

**MİKROALBÜMİN TAYİNİ İÇİN SPR TEMELLİ
NANOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF SPR BASED NANOSENSORS FOR
MICROALBUMIN ASSAY**

MELTEM KOCA ESENTÜRK

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

MELTEM KOCA ESENTÜRK'ün hazırladığı "**Mikroalbümin Tayini için SPR Temelli Nanosensörlerin Hazırlanması**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ
(Danışman)



Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ
Üye



Prof. Dr. Serap ŞENEL
Üye



Doç. Dr. Nilay BERELİ
Üye



Yrd. Doç. Dr. Fatma YILMAZ
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☒ Tezimin/Raporumun 2020 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

27/02/2017


(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Meltem Koca Esentürk

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

27 / 01 / 2017

Meltem KOCA ESENTÜRK

ÖZET

MİKROALBÜMİN TAYİNİ İÇİN SPR TEMELLİ NANOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

Meltem KOCA ESENTÜRK

Yükseklisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Ocak 2017, 137 sayfa

İnsan Serum albümini (HSA) kanda en çok bulunan proteindir. Böbreklerde oluşan hasarlar, glomerüllerdeki gözeneklerin genişlemesine ve fazla miktarda plazma proteinin idrara sızmasına neden olmaktadır. İdrara sızan HSA'nın belli bir miktarı (spot idrarda 0-20 mg/L) mikroalbümin olarak tanımlanmaktadır. Mikroalbümin miktarının artması önemli bazı hastalıkların habercisi olduğundan erken tayini oldukça önemlidir.

Biyolojik cevabı elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlara “Biyosensör” denir. Biyosensörler bünyesinde biyolojik tanıma elemanı bulunduran ve fizikokimyasal dönüştürücü içeren analitik cihazlardır. Biyosensör alanındaki büyük gelişmelerle birlikte moleküler baskılanmış polimerler (MIP) dönüştürücülerle birleştirilmiş ve tayin edilecek analitle MIP arasındaki etkileşim işlenilebilir bir sinyale dönüştürülmüştür. Bu anlamda yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli optik cihazlar büyük bir potansiyele sahiptirler.

Bu çalışmada, idrarda mikroalbümin tayinine yönelik moleküler baskılama tekniği kullanarak, SPR temelli nanosensör hazırlanması amaçlanmıştır. İlk aşamada HSA ile etkileşerek boşluklar oluşturabilecek fonksiyonel N-Metakriloil-(L)-Lösin Metil Ester (MALM) monomeri, L-Lösin metil esterin metakroil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir. Optimum kalıp molekül HSA ve MALM monomeri oranı,

HSA'nin farklı oranlarda MALM monomeri ile etkileştirilmesiyle UV-görünür bölge spektrofotometre cihazıyla tespit edildi ve optimize edilen bu orana göre nanosensör hazırlama çalışmaları gerçekleştirildi. Nanosensör hazırlama çalışmaları sırasıyla Mikro-temas yöntemi ile HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensörlerin hazırlanması ve HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin sentezlenmesiyle iki farklı şekilde gerçekleştirildi.

Belirlenen amaç doğrultusunda mikro-temas yöntemiyle alil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR sensör yüzeyinde, HSA baskılanmış poli(N-Metakriloil-(L)-Lösin Metil Ester-insan serum albümin) [PEDMALM-HSA] (MIP) nanofilim sentezlenmiştir. Belirli oranlarda hazırlanan MALM monomeri, çapraz bağlayıcı etilen dimetakrilat (EDMA) ve başlatıcı 2,2'-azobis(izobütironitril) (AIBN)'den oluşan karışımından 20 µl alınarak damlatılan SPR sensör çip yüzeyine, lam üzerinde hazırlanan kalıp protein HSA baskılanmıştır. Bu preparatın UV ışık altında 4 saat bekletilmesiyle hedef protein HSA'ya ait özel boşluklar oluşturulmuştur. Kontrol deneyleri için hedef protein HSA eklemeyen aynı koşullarda baskılanmamış nanofilim hazırlanmıştır.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanofilimler ile hazırlanan SPR nanosensörlerin karakterizasyon çalışmaları FTIR-ATR, Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), Temas açısı (CA) ve Elipsometre ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. AFM ölçümlerinden elde edilen pürüzlülük değerleri HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanofilimler için sırasıyla 3,64 ve 2,47 nm olarak bulunmuştur. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanofilimlerin pürüzlülük değerleri arasındaki farklılık HSA moleküllerinin başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanofilimlerin film kalınlığı elipsometri ile ölçülmüş ve sırasıyla $89,9 \pm 6,3$ ve $95,0 \pm 4,9$ olarak bulunmuştur. Islanabilirlik çalışmaları temas açısı ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmemiş altın yüzey için ($80^\circ \pm 0,73$), HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanofilim yüzey için ($55,2^\circ \pm 2,24$) ve HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanofilim yüzey için ($61,5^\circ \pm 4,63$) elde edilen artan temas açısı değerleri baskılama işleminin hidrofilikliğini arttırdığını göstermektedir.

Hedeflenen derişim aralığına inmek amacıyla çalışmanın ikinci kısmında HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküller iki fazlı miniemülsiyon polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Faz I; PVA (95 mg), SDS (15 mg) ve NaHCO₃'ın (12 mg) 5,0 mL deiyonize su içinde özölmesiyle hazırlanmıştır. Faz II; PVA (50 mg) ve SDS'in (50 mg) 100 mL deiyonize suda özölmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan MALM:HSA ön-kompleksi (0.15:0,015 mmol), çapraz bağlayıcı monomer EDMA ile (4,8 mmol) karıştırılarak yağ fazı elde edilmiştir. Yağ fazı faz I'e yavaşça eklenmiştir. Karışım, 25.000 rpm de homojenizatörde homojenize edildikten sonra Faz II ile karıştırılmıştır. Sodyum bisülfid (50 mg) ve amonyum persülfat (100 mg) başlatıcısının eklenmesinden sonra polimerizasyon işlemi 40°C de 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Kontrol deneyleri için HSA baskılanmadan hazırlanan nanopartiküller aynı koşullarda sentezlenmiştir.

Sentezlenen nanopartiküller, zeta boyut analizi ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin ortalama boyut dağılımı zeta boyut analizörü ile ölçölerek sırasıyla 63 ve 55 nm şeklinde bulunmuştur. Baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküller için düşük polidispersite indeks değerleri (PDI:0,138; PDI:0,113) nanopartiküllerin ortalama boyut dağılımının homojen olduğunu göstermektedir. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerin büyüklüğu ise taramalı elektron mikroskobu ile ölçölmüş ve ortalama boyutları 60-65 nm aralığında bulunmuştur.

Etil alkol ile temizlenerek vakumlu etüvde kurutulan altın ip yüzeyine sentezlenen HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin 100 kat seyreltilmiş çözeltisinden 5 µl damlatılarak UV işık altında 2 saat bekletilmesiyle nanopartiküllerin ip yüzeyine tutturulması sağlanmıştır.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin tutturulmasıyla hazırlanan SPR nanosensörler FTIR-ATR, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), temas açısı (CA) elipsometre ölçömleri ile karakterize edilmiştir. AFM ölçömlerinden elde edilen pürüzlölük değerleri HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküller için sırasıyla 1,61 ve 1,28 nm olarak bulunmuştur. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin pürüzlölük değerleri arasındaki farklılık HSA moleküllerinin başarılı bir şekilde baskılandığını

göstermektedir. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin film kalınlığı elipsometri ile ölçülmüş ve sırasıyla $118,4 \pm 0,3$ ve $116,7 \pm 0,3$ nm olarak bulunmuştur. Islanabilirlik çalışmaları temas açısı ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmemiş altın yüzey için ($80^\circ \pm 0,73$), HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanofilm yüzey için ($67,3^\circ \pm 2,24$) ve HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanofilm yüzey için ($84,5^\circ \pm 4,63$) elde edilen artan temas açısı değerleri baskılama işleminin hidrofilikliğini arttırdığını göstermektedir.

HSA tayini için mikro-temas yönteminde 1,5-300 nM derişim aralığında çalışılırken, nanopartiküller ile HSA tayininde 0,15-500 nM gibi daha geniş derişim aralığında 50 mM pH 7,4 fosfat tamponunda hazırlanan HSA çözeltileri ile çalışılmıştır. Desorpsiyon ajanı olarak 0,05 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Farklı derişimlerde yapay plazma ve yapay idrar örneklerin de HSA analizleri fosfat tamponu ortamında (pH 7,4) gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) sensörlerin seçiciliğini göstermek için yarışmacı ajan olarak seçilen farklı proteinler ile (hemoglobin-transferrin) çalışmalar yapılmıştır. Mikro-temas yöntemiyle hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün tespit edilen seçicilik faktörünün, nanopartikül tutturularak hazırlanan [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün seçicilik faktöründen büyük olduğu tespit edilmiş ve Hb ve HTR için değerleri sırasıyla $k' = 5,02$, $k' = 4,25$ olarak hesaplanmıştır. Mikro-temas ve nanopartiküllerle hazırlanan nanosensörlerin tayin limitleri (LOD) sırasıyla 8,8 ve 0,7 pM olarak hesaplanmıştır. Mikro-temas ve nanopartiküllerle hazırlanan nanosensörlerin tekrar kullanılabilirlik çalışmaları sırasıyla 300 ve 500 nM çözeltiler için arka arkaya 5 kez yapılarak reflektans değerleri ölçülmüştür. Kararlılık çalışması için aynı nanosensör çip 3 aylık periyotlarla 3 kez 4 tekrarlı HSA analizi için kullanılmış ve SPR nanosensörlerin kararlılığı gösterilmiştir.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanofilm tutturulmuş SPR nanosensör ile HSA arasındaki etkileşimlerin kinetik ve adsorpsiyon modelini belirlemek amacıyla dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Scatchard Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri. Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinin bu afinite sistemine en uygun model olduğu görülmüş ve sonuçlar HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensördeki HSA'ye afinite gösteren

bağlanma bölgelerinin homojen olarak dağıldığını ve tek tabakalı yapı oluşturduğunu göstermektedir.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartikül tutturulmuş SPR nanosensör ile HSA arasındaki etkileşimlerin kinetik ve adsorpsiyon modelini belirlemek amacıyla dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Scatchard, Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri. SPR sensörün düşük derişimlerde Langmuir adsorpsiyon izoterm modeline, yüksek derişimler de ise Freundlich adsorpsiyon izoterm modeline uygun olduğu görülmüştür. Sonuçlar HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensördeki HSA'e afinite gösteren bağlanma bölgelerinin homojen olarak dağıldığını ve düşük derişimler için tek tabakalı yapı oluşturduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak 0-20 mg/L (0-303 nM) aralığındaki HSA derişimi mikroalbümin işaretçisi olarak kabul edilmektedir. Mikro-temas yöntemiyle hazırlanan nanosensörün HSA tayininde nanopartiküllerle hazırlanan nanosensöre göre daha seçici olduğu tespit edildi. Mikro-temas yöntemiyle hazırlanan nanosensör 1,5-300 nM konsantrasyon aralığındaki HSA tayininde başarılı bir şekilde kullanılabilmesine rağmen 0-300 nM konsantrasyon aralığındaki HSA'yı tam olarak tayin edemediği için daha düşük tayin limitlerine inilmesine gerek duyulmuştur. Böylece nanopartiküler kullanılarak hazırlanan nanosensör ile daha düşük tayin limitine inilmiştir. Mikro-temas yöntemiyle hazırlanan nanosensör HSA tayinini, seçici, duyarlı, herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan, diğer yöntemlere göre, düşük maliyet, hızlı ve gerçek zamanlı yapabilmektedir ve nanopartiküllerde düşük HSA derişimlerinin tayininde kullanılabilir. Bu çalışmanın HSA tayinine yönelik, mikro-temas yöntemiyle nanofilm tutturularak hazırlanan nanosensörün ve nanopartikül tutturularak hazırlanan nanosensörün avantajlarının karşılaştırılması bakımından, literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Yüzey plazmon rezonans (SPR), moleküler baskılanmış polimer (MIP), mikro-temas, nanopartikül, mikroalbümin

ABSTRACT

PREPARATION OF SPR BASED NANOSENSORS FOR MICROALBUMIN ASSAY

Meltem KOCA ESENTÜRK

Master of Biochemistry, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

January 2017, 137 pages

Human serum albumin (HSA) is the most abundant protein in the blood. Enlargement of the pores in the glomeruli and remarkable amount of plasma proteins' leakage into urine is caused by the kidney damages. A certain amount of leaked HSA (in spot urine 0-20 mg/L) is defined as microalbumin. Since the increase in the amount of microalbumin is a sign of some important diseases, early identification is very important for the diagnosis.

Devices which convert biological response to electrical signals are defined as "Biosensors". Biosensors are analytical devices that contain biological recognition elements and physicochemical transducers in their bodies. Molecular imprinted polymers was unified with the transducers through major developments in the field of biosensors and interactions between analyte and MIP can be converted into a processable signals. In this sense, surface plasmon resonance (SPR) based optical devices have a great potential.

In this study, it was aimed to prepare SPR based nanosensor using molecular imprinting technique for microalbumin detection in urine. In the first step, N-Methacryloyl-(L)-Leucine Methyl Ester (MALM) monomer having capability of interaction with HSA to create cavities was synthesized by reacting of L-Leucine methyl ester with methacryloyl Chloride. To define optimum ratio between template HSA molecule and MALM monomer, HSA was mixed with different ratios of MALM

monomer and optimum ratio was determined by using UV-visible spectrophotometer instrument.

Nanosensor preparation studies were realized according to the optimized ratio conditions. Nanosensors are prepared in two ways by micro-contact method with HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) and non imprinted [PEDMALM] (NIP) nanosensor preparation and by attaching HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) and non imprinted [PEDMALM] (NIP) nanoparticles to the chip gold surface respectively.

For this specified purpose, HSA imprinted poly(N-Methacryloyl-(L)-Leucine Methyl Ester-Human Serum Albumin) [PEDMALM-HSA] (MIP) nanofilm was synthesized onto the allyl mercaptan modified gold chip surface by micro-contact method. Mixture prepared from specific proportions of MALM monomer, crosslinker ethylene dimethacrylate (EDMA) and initiator 2,2'-azobis (isobutyronitrile) (AIBN) was poured (20 μ L) onto the SPR gold sensor surface and after then HSA immobilized glass slides was inserted onto the poured mixture by pressing to form stamped structure. Special cavities for the target HSA protein was formed when the mixture put under the UV light for 4 hours. For control experiments non-imprinted nanofilm preparation was performed in the same conditions without adding target HSA protein.

SPR biosensors prepared by HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) and non imprinted [PEDMALM-HSA] (NIP) nanofilms were characterized by FTIR-ATR, Atomic force microscope (AFM), Contact angle (CA), Ellipsometer measurements. Surface roughness measurements were obtained by Atomic force microscopy (AFM) method and images showed that roughness of HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) and non imprinted [PEDMALM] (NIP) nanofilms was estimated as 3.64 and 2.47 nm respectively. Roughness difference between HSA imprinted [PEDMALM-HSA] and non imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) nanofilms show that imprinting process of HSA molecules was performed successfully. Film thickness of HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) and non imprinted [PEDMALM] (NIP) nanofilms was estimated by ellipsometry measurements and recorded as 95 ± 4.9 and 89.9 ± 4.9 nm for imprinted and non imprinted nanofilms respectively. Wettability studies was performed by contact angle measurements. Increasing contact angle values for unmodified gold chip surface ($80^\circ\pm0.73$), HSA imprinted

[PEDMALM-HSA] (MIP) ($55.2^{\circ} \pm 2.24$) and HSA non imprinted [PEDMALM] (NIP) ($61.5 \pm 4.63^{\circ}$) nanofilms show that imprinting process enabled hydrophilicity increment.

In the second part of the study to work in a a targeted concentration range [PEDMALM-HSA] (MIP) nanoparticles were synthesized by a two-phase mini-emulsion polymerization method. The first aqueous phase PHASE I was prepared by dissolving of PVA (95 mg), SDS (15 mg) and NaHCO_3 (12 mg) in 5.0 mL deionized water. The second phase PHASE II was prepared by dissolving of PVA (50 mg) and SDS (50 mg) in 100 mL of deionized water. Prepared MALM:HSA pre-complex (0.15; 0.015 mmol) was dissolved in a crosslinker, ethylene glycol dimethacrylate (EDMA; 4.8 mmol) to form oil phase. The oil phase was slowly added to the first aqueous phase. In order to obtain mini-emulsion, the mixture was homogenized at 25 000 rpm by a homogenizer. After homogenization, mixture was added to the PHASE II. Then, initiators, sodium bisulfite (125 mg) and ammonium persulfate (125 mg), were added into the solution. Polymerization was continued for 24 h at 40°C . Besides this, for control experiment, the non-imprinted [PEDMALM] (NIP) nanoparticles were synthesized by applying same procedure with imprinted nanoparticles except addition of template HSA molecules.

Size distrubution of the prepared nanoparticles was characterized by zeta size and scanning electron microscopy measurements. Averaged size distrubution value of the HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) and nonimprinted [PEDMALM] (NIP) nanoparticles was estimated as 63 and 55 nm respectively. Because of low polydispersity index values for imprinted and nonimprinted nanoparticles (PDI:0.138; PDI:0.113) homogeneous average nanoparticle size distrubition was attained. Average size of HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) nanoparticles was determined as 60-65 nm by Scanning electron microscopy measurements.

Target protein HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) and non imprinted [PEDMALM] (NIP) nanoparticles were attached to the chip surface by dropping 5 μL of the prepared particles diluted 100 times with distilled water onto the chip surface which was already cleaned with ethyl alcohol and dried in a vacuum oven and put under the UV light for 2 hours.

Prepared HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) and non imprinted [PEDMALM] (NIP) nanoparticles attached SPR nanosensors were characterized by FTIR-ATR, atomic force microscope (AFM) method, contact angle (CA), ellipsometer measurements. Surface roughness measurements were obtained by Atomic force microscopy (AFM) and images showed that roughness values of HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) and non imprinted [PEDMALM] (NIP) nanoparticles were estimated as 1.61 and 1.28 nm respectively. Roughness difference between HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) and non imprinted [PEDMALM] (NIP) nanoparticles attached nanoparticles show that imprinting process of HSA molecules was performed successfully. Thickness of HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) and non imprinted [PEDMALM] (NIP) nanoparticles attached biosensor chips was estimated by ellipsometry measurements and recorded as 118.4 ± 0.3 and 116 ± 0.3 nm for imprinted and non imprinted nanofilms respectively. Wettability studies was performed by contact angle measurements. Increasing contact angle values for unmodified gold chip surface ($80^\circ \pm 0.73$), HSA imprinted [PEDMALM-HSA] (MIP) ($67.3^\circ \pm 2.24$) and HSA non imprinted [PEDMALM] (NIP) ($84.5^\circ \pm 4.63$) biosensors show that imprinting process enabled hydrophilicity increment.

Detection of HSA by micro-contact method was performed in the 1,5-300 nM concentration range and by nanoparticles in the 0,15-500 nM concentration range for HSA solutions prepared with 50 mM pH= 7.4 phosphate buffer solution. Desorption studies were carried out by using 0.05 M NaCl solution. Adsorption analyses for the HSA spiked artificial urine and plasma samples which was prepared in pH=7.4 phosphate buffer were examined. Selectivity studies of [PEDMALM-HSA] (MIP) and [PEDMALM] (NIP) SPR biosensors for HSA determination were investigated by using different protein samples such as hemoglobine and transferrine. Higher selectivity factor was estimated for the [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensor which was prepared by micro-contact method than nanoparticles attached [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensor as $k'=5.02$, $k'=4.25$ for Hb and HTR respectively. Limit of detection value for the nanoparticles was estimated lower (LOD: 0.7 pM) than the nanofilms prepared by micro-contact method (LOD: 8.8 pM). As a result nanoparticles attached biosensors more sensitive than the nanofilm attached ones. Repeatability experiments of

[PEDMALM-HSA] nanosensor prepared by microcontact method and nanoparticles attached nanosensor was performed five times (5 times) by using HSA solutions (300 nM and 500 nM respectively) and reflectance values were measured. Stability studies were performed for the 3 times in the three months periods with four repeatability.

To determine the kinetic and adsorption models of interactions between [PEDMALM-HSA] (MIP) nanofilm attached SPR nanosensor and HSA solution, four different adsorption models named Scatchard, Langmuir, Freundlich and Langmuir-Freundlich (LF) were employed. Langmuir adsorption model was found most applicable model for this affinity system and results showed that affinity regions on the surface of [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensor for the HSA template were homogeneously distributed and have monolayer structure.

To determine the kinetic and adsorption models of interactions between [PEDMALM-HSA] (MIP) nanoparticles attached SPR nanosensor and HSA solution, four different adsorption models named Scatchard, Langmuir, Freundlich and Langmuir-Freundlich (LF) were employed. Langmuir adsorption model was found most applicable model for the low concentrations of HSA while Freundlich adsorption model fits for the high HSA concentrations in this affinity system and results showed that affinity regions on the surface of [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensor for the HSA template were homogeneously distributed and have monolayer structure for the low concentrations.

As a result, albumin level are used as a Biomarker for the 0-20 mg/L (0-300 nM) concentration range. Nanosensor prepared by the micro-contact method was estimated more selective for the HSA determination than the nanosensor prepared by the nanoparticle attached method. Although the nanosensor prepared by the micro-contact method can be used successfully for the estimation of HSA in the 1.5-300 nM concentration level, it can not detect precisely 0-300 nM HSA concentration level. So it has been required to use nanoparticles to detect HSA with lower concentration limits.

Selective and sensitive nanosensor prepared by micro-contact method can be used for HSA detection by real time measurement, no need labeling, low cost and ease of miniaturization when compared with the other methods and nanoparticles

can be used for the detection of lower HSA concentrations. This study will contribute to the literature by comparing the advantages of the nanofilm attached nanosensor prepared by micro-contact method and nanoparticles attached nanosensor.

Keywords: Surface plasmon resonance (SPR), molecular imprinted polymer (MIP), micro-contact, nanoparticle, microalbumin



☺ TEŞEKKÜRLER ☺

İki buçuk yıl boyunca hazırladığım ve Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada;

Bilgi ve deneyimlerini aktaran, yol gösteren çok sevdiğim ve örnek aldığım çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Güler yüzüyle sorduğum her soruda bana yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Handan YAVUZ'a çok teşekkür ederim.

Sabrına hayran olduğum ve çekinmeden sorularımı sorabildiğim, desteğini esirgemeyen değerli hocam, Yrd. Doç. Dr. Fatma YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımın aşamalarında bana yardımcı olan öncelikle Semra AKGÖNÜLLÜ'ye ve Nilay BERELİ, Deniz TÜRKMEN, Kemal ÇETİN, Erdoğan ÖZGÜR, Monireh BAKHSHPOUR, Ali DERAZSHAMSHİR, Fatma KARTAL, Canan ARMUTÇU, Ilgım GÖKTÜRK, Duygu SARI, Yeşeren SAYLAN ve Biyokimya laboratuvarında birlikte çalıştığım diğer tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Sevgili arkadaşım Aynur YILMAZ'a her türlü yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tanıdığım günden bugüne her zaman yanımda olup sınırsız yüreğiyle yüzümü gülümseten ve bu yolda en zor engelleri aşmamdaki en büyük destekçim olan değerli eşim Oğuz Kaan ESENTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Bütün hayatım boyunca iyi ve kötü günlerimde hep yanımda olup bugünlere gelmemde büyük emekleri olan bana hep inanan annem Berrin İNCE'ye ve babam Kemal KOCA'ya, ablalarım Özden KOCA CRİVELLA ve Özlem GÜÇLÜ'ye çok teşekkür ederim...

Meltem KOCA ESENTÜRK

2017

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	xi
İÇİNDEKİLER	xii
ŞEKİLLER	xvii
ÇİZELGELER	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Albümin ve Mikroalbümin Nedir?	7
2.1.1. Albümininin Moleküler Yapısı	8
2.1.2. İdrarda Mikroalbümin Ölçümü	9
2.2. Biyosensörler	10
2.2.1. Optik Çeviriciler	12
2.2.2. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)	13
2.2.2.1. Yüzey Plazmonlarının Oluşumu	14
2.2.2.2. SPR Sistemlerinin Yapısı	15
2.2.2.3. Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi	17
2.2.2.4. SPR Nanosensörler	21
2.3. Moleküler Baskılama	22
2.3.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi	23
2.3.1.1. Kalıp (Hedef) Molekül	25
2.3.1.2. Fonksiyonel Monomerler	26
2.3.1.3. Çapraz Bağlayıcılar	26
2.3.1.4. Çözücü	26
2.3.1.5. Başlatıcılar	27
2.3.1.6. Sıcaklık	27
2.3.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri	27
2.3.2.1. Kovalent Baskılama	27
2.3.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama	28
2.3.3. Protein Baskılama	28

2.3.3.1. Protein Baskılamada Kullanılan Yaklaşımlar	29
2.3.3.1.1. Yüzey baskılama	29
2.3.4. Nanopartiküller	30
3. DENEYSEL YÖNTEMLER	31
3.1. Kimyasal Maddeler	31
3.2. MALM monomerinin Sentezi	31
3.2.1. MALM monomerinin Karakterizasyonu	31
3.2.1.1. FTIR-ATR Analizi	31
3.2.1.2. NMR Analizi	32
3.3. Mikro-temas Yöntemiyle HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) SPR Nanosensörlerin Hazırlanması	32
3.3.1. Cam Slaytların Yüzey Modifikasyonu ve Protein Kalıbının Hazırlanması	32
3.3.2. Cam slaytların Karakterizasyon Çalışmaları	33
3.3.2.1. Temas Açısı Analizi	33
3.3.3. SPR Altın Çip Yüzeylerinin Modifikasyonu	34
3.3.4. SPR Altın Çip Yüzeyinde HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Filmlerin Sentezi	34
3.3.5. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) SPR Nanosensörlerin Yüzey Karakterizasyonu	36
3.3.5.1. FTIR-ATR Analizi	36
3.3.5.2. Temas Açısı Analizi	36
3.3.5.3. AFM Analizi	36
3.3.5.4. Elipsometre Analizi	36
3.3.6. SPR Sisteminin Analiz İçin Hazırlanması	37
3.3.6.1. Yüzey Plazman Rezonans Sistemi ile Sensorgram Alınması	38
3.3.7. Yüzey Plazman Rezonans Sistemi ile Kinetik Analizler	38
3.3.8. Yarışmalı Kinetik Analizler	38
3.3.9. Seçicilik Çalışmaları	39
3.3.10. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Çalışmaları	39
3.3.11. Tekrar Kullanılabilirlik ve Kararlılık Çalışmaları	39
3.4. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle SPR Nanosensörlerin Hazırlanması	40
3.4.1. Nanopartiküllerin Sentezi	40

3.4.2. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	41
3.4.2.1. Zeta Boyut Analizi	41
3.4.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	41
3.4.3. Yüzey Plazmon Rezonans Sensör Yüzeyine HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] Nanopartiküllerin Tutturulması	41
3.4.4. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle Hazırlanan SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonu	42
3.4.4.1. FTIR-ATR Analizi	42
3.4.4.2. Temas Açısı Analizi	42
3.4.4.3. AFM Analizi	43
3.4.4.4. Elipsometre	43
3.4.5. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Kinetik Analizler	43
3.4.6. Yarışmalı Kinetik Analizler	44
3.4.7. Seçicilik Çalışmaları	44
3.4.8. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Çalışmaları	44
3.4.9. Tekrar Kullanılabilirlik ve Kararlılık Çalışmaları	44
4.BULGULAR VE TARTIŞMA.....	46
4.1. MALM Monomerinin Sentezi	46
4.1.1. MALM Monomerinin Karakterizasyonu.....	46
4.1.1.1. FTIR-ATR Analizi	46
4.1.1.2. MALM Monometrinin NMR Analizi	47
4.2. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) Nanosensörün Hazırlanması için MALM-HSA Ön-Kompleks Oranının Optimize Edilmesi.....	47
4.3. Mikro-temas Yöntemi ile [PEDMALM-HSA] (MIP) ve [PEDMALM] SPR Nanosensörlerin Hazırlanması.....	48
4.3.1. Cam Slayt Modifikasyonunun Karakterizasyonu	48
4.3.1.1. Temas Açısı Analizi	49
4.3.2. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonu.....	51
4.3.2.1. FTIR-ATR Analizi	51
4.3.2.2. Temas Açısı Analizi	52

4.3.2.3. AFM	53
4.3.2.4. Elipsometre	54
4.3.3. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve HSA Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) SPR Nanosensörler ile Kinetik Analizler	56
4.3.3.1. Kinetik Analizler	58
4.4.3.1.1. Denge Analizi	58
4.4.3.1.2. Bağlanma Kinetik Analizi	59
4.4.3.1.3. Dengi Analizi (Scathard).....	60
4.3.4. Denge İzoterm Modelleri	61
4.3.5. Yarışmalı Kinetik Analizler	63
4.3.6. Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi	65
4.3.7. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Çalışmaları.....	67
4.3.8. [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR Nanosensörün Tekrar Kullanılabilirliği ve Kararlılığı	69
4.4. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle Hazırlanan Nanosensörler	71
4.4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	71
4.4.1.1. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Boyut Analizi	71
4.4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi	72
4.4.2. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle Hazırlanan SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonu	73
4.4.2.1. Temas Açısı	73
4.4.2.2. AFM	74
4.4.2.3. Elipsometre Analizi	76
4.4.3. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR Nanosensör ile Kinetik Çalışmalar	78
4.4.4. Kinetik Analizler	80
4.4.5. Denge İzoterm Modelleri	82
4.4.6. Yarışmalı Kinetik Analizler	83
4.4.7. Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi.....	84
4.4.8. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Çalışmaları.....	85

4.4.9. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR Nanosensörün Tekrar Kullanılabilirliği ve Kararlılığı	87
5. SONUÇ VE YORUM	89
5.1. Mikro-temas Yöntemiyle HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) SPR Nanosensörlerin Hazırlanması	89
5.2. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle Hazırlanan SPR Nanosensörler ...	93
5.3. İki Yöntemin Karşılaştırılması	96
KAYNAKLAR	98
EKLER	108
EK 1. ORJİNALLİK RAPORU	108
ÖZGEÇMİŞ	109

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Albüminin altı bağlanma bölgesinin gösterimi	8
Şekil 2.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması	11
Şekil 2.3. Optik çeviricilerin kullandığı optik tayin	12
Şekil 2.4. Polarize olmayan ve düzlemsel polarize ışık	13
Şekil 2.5. Tipik bir SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi	15
Şekil 2.6. Dielektrik sınırlarda gerçekleşen toplam iç kırınım	17
Şekil 2.7. Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılma eğrileri	19
Şekil 2.8. Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri	20
Şekil 2.9. Moleküler baskılama tekniğinin basamakları	24
Şekil 3.1. Cam slaytların yüzey modifikasyonu ve protein kalıbının hazırlanması	33
Şekil 3.2. SPR çip yüzeyinde HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) filminin hazırlanması	35
Şekil 4.1. MALM monomerinin sentezi	46
Şekil 4.2. MALM monomerinin FTIR-ATR spektrumu	47
Şekil 4.3. MALM:HSA ön-kompleksin spektrofotometrik ölçümü	48
Şekil 4.4. Cam slayt modifikasyonunun temas açıları	50
Şekil 4.5. MALM monomeri ve PEDMALM nanosensöre ait FTIR-ATR spektrumu	52
Şekil 4.6. [PEDMALM-HSA] ve [PEDMALM] SPR nanosensörlerin temas açısı ...	52
Şekil 4.7. [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensörün AFM görüntüsü	53
Şekil 4.8. [PEDMALM] (NIP) SPR nanosensörün AFM görüntüsü	54
Şekil 4.9. SPR nanosensörlerin 3D Elipsometre görüntüsü	55
Şekil 4.10. HSA çözeltileri ile [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramların karşılaştırılması	56
Şekil 4.11. HSA derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki	57
Şekil 4.12. 1,5 – 50 nM ve 50 – 300 nM aralıklarında HSA derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki	57
Şekil 4.13. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi	60
Şekil 4.14. Adsorpsiyon modelleri	62

Şekil 4.15. 300 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar	65
Şekil 4.16. (a) 300 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar (b) 300 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA baskılanmamış [PEDMALM] SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar	66
Şekil 4.17. 1:1×10 ³ , 1:2×10 ³ ve 1:3×10 ³ oranında seyreltilerek elde edilen yapay plazma örneğinin [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör ile etkileştirilmesiyle elde edilen sensorgram.....	68
Şekil 4.18. 1,5, 25, 300 nM HSA spike edilmesiyle elde edilen yapay idrar örneğinin [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör ile etkileştirilmesiyle elde edilen sensorgram	69
Şekil 4.19. [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensörün tekrar kullanımı	70
Şekil 4.20. [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensörün kararlılığı	70
Şekil 4.21. 5:1, 10:1, 20:1 oranındaki MALM:HSA kompleksleriyle hazırlanan nanofilim ve nanopartiküller ile HSA tayini	71
Şekil 4.22. Nanopartiküllerin zeta boyut analizleri	72
Şekil 4.23. Nanopartiküllerin SEM görüntüleri	73
Şekil 4.24. SPR nanosensörlerin temas açıları	74
Şekil 4.25. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensörlerin AFM görüntüsü	75
Şekil 4.26.. HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensörlerin AFM görüntüsü	76
Şekil 4.27. SPR nanosensörlerin 3D Elipsometre görüntüsü.....	77
Şekil 4.28. HSA çözeltileri ile HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramların karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.29. HSA derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki	79
Şekil 4.30. 0,15 – 10 nM ve 10 – 500 nM aralıklarında HSA derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki	79

Şekil 4.31. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi	80
Şekil 4.32. Adsorpsiyon modelleri.....	82
Şekil 4.33. 500 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar.....	83
Şekil 4.34. (a) 500 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA baskılanmış nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar (b) 500 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA baskılanmamış nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar	84
Şekil 4.35. $1:2 \times 10^3$, $1:6 \times 10^3$ ve $1:12 \times 10^3$ oranında seyreltilerek elde edilen yapay plazma örneğinin HSA baskılanmış nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör ile etkileştirilmesiyle elde edilen sensorgram	86
Şekil 4.36. 0,75, 10, 100 nM HSA spike edilmesiyle elde edilen yapay idrar örneğinin HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör ile etkileştirilmesiyle elde edilen sensorgram	86
Şekil 4.37. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensörün tekrar kullanımı	87
Şekil 4.38. HSA baskılanmış nanopartiküllerle hazırlanan [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensörün kararlılığı.....	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Albüminin yapısında bulunan aminoasitler	7
Çizelge 2.2. Yapılan bazı çalışmalar yöntemleri ve tespit sınırları	10
Çizelge 4.1. Cam slayt modifikasyonunun temas açıları	50
Çizelge 4.2. Albüminüri tanım ve sınır değerleri	58
Çizelge 4.3. Kinetik hız sabitleri.....	60
Çizelge 4.4. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri	63
Çizelge 4.5. Yarışmalı kinetik analizlerde kullanılan protein ve özellikleri.....	64
Çizelge 4.6. HSA'ya göre Hb ve HTR için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları ...	67
Çizelge 4.7. Yapay idrar hazırlanmasında kullanılan organik ve inorganik malzemeler	68
Çizelge 4.8. Albüminüri tanım ve sınır değerleri	80
Çizelge 4.9. Kinetik hız sabitleri (0.15-10 nM)	81
Çizelge 4.10. Kinetik hız sabitleri (10-500 nM)	81
Çizelge 4.11. Langmuir, Freundlich ve Langmuir - Freundlich parametreleri (0,15 –10 nM).....	83
Çizelge 4.12. Langmuir, Freundlich ve Langmuir - Freundlich parametreleri.....	83
Çizelge 4.13. HSA'ya göre Hb ve HTR için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları .	85

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C	Analit derişimi (μM)
k_a	Bağlanma hız sabiti ($\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
KA	Bağlanma sabiti (μM^{-1})
k_d	Ayrılma hız sabiti (s^{-1})
KD	Ayrılmaz sabiti (μM)

Kısaltmalar

AIBN	Azoizobutironitril
APS	Amonyum Persülfat
APTES	3-aminopropil-trietoksisilan
EDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetikasit
FTIR-ATR	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi-Azaltılmış Toplam Reflektans
GA	Glutaraldehit
Hb	Hemoglobin
HSA	İnsan Serum Albümin
HTR	Humman Transferrin
MALM	N-Metakriloil-(L)-Lösin Metil Ester
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
NaHCO_3	Sodyum Bikarbonat
NaHSO_4	Sodyum Metabisülfat
NIP	Baskılanmamış Polimer
PVA	Polivinil Alkol
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans

1. GİRİŞ

Albümin tüm omurgalıların vücudunda en bol bulunan çözünebilir, 66,438 kDa molekül ağırlığına sahip negatif yüklü bir proteindir. Kanın yaklaşık %60' nı albümin oluşturmaktadır. Albümin toplam plazma proteinlerinin yarısından fazlasını oluşturur ki sağlıklı bireylerde miktarı 35-50 g/L dir [1]. Plazmadaki proteinin yapısal özellikleri Peters tarafından incelenmiştir [1]. İnsan serum albümin için gen karaciğer gözeneklerinden 585 aminoasit (aa) kalıntısının olgunlaşmış plazma proteinin hücre içi işleme tabi tutulan preproalbümin öncülüğünde kodlanmaktadır [2]. Albüminin insan vücudunda önemli rolleri vardır. Bu ana fonksiyonlardan birisi dokular ile kan arasındaki ozmatik basıncı düzenlemektir. İkinci bir önemli fonksiyonu ise 6 farklı bölgesinden bağlayabilme özelliği ile vücut içi taşımacılığında görev almasıdır.

İnsan serum albümin (HSA) böbrek rahatsızlığı için önemli bir biyoişaretleyicidir. Kanda yaygınca bulunan HSA böbrekler tarafından filtrelendir. Eğer böbrek hasarlıysa, ilk belirti idrara bir miktar proteinin sızması olacaktır. Vücutta miktar olarak fazla olması nedeniyle sızıntıda da en çok albümin proteini gözlemlenir. İdrara sızan albüminin belli bir miktarı mikroalbümin olarak bilinir. İdrardaki albüminin kimyası tam olarak anlaşılamamıştır. İdrarda bulunan albüminin moleküler formları ve çeşitliliği; albüminin modifiye formlarının farklı filtrasyonu ve farklı tübüler geri alınımı, albüminin idrar yolağı boyunca proteoliz aracılığıyla maruz kaldığı modifikasyonlar, kimyasal oksidanlar, serbest radikal ve idrarda bulunan diğer ligandların meydana getirdiği kimyasal değişiklik ve idrarı dondurma esnasında oluşan değişiklikler sebebiyle plazmadakinden farklıdır [2]. İdrarın pH'ı genellikle 5-8 arasındadır ve albüminin moleküler şeklini etkilemez [2]. Ancak pH 4'ten düşük ve 8'den yüksek olursa albümin konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. İdrardaki ürenin miktarı da en fazla 1 mol/ L kadardır ve denatrasyona sebep olmamaktadır [2]. Bu değişimlerden dolayı idrardaki albüminin referans materyali belirlenememiştir. Referans metodu yoktur [2, 3]. İdrar da sürekli olarak albümin olması önemli bazı hastalıkların habercisidir. Böbreğin hasarlı olması, böbrek ve kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklı olabilir. 1827 yılında ilk olarak Richard Bright, albümin içerikli idrar ile böbrek hastalığını ilişkilendirmiştir [4]. Dolayısıyla idrarda albüminin erken tayini hayati önem taşımaktadır. İdrar da bu tayinin erken yapılabilmesi klinik şartları sınırlandırmaktadır. İdrarda albümin,

immünotürbidimetrik, immünonefelometrik, ELISA, HPLC, tandem mass yöntemleriyle tayin edilmektedir [3]. Albümin ölçümü ilk olarak 24 saatlik idrarda albüminin atılma oranına (AER) bakılarak yapıyordu. Sonra yaygın bir şekilde kullanılan albümin/kreatin oranı (ACR) bu yöntemin yerini almıştır [5]. Şimdilerde idrar da albümin tayini için düzeltme faktörü olarak kreatin kullanılmaktadır ve böylece ACR yöntemi ile tayin yapılmaktadır. İdrarla atılan albüminin miktarı az olduğundan doğru tespit için bazı sıkıntılar ortaya çıkabilir. İdrarın depolandığı kabın yüzeyine adsorplanan idrardaki albümin, düşük derişimler de önemli kayıplara sebep olabilir. Albüminin tek bir tabakasının yüzeye bağlanması yaklaşık $0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ gerektirir [6]. İdrar albüminin nonspesifik adsorpsiyonu hidrofilik yüzeylerde $< 1\text{mg}/\text{L}$ ve nonhidrofilik yüzeylerde $< 2\text{mg}/\text{L}$ olarak hesaplanmıştır [7]. Bu yöntemlerin dışında kalitatif olarak idrarda albümin tespiti yapmak mümkündür.

Biyosensörler bünyesinde biyolojik bir tanıma elemanı bulunduran ve fizikokimyasal dönüştürücü içeren analitik cihazlardır. Biyosensörler; “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) tarafından, “kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar” olarak tanımlanmıştır [8]. Biyosensör, herhangi bir işaretlemeye gerek duymadan, eş zamanlı moleküler tanıma aracı olarak biyomoleküllerin yüksek tanıma özelliğini kullanarak ön hazırlık yapmaya ihtiyaç duymadan karışım içerisindeki hedef analiti seçici olarak tayin edebilir. Tüm bunlardan dolayı biyosensörlerin diğer geleneksel tekniklere göre daha avantajlı olduğunu söyleyebiliriz. Biyosensörler ayrıca yüksek hassasiyete, hıza, basit kullanıma sahip ve çoğaltılabilir analitik cihazlardır [9]. Canlıların, çevrelerindeki değişimi algılama ve yanıt verme sistemleri, biyosensörlerin geliştirilmesi için temel teşkil etmekte ve sıklıkla biyolojik analizler için kullanılmaktadır [10, 11]. Biyosensör alanındaki büyük gelişmelerle birlikte moleküler baskılanmış polimerler (MIP) dönüştürücülerle bütünleştirilmiş ve tayin edilecek analitle MIP arasındaki etkileşim işlenilebilir bir sinyale dönüştürülmüştür. Bu anlamda yüzey plazmon rezonans (SPR) gibi optik cihazlar büyük bir potansiyele sahiptirler. SPR, metal yüzeye yakın kırılma indisindeki değişimi ölçerek basit ve doğrudan ölçüm yapan bir tekniktir [12]. Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler yeni nesil nanobiyosensör kavramının doğuşuna sebep olmuştur.

Moleküler baskılama kabaca, kalıp molekül varlığında öncelikle özgöl boşluklar oluşturup, sonra bu kalıp molekülün uzaklaştırılmasıyla boşluklarda özel bağlanma bölgelerine sahip

yapay reseptör hazırlama tekniğidir. Bu tekniği kullanarak hazırlanan yapay reseptörler, biyosensörlerde kullanılan doğal reseptörler, enzimler ve antibadiler ile karşılaştırıldığında sahip oldukları yüksek afinite, yüksek özgüllük, düşük maliyet ve yüksek dayanıklılık nedeniyle oldukça ilgi çeken malzemelerdir. Hazırlanan moleküler baskılanmış polimerler, hedef molekülü tayin etmek üzere fotopolimerizasyon ile algılayıcı yüzeyine immobilize olarak tutturulabilir.

Bu çalışmanın amacı mikroalbümin tayini için SPR temelli nanosensörlerin hazırlanmasıdır. Bu amaçla MIP tekniği ile albümin tanıma bölgelerine sahip polimer sentezlenmiş, fotopolimerizasyon ve nanopartikül damlatma yöntemi ile algılayıcı yüzeyine immobilize olarak tutturulmuş SPR sensör cihazı ile analizler gerçekleştirilmiştir. Aşağıda, yapılan çalışmanın basamaklarına yer verilmiştir;

- İlk aşamada HSA ile etkileşerek boşluklar oluşturabilecek fonksiyonel N-Metakriloil-(L)-Lösin Metil Ester (MALM) monomeri, L-Lösin metil esterin metakroil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir.
- Optimum kalıp molekül, HSA ve MALM monomer oranı, HSA'nin farklı oranlarda MALM monomeri ile etkileştirilmesiyle UV-görünür bölge spektrofotometre cihazıyla tespit edildi ve optimize edilen bu orana göre nanosensör hazırlanması çalışmaları gerçekleştirildi.
- Nanosensör çalışmaları iki aşamalı olarak Mikro-temas yöntemiyle HSA baskılanmış nanofilm ve yine HSA baskılanmış nanopartiküllerin altın çip yüzeyine tutturulmasıyla nanosensör oluşturulması şeklinde gerçekleştirildi.

Mikro temas yöntemiyle HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] ve baskılanmamış [PEDMALM] nanofilmlerin hazırlanması;

- Lam yüzeyi etanol ile yıkandı ve 20 dk etüvde kurumaya bırakılmıştır.
- Temizlenen ve kurutulan lam hazırlanan HCl çözeltisi (20 ml, 1M) ile 20 dk sonikatörde bekletilmiştir.
- HCl ile muamele edilen lam 3 defa saf su ile yıkanmıştır.
- Saf su ile yıkanan lam hazırlanan NaOH çözeltisi (20 ml, 1 M) ile birlikte 20 dk sonikatörde bekletilmiştir.

- NaOH ile muamele edilen lam 3 defa su ile yıkanmıştır.
- Kurutulan lam APTES (EtOH) çözeltisinde 2 sa shaker da (60 rpm) modifiye edildi.
- Modifiye edilen lam petri 10 ml EtOH ' de 30 dk sonikatörde bekletildi.
- EtOH ile yıkanan lam 10 dk N_{2(g)} ' ı ile kurutulmuştur.
- Kurutulan lam fosfat tamponu pH 7,4' de hazırlanan GA çözeltisi içerisinde 2 sa shaker da (60 rpm) bekletilmiştir.
- Bu işlemin ardından lam hazırlanan fosfat tamponu (pH 7,4) ardından saf su ile yıkanmıştır.
- Lam 10 dk N_{2(g)} ' ı ile kurutulmuştur.
- N_{2(g)} ' ı ile kurutulan lam, pH 7,4'de fosfat tamponu içerisinde hazırlanan HSA çözeltisinde 24 sa buzdolabında +4 °C' de bekletilmiş ve böylelikle kalıp hazırlanmıştır.
- Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR sensör yüzeyine, HSA baskılanmış poli(N-Metakriloil-(L)-Lösin Metil Ester-insan serum albümini) [PEDMALM-HSA] (MIP) nanofilm sentezlenmiştir.
- Belirli oranlarda hazırlanan MALM, çapraz bağlayıcı etilen dimetakrilat (EDMA) ve başlatıcı 2,2'-azobis(izobütironitril) (AIBN) karışımından 20 µl alınarak damlatılan SPR sensör çip yüzeyine, lam üzerinde hazırlanan kalıp protein HSA baskılanmıştır.
- Bu preparatın UV ışık altında 4 saat bekletilmesiyle hedef proteine ait özel boşluklar oluşturulmuştur.
- Kontrol deneyleri için HSA baskılanmadan nanofilm aynı koşullarda sentezlenmiştir.
- HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] tutturulmuş SPR nanosensör ile HSA arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla üç farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri. SPR sensörün Langmuir adsorpsiyon izoterm modeline uygun olduğu görülmüştür.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] ve baskılanmamış [PEDMALM] nanopartiküllerin sentezlenmesiyle hazırlanan nanosensörler;

- Hedeflenen derişim aralığına inmek amacıyla çalışmanın ikinci kısmında HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküller iki fazlı miniemülsiyon polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir.
- Faz I; PVA (95 mg), SDS (15 mg) ve NaHCO₃'ün (12 mg) 5.0 mL deiyonize su içinde özölmesiyle hazırlanmıştır.
- Faz II; PVA (50 mg) ve SDS'in (50 mg) 100 mL deiyonize suda özölmesiyle hazırlanmıştır. MALM: HSA ön-kompleksi (10:1 µmol) ve hidrofilik monomer çapraz bağlayıcı etilenglikol dimetakrilat' dan (MALM:EDMA; 1:30 µmol) oluşan monomer fazına eklenerek yağ fazı elde edilmiştir. Yağ fazı faz I'e yavaşça eklenmiştir.
- Karışım, 25.000 rpm de homojenizatörde homojenize edildikten sonra Faz II ile karıştırılmıştır.
- Sodyum bisülfid (50 mg) ve amonyum persülfat (100 mg) başlatıcısının eklenmesinden sonra polimerizasyon işlemi 40°C de 24 saat süreyle gerekleştirilmıştır.
- Kontrol deneyleri için HSA baskılanmadan nanopartiküller aynı koşullarda sentezlenmiştir.
- Sentezlenen nanopartiküller, zeta boyut analizi ile karakterize edilmiştir. Nanopartiküllerin boyutlarının ortalama 63 nm olduğu görölmüştür.
- Etil alkol ile temizlenerek vakumlu etüvde kurutulan altın ip yüzeyine 20 µl sentezlenen nanopartiküllerden damlatılarak UV ışık altında 2 saat bekletilerek nanopartiküllerin ip yüzeyine tutturulması sağlanmıştır. SPR sensörün düşük derişimlerde Langmuir adsorpsiyon izoterm modeline, yüksek derişimler de ise Freundlich adsorpsiyon izoterm modeline uygun olduğu görölmüştür. SPR temelli sensörler, Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi-Azaltılmış Toplam Reflektans (FTIR-ATR), temas açısı ölçümleri, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), ve elipsometre ile karakterize edilmiştir.
- HSA tayini için mikro-temas yönteminde 1,5–300 nM derişim aralığında çalışılırken, nanopartiküller ile HSA tayininde 0,15–500 nM gibi daha geniş derişim aralığında çalışılmıştır.
- Desorpsiyon ajanı olarak 0,05 M NaCl özeltisi kullanılmıştır. Farklı derişimlerde yapay plazma ve yapay idrar örneklerin de HSA analizleri fosfat tamponu ortamında (pH 7,4) gerekleştirilmıştır.,

- Sensörlerin seçiciliğini göstermek için yarışmacı ajan olarak seçilen farklı proteinler ile (hemoglobin-transferrin) çalışmalar yapılmış ve mikro-temas yöntemiyle hazırlanan SPR sensörlerin tespit edilen seçicilik faktörünün $k' = 5,02$, $k' = 4,25$ değeri ile nanopartiküllere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Mikro-temas ve nanopartiküllerle hazırlanan nanosensörlerin tayin limitleri (LOD) sırasıyla 8,8 ve 0,7 pM olarak hesaplanmıştır.
- Mikro-temas ve nanopartiküllerle hazırlanan nanosensörlerin tekrar kullanılabilirlik çalışmaları sırasıyla 300 ve 500 nM çözeltiler için arka arkaya 5 kez yapılmıştır. Kararlılık çalışması için aynı nanosensör çip 3 aylık periyotlarla 3 kez 4 tekrarlı HSA analizi için kullanılmış ve SPR nanosensörlerin kararlılığı gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

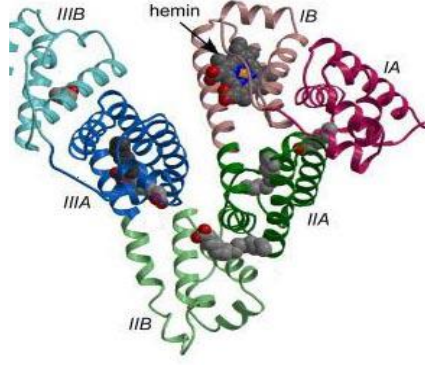
2.1. Albümin ve Mikroalbümin Nedir?

Albümin tüm omurgalıların vücudunda en bol bulunan çözünebilir, 66,438.41 Da molekül ağırlığına sahip negatif yüklü bir proteindir. Kanın yaklaşık %60'nı albümin oluşturmaktadır. Albümin toplam plazma proteinlerinin yarısından fazlasını oluşturur ki sağlıklı bireylerde miktarı 35-50 g/L dir [1]. Plazmadaki proteinin yapısal özellikleri Peters tarafından incelenmiştir [1]. Hepatositlerden, insan serum albümin geni tarafından, preproalbümin şeklinde kodlanmaktadır ve hücre içi olarak olgun plazma proteinine dönüştürülüp 585 aminoasitlik bir primer zincirden meydana gelmektedir [2]. Albümin 17 iç disülfid çapraz bağı ile α - helikal yapı stabilize edilmektedir ki, bunların sonucunda molekül denatürasyona karşı dayanıklı hale gelmektedir [1].

Albüminin insan vücudunda önemli rolleri vardır. Bu ana fonksiyonlardan birisi dokular ile kan arasındaki ozmatik basıncı düzenlemektir. İkinci bir önemli fonksiyonu ise 6 farklı bölgesinden bağlayabilme özelliği ile vücut içi taşımacılığında görev almasıdır [13].

Çizelge 2.1. Albüminin yapısında bulunan aminoasitler [1]

Amino asitler	Sınır ölçüleri	Amino asit	Sınır ölçüleri
Aspartik asit	36	Sistein	35
Asparagin	17	Metiyonin	6
Treonin	28	İzolösin	8
Serin	24	Lösin	61
Glutamik asit	62	Tirozin	18
Glutamin	20	Fenilalanin	31
Prolin	24	Lisin	59
Glisin	12	Histidin	16
Alanin	62	Triptofan	1
Valin	41	Arginin	24



Şekil 2.1. Albüminin altı bağlanma bölgesinin gösterimi [135]

İnsan serum albümin (HSA) böbrek rahatsızlığı için önemli bir biyoişaretleyicidir. Kanda yaygınca bulunan HSA böbrekler tarafından filtrelenir. Eğer böbrek hasarlıysa, ilk belirti idrara bir miktar proteinin sızması olacaktır. Vücutta miktar olarak fazla olması nedeniyle sızıntıda da en çok albümin proteini gözlemlenir. İdrara sızan albümin albümüri, bunun belli bir miktarı ise mikroalbümin olarak bilinir.

2.1.1. Albümininin Moleküler Yapısı

İdrar albümin, plazmadaki albüminden farklı olabilir. İdrarın pH'sı ve idrardaki üre, yüksek glukoz derişimi, askorbik asit, idrar yolu enfeksiyonlarındaki artmış nitrit gibi çevresel faktörlerden dolayı albümin geniş bir iyonik etkileşime maruz kalabilir [14]. İdrarın pH'ı genellikle 5-8 arasındadır ve albüminin moleküler şeklini etkilemez [2]. Ancak pH 4'ten düşük ve 8'den yüksek olursa albümin konformasyonel değişikliğe uğrayabilir. İdrardaki ürenin miktarı da en fazla 1 mol/ L kadardır ve denatrasyona sebep olmamaktadır [2]. Albümin, çok sayıda küçük organik molekül ve iyon gibi molekülleri taşıyabilme özelliğe sahiptir. Bu moleküllere bağlanması sonucunda albüminin konformasyonun da değişiklikler olabilir [15].

Bakır ve tiroksin gibi diğer hücre içi moleküller albümine bağlanabilir ancak plazmadaki albüminin %1'inden daha düşük miktarı bu moleküllerle bağlıdır [2]. Plazmadaki derişim değerleri içerisinde, albümin molekülü başına 1 ya da 2 Ca^{+2} , 7 veya 8 Cl^{-} bağlanmış durumdadır. Bahsedilen iyonların bağlanması pH'a bağımlı olarak gerçekleşmektedir ve bu sebeple idrardaki değerleri değişik olabilir. Analiz esnasında iyonlar başka iyonlarla hızlı bir şekilde yer değiştirebilirler [14].

Dolaşan kanda albüminin yarı ömrü yaklaşık 19 gündür [16]. Bu özelliği de albümine kimyasal değişim özelliği kazandırmaktadır. Özellikle idrar, plazmaya kıyasla düşük molekül ağırlıklı peptidler ve hippürik asit ile fenilasetilglutamin gibi aminoasitten türetilmiş moleküller açısından da zengindir [17]. Albümin, proksimal tübül hücreleri tarafından hızlı bir şekilde endositozla alınır. Süzölmüş albüminin geri kazanılmamış küçük bir miktarı, idrarla atılım öncesinde peptid fragmentleri şeklinde kaçınılmaz bir lizozomal bozunmaya uğrar [4]. İdrarda >5 kDa büyüklüğünde çeşitli albümin fragmentleri tespit edilmiştir [2]. Albüminin lizozomlarca parçalanma derecesine bağlı olarak tespit edilebilen veya tespit edilemeyen parçalar ortaya çıkmaktadır. Mikroalbüminüri düzeyi, bozulmamış ve bozulmuş albümin formlarının dengesindeki değişikliklere bağlı olarak değişir. Nefrotik düzeyde proteinüri olanlarda ise bozulma yolağı inhibe olur [18]. Bu değişimlerden dolayı idrardaki albüminin referans materyali belirlenememiştir. Referans metodu yoktur [2, 3].

2.1.2. İdrarda Mikroalbümin Ölçümü

İnsan serum albümin (HSA) böbrek rahatsızlığı için önemli bir biyoişaretleyicidir. Kanda yaygınca bulunan HSA böbrekler tarafından filtrelendir. 1827 yılında ilk olarak Richard Bright, albümin içerikli idrar ile böbrek hastalığını ilişkilendirmiştir [4]. Dolayısıyla idrarda albüminin erken tayini hayati önem taşımaktadır. İdrar da bu tayinin erken yapılabilmesi klinik şartları sınırlandırmaktadır. İdrarda albümin, immünotürbidimetrik [19], immünonefelometrik [20], HPLC [21], floresans immunoassay [22], kemüliminans-ELISA [23], elektroforez [24], immunoneferometre [25], immunorezonans tarama ELISA [26, 27], kriyojel [28], SPR [29] yöntemleriyle tayin edilmektedir. Klinik olarak idrarda albümin ölçümü ilk olarak 24 saatlik idrarda albüminin atılma oranına (AER) bakılarak yapılmıyordu. Sonra yaygın bir şekilde kullanılan albümin/kreatin oranı (ACR) bu yöntemin yerini almıştır [1]. Şimdilerde idrar da albümin tayini için düzeltme faktörü olarak kreatin kullanılmaktadır ve böylece ACR yöntemi ile tayin yapılmaktadır. İdrarla atılan albüminin miktarı az olduğundan doğru tespit için bazı sıkıntılar ortaya çıkabilir. İdrarın depolandığı kabın yüzeyine adsorplanan idrardaki albümin, düşük derişimler de önemli kayıplara sebep olabilir. Albüminin tek bir tabakasının yüzeye bağlanması yaklaşık 0,15 µg/cm² gerektirir [6]. İdrar albüminin nonspesifik

adsorpsiyonu hidrofilik yüzeylerde < 1mg/L ve nonhidrofilik yüzeylerde <2mg/L olarak hesaplanmıştır [7]. Bu yöntemlerin dışında kalitatif olarak idrarda albümin tespiti yapmak mümkündür.

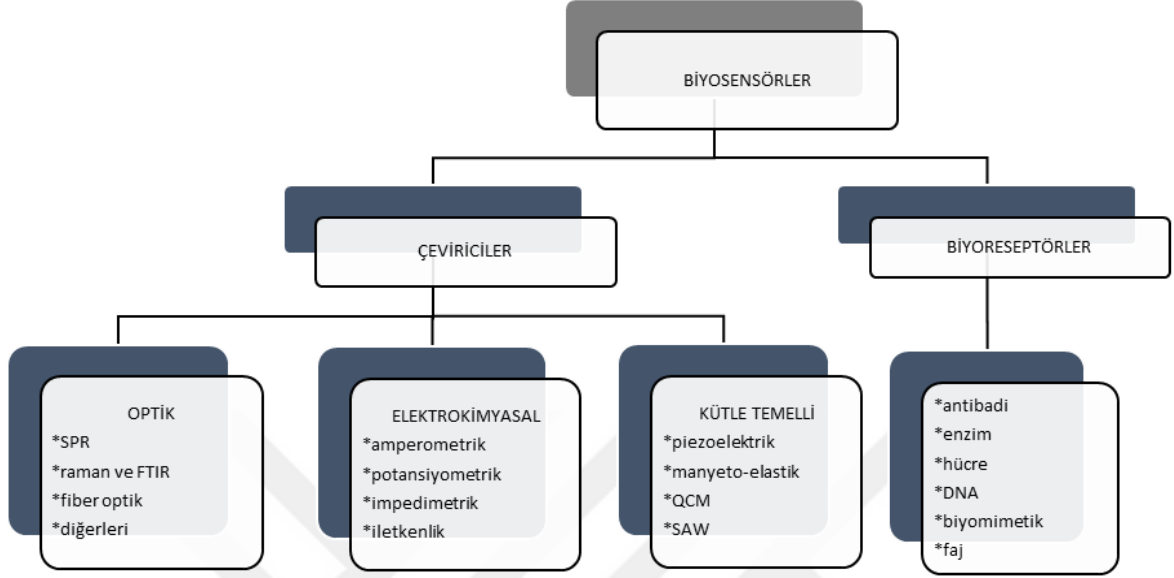
Çizelge 2.2. Yapılan bazı çalışmalar yöntemleri ve tespit sınırları

Tarih	Yöntem	Tespit sınırı
1987	İmmunotürbidimetrik	5 mg/L
2003	Floresans immunoassay	5,5 mg/L
2005	Kemülininans-ELISA	0,089 µg/mL
2005	HPLC	3,4 mg/L
2007	İmmunorezonans tarama	0,02 mg/L
2007	Elektroforez	15 µg/MI
2009	İmmunorezonans tarama	7,2 pg/l
2011	SPR	4 µg/MI
2014	Kriyojel	5*10 ⁻⁵ mg/L

2.2. Biyosensörler

Biyosensörler bünyesinde biyolojik bir tanıma elemanı bulunduran ve fizikokimyasal dönüştürücü içeren analitik cihazlardır. Biyosensörler; “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) tarafından, “kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar” olarak tanımlanmıştır [30]. Biyosensör, herhangi bir işaretlemeye gerek duymadan, eş zamanlı moleküler tanıma aracı olarak biyomoleküllerin yüksek tanıma özelliğini kullanarak ön hazırlık yapmaya ihtiyaç duymadan karışım içerisindeki hedef analiti seçici olarak tayin edebilir. Tüm bunlardan dolayı biyosensörlerin diğer geleneksel tekniklere göre daha avantajlı olduğunu söyleyebiliriz. Biyosensörler ayrıca yüksek hassasiyete, hıza, basit kullanıma sahip ve çoğaltılabilir analitik cihazlardır [9]. Canlıların, çevrelerindeki değişimi algılama ve yanıt verme sistemleri, biyosensörlerin geliştirilmesi için temel teşkil etmekte ve sıklıkla biyolojik analizler için kullanılmaktadır [10, 11]. Biyosensör alanındaki büyük gelişmelerle birlikte moleküler baskılanmış polimerler (MIP) dönüştürücülerle bütünleştirilmiş ve tayin edilecek analitle MIP arasındaki etkileşim işlenilebilir bir sinyale dönüştürülmüştür. Bu anlamda yüzey plazmon rezonans (SPR) gibi optik cihazlar büyük bir potansiyele sahiptirler. SPR, metal yüzeye yakın kırılma indisindeki değişimi ölçerek basit ve doğrudan ölçüm yapan bir tekniktir [12]. Standart analiz yöntemleri ile kıyaslandığında sensörler çabuk, ucuz,

portatif, kolay uygulanabilirlik ve basitlik açısından standart yöntemlerin önüne geçmektedir. Biyosensörler dönüştürücülerine ve biyolojik tanıma elemanları iki ana sınıfa ayrılmıştır. Şekil 2.2’ de biyosensörlerin sınıflandırılması verilmiştir.



Şekil 2.2. Biyosensörlerin sınıflandırılması

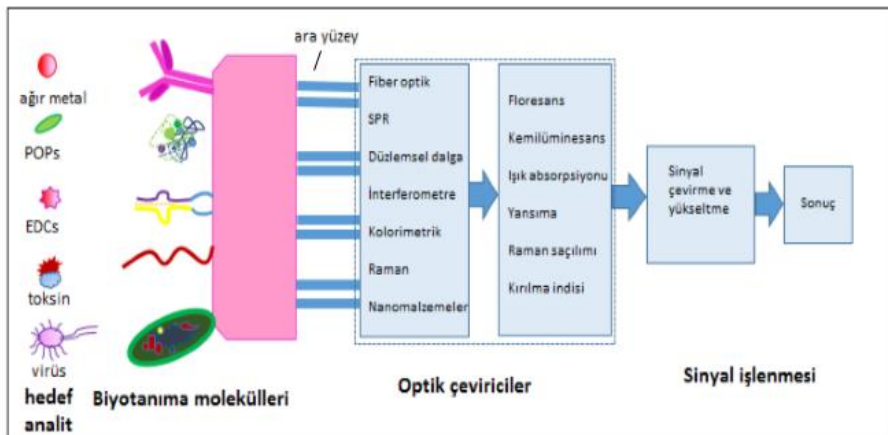
Nanoteknoloji alanındaki gelişmeler yeni nesil nanobiyosensör kavramının doğuşuna sebep olmuştur.

Son yıllarda bazı bilim alanlarındaki gelişmelerle birlikte birçok hastalığın teşhisi için yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu gelişmelerle birlikte hastalıklar erken teşhis edilmiş ve yaşam kalitesi buna bağlı olarak artmıştır. Hastalıkların belirlenmesinde biyolojik belirteçlerin değişimi oldukça önemlidir. Günümüzde vücut sıvılarındaki biyolojik belirteçlerin tespiti için hastanelerde ve laboratuvarlarda farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler radyoimmün testi (RAI), enzim bağlı immünosorbent testi (ELİZA), immünoglutinasyon (IAA) ve floresans immün testi (FIA) gibi geleneksel tekniklerdir. İmmün testlerde biyolojik tanıma elemanı olarak antibadiler kullanılır [31]. Tanıma için genelde işaretleme basamağına ve analitle reseptör arasındaki bağlanmayı gösterecek ek maddelere ihtiyaç duyulur [32]. Bu durum, tayin süresini uzatır, maliyeti artırır ve reseptörün bağlanma bölgesinde tahribata neden olabilir. Bunlar istenmeyen durumlar olmakla birlikte yanlış sonuçlar elde edilmesine sebep olabilir. İstenilen anlaiz hızlı, hassas, seçici, güvenilir, kolay kullanımlı ve ucuz olmalıdır.

Biyosensör kavramı 1962 yılında ilk kez Clark ve Lyons adlı araştırmacılar tarafından ortaya çıkmıştır. Clark ve Lyons diyaliz membranı ile tasarlanmış oksijen elektroduna, glukozoksidaz enzimini bağlamış ve kanın glukoz seviyesini tespit etmişlerdir [33]. İlk kez 1962 yılında kullanılmış olmasına rağmen daha önce de biyosensörlerin yapımını ve ar-ge'sine yardımcı olacak birçok bilimsel araştırmalar da yapılmıştır.

2.2.1. Optik Çeviriciler

Bir kimyasal tepkimede enerjinin ışık şeklinde oluşması kemilüminans olarak bilinir. Kimyasal tepkime sırasında peroksit gibi yapay bileşikler yüksek derecede oksitlenmiş türde enerji yaydığı zaman, kemilüminans oluşur [34]. Biyolüminesans, yapay bileşik olarak lusiferaz/lusiferin kullanımına dayanan diğer bir lüminesans tekniğidir [35]. SPR yüzey aktivitesini ölçme tekniğine dayanır. Bu teknikte, belirli bir yük yoğunluğundaki dalga, dielektrik ara yüzeyi ve metal yüzeyi boyunca ilerler [36]. Altın veya gümüş gibi malzemelerden ışığın toplam iç yansımaya bağlı olarak, yüzeyde oluşan kendiliğinden istekli dalga veya alan, metal yüzeyi boyunca ara yüzeyi kat eder. Bu ışık, yüzey üzerinden plazmon olarak bilinen serbest elektronlarla birleşme yeteneğine sahiptir. Bu, kayıt edilebilen rezonans dalgası yaratır. Bu yüzden, metal yüzeyinde yerleşik herhangi bir biyomolekül tabakası bulunursa, SPR adsorpsiyon profili oluşur ve biyomoleküller özelliklerine göre her bir SPR spektrumu farklı olur. Her bir moleküle göre değişiklik gösteren faktör SPR açısıdır. İnce film yerine metal nanopartikül kullanımı SPR sinyalini ciddi derecede yükseltir. Optik tayin yöntemleri Şekil 2.3' de verilmiştir.



Şekil 2.3. Optik çeviricilerin kullandığı optik tayin

Optik çeviricinin kullanıldığı SPR biyosensörlerin diğer çeviricilerin kullanıldığı biyosensörlere göre bazı avantaj ve dezavantajları vardır.

Avantajları;

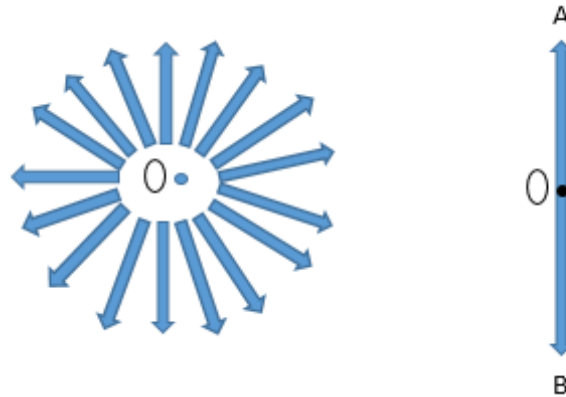
Farklı spektroskopik faaliyetler yürütülebilir, elektromagnetik bazlı maruz kaldığı faktörlerden etkilenmemektedir ve elektrik bazlı tehlikeli bir durum oluşma durumu oldukça nadir gerçekleşmektedir.

Dezavantajları;

Işıksal etkileşimlerden fazla etkilenebilmektedir ve matrislerdeki birikim dolayısıyla yön bazlı uzunluğu değişkenlik göstermektedir [37].

2.2.2. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)

Plazmon, birbirleri ile temas halindeki metaller gibi elektrik iletkenliği olan malzemeler ile cam ve hava gibi dielektrik malzemelerin arayüzeyinde oluşan değişimler sonucu ortaya çıkan elektron yoğunluğu dalgalanmasıdır. Işık bir ortamdan diğer bir ortama geçtiğinde kısmen yansır, kısmende diğer ortama geçer. İkinci ortamda ilerleyen ışığın frekansı değişmez ancak ilerleme yönü ve hızı değişir. **Işığın kırılması**, ışık demetinin yoğunluğu farklı başka bir ortama geçerken yön değiştirmesidir. **Işık dalgası**, genellikle her düzlemde ilerleyen dalgaların karışımıdır. **Düzlemsel polarize ışık** tek düzlemde ilerleyen ışık dalgasıdır. Düzlemsel polarize ışık ile asimetrik ve ışığı absorplamayan maddeler etkileştiği zaman, polarize ışığın düzlemi sağa (+) veya sola (-) açı değiştirir. Şekil 2.4' de polarize olmayan ve düzlem polarize ışık gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Polarize olmayan ve düzlemsel polarize ışık

Yüzey plazmon kavramı ilk olarak 1902 yılında Wood tarafından gözlemlenmiştir [38]. Wood, metal kırınım ızgarasına polikromatik ışık yolladığında, kırınımına uğrayan ışığın spektrumunda ince karanlık bantlar gözlemlemiş ve bunları anomaliler olarak kaydetmiştir [39]. Wood'un ardından Lord Rayleigh ve Fano teorisinin gelişimine katkıda bulunmuşlardır. Ancak yapılan bu çalışmalara rağmen yüzey plazmon rezonans kavramı tam olarak 1968 yılında anlaşılmıştır. 1968 yılında Otto ve Kretschmann birbirlerinden bağımsız farklı yöntemlerle yüzey plazmon rezonansların oluşumunu sağladılar [40]. 1970'lerin sonlarından itibaren yüzey plazmonlar ince filmlerin karakterizasyonu ve metal yüzeylerdeki işlemlerde kullanılmaya başlanmıştır. Yüzey plazmon rezonans temelli sensörlerin biyomolekül-biyomolekül etkileşimlerini ölçmek için ilk defa kullanımı ise 1983 yılında Liedberg ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [41].

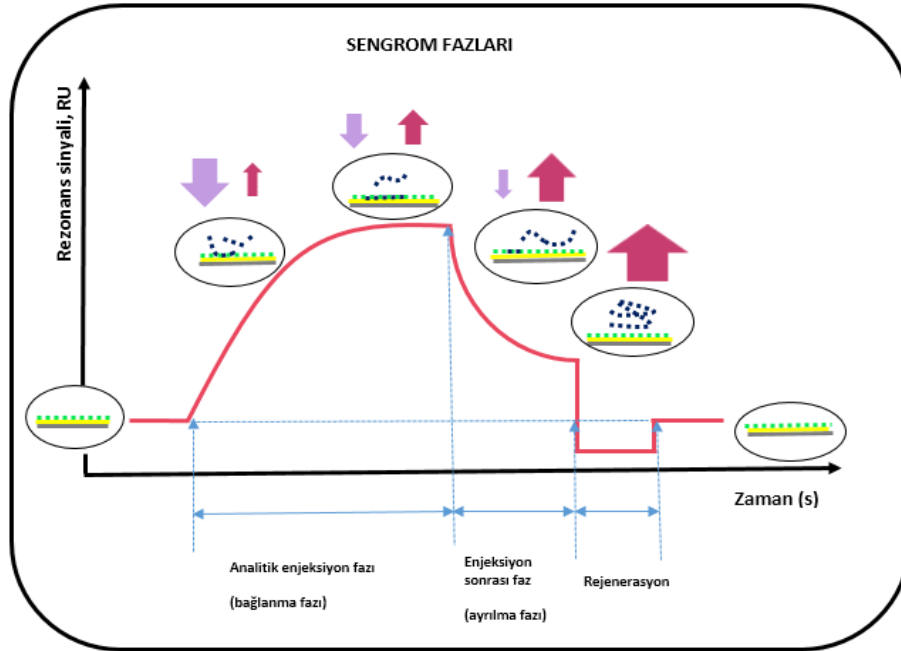
2.2.2.1. Yüzey Plazmonlarının Oluşumu

Yüzey plazmon rezonans, iletken film ile ayrılmış farklı kırılma indisine sahip iki ortama uygun dalga boyunda ışık gönderilmesi sonucu, ışığın metal yüzeyle etkileşmesiyle oluşan optik-elektriksel bir olaydır. Işığın metal yüzeyine çarpması ile gelen ışığın bir kısmı yansırken bir kısmı da metal atomları (metalin iletim bandı elektronları) ile etkileşerek homojen olmayan elektromanyetik dalga oluşturur. Kullanılan metalin ışık ile uygun dalga boyunda rezonansa girebilecek iletim bandı elektronlarına sahip olması gereklidir. Genelde en çok kullanılan metaller altın, gümüş, bakır, alüminyum ve sodyumdur. Oluşan homojen dalga prizma metal yüzeyine dikey olarak yayılır ve üssel olarak yazılır. Metal yeterince ince ise (<100 nm) dalga metal film boyunca ilerler ve metalin dış yüzeyinde yüzey plazmon ile çiftleşir. Oluşan yüzey plazmonları metal/dielektrik arayüzeyine paralel olarak yayılır. Plazmon metal ile dielektrik bölge sınırında olduğundan bu yüzeydeki değişikliklere karşı çok duyarlıdır. Plazmonun oluşturduğu alan etrafındaki kimyasal yapıda oluşacak herhangi bir değişiklik, rezonansa giren ışığın dalga boyunda da değişikliğe neden olur. Bu da SPR'yi analitik uygulamalarda kullanmamızı sağlar. Sensör yüzeyinin yakınındaki kırılma indisi, yüzeye bağlanan makromolekülün miktarına göre değişir. Yansıyan ışığın açısı ile bağlanan maddenin miktarı arasında doğrusal bir ilişki vardır.

2.2.2.2. SPR Sistemlerinin Yapısı

SPR cihazları, bir sisteme entgre olmuş 3 temel birimden oluşur; optik birim, sıvı (akışkan) birim ve sensör yüzeyi yani sensör çipi. Sensör çipi, akışkan hücre ile optik birim arasında fiziksel engel görevi görür. Biyomoleküler etkileşim, sensörün akışkan kısmında oluşur.

Işık kaynağından altın kaplı sensör yüzeyi üzerine ışık gönderildiği zaman, bu ışık belli bir açı derecesinde yansır. Yansıyan ışığın yoğunluğu da disk şeklinde gösterilen dedektörde ölçülür. Sensör yüzeyi üzerinde oluşabilecek herhangi bir değişim; örneğin yüzey üzerine makromolekül adsorpsiyonu; kırılma indisinde de bir değişime neden olur. Bu da ilk durumda ölçülen açının kaymasına neden olur. Açıdaki bu değişim eş-zamanlı olarak gözlenebilir. Açıdaki bu değişim eş zamanlı olarak gözlenebilir. Zamana karşı açı değişiminin gözleendiği grafik sensörgram olarak tanımlanır. Sensörgramdan elde edilen veriler ile adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi eş zamanlı olarak izlenebilir. Ayrıca yüzey üzerinde biriken madde miktarıda belirlenebilir. Şekilde tipik bir sensörgram görülmektedir. Örnek enjeksiyonundan itibaren (analit molekülleri yüzey üzerine adsorplandıkça) kırılma indisindeki değişime bağlı olarak plazmon açısında de kaymalar gözlenir. Şekil 2.5' de tipik bir SPR biyosensör sensörgramının şeması gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Tipik bir SPR biyosensör sensörgramının şematik gösterimi

SPR ölçümleri sensör yüzeyinin uygun bir tampon çözeltisi ile muamele edilmesiyle başlar. Bu, biyotanıma olayı gerçekleşmeden önce bir temel elde edebilmek için gereklidir. Bu durumda sensör yüzeyi, hedef analitleri yüzeye adsorplayacak ligandlarla aktif hale getirilir. İkinci aşamada, analiti içeren çözelti enjekte edildiğinde hedef analitler yüzey üzerine tutunur. Bu durumda analit molekülünün adsorpsiyon kinetiğide eş zamanlı olarak ölçülebilir. Daha sonra üçüncü aşama olarak yeniden bir tampon uygulaması yapılır ve seçici olmayan tutunmuş moleküller sensör yüzeyinden uzaklaştırılır. Ayrıca bu aşamada analitin desorpsiyonuda başlar. Böylece ayrışma kinetiğide eş zamanlı olarak ölçülebilir. Son olarak, Rejenerasyon aşamasında bir Rejenerasyon çözeltisi enjekte edilerek, ligand ile analit arasındaki seçici etkileşim bozulur. Sonuçta bir analiz döngüsü tamamlanmış olur. Rezonans sinyal birimindeki farklılık, yüzey üzerindeki madde miktarını verir.

SPR Sistemlerinin Avantajları

- ✓ SPR'nin büyük avantajı biyomolekül etkileşimlerinin eşzamanlı izlenmesi ve herhangi bir işaretleme yöntemine ihtiyaç duyulmamasıdır.
- ✓ Analiz süresi oldukça kısadır.
- ✓ İncelenen biyomoleküller analiz sırasında zarar görmez.
- ✓ Pikomolar seviyelerde dahi ölçüm alınabilir.

SPR Sistemlerin Kullanım Alanları ve Hedef Yapılar

SPR, temel olarak dört farklı alanda uygulanabilir. Bunlar;

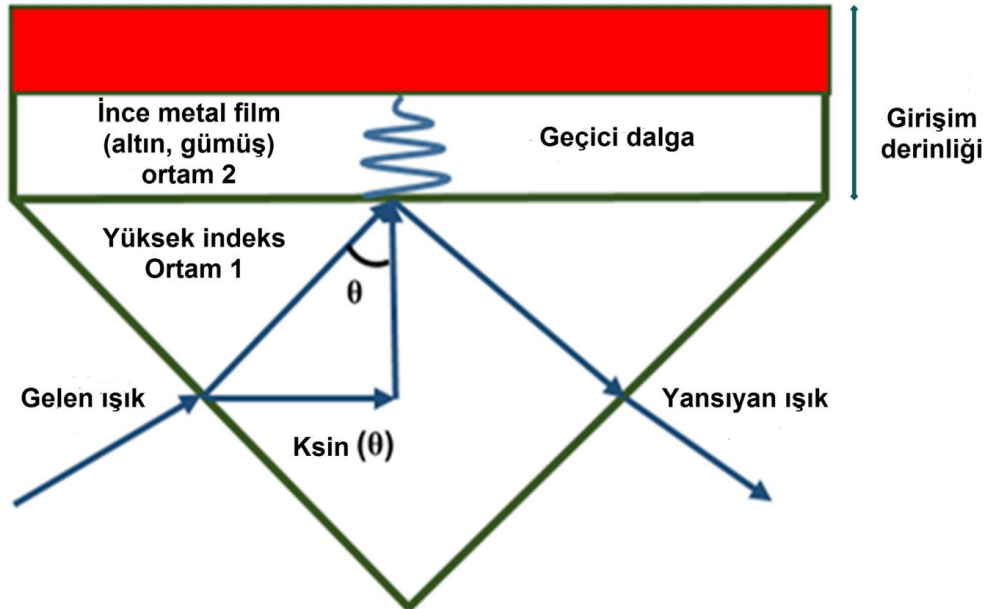
- ✓ Düşük derişimli hedef moleküllerin tayini
- ✓ Biyotanıma molekülü ile hedef analit arasındaki afinite etkileşimlerinin incelenmesi
- ✓ Kinetik eğrisinden bağlanma ve ayrışma analizlerin yapılması
- ✓ Sitokiyometri ve termodinamik analizlerin yapılmasıdır.

SPR ile incelenebilen afinite etkileşimleri çok çeşitlidir. Bunlara örnek olarak; peptit-protein, protein-protein, protein-boyalar, protein-metal iyonları arasındaki etkileşimler, nükleik asit ile proteinler arasındaki etkileşimler, moleküler baskılama yöntemiyle oluşturulmuş yapay malzeme ile biyomoleküller arasındaki etkileşimler, çeşitli ilaçlar ile protein veya nükleik asitler arasındaki etkileşimler verilebilir. SPR ile gıda, çevre ve teşhis amaçlı analizler yapılabilmektedir.

2.2.2.3. Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi

Yüzey plazmon rezonans teorisi, enerji taşıyan ışık fotonunun metalin elektronları ile birleşmesi veya enerji transferi ilkesine dayanmaktadır. Birleşmenin (veya enerji transferinin) gerçekleştiği ışığın geliş açısı her metal ve metal yüzeyinin çevresine göre değişmektedir. Işık fotonları ve metal yüzeyindeki elektronlar arasında bir eşleşme ve/veya rezonans yakalandığında enerji transferi gerçekleşir. Bu enerji transferi, metal filmin alt yüzeyinden yansıyan ışığın miktarının ölçülmesiyle belirlenebilir. Her ışık birçok açıda yansırken, ışığın bir bölümü rezonans açısında absorplanmaktadır.

Kretschmann prizma yapısı, yüzey plazmon rezonans prizmalarının hazırlanmasında en sık kullanılan tasarımıdır. Şekil 2.6' da görüldüğü gibi, metal film yüzeyindeki yük yoğunluk salınımını uyaran ışık demetinin toplam iç kırılması ile oluşan kendiliğinden sönümlü dalga kullanıldığı bir yaklaşım vardır. Bu elektron salınımları, yüzey plazmonları olarak adlandırılmaktadır. Geçici alanın girişim derinliği ışığın dalga boyuna, ışığın geldiği ortam ile çevresinin kırınım açısı indekslerinin oranına ve fotonun parlaklığına bağlıdır. Enerji alanı yüzeyden uzaklaştıkça üstel olarak azalmaktadır. Bundan dolayı, girişim derinliği aniden düşmektedir.



Şekil 2.6. Dielektrik sınırlarda gerçekleşen toplam iç kırınım

Girişim derinliği aşağıdaki eşitlikle tanımlanmaktadır:

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{\eta_1^2 \sin^2 \theta - \eta_2^2}} \quad (2.1)$$

Burada;

- η_1 ve η_2 , birinci ve ikinci ortamın kırınım açısı indeksi,
- θ , ışığın metal yüzeye geliş açısıdır.

Metal yüzeye uygun p-polarize ışık, metal film ile birleşmek için prizmanın içerisine girer. Sadece p-polarize ışık plazmon oluşumuna sebep olmaktadır. Bunun nedeni sadece bu polarizasyonun metal film normaline uygun elektrik alan vektör salınımına sahip olmasıdır. Bu özellik, metal yüzeyindeki elektron plazmalarının transvers manyetik (TM) dalgası olarak adlandırılmaktadır [42, 43] Oysa s-polarize transvers elektrik (TE) polarizasyonu yüzey plazmonlarını oluşturamamaktadır. Çünkü s-polarize ışığın elektrik alan vektörü, metal filme paralel olarak oluşmaktadır. Salınımların dalga vektörü (K_{sp}) aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s}} \quad (2.2)$$

Burada;

- ω , salınımın frekansı,
- c , ışık hızı,
- ϵ_s , metal yüzeyine temas eden örnek ortamının dielektrik fonksiyonu,
- ϵ_m , metalin dielektrik fonksiyonudur.

Gelen ışığın bir bileşenine ait dalga vektörü aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

$$K_x = \frac{\omega}{c} \eta_p \sin \theta \quad (2.3)$$

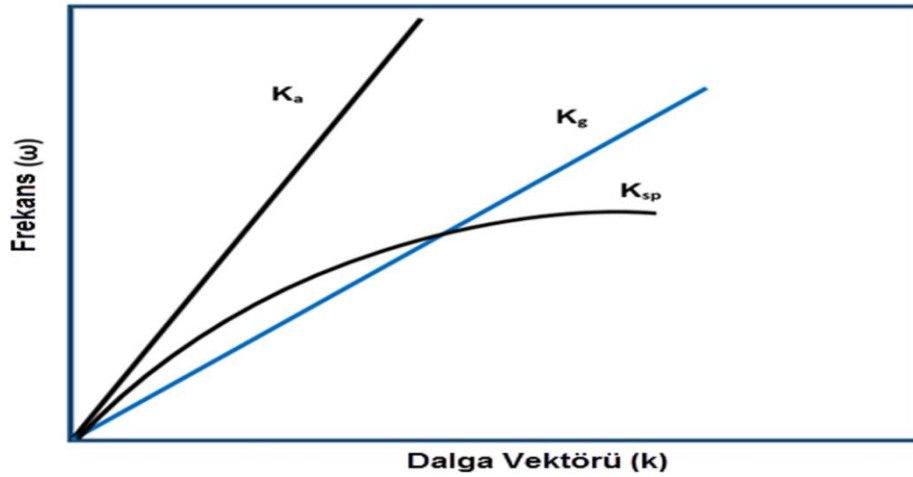
Burada;

➤ θ , ışığın metal film yüzeyine geliş açısı,

➤ η_p , prizmanın kırınım açısıdır.

Metal filmin üst yüzeyinde salınan ve toplanan yüzey plazmonları, p-polarize ışığı absorplar ve toplam iç kırınımına uğrayan ışığın parlaklığını (I_r) değiştirir. Bu nedenle, I_r 'e karşı geliş (veya kırınım) açısı (θ_r) grafiğe geçirildiğinde açısal parlaklık profili elde edilir. Bu profile ait grafikte, rezonans açısında keskin bir azalma gözlenir.

Bu olayın gerçekleşmesi, yüksek kırınım indeksine sahip bir prizma gerektirmektedir. Bu tip bir prizmaya gereksinim, havadaki ışık yayılması ile yüzey plazmonların üretilmemesinden kaynaklanmaktadır. Yüzey plazmon rezonans sırasında, gelen ışığın ve yüzey plazmonun dalga vektörleri eşit olmalıdır. Fakat Şekil 2.2'de görüldüğü gibi, ışığın havadaki ($K_a: \omega/c$) ve metalin plazmonundaki (K_{sp}) dağılma eğrisi kesişmemektedir. Bundan nedenle, dalga vektörü ve frekansı eşzamanlı olarak karşılaştırılmasına imkân yoktur. Bunun tersine; K_{sp} ve cam yüzeyin (K_g) dağılma eğrilerinin kesişmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılma eğrileri

Yüzey plazmon dalga vektörü, metal filme yakın bölgedeki ortamın kırınma indeksi ile ilişkilidir. Bundan dolayı, K_{sp} eşitliği şu şekilde basitleştirilebilir:

$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\eta_m^2 \eta_s^2}{\eta_m^2 + \eta_s^2}} \quad (2.4)$$

Bu formülde;

➤ η_m , metalin,

➤ η_s , örneğin kırınım indeksleridir.

Kompleks kırınım indeksi teriminin karmaşık bileşeni, absorbans ile ilişkilidir.

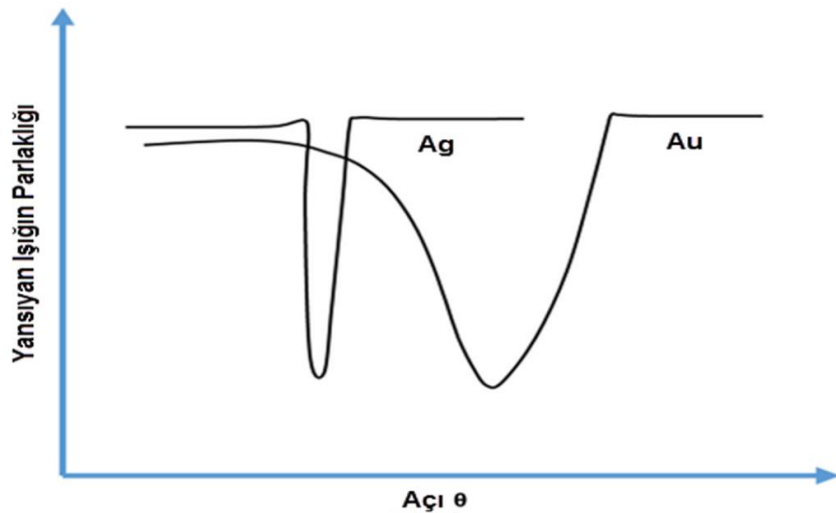
Yüzey plazmon rezonansın profili, seçilen metale göre değişiklik göstermektedir.

Çünkü her metal, dielektrik geçirgenlik gibi farklı özgül optik özelliklere sahiptir.

Şekil 2.8’ de altın ve gümüş film için, yansıyan ışığın parlaklığına karşı gelen ışığın açısını gösteren eğriler verilmiştir. Gümüş daha keskin bir rezonans pikine sahiptir.

Bu rezonans piki, metal filmdeki yüzey plazmon salınımlarının kendiliğinden azalması nedeniyle olmaktadır. Tüm yüzey plazmon metalleri, uyarılma ışığının elektrik alanının saçılmasına bağlı olarak bu salınımları azaltma eğilimindedir.

Birçok metal yüzey plazmon üretebilir. Yüzey plazmon rezonans için kullanılacak olan metal, uygun açılı ışıkla rezonansa girebilecek iletkenlik bandı elektronlarına ve sensör olarak kullanılabilmek için gerekli kimyasal modifikasyonlar için uygun özelliklere sahip olmalıdır. Altın belirtilen iki temel özelliğe birden sahip olan nadir metallerden biridir. Bu özelliklere sahip olan diğer metallere göre uygulaması oldukça kolaydır. Örnek olarak, indiyum gibi bazı elementler çok pahalıdır; sodyum gibi elementler oldukça reaktiftir; bakır, alüminyum gibi bazılarının yüzey plazmon cevapları çok geniştir veya gümüş gibi bazı elementler oksitlenmektedir [44].



Şekil 2.8. Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri [44]

SPR'nin analitik bir cihaz olarak kullanılması, plazmon alanı aralığındaki çevrenin kimyasal bileşimindeki değişimin sebep olduğu ışığın rezonans açısındaki

kaymanın ölçülmesine dayanmaktadır. Kimyasal bileşenlerdeki değişim absorplanan ışığın geliş açısında kaymaya neden olmaktadır. Açı kaymasının büyüklüğü, nicel olarak kimyasal değişimle ilgilidir. Bir sensörde, ince metal film üzerine substrat bağlanmış bir prizma (genel olarak cam ve plastik) üzerine uygulanır. Daha sonra özel bir analite (hormon, ilaç, tümör belirtici vb.) özgül moleküller metal film üzerine non-spesifik olarak adsorplanır. Sensöre analit içeren örnek uygulandığında gerçekleşen etkileşim (antibadi ve analit bağlanması gibi) gelen ışığın rezonans açısındaki kaymanın ölçüldüğü metal yüzeyindeki kimyasal bileşen değişimine neden olur. Rezonans açısındaki kaymanın boyutu, örnek içerisindeki analitin miktarı ile orantılıdır. Moleküller arasındaki ilişki oldukça özgül olduğundan dolayı diğer moleküller sensör tarafından ölçülememekte ve çapraz-reaktivite gözlenmemektedir.

2.2.2.4. SPR Nanosensörler

SPR temelli nanosensörler, herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan biyomoleküllerin etkileşimlerini ölçebilirler. Bu özellikleri nedeniyle, moleküler etkileşimlerin anlaşılması için bu cihazların önemi artmıştır. Etkileşimleri eş zamanlı, doğrudan ölçebilmek; kinetik, termodinamik parametrelerin, derişimin veya ligandlarla analitler arasındaki etkileşimlerin belirlenebilmesini sağlamaktadır. SPR temelli nanosensörlerin hızlı cevap süresi ve yüksek seçiciliği vardır.

Yüzey plazmon rezonans (SPR) nanosensörler, metal yüzeyinde biyo-tanımayı sağlayacak bölgelerin oluşturulmasıyla elde edilir. Biyo-tanımayı sağlamak için antibadiler [45] ya da nanopartiküller kullanılabilir [46]. Hedef molekülü içeren çözelti biyosensörle etkileştiğinde hedef molekül sensör yüzeyine bağlanır ve yüzeyin yoğunluğunun artmasına neden olur. Yüzeydeki yoğunluk artışı yüzeyin kırılma indisinin artmasına neden olur. Kırılma indisindeki bu artış ise rezonans açısının kayması ile sonuçlanır. Bu etki zamana bağlı olarak incelenirse bir sensorgram elde edilir. Yüzeye analit bağlanması ile rezonans açısı artmaktadır. Desorpsiyon çözeltisinin sisteme verilmesiyle analit, yüzeyden ayrılmaya başlar ve belli süre sonra sinyal tekrar eski seviyesine döner. SPR bazlı nanosensörlerin Pharmacia BIACore markası adı altında üretimi 1990 yılında yapılmıştır.

Yaşam bilimlerinde ve farmasötik çalışmalarda makromoleküllerin ve onların etkileşimlerinin araştırılması için SPR nanosensörlerden yararlanılmaktadır. Ayrıca SPR nanosensörler çevresel kirleticilerin tespitinde [47, 48, 29], gıda teknolojisinde [50, 51, 52], hastalıkların teşhisinde [53, 54, 55] kullanılmaktadır.

Su ve besinler bazlı oluşan bakterilerin tespiti için son zamanlarda oldukça fazla immunosensör çalışmalarının rapor edildiği görülmektedir [56, 57, 58]. Yüzey plazmon rezonan temelli biyosensörler bu tip tespiti yönelik hazırlanan immüsensörlerden biridir. Önemli zirai patojenlerden biri olan Phytophthora infestans'ın tespitine yönelik hazırlanan SPR temelli nanosensörde tespit sınırı 2.2×10^6 spor/mL olarak tespit edilmiştir [59]. Yapılan başka bir çalışmada 1×10^6 mL'de Salmonella Typhimurium'un varlığı tespit edilmiştir [60]. Mauriz ve arkadaşları SPR temelli taşınabilir immünosensör ile doğal su örneklerinden karbonil analizi yapmışlardır [61]. Ortalama 15 nm büyüklüğündeki kolloid altın nanopartiküllerle güçlendirilmiş SPR temelli biyosensör ile 7.5 dakika gibi kısa bir sürede 14 pg/ml derişiminde estrol-16-glusuronit tespiti sağlanmıştır [62]. Yapılan diğer bir çalışmada sudan profenofos tespiti için SPR temelli moleküler baskılanmış çok ince bir film tanıma elemanı olarak kullanılmıştır [63].

2.3. Moleküler Baskılama

Moleküler tanıma yaşam için oldukça önemlidir. Doğadaki moleküllerin birbirini tanıması, birçok bilim adamlarını onları taklit etme yönünde harekete geçirmiştir. Yapay reseptörlerin en önemli avantajlarından biri moleküler tasarımın serbest ve doğal oluşmasıdır. Yapılan çalışmalar sonucunda moleküler tanıma için aşağıdaki faktörlerin uygun olması gerektiği belirlenmiştir.

- ✓ Reseptör ve hedef molekülün fonksiyonel grupları birbirini tamamlayıcı olmalıdır.
- ✓ Her iki bileşimin konformasyonel serbestliği minimize edilmelidir.
- ✓ Kimyasal koşullar uygun bir şekilde ayarlanmalıdır.

Endüstride reseptörler tepkime karışımından hedef molekülleri ekonomik olarak ayırmak için kullanılmaktadır. Ürünlerin ayrılması ve saflaştırılması bazı durumlarda toplam üretim maliyetinin yarısından fazlasına karşılık gelmektedir. Yapay reseptörler, endüstriyel uygulamalarda bazı sakıncalara sahiptir. Bunlar;

daha az elde edilebilirlik ve büyük ölçekli uygulamalar için pahalı olmalarıdır. İkinci olarak, büyük moleküller için yapay reseptörlerin tasarımı zordur. Üçüncü olarak, kesin moleküler tanıma için bu yapay reseptörlerle uygun tepkime ortamını sağlamak zordur.

Moleküler baskılama yöntemi bu sorunlara en iyi şekilde cevap verebilmek amacıyla, reseptörleri verimli, hızlı ve ekonomik olarak oluşturmak için geliştirilmiştir.

Hedef molekül varlığında uygun fonksiyonel monomerlerin polimerleştirilmesiyle istenilen yapay reseptörler hazırlanabilir. Uygun monomerlerin, çapraz bağlayıcı ajanlarla birleşmesiyle hedef bağlanma bölgelerindeki kimyasal koşullar kolayca düzenlenebilir. Bu özellikler moleküler baskılama tekniğini cazip yöntemlerden birisi yapar. Büyüklüklerine bağlı olarak moleküler baskılanmış polimerler binlerce ya da milyonlarca bağlanma bölgelerine sahip iken biyolojik reseptörler bir veya birkaç bağlanma bölgesine sahiptir [64].

2.3.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi

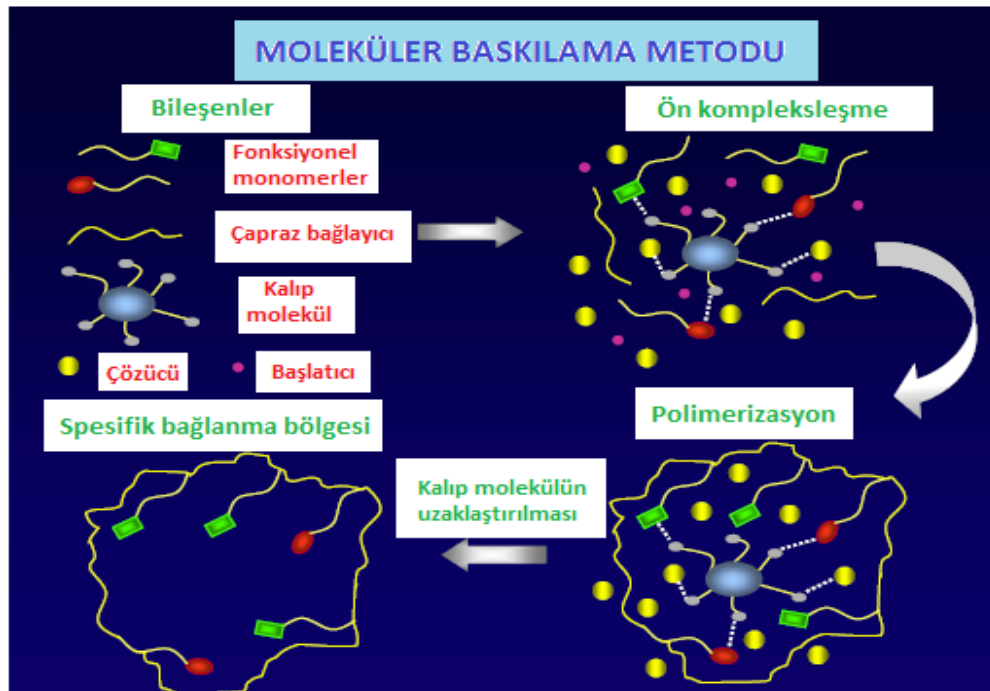
Moleküler baskılama, hedef molekül için seçici tanıma bölgelerine sahip polimerlerin hazırlanması için kullanılan bir tekniktir ve hedef molekül için yüksek seçiciliğe sahip olması bakımından da oldukça önemlidir. Moleküler baskılama tekniği ilk kez 1972 yılında Günter Wulff ve çalışma grubu tarafından tanımlanmış ve polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar istenilen enzim tepkimelerinin substratlarını, ürünlerini veya geçiş analoglarını kalıp molekül olarak kullanarak bu yöntemle “Yapay Enzim” elde edileceğini de göstermiştir [65]. Antibadi gibi biyoreseptörler, yüksek seçicilikleri nedeniyle spesifik antijenlerini saflaştırmada kullanılan popüler ligandlardır. Fakat yüksek seçiciliği olan bu biyolojik moleküller ortam koşullarından kolay etkilenir ve protein yapıları asidik şartlarda, yüksek sıcaklıklarda ya da proteolitik aktivite sonucunda bozunur. Antibadi/antijen ya da enzim/substrat gibi biyolojik sistemlerin tanıma mekanizmasını polimerik yapılara aktaran teknik “Moleküler Baskılama”dır [66].

Moleküler baskılanmış polimerler (MBP); moleküler tanımaya elverişlidir, ucuzdur ve kolayca hazırlanabilme avantajlarına sahiptir. MBP'ler yüksek mekanik özellikleri, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlamlıkları, asitler, bazlar, metal iyonları ve organik çözücüler gibi ortamlardaki yüksek kararlılıkları sebebiyle oldukça dayanıklıdır. Birkaç yıl boyunca performansında değişim olmaksızın saklanabilirler [67, 68]. Moleküler baskılama tekniği temel olarak 3 basamaktan oluşmaktadır;

1. basamak, önkomplesleşme: Uygun fonksiyonel gruba sahip polimerleşebilen monomer hedef analitle kovalent veya kovalent olmayan etkileşmelerle kompleks oluşturur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemlidir.

2. basamak, polimerizasyon: Monomer-analit kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcı ve başlatıcı kullanılarak fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

3. basamak, analit molekülün uzaklaştırılması: Uygun çözücü veya çözücü karışımları kullanılarak polimerik yapıdan analit uzaklaştırılır. Baskılanan molekülün polimerden uzaklaştırılması sonucunda polimerde baskılanan moleküle kimyasal ve topolojik olarak uygun seçici bellekler elde edilir. Bir karışımda baskılanan molekül polimere seçici olarak tekrar bağlanabilir. Şekil 2.9' da Moleküler Baskılama Tekniğinin basamakları gösterilmektedir.



Şekil 2.9. Moleküler baskılama tekniğinin basamakları [69]

Molekül baskılanmış kalıp moleküller sistemden çözücüyle çıkarıldıktan sonra kendilerine özgü boyut ve şekli tanımlama özellikleri dolayısıyla bu teknolojiye kalıp molekül olarak birçok farklı partikül ya da molekül kullanılabilir. Örneğin öğütülmüş net bir şekle sahip olmayan partiküller, düzgün şekilli partiküller, nanopartiküller, çelik kolondaki monolitler, kapiler kolondaki monolitler, açık boru kapilerdeki katmanlar, yüzeye tutturulmuş ince tabakalar, membranlar ve kompozitler moleküler baskılama tekniği ile tespit edilebilmektedir. Bu kadar geniş alandaki maddelerin tespit edilmesi dolayısıyla da moleküler baskılama tekniği ile ilgili çalışmaların karakterizasyon, optimizasyon ve sonuç aşamalarını içeren birçok bilimsel çalışma görmek mümkündür. Bu akademik çalışmalarda kiral tanıma [70, 71] ve kapiler elektrokromatografi (CEC) [72, 73, 74] geniş bir yer tutmaktadır. MIP teknolojisi ile membran, partikül ve monolit kullanımı gibi daha spesifik formlarla ilgili de bilimsel çalışmalar görülmektedir [75]. Yine MIP katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile zenginleştirilmede [76], ilaç salınım sistemlerinde [77], antibadiler için yapay enzim ya da reseptör [78, 79] olarak kullanılabilir. Bu çalışmalara ek olarak MIP teknolojisinde matrikse iletken polimerlerin sokulduğu farklı konularda da çeşitli çalışmalar yapılmıştır [80].

Moleküler baskılama işleminde; polimerizasyon için fonksiyonel monomer, analit, çapraz bağlayıcı, çözücü ve başlatıcı kullanılır. Etkili bir baskılama elde edebilmek için bu parametrelerin optimizasyonu önemlidir.

2.3.1.1. Kalıp (Hedef) Molekül

Kalıp molekül tespit etmek istediğimiz hedef madde olarak tanımlanabilir ve fonksiyonel monomerlerle kompleks oluşturmaktadır. Kalıp molekül konformasyonunun yapısı moleküler baskılama tekniğinin başarılı sonuç verebilmesinde ana etmenlerden birisi olduğundan dolayı bu yapıda meydana gelebilecek değişiklikler işlemin başarısını direk olarak etkileyebilmektedir [81]. Proteinler, karbonhidratlar, aminoasitler, koenzimler, pestisitler, hormonlar, ilaçlar, iyonlar ve nükleotid bazlar baskılanacak molekül olarak tercih edilebilmektedir [82].

2.3.1.2. Fonksiyonel Monomerler

Moleküler baskılama tekniğinde fonksiyonel monomerler bağlanma bölgelerinde gerçekleşen bağlanma etkileşimlerinin kalitesini belirlemektedir. Ek olarak, fonksiyonel monomer seçiminin önemini sistemden sökülen kalıp molekülün, sisteme geri bağlanış sürecindeki bağları da fonksiyonel monomerlerle yapması göstermektedir. Kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki bağlanma gruplarının uyuşması ile baskılama sürecinin ve çıktı olarak oluşan kompleksin kalitesi belirlenmektedir. Kovalent baskılamada, kalıp molekülün vinil gruplarına kovalent olarak bağlanır. Akrilik asit türevleri ve esterleri veya metakrilik asit en sık kullanılan monomerlerdir. Kovalent olmayan baskılamada, uygun fonksiyonel gruplara bağlı vinil monomerleri kullanılır.

2.3.1.3. Çapraz Bağlayıcılar

Kalıp molekülü uygun bir çapraz bağlayıcı seçimi MIP işlemi için çok önemli bir işlem basamağıdır. Çapraz bağlayıcıların varlığı sayesinde ihtiyaç duyulan miktarda kararlı bir molekül bütünü yaratılabilmektedir. Farklı çapraz bağlayıcıların kullanımı işlemde farklı bağlanma bölgelerinin aktifleşmesine ve farklı kararlılıktaki moleküllerin oluşumunu sağlamaktadır [83]. Çapraz bağlayıcının mol miktarının fazlalığı kalıp molekül ve fonksiyonel monomerlerle kurduğu etkileşimler moleküler baskılama etkinliğini direk olarak etkileyen parametrelerdendir [84].

2.3.1.4. Çözücü

MIP işleminde çözücülerin işlevi gözenek oluşturmak ve yeniden bağlanmaya uygun zemin hazırlamaktır.

Çözücünün seçimi baskılama türüne göre belirlenmektedir. Kovalent olmayan baskılamalarda çözücü seçimi daha fazla önem taşımaktadır [85]. Yapılan çalışmalarda polar özellik taşımayan organik çözücülerin, polar çözücülerin kullanıldığı sistemlere oranla daha yüksek seçiciliğe sahip olduğu rapor edilmiştir [86].

2.3.1.5. Başlatıcılar

Radikalik polimerizasyon, radikal başlatıcıların ısı bozunmasıyla başlatılabilir. Monomer ile kalıp molekül arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin çok zayıf olduğu durumlarda çok yüksek sıcaklıklara çıkılamaz. Düşük sıcaklıklarda etkili olan fotokimyasal başlatıcılar tercih edilir. Genellikle 2,2'-azobis(izobütironitril) (AIBN) ve 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ADVN) kullanılır. Bu koşullarda, ısı bozunma yerine UV bozunma tercih edilmektedir.

2.3.1.6. Sıcaklık

Monomer ile hedef molekül arasındaki denge basınç ve sıcaklıkla direk olarak bağlantılıdır [87]. MIP işlemlerinde etkileşimler için yeterli olmadığından düşük sıcaklık tercih edilmemektedir.

2.3.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan bağın çeşidine göre ikiye ayrılır. Kovalent ve kovalent olmayan baskılama.

2.3.2.1. Kovalent Baskılama

Ön organizasyonlu moleküler baskılama yaklaşımında, polimerizasyondan önce baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomerler arasında kuvvetli, tersinir bir kovalent düzenleme oluşur. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp oluşturmak amacıyla polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül baskılanmış polimerlerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşur [88, 89].

Avantajları:

Kararlılığı oldukça yüksektir [90]. Polimerizasyon ortamı istenildiği gibi tercih edilebilir.

Dezavantajları:

Konjugatın sentezlenmesi aşamasında problemler çıkmaktadır. Sistem ucuz değildir. Bağlanma kinetiği yavaş gerçekleşmektedir [91].

2.3.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama

Polimerizasyon öncesi non-kovalent bağ oluşur. Daha sonra hedef molekül sistemden uzaklaştırılır. Kalıp molekülü içeren polimerle etkileştiğinde sistem non-kovalent bağların tekrar oluşumu görülmektedir [92].

Avantajları:

Konjugat sentezine gerek yoktur. Kalıp molekülü istenildiğinde uzaklaştırmak daha kolaydır. Kalıp moleküldeki bağlanma kinetiğini hızlıdır [93].

Dezavantajları:

Polimerizasyon safhasındaki koşullar sınırlıdır. Fonksiyonel monomerler daha fazla kullanıldığından non-spesifik bağların oluşumu gözlenmektedir [94]. Bu yüzden seçiciliği azdır.

2.3.3. Protein Baskılama

1990'lı yıllardan bu yana çok sayıda farklı molekül, moleküler baskılama teknolojisi ile spesifik tanıma bölgelerinin elde edilmesi için kullanılmıştır. Bunlardan bazıları polipeptidler [95, 96], bakteriler [97], düşük moleküler ağırlıklı bileşikler [98, 99, 100] ve proteinlerdir [101, 102, 103]. Moleküler baskılama teknolojisi 20 yılı aşkın süreden beri kullanılmasına rağmen, proteinler gibi yüksek molekül ağırlığına sahip moleküllerin ve hatta hücrelerin kalıp molekül olarak kullanıldığı çalışma sayısı oldukça azdır. Bunun sebebi baskılanmak istenen protein moleküllerinin özellikleridir. Proteinler suda çözünen bileşiklerdir ve bu da polimer hazırlanması için organik çözücülerin kullanılmasını gerektiren moleküler baskılama tekniği ile tamamen uyumsuzdur. İkincisi ise proteinlerin sıcaklık ve pH gibi değişimlerden kolayca etkilenen esnek bir yapı ve konformasyona sahip olmasıdır. Termodinamik ve pratik açılardan bakıldığında da bu özelliklere sahip bir molekül için moleküler baskılama işlemini gerçekleştirmek zordur. Üçüncüsü de proteinlerin, fonksiyonel monomerler ile etkileşebilecek çok sayıda fonksiyonel grup içermesidir. Baskılama işleminin belirlenmesinde baskılanması istenen proteinlere uygun koşulların seçilmesi gerekmektedir.

2.3.3.1. Protein Baskılamada Kullanılan Yaklaşımlar

Proteinlerin baskılanmasına ilişkin yaklaşımlar proteinin baskılamaya dahil edilen kısmına göre (protein molekülünün tamamı, belli bir bölgesi ya da protein üzerindeki belli bir epitop) genel olarak üç başlık altında incelenebilir;

- (1) Kütle (Yığın) polimerizasyonu ile baskılama
- (2) Epitop yaklaşımı
- (3) Yüzey baskılama

Üç boyutlu (3D) baskılama metodu olarak adlandırılan kütle polimerizasyonu ile baskılama metodunda protein bir bütün olarak üç boyutlu yapısıyla polimer matriksin içerisinde baskılanmakta ve fonksiyonel monomerler ile bir bütün olarak etkileşmektedir. Proteinin geri bağlanması da bu şekilde gerçekleşmektedir. Yüzey baskılamada ise baskılama ve tanıma üç boyutlu yapının tamamı ile değil proteinin belli bir bölgesi ile kısmen gerçekleşmekte ve tanıma bölgeleri moleküler baskılanmış polimerin yüzeyinde ya da yüzeyine yakın bölgede yer almaktadır. Yüzey baskılama yöntemi iki boyutlu (2D) baskılama yöntemi olarak adlandırılan baskılama yöntemleri arasında yer almaktadır.

Proteinin küçük bir epitopunun baskılanmasıyla gerçekleşen yaklaşım ise epitop yaklaşımıdır ve elde edilen moleküler baskılanmış polimer proteini baskılanan bu epitop sayesinde tanıyabilmektedir. Bu yaklaşım da yine 2D baskılama metodları arasında yer almaktadır.

2.3.3.1.1. Yüzey Baskılama

Kütle polimerizasyonu ile baskılama tekniğinin büyük moleküller olan proteinler için kullanımı sınırlıdır. Alternatif yaklaşımlardan biri polimerleri ince filmler şeklinde hazırlamak ya da bir destek yüzeyine tutturma [104]. Yüzey baskılamada temel strateji bağlanma bölgelerinin yüzeyde ya da yüzeye yakın bölgelerde oluşturulmasıdır. Bu sayede protein moleküllerinin kolayca bağlanma bölgelerine ulaşması sağlanmaktadır. Fakat bununla birlikte bu yaklaşım ile hazırlanan moleküler baskılanmış polimerlerde protein yüzeyinin belli bir bölümü baskılandığından seçicilik düşük olabilir. Aynı zamanda heterojen bağlanma bölgelerinin oluşma olasılığı yüksektir. Yüksek kütle transferi, sensör platformları ile entegrasyon ve sağlamlık gibi avantajlar ise bu yaklaşımı protein baskılamada

klasik kütle polimerizasyonuna göre daha fazla tercih edilen bir metod haline getirmiştir. Bu avantajlar ve son zamanlarda yüzey kimyasına olan artan ilgi nedeniyle yüzey baskılama metodu ile protein baskılanmasına ilişkin araştırma sayısı artmaktadır.

2.3.4. Nanopartiküller

Geleneksel baskılanmış MIP'lere küçük partiküllerin elde edilmesi için öğütme işlemi uygulanmalıdır. Son zamanlarda yüksek verimi, boyutunun ve boyut dağılımının kolay kontrol edilebilmesi nedeniyle MIP nanopartiküllerin hazırlanması, araştırmacıların ilgi odağı olmuştur [105, 106, 107, 108]. Li ve arkadaşları MIP nanopartiküllerin sentezinde kullanılabilecek bir çeşit blok kopolimer tasarlamışlardır. Fonksiyonel gruplara sahip bloklardan biri, kalıp molekül ile hidrojen bağı etkileşimini ve eşzamanlı mikromisel oluşumunu sağlarken, polimerleşebilen grupları içeren diğer blok, düzgün nanopartiküllerin oluşumunda çapraz bağlama ajanının görevini üstlenmektedir.

Sonuçlar, nanopartiküllerin boyut ve biçiminin baskılama verimi için oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Daha küçük boyutlu olmalarından dolayı MIP nanopartiküller, daha yüksek afinite, seçicilik ve bağlanma bölgelerine erişim kolaylığı sağlamaktadır. MIP nanopartiküllerin (100 nm), normal partiküllerden (5 µm) tam 2.5 kat daha fazla bağlanma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Tan ve arkadaşları miniemulsiyon polimerizasyonu ile yaklaşık 40 nm boyutunda ribonukleaz A (RNase A), sığır serum albümini (BSA) ve lizozim (Lys) yüze baskılanmış nanopartiküller sentezlemişler ve bunların seçicilik ve tekrar kullanılabilirliklerini incelemişlerdir. Hazırlanan baskılanmış nanopartiküllerin hedef moleküllere karşı yüksek seçicilik göstermişlerdir. Bu yüksek seçiciliğin nedeni ise yüzey arttırıcı moleküller ile proteinler arasındaki etkileşim olduğu belirtmişlerdir.

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Maddeler

İnsan serum albümin (HSA), hemoglobin(Hb), transferrin, L- lösin metilester, metakroil 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES), etilenglikol dimetakrilat (EDMA), poli(vinil alkol) (PVA), sodyum dodesil sülfat (SDS), hidroklorik asit (HCl), Sigma firmasından (St. Louis, ABD), disodyum hidrojenfosfat, sodyum dihidrojenfosfat, sodyum hidroksit, etanol, hidrojen peroksit, nitrik asit, glutaraldehit (GA), Azoizobutironitril (AIBN), Merck firmasından A.G. (Darmstadt, Almanya), sodyum klorür, sülfirik asit Fluka firmasından A.G. (Buchs, İsviçre) elde edilmiştir. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18.2 M/cm'dir. Deneylerde kullanılan cam malzemeler bir gece boyunca 4 M nitrik asitte bekletilmiş ve tozsuz ortamda kurutulmuştur.

3.2. MALM monomerinin Sentezi

N-Metakriloil-(L)-Lösin metil ester (MALM) monomerinin sentezi kısaca şöyledir: L- Lösin metil ester (5.0 g) ve hidrokinon (0.2 g) diklorometan (CH_2Cl_2) (100 mL) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'a soğutulmuştur. Trietilamin (12.7 g) bu çözeltiye ilave edilmiştir. Metakroil klorür (5.0 mL) yavaşça bu çözeltinin üzerine dökülmüştür. Reaksiyon karışımı azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda reaksiyona girmeyen metakroil klorür, %10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MALM) etanolde çözülmüştür [109].

3.2.1. MALM monomerinin Karakterizasyonu

3.2.1.1. FTIR-ATR Analizi

MALM monomerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Peklin Elmer, Spectrum 100, Waltham, MA, ABD) kullanıldı.

3.2.1.2. NMR Analizi

MALM monomerinin proton NMR spektrumu, CDCl_3 içerisinde JEOL GX-400 300 MHz (Japonya) NMR cihazı kullanılarak alınmıştır. Kimyasal kaymalar ppm cinsinden CDCl_3 referans alınarak rapor edilmiştir. İnsan serum albumin baskılanmış yüzey plazmon rezonans nanosensörün hazırlanması iki farklı yöntem ile yapılmıştır.

1. Mikro-temas yöntemi ile HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensörlerin hazırlanması
2. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) sentezleyerek ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin sentezlenmesiyle nanosensörlerin hazırlanması

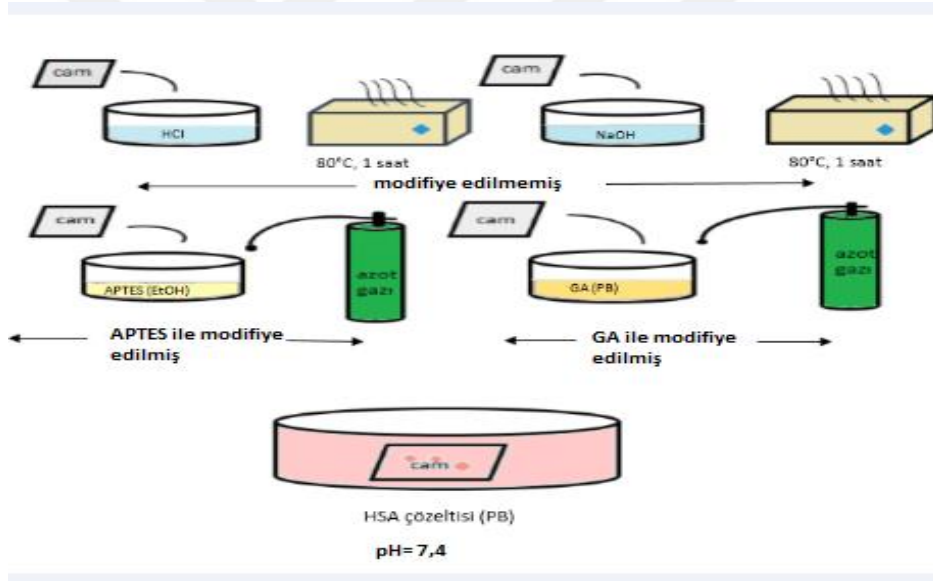
3.3. Mikro-temas Yöntemiyle HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) SPR Nanosensörlerin Hazırlanması

3.3.1. Cam Slaytların Yüzey Modifikasyonu ve Protein Kalıbının Hazırlanması

Kalınlığı 1 mm olan 2,5 cmx7,5 cm boyutlarındaki cam slaytların temizlenmesi şu şekildedir; Cam slaytlar petri kabında sıvı hacimleri 20 mL/slayt olacak şekilde etanol ile 20 dakika ultrasonik banyoda bekletildi, deiyonize su ile yıkandı ve ardından 80°C de etüvde kurutuldu. Hazırlanan hidroklorik asit çözeltisi ile aynı şekilde muamele edildi ve ardından üç defa deiyonize su ile yıkandı. Aynı işlem hazırlanan sodyum hidroksit çözeltisi ile tekrarlandı. Son olarak cam slaytlar 10 dakika $\text{N}_2(\text{g})$ 'ı ile kurutularak modifiye edilmeye hazır duruma getirildi.

Protein kalıbının hazırlanması için HSA cam yüzeyine kovalent olarak immobilize edildi. Bu amaçla ilk olarak temizlenmiş olan cam slaytlar oda sıcaklığında 30 dakika süre ile $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:3) (v/v) karışımında bekletildi. Ardından saf su ile 3 kez yıkanarak 80°C 'da vakum etüvünde 2 saat kurutuldu. Kurutulan cam slaytlar etanol ile hazırlanmış %5 (v/v) APTES (3-aminopropil-trietoksisilan) çözeltisine daldırılarak çalkalamalı su banyosunda oda sıcaklığında 2 saat 60 rpm' de çalkalamaya bırakıldı ve böylelikle aminogruplarının cam yüzeyine takılması sağlandı. Bu süre sonunda cam slaytlar etanol ve damıtık su ile 3'er kez yıkanarak $\text{N}_2(\text{g})$ 'ı ile 10 dakika kurutuldu. APTES ile modifiye edilmiş cam slaytlar pH 7,4

fosfat tamponu ile hazırlanmış %2,5 (v/v) GA çözeltisine daldırılarak çalkalama su banyosunda oda sıcaklığında 2 saat 60 rpm' de çalkalamaya bırakıldı ve böylelikle amino grupları aktifleştirildi. Ardından cam slaytlar pH 7,4 fosfat tamponu ile 3 kez yıkandı. Daha sonra saf su ile yıkandı ve $N_2(g)$ 'ı ile 10 dakika kurutuldu. Elde edilen modifiye camlar 15 μmol içeren 500 μL HSA çözeltisi kalıp molekülün fonksiyonel monomere oranı 1:10 olacak şekilde 10 mL 0,1 g/mL HSA çözeltisine daldırılarak 24 saat süre ile $+4^\circ\text{C}$ 'de bekletildi. Elde edilen HSA kalıbı cam slaytlar pH 7,4 tamponu ile 3 kez yıkanarak reaksiyona girmeyen HSA uzaklaştırıldı. Hazırlanan slaytlar $N_2(g)$ 'ı ile 10 dakika kurutularak HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) filmin hazırlanmasında protein kalıbı olarak kullanıldı. Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) filmin hazırlanmasında ise APTES ve glutaraldehit ile modifiye edilen cam slaytlar sadece pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde bekletildi ve kurutulduktan sonra kullanıldı.



Şekil 3.1. Cam slaytların yüzey modifikasyonu ve protein kalıbının hazırlanması

3.3.2. Cam slaytların Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.2.1. Temas Açısı Analizi

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) filmlerinin su ile yaptığı temas açısı belirlendi. Temas açısı ölçümlerinde Phoenix 300 (Kore) cihazı kullanıldı. Temas açısı ölçümünde yapışık damla (Sessile Drop) yönteminden yararlanıldı. Bu yöntemle analizi yapılmak istenen yüzeyler üzerine 1

damla su damlatılarak her birinin temas açısı ölçüldü. Ölçümlerde yüzeylerin farklı bölgelerine su damlatmak suretiyle 20 ayrı fotoğraf çekildi ve her biri için ayrı temas açısı belirlendi. Temas açısı ölçümlerinde Phoenix cihazı ile birlikte verilen ImageXP yazılımı kullanıldı. Bu yazılımda temas açı değerleri damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı dikkate alınarak belirlenmektedir. Her bir yüzey için belirlenen temas açısı 10 ölçümün ortalama değeridir.

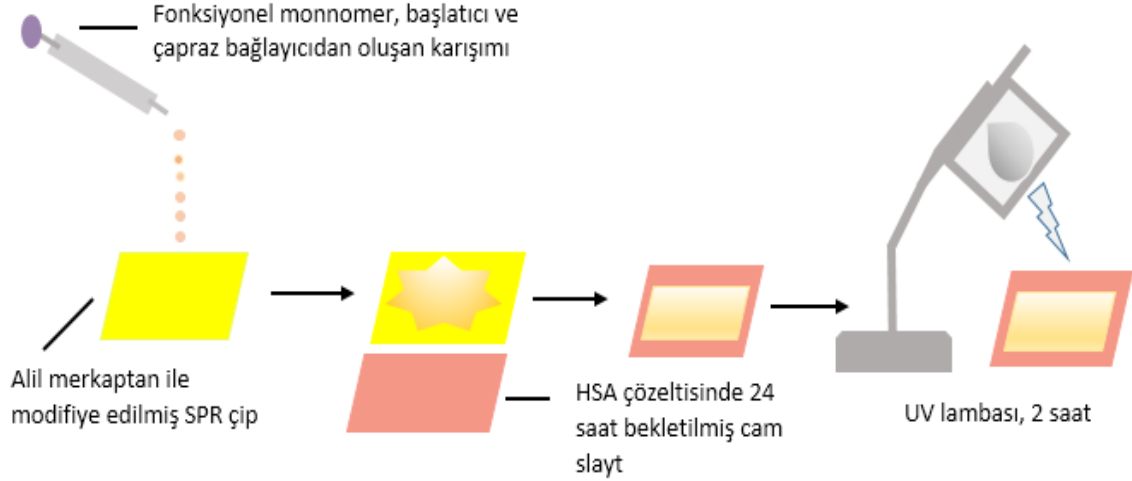
3.3.3. SPR Altın Çip Yüzeylerinin Modifikasyonu

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensörünün hazırlanmasında GWC SPRImager II sistemine uygun 2,5 cmx2,5 cm boyutlarındaki altın kaplı çip (SPRchip™) kullanıldı. Bu çipler SF10 cam üzerine 2 nm titanyum ve 42,5 nm altın kaplama içermekte ve firmadan hazır olarak temin edilebilmektedir. Modifikasyon öncesi altın yüzey asidik pirana çözeltisi (3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂) ile temizlendi. Altın kaplı çip yüzeyleri allil merkaptan (CH₂=CH-CH₂SH) kullanılarak 24 saat modifiye edildi. Böylelikle polimerizasyonun altın yüzeyinde gerçekleşmesi için gerekli doymamış bağlar oluşturuldu.

3.3.4. SPR Sensör Yüzeyinde HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Filmlerin Sentezi

Allil merkaptan bulunan tiyoller (R-SH) Au(111) substratlar üzerinde mükemmel kendiliğinden oluşumlu tek tabaka (SAM; Self-Assembled Monolayer) oluştururlar. Uç grup altın yüzeyinde kuvvetli ve istemli bir şekilde adsorbe olur. Daha sonra moleküller zincir-zincir etkileşimleri ile tekrar kendi aralarında organize olarak yüzeyde yoğun ve düzenli bir tabaka oluştururlar. Bu düzenlenmede kuyruk kısmında yer alan doymamış grup dışa doğru yönelmektedir. Bu şekilde Allil merkaptan ile modifiye edilmiş yüzey plazmon rezonans altın çip yüzeyinde HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) polimerinin hazırlanması için ilk olarak HSA ile etkileşime girebilecek olan fonksiyonel MALM monomeri (77 µL) ile çapraz bağlayıcı EDMA monomeri (28 µL) 2 saat süreyle oda koşullarında karıştırılarak stok monomer karışımı hazırlandı. Daha sonra bu karışım içerisine 1 mg azobisisobütironitril (AIBN) eklenerek polimerizasyon karışımı hazırlandı.

Reaksiyon karışımından azot gazı geçirilerek çözünmüş haldeki oksijen ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra reaksiyon karışımından 20 µL numune alındı ve daha önceden allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR sensör çip yüzeyine damlatılarak lam üzerinde hazırlanan kalıp protein olarak kullanılan HSA' nın baskılanması gerçekleştirildi. Polimerizasyon hazırlanan preparatın UV ışığı (100 W, 356 nm, UVP B100-AP High Intensity UV-lamp) altında 2 saat bekletilmesi suretiyle gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. SPR çip yüzeyinde HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) filminin hazırlanması

Polimerizasyon işleminden sonra protein kalıbı yüzey plazmon rezonans çip yüzeyinden ayrıldı. Polimer kaplanmış yüzey plazmon rezonans çipler önce deiyonize su/etanol ardından ve vakum etüvünde kurutuldu. Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) filmin hazırlanmasında ise APTES ve glutaraldehit ile modifiye edilmiş cam slayt HSA çözeltisi yerine pH 7,4 fosfat tamponunda bekletildi ve kurutulduktan sonra yukarıda anlatıldığı şekilde kullanıldı.

Uygun polimerizasyon karışımının belirlenmesi için MALM:HSA oranı 1:1, 1:5, 1:10, 1:20 şeklinde değiştirilerek MALM-HSA oranının UV ile optimizasyonu yapılmıştır. HSA baskılanmış (MIP-HSA) ve baskılanmamış (NIP) PEDMALM filmler hazırlandı ve 300 nM HSA çözeltisi kullanılarak baskılama faktörü (% Δ RMIP-HSA/ % Δ RNIP) hesaplandı.

3.3.5. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) SPR Nanosensörlerin Yüzey Karakterizasyonu

3.3.5.1. FTIR-ATR Analizi

HSA baskılanmış ve baskılanmamış yüzey plazmon rezonans çiplerin yüzeylerinin ve kalıp proteinin hazırlanma aşamalarının karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Peklin Elmer, Spectrum 100, Waltham, MA, ABD) kullanıldı. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) kaplanmış SPR nanosensör çipler ve lamalar cihazın örnek yuvasına yerleştirildi ve 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçüldü.

3.3.5.2. Temas Açısı Analizi

Yüzeyinde HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] ve baskılanmamış [PEDMALM] nanosensör film yüzeylerinin ıslanabilirlik özelliklerinin incelenmesi amacıyla bu yüzeylerin su ile yaptıkları temas açıları ölçülmüştür.

3.3.5.3. AFM Analizi

HSA baskılanmış ve baskılanmamış altın çiplerin yüzeylerinin karakterizasyonu için yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanıldı. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı degen modda gerçekleştirildi. Salınım rezonans frekansı, 341.30 Hz olarak uygulandı. Titreşim genliği, 1 VRMS ve boş titreşim genliği ise 2 VRMS'dir. Örneklerden 2 $\mu\text{m/s}$ tarama hızında, 256x256 piksel çözünürlükte, 2x2 μm^2 ' lik alanların görüntüsü alındı.

3.3.5.4. Elipsometre

HSA baskılanmış ve baskılanmamış altın çiplerin yüzeyindeki kalınlık ölçümleri Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile yapıldı. Kalınlık

ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 62 derecelik bir geliş açısında gerçekleştirildi. Yüzeyinde polimerik film içeren altın çip lazer ışık kaynağı altına yerleştirildi. Yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 cam + 2 nm titanyum katmanı + 42,5 nm altın katmanı veri olarak öngörüldü. Ölçümler sensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlandı ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edildi.

3.3.6. SPR Sisteminin Analiz İçin Hazırlanması

Hazırlanan HSA baskılanmış ve baskılanmamış altın çipler ile kinetik analizler yüzey plazmon rezonans sistemi SPRimager II (GWC Technologies, Madison, ABD) ile gerçekleştirildi. Sensorgramların elde edilmesinde sistem ile birlikte sağlanan Digital Optics V++ görüntüleme yazılımı ve bu yazılımla birlikte çalışan Microsoft Excel programı kullanıldı.

GWC SPRimager II cihazında yüzey plazmon rezonans etkisi yüzey plazmon rezonans açısına yakın sabit bir açıda uyarılmış olan örnekten yansıyan ışığın ölçülmesi prensibine göre çalışmaktadır. SPRimager II sisteminde ışığın dalga boyu (800 nm) ve geliş açısı (40°–70°) sabittir. Cihaz ışık kaynağı, kutuplayıcı, örnek hücresi, dar band filtresi, çip yüzeyindeki tüm optik alanı yakalayabilen CCD kameradan oluşan bir dedektör ve sıcaklık değişimini önlemek için bir sıcaklık sensörü içermektedir. Koşutlanmış polikromatik bir kaynaktan gelen ışık yüzey plazmon rezonans açısına yakın bir bölgedeki açıda bir polarizörden (kutuplayıcı) geçerek prizma/ince altın film/örnek üçlüsünün beraberce oluşturduğu örnek hücresine çarpmaktadır. Işık, prizma/altın arayüzeyi ile etkileşerek yansıyan ışığın şiddetindeki azalmaya neden olan yüzey plazmonlarını oluşturur. Örnekten yansıyan ışık sadece dedektörün algılayabileceği aralığa denk gelen dar bir band aralığındaki ışığın geçişine izin veren bir filtreden geçer ve bu sayede yansıyan ışığın şiddeti ölçülür.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] ve baskılanmamış [PEDMALM] nanosensörler ile kinetik analizler yapılabilmesi için hazırlanan nanosensörlerin yüzeyi akış hücresi yönünde olacak şekilde örnek tutucuya yerleştirildi ve üzerine kırılma indisi eşitleyici sıvı (kırılma indisi: $1,720 \pm 0,0005$, Cargille Laboratories series M fluid) damlatılarak üzerine prizma yerleştirildi. Bu sayede SF-10 cam prizma ile altın çip arasındaki bağlantı sağlanmış oldu. Ardından akış hücresi, giriş ve çıkış uçlarında

örnek tutucuya eklenerek örnek hücresi hazırlandı ve kinetik analizlerin gerçekleştirilmesi için cihaza yerleştirildi. Sıcaklık sensörü kullanılarak sıcaklık 25°C'a sabitlendi ve tüm sensorgramlar bu sıcaklıkta alındı.

3.3.6.1. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Sensorgram Alınması

Örnek hücresi hazırlanarak cihaza yerleştirildi. İlk olarak sisteme pH 7,4 fosfat tamponu gönderilerek çip üzerindeki polimer yüzeyinin ıslanması sağlandı ve yüzeyden 150 µL/dakika hızında 30 dakika süre ile pH 7,4 tamponu geçirilmeye devam edildi. Daha sonra geliş açısı yüzey plazmon rezonans açısına yakın bir açıya sabitlenerek sensorgram alınmaya başlandı. Sistemden ilk olarak pH 7,4 tamponu yaklaşık 3 dakika geçirildi ve ardından analizi yapılacak olan çözelti (HSA içeren sulu çözelti, yarışmacı protein çözeltileri ya da plazma örnekleri) nanosensör yüzeyine yaklaşık 10 dakika gönderilerek yansıyan ışığın şiddetindeki değişim değerleri anlık olarak gözlendi. Sistemin denge durumuna gelmesinin ardından yüzeye yaklaşık 2 dakika 0,05 M NaCl karışımı verilerek desorpsiyon işlemi gerçekleştirildi. Desorpsiyon işlemi 10 dakika daha sürdükten sonra, nanosensör yüzeyi 10 dakika su ve tekrar dengeye gelene kadar 10 dakika pH 7,4 tamponu ile yıkanarak rejenere edildi. Ardından cihazla birlikte verilen yazılımlar kullanılarak sensorgram elde edildi.

3.3.7. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Kinetik Analizler

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensörler için kalibrasyon eğrisinin hazırlanması amacıyla farklı derişimlerdeki HSA çözeltileri sensör yüzeyine gönderildi. Bu çözeltiler 1,5 ile 300 nM derişim aralığında pH 7,4 fosfat tamponuyla hazırlandı ve her bir derişim değerine ait sensorgram alınarak %ΔR değerleri belirlendi.

3.3.8. Yarışmalı Kinetik Analizler

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR sensörün seçiciliğini göstermek için hemoglobin ve transferrin proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler yüzey plazmon sistemine gönderilerek yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları

gerçekleştirildi. Bu çözeltiler, pH 7,4 tamponunda 300 nM derişiminde hazırlandı ve çip yüzeyine gönderilerek sensorgramlar alındı.

3.3.9. Seçicilik Çalışmaları

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün seçiciliğini göstermek için HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensörde hazırlanmıştır. HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) SPR sensör yüzeyine hemoglobin ve transferrin protein çözeltileri gönderilerek seçicilik çalışmaları yapıldı. Bu çözeltiler, pH 7,4 tamponunda 300 nM derişiminde hazırlandı ve çip yüzeyine gönderilerek sensorgramlar alındı.

3.3.10. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Çalışmaları

Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] yüzey plazmon rezonans sensörün gerçek örnekler ile kullanılabilirliğinin ve mevcut yöntemler ile uyumluluğunun araştırılabilmesi için yapay plazma ve idrar örnekleri ile çalışıldı. Yapay plazma, 1 ml saf su ile çözüldü ardından $1:1 \times 10^3$, $1:2 \times 10^3$, $1:3 \times 10^3$ oranlarında seyreltilerek (pH 7,4 fosfat tamponu) örnekler hazırlandı ve nanosensör yüzeyine gönderilerek sensorgramlar alındı. İdrar çalışmaları ise idrar içerisine farklı derişimlerdeki HSA çözeltisi spike edilerek yapıldı. Bu şekilde hazırlanan yapay idrar örnekleri sensör yüzeyine gönderilerek sensorgramlar alındı ve daha önce yapılan kinetik çalışmalar ile uyumluluğuna bakıldı.

3.3.11. Tekrar Kullanılabilirlik ve Kararlılık Çalışmaları

Mikro-temas yöntemiyle hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensörlerin performanslarını belirlemek amacıyla 5 kez ardarda örnek verildi ve sensorgram alındı bu şekilde tekrar kullanılabilirlik çalışması gerçekleştirildi. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün, kararlılık çalışması için aynı nanosensör 3 aylık periyotlarla toplamda 3 kez 4 tekrarlı HSA analizi için kullanılmış ve SPR nanosensörün kararlılığı gösterilmiştir.

3.4. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle Nanosensörlerin Hazırlanması

3.4.1. Nanopartiküllerin Sentezi

Hedeflenen derişim aralığına inmek amacıyla çalışmanın ikinci kısmında HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküller iki fazlı miniemülsiyon polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Baskılanan HSA derişiminin HSA' nın SPR ile tayinine etkisini incelemek için 5:1, 10:1, 20:1 oranındaki MALM:HSA kompleksleriyle hazırlanan nanofilim ve nanopartiküller ile HSA ölçümü gerçekleştirilmiştir.

HSA baskılanmış nanopartiküllerin hazırlanmasında aşağıdaki yöntem izlenmiştir;

Faz I; PVA (95 mg), SDS (15 mg) ve NaHCO₃'ün (12 mg) 5.0 mL deiyonize su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Faz II; PVA (50 mg) ve SDS'in (50 mg) 100 mL deiyonize suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. MALM:HSA ön-kompleksi (10:1 µmol) olacak şekilde 500 mikrolitre HSA çözeltisi karıştırılarak ön-kompleks oluşturularak monomerin çapraz bağlayıcıya oranı (1:30 µmol) olacak şekilde çapraz bağlayıcı EDMA'dan 850 µl alınarak eklenerek yağ fazı elde edilmiştir. Yağ fazı faz I'e yavaşça eklenmiştir. Karışım, 25.000 rpm de homojenizatörde (T10, Ika Labortechnik, Almanya) homojenize edildikten sonra Faz II ile karıştırılmıştır. Sodyum bisülfat (50 mg) ve amonyum persülfat (100 mg) başlatıcısının eklenmesinden sonra polimerizasyon işlemi 40°C de 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen HSA baskılanmış nanopartiküller 5 kez deiyonize su, 5 kez etil alkol ve tekrar deiyonize su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen monomer, yüzey aktif madde ve başlatıcı uzaklaştırılmıştır. Her bir yıkama basamağı için çözelti 25.000 rpm'de 1 saat süreyle santrifüj edilmiş (Allegra-64R BeckmanCoulter, ABD) ve nanopartiküller yıkama ortamından ayrılmıştır. Temizlenen nanopartiküller, deiyonize su içerisinde tekrar dağıtılmış ve 4°C'de saklanmıştır. Kontrol deneyleri için HSA baskılanmadan nanopartiküller aynı koşullarda sentezlenmiştir.

3.4.2. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.4.2.1. Zeta Boyut Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin boyut analizi, Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile belirlenmiştir. Zeta boyut analizi, ışık saçılması tekniği ile ölçüm yapan nanopartiküllerin hidrodinamik boyutu (0.6 nm-6.0 µm aralığında), zeta potansiyeli (maksimum iletkenlik 200 mS) ve molekül ağırlığının (1×10^3 – 2×10^7 aralığında) tayinine olanak sağlayan bir sistemdir. Zeta boyut analizi için izlenen deneysel yöntem şu şekildedir: nanopartikül çözeltisi (3 ml) nanoboyut analizörünün örnek yuvasına yerleştirilmiştir. Işık saçılması 90°'lik geliş açısında 25°C'da tayin edilmiştir. Veri analizi için, deiyonize suyun yoğunluğu (0.88 mPa.s) ve kırınma indeksi (1.33) kullanılmıştır. Işık saçılma sinyali birim saniyedeki partikül sayısı (partikül sayısı/s) olarak hesaplanmıştır. Ölçümler, 3 kere tekrarlanmış ve sonuçlar zeta boyut analizörünün yazılımı ile incelenmiş ve standart sapma değerleri ile birlikte rapor edilmiştir.

3.4.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

As-IIP nanopartiküllerin yüzey ve yığın yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) (JEOL, JEM 1200 EX, Tokyo, Japonya) ile incelenmiştir. SEM öncesi As-IIP nanopartiküller ilk olarak -20°C'de dondurulmuş ve liyofilizatörde (Chris Alpha 1-2 LD plus, M Christ GmbH, Almanya) kurutulmuştur. Liyofilizatörden alınan nanopartikül örneği SEM fotoğraflarının alınması amacı ile iletken bir yapıştırıcı ile SEM örnek plakası üzerine tutturulmuştur. Daha sonra örnek yüzeyi vakum altında 50 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanarak yüzey iletken hale getirilmiş ve çeşitli büyütme oranlarında görüntüleri alınmıştır.

3.4.3. Yüzey Plazmon Rezonans Sensör Yüzeyine HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] Nanopartiküllerin Tutturulması

GWC SPRImager II sistemine uygun 2,5 cmx2,5 cm boyutlarındaki altın kaplı çip (SPRchipTM) kullanıldı. Bu çipler SF10 cam üzerine 2 nm titanyum ve 42,5 nm altın kaplama içermekte ve firmadan hazır olarak temin edilebilmektedir.

Modifikasyon öncesi altın yüzey asidik pirana çözeltisi (3:1 (v/v) H₂SO₄:H₂O₂) ile temizlendi. Altın kaplı çip yüzeyleri allil merkaptan (CH₂=CH-CH₂SH) kullanılarak 24 saat modifiye edildi. Böylelikle polimerizasyonun altın yüzeyinde gerçekleşmesi için gerekli doymamış bağlar oluşturuldu.

Etil alkol ile temizlenerek vakumlu etüvde kurutulan SPR altın çip yüzeyine sentezlenen HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin 100 kat seyreltilmiş çözeltisinden 5 µl damlatılarak UV ışık altında 2 saat bekletilmesiyle nanopartiküllerin çip yüzeyine tutturulması sağlanmıştır. Hazırlanan nanosensörlerin 500 nM HSA çözeltisi kullanılarak baskılama faktörü (%ΔRMIP-HSA/ %ΔRNIP) hesaplandı.

3.4.4. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle Hazırlanan Nanosensörlerin Karakterizasyonu

3.4.4.1. FTIR-ATR Analizi

HSA baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküller ile hazırlanan yüzey plazmon rezonans çiplerin yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Peklin Elmer, Spectrum 100, Waltham, MA, ABD) kullanıldı. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) ile hazırlanan nanosensörler cihazın örnek yuvasına yerleştirildi ve 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçüldü.

3.4.4.2. Temas Açısı Analizi

HSA baskılanmış ve baskılanmamış nanopartikül ile yüzeyinde film hazırlanmış altın yüzeylerin ıslanabilirlik özelliklerinin incelenmesi amacıyla bu yüzeylerin su ile yaptıkları temas açıları ölçülmüştür.

3.4.4.3. AFM Analizi

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküller ile nanosensörlerin karakterizasyonu için yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanıldı. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı degen modda gerçekleştirildi. Salınım rezonans frekansı, 341.30 Hz olarak uygulandı. Titreşim genliği, 1 VRMS ve boş titreşim genliği ise 2 VRMS'dir. Örneklerden 2 µm/s tarama hızında, 256x256 piksel çözünürlükte, 2x2µm² ' lik alanların görüntüsü alındı.

3.4.4.4. Elipsometre

HSA baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküller ile hazırlanan yüzey plazmon rezonans çiplerin kalınlık ölçümleri Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile yapıldı. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 62 derecelik bir geliş açısında gerçekleştirildi. Yüzeyinde polimerik film içeren altın çip lazer ışık kaynağı altına yerleştirildi. Yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 cam + 2 nm titanyum katmanı + 42,5 nm altın katmanı veri olarak öngörüldü. Ölçümler sensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlandı ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edildi.

3.4.5. Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi ile Kinetik Analizler

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküller ile hazırlanan yüzey plazmon rezonans nanosensörleri için kalibrasyon eğrisinin hazırlanması amacıyla farklı derişimlerdeki HSA çözeltileri sensör yüzeyine gönderildi. Bu çözeltiler 0,15 ile 500 nM derişim aralığında pH 7,4 fosfat tamponuyla hazırlandı ve her bir derişim değerine ait sensorgram alınarak %ΔR değerleri belirlendi.

3.4.6. Yarışmalı Kinetik Analizler

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküller ile hazırlanan yüzey plazmon rezonans nanosensörlerin seçiciliğini göstermek için hemoglobin ve transferrin proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar yüzey plazmon sistemine gönderilerek yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu çözeltiler, pH 7,4 tamponunda 500 nM derişiminde hazırlandı ve çip yüzeyine gönderilerek sensorgramlar alındı.

3.4.7. Seçicilik Çalışmaları

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküller ile hazırlanan yüzey plazmon rezonans nanosensörlerin yüzeyine hemoglobin ve transferrin protein çözeltileri gönderilerek seçicilik çalışmaları yapılmıştır. Bu çözeltiler, pH 7,4 tamponunda 500 nM derişiminde hazırlandı ve çip yüzeyine gönderilerek sensorgramlar alındı.

3.4.8. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Çalışmaları

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküller ile hazırlanan yüzey plazmon rezonans nanosensörlerin gerçek örnekler ile kullanılabilirliğinin ve mevcut yöntemler ile uyumluluğunun araştırılabilmesi için yapay plazma ve idrar örnekleri ile çalışıldı. Yapay plazma, 1 ml saf su ile çözüldü ve ardından, $1:2 \times 10^3$, $1:6 \times 10^3$ ve $1:12 \times 10^3$ oranlarında seyreltilerek (pH 7,4 fosfat tamponu) örnekler hazırlandı ve nanosensör yüzeyine gönderilerek sensorgramlar alındı. İdrar çalışmaları ise idrar içerisine farklı derişimlerdeki HSA çözeltisi spike edilerek yapıldı. Bu şekilde hazırlanan yapay idrar örnekleri sensör yüzeyine gönderilerek sensorgramlar alındı ve daha önce yapılan kinetik çalışmalar ile uyumluluğuna bakıldı.

3.4.9. Tekrar Kullanılabilirlik ve Kararlılık Çalışmaları

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensörlerin performanslarını belirlemek amacıyla 5 kez ardarda örnek verildi ve sensorgram alındı bu şekilde tekrar kullanılabilirlik çalışması gerçekleştirildi.

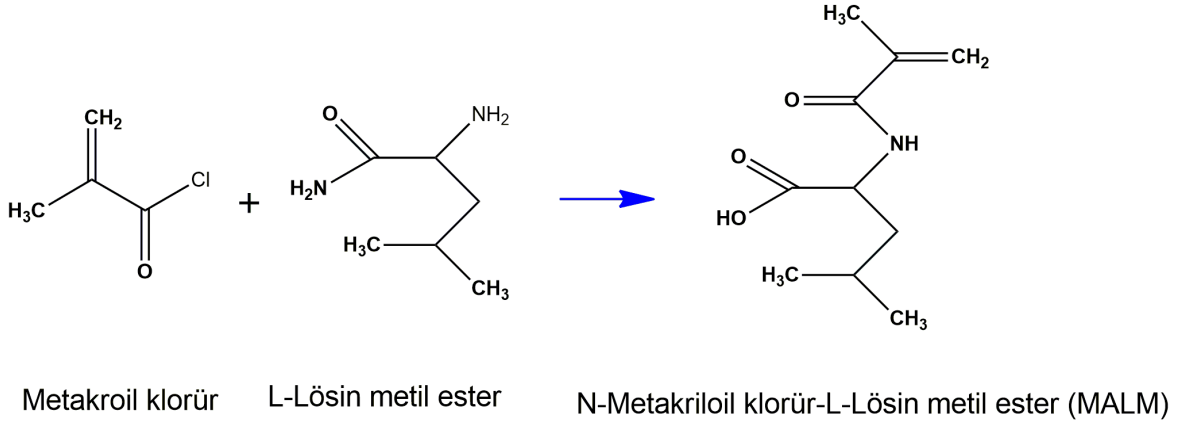
HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün, kararlılık çalışması için aynı nanosensör 3 aylık periyotlarla toplamda 3 kez 4 tekrarlı HSA analizi için kullanılmış ve SPR nanosensörün kararlılığı gösterilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. MALM Monomerinin Sentezi

N-Metakriloil –(L)-Lösin metil ester (MALM) monomerinin sentez reaksiyonu aşağıdaki gibidir.



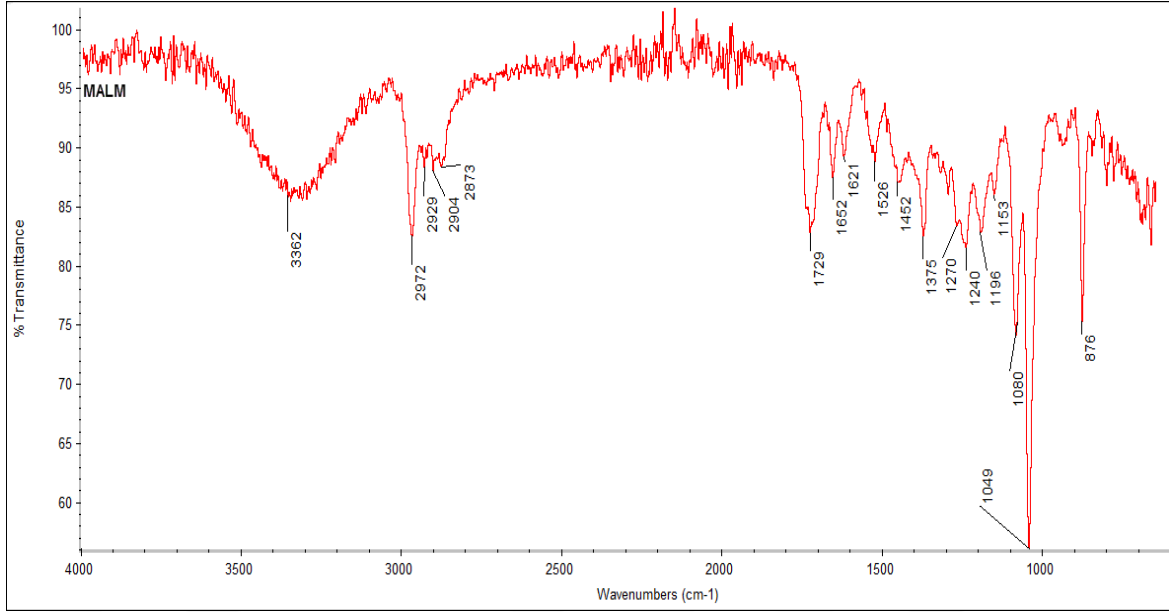
Şekil 4.1. MALM monomerinin sentezi

4.1.1. MALM Monomerinin Karakterizasyonu

4.1.1.1. FTIR-ATR Analizi

Elde edililen N-Metakriloil –(L)-Lösin metil ester (MALM) monomer (Şekil 4.1) FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.2). MALM monomerinin yapısının belirlenmesi için FTIR-ATR tekniği kullanılmıştır. Spektrum üzerinde bileşiğe ait olan karakteristik bandlar gösterilmiştir. 3362 cm^{-1} de görülen pik (-NH) gerilme bandına, 2972 cm^{-1} de ki pik alifatik (C-H) gerilmelerinden kaynaklanan absorpsiyon bandına, 1729 cm^{-1} deki pik ester karbonil (C=O) grubuna ait gerilme bandına, 1652 cm^{-1} de görülen pik amid (C=O) grubuna ait banda, 1621 cm^{-1} deki pik vinil grubunun (C=C) bandına, 1526 cm^{-1} deki pik (N-H) bandına aittir.

Yapıya ait titreşim, gerilme ve eğilme bandları, N-Metakriloil–(L)-Lösin metil ester (MALM) monomerinin sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir [110, 111].



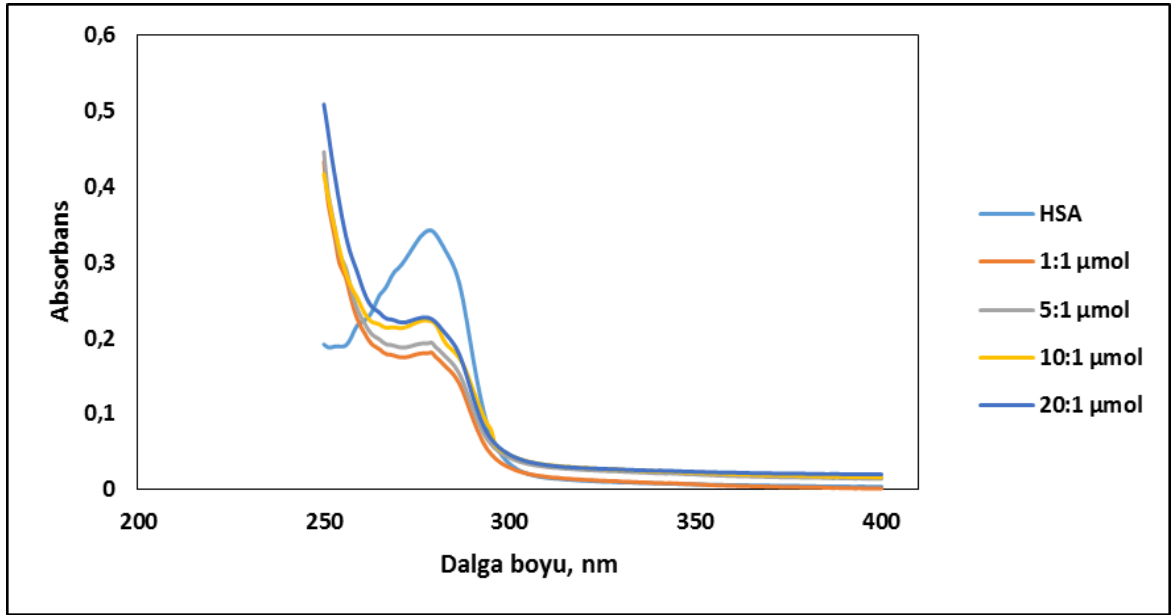
Şekil 4.2. MALM monomerinin FTIR-ATR spektrumu

4.1.1.2. MALM Monomerinin NMR Analizi

N-Metakriloil-L-Lösin metil ester (MALM) monomeri sentezlendikten sonra kimyasal yapısının belirlenmesi için proton NMR analizi yapılmış (CDCl_3) ve kayma değerleri kaydedilmiştir: δ 0.95 (6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.513–1.641 (1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.630–1.704 (2H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.958 (3H, COOCH_3), 4.065–4.168 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CHCOOCH}_3$), 1.950 (3H, CH_2CCH_3), 5.720 (s, 1H, $\text{CH}(\text{H})=\text{CCH}_3$), 5.354 (s, 1H, $\text{CH}(\text{H})\text{CCH}_3$) olarak belirlenmiştir.

4.2. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) Nanosensörün Hazırlanması için MALM-HSA Ön-kompleks Oranının Optimize Edilmesi

MALM:HSA ön-kompleksi, kalıp molekül olarak HSA, fonksiyonel monomer olarak MALM monomerinin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon ölçümleri spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3' de gösterilen MALM:HSA ön-kompleksinin spektrofotometrik ölçümü incelendiğinde 10:1 μmol oranından sonra elde edilen spektrumdaki MALM:HSA kompleksleşmesinden meydana gelen sinyal şiddetinin artmasının sona erdiği tespit edilmiş ve polimerleşme bu oran üzerinden gerçekleştirilmiştir. Farklı monomer template oranlarında hazırlanan nanopartiküller ile yapılan kinetik çalışmalarında $\%\Delta R$ değerinin 10:1 μmol oranından sonra fazla bir değişim olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.3. MALM:HSA ön-kompleksin spektrofotometrik ölçümü

4.3. Mikro-temas Yöntemi ile [PEDMALM-HSA] ve [PEDMALM] SPR Nanosensörlerin Hazırlanması

4.3.1. Cam Slayt Modifikasyonunun Karakterizasyonu

Yaptığımız bu çalışmada, HSA'nın [PEDMALM] film yüzeyine baskılanması mikro-temas yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Mikro-temas yönteminde kalıp protein cam yüzeyine immobilize edilmekte ve bu şekilde proteinin polimerizasyon karşımında çözünme sorunu ortadan kalkmaktadır [112]. Şimdiye kadar bu yöntem ile yapılan tüm çalışmalarda, protein kalıbı olarak kullanılacak camın yüzeyi hekzametilendisilazan (HMDS) ile hidrofobik duruma getirilerek protein molekülü yüzeye hidrofobik etkileşimler ile immobilize edilmiştir [113].

Protein molekülleri yüzeye temelde iyonik, hidrofobik ve polar etkileşimler ile adsorbe olabilirler. Bu şekilde oluşan yüzey heterojen ve rastgele yönlenmiş protein moleküllerinden meydana gelmektedir. Bunun sebebi, her bir molekül substrat ve daha önceden baskılanmış protein arasındaki itme kuvvetlerini en aza indirmek için farklı yönlenmelerde birçok temasta bulunmasından kaynaklanıyor olabilir. Adsorpsiyon ve immobilizasyonda bazı çevresel koşulların (pH, sıcaklık, iyonik şiddet vb.) değişmesinin etkisiyle adsorplanmış moleküller desorbe olurlar [114, 115].

Proteinler yüzeylere protein yapısında yer alan ulaşılabilir konumdaki aminoasit yan zincirlerindeki fonksiyonel gruplar aracılığı ile kovalent olarak da immobilize edilebilir. Kovalent bağ genellikle yan zincirdeki fonksiyonel grup ile uygun şekilde modifiye edilmiş substrat arasında gerçekleştirilir. Sonuç olarak bağlanmanın tersinmez olduğu ve yüzeyin büyük ölçüde kaplandığı substratlar elde edilir. Kovalent bağlama tekniği bağlanma kararlılığı ve dayanıklılık düşünüldüğünde adsorpsiyona göre çok daha uygun bir tekniktir [116]. Biyosensör yüzeylerine proteinlerin bağlanmasında da sıklıkla tercih edilen yaklaşım kovalent bağlamadır [117, 118, 119]. Kovalent bağlamada en çok kullanılan yaklaşım protein molekülünde yer alan $-NH_2$ grupları ve aldehit grupları ile türevlendirilmiş substrat arasında Schiff bazı oluşumudur [120, 121, 122]. Aldehit-amin kimyası farklı yüzeylere protein immobilizasyonunda yıllardır yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [123, 118].

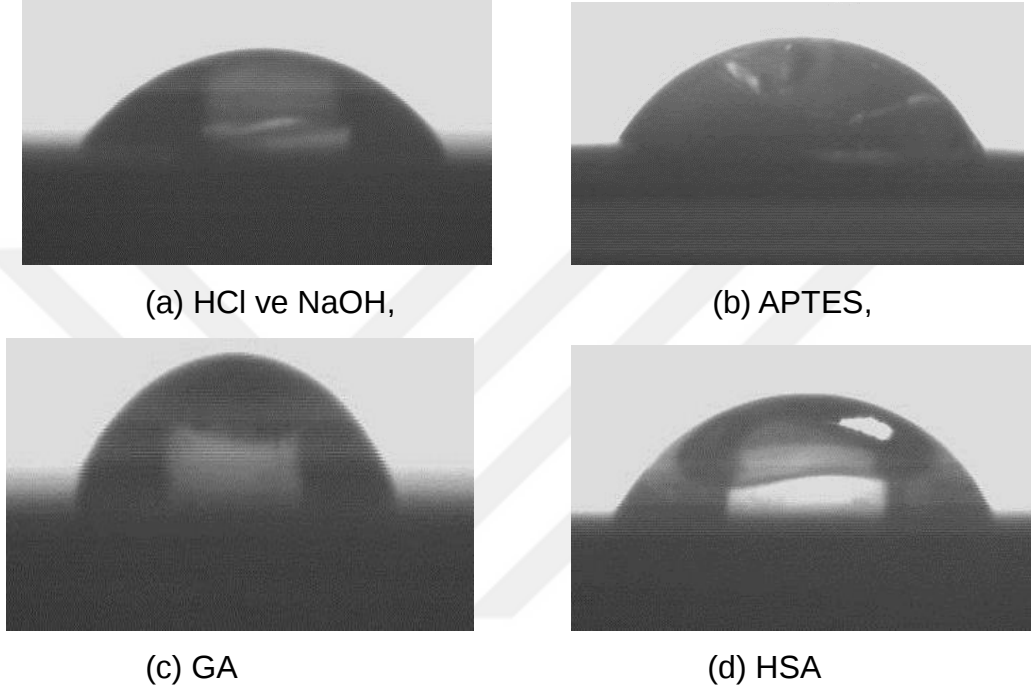
Cam yüzeyinde fonksiyonel grup oluşturmak için genellikle protein yüzeyinde yer alan gruplar ile elektrostatik ya da kovalent etkileşimi sağlayacak fonksiyonel gruplar içeren silan bileşiklerini kullanılır. Yüzey modifikasyonunda en sık kullanılan iki madde aminopropil trietoksi silan (APTES) ve glutaraldehit [124,125]. APTES kovalent olarak cam yüzeyine bağlanır. $-NH_2$ uçları her iki ucuda aldehit grubu içeren glutaraldehit ile kovalent olarak bağlanarak yüzeyde serbest aldehit grupları oluşturulur. Bu aldehit grupları da proteinleri Schiff bazı oluşumu ile kovalent olarak bağlar [126].

Bu çalışmada, cam yüzeyi ilk olarak APTES ve glutaraldehit ile modifiye edilmiş ve ardından miyoglobin yüzeye kovalent olarak immobilize edilmiştir. Bu sayede proteinin yüzeyden desorpsiyonu engellenmiştir. Bu yöntem ile NaOH/SDS gibi bağlanma bölgelerinin yapısını bozabilecek kimyasallar ile yıkama aşaması da ortadan kaldırılmıştır

4.3.1.1. Temas Açısı Analizi

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] filmi hazırlanırken cam slaytlar öncelikle temizlenmekte ve daha sonra modifiye edilerek protein kalıbının hazırlanmasına uygun hale getirilmektedir. Her bir aşamada cam slaytın yüzeyinde değişimler olmaktadır. Bu değişimleri her bir basamağın temas açısındaki değişimi ölçerek

gözlemlemek mümkündür. Karakterize etmek amacıyla temizlenmiş cam, APTES ile modifiye edilmiş cam, devamında glutaraldehit ile modifiye edilmiş cam ve HSA ile immobilize edilmiş camın (protein kalıbı) su ile yaptıkları temas açıları belirlenmiştir. Çizelge 4.1' de suyun cam yüzeyler ile yaptığı temas açısı değerleri, Şekil 4.4' de ise yine bu yüzeylere ait temas açısı görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 4.4. Cam slayt modifikasyonunun temas açıları

Çizelge 4.1. Cam slayt modifikasyonunun temas açıları

Yüzey	Temas açısı,° (H ₂ O)
HCl ve NaOH ile temizlenmiş cam	32,2° ± 2,58
APTES ile modifiye edilmiş cam	40,1° ± 0,21
APTES ve GA ile modifiye edilmiş cam	59,6° ± 2,94
HSA bağlanmış cam (protein kalıbı)	63,4° ± 3,11

HCl ve NaOH çözeltisi ile temizlenmiş cam için temas açısı 32,2° ± 2,58 iken APTES ile modife edilmiş cam için bu değer 40,1° ± 0,21 'e yükselmiştir. Bu değişim APTES ile muamele sonucunda cam yüzeyinin daha hidrofobik bir karakter kazandığını göstermektedir. Bu değişim büyük olasılıkla cam yüzeyindeki

-OH gruplarının aminopropil segmentleri ile kovalent olarak bağlanmasından kaynaklanmaktadır. APTES ile kaplanmış cam yüzey daha sonra glutaraldehit ile modifiye edilmiş ve temas açısı $59,6^\circ \pm 2,94$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre yüzey biraz daha hidrofobik hale gelmiştir. Çünkü glutaraldehit, APTES den gelen amin uçlarını imin oluşumuyla kapatmış ve içerdiği hidrokarbon zincirinden dolayı da hidrofobik özellik kazandırmıştır. HSA kovalent olarak bağlandığı cam yüzeyinde ise temas açısı $63,4^\circ \pm 3,11$ olarak elde edilmiştir. Bu sayede hidrofobisitede az da olsa bir artış olmuştur.

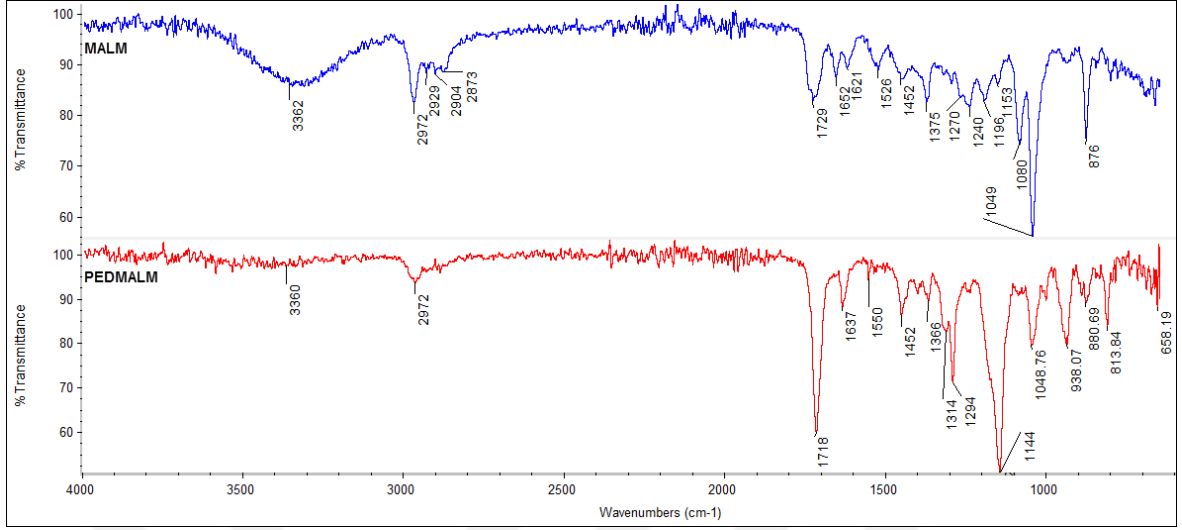
4.3.2. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanosensörün Karakterizasyonu

4.3.2.1. FTIR-ATR Analizi

Tiyoller (R-SH) Au(111) substratlar üzerinde mükemmel SAM (Self-Assembled Monolayer) oluştururlar. Uç grup altın yüzeyinde kuvvetli ve istemli bir şekilde adsorbe olur. Daha sonra moleküller zincir-zincir etkileşimleri ile tekrar kendi aralarında organize olarak yüzeyde yoğun ve düzenli bir tabaka oluştururlar. Bu düzenlenmede kuyruk kısmında yer alan grup dışı doğru yönelmektedir. Altın yüzeyimiz, yüzey doymamış bağlar içeren allil merkaptan ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SH}$) ile kaplanmıştır. Allil merkaptan ile modifiye edildikten sonra yüzeyde HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) polimerik film hazırlanmıştır.

SPR sensörünün altın yüzeyinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. SPR sensör, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş $4000-400\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensör yüzeyine ait FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.5’de verilmiştir. MALM monomerinin EDMA monomerinin yapısına katılarak oluşturduğu [PEDMALM] (NIP) nanofilmin yapısı FTIR ile karakterize edilmiştir. MALM monomerinin ester grubuna ait 1729 cm^{-1} deki karbonil bandı ($\text{C}=\text{O}$) [PEDMALM]’ın yapısına katıldığı için 1718 cm^{-1} ’e kaymıştır. Yine aynı şekilde 1652 cm^{-1} de görülen pik amid ($\text{C}=\text{O}$) grubuna ait band polimerik yapıya katılımdan dolayı 1637 cm^{-1} ’e kaymıştır. MALM monomerine ait 1621 cm^{-1} deki vinil grubuna ait ($\text{C}=\text{C}$) bandı polimerleşmeden dolayı yok olmuştur. 1526 cm^{-1}

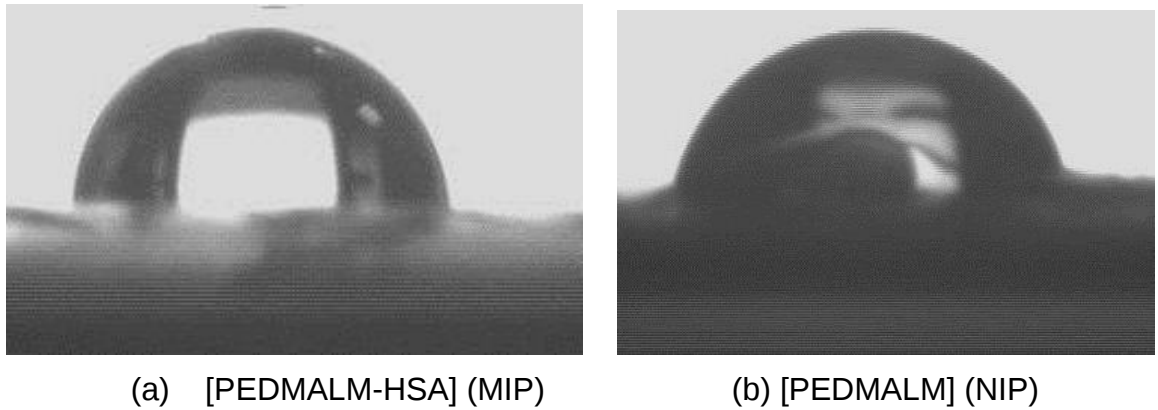
deki pik (N-H) bandına ait pik polimerleşmeden dolayı 1550 cm^{-1} 'e kaymıştır. Bu da polimerleşmenin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.5. Malm monomeri ve [PEDMalm] nanosensöre ait FTIR-ATR spektrumu

4.3.2.2. Temas Açısı Analizi

HSA baskılanmış [PEDMalm-HSA] ve baskılanmamış [PEDMalm] filmlerinin sentezlendiği sensör yüzeylerini karakterize etmek amacıyla temas açıları ölçülmüştür. Şekil 4.6' da yüzeylere ait temas açıları görülmektedir.

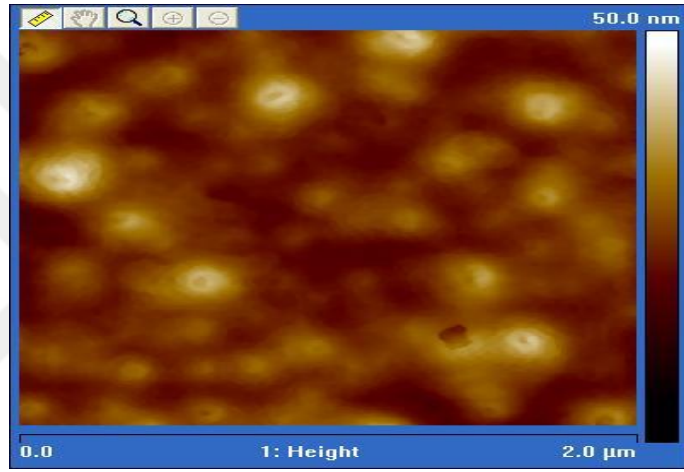


Şekil 4.6. [PEDMalm-HSA] ve [PEDMalm] SPR nanosensörlerin temas açısı

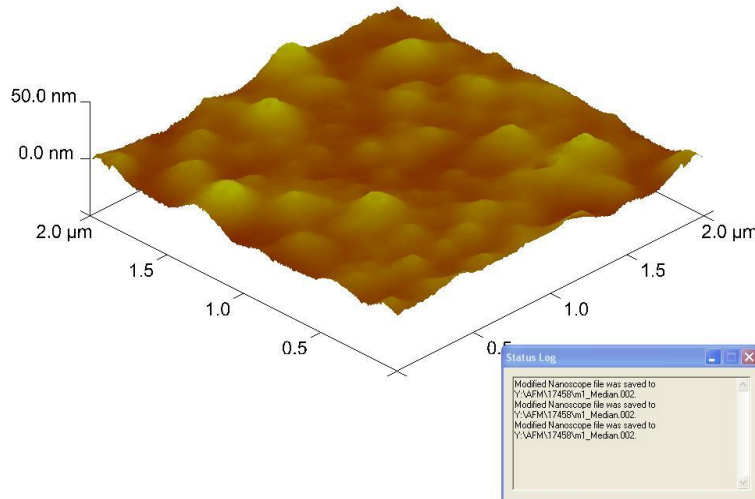
HSA baskılanmış [PEDMalm-HSA] ve baskılanmamış [PEDMalm] nanosensör yüzeylerinin temas açıları sırasıyla $55,2 \pm 2,24$ ve $61,5 \pm 4,63$ olarak ölçülmüştür.

4.3.2.3. AFM

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR sensör yüzeyin morfolojik karakterizasyonu için AFM görüntüleri alınmıştır. Yüzeyle ait AFM görüntüleri şekil 4.7 ve şekil 4.8’ de gösterilmiştir. AFM ölçümlerinden elde edilen pürüzlülük değerleri HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanofilmler için sırasıyla 3,64 ve 2,47 nm olarak bulunmuştur. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanofilmlerin pürüzlülük değerleri arasındaki farklılık HSA moleküllerinin başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir.

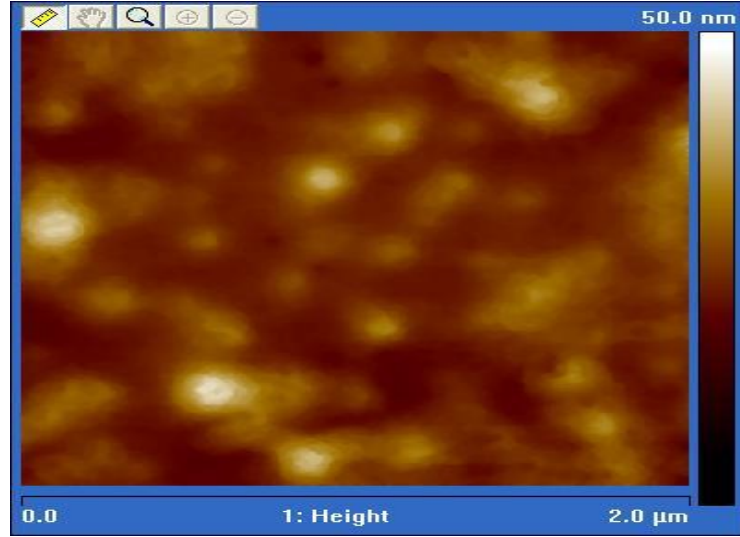


(a) Yüzey görüntüsü

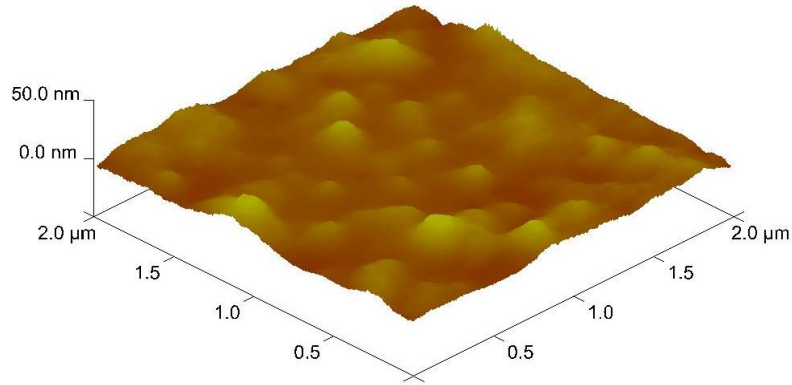


(b) 3D görüntüsü (2x2 μm^2)

Şekil 4.7. [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensörün AFM görüntüsü



(a) Yüzey görüntüsü



(b) 3D görüntüsü (2x2 μm²)

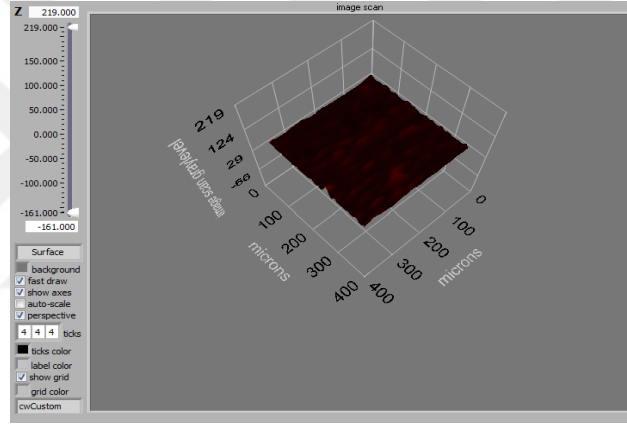
Şekil 4.8. [PEDMALM] (NIP) SPR nanosensörün AFM görüntüsü

4.3.2.4. Elipsometre

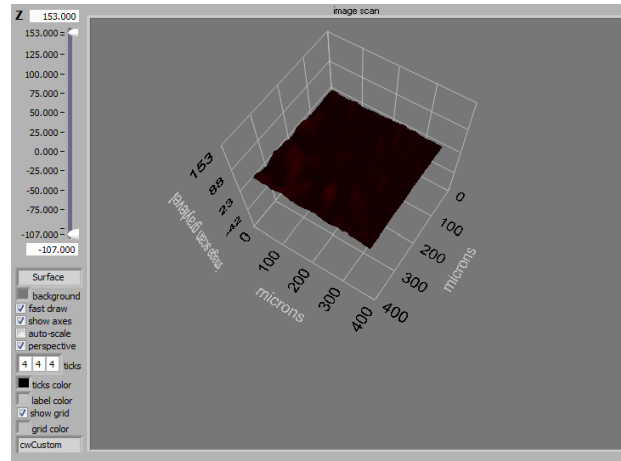
Geleneksel olarak moleküler baskılanmış polimerler yığın polimer monolitler olarak hazırlanır ve mikrometre boyutlarındaki partiküller elde etmek için parçalanarak elenir. Bu yöntem ile MIP hazırlama birçok uygulama için halen yararlı iken diğer bazı uygulamalar (özellikle sensörler) için hazırlanacak moleküler baskılanmış polimerlerin film ya da nanopartiküller gibi belirli bir fiziksel formda hazırlanması gerekmektedir. Bu durumda özel olarak adapte edilmiş sentez metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca difüzyonun hızlandırılması ve cevap süresinin kısaltılması için baskılama bölgelerinin yüzeyde ya da yüzeye çok yakın bölgede oluşturulması gerekmektedir [127]. Dolayısıyla sensör olarak kullanılacak moleküler baskılanmış film ya da membranın kalınlığının 100 nm den kalın olmaması ve hatta 50 nm den

küçük olması istenir [128]. Özellikle kaybolan dalga prensibini kullanan optik transdüserlerde bu durum daha da büyük önem kazanmaktadır.

Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) filmlerin kalınlık ölçümleri için Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı kullanıldı. Ölçümler 532 nm dalga boyunda, 60,5°'lik bir geliş açısında gerçekleştirildi. SPR sensör lazer ışık kaynağı altına yerleştirildi. Yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 cam + 2 nm titanyum tabaka ve 42,5 nm altın tabaka olarak öngörüldü. Ölçümler sensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlandı ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edildi. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) filmler sırasıyla $95 \pm 4,9$ nm ve $89,9 \pm 4,9$ nm kalınlıktadır.



(a) [PEDMALM-HSA] (MIP)

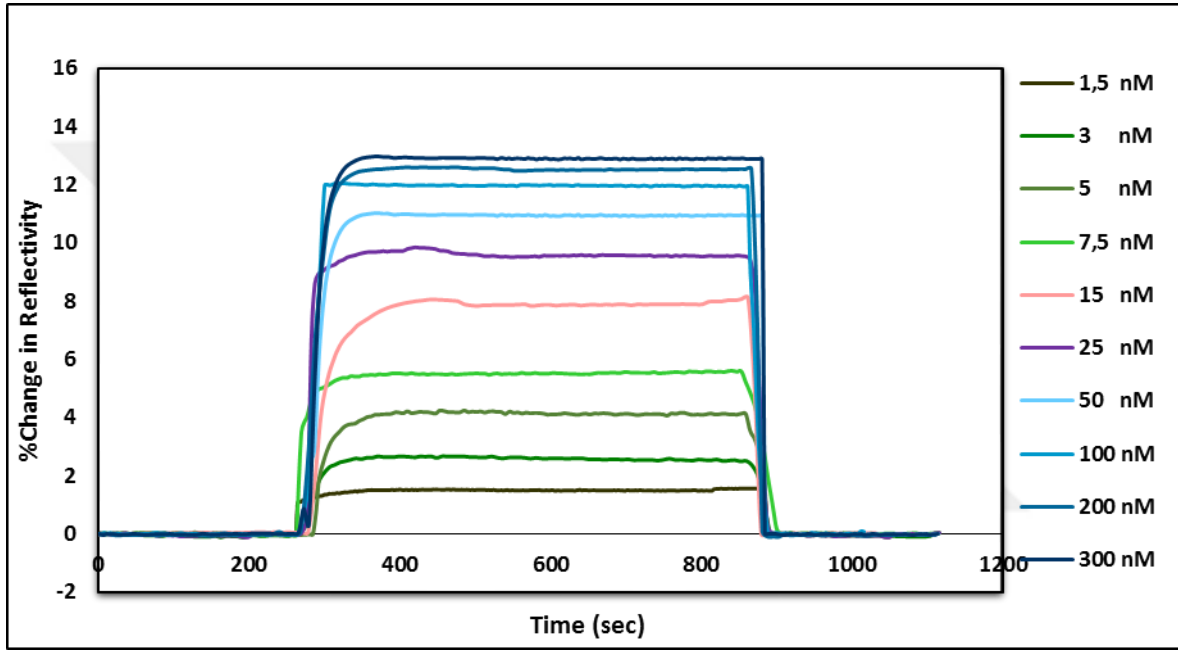


(b) [PEDMALM] (NIP)

Şekil 4.9. SPR nanosensörlerin 3D Elipsometre görüntüsü

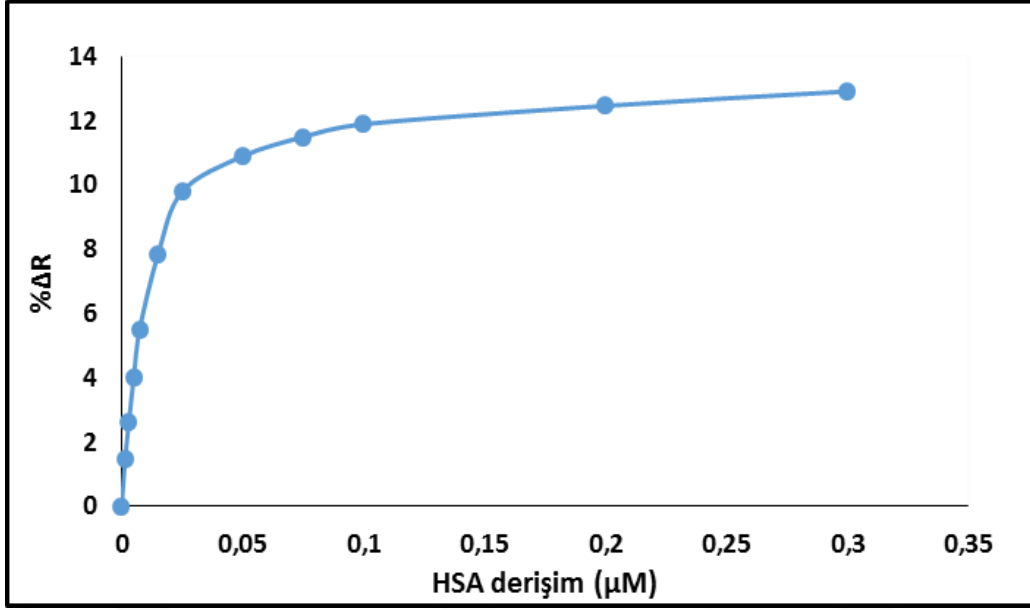
4.3.3. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR Nanosensör ile Kinetik Analizler

Bu çalışmada HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] SPR nanosensör hazırlanmıştır. HSA derişimi ile SPR sinyali arasındaki ilişkinin değeriendirilebilmesi için farklı derişimlerde (1,5-300 nM) HSA çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığıyla HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörle etkileştirilerek sensorgramlar alındı. Şekil 4.10' da farklı derişimlerde HSA çözeltileri ile etkileşimden elde edilen sensorgramlar toplu halde görölmektedir.

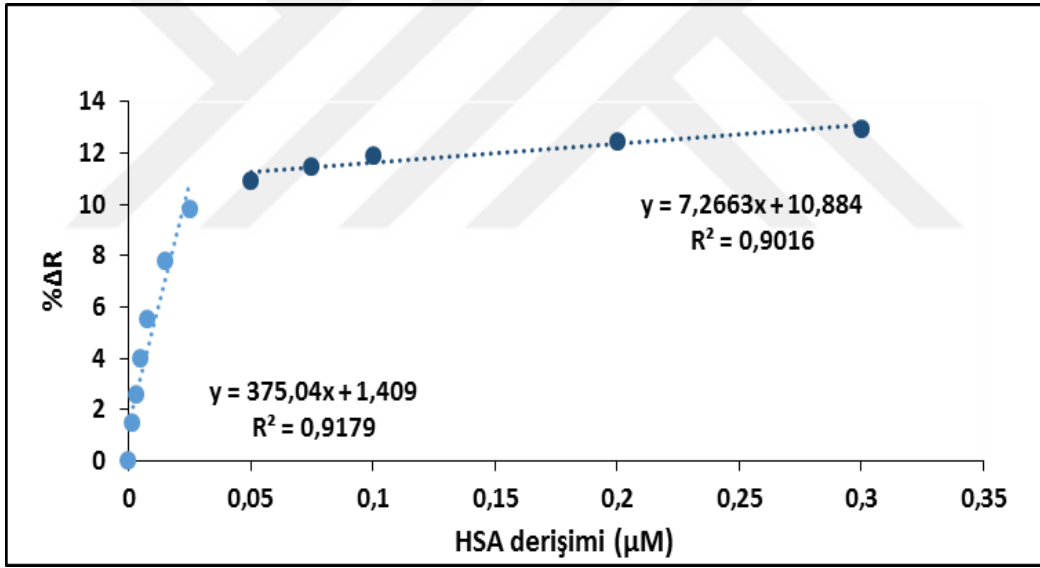


Şekil 4.10. HSA çözeltileri ile [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramların çakiştirilmesi

Şekil 4.10' da göröldüğü gibi yüzeye HSA gönderilmesi ile birlikte birlikte %ΔR değeri artmaktadır. Standart bir ölçümde; sistemden öncelikle yaklaşık 3 dakika denge tamponu, daha sonra sistem yeniden dengeye ulaşana kadar yaklaşık 10 dakika HSA çözeltisi geçirilmiş ve sonra yaklaşık 2 dakika desorpsiyon ajanı kullanılmıştır. İki ölçüm arasında 15 dakika su sönsör yüzeyine gönderilmiştir. Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için yaklaşık 30 dakika beklenmiştir.



Şekil 4.11. HSA derişimi ile %ΔR arasındaki ilişki



Şekil 4.12. 1,5–50 nM ve 50–300 nM aralıklarında HSA derişimi ile %ΔR arasındaki ilişki

Şekil 4.11' de görüldüğü gibi % ΔR değeri, derişim arttıkça artmaktadır. Bu değer yaklaşık 200 nM civarında dengeye ulaşmış ve denge değeri 12,9 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.12' de görüldüğü gibi SPR sensör, 1,5-300 nM derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu aralıktaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen iki doğrunun denklemi ve doğrusallıkları sırasıyla $y_1=375,04x+1,409$, 0,9179 ve $y_2=7,2663x+10,884$ ve 0,9066 olarak

hesaplanmıştır. Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensör için elde edilen veriler kullanılarak tayin sınırı (LOD) değeri de belirlendi. Tayin sınırının (LOD) hesaplanması için 3s/m denklemi kullanıldı ve 8,8 pM hesaplanmıştır. Sağlıklı bir böbreğe sahip insanların idrarına albümin hiç sızmamalıdır. Buna rağmen albüminürinin idrara sızmasının belli bir kısmı normal olarak kabul edilmektedir. Bu referans aralığını geçtiği takdirde insan sağlığında ciddi sıkıntılara yol açabilmektedir.

Çizelge 4.2. Albüminüri tanım ve sınır değerleri

Tanım	Protein (mg/gün)	Albümin (mg/gün)	Spot idrar (mg/gün)
Normal	<150	<30	<30 µg albümin/mg kreatinin
mikroalbüminüri	<500	30-300	30-300 µg albümin/mg kreatinin
makroalbüminüri	≥500	>300	>300 µg albümin/mg kreatinin

Ayrıca 1,5-300 nM HSA derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu sonuçlara göre HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün, idrara albüminin sızması durumunda mikroalbüminin tayinini başarıyla gerçekleştirebilecek sensör özelliklerine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

4.3.3.1. Kinetik Analizler

4.3.3.1.1. Denge Analizi

Toplam ligand miktarı ($[B]_0$), yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanırsa; diğer tüm derişim değerleri SPR sinyali olarak ifade edilebilir. Böylelikle kütlenin derişime dönüştürölme işleminin yapılmasına gerek kalmayacaktır. Serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit kaldığı yalancı birinci derece koşulları altında bağlanma şu şekilde ifade edilir:

$$d\Delta R / dt = k_a C (\Delta R_{maks} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad (4.1)$$

Burada; $d\Delta R/dt$, SPR sinyalinin değışim hızı; R ve R_{maks} , bağlanma ile ölçülen ve maksimum sinyal; C, analit derişimi (μM), k_a , bağlanma hız sabiti ($\mu M^{-1}.S^{-1}$) ve k_d , ayrılma hız sabiti ($1/s$)'dir. Bağlanma sabiti K_A (μM^{-1}), k_a ve k_d sabitlerinin

oranından hesaplanır ($K_A=k_a/k_d$). Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ alınarak eşitlik basitleştirilir:

$$\Delta R_{\text{denge}} / C = K_A \Delta R_{\text{maks}} - K_A \Delta R_{\text{denge}} \quad (4.2)$$

Bundan dolayı, bağlanma sabiti K_A , $\Delta R_{\text{denge}}/C$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden hesaplanır. Ayrılma sabiti K_D ise; $1/K_A$ eşitliği ile hesaplanabilir.

4.3.3.1.2. Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 4.1 tekrar düzenlendiğinde;

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{\text{maks}} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (4.3)$$

eşitliği elde edilir. Buradan, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiğinin, eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bir doğru verdiği görülmektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisindedir ve kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılır. Eğer R_{maks} değeri biliniyorsa, tek bir sensorgram kullanılarak k_a ve k_d değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doygunluğa erştirmek için çok yüksek analit derişimlerine gerek olduğu için R_{maks} 'ın deneysel olarak belirlenmesi zordur. Tercih edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensorgramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri (S) vermektedir:

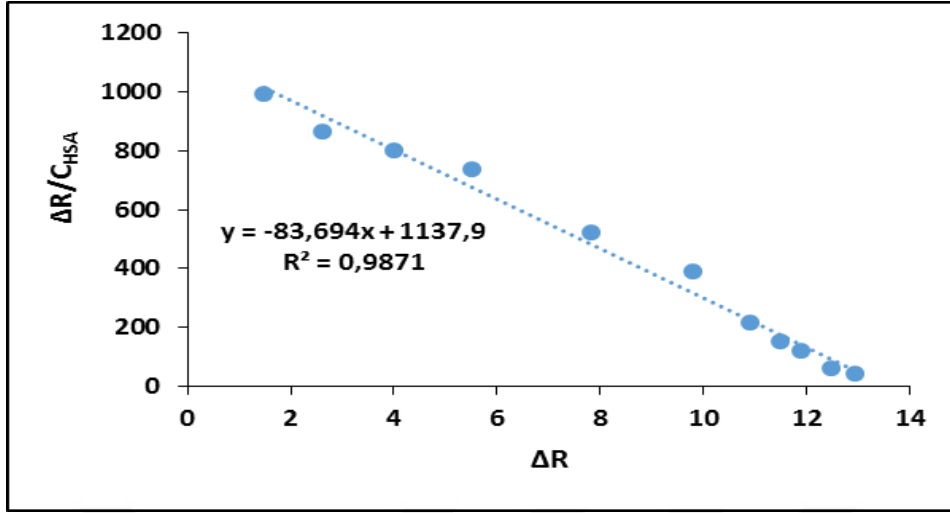
$$S = k_a C + k_d \quad (4.4)$$

S 'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası k_d değerini vermektedir. Fakat, $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

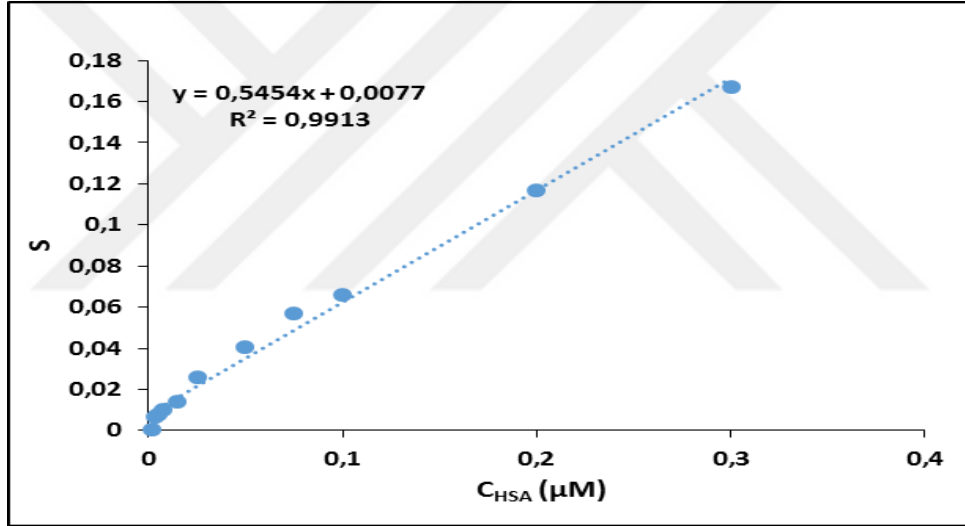
$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (4.5)$$

Burada; ΔR_0 ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir (129). Şekil 4.13' de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.3' de özetlenmiştir.

4.3.3.3. Denge Analizi (Scathard)



(a) Denge analiz yaklaşımı



(b) Bağlanma kinetik yaklaşımı

Şekil 4.13. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi

Çizelge 4.3. Kinetik hız sabitleri

Denge Analiz (Scathard)		Bağlanma Kinetik	
ΔR_{max}	13,59596	$k_a, \mu M^{-1}.s^{-1}$	0,5454
$K_A, \mu M^{-1}$	83,694	k_d, s^{-1}	0,0077
$K_D, \mu M$	0,011948	$K_A, \mu M^{-1}$	70,83117
R^2	0,9871	$K_D, \mu M$	0,014118
		R^2	0,9913

4.3.4. Denge İzoterm Modelleri

HSA baskılanmış SPR sensörün ile HSA moleküller arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla, Scatchard, Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri olmak üzere dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır.

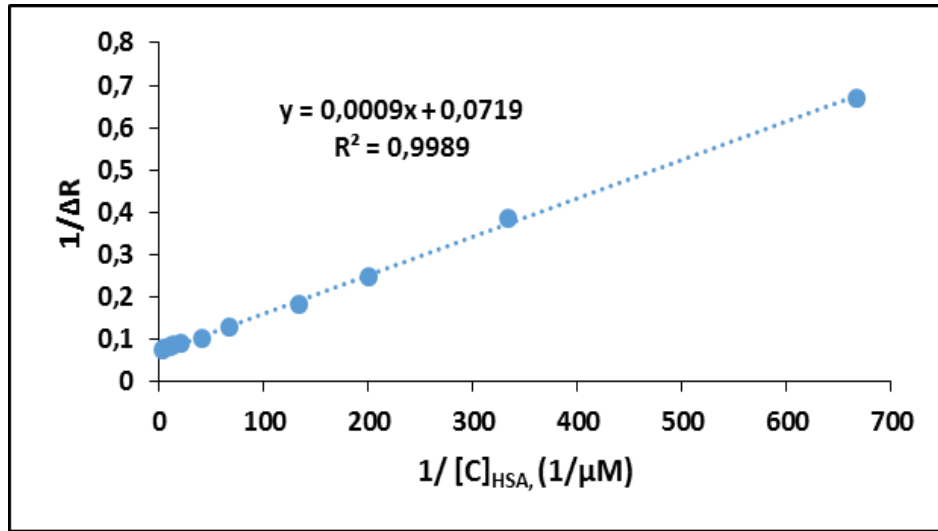
$$\text{Scatchard } \Delta R_{\text{denge}} / [C] = K_A (\Delta R_{\text{maks}} - \Delta R_{\text{denge}}) \quad (4.6)$$

$$\text{Langmuir } \Delta R = \{\Delta R_{\text{maks}} [C] / K_D + [C]\} \quad (4.7)$$

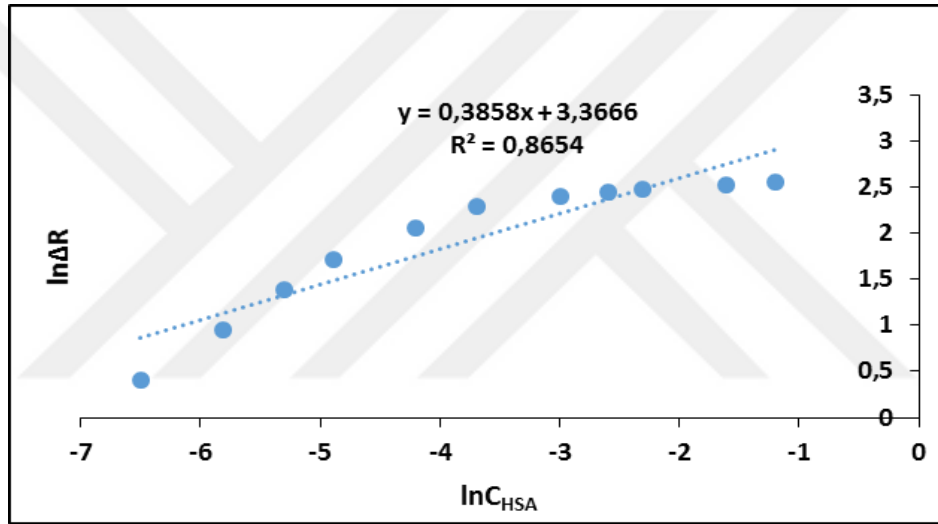
$$\text{Freundlich } \Delta R = \Delta R_{\text{maks}} [C]^{1/n} \quad (4.8)$$

$$\text{Langmuir-Freundlich } \Delta R = \{\Delta R_{\text{maks}} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n}\} \quad (4.9)$$

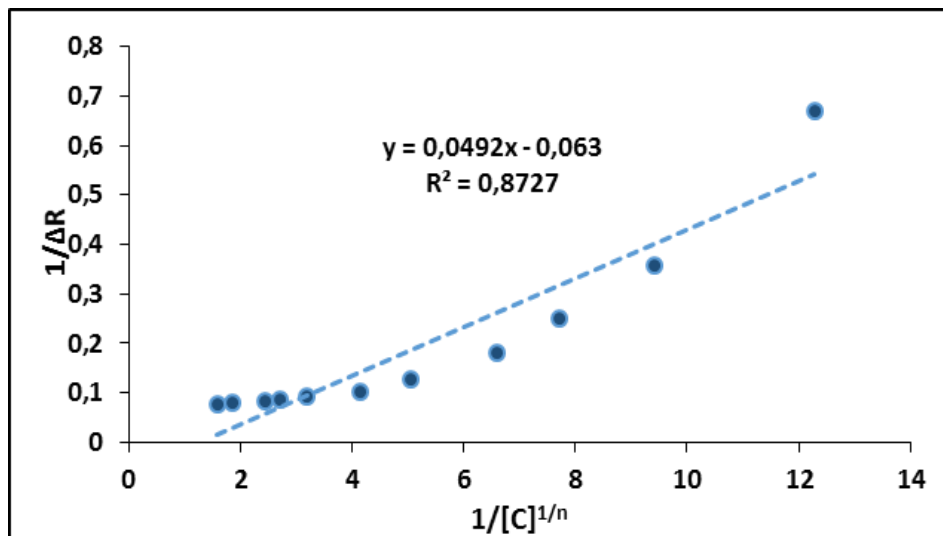
Burada; ΔR_{maks} , maksimum SPR sinyal kayması; ΔR_{denge} , denge halindeki SPR sinyal kayması; $[C]$, analit derişimi (μM); K_A (μM^{-1}), bağlanma denge sabiti; K_D (μM), ayrılma denge sabiti; $1/n$, Freundlich yüzey heterojenite indeksidir. Langmuir adsorpsiyon modeli homojen, Freundlich adsorpsiyon modeli ise heterojen bağlanma varsayımına dayanır. Langmuir modeli, moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı bağlanma izotermelerinde yaygın olarak kullanılmıştır [130]. Moleküler baskılanmış polimerlerin heterojen bağlanma bölgeleri de içerdiği rapor edilmiştir [131, 132]. Freundlich adsorpsiyon modeli, özellikle düşük derişimlerde MIP sistemlerine uygunluk göstermektedir [131]. Fakat bu model, yüksek derişim değerlerinde bazı sapmalar göstermektedir. Bu sapmaları engellemek için Langmuir-Freundlich ikili modeli kullanılabilir. Bu model, heterojenite olduğu durumda çok düşük derişimlerden doygunluğa kadar MIP sistemleriyle uygunluk göstermektedir [132]. Şekil 4.14' de Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modellerine ait grafikler verilmiştir.



(a) Langmuir



(b) Freundlich



(c) Langmuir-Freundlich

Şekil 4.14. Adsorpsiyon modelleri

Çizelge 4.4. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
$\Delta R_{\max}$	13,90821	$\Delta R_{\max}$	29,00	$\Delta R_{\max}$	15,87302
$K_A, \mu M^{-1}$	79,89	$1/n$	0,3858	$1/n$	0,3858
$K_D, \mu M$	0,012517	R^2	0,8654	$K_A, \mu M^{-1}$	1,280488
R^2	0,9989			$K_D, \mu M$	0,780952
				R^2	0,8727

deneysel olarak elde edilen veriler Langmuir modeli ile en uyumludur ($R^2 = 0,9989$). Bu sonuç; hazırlanan HSA baskılanmış nanosensör yüzeyindeki HSA bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanal etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4’ de verilmiştir. Çizelge 4.3 ve 4.4 birlikte incelendiğinde Langmuir modelinin hazırlanan sensörlere en uygun izoterm modeli olduğu görülmüştür.

4.3.5. Yarışmalı Kinetik Analizler

Hemoglobin ve transferrin için HSA molekülüne göre dağılma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (4.10)$$

Eşitlikte K_d , dağılma katsayısını (mL/g); C_i ve C_f , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini (mg/mL); V , kullanılan çözelti hacmini (mL) ve m , polimerin ağırlığını (g) ifade etmektedir. SPR sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi (133). Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi; polimerin kütlesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin ΔR ile doğrusal ilişkide olmasıdır.

Bu durumda; seçicilik katsayısı,

$$k = \Delta R_{\text{kalıp}} / \Delta R_{\text{girişimci}} \quad (4.11)$$

şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için ise;

$$k' = k_{\text{baskılanmış}}/k_{\text{kontrol}} \quad (4.12)$$

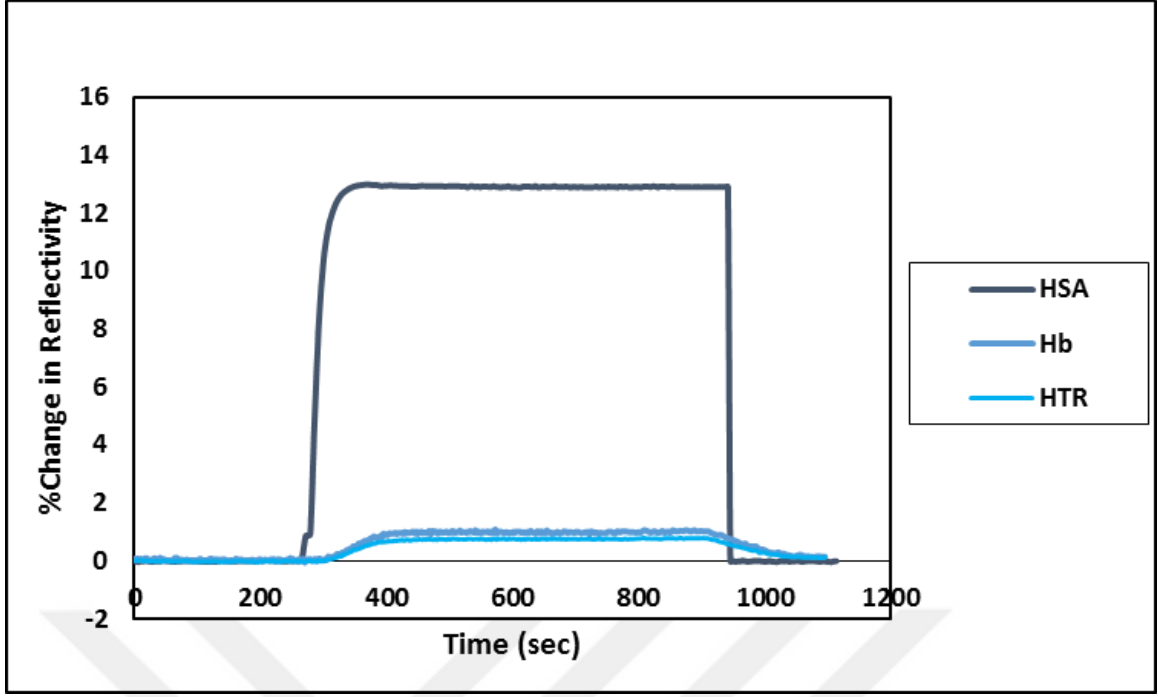
şeklinde ifade edilebilir.

Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün HSA'ye karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri 300 nM derişimindeki hemoglobin, transferrin ve HSA proteinleri sırasıyla sensör yüzeyine gönderilmiştir. Sensörün bu çözeltilere gösterdiği tepki, Şekil 4.15' de %ΔR/zaman ilişkilerine ait sensorgramlarda görülmektedir. Hemoglobin ve Transferrin; büyüklük, şekil ve izoelektrik noktasının (PI) HSA'ye yakın olmasından dolayı yarışmacı moleküller olarak seçilmiştir. Yarışmalı kinetik analizlerde kullanılan protein ve özellikleri çizelge 4.5' de verilmiştir.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) sensörün hemoglobine verdiği sensorgram sinyal değeri (%ΔR); 1,3, transferrine verdiği sinyal değeri (%ΔR); 0,8' tir. Aynı derişimdeki HSA için elde edilen sinyal değeri (%ΔR) ise 12,92'tir. Bir başka deyişle; baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensör HSA'yi; hemoglobine göre 9,94 kat, transferrine göre 16,15 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir.

Çizelge 4.5. Yarışmalı kinetik analizlerde kullanılan proteinler ve özellikleri

Protein	HSA	Hb	HTR
Mw (kDa)	66	67	80
PI	4,9	6,9	5,2

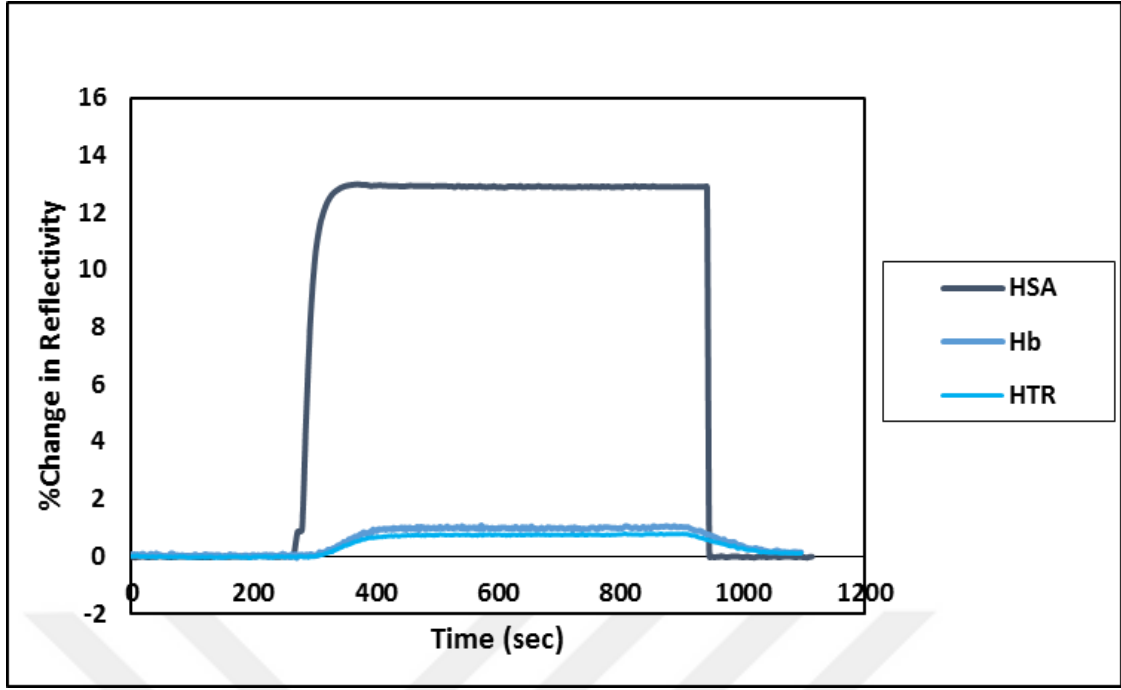


Şekil 4.15. 300 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar

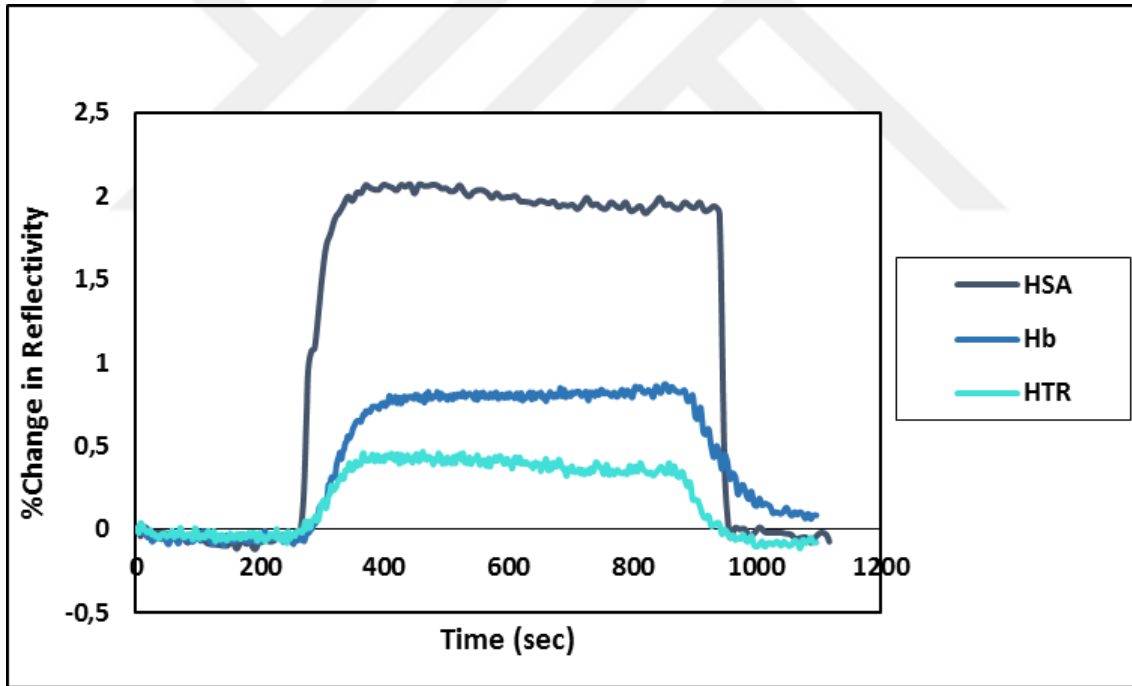
4.3.6. Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensör hazırlanmıştır. 300 nM fosfat tamponunda (pH 7,4) derişiminde Hb, transferrin ve HSA çözeltileri hazırlanmıştır. Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) sensörün bu çözeltilere gösterdiği tepki, Şekil 4.16' da $\Delta R/\text{Zaman}$ fonksiyonu olarak verilmiştir.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensörler karşılaştırıldığında; HSA sinyalinin duyarlılığının düştüğü görülmektedir. Çizelge 4.6' da baskılama seçiciliğini gösteren bağıl seçicilik katsayıları özetlenmiştir. Baskılama Bağıl seçicilik değeri, 1'in ne kadar üzerinde ise baskılama işleminin o kadar etkin olduğu bilinmektedir [134].



(a)



(b)

Şekil 4.16. (a) 300 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar (b) 300 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA baskılanmamış [PEDMALM] SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar:

Çizelge 4.6. HSA'ya göre Hb ve HTR için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları

MIP			NIP		
Protein	ΔR	K	ΔR	k	k'
HSA	12,92		1,9		
Hemoglobin	1,3	9,94	0,96	1,98	5,02
Transferin	0,8	16,15	0,5	3,8	4,25

4.3.7. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Çalışmaları

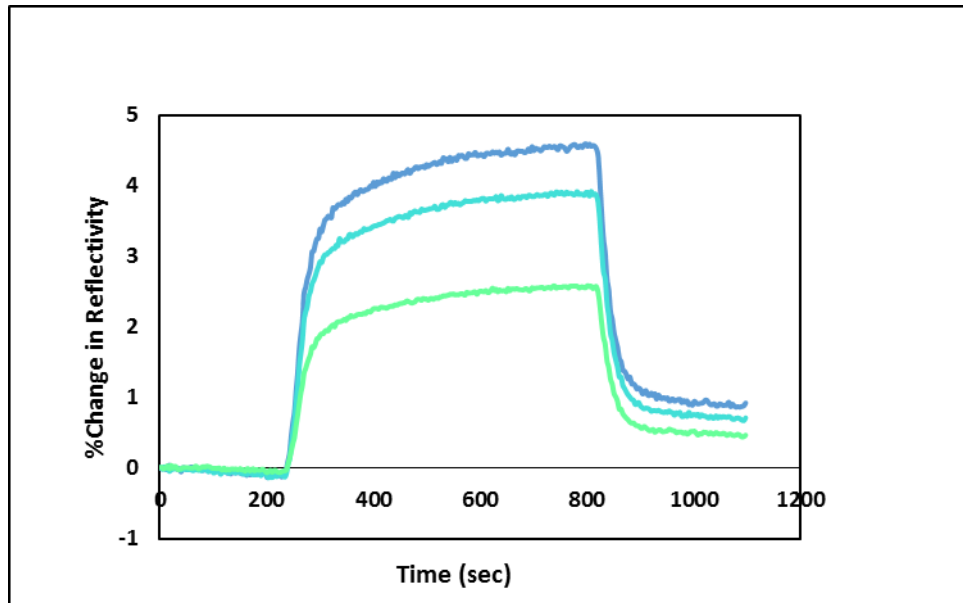
SPR sinyali ile bir doğal kaynak olan plazma arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı oranlarda seyreltilmiş plazma örnekleriyle $1:1 \times 10^3$, $1:2 \times 10^3$ ve $1:3 \times 10^3$ (pH 7,4 fosfat tamponu) çalışılmıştır. Plazma örnekleri peristaltik pompa aracılığıyla SPR sensörle etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alınmıştır.

Şekil 4.17' de plazma çalışmalarından elde edilen ΔR /zaman sensorgramları verilmektedir. Şekillerden de görüldüğü gibi azalan seyreltme oranı (artan derişim) ile birlikte HSA baskılanmış sensörün sinyal değeri artmaktadır. Oldukça yüksek seyreltme oranlarında bile baskılanmış sensörlerin sinyal verdiği görülmektedir. Bu kapsamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçların en önemli noktası, plazma gibi kompleks bir ortamda (%91 su, %7 proteinler, %2 iyonlar, besinler, gazlar, atıklar, hormonlar) bile HSA'nın teşhis edilebildiğinin belirlenmesidir. Ardından idrar çalışmaları yapılmıştır. İdrar içerisine hazırlanan 1,5-25-300 nM derişimindeki HSA çözeltileri ayrı ayrı enjekte edilmiştir. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün hazırlanan bu çözeltilere gösterdiği tepki, Şekil 4.18' de % ΔR /Zaman fonksiyonu olarak verilmiştir.

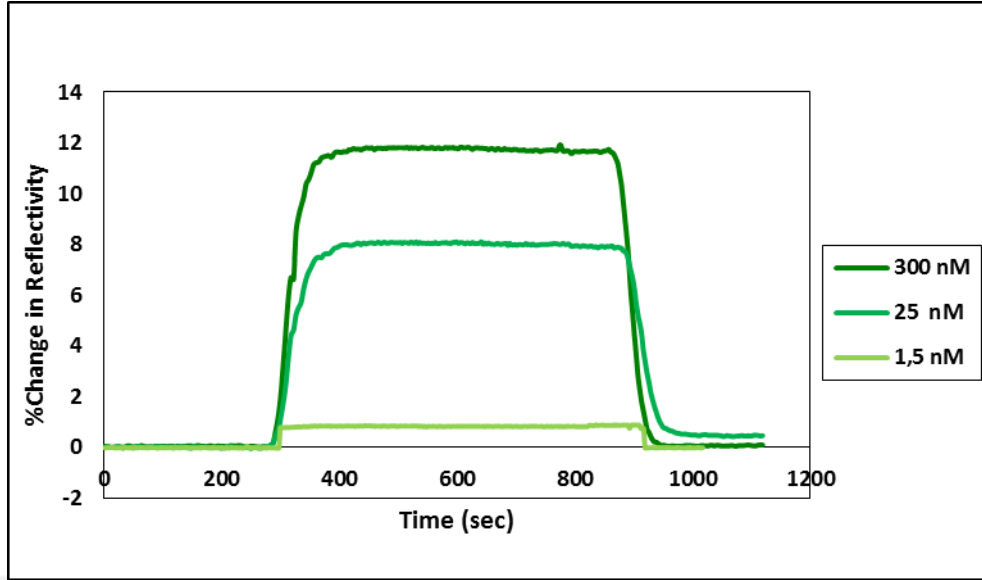
Çizelge 4.7. Yapay idrar hazırlanmasında kullanılan organik ve inorganik malzemeler

Kimyasal Bileşenler	İnorganik	Organik
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.100 g	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.089 g	
NaCl	0.634 g	
NH ₄ Cl	0.161 g	
Na ₂ SO ₄	0.258 g	
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	0.297 g	
IoNaHCO ₃	0.034 g	
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O,	0.100 g	
Na ₂ HPO ₄	0.011 g	
NaC ₂ O ₄	0.003 g	
Üre		2.427 g
Ürik asit		0.034 g
Kreatinin		0.090 g
H ₂ O	200 mL	

Sonuç olarak HSA baskılanmış sensörler, hem yapay plazma çözeltilerden hem de yapay idrar çözeltilerinden HSA tayininde başarı ile kullanılabilir.



Şekil 4.17. 1:1×10³, 1:2×10³ ve 1:3×10³ oranında seyreltilerek hazırlanan yapay plazma örneğinin [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör ile etkileştirilmesiyle elde edilen sensorgram



Şekil 4.18. 1,5, 25, 300 nM HSA spike edilmesiyle hazırlanan yapay idrar örneğinin [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör ile etkileştirilmesiyle elde edilen sensorgram

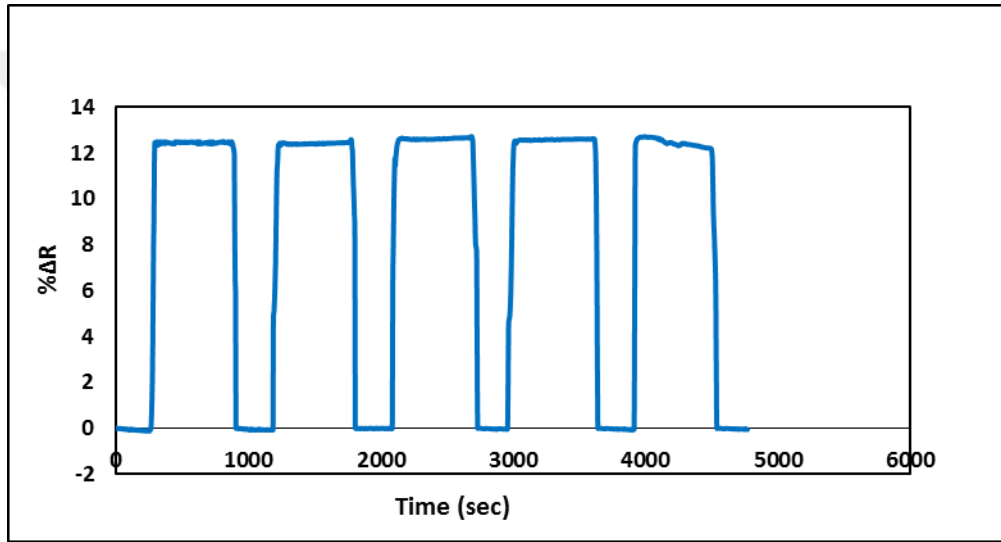
4.3.8. [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR Nanosensörün Tekrar Kullanılabilirliği ve Kararlılığı

SPR temelli biyosensörlerin kullanımda sağladığı en büyük avantajlardan biri tekrar kullanımlarıdır. Tanıma elemanı olarak biyolojik moleküllerin kullanılması durumunda tekrar kullanım sınırlıdır. Çünkü rejenerasyon için kullanılan çözeltiler biyolojik molekülün üç boyutlu yapısını bozarak sensörün tanıma kapasitesini değiştirmekte ve sensör zamanla kullanılamaz hale gelmektedir. Moleküler baskılanmış polimerler ile hazırlanan sensörler ise polimerik yapının sağlamlığı ve çevresel koşullara karşı dayanıklılığı nedeniyle biyomoleküller ile hazırlanan sensörlere göre çok daha uzun süre tekrar kullanılabilme kapasitesine sahiptir.

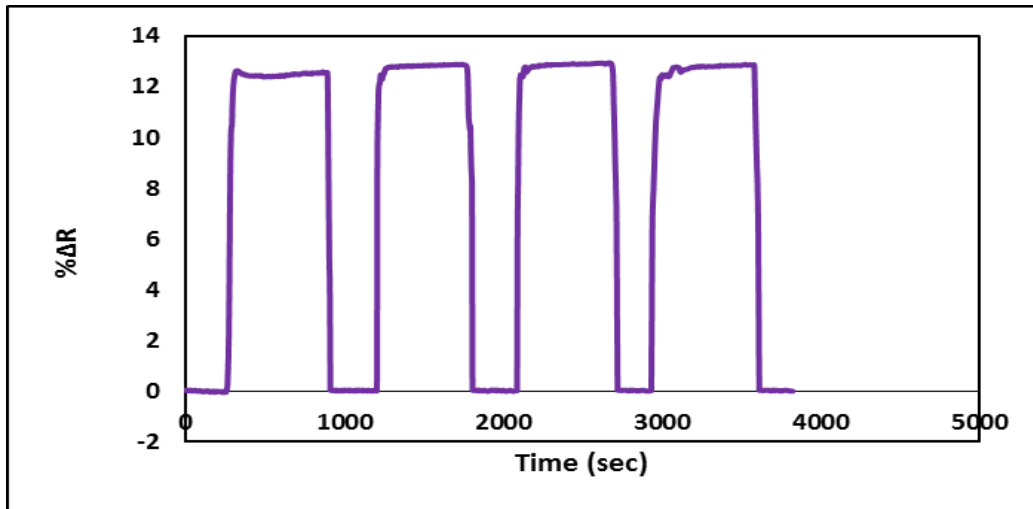
HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün tekrar kullanımı için nanosensör yüzeyi analizden sonra rejenere edilmiştir. MALM monomeri ve HSA arasındaki etkileşim, hidrofobik etkileşimler, hidrofilik ve hidrojen bağlarının ortak etkisi temeline dayanmaktadır. Hidrofobik etkileşimler lösin amino asidinde bulunan aromatik halka ve protein yapısındaki hidrofobik amino asitler arasındaki etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Hidrojen bağlarının da bu kompleks oluşumuna önemli bir katkısı olduğu düşünülmektedir. Bu amaçla HSA molekülünün polimerik yapıdan uzaklaştırılması için HSA molekülü ile lösin

aminoasiti arasındaki etkileşimleri kırabilecek bir desorpsiyon ajanı kullanılmalıdır. Bu amaçla desorpsiyon ajanı olarak 0,05 M NaCl kullanılmıştır.

Şekil 4.19' da nanosensör yüzeyinden ard arda sırasıyla 300 nM derişimindeki HSA çözeltisi HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve desorpsiyon çözeltisi beş defa ardarda geçirilerek kinetik analiz tamamlanmış. Görüldüğü gibi bağlanma bölgelerinde herhangi bir bozulma olmaksızın yüzey beş kez tekrar kullanılabilir. Ayrıca Şekil 4.20'de kararlılık çalışması için aynı nanosensör 3 aylık periyotlarla toplamda 3 kez 4 tekrarlı HSA analizi için kullanılmış ve SPR nanosensörün kararlılığı gösterilmiştir.



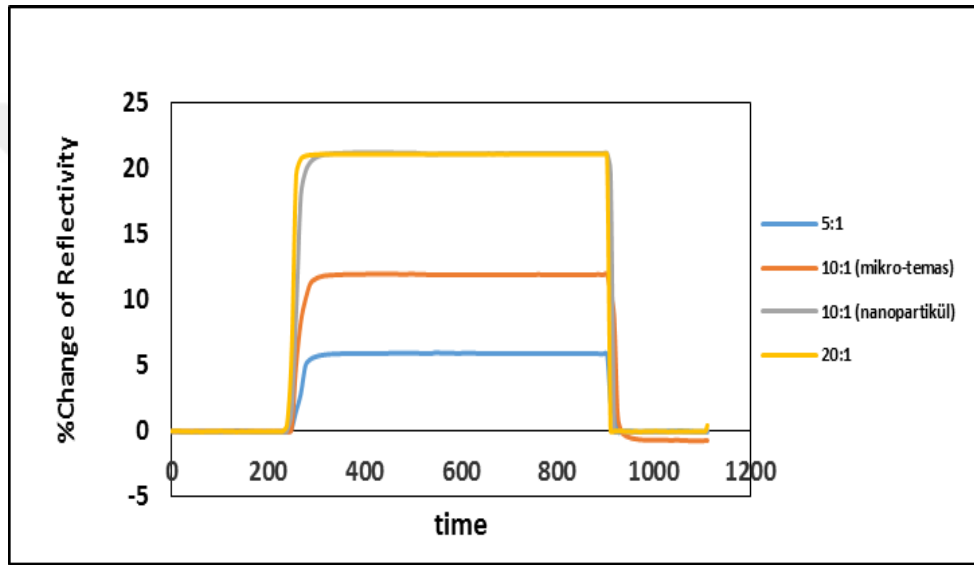
Şekil 4.19. [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensörün tekrar kullanımı



Şekil 4.20. [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensörün kararlılığı

4.4. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle Hazırlanan Nanosensörler

Hedeflenen derişim aralığına inmek amacıyla çalışmanın ikinci kısmında HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküller iki fazlı miniemülsiyon polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Baskılanan HSA molekülünün HSA'nın SPR nanosensör ile tayinine etkisini incelemek için 5:1, 10:1, 20:1 oranındaki MALM:HSA kompleksleriyle hazırlanan nanofilim ve nanopartiküller ile HSA ölçümü gerçekleştirilmiştir.

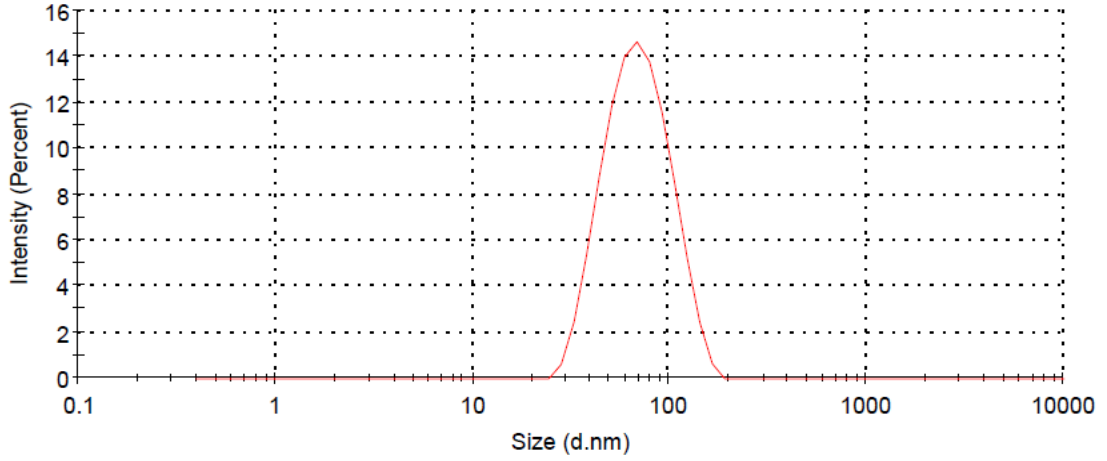


Şekil 4.21. 5:1, 10:1, 20:1 oranındaki MALM:HSA kompleksleriyle hazırlanan nanofilim ve nanopartiküller ile HSA tayini

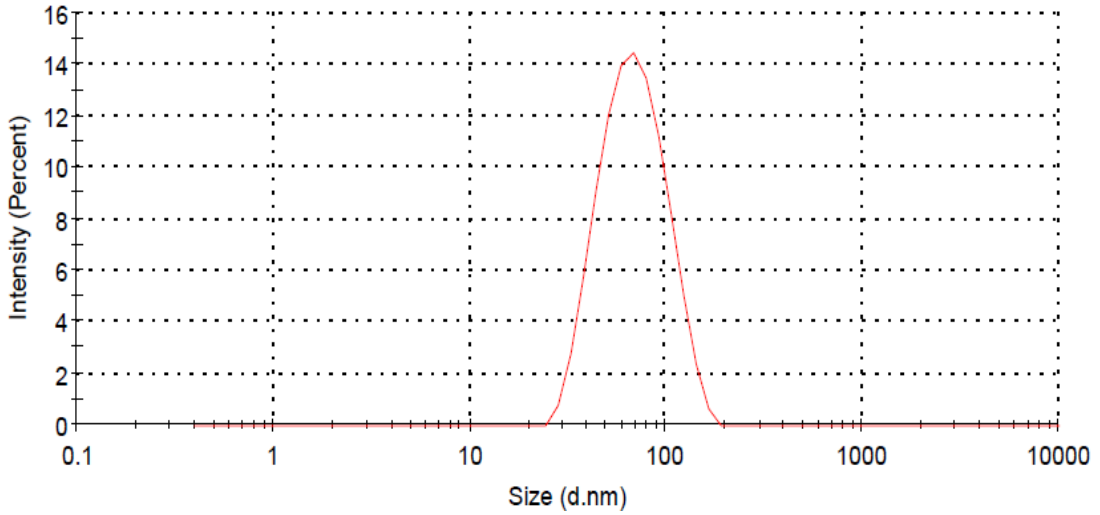
4.4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.4.1.1. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Boyut Analizi

Şekil 4.22'de HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (HSA) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin zeta boyut analizi sonuçları görülmektedir. HSA baskılanmış nanopartiküllerin ortalama boyutu 60 nm ve polidispersitesinin 0.138 olarak bulunmuştur. HSA baskılanmamış nanopartiküller içinse bu değerler sırasıyla 55 nm ve 0.113 olarak bulunmuştur. Ortalama partikül boyutundaki artış polimerizasyona eklenen HSA baskılanmasıyla açıklanabilir.



(a) HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP)

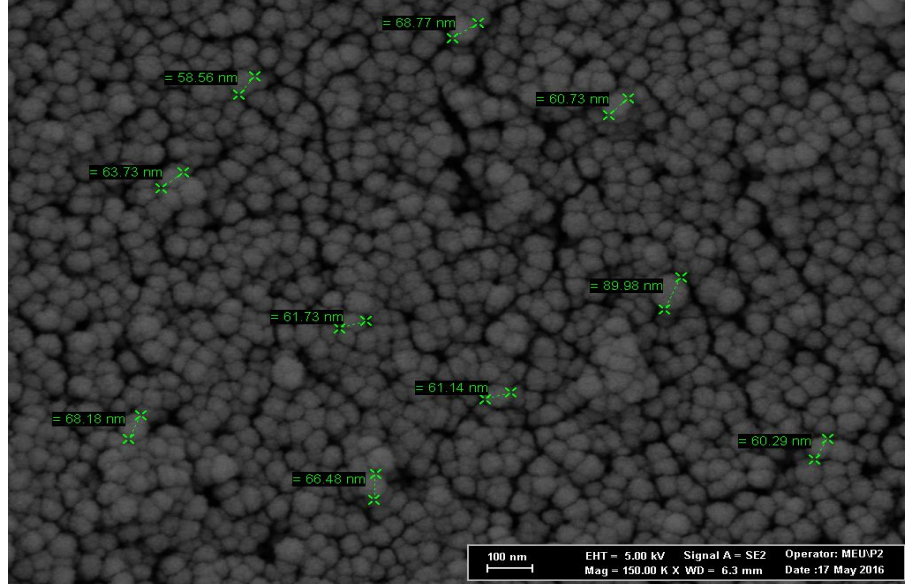


(b) HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP)

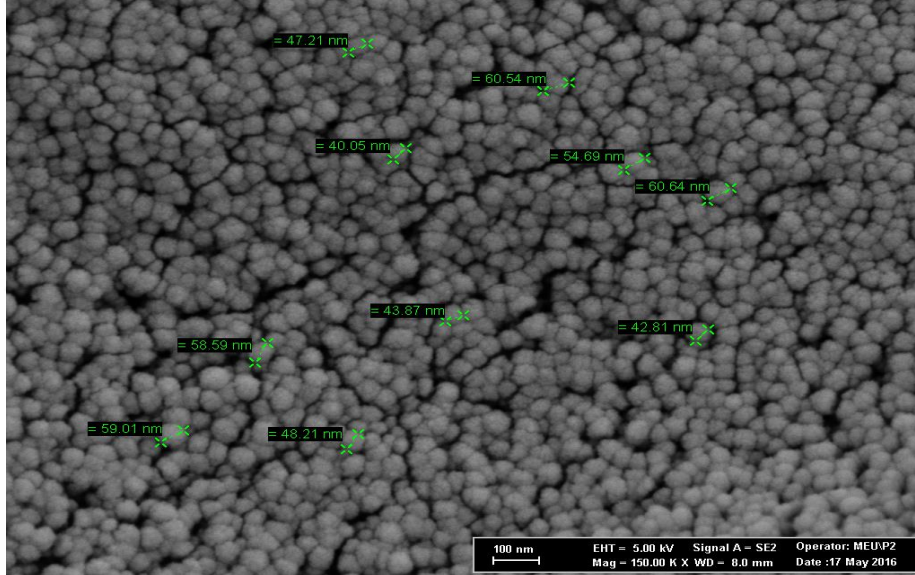
Şekil 4.22. Nanopartiküllerin zeta boyut analizleri

4.4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Şekil 4.23.a ve 4.23.b' de görüldüğü gibi nanopartiküllerin büyüklükleri ortalama 60-65 nm boyutundadır. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin SEM fotoğrafları X50 000 büyütme oranında görüntülenmiştir.



(a) HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP)



(b) HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP)

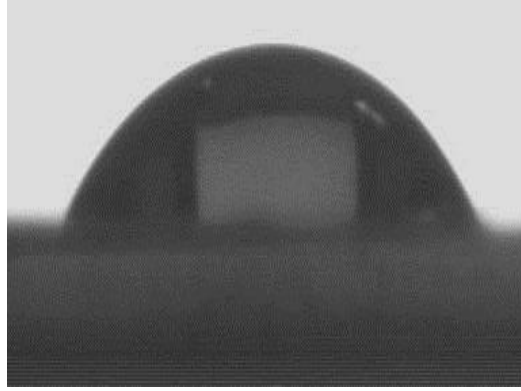
Şekil 4.23. Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) görüntüleri

4.4.2. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle Hazırlanan SPR Nanosensörlerin Karakterizasyonu

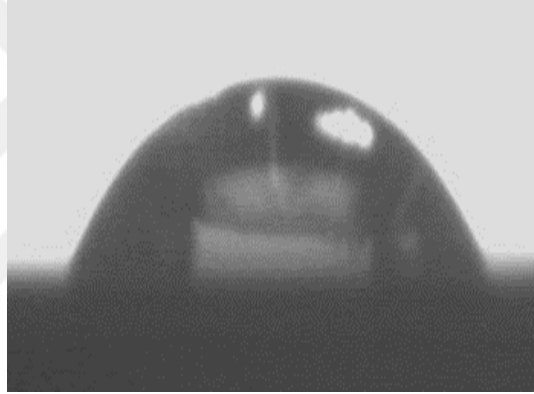
4.4.2.1. Temas Açısı

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin sentezlenmesiyle hazırlanan nanosensör yüzeylerini karakterize

etmek amacıyla temas açıları ölçülmüştür. Şekil 4.24' de yüzeylere ait temas açıları görülmektedir.



(a) HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP)



(b) HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP)

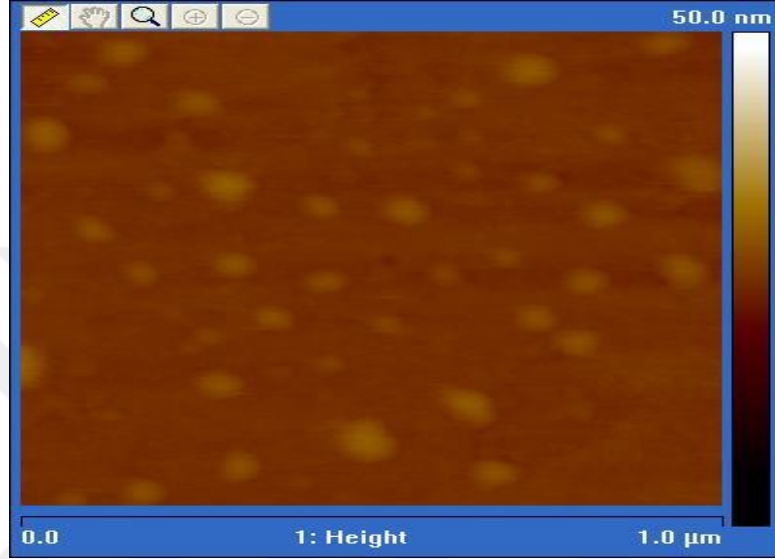
Şekil 4.24. SPR nanosensörlerin temas açıları (a) (b)

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] ve baskılanmamış [PEDMALM] nanosensör yüzeyleri için temas açısı değerleri sırasıyla $67,3 \pm 2,24$ ve $84,5 \pm 4,63$ olarak ölçülmüştür.

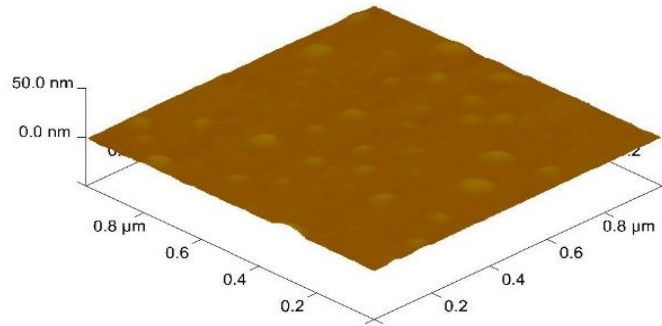
4.4.2.2. AFM

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin sentezlenmesiyle hazırlanan nanosensör yüzeyin morfolojik karakterizasyonu için AFM görüntüleri alınmıştır. Yüzeylere ait AFM görüntüleri Şekil 4.25 ve Şekil 4.26' da gösterilmiştir. AFM ölçümlerinden elde edilen

pürüzlülük değerleri HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküller için sırasıyla 1,61 ve 1,28 nm olarak bulunmuştur. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin pürüzlülük değerleri arasındaki farklılık HSA moleküllerinin başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir.

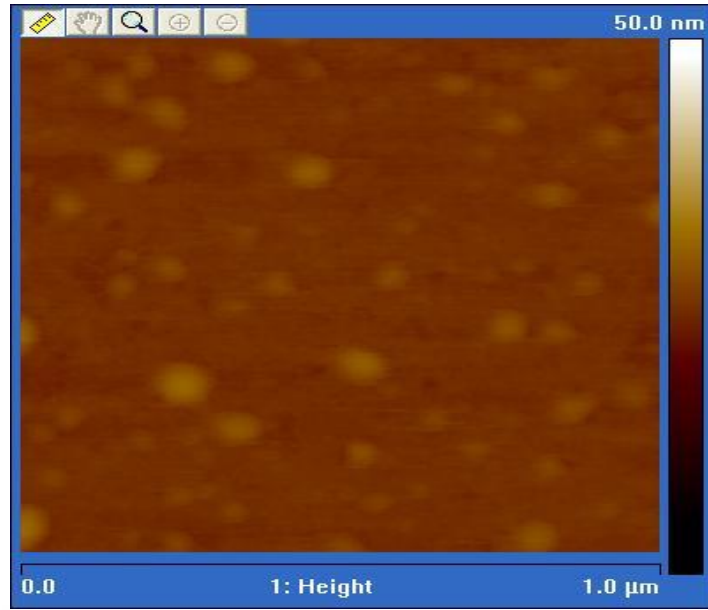


(a) Yüzey görüntüsü

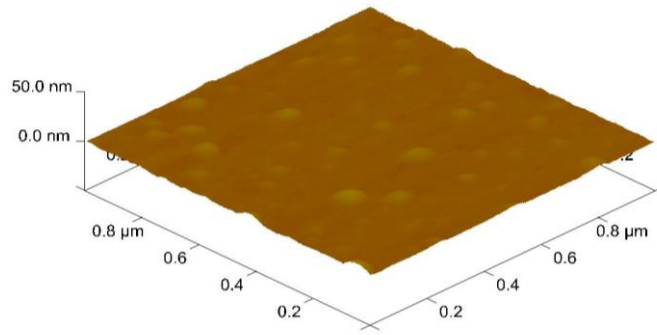


3D görüntüsü (2x2 μm^2)

Şekil 4.25. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensörlerin AFM görüntüsü



(a) yüzey görüntüsü



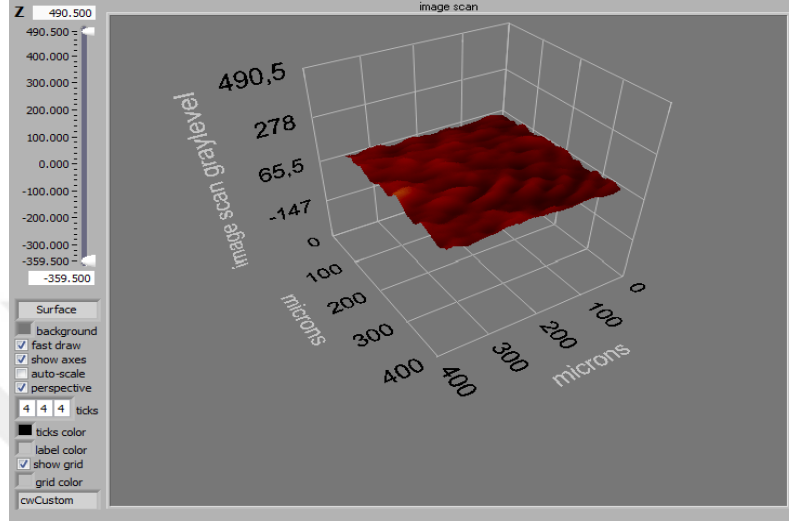
(b) 3D görüntüsü (2x2 μm^2)

Şekil 4.26. HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensörlerin AFM görüntüsü (a) (b)

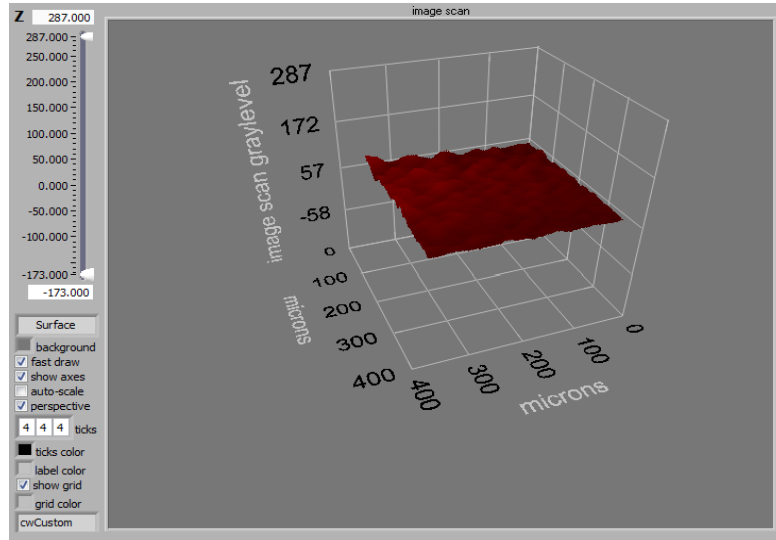
4.4.2.3. Elipsometre Analizi

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin sentezlenmesiyle hazırlanan nanosensörlerin yüzey kalınlık ölçümleri için Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı kullanıldı. Ölçümler 532 nm dalga boyunda, 60,5°'lik bir geliş açısında gerçekleştirildi. SPR sensör lazer ışık kaynağı altına yerleştirildi. Yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 cam + 2 nm titanyum tabaka ve 42,5 nm altın tabaka olarak öngörüldü. Ölçümler sensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere

tekrarlandı ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edildi. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensörler sırasıyla $118,4 \pm 0,3$ – $116,7 \pm 0,3$ nm kalınlıktadır.



(a) HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP)

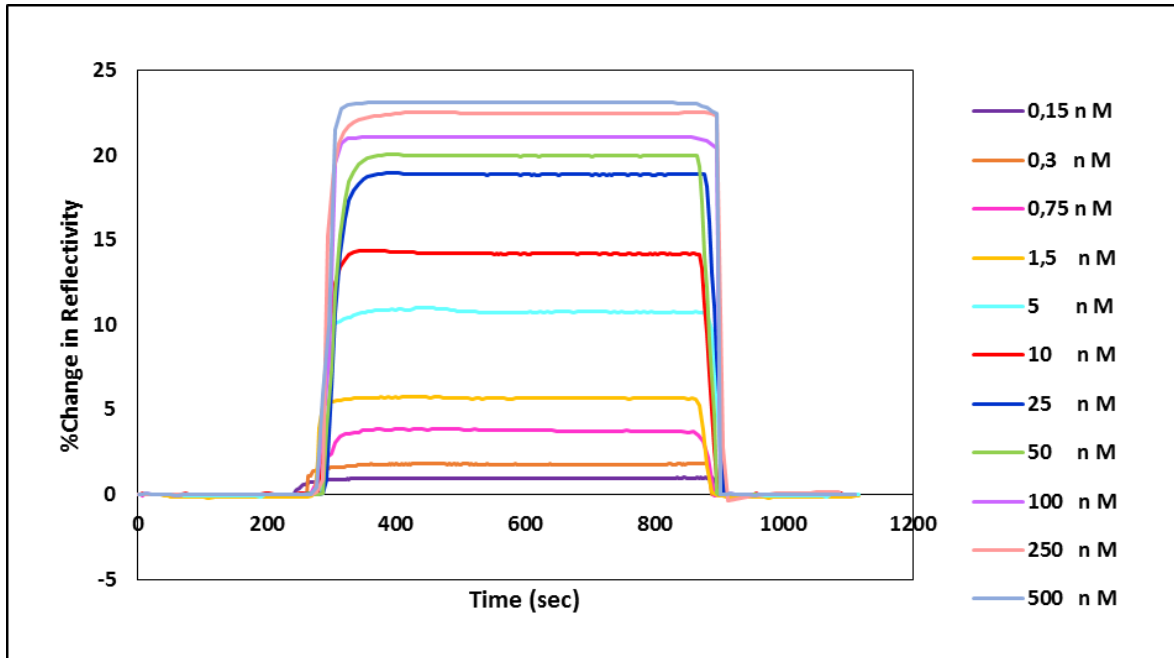


(b) HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP)

Şekil 4.27. SPR nanosensörlerin 3D Elipsometre görüntüsü

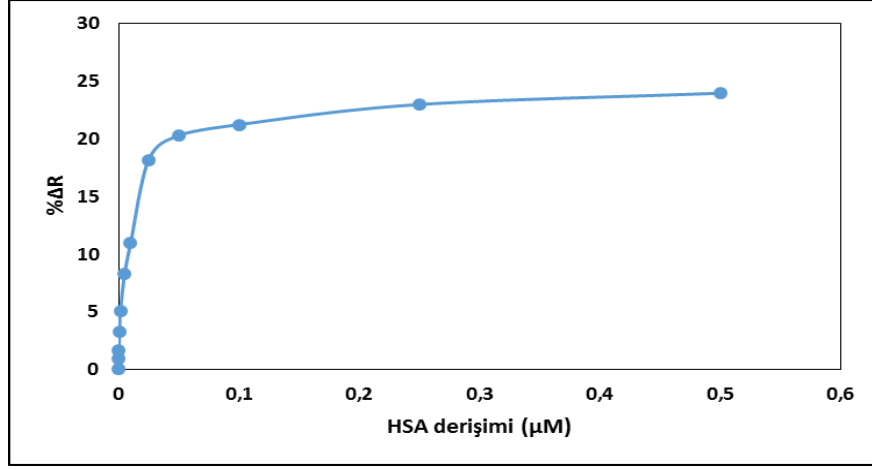
4.4.3. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR Nanosensör ile Kinetik Çalışmalar

Bu çalışmada hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerin sentezlenmesiyle hazırlanan nanosensörün HSA derişimi ile SPR sinyali arasındaki ilişkiye bakıldı ve bu ilişkinin değeriendirilebilmesi için farklı derişimlerde (0,15-500 nM) HSA çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığıyla HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörle etkileştirilerek sensorgramlar alındı. Şekil 4.28' de farklı derişimlerde HSA çözeltileri ile etkileşimden elde edilen sensorgramlar toplu halde görölmektedir.

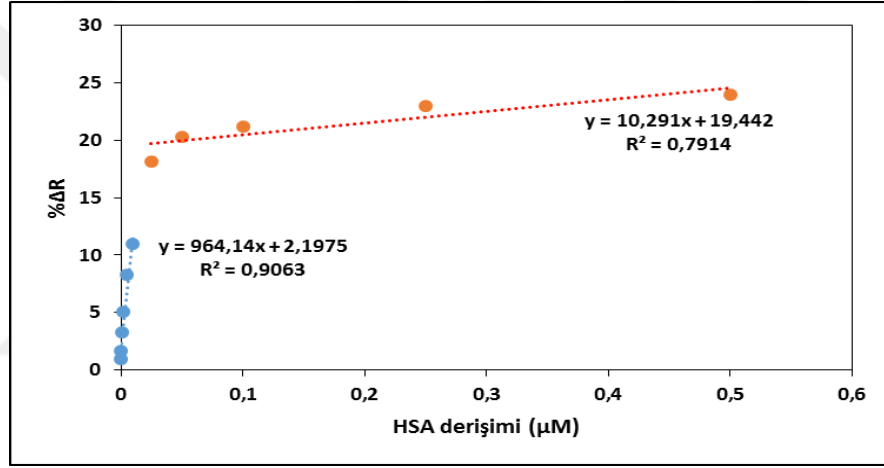


Şekil 4.28. HSA çözeltileri ile HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramların çakıştırılması

Şekil 4.28' de göröldüğü gibi yüzeye HSA gönderilmesi ile birlikte birlikte %ΔR değeri artmaktadır. Standart bir ölçümde; sistemden öncelikle yaklaşık 3 dakika denge tamponu, daha sonra, sistem yeniden dengeye ulaşana kadar yaklaşık 10 dakika HSA çözeltisi geçirilmiş ve sonra yaklaşık 2 dakika desorpsiyon ajanı kullanılmıştır. İki ölçüm arasında 15 dakika tampon çözeltisi geçirilerek sistem rejenere edilerek sistem dengeye getirilmiştir.



Şekil 4.29. HSA derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki



Şekil 4.30. 0,15–10 nM ve 25–500 nM aralıklarında HSA derişimi ile % ΔR arasındaki ilişki

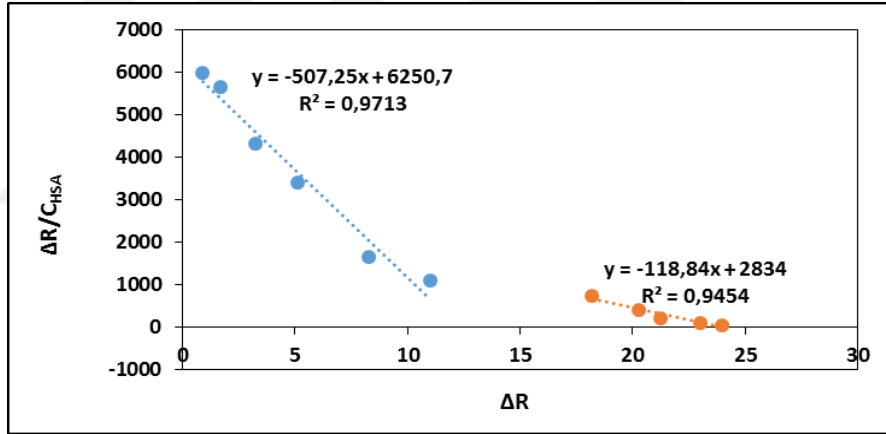
Şekil 4.30' de görüldüğü gibi SPR sensör, 0,15-500 nM derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu aralıktaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen iki doğrunun denklemi ve doğrusallıkları sırasıyla $y_1=964,14x+2,1975$, 0,9063 ve $y_2=10,291x+19,442$, 0,7914 olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensör için elde edilen veriler kullanılarak tayin sınırı (LOD) ve tayin değeri de belirlendi. Tayin sınırının (LOD) hesaplanması için $3s/m$ denklemi kullanıldı ve 0,7 pM hesaplanmıştır. Sağlıklı bir böbreğe sahip insanların idrarına albümin hiç sızmamalıdır. Buna rağmen albüminürinin idrara sızmasının belli bir kısmı normal olarak kabul edilmektedir. Bu referans aralığını geçtiği takdirde insan sağlığında ciddi sıkıntılara yol açabilmektedir.

Çizelge 4.8. Albüminüri tanım ve sınır değerleri

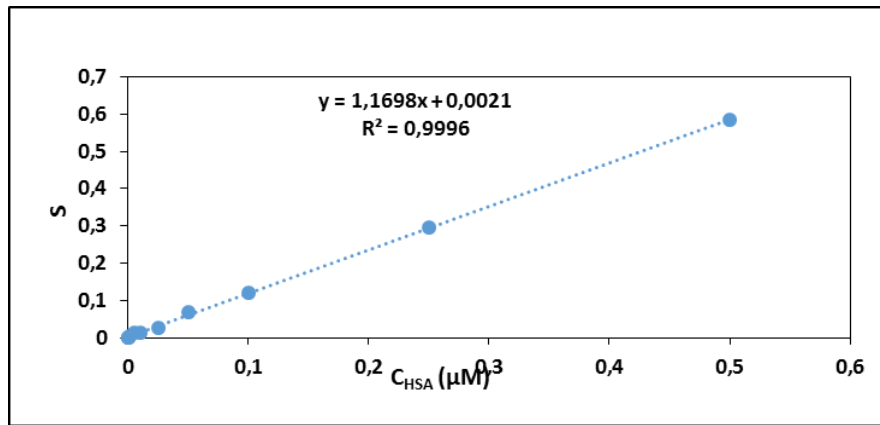
Tanım	Protein (mg/gün)	Albümin (mg/gün)	Spot idrar (mg/gün)
Normal	<150	<30	<30 µg albümin/mg kreatinin
mikroalbüminüri	<500	30-300	30-300 µg albümin/mg kreatinin
makroalbüminüri	≥500	>300	>300 µg albümin/mg kreatinin

Ayrıca 0,15-500 nM HSA derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu sonuçlara göre HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün, idrara albüminin sızması durumunda mikroalbüminin tayinini başarıyla gerçekleştirebilecek sensör özelliklerine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

4.4.4. Kinetik Analizler



(a) Denge analiz yaklaşımı



(b) Bağlanma kinetik yaklaşımı

Şekil 4.31. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi

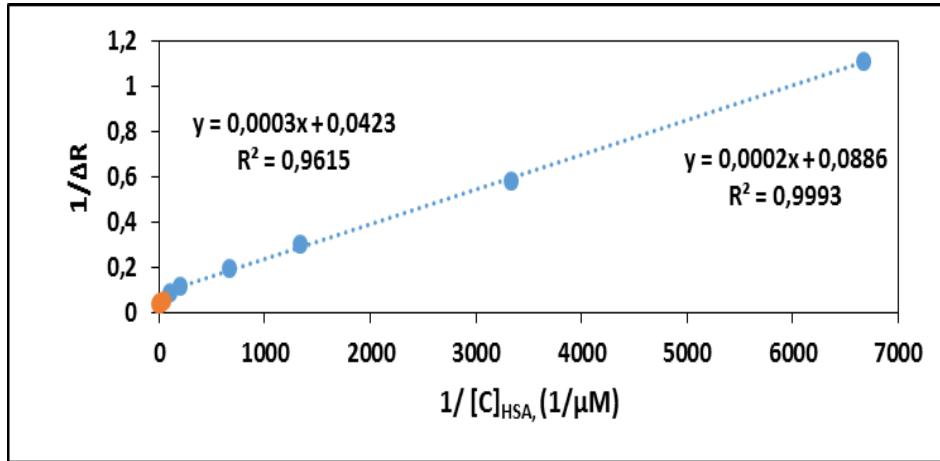
Çizelge 4.9. Kinetik hız sabitleri (0,15-10 nM)

Denge Analiz (Scathard)		Bağlanma Kinetik	
$\Delta R_{\max}$	12,32742	$k_a, \mu M^{-1}.s^{-1}$	1,16
$K_A, \mu M^{-1}$	507,25	k_d, s^{-1}	0,0021
$K_D, \mu M$	0,001972	$K_A, \mu M^{-1}$	552,381
R^2	0,9713	$K_D, \mu M$	0,00181
		R^2	0,9996

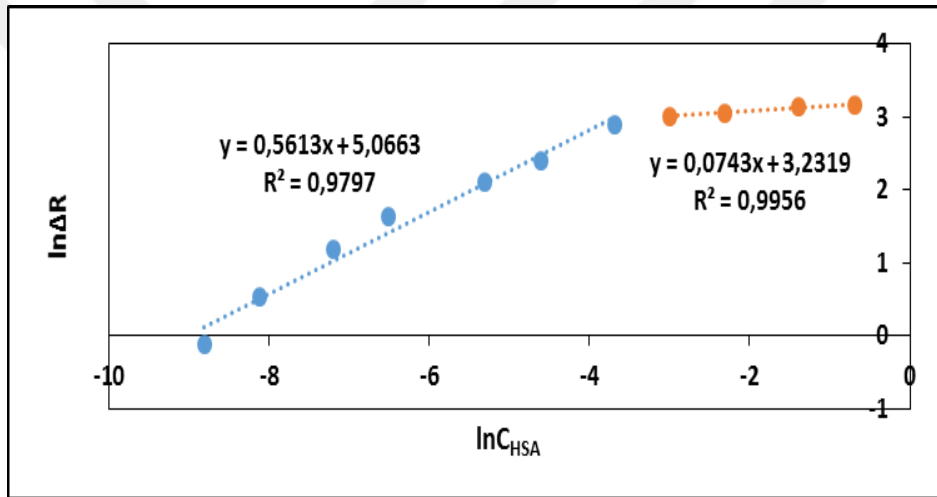
Çizelge 4.10. Kinetik hız sabitleri (25-500 nM)

Denge Analiz (Scathard)		Bağlanma Kinetik	
$\Delta R_{\max}$	23,84719	$k_a, \mu M^{-1}.s^{-1}$	1,16
$K_A, \mu M^{-1}$	118,84	k_d, s^{-1}	0,0021
$K_D, \mu M$	0,08415	$K_A, \mu M^{-1}$	552,381
R^2	0,9454	$K_D, \mu M$	0,00181
		R^2	0,9996

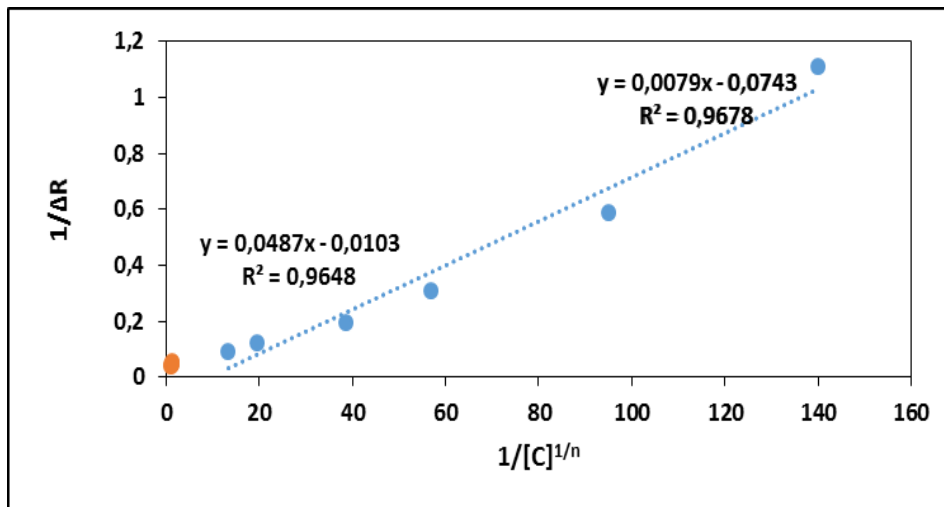
4.4.5. Denge İzoterm Modelleri



(a) Langmuir



(b) Freundlich



(c) Langmuir-Freundlich

Şekil 4.32. Adsorpsiyon modelleri

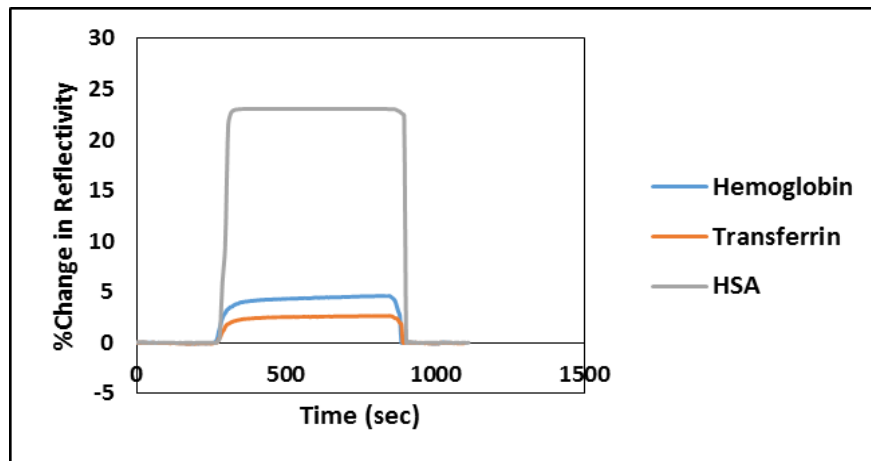
Çizelge 4.11. Langmuir, Freundlich ve Langmuir - Freundlich parametreleri (0,15–10 nM)

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
$\Delta R_{\max}$	11,28668	$\Delta R_{\max}$	157	$\Delta R_{\max}$	13,45895
$K_A, \mu M^{-1}$	443	$1/n$	0,5613	$1/n$	0,5613
$K_D, \mu M$	0,002257	R^2	0,9797	$K_A, \mu M^{-1}$	9,405063
R^2	0,9993			$K_D, \mu M$	0,106326
				R^2	0,9678

Çizelge 4.12. Langmuir, Freundlich ve Langmuir - Freundlich parametreleri (25 – 500 nM)

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
$\Delta R_{\max}$	23,64066	$\Delta R_{\max}$	25,28	$\Delta R_{\max}$	100
$K_A, \mu M^{-1}$	141	$1/n$	0,074	$1/n$	0,074
$K_D, \mu M$	0,007092	R^2	0,9956	$K_A, \mu M^{-1}$	0,205339
R^2	0,9615			$K_D, \mu M$	4,87
				R^2	0,9848

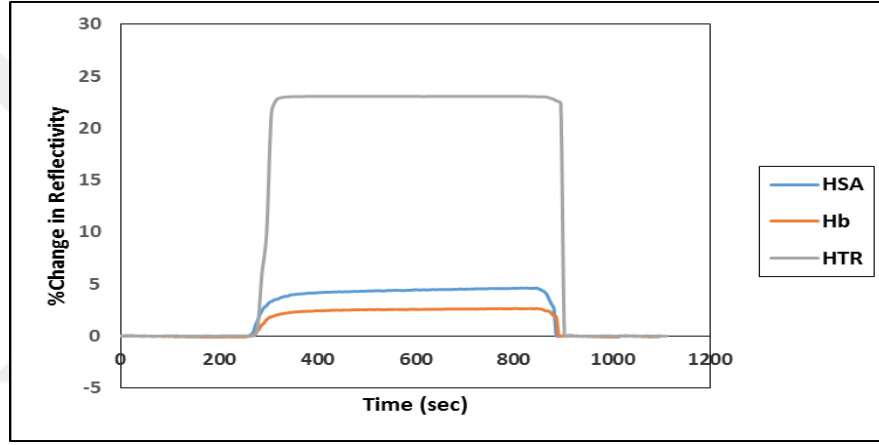
4.4.6. Yarışmalı Kinetik Analizler



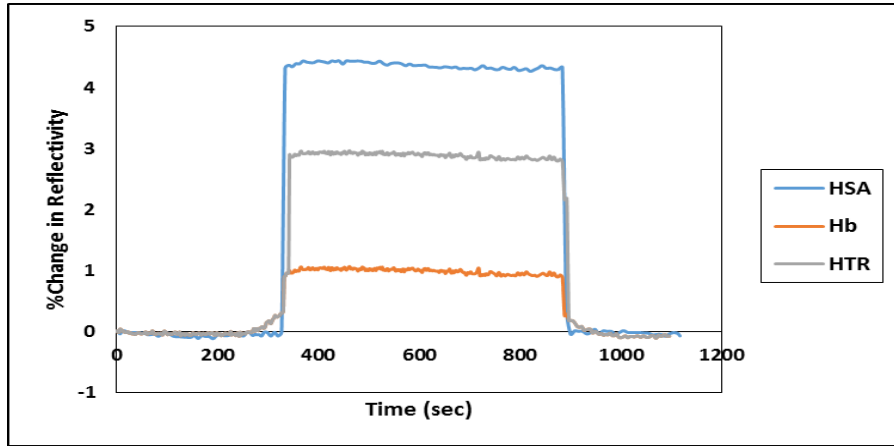
Şekil 4.33. 500 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar

4.4.7. Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensör hazırlanmıştır. 500 nM fosfat tamponunda (pH 7,4) hemoglobin, transferrin ve HSA çözeltileri hazırlanmıştır. HSA baskılanmamış [PHEMALM] (NIP) nanosensörün bu çözeltilere gösterdiği tepki, Şekil 4.34' de % ΔR /Zaman fonksiyonu olarak verilmiştir. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensörler karşılaştırıldığında; HSA sinyalinin duyarlılığının düştüğü görülmektedir. Seçicilik katsayıları Çizelge 4.13' de özetlenmiştir



(a)



(b)

Şekil 4.34. (a) 500 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA baskılanmış nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar (b) 500 nM derişiminde HSA, Hb ve HTR proteinlerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile HSA

baskılanmamış nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar

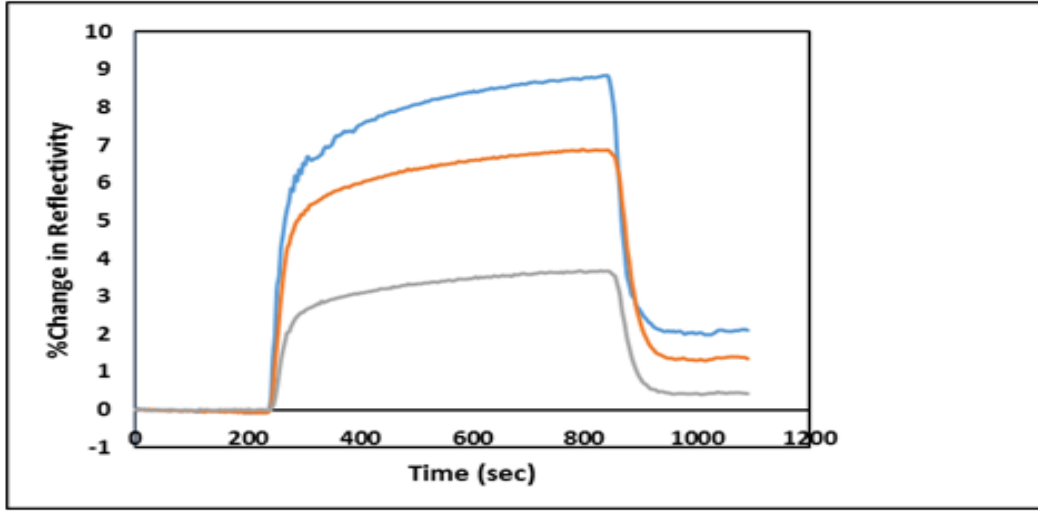
Çizelge 4.13. HSA'ya göre Hb ve HTR için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları

MIP			NIP		
Protein	ΔR	K	ΔR	K	k'
HSA	23,09		4,38		
Hemoglobin	4,48	5,33	2,8	1,564286	3,4
Transferin	2,5	9,56	0,98	4,469388	2,1

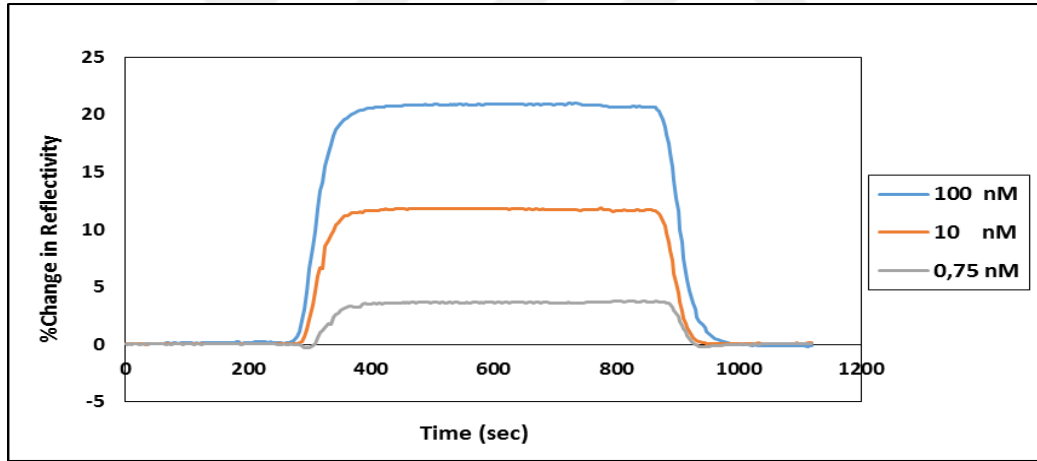
4.4.8. Yapay Plazma ve Yapay İdrar Çalışmaları

SPR sinyali ile bir doğal kaynak olan plazma arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı oranlarda seyreltilmiş plazma örnekleriyle $1:2 \times 10^3$, $1:6 \times 10^3$ ve $1:12 \times 10^3$ (pH 7,4 fosfat tamponu) çalışılmıştır. Plazma örnekleri peristaltik pompa aracılığıyla SPR sensörle etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alınmıştır. Şekil 4.35' de farklı seyreltme oranlarında plazma örneklerinden elde edilen sensorgramlar verilmektedir.

Şekil 4.35' de plazma çalışmalarından elde edilen ΔR /zaman sensorgramları verilmektedir. Şekillerden de görüldüğü gibi azalan seyreltme oranı (artan derişim) ile birlikte HSA baskılanmış sensörün sinyal değeri artmaktadır. Oldukça yüksek seyreltme oranlarında bile baskılanmış sensörlerin sinyal verdiği görülmektedir. Bu kapsamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçların en önemli noktası, plazma gibi kompleks bir ortamda (%91 su, %7 proteinler, %2 iyonlar, besinler, gazlar, atıklar, hormonlar) bile HSA'nın teşhis edilebildiğinin belirlenmesidir. Ardından idrar çalışmaları yapılmıştır. İdrar içerisine hazırlanan 1,5-50-100 nM derişimlerdeki HSA çözeltileri ayrı ayrı enjekte edilmiştir. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün hazırlanan bu çözeltilere gösterdiği tepki, Şekil 4.36' da % ΔR /Zaman fonksiyonu olarak verilmiştir. Sonuç olarak HSA baskılanmış sensörler, hem yapay plazma çözeltilerden hem de yapay idrar çözeltilerinden HSA tayininde başarı ile kullanılabilmektedir.



Şekil 4.35. $1:2 \times 10^3$, $1:6 \times 10^3$ ve $1:12 \times 10^3$ oranında seyreltilerek elde edilen yapay plazma örneğinin HSA baskılanmış nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör ile etkileştirilmesiyle elde edilen sensorgram

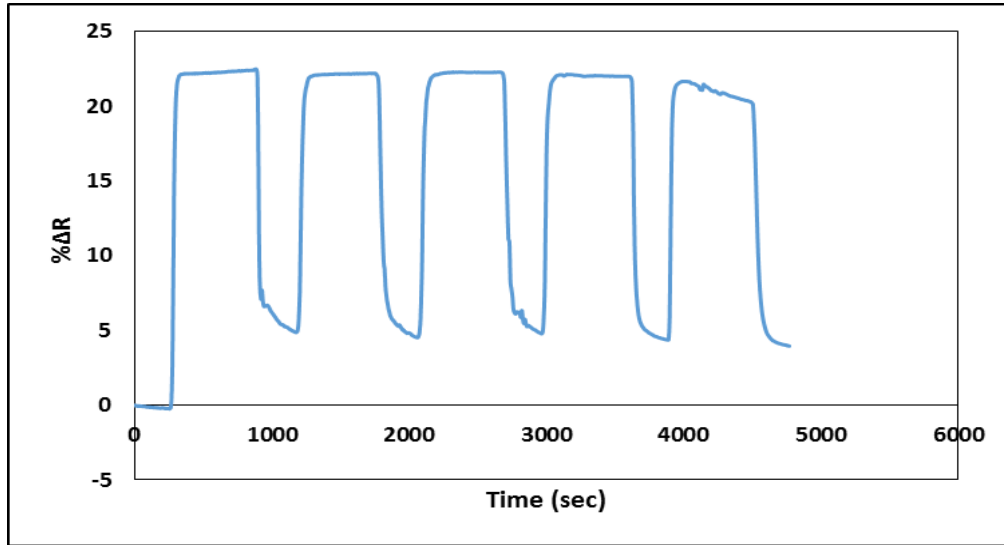


Şekil 4.36. 0,75, 10, 100 nM HSA spike edilmesiyle elde edilen yapay idrar örneğinin HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensör ile etkileştirilmesiyle elde edilen sensorgram

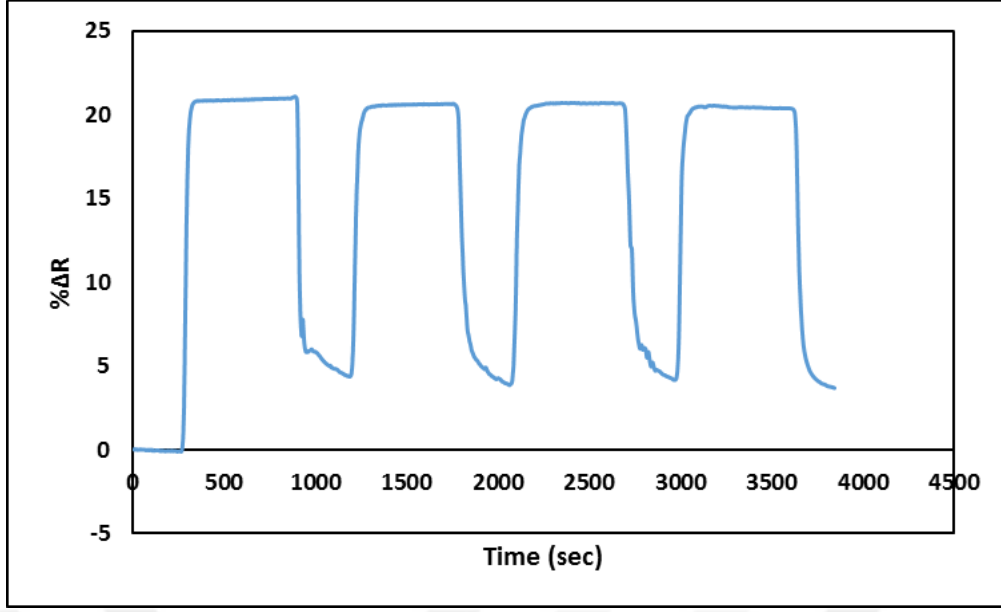
4.4.9. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR Nanosensörün Tekrar Kullanılabilirliği ve Kararlılığı

SPR temelli biyosensörlerin kullanımda sağladığı en büyük avantajlardan biri tekrar kullanımdır. Tanıma elemanı olarak biyolojik moleküllerin kullanılması durumunda tekrar kullanım sınırlıdır. Çünkü rejenerasyon için kullanılan çözeltiler biyolojik molekülün üç boyutlu yapısını bozarak sensörün tanıma kapasitesini değiştirmekte ve sensör zamanla kullanılamaz hale gelmektedir. Moleküler baskılanmış polimerler ile hazırlanan sensörler ise polimerik yapının sağlamlığı ve çevresel koşullara karşı dayanıklılığı nedeniyle biyomoleküller ile hazırlanan sensörlere göre çok daha uzun süre tekrar kullanılabilme kapasitesine sahiptir.

Şekil 4.37' de HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensör yüzeyinden sırasıyla 500 nM derişimindeki HSA çözeltisi ve desorpsiyon çözeltisi beş defa ardarda geçirilerek kinetik analiz tamamlanmış. Görüldüğü gibi bağlanma bölgelerinde herhangi bir bozulma olmaksızın yüzey beş kez tekrar kullanılabilir. Ayrıca Şekil 4.38' de kararlılık çalışması için aynı nanosensör 3 aylık periyotlarla toplamda 3 kez 4 tekrarlı HSA analizi için kullanılmış ve SPR nanosensörün kararlılığı gösterilmiştir.



Şekil 4.37. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanopartiküllerle hazırlanan SPR nanosensörün tekrar kullanımı



Şekil 4.38. HSA baskılanmış nanopartiküllerle hazırlanan [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensörün kararlılığı

5. SONUÇ VE YORUM

5.1. Mikro-temas Yöntemiyle HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) SPR Nanosensörlerin Hazırlanması

N-Metakriloil-L-Lösin metil ester (MALM) monomeri, L-Lösin metil esterinin metakroil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir. Elde edilen monomer NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir.

MALM monomerinin yapısının belirlenmesi için FTIR tekniği de kullanılmıştır. 3362 cm^{-1} de görülen pik (-NH) gerilme bandına, 2972 cm^{-1} de ki pik alifatik (C-H) gerilmelerinden kaynaklanan absorpsiyon bandına, 1729 cm^{-1} deki pik ester karbonil (C=O) grubuna ait gerilme bandına, 1652 cm^{-1} de görülen pik amid (C=O) grubuna ait banda, 1621 cm^{-1} deki pik vinil grubunun (C=C) bandına, 1526 cm^{-1} deki pik (N-H) bandına aittir. FTIR ve NMR sonuçları monomerin başarıyla sentezlendiğini göstermiştir.

N-Metakriloil-L-Lösin metil ester (MALM) monomeri sentezlendikten sonra kimyasal yapısının belirlenmesi için proton NMR analizi yapılmış (CDCl_3) ve kayma değerleri kaydedilmiştir: δ 0.95 (6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.513–1.641 (1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.630–1.704 (2H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.958 (3H, COOCH_3), 4.065–4.168 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CHCOOCH}_3$), 1.950 (3H, CH_2CCH_3), 5.720 (s, 1H, $\text{CH}(\text{H})=\text{CCH}_3$), 5.354 (s, 1H, $\text{CH}(\text{H})\text{CCH}_3$) olarak belirlenmiştir.

Protein kalıbının hazırlanmasında kullanılacak cam yüzeyin her bir aşaması temas açısı analizleri ile karakterize edilmiştir.

HCl ve NaOH ile temizlenmiş cam için temas açısı $32,2^\circ \pm 2,58$ iken APTES ile modifiye edilmiş cam için bu değer $40,10^\circ \pm 0,21$ 'ye yükselmiştir. Bu değişim APTES ile muamele sonucunda cam yüzeyinin daha hidrofobik bir karakter kazandığını göstermektedir. APTES ile kaplanmış cam yüzey daha sonra glutaraldehit ile modifiye edilmiş ve temas açısı $59,6^\circ \pm 2,94$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuca göre yüzey biraz daha hidrofobik hale gelmiştir. Çünkü glutaraldehit, APTES den gelen amin uçlarını imin oluşumuyla kapatmış ve içerdiği hidrokarbon zincirinden dolayı da hidrofobik özellik kazandırmıştır. HSA'nın kovalent olarak bağlandığı cam yüzeyinde ise temas açısı $63,4^\circ \pm 3,11$ olarak elde edilmiştir. Bu değişimler HSA proteinin cam yüzeyine bağlandığını gösteren sonuçlardan biridir.

SPR altın sensör yüzeyinde HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) filmin hazırlanabilmesi için ilk olarak yüzey doymamış bağlar içeren allil merkaptan ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{SH}$) içinde 24 saat bekletilerek kaplanmıştır.

MALM:HSA ön-kompleksinin spektrofotometrik ölçümü incelendiğinde 10:1 μmol oranından sonra elde edilen spektrumdaki MALM:HSA kompleksleşmesinden meydana gelen sinyal şiddetinin artmasının sona erdiği tespit edilmiş ve polimerleşme bu oran üzerinden gerçekleştirilmiştir. Farklı monomer template oranlarında hazırlanan nanopartiküller ile yapılan kinetik çalışmalarında $\%\Delta R$ değerinin 10:1 μmol oranından sonra fazla bir değişim göstermediği görülmüştür.

Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) filmler FTIR-ATR, temas açısı, AFM ve elipsometre cihazlarıyla karakterize edilmiştir.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensör yüzeyine ait absorpsiyon bandları şu şekildedir; MALM monomerinin EDMA monomerinin yapısına katılarak oluşturduğu [PEDMALM] (NIP) nanofilmin yapısı FTIR ile karakterize edilmiştir. MALM monomerinin ester grubuna ait 1729 cm^{-1} deki karbonil bandı ($\text{C}=\text{O}$) [PEDMALM]'ın yapısına katıldığı için 1718 cm^{-1} 'e kaymıştır. Yine aynı şekilde 1652 cm^{-1} de görülen pik amid ($\text{C}=\text{O}$) grubuna ait band polimerik yapıya katılımdan dolayı 1637 cm^{-1} 'e kaymıştır. MALM monomerine ait 1621 cm^{-1} deki vinil grubuna ait ($\text{C}=\text{C}$) bandı polimerleşmeden dolayı yok olmuştur. 1526 cm^{-1} deki pik ($\text{N}-\text{H}$) bandına ait pik polimerleşmeden dolayı 1550 cm^{-1} 'e kaymıştır. Bu da polimerleşmenin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Allil merkaptan ile modifiye edilmiş, yüzeyinde HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) film hazırlanmış altın yüzeylerin ıslanabilirlik özelliklerinin incelenmesi amacıyla bu yüzeylerin su ile yaptıkları temas açıları ölçülmüştür. Su ile yapılan temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi, HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensör yüzeylerinin temas açısı değerleri sırasıyla $55,2^\circ \pm 2,24$ ve $61,5^\circ \pm 4,63$ olarak ölçülmüştür.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) altın yüzeyin morfolojik karakterizasyonu için AFM görüntüleri alınmıştır. AFM ölçümlerinden elde edilen pürüzlülük değerleri HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış

[PEDMALM] (NIP) nanoflimler için sırasıyla 3,64 ve 2,47 nm olarak bulunmuştur. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanofilmlerin pürüzlülük değerleri arasındaki farklılık HSA moleküllerinin başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir.

Elipsometri sonuçlarına göre hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) filmlerin kalınlığı sırasıyla $95 \pm 4,9$ nm ve $89,9 \pm 6,3$ nm olarak ölçülmüştür. Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensörlerin uygun kalınlık değerine sahip olduğu ve optik transdüser prensibi ile çalışan SPR sensör sistemi ile büyük bir uyum göstereceği görülmüştür.

HSA derişimi ile ΔR arasındaki ilişki incelenmiştir. Görüldüğü gibi HSA derişimi arttıkça ΔR değerleri artmaktadır. Yaklaşık 200 nM derişim değerinden sonra yüzeydeki aktif bölgelerin dolmasına bağlı olarak bu artış hızı azalmakta ve yaklaşık 300 nM değerinde dengeye ulaşılmaktadır. Bu derişimde elde edilen ΔR değeri 12,9' dur.

Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör, 1,5-25 nM derişim aralığında ve 50-300 nM derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu aralıklardaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemleri ve doğrusallıkları sırasıyla, $y_1=375,04x+1,409$, 0,9179 ve $y_2=7,2663x+10,884$ ve 0,9066 olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] nanosensör için elde edilen veriler kullanılarak tayin sınırı (LOD) 8,8 pM olarak belirlenmiştir.

Elde edilen verilerin Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich absorpsiyon modellerine uygunluğu araştırıldı. $R^2 = 0,9989$ değeri ile en uygun adsorbsiyon modelinin Langmuir absorpsiyon modeli olduğu belirlendi. Bu sonuç; hazırlanan baskılanmış sensör yüzeyindeki HSA bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanal etkileşimli olduğunu göstermiştir. Buradan hesaplanan $\Delta R=13,90821$ değeri deneysel değere (12,9 nM) yakındır. Langmuir denkleminde hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla $79,89 \mu/M^{-1}$ ve 0,012512 μM olarak belirlenmiştir.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün HSA'e karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri 300 nM derişimindeki

hemoglobin, transferrin ve HSA çözeltilerinin ayrı ayrı nanosensör yüzeyine gönderilmesiyle incelenmiştir. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün hemoglobinin verdiği sensorgram sinyal değeri ($\% \Delta R$); 1,3, transferrin ile verdiği sinyal değeri ($\% \Delta R$); 0,8'dir. Aynı derişimdeki HSA için elde edilen sinyal değeri ($\% \Delta R$) ise 12,92' dir. Bir başka deyişle; HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] nanosensör HSA' yı; hemoglobine göre 9,94 kat, transferrine göre 16,15 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensör hazırlanmıştır. HSA baskılanmamış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün hemoglobinin verdiği sensorgram sinyal değeri ($\% \Delta R$); 0,96, transferrin ile verdiği sinyal değeri ($\% \Delta R$); 0,5'tir. Aynı derişimdeki HSA için elde edilen sinyal değeri ($\% \Delta R$) ise 1,9'dur. Bir başka deyişle; HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensör HSA' yı; hemoglobine göre 1,98 kat, transferrine göre 3,8 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir.

Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] nanosensörler karşılaştırıldığında; HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] nanosensörün, HSA'nın hemoglobin'e göre 5,02 kat, transferrin'e göre 4,25 kat seçicilikte tanıdığı tespit edilmiştir.

Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün etkinliği yapay plazma ve yapay idrar örnekleriyle çalışılarak belirlenmiştir.

Yapay plazma, 1 ml saf su ile çözülerek hazırlanmış ve 3 farklı seyreltme oranları ile ($1:1 \times 10^3$, $1:2 \times 10^3$, $1:3 \times 10^3$) analiz edilmiştir. Her bir derişim için elde edilen sinyal değeri ($\% \Delta R$) sırasıyla 4,52, 3,85 ve 2,48'dir. Bu kapsamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçların en önemli noktası, plazma gibi kompleks bir ortamda (%91 su, %7 proteinler, %2 iyonlar, besinler, gazlar, atıklar, hormonlar) bile HSA' nın teşhis edilebilirliği nanosensör hassaslığında bir kayıp olmadan gösterilmiştir.

Yapay idrar hazırlandı ve içerisine 3 farklı derişimde (1,5, 25, 300 nM) HSA spike edilmiştir. Her bir derişim için elde edilen $\% \Delta R$ değerleri sırasıyla 0,83, 7,96 ve 11,6 olarak tespit edilmiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen

sonuçların en önemli noktası, idrar gibi kompleks bir ortamda bile HSA'nın teşhis edilebilirliği nanosensör hassaslığında bir kayıp olmadan gösterilmiştir..

Sensör yüzeyinin rejenerasyonu için 0,05M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Yüzey tekrarlanabilir bir şekilde beş kez kullanılmıştır. Beş kez tekrar kullanımda yüzey başarıyla rejenere edilebilmiş ve bağlanma kapasitesinde bir kayıp olmamıştır. Kararlılık çalışması için aynı nanosensör 3 aylık periyotlarla toplamda 3 kez 4 tekrarlı HSA analizi için kullanılmış ve SPR nanosensörlerin kararlılığı gösterilmiştir.

5.2. HSA Baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve Baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) Nanopartiküllerin Sentezlenmesiyle Hazırlanan Nanosensörler

Hedeflenen derişim aralığına inebilmek amacıyla çalışmanın ikinci kısmında HSA tayini için HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve kontrol deneyleri için HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküller iki fazlı miniemülsiyon polimerizasyon yöntemiyle başarıyla sentezlenmiştir. Sabit miktarda HSA varlığında MALM monomerinin miktarının değiştirilmesiyle MALM:HSA (5:1; 10:1; 20:1) sentezlenen nanopartiküller ile hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün 100 nM HSA çözeltisi için elde edilen sinyal değerlerindeki değişimler incelenmiştir. Karışım oranının 1:10 olduğundaki sinyal değerinin, 1:20 oranındaki sinyal değeriyle yaklaşık aynı olduğundan 1:10 oranında doygunluğa ulaştığı görülmüştür.

Sentezlenen HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin Zeta-Sizer ile boyut-ölçüm analizi yapılmıştır ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir.

HSA baskılanmış ve [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin boyut-analiz sonuçları sırasıyla 60 nm ve 55 nm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar SEM cihazıyla yapılan ölçüm sonuçlarını da desteklemektedir.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) SPR nanosensörleri Temas açısı, Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve Elipsometre ölçümleriyle karakterize edilmiştir.

Su ile yapılan temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi, HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensör filmlerinin temas açıları sırasıyla $67,3^{\circ} \pm 2,24$ ve $84,5^{\circ} \pm 4,63$ olarak ölçülmüştür.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) SPR nanosensörleri yüzey morfolojisi atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterize edilmiştir. AFM ölçümlerinden elde edilen pürüzlülük değerleri HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküller için sırasıyla 1,61 ve 1,28 nm olarak bulunmuştur. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanopartiküllerin pürüzlülük değerleri arasındaki farklılık HSA moleküllerinin başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir.

Elipsometri sonuçlarına göre hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensör filmlerinin kalınlıkları sırasıyla $118,4 \pm 0,3$ nm ve $116,7 \pm 0,3$ nm kalınlıktadır. Nanosensör filmlerinin kalınlığı uygun kalınlık değerine sahip olduğu ve optik transdüser prensibi ile çalışan SPR sistemi ile büyük bir uyum göstereceği görülmüştür.

HSA derişimi ile $\% \Delta R$ arasındaki ilişki incelenmiştir. Görüldüğü gibi HSA derişimi arttıkça $\% \Delta R$ değerleri artmaktadır. Yaklaşık 250 nM derişim değerinden sonra yüzeydeki aktif bölgelerin kaplanarak dolmasına bağlı olarak bu artış hızı azalmakta ve yaklaşık 500 nM değerinde dengeye ulaşılmaktadır. Bu derişimde elde edilen $\% \Delta R$ değeri 23,9' dur.

Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) SPR nanosensör, 0,15-10 nM derişim aralığında ve 25-500 nM derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Bu aralıklardaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemleri ve doğrusallıkları sırasıyla, $y_1=964,14x+2,1975$, 0,9063 ve $y_2=10,291x+19,442$ ve 0,79 olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (NIP) nanosensör için elde edilen veriler kullanılarak tayin sınırı (LOD) 0,7 pM olarak belirlenmiştir.

Elde edilen verilerin Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich absorpsiyon modellerine uygunluğu araştırıldı. Düşük derişimlerde $R^2 = 0,9993$ değeri ile en uygun adsorbsiyon modelinin Langmuir absorpsiyon modeli olduğu belirlendi. Yüksek derişimlerde ise $R^2 = 0,9956$ değeri ile en uygun adsorbsiyon modelinin

Freundlich absorpsiyon modeli olduğu belirlendi. Bu sonuç; hazırlanan baskılanmış sensör yüzeyindeki HSA bağlanma bölgelerinin düşük derişimlerde homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanal etkileşimlerin olduğunu, yüksek derişimlerde ise heterojen dağılımlı, yanal etkileşimlerin olduğunu göstermiştir. Buradan hesaplanan düşük derişimlerde (0,15-10) $\Delta R=11,28$ değeri deneysel değere (11 nM) yakındır. Langmuir denkleminde hesaplanan K_A ve K_D değerleri sırasıyla $443 \mu M^{-1}$ ve $0,002257 \mu M$ olarak belirlenmiştir. Yüksek derişimlerde (25-500) ise $\Delta R=24,38$ değeri deneysel değere (23,9 nM) yakındır.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün HSA'e karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri 500 nM derişimindeki hemoglobin, transferrin ve HSA çözeltileri ayrı ayrı nanosensör yüzeyine gönderilmiştir. HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün hemoglobinin verdiği sensorgram sinyal değeri (% ΔR); 4,48, transferrin ile verdiği sinyal değeri (% ΔR); 2,5'dir. Aynı derişimdeki HSA için elde edilen sinyal değeri (% ΔR) ise 23,9'dur. Bir başka deyişle; baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensör HSA; hemoglobine göre 5,3 kat, transferrine göre 9,56 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için HSA baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensör hazırlanmıştır. HSA baskılanmamış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün hemoglobinin verdiği sensorgram sinyal değeri (% ΔR); 2,8, transferrin ile verdiği sinyal değeri (% ΔR); 0,98 'dir. Aynı derişimdeki HSA için elde edilen sinyal değeri (% ΔR) ise 4,38'dir. Bir başka deyişle; baskılanmamış [PEDMALM] (NIP) nanosensör HSA; hemoglobine göre 1,56 kat, transferrine göre 4,47 kat daha duyarlı tayin edebilmektedir.

HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) ve baskılanmamış [PEDMALM] nanosensörler karşılaştırıldığında; HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün, HSA'nın hemoglobin'e göre 3,39 kat, transferrin'e göre 2,14 kat seçicilikte tanıdığı belirlenmiştir.

Hazırlanan HSA baskılanmış [PEDMALM-HSA] (MIP) nanosensörün etkinliği yapay plazma ve yapay idrar örnekleriyle çalışılarak belirlenmiştir.

Yapay plazma, 1 ml saf su ile çözülerek hazırlanmış ve 3 farklı seyreltme oranları ile ($1:2 \times 10^3$, $1:6 \times 10^3$, $1:12 \times 10^3$) analiz edilmiştir. Her bir derişim için elde edilen sinyal değeri ($\% \Delta R$) sırasıyla 8,47; 6,56; ve 3,25'dir. Bu kapsamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçların en önemli noktası, plazma gibi kompleks bir ortamda (%91 su, %7 proteinler, %2 iyonlar, besinler, gazlar, atıklar, hormonlar) bile HSA'nın teşhis edilebilirliği nanosensör hassaslığında bir kayıp olmadan gösterilmiştir.

Yapay idarar analizi içersine 3 farklı derişimde (0,75, 10, 100 nM) HSA'nın spike edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Her bir derişim için ($\% \Delta R$) sırasıyla 3,78, 11,72 ve 20,83' dür. Bu kapsamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçların en önemli noktası, idrar gibi kompleks bir ortamda bile HSA'nın teşhis edilebilirliği nanosensör hassaslığında bir kayıp olmadan gösterilmiştir..

Nanosensör yüzeyinin rejenerasyonu için 0,05M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. Yüzey tekrarlanabilir bir şekilde beş kez kullanılmıştır. Beş kez tekrar kullanımda yüzey başarıyla rejenere edilebilmiş ve bağlanma kapasitesinde bir kayıp olmamıştır. Kararlılık çalışması için aynı nanosensör çip 3 aylık periyotlarla toplamda 3 kez 4 tekrarlı HSA analizi için kullanılmış ve SPR nanosensörlerin kararlılığı gösterilmiştir.

5.3. İki Yöntemin Karşılaştırılması

Mikroalbümin tayini için çalışmış olduğumuz iki yöntemin, avantaj ve dezavantajlarını göz önüne aldığımızda; 0-20 mg/L (0-303 nM) aralığındaki HSA derişimi mikroalbümin işaretçisi olarak kabul edilmektedir. Mikro-temas yöntemiyle hazırlanan nanosensörün HSA tayininde nanopartiküllerle hazırlanan nanosensöre göre daha duyarlı ve seçici bir şekilde kullanılabileceği belirlendi. Mikro-temas yöntemiyle hazırlanan nanosensörün 1,5-300 nM aralığında HSA tayininde başarılı bir şekilde kullanılabilmesine rağmen daha düşük tayin limitlerine inilmesine gerek duyulmuştur. Böylece nanopartiküler kullanılarak hazırlanan nanosensör ile daha düşük tayin limitine inilmiştir. Mikro-temas yöntemiyle hazırlanan nanosensör HSA tayinini, seçici, duyarlı, herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan, diğer yöntemlere göre, düşük maliyet, hızlı ve gerçek zamanlı yapabilmektedir ve nanopartiküllerde düşük HSA derişimlerinin tayininde kullanılabilmektedir. Bu

Çalışmanın HSA tayinine yönelik, mikro-temas yöntemiyle nanofilm tutturularak hazırlanan nanosensörün ve nanopartikül tutturularak hazırlanan nanosensörün avantajlarının karşılaştırılması bakımından, literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] Peters T., *All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, San Diego, CA: Academic Press, **1996**.
- [2] Miller, W.G., Bruns, D.E., Hortin, G.L., Sandberg, S., Kristin, M.A., Matthew J.M., Itoh, Y., Lieske, J.C., Current Issues in Measurement and Reporting of Urinary Albumin Excretion, *Clinical Chemistry*, 55, 124–138, **2009**.
- [3] Shaikh, A., Seegmiller, J.C., Borland, T.M., Burns, B.E., Ladwig, P.M., Singh, R.J., Kumar, R., Larson, T.S., Lieske, J.C., Comparison between Immunoturbidimetry, Size-Exclusion Chromatography and LC-MS to Quantify Urinary Albumin, *Clinical Chemistry*, 54, 9 1504–1510, **2008**.
- [4] Wayne, D.C., Lucinda, M.H., David, J.N., Leileata M., Disease-Dependent Mechanisms of Albuminuria, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 295, 1589–1600, **2008**.
- [5] Linksde Jong, P.E., Curhan, G.C., Screening, Monitoring, and Treatment of Albuminuria: Public Health Perspectives, *Journal of the American Society Nephrology*, 17, 2120–2126, **2006**.
- [6] Mura-Galelli, M.J., Voegel, J.C., Behr, S., Bres, E.F., Schaaf, P., Adsorption/Desorption of Human Serum Albumin on Hydroxyapatite: A Critical Analysis of The Langmuir Model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 5557– 5561, **1991**.
- [7] Hara F, Shiba K., Nonspecific Binding of Urinary Albumin on Preservation Tube, *Japanese Journal of Clinical Chemistry*, 32(Suppl 1), 28–29, **2003**.
- [8] Wulff, G., Poll, H.G., Enzyme-analogue Built Polymers, 23. Influence of the Structure of the Binding Sites on the Selectivity for Racemic Resolution, *Makromolecular Chemistry and Physics*, 188, 4, 741-748, **1987**.
- [9] Velasco-Garcia, M. N., Mottram, T., Biosensor Technology Addressing Agricultural Problems, *Biosystems Engineering*, 84,1, 1-12, **2003**.
- [10] Anthony, T., *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*, New York: Springer Science and Business Media, **2008**.
- [11] Özlem, H., *Biyosensör Hazırlamada Enzim Kaynağı Olarak Değerlendirilmek Üzere Bazı Bitkisel Dokuların İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, **2008**.
- [12] Homola, J., Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species, *Chemical Reviews*, 108, 2, 462-493, **2008**.
- [13] Doumas B.T., Peters, T., Serum and Urine Albumin: A Progress Report on Their Measurement and Clinical Significance. *Clinica Chimica Acta*, 258, 3–20, **1997**.
- [14] Andersen, N., Albumin Calcium Association at Different Ph, As Determined By Potentiometry. *Clinical Chemistry*, 23, 11, 2122-2126, **1977**.

- [15] Fogh-Andersen, N., Albumin/Calcium Association at Different Ph, as Determined by Potentiometry, *Clinical Chemistry*, 23, 11, 2122-2126, **1977**.
- [16] Berthil, H.C., Prinsen, M.T., Monique, G.M., Albumin Turnover: Experimental Approach and its Application in Health And Renal Diseases, *Clinica Chimica Acta*, 347, 1 –14, **2004**.
- [17] Sviridov, D., Drake, S.K., Hortin, G.L, Reactivity of Urinary Albumin (Microalbumin) Assays With Fragmented or Modified Albumin, *Clinical Chemistry*, 54, 61– 68, **2008**.
- [18] Clavant, S.P., Osicka, T.M., Comper, W.D., Albuminuria: Its Importance in Disease Detection, *Laboratory Medicine*, 38, 35-38, **2007**.
- [19] Paloheimo L., Pajari-Backas M., Pitkänen E., Evaluation of an Immunoturbidimetric Microalbuminuria Assay, *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 25, 889-892, **1987**.
- [20] Yamaguchi, T., Amano, E., Kamino, S., Umehara, S., Yanaihara, C., Fujita, Y., Spectrophotometric Determination of Urinary Protein with o-sulfophenyfluorone-metal complex, *Analytical Sciences*, 21, 1237–1240, **2005**.
- [21] Owen, W.E., Roberts, W. L., Performance characteristics of an HPLC assay for urinary albumin, *American Journal of Clinical Pathology*, 124, 219–225, **2005**.
- [22] Qin, Q.P., Peltola, O. and Pettersson, K., Time-resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay for Point-of-Care Testing of Urinary Albumin *Clinical Chemistry*, 49, 1105–1113, **2003**.
- [23] Zhao, L., Lin, J.M., Li, Z., Comparison and Development of Two Different Solid Phase Chemiluminescence ELISA for The Determination of Albumin in Urine, *Analytica Chimica Acta*, 541, 197–205, **2005**.
- [24] Bessonova, E.A., Kartsova, L.A., Shmukov, A.U., Electrophoretic Determination of Albumin in Urine using on-line Concentration Techniques, *Journal of Chromatography*, 1150, 1/2, 332–338, **2007**.
- [25] Markó, L., Molnár, G.A., Wagner, Z., Koszegi, T.Z., Matus, Mohás, Kuzma, M.M., Sziártó, I. A., Wittmann, I. *Orvosi Hetilap*, 149, 59–67, **2008**.
- [26] Liang, A.H., Huang, Y.J., Jiang, Z.L., A Rapid and Sensitive Immuno-resonance Scattering Spectral Assay for Microalbumin., *Clinica Chimica Acta*, 383, 73–77, **2007**.
- [27] Jiang, Z., Huang, Y., Liang, A., Pan, H. and Liu, Q. Biosens, *Bioelectron*, 224, 1674–1678, **2009**.
- [28] Fatoni, A., Numnuam, A., Kanatharana, P., Limbut, W. and Thavarungkul, P. A Novel Molecularly Imprinted Chitosan–Acrylamide, Graphene, Ferrocene Composite Cryogel Biosensor Used To Detect Microalbumin, *Analyst*, 139, 6160-6167, **2014**.

- [29] Jen-Tsai Liu a, Po-Shen Lin, Yue-Ming Hsin, Jang-Zern Tsai, Wen-Yih Chen. Surface Plasmon Resonance Biosensor for Microalbumin Detection: *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 696–700. **2011**.
- [30] Rasooly, A., Analysis I Biosensors, *Encyclopedia of Dairy Science*, 85-93, **2002**.
- [31] McGlennen, R.C., Miniaturization Technologies for Molecular Diagnostics, *Clinical Chemistry*, 47, 3, 393-402. **2001**.
- [32] Peter, C., Meusel, F., Grawe, A., Cammann, K., Borchers, T. Optical DNA-sensor Chip for Real-time Detection of Hybridization Events, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 371, 120-127, **2001**.
- [33] Çağlarırnak, N., Hepçimen, A.Z., Ağır Metal Toprak Kirliliğinin Gıda Zinciri ve İnsan Sağlığına Etkisi, *Akademik Gıda*, 8, 2, 31-35, **2010**.
- [34] Ertürk, G., Denizli, A., Nanobiyesensörler. *Afinite Temelli Biyosensörler – 2 Yeni Yaklaşımlar*, (eds: Denizli, A.), Kukla Kırtasiye Bilgisayar ve Malz. Tic. Ltd. Şti., Ankara, 1-19, **2016**.
- [35] Hibbert, D.B., *Introduction to Electrochemistry*, London, Macmillan, **1993**.
- [36] Puzyr, A.P., Pozdnyakova I.O., Bondar, V.S., Design of a Luminescent Biochip with Nanodiamonds and Bacterial Luciferase, *Physics Solid State*, 46, 761-763, **2004**.
- [37] Wang, Y., Zhang, X., Zhang, H., Lu, Y., Huang, H., Dong, X., Chen, J., Dong, J., Yang, X., Hang, H. and Jiang, T., Coiled-Coil Networking Shapes Cell Molecular Machinery, *Molecular Biology of the Cell* 23, 19, 3911-3922, **2012**.
- [38] Wood, R.W., On A Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in A Diffraction, *Proceedings of the Physical Society of London*, 18, 1, 269-275 **1902**.
- [39] Wood, R.W., XLII. On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum, *Philosophical Magazine*, 4, 21, 396-402, **1902**.
- [40] Kretchmann, E., Reather, H., Z., Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light, 2135-2136, **1968**.
- [41] Liedberg, B., Nylander, C., Lunström, I., Surface Plasmon Resonance for Gas Detection and Biosensing, *Sensors Actuators*, 4, 299-304, **1983**.
- [42] Kawazumi, H., Gobi, V., Ogino, K., Maeda, H., Miura, N., Compact Surface Plasmon Resonance (SPR) Immunosensor Using Multichannel for Simultaneous Detection of Small Molecule Compounds, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108, 791–796, **2005**.
- [43] Kawazumi, H., Gobi, V., Ogino, K., Maeda, H., Miura, N., Compact Surface Plasmon Resonance (SPR) Immunosensor Using Multichannel for Simultaneous Detection of Small Molecule Compounds, 108, 1-2, 791-796, **2005**.

- [44] Rodríguez-Mozaz, S., Reder, S., Lopez de Alda, M., Gauglitz, G. ve Barceló, D., Simultaneous Multi-Analyte Determination of Estrone, Isoproturon and Atrazine in Natural Waters by the River Analyser (RIANA), An Optical Immunosensor, *Biosens Bioelectron*, 19, 7, 633-640, **2004**.
- [45] Tschmelak, J., Proll, G. ve Gauglitz, G., Optical Biosensor for Pharmaceuticals, Antibiotics, Hormones, Endocrine Disrupting Chemicals and Pesticides in Water: Assay Optimization Process for Estrone As Example, *Talanta*, 65, 313–323, **2005**.
- [46] Goldman, E.R., Clapp, A.R., Anderson, G.P., Uyeda, H.T., Mauro, J.M., Medintz, I.L., Mattoussi, H., Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents, *Analytical Chemistry*, 76, 684–688, **2004**.
- [47] Sequeira, M., Bowden, M., Minogue, E., Diamond, D., Towards autonomous environmental monitoring systems, *Talanta*, 56, 355–363, **2002**.
- [48] Suzuki, H., Microfabrication of Chemical Sensors and Biosensors for Environmental Monitoring, *Materials Science and Engineering*, 12, 55–61, **2000**.
- [49] Rodríguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J. ve Barceló, D. Biosensors as Useful Tools for Environmental Analysis and Monitoring, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 1025-1041, **2006**.
- [50] Bange, A., Halsall, H.B., Heineman, W.R., Microfluidic Immunosensor Systems, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2488–2503, **2005**.
- [51] Çaktü, K., *Kolesterol Baskılanmış Eş-Boyutlu Poli(GMA-MAT) Mikroküre-poli(HEMA) Kriyojel Kompozit Sistemlerinin Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2009**.
- [52] Alocilja, E.C., Radke, S.M., Market Analysis of Biosensors for Food Safety, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 841–846, **2003**.
- [53] Tothill, I.E., Biosensors Developments and Potential Applications in the Agricultural Diagnosis Sector, *Computers and Electronics in Agriculture*, 30, 205–218, **2001**.
- [54] Kroger, S., Piletsky, S., Turner, A.P.F., Biosensors for Marine Pollution Research, Monitoring and Control, *Marine Pollution Bulletin*, 45, 24–34, **2002**.
- [55] Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O’Kennedy, R., Advances in Biosensors for Detection of Pathogens in Food and Water, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 3–13, **2003**.
- [56] Mauriz, E., Calle, A., Abad, A., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barceló, D., Lechuga, L.M., Determination of Carbaryl in Natural Water Samples by A Surface Plasmon Resonance Flow-Through Immunosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2129–2136, **2006**.
- [57] Rich, R.L., Myszka, D.G., Advances in Surface Plasmon Resonance Biosensor Analysis, *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 54–61, **2000**.

- [58] Glazier, S.A., Campbell, E.R., Campbell, W.H., Construction and Characterization of Nitrate Reductase-Based Amperometric Electrode and Nitrate Assay of Fertilizers and Drinking Water, *Analytical Chemistry*, 70, 1511–1515, **1998**.
- [59] Behnisch, P.A., Hosoe, K., Sakai, S-i., Bioanalytical Screening Methods for Dioxins and Dioxin-Like Compounds — A Review of Bioassay/Biomarker Technology, *Environment International*, 27, 413–439, **2001**.
- [60] Iqbal, S.S., Mayo, M.W., Bruno, J.G., Bronk, B.V., Batt, C.A., Chambers, J.P., A Review of Molecular Recognition Technologies for Detection of Biological Threat Agents, *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 549–578, **2000**.
- [61] Wood, R.W., On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in A Diffraction Grating Spectrum, *Philosophical Magazine*, 4, 396-402, **1902**.
- [62] Schasfoort R.B.M., Tudos A.J., (eds), *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2008**.
- [63] Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I., Surface Plasmon Resonance for Gas Detection and Biosensing, *Sensors and Actuators*, 4, 29-304, **1983**.
- [64] Komiyama, M., Takeuchi T., Mukawa, T., Asanuma, H., *Molecular Imprinting from Fundamentals to Applications*, Wiley-VCH, New York, USA, **2003**.
- [65] Wulff, G., Poll, H.G., Enzyme-analogue Built Polymers, 23. Influence of the Structure of the Binding Sites on the Selectivity for Racemic Resolution, *Makromolecular Chemistry and Physics*, 188, 4, 741-748, **1987**..
- [66] Mosbach, K., Ramström, O., The Emerging Technique of Molecular Imprinting and its Future Impact on Biotechnology, *Nature Biotechnology*, 14, 163-170, **1996**.
- [67] Rao, T.P., Daniel, S., Gladis, J.M., Tailored Materials for Preconcentration or Separation of Metals by Ion-imprinted Polymers for Solid-phase Extraction (IIP-SPE), *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 28-35, **2004**.
- [68] Piletsky, S. A., Alcock, S., Turner, A.P.F., Molecular Imprinting: at the edge of the third Millennium, *Trends Biotechnol*, 19, 9-12, **2001**.
- [69] Osman, B., *Miyoglobin Tayinine Yönelik Moleküler Bakılanmış Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensör Hazırlanması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.
- [70] Türkoğlu, E.A. *Yüzey Plazmon Rezonans Temelli Antibadi Sensörlerin Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**.
- [71] Nakamura, C., Hasegawa, M., Nakamura, N., Miyake, J., Rapid and Specific Detection of Herbicides Using A Self-Assembled Photosynthetic Reaction Center from Purple Bacterium on an SPR Chip, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 599-603, **2003**.
- [72] Miura N., Sasaki, M., Gobi, K.V., Kataoka, C., Shoyama, Y., Highly Sensitive And Selective Surface Plasmon Resonance Sensor for Detection of Sub-Ppb Levels of Benzo[A]Pyrene by Indirect Competitive Immunoreaction Method, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 7, 953-959, **2003**.

- [73] Strong, A., Stimpson, D.I., Bartholomew, D.U., Jenkins, T.F., Elkind, J.L., Detection of Trinitrotoluene (TNT) Extracted From Soil Using A Surface Plasmon Resonance (SPR)-based Sensor Platform. *SPIE*, 3710, 362-372, **1999**.
- [74] Oh, B.K., Kim, Y.K., Bae, Y.M., Lee, W.H., Choi, J.W., Detection of Escherichia Coli O157, H7 Using Immunosensor Based on Surface Plasmon Resonance, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 780-786, **2002**.
- [75] Taylor, A.D., Ladd, J., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., Jiang, S., Quantitative And Simultaneous Detection of Four Foodborne Bacterial Pathogens with A Multi-Channel SPR Sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 752-758, **2006**.
- [76] Lotierzo, M., Henry, O.Y.F., Piletsky, S., Tothill, I., Cullen, D., Kania, M., Hock, B., Turner, A.P.F., Surface Plasmon Resonance Sensor for Domoic Acid Based on Grafted Imprinted Polymer, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 145-152, **2004**.
- [77] Uzun, L., Say , R., Ünal, S., Denizli, A., Production of Surface Plasmon Resonance Based Assay Kit for Hepatitis Diagnosis, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2878–2884, **2009**.
- [78] Ladd, J., Boozer, C., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., Jiang, S., DNA-directed Protein Immobilization on Mixed Self-Assembled Monolayers Via A Streptavidin Bridge, *Langmuir*, 20, 8090-8095, **2004**.
- [79] Stigter, E.C., Jong, G.J., Van Bennekom, W.P., An Improved Coating for The Isolation and Quantitation of Interferon-Gamma in Spiked Plasma Using Surface Plasmon Resonance (SPR), *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 474-482, **2005**.
- [80] Bokken, G.C.A.M., Corbee, R.J., van Knapen, F., Bergwerff, A.A., Immunochemical Detection of Salmonella Group B, D. and E Using an Optical Surface Plasmon Resonance Biosensor, *FEMS Microbiology Letters*, 222, 75–82, **2003**.
- [81] Jiang, T., Zhao, L., Chu, B., Feng, Q., Yan, W., Lin, J-M., Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction for the Selective Determination of 17 β -Estradiol in Fishery Samples with High Performance Liquid Chromatography, *Talanta*, 78, 442-447, **2009**.
- [82] Dong, J., Gao, N., Peng, Y., Guo, C., Lv, Z., Wang, Y., Zhou, C., Ning, B., Liu, M., Gao, Z., Surface Plasmon Resonance Sensor for Profenofos Detection Using Molecularly Imprinted Thin Film as Recognition Element, *Food Control*, 25, 543-549, **2012**.
- [83] Wulff, G., Poll, H.G., Enzyme-analogue Built Polymers, 23. Influence of the Structure of the Binding Sites on the Selectivity for Racemic Resolution, *Makromolecular Chemistry and Physics*, 188, 4, 741-748, **1987**.
- [84] Sönmezler, M., *Kuartz Kristal Mikroterazi (QCM) Temelli Histidin Sensörler*, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.
- [85] Haupt, K., Molecularly imprinted polymers: The Next Generation, *Analytical Chemistry*, 75, 376A-383A, **2003**.

- [86] Mayers, A.G., Mosbach, K., Molecularly Imprinted Polymers: Useful Materials for Analytical Chemistry, *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 321–332, **1997**.
- [87] Rao, T.P., Daniel, S., Gladis, J.M., Tailored Materials for Preconcentration or Separation of Metals by Ion-Imprinted Polymers for Solid-Phase Extraction (IIP-SPE), *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 28-35, **2004**.
- [88] Haupt, K., Ye, L., Molecularly Imprinted Polymers as Antibody and Receptor Mimics for Assays, Sensors and Drug Discovery, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1887-1897, **2004**.
- [89] Yavuz, H., Karakoc, V., Turkmen, D., Say, R., Denizli, A., Synthesis of Cholesterol Imprinted Polymeric Particles, *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 8-15, **2006**.
- [90] Owens, P.K., Karlsson, L., Lutz, E.S.M., Andersson, L.I., Molecular Imprinting for Bio- And Pharmaceutical Analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 146–154, **1999**.
- [91] Ansell, D.J., Molecularly Imprinted Polymers for The Enantioseparation of Chiral Drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1809–1835, **2005**.
- [92] Schweitz, L., Spéegle, P., Nilsson, S., Approaches to Molecular Imprinting Based Selectivity in Capillary Electrochromatography, *Electrophoresis*, 22, 4053–4063, **2001**.
- [93] Liu, C., Lin, C., An Insight into Molecularly Imprinted Polymers for Capillary Electrochromatography, *Electrophoresis*, 25, 3997–4007, **2004**.
- [94] Liu, Z., Zheng, C., Yan, C., Gao, R., Molecularly Imprinted Polymers as a Tool for Separation in CEC, *Electrophoresis*, 28, 127–136, **2007**.
- [95] Kempe, M., Mosbach, K., Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins on Molecularly Imprinted Stationary Phases. *J Chrom. A*, 691, 1/2, 317-323, **1995**.
- [96] Anderson, L., Muller, R., Vlatakis, G., Mosbach, K., Mimics of The Binding Sites of Opioid Receptors Obtained by Molecular Imprinting of Enkephalin and Morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 92, 11, 4788-4792, **1995**.
- [97] Dickert, F.L., Hayden, O., Bioimprinting of Polymers and Sol-Gel Phases “Selective Detection of Yeasts with Imprinted Polymers”. *Anal. Chem.*, 74, 6, 1302-1306, **2002**.
- [98] Katz, A., Davis, M. E., Molecular Imprinting of Bulk, Microporous Silica, *Nature*, 403, 6767, 286-289, **2000**.
- [99] Parmpi, P., Kofinas, P., Biomimetic Glucose Recognition Using Molecularly Imprinted Polymer Hydrogels. *Biomaterials*, 25, 10, 1969-1973, **2004**.
- [100] Yilmaz, E., Haupt, K., Mosbach, K., The Use of Immobilized Templates-A New Approach in Molecular Imprinting. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39, 12, 2115-2118, **2000**.
- [101] Burow, N., Minoura, N., Molecular Imprinting: Synthesis Of Polymer Particles With Antibody-Like Binding Characteristics For Glucose Oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227, 2, 419-422, **1996**.

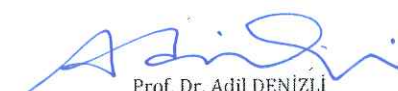
- [102] Bossi, A., Piletsky, S.A., Piletska, E.V., Righetti, P.G, Turner, A.P.F., Surface-Grafted Molecularly Imprinted Polymers for Protein Recognition. *Anal. Chem.*, 73, 21, 5281-5286, **2001**.
- [103] Guo, T. Y., Xia, Y. Q., Hao, G. J., Song, M. D., Zhang, B.H., Adsorptive Separation of Hemoglobin by Molecularly Imprinted Polymers. *Biomaterials*, 25, 5905-5912, **2004**.
- [104] Nicholls, I.A., Rosengren, J.P., Molecular Imprinting of Surfaces. *Bioseparations*, 10, 301-305, 2002.
- [105] Ki, C.D., Oh, C., Oh, S-G., Chang, J.Y., The Use of A Thermally Reversible Bond for Molecular Imprinting of Silica Spheres. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 14838-14839, **2002**.
- [106] Li, Z., Ding, J., Day, M., Tao, Y., Molecularly Imprinted Polymeric Nanospheres by Diblock Copolymer Self-Assembly. *Macromol.*, 39, 2629-2636, **2006**.
- [107] Kempe, H., Kempe, M., Development and Evaluation of Spherical Molecularly Imprinted Polymer Beads, *Analytical Chemistry*, 78, 3659-3666, **2006**.
- [108] Ciardelli, G., Borrelli, C., Silvestri, D., Cristallini, C., Barbani, N., Giusti, P., Supported Imprinted Nanospheres for the Selective Recognition of Cholesterol., *Biosens Bioelectron*, 15, 12, 2329-2338, **2006**.
- [109] Garipcan, B., Denizli, A., A Novel Affinity Support Material for the Separation of Immunoglobulin G from Human Plasma, *Macromolecular Bioscience*, 2, 135-144, **2002**.
- [110] Colthup, N.B., Daly, L.H., Wiberley, S.E., *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*, 3rd ed, Academic Press, New York, **1990**.
- [111] Lin-Vein, D., Colthup, N, Fateley, W.G., Grasselli, J., *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, San Diego, Kaliforniya, **1991**.
- [112] Chou, P.C., Rick, J., Chou, T.C., C-reactive Protein Thin-Film Molecularly Imprinted Polymers Formed Using a Micro-Contact Approach. *Analytica Chimica Acta*, 542, 20-25, **2005**.
- [113] Lin, H.Y., Hsu, C.Y., Thomas, J.L., Wang, S.E., Chen, H.C., Chou, T.C. The Micro-Contact Imprinting of Proteins: The Effect of Cross-Linking Monomers for Lysozyme, Ribonuclease A And Myoglobin. *Biosensors & Bioelectronics*, 15, 534-543, **2006**.
- [114] Sun, Y., Yan, F., Yang, W., Sun, C., Multilayered Construction of Glucose Oxidase and Silica Nanoparticles on Au Electrodes Based on Layer-By-Layer Covalent Attachment. *Biomaterials*, 27, 4042-4049, **2006**.
- [115] Frederix, F., Bonroy, K., Reekmans, G., Laureyn, W., Campitelli, A., Abramov, M.A., Dehaen, W., Maes, G., Reduced Nonspecific Adsorption on Covalently Immobilized Protein Surfaces Using Poly(Ethylene Oxide) Containing Blocking Agents, *The International Journal of Biochemistry*, 30, 1, 67-74, **2004**.

- [116] Lu, Z., Li, C.M., Z, Q., Bao, Q., Cui, X., Covalently Linked DNA/protein Multilayered Film for Controlled DNA Release. *J. Coll. Inter. Sci.*, 314, 80-88, **2007**.
- [117] Duan, L., He, Q., Yan, X., Cui, Y., Wang, K., Li, J., Hemoglobin Protein Hollow Shells Fabricated Through Covalent Layer-By-Layer Technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354, 357-362, **2007**.
- [118] Zhang, Q.Y., Tao, M.L., Shen, W.D., Zhou, Y.Z., Ding, Y., Ma, Y., Zhou, W.L. Immobilization of L-Asparaginase on the Microparticles of the Natural Silk Sericin Protein and Its Characters, *Biomaterials*, 25, 17, 3751-3759, **2004**.
- [119] Christiaens, P., Vermeeren, V., Wenmackers, S., Daenen, M., Haenen, K., Nesladek, M., vandeVen, M., Ameloot, M., Michiels, L., Wagner, P., EDC-Mediated DNA Attachment to Nanocrystalline CVD Diamond Films. *Biosens. Bioelectron.*, 22, 170-177, **2006**.
- [120] D'Souza, S.F., Godbole, S.S., Immobilization of Invertase on Rice Husks Using Polyethyleneimine. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 52, 59-62, **2002**.
- [121] Choi, H. J., Kimb, N. H., Chung, B. H., Seong, G. H., Micropatterning of Biomolecules on Glass Surfaces Modified with Various Functional Groups Using Photoactivatable Biotin. *Anal. Biochem.*, 347, 60-66, **2005**.
- [122] Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Different Mechanisms of Protein Immobilization on Glutaraldehyde Activated Supports: Effect of Support Activation and Immobilization Conditions, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 4, 877-882, **2006**.
- [123] Avseenko, N.V., Morozova, T.Y., Ataullakhanov, F.I., Immobilization of Proteins in Immunochemical Microarrays Fabricated by Electrospray Deposition, *Analytical Chemistry*, 73, 6047-6052, **2001**.
- [124] Gan, S.H., Yang, P., Yang, W.T., Photoactivation of Alkyl C-H and Silanization: A Simple and General Route to Prepare High-Density Primary Amines on Inert Polymer Surfaces for Protein Immobilization. *Biomacromolecules*, 10, 1238-1243, **2009**.
- [125] Graf, N., Yegen, E., Lippitz, A., Treu, D., Wirth, T., Unger, W.E.S. *Optimization of Cleaning and Amino-Silanization Protocols for Si Wafers to Be Used as Platforms for Biochip Microarrays by Surface Analysis (XPS, ToF-SIMS and NEXAFS spectroscopy)*, *Surface and Interface Analysis*, 40, 180-183, **2008**.
- [126] Qin, M., Hou, S., Wang, L.K., Feng, X.Z., Wang, R., Yang, Y.B., Wang, C., Yu, L., Shao, B., Qiao, M.Q. Two Methods for Glass Surface Modification and Their Application in Protein Immobilization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60, 243-249, **2007**.
- [127] Haupt, K., Belmont, A.S. *Handbook of Biosensors and Biochips: Molecularly Imprinted Polymers as Recognition Elements in Sensors*, Ed.: John Wiley and Sons, Ltd. Chapter 14, 8-9, **2007**.

- [128] Piacham, T., Josell, A., Arwin, H., Prachayasittikul, V., Ye, L.. Molecularly Imprinted Polymer Thin Films On Quartz Crystal Microbalance Using A Surface Bound Photo-Radical Initiator. *Analytica Chimica Acta*, 536, 191–196, **2005**.
- [129] Lin, L.P., Huang, L.S., Lin, C.W., Lee, C.K., Chen, J.L., Hsu, S.M., Lin, S.. Determination of Binding Constant of DNA-binding Drug to Target DNA by Surface Plasmon Resonance Biosensor Technology. *Current Drug Target*, 5, 61-72, **2005**.
- [130] Li, X., Husson, S.M., Two-Dimensional Molecular Imprinting Approach to Produce Optical Biosensor Recognition Elements. *Langmuir*, 22, 9658-9663, **2006b**.
- [131] Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen,Y., Shah, R.N., Shimizu, K.D., Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir–Freundlich Isotherm. *Analytical Chemistry*, 73, 4584–4591, **2001**.
- [132] Wei, X., Samadi, A., Husson, S.M., Synthesis and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers for Chromatographic Separations. *Separation Science and Technology*, 40, 109–129, **2005**.
- [133] Lin, L.P., Huang, L.S., Lin, C.W., Lee, C.K., Chen, J.L., Hsu, S.M., Lin, S. Determination of Binding Constant of DNA-binding Drug to Target DNA by Surface Plasmon Resonance Biosensor Technology, *Current Drug Target*, 5, 61-72, **2005**.
- [134] Zhang, L., Cheng, G., Fu, C. Molecular Selectivity of Tyrosine-Imprinted Polymers Prepared by Seed Swelling and Suspension Polymerization. *Polymer International*, 51, 8, 687-692, **2002**.
- [135] Patricia, A. Zunszain, Ghuman, J., Komatsu, T., Tsuchida, E. and Curry, S., Crystal Structural Analysis of Human Serum Albumin Complexed with Hemin and Fatty Acid, *BMC Structural Biology*, 3, 6, 1-9, **2003**.

EKLER

EK 1. ORJİNALLİK RAPORU

	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA	
Tarih: 27/01/2017	
Tez Başlığı / Konusu: Mikroalbumin Tayini için SPR Temelli Nanosensörlerin Hazırlanması	
Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç ve e)Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 112 sayfalık kısmına ilişkin, 26/01/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 10 'dur.	
Uygulanan filtrelemeler:	
1- Kaynakça hariç	
2- Alıntılar hariç/dâhil	
3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç	
Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.	
Gereğini saygılarımla arz ederim.	27/01/2017
Adı Soyadı: Meltem KOCA ESENTÜRK	Tarih ve İmza
Öğrenci No: N13222051	
Anabilim Dalı: Kimya	
Programı: Biyokimya	
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.	
<u>DANIŞMAN ONAYI</u>	
UYGUNDUR.	
 Prof. Dr. Adil DENİZLİ (Unvan, Ad Soyad, İmza)	

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı-Soyadı : Meltem KOCA ESENTÜRK

Doğum Yeri : Altındağ

Medeni Hali : Evli

E-Posta : kocameltem@yahoo.com

Adres : Etimesgut/Ankara

Eğitim

Lisans : Erzincan Üniversitesi

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (Çok iyi)

İş Deneyimi

- (29.09.2013-29.01.2014) Hayat Medikal Erzincan (Satış ve Pazarlama Müdürü)
- (2013) MENGÜCEK Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Erzincan (Biyokimya Laboratuvarı)
- (2011) Mekasan Metal Kaplama Kimya San. Tic. Ltd. Şti. Ankara (Kimyager)

Deneyim Alanları

- (08-10 Haziran 2016) Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler (Hacettepe Üniversitesi)
- (26-28 Mayıs 2016) 10. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi (Ayvalık/BALIKESİR)
- (05-06 Aralık 2015) ODTÜ Biyokimya Konferansı (ODTÜ)
- (08-10 Nisan 2015) 15. Kromatografi Kongresi (Uşak Üniversitesi)
- (07.08.2013-06.09.2013) C Sınıfı İş Sağlığı Ve Güvenliği Uzmanlığı 220 saat (Mersin Üniversitesi)
- (12-14 Mart 2013)AGİLENT 700 ICP-MS Kullanım ve Uygulama Teknikleri 48 saat (Erzincan Üniversitesi)

- (20-21 Nisan 2013) TS EN ISO 22000:2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi (HACCP) 48 saat (Kimyagerler Derneği)
- (24-25 Kasım 2012) Kozmetik Üretim Yönetimi 48 saat (Kimyagerler Derneği)
- (19-20 Mayıs 2012) TS 18001:2007 OHSAS İş Sağlığı ve İş Güvenliği Yönetim Sistemi 48 saat (Kimyagerler Derneği)
- (28-29 Nisan 2012) TS EN 9001:2008 Kalite Yönetim Sitemi 48 saat (Kimyagerler Derneği)
- (03-04 Mart 2012) Gıda İşletmelerinde Sorumlu Yöneticilik Sertifikası 48 saat (Kimyagerler Derneği)

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar