



**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KÂĞIT TABANLI YÜZEY PLAZMON REZONANS
BİYOSENSÖRLERİNİN ÜRETİLMESİ VE SENSÖR ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fatma TAMBAĞ

**FİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY
ARALIK-2015**



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÂĞIT TABANLI YÜZEY PLAZMON REZONANS
BİYOSENSÖRLERİNİN ÜRETİLMESİ VE SENSÖR ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fatma TAMBAĞ

**FİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY
ARALIK-2015**


T.C.
MUSTAFAKEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÂĞIT TABANLI YÜZEY PLAZMON REZONANS BİYOSENSÖRLERİNİN
ÜRETİLMESİ VE SENSÖR ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

FAMA TAMBAĞ
FİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Fatih BAYANSAL danışmanlığında hazırlanan bu tez 30/12/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç. Dr. Fatih BAYANSAL
Başkan


Prof. Dr. Mustafa ERAYMAN
Üye


Doç. Dr. H. Ali ÇETİNKARA
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Okan ŞENER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma TÜBİTAK (Proje No: 214Z252) ve MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (Proje No: 13100) tarafından desteklenmiştir

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

30/ 12 / 2015

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklikyapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Fatma TAMBAĞ

ÖZET

KÂĞIT TABANLI YÜZEY PLAZMON REZONANS BİYOSENSÖRLERİNİN ÜRETİLMESİ VE SENSÖR ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yapılan çalışmanın amacı, optik çeviriciye sahip, etiketsiz tanı yapabilen, kısa sürede sonuca götüren, kolay kullanılan ve gerçek zamanlı analiz imkanı sağlayan yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörlerin geliştirilmesidir. Sunulan tezde SPR biyosensör sisteminin altın sensör ve A4 kağıt sensör ile üre tayini yapıp yapmadığı üzerine çalışılmıştır. Bu kapsamda tez çalışması iki ayrı bölüm halinde gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının birinci bölümünde üreaz immobilize edilen altın sensörler farklı konsantrasyonlarda hazırlanan üre çözeltileri kullanılarak SPR sisteminin altın sensörlere verdiği tepkiler ölçülmüştür. Sonraki aşamada altın sensörlere immobilize edilen üreaz miktarları değiştirilerek bir önceki aşamada kullanılanlarla aynı konsantrasyonda üre çözeltileri ile yeni altın sensörlerin tepkileri ölçülmüştür. Çalışmanın ikinci bölümünde ise altın sensörler üzerine üreaz immobilize edilmiş A4 kağıtlar konularak birinci kısımda yapılan çalışmalar tekrarlanmıştır. Çalışmalarda kullanılan sensörler için birleşme (K_A) ve ayrılma (K_D) denge sabitleri her bir konsantrasyon değeri için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Sistemde kullanılan sensör yüzeyleri için Raman ve UV-vis analizleri yapılmıştır. Yapılan çalışmalar ve analizler sonucu A4 kağıt kullanılarak üretilen sensör analizlerinin yalnızca altın sensörlerle üretilen analizlerle paralel tepkiler verdiği ve bu alanda altın sensörlere alternatif bir kullanım sergiledikleri gözlemlenmiştir.

2015, 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: SPR, kağıt tabanlı biyosensör, üreaz, üre

ABSTRACT

PRODUCTION OF PAPER-BASED SURFACE PLASMON RESONANCE BIOSENSOR AND INVESTIGATION OF SENSOR PROPERTIES

The aim of the study is development of surface plasmon resonance (SPR) biosensors with an optical transducer, shorter testing time, ability for real time analysis, capable of label-free detection and ease of use. In the thesis, it is investigated that whether the SPR biosensor system with gold sensor and A4 paper sensors can detect the amount of urea or not. In this context the thesis was carried out in two separate parts. The first part of the study, enzyme immobilization studies were performed using gold chips. The response of urease immobilized SPR sensors were measured using urea solution prepared at different concentrations. In the next step, the responses of new sensors with varying amounts immobilized urease were measured to urea solutions in the same concentration used in the previous step. In the second part of study urease immobilized A4 paper sensors were put onto the gold films and the investigations in the first part were repeated. Association (K_A) and dissociation (K_D) equilibrium constants were calculated for the sensors used in the experiments for each concentrations. Furthermore the UV-Vis. and Raman analysis were performed on the sensor surfaces. The results of the investigations and analyses were demonstrated that the A4 paper sensors have parallel results with the gold sensors which means that these paper sensors can alternatively be used as biosensors in surface plasmon resonance systems.

2015, 61 pages

Key words: SPR, paper-based biosensor, urease, urea

TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinde, tezin alışılmasında ve yazılmasında bilgisi ve tecrübesi ile bana yol gösteren ve her daim sabırlı olan saygıdeğer danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Fatih BAYANSAL'a sonsuz saygı ve teőekkürlerimi sunarım.

Nanomalzemeler ve Aygıtlar Araştırma Laboratuvarında birlikte çalıştığım kıymetli hocalarım Doç. Dr. H. Ali ÇETİNKARA'ya ve Doç. Dr. Bünyamin ŐAHİN'e, çalışmalarım sırasında beni her zaman destekleyen laboratuvar arkadaşlarıma,

Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümündeki tüm hocalarıma,

Çalışmalarımı maddi olarak destekleyen bu alışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna ve TUBİTAK'a,

Beni her zaman ve her koşulda özveriyle ve sabırla destekleyip yanımda olan ve bugüne gelmemi sağlayan sevgili aileme,

En içten minnet ve Őükran duygularım ile sonsuz teőekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
3.MATERYAL ve YÖNTEM	10
3.1. Materyal	10
3.2. Yöntem.....	10
3.2.1. Yüze Plazmon Rezonans (SPR).....	10
3.2.2. SPR Sisteminin Çalışma Prensibi	12
3.2.3. SPR Çalışmalarında Kullanılan Ölçüm Yöntemleri	14
3.3. Kinetik Analiz	16
3.4. Deneysel Hazırlık.....	17
3.4.1. Altın Yüzeyin Temizlenmesi	18
3.4.2. PBS Hazırlanması	19
3.4.3. Üre Çözeltilisinin Hazırlanması	19
3.4.4. Üreaz Çözeltilisinin Hazırlanması	20
3.4.5. Kâğıt Yüzeylerin Oluşturulması	20
3.4.6. Sensör Yüzeyine Enzim İmmobilizasyonu	20
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	21
4.1. Enzim Kontrolü.....	21
4.2. SPR Ölçümleri	26
4.2. Kinetik Analiz	50
4.3. SPR Sensörlerinin Yüze İncelemesi	52
4.3.1. Raman Analizi	52
4.3.2. UV-vis Analizi	54
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	(a) Uyarılmış yüzey plazmonları için üç katmanlı geometri. Bir yüzey plazmon dalgası, metal arayüzde uyarılır. (b) SPR reaksiyonu.....	13
Şekil 3.2.	SPR biyosensör sensogramının şematik gösterimi.....	13
Şekil 3.3.	SPR biyosensör çalışmalarında kullanılan ölçüm yöntemleri (a) doğrudan ölçüm yöntemi, (b) yarışmacı ölçüm yöntemi, (c) inhibisyon ölçüm yöntemi, (d) sandviç ölçüm yöntemi.....	14
Şekil 3.4.	Tez çalışmasında kullanılan SPR sistemi.....	18
Şekil 3.5.	Tez çalışmasında kullanılan altın sensörler.....	19
Şekil 4.1.	10 mM üre konsantrasyonunda 5 µL enzim için gözlenen pH değerleri.....	22
Şekil 4.2.	20 mM üre konsantrasyonunda 5 µL enzim için gözlenen pH değerleri.....	22
Şekil 4.3.	40 mM üre konsantrasyonunda 5 µL enzim için gözlenen pH değerleri.....	23
Şekil 4.4.	80 mM üre konsantrasyonunda 5 µL enzim için gözlenen pH değerleri.....	23
Şekil 4.5.	10 mM üre konsantrasyonunda 10 µL enzim için gözlenen pH değerleri.....	24
Şekil 4.6.	20 mM üre konsantrasyonunda 10 µL enzim için gözlenen pH değerleri.....	24
Şekil 4.7.	40 mM üre konsantrasyonunda 10 µL enzim için gözlenen pH değerleri.....	25
Şekil 4.8.	80 mM üre konsantrasyonunda 10 µL enzim için gözlenen pH değerleri.....	25
Şekil 4.9.	Akış hücresinin temsili görünüşü.....	26
Şekil 4.10.	160 mM üre için kalibrasyon sensogramı.....	27
Şekil 4.11.	80 mM üre için kalibrasyon sensogramı.....	28
Şekil 4.12.	Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin 10 mM üre akışına verdiği tepkiler ($\Delta\theta$).....	29
Şekil 4.13.	Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin (a) 20 (b) 40 mM üre akışına verdiği tepkiler ($\Delta\theta$).....	30
Şekil 4.14.	Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin (a) 80 (b) 160 mM mM üre akışına verdiği tepkiler ($\Delta\theta$).....	31
Şekil 4.15.	Enzim immobilize edilmeyen altın sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$).....	33
Şekil 4.16.	Enzim immobilize edilen altın sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$). (a) 1.0 mg/ml (b) 2.5 mg/ml.....	34
Şekil 4.17.	Enzim immobilize edilen altın sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$). (a) 5.0 mg/ml (b) 10 mg/ml.....	35

Şekil 4.18. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin 10 mM üre akışına verdiği tepkiler (RU).....	36
Şekil 4.19. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin (a) 20 (b) 40 mM üre akışına verdiği tepkiler (RU).....	37
Şekil 4.20. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin (a) 80 (b) 160 mM üre akışına verdiği tepkiler (RU).....	38
Şekil 4.21. Temizleme sonrası aşınan altın sensörler.....	39
Şekil 4.22. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin (a) 10 (b) 20 mM üre akışına verdiği tepkiler ($\Delta\theta$).....	40
Şekil 4.23. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin (a) 40 (b) 80 mM üre akışına verdiği tepkiler ($\Delta\theta$).....	41
Şekil 4.24. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin 160 mM üre akışına verdiği tepkiler ($\Delta\theta$).....	42
Şekil 4.25. Enzim immobilize edilmeyen kağıt sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$).....	43
Şekil 4.26. Enzim immobilize edilen kağıt sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$). (a) 1.0 mg/ml (b) 2.5 mg/ml.....	44
Şekil 4.27. Enzim immobilize edilen kağıt sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$). (a) 5.0 mg/ml (b) 10 mg/ml.....	45
Şekil 4.28. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin (a) 10 (b) 20 mM üre akışına verdiği tepkiler (RU).....	46
Şekil 4.29. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin (a) 40 (b) 80 mM üre akışına verdiği tepkiler (RU).....	47
Şekil 4.30. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin 160 mM üre akışına verdiği tepkiler (RU).....	48
Şekil 4.31. Analit konsantrasyonuna karşı tepki grafiği (a) Altın sensör kullanılarak elde edilen ölçümler (b) Kağıt sensör kullanılarak elde edilen ölçümler.....	49
Şekil 4.32. Altın ve kağıt sensörler için $R_{eq}/C - R_{eq}$ grafikleri	51
Şekil 4.33. Sistemde kullanılan altın sensörlerin Raman analizi.....	53
Şekil 4.34. Sistemde kullanılan A4 kağıt sensörlerin Raman analizi.....	53
Şekil 4.35. Altın sensörün absorbans – dalgaboyu grafiği	55
Şekil 4.36. Kağıt sensörün absorbans – dalgaboyu grafiği	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Altın sensör kullanılarak gözlenen maksimum rezonans açığı kayma değerleri ($\Delta\theta$)	32
Çizelge 4.2. Kağıt sensör kullanılarak gözlenen maksimum rezonans açığı kayma değerleri ($\Delta\theta$)	42
Çizelge 4.3. Altın ve kağıt sensörler için hesaplanan K_A ve K_D değerleri.....	50



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

A	: Analit
L	: Ligand
R	: Sensör tepkisi
C	: Analit konsantrasyonu
R_{max}	: Maksimum analit bağlanma kapasitesi
R_{eq}	: Denge halinde sensör tepkisi
k_a	: Birleşme oran sabiti
k_d	: Ayrılma oran sabiti
K_A	: Birleşme sabiti
K_D	: Ayrılma sabiti
$\Delta\theta$: Max. tepkideki açı değeri ile başlangıç açı değeri arasındaki fark

KISALTMALAR

SPR	: Yüzey Plazmon Rezonans
ELISA	: Enzim İliintili İmmün Test
SAW	: Akustik Dalga Klavuzu
FET	: Alan Etkili Transistör
RI	: Kırılma İndisi
SPW	: Yüzey Plazmon Dalga
ATR	: Azalan Toplam Yansıma
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi
RU	: Rezonans Birimi

1. GİRİŞ

Özelikle son yıllarda biyosensörler, biyolojik ve kimyasal etken maddelerin tarımsal üretim, gıda işleme ve çevresel izleme yanında klinik teşhisler, ilaç testleri, biyoişleme, biyolojik savaş ve anti-biyoterörizm alanlarında algılama yapması konusunda son yıllarda dikkat çekmektedir.

Biyosensör terimi 1970'lerin sonlarında bilimsel literatürde kendini göstermeye başlamıştır ancak temel yapısı ile ilgili bilgiler daha eski tarihlere dayanmaktadır. Enzim elektrot olarak bilinen ilk biyosensör 1962'de Clark ve Lyons tarafından ortaya atılmıştır. Bu çalışma, 1974 yılında ilk defa piyasada görülen Yellow Springs Instruments (Model 23YSI, Yellow Springs, OH) firmasını, biyosensör ürününün üretimine sevk etmiştir. Daha sonra 1977'de bilimadamları biyo-seçici sensör olarak tanımladıkları aminoasit arginin için seçici bir elektrot inşa edip amonyak gaz algılama elektrotunun yüzeyine canlı mikroorganizmalar immobilize etmişlerdir. Sonraları biyo-seçici sensör biyosensör olarak kısaltılmış ve biyolojik kökenli malzemelerle fiziksel çeviricilerin bir arada kullanılması popüler bir hal almıştır. Bu tip biyosensörler birinci nesil biyosensörler olarak adlandırılmaktadır. İkinci nesil biyosensörler, biyoalgılama materyalinin immobilizasyonu, modifiye edilmiş çevirici arabirimlerinde veya bunların çevirici yüzeyinde bir polimer matris içine dâhil ederek çapraz-bağlantılı ayıraç maddeler veya iki işlevli ayıraç maddeler kullanılarak elde edilmiştir. Tipik olarak, çevirici yüzey, biyoalgılama materyalinin eklerini takiben kimyasallarla modifiye edilmiştir.

Üçüncü nesil biyosensörler için optik biyosensörlerde olduğu gibi biyomolekül, biyoalgılama materyalinin dahili bir parçası haline gelmiştir (Li, 2006).

Bir biyosensör, temel olarak bir biyoalgılama materyali ve bir çeviriciden oluşur ve biyolojik ve kimyasal etken maddelerin tespitinde kullanılmaktadır. Enzimler, antikolar, nükleik asitler, hücreler, dokular ve organeller de dâhil olmak üzere biyoalgılama materyalleri, elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, termal ve manyetik cihazlar gibi hedef analitleri seçerek tanıyabilir ve nicel olarak izleyebilmektedir. Biyosensörler, moleküler biyoloji, mikroakışkanlar ve nanomateryaller gibi yeni teknolojilerle bir araya gelerek, bitkilerde, hayvanlarda, gıdalarda, toprakta, havada ve suda; pestisitler, antibiyotikler, patojenler, toksinler, proteinler, nutrilitler, mikroplar ve

daha fazlasını hızlı, spesifik, hassas, düşük maliyetli, gerçek-zamanlı kullanılabilirler.

Yapılan araştırmaların önemli bir kısmında kimyasal ve biyolojik numunelerin ölçümü için optik biyosensörler başrol oynamıştır. Optik biyosensörler, etkileşim sonucu meydana gelen kimyasal ya da fizikokimyasal bir değişim ölçümünü temel almaktadırlar. Optik biyosensörlerde sinyal; ışık yansıması, saçılımı ya da yayımı sonucu oluşmaktadır.

Optik yöntemlerin büyük çoğunluğu elipsometri, spektroskopi (luminesans, fosforesans, floresans, Raman), interferometri ve SPR'yi içeren biyosensör cihazlarında kullanılmıştır. Uygulama açısından kolaylık sağlayan, hızlı bir şekilde sonuca götüren ve çevresel etkilerden en az etkilenen sensör tipleri yine optik sensörlerdir (Li, 2006).

Kağıt tabanlı sensörler, ile ilgili çalışmalar 19 yy.'da gelişme göstermeye başlamıştır. Ancak kağıt türü malzemeler maliyetsiz, kullanıma elverişlilik ve taşınabilirlik özelliklerinden dolayı sensör alanında son yıllarda yeni bir akım oluşturmuştur.

Kağıt temelli cihazlar yerinde tanı ve bilimsel ilerlemeleri de içeren çeşitli küçültülmüş testlerde klinik teşhisler için oldukça yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Tanı cihazlarında materyal olarak kullanılan kağıt malzemeler aşağıda sıralanan avantajlara sahiptir:

- i. İncedir (0,07-1,00 mm kalınlığında), hafiftir ($\sim 10 \text{ mg/cm}^2$) ve bu yüzden kolay taşınır, kolay depolanır.
- ii. Kağıtlar, tipik olarak selüloz ya da selüloz-polimer karışımlarından yapıldığı için biyolojik numunelerle çalışmaya uyumludur.
- iii. Kağıtlar; DNA, protein ya da daha küçük molekülleri kendileri ile kovalent bağ yapan fonksiyonel gruplarla birleştirmek için kimyasal olarak modifiye edilebilirler.
- iv. Işığı dağıttığı için genellikle beyazdır ve renkli bir maddeyle güçlü kontrast sağladığından dolayı kolorimetrik testler için uygundur.
- v. Kağıt yanıcıdır, bu yüzden bulaşıcı hastalık teşhisi sonrası kolayca yok edilebilir.

vi. Esnektir, mevcut baskı teknolojileri ile uyumlu olduğundan cihaz üretiminde kullanılır (Martinez ve ark., 2010).

Kâğıt tabanlı biyosensörler çoğu uygulamada genellikle kolorimetrik algılama yöntemiyle protein ve glikozun algılanmasında kullanılmıştır veya kullanıldığı çalışmalarda sensörün hassasiyetini arttırmak için farklı tür nanoparçacıklardan faydalanılmıştır.

Uygulamalarda yüksek hassasiyet, geniş konsantrasyon aralığı ve çalışma kolaylığı gibi belirgin özelliklere sahip olması kağıt temeli cihazları gelecekte sıkça kullanılacak bir yöntem haline getirmiştir.

SPR sensör sistemlerinde algılayıcı tabaka olarak altın film kullanılmaktadır. Ancak bu film biyolojik ve kimyasal etkenlerden dolayı birkaç kullanım sonrası bozulmaktadır ve yeni bir filmin üretilmesi çalışan açısından hem zaman almakta hem de maliyet oluşturmaktadır. Bu nedenle sunulan tezde, prizma temelli yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörlerin daha az maliyet gerektiren işlemlerle geliştirilmesi amacıyla çalışılmıştır. Bu doğrultuda daha önce yüzey plazmon rezonans yönteminde kullanılmamış olan kağıt tabanlı biyosensör uygulamaları yine daha önce rastlanmamış A4 kağıt kullanılarak çalışılmış ve sensörde kullanılan altın filmlerin ömrünü uzatmak, ölçüm maliyetini azaltmak ve seri üretim sayesinde işlem süresini azaltmak amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

SPR yöntemi belirli bir bağlanma dinamiği olan her türlü molekül çiftine uyarlanabilmeye uygun görülen bir yöntemdir. Bunlar bir antijen ve antikor, bir DNA örneği ve tamamlayıcı DNA ipliği, bir enzim ve reaktanı olabilir. Bu ölçüm yönteminin tipik uygulama alanları arasında çevresel görüntüleme ya da biyoalgılama sayılabilir. Hızlı ve güvenilir sonuçlara ulaşılmasını sağlayan bu yöntemin kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Aşağıda özetlenen çalışmalar yöntemin geniş bir alana yayıldığına göstergesidir.

Bianchi ve arkadaşları (1997), yaptıkları çalışmada biyo-özellik etkileşim analizleri için biyosensör teknolojilerindeki gelişmeler SPR'nin moleküler reaksiyon türlerini zaman kaybetmeden görüntüleyebilmesi durumundan faydalanmışlardır. Ligand olarak biyotinlenmiş tek iplikli DNA seçerek SPR sisteminde DNA-DNA hibridizasyonunu görüntüleyebilmişlerdir. Bu yaklaşım, hibridizasyon adımının özellikle tanımlanan moleküllerin doğrulanması için gerekli olduğundan Viroloji'de büyük ilgi görmüştür. Bundan hareketle Bianchi ve arkadaşları insan bağışıklık sisteminde HIV-1 virüsünün moleküler tanısı için gerçek zamanlı çalışan SPR teknolojisinin kullanılabilir olduğunu düşünmüşlerdir. Sistemin, bir hücre içi HIV-1 oligonükleotid prob bulunduran sensor çipine asimetric PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyon)'nin doğrudan enjekte edilmesi yöntemiyle hibridizasyonun algılanmasına imkân sağladığını gözlemişlerdir. Bu gelişme tek adımda ve radyoaktif olmayan işlemlerle sonuca ulaşmayı sağlamıştır.

May ve Russell (2003), çalışmalarında üreaz enziminin aktifliğinin ağır metal olan kadmiyum tarafından engellendiği bilgisinden yola çıkarak üreaz enzimine kadmiyum bağlanması sonucunda enzim yapısındaki değişiklikler yüzey plazmon rezonans biyosensör sistemi ile çalışmışlardır. Çalışmalarında altın SPR sensör çipine SAM (self-assembled monolayer) metodu ile enzimi kolaylıkla sabitleyebilmişlerdir. Enzimi yüzeye SAM metodu ile N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithiol) propionate (SPDP) yardımıyla modifiye etmişlerdir. Üreaz tabakasını kadmiyum iyonlarına maruz bırakmış ve SPR ile görüntülemişlerdir. Böylece üreaz enzimidaki aktif nikelli bölgelerin yapısı bölgeye kadmiyum iyonlarının bağlanması ile değişiklik gösterdiğini gözlemişlerdir. Enzim tabakasındaki bu değişiklikler SPR ile ölçülmüş, 0-10mgL⁻¹ aralığında

kadmiyum konsantrasyonu ile sensörün kullanılabilirliğini belirtmişlerdir. May ve Russell'a göre bu veriler ilk kez metal iyonlarının SPR sensör tarafından algılanabilir olduğunu göstermiştir.

Hu ve arkadaşları (2004), RF magnetron co-sputtering ile hazırladıkları Au:SiO₂ filmleri Au SPR sensör çipi üzerine yerleştirmişlerdir. Edindikleri deneysel sonuçlar Au:SiO₂ kaplaması SPR sensör çiplerinin katı veya sıvı ortamlardaki algılama limitlerini geliştirdiğini göstermiştir. Önerilen bu SPR sensörünün ana avantajının; SPR açığı kayma sinyalinin karmaşık yöntemlere gerek kalmadan etkinleştirilmesi olduğunu belirtmişlerdir. Oluşturulan bu sensör çipleriyle düşük konsantrasyonlardaki (biyomoleküllerin yüzeyinde 1 pg/mm²) protein, DNA, RNA, polisakkarit, nükleik asit gibi küçük biyomoleküller arasındaki etkileşimin araştırılabileceğini ortaya çıkarmışlardır.

Kawazumi'nin (2005) ekibiyle birlikte yaptığı bir çalışmada benzo[a]pyrene ve 2-hidroxybiphenyl'in yüksek hassasiyet ve seçicilik gerektiren analizi SPR temelli dolaylı immunoreaksiyon kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Çoklu mikro akış hücrelerine sahip cihaz, farklı sıcaklıklarda kırılma indisinin gözlenmesini sağlamışlar ve SPR sensörün hassasiyeti ppb seviyesinde bulunduğunu belirtmişlerdir.

Durta ve Kubota (2007), kardiyak troponin T (cTnT) miyokardiyal zararlar için oldukça hassas ve kalbe özel bir işaretleyicidir ve akut miyokard infarktüsü (AMI) sırasında hemen kana salınır bilgilerinden yola çıkarak insan vücudundaki cTnT'yi eş zamanlı ve hızlı tanımak için geliştirilen yüzey plazmon rezonans biyosensörlerle çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmada yüzeyine Streptavidin immobilize ettikleri SPR sensör, biyotinlenmiş anti-TnT'yi algılamayı başarmışlardır.

Chen ve arkadaşları 2007'de basit bir modifikasyon işlemi ile DNA ikincil yapısının hibridizasyonunu gözlemlemek için SPR görüntüleme sisteminde çip olarak DNA yapısı kullanılarak deneysel çalışmalar başlatılmıştır. Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada çoklu DNA çipini hazırlamak için Au yüzeye tiyol grubu eklenmiş tek dize oligonükleotidler oligoetilen glikol alkenetiollerle karıştırarak immobilize etmişlerdir. Ulaştıkları deneysel sonuçlar yöntemin hızlı olduğunu ve kolayca uygulanabileceğini göstermiştir.

Uzun ve arkadaşları (2009), dünyada iki milyondan fazla hepatit B hastasının bulunduğu bilgisinden hareketle hepatit B'nin ucuz ve hızlı teşhisi için, moleküler baskılama temelli SPR biyosensör hazırlamışlar ve sensörün etkinliğini hasta plazması

ile test etmişlerdir. Hazırladıkları biyosensörün sonuçları ile ELISA yöntemiyle elde ettikleri sonuçlar arasında %99.7 oranında uygunluk olduğunu rapor etmişlerdir.

Vaisocherová ve arkadaşları (2009), plazmadaki ALCAM (aktive edilmiş hücre lökosit yapışma molekülü)'ın tespiti için yapışmayı arttırıcı Ti film (2nm) ile kaplı Au (48nm) sensör çipi kullanarak SPR sensörü ELISA temelli yöntemle karşılaştırmışlardır. SPR sensör hassasiyeti ALCAM mililitresi başına nanogram altında bir detektör sınırında ELISA ile karşılaştırılabilmiştir. Sağlıklı bir insandaki ALCAM seviyesi 100 ng/ml'den daha düşüktür. SPR yönteminin algılama limiti bu konsantrasyon için uygun bulunmuştur. Yapılan çalışmada işaretleyici olmadan kullanılan SPR tekniği işaretleyici ile çalışan ELISA'ya karşı oldukça iyi bir alternatif olarak gösterilmiştir. Plazmadaki protein hedeflerin doğrudan saptanabilmesi için tek antikora ihtiyaç vardır ve SPR bu tür biyolojik çalışmalar için ilgi çekici bulunmuştur.

Eum ve arkadaşları (2009), yaptıkları çalışmada SPR sensörü Salmonella isimli bakterideki panisilnaz-penisilin ve antijen-antikor reaksiyonlarını izlemek için kullanmışlardır. Salmonella antijen-antikor reaksiyonu için dalgaboyu değişimi 0,26 nm/dk civarında ölçülmüştür. Deneyden elde edilen sonuçlara göre değişken dalgaboylu SPR sensör, düşük konsantrasyonlardaki numuneleri algılamaya ve klinik teşhis içeren biyomateryal ölçümlerine uygun bulunmuştur.

Robelek ve Wegener (2009), çalışmalarında yapışık büyüyen memeli hücrelerindeki hacim değişikliklerinin ölçümleri için inert ortamı, kolay kullanımı ve etiketsiz izleme özelliklerinden dolayı SPR sensörü tercih etmiştir. SPR sensör yüzeyinde büyüyen hücrenin hacim değişikliklerini doğrudan gözlemlemiştir. Farklı yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar ile bu çalışmada yapılan SPR temelli deneylerin karşılaştırılması sonucunda SPR sinyal kayması ve hücre hacim değişiklikleri arasında doğru orantılı ilişki bulunmuştur.

Ertürk ve arkadaşları (2011), makro molekül baskılama sırasında karşılaşılan dezavantajların üstesinden gelmek için moleküler baskı işlemini kolaylaştırmak ve F_{ab} parçalarını kullanmak sureti ile sensörün verimliliği arttırmışlardır. Yürütülen karakterizasyon çalışmaları ve kinetik çalışmalar, F_{ab} parçaları baskılı SPR çiplerin bütün immunoglobulin G (IgG) molekülerinin biyotanıma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, F_{ab} parçaları baskılanmış SPR çiplerin, geleneksel belirleme yöntemi ELISA ile yüksek paralellik göstererek plazma gibi gerçek karmaşık

numunelerden IgG moleküllerini belirleyebildiği ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak, F_{ab} baskılanmış SPR çiplerin, plazma örnekleri ve sulu çözeltilerin geniş bir konsantrasyon aralığında IgG moleküllerin tespiti için ümit verici bir alternatif olduğu anlaşılmıştır.

Zhang ve arkadaşları (2013), Au film üzerine üçgen gümüş nanoplaka/chitosan karışımını spin-coating yöntemi ile immobilize edip filmin bovin IgG'yi algılamasını incelemiştir. 0.075–40.00 µg mL⁻¹ konsantrasyonları arasında üçgen gümüş nanoplaka/chitosan SPR biyosensör tatmin edici sonuçlar vermiştir. Çalışmalarında biyosensörün performansının kırılma indisi değişimine, üçgen gümüş nanoplakaların hassasiyetine ve chitosanın biyo-uyumluluğuna bağlı olduğunu keşfetmişlerdir.

Sípová ve Homola (2013), yaptıkları çalışmada altın tabakayı hiçbir kaplama yapmadan sensor çipi olarak kullanmışlardır. Çalışmalarını nükleik asit-nükleik asit, nükleik asit-protein, nükleik asit-küçük moleküller arasındaki etkileşimin hücrelerdeki karmaşık biyolojik süreçlerin anlaşılması için SPR üzerine yoğunlaştırmışlardır. Bu yöntem tedavilerin ve yeni ilaçların geliştirilmesine olanak tanımıştır. Bu çalışmada SPR sensörler sıradan moleküler etkileşimin kinetik parametrelerinin ölçümü için kullanılmıştır. Nükleik asit SPR sensörler attomolar seviyenin (=L/10⁻⁸mol) altındaki nükleik asitleri algılamak için çalışılmıştır .

Wang ve arkadaşları (2013), SPR sensörü Co film ve su içinde çözülmüş oksijen arasındaki reaksiyonu tespit etmek için geliştirmişlerdir. Co kalınlığı ile saptanabilir yansıma şiddeti değişimini anlamak için Au-Co iki tabakalı film kalınlığı teorik olarak optimize edilmiştir. Uygun Au tabaka ve Co tabaka yapısı, yansıma yoğunluğu Co filmin kütesinin azalması ile düzenli olarak azaldığı gözlenmiştir. Deiyonize su içerisinde Co filmin tükenme süreci yansıma yoğunluğu ölçülerek takip edilmiştir. Au film üzerine Co film kaplanarak oluşturulan sensörleri fosfat dedektörü olarak umut vaat edici bulmuşlardır.

Yu ve arkadaşlarının (2013), çalışmasında Cr katkılı Ag film sensor çipi olarak kullanılmış ve viral hastalıkların (kabakulak, kızamık, çiçek, nezle, grip, AIDS, DNA virüslerinin sebep olduğu hastalıklar vb.) teşhisinde uzun vadede düşük konsantrasyonlarda tanı sağlayabileceği ortaya çıkmıştır.

Enrico ve arkadaşları (2013), kirli sulardaki L. Pneumophila bakterisini algılamak için SPR sensör sistemini kullanmışlardır. Elde edilen sensörler sulu çözeltilerde L. Pneumophila'yı ayırt edebilmiştir. Kirli sulardaki ve yiyeceklerdeki Salmonella, E.

Coli, L. Monocithogenes gibi patojen çeşitlerine karşı sensor geliştirilmesi için yol gösterici bir çalışma olmuştur.

Zhang ve arkadaşları (2014), yaptıkları çalışmada hücre-protein etkileşimini araştırmak için SPR sistemini kullanmışlardır. Çalışmada fareden alınan IgG, SPR çip üzerine immobilize edildiğinde sensörün L5178Y hücresine verdiği yanıt gözlenmiştir. Görüntülenen bölgelerdeki kırmızı floresan noktaları fare lenfosit kanser hücrelerinin artması ile artmış ve SPR sinyali ile uyum göstermiştir. Sensörde 1×10^3 hücre/mL algılama limitine kadar inilmiştir. Kullanılan bu yöntemin kanser hücresi tanımlaması için belli bir proteinin daha fazla modifikasyonu ile doğrudan kanser hücresi saptanması potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir.

Lokman ve arkadaşları (2014), SPR temelli optik sensörleri toksik ağır metalleri belirlemek için kullanılmıştır. SPR sensörün hassasiyetini geliştirmek için aktif katmanları ile nanoyapılı ince filmler sentezlenmiştir. Bu çalışmada Pb(II) tepkisi ölçülmüştür ve Au/CS(altın/chitosan) filmler ve Au/CS/GO(altın/chitosan/grafen oksit) nanoyapılı ince filmler içeren SPR sensörler karşılaştırılmıştır. Sensör 5 ppm Pb(II) iyon çözeltisine maruz kaldığında Au/CS filmler $0,78 \text{ ppm}^{-1}$ Au/CS/GO filmler ise $1,11 \text{ ppm}^{-1}$ yüksek SPR hassasiyeti sergilemiştir. SPR sensörün gelişen bu tepkisi CS ve GO arasındaki güçlü kovalent bağlardan kaynaklanmıştır. Ulaşılan sonuçlar Au/CS/GO filmlerin çevresel uygulamalardaki ağır metal kirliliğini belirleme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Du ve Zhao (2014), 633 nm görünür dalgaboyunda kırılma indisi 1,3-1,5 arasında olan kimyasal buhar depolama yöntemi ile oluşturulmuş Au/SiC (50 nm/ 20 nm) çip kullanarak SPR sistemi sistemi geliştirmişlerdir. Oluşturulan bu sensor biyolojik ve kimyasal algılamalar için umut verici bulunmuştur.

Li ve çalışma arkadaşları (2015), yüksek afiniteli farklı epitopa (antijenin kendi antikoru ile bağ yapmasını sağlayan kimyasal grup) sahip CEA'yı tanımlayabilmek için iki farklı antikor kullanmışlardır. SPR sensörün algılama sınırı 1,0 ng/ml olarak belirlemişlerdir. Sensör yüzeyiyle yapılan doğrudan ölçümlerde 4,2-kat; sandviç yöntemiyle yapılan ölçümlerde ise 13,8-kat hassasiyete ulaşmışlardır. Elde edilen bu sonuçlar SPR sensörün CEA için yüksek hassasiyette ve seçicilikte kullanılabileceğini göstermiştir. Li ve arkadaşları bu yöntemin kanser teşhisi için geleneksel yöntemlerden daha faydalı ve başarılı olacağını öngörmüşlerdir.

Then ve arkadaşları (2015), kan grubu antijen-antikor etkileşimlerini ölçme teknikleri oldukça sınırlılığında kurtulmak için yaygın olarak antijen-antikor etkileşimini karakterize etmek için kullanılırken hücrelerde meydana gelen antijen-antikor etkileşimleri için kullanımı yaygın olmayan SPR ile çalışmışlardır. Önceki çalışmalar kan grubu belirlemede SPR'yi kullanmışlar fakat ilk kullanımdan sonra işlevsellik kaybından dolayı düşük seviyede yenilenme tespit etmişlerdir. Then ve ekibinin yaptığı çalışmada tekrar tekrar kullanılabilen SPR çipleri yardımıyla kan grup tipinin niceliğine sensör yüzeyine IgG-antikor immobilize edilerek ulaşılmıştır.

Literatürdeki çalışmalar, çabuk, hassas, seçici, tekrar kullanılabilir, basit ve vücut sıvılarından doğrudan ölçüm yapabilen yüzey plazmon rezonans biyosensörlerin, teşhis amaçlı yeni analitik sistemlerin geliştirilmesinde umut verici yaklaşımlardan biri olduğunu göstermektedir.

Özetlenen çalışmalarda yüzey plazmon rezonans biyosensörlerin kullanım alanlarının genişletilmesi ve algılama limitlerinin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu amaçla sensörde kullanılan altın yüzeyleri değişik türde ve oranda iletken ya da yalıtkan malzemelerle kaplama gibi ekstra maliyet gerektiren yollar tercih edilmiştir. Ancak sensörde algılayıcı yüzey olarak kullanılan altın yüzeylerin kullanım ömrünü uzatacak bir öneride bulunulmamıştır. Yapılan tez çalışmasında gün geçtikçe kullanımı artan yüzey plazmon rezonans biyosensörlerin daha az maliyetle kullanılabilmesi ve altın yüzeylerin daha uzun ömürlü olabilmesi amaçlanmıştır.

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada SPR mini cihazı, cihazla birlikte temin edilen ve yüzey plazmon rezonans yönteminin temelini oluşturan BK7 cam prizma kullanılmıştır. Algılayıcı yüzey olarak 50 nm kalınlığında altın sensörler kullanılmıştır. LAQUATwin pH metre ile üreaz enziminin aktifliği kontrol edilmiştir.

Çalışmada ligand olarak üreaz (U1500 Jack Bean), analit olarak üre (U0931) kullanılmıştır. %99 saflıkta $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve %98 saflıkta $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tuzları ile fosfat tampon çözelti (PBS) hazırlanmıştır. Sensör yüzeyleri biyolojik ve kimyasal kalıntılardan 1:3 oranında H_2O_2 ve H_2SO_4 ile hazırlanan pirana çözeltisiyle temizlenerek arındırılmıştır. Prizma %99 saflıkta İzopropil alkol ile, altın sensörler % 99 saflıkta etil alkol ile durulanmıştır. Son olarak altın sensörler azot gazı kullanılarak kurutulmuştur.

3.2. Yöntem

Sunulan tezde optik biyosensörler sınıfına ait Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) biyosensör sisteminin algılama özellikleri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Çalışmada kullanılan SPR cihazın nasıl çalıştığı sonraki bölümde anlatılacaktır.

3.2.1. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)

Optik biyosensörler immunoreaksiyonları görüntülemek için kullanılırlar ve klinik kimyada antijen-antikor etkileşiminin kinetiğini ve afinitesini anlamak ve antijenik bölgelerin miktarını belirlemek için kullanılır. Özellikle yüzey plazmon rezonans gibi işaretleme gerektirmeyen doğrudan optik çeviriciler oldukça etkilidir. Doğrudan optik çeviricilerin ana avantajı antijen-antikor bağlanma olayını anlamak için herhangi bir ize ya da işaretleyiciye ihtiyaç duymamasıdır.

Bahsi geçen yöntemin ana ilkesi; bir optik cihaza gelen ışığın bir algılama yüzeyine doğrudan gelmesi ve tekrar dışarıya yansmasıdır. Yansıyan ışık, algılama yüzeyinde meydana gelen fiziksel olaylar hakkında bilgi sunan bir malzeme olarak kullanılır.

Doğrudan optik sensörlerin çoğu, toplam iç yansımanın oluşturduğu kritik açıya eşit ya da kritik açıdan daha büyük bir açı ile gelen ışığın özelliğinden faydalanır. Gelen

ışık farklı kırılma indisli (Refractive Index, RI) iki malzemenin arasına yönlendirilmiştir. Işık ışını yüksek RI'lı bir algılama yüzeyinden düşük RI'lı bir malzemeye yönlendirildiği zaman ışık toplam iç yansıma olarak bilinen bir olayla yüksek RI'lı malzemedan geri yansır. Aynı anda kayıp dalga olarak adlandırılan elektrik alan düşük RI'lı malzemede üretilir. Belli bir derinlikte düşük RI'lı malzemeye nüfuz eden kayıp dalga, yolculuğu sırasında exponansiyel azalan elektrik alanın genliğine ve dalgaboyu kırılma indisine bağlıdır. Biyomoleküller özellikle kayıp dalga ile gerçekleşecek olan antijen-antibody reaksiyonu gibi bağlanma süreçlerinin sonucu olarak algılama yüzeyine yerleşirler ve yüzey algılama büyüklüğündeki bir değişiklikten dolayı yansıyan ışığın yoğunluğunun azalmasına sebep olurlar. Bu olay iç yansımanın zayıflaması ile sonuçlanır.

Toplam iç yansıma, floresan moleköl kayıp elektrik alana girdiği zaman meydana gelir, floresan işaretleri kullanmak antijen-antikör reaksiyonları görüntülemeyi kullanışlı bir teknik yapar. Bu durumda kayıp enerji bir dalgaboyundan emilir ve bir diğerinden salınır.

Kayıp dalga işleyişiyle çalışan yüzey plazmon rezonans, yüksek RI'lı bir yüzeyden (prizma) düşük RI'lı bir yüzeye (Au çip) polarize ışık yönlendirildiği zaman meydana gelir. Yaklaşık 50nm kalınlığında ince altın film prizma ve numune arasında yer alır ve düşük RI'lı ortam görevi üstlenir. Gelen ışık, yüksek RI'lı tabaka boyunca yolculuk eder ve yansıma açısı kritik açıya eşit ya da bükük olduğunda yüksek RI'lı bölgeye geri yansır. Bu olay rezonans açısı (θ) oluşturur. Rezonans açıda yüzey plazmon olayı başlar.

Bu optiksel-elektriksel olay optiksel enerjinin plazmon denilen paketler halinde metal tabakanın yüzeyine transferi ile meydana gelir. Metal yüzeyin yaklaşık 100nm altında ve üstünde meydana gelen elektrik alan, metal tabakadaki yüzey elektronları metalden farklı bir frekansta salınmaya başladığı zaman oluşur. Numune bulunan yüzeydeki maddenin oluşumunda meydana gelen herhangi bir değişiklik metal film ve numune arasında etkili olan RI'yı değiştirir ve rezonans açısında (SPR shift) bir kayma olarak ortaya çıkar.

Metal gelen ışık ile uygun bir dalgaboyunda etkileşime yatkın olan geçiş-bant elektronlarına sahip olmalıdır. Bu koşulları içeren metaller; gümüş, altın, bakır, alüminyum, sodyum ve indiyumdur. Bu metallerden indiyumun çok pahalı, sodyumun

çok reaktif, bakır ve alüminyumun çok geniş SPR açısına sahip olması ve gümüşün kolay oksitlenmesi nedeniyle altın en pratik metal olarak SPR cihazlarında tercih edilir.

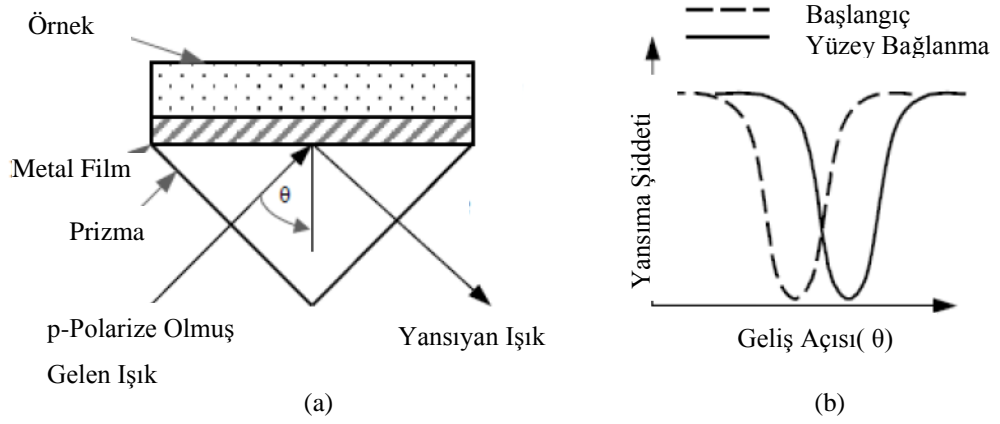
Altın oksitlenmeye karşı çok dirençlidir ve birçok kimyasal modifikasyon sistemiyle de uyumludur. Metalin kalınlığı çok büyük önem taşımaktadır. Optimum kalınlığın üzerinde bir tabakada yansıyan ışık Şekil 3.2'deki gümüş filmle yapılan çalışmadaki gibi derin olmaz; optimum kalınlığın altında ise yansıyan ışık alüminyum filmdeki gibi yayvanlaşır. Şekilde görüldüğü gibi keskin bir dip (ideal rezonans) elde etmek için ışık kaynağının monokromatik ve p-polarize (yüzeyin düzlemsel kısmında polarize olması) olması gerekmektedir. p-polarize olmayan tüm ışık kaynakları SPR'ye uygun olmayıp, yansıyan ışığın arka plandaki şiddetini de artırır (Nagata ve Handa, 2000).

3.2.2. SPR Sisteminin Çalışma Prensibi

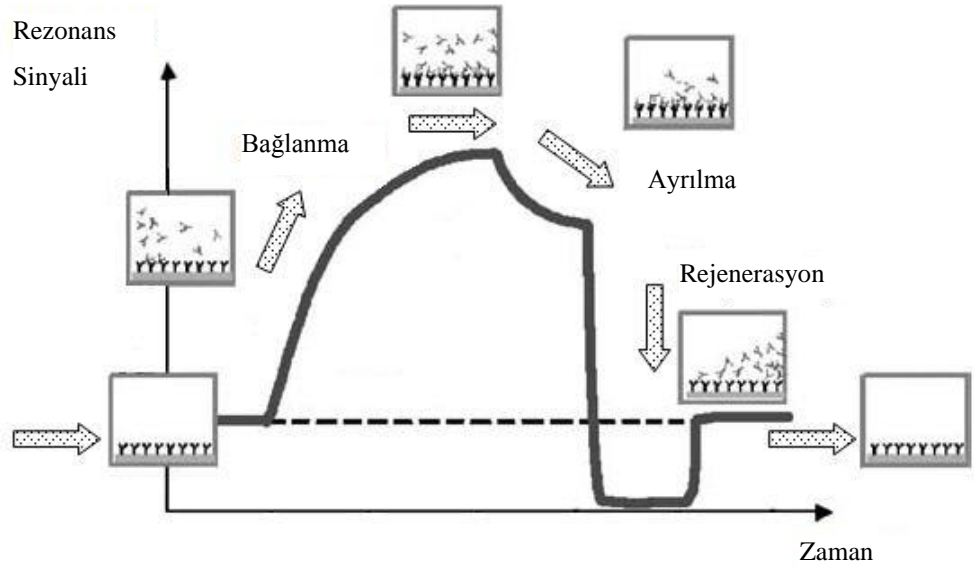
SPR, ışık ile metal yüzeyinin etkileşimi ile meydana gelen optoelektronik bir olgudur. SPR'nin temeli, bir metalin yüzeyinde serbest olarak salınım yapan bir grup elektrona (plazmon) ışık fotonlarıyla enerji aktarımına dayanır.

Farklı kırılma indisine sahip iki yüzey arasına yönlendirilen polarize ışık, büyük kırılma indisli prizmadan (dielektrik) düşük kırılma indisli Altın (metal) yüzeye geçmeden geri yansır (Şekil 3.1 (a)). Bu olay yansıma açısının kritik açıya eşit olduğu ya da kritik açıdan büyük olduğu değerlerde gözlenir (=Rezonans Açısı) (Şekil 3.1 (b)). Aynı anda metal yüzeyde metalden farklı bir frekansta titreşen yüzey elektronları, salınmaya başlayarak bir elektrik alan meydana getirir. Sistem içinde bulunan numune yapısında meydana gelen herhangi bir değişiklik metal ile numune arasındaki kırılma indisini değiştirir ve rezonans açıda bir değişiklik olarak ortaya çıkar. Bu yolla antijen-antibody reaksiyonlarını görüntülemek kolaylaşır.

SPR analizlerinde, bir metal ve genellikle altın ile kaplanan prizma yüzeyi analit molekülünü seçici olarak bağlayan ve ligand adı verilen bir molekül ile modifiye edilir. SPR ölçümünden önce ligandın sensör yüzeyine immobilize edilmiş olması gerekir. Prizmadan yansıyan ışık bir dedektöre ulaştırıldığında absorpsiyondan dolayı meydana gelen ışık yoğunluğundaki azalma belirlenebilir ve sensorgramda temel hat (baseline) olarak elde edilir (Şekil 3.1 (b) kesikli çizgi).



Şekil 3.1. (a) Uyarılmış yüzey plazmonları için üç katmanlı geometri. Bir yüzey plazmon dalgası, metal arayüzde uyarılır. (b) SPR reaksiyonu (Li, 2006)



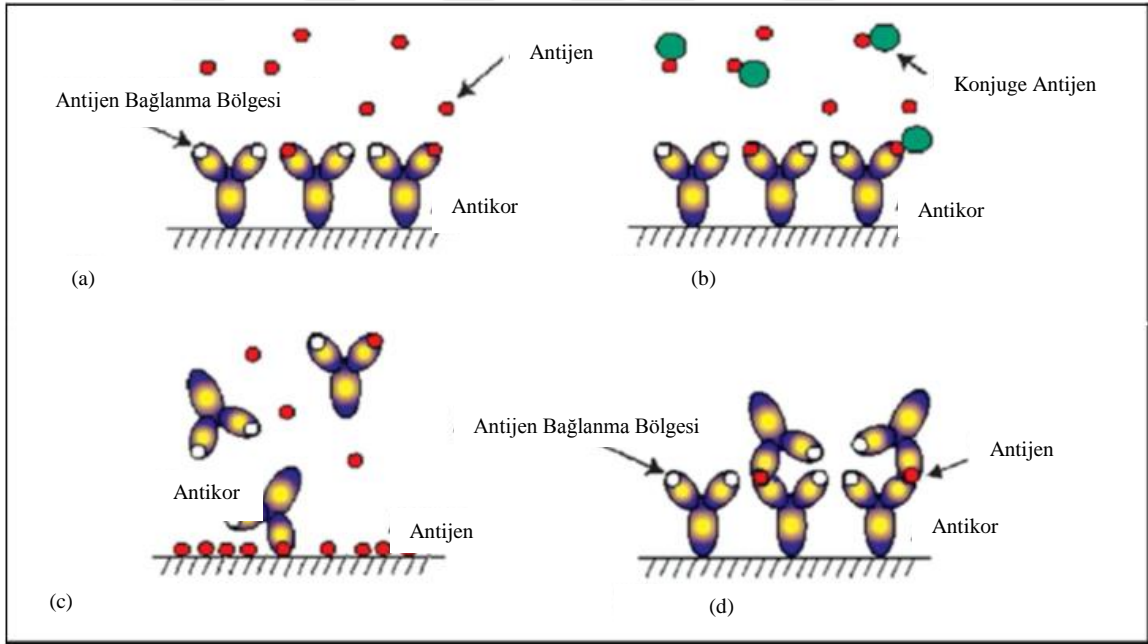
Şekil 3.2. SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi (Li, 2006)

Ardından prizma yüzeyine ligand molekülleri ile etkileşecek analit çözeltisi gönderilir. Analit moleküllerinin ligand moleküllerine bağlanması prizmanın yüzeyinde değişim olması demektir ve bu durum yüzey plazmonlarının absorbansını etkiler. Sonuç, dedektör tarafından yansıyan ışığın açısındaki kayma olarak algılanır (Şekil 3.1 (b) sürekli çizgi). Işığın açısındaki kaymanın miktarı yüzeye bağlanan analit molekülleri miktarı ile ilişkilidir ve sensorgramdaki sinyalde bağlanma ile eşzamanlı olarak bir artış

meydana gelir. SPR sensörlerde amaç; rezonans açısındaki bu kaymayı ve sinyaldeki artış miktarını tespit etmektir. Rezonans açısındaki kaymanın büyüklüğü bağlanma (association) miktarı ile doğru orantılıdır ve analit ile ligand molekülü arasındaki etkileşime ait bağlanma sabitlerinin ve kinetik verilerin belirlenmesinde kullanılır. Ardından sistemden tekrar tampon çözelti geçirilerek yüzeyde bağlanmamış analit ve diğer moleküllerinin uzaklaştırılması sağlanır. Bu aşama ayrılma (dissociation) aşaması olarak adlandırılır ve analit ile ligand arasındaki etkileşimin ayrılma sabitlerinin belirlenmesi için kullanılır. Bahsi geçen aşamalar Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

3.2.3. SPR Çalışmalarında Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

Kimyasal ve biyolojik numunelerin tayini için SPR sensör çalışmalarında çeşitli ölçüm yöntemleri bulunmaktadır. Hangi yöntemin seçileceği; hedef molekülün boyutuna, mevcut biyotanıma molekülünün bağlanma özelliğine, ölçüm yapılacak analit derişim aralığına ve örnek matrisine göre değişmektedir (Shankaran ve ark., 2007).



Şekil 3.3. SPR biyosensör çalışmalarında kullanılan ölçüm yöntemleri (a) doğrudan ölçüm yöntemi, (b) yarışmacı ölçüm yöntemi, (c) inhibisyon ölçüm yöntemi, (d) sandviç ölçüm yöntemi (Homola, 2008)

Sıklıkla kullanılan ölçüm yöntemleri;

- (a) doğrudan ölçüm yöntemi,
- (b) yarışmacı ölçüm yöntemi,
- (c) inhibisyon ölçüm yöntemi,
- (d) sandviç ölçüm yöntemidir

Doğrudan ölçüm yönteminde (Şekil 3.3 (a)); biyotanıma molekülü, sensör yüzeyi üzerine immobilize edilir. Çözelti içindeki analit antikora bağlandıkça kırılma indisinde değişime neden olur. Sensör tarafından tespit edilen bu değişim sinyal artışı olarak gözlenir. Sinyal artışı analit derişimi ile doğru orantılıdır. Bu yöntem genellikle ilgilenilen analit derişimi ölçülebilir ve yeterli bir sinyal oluşturabiliyorsa tercih edilir (Homola, 2008).

Yarışmacı ölçüm yöntemi (Şekil 3.3 (b)), genellikle düşük moleköl ağırlığındaki antijenlerle çalışılırken tercih edilir. Bu yöntemde, özgül antikorlar sensör yüzeyine immobilize edilir. Hedef antijeni de içeren çözelti, bir antijen konjugatı ile karıştırılır. Antijen- konjuge antijen karışımını içeren çözelti sisteme gönderilir. Sadece konjuge antijeni içeren referans bir örneğin meydana getirdiği sinyal ile çözeltinin meydana getirdiği sinyal arasındaki fark, örnek içindeki antijen miktarını verir (Homola, 2008). Bu yöntemde örnek içindeki yüksek antijen derişimi sinyalin düşük olmasına neden olur. Çünkü daha yüksek moleköl ağırlığına sahip olduğu için bir proteine bağlı (konjuge) antijen SPR'de daha güçlü bir sinyal meydana getirir. Yarışmacı ölçüm yöntemi, genellikle toksik bileşiklerin tayininde kullanılır (Homola, 2008).

İnhibisyon ölçüm yönteminde (Şekil 3.3 (c)), hedef antijen sensör yüzeyine immobilize edilir. Hedef antijeni de içeren örnek çözeltisi, bu antijene karşı olan özgül antikorlar ile karıştırılır ve sensöre enjekte edilir. Antikorlar hem çözeltideki antijenlere hem de sensör yüzeyindeki antijenlere bağlanır. Antijen içermeyen referans örneğin oluşturduğu sinyal ile antijeni de içeren örnek çözeltisi arasındaki sinyal farkı, örnek içindeki antijen miktarını verir. Bu yöntemde, örnek içindeki yüksek antijen derişimi sinyalin düşük olmasına neden olur (Homola, 2008).

Sandviç ölçüm yönteminde (Şekil 3.3 (d)), antijene karşı olan antikor molekülleri sensör yüzeyine immobilize edilir. Antijeni de içeren örnek çözeltisinin enjeksiyonundan sonra, hedef antijen bu antikora bağlanır. Sonraki aşamada, ikincil

bir antikör uygulaması yapılır ve hedef antijen böylece bu iki antikörün sandviçi şeklinde tespit edilir. Sinyaldeki artış, antijen derişimi ile doğru orantılıdır. Bu yöntemle özgüllük ve tayin limiti (LOD) arttırılmış olur (Homola, 2008).

Algılanmasını istediğimiz malzemenin (üenin) ve algılayıcı enzimin (üreazın) yeterince büyük molekül ağırlığına sahip olması sebebiyle çalışmada doğrudan ölçüm yöntemi kullanılmıştır.

3.3. Kinetik Analiz

Bir SPR biyosensörün aktif yüzeydeki biyomoleküllerin bağlandığı ya da bağlanmadığı biyosensör tepkisinin geçici sonuçlarına ve çevre koşullarına bağlı çeşitli mekanizmalarca kontroledilir. Bağlanma kinetiğinin belirlenmesi etkileşen moleküler hakkında bilgi sağlar. Bu özellik genellikle SPR biyosensörlerin en önemli avantajlarında biri olarak görülür.

SPR biyosensör deneyleri sadece sensör yüzeyinde etkileşimin başlangıcı ile moleküler büyüklükteki değışikliği ölçer. Sensör tepkisi doğrudan bağlanan analitin (üenin) konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu çalışmada tek tip analitin 1:1 etkileşimi ile liganda bağlandığı düşünülerek kinetik analiz gerçekleştirilmiştir.

Analit (A) ile Ligand (L) arasındaki etkileşim 1:1 etkileşimi ile aşağıdaki gibi tanımlanabilir:



Birleşme fazında sensör yüzeyin sürekli olarak serbest analitle doldurulduğu ve bağlanan analit miktarının toplam analit konsantrasyonuna (C) kıyasla ihmal edildiğı göz önünde bulundurulursa pseudo-first order kinetiğı kullanılabilir.

$$\frac{d[AL]}{dt} = k_a[A][L] - k_d[AL] \quad (3.2)$$

Buradan SPR tepkisi;

$$\frac{dR}{dt} = k_a C(R_{\max} - R) - k_d R \quad (3.3)$$

Denklem (3.3) düzenlendiğinde

$$\frac{dR}{dt} = k_a C R_{\max} - (k_a C + k_d) R \quad (3.4)$$

elde edilir. Burada ; R : SPR tepkisi, R_{\max} : Maksimum analit bağlanma kapasitesi yani ligand konsantrasyonu, k_a : Birleşme oran sabiti, k_d : Ayrılma oran sabitidir.

Denge anında $\frac{dR}{dt} = 0$ olacağından;

$$k_a C (R_{\max} - R_{eq}) = k_d R_{eq} \quad (3.5)$$

sonucuna ulaşılır. Burada; R_{eq} : Denge durumundaki tepki, K_A : Birleşme sabiti $\left(= \frac{k_a}{k_d} \right)$,

K_D : Ayrılma sabitidir.

K_A değeri denklem (3.5)'te yerine konursa;

$$\frac{R_{eq}}{C} = K_A R_{\max} - K_A R_{eq} \quad (3.6)$$

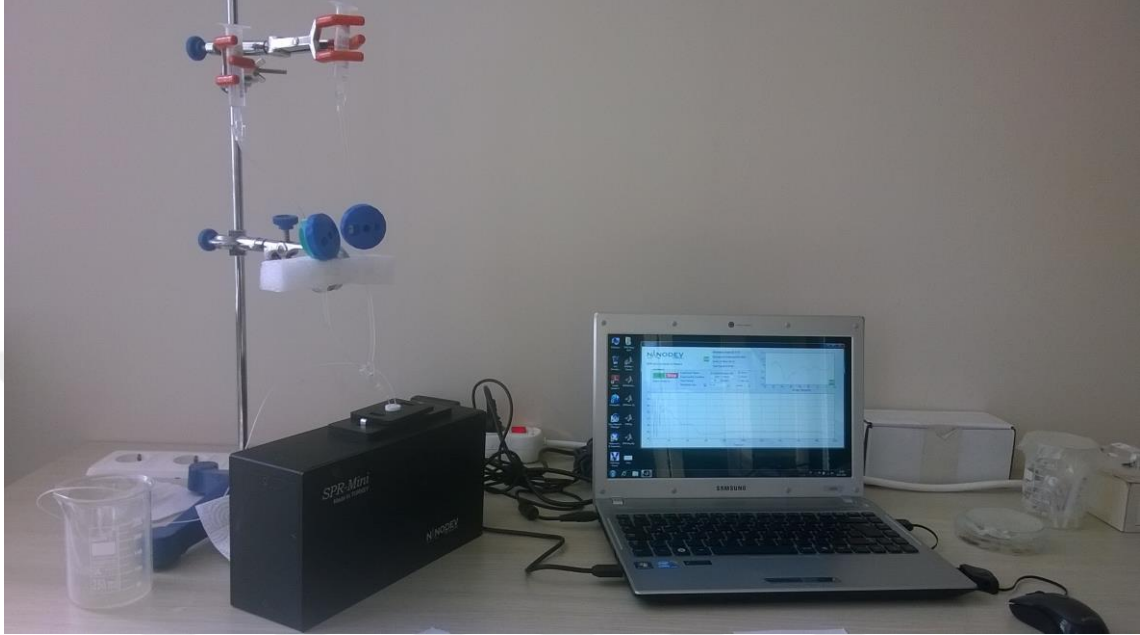
elde edilir. Burada $\frac{R_{eq}}{C}$ 'ye karşı R_{eq} grafiği çizilirse grafiğin eğimi K_A 'yı verir ve

$$K_A = \frac{1}{K_D} \text{ 'dir.} \quad (3.7)$$

3.4. Deneysel Hazırlık

Çalışmada kullandığımız cihaz SPR görüntüleme sistemi, damla ayar seti ve veri toplama birimi olmak üzere üç bileşenden oluşur (Şekil 3.4). İlgili kimyasallar, çözeltiler vs. sensörün akış hücresinden akıtılmaktadır. Prizma ve altın yüzey arasında kırılma indisi eşitleme yağı kullanılmıştır. Çözeltilerin akış hücresine geçişi damla ayar setleriyle sağlanmıştır. Veri toplama yazılımı zamanı ve rezonans açısındaki değişikliği kaydetmektedir. Cihazda kullanılan ışık kaynağı 850 nm dalgaboylu LED'dir. Işık kaynağının önünde bulunan lens sayesinde ışık prizmaya odaklanmaktadır. Odaklanmış ışık da detektör önünde bulunan lens yardımıyla kameraya toplanmaktadır.

Böylece tek dalgaboylu ışık farklı açılarda ölçülmektedir. Ayrıca cihazda 1,3 megapiksel CMOS dedektör ve 12 mm çapında 50 nm kalınlığında altın çipler kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Tez çalışmasında kullanılan SPR sistemi

3.4.1. Altın Yüzeyin Temizlenmesi

Nanodev firmasından tedarik edilen 50 nm kalınlığındaki altın kaplı yüzeyler H_2O_2 ve H_2SO_4 kullanılarak 1:3 oranında hazırlanan pirana çözeltisi ile 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda temizlendi. Bu işlemin ardından altın sensörler sırayla saf su ve etanolle durulanıp azot ile kurutularak parmak izi, toz, vücut yağı vb. kirlilikten arındırılmıştır.

Şekil 3.5'te çalışmada kullanılan altın sensörler gösterilmektedir. Altın sensör sol üstte, kağıt sensör sağ üstte görüldüğü şekliyle sistemde kullanılmıştır. Altta ise altın sensörlerin çizilmeye ve kirlenmeye karşı muhafaza edildiği saklama kabı görülmektedir.



Şekil 3.5. Tez çalışmasında kullanılan altın sensörler

3.4.2. PBS Hazırlanması

Biyolojik sistemlerin düzgün olarak çalışabilmesi için ortamın pH'sı oldukça önemlidir. Enzimlerin sorunsuz bir şekilde faaliyetlerini yerine getirebilmesi için ortamın pH'sını belirli bir aralıkta sabit olması gerekir. Bunu yapabilmek için tampon çözeltiler kullanılır. Tampon çözeltiler pH'sı belli olan seyrelmeyle veya az miktarda kuvvetli asit veya baz ilavesi ile pH'sı değişmeyen çözeltilere denir. Bir tüpe 0,2 M olacak şekilde %99'luk NaH_2PO_4 tuzundan 1,56 gr eklendi ve 50 ml saf su ile çözüldü. Başka bir tüpte de yine 0,2 M olacak şekilde 3,58 gr %99'luk Na_2HPO_4 tuzu 50 ml saf suda çözüldü. Elde edilen bu çözeltiler kullanılarak başka bir tüpte 1,9 ml NaH_2PO_4 çözeltisi ve 8,1 ml Na_2HPO_4 çözeltisi 20 ml saf su ile karıştırılarak PBS elde edildi. Oluşturulan çözeltinin pH'ı 7,4 olarak ölçüldü. Çalışmanın ilerleyen kısımlarında kullanmak üzere mevcut çözelti saf su ile 1/10 oranında seyreltilti.

3.4.3. Üre Çözeltisinin Hazırlanması

60,06 g/mol ağırlığa sahip üre ile hazırlanmış olduğumuz 1/10 PBS kullanılarak 10, 20, 40, 80 ve 160 mM'lık çözeltiler oluşturuldu ve 2 °C'de buzdolabında saklandı.

3.4.4. Üreaz Çözeltisinin Hazırlanması

Yine 1/10 PBS çözeltisi kullanılarak 1.0, 2.5, 5.0 ve 10 mg/ml yoğunluğunda enzim çözeltileri hazırlanıp buzdolabında 2 °C’de saklandı.

3.4.5. Kâğıt Yüzeylerin Oluşturulması

80gr’lık A4 kâğıtları altın sensörlerin altın kaplı alanını örtecek şekilde yani 12 mm çapında kesildi ve daha sonra kullanılmak üzere temiz bir petri kabında muhafaza edildi.

3.4.6. Sensör Yüzeyine Enzim İmmobilizasyonu

Yaptığımız bu tez çalışmasında iki tür sensör yüzeyi kullandık. Birincisi hiçbir ekleme ya da kaplama yapmadan kullanmış olduğumuz altın sensörler ve ikincisi ise altın üzerine yerleştirilmiş kâğıt yüzeyli sensörlerdir. Bu aşamada hazırlanan enzim çözeltileri (1.0, 2.5, 5.0 ve 10 mg/ml) her ölçümden önce sensör yüzeylerine mikropipet yardımıyla 10 μ L hacminde immobilize edildi ve oda sıcaklığında yaklaşık bir saat kuruduktan sonra sisteme yerleştirilip ölçüm alınmıştır.

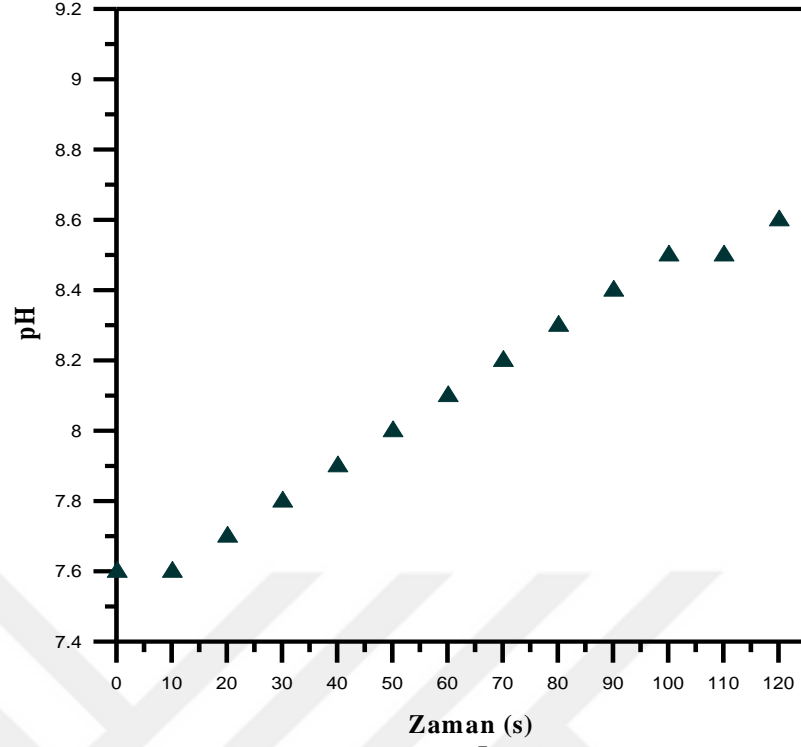
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Molekülerin algılanmasında sıklıkla kullanılan enzim işaretleme yöntemlerinden farklı olarak SPR biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye gerek duyulmadan kullanılabilirler. Çalışmada altın ve kağıt sensörler kullanılarak üreaz enziminin altın ve kağıt yüzeylerde üre algılama potansiyeli incelenmiştir. Yüzeylerin sensör özelliklerini incelemeye geçmeden önce algılayıcı olarak kullanacağımız üreaz enziminin aktifliği kontrol edilmiştir. Enzim için optimum pH belirlendikten sonra enzimli altın ve kağıt sensörlerin algılama özelliklerini belirlemek amacıyla yüzeylere farklı konsantrasyonlarda üreaz immobilize edilip enzimli yüzeylerin farklı konsantrasyonlardaki üreye verdikleri tepkiler SPR cihazıyla ölçülmüştür. Daha sonra elde edilen sensör tepkileri kullanılarak altın ve kağıt sensörlerin kinetik analizi gerçekleştirilmiştir. Son olarak altın ve kağıt sensörlerin Raman ve UV-vis analizleri yapılmıştır.

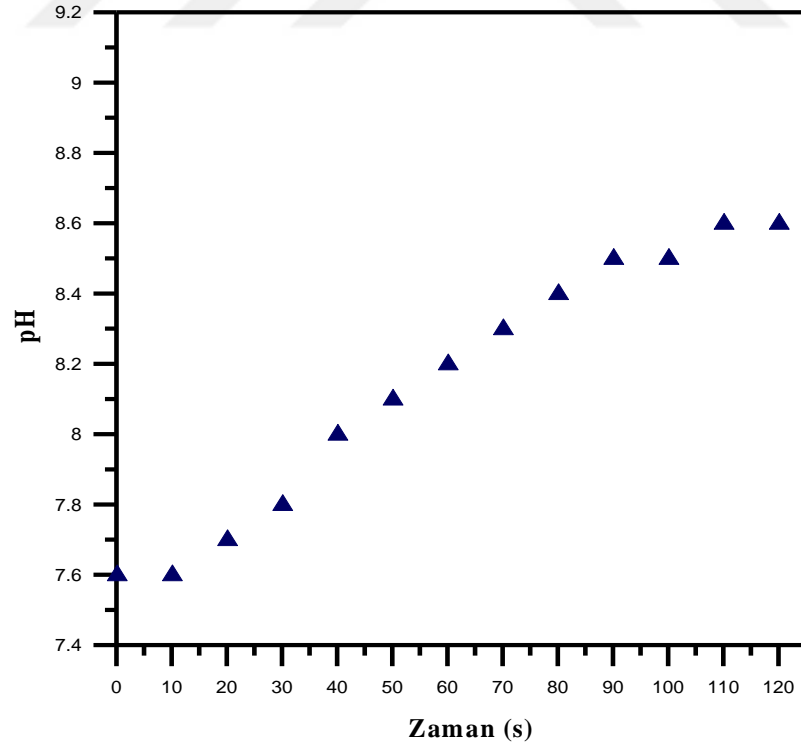
4.1. Enzim Kontrolü

SPR ölçümlerine geçmeden önce hazırlanan çözeltilerinin doğru pH'da hazırlanıp hazırlanmadığını ve enzim aktifliğini kontrol etmek amacıyla pH ölçümleri alındı. Bunun için 10, 20, 40 ve 80 mM'lık üre çözeltileri kullanıldı. Önce pH metreyle 80mM'lık 1 ml üre immobilize edildi pH sabitlendikten sonra 10 μ L haciminde önceden hazırlanmış olduğumuz 10 mg/ml'lik üreaz immobilize edildi ve iki dakika boyunca her 10 saniyede bir gözlenen değerler not edildi. Bu işlem sırası hazırlanmış diğer üre çözeltileri için tekrarlandı ve gözlenen değerler not edildi. Daha sonra aynı basamaklar 5 μ L hacminde üreaz için tekrarlandı, gözlenen pH değerleri not edildi.

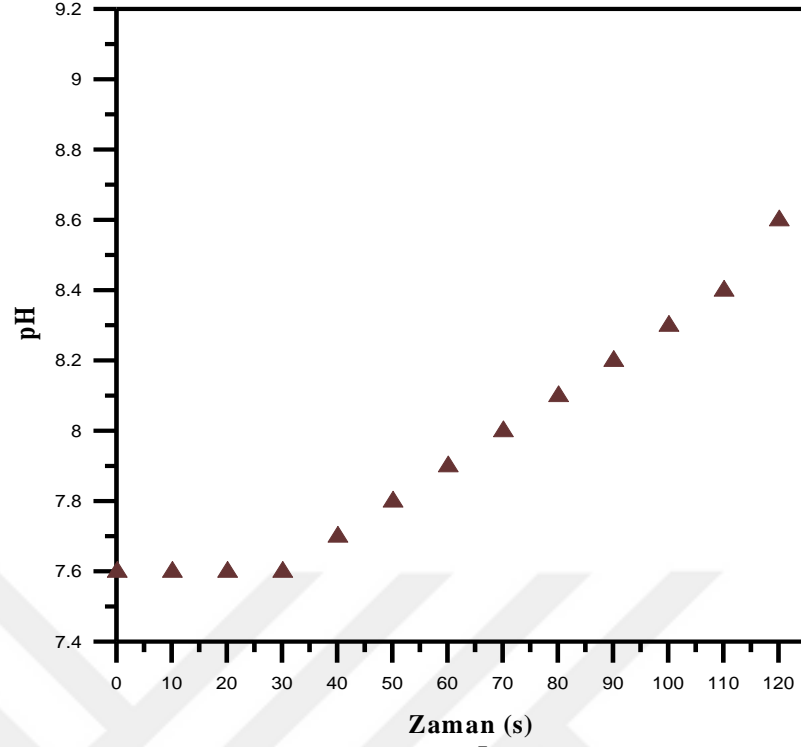
Şekil 4.1'de 10, Şekil 4.2'de 20, Şekil 4.3'te 40 ve Şekil 4.4'te 80 mM üreye 5 μ L enzim damlatılarak ve Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de ise aynı üre konsantrasyonlarına 10 μ L enzim damlatılarak gözlenen pH değerleri ile oluşturulan grafikler gösterilmektedir. Grafiklerde SPR sisteminde kullanmayı planladığımız çözeltilerin istenilen yani enzimin aktifliğini sürdürdüğü pH'da hazırlandığı görülmektedir.



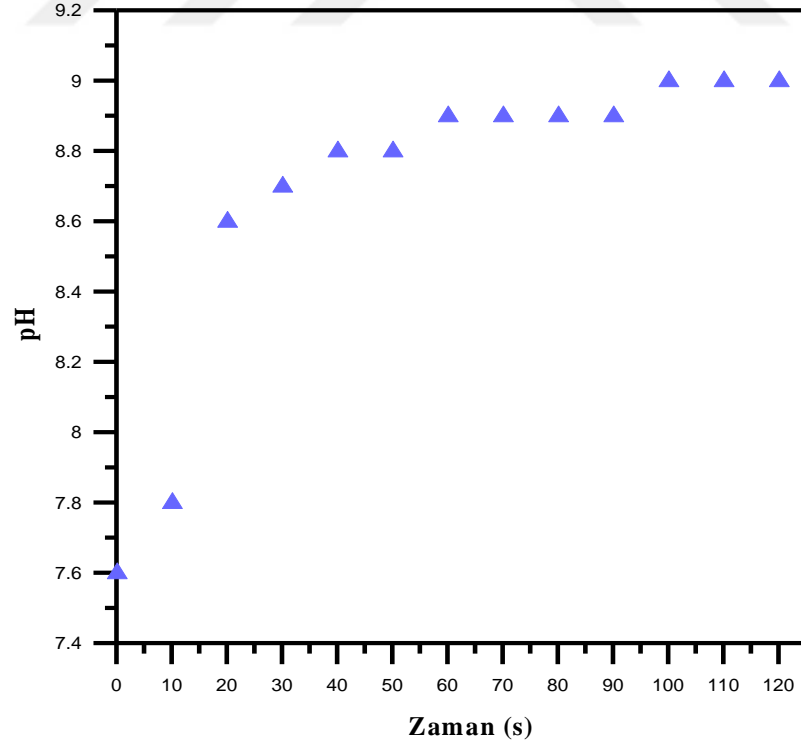
Şekil 4.1. 10 mM üre konsantrasyonunda 5 μL enzim için gözlenen pH değerleri



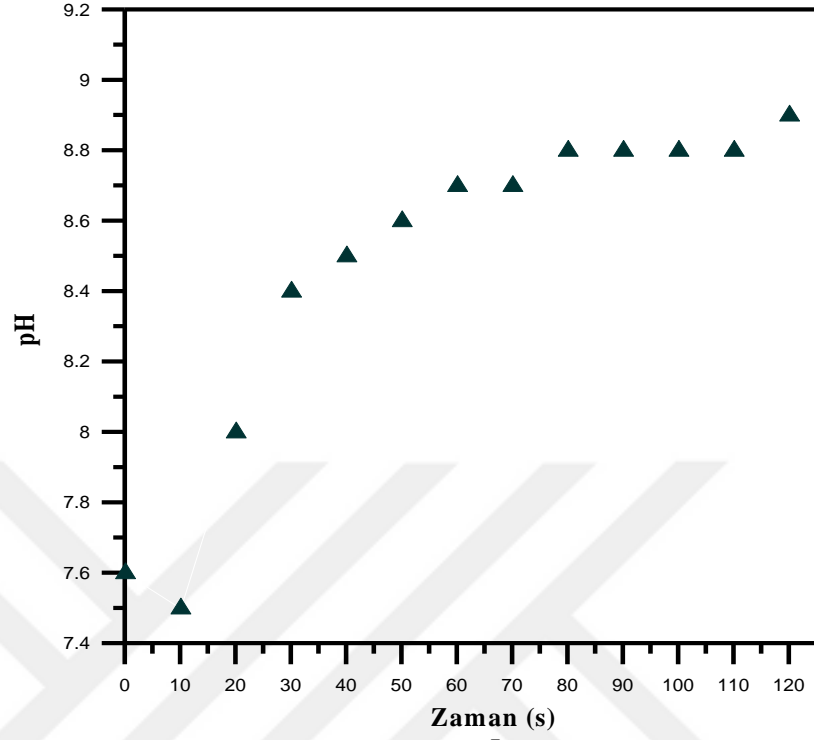
Şekil 4.2. 20 mM üre konsantrasyonunda 5 μL enzim için gözlenen pH değerleri



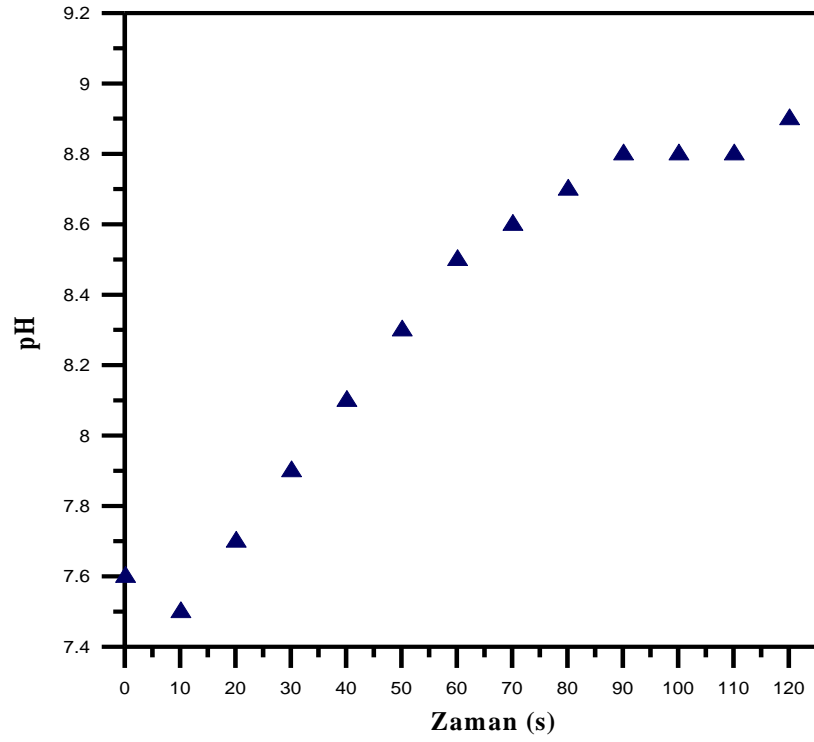
Şekil 4.3. 40 mM üre konsantrasyonunda 5 μL enzim için gözlenen pH değerleri



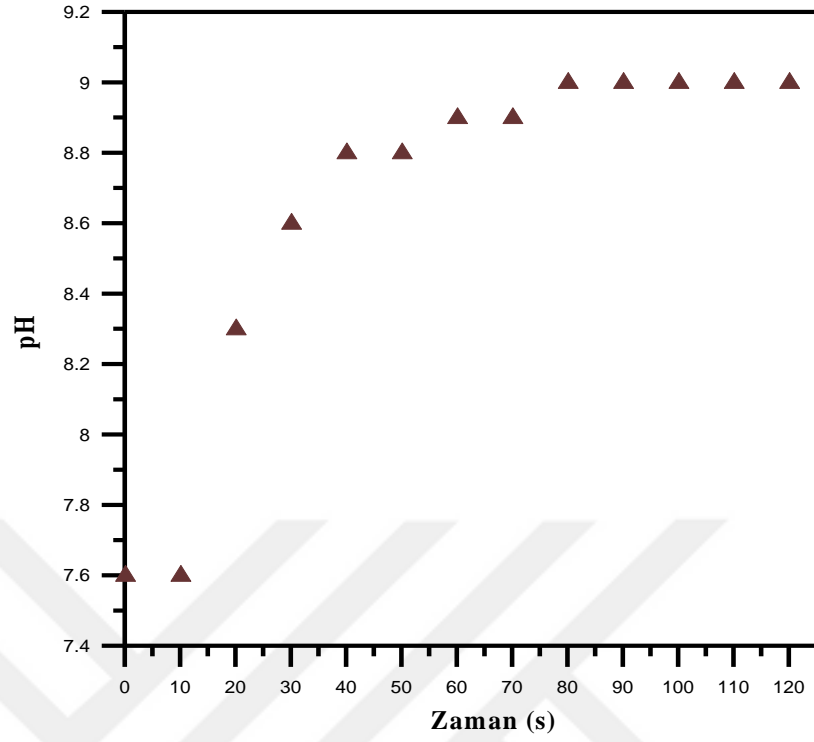
Şekil 4.4. 80 mM üre konsantrasyonunda 5 μL enzim için gözlenen pH değerleri



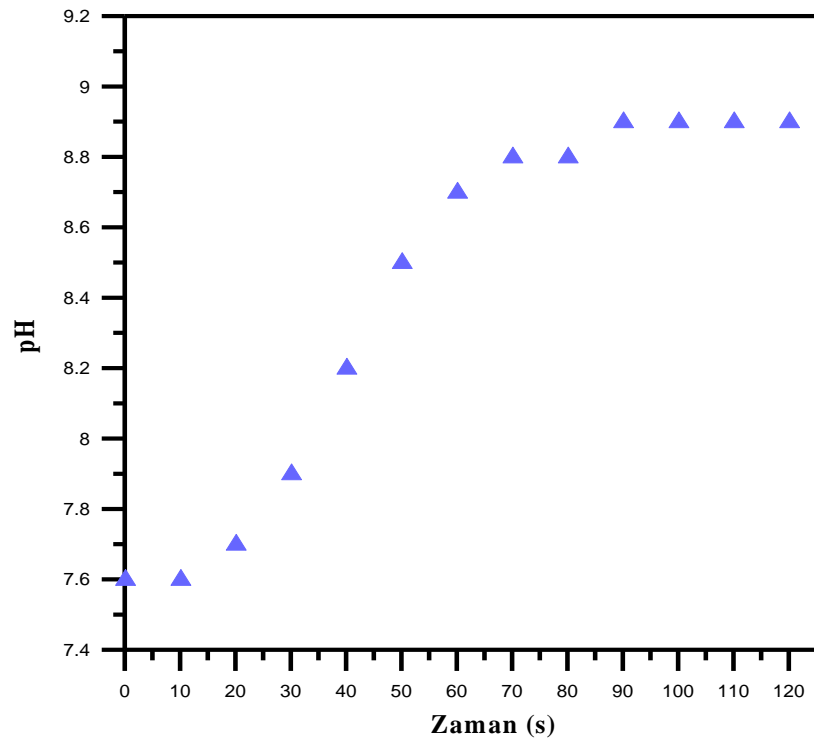
Şekil 4.5. 10 mM üre konsantrasyonunda 10 μL enzim için gözlenen pH değerleri



Şekil 4.6. 20 mM üre konsantrasyonunda 10 μL enzim için gözlenen pH değerleri



Şekil 4.7. 40 mM üre konsantrasyonunda $10 \mu\text{L}$ enzim için gözlenen pH değerleri



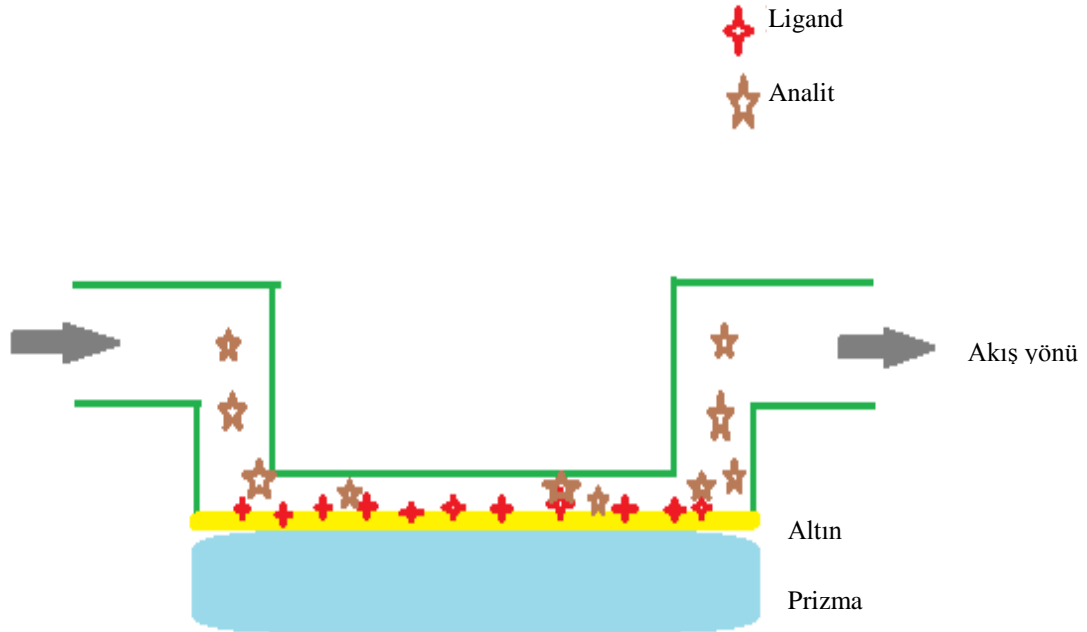
Şekil 4.8. 80 mM üre konsantrasyonunda $10 \mu\text{L}$ enzim için gözlenen pH değerleri

4.2. SPR Ölçümleri

Yapılan tez çalışmasında altın sensörler ve A4 kağıt sensörler kullanılarak A4 kâğıdın SPR sisteminde enzim aktivitesinin görüntülenmesi konusunda kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır. Bu amaçla pH: 7.6 olarak ölçülen ve 1/10 oranında seyreltilen PBS çözücünde analit olarak 10, 20, 40, 80 ve 160 mM'lık üre (U0931, Sigma-Aldrich) ve ligand olarak da 1.0, 2.5, 5.0 ve 10 mg/ml'lik üreaz (U1500 Jack Bean, Sigma-Aldrich) çözeltileri hazırlandı.

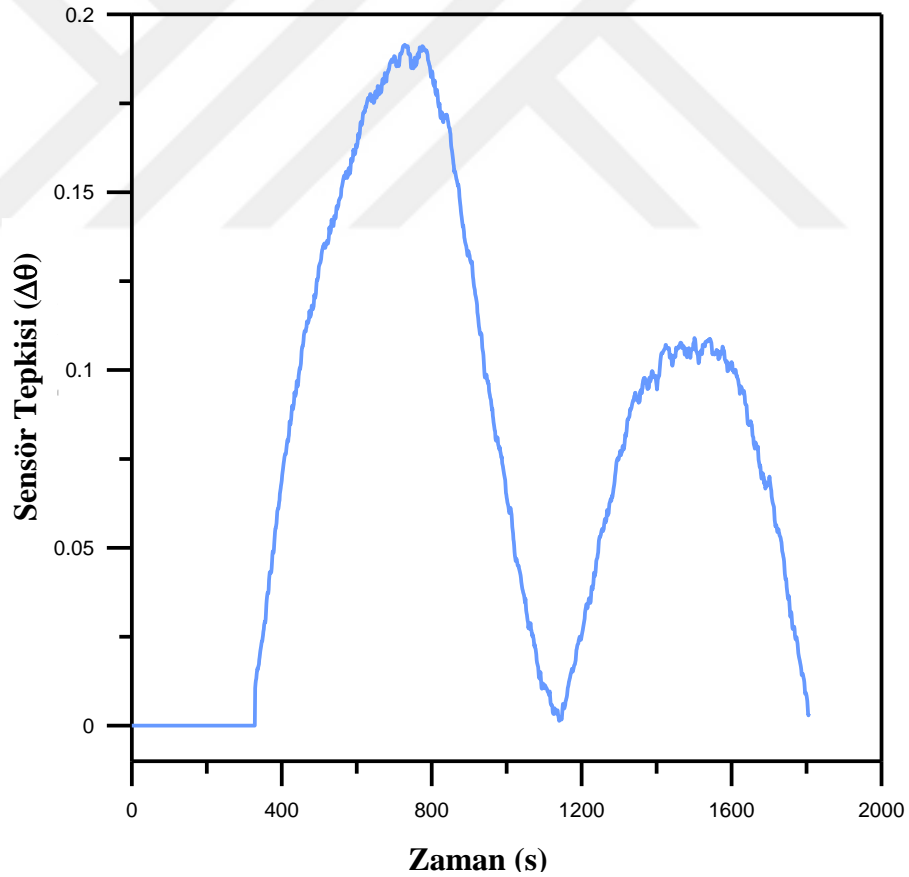
Altın sensörler pirana çözeltilisinde temizlendikten sonra sırayla saf su ve etanolle durulandı ve azot ile kurutulup kullanıma hazır hale getirildi. Sistemde prizma olarak BK7 cam kullanıldı.

Ligand olarak hazırlanan enzim çözeltileri teker teker altın sensörler üzerine immobilize edildi ve oda sıcaklığında yaklaşık 1 saat kurutulduktan sonra sisteme yerleştirilip altın sensörlerin ayrı ayrı sensogramları oluşturuldu. Her bir ölçümde akış hücresinden (Şekil 4.9) sistem dengeye gelene kadar önce hazırlanan PBS çözeltisi daha sonra sistem tekrar dengeye gelinceye (400 saniye) kadar üre çözeltisi geçirildi.

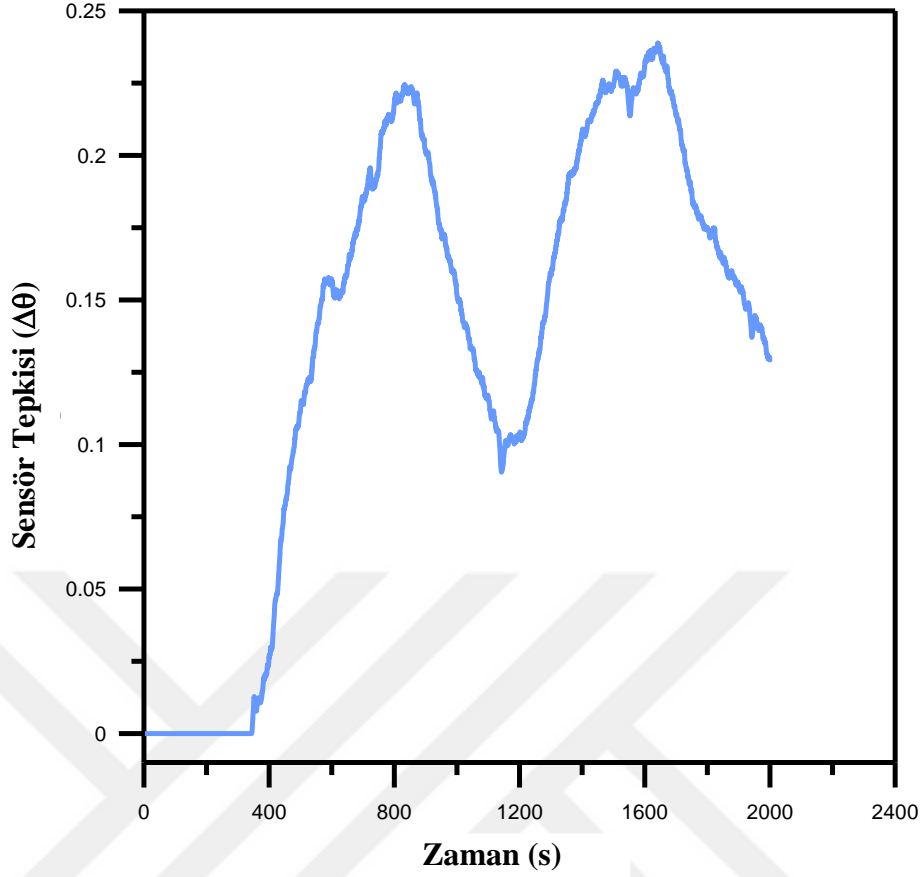


Şekil 4.9. Akış hücresinin temsili görünüşü

Şekil 4.10'da SPR cihazından elde edilen sensogram görülmektedir. Bu sensogramın oluşması için ilk etapta prizmanın üzerine indis eşitleme yağı immobilize edildiktan sonra enzim immobilize edilmiş altın sensör sisteme yerleştirildi ve sistem dengeye ulaşıncaya kadar akış hücrelerinden PBS tampon çözelti geçirildi. Daha sonra akış hücrelerinden yaklaşık 400 s boyunca 160 mM üre akıtıldı. İzleyen 400 s'de ise akış hücrelerine ortamı temizlemesi amacıyla PBS gönderildi ve ardından tekrar üre ve tekrar PBS akıtıldı. Elde edilen sensograma göre sisteme ikinci kez üre gönderildiğinde sensörün tepkisinde azalma olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.11'de enzim immobilize edilmiş başka bir altın sensör için aynı işlem sırası izlenerek elde edilen sensogram görülmektedir. Bu sensogramda ise akış hücrelerine ortamdaki kalıntıları temizlemesi için PBS gönderilmesine rağmen sinyalin başlangıç seviyesine (base) düşmediği gözlenmektedir.



Şekil 4.10. 160 mM üre için kalibrasyon sensogramı



Şekil 4.11. 80 mM üre için kalibrasyon sensogramı

Sensörün sergilediği bu farklı davranışlar iki şekilde yorumlanabilir:

- Sensör yüzeyine immobilize edilen enzimin bir kısmı akan PBS ile birlikte kopup gitmekte veya
- Ortamı temizlemek için sisteme gönderilen PBS çözeltisi kalıntıları tamamiyle temizleyememektedir.

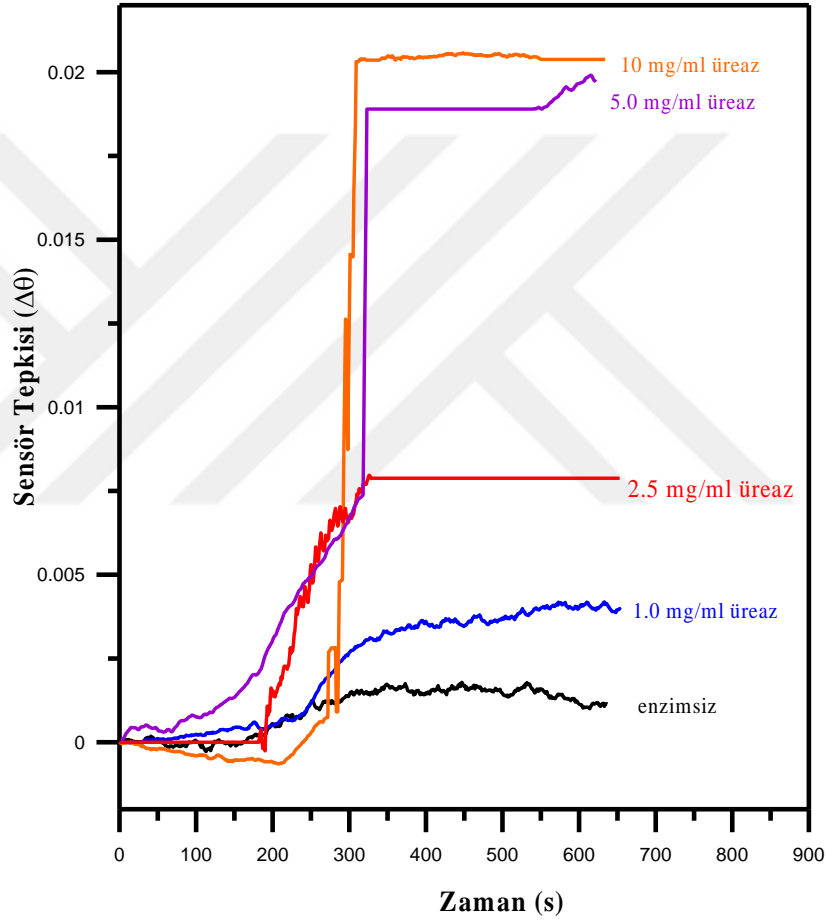
Bu yüzden ilerleyen bölümlerdeki sensogramlar sensörün sadece ilk etapta verdiği tepki ele alınarak oluşturulmuştur.

Sensör tepkisinin düşmesi, piklerin şiddetinin azalması ve sensörün başlangıç seviyesine dönememesi gibi sonuçlar altın sensörlerin sadece bir kez kullanılabilirliğinin göstergesidir. Bu durum pahalı bir metal olan altın sarfiyatını arttırmaktadır. Bunun önüne geçebilmek amacıyla çalışmada altın sensörlerle birlikte kolayca bulunan A4 kağıt ilerleyen kısımlarda anlatılacağı gibi kullanılmıştır.

Farklı konsantrasyonda enzim immobilize edilerek oluşturulan her bir SPR altın sensörü için ayrı sensogramlar elde edilmiş ancak aralarında karşılaştırma yapabilmek

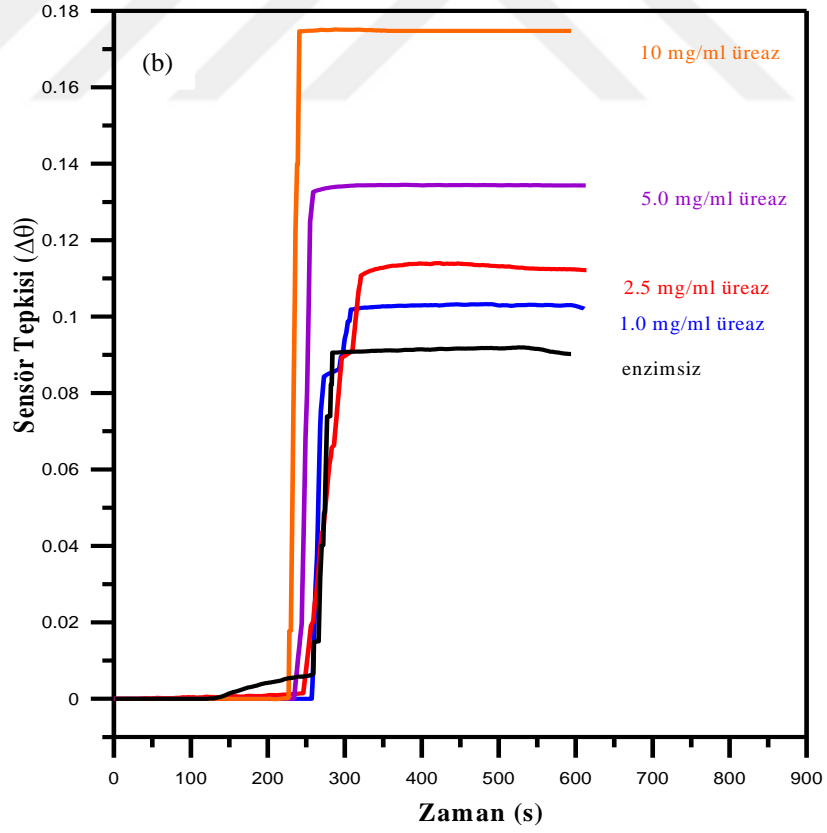
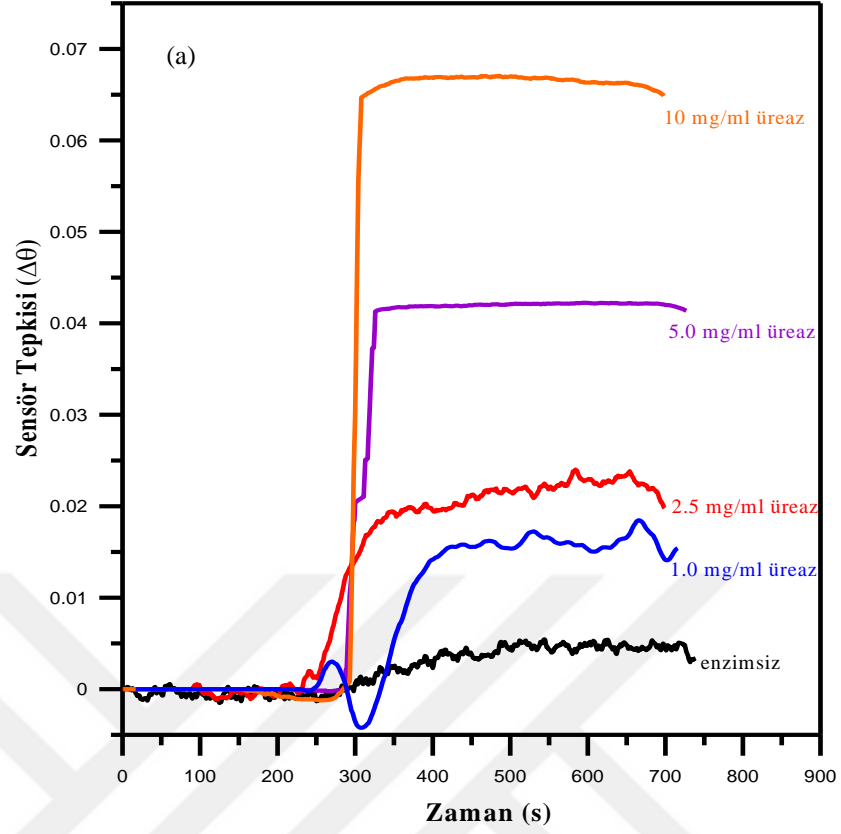
amacıyla aynı konsantrasyondaki üre çözeltileri ile elde edilen veriler aynı sensogramda verilmiştir.

Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te görülen sensogramlar verilerin daha duyarlı değerlendirilebilmesi için maximum tepkideki açı değeri ile başlangıç açı değeri arasındaki farkı gösteren $\Delta\theta$ değerleri kullanılarak oluşturulmuştur. Her bir sensogram aşağıdan yukarıya enzimsiz altın sensör, 1 mg/ml enzimli altın sensör, 2.5 mg/ml enzimli altın sensör, 5 mg/ml enzimli altın sensör ve 10 mg/ml enzimli altın sensör sırasıyla verilmiştir.

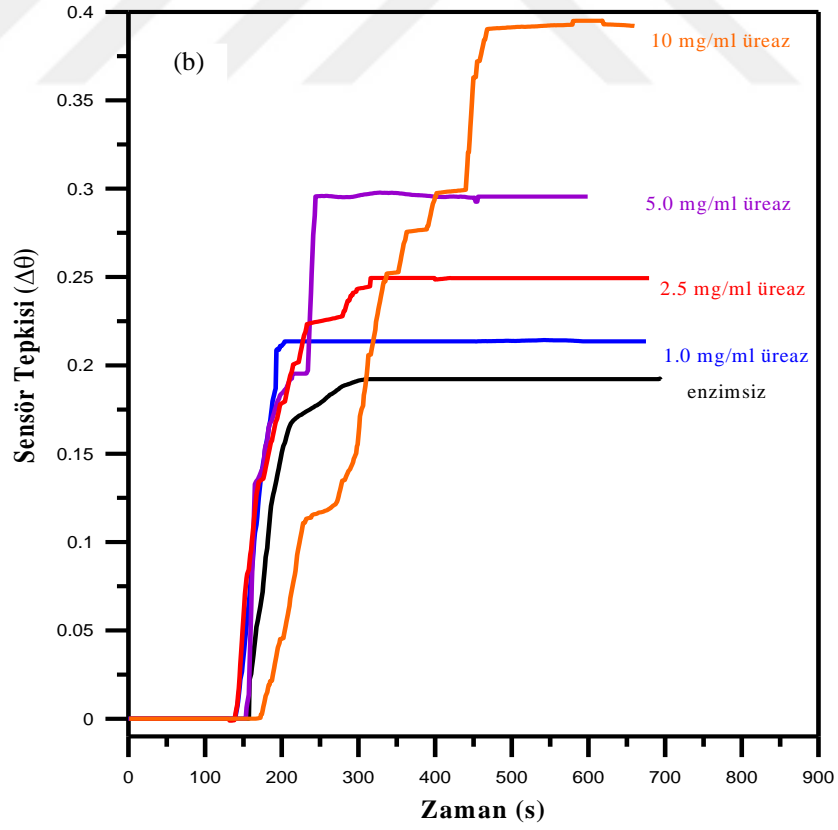
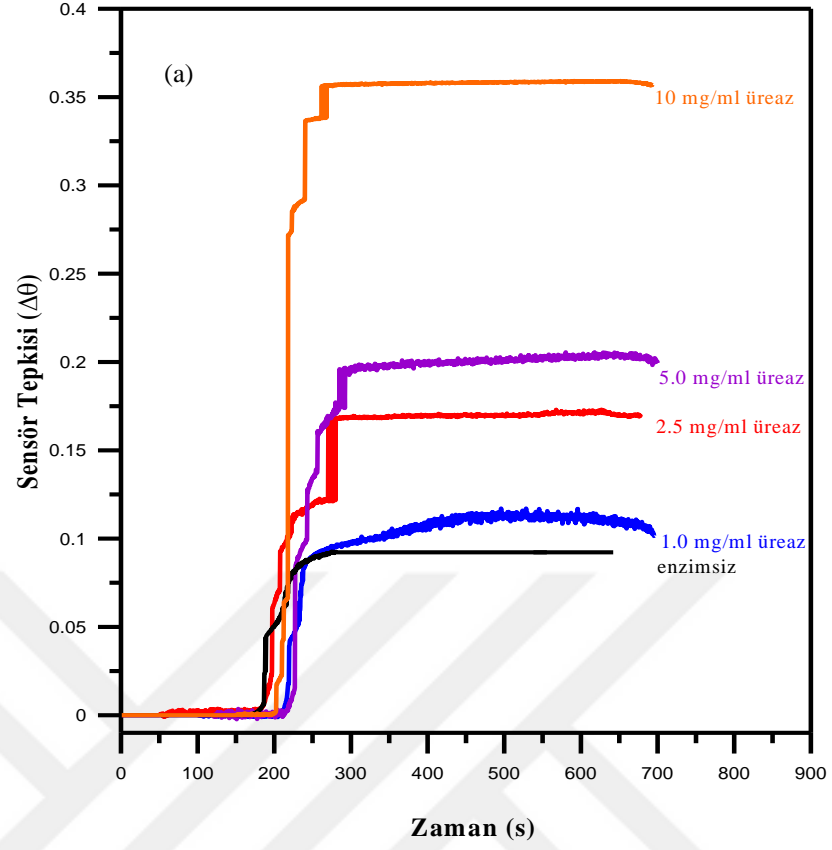


Şekil 4.12. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin 10 mM üre akışına verdiği tepkiler ($\Delta\theta$).

Şekil 4.12'de enzimsiz altın sensörle elde edilen maksimum açı kayması 0.0015° iken 1.0 mg/ml enzimli altın sensör için 0.0040°, 2.5 mg/ml enzimli altın sensör için 0.0079°, 5.0 mg/ml enzimli altın sensör için 0.0189° ve son olarak 10 mg/ml enzimli altın sensörle elde edilen maksimum açı kayması 0.0205° olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 4.13. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin (a) 20 (b) 40mM üre akışına verdiği tepkileri ($\Delta\theta$).



Şekil 4.14. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin (a) 80 (b) 160mM üre akışına verdiği tepkiler ($\Delta\theta$).

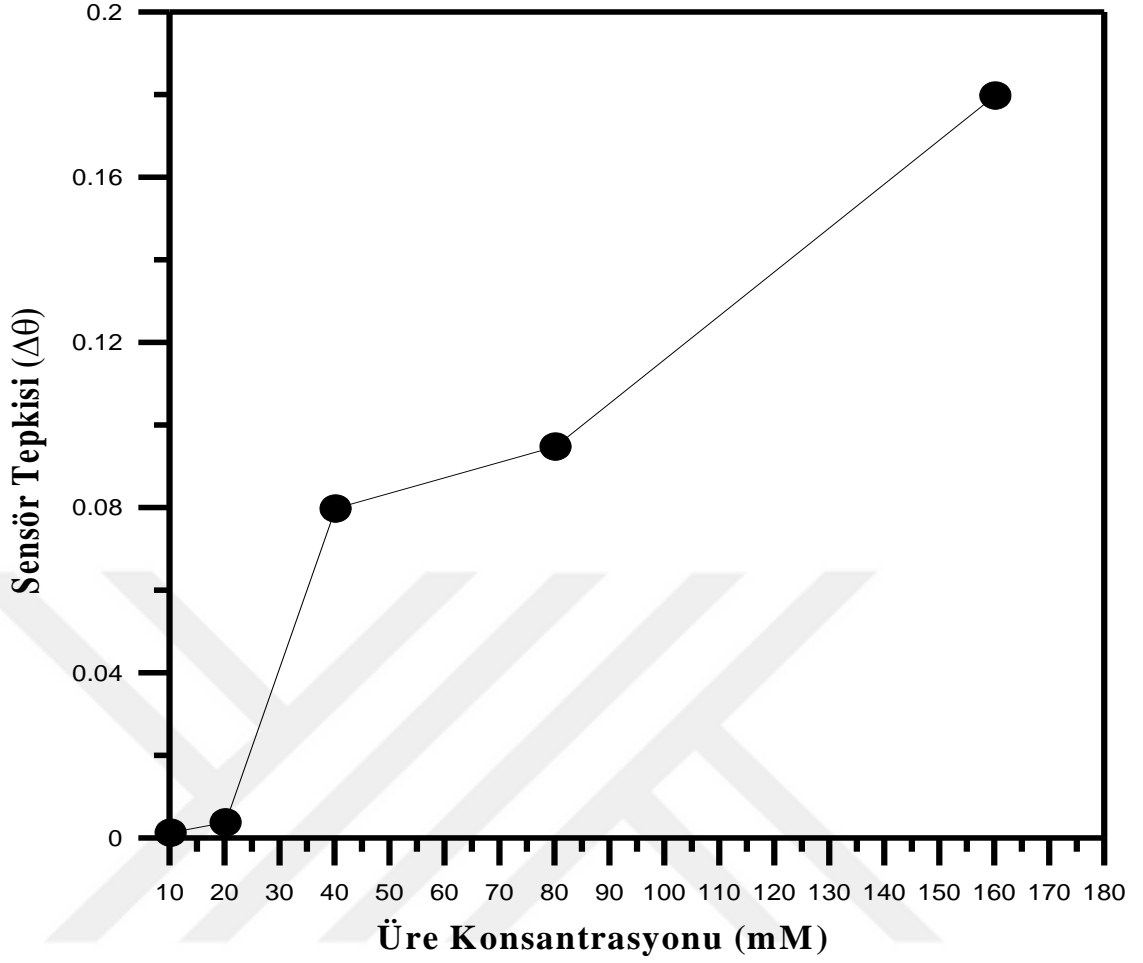
Daha sonra 20 mM üre konsantrasyonu için altın sensörün verdiği tepkiler enzimsiz sensörde 0.0040°, 1.0 mg/ml enzimli sensörde 0.0160°, 2.5 mg/ml enzimli sensörde 0.0220°, 5.0 mg/ml enzimli sensörde 0.0420° ve 10 mg/ml enzimli sensörde 0.0670° olarak gözlenmiş ve Şekil 4.13 (a)'daki sensogram olarak kaydedilmiştir. Şekil 4.13 (b)'de 40 mM üre konsantrasyonu ile enzimsiz altın sensör, 1.0 mg/ml enzimli altın sensör, 2.5 mg/ml enzimli altın sensör, 5.0 mg/ml enzimli altın sensör ve 10 mg/ml enzimli altın sensör ile yapılan ölçümler sensogram olarak verilmiştir. Şekil 4.14 (a) ve Şekil 4.14 (b) ise sırayla 80 ve 160 mM üre konsantrasyonları kullanılarak elde edilen sensogramlar gösterilmektedir.

Sensogramları Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te gösterilen üre konsantrasyonları için elde edilen maksimum rezonans açısı kayma değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Altın sensör kullanılarak gözlenen maksimum rezonans açısı kayma değerleri ($\Delta\theta$)

		Üre (mM)				
		10	20	40	80	160
Üreaz (mg/ml)	0	0.0015	0.0040	0.0800	0.0950	0.1800
	1.0	0.0040	0.0160	0.1020	0.1150	0.2100
	2.5	0.0079	0.0220	0.1150	0.1700	0.2500
	5.0	0.0189	0.0420	0.1350	0.2000	0.2900
	10	0.0205	0.0670	0.1750	0.3600	0.3900

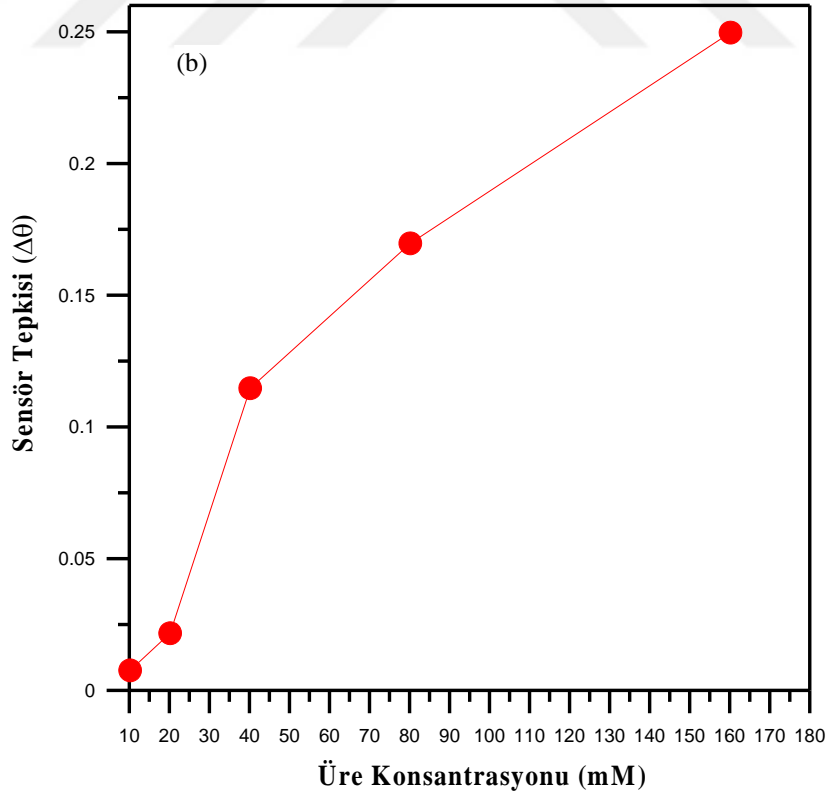
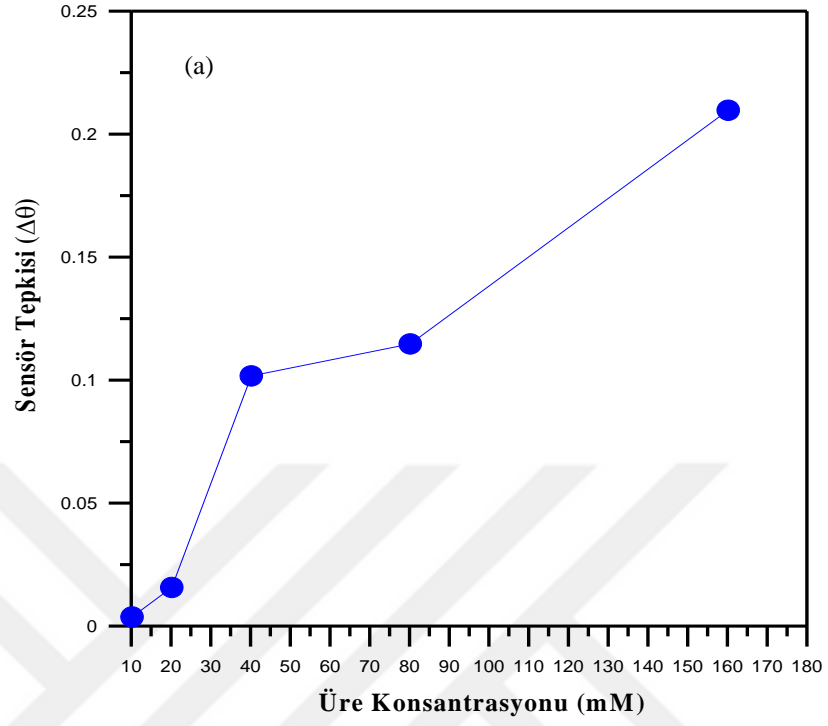
Altın sensörlere immobilize edilen enzim konsantrasyonları ele alındığında enzim immobilize edilmeden tepkileri kontrol edilen altın sensörler üre konsantrasyonlarına Şekil 4.15'te görüldüğü gibi tepki vermiştir. Sensör tepkisi açısı farkı şeklinde belirtilmiştir. Enzimsiz altın sensörlerle ölçüm olarak tek değişkenle SPR sisteminin çalışması kontrol edilmiştir ve enzimli uygulamalar için tepki alt limitleri elde edilmiştir.



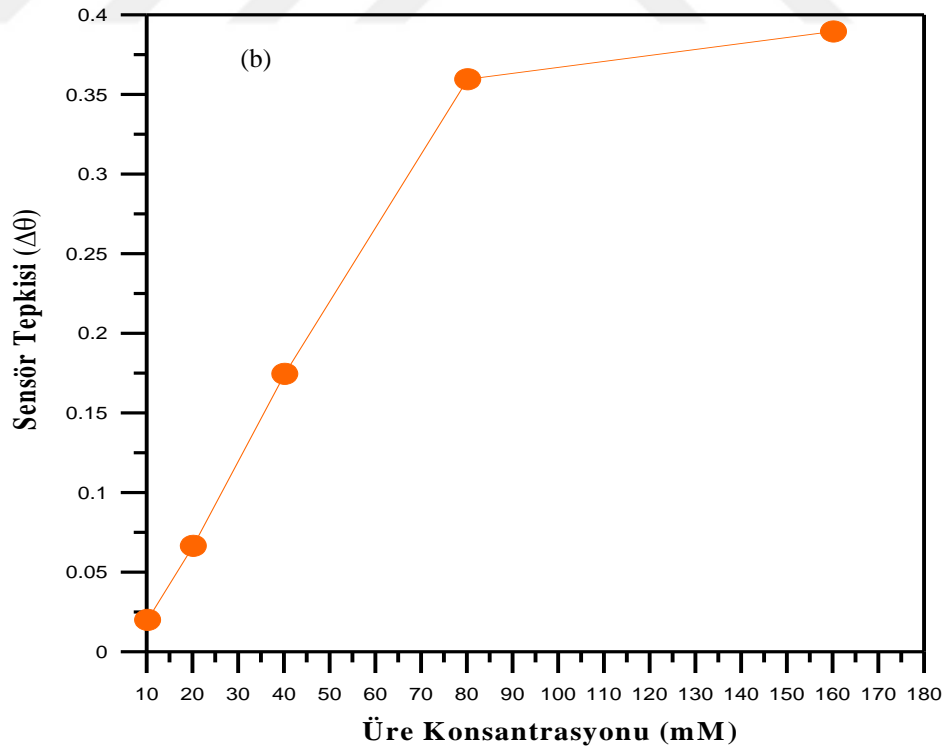
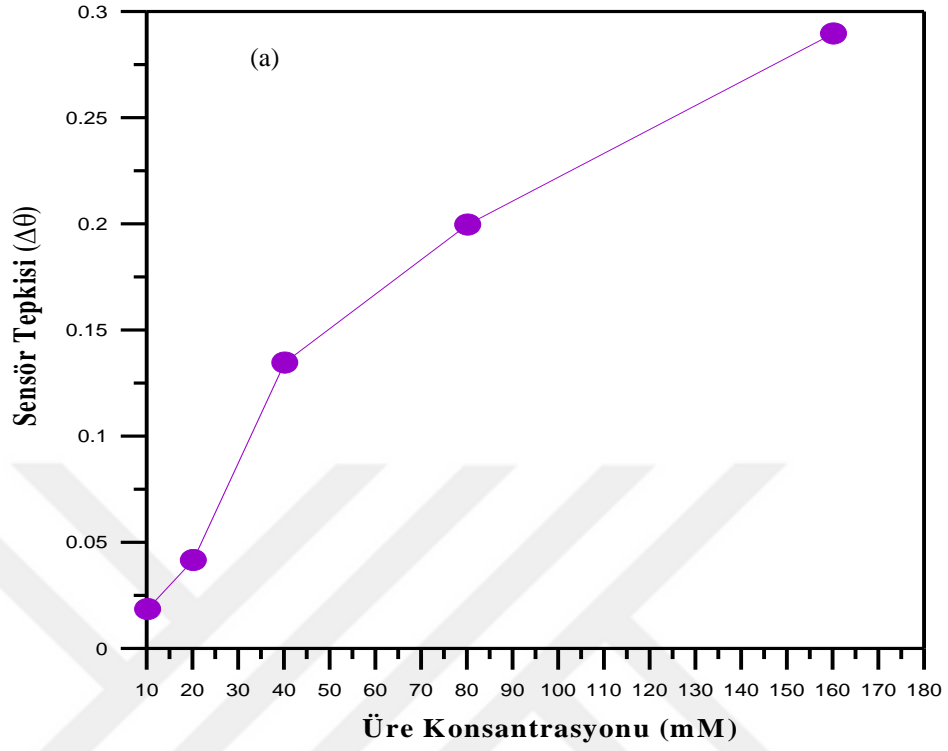
Şekil 4.15. Enzim immobilize edilmeyen altın sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$).

1.0 mg/ml enzimli sensörün davranışı enzimsiz sensörün davranışına benzerken 2.5 mg/ml enzimli sensörün davranışı özellikle 80 mM ürede daha yüksek bir artış sergilemiştir. Şekil 4.16 (a) 1.0 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensörlerin Şekil 4.16 (b) ise 2.5 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensörlerin verdikleri tepkileri göstermektedir.

Şekil 4.17 (a) 5.0 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensörlerin Şekil 4.17 (b) ise 10 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensörlerin verdikleri tepkileri göstermektedir. 5.0 mg/ml enzimli sensörün üre konsantrasyonundaki artışla tepkide azalan oranda artış olduğu görülmektedir. 10 mg/ml enzimli sensörde doyum noktasına yaklaştığı görülmektedir.

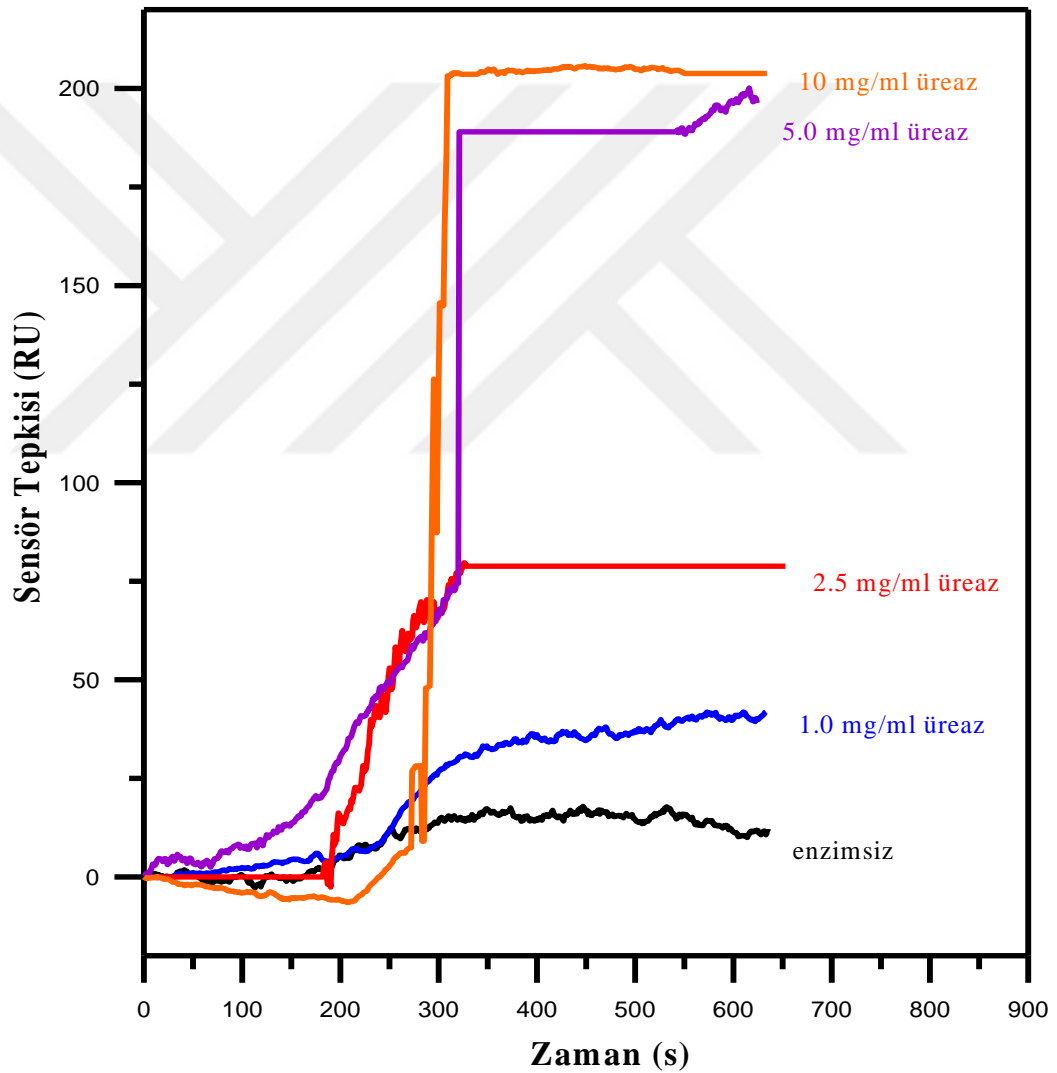


Şekil 4.16. Enzim immobilize edilmiş altın sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$).
(a) 1.0 mg/ml (b) 2.5 mg/ml

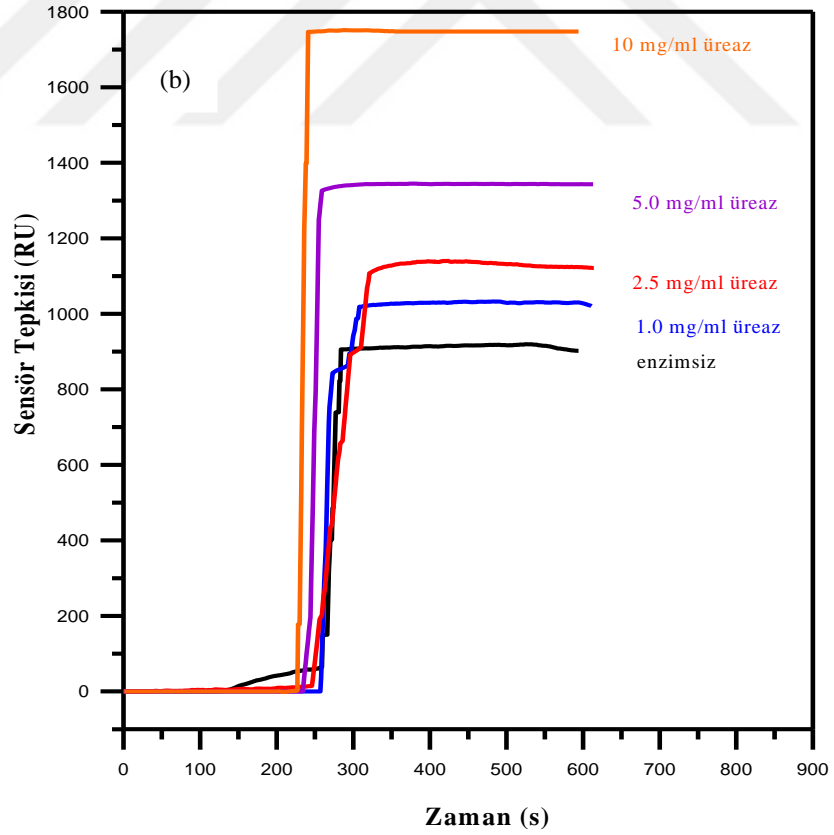
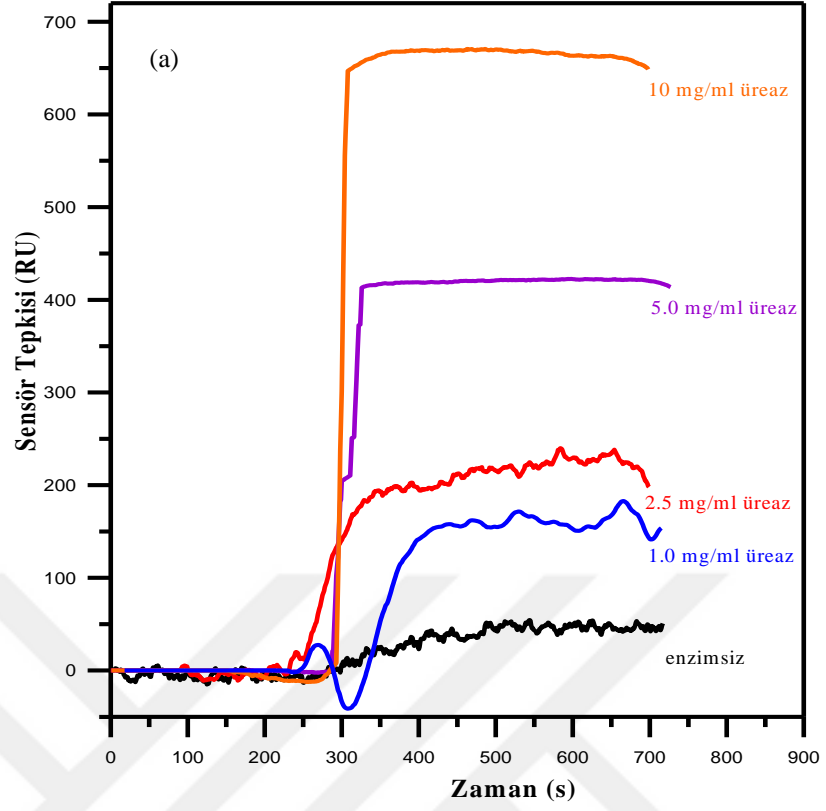


Şekil 4.17. Enzim immobilize edilmiş altın sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$).
(a) 5.0 mg/ml (b) 10 mg/ml

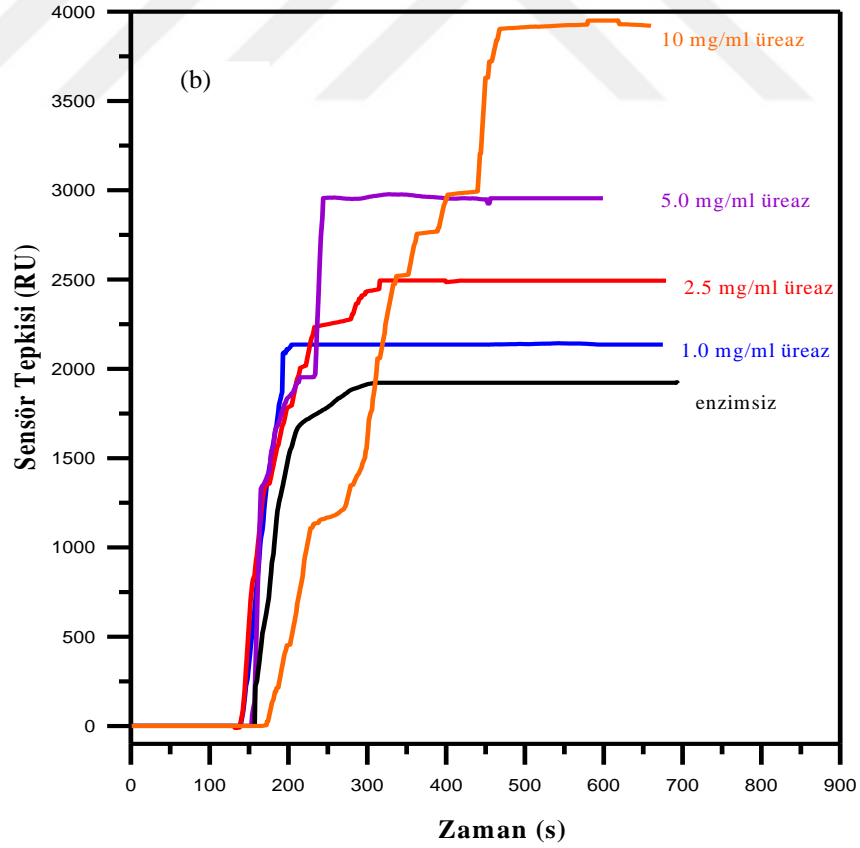
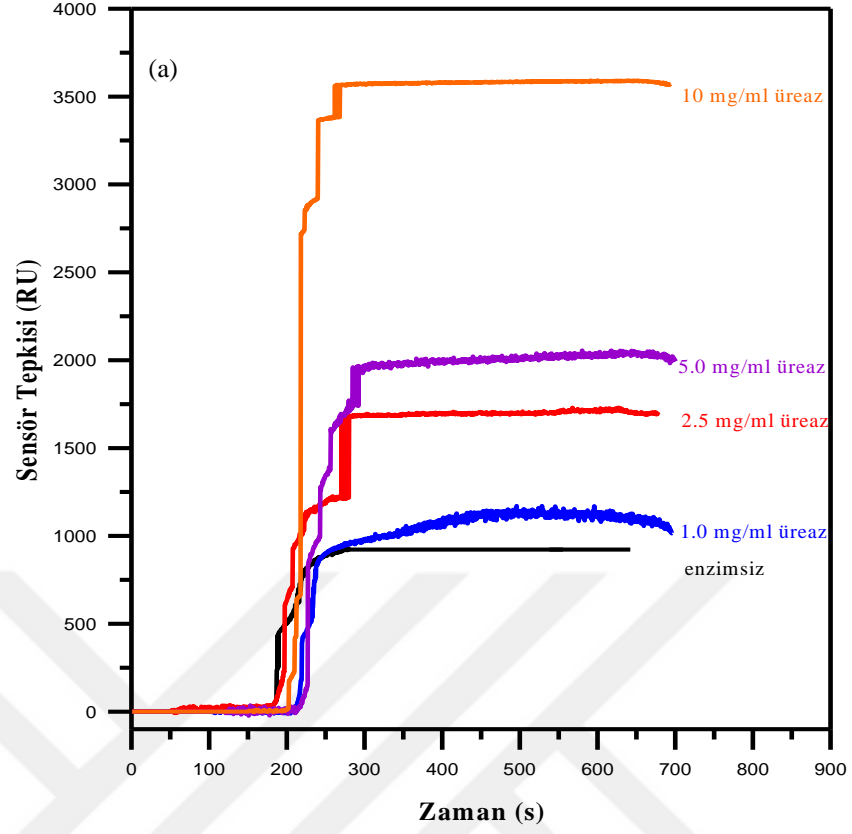
Uluslararası literatürde SPR sensör tepkisi $0,1^\circ$ açı kaymasına karşılık 1000 RU olarak gösterilir. Burada RU rezonance unit ya da response unit olarak adlandırılır. 1000 RU sensör tepkisi enzim bağının yaklaşık 1 mm^2 de meydana getirdiği değişikliktir. RU ve 1 ng malzemenin bağlanması arasındaki ilişki yüzeye bağlı molekülün kırma indisiyle değişir. (Davis ve Wilson, 2000, 2001). Burdan hareketle $\Delta\theta$ ile oluşturulan sensogramlar RU birimine dönüştürülerek Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’ de tekrar verilmiştir.



Şekil 4.18. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin 10 mM üre akışına verdiği tepkiler (RU).



Şekil 4.19. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin (a) 20 (b) 40 mM üre akışına verdiği tepkiler (RU).



Şekil 4.20. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki Au sensörlerin (a) 80 (b) 160 mM üre akışına verdiği tepkileri (RU).

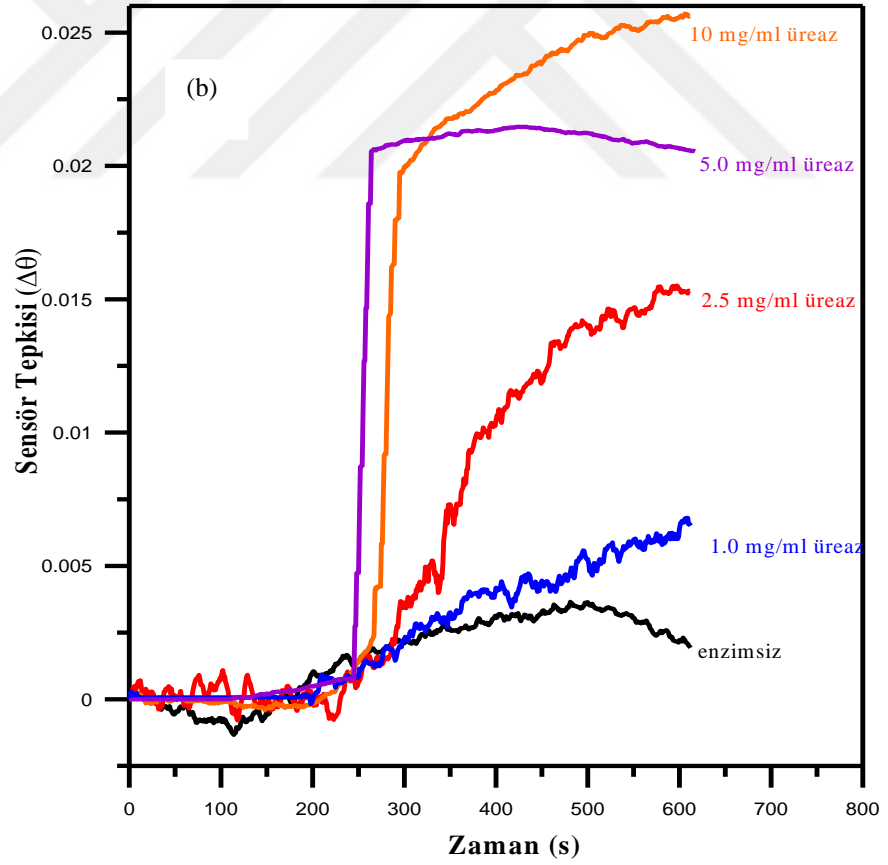
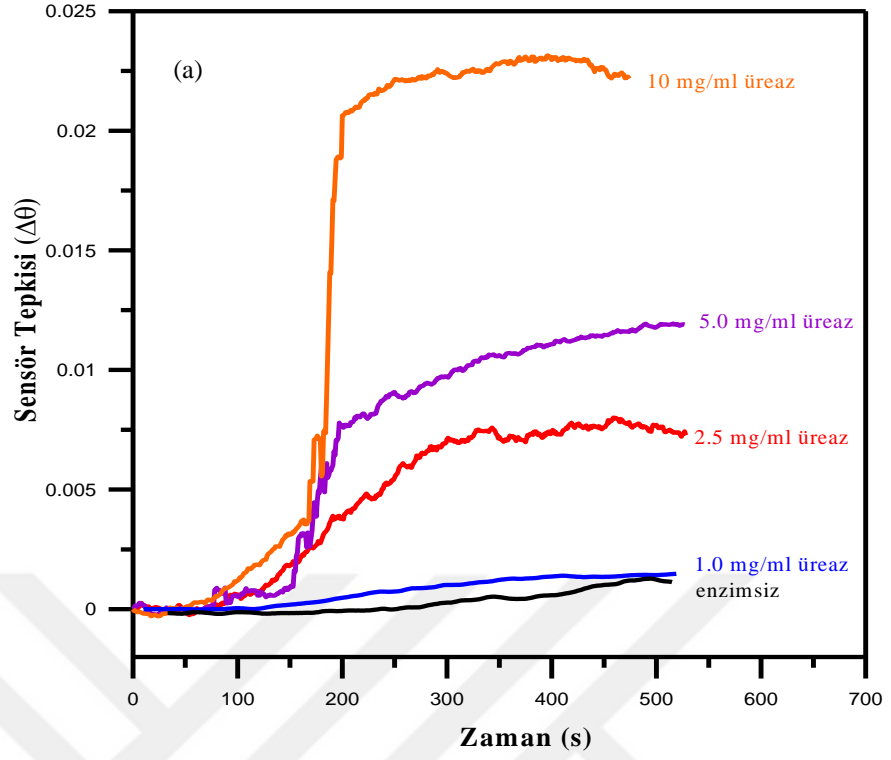
Deney aşamasında kullanılan altın sensöri biyolojik ve kimyasal artıkların temizlenmesi için ultrasonik banyoda pirana çözeltisiyle temizlendi. Daha önce bahsedilen temizleme basamakları bir altın sensörde 5 tur ve fazlasında uygulandığında altının yüzeyinde Şekil 4.21’de görüldüğü gibi aşınma meydana getirmiştir..



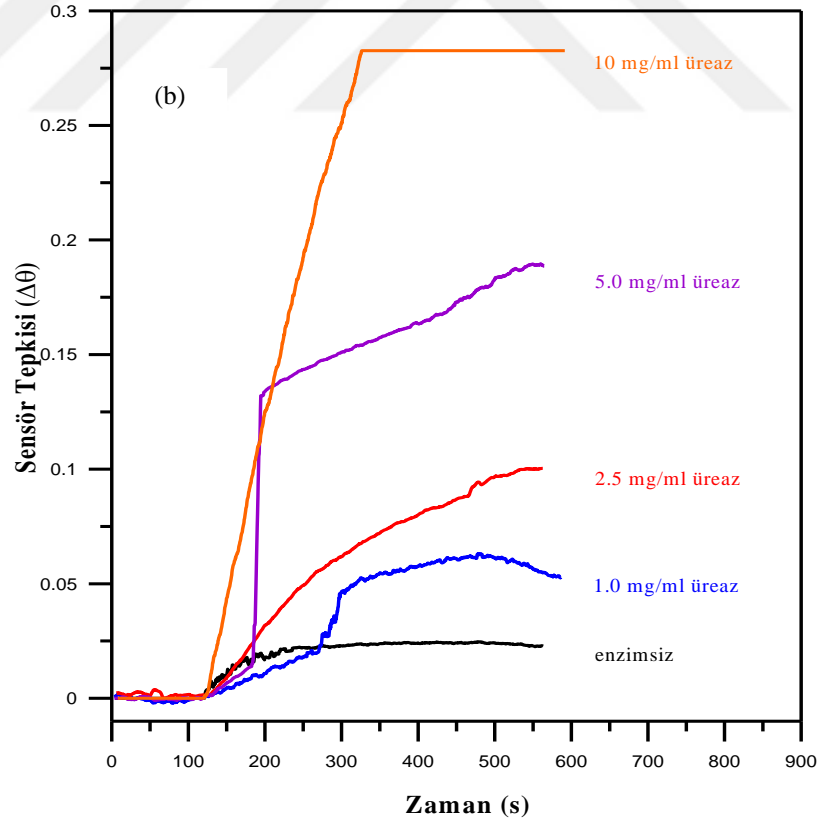
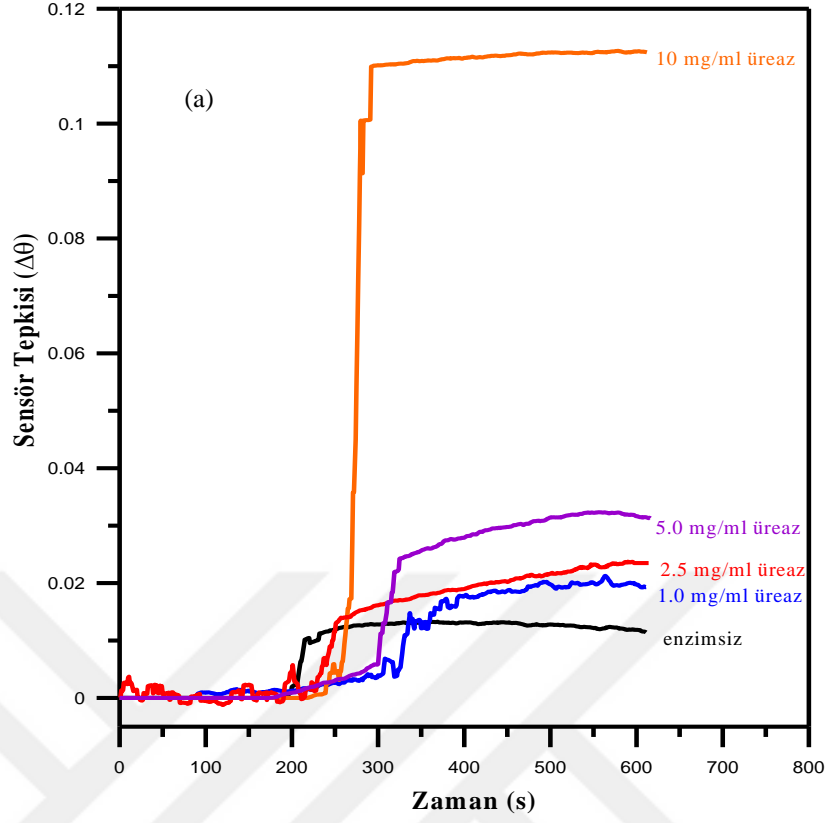
Şekil 4.21. Temizleme sonrası aşınan altın sensörler

SPR cihazıyla sağlıklı ölçümler yapabilmek, pahalı bir malzemeyle maliyetli bir şekilde üretilen altın sensörlerde meydana gelen bozulmaların önüne geçebilmek ve altın sensörlerin kullanım ömrünü uzatabilmek amacıyla altın sensörlerle yapılan ölçümler, altın sensörler üzerine enzim immobilize edilen selüloz yapılı A4 kağıt konularak tekrar edilmiştir. Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24’teki sensogramlar elde edilmiştir.

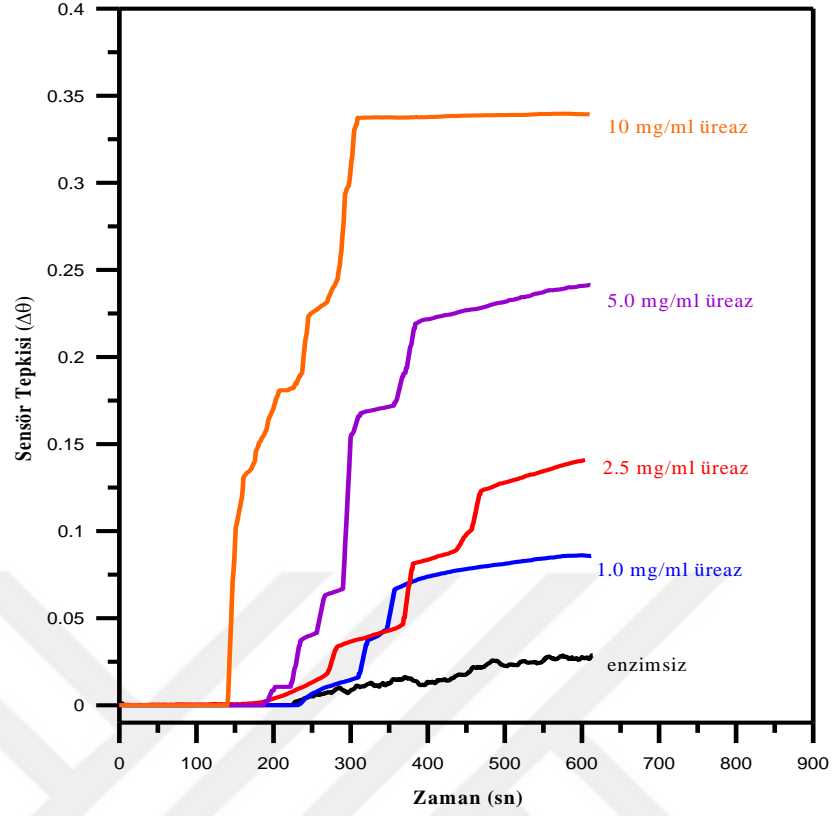
Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24’te görülen sensogramlar da yukarıda belirtildiği gibi aşağıdan yukarıya enzimsiz altın sensör, 1.0 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensör, 2.5 mg/ml enzimli altın sensör, 5.0 mg/ml enzimli altın sensör ve 10 mg/ml enzimli altın sensör sırasıyla verilmiştir. Şekil 4.22’de enzimsiz altın sensörle elde edilen maksimum açı kayması 0.0012° iken 1.0 mg/ml üreaz immobilize edilmiş altın sensör için 0.0015° , 2.5 mg/ml üreaz immobilize edilmiş altın sensör için 0.0080° , 5.0 mg/ml üreaz immobilize edilmiş altın sensör için 0.0120° ve son olarak 10 mg/ml üreaz immobilize edilmiş altın sensörle elde edilen maksimum açı kayması 0.0230° olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.22. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin (a) 10 (b) 20 mM üre akışına verdiği tepkiler ($\Delta\theta$).



Şekil 4.23. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin (a) 40 (b) 80 mM üre akışına verdiği tepkileri ($\Delta\theta$).



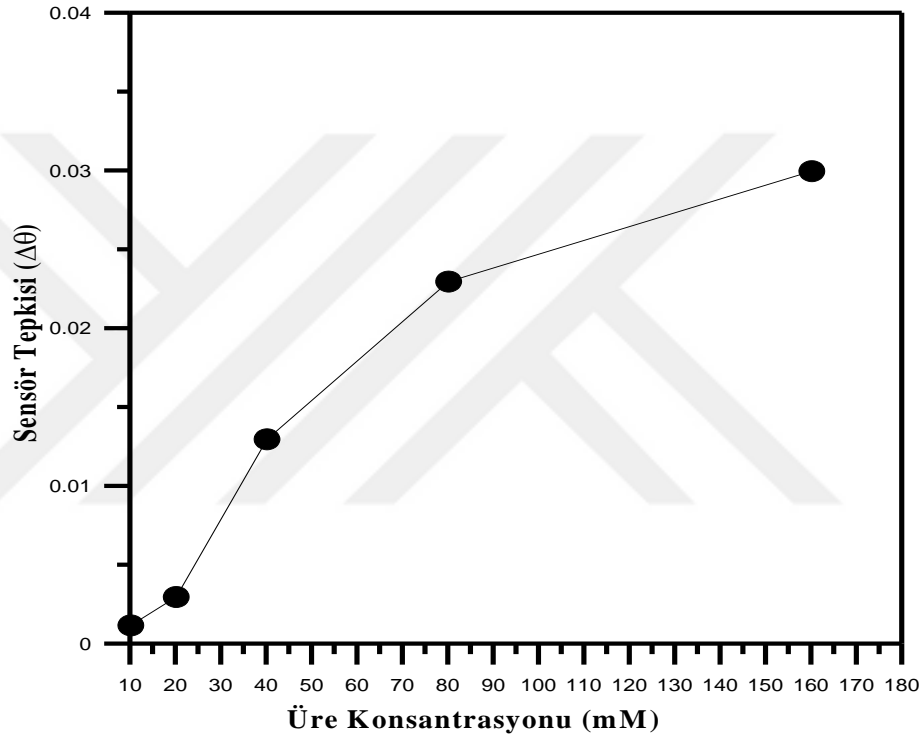
Şekil 4.24. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin 160 mM üre akışına verdiği tepkiler ($\Delta\theta$).

Altın sensörün üzerine A4 kağıt eklenerek yapılan ölçümlerde yine üre konsantrasyonuna göre karşılaştırma yapıldığında yüzeye immobilize edilen enzim konsantrasyonu arttıkça sensörün tepkisinde de artış olduğu gözlenmiştir ve elde edilen $\Delta\theta$ değerleri Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Kağıt sensör kullanılarak ulaşılan maksimum rezonans açısı kayma değerleri ($\Delta\theta$)

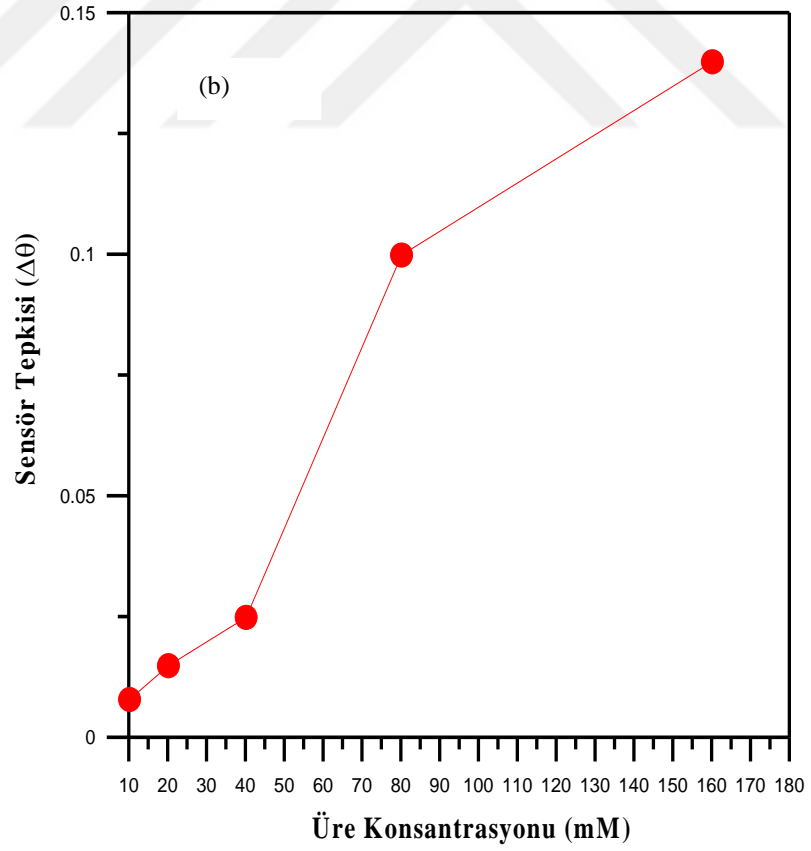
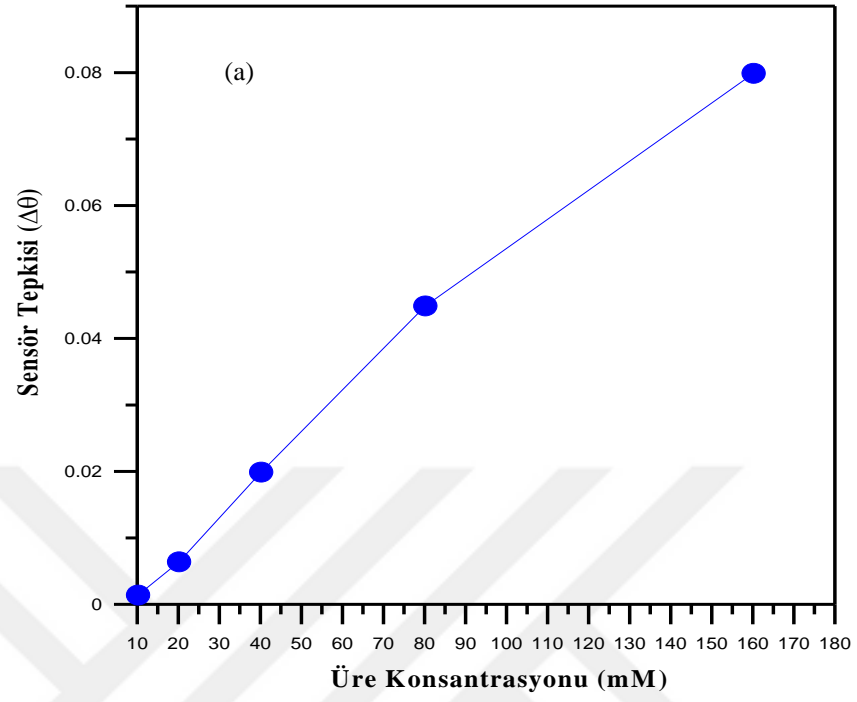
		Üre (mM)				
		10	20	40	80	160
Üreaz (mg/ml)	0	0,0012	0,0030	0,0130	0,0230	0,0300
	1	0,0015	0,0065	0,0200	0,0450	0,0800
	2,5	0,0080	0,0150	0,0250	0,1000	0,1400
	5	0,0120	0,0210	0,0320	0,1900	0,2200
	10	0,0230	0,0260	0,1100	0,2830	0,3400

Çizelge 4.2’de görülen değerleri daha iyi yorumlamak amacıyla üre konsantrasyon artışıyla sensörün ne kadar tepki verdiği Şekil 4.25, Şekil 4.26 ve Şekil 4.27’de gösterilmiştir. Şekil 4.25’de enzim immobilize edilmeyen kağıt sensörün değişen üre konsantrasyonlarına verdiği tepkiler gösterilmektedir. Enzim olmadan yapılan analizler kağıt sensörlerin SPR sisteminde kullanılabilirliğini kontrol etmek amacıyla yapılmıştır ve üre konsantrasyonuna artışıyla kağıt sensörlerin verdiği tepkilerin artması kağıt sensörlerin SPR sensör sistemlerinde kullanılabileceğini göstermiştir.



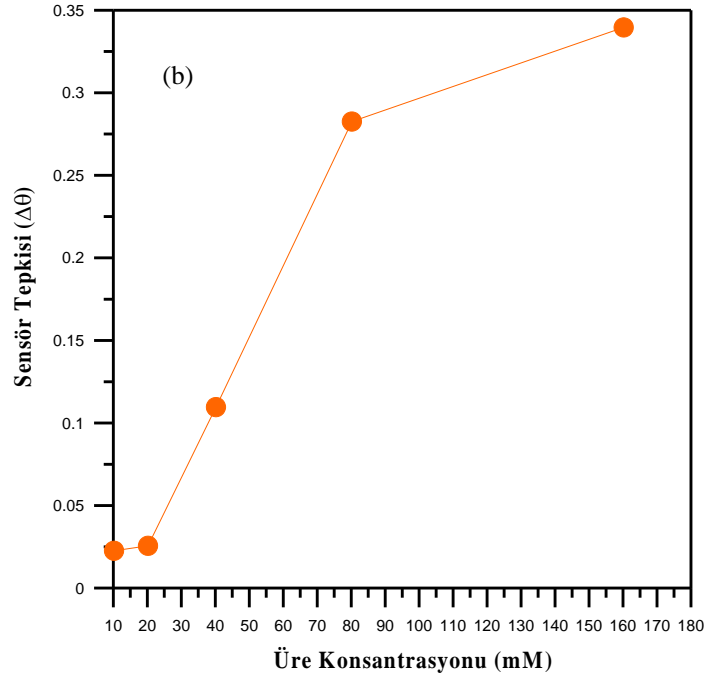
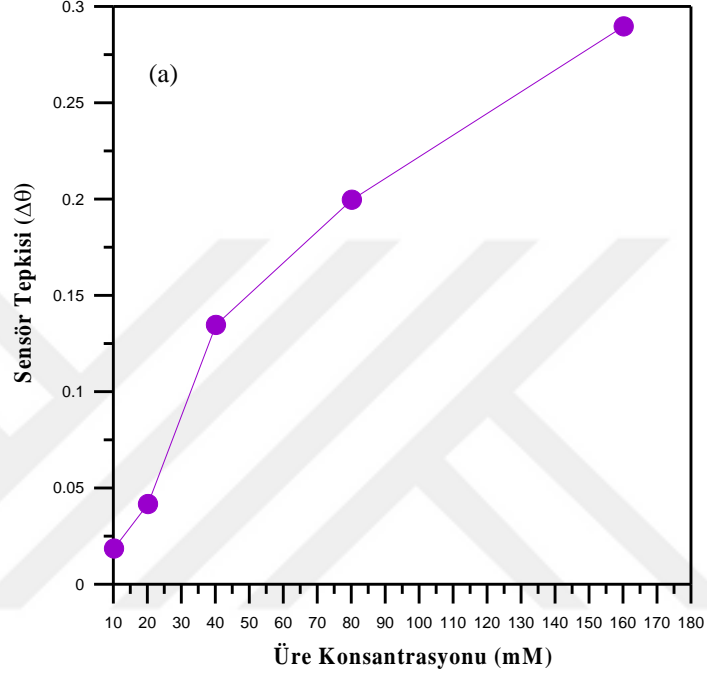
Şekil 4.25. Enzim immobilize edilmeyen kağıt sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$).

Şekil 4.26 (a) 1 mg/ml enzim immobilize edilmiş kağıt sensörün değişen üre konsantrasyonlarına verdiği tepkileri gösterilmektedir. Şekilde artan üre konsantrasyonu ile sensör tepkisinin orantılı bir şekilde arttığı açıkça görülmektedir. Şekil 4.26 (b) 2.5 mg/ml enzim immobilize edilmiş kağıt sensörün üre konsantrasyonlarına verdiği tepkileri göstermektedir. 1.0 mg/ml enzimli kağıt sensörle yakalanan orantılı artış 2.5 mg/ml enzimli kağıt sensörde gözlenmemektedir. Şekil 4.26 (b)'ye göre 40 – 80 mM aralığı sensörün lineer analiz bölgesidir.



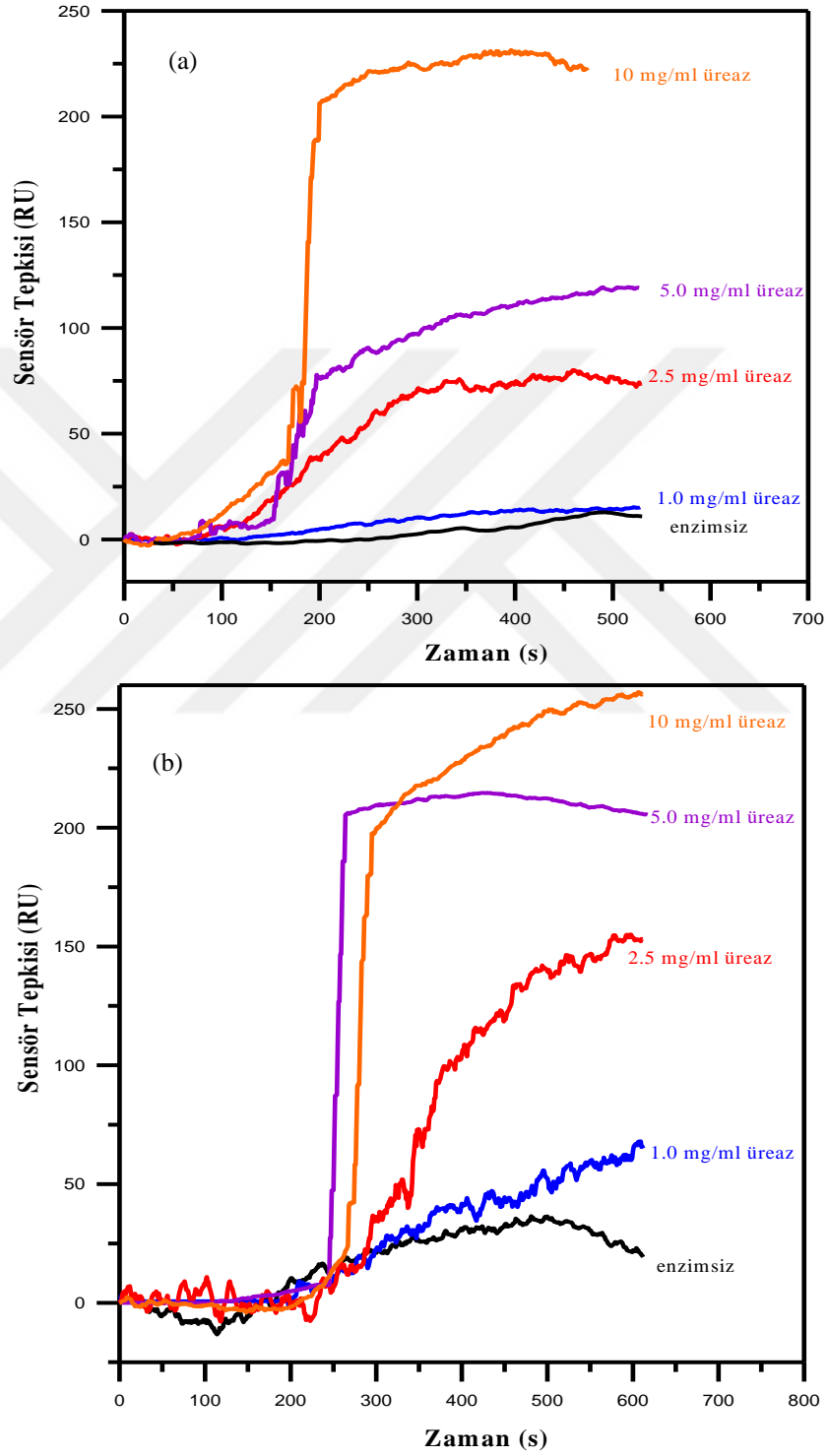
Şekil 4.26. Enzim immobilize edilmiş kağıt sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$).
(a) 1.0 mg/ml (b) 2.5 mg/ml

Şekil 4.27 (a) 5.0 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensörlerin Şekil 4.27 (b) ise 10 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensörlerin verdikleri tepkileri göstermektedir. 5.0 mg/ml enzimli sensörün üre konsantrasyonundaki artışla tepkide azalan oranda artış olduğu görülmektedir. 10 mg/ml enzimli sensörde doyum noktasına yaklaştığı görülmektedir.

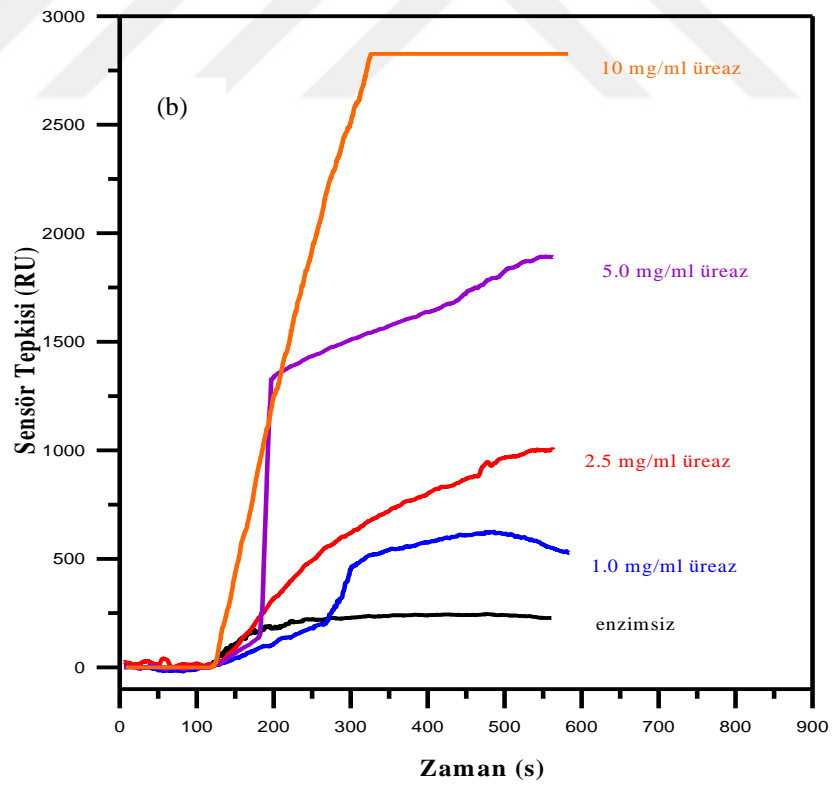
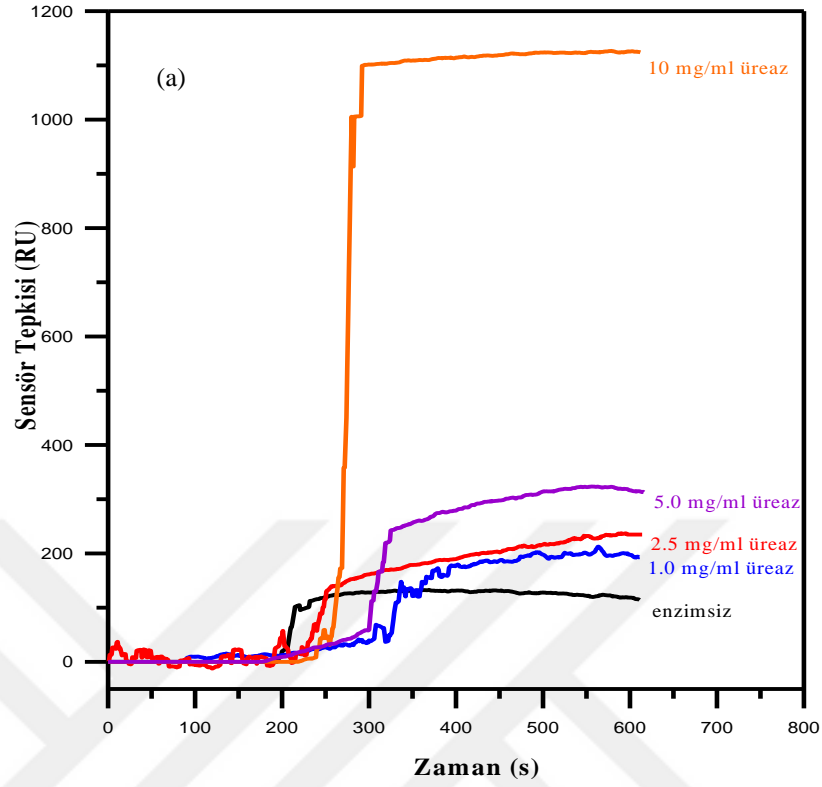


Şekil 4.27. Enzim immobilize edilmiş kağıt sensörlerin üre akışına verdiği tepki ($\Delta\theta$).
(a) 5.0 mg/ml (b) 10 mg/ml

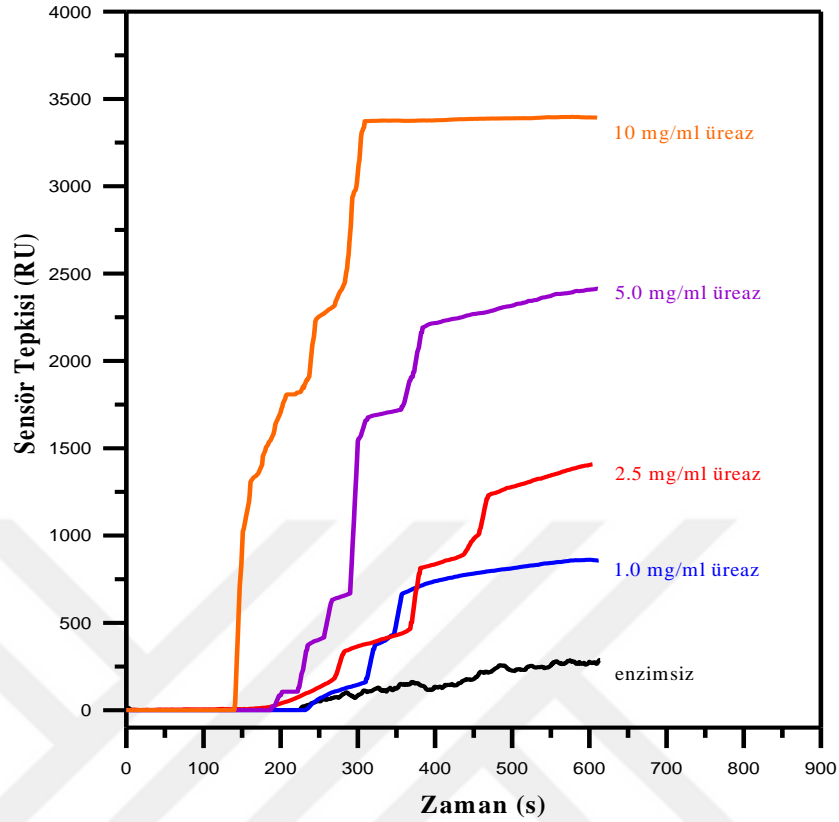
Çizelge 4.2’de gösterilen rezonans açığı kaymaları önceden belirtilen sebeplerden dolayı RU’ya dönüştürülerek elde edilen yeni sensogramlar Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30’da gösterilmiştir.



Şekil 4.28. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin (a) 10 (b) 20 mM üre akışına verdiği tepkileri (RU).

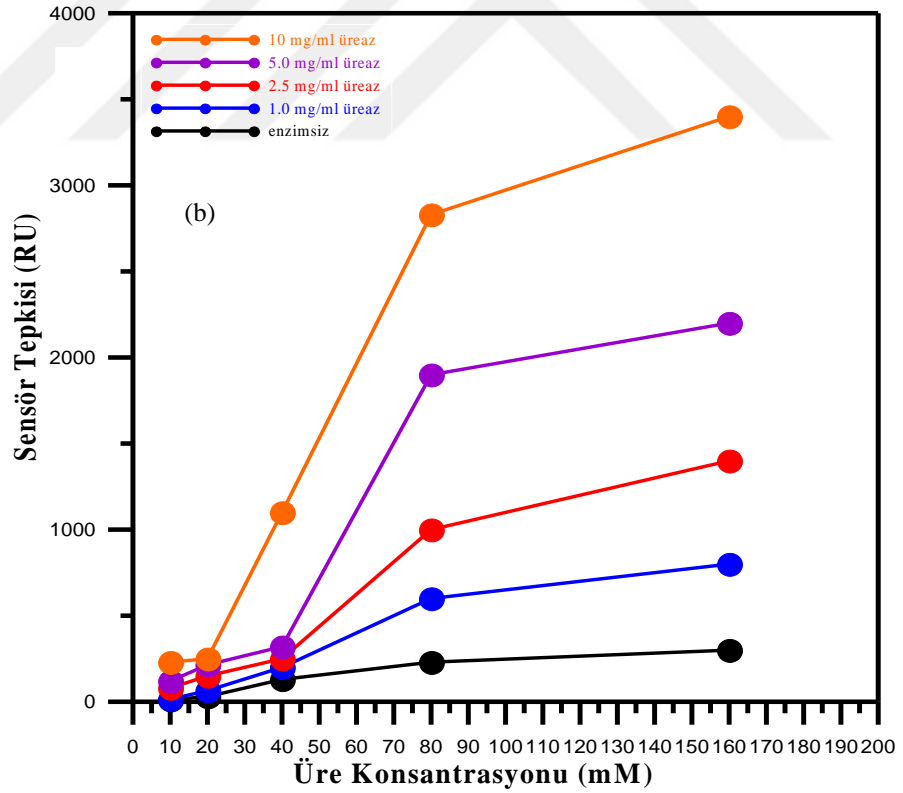
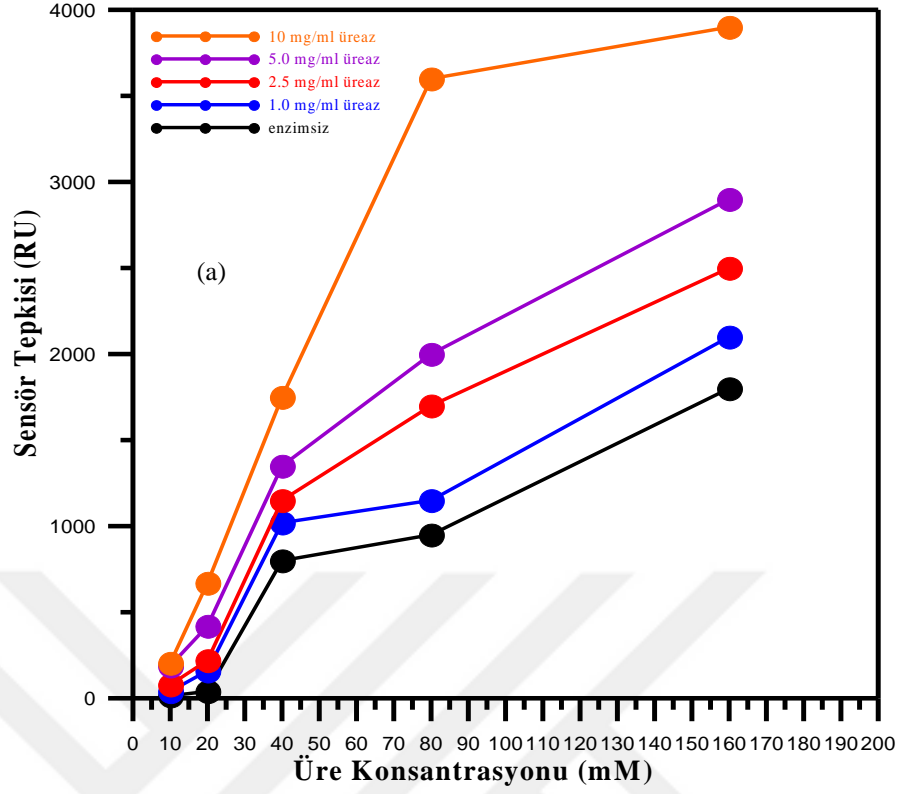


Şekil 4.29. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin (a) 40 (b) 80 mM üre akışına verdiği tepkiler (RU).



Şekil 4.30. Farklı üreaz konsantrasyonlarındaki kağıt sensörlerin 160 mM üre akışına verdiği tepkiler (RU).

Şekil 4.31 SPR sensör ile alınan tüm ölçümlerin tepe değerlerine (maksimum tepki) karşılık kullanılan üre konsantrasyonları (10, 20, 40, 80 ve 160 mM) alınarak oluşturuldu. Şekil 4.31 (a) ve (b)'de enzimsiz altın sensörle elde edilen değerler, 1.0 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensörle elde edilen değerler, 2.5 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensörle elde edilen değerler, 5.0 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensörle elde edilen değerler ve 10 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensörle elde edilen değerler gösterilmiştir. Yüzeyde üreaz enzimi olmadığı zaman bile sensör tepkisi gözlenebilmiştir. Yüzeğe üreaz immobilize edilmiş durumlarda ise üre konsantrasyonuna bağlı olarak sensör tepkisinin lineer olarak arttığı görülmektedir (20 – 80 mM aralığında). Daha yüksek üre konsantrasyonlarında ise doyuma ulaştığı ya da doyum bölgesine yaklaştığı görülmektedir. Bu durum sensör yüzeyindeki üreaz ile yüzeğe gönderilen ürenin tamamen reaksiyona girdiği ve ortama gönderilen yüksek konsantrasyonlardaki ürenin reaksiyona girecek bir enzim bulamadığı için yüzeğe tutunmadığı veya ortama reaksiyon sonrası ürün vermediği için herhangi bir



Şekil 4.31. Analit konsantrasyonuna karşı tepki grafiği (a) Altın sensör kullanılarak elde edilen ölçümler (b) Kâğıt sensör kullanılarak elde edilen ölçümler

değişikliğe yol açmadığını göstermektedir. Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'deki sensör tepkileri dikkatle incelendiğinde kağıt sensörlerin ve altın sensörlerin sensör tepkileri birbirlerine yakın çıkmıştır. Bu durum bizi kağıt sensörlerin sensör hassasiyetini çok değiştirmedeği ve ara yüzey olarak kullanılabilceği sonucuna götürür.

4.2. Kinetik Analiz

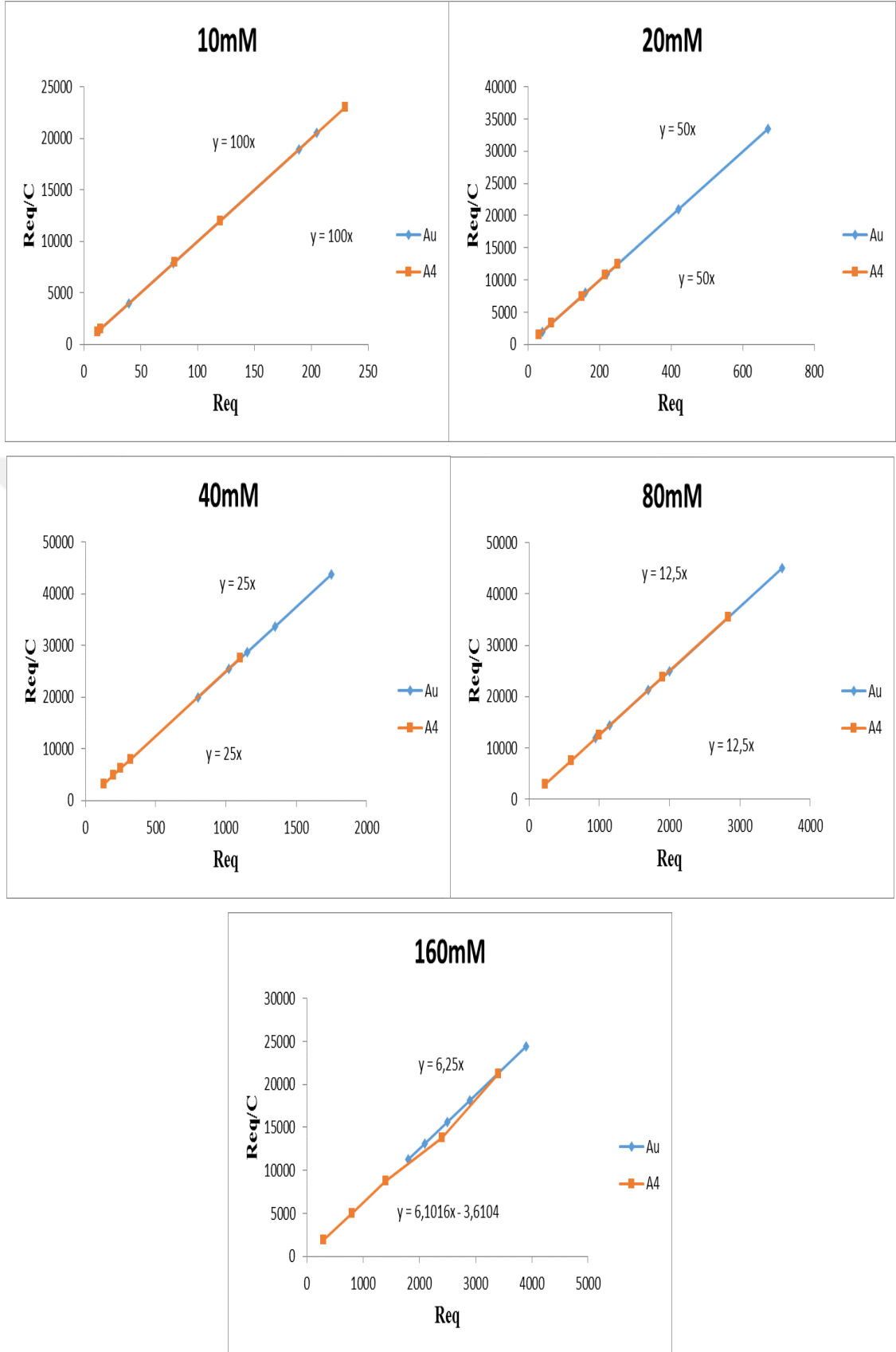
Birleşme denge sabiti (K_A), 1:1 bağlanma modeline göre maksimum tepkinin üre konsantrasyonuna oranını (R_{eq}/C) – maksimum tepki (R_{eq}) grafiği çizilip grafiğin eğimi denklem (3.6)'da gösterildiği gibi hesaplanabilir.

Üreaz immobilize edilmiş altın ve kağıt sensörler kullanılarak SPR sensörlerin üre tayin özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, sensör farklı derişimlerde üre çözeltileri ile etkileştirilmiştir. Elde edilen sensogramlara denklem (3.6) uygulanarak kinetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.32'deki grafiklerden faydalanarak altın ve kağıt sensörlerin birleşme denge sabiti, K_A ve denklem (3.7) kullanılarak ayrılma denge sabiti, K_D değerleri hesaplanmıştır ve Çizelge 4.3'te gösterilen değerlere ulaşılmıştır. Hesaplanan denge sabitleri sensör yüzeylerinin afiniteleri hakkında bilgi edinmemizi sağlamıştır.

Çizelge 4.3. Altın ve kağıt sensörler için hesaplanan K_A ve K_D değerleri

		K_A		K_D	
		Au	A4	Au	A4
Üre (mM)	10	100	100	0,01	0,01
	20	50	50	0,02	0,02
	40	25	25	0,04	0,04
	80	12,5	12,5	0,08	0,08
	160	6,25	6,10	0,16	0,163

Şekil 4.32'deki garfiklerin eğimi Çizelge 4.3'te belirtilen K_A değerlerini verir ve denklem (3.7)'den faydalanarak da K_D değerleri hesaplanmıştır. K_D değerinin büyümesi sensör yüzeyinin afinitesinin azaldığını göstermektedir.



Şekil 4.32. Altın ve kağıt sensörler için $R_{eq}/C - R_{eq}$ grafikleri

Çizelgeye göre hem yalnız altın kullanılan sensörlerde hem de altın üzerine A4 tabakası kullanılarak üretilen sensörlerde K_D değerinin 0.01 seviyelerinde başlayıp 0.16 seviyelerine ulaştığı görülmektedir. Bu durum yüzey afinitesinin azaldığını göstermektedir. Elde edilen verilere göre yüksek konsantrasyonlarda çalışmak sensörün kalitesinde azalmaya neden olmuştur. Ayrıca altın ve kağıt sensörler için K_A ve K_D değerlerinin neredeyse eşit çıkması maliyetsiz, kolay ulaşılabilen ve bol bulunan kağıdın SPR sistemlerinde sistemin koşullarını etkilemeden ve en önemlisi çalışmanın amaçlarından biri olan altın sensörlerin ömrünü uzatarak kullanılabilceğini gösterir.

4.3. SPR Sensörlerinin Yüzey İncelemesi

Altın ve kağıt sensörlerin yüzeyinde meydana gelen üreaz - üre etkileşimi SPR sistemi ile sensogram olarak görüntülenmiştir. Üreaz - üre etkileşimini daha değişik şekillerde görüntülemek için Raman ve UV-vis analizleri kullanılmıştır.

4.3.1. Raman Analizi

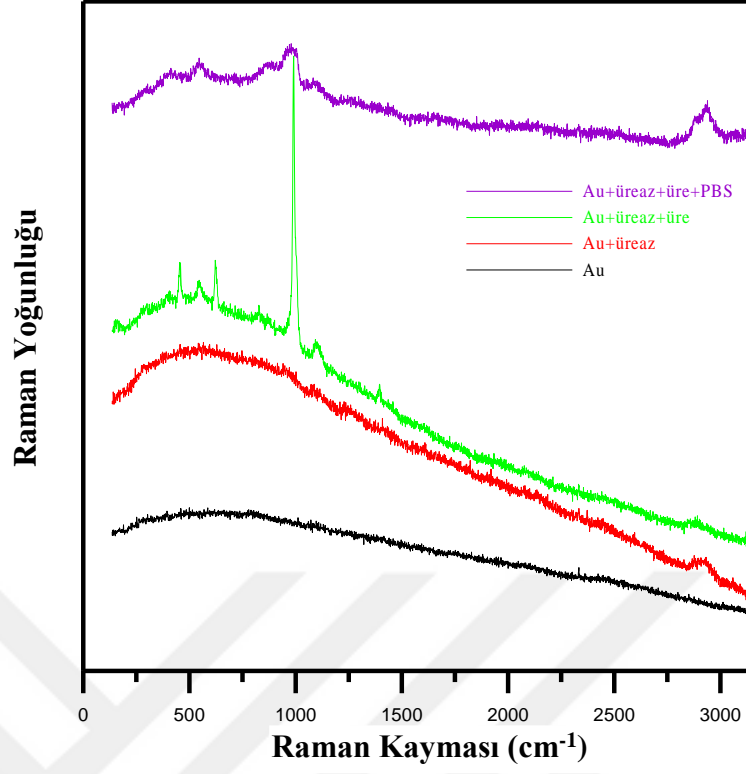
Yüzey Plazmon Rezonans sisteminde kullanılan altın ve kağıt sensörler Renishaw inVia Raman mikroskop cihazıyla 532 nm dalgaboyunda analiz edilmiştir.

Şekil 4.33 ve Şekil 4.34'te gösterilen grafiklerde görülen her bir aşama için farklı bir sensör kullanılarak ölçüm alınmıştır. Sensörler sırasıyla;

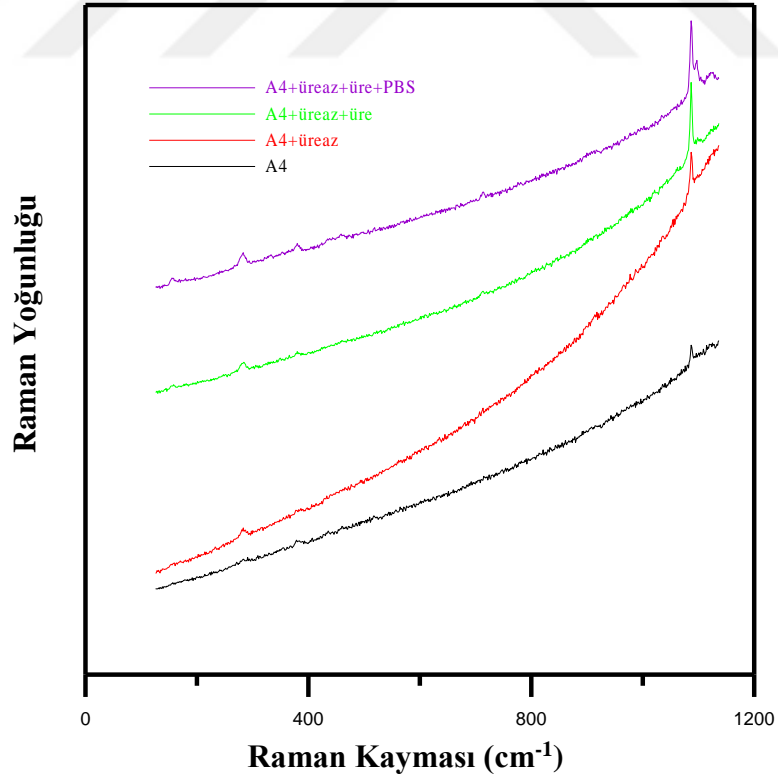
- I. Boş sensör
- II. Sensör + üreaz
- III. Sensör + üreaz + üre
- IV. Sensör+ üreaz + üre +PBS

şeklinde hazırlandı. Her aşamada sensörlerin oda sıcaklığında kurumaması beklenip yeni çözelti sensör kurduktan sonra immobilize edilmiştir.

Şekil 4.33 incelendiğinde enzimsiz Au sensörü hiçbir pik vermezken 10 mg/ml enzim immobilize edilen sensör 2900 bandında bir pike sahiptir. Bu pikin enzime ait olduğu düşünülmektedir çünkü her aşamadaki ölçümde 2900 bandında pik gözlenmektedir. Literatürde böyle bir ölçüm olmadığı için herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır.



Şekil 4.33. Sistemde kullanılan altın sensörlerin Raman analizi



Şekil 4.34. Sistemde kullanılan A4 kağıt sensörlerin Raman analizi

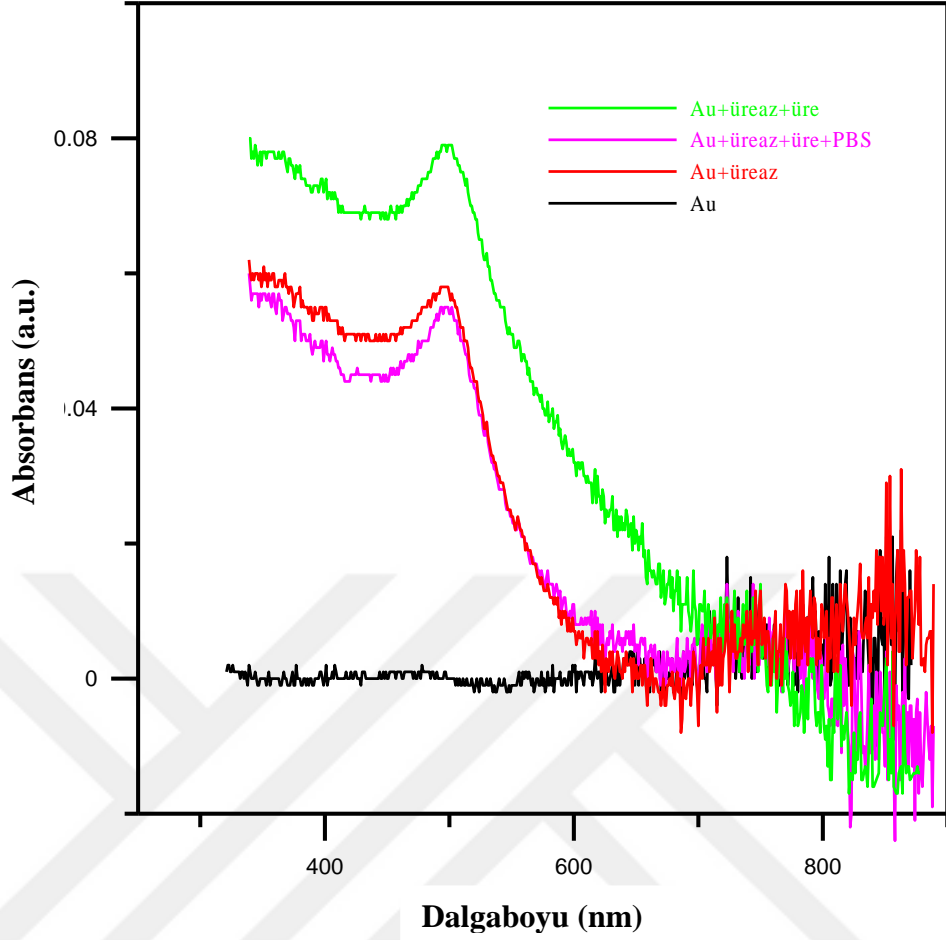
Enzim+üre bulunduran sensör sırasıyla 400, 450, 650, 1000, 1100 ve 2900 bandlarında pikler göstermiştir. Literatürle karşılaştırıldığında 400 ve 450 bandındaki piklerin NH_3 piki ile (Reardon, 2012) uyumlu ve 650 bandındaki pikin HCO_3^- (Wang ve ark. 2015) piki ile uyumlu ve 1000-1100 bandındaki piklerin ise üre içinde bulunan C-OH piki ile (Wang ve ark. 2015) uyumlu olduğu görülmektedir. Enzim+üre+PBS bulunduran sensörde de bir önceki ile aynı bandlarda pikler görülmekte ancak şiddetlerinde belirgin bir azalma göstermektedir. SPR sistemiyle çalışırken akış hücresinden son kez PBS geçirilmesinin amacı üre ve üreaz kalıntılarını ortadan kaldırıp sensörü tekrar kullanabilmektir. Ancak Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de belirtildiği gibi PBS ile yıkanan sensörün üreye gösterdiği tepki azalma göstermişti. Tepkideki azalmanın sebebi ortamdaki NH_3 ve HCO_3^- kalıntılarının tamamen ortamdaki temizlenmemesi olarak düşünülmektedir.

Şekil 4.34’te ise A4 kağıt kullanılarak alınan Raman ölçümleri gösterilmektedir. Elde edilen sensogramlar düşünüldüğünde Şekil 4.33’teki gibi piklerin oluşması bekleniyordu. Ancak lifli bir yapıya sahip olan A4 kağıtların sıvı ile her teması sonrası yapısının değiştiği ve bu sebepten beklenen pikleri vermediği düşünülmektedir.

4.3.2. UV-vis Analizi

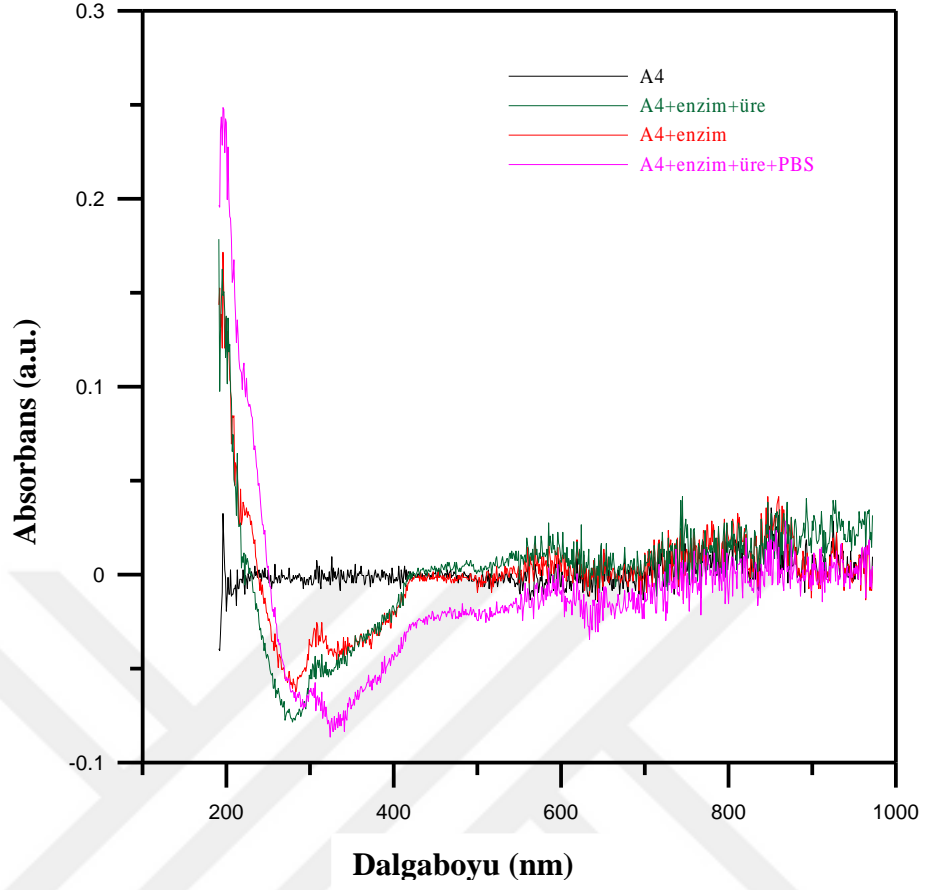
UV-vis analizi Thermo Scientific Genesys 10S UV-vis Spektrometre ile yapıldı. Şekil 4.35’te gösterilen enzimsiz altın sensörü referans olarak sensörlerin absorbans değerlerine bakıldı. Referans sensöre sırasıyla üreaz, üre ve PBS damlatılıp oda sıcaklığında kurutulduktan sonra ölçülmüştür. Şekil 4. 35 incelendiğinde her aşamada aynı dalgaboyunda absorbans değerine sahip olduğu görülmektedir. Gözlenen absorbans değerleri her üç durum içinde neredeyse aynı şiddettedir. Bu durumda gözlenen değerlerin hepsinin üreaza ait olduğu düşünülmektedir.

A4 kağıt sensörü ile yapılan absorbans ölçümleri için daha önce sıvı ile temas etmemiş enzimsiz kağıt referans olarak alınmıştır. Sonra sırasıyla referans kağıda üreaz, üre ve PBS damlatılıp oda sıcaklığında kurutulduktan sonra UV-vis analizi yapılmıştır.



Şekil 4.35. Altın sensörün absorbans – dalgaboyu grafiği

Şekil 4.36’da A4 kağıt sensörün UV-vis analizi gösterilmektedir. Literatürde, yapılan çalışma ile ilgili örnek teşkil edecek bir veri bulunamamıştır. Bu sebeple absorbans değerinin negatif çıkması ile ilgili bir yorum getirilememiştir. Ancak sıvı ortamda absorbans ölçümü ile ilgili çalışmalar yüksek derişimlerdeki numunelerin kendi kendine absorpsiyon yapması sebebiyle absorbans değerlerinin negatif sapma gösterdiğini belirtmiştir. Yüksek derişimlerde absorpsiyon yapan moleküller arasındaki uzaklık azalır ve moleküllerin yük dağılımı bozulduğundan dolayı Beer Kanununa göre genellikle 0,01 M’den büyük derişimlerde ışının doğrusallıktan saptığı belirtilmiştir (Karacan, 2008). Lifli bir yapıya sahip olan A4 kağıdın sıvı ile temas ettiği zaman yapısının değişmesi ve içeriğinde bol miktarda üre ve türevlerinin bulunması sebebiyle absorbans seviyesinin negatif değerler verdiği düşünülmektedir.



Şekil 4.36. Kağıt sensörün absorbans – dalğaboyu grafiği

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında; yaklaşık 50 nm kalınlığındaki altın filmler üzerine herhangi bir kaplama ya da tabaka ekleme gibi bir işlem kullanmaksızın üreaz enzimi immobilize edilmiş ve enzimin yapısında bozulmaya sebebiyet vermemek için ek bir işlem yapmak yerine oda sıcaklığında kurumaması beklenilmiştir. Kuruyan sensörlerin üreye verdiği tepkilerin analizi için sensörler SPR sisteminde test edilmiştir. Analiz sonucunda Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'teki enzimsiz sensör ve 1.0, 2.5, 5.0, 10 mg/ml enzim immobilize edilmiş altın sensörlerin sensogramları elde edilmiştir. Her bir sensogram kendi içinde incelendiğinde sensör yüzeyine immobilize edilen enzim miktarı ile sensör tepkisi arasında pozitif yönde korelasyon sağlandığı gözlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise aynı konsantrasyona sahip enzim çözeltileri altın sensörler üzerine A4 kağıt konularak kağıtların üzerine immobilize edilmiş ve yine oda sıcaklığında kurutulmuştur. Sensörlerin analizi sonucu elde edilen sensogramlar Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'deki gibidir. Sensogramlar incelendiğinde A4 kağıt sensörlerde de enzim konsantrasyonu ile sensör tepkisi arasında yine pozitif yönlü ilişki olduğu görülmüştür.

Altın sensörle yapılan çalışmalar, literatürde üre tayini için prizma temelli SPR biyosensör sistemi kullanımına rastlanmadığı için uygulanmıştır. Kağıt sensörle yapılan çalışmalar ise üretimi ve temini maliyetli altın sensörlerin kullanım ömrünü uzatmak ve analiz aşamasında kolaylık sağlamak (çip arındırma, indis eşitleme yağı ekleme vs.) için çalışılmıştır. Çalışılan üre konsantrasyon aralığında (10, 20, 40, 80 ve 160 mM) A4 kağıt sensörlerin gösterdikleri tepkilerin altın sensörlerin gösterdikleri tepkilere yakın oldukları gözlenmiştir.

Elde edilen sensogramlarla gerçekleştirilen kinetik analizlerde altın filmler ve A4 kağıt sensörler için hesaplanan birleşme denge sabiti (K_A) ve ayrılma denge sabiti (K_D) Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi neredeyse eşit olarak hesaplanmıştır. Bu durum A4 kağıt sensörlerin altın sensörlere iyi bir alternatif oluşturduğu anlamına gelmektedir.

Sensör yüzeyindeki değişiklikleri inceleyebilmek için SPR sistemindeki her aşama sonrası sensörler Raman ve UV-vis ile analiz edilmiştir. Analizlerde altın sensörler her aşama ile ilgili fikir sunsa da kağıt sensörler kısmen anlamlı sonuçlar vermiştir. Bu durumun yapısında bol miktarda üre ve türevlerini bulunduran kağıdın

sıvı ile teması sonucu her aşamada yapısının değişmesinden kaynaklandığı düşünölmektedir.

Yapılan tez çalışmasına göre sensör hassasiyetini geliştirmek için sensörün sadece bir kez kullanılması için uygulanan işlemlerin (sensör yüzeyini yeniden kaplamak, sensör yüzeyinde geri dönüşümü olmayan biyolojik ya da kimyasal malzemeler kullanmak vs.), üretimi zahmetli altın sensörler üzerine yapılması yerine sensör özelliklerinin daha az maliyetle geliştirilmesi için kağıt tabakalar kullanılmasının uygun olacağı düşünölmektedir.



KAYNAKLAR

- Bianchi N., Rutigliano C., Tomassetti M., Feriotto G., Zorzato F., Gambari R., 1997. Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction. **Clinical and Diagnostic Virology**, 8, 199-208.
- Chen W.Y., Hu W.P., Su Y.D., Taylor A., Jiang S., Chang G.L., 2007. A multispot DNA chip fabricated with mixed ssDNA/oligo (ethylene glycol) self-assembled monolayers for detecting the effect of secondary structures on hybridization by SPR imaging. **Sensors and Actuators B**, 125, 607-614.
- Davis T.M., Wilson W.D., 2000. Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data. **Anal. Biochem.**, 284, 348-353.
- Davis T. M., Wilson W. D., 2001. Surface plasmon resonance biosensor analysis of RNA-small molecule interactions. **Methods Enzymol.**, 340, 22-51.
- Du, W., Zhao, F., 2014. Surface plasmon resonance based silicon carbide optical waveguide sensor. **Materials Letters**, 115, 92-95.
- Dutra R.F., Mendes R. K., Silva V. L., Kubota L. T., 2007. Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 43, 1744-1750.
- Erturk, G., Uzun, L., Tumer, M. A, Say, R., Denizli, A., 2011. Fab fragments imprinted SPR biosensor for real-time human immunoglobulin G Detection. **Biosensors and Bioelectronics**, 28, 97- 104.
- Enrico, D.L., Manera, M.G., Montagna, G., Cimaglia, F., Chiesa, M., Poltronieri, P., Santino, A., Rella, R., 2013. SPR based immunosensor for detection of Legionella pneumophila in water samples. **Optics Communications**, 294, 420-426.
- Eum, N.S., Kim, D.E., Yeom, S.H., Kang, B.H, Kim, K.J., Park, C.S., Kang, S.W., 2009. Variable wavelength surface plasmon resonance (SPR) in biosensing. **BioSystems**, 98, 51-55.
- Homola J., 2008. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. **Chem. Rev.**, 108, 462-493.
- Hu, W.P., Chen, S.J., Huang, K.T., Hsu, J.H., Chen, W.Y., Chang, G.L., Lai, K.A., 2004. A novel ultrahigh-resolution surface plasmon resonance biosensor with an Au nanocluster-embedded dielectric film. **Biosensors and Bioelectronics**, 19, 1465-1471.
- Karacan, M., 2008. Aletli (Enstrümental) Analiz, w3.gazi.edu.tr/~mkaracan.
- Kawazumi H., Gobi K. V., Ogino K., Maeda H., Miura N., 2005. Compact surface plasmon resonance (SPR) immunosensor using multichannel for simultaneous detection of small molecule compounds. **Sensors and Actuators**, 108, 791-796.
- Li R., Feng F., Chen Z.Z., Bai Y.F., Guo F.F., Wu F.Y., Zhou G., 2015. Sensitive detection of carcinoembryonic antigen using surface plasmon resonance biosensor with gold nanoparticles signal amplification. **Talanta**, 140, 143-149.
- Li Y., 2006. **CIGR Handbook of Agricultural Engineering: Information technology**, Belçika.
- Lokman, N.F., Bakar, A.A.A., Suja, F., Abdullah, H., Rahman, W.B.W.A., Huang, N.M., Yaaco, M.H., 2014. Highly sensitive SPR response of

- Au/chitosan/graphene oxide nanostructured thin films toward Pb (II) ions. **Sensors and Actuators B**, 195, 459-466.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Whitesides, G. M., 2010. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices. **Analytical Chemistry**, 82, 1-3.
- May L. M., Russell D. A., 2003. Novel determination of cadmium ions using an enzyme self-assembled monolayer with surface plasmon Resonance. **Analytica Chimica Acta**, 500, 119–125.
- Nagata, K., Handa, H., 2000. **Real-Time Analysis of Biomelecular Interactions**
- Reardon, H., Hanlon, J. M., Grant, M., Fullbrook, I., Gregory D. H., 2012. Ammonia Uptake and Release in the MnX_2-NH_3 ($X = Cl, Br$) Systems and Structure of the $Mn(NH_3)_nX_2$ ($n = 6, 2$) Ammines. **Crystals**, 2, 193-212
- Robelek, R., Wegener, J., 2010. Label-free and time-resolved measurements of cell volume changes by surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, 25, 1221–1224.
- Shankaran, D. R., Gobi, K. V., Miura, N., 2007. Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest. **Sensors and Actuators B**, 121, 158–177 .
- Sipova, H., Homola, J., 2013. Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review. **Analytica Chimica Acta**, 773, 9–23.
- Then W. L., Aguilar M. I., Garnier G., 2015. Quantitative blood group typing using surface plasmon Resonance. **Biosensors and Bioelectronics**, 73, 79–84.
- Uzun, L., Say, R., Ünal, S., Denizli, A., 2009. Hepatitis B surface antibody purification with hepatitis B surface antibody imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-l-tyrosine methyl ester) particles. **Journal of Chromatography B**, 877, 181–188.
- Vaisocherová, H., Faca, V.M., Taylor, A.D., Hanash, S., Jiang, S., 2009. Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels in cancer and control human sera. **Biosensors and Bioelectronics**, 24, 2143–2148.
- Wang, Z., Liu, W., Wang, C., Kan, Q., Chen, S., Chen, H., 2013. Surface plasmon resonance enhanced ellipsometric analysis for monitoring of cobalt electrochemical reaction in solution. **Sensors and Actuators B**, 181, 221– 226.
- Yu, H., Kim, K., Ma, K., Lee, W., Choi, J.W., Yun, C.O., Kim, D., 2013. Enhanced detection of virus particles by nanoisland-based localized surface plasmon Resonance. **Biosensors and Bioelectronics**, 41, 249–255.
- Zhang, H. , Yang, L. , Zhou, B. , Wang, X. , Liu, G. , Liu, W., Wang, P., 2014. Investigation of biological cell–protein interactions using SPR sensor through laser scanning confocal imaging–surface plasmon resonance system. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 121, 381–386.
- Zhang, J., Sun, Y., Zhang, H., Xu, B., Zhang, H., Song, D., 2013. Preparation and application of triangular silver nanoplates/chitosan composite in surface plasmon resonance biosensing. **Analytica Chimica Acta**, 769, 114– 120.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1988 yılında Antakya/Hatay'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini aynı şehirde tamamladı. 2006 yılında Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümünü kazandı. 2011 yılında üniversiteden mezun oldu ve aynı yıl pedagojik eğitimini tamamladı. 2013 yılı güz döneminde Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Yazar halen Mustafa Kemal Üniversitesinde Yüksek Lisans öğrenimine devam etmektedir.

