesi (Laminasyon).....	56
3.7. Tanı Kitinin Standadizasyon ve Validasyonu.....	59
3.7.1. Qdot-HCV Tanı kiti.....	59
3.7.2. Qdot-HIV Tanı kiti.....	60
3.7.3. Qdot-HbsAG Tanı Kiti.....	62
3.7.4. Qdot-Troponin I Tanı Kiti.....	64
3.7.5. Qdot-HFABP Tanı Kiti.....	65
3.7.6. Qdot-NTproBNP Tanı Kiti.....	67

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	69
4.1.	Kuantum Nokta Sentezi ve Karakterizasyonu.....	69
4.1.1.	CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların Karakterizasyonu.....	69
4.2.	Konjugasyonun Kalite Kontrolü.....	74
4.2.1.	Agaroz Jel Elektroforez Sonuçları.....	74
4.2.2.	Protein Tayini Sonuçları.....	76
4.2.3.	Konjugasyonun Yapısal Karakterizasyonu.....	76
4.2.4.	Radyoişaretleme Çalışmalarının Optimizasyonu.....	78
4.2.5.	HPLC sonuçları.....	80
4.2.6.	Fotostabilite Çalışması.....	81
4.3.	Hızlı Tanı Kitinin Tasarlanması.....	82
4.3.1.	Antikor/Antijen Konjuge Kuantum Noktaların Konjugat Ped Yüzeyine İmmobilizasyonu.....	82
4.3.2.	Antikor/Antijenlerin Membran Yüzeyine İmmobilizasyonu.....	83
4.3.2.1.	T çizgi Antikor/Antijenlerin İmmobilizasyonu.....	83
4.3.2.2.	C çizgi Antikor/Antijenlerin İmmobilizasyonu.....	84
4.3.2.3.	Nitroselüloz membranın Bloklanması.....	84

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.3.3. Test Komponentlerinin Birleştirilmesi (Laminasyon).....	84
4.4. Tanı Kitinin Standardizasyon ve Validasyonu.....	85
4.4.1. Qdot-HCV Tanı kiti.....	85
4.4.2. Qdot-HIV Tanı kiti.....	88
4.4.3. Qdot-HbsAg Tanı kiti.....	90
4.4.4. Qdot-Troponin I Tanı kiti.....	92
4.4.5. Qdot- hFABP Tanı kiti.....	93
4.4.6. Qdot- NTproBNP Tanı kiti.....	93
5. SONUÇ.....	95
KAYNAKLAR DİZİNİ	97
ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Hızlı tanı testi bileşenleri	6
2.2 Immünokromatografik hızlı tanı testlerinin çalışma prensibi	7
2.3 Çeşitli boyutlardaki kuantum noktalar	8
2.4 Kuantum noktaların bant boşluğu mesafesi	9
2.5 Çekirdek/kabuk-yüzey aktif madde Kuantum noktalar	10
2.6 UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi bileşenleri	13
2.7 Herhangi bir çözücü ortam içerisinde parçacığın sahip olduğu hidrodinamik çap değeri.....	14
2.8 Taramalı elektron mikroskobunun şematik görünüşü	15
2.9 Geçirimli elektron mikroskobunun şematik görünüşü	17
2.10 Taramalı Geçirimli elektron mikroskobunun şematik görünüşü	18
2.11 AFM çalışma prensibi ve bileşenleri	19
2.12 XRD çalışma prensibi ve bileşenleri	20
2.13 Coomassie Brilliant Blue G-250 kimyasal yapısı.....	21
2.14 Protein tayini standart grafiği	21

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.15 İdojen molekül yapısı	23
2.16 ^{131}I 'un bozunum şeması	24
2.17 İnce Tabaka Kromatografisi ve Rf değerinin hesaplanması	27
2.18 HPLC sistemi şeması	29
2.19 Hepatit B Virüsü	30
2.20 Hepatit C Virüsü genom organizasyonu	31
2.21 İmmünyetmezlik Virüsü (HIV)	32
2.22 Troponin kompleksinin yapısı.....	33
2.23 AME sonrası cTnI düzeyindeki değişim	34
2.24 AME sonrası kanda cTnI ve h-FABP konsantrasyonundaki değişim.....	35
2.25 BNP ve NT-proBNP oluşumunun şematik gösterimi	36
3.1 Radleys Carousel 6 Paralel Sentez Sistemi içerisinde 1.reaksiyon.....	45
3.2 Radleys Carousel 6 Paralel Sentez Sistemi içerisinde 2.reaksiyon.....	45
3.3 EDC (karbodimid) ve NHS çapraz bağlama reaksiyon şeması.....	47
3.4 Imogene IsoFlow Dispenser ile Spreyleme metodu.....	54
3.5 Imogene IsoFlow Dispenser ile T ve C çizgilerinin immobilizasyonu.....	55
3.6 HCV tanı kiti tasarımı.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.7 HIV tanı kiti tasarımı.....	57
3.8 HbsAg tanı kiti tasarımı.....	57
3.9 Troponin I tanı kiti tasarımı.....	58
3.10 hFABP tanı kiti tasarımı.....	58
3.11 NT-proBNP tanı kiti tasarımı.....	58
3.12 HCV tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi.....	60
3.13 HIV tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi.....	62
3.14 HbsAg tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi.....	63
3.15 Troponin I tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi.....	65
3.16 hFABP tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi.....	66
3.17 NT-proBNP tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi.....	68
4.1 CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta UV-Vis ve floresans Spektrumu.....	69
4.2 CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta hidrodinamik çapı.....	70
4.3 CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta zeta potansiyeli.....	71
4.4 CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların STEM (A) ve TEM (B) görüntüleri...	71
4.5 CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta XRD deseni. Mavi çizgiler, yüzey merkezli kübik CdTe'nin hlk indisleri (sırasıyla 111,220,311) kırmızı çizgiler yüzey merkezli kübik CdS'nin hlk indisleri (sırasıyla 111,220,311) temsil eder.....	72

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.6 CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların EDX Dağılımı.....	73
4.7 CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların AFM görüntüleri.....	73
4.8 Agaroz jel elektroforez görüntüsü. (A-B) 1. Qdot 2-3. HFABP IgG1-Qdot 4. Qdot + HFABP IgG1-Qdot. (C) 1. Qdot 2,4. cTnI IgG2b-Qdot 3,5. Qdot + cTnI IgG2b-Qdot 6. HFABP IgG1-Qdot 7. Qdot + HFABP IgG1-Qdot. 8,10. NTproBNP IgG2b-Qdot 9,11. Qdot + NTproBNP IgG2b-Qdot (D) 1. Qdot 2,4. rHCV-Qdot 3,5. Qdot + rHCV-Qdot 6,8. GP41,GP36,P24-Qdot 7,9. Qdot+ GP41,GP36,P24-Qdot 10,12. HbsAg mAb1-Qdot 11,13.Qdot+ HbsAg mAb1-Qdot.....	75
4.9 Konjugatların hidrodinamik çapı.....	76
4.10 TEM görüntüleri (A) rHCV-Qdot (B) GP41,GP36,P24-Qdot (C) HbsAg mAb1-Qdot (D) cTnI IgG2b-Qdot (E) HFABP IgG1-Qdot (F) NTproBNP IgG2b-Qdot	77
4.11 Optimum banyo çözeltisinde gerçekleştirilen TLRC kalite kontrol kromatogramları.....	80
4.12. rHCV (A), Qdot (B) ve rHCV-Qdot HPLC Kromatogramları.....	81
4.13 Konjugat ped (A) ve rHCV-Qdot immobilize konjugat ped floresan mikroskop görüntüsü.....	82
4.14 10 µm por çaplı NC Membran polarize (solda) ve floresan (sağda) mikroskop görüntüleri.....	83
4.15 Kuantum nokta esaslı HCV, HIV, HBsAg, cTnI, Hfabp ve NT-proBNP tanı kitleri.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.16 Qdot -HCV testlerinin pozitif-negatif-çapraz kontrol deneme sonuçları....	85
4.17 Qdot – HCV testlerinin pozitif-çapraz kontrol deneme sonuçları	86
4.18 Qdot – HIV testlerinin pozitif-negatif-çapraz kontrol deneme sonuçları ...	88
4.19 Qdot – HBsAg testlerinin pozitif-negatif-çapraz kontrol deneme sonuçları	90
4.20 Qdot – HBsAg testlerinin farklı konsantrasyonlarda pozitif kontrol deneme sonuçları.....	91
4.21 Qdot- HBsAg testlerinin çapraz kontrol deneme sonuçları	92
4.22 Qdot – Troponin I testlerinin pozitif –negatif kontrol deneme sonuçları....	92
4.23 Qdot – hFABP testlerinin pozitif –negatif kontrol deneme sonuçları	93
4.24 Qdot – NT-proBNP testlerinin pozitif –negatif kontrol deneme sonuçları...	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Konjugat pede imobilize edilen antikor/antijen-Qdot	53
3.2 Dispenser çalışma koşulları.....	54
3.3 Test çizgisine immobilize edilen antikor/antijen.....	55
3.4 Kontrol çizgisine immobilize edilen antikor/antijen	56
4.1 Protein Tayini sonuçları.....	76
4.2 Banyo çözeltisi optimizasyonuna ilişkin farklı çözeltiler kullanılarak karakterizasyonu yapılan örneklerin işaretlenme verimi ve R_f değerleri.....	79
4.3 Qdot – HCV testlerinin SFTS 97- panel kontrol deneme sonuçları.....	87
4.4 Qdot – HIV testlerinin SFTS 2006- panel kontrol deneme sonuçları	89



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler****Açıklama**

Ex

Eksitasyon

Em

Emisyon



Kısaltmalar**Açıklama**

Qdot	CdTe/CdS-TGA kuantum nokta
AME	Akut miyokardiyal enfarktüs
KKY	Konjestif Kalp Yetmezliği
HCV	Hepatit C virüsü
HIV	İmmünyetmezlik virüsü
HBsAg	Hepatit B yüzey antiijeni
XRD	X-Işını Kırınımı
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
EDX	Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskopi
TLC	İnce Tabaka Kromatografi
TLRC	İnce Tabaka Radyo Kromatografi
HPLRC	Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi
R _f	Alıkonma mesafesi
R _t	Alıkonma zamanı
¹³¹ I	İyot-131
hFABP	Kalp spesifik yağ asiti bağlayıcı proteini
cTnI	Troponin I

Kısaltmalar**Açıklama**

NC	Nitroselüloz membran
T çizgisi	Test çizgisi
C çizgisi	Kontrol çizgisi
EDC	1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochlorid
NHS	N-hidroksisüksinimid
IMS	İmmuno-Manyetik Seperasyon
IFA	İmmunofloresan Antikor testi
RIA	Radioimmunassay
ICTS	İmmünokromatografik bazlı hızlı tanı kitleri
ELISA	Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
PBS	Fosfat tampon çözeltisi

1. GİRİŞ

Hastalıklarda erken ve doğru tanı, hem yaşam süresi hemde kalitesi açısından son derece büyük önem taşır. Hastalıkların hızlı bir şekilde belirlenmesi etkin ve kanıta dayalı tedavi ve uygulamaların başlatılması açısından kritik öneme sahiptir. Son yıllarda enfeksiyonel hastalıklara neden olan belirteçlerin, akut miyokardiyal enfarktüs (AME) ve Konjestif Kalp Yetmezliği (KKY) tanısında kullanılan kardiyak belirteçlerin saptanması için İmmunofloresan Antikor (IFA) Testi , Otomatik ve Manuel ELISA (Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay) (Uçan et al., 2010), Radioimmunassay (RIA) Yöntemleri, İmmuno-Manyetik Seperasyon (IMS) Teknolojisi, Biyosensör kökenli yöntemler, PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Fung, 2006). Fakat bütün bu teknikler, Nokta-Bakım Analizleri (Point-Of-Care Testing-POCT) için uygun değildir; çünkü büyük ve sofistike aletler, karmaşık işlemler, uzun analiz süresi ve eğitimli personel istihdam etmeyi gerektirirler.

İmmünokromatografik bazlı hızlı tanı kitleri (ICTS) minimal manipülasyon, küçük analit hacmi, kısa analiz süresi, düşük maliyeti, çoklu analit analizi gerçekleştirebilmesi, profesyonel ekipman ve eğitimli personel gerektirmemesi ve Nokta-Bakım Analizlerine (Point-Of-Care Testing-POCT) imkan vermesi gibi avantajlarından dolayı yıllar içinde giderek daha fazla ilgi görmektedir. (Chaivisuthangkura et al., 2013) (Zhou et al., 2013) Günümüzde klinik, ilaç, gıda (Li et al, 2011) (Watanabe et al., 2015) (Anfossi et al., 2011), adli (Romolo et al., 2015) ve çevresel (Zhou et al., 2013) analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. ICTS' ler uygulanan numunelerin immünoreaktif madde immobilize edilmiş analitik bir membran yüzeyinde kapiler kuvvet etkisiyle hareket etmesi temeline dayanan immünoassaylerdir. Genellikle cut-off (minimum tespit değeri) seviyesinde veya üzerinde bir analit konsantrasyonunda veya analitin bulunmadığı durumda evet/hayır (pozitif/negatif) şekilde ikili yanıt verir.

Yaygın olarak kullanılan ICTS ler genellikle görsel sinyal üretmek için kolloidal altın, boya veya lateks boncuk malzemeleri kullanırlar (Tao et al., 2016). Ancak bu malzemeler sınırlı duyarlılığa sahiptirler ve belli bir seviyeye kadar test sonucunu verebilirler. Dolayısıyla ICTS'lerde sinyal üretimi için kullanılan malzeme, ICTS'nin performansını belirlemede çok büyük rol oynamaktadır. Araştırmacılar duyarlılığı artırmak umuduyla kemülüminesan veya floresan materyaller gibi farklı etiketler üzerinde çalışmaktadırlar (Posthuma-Trumpie et al., 2009) (Wang et al., 2016). Kolorimetrik etiketler yerine floresan etiketler

kullanılması ICTS tespit sınırının önemli ölçüde düşürülmesini sağlar (Sabnis, 2015). Floresan materyaller açık seçiktir, çünkü optik sinyaller duyarlıdır ve floresans etiketli ICTS daha hassas analiz potansiyeline sahiptir (Khreich et al., 2010). Ayrıca floresan etiketler, biyosensör uygulamaları (Adegoke et al., 2016) nükleik asit dedeksiyonu, rezonans enerji transferi çalışmaları, hücresel etiketleme (Jiang et al., 2016) gibi birçok alanda başarıyla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, halen kullanılan organik boya ve protein bazlı floroforların birçoğu, pH bağımlılığı, yüksek konsantrasyonlarda kendiliğinden soğutma, foto ağartma hassasiyeti, sulu ortamdaki kısa süreli stabilite gibi ciddi kimyasal ve fotofiziksel dezavantajlara sahiptir.

Kuantum noktalar (QDot'lar) 2 ile 20 nm arasında çapa sahip, periyodik tablodaki grup II ve VI elementlerinden (CdSe, CdTe, CdS) ya da grup III ve V (InP ve InAs) elementlerinden oluşan yarı iletken nanokristallerdir. Qdot' lar benzersiz optik ve elektronik özelliklerinden dolayı ICTS'de floresan etiketler olarak kullanılmıştır (Berlina et al., 2013) (Chen et al., 2014). Bu yeni floresan etiketler, yüksek kuantum verimi, boyuta bağlı floresan, geniş absorpsiyon spektrumu ve dar simetrik emisyon spektrumu, büyük molar sönme katsayısı, güçlü floresan emisyonu gibi eşsiz özelliklerinden dolayı geleneksel organik boyalara kıyasla bir çok üstünlüklere sahiptir. QDot'ların yüksek seviyede parlaklık ve kararlı fotostabilite özelliği yüksek duyarlı tanı sistemlerinin tasarlanmasına olanak sağlar (Hildebrandt, 2011), (Jin et al., 2012).

Yüzeylerinde geniş karboksil veya amin grupları bulunan suda çözünür QDot'lar antikör/antijenlerle kolayca konjuge edilebilirler. Bu özellikleri QDot'ları yüksek hassasiyette ICTS geliştirmek için güçlü bir alternatif yapmaktadır (Nardo et al., 2016).

Bu tez çalışmasının amacı ekonomik, kullanımı kolay, analiz süresi kısa ve yüksek duyarlılıkta HIV, HCV, HbsAg gibi enfeksiyonel hastalıkların, Troponin I, NT-proBNP, h-FABP gibi kardiyak belirteçlerin insan tam kan, serum ve plazmasında tespitinde kullanılacak Qdot esaslı immünokromatografik tanı kitlerinin tasarlanmasıdır. Tasarlanan bu testlerle hastalıkların daha erken evrede tanısı sağlanacak ve hastalar tedaviye yönlendirilebileceklerdir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diagnostik(Tanı) Testleri

Hastalıklarda erken teşhis çok önem arzeder. Çünkü hastalığın seyri ve tedavi sürecine direk etki eder. Hastalıkların ileri aşamasında tedavi süreci gittikçe zorlaşır. Tanı hastanın hikayesinin alınması ve muayenesinin yapılması ile başlar. Koruyucu tıp veya klinik çalışmalarda bireylerin sağlam olup olmadıklarını belirlemek amacı ile kullanılan laboratuvar tekniklerine, klinik gözlemlere veya özgün gereç ölçümlerine bağlı olarak karara erişilen değerlendirme kurgularına "Tanı Testleri" denir.

Enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan testleri rutin laboratuvar incelemeleri ve özgül laboratuvar incelemeleri olmak üzere iki ana başlık altında incelemek mümkündür. Hemogram, idrar ve biyokimya parametre değerlerinin normal değerleri ile karşılaştırılması rutin laboratuvar incelemelerini oluştururken, Enfeksiyon hastalıkları tanısında etken mikroorganizmanın kendisinin, mikroorganizmaya ilişkin antijenik yapılarının ya da konak dokuda mikroorganizmaya karşı oluşmuş antikorların saptanması özgül tanıyı oluşturmaktadır.

- Mikrobiyolojik İncelemeler

Alınan materyallerde, (kan, gaita, idrar, balgam, BOS, seröz ve sinivoal sıvılar, biyopsi ve lezyonlar) mikroorganizmaların mikroskopla incelenmesi ya da kültür yapılarak görülmesi ile enfeksiyon hastalığının teşhisi konur. Mikroskopik incelemelerde, santrifüj ve boyama yöntemlerinden faydalanılır. Çeşitli besi yerlerinde kültür yapılarak mikroorganizmalar üretilir. Mikroorganizmaların çeşitlerine göre, laboratuvar tetkikleri de değişir.

- Serolojik İncelemeler

İndirekt serolojik yöntemler bazı bakteri, mantar, virüs ve parazitlerin tanısında kullanılabilir. Bu yöntem ile mikroorganizmanın kendisine karşı oluşturduğu IgM, IgG ya da her iki antikor saptanabilmektedir, aglütinasyon testleri, Radioimmünassay (RIA), İmmunfluoresans Antikor (IFA) Testi; enzyme immunoassay (EIA,ELİSA) gibi yöntemler bu amaç için kullanılmaktadırlar.

Lateks aglütinasyon testi;

Bu test de, hem antikorları veya hem de antijenleri belirlemede kullanılabilir. Lateks partikülleri (0,80 mm çapında, polistern) immunojenik moleküllerle kaplandığında, kandaki antikorları saptamada veya eğer lateks partikülleri spesifik antikorlarla kaplanırsa virusları (antijenleri) belirlemede kullanılır. Her ikisinde de pozitif olgularda aglütinasyon meydana gelir ve lateks partikülleri kümeleşirler (lateks aglütinasyonu). Antijenin, homolog antiserumla birleşemediği durumlarda, aglütinasyon meydana gelmez. Bu tür testlerin avantajı kısa süre içerisinde sonuç vermesidir. Özgüllüğü yüksek olmasına karşın duyarlılığı düşük testlerdir. Bunun anlamı; test pozitifliği tanı için anlamlı iken negatifliği durumunda mutlaka kültür sonucu ile birlikte değerlendirilmelidir. Çünkü alınan vücut sıvısı örneğinde az miktarda mikroorganizma antijeni olduğunda test yalancı negatiflik ile sonuçlanabilmektedir.

İmmunfluoresans Antikor (IFA) Testi;

Bir antijen-antikor reaksiyonu olan bu testte, spesifik antikorlar fluorokrom bir boya (FITC, Auramine, Rhodamin, vs) ile boyanmıştır. Bir preparatta homolog antijenin bulunduğu durumlarda üzerine boyalı antikor konursa, boyalı antikorlar antijenle birleşir ve UV-ışınları ile donatılmış mikroskop altında sarı-yeşil parlak bir floresans vererek kolayca fark edilirler. Bu test iki tarzda uygulanabilir. Direkt İFA testinde, şüpheli antijeni taşıyan materyal sıvı (hücre kültürü, vs) temiz lâm üzerine yayılır ve asetonla fiks edilir. Bunun üzerine, FITC (fluorescein isothiocyanate) ile boyalı bilinen antikorlar konulur. Bir süre bekletildikten sonra yıkanır, kurutulur ve UV-ışınları altında mikroskopta incelenir. Eğer preparat üzerinde homolog antijen varsa, boyalı antikorla birleşerek mikroskop altında parıltılı olarak görülecektir (pozitif reaksiyon). Antijen yoksa veya başka bir etken varsa böyle bir birleşme olmayacak, boyalı antikor yıkanma sırasında giderileceğinden mikroskop altında parıltı görülmecektir (negatif reaksiyon).

İndirekt İFA testinde ise, temiz bir lâm üzerine bilinen antijen konarak fiks edilir. Üzerine şüpheli serum ilave edilerek bir süre bekletilir ve yıkanır. Kuruduktan sonra, lâm üzerine, FITC ile boyanmış antiglobulin (antihuman, antibovine, vs) ilave edildikten bir süre sonra yıkanır ve kurutulur. Mikroskop altında muayene edilir. Eğer, şüpheli (boyasız, birinci serum) serumda lâmdaki antijene karşı homolog antikor varsa, antijenle birleşir ve preparat üzerinde kalır.

Yıkanınca gitmez. Bunun üzerine boyalı antikor konduğunda, bu ikinci antikor kompleksle birleşerek mikroskop altında sarı yeşil bir parlaklık gösterir (pozitif reaksiyon). Eğer, şüpheli serum da (ilk serum) antikor yoksa (veya serum başka bir etkene ait ise), lâm üzerinde birleşme olmaz ve boyalı antikorda bağlanamayacağından, mikroskop altında floresans gözlenemez (negatif reaksiyon).

Radioimmunassay (RIA):

Antikor veya antijen aramada yararlanılan bu test de, ELISA'nın bir benzeridir. Ancak, bu testte, immunglobulinler (antihuman, antibovine, vs) radyoaktif maddelerle (radioisotoplar ^{14}C , ^{125}I , vs) konjuge edilmiştir. Pozitif reaksiyonlar da, antijenle antikor birleştiğinde meydana gelen immun kompleks bir radyoaktivite kazanır. Bu da özel sayıcılarla (gama sayıcısı detektör gibi) saptanır. Belirlenen radyo aktivitenin derecesi ölçülür. Negatif olgularda, bir radyoaktivite tespit edilemez. Kompetatif RIA'da ise saptanan maddelerin miktarı da belirlenebilir.

Enzyme-linked immunoassay, (ELISA):

Antijen antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için enzim kullanılan tüm tanı yöntemlerine genel olarak enzim immuno test (enzyme immunoassay, EIA, ELISA) denmektedir. Antijene karşı antikor yada antikora karşı antijen aramak mümkündür. Virüs ve parazit enfeksiyonlarında kullanılan bir tanı yöntemidir; immobilize edilmiş antijen kullanılarak kompetitif olmayan indirek boyama yöntemi kullanılmaktadır. ELISA yönteminde kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olması ve atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması nedeniyle hızlı bir şekilde RIA (Radioimmunoassay) yöntemine göre çokça tercih edilmeye başlanmıştır. ELISA yönteminin en önemli avantajlarından biri de tanı laboratuvarlarında az zamanda çok sayıda örnekle çalışma imkanı sağlamasıdır (Falci et al, 2016). Viral hepatit A, B, C, D, E tanısında hem antikor hem de antijenleri saptamada ayrıca HIV enfeksiyonunun tanısında kullanılmaktadır.

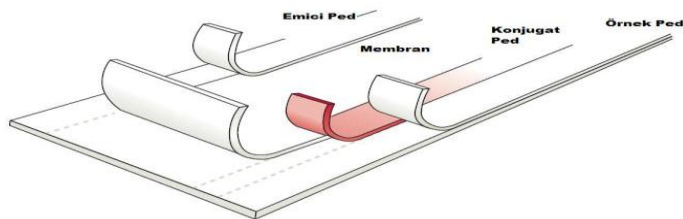
Moleküler temelli yöntemler;

Bu yöntemle vücut sıvılarından etken mikroorganizmaların nükleik asitleri saptanabilmektedir. Bu yöntemlerin hızlı, duyarlı olmalarının yanı sıra bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar; pahalı yöntemler olması, ileri teknolojiye, deneyimli personele gereksinim duyulması olarak sıralanabilir. Ayrıca bu testler ile sonuçların negatif bulunduğu durumlarda bunun yalancı negatiflik olabileceği göz önünde bulundurulmalı ve kültür sonucu ile kesin yargıya varılmalıdır.

2.2. İmmünokromatografik Hızlı Tanı Kiti

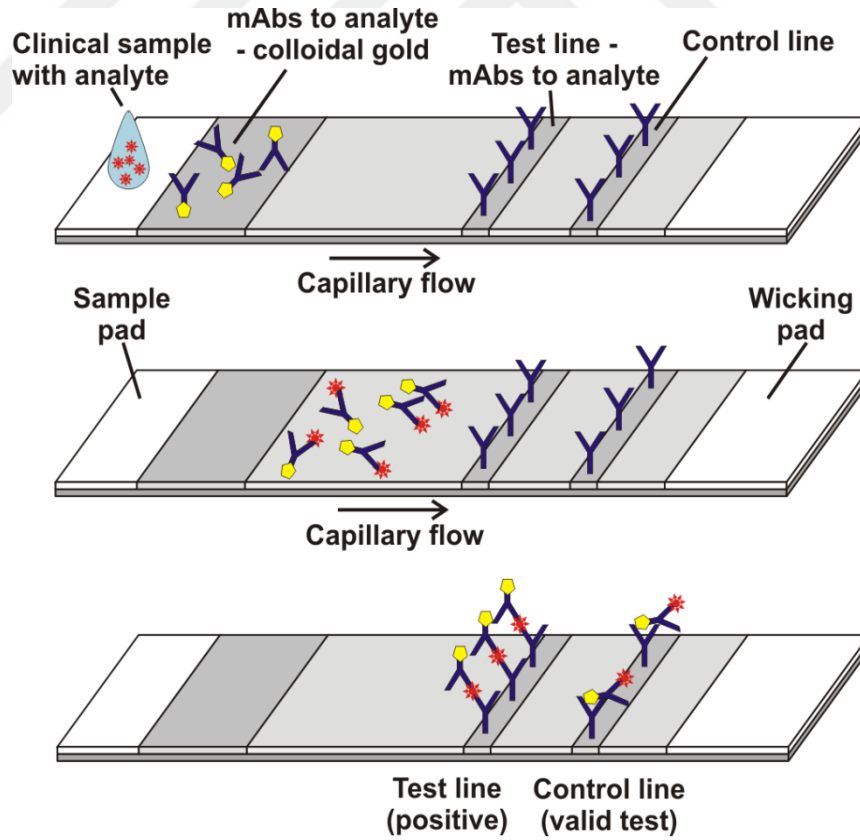
Hızlı tanı testleri, çok sayıda hastalığın teşhisine yardımcı tek adımlı, hızlı, “double sandwich veya capture ” prensipleriyle çalışan immünokromatografik testlerdir. Tek kullanımlık olmaları, uygulama kolaylıkları, düşük maliyetleri, uzun raf ömürleri, yüksek duyarlık ve seçiciliğe sahip olmaları ve kısa sürede sonuç vermeleri gibi özelliklerinden dolayı klinik tanıda en geniş alanı oluşturmaktadır. Bu durum hastanelerde hastaların kısa zamanda daha etkin tedaviye yönlendirilmesi açısından çok önemlidir. Aynı belirtce arandığı bir ELISA uygun laboratuvarlarda 2-3 saat aralığında sonuç verirken geliştirilecek test pahalı bir ekipman gerektirmeden tek adımda (sadece serum/plazma/tam kan kullanımı ile) sonuç verebilmektedir.

Tanı kiti temel olarak aşağıdaki gibi sırtlık üzerine lamine edilmiş numunenin damlatıldığı ve selüloz yapılı “örnek uygulama pedi”, renkli nanoparçacıkların ve antikorlar/antijenlerin bulunduğu, reaksiyonların gerçekleştiği fiber glass yapılı “konjugat ped”, kapiller akımın gerçekleştiği, test çizgisi ve kontrol çizgisinin bulunduğu ve sonucun izlendiği “nitroselüloz membran”, artan numunenin biriktiği selüloz yapılı “emici ped” olmak üzere 4 komponentten oluşmaktadır. Tanı testleri genellikle eni 4-6 mm, boyu 6-7 cm, kalınlığı ise 1-2 mm ölçülerinde şerit şeklinde üretilirler. Hızlı tanı testlerin üstü plastik kaset kapak ile kapalıdır ve sadece numune uygulama alanı ile gözlem penceresi alanı açıktır. Bu nedenle sadece bu alanlar gözle görülebilir.



Şekil 2.1. Hızlı tanı testi bileşenleri

Numune uygulama alanının hemen altında örnek uygulama pedi bulunmaktadır ve damlatılan numune öncelikle bu pedde birikir. Numune, bu pedin sıvı tutma kapasitesinden fazla damlatıldığından sıvı bu pede temas eden konjugasyon pedine doğru ilerler. Konjugasyon pedinin üzeri kapalıdır ve renkli nanoparçacıklar bu pedde bulunur. Konjugasyon pedine gelen sıvı numune buradaki antijen/antikor konjuge nanopartiküllerle reaksiyona girer, bu peddeki molekülleri de sürükleyerek buna temas eden nitroselüloz membrana doğru ilerler. Nitroselüloz membranının ilk kısmı örtülüdür, ancak daha sonraki test ve kontrol çizgisini içeren bölümünün üzeri açıktır; test sonucu buradan gözlemlenir. Nitroselüloz membrana gelen sıvı, içindeki molekülleri de sürükleyerek membran üzerinde kapiller akım kuvvetine göre membranın sonuna doğru ilerler. Bu sırada test çizgisi ve kontrol çizgisinde ilgili reaksiyonlar gerçekleşir ve buna göre test sonucunu belirten renkli çizgiler oluşur. Sıvı daha da ilerleyerek membranın sonuna temas eden emici pedte birikir, bu alanın da üzeri kapalıdır. Tüm bu reaksiyon yaklaşık olarak birkaç dakika içinde gerçekleşir ve sonuç en fazla 5 dakika içinde okunabilir (Zhang et al., 2009).



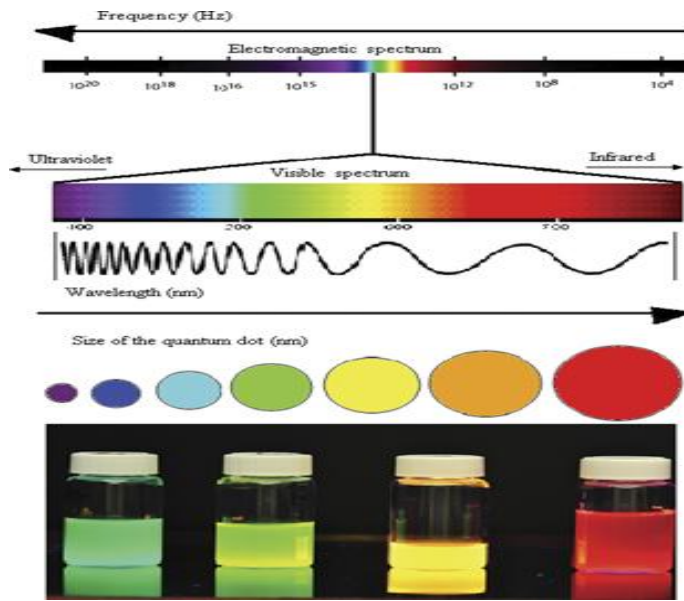
Şekil 2.2. İmmünokromatografik hızlı tanı testlerinin çalışma prensibi

Hızlı tanı testleri, gözlem penceresindeki kontrol ve test çizgilerinde gözle görülebilen renkli çizgi bulunup bulunmamasına göre sonuç verirler. Normalde test yapılmadan önce bu alanda gözle görülebilen herhangi bir çizgi bulunmaz. Bu testlerde esas reaksiyon antijen-antikor kompleksinin oluşmasına bağlıdır. Genel olarak, antijen veya antikordan birisi tanı testin zemininde bulunan nitroselüloz membrana sabitlenir, diğerinin ise konjugasyon pedinde hareketli kalması sağlanır. Bu hareket esnasında kompleks oluşur ve bu kompleksin varlığına veya yokluğuna göre sonuç yorumlanır (Costa et al., 2014) (Zhang et al., 2009). Hızlı tanı testlerinde, test çizgisi alanında nitroselüloz zemine sabitlenen molekülere göre, sandviç model ve yarışmalı model olmak üzere 2 farklı çalışma prensibi bulunmaktadır. Sandviç model ilk üretilen testlerde kullanıldığı için buna ayrıca standart model veya konvansiyonel model de denir. Kontrol çizgisinin çalışma prensibi her iki modelde de aynıdır ve testin geçerliliğini kontrol etmeyi sağlar

2.3. Kuantum Noktalar

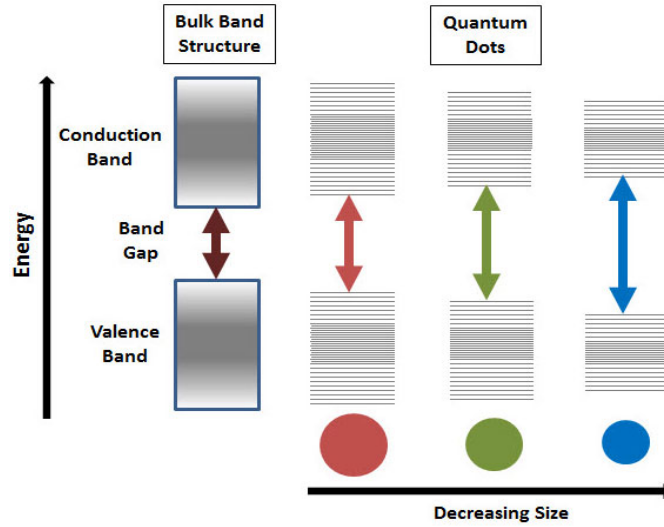
2.3.1. Kuantum Noktaların Genel Özellikleri

Kuantum noktalar, 2 ile 20 nm arasında çapa sahip, yarı-iletken nanokristallerdir. Genelde periyodik tablodaki grup II ve VI elementlerinden (ör: CdSe ve CdTe) ya da grup III ve V (ör: InP ve InAs) elementlerinden oluşurlar. Günümüzde optik ve elektriksel özelliklerinden kaynaklı en çok üretilen kuantum noktalar, CdSe, InAs, CdS, GaN, InGeAS, CdTe, PbS, PbSe, ZnS dir. UV ışık ile uyarıldıklarında boyutlarına bağlı olarak farklı renklerde ışıma yaparlar(Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Çeşitli boyutlardaki kuantum noktalar (www.aestheticsandculture.net)

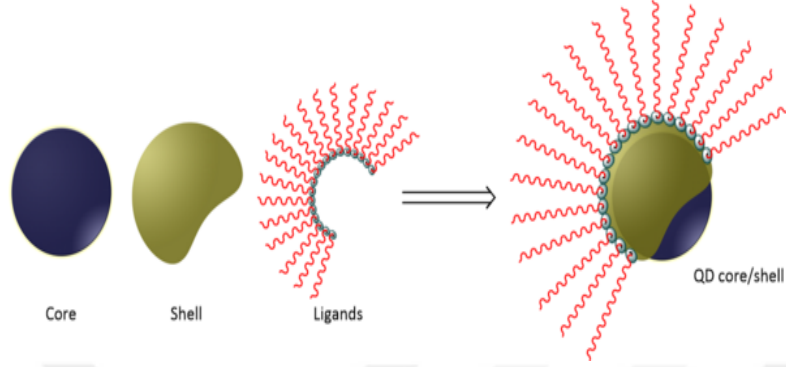
Kuantum noktaların boyutları büyüdükçe floresans ışınımı kırmızı bölgeye kaymaktadır. Bu kayma değerlik bandı ile iletkenlik bandı arasında kalan ve bant boşluğu olarak adlandırılan aralığın daralması nedeni ile olmaktadır. Bu daralmanın nedeni parçacığın büyümesi ile daha fazla enerji bandının iç içe girmesidir. Ancak bu daralma belli bir parçacık büyüklüğüne kadar devam eder ve sonrasında parçacık büyüklüğüne bağlı olarak değişmez. Bu noktadan sonra enerji bantları artık tamamen iç içe girdiğinden bu noktadan sonra optik özellikte bir değişme olmaz. Bu olaya Kuantum Sınırlaması denir (Quantum Dot Corp, 2003). Bulk bir malzemede sınırlandırma yoktur ancak kuantum noktada üç boyutta sınırlandırma söz konusudur. Kuantum noktada üç boyutta da sıkışan elektron enerjisini üst seviyelere çıkararak harcamadığı için kinetik enerjisi artmaya başlar ki bundan dolayı dalga boyunu kısaltır. Bunun sonucunda elektronun yaptığı ışımının rengi değişir ve bununla birlikte daha yüksek enerjiye sahip olduğu için yaptığı ışımaya da daha şiddetli (daha parlak) olur. Yani biz malzemenin boyutunu exciton Bohr yarıçapının altına indirdiğimizde sıra dışı bir kuantum özelliği olan malzemenin renginin değişmesi özelliği ortaya çıkar.



Şekil 2.4. Kuantum noktaların bant boşluğu mesafesi

Kuantum noktalarda çekirdek/kabuk yapısı oluşturulabilir. Burada optik özellikler çekirdekte bulunan kristalinkinden kaynaklanmakta kabuk kısmındaki kristal ise hem çekirdeğin yüzeyindeki atom boşluklarını doldurarak optik özellikleri geliştirmekte hem de koruyucu görev yapmaktadır. Öte yandan bu tip parçacıkların yüzeyi çevresel etmenler nedeni ile kolaylıkla bozulabildiğinden dış yüzeyleri bir yüzey aktif malzeme ile kaplanır. Malzemeler kristal yüzeyini dış etkenlere karşı koruduğu gibi doğal yapılarına göre parçacıkların su veya organik

solventlerde çözünmesini de sağlar. Günümüzde kuantum noktalar çekirdek-kabuk-yüzey aktif madde şeklinde sentezlenmektedir. Böylece daha dayanıklı nanokristaller elde edilebilmekte bunun yanında yüzeylere istenilen işlevsel gruplar takılabilmektedir.



Şekil 2.5. Çekirdek/kabuk-yüzey aktif madde Kuantum noktalar

Protein, peptid, DNA, antijen/antikor vb. biyomoleküllerle konjuge edildiklerinde kuantum nokta biyokompozitlerin, *in vivo* görüntülemeye tanınma, halk sağlığı ile ilgili çevresel denetim ve güvenliğe kadar pek çok farklı alanda uygulamaları vardır. Kuantum nanokristallerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanılması ise nanoteknolojideki hızlı gelişmelere paralel olarak ilerlemiştir. Kuantum nanokristallerin ve yarı iletken nanokristallerin tıp ve biyoloji alanında kullanılmasıyla biyogörüntüleme, hastalıkların teşhis ve takibinde önemli bir adım atılmıştır.

Kuantum nokta kullanılarak tasarlanan immokromatografik tanı testleri koloidal altın temelli tanı testleri ile karşılaştırıldığında daha sensitive ve duyarlı olduğu görülmüştür.

2.3.2. Kuantum Noktaların Sentez Yöntemleri

Araştırmacılar son zamanlarda yarı iletken QDot'ları sentezlemek için çeşitli yöntemler üzerinde çalışmışlardır. QDot'lar, yüksek sıcaklığa sahip organometalik yollar, yüksek sıcaklıklı yeşil sentez (Jang et al., 2003) tek kaynaklı öncüller, misel yöntemleri, katalitik büyüme, iki fazlı yaklaşım, Solvo (hidro) termal yöntem ve tek kaplı yaklaşım, vs. (Donega 2011) (Khatei et al., 2011) (Lee et al., 2006) (Lesnyak et al., 2009) (Murray et al., 1993) (Kortan et al., 1990) (Murray et al., 1994) gibi farklı yöntemlerle sentezlenebilirler. Uygun sentez yöntemini seçmek, istenilen optik ve kompozisyon özelliklerine sahip QDot'ları elde etmek için önemlidir.

Sentez, bir kristal yapının büyümesi olarak düşünülebilir, sentez sırasında sıcaklığı kontrol etmek çok önemlidir. Ortalama boyut ve boyut dağılımı, büyüme sıcaklığına bağlıdır. Monodispers büyüme, yüksek optik özelliklere sahip QDot'ların oluşturulması için çok önemlidir. Ortamın sıcaklığını ve basıncını kontrol ederek, monodispers QDot'ları sentezlemek son derece zordur, çünkü QDot'lar anında birikebilir ve böylece yığınsal kristal yapılar oluşur. Bununla birlikte, organik yüzey aktif maddeler, tek dağılımlı QDot'ların sentezine yardımcı olabilir. Aglomerasyonu önlemek ve monodispers yarı iletken nanokristalleri tutmak için yüzey aktif maddeler kullanılır. Ayrıca, yüzey aktif maddeler suda çözünürlük, kimyasal reaksiyon gibi spesifik amaçları karşılamakta yardımcı olurlar. Ayrıca yüksek sıcaklıktaki organometalik yolda çözücü olarak kullanılabilirler. En sık kullanılan yüzey aktif ajanlar trioctilfosfin oksit (TOPO) (Pan et al., 2004), oleik asit (Bullen et al., 2004), 3-Mercaptopropionik asit (MPA) ve Tiyoglikolik asit (TGA) (Gu et al., 2008).

Solvo/hidro-termal sentez sırasında, reaksiyon şişesi olarak paslanmaz çelik otoklav kullanılır. Jiang ve Zhu tarafından CoTe, Ag₂Te / Ag ve CdTe olan metal tellürleri sentezlemek ve Wang ve diğerleri tarafından CdTe, CdSe NC'leri kontrollü bir şekil ve boyutta sentezlemek için basit ve genel tek adımlı yüzey aktif madde yardımlı solvotermal sentez yöntemi geliştirildi. (Jiang et al., 2010) (Wang et al., 2006).

Tek kaplı sulu sentez, organometalik sentez yollarının alternatif bir yoludur. Bu yöntem en az kullanılan yöntemdir, çünkü daha az toksiktir ve daha ucuzdur. Reaksiyon, sulu ortamda meydana gelebilir ve amin, merkaptto grupları gibi farklı gruplar kapak ajan olarak kullanılabilir. Birçok suda dağılabilen yarı iletken NC türü, yöntem vasıtasıyla sentezlenmiştir (Lesnyak et al., 2009).

İki fazlı yaklaşım, düşük toksisitesi, kolay uygulanabilirliği ve daha düşük sıcaklık gereksinimi nedeniyle daha fazla tercih edilen yöntemdir. Yöntem, önce bir akantiyol çözeltisinin varlığında (Brust et al., 1994) AuCl₄'ün sodyum borohidrit ile indirgenmesiyle tiyol kapaklı altın NC'lerin oluştuğu 1 - 3 nm altın NC'leri sentezlemek için kullanılmıştır. Bazı soylu NC'ler bu yöntemle başarıyla sentezlenmiştir. Pan ve ark. Toluen-su arayüzünde yüksek parlaklıklı, tek dağılımlı CdS NC'leri sentezleyen ilk gruptu (Pan et al., 2004).

2.4. Sentezlenen Kuantum Noktaların Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

2.4.1. UV-Vis Absorpsiyon Spektroskopisi

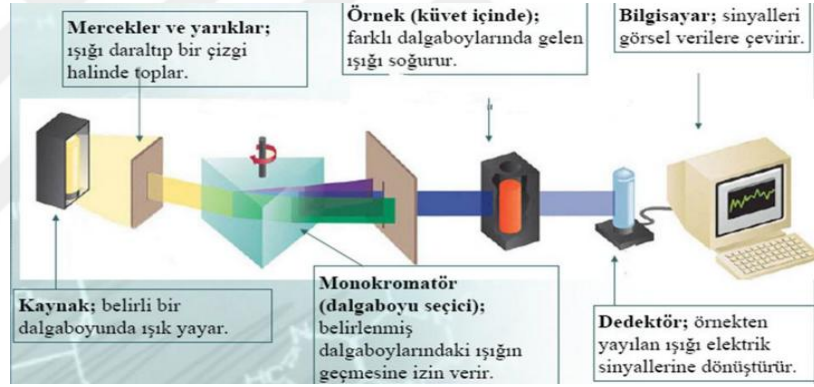
Spektroskopi, bir örnekteki atom, molekül veya iyonların, bir enerji düzeyinden diğerine geçişleri sırasında absorplanan veya yayılan elektromanyetik ışımının ölçülmesi ve yorumlanmasıdır.

Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) absorpsiyon spektroskopisi bir ışın demetinin bir örnekten geçtikten veya bir örnek yüzeyinden yansıtıldıktan sonraki azalmasının ölçülmesidir. Işığın şiddetinin azalması absorplamanın arttığını gösterir. Örneğin derişimi, belirli bir dalga boyundaki absorpsiyonunu ölçerek bulunur. UV-Vis spektroskopisi genellikle çözeltideki moleküller veya inorganik iyon ve komplekslerin ölçümünde kullanılır. Birçok molekül UV veya Vis dalgaboylarını absorplar ve farklı moleküller farklı dalga boylarını absorplarlar. Bir absorpsiyon spektrumu molekülün yapısını gösteren birçok absorplama bantlarından oluşmaktadır. <http://merlab.metu.edu.tr/uv-vis-spektrofotometresi>

Bir spektrofotometre düzeneği, başlıca ışık kaynağı, dalga boyu seçicisi (monokromatör), dedektörden oluşur; dedektörde elektrik sinyaline çevrilen optik sinyal bir kaydedici veya bir galvanometre ile ölçülür. Ana bileşenlere ek olarak spektrofotometrede ışığı toplamak, odaklamak, yansıtmak, iki demete bölmek, ve örnek üzerine belli bir şiddette göndermek amacıyla mercekler, aynalar, ışık bölücüler, giriş ve çıkış aralıkları vardır. Örnek, kullanılan dalga boyu bölgesinde ışığı geçiren maddeden yapılmış örnek kaplarına (küvet) konularak ışık yoluna yerleştirilir. UV-görünür bölgede D₂, W, H₂, Xe, civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Dalga boyu seçicileri (monokromatörler), ışık kaynağından gelen polikromatik ışıktan tek bir dalga boyunda monokromatik ışık elde edilmesini gerçekleştiren düzeneklerdir. Dedektör, maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan düzendir. UV-görünür bölgede kullanılabilen Fotovoltaik dedektörler, Fototüp, Fotoçoğaltıcı tüp olmak üzere üç tür dedektör vardır. Tek ışık yollu spektrofotometrelerde, bileşenlerin tümü aynı ışık yoluna yerleştirilmiştir. Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, monokromatörden çıkan ışık, eşit şiddette iki demete bölünerek biri örneğe diğeri sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilir. İkiye ayrılan ışık, iki ayrı dedektörle algılanır ve dedektörlerde oluşan sinyallerin oranı ölçülür. Böylece

örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olur. Burada iki dedektörün tam uyumlu olması, yani eşit şiddetteki ışık ile aynı sinyali oluşturması gerekir. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/45-uzm-02.pdf>

Spektrofotometre ile bir maddenin nicel analizinin yapılacağı dalga boyunu kararlaştırmak için, örneğin absorpsiyon spektrumunu bilmek gerekir. Bunun için, maddenin 1 molar çözeltisinin çeşitli dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülür. Çözücünün ve çözeltide bulunan başka türlerin ışığı absorplamadığı, Lambert Beer eşitliğine uyulduğu ve nicel analiz en duyarlı bir biçimde yapılabileceği dalga boyu değeri saptandıktan sonra analizi yapılacak maddeyi içeren ve derişimleri bilinen bir dizi standart çözelti ile bu dalga boyundaki absorbans (A) değerleri ölçülür. A değerleri, standart çözeltilerin bilinen derişimlerine karşı grafiğe geçirilir. Buna kalibrasyon doğrusu adı verilir. Derişimi bilinmeyen örneğin A değeri ölçülür ve kalibrasyon doğrusunda bu değere karşılık gelen derişim saptanır. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/45-uzm-02.pdf>



Şekil 2.6. UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi bileşenleri

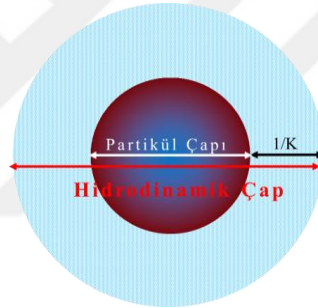
2.4.2. Floresans Spektroskopisi

Uyarılmış bir atom veya molekül kararsızdır; fazla enerjisini atarak temel hale dönmek ister. Atom veya molekül temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışık şeklinde atabilir ve böylece sistemden bir ışık yayılması (ışık emisyonu) gözlenir. Bu ışık yayılması olayına genel olarak lüminesans denir. Uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa floresans denir. Florometre denilen cihazlarla madde konsantrasyonu, floresans ışımının ölçümü ile tayin edilir. <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/45-uzm-02.pdf>

Metal iyonlarının analizi, bunların oluşturdukları bazı floresant kompleksleri yardımıyla yapılabilir. Bazı biyokimyasal bileşiklerin florometrik tayini, bunların bir floresant madde ile tepkimeye sokulup yeni bir floresant ürün veya etiketlenmiş ürün oluşturularak yapılır.

2.4.3. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Tekniği ile Parçacık Boyut Ölçümü

Sıvı veya gaz ortamda asılı bir şekilde bulunan herhangi bir parçacığa hareketli sıvı veya gaz atomlarının parçacığa çarpması sonucu parçacık, Brownian hareketi olarak tanımlanan rastgele hareketlere sahip olmaktadır. Parçacık; bulunduğu çözücü molekülleri içerisinde rastgele hareket ederken iyonik güç etkisiyle çözücü moleküller ile arasında bir elektriksel çift tabaka oluşmaktadır. Oluşan elektriksel çift tabaka ile parçacığın hidrodinamik çapı meydana çıkmaktadır (Harada et al., 1998).



Şekil 2.7. Herhangi bir çözücü ortam içerisinde parçacığın sahip olduğu hidrodinamik çap değeri.

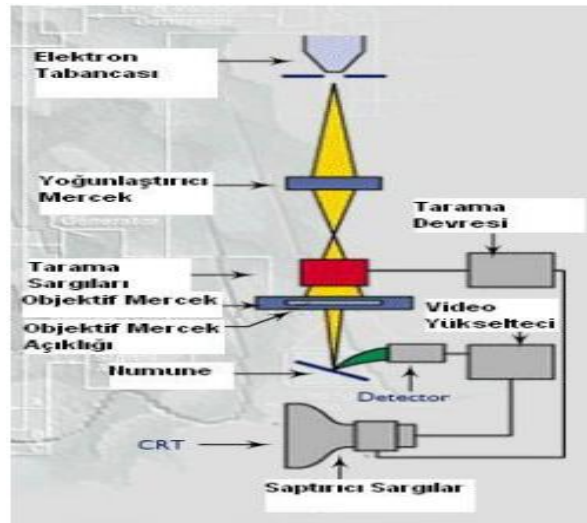
Şekil 1.6 'da verilen hidrodinamik çap; parçacığın bulunduğu çözücü ortamında oluşan elektriksel çift tabakanın kalınlığının ($1/K$) parçacığının çapına eklenmiş halidir. Parçacık etrafındaki elektriksel çift tabaka ile hareket etmektedir. Zeta boyutu ise Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering; DLS) tekniği kullanılarak yapılan parçacık boyutu ölçümü sonrasında parçacığın çözücü ortam içerisindeki boyutunu ifade etmektedir. DLS tekniği ile yapılan ölçümlerde parçacıklara laser ışığı gönderilerek oluşan titreşimlerin dedeksiyonu sonucunda difüzyon katsayısı olarak tanımlanan Brownian hareketinin hızı ölçülerek ilgili denklemler aracılığıyla hidrodinamik çap tespit edilmektedir. İyonik şiddeti güçlü olan ortamlarda hidrodinamik çap küçülerek parçacık daha hızlı hareket etmektedir. Sıcaklık ve viskozite brownian hareketi için önemli parametrelerdir. Brownian hareketi parçacık boyutu arttıkça yavaşlarken sıcaklık yükseldikçe hızlanmaktadır (Harada et al., 1998) (Arzen et al., 2010).

DLS tekniği ile ölçülen boyut bir parçacığın bir sıvı içerisindeki hareketini temsil ettiğinden önemli bir analizdir. Sentezlenen parçacıkların uygulanan ortamlardaki davranışı hakkında bilgi alınması amacıyla literatürde geniş kullanım alanı bulmuştur (Andrieux et al., 2009) (Jena et al., 2011) (Murdock et al., 2008) (Nobbmann et al., 2007) (Pereira et al., 2008) (Yang et al., 2011).

2.4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını (EDX) Dedektörü

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı Elektron Mikroskobu veya SEM (Scanning Electron Microscope), çok küçük bir alana odaklanan yüksek enerjili elektronlarla yüzeyin taranması prensibiyle çalışır. Cihaz; optik kolon, numune haznesi ve görüntüleme sistemi olmak üzere üç temel kısımdan oluşur. Optik kolon kısmında; elektron demetinin kaynağı olan elektron tabancası, elektronları numuneye doğru hızlandırmak için yüksek gerilimin uygulandığı anot plakası, ince elektron demeti elde etmek için yoğunlaştırıcı mercekler, demeti numune üzerinde odaklamak için objektif merceği, bu merceğe bağlı çeşitli çapta apatürler ve elektron demetinin numune yüzeyini taraması için tarama bobinleri yer almaktadır. Mercek sistemleri elektromanyetik alan ile elektron demetini inceltmekte veya numune üzerine odaklamaktadır. Görüntü sisteminde, elektron demeti ile numune girişimi sonucunda oluşan çeşitli elektron ve ışınları toplayan dedektörler, bunların sinyal çoğaltıcıları ve numune yüzeyinde elektron demetini görüntü ekranıyla senkronize tarayan manyetik bobinler bulunmaktadır.



Şekil 2.8. Taramalı elektron mikroskobunun şematik görünüşü

SEM yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanmaktadır. Görüntü ise bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılar tarafından toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilmektedir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilerek bilgisayara aktarılmaktadır (Heckman et al., 1993) (Brundle et al., 1992).

Gerek ayırım gücü, gerek odak derinliği, gerekse görüntü ve analiz birleştirme özellikleri SEM'in kullanım alanlarını genişletmiştir. 1965 yılında ilk kez ticari olarak kullanılmaya başlanan SEM, teknik ilerlemelere paralel olarak birçok dalda araştırma-geliştirme çalışmalarında, mikro elektronikte, sanayinin değişik kollarında, biyoloji bilimlerinde, tıp ve kriminal uygulamalarda yerini almıştır. SEM görüntülerinden numunenin topografi, morfoloji, şekil, boyut, bileşim ve kristalografik bilgileri elde edilebilmektedir (Zhou et al., 2006).

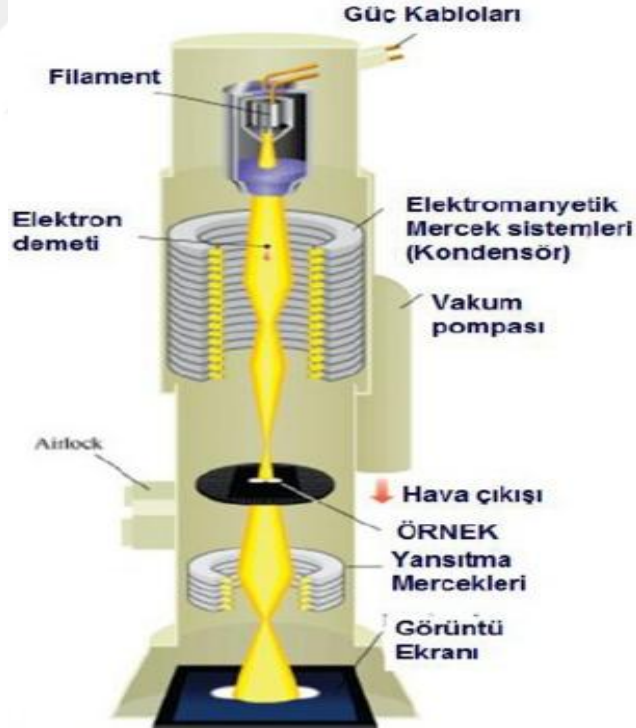
Enerji yayımlı X-Işını Analizi (EDX)

Örneğin yüzeyine yüksek enerjili elektronlar çarptığında bu çarpışmalardan dolayı, örnek yüzeyinde bazı elektronlar kopar. Eğer bu elektronlar içteki orbitallerden koparılmışlarsa atomlar kararlılıklarını kaybederler. Tekrar kararlı hale gelebilmek için dış orbitallerdeki elektronlar iç orbitallerdeki boşlukları doldururlar. Dış orbitallerdeki elektronların enerjileri iç orbitallerdeki elektronların enerjilerinden daha yüksek olduğu için, dış orbital elektronların iç orbitalleri doldururken belli bir miktar enerji kaybetmek zorundadır. Bu kaybedilen enerji X ışını şeklinde ortaya çıkar. Ortaya çıkan X ışınlarının enerjisi ve dalgaboyu sadece atomla ilgili olmayıp o atomun alışverişinde bulunan orbitalleri ile ilgili karakteristik bir özelliktir. Örnekten çıkan X ışınları yarıiletken dedektör tarafından algılanır. İletkenlik bandına geçen elektronlar, elektrik sinyaline dönüştürülür.

EDX dedektörü ile de yapıların elementel içeriği nicel ve nitel olarak bulunabilmekte ve haritalandırma ile resim üzerinde elementlerin dağılımı izlenebilmektedir. (<http://mam.iyte.edu.tr/sem/>)

2.4.5. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

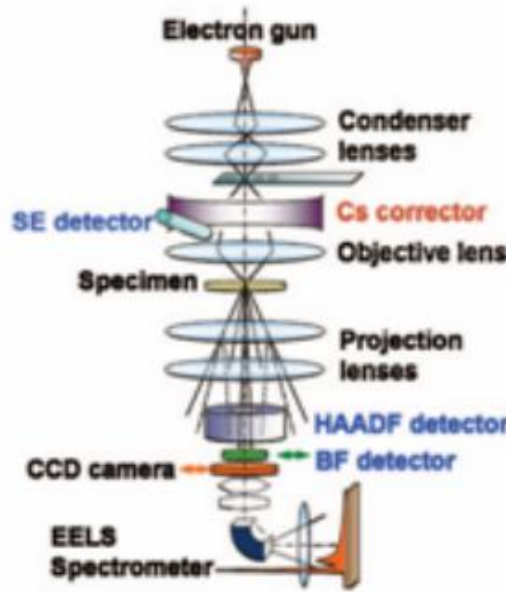
TEM, incelenecek numuneden elektronların geçirilmesi yoluyla görüntüsünün alınmasına dayalı bir elektron mikroskobudur. Çalışma sistemi olarak optik mikroskoba benzer, tek fark ışık ışını yerine elektron ışını kullanılmasıdır. TEM’de elektron demeti kondensör lens sistemi kullanılarak numune üzerine odaklanır. Oluşan görüntü objektif lens yardımıyla belli bir noktaya odaklanır (kesişim noktası). Daha sonra bu görüntü bir floresan ekran üzerine düşürülür ve objektif lensler yardımıyla görüntünün boyutu değiştirilebilir. Elektromanyetik lenslere uygulanan akımın değiştirilmesi, görüntünün büyütülüp küçültülmesini sağlayan bu lenslerin odak uzaklığını değiştirir. SEM’de görüntü örnekten yansıyan elektronlarla oluşturulurken TEM’de görüntü örnekten geçen elektronlarla oluşturulur. (http://www.academia.edu/1747599/Taramal%C4%B1_Elektron_mikroskobu_ve_Ge%C3%A7irimli_Elektron_Mikroskobu)



Şekil 2.9. Geçirimli elektron mikroskobunun şematik görünüşü (<http://www.academia.edu>)

2.4.6. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM)

Hem analiz hem görüntüleme yapabilen elektron mikroskobudur. Odaklanmış elektron demeti ile taranır ve topografik görüntü alınır. Gelen elektronlar numune yüzeyinden geçer ya da geri yansır. Gelen elektronların numune yüzeyinden geçen kısmı BF ve DF görüntülemeleri ile analiz edilir. Gelen elektronların geri yansıyan kısmı ise dedektörlerle toplanarak görüntü oluşturulur. SEM ve TEM 'e kıyasla daha yüksek çözünürlüğe sahiptir. elde edilen görüntüler daha kolay yorumlanır. EDX kullanılarak daha küçük alanlardada analiz yapılabilir.

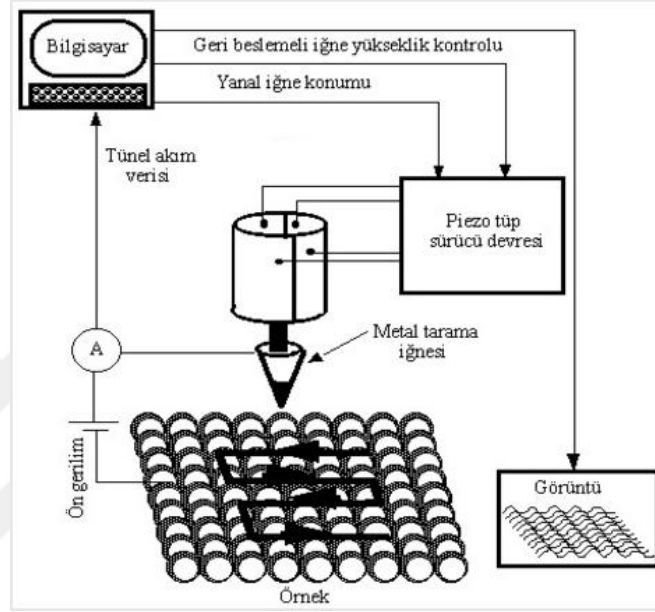


Şekil 2.10. Taramalı Geçirimli elektron mikroskobunun şematik görünüşü

2.4.7. Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscopy - AFM)

Atomik boyutlara kadar sivriltilmiş bir iğne ucu yardımıyla, sıvı ya da katı örneklerin yüzey topografisini nanometre (nm) seviyesinde görüntüleyebilen ve moleküller arası kuvvetleri (nN, pN) ölçebilen taramalı kuvvet mikroskobudur. Görüntüleme, iğne ucunun yüzey ile etkileşiminin incelenmesi sonucunda gerçekleştirilir. Örnek ile iğne arasındaki kuvvet etkileşimi sonucu kaldırma mekanizması nm ölçeğinde hareket eder. Atomik kuvvet mikroskobu üç farklı teknik ile kullanabilmektedir. Bunlar; iğnenin yüzeye temas ettirilerek

uygulandığı temas yöntemi, iğnenin yüzeye temas etmediği temassız yöntem ve iğnenin yüzeye vurularak uygulandığı vurma yöntemidir. Bu hareketten faydalanılarak bilgisayar ortamına aktarılan veriler, yazılım aracılığıyla derlenerek ya örneğin görüntüsü elde edilir ya da iğne ve örnek arası etkileşimler ölçülür. Değişik amaçlar için farklı iğne uçları kullanılır. Örnek yüzeylerinin görüntülenmesi yanı sıra faz, elektrik iletkenlik ve manyetik farklılıklar da saptanabilmektedir.

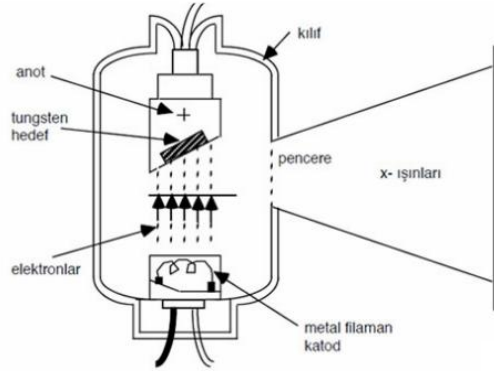


Şekil 2.11. AFM çalışma prensibi ve bileşenleri

2.4.8. X-Işınları Difraksiyonu (Kırınımı) (XRD)

Bir malzemenin atomik yapısını görüntülemek, yüksek çözünürlüğe sahip çeşitli elektron mikroskopları kullanılarak mümkündür. Fakat bilinmeyen yapıları belirtmek veya yapısal parametreleri tayin etmek için kırınım tekniklerini kullanmak gerekir. Katıların kristal yapılarını incelemek için en çok kullanılan kırınım tekniği X-ışını kırınımıdır. Bu tekniğin ince film analizi için uygun olması, temelde iki nedenden dolayıdır; 1. X-ışınlarının dalga boyları, yoğunlaştırılmış maddedeki (condensed matter) atomik mesafeler ölçüsündedir ve bu özellik, yapısal araştırmalarda kullanılmalarını sağlar. 2. X-ışını saçılım teknikleri, yıkıcı değildir ve incelenen numuneyi değiştirmez. Katı malzemelerin incelenmesinde kullanılan X-ışınlarının dalga boyları, atomlar arası mesafelerle kıyaslanabilir büyüklükte olup yaklaşık olarak 0.5 Å ile 2.5 Å arasında değişir.

X-ışınları difraksiyonu (XRD) malzeme yapısında mevcut kristal fazların belirlenmesinde, bu fazların yapısal özelliklerinin (deformasyon, iç gerilmeler, tercihli yönelme, kristal tane boyutu, hata yapısı) ölçülmesinde kullanılan güçlü bir yöntemdir. XRD ince filmlerin ve çok katmanlı yapıların kalınlıklarının belirlenmesinde ve amorf malzemelerin (polimer dahil) atomsal düzlemlerinin belirlenmesinde de kullanılır. XRD atomsal mesafelerin ölçümünde yüksek hassasiyet sağlar ve ince filmlerdeki deformasyon ölçümleri için kullanılan ana yöntemdir.



Şekil 2.12. XRD çalışma prensibi ve bileşenleri

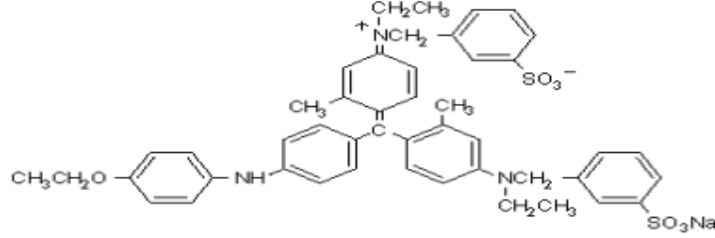
2.5. Konjugasyonun Kalite Kontrolünde Kullanılan Yöntemler

2.5.1. Bradford (Coomassie Blue) Yöntemi ile Protein Miktarının Tayini

Oldukça duyarlı olan bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm’de absorbansının ölçülmesi esasına dayanır.

Bu boya negatif yüklüdür ve pozitif yüklü proteinlerle kompleks yaparak kırmızı renkten ($A_{\max}=465$) mavi renge ($A_{\max}=595$) dönüşür. Yöntemde temel alınan olgu, boya normal şartlarda 465 nm’de maksimum absorbans verirken, protein ile bağlandığı zaman 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermesidir. Bradford yöntemi Protein boya bağlanma prensibini kullanarak mikrogram (5-100 $\mu\text{g/ml}$) miktarlarda protein tayini için hızlı duyarlı bir yöntemdir.

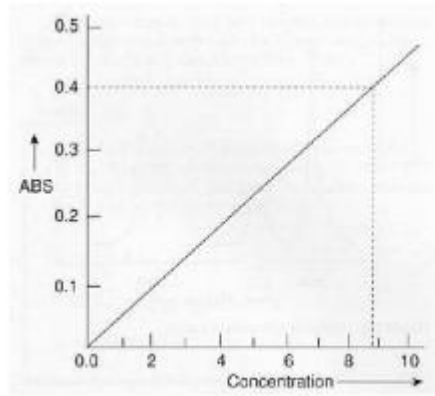
Bradford reaktifi: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, %95'lik 50 ml etanolde çözülür, üzerine 55 ml %88'lik fosforik asit ilave edilerek distile su ile 1 lt ye tamamlanıp filtre edilir.



Chemical Structure of Coomassie Brilliant Blue G-250

Şekil 2.13. Coomassie Brilliant Blue G-250 kimyasal yapısı

Protein miktar tayini denemelerinde çoğu zaman protein karışımlarının veya ektinksiyon katsayısı bilinmeyen proteinlerin miktarları tayin edilmek istenir. Bu durumunda miktarı bilinen saf bir protein “standart” olarak kullanılmak suretiyle bir standart eğri oluşturulur. Standart eğri oluşturmak için miktarı bilinen standart proteinin çeşitli konsantrasyonlarda absorbanısı ölçülür ve miktarı bilinmeyen protein örneğinin absorbanısı standart proteinin absorbanısı ile karşılaştırılır.



Şekil 2.14. Protein tayini standart grafiği

2.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez, bir çözeltilde çözülmüş haldeki yüklü taneciklerin, elektrik alanı etkisiyle ayrılması temeline dayanır. Makromolekülleri (örn. nükleik asitler, amino asitler, peptidler ve proteinler) büyüklük, elektrik yükü ve konformasyonlarına göre birbirinden ayırmak veya bazen saflaştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Jel elektroforezi, elektrik akımı ile hareketlenen moleküllerin jel boyunca karşıya göç ettiği bir tekniktir. Elektroforez için gerekli güç, jelin iki ucunda bulunan elektrotlara uygulanan voltajdır. Bir elektrik alanının bir molekülü hangi hızla jel ortamında hareket ettirdiği, molekülün büyüklüğüne, yapısına, ortamın yoğunluğuna, iyonik kuvvete ve uygulanan akıma bağlıdır. Büyük moleküller jel üzerinde yürümekte zorluk çekerken küçük moleküller daha hızlı ve rahat hareket edebilirler. Birçok biyolojik makromolekül iyonlaşabilen gruplara sahiptir ve pH a bağlı olarak çözeltilde katyon (+) yada anyon (-) biçiminde elektrik yükü taşıyan türler olarak bulunurlar. Net yükün özelliğine bağlı olarak, eksi yüklü moleküller (anyonlar) artı yüklü elektroda (katoda) , artı yüklü moleküller (katyonlar) eksi yüklü elektroda (anoda) doğru hareket ederler.

Agaroz jel elektroforezi proteinlerin ve küçük (350.000 Da yani 500bc'e kadar) DNA parçalarının ayırımı için kullanılan basit, hızlı bir tekniktir. Agaroz deniz yosunlarından ekstrakte edilen bir polisakkarittir. Agaroz jel kuru toz halindeki agarozun sıvı bir tampon içine konması ve sonra karışımın, agaroz berrak bir çözeltiliye dönüşene kadar kaynatılmasıyla oluşturulur. Daha sonra bu çözelti jel tepsisine dökülür ve oda sıcaklığında katılaşıncaya kadar soğutulur. Katılaştıktan sonra yoğunluğu agaroz konsantrasyonuyla belirlenen bir matris oluşur. En etkin agaroz konsantrasyonu %0,3-2 dir. Agaroz jel büyük por çapına sahiptir. Elektroforez tamponları genellikle EDTA (pH 8) ve yaklaşık 50 mM (pH 7,5-7,8) konsantrasyonunda Tris-asetat (TAE), Tris-borat (TBE) veya Tris-fosfat (TPE) içerir. Elektroforez deneyleri tampon çözeltileri içerisinde yapılır. Bunun iki temel nedeni vardır. Birinci neden akımın geçişini sağlamak için ortamın elektrolit miktarını artırmak ikinci nedense ortamın pH'sında meydana gelebilecek radikal değişimlere izin vermemektir. Kullanılan molekülün jel üzerindeki yerini belirlemek için ortamda UV ışığı altında floresan etki gösteren etidyum bromürün (EB) veya benzeri bir ışıyıcı maddenin bulunması gerekmektedir. Ayırımı yapılacak örnek taraklarla oluşturulmuş kuyucuklara yüklenir ve jel daha sonra, içine elektrotlar yerleştirilmiş ayırıcı tampon tankına daldırılır, elektriksel alanda yürütülerek ayırımı yapılır. Büyük moleküller

kuyucuklara yakın kalırken, küçükler daha uzakta yerleşir. (Sambrook et al., 1989) (Westermeier, 1997)

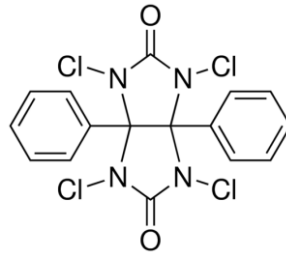
2.6. Radyoiyodinasyon

İyot radyoişaretleme çalışmalarında kullanılan ilk izotop olarak bilinmektedir. Radyoaktif bir atomu büyük bir biyolojik molekülün içine sokmak için kullanılan en yaygın yol Radyoiyodinasyondur. İyodun bağlanabilmesi için yükseltgenmesi gerektiğinden, işaretleme yöntemleri yükseltgeyici ajanları içermektedir (Sampson, 1999). Triiodide, İyodo-Boncuk, İyodin Monoklorid, Kloramin-T, Elektroliti, Enzimatik, Konjugasyon, Demetalasyon ve iodojen yöntemi gibi çok sayıda iyodinasyon yöntemi mevcuttur (Saha, 2003)

Reaksiyon radyoaktif iyodürün yükseltgenmesiyle başlar. İyodun oksidasyonu ile doymamış karbon atomuna I^+ , elektrofilik süstitüsyon (yerdeğiştirme) reaksiyonu ile aromatik gruptaki hidrojen yer değiştirerek, bağlanır. Bu teknik genellikle proteinler için kullanılması yanı sıra ilaçlar, steroidler, nükleik asitler ve bazı karbonlar içinde kullanılabilir (Farah et al., 1998) (Tayan et al., 2015) (Sobal et al., 2004)

2.6.1. İodojen Yöntemi

İodojen ilk olarak Fracer ve Speck tarafından protein ve hücre membranlarını iyodlamak için kullanılan yükseltgen bir ajan olarak tanımlanmıştır. (Fraker et al., 1978) Protein ve hücre membranlarının radyoiyodinasyonunda en çok kullanılan yöntemlerinden biri iodojen metodudur. Bu metotta iyodinasyon ajanı olarak en çok iodojen kullanılmaktadır. Suda çözünmeyen iodojen, I^- ve proteinlerin sulu çözeltilerinin katı fazda hızlı iyodinasyonuna aracılık eder ve yan reaksiyonların oluş derecesi, bu metotta önemsenecek kadar azdır.

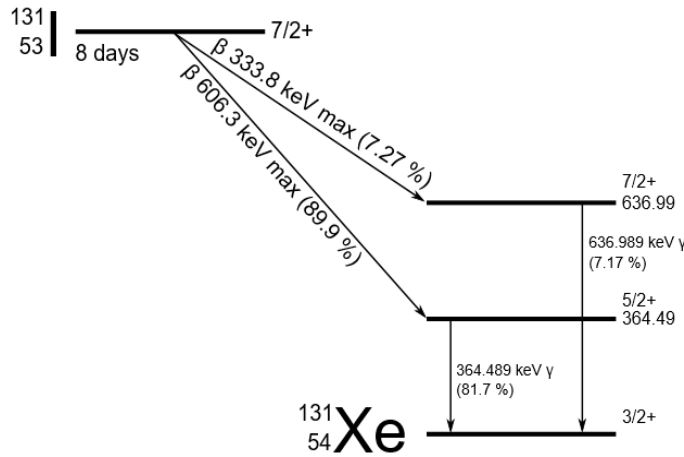


Şekil 2.15. İodojen molekül yapısı

İodojen, diklorometan veya kloroform gibi organik çözügenlerde çözülerek buharlaştırılır ve bulunduğu kaptaki ince bir film şeridi halinde kalır. Ajanın kaba yapışma yeteneği, sıcaklığa, neme, çözügene, buharlaşma oranına ve kaplanma prosedürüne bağlı olarak zaman alıcıdır. İodojen ile iyodürün oksidasyonu gerçekleşerek (I⁺) üretilir ve aromatik halkaya elektrofilik yer değiştirmeyle iyodun bağlanması gerçekleşir (Farah et al., 1998) (Ünak et al., 1997) (Sampson, 1999) (Vertes et al., 2004) Genellikle % 80 nin üzerinde bir radyo işaretleme verimi elde edilir.

2.6.2. I-131

Uranyum parçalanma ürünü ve ya Telliuryum'un nötron aktivasyonu ile elde edilir. $^{235}\text{U}(n,f)^{131}\text{Te} \rightarrow ^{131}\text{I}$ veya $^{130}\text{Te}(n, \gamma)^{131}\text{Te} \rightarrow ^{131}\text{I}$ Stabil ^{127}I ile karşılaştırıldığında 4 nötron fazlası vardır. ^{131}I izotopunun bu nötron bolluğu negatif beta bozunumu yapmasına neden olmaktadır ve bunun sonucunda, biri β geçişi ve hemen ardından bir γ -ışını salınımı şeklinde iki basamakta gerçekleşen bir dönüşümle kararlı ^{131}Xe oluşur. ^{131}I ve ^{131}Xe in temel enerji düzeyi arasındaki değişim enerjisi 971 keV'dir. Beta ışını salınımı, maksimum enerjisi 606 keV olacak şekilde gerçekleşir ve bu enerji β ve antinötrino arasında paylaşılır; ayrıca bu salınımın ardından gerçekleşen 364 keV'lik γ -ışını salınımı ise uyarılmış ^{131}Xe çekirdeğinin temel düzeye geçişini sağlar.



Şekil 2.16. ^{131}I 'un bozunum şeması

2.6.3. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbiriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Kromatografi tekniğinde yararlanılan temel prensip, bir karışımdaki çeşitli maddelerin hareketli bir faz yardımı ile sabit bir faz üzerinden geçirilmeleri ve bu geçiş sırasında farklı hızlarla hareket edebilmeleridir. Polarite, çözünürlük, affinite, iyonik güç ve/veya çap farklılıklarına bağlı olarak karışımdaki maddeler ayrılabilir. Özellikle fiziksel ve kimyasal nitelikleri çok benzeyen maddelerin ayrılma işlemlerinde, kromatografi yönteminin kullanımı ile başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

Karışım, sabit fazla birlikte kolonun başlangıç bölgesine uygulanır ve hareketli faz (sıvı veya gaz) akmaya bırakılır. Bazı kromatografi tiplerinde de madde karışımı hareketli faza karıştırılarak uygulanır. Numunede bulunan bileşimler farklı yürüme veya hareket hızlarına göre hareketli faz içerisinde ilerlerler. Yürüme hızı, alıkonma faktörü (Relatif Front; R_f) ile ifade edilir ve substansın yürüme mesafesinin, çözücünün yürüme mesafesine oranından hesaplanır. Aynı uygulama koşulları altında her maddenin kendine özgü R_f değeri vardır. R_f değeri 0 ile 1 arasında bulunur ve doğal olarak hızlı yürüyen komponentler için alınan mesafe büyük olacağından R_f değeri büyük daha yavaş yürüyenler için daha küçüktür.

Kromatografinin Sınıflandırması

A. Mobil fazın tipine göre:

1. Sıvı Kromatografisi (LC)
2. Gaz Kromatografisi (GC)
3. Süperkritik Akışkan Kromatografisi (SFC) Kritik sıcaklık ve basınçtaki maddelerin (CO_2) kullanıldığı kromatografi türüdür.

B. Uygulama biçimine göre

1. Kağıt kromatografisi
2. İnce tabaka kromatografisi (TLC)
3. Sütun (kolon) kromatografisi (CC)
4. Gaz kromatografisi (GC)
5. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

C. Ayrılma mekanizmalarına göre

1. Adsorpsiyon kromatografisi

2. Dağılma (Partisyon) kromatografisi
3. İyon değiştirme kromatografisi
4. Moleküler eleme kromatografisi (Jel krom.)
5. Afinite kromatografisi (Kimyasal krom.)

2.6.3.1. İnce tabaka kromatografi ve İnce tabaka radyo kromatografi yöntemleri (TLC-TLRC)

İnce tabaka kromatografisi (TLC), bir katı-sıvı adsorpsiyon kromatografisidir. Bu yöntemde sabit faz, çeşitli boyutlardaki cam, alüminyum ya da plastik plakalar üstüne, ince bir tabaka halinde sıvanmış katı adsorban maddedir. Adsorban madde olarak kolon kromatografisinde kullanılan tüm katılar (alüminyum oksit, silika jel, sellüloz vb.) kullanılabilir. Hareketli faz olarak ise çeşitli çözücüler veya çözücü karışımları kullanılmaktadır. Plakanın yerleştirilmesi öncesinde uygulama tankının çözücü buharıyla doymuş olması gerekmektedir. Bu yöntemde hareketli fazın sabit faz üzerinden ilerleyişi, aşağıdan yukarı doğru olur. Çözücü kılcallık etkisi ile içerisine daldırılan ince tabaka plakası üzerinde yürür. Bu işlem sırasında, plakanın alt kesimlerine bir damlalıkla önceden damlatılmış olan karışımı da farklı hızlarla yukarıya sürükler. Ayırım bu şekilde sağlanmış olur. Hareketli faz, plaka uzunluğunun 2/3'ünü geçtikten sonra tanktan dikkatlice çıkarılarak kurutulur. Plaka üzerindeki bileşenlerin dedeksiyonu için örneğin özelliğine göre UV ışığı altında gözlem, florasan sayımı, radyoaktivite sayımı gibi metotlar kullanılmaktadır.

Yürüme hızı maddenin, katı fazın ve çözücünün polaritesine bağlıdır. TLC çalışmaları sırasında polarite dikkat edilmesi gereken bir husustur. Adsorban yüzeyinde hareket eden çok polar olan bir bileşik az polar olandan daha kuvvetlice adsorbana çekilir. Ayrıca çözücü polarlığı da bileşiğin adsorban üzerindeki yürüme hızını etkilemektedir. Çözücü polarlığı arttıkça çözünen örnek çözücü tarafından daha çok çekilecek ve buna bağlı olarak da örneğin adsorban üzerindeki hareketi hızlanacaktır.

Radyoişaretli bileşiklerin kalite kontrolü amacıyla yapılan İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) uygulamaları TLC yönteminin radyoaktivite sayım metodu ile dedeksiyon yapılan şeklidir. Bağlanma verimi, serbest radyoizotopu, yükseltgen yada indirgen halini ve ortamdaki yükseltgen/indirgenin kendisini olmak üzere bu üç bileşiği tahmin etmek için kullanılır.

kaynağı ksenon lamba olup duyarlılığı UV/VIS dedektöre göre yaklaşık 10^3 kat fazladır. Floresans esaslı uygulamalara hassaslık ve seçicilik sağlar.

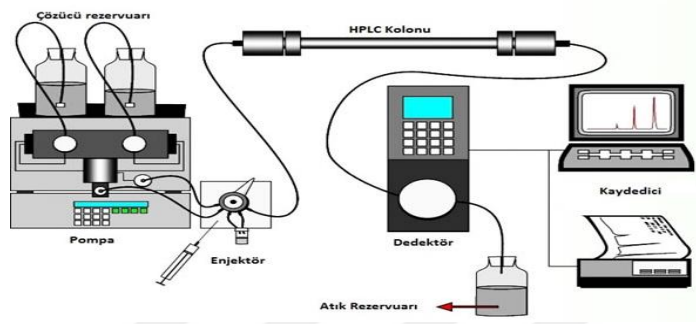
Dedeksiyonun radyoaktivite dedektörleri ile yapıldığı durumlarda ise bu sistem Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi (HPLRC) şeklinde tanımlanmaktadır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi tekniğinin düzgün bir şekilde uygulanabilmesi için, enjeksiyonu yapılacak örnek mutlaka sıvı olmalıdır. Katı örnekler ise durgun ve hareketli faza uyumlu olan bir çözgenle çözüldükten sonra yada ekstraksiyon işlemi yapıldıktan sonra enjekte edilebilmektedir. Tipik bir HPLC cihazı sekiz üniteden meydana gelmektedir. • çözgen tankı • örnek giriş ünitesi • pompa • kolon • dedektör • atık toplama ünitesi • bağlantı tüpü • bilgi işlemcidir. Kolon üretiminde yapı materyali olarak genellikle paslanmaz çelik, teflon veya cam kullanılmaktadır. Kolonun ayırım gücü ve performansı yapıldığı materyalden çok iç yüzeyine yapılan kaplamada kullanılan malzemenin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden etkilenmektedir. Kolonun iç çapı 2-5 mm, boyları çok çeşitli olup genellikle 30-300 mm aralığında değişmektedir. Kolon iç çapı arttıkça akış hızı ve iç doldurma hacmi artmakta ama oluşacak piklerin çözünürlüğü ve dolayısıyla duyarlılık azalmaktadır. Kolon uzunluğu arttıkça örnek bileşenlerinin ayırımı daha iyi olmakta fakat analiz süresi uzadığı için daha fazla mobil faz harcanmaktadır. Kolona verilen örnek hacmi küçük olmalıdır (5 – 250 μ L), yüksek hacimler kromatografik ayırımın çözünürlüğünü düşürür.

HPLC yöntemi Normal Faz Sıvı Kromatografisi: polar sabit faz ve apolar veya düşük polariteye sahip hareketli faz ve Ters Faz Sıvı Kromatografisi: apolar sabit faz ve polar hareketli faz olmak üzere iki tiptedir. Ters faz HPLC’de Oktadesilsilan (ODS ya da C18) materyali yaygın olarak kolon dolgu maddesi olarak, su, metanol, asetonitril gibi polar solventler hareketli faz olarak kullanılmaktadır. Apolar ya da zayıf polar bileşikler ters faz HPLC ile çok iyi ayrılabilir. Tez çalışmasında biyokonjuge parçacıkların kalite kontrolünde Ters faz HPLC kullanılmıştır.

İlaçlar (Antibiyotikler, sedatifler, steroidler, analjezikler), Biyokimyasallar, Gıda Maddeleri (Sunı tatlandırıcılar, antioksidanlar, alfatoksinler), Endüstriyel Kimyasallar (çok halkalı aromatikler, boyalar, yüzey aktif maddeler), Kirleticiler (Pestisitler, herbisitler, fenoller), Uyuşturucular (uyuşturucu ilaçlar, zehirler, narkotikler), Klinik Tıp (safra asitleri, ilaç metabolitleri, üre ekstraktları) gibi

çeşitli bileşiklerin miktar tayini, bileşiklerin tanınması ve saflaştırma işlemleri için HPLC kullanılmaktadır. (<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yukse-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>). (<http://bys.trakya.edu.tr/file/open/20607229>)



Şekil 2.18. HPLC sistemi şeması (www.inovatifkimyadergisi.com)

2.7. Enfeksiyonel Hastalıkların Tanısı

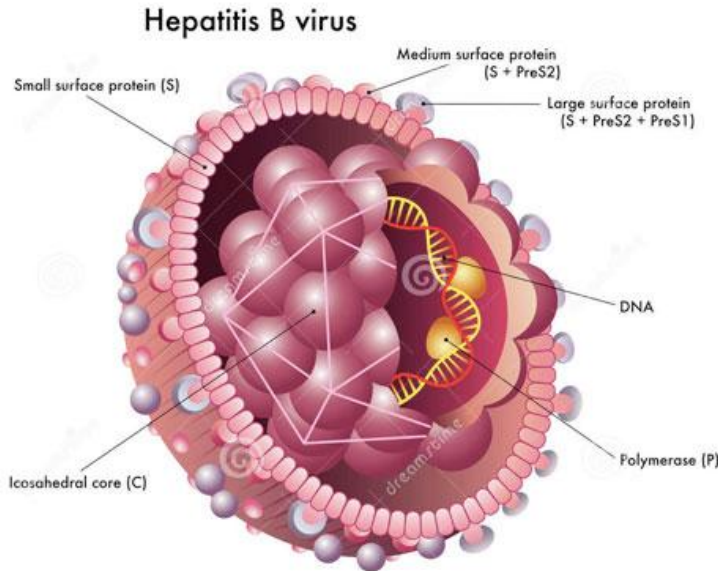
Enfeksiyonlar vücudumuzun her bölgesinde meydana gelebilen, bakteriler, virüsler veya parazitler tarafından oluşturulan ve bir kısmı bulaşıcı olabilen hastalıklardır. Grip, idrar yolu enfeksiyonu, ishallerden ciddi hatta ölümcül olabilen AIDS, menenjit, tüberküloz sarılıklara kadar çok geniş bir hastalık grubu enfeksiyon hastalıkları kapsamına girmektedir. Tanı yöntemlerindeki ilerlemeler ışığında günümüzde birçok enfeksiyon hastalığı erken teşhis edebilmek mümkündür. Mikrobiyoloji laboratuvarları enfeksiyon hastalıklarının tanısında ve takibinde belirleyici rol alır. Bu hastalıklara sebep olan mikroorganizmalar kültür yöntemleri ile, serolojik testlerle veya direk incelemelerle gösterilebilir. Bu testlere en ucuz, kolay ve hızlı alternatif virüsün kendisinin veya virüse karşı geliştirilen antikorun tespit edildiği immünokromatografik hızlı tanı testleridir.

2.7.1. Hepatit B Virüs Yüzey Antijeni (HBsAg)

Hepatit, hepatit A, B, C, D ve E virüslerinin karaciğere verdiği zarardan ötürü, karaciğerin iltihaplanmasına verilen genel isimdir. Sarılığın gelişmesi karaciğer hastalığının karakteristik bir özelliği olduğu bilindiğinden beri, doğru teşhis sadece hastaların serumunda spesifik virüs yüzey antijenlerinin ve antikorlarının varlığının test edilmesi ile mümkün olmaktadır.

İnsan hepatitinin birçok viral etmeni arasından sadece birkaçı Hepatit B (HBV) virüsünden daha fazla global öneme sahiptir. Hepatit B, karaciğerin ciddi ve yaygın enfeksiyonel hastalığıdır ve dünya üzerinde milyonlarca kişiyi etkiler. Sürekli HBV enfeksiyonlarının sonucunda, kronik karaciğer yetmezliği, siroz ve karaciğer kanseri gibi ciddi patolojik neticeler doğabilir. Ayrıca HBV taşıyıcıları hastalığı yıllarca taşıyabilir ve bulaştırabilirler. Hastalık çok sıklıkla erken çocuklukta, asemptomatik halde görülür ve genellikle kronik taşıyıcı faza geçer. Şuanda dünyada 350 milyondan fazla HBV taşıyıcısı vardır, ayrıca her yıl 4 milyon akut enfeksiyonu eklenmektedir. Her yıl hepatit B kaynaklı karaciğer rahatsızlıklarından ve hepatosellüler karsinomdan yaklaşık bir milyon insan ölmektedir.

Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) tespiti, Hepatit B virüsü taşıyan bireyleri saptar. Serum HBV DNA'nın konsantrasyonu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlenir ve hastalığın gelişimi ile ilişkilidir, tedavi ve izleme için kullanılır. HBsAg'nin geleneksel tespitinde, hepatiti B yüzey antijenlerine karşı gelişen antikorları kullanan hassas immunoassayler kullanılır. Hasta başı testleri düşük maliyet, sonuçların hızlı alınması, erken tanı, hemşire ya da teknisyenlerin daha az eğitim gerekliliği, halk sağlığının izlenmesi ve tedavinin hızlı bir şekilde başlanması gibi önemli avantajlar sunar.

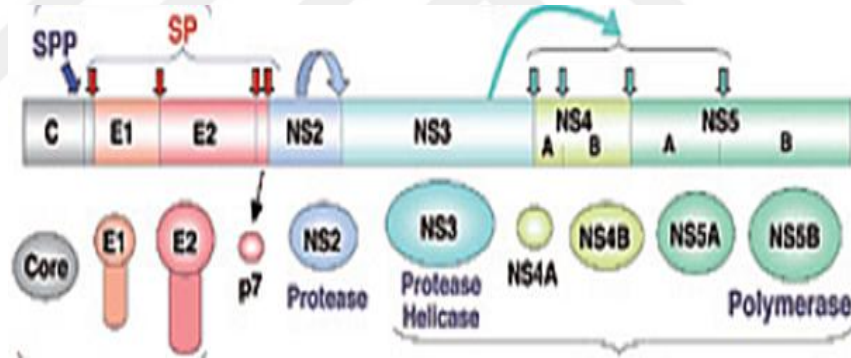


Şekil 2.19. Hepatit B Virüsü (www.hepatitisaustralia.com)

2.7.2. Hepatit C Virüsü (HCV)

Hepatit C virüsü (HCV) kronik karaciğer hastalıklarının ana sebebidir, sıklıkla siroza neden olur ve karaciğer kanseri riskini artırır. HCV, *Flaviviridae* ailesine ait, pozitif, tek iplikli RNA ya sahip bir virüstür. Genom, ortalama 10000 nükleotitten oluşur ve tek bir poliproteini 3000 amino asit kodlar. Poliprotein, konukçu hücre ve virüs proteazlar tarafından işlenir ve böylece viral replikasyon için gerekli birçok yapısal olmayan protein ve üç ana yapısal protein haline dönüşür. HCV'nin genomik sekansları birbirinden biraz farklı, interferon alfa tedavisine farklı yanıtlar gösteren, birçok farklı genotipi tanımlanmıştır. HCV, genotip bakımından 6 farklı genetik yapıya sahiptir ve bunlar nükleotit seviyesinde sırasıyla ortalama %30 ve %15 civarında farklılık gösteren en az 70 alttipe ayrılırlar. Farklı genotipler farklı fenotipik özelliklere sahip olabilirler.

Hepatit C hastalığının tanısında HCV core, NS3, NS4 ve NS5 coctail antijenler kullanılarak bunlara karşı geliştirilmiş antikorların insan serum/plazmasında tespit edilmesi sağlanır.

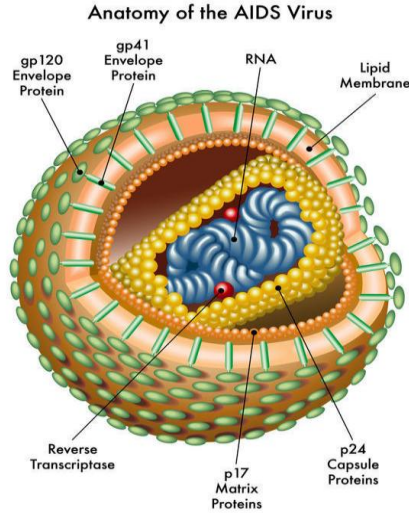


Şekil 2.20. Hepatit C Virüsü genom organizasyonu

2.7.3. İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (HIV)

HIV/AIDS insan ırkının şimdiye kadar karşılaştığı en yıkıcı hastalıktır. HIV; İnsan İmmünyetmezlik Virüsünün (Human Immunodeficiency Virus) açılımıdır ve bu virüs Kazanılmış immünyetmezlik sendromuna (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) neden olur. HIV, bağışıklık sisteminin normal işleyişi için hayati önem taşıyan ve vücudu hastalıklardan koruyan kan hücrelerini tahrip eder. AIDS bağışıklık sisteminin HIV virüsü tarafından zayıf düşürülüp, insan vücudunun hastalıklara açık hale gelmesiyle oluşur.

HIV enfeksiyonu genel olarak kan örneklerinin ve oral sıvıların test edilmesiyle saptanabilir. Eğer kan ya da oral sıvıda HIV antikoru (enfeksiyonla savaşmak için vücut tarafından üretilen proteinler) varsa kişi HIV pozitifdir. HIV vücut dışında yaşamını sürdüremez. Bu sebeple günlük tesadüfi temas ile yayılmaz. Sivrisinekler ve diğer böcekler HIV taşıyıcısı değildir. HIV; enfekte bir kişi ile gerçekleştirilen cinsel ilişki ile, iğne ve/veya enjektör ve/veya diğer enjeksiyon ekipmanı ile, daha az rastlanır bir şekilde (şimdilerde kanda HIV antikorlarının tarandığı ülkelerde daha nadir olarak) enfekte kan nakilleri ya da enfekte pıhtılaştırma faktörleri ile yayılmaktadır. Birincil insan immünyetmezlik virüsü (HIV)'nün erken laboratuvar tanısı antikorun serolojik çevriminden önce plazma ya da serumda viral RNA'nın ya da p24 antijeninin tespitine dayanır. HIV enfeksiyonunun tanı zamanı p24 antijeninin taranmasıyla ortalama 4–5 gün azaltılabilir. Tasarlanan tanı kitleri GP36, GP41 ve p24 antijenlerine karşı geliştirilmiş antikorların tespitine dayanmaktadır.



Şekil 2.21. İmmünyetmezlik Virüsü (HIV) (www.healthtap.com)

2.8. Akut Miyokardiyal Enfarktüs (AME) Tanısı

Koroner arterler kan pıhtıları ile tıkanığında kalpteki hücrelerin yaşamlarını sürdürebilmesi için gerekli olan kan buraya pompalanamaz ve akut miyokardiyal enfarktüs (AME) oluşur. Bu kısıtlama sebebiyle oksijen ve nutrient bakımından zengin kan kalp kası hücrelerine olması gerektiğinden daha az ulaşır ya da ulaşamaz ve bu hücrelere ani zararlar verir ya da kalp kasının kısmi ölümü ile sonuçlanır. Kalp kasının normal çalışması için fazla miktarda oksijen gerektiğinden oksijenin yetersiz olduğu durumlarda doku ölümleri görülecektir.

Heryıl dünyada milyonlarca insan AME geçirmekte ve bunların birçoğu bu nedenle yaşamlarını yitirmektedir. Ayrıca birçok insanda gėős ağrısı nedeniyle hekime başvurmaktadır. Ölüm riski, AME başlangıcından sonraki ilk birkaç saatte en yüksektir. Bu nedenle AME nin hızlı bir şekilde belirlenmesi etkin ve kanıta dayalı tedavi ve uygulamaların başlatılması açısından kritik önem taşır.

AME iskemi kanıtları;

- İskemi semptomları
- Yeni geşişen iskemik EKG değişiklikleri
- EKG’de patolojik Q dalgasının geşişmesi
- Yeni geşişen, canlı doku kaybı veya bölgesel duvar hareket bozukluğunun görüntülenmesi
- Myokardiyal nekroz belirteçlerinde yükselme ve/veya düşmedir.

AME tanısında kullanılan kardiyak belirteçler enzimler ve proteinler olmak üzere ikiye ayrılır.

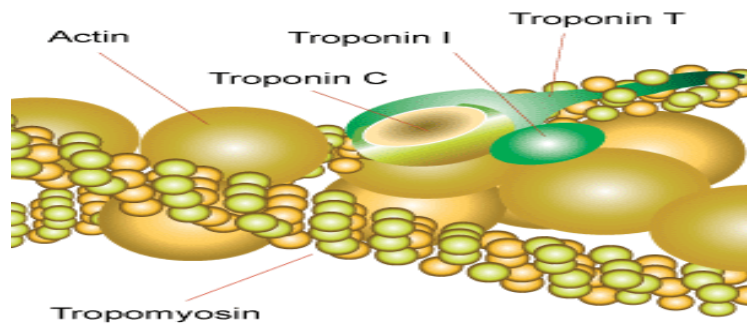
Enzimler: CK,CK-MB, LD,AST

Proteinler: Troponin I,T, Miyogloblin, MLC,MHC, FABP

<http://www.turkbiyokimyadernegi.org.tr/dosyalar/belgeler/kongre/sebahat-ozdem.pdf>

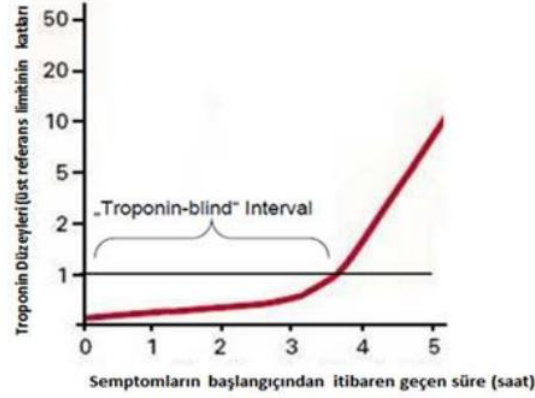
2.8.1. Troponin I (cTnI)

Myokardiyal hasarının tanısında, kardiyak troponinler altın standarttır. Kardiyak Troponin I (cTnI) kardiyak kaslarda bulunan ve molekül ağrılığı 22,5 kDa olan bir proteindir. Troponin I, Troponin T ve Troponin C’nin de dahil olduğu üç alt ünite kompleksinden biridir. Bu yapısal kompleks tropomiyozin ile birlikte çizgili iskelet kaslarında ve kardiyak kaslarındaki aktomiyozinin kalsiyuma hassas ATPaz aktivitesini regüle eder.



şekil 2.22. Troponin kompleksinin yapısı (<http://www.sigmaaldrich.com/>)

Kardiyak bir hasar oluştuğunda ağrının başlangıcından 4 - 6 saat sonra kana Troponin I salınır. cTnI'nın salınım modeli CK-MB'ye benzemekle beraber, CK-MB'nin seviyesi 72 saat sonra normale donmekteyken, Troponin I'nın yüksek seviyesi 6-10 gün boyunca devam eder. Böylece kardiyak hasarın tespiti için daha uzun bir pencere dönemi söz konusu olmaktadır.



Şekil 2.23. AME sonrası cTnI düzeyindeki değişim (<http://www.turkbiyokimyadernegi.org.tr/>)

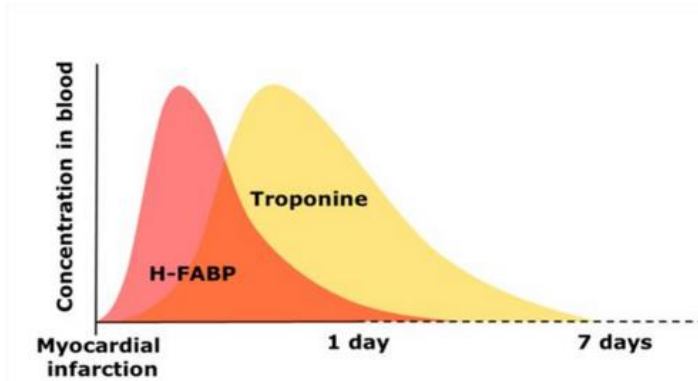
cTnI'lar klinik pratikte; yüksek riskteki akut koroner sendromlu hastaların belirlenmesinde, erken koroner anjiografiden yarar görecek hastaların seçilmesinde, mümkün olduğca perkütan koroner girişimlerden yarar görecek hastaların seçilmesinde olduğca yararlıdırlar.

cTnI ölçümlerinin miyokardiyal hasarın tanımlanmasındaki yüksek spesifitesi; perioperatif dönem, maraton koşuları sonrası, şiddetli göğüs ağrısı travmaları gibi durumlarda kanıtlanmıştır. cTnI salınımı, istikrarsız kalp spazmları, konjestif kalp yetmezliği, koroner arter by-pas ameliyatına bağlı iskemik hasarlar gibi akut miyokardiyal enfarktüs (AME) dışındaki durumlar için de dokümente edilmiştir. Troponin I, miyokardiyal dokudaki yüksek hassasiyet ve spesifitesi nedeniyle son yıllarda miyokardiyal enfarktusun tespiti için en fazla tercih edilen biyomarker olmuştur. Troponin-I (cTnI)'nın kardiyak izoformları sadece kardiyak kaslarında eksprese olmaktadır. cTnI çizgili kaslarda bulunan yapısal bir protein - ince filamente bağlı olarak - olmasına rağmen duşuk bir yüzde ile (% 3 - 4) sitoplazmada serbest olarak bulunmaktadır. Troponinlerin artması (>0.5 ng/ml) , miyokardiyal enfarktuste (AMI) büyük hassasiyet (% 100) göstermektedir.

2.8.2. Kalp spesifik yağ asiti bağlayıcı proteini (h-FABP)

Kalp spesifik yağ asiti bağlayıcı proteinin (h-FABP) 132 amino asitin oluşturduğu, teorik pI değeri 6,34 olan, miyokardiyum hücrelerinin plazmasında bulunan ve 15 kDa moleküler ağırlığa sahip bir proteindir. Kalpteki toplam solubl proteinin yaklaşık % 5'inin FABP olduğu belirtilmektedir. Görevi serbest yağ asitlerinin miyokardiyum hücreleri içerisinde taşınmasının düzenlenmesidir. Ek olarak miyokardiyum hücrelerine enerji sağlanmasına da yardım eder.

h-FABP teşhisi AME tanısında önemli bir parametredir. h-FABP konsantrasyonu iskelet kaslarında (miyoglobin ile karşılaştırıldığında) belirgin bir şekilde daha düşüktür. Aynı zamanda h-FABP konsantrasyonu sağlıklı donörlerin kan dolaşımında da belirgin bir şekilde daha düşüktür (h-FABP konsantrasyonu 6-10 ng/ml, miyoglobin konsantrasyonu 40-60 ng/ml) (Okamoto et al., 2000) Bu durum miyokardiyal hücre ölümünün tespitinde h-FABP tanı kitini daha hassas ve güvenilir bir erken teşhis kiti haline getirmektedir. Miyokardiyum hasarında h-FABP hızlı bir şekilde kan akımına katılır ve buradaki konsantrasyonu hızla artar. Bu sebeple de h-FABP, AME'lerin erken teşhisinde çok önemli bir biyokimyasal markır olmaktadır.(Veerkamp et al., 1995) (Fournier et al., 1985) (Glatz et al., 1990)



Şekil 2.24. AME sonrası kanda cTnI ve h-FABP konsantrasyonundaki değişim

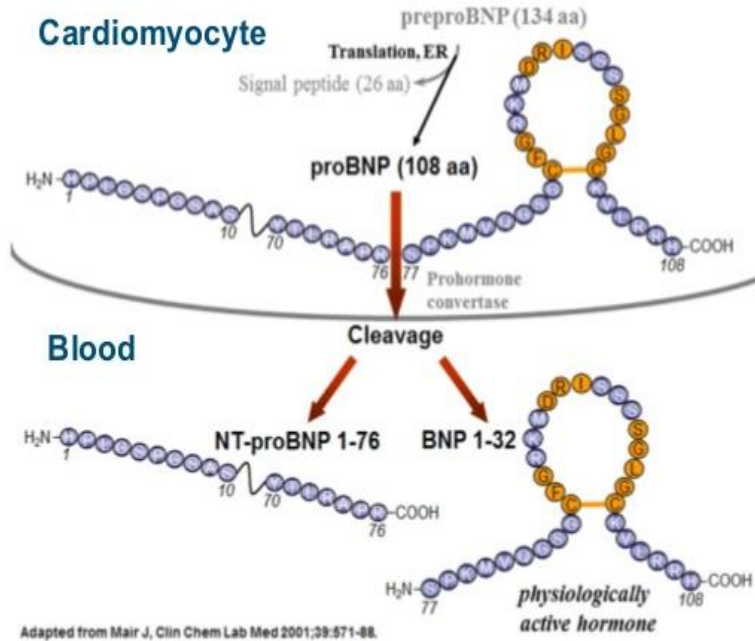
(<http://www.mediphos.com>)

2.9. Konjestif Kalp Yetmezliği (KKY) Tanısı

Kalbin yeterli miktarda kanı dokuya ulaştıramaması ya da dokudaki venöz kanı venöz sirkülasyona pompalayarak dokudan uzaklaştıramamasına Konjestif Kalp Yetmezliği (KKY) denir. Kalp yetmezliği sıklığı giderek artan, önemli bir morbidite ve mortaliteye sahip ciddi bir sağlık problemidir.

Günümüzde hastanın kliniği ve ekokardiyografik bulguları kalp yetmezliği tanısında önemli yer tutmaktadır. Ancak kardiyak ventrikül kaynaklı yeni nesil biyokimyasal markerler kalp yetmezliği tanısına yönelik şaşırtıcı ipuçları verebilmekte ve bu konuda daha da yeni kardiyak marker bulma çalışmaları tüm dünyada devam etmektedir. Kalp yetmezliği tanısında bir çok biyokimyasal parametreden faydalanılmaktadır. Kalp kası, vücuda kan pompalaması görevinin yanında endokrin bir organdır. Bu bağlamda kalbin atrium ve ventrikül duvarlarındaki miyosit hücrelerinin gerimi neticesinde, atriumdan atrial natriüretik peptid (ANP), ventrikülden brain natriüretik peptid (BNP) salgılanır.

B-tipi natriüretik peptid (BNP), 32 amino asitten oluşan bir nörohormondur. BNP esas olarak ventriküllerde (büyük oranda sol ventrikülde) sentez edilir, orada depolanır ve oradan salgılanır. Daha az oranda ilk olarak tanımlandığı beyinde (bu nedenle önceleri “beyin-NP” terimi kullanılmıştır) ve atriyumlarda da sentezi söz konusudur. Önce 132 amino asit içeren prepro-BNP sentez edilir. Daha sonra prepro-BNP 108 amino asit içeren proBNP’ye dönüşür. ProBNP proteoliz ile aktif BNP’ye ve 76 amino asit içeren inaktif N-terminal proBNP’ye (NT-proBNP) ayrışır. BNP ve NT-proBNP ventriküllerin geriliminde artış ve çeşitli nörohormonal faktörlerin uyarısıyla miyositlerden ve muhtemelen bir miktar da direkt olarak perimiyokardiyal bölgedeki fibroblastlardan, koroner sinüsler aracılığıyla pulsatil olarak, dolaşıma salgılanır.



Şekil 2.25. BNP ve NT-proBNP oluşumunun şematik gösterimi

(<http://sigmadiagnosticsinc.com>)

NT-pro-BNP'nin BNP ye göre gerek yarı ömrünün daha uzun olması gerekse sodyum tüketiminden ve glomerül filtrasyon hızından daha az etkilenir olması KKY tanısında NT-pro-BNP'nin daha yaygın olarak kullanılmasının sebebidir (Swedberg et al., 2005) (Maisel et al., 2003) (Maisel et al., 2004) (Januzzi et al., 2005).

2.9.1. NT-proBNP

ProBNP'nin N-ucu fragmanı olan NT-proBNP prekürsör peptid proBNP'den ayrılır. İlk kez bulunuşu yıllar öncesine dayanan ancak kardiyolojik olarak önemi son zamanlarda anlaşılan NT-pro-BNP günümüzde kalp yetmezliğinin ön tanısı için anlamlı bulunmaktadır. Pro-B tipi natriüretik peptit (Pro-BNP) ventrikül miyokardında sentezlenen ama sadece ventrikül içi volümü, duvar gerginliği, diastol sonu basınç artışı gibi sol kalp yetmezliği hallerinde cevap olarak plazmaya salınan bir diüretik peptittir. Kalp yetmezliğini teşhisindeki spesifitesi ve sensitivitesi % 95 civarında olduğu American College of Cardiology ve American Heart of Association'ın 2001 pratik klavuzunda yayınlanmıştır. Henüz asemptomatik kalp yetmezliği vakalarını belirleme de bile değerli non-invaziv bir yöntemdir. Daha önceden yapılan çalışmalarda da Doust ve arkadaşları, Maisel ve arkadaşları, Remme ve arkadaşları Pro-BNP'nin semptomatik kalp yetmezliğinin tanısında kullanılabileceğini göstermişlerdir (Doust et al., 2004) (Maisel., 2001) (Remme., 2001).

3. MATERYAL METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

- Kadmiyum klorür (CdCl_2) (Fluka)
- Tiyoglikolik asit (TGA) ($\text{HSCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, 98%) (Merck)
- Tellür (NaHTe) (Fluka)
- Sodyum bor hidrür (NaBH_4 , 95%) (Riedel)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Sigma)
- Tiyoüre ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$, 99.5%) (Aldrich)
- 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimid hidroklorür (EDC) (Sigma)
- N-hidroksisüksinimid (NHS) (Sigma)
- Tris-asetat-EDTA (TAE)
- Agaroz
- 2-Amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propanediol (tris-base)
- Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)
- rHCV coctail (Core, NS3, NS4, & NS5) soluble for capture (2 mg/ml) (Arista)
- rHCV coctail (Core, NS3, NS4, & NS5) soluble for conjugate (2 mg/ml) (Arista)

- GP41,GP36,P24 coctail (2 mg/ml) (Arista)
- HbsAg mAb2 (2 mg/ml) (Artron)
- HbsAg mAb1 (2 mg/ml) (Artron)
- 4C2 (IgG2a for MAbs) (2 mg/ml) (Hytest)
- 19C7 (IgG2b for MAbs) (2 mg/ml) (Hytest)
- 24E11 (IgG2a for MAbs) (2 mg/ml) (Hytest)
- 15F11 (IgG2b for MAbs) (2 mg/ml) (Hytest)
- 9F3 (IgG1 for MAbs) (2 mg/ml) (Hytest)
- 10E1 (IgG1 for MAbs) (2 mg/ml) (Hytest)
- Keçi anti fare IgG (ABGAM-500) (1 mg/ml) (Arista)
- Groupe Servi Bio, Panel HIV
- Groupe Servi Bio Panel HCV
- Trina, Anti HIV (High Concentration)
- Groupe Servi Bio, Panel Antigene HBs 10 Controles
- HbsAg (2 different Concentrations in IU/ml)
- NT-proBNP (2 different Concentrations in ng/ml)
- Troponin I (2 different Concentrations in ng/ml)
- Nitroselüloz membran (CN 140) (Sartorius)
- Nitroselüloz membran (LFNC-H) (Nupore)

- Nitroselüloz membran (LFNC-C) (Nupore)
- Nitroselüloz membran (FP) (Whatman)
- Nitroselüloz membran (CNPC-SS12) (MDI)
- Örnek Uygulama pedi (GP04) (Nupore)
- Konjugat ped (Release Matrix, PT1-05) (Nupore)
- Emici ped (CF6) (Whatman)
- Asetonitril (CH_3CN) (Merck)
- Metanol (CH_3OH) (Merck)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck)
- N-Bütanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$) (Merck)
- izopropil alkol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) (Merck)
- Asetik asit (CH_3COOH) (Merck)
- Fosforik asit (H_3PO_4) (Sigma)
- Amonyum hidroksit (NH_4OH)
- Coomassie Brilliant Blue G-250
- Süktroz (Sigma)
- Trehaloz (Sigma)
- Fetal Bovine Serum (Bio.Ind.)
- Potasyum iyodür (KI) (Merck)

- PBS (Merck)
- Membran filtre- Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-50 membrane; 50 NMWL
- Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-100 membrane; 100 NMWL
- İnce tabaka kromatografi kağıdı ITLC-SG (Merck-5554).
- ^{131}I (Ege Üniversitesi Hastanesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Bornova, İzmir)
- Argon gazı (HABAŞ, Sınai ve Tıbbi Gazlar İstihsal Endüstrisi A.Ş.)

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- TLRC Bioscan (AR2000, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Kolon fırını (Shimadzu CTO-10ASvp, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Fraksiyon Kollektörü (Shimadzu FRC-10A, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Diyot array dedektör (DAD) (Shimadzu SPD-M20A, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- UV-VIS dedektör (Shimadzu SPD-10A/V, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Fotodiyot Dedektör (Shimadzu, SPD-M20A, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Refraktif Index Dedektör (Shimadzu, RID-10A, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Otomatik örnekleyici (SIL-20A HT, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)

- Shimadzu LC-10Atvp (SPD-10AV) sistemi (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Doz kalibratörü (Biodex AtomLab 100 Plus, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gamma sayım sistemi (RAD-501, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Spreyleme sistemi (Bio Dot XYZ 3060, Türklab Tıbbi Malzemeler A.Ş.)
- Nanodrop 3300 spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Türklab Tıbbi Malzemeler A.Ş.)
- Üç boyutlu çalkalayıcı (Ika, Türklab Tıbbi Malzemeler A.Ş.)
- Santrifüj cihazı (Selecta Cencom I, Türklab Tıbbi Malzemeler A.Ş.)
- Vorteks cihazı (Ika, Türklab Tıbbi Malzemeler A.Ş.)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Ika, Türklab Tıbbi Malzemeler A.Ş.)
- Floresan mikroskop (Olympus BX53, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Polarize Işık mikroskobu (Olympus, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü)
- Laminar flow kabin (Nüve, Türklab Tıbbi Malzemeler A.Ş.)
- Sentez ünitesi (Radleys Carousel 6, Türklab Tıbbi Malzemeler A.Ş.)
- UV-visible spektrofotometre (Varian Cary 50 Scan, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü)
- Floresan spektrofotometre (Varian Cary Eclipse, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü)

- Boyut ve potansiyel ölçüm sistemi (Malvern NanoZS, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü)
- SEM (Phillips XL30 SFEG, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi)
- HRTEM (JEOL JEM 2100F, USA, Muğla Üniversitesi, Merkez Araştırma Laboratuvarı)
- XRD (Philips X'Pert Pro, the Netherlands, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi)
- Mikroplaka okuyucu (ThermoLabsystems Multiscan Spectrum, E.Ü. Biyokimya Bölümü)
- Agaroz jel elektroforez (Thermo EC, E.Ü. Biyokimya Bölümü)
- UV ışık kaynağı (UVstar Biometra, E.Ü. Biyokimya Bölümü)
- Dispenser (Imagene IsoFlow dispenser) (Türklab Tıbbi Malzemeler A.Ş.)

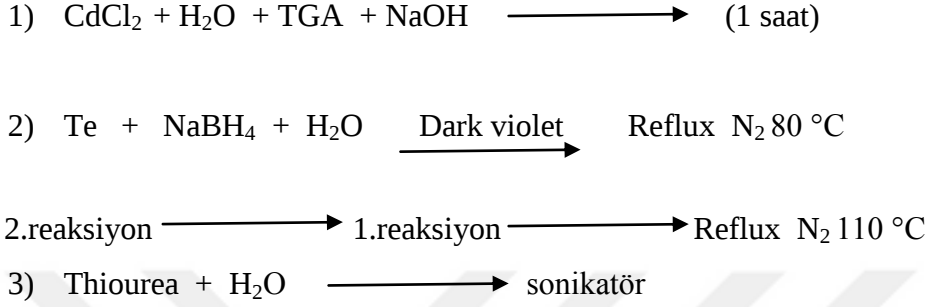
3.2. Sentez ve Konjugasyonlar

Giriş bölümünde değinilen amaç doğrultusunda immünofloresans esaslı hızlı tanı test kiti tasarımı için uygun, yüksek floresans kararlılığı ve etkin fonksiyonel gruplara sahip, biyokonjugasyona uyumlu, kuantum verimi yüksek CdTe/CdS-TGA kuantum noktalar seçilmiş ve sentezi gerçekleştirilmiştir. Kuantum noktaların tasarlanacak teste uygun monoklonal/poliklonal antikor veya rekombinant antijenler ile konjugasyonu sağlanmıştır.

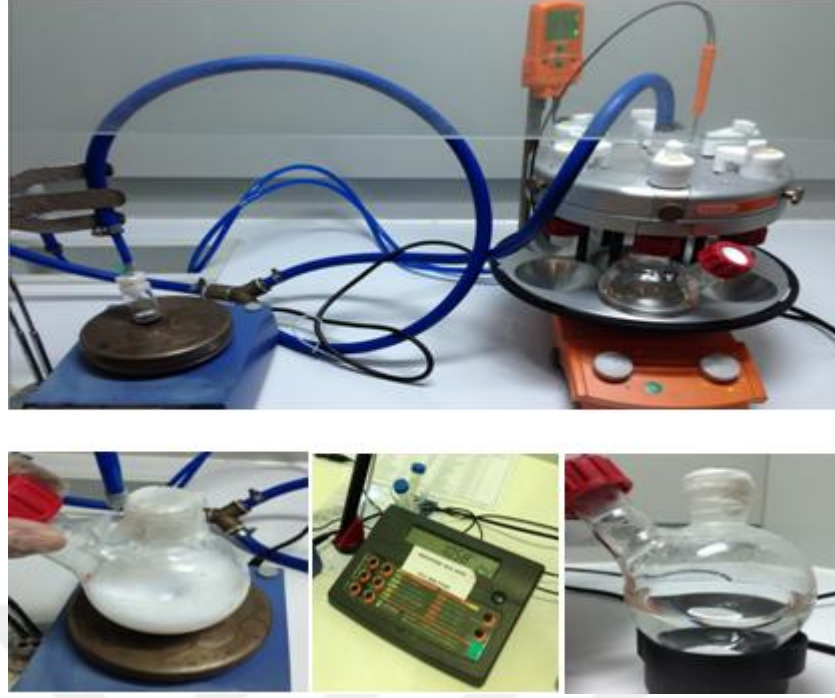
Sentez aşaması için gerekli olan sentez ünitesi 01040.STZ.2011-2 nolu sentez projesi kapsamında Türklab Tıbbi Malzemeler A.Ş tarafından sağlanmıştır. Sentezlenen kuantum noktalar EDC-NHS kimyası ile monoklonal/poliklonal antikor veya rekombinant antijenler ile konjuge edilmiştir. Sentez ve konjugasyon prosedürleri aşağıda verilmiştir.

3.2.1. CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların Sentezi

CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların sentezi kimyasal reaksiyon ile Şekil 3.1' de gösterilen azot gazı altında geri soğutuculu Radleys Carousel 6 Paralel Sentez düzeneğinde 3 temel basamakta gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki gibidir:



1.reaksiyonda Radleys Carousel 6 Paralel Sentez Sisteminin iki boyunlu balonu içerisine 0,5712 g Kadmiyumklorür (CdCl_2) tartılmış, 110 ml H_2O içerisinde çözünmüş ve ardından ortama 420 ul Tiyoglikolikasit (TGA) eklenmiştir. Çözelti bulanıklaşmıştır. Oluşan bulanık çözelti TGA'nın Cd ile kompleks oluşturduğunu göstermiştir. Çözeltinin pH:2 olarak ölçülmüştür. Çözeltinin pH'ı 1M NaOH eklenerek 11 e çekilmiştir. Balonjoje Şekil 3.1'de görülen geri soğutuculu sentez düzeneğine bağlanmıştır. Azot gazı, ısıtıcı ve karıştırıcılar açılmıştır. Sıcaklık 80°C ye ayarlanmıştır. Sıcaklık 80°C ye geldiğinde reaksiyon 1 saat bu sıcaklıkta karıştırılmıştır.



Şekil 3.1 Radleys Carousel 6 Paralel Sentez Sistemi içerisinde 1.reaksiyon.

2.reaksiyonda Tellür 0,0918 g tartılmış ve cam vial içerisinde magnet ile karıştırılmıştır. Cam vial içerisinden azot gazı geçirilmeye başlanmıştır. Üzerine 10 ml H₂O eklenmiş ısıtıcıya yerleştirilmiş ve sıcaklık 60 °C ye ayarlanmıştır. 2.reaksiyondan gaz geçişi durduktan sonra çözeltinin 2,5 ml si 1 nolu reaksiyona eklenmiştir. Daha sonra ısıtıcının sıcaklığı 110 °C ye ayarlanmıştır.



Şekil 3.2 Radleys Carousel 6 Paralel Sentez Sistemi içerisinde 2.reaksiyon.

3.reaksiyonda 0,137 g tiyoüre tartılmış ve 6 ml H₂O içerisinde çözünmüş ve çözelti sonikatöre konulmuştur. 1+2.Reaksiyon 110 °C ye ulaştığında 3. Reaksiyonun 2,5 ml si enjektör ile çekilerek reaksiyona eklenmiştir.

CdTe/CdS-TGA Kuantum noktaların sentez reaksiyonu sırasında 90,110 °C de ve tiyoüre eklendikten 10, 30, 60, 90, 120 ve 150 dk sonra örnek numuneler

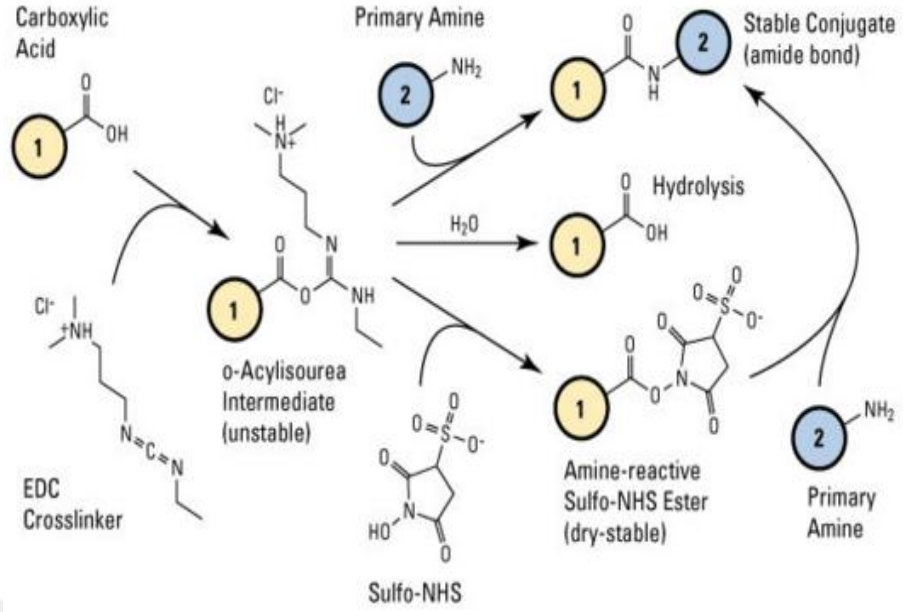
alınarak UV visible ve floresan spektrofotometrede dalga boyu ölçümleri, DLS de boyut analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde sentez aşamalarında parçacıkların durumu izlenmiştir. Son olarak elde edilen sentez ürünü CdTe/CdS-TGA Kuantum noktaların DLS, TEM , TEM , AFM , SEM- EDX ve XRD analizleri yapılmıştır.

3.2.2. CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların Antikor/Antijen Konjugasyonu

Sentezlenen CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların EDC (karbodimid) çapraz bağlayıcı ve EDC/NHS kimyasal yöntemi ile uygun monoklonal/poliklonal antikor veya rekombinant antijenler ile konjugasyonu gerçekleştirilmiştir.

- 0,2M EDC ve 0,05M NHS 25 mM (pH 6.0) MES tamponunda hazırlanmıştır. Sentezlenen CdTe/CdS-TGA kuantum nokta (1 mg/ml) çözeltisinden 2 farklı ependorfa 200'er ul alınmış ve üzerlerine 25 µl EDC ve 25µl NHS eklenmiştir. 15 dk, oda sıcaklığında 1000 rpm karıştırılmıştır. Daha sonra 1.ependorfa rHCV (Core, NS3, NS4, & NS5), 2. ependorfa GP41,GP36,P24 ilave edilmiş ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırmaya bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 300 kDa membran filtre (Sartorius Stedim Biotech) ile 4000 rpm'de DI su ile 3 kez yıkanarak bağlanmayan kuantum noktalar uzaklaştırılmıştır.
- 2M EDC 25 mM (pH 6.0) MES tamponunda hazırlanmıştır. Sentezlenen CdTe/CdS-TGA kuantum nokta (1 mg/ml) çözeltisinden 4 farklı ependorfa 200'er ul alınmış ve üzerlerine 25 µl EDC eklenmiştir. 15 dk, oda sıcaklığında 1000 rpm karıştırılmıştır. Daha sonra 1.ependorfa HbsAg mAb1, 2. ependorfa cTnI IgG2b, 3.ependorfa HFABP IgG1, 4.ependorfa NTproBNP IgG2b ilave edilmiş ve 4 saat oda sıcaklığında karıştırmaya bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 300 kDa membran filtre (Sartorius Stedim Biotech) ile 4000 rpm'de DI su ile 3 kez yıkanarak bağlanmayan kuantum noktalar uzaklaştırılmıştır.

Konjugasyon sonunda rHCV-Qdot, GP41,GP36,P24-Qdot, HbsAg mAb1-Qdot, cTnI IgG2b-Qdot, HFABP IgG1-Qdot ve NTproBNP IgG2b-Qdot konjugatların karakterizasyonları DLS, Uv-Vis Absorpsiyon Spektroskopisi, Floresan Spektroskopisi, TEM, STEM, HPLC, TLRC ve Agaro Jel Elektroforez ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3 EDC (karbodimid) ve NHS çapraz bağlama reaksiyon şeması.

3.3. Sentezlenen CdTe/CdS-TGA Kuantum noktaların Optik Karakterizasyonu

Sentezlenen kuantum noktaların optik karakterizasyonu UV-Vis Spektrometresi ve Floresans Spektrometresi ile gerçekleştirilmiştir. Floresan ve UV-Vis spektrumlarındaki Gauss eğrisi şeklindeki pikler, kristallerin büyümesi ile ilişkili boyut dağılımını izlemek için kullanılmıştır.

Kuantum noktaların kuantum verimi, absorpsiyon ve floresan emisyon spektrumu ile kuantum verimi bilinen bir boyanın flüoresansının karşılaştırılmasıyla hesaplanmıştır. CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların kuantum verimi, standart olarak suda Rodeamin 6G kullanılarak (referans kuantum verimi 0.95) aşağıdaki denklem yardımı ile ölçülmüştür.

$$\Phi = \Phi_R \frac{Int}{Int_R} \frac{A_R}{A} \frac{n^2}{n_R^2}$$

ϕ kuantum verimi, Int , emisyon piki altındaki alanı, A eksitasyon dalga boyundaki absorbansı, n kırılma indeksini, ϕ_R , A_R ve n_R sırasıyla referansın kuantum verimi, eksitasyon dalga boyundaki absorbansı ve kırılma indeksini ifade etmektedir.

3.3.1. UV-Vis Absorpsiyon Spektroskopisi

CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların sentezi sırasında farklı zaman aralıklarındaki numunelerinin fotofiziksel karakterizasyonu UV-visible absorpsiyon spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Kuantum noktaların spektral özellikleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü'nde Varian Cary 50 Scan UV-visible spectrophotometer ile 25 °C 'de ölçülmüştür. Ölçüm sırasında örnekler su içerisinde disperse edilmiş ve 800 µl quartz küvete yerleştirilmiştir. UV-Vis absorpsiyon spektrum 400 ile 800 nm arasında toplanmıştır.

3.3.2. Floresan Spektroskopisi

Kuantum noktaların floresan spektroskopi ölçümleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü'nde Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer ile oda sıcaklığında quartz küvet içerisinde gerçekleştirilmiştir. PL spektrumu, 475 nm bir uyarım dalga boyu kullanılarak 500 ile 750 nm arasında toplanmıştır.

3.4. Sentez CdTe/CdS-TGA Kuantum noktaların Yapısal Karakterizasyonu

3.4.1. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Tekniği ile Parçacık Boyut Ölçümü ve Zeta Potansiyel Analiz

CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların boyut ve zeta potansiyel analizi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü'nde Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Kuantum noktaların sentez sırasında büyümesi de DLS tarafından izlenmiştir. Analizlenecek örneğin 50 µl si 1 mL distile suda disperse edilerek tek kullanımlık plastik küvete yerleştirilmiş ve 25 °C 'de küresel nanopartiküllerin boyutu, en az 5 tekrarlı olarak Zetasizer tarafından ölçülmüştür.

3.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX)

Sentezlenen kuantum noktaların boyut ve yüzey özelliklerinin belirlenmesi için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezinde bulunan Phillips XL30 SFEG cihazı ile SEM görüntüleri alınmıştır. Analiz için numune katı olarak hazırlanmış, üzerine metanol eklenmiş ve mikropipet yardımıyla

cihaza ait elik plakalar üzerine damlatılarak yayılmıştır. Plakalar zerindeki metanolun uçması için yaklaşık 5 dakika beklendikten sonra SEM görüntüleri alınmıştır. SEM’i alınan örneklerin elementel dağılımının incelenmesi amacıyla EDX analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.4.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Sentezlenen kuantum noktaların morfolojisinin incelenmesi amacıyla TEM görüntüleri Muğla Üniversitesi, Merkez Araştırma Laboratuvarında JEOL JEM 2100F, HRTEM cihazı ile alınmıştır. Analizler için bir damla kuantum nokta solüsyonu bir bakır grid yüzeyine damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra mikroskopayerleştirilerek ve görüntüler 200 kV’luk bir voltaj kullanılarak elde edilmiştir.

3.4.4. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM)

Sentezlenen kuantum noktaların elementel analizi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezinde bulunan Phillips XL30 SFEG cihazı ile STEM görüntüleri alınmıştır. Analiz için numune katı olarak hazırlanmış, üzerine metanol eklenmiş ve mikropipet yardımıyla cihaza ait elik plakalar üzerine damlatılarak kurumaya bırakılmış ve STEM görüntüleri alınmıştır.

3.4.5. Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscopy –AFM)

Sentezlenen kuantum noktaların boyut ve boyut dağılımını belirlemek için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezinde AFM görüntüleri alınmıştır.

3.4.6. X Işını Difraksiyonu (Kırınımı) (XRD)

Sentezlenen kuantum noktaların kristal formlar veya fazlar hakkında bilgi edinmek amacı ile toz haline getirilmiş numunenin İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezinde Philips X’pert Pro X-ray diffractometer ile XRD spektrumları alınmıştır.

3.5. Konjugasyonun Kalite Kontrolü

3.5.1. Bradford (Coomassie Blue) Yöntemi ile Protein Miktarının Tayini

Bradford yöntemi ile protein tayini, Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılarak 595 nm'de optik yoğunlukların izlenmesiyle kuantum nokta-biyokonjugat içerisindeki protein içeriğinin analizi için kullanılmıştır. 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 12,5 mg %95'lik EtOH ve 14 ml %88 fosforik asit saf su ile 250 ml ye tamamlanmış ve süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek hazırlanmıştır. 10 ul örnek +200 ul Bradford reaktifi 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra bir mikropilaya okuyucu (ThermoLabsystems Multiscan Spectrum) ile 595 nm'de absorbansları okunmuştur. Örneklerin protein konsantrasyonu, bir seri (0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml , 0,025 mg/ml , 0,05 mg/ml , 0,1 mg/ml ,0,15 mg/ml , 0,2 mg/ml, 0,25 mg/ml) BSA standartına karşılık belirlenmiştir.

3.5.2. Agaroz Jel Elektroforez

rHCV-Qdot, GP41,GP36,P24-Qdot, HbsAg mAb1-Qdot, cTnI IgG2b-Qdot, HFABP IgG1-Qdot ve NTproBNP IgG2b-Qdot konjugasyonunun kalite kontrolünün yapılması için Thermo EC Agaroz jel elektroforez sistemi kullanılmıştır. % 0,5 lik agaroz jel hazırlamak için, toz agaroz tartılmış ve (Tris-acetate-EDTA) TAE içerisinde çözülmüştür. Sonra erlende ki karışım mikrodalga fırın içerisinde, agaroz berrak bir çözeltiye dönüşene kadar kaynatılmıştır. Daha sonra bu çözelti jel tepsisine dökülüp, içerisine yükleme kuyularının oluşması için uygun tarak yerleştirilmiş ve oda sıcaklığında katılaşıncaya kadar soğutulmuştur. Jel katılaştıktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve jel elektroforez haznesine yerleştirilmiştir. Jelin kaplanması için yeterli miktarda TAE tamponu elektroforez ünitesine eklenmiştir. Örnekler birbirini izleyen kuyucuklara aşağıda belirtilen oranlarda yüklenmiştir.

- Qdot 40 ul
- HFABP IgG1-Qdot 40 ul
- Qdot 20 ul + HFABP IgG1-Qdot 20 ul (ependorf içerisinde karıştırılarak kuyucuğa yüklenmiştir.)
- NTproBNP IgG2b-Qdot 40 ul

- Qdot 20 ul + NTproBNP IgG2b-Qdot 20 ul (ependorf içerisinde karıştırılarak kuyucuğa yüklenmiştir.)
- cTnI IgG2b-Qdot 40 ul
- Qdot 20 ul + cTnI IgG2b-Qdot 20 ul (ependorf içerisinde karıştırılarak kuyucuğa yüklenmiştir.)
- rHCV-Qdot 40 ul
- Qdot 20 ul + rHCV-Qdot 20 ul (ependorf içerisinde karıştırılarak kuyucuğa yüklenmiştir.)
- GP41,GP36,P24-Qdot 40 ul
- Qdot 20 ul + GP41,GP36,P24-Qdot 20 ul (ependorf içerisinde karıştırılarak kuyucuğa yüklenmiştir.)
- HbsAg mAb1-Qdot 40 ul
- Qdot 20 ul + HbsAg mAb1-Qdot 20 ul (ependorf içerisinde karıştırılarak kuyucuğa yüklenmiştir.)

Jel haznesinin kapağı kapatılarak 98 V uygulanmıştır (Yaklaşık 25-30 dk). Bu süre sonunda akım kapatılmış elektrod ve jel haznesinin kapağı çıkartılarak jel dışarı alınmış ve UVstar Biometra (365nm) ışık üzerine yerleştirilerek fotoğrafı çekilmiştir.

3.5.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)

Qdot, rHCV (Core, NS3, NS4, & NS5) antijeni ve rHCV-Qdot bileşiklerine ait HPLC analizleri sentez ürününün yapısal analizi ve konjugasyonun kalite kontrolünde molekül ağırlığına göre ayırma sağlayan Nucleogel 40:8-OH gel permeation kromatografik kolonu kullanılarak kolon fırını (Shimadzu CTO-10ASvp) ve düşük basınçlı dörtlü pompa üzerinde UV-VIS (SPD-10A/V) dedektörü, diyod array dedektörü (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), fraksiyon kollektörü (FRC-10A) ile otomatik örnekleyici (SIL-20A HT) içeren Shimadzu LC-10Atvp (SPD-10AV) sistemi kullanılmıştır. Floresan Dedektör Ex:475 nm, Em: 540 nm ,UV dedektörü:300 nm, Enjeksiyon hacmi:60 ul, akış hızı:1 ml/dk koşullarında uygulanılmıştır.

3.5.4. ¹³¹I ile Radyoişaretlenme Çalışmaları

¹³¹I ile işaretleme çalışmaları için iodojen yöntemi kullanılmıştır. 250 µg iodojen 250 µL diklorometanda çözülmüş ve cam tüplerin içine konulmuştur. Daha sonra bu tüpler diklorometanın buharlaşması için 1 gün boyunca oda

sıcaklığında bekletilmiştir ve bu şekilde iodojenin cam yüzeyine bir film tabakası şeklinde kaplanması sağlanmıştır. Bu film kaplı tüplere 100 µL örnek ve 100 µCi ^{131}I ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilerek radyoiyodinyasyon gerçekleştirilmiştir. İşaretli bileşiğe ait bağlanma verimi TLRC yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.4.1. İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC)

TLRC için kalınlıkları 0.1 mm olan 20 x 20 cm selülozla kaplı plastik tabakalar kullanılmış ve bu kağıtlar 1.50 x 10 cm'lik şeritler halinde kesilmiştir. Hazırlanan şeritlerin üzerine tabandan 1 cm yukarıya kapiler yardımıyla 2'şer ul radyoaktif bileşenler damlatılmıştır. Maddelerin uygulandığı bu şeritler içerisinde banyo çözeltisi içeren TLRC tankına konmuştur. Tanktaki çözücünün yaklaşık 8 cm kadar ilerlemesinden sonra şeritler tank içerisinden çıkartılıp oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan radyoişaretli örnekler dış yüzeyi yapışkan bir bantla kaplanarak herhangi bir kontaminasyona neden olmadan Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde bulunan TLC Scanner (Bioscan AR2000) cihazında aktivite sayımları alınmıştır. Elde edilen kromatogramlardan R_f (Relative Front) değeri ve işaretlenme verimleri tespit edilmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda verim ve R_f değerleri kıyaslanarak optimum banyo çözeltisi tespit edilmiştir. Aşağıda optimizasyonu yapılan çözelti ve oranları açıklanmıştır.

TLRC-1: n-bütanol/etil alkol/0,2N NH_4OH (5:2:1)

TLRC-2: n-bütanol/distile su/asetik asit (4:2:1)

TLRC-3: izopropil alkol/n-bütanol/0,2N NH_4OH (4:2:1)

3.5.5. Fotostabilite Çalışması

Karanlıkta 4 °C'de depolanan rHCV-Qdot, GP41,GP36,P24-Qdot, HbsAg mAb1-Qdot, cTnI IgG2b-Qdot, hFABP IgG1-Qdot, NT-proBNP IgG2b-Qdot konjugatların fotostabilitesi 30 gün boyunca floresans yoğunluğu ölçülerek izlenmiştir. Ölçümler 2µl örnek hacmi kullanılarak Nanodrop3300 spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca antijen/antikor konjugasyonunun CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların floresansı üzerindeki etkisinde bu cihaz ile elde edilen floresan spektrumlarındaki RFU (relative fluorescence units) değerleri karşılaştırılarak incelenmiştir.

3.6. Tanı Kitinin Tasarlanması

3.6.1. Antikor/Antijen Konjuge Kuantum Noktaların Konjugat Ped Yüzeyine İmmobilizasyonu

Konjugat pede, test ve kontrol çizgisini görünür hale getirebilmek için test ve kontrol çizgisine emdirilen monoklonal/poliklonal antikor veya antijenlerle etkileşime girecek floresan özellik gösteren monoklonal antikor veya antijenlerle konjuge kuantum noktalar uygulanmıştır. Uygulamadan önce Antikor/Antijen Kuantum nokta konjugatların içerisine %20 süktroz ve %5 trehaloz olacak şekilde şeker ilavesi yapılmıştır. Her test için spesifik antijen/antikorlar ile konjuge kuantum noktalar aşağıda **Çizelge 3.1** verilmiştir.

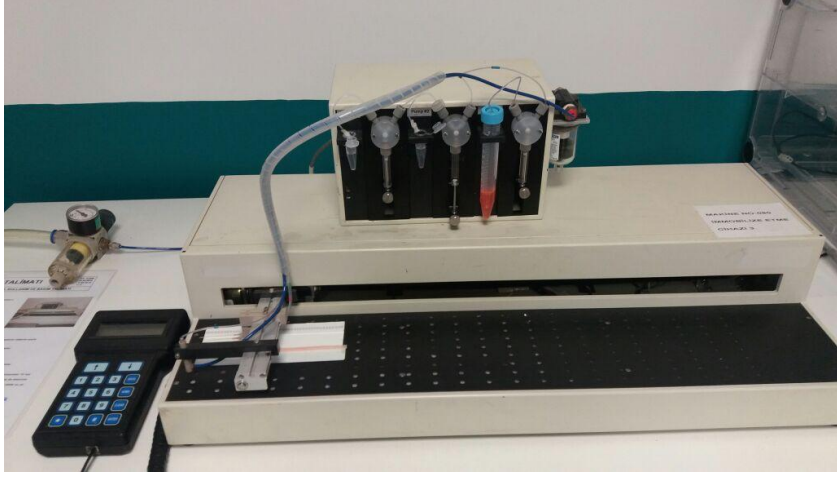
Çizelge 3.1 Konjugat pede immobilize edilen antikor/antijen-Qdot

Test Kiti	Konjugat Ped
HCV	rHCV coctail (Core, NS3, NS4, & NS5) soluble for conjugate (AGHCV-0232) -Qdot
HIV	GP41,GP36,P24 coctail - Qdot
HbsAg	HbsAg mAb1- Qdot
Troponin I	19C7 (IgG2b for MAbs)- Qdot
hFABP	10E1 (IgG1 for MAbs) - Qdot
NT-proBNP	15F11 (IgG2b for MAbs)- Qdot

Antikor/Antijen Konjuge Kuantum Noktaların Konjugat Ped Yüzeyine İmmobilizasyon için 2 yöntem kullanılmıştır;

Emdirme metodu : Bu yöntemde mikropipet yardımıyla alınan kuantum nokta-antikor/antijen konjugatlar (Çizelge 3.1) 0,5 cm x 30 cm konjugat ped (Release Matrix,PT1-05) (Nupore) yüzeyine 135 ul olacak şekilde uygulanmıştır. 37 ° C de etüv içerisinde gece boyu kurumaya bırakılmıştır.

Dispenser ile spreyleme metodu : Bu metod için Imagene IsoFlow Dispenser kullanılmıştır. Kuantum nokta-antikor/antijen konjugatlar .(Çizelge 3.1) 0,5 cm x 30 cm konjugat ped (Release Matrix,PT1-05) (Nupore) yüzeyine 135 ul olacak şekilde dispenser ile uygulanmıştır ve 37 ° C de etüv içerisinde gece boyu kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 3.4 Imagene IsoFlow Dispenser ile Spreyleme metodu

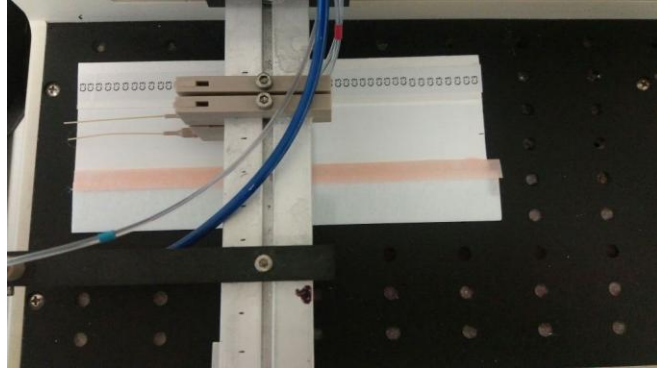
3.6.2. Antikor/Antijenlerin Membran Yüzeyine İmmobilizasyonu

Uygun nitroselüloz membranın belirlenmesi için farklı por çaplarında membranlar kullanılmıştır. Geliştirilecek test için Nupore LFNC-C 8 μm , 10 μm , 12 μm , Nupore LFNC-H 15 μm , Whatman immunopore FP, MDİ CNPC-SS12 10 μm , 12 μm , 15 μm , Sartorius CN140 10 μm por çapına sahip nitroselüloz membranlar üzerinde eşit hacimli örnek numunelerin ilerleme süreleri test edilmiştir.

Nitroselüloz membran yüzeyine T ve C çizgileri Imagene IsoFlow yardımıyla immobilize edilmiştir. Dispenserın çalışma koşulları aşağıdaki Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Dispenser çalışma koşulları

Movement :	Pump 1 (Tçizgisi)	Pump 2 (C çizgisi)
Dispence distend 300 mm	Dispence Rate: 0,1 (ul/mm)	Dispence Rate: 0,1 (ul/mm)
Dispence speed (mm/s) 28	Aspirate Rate: 50	Aspirate Rate: 50
Return speed 300 mm/s	Start Pause: -0,1	Start Pause: -0,1
Start position 0	Stop Pause: 0	Stop Pause: 0
Return pause 0.05 s	250	250
Lower nozzles 0,5	İn volume 40	İn volume 40
Raise nozzles 0,5	Out volume 50	Out volume 50



Şekil 3.5 Imagene IsoFlow Dispenser ile T ve C çizgilerinin immobilizasyonu

3.6.2.1. T çizgi Antikor/Antijenlerin İmmobilizasyonu

Nitroselüloz membrana, T çizgisini oluşturabilmek için konjugat pade emdirilen antijen/antikor ile konjuge kuantum noktaların tutunabileceği spesifik rekombinant antijenler veya monoklonal antikorlar emdirilmiştir. Her test için spesifik antijen/antikorlar Çizelge 3.3’de verilmiştir. Membranın protein bağlama kapasitesi yaklaşık 4 mg/ml dir. Her test için emdirilen antikor miktarı istenilen sinyalin alınması için optimize edilmiştir. 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3 mg/ml, 3,5 mg/ml ve 4 mg/ml konsantrasyonda antikorlar nitroselüloz membranın T çizgisi alanına Imagene IsoFlow dispenser ile emdirilmiş ve pozitif kontroller ile denemeler gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3 Test çizgisine immobilize edilen antikor/antijen

Test Kiti	Test Çizgisi
HCV	rHCV coctail (Core, NS3, NS4, & NS5) soluble for capture (AGHCV-0231) (2 mg/ml)
HIV	GP41,GP36,P24 coctail (2 mg/ml)
HbsAg	HbsAg mAb2 (2 mg/ml)
Troponin I	4C2 (IgG2a for MAbs) (2 mg/ml)
hFABP	9F3 (IgG1 for MAbs) (2 mg/ml)
NT-proBNP	24E11 (IgG2a for MAbs) (2 mg/ml)

3.6.2.2. C çizgi Antikor/Antijenlerin İmmobilizasyonu

Nitroselüloz membrana, C çizgisini oluşturabilmek için konjugat pade emdirilen antijen/antikor ile konjuge kuantum noktaların tutunabileceği monoklonal/poliklonal antikorlar konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde emdirilmiştir. Teste göre C çizgisine emdirilen antikorlar çizelge 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Kontrol çizgisine immobilize edilen antikor/antijen

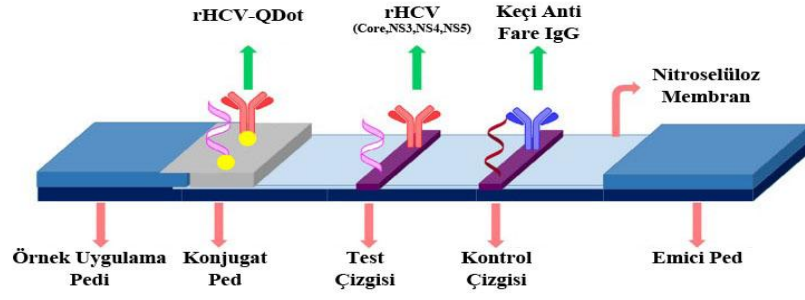
Test Kiti	Kontrol çizgisi
HCV	Keçi anti fare IgG (ABGAM-500) (1 mg/ml)
HIV	Keçi anti fare IgG (ABGAM-500) (1 mg/ml)
HbsAg	Keçi anti fare IgG (ABGAM-500) (1 mg/ml)
Troponin I	Keçi anti fare IgG (ABGAM-500) (1 mg/ml)
NT-proBNP	Keçi anti fare IgG (ABGAM-500) (1 mg/ml)
hFABP	Keçi anti fare IgG (ABGAM-500) (1 mg/ml)

3.6.2.3. Nitroselüloz Membranın Bloklanması

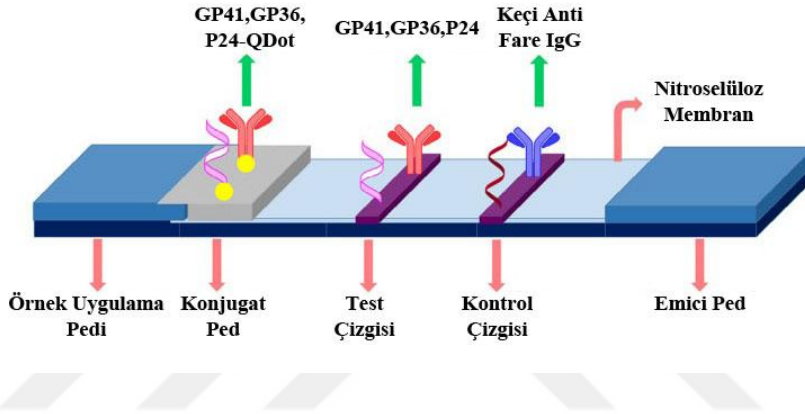
Nitroselüloz membran, T ve C çizgisi antikor/antijenleri immobilize edildikten sonra % 4 sükröz, % 0,5 BSA içeren PBS PH:7.4 blok solüsyon içerisine daldırılmıştır. 30 dk 37 ° C de bloklama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra blok solüsyon içerisinden çıkartılarak 37 ° C de gece boyu inkübasyona devam edilmiştir.

3.6.3. Test Komponentlerinin Birleştirilmesi (Laminasyon)

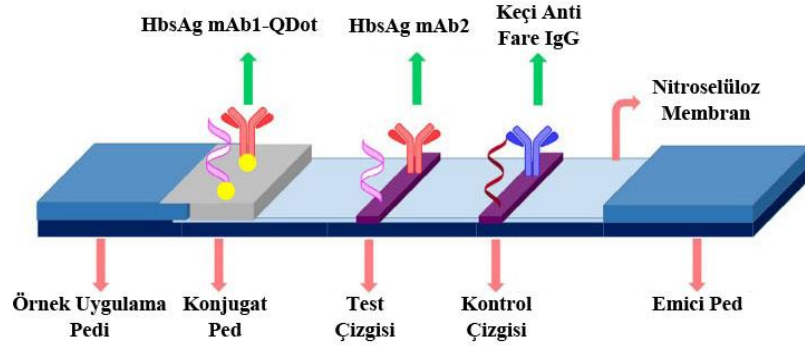
Test komponentlerinin laminasyonu nemin %25 olduğu ortamda gerçekleştirilmiştir. Örnek uygulama pedi 0,5 cm konjugat ped üzerine , konjugat ped ve emici ped 0,5 cm nitrosülüloz membran üzerine gelecek şekilde sırtlık üzerine yerleştirilmiştir. Laminasyonu yapılan tabakalar 0,3 mm olacak şekilde kesilmiştir.



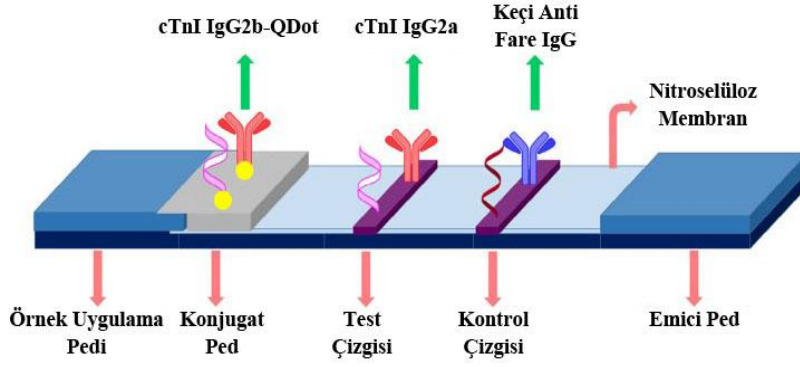
Şekil 3.6 HCV tanı kiti tasarımı



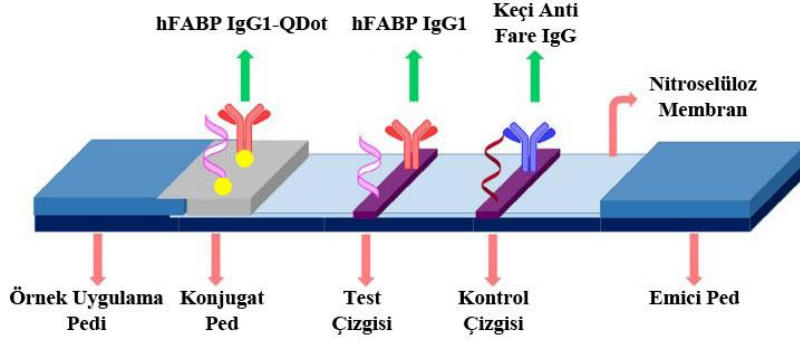
Şekil 3.7 HIV tanı kiti tasarımı



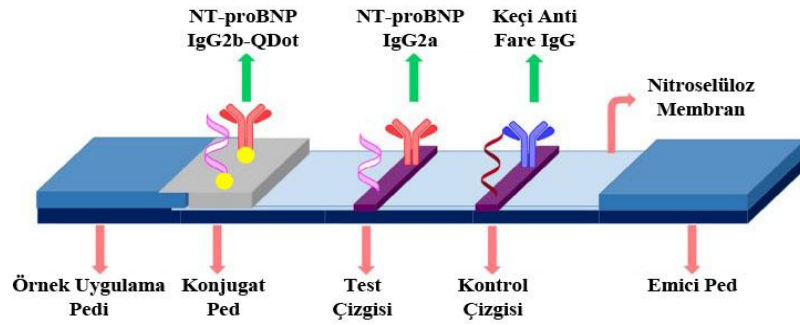
Şekil 3.8 HbsAg tanı kiti tasarımı



Şekil 3.9 Troponin I tanı kiti tasarımı



Şekil 3.10 hFABP tanı kiti tasarımı



Şekil 3.11 NT-proBNP tanı kiti tasarımı

3.7. Tanı Kitinin Standardizasyon ve Validasyonu

3.7.1. Qdot-HCV Tanı kiti

Anti-HCV testi, HCV genomunun korunmuş sekansları olan Core, NS3, NS4, NS5 gen bölgeleri tarafından kodlanan antijenlere karşı geliştirilen antikorların insan serum ya da plazmasında kalitatif olarak tespitinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

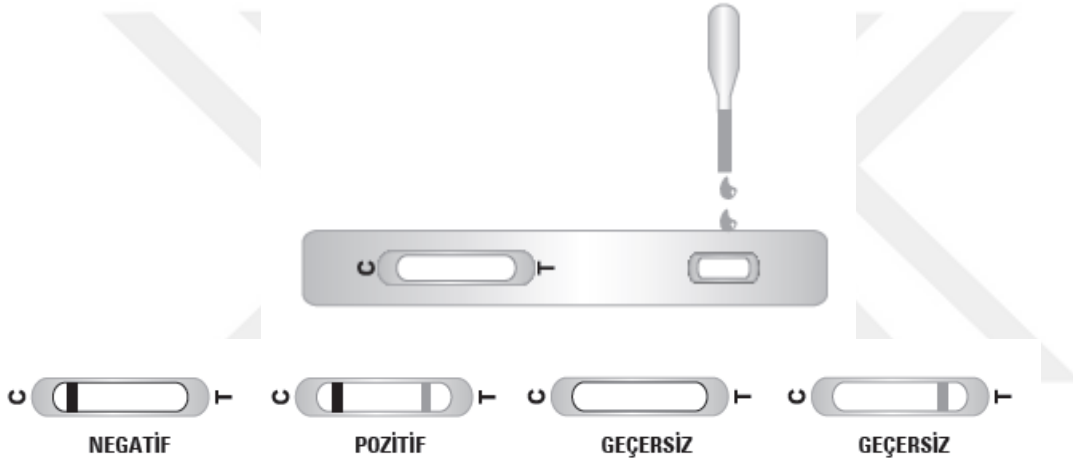
Numune, örnek uygulama pedine damlatılmıştır. Eğer örnekte anti-HCV bulunuyorsa anti-HCV, kuantum noktalar ile konjuge edilmiş rekombinant HCV antijenlerine bağlanır. Bu kompleks birlikte “T” test çizgisine ilerler. Kuantum noktalar ile konjuge edilen hareketli rekombinant HCV antijenlerine bağlanan anti-HCV antikorları “T” test çizgisindeki rekombinant HCV antijenlerine bağlanarak immobilize olur ve “T” test çizgisinde kuantum noktaların birikmesine bağlı, pozitif test sonucunu belirten floresan özellikte bir test çizgisi oluşmasına sebep olur. Eğer numunede anti-HCV yoksa numune, (serbest) kuantum noktalar ile konjuge edilmiş rekombinant HCV antijenleri ile birlikte “T” test alanına doğru hareket eder. Immobilize edilmiş HCV antijenleri mobilize kuantum noktalar ile konjuge edilmiş HCV antijenlerine bağlanamaz ve “T” test alanında floresan özellikte bir çizgi oluşmaz. Bu da negatif test sonucunu gösterir. Örnekte anti-HCV varlığına bağlı olmaksızın kuantum noktalar ile konjuge edilmiş rekombinant HCV antijenleri, numune “C” kontrol alanından geçerken, “C” kontrol alanında immobilize edilmiş keçi anti-fare IgG poliklonal antikorlarına bağlanır. Bu sebeple kuantum noktaların “C” kontrol alanında birikmesine bağlı olarak UV altında test sonucunun geçerli olduğunu gösteren floresan özellikte bir kontrol çizgisi oluşur. Her koşulda “C” kontrol alanında renkli bir çizgi oluşmalıdır, eğer “C” kontrol alanında gözle görülebilir renkli bir çizgi yok ise test sonucu geçersiz olarak yorumlanır.

Test uygulama prosedürü: Test ve serum / plazma numuneleri oda sıcaklığına getirilmiştir. Serum / plazma damlalık ile çekilmiş ve tanı kitinin örnek uygulama kısmına 2 damla (60 µl) damlatılmıştır ve emilimi beklenmiştir. Sonuçlar 15 dakika içerisinde okunmuştur. . Anti-HCV tanı kitlerinin kontrolü için Seracare 300 S/CO, Seracare 5 S/CO pozitif kontrol, Seracare HBsAg pozitif-HCV negatif kontrol, Seracare HIV pozitif-HCV negatif, Seracare HBsAb pozitif-HCV negatif kontrol ve Trina Negatif kontrol kullanılmıştır. Ayrıca testler SFTS 1997 HCV panel (50 üye) ile test edilmiştir.

Negatif : Sadece “C” alanında bir renkli çizgi görülmesi hepatit C antikorlarının var olmadığını gösterir.

Pozitif : “C” ve “T” alanlarında birer renkli çizgi görülmesi, hepatit C antikorlarının varlığını gösterir. Düşük konsantrasyonlardaki hepatit C yüzey antikorları “T” alanında silik bir çizgi oluşmasına sebep olabilir.“T” alanında silik bir çizgi dahi görülmesi “pozitif” olarak yorumlanmalıdır.

Geçersiz: Hiçbir renkli çizgi görünmüyor ya da sadece “T” alanında renkli bir çizgi görünüyorsa test geçersizdir. C çizgisinin oluşmaması genellikle yetersiz numune kullanımı ya da test prosedürünün yanlış uygulanmasından kaynaklanır.



Şekil 3.12 HCV tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi

3.7.2. Qdot-HIV Tanı kiti

Anti-HIV testi, HIV (gp41, gp36, p24) antijenlere karşı geliştirilen antikorların insan serum ya da plazmasında kalitatif olarak tespitinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Numune, örnek uygulama pedine damlatılmıştır. Eğer örnekte anti-HIV bulunuyorsa anti-HIV, kuantum noktalar ile konjuge edilmiş rekombinant HIV antijenlerine bağlanır. Bu kompleks birlikte “T” test çizgisine ilerler. Kuantum noktalar ile konjuge edilen hareketli rekombinant HIV antijenlerine bağlanan anti-HIV antikorları “T” test çizgisindeki rekombinant HIV antijenlerine bağlanarak immobilize olur ve “T” test çizgisinde kuantum noktaların birikmesine bağlı, pozitif test sonucunu belirten floresan özellikte bir test çizgisi oluşmasına sebep

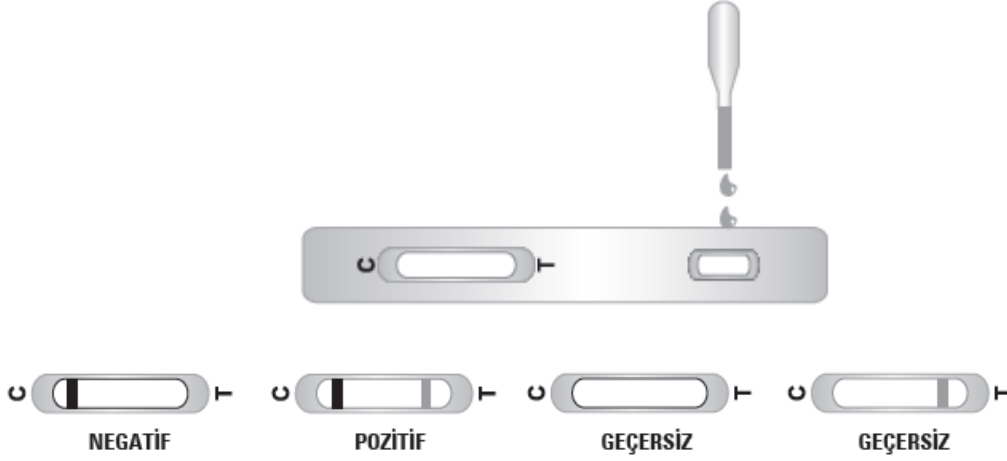
olur. Eğer numunede anti-HIV yoksa numune, (serbest) kuantum noktalar ile konjuge edilmiş rekombinant HIV antijenleri ile birlikte “T” test alanına doğru hareket eder. İmmobilize edilmiş HIV antijenleri mobilize kuantum noktalar ile konjuge edilmiş HIV antijenlerine bağlanamaz ve “T” test alanında floresan özellikte bir çizgi oluşmaz. Bu da negatif test sonucunu gösterir. Örnekte anti-HIV varlığına bağlı olmaksızın kuantum noktalar ile konjuge edilmiş rekombinant HIV antijenleri, numune “C” kontrol alanından geçerken, “C” kontrol alanında immobilize edilmiş keçi anti-fare IgG poliklonal antikorlarına bağlanır. Bu sebeple kuantum noktaların “C” kontrol alanında birikmesine bağlı olarak UV altında test sonucunun geçerli olduğunu gösteren floresan özellikte bir kontrol çizgisi oluşur. Her koşulda “C” kontrol alanında renkli bir çizgi oluşmalıdır, eğer “C” kontrol alanında gözle görülebilir renkli bir çizgi yok ise test sonucu geçersiz olarak yorumlanır.

Test uygulama prosedürü: Test ve serum / plazma numuneleri oda sıcaklığına getirilmiştir. Serum / plazma damlalık ile çekilmiş ve tanı kitinin örnek uygulama kısmına 2 damla (60 µl) damlatılmıştır ve emilimi beklenmiştir. Sonuçlar 15 dakika içerisinde okunmuştur. Anti-HIV tanı kitlerinin kontrolü için Seracare 200 S/CO, Seracare 3.2 S/CO pozitif kontrol, Seracare HCV pozitif-HIV negatif kontrol ve Trina Negatif kontrol kullanılmıştır. Ayrıca testler SFTS 2006 HIV panel (40 üye) ile test edilmiştir.

Negatif : Sadece “C” alanında bir renkli çizgi görülmesi HIV antikorlarının var olmadığını gösterir.

Pozitif : “C” ve “T” alanlarında birer renkli çizgi görülmesi, HIV antikorlarının varlığını gösterir. Düşük konsantrasyonlardaki HIV antikorları “T” alanında silik bir çizgi oluşmasına sebep olabilir. “T” alanında silik bir çizgi dahi görülmesi “pozitif” olarak yorumlanmalıdır.

Geçersiz: Hiçbir renkli çizgi görünmüyor ya da sadece “T” alanında renkli bir çizgi görünüyorsa test geçersizdir. C çizgisinin oluşmaması genellikle yetersiz numune kullanımı ya da test prosedürünün yanlış uygulanmasından kaynaklanır.



Şekil 3.13 HIV tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi

3.7.3. Qdot-HbsAg Tanı Kiti

HbsAg testi, Hepatit B Virüsü yüzey antijenlerinin insan serum ya da plazmasında kalitatif olarak tespitinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

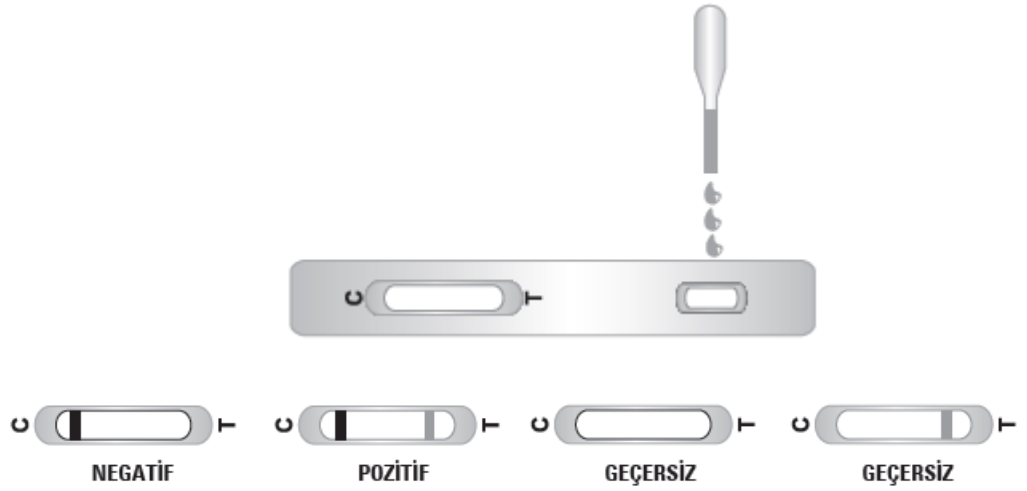
Numune, örnek uygulama pedine damlatılmıştır. Eğer örnekte HbsAg bulunuyorsa HbsAg, kuantum noktalar ile konjuge edilmiş anti-HBs monoklonal antikorlarına bağlanır. Bu kompleks birlikte “T” test çizgisine ilerler. Kuantum noktalar ile konjuge edilen hareketli anti-HBs antikorlarına bağlanan HbsAg “T” test çizgisindeki anti-HBs monoklonal antikorlarına bağlanarak immobilize olur ve “T” test çizgisinde kuantum noktaların birikmesine bağlı, pozitif test sonucunu belirten floresan özellikte bir test çizgisi oluşmasına sebep olur. Eğer numunede HbsAg yoksa numune, (serbest) kuantum noktalar ile konjuge edilmiş anti-HBs antikorları ile birlikte “T” test alanına doğru hareket eder. İmmobilize edilmiş anti-HBs antikorları mobilize kuantum noktalar ile konjuge edilmiş anti-HBs antikorlarına bağlanamaz ve “T” test alanında floresan özellikte bir çizgi oluşmaz. Bu da negatif test sonucunu gösterir. Örnekte HbsAg varlığına bağlı olmaksızın kuantum noktalar ile konjuge edilmiş anti-HBs antikorları, numune “C” kontrol alanından geçerken, “C” kontrol alanında immobilize edilmiş keçi anti-fare IgG poliklonal antikorlarına bağlanır. Bu sebeple kuantum noktaların “C” kontrol alanında birikmesine bağlı olarak UV altında test sonucunun geçerli olduğunu gösteren floresan özellikte bir kontrol çizgisi oluşur. Her koşulda “C” kontrol alanında renkli bir çizgi oluşmalıdır, eğer “C” kontrol alanında gözle görülebilir renkli bir çizgi yok ise test sonucu geçersiz olarak yorumlanır.

Test uygulama prosedürü: Test ve serum / plazma numuneleri oda sıcaklığına getirilmiştir. Serum / plazma damlalık ile çekilmiş ve tanı kitinin örnek uygulama kısmına 3 damla (100 µl) damlatılmıştır ve emilimi beklenmiştir. Sonuçlar 15 dakika içerisinde okunmuştur. HBsAg tanı kitlerinin kontrolü için Seracare Inc. 1000 iu/ml, 500 iu/ml, 250 iu/ml, 100 iu/ml, 50 iu/ml, 9 iu/ml ve 4.5 iu/ml HbsAg pozitif kontrol, Seracare HCV pozitif-HBsAg negatif, HIV pozitif-HBsAg negatif, HbsAb pozitif-HBsAg negatif kontrol ve Trina Negatif kontrol kullanılmıştır.

Negatif : Sadece “C” alanında bir renkli çizgi görülmesi hepatit B yüzey antijenlerinin var olmadığını gösterir.

Pozitif : “C” ve “T” alanlarında birer renkli çizgi görülmesi, hepatit B yüzey antijenlerinin varlığını gösterir. Düşük konsantrasyonlardaki hepatit B yüzey antijenleri “T” alanında silik bir çizgi oluşmasına sebep olabilir.“T” alanında silik bir çizgi dahi görülmesi “pozitif” olarak yorumlanmalıdır.

Geçersiz: Hiçbir renkli çizgi görünmüyor ya da sadece “T” alanında renkli bir çizgi görünüyorsa test geçersizdir. C çizgisinin oluşmaması genellikle yetersiz numune kullanımı ya da test prosedürünün yanlış uygulanmasından kaynaklanır.



Şekil 3.14 HbsAG tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi

3.7.4. Qdot-Troponin I (cTnI) Tanı Kiti

Troponin I testi, miyokardiyal enfarktüs'ün (ME) teşhisine yardımcı olmak amacıyla, insan serum/ plazma da kardiyak Troponin I'nın kalitatif tespitinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Numune, örnek uygulama pedine damlatılmıştır. Eğer örnekte Troponin I bulunuyorsa Troponin I, kuantum noktalar ile konjuge edilmiş cTnI antikoruna bağlanır. Bu kompleks birlikte “T” test çizgisine ilerler. Kuantum noktalar ile konjuge edilen hareketli cTnI antikoruna bağlanan Troponin I “T” test çizgisindeki cTnI antikoruna bağlanarak immobilize olur ve “T” test çizgisinde kuantum noktaların birikmesine bağlı, pozitif test sonucunu belirten floresan özellikte bir test çizgisi oluşmasına sebep olur. Eğer numunede Troponin I yoksa numune, (serbest) kuantum noktalar ile konjuge edilmiş cTnI antikoruna ile birlikte “T” test alanına doğru hareket eder. Immobilize edilmiş cTnI antikoru mobilize kuantum noktalar ile konjuge edilmiş cTnI antikoruna bağlanamaz ve “T” test alanında floresan özellikte bir çizgi oluşmaz. Bu da negatif test sonucunu gösterir. Örnekte Troponin I varlığına bağlı olmaksızın kuantum noktalar ile konjuge edilmiş cTnI antikoru, numune “C” kontrol alanından geçerken, “C” kontrol alanında immobilize edilmiş keçi anti-fare IgG poliklonal antikorlarına bağlanır. Bu sebeple kuantum noktaların “C” kontrol alanında birikmesine bağlı olarak UV altında test sonucunun geçerli olduğunu gösteren floresan özellikte bir kontrol çizgisi oluşur. Her koşulda “C” kontrol alanında renkli bir çizgi oluşmalıdır, eğer “C” kontrol alanında gözle görülebilir renkli bir çizgi yok ise test sonucu geçersiz olarak yorumlanır.

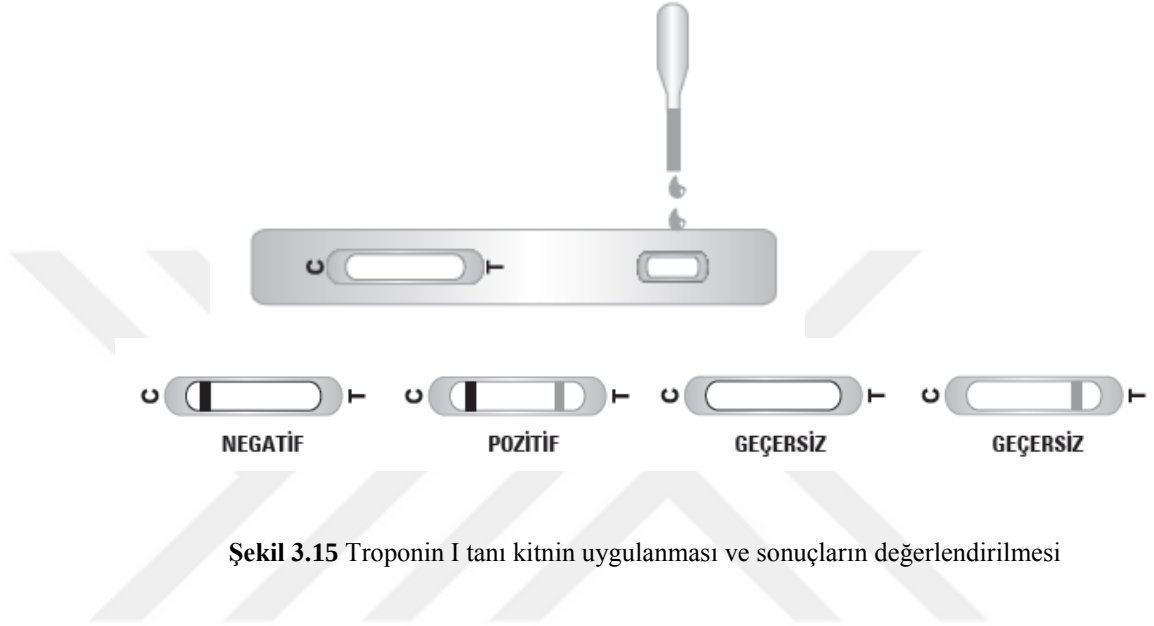
Test uygulama prosedürü: Test ve serum / plazma numuneleri oda sıcaklığına getirilmiştir. Serum / plazma damlalık ile çekilmiş ve tanı kitinin örnek uygulama kısmına 2 damla (60 µl) damlatılmıştır ve emilimi beklenmiştir. Sonuçlar 15 dakika içerisinde okunmuştur. Troponin I tanı kitlerinin kontrolü için Trina inc. Troponin I 1000 ng/ml pozitif kontrol, 5 ng/ml pozitif kontrol ve Trina Negatif kontrol kullanılmıştır.

Negatif : Sadece “C” alanında bir renkli çizgi görülmesi Troponin I'nın var olmadığını gösterir.

Pozitif : “C” ve “T” alanlarında birer renkli çizgi görülmesi, Troponin I varlığını gösterir. Düşük konsantrasyonlardaki Troponin I “T” alanında silik bir

çizgi oluşmasına sebep olabilir. “T” alanında silik bir çizgi dahi görülmesi “pozitif” olarak yorumlanmalıdır.

Geçersiz: Hiçbir renkli çizgi görünmüyor ya da sadece “T” alanında renkli bir çizgi görünüyorsa test geçersizdir. C çizgisinin oluşmaması genellikle yetersiz numune kullanımı ya da test prosedürünün yanlış uygulanmasından kaynaklanır.



Şekil 3.15 Troponin I tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi

3.7.5. Qdot-hFABP Tanı Kiti

Akut miyokardiyal enfarktüs'ün (AMI) erken teşhisine yardımcı olmak amacıyla, insan serum/ plazma sında hFABP 'ın kalitatif tespitinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Numune, örnek uygulama pedine damlatılmıştır. Eğer örnekte hFABP bulunuyorsa hFABP, kuantum noktalar ile konjuge edilmiş hFABP antikoruna bağlanır. Bu kompleks birlikte “T” test çizgisine ilerler. Kuantum noktalar ile konjuge edilen hareketli hFABP antikoruna bağlanan hFABP “T” test çizgisindeki hFABP antikoruna bağlanarak immobilize olur ve “T” test çizgisinde kuantum noktaların birikmesine bağlı, pozitif test sonucunu belirten floresan özellikte bir test çizgisi oluşmasına sebep olur. Eğer numunede hFABP yoksa numune, (serbest) kuantum noktalar ile konjuge edilmiş hFABP antikoru ile birlikte “T” test alanına doğru hareket eder. Immobilize edilmiş hFABP antikoru mobilize kuantum noktalar ile konjuge edilmiş hFABP antikoruna bağlanamaz ve “T” test alanında floresan özellikte bir çizgi oluşmaz. Bu da negatif test sonucunu gösterir. Örnekte hFABP varlığına bağlı olmaksızın kuantum noktalar ile konjuge edilmiş

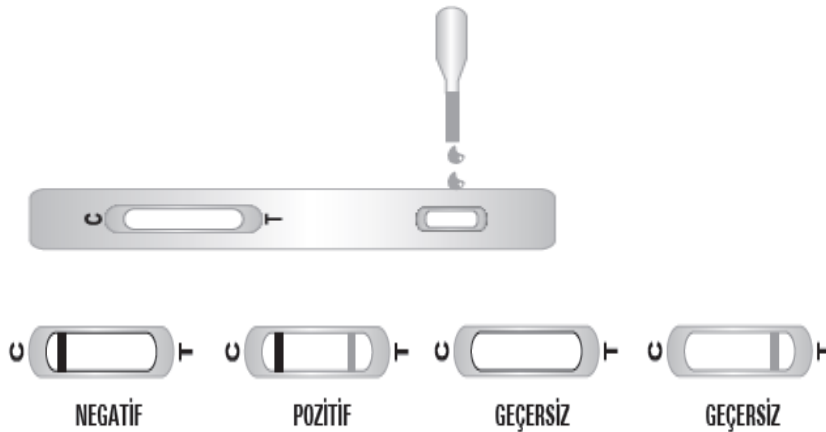
hFABP antikoru, numune “C” kontrol alanından geçerken, “C” kontrol alanında immobilize edilmiş keçi anti-fare IgG poliklonal antikorlarına bağlanır. Bu sebeple kuantum noktaların “C” kontrol alanında birikmesine bağlı olarak UV altında test sonucunun geçerli olduğunu gösteren floresan özellikte bir kontrol çizgisi oluşur. Her koşulda “C” kontrol alanında renkli bir çizgi oluşmalıdır, eğer “C” kontrol alanında gözle görülebilir renkli bir çizgi yok ise test sonucu geçersiz olarak yorumlanır.

Test uygulama prosedürü: Test ve serum / plazma numuneleri oda sıcaklığına getirilmiştir. Serum / plazma damlalık ile çekilmiş ve tanı kitinin örnek uygulama kısmına 2 damla (60 µl) damlatılmıştır ve emilimi beklenmiştir. Sonuçlar 15 dakika içerisinde okunmuştur. hFABP tanı kitlerinin kontrolü için Trina inc. hFABP 1000 ng/ml pozitif kontrol, 6,5 ng/ml pozitif kontrol ve Trina Negatif kontrol kullanılmıştır.

Negatif : Sadece “C” alanında bir renkli çizgi görülmesi hFABP’in var olmadığını gösterir.

Pozitif : “C” ve “T” alanlarında birer renkli çizgi görülmesi, hFABP varlığını gösterir. Düşük konsantrasyonlardaki hFABP “T” alanında silik bir çizgi oluşmasına sebep olabilir. “T” alanında silik bir çizgi dahi görülmesi “pozitif” olarak yorumlanmalıdır.

Geçersiz: Hiçbir renkli çizgi görünmüyor ya da sadece “T” alanında renkli bir çizgi görünüyorsa test geçersizdir. C çizgisinin oluşmaması genellikle yetersiz numune kullanımı ya da test prosedürünün yanlış uygulanmasından kaynaklanır.



Şekil 3.16 hFABP tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi

3.7.6. Qdot-NT-pro BNP Tanı Kiti

Konjestif Kalp Yetmezliği (CHF) erken teşhisine yardımcı olmak amacıyla, insan serum/ plazma sında NT-pro BNP 'ın kalitatif tespitinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

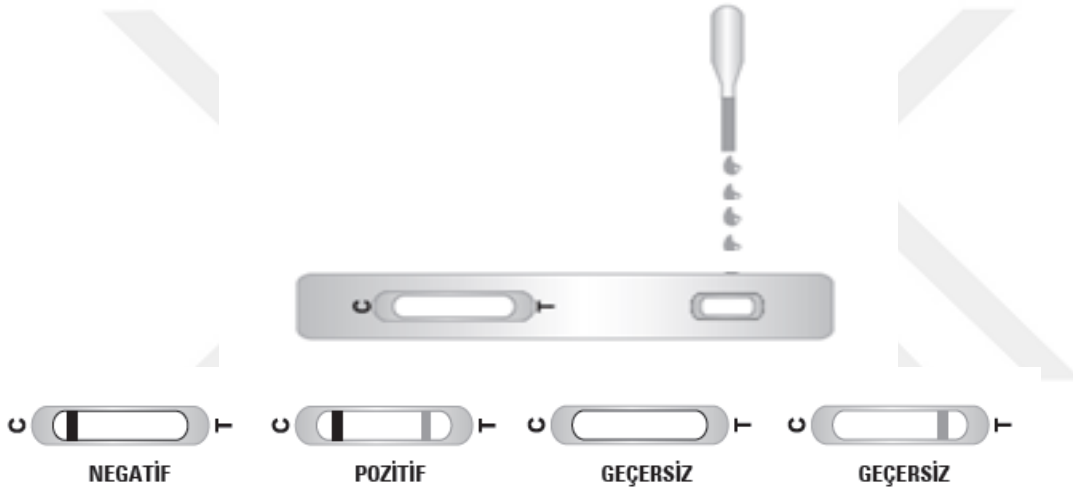
Numune, örnek uygulama pedine damlatılmıştır. Eğer örnekte NT-pro BNP bulunuyorsa NT-pro BNP, kuantum noktalar ile konjuge edilmiş NT-pro BNP antikoruna bağlanır. Bu kompleks birlikte “T” test çizgisine ilerler. Kuantum noktalar ile konjuge edilen hareketli NT-pro BNP antikoruna bağlanan NT-pro BNP “T” test çizgisindeki NT-pro BNP antikoruna bağlanarak immobilize olur ve “T” test çizgisinde kuantum noktaların birikmesine bağlı, pozitif test sonucunu belirten floresan özellikte bir test çizgisi oluşmasına sebep olur. Eğer numunede NT-pro BNP yoksa numune, (serbest) kuantum noktalar ile konjuge edilmiş NT-pro BNP antikoruna ile birlikte “T” test alanına doğru hareket eder. Immobilize edilmiş NT-pro BNP antikoruna mobilize kuantum noktalar ile konjuge edilmiş NT-pro BNP antikoruna bağlanamaz ve “T” test alanında floresan özellikte bir çizgi oluşmaz. Bu da negatif test sonucunu gösterir. Örnekte NT-pro BNP varlığına bağlı olmaksızın kuantum noktalar ile konjuge edilmiş NT-pro BNP antikoruna, numune “C” kontrol alanından geçerken, “C” kontrol alanında immobilize edilmiş keçi anti-fare IgG poliklonal antikorlarına bağlanır. Bu sebeple kuantum noktaların “C” kontrol alanında birikmesine bağlı olarak UV altında test sonucunun geçerli olduğunu gösteren floresan özellikte bir kontrol çizgisi oluşur. Her koşulda “C” kontrol alanında renkli bir çizgi oluşmalıdır, eğer “C” kontrol alanında gözle görülebilir renkli bir çizgi yok ise test sonucu geçersiz olarak yorumlanır.

Test uygulama prosedürü: Test ve serum / plazma numuneleri oda sıcaklığına getirilmiştir. Serum / plazma damlalık ile çekilmiş ve tanı kitinin örnek uygulama kısmına 4 damla (120 µl) damlatılmıştır ve emilimi beklenmiştir. Sonuçlar 15 dakika içerisinde okunmuştur. NT-pro BNP tanı kitlerinin kontrolü için Trina inc. NT-pro BNP 1000 pg/ml pozitif kontrol, 450 pg/ml pozitif kontrol, ve Trina Negatif kontrol kullanılmıştır.

Negatif : Sadece “C” alanında bir floresan çizgi görülmesi NT-pro BNP’in var olmadığını gösterir.

Pozitif : “C” ve “T” alanlarında birer renkli çizgi görülmesi, NT-pro BNP varlığını gösterir. Düşük konsantrasyonlardaki NT-pro BNP “T” alanında silik bir çizgi oluşmasına sebep olabilir.“T” alanında silik bir çizgi dahi görülmesi “pozitif” olarak yorumlanmalıdır.

Geçersiz: Hiçbir renkli çizgi görünmüyor ya da sadece “T” alanında renkli bir çizgi görünüyorsa test geçersizdir. C çizgisinin oluşmaması genellikle yetersiz numune kullanımı ya da test prosedürünün yanlış uygulanmasından kaynaklanır.



Şekil 3.17 hFABP tanı kitinin uygulanması ve sonuçların değerlendirilmesi

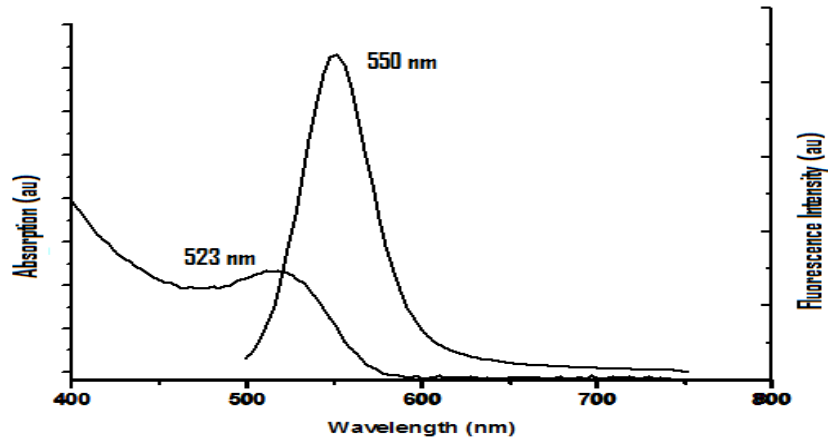
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kuantum Nokta Sentezi ve Karakterizasyonu

4.1.1. CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların Karakterizasyonu

Sentezlenen CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların optik karakterizasyonu UV-Vis Spektrometresi ve Floresans Spektrometresi ile yapısal karakterizasyonu DLS ve zeta potansiyel analizi, STEM , TEM , AFM , EDX ve XRD analizleri ile gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların optik karakterizasyonu UV-Vis Spektrometresi ve Floresans Spektrometresi (PL) ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1 Kuantum noktaların 488 nm uyarılma dalga boyunda 550 nm max floresans dalga boyuna sahip olduğunu göstermiştir. Sarı-turuncu renkte ışıma yapmaktadır. Floresans bandının Maksimum yarısi tam genişlik (FWHM) 50 nm dir. Bu da parçacık boyutlarının monodispers olduğunu göstermiştir. Emisyon ve absorbsiyon eğrilerinin maksimumlarının arasındaki dalgaboyu farkı (stokes kayması) 27 nm dir. UV-Vis ve PL pik konumu arasındaki fark (Stokes kayması), absorbsiyon spektrumu emisyon spektrumundan daha yüksek derecede etkileyen homojen olmayan genişlemeden kaynaklanmaktadır. Floresans spektrumunda herhangi bir omuz veya geniş bandın bulunmaması, kuantum noktaların kusursuz yüzey yapısına sahip olduğunu göstermiştir.



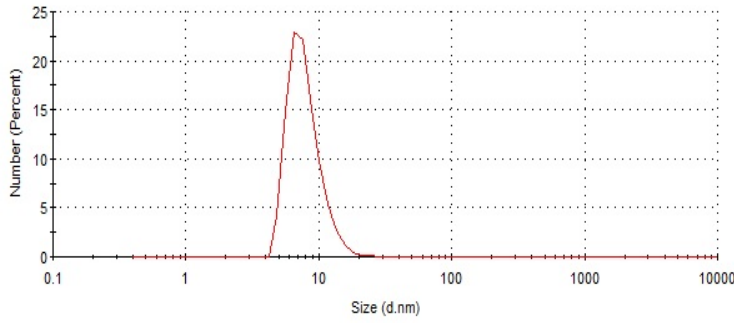
Şekil 4.1 CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta UV-Vis ve Floresans Spektrumu

CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların sentez sırasında belli reaksiyon ilerleme zamanlarında alınan örneklerin UV-Vis ve floresan spektrumları

incelendiğinde Kuantum noktaların absorpsiyon ve emisyon piklerinin uzun süren reaksiyon süresi ile sürekli olarak daha yüksek dalga boylarına kaydığı görülmüştür. Kuantum noktaların UV ışığı altındaki emisyon rengi yeşilden turuncuya doğru değişmektedir. DLS ölçümleri, floresans spektrumlarında 500 nm'den 550 nm 'ye kırmızıya doğru kaymanın, kuantum noktaların boyutlarındaki artış ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir. Floresan spektrumunun Maksimum yarısı tam genişlik yaklaşık 25-30 nm dir. Stokes kayması, daha uzun reaksiyon süreleri ile yavaş yavaş artmıştır.

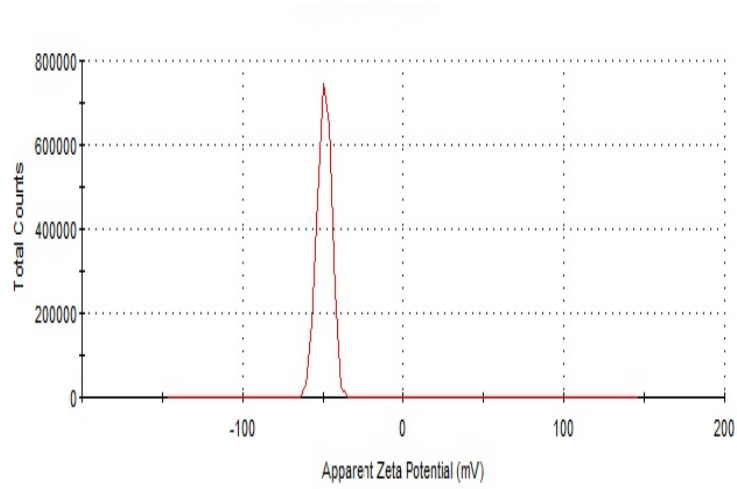
CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların emisyonun kuantum verimi 488 nm eksitasyon dalga boyunda ~40% olarak bulunmuştur.

DLS sonuçları CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların boyutunun 7.92 ± 2.42 nm (n: 5) olduğunu göstermiştir. DLS ile elde edilen sonuçlar TEM ve STEM de elde edilen sonuçlardan daha büyüktür çünkü TEM ve STEM kuantum noktaların partikül çapını ölçerken DLS hem partikül hemde hidrodinamik çapını ölçmektedir.



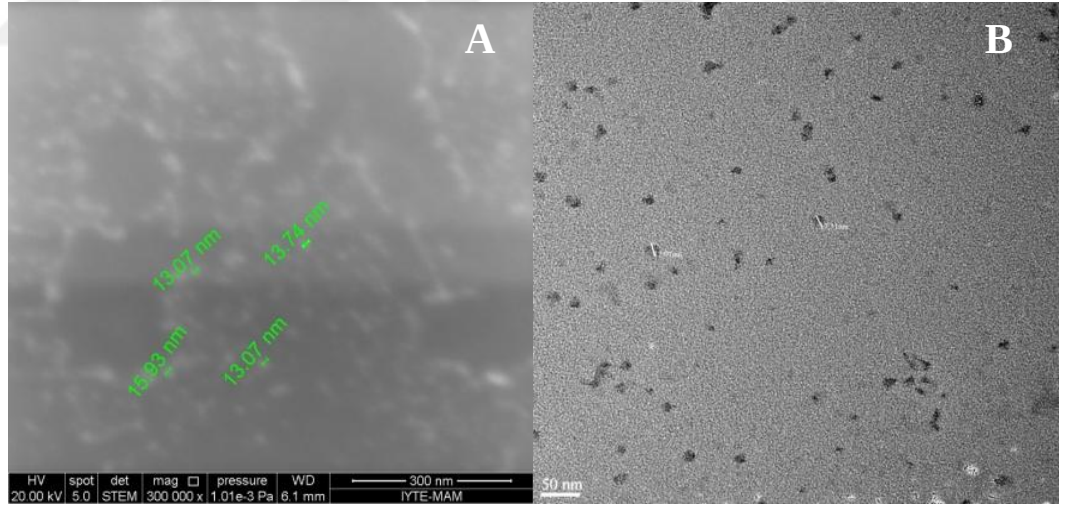
Şekil 4.2 CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta hidrodinamik çapı

CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların yük dağılımları zeta potansiyel analizi ile incelenmiştir. Zeta potansiyel analizine göre, kuantum noktaların zeta potansiyeli -49.4 ± 4.38 mV (n: 5) dir. Kuantum noktaların yüzeyi, tioglikolik asitin -COO gruplarının varlığı nedeniyle negatif yüklüdür.



Şekil 4.3 CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta zeta potansiyeli

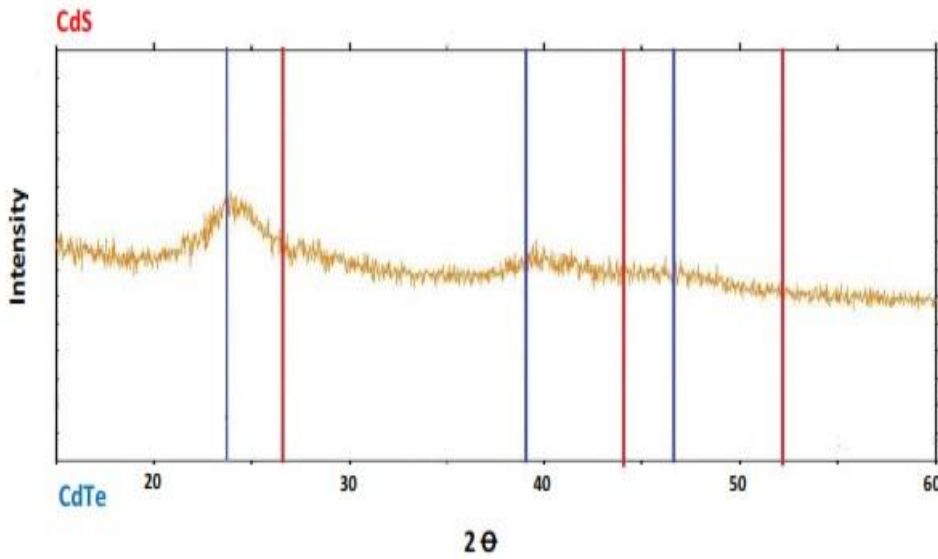
CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların STEM (A) ve TEM (B) Şekil 4.4 görüntüleri kuantum noktaların küresel yapıda, boyutlarının 10 nm civarında ve boyut dağılımının monodispers olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4 CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların STEM (A) ve TEM (B) görüntüleri

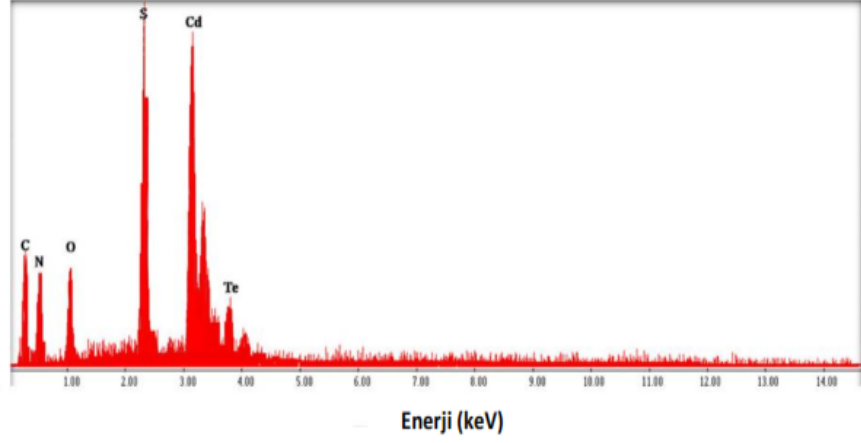
CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların kimyasal bileşimi ve kristal yapısı hakkında bilgi edinmek için XRD kullanılmıştır. Nanoparçacıkların kristal yapısını bulmak için, XRD difraktogramındaki piklerin miller indisi (hkl), Bragg Kanunu kullanılarak $n\lambda = 2d \sin\theta$ bağıntısından belirlenir. λ x-ışınlarının dalga boyu, d (hkl) düzlemler arası mesafe ve θ gelen ışın ile yansıyan ışın arasındaki açıdır.

Böylece toplam kırınım açısı 2θ 'nın, kırınımına uğrayan ışının şiddetine göre değişimini veren kırınım deseni elde edilir. Desen üzerindeki pik genişliklerine ve zemin şiddetine bakılarak malzemenin kristalleşmesi hakkında bilgi edinilebilir. Şekil 4.5 'de CdTe ve CdS karakteristik XRD kırınım deseni sırasıyla alt ve üstte gösterilmiştir. CdTe ve CdS in hkl indisleri karşılaştırılarak CdTeCdS kor/kabuk kuantum noktaların yüzey merkezli kübik olduğu tahmin edilmiştir. Kırınım desenleri literatür ile karşılaştırıldığında elde edilen kırınım piklerinin CdTeCdS'e ait olduğu tespit edilmiştir. Pan, et al. 2007 belirtildiği gibi 3 tane sırasıyla 111,220,311 kırınım pikleri CdTe'i ifade etmektedir. 111,220,311 kırınım ise CdS'ü ifade etmektedir. CdTe çekirdeği ve CdS kabuğuna sahip QDot'lar yığinsal kübik CdTe'ye benzer bir kırınım deseni sergilemektedir. CdTe / CdS QDot 'ların kristal yapısı bir çinko blend türüdür. QDot'ların XRD paterni, kübik kafesin genel düzenini andırmıştır. Kırılma eğrileri, kübik CdTe ve CdS kristalleri arasında olan daha büyük açılara kaymıştır. CdTe ve CdS kristaller arasındaki tepe noktaları, bir CdS kabuğu oluştuğunu göstermiştir.

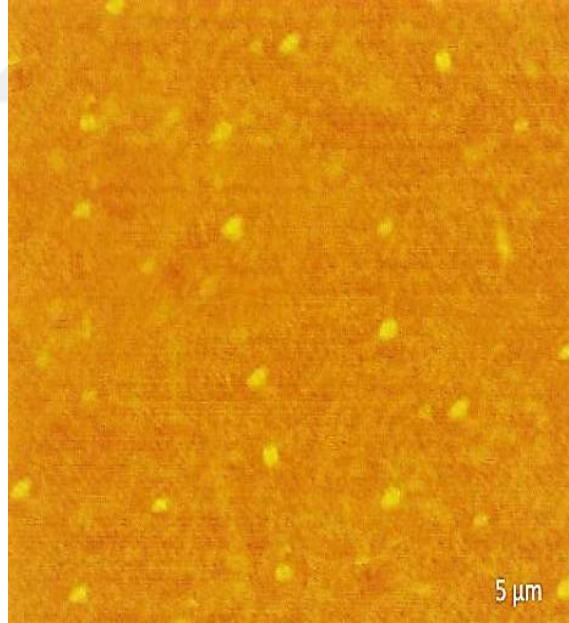


Şekil 4.5 CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta XRD deseni. Mavi çizgiler, yüzey merkezli kübik CdTe'nin hkl indisleri (sırasıyla 111,220,311) kırmızı çizgiler yüzey merkezli kübik CdS'nin hkl indisleri (sırasıyla 111,220,311) temsil eder.

CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların, AFM ve SEM-EDX analizleri gerçekleştirilmiştir. Kuantum noktaların AFM (Şekil 4.7) görüntüleri, elde edilen parçacıkların monodispers olarak büyüdüğünü göstermektedir. EDX (Şekil 4.6) haritası ayrıca Kuantum noktaların Cd, Te, S, C, O, N içerdiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 4.6 CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların EDX Dağılımı



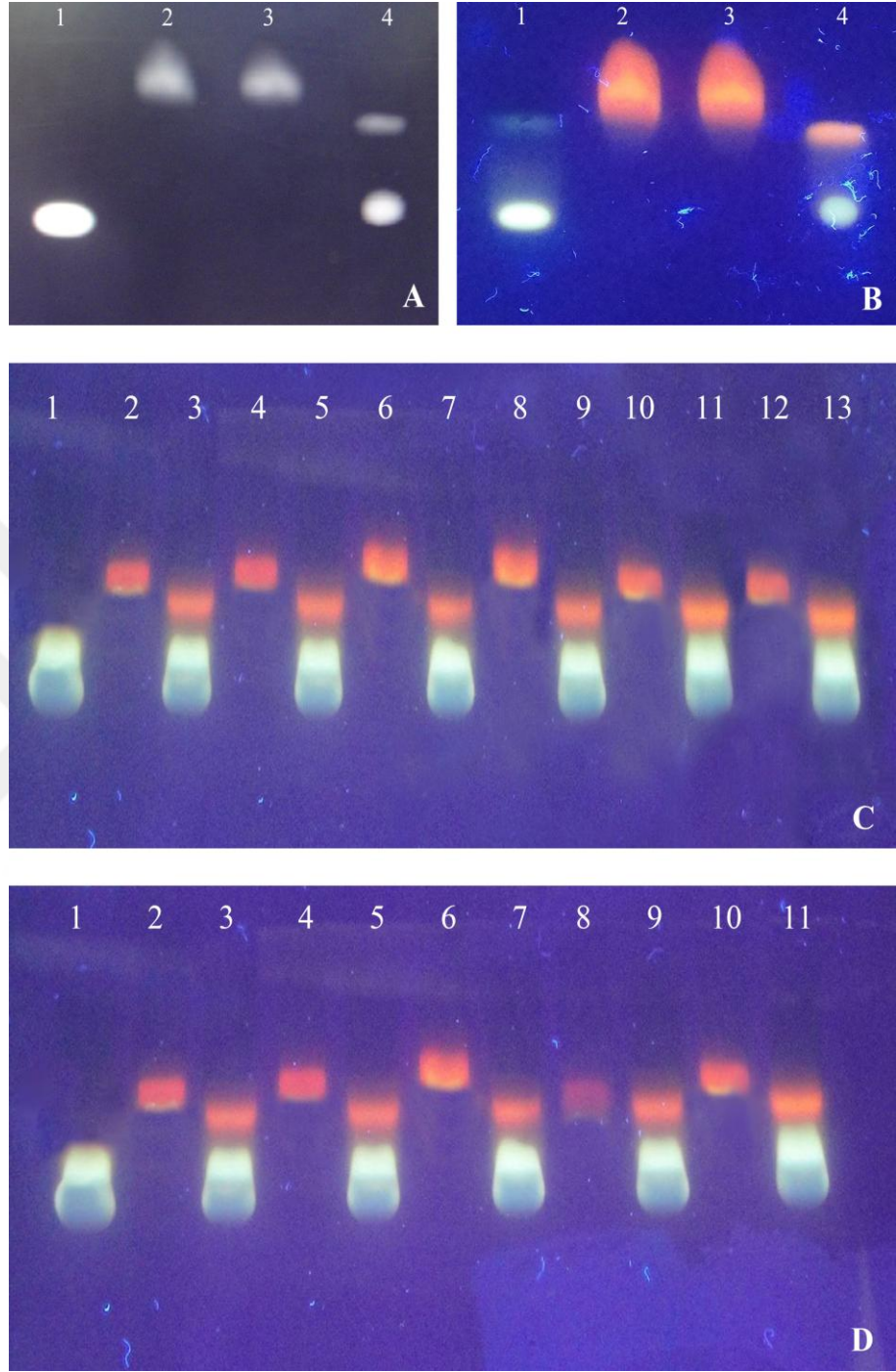
Şekil 4.7 CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların AFM görüntüleri

4.2. Konjugasyonun Kalite Kontrolü

4.2.1. Agaroz Jel Elektroforez Sonuçları

CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların HCV tanı testi için rHCV coctail soluble for conjugate ile, HIV tanı testi için GP41,GP36,P24 ile, HbsAg tanı testi için HbsAg mAb1 ile, Troponin I tanı testi için 19C7 (IgG2b for MAbs) ile, NTproBNP tanı testi için 15F11 (IgG2b for MAbs) ile ve hFABP tanı testi için 10E1 (IgG1 for MAbs) ile konjugasyonu EDC ve EDC/NHS kovalent bağlama reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında NHS, kuantum noktalar üzerindeki karboksil grupları için aktive edici bir ajan olarak kullanılmıştır. NHS, proteinlerin amin grupları için amid bağlantıları oluşturmuştur. Antikor/antijen konjugasyonunu doğrulamak için %0.5' lik agaroz jel elektroforez yöntemi, Floresan spektroskopisi, DLS, TEM, HPLC ve TLRC yöntemleri uygulanmıştır.

Agaroz jel elektroforez şekil 4.8 görüntüleri Qdot' ların rHCV coctail soluble for conjugate, GP41,GP36,P24, HbsAg mAb1 , 19C7 (IgG2b for MAbs), NTproBNP, 15F11 (IgG2b for MAbs) ve 10E1 (IgG1 for MAbs) ile konjugasyonları sonrasında molekül ağırlığında artış olacağından konjugatın jel içerisinde kuantum noktalardan daha ağır ilerlediğini ve konjugasyonun gerçekleşmiş olduğunu göstermiştir. Aynı kuyu içerisine eşit oranlarda CdTe/CdS-TGA ve antikor/antijen konjuge kuantum nokta karıştırılarak uygulanan örneğin jel içerisinde birbirinden ayrılarak ilerlemesi konjuge kuantum noktalar ile CdTe/CdS-TGA kuantum noktalar arasında nan-spesifik bir etkileşimin olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.8 Agaroz jel elektroforez görüntüsü. **(A-B)** 1. Qdot 2-3. HFABP IgG1-Qdot 4. Qdot + HFABP IgG1-Qdot. **(C)** 1. Qdot 2,4. cTnI IgG2b-Qdot 3,5. Qdot + cTnI IgG2b-Qdot 6. HFABP IgG1-Qdot 7. Qdot + HFABP IgG1-Qdot. 8,10. NTproBNP IgG2b-Qdot 9,11. Qdot + NTproBNP IgG2b-Qdot **(D)** 1. Qdot 2,4. rHCV-Qdot 3,5. Qdot + rHCV-Qdot 6,8. GP41,GP36,P24-Qdot 7,9. Qdot+ GP41,GP36,P24-Qdot 10,12. HbsAg mAb1-Qdot 11,13.Qdot+ HbsAg mAb1-Qdot

4.2.2. Protein Tayini Sonuçları

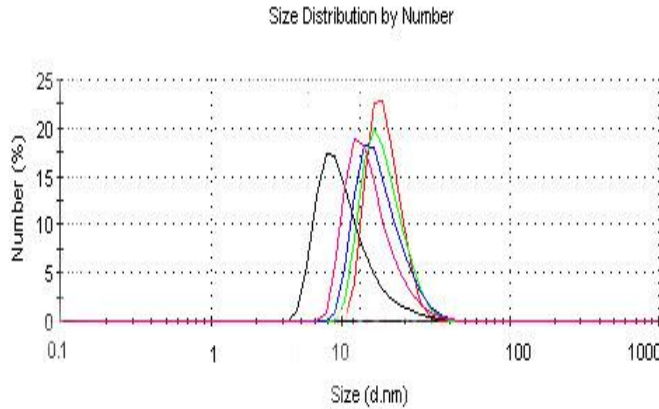
Bradford yöntemi kullanılarak biyokonjugatların konjugasyon sonrası sığır serum albümin (BSA) standart eğrisi ($y = 1.2214x + 0.0028$, $R^2 = 0.9943$) ile protein içeriği belirlenmiştir. Antikorların başlangıç miktarı 5 μg 'dır. Konjugasyon sonrasında, CdTe/CdS-TGA kuantum noktalar, bağlanmamış antikorları uzaklaştırmak için saf su ile filtlenerek yıkanmıştır ve bağlanma verimi aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1 Protein Tayini sonuçları

	Bağlanma verimi (%)
rHCV coctail (Core, NS3, NS4, & NS5)-Qdot	%93
GP41,GP36,P24 coctail - Qdot	%95
HbsAg mAb1- Qdot	%89
19C7 (IgG2b for MAbs)- Qdot	%91
10E1 (IgG1 for MAbs) - Qdot	%95
15F11 (IgG2b for MAbs)- Qdot	%88

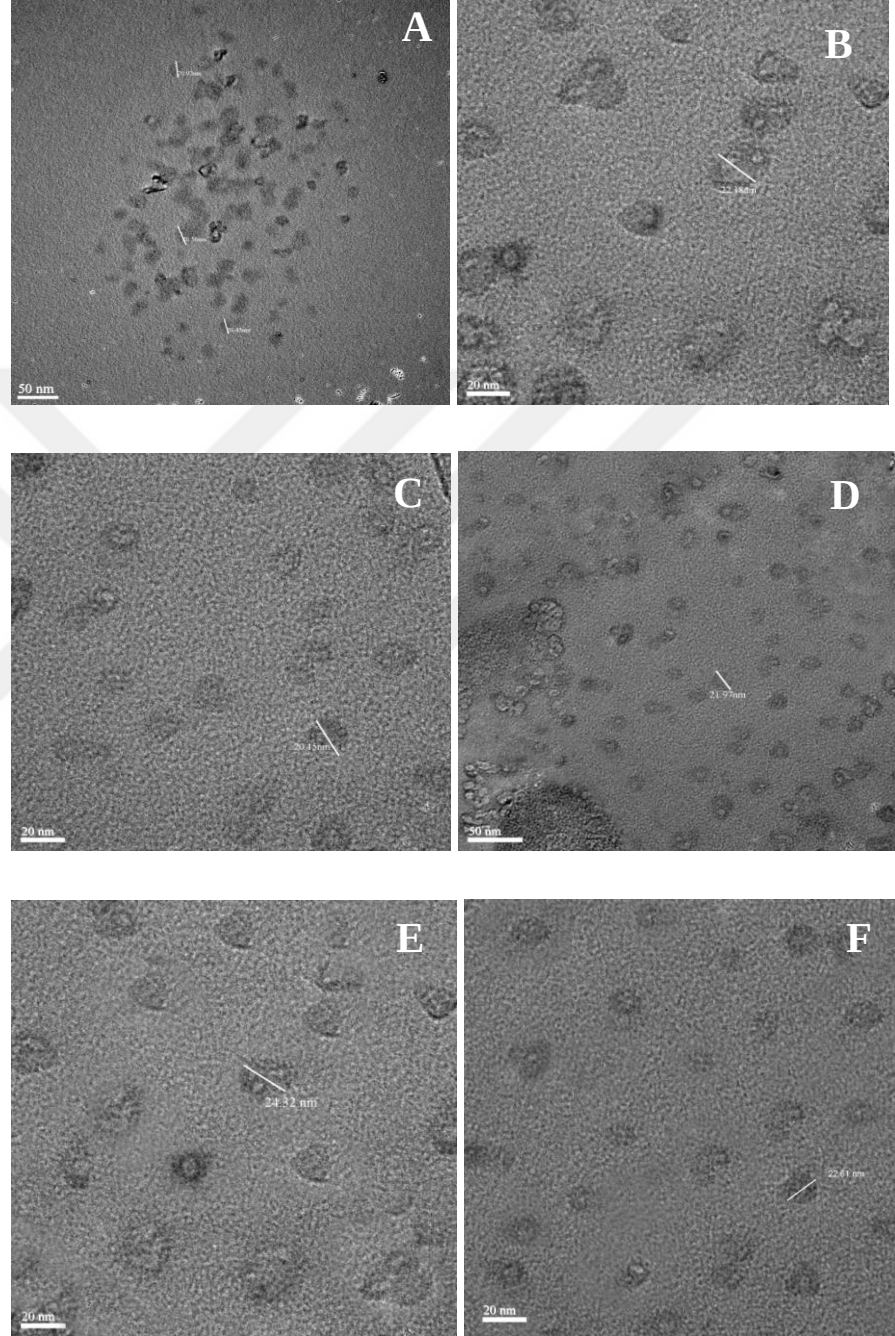
4.2.3. Konjugasyonun Yapısal Karakterizasyonu

DLS biyokonjugasyondan sonra hidrodinamik çapların ortalama 20-25 nm'ye yükseldiğini göstermiştir.



Şekil 4.9 Konjugatların hidrodinamik çapı

Şekil 4.10'da biyokonjuge kuantum noktalara ait TEM görüntüleri verilmiştir. CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların şekil 4.4' de boyutlarının 10 nm civarında olduğu görülmüştür. Antikor/antijen konjuge kuantum noktalarının boyutlarının ortalama 20-25 nm' ye büyüdüğünü göstermiştir.



Şekil 4.10 TEM görüntüleri **(A)** rHCV-Qdot **(B)** GP41,GP36,P24-Qdot **(C)** HbsAg mAb1-Qdot **(D)** cTnI IgG2b-Qdot **(E)** HFABP IgG1-Qdot **(F)** NTproBNP IgG2b-Qdot

4.2.4. Radyoişaretleme Çalışmalarının Optimizasyonu

Troponin I ile konjuge edilen kuantum noktaların konjugasyonunun radyoişaretleme ile kalite kontrolünün gerçekleştirilebilmesi ve işaretleme gerçekleşip gerçekleşmediğinin tespit edilebilmesi amacıyla işaretleme koşullarının optimizasyonun yanı sıra TLRC banyo çözeltisi optimizasyonu yapılmıştır. Bu çalışma Bölüm 3.5.4.1’de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. En uygun ayırma koşullarının tespit edilebilmesi için banyo çözeltisi optimizasyonu yapılmıştır ve 3 farklı çözelti kullanılarak R_f ve işaretleme verimleri tespit edilmiştir. Bu çalışmaya ilişkin sonuçlar Çizgelge 4.2’ de verilmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda verim ve R_f değerleri kıyaslanarak optimum banyo çözeltisi olarak TLRC-2 nolu çözelti tespit edilmiştir. Aşağıda optimizasyonu yapılan çözelti ve oranları açıklanmıştır.

TLRC-1: n-bütanol/etil alkol/0,2N NH_4OH (5:2:1)

TLRC-2: n-bütanol/distile su/asetik asit (4:2:1)

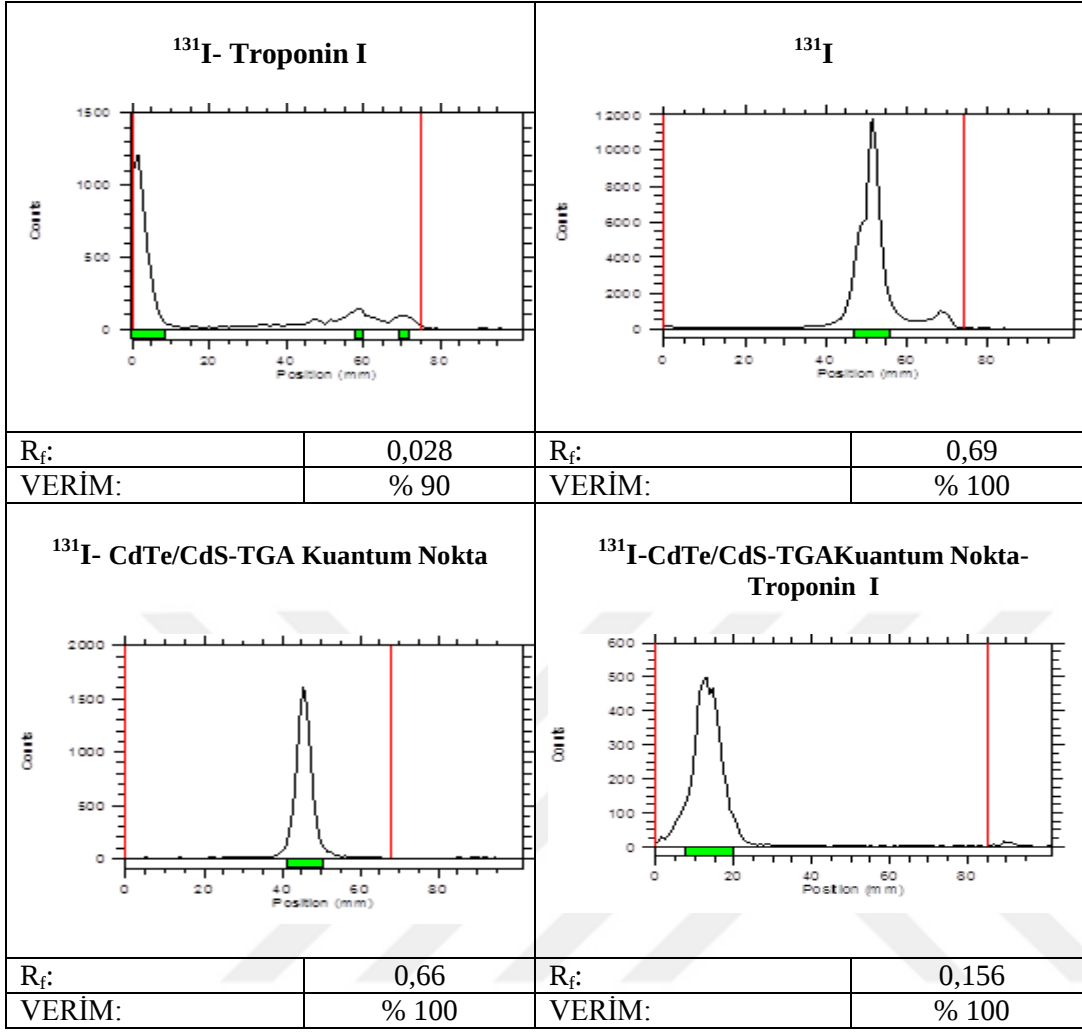
TLRC-3: izopropil alkol/n-bütanol/0,2N NH_4OH (4:2:1)

Çizelge 4.2 Banyo çözeltisi optimizasyonuna ilişkin farklı çözeltiler kullanılarak karakterizasyonu yapılan örneklerin işaretlenme verimi ve R_f değerleri.

Banyo Çözeltileri		^{131}I -Troponin I	^{131}I -CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta	^{131}I -CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta-Troponin I	$^{131}\text{I}^-$	$^{131}\text{I}^+$
TLRC-1	Rf	0,066	0,899	0,874	0,817	0,907
	Verim	%91	%100	%100	%50	%100
TLRC-2	Rf	0,028	0,66	0,156	0,907	0,69
	Verim	%100	%100	%100	%100	%100
TLRC-3	Rf	0,025	0,902	0,942	0,931	0,894
	Verim	%100	%100	%100	%90	%100

3 farklı banyo çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon sonucunda $^{131}\text{I}^-$ 'in yükseltgenmesinin gerçekleştiğini ve yükseltgenen iyotun CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta'lara bağlandığını ifade eden aynı zamanda kuantum nokta ve CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta-Troponin I konjugasyonunun ayrımını sağlayan sonucun TLRC 2 nolu çözgene ait olduğu tespit edilmiştir. Optimum banyo çözeltisine ilişkin TLRC kromatogramları Şekil 4.11' te gösterilmektedir.

TLRC sonucunda I^{131} ile radyoiyodinasyon sonucunda I^{131} -Troponin I RF:0,028 iken, I^{131} -CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta-Troponin I RF:0,156 bulunmuştur. Buda kuantum noktaların Troponin I ile konjugasyonunun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.



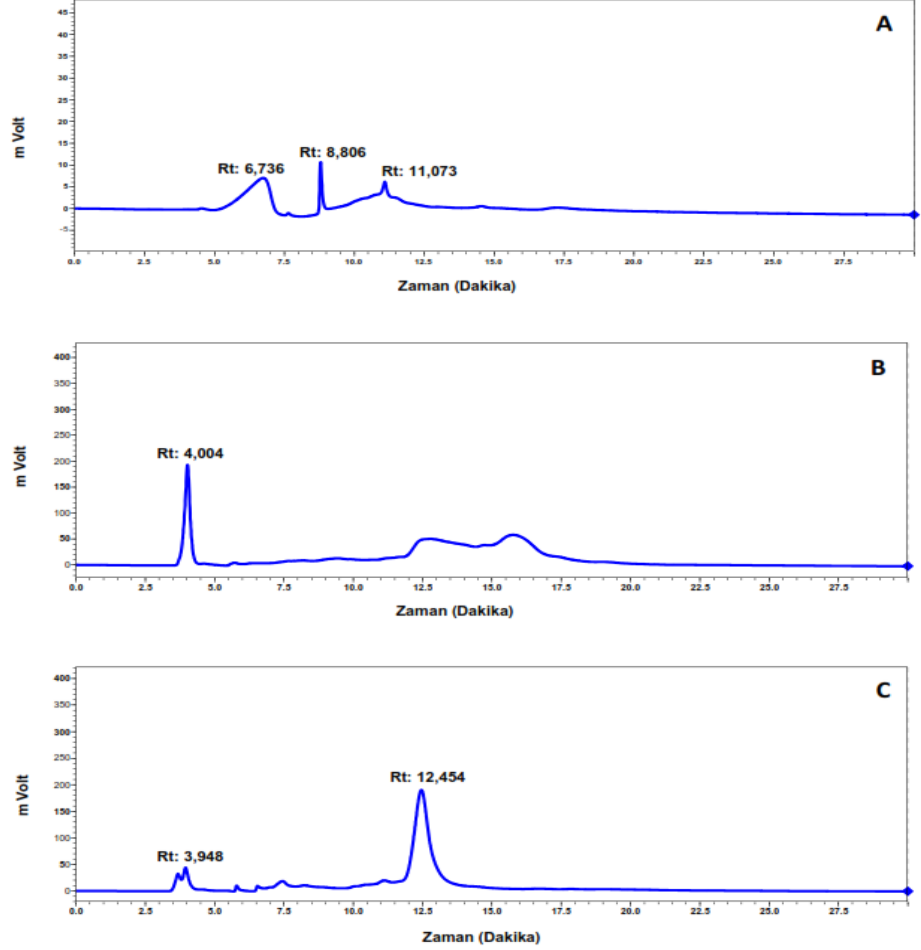
Şekil 4.11 Optimum banyo çözeltisinde gerçekleştirilen TLRC kalite kontrol kromatogramları

4.2.5. HPLC sonuçları

HPLC (High-performance liquid chromatography) denemelerinde Shimadzu LC10 ATVP HPLC cihazı ve molekül ağırlığına göre ayırma sağlayan Nucleogel 40:8-OH gel permeation kromatografik kolon kullanılmıştır. Dedektör: Floresan Ex:475 nm, Em: 540 nm UV:300 nm Akış hızı:1 ml/dk, Enjeksiyon hacmi:60 ul

HPLC kromatogramları CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların Rt:4,004 dk, HCV coctail antijenlerinin alt birimlerinin Rt1:6,0736 dk, Rt2:8,806, Rt3:11,073 dk , CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktalarla konjuge HCV antijenlerin Rt:12,454 dk olarak vermiştir. Bu durum CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktalarla-HCV %90

verimde konjuge olduğunu ve HCV antijen alt birimlerinin tek bir fraksiyonda toplandığını göstermektedir.



§

Şekil 4.12. rHCV (A), Qdot (B) ve rHCV-Qdot HPLC Kromatogramları.

4.2.6. Fotostabilite Çalışması

Antikor/antijen konjuge kuantum noktaların tanı kitlerinde kullanılması için fotostabilitesinin yüksek olması gerekmektedir. Karanlıkta 4 ° C'de depolanan depolanan rHCV-Qdot, GP41,GP36,P24-Qdot, HbsAg mAb1-Qdot, cTnI IgG2b-Qdot, hFABP IgG1-Qdot, NT-proBNP IgG2b-Qdot konjugatların fotostabilitesini incelemek için 30 gün boyunca floresans yoğunlukları ölçülmüştür. Bu koşullar altında saklanan Qdot konjugatların floresansı azalmaksızın 30 gün boyunca kararlılığını korumuştur

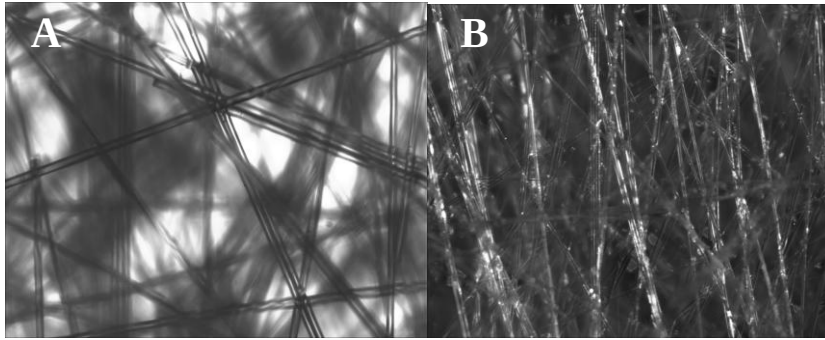
4.3. Hızlı Tanı Kitinin Tasarlanması

4.3.1. Antikor/Antijen Konjuge Kuantum Noktaların Konjugat Ped Yüzeyine İmmobilizasyonu

Nem kontrolü: immobilizasyonun gerçekleştirileceği ortam nemi, nem çekici cihaz yardımı ile % 20-25 nem durumuna getirilmiştir. %50 üzerinde nemin bulunduğu durumlarda kuantum nokta-antikor/antijen konjugatlar ile temas eden nem antikor/antijenin denatüre olmasına ve nanoparçacıkların agregatlaşmasına neden olmuştur.

Emdirme metodu ile yapılan uygulamada kuruma sonunda kuantum nokta biyokonjugatların konjugat pedin uçlarına doğru göç ettiği ve o bölgelerde konsantrasyonun arttığı gözlenmiştir. Bu durum da biyokonjugatın homojen bir şekilde pede dağılmadığını göstermiştir. Emdirme metodu ileriki aşamalarda testte farklı varyasyonların oluşmasına neden olabileceği için uygulanabilir bulunmamıştır. Bu nedenle dispenser ile spreyleme metoduna geçilmiştir.

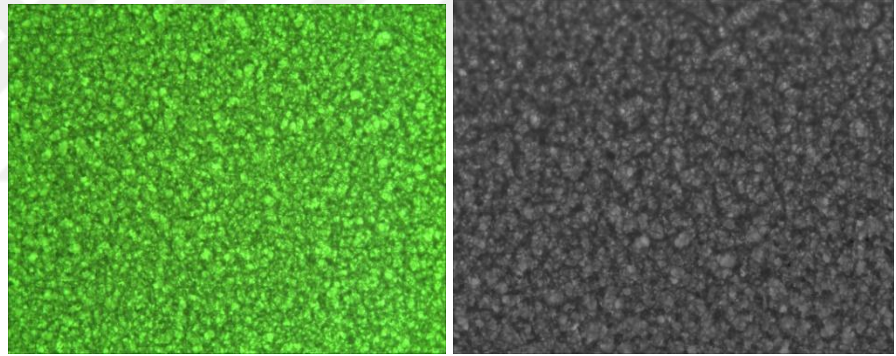
Antikor/Antijen Kuantum nokta konjugatların içerisine %20 sükroz ve %5 trehaloz olacak şekilde şeker ilavesi yapılmıştır. Şeker ilavesi yapılmayan konjugatların konjugat pedden örnek uygulama sonrası sürüklenmediği konjugatı nitroselüloz membrana taşınmadığı ve T, C çizgilerinin oluşmadığı görülmüştür.



Şekil 4.13 Konjugat ped (A) ve rHCV-Qdot immobilize konjugat ped floresan mikroskop görüntüsü

4.3.2. Antikor/Antijenlerin Membran Yüzeyine İmmobilizasyonu

Uygun NC Membran por çapı seçimi; Yapılan literatür çalışmalarından ve Türklab A.Ş nin mevcut tecrübelerinden yararlandığımızda immünokromatografik testlerde nitroselüloz membranların por çapının arttıkça test hızının arttığı ancak hassasiyetin azaldığı görülmüştür. Elde edilecek sinyalin daha kuvvetli olması için büyük por çaplı membranlar kullanıldığında daha fazla örnek uygulaması gerekecektir. Geliştirilecek test için Nupore LFNC-C 8 μm , 10 μm , 12 μm , Nupore LFNC-H 15 μm , Whatman immunopore FP, MDI CNPC-SS12 10 μm , 12 μm , 15 μm , Sartorius CN140 10 μm por çapına sahip nitroselüloz membranlar üzerinde eşit hacimli örnek numunelerin ilerleme süreleri test edilmiştir. Testler için uygun membran 8-10 μm por çapa sahip nitroselüloz membranlar olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.14 10 μm por çaplı NC Membran polarize (solda) ve floresan (sağda) mikroskop görüntüleri.

4.3.2.1. T çizgi Antikor/Antijenlerin İmmobilizasyonu

Nitroselüloz membran yüzeyine T çizgi antikor/antijen immobilizasyonu dispenser ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ile, bir taraftan sabit hızda enjeksiyon ile membrana sıvı uygulanırken, diğer taraftan membran sabit hızla hareket ettirilerek, membran üzerine ince ve düzgün bir çizgi halinde sıvının uygulanması mümkün olmuştur.

Yapılan çalışmalarda optimum T çizgisi konsantrasyonu 2 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerin üzerindeki konsantrasyonlar testin hassasiyetinde artışa neden olmamakta sadece fazla antijen/antikor miktarının kullanımına ve dolayısıyla test maliyetinin yükselmesine neden olmaktadır.

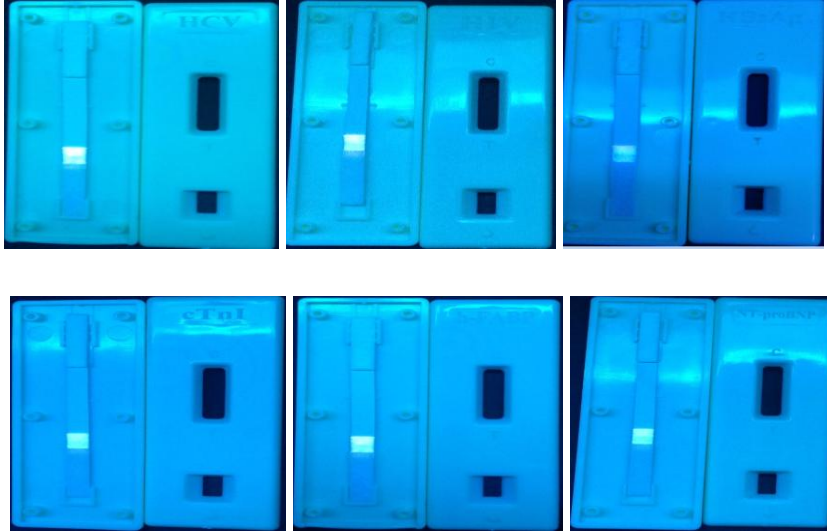
4.3.2.2. C çizgi Antikor/Antijenlerin İmmobilizasyonu

Nitroselüloz membrana, C çizgisini oluşturabilmek için konjugat pade emdirilen antijen/antikor ile konjuge kuantum noktaların tutunabileceği monoklonal/poliklonal antikorlar konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde emdirilmiştir.

4.3.2.3. Nitroselüloz membranın Bloklanması

Bloklanmamış membranlarla karşılaştırıldığında bloklamanın test hızını azalttığı görülmüştür. Ayrıca bloklanmayan membranlarda hatalı pozitiflikler (spesifik olmayan bağlanmalar) gözlemlenirken bloklamanın bu durumu elimine ettiği tespit edilmiştir.

4.3.3. Test Komponentlerinin Birleştirilmesi (Laminasyon)



Şekil 4.15 Kuantum nokta esaslı HCV, HIV, HBsAg, cTnI, Hfabp ve NT-proBNP tanı kitleri

4.4. Tanı Kitinin Standardizasyon ve Validasyonu

4.4.1. Qdot-HCV Tanı kiti

Şekil 4.16 incelendiğinde soldan sağa sırasıyla Seracare 300 S/CO HCV pozitif , Seracare 5 S/CO HCV pozitif, Seracare HbsAg pozitif-HCV negatif ve Trina Negatif kontrol ile denenmiş testlerin sonuçları görülmektedir. Testlerin pozitif kontrol numuneleri uygulandığında, numune içerisindeki anti-HCV ile kuantum noktalar ile konjuge edilmiş rekombinant HCV antijenlerin bir araya gelerek T çizgisini görünür hale getirdiği görülmüştür. Testler pozitif kontrol uygulaması sonucu pozitif yanıt vermiştir. Ayrıca numune “C” kontrol çizgisinden geçerken, “C” kontrol çizgisine immobilize edilmiş keçi anti-fare IgG poliklonal antikörlerine bağlanmış ve UV altında görünür kontrol çizgisi oluşturmuştur. Buda testlerin doğru çalıştığını ve testlerin geçerli olduğunu göstermiştir.

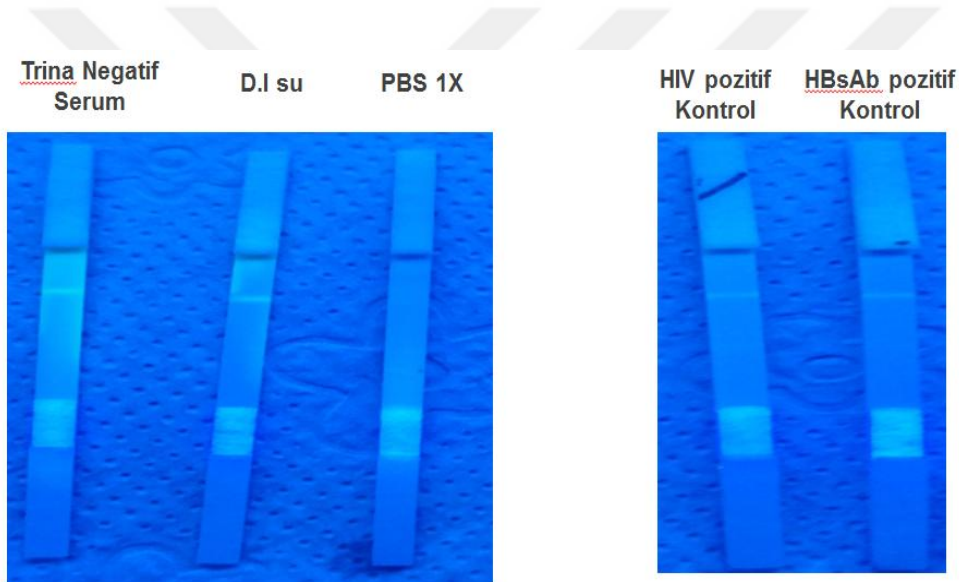
Negatif kontrol uygulaması sonucu numune içerisinde anti-HCV bulunmadığından “T” test çizgisi üzerine immobilize edilmiş HCV antijenleri mobilize kuantum noktalar ile konjuge edilmiş HCV antijenlerine bağlanamamış ve UV altında T çizgisi görülmemiştir. Testler negatif kontrol uygulaması sonucu negatif yanıt vermiştir. Farklı enfeksiyonel pozitif kontrol numuneleri (Seracare HbsAg pozitif-HCV negatif) ile yapılan çapraz girişim denemelerinde testin T çizgi alanında herhangi spesifik olmayan bağlanma girişimi gözlenmemiştir.



Şekil 4.16 Qdot -HCV testlerinin pozitif-negatif-çapraz kontrol deneme sonuçları

Şekil 4.17 de Çapraz reaksiyon ihtimaline karşı Seracare HbsAb pozitif-HCV negatif ve Seracare HIV pozitif-HCV negatif numuneler ile denenmiş testlerin sonuçları incelendiğinde testin T çizgi alanında herhangi bir nan-spesifik bağlanma gözlenmemiştir. Testlerin farklı enfeksiyonel belirteç bulunduran serum/plazma örneklerine hatalı pozitiflik göstermediği görülmüştür.

Negatif uygulamalarda testin DI su ile herhangi bir hatalı pozitiflik oluşturmadığı C çizgisini görünür hale getirerek testin doğru çalıştığını gösterdiği ancak PBS 1X in kuantum noktaların floresansında sönmlemeye neden olduğu görülmüştür. Yapılan bu çalışma yoğun numunelerde numuneyi dilüe etmek amacıyla alternatif dilüent için yapılmıştır.



Şekil 4.17 Qdot – HCV testlerinin pozitif-çapraz kontrol deneme sonuçları

Şekil 4.18 ‘de görüldüğü üzere 50 üyeli SFTS-1997 HCV serokonversiyon panel ile denenmiş anti-HCV testlerinin sonuçları EIA testleri referans alınarak incelenmiştir. Serokonversiyon panelin pozitif üyelerine, Qdot esaslı anti-hcv testlerinin “C” alanında bir kontrol çizgisi ve “T” alanında bir test çizgisi oluşumu ile doğru bir şekilde pozitif yanıt verdiği tespit edilmiştir. Negatif üyelerine ise “C” alanında bir kontrol çizgisi ile doğru bir şekilde negatif yanıt verdiği tespit edilmiştir. Referans EIA testleri de tüm panelde aynı sonuçları elde etmiştir. Bu sonuçlar Anti-HCV Testinin, teşhis hassasiyet performansları karşılaştırıldığında CE sertifikalı EIA testleri ile eşdeğer olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.3 Qdot – HCV testlerinin SFTS 97- panel kontrol deneme sonuçları

N°	Catégorie	PCR	Antigène	Génotype	Résultat attendu	Résultat ELISA DIA PRO	Résultat ORTHO	Kuantum Nokta-HCV test	ImmunocomB PBS INVERNESS		
						>1,1	Seuil : 3		Nucléocapside	NS	Interprétation
31	A	NEG	NEG		NEG	0,2	0	NEG	NEG	NEG	NEG
33	A	NEG	NEG		NEG	0,2	0	NoMigration	NEG	NEG	NEG
34	A	NEG	NEG	NEG	NEG	0,3	0	NEG	NEG	NEG	NEG
11	B1	NEG	CORE			7,1	3,1	pos light	POS FAIBLE	NEG	POS
13	B1	NEG	CORE			3,1	1,9	pos light	POS	NEG	POS
40	B1	NEG	CORE			3,8	2,5	pos light	POS	NEG	POS
49	B1	NEG	CORE			9,8	5	pos	POS	NEG	POS
22	B2	NEG	NS3			1,4	2,1	NEG	NEG	NEG	NEG
41	B2	NEG	NS3			1,7	2,3	NEG	NEG	POS	POS
42	B2	NEG	NS3			0,2	0,5	NEG	NEG	POS faible	POS
18	B3	NEG	NS5			0,3	0,3	NEG	NEG	NEG	NEG
14	C1	POS	CORE	3a	POS	10,4	>5	POS	POS	POS	POS
20	C1	POS	CORE	3a	POS	10	>5	POS	POS	POS faible	POS
30	C1	POS	CORE	3	POS	10,1	>5	POS	POS	POS faible	POS
12	C2	POS	NS3	1a/1b	POS	3,8	>5	POS	NEG	POS	POS
25	C2	POS	NS3	1a/1b	POS	1,9	>5	NEG	NEG	POS faible	POS
35	C2	POS	NS3	1a	POS	5,3	>5	NEG	NEG	POS	POS
1	D1	POS	CORE NS3	2a/2c	POS	11	>5	POS	POS	POS	POS
4	D1	POS	CORE NS3	2a/2c	POS	10	>5	POS	POS	POS	POS
6	D1	POS	CORE NS3	1	POS	10,3	>5	POS	POS	POS faible	POS
8	D1	POS	CORE NS3	1b	POS	9,4	>5	POS	POS	POS	POS
9	D1	POS	CORE NS3	3	POS	10,8	>5	POS	POS	POS faible	POS
17	D1	POS	CORE NS3	1b	POS	10	>5	POS	POS	POS faible	POS
44	D1	NEG	CORE NS3		POS	4,5	>5	pos light	NEG	POS faible	POS
50	D1	NEG	CORE NS3		POS	7	5	pos light	POS	POS	POS
7	D2	NEG	CORE NS4		POS	3,2	2,9	NEG	NEG	NEG	NEG
10	D2	POS	CORE NS4	3a	POS	10	>5	POS	POS	NEG	POS
46	D2	NEG	CORE NS4		POS	5,1	3,7	pos light	POS FAIBLE	NEG	POS
47	D2	NEG	CORE NS4		POS	7,1	4,7	pos light	POS	NEG	POS
5	D3	POS	NS3 + NS4	1b	POS	6,5	>5	POS	NEG	POS	POS
15	D3	NEG	NS3 + NS4		POS	4,5	>5	POS light	NEG	POS	POS
16	D3	NEG	NS3 + NS4		POS	3	>5	POS light	NEG	POS	POS
21	D3	POS	NS3 + NS4	1a/1b	POS	5,1	>5	POS light	NEG	POS	POS
27	D3	NEG	NS3 + NS4		POS	5,9	>5	NEG	NEG	POS	POS
39	D3	POS	NS3 + NS4	1b	POS	4	>5	pos light	NEG	POS	POS
45	D3	NEG	NS3 + NS4			2,2	2,2	NEG	NEG	NEG	NEG
2	E	POS	3 REAC	1b	POS	10,8	>5	POS	POS	POS	POS
3	E	POS	3 REAC	2a/2c	POS	11	>5	POS	POS	POS	POS
19	E	POS	3 REAC	5a	POS	10,1	>5	POS	POS	POS	POS
23	E	POS	3 REAC	1b	POS	10	>5	POS	POS	POS	POS
24	E	POS	3 REAC	2a	POS	9,4	>5	POS	POS	POS	POS
26	E	POS	3 REAC	12b	POS	9	>5	POS	POS	POS	POS
28	E	POS	3 REAC	1a	POS	10	>5	POS	POS	POS	POS
29	E	POS	3 REAC	2a/2c	POS	10,2	>5	POS	POS	POS	POS
32	E	POS	3 REAC	1b	POS	10	>5	POS	POS	POS	POS
38	E	POS	3 REAC	1b	POS	9	>5	POS	POS	POS	POS
43	E	POS	3 REAC	4	POS	11	>5	NEG	POS	POS	POS
48	E	NEG	3 REAC		POS	6	4,9	POS	NEG	POS faible	POS
36	F(1 AU 1/200°)	POS	3 REAC			3,1	1,1	NEG	POS faible	NEG	POS
37	F(1 AU 1/400°)	POS	3 REAC			2,6	2,3	NEG	NEG	NEG	NEG

4.4.2. Qdot-HIV Tanı Kiti

Şekil 4.19 incelendiğinde soldan sağa sırasıyla Seracare 200 S/CO HCV pozitif , Seracare 3.2 S/CO HCV pozitif, Seracare HCV pozitif-HIV negatif ve Trina Negatif kontrol ile denenmiş testlerin sonuçları görülmektedir. Testlerin pozitif kontrol numuneleri uygulandığında, numune içerisindeki anti-HIV ile kuantum noktalar ile konjuge edilmiş rekombinant HIV antijenlerin bir araya gelerek T çizgisini görünür hale getirdiği görülmüştür. Testler pozitif kontrol uygulaması sonucu pozitif yanıt vermiştir. Ayrıca numune “C” kontrol çizgisinden geçerken, “C” kontrol çizgisine immobilize edilmiş keçi anti-fare IgG poliklonal antikörlerine bağlanmış ve UV altında görünür kontrol çizgisi oluşturmuştur. Buda testlerin doğru çalıştığını ve testlerin geçerli olduğunu göstermiştir.

Negatif kontrol uygulaması sonucu numune içerisinde anti-HIV bulunmadığından “T” test çizgisi üzerine immobilize edilmiş rekombinant HIV antijenleri mobilize kuantum noktalar ile konjuge edilmiş HIV antijenlerine bağlanamamış ve UV altında T çizgisi görülmemiştir. Testler negatif kontrol uygulaması sonucu negatif yanıt vermiştir

Seracare HCV pozitif-HIV negatif gibi farklı enfeksiyonel pozitif kontrol numuneleri ile yapılan çapraz girişim denemelerinde testin T çizgi alanında herhangi spesifik olmayan bağlanma girişimi gözlenmemiştir.



Şekil 4.18. Qdot – HIV testlerinin pozitif-negatif-çapraz kontrol deneme sonuçları

Şekil 4.20 ‘ de görüldüğü üzere 40 üyeli SFTS-2006 HIV serokonversiyon panel ile denenmiş anti-HIV testlerinin sonuçları EIA testleri referans alınarak incelenmiştir. Serokonversiyon panelin pozitif üyelerine, Qdot esaslı anti-HIV testlerinin “C” alanında bir kontrol çizgisi ve “T” alanında bir test çizgisi oluşumu ile doğru bir şekilde pozitif yanıt verdiği tespit edilmiştir. Negatif üyelerine ise “C” alanında bir kontrol çizgisi ile doğru bir şekilde negatif yanıt verdiği tespit edilmiştir. Referans EIA testleri de tüm panelde aynı sonuçları elde etmiştir. Bu sonuçlar Anti-HIV Testinin, teşhis hassasiyet performansları karşılaştırıldığında CE sertifikalı EIA testleri ile eşdeğer olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.4 Qdot – HIV testlerinin SFTS 2006- panel kontrol deneme sonuçları

N°	HIV	Caractérisation	Dilution	Sérotype	AgP24	CV TaqMan copie/mL	Genotype	Résultat Attendu	Kuantum Nokta-HIV Test
06-01	1/M	Pré séroconversion			Nég	>47		Nég	NEG
06-02	1/M	Per séroconversion			3000 pg	700.000	B	Nég	NEG
06-03	1/M	Séroconversion		non typable	Nég	4.000	B	Pos	POS light
06-04	1/M	Séroconversion		B	Nég	3.400	PCR Nég	Pos	POS
06-05	1/M	Séroconversion		B	16 pg	14.000	B	Pos	POS
06-06	1/M	Séroconversion		B	Nég	1.700	B	Pos	POS
06-07	1/M	Séroconversion	dil 1/20 de 06-06	B	Nég	<47		Pos	POS
06-08	1/M	Séroconversion		B	Nég	5.800	B	Pos	POS
06-09	1/M	Séroconversion		B	Nég	1.100	PCR Nég	Pos	POS
06-10	1/M	Séroconversion	dil 1/20	non typable	Nég	50		Pos	POS light
06-11	1/M	Séroconversion		B	Nég	23.000	B	Pos	POS
06-12	1/M	Séroconversion		B	Nég	7.300	B	Pos	POS
06-13	1/M	Séropositifs francs		B	Nég	5.000	B	Pos	POS
06-14	1/M	Séropositifs francs		A	Nég	3.100	D	Pos	POS
06-15	1/M	Séropositifs francs		C	Nég	900	PCR Nég	Pos	POS
06-16	1/M	Séropositifs francs		C	Nég	5.000	CRF 02	Pos	POS
06-17	1/M	Séropositifs francs		B	15 pg	560	PCR Nég	Pos	POS
06-18	1/M	Séropositifs francs		B	Nég	180	PCR Nég	Pos	POS
06-19	1/M	Séropositifs francs		B	Nég	630	B	Pos	POS
06-20	1/M	Séropositifs francs		B	Nég	<47		Pos	POS
06-21	1/M	Séropositifs francs		B	Nég	Nég		Pos	POS
06-22	1/M	Séropositifs francs		B	Nég	9.000	B	Pos	POS
06-23	1/M	Séropositifs francs		A	Nég	1.700	PCR Nég	Pos	POS
06-24	1/M	Séropositifs francs		A	Nég	18.000	CRF 02	Pos	POS light
06-25	1/M	Séropositifs francs		C	Nég	8.300	A1	Pos	POS
06-26	1/M	Séropositifs francs		C	Nég	980	A1	Pos	POS
06-27	1/M	Séropositifs francs		D	Nég	8.000	D	Pos	POS
06-28	2							Pos	POS
06-29	2							Pos	POS
06-30	2							Pos	POS
06-31	2							Pos	POS light
06-32	2							Pos	POS light
06-33	2							Pos	POS light
06-34	2							Pos	POS
06-35	2		Dil 1/20 de 06-34					Pos	POS
06-36	Nég	Cross reaction p18						Nég	NEG
06-37	Nég	Cross reaction p18						Nég	NEG
06-38	Nég	Cross reaction p24						Nég	NEG
06-39	Nég	Cross reaction p24						Nég	NEG
06-40	Nég	Négatif Diluent						Nég	NEG

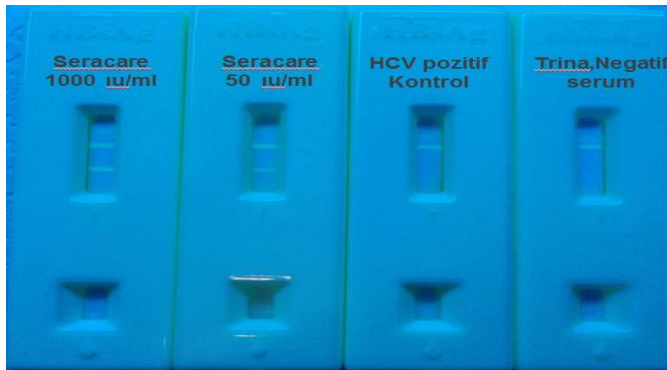
4.4.3. Qdot-HBsAg Tanı Kiti

Şekil 4.21 incelendiğinde soldan sağa sırasıyla Seracare 1000 μ /ml HbsAg pozitif , Seracare 50 μ /ml HbsAg pozitif, Seracare HCV pozitif-HbsAG negatif ve Trina Negatif kontrol ile denenmiş testlerin sonuçları görülmektedir.

Testlerin pozitif kontrol numuneleri uygulandığında, numune içerisindeki HbsAg ile kuantum noktalar ile konjuge edilmiş anti-HBs monoklonal antikorların bir araya gelerek T çizgisini görünür hale getirdiği görülmüştür. Testler pozitif kontrol uygulaması sonucu pozitif yanıt vermiştir. Ayrıca numune “C” kontrol çizgisinden geçerken, “C” kontrol çizgisine immobilize edilmiş keçi anti-fare IgG poliklonal antikorlarına bağlanmış ve UV altında görünür kontrol çizgisi oluşturmuştur. Buda testlerin doğru çalıştığını ve testlerin geçerli olduğunu göstermiştir.

Negatif kontrol uygulaması sonucu numune içerisinde HbsAg bulunmadığından “T” test çizgisi üzerine İmmobilize edilmiş anti-HBs antikorları mobilize kuantum noktalar ile konjuge edilmiş anti-HBs antikorlarına bağlanamamış ve UV altında T çizgisi görülmemiştir. Testler negatif kontrol uygulaması sonucu negatif yanıt vermiştir.

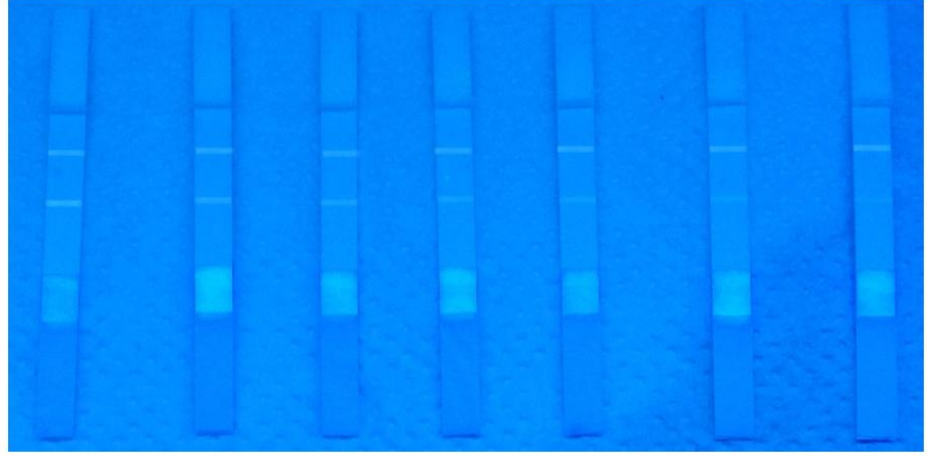
Farklı enfeksiyonel pozitif kontrol numuneleri (Seracare HCV pozitif-HbsAG negatif) ile yapılan çapraz girişim denemelerinde testin T çizgi alanında herhangi spesifik olmayan bağlanma girişimi gözlenmemiştir.



Şekil 4.19 Qdot – HBsAg testlerinin pozitif-negatif-çapraz kontrol deneme sonuçları

Testler Seracare Inc. 1000 IU/ml, 500 IU/ml, 250 IU/ml, 100 IU/ml, 50 IU/ml, 9 IU/ml ve 4.5 IU/ml pozitif kontrol ile denenmiştir. Colloidal gold nanopartikül temelli HbsAg tanı kitlerinin minimum tespit değeri (cut off) 9 IU/ml dir. Kuantum nokta temelli bu testlerde minimum tespit değeri yarıya inmiştir.

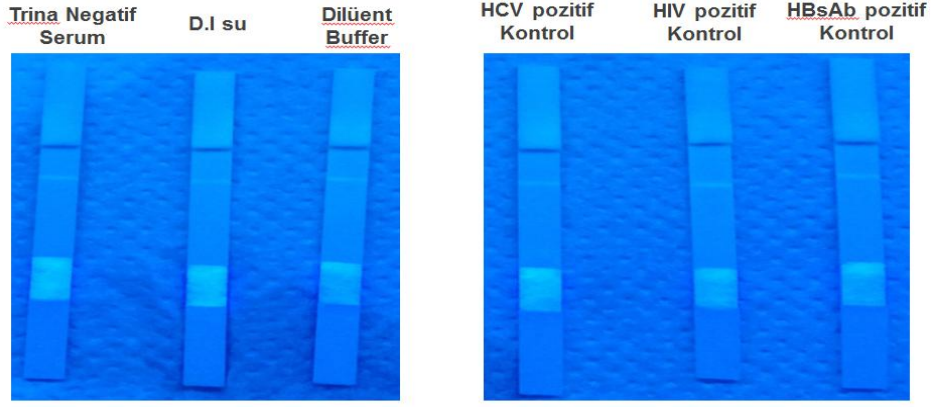
1000 IU/ML 500 IU/ML 250 IU/ML 100 IU/ML 50 IU/ML 9 IU/ML 4.5 IU/ML



Şekil 4.20 Qdot – HBsAg testlerinin farklı konsantrasyonlarda pozitif kontrol deneme sonuçları

Şekil 4.21’ de Çapraz reaksiyon ihtimaline karşı Seracare HCV pozitif- HBsAg negatif Seracare HIV pozitif- HBsAg negatif ve Seracare HBsAb pozitif- HBsAg negatif numuneler ile denenmiş testlerin sonuçları incelendiğinde testin T çizgi alanında herhangi bir nan-spesifik bağlanma gözlenmemiştir. Testlerin farklı enfeksiyonel belirteç bulunduran serum/plazma örneklerine hatalı pozitiflik göstermediği görülmüştür.

Negatif uygulamalarda testin DI su ve dilüent buffer ile herhangi bir hatalı pozitiflik oluşturmadığı C çizgisini görünür hale getirerek testin doğru çalıştığını gösterdiği görülmüştür. Yapılan bu çalışma yoğun numunelerde numuneyi dilüe etmek amacıyla alternatif dilüent için yapılmıştır.



Şekil 4.21 Qdot- HBsAg testlerinin çapraz kontrol deneme sonuçları

4.4.4. Qdot-Troponin I Tanı Kiti

Trina inc. Troponin I 1000 ng/ml pozitif kontrol, 5 ng/ml pozitif kontrol ve Trina Negatif kontrol ile denenmiştir. Negatif kontrole testlerin negatif, pozitif kontrole ise pozitif yanıt verdiği görülmüştür (şekil 4.21).

Kaset test sonuçları; pozitif kontrol numuneleri içerisindeki antijenler ile kuantum noktalarla konjuge antikorların bir araya gelerek T çizgisini görünür hale getirdiğini, negatif kontrol numunelerinde bu çizginin görülmediğini göstermektedir. Farklı kardiyak belirteç pozitif kontrol numuneleri ile yapılan çapraz girişim denemelerinde spesifik olmayan bağlanma girişimlerinin olmadığı görülmüştür.

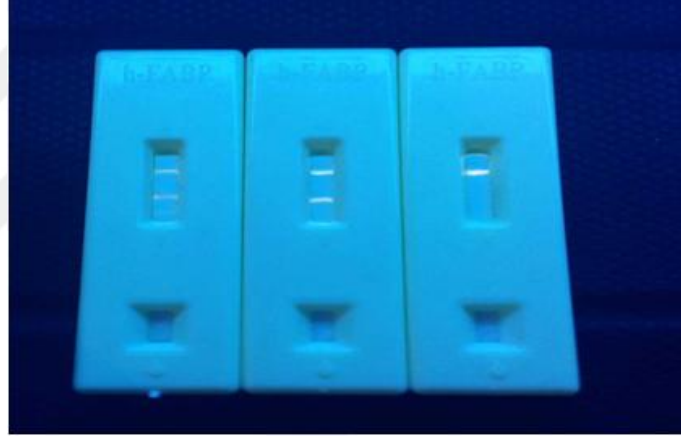


Şekil 4.22 Qdot – Troponin I testlerinin pozitif –negatif kontrol deneme sonuçları

4.4.5. Qdot-hFABP Tanı Kiti

Testler Trina inc. h-FABP 1000 ng/ml pozitif kontrol, 6,5 ng/ml pozitif kontrol ve Trina Negatif kontrol ile denenmiştir. Negatif kontrole testlerin negatif, pozitif kontrole ise pozitif yanıt verdiği görülmüştür (Şekil 4.23).

Kaset test sonuçları; pozitif kontrol numuneleri içerisindeki antijenler ile kuantum noktalarla konjuge antikörlerin bir araya gelerek T çizgisini görünür hale getirdiğini, negatif kontrol numunelerinde bu çizginin görülmediğini göstermektedir. Farklı kardiyak belirteç pozitif kontrol numuneleri ile yapılan çapraz girişim denemelerinde spesifik olmayan bağlanma girişimlerinin olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.23 Qdot – hFABP testlerinin pozitif –negatif kontrol deneme sonuçları

4.4.6. Qdot-NT-proBNP Tanı Kiti

Testler Trina inc. NT-proBNP 1000 pg/ml pozitif kontrol, 450 pg/ml pozitif kontrol ve Trina Negatif kontrol ile denenmiştir. Negatif kontrole testlerin negatif, pozitif kontrole ise pozitif yanıt verdiği görülmüştür (Şekil 4.24).

Kaset test sonuçları; pozitif kontrol numuneleri içerisindeki antijenler ile kuantum noktalarla konjuge antikörlerin bir araya gelerek T çizgisini görünür hale getirdiğini, negatif kontrol numunelerinde bu çizginin görülmediğini göstermektedir. Farklı kardiyak belirteç pozitif kontrol numuneleri ile yapılan çapraz girişim denemelerinde spesifik olmayan bağlanma girişimlerinin olmadığı

görülmüştür.



Şekil 4.24 Qdot – NT-proBNP testlerinin pozitif –negatif kontrol deneme sonuçları



5. SONUÇ

CdTe/CdS-TGA Kuantum noktalar azot gazı altında geri soğutucu sentez ünitesinde %40 verimle sentezlenmişlerdir. Sentezlenen Qdotların optik karakterizasyonu UV-Vis Spektrometresi ve Floresans Spektrometresi ile yapısal karakterizasyonu DLS ve zeta potansiyel analizi, STEM , TEM , AFM , EDX ve XRD analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları kuantum noktaların 8-10 nm boyutta olduğunu, STEM (A) ve TEM ve AFM görüntüleri küresel yapıda, olduğunu göstermektedir. Kuantum noktaların 488 nm uyarılma dalga boyunda 550 nm max floresans dalga boyuna sahip olduğunu göstermiştir. Sarı-turuncu renkte ışıma yapmaktadır. Floresans bandının Maksimum yarısi tam genişlik (FWHM) 50 nm dir. Bu da parçacık boyutlarının monodispers olduğunu göstermiştir. Emisyon ve absorpsiyon eğrilerinin maksimumlarının arasındaki dalgaboyu farkı (stokes kayması) 27 nm dir. CdTe/CdS-TGA kuantum noktaların zeta potansiyel analizine göre, zeta potansiyeli -49.4 ± 4.38 mV (n: 5) dir. Kuantum noktaların yüzeyi, tioglikolik asitin -COO gruplarının varlığı nedeniyle negatif yüklüdür. EDX haritası ayrıca Kuantum noktaların Cd, Te, S, C, O, N içerdiğini kanıtlamaktadır.

Sentezlenen Kuantum noktaların EDC ve EDC/NHS kimyasal yöntemi ile rHCV, GP41,GP36,P24, HbsAg mAb1, cTnI IgG2b, HFABP IgG1 ve NTproBNP IgG2b ile konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. rHCV-Qdot, GP41,GP36,P24-Qdot, HbsAg mAb1-Qdot, cTnI IgG2b-Qdot, HFABP IgG1-Qdot ve NTproBNP IgG2b-Qdot konjugatların Bradford Protein tayini yöntemiyle bağlanma verimlerinin %90 ın üzerinde olduğunu göstermiştir. Agaroz jel elektroforez yöntemi sonuçları antijen/antikor konjugasyonu sonrasında molekül ağırlığında artış olacağından konjugatın jel içerisinde kuantum noktalardan daha ağır ilerlediğini ve konjugasyonun gerçekleşmiş olduğunu göstermiştir. Kuantum noktaların Antikor/antijen konjugasyonu sonrasında boyutlarının 10 nm den ortalama 20-25 nm' ye büyüdüğünü göstermiştir.

I^{131} ile radyoiyodinasyon sonucunda I^{131} -Troponin I RF:0,028 iken, I^{131} -CdTe/CdS-TGA Kuantum Nokta-Troponin I RF:0,156 bulunmuştur. Buda kuantum noktaların Troponin I ile konjugasyonunun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

HPLC kromatogramları CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktaların Rt:4,004 dk, HCV coctail antijenlerinin alt birimlerinin Rt1:6,0736 dk, Rt2:8,806, Rt3:11,073

dk , CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktalarla konjuge HCV antijenlerin Rt:12,454 dk olarak vermiştir. Bu durum CdTe/CdS-TGA Kuantum Noktalarla-HCV %90 verimde konjuge olduğunu ve HCV antijen alt birimlerinin tek bir fraksiyonda toplandığını göstermektedir. Fotostabilite çalışmaları sonucunda saklanan Qdot konjugatların floresansı azalmaksızın 30 gün boyunca kararlılığını korumuştur. Bu yüksek kararlı fotostabilite kuantum nokta esaslı yüksek hassasiyet ve seçicilikte tanı kiti üretimi için büyük avantaj sağlamaktadır.

Tasarlanan Qdot esaslı tanı kitlerinin pozitif ve negatif kontrollerle yapılan denemelere doğru yanıt verdiği ayrıca farklı pozitif kontrol numuneleri ile yapılan çapraz girişim denemelerinde spesifik olmayan bağlanma girişimlerinin olmadığı görülmüştür. Tasarlanan yüksek hassasiyetli Qdot esaslı HBsAg tanı kiti 100 µl serum/plazma örneği ile 10 dk da cut off 4.5 iu/ml sonuç vermektedir. Buda mevcut rapid testlerden daha yüksek hassasiyette ölçüm imkanı sağlamaktadır. Qdot esaslı HCV tanı kiti NS3+NS4 alt birimlerinde pozitif örnekleri PZR'ye kıyasla yüksek hassasiyette tespit edebilmektedir. Qdot esaslı HIV tanı kiti ile Referans EIA testleri tüm 40 panelde aynı sonuçları elde etmiştir. Testlerin teşhis hassasiyet performansları karşılaştırıldığında CE sertifikalı EIA testleri ile eşdeğer olduğunu göstermiştir. Qdot esaslı NT-proBNP tanı kiti ile 120 µl gibi düşük bir numune hacminde 5dk içerisinde 450 pg/ml hassasiyette ölçüm yapılabilir. Ayrıca tasarlanan testlerin kolloidal gold temelli mevcut testlerle karşılaştırıldığında çok daha düşük maliyetlere elde edildiği görülmüştür. Hem etkinlik hem de maliyet açısından bir adım önde olan bu testler yakın gelecekte hastalıkların erken tanısında önemli rol oynayacaktır.

Aynı zamanda 01040.STZ.2011-2 no'lu santez projesi olarak yürütülen bu tez sonucunda elde edilen qdot esaslı tanı kitleri kullanım kolaylığı, arttırılmış hassasiyet, duyarlılık ve doğruluğa sahip olması ve düşük maliyeti Milli geliri düşük ülkelerde basit bir UV lamba ile testin kalitatif olarak pratikçe kullanılabilir olması, Kantitatif tayine imkan vermesi gibi özelliklerinden dolayı proje ortağı firmaya iç ve dış pazarda rekabet üstünlüğü sağlayacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adegoke, O., Kato, T., Park, E.Y.,** 2016, An ultrasensitive alloyed near-infrared quaternary quantum dot-molecular beacon nanodiagnostic bioprobe for influenza virus RNA, *Biosensors and Bioelectronics*, 80 pp. 483-490.
- Andrieux, K., Couvreur, P.,** 2009, Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1 pp. 463–74.
- Anfossi, L., D’Arco, G., Baggiani, C., Giovannoli, C., Giraudi, G.,** 2011, A lateral flow immunoassay for measuring ochratoxin A : development of a single system for maize, wheat and durum wheat, *Food Control*, 22 pp. 1965–1970.
- Arzen, D., Podgornik, R., Kuzman Ljubljana, D.,** 2010, Dynamic light scattering and application to proteins in solutions, seminar, University of Ljubljana Faculty of Mathematics and Physics, Department of Physics, May 19.
- Berlina, A.N., Taranova, N.A., Zherdev, A.V., Vengerov, Y.Y., Dzantiev, B.B.,** 2013, Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk, *Anal. Bioanal.Chem.*, 405(14)pp. 4997–5000.
- Brundle, C.R., Evans, C.A., Wilson S. Jr.,** 1992 , *Encyclopedia of Materials Characterization*, Butterworth-Heinemann , ISBN #0-7506-9168-8
- Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., Whyman, R.,** 1994, Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, (7) pp. 801-802.
- Bullen, C. R., Mulvaey, P.,** 2004, Nucleation and Growth Kinetics of CdSe Nanocrystals in Octadecene, *Nano Lett.*, 4 pp. 2303-2307.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chaivisuthangkura, P., Senapin, S., Wangman, P., Longyant, S., Sithigorngul, P.,** 2013, Simple and rapid detection of infectious myonecrosis virus using an immunochromatographic strip test, *Arch. Virol.*,158(9) pp.1925–1930.
- Chen, X., Gan, M., Xu, H., Chen, F., Ming, X., Xu, H., Wei, H., Xu, F., Liu, C.,** 2014, *Food Control*, 46 pp. 225–232.
- Costa, M.N., Veigas, B., Jacob, J.M., Santos, D.S., Gomes, J., Baptista, P.V., Martins, R., Inácio, J.,**2014, **Fortunato, E.A.,** Low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper, *Nanotechnology*, 25 pp. 1–12.
- Donega, C.D.,** 2011, Synthesis and properties of colloidal heteronanocrystals, *Chemical Society Reviews*, 40 (3) pp.1512-1546.
- Doust, J.A., Glasziou, P.P., Pietrzak, E., Dobson, A.J.,** 2004, A Systematic Review Of The Diagnostic Accuracy Of Natriuretic Peptides For Heart Failure, *Arch Intern Med.*, 164 pp. 1978-84.
- Ercan Tayan, M., Caglar, M.,** 2000, Therapeutic Radipharmaeaceuticals, *Current Pharmaceutical Design*, (6) pp. 1085-1121.
- Falci, D.R., Hoffmann, E.R., Paskulin, D.D. , Pasqualotto, A.C.,** 2016, Progressive disseminated histoplasmosis: a systematic review on the performance of non-culture-based diagnostic tests, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, S1413-8670(16)30510-4
- Farah, K., Farouk, N.,** 1998, Electrophilic Radioiodination of Tyrosine Derivatives, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, XLI, pp. 255-259 .
- Fraker, P.J., Speck, J.C.,** 1978, Protein and Cell Membrane Iodinations with a Sparingly Soluble Chlroamide 1,3,4,6-tetrachloro 3,6-diphenyl glycoluril, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 80 pp. 849-857.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fournier, N.C., Rahim, M.,** 1985, Control of energy production in the heart: A new function for fatty acid binding protein, *Biochemistry*, 24(9)pp. 2387-2396.
- Fung, D.Y.C.,** 2006, Rapid methods and automation in microbiology: 25 years of development and predictions, *Bull Tech U Ist.*, 54(4)pp. 45-55.
- Glatz, J.F., Van Der Vusse, G.J.,** 1990, Cellular fatty acid-binding proteins: Current concepts and future directions, *Mol Cell Biochem.*, 98 pp. 237–251.
- Gu, Z.Y., Zou, L., Fang, Z., Zhu, W.H., Zhong, X.H.,** 2008, One-pot synthesis of highly luminescent CdTe/CdS core/shell Nanocrystals in aqueous phase, *Nanotechnology*, 19 (13).
- Harada, Y., AsakuraT.,** 1998, Dynamics and dynamic light-scattering properties of Brownian particles under laser radiation pressure, *Pure and Applied Optics, Journal of the European Optical Society Part A*, 7(5)pp. 1001–12.
- Heckman, J.W., Flegler, S.L., Klomparens, K.L.,** 1993, *Scanning and Transmission Electron Microscopy: An Introduction*, Oxford Univ. Press, ISBN #0-19-510751-9.
- Hildebrandt, N.,** 2011, Biofunctional quantum dots: controlled conjugation for multiplexed biosensors, *ACS Nano*, 5(7) pp. 5286–5290.
- Jang, E., Jun, S., Pu, L.,** 2003, High quality CdSeS nanocrystals synthesized by facile single injection process and their electroluminescence, *Chem. Commun.*, 2964– 2965.
- Januzzi, JL Jr., Camargo, C.A., Anwaruddin, S.,** 2005, The N-terminal Pro-BNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) study, *Am J Cardiol.*, 95 pp. 948-954.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jena, K.K.**, 2011, Biodegradable Polymers (PLA and PLGA) Based Nanoparticles in Protein and Plasmid DNA Delivery.
- Jiang, C., Shen, Z., Luo, C., Lin, H., Huang, R., Wang, Y., Peng, H.**, 2016, One-pot aqueous synthesis of gadolinium doped CdTe quantum dots with dual imaging modalities, *Talanta*, 155 pp. 14-20.
- Jiang, L., Zhu, Y. J.**, 2010, A General Solvothermal Route to the Synthesis of CoTe, Ag₂Te/Ag, and CdTe Nanostructures with Varied Morphologies, *European Journal of Inorganic Chemistry*, (8)pp. 1238-1243.
- Jin, Z., Hildebrandt, N.**, 2012, Semiconductor quantum dots for in vitro diagnostics and cellular imaging, *Trends Biotechnol.*, 30(7) pp. 394–403.
- Khatei, J., Pendyala, N.B., Rao, K.S.R.K.**, 2011, Solvothermal synthesis of Hg_{1-x}Cd_xTe nanostructures-Their structural and optical properties, *Journal of Alloys and Compounds*, 509(13) pp. 4632-4635.
- Khreich, N., Lamourette, P., Lagoutte, B., Ronco, C., Franck, X., Créminon, C., Volland, H.**, 2010, A fluorescent immunochromatographic test using immunoliposomes for detecting microcystins and nodularins, *Anal. Bioanal. Chem.*, 397(5) pp.1733–1742.
- Kortan, A. R., Hull, R., Opila, R. L., Bawendi, M. G., Steigerwald, M. L., Carroll, P. J., Brus, L. E.**, 1990, Nucleation and Growth of CdSe on ZnS Quantum Crystallite Seeds, and Vice Versa, In Inverse Micelle Media, *Journal of the American Chemical Society*, 112(4) pp. 1327-1332
- Lee, H., Holloway, P. H., and Yang, H.**, 2006, Synthesis and characterization of colloidal ternary ZnCdSe semiconductor nanorods, *Journal of Chemical Physics*, 125 (16).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lesnyak, V., Lutich, A., Gaponik, N., Grabolle, M., Plotnikov, A., Resch-Genger, U., Eychmüller, A.,** 2009, One-pot aqueous synthesis of high quality near infrared emitting Cd_{1-x}Hg_xTe Nanocrystals, *Journal of Materials Chemistry*, 19 (48) pp. 9147-9152.
- Li, C.Z., Vandenberg, K., Prabhulkar, S., Zhu, X., Schneper, L., Methee, K., Rosser, C.J., Almeida, E.,** 2011, Paper based point-of-care testing disc for multiplex whole cell bacteria analysis, *Biosens.Bioelectron.*, 26 pp. 4342–4348.
- Maisel, A.S., McCord, J., Nowak, R.M.,** 2003, Bedside B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study, *J Am Coll Cardiol.*, 41 pp. 2010-2017.
- Maisel, A., Hollander, J.E., Guss, D.,** 2004, Primary results of the Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial (REDHOT). A multicenter Study of B-type natriuretic peptide levels, emergency department decision making, and outcomes in patients presenting with shortness of breath, *J Am Coll Cardiol.*, 44 pp. 1328-1333.
- Maisel, A.,** 2001, B Type Natriuretic Peptide In The Diagnosis And Management Of Congestive Heart Failure, *Cardiol Clinics.*, 19 pp. 557-571.
- Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A.M., Schlager, J.J., Hussain, S.M.,** 2008, Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique, *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 101(2)pp. 239–53.
- Murray, C. B., Norris, D. J., Bawendi, M. G.,** 1993, Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (S = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites, *Journal of the American Chemical Society* 115 (19) pp. 8706-8715.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Murray, C. B., Kagan, C. R., Bawendi, M. G.,** 1994, Synthesis and Manipulation of Nearly Monodisperse II-VI Semiconductor Nanocrystallites, *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 208 pp.300-Inor.
- Nardo, F.Di., Anfossi, L., Giovannoli, C., Passini, C., Gofman, V.V., Goryacheva, I.Y., Baggiani,C.,** 2016, A fluorescent immunochromatographic strip test using QuantumDots for fumonisins detection, *Talanta*, 150 pp. 463–468.
- Nobmann, U., Connah, M., Fish, B., Varley, P., Gee, C., Mulot, S., Chen, J., Zhou L., Lu, Y., Shen, F., Yi, J., Harding, S.E.,** 2007, Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies, *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 24 pp. 117–28.
- Okamoto, F., Sohmiya, K., Ohkaru, Y., Kawamura, K.,** 2000, Human heart-type cytoplasmic fatty acid-binding protein (H-FABP) for the diagnosis of acute myocardial infarction. Clinical evaluation of H-FABP in comparison with myoglobin and creatine isoenzyme MB., *Clin Chem Lab Med*, 38(3)pp. 231-238.
- Pereira, M.A., Mosqueira, V.C., Vilela, J.M., Andrade, M.S., Ramaldes, G.A., Cardoso, V.N.,** 2008, PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Tc-HMPAO: release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy, *European journal of pharmaceutical sciences official, journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 33(1)pp. 42–51.
- Pan, D. C., Jiang, S. C., An, L. J., Jiang, B. Z.,** 2004, Controllable synthesis of highly luminescent and monodisperse CdS Nanocrystals by a two-phase approach under mild conditions, *Advanced Materials.*, 16 (12) pp.982.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., van Amerongen, A.,** 2009, Lateral flow (Immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393 pp. 569.
- Remme, W.J., Swedberg, K.,** 2001, Guidelines For Diagnosis And Treatment Of Heart Failure, *Eur Heart J.*, 22 pp. 1527-60.
- Romolo, F.S., Ferri, E., Mirasoli, M., D'Elia, M., Ripani, L., Peluso, G., Risoluti, R., Maiolini, E., Girotti, S.,** 2015, Field detection capability of immunochemical assays during criminal investigations involving the use of TNT, *Forensic Sci. Int.*, 246 pp. 25–30.
- Sabnis, R.W.,** *Handbook of Fluorescent Dyes and Probes*, Wiley, USA, 2015, ISBN: 978-1-118-02869-8.
- Saha, G. B.,** 2003, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Springer.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.,** 1989, Gel electrophoresis of DNA. In: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, chapter 6.
- Sampson, C.B.,** 1999, *Text Book of Radiopharmacy Theory and Practice*, Sampson, Gordon and Breach Science Publishers, ISBN 90-5699-154-X, pp.60-65.
- Sobal, G., Resch, U., Sinzinger, H.,** 2004, Modification of Low-Density Lipoprotein by Different Radioiodination Methods, *Nucl. Med. Biol.*, 31pp. 381-388.
- Swedberg, K., Cleland, J., Dargie, H.,** 2005, Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary, *Eur Heart J.*, 26 pp. 1115-1140.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tao, C., Zhang, Q., Feng, N., Shi, D., Liu, B.,** 2016, Development of a colloidal gold immunochromatographic strip assay for simple and fast detection of human α -lactalbumin in genetically modified cow milk, *Journal of Dairy Science*, 99 pp. 1773-1779.
- Uçan, US., Aras, Z., Semacan, A.,** 2010, Serodiagnosis of *Brucella canis* infection in dogs by a dipstick enzyme immunoassay, *Eurasian J Vet Sci.*, 26(2) pp. 109-112.
- Ünak, T., Ünak, P., Ogun, B., Duman, Y.,** 1997, Synthesis and Iodine-125 Labelling of Glucuronide compounds for combined Chemo- and radiotherapy of cancer, *Appl. Radiat. Isot.*, 48(6) pp. 777-783.
- Veerkamp, J.H., Maatman, R.G.,** 1995, Cytoplasmic fatty acid binding proteins: Their structure and genes, *Prog Lipid Res.*, 34(1) pp. 17-52.
- Vertes, A., Nagy, S., Klencsar, Z.,** 2004, *Handbook of Nuclear Chemistry*, Editor: Kluwer Academic., Publications: Dordrecht/Boston/London, 4(7) pp. 22.
- Wang, Q., Pan, D.C., Jiang, S.C., Ji, X.L., An, L.J., and Jiang, B.Z.,** 2006, A solvothermal route to size- and shape-controlled CdSe and CdTe Nanocrystals, *Journal of Crystal Growth*, 286 (1) pp. 83-90.
- Wang, C., Hou, Fei., Man, Y.,** 2016, Simultaneous quantitative detection of multiple tumor markers with a rapid and sensitive multicolor quantum dots based immunochromatographic test strip, *Biosensors and Bioelectronics*, 68 pp. 156-162.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Watanabe, Y., Ito, T., Ibrahim, M.S., Arai, Y., Hotta, K., Phuong, H.V.M., Hang, N.L.K., Mai, L.Q., Soda, K., Yamaoka, M., Poetranto, E.D., Wulandari, L., Hiramatsu, H., Daidoji, T., Kubota Koketsu, R., Sriwilaijaroen, N., Nakaya, T., Okuno, Y., T. Takahashi, Suzuki, T., Ito, T., Hotta, H., Yamashiro, T., Hayashi, T., Morita, K., Ikuta, K., Suzuki, Y., 2015, A novel immunochromatographic system for easy-to-use detection of group 1 avian influenza viruses with acquired human-type-receptor binding specificity, Biosens. Bioelectron., 65 pp. 211–219.**
- Westermeier, R., 1997, Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation, VCH, Weinheim.**
- Yang, X., Huang, J., Wang, Q., Wang, K., Yanga, L., Huoa, X., 2011, A one-step sensitive dynamic light scattering method for adenosine detection using split aptamer fragments, Analytical Methods, 3(1) pp. 59.**
- Zhang, C., Zhang, Y., 2009, Lateral flow colloidal gold-based immunoassay for pesticide, Methods Mol Biol., 504 pp. 237-252.**
- Zhou, Y., Li, Y.S., Meng, X.Y., Zhang, Y.Y., Yang, L., Zhang, J.H., R. Wang, X., Lu, S.Y., Ren, H. L., Liu, Z.S., 2013, Development of an immunochromatographic strip and its application in the simultaneous determination of Hg(II), Cd(II) and Pb(II), Sens. Actuators B: Chem., 183 pp. 303–309.**
- Zhou, W., Wang, Z., 2006, Scanning Microscopy for Nanotechnology.**

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özlet AKÇA ÖZDEMİR

Doğum Yeri : İzmir/Türkiye

Doğum Yılı : 27/04/1986

Öğrenim Durumu

Lisans : 2003 – 2008 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyokimya Bölümü

Yüksek Lisans :2008 – 2010 Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler
Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

Doktora : 2010 – Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler
Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

Akademik ve Mesleki Deneyim:

Araştırma Görevlisi :

Bilimsel Etkinlikler:

SCI dergilerde yayımlanmış makaleler : 6 adet

Patentler : 1 adet

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Tebliğler :12 adet

Ulusal Kongrelerde Sunulan Tebliğler :15 adet