



**KAĞIT TABANLI MİKRO AKIŞKAN ÇİPLERİN GELİŞTİRİLMESİ; KAN
MATRİKSİNDE GLİKOZ VE KANSER BİYOBELİRTEÇ TAYİNİ**

Hilal TORUL

**DOKTORA TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2016

Hilal TORUL tarafından hazırlanan “KAĞIT TABANLI MİKRO AKIŞKAN ÇİPLERİN GELİŞTİRİLMESİ; KAN MATRİKSİNDE GLİKOZ VE KANSER BİYOBELİRTEÇ TAYİNİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Uğur TAMER

Analitik Kimya AbD, Eczacılık Fakültesi, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Başkan : Prof. Dr. Hasan BASAN

Analitik Kimya AbD, Eczacılık Fakültesi, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye : Prof. Dr. Haluk KÜLAH

Elektrik ve Elektronik Mühendisliği, Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye : Prof. Dr. Nusret ERTAŞ

Analitik Kimya AbD, Eczacılık Fakültesi, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye : Doç. Dr. Hakan ÇİFTÇİ

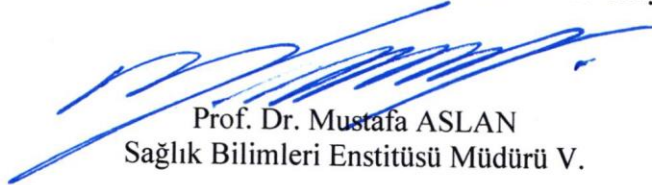
Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü, Kırıkkale MYO,
Kırıkkale Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Savunma Tarihi: 23/09/2016

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.


Hilal TORUL
23/09/2016

KAĞIT TABANLI MİKRO AKIŞKAN ÇİPLERİN GELİŞTİRİLMESİ; KAN MATRİKSİNDE GLİKOZ VE KANSER BİYOBELİRTEÇ TAYİNİ

(Doktora Tezi)

Hilal TORUL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2016

ÖZET

Bu tezde, mikro akışkan çipler kullanılarak kan örneklerinde glikoz ve kanser biyobelirteç tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla üç farklı türde çip hazırlanmış ve kan örneğinde iki farklı tür hedef molekül ile test edilmiştir. Ayrıca yürütülen tez kapsamında, taşınabilir sistemlere geçiş yapmak amacıyla cep telefonu tabanlı bir mikroskop üretilmiştir. Kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (SAM) ve kağıt tabanlı mikroçipler kullanılarak kan matriksinde glikoz tayini ve yatay akış testleri kullanılarak karsinoembriyonik antijen (CEA) tayini gerçekleştirilmiştir. Tezin ilk çalışması olarak, kendiliğinden düzenlenme yöntemi (SAMs) ile hazırlanmış bir Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Saçılması (YGRS) probu (4-merkaptofenil boronik asit (4-MBA)/ 1-dekantiyol (1-DT)) kullanılarak glikoz tayini için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Analitik performans değerlendirilmiş ve kan matriksinde 2–16 mM glikoz derişim aralığında doğrusal kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Teşhis sınırı kullanılan referans kanda 0,5 mM olarak bulunmuştur. Referans kan örneğinde glikoz derişimi $5,61 \pm 0,29$ mM olarak bulunmuş ve glikozun belirtilen derişimi $6,17 \pm 0,11$ mM'dır. Referans kan örneğindeki glikozun geri kazanımı % 90,9 olarak bulunmuştur. Tezin ikinci çalışmasında nitroselüloz membran kullanılarak kanda glikoz seviyesinin tayini için kağıt membran tabanlı YGRS platformu geliştirilmiş ve mikro akışkan kanallar basit bir şekilde mum baskılama yöntemi ile oluşturulmuştur. Çubuk şeklinde altın nanopartiküller 4-MBA ve 1- DT molekülleri ile modifiye edilmiş ve kağıt tabanlı mikroakışkan sistemler için YGRS probu olarak kullanılmıştır. Toplam analiz süresi 5 dakikadır. YGRS ölçümlerinde, kan örneğindeki glikoz derişiminin artışına bağlı olarak B–OH titreşimini gösteren 1070 cm^{-1} 'deki bandın şiddetinde azalma gözlenmiştir. Referans kan örneğinde glikoz derişimi $5,43 \pm 0,51$ mM ve geri kazanımı yaklaşık % 88 olarak bulunmuştur. Yürütülen tez kapsamında son olarak, kuantum noktacıkları ve yatay akış test stripleri ile cep telefonu tabanlı floresans mikroskop kullanılarak tam kan örneğinden karsinoembriyonik antijenin (CEA) kantitatif tayini gerçekleştirilmiştir. Cep telefonu tabanlı floresans mikroskobun üretilmesi için ticari Nokia Lumia 1020 cep telefonu kullanılmıştır. Sandviç immunoreaksiyonuna dayanan yatay akış test stripleri, nitroselüloz membran yüzeyinde test ve kontrol hatlarının oluşturulmasıyla hazırlanmıştır. Optimum koşullar altında, geliştirilen yatay akış test stripleriyle sadece 80 µl örnek hacmi kullanılarak CEA protein için LOD değeri 1,0 ng/ml olarak bulunmuştur.

Bilim Kodu : 1.004

Anahtar Kelimeler : YGRS, çip, kağıt tabanlı mikro akışkan sistemler, cep telefonu tabanlı floresans mikroskop

Sayfa Adedi : 162

Danışman : Prof. Dr. Uğur Tamer

THE DEVELOPMENT OF PAPER BASED MICROFLUIDIC CHIPS;
DETERMINATION OF GLUCOSE AND CANCER BIOMARKER IN BLOOD MATRIX
(Ph. D. Thesis)

Hilal TORUL

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

September 2016

ABSTRACT

In this thesis, determination of glucose and cancer biomarker was carried out by using microfluidic chips in blood samples. For this purpose, three different types of chip were prepared and they were used to detect two different target molecules in blood sample. Moreover, in the scope of carried out thesis, a smartphone based fluorescent microscope was created to relate hand-held systems. The determination of glucose molecules was achieved by using self-assembled monolayers (SAMs) and paper based micro fluidic assays in blood sample and also the detection of carcinoembryonic antigen (CEA) was achieved using lateral flow test strips. As the first study of this thesis, a new detection method for blood glucose was developed using a Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) probe (4- mercaptophenylboronic acid (4-MBA)/1-decanethiol (1- DT)) embedded in self-assembled monolayers (SAMs). The analytical performance was evaluated and linear calibration graphs were obtained in the glucose concentration range of 2–16 mM, which is also in the range of the blood glucose levels, and the detection limit was found to be 0,5 mM in reference blood sample. The glucose concentration was found to be $5,61 \pm 0,29$ mM in the reference blood sample and the certified value for glucose was $6,17 \pm 0,11$ mM. The recovery of the glucose in the reference blood sample was found as 90,9 %. As the second study of this thesis, a paper membrane-based SERS platform for the determination of blood glucose level was developed using a nitrocellulose membrane as substrate paper, and the microfluidic channel was simply constructed by wax-printing method. The rod shaped gold nanoparticles were modified with 4-MBA and 1-DT molecules and used as embedded SERS probe for paper based microfluidics. Total analysis was completed in 5 min. In SERS measurements, the intensity of the band at 1070 cm^{-1} which is attributed to B–OH vibration decreased depending on the rise in glucose concentration in the blood sample. The glucose concentration in the reference blood sample was found to be $5,43 \pm 0,51$ mM and the recovery of the glucose was found as 88 %. Ultimately, in the scope of carried out thesis, the detection of CEA was achieved from whole blood using smartphone based fluorescence microscope with quantum dot-based lateral flow immunoassay test strip. To design smartphone based fluorescence microscope, commercial Nokia Lumia 1020 was used as a cell phone. The lateral flow immunoassay which is on the basis of a sandwich immunoreaction was constructed by creating test and control lines on nitro cellulose membrane. Under optimal conditions, the LOD of CEA protein was found to be 1,0 ng/ml by using developed lateral flow assay with only 80 μL sample volume.

Science Code : 1.004

Key Words : SERS, chip, paper based microfluidic systems, cell phone fluorescence microscopes

Page Number : 162

Advisor : Prof. Dr. Uğur Tamer

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanması ve yürütülmesi aşamalarında desteğini esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan ve güvenen değerli danışman hocam Prof. Dr. Uğur Tamer'e, Tez çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirmek üzere beni laboratuvarına kabul eden, gerekli altyapıyı sağlayan, yol gösteren ve ayrıca maddi desteğini esirgemeyen UCLA, Elektrik Elektronik Bölümü öğretim üyesi, değerli hocam Prof. Dr. Aydoğan Özcan'a, UCLA Elektrik Elektronik Bölümü'nde gerçekleştirdiğim çalışmalarda bana destek olan Dr. Hatice Ceylan Koydemir'e ve ayrıca cep telefonu tabanlı mikroskop tasarımında yardımcı olan ve üretimini gerçekleştiren Derek K. Tseng'e,

Tezin ilk aşamasındaki çalışmalara ve bu çalışmaların yayına dönüştürülmesine katkılarından ve desteğinden dolayı Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale MYO, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü öğretim üyesi, Doç. Dr. Hakan Çiftçi'ye,

Tez çalışmalarımındaki SEM görüntülerini sağlayarak tezimi zenginleştirdiği için Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi, Prof. Dr. Zekiye Suludere'ye, Tezimde AFM görüntülerinin alınmasını sağladığı için Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Nihal Aydoğan ve Dr. Hande Ünsal'a,

Tez çalışmam süresince yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi, Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı'ya, ODTÜ, Mühendislik Fakültesi, Elektrik ve Elektronik Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi, Prof. Dr. Haluk Külâh'a, bölümümüz öğretim üyelerinden Prof. Dr. Nusret Ertaş, Prof. Dr. Hasan Basan ve Prof. Dr. Nilgün Günden Göğer'e,

Bu süreçte beni her zaman destekleyen, motive eden ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Damla Torul, Nurcan Turan Oluk, Pınar Ay Kılınç, Koray Kılınç ve Üzeyir Doğan'a,

Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı (2214-A) kapsamında, tezimin bir bölümünü yurtdışında gerçekleştirme imkanı sunduğu, Doktora süresince Yurtiçi Doktora Burs Programı (2211-A) ile desteklediği ve ayrıca tezimin Türkiye'de gerçekleştirdiğim bölümüne CostMP 1205-111T983 numaralı proje ile çalışmalarımın yürütülmesini sağladığı için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na,

Hedeflediğim bu yolda yürürken desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her konuda yanımda olan sevgili babama, anneme ve bütün eğitim hayatım boyunca bana emek veren hocalarıma, ayrıca adını sayamadığım tüm arkadaşlarım ve sevdiklerime,

SAYGI VE SEVGİLERİMLE TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	15
2.1. Biyosensörler.....	15
2.1.1 Nanopartiküller.....	15
2.1.2. Kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (Self-assembled monolayer, SAM).....	22
2.1.3. Mikro elektromekanik sistemler (MEMS).....	23
2.1.4. Kağıt tabanlı biyosensörler.....	24
2.2. Biyosensör Teknolojisinde Kullanılan Tayin Yöntemleri.....	36
2.2.1. Raman spektroskopisi.....	36
2.2.2. Floresans spektroskopisi.....	48
2.2.3. Floresans mikroskopisi.....	52
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	57
3.1. Gereç.....	57
3.1.1. Kimyasal maddeler ve malzemeler.....	57
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	58
3.2. Yöntem.....	58

Sayfa

3.2.1. Glikoz tayini için yöntem geliştirilmesi.....	59
3.2.2. Kanser biyobelirteç tayini için yöntem geliştirilmesi.....	72
4. BULGULAR.....	81
4.1. Glikoz Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi.....	81
4.1.1. Kendiliğinden düzenlenme (SAM) tekniğiyle hazırlanan biyosensör ile glikoz tayini.....	81
4.1.2. Kağıt tabanlı mikro akışkan çip kullanımı ile glikoz tayini.....	104
4.2. Kanser Biyobelirteç Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi.....	113
4.2.1. Hazırlanan yatay akış test striplerinin çalışma prensibi.....	113
4.2.2. Yatay akış test striplerinin optimizasyon çalışmaları.....	116
4.2.3. CEA protein tayini için yatay akış test striplerinin analitik performansının değerlendirilmesi.....	121
4.2.4. Tam kan örneğinde CEA protein tayini.....	125
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	129
KAYNAKLAR.....	141
ÖZGEÇMİŞ.....	159

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Kanser türleri ve ilgili biyobelirteçler.....	7
Çizelge 1.2. Meme kanseri biyobelirteçleri için ticari ELISA kitlerinin karşılaştırılması.....	9
Çizelge 1.3. Çalışılması planlanan kanser biyobelirteçleri için teşhis sınırı (LOD) değerleri ile birlikte literatür özeti.....	10
Çizelge 1.4. Kan örneklerinde kanser biyobelirteçleri için teşhis sınırı (LOD) ve eşik değerlerinin karşılaştırılması.....	11
Çizelge 1.5. Farklı biyosensör sistemlerine ait tayin metotları, avantajları ve dezavantajları.....	12
Çizelge 2.1. Organik floroforlar (örnek olarak floressein verilmiştir) ve kuantum noktaları (Qdot) arasında karşılaştırma.....	20
Çizelge 2.2. Kağıt tabanlı biyosensörlerin tayin metotları, avantajları ve dezavantajları.....	24
Çizelge 4.1. Literatürdeki mevcut sistemler ve geliştirilen Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopi (YGRS) tekniğinin karşılaştırılması.....	101
Çizelge 4.2. BSS değerleri ile birlikte gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları.....	123
Çizelge 4.3. CEA moleküllerinin tayini için, üç farklı kan örneğiyle yapılan doğruluk çalışması.....	128

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü ülkelerinde kanser türlerine göre ölüm oranları.....	7
Şekil 2.1. a) Altın nanokürelerin yüzey plazmon rezonansının şematik gösterimi, b) Altın nanokürelerin absorpsiyon bandı.....	18
Şekil 2.2. a) Altın nanoçubukların yüzey plazmon rezonansının şematik gösterimi, b) Altın nanoçubukların absorpsiyon bandı: enine ve boyuna plazmon bantları.....	19
Şekil 2.3. Kuantum noktacıkarı için yüzey modifikasyon seçenekleri.....	21
Şekil 2.4. Tipik bir yatay akış test stribinin şematik gösterimi.....	25
Şekil 2.5. Tipik bir sandviç yapıda yatay akış testinin çalışma prensibi.....	28
Şekil 2.6. Tipik bir yarışmalı yatay akış testinin çalışma prensibi.....	29
Şekil 2.7. Kağıt tabanlı mikro akışkan çiplerin üretim teknikleri. (A) Şablon baskılama (B) Mum içerisine daldırma (C) Mum baskılama.....	35
Şekil 2.8. Farklı tasarımda kağıt tabanlı mikro akışkan çipler.....	35
Şekil 2.9. Rayleigh ve Raman saçılmaları için enerji diyagramı.....	37
Şekil 2.10. Argon iyon lazeri ile uyarılan CCl_4 'ün Raman spektrumu ($\lambda_0=488,0 \text{ nm}$, $\sigma_0=20,49 \text{ cm}^{-1}$).....	38
Şekil 2.11. a) Rezonans Raman saçılması, b) Floresanss emisyonu için enerji diyagramları.....	42
Şekil 2.12. Metal yüzeyine tutunan molekülün enerji diyagramı.....	47
Şekil 2.13. Floresansın ilkeleri, a) bir molekülün enerji seviyelerinin gösteren Jablonski Diyagramı, b) bir molekülün enerjinin absorpsiyon ve emisyonu ile ilişkili spektral karakteristiği, c) floresanssta gerçekleşen bazı basamaklar, uyarılma ve lüminesans için süreler.....	49
Şekil 2.14. Floresans mikroskop, a) üstten aydınlatmalı floresans mikroskopun parçalarının gösterimi, b) bir küpün dizaynı ve filtrelerin spektral özellikleri	53
Şekil 3.1. a) Au-4-MBA/DT, b) Au-4-MBA/DT - AuNPs-4-MBA/DT yüzeylerinin şematik gösterimi.....	63
Şekil 3.2. Referans kan örneğinde glikoz tayininin şematik gösterimi.....	68
Şekil 3.3. Kağıt tabanlı mikro akışkan çiplerin üretim şeması.....	70

Şekil	Sayfa
Şekil 3.4. Cep telefonu tabanlı floresans mikroskopun (a) şematik gösterimi ve (b) fotoğrafları.....	76
Şekil 3.5. Streptavidin bağlı Qdot-625'e ait absorpsiyon ve emisyon spektrumları	78
Şekil 4.1. UV-Vis absorpsiyon spektrumları a) Altın nanoçubuk b) Modifiye edilmiş altın nanoçubuk.....	84
Şekil 4.2. Altın nanoçubuklara ait zeta potansiyel dağılımı.....	84
Şekil 4.3. Küresel yapıdaki altın nanopartiküllere ait UV-Vis absorpsiyon spektrumu.....	86
Şekil 4.4. a) Au-4-MBA/DT, b) Au-4-MBA/DT-AuNps-4-MBA/DT yüzeylerinin Raman spektrumu.....	90
Şekil 4.5. SPR sensorgramları a) Au-4-MBA/DT b) Au-4-MBA/DT-AuNps-4-MBA/DT (glikoz konsantrasyonları; 2,8; 5,6; 11,1 ve 22,2 μ M).....	91
Şekil 4.6. 4-MBA ile farklı ligandlar kullanılarak hazırlanan YGRS platformları ile elde edilen Raman sinyallerinin karşılaştırması.....	92
Şekil 4.7. 4-MBA/PEG tiyol, 4-MBA/PEG tiyol asit, 4-MBA/DT kullanılarak hazırlanan YGRS platformları ile elde edilen kalibrasyon grafikleri.....	93
Şekil 4.8. 4-MBA/PEG tiyol asit (1/1) ile modifiye edilen altın levha yüzeyine, (1/1), (1/3), (3/1) oranlarında 4-MBA/PEG tiyol asit ile modifiye edilen altın nanopartiküllerin immobilizasyonu ile hazırlanan YGRS platformları kullanıldığında elde edilen değişim eğrileri.....	93
Şekil 4.9. 4-MBA/PEG tiyol (1/1) ile modifiye edilen altın levha yüzeyine, (1/1), (1/3), (3/1) oranlarında 4-MBA/PEG tiyol ile modifiye edilen altın nanopartiküllerin immobilizasyonu ile hazırlanan YGRS platformları kullanıldığında elde edilen değişim eğrileri.....	94
Şekil 4.10. Altın levha yüzeyinin farklı konsantrasyonlarda 4-MBA/DT oranlarında modifikasyonun glikoz ölçümlerine etkisi.....	95
Şekil 4.11. Altın nanoçubuk yüzeyinin farklı konsantrasyonlarda 4-MBA/DT oranlarında modifikasyonunun glikoz ölçümlerine etkisi.....	96
Şekil 4.12. pH değişiminin YGRS sinyaline etkisi.....	97
Şekil 4.13. Glikoz ölçümüne glikoz-boronik asit gruplarının etkileşim süresinin etkisi.....	97
Şekil 4.14. Hazırlanan YGRS platform için stabilite çalışması sonuçları.....	98

Şekil	Sayfa
Şekil 4.15. Artan glikoz konsantrasyonu ile YGRS platformundan elde edilen Raman spektrumundaki değişim.....	99
Şekil 4.16. Glikoz tayini için kalibrasyon grafiği.....	100
Şekil 4.17. Glikoz tayininde girişim çalışması.....	102
Şekil 4.18. Referans kan örneğinde glikoz konsantrasyonuna karşı, boronik asidin 1070 cm^{-1} ' deki pik şiddetindeki değişimi gösterir YGRS spektrumu.....	103
Şekil 4.19. Standart ekleme yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	104
Şekil 4.20. Altın nanoçubuk çözelti miktarı ve damla sayısının YGRS sinyallerine etkisi.....	106
Şekil 4.21. Çalışılan kan örneği miktarının YGRS sinyal şiddetine etkisi.....	107
Şekil 4.22. Ölçüm süresinin YGRS sinyal şiddetine etkisi.....	108
Şekil 4.23. Glikoz tayininde Raman sinyallerine ürik asit (UA), dopamin (DA), ve askorbik asit (AA) varlığının etkisi.....	109
Şekil 4.24. Kağıt tabanlı mikro akışkan çip yüzeyinde artan glikoz konsantrasyonuna karşı boronik asidin 1070 cm^{-1} ' deki pik şiddetindeki değişimin Raman spektrumu.....	112
Şekil 4.25. Kağıt tabanlı mikro akışkan çip kullanılarak standart ekleme yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	112
Şekil 4.26. A) Yatay akış test striplerinin şematik gösterimi, B) numune uygulama pedine CEA protein içeren örneğin uygulanması, C) analit-Qdot kompleksinin düzenlenmesi ve düzenlenen kompleksin nitroselüloz membran boyunca kapiler etkisi ile ilerlemesi, D) test hattında bulunan poliklonal antikorlar tarafından CEA-Qdot komplekslerinin yakalanması ve kontrol hattındaki ikincil antikorlar tarafından bağlanmayan Qdot konjugatlarının yakalanması.....	113
Şekil 4.27. Farklı konsantrasyonlarda Qdot konjugatı kullanılmasının Qdot-tabanlı yatay akış test striplerinin sinyal şiddetine etkisi.....	119
Şekil 4.28. Qdot-tabanlı yatay akış test striplerinde analiz süresinin Qdot sinyallerine etkisi.....	120
Şekil 4.29. Kan örneklerinin seyreltme oranlarının CEA tayininde sonuçlara etkisi.....	121

Şekil**Sayfa**

Şekil 4.30. Tampon çözeltide CEA moleküllerinin kantitatif tayini; a) Cep telefonu tabanlı floresans mikroskop kullanılarak CEA moleküllerinin kantitatif tayini için kalibrasyon grafiği, b) 1,05 ng/ml ile 15,0 ng/ml derişim aralığında CEA içeren standart çözeltiler için test striplerinin doğrusal cevabı.....	122
Şekil 4.31. Yatay akış test stripleri ile geliştirilen yöntem için kesinlik testi. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarının a) tampon çözelti ve b) kan örneği içerisine spike edilen CEA molekülleri ile elde edilen kalibrasyon grafikleri.....	124
Şekil 4.32. Yatay akış test striplerinin kan örnekleri ile etkileştikten sonraki kararlılık testi.....	125
Şekil 4.33. Kan örneğinde CEA moleküllerinin kantitatif tayini; a) Cep telefonu tabanlı floresans mikroskop kullanılarak CEA moleküllerinin kantitatif tayini için kalibrasyon grafiği, b) 1,05 ng/ml ile 15,0 ng/ml derişim aralığında CEA içeren standart çözeltiler için test striplerinin doğrusal cevabı.....	127
Şekil 4.34. Farklı derişimlerde CEA içeren insan kanının, cep telefonu tabanlı floresans mikroskop ile elde edilen test sonuçları.....	128

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. a) Farklı şekillerdeki gümüş nanoparçacıkların renkli elektriksel alan kuvvetlendirme çizgileri: (1) ve (2) iki farklı simetri eksenini boyunca polarizlenen üçgen prizma; (3) ve (4) boyunca polarizlenen çubuk ve eliptik gümüş nanoparçacıklar. Oklar en yüksek elektriksel alanları gösterir, b) Yıldız şeklinde manyetik altın nano parçacıklara ait elektriksel alan kuvvetlendirme bölgeleri.....	45
Resim 4.1. Çubuk formundaki altın nanopartiküllerin TEM görüntüleri.....	82
Resim 4.2. Kemik şeklinde altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü.....	83
Resim 4.3. Küresel yapıdaki altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü.....	85
Resim 4.4. YGRS platformunun TEM görüntüleri a) x200, b) x13.000 büyütme...	87
Resim 4.5. AFM görüntüleri a) Au yüzey, b) Au-4-MBA/DT ve c) Au-4-MBA/DT-AuNPs-4- MBA/DT yüzeyleri.....	88
Resim 4.6. a) Au yüzey, b) Au-4-MBA/DT, ve c) Au-4-MBA/DT- AuNPs-4-MBA/DT yüzeylerinin su değme açısı fotoğrafları.....	89
Resim 4.7. Kağıt tabanlı mikro akışkan çipe ait a) kanalın, b) partikül kaplı ölçüm alanının ve c) mum kaplı bariyerin SEM görüntüleri.....	105
Resim 4.8. Kağıt tabanlı mikro akışkan çip kullanılarak kan örneği çalışılırken, a) kanın damlatıldığı, b) serumun ayrıldığı ve c) küçük moleküllerin ilerlediği bölgelerin SEM görüntüleri.....	110
Resim 4.9. Test hattının farklı filtre setleri ile elde edilen mikroskop görüntüsü.....	115
Resim 4.10. Farklı bloke etme çözeltileri kullanılarak hazırlanan yatay akış test striplerinde Qdot konjugatlarının ilerlemesini gösteren mikroskop görüntüleri.....	116
Resim 4.11. Bloke etme ajanı olarak BSA yerine kazein kullanılmasının ve bloking işleminden sonra yıkama yapılmasının Qdot konjugatlarının analitik membran boyunca ilerlemesine etkisini gösteren mikroskop görüntüleri.....	117
Resim 4.12. Kan örneğinin seyreltme oranının optimizasyon çalışmasında kullanılan test striplerinin görüntüsü.....	120
Resim 4.13. Farklı derişimlerde (1,05 ng/ml-15,0 ng/ml) CEA protein içeren kan örneklerinin 80 µl'si ile etkileştikten sonra Qdot tabanlı yatay akış test striplerin floresans görüntüleri.....	126

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
μPAD	Kağıt-tabanlı Mikro Akışkan Analitik Araçlar (Microfluidic Paper-based Analytical Devices)
AA	Askorbik Asit
ACN	Asetonitril
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscopy)
APBA	3-Aminofenil Boronik Asit
CARS	Koherent Anti-Stokes Raman Saçılması (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering)
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromür
DA	Dopamin
1-DT	1-Dekantiyol
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-Etilkarbodimid Hidroklorür
EF	Kuvvetlendirme Faktörü (Enhancement Factor)
AuNP	Altın Nanopartikül
HOMO	En Yüksek Dolu Moleküler Orbital
HRP	Horseradish Peroksidaz
LUMO	En Düşük Dolmamış Moleküler Orbital
4-MBA	4-Merkaptofenil Boronik Asit
NHS	N-Hidroksisülfo- Süksinimid Sodyum Tuzu
NIR	Yakın İnfrared
PEG Tiyol Asit	O-(2-Karboksietil)O-(2-Merkaptoetil)-Heptaetilen Glikol
PEG Tiyol	O[2-(3-Mercaptopropionylamino)Ethyl]-O-Methylpolyethylene Glycol
Qdots	Kuantum Noktacıkları (Quantum Dots)

Kısaltmalar	Açıklama
SAM	Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabaka (Self-Assembled Monolayer)
YGRS	Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy-SERS)
SPR	Yüzey Plazmon Rezonansı (Surface Plasmon Resonance)
TCAB	Tetradodesil Amonyum Bromür
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope)
UA	Ürik Asit
UV-Vis	Ultra Viyole-Görünür Bölge

1. GİRİŞ

Bu çalışmada kağıt tabanlı mikro akışkan çipler kullanılarak kan örneklerinde glikoz ve kanser biyobelirteç tayini gerçekleştirilmiştir. Kan örneklerinde yapılan analizlerin çip teknolojisine dayalı olarak yapılması; analiz süresinin kısalması, taşınabilir cihazlar ile büyük laboratuvar ekipmanlarına ve kalifiye eleman çalıştırılmasına ihtiyaç duyulmadan analizin gerçekleştirilmesi, bu tür büyük sistemlere sahip olmayan yerlerde de kolaylıkla analiz yapılması ve tüm bunlara ek olarak düşük maliyetli sistemlerin geliştirilmesi açısından önem arz etmektedir. Bu amaçla farklı türde çipler hazırlanmış ve iki farklı tür hedef molekül ile hazırlanan sistemler test edilmiştir. Altın levha kullanılarak kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (SAMs) ve kağıt tabanlı mikroçipler hazırlanarak glikoz tayini, yatay akış testleri hazırlanarak karsinoembriyonik antijen (CEA) kanser biyobelirteç tayinin uygulanabilirliği test edilmiştir. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında ise taşınabilir sistemlere geçiş yapmak amacıyla cep telefonu tabanlı bir mikroskop üretilmiştir. Aşağıda kendiliğinden düzenlenen yapılar ve kağıt tabanlı teknikler olmak üzere çalışmanın amacı iki başlık halinde genel hatları ile verilmiştir.

SAMs Tekniği Kullanılarak Glikoz Tayini

Kan sıvılarında glikoz tayininin yapılması, özellikle diyabet hastalarında glikoz seviyesinin sürekli takibi açısından tanı analizlerinde önemli bir analitik zorluktur (Reach ve Wilson, 1992). Kanda glikoz tayini için elektrokimyasal, kolorimetrik, iletkenlik ölçümü ve optik yöntemler kullanılarak farklı metotlar geliştirilmiştir (Al-Ogaidi ve diğerleri, 2014; Rahman, Ahammad, Jin, Ahn ve Lee, 2010). Glikoz tayini için genellikle enzimatik sensörler kullanılmasına rağmen, bu yaklaşımda karşılaşılan en büyük problem enzimin kararlılık problemidir (Antonisse ve Reinhoudt, 1998; S. Park, Boo ve Chung, 2006). Enzimatik olmayan elektrokimyasal yöntemlerin ise düşük hassasiyet, seçicilik ve bazik pH bölgesinde çalışma gibi bazı problemleri vardır. Bu yüzden glikoz molekülleri için yeni tanıyıcı sistemlere gereksinim duyulmaktadır (Beer ve Gale, 2001; Linton ve Hamilton, 1997; S. Park ve diğerleri, 2006). Bu amaçla kullanılan moleküler tanıma ajanlarından biri olan fenil boronik asit, sakkaritlerde cis-diol düzenlenmesini gerçekleştirme yeteneği ve sulu ortamda sakkaritlerle tersinir kovalent kompleks oluşturabilmesi sayesinde ideal bir sentetik yapıdır (Bagudu, Lakowicz ve Geddes, 2006; Baker, Desikan ve Thundat, 2008; Çiftçi, Tamer, Teker ve Pekmez, 2013; Torun, Dudak, Baş, Tamer ve Boyacı, 2009). Fenil

boronik asit türevleri, UV-Vis absorpsiyon (Bagudu ve diğerleri, 2006), floresans ölçümleri (Çubuk, Yetimoğlu, Kahraman, Demirbilek ve Firlak, 2013; Swamy ve diğerleri, 2005), elektrokimya (Aytaç, Kuralay, Boyaci ve Unaleroglu, 2011; J. Li, Sun, Wei ve Zheng, 2013), plazmonik sensörler (M. Lee ve diğerleri, 2002; H. B. Liu ve diğerleri, 2011), holografi ve SPR (M. C. Lee ve diğerleri, 2004; Soh, Sonezaki ve Imato, 2003) gibi çeşitli çalışmalarda sakkarit ölçümü için kullanılmıştır. Sonuç olarak fenil boronik asit problemleri, kan gibi kompleks matrislerde glikoz tayini için tanıma ajanı olarak kullanılmaktadır. Düşük örnek hacmiyle çalışıldığında ve hedef molekülün düşük konsantrasyonda tayin edilmesi gerektiğinde Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (YGRS) yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlar (De Guzman, Soper ve McCarley, 2010; Nie, 1997). Fakat YGRS tabanlı analitik metotlar veya sensörler hala bir takım dezavantajlara sahiptir. Bunların başında gelen sebep, nanoyapıların yüzeyleri ya da nanopartiküllerin Raman aktivitelerinin kontrolünde zorluk olmasıdır (Bantz ve diğerleri, 2011). YGRS’de sinyal kuvvetlendirme genellikle nanoyapıların yüzeyinde oluşan elektriksel alan ile sağlandığı için nanopartiküllerin aktiviteleri önemlidir. Bu sınırlama yüzünden güvenilir ve tekrarlanabilir YGRS tabanlı bir analitik yöntem geliştirmek çok fazla çaba gerektirir. Van Duyne ve grubu tarafından YGRS yöntemi kullanılarak glikoz tayini gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada dekantiyol ve (1-merkaptoundeka-1(-yl) tri (etilen)glikol) gibi alkan tiyolatlar kullanılarak YGRS yöntemiyle glikozun direkt tayinini gerçekleştirmişlerdir (K. Ma ve diğerleri, 2011; Nuzzo, Fusco ve Allara, 1987; Porter, Bright, Allara ve Chidsey, 1987). Alkil arayüz fonksiyonel grubu, glikozun direkt tayini sırasında glikoz yayılımını artırmak için kullanılmıştır.

Kendiliğinden düzenlenme tekniği (SAMs), nanopartikül yüzeyine biyolojik molekülleri tutturmak için kullanılan yüzey modifikasyonlarında çeşitli avantajlar sağlar (Tamer ve diğerleri, 2013). Bu yöntem nanopartiküllerin yüzeyinde yapısal olarak yoğun ve iyi düzenlenmiş tek tabakanın oluşmasını sağlar. Etanol çözeltilerinde gerçekleştirilen deneysel prosedür, bir çok sensör türü için uygulanabilir ve kolay bir prosedürdür. Örnek olarak 3-aminofenil boronik asit (3-APBA) SAM aracılığı ile altın bir elektroda bağlanmış ve 3-APBA ile bakteri arasındaki bağlanmanın neden olduğu, ölçüm yüzeyinin kapasitansındaki değişim, boyuna akış sisteminde potansiyostatik bir metotla tayin edilmiştir (De Guzman ve diğerleri, 2010). Bu metot bakteri türüne seçici değildir ve yalnızca 3-APBA’ya bakterinin bağlanmasını gösterir. Aromatik boronik asitlerle sakkaritlerin oluşturduğu kompleks, bir stabil ester gibi davranır ve bağlanma sabiti

ortamın pH'ına, elektrolit konsantrasyonuna ve aromatik boronik asitin pKa değerine bağlıdır (Van Duyne, 2003). Ayrıca hücre duvarları 3-APBA moleküllerine seçici kimyasal bağlanma sağlayan diol gruplarını içeren polisakkaritlerden oluştuğu için, 3-APBA kullanılan bu metodun uygulaması toplam bakterilerin hızlı bir şekilde tayini için önerilmiştir (Nuzzo ve Allara, 1983; Yonzon, Haynes, Zhang, Walsh ve Van Duyne, 2004). Bir başka çalışmada ise, 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) ve merkaptofenil boronik asit (MBA) ile modifiye edilen altın nanopartiküller hidrofobik kuvvetlerle poli(3-oktiltiyofen) (POT) yüzeyine bağlanmış ve hazırlanan POT-Au-SAM elektrot glikoz tayini için boronik asit/dekan tiyol tabakasında glikozun dağılımına dayanan enzimatik olmayan potansiyometrik glikoz sensörü olarak kullanılmıştır (Çiftçi ve Tamer, 2012). Benzer bir yaklaşımla araştırma grubumuzda yürütülen bir çalışmada, yeni bir organik iletken polimer elektrot (poli(3-aminofenilboronik asit-co-3-oktiltiyofen)) da glikoz tayini için kullanılmıştır ve sensörün analitik performansı potansiyometrik ölçümlerle değerlendirilmiştir (Çiftçi ve diğerleri, 2013). Diğer bir çalışmada, glikozun diol grupları ve boronik asit arasında kompleks oluşumu esasına dayalı glikoz tayini için Ag@Au-grafen oksit nanomateriyalde MBA bulunduran bir sensör geliştirilmiştir (Gupta ve diğerleri, 2013).

Yürütülen tez çalışması kapsamında ilk olarak, kendiliğinden düzenlenme tekniği ile modifiye edilen altın yüzeyine, yine kendiliğinden düzenlenme tekniği ile modifiye edilen altın nanoparçacıklar bağlanarak bir sensör hazırlanmış, glikozun seçici ve hassas olarak tayini için bir YGRS platformu oluşturulmuştur. Dekantiyol (1-DT) ve 4-merkaptofenil boronik asit (4-MBA) tek tabaka olarak altın kaplı yüzey ve altın nanopartiküller üzerinde düzenlenmiştir. Daha sonra hidrofobik etkileşimlerle mofiyeye altın kaplı yüzey üzerinde modifiye edilmiş SAM altın nanopartiküllerin bağlanması sağlanmıştır. Hazırlanan bu YGRS platformu, glikoz ve yüzey arasında kompleks oluşumunu esas alan bir yaklaşımla, glikoz tayini için kullanılmıştır.

Hazırlanan YGRS platformu, dönüşümlü voltametri, değme açısı ölçümleri, atomik kuvvet mikroskobu (Atomic Force Microscopy-AFM), ve Raman spektroskopisi yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Ayrıca bu YGRS platformu plazma örneğinde glikoz tayini için de kullanılmıştır.

Kağıt tabanlı mikroçipler ile glikoz ve kanser biyobelirteç tayini

Kan sıvılarında küçük moleküllerin tayini, klinik tanıda hala önemli bir analitik zorluktur. Genellikle tam kan matriksinden serum ya da plazmanın ayrılması işlemi santrifüj etme (Frank, Shubha ve D'Souza, 2012) ve sedimentasyon (Kersaudy-Kerhoas, Dhariwal, Desmulliez ve Jouvet, 2010) ile gerçekleştirilir. Fakat bir çok biyolojik test için kullanılan bu ayırma yöntemlerinde yüksek miktarda örnek hacmine, uzman personele ve pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyulur (Minnikanti, Gangopadhyay ve Reyes, 2014). Bu yüzden örnek hacmini, analiz maliyetini ve zamanını azaltmak için alternatif analiz metotları ve sensörlere ihtiyaç duyulmuştur. Bu alternatif yöntemlerden bir tanesi de mikro akışkan sistemlerdir (Chin, Linder ve Sia, 2007; Whitesides, 2006). Mikro akışkan sistemler düşük maliyetli olması, hızlı analiz imkanı sağlaması ve düşük örnek hacmine gereksinim duyulması açısından, tam kan analizlerinde tercih edilirler (Crowley ve Pizziconi, 2005). Zweifach-Fung etkisi (S. Yang, Undar ve Zahn, 2006), hidroforetik filtrasyon (S. Choi, Song, Choi ve Park, 2007), hidrodinamik filtrasyon (Yamada ve Seki, 2005) ve çapraz akış filtrasyon (X. Chen, Cui, Liu ve Li, 2008; VanDelinder ve Groisman, 2006) gibi mikro akışkan sistemler kan analizleri için kullanılmıştır. Yine de bu tür mikro akışkan çipler, örneğin kanal boyunca akışını sağlamak için şırınga pompası kullanımı gibi bir takım ek aparatlara ihtiyaç duymaktadırlar (Songjaroen, Dungchai, Chailapakul, Henry ve Laiwattanapaisal, 2012). Bu yüzden kağıt tabanlı mikro akışkan sistemler, kısa analiz süresinine sahip olması açısından yeni ve alternatif bir yaklaşım olarak düşünülebilir (X. Li, Tian, Garnier ve Shen, 2010; Martinez ve diğerleri, 2008). Bu sistemler, kağıt yüzeyinde mikro akışkan kanalların düzenlenmesiyle hazırlanırlar (X. Li, Tian, Garnier ve diğerleri, 2010; R. Lu, Shi, Jiang, Qin ve Lin, 2009; Martinez ve diğerleri, 2008). Kağıt tabanlı mikro akışkan çipler maliyetinin düşük olması, kullanımının kolay olması, taşınabilir olması ve tek kullanımlık olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir (Y. Lu, Shi, Qin ve Lin, 2010) ve medikal amaçlı çip üretimi için gelecek vaat etmektedir (Martinez ve diğerleri, 2008; Ren, Zhou ve Wu, 2013). Bütün bunlara ek olarak, yüzey-hacim oranının önemli derecede büyük olması sayesinde kan analizleri gibi yüzey etkileşimine dayanan uygulamalar için bir avantaj sağlar (Ren ve diğerleri, 2013).

Kağıt tabanlı mikro akışkan çiplerin üretilmesi için genellikle tam selüloz içeren kağıtlar kullanılır. Öte yandan nitro selüloz membran (NC) kullanılarak üretilen kağıt tabanlı mikro akışkan çiplerin sağladığı bazı avantajlar vardır. NC membranlar Van der Waals etkisi,

hidrojen bağları ve yük etkileşimleri sayesinde proteinleri tutma özelliğine sahiptir ve böylece biyolojik matriksten proteinlerin ayrılmasına olanak sağlarlar (Y. Lu ve diğerleri, 2010). Ayrıca membranın gözenekli yapısı proteinlerin ideal olarak ayrımını sağlar ve günümüzde Western blotting (Han ve diğerleri, 2008), enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) (Hou, Chen, Cheng ve Huang, 2007) ve altın partiküllerle hazırlanmış test stripleri (Lisa, Chouhan, Vinayaka, Manonmani ve Thakur, 2009) gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Ayrıca NC membran, örneklerden kirliliklerin ayrımı için de kullanılabilir. NC membranın mikro kanalları boyunca akış, oldukça pürüzsüz yüzeyi sayesinde daha kararlı ve tekrarlanabilir (Y. Lu ve diğerleri, 2010).

Mikro akışkan sistemler için, uygulanabilir tayin metotları kolorimetrik, optik ve elektrokimyasal tayin metotlarıdır (X. Li, Ballerini ve Shen, 2012; Ren ve diğerleri, 2013). Bu yöntemler arasında en çok tercih edilen yöntem kolorimetrik metottur. Bu metot az sayıda ekipman kullanımı ve test hatlarının fotoğrafını çekerek teletıp için uygulanabilirliği sayesinde ticari amaçla kullanım için en uygun strateji olarak görülmektedir (Martinez ve diğerleri, 2008; Ren ve diğerleri, 2013). Bunun dışında, son on yıl boyunca yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılması (YGRS) tabanlı sensörler yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlamıştır (Guerrini ve Graham, 2012; Lyandres ve diğerleri, 2005; X. Zhang, Young, Lyandres ve Van Duyne, 2005). Çeşitli mikro akışkan sistemler de laboratuvar ve saha analizleri için YGRS substratları olarak geliştirilmiştir (Lim, Hong, Chung, deMello ve Choo, 2010; G. L. Liu ve Lee, 2005; M. Wang, Benford, Jing, Côté ve Kameoka, 2009). Genellikle bu YGRS tabanlı mikro akışkan sistemler, metal nanoyapıların mikro üretimi ile hazırlanır ve birçok uygulamada nano yapıların üretimine ihtiyaç duyulur. Bu durum örnek başına düşünüldüğünde yüksek maliyetli ve zaman alıcıdır (Yu ve White, 2010). Bütün bunlar göz önünde bulundurulduğunda kağıt tabanlı mikro akışkan sistemler düşük maliyetli olması ve üretim kolaylığı açısından alternatif olarak düşünülebilir.

Kağıt tabanlı mikroçipler ile glikoz tayini

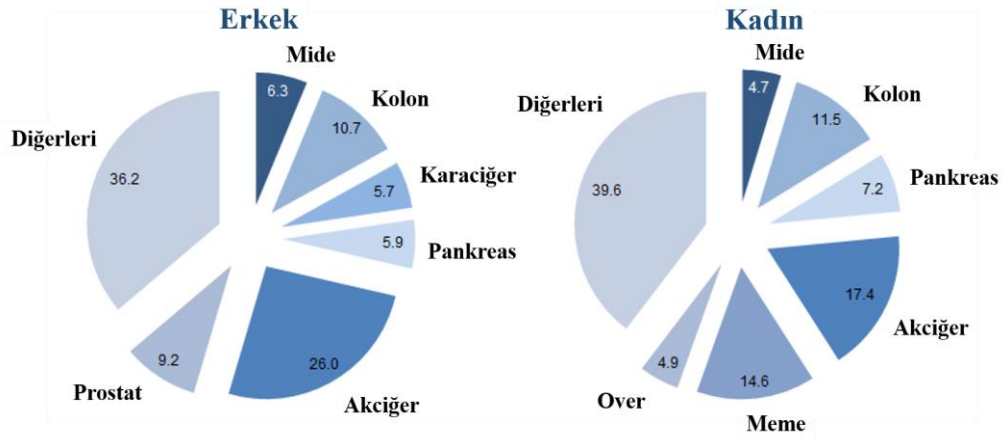
Mevcut sistemler yüksek maliyetli ve zaman alıcı olduğu için tam kan örneğinde glikoz tayini için yeni bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın ikinci aşaması olarak düşünülen bu bölümde tam kan örneğinde glikoz tayini için mum baskılama yöntemi kullanılarak kağıt tabanlı bir çip üretilmiştir. Hidrofobik kanallar mum yazıcı kullanılarak nitroselüloz membran üzerinde oluşturulmuştur. Kağıt tabanlı mikro akışkan çipin kan

matriksinden kan hücrelerinin ve proteinlerin hapsedilerek ayrılması için kullanılabildiği ispatlanmıştır. Bu amaçla, altın nanopartikül yüzeyinde 4-MBA ve DT molekülleri ile tek tabaka oluşturulmuştur. Modifiye edilmiş altın nanoçubuklar YGRS ölçüm alanını oluşturmak üzere damlatıp kurutma tekniği kullanılarak kağıt yüzeyine uygulanmıştır. Hazırlanan kağıt tabanlı mikro akışkan çip tam kan örneğinde glikoz tayini için kullanılmıştır. Kağıt tabanlı çip taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Raman spektroskopisi kullanılarak karakterize edilmiştir.

Kağıt tabanlı mikroçipler ile kanser biyobelirteç tayini

Kanser dünyanın her yerinde hala üzerinde çok fazla çalışılması gereken büyük bir sağlık problemidir. Kanser hastalığının yaygın olması, birçok kanser türünün yüksek ölüm oranlarıyla sonuçlanması ve tedavi sonrasında hastalığın tekrarlanması gibi nedenler dolayısı ile bu konu üzerinde yapılan çalışmalar yoğunluk kazanmaktadır. Kanser tanısı için kullanılan çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunların yanı sıra, bazı kanser türlerini belirlemek, tanımlamak ve tedaviyi planlamak için kanser biyobelirteçleri kullanılmaktadır. Çünkü kanser biyobelirteçlerinin seviyesindeki artış kanser varlığını gösterebilir. Ayrıca tanısı yapılmış bir kanser için de tedaviye başlamadan önce kanser biyobelirteç seviyesinin ölçülmesi uygun tedavinin planlanması aşamasında yardımcı olmaktadır. Bazı kanser türlerinde kanser biyobelirteç seviyesi hastalığın aşaması hakkında bilgi verir. Ayrıca kanser biyobelirteçleri kanser tedavisi boyunca da periyodik olarak ölçülerek hastalığın seyri takip edilebilir. Burada kanser biyobelirteç seviyesindeki düşüş ya da biyobelirtecin normal seviyeye dönmesi, hastanın tedaviye cevap verdiğini gösterirken seviyede hiç bir değişikliğin olmaması ya da artış yaşanması tedaviye cevap alınamadığını gösterebilir. Bunun dışında kanser biyobelirteçleri tedavi sonrasında hastalığın nüksedip nüksetmediğini değerlendirmek amacıyla da ölçülebilir.

Bu çalışmada yaygın olarak rastlanan kanser türlerine işaret eden kanser biyobelirteçleri ile çalışmaya karar verilmiştir. Şekil 1.1’de (OECD Health Statistics 2016) OECD ülkelerinde kanser türlerine göre ölüm oranları verilmiştir. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) ve Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) verilerine göre dünya ve Türkiye’de en yaygın kanser türleri meme kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri ve prostat kanseridir. Bu kanser türlerinin erken tanısı hastaların yaşamlarına devam ettirmelerini sağlamak açısından oldukça önemlidir.



Şekil 1.1. Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü ülkelerinde kanser türlerine göre ölüm oranları

Kanser biyobelirteçleri kanda veya dokularda bulunan moleküllerdir ve seviyeleri direkt olarak kanser aşamalarıyla ilgilidir. Bu yüzden kanser biyobelirteçleri erken tanı ve hasta için uygun tedavinin değerlendirilmesinde önemli rol oynar. Genel olarak kanser türleri ve bu türlerle ilişkili kanser biyobelirteçleri Çizelge 1.1’de (Tothill, 2009; J. Wu, Fu, Yan ve Ju, 2007) verilmiştir. Görüldüğü gibi birçok kanser türü birden fazla kanser biyobelirtecine sahiptir ve birçok kanser biyobelirteci de birden fazla kanser türüne işaret edebilir. Bu yüzden kanser biyobelirteçlerinin çoklu analizi doğru kanser türünü belirlemek açısından oldukça önemlidir.

Çizelge 1.1. Kanser türleri ve ilgili biyobelirteçler

Kanser türleri	Biyobelirteçler
Karaciğer kanseri	AFP, CEA
Kolon ve pankreas kanseri	CEA, CA19-9, CA24-2
Mide kanseri	CA72-4, CEA, CA19-9
Yemek borusu kanseri	SCC
Akciğer kanseri	CEA, CA19-9, SCC, CYFRA21-1, NSE
Meme kanseri	CA15-3, CA125, CEA, CA27-29
Epitelyal over kanseri	CA125, AFP, hCG, CEA
Trofoblastik kanser	SCC, hCG
Prostat kanseri	PSA
Kan kanseri	Kromazomal anormallikler
Testis kanseri	AFP, hCG, CAGE-1, ESO-1
Mesane kanseri	BAT, FDP, NMP22, HA-Hase, BLCA-4, CYFRA 21-1

Çalışmada tek kanser türüne işaret eden farklı biyobelirteç tayinleri yapılabileceği gibi farklı kanser türlerine işaret eden biyobelirteç tayini de yapılabilir. Bu tez çalışmasında

meme kanserine işaret eden CEA, CA15-3, CA125 ve CA27-29 biyobelirteçlerinin tayin edilmesi amaçlanmıştır.

Bilindiği üzere günümüzde klinik olarak meme kanserinin tanısı için kullanılan bazı teknikler mevcuttur. Bunun için kullanılan geleneksel yöntemler, mamografi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) gibi tekniklerdir. Fakat bu teknikler hastaların radyasyona maruz kalması, yüksek maliyete sahip olmaları, kalifiye elemana ve karmaşık cihazlara ihtiyaç duyulması gibi bazı sınırlamalara sahiptir (Kloten ve diğerleri, 2013). Bunun yanında yanlış sonuç alınması olasılığı da vardır. Mamografi ve MRI yöntemlerinin sınırlamaları yüzünden, meme kanserinin tanısı için farklı yöntemler geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ek olarak, son zamanlarda kanda ve dokularda bulunan moleküler biyobelirteçlerin seviyelerinin tayin edilmesine dayalı yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Bunun için bazı ELISA kitleri mevcuttur ve bunlardan bazıları Çizelge 1.2’de listelenmiştir. Çizelge 1.2 incelendiğinde kullanılan kitlerin maliyetli olduğu ve uzun analiz sürelerine ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Bunların yanında bu kitler yalnızca araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

Çizelge 1.2. Meme kanseri biyobelirteçleri için ticari ELISA kitlerinin karşılaştırılması

Kanser biyo-belirteçleri	Kanser Antijen 27-29 (CA 27-29) ELISA Kit	Kanser Antijen 15-3 (CA 15-3) ELISA Kit	Kanser Antijen 125 (CA 125) ELISA Kit	Karsino-embriyonik antijen (CEA) ELISA Kit
Metot türü	Sandviç ELISA	Sandviç ELISA	Sandviç ELISA	Sandviç ELISA
Reaktivitesi	İnsan	İnsan	İnsan	İnsan
Örnek türü	Serum	Serum	Serum	Serum
Miktarı	96 test	96 test	96 test	96 test
Tayin aralığı	~ 3 - 450 U/mL	~ 4mU - 1000 U/mL	0,6 - 600 U/mL	~0,02 - 250 ng/mL
Hassasiyeti	0,8 U/mL	4 mU/mL	0,25 U/mL	0,007 ng/mL
Örnek hacmi (µL)	50	10	50	50
Analiz süresi (saat)	~1-5	~1-5	~1-5	~1-5
Tayin metodu	Kolorimetrik	Kolorimetrik	Kolorimetrik	Kolorimetrik
Dalga boyu (nm)	450	450	450	450
Firmalar	Antibodies, MyBioSource, Cusabio, Proteogenix	Alpco, RayBiotech, MyBioSource, Calbiotech	Calbiotech, Demeditec, Biorbyt, Cusabio, Abcam	Abcam, USCN, RayBiotech, Calbiotech, Antibodies
Maliyeti	\$ 570 - 1,027	\$ 350 - 480	\$ 200 – 1,131	\$ 350 – 475

Geleneksel yöntemlerin sınırlamaları yüzünden biyobelirteçlerin tayini için literatürde başta elektrokimyasal ve optik olmak üzere çeşitli yöntemler rapor edilmiştir. Çizelge

1.3'te kanser biyobelirteçlerinin tayini için geliştirilen yöntemler özetlenmiştir. Bu çalışmada öncelikli olarak tayini planlanan karsinoembriyonik antijen (CEA) için, literatürde bazı elektrokimyasal ve optik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında YGRS tekniği kullanılarak da CEA tayini yapılan bir çalışma mevcuttur. Diğer kanser biyobelirteçleri için ise elektrokimyasal, optik, PCR ve ICP-MS gibi yöntemler rapor edilmiştir.

Çizelge 1.3. Çalışılması planlanan kanser biyobelirteçleri için teşhis sınırı (LOD) değerleri ile birlikte literatür özeti

Kanser biyobelirteç	Biosensör yöntemi	Biyosensör türü	Teşhis sınırı (LOD)	Referans
CEA	Elektrokimyasal	AuNP	0,8 fg/ml (tampon çözeltide)	Biosensors and Bioelectronics 26 (2011) 3219–3226
	Elektrokimyasal	Elektrokimyasal immunosensör	1,7 pg/ml (tampon çözeltide)	Electrochimica Acta 112 (2013) 473-479
	YGRS	Oyuk AuNP	0,1 pg/ml (tampon çözeltide)	Biosensors and Bioelectronics 26 (2011) 2135–2141
	Optik	Ag@Au CSNP	35,6 pg/ml (tampon çözeltide)	Sensor and Actuators B 191 (2014) 396-400
	Optik	Kemilüminesan immunosensör	5,0 pg/ml (tampon çözeltide)	Analytica Chimica Acta 766 (2013) 94-99
	Optik	Mikro elektro mekanik sistem (MEMS) Platformu-Floresans Qdot etiket	0,02 ng/mL (serumda)	Biosensors and Bioelectronics 24 (2009) 3622–3629
	Optik	Çoklu floresans Polarizasyon immünoassay (CdTe/CdS QDOTs)	0,36 ng/mL (tampon çözeltide)	Talanta 92(2012) 72-77
CA125	Elektrokimyasal	Kapiler elektroforetik camı karbon elektrot	1,29 U/ml (tampon çözeltide)	Anal. Chem. 75 (2003) 5429–5434
	Optik	Mikro elektro-mekanik sistem (MEMS) platformu	-	Biosensors and Bioelectronics 24 (2009) 3622–3629
CA15-3	Elektrokimyasal	Antikor fonksiyonelize sol-jel film	5,0 U/ml (tampon çözeltide)	Chem J Chin Univ. 25 (2004) 425
	PCR	Karbon nanotüp	0,0001U/ml (tampon çözeltide)	J Mater Sci: Mater Med (2014) 25:101–111
CA27-29	- Planlanan çalışma ile benzer bir yöntemle rastlanmamıştır.			

Kanser biyobelirteçlerinin vücutta herhangi bir tümör bulunmadığı durumlarda kanda eser seviyede bulunduğu belirtilmiştir. Çizelge 1.4’te insan kanında, çalışılması planlanan kanser biyobelirteçlerine ait eşik seviyeleri verilmiştir (Y.-E. Choi, Kwak, ve Park, 2010; Tothill, 2009). Vücutta küçük bir tümör oluşmaya başladığında kandaki biyobelirteç seviyelerinde artış olmaktadır. Bu sebeple erken tanı için geliştirilen yöntemlerin teşhis sınırı (LOD) oldukça önemlidir. Daha önce yapılan çalışmalara göre kan örnekleri ile çalışıldığında literatürdeki en düşük teşhis sınırları Çizelge 1.4’te verilmiştir.

Çizelge 1.4. Kan örneklerinde kanser biyobelirteçleri için teşhis sınırı (LOD) ve eşik değerlerinin karşılaştırılması

Kanser türü	Farklı kanser türlerine işaret eden biyobelirteçler	Kandaki eşik değerleri	Önceki çalışmalarda elde edilen en düşük LOD değerleri
Karaciğer, pankreas, mide, akciğer, meme, over kanserleri	CEA	3 ng/ml	- 5,0 pg/ml
Meme ve over kanserleri	CA125	0,035 U/ml	-1,29 U/ml
Meme kanseri	CA15-3	25 U/ml	- 0,0001U/ml
Meme kanseri	CA27-29	38 U/mL	-

Biyobelirteç tayini için literatürde mikroakışkan sistemleri kullanarak geliştirilen birçok yöntem de mevcuttur. Bilindiği gibi mikroakışkan sistemlerin hazırlanmasında en yaygın kullanılan materyal polidimetilsiloksan (PDMS)’dir. Bunun yanında perfloropolieter (PFPE), poly(metil metakrilat) (PMMA), polikarbon (PC) ve kağıt çipler de kullanılmaktadır. Bu biyosensörlerin kullanıldığı tayin metotları genellikle optik ve elektrokimyasal metotlardır. Literatürde yapılan biyosensör sistemler avantaj ve dezavantajları ile birlikte Çizelge 1.5’te özetlenmiştir (Luka ve diğerleri, 2015).

Çizelge 1.5. Farklı biyosensör sistemlerinde kullanılan malzemenin avantajları ve dezavantajları

Mikroakışkan türü	Tayin yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
PDMS	➤Optik ➤YGRS ➤SPR ➤Elektrokimyasal ➤Kemilüminesans ➤MEMS	➤Optik geçirgen ➤Düşük maliyetli ➤Otofloresanssı düşük ➤Biyolojik analizlerde yüksek örnek hacmi için uygun	➤Vana ve pompaya ihtiyaç duyulur ➤Ancak laboratuvarıda üretilebilir ➤Organik çözücülerle şişmesi kullanımını sınırlar ➤Üretimi için temiz oda altyapısı gerekir
PFPE	➤MEMS ➤Optik	➤Düşük maliyetli ➤Esneklik ve tek kullanımlık özelliği ➤Yüksek gaz geçirgenliği ➤Düşük toksik özellik	➤Düşük yapışma özelliği yüzeylere bağlanmasını zorlaştırır
Termoplastik çipler PMMA ve PC	➤PCR ➤Optik	➤Düşük maliyetli ➤Tek kullanımlık ➤Düşük ısı iletkenlik ➤Mekanik kararlılık ve optik şeffaflık (PMMA) ➤Yüzey modifikasyonu nispeten basit (PMMA)	➤Çözünürlükleri bazı anorganik ve organik çözücülerle sınırlı ➤Düşük hassasiyet
Kağıt tabanlı çipler	➤Optik ➤Elektrokimyasal ➤Kemilüminesans ➤MEMS	➤En düşük maliyetli sistem ➤Tek kullanımlık ve geri dönüşümlü ➤Taşınabilir, küçük, basit ➤Hassas, hızlı ve sağlam ➤Kullanım kolaylığı ➤Geniş sıcaklık ve zaman aralığında oldukça kararlı	➤Uzun optimizasyon süresi gerektirir

Her yöntem bir takım avantaj ve dezavantajlara sahiptir fakat kağıt tabanlı mikro akışkan sistemler diğer yöntemlere göre özellikle düşük maliyetli olması açısından daha avantajlıdır. Ayrıca taşınabilir sistemlere de uyumlu olduğu için çalışmada kağıt tabanlı bir sistem kullanılmasına karar verilmiştir.

Kağıt tabanlı biyosensörler olarak dipstikler, yatay akış test stripleri ve kağıt tabanlı mikroakışkan sistemler kullanılmaktadır (Claudio Parolo ve Arben Merkoçi, 2013). Bu sistemler arasında uygulanabilirlikleri açısından bir takım farklılıklar vardır. Dipstiklerin dizaynı kolay fakat optimizasyon süresi uzundur ve ayrıca kantitatif çalışmalarda kullanıma uygun değildir. Kağıt tabanlı mikroakışkan sistemler az hacimde numune ile çalışma imkanı sağlar ve kantitatif çalışmalar için uygundur. Yatay akış test stripleri ise nispeten daha fazla örnek hacmine ihtiyaç duyar fakat bununla beraber kantitatif çalışmalara uygundur. Kağıt tabanlı biyosensörler birçok çalışmada kullanılmıştır fakat genellikle floresans görüntüleme yapmak için dijital kameralar veya lazer taramalı mikroskop kullanılmıştır.

Bu çalışmada kuantum nokta (Qdot) tabanlı bir sandviç assay tasarlandığı için en uygun biyosensör olarak yatay akış test stripleri seçilmiştir. Ayrıca hazırlanan yatay akış test striplerinin analizi için de bir cep telefonu tabanlı floresans mikroskop tasarlanmıştır. Burada tam kan örneğinde CEA protein molekülleri hazırlanan yatay akış test stripleri ile yakalanmış ve cep telefonu tabanlı floresans mikroskop ile de veriler toplanmıştır. Sonuçlar test hatlarındaki sinyal şiddetinin kontrol hatlarındaki sinyal şiddetine oranı alınarak hesaplanmış ve değerlendirilmiştir. Geliştirilen bu biyosensör sistemi hızlı tanı testlerinde kullanılabilecek potansiyelde düşük maliyetli bir sistemdir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensörler

Biyosensör, moleküler tanımda kullanılan biyoanalitik araçlar olarak tanımlanır. Biyosensör teknolojisinde en önemli bileşen biyolojik yapılarla etkileşebilecek olan biyolojik materyaldır. Bu biyomateriyaller nano yapılar veya çeşitli yüzeyler olabilir. Biyomateriyallerin kullanımı ile yüksek seçiciliğe sahip, hassas ve hızlı sonuç veren sistemler hazırlamak mümkündür. Aşağıda biyosensör teknolojisinde kullanılan nanoyapılardan bazıları açıklanmıştır.

2.1.1. Nanopartiküller

Altın nanopartiküller

Metal nanopartiküller, sensör yüzeyine tutunan moleküllerin miktarını artırma yetenekleri açısından biyosensör araçlarının üretimi için oldukça caziptirler (Putzbach ve diğerleri, 2013). Genel olarak, altın, gümüş ve bakır nanopartiküller kullanılmaktadır. Kolloidal altın biyosensör teknolojinde en çok kullanılan nanoyapılardan birisidir. Altın nanopartiküllerin yapısı ve büyüklüğü, uygulanan sentez yöntemine bağlı olarak değiştirilebilir (Y. Li ve diğerleri, 2010). Altın nanopartiküller genellikle sulu çözeltilerde muhafaza edilirler. Altın nanopartiküller güçlü yüzey plazmon rezonansı özelliği ile görüntüleme etiketi olarak kullanılırlar. Ayrıca organik boyalardan daha iyi absorpsiyon ve saçılma bantlarına sahiptir (P. K. Jain ve diğerleri, 2006). Bundan başka altın nanopartiküllerin biyouyumluluğu ve düşük sitotoksik özelliği kanıtlanmıştır (Connor ve diğerleri, 2005). Altın nanopartiküllerin başka bir özelliği ise boyutlarına bağlı olarak optik özelliklerin değişmesidir. Boyutlarına ve şekillerine göre altın nanopartiküller görünür bölgeden yakın infrared bölgesine kadar olan ışığı absorblayabilir ve saçabilirler (Choi ve diğerleri, 2010).

Altın nanopartikül sentezinde kullanılan en yaygın yöntem sitrat kullanılarak yapılan indirgeme yöntemidir. Bu yöntemde nanopartiküller bilinen miktarda sitrat çözeltisinin kaynayan kloraurik asit (HAuCl_4) çözeltisine ilave edilmesiyle sentezlenir. Böylece altın nanopartiküllerin büyüklüğü sitrat ve altın tuzu arasındaki oran ayarlanarak kolaylıkla kontrol edilebilir (Daniel ve diğerleri, 2004; Sai ve diğerleri, 2009; Turkevich ve diğerleri,

1951) ve 12-100 nm boyutları arasında küresel nanopartiküller elde edilebilmektedir. Ayrıca altın nanopartiküllerin sentezi, sodyum bor hidrür kullanılarak da gerçekleştirilir. Buradaki sentez altının sodyum bor hidrür ile indirgenmesi esasına dayanır. Sodyum bor hidrür ile indirgeme sonucunda 2-10 nm boyutunda küresel nanopartikül elde edilebilmektedir. Elde edilen bu partiküller farklı şekil ve büyüklükteki partikülleri sentezlemek için çekirdek olarak da kullanılabilir (Perrault ve diğerleri, 2009). Fakat altın çubuk sentezi daha karmaşıktır ve ancak son on yılda başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Altın çubuk sentezinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler kimyasal, elektrokimyasal (Chang ve diğerleri, 1997; Chang ve diğerleri, 1999), ve fotokimyasal (F. Kim ve diğerleri, 2002) yöntemlerdir.

Altın nanopartiküllerin sentezi

Kimyasal yöntem

Bu yöntemler arasında en yaygın olarak kullanılan yöntem kimyasal olarak gerçekleştirilen çekirdek büyütme yöntemidir. Bu yöntem ilk kez 2001'de Suh ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Suh ve diğerleri, 2001). Yapılan çalışmada, çekirdek çözeltisi sodyum sitrat varlığında sodyum bor hidrür (NaBH_4) ile altın tuzunun (HAuCl_4) indirgenmesiyle hazırlanmıştır. Burada sentezlenen küresel nanopartiküller yaklaşık 3-4 nm boyutundadır. Daha sonra, altın nanoçubuk oluşumunu sağlamak için bu çekirdek çözeltisi, yüzey aktif madde olarak setil trimetil amonyum bromür (CTAB), indirgeme ajanı olarak askorbik asit, şekil oluşumunu başlatması için AgNO_3 ve HAuCl_4 içeren bir büyütme çözeltisine ilave edilmiştir (Cao ve diğerleri, 2014). Buradaki nanoçubukların kimyasal sentezi, gümüş iyonu varlığında altın çekirdeklerin üzerine katyonik yüzey aktif maddenin kaplanması ve ortamdaki altının askorbik asit ile indirgenerek çekirdeklerin yüzeyinde birikmesi olarak açıklanabilir (Sau ve diğerleri, 2004). Literatürde mekanizma çok net açıklanamamıştır fakat potansiyel altı depozisyon mekanizması rol oynamaktadır. CTAB molekülleri ve gümüş atomları, nanoçubuğun köşelerini ve kenarlarını oluşturan yüzeylerine adsorbe olmaktadır (Mitamura ve diğerleri, 2009). CTAB moleküllerinin ve gümüş atomlarının bu şekilde yerleşmesi, çekirdek yüzeyine adsorbe olan altın ile oluşan nanopartikülün çubuk şeklinde düzenlenmesini sağlar.

Altın nanoçubuklar, büyütme çözeltisine ilave edilen çekirdek çözeltisinin hacmine, indirgeyici ajan, yüzey aktif madde ve gümüş çözeltisinin derişimlerine, ortam sıcaklığına ve nanoçubuk oluşumu için beklenen süreye bağılı olarak farklı boyutlarda sentezlenmektedir.

Elektrokimyasal yöntem

Wang ve çalışma arkadaşları, 1990’larda altın nanoçubukların çift elektrotlu bir elektrokimyasal hücre içerisinde organik bir çözücünde sentezini gerçekleştirmiştir. Burada altın metal plaka anot olarak kullanılmıştır ve katot olarak kullanılan platin plaka katyonik yüzey aktif madde olan CTAB ve tetradodesil amonyum bromür (TCAB) içeren elektrolit çözeltisine daldırılmıştır. Elektrolizden önce az miktarda aseton ve sikloheksan da elektrolit çözeltisine eklenmiştir. Aseton misel yapının bozulması, sikloheksan ise çubuk şekillerinin oluşması için gereklidir (Chang ve diğerleri, 1999). Elektroliz boyunca, altın metal anot, katoda göç eden AuBr_4^- ’ü oluşturmak üzere harcanır. Burada altın nanoçubukları dağıtmak ve elektroliz boyunca katottan uzak tutmak için ultrasonikatöre ihtiyaç duyulur. Altın nanoçubukların boyutu, platin elektrodun arkasında yer alacak şekilde bir gümüş plaka elektrotun çözeltiye daldırılması ile kontrol edilir (Cao ve diğerleri, 2014).

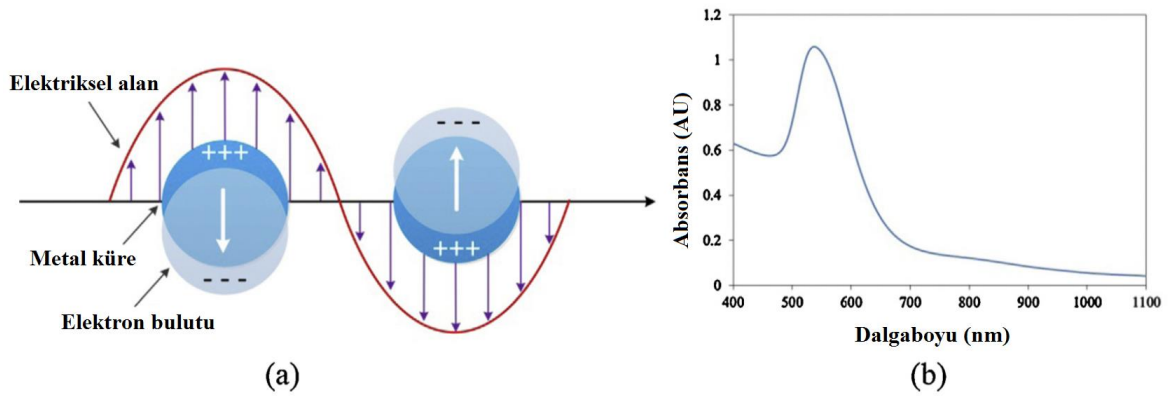
Altın nanoçubukların boyutlarının, anotta üretilen altın iyonları ve gümüş plaka arasındaki redoks tepkimesinden elde edilen gümüş iyonlarının derişimi ve salınım oranı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ama yine de, sentez mekanizması özellikle de gümüş iyonlarının rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır (Cao ve diğerleri, 2014).

Fotokimyasal yöntem

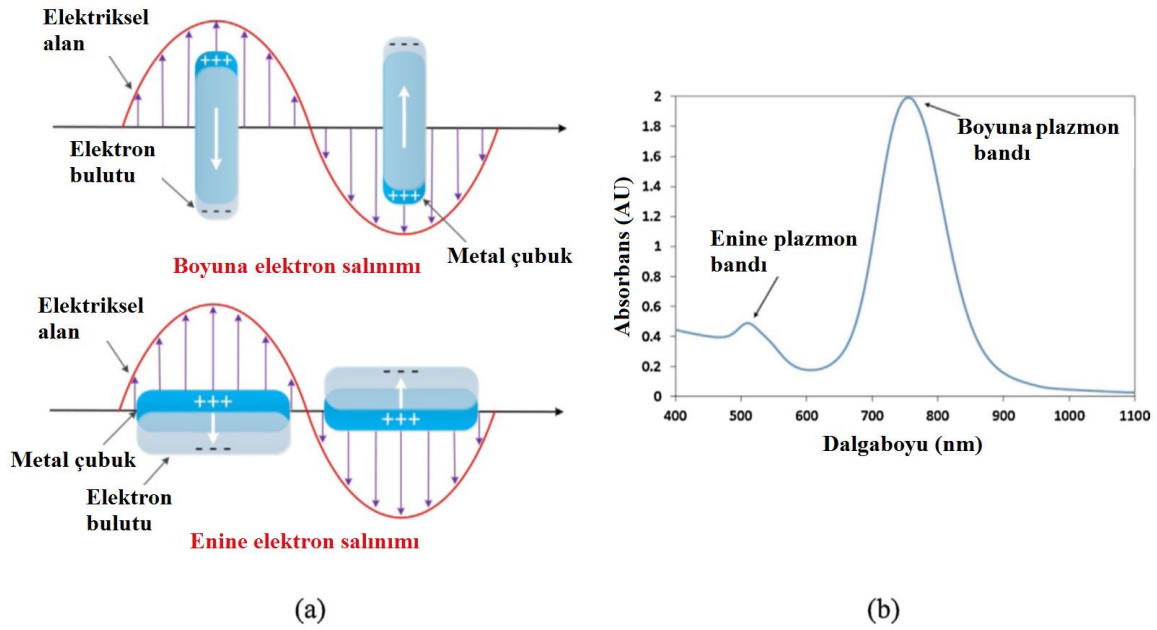
Altın nanoçubukları sentezlemek için kullanılan bir diğer yöntem ise fotokimyasal yöntemdir. Yang ve çalışma arkadaşları (F. Kim ve diğerleri, 2002) çalışmalarında, altın nanoçubukları altın tuzu, CTAB ve TCAB yüzey aktif madder, gümüş nitrat, aseton ve hekzan içeren büyütme çözeltisini 254 nm UV ışığı ile uyatarak sentezlemiştir. Burada UV ışığı Au^{3+} ’ü Au^0 ’a dönüştürmek için indirgeme ajanı olarak kullanılmıştır. Üretilen altın nanoçubuğun boyutu büyütme çözeltisindeki gümüş iyonlarının derişimine bağılı olarak değiştirilebilir. Bu reaksiyon 24 saatten fazla sürmüştür (Cao ve diğerleri, 2014). Bu

kadar uzun süre UV ışınlarına maruz kalan nanoçubukların yapısının bozularak küresel forma döndüğü gözlemlenmiştir. Fakat kuvvetli bir ışınlama ile süre kısaltılırsa bu bozunma bir miktar azaltılabilmektedir (Mitamura ve diğerleri, 2009). Ayrıca, 300 nm UV ışığı ile optik yoğunluk artırılarak altın nanoçubukların boyutunu uzatmanın mümkün olduğu bulunmuş ve böylece sentez süresi kısaltılmıştır (Cao ve diğerleri, 2014; Miranda ve diğerleri, 2005).

Nanoçubuklar, küre nanopartiküllere kıyasla optik özellikleri bakımından daha belirgin ve seçicidirler. Küre nanopartiküller için plazmon salınımı küresel simetriden dolayı izotropiktir (Şekil 2.1). Fakat boy-en oranı 1 ile 20 arasında değişen nanoçubuklar için salınımlar nanoçubukların uzun olan kenarları (boyuna plazmon bandı-longitudinal plasmon band) ve kısa olan kenarları (enine plazmon bandı-transverse plasmon band) için ayrı olarak gerçekleşmekte ve dolayısı ile Şekil 2.2.a ve b'de (Cao ve diğerleri, 2014) görüldüğü gibi nanoçubukların değişen boy-en oranları ile iki farklı plazmon bandı gözlenmektedir (Murphy ve diğerleri, 2008).



Şekil 2.1. a) Altın nanokürelerin yüzey plazmon rezonansının şematik gösterimi, b) Altın nanokürelerin absorpsiyon bandı



Şekil 2.2. a) Altın nanoçubukların yüzey plazmon rezonansının şematik gösterimi, b) Altın nanoçubukların absorpsiyon bandı: enine ve boyuna plazmon bantları

Kuantum noktacıkları (Quantum Dots-Qdots)

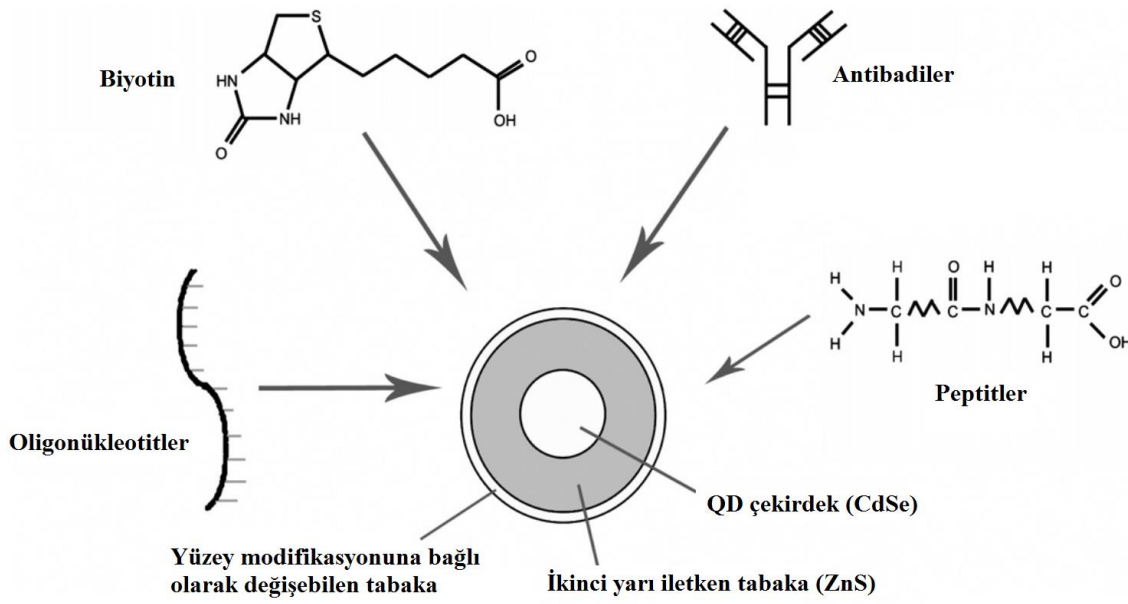
Quantum noktacıkları yarı iletken bir çekirdekten oluşan ve başka bir yarı iletken kabuk tarafından sarılan nanokristallerdir (Gambhir ve diğerleri, 2005; K.K. Jain, 2005; Pharmabiotech, 2003; Salata, 2004). İlk kez 1980'lerde hazırlanmıştır. Qdot'ların kabuk kısımları ZnS gibi yüksek bant geçişlerine sahip bileşiklerden oluşurken, çekirdekleri genellikle grup II ve IV elementleriyle hazırlanır ve en yaygın olarak kullanılanı CdSe'dir (Alivisatos ve diğerleri, 2005). Qdot'ların boyutları genellikle 2-10 nm aralığındadır ve bu sayede protein gibi biyomoleküllerle bire bir etkileşme imkanı bulabilmektedirler (Pharmabiotech, 2003; West ve diğerleri, 2003).

Quantum noktacıkları, boyutlarına bağlı olarak emisyon veren, güçlü ışık absorbansı olan, parlak florasan veren, dar simetrik emisyon bantları (20-40 nm) olan ve yüksek fotokararlılığa sahip inorganik floroforlardır. Tek ışık kaynağı ile eş zamanlı olarak uyarılabilirler (Alivisatos ve diğerleri, 2005; Fortina ve diğerleri, 2005; Salata, 2004). Beyaz ışık ile uyarılabilmelerine rağmen (S. Kim ve diğerleri, 2004), 405 ya da 488 nm lazer, ya da bir mavi-mor ışıkla da uyarılabilmektedirler (Bruchez, 2005). Ayrıca herhangi boyuttaki bir Qdot, UV ışığı ile uyarılabilir (Ozkan, 2004).

Qdot'ın bileşimi ve büyüklüğü, emisyon dalga boyunu ve dolayısıyla rengini belirler. Qdot'ların emisyon dalga boyu genellikle 450 ve 850 nm dalga boyu aralığındadır (Yezhelyev ve diğerleri, 2006). Ayrıca kuantum verimliliği %50'nin üzerindedir (Bruchez, 2005). Örneğin CdSe Qdot'lar % 40 ve 90 arasında kuantum verimliliğine sahiptir (Ozkan, 2004). Qdot'lar sadece çekirdekten oluştuğunda % 10 civarında kuantum verimliliğine sahipken, çekirdek-kabuk yapısındakilerde kuantum verimliliği % 80'e kadar artabilmektedir (Alivisatos ve diğerleri, 2005; Jaiswal ve diğerleri, 2004). Qdot'ların emisyon ve uyarma dalga boyları arasındaki farkın büyük olması, emisyon spektrumunun tamamının tayin edilmesine olanak sağlar ve böylece hassasiyet artırılmış olur (Jaiswal ve diğerleri, 2004). Qdot'lar inorganik yapıda olmaları nedeniyle bulundukları ortamla etkileşimleri en az seviyededir (Bruchez, 2005). Optik ve yüzey özellikleri sayesinde Qdot'lar biyoyumluluğa sahiptir ve bir çok yapıyla kompleks oluşturarak birlikte kullanılabilirler (Portney ve diğerleri, 2006). Böylece biyolojik çalışmalarda floresans etiket olarak klasik organik floroforlara göre çok daha fazla tercih edilmektedirler. Organik floroforlar ve Qdot'lar arasındaki karşılaştırma Çizelge 2.1'de verilmiştir (Azzazy, Mansour, ve Kazmierczak, 2007).

Çizelge 2.1. Organik floroforlar (örnek olarak floressein verilmiştir) ve Qdot'lar arasında karşılaştırma

	Kuantum noktacıkları	Organik floroforlar
Uyarma dalga boyu	Geniş bir aralıktadır. Herhangi boyuttaki bir Qdot'ı uyarmak için UV ışık kullanılabilir.	Dar bantlı uyarma spektrumu vardır.
Emisyon bant genişliği	20–40 nm	50–100 nm
Floresans yarı ömrü	10–40 ns	Birkaç nanosaniye
Fotostabilite (50 mW, 488 nm lazerle uyarıldığında)	14 saatten fazla kararlı	20 dakikanın altında emisyonu son bulur



Şekil 2.3. Kuantum noktacıkarı için yüzey modifikasyon seçenekleri

Qdot'ların sentezi

Qdot üretimi için kullanılan çeşitli yöntemler vardır. Bu yöntemlerden en basit olanı kolloidal sentezdir. Kolloidal sentez ile Qdot sentezi, yarı iletkenlerin sıcak ve sürekli karıştırılan tri-n-oktilfosfin oksit ve hekzadesilamin gibi apolar bir organik çözelti içerisinde hızlı bir şekilde enjekte edilmesiyle gerçekleştirilir (Chan ve diğerleri, 2002; Smith ve diğerleri, 2006). Burada çözeltinin sıcaklığı ve kristal büyüme süresine bağlı olarak Qdot'ların şekli ve büyüklüğü kontrol edilebilir. Dıştaki yarı iletken kabuk, çekirdek etrafına biriktirme yöntemi (epitaxy) ile büyütülür (Alivisatos ve diğerleri, 2005; Gambhir ve diğerleri, 2005). Çeşitli yüzey modifikasyon işlemleri Qdot'ları biyoyumlu ve hedef molekül tanıma uygulamaları için uygun hale getirmek için kullanılabilir (Şekil 2.3) (Azzazy ve diğerleri, 2007)

Qdot'lar optik ve yüzey özellikleri sayesinde birçok uygulama alanı bulmuşlardır. En yaygın olarak bilinen uygulamaları moleküler ve hücresel görüntüleme, ilaç taşınımı, çok duyarlı tanı uygulamalarıdır. Potansiyel uygulamalar ise, tümör tayini, doku görüntüleme, hücreler arası görüntüleme ve çoklu tanı gibi birçok uygulama alanlarıdır. Tüm bu yaklaşımlara rağmen Qdot'lar hala tıbbi alanda çok fazla yer bulamamıştır. Bunun sebebi ise toksik endişelerin var olmasıdır (Azzazy ve diğerleri, 2007).

2.1.2. Kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (self-assembled monolayer, SAM)

Kendiliğinden düzenlenen tek tabaka yöntemi ile nanopartiküller ve enzimler elektrot yüzeyine basit ve oldukça başarılı bir şekilde bağlanabilir. Bu yüzeyde oluşturulan tabakanın kalınlığı ve bileşimi yüksek oranda kontrol edilebilir özelliktedir (Lin ve diğerleri, 2009). Kolloidal altın modifiye elektrotlar, SAMs-modifiye elektrot yüzeyindeki $-CN$, $-NH_2$ ve $-SH$ gibi fonksiyonel gruplara altın nanopartiküllerin kovalent olarak bağlanmasıyla hazırlanabilmektedir. Nanopartiküllerin bağlanması için, sistamin ve 3-merkaptopropiyonik asit gibi kısa zincirli moleküller modifiye elektrot yüzeyinde kendiliğinden düzenlenebilir (C. S. S. Kumar, 2007). Bu moleküller aynı zamanda enzimlerin yüzeye kovalent olarak bağlanmaları için gerekli fonksiyonel grupları içerirler. Zhang ve grubu, glikoz oksidaz tabanlı bir biyosensör üretiminde SAMs-modifiye elektrotlardan yararlanmışlardır (Kanno ve diğerleri, 2000). Bu çalışmada, altın elektrot yüzeyine altın nanopartikülleri bağlamak için iki ucu tiyol içeren bir bileşik kullanılmıştır. Modifiye edilen elektroda daha sonra sistamin bağlanmıştır. Bu amin grupları, glikoz oksidaz enziminin aldehit grupları ile reaksiyona girerek yüzeye enzimin kovalent olarak bağlanmasını sağlamıştır. Benzer bir yöntem, Jia ve grubu tarafından horseradish peroksidaz (HRP) enzimi kullanılarak gösterilmiştir (Jia ve diğerleri, 2002). Üç boyutlu silika jel tek tabakasını oluşturmak için altın elektrot ilk önce hidrolize (3-merkaptopropil)-trimetoksisilan sol-jel çözeltisine daldırılmıştır. Daha sonra altın nanopartiküller, sol-jel tabakasındaki $-SH$ gruplarına kimyasal olarak bağlanmış ve son olarak HRP altın nanopartiküllerin yüzeyine bağlanmıştır (Putzbach ve diğerleri, 2013).

Ayrıca iki bileşenli SAM'ler de hazırlanmıştır. Uzun ve kısa zincirli bileşenlerin karışımından oluşan SAM'lerin, ara yüzeydeki redoks türü dağılımının esnekliğini artırdığı için tek bileşenli SAM'lerden daha iyi elektron transfer oranına sahip oldukları gözlenmiştir (Park ve diğerleri, 2011). Park ve grubu, altın nanopartikülleri ve HRP'yi kullanarak hetero uzunluktaki ikili SAM düzenlenmesini incelemişlerdir (Park ve diğerleri, 2011). Altın elektrot yüzeyi farklı bileşenlerle modifiye edilmiştir ve yüzeye kolloidal altın nanopartiküller immobilize edilmiştir. Daha sonra yüzeye HRP bağlanmıştır. Altın yüzeyine altın nanopartiküllerin bağlanmasından sonra, AuNP (altın nanopartikül)-altın elektrot ve modifiye edilmemiş elektrot AFM ve dönüşümlü voltametri kullanılarak elektrik akımı ve yüzey alanı açısından karşılaştırma yapılmıştır. Burada altın elektrot yüzeyine kuvvetlice bağlanan AuNP'lerin, tekdüze bir dağılıma sahip olduğu ve oldukça

kararlı yapılar oluşturduğu gösterilmiştir. Abad ve grubu, ikili bir SAM tasarımıyla glikoliz enzimlerinin kovalent olarak bağlanması için bir strateji geliştirmiştir (Abad ve diğerleri, 2002). Şekerlerle halkalı ester oluşturan boronik asitler, elektrot yüzeyine glikoproteinleri bağlamak için SAM'lere birleştirilmiştir. Elektrot yüzeyinden protein salınımını engellemek için, boronik asit tuzunun çekim gücünü epoksi gruplarının reaktivitesiyle birleştirerek proteinin yüzeye kovalent olarak bağlanmasını sağlamışlardır. Bu çalışmada boronik asit tuzu ve şeker molekülleri arasındaki etkileşime bağlı olarak da bir çekim olduğunu göstermişlerdir (Putzbach ve diğerleri, 2013)

Tabaka tabaka oluşturulan tasarımlar, hazırlanma kolaylığı, farklı bileşenlerle çalışılabilmesi ve kendiliğinden düzenlenmiş tabakanın kalınlığı açısından ilgi çekicidir (Putzbach ve diğerleri, 2013).

2.1.3. Mikro elektromekanik sistemler (MEMS)

Elektronik ve mekanik yapıların küçültülerek hazırlanmasını sağlayan sistemler Mikro Elektromekanik Sistemler (MEMS) olarak tanımlanır. Mikro Elektromekanik Sistemler (MEMS)-tabanlı mikroçipler günümüzde birçok alanda kullanılmaktadır. MEMS-tabanlı mikroçiplerin avantajları; az miktarda reaktif kullanımına olanak vermeleri; vücut içi kullanılabilecek üretilere imkan tanımaları, yüksek hassasiyete ve hızlı analiz sürelerine sahip olmaları ayrıca sınırlı imkanlara sahip hasta başı sistemlerinde (point-of-care) tetkik için uygun olmaları şeklinde özetlenebilir.

Mikro akışkan çiplerin farklı üretim yöntemleri mevcuttur. Bunlardan biri yüzey mikroişleme tekniği ile mikrokanal üretimidir. Burada, ilk önce farklı yüzeyler üzerinde foto-direnç polimerinin kontrollü bir şekilde 3-boyutlu olarak kaplanması söz konusudur. Daha sonra, kanal oluşturmak istenilen malzeme yerleştirilir. Foto-direnç polimerinin ortamdan uzaklaştırılmasıyla kanallar hazırlanmış olur.

Bu yöntem ile hazırlanan mikroçipler YGRS aktif yüzeyi olarak da kullanılabilirler. Bu yöntemle hazırlanan mikroçipler yüksek oranda tekrarlanabilir sonuç vermeleri açısından da oldukça avantajlı yapılardır.

2.1.4. Kağıt tabanlı biyosensörler

Kağıt teknolojisi sağlık ve çevre uygulamalarında, düşük maliyetli tanı platformu oluşturulmasına olanak sağladığı için son zamanlarda oldukça ilgi görmektedir. Kağıt tabanlı sistemlerin ucuz olması ve bunun yanı sıra kağıdın biyolojik olarak parçalanabilir, biyoyumlu ve kolay üretilebilir olması bu yöntemin önemli avantajlarıdır (Al-Tamimi ve diğerleri, 2012; Khan ve diğerleri, 2010). Dipstikler, yatay akış test stripleri (LFA) ve kağıt-tabanlı mikro akışkan analitik araçlar (Microfluidic paper-based analytical devices- μ PAD) kağıt tabanlı biyosensör sınıfına girerler (C Parol ve diğerleri, 2013). Bu yöntemler arasında uygulanabilirlikleri açısından bir takım farklılıklar vardır ve Çizelge 2.2’de bu farklılıklar özetlenmiştir (C Parolo ve Merkoci, 2013). Dipstiklerin tasarımı kolaydır ve optimizasyon süreleri kısadır. Ancak bu tür biyosensörler, kantitatif çalışmalar için uygun değildirler. Yatay akış test stripleri kantitatif çalışmalarda kullanılabilirken, yatay akış test striplerinin üretim ve optimizasyonu oldukça uzun süre alır. Bununla birlikte fazla hacimde örnek kullanımını gerektirir. Kağıt-tabanlı mikro akışkan analitik araçlar kalitatif çalışmalarda kullanılabildiği gibi düşük örnek hacmiyle de çalışılması açısından avantajlıdır.

Çizelge 2.2. Kağıt tabanlı biyosensörlerin tayin metotları, avantajları ve dezavantajları

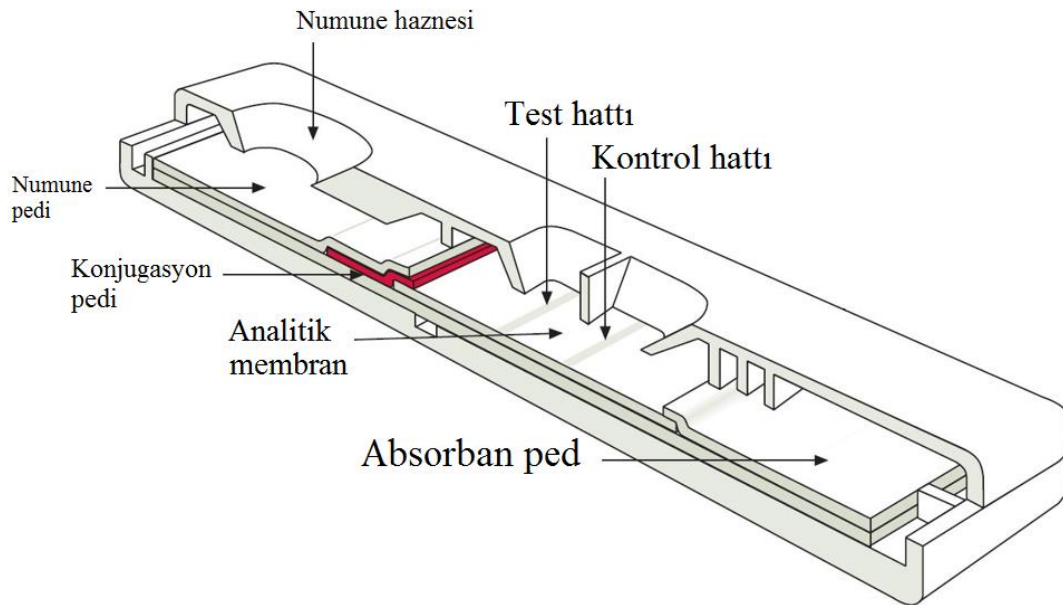
Biyosensör türü	Tayin metodu	Avantajları	Dezavantajları
Dipstikler	•Optik	Tasarımı kolay Hızlı optimizasyon	Tek aşamadan oluşur Sadece optik tayin yapılabilir Kantitatif çalışmalarda tercih edilmezler
LFA	•Optik •Elektrokimyasal	Çok yönlü akış Elektrokimyasal tayin Kantitatif çalışma	Uzun optimizasyon süreleri vardır Üretim süreleri uzundur Örnek hacmi yüksektir (genellikle 100 μ L civarındadır)
μ PAD	•Optik •Elektrokimyasal •Kemilüminesans	Çok yönlü akış Farklı tayin metotları Kantitatif çalışma Düşük örnek hacmi (10 μ L’den daha az)	Uzun optimizasyon süreleri vardır

Dipstikler

Dipstikler, kağıt tabanlı biyosensörler arasında en basit tasarıma sahip olan sistemdir. Burada kağıt yüzeyinde bir takım belirteçlerle örneğin etkileşmesine dayanan bir kalitatif analiz söz konusudur. En yaygın olarak bilinen strip pH stripleridir. Bu sistemlerin en temel dezavantajı sıklıkla ihtiyaç duyulan tanı amaçlı karmaşık tasarımların yapılamamasıdır. Ayrıca sadece optik sistemler olarak kullanılır (Parolo ve diğerleri, 2013).

Yatay akış testleri (Lateral flow assay-LFA)

Yatay akış testi yöntemi, tayinini yapmak istediğimiz maddeyi içeren sıvı örneğin polimerik materyal boyunca ilerlemesi esasına dayanır. Burada sıvı strip materyalin kapiler etkisi ile hareket eder ama bu akışın devamı için stribin sonuna yerleştirilen bir absorban ped kullanılmıştır. Absorban ped sıvıyı emerek sürekli sıvı akışı sağlayacaktır. Böylece yöntem yatay akış testi ismini almıştır. Temel olarak yatay akış test stripleri numune uygulama pedi, konjugasyon pedi, analitik membran ve absorban ped olmak üzere dört ana bileşenden oluşurlar (Şekil 2.4) (Rapid Lateral Flow Test Strips: Considerations for Product Development_Millipore).



Şekil 2.4. Tipik bir yatay akış test stribinin şematik gösterimi

a) Numune uygulama pedi

Stribin bir ucunda numunenin uygulanması için kullanılan numune uygulama pedi yer alır. Numune uygulama pedi genellikle selüloz ya da cam liflerden hazırlanır. Bu pedin görevi, numuneyi yatay akış test stribinin diğer bileşenlerine taşımaktır. Numune pedine numunenin akış hızını etkilemesi için proteinler, deterjanlar, viskozite artırıcı maddeler ve tampon tuzları emdirilebilir. Burada amaç, örneğin viskozitesini artırmak, konjugasyon pedde reaksiyon süresini uzatmak ve ayrıca test hattında bağlanmanın sağlanması için numunenin kimyasal olarak modifikasyonunu sağlamaktır (Posthuma-Trumpie ve diğerleri, 2009).

Numune uygulama pedi numune bileşenlerinin ayrılması, girişim yapan maddelerin uzaklaştırılması ve pH ayarı gibi ön hazırlık işlemlerinin yapılması açısından da önem arzeder (Posthuma-Trumpie ve diğerleri, 2009; Sajid ve diğerleri, 2015).

b) Konjugasyon pedi

Analitik membran ve numune pedi arasında yer alan ped konjugasyon pedidir. Cam fiber, selüloz ve poliester gibi bir takım materyaller kullanılarak üretilir. Etiketlenmiş analit ya da tanıma elemanları bu pedde kurutulur ve etiketli konjugatın uzun süre kararlı kalması gerekmektedir. Burada etiketli konjugatın pede yüklenmesi, kurutulması ve konjugatın salımı, verimliliği önemli ölçüde etkileyen parametrelerdir. Numunenin eklenmesinden sonra sıvıyla temas eder etmez etiketli konjugatın bu materyalden salınımı gerçekleşmelidir. Etiketli konjugatın konsantrasyonun düşük olması hassasiyetin düşmesine neden olur. Bu yüzden optimize edilmesi gerekir (Posthuma-Trumpie ve diğerleri, 2009; Sajid ve diğerleri, 2015).

c) Analitik Membranlar

Analitik membranlar stripin test ve kontrol hatlarını içeren bileşenidir. Analitik membranlar genellikle ince ve kırılgan yapıya sahiptirler. Bu yüzden plastik ya da naylon tabakalar üzerine tutturularak kesme ve çalışma kolaylığı sağlanır.

Analitik membranlar nitroselüloz, naylon, polietersülfon ya da ergitilmiş silikadan hazırlanabilir. Sadece taşıyıcı materyalin kapiler gücü değil, art arda gerçekleşen seçme,

reaksiyon ve tayin aşamaları için proteinlerin bağlanma kolaylığı membran seçiminde önemlidir. Analitik membran olarak genellikle nitroselüloz membran tercih edilir. Bu membranlar kullanım kolaylığına sahiptir, ucuzdur, protein ve biyomoleküllere yüksek seçicilik gösterir. Test ve kontrol hatlarını oluştururken kullanılan antikor, aptamer gibi yapılar membranla kolaylıkla etkileşebilir (Posthuma-Trumpie ve diğerleri, 2009 ve diğerleri, 2015).

Nitroselüloz membranlar 0,05-12,0 µm aralığında çeşitli gözenek genişliklerine sahip membranlardır. Membranın gözenek boyutu, etiketin taşınması açısından önemlidir. Akış hızı, analit ve etiket kompleksinin optimum reaksiyon süresinde membran boyunca hareketi açısından bir diğer önemli parametredir. Genellikle nitroselüloz materyal oda koşullarında ve nemli ortamda saklanır. Nemin düşük olduğu ortamlarda statik elektrik birikimi yüzünden bu materyalle çalışmak zor olabilir (Posthuma-Trumpie ve diğerleri, 2009; Sajid ve diğerleri, 2015).

d) Absorban ped

Absorban pedin görevi membran boyunca akan sıvının emilimini sağlamaktır. Absorban ped kullanıldığında, numune miktarı artırılabilir ve böylece hassasiyet artırılabilir. Sıklıkla selüloz filtreler kullanılır. Burada pedin sıvı emme kapasitesi dikkat edilmesi gereken bir parametredir.

Yatay akış testlerinde temel basamaklar; 1) hedef moleküle seçimli antikor hazırlanması, 2) etiketin hazırlanması, 3) biyotanıma moleküllerinin etiketlenmesi, 4) pedlere gerekli belirteçlerin yüklenmesinden sonra bileşenlerin destek materyalin üzerinde yapıştırılması ve sabit bir yapının sağlanması için bu striplerin plastik bir materyal içerisine yerleştirilmesi, 5) örneğin uygulanması ve sonuçların elde edilmesi (Posthuma-Trumpie ve diğerleri, 2009; Sajid ve diğerleri, 2015).

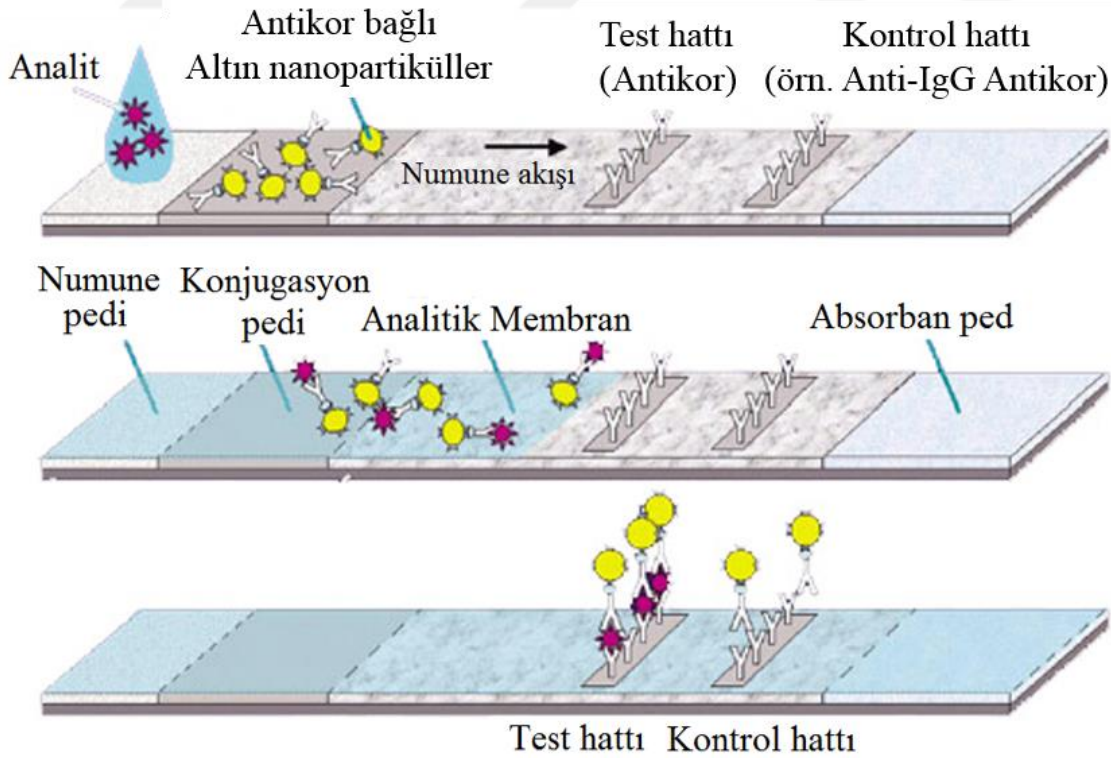
Yatay akış testlerinin çeşitleri

Sandviç tipi yatay akış testi

Tipik bir yatay akış test stribinde, antikor ya da aptamer kaplı etiket konjugasyon pedine emdirilir ve bu geçici bir bağlanmadır. Numunenin veya tampon çözeltinin akışıyla

beraber bu etiketler pedden salınırlar. Hedef moleküle seçimli birincil (primary) antikor ya da aptamer test hattını oluşturmak üzere analitik membrana bağlanır. Etiketli konjugata seçimli bir prop ya da ikincil (secondary) antikor kullanılarak da kontrol hattı oluşturulur (Sajid ve diğerleri, 2015).

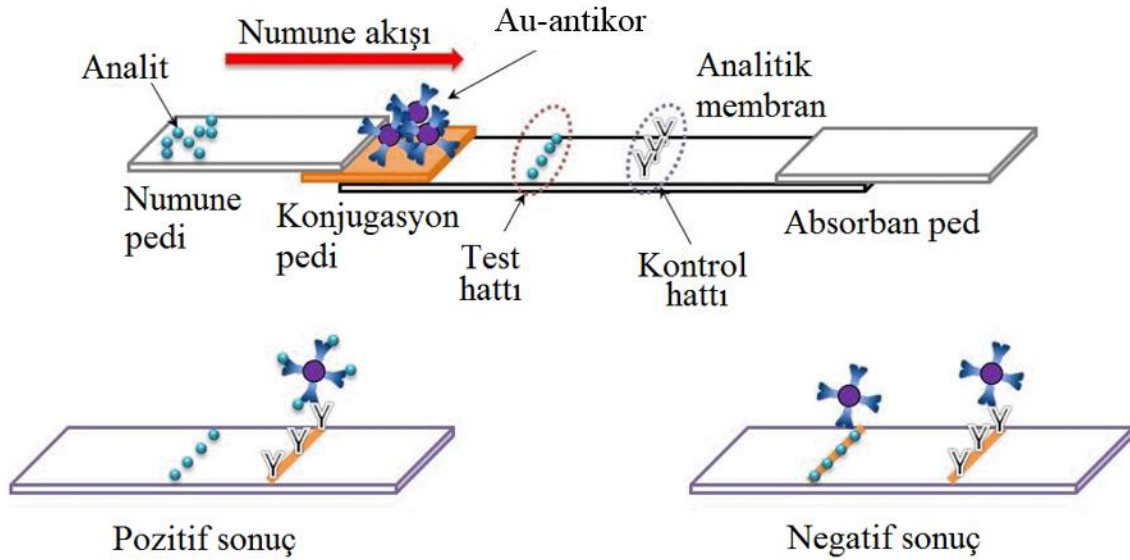
Analiti içeren numune matriksi, numune pedine uygulanır ve stripin diğer bileşenlerine sırasıyla taşınması beklenir. Konjugasyon pedinde, analit etiketli antikor ile etkileşir ve etiketli antikor/analit kompleksi oluşur. Bu kompleks kapiler etkisi ile analitik membran boyunca absorban pede doğru ilerler. Test hattında bu kompleks birincil antikor tarafından yakalanır. Burada analit test hattındaki birincil antikor ve etiketli antikor konjugatı arasında hapsolmuştur ve sandviç yapı oluşturulmuştur. Etiketli antikorun aşırısı kontrol hattında ikincil antikor tarafından yakalanır. Tampon ve fazla çözelti ise absorban ped tarafından emilir. Test hattındaki rengin şiddeti analit derişimi ile orantılı olarak değişir (Sajid ve diğerleri, 2015). Tipik bir sandviç yapıdaki yatay akış sisteminin çalışma prensibi Şekil 2.5'te verilmiştir (<http://www.cytodiagnosics.com/store/pc/Lateral-Flow-Immunoassays-d6.htm>).



Şekil 2.5. Tipik bir sandviç yapıda yatay akış testinin çalışma prensibi

Yarışmalı (competitive) yatay akış testi

Bu tür testler iki antikorla eş zamanlı olarak etkileşemeyen düşük molekül ağırlığına sahip moleküller için uygundur. Burada test ve kontrol hatların her ikisinde de renklenme gözleniyorsa numune analit içermiyor demektir. İki tip tasarımda hazırlanabilirler. İlkinde, test hattına tayin edilecek molekülün aynısı olan antijen önceden emdirilmiştir. Kontrol hattında ise etiketli antikor konjugatı ile etkileşecek ikincil antikor vardır. Numune çözeltisi numune pedine uygulanır. Çözelti test hattına ulaştığında eğer numunede analit yoksa etiketli antikor test hattındaki antijene bağlanır. Ama eğer numunede analit varsa, etiketli antikor ile kompleks oluşturacağından, etiketli antikor konjugatı test hattındaki antijene bağlanamaz. İkinci tip tasarımda ise, konjugasyon pedine etiketli analit emdirilir ve test hattına birincil antikor bağlanmıştır. Numunenin uygulanmasından sonra, numunedeki analit ve etiketli analit yarışmalı olarak test hattına doğru ilerlerler. Eğer numunede analit varsa etiketli analitten daha hızlı hareket edeceği için test hattına daha önce bağlanır ve hatta renk değişimi olmaz (Sajid ve diğerleri, 2015). Şekil 2.6'da gerçekleşen olay şematize edilmiştir (G. Kim ve diğerleri 2015).



Şekil 2.6. Tipik bir yarışmalı yatay akış testinin çalışma prensibi

Çoklu tayin

Bu tasarım birden fazla analitin tayini için hazırlanmıştır. Burada tayin edilmek istenen madde sayısı kadar test hattı oluşturulur. Bu tür stripler özellikle klinik teşhisler açısından

çok kullanışlıdır. Bir hastalığın teşhisi için birden fazla analit türünün varlığının kontrolü gerekiyorsa, bu striplerin kullanımı zaman kaybının olmaması, düşük numune hacminin yeterli olması ve ucuza malolması gibi özellikleri sayesinde çok avantajlıdır (Sajid ve diğerleri, 2015).

Biyotanıma molekülleri

Antikorlar

Antikorlar test ve kontrol hatlarının oluşturulması için kullanılan biyotanıma molekülleri. Analitin hatlara immünokimyasal olarak bağlanmasını sağlarlar. Antikorlar analit türüne özgü sentezlenebilirler. Fare, tavşan ya da keçi gibi hayvanlardan elde edilebilirler. Eğer bir antikor hedef moleküle seçimli olarak bağlanıyorsa birincil (primary) antikor, bir diğer antikora bağlanıyorsa ikincil (secondary) antikor adını alır (Sajid ve diğerleri, 2015).

Aptamerler

Aptamerler yapay nükleik asitlerdir ve ilk kez 1990'da keşfedilmişlerdir. Aptamerler SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment-Üstel zenginleştirmeyle sistemetik ligand oluşturma) olarak bilinen bir yöntemle laboratuvar koşullarında üretilir (Ellington ve diğerleri, 1990). Aptamerler yüksek bağlanma katsayısına sahiptir ve çeşitli analit türlerine seçimli olarak bağlanabilirler. Aptamerler, kolay üretilmeleri, basit bir şekilde etiketlenmeleri, yüzey modifikasyonlarının kolay olması, kararlı olmaları ve çok yönlü uygulanabilme özellikleri sayesinde antikorlardan daha çok tercih edilirler. Seçici kromatografi, hücre görüntüleme, hedef yakalama, in vivo tedavi, protein tabanlı görüntüleme, kanser hücre biyolojisi gibi birçok biyolojik uygulamada kullanılırlar (Famulok, Mayer, ve Blind, 2000; Iliuk, Hu, ve Tao, 2011; Navani ve Li, 2006; Phillips, Lopez-Colon, Zhu, Xu, ve Tan, 2008; Temur ve diğerleri, 2012).

Moleküler ışıma ajanları

Moleküler ışıma ajanları, bir ucunda florofor diğer ucunda sönmüleyici (quencher) bulunan özel bir DNA yapısıdır ve ilk kez 1996'da keşfedilmiştir (Tyagi ve diğerleri, 1996). Analit

bulunmadığında florofor floresans sinyali vermez çünkü sönümleyiciye yakın konumdadır. Ortamda analit varsa DNA sarmalı açılır daha sonra florofor ve sönümleyici birbirlerinden uzaklaşırlar ve böylece floresans gözlenir. Moleküler ışıma ajanları, mRNA tayini, hücreler arası görüntüleme, küçük molekül analizi ve biyosensör teknolojisi gibi birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır. Yatay akış testlerinde de farklı hastalıklar ve genetik problemlerle ilişkili DNA parçalarının tayini için kullanılmıştır (Mao ve diğerleri, 2009; Sajid ve diğerleri, 2015).

Etiketler

Yatay akış testlerinde kullanılan etiketler 15-800 nm arasında değişebilen boyutlara sahip renkli ya da floresans nanoparçacıklarıdır. Büyük parçacık kullanıldığında hassasiyetin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Ama parçacık boyutu 40 nm'nin üzerine çıktığında kararlılıklarında azalma görülmektedir (Laitinen ve diğerleri, 1996). Genellikle koloidal altın kullanılır (Al-Yousif ve diğerleri, 2002; Kusano ve diğerleri, 2007; G. P. Zhang ve diğerleri 2006). Bunun yanında lateks (Gussenhoven ve diğerleri, 1997), selenyum (Lou ve diğerleri, 1993), karbon (Lönnberg ve diğerleri, 2001) ya da lipozomlar (Ho ve diğerleri, 2005; Zaytseva ve diğerleri, 2004) kullanılabilirler. Kuantum parçacıkları (Goldman ve diğerleri, 2004) en yeni olarak kullanılan etiketlerdir. Etiket olarak kullanılacak olan malzemenin çok düşük konsantrasyonlarda tayin edilebilir olması gerekmektedir. Ayrıca biyotanıma molekülleri ile konjuge edildiğinde özelliklerini korumalı ve biyotanıma moleküllerinin özelliklerini de değiştirmemelidir. Derişimi en az 10^{-9} M olduğunda bile optik olarak tayin edilebilmelidir (Gubala ve diğerleri, 2012; Sajid ve diğerleri, 2015).

Altın nanoparçacıklar

Altın nanoparçacıklar yatay akış test striplerinde en sık kullanılan malzemedir. Bu partiküller biyomoleküllere karşı yüksek ilgi gösterirler ve kolaylıkla modifiye edilebilirler. Partikül büyüklükleri ayarlanabilir. Çevre dostu olarak hazırlanabilmeleri, protein ve biyomoleküllere yüksek ilgilerinin olması, kararlı olmaları ve optik sinyal alınabilmesi gibi özellikleri vardır (Kavosi ve diğerleri, 2014). Altın nanoparçacıkların optik özellikleri yatay akış testlerinde analizin hassasiyetini artırır (Delmulle ve diğerleri, 2005).

Manyetik nanoparçacıklar

Renkli manyetik parçacıklar test hattında renklenmeye sebep olarak optik strip okuyucu tarafından ölçülebilir ayrıca manyetik sinyali ise manyetik yüzey okuyucu tarafından ölçülebilir. Fakat manyetik sinyallerin optik sinyallerden daha uzun süre kararlı olduğu bulunmuştur. Ayrıca yatay akış testlerinin hassasiyetini 10-1000 kat artırabilirler (Wang ve diğerleri, 2009).

Fluoroforlar

Floresan moleküller yatay akış testlerinde sıklıkla kullanılır ve analitin derişimi floresans şiddeti ile belirlenir. Etiket olarak rodamin gibi organik fluoroforlar kullanılarak proteinlerin tayini yapılabilmektedir (Ahn ve diğerleri, 2003; Khreich ve diğerleri, 2008). Fakat organik fluoroforlar ile çalışıldığında fotobozunma problemi yüzünden hassasiyet düşer.

Son zamanlarda yatay akış testlerinde etiket olarak optik ve elektriksel özelliklere sahip kuantum noktacıkları kullanılmaya başlanmıştır. Bu yarı iletken partiküller suda çözünmelerinin yanı sıra biyomoleküllerle kolaylıkla eşleşebilirler. Kuantum noktacıkları ve organik fluoroforlar dışında yatay akış testlerinde etiket olarak lantanitler (Juntunen ve diğerleri, and Pettersson, 2012), lantanit şelat yüklü silika nanopartiküller (F. Zhang ve diğerleri, 2014) ve mikroküreler (Chen ve diğerleri, 2013) kullanılmıştır.

Enzimler

Enzimler de yatay akış testlerinde etiket olarak kullanılır fakat bu ek bir basamağın daha eklenmesi demektir (Maiolini ve diğerleri, 2013). Deney tamamlandıktan sonra uygun bir substrat uygulanır, bu substrat test ve kontrol hatlarında enzimatik bir reaksiyonun sonucu olarak renklenmeye sebep olur. Örneğin horse-radish peroxidase (HRP) işaretli antikolarlar kullanılarak R-IgG tayini yapılmıştır (Kawde ve diğerleri, 2010). Enzimler ayrıca yatay akış testlerinde kemilüminesans üretmek için de kullanılır (Mirasoli ve diğerleri, 2012). Enzimlerle çalışıldığında uygun enzim substrat uyumunu sağlamak strip okuyucuları için renk oluşumu, elektrokimyasal tayin için de elektroanalitik türün oluşumu açısından önemlidir. Yani tayinin hassasiyeti enzim substrat uyumuna bağlıdır. Enzim bağlı altın

nanopartüküller kullanıldığında yatay akış testlerinin hassasiyetinin arttığı gözlenmiştir (Claudio ve diğerleri, 2013; Sajid ve diğerleri, 2015).

Yatay akış testlerinin uygulama alanları

Yatay akış testleri plazma, serum, hücreler, dokular ve diğer biyolojik numunelerdeki klinik önemi olan analitlerin tayini için kullanılır. Bu yöntem kullanılarak 20 dakika içerisinde mRNA tayini yapılabilmektedir (Aveyard ve diğerleri, 2007). Biyobelirteçler gibi proteinlerin tayini yatay akış testlerinde aptamer ya da antikor ve altın nanopartikül kullanımı ile ng/ml ya da pg/ml gibi düşük tayin sınırları ile yapılabilmektedir (Lee ve diğerleri, 1999; Yan ve diğerleri, 2006). Bunların yanında bir takım patojenlerin (Gabaldón ve diğerleri 2005; Zhou ve diğerleri, 2004), toksinlerin (Kasahara ve diğerleri, 1997; Y. F. Xu ve diğerleri, 2005), hücrelerin (Bartolini ve diğerleri, 2003; Wittmann ve diğerleri, 1996) pestisitlerin (Hindson ve diğerleri, 2004; Jani ve diğerleri, 2002; J. E. Kim ve diğerleri, 2005; Ymeti et al., 2007) ve ağır metallerin (Corstjens ve diğerleri, 2007; Kulagina ve diğerleri, 2007; Niedbala ve diğerleri, 2001) tayini de yapılabilmektedir (Posthuma-Trumpie ve diğerleri, 2009).

Yatay akış testlerinin avantajları ve dezavantajları

Yatay akış testleri tek basamaklı sistemlerdir ve bu yüzden yıkama basamağının uygulanması çok zordur. Ayrıca membranın çalışmadan önce bloke edilmesi gerekir fakat bu işlem nitroselüloz membranın hidrofobiklik ve ıslanma özelliği arasındaki mükemmel dengenin bozulmasına neden olabilir. Bu yüzden bloke etme işlemi tavsiye edilmez. Ama yine de birçok uygulamada bu işleme rastlanmaktadır (Cho ve diğerleri, 2001; Henderson ve diğerleri, 2002; Laitinen ve diğerleri, 1996).

Kantitatif analizlerde test ve kontrol hatlarının ölçümü basit bir el-tipi reflektometre ile yapılabilir (Birnbaum ve diğerleri, 1992; Wittmann ve diğerleri, 1996; Zaytseva ve diğerleri, 2004). Fakat daha kesin sonuçlar elde etmek gerekirse, sinyal flatbed tarayıcı ya da CCD dedektör ve software kullanılmalıdır (Lönnberg ve diğerleri, 2001; Van Amerongen ve diğerleri, 1994), ama bu durumda da maliyet ve analiz süresi artar.

Buna rağmen son yıllarda; basit test yöntemi, düşük numune hacminin kullanılması, hızlı analiz imkanı, uzman personel ihtiyacının olmaması ve düşük maliyete sahip olması nedeniyle bir çok klinik ve klinik olmayan çalışmalarda yatay akış testleri kullanılmıştır. Bunun yanında yatay akış testleri ile nanoteknolojinin birleştirilmesi sayesinde sinyal/gürültü oranı artırılmış, analiz süresi kısalmış, ve çoklu analiz yapma imkanına sahip olunmuştur (Posthuma-Trumpie ve diğerleri, 2009).

Kağıt-tabanlı mikro akışkan analitik araçlar (Microfluidic paper-based analytical devices- μ PAD)

Mikro-akışkan sistemler, reaktörler ve vanalar, analitlerin ve reaktiflerin akışını düzenlemek, ölçmek ve kontrol etmek için kağıda basılmıştır (Khan ve diğerleri, 2010; X. Li ve diğerleri, 2010; X. Li ve diğerleri, 2010; X. Li ve diğerleri, 2008). Bu sistemlerdeki akış kağıt yüzeyi ve analit arasında doğrudan bir temas olmasını sağlar. Burada birçok yöntemle tayin gerçekleştirebildiği gibi YGRS yöntemi kullanılarak da hızlı moleküler sinyal takibi gerçekleştirilebilir (Ngo ve diğerleri, 2013).

Kağıt tabanlı mikro akışkan çip hazırlanırken hidrofobik bariyerleri oluşturmak için parafin veya balmumu kullanılmaktadır (Dietrich, 1902). Mum emdirililerek hazırlanan kağıt tabanlı yüzeyler, kan ve idrar numunelerinde biyolojik analizler, su testleri, pH ölçümü için tasarlanmıştır (Johnson, 1966). Kağıt tabanlı mikro akışkan çipler hazırlanırken kullanılacak kağıdın yüzey alanı, kapiler akış hızı, gözenek büyüklüğü, ve kağıt kalınlığı dikkat edilmesi gereken parametrelerdir. Literatürde çip hazırlamak için kullanılan üç farklı yöntem mevcuttur. Bu yöntemler; şablon baskılama, mum içerisine daldırma ve mum baskılama olarak adlandırılır. Bu yöntemler Şekil 2.7’de gösterilmiştir (Yetisen, Akram, ve Lowe, 2013).

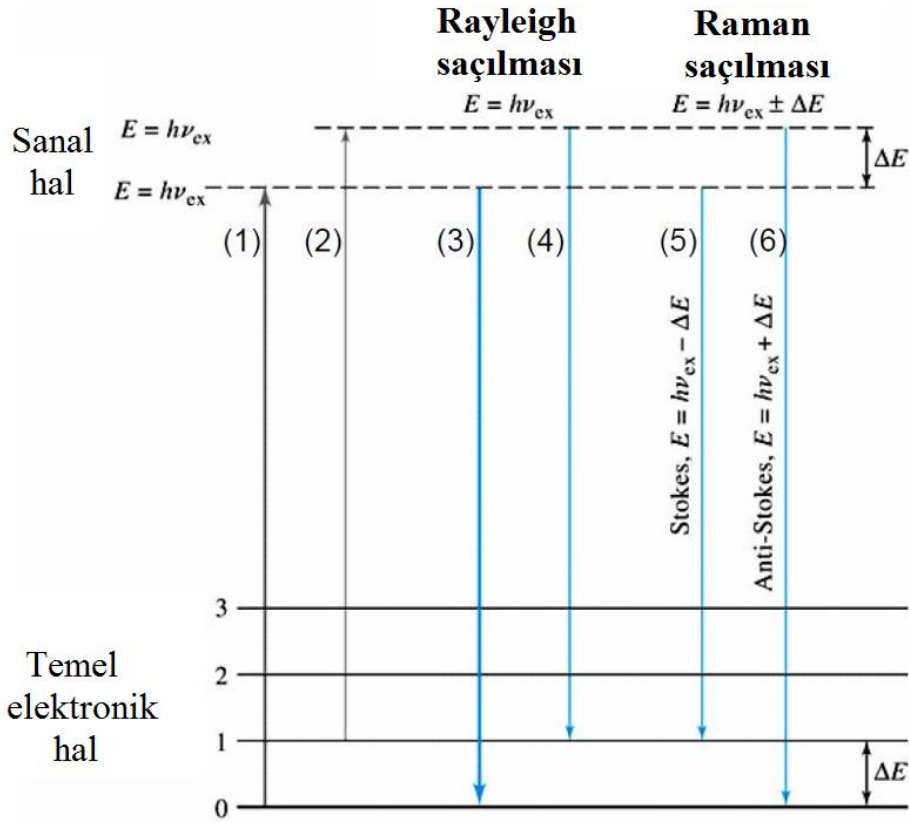
şekilde kanallar hazırlanmış olur. Hazırlanan kağıt tabanlı mikro akışkan çipte oluşan hidrofilik ve hidrofobik alanlar mikroskop altında gözlenebilir (Songjaroen ve diğerleri, 2011).

2.2. Biyosensör Teknolojisinde Kullanılan Tayin Yöntemleri

2.2.1. Raman spektroskopisi

İlk olarak 1922’de Hintli fizik profesörü Chandrasekhara Venkata Raman, Calcutta Üniversitesi’nde sıvılarla ışık etkileşimi üzerine çalışmalara başladı. 1928’de Raman adı ile anılan fenomeni geliştirdiği zaman, yalnızca ilkel enstrumanlar mevcuttu. Işık kaynağı olarak cıva lambası, toplayıcı olarak teleskop ve dedektör olarak da gözlerini kullandı (Ferraro ve diğerleri, 2003). Geliştirdiği bu fenomende, madde tarafından saçılan ışığın küçük bir yüzdesinin gelen ışığın frekansından farklı bir frekansa sahip olacağını belirtti. Saçılan ışığın frekansında gözlemlenen kaymanın, gelen ışığın frekansı ve etkileşen maddenin moleküler hareketinin frekansı arasındaki kombinasyonu sonucu olduğunu belirtti. 1926’dan beri kristallerle ışık etkileşimi üzerine çalışan iki Rus bilim adamı G. S. Landsberg ve L. I. Mandelstam, bir hafta önce aynı fenomeni rapor etti. Rus literatüründe bu olay ışığın kombinasyonel saçılması olarak bilinirken, dünyanın geri kalanında bu fenomen Raman etkisi olarak bilinir. Ve bu buluşu ile C. V. Raman, 1930’da Fizik alanında Nobel ödülü almıştır (Amer, 2010).

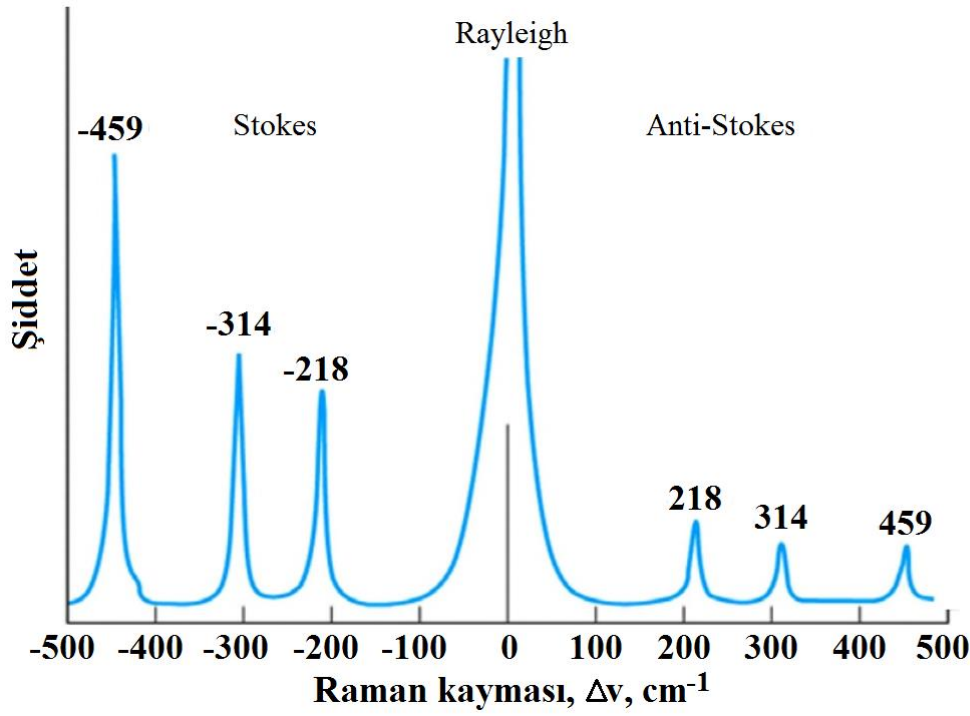
Raman spektroskopisi çalışılan örneğin dar bir alanda spektral özellik karakteristiğini belirleyen titreşimsel geçişlerle ilişkili bir spektroskopik tekniktir (Karabıcak, 2011). Raman etkisi kısaca madde tarafından ışığın inelastik saçılması olarak tanımlanır. Monokromatik ışık demeti madde tarafından saçıldığında, iki tür etkileşim meydana gelir. Bu etkileşimlerden birinde, gelen ışık fotonu ve maddenin atomları ya da molekülleri arasında enerji transferi veya değişimi gerçekleşmez. Bu saçılma elastik olup Rayleigh saçılması olarak adlandırılır. Bu tür saçılma olayında saçılan ışık gelen ışık ile aynı frekansa sahiptir (ν_0). İkinci tür etkileşimde ise, gelen foton ve maddenin molekülleri arasında enerji değişimi gerçekleşir. Bu enerji değişimi maddenin karakteristik moleküler titreşimi sonucu oluşur. Bu tür saçılma inelastik saçılma ve Raman saçılması olarak adlandırılır (Amer, 2010). Raman ve Rayleigh saçılmalarını gösteren enerji diyagramı Şekil 2.9’de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.9. Rayleigh ve Raman saçılmaları için enerji diyagramı

Frekansında değişim meydana gelen fotonların bir kısmı gelen fotonun enerjisine göre daha düşük, bir kısmı ise daha yüksek enerjiyle saçılırlar. Bu değişim, ışıkla etkileşen molekülün titreşim enerji düzeyleri arasındaki enerji farkı kadardır. Fotonların enerjisinin molekülün titreşim enerjisi kadar azalması olayına Stokes Raman Saçılması denir ve bu durumda gelen ışığın frekansı molekülün titreşim frekansı kadar azalır ($\nu_0 - \nu_1$). Fotonların enerjisinin molekülün titreşim enerjisi kadar artması olayı ise Anti-Stokes Raman Saçılması olarak adlandırılır ve bu durumda gelen ışığın frekansı molekülün titreşim frekansı kadar artar ($\nu_0 + \nu_1$).

Şekil 2.10'da CCl_4 'ün Raman spektrumunun bir bölümü gösterilmektedir. Burada molekül 488,0 nm dalga boyunda ışıma yapan argon iyon lazer ile uyarılmıştır. Ve şekilde üç tür saçılma da görülmektedir. Burada şüphesiz uyarma dalga boyunda gözlemlenen Rayleigh saçılmasının şiddeti stokes ve anti-stokes Raman saçılmalarına kıyasla çok daha yoğundur (Skoog ve diğerleri, 1998).



Şekil 2.10. Argon iyon lazeri ile uyarılan CCl₄'ün Raman spektrumu ($\lambda_0=488,0$ nm, $\sigma_0=20,49$ cm⁻¹)

Öte yandan, Boltzmann yasasına göre, oda sıcaklığında birçok molekül temel titreşim enerji seviyesinde bulunurken çok az sayıda molekül uyarılmış titreşim enerji seviyesinde bulunur. Bu nedenle foton ve madde etkileştiğinde, titreşimsel enerjiyi moleküle transfer eden ve fotonun daha düşük enerjili olarak ayrılmasını sağlayan Raman prosesinin gerçekleşme olasılığı daha yüksektir. Yani gelen fotonun enerjisinden daha düşük enerji ile oluşan Stokes hatlarının gerçekleşme olasılığı Anti stokes hatlarının gerçekleşme olasılığından daha fazladır. Bu yüzden genellikle sadece Raman spektrumu olarak Stokes bantlarına yer verilir (Schrauder, 1995). Bununla birlikte floresans örneklerle çalışırken, maddenin floresans emisyon bandı stokes Raman bantları ile girişim oluşturabileceği için daha düşük şiddete sahip olmasına rağmen anti-stokes sinyalleri ile çalışmak daha iyi sonuç verebilir.

Bir molekül elektriksel bir alana maruz kaldığında, elektronlar farklı yöne gitmeye zorlanır böylece elektriksel alanın kuvveti ve molekülün polarlanabilirliğiyle orantılı olarak geçici bir dipol moment (μ) oluşur. Burada molekülün titreşimi sırasında polarlanabilirliğinde bir değişim meydana gelirse ancak, Raman türü saçılma gözlemlenebilir (Schrauder, 1995).

Aynı titreşimsel hareketlere bağlı olmalarına rağmen temel mekanizmaları düşünüldüğünde bir Raman spektrumu ve bir infrared spektrumunun arasındaki farklar şaşırtıcı değildir. Infrared absorpsiyonunun gerçekleşmesi için, moleküldeki titreşim hareketlerinin molekülün dipol momentini değiştirmesi gerekir. Sadece o zaman aynı frekanstaki ışın molekülle etkileşebilir. Bunun tersine, saçılma bir moleküldeki bağlar etrafında dağılan elektronların anlık olarak bozulması sonucu oluşur. Bunu takiben ışının yeniden emisyonu söz konusudur ve bağlar normal hallerine dönerler. Bozulmuş formda, molekül geçici olarak polarize olur yani anlık bir dipol moment değişimi söz konusudur. Mekanizmadaki bu temel farklılık yüzünden, bir molekülün Raman davranışı infrared davranışından belirgin olarak farklı olabilir. Örneğin, klor, hidrojen ya da azot gazı gibi homonükleer moleküllerin dipol momentleri yoktur. Bu yüzden titreşim frekansındaki ışığın absorpsiyonu gerçekleşmez. Öte yandan böyle bir moleküldeki iki atom arasındaki bağın polarlanabilirliği gerilme titreşimine eş zamanlı olarak periyodik olarak değişir. Bu durum titreşimsel halin frekansına bağlı olan bir Raman kayması ile sonuçlanır (Skoog ve diğerleri, 1998).

Karbondioksit molekülü (CO_2) için, simetrik titreşimsel halde iki oksijen atomu merkez karbon atomuna doğru ya da zıt yönde eş zamanlı olarak hareket ettikleri için dipol momentinde bir değişiklik meydana gelmez. Bu yüzden bu titreşimsel hal infrared inaktiftir. Bununla birlikte, bağın bozulması bağ kısa iken daha zor ve bağ uzun iken daha kolay olduğu için, polarlanabilirlik titreşimle eş zamanlı olarak değişir. Bu titreşim halinde molekül Raman aktiftir (Skoog ve diğerleri, 1998).

Bunun tersine, karbondioksitin dipol momentleri, simetrik olmayan titreşimsel hal ile eş zamanlı olarak değişir. Bu yüzden bu titreşim modunda molekül infrared aktiftir. Öte yandan, bağların birinin polarlanabilirliği bağ uzadığında artarken, diğerininki azalır. Böylelikle polarlanabilirlikte net bir değişim olmaz ve bu titreşimsel halde molekül Raman inaktiftir (Skoog ve diğerleri, 1998).

Daha önce bahsedilen örneklerde Raman ve infrared spektrumları birbirlerinin tamamlayıcısıdır ve herbiri molekülde bulunan farklı titreşimsel hallerle ilgilidir. Fakat bazı titreşimsel haller hem Raman hem de infrared aktif olabilir. Örneğin, kükürt dioksitin titreşimsel hallerinin tamamı hem Raman hem de infrared piklerini sağlarlar. Her iki

mekanizma için de geçişlerin görülme olasılığı farklı olduğu için, piklerin şiddeti farklılık gösterebilir (Skoog ve diğerleri, 1998).

Modern Raman spektroskopisi ışık kaynağı, numune aydınlatma sistemi ve uygun bir spektrometre olmak üzere üç ana bileşenden oluşur. Raman sinyalleri oldukça zayıf ve bu sinyalleri yakalamak oldukça zor olduğu için diğer moleküler spektrometrelere göre Raman spektrometrenin cihaz bileşenlerinin çok daha yüksek performansa sahip olması gerekir.

Raman sinyallerinin şiddetini artırabilmek için, yüksek ışık şiddetine sahip olmaları nedeniyle ışık kaynağı olarak genellikle lazerler kullanılır. Yaygın olarak kullanılan lazerler; argon iyon (488,0 – 514,5 nm), kripton iyon (530,9 – 647,1 nm), helyum/neon (632,8 nm), diyod lazer (782,0- 830,0 nm), ve Nd/YAG (1064,0 nm) lazerleridir. Bu lazerlerden argon ve kripton iyon lazerleri yani mavi ve yeşil bölgede emisyon yapan lazerlerle çalışıldığında çok daha şiddetli Raman sinyalleri alınmaktadır. Fakat yaygın olarak kullanılan lazerler yakın infrared bölgede emisyon yapan diyod lazerler ve Nd/YAG lazerleridir. Bu iki lazer türünün tercih edilme sebeplerinden biri, çalışılan örneğin yapısını bozmadan daha yüksek şiddetlerde çalışabilmeleridir. İkincisi ise birçok molekül için bu lazerler ile uyarıldığında floresans şiddeti ya çok düşüktür ya da gözlenmez (Skoog ve diğerleri, 1998).

Raman spektroskopide örnekle ışık etkileşimini sağlamak infrared spektroskopiye göre çok daha kolaydır çünkü lensler ve diğer optik bileşenler için daha kırılğan ve atmosferik olarak daha az kararlı olan kristal halojenürler yerine cam kullanılabilir. Ek olarak lazer kaynağı kolaylıkla küçük bir örnek alanına odaklanabilir ve saçılan ışık etkili bir şekilde slite odaklanabilir. Bu nedenle çok küçük örneklerle çalışılabilir. Raman spektroskopisiyle çalışmanın infrared spektroskopiye göre en önemli üstünlüğü sulu örneklerle de çalışabilmektir. Çünkü su çok zayıf bir Raman sinyaline sahiptir fakat infrared ışığını güçlü bir şekilde absorbe eder. Bu avantaj biyolojik ve inorganik sistemlerle çalışmak açısından önem arzeder (Skoog ve diğerleri, 1998).

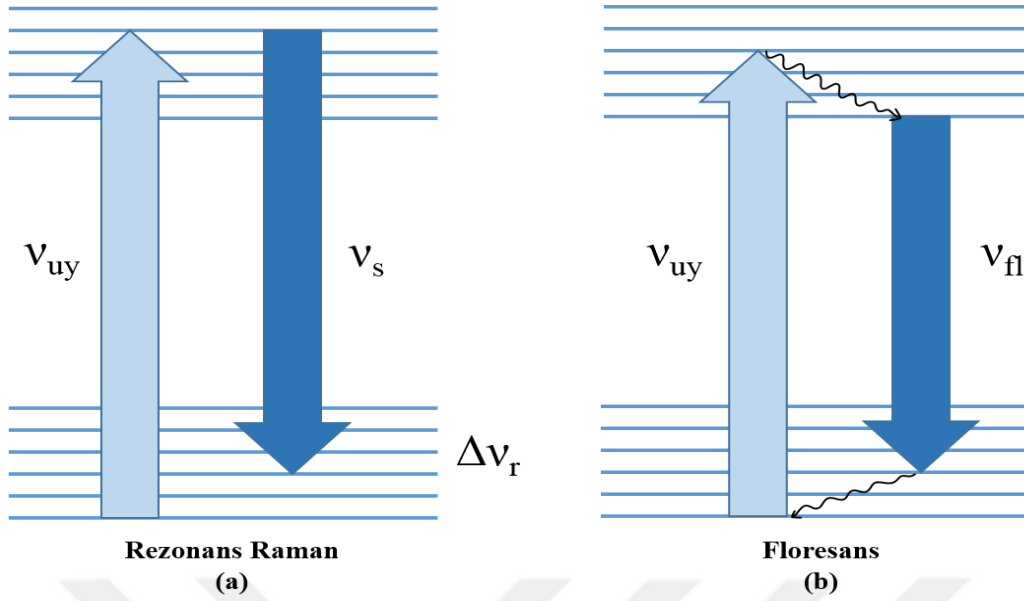
Raman spektroskopide dedektör olarak, foto çoğaltıcı tüpler veya yük-eşleşmiş dedektörler (CCD) kullanılmaktadır. CCD dedektörler foto çoğaltıcı tüplerin aksine, floresans sinyali vermeden birçok bileşiğin Raman sinyalini sağlayan 782 nm'deki ışıma daha hassastır.

Fakat 1064 nm'deki ışıma hassas değildirler. Bu dedektörlerin yanında ışık kaynağının dalga boyundan daha uzun dalga boylarının dedektöre ulaşmasını engelleyen *notch filtreleri* kullanılır. Böylelikle spektrumun sadece Stokes hatları kullanılmış olur. Bazı cihazlarda sadece ışık kaynağının dalga boyunu ayırmak için tasarlanan filtreler kullanılır (Skoog ve diğerleri, 1998).

Raman spektroskopisi, inorganik, organik ve biyolojik sistemlerin kalitatif ve kantitatif analizi için uygulanabilir. Raman spektrumu infrared spektrumuna benzer şekilde fonksiyonel grupların tayini ve özel bileşiklerin tanımlanmasını sağlayan parmak izi bölgeleri için kullanışlı bölgelere sahiptir (Skoog ve diğerleri, 1998).

Rezonans Raman Spektroskopisi

Rezonans Raman saçılması, analitin bir elektronik absorpsiyon dalga boyuna çok yakın bir dalga boyunda uyarılarak Raman sinyallerinin mükemmel şekilde artırılması olarak tanımlanabilir. Bu durumda Raman piklerinin şiddeti $10^2 - 10^6$ kat artırılabilir. Bunun bir sonucu olarak da en düşük 10^{-8} M derişime sahip bir analitin rezonans Raman spektrumu alınabilir. Bununla birlikte rezonans Raman spektrumu oldukça seçici olabilir çünkü uyarma seçici absorpsiyon bantları için hedeflenebilir. Şekil 2.11'de (Skoog ve diğerleri, 1998) rezonans Raman saçılması ve floresans emisyonu için enerji değişim diyagramı gösterilmektedir. Bu şekil, elektron uyarılmış bir elektronik enerji seviyesine geçtiği daha sonra da temel elektronik enerji seviyesinin bir titreşimsel seviyesine döndüğü için normal Raman saçılması diyagramından farklıdır. Şekil 2.11'de görüldüğü gibi rezonans Raman saçılması, uyarılan elektron titreşimsel durulma yaparak uyarılmış elektrikselleşmiş halin en düşük titreşimsel enerji seviyesine dönmediği ve temel halin titreşimsel enerji seviyesinden de yine titreşimsel durulma yaparak temel elektronik hale dönmediği için floresansstan da farklıdır. Burada Raman saçılması 10^{-14} s'de gerçekleşirken, floresans emisyonu 10^{-6} - 10^{-8} s'de gerçekleşir (Skoog ve diğerleri, 1998).



Şekil 2.11. a) Rezonans Raman saçılması, b) Floresanss emisyonu için enerji diyagramları

Lazer ışımalarının şiddeti ile örneğin bozulması büyük bir problemdir çünkü elektronik absorpsiyon pikleri genellikle UV bölgede gerçekleşir. Bunun yanında en büyük sınırlaması, floresanss girişiminin olmasıdır. Analit tarafından veya örnekte bulunan diğer türler tarafından floresanss sinyali gözlenebilir (Skoog ve diğerleri, 1998).

Doğrusal olmayan Raman spektroskopisi

Yoğun şiddette birçok farklı lazer kullanımıyla önemli miktarda doğrusal olmayan ışıma üretilmiştir. 1970 ve 1980'ler boyunca birçok Raman tekniği geliştirilmiştir. Bu teknikler doğrusal olmayan Raman teknikleri olarak bilinir. Bunlardan bazıları, zorlanmış Raman saçılması, hiper Raman etkisi, koherent anti-stokes Raman saçılması ve koherent stokes Raman saçılması olarak bilinir. Bu tekniklerden en yaygın olarak kullanılan ise koherent Anti-Stokes Raman saçılmasıdır (CARS) (Skoog ve diğerleri, 1998).

Bu teknikler, geleneksel Raman spektroskopisinde karşılaşılan düşük verim, UV-Vis bilgede çalışma zorluğu ve floresanss girişimi gibi sorunların üstesinden gelmek için kullanılırlar. Bu tekniklerin en büyük dezavantajı ise, analite özgü olmalarıdır ve farklı türlere uygulanabilmeleri için farklı ayarlanabilen lazer gerektirmeleridir (Skoog ve diğerleri, 1998).

Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi, YGRS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS)

Bir önceki bölümde de değinildiği gibi Raman sinyalleri ile moleküler parmak izi bölgesinden molekül tanımlanması yapılabilabileceği gibi sinyal artışı ile tek molekül tayini yapmak da mümkündür. Ancak Raman spektroskopisi ile çalışırken karşılaşılan en büyük problem sinyallerin zayıf olmasıdır. Raman sinyalini artırmak için geliştirilen yöntemlerden bir tanesi de yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisidir (YGRS).

Raman sinyallerinin artışı ilk kez 1974’de Fleischmann tarafından gözlemlenmiştir. Fleischmann, elektromanyetik olarak pürüzlendirilmiş gümüş elektrot yüzeyinde piridin moleküllerinin Raman spektrumunu incelemiştir (Fleischmann ve diğerleri, 1974) ve 10^6 kattan daha fazla sinyal artışı gözlemlemiştir (Hu ve diğerleri, 2002). Bir kaç yıl sonra 1977’de ise Jeanmarie (Jeanmaire ve diğerleri, 1977) ve Albercht (Albrecht ve diğerleri, 1977)’in çalışma grupları birbirlerinden bağımsız olarak yaptıkları çalışmalarla, Raman sinyallerini önemli ölçüde artırmanın sadece elektrokimyasal pürüzlendirme yöntemiyle oluşturulan yüzey alanı artışı ya da moleküllerin konsantrasyonunun artışıyla anlaşılamayacağını rapor etmişlerdir (Albrecht ve diğerleri, 1977; Jeanmaire ve diğerleri, 1977). Jeanmaire ve Van Duyne metalik nanoyapıların oluşturduğu hot-spot olarak adlandırılan plazmon resonansı yüzünden Raman sinyallerinde artış olduğunu öne sürmüşlerdir ve buna elektromanyetik kuvvetlendirme adı verilmektedir (Jeanmaire ve diğerleri, 1977; Moskovits, 2005). Albrecht ve Creighton tarafından önerilen bir diğer yaklaşım ise analit ve plazmonik nanoyapılar arasında yük aktarımı olduğu için sinyal artışı gözlemlenmesidir ve bu yaklaşım kimyasal kuvvetlendirme olarak bilinir (Albrecht ve diğerleri, 1977; Campion ve diğerleri, 1995). Her iki teori de büyük oranda kabul görmüştür ve bu fenomen yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılması (YGRS) adını almıştır (Fan ve diğerleri, 2011; Sharma ve diğerleri, 2012).

YGRS, yerinde zenginleştirme imkanı sağlaması, yüksek hassasiyete sahip olması, floresans yöntemine göre kompleks matrikslerde çalışırken daha dar bantlı spektrum elde edilmesine imkan sağlaması, tayin sınırının fmol-attomol (Temur ve diğerleri, 2012) gibi çok düşük miktarlarda olması, yalnızca yüzeyde veya yüzeye yakın olan moleküllerin Raman sinyalinin ölçmesi nedeniyle yüksek seçiciliğe sahip olması gibi avantajlara sahiptir.

YGRS kuvvetlendirme mekanizmaları

Yukarıda değindiğimiz üzere YGRS genel olarak iki mekanizmaya dayanır. Bunlar elektromanyetik kuvvetlendirme ve kimyasal kuvvetlendirme olarak bilinir.

Elektromanyetik kuvvetlendirme

Altın (Au) gibi soy metal, gümüş (Ag) veya bakır (Cu) gibi yarı soy metallerden oluşan nano yapılar son yörüngelerindeki serbest elektron sayesinde oluşturdukları yüzey plazmonu nedeniyle YGRS ölçümlerinde tercih edilirler (Kumar, 2012).

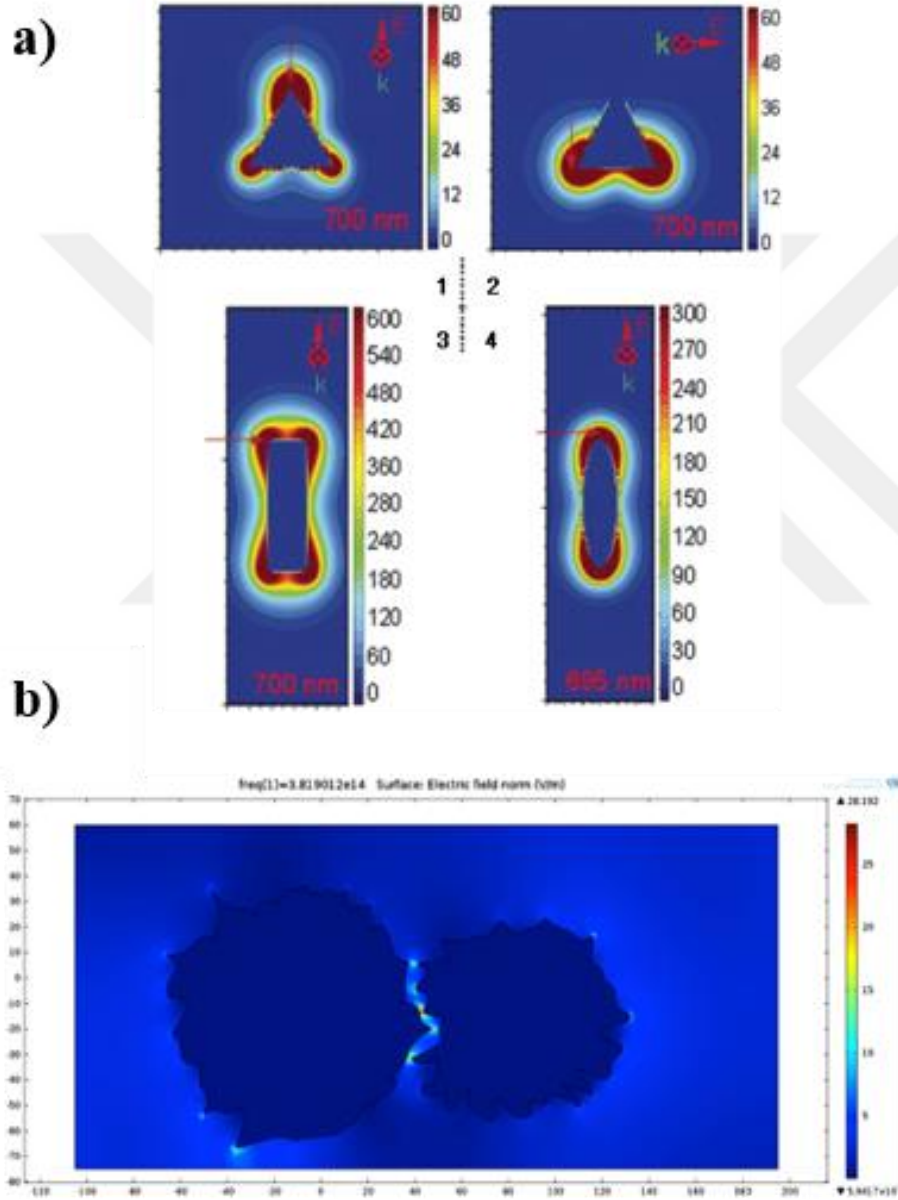
Elektromanyetik dalga metal nanoyapılarla etkileştiği zaman, metal yüzeydeki serbest elektronların doğal titreşim hareketiyle lokalize yüzey plazmonu oluşur (X. Xu ve diğerleri, 2015). Oluşan bu yüzey plazmon rezonans bantları metalin dielektrik sabitine, yapısına, şekline, büyüklüğüne ve bulunduğu ortama bağlı olarak değişim gösterir. Çünkü bu faktörler metalik nanoyapının yüzeyindeki elektronik yük yoğunluğuna etki eder (Link ve diğerleri, 2003)

Şekil 2.1a'da gösterildiği gibi metallerin bir elektron bulutu tarafından çevrelenmiş ve pozitif yüke sahip olduklarını düşünebiliriz. Elektronların anlık olarak yer değiştirmesi kutuplaşmaya neden olur ve bu kutuplaşma metalin karakteristik frekansı ile titreşim oluşturmasını sağlar. Bu titreşim bir elektriksel alan meydana getirir (Siddhanta ve diğerleri, 2012). Oluşan elektriksel alan molekül ve metal yüzey arasındaki mesafeye bağlı olarak değişir. Ayrıca metalin dielektrik sabitine ve uygulanan elektriksel alana da bağlıdır.

Metalik yapının karakteristik frekansı ve uygulanan elektromanyetik ışığın frekansı aynı ise metal yüzeyinde bir elektriksel alan oluşur (Karabıcak, 2011). Mevcut elektriksel alan ve yüzey plazmonunun oluşturduğu elektriksel alanın birleşmesiyle oluşan kuvvetlendirilmiş elektriksel alanın olduğu bölgeler hotspot olarak adlandırılır. Bu hotspotlardaki moleküllerde, oluşan elektriksel alanın etkisiyle zorlanmış kutuplaşma meydana gelir ve Raman sinyalleri çarpıcı bir şekilde artar (X. Xu ve diğerleri, 2015).

Hotspotlar metalik nanoyapının şekline bağlı olarak değişim gösterir. Resim 2.1a'da (Hao ve diğerleri, 2004) üçgen, dikdörtgen ve eliptik şeklindeki gümüş nanoparçacıklara ait elektriksel alanlar gösterilmiştir. Buradan da anlaşıldığı gibi nanoyapıların keskin

uçlarında elektromanyetik alan artışı daha fazladır. Bu yüzden küresel parçacıklarla çalışıldığında Raman sinyallerindeki artış daha düşüktür (Radziuk ve diğerleri, 2015). Resim 2.1b’de (Tamer ve diğerleri, 2014) ise örnek olarak grubumuz tarafından hazırlanan nano yıldız yapıdaki manyetik nanopartiküllere ait elektriksel alan kuvvetlendirme çizgileri gösterilmiştir.



Resim 2.1. a) Farklı şekillerdeki gümüş nanoparçacıkların renkli elektriksel alan kuvvetlendirme çizgileri: (1) ve (2) iki farklı simetri eksenine boyunca polarizlenen üçgen prizma; (3) ve (4) boyuna polarizlenen çubuk ve eliptik gümüş nanoparçacıklar. Oklar en yüksek elektriksel alanları gösterir, b) Yıldız şeklinde manyetik altın nano parçacıklara ait elektriksel alan kuvvetlendirme bölgeleri

Yüzey plazmonları lazer ışıması tarafından uyarıldığı için, YGRS deneyleri için uyarma dalga boyu metalik nanoyapının plazmon dalga boyuna uygun olarak ayarlanmalıdır. Bu nedenle uyarma dalga boyları temel olarak 450 ve 1064 nm arasındaki yakın infrared (NIR) bölgeye kadar olan görünür bölgeyi kapsar. Bu dalga boylarında çalışılan lazerler ile, genellikle YGRS aktif yüzey olarak tercih edilen altın ve gümüş gibi metallerin yüzey plazmonları uyarılabilir (Tian ve diğerleri, 2006)

Bütün bunların bir sonucu olarak, şunu söyleyebiliriz ki YGRS hassasiyetini artırmak için en etkili yöntem lokalize elektriksel alanın artırılmasıdır. Örneğin, plazmonik rezonans lokalize elektriksel alanı 10 kat artırırorsa, molekülün Raman sinyalleri 10^4 kat artırılabilir. Aslında, nanoyapının şeklini, büyüklüğünü ve yapısını optimize ederek, YGRS kuvvetlendirme faktörü (EF) 10^{10} kat ya da daha fazla artırılabilir (Le Ru ve diğerleri, 2007; X. Xu ve diğerleri, 2015).

Kimyasal kuvvetlendirme

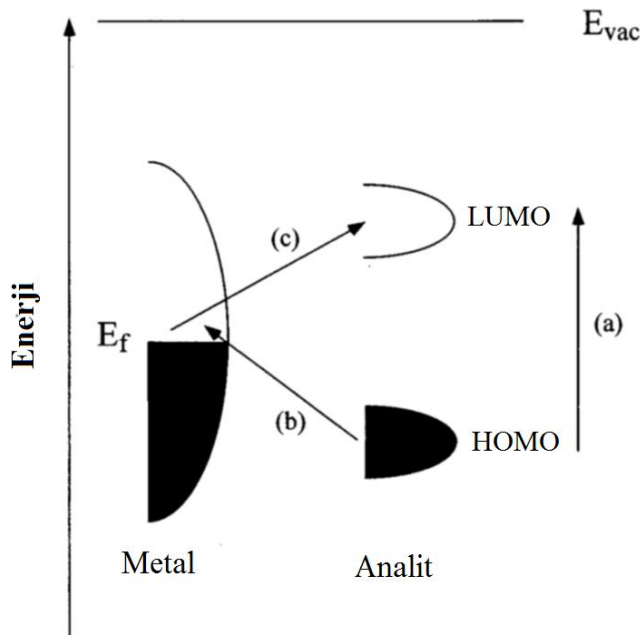
Kimyasal etkide ise metal yüzeyi ve kimyasal olarak yüzeye tutunan türlerin arasındaki yük transferi olduğu kabul edilmektedir. Böylece adsorblanan türün polarlanabilirliği değişkenlik gösterir. Fakat kimyasal kuvvetlendirmenin mekanizması hala net olarak bilinmemektedir.

Sadece elektromanyetik kuvvetlendirme mekanizması ile YGRS’de oluşan sinyal artışının büyüklüğü tam olarak açıklanamamıştır. Yapılan araştırmalar elektromanyetik kuvvetlendirmeden bağımsız olarak çalışan başka bir mekanizmanın olması gerektiğini göstermiştir. Örneğin, elektromanyetik kuvvetlendirme mekanizması moleküler türlere bağlı olarak çalışmamasına rağmen, aynı deneysel koşullarda CO ve N₂ moleküllerinin YGRS şiddetlerinin 200 kat farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir (Alan ve diğerleri, 1998).

Kimyasal kuvvetlendirme toplam kuvvetlendirme faktörünün ancak % 1-0.1 katını oluşturur ve bu değer göreceli olarak elektrokimyasal kuvvetlendirmeye göre oldukça düşük bir değer olmasına rağmen yine de önem arzeder. Kimyasal kuvvetlendirmenin gerçekleşmesi için molekülün, metalik nanoyapının yüzeyi ile doğrudan etkileşmesi yani yüzeye bağlı olması gerekir (Alan ve diğerleri, 1998). Bu kemisorbsiyon ile resonant ara yüzey hali olarak adlandırılan yeni bir elektronik hal oluşur. Burada molekül ve metal

arasında bir elektronik eşleşme gerçekleşir ve molekülün uyarma enerjisinin yaklaşık yarısı kadar enerjide molekülden metale veya tam tersi yönde yük transferi olur. Molekül ve metal arasındaki bu yük transferi molekülün elektronik enerji seviyesinde kaymaya ve genişlemeye neden olur ve bu da YGRS kuvvetlendirmesi sağlayan rezonans Raman etkisi ile sonuçlanır.

Bu durumun şu şekilde olduğu düşünülmektedir: Metalik yüzeye adsorbe olan molekülün en yüksek dolu moleküler orbitali (HOMO) ve en düşük dolmamış moleküler orbitali (LUMO) enerji diyagramında metalin Fermi seviyesine göre simetrik olarak yerleşebilir. Bir foton metal tarafından absorbe edildiğinde dinamik yük taransferi gerçekleşir ve sıcak elektron hali oluşur. Bu elektron molekülün en düşük dolmamış moleküler orbitaline (LUMO) geçer. Böylece uyarılmış elektronların sayısı büyük ölçüde artar ve uyarılan elektronun daha sonra molekülün LUMO'ndan metale geri dönerken yaptığı emisyon Stokes hatlarını oluşturur. Dolayısıyla Raman sinyallerinde de artış gözlenir. Oluşan elektrokimyasal kuvvetlendirmenin büyüklüğü genellikle 10-100 kattır (Alan ve diğerleri, 1998). Şekil 2.12'de (X. Xu ve diğerleri, 2015) kimyasal kuvvetlendirme mekanizmasının şematik gösterimi mevcuttur. Burada molekülün yüzeye doğrudan bağlanması kuvvetlendirmenin daha yüksek olmasına olanak sağlar (Moens, 2007).



Şekil 2.12. Metal yüzeyine tutunan molekülün enerji diyagramı

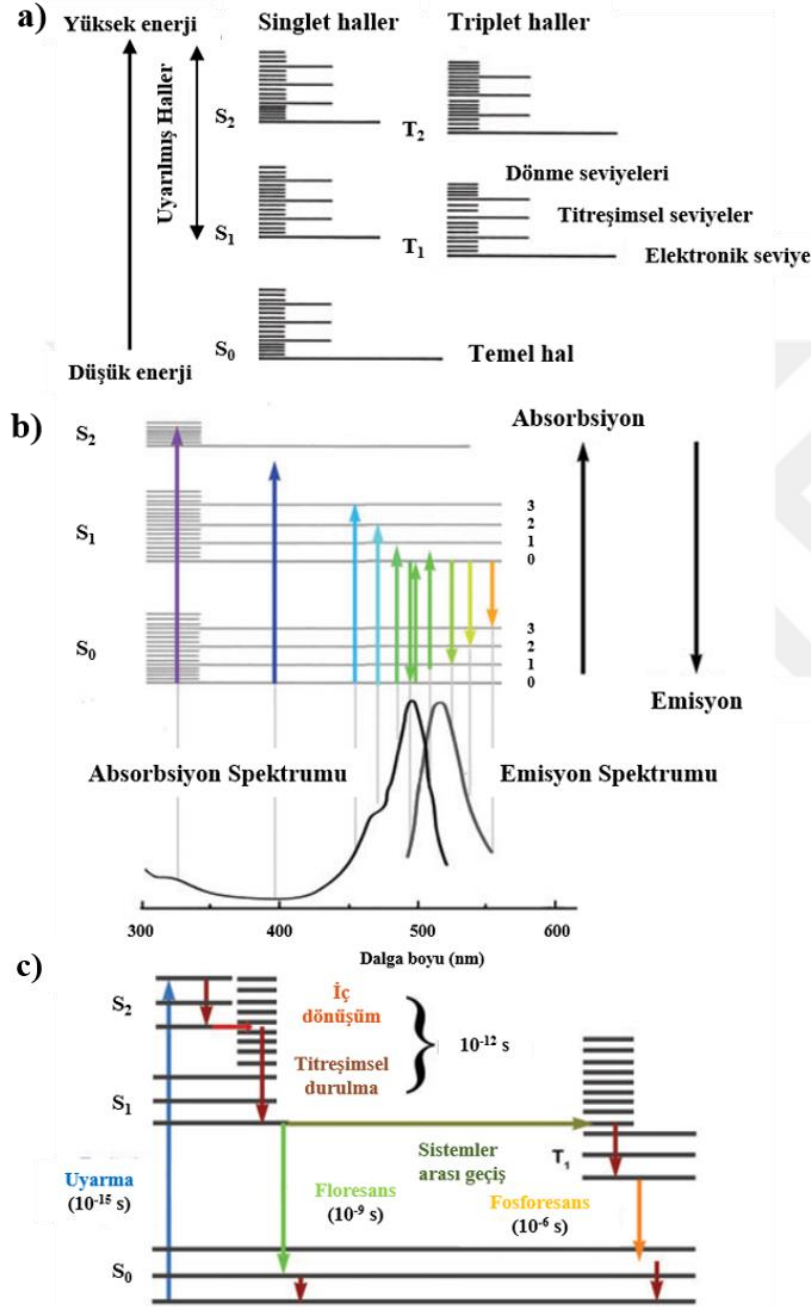
2.2.2. Floresans spektroskopisi

Uyarılmış singlet bir sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa floresans denir ve bu ışığın analit tarafından absorplandıktan 10^{-5} - 10^{-8} s sonra daha uzun dalga boylarında emisyonu olarak tanımlanır. Frekansta değişiklik olmaksızın absorplanan ışığın yeniden yayılması rezonans ışması veya rezonans floresansı olarak bilinir. Birçok moleküler tür, rezonans floresansı da gösterir. Bununla beraber, moleküler floresans veya fosforesans bantları rezonans çizgisinden daha uzun dalga boylarında merkezlenmiş olarak bulunur. Bu uzun dalga boyları veya düşük enerjiler stokes kayması olarak ifade edilir (Skoog ve diğerleri, 1998). Yayılan floresansı bloke etmeden uyarma ışığını tamamen filtreleyerek sadece floresans nesneleri görmek mümkündür.

Uyarma ve emisyon prosesinin ayrıntılarını anlamak için en iyi yaklaşım, ilk kez 1930'da Alexander Jablonski tarafından düşünülmüş olan bir diyagramın yorumlanmasıdır (Şekil 2.13a) (Valeur, 2002; Lakowicz, 1999; Turro, 1991). Diyagramın sol tarafında singlet sistemler gösterilmektedir. Bütün elektron spinlerinin eşleşmiş olduğu bir moleküler elektronik hal, bir singlet hal olarak adlandırılır ve molekül bir manyetik alana maruz bırakıldığında elektronik enerji seviyelerinde hiçbir yarıma meydana gelmez (Skoog ve diğerleri, 1998). Diyagramda gösterilen S_0 , temel hal olarak adlandırılır ve molekülün ışık ile etkileşmeden önceki enerji seviyesini gösterir. S_1 ve S_2 farklı orbitallerdeki uyarılmış singlet halleri gösterir. S_2 'nin enerjisi S_1 'den, S_1 'in enerjisi ise Temel hal, S_0 'dan daha yüksektir. Diyagramın sağ tarafında ise triplet hal gösterilmiştir. Triplet halde iki elektronun spinleri eşleşmemiş halde bu da demek oluyor ki elektronlar paralel durumdadır (Lichtman ve Conchello, 2005). Bununla beraber uyarılmış triplet halin enerjisi buna karşı gelen uyarılmış singlet halin enerjisinden daha düşüktür. Quantum teorisinde belirtilen sınırlamaya göre bir orbitalde en fazla iki elektron bulunması ve bu elektronların birbirlerine zıt spinlere sahip olması gerekir. Bu şartlar altında spinler eşleşmiştir (Skoog ve diğerleri, 1998). Fakat yine de elektronlar singlet ve triplet halleri arasında sistemler arası bir geçiş gerçekleştirebilirler.

Bir florofor ışığı absorpladığında, fotonun bütün enerjisi florofora transfer edilir. Bu enerji fotonun dalga boyu ile ters orantılıdır ($E = h \times c / \lambda$, h Plank sabiti, c ve λ sırasıyla ışığın hızı ve dalga boyu). Absorblanan fotonun enerjisi, temel halden S_1 'in en düşük enerji seviyesine geçiş için gereken enerjiden daha yüksek ise molekülün titreşimsel, dönme

enerji seviyelerinde değişim gözlenir veya elektron daha yüksek elektronik orbitale (S_2) geçer. Bu yüzden bir molekülün uyarılabileceği bir dalga boyu aralığı vardır (Lichtman ve Conchello, 2005).



Şekil 2.13. Floresansın ilkeleri, a) bir molekülün enerji seviyelerinin gösteren Jablonski Diyagramı, b) bir molekülün, enerjinin absorpsiyon ve emisyonu ile ilişkili spektral karakteristiği, c) floresanssta gerçekleşen bazı basamaklar, uyarılma ve lüminesans için süreler

Temel halden uyarılmış hale geçiş yalnızca femto saniyeler alır. Uygun enerjiye sahip bir foton bu geçişe neden olabilirken, bunun yanında çoklu fotonların da enerji vererek molekülü uyarması mümkün olabilir. Floresans emisyonu ise göreceli olarak yavaş hızda gerçekleşir. Burada, uyarılmış halin ömrü, uyarılma işlemine karşılık gelen absorpsiyon pikinin molar absorbtivitesi ile ters orantılıdır. Bu sebeple, 10^3 - 10^5 aralığındaki molar absorbtiviteler için uyarılmış hallerin ömrü 10^{-7} - 10^{-9} s arasında gözlenir. Geçiş olasılığının daha düşük olduğu zayıf absorblayıcı sistemler için ömür, 10^{-6} - 10^{-5} s kadar uzun olabilir.

Uyarılmış bir molekül temel hale birkaç mekanik basamağın birleşimi yoluyla dönebilir. Bunlardan ikisi Şekil 1c'de gösterildiği gibi bir ışın fotonunun yayımını içeren floresans ve fosforesanstır. Diğer sönüm olayları ışımasız durulmadır. Temel hale geçişte en fazla tercih edilen yol, uyarılmış halin ömrünü en az yapan yoldur. Bu yüzden ışımasız geçişlere göre floresans ile sönüm hızlı ise, bir emisyon gözlenir. Fakat eğer bir ışımasız yol daha büyük hız sabitine sahipse floresans ya yoktur ya da çok küçük şiddettedir.

Elektronik uyarılma sırasında bir molekül birçok titreşim seviyesinden herhangi birine uyarılabilir. Bununla beraber çözeltide aşırı titreşim enerjisi, uyarılmış türlerin molekülleri ile çözücü molekülleri arasındaki çarpışmalar sonucu hemen kaybedilir. Bunun sonucu olarak bir enerji aktarımı ve çözelti sıcaklığında çok az bir artış gözlenir. Titreşim enerji seviyeleri bakımından uyarılmış bir molekülün ortalama ömrü 10^{-12} s veya daha az olup, bu süre elektronik olarak uyarılmış bir halin ortalama ömründen önemli derecede daha kısa olduğundan, durulma işlemi çok etkilidir. Bununla beraber, elektron temel halin enerji seviyelerinden herhangi birine dönebileceği için birbirine yakın birçok pik oluşur. Daha sonra daha fazla titreşimsel durulma ile elektron, hızla temel elektronik halin en düşük titreşim seviyesine döner. Titreşimsel durulmanın etkinliğinin bir sonucu, verilen bir elektronik geçiş için floresans bandının absorpsiyon bandından daha düşük frekanslara veya uzun dalga boylarına doğru kaymasıdır ki bu kayma Stokes kaymasıdır. Sadece temel halin en düşük titreşim seviyesi ve bir uyarılmış halin buna karşılık gelen seviyesi arasındaki geçişleri kapsayan rezonans piki için örtüşme olur. İç dönüşüm ise bir molekülün, ışın yaymadan daha düşük bir elektronik enerji seviyesine geçmesi ile ilgili molekül içi olayları ifade eder. İki elektronik enerji seviyesi, titreşim enerji seviyelerinde bir örtüşme görülecek kadar birbirine yakın ise iç dönüşüm etkilidir. Şekil 2.13c'de gösterilen örtüşmede uyarılmış iki halin potansiyel enerjisi aynıdır ve bu yüzden etkin bir geçiş söz konusudur. Örtüşen titreşim seviyeleri arasında iç dönüşüm olma olasılığı

genellikle floresans gözlenmesi olasılığından yüksektir. Temel halin titreşim seviyeleri, birinci uyarılmış elektronik halin titreşim seviyeleri ile örtüşürse sönümlenme hızla gerçekleşir ve nadiren floresans gözlenir. Bununla beraber uyarılmış bir halin sönümlenmesi bazen uyarılmış molekül ve çözücü ya da diğer çözeltideki diğer moleküller arasında çarpışmalar sonucu enerji aktarılması ile gerçekleşir. Bu olaya dış dönüşüm adı verilir. Düşük sıcaklıklarda ve viskoz çözeltilerde kinetik enerji düşer çarpışma olasılığı azalır ve dış dönüşüm görülme olasılığı azalır. Sistemler arası geçiş olayında ise uyarılmış bir elektronun spininin değişimi gerçekleşir. Bu olayın olması için singlet ve triplet enerji seviyelerinin örtüşmesi gerekir. Ağır atom etkisi olarak bilinen iyot veya brom gibi ağır atomları içeren moleküllerde sistemler arası geçiş çok daha fazladır. Bu atomların varlığında spin-orbital etkileşimleri artar ve spinde değişme olma olasılığı artar. Çözeltide moleküler oksijen gibi paramanyetik türlerin varlığı da sistemler arası geçişi artırarak floresans gözlenme olasılığını azaltır. Tüm bunların yanı sıra uyarılmış türün enerji kaybı fosforesans ile de gerçekleşebilir. Sistemler arası geçişten sonra triplet halden singlet hale geçişte ışıma olur ve fosforesans olarak adlandırılır. Uyarılmış triplet halin ortalama ömrü emisyonu göre 10^{-4} s'den 10 s'ye kadar daha uzun sürebilir (Skoog ve diğerleri, 1998).

Bir maddenin moleküler yapısı ve kimyasal çevrenin etkisi lüminesans gerçekleşip gerçekleşmeyeceğine karar verir. Ayrıca bu faktörler floresans şiddetini de belirler. Kuantum verimi bu etkenlerden biridir. Temel olarak emisyon yapan molekül sayısının toplam uyarılmış tür sayısına oranı verilerek hesaplanır. Bu oran 1'e ne kadar yakınsa floresans şiddeti o kadar artar.

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_s + k_{dd} + k_{id} + k_{oa} + k_a}$$

Eşitlik 2.1. Kuantum verimliliği

Yukarıdaki eşitlikte bir bileşik için floresans kuantum veriminin en düşük uyarılmış singlet halin sönümündeki olaylar ile nasıl hesaplanacağı gösterilmiştir. Bu olaylar floresans (k_f), sistemler arası geçiş (k_s), dış dönüşüm (k_{dd}), iç dönüşüm (k_{id}), ön ayrışma (k_{oa}) ve ayrışma (k_a) olaylarıdır. Burada “k” bağıl hız sabitini ifade eder. Bu eşitliğe göre k_f değerini artıran ve diğer olayları azaltan durumlar floresans şiddetinin artmasını sağlar.

Ön ayrışma (k_{0a}) ve ayrışma (k_a) hız sabitlerinin büyüklüğü kimyasal yapıya bağlıken diğer hız sabitleri çevresel etmenlerden daha çok etkilenirler (Skoog ve diğerleri, 1998).

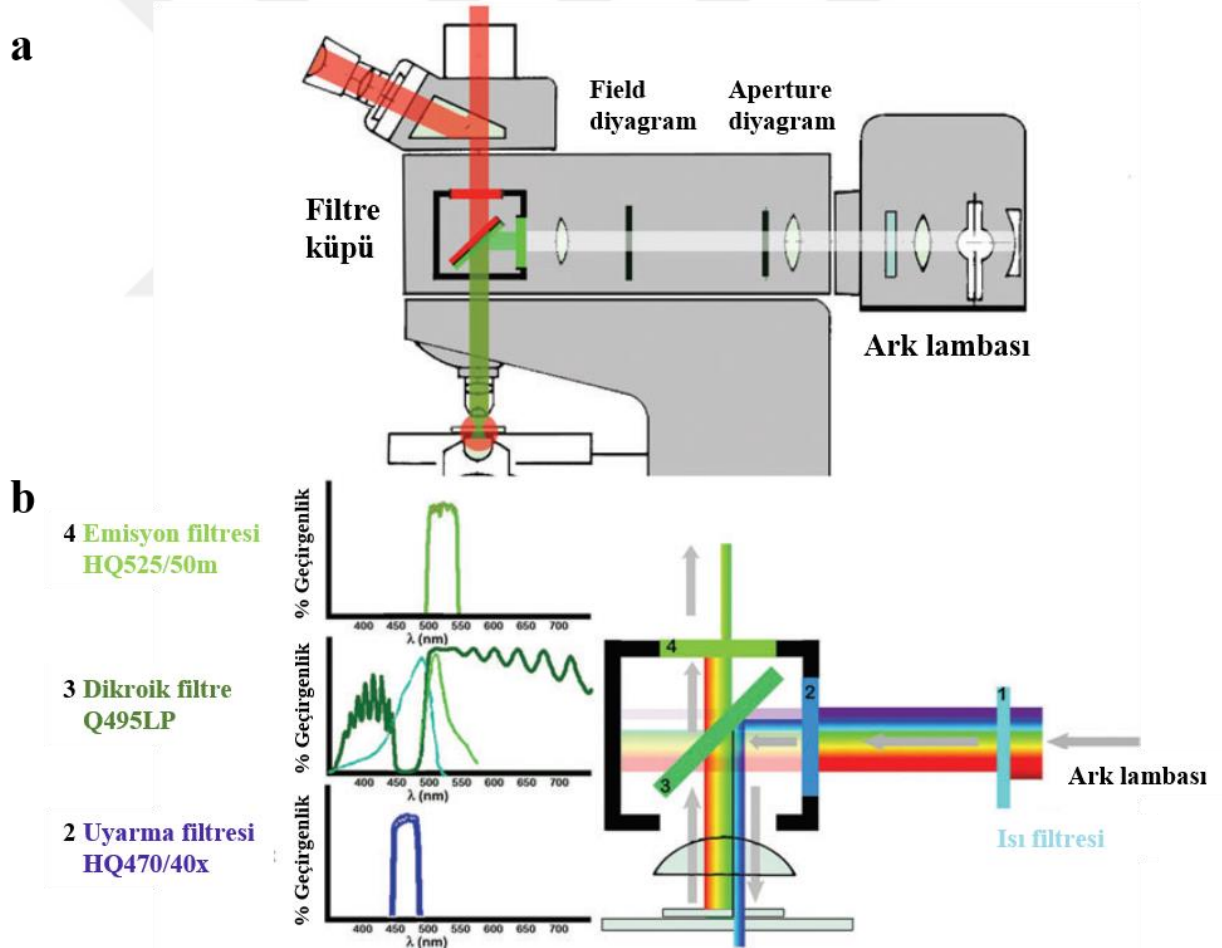
2.2.3. Floresans mikroskopi

Belirtilen bir Stokes kayması için, bir floresans mikroskop tasarlamak oldukça kolaydır. Temel olarak, tek bir dalga boyu ile örneğin aydınlatılması ve yalnızca floresansla kayan daha uzun dalga boylarının gözlenebilmesi için yayılan ışığın filtrelenmesi gereklidir. Aslında floresansın ilk kez bahseden Sir George Gabriel Stokes, kinin içeren su şişesi üzerinde güneş ışığını filtreleyerek mor ışık göndermiş ve mor ışığı bloke eden beyaz şarapla dolu bir cam ile kininden mavi ışık emisyonunu gözlemlemiştir (Lakowicz, 1999). Floresans mikroskoplarda, uyarma ışığı ışık toplayıcıya (kondenser) gelir, örnekle etkileşir ve emisyon objektif tarafından toplanır. Modern mikroskoplarda tercih edilen yaklaşım üstten aydınlatmadır (Şekil 2.14a). Bu konfigürasyonda objektif sadece görüntüleme ve örneği büyütme için değil aynı zamanda örneği aydınlatan bir ışık kondenser olarak da davranır. Üstten aydınlatmalı ve geçirgen mikroskopların her ikisinde de floroforların uyarılması eşit iken, sadece üstten aydınlatmalı mikroskoplarda örnekten yansıtılan uyarma ışığının düşük bir yüzdesini bloke etmek gereklidir. Bu yaklaşımdaki en önemli teknik engel uyarma ışığı ve floresans emisyonunun ışık yolunda çakışmasıdır. Uyarma ve emisyon ışınını ayırmak için ise özel bir tür ışık ayırıcı (beam splitter) olan bir dikroik ayna kullanılır. Dikroik aynalar ışık yolunda 45 °'lik açı ile bulunmak üzere tasarlanmıştır. Sıradan floresans mikroskoplarda, dikroik ayna ışık kaynağından gelen kısa dalga boylu ışığı yansıtırken, uzun dalga boylarında yayılan floresansı geçirir. Her bir dikroik ayna floroforun uyarma ve emisyon pikleri arasında bir geçişe sahip olacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 2.14b).

Dikroikler nadiren, yalnızca uyarma dalga boyunun seçilmesini sağlayan uyarma filtresi ve detektöre daha uzun dalga boylu ışığın geçişine izin veren emisyon filtresi olmadan kullanılırlar. Bu üç tür filtre de tipik olarak girişim filtreleridir ve çok özel dalga boyu seçicilikleri vardır. Bu üç filtre kullanılarak uyarma ışığının emisyon ışığından ayrılması başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilir (Lichtman ve Conchello, 2005).

Filtre küpleri

Filtre küpleri uyarma, emisyon ve dikroik filtrelerden meydana gelir (Şekil 2.14b) ve bir mikroskopta 3 ila 9 arasında filtre kübü bulunabilir. Bu küplerin pozisyonu manuel ya da bilgisayar kontrollü olarak değiştirilebilir. Böylece farklı dalga boylarında yapılan emisyonlar için uygun filtre küpü kolaylıkla değiştirilebilir. Örneğin floressein gibi yeşil floresans yapan boyalar, DAPI gibi mavi floresans yapan boyalar ve TRITC gibi kırmızı floresans yapan boyalar için tasarlanmış filtre setleri mevcuttur. Uygun filtre setini seçerken floroforun emisyon ve uyarma dalga boyları dikkate alınmalıdır. Şekil 2.14b’de bir filtre seti için uyarma, emisyon ve dikroik filtrenin spektral özellikleri verilmiştir (Lichtman ve Conchello, 2005).



Şekil 2.14. Floresans mikroskop, a) üstten aydınlatmalı floresans mikroskopun parçalarının gösterimi, b) bir küpün dizaynı ve filtrelerin spektral özellikleri

Işık kaynakları

Floresansda örneğin aydınlatılması için bazı farklı stratejiler mevcuttur. Bunun için yaygın olarak ark tipi cıva ve Ksenon lambaları kullanılır. Ark lambaları pahalı, potansiyel olarak tehlikeli ve özel lamba haznelerine ihtiyaç duyarlar. Fakat ihtiyaca göre Ksenon ve cıva lambaları öncelikli olarak tercih edilebilirler. Ksenon lambaları UV, görünür ve yakın IR bölgelerini kapsadığı için avantajlıdır. Cıva ise oldukça yoğun şiddete sahip bir ışık kaynağıdır. Bunların yanında cıva lambanın 200 saat ve birçok Ksenon lambanın ise 400 saat kullanım süresi vardır. Günümüzde ışık yayan diyotlar (LEDs) ark lambalarıyla yer değiştirmeye başlamıştır. Bunlar pahalı olmayan ışık kaynaklarıdır (Lichtman ve Conchello, 2005).

Objektifler

Mikroskop objektifleri örneği uyaran ışık kaynağı ve aynı zamanda floresansı toplayan optik parça olarak davrandıkları için, objektiflerin özellikleri floresans görüntülemeye büyük öneme sahiptir. İdeal bir floresans mikroskop objektifinde açıklık sayısının (NA) büyük olması gerekir. Açıklık sayısı, mikroskopun ayırma (resolüsyon) gücünün bir ölçüsüdür ve merceğin geçirebildiği ışık demetinin çapını ifade eder. Açıklık sayısı arttıkça rezolüsyon kuvveti de artar. Açıklık sayısı büyük olan objektifler immersiyon yağı ile kullanılırlar. Uyarma ışığının miktarı ve aynı zamanda floresans emisyonunun miktarı yaklaşık olarak $(NA)^2$ ile orantılı olarak değişir (Lichtman ve Conchello, 2005).

Cep telefonu tabanlı mikroskoplar

Optik görüntüleme teknikleri, yerinde tanı yapmak için geliştirilen tıbbi cihazların geliştirilmesinde önemli avantajlar sağlar. Optik görüntüleme ile hızlı ve doğru tanı koyma, gerçek zamanlı ve yüksek çözünürlükte mikroskopik ve makroskopik bilgi edinme sağlanabilir. Son yıllarda optik görüntüleme platformları çeşitli çalışmalarla minyatürize edilmiş ve böylece oldukça düşük maliyetli sistemler geliştirilmiştir. Elektronik pazardaki hızlı gelişmeler sayesinde cep telefonu gibi yüksek performanslı görüntüleme araçları her yerde bulunmaktadır ve ayrıca taşınabilir, küçük ve düşük maliyetli olduğu için, cep telefonları yerinde tanı araçlarının geliştirilmesinde tercih edilen cihazlar olmaya başlamıştır. Bunun dışında mikro akışkan sistemlerle birleştirilebilirliği sayesinde çip üzeri laboratuvar (lab-on-a-chip) tanıma teknolojisinde kullanılabilecek araçlar arasında yerini almıştır (Zhu, Isikman, Mudanyali, Greenbaum ve Ozcan, 2013).

Klasik parlak alan ve floresans mikroskop tasarımları için çeşitli lens düzenlemeleriyle cep telefonlarını birleştirerek hazırlanan taşınabilir ve son derece uygun fiyatlı mikroskop sistemleriyle ilgili önemli sayıda çalışma mevcuttur. Cep telefonu tabanlı mikroskop yaklaşımları; lenssiz (lens free), lens üzerinde (on-lens) ve ek parça (attachment) yaklaşımları olmak üzere üçe ayrılır. Bu üç tasarımın her biri için yapılan araştırmalarda, gelişmekte olan ülkelerdeki sağlık standartlarını önemli ölçüde etkileyebilecek cep telefonu tabanlı mikroskop tasarımları ile ilgili umut vaat eden bilimsel yaklaşımlar üretilmiştir (Bates ve Zumla, 2015; Pirstill ve Coté, 2015).

Geleneksel parlak alan mikroskopik tekniklerle elde edilen çözünürlükle kıyaslanabilir çözünürlüğü (~40X büyütme) sağlamak için, lens içermeyen tasarımlarda holografi kullanılır. Burada mobil cihazdaki kamera tarafından toplanan görüntünün sonradan işlenmesi tekniğinden yararlanır. Lenssiz yaklaşım kullanımı daha küçük tasarımların yapılmasına olanak sağlar ve optik hizalama ihtiyacını ortadan kaldırır. Ek olarak bu teknik görüntüleme alanı ve çözünürlük arasındaki ilişkinin ayrıştırılmasını sağlar ve böylece klasik mikroskop tekniklerine kıyasla sistem çözünürlüğünde kayıp olmadan büyük görüntüleme alanlarının çözünürlüğünde önemli gelişmeler sağlar. Bazı uygulamalar için bu yaklaşımı kısıtlayan iki temel sınırlama vardır. Birincisi bu yapıda kullanılan cep telefonu tabanlı mikroskop sistemleri, hologramlardan elde edilen görüntüleri yeniden oluşturmak veya görüntüleri uzaktan bir sunucuda işlemek için yeterli işlem gücü içermelidir. İkincisi ise görüntülenecek örnekler göreceli olarak kameraya yakın olacak şekilde yerleştirilmelidir ve bu da çalışma zorluğu doğurur (Pirstill ve Coté, 2015)(2).

İkinci yaklaşım olan lens üzerindeki cihaz tasarımı, odak noktasında cep telefonu kamerasına direkt olarak eklenen bir kırılma elemanı yerleştirilerek veya kamera lensinin önüne bir küresel lens yerleştirilerek gerçekleştirilir. Bu yaklaşım düşük maliyetli bir alternatif oluşturma imkanı sağlar ve diğer rapor edilen cep telefonu tabanlı mikroskop sistemlerle kıyaslanabilir bir çözünürlük sağlar. Küresel lens kullanımı küresel odak düzlemi oluşturur ve böylece bu teknik odak noktasında yakalanan görüntünün sadece küçük bir görüntüleme alanı ile çalışılmasına olanak sağlar. Görüntüleme alanında odak dışındaki bölgeler için daha sonra görüntü işleme ile düzeltme tekniklerini kullanılarak ayarlama yapma ihtiyacı duyulur (Pirstill ve Coté, 2015).

Rapor edilen cep telefonu tabanlı mikroskop tasarımlarının büyük bölümünü içeren üçüncü yaklaşımda cep telefonu ek parça ilavesiyle kullanılır. Bu yaklaşımda mikroskopik görüntüleme için ek bir donanım gereklidir. Bu çalışmalarda cep telefonları klasik mikroskop objektifleri (Breslauer, Maamari, Switz, Lam, ve Fletcher, 2009) ya da düşük maliyetli basit lenslerle birleştirilmiştir (Bogoch ve diğerleri, 2014) fakat sınırlı görüntüleme alanı ve görüntü kalitesi sorunları yaşanmıştır. Bu yaklaşımın diğer sınırlamaları ise her bir cep telefonu modeli için ayrı bir ek parçaya gereksinim duyulması ve karmaşık optik elemanlar gerektirebilmesidir. Bu yüzden gelişmekte olan ülkelerde potansiyel olarak böyle bir tasarımın uygulanmasında zorluklar yaşanabilir (Pirstill ve Coté, 2015).

Lens, ışık kaynağı, numune kabı, USB ve bluetooth bağlantı yerleri monte edilerek hazırlanan ve üç boyutlu yazıcı ile basılmış cep telefonunun rahatça yerleştirilebileceği bir kap içerisine cep telefonu lensinin ilavesinin performansı artırdığı gösterilmiştir (D'Ambrosio ve diğerleri, 2015). Bu tasarımın ileri aşaması olarak bir grup, klasik bir floresans mikroskopundaki 10X objektif lens ile benzer performansa sahip geniş alan floresans görüntülerini elde etmek için, cep telefonu tabanlı bir mikroskop ile sinyal işleme algoritmalarını birleştirmiştir (H. Zhu, Yaglidere, Su, Tseng, ve Ozcan, 2011). Böylelikle mikro akışkan bir sistemden geçen floresans etiketli hücreleri sayabilen, temel bir akış sitometriye (flow cytometer) benzer fakat daha ileri bir teknoloji geliştirilmiştir (H. Zhu ve Ozcan, 2013). Cep telefonu tabanlı mikroskopların ön denemelerinde gelişmekte olan ülkelerin kırsal kesimlerinde yaygın olarak rastlandığı için pratik ve mantıklı uygulamalar sağlayan Giardia (Koydemir ve diğerleri, 2015) ve parazit (Bogoch ve diğerleri, 2014; D'Ambrosio ve diğerleri, 2015) enfeksiyonu tanısı üzerine yoğunlaşmıştır (Bates ve Zumla, 2015).

Geliştirilen bu yeni yaklaşımlar sayesinde bilgisayar desteği ya da cep telefonu veri tabanı aracılığıyla görüntü paylaşımı ile dünyanın farklı bölgelerinde elde edilen veriler işlenebilir. Ve bu yaklaşımlar özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak rastlanan hastalıkların tanısına olanak sağlar.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasal maddeler ve malzemeler

Hidrojen tetrakloro aurat (HAuCl_4), hekzadesiltrimetil-amonyum bromür (CTAB), L-askorbik asit (AA), 1-dekantiyol (DT), 4-merkaptofenilboronik asit (4-MBA), ürik asit (UA) ve etanol Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya)'den alınmıştır. Gümüş nitrat (AgNO_3) ve sodyum borohidrür (NaBH_4) Merck (Darmstadt, Almanya)'den alınmıştır. N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid hidroklorür (EDC), N-Hidroksisülfosüksinimid sodyum tuzu (NHS), boraks, borik asit, MES tampon, 1-Oktadekantiyol, sodyum sitrat ($\text{NaH}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), O-(2-karboksietil)O-(2-Merkaptoetil)-Heptaetilen glikol (PEG tiyol asit), 11-Merkaptoundekanoik Asit (MUA), hidroksilaminhidroklorür ($\text{HONH}_2 \cdot \text{HCl}$), Merkaptosilan, O[2-(3-merkaptopropionilamino)etil]-O-metilpolietilen glikol, 1-Merkaptoundeka-11yl)tri(etilen glikol), 11-merkaptopropionik asit (MPA), ve etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya)'den alınmıştır. Whatman 7184-004, nitroselüloz membran filtresi (0,45 μm gözenek büyüklüğü ve 47 mm çapında) Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya)'den alınmıştır. Referans kan örneği (Hb/glucose L-1), Seronorm (Billingstad, Norveç) firmasından alınmıştır. Altın tabaka kalınlığı 100 nm olan altın kaplı silikon plaka Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya)'den alınmıştır. Bütün çözeltiler, Millipore saflaştırma sistemi ile organik bileşiklerden arınmış deiyonize su (18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$) ile hazırlanmıştır.

Karsinoembriyjenik Antijen (CEA) Protein, Fitzgerald Industries International (Acton, MA, USA)'den alınmıştır. CEA monoklonal antikor ve CEA poliklonal antikor My BioSource, Inc. (San Diego, CA, USA)'dan, ikincil antikor ise Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)'den alınmıştır. Streptavidin-AU ve Qdot625-streptavidin konjugatları sırasıyla Cytodiagnosics (Burlington, Ontario, Canada) ve Life Technologies-Invitrogen (Grand Island, NY, USA)'den alınmıştır. %1'lik kazein çözeltisi Bio Rad Life Science Education (Hercules, CA, USA)'den alınmıştır. Poli(etilen glikol), sükröz ve bovin serum albumin Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)'den alınmıştır. Numune uygulama pedi, nitroselüloz membran ve absorbent pad GE Healthcare Life Science (Pittsburgh, PA, USA) tarafından sağlanmıştır. Konjugasyon pedi EMD Millipore

(Darmstadt, Germany) tarafından sağlanmıştır. Nanosep santrifüj tüpü Pall Corporation (Port Washington, NY, USA)'den alınmıştır. Biyobelirteç tayini çalışmasında kullanılan tüm tampon çözeltiler ve ve diğer çözeltileri hazırlamak için kullanılan deiyonize su (18.2 MΩ.cm) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)'den alınmıştır. Plano-konveks lens (12mm dia. x 24mm fl) Edmund Optics (Barrington, NJ, USA)'den alınmıştır. Long-pass filtre Semrock Inc. (Rochester, NY, USA)'dan, LED'ler ise Parts Express (Springboro, OH, USA)'den alınmıştır.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Çalışmalarda DeltaNu Examiner Raman Mikroskop sistemi (A.B.D.) kullanılmıştır. Mikro Raman sistemi 785 nm lazer ve CCD detektör, optik sistemlerini içermektedir. Enstrüman parametreleri olarak: 20X objektif, 30 µm lazer spot çapı, 150 mW lazer gücü ve 60 saniye örnekleme süresi kullanılmıştır. Absorbans ölçümleri Spectronics UV-Vis Spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları için Atomik Kuvvet Mikroskobu (XE-100E; Park System Corp., Suwan, Kore) ve Yüzey Plazmon Rezonans Sistemi- Spreeta™ (Texas Instruments, TX, ABD) kullanılmıştır. TEM ölçümleri Tecnai G2 F30 HRTEM sistemi (Japonya) kullanılarak yapılmıştır. Zeta potansiyel ve hidrodinamik çap ölçümleri Malvern Instrument Zetasizer (İngiltere) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Energy-dispersive X-ray (EDX) analizleri Joel marka SEM cihazı kullanılarak yapılmıştır. Juan Soğutmalı santrifüj: nanopartikülleri sentezlerken ortamda aşırı miktarda olan bazı maddeleri ortamdan uzaklaştırmak için kullanılmıştır. Mum yazıcı olarak XEROX ColorQube™8570 (Norwalk, ABD) yazıcı kullanıldı. Isıtıcı (Hot Plate Stirrer) olarak VELP Scientifica (Usmate Velate, Italya) kullanıldı.

Yatay akış düzeneği Claremont Biosolutions (Upland, CA, USA)'dan, Fusion 400 Touch şırınga pompası Chemyx Inc. (Stafford, TX, USA)'den alınmıştır. Mini-santrifüj Fisher Science Education (Hanover Park, IL, USA)'den alınmıştır.

3.2. Yöntem

Bu tez kapsamında iki farklı çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmaların ilkinde kanda bulunan küçük moleküllerden glikozun tayini iki farklı çip sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Diğer çalışmada ise kanser biyobelirteçlerinin tayini için kağıt tabanlı mikroakışkan yöntemi geliştirilmiştir.

3.2.1. Glikoz tayini için yöntem geliştirilmesi

Glikoz tayini için, ilk önce kendiliğinden düzenlenen tek tabaka yöntemi ile çip hazırlanmış ve Raman spektroskopisi ile sonuçlar elde edilmiştir. Burada kan örneğindeki matriksi uzaklaştırmak için klasik yöntemler kullanılmıştır. Dolayısıyla bir ön hazırlık işlemi uygulanmıştır. Daha sonra, yöntemi geliştirmek amacı ile glikoz tayini için kağıt tabanlı mikro akışkan bir sistem hazırlanmıştır. Bu yöntemde ise matriksin ayrımı kullanılan membran yüzeyinde gerçekleştiği için bir ön işleme gerek duyulmadan glikoz tayini başarılı bir şekilde yapılmıştır.

Kendiliğinden düzenlenme (SAM) tekniğiyle hazırlanan çip ile glikoz tayini

Bu yöntem ile çip hazırlamak için altın levha yüzey ve altın nanoparçacıklar kullanılmıştır. Bunun için ilk önce altın nanoparçacıklar sentezlenmiştir. Daha sonra hazırlanan nanoparçacıklar ve kullanılan altın levha yüzeyi uygun ligandlar ile modifiye edilmiştir. Hazırlanan altın yüzeyler ve partiküller etkileştirilerek SAM yüzeylerinin oluşumu sağlanmıştır. Elde edilen yüzeylerin karakterizasyon ve optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, bu yüzeyler glikoz tayini için kullanılmıştır. Yöntemin analitik performans verileri belirlendikten sonra referans kan örneğinde glikoz tayini de gerçekleştirilmiştir. Yöntemin uygulanma aşamaları aşağıda detaylandırılmıştır.

Altın nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu

Altın nanopartiküllerin sentezi kimyasal yöntem kullanılarak basit ve hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılmak üzere küre ve çubuk şeklinde altın nanopartiküller sentezlenmiştir. Nanopartiküllerin sentezi aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

Altın nanopartiküllerin karakterizasyonu ise farklı yöntemler uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla taramalı elektron mikroskop (TEM) görüntüleri alınmıştır. UV-Vis absorpsiyon spektrumları incelenmiş ve Zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar bulgular kısmında açıklanmıştır.

Altın nanoçubuk sentezi

Altın nanoçubuk sentezi, çekirdek büyütme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Nikoobakht ve diğerleri, 2003). Bu yöntemin kullanılmasındaki amaç, farklı boy/en oranına sahip anizotropik nanoparçacıkları yüksek verimle sentezlemektir. Bu amaçla ilk önce çekirdek çözeltisi hazırlanmıştır. Çekirdek çözeltisini hazırlamak için 0,1 M CTAB çözeltisinden 7,5 mL alınmış ve içerisine 250 µL 0,01 M HAuCl_4 çözeltisi ilave edilmiştir. Bu çözelti karıştırıldıktan sonra buz banyosunda soğutulmuş indirgeyici olarak 600 µL 0,01 M NaBH_4 çözeltisi de ilave edilmiş ve 30°C su banyosunda 30 dk boyunca bekletilerek altın çekirdeklerin oluşması sağlanmıştır. Daha sonra altın nanoçubukları üretmek için büyüme çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiyi hazırlamak için 4,75 mL 0,1 M CTAB çözeltisine sırasıyla 250 µL 0,01 M HAuCl_4 , ve 60 µL 0,01 M AgNO_3 çözeltileri ilave edilmiştir. Başlangıçta renksiz olan çözeltinin rengi koyu turuncuya değişmiştir. Sonrasında ise 250 µL 0,1 M askorbik asit (AA) çözeltisi ilave edilmiş ve bu ilave ile renksiz bir çözelti elde edilmiştir. Önceden hazırlanmış olan çekirdek çözeltisinden 5 µL alınarak büyüme çözeltisine ilave edilmiş, birkaç saniye karıştırılmış ve 30°C su banyosunda 3 saat bekletilerek çubuk formunda altın nanopartiküller üretilmiştir. Altın nanoparçacıklar oluşuktan sonra çözeltinin rengi maviye dönmüştür. Sentezlenen mavi renkli çubuk şeklindeki nanopartiküller 13000 rpm’de santrifüjlenerek çözeltisinden ayrılmış ve 5 mL su ile ve 3 defa yıkanarak CTAB moleküllerinin aşırısının ortamdaki uzaklaşması sağlanmıştır.

Altın nanoküre sentezi

Küresel yapıdaki altın nanopartiküllerin sentezi için indirgeyici olarak sitrat kullanılmıştır. Bunun için ilk önce 500 ml % 0,01’ lik (h/h) HAuCl_4 çözeltisi karıştırılarak kaynatılmıştır. Daha sonra kaynayan bu çözeltiye 7,5 ml % 1’lik sodyum sitrat çözeltisi ilave edilmiştir. Sitrat ilavesinden sonra kaynatma işlemine 15 dakika daha devam edilmiştir. Çözeltinin rengi turuncudan şarap kırmızısı renge tamamen döndüğünde küresel yapıda altın nanopartiküllerin sentezi tamamlanmıştır. Küresel altın nanopartikülleri içeren çözelti soğutulduktan sonra karakterizasyon işlemleri yapılmış ve analiz için kullanılmıştır.

Yüzey modifikasyonları

SAM yüzeyinin hazırlanması için sentezlenen altın nanopartiküllerin ve altın levhaların yüzey modifikasyonları, yaygın olarak kullanılan pahalı enzimleri kullanmak yerine, küçük molekül ağırlıklı molekül seçimli ligand olan 4-merkaptofenil boronik asit (4-MBA), 1-dekantiyol (DT), O-(2-Karboksietil)O-(2-merkaptometil)-heptaetilen glikol (PEG tiyol acid) ve O[2-(3-Merkaptopropionilamin)etil]-O-metilpolietilen glikol (PEG tiyol) gibi hidrofobik fonksiyonel grupların bağlanması ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla altın nanopartiküllerin ve altın levhaların yüzeyi belirtilen ligandlarla modifiye edilmiştir. Kullanılan ligandların hangisinin çalışma için daha uygun olduğunu anlamak için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Fakat ilk önce çalışma koşullarını belirlemek için 4-MBA ve DT ile çalışmalar yürütülmüştür. Glikoz moleküllerinin yüzeye tutunmasını sağlamak için boronik asit ve alkil gruplarına ihtiyaç vardır. Çünkü alkan tiyol grubu, moleküllerin homojen dağılmasını sağlayan bir tabaka olarak davranırken, boronik asit grubu da kompleks oluşumunu gerçekleştirir (Çiftçi ve diğerleri, 2013) Böylece hazırlanan iki bileşenli sistem ile glikoz molekülleri hassas bir şekilde tayin edilebilmiştir.

Altın nanopartikül yüzeylerinin modifikasyonu

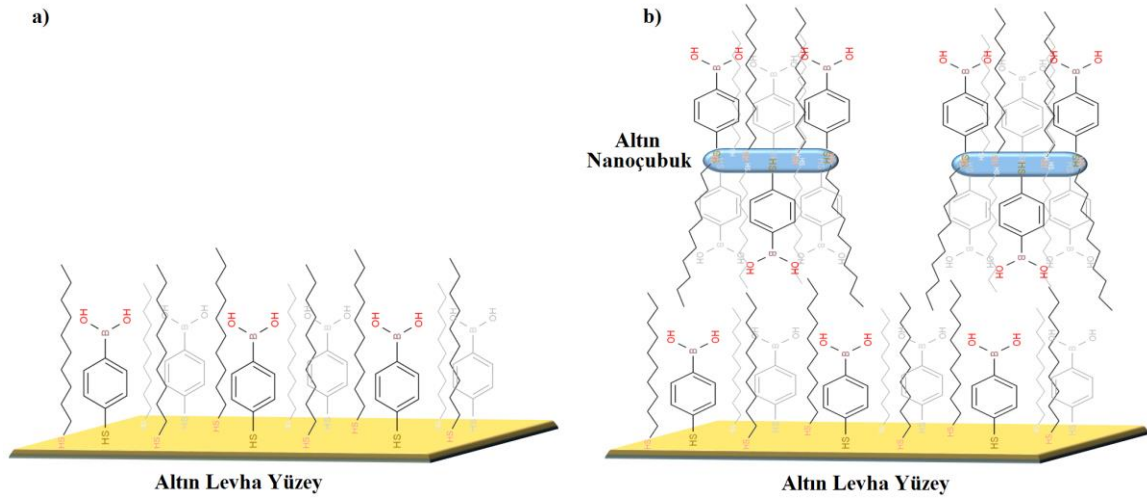
Altın nanoçubuklar sentezlendikten sonra karakterize edilmiştir. Daha sonra bu parçacıkların yüzeyi 4-MBA ve 1-DT ile kendiliğinden düzenlenme (self assembly monolayer-SAM) tekniğiyle modifiye edilmiştir (AuNPs-4-MBA/DT). Bu amaçla ilk önce belirli oranlarda 4-MBA ve 1-DT, etanol çözeltisi içerisinde karıştırılarak hazırlanmıştır. Altın nanoçubuklar hazırlanan bu çözelti içerisinde dağıtılmıştır ve bu çözelti 16 saat boyunca çalkalayıcıda belirli bir hızda karıştırılarak 4-MBA ve 1-DT'ün partikül yüzeyine bağlanması sağlanmıştır. Çözelti içerisindeki altın nanoçubuk yüzeyine bağlanmayan 4-MBA ve 1-DT molekülleri 10000 rpm'de santrifüjlenerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra modifiye altın nanoçubuklar etanol ile yıkanmış ve yine 10000 rpm'de santrifüjlenerek yıkama çözeltisi atılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmış ve bu modifiye parçacıklar daha sonra kullanılmak üzere etanol çözeltisine alınmıştır.

Altın levha yüzeylerinin modifikasyonu

Altın levha yüzeyler nanoparçacıkların modifiye edilmesinde kullanılan ligandlar ile modifiye edilmiştir. Boyutları 1cm x 1cm olan altın levha yüzeyler modifiye edilmeden önce pirana çözeltisi (%75 H₂SO₄-%25 H₂O₂) ile temizlenmiştir. Altın yüzeyler pirana çözeltisinde 30 dk. bekletilmiş ve daha sonra deiyonize su ile yıkanmıştır. Yıkanan yüzeyler kullanılmadan önce kurutulmuştur. Temizlenen altın yüzeyleri modifiye etmek için 4-MBA ve 1-DT içeren etanol çözeltisi içerisinde daldırılmıştır. Ligandların altın levha yüzeylerine bağlanması için 16 saat çalkalayıcıda belirli bir hızda karıştırılarak bekletilmiştir. Modifiye edilen altın levha yüzeyler etanol çözeltisi ile yıkanarak yüzeye bağlanmayan 4-MBA ve 1-DT moleküllerinin yüzeyden uzaklaştırılmaları sağlanmış ve böylece yüzeyler hazırlanmıştır. Şekil 3.1a'da kendiliğinden düzenlenme tekniğiyle modifiye edilen altın levha yüzeylerin (Au-4-MBA/DT) şematik gösterimi verilmiştir.

Altın Levha ve Altın Nanopartiküllerin Etkileştirilmesi

Modifiye edilen altın levha yüzeyler (Au-4-MBA/DT), modifiye altın nanoçubukları (AuNPs-4-MBA/DT) içeren 2 ml etanol çözeltisi içerisinde 1 gece bekletilerek, hidrofobik etkileşimler ile nanopartiküllerin altın levha yüzeyine tutunmaları sağlanmıştır. Şekil 3.1b'de hazırlanan sensör (Au-4-MBA/DT - AuNPs-4-MBA/DT) şematik olarak gösterilmiştir. Altın nanoçubuklarla modifiye edilmiş yüzeyler etanol ile 3 kez yıkanarak etkileşime girmeyen nanopartiküllerin yüzeyden uzaklaştırılmaları sağlanmıştır. Yıkama işleminden sonra yüzeyler kurutulmuş ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



. a) Au-4-MBA/DT, b) Au-4-MBA/DT - AuNPs-4-MBA/DT yüzeylerinin şematik gösterimi

Glikoz ölçümleri için yöntem optimizasyonu

Ligand türünün etkisi

Kendiliğinden düzenlenme tekniği ile hazırlanan platformu glikoz tayininde kullanırken optimum şartların belirlenebilmesi için DT yerine farklı ligandlar da kullanılmıştır. Bunun için altın levha yüzeyi ve altın nanoçubuk yüzeyleri toplam 20 mM derişimde olacak şekilde 4-merkaptofenilboronik asit (4-MBA) eşliğinde ligand olarak 1-dekantiyol, O-(2-Karboksietil)O-(2-merkaptometil)-heptaetilen glikol (PEG tiyol asit) ve O[2-(3-Merkaptopropiyonilamin)etil]-O-metilpolietilen glikol (PEG tiyol) kullanılarak kendiliğinden düzenlenme tekniğiyle modifiye edilmiştir. Farklı ligandlar ile modifiye edilen yüzeyler kullanılarak 5 mM glikoz içeren örnek yüzeye etkileştirilmiş ve 4-MBA'in YGRS sinyali takip edilmiştir. Hazırlanan bu farklı platformların glikoza karşı cevapları karşılaştırılarak en yüksek sinyal elde edilen platform çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Hazırlanan bu platformların değişen glikoz derişimine karşı cevapları da incelenmiştir. Bunun için altın yüzeyler, 10 mM 4-MBA ve 10 mM DT içeren etanol çözeltisinde 16 saat bekletilerek moleküllerin yüzeye bağlanması sağlanmıştır. Aynı prosedür kullanılarak 10 mM 4-MBA ile 10 mM PEG tiyol asit de etanol içerisinde altın yüzeyler ile

etkileştirilmiştir. Fakat PEG tiyol ile çalışırken, PEG tiyolün etanolde çözünürlüğü düşük olduğu için 10 mM 4-MBA ile 10 mM PEG tiyol, 1:1 oranında hazırlanmış su:etanol karışımı içerisinde çözünmüştür. Ve yine 16 saat moleküllerin yüzeye bağlanması için beklenmiştir. Modifiye edilen bu altın yüzeylerle etkileştirilmek üzere altın nanopartiküller de modifiye edilmiştir. Bunun için altın nanoçubuklar, 15 mM 4-MBA ve 5 mM DT içeren etanol çözeltisi içerisinde homojen olarak dağıtılmış ve 16 saat süreyle moleküllerin altın nanoçubuklarla etkileşmesini sağlamak için çalkalayıcıda belirli bir hızda karıştırılmıştır. Aynı prosedür kullanılarak 15 mM 4-MBA ile 5 mM PEG tiyol asit de etanol çözeltisi içerisinde altın nanoçubuklar ile etkileştirilmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi çözünürlük problemi yüzünden, 15 mM 4-MBA ile 5 mM PEG tiyol ise 1:1 oranında hazırlanmış su:etanol çözeltisi içerisinde altın nanopartiküller ile etkileştirilmiştir. Altın nanoçubukların yüzeyine bağlanmayan moleküller 10000 rpm devirde santrifüjlenerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen bu modifiye altın nanopartiküller, modifiye altın yüzeylerle farklı kombinasyonlar elde edilecek şekilde etkileştirilmiştir ve değişen glikoz derişimine karşı YGRS sinyalleri alınmıştır. Bu sonuçlara göre en yüksek ve doğrusal sinyal elde edilen platformla çalışmaya karar verilmiştir.

Fakat bununla beraber farklı oranlarda ligand kullanılarak altın nanoçubuklar modifiye edildiğinde, PEG tiyol ve PEG tiyol asit için sonucun değişip değişmediğini görmek amacıyla altın nanoçubuklar, ligand oranları değiştirilerek modifiye edilmiştir. Bu amaçla altın yüzeyler toplam derişimi 20 mM olacak şekilde 1/1 oranında 4-MBA/ligand bileşiminde hazırlanmıştır. Yüzeylerle etkileştirilmek üzere kullanılan altın nanoçubuklar ise yine toplam derişimi 20 mM olacak şekilde 1/1, 1/3, 3/1 oranlarında 4-MBA/ligand bileşimlerinde hazırlanmıştır. Farklı oranlarda 4-MBA/ligand kullanılarak hazırlanan platformların glikoza karşı cevapları incelenmiştir. Burada artan glikoz derişimine karşı, boronik asite ait 1070 cm^{-1} 'deki YGRS sinyal şiddeti grafiğe geçirilmiştir.

Yüzey modifikasyonlarında ligand olarak DT kullanılmasına karar verildikten sonra hem altın levha yüzeyine hem de altın nanoçubuk yüzeyine bağlanan 4-MBA ve DT moleküllerinin molar oranı optimize edilmiştir.

Altın levha yüzeyinde 4-MBA/DT molar oranının optimizasyonu

YGRS platformu hazırlanırken kullanılan ligandların oranı ile glikoz moleküllerinin yüzeye bağlanma miktarı değişeceği için 4-MBA ve ligandların molar oranları optimize edilmiştir. Burada amaç glikoz moleküllerinin yüzeye maksimum oranda tutunmasını sağlamaktır. En yüksek miktarda bağlanmayı sağlamak için altın levha yüzeyinin modifikasyonu farklı konsantrasyon oranlarında 4-MBA/DT karışımı kullanılarak çalışılmıştır. Bunun için toplam konsantrasyonu 20 mM ve 4-MBA/DT konsantrasyon oranları 1/1, 1/3, 1/5 ve 3/1 olacak şekilde çözeltiler hazırlanmış ve yüzeylerle etkileştirilmiştir. Altın levha yüzeyine bağlanan ligandların miktarı optimize edilirken hidrofobik etkileşimlerle yüzeye tutturulan altın nanoçubukların yüzeyinde ise 4-MBA/DT konsantrasyon oranı 1/3 olarak sabit tutulmuştur. Bu farklı derişim oranlarında hazırlanan yüzeylerin glikoz ile etkileşimini incelemek için 4 mM glikoz ile çalışılmıştır. Hazırlanan platformların glikoz konsantrasyon karşı cevabı grafiğe geçirilmiştir.

Altın nanopartikül yüzeyinde 4-MBA/DT molar oranının optimizasyonu

YGRS platformu hazırlanırken kullanılan altın yüzeylerindeki ligandların oranı belirlendikten sonra aynı şekilde altın nanoçubuklar için de optimizasyon çalışması yapılmıştır. Altın nanoçubuk yüzeyinin modifikasyonu farklı derişim oranlarında 4-MBA/DT karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için toplam derişim 20 mM ve 4-MBA/DT derişimleri sırasıyla 1/1, 1/3, 1/5 ve 3/1 oranında olacak şekilde hazırlanan çözeltiler ile altın nanopartikül yüzeyleri kendiliğinden düzenlenme tekniğiyle modifiye edilmiştir. Altın nanoçubuklar, bir önceki aşamada optimize edilerek 1/1 oranında 4-MBA/DT karışımı ile modifiye edilen altın levha yüzeyine hidrofobik etkileşimlerle tutturulmuştur. Bu farklı derişim oranlarına sahip 4-MBA/DT çözeltileri ile hazırlanan nanoçubuk yüzeyleri kullanılarak oluşturulan YGRS platformu kullanılarak glikoz tayini gerçekleştirilmiştir. Bunun için 4 mM glikoz çözeltisi ile çalışılmış ve sonuçlar grafiğe geçirilmiştir.

Analiz platformunda pH'nın etkisi

Altın levha ve nanoçubukların modifikasyonu için kullanılacak olan ligandları belirleyip optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra, boronik asit-glikoz etkileşiminin en yüksek

olduğu pH'nın belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Literatürden ve daha önceki çalışmalarımızdan bilindiği üzere boronik asit ve glikoz etkileşiminin gerçekleşmesi için pH'nın 6-10 arasında olması gereklidir. Bu pH aralığında tampon çözeltiler hazırlanarak glikoz tayininde optimum pH belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için daha önce anlatıldığı gibi modifiye edilen YGRS platformlarına, pH 6-10 aralığındaki çözeltiler kullanılarak hazırlanan 4 mM glikoz ilave edilmiş, 20 dk. süreyle bekletilmiş ve yüzeyler ile glikozun etkileşmesi sağlanmıştır. Bağlanmayan glikozu uzaklaştırmak için yüzeyler yıkanmış daha sonra Raman spektrumları alınmıştır.

Glikoz molekülleri ile yüzey etkileşim süresinin optimizasyonu

Uygun ligand, yüzey modifikasyonunda ligandların uygun derişim oranları ve çözeltinin pH'ı belirlendikten sonra hazırlanan platform ile glikoz moleküllerinin etkileşim süresinin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun için optimum koşullarda hazırlanan platform üzerine, pH 9 tamponunda 4 mM glikoz içeren çözelti ilave edilmiş ve etkileşim için farklı sürelerde bekletilmiştir. Glikoz molekülleri yüzeyle etkileştikten sonra yüzeye tutunmayan molekülleri uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılmış ve daha sonra Raman spektrumları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilmiştir.

Kararlılık çalışması

Hazırlanan YGRS platformunun ne kadar süre ile kullanılabileceğini test etmek amacıyla kararlılık çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada hazırlanan YGRS platformları 8 mM glikoz çözeltisinin analizi için, hazırlandığı gün, bir gün sonra, 15 gün sonra ve 2 ay sonra kullanılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Kalibrasyon grafiğinin oluşturulması

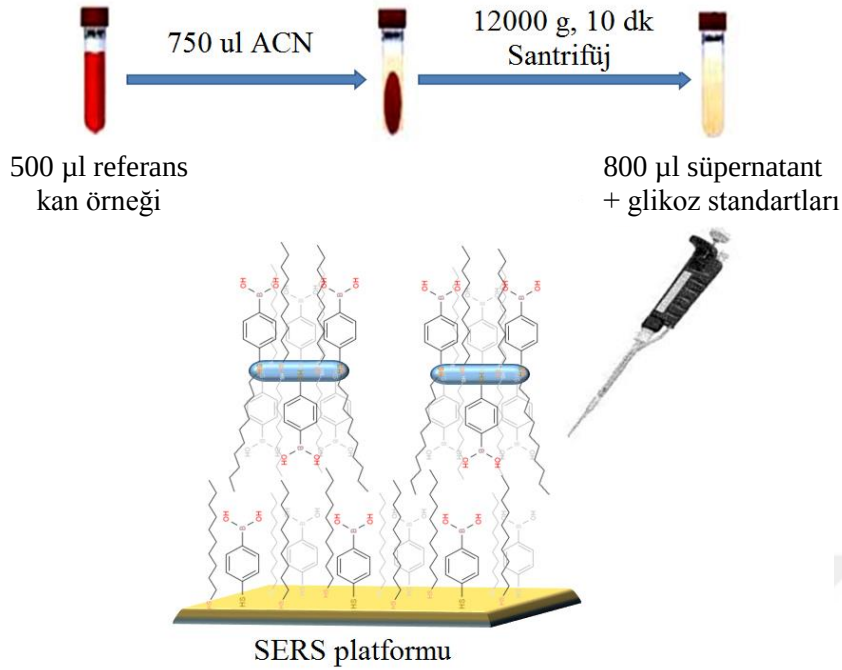
Optimum koşullarda hazırlanan platform ile 5 dk. yüzey-glikoz etkileşim süresinde ve 2-14 mM glikoz konsantrasyonu aralığında glikoz ölçümleri yapılmıştır. Bu aralıkta artan glikoz konsantrasyonu ile boronik asite ait olan 1070 cm^{-1} 'deki pik şiddeti takip edilmiş ve YGRS sinyal şiddetine karşı Raman kayması (cm^{-1}) grafiğe geçirilmiştir.

Kan ortamında girişim etkisi yapabilecek moleküllerin sonuçlara etkisi

Sağlıklı bir insanın kan şekeri seviyesi 4,4-6,6 mM konsantrasyon aralığındadır. Pankreas yeteri kadar insülin üretmediğinde veya üretilen insülin etkili bir şekilde kullanılamadığında şeker hastalığı ortaya çıkmaktadır ve kandaki glikoz miktarının belirlenmesi şeker hastaları için önem arz etmektedir. Bu yüzden hazırlanan platformun kan örnekleri için uygulanabilirliği araştırılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce gerçek örnek analizi yapılırken, kan matrisinde girişim oluşturabilecek türlerin etkileri incelenmiştir. Bu amaçla boronik asit ve glikoz moleküllerinin etkileşimi sırasında girişim oluşturabileceği düşünülen, diol gurupları içeren ve kanda glikoz ile beraber bulunan dopamin (DA), ürik asit (UA) ve askorbik asitin (AA) girişim etkileri incelenmiştir. Kan örneği içerisinde bu moleküllerin miktarının glikoz molekülünden yaklaşık 50 kat daha az olduğu bilinmektedir. Bu amaçla çalışmalarda 4 mM glikoz içeren çözeltide, girişim yapabilecek moleküllerin etkisi, 0,1-0,5 mM konsantrasyon aralığında incelenmiştir. Ölçümler YGRS platformu üzerine 4 mM glikoz ve artan derişimlerde girişim yapan moleküller eklendikten sonra boronik asitteki B-OH gerilme bandına ait olan 1070 cm^{-1} 'deki pikin şiddetindeki değişim incelenmiştir.

Gerçek örnekte glikoz tayini

Hazırlanan bu YGRS platformu ile gerçek örnekte glikoz tayininin yapılabilirliği test edilmiştir. Bu amaçla referans kan örneğinde glikoz tayini için hazırlanan sistem şekil 3.2'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.2. Referans kan örneğinde glikoz tayininin şematik gösterimi

Yukarıdaki şemada görüldüğü gibi, kan örneğinden serum proteinlerinin ayrılması için klasik bir yöntem olan asetonitril (ACN) ile çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Bunun için, beş farklı santrifüj tüpüne 500'er µL referans kan örneği alınmış ve proteinleri çöktürmek için üzerine 750'şer µL ACN eklenmiştir. Hazırlanan örnekler 12000 g'de, 10 dk. süreyle, oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen supernatantların 800'er µL'si temiz tüplere alınmıştır. Sonrasında 0,1 M borik asit/borat tamponu (pH 9,0) içerisinde stok glikoz çözeltisi hazırlanmıştır. Süpernantantları içeren çözeltilere son konsantrasyonları 2, 4, 6, 8, 10 mM olacak şekilde, hazırlanan stok glikoz çözeltisinden ilave edilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin hacimleri borat tamponu ile 1000 µL'ye tamamlanmıştır. Aynı prosedür kullanılarak farklı bir tüpte glikoz eklenmemiş bir örnek hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerin homojenliğini sağlamak için vorteks ile karıştırılmış ve YGRS platformu ile örnekler etkileştirilmiştir. Daha sonra bağlanmayan glikoz moleküllerinin yüzeyden uzaklaştırılması için 3 kez deiyonize su ile yıkama yapılmıştır. Yaklaşık 3 µm spot büyüklüğüne sahip lazer ışığı 20X objektif lens kullanılarak odaklanmış ve örnekle etkileştirilmiştir. Platformun 500–1800 cm^{-1} aralığında YGRS sinyalleri 140 mW lazer gücü kullanılarak 20 s etkileşim süresinde elde edilmiştir. Her bir örnek için 10 farklı bölgeden ölçüm alınmış ve bu verilerin ortalaması alınarak YGRS

sinyal şiddetleri hesaplanmıştır. Standart ekleme yöntemi ile kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

Kağıt tabanlı mikro akışkan çip kullanımı ile glikoz tayini

Tam kan örneğinde glikoz tayini için kağıt tabanlı mikro akışkan çip tasarlanmıştır. Nitroselüloz membran kullanılarak kan matriksinden kan hücreleri ve proteinler ayrılmış ve daha sonra glikoz tayini gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk önce nitroselüloz membranda hidrofilik kanal oluşturmak üzere kağıt üzerine desen çizilmiş ve mum baskılama yöntemi ile hidrofobik duvarlar oluşturulmuştur. Daha sonra altın nanoçubuklar 4-MBA ve DT ile modifiye edilmiş ve bu partiküller kağıt yüzeyinde YGRS ölçüm alanına uygulanmış ve kurutulmuştur. Böylece hazırlanan mikro akışkan çipler kullanılarak kandaki glikoz seviyesinin ölçümü hiç bir ön işlem uygulanmadan YGRS ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hazırlanan çipler SEM kullanılarak da karakterize edilmiştir.

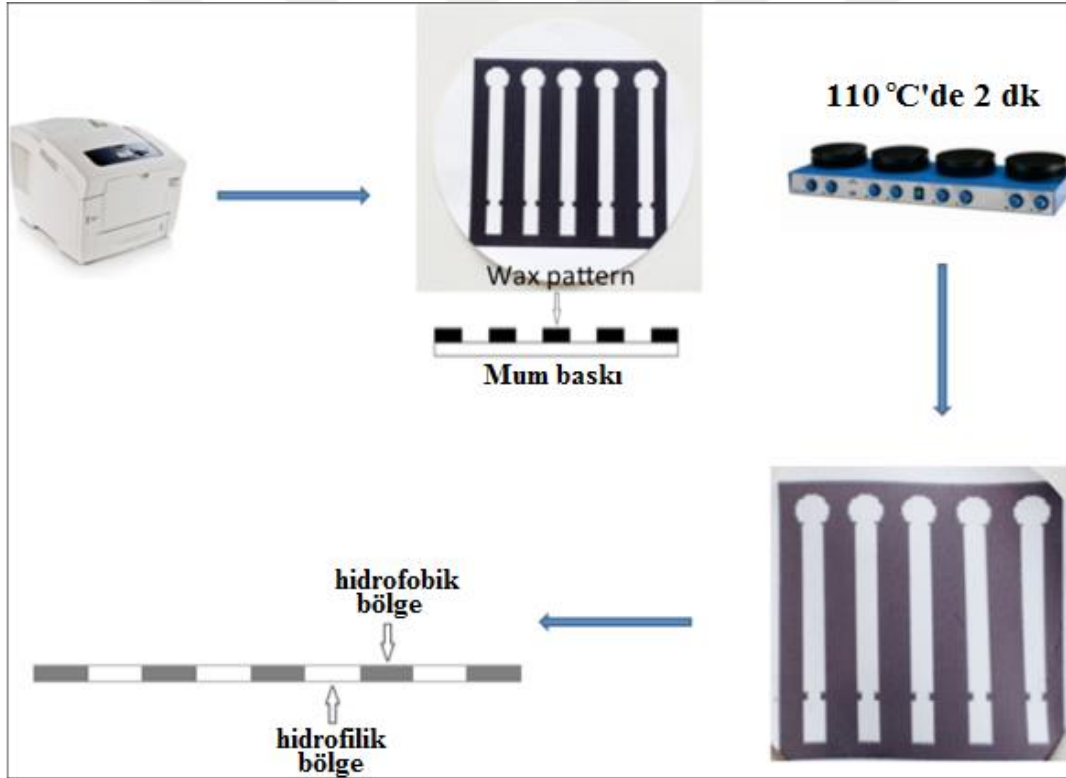
Altın nanoçubuk sentezi ve modifikasyonu

Çalışmada çekirdek büyütme yöntemi kullanılarak altın nanoçubuk sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk önce altın çekirdek sentezlenmiş ve bu çekirdekler büyütme çözeltisine alınarak nanoçubuk üretilmiştir. Glikoz moleküllerini yakalamak için, altın nanoçubukların yüzeyi 4-MBA ve DT ile modifiye edilmiştir. Bunun için altın nanoçubuklar 10 mM 4-MBA ve 10 mM 1-DT içeren 2 ml etanol çözeltisine alınmış ve bir gece boyunca sürekli karıştırılarak etkileşmesi için beklenmiştir. Hazırlanan bu çözelti santrifüjlenerek bağlanmayan 4-MBA ve DT uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bu modifiye parçacıklar YGRS ölçüm yüzeyini oluşturmak için kullanılmıştır.

Kağıt tabanlı mikro akışkan çiplerin üretilmesi

Kağıt tabanlı mikro akışkan çiplerin üretilmesi için ilk basamak nitroselüloz membran yüzeyine mikro kanalların baskılanmasıdır. Bu amaçla selüloz nitrat membran üzerine desen çizilerek mum ile baskılama yapılmıştır. Kapiler akışı sağlamak için kanallar 1 mm çapında, 2 cm uzunlukta olacak şekilde tasarlanmıştır. YGRS ölçüm alanı 12 mm² çapında hazırlanmıştır. İkinci önemli basamak ise mumun kağıt içerisine nüfuz etmesi aşamasıdır. Mum baskılanmış selüloz nitrat membran, içerisine mumun nüfuz etmesini sağlamak

amacıyla ısıtıcı ile 110 °C'de 2 dk. boyunca ısıtılmıştır. Burada ısıtma sıcaklığının büyük önemi vardır. Mum baskılar 130 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda deforme olabilirler. Bunun yanında nitroselüloz membran 200 °C'de yüksek oranda yanıcıdır. Bu yüzden ısıtma sıcaklığı iyi ayarlanmalıdır. Isıtma işleminden sonra mum baskılanmış nitroselüloz membranlar 1-2 dakika içerisinde oda sıcaklığına getirilmiştir. Bu yöntemle hidrofobik desenler ve hidrofilik kanallar oluşturulmuştur. Mum baskılama işlemi yaklaşık 10 dk. içerisinde tamamlanmıştır. Baskılama işleminden sonra 1-3 µL modifiye altın nanoçubuk çözeltisi, mum baskılanmış nitroselüloz membranın hidrofilik kanalının uç bölgesine damlatılarak uygulanmış ve YGRS ölçümü için platform oluşturulmuştur. Şekil 3.3'de hazırlanan kağıt tabanlı mikro akışkan çiplerin üretim şeması yer almaktadır (Torul ve diğerleri, 2015).



Şekil 3.3. Kağıt tabanlı mikro akışkan çiplerin üretim şeması

Kağıt tabanlı mikro akışkan çipler hazırlandıktan sonra ve ayrıca kan örneği ile etkileştikten sonra SEM ölçümleri alınarak karakterize edilmiştir. Bunun için örnekler altınla kaplanmış ve 10-15 kV' da SEM ölçümleri alınmıştır. Bunun yanında modifiye altın nanoçubukların kağıt yüzeyindeki davranışını görmek için de YGRS ölçümleri alınmıştır.

Kağıt tabanlı mikro akışkan çipler için yöntem optimizasyonu

Altın nanoçubuk çözeltisi miktarının optimizasyonu

Nitroselüloz membran yüzeyine immobilize edilen altın nanoçubuk çözeltisinin miktarı optimize edilerek Raman sinyal şiddeti artırılmıştır. Bu amaçla farklı hacimlerde ve damla sayısında altın nanoçubuk çözeltileri, YGRS ölçüm alanı oluşturmak üzere membran yüzeyine damlatılmıştır. Her bir kombinasyon için yüzeylere ait YGRS sinyalleri ölçülmüş ve sonuçlar grafiğe geçirilmiştir.

Kan miktarının optimizasyonu

Glikoz moleküllerinin kan matriksinden yüksek verimle ayrılabilmesi için deneylerde kullanılacak kan örneğinin hacmi optimize edilmiştir. Bunun için 3 ve 10 μL arasında kan örnekleri ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Daha sonra Raman ölçümleri alınmış ve sonuçlar karşılaştırılarak deneylerde çalışılacak örnek hacmine karar verilmiştir.

Etkileşim süresinin optimizasyonu

En yüksek Raman sinyalini elde etmek için örneği çipe damlattıktan sonra ölçüm için beklenen sürenin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum etkileşim süresi, hidrofilik kanal boyunca kan örneğinin akışı takip edilerek belirlenmiştir.

Kan ortamında girişim yapabilecek moleküllerin sonuçlara etkisi

Bilindiği gibi glikoz molekülleri ile birlikte kan örneğinde var olan ve glikoz tayini sırasında girişim oluşturabilecek türler mevcuttur. Bu yüzden glikoz moleküllerinin bu girişim yapan türlerin varlığında seçici bir şekilde tayininin yapılması için bir yöntem geliştirilmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada, askorbik asit (AA), ürik asit (UA) ve dopamin (DA) gibi olası girişim yapabilecek türlerin etkisi, geliştirilen kağıt tabanlı YGRS çipleri kullanılarak incelenmiştir. Girişim yapabilecek türler farklı konsantrasyonlarda olacak şekilde, modifiye membran yüzeyine damlatılmış ve B-OH gerilme bandına ait olan 1070 cm^{-1} 'deki Raman pikinin değişimi incelenmiştir.

Kağıt tabanlı mikro akışkan çip kullanılarak gerçek örnekte glikoz tayini

Kan hücrelerinin ve proteinlerin ayrımını sağlamak için, 20 kat seyreltilmiş kan örneği kağıt çipin üzerine damlatılmıştır ve glikoz molekülleri YGRS ölçüm alanına doğru hareket ederek modifiye altın nanoparçacıklarla etkileşmesi için beklenmiştir. YGRS ölçümleri, 785 nm lazer kaynağı ve CCD dedektör içeren DeltaNu Examiner Raman mikroskobu (Deltanu Inc., Laramie, WY) ile gerçekleştirilmiştir. Serum YGRS aktif bölgeye ulaştığı zaman ölçümler alınmıştır. Çalışmada pH 9 borat tamponunda farklı konsantrasyonlarda glikoz çözeltileri hazırlanmış ve son konsantrasyonları 0.5 ve 10 mM olacak şekilde referans kan örneğine ilave edilmiştir. Daha sonra hazırlanan örnekler son hacmi 1 ml olacak şekilde tampon çözelti ile seyreltilmiştir. Hazırlanan bu örnekler kağıt çiplere damlatılmış ve 5 dk beklendikten sonra kan hücreleri ve proteinler ayrılarak numunenin serum kısmının YGRS ölçüm alanına kadar ilerlediği gözlenmiştir. Protein ve hücre kalıntıları örnek akışı sırasında nitroselüloz membranda hidrofilik kanal içerisinde hapsolmuştur. Daha sonra da 500-1800 cm^{-1} dalga sayısı aralığında örneklerin YGRS spektrumları alınmıştır. Yaklaşık 3 μm spot büyüklüğüne sahip lazer ışığı 20X objektif lens kullanılarak odaklanmış ve örnekle etkileştirilmiştir. YGRS sinyalleri 140 mW lazer gücü kullanılarak 20 s etkileşim süresinde elde edilmiştir. Her bir örnek için 10 farklı bölgeden ölçüm alınmış ve bu verilerin ortalaması alınarak YGRS sinyal şiddetleri hesaplanmıştır. YGRS aktif bölgedeki takip edilen Raman bantlarının sinyal şiddetleri, glikoz molekülleri ile etkileşmeden önce ve sonra kaydedilmiştir ve sinyal şiddetleri arasındaki değişim incelenmiştir.

3.2.2. Kanser biyobelirteç tayini için yöntem geliştirilmesi

Tezin ikinci çalışmasında ise yatay akış test stripleri hazırlanarak karaciğer, akciğer, pankreas, rahim ve meme kanseri gibi kanser türlerinin tanısı için kanser biyobelirteci olan karsino embriyonik antijenin (CEA)'nin tayini yapılmıştır. Bu çalışmada floresans sinyalleri cep telefonu tabanlı floresans mikroskop kullanılarak elde edilmiştir. Bu bölümde ilk önce CEA tayini için hazırlanan yatay akış test striplerinin üretim aşamasına ve daha sonra ise üretilen stripler kullanılarak CEA tayininin yapılacağı floresans mikroskobun hazırlanma aşamasına yer verilmiştir. Test striplerinin üretim aşaması; Qdot tabanlı etiketlerin hazırlanması, test ve kontrol hatlarını oluşturmak için altın nanopartikül-antikor komplekslerinin hazırlanması ve yatay akış test striplerinin hazırlanması olmak

üzere üç başlık altında detaylandırılmıştır. Son olarak mikroskobun üretimi ve analiz prosedürü açıklanmıştır.

Qdot-CEA monoklonal antikor konjugatının hazırlanması

Biyotin ve streptavidin yapıları arasında kısa sürede güçlü bir bağlanma ilgisi olduğu için Qdot-CEA monoklonal antikor konjugatının hazırlanmasında, biyotin-streptavidin etkileşim mekanizmasından yararlanılmıştır. Kısaca, 1 μ M Qdot stok çözeltisinin 10 μ l'si ve 1mg/ml monoklonal antikorun 20 μ l'si karıştırılmış, 170 μ L 0,01 M fosfat tamponu (PBS) (pH 7,4) ile seyreltilmiştir. Hazırlanan bu çözelti oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılarak inkübe edilmiştir. Daha sonra bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması nanosep santrifüj tüpü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle, nanosep santrifüj tüpüne 400 μ l PBS çözeltisi alınmış 5000 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve bu işlem iki kez tekrar edilerek tüpün şartlanması sağlanmıştır. Daha sonra Qdot-CEA monoklonal antikor konjugatlarını ve bağlanmayan türleri içeren çözelti, şartlanmış olan nanosep santrifüj tüpüne alınmış ve 5000 rpm devirde 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Filtre yüzeyinde kalan Qdot-CEA monoklonal antikor konjugatları 200 μ l, 0,5% BSA çözeltisi ile toplanmıştır. Hazırlanan bu stok çözelti, % 1 BSA, % 7 Sukroz, % 2 PEG 300, ve % 0,1 Tween-20 içeren fosfat tamponu ile 10 kat seyreltilmiştir. Seyreltilen bu çözelti sükroz moleküllerinin konjugatları tamamen sarması için gece boyunca 4°C'de saklanmıştır. Böylece şeker molekülleri tarafından çevrelenen Qdot-CEA monoklonal antikor konjugatları konjugasyon pedine yapışmayacak ve konjugatların pedden salınımı kolaylaştırılmış olacaktır.

AuNP-CEA poliklonal ve ikincil antikor konjugatlarının hazırlanması

AuNP-CEA poliklonal ve ikincil antikor konjugatlarının hazırlanması için, biyotinli antikorlar streptavidin bağlı altın nanoparçacıklarla inkübe edilmiştir. Bu amaçla 50 μ l streptavidin bağlı altın nanoparçacık çözeltisi koruyucusunun uzaklaştırılması için 10000 rpm devirde 30 dk boyunca santrifüj edilmiştir ve altın parçacıklar 50 μ l 0.01 M PBS (pH 7,4) içerisine alınmıştır. Bu çözelti içerisine 50 μ l, 100 μ g/ml biyotinli poliklonal antikor çözeltisi ilave edilmiş ve oda koşullarında karıştırılarak 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyondan sonra bağlanmayan antikorlar nanosep santrifüj tüpü kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Safılaştırılan AuNP-CEA poliklonal antikorlar, açıkta kalan yüzeylerin

bloke edilmesi için % 1 BSA içeren fosfat tamponuna alınmıştır. Aynı prosedür kullanılarak AuNP-CEA ikincil antikor konjugatı da hazırlanmıştır. Her iki AuNP-CEA poliklonal ve ikincil antikor çözeltisi, kullanılabileceği kadar 4 °C’de saklanmıştır.

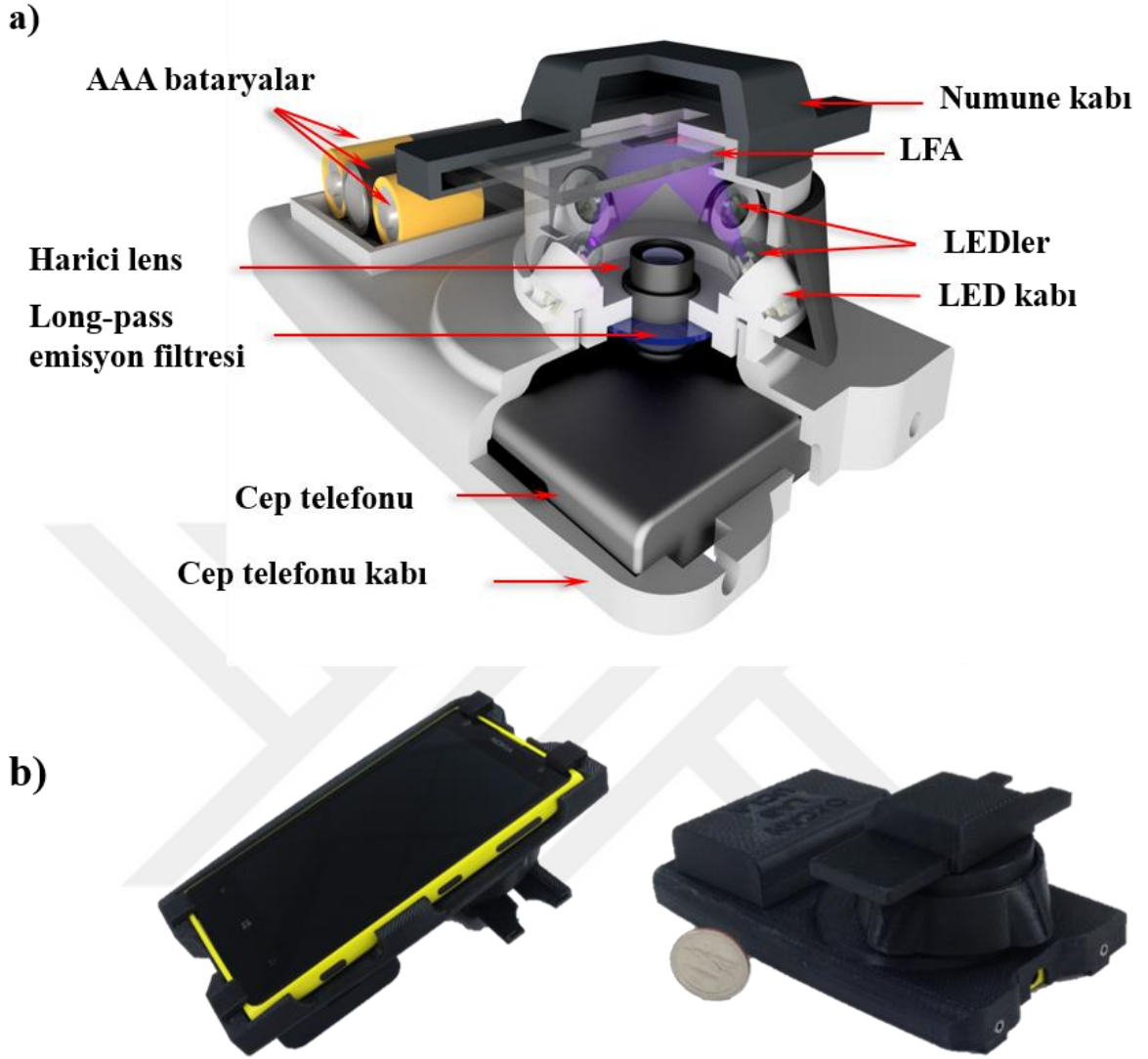
Yatay akış test striplerinin hazırlanması

Yatay akış test stripleri temel olarak numune uygulama pedi, konjugasyon pedi, analitik membran ve absorban ped olmak üzere dört bileşenden oluşmaktadır. Bu çalışmada, numune uygulama pedi olarak kan hücrelerinin ayrımı için de uygun olan lifli yapıda cam ped kullanılmıştır. İlk önce numune uygulama pedi, lazer kesici ile 3 mm x 2.2 cm boyutlarında parçalara kesilmiştir. Daha sonra ise örnekteki proteinlerin pede tutunup kalmasını engellemek için pedler, % 1,0 BSA ve % 0,1 Tween-20 içeren 10 mM fosfat tamponu ile 1 saat boyunca etkileştirilerek bloke edilmiştir ve 37°C’de 2 saat süre ile kurutulmuştur. Konjugasyon pedi olarak yine lifli yapıda fakat daha seyrek istiflenmiş bir cam ped kullanılmıştır. Belirli hacimde 10 kat seyreltilmiş Qdot-CEA monoklonal antikor çözeltisi konjugasyon pedine uygulanmıştır ve inkübatörde 37°C’de 45 dk. süre ile kurutulmuştur. Qdot-CEA monoklonal antikor yüklenen konjugasyon pedi lazer kesici ile 2 mm x 5 mm boyutlarında kesilmiştir ve kullanılabileceği kadar 4°C’de saklanmıştır. Analitik membran olarak nitroselüloz membran kullanılmıştır. Membran üzerinde test hattını oluşturmak için belirli hacimde AuNP-CEA poliklonal antikor ve kontrol hattını oluşturmak için ise AuNP-CEA ikincil antikor çözeltisi, yatay akış dağıtıcısı ile membran yüzeyine uygulanmıştır. Hatların kuruması için oda sıcaklığında 30 dk. bekletilmiştir. Daha sonra test ve kontrol hatlarını bulunduran nitroselüloz membran, %1 kazein içeren bloke etme çözeltisine daldırılmış ve 30 dk. boyunca çalkalayıcıda karıştırılarak bloke edilmiştir. Daha sonra fazla deterjanı uzaklaştırmak amacı ile 10 mM sodyum fosfat, 0,15 M NaCl ve % 0,05 Tween-20 içeren PBS-T (pH 7,5) ile çalkalayıcıda 5 dk karıştırılarak 3 kez yıkanmıştır ve oda sıcaklığında 1 saat kurutulmuştur. Hazırlanan analitik membran jilet kullanılarak 2 mm x 2 cm boyutlarında kesilmiştir. Pamuk lifinden oluşan absorban ped de lazer kesici kullanılarak 4 mm x 2.2 cm boyutlarında kesilmiştir. Sonuç olarak, bütün bu bileşenler mikroskop camı üzerinde çift taraflı bant kullanılarak birleştirilmiştir. Çözelti akışını sağlamak için bütün bileşenler 2 mm örtülecek şekilde sıralanmıştır. Hazırlanan yatay akış test stripleri kararlılıklarının sağlanması için karanlık bir ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Cep telefonu tabanlı floresans mikroskobun tasarlanması

Cep telefonu tabanlı floresans mikroskobun tasarlanması için Nokia Lumia 1020 kullanılmıştır. Bu cep telefonu 1.5GHz çift çekirdek işlemci, BSI-CMOS sensör, Qualcomm Snapdragon çip seti ve 2 GB belleğe sahiptir. Çözünürlüğü 41MP ve ayrıca resmi JPEG veya TIFF gibi formatlara dönüştürmeden önceki işlenmemiş veriyi saklama özelliğine sahip olduğu için tercih edilmiştir. Bu sayede elde edilen sonuçlarda veri kaybı olmadan görüntü işleme gerçekleştirilir. Piksel boyutu 1.12 μm , ön kamera odak mesafesi, f 7.2 mm ve diyafram açıklığı f/2.2 dir. Bu telefon ayrıca white balans, odak, ISO hızı, etkileşim süresi ve zıtlık gibi kamera parametrelerinin ayarlanmasına olanak sağlar. Bu sayede elde edilen fotoğrafların çözünürlüğü artırılabilir.

Geliştirilen cep telefonu tabanlı floresans mikroskobu ile yaygın olarak kullanılan hızlı tanı test (Rapid diagnostic test-RDT) okuyuculara alternatif olarak miniatürize bir tasarım hazırlanmıştır. Bunun için ise yukarıda özellikleri verilen cep telefonuna düşük maliyetli optik bileşenler ilave edilmiştir. On iki mm çapında ve 24 mm odak mesafesine, diyafram açıklığı f2 olan bir plano-konveks lens kullanılmıştır. Kullanılan bu harici lens, cep telefonunun mevcut lensinin önüne yerleştirilmiştir. Bu iki lensin birlikte kullanılması yatay akış test strip yüzeyi ve cep telefonunun CMOS sensör yüzeyi arasında yaklaşık 3.33 gibi bir büyüme faktörü (f_2/f) sağlamıştır. Örneklerin floresans görüntüsünü elde etmek için, iki tane AA alkali pil ile güçlendirilen 4 tane UV-LED lamba, homojen aydınlatmanın sağlanabilmesi amacıyla eşit aralıklara sahip olacak şekilde yerleştirilmiş ve örneğin uyarılması sağlanmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere 395 nm dalga boyunda UV ışık emisyonu yapan LED'ler, çalışılan Qdot'ın uyarma dalga boyuna göre belirlenmiştir. LED'lerin bant genişlikleri 8-10 nm olduğu için bir uyarma filtresi kullanma gerekliliği olmamıştır. Bunun yanında ışık kaynağının emisyonunu bloke etmek için 418 nm ve üzerini geçiren bir long-pass emisyon filtresi kullanılmıştır. Bu emisyon filtresi cep telefonunun mevcut lensi ve harici lens arasına yerleştirilmiştir. Geliştirilen cep telefonu tabanlı floresans mikroskobun mekanik parçaları ABS termoplastik materyal ile üç boyutlu yazıcı (3D-printed, Stratasys, Dimension Elite) kullanılarak basılmıştır. Cep telefonun yerleştirileceği parça değiştirilerek, farklı cep telefonlarına uyumlu hale de getirilebilmektedir. Ayrıca basit bir şekilde optik bileşenleri değiştirerek farklı türde RDT okuyucuları inşaa etmek de mümkündür.



Şekil 3.4. Cep telefonu tabanlı floresans mikroskobun (a) şematik gösterimi ve (b) fotoğrafları

CEA protein analiz prosedürü

Standart çözeltileri hazırlamak için 10,5 µg/ml stok CEA protein çözeltisi kullanılmıştır. Bu stok CEA çözeltisinden belirli hacimlerde kan örneklerine ilave edilerek son derişimleri 0,1-105,0 ng/ml aralığında olacak şekilde 21 farklı örnek hazırlanmıştır. Daha sonra PBS ilave edilerek kan örneklerinin 20 kat seyreltilmesi sağlanmıştır. Hazırlanan örneklerin 80 µl'si numune uygulama pedine damlatılmış ve analitik membran boyunca ilerleyip test ve kontrol hatları ile etkileşimleri için beklenmiştir. İmmünoreaksiyon gerçekleşikten sonra, yatay akış test stripleri cep telefonu tabanlı floresans mikroskobun numune haznesine

sürülmüş ve floresans görüntüleri alınmıştır. Daha sonra örneklerdeki CEA moleküllerinin miktarını bulmak için test ve kontrol hatlarının floresans şiddetleri hesaplanmıştır.

Yatay akış test stripleri için optimizasyon çalışmaları

Nitroselüloz membranda seçici olmayan bağlanmaları engellemek için yapılan optimizasyon çalışması

Nanopartikül tabanlı immünoassaylerde seçici olmayan bağlanma problemi çözülmesi gereken oldukça önemli bir zorluktur. Genellikle bu tür seçici olmayan bağlanma problemlerini çözmek için membran bloke edilir. Membranın bloke edilmesindeki asıl amaç etiketli nanopartikül konjugatlarının ve proteinlerin test ve kontrol hatları dışındaki membranın diğer bölgelerine bağlanmalarını önlemektir. Fakat bunların yanı sıra membranın hidrasyonunun sağlanması, membran emme hızının düzenlenmesi, test ve kontrol hatlarındaki proteinlerin stabilitesinin sağlanması gibi bir takım düzenlenmelerin sağlanması için de bloke etme işlemi önemlidir. Bloke etme işlemi genellikle protein, yüzey aktif madde ve polimer gibi maddeleri içeren bir çözücü içerisinde membranın daldırılması ile gerçekleştirilir. Bloke etme prosedürü, elde edilen ürünün kullanım süresi açısından en uygun performansın sağlanması için dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir. Ayrıca bloke etme işlemi tamamlandıktan sonra sıvının kurutulması işlemi de üründe oluşabilecek değişiklikleri en aza indirmek için optimize edilmelidir.

Bu çalışmada seçici olmayan bağlanmaları engellemek için ilk önce üç farklı çözelti denenmiştir. Bu çözeltilerden bir tanesi protein olarak % 5 Bovin serum albumin (BSA), yüzey aktif madde olarak % 0,1 Tween-20 ve polimer olarak da % 2 polivinil pirolidon (PVP) içermektedir. İkinci çözeltide ise yalnızca polimer değiştirilmiş ve polietilen glikol (PEG-400) kullanılmıştır. Sonuncusunda ise herhangi bir polimer kullanılmamıştır. Nitroselüloz membran bu çözeltilerin içerisinde daldırılmış ve iki saat boyunca çalkalayıcıda etkileşim için bekletilmiştir. Bu süre sonunda membran çözeltiden çıkartılmış ve bir saat oda sıcaklığında kurutulmuştur.

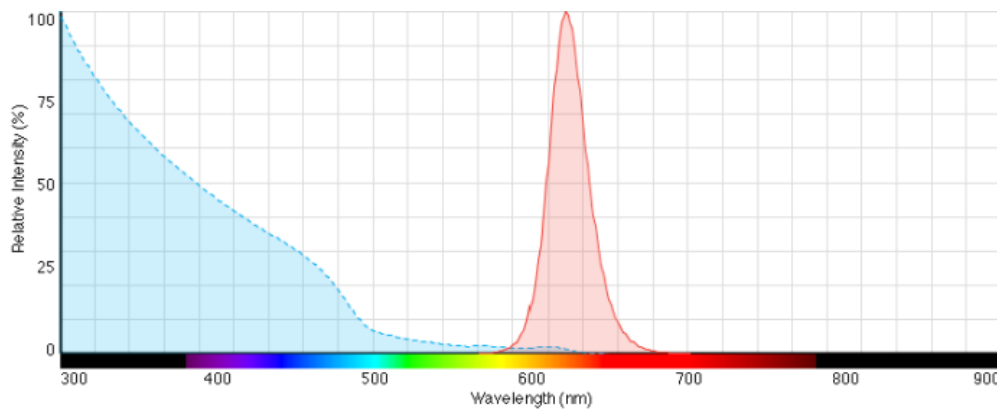
Bloke etme işlemi tamamlandıktan sonra numune uygulama pedi, konjugasyon pedi ve absorban ped de hazırlanarak stripler hazırlanmıştır. Numune uygulama pedine yalnızca

tampon çözelti damlatılarak konjuge Qdot'ların 15 dk. boyunca membrandan ilerlemeleri için beklenmiştir. Daha sonra mikroskop görüntüleri alınarak sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Bir kaç gün sonra hazırlanan test stripleri kullanıldığında membranda tıkanmaların olduğu ve numune akışının sağlanamadığı gözlenmiştir. Bu problemin çözümü için çeşitli çalışmalar yapılmış ve %1 kazein içeren farklı bir bloke etme çözeltisi kullanılmasına karar verilmiştir. Membran bloke edildikten sonra ise fazla kazeinin uzaklaştırılması için PBS-T ile yıkama yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar bir önceki çalışmada en iyi sonuç alınan PEG-400 içeren çözelti ile elde edilen sonuç ile karşılaştırılmıştır.

Qdot miktar optimizasyonu

Tez çalışmasında CEA antikorlarını işaretlemek için Qdot kullanılmıştır. Qdot'lar büyüklüklerine bağlı olarak değişen emisyon dalga boyuna, geniş absorpsiyon bandına, dar ve simetrik fotoluminesans spektrumuna, güçlü lüminesansa ve fotokararlılığa sahip olmaları gibi optik özellikleri dolayısıyla tercih edilmişlerdir. Literatürde yaygın olarak kullanılan Qdot'lar arasında en yüksek quantum verimliliğine sahip olanlar kadmiyum selenit (CdSe) ve kadmiyum tellürid (CdTe)'dir. Bununla beraber çekirdek kabuk yapısındaki Qdot'ların quantum verimliliğinin daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu yüzden çalışmada çekirdek kabuk yapısındaki çinko sülfid kaplı kadmiyum selenit (CdSe@ZnS) kullanılmıştır. Seçilen bu Qdot, 625 nm dalga boyunda maksimum emisyonaya sahiptir. Antikorları etiketleme kolaylığı açısından yaklaşık 20 nm çapında Qdot-streptavidin konjugatı kullanılmıştır ve absorpsiyon ve emisyon spektrumu Şekil 3.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.5. Streptavidin bağlı Qdot-625'e ait absorpsiyon ve emisyon spektrumları

Qdot tabanlı yatay akış testlerinde elde edilen floresans sinyali direkt olarak konjuge Qdot'ların test ve kontrol hatları üzerinde yakalanan miktarı ile ilgili olduğu için konjugasyon pedindeki Qdot miktarının optimize edilmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla konjuge Qdot çözeltisi farklı oranlarda seyreltilmiş ve 1,0 nM; 2,5 nM; 5,0 nM; 10,0 nM; 50,0 nM Qdot içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözeltiler konjugasyon pedine emme kapasitesi dikkate alınarak damlatılmış ve inkübatörde 37°C'de 1 saat kurumaya bırakılmıştır. Beş farklı derişimde Qdot konjugatı emdirilen konjugasyon pedlerinin her birinden 3 tane olmak üzere test stripleri hazırlanmış ve 10 ng/ml CEA protein içeren çözelti ile stripler test edilmiştir. Bununla beraber her bir derişim için yine üçer tane daha strip hazırlanmış ve CEA içermeyen tampon çözelti ile kör ölçümleri alınmıştır. Buna göre test hattının sinyal şiddetinin kontrol hattının sinyal şiddetine oranı (T/C) ve sinyalin gürültüye oranı (S/N) hesaplanarak grafiğe geçirilmiştir.

Etkileşim süresinin optimizasyonu

Hazırlanan yatay akış test stripleri kullanılarak gerçekleştirilen CEA tayininde en yüksek sinyali elde etmek için en uygun etkileşim süresi belirlenmiştir. Bu amaçla 3 farklı test stribine 10,0 ng/ml CEA protein içeren çözeltilerden damlatılmış ve farklı zamanlarda mikroskop görüntüleri alınmıştır. Sinyal şiddetleri hesaplanarak sonuçlar T/C ve S/N olmak üzere her iki şekilde de grafiğe geçirilmiştir.

Kan miktarının optimizasyonu

Gerçek örnekte CEA analizi yapmak için tam kan örneği kullanılmıştır. Farklı seyreltme oranlarında kan örnekleri hazırlanmış ve 10,0 ng/ml CEA spike edilmiştir. Daha sonra 5, 10, 20 ve 40 kat seyreltilen bu örnekler test striplerine damlatılarak CEA moleküllerinin test hattı ile etkileşmesi için beklenmiş ve mikroskop görüntüleri alınmıştır. Görüntülerden elde edilen sinyaller T/C ve S/N olarak grafiğe geçirilmiştir.

CEA protein tayini için yatay akış test striplerinin analitik performansının değerlendirilmesi

Bu çalışmada hazırlanan yatay akış test striplerinin analitik performansı optimum deney koşulları altında incelenmiştir. Bu amaçla CEA moleküllerinin tayini için geliştirilen

yöntemin hassasiyeti 0,1 ng/ml ve 105,0 ng/ml arasında farklı derişimlerde standart CEA protein çözeltileri ile test edilmiştir. Stok CEA protein, fosfat tamponu (PBS) (pH 7,4) ile seyreltilerek standartlar hazırlanmıştır. Artan CEA derişimine karşı elde edilen T/C değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak LOD değeri hesaplanmıştır.

Geliştirilen yöntemin kesinlik çalışmaları hem kan örneğine hem de tampon çözeltiye CEA protein spike edilerek hazırlanan örneklerle gerçekleştirilmiştir. Örnekler hazırlandıktan sonra kesinliğin ölçütü olan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla 0,1 ng/ml ile 105,0 ng/ml arasında 9 farklı derişimde CEA protein içeren örnekler hazırlanmıştır. Yani gün içinde her bir derişim için üç test stribi hazırlanmış ve örnekler test edilmiştir (Yatay akış test stripleri hazırlandıktan 3 saat sonra). Aynı zamanda hazırlanan yatay akış test striplerinin kullanım süreleri hakkında da fikir sahibi olmak amacı ile iki hafta sonra (Yatay akış test stripleri hazırlandıktan 340 saat sonra) çözeltiler 3 test stripi ile tekrar test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar kesinlik için bir sayısal ölçüt olan bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Ayrıca, test striplerinin örnek ile etkileşiminden ne kadar süre sonra sinyal kaybının gözlemlendiğini anlamak için kararlılık çalışması yapılmıştır. Bu amaçla dört farklı derişimde CEA moleküllerini içerecek şekilde kan örnekleri hazırlanmış ve test edilmiştir. Bu test striplerinin mikroskop görüntüsü farklı etkileşim sürelerinde alınmış ve T/C değerleri hesaplanmış ve sonuçlar grafiğe geçirilmiştir.

Tam kan örneğinde CEA protein tayini

Geliştirilen yöntemde Qdot tabanlı yatay akış testlerinin klinik çalışmalara uygulanabilirliğini göstermek için 20 kat seyreltilmiş ve farklı derişimlerde CEA katılmış tam kan örnekleri optimum koşullarda analiz edilmiştir. Bu amaçla 0,1 -105,0 ng/ml aralığında CEA içeren 21 kan örneği hazırlanmıştır. Bu örneklerin 80 µl'si her bir örnek için üç kez olacak şekilde Qdot tabanlı yatay akış test striplerine uygulanmış ve 20 dk sonra cep telefonu tabanlı mikroskop ile floresans görüntüleri alınmıştır. Bu görüntülere göre her bir örnek için T/C değerleri hesaplanmış ve grafiğe geçirilmiştir. Sonuçlar üç ölçümün standart sapması alınarak verilmiş ve grafik üzerinde hata çubukları ile gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Glikoz Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi

4.1.1. Kendiliğinden düzenlenme (SAM) tekniğiyle hazırlanan biyosensör ile glikoz tayini

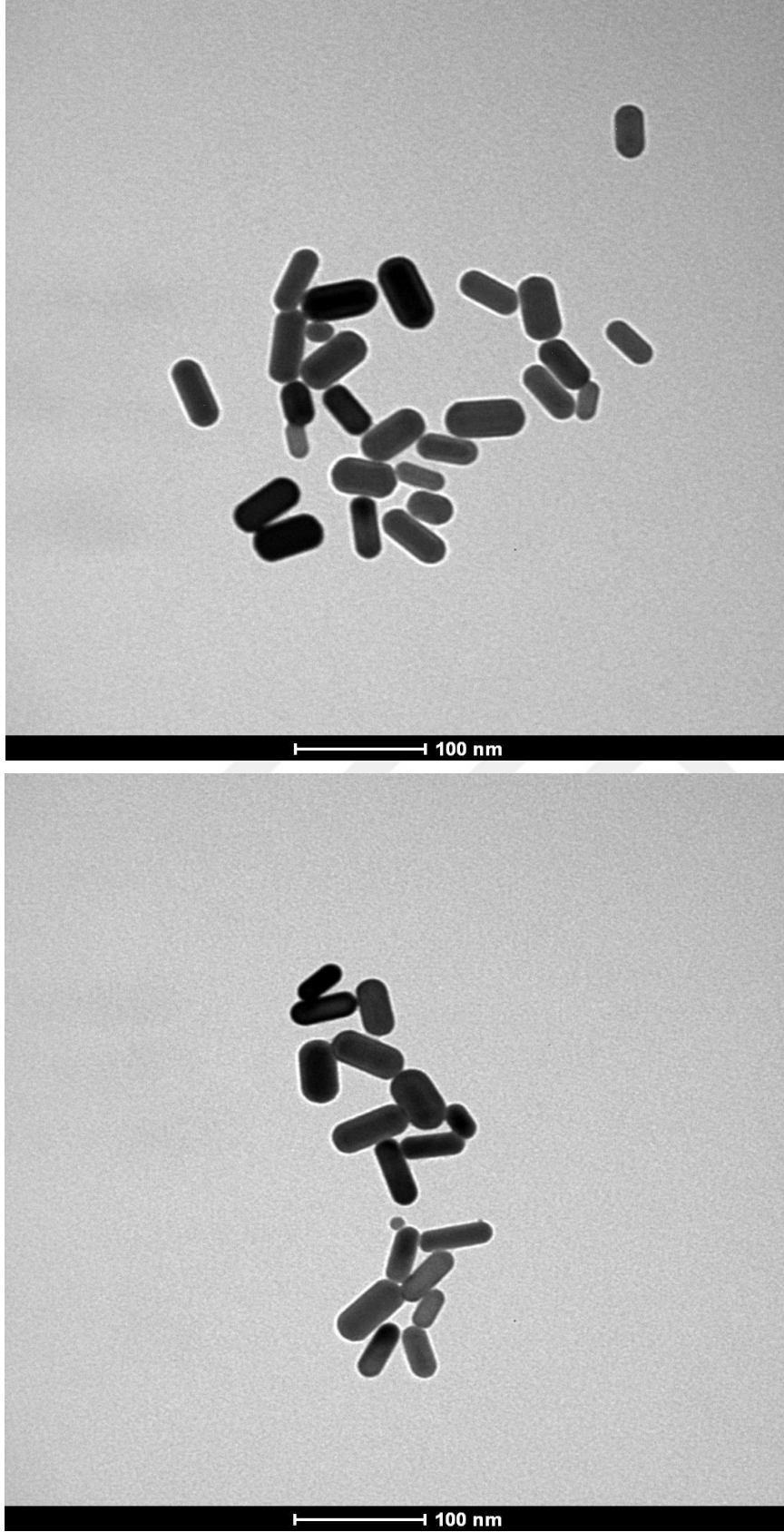
Glikoz tayini için kendiliğinden düzenlenme yöntemi ile YGRS platformu oluşturulmuştur. YGRS platformunu hazırlamak için altın nanopartiküller sentezlenerek, bu partiküller ve altın levha yüzeyi çeşitli ligandlarla modifiye edilmiş, daha sonra karakterizasyon ve optimizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Daha sonra ise optimize edilen yüzeylerle kan örneğinde glikoz tayini yapılmış ve deney sonuçları aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

Altın nanopartikül karakterizasyonu

Küresel yapıda ve çubuk şeklinde altın nanopartiküller sentezlenerek karakterize edilmiştir. Altın nanopartiküllerin karakterizasyonu için TEM görüntüleri alınmış, UV-Vis absorpsiyon spektrumları incelenmiş ve Zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

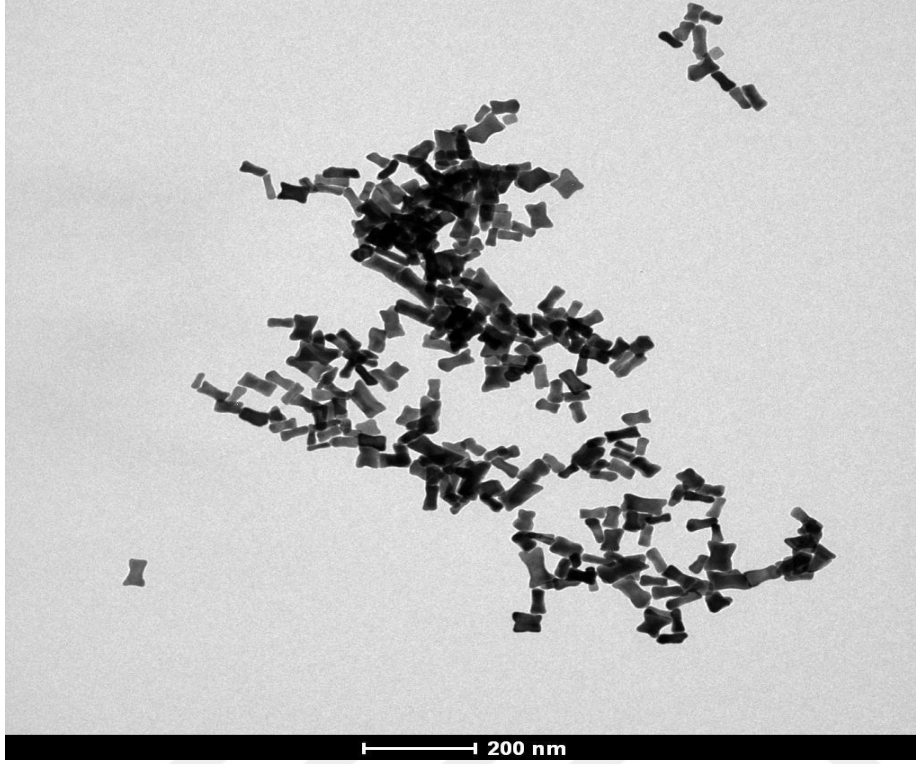
Altın nanoçubuk karakterizasyonu

Çubuk formunda sentezlenen altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü Resim 4.1’de verilmiştir. Elde edilen bu TEM görüntüsü üzerinden yapılan ölçümler sonucunda çubuk formunda altın nanopartiküllerin ortalama uzunluğu 48 ± 7 nm ve ortalama çapı 22 ± 5 nm olarak hesaplanmıştır. Ayrıca çubuk formundaki altın nanopartiküllerin en/boy oranlarının yaklaşık 1/3 olduğu bulunmuştur. Resim 4.1’den de görüldüğü üzere boyutları düzgün bir dağılım gösteren çubuk formunda altın nanopartiküllerin üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.



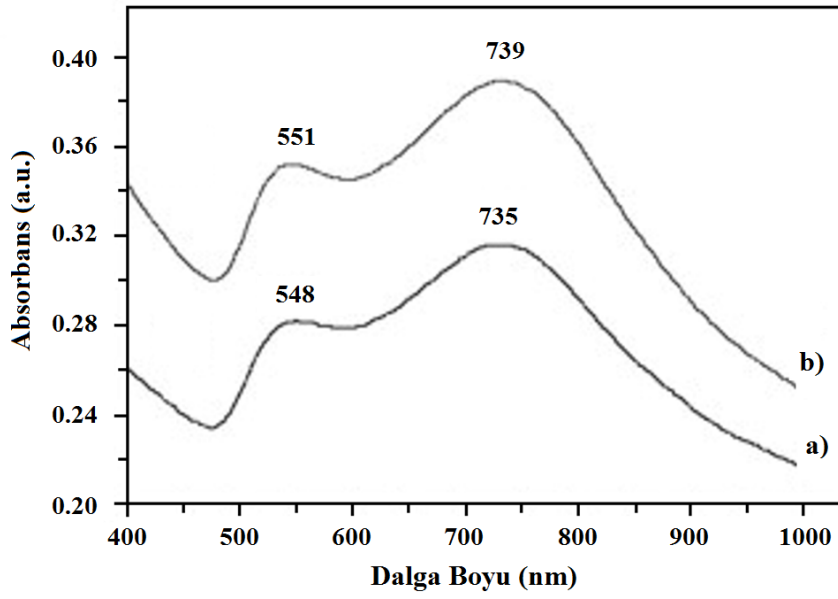
Resim 4.1. Çubuk formundaki altın nanopartiküllerin TEM görüntüleri

Üretilen çubuk formundaki nanopartiküllere ek olarak kemik şeklinde nanopartiküller de sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin TEM görüntüsü Resim 4.2’de verilmiştir.



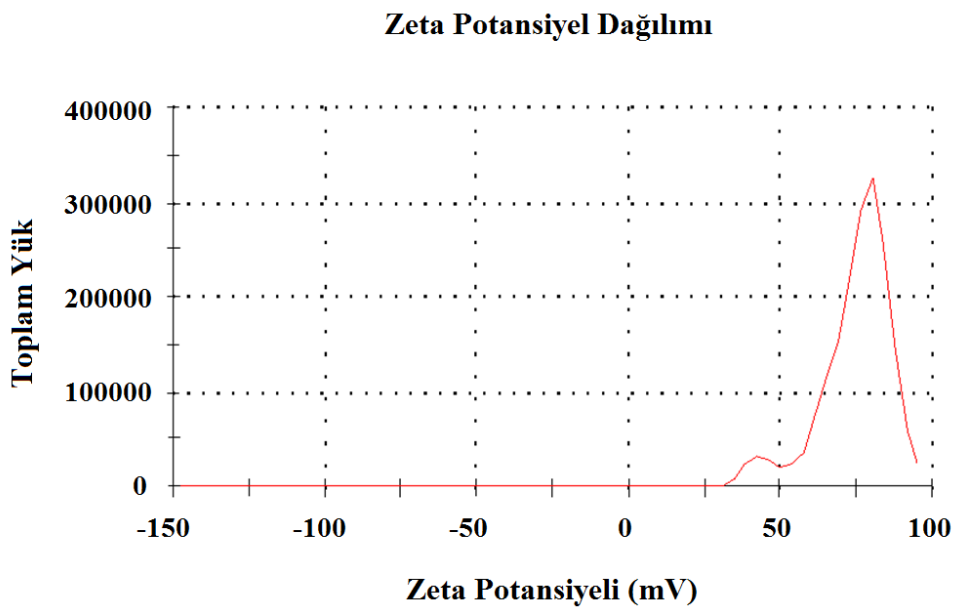
Resim 4.2. Kemik şeklinde altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü

Sentezlenen altın nanoçubukların karakterizasyonu için UV-Vis spektroskopi de kullanılmıştır. Partiküllerin optik özellikleri ve şekilleri hakkında fikir veren absorpsiyon spektrumları Şekil 4.1’de verilmiştir. Şekil 4.1a’da görülen ilk plazmon bandı çubuk formundaki altın nanopartiküle ait 548 nm’deki enine plazmon bandıdır. Spektrumda 735 nm’deki plazmon bandı ise çubuk formundaki altın nanopartikül için boyuna plazmon bandı olarak tanımlanan banttır. Şekil 4.1a’da modifiye edilmemiş altın nanoçubukların absorpsiyon spektrumu verilirken, Şekil 4.1b’de ise modifiye altın nanoçubukların absorpsiyon spektrumu verilmiştir. Görüldüğü gibi modifikasyondan sonra plazmon bantlarında 3-4 nm kayma gözlenmiştir. Spektrumda gözlenen kayma bize altın nanoçubuk yüzeyinde modifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir.



Şekil 4.1. UV-Vis absorpsiyon spektrumları a) Altın nanoçubuk b) Modifiye edilmiş altın nanoçubuk

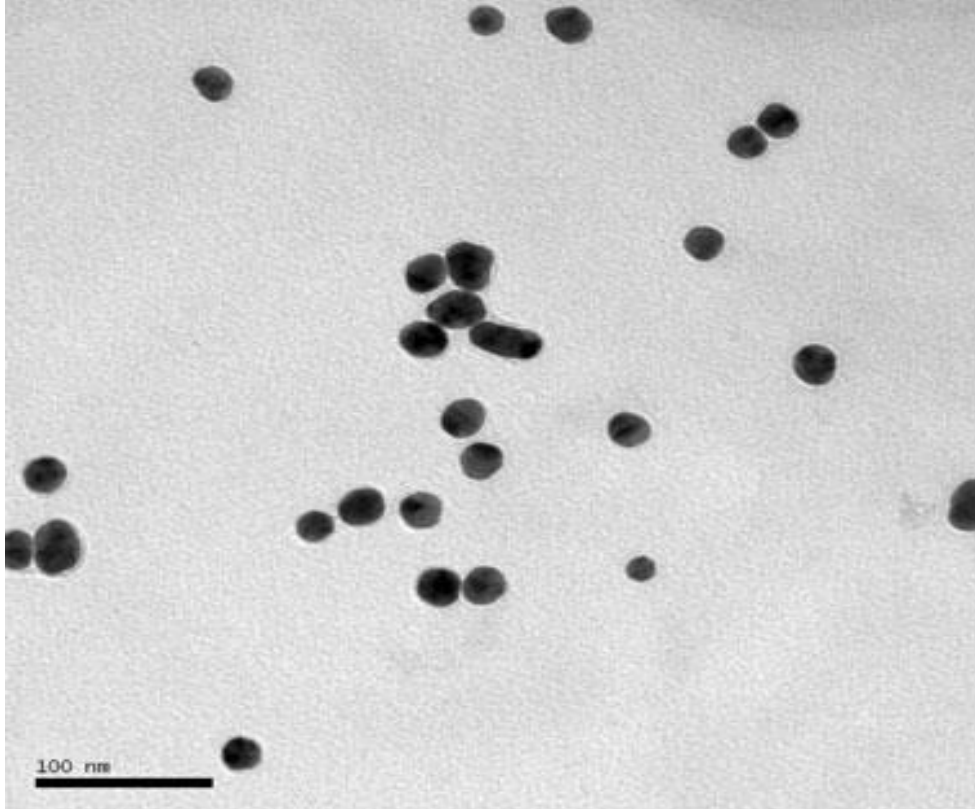
Ayrıca sentezlenen altın nanoçubukların zeta potansiyel değeri ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda altın nanoçubukların zeta potansiyel değeri pozitif ve yaklaşık 75 mV olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değer altın nanopartiküllerin pozitif yüklü olduğunu ve çözelti içerisinde kararlı bir yapıda bulunduğunu göstermiştir. Altın nanoçubuklara ait zeta potansiyel grafiği Şekil 4.2’de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.2. Altın nanoçubuklara ait zeta potansiyel dağılımı

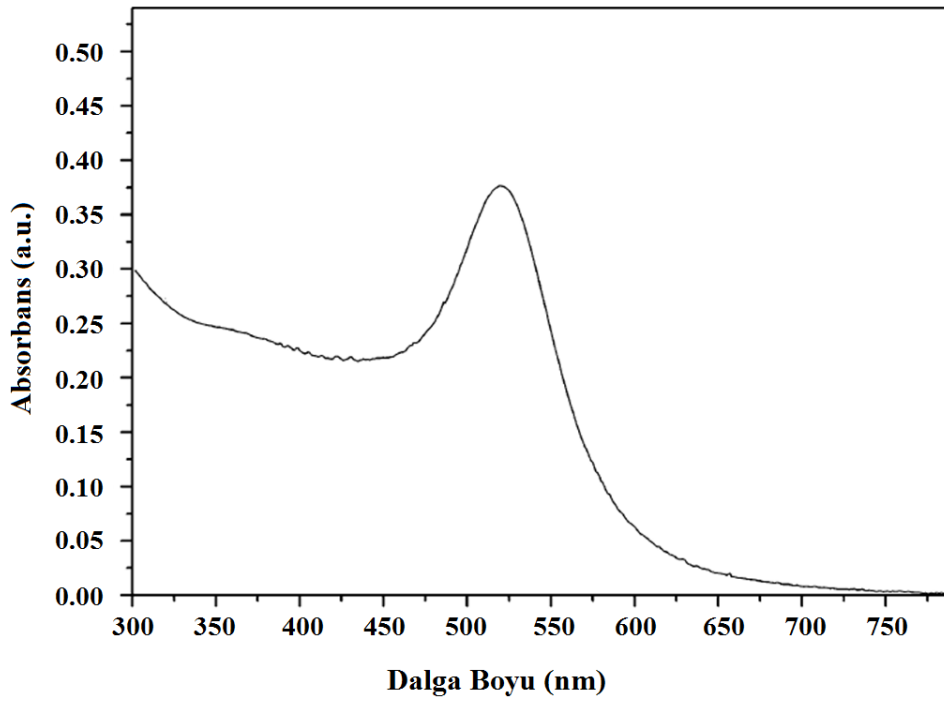
Küresel yapıda altın nanopartikül karakterizasyonu

Küresel yapıda sentezlenmiş altın nanopartikülleri karakterize etmek için partiküllerin TEM görüntüsü alınmıştır. Resim 4.3'te gösterilen TEM görüntüsü üzerinden yapılan ölçümler sonucunda küresel yapıdaki altın nanopartiküllerin ortalama 20 ± 4 nm olduğu saptanmıştır.



Resim 4.3. Küresel yapıdaki altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü

Küresel yapıdaki altın nanopartiküllerin optik özellikleri ve şekilleri hakkında fikir almak için UV-Vis spektrofotometri ile absorpsiyon spektrumları alınmıştır. Şekil 4.3'te verilen spektrumda 520 nm'de gözlemlenen bant küresel yapıdaki altın nanopartiküllere özgü banttır.

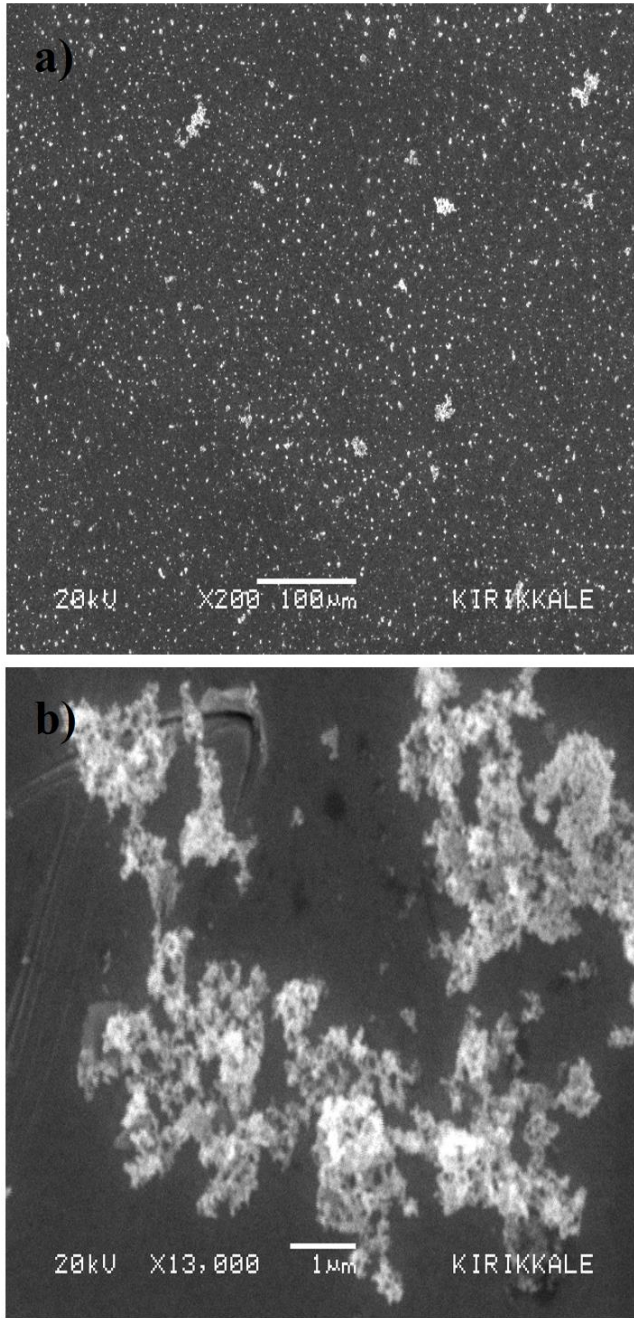


Şekil 4.3. Küresel yapıdaki altın nanopartiküllere ait UV-Vis absorpsiyon spektrumu

YGRS platformunun karakterizasyonu

YGRS platformunu oluşturmak için sentezlenen altın nanoçubukların UV-Vis spektrumları alınmış ve Şekil 4.1b’de gösterilmiştir. Bu spektrumda 548 nm’de görülen enine plazmon bandının 551 nm’ye kaydığı ve 735 nm’deki boyuna plazmon bandının ise 739 nm’ye kaydığı görülmüştür. Plazmon bandlarındaki bu kayma altın nanoçubuk yüzeylerinin 4-MBA ve DT ile modifiye olduğunu göstermektedir. Bu modifiye olan altın nanopartiküller ve modifiye altın levha yüzeyler ile oluşturulan YGRS platformunun karakterizasyon çalışmaları TEM görüntüleri, su değme açıları (contact angle) ve Raman spektrumları alınarak gerçekleştirilmiştir.

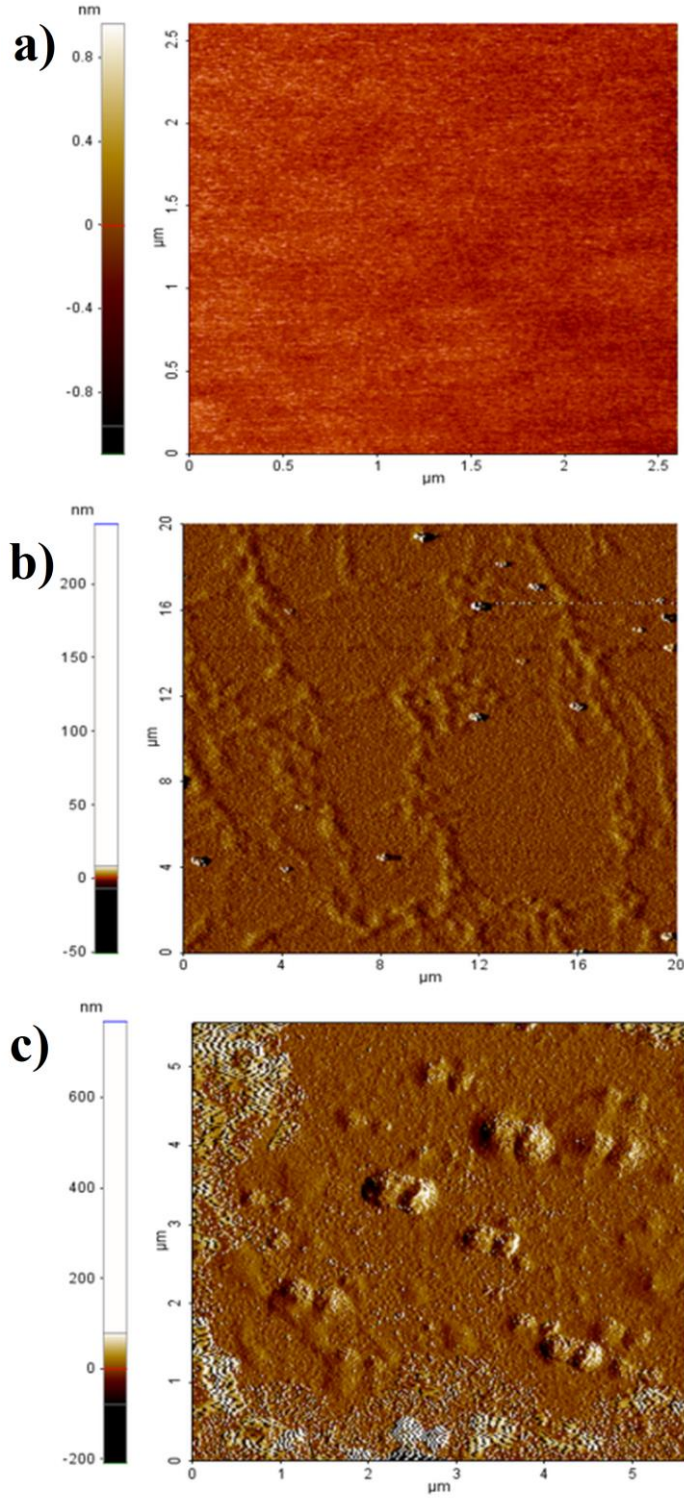
YGRS platformu için TEM görüntüleri Resim 4.4’te verilmiştir. TEM görüntüleri incelendiğinde, modifiye altın partiküllerin altın levha yüzeyinin geneline homojen olarak dağıldığı ancak bazı bölgelerde nanopartiküllerin kümелendiği görülmüştür (Resim 4.4a). Görüntülerin büyütme dereceleri artırıldığında ise modifiye altın nanoçubukların yüzeyin her tarafında bulunmadığı ve partiküller arasında boşluklu yapıların olduğu görülmüştür (Resim 4.4b).



Resim 4.4. YGRS platformunun TEM görüntüleri a) x200, b) x13.000 büyütme

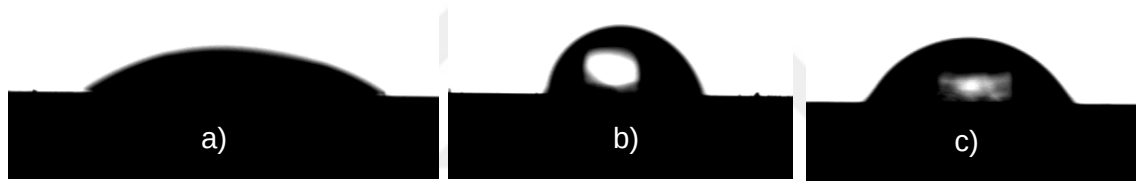
Ayrıca Au-4-MBA/DT yüzeyine, AuNPs-4-MBA/DT partiküllerin homojen bir şekilde tutunup tutunmadığını kontrol etmek için AFM ölçümleri yapılmıştır. Resim 4.5a’da modifiye edilmemiş altın levha yüzeyin AFM görüntüsü görülmektedir. Bu yüzeye 4-MBA ve 1-DT moleküllerinin bağlanmasından sonra altın yüzeydeki katmanların arttığı gözlenmektedir (Resim 4.5b). Modifiye edilen altın levha yüzeyi ile 4-MBA ve 1-DT molekülleri bağlı olan altın nanoçubukların etkileşiminden sonra elde edilen yüzeyin katmanlarında ise önemli derecede artış görülmektedir (Resim 4.5c). AFM görüntüleri

altın levhanın yüzeyine altın nanoçubukların uygun bir dağılım gerçekleştirerek bağlandığını göstermektedir.



Resim 4.5. AFM görüntüleri a) Au yüzey, b) Au-4-MBA/DT ve c) Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT yüzeyleri

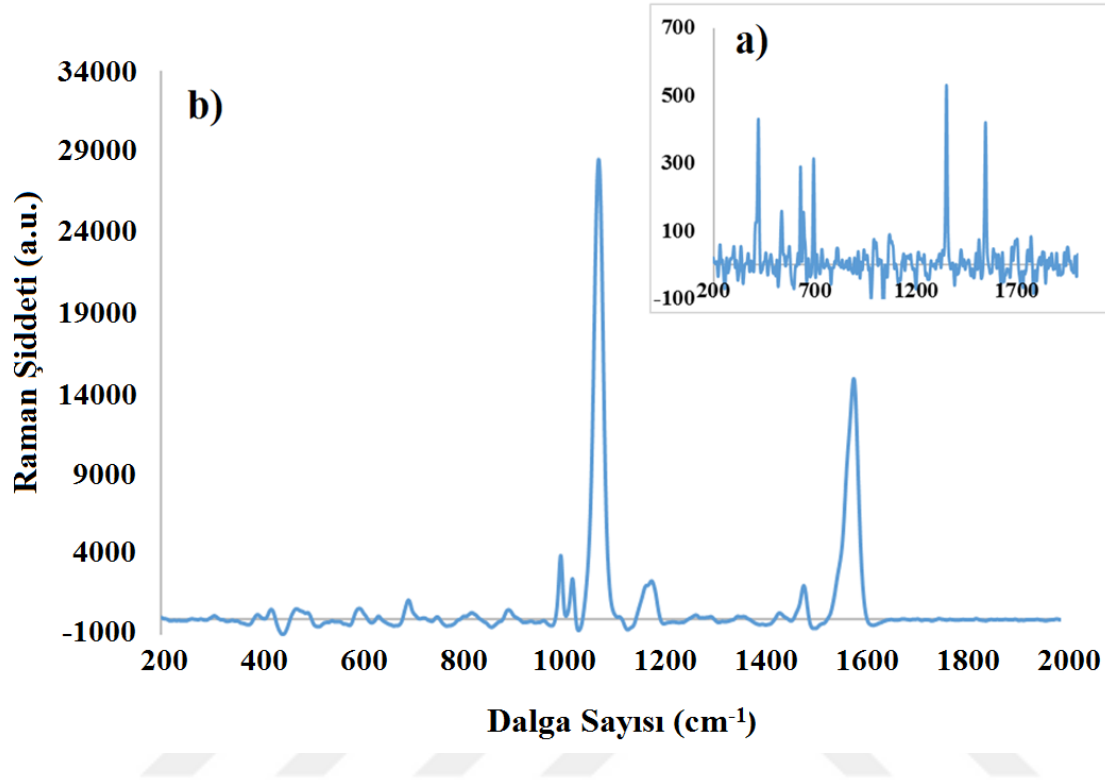
Hazırlanan yüzeylerin su değme açısı ölçümleri DSA 100 model değme açısı ölçüm cihazı ile alınmıştır. Yüzeylerin su değme açıları, altın levha için 8.51° , Au-4-MBA/DT yüzeyi için 74.9° ve Au-4-MBA/DT - AuNPs-4-MBA/DT yüzeyi için ise 58.3° olarak ölçülmüştür. Temel olarak yüzeylerin hidrofobik karakteri arttığında yüzeyin su damlası ile etkileşimi daha az olacak ve bu sayede su değme açısı daha büyük bulunacaktır. Beklenildiği gibi altın levha yüzeyin su değme açısı oldukça küçük bir değerdir. Au-4-MBA/DT - AuNPs-4-MBA/DT yüzeyinin su değme açısının, Au-4-MBA/DT yüzeyinin değme açısından daha küçük çıkması beklenen bir sonuçtur. Dekantiyol molekülleri, 1/1 oranında MBA/DT ile modifiye edilmiş altın levha yüzeyine hidrofobik özellik kazandırmıştır. Daha sonra ise 3/1 oranında MBA/DT ile modifiye edilmiş altın nanoçubukların yüzeye bağlanmasıyla hidrofilik karakteri yüksek olan boronik asit gruplarının miktarı artacağı için su değme açısında düşüş gözlenmiştir. Resim 4.6'da yüzeylere ait değme açıları gösterilmiştir.



Resim 4.6. a) Au yüzey, b) Au-4-MBA/DT, ve c) Au-4-MBA/DT- AuNPs-4-MBA/DT yüzeylerinin su değme açısı fotoğrafları

YGRS platformu için hazırlanan yüzeylerin Raman spektrumları DeltaNu Examiner Raman mikroskop cihazı ile alınmıştır. Au-4-MBA/DT yüzeyinin Raman spektrumunda kaydadeğer ve yorumlanabilecek şiddette pikler görülmezken (Şekil 4.4a), Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT yüzeyinde nanoçubukların ortamda bulunmasından dolayı YGRS etkisi ile şiddetli Raman sinyalleri alınmıştır (Şekil 4.4b). Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT yüzeyinin Raman spektrumunda 698, 1000, 1024, 1070, 1184, 1290, 1490, 1583 cm^{-1} 'de pikler gözlenmiştir. 698 ve 1024 cm^{-1} 'de görünen pikler C-S gerilme moduna ait, 1000 cm^{-1} 'de görülen pik ise fenil grubuna ait piktir (Kanayama ve diğerleri, 2000; Rycenga ve diğerleri, 2008) 1290 ve 1490 cm^{-1} 'de görülen pikler ise fenil halkasında bulunan C-C ve C=C gerilme modlarına ait piklerdir (Erdogdu ve diğerleri, 2009). 1070 cm^{-1} ve 1184 cm^{-1} 'deki pikler ise boronik asitin B-OH ve B-C gerilme modlarına ait piklerdir (Kurt ve diğerleri, 2009). Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT yüzeyinin Raman

spektrumunda görünen bu pikler, yüzeyin altın nanoçubuklarla kaplanmış olduğunun bir göstergesidir.

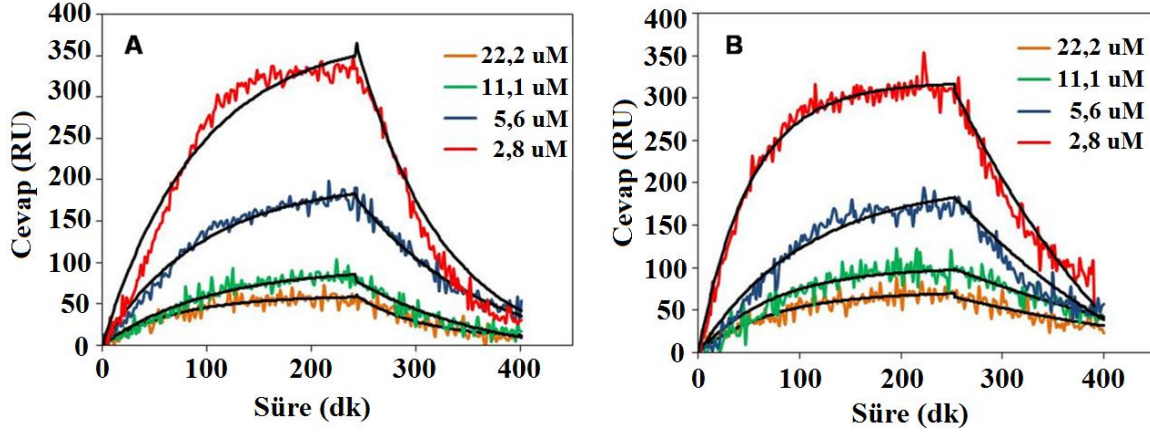


Şekil 4.4. a) Au-4-MBA/DT, b) Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT yüzeylerinin Raman spektrumu

Au-4-MBA/DT ve Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT yüzeylerine glikozun bağlanma ilgileri SPR sensör kullanarak belirlenmiştir. SPR ölçümleri sonucunda Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT yüzeyine glikoz bağlanma ilgisinin, Au-4-MBA/DT yüzeyine bağlanma ilgisinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Konsantrasyonu 100 mM olan borat tamponu (pH 9) içerisinde farklı konsantrasyonlarda glikoz çözeltileri, Au-4-MBA/DT yüzeyi (Şekil 4.5a) ve Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT yüzeyinin (Şekil 4.5b) her ikisiyle de etkileştirilmiştir. Elde edilen veriler basit 1:1 Langmuir etkileşim modeli ile uyumlu olmuştur.

Sakkaritlerin borik ve boronik asit türevleri ile etkileşimi bilinen bir reaksiyondur (Ludwig ve diğerleri, 1994). Boronik asit grupları yakın diyol grupları içeren bileşiklerle tersinir ester düzenlenmesi ile kompleks oluşturur. Bunun yanında glikozun yüzeyde tutunmasını sağlamak için alkil gruplarına ihtiyaç duyulmuştur (Çiftçi ve diğerleri, 2012). DT kullanımının sağladığı en önemli avantaj glikoz moleküllerinin etkili bir şekilde yüzeyde

dağılımını sağlamak için yüzeye yakın bir dağılıma tabakası oluşturmaktır. Bu yüzden kendiliğinden düzenlenen platform iki bileşenli olarak hazırlanmıştır.



Şekil 4.5. SPR sensorgramları a) Au-4-MBA/DT b) Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT (glikoz konsantrasyonları; 2,8; 5,6; 11,1 ve 22,2 μM)

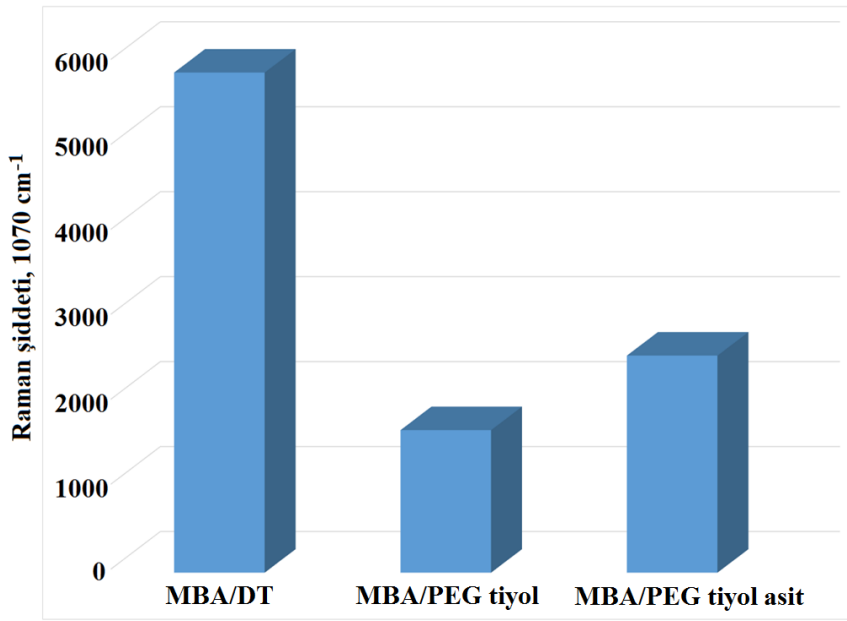
SPR sensör kullanılarak Au-4-MBA/DT ve Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT yüzeylerine glikozun bağlanma ilgisi incelenmiştir. Glikozun Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT ölçüm yüzeyine bağlanma ilgisinin, Au-4-MBA/DT yüzeyine bağlanma ilgisinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Farklı derişimlerde glikoz çözeltisi (pH 9,0 100 mM borat tamponu) her iki yüzeye de enjekte edilmiştir. Şekil 4.5a ve b’de gösterilen bağlanma verileri 1:1 Langmuir etkileşim modeli ile elde edilmiştir. Buna göre glikoz-boronik asit kompleksinin Au-4-MBA/DT-AuNPs-4-MBA/DT yüzeyinde afinite sabiti, $7.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer Au-4-MBA/DT yüzeyi ile elde edilen sabittten üç kat daha yüksektir ($2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Bu artış altın nanopartiküllerin yüzeye ilave edilmesinin sonucudur. Ayrıca altın nanopartiküllerin SPR sistemlerinin hassasiyetini artırdığı bilinmektedir. Altın nanopartiküllerin ilavesiyle yüzey alanındaki artış sayesinde glikoz molekülleri yüzeye daha yüksek oranda bağlanmış ve plazmon rezonansında zamana bağlı olarak artışa neden olmuştur.

Glikoz ölçümleri için yöntem optimizasyonu

Ligand türünün etkisi

YGRS platformu hazırlanırken farklı ligandlar kullanılarak optimum yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla altın levha ve altın nanoçubuk yüzeyleri 4-MBA ile ligand

olarak DT, PEG tiyol asit ve PEG tiyol kullanılarak kendiliğinden düzenlenme tekniğiyle modifiye edilmiştir. Bu yüzeylerin sabit glikoz miktarına karşı cevapları 4-MBA'in YGRS sinyali takip edilerek karşılaştırılmıştır. Şekil 4.6'da farklı ligandlar ile modifiye edilen yüzeyler kullanılarak elde edilen sonuçlar grafiğe geçirilmiştir. Grafik incelendiğinde yüzey modifikasyonu için 4-MBA/DT kullanıldığında elde edilen sinyalin pik şiddetinin daha yüksek olduğu gözlenmektedir.

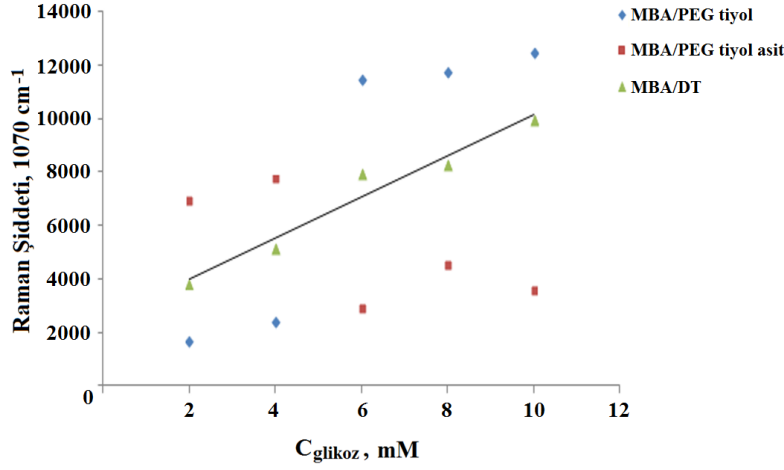


Şekil 4.6. 4-MBA ile farklı ligandlar kullanılarak hazırlanan YGRS platformları ile elde edilen Raman sinyallerinin karşılaştırması

PEG tiyol ile modifiye edilen platformda, PEG tiyol etanol-su karışımıyla çözüldüğü için sonuçları olumsuz etkilemiştir. Çözücü ortamında su bulunması yüzey modifikasyonu esnasında altın yüzeyle ligandın etkileşimini azaltmış ve bağlanmanın diğer ligand türlerine göre daha az olmasına neden olmuştur.

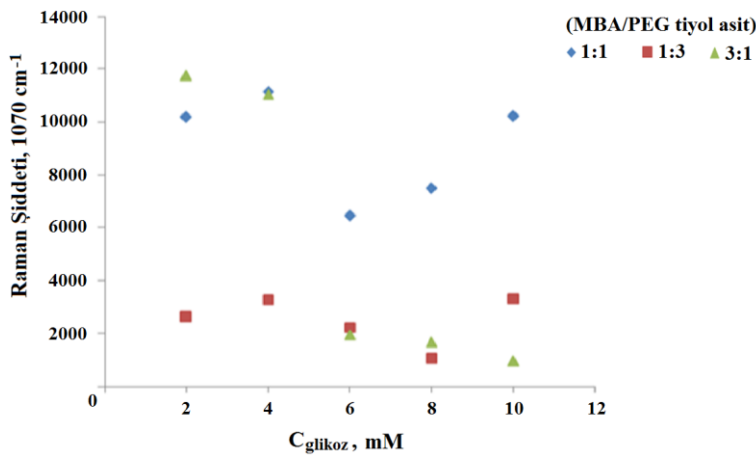
Şekil 4.6.'da gözlenen sonucu desteklemek amacıyla DT dışındaki diğer ligandların farklı glikoz konsantrasyonlarına karşı cevabını görmek için hazırlanan YGRS platformlarının her biri ile kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Hazırlanan bu üç farklı yüzeyde ayrı ayrı 2, 4, 6, 8, 10 mM glikoz konsantrasyonlarına karşı 4-MBA' ya ait YGRS sinyali takip edilmiştir. Şekil 4.7.'de de görüldüğü gibi aynı koşullar altında hazırlanan platformlar arasında yalnızca 4-MBA ile DT kullanılarak hazırlanan yüzeyde doğrusal bir grafik elde

edilmiştir. Diğer iki yüzeyde artan glikoz derişimine karşı gözlenen YGRS sinyalleri rastgele değişim göstermektedir.

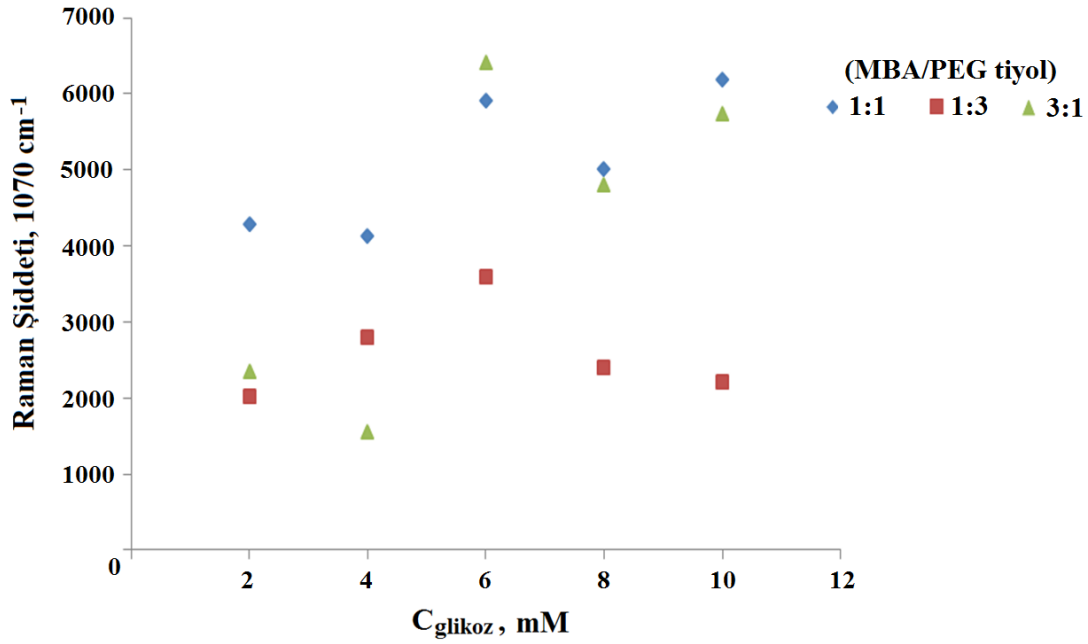


Şekil 4.7. 4-MBA/PEG tiyol, 4-MBA/PEG tiyol asit, 4-MBA/DT kullanılarak hazırlanan YGRS platformları ile elde edilen kalibrasyon grafikleri

Son olarak altın nanoçubuklar 4-MBA ile birlikte farklı oranlarda PEG tiyol ve PEG tiyol asit ile modifiye edilerek, modifiye altın yüzeylerle etkileştirilmiştir. Hazırlanan YGRS platformlarının glikoza karşı cevapları incelenmiştir. Burada artan glikoz derişimine karşı, boronik asite ait 1070 cm^{-1} deki YGRS sinyalleri Şekil 4.8 ve 4.9'da görüldüğü gibi grafiğe geçirilmiştir.

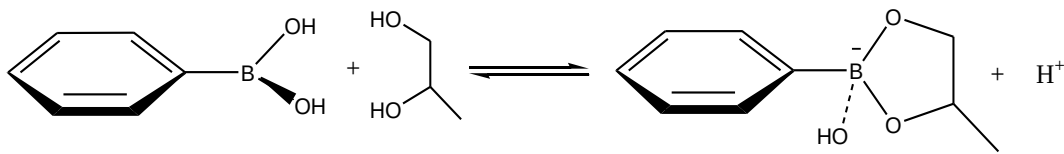


Şekil 4.8. 4-MBA/PEG tiyol asit (1/1) ile modifiye edilen altın levha yüzeyine, (1/1), (1/3), (3/1) oranlarında 4-MBA/PEG tiyol asit ile modifiye edilen altın nanopartiküllerin immobilizasyonu ile hazırlanan YGRS platformları kullanıldığında elde edilen değişim eğrileri



Şekil 4.9. 4-MBA/PEG tiyol (1/1) ile modifiye edilen altın levha yüzeyine, (1/1), (1/3), (3/1) oranlarında 4-MBA/PEG tiyol ile modifiye edilen altın nanopartiküllerin immobilizasyonu ile hazırlanan YGRS platformları kullanıldığında elde edilen değişim eğrileri

Her iki grafik incelendiğinde sonuçların rastgele değişim gösterdiği gözlenmiştir. Ancak 1-dekantiyol ile hazırlanan yüzeylerde pik şiddetindeki değişim glikoz derişimiyle orantılı olarak azalmaktadır (Şekil 4.7). Pik şiddetindeki bu azalmanın, glikoz ile B-OH gruplarının etkileşmesinin sonucu olduğu düşünülmektedir (Eşitlik 4.1).



Eşitlik 4.1. Fenil boronik asit ve glikoz moleküllerinin reaksiyon mekanizması

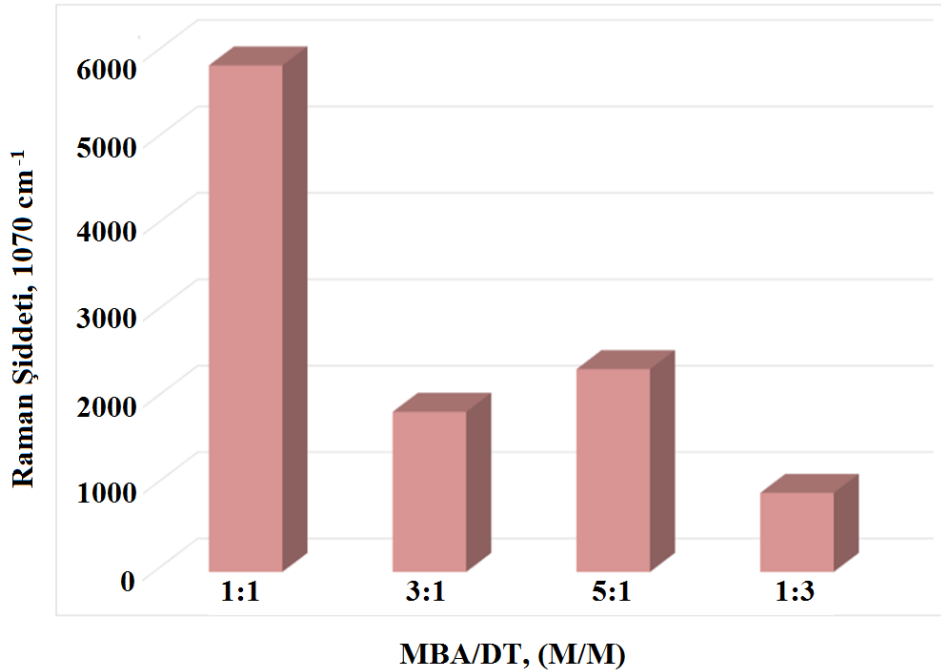
Yüzey modifikasyonu için bu ligandlara ek olarak dodekantiyol de 4-merkaptofenil boronik asitle birlikte kullanılmıştır. Fakat çözünürlük problemiyle karşılaşmıştır. Dodekantiyol etanolde çözünmediği için nanopartiküllerin, altın levha yüzeyine hidrofobik etkileşimlerle immobilizasyonu gerçekleştirilememiştir. Yapılan tüm bu deneylerin sonucunda aynı koşullarda hazırlanan yüzeyler arasında en yüksek ve en doğrusal sinyal, 4-MBA ile DT birlikte kullanıldığında hazırlanan YGRS platformları ile elde edilmiştir.

Bu yüzden çalışmanın devamına, yüzey modifikasyonu için 1-DT kullanılmasına karar verilmiştir.

Yüzey modifikasyonlarında ligand olarak DT kullanılmasına karar verildikten sonra hem altın levha yüzeyi hem de altın nanoçubuk yüzeyinin hazırlanmasında kullanılan 4-MBA ve 1-DT moleküllerinin molar oranı optimize edilmiştir ve sonuçlar aşağıda detaylandırılmıştır.

Altın levha yüzeyinde 4-MBA/DT molar oranının optimizasyonu

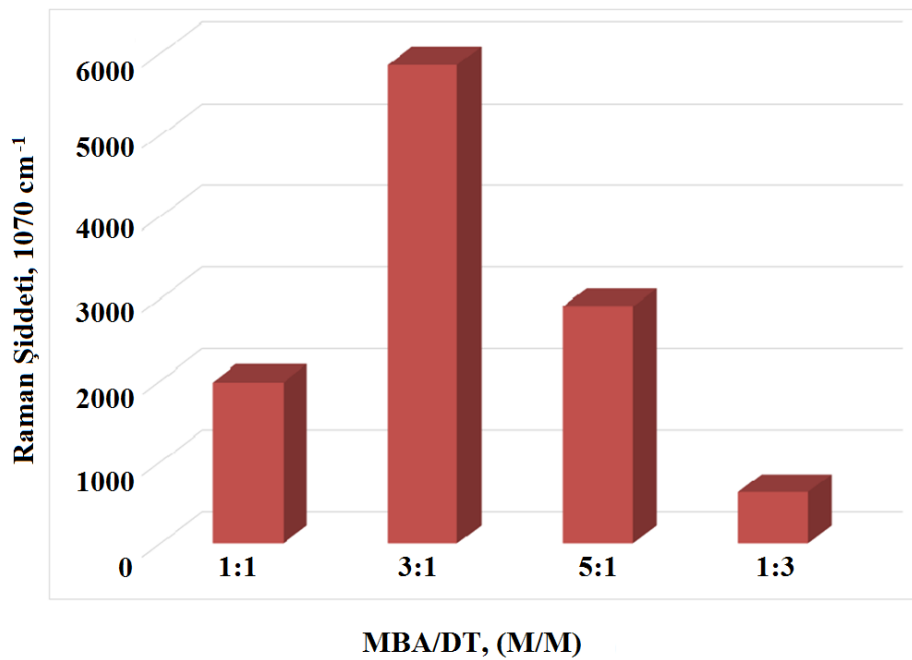
Altın levha yüzeyine en yüksek miktarda bağlanmayı sağlamak için farklı konsantrasyon oranlarında 4-MBA/DT hazırlanarak yüzeyler modifiye edilmiştir. Hazırlanan platformların glikoz konsantrasyon karşı cevabı grafiğe geçirilmiştir. Altın levha yüzeyinin modifikasyonu için en yüksek sinyal 4-MBA/DT derişim oranı 1/1 olduğunda elde edilmiştir (Şekil 4.10). Bundan sonraki çalışmalarda yüzey modifikasyonu için 4-MBA/DT konsantrasyonu oranı 1/1 olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.10. Altın levha yüzeyinin farklı konsantrasyonlarda 4-MBA/DT oranlarında modifikasyonun glikoz ölçümlerine etkisi

Altın nanoçubuk yüzeyinde 4-MBA/DT molar oranının optimizasyonu

Altın levha yüzeyindeki optimizasyondan sonra, farklı konsantrasyon oranlarında 4-MBA/DT ile modifiye edilen altın nanoçubuklar ile hazırlanan platformlar ile glikoz miktarı ölçülmüştür. Sonuçlar değerlendirildiğinde, altın nanoçubukların modifikasyonu için en yüksek sinyal 4-MBA/DT derişim oranı 3/1 olduğunda elde edilmiştir (Şekil 4.11).



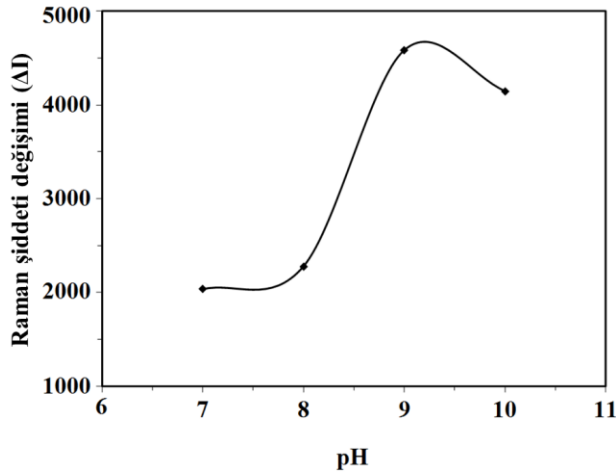
Şekil 4.11. Altın nanoçubuk yüzeyinin farklı konsantrasyonlarda 4-MBA/DT oranlarında modifikasyonunun glikoz ölçümlerine etkisi

Altın levha ve altın nanoçubuk yüzeylerinde kullanılacak 4-MBA/DT konsantrasyon oranı optimizasyon çalışmaları sonucunda; altın levha yüzeyi için (1/1) ve altın nanoçubuk yüzeyi için (3/1) olarak belirlenmiştir. Modifiye edilen bu yüzeyler, dekantiyol gruplarının hidrofobik etkileşimleri ile birbirlerine bağlanmıştır.

YGRS sinyallerine çözelti pH'sının etkisi

Glikoz molekülleri ve YGRS platformundaki boronik asit moleküllerinin en yüksek oranda etkileşimini sağlamak için çalışılan tampon çözeltinin pH'ı optimize edilmiştir. Boronik asit-glikoz kompleksinin bağlanma sabiti yüksek pH'larda artar (Torun ve diğerleri, 2009). Hazırlanan yüzeyler 7-10 pH aralığında çalışarak incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.12'de görüldüğü gibi grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen sonuçlar yüzeylerin glikozla etkileşmeden

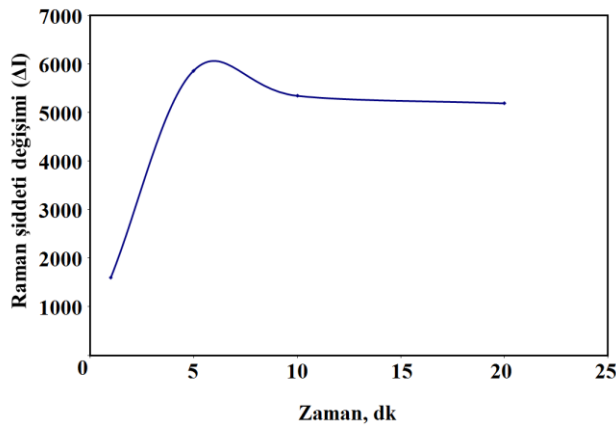
önce ve etkileştikten sonraki sinyallerinin farkı alınarak verildiği için grafikte gözlenen sinyal farkının büyük olması daha fazla glikoz molekülünün yüzeyle etkileştiğini gösterir. Buna göre çalışılan pH aralığında elde edilen en yüksek sinyal pH 9 (borik asit/borat) tamponunda çalışıldığında sağlanmıştır.



Şekil 4.12. pH değişiminin YGRS sinyaline etkisi

Glikoz molekülleri ile yüzey etkileşim süresinin optimizasyonu

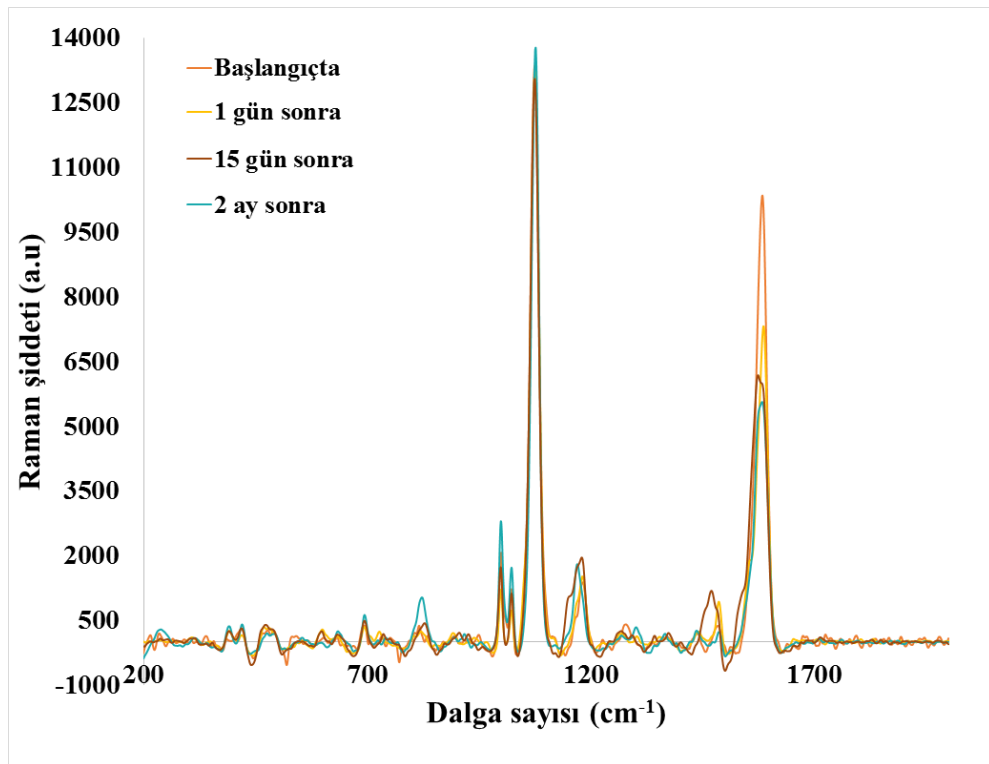
Glikoz moleküllerinin hazırlanan YGRS platformu ile etkileşme süresini optimize etmek için aynı konsantrasyona sahip glikoz çözeltisi yüzeylerle 2-20 dk aralığında etkileştirilmiştir. Yüzeylerin her birinden farklı süreler sonunda Raman sinyalleri elde edilmiştir. İnkübasyon süresi 10 dk'dan daha fazla olduğunda pik şiddeti neredeyse sabit kalmıştır. En yüksek sinyal, 5 dk sonra ölçüm alındığında elde edilmiştir.



Şekil 4.13. Glikoz ölçümüne glikoz-boronik asit gruplarının etkileşim süresinin etkisi

Geliştirilen YGRS platformunun kararlılık çalışması

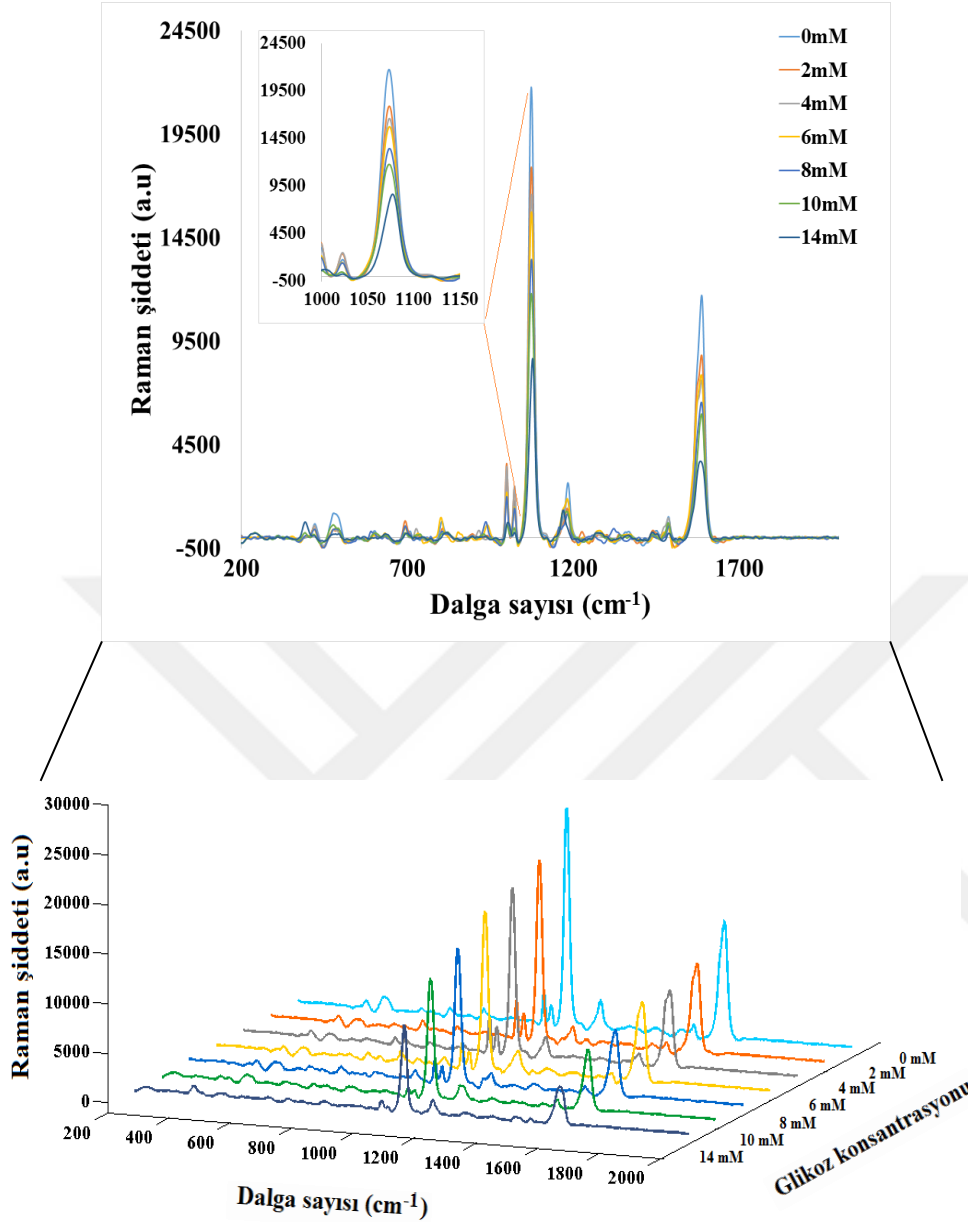
Hazırlanan YGRS platformu için kararlılık çalışmasının sonuçları Şekil 4.14’de verilmiştir. Glikoz molekülleri ile boronik asitin etkileşimi sonucunda B-OH gerilme bandına ait olan 1070 cm^{-1} ’deki pikin şiddetinde azalma olduğu için bu pikdeki değişim takip edilmiştir. Şekil 4.14’deki sonuçlara göre hazırlanan platform iki ay içerisinde kullanıldığında elde edilen sonuçlarda önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bunun sonucu olarak platformun en az iki ay kullanılabileceğini söyleyebiliriz.



Şekil 4.14. Hazırlanan YGRS platform için stabilite çalışması sonuçları

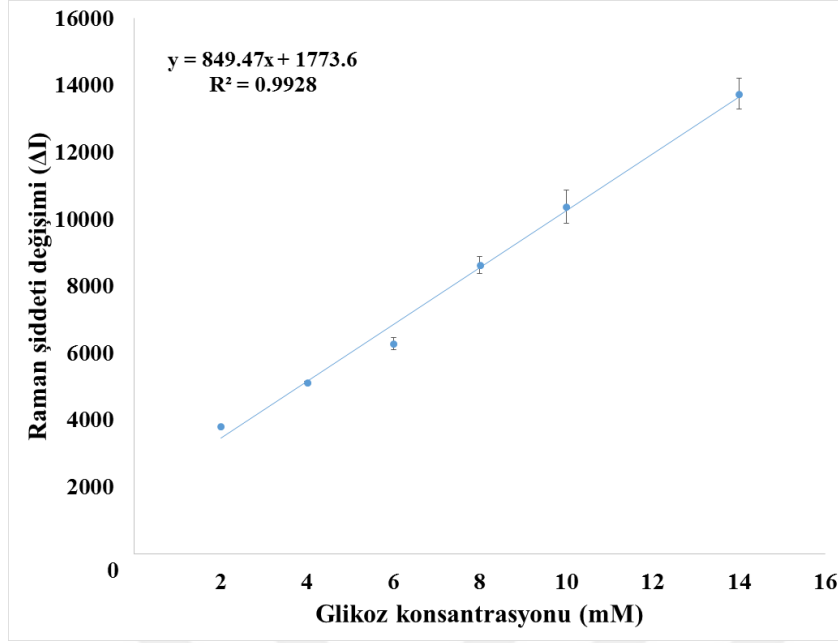
Kalibrasyon grafiğinin oluşturulması

Çalışma koşulları belirlendikten sonra hazırlanan YGRS platformu kullanılarak, 2-14 mM glikoz konsantrasyonu aralığında ölçümler alınmıştır. Bu aralıkta artan glikoz konsantrasyonu ile glikoz moleküllerinin boronik asite bağlanma oranı artacağından boronik asite ait olan 1070 cm^{-1} deki pik şiddetinin doğrusal olarak azaldığı gözlenmiştir. YGRS sinyal şiddetine karşı Raman kayması (cm^{-1}) grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 4.15. Artan glikoz konsantrasyonu ile YGRS platformundan elde edilen Raman spektrumundaki değişim

Artan glikoz konsantrasyonu ile pik şiddetinde meydana gelen azalmadan faydalanarak, konsantrasyona karşı Raman pik şiddetindeki azalma grafiğe geçirilmiş ve 2-14 mM aralığında doğrusal bir değişim gözlenmiştir (Şekil 4.16). Çizilen kalibrasyon grafiğine göre R^2 değeri 0,9928 olarak bulunmuş ve doğrunun denklemi $y = 849,47x + 1773,6$ olarak elde edilmiştir. Buna göre geliştirilen YGRS platformu için teşhis sınırı 0,108 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.16. Glikoz tayini için kalibrasyon grafiği

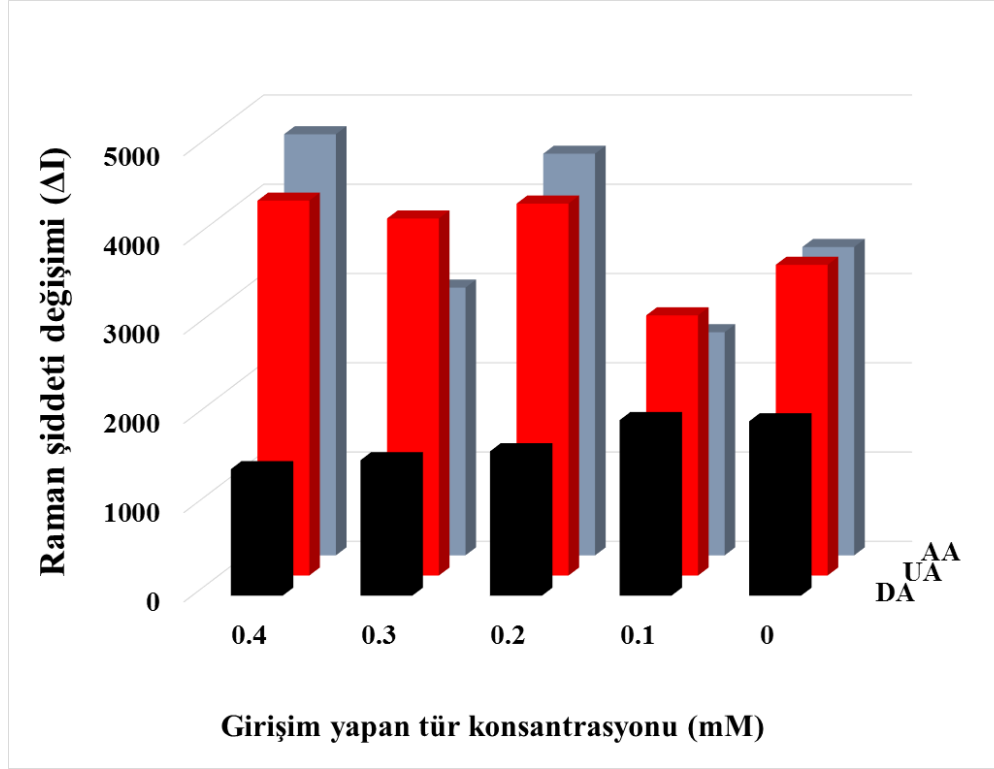
Geliştirilen YGRS tekniği ve mevcut sistemler Çizelge 1’de karşılaştırılmıştır. Elde edilen LOD değeri literatürdeki diğer sistemlerle elde edilen değerle kıyaslandığında daha yüksek bulunmasına rağmen, kandaki glikoz derişim aralığını kapsayacak şekilde geniş bir doğrusal aralık sağlanmıştır. Ayrıca yöntemin tekrarlanabilirliği 4 mM glikoz kullanılarak başarılı bir şekilde test edilmiş ve bağıl standart sapma (BSS) değeri % 4.42 (n = 4) olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Literatürdeki mevcut sistemler ve geliştirilen YGRS tekniğinin karşılaştırılması

Uygulanan Teknikler	LOD	Doğrusal aralık
Floresans spektroskopisi (Ling ve diğerleri, 2014)	8,0 μ M	0,01 μ M–0,1 μ M
Enzimatik olmayan glikoz biyosensör (X. Wang ve diğerleri, 2014)	0,1 μ M	0,4 μ M–12 μ M
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (Shervedani ve diğerleri, 2006)	0,016 μ M	0 μ M–10 μ M
Floresans spektroskopisi (Jin ve diğerleri, 2011)	0,005 μ M	0,01 μ M–0,5 μ M
GC/Kütle Spektroskopisi (Wahjudi ve diğerleri, 2010)	0,3 μ M	0,05 μ M–1 μ M
HPLC-ELDS (Ma ve diğerleri, 2014)	0,4 μ M	1,1 μ M–11 μ M
Triosmiyum karbonil - boronik asit-YGRS (Kong ve diğerleri, 2013)	0,1 mM	0,1 mM–10 mM
AuNStar@SiO ₂ -YGRS (Al-Ogaidi ve diğerleri, 2014)	16,0 μ M	25 μ M–25 mM
1-Dodekantiyol kaplı Ag nanoküp- YGRS (Rycenga ve diğerleri, 2008)	-	0 mM–250 mM
HRP modifiye Au ve GOX-YGRS (Wu ve diğerleri, 2006)	0,46 mM	0,50 mM–32 mM
Geliştirilen YGRS yöntemi	0,108 mM	2 mM–14 mM

Kan ortamında girişim etkisi yapabilecek moleküllerin sonuçlara etkisi

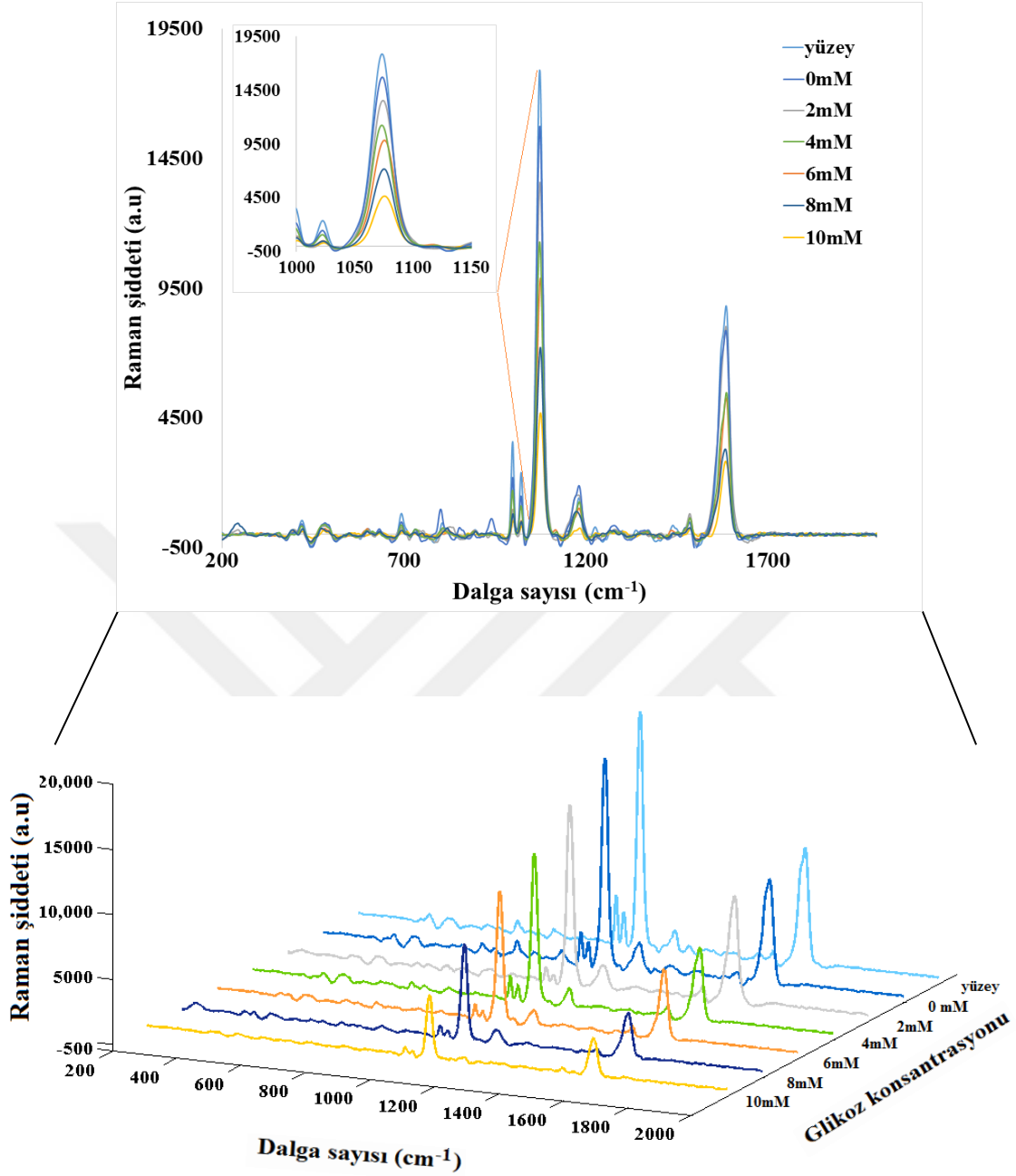
Şekil 4.17’de görüldüğü gibi 4 mM glikoz üzerine farklı derişimlerde DA eklendiğinde, glikoz ölçümüne ait Raman spektrumunda % 8,7 oranında değişiklik olmuştur. AA ve UA ile yapılan çalışmalarda ise 1070 cm⁻¹’deki pik şiddetinde sırasıyla % 20,3 ve % 15,5 oranında doğrusal olmayan değişim gözlenmiştir. Bu pik şiddetindeki değişikliklerin, AA ve UA’in glikoza blok etkisi yaparak yüzeye ulaşmasını engellemelerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Fakat değişimler rastgele olduğu için hazırlanan platformun glikoza seçimli olduğu düşünülmüştür. Kan matriksinde çalışıldığında bu moleküllerin girişim etkisi yaratmayacağına karar verilmiştir.



Şekil 4.17. Glikoz tayininde, girişim çalışması

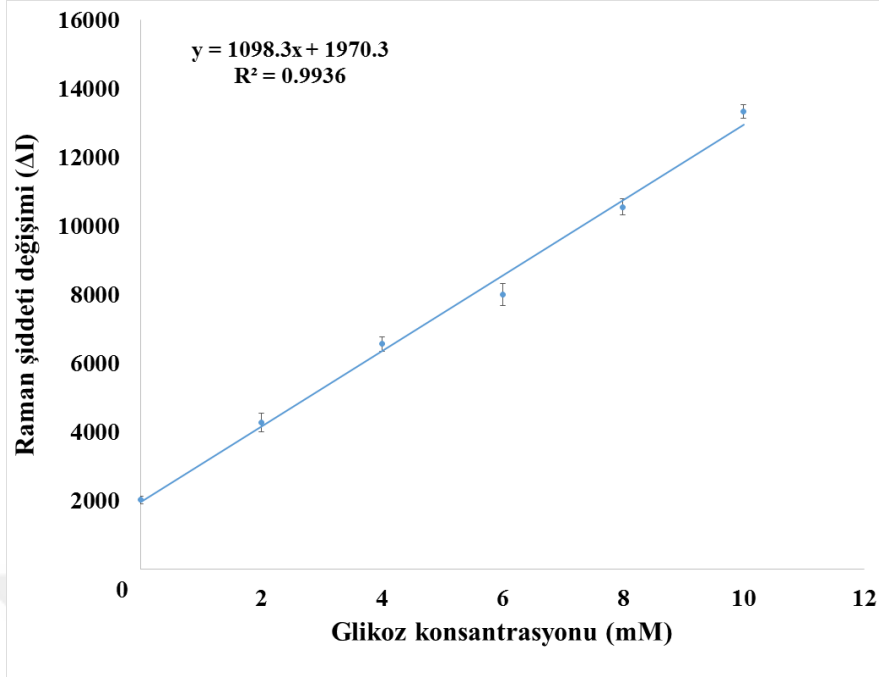
Gerçek örnekte glikoz tayini

YGRS platformu ile gerçek örnekte glikoz tayini gerçekleştirmek için referans kan örneğine konsantrasyonları 2, 4, 6, 8, 10 mM olacak şekilde stok glikoz çözeltisinden ilave edilmiş ve bu örnekler gerekli ön işlemler tamamlandıktan sonra YGRS platformu ile etkileştirilmiştir. Daha sonra platformun $500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ aralığında YGRS sinyalleri alınmıştır. Bu standart ekleme yöntemi ile kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.



Şekil 4.18. Referans kan örneğinde glikoz konsantrasyonuna karşı, boronik asidin 1070 cm^{-1} 'deki pik şiddetindeki değişimi gösterir YGRS spektrumu

Şekil 4.18'de görüldüğü gibi kan eşleniği içerisine ilave edilen glikoz konsantrasyonunun artışıyla 1070 cm^{-1} 'deki B-OH'in pik şiddetinde orantılı bir azalma gözlenmiştir. Bu sayede, standart ekleme yöntemiyle kan eşleniği içerisindeki glikoz konsantrasyonu hesaplanabilmektedir. Elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.19'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Standart ekleme yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi

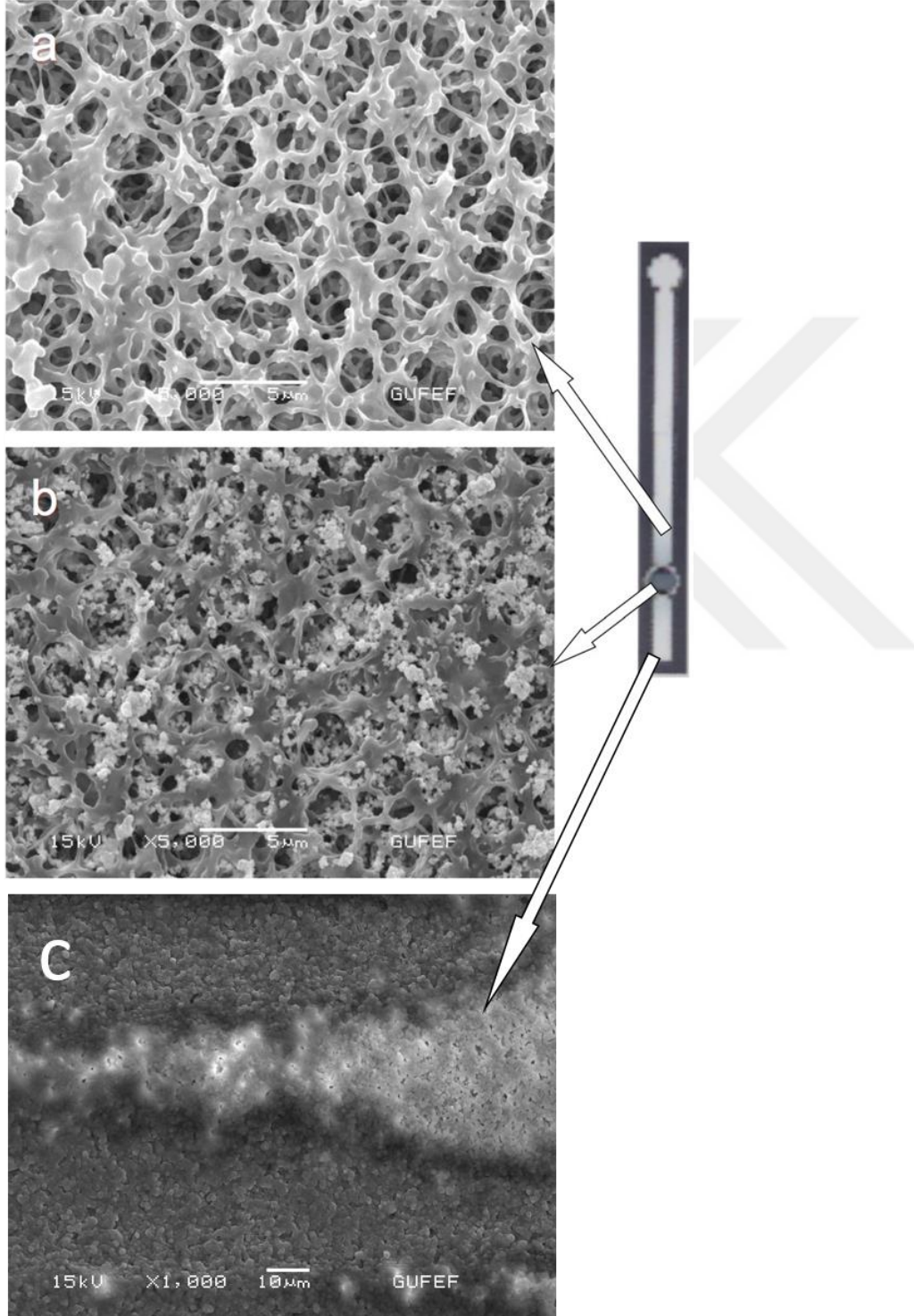
Referans kan örneğindeki glikoz miktarı, oluşturulan kalibrasyon grafiğine göre hesaplanmış ve 6.17 ± 0.11 mM olan glikoz konsantrasyonu 5.61 ± 0.29 mM olarak bulunmuştur. Gerçek değer ve hesaplanan değer arasındaki fark % 95 güven sınırları içerisinde anlamsızdır. Buna göre geri kazanım değeri % 90,9 olarak hesaplanmıştır. Bu iki sonuç arasındaki benzerlik geliştirilen sensörün gerçek kan örneğindeki glikozun tayini için kullanılabilir olduğunu göstermiştir. Böylece geliştirilen yöntem, glikoz tayininde enzimatik olmayan YGRS tabanlı bir sensör geliştirmek için yeni bir potansiyel platform sağlanmıştır.

4.1.2. Kağıt tabanlı mikro akışkan çip kullanımı ile glikoz tayini

Kağıt tabanlı mikro akışkan çipin karakterizasyonu

Kağıt tabanlı mikro akışkan çipler mum yazıcı kullanılarak hazırlanmış ve YGRS ölçüm alanının oluşturulması için MBA ve DT ile modifiye edilmiş altın nanoçubuklar kullanılmıştır. Hazırlanan kağıt tabanlı mikro akışkan çiplerin karakterizasyonu için SEM görüntüleri alınmıştır. Resim 4.7’de kağıt tabanlı mikro akışkan çipin YGRS ölçüm alanına altın nanopartikül damlatılıp kurutulduktan sonraki SEM görüntüleri incelenmiştir. Resim 4.7a’da hidrofilik kanal yani selüloz nitrat membrandan oluşan kısmın SEM görüntüsü

verilmiştir. Resim 4.7b’de altın nanopartikül damlatılmış YGRS ölçüm alanının SEM görüntüsü ve Resim 4.7c’de ise mum ile baskılanmış hidroforobik bölgenin SEM görüntüsü verilmiştir.



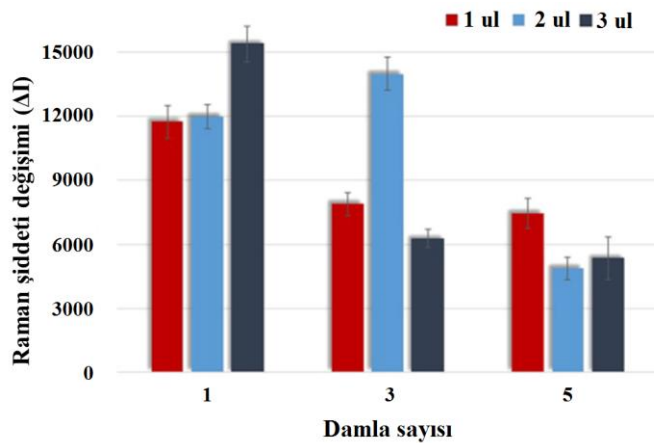
Resim 4.7. Kağıt tabanlı mikro akışkan çipe ait a) kanalın, b) partikül kaplı ölçüm alanının ve c) mum kaplı bariyerin SEM görüntüleri

Modifiye altın nanoparçacık çözeltisi membran yüzeyine damlatıldığında çözeltinin membranın iç kısımlarına doğru nüfuz ettiği görülmektedir. Bu da yüksek oranda glikoz moleküllerinin YGRS ölçüm alanında boronik asit molekülleri ile etkileşebileceğini ve geliştirilen yöntemin hassasiyetinin artabileceğini göstermektedir. Resim 4.7c’de ise membranın gözeneklerinin mum ile doldurulduğu ve hidrofobik bariyerlerin homojen bir şekilde oluşturulduğu görülmektedir.

Kağıt tabanlı mikro akışkan çipler için yöntem optimizasyonu

Altın nanoçubuk çözeltisi miktarının optimizasyonu

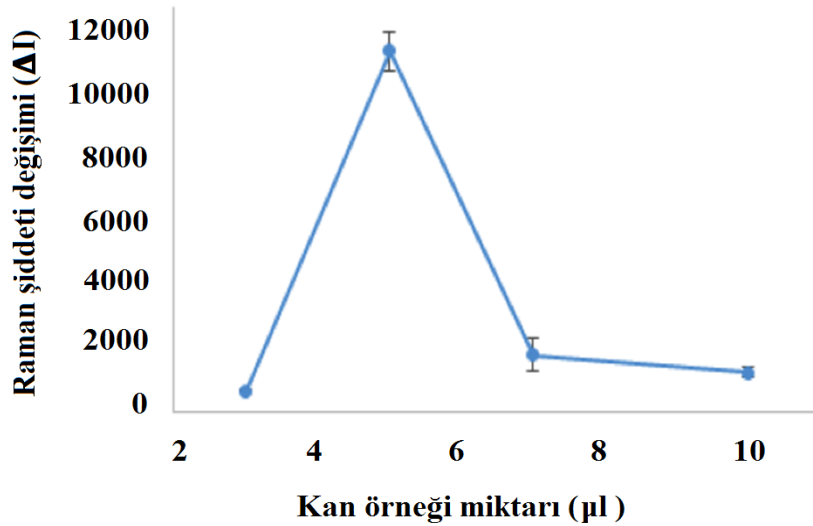
YGRS ölçüm alanına farklı miktarda modifiye altın nanoçubuk çözeltileri uygulanarak optimum sinyal elde edilmiştir. Şekil 4.20’de görüldüğü gibi her bir kombinasyon için YGRS sinyalleri grafiğe geçirilmiştir. Bu sonuçlara göre optimum YGRS sinyali, 3 µl hacminde modifiye altın nanoçubuk çözeltisi ile ölçüm alanı hazırlandığında elde edilmiştir. YGRS sinyalinin, en yüksek hacimde ve damla sayısında altın nanoçubuk çözeltisi kullanıldığında en yüksek şiddette olması beklenmesine rağmen düşük miktarda çözelti kullanıldığında şiddet artırılmıştır. Gözlemlenen YGRS sinyal şiddeti, şekilde de görüldüğü üzere, damla sayısının artışı ile azalmıştır. Burada molekül sayısı arttığında sönümlenme söz konusu olduğu için sinyallerde düşüş gözlenmiştir. Bu yüzden membran baskılanıp kanal oluşturulduktan sonra modifiye altın nanoçubuk çözeltisinin 3 µl’si tek uygulama ile nitro selüloz membran yüzeyine damlatılarak YGRS ölçüm alanı hazırlanmıştır.



Şekil 4.20. Altın nanoçubuk çözelti miktarı ve damla sayısının YGRS sinyallerine etkisi

Kan miktarının optimizasyonu

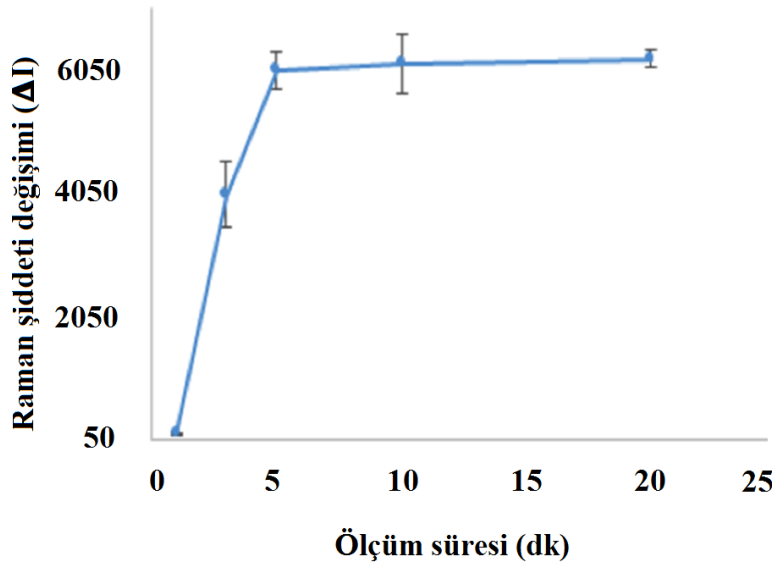
Kan örneği hacminin belirlenmesi için, 1 mm x 2 cm boyutundaki kağıt tabanlı çiplerle aynı konsantrasyonda 3 ve 10 μ L arasında kan örnekleri ile çalışılmıştır. Deneylerde 10 μ L gibi yüksek örnek hacmi ile çalışıldığında, kan hücrelerinin tamamının kanalda tutunmadığı ve YGRS ölçüm alanına ulaştığı ve böylece sinyalleri engellediği ya da kan örneğinin kanaldan taşıdığı gözlenmiştir. Bunun yanında 3 μ L gibi düşük örnek hacimleri ile çalışıldığında ise kan örneğinin yalnızca kanalın orta bölgesine kadar geldiği ve örneğin büyük bölümünün YGRS ölçüm alanına ulaşamadığı gözlenmiştir. Ancak 5 μ L örnek hacmi ile çalışıldığında plazma YGRS ölçüm alanına ulaşmış ve optimum YGRS sinyali elde edilmiştir.



Şekil 4.21. Çalışılan kan örneği miktarının YGRS sinyal şiddetine etkisi

Etkileşim süresinin optimizasyonu

Örneğin boronik asit molekülleri ile etkileşmesi için optimum ölçüm süresi belirlenmiştir. Çipe kan damlatıldıktan sonra belirli zaman aralıklarında ölçümler alınarak en yüksek Raman sinyalinin elde edildiği süre belirlenmiştir. Şekil 4.22’de elde edilen sonuçlara göre Raman ölçümünün alınması için etkileşim süresi en az 5 dk olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda 5 dakikadan sonra kan miktarının YGRS sinyal şiddetini değiştirmedeği gözlenmiştir.

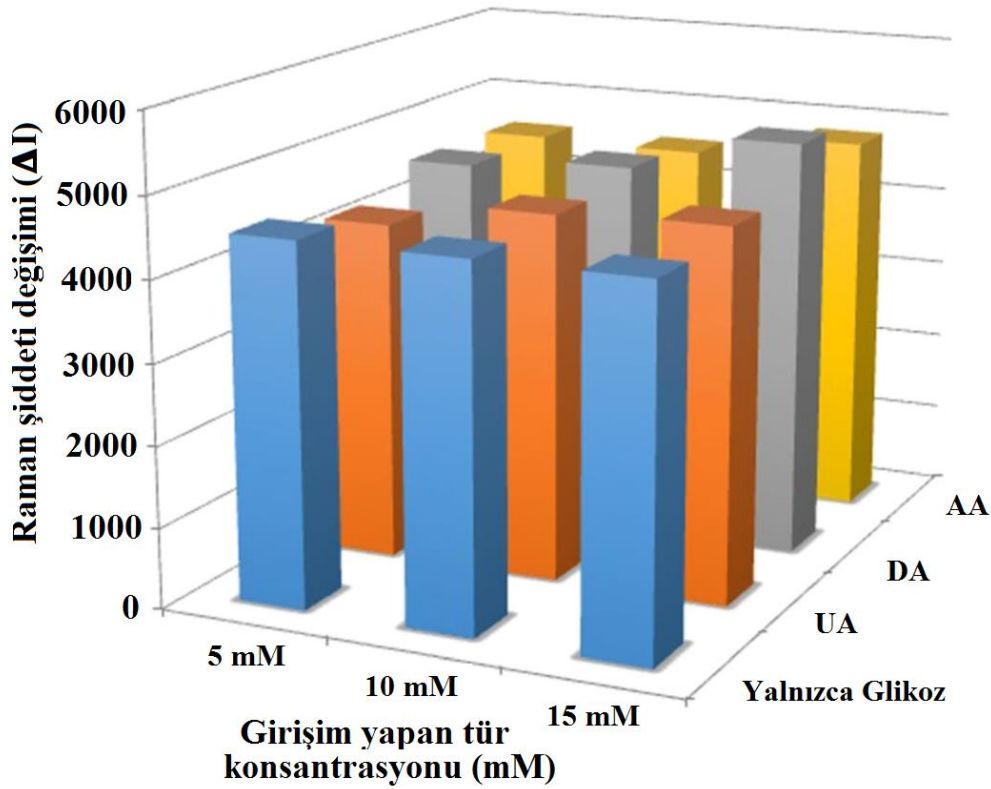


Şekil 4.22. Ölçüm süresinin YGRS sinyal şiddetine etkisi

Bütün bu optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra üretilen çiplerin kullanım süresinin tespit edilmesi açısından kullanılan membranın kararlılık çalışması yapılmıştır. Hazırlanan çiplerde nitroselüloz membranın orjinal yapısı 2 aya kadar korunmaktadır. Fakat 2 ay sonra, membranın yapısı bozulmaya başlamıştır. Ayrıca kanal oluşturmak için kullanılan mum, nitroselüloz membranın hidrofilik kanallarına doğru nüfuz etmeye başlamış ve kanallar tıkanmıştır. Bu yüzden hazırlanan mikro akışkan nitroselüloz membranların kullanım süresi 2 ay olarak belirlenmiştir.

Kan ortamında girişim yapabilecek moleküllerin sonuçlara etkisi

Kan örneği ile çalışılırken glikoz molekülleri ile girişim oluşturabilecek türlerin sonuçlara etkisi de incelenmiştir. Bunun için AA, UA ve DA gibi olası girişim yapabilcek türler ile çalışılmıştır. Bu moleküllerin farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış, glikoz içeren kan örneklerine ilave edilmiş ve membran yüzeyine damlatılmıştır. Daha sonra 1070 cm^{-1} 'deki Raman pikinin değişimine göre sonuçlar grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.23'de görüldüğü gibi Raman sinyal şiddetindeki değişim UA için % 5,10; DA için % 2,49 ve AA için ise % 2,39 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu veriler, geliştirilen kağıt tabanlı YGRS çipi ile glikoz moleküllerinin tayininin UA, AA ve DA moleküllerinin varlığında seçici bir şekilde yapılabileceğini göstermiştir.

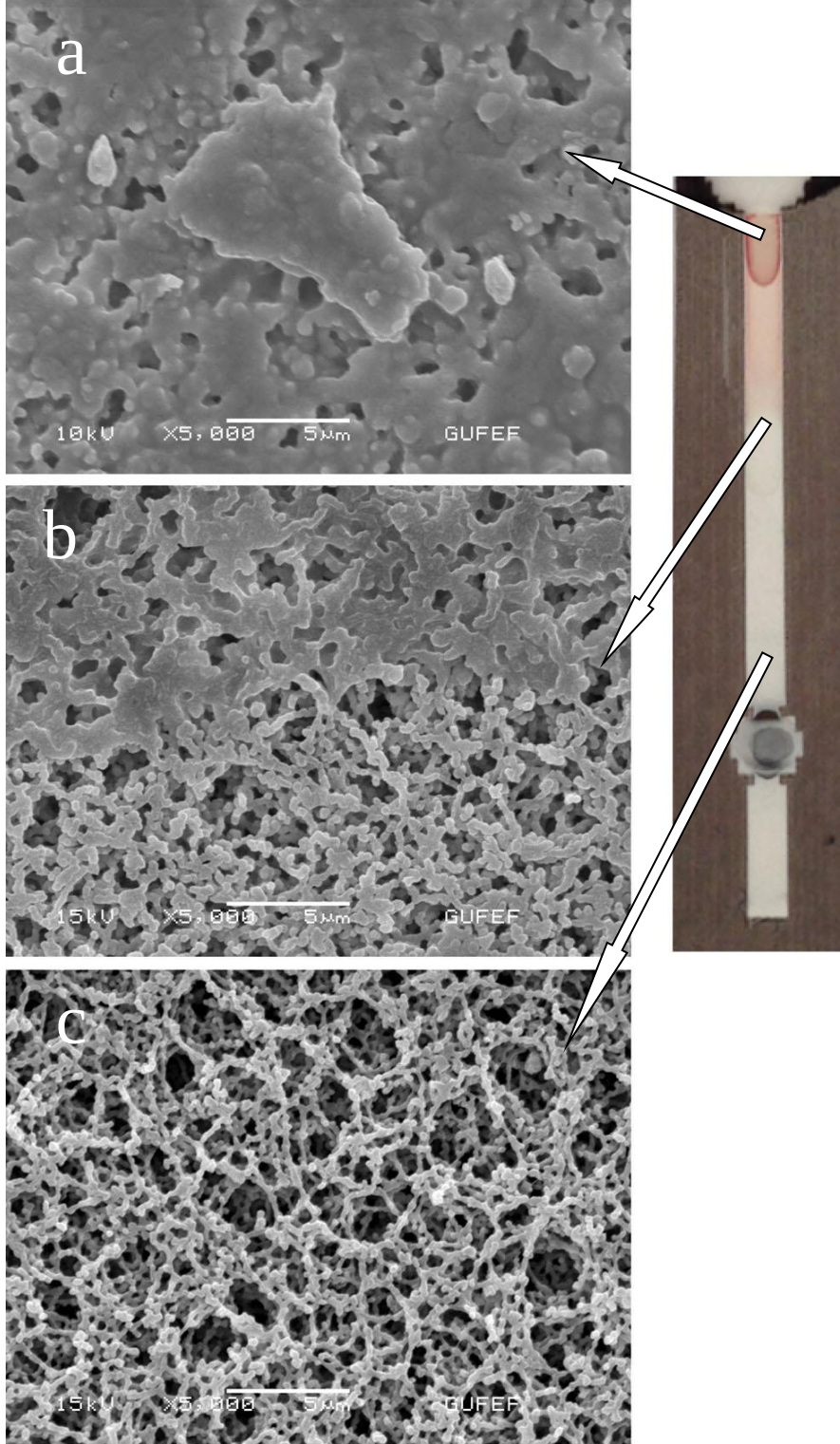


Şekil 4.23. Glikoz tayininde Raman sinyallerine 5, 10, 15 mM ürik asit (UA), dopamin (DA), ve askorbik asit (AA) varlığının etkisi

Kağıt tabanlı mikro akışkan chip kullanılarak gerçek örnekte glikoz tayini

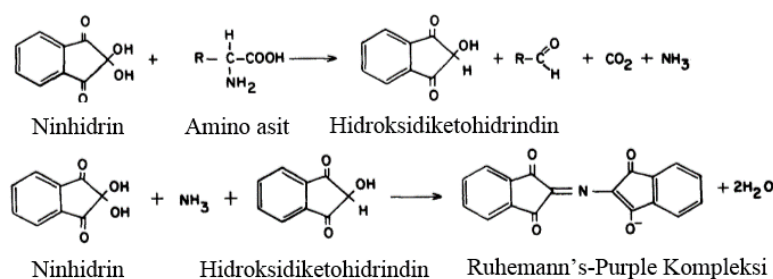
Hazırlanan chipin hidrofilik mikro kanalı, yüksek akış hızından düşük akış hızına kontrollü olarak değişen çok basamaklı bir pompa gibi davranır. Bu sayede serum YGRS ölçüm alanına doğru ilerler (Martinez ve diğerleri, 2008). Nitroselüloz membranda serumun kan örneğinden ayrılıp ayrılmadığını belirlemek için SEM görüntüleri alınmıştır. Bu görüntülere göre YGRS ölçüm alanında hiç bir kan hücresine ya da kalıntısına rastlanmamıştır. Buna ek olarak nitroselüloz membrana kan örneği damlatıldıktan sonra kanalda meydana gelen olayları aydınlatmak amacıyla hidrofilik kanal boyunca her bir bölgenin SEM görüntüsü alınmıştır. Resim 4.8a incelendiğinde örneğin damlatıldığı bölgenin kan matriksiyle dolu olduğu görülmektedir. Kan örneği hidrofilik kanal boyunca kapiler etki ile hareket ederken, kan hücreleri ve proteinler nitroselüloz membranda hapsolmuştur ve kan örneğindeki küçük moleküller YGRS ölçüm alanına doğru ilerlemiştir. Resim 4.8b’de membranda, kan matriksinin hapsoldüğü ve serumun ilerlediği faz ayrımı gösterilmiştir. Ölçme alanına yakın bölgelerde artık büyük moleküllere ve kan hücrelerine hiç rastlanmamaktadır. Glikoz moleküllerinin YGRS ölçüm alanına akışı

tamamlandıktan sonra, kan örneğindeki glikoz konsantrasyonunu belirlemek için YGRS ölçümleri alınmıştır.



Resim 4.8. Kağıt tabanlı mikro akışkan çip kullanılarak kan örneği çalışılırken, a) kanın damlatıldığı, b) serumun ayrıldığı ve c) küçük moleküllerin ilerlediği bölgelerin SEM görüntüleri

Kanda bulunan proteinlerin kanal boyunca hareketini belirlemek için, α -amino grubunun en karakteristik reaksiyonu olan ninhidrin reaksiyonu kullanılmıştır. Bu yöntemde amino asitler, ninhidrin ile tepkimeye girerek mor renkli bir kompleks oluştururlar. Eşitlik 4.2’de reaksiyon mekanizması gösterilmiştir (Bottom, Hanna ve Siehr, 1973). Serum ile hazırlanan kağıt tabanlı mikro akışkan çip etkileştirildikten sonra çipin farklı bölgelerine ninhidrin çözeltisi damlatılmıştır. Özellikle örneğin uygulandığı bölgeye yakın bölgelerde mor renk gözlenmiş ve bu bölgelerde protein varlığı tespit edilmiştir. Fakat ölçüm alanında ise mor renge rastlanmamıştır. Böylece proteinlerin ölçüm alanına ulaşmadan önce nitroselüloz membran tarafından hapsedildiği belirlenmiştir.



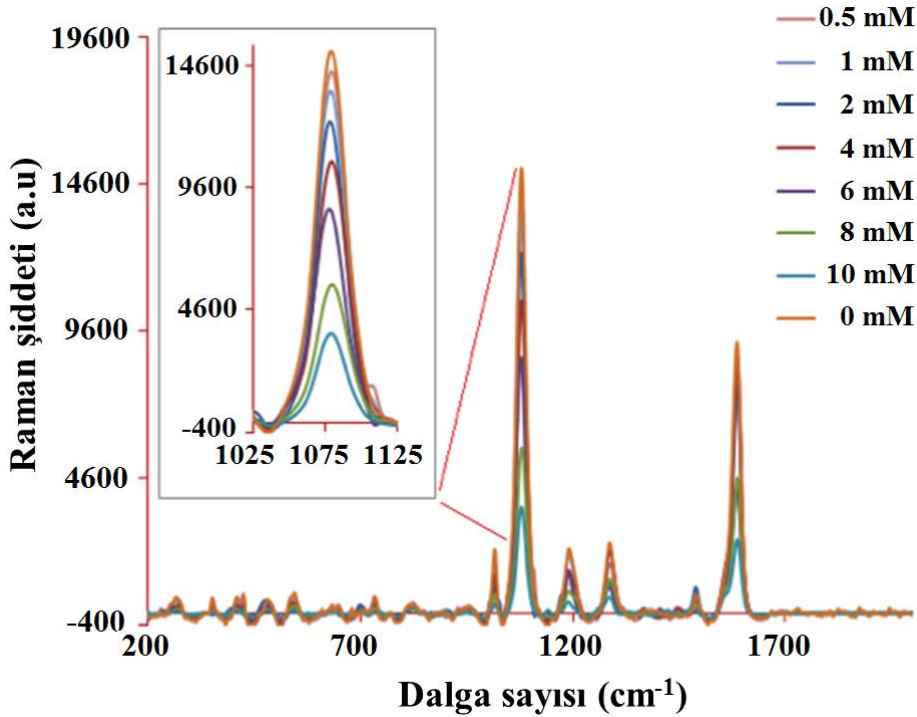
Eşitlik 4.2. Amino asitlerle ninhidrinin reaksiyon mekanizması

Çubuk şeklinde sentezlenen altın nanoparçacıklar, glikoz molekülerinin tutunmasını artırmak için 15 mM 4-MBA'nın yanısıra 5mM 1-DT ile modifiye edilmiştir. Bu molekülün tercih edilmesinin nedeni, tiyol grubu içeren uzun alkan zinciri sayesinde homojen bir dağılım sağlamasıdır. Fenil boronik asit grupları ise kompleks oluşum ajanı olarak davranır (Torul ve diğerleri, 2014). Modifiye altın nanoçubukların Raman pikleri Şekil 4.24’de görüldüğü gibi 698, 1000, 1024, 1070, 1184, 1290, 1490, 1583 cm^{-1} olarak gözlenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi 698 ve 1024 cm^{-1} ’de görünen pikler C-S gerilme moduna, 1000 cm^{-1} ’de görülen pik ise fenil gruplarına ait piklerdir (Kanayama ve diğerleri, 2000; Rycenga ve diğerleri, 2008). 1290 ve 1490 cm^{-1} ’de görülen pikler ise fenil halkasında bulunan C-C ve C=C gerilme modlarına ait piklerdir (Erdogdu ve diğerleri, 2009). 1070 cm^{-1} ve 1184 cm^{-1} ’deki pikler ise boronik asitin B-OH ve B-C gerilme modlarına ait piklerdir (Kurt ve diğerleri, 2009).

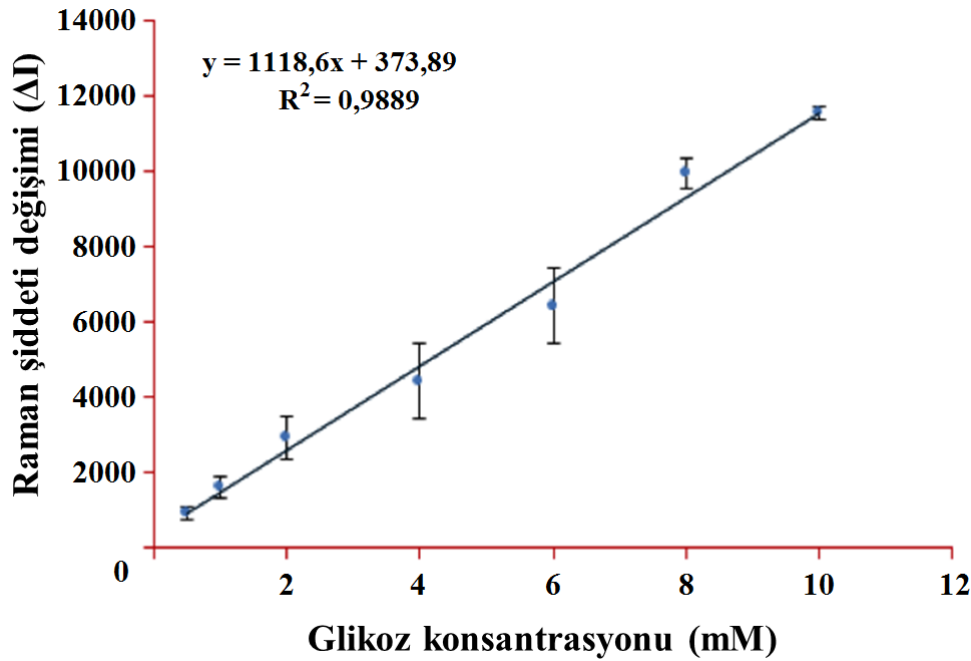
Glikoz molekülleri boronik asit ile etkileştiğinden, B-OH gerilme moduna işaret eden 1070 cm^{-1} ’deki pik glikoz konsantrasyonunun artışı ile orantılı olarak azalmaktadır. Bu azalmadan yola çıkılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve glikoz molekülerinin tayini

gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.25’de gösterildiği gibi, kan örneğine 0,5 ve 10,0 mM konsantrasyon aralığında glikoz çözeltileri ilave edilerek örnekler hazırlanmış ve bu örnekler kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Buna göre geliştirilen yöntem için doğrusal çalışma aralığı 0,5 and 10,0 mM iken LOD değeri 0,1 mM olarak bulunmuştur. Ayrıca şekilde glikoz konsantrasyonuna bağlı olarak pik şiddetindeki değişim de gösterilmiştir.

Kan örneğinden glikoz moleküllerinin tayini oluşturulan kalibrasyon grafiği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan kan eşleniğinde glikoz konsantrasyonu, firmadan sağlanan bilgilere göre $6,17 \pm 0,11$ mM olarak bilinirken geliştirilen yöntemle elde edilen sonuç $5,43 \pm 0,51$ mM’dır. Glikoz konsantrasyon değeri kalibrasyon eğrisi kullanılarak % 95 güven seviyesinde deneysel olarak hesaplanmış ve istatistiksel olarak ürün için belirtilen değer ile hesaplanan değer arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bununla birlikte kan eşleniğindeki glikoz konsantrasyonunun geri kazanım değeri % 88 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçlara göre, hiç bir ön hazırlık işlemi yapılmadan gerçek örnekte glikoz tayininin geliştirilen yöntem ile yapılabileceği söylenebilir.



Şekil 4.24. Kağıt tabanlı mikro akışkan çip yüzeyinde artan glikoz konsantrasyonuna karşı boronik asidin 1070 cm^{-1} ’deki pik şiddetindeki değişimin Raman spektrumu

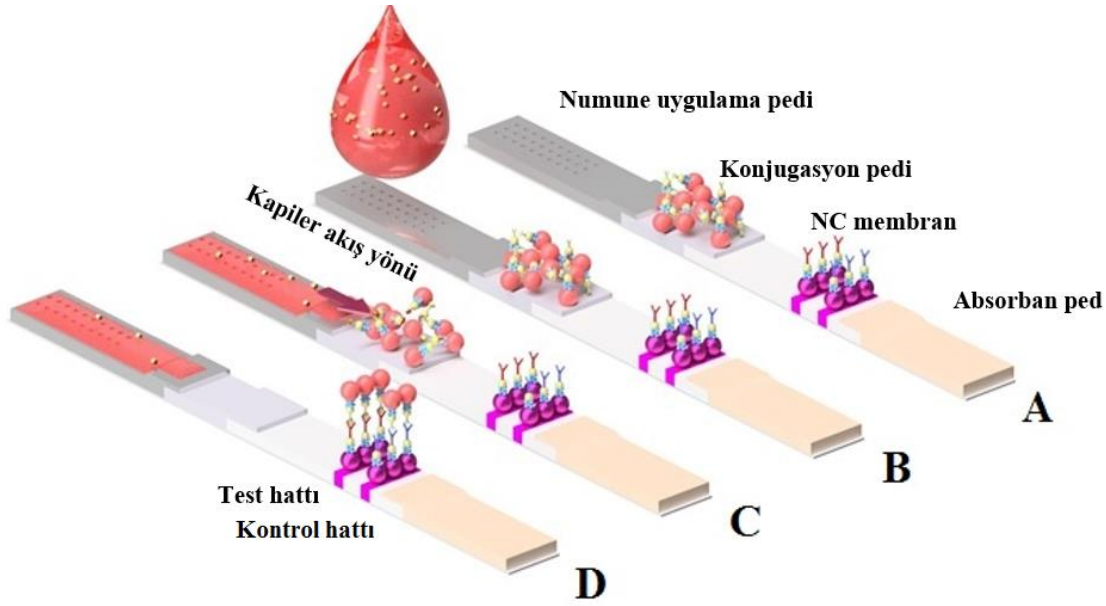


Şekil 4.25. Kağıt tabanlı mikro akışkan çip kullanılarak standart ekleme yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi

4.2. Kanser Biyobelirteç Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi

4.2.1. Hazırlanan yatay akış test striplerinin çalışma prensibi

Tipik bir yatay akış test stripi, numune uygulama pedi, konjugasyon pedi, analitik membran ve absorban pedi olmak üzere dört bileşenden oluşur. Bu çalışmada sandviç immünoassay temeline dayanan Qdot tabanlı bir yatay akış test stripi geliştirilmiştir. Geliştirilen immünoassay ve çalışma ilkesi Şekil 4.26’da şematik olarak gösterilmiştir. Yatay akış test stribini inşaa etmek için ilk önce, test ve kontrol hatlarını oluşturmak üzere, sırasıyla poliklonal ve ikincil antikorlar ile konjuge edilmiş altın nanopartiküller analitik membrana uygulanmıştır. Burada altın nanopartiküller Qdot’ların floresans şiddetini artırmak için kullanılmıştır. Son olarak tüm bileşenler bir mikroskop camının üzerine çift taraflı bir bant ile her bir bileşen bir diğerinin üzerine 2 mm gelecek şekilde tutturulmuştur.

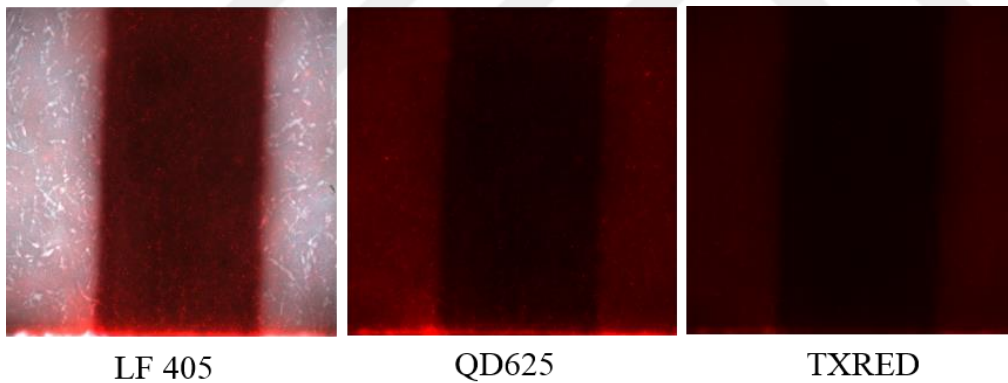


Şekil 4.26. A) Yatay akış test striplerinin şematik gösterimi, B) numune uygulama pedine CEA protein içeren örneğin uygulanması, C) analit-Qdot kompleksinin düzenlenmesi ve düzenlenen kompleksin nitroselüloz membran boyunca kapiler etkisi ile ilerlemesi, D) test hattında bulunan poliklonal antikorlar tarafından CEA-Qdot komplekslerinin yakalanması ve kontrol hattındaki ikincil antikorlar tarafından bağlanmayan Qdot konjugatlarının yakalanması

Hazırlanan sistemin çalışma prensibi şu şekilde özetlenebilir; tam kan analizi için analit içeren örnek numune uygulama pedine damlatılmıştır. Kan hücreleri numune uygulama pedinde hapsolürken, analit kapileri etkisi ile membran boyunca hareket etmiş ve aynı zamanda Qdot-antikor konjugatları ile etkileşmiştir (Şekil 4.26C). Daha sonra düzenlenen analit-Qdot kompleksi NC membran boyunca ilerlemeye devam etmiş ve sonunda seçici antijen-antikor ilişkisine dayanan bir tutunma ile test hattında altın nanopartikül-Qdot poliklonal antikor konjugatları tarafından yakalanmıştır. Qdot konjugatlarının fazlası ise kontrol hattında altın nanopartikül-CEA ikincil antikor konjugatları tarafından yakalanmıştır (Şekil 4.26D). Akış, örneğin kalan kısmının absorban pedde toplanmasıyla sonuçlanmıştır. Qdot-antikor konsantrasyonunun fazla olması durumunda NC membran yüzeyinde Qdot konjugatlarının toplanması ile zemin sinyali arttığı için, Qdot konsantrasyonu belirli bir seviyede tutulmuştur. Fakat bu durumda yüksek derişimde analit içeren örnekler ile çalışıldığında ortamda yeteri kadar Qdot konjugatı bulunmadığı için kontrol hattına bağlanan Qdot konjugatlarının miktarı azalmıştır. Yukarıda tanımlanan ilkenin bir sonucu olarak, örnekte bulunan analit derişimine bağlı olarak kontrol hattından alınan sinyalin değiştiğini söyleyebiliriz. Eğer yüksek derişimde analit içeren bir örnek için kontrol hattındaki sinyal şiddeti belirli bir seviyenin altında veya yok ise test geçersizdir

aksi durumda sonuç pozitifdir. Örnek analit içermiyor ise, sadece kontrol hattında sinyal gözlenir ve sonuç negatiftir.

Cep telefonu tasarımı yapılırken kullanılacak olan ışık kaynağı ve emisyon filtresinin dalga boyuna karar vermek için LF405/LP-B (405 nm sonrasında geçiren emisyon filtresi), QDOT625-C (625 $\pm$ 15 nm'yi geçiren emisyon filtresi) ve TxRED-4040C (624 $\pm$ 40 nm'yi geçiren emisyon filtresi) olmak üzere üç farklı filtre seti denenmiştir. Bu amaçla Olympus marka mikroskop kullanılmıştır. Yatay akış test stribi ile örnek etkileştirilmiş ve 10X objektif lens ile 1000 ms uyarma süresinde test hattının mikroskop görüntüsü alınmıştır. Resim 4.9'da elde edilen mikroskop görüntüleri verilmiştir. Burada QDOT625-C ve TxRED-4040C filtre setleri kullanıldığında nitroselüloz membranın kırmızı dalga boyunda floresansı görülmektedir. LF405/LP-B filtre seti kullanıldığında ise nitroselüloz membranın floresansı filtrelenerek Qdot emisyonu belirgin hale gelmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak 395 nm dalga boyunda emisyon yapan ışık kaynağı ile 418 nm ve üzerini geçiren bir long-pass emisyon filtresi kullanılmıştır.



Resim 4.9. Test hattının farklı filtre setleri ile elde edilen mikroskop görüntüsü

Geliştirilen cep telefonu tabanlı floresans mikroskop ile kantitatif analiz gerçekleştirilmiştir. Burada örnekteki analit derişiminin artışına karşı test hattındaki Qdot'ların sinyal şiddetinde artış olması beklenmektedir. Son olarak yatay akış test striplerinin görüntüleri alınarak, test ve kontrol hatlarındaki Qdot'ların floresans şiddetleri hesaplanmış ve sonuçlar test /kontrol hattı (T/C) olarak verilmiştir. Böylece üretim süreci boyunca oluşan yatay akış test striplerinin yapısında olan heterojenlikten kaynaklanan hatalar elimine edilmiş ve ayrıca daha güvenilir ve doğru sonuçlar verilmiştir.

4.2.2. Yatay akış test striplerinin optimizasyon çalışmaları

Nitroselüloz membranda seçici olmayan bağlanmaları engellemek için yapılan optimizasyon çalışması

Üç farklı çözelti kullanılarak bloke edilmiş membranlar kullanılarak hazırlanan striplere tampon çözelti damlatılarak konjuge Qdot'ların kanal boyunca ilerlemeleri beklenmiş ve 15 dakika sonra Olympus marka mikroskop kullanılarak, 4X objektif ile floresans görüntüleri alınmıştır. Resimlerin sağ tarafında yeşil renkli olarak gördüğümüz ped absorban pedidir. Sol taraftaki turuncu kırmızı renkli olarak gördüğümüz ped ise konjugasyon pedidir. Tampon çözelti konjugasyon pedinden önce yerleştirilen numune uygulama pedine damlatılmıştır. Resim 4.10a'da PVP kullanılarak hazırlanan çözelti ile bloke edilmiş membranda kanal boyunca konjuge Qdot'ların emisyonu görülmektedir. Yani burada nanoparçacıklar membran yüzeyine tutunmuşlardır. Resim 4.10c'de ise bloke etme ajanı içermeyen yalnızca protein ve yüzey aktif madde içeren çözelti ile bloke edilmiş membran kullanılarak hazırlanan stripin floresans mikroskop görüntüsü verilmiştir. Burada konjuge Qdot'lar konjugasyon pedinin yakınında toplanmış ve kanal boyunca ilerleyememiştir. Son olarak Resim 4.10b'de ise PEG-400 içeren çözelti kullanılarak hazırlanan stripin floresans mikroskop görüntüsü verilmektedir. Burada ise konjuge Qdot'ların absorban pede doğru hareket ettiği, kanal boyunca konjugatların tutunmasının önemli oranda azaldığı ve konjugasyon pedine yakın bölgelerde konjuge Qdot'ların neredeyse olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre % 5 BSA, % 2 PEG-400 ve % 0,1 Tween-20 içeren çözelti ile en iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Bloking çözeltileri

% 5 BSA
% 0.1 Tween-20
% 2 PVP



% 5 BSA
% 0.1 Tween-20
% 2 PEG-400



% 3 BSA
% 0.1 Tween-20

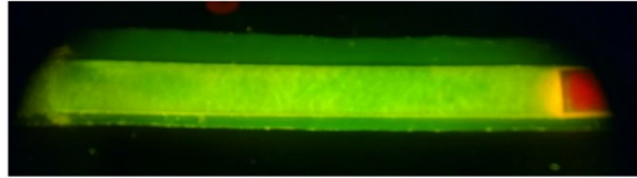


Resim 4.10. Farklı bloke etme çözeltileri kullanılarak hazırlanan yatay akış test striplerinde Qdot konjugatlarının ilerlemesini gösteren mikroskop görüntüleri

Stripler hazırlandıkları gün kullanılmadıkları takdirde, membranın emme kapasitesi düştüğü için bloke etme işlemi için çözelti değiştirilmiş ve %1 kazein içeren bir çözelti kullanılmıştır. Bunun yanı sıra bloke etme işlemi tamamlandıktan sonra membranda kalan tuzların temizlenmesi ve membranın tekrar hidofilik özelliğini kazanması için PBS-T ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Resim 4.11a'da kazein içeren çözelti ile hazırlanmış stripin floresans mikroskop görüntüsü ile Resim 4.11b'de ise BSA, PEG-400 ve Tween-20 içeren çözelti ile hazırlanmış stripin floresans mikroskop görüntüsü görülmektedir. Buna göre kazein kullanıldığında konjuge Qdot'lar membran boyunca bağlanmadan ilerlemiştir.

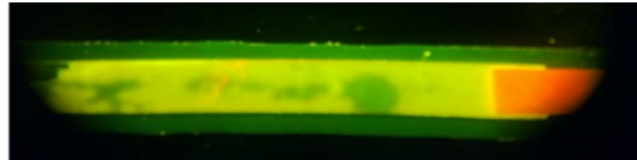
Bloking çözeltileri

**% 1 Kazein çözeltisi
(+ PBS-T ile yıkama)**



**% 5 BSA
% 0.1 Tween-20
% 2 PEG-400**

b



Resim 4.11. Bloke etme ajanı olarak BSA yerine kazein kullanılmasının ve bloking işleminden sonra yıkama yapılmasının Qdot konjugatlarının analitik membran boyunca ilerlemesine etkisini gösteren mikroskop görüntüleri

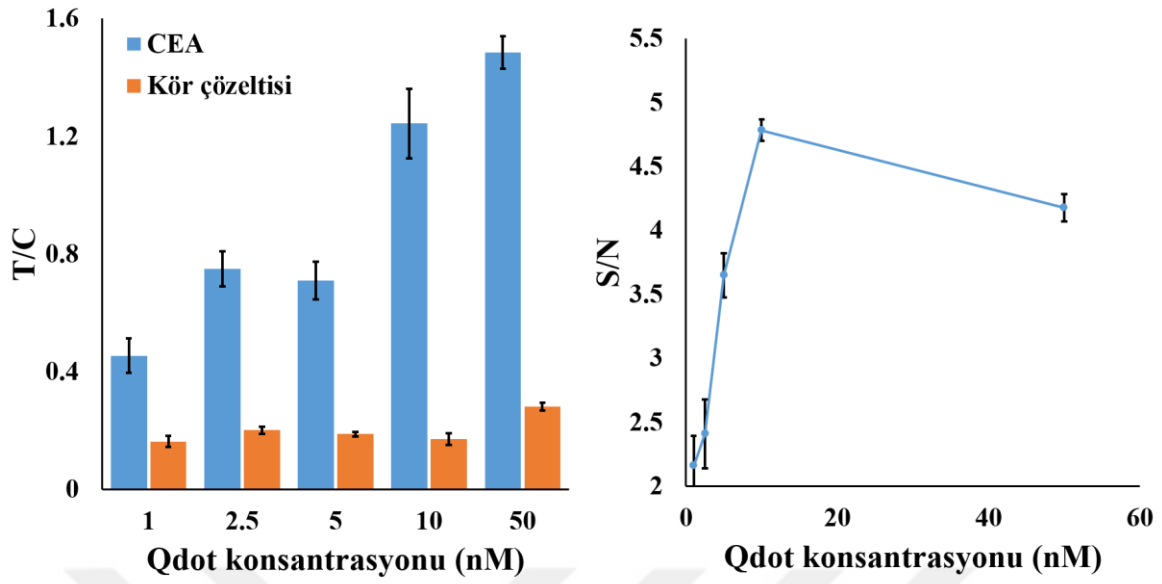
Bununla birlikte PBS-T ile yıkama işleminin yapılması membranın gözeneklerinin açılmasını sağlamıştır. Bu yıkama işleminin test striplerinin kullanım süresini nasıl etkilediğini anlamak için farklı zaman aralıklarında elüsyon süreleri değerlendirilmiştir. Membran bloke edildikten hemen sonra 2 cm uzunluğunda ve 2 mm genişliğindeki membran için elüsyon süresi 5 dk. olarak belirlenmiştir. Hazırlanan bu test stripleri 12 saat ve 2 gün sonra da test edilmiş ve elüsyon süreleri ilk günkü değerle aynı bulunmuştur. Bloke etme işlemine ek olarak yapılan yıkama işleminin bloke etme işlemi sonrası

hazırlanan striplerindeki membranın gözeneklerinin açılmasında ve hidrofilik özelliğini korumasında etkili olduğu gözlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında membran %1'lik kazein çözeltisi ile 2 saat bloke edilmiş, PBS-T ile 3 kez 5'er dakika yıkanmış, daha sonra 1 saat boyunca oda sıcaklığında kurutulmuş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Qdot miktar optimizasyonu

Beş farklı konsantrasyonda (1-50 nM) Qdot içeren konjugasyon çözeltileri ile hazırlanan test stripleri ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.27'de gösterilmiştir. Şekil 4.27a'da farklı konsantrasyonlarda Qdot konjugatları ile hazırlanan striplerle CEA protein ve kör çözeltileri ile elde edilen test sonuçları test hattının floresans şiddetinin kontrol hattının floresans şiddetine oranı olarak verilmiştir. Şekil 4.27b'de ise sinyal/gürültü oranı hesaplanarak sonuçlar verilmiştir. Burada sinyal CEA protein tayindeki test hattının floresans şiddetini gösterirken, gürültü ise tampon çözelti ile çalışıldığında test hattından elde edilen floresans şiddeti alınarak hesaplanmıştır. T/C hattı oranları dikkate alındığında 10 ve 50 nM Qdot konjugatı emdirilmiş konjugasyon pedleri kullanıldığında en yüksek sinyalin elde edildiği görülmektedir.

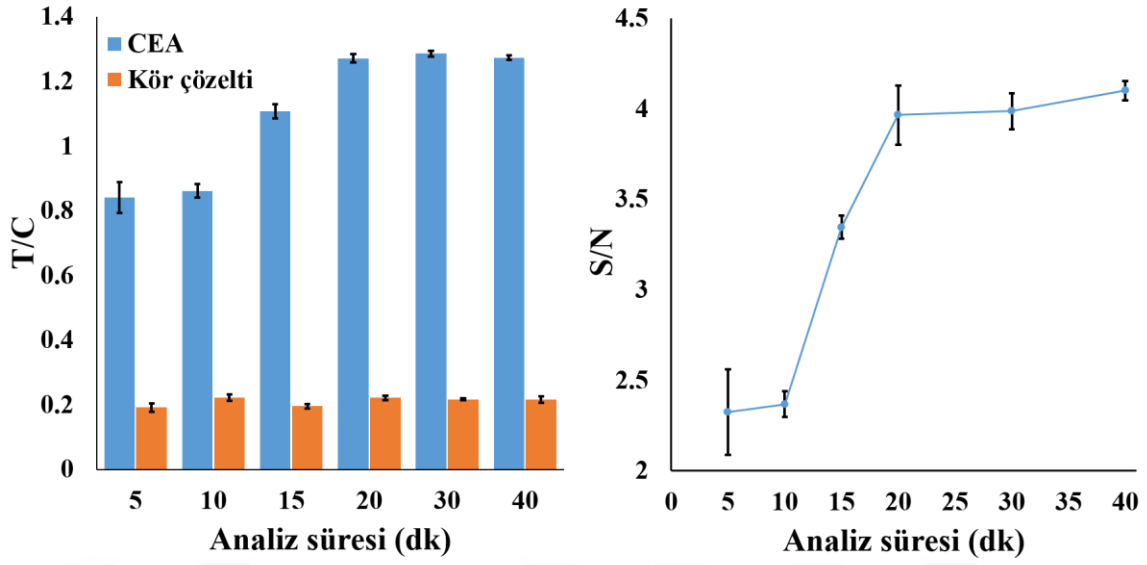
Bununla beraber S/N oranları incelendiğinde ise en yüksek değer 10 nM Qdot konjugatı emdirilmiş konjugasyon pedi ile elde edilmiştir. Bunun nedeni Qdot konsantrasyonu gereğinden fazla arttığında test hattındaki bağlanma ile birlikte seçici olmayan bağlanmanın da artmasıdır. Burada 50 nM Qdot ile çalışıldığında seçici olmayan bağlanmadan kaynaklı sinyal artışı olduğu için ve 10 nM Qdot konjugatı emdirilmiş konjugasyon pedleri ile en yüksek sinyal ve en düşük seçici olmayan bağlanma sağlandığı için bu konsantrasyonda çalışılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.27. Farklı konsantrasyonlarda Qdot konjugatı kullanılması nın Qdot-tabanlı yatay akış test striplerinin sinyal şiddetine etkisi

Etkileşim süresinin optimizasyonu

Analiz süresinin optimizasyonu için yapılan çalışmada hazırlanan test striplerinin mikroskop görüntüleri, çözelti damlatıldıktan 5, 10, 15, 20, 30 ve 40 dk sonra alınmıştır. Sinyaller hesaplanmış ve  ekil 4.28'de görüldüğü gibi grafiğe ge irilmıştir. Şekil 4.28a'da CEA ve k r çözelti ile elde edilen sonuçlar T/C oranı olarak verilmiştir. En yüksek T/C sinyali 20 dk. sonra elde edilmiştir. Daha sonraki dakikalarda artık sinyal şiddetinde farklılık olmadığı gözlenmiştir. Şekil 4.28b'de ise aynı test striplerine ait S/N oranları verilmiştir. Aynı şekilde 20 dk. sonra en yüksek değere ulaşılmış ve daha sonraki dakikalarda önemli bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Her iki grafikten elde edilen sonuçlara göre analiz süresi 20 dk. olarak belirlenmiştir.

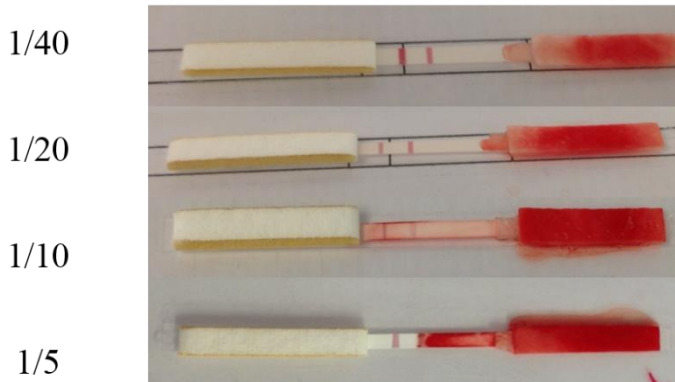


Şekil 4.28. Qdot-tabanlı yatay akış test striplerinde analiz süresinin Qdot sinyallerine etkisi

Kan miktarının optimizasyonu

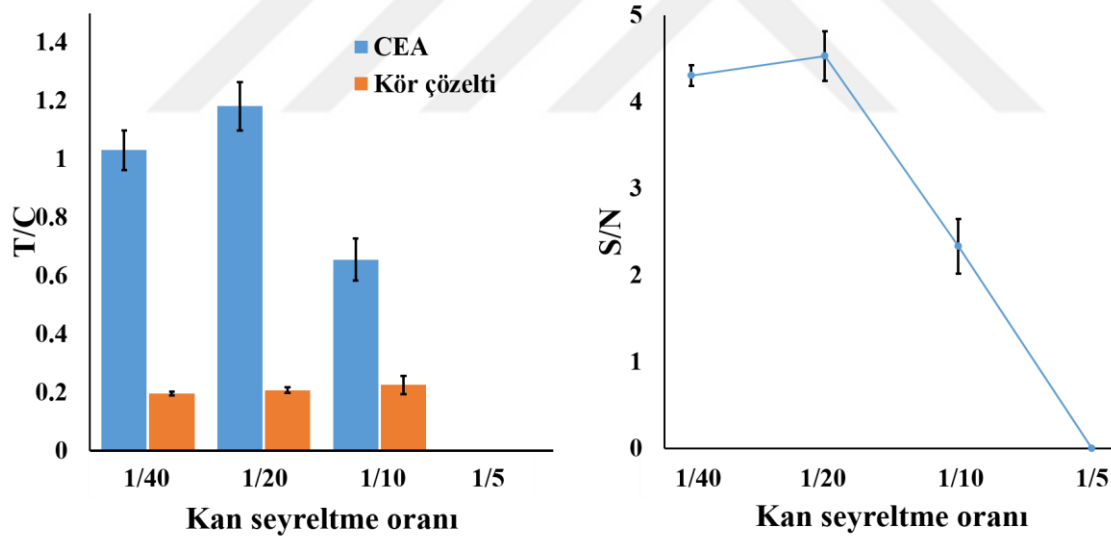
Farklı oranlarda seyreltilmiş kan örneklerine 10 ng/ml CEA spike edilerek hazırlanan örnekler ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.29’da gösterilmiştir. Şekil 4.29a’da sonuçlar test hattının kontrol hattına oranı olarak verilmiştir. Ayrıca aynı grafikte seyreltik kan örneklerine CEA spike edilmeden hazırlanan kör çözeltileri ile alınmış sonuçlar da gösterilmiştir. Resim 4.12’de ise hazırlanan test stripleri görülmektedir.

Seyreltme oranı



Resim 4.12. Kan örneğinin seyreltme oranının optimizasyon çalışmasında kullanılan test striplerinin görüntüsü

Resimlerde görüldüğü gibi 40 ve 20 kat seyreltilmiş kan örneklerinde kırmızı kan hücreleri örnekten başarılı bir şekilde ayrılmış ve serum kısmı test ve kontrol hatlarına uygun analiz süresinde ulaşmıştır. Fakat 10 kat seyreltilmiş kan örneğinde, plazma hatlara doğru ilerlemesine rağmen plazma ile beraber kan hücrelerinin bir bölümü de hatlara ulaşmıştır. Kan hücrelerinin hatlara ulaşması konjuge Qdot'ların hatlardaki antikorlar tarafından yakalanmasını engellemesinin yanı sıra bağlanan konjuge Qdot'ların sinyal şiddetinde de azalmaya neden olduğu için 10 kat seyreltme uygun bulunmamıştır. Beş kat seyreltilmiş kan örneği ile çalışıldığında ise örnek çok derişik olduğu için örnek uygulama pedinde ve analitik membran boyunca örneğin tamamı hapsolmuş, test ve kontrol hatlarına ulaşamamıştır. Bu sebeple bu örneklerden sinyal alınamamıştır. Şekil 4.29b'de gösterilen S/N oranlarına bakıldığında da 1/40 ve 1/20 kat seyreltilmiş kan örnekleri ile çalışıldığında elde edilen sinyaller arasında önemli bir fark olmadığı ve en iyi sonuçların bu seyreltme oranları kullanılarak alındığı belirtilmiştir. Çalışmada 1/20 kat seyreltilmiş kan örnekleri ile çalışılmasına karar verilmiştir.

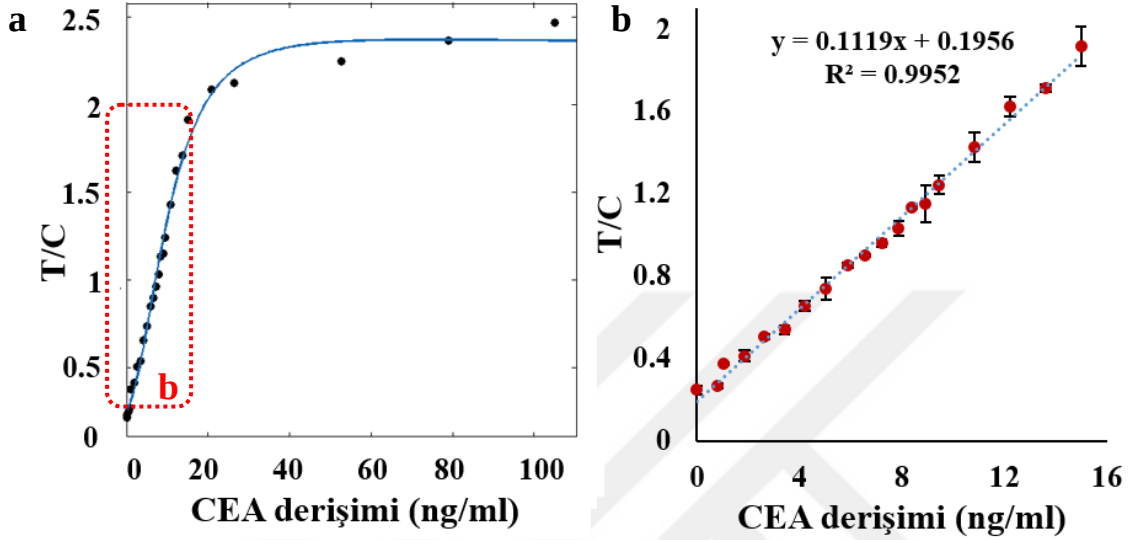


Şekil 4.29. Kan örneklerinin seyreltme oranlarının CEA tayininde sonuçlara etkisi

4.2.3. CEA protein tayini için yatay akış test striplerinin analitik performansının değerlendirilmesi

Doğrusal aralığın belirlenmesi için geliştirilen yatay akış test stripleri 0,1 ng/ml ve 105,0 ng/ml arasında farklı derişimlerde standart CEA protein çözeltileri ile test edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrisinin denklemi, $f(x) = (2.311x^2 + 6.348x + 40.46) / (x^2 - 1.177x +$

161) ve R^2 değeri 0.9931 olarak bulunmuştur. Şekil 4.30'de elde edilen eğri yakından incelendiğinde eğri 1,05 ng/ml ile 15,0 ng/ml arasında doğrusal bulunmuştur. Doğrusal grafiğin denklemi ise $y = 0.1119x + 0.1956$ ve R^2 değeri 0.9952 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre LOD değeri 0,96 ng/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.30. Tampon çözeltide CEA moleküllerinin kantitatif tayini; a) Cep telefonu tabanlı floresans mikroskop kullanılarak CEA moleküllerinin kantitatif tayini için kalibrasyon grafiği, b) 1,05ng/ml ile 15,0 ng/ml derişim aralığında CEA içeren standart çözelti için test striplerinin doğrusal cevabı

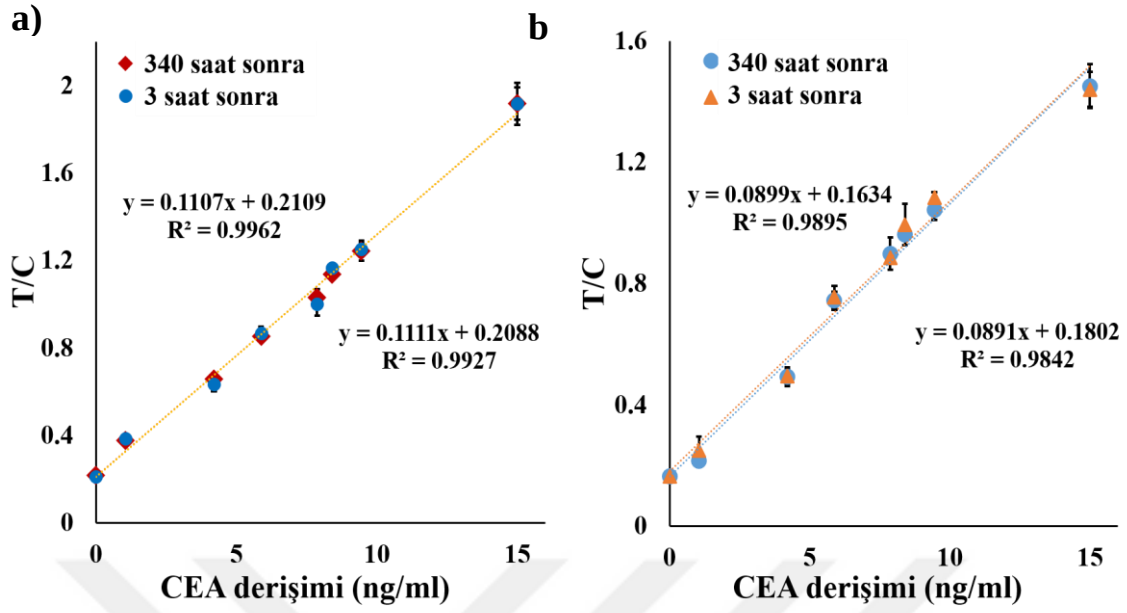
Geliştirilen bir yöntemin kesinliği, elde edilen sonuçların tekrarlanabilme kabiliyeti veya deney sonuçlarının birbirine yakınlığının bir ölçüsüdür. Bu amaçla yapılan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında elde edilen sonuçlar Şekil 4.31'de görüldüğü gibi grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.31a'daki grafikler tampon çözeltisi içerisine CEA protein spike edilerek hazırlanan örneklerden, şekil 4.31b ise 20 kat seyreltilmiş kan örneklerine CEA protein spike edilerek hazırlanan örneklerden farklı günlerde alınan deney sonuçlarını içermektedir. Bu grafikler karşılaştırıldığında, gerek tampon çözeltisi gerekse kan örneklerinde hazırlanan örneklerle alınan sonuçlar arasında önemli bir fark bulunmamaktadır. Kalibrasyon eğrilerinin R^2 değerleri birbirleri ile uyum göstermektedir.

Çizelge 4.2. BSS* değerleri ile birlikte gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

Gün içi kesinlik (n=3)					Günler arası kesinlik (n=6)				
Tamponda			Kanda		Tamponda			Kanda	
CEA (ng/ml)	Bulunan CEA (ng/ml)	BSS	Bulunan CEA (ng/ml)	BSS	Bulunan CEA (ng/ml)	BSS	Bulunan CEA (ng/ml)	BSS	
105	20,36	±0,50 2,44	20,01	±0,64 3,20	20,40	±0,73 3,60	20,25	±0,58 2,87	
26,5	17,16	±0,02 0,14	18,19	±0,19 1,07	17,24	±0,06 0,37	18,19	±0,24 1,30	
15,0	15,37	±0,65 4,25	14,20	±0,77 5,40	15,40	±0,77 5,00	14,20	±0,61 4,28	
9,5	9,38	±0,30 3,18	10,23	±0,07 0,73	9,36	±0,36 3,83	9,91	±0,25 2,49	
8,4	8,61	±0,04 0,47	9,24	±0,43 4,60	8,49	±0,15 1,71	8,95	±0,41 4,62	
7,9	7,12	±0,49 6,82	8,02	±0,28 3,55	7,27	±0,44 6,07	7,98	±0,22 2,79	
5,9	5,92	±0,27 4,57	6,57	±0,51 7,71	5,85	±0,22 3,71	6,38	±0,51 7,92	
4,2	3,82	±0,27 7,18	4.11	±0.26 6.34	4,00	±0,31 7,79	3,83	±0,23 6,07	
1,1	1,60	±0,15 9,28	1.09	±0.01 0.95	1,54	±0,12 7,96	0,90	±0,04 4,24	
Kör	0,29	±0,06 20,5	0.25	±0.05 18.33	0,23	±0,07 30,52	0.04	±0.03 71.5	

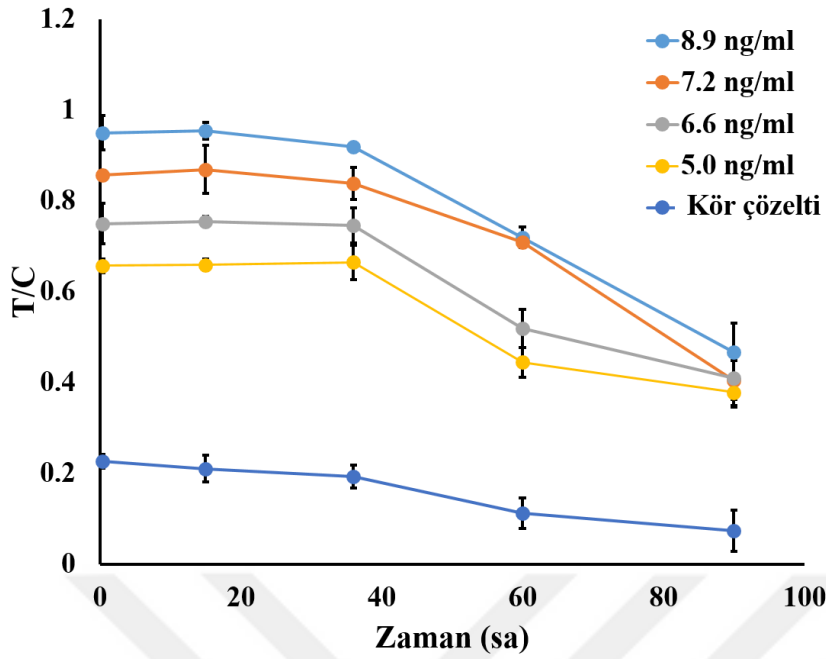
*Bağıl standart sapma (Relative standard deviation-BSS)

Çizelge 4.2’de hazırlanan test stripleri ile yapılan testlerden elde edilen sonuçlar T/C değerleri hesaplanarak verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.2’de sonuçların standart sapması ve BSS değerleri de verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde hazırlanan test striplerinin iki hafta sonra kullanılması durumunda sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmamıştır. Kesinlik için biyolojik örneklerde % 15 ve diğer örneklerde % 10 oranında konsantrasyon düzeylerindeki değişim kabul edilebilir değerdir. Bu sebeple Çizelge 4.2’deki sonuçların kabul edilebilir değerler olduğu söylenebilir.



Şekil 4.31. Yatay akış test stripleri ile geliştirilen yöntem için kesinlik testi. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarının a) tampon çözelti ve b) kan örneği içerisine spike edilen CEA molekülleri ile elde edilen kalibrasyon grafikleri

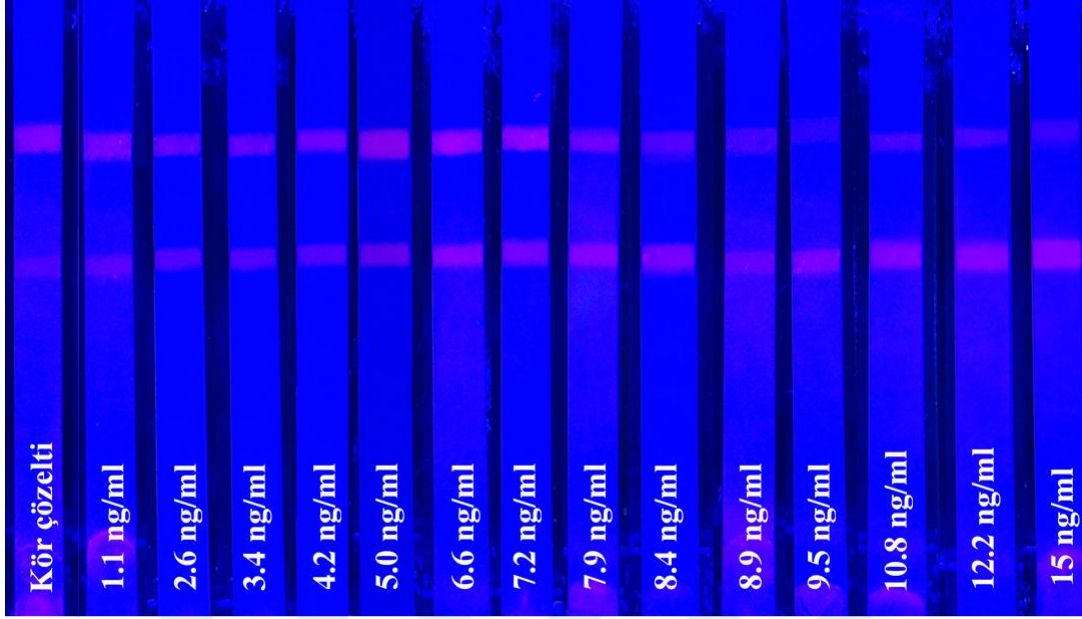
Hazırlanan test striplerinin kararlılık çalışmasından elde edilen sonuçlar Şekil 4.32’de grafiğe geçirilmiştir. Stabilité çalışması için 5,0 ng/ml, 6,6 ng/ml, 7,2 ng/ml ve 8,9 ng/ml olmak üzere 4 farklı derişimde CEA moleküllerini içeren kan örnekleri test stripleri ile etkileştirilmiştir. İlk ölçüm analiz süresinin sonunda yani 20 dk. sonra alınmıştır. İkinci ölçüm 15 saat sonra ve diğer ölçümler de 30, 60 ve 90 saat sonra alınmıştır. Şekil 4.32’de de görüldüğü gibi ilk 30 saat içerisinde test striplerinden elde edilen sinyallerde herhangi bir düşüş olmamıştır. Fakat 30 saatten sonra test ve kontrol hatlarına bağlanmış olan Qdot’ların floresans şiddeti düştüğü için T/C değerlerinde düşüş yaşanmıştır. Fakat burada sonuçlar T/C değeri olarak verildiğinden, yani test hattında sinyal düşüşü olurken kontrol hattında da düşüş olduğu için test hatlarındaki sinyal kaybı grafikte keskin bir şekilde görülmemektedir. Ayrıca 30 saatten sonra alınan sonuçlarda gözlenen azalma zamana bağlı olarak rastgele değişmektedir. Bu sebeple bu süreden sonra test striplerinden okunan sonuçlar doğru sonuç vermeyeceği için kullanılması doğru değildir. Sonuç olarak uygun saklama koşulları sağlandığında örnekle etkileştikten sonra bir test stripi 30 saate kadar doğru sonuç vermektedir.



Şekil 4.32. Yatay akış test striplerinin kan örnekleri ile etkileştikten sonraki kararlılık testi

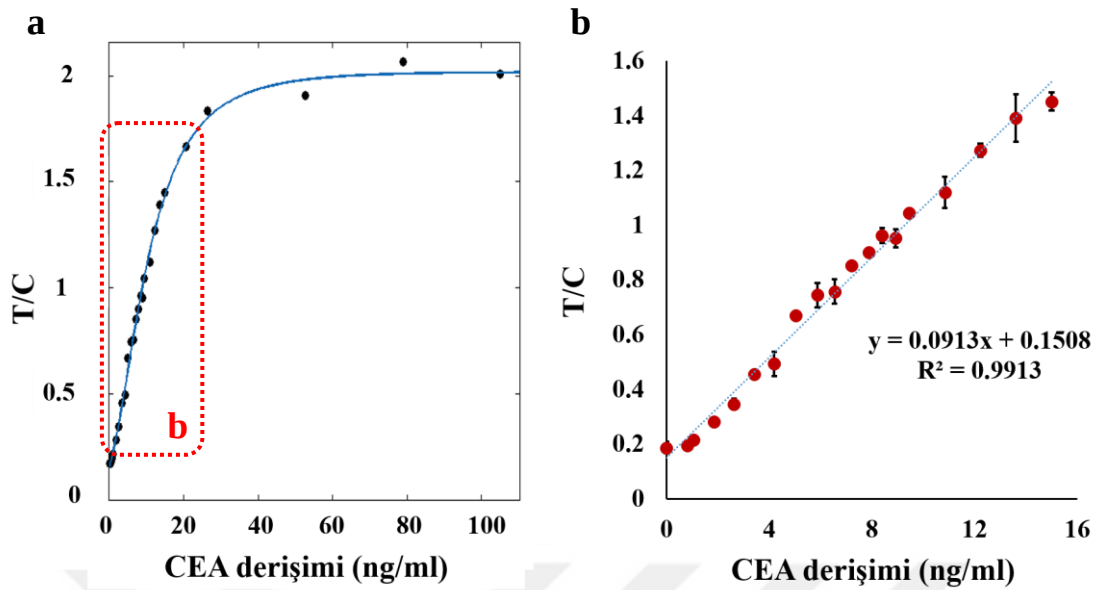
4.2.4. Tam kan örneğinde CEA protein tayini

Klinik çalışmalara zemin hazırlaması açısından Qdot tabanlı yatay akış test striplerinin, tasarlanan cep telefonu tabanlı mikroskop ile tam kan örneklerine uygulanabilirliği test edilmiştir. Bu amaçla son derişimi 0,1 ile 105,0 ng/ml aralığında CEA protein içeren tam kan örnekleri Qdot tabanlı yatay akış test striplerine uygulanmış ve Resim 4.13’de cep telefonu tabanlı mikroskop ile alınan görüntüler verilmiştir. Resimde görüldüğü gibi artan CEA derişimi ile test hatlarında elde edilen sinyal artarken kontrol hatlarındaki sinyal düşmektedir. Burada yalnızca doğrusal aralıktaki örneklerin görüntüleri verilmiştir. Daha önce de değinildiği üzere, zemin sinyalini azaltmak için optimize edilen Qdot miktarı ile çalışıldığında, yüksek derişimlerde CEA içeren örnek için test hattına tutunan Qdot miktarı fazla olacağı için çözeltide kontrol hattına yeterince bağlanacak kadar Qdot kalmamaktadır. Bu yüzden elde edilen görüntülerde yüksek derişimlerde test hattının sinyali artarken kontrol hattının sinyali azalmaktadır.



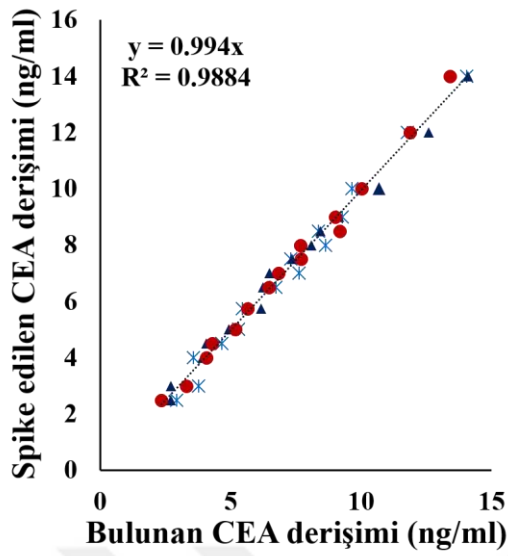
Resim 4.13. Farklı derişimlerde (1,05 ng/ml-15,0 ng/ml) CEA protein içeren kan örneklerinin 80 μ l'si ile etkileştikten sonra Qdot tabanlı yatay akış test striplerin floresans görüntüleri

Mikroskop görüntülerine göre her bir örnek için T/C değeri hesaplanmış ve Şekil 4.33'te görüldüğü gibi artan CEA derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Eğrinin denklemi, $f(x) = (1.994x^2 + 11.18x + 27.24) / (x^2 + 2.826x + 180)$ ve R^2 değeri 0,9972 olarak bulunmuştur. Şekil 4.33a'da elde edilen eğri yakından incelendiğinde eğri 1,05 ng/ml ile 15,0 ng/ml arasında doğrusaldır. Grafiğin denklemi, $y = 0.0913x + 0.1508$ ve R^2 değeri 0,9913 olarak bulunmuştur. LOD değeri, 3 kez analiz edilen kör çözeltinin standart sapma değeri kullanılarak 1,0 ng/ml olarak hesaplanmıştır. CEA proteinin kandaki en düşük seviyesi 3,0 ng/ml olarak bilinmektedir. Bu sebeple geliştirilen Qdot tabanlı yatay akış test stripleri ile birleştirilen cep telefonu tabanlı mikroskop yöntemini kullanarak tam kan örneklerinde kantitatif tayinin yapılabileceği söylenebilir.



Şekil 4.33. Kan örneğinde CEA moleküllerinin kantitatif tayini; a) Cep telefonu tabanlı floresans mikroskop kullanılarak CEA moleküllerinin kantitatif tayini için kalibrasyon grafiği, b) 1,05 ng/ml ile 15,0 ng/ml derişim aralığında CEA içeren standart çözeltiler için test striplerinin doğrusal cevabı

Son olarak yöntemin doğruluğunu değerlendirmek amacı ile 3 hastadan alınan kan örneklerine 15 farklı derişimde CEA protein eklenerek son derişimleri 2,5 ng/ml ile 15,0 mg/ml arasında değişen CEA protein içeren örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu örnekler yatay akış test stripleri ile analiz edilmiş ve mikroskop görüntüleri alınmıştır. Alınan görüntülere göre T/C değerleri hesaplanmış ve Şekil 4.34'de gösterilen kalibrasyon grafiğinin denklemi kullanılarak hazırlanan örneklerdeki CEA derişimleri hesaplanmıştır. Kan örneklerine spike edilen CEA derişimlerine karşı doğru denklemi kullanılarak bulunan değerler Şekil 4.34'de görüldüğü gibi grafiğe geçirilmiştir. Bu doğruya ait R^2 değeri 0,9884 ve eğim 0,994 olarak bulunmuştur. Elde edilen değerler geliştirilen yöntemin kan örneklerinde CEA tayini için uygun olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.3'de yapılan doğruluk çalışmasına ait sayısal veriler sunulmuştur. A, B ve C farklı kan örnekleri ile yapılan çalışmaları göstermektedir. Üç farklı kan örneğinden elde edilen veriler değerlendirildiğinde, BSS değerleri % 10'un altında bulunduğu için sonuçlar arasında anlamlı bir fark yoktur denilebilir. Böylece geliştirilen yöntemin tam kan örneklerinde CEA tayini için uygun olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 4.34. Farklı derişimlerde CEA içeren insan kanının, cep telefonu tabanlı floresans mikroskop ile elde edilen test sonuçları

Çizelge 4.3. CEA moleküllerinin tayini için, üç farklı kan örneğiyle yapılan doğruluk çalışması

Teorik CEA derişimi (ng/ml)	Hesaplanan CEA derişimi (ng/ml)			Ortalama değer		BSS
	A	B	C			
2,5	2,92	2,71	2,35	2,66	±0,24	8,87
3,0	3,76	2,70	3,30	3,26	±0,43	13,35
4,0	3,58	3,93	4,06	3,86	±0,20	5,18
4,5	4,66	4,08	4,30	4,35	±0,24	5,48
5,0	5,30	4,94	5,18	5,14	±0,15	2,94
5,8	5,44	6,18	5,66	5,76	±0,31	5,35
6,5	6,73	6,24	6,45	6,47	±0,20	3,06
7,0	7,62	6,50	6,83	6,98	±0,47	6,77
7,5	7,32	7,36	7,71	7,46	±0,18	2,36
8,0	8,65	8,09	7,68	8,14	±0,39	4,85
8,5	8,37	8,45	9,17	8,66	±0,36	4,18
9,0	9,28	9,16	9,01	9,15	±0,11	1,21
10,0	9,65	10,70	10,03	10,12	±0,43	4,29
12,0	11,76	12,58	11,87	12,07	±0,36	2,99
14,0	14,04	14,09	13,40	13,84	±0,31	2,27

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanda bulunan moleküllerin tayini hala çözülmesi gereken problemler arasındadır. Günümüzde bu problemi çözmek için geliştirilen sistemler arasında biyosensör teknolojisi kullanılarak geliştirilen sistemler önem arz etmektedir. Çalışmada biyosensör sistemleri geliştirilerek kanda glikoz ve karsinoembriyonik antijen (CEA) biyobelirteç tayini başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Temel olarak altın levha kullanılarak kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (SAMs) ve kağıt tabanlı mikroçipler hazırlanmıştır.

SAMs tekniği kullanılarak glikoz tayini

Glikoz ölçümünde kullanılan spektroskopik ve elektrokimyasal teknikler arasında, elektrokimyasal olanlar basit olmaları açısından avantajlıdır. En başarılı elektrokimyasal teknikler, enzimatik metot kullanılarak glikozun yükseltgenmesiyle üretilen hidrojen peroksitin tayinine dayanır fakat enzimatik sensörlerin kararlılık problemleri vardır. Alternatif olarak enzimatik olmayan sensörler kullanılmıştır. Fakat bu sensörler ile düşük hassasiyet ve yüksek seçicilik sağlanamamıştır. Bu sebepler yüzünden glikoz tayini için yeni yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacı oluşmuştur. Bu amaçla ilk olarak, 4-MBA/1-DT ile modifiye edilmiş altın kaplı yüzey üzerine 4-MBA/1-DT ile modifiye edilmiş altın nanoçubuklar ile YGRS platformu oluşturulmuş ve bu platform kan matriksinde glikoz tayin parametrelerinin optimum değerlerini bularak karakterize edilmiştir.

Kantitatif glikoz tayini için YGRS yüksek oranda hassas, seçici ve hızlı bir metottur. Bu çalışmada glikoz derişiminin belirlenmesi için basit bir YGRS tabanlı yaklaşım gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma glikozun YGRS ölçümlerinde, hidrofobik yüzeyde dağılma tabakası olarak davranan 1-dekantiyol grubu ve glikozun yakalanması için kompleks oluşum ajanı olarak fenil boronik asit grubu kullanılması esasına dayanır. Enzimatik olmayan reaksiyon kullanılarak hassas glikoz tayini için YGRS sensörünün uygulanabilirliği başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Ayrıca girişim yapan türler varlığında da glikoz tayini için YGRS sensörünün kullanılabilirliği gösterilmiştir. Çalışmada referans kan örneğinde glikoz tayini için serum örneği analizi de gerçekleştirilmiş ve sonuçlar referans kan örneği için sertifikalı değerle uyumlu bulunmuştur.

Artan glikoz konsantrasyonu ile merkaptto fenil boronik asite ait olan 1070 cm^{-1} deki pik şiddetinde meydana gelen azalma, glikoz konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilmiş ve doğrusal aralık 2-14 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.22). Geliştirilen YGRS platformu için LOD değeri 0,11 mM olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem ile referans kan örneğindeki glikoz miktarı, $5,61 \pm 0,29$ mM olarak bulunmuştur. Referans kan örneğindeki glikoz konsantrasyonu için sertifikalı değer $6,17 \pm 0,11$ mM'dir. Buna göre geri kazanım değeri % 90,9 olarak hesaplanmış ve bu değere göre % 95 güven sınırları içerisinde fark anlamsızdır. Elde edilen bu sonuçlar, geliştirilen sensörün gerçek kan örneğindeki glikozun tayini için kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

Kağıt tabanlı mikroçipler ile glikoz ve kanser biyobelirteç tayini

Kağıt tabanlı mikroçipler ile glikoz tayini

Daha önce de belirtildiği üzere kanda glikoz tayininde yaygın olarak kullanılan elektrokimyasal tekniklerde enzim kullanılması sebebiyle stabilite problemleri görülmektedir. Enzimatik olmayan sensörler ise düşük hassasiyete sahip değildir. YGRS tekniği ile birleştirilebilir sensörler kullanılarak daha önce uygulanan yöntemlerin dezavantajlarının üstesinden gelinebileceği düşünülmüştür. Yalnız kan örnekleri ile çalışırken karşılaşılan en önemli problem kan matriksinden girişim yapabilecek türleri ayırmak için basit seyreltme işlemleri yapmanın etkili olmamasıdır. Bu amaçla kullanılan nitroselüloz membran, kompleks kan örneğinden küçük hedef moleküllerin etkili bir şekilde ayrılmasına olanak sağlar. Bu sebeple çalışmada, kan matriks etkisini yok ederek glikoz tayini için kullanıma hazır basit bir kağıt tabanlı YGRS platformu hazırlanmıştır. Burada en önemli gereklilik, glikoz tayini için yapılan YGRS ölçümleri sırasında girişim oluşturan proteinlerin ayrılmasını sağlamaktır. Hazırlanan çip sayesinde, herhangi bir ön işlem uygulanmadan kan matriksinden glikozun ayrımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kağıt tabanlı mikro akışkan YGRS platformunun hazırlanması mum baskılama tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Son zamanlarda düşük maliyetli ve toksik çözeltiler kullanılmadan hazırlanması nedeniyle mum baskılama tekniği kağıt tabanlı mikro akışkan çiplerin üretilmesinde kullanılmaktadır (Carrilho, Martinez ve Whitesides, 2009; R. Lu ve diğerleri, 2009; Yetisen ve diğerleri, 2013). Bu çalışmada, kağıt tabanlı mikro akışkan

YGRS platformu baskılama ve pişirme olarak iki ana basamakta üretilmiştir. Membran yüzeyinde kanallar mum ile bariyerler oluşturularak hazırlanmıştır. Mum baskılanmış nitro selüloz membran 2 dk. 110 °C’de ısıtılarak mumun kağıdın iç kesimlerine nüfuz etmesi sağlanmıştır. Burada ısıtma sıcaklığının optimize edilmesi oldukça önemlidir. Düşük sıcaklıklarda mum tam olarak erimeyeceği için nitroselüloz membranın derinlerine kadar nüfuz edemez ve örneğin tamamı ölçüm alanına ilerleyemeden membranın alt kısımlarında kenarlara doğru yayılır. Bununla beraber 110°C’den daha yüksek sıcaklıklarda çalışıldığında ise mumun akışkanlığı artacağı için yalnızca membranın alt kesimlerine doğru dikey olarak yayılmak yerine yanlara doğru da ilerleyeceğinden oluşturulmaya çalışılan kanal tıkanacaktır. Membranda kanal oluşturulduktan sonra 4-MBA/1-DT ile modifiye edilmiş altın nanoçubuklar YGRS ölçüm alanı oluşturmak üzere membran yüzeyine tutturulmuştur. Böylece hazırlanan sensör YGRS ölçümleri için kullanılabilmiştir. Deneyler herhangi bir yıkama prosedürü uygulanmadan tek basamaklı olarak gerçekleştirilmiştir. Nitro selüloz membranda oluşturulan gözenekli hidrofilik kanal, hem akış yatağı ve hem de matriks ayırma alanı olarak kullanılmıştır. Kan örneği kapileri etki ile kanal boyunca hareket ederken, kan hücreleri ve proteinler nitroselüloz membranda tutunmuş ve kan örneğindeki glikoz molekülleri YGRS ölçüm alanında yakalanmıştır. Daha sonra YGRS yöntemi ile ölçümler alınmış ve değerlendirilmiştir. Yukarıda bahsedildiği gibi baskılama, saflaştırma ve ölçüm basamaklarını içeren deney prosedürü yaklaşık 20 dk.’da gerçekleştirilmiştir.

DeneySEL sonuçlar değerlendirildiğinde, herhangi bir ön işlem uygulanmaksızın gerçek örnekte glikoz konsantrasyonunun hesaplandığı görülmektedir. Bunun yanında klinik açıdan bakıldığında, glikoz seviyesinin kan akışında sürekli dalgalanmasını doğru bir şekilde takip edilmesi için, kan örneği analizleri gün içerisinde bir kaç kez gerçekleştirilmelidir. Bu sebeple geliştirilen yöntemin hızlı tayin yöntemi olması önemli avantaj sağlamaktadır. Son zamanlarda, alternatif olarak diyabet hastalarında glikoz seviyesini takip etmek için bir belirteç olan glikat hemoglobin (HbA1c) takibi de yapılmaktadır. Kıran ve diğerleri (Kıran ve diğerleri, 2010), HbA’ dan HbA1c’nin tayinini rapor etmişlerdir. Çalışmalarında HbA1c belirtecinin tayini için 770 and 830 cm^{-1} ’deki Raman piklerini takip etmişler fakat yine de kantitatif analizi gerçekleştirememişlerdir. Hazırlanan kağıt tabanlı mikro akışkan YGRS platformu kullanılarak literatürde rapor edilen kanda HbA1c tayininde yaşanan problemler çözülerek kantitatif analiz gerçekleştirilebilir.

Bu çalışmada amaç mevcut glikoz tayin metotlarıyla yarışan bir glikoz sensör geliştirmek olduğu için, geliştirilen yöntem ve diğer enzimatik olmayan YGRS tabanlı tekniklerle elde edilen LOD değerleri ve çalışma aralıkları karşılaştırılmıştır. Geliştirilen yöntem ile elde edilen LOD değeri 0,1 mM iken doğrusal çalışma aralığı 0,5 ve 10,0 mM arasında bulunmuştur. Olivo ve grubu (Kong ve diğerleri, 2013), triosmiyum karbonil-boronik asit kullanarak YGRS tabanlı glikoz tayin yöntemini 0,1 mM LOD ile optimize etmişlerdir. Daha önceki çalışmalarında ise altın kaplı çinko oksit nanotel kullanarak glikoz tayinini gerçekleştirmiş ve çalışma aralığını 0,9-30,0 mM ve LOD değerini 0,25 mM olarak bulmuşlardır. Al-Ogaidi ve grubu (Al-Ogaidi ve diğerleri, 2014) ise altın nanoyıldız@SiO₂ çekirdek-kabuk naopartiküllerini kullanarak 25,0 μ M–25,0 mM gibi geniş bir çalışma aralığında 16,0 μ M LOD değeri elde etmişlerdir. Diğer metotlara kıyasla geliştirilen kağıt tabanlı sistemin LOD değeri yüksek olmasına rağmen kan matriksinin ayrımı için santrifüj gibi herhangi bir ön işlem gerektirmemesi yöntemi avantajlı kılmaktadır.

Çalışmada mum baskılanmış nitro selüloz membranın kullanılması; hızlı üretim prosedürü, düşük maliyetli olması ve sensör üretiminde organik çözeltiler kullanılmaması gibi avantajlar sağlamaktadır. Bununla beraber, geliştirilen yöntem diyabet hastalığı için tanı prosesini kolaylaştırabilecek ve hastalığın takibi sırasında da kolaylıkla kullanılacak bir yöntem olarak görülmektedir. Ek olarak, hazırlanan kağıt tabanlı mikro akışkan YGRS platformu, farklı YGRS metotları için düşük maliyetli bir biyosensör olarak önerilebilir ve diğer tayin metotları için nitroselüloz membran yerine geliştirilecek çalışmaya uygun farklı bir membran kullanılabilir. Ayrıca karışık örnek analizlerinin, kağıt tabanlı mikro akışkan YGRS platformları ile basit bir şekilde başarılabileceği düşünülmektedir.

Kağıt tabanlı mikroçipler ile kanser biyobelirteç tayini

Kanser biyobelirteç tayini son yıllarda kanser tanısı ve izlenmesi hususunda ilgi uyandıran konular arasındadır. Yapılan çalışmada karsinoembriyonik antijen (CEA)'in kantitatif tayini için taşınabilir kağıt tabanlı bir biyosensör sistemi geliştirilmiştir. CEA'nin tayini için ilk önce Qdot tabanlı yatay akış test stripleri, numune uygulama pedi, konjugasyon pedi, analitik membran (NC membran) ve absorban pedin optimum koşullarda hazırlanmasıyla inşa edilmiştir. Daha sonra ise cep telefonu tabanlı floresans mikroskop tasarlanmış ve hazırlanan bu iki sistem birleştirilerek yüksek hassasiyette taşınabilir biyosensör sistemi geliştirilmiştir.

Biyotin bağı CEA monoklonal antikorlar streptavidin-biyotin etkileşiminin en yüksek olduğu pH 7,4'de 10 mM fosfat tamponunda Qdot-streptavidin konjugatları ile etkileştirilmişlerdir. Elde edilen Qdot-CEA monoklonal antikor konjugatlarında açık kalan bölgelerde seçici olmayan bağlanmanın engellenmesi için bovin serum albümin (BSA) kullanılmıştır. Hazırlanan Qdot konjugatlarının konjugasyon pedine tutunup kalmasını engellemek amacıyla konjugatlar % 1 BSA, % 7 Sukroz, % 2 PEG 300, ve 0.1% Tween-20 içeren bir tampona alınmıştır. Burada sukroz, Qdot-antikor konjugatlarını çevreleyerek konjugasyon pedine tutunup kalmalarını önler ve numune çözeltisi ile etkileştiğinde kolayca pedden ayrılmasını sağlar. Bunun yanında numune çözeltisinin viskozitesini artırarak test ve kontrol hatlarında etkileşim süresinin artmasına olanak sağlar. Yüzey aktif madde olarak Tween-20 kullanılması ise Qdot-antikor konjugatlarının homojen bir şekilde dağılmasını sağlar. Qdot-antikor konjugatlarını içeren bu bloke etme çözeltisi konjugasyon pedine damlatılmış ve kurutulmuştur. Burada kullanılan konjugasyon pedinin Qdot salınımına izin verecek kadar gözenekli yapıda olması önemlidir. Konjugasyon pedi olarak GE Healthcare Life Sciences firmasından temin edilen Fusion 5, VF2, ST14 ve ST17 gibi birçok lifli yapıda cam membran denenmesine rağmen Qdot salınımı gerçekleştirilememiştir. Bu problem EMD Millipore'dan temin edilen yine lifli yapıda cam olan fakat daha gözenekli yapıdaki GFDX membran kullanılarak büyük oranda çözülmüştür. Qdot'ların salınımı %100 gerçekleştirilememiş fakat hatlardaki emisyon şiddeti farklı derişimlerdeki örneklerin cevaplarını ayırt edebilecek kadar yüksek olduğu için GFDX membran kullanılması uygun bulunmuştur. Qdot-antikor konjugatlarını içeren membranlar kullanılmak üzere buzdolabında (4°C'de) muhafaza edilmiştir.

Analitik membranın hazırlanması test ve kontrol hatlarının oluşturulması daha sonra ise membranın bloke edilmesi basamaklarından oluşur. Birinci aşamada test ve kontrol hatları sırasıyla biyotin bağı poliklonal antikor ve ikincil antikorların 20 nm boyutunda streptavidin bağı altın nanoparçacıklara bağlanması ile hazırlanan konjugatların membran yüzeyine bağlanmasıyla oluşturulmuştur. Burada altın parçacıklar oluşturulacak olan sandviç yapısında Qdot sinyallerinin kuvvetlendirilmesi dolayısıyla hassasiyetin artırılması amacıyla kullanılmıştır. Bu sinyal kuvvetlendirmesinin gerçekleşmesi için altın ve Qdot parçacıklarının arasında yaklaşık 12 nm uzaklık olması gerekmektedir (Bardhan, Grady, Cole, Joshi ve Halas, 2009; Dey ve Zhao, 2016; Kulakovich ve diğerleri, 2002; Tam, Goodrich, Johnson, ve Halas, 2007). Geliştirilen sistemde parçacıklar arasında yaklaşık 14 nm uzaklık bulunmaktadır ve bu mesafe kuvvetlendirme için uygun bulunmuştur. İkinci

aşamada ise yarım saat hatların kuruması için beklendikten sonra membran % 1 kazein içeren tampon çözelti ile bloke edilmiştir. NC membranı bloke etmek için 0,1–0,5 % w/v jelatin, 1 – 2 % a/h kazein, 1 – 2% a/h BSA, 1 – 2% a/h IgG, 0,5 – 1 % a/h PVP (8 – 10 kDa) ve 0,1 – 1% a/h PVA (8 – 10 kDa) bloke etme ajanları denenmiş optimizasyon işleminden sonra kazein içeren tampon çözelti kullanılmasına karar verilmiştir.

Manuel olarak gerçekleştirilen bloke etme işlemlerinde membran bloke etme çözeltisine daldırılır. Burada daldırma işleminin membranın gözeneklerindeki hava ile çözücünün yer değiştirmesine olanak sağlayacak kadar yavaş yapılması gerekir. Bu ayrıntıya dikkat edilerek bloke etme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan bloke etme çözeltisinde bloke etme ajanı miktarı azalacağından çözeltiler tekrar kullanılmamıştır. Membran bloke edildikten sonra yüzeyindeki fazla bloke etme ajanının uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Çünkü fazlası kuruyarak kristalleşir ve fiziksel olarak gözeneklerin tıkanmasına sebep olur. Bunu engellemek için genellikle düşük derişimde tampon çözeltiler ile yıkama yapılır. Ayrıca membranın yeniden ıslanmasını kolaylaştırmak için yıkama çözeltisine düşük konsantrasyonda deterjan ilave edilebilir. Tüm bunlar dikkate alınarak bloke edilen NC membranın stabilitesi, % 0,05 Tween-20 içeren 10 mM PBS (pH 7,5) çözeltisi ile yıkanarak sağlanmıştır. Bu membranlar yeniden hidrasyon oluşumunu önlemek için genellikle oda sıcaklığında ve bağıl nemi düşük olacak şekilde saklanmalıdır. Hazırlanan analitik membranın saklanma koşulları kullanım ömrünü ciddi oranda değiştirmektedir. Bu sebeple membranlar nem dengesinin sağlanması için desikant içeren bir saklama kabında muhafaza edilmiştir.

Yatay akış test stripleri numune uygulama pedi, konjugasyon pedi, analitik membran (NC membran) ve absorban pedin kesilmesi ve bir mikroskop camı üzerinde çift taraflı bant ile örtülecek şekilde birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Bu tür sistemlerde absorban ped kullanmanın başlıca amacı test stribine giren örnek hacminin artırılmasıdır. Bu hacim artışı sayesinde bağlanmayan partiküllerin test ve kontrol hatlarından uzaklaştırılması da sağlanabilir. Böylelikle zemin sinyali azaltılarak hassasiyet artırılabilir. Fakat geliştirilen sistemde seyreltik kan örneği ile çalışıldığı için analize bir yıkama basamağı eklenmemiştir.

Hazırlanan yatay akış test striplerinin muhafaza edilmesi hususu önemlidir. Nitroselüloz membranlar için özel bir saklama koşuluna gerek yoktur fakat yine de organik çözücü

buharından uzak tutulmalıdır. Çünkü organik çözücüler membran yüzeyine tutunarak yüzeyin hidrofobik özellik kazanmasına sebep olurlar. Ayrıca yüzeyde toz ve kirlilik birikmesini önlemek için kapalı tutulmaları gerekmektedir. Nem oranı düşük olduğunda nitroselüloz membran önemli oranda statik yük meydana getirir. Bu da membranın farklı yüzeyler tarafından itilmesine ya da çekilmesine neden olur. Destek materyal içermeyen membranlar bu durumdan daha fazla etkilenirken, içerenler ise daha ağır yapıda oldukları için genellikle daha az etkilenirler. Fakat her ikisinde de bu statik yük sonucunda toz ve kirliliğin yüzeyde toplanması kaçınılmazdır ve genellikle yüzeye zarar vermeden temizlenmeleri çok güçtür. Bu yüzden uzun süreli saklama koşullarında ortam sıcaklığı 10-25 °C arasında ve bağıl nem oranı % 30 ile % 70 arasında tutulmalıdır. Fakat yine de test strip stabilitesini sadece membran stabilite profiline göre değerlendirmek doğru olmaz. Test stripte yer alan biyolojik bileşenler de ürün stabilitesini belirlemede oldukça önem arzeder.

Yatay akış test stripleri oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda ve nem dengesi korumak için desikant varlığında muhafaza edilmiştir. Bu şekilde muhafaza edilen yatay akış test striplerinin raf ömrü en az 2 haftadır. Bunun için gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik deneylerinde farklı derişimlerde CEA protein içeren örnekler aynı yatay akış test stripleri ile iki hafta arayla test edilmiştir. İki hafta sonra elde edilen sonuçların striplerin hazırlandığı gün elde edilen sonuçlarla %91,4 ve %98,8 arasında uyumlu olduğu bulunmuştur. Fakat daha uzun sürede kullanılabilirlikleri test edilmemiştir. Yatay akış test striplerinin hazırlanmasında kullanılan bileşenler, tüm kimsayal ve biyolojik materyaller göz önünde bulundurularak maliyet hesabı yapıldığında bir tane test stripi için bu değer yaklaşık 5 TL olarak bulunmuştur. Buna göre maliyeti oldukça düşük bir sistem geliştirilmiştir.

Yatay akış test stripleri optimum koşullarda hazırlanıp uygun saklama koşulları belirlendikten sonra, cep telefonu tabanlı floresans mikroskobun tasarımı üzerinde çalışılmıştır. Bu amaçla ilk önce sinyali takip edilecek olan Qdot'ın uyarılma ve emisyon dalga boylarına uygun bir sistemin oluşturulması amacıyla ışık kaynağı olarak LED lambalar ve emisyon filtresi seçilmiştir. Qdot-625'e ait Şekil 5.1'deki spektrum dikkate alınarak 395 nm dalga boyunda UV ışık emisyonu yapan LED'lerin kullanılmasının uygun olacağına karar verilmiştir. Örneği 4 LED lamba ile aydınlatmak, gerekli sinyal şiddetini sağladığından yeterli bulunmuştur. Bununla beraber LED'lerin bant genişlikleri yaklaşık

8-10 nm olduğu için bir uyarma filtresi kullanmamıştır. Emisyon filtresi olarak 418 nm ve üzerini geçiren bir long-pass emisyon filtresi cep telefonunun mevcut lensi ve harici lens arasına yerleştirilmiştir. Ek olarak büyütme faktörünü artırmak için 12 mm çapında ve 24 mm odak mesafesine, diyafram açıklığı f2 olan bir plano-konveks lens, cep telefonunun mevcut lensinin önüne yerleştirilmiştir. Bu iki lensin birlikte kullanılması örnek ve cep telefonunun CMOS sensör yüzeyi arasında yaklaşık 3.33 gibi bir büyüme faktörü ($f2/f$) elde edilmesini sağlamıştır. Tüm bu parçaların birleştirilmesi için bir prototip hazırlanmıştır. Bunun için üç boyutlu yazıcı (3D-printed, Stratasys, Dimension Elite) kullanılmıştır. Cep telefonu olarak Nokia Lumia 1020 kullanılmıştır. Bu telefonunun kullanılmasının en önemli sebebi 41MP çözünürlüğüne sahip olmasıdır. Ayrıca çekilen fotoğrafları JPEG veya TIFF formatlarına dönüştürmeden önceki işlenmemiş veriyi saklama özelliğine sahip olduğu için tercih edilmiştir. Bu sayede elde edilen sonuçlarda veri kaybı olmadan görüntü işleme gerçekleştirilebilir. Örnek ile etkileştirilen yatay akış test striplerinin görüntüsü white balance, odak, ISO hızı, etkileşim süresi ve zıtlık gibi kamera parametrelerinin ayarlanmasından sonra alınmıştır. Bu parametrelerin optimize edilmesi elde edilen görüntünün netliğinin ayarlanması ve dolayısıyla örneklerden en yüksek emisyon şiddetinin sağlanması açısından oldukça önemlidir.

Mikroskop inşa edilip koşullar optimize edildikten sonra sistemi valide etmek için CEA protein analizi için kalibrasyon grafiği oluşturulmuş; doğrusallık, çalışma aralığı, doğruluk ve kesinlik parametreleri belirlenmiştir. Valide edilen sistemle kan örneklerinde CEA protein tayini başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin sınırlaması, hazırlanan yatay akış test striplerinde Qdot konjugatlarının analitik membran yüzeyine tutunması yüzünden oluşan zemin sinyali azaltmak için optimize edilen Qdot miktarı (10 nM) ile çalışıldığında, yüksek derişimlerde CEA içeren örnek analiz edilmek istendiğinde test hattına tutunan Qdot miktarı fazla olacağı için örnekte kontrol hattına yeterince bağlanacak kadar Qdot bulunmamasıdır. Bu sebeple floresans görüntülerinde (Şekil 4.44) de açıkça görülmektedir ki yüksek derişimlerde CEA içeren çözelti ile çalışıldığında test hattının sinyali artarken kontrol hattının sinyali azalmaktadır. Bununla beraber düşük derişimlerde CEA içeren örnek ile çalışıldığında ise Qdot konjugatlarının çok az bir miktarı test hattına tutunacağı için kontrol hattına tutunmaya yetecek kadar Qdot konjugatı örnek içerisinde mevcuttur ve test hattına bağlanma gerçekleştikten sonra kalan konjugatlar kapileri etki ile membran boyunca ilerlemeye

devam ederken kontrol hattına tutunurlar. Bu tür örneklerde ise kontrol hatlarının sinyal şiddeti yüksektir. Dolayısıyla kontrol hattının sinyal şiddeti numunede CEA derişimi hangi seviyede olursa olsun aynı şiddette olmayacaktır. Bu etkiyi ortadan kaldırmak ve striplerin hazırlanmasında yaşanan homojen olmayan üretimden kaynaklı hataları da elimine etmek için sonuçlar test hattının ortalama sinyal şiddetinin kontrol hattının ortalama sinyal şiddetine oranı (T/C) olarak verilmiştir. Ayrıca belirtilmesi gereken bir başka husus şudur; çalışmada, belirlenen doğrusal aralığın en düşük noktasındaki CEA derişimi (0,8 ng/ml) ile çalışıldığında stribin test hattından elde edilen ortalama floresanss sinyal şiddetinden 10-15 birim daha düşük ortalama sinyal alınan durumlarda test geçersiz kabul edilmelidir. Sağlıklı bir insanın kanında bulunan CEA derişimi yaklaşık 3,0 ng/ml civarındadır. Bu yüzden testte negatif sonuç olmayacaktır. Yalnızca pozitif ve geçersiz sonuçlar olabilir.

Literatürde yapılan çalışmalarda, sadece meme kanserine işaret eden kanser biyobelirteçlerinin değil aynı zamanda diğer kanser türlerine işaret eden bazı kanser biyobelirteçler için de opto-akışkan sistemler rapor edilmiştir. Yang ve grubu (Q. Yang ve diğerleri, 2011), insan kanında kanser biyobelirteç tayini için Qdot tabanlı bir immünokromatografik test stribi ile test strip okuyucunun birleştirilmesiyle oluşan yeni bir taşınabilir floresans biyosensör sistemi geliştirmiştir. Tayin bölgesi ve analitik membran olarak nitroselüloz membran kullanmışlardır. Amaçlanan immünosensörün performansını göstermek için karaciğerle ilgili kanser türüne işaret eden kanser biyobelirteçlerinden biri olan alfa fetoprotein (AFP) model olarak seçilmiştir. Yapılan çalışmada 50 µl örnek hacmi ile çalışıldığında 10 dk analiz süresinde AFP için LOD değeri 1,0 ng/ml olarak bulunmuştur.

Z. Li ve grubu (Li, Wang, J. Wang, Tang ve Pounds, 2010) bir yatay akış test stribi ve Qdot'lar ile protein biyo belirteçleri için taşınabilir bir floresanss biyosensör inşaa etmiştir. Kalp hastalıkları ve akciğer kanserinin önemli biyobelirteçlerinden nitratlı seruloplazmin (NC), amaçlanan Qdot tabanlı yatay akış test stribinin performansını test etmek için model protein biyobelirteç olarak kullanılmıştır. Analitik membran olarak nitroselüloz membran ve NC-Qdot konjugatlarının floresansını ölçmek için bir test strip okuyucu kullanılmıştır. Test strip örneklerinin görüntülenmesi için ayrıca dijital kamera da kullanmışlardır. Ayrıca biyosensör NC protein spike edilmiş insan plazma örneği için değerlendirilmiştir. Geniş bir çalışma aralığında LOD değerini 8 ng/ml olarak bulmuşlardır.

M. Hu ve grubu (M. Hu ve diğeri, 2010), kanser biyobelirteçlerinin çoklu tayini için bir mikroakışkan protein çip geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, CEA ve AFP'nin tayini için PDMS kullanarak bir mikro akışkan çip hazırlamışlardır. Etiket olarak çekirdek-kabuk yapısında bir Qdot kullanmışlardır. Qdot- CEA ve Qdot-AFP konjugatlarının floresans sinyali ölçmek için CCD dedektör ve optik filtrelerle birleştirilmiş bir floresans mikroskop kullanmışlardır. İnsan kanında yapılan analizlerde, serumda CEA için LOD değerini 0,45 ng/ml bulmuşlardır. Yalnız tampon çözeltisinde çalışıldığında CEA ve AFP için LOD değerinin 0,04 ng/ml olduğu hesaplanmıştır.

D. Liu ve grubu (D. Liu ve diğeri, 2013), floresans etiket olarak CdSe/ZnS Qdot ve matriks olarak karboksil bağlı mikro gözenekli naylon membran kullanarak serumda biyobelirteç tayini için çoklu immünoassay biosensör geliştirmişlerdir. Down Sendromu (DS) için iki ana biyobelirteç olan β -insan koriyonik gonadotropin (β -hCG) ve α -fetal protein (AFP), bu biyosensör sisteminde tayin edilmek üzere seçilmişlerdir. DS'in seçici bir şekilde belirlenmesi için, ilk önce fizyolojik örneklerden hedef antijenler, antikor bağlanmış mikro gözenekli naylon membran tarafından yakalanmıştır ve membran yüzeyinde antikor-antijen immünokompleksi oluşturulmuştur. Daha sonra bu immünokompleksler Qdot-antikor konjugatları ile etkileşmiş ve üçlü sandviç yapısı düzenlenmiştir. β -HCG ve AFP'in kantitatif analizi gerçekleştirilmiş ve bu yeni dedektör sisteminin tayin edebildiği seviye β -HCG için 10^{-6} IU/L ve AFP için ise 1,0 ng/ml'den az bulunmuştur. Zenginleştirme işlemi yapılmadan yürütülen bu sistemin analiz süresi göreceli olarak kısadır.

Shuxue Qu ve grubu (Qu ve diğeri, 2013), karaciğer, akciğer, pankreas, rahim ve meme kanserleri için biyobelirteç olarak bilinen karsinoembriyonik antijen (CEA) tayini için kemilüminesans immünoassay tabanlı bir immunosensör geliştirmiştir. Anti-CEA antikor ve immünomanyetik boncukları (iMBS) ile etiketlenmiş horseradish peroksidazı (HRP) kullanarak bir sandviç sistem hazırlamışlardır. Çalışmada hedef protein olan CEA varlığında sandviç yapıların (iMBS-CEA antikor-HRP etiketli) oluşumu gerçekleştirilmiştir. Antikor yüzeyindeki HRP lüminesans yüzeyini katalitik olarak oksitleyerek optik sinyalleri oluşturmuştur. CEA derişimine bağlı olarak değişen sinyalleri takip ederek analizi gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada teşhis sınırını 5,0 pg/ml olarak bulmuşlardır.

Çalışmada öncelikli olarak CEA tayini için yatay akış test stripleri inşaa edilmiş daha sonra ise cep telefonu tabanlı floresans mikroskop dizayn edilmiştir. Geliştirilen bu biyosensör sisteminde tam kan örnekleri ile yapılan analizde çalışma aralığı 1,05-15,0 ng/ml arasındadır ve CEA'ne ait LOD değeri 1,0 ng/ml olarak bulunmuştur. Literatürde CEA tayini için bazı yöntemler geliştirilmiştir ve bazı patentler de mevcuttur fakat geliştirilen yöntemin en önemli yeniliği sonuçları analiz ederken cep telefonu kullanılmasıdır.

Kağıt tabanlı bir sistemle çalışmanın bazı avantajları, düşük maliyetli bir sistem geliştirmek, difüzyon basamağını hızlandırmak ve reaktif sarfiyatını azaltmaktır. Bunlara ek olarak küçük hacimde biyolojik örnekleri ön işleme gerek duyulmadan hazırlayabilmek ve kısa süre içerisinde testlerin tamamlanması açısından da avantaj sağlamaktadır. Hazırlanan yatay akış test striplerinde ölçümler ise hazırlanmış olduğumuz cep telefonu tabanlı floresans mikroskop ile gerçekleştirilmiştir. Burada amacımız düşük maliyetli ve kullanım kolaylığı olan taşınabilir sistemlere geçiş yapmaktır. Bu ticari amaçla rutin analizlerde kullanım kolaylığı sağlaması açısından büyük önem arz etmektedir.

Daha geniş bir açıdan bakacak olursak; kanser belirteçlerinin kandan direkt tayini için kullanılabilen bu sistem kolay uygulanabilirliği, hızlı bir yöntem olması, ön hazırlık aşamalarına gerek duyulmaması sebebiyle mevcut sistemlere göre üstünlük sağlamaktadır. Bu bilgiler eşliğinde geliştirilen yöntemin rutin analizler için de uygun bir sistem olması düşünülmektedir. Böylelikle kanser hastalarının tedavi süresince takibi daha kolay ve hızlı hale gelecek ve tedavi süreci hızlanacaktır. Ayrıca kanser hastalığının erken aşamada belirlenmesi sayesinde etkili tedavi süreci başlatılabilecektir. Tedavi süresince kanser belirteçlerinin konsantrasyonlarının hızlı takibi hastaya müdahale yöntemini de belirlemekte önemli bir unsurdur.

Çalışmada cep telefonu kullanılmasıdaki amaç, ileriye dönük olarak kullanılabilir sistemler geliştirmektir. Cep telefonuna entegre ettiğimiz sistem sayesinde telefona önceden yüklenmiş uygulamalarla sağlık çalışanları yerinde ölçüm yapma olanağı bulabilecektir. Ayrıca teknolojinin ilerlemesiyle birlikte rutin olarak ölçüm alması gereken hastalar sonuçlarını alarak telefonda mesaj ya da e-posta yoluyla doktorlarına iletebileceklerdir. Bu durum sağlık personelleri için de geçerli olup hastalardan aldıkları verileri daha hızlı bir şekilde ilgili hekime veya sağlık kurumuna iletebileceklerdir.

Böylece daha çok saha taraması, az gelişmiş bölgelerdeki sağlık taramaları ve hasta takibi yapılabilecektir.

Daha önce yapılan çalışmalarda mikro akışkan deneylerinde ölçüm almak için cep telefonu kullanılması rapor edilmiştir (Navruz ve diğerleri, 2013). Yerinde biyomedikal teşhis için cep telefonu kullanımının, dermatoloji (Wurm, Hofmann-Wellenhof, Wurm ve Soyer, 2008), mikroskopi (Breslauer, Maamari, Switz, Lam ve Fletcher, 2009), göz bilimi (Pamplona, Mohan, Oliveira ve Raskar, 2010), deneylerinde kullanımı ispatlanmıştır. Daha önce yapılmış olan bu tür çalışmalar cep telefonu tabanlı floresans mikroskobun da uygulanabilir olduğunu desteklemektir. Fakat RDT okuyucu yerine cep telefonu kullanılması ile ilgili çalışmalar yakın zamanda çalışılmaya başlanmıştır. Cep telefonu ile çalışılmasının en önemli avantajlarından biri de mevcut kameraları sayesinde, ayrıca pahalı bir optik sistemin kurulmasına gerek kalmadan daha düşük maliyetli bir üretim olanağıdır.

KAYNAKLAR

- Abad, J. M., Vélez, M., Santamaría, C., Guisán, J. M., Matheus, P. R., Vázquez, L., Fernández, V. M. (2002). Immobilization of peroxidase glycoprotein on gold electrodes modified with mixed epoxy-boronic acid monolayers. *Journal of the American Chemical Society*, 124(43), 12845–12853.
- Ahn, J. S., Choi, S., Jang, S. H., Chang, H. J., Kim, J. H., Nahm, K. B., Choi, E. Y. (2003). Development of a point-of-care assay system for high-sensitivity C-reactive protein in whole blood. *Clinica Chimica Acta*, 332(1–2), 51–59.
- Alan, P. C., and Kambhampati. (1998). Surface-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews*, 27, 241–250.
- Albrecht, M. G., and Creighton, J. A. (1977). Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of the American Chemical Society*, 99, 5215–5217.
- Alivisatos, P., Gu, W., and Larabell, C. (2005). Quantum dots as cellular probes. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 7, 55–76.
- Al-Ogaidi, I., Gou, H., Al-kazaz, A. K., Aguilar, Z. P., Melconian, A. K., Zheng, P., and Wu, N. (2014). A gold@silica core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering biosensor for label-free glucose detection. *Analytica Chimica Acta*, 811, 76–80.
- Al-Tamimi, M., Shen, W., Zeineddine, R., Tran, H., and Garnier, G. (2012). Validation of paper-based assay for rapid blood typing. *Analytical Chemistry*, 84(3), 1661–1668.
- Al-Yousif, Y., Anderson, J., Chard-Bergstrom, C., and Kapil, S. (2002). Development, evaluation, and application of lateral-flow immunoassay (immunochromatography) for detection of rotavirus in bovine fecal samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(3), 723–725.
- Amer, M. S. (2010). Raman Spectroscopy; the Diagnostic Tool. In *Raman Spectroscopy, Fullerenes and Nanotechnology* (pp. 43–50). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
- Antonisse, M. M. G., and Reinhoudt, D. N. (1998). Neutral anion receptors: design and application. *Chemical Communications*, 443–448.
- Aveyard, J., Mehrabi, M., Cossins, A., Braven, H., and Wilson, R. (2007). One step visual detection of PCR products with gold nanoparticles and a nucleic acid lateral flow (NALF) device. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (41), 4251–4253.
- Aytaç, S., Kuralay, F., Boyaci, I. H., and Unaleroglu, C. (2011). A novel polypyrrole-phenylboronic acid based electrochemical saccharide sensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 160(1), 405–411.
- Azzazy, H. M. E., Mansour, M. M. H., and Kazmierczak, S. C. (2007). From diagnostics to therapy: Prospects of quantum dots. *Clinical Biochemistry*, 40, 917–927.

- Bagudu, R., Lakowicz, J. R., and Geddes, C. D. (2006). Wavelength-ratiometric and colorimetric probes for glucose determination. *Dyes and Pigments*, 68(2–3), 159–163.
- Baker, G., Desikan, R., and Thundat, T. (2008). Label-free sugar detection using phenylboronic acid-functionalized piezoresistive microcantilevers. *Analytical Chemistry*, 80(13), 4860–4865.
- Bantz, K. C., Meyer, A. F., Wittenberg, N. J., Im, H., Kurtuluş, O., Lee, S. H., Haynes, C. L. (2011). Recent progress in SERS biosensing. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP*, 13(24), 11551–67.
- Bardhan, R., Grady, N. K., Cole, J. R., Joshi, A., and Halas, N. J. (2009). Fluorescence enhancement by au nanostructures: Nanoshells and nanorods. *ACS Nano*, 3(3), 744–752.
- Bartolini, M., Andrisano, V., and Wainer, I. W. (2003). Development and characterization of an immobilized enzyme reactor based on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for on-line enzymatic studies. *Journal of Chromatography A*, 987(1–2), 331–340.
- Bates, M., and Zumla, A. (2015). Rapid infectious diseases diagnostics using Smartphones. *Annals of Translational Medicine*, 3(15), 215.
- Beer, P. D., and Gale, P. a. (2001). Anion Recognition and Sensing: The State of the Art and Future Perspectives. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 40(3), 486–516.
- Birnbaum, S., Udén, C., Magnusson, C. G. M., and Nilsson, S. (1992). Latex-based thin-layer immunoaffinity chromatography for quantitation of protein analytes. *Analytical Biochemistry*, 206(1), 168–171.
- Bogoch, I. I., Coulibaly, J. T., Andrews, J. R., Speich, B., Keiser, J., Stothard, J. R., Utzinger, J. (2014). Evaluation of portable microscopic devices for the diagnosis of Schistosoma and soil-transmitted helminth infection. *Parasitology*, 1–8.
- Bottom, C. B., Hanna, S. S., and Siehr, D. J. (1973). Biochemical education. *Biochimie*, 55(6–7), XIV.
- Breslauer, D. N., Maamari, R. N., Switz, N. A., Lam, W. A., and Fletcher, D. A. (2009). Mobile phone based clinical microscopy for global health applications. *PLoS ONE*, 4(7), 1–7.
- Bruchez, M. P. (2005). Turning all the lights on: Quantum dots in cellular assays. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(5), 533–537.
- Campion, A., Ivanecky, J. E., Child, C. M., and Foster, M. (1995). On the Mechanism of Chemical Enhancement in Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(6), 11807–11808.
- Cao, J., Sun, T., and Grattan, K. T. V. (2014). Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 195, 332–351.

- Carrilho, E., Martinez, A. W., and Whitesides, G. M. (2009). Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Analytical Chemistry*, 81(16), 7091–7095.
- Chan, W. C. W., Maxwell, D. J., Gao, X., Bailey, R. E., Han, M., and Nie, S. (2002). Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(1), 40–46.
- Chang, S. S., Lee, C.-L., and Wang, C. R. C. (1997). Gold Nanorods: Electrochemical Synthesis and Optical Properties. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(34), 6661–6664.
- Chang, S. S., Shih, C. W., Chen, C. D., Lai, W. C., and Wang, C. R. C. (1999). The Shape Transition of Gold Nanorods. *Langmuir*, 15(13), 701–709.
- Chen, R., Li, H., Zhang, H., Zhang, S., Shi, W., Shen, J., and Wang, Z. (2013). Development of a lateral flow fluorescent microsphere immunoassay for the determination of sulfamethazine in milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(21), 6783–6789.
- Chen, X., Cui, D. F., Liu, C. C., and Li, H. (2008). Microfluidic chip for blood cell separation and collection based on crossflow filtration. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 130, 216–221.
- Chin, C. D., Linder, V., and Sia, S. K. (2007). Lab-on-a-chip devices for global health: past studies and future opportunities. *Lab on a Chip*, 7(1), 41–57.
- Cho, J. H., and Paek, S. H. (2001). Semiquantitative, bar code version of immunochromatographic assay system for human serum albumin as model analyte. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(6), 725–732.
- Choi, S., Song, S., Choi, C., and Park, J. K. (2007). Continuous blood cell separation by hydrophoretic filtration. *Lab on a Chip*, 7(11), 1532–1538.
- Choi, Y. E., Kwak, J. W., and Park, J. W. (2010). Nanotechnology for Early Cancer Detection. *Sensors*, 10(1), 428–455.
- Çiftçi, H., and Tamer, U. (2012). Functional gold nanorod particles on conducting polymer poly(3-octylthiophene) as non-enzymatic glucose sensor. *Reactive and Functional Polymers*, 72(2), 127–132.
- Çiftçi, H., Tamer, U., Teker, M. Ş., and Pekmez, N. Ö. (2013). An enzyme free potentiometric detection of glucose based on a conducting polymer poly (3-aminophenyl boronic acid-co-3-octylthiophene). *Electrochimica Acta*, 90, 358–365.
- Claudio Parolo and Arben Merkoçi. (2013). Paper-based nanobiosensors for diagnostics. *Chemical Society Reviews*, 42(2), 450–457.
- Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., and Wyatt, M. D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1(3), 325–327.

- Corstjens, P. L. A. M., Chen, Z., Zuiderwijk, M., Bau, H. H., Abrams, W. R., Malamud, D., Tanke, H. J. (2007). Rapid assay format for multiplex detection of humoral immune responses to infectious disease pathogens (HIV, HCV, and TB). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098, 437–445.
- Crowley, T. A., and Pizziconi, V. (2005). Isolation of plasma from whole blood using planar microfilters for lab-on-a-chip applications. *Lab on a Chip*, 5(9), 922–9.
- Çubuk, S., Yetimoğlu, E. K., Kahraman, M. V., Demirbilek, P., and Firlak, M. (2013). Development of photopolymerized fluorescence sensor for glucose analysis. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 181, 187–193.
- D'Ambrosio, M. V, Bakalar, M., Bennuru, S., Reber, C., Skandarajah, A., Nilsson, L., Fletcher, D. a. (2015). Point-of-care quantification of blood-borne filarial parasites with a mobile phone microscope. *Science Translational Medicine*, 7(286), 286re4.
- Daniel, M. C. M., and Astruc, D. (2004). Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties and Applications toward Biology, Catalysis and Nanotechnology,. *Chemical Reviews*, 104(1), 293–346.
- De Guzman, J. M., Soper, S. A., and McCarley, R. L. (2010). Assessment of glycoprotein interactions with 4-[(2-aminoethyl)carbamoyl]phenylboronic acid surfaces using surface plasmon resonance spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 82(21), 8970–8977.
- Delmulle, B., De Saeger, S., Sibanda, L., Barna-Vetro, I., and Van Peteghem, C. (2005). Development of an immunoassay based lateral flow dipstick for the rapid detection of aflatoxin B1 in feed. *Abstracts of Lectures and Posters of the International Conference and Marketplace "Rapid Methods Europe 2005 for Food and Feed Quality Determination," 1998*, 87.
- Dey, S., and Zhao, J. (2016). Plasmonic Effect on Exciton and Multiexciton Emission of Single Quantum Dots. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(15), 2921–2929.
- Dietrich, K. (1902). Testing-paper and method of making same, US Pat, 691,249.
- Douglas A Skoog, F James Holler, T. A. N. (1998). *Principles of Instrumental Analysis* (5th ed). Philadelphia, USA: Saunders College Pub.
- Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818–22.
- Erdogdu, Y., Tahir Güllüoğlu, M., and Kurt, M. (2009). DFT, FT-Raman, FT-IR and NMR studies of 2-fluorophenylboronic acid. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(November 2008), 1615–1623.
- Famulok, M., Mayer, G., and Blind, M. (2000). Nucleic acid aptamers - From selection in vitro to applications in vivo. *Accounts of Chemical Research*, 33(9), 591–599.
- Fan, M., Andrade, G. F. S., and Brolo, A. G. (2011). A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 693(1–2), 7–25.

- Ferraro, John R., Nakamoto, Kazuo Brown, C. W. (2003). *Introductory Raman Spectroscopy*, Academic Press. USA: 1994 Elsevier Science (USA).
- Fleischmann, M., Hendra, P. J., and McQuillan, A. J. (1974). Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26(2), 163–166.
- Fortina, P., Kricka, L. J., Surrey, S., and Grodzinski, P. (2005). Nanobiotechnology: The promise and reality of new approaches to molecular recognition. *Trends in Biotechnology*, 23(4), 168–173.
- Frank, E. A., Shubha, M. C., and D'Souza, C. J. M. (2012). Blood glucose determination: Plasma or serum? *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 26, 317–320.
- Gabaldón, J., Cascales, J. M., Morias, S., Maquieira, A., and Puchades, R. (2003). Determination of atrazine and carbaryl pesticide residues in vegetable samples using a multianalyte dipstick immunoassay format. *Food Additives and Contaminants*, 20(8), 707–715.
- Gambhir, S. S., and Weiss, S. (2005). Quantum Dots for Live Cells , (January), 538–545.
- Goldman, E. R., Clapp, A. R. A. R., Anderson, G. P., Uyeda, H. T., Mauro, J. M., Medintz, I. L., Tetsr, P. A. H. (2004). Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents. *Analytical Chemistry*, 76(3), 684–688.
- Gubala, V., Harris, L. F., Ricco, A. J., Tan, M. X., and Williams, D. E. (2012). Point of care diagnostics: Status and future. *Analytical Chemistry*, 84(2), 487–515.
- Guerrini, L., and Graham, D. (2012). Molecularly-mediated assemblies of plasmonic nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy applications. *Chem. Soc. Rev.*, 41(21), 7085–7107.
- Gupta, V. K., Atar, N., and Torul, H. (2013). Journal of Colloid and Interface Science A novel glucose biosensor platform based on Ag @ AuNPs modified graphene oxide nanocomposite and SERS application, 406, 231–237.
- Gussenhoven, G. C., Hoorn, M. a Van Der, Goris, M. G., Terpstra, W. J., Hartskeerl, R. a, Mol, B. W., Smits, H. L. (1997). LEPTO dipstick , a dipstick assay for detection of Leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera . LEPTO Dipstick , a Dipstick Assay for Detection of Leptospira - Specific Immunoglobulin M Antibodies in Human Sera, 35(1), 92–97.
- Han, X. X., Jia, H. Y., Wang, Y. F., Lu, Z. C., Wang, C. X., Xu, W. Q., Ozaki, Y. (2008). Analytical technique for label-free multi-protein detection based on Western blot and surface-enhanced Raman scattering. *Analytical Chemistry*, 80(8), 2799–2804.
- Hao, E., and Schatz, G. C. (2004). Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers. *Journal of Chemical Physics*, 120(1), 357–366.
- Henderson, K., and Stewart, J. (2002). Factors influencing the measurement of oestrone sulphate by dipstick particle capture immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 270(1), 77–84.

- Hindson, B. J., Brown, S. B., Marshall, G. D., McBride, M. T., Makarewicz, A. J., Gutierrez, D. M., Colston, B. W. (2004). Development of an automated sample preparation module for environmental monitoring of biowarfare agents. *Analytical Chemistry*, 76(13), 3492–3497.
- Ho, J. A. A., and Huang, M. R. (2005). Application of a liposomal bioluminescent label in the development of a flow injection immunoanalytical system. *Analytical Chemistry*, 77(11), 3431–3436.
- Hou, S. Y., Chen, H. K., Cheng, H. C., and Huang, C. Y. (2007). Development of zeptomole and attomolar detection sensitivity of biotin-peptide using a dot-blot goldnanoparticle immunoassay. *Analytical Chemistry*, 79(3), 980–985.
- Hu, J. W., Zhao, B., Xu, W. Q., Li, B. F., and Fan, Y. G. (2002). Surface-enhanced Raman spectroscopy study on the structure changes of 4-mercaptopyridine adsorbed on silver substrates and silver colloids. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 58(13), 2827–2834.
- Hu, M., Yan, J., He, Y., Lu, H., Weng, L., Song, S., Wang, L. (2010). Ultrasensitive, multiplexed detection of cancer biomarkers directly in serum by using a quantum dot-based microfluidic protein chip. *ACS Nano*, 4(1), 488–494.
- Iliuk, A. B., Hu, L., and Tao, W. A. (2011). Aptamer in bioanalytical applications. *Analytical Chemistry*, 83(12), 4440–4452.
- Jain, K. K. (2005). Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta*, 358(1–2), 37–54.
- Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H., and El-Sayed, M. A. (2006). Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(14), 7238–7248.
- Jaiswal, J. K., and Simon, S. M. (2004). Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends in Cell Biology*, 14(9), 497–504.
- Jani, I. V., Janossy, G., Brown, D. W. G., and Mandy, F. (2002). Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings. *Lancet Infectious Diseases*, 2(4), 243–250.
- Jeanmaire, D. L., and Van Duyne, R. P. (1977). Surface raman spectroelectrochemistryPart I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 84(1), 1–20.
- Jia, J., Wang, B., Wu, A., Cheng, G., Li, Z., and Dong, S. (2002). A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: Self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network. *Analytical Chemistry*, 74(9), 2217–2223.
- Jin, L., Shang, L., Guo, S., Fang, Y., Wen, D., Wang, L., Dong, S. (2011). Biomolecule-stabilized Au nanoclusters as a fluorescence probe for sensitive detection of glucose. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 1965–1969.

- Johnson, J. L. (1966). Microchemical Techniques in Solving Industrial Problems. *Microchim Acta*, 756-762.
- Juntunen, E., Myyryläinen, T., Salminen, T., Soukka, T., and Pettersson, K. (2012). Performance of fluorescent europium(III) nanoparticles and colloidal gold reporters in lateral flow bioaffinity assay. *Analytical Biochemistry*, 428(1), 31–38.
- Kanayama, N., and Kitano, H. (2000). Interfacial recognition of sugars by boronic acid-carrying self-assembled monolayer. *Langmuir*, 16(12), 577–583.
- Kanno, S., Yanagida, Y., Haruyama, T., Kobatake, E., and Aizawa, M. (2000). Assembling of engineered IgG-binding protein on gold surface for highly oriented antibody immobilization. *Journal of Biotechnology*, 76(2–3), 207–214.
- Karabıcak, S. (2011). *Application of Surface- Enhanced Raman Scattering (SERS) Method for Genetic Analysis*. Doctorate Thesis, Middle East Technical University, Institute of Science, Ankara, 1-11.
- Kasahara, Y., and Ashihara, Y. (1997). Simple devices and their possible application in clinical laboratory downsizing. *Clinica Chimica Acta*, 267(1), 87–102.
- Kavosi, B., Hallaj, R., Teymourian, H., and Salimi, A. (2014). Au nanoparticles/PAMAM dendrimer functionalized wired ethyleneamine-viologen as highly efficient interface for ultra-sensitive ??-fetoprotein electrochemical immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 59, 389–396.
- Kawde, A., Mao, X., Xu, H., Zeng, Q., He, Y., and Liu, G. (2010). Moving Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay to the Point-of-Care Dry-Reagent Strip Biosensors. *American Journal of Biomedical Sciences*, 2(1), 23–32.
- Kersaudy-Kerhoas, M., Dhariwal, R., Desmulliez, M. P. Y., and Jouvét, L. (2010). Hydrodynamic blood plasma separation in microfluidic channels. *Microfluidics and Nanofluidics*, 8(1), 105–114.
- Khan, M. S., Thouas, G., Shen, W., Whyte, G., and Garnier, G. (2010). Paper diagnostic for instantaneous blood typing. *Analytical Chemistry*, 82(10), 4158–4164.
- Khreich, N., Lamourette, P., Boutal, H., Devilliers, K., Créminon, C., and Volland, H. (2008). Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing. *Analytical Biochemistry*, 377(2), 182–188.
- Kim, F., Song, J. H., and Yang, P. (2002). Photochemical synthesis of gold nanorods. *Journal of the American Chemical Society*, 124(48), 14316–14317.
- Kim, G., Lim, J., and Mo, C. (2015). A Review on Lateral Flow Test Strip for Food Safety, 40(3), 277–283.
- Kim, J. E., Cho, J. H., and Paek, S. H. (2005). Functional membrane-implanted lab-on-a-chip for analysis of percent HDL cholesterol. *Analytical Chemistry*, 77(24), 7901–7907.

- Kim, S., Lim, Y. T., Soltesz, E. G., De Grand, A. M., Lee, J., Nakayama, A., Frangioni, J. V. (2004). Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nature Biotechnology*, 22(1), 93–97.
- Kiran, M. S., Itoh, T., Yoshida, K., Kawashima, N., Biju, V., and Ishikawa, M. (2010). Selective detection of HbA1c using surface enhanced resonance Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 82(4), 1342–8.
- Kloten, V., Becker, B., Winner, K., Schrauder, M. G., Fasching, P. a, Anzeneder, T., Dahl, E. (2013). Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening. *Breast Cancer Research : BCR*, 15(1), R4.
- Kong, K. V., Lam, Z., Kam, W., Lau, O., Leong, W. K., and Olivo, M. (2013). A Transition Metal Carbonyl Probe for Use in a Highly Specific and Sensitive SERS-Based Assay for Glucose. *Journal of the American Chemical Society*, 135(48), 18028-18031.
- Koydemir, H. C., Gorocs, Z., Tseng, D., Cortazar, B., Feng, S., Chan, R. Y. L., Ozcan, A. (2015). Rapid imaging, detection and quantification of Giardia lamblia cysts using mobile-phone based fluorescent microscopy and machine learning. *Lab Chip*, 15(5), 1284–1293.
- Kulagina, N. V., Shaffer, K. M., Ligler, F. S., and Taitt, C. R. (2007). Antimicrobial peptides as new recognition molecules for screening challenging species. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 121(1), 150–157.
- Kulakovich, O., Strekal, N., Yaroshevich, A., Maskevich, S., Gaponenko, S., Nabiev, I., Artemyev, M. (2002). Enhanced Luminescence of CdSe Quantum Dots on Gold Colloids. *Nano Letters*, 2(12), 1449–1452.
- Kumar, C. S. S. . (2007). *Carbon Nanotube-Based Sensor*. In *Nanomaterials for Biosensors*. (wiley VCH, Ed.). Weinheim.
- Kumar, G. V. P. (2012). Plasmonic nano-architectures for surface enhanced Raman scattering: a review. *Journal of Nanophotonics*, 6(1), 64503.
- Kurt, M., Raci Sertbakan, T., Özduran, M., and Karabacak, M. (2009). Infrared and Raman spectrum, molecular structure and theoretical calculation of 3,4-dichlorophenylboronic acid. *Journal of Molecular Structure*, 921(1–3), 178–187.
- Kusano, N., Hirashima, K., Kuwahara, M., Narahara, K., Imamura, T., Mimori, T., Torii, K. (2007). Immunochromatographic assay for simple and rapid detection of Satsuma dwarf virus and related viruses using monoclonal antibodies. *Journal of General Plant Pathology*, 73(1), 66–71.
- Laitinen, M. P. A., and Vuento, M. (1996). Affinity immunosensor for milk progesterone: Identification of critical parameters. *Biosensors and Bioelectronics*, 11(12), 1207–1214.
- Le Ru, E. C., Blackie, E. J., Meyer, M., and Etchegoin, P. G. (2007). Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(37), 13794–13803.

- Lee, K. S., Kim, T. H., Shin, M. C., Lee, W. Y., and Park, J. K. (1999). Disposable liposome immunosensor for theophylline combining an immunochromatographic membrane and a thick-film electrode. *Analytica Chimica Acta*, 380(1), 17–26.
- Lee, M. C., Kabilan, S., Hussain, A., Yang, X., Blyth, J., and Lowe, C. R. (2004). Glucose-sensitive holographic sensors for monitoring bacterial growth. *Analytical Chemistry*, 76(19), 5748–5755.
- Lee, M., Kim, T. Il, Kim, K. H., Kim, J. H., Choi, M. S., Choi, H. J., and Koh, K. (2002). Formation of a self-assembled phenylboronic acid monolayer and its application toward developing a surface plasmon resonance-based monosaccharide sensor. *Analytical Biochemistry*, 310(2), 163–170.
- Li, J., Sun, Y. Q., Wei, Y. M., and Zheng, J. B. (2013). Phenylboronic acid and dopamine as probe set for electrochemical detection of saccharides. *Chinese Chemical Letters*, 24(4), 291–294.
- Li, X., Ballerini, D. R., and Shen, W. (2012). A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends. *Biomicrofluidics*, 6(1).
- Li, X., Li, X., Tian, J., Tian, J., Nguyen, T., Nguyen, T., Shen, W. (2008). Paper-Based Microfluidic Devices by Plasma Treatment. *Lab on a Chip*, 8(2008903553), 9131–9134.
- Li, X., Tian, J., Garnier, G., and Shen, W. (2010). Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76, 564–570.
- Li, X., Tian, J., and Shen, W. (2010). Quantitative biomarker assay with microfluidic paper-based analytical devices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(1), 495–501.
- Li, Y., Schluesener, H. J., and Xu, S. (2010). Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bulletin*, 43(1), 29–41.
- Lim, C., Hong, J., Chung, B. G., deMello, A. J., and Choo, J. (2010). Optofluidic platforms based on surface-enhanced Raman scattering. *The Analyst*, 135(5), 837–844.
- Lin, Y. C., Yu, B. Y., Lin, W. C., Lee, S. H., Kuo, C. H., and Shyue, J. J. (2009). Tailoring the surface potential of gold nanoparticles with self-assembled monolayers with mixed functional groups. *Journal of Colloid and Interface Science*, 340(1), 126–130.
- Ling, Y., Zhang, N., Qu, F., Wen, T., Gao, Z. F., Li, N. B., and Luo, H. Q. (2014). Fluorescent detection of hydrogen peroxide and glucose with polyethyleneimine-templated Cu nanoclusters. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118, 315–320.
- Link, S., and El-Sayed, M. A. (2003). Optical Properties and Ultrafast Dynamics of Metallic Nanocrystals. *Annual Review of Physical Chemistry*, 54(1), 331–366.
- Linton, B., and Hamilton, A. D. (1997). Formation of Artificial Receptors by Metal-Templated Self-Assembly. *Chemical Reviews*, 97, 1669–1680.
- Lisa, M., Chouhan, R. S., Vinayaka, C., Manonmani, H. K., and Thakur, M. S. (2009). Gold

- nanoparticles based dipstick immunoassay for the rapid detection of dichlorodiphenyltrichloroethane: An organochlorine pesticide. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 224–227.
- Liu, D., Wu, F., Zhou, C., Shen, H., Yuan, H., Du, Z., Li, L. S. (2013). Multiplexed immunoassay biosensor for the detection of serum biomarkers - β -HCG and AFP of Down Syndrome based on photoluminescent water-soluble CdSe/ZnS quantum dots. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 186(August), 235–243.
- Liu, G. L., and Lee, L. P. (2005). Nanowell surface enhanced Raman scattering arrays fabricated by soft-lithography for label-free biomolecular detections in integrated microfluidics. *Applied Physics Letters*, 87(7).
- Liu, H. B., Yan, Q., Wang, C., Liu, X., Wang, C., Zhou, X. H., and Xiao, S. J. (2011). Saccharide- and temperature-responsive polymer brushes grown on gold nanoshells for controlled release of diols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 386(1–3), 131–134.
- Lönnberg, M., and Carlsson, J. (2001). Quantitative detection in the attomole range for immunochromatographic tests by means of a flatbed scanner. *Analytical Biochemistry*, 293(2), 224–31.
- Lou, S. C., Patel, C., Ching, S., and Gordon, J. (1993). One-step competitive immunochromatographic assay for semiquantitative determination of lipoprotein(a) in plasma. *Clinical Chemistry*, 39(4), 619–624.
- Lu, R., Shi, W., Jiang, L., Qin, J., and Lin, B. (2009). Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. *Electrophoresis*, 30, 1497–1500.
- Lu, Y., Shi, W., Qin, J., and Lin, B. (2010). Fabrication and characterization of paper-based microfluidics prepared in nitrocellulose membrane by Wax printing. *Analytical Chemistry*, 82(1), 329–335.
- Ludwig, R., Shiomi, Y., and Shinkai, S. (1994). Saccharide Recognition by Amphiphilic Diboronic Acids at the Air-Water Interface and the Relationship between Selectivity and Stoichiometry. *Langmuir*, 10(9), 3195–3200.
- Luka, G., Ahmadi, A., Najjaran, H., Alocilja, E., Derosa, M., Wolthers, K., Hoorfar, M. (2015). Microfluidics integrated biosensors: A leading technology towards lab-on-A-chip and sensing applications. *Sensors (Switzerland)*, 15(12), 30011–30031.
- Lyandres, O., Shah, N. C., Yonzon, C. R., Walsh, J. T., Glucksberg, M. R., and Van Duyne, R. P. (2005). Real-time glucose sensing by surface-enhanced Raman spectroscopy in bovine plasma facilitated by a mixed decanethiol/mercaptohexanol partition layer. *Analytical Chemistry*, 77, 6134–6139.
- Ma, C., Sun, Z., Chen, C., Zhang, L., and Zhu, S. (2014). Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC-ELSD. *Food Chemistry*, 145, 784–788.
- Ma, K., Yuen, J. M., Shah, N. C., Walsh, J. T., Glucksberg, M. R., and Duyne, R. P. Van.

- (2011). In vivo, transcutaneous glucose sensing using surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy: multiple rats, improved hypoglycemic accuracy, low incident power, and continuous monitoring for Greater than 17 Days. *Analytical Chemistry*, 83(23), 9146–9152.
- Maiolini, E., Ferri, E., Pitasi, A. L., Montoya, A., Di Giovanni, M., Errani, E., and Girotti, S. (2013). Bisphenol A determination in baby bottles by chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay, lateral flow immunoassay and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *The Analyst*, 139, 318–24.
- Mao, X., Ma, Y., Zhang, A., Zhang, L., Zeng, L., and Liu, G. (2009). Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip. *Analytical Chemistry*, 81(4), 1660–1668.
- Martinez, A. W., Phillips, S. T., Carrilho, E., Thomas, S. W., Sindi, H., and Whitesides, G. M. (2008). Simple telemedicine for developing regions: Camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Analytical Chemistry*, 80, 3699–3707.
- Minnikanti, S., Gangopadhyay, A., and Reyes, D. (2014). Polyelectrolyte Multilayers in Microfluidic Systems for Biological Applications. *Polymers*, 6, 2100–2115.
- Miranda, O. R., and Ahmadi, T. S. (2005). Effects of intensity and energy of CW UV light on the growth of gold nanorods. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 109(33), 15724–34.
- Mirasoli, M., Buragina, A., Dolci, L. S., Guardigli, M., Simoni, P., Montoya, A., Roda, A. (2012). Development of a chemiluminescence-based quantitative lateral flow immunoassay for on-field detection of 2,4,6-trinitrotoluene. *Analytica Chimica Acta*, 721, 167–172.
- Mitamura, K., and Imae, T. (2009). Functionalization of gold nanorods toward their applications. *Plasmonics*, 4(1), 23–30.
- Moens, L. G. J. D. G. K. D. V. P. (2007). Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(April), 1133–1147.
- Moskovits, M. (2005). Surface-enhanced Raman spectroscopy: A brief retrospective. *Journal of Raman Spectroscopy*, 36(6–7), 485–496.
- Murphy, C. J., Gole, A. M., Hunyadi, S. E., Stone, J. W., Sisco, P. N., Alkilany, A., Hankins, P. (2008). Chemical sensing and imaging with metallic nanorods. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (5), 544–557.
- Navani, N. K., and Li, Y. (2006). Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(3), 272–281.
- Navruz, I., Coskun, A. F., Wong, J., Mohammad, S., Tseng, D., Nagi, R., Ozcan, A. (2013). Smart-phone based computational microscopy using multi-frame contact imaging on a fiber-optic array. *Lab on a Chip*, 13(20), 4015–23.
- Ngo, Y. H., Li, D., Simon, G. P., and Garnier, G. (2013). Effect of cationic polyacrylamides

- on the aggregation and SERS performance of gold nanoparticles-treated paper. *Journal of Colloid and Interface Science*, 392(1), 237–246.
- Nie, S. (1997). Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science*, 275(February), 1102–1106.
- Niedbala, R. S., Feindt, H., Kardos, K., Vail, T., Burton, J., Bielska, B., Vallejo, R. (2001). Detection of analytes by immunoassay using up-converting phosphor technology. *Analytical Biochemistry*, 293(1), 22–30.
- Nik, B., and Sayed, El. (2003). Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed - Mediated Growth Method. *Chemistry of Materials*, 15(16), 1957–1962.
- Nuzzo, R. G., and Allara, D. L. (1983). Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *Journal of American Chemical Society*, 105(13), 4481–4483.
- Nuzzo, R. G., Fusco, F. a., and Allara, D. L. (1987). Spontaneously organized molecular assemblies. 3. Preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 109(8), 2358–2368.
- Ozkan, M. (2004). Quantum dots and other nanoparticles: What can they offer to drug discovery? *Drug Discovery Today*, 9(24), 1065–1071.
- Pamplona, V. F., Mohan, A., Oliveira, M. M., and Raskar, R. (2010). Dual of Shack-Hartmann Optometry Using Mobile Phones. *Frontiers in Optics 2010/Laser Science XXVI*, 2, FTuB4.
- Park, B. W., Kim, D. S., and Yoon, D. Y. (2011). Surface modification of gold electrode with gold nanoparticles and mixed self-assembled monolayers for enzyme biosensors. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 64–70.
- Park, S., Boo, H., and Chung, T. D. (2006). Electrochemical non-enzymatic glucose sensors. *Analytica Chimica Acta*, 556(1), 46–57.
- Parolo, C., de la Escosura-Muñiz, A., and Merkoçi, A. (2013). Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1), 412–416.
- Parolo, C., and Merkoci, A. (2013). Paper-based nanobiosensors for diagnostics. *Chemical Society Reviews*, 42(2), 450–457.
- Perrault, S. D., and Chan, W. C. W. (2009). Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50-200 nm. *Journal of the American Chemical Society*, 131(47), 17042–17043.
- Pharmabiotech, J. (2003). Nanodiagnosics : application of nanotechnology in, 153–161.
- Phillips, J. A., Lopez-Colon, D., Zhu, Z., Xu, Y., and Tan, W. (2008). Applications of aptamers in cancer cell biology. *Analytica Chimica Acta*, 621(2), 101–108.

- Pirnstill, C. W., and Coté, G. L. (2015). Malaria Diagnosis Using a Mobile Phone Polarized Microscope. *Scientific Reports*, 1–13.
- Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D. L., and Chidsey, C. E. D. (1987). Spontaneously Organized Molecular Assemblies. 4. Structural Characterization of n-Alkyl Thiol Monolayers on Gold by Optical Ellipsometry, Infrared Spectroscopy, and Electrochemistry. *Journal of American Chemical Society*, 109(6), 3559–3568.
- Portney, N. G., and Ozkan, M. (2006). Nano-oncology: Drug delivery, imaging, and sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(3), 620–630.
- Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., and Van Amerongen, A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2), 569–582.
- Putzbach, W., and Ronkainen, N. J. (2013). Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13(4), 4811–4840.
- Qu, S., Liu, J., Luo, J., Huang, Y., Shi, W., Wang, B., and Cai, X. (2013). A rapid and highly sensitive portable chemiluminescent immunosensor of carcinoembryonic antigen based on immunomagnetic separation in human serum. *Analytica Chimica Acta*, 766, 94–99.
- Radziuk, D., and Moehwald, H. (2015). Prospects for plasmonic hot spots in single molecule SERS towards the chemical imaging of live cells. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP*, 17(33), 21072–93.
- Rahman, M. M., Ahammad, J. S., Jin, J. H., Ahn, S. J., and Lee, J. J. (2010). A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. *Sensors*, 10, 4855–4886.
- Reach, G., and Wilson, G. S. (1992). Can continuous glucose monitoring be used for the treatment of diabetes. *Analytical Chemistry*, 64(6), 381A–386A.
- Ren, K., Zhou, J., and Wu, H. (2013). Materials for microfluidic chip fabrication. *Accounts of Chemical Research*, 46(11), 2396–2406.
- Shafer-Peltier, K. E., Haynes, C. L., Gluksberg, M. R., and Van Duyne, R. P. (2003). Toward a glucose biosensor based on surface-enhanced Raman scattering. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 588.
- Rycenga, M., McLellan, J. M., and Xia, Y. (2008). A SERS study of the molecular structure of alkanethiol monolayers on Ag nanocubes in the presence of aqueous glucose. *Chemical Physics Letters*, 463(1–3), 166–171.
- Sai, V. V. R., Kundu, T., and Mukherji, S. (2009). Novel U-bent fiber optic probe for localized surface plasmon resonance based biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(9), 2804–2809.
- Sajid, M., Kawde, A. N., and Daud, M. (2015). Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(6), 689–705.

- Salata, O. V. (2004). Journal of Nanobiotechnology. *Journal of Nanobiotechnology*, 6(3), 1–6.
- Sang, W. O., Jung, D. M., Sang, Y. P., Heuk, J. J., Jae, H. K., Ki, B. N., and Eui, Y. C. (2005). Evaluation of fluorescence hs-CRP immunoassay for point-of-care testing. *Clinica Chimica Acta*, 356(1–2), 172–177.
- Sau, T. K., and Murphy, C. J., (2004). Seeded high yield synthesis of short au nanorods in aqueous solution. *Langmuir*, 20(15), 6414–6420.
- Schrauder, B. (1995). General Survey of Vibrational Spectroscopy. In *Schrader B (ed.) Infrared and Raman Spectroscopy, Methods and Applications* (pp. 7–61). Weinheim: VCH.
- Sharma, B., Frontiera, R. R., Henry, A. I., Ringe, E., and Van Duyne, R. P. (2012). SERS: Materials, applications, and the future. *Materials Today*, 15(1–2), 16–25.
- Shervedani, R. K., Mehrjardi, A. H., and Zamiri, N. (2006). A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor. *Bioelectrochemistry*, 69(2), 201–208.
- Siddhanta, S., and Narayana, C. (2012). Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Proteins : Implications for Drug Designing. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 2, 1–13.
- Smith, A. M., Dave, S., Nie, S., True, L., and Gao, X. (2006). Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 6(2), 231–244.
- Soh, N., Sonezaki, M., and Imato, T. (2003). Modification of a Thin Gold Film with Boronic Acid Membrane and Its Application to a Saccharide Sensor Based on Surface Plasmon Resonance. *Electroanalysis*, 15(1516), 1281–1290.
- Songjaroen, T., Dungchai, W., Chailapakul, O., Henry, C. S., and Laiwattanapaisal, W. (2012). Blood separation on microfluidic paper-based analytical devices. *Lab on a Chip*, 12(18), 3392.
- Songjaroen, T., Dungchai, W., Chailapakul, O., and Laiwattanapaisal, W. (2011). Novel, simple and low-cost alternative method for fabrication of paper-based microfluidics by wax dipping. *Talanta*, 85(5), 2587–2593.
- Suh, K. Y., Kim, Y. S., and Lee, H. H. (2001). Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials*, 13(18), 1389–1393.
- Swamy, K. M. K., Jang, Y. J., Park, M. S., Koh, H. S., Lee, S. K., Yoon, Y. J., and Yoon, J. (2005). A sorbitol-selective fluorescence sensor. *Tetrahedron Letters*, 46(20), 3453–3456.
- Tam, F., Goodrich, P. G., Johnson, R. B., and Halas, J. N. (2007). No Title Plasmonic Enhancement of Molecular Fluorescence. *Nano Letters*, 7(2), 496–501.

- Tamer, U., Cetin, D., Suludere, Z., Boyaci, I. H., Temiz, H. T., Yegenoglu, H., Elerman, Y. (2013). Gold-coated iron composite nanospheres targeted the detection of *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 6223–6240.
- Tamer, U., Onay, A., Ciftci, H., Bozkurt, A. G., Cetin, D., Suludere, Z., Greneche, J. M. (2014). High-yield aqueous synthesis of multi-branched iron oxide core-gold shell nanoparticles: SERS substrate for immobilization and magnetic separation of bacteria. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(10).
- Temur, E., Zengin, A., Boyacı, I. H., Dudak, F. C., Torul, H., and Tamer, U. (2012). Attomole sensitivity of staphylococcal enterotoxin b detection using an aptamer-modified surface-enhanced Raman scattering probe. *Analytical Chemistry*, 84(24), 10600–10606.
- Tian, Z. Q., Yang, Z. L., Ren, B., and Wu, D. Y. (2006). SERS From Transition Metals and Excited by Ultraviolet Light. *Surface-Enhanced Raman Scattering*, 103, 125–146.
- Torul, H., Çiftçi, H., Çetin, D., Suludere, Z., Boyacı, I. H., and Tamer, U. (2015). Paper membrane-based SERS platform for the determination of glucose in blood samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 8243–8251.
- Torul, H., Çiftçi, H., Dudak, F. C., Adıgüzel, Y., Kulah, H., Boyacı, İ. H., and Tamer, U. (2014). Glucose determination based on a two component self-assembled monolayer functionalized surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) probe. *Analytical Methods*, 6(14), 5097.
- Torun, Özlem, Dudak, F. C., Baş, D., Tamer, U., and Boyaci, I. H. (2009). Thermodynamic analysis of the interaction between 3-aminophenylboronic acid and monosaccharides for development of biosensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 140(2), 597–602.
- Tothill, I. E. (2009). Biosensors for cancer markers diagnosis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20, 55–62.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C., and Hillier, J. (1951). A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11(c), 55–75.
- Tyagi, S., and Kramer, F. R. (1996). Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology*, 14(3), 303–308.
- Van Amerongen, A., Van Loon, D., Berendsen, L. B., and Wichers, J. H. (1994). Quantitative computer image analysis of a human chorionic gonadotropin colloidal carbon dipstick assay. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 229(1–2), 67–75.
- Van Delinder, V., and Groisman, A. (2006). Separation of plasma from whole human blood in a continuous cross-flow in a molded microfluidic device. *Analytical Chemistry*, 78(11), 3765–3771.
- Wahjudi, P. N., Patterson, M. E., Lim, S., Yee, J. K., Mao, C. S., and Lee, W. N. P. (2010). Measurement of glucose and fructose in clinical samples using gas chromatography/mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 43(1–2), 198–207.

- Wang, M., Benford, M., Jing, N., Coté, G., and Kameoka, J. (2009). Optofluidic device for ultra-sensitive detection of proteins using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Microfluidics and Nanofluidics*, 6, 411–417.
- Wang, X., Liu, E., and Zhang, X. (2014). Non-enzymatic glucose biosensor based on copper oxide-reduced graphene oxide nanocomposites synthesized from water-isopropanol solution. *Electrochimica Acta*, 130, 253–260.
- Wang, Y., Xu, H., Wei, M., Gu, H., Xu, Q., and Zhu, W. (2009). Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay. *Materials Science and Engineering C*, 29(3), 714–718.
- West, J. L., and Halas, N. J. (2003). Engineered nanomaterials for biophotonics applications: improving sensing, imaging, and therapeutics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5, 285–292.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(July), 368–373.
- Wittmann, C., Bilitewski, U., Giersch, T., Kettling, U., and Schmid, R. D. (1996). Development and evaluation of a dipstick immunoassay format for the determination of atrazine residues on-site. *The Analyst*, 121(6), 863–869.
- Wu, Z. S., Zhou, G. Z., Jiang, J. H., Shen, G. L., and Yu, R. Q. (2006). Gold colloid-bi-enzyme conjugates for glucose detection utilizing surface-enhanced Raman scattering. *Talanta*, 70(3), 533–539.
- Wurm, E. M. T., Hofmann-Wellenhof, R., Wurm, R., and Soyer, H. P. (2008). Telemedicine and teledermatology: Past, present and future. *Jddg*, 6(2), 106–112.
- Xu, X., Kim, K., Liu, C., and Fan, D. (2015). Fabrication and robotization of ultrasensitive plasmonic nanosensors for molecule detection with Raman scattering. *Sensors (Switzerland)*, 15(5), 10422–10451.
- Xu, Y. F., Velasco-Garcia, M., and Mottram, T. T. (2005). Quantitative analysis of the response of an electrochemical biosensor for progesterone in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(10 SPEC. ISS.), 2061–2070.
- Yamada, M., and Seki, M. (2005). Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics. *Lab Chip*, 5(11), 1233–1239.
- Yan, Z., Zhou, L., Zhao, Y., Wang, J., Huang, L., Hu, K., Yang, R. (2006). Rapid quantitative detection of *Yersinia pestis* by lateral-flow immunoassay and up-converting phosphor technology-based biosensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 119(2), 656–663.
- Yang, Q., Gong, X., Song, T., Yang, J., Zhu, S., Li, Y., Chang, J. (2011). Quantum dot-based immunochromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of alpha fetoprotein. *Biosensors and Bioelectronics*, 30(1), 145–150.
- Yang, S., Undar, A., and Zahn, J. D. (2006). A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation. *Lab on a Chip*, 6(7), 871–880.

- Yetisen, A. K., Akram, M. S., and Lowe, C. R. (2013). Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 13(12), 2210–51.
- Yezhelyev, M. V., Gao, X., Xing, Y., Al-Hajj, A., Nie, S., and O'Regan, R. M. (2006). Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncology*, 7(8), 657–667.
- Ymeti, A., Greve, J., Lambeck, P. V., Wink, T., Van Novell, S. W. F. M., Beumer, T. A. M., Kanger, J. S. (2007). Fast, ultrasensitive virus detection using a young interferometer sensor. *Nano Letters*, 7(2), 394–397.
- Yonzon, C. R., Haynes, C. L., Zhang, X., Walsh, J. T., and Van Duyne, R. P. (2004). A Glucose Biosensor Based on Surface-Enhanced Raman Scattering: Improved Partition Layer, Temporal Stability, Reversibility, and Resistance to Serum Protein Interference. *Analytical Chemistry*, 76(1), 78–85.
- Yu, W. W., and White, I. M. (2010). Inkjet printed surface enhanced raman spectroscopy array on cellulose paper. *Analytical Chemistry*, 82(23), 9626–9630.
- Zaytseva, N. V., Montagna, R. A., Lee, E. M., and Baeumner, A. J. (2004). Multi-analyte single-membrane biosensor for the serotype-specific detection of Dengue virus. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(1), 46–53.
- Zhang, F., Zou, M., Chen, Y., Li, J., Wang, Y., Qi, X., and Xue, Q. (2014). Lanthanide-labeled immunochromatographic strips for the rapid detection of *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*. *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 29–35.
- Zhang, G. P., Guo, J. Q., Wang, X. N., Yang, J. X., Yang, Y. Y., Li, Q. M., Zhao, D. (2006). Development and evaluation of an immunochromatographic strip for trichinellosis detection. *Veterinary Parasitology*, 137(3–4), 286–293.
- Zhang, X., Young, M. a., Lyandres, O., and Van Duyne, R. P. (2005). Rapid detection of an anthrax biomarker by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 4484–4489.
- Zhaohui Li, Ying Wang, Jun Wang, Zhiwen Tang, Joel G. Pounds, and Y. L. (2010). Rapid and Sensitive Detection of Protein Biomarker Using a Portable Fluorescence Biosensor Based on Quantum Dots and a Lateral Flow Test Strip No Title. *Anal. Chem.*, 82(16), 7008–7014.
- Zhou, P., Lu, Y., Zhu, J., Hong, J., Li, B., Zhou, J., Montoya, A. (2004). Nanocolloidal gold-based immunoassay for the detection of the N-methylcarbamate pesticide carbofuran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4355–4359.
- Zhu, H., and Ozcan, A. (2013). Wide-field fluorescent microscopy and fluorescent imaging flow cytometry on a cell-phone. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (74), e50451.
- Zhu, H. Y., Isikman, S. O., Mudanyali, O., Greenbaum, A., and Ozcan, A. (2013). Optical imaging techniques for point-of-care diagnostics. *Lab on A Chip*, 13(1), 51–67.
- Zhu, H., Yaglidere, O., Su, T. W., Tseng, D., and Ozcan, A. (2011). Cost-effective and

compact wide-field fluorescent imaging on a cell-phone. *Lab on a Chip*, 11(2), 315–22.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : TORUL, Hilal
 Uyruğu : T.C
 Doğum tarihi ve yeri : 21/01/1985
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (312) 202 31 07
 Faks : 0 (312) 223 50 18
 e-mail : hilaltorul@gazi.edu.tr



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi/Analitik Kimya AbD	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Analitik Kimya AbD	2009
Lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya Öğretmenliği	2007
Lise	Düzce Arsal Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2011- devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

1. Torul, H., Tamer, U. (2011). Determination of Enantiomers of Atenolol and Propranolol in Pharmaceutical Formulation by HPLC. **The Journal of AOAC International**, 94(3), 833-838.
2. Tamer, U., Kanbeş Ç., Torul, H., Ertaş, N. (2011). Preparation, characterization and electrical properties of polyaniline nanofibers containing sulfonated cyclodextrin group. **Reactive and Functional Polymers**. 71(9), 933-937.
3. Tamer, U., Seçkin, A.İ., Torul, H., Temur, E. (2011). Fabrication of Biosensor Based

- on Polyaniline/Gold Nanorod Composite. **International Journal of Electrochemistry**. Article ID 869742, doi:10.4061/2011/869742.
4. Temur, E., Zengin, A., Boyacı, İ.H., Dudak, F.C., Torul, H., Tamer, U. (2012). Attomole Sensitivity of Staphylococcal Enterotoxin B Detection Using an Aptamer-Modified Surface-Enhanced Raman Scattering Probe. **Analytical Chemistry**. 84(24), 10600-10606.
 5. Torul, H., Boyacı, İ.H., Tamer, U. (2010). Attomole Detection of Glyphosate by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Using Gold Nanorods, **FABAD J. Pharm. Sci.** 35, 2-12.
 6. Gupta, V.K., Atar, N., Yola, M.L., Eryılmaz, M., Torul, H., Tamer, U., Boyacı, İ.H., Üstundağ, Z. (2013). A novel glucose biosensor platform based on Ag@AuNPs modified graphene oxide nanocomposite and SERS application. **Journal of Colloid and Interface Science**. 406, 231–237.
 7. Torul, H., Çiftçi, H., Dudak, F.C., Adıgüzel, Y., Kulah, H., Boyacı İ.H., Tamer, U. (2014). Glucose determination based on two component self-assembled monolayer functionalized surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) probe. **Anal. Methods**. 6 (14), 5097 – 5104.
 8. Er Demirhan, B., Demirhan, B., Sönmez, C., Torul, H., Tamer, U., Yentür, G. (2015). Short communication: Determination of potential 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and 2-furaldehyde compounds in follow-on milks and infant formulas using the high-performance liquid chromatography method. **Journal of Dairy Science**. 98 (2), 818-822.
 9. Er Demirhan, B., Demirhan, B., Sönmez, C., Torul, H., Tamer, U., Yentür, G. (2015). Monosodium glutamate in chicken and beef stock cubes using high-performance liquid chromatography, **Food Additives and Contaminants: Part B**. 8 (1), 63-66.
 10. Çağlayan, M.G., Torul, H., Onur, F., Tamer, U. (2015). SERS-based assays for sensitive detection of modafinil. **Journal of Raman Spectroscopy**. 46, 802–806.
 11. Torul, H., Çiftçi, H., Çetin, D., Suludere, Z., Boyacı, İ.H., Tamer, U. (2015). Paper membrane-based SERS platform for the determination of glucose in blood samples” **Anal Bioanal Chem**. 407(27), 8243–825.
 12. Ömürlü, H., Deniz Arısu, H., Eligüzeloğlu Dalkilic, E., Tamer, U., Torul, T. (2016). Investigation of eluted monomers from resin-based root canal sealer by high-performance liquid chromatography analysis. **European Journal of Dentistry**. 10(1):92-96.

Sunumlar

1. Ömürlü, H., Deniz Arısu, H., Eligüzeloğlu, E., Tamer, U., Torul, H. (2009). HPLC analysis of the released monomers from Epiphany which is resin-based root canal filling material. **4. Scientific Symposium on Endodontics**. Antalya, Türkiye.
2. Torul, H., Tamer, U. (2009). Development of HPLC-UV Method for The Quantitation of Atenolol Enantiomers. **International Symposium On Drug and**

Development. Ankara, Türkiye

3. Torul, H., Tamer, U. (2009). Determination of Propranolol Enantiomers by HPLC-UV Method. **9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences.** Ankara, Türkiye.
4. Şendil, O., Peçenek, E., Özmen, A., Torul, H., Turan, N., Ekmekci, G. (2006). Preparation of Potassium Ion-Selective Membrane Electrode based on Benzo-15-Crown-5 Ether. **III. National Analytical Chemistry Conference.** Çanakkale, Türkiye.
5. Torul, H., Kanbeş, Ç., Ertaş, N., Tamer, U. (2010). Design and synthesis of enantiomer selective column material based on conducting polymer. **5. Analytical Chemistry Conference.** Erzurum, Türkiye.
6. Tamer, U., Zengin, A., Torul, H., Boyacı, İ.H. (2010). Composite Nanomaterial with Enhanced Magnetic and/or Optical Properties. **Intel European Research and Innovation Conference.** Leixlip, Ireland.
7. Torul, H., Tamer, U. (2011). Detection of glyphosate by SERS using gold nanorods. **Workshop on Vibrational spectroscopy in nanotechnology COST action MP0901.** Istanbul, Türkiye.
8. Saçintı, Ç., Torul, H., Günden Göğer, N. (2012). Determination of Olmesartan Medoximil and Hydrochlorothiazide in The Presence of Their Impurities Using HPLC-UV Method. **International Symposium on Pharmaceutical Sciences.** Ankara, Türkiye.
9. Tamer, U., Zengin, A., Torul, H., Dudak, C., Boyacı, İ.H. (2012). Surface enhanced Raman Scattering substrates preparation using functionalized nanoparticles. **Nanoalloy action MP0309 Action Conference.** Antalya, Türkiye.
10. Torul, H., Çiftçi, H., Boyacı, İ.H., Kulah, H., Tamer; U. (2013). SERS based non-enzymatic glucose sensor using functional gold nanorod particles. **Pittcon 2013 Conference.** Philadelphia, USA.
11. Torul, H., Tamer, U., Adıgüzel, Y., Çiftçi, H., Ceylan Koydemir, H., Kulah, H. (2013). SERS Based Non-Enzymatic Glucose Detection On Chip. **IMA-2013.** Thessaloniki, Greece.
12. Torul, H., Adıgüzel, Y., Çiftçi, H., Ceylan Koydemir, H., Tamer, U., Kulah, H. (2013). The Construction of a Optofluidic Platform Based On the Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Measurement of Blood Sugar Levels. **International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development.** Antalya, Türkiye.
13. Torul, H., Küçükboyacı, H., Tamer, U., Karasu, Ç. (2013). Development of HPLC-UV Method for The Quantitative Determination of Oleuropein, Hydroxytyrosol, Quercetin, Luteolin and Rutin in Olea Europea Leaves. **International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development.** Antalya, Türkiye.

14. Tamer, T., Doğan, Ü., Zengin, A., Torul, H., Çiftçi, H., Çetin, D., Suludere, Z., Boyacı, İ.H. (2014). The high product yield of hybrid nanoparticle and rationale biomolecule immobilization for sub-femtomolar SERS detection. **10th Nanoscience and Nanotechnology Conference**. İstanbul, Türkiye.

Yer aldığı projeler

1. Development of anisotropic nanoparticles and using detection of bacteria. Supported by Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Merkezi Projeleri, G. Ü. BAP, 46/2010-02.
2. Copolymerization of 3-aminophenyl boronic acid and 3-octylthiophene and investigation of usability as non-enzymatic glucose sensor. Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Merkezi Projeleri, G. Ü. BAP, 02/2011-28.
3. Biofilm characterization by SERS. Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Merkezi Projeleri, G. Ü. BAP, 02/2011-06.
4. Preparation of SERS Active Magnetic Nanoparticles and Using Detection of Enzyme Activity. Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Merkezi Projeleri, G. Ü. BAP, 02/2012-34.
5. Preparing a new Raman platform for glucose determination and investigation of its using for glucose measurement. Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Merkezi Projeleri, G. Ü. BAP, 02/2012-33.
6. The development of a new analysis platform based on the surface enhanced Raman spectroscopy and measurement of blood sugar levels, Türkiye Bilim ve Teknolojik Araştırma Kurumu, TÜBİTAK, Proje No: 111 T 983, April, 2012.

Hobiler

Resim yapmak, kitap okumak, seyahat etmek



GAZİ GELECEKTİR...