

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**FERRİTİN TAYİNİNE YÖNELİK
ELEKTROKİMYASAL İMPEDANS
SPEKTROSKOPİSİ ESASLI İMMUNOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

Umut MENGÜLLÜOĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

Biyokimya Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 25.05.2018

Bornova-İZMİR

2018

Umut MENGÜLLÜOĞLU tarafından doktora tezi olarak sunulan “FERRİTİN TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL İMPEDANS SPEKTROSKOPİSİ ESASLI İMMUNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 25.05.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof .Dr. Erhan DİNÇKAYA

Raportör Üye : Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Üye : Doç. Dr. Ayşe DİNÇER

Üye : Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Engin ASAV

.....
.....
.....
.....
.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “FERRİTİN TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL İMPEDANS SPEKTROSKOPİSİ ESASLI İMMUNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

25/05/2018


Umut MENGÜLLÜOĞLU

ÖZET

FERRİTİN TAYİNİNE YÖNELİK ELEKTROKİMYASAL İMPEDANS SPEKTROSKOPİSİ ESASLI İMMUNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

MENGÜLLÜOĞLU, Umut

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA
Nisan 2018, 129 sayfa

Ferritin dünyada insan popülasyonunda çok yaygın bir şekilde görülen demir eksikliği anemisinin en önemli belirteçlerinden biridir. Bunun yanı sıra bir akut faz reaktanı olarak pek çok enflamasyon durumunda ve bazı durumlarda da bir tümör marker olarak tayini önem taşımaktadır.

Bu önemli nedenlerden dolayı proje kapsamında ferritin tayinine yönelik yeni bir impedimetrik immünosensör geliştirildi. Temel prensip olarak antijen – antikor etkileşimine dayalı afinite temelli bir biyosensör sistemi geliştirildi ve sensör yüzeyinde meydana gelen değişimler elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile izlendi. Söz konusu değişimlerden yola çıkılarak ferritin tayini gerçekleştirildi. Antijen – antikor etkileşimi anti ferritin antikoruna ile ferritin biyomolekülleri arasında gerçekleştirildi. İmmünosensör sisteminin hassasiyeti, kullanılan sensör yüzeylerinin çeşitli yöntemlerle modifikasyonları neticesinde artırıldı.

Anti ferritin antikorları altın elektrot yüzeyine 11 – merkaptoundekanoik asit (11 – MUA) ile oluşturulan kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) üzerinden kovalent bağlarla immobilize edildi. Ferritin antijenleri, yüzeye immobilize edilen antikorlarla etkileşimleri sonucunda elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) sistemi ile tayin edildi. Geliştirilen biyosensör sistemi 2,5 – 400 pg/mL ferritin konsantrasyonlarında doğrusal tayin aralığına sahiptir. Biyosensörün tekrar üretilebilirlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları ise oldukça tutarlıdır.

Anahtar sözcükler: Ferritin, Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi, İmmünosensör, Biyosensör, Afinite



ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY BASED IMMUNOSENSOR FOR FERRITINE DETERMINATION

MENGÜLLÜOĞLU, Umut

PhD in Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

April 2018, 129 pages

Ferritin is one of the most important markers of iron deficiency anemia, which is very common in human populations around the world. In addition, it is important as an acute phase reactant in many cases of inflammation and in some cases as a tumor marker.

Due to these important reasons, a new impedimetric immunosensor for the determination of ferritin was developed under the project. As a basic principle, an affinity - based biosensor system based on antigen - antibody interaction was developed and the changes on the sensor surface were observed by electrochemical impedance spectroscopy. Ferritin determination was carried out by way of the mentioned changes. Antigen - antibody interaction was carried out between the anti-ferritin antibody and the ferritin biomolecules. The sensitivity of the immunosensor system has been increased as a result of various modifications of the sensor surfaces used.

Anti-ferritin antibodies were covalently immobilized onto the gold electrode surface via a self-assembled monolayer (SAM) of 11 - mercaptoundecanoic acid (11 – MUA). Ferritin antigens were detected by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) as a result of their interaction with surface-immobilized antibodies. The developed biosensor system has a linear range of 2.5 to 400 pg/mL ferritin. The reproducibility and repeatability results of the biosensor are highly consistent.

Keywords: Ferritin, Electrochemical Impedance Spectroscopy, Immunosensor, Biosensor, Affinity

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince görüş ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA'ya teşekkür ederim.

Tez izleme toplantılarında değerli görüş ve önerilerini sunan Sayın Prof. Dr. Erol AKYILMAZ ve Sayın Prof. Dr. Zekerya DURSUN'a katkılarından ötürü teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca bilimsel görüşlerini, kimyasal malzemelerini ve manevi desteklerini benden esirgemeyen Sayın Doç. Dr. DİLEK ODACI DEMİRKOL'a, Sayın Doç. Dr. Serap EVRAN'a, Sayın Araş. Gör. Dr. Çağrı ALTUĞ'a, Sayın Dr. Canan ÖZYURT'a ve Sayın Öğretim Görevlisi Burhan BORA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım kapsamında laboratuvarlarındaki cihazlarını kullanımına sunan Sayın Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Şenay ŞANLIER'e ve Sayın Araş. Gör. Dr. Güliz AK'a; ayrıca kimyasal malzeme desteğinden ötürü Sayın Araş. Gör. Dr. İdris YAZGAN'a teşekkür ederim.

Sonsuz sevgi, sabır ve destekleri için annem, babam ve kardeşime sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13-FEN-029 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir. Desteklerinden ötürü Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
1.1 Biyosensörler	4
1.2 Biyosensörlerin sınıflandırılması	7
1.3 Biyomoleküllerin immobilizasyonu	10
1.3.1 İmmobilizasyon prosedürleri	13
1.4 Elektrokimyasal biyosensörler	27
1.4.1 Voltammetri/amperometri	29
1.4.2 Kondüktometri	31
1.4.3 Potansiyometri	31
1.5 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi	32
1.5.1 İmpedans spektroskopisinde temel prensipler ve terimler	33

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

1.6	Biyosensör tasarımında elektrokimyasal impedans spektroskopisi	39
1.7	Ferritin.....	42
1.7.1	Giriş	42
1.7.2	Yapı	43
1.7.3	Serum ferritini	44
2.	MATERYAL VE METOD.....	46
2.1	Materyal	46
2.1.1	Kullanılan malzemeler	46
2.1.2	Kullanılan cihaz ve sistemler	47
2.2	Yöntem.....	49
2.2.1	Elektrot temizliği.....	49
2.2.2	Biyosensörün ölçüm sistemi.....	50
2.2.3	Verilerin değerlendirilmesi.....	51
2.2.4	Uygun eş değer devre modeli ile ölçümlerin değerlendirilmesi.....	52
2.2.5	Ferritin tayinine yönelik hazırlanan elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli biyosensörün hazırlanması.....	54
2.2.6	Kullanılacak olan anti ferritin – ferritin proteinlerinin test edilmesi.....	56

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.7 Ferritin tayinine yönelik elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli biyosensörün immobilizasyon aşamalarının optimizasyonu	58
2.2.8 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) yöntemi ile ferritin tayinine yönelik olarak geliştirilen afinite temelli biyosensörün karakterizasyon çalışmaları.....	63
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	65
3.1 Ferritin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün modifikasyon basamaklarına ilişkin bulgular	65
3.2 ELISA testine ilişkin bulgular	70
3.3 Ferritin tayinine yönelik elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli biyosensörün immobilizasyon aşamalarının optimizasyonuna ilişkin bulgular	73
3.3.1 Antijen türünün biyosensör cevabına etkisi	73
3.3.2 Antijen ve antikor için seçilen çözgen türünün biyosensör cevabına etkisi.....	75
3.3.3 11 – Merkaptoundakanoik asit konsantrasyonunun optimizasyonu	76
3.3.4 11 – Merkaptoundekanoik asit çözeltisinde en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi	78
3.3.5 EDC – NHS derişimlerinin optimizasyonu.....	80
3.3.6 EDC – NHS sisteminin inkübasyon yönteminin biyosensör cevabına etkisi.....	83
3.3.7 Antikor derişiminin biyosensör cevabına etkisi.....	85

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.3.8	Antiferritin inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi.....	87
3.3.9	Ferritin inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi.....	89
3.4	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) yöntemi ile ferritin tayinine yönelik olarak geliştirilen afinite temelli biyosensörün karakterizasyon çalışmalarına ilişkin bulgular	92
3.4.1	Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi	92
3.4.2	Tekrar üretilebilirlik	96
3.4.3	Tekrarlanabilirlik.....	97
3.4.4	Biyosensörün seçimliliği	99
3.4.5	Yapay serumda ferritin tayini.....	101
4.	GENEL DEĞERLENDİRME	105
	KAYNAKLAR DİZİNİ	109
	ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil

Sayfa

1.1 Biyosensör alanındaki bilimsel makalelerin yıllara göre sayısal dağılımı.	4
1.2 Biyosensörlerin şematik gösterimi.	5
1.3 Biyosensörlerde kullanılan yaygın immobilizasyon yöntemleri. (A) kovalent bağlama; (B) adsorpsiyon; (C) çapraz bağlama; (D) enkapsülasyon; (E) tutuklama	14
1.4 Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM'ler).....	20
1.5 SAM'lerin tipik moleküler prokürsörleri.	23
1.6 İmpedans değerini oluşturan bileşenler.	33
1.7 Nyquist grafiği ve Randles eş devre modeli.	35
1.8 İki elektrot ve bir biyolojik bileşenin kullanıldığı elektrokimyasal hücreler için eşdeğer devre.	37
1.9 Biyosensör tasarımları için biyomoleküler nanomateryal platformları (a) <i>Schistosoma japonicum</i> antikorları (jsAb) ve jsAg tayini, (b) GOx enzimi ve (c) ss DNA immobilizasyonu.	41
1.10 Ferritin	43
3.1 Elektrot yüzeyinin modifikasyon basamaklarına ait döngüsel voltammogramlar.....	65
3.2 Elektrot yüzeyinin modifikasyon basamaklarına ait Nyquist eğrileri (A), bu eğrilerin yakından görünümü (B).	66

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

3.3 ELISA yöntemi ile antijen - antikor etkileşiminin test edilmesi.....	71
3.4 ELISA testinden elde edilen standart grafiği.	72
3.5 Optimum antijen formu. Antijen konsantrasyonlarının logaritmasına karşı R_{et} değerlerinin değişim grafiği	74
3.6 Antijen ve antikor için kullanılan çözgen türünün biyosensör cevabına etkisi.	76
3.7 Optimum 11 – MUA derişimi. Antijen konsantrasyonlarının logaritmasına karşı R_{et} değerlerinin değişim grafiği.....	77
3.8 Optimum 11 – MUA inkübasyon süresi. Antijen konsantrasyonlarının logaritmasına karşı R_{et} değerlerinin değişim grafiği.....	79
3.9 Optimum EDC/NHS derişimi. Antijen konsantrasyonlarının logaritmasına karşı R_{et} değerlerinin değişim grafiği.....	81
3.10 EDC-NHS konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilen temel aktivasyon reaksiyonları.....	82
3.11 EDC - NHS inkübasyon yönteminin biyosensör cevabına etkisi.	84
3.12 Optimum anti-ferritin derişimi. Antijen konsantrasyonlarının logaritmasına karşı R_{et} değerlerinin değişim grafiği.....	86
3.13 Antikor immobilizasyonu süresi optimizasyonu.....	88
3.14 Ferritinin optimum inkübasyon süresi.	90

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

3.15 Doğrusal tayin aralığı çalışmaları sonu elde edilen Nyquist eğrileri.....	93
3.16 Doğrusal tayin aralığı çalışmaları sonucu elde edilen döngüsel voltammogramlar.....	94
3.17 Doğrusal tayin aralığı.	95
3.18 Ferritin biyosensörünün tekrarlanabilirliği.	98
3.19 Biyosensörün seçimliliği.	100
3.20 Yapay serumda hazırlanan ferritin çözeltileri ile yapılan impedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrileri.....	102
3.21 Yapay serum kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiği.....	103
3.22 Yapay serum ve ultra saf suda çözülen ferritin ile oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılması.	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

1.1 Biyosensörlerin dedektör türlerine göre sınıflandırılması	7
1.2 Biyosensörlerin sinyal iletim türlerine göre sınıflandırılması.....	8
1.3 Biyosensörlerin temel uygulama alanları.....	10
1.4 Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamak için en sık kullanılan impedans elemanlarının tanımları, frekans bağımlılıkları ve faz kaymaları.	36
1.5 Serum ferritin değerleri.....	44
3.1 Modifikasyon basamakları öncesi ve sonrasına ait R_{et} değerleri.	67
3.2 ELISA testi sonucu elde edilen absorbans değerleri.....	71
3.3 En uygun ferritin türünün belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.....	74
3.4 En uygun 11 – MUA konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.	77
3.5 En uygun 11 – MUA inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.	79
3.6 En uygun EDC -NHS konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.	81

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

3.7 Çalkalamalı ve çalkalamasız ortamda gerçekleştirilen EDC-NHS reaksiyonları sonucu elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.	84
3.8 En uygun antikor konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.	86
3.9 En uygun antikor inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.	88
3.10 En uygun antijen inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.	90
3.11 Ferritine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirliği.	96
3.12 Biyosensörün ferritin, insülin, HSA ve bu üç proteinin karışımını içeren protein çözeltilerine karşı verdiği yanıt.	100
4.1 Ferritin tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçları.	107

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

EİS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
SAM	Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar (self assembled monolayer)
11 – MUA	11 – Merkaptoundekanoik asit
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorid
NHS	N-Hidroksisüksinimid
MES	2-(N-Morfolin)etansülfonik asit hidrat, 4-Morfolinetansülfonik asit
HSA	İnsan Serum Albümin (Human Serum Albumin)

1. GİRİŞ

Tez çalışması kapsamında, elektrokimyasal impedans spektroskopisi tekniği kullanılarak demir eksikliği anemisinin önemli belirteçlerinden biri olan ferritin tayinine yönelik afinite temelli yeni bir impedimetrik biyosensör geliştirildi. Geliştirilen bu biyosensör sisteminin günümüzde kullanılan yöntemlerin yanında güçlü bir alternatif yöntem olarak literatürde yerini alması amaçlanmaktadır.

Serum ferritin düzeylerinin ölçümü demir eksikliği anemisinin belirlenmesinde önemlidir. Ölçülen ferritin düzeyleri ile vücutta depo edilen toplam demir miktarı arasında genellikle bir korelasyon bulunmaktadır. Ayrıca demir eksikliği tedavisinin ve bununla birlikte bazı klinik durumlarda organizmada demir birikiminin izlenmesinde ferritin tayini büyük önem taşır. Çünkü yüksek düzeyli demir birikiminin klinik açıdan ciddi sorunlara yol açma potansiyeli mevcuttur. Bunun yanı sıra meme tümörlerinin teşhis ve tedavisinin takibinde yararlanılabilecek bir marker olarak kabul edilir (Alkhateeb, Han, and Connor 2013). Bununla birlikte birçok kanser vakasında serum ferritin düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Yapılan son araştırmalarda ferritin makrofajlar ve erken eritrosit prekürsörleri için yeni ve güvenilir bir belirteç olduğu ve bu iki hücre tipi ile ilgili hastalıkların teşhisinde klinik olarak ferritinden yararlanılabileceği ortaya konmuştur (W. Wang et al. 2013). Ferritin ve demir dengesi, demir yararlanımı, depolanması ve transferi gibi çeşitli durumların patolojisinde önemli olduğu kadar; Alzheimer hastalığı, pulmoner hastalıklar, Parkinson hastalığı ve ateroskleroz gibi hastalıklarla da ilişkilidir (Zandman-Goddard and Shoenfeld 2007). İnsanlarda, serum ferritin seviyeleri ile insülin direnci arasında ilişkinin olduğu yönelik çalışmalar literatürde mevcuttur (Hamed and Yousry 2012). Ferritin ayrıca bir akut faz reaktanıdır (Chakraborty et al. 2013; Jain, Gautam, and Naseem 2011).

Ferritin yukarıda sözü edilen özelliklerinden anlaşılacağı üzere, serum ferritin seviyelerinin tayini birçok farklı hastalığın teşhisinde ve tedavi sürecinin izlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Dolayısıyla ferritin tayini için

hassasiyeti, doğruluğu, kesinliği yüksek ve maliyeti düşük yöntemlerin geliştirilmesi büyük bir önem arz etmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, sözü edilen özelliklere sahip ferritin tayinine yönelik yeni bir biyosensör sistemi geliştirildi. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi yöntemi kullanılarak geliştirilen bu biyosensör sistemi ile anti ferritin – ferritin etkileşimine dayalı afinite temelli ölçümler gerçekleştirildi.

Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EİS) esaslı biyosensörler, son yıllarda çok çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklerin belirlenmesinde oldukça duyarlı bir belirteç olarak ortaya çıkmıştır. EİS, analitik çözümler sunmasının yanı sıra membran özelliklerinin belirlenmesi, biyosensör karakterizasyonu ve fabrikasyonu amaçlı araştırmaların yapılmasına olanak sağlamaktadır (K'Owino and Sadik 2005).

EİS immünoensörlerinde antikor temelli tayinlerin ana prensibi, antikorların hedef antijenlere bağlanması ve bunu takiben antijen – antikor kompleks yapısının belirlenmesi şeklindedir. Antijen – antikor etkileşiminin spesifikliği ve seçiciliği, bu tekniğin kan, idrar gibi kompleks biyolojik materyalleri kapsayan analitik metotlar üzerinde uygulanabilir olmasına olanak tanır. Bu uygulamaların başarısı, örnek içerisinde bulunan antijen ve antikorların bağlanma spesifikliği altında yatmaktadır. Bağlanma başarısının düzeyi, kullanılacak elektrot yüzeylerinin yüzey aktif maddeler, SAM (Self Assembled Monolayer – Kendiliğinden Oluşan Tek Tabaka) molekülleri veya nanopartiküller ile uygun modifikasyon yöntemleriyle modifiye edilmesi yoluyla artırılabilir.

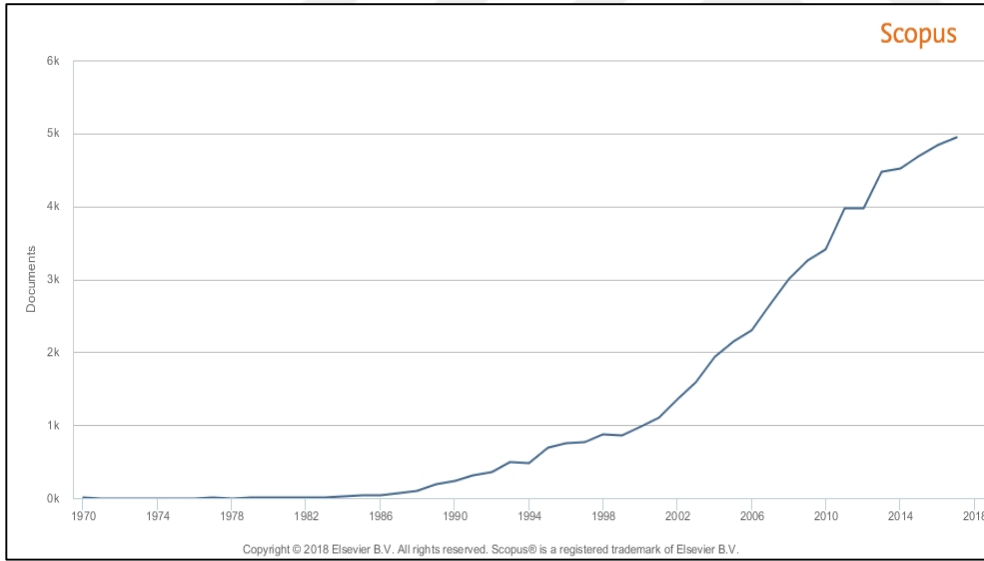
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli impedimetrik sensörler, bağlanma sonrası gerçekleşen afinite temelli biyomolekül etkileşimleri sonucu meydana gelen yük transfer değişimleri yoluyla, söz konusu etkileşimleri belirlenebilir kılar. Moleküler düzeydeki etkileşimlerin oluşturduğu elektriksel değişimler ve bu değişimlerin neticesinde akımda, voltajda, kapasitansta veya impedansta gerçekleşen farklanmalar, biyosensörün geliştirilme prosedürünün her aşamasındaki döngüsel voltammogramların alınması ve impedans ölçümlerinin yapılması yoluyla takip edildi. Böylece sensör yüzeyinde gerçekleştirilen modifikasyonların başarısı incelendi ve karakterize edildi.

Tez çalışmaları kapsamındaki denemelerde, altın elektrot ile bu elektrodun yüzey modifikasyon yönteminde yararlanılan kimyasallar kullanıldı. Ölçüm sistemi olarak laboratuvarlarımızda var olan Autolab PGSTAT302 marka/model potansiyostat cihazından yararlanıldı. Elektrotların yüzey modifikasyon kademelerinde, her aşamada döngüsel voltammogramları alındı ve impedans ölçümleri yapıldı. Böylece yüzey modifikasyonunun başarısı incelenerek sensör yüzeyleri karakterize edildi.

Tez çalışması klinik açıdan önemli bir belirteç olan serum ferritin düzeylerinin ölçümüne yönelik bir immünosensör geliştirilmesine yönelik bir çalışmadır. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli biyosensörler dünyada biyosensör teknolojileri alanındaki çalışmaların yeni bir dalını oluşturmaktadır. Günümüzde var olan ferritin ölçüm tekniklerinden farklı olarak bu tezdeki çalışmalar kapsamında ilk defa elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli bir yöntem literatüre kazandırılacak ve bu sayede var olan yöntemlere kıyasla duyarlılığı ve seçiciliği yüksek, düşük maliyetli ve çevreye duyarlı ferritin analizleri gerçekleştirilebilecektir.

1.1 Biyosensörler

Biyosensörlerin tarihi 1962'de bilim adamı Leland C. Clark tarafından enzim elektrotlarının geliştirilmesiyle başlamıştır (Clark and Lyons 1962). İlk glukoz biyosensörünün Clark tarafından geliştirilmesiyle başlayan bu çalışmaların neticesinde, dünya çapında yaygın bir sağlık sorunu olan diyabet hastalığının teşhisi ve yönetimi konusunda önemli kolaylıklar sağlandı (Turner, Chen, and Piletsky 1999). Bu tarihten günümüze değin, fizik, kimya ve malzeme bilimi gibi çeşitli alanlardan araştırma toplulukları, çok geniş kapsamlı multi disiplinler işbirlikleri sonucunda daha sofistike, güvenilir ve gelişmiş biyo-algılama cihazları geliştirmişlerdir. Yıllar içinde geliştirilen cihazlar, tıp, tarım, biyoteknoloji gibi alanlarda olduğu kadar askeri alanlar ile biyoterörizmin tespiti ve önlenmesinde başarılı sonuçlar ortaya koymuştur (Mohanty and Koucianos 2006). Clark'ın biyosensöründen günümüze değin biyosensör alanında yapılan bilimsel çalışmaların sayısı artarak devam etmektedir (Şekil 1.1).

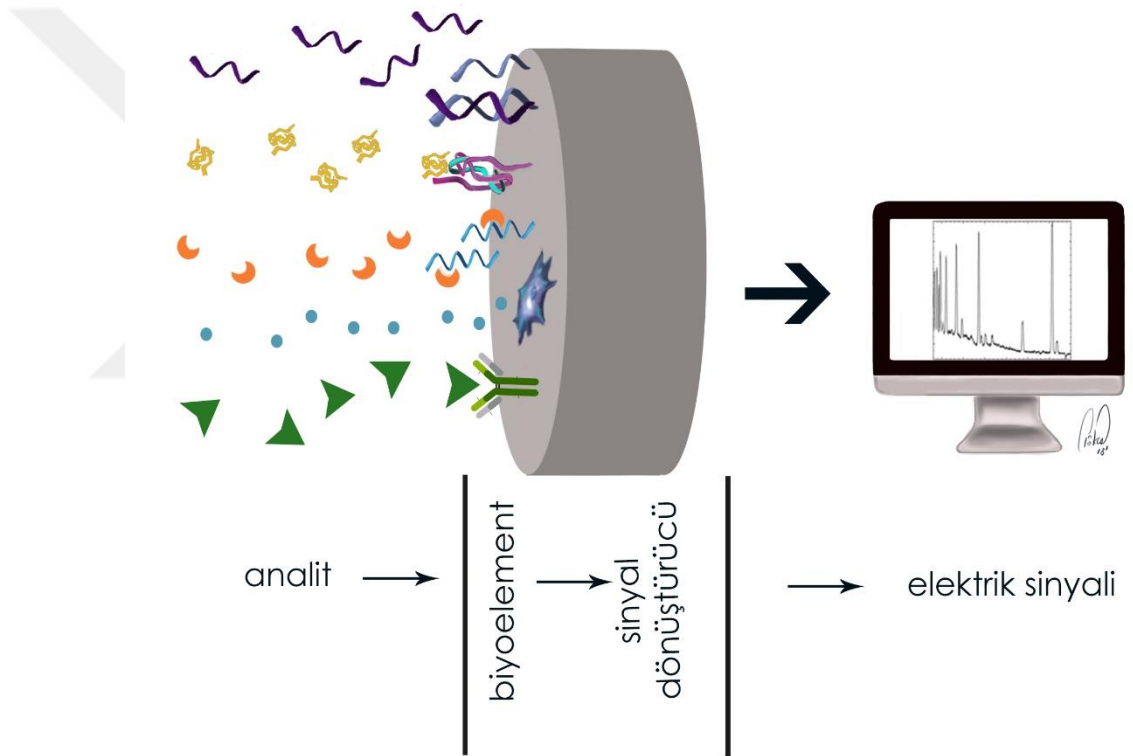


Şekil 1.1Biyosensör alanındaki bilimsel makalelerin yıllara göre sayısal dağılımı (Scopus - Analyze search results n.d.).

Biyosensörler için, uygulamanın alanına bağlı olarak çeşitli tanımlar ve terminolojiler kullanılmaktadır. Biyosensörler, immünosensör, optrodlar (optik sensörler), rezonant aynalar, glukometreler, biyoçipler ve biyolojik bilgisayarlar

bunlardan bazılarıdır. S.P.J. Higson ve D.M. Frazer tarafından sıklıkla alıntılanan iki tanım sırasıyla "biyosensör, bazı kompleks biyokimyasal parametrelerin niceliksel gelişimine izin vermek için biyolojik olarak türetilmiş bir tanıma ögesinin bir dönüştürücüye bağlandığı bir kimyasal algılama cihazıdır," ve "biyosensör, belirli bir biyolojik ögenin (tanıma olayı yaratan) ve fiziksel ögenin (tanıma olayını ileten) tasarlanmış şekilde ve iç içe bir kombinasyonunu içeren bir analitik cihazdır." şeklindedir.

Biyosensör adı, cihazın iki parçadan oluşan bir kombinasyon olduğunu belirtir: biyo element ve bir sensör elemanı.



Şekil 1.2 Biyosensörlerin şematik gösterimi.

Bir biyosensörün operasyonunun temel kavramları Şekil 1.2 yardımıyla gösterilebilir. Bir enzim gibi spesifik biyo element, belirli bir analiti tanır ve sensör elemanı, biyomoleküldeki değişikliği bir elektrik sinyaline dönüştürür. Biyoelement duyarlı olduğu analit için oldukça spesifikdir. Diğer analitleri tanımaz. Kullanılan dönüştürücü mekanizmaya bağlı olarak, biyosensörler; rezonant biyosensörler, optik algılama biyosensörleri, termal algılama

biyosensörleri, iyon duyarlı alan etkili transistör (ISFET) biyosensörleri ve elektrokimyasal biyosensörler gibi birçok türde olabilir. Ölçülen parametreye dayanan elektrokimyasal biyosensörler ayrıca iletkenlik, amperometrik ve potansiyometrik olarak sınıflandırılabilir (Mohanty and Koucianos 2006).

Biyosensörler, bir biyolojik tanıma elemanı ile bir sinyal ileticinin (transdüser) entegre edildiği, hedef analite spesifik bir algılama sistemi olarak geliştirilen analitik cihazlardır. Günümüzde birçok farklı biyosensör türü mevcuttur. Bununla birlikte, hepsi temel olarak, analit ile etkileşime giren ve bir dönüştürücü ile tespit edilebilecek bir şekilde tepki veren biyolojik bir tanıma elemanı ya da biyoreseptör içermektedir. Biyolojik grupların çeşitli iletken ve yarı iletken yüzeylerde oluşturulması, çoğu elektrokimyasal tabanlı biyosensörün temelini oluşturmaktadır. Yakın tarihli bir araştırmaya göre, literatürde bildirilen biyosensörlerin yarısından fazlasının tayin yönteminin elektrokimyasal temelli olduğu (diğer bir deyişle, amperometrik, potansiyometrik, kapasitif, iletkenlik) ortaya çıkmıştır (D’Orazio 2003; Meadows 1996). Bu bağlamda elektrokimyasal tabanlı biyosensörlerin nispi avantajlarını tartışan bazı incelemeler yayınlanmıştır (D’Orazio 2003; Guilbault et al. 2004; Yakovleva and Emnéus 2008). Bir dizi araştırmacı da biyosensör gelişiminde elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) uygulamasını gözden geçirmiştir. Alfonta ve arkadaşları (Alfonta et al. 2001; Gooding et al. 2003) iletken ve yarı iletken yüzeylerdeki biyomoleküler etkileşimleri saptamak ve anlamak için impedans spektroskopisinin önemini vurgulamışlardır. Benzer şekilde, Guan ve ark. (Guan, Miao, and Zhang 2004), çeşitli enzim temelli ve mikroorganizma tabanlı biyosensörlerin karakterize edilmesi için EİS uygulamasını incelemişlerdir. Daha yakın zamanlarda, K’Owino ve Sadık (K’Owino and Sadık 2005) yayınladıkları bir çalışmada hücre kültürü izleme ve bimoleküler taramada EİS'nin gücünü göstermişlerdir.

Biyosensörler üzerine yapılan geçmiş araştırmaların çoğu, yüzey yapısının optimize edilmesine odaklanmıştır. Aslında, elektrokimyasal tabanlı biyo-algılama aygıtlarının geliştirilmesindeki en önemli adımlardan biri, bir biyomolekül film tabakasının bir metal / yarı iletken yüzey üzerine depozisyonu veya kaplanması adımıdır. Biyosensörün son derece başarılı olabilmesi için biyo-tanımlama molekülünün transdüsera geri döndürülemez şekilde bağlanması gereklidir. Yüzey kimyasının ve kapsama alanının kontrolü, yüksek reaktivite, kararlılık, yönlendirme ve erişilebilirliği sağlamak ve spesifik olmayan adsorpsiyon proseslerini en aza indirmek için büyük önem taşır. İmmobilizasyon, bir biyosensörün genel performansının belirlenmesinde önemli

bir adımdır ve son on yılda SAM gibi sıralı organik filmler oluşturmak için önemli çalışmalar yürütülmüştür (Chaki and Vijayamohanan 2002a),(Katz and Willner 2003a).

1.2 Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler üç şemaya göre sınıflandırılabilir:

- (i) Dedektör tipi, örneğin; bir immünosensör,
- (ii) İletim işleminin fiziği, örneğin; bir amperometrik sensör
- (iii) Uygulama, örneğin; bir tıbbi biyosensör.

Her şema belirli bir bağlamda faydalı olabilir, ancak (ii) ve (iii) en yaygın şekilde kullanılır. Tablo 1 ve 2 sırasıyla dedektör tipi, iletim yöntemi ve uygulamaları açısından çeşitli biyosensörlerin derlemelerini içermektedir (A. F. Collings and Caruso 1997).

Tablo 1.1 Biyosensörlerin dedektör türlerine göre sınıflandırılması (Rogers 2006).

Enzim sensörleri
İmmünosensörler
Hücre temelli sensörler
Nükleik asit sensörleri
Doku temelli sensörler
Organel temelli sensörler

Tablo 1.2 Biyosensörlerin sinyal iletim türlerine göre sınıflandırılması (A. F. Collings and Caruso 1997).

Elektrokimyasal	Potansiyometrik Sensörler
	Amperometrik Sensörler
	Voltammetrik Sensörler
	İmpedimetrik Sensörler
	ISE/ISFET/CHEMFET Sensörler
Elektriksel	Yüzey İletken Sensörler
	Kondüktometrik Sensörler
	Kapasitans Sensörleri
Termal	Kalorimetrik Sensörler
	Enzim Termistör (reaksiyon veya absorpsiyon ısısı) Sensörleri
Manyetik	Paramanyetizm Sensörleri

Optik	Fiber Optik Sensörler
	Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Sensörleri
	Frekans Yönlendirici Temelli SPR Sensörleri
	Birleştirilmiş Girişim Ölçerler
	Diferansiyel Mod Girişim Ölçerler
	Yankılanan Ayna Sensörleri
	Izgara Bağlayıcı Sensörler
Piezoelektrik	Optik Frekans Yönlendirici Işık Modu Spektroskopik Sistem (OWLS) Sensörleri
	Refraktometrik Girişim Spektroskopisi (RIfS) Sensörleri
	Kuartz Kristal Mikrobals (QCM)
	Yüzey Akustik Dalga (SAW) Sensörleri
	Makaslama-Yatay Akustik Plaka Modu (SH/APM) Sensörleri
	Lamb Dalga Sensörleri
	Love Dalga Sensörleri

Tablo 1.3 Biyosensörlerin temel uygulama alanları(A. F. Collings and Caruso 1997).

Medikal/Klinik
Endüstriyel/Robotik
Veterinerlik/Tarım/Gıda
Çevre
Proses izleme/Kontrol
Askeri Savunma

1.3 Biyomoleküllerin immobilizasyonu

Bir biyosensör, bir transdüser (piezoelektrik, akustik, optik, kalorimetrik veya elektrokimyasal) ile temas halinde veya entegre edilmiş ve biyolojik olarak hassas bir immobilize materyali (enzim, antikor, antijen, organel, DNA, hücre, doku veya organik molekül) içeren bir analitik cihazdır. Bu cihaz biyolojik bir sinyali nicel olarak ölçülebilen bir elektrik sinyaline dönüştürür. Biyosensör yapımındaki en önemli faktör, biyomoleküllerin immobilize edilmesi ve yüzeylere tutturulması için immobilizasyon teknolojilerinin geliştirilmesidir. Her zamanki amaç, transdüser yüzeyinde veya yakınında immobilize edilmiş biyolojik olarak aktif maddenin ince bir filmini üretmektir. Bu biyosensörler, tayini istenen sadece bir veya bir grup materyalin veya maddelerin varlığına cevap verir (A. Collings and Caruso 1997).

Bugüne kadar kullanılan immobilizasyon tekniklerinin çoğunun tekrarlanabilir sonuçlar vermesi istenilen düzeyde değildir ve halen kullanılan birçok prosedür, deneme yanılma süreci ile evrimleşmiştir. Mevcut immobilizasyon yöntemleri, belirli molekül türlerine ilgisi olan ince biyolojik filmlerin hazırlanmasına izin vermekle birlikte, bu teknikler genellikle doğal

konformasyonda ve dolayısıyla biyolojik materyalin aktivitesinde bir kayıba neden olur. Yüzeyde oluşturulan biyolojik filmlerdeki aktivite kayıpları ortadan kaldırılabiliyse, biyosensörlerin mevcut dezavantajlarının birçoğu aşılabılır. İlk aşamada meydana gelen aktivite kaybına rağmen, biyosensör immobilizasyon teknolojilerindeki son gelişmeler, biyosensörlerin, bir yıla kadar hassasiyet kaybı olmaksızın depolanmasına olanak sağlamıştır.

Biyolojik materyali sensör yüzeyine immobilize etmek için kullanılan immobilizasyon tekniği biyosensörün operasyonel davranışı açısından oldukça önemli olduğu için, immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi için gerçekçi stratejiler, pratik olarak kullanılabilir biyosensörler için elzemdir.

Biyomateryallerin immobilizasyonu için kullanılacak tekniğinin karşılaması gereken bir takım gereklilikler vardır: (i) biyolojik bileşen, sensör yüzeyine bağlandığında biyolojik etkinliğini önemli ölçüde muhafaza etmelidir; (ii) biyolojik film yapısını ve işlevini muhafaza ederken sensör yüzeyine sıkıca bağlı kalmalıdır; (iii) immobilize edilmiş biyolojik filmin uzun vadeli kararlılığının ve dayanıklılığının olması gerekir; ve (iv) biyolojik materyalin, belirli bir biyolojik bileşene yüksek bir spesifikliği olmalıdır. Etkili bir biyosensör için bu koşullar yerine getirilmelidir.

Genellikle immobilizasyon yönteminde aranan diğer avantajlar, biyolojik filmlerin tekrarlanabilir prosedürlerle oluşturulması ve bu filmlerin olduğu zaman farklı ortamlara adapte olabilmesidir. Bilhassa, immobilize edilmiş filmlerin sıcaklık, iyonik kuvvet ve kimyasal bileşimdeki değişikliklerle kararlılıklarını ve aktivitelerini muhafaza ederek fizyolojik pH değerlerine direnci olmalıdır. Bazı durumlarda, birden fazla biyolojik açıdan aktif bileşenin birlikte immobilize edilebilme özelliği de gerekli olabilir.

Duyarlılık konusu, etkin ve etkili bir biyosensör için özellikle önemlidir. Biyosensör duyarlılığı hem algılama sisteminin hassaslığına hem de sensör yüzeyinin yakınındaki biyolojik materyalin dağılım yoğunluğuna ve / veya oryantasyonuna bağlıdır. Bu nedenle, biyosensör geliştirilmesinin önemli bir yönü, özellikle de afiniteye dayalı biyosensörlerde, immobilize edilmiş biyolojik moleküllerin arzulanan dağılımını ve / veya yönlendirilmesini sağlamak için kullanılan immobilizasyon tekniğidir. Hassas bir cihaz için fonksiyonel biyolojik moleküllerin yüksek bir yüzey yoğunluğuna ihtiyaç duyulmasına rağmen, özellikle biyolojik bileşenin başka bir biyomolekül ile etkileşime girdiği afinite

tabanlı sistemlerde yüzeyin aşırı yüklenmesinden kaçınılmalıdır. Aktivite genel olarak yüzey yüklemesiyle başlangıçta artarken, yüksek yüzey yüklemesi genellikle biyomolekül agregasyonuna ve aktivitede azalmaya neden olur. Aşırı yüklenme yapılan sistemlerde, immobilize edilmiş biyolojik materyalin aktif bölgesinin tıkanması veya inaktivasyonu potansiyeli söz konusudur (A. F. Collings and Caruso 1997).

Biyoaktif materyalin sensör yüzeyinin tamamında eşit bir şekilde katmanlanıp konumlanması gerekliliği, yıllarca optimal bir biyosensör yüzeyinin (üretimnin) ön koşulu olarak kabul edilmiştir. İdeal olarak, enzim veya protein molekülleri sensör yüzeyine, aktif bölgelerini açıkta bırakarak, aynı bölgeden bağlanırlar. Sensör yüzeyinin protein üzerindeki yalnızca aktif bölgeden uzakta bulunan tek bir bölge ile reaksiyona girmesi gerektiği öne sürülmüştür (Zull et al. 1994).

Pek çok biyosensör, spesifik olmayan bağlanma ile ilgili problemler ortaya çıkarır. Genellikle, birçok moleküler türe sahip bir serum ya da çözelti ortamında bulunan spesifik bir analitin tayini yapılırken, çözeltideki diğer türlerden etkileşim olur. Spesifik olmayan bağlanmayı azaltmak için bloke edici maddeleri (örneğin immünosensör uygulamaları için sığır serum albümini (BSA)) sisteme sokmak yaygın bir uygulamadır. Spesifik biyomolekül etkileşimleri üzerinde net bilgi elde edilmesi için spesifik olmayan bağlanma en aza indirilmelidir. Ayrıca, biyomoleküllerin minimum spesifik olmayan adsorpsiyonuna imkân tanıyan yüzeylerde genel olarak biyolojik bileşenin tekli bölge üzerinden tutturulduğu öne sürülmüştür (Zull et al. 1994).

Biyomoleküllerin immobilizasyonunda bir diğer önemli husus, biyosensörün kullanımı esnasında biyolojik bileşenin desorpsiyon yapmamasıdır. Bu duruma özellikle tutuklama yöntemlerinde, biyomoleküllerin tutulması için polimerle tutuklama veya membran bariyerlerinden faydalandığında dikkat edilmelidir.

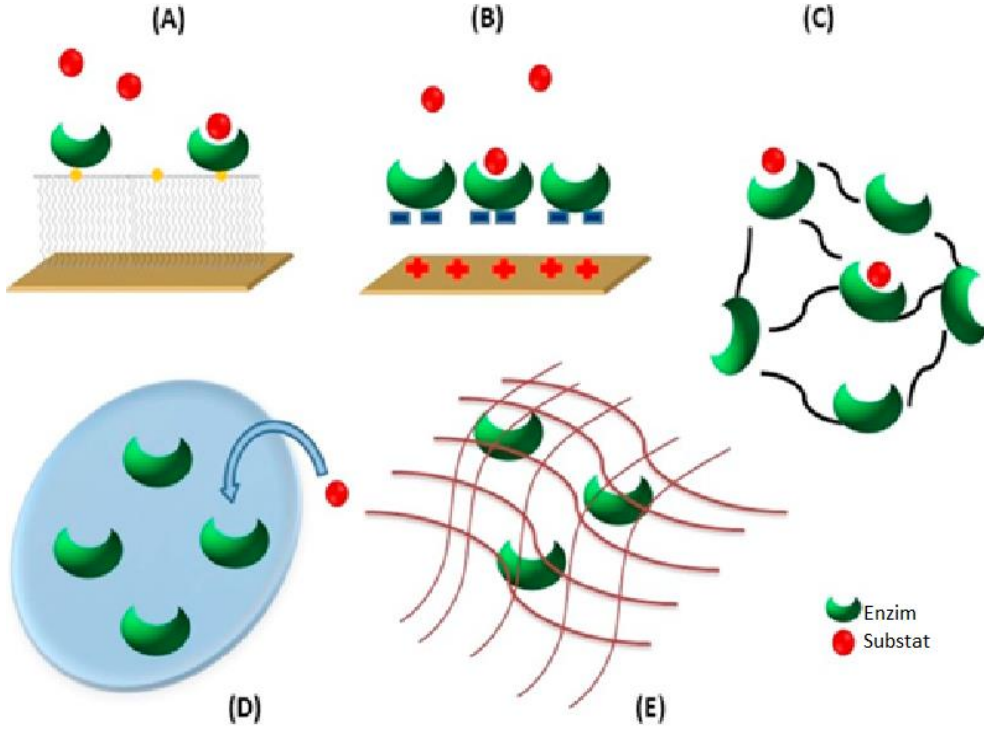
Yukarıdaki tartışma, biyosensör alanındaki araştırmacıların biyomoleküllerin immobilizasyonu ile ilgili karşılaştıkları zorlukları vurgulamaktadır. Bu nedenle, güvenilir ve ticari olarak faydalı biyosensörlere doğru evrilmenin, sensör yüzeylerinde enzimlerin veya proteinlerin homojen, aktif, kararlı ve dayanıklı filmlerinin üretilmesinin teknik mücadelesi nedeniyle uzun süredir gecikmesi şaşırtıcı değildir. Bu nedenle, biyosensör yapımındaki

odakların büyük kısmı, enzim ve protein immobilizasyonu için yeni ve umut verici immobilizasyon yöntemleri geliştirmektedir.

1.3.1 İmmobilizasyon prosedürleri

Membran yapılarına biyolojik bileşenlerin dâhil edilmesi ilk olarak Clark ve Lyons tarafından tanımlanmıştır (Clark and Lyons 1962). Enzim temelli bir glukoz sensörünün membranla kaplanmış bir sandviç içerisinde glukoz oksidazın tutuklanmasıyla geliştirildiği bu öncü çalışmadan bu yana, enzimlerin ve proteinlerin yüzeylerde ve çeşitli matrisler içinde immobilizasyonu için tarif edilen bir takım yöntemler olmuştur. Temel immobilizasyon yöntemleri şunlardır:

1. Bir yüzeye kovalent bağlama
2. Katı bir yüzeyde fiziksel veya kimyasal adsorpsiyon
3. Moleküller arası çapraz bağlama
4. Enkapsülasyon
5. Bir membran, sürfaktan matrisi, polimer veya mikrokapsül içerisine tutuklama



Şekil 1.3 Biyosensörlerde kullanılan yaygın immobilizasyon yöntemleri. (A) kovalent bağlama; (B) adsorpsiyon; (C) çapraz bağlama; (D) enkapsülasyon; (E) tutuklama (Rodríguez-Delgado et al. 2015).

Bu geleneksel metotlara ilaveten, yakın geçmişte sol-jel tutuklama, Langmuir-Blodgett (LB) biriktirme ve elektropolimerizasyon metotları, biyolojik bileşenlerin immobilize edilmesi için kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır. Kullanılan immobilizasyon yöntemi bir takım faktörlere bağlıdır; ancak genel olarak yöntem immobilize edilecek biyomoleküle, immobilizasyonun yapılacağı sensör yüzeyine veya matrisine ve nihai olarak sensörün son kullanımı ile uyumlu olmalıdır (A. F. Collings and Caruso 1997). Tüm bu hususlar, biyolojik unsurun maksimum etkinlik sergilemesine ve cihazın stabilitesine ve tekrar kullanılabilirliğine yardımcı olmasına izin verecektir (Rodríguez-Delgado et al. 2015).

1.3.1.1 Adsorpsiyon yöntemi

Adsorpsiyon basit, düşük maliyetli ve hızlı bir immobilizasyon yöntemidir. Enzim, iyonik etkileşimler ya da Van der Waals ve hidrojen köprüleri gibi zayıf kuvvetler yoluyla bir desteğe bağlanır. Bununla birlikte, bu yöntemle immobilize edilen biyomoleküller mekanik olarak dengesizdir ve çalışma koşulları altında kolaylıkla dışarı atılabilirler (Muhammad-Tahir and Alocilja 2003).

1.3.1.2 Çapraz bağlama

Çapraz bağlanma, biyomoleküller arasında molekül içi bağlar oluşturmak için bi- veya multi-fonksiyonel gruplar içeren reaktifleri kullanır. Bu çapraz bağlayıcılar, dialdehitler, diiminoesterler, diizosiyanatlar ve karbodiimid ile aktive edilen diaminleri içerir. Bu immobilizasyon türü altında, oluşan kompleks biyomolekül, aşırı pH ve sıcaklık koşullarına karşı dirençlidir. Bununla birlikte, büyük miktarda biyomoleküle ihtiyaç duyulmaktadır. pH ve iyonik kuvvet gibi faktörler kontrol edilmelidir (Bryjak et al. 2007).

1.3.1.3 Enkapsülasyon

Enkapsülasyonda, biyoaktif madde, polimerler gibi yarı geçirgen bir malzemeden yapılmış mikron boyutlu kürelerin çekirdeği ile hapsedilmiştir. Tuzaklama, bir biyomalzemenin bir monomer çözeltisiyle karışımı sonrasında bu karışımın bir jel elde etmek üzere polimerize edilmesi ve biyomalzemenin bu polimerik jelin ara boşluklarına sokulması ile oluşturulur (Ibarra-Escutia et al. 2010). Biyomateryalin minimum düzeyde bozulması söz konusudur; ancak yöntem, değişken gözenek boyutundan dolayı sürekli biyomateryal sızıntısı, jelde eşit olmayan dağılım ve difüzyonel sınırlama ile biyomateryale analit erişilebilirliğinde azalma gibi bazı dezavantajlara sahiptir (Fernández-Fernández, Sanromán, and Moldes 2013).

1.3.1.4 Tutuklama

Biyomateryallerin jeller veya fiberler içine tutuklanması, düşük moleköl ağırlıklı substratlar ve ürünler içeren proseslerde kullanım için uygun bir yöntemdir. Jel veya fiber gramı başına 1 g biyomolekül miktarını aşan miktarlar tutuklanabilir. Bununla birlikte, büyük moleküllerin tutuklanmış enzimlerin katalitik bölgelerine yaklaşmakta zorluk çekmesinden ötürü, yüksek moleköl ağırlıklı substratlara sahip tutuklanmış enzimlerin kullanımı uygun değildir. Tutuklama işlemi tamamen fiziksel bir kafesleme veya kovalent bağlama şeklinde olabilir. İkinci yöntemin bir örneği olarak, enzimlerin yüzey lizin yan grupları, akriloil amidleri vermek üzere akriloil klorür ($\text{CH}_2 = \text{CH-CO-Cl}$) ile reaksiyona sokarak türevlendirilebilir. Bu ürün daha sonra bir jel oluşturmak üzere kopolimerize edilebilir ve akrilamid ($\text{CH}_2 = \text{CH-CO-NH}_2$) ve bisakrilamid ($\text{H}_2\text{N-CO-CH} = \text{CH-CH} = \text{CH-CO-NH}_2$) ile çapraz bağlanabilir. Enzimler selüloz asetat fiberlerine, örneğin metilen klorür içinde enzim ve bir selüloz asetat emülsiyonunun hazırlanması, ardından bir ince boru aracılığıyla bir sulu çöktürücünün çözeltisine fişkırtılması yoluyla tutuklanabilir. Tutuklama, kalsiyum aljinatın yaygın olarak kullanıldığı, mikrobik, hayvan ve bitki hücrelerinin immobilizasyonu için tercih edilen yöntemdir.

1.3.1.5 Kovalent bağlama

Kovalent bağlama, destek matrisindeki grupların kimyasal olarak aktivasyonuna dayanır, böylece biyomateryalde bulunan ve ilgilenilen analit ile etkileşimde gerekli olmayan fonksiyonel gruplarla reaksiyona girerler. Bu yöntem, yüksek kararlılık sunar ve enzimin, sıcaklık, pH ve diğer koşulların etkilerine dirençli olmasını sağlar. Bununla birlikte, aktif merkezin yapısında olası değişiklikler meydana gelebilir (Rodríguez-Delgado et al. 2015).

Bu yöntem, bağlı proteinlerin homojenliğini, yoğunluğunu, dağılımını ve yüzeylerin tekrarlanabilirliğini arttırmak için kullanılmıştır. Biyomoleküller polimer matrisler tarafından sensör yüzeylerine tutturulduğunda, proteinlerde yaygın olarak gözlenen kararsızlık, difüzyon ve agregasyon veya inaktivasyon ile ilgili problemler de kovalent immobilizasyon ile aşılabılır. Glutaraldehit, karbodiimid, sukinimid esterleri, maleinimidler ve periyodat gibi reaktifler, kovalent immobilizasyon için yaygın olarak kullanılırlar.

Enzimler ve proteinler gibi biyomoleküller, yüzeylere kovalent immobilizasyon için mevcut birçok fonksiyonel gruba sahiptir; bunlar arasında amino asit yan zincirleri (örneğin lizin amino grupları), karboksil grupları (aspartat ve glutamat), sülfhidril grupları (sistein), fenolik, tiyol ve imidazol grupları bulunur. Enzim veya protein ile katı destek arasındaki kovalent bağlanma, biyolojik molekül üzerindeki biyolojik aktivite için gerekli olmayan fonksiyonel gruplar vasıtasıyla gerçekleştirilir. Kovalent bağlanma, biyomolekülün genellikle yüzey üzerine kuvvetli bir şekilde immobilize edilmesi ve bu nedenle kullanım sırasında yüzeyden ayrılma ihtimalinin düşük olması avantajına sahiptir. Bu aynı zamanda biyomoleküllerin sensör yüzeyindeki dağılımını belirlemek için atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) gibi, yüzey-kuvvet mikroskopisi tekniklerinin uygulanabilmesi açısından önemli bir gerekliliktir.

Bir başka avantaj da, kovalent immobilizasyonu mümkün kılabilen; bunu sağlarken de aktif bölgenin bağlanmasını önleyebilecek fonksiyonel grupların çeşitliliğidir. Biyomoleküllerin yüzey üzerine immobilizasyonunda kullanılan reaktiflerin, fonksiyonel gruplara etki edebilecek reaksiyonlardan ötürü bir aktivite kaybına neden olmaması önemlidir. Bu, biyomolekülün aktif bölgesini / bölgelerini korumak için fazla substrat varlığında yapılan immobilizasyon ile genellikle azaltılabilir.

Kovalent bağlanma için uygun fonksiyonel gruplar, bazı transduser malzemeler (silika üzerinde hidroksil grupları) üzerinde de mevcuttur. Bununla birlikte, yüzeylerin çoğu, enzim veya protein ile birleşebilen bir işlevsellik sağlamak için modifiye edilir. Cam, titanyum dioksit, polisakkaritler ve polimerler (naylon, polimetilmetakrilat) içeren katı destekler, bi-fonksiyonel kimyasallarla reaksiyona sokulduktan sonra, enzimlerin veya proteinlerin kovalent bağlanabildiği bir aktif yüzey haline dönüşürler. Altın ve gümüş gibi metal yüzeyler, enzimler veya proteinlerle reaksiyona girebilen hidroksil, karboksil veya amino grupları üretmek için bir hidroksilalkantiyol ile reaksiyona sokularak değiştirilebilir (Caruso et al. 1995; Geddes et al. 1995). Organosilanlar kullanılarak enzim bağlamak için elektrokimyasal oksidasyona maruz bırakılan platin elektrotların kullanıldığı bir çalışma da literatürde mevcuttur (Yao 1983). Bu gibi ön muamele yöntemleri, yüzey üzerinde istenen belirli bir fonksiyonel grubun yoğunluğunu arttırmak için de kullanılabilir. Silika yüzeyler, bir yüzey-etkin amino işlevselliği üretmek için trikloro ve trialkilsilanlar gibi amino silanlar ile reaksiyona sokulabilirler. Proteinler veya enzimler bu yüzeylere glutaraldehit veya karbodiimid kimyası kullanılarak bağlanabilir. Biyosensör cihazları için,

proteinleri veya enzimleri bağlayan ön aktifleştirilmiş membranlar (örneğin, Immudodyne TM veya Immobililine TM) son zamanlarda mevcuttur. Aktive edilmiş kollajen membranlar da biyosensörlerde kullanım için umut vericidir. Bu malzemeler, kimyasal tepkime ile elde edilen aktivasyon aşamasının by-pass edilebilmesi ve ayrıca, biyolojik bileşenin immobilizasyonunun hızlı ve basit olması sebebiyle ek avantajlara sahiptir.

Kovalent bağlanma prosedürleri, literatürde tarif edilen bir dizi biyosensör sistemi için umut verici sonuçlar vermesine rağmen, fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon prosedürleri gibi kullanılan birçok yöntem, sensör yüzeyinde inaktive enzimlerin veya protein moleküllerinin rasgele yönlendirilmiş, düzensiz yapılarını üretir. Bu durum, düzgün, aktif protein katmanları üretebilen immobilizasyon yöntemlerine duyulan gereksinimi artırır.

Aslında, elektrokimyasal tabanlı biyo-algılama aygıtlarının gerçekleştirilmesindeki en önemli adımlardan biri, bir biyomolekül film tabakasının bir metal / yarı iletken yüzey üzerine depozisyonu veya kaplanması adımıdır. Biyosensörün son derece başarılı olabilmesi için biyo-tanımlama molekülünün transdüsera geri döndürülemez şekilde bağlanması gereklidir. Yüzey kimyasının ve kapsama alanının kontrolü, yüksek reaktivite, kararlılık, yönlendirme ve erişilebilirliği sağlamak ve spesifik olmayan adsorpsiyon proseslerini en aza indirmek için büyük önem taşır. Immobilizasyon, bir biyosensörün genel performansının belirlenmesinde önemli bir adımdır ve son on yılda SAM gibi sıralı organik filmler oluşturmak için önemli çalışmalar yürütülmüştür (Chaki and Vijayamohanan 2002a; Katz and Willner 2003a).

Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar (SAM'ler)

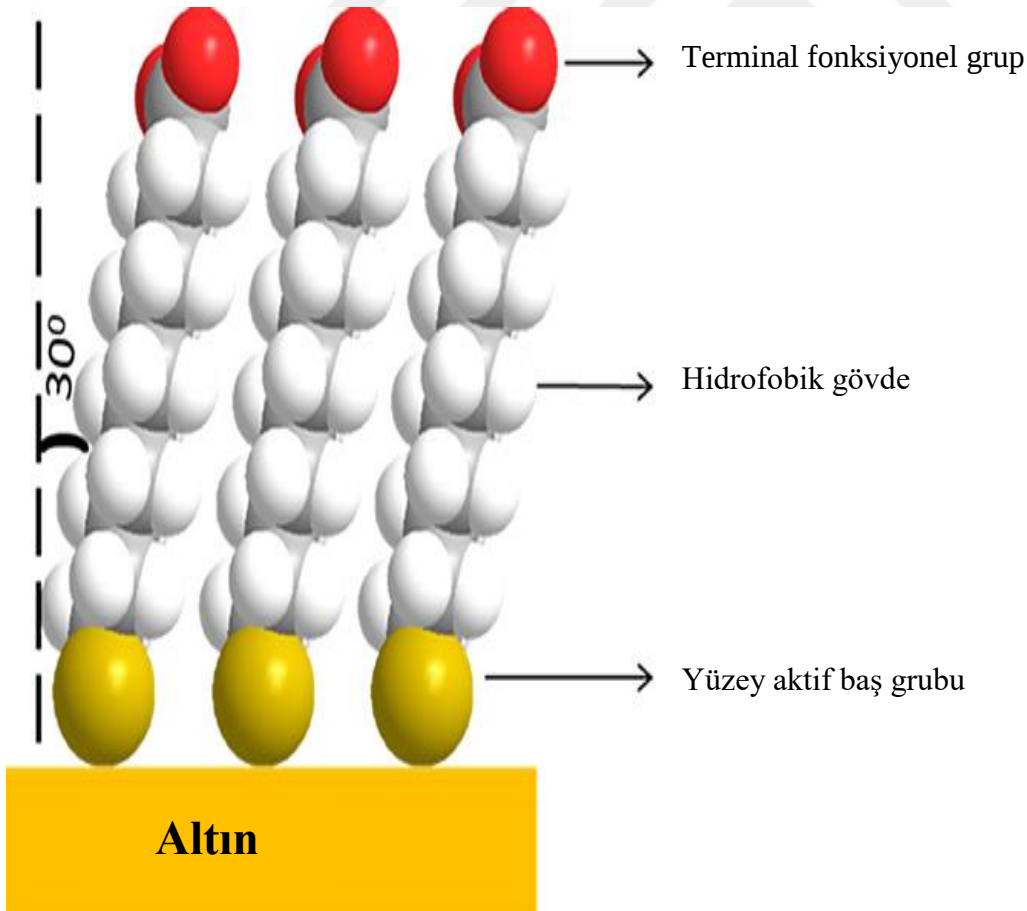
Alkan tiyollerin altın üzerinde oluşturduğu tabakaların araştırılması ile SAM ilk olarak 1983 yılında keşfedilmiştir.

SAM, seçilen bir organik molekülün baş grubu ile substrat arasında gerçekleşen kimyasal adsorpsiyon yoluyla oluşturulur (Şekil 1.4). Bu yöntemle kalınlığı kontrol edilebilir ultra ince organik film tabakaları elde edilebilir. Oda sıcaklığında substratın seyreltik bir çözeltiye (yaklaşık 1 mM) daldırılması yoluyla basit bir şekilde oluşturulurlar. Ek olarak, zincirler arası güçlü etkileşimler (Van der Waals etkileşimleri), tek tabakaların sıkı paketlenmesini ve kararlılığını sağlar. Bu, kimyasal algılama, ıslanabilirlik ve sürtünme, korozyona karşı koruma, desenlendirme, yarı iletken pasivasyonu ve optik ikinci dereceden harmonik üretimi gibi yüzey özelliklerinin kontrolü de dâhil olmak üzere birçok uygulamaya imkân tanır. Hem bu teorik hem de teknolojik önemine ek olarak, nanoteknolojideki uygulamaları sayesinde, son zamanlarda, farklı terminal fonksiyonel gruplara sahip bi-fonksiyonel moleküllerin uygun olanlarının kullanılmasıyla, tamamıyla kontrol edilebilen uzunluk ölçeklerinde nanodiziler düzenleme kabiliyeti açısından önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

Tek tabakaların terminal işlevselliğinin bu yolla seçilmesi, metallerin veya yarı iletkenlerin nano mimarisinin daha iyi kontrol edilmesini sağlar. Bu mimari, biyomoleküler elektronik ve biyosensör gelişiminde, bu yapıların optik ve elektronik özelliklerinin, uygun bi-fonksiyonel molekülü seçerek uzaysal olarak modüle edilebildiği (süper tabakalı oluşum) potansiyel uygulamalara sahiptir.

Mevcut biyosensörlerin (örneğin glukoz sensörleri) yanı sıra yeni biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik araştırmaların bugünkü seviyesi son on yılda artmıştır. Bu artan araştırma faaliyetinin başlıca itici gücü, özellikle teşhis uygulamaları için minyatürize biyosensörlere olan talebin patlamasıdır. Bununla birlikte, söz konusu uygulamalar, cihazın boyutu, analitin seçici cevabı, hızlı tepki süresi ve çevresel elektronik devresi ile uyumluluk konusunda oldukça sıkı gereklilikler getirmektedir. Biyomedikal kullanım için bu küçük algılama cihazlarının geliştirilmesine yönelik ilgi artmakla birlikte, mevcut biyosensörlerin bir kısmı bu konularda yetersizdir ve bu sınırlamalardan bazılarının üstesinden gelmek için birtakım yeni ve gelişmiş materyallere ihtiyaç duyulmaktadır.

Kendiliğinden oluşan tek tabakalar çeşitli nedenlerden ötürü bu tür uygulamalar için birtakım cazip özellikler sunar. Birincisi, yalnızca az miktarda kaynak kullandıkları için minyatürizasyon sağlamak kolaydır. İkincisi, SAM'ların uzun zincirli alkan tiyollerinin oldukça düzenli ve yoğun doğası, immobilize biyomoleküller (antikorlar, enzimler, nükleik asitler) veya biyolojik sistemler (reseptörler, bütün hücreler) için yeni substratlar sağlayan lipid çift tabakalı yapıların hücresel mikro ortamını taklit eder. Daha da önemlisi, SAM oluşumu için kolay prosedürlerin mevcudiyeti ve elektrokimyasal ölçümler için metal substratlar (Au, Ag vb.) ile uyumluluk, akım veya potansiyel ölçümlerini içeren biyosensör uygulamaları için özel avantajlar sağlamaktadır. Son olarak, tek tabakaların kimyasal kararlılıkları, biyolojik tanıma için immobilize edilen ve elektrokimyasal, optik veya piezoelektrik transduserlerle entegre edilmiş moleküllerle kaplanmalarının ardından dahi, onların biyosensör ve immünosensör olarak çalışmalarına olanak tanır.



Şekil 1.4 Kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM'ler) (Jay et al. n.d.).

Katı substrat yüzeylerin kimyasal modifikasyonu yoluyla oluşturulan SAM'ler yüzey kaplama filmleridirler. Korozyona karşı direnç kazandırmada, nano aletlerin üretiminde iskelet oluşturmada, biyo-duyarlılığın artırılmasında ve en önemlisi biyomoleküllerin immobilizasyonunda kullanılırlar.

İdeal tek tabaka mükemmel bir şekilde sıralanmış, sıkıca paketlenmiş alkan zincirlerin düz ve pürüzsüz yüzeye tutunmasıyla tarif edilir. Uzun karbon zincirleri arasındaki Van der Waals etkileşimleri gibi güçlü moleküler etkileşimler SAM yapısının stabilitesini ve düzenini artırır. SAM oluşturmada iki yöntem kullanılabilir: Fiziksel ve Kimyasal.

Fiziksel yöntem, çok stabil değildir. Bu yüzden özellikle biyosensör üretiminde yaşam ömrü kısıtlıdır. Buna karşın kimyasal yöntem daha uzun ömürlü ve daha kullanışlı sistemler geliştirilmesi için kullanılır.

Tabakaların oluşturulması için gerçekleştirilen adsorpsiyon işleminin süresi zincir uzunluğundan bağımsızdır; fakat yüksek konsantrasyon adsorpsiyon zamanını kısaltır. Ayrıca, Kendiliğinden oluşan tek tabaka için genel bir prosedür verilmesi oldukça zordur çünkü hazırlanma prosedürü tamamen istenen özelliklere bağlıdır.

Uzun zincirli alkan tiyoller elektrot yüzeyinde az sayıda veya hiç defekt bölgesi olmadan sıkı paketlenmiş kalın bir tek tabaka oluşturur ve bu nedenle elektrot yüzeyine doğru hareket etmekte olan redoks probunun difüzyonunu bloke eder. Kısa zincirli tiyoller ise ince bir tek tabaka oluşturur ve bu durumda çok sayıda defekt bölge beklenir.

Biyosensörler için SAM'lerin tasarımı

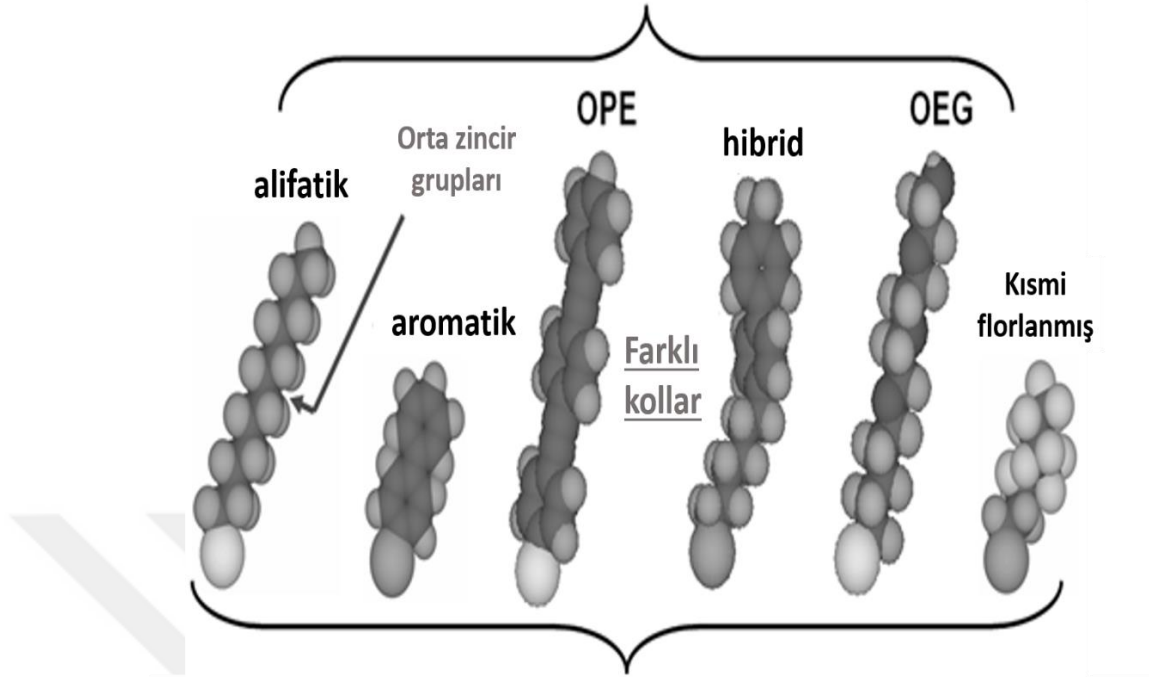
SAM'ler, soy metal yüzey ile çözelti veya buhar fazında mevcut olan bir tür arasında ara yüzey tabakası görevi görebileceğinden, moleküler tanıma (veya kimyasal algılama) amacıyla kullanımlarında avantajlara sahiptirler. Antikorlar, nükleik asitler, enzimler gibi biyomoleküllerin veya hücreler gibi organize sistemlerin sunduğu seçicilik, moleküler tanıma için uygun bir şekilde kullanılabilir. Daha önemlisi, bu biyomoleküllerin SAM'i kullanarak immobilize edilmesi, biyolojik aktivitelerini muhafaza etse de mümkün olan en az miktarın

(tek katman) olmasını gerektirir. Miktar, çevre ve tepki süresine bağlı olarak analit moleküllerinin biyolojik olarak algılanması için elektrokimyasal, optik veya piezoelektrik gibi çeşitli iletim modları kullanılabilir. Son olarak, immobilizasyon işleminin (örn., biyotin-avidin kimyası) yanı sıra, biyomoleküllerin yönelimi üzerinde yapılan kontrol, tasarımda muazzam esnekliğe izin verir.

SAM için moleküllerin seçimi

Kararlılık, düzgün yüzey yapısı ve işlevsellikleri değiştirmenin nispeten kolay olması, biyosensörler alanındaki uygulamaların gelişmesinde SAM'lerin kullanımını popüler hale getirmiştir. Altın üzerinde alkantiyollerin kendiliğinden oluşturulmuş tek tabakaları, esneklik ve kararlılık gibi çeşitli avantajlar ile birlikte biyosensörlerin geliştirilmesi için gerekli olan fonksiyonelleştirme ve modifikasyon işlemlerini gerçekleştirmede muhtemelen mevcut en iyi yüzeylerden biridir.

Farklı kuyruk grupları: -CH₃, -OH, -COOH, -CN, -ferrosen, biotin vs.



Farklı baş grupları: -SH, -SiCl₃, -COOH, -PO₃H₂, -COOH vs.

Şekil 1.5 SAM'lerin tipik moleküler prokürsörleri (Bottom-up approach to interface engineering - molecular self-assembly on metal surfaces | Nanotech | Centro Universitario de los Valles n.d.).

İmmobilizasyon Stratejileri

Elektrot yüzeylerini biyomoleküllerle kaplamak için çeşitli immobilizasyon prosedürleri mevcuttur:

- Amin gibi serbest terminal grupları içeren tek tabaka yüzeylerine enzimlerin amid bağı yoluyla kovalent bağlanması ya da yüzey fonksiyonel gruplarla glutaraldehit gibi bazı çapraz bağlayıcılar aracılığıyla bağlanması.
- Enzim ile tek tabaka arasında elektrostatik, hidrofobik ve hidrofilik etkileşimler aracılığı ile nonkovalent kaplama.

- Reseptör proteini ve antijen-antikor çiftlerinin tanıma çiftlerinin afinite etkileşimi vasıtasıyla. Biotin-avidin, enzimlerin bu tür yüzey immobilizasyonlarına yol açan benzersiz bir örnektir.

SAM biyosensörlerinin avantajları

SAM'ı direkt kimyasal bağlar kullanarak veya polimerik desteklerin yardımıyla enkapsülasyon yoluyla, biyomoleküllerin bağlanması için bir platform olarak kullanmanın önemli avantajları aşağıda belirtilmiştir:

- Düzenli sıralanmış, iğne deliği içermeyen ve kararlı mono tabakaların kolay oluşumları.
- SAM tarafından sağlanan membran (hücre sel) benzeri mikroçevre, biyomolekül immobilizasyonu için elverişli olması.
- İhtiyaca göre hidrofobik veya hidrofilik yüzey elde etmek için SAM'in baş grubunu çeşitli fonksiyonel gruplarla tasarlayabilme esnekliği.
- SAM üzerinde immobilizasyon için yalnızca minimum miktarda biyomolekül (tek tabaka) gerekmesi.
- Birden çok güvenilir ölçümlere izin veren, uzun süreli stabilite.
- AFM ve STM gibi yüzey hassas teknikler kullanarak protein adsorpsiyonu, DNA hibridizasyonu, antijen-antikor etkileşimi vb. gibi olgular hakkında moleküler düzeydeki bilgilerin edinilebilmesi.

SAM biyosensörlerinin sınırlamaları

- İmmobilize enzimler, pH, iyonik şiddet ve sıcaklıktaki değişikliklere karşı çok hassastırlar: Bu parametrelerden birindeki küçük bir değişiklik bazen biyolojik aktivitenin kaybolmasından sorumlu olabilir.
- SAM'ların bazılarının kimyasal stabilitesi, tek tabaka kimyasal olarak okside olabileceği için iyi değildir.
- Elektrik alanının indüklenmesi ve tek tabakaların ısı desorpsiyonu, biyosensör uygulamaları için zararlıdır.
- Yüksek yüzey enerjisi nedeniyle, hidrofobik SAM yüzeyi çeşitli kontaminantları toplayabilir ve bu nedenle istenmeyen safsızlıklar analit tanıma bölgelerini adsorbe ve bloke edebilir.

SAM'ler, elektrokimyasal sensörlerin seçiciliği ve duyarlılığında önemli bir rol oynamaktadır. Pek çok çalışma grubu, SAM'lerin ve iki katmanlı lipid membran yüzeylerinin ara yüz kapasitans ve direncindeki değişimleri ölçerek adsorpsiyon hakkında önemli mekanik bilgi sağlamak için EİS'yi kullanmıştır (Abdelghani, Hleli, and Cherif 2002; Bordi, Cametti, and Gliozzi 2002; Chaki and Vijayamohanan 2002a; H. a Chou et al. 2003; Ding et al. 2005a; Ekeröth et al. 2002; Gufler et al. 2004; Hou et al. 2006; Krishna et al. 2001; Liu et al. 2003; Purucker et al. 2001; Vallejo and Gervasi 2002; J. S. Ye et al. 2003; Yin et al. 2003). Benzer şekilde, çeşitli biyomoleküllerin (yani proteinlerin, protaminlerin) iletken yüzeylere immobilizasyon ve adsorpsiyon davranışları impedans spektroskopisi ile araştırılmıştır (Cheng, Lin, and Chang 2002; Mimica et al. 2004; G.-C. Zhao et al. 2003). Sensör yüzeyi ile kimyasal / biyolojik sistem arasındaki ara yüzey, katı desteğe tutunan reseptör moleküllerinin faaliyetlerini koruyabilecekleri şekilde düzenlenmelidir.

Elektroaktif SAM'ler seçici elektron-tünel sistemi veya seçici elektron kapıları olarak kararlı bir davranış gösterirler. Bu özellikleri SAM temelli biyosensörleri avantajlı hale getirir. SAM'lerin elektroaktif uç grupları (mediyatör

veya elektron iletim fonksiyonu için), redoks-aktif enzimler ile elektrot yüzeyleri arasında elektriksel iletim veya iletişim amacıyla kullanılabilirler. Bu amaçla kullanılabilecek ferrosen türevleri, dimetilviyolojen gibi birçok mediyatör mevcuttur.

Çoğu impedans biyosensörü, elektrot-çözeltili arabirimine probalar bağlamak için kendiliğinden SAM'leri kullanır. En yaygın bağlanma kimyası türleri, altın yüzeylere bağlı tiyollere (Daniels and Pourmand 2007) ve oksit yüzeylere bağlı siloksanlara dayanır. İmpedans biyosensörlerinde en yaygın olarak tiyol SAM'leri kullanılmaktadır. Sensör yüzeylerinde SAM oluşturulabilir ve daha sonra probalar uçlara immobilize edilebilir veya probalar kendileri tiyol modifiye edilerek SAM olarak düzenlenirler (Daniels and Pourmand 2007).

SAM oluşumu, biyomembran mikro çevreyi andıran yüksek derecede düzenlenmiş, tek moleküllü bir film oluşturarak elektrot yüzeyinin işlevselleştirilmesi için kolay bir yol sağlar. Çok sayıda elektroaktif veya elektroinaktif fonksiyonel grup ile farklı baş gruplara sahip tek tabakaları tasarlama konusundaki esneklik, bu fonksiyonellendirme stratejisini özellikle biyosensör uygulamaları için kullanışlı kılmaktadır. Dahası, tek tabakaların ucundaki hidrofobik ve hidrofilik gruplar, farklı analitlerin seçici olarak algılanması için enzimlerin, proteinlerin veya tüm hücrelerin immobilize edilmesi için mükemmel bir yol sağlar. Teşhis uygulamaları için hem düşük miktardaki (nanogram düzeyinde) gereksinim hem de iyi bir kararlılık, hastalara maliyetin düşürülmesine katkıda bulunabilir ve bu durum özellikle, mikro kontak baskı gibi seri üretim teknikleri etkili bir şekilde kullanılıyorsa önemlidir.

Ayrıca, proteinlerin sistein ve metionin yan gruplarından dolayı doğal olarak oluşan birçok tiyol ve disülfid yapıları vardır. Bu yapılarla gerçekleştirilecek SAM oluşumu, bu biyomoleküllerin elektrot yüzeyine eklenmesi için çok yararlı olabilir. Sülfür ayrıca çeşitli polisakkarit ve steroidlerde bir ester veya amit sülfat olarak bulunur ve dolayısıyla SAM oluşumları için de uygundur. Bu bağlamda birçok SH ve S-S içeren enzim, benzersiz biyomoleküller aktiviteleri için araştırılabilir. Bu yönde sistematik çalışmalar henüz bulunmamaktadır.

Sonuç olarak, EİS, biyomoleküler etkileşimlerin dinamiklerini gözlemlemek için ideal bir araçtır ve reaksiyon oranları, yüzey yüklemesi, yüzey reaksiyon / kararlılık ve bağlanma sabitleri gibi biyosensör gelişiminin önemli yönlerini öngörmek için kullanılabilmektedir.

1.4Elektrokimyasal biyosensörler

Kimyasal sensörlerin bir alt sınıfı olan elektrokimyasal biyosensörler, elektrokimyasal ileticilerin (transdüserlerin) düşük tayin limitleri ile kendini gösteren hassasiyetlerini, biyolojik tanıma süreçlerinin yüksek spesifikliği ile birleştirirler. Bu cihazlar, hedef analit ile seçici olarak reaksiyona giren ve incelenen analit konsantrasyonu ile ilgili bir elektrik sinyali üreten bir biyolojik tanıma elemanı (enzimler, proteinler, antikorlar, nükleik asitler, hücreler, dokular veya reseptörler) içerir. Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik tanımlama işleminin niteliğine, yani biyokatalitik cihazlara ve afinite sensörlerine dayalı olarak iki ana kategoriye ayrılabilir.

Biyokatalitik cihazlar, hedef analiti tanıyan ve elektroaktif türe sahip enzimleri, tam hücreleri veya doku dilimlerini içerir. Afinite sensörleri, analit ile bir antikor, nükleik asit veya bir reseptör gibi biyolojik bir bileşen arasındaki selektif bir bağlanma etkileşimine dayanır. Afinite sensörlerine örnek olarak, immünosensörler ve DNA hibridizasyon biyosensörleri gösterilebilir.

Biyosensörler, günümüzde en aktif disiplinlerarası araştırma alanlarından birini teşkil etmektedir. Biyosensörlerin kullanılması çoğu zaman örnek hazırlama ihtiyacını ortadan kaldırır. Biyosensörün performansı genellikle duyarlılığına, saptama limitine (LOD), doğrusal ve dinamik aralıklara, cevabın tekrarlanabilirliğine veya hassaslığına, parazitlenmelere ve interferanslara karşı cevabına dayanarak deneysel olarak değerlendirilir (Eggins 2002). Genellikle kıyaslanan diğer parametreler sensörün tepki süresi (yani nihai değerinin% 95'ine ulaşmak için sensör tepkisi için analit ekledikten sonraki süre), operasyonel ve depolama kararlılığı, kullanım kolaylığı ve taşınabilirliktir. İdeal olarak, birkaç ardışık ölçüm yapılması için algılama yüzeyi yenilenebilir olmalıdır. Birçok klinik, gıda, çevre ve ulusal savunma uygulamaları için, sensör analiti çevrimiçi olarak sürekli olarak izleyebilmelidir. Bununla birlikte, tek kullanımlık

biyosensörler, şeker hastaları tarafından kişisel kan şekeri izlemesi gibi bazı önemli uygulamalar için tatmin edicidir.

Çoğu biyosensörde, düşük maliyet, kullanım kolaylığı, taşınabilirlik ve yapının sadeliğinden dolayı dönüştürücü için elektrokimyasal tayin yöntemi kullanılır (Eggins 2002; J. Wang 2006). Elektrokimyasal olarak izlenen reaksiyon tipik olarak ölçülebilir bir akım (amperometri), ölçülebilir bir şarj birikimi veya potansiyel (potansiyometri) üretir ya da elektrotlar arasındaki ortamın iletken özelliklerini değiştirir (iletkenlik ölçümü) (Grieshaber et al. 2008). Hem direnç hem de reaktansın izlemesi yoluyla kullanılabilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi yöntemi, bu alanda gittikçe yaygın hale gelmektedir (Grieshaber et al. 2008).

Elektrokimya bir yüzey tekniğidir ve biyosensörlerde tayin için belli avantajlar sunmaktadır. Reaksiyon hacmine kesinlikle bağlı değildir ve çok küçük numune hacimleri, ölçüm için kullanılabilir (Ronkainen-Matsuno et al. 2002). Elektrokimyasal tayin, immünolojik testlerde az miktarda örnek hazırlığıyla veya hiç örnek hazırlığı olmaksızın düşük tayin sınırları elde etmek için kullanılabilir. Atto- ve zeptomole tayinini mümkün kılan elektrokimyasal immüno testler literatürde mevcuttur (Christian G. Bauer et al. 1996; Jenkins, Heineman, and Halsall 1988). Elektrokimyasal tayin, antikor-antijen kompleksini bağlanma yapmamış ortam bileşenlerinden izole etmek için ayırma basamağının olmadığı homojen immüno testlerde, kromoforlar, floroforlar ve spektrofotometrik tayine sıklıkla girişim yapan parçacıklar gibi numune bileşenleri tarafından etkilenmez. Bu nedenle, yağ hücrelerinden, kırmızı kan hücrelerinden, hemoglobin ve bilirubinden etkilenmeden tam kan gibi renkli veya bulanık numunelerde elektrokimyasal ölçümler yapılabilir (Cai et al. 2017).

1.4.1 Voltammetri/amperometri

Voltammetrik ve amperometrik teknikler, bir çalışma elektroduna bir referans elektrota karşı bir potansiyelin uygulanması ve akımın ölçülmesi ile karakterizedir (Kissinger and Heineman 1996). Akım, çalışma elektrodunda gerçekleşen indirgenme veya yükseltgenme reaksiyonları sonucunda meydana gelir. Akım, moleküllerin elektroda doğru gerçekleştirdiği kütle taşıma hızı ile sınırlanır (Kissinger and Heineman 1996).

Voltammetri terimi, potansiyelin belirlenmiş bir potansiyel aralığında tarandığı teknikler için kullanılır. Akım cevabı genellikle analit konsantrasyonu ile orantılı olan bir tepe veya platodur. Voltammetrik yöntemler lineer sweep voltammetrisi, döngüsel voltammetri, hidrodinamik voltammetri, diferansiyel puls voltammetrisi, kare dalga voltammetrisi, AC voltammetri, polarografi ve sıyırma voltammetrisini içerir. Bu yöntemler geniş bir dinamik aralığa sahiptir ve düşük tayin seviyeleri için kullanışlıdır.

Amperometride, çalışma elektroduna bir referans elektrota göre sabit bir potansiyel uygulanırken, elektrokimyasal oksidasyon veya redüksiyon sonucu oluşan akım değişiklikleri doğrudan zamana karşı izlenir (Bartlett 2008). Amperometriyi voltammetri'den ayıran, bir tarama potansiyelinin bulunmamasıdır. Teknik, potansiyeli istenen değere sabitleyerek akımı ölçmeye dayalıdır. Akım, numunedeki elektroaktif türün konsantrasyonu ile orantılıdır. Amperometrik biyosensörler, tayin için kullanılan yükseltgenme veya indirgeme potansiyelinin analit türlerinin karakteristiği olması açısından ek seçiciliğe sahiptir (Eggins 2002).

Amperometrik tayin, basitliği ve tayin sınırının düşük olması nedeniyle biyokatalitik ve afinite sensörlerinde yaygın olarak kullanılır (League of nations. Secretariat. Information section. and (L. 1929). Avantajlı bir şekilde, amperometrik tayin sırasında sabit potansiyel, ihmal edilebilir bir yük akımına (potansiyelin sisteme uygulanması için gereken akım) neden olur ve böylece tayin limitini olumsuz yönde etkileyen zemin akımını en aza indirir. Buna ek olarak, hidrodinamik amperometrik teknikler örneğin çalışma elektrodunun dönmesi veya titreşmesi suretiyle çözeltiye göre hareket ettiğinde (Wijayawardhana et al. 1999; Wijayawardhana, Halsall, and Heineman 1999) veya numune çözeltisinin sabit elektrotların üzerinden geçtiği akış koşullarında elektrot yüzeyine kütle

taşınmasını önemli ölçüde sağlayabilir (Jiang et al. 1995; Puchades and Maquieira 1996; Trojanowicz, Szewczynska, and Wcislo 2003). Akış kontrollü sistemlerde elektrokimyasal tayinler, çevresel analizlerde ve endüstriyel proseslerde diğer yöntemlere göre oldukça kullanışlıdır. Çünkü akış kontrollü proseslerde, akış şartlarının uygun bir şekilde düzenlenmesiyle çok basamaklı test prosedürlerinde çözeltiler kolaylıkla değiştirilebilir ve bu yöntem anlık izleme için idealdir.

Elektrokimyasal sensörler, üç elektrottan veya iki elektrottan oluşan bir elektrokimyasal hücrenin parçasıdır. Tipik bir üç elektrotlu elektrokimyasal hücre, platin, altın veya karbon gibi kimyasal olarak kararlı, katı bir iletken malzemeden (örneğin grafit) bir çalışma (veya indikatör) elektrodundan oluşur. Genellikle gümüş kaplanmış tabakasıyla gümüş klorür (Ag / AgCl) çözeltisinden oluşan bir referans elektrot ve bir platin tel yardımcı elektrodu içerir. Referans elektrot genellikle bilinen ve kararlı bir referans potansiyelini korumak için redoks reaksiyonu alanından uzaklaştırılır (Grieshaber et al. 2008). Bu sistemin bir avantajı elektrolizden gelen yükün referans elektrot yerine yardımcı elektrottan geçerek referans elektrodunun yarı hücre potansiyelini değiştirmesini engellemesidir.

İki elektrot sistemi yalnızca çalışma ve referans elektrotlarına sahiptir. Akım yoğunluğu yeterince düşükse ($< \mu\text{A cm}^{-2}$) referans elektrot yükü olumsuz bir etkiye sahip olmadan taşıyabilir (Bartlett 2008). İkili ve üçlü elektrot sistemlerinin her ikisi de sensörler için kullanılır. Bununla birlikte, tek kullanımlık sensörler için genellikle iki elektrot sistemi tercih edilmektedir, çünkü referansın uzun vadeli kararlılığı gerekli değildir ve maliyet düşüktür.

Bu elektrotlar kolaylıkla minyatürize edilebilir; mikrometre boyutları yaygınken nanometre boyutları da mevcuttur (Heinze 1993; Wightman 1981). Nanoteller, nanoparçacıklar ve karbon nanotüpleri günümüzde biyosensörlere dâhil edilmektedir. Küçülen elektrot boyutları daha yüksek duyarlılık imkânı sağlamaktadır. Küçük yüzey alanları nedeniyle bu tür küçük elektrotlarla tayin yapabilmek için çok küçük numune hacimleri (mikrolitre ve daha küçük) gereklidir ve numune miktarları sınırlı olduğunda bu önemli bir avantajdır (Farrell et al. 2004; Thomas et al. 2003). Ayrıca, elektrokimyasal dedektörler ve bunların gerekli kontrol araçları mikro imalat ile nispeten düşük bir maliyetle kolayca minyatürize edilebilir. Böylece biyo-algılama için taşınabilir aletlerin imalatı mümkün olur. Voltammetride sınırlayıcı akım sıcaklığa bağlı olduğundan, doğru

ve hassas sonuçlar elde etmek için ölçüm hücreleri sabit bir sıcaklıkta tutulmalıdır (Thomas et al. 2003).

1.4.2 Kondüktometri

Kondüktometrik tayin, kimyasal reaksiyon sırasında çözelti / ortamın bileşimi değiştikçe, numune çözeltisinin veya nanoteller gibi bir ortamın elektrik iletkenliğindeki değişiklikleri izler. Kondüktometrik biyosensörler sıklıkla yüklü ürünlerin iyon şiddetinde değişikliklerine sebep olduğu ve dolayısıyla artan iletkenlik sağlayan enzimleri içerir. İletkenlik ölçümü, çevresel izleme ve klinik analiz için biyosensörlerde tayin türü olarak kullanılmıştır. Diuron, atrazin ve metabolitleri gibi ppb düzeylerindeki kirleticileri ölçmek için bir kondüktometrik tirozinaz biyosensörü geliştirilmiştir (Anh et al. 2004). Biyo-güvenlik açısından *Escherichia coli* O157: H7 ve *Salmonella spp.* gibi gıda kaynaklı patojenleri tespit etmek için de kondüktometrik immünosensörler literatürde yer almaktadır (Muhammad-Tahir and Alocilja 2003). Hassas, düşük hacimle çalışabilme imkânı sağlayan bu biyosensör, bir elektrokimyasal sandviç immüno testine dayanan bir immünosensör ve sinyali ölçmek için bir okuyucu cihazdan oluşmaktadır. İnsan idrarında metamfetaminin tayinine yönelik bir biyosensör de yine kondüktometri yöntemiyle geliştirilmiştir (Yagiuda et al. 1996).

1.4.3 Potansiyometri

Potansiyometrik sensörler, ihmal edilebilir düzeyde akım altında bir elektrokimyasal hücrenin potansiyelinin ölçülmesine dayanır. Yaygın olarak, cam pH elektrodu ve K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- gibi iyonlar için iyon seçici elektrotlardır (Eggins 2002; J. Wang 2006). Sensörler, ilgilenilen yüklü iyonlarla seçici olarak tepkimeye giren bir membran boyunca oluşan potansiyeli ölçmek için iki referans elektrotlu bir elektrokimyasal hücre kullanır. Bu kimyasal sensörler, elektrotun algılaması için tasarlanan iyonu oluşturan bir reaksiyonu katalize eden enzim gibi bir biyolojik element ile kaplanarak biyolojik sensörlere dönüştürülebilir. Örneğin bir penisilin sensörü, bir pH elektrodunun penisilinaz ile kaplanmasıyla geliştirilebilir ve bu da H^+ üreten bir penisilinin reaksiyonunu katalizler

(Papariello, Mukherji, and Shearer 1973). pH elektrodu, yüzeyinde, penisilinin dolaylı bir ölçümü olan pH'taki değişimi algılar.

Alan etkili transistörler, bir elektrokimyasal hücreye dâhil edilerek kimyasal sensörlere (ChemFETs) adapte edilmiştir (Barbaro et al. 1992; Colapicchioni et al. 1991). Algılama yüzeyini, yukarıda penisilin için tarif edildiği gibi biyolojik bir ajan ile kaplayarak biyosensörlere dönüştürülebilirler (Caras and Janata 1980). Işık etkili potansiyometrik sensörler (LAPS) yüzey potansiyelini fotovoltaiik etki yoluyla optik olarak belirler (Hafeman, Parce, and Mcconnell 1988). LAPS, yüzeyi üzerine örneğin oligonükleotid gibi bir biyolojik materyalin eklenmesi yoluyla biyosensör olarak da kullanılabilir (Shishkanova et al. 2007).

1.5 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi

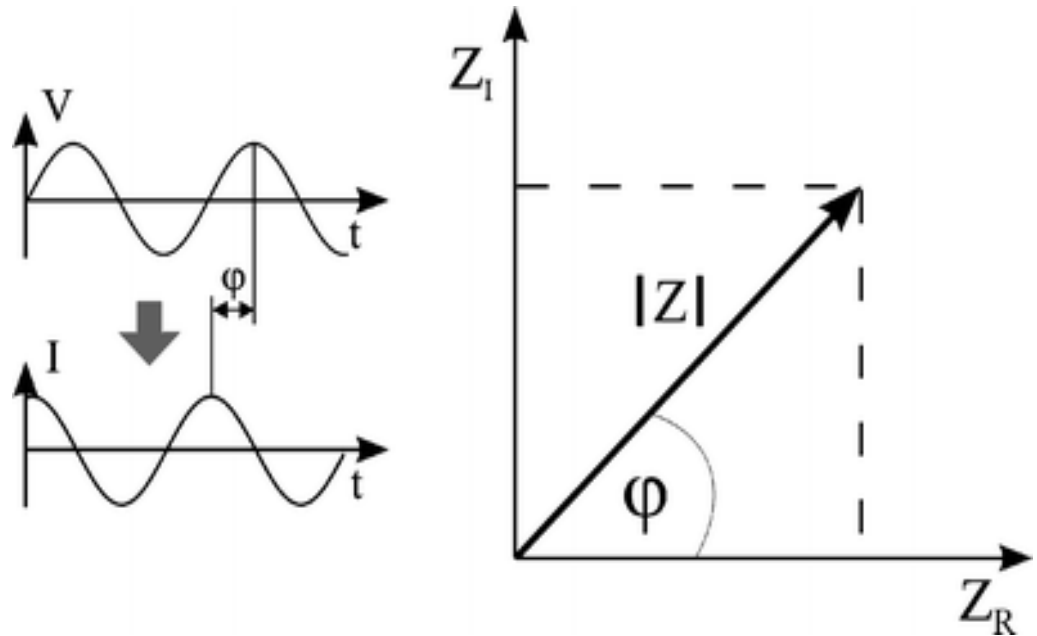
İmpedans spektroskopisi, bir sistemin bileşik elektrik direncini analiz etmek için kullanılan güçlü bir yöntemdir. Yüzey olaylarına ve kütle özelliklerinin değişimlerine karşı hassastır. Korozyon mekanizmalarının aydınlatılması, membranlar ile membran / çözelti ara yüzleri arasındaki yük taşınmasının karakterize edilmesi ve pillerin optimizasyonu için yoğun şekilde kullanılmaktadır. Biyosensörler alanında, özellikle transdüser (elektrot) yüzeyindeki bağlanma olaylarının izlenmesi için uygundur. Kullanımının ilk örneklerine 1980'lerin sonunda rastlanmıştır. Bununla birlikte, yöntem enstrümantasyonda yapılan ilerlemeler nedeniyle son yıllarda artan bir uygulama alanı bulmuştur. Biyolojik tanıma süreçlerinin saptanmasının yanı sıra, biyomoleküllerin transdüser üzerine immobilizasyonu gibi işlemlerde meydana gelen yüzey modifikasyonlarının karakterize edilmesinde kullanılan değerli bir araçtır. Bu teknik, işaretleyicisiz algılama için doğal bir potansiyele sahiptir. Bu durum biyoanalizde oldukça önemli bir avantajdır; çünkü işaretleme işlemlerinin olmaması, biyomoleküllerin floresan boyalar, enzimler, redoks veya radyoaktif işaretleyicilerle modifiye edilmesi gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır. Bununla birlikte, çok düşük analit konsantrasyonları ile yapılan analizlerde bir yanıt elde etmek için genellikle bir amplifikasyon adımı gereklidir.

1.5.1 İmpedans spektroskopisinde temel prensipler ve terimler

Bir sistemin impedans Z değeri, genellikle küçük genlikli bir voltaj uygulanması ve akım cevabının tayini ile belirlenir. Bu tanımdan, Z impedansı, voltaj-zaman fonksiyonu $V(t)$ ve akım-zaman fonksiyonu $I(t)$ 'nin oranıdır:

$$Z = V(t)/I(t) = V_0 \sin(2\pi ft) / I_0 \sin(2\pi ft + \phi) = 1/Y \quad (1)$$

Formülde V_0 ve I_0 sırasıyla en yüksek voltaj ve akım sinyallerini, f frekansı, t zamanı, ϕ voltaj-zaman ile akım-zaman fonksiyonları arasındaki faz kaymasını ve Y kompleks kondüktans veya admitansı ifade etmektedir. İmpedans karmaşık bir değerdir; çünkü akım sadece genliğe bağlı olarak değişmeyebilir, aynı zamanda voltaj-zaman fonksiyonuyla kıyasla bir faz kayması da gösterebilir. Böylece değer, impedansın ya $|Z|$ modülü ile faz kayması ϕ tarafından, ya da alternatif olarak reel bölüm Z_R ve imajinel bölüm Z_I tarafından tanımlanabilir. Bu durum şekil 1.6'da gösterilmiştir. Dolayısıyla impedans ölçümünün sonuçları iki farklı şekilde gösterilebilir: $\log f$ 'nin fonksiyonu olarak $\log|Z|$ ve ϕ değerlerinin yer aldığı Bode grafiği veya Z_R ve Z_I değerlerinin yer aldığı Nyquist grafiği.

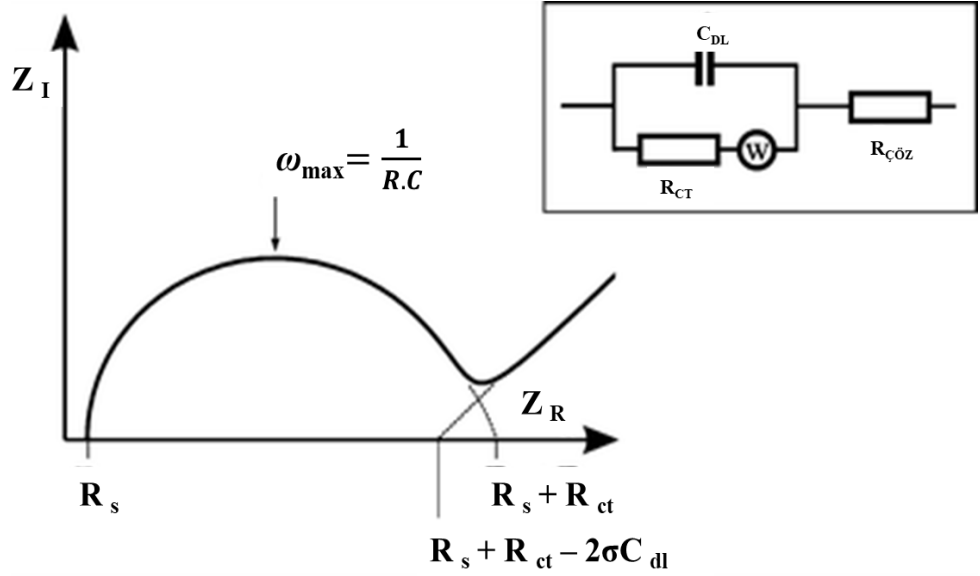


Şekil 1.6 İmpedans değerini oluşturan bileşenler (Lisdar and Schäfer 2008).

İmpedans "spektroskopisi" ismi, impedansın genellikle sadece bir tane değil birden fazla ve farklı değerlerdeki frekanslarda belirlenmesinden kaynaklanır. Böylece, değişim ve difüzyon işlemleri ile birlikte yüzeylerin, tabakaların veya membranların karakterizasyonuna izin veren bir impedans spektrumu elde edilir. Bunu başarmak için, impedans spektrumu genellikle bir eşdeğer devre kullanılarak analiz edilir. Genellikle dirençlerden ve kapasitanslardan oluşan bu devre, araştırılan sistemin farklı fizikokimyasal özelliklerini temsil eder (Lisdar and Schäfer 2008; Macdonald 1987). Alternatif olarak, sistem, elektrokinetik, difüzyon, bölümlene vb. işlemlerin temel kanunlarından türetilen transfer fonksiyonlarına dayanılarak tarif edilebilir.

Bununla birlikte, yalnızca ilgilenilen bir sistemi tanımlamak için değil aynı zamanda bu teknik analitik amaçla da kullanılabilir. Bu durumda, bir impedans elemanının (bir direnç veya bir kapasitans-çözelti bileşiminin bir fonksiyonu olarak) değişimi değerlendirilir. Bazı durumlarda, toplam impedansı konsantrasyon değişikliği ile ilişkilendirmek de mümkündür. Bu, ölçümleri basitleştirebilir, çünkü bu durumlarda sadece seçilen bir frekansta veya sınırlı bir frekans penceresinde (görece değişikliklerin en büyük olduğu yerlerde) impedansı belirlemek genellikle yeterlidir.

Elektrolitik çözeltinin araştırılacak sistemin bir bileşeni olduğu elektrokimyasal impedans spektroskopisinde impedans davranışını tanımlamak için genellikle dört bileşen kullanılır: ohmik direnç, kapasitans, sabit faz elemanı ve Warburg impedansı. Bu elemanlar ve tanımları Tablo 1.4'te özetlenmektedir. Deneysel impedans verilerini, seri veya paralel düzenlenmiş ideal veya dağıtılmış impedans elemanları ile yaklaştırmak için eşdeğer devreler kullanılır. Birçok elektrokimyasal sistem bu prosedüre göre analiz edilmiştir. Belli bir sistemin impedans davranışını açıklamak için muhtemelen literatürde bir model bulabilir. Bu, en azından analiz için başlangıç noktası olarak kullanılabilir. Bir elektrolit ile temas halinde olan bir elektrodun durumu için, çözelti direnci R_s , yük transfer direnci R_{et} , çift katmanlı kapasitans C_{dl} ile Warburg impedansı W' 'ni içeren ve Randles olarak adlandırılan devre kullanılır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 Nyquist grafiği ve Randles eş devre modeli (Lisdar and Schäfer 2008).

Çift katlı kapasitans C_{dl} , yükün ara yüzde çift tabakada depolanmasından kaynaklanmaktadır. Elektron transfer direnci R_{et} , arayüzdeki redoks reaksiyonları tarafından üretilen akım akışını, Warburg impedansı ise, çözeltiden ara yüze difüzyona bağlı olarak oluşan akımın impedansından kaynaklanmaktadır. R_s , iyon konsantrasyonu ve hücre geometrisi tarafından sağlanan çözelti direncidir. R_s ve R_{et} , Nyquist grafiğinden kolayca belirlenebilir; ancak bununla birlikte Warburg impedansının σ değeri de değerlendirilebilir.

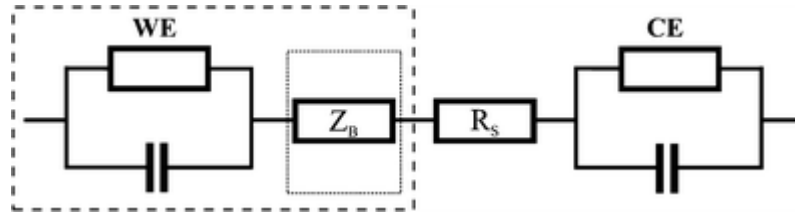
Tablo 1.4 Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamak için en sık kullanılan impedans elemanlarının tanımları, frekans bağımlılıkları ve faz kaymaları (Lisdat and Schäfer 2008).

İmpedans bileşeni	Tanımı	Faz Açısı	Frekansa Dayalı
R	$Z=R$	0°	Hayır
C	$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$	90°	Evet
CPE	$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^\alpha}$	$0-90^\circ$	Evet
W (infinite) ^a	$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}(1-j)$	45°	Evet
	$\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 \sqrt{2}} \left(\frac{1}{\sqrt{D_0} c_0} + \frac{1}{\sqrt{D_R} c_R} \right)$		

Şekil 1.7'de gösterilen Nyquist grafiğinde R_s ve R_{et} değerleri kolayca belirlenebilir. Çift katman kapasitansı yarı dairenin maksimum frekansından hesaplanabilir ($\omega = 2\pi f = 1 / R_{et}C_{dl}$). R_{et} ve C_{dl} 'in ürünü genellikle elektrokimyasal prosesin zaman sabiti τ olarak adlandırılır. Warburg sınırlamalı davranışı gösteren 45° çizgisi, reel eksene ekstrapole edilebilir. Kesişim noktası σ ve ardından difüzyon katsayılarının hesaplanabileceği $R_s + R_{et} - 2\sigma C_{dl}$ 'ye eşittir (bkz. Tablo 1.4). Bununla birlikte, analitik uygulamalar için, eşdeğer devre, genellikle Warburg impedansını ihmal ederek basitleştirilir. Bu, Nyquist grafiklerinde 45° derecelik çizginin görülmediği ve ara yüzey veya çözelti impedansının baskın olduğu bir frekans aralığı seçilerek yapılabilir.

Biyolojik bir malzemeyi karakterize etmek için, örneğin; antikorlar veya hücreler, elektrotlar sisteme sokulmalı, böylece bir elektrokimyasal hücre oluşturulmalıdır. Bir AC voltaj sarsımı uyguladıktan sonra, akım, sistemin tüm bileşenleri, çalışma elektrodu, biyolojik malzeme, çözelti ve yardımcı elektrodun içinden akmaya zorlanır. Ölçülen impedans, tekil katkıların toplamıdır. Şekil 1.8, Warburg impedansının potansiyel katkısını ihmal ederek bu durum için basitleştirilmiş bir eşdeğer devre sağlar. Analitik uygulamalar için iki farklı durum ortaya çıkabilir:

- a) Biyolojik maddenin impedansı çözeltideki belli bir analit konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak veya zamanın bir fonksiyonu olarak incelenir. Bu, çözeltideki iyon konsantrasyonunun (iletkenlik ölçümleri) bir fonksiyonu olarak çözelti direncinin analizi ile benzerdir. Her iki durumda da, iki elektrodun impedansı belirlenecek impedansa kıyasla küçük olmalıdır. Bu, oldukça geniş yüzey alanlarına sahip elektrotlar kullanılarak başarılabılır. Buna ek olarak, biyolojik maddenin çözeltiden nonspesifik adsorpsiyonundan kaçınılmalıdır; çünkü bu da ara yüz impedansını artıracaktır. Bu tip ölçümlerin bir örneği, fermantasyon işlemi sırasında hücre kütlelerinin belirlenmesidir (Cheung, Gawad, and Renaud 2005; Krommenhoek et al. 2006). Çözeltideki hücrelerin artan yoğunluğu, kolayca izlenebilen bir impedans değişimine neden olur.
- b) Alternatif olarak, biyolojik bileşen çalışma elektrodu üzerine immobilize edilir ve bir analit molekülü ile etkileşim saptanır. Bu tipik bir biyosensör uygulamasıdır. Burada, algılama elektrodunun impedansı (biyolojik bileşen ile modifiye edilmiş çalışma elektrodu), toplam impedansı kontrol eder. Böylece, yardımcı elektrodun impedansı önemli ölçüde daha küçük olmalıdır. Bu, genellikle, algılama elektrodundan en az on kat daha büyük bir alana sahip bir elektrot kullanılarak gerçekleştirilir. Buna ek olarak, yüzey, elektrokimyasal metal birikimi veya metal çözünmesi ile pürüzlendirilebilir. Bir destek elektroliti (0.01-1 M) kullanarak, çözelti direnci, akım yanıtını sınırlamayacak şekilde ayarlanabilir.



Şekil 1.8 İki elektrot ve bir biyolojik bileşenin kullanıldığı elektrokimyasal hücreler için eşdeğer devre (Lisdar and Schäfer 2008).

Şekil 1.8'de *WE* çalışma elektrodunu, *CE* ise yardımcı elektrodu ifade etmektedir. Her iki elektrot, çift katlı bir kapasitans ve bir yük transfer direncine sahip bir paralel devre kullanılarak örneklendirilir. Çözünürlük direnci R_s ve biyolojik bileşenin Z_B impedansı elektrot impedansı ile seri haldedir. Çalışma elektrodu, biyolojik bileşen ile modifiye edilebilir ve böylece algılama elektrodu olarak görünür. Bu, kesikli kutuyla gösterilir. Bu tip ölçümlerde, diğer impedans elemanları nispeten küçük olmalıdır. Çözeltide biyolojik bileşen araştırılması gerektiğinde, değeri genel impedansı büyük ölçüde belirlemelidir ve elektrotların impedansları küçük olmalıdır. Bu tür bir araştırma nokta kutusu ile gösterilir

Bu tür yüzey modifiye edilmiş algılama elektrotlarıyla ölçümler yapılırken, redoks-aktif bileşikler genelde çözeltiye eklenir ve bu da iyi tanımlanmış bir elektron transfer direnci R_{et} ile sonuçlanır. Redoks aktif bileşik atlanmışsa veya engelleyici bir katman elektrotta uygulandığında kapasitif impedans davranışı gözlemlenecektir (çünkü R_{et} çok büyük olur). Böylece, elektrotta bir bağlanma olayı, ilk durumda R_{et} 'deki değişimi izleyerek veya ikinci durumda kapasitans değişikliğini izleyerek tespit edilebilir.

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi yaparken, çalışma elektrodundaki durumu kontrol etmek genellikle gereklidir. (i) Bazı durumlarda impedans "açık devre potansiyeli"nde (OCP) ölçülebilir. Bu, çözelti bileşimine bağlı olarak elektrotta dengelenmiş bir durum anlamına gelir. Bununla birlikte, ölçümler sırasında bu durum dengeli olmalıdır. Burada basit bir iki elektrotlu düzenleme sıklıkla kullanılabilir. (ii) Alternatif olarak, bir elektrotta bir durum tanımlamak veya bir işlemi zorlamak için (örneğin; bir oksidasyon işlemi) çalışma elektrodunda bir dc potansiyeli sabitlenmelidir. Bu, üç elektrotlu bir düzenlemenin gerekli olduğu tipik bir potansiyostatik moddur. (iii) Bir diğer yaklaşım, çalışma elektrodunun üzerine akacak bir akımı tanımlamaktır. Bu, yine üç elektrotlu bir düzenleme ile galvanostatik modda gerçekleştirilebilir.

Modern impedans analizörleri, eşdeğer devrelere göre transfer fonksiyonlarının hesaplanmasına izin veren veri değerlendirme yazılımı ve montaj programları da içerir. Literatürde modeller bulunur ya da tek bir sistemin tanımlanması için bir başlangıç noktası olarak uygulanan yazılımdan eşdeğer bir devre seçebilir. Seçilen devrenin geçerliliğini doğrulamak için, deneysel eğriye uygunluğun kalitesi değerlendirilmelidir ve elektrolit veya analit

konsantrasyonları veya bir tabaka kalınlığı veya elektrot alanı gibi deneysel parametreler değiştirilmelidir.

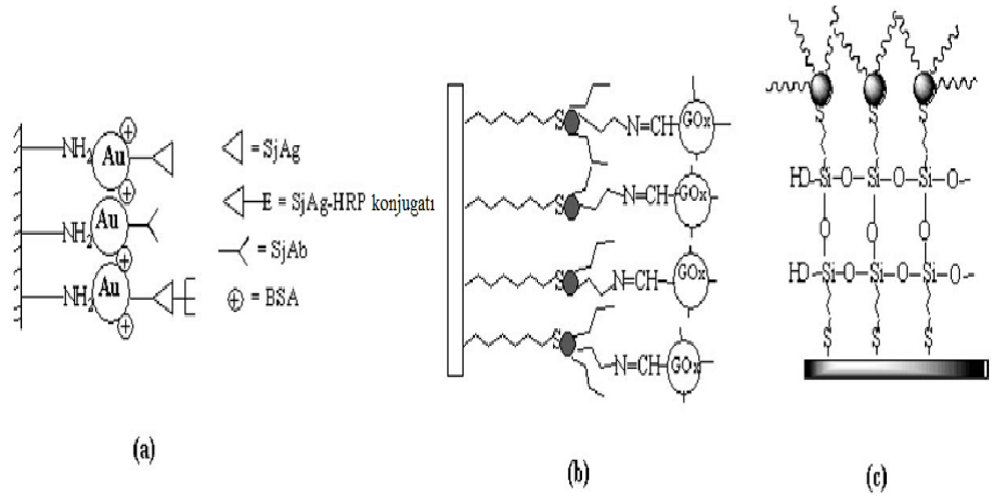
İlgili parametreyi belirlemek için gereken frekans aralığı, impedans verilerinin böyle bir analizinden çıkarılabilir. Analitik uygulamalar için, sadece frekans aralığını azaltmakla kalmaz aynı zamanda ölçümleri birkaç veya sadece bir seçili frekansla sınırlamak da mümkündür. Örneğin, bu yaklaşım oldukça kapasitif davranış gösteren kimyasal olarak hassas yarı iletken yapıları ölçerken kullanılabilir (Moritz et al. 1992). Analiz edilmesi gereken frekans aralığı incelenen sisteme göre değişir, ancak genelde birkaç on kilosaat ile 10^{-1} veya 10^{-3} Hz arasında değişir. Ticari aletler 10^{-5} Hz ile 10^6 Hz aralığını kolayca kaplarlar. İlgili impedans parametresi (örneğin, belirlenecek konsantrasyonun direnci veya kapasitesi gibi), doğrulanmış bir eşdeğer devre ile ölçülen impedans verilerinin uydurulmasıyla elde edilebilir veya toplam impedans doğrudan konsantrasyon ile ilişkilendirilebilir.

1.6 Biyosensör tasarımında elektrokimyasal impedans spektroskopisi

İmpedans biyosensörleri, ölçülen büyüklüğü bir impedans sinyaline dönüştüren fiziksel bir dönüştürücü ile bu dönüştürücüye entegre edilmiş ve biyolojik veya biyofiziksel olarak türetilmiş bir algılama elemanından oluşur. Performansı, (i) dönüştürücünün yüzey özelliklerine (ii) modifiye edicinin kimyasal bileşimine ve (iii) uygulanan elektrot potansiyelinin etkisine bağlıdır. EİS hassasiyeti, kullanılan immobilizasyon prosedürünün elektrot yüzeyinin tamamını kaplamadığında ortaya çıkan iğne deliği etkilerinden daha fazla etkilenir. Sonuç olarak, redoks molekülleri immobilize edilmiş biyomoleküllerden kurtulur ve elektrot yüzeyindeki çıplak noktalara ulaşır. Bu gibi olaylar, hedef biyomoleküllerin çıplak noktalara nonspesifik adsorpsiyonu sonucunda, yanlış EİS yanıtlarına büyük katkıda bulunurlar. İğne deliği etkileri hemen hemen tüm biyolojik sensörlerde ortaya çıkmasına rağmen, immünosensörler ve mikrobiyal biyosensörlerde nonspesifik adsorpsiyon daha yaygındır. Öte yandan, DNA biyosensörlerinden kaynaklanan EİS sinyalleri, negatif yüklü fosfat iskeleti ile $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ gibi redoks anyonları arasındaki itme kuvvetlerinden büyük ölçüde

etkilenir. Bu durum, DNA hibridizasyon reaksiyonlarının düzeyinin belirlenmesini olumsuz etkiler. Bu nedenle, BSA ve 1-merkaptohexanol dahil olmak üzere çeşitli bloke edici maddeler, hem spesifik olmayan adsorpsiyon hem de iğne deliği etkilerini ortadan kaldırmak için kullanılmıştır. Buna ek olarak, DNA fosfat iskeleti ile anyonlar arasındaki elektrostatik etkileşimler, pozitif yüklü DNA bağlayıcılar, örneğin $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ kullanılarak asgariye indirilmiştir. Bununla birlikte, EİS temelli biyosensörlerin başarısı, tercih edilen immobilizasyon kimyasıyla uyumlu olan ve titizlikle gerçekleştirilmiş bir elektrot malzemesi seçimine bağlıdır. Yaygın olarak kullanılan elektrot malzemeleri cam, altın, platin ve karbon pasta elektrotlarını içerir. Biyomoleküllerin, bağlayıcılar vasıtasıyla elektrot yüzeylerine kovalent bağlanması en güvenilir yöntemdir. Günümüzde, EİS biyosensörünün duyarlılığı, biyokimyasal sistemlerde daha geniş uygulama alanlarına yönelik hâlâ önemli bir sınırlamadır ve elektrot yüzeylerinde biyomoleküler kompleks oluşumunu arttıracak yeni immobilizasyon stratejileri gerektirmektedir.

SAM'lerin veya üretilmiş supramoleküler tasarımlar gibi biyomalzemelerin nanomateryal platformlara immobilizasyonu, hem güncel bir yaklaşımdır hem de EİS biyosensör duyarlılığını önemli ölçüde geliştiren önemli yöntemlerdir. Bu yöntemler, elektrotlar üzerindeki ilgili biyomoleküler belirteçlerin (DNA, enzim veya antikor- antijen) yüzey yoğunluklarını arttırmak suretiyle, biyomoleküler belirteçlerin spesifik aktivite ve afinitelerini arttıracak ve ardından gelen biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilecek yeni platformlar geliştirilmesine olanak tanırlar. Ayrıca, nanopartiküller genellikle kararlı, ucuz ve daha esnektir. Buna ek olarak, küçük boyutları, daha yüksek bağlama kinetiğine izin verir ve bu da yüksek duyarlığa daha fazla katkıda bulunur. Biyosensör tasarımları için örnek nanoplatforu dizileri Şekil 1.9'da gösterilmektedir. Genel olarak nanoparçacıklar açık uçlarında SH, NH_2 veya CN gibi fonksiyonel gruplara sahip olan SAM'ler vasıtasıyla elektrot yüzeylerine bağlanabilir.



Şekil 1.9 Biyosensör tasarımları için biyomoleküler nanomateryal platformları
 (a) *Schistosoma japonicum* antikorları (jsAb) ve jsAg tayini, (b) GOx enzimi ve
 (c) ss DNA immobilizasyonu (K'Owino and Sadik 2005).

İmmünosensörler en çok çalışılan impedimetrik biyosensörlerdir. Bunu DNA biyosensörleri ve enzim biyosensörleri izlemektedir.

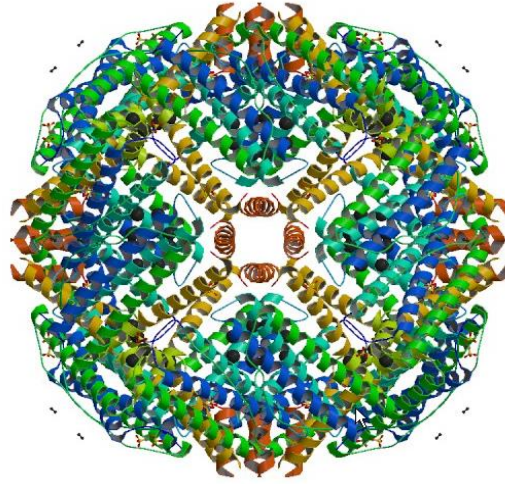
1.7 Ferritin

1.7.1 Giriş

Demir depolama proteini ferritin hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunur. Ferritin, moleküler kütlesi yaklaşık 500 kDa olan ve 24 alt birimden oluşan bir protein kabuğundan oluşur. Protein kabuğu, 4500 atoma kadar demir tutabilen ferrik-hidroksi-fosfat çekirdeğini kapsar. Benzer bir genel yapıya sahip proteinler bitki ve hayvanlardan bakteriler âlemine kadar bulunur; ancak bakteri ferritininin, hayvan ferritinleri ile hiçbir amino asit dizilimi homolojisi bulunmadığı için bunların ayrı geliştiği düşünülmektedir. Ferritin, evrimsel açıdan oldukça eskidir ve aynı zamanda uzun bir biyokimyasal tarihe sahiptir. İlk izole edildiğinden bu yana ferritin araştırmalarına iki ana konu hâkim olmuştur: yapısı ve demir alımı ile bırakma mekanizması. Son zamanlarda ferritinin moleküler biyolojisi ön plana çıkmıştır ve bu molekül, sentezin genetik translasyon seviyesinde nasıl düzenlendiğine ilişkin çalışmalar için bir model haline gelmiştir. Ferritinin yapısı ve fonksiyonu hakkında detaylı bir inceleme yayınlanmıştır (Harrison and Arosio 1996).

1.7.2 Yapı

Bir ferritin alt birimi beş heliks ve uzun bir heliksler arası döngü bulunur. L döngüsü ve N-terminal kalıntıları, meydana gelen 24 alt-birimlik molekülünün dışındadır. C-terminal artıkları kabuk içinde bulunur. H ve L zincirleri, molekül içinde aynı konformasyonu benimser.



Şekil 1.10 Ferritin

İnsan dokularında H-zengin izoferritinler (izoelektrik nokta; pI 4,5-5,0) kalp kasında, kırmızı kan hücrelerinde, lenfositlerde, monositlerde, HeLa hücrelerinde ve diğer bazı kültür hücrelerinde bulunur. L-zengin izoferritinler, H-zengin izoferritinlere göre çok daha basit yapılı (pI 5.0-5.7) olup karaciğer, dalak ve plasentada bulunur. Ferritinin pI'sı, demir içeriğinden önemli ölçüde etkilenmez. pI değeri, dokudan dokuya ve doku demir içeriği ile değişir.

Ferritin, üç özelliğin avantajlarından yararlanılarak dokulardan saflaştırılır: 75°C'lik bir sıcaklığa dayanıklılık; ultrasantrifüjle konsantrasyona izin veren demir açısından zengin molekülün yüksek yoğunluğu; ve kadmiyum sülfat varlığında kristalleştirme. Bununla birlikte, ultrasantrifüj işlemi H-alt birimlerince zengin molekülleri konsantre etme eğilimi gösterse de, kadmiyum sülfat çözeltisinden kristalleştirme işlemi daha düşük toplam bir geri kazanım eğilimi gösterir ve L-alt birimleri bakımından zengin moleküllere daha seçimlidir (Harrison and Arosio 1996).

1.7.3 Serum ferritini

Duyarlı bir immün radyometrik testin (IRMA) geliştirilmesinden sonra, ferritin, normal bireylerin serumunda veya plazmasında tespit edilebilmiştir (Jacobs et al. 1972). Güvenilir yöntemler olarak etiketli ferritin kullanan radyoimmünoassay (RIA) ve etiketli antikor kullanan IRMA yöntemleri detaylı bir şekilde tarif edilmiştir (Worwoon et al. 1980). Bu yöntemlerin yerini daha sonraları, kolorimetrik ve flüoresans substratlar kullanılan enzim bağlantılı immünoassayler (ELISA) veya kemilüminesans etiketler içeren antikorlar almıştır.

Serum ferritin konsantrasyonları normalde 15-300 µg / L arasındadır ve çocuklarda yetişkinlerden daha düşüktür (Tablo 1.5). Menopoz öncesi kadınlarda ortalama değerler erkeklere göre daha düşüktür. Bu durum menstrasyon ve doğum sırasındaki kayıpların bir sonucudur. Doğumdan itibaren daha ileri yaşlara doğru serum ferritin konsantrasyonlarındaki değişimler, dokularda depolanan demir miktarlarındaki değişimi yansıtır. Bir annenin demir durumunun, kordon serumundaki konsantrasyon üzerinde nispeten az etkisi olduğu görülmektedir ve ortalama değerler 100-200 µg/L aralığındadır.

Tablo 1.5 Serum ferritin değerleri

	Erkek	Kadın
16-50 yaş	15-200 ng/mL	14-150ng/mL
51-60 yaş	15-220 ng/mL	14-150ng/mL
>60 yaş	18-250 ng/mL	18-200 ng/mL

Serum ferritin konsantrasyonu ile flebotomi sonucu harekete geçirilen depo demirleri arasında iyi bir korelasyon vardır. Bu, normal bireylerde toplam demir miktarı ve serum ferritin konsantrasyonu arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir (Walters, Miller, and Worwood 1973). Serum ferritin konsantrasyonu kan bağıışı ile azalır ve alkol alımıyla birlikte artar. Hem erkeklerde hem de kadınlarda alkol tüketimi ile anlamlı ilişki İngiltere Sağlık Araştırması'nda doğrulanmıştır. Bu araştırmada ferritin konsantrasyonu vücut kitle indeksi arttıkça daha yüksekti. Menopozdan sonra kadınlarda ferritin konsantrasyonu artmakta fakat erkeklerdekinden daha düşük kalmaktadır. Seçilmemiş yaşlı hastalarda yüksek ferritin konsantrasyonu genellikle hastalığa bağlıdır (Touitou et al. 1985). Serum ferritin konsantrasyonu sağlıklı kişilerde nispeten kararlıdır. Demir eksikliği anemisi olan hastalarda, serum ferritin konsantrasyonu tipik olarak 12-15 $\mu\text{g} / \text{L}$ 'den daha düşüktür. Bu eşik, demir eksikliği anemisine sahip hastaların serum ferritin konsantrasyonlarının araştırılmasıyla ilgili bir dizi çalışma sonucunda belirlenmiştir ve retiküloendotelial demir depolarındaki azalmanın ortak tek sebebi olarak düşük serum ferritin konsantrasyonunun olduğu açıklanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan malzemeler

Kullanılan kimyasal maddeler:

Tez çalışmaları kapsamında kullanılan sodyum hidroksit (NaOH), sülfürik asit (H_2SO_4), potasyum klorür (KCl), potasyum nitrat (KNO_3), dipotasyum hidrojenfosfat (K_2HPO_4), Etanol (C_2H_6OH), Absolute-% 99,9), potasyum ferrosiyanür ($K_4Fe(CN)_6$), potasyum ferrisiyanür ($K_3Fe(CN)_6$), 11-merkaptoundekanoik asit (11-MUA, $HS(CH_2)_{10}CO_2H$), N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC, ($C_8H_{17}N_3$)), N-Hidroksisüksinimit (NHS, ($C_4H_5NO_3$) % 98), magnezyum klorür ($MgCl_2$), üre (CH_4N_2O), sodyum klorür (NaCl), kalsiyum klorür ($CaCl_2$), D-glukoz ($C_6H_{12}O_6$) Sigma-Aldrich Co. LLC (USA)'dan, 2-(N-Morfolino)-etan sülfonik asit (MES) Carl Roth GmbH + Co. KG firmasından temin edildi.

Denemelerde kullanılan biyolojik maddeler:

Ferritin (F6879, insan dalağından izole), insan serum albümini (HSA) ve insülin Sigma-Aldrich Co. LLC (U.S.A.)'dan temin edildi. rekombinant insan ferritin ağır zincir protein (ab158472), rekombinant insan ferritin hafif zincir protein (ab158473), Anti-Ferritin antikoru (ab10060) ABCAM (U.S.A.) firmasından temin edildi.

Denemelerin tamamında ultra saf su kullanıldı.

Kullanılan çözeltilerin tamamı, denemelerden hemen önce taze olarak hazırlandı.

ABCAM firmasından temin edilen anti-ferritin antikorları ve ferritin antijenleri belirli hacimlerde porsiyonlanarak sırasıyla -20°C ve -80°C 'de saklandı. Her denemeden önce yeni bir porsiyon ile çalışıldı.

Sigma-Aldrich firmasından temin edilen ferritin antijeni $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Kullanılan cam malzemeler Isolab firmasından temin edildi.

2.1.2 Kullanılan cihaz ve sistemler

Ferritin tayini için elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli impedimetrik biyosensörün geliştirilmesine yönelik denemelerde konvansiyonel üçlü elektrot sistemi, ölçüm hücresi ve potansiyostat/galvanostat cihazını kapsayan ölçüm sistemi kullanıldı.

Çalışma elektrodu, referans elektrot ve yardımcı elektrot olarak sırasıyla Metrohm marka 6.1204.320 model altın elektrot, Metrohm marka 6.0733.100 model Ag/AgCl (3 M KCl) elektrot ve 6.1248.000 model platin elektrot kullanıldı. Ölçümler Metrohm marka ve 6.1418.110 model ceketli cam ölçüm hücrelerinde gerçekleştirildi. Ölçüm hücrelerine bağlanarak sabit sıcaklıkta ölçüm alınmasına olanak sağlamak amacıyla LAUDA marka ve RE 120 model soğutmalı su sirkülatörü kullanıldı.

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi ölçümleri ve döngüsel voltammogramlar NOVA (sürüm 1.11) yazılımı içeren bilgisayarın bağlı olduğu FRA modüllü Metrohm marka AUTOLAB PGSTAT302 Potansiyostat/Galvanostat cihazı ile gerçekleştirildi.

Elde edilen ölçümler, ölçüm cihazının bağlı olduğu bilgisayar sistemine kurulu ve Metrohm firmasının geliştirdiği NOVA (sürüm 1.11) yazılımı ile değerlendirildi.



Şekil 2.1 Ölçüm düzeneği. (Üst sıra, soldan sağa: Güç kaynağı, bilgisayar, yazıcı, karıştırıcı, potansiyostat/galvanostat. Alt sıra, soldan sağa: Monitör, ölçüm hücresi ve elektrotlar, soğutmalı su sirkülatörü)

Altın elektrotların temizlik prosedüründe kullanılan 0,05 ve 1 mikron parçacık boyutlarına sahip alümina çözeltileri Buehler firmasından, aynı aşamada kullanılan parlatma kumaşları BASI firmasından temin edildi.

Deneysel çalışmaların elektrot hazırlama aşamalarında ultrasonik su banyosu (Elma Schmidbauer GmbH., E 120), orbital karıştırıcı (Heideldolph Unimax1010/incubator 1000), pH metre (Hanna HI 221), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA Combimag RET), buzdolabı (+4°C ve -20°C, Whirlpool ARC8140/1/IX), dondurucu (-80°C, Thermo Electron Corporation, Model 702) ve buz makinası (Kleo KBM025) kullanıldı.

2.2 Yöntem

2.2.1 Elektrot temizliği

Her çalışma öncesinde elektrot yüzeyi temizlendi. Kullanılan elektrodun yüzey temizliği her çalışmadan önce sağlanmalıdır ve bu temizliğin derecesi, tekrarlanabilir sonuçların elde edilebilmesi açısından eşit olmalıdır. Bu nedenle uygulanan temizlik adımlarına özen gösterilmelidir.

Temizlik adımları aşağıdaki gibidir:

1. Adım: Fiziksel Temizlik

Bu adımda elektrot yüzeyi kadife yüzey üzerine damlatılan sırasıyla 1 ve 0,05 mikron parçacık boyutlarına sahip alümina (alüminyum oksit) süspansiyonları üzerinde ∞ simgesi çizilecek şekilde ayrı ayrı gezdirildi. Bu şekilde altın yüzeydeki kirlilik mekanik olarak giderildi.

2. Adım: Kimyasal Temizlik (Y. Xiao, Lai, and Plaxco 2007)

Altın elektrot ölçüm hücresine yerleştirildi ve aşağıdaki adımlar sırasıyla uygulandı:

- a. 0,5 M NaOH çözeltisi içerisinde 2 V/s tarama hızında -0,35 / -1,35 V potansiyel aralığında 500 tekrarlı döngüsel voltammogramlar alındı.
- b. 0,5 M H₂SO₄ çözeltisinde 5 s boyunca 2 V potansiyelde oksidasyon ve 10 s -0,35 V redüksiyon gerçekleştirildi.
Aynı çözeltide 4 V/s tarama hızında -0,35 / 1,5 V potansiyel aralığında 20 tekrarlı döngüsel voltammogramlar alındı.
Aynı çözeltide 0,1 V/s tarama hızında -0,35 / 1,5 V potansiyel aralığında 4 tekrarlı döngüsel voltammogramlar alındı.

- c. 0,01 M KCl / 0,1 M H₂SO₄ çözeltisi içerisinde 0,1 V/s tarama hızında 10'ar döngü olacak şekilde
- i. 0,2 – 0,75 V
 - ii. 0,2 – 1,0 V
 - iii. 0,2 – 1,25 V
 - iv. 0,2 – 1,5 V potansiyel aralıklarında döngüsel voltammogramlar alındı.

2.2.2 Biyosensörün ölçüm sistemi

EİS'de, elektrokimyasal hücreye, ölçülebilir akımsal yanıt ile sonuçlanan küçük bir genlikte sinüzoidal voltaj uygulanır. Elektrotlarda gerçekleşen elektrokimyasal değişimler, materyallerin rezistif veya kapasitif özelliklerini belirtir. Bu özellikler de impedans diye tanımlanır. İmpedans, sistem voltaj vektörünün, $U(j\omega)$, ve akım vektörünün oranı, $I(j\omega)$, ile hesaplanır. Bu değerler ise potasyostata bağlı bulunan frekans analizörü tarafından üretilir (Eşitlik 1).

$$Z(j\omega) = U(j\omega)/I(j\omega) = Z_{re}(w) + jZ_{im}(w) \quad (1)$$

Eşitlik 1'den de anlaşılabileceği gibi, impedans ölçümleri sonucunda impedansın gerçek (reel) (Z_{re}) ve sanal (imajinel) (Z_{im}) kısımları, elektrot – elektrolit ara yüzeyinin karakteristik rezistans ve kapasitans bileşenlerinin tanımlayıcıları olarak ortaya çıkarlar. Elektrot yüzeyinin kalınlığındaki bir değişim, kendini kapasitansa ilişkin bir değişiklik ile gösterir. Bu değişimler yüzeyler arası elektron transfer rezistansındaki (R_{et}) artışlar tarafından aynı şekilde yansıtılabilir. R_{et} 'nin elektrot yüzeyindeki redoks belirteçlerinin elektron transfer karakteristiklerini kontrol etmesinden dolayı, makromolekülün birlikte bağlanacağı bağlanma eşiyle (örnek: antijen – antikor) etkileşiminden kaynaklanan ayırıcı bir tabakanın oluşumu, elektronların elektrot yüzeyine akışını aksatacak ve artan elektron transfer direnci geliştirecektir. Dolayısıyla bu çalışmada, modifikasyon basamakları ve antijen – antikor kompleksleşmesinin düzeyi, R_{et} değeri üzerinden dolaylı olarak takip edildi.

Altın elektrodun temizliği sonrasında yüzey temizliğinin değerlendirilmesi ve her bir modifikasyon aşamasının ardından modifikasyon adımlarının

başarısının ölçülmesi amacıyla elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ve döngüsel voltammetri (CV) tekniklerinden yararlanıldı. Antijen konsantrasyonlarına bağlı olarak, elektrot yüzeyindeki antijen – antikor bağlanma düzeyleri ve buna bağlı olarak yüzeye bağlanan antijen konsantrasyonlarının tayini yine EİS ve CV teknikleriyle gerçekleştirildi.

CV ölçümleri -0,3 V – 0,5 V potansiyel aralığında, 20 mV adım büyüklüğü ve 50 mV/s tarama hızında yapıldı. EİS ölçümleri 10000 Hz – 0,05 Hz frekans aralığında ve 15 mV değerindeki alternatif akımda yapıldı. Gerek elde edilen CV sonuçlarından gerekse de NOVA yazılımı içerisindeki OCP (Open Circuit Potential) komutundan elde edilen bilgi sonucunda tüm impedans ölçümleri 0 V'luk bias potansiyeli ile gerçekleştirildi.

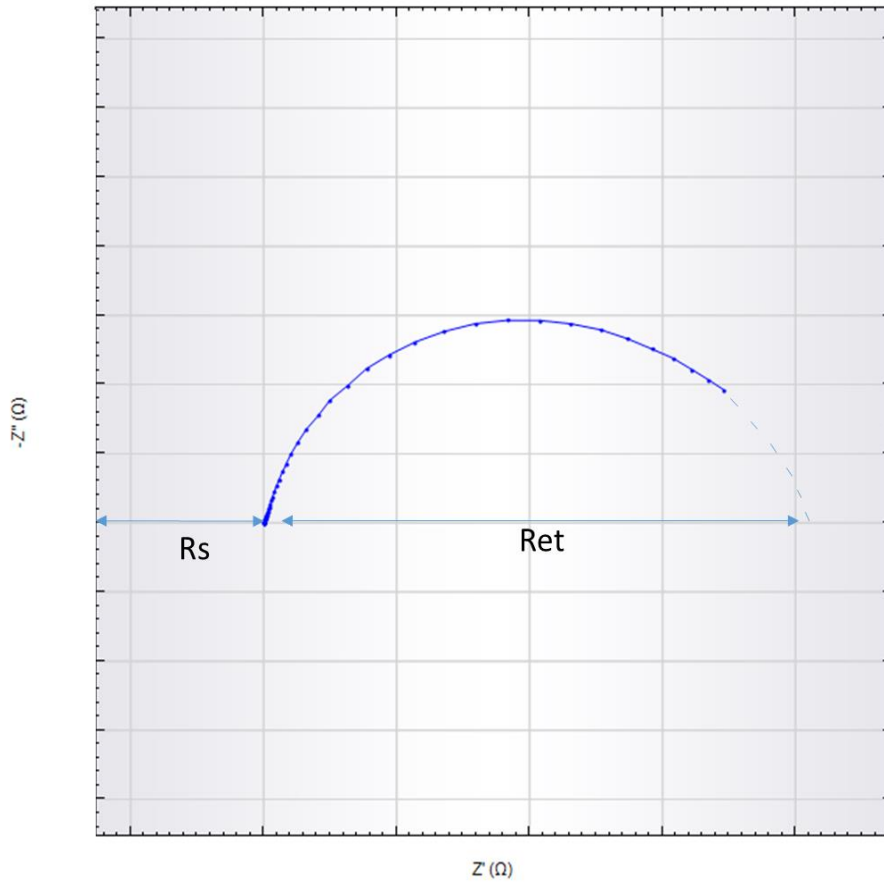
Hem yalın elektrot ile hem de biyoafinite esaslı yüzey oluşumunun her aşamasında her kademedeki tasarlanan bağlanmaların başarısının ölçümlerinde ve ferritin miktarlarının tayininde, fosfat tamponu (50 mM pH 7,4) içerisinde hazırlanan 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1:1) + 0,1 M KNO_3 çözeltisi redoks belirteci olarak kullanılarak EİS ve CV ölçümleri yapıldı.

2.2.3 Verilerin değerlendirilmesi

Yukarıda da bahsedildiği gibi, her aşamadaki modifikasyon işlemlerinin başarı düzeyinin ölçülebilmesi, antikor immobilizasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi ve ferritin tayininin gerçekleştirilebilmesi için impedans ölçümleri gerçekleştirildi. Bu ölçümler sonucunda elde edilen Nyquist eğrileri uygun bir eş değer devre yardımıyla değerlendirildi. Bu sayede, elektrot – elektrolit ara yüzeyinde meydana gelen çeşitli elektrokimyasal özelliklerdeki değişimler, okunabilir sayısal verilere dönüştürüldü.

2.2.4 Uygun eş değer devre modeli ile ölçümlerin değerlendirilmesi

İmpedans ölçümleri sonucunda elde edilen Nyquist eğrileri, yukarıda verilen frekans aralığındaki 60 farklı frekans değerindeki Z' (reel impedans) ile Z'' (imajinel impedans) büyüklüklerinin bileşke değerlerinin meydana getirdiği noktalardan oluşur. Bu eğriler, uygun bir eş değer devre sistemi ile yorumlanabilir.

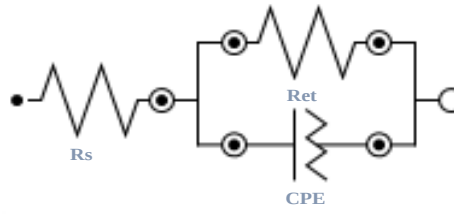


Şekil 2.2 Denemeler sonucu elde edilen tipik bir Nyquist eğrisi.

Yapılan impedans ölçümleri sonucunda elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 2.2’de gösterildiği gibidir. Bu eğrilere göre, ölçüm sırasında uygulanan tüm frekans değerleri boyunca, impedansın ara yüzey elektron transferi tarafından kontrol edildiği anlaşılmaktadır (Katz and Willner 2003b). Frekans değerleri

eğrinin solundan sağına doğru azalmaktadır. Şekilde, elektrolit çözeltinin direnci R_s , elektron transfer direnci ise R_{et} ile gösterilmiştir.

Elde edilen Nyquist eğrilerine en uygun eş değer devre sistemi Şekil 2.3’de verilmiştir:



Şekil 2.3 NOVA yazılımı kullanılarak elde edilen eş değer devre modeli.

Bu devre sisteminde R_s çözelti direncini, CPE sabit faz elemanını, R_{et} ise elektron transfer direncini ifade eder. CPE, elektrot yüzeyinde oluşturulan tabakanın homojen olmadığını ifade eder. Elektrot yüzeylerinde protein katmanlarının varlığında, CPE elemanının eş değer devre modellerine yerleştirilmesi, daha doğru sonuçların elde edilmesine olanak tanır (Katz and Willner 2003b).

R_{et} , redoks belirtecinin elektrot ara yüzeyindeki elektron transfer kinetiğini kontrol eder. Dolayısıyla elektrot yüzeyinde kullanılan yalıtkan modifiye edici maddenin ara yüzey elektron transfer kinetiğinin hızını kesmesi ve elektron transfer direncini arttırması beklenir. Elektron transfer direnci,

$$R_{et} = R_{Au} + R_{mod}$$

eşitliği ile ifade edilir. Bu eşitlikte R_{Au} ve R_{mod} -redoks belirteçlerinin varlığında- sırasıyla yalın elektrodun sabit elektron transfer direncini ve modifiye edici maddeden kaynaklanan değişken elektron transfer direncini ifade eder. Şekil 2.2’de görülen büyük yarım daire şeklindeki eğriler, çok yavaş gerçekleşen elektron transferleri sonucunda ortaya çıkar. Bu yarım dairelerin çapları elektron transfer direncine, R_{et} ’ye eşittir. Özetle bu değer, Nyquist eğrilerinde meydana

gelen yarı dairenin çap değerine de karşılık gelen, elektrot – çözelti ara yüzeyinde oluşan redoks belirteç elektronunun transfer kinetiğini doğrudan kontrol ettiğinden (Cai et al. 2017), ölçümlerin değerlendirilmesinde R_{et} değerleri ele alındı. Ölçümler alındıktan sonra seçilen en uygun eş değer devre modelindeki tüm bileşenlerin sayısal değeri, NOVA yazılımı tarafından otomatik olarak hesaplanıp kullanıcıya sunulmaktadır.

Yapılan ölçümler sonucunda, antikorun immobilizasyonu basamağına kadar geliştirilen biyosensör için elde edilen R_{et} değeri (R_0), her bir ferritin konsantrasyonu için elde edilen R_{et} değerinden (R_1) çıkarılır ve aradaki fark (ΔR_{et}) kullanılır.

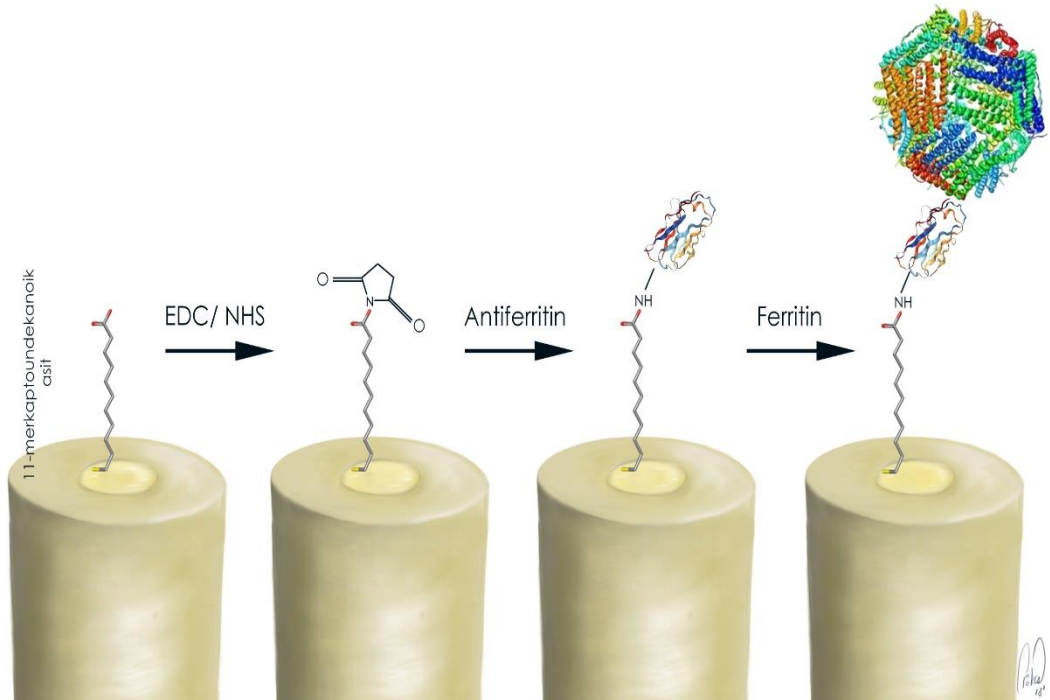
2.2.5 Ferritin tayinine yönelik hazırlanan elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli biyosensörün hazırlanması

Biyosensör sisteminin geliştirilmesinde elektrot türü olarak altın elektrot kullanıldı. Bu elektrot 2,5 mM 11 – merkaptoundekanoik asit (11 – MUA)’nın etanolde hazırlanmış çözeltisi içerisinde 16 saat inkübe edilerek, yüzeyinde kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) oluşturuldu. Ardından elektrot 50 mM derişiminde ve pH 6,0 değerindeki MES tamponunda çözölmüş EDC-NHS (sırasıyla 0,3-0,1 M) çözeltisine daldırılarak 1 saat boyunca karanlık ortamda çalkalayıcı içerisinde inkübe edildi. Böylece 11 karbonlu zincire sahip SAM tabakasının serbest uçlarındaki karboksil grupları N-hidroksi süksinimid esterlerine aktive edildi. Son aşamada elektrot ferritine spesifik antikor olan antiferritinin 10 ng/mL’lik çözeltisi ile 30 dakika boyunca muamele edildi.

Antikorun yüzeye immobilizasyonunun ardından, ferritin çözeltisinden alınan 150 μ L’lik hacimler biyosensör yüzeyine mikro pipet ile pipetlendi ve 30 dakika boyunca yüzeyde tutuldu. 30 dakika sonunda elektrodu ultra saf suya daldırıp çıkarmak suretiyle yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkamanın ardında elektrot ölçüm hücresine yerleştirildi ve ölçüm alındı. Ölçüm sonunda elektrot ultra saf su ile aynı şekilde yıkandı ve bir sonraki ferritin çözeltisiyle işlemler

tekrar edildi. Bu işlemler tüm farklı konsantrasyonlardaki ferritin çözeltileri için, en küçük derişimden en yüksekine doğru olacak şekilde, sırasıyla tekrarlandı.

Gerek çıplak elektrot ile gerekse de biyoafinite esaslı membran oluşumunun her aşamasında her kademedeki tasarlanan bağlanmaların başarısının ölçümlelerinde ve ferritin miktarlarının tayininde, fosfat tamponu (50 mM pH 7,4) içerisinde hazırlanan 5 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (1:1) + 0,1 M KNO_3 çözeltisi redoks belirteci olarak kullanılarak döngüsel voltammogramlar (CV) alındı. Döngüsel voltammogramlar -0,3 – 0,5 V potansiyel aralığında, 50 mV tarama hızında alındı. Benzer amaçla her aşamaya ilişkin elektrokimyasal impedans ölçümleri yapıldı. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 15 mV alternatif akımda gerçekleştirildi. İmpedans spektrumları 10,000 – 0,05 Hz aralığında ve 60 frekans değeri olacak şekilde düzenlendi.



Şekil 2.4 Ferritin biyosensörünün modifikasyon basamaklarının şematik gösterimi.

2.2.6 Kullanılacak olan anti ferritin – ferritin proteinlerinin test edilmesi

Tez çalışmalarının yürütülmesi amacıyla sipariş edilen anti-ferritin antikoruna ile ferritin antijeninin birbirleri ile bağlanıp bağlanmadığını test etmek amacıyla, optimizasyon çalışmalarından önce ilk olarak ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemi uygulandı. Bu yöntem sonucuna göre, eldeki antikor – antijen çiftinin bundan sonra devam edecek olan biyosensör çalışmaları için uygun olup olmadığına karar verildi. Bu işlem için kullanılan prosedür (Noah et al. 2011) aşağıdaki gibidir:

- 700 ng/mL ferritin (pH 7,6 50 mM fosfat tamponunda) mikrotabaka kuyucuklarına eklendi (5 standart kuyucuğu+1 kontrol kuyucuğu olacak şekilde)
- +4°C’de 1 gece boyunca inkübasyon gerçekleştirildi

Ertesi gün:

- Tabaka boşaltıldı ve yıkandı (pH 7,6 50 mM fosfat tamponu içinde 1 mg/mL BSA ve %0,03 Tween 20 ile hazırlanan çözelti ile)
- 5 farklı konsantrasyonda (0,14 – 0,7 – 2,8 - 14,0 - 700,0 ng/mL) antikor eklendi (pH 7,6 50 mM fosfat tamponu içinde 10 mg/mL BSA ve %0,03 Tween 20 ile hazırlanan çözelti ile)
- Kontrol kuyucuğuna antikorsuz tampon eklendi
- 75 dakika inkübasyon yapıldı
- pH 8 50 mM Tris-HCl tamponu içinde 1 mg/mL BSA ve % 0,03 Tween 20 olan çözelti ile yıkama yapıldı
- Alkalen fosfataz konjuge sekonder antikor (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross Adsorbed Secondary Antibody, AP conjugate) ile inkübasyon gerçekleştirildi

- Ana stok pH 8 50 mM Tris-HCl tamponu içinde 10 mg/mL BSA ve % 0,03 Tween 20 çözeltisi ile 1000 kat seyreltildi.
- pH 8 50 mM Tris-HCl tamponu ile yıkama yapıldı
- Substrat (p-nitrofenil fosfat) ile 30 dakika reaksiyon
- 405 nm’de spektrofotometrik ölçüm alındı.



2.2.7 Ferritin tayinine yönelik elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli biyosensörün immobilizasyon aşamalarının optimizasyonu

2.2.7.1 Altın elektrot yüzeyine anti-ferritin immobilize edilerek geliştirilen biyosensör için en uygun ferritin türünün belirlenmesi

İmmobilize edilecek olan anti-ferritin antikoru ile en uygun bağlanmayı gerçekleştirecek ferritin protein türüne karar vermek amacıyla ferritin L ve H zincirleri ile tam ferritin proteininin kullanıldığı denemeler yapıldı. Bu denemeler ile hangi ferritin formunun antikor ile en iyi şekilde etkileştiği belirlendi. Bu optimizasyon çalışmasının diğer immobilizasyon adımlarında 5 mM 11 – MUA (16 saat inkübasyon), EDC-NHS derişimleri sırasıyla 0,3-0,1 M (50 mM pH 6,0 MES tamponunda) (1 saat inkübasyon), 1000 ng/mL antiferritin antikoru (1 saat inkübasyon) kullanıldı. Ferritin konsantrasyonları: 10 – 50 – 100 – 200 – 300 – 400 pg/mL (30 dakika inkübasyon).

2.2.7.2 Antikor ve antijen için en uygun çözgen türünün belirlenmesi

Kullanılacak antijen ve antikor sisteminin en iyi cevap vereceği çözgen türünü belirlemek amacıyla pH 7,4 fosfat tampon sistemi, pH 6,0 MES tamponu ve ultra saf su kullanıldı. Çalışmanın diğer immobilizasyon adımlarında 5 mM 11 – MUA (16 saat), EDC-NHS derişimleri sırasıyla 0,3-0,1 M (50 mM pH 6,0 MES tamponunda) (1 saat inkübasyon), 1000 ng/mL antiferritin antikoru (1 saat inkübasyon) kullanıldı. H-Ferritin konsantrasyonları: 10 – 50 – 100 – 200 – 300 – 400 pg/mL (30 dakika inkübasyon).

2.2.7.3 **11 – Merkaptooundekanoik asit konsantrasyonunun optimizasyonu**

Literatürde yapılan çalışmalar, uzun zincirli ($n > 9$) alkantiyollerin daha düzgün ve kararlı tekli tabakalar oluşturduğunu göstermektedir (Ulman n.d.). Alkil zincirleri bir arada tutan Van der Waals, dipol – dipol vb. etkileşimlerin artmasından ötürü, uzun zincirli alkan tiyoller SAM oluşumu için daha çok tercih edilir. Bunun yanı sıra, kısa zincirlerde zincirler arası Van der Waals çekim kuvveti azalacağından, tekli tabakaların oluşum süresi de uzamaktadır (Ulman n.d.).

Basit düz zincirli yapıların kullanılması durumunda, SAM oluşumu sürecinin ilk aşamalarında meydana gelen düzensiz dağılmış zincirlerin adsorpsiyon bölgelerini maskeleyesi önemli bir sorun değildir. Ancak, büyük grupları ihtiva eden zincirlerin kullanılması durumunda, düzensiz dağılmış zincirlerin maskeleye etkisi, kemisorpsiyon kinetiğini önemli derecede engeller. Bu nedenle düzenli ve sıkı paketlenmiş özellikteki SAM oluşumu, basit düz zincirlerinkine nazaran daha başarısızdır.

Bu bilgiler ışığında altın elektrot yüzeyinde SAM oluşturmak için 11 – MUA tercih edilmiştir. Bu yöntemde, altın elektrodun yüzeyinde 1 – 2,5 – 5,0 mM derişimlerde 16 saatlik inkübasyonlar sonucunda 11 – MUA ile kendiliğinden oluşan tek tabaka (SAM) oluşturuldu. Bu işlem sonrasında elektrot yüzeyi EDC-NHS derişimleri sırasıyla 0,3-0,1 M (50 mM pH 6,0 MES tamponunda) (1 saat inkübasyon), 1000 ng/mL antiferritin antikoru (1 saat inkübasyon) kullanılarak modifiye edildi. H-Ferritin konsantrasyonları: 10 – 50 – 100 – 200 – 300 – 400 pg/mL (30 dakika inkübasyon).

2.2.7.4 11 – Merkaptoundekanoik asit çözeltisinde en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi

En uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi için, 11 – MUA çözeltisine daldırılan altın elektrodun 1 – 2 – 4 – 16 saatlik immobilizasyonları gerçekleştirildi. Bu işlem sonrasında elektrot yüzeyi 2,5 mM 11 – MUA (16 saat inkübasyon), EDC-NHS derişimleri sırasıyla 0,3-0,1 M (50 mM pH 6,0 MES tamponunda) (1 saat inkübasyon), 1000 ng/mL antiferritin antikoru (1 saat inkübasyon) kullanılarak modifiye edildi. H-Ferritin konsantrasyonları: 10 – 50 – 100 – 200 – 300 – 400 pg/mL (30 dakika inkübasyon).

2.2.7.5 EDC – NHS derişimlerinin optimizasyonu

EDC/NHS çifti altın elektrot yüzeyinde oluşturulan SAM'in serbest uçlarında bulunan karboksil gruplarının N-hidroksi süksinimid esterlerine aktive edilmesi amacıyla kullanıldı. Denemelerde, 50 mM pH 6,0 MES tamponunda 0,03 mM EDC – 0,01 M NHS, 0,3 M EDC – 0,1 M NHS, 0,75 M EDC – 0,25 M NHS konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı ve elektrot bu çözeltilerde 1 saat inkübe edildi. Diğer aşamalarda kullanılan materyaller 2,5 mM 11 – MUA (16 saat inkübasyon), 1000 ng/mL antiferritin antikoru (1 saat inkübasyon) olacak şekilde sabit tutularak, elektrot yüzeyi modifiye edildi. H-Ferritin konsantrasyonları: 10 – 50 – 100 – 200 – 300 – 400 pg/mL (30 dakika inkübasyon).

2.2.7.6 EDC-NHS sisteminin inkübasyon yöntemi

EDC-NHS derişimlerinin en uygun değerin belirlenmesinin ardından, bu çözeltide gerçekleştirilen inkübasyonun çalkalamalı ortamda daha iyi sonuç verip vermeyeceğine ilişkin denemeler yapıldı. Diğer aşamalarda kullanılan materyaller 2,5 mM 11 – MUA (16 saat inkübasyon), EDC-NHS derişimleri sırasıyla 0,3-0,1 M (50 mM pH 6,0 MES tamponunda) (1 saat inkübasyon), 1000 ng/mL antiferritin antikoru (1 saat inkübasyon) olacak şekilde sabit tutularak, elektrot yüzeyi modifiye edildi. H-Ferritin konsantrasyonları: 10 – 50 – 100 – 200 – 300 – 400 pg/mL (30 dakika inkübasyon).

2.2.7.7 Antikor derişiminin optimizasyonu

Modifikasyon aşamalarının optimizasyonuna yönelik çalışmaların bu bölümünde, kullanılan SAM ile modifiye edilmiş ve EDC/NHS kimyasıyla karboksil uçları aktive edilmiş elektrot yüzeyine immobilize edilecek ferritine spesifik monoklonal anti - ferritin antikorunun en uygun miktarı belirlendi. 1,0 – 10,0 – 50,0 – 1000,0 ng/mL anti-ferritin konsantrasyonları ile 1 saat boyunca muamele edilerek hazırlanan elektrotların ferritine yönelik cevapları incelendi. Diğer aşamalarda kullanılan materyaller 2,5 mM 11 – MUA (16 saat inkübasyon), EDC-NHS derişimleri sırasıyla 0,3-0,1 M (50 mM pH 6,0 MES tamponunda) (1 saat inkübasyon) kullanılarak elektrot yüzeyi modifiye edildi. H-Ferritin konsantrasyonları: 10 – 50 – 100 – 200 – 300 – 400 pg/mL (30 dakika inkübasyon).

2.2.7.8 Antikor inkübasyon süresinin optimizasyonu

Antikorların aktive edilmiş SAM uçlarına kovalent bağlanmasında, antikor inkübasyon süresinin önemi büyüktür. Optimum süre, antikor oryantasyonu ve bağlanan antikor miktarı üzerinde etkilidir. Bu aşamada, immobilize edilen antikorun en verimli şekilde yüzeye immobilize olması amacıyla inkübasyon süresinin optimizasyonuna yönelik denemeler yapıldı. 0,5 – 1,0 – 2,0 saatlik antikor immobilizasyonu gerçekleştirildi. Diğer aşamalarda kullanılan materyaller 2,5 mM 11 – MUA (16 saat inkübasyon), EDC-NHS derişimleri sırasıyla 0,3-0,1 M (50 mM pH 6,0 MES tamponunda) (1 saat inkübasyon), 10 ng/mL antiferritin antikor (1 saat inkübasyon) kullanılarak elektrot yüzeyi modifiye edildi. H-Ferritin konsantrasyonları: 10 – 50 – 100 – 200 – 300 – 400 pg/mL (30 dakika inkübasyon).

2.2.7.9 Ferritin ile etkileşim süresinin optimizasyonu

Modifikasyon aşamaları tamamlanan biyosensör yüzeyinin ferritinle muamele edilmesi sonrasında en iyi yanıtın alınabilmesi için, ferritin ile etkileşim süresinin optimizasyonuna yönelik çalışma gerçekleştirildi. Bu amaçla elektrot yüzeyine mikro pipet vasıtasıyla eklenen ferritin 15 – 30 – 60 dakikalık inkübasyonları gerçekleştirildi. Diğer aşamalarda kullanılan materyaller 2,5 mM 11 – MUA (16 saat inkübasyon), EDC-NHS derişimleri sırasıyla 0,3-0,1 M (50 mM pH 6,0 MES tamponunda) (1 saat inkübasyon), 10 ng/mL antiferritin antikor (1 saat inkübasyon) kullanılarak elektrot yüzeyi modifiye edildi. H-Ferritin konsantrasyonları: 10 – 50 – 100 – 200 – 300 – 400 pg/mL.

2.2.8 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemi ile ferritin tayinine yönelik olarak geliştirilen afinite temelli biyosensörün karakterizasyon çalışmaları

2.2.8.1 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Geliştirilen biyosensörün doğrusal tayin aralığını belirleyebilmek amacıyla çalışmalar yapıldı. Gerçekleştirilen çalışmalarda, optimizasyon adımları sonucunda belirlenen değerler (2,5 mM 11 – MUA, 16 saat 11 – MUA inkübasyonu, çalkalamalı ortamda 0,3/0,1 M EDC/NHS çözeltisi, 30 dakika antikor immobilizasyonu ve 30 dakika antijen immobilizasyonu) kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile ölçümler alındı. Ölçümlerin tamamı, optimizasyon basamaklarında belirtilen koşullar altında yapıldı.

2.2.8.2 Tekrar üretilebilirlik

Bu aşamada, tamamen aynı koşullarda hazırlanan (2,5 mM 11 – MUA, 16 saat 11 – MUA inkübasyonu, çalkalamalı ortamda 0,3/0,1 M EDC/NHS çözeltisi, 30 dakika antikor immobilizasyonu ve 30 dakika antijen immobilizasyonu) 5 farklı biyosensör ile standart grafikleri oluşturuldu. Bu standart grafiklerinin eğim ve R^2 değerleri karşılaştırılarak biyosensörün tekrar üretilebilirlik özelliği değerlendirildi.

2.2.8.3 Tekrarlanabilirlik

Tekrar üretilebilirlik denemelerinden elde edilen veriler ışığında, her bir konsantrasyon değerine ilişkin elde edilen sinyal değerlerinin ortalaması ($\bar{X}$) alındı. Elde edilen ortalama değerler ile standart grafiği elde edildi. Ayrıca söz konusu verilerin standart sapma (S.S.) değerleri ve varyasyon katsayıları (V.K.) belirlendi.

2.2.8.4 Seçimlilik

Geliştirilen biyosensörün antiferritin için non-spesifik özellikteki proteinler karşısındaki seçimliliği belirlendi. Bu amaçla belirli konsantrasyonlardaki insan serum albümini (HSA), insülin ve ferritin-HSA-insülin karışımından oluşan çözeltiler ile ölçümler alındı. Alınan biyosensör yanıtları ile sadece ferritinden alınan biyosensör yanıtı karşılaştırıldı.

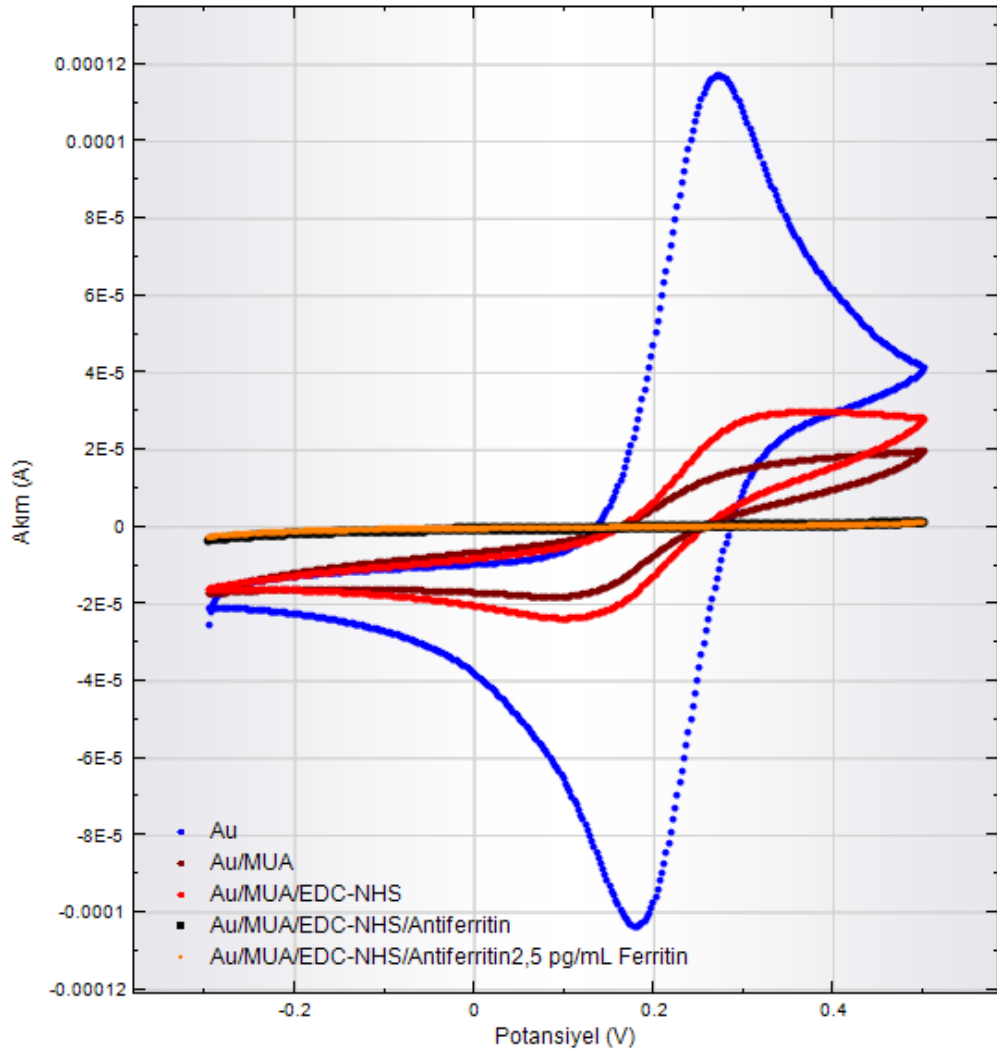
2.2.8.5 Yapay serumda örnek uygulaması

Bu aşamada kullanılacak çözgen olarak yapay serum hazırlandı (Sonuç and Sezgintürk 2014). 4,5 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 1,6 mM MgCl₂, 4,7 mM (D⁺)-glukoz, 2,5 mM üre, % 0,1 HSA ve 145 mM NaCl ile hazırlanan yapay serum örneğinde çözülen ferritin çözeltileri ile EİS ölçümleri alındı. Ferritin konsantrasyonları, doğrusal tayin aralığındaki değerlere göre hazırlandı. Ölçümler sonucunda yapay serum bileşenlerinin alınan biyosensör cevabına etkisi incelendi.

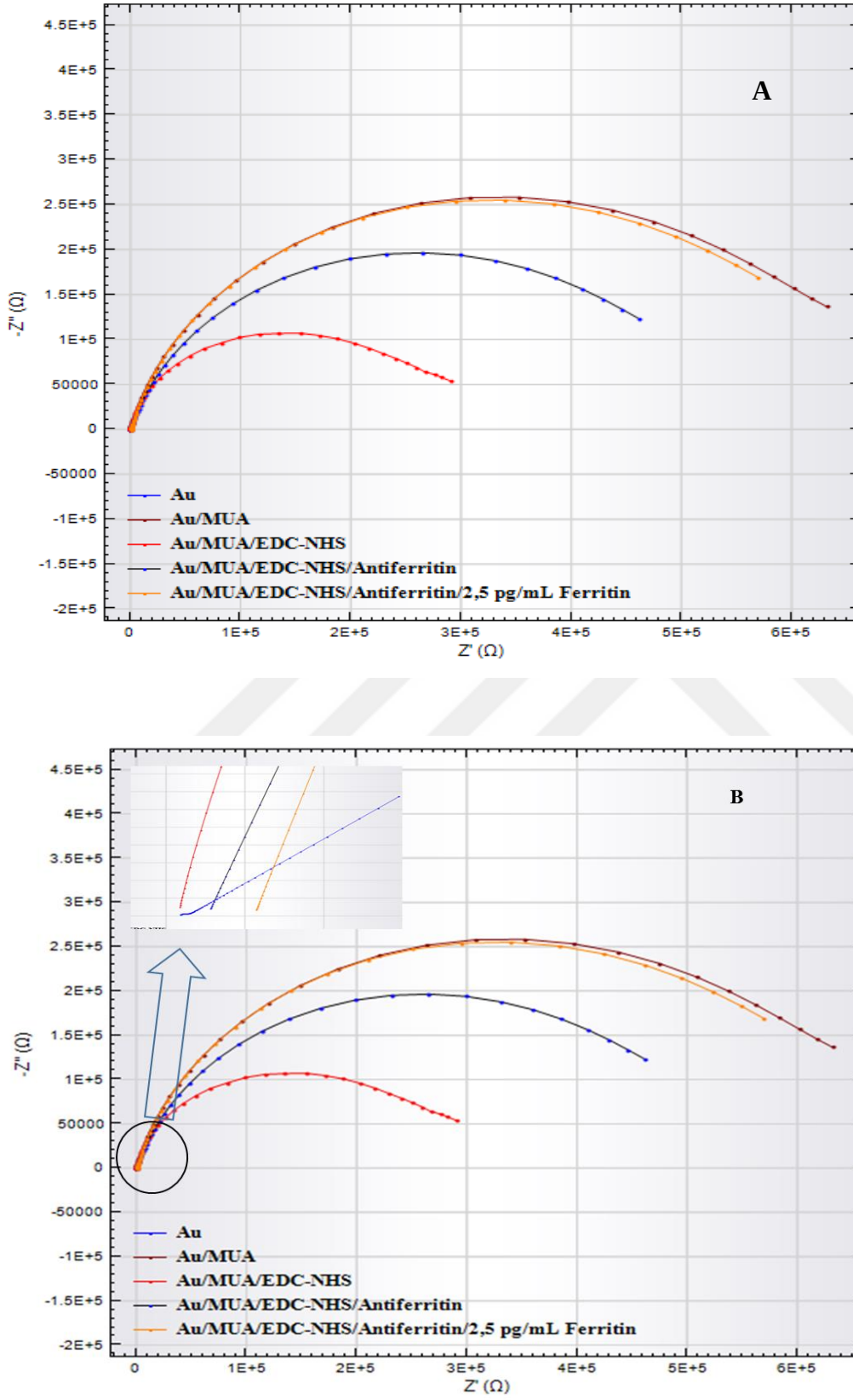
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Ferritin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün modifikasyon basamaklarına ilişkin bulgular

Ferritin biyosensörünün her bir modifikasyon basamağından sonra oluşan modifiye yüzeyler için elde edilen döngüsel voltammogramlar ve EİS verileri (Nyquist eğrileri) Şekil 3.1, Şekil 3.2 (A) ve 3.2 (B)'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Elektrot yüzeyinin modifikasyon basamaklarına ait döngüsel voltammogramlar.



Şekil 3.2 Elektrot yüzeyinin modifikasyon basamaklarına ait Nyquist eğrileri (A), bu eğrilerin yakından görünümü (B).

Yalın elektrot ile yapılan impedans ölçümü sonrası ve modifikasyon basamaklarından sonra yapılan impedans ölçümleri sonrasında elde edilen R_{et} değerleri Tablo 3.1'deki gibidir.

Tablo 3.1 Modifikasyon basamakları öncesi ve sonrasına ait R_{et} değerleri.

Modifikasyon basamakları	R_{et} (Ohm)
Yalın Au elektrot	49,5
Au-MUA	636
Au-MUA-EDC/NHS	281
Au-MUA-EDC/NHS-Antiferritin	495
Au-MUA-EDC/NHS-Antiferritin-Ferritin	618

Şekil 3.1'de biyosensörün modifikasyon aşamalarına ilişkin döngüsel voltammogramlar yer almaktadır. Mavi voltammogram, yalın elektrota ait olan karakteristik indirgenme ve yükseltgenme piklerini göstermektedir. SAM ile modifikasyon aşamasının ardından anodik ve katodik piklerin değerlerinde belirgin bir düşüş görülmektedir. Bu durum 11 – MUA ile oluşturulan SAM'in elektron iletimini bloke etme özelliğinden ileri gelmektedir. Bunun sebebi muhtemelen artan yüzey kalınlığı ve yoğunluğudur (Ding et al. 2005b).

İmpedans ölçümlerin tamamında Nyquist eğrileri yarım daire şeklindedir. Bu durum bize tüm $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 'e ilişkin prosesin elektron transfer limitli gerçekleştiğini göstermektedir. Yarım daireye ilişkin çapın değeri, elektrot yüzeyindeki yük transfer direncinin hesaplanmasında kullanılır. Bu hesaplamada kullanılacak eşdeğer devre modeli ise Şekil 2.3'te gösterildiği gibidir. Söz konusu eşdeğer devre modelinde, elde edilen Nyquist diyagramlarından daha doğru bir sonuç alabilmek için, kapasitans yerine sabit faz elemanı (CPE) kullanıldı; çünkü 11 – MUA'nın uzun zincirli molekülleri sadece elektron transfer bariyeri olarak değil, aynı zamanda kapasitör olarak da işlev görür (Ding et al. 2005b). Daha önce de belirtildiği gibi (bkz. sayfa 49), CPE yüzeyin heterojenliğini ve defekt alanlarını da ifade eder (Hleli et al. 2006). Bu devre elemanı antiferritin/elektrolit ara yüzündeki alanın yük kapasitansına karşılık gelir (Tlili et al. 2005). R_s değeri, elektrolit çözeltinin özellikleri ile ilgili bir değerdir. Bu değer, elektrot yüzeyinde

meydana gelen modifikasyonlardan etkilenmez (Ding et al. 2005b). Diğer taraftan R_{et} ve CPE ise elektrot/elektrolit ara yüzündeki yalıtkanlık ve dielektrik özellikleri ile ilgilidir. Faradaik impedans için R_{et} değeri, çalışma elektrodunun yüzeyinde meydana gelen olayların karakterizasyonunda kullanılabilecek en hassas ve basit parametredir. CPE'deki değişimler ise R_{et} 'ye kıyasla neredeyse fark edilmeyecek düzeydedir. 11 – MUA ile oluşturulan SAM'in ardından, R_{et} değerinde yalın Au elektrot yüzeyine nazaran bir artış söz konusudur (Şekil 3.2(A) ve 3.2(B)). Bu artış $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 'ün gerçekleştirdiği redoks reaksiyonuna SAM'in bloke etme yeteneğinin bir yanıtıdır. Buna ek olarak, -COOH terminal gruplarına sahip olan SAM'ler negatif yüklü tabakalar meydana getirirler ve bu negatif yüklü tabakalar $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ anyonlarının altın elektrot yüzeyine nüfuz etmesini önemli ölçüde engellerler (Ding et al. 2005b). Paralel bir şekilde, 11 – MUA ile modifikasyon basamağının ardından yapılan CV ölçümlerinde, pik akımları azalmıştır. Modifikasyon sonrasında yüzey artık yalıtkan hale gelmiş ve altın yüzeye ulaşan redoks probu sayısı azalmıştır. Dolayısıyla altın yüzeyde redoks reaksiyonları sonucu açığa çıkan elektron miktarı azalmış, buna bağlı olarak da ölçülen akım değeri düşmüştür.

SAM ile modifikasyon aşamasının ardından, oluşturulan tabakanın uçlarında bulunan -COOH gruplarının aktive edilerek, bu gruplara protein bağlama işlevinin kazandırılabilmesi amacıyla EDC/NHS kimyası ile 2. modifikasyon adımı gerçekleştirildi. Bu adım sonrasında R_{et} değeri 281 kOhm seviyesine kadar geriledi. EDC/NHS kimyası karboksilat gruplarının amin-reaktif esterlerini oluşturmada kullanılır. Bu reaktif esterler oluşturulduktan sonra, bir başka değişle SAM uçları aktive edildikten sonra, proteinlerin primer amin grupları ile amid bağı oluşturulabilir. Karboksilat grupları ilk olarak EDC ile reaktif kararsız bir ara ürüne dönüşür (o-açilizoüre esteri). Bu kararsız ara ürünün NHS ile reaksiyonu sonucunda yarı kararlı NHS esterleri oluşur ki bu sayede proteinlerin primer amin (-NH₂) grupları ile reaksiyon gerçekleşir ve amid bağları oluşur. Oluşan yarı kararlı ara ürün pozitif yüklüdür ve redoks probu anyonlarının yüzeye nüfuz etmesini kolaylaştırır (Sam et al. 2010a; Su and Li 2004). Neticede yüzeyde bir önceki aşamaya göre daha fazla $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ prosesi gerçekleşir. Yapılan impedans ölçümlerinde, Nyquist eğrilerinin çaplarında gözlenen artış, bu durumun bir sonucudur. Bu eğri (bordo renkli eğri), yük transfer direncinin düştüğünün bir ifadesidir. CV ölçümlerinde, $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ türleri için karakteristik olan indirgenme ve yükseltgenme piklerinde gözlenen akım artışı, impedans ölçümü sonuçlarıyla uyumludur.

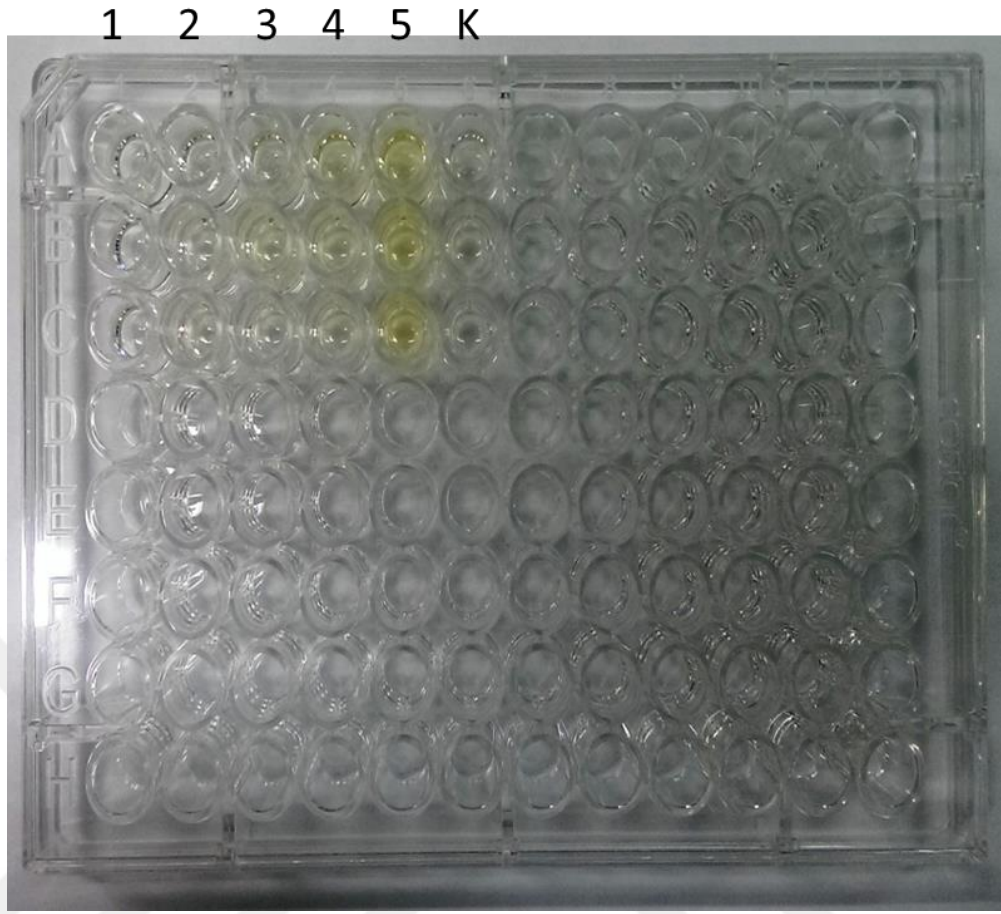
Antiferitin immobilizasyonu sonrasında, elektrot yüzeyinin kalınlığı iyice artmıştır. Antikor gibi büyük moleküllerin yüzeye immobilizasyonu sonucunda R_{et} değeri 495 kOhm olarak bulundu. Bu büyük orandaki artış, yüzey kalınlığındaki artışın ve dolayısıyla elektron transfer direncindeki artışın matematiksel karşılığıdır. Antikor immobilizasyonu ile tekrar kalın ve yoğun bir hal alan elektrot yüzeyi, redoks türlerinin altın yüzeye doğru hareketini zorlaştırmakta de buna bağlı olarak R_{et} değerini arttırmaktadır. Döngüsel voltammogramlardan elde edilen sonuçlara bakıldığında, redoks türlerinin karakteristik piklerine ait akım değerlerinde oldukça büyük düşüş gerçekleştiği rahatlıkla görülebilmektedir.

2,5 pg/mL’lik ferritin immobilizasyonu, R_{et} değerini 618 kOhm seviyesine yükseltti. Çünkü antiferitin-ferritin kompleksi, yüzey kalınlığına ve yoğunluğuna katkıda bulunmuş ve elektron transfer direncini daha da arttırmıştır. CV sonuçları, bir önceki aşamaya ait sonuçlar ile neredeyse aynıdır. Yüzeyde meydana gelen söz konusu sebeplerden ötürü, redoks türlerine ait karakteristik pikler neredeyse gözlenememektedir.

R_{et} değerlerindeki artış ve CV ölçümleri sonrasında gözlenen pik akım değerlerindeki azalma, ferritin konsantrasyonu arttıkça devam etmiştir.

3.2 ELISA testine ilişkin bulgular

Antiferritin antikoruna ile ferritin tayinine yönelik olarak yeni geliştirilecek olan elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli biyosensör sistemi ile ilgili deneysel çalışmalara başlamadan önce, ilk olarak literatürde (Noah et al. 2011) var olan ve geçerliliği kanıtlanmış ELISA prosedürüyle antijen – antikor etkileşimin gerçekleşip gerçekleşmediği test edildi. Tez çalışmalarının bu ilk safhasında, ticari olarak temin edilen antijen – antikor çiftinin birbirine karşı afinitesi olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı. Şekil 3.3’te gösterilen polistiren malzemeden üretilen bir mikro tabakada, 1, 2, 3, 4, 5 ve K kuyucuklarına eklenen 700 ng/mL derişimindeki ferritin proteinlerinin 1 gece boyunca inkübe edilmesiyle kuyucuklara fiziksel adsorpsiyonları gerçekleştirildi. (Stevens, Hansberry, and Kelso 1995). Ardından, 1. kuyucuktan 5. kuyucuğa doğru sırasıyla 0,14 – 0,70 – 2,80 – 14,0 – 700 ng/mL derişimindeki antiferritin çözeltileri pipetlendi. Bu şekilde 5 ayrı kuyucukta 3 tekrarlı çalışılmış oldu. 6. kuyucuk kontrol kuyucuğu olarak kullanıldı ve bu kuyucuğa antikor ilave edilmedi. Bu işlem ile antiferritin – ferritin etkileşimi gerçekleştirilmiş oldu. Alkalen fosfataz konjuge sekonder antikorun ortama eklenmesiyle, antiferritin – ferritin kompleksi sayısı kadar alkalen fosfataz konjuge sekonder antikor tabakada tutunmuş oldu. Tutunamayan sekonder antikorun fazlası, yıkama ile ortamdan uzaklaştırıldı. Son aşamada eklenen p-nitrofenil, alkalen fosfatazın substratıdır ve gerçekleşen reaksiyon sonucunda sarı renkli p-nitrofenol oluşur. Oluşacak rengin şiddeti, reaksiyona girecek kuyucuktaki enzim miktarıyla ve dolayısıyla sekonder antikor miktarıyla doğru orantılı olduğundan, spektrofotometrik ölçüm sonucunda antiferritin artan konsantrasyonuna bağlı olarak artan absorbans değerleri elde edildi.



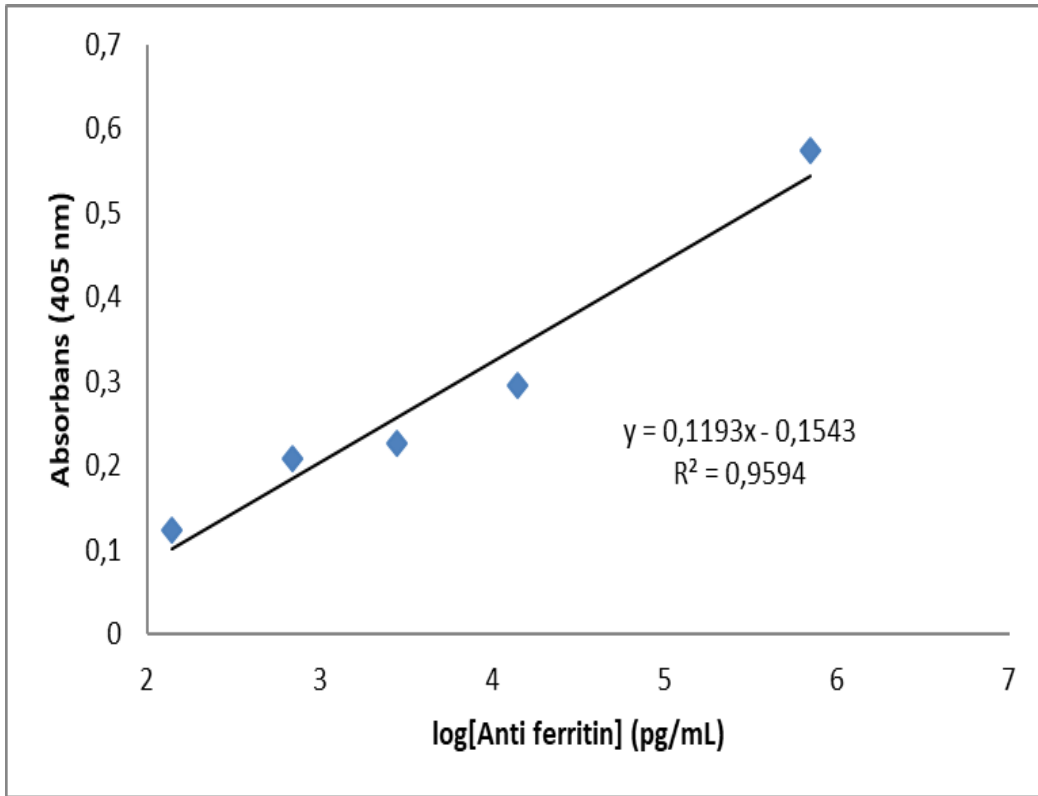
Şekil 3.3 ELISA yöntemi ile antijen - antikor etkileşiminin test edilmesi.

Tablo 3.2 ELISA testi sonucu elde edilen absorbans değerleri.

	1	2	3	4	5	K
A	0,134	0,178	0,211	0,355	0,565	0,144
B	0,111	0,21	0,305	0,302	0,562	0,156
C	0,124	0,237	0,166	0,229	0,594	0,131

Tablo 3.2’de, her sütunun başındaki rakam, kuyucuk numarasını, her satırın başındaki harf ise tekrarlanan ölçümleri göstermektedir. 1. kuyucuktan 5. kuyucuğa doğru konsantrasyon artışına bağlı olarak artan renk şiddetine paralel bir şekilde, absorbans değerlerinin de arttığı görülmektedir.

Bu değerler ile elde edilen standart grafiği şekil 3.4’te sunulmuştur.



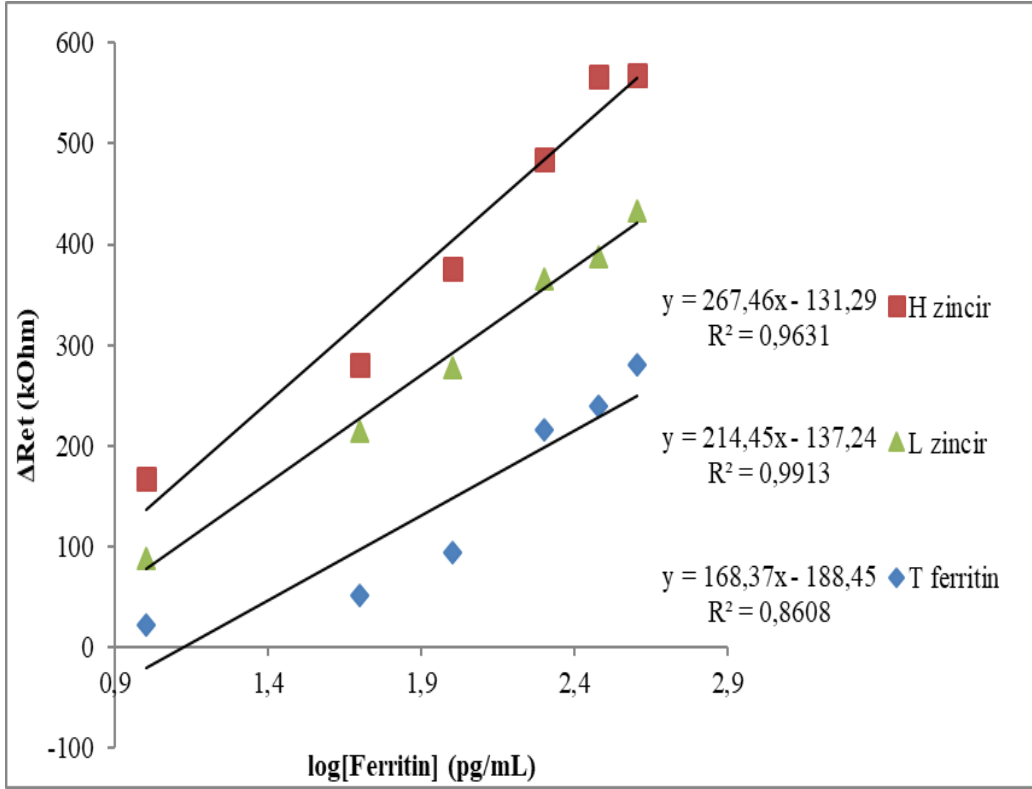
Şekil 3.4 ELISA testinden elde edilen standart grafiği.

Elde edilen standart grafiğine göre, sabit antijen konsantrasyonunun (700 ng/mL) bulunduğu şartlarda artan antikor konsantrasyonuna bağlı olarak absorbans değerlerinde de artış elde edildi. Bu durum, denemelerde kullanılacak olan antijen- antikor çiftinin birbirine karşı afinite gösterdiğini ifade etmektedir. Buradan elde edilen sonuçlar ışığında biyosensör geliştirilmesine yönelik denemelerin, temin edilen ferritin – antiferritin proteinleri ile yapılabileceği anlaşılmış oldu.

3.3 Ferritin tayinine yönelik elektrokimyasal impedans spektroskopisi temelli biyosensörün immobilizasyon aşamalarının optimizasyonuna ilişkin bulgular

3.3.1 Antijen türünün biyosensör cevabına etkisi

Serum ferritin proteini, salındığı dokuya bağlı olarak farklı kompozisyonlara sahip olabilir. Birtakım sebepler sonucunda H veya L alt birimleri ferritin proteininde daha baskın olabilir. Normal şartlarda ise alt birimler neredeyse eşit bir dağılım göstermektedir (W. Wang et al. 2010). Dolayısıyla denemelerin yapılacağı antiferritin antikorunun hangi özellikteki ferritin ile en iyi biyosensör cevabını vereceğinin bilinmesi çok önemlidir. Bu amaçla, ferritinin H ve L zincirleri ile tüm protein olarak saflaştırılmış ferritin proteinine yönelik denemeler yapıldı. Bu denemeler ile hangi protein formunun antikor ile en iyi şekilde etkileştiği belirlendi.



Şekil 3.5 Optimum antijen formu. Antijen konsantrasyonlarının logaritmasına karşı R_{et} değerlerinin değişim grafiği

Tablo 3.3 En uygun ferritin türünün belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.

Antijen türü (ferritin)	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
H zincir	$y = 267,46x - 131,29$	0,9631
L zincir	$y = 214,45x - 137,24$	0,9913
Tüm protein	$y = 168,37x - 188,45$	0,8608

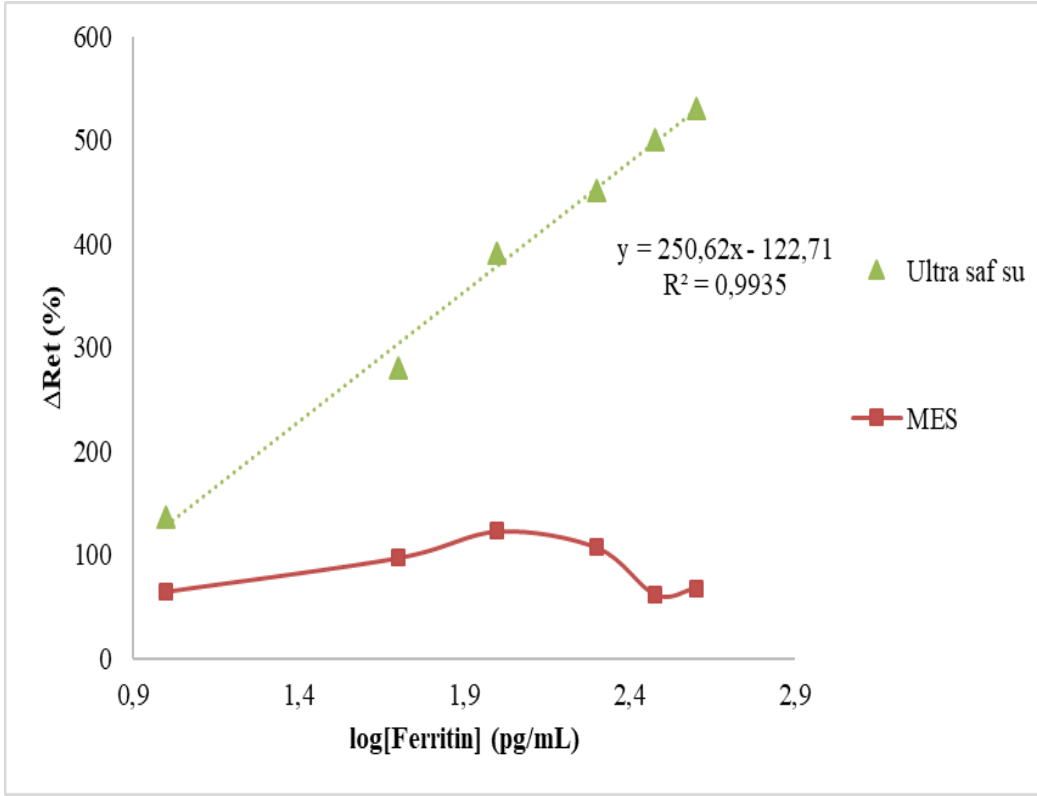
Total protein H ve L alt birimlerden oluşmaktadır. H ve L alt birimler ise birbirine benzerlikler gösteren amino asit dizilimine sahiptir (W. Wang et al. 2010). Dolayısıyla antiferritin her üç ferritin türüne de cevap vermesi beklenen bir durumdur. Ferritin kimi kanser türlerinde kanser biyobelirteci olarak kabul görür ve bu vakalarda dolaşımda ferritin miktarı artar. (HAZARD and DRYSDALE 1977; Kırkalı et al. 1999). Bazı durumlarda, dolaşımdaki ferritin bu genel artışı, ferritin daha fazla H-zengin türe dönüştürülmesi ile de ilişkilidir

(Cazzola et al. 1985). Örneğin malin histiyositozdaki serum ferritin, başlıca ferritin H'den oluşur (Lukina et al. 1993).

Çalışmaların bu kısmında, kullanılan antikorun, H – alt birimli ferritine daha yüksek düzeyde biyosensör cevabı gösterdiği belirlendi. Bu sonuç, tez projesinin amaçlarından olan ferritin tayininin bir kanser biyobelirteci olarak kullanılabilmesine imkan vermesi açısından olumlu bir netice olarak tespit edilmiştir. Denemeler, bu antikorun H alt birimli ferritine daha yüksek düzeyde biyosensör cevabı elde edildiğini gösterdi. Bu sonuç, tez projesinin esas amacına yönelik bir biyosensörün başarılı bir şekilde gerçekleştirilebileceğini göstermektedir.

3.3.2 Antijen ve antikor için seçilen çözgen türünün biyosensör cevabına etkisi

Antijen ve antikor etkileşimi afinite temellidir. Bu etkileşimin en iyi şekilde gerçekleşebilmesi, ortam şartlarına bağlıdır. Bu şartlardan biri de söz konusu proteinlerin çözüldüğü çözgen türü ve pH değeridir (Park, Kim, and Kim 2000; Zheng and Janis 2006). Çünkü çözgen türü ve pH değeri, proteinlerin yüzeyindeki iyonize olabilen grupların yük dağılımlarına etki eder ve bu da proteinlerin agregatlaşmasına dahi sebep olabilir (Dandliker et al. 1967). Birleşme – ayrışma düzeyleri de bu durumdan etkilenen başka bir parametredir; çünkü yapıdaki iyonlaşabilir gruplara sahip aminoasitlerde meydana yük dağılımı değişimlerinin derecesi, antikora spesifik olan antijene karşı gösterilen afiniteyi etkiler (Sharma et al. 2016).

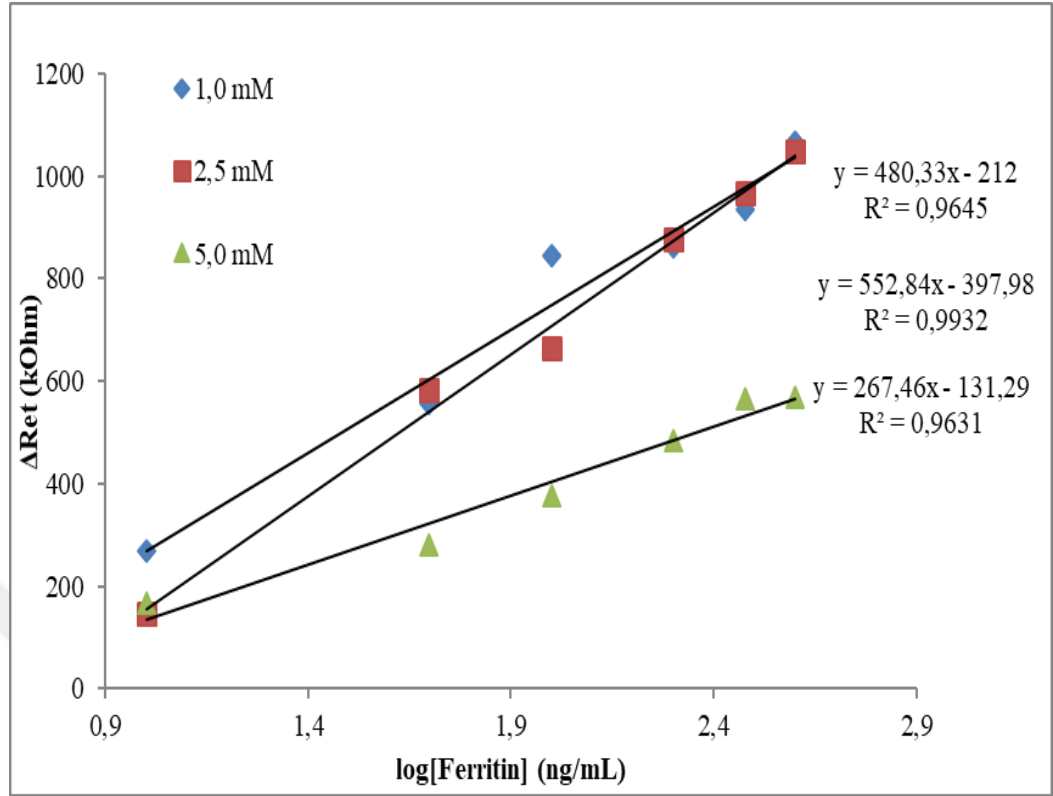


Şekil 3.6 Antijen ve antikor için kullanılan çözgen türünün biyosensör cevabına etkisi.

Bu adımda yapılan denemelerde ultra saf su dışında, 10 mM pH 5 sodyum asetat tamponu, 50 mM pH 6,0 MES ve pH 7,4 PBS tampon sistemleri kullanıldı. Sodyum asetat tamponu ve PBS ile yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler anlamlı olmadığı için grafikte bu verilere yer verilemedi. MES ve ultra saf su ile yapılan çalışmalar sonucunda Şekil 3.6'dan da anlaşılabacağı üzere, antijen ve antikorun ultra saf suda çözülerek kullanımına karar verildi.

3.3.3 11 – Merkaptoendekanoik asit konsantrasyonunun optimizasyonu

En uygun 11 – MUA derişiminin belirlenebilmesi amacıyla 1,0 – 2,5 – 5,0 mM konsantrasyonlarındaki 11 – MUA çözeltileri ile elektrot yüzeyinde SAM oluşturuldu ve diğer modifikasyon basamaklarının tamamlanmasının ardından ölçümler alındı.



Şekil 3.7 Optimum 11 – MUA derişimi. Antijen konsantrasyonlarının logaritmasına karşı R_{et} değerlerinin değişim grafiği.

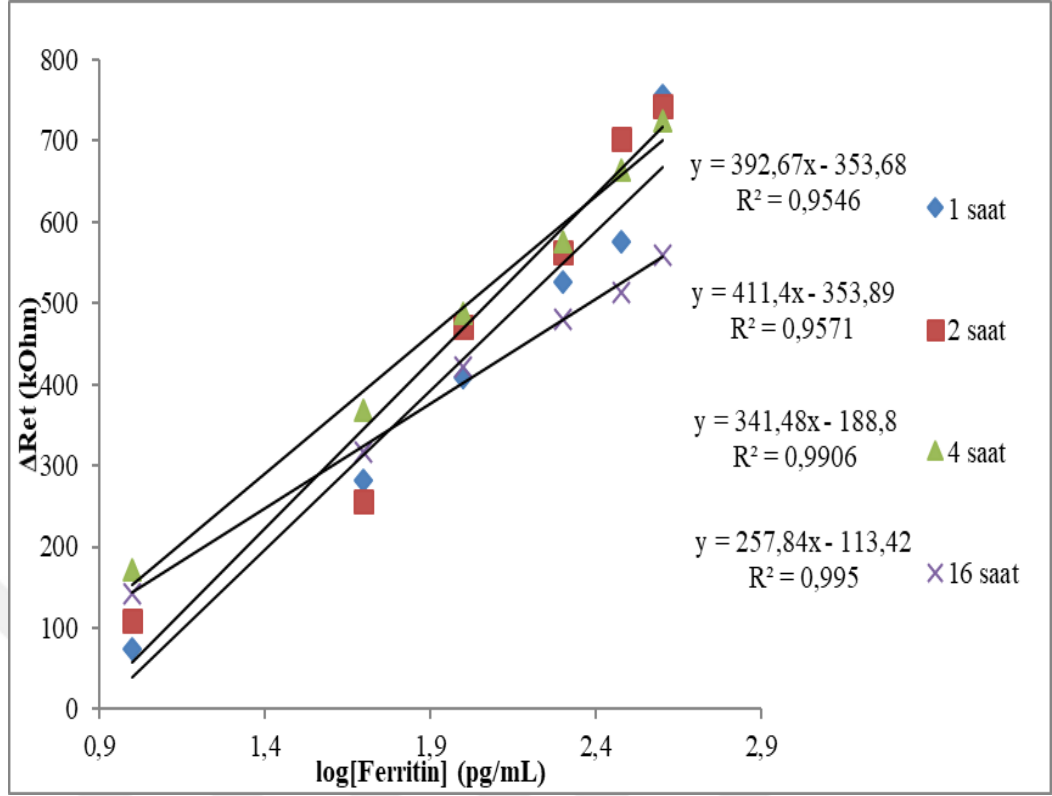
Tablo 3.4 En uygun 11 – MUA konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.

11 – MUA konsantrasyonu	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
1,0 mM	$y = 480,33x - 212,00$	0,9645
2,5 mM	$y = 552,84x - 397,98$	0,9932
5,0 mM	$y = 267,46x - 131,29$	0,9631

Uzun zincirli alkantiyol gruplarına sahip kimyasallar ile sensör yüzeyinde daha düzgün ve sıkı paketlenmeler elde edilebilmektedir. Bu sayede yüzeyin dayanıklılığı artmaktadır (Bedford et al. 2014; Chaki and Vijayamohanan 2002b; J. W. Lee et al. 2005; Wink et al. n.d.) . İyi bir SAM oluşumu aynı zamanda kullanılan konsantrasyona bağlıdır. Düşük konsantrasyon ile yeterince sıkı bir paketlenme elde edilemez. Bu da yüzeyin kararsız yapıda olmasına sebep olur. Yapılan çalışmalar belirli bir konsantrasyondan sonra SAM yoğunluğunun neredeyse sabit kaldığını göstermektedir (Su and Li 2004). Şekil 3.7'deki sonuçlara göre 5 mM 11 – MUA konsantrasyonundan daha yoğun konsantrasyonlarda yapılacak denemeler muhtemelen aynı sonuçları verecekti. Yüksek konsantrasyon aşırı yoğun bir SAM yüzeyi meydana getirdiğinden, biyosensör cevabı düşmüştür. Düşen biyosensör cevabı, elektron transferine karşı gösterilen aşırı direnç ile ilgilidir. 1 mM 11 – MUA ise, yüzeyde yeterince antikorun immobilize olmaması ve sıkı paketlenmiş düzenli bir SAM yapısının elde edilememesi nedeniyle doğrusallık katsayısı düşük olan sonuçlar vermiştir. 1 mM ile yapılan az sayıdaki ölçümden sonra elektrot yüzeyinin bozulduğu, ölçümlerde meydana gelen sapmalardan anlaşılabilmektedir. Dolayısıyla 2,5 mM 11 – MUA derişimleri kullanılarak geliştirilen biyosensörden alınan yanıtlar ile çizilen grafiğin gerek eğiminin gerekse de R^2 değerinin en yüksek olması nedeniyle, optimum konsantrasyon değeri 2,5 mM 11 – MUA olarak kabul edilmiştir.

3.3.4 11 – Merkaptoendekanoik asit çözeltisinde en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi

11 – MUA için en uygun derişim değerinin belirlenmesinin ardından, elektrot yüzeyinde kararlı bir SAM oluşturulması için gerekli olan optimum inkübasyon süresi belirlendi. Yüzeyin iyi paketlenmiş alkantiyol gruplarıyla kaplanabilmesinde, inkübasyon süresinin önemi büyüktür. Yapılan denemelerde 1 – 2 – 4 – 16 saatlik inkübasyonlar gerçekleştirildi.



Şekil 3.8 Optimum 11 – MUA inkübasyon süresi. Antijen konsantrasyonlarının logaritmasına karşı R_{et} değerlerinin değişim grafiği.

Tablo 3.5 En uygun 11 – MUA inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.

11 – MUA çözeltisinde inkübasyon süresi	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R ²)
1 saat	$y = 392,67x - 353,68$	0,9546
2 saat	$y = 411,4x - 353,89$	0,9571
4 saat	$y = 341,48x - 188,8$	0,9906
16 saat	$y = 257,84x - 113,42$	0,9950

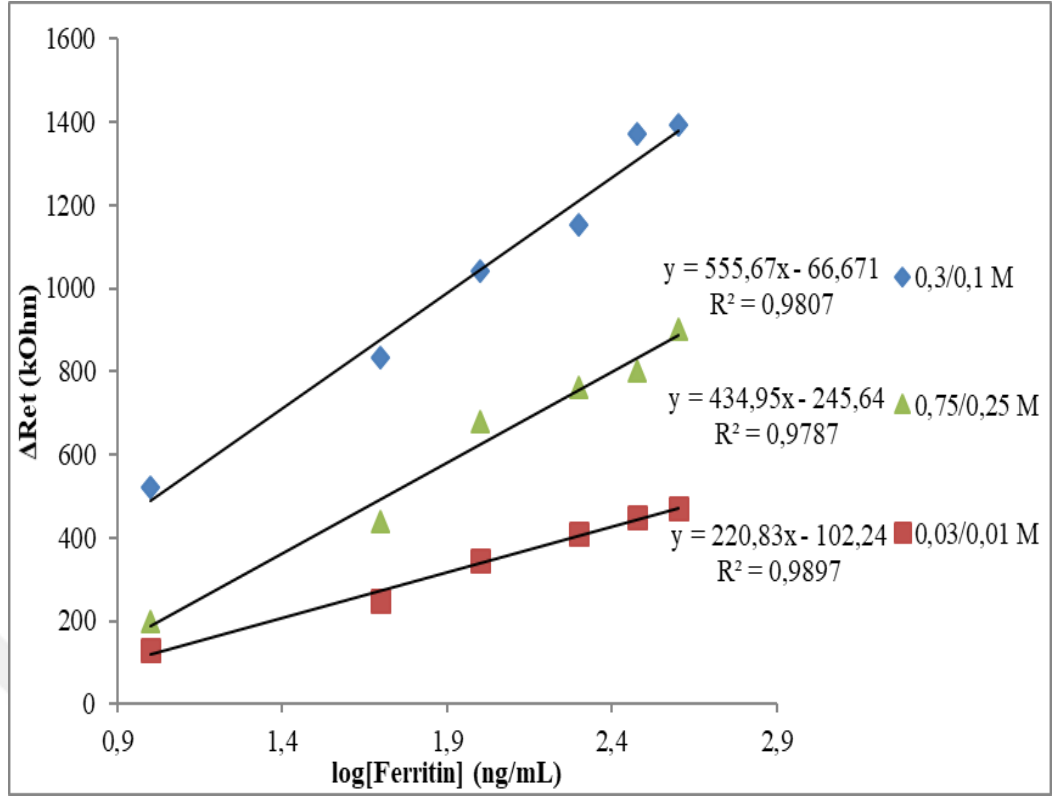
Düzenli ve kararlı SAM oluşumunda bir diğer önemli parametre inkübasyon süresidir. Yüksek konsantrasyonlarda kısa sürede düzenli bir yapı gözlenirken, düşük konsantrasyonlarda bu süre artar (Chaki and Vijayamohanan 2002b; Wink et al. n.d.). Çok uzun sürelerde ise (ör. 6 gün) çoklu tabakalar oluşumu gerçekleşebilir (Chaki and Vijayamohanan 2002b).

Şekil 3.8, 11 – MUA içerisinde farklı sürelerde gerçekleştirilen inkübasyonlar sonucunda elde edilen sonuçları göstermektedir. Sonuçlar birbirlerine yakın görünse de, en iyi R^2 değerleri 4 ve 16 saatlik denemelere ait olarak belirlendi. 4 saatlik inkübasyon süresi biyosensörün ardışık devam eden diğer modifikasyon adımlarının pratikçe uygulanabilmesi için uygun zamanlama süreci açısından pratik değildir. Bu nedenle yaklaşık aynı sonuçların elde edildiği 16 saatlik inkübasyon süresi, en uygun inkübasyon süresi olarak seçildi.

3.3.5 EDC – NHS derişimlerinin optimizasyonu

11 – MUA'nın serbest uçlarında bulunan $-\text{COOH}$ gruplarının $-\text{COOSuc}$ gruplarına dönüşümünü sağlamak ve bu sayede antijen üzerinde bulunan $-\text{NH}_2$ gruplarıyla amid bağı yapmak suretiyle antijenlerin elektrot yüzeyine immobilizasyonunu gerçekleştirmek (Sam et al. 2010b) amacıyla kullanılan EDC/NHS çiftinin optimum derişimleri belirlendi.

Denemelerde 0,03/0,01 – 0,3/0,01 – 0,75/0,25 M'lık EDC/NHS çözeltileri kullanıldı.

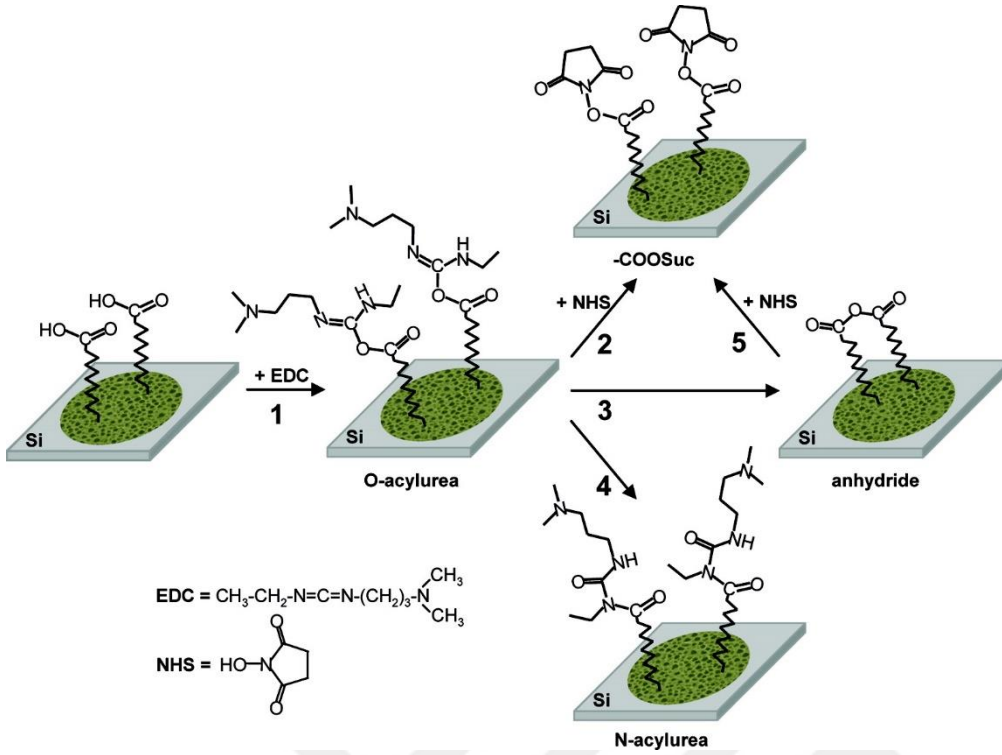


Şekil 3.9 Optimum EDC/NHS derişimi. Antijen konsantrasyonlarının logaritmasına karşı R_{et} değerlerinin değişim grafiği.

Tablo 3.6 En uygun EDC -NHS konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.

EDC – NHS konsantrasyonu	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
0,30 – 0,10 M	$y = 555,67x - 66,671$	0,9807
0,75 – 0,25 M	$y = 434,95x - 245,64$	0,9787
0,03 – 0,01 M	$y = 220,83x - 102,24$	0,9897

EDC – NHS kimyası ile yüzeyde meydana gelebilecek ara ürünler konsantrasyona bağlı olarak değişir (şekil 3.10).



Şekil 3.10 EDC-NHS konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilen temel aktivasyon reaksiyonları (Sam et al. 2010b).

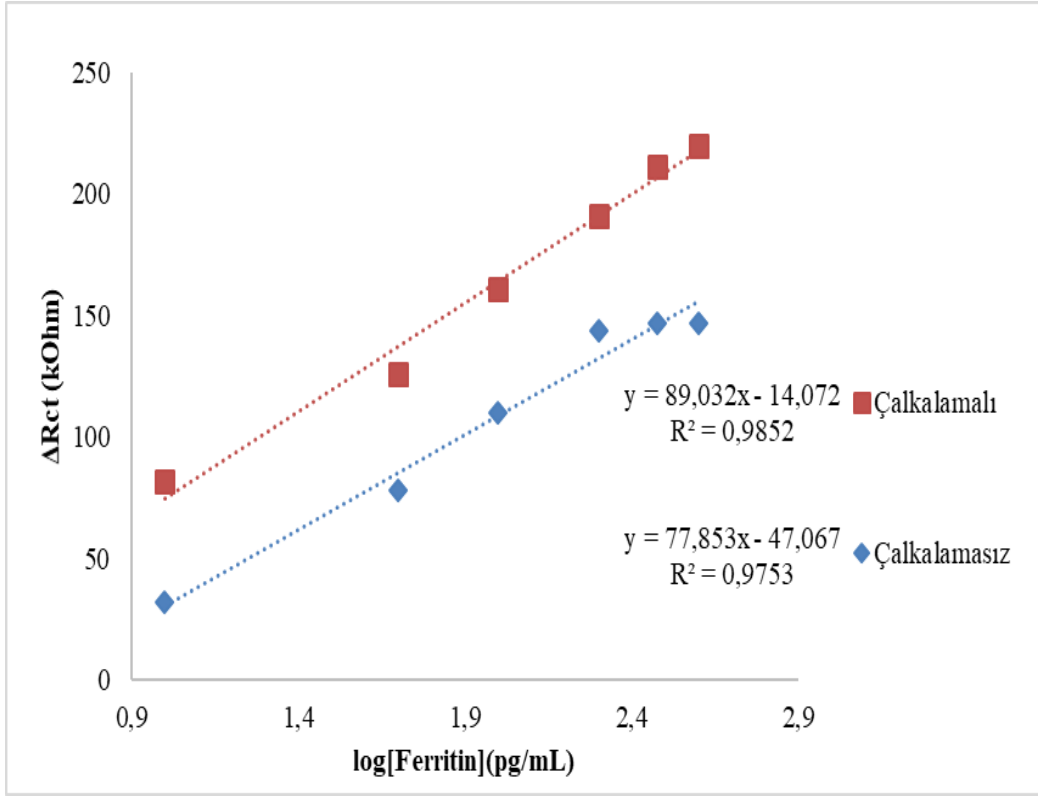
10 – 50 mM konsantrasyonlarındaki HEPES veya MES tamponları EDC – NHS kimyasının veriminin artırılması için iyi birer seçenektir (Fischer 2010). Bu bilgi ışığında çözücü olarak MES tamponu kullanıldı. 11 – MUA pKa değeri yaklaşık 4,8’dir (Quan, Madura, and Hutchison n.d.; X. Zhao et al. 2008). pKa değerinin üzerindeki pH değerinde karboksilik asit grupları karboksilat anyonlarına dönüşürler. EDC – NHS aktivasyon reaksiyonu için kullanılan tamponun pH değeri pKa değerinden büyük olmalıdır (Nam, Kimura, and Kishida 2008). Bunun sebebi karboksilat anyonlarının karboksil gruplarına nazaran daha yüksek oranda reaksiyon vermesidir (Nakajima and Ikada 1995). Bu nedenle MES tamponunun tamponlama aralığına uygun olan ve karboksil gruplarının pKa değerinin üzerinde olan pH 6,0 değerinde çalışıldı.

O-açilüre ara ürünü doğrudan proteinlerin primer aminleriyle reaksiyona girerek istenilen amid bağlarını oluşturabilir; fakat reaksiyon verimi çok düşüktür. Bu verimi arttırabilmek için NHS kullanılır. Bu sayede daha kararlı bir ara ürün oluşur (-COOSuc) ve amid bağları yüksek verimle gerçekleşir. Sam ve

arkadaşları, NHS konsantrasyonunun EDC konsantrasyonundan büyük olduğu koşullarda, yüzey aktivasyonu için gerçekleşmesi gereken reaksiyonun tamamlanamadığını bildirmiştir. Dolayısıyla denemelerde EDC konsantrasyonu daha yüksek tutuldu. Aynı çalışmada, düşük EDC – NHS konsantrasyonunda yüzey aktivasyonunun tamamıyla gerçekleşmediği, yüzeyde asit gruplarının kaldığı ve anhidrit varlığının söz konusu olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle yüzeye bağlanan antikor miktarı az olur. Çok yüksek konsantrasyonlarda ise aktivasyon verimi büyüktür; fakat bu koşullarda üre türevleri (N-açilüre) oluşur ve bu ara ürün reaktif değildir (Sam et al. 2010b). Dolayısıyla yüzeyin antikor bağlama kapasitesi düşük olur. Bu optimizasyon basamağında yapılan denemeler sonucunda, –COOSuc gruplarına dönüşümün en verimli şekilde gerçekleştiği konsantrasyon değerleri EDC – NHS için sırasıyla 0,3 – 0,1 M olarak bulundu.

3.3.6 EDC – NHS sisteminin inkübasyon yönteminin biyosensör cevabına etkisi

EDC-NHS derişimlerinin en uygun değerinin belirlenmesinin ardından, bu çözeltide gerçekleştirilen inkübasyonun çalkalamalı ortamda daha iyi sonuç verip vermeyeceğine ilişkin denemeler yapıldı. Bu adıma ait sonuçlar Şekil 3.11’de sunulmuştur. Elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri ise Tablo 3.7’de sunulmuştur.



Şekil 3.11 EDC - NHS inkübasyon yönteminin biyosensör cevabına etkisi.

Tablo 3.7 Çalkalamalı ve çalkalamasız ortamda gerçekleştirilen EDC-NHS reaksiyonları sonucu elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.

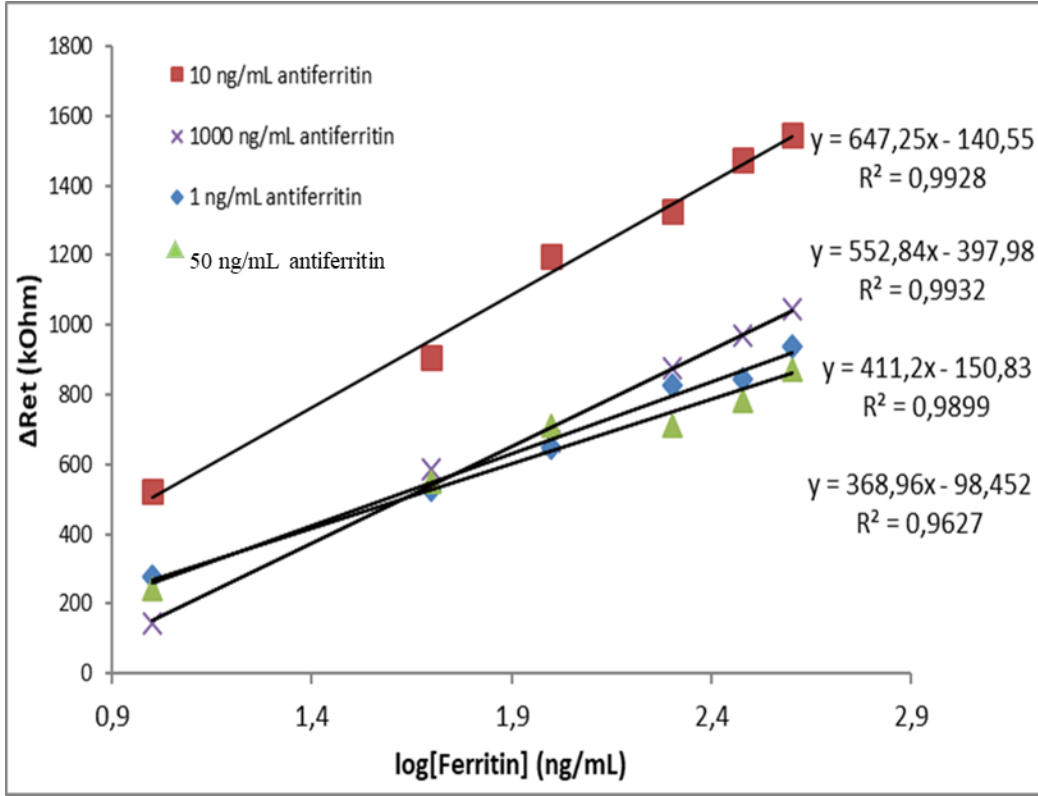
EDC – NHS reaksiyon ortamı	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R^2)
Çalkalamalı	$y = 89,032x - 14,072$	0,9852
Çalkalamasız	$y = 77,853x - 47,067$	0,9753

Literatürde sıkça rastlanan ((H.-J. Lee et al. 2009; Li et al. 2011; P. Ye et al. 2006) EDC – NHS kimyası ile yüzey aktivasyonu sırasında çalkalamalı ortamın

kullanılması işlemi, bu prosesin verimini arttırmaktadır. Reaksiyon sırasında oluşan kabarcıklar elektrot yüzeyini kaplar ve yüzeyde gerçekleşecek reaksiyonlar bu sebeple zorlaşacağından, belirli bir sürede aktive edilecek -COOH grubu sayısı azalır. Kabarcıkların elektrot yüzeyinden uzaklaştırılıp, sebep oldukları bu olumsuz etkiyi bertaraf edebilmek için, EDC – NHS reaksiyon adımı sıcaklık kontrollü orbital karıştırıcıda 25°C’de 170 rpm’de gerçekleştirildi. Çalkalamalı ortamda yapılan inkübasyon adımı sonrasındaki ileri modifikasyon adımları neticesinde, daha yüksek sinyal değerleri elde edildi. Geliştirilen biyosensörün EDC-NHS ile inkübasyonu aşamasında, aktive edilen –COOH grubu sayısındaki artışa paralel olarak çalkalamalı ortamın yüzeyde daha verimli bir şekilde modifikasyona yol açtığı ve bunun antijen tayininde daha yüksek sinyallerin alınmasını sağladığı belirlendi.

3.3.7 Antikor derişiminin biyosensör cevabına etkisi

1,0 – 10,0 – 50,0 – 1000,0 ng/mL anti-ferritin konsantrasyonları ile hazırlanan elektrotların ferritine yönelik cevapları incelendi. Yapılan ölçümler neticesinde elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan R_{et} değerleri ile değişen ferritin konsantrasyonlarının logaritma değerleri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafikleri Şekil 3.12’de sunulmuştur. Bu grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri ise Tablo 3.8’de yer almaktadır.



Şekil 3.12 Optimum anti-ferritin derişimi. Antijen konsantrasyonlarının logaritmasına karşı R_{et} değerlerinin değişim grafiği.

Tablo 3.8 En uygun antikor konsantrasyonunun belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.

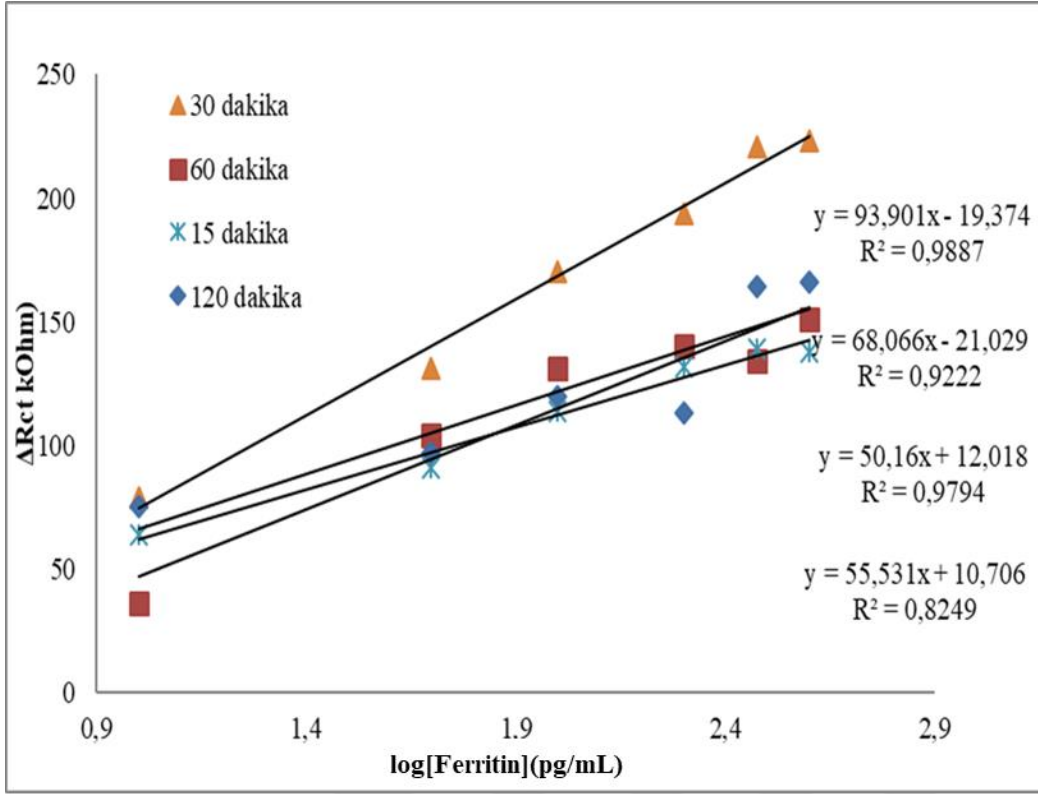
Anti ferritin konsantrasyonu	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R ²)
1 ng/mL	$y = 411,20x - 150,830$	0,9899
10 ng/mL	$y = 647,25x - 140,550$	0,9807
50 ng/mL	$y = 368,96x - 98,4520$	0,9627
1000 ng/mL	$y = 552,84x - 397,980$	0,9932

Şekil 3.12’de yer alan sonuçlara göre, 1 ng/mL antiferritin kullanıldığında, duyarlı bir cevap alınabilmesi için yüzeye immobilize edilmesi gereken miktardan

daha düşük antikor miktarının immobilize edilmiş olduğu görüldü. 50 ve 1000 ng/mL derişimindeki antiferritin konsantrasyonları ise, elektrot yüzeyinde kalın bir tabaka oluşturduğundan, elektrot – elektrolit ara yüzünden elektrot boyunca gerçekleşen elektron transferi için yüksek dirençli yani yalıtkan bir geçiş yolu meydana geldiği anlaşıldı. Ayrıca, yüksek antikor konsantrasyonlarında, yüzeye immobilize olan antikorların uzaysal konfigürasyonunun uygun olamamasından ötürü, antijenle uygun etkileşim gerçekleşmemektedir (Mishra, Sharma, and Bhand 2015; Saberi et al. 2016). Bu durum, impedans ölçümü sonucunda elde edilen elektron transfer değerlerinin (R_{et}), 10 ng/mL antikor kullanılarak yapılan denemelerden elde edilen değerlere göre daha düşük olmasına sebep oldu. 10 ng/mL derişiminde antiferritin kullanıldığında, biyosensörün ferritine verdiği cevap en yüksek seviyededir. Dolayısıyla, 10 ng/mL derişiminde antikor çözeltisinin en uygun değer olduğu kabul edildi.

3.3.8 Antiferritin inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Gereksiz zaman kaybını önlemek ve en uygun miktarda antikorun yüzeye immobilizasyonunu sağlayabilmek amacıyla, optimum antikor immobilizasyon süresini belirlemeye yönelik denemeler yapıldı. 11 – MUA ile modifiye edilen elektrotlar üzerine eklenen 10 ng/mL konsantrasyonundaki antikor çözeltileri, 15 – 30 – 60 – 120 dakikalık süreler boyunca inkübe edildi. Denemeler sonucunda elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan R_{et} değerleri ile ferritin konsantrasyonlarının logaritma değerleri kullanılarak oluşturulan grafik ve bu grafikte yer alan doğruların doğru denklemleri ile doğrusallık katsayısı değerleri sırasıyla Şekil 3.13 ve Tablo 3.9’da gösterilmiştir.



Şekil 3.13 Antikor immobilizasyonu süresi optimizasyonu

Tablo 3.9 En uygun antikor inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik yapılan deneylerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.

Anti ferritin inkübasyon süresi	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R²)
15 dakika	$y = 50,16x + 12,018$	0,9794
30 dakika	$y = 93,901x - 19,374$	0,9887
60 dakika	$y = 68,066x - 21,029$	0,9222
120 dakika	$y = 55,531x + 10,706$	0,8249

Sonuçlar Şekil 3.13 ve Tablo 3.9’da yer almaktadır. Elde edilen sonuçlar, antikor immobilizasyonu için en uygun inkübasyon süresinin 30 dakika olduğunu gösterdi. 15 dakikalık immobilizasyon süresinin, antikorun yüzeye immobilizasyonu için gerçekleşmesi gereken reaksiyon açısından kısa olduğu

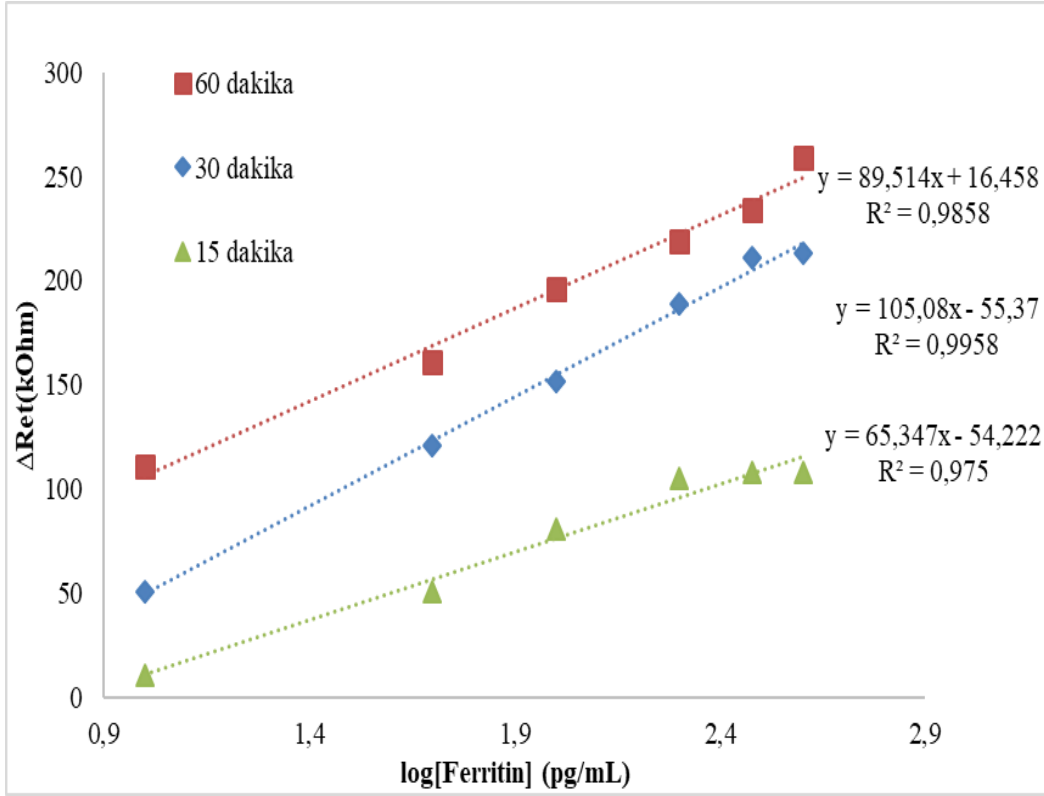
tespit edildi. Bu kısa sürede antikor yüzeye etkin bir şekilde bağlanamamış ve bir miktarı ortamdan yıkamayla uzaklaşmıştır. Dolayısıyla elde edilen yanıtların düşük olduğu gözlemlendi. 60 ve 120 dakikalık süreler, elektrot yüzeyine eklenen antikor çözeltisinin kısmen buharlaşmasına sebep olduğu için (K. Xiao et al. 2017), etkili bir immobilizasyon gerçekleşmemiştir. Buharlaşma nedeniyle yapısı değişen yüzeyde verimli bir antijen – antikor etkileşimi olmamıştır. Bu durum da sonuçlara düşük ve doğrusal olmayan cevaplar olarak yansımıştır. Sonuç olarak 30 dakikalık inkübasyon süresi en uygun süre olarak kabul edildi.



3.3.9 Ferritin inkübasyon süresinin biyosensör cevabına etkisi

Afinite temelli biyosensörlerde, analitin biyosensör yüzeyindeki inkübasyon süresinin optimizasyonu oldukça önemlidir. Optimize edilen süre zarfında, antijen ile antikor etkileşimi en verimli şekilde olacaktır.

Tez çalışması kapsamındaki optimizasyon çalışmalarının son aşamasında, modifikasyon aşamaları tamamlanan biyosensörün ferritine vereceği cevabın daha yüksek, daha hassas, tekrarlanabilir ve daha doğrusal olmasını sağlayabilmek adına, ferritin yüzeyde inkübasyon süresinin optimizasyonuna yönelik denemeler yapıldı.



Şekil 3.14 Ferritinin optimum inkübasyon süresi.

Tablo 3.10 En uygun antijen inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik yapılan denemelerden elde edilen grafiklerin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayısı değerleri.

Anti ferritin inkübasyon süresi	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R ²)
15 dakika	$y = 65,347x - 54,522$	0,9750
30 dakika	$y = 105,08x - 55,370$	0,9958
60 dakika	$y = 89,514x + 16,458$	0,9858

Bu optimizasyon adımı ile, gereksiz zaman kayıplarının ve en iyi antijen – antikor etkileşim düzeyinin belirlenmesini amaçlandı. 15 dakikalık inkübasyon süresi, antijen – antikor etkileşimi için yetersiz kalmıştır. Bu nedenle, yapılan

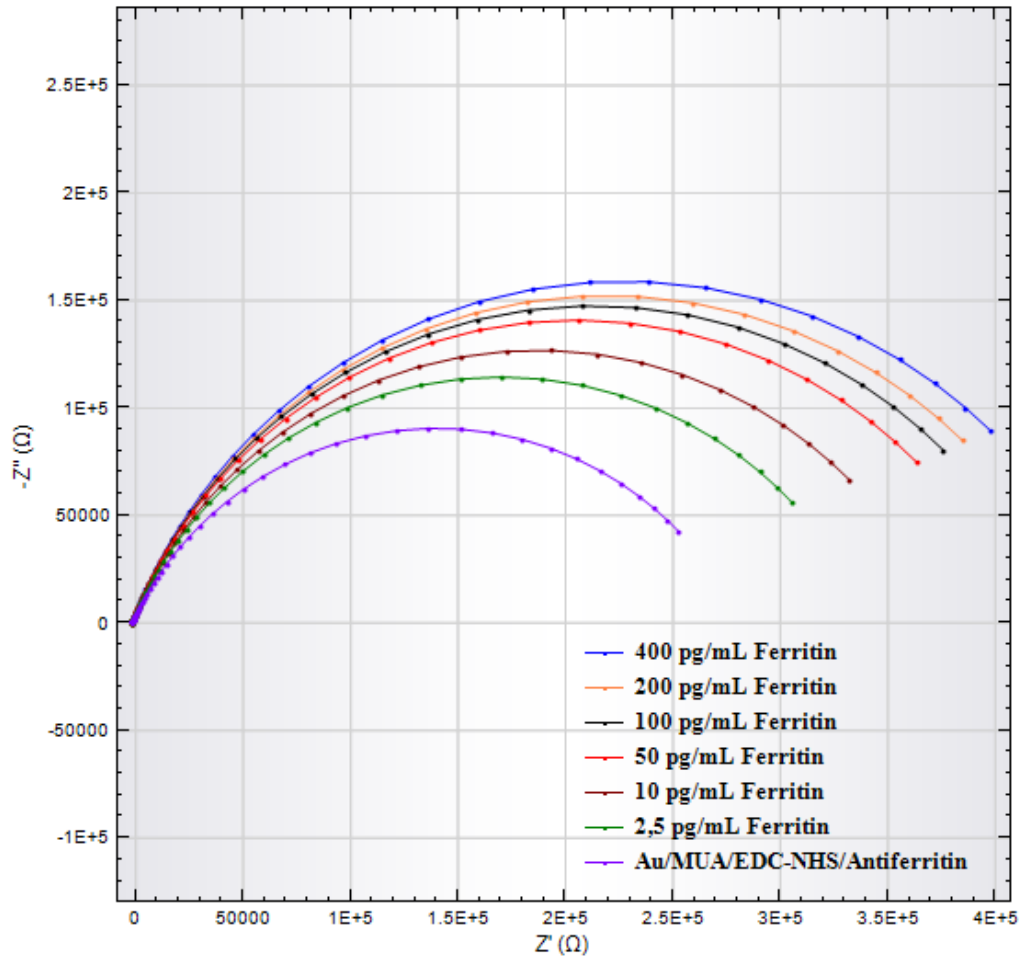
ölçümler ile diğerlerine kıyasla R^2 değeri ve eğimi daha düşük bir grafik elde edildi. 60 ve 30 dakikalık inkübasyon süreleri sonucunda daha doğrusal grafikler elde edildi; fakat gerek 30 dakikalık deneme sonucu daha doğrusal ve daha yüksek eğimli bir grafik elde edilmesi, gerekse de kısa sürede denemelerin tamamlanabilmesinden ötürü, en uygun inkübasyon süresi olarak 30 dakika seçildi. Biyosensörler ile yapılan analizlerin, alternatif analiz yöntemleri karşısındaki en önemli üstünlüklerinden birisi, biyosensörlerin kısa sürede tayin olanağı sunmasıdır. Bu açıdan düşünüldüğünde, 30 dakikalık antijen inkübasyon süresinin optimum süre olarak seçilmesi oldukça anlamlıdır.



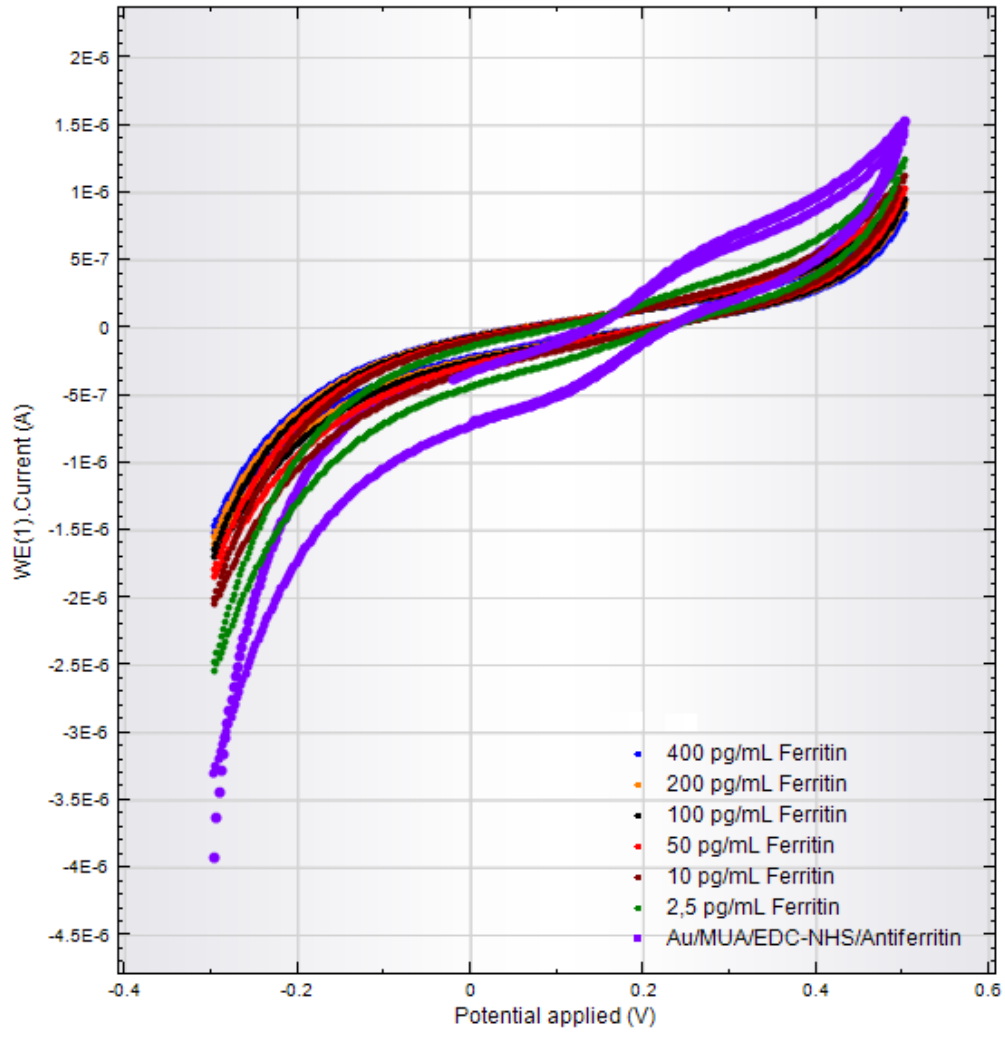
3.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemi ile ferritin tayinine yönelik olarak geliştirilen afinite temelli biyosensörün karakterizasyon çalışmalarına ilişkin bulgular

3.4.1 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

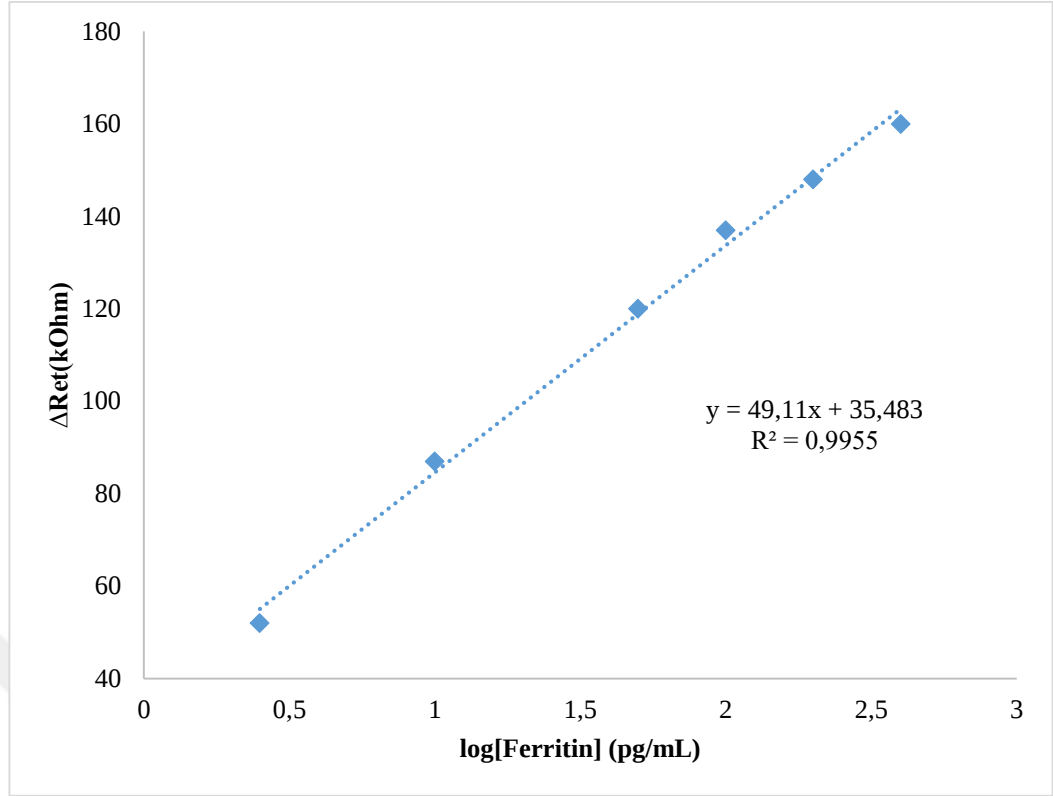
Bu bölümdeki denemeler için, ferritin tayinine yönelik biyosensör belirlenen optimal şartlar altında hazırlandı. Artan ferritin konsantrasyonları ile denemeler gerçekleştirildi. Bu denemeler kapsamında, her defasında artan konsantrasyonda ferritin çözeltileri biyosensör yüzeyinde inkübe edildi ve yüzeye immobilize edilen antiferritin antikorları ile antikor- antijen kompleksleşmesi için 30 dakika beklenildi. Bu süre sonunda elektrot ultra saf su ile yıkandı ve impedans ölçümleri yapıldı. Elde edilen Nyquist eğrilerinden R_{et} değerleri bulundu. Yapılan çalışmalarda tüm elektrokimyasal impedans ölçümleri 10000 – 0,05 Hz frekans aralığında ve 60 frekans adımıyla gerçekleştirildi. İlgili denemeler sonucu elde edilen Nyquist eğrileri, döngüsel voltammogramlar ve ferritin (pg/mL) derişimlerine karşılık gelen ΔR_{et} (kOhm) direnç değerleri ile çizilen standart grafiği sırasıyla Şekil 3.15, 3.16 ve 3.17’de verilmiştir.



Şekil 3.15 Doğrusal tayin aralığı çalışmaları sonu elde edilen Nyquist eğrileri.



Şekil 3.16 Doğrusal tayin aralığı çalışmaları sonucu elde edilen döngüsel voltammogramlar.



Şekil 3.17 Doğrusal tayin aralığı.

Şekil 3.17’de yer alan kalibrasyon eğrisinde y ekseninde belirtilen ΔR_{et} değeri, $\Delta R_{et} = R_{et}(\text{ferritin} - \text{antiferritin kompleksi}) - R_{et}(\text{antiferritin})$ değerinin bir ifadesidir. Kalibrasyon eğrisi, R_{et} değerlerine karşılık $\log[\text{Ferritin}](\text{pg/mL})$ değerleri kullanılarak elde edildi. ΔR_{et} ile $\log[\text{Ferritin}](\text{pg/mL})$ arasında 2,5 pg/mL – 400 pg/mL ferritin konsantrasyonları aralığında doğrusal tayin gerçekleştirilebildi. 400 pg/mL değerinin üzerindeki ferritin konsantrasyonları kullanılarak yapılan ölçümler sonucunda neredeyse sabit değerler elde edildi. 2,5 pg/mL ferritin konsantrasyonlarının altındaki değerlerde, elde edilen Nyquist eğrileri, ferritinsiz biyosensör ile elde edilen Nyquist eğrilerine göre anlamlı düzeyde bir farka sahip değildi. Dolayısıyla 2,5 pg/mL – 400 pg/mL aralığı, doğrusal tayin aralığı olarak belirlendi. Ayrıca, elde edilen doğru eğimi ve doğrusallık katsayısı (R^2) sırasıyla $y = 49,11x + 35,483$ ve 0,9955 olarak bulundu.

3.4.2 Tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik aşamasında, optimize edilen değerler kullanılarak hazırlanan 5 farklı biyosensör ile doğrusal tayin aralığı sınırları dahilinde (2,5 pg/mL – 400 pg/mL) ölçümler alındı ve bu ölçüm sonuçları kullanılarak kalibrasyon eğrileri elde edildi. Elde edilen kalibrasyon eğrilerinin doğru denklemleri ve doğrusallık katsayıları hesaplandı. Bu veriler tablo 3.11’de gösterilmiştir.

Tablo 3.11 Ferritine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirliği.

Hazırlanan Biyosensör	Doğru Denklemi	Doğrusallık Katsayısı (R ²)
1	$y = 48,036x + 33,273$	0,9971
2	$y = 48,558x + 31,339$	0,9930
3	$y = 48,506x + 36,763$	0,9964
4	$y = 46,100x + 35,93$	0,9966
5	$y = 48,140x + 36,237$	0,9960

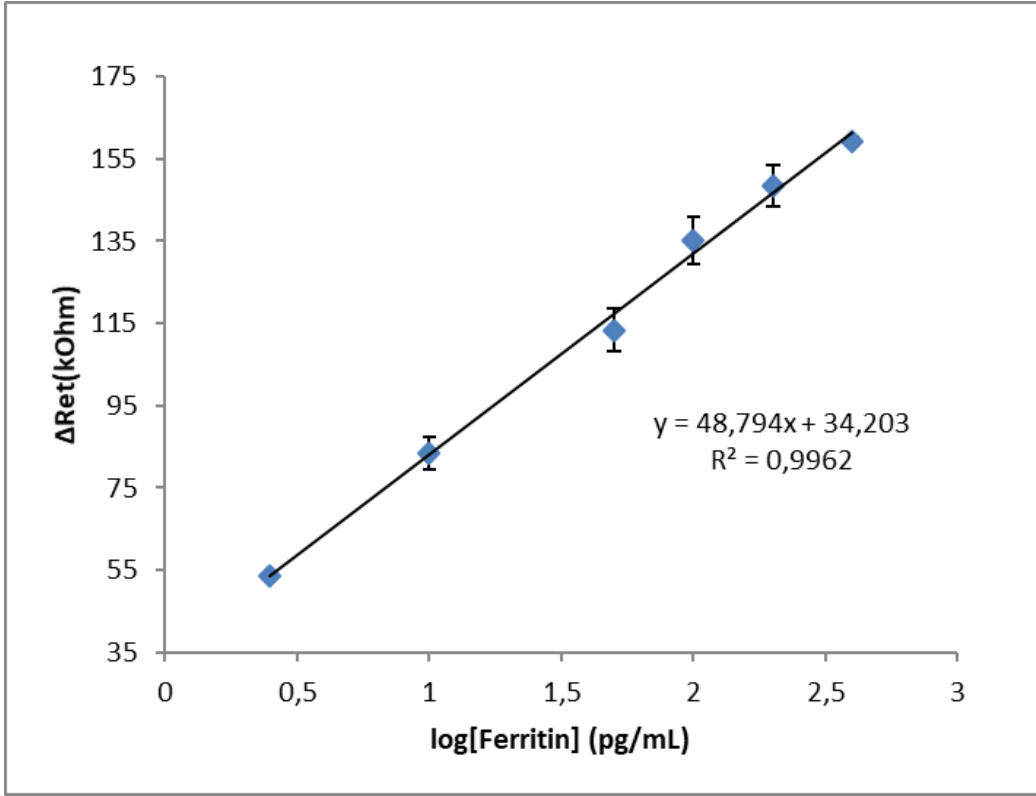
Farklı günlerde, aynı şartlarda hazırlanan biyosensörler ile alınan sonuçlar birbirine çok yakındır. Elde edilen eğim değerlerinin birbiriyle uyumlu olması, aynı ferritin konsantrasyonlarında yaklaşık olarak aynı R_{et} değerlerinin elde edildiğini göstermektedir. R^2 değerlerinin tamamının 1’e çok yakın olması ise, tüm biyosensörlerin doğrusallık değerlerinin yüksek olduğunu ifade etmektedir.

3.4.3 Tekrarlanabilirlik

Afinite temelli biyosensörlerde, antijen – antikor kompleksi oluşturulduktan sonra, sensörün rejenere edilerek yüzeyin antijenlerden arındırılması işlemi zordur. Dolayısıyla ölçüm alınan bir afinite temelli biyosensörde, aynı konsantrasyondaki analitin tekrar tekrar ölçülebilmesi için, yüzeyin oldukça iyi bir şekilde rejenere edilmesi gerekmektedir.

Tez kapsamında geliştirilen ferritin biyosensörünün rejenerasyon denemeleri sonuçsuz kaldı. Yapılan denemeler sonrasında yüzeyin bozulduğu ve verilen cevabın büyük oranda düştüğü görüldü. Bu nedenle tekrarlanabilirlik özelliğinin belirlenmesi amacıyla, tekrar üretilebilirlik denemelerinden elde edilen veriler kullanıldı.

Bu amaçla, tekrar üretilebilirlik denemelerinde her bir ferritin konsantrasyonu için elde edilen R_{et} değerlerinin ortalaması alınarak yeni bir kalibrasyon eğrisi elde edildi. Her bir konsantrasyona karşılık 5 farklı deneme sonucu elde edilen 5 farklı R_{et} değerinin ortalaması alınarak, grafikte yer alan noktaların standart sapma değerleri hesaplandı. Ayrıca söz konusu noktalara hata çubukları eklendi. Elde edilen grafik Şekil 3.18’de gösterilmiştir.



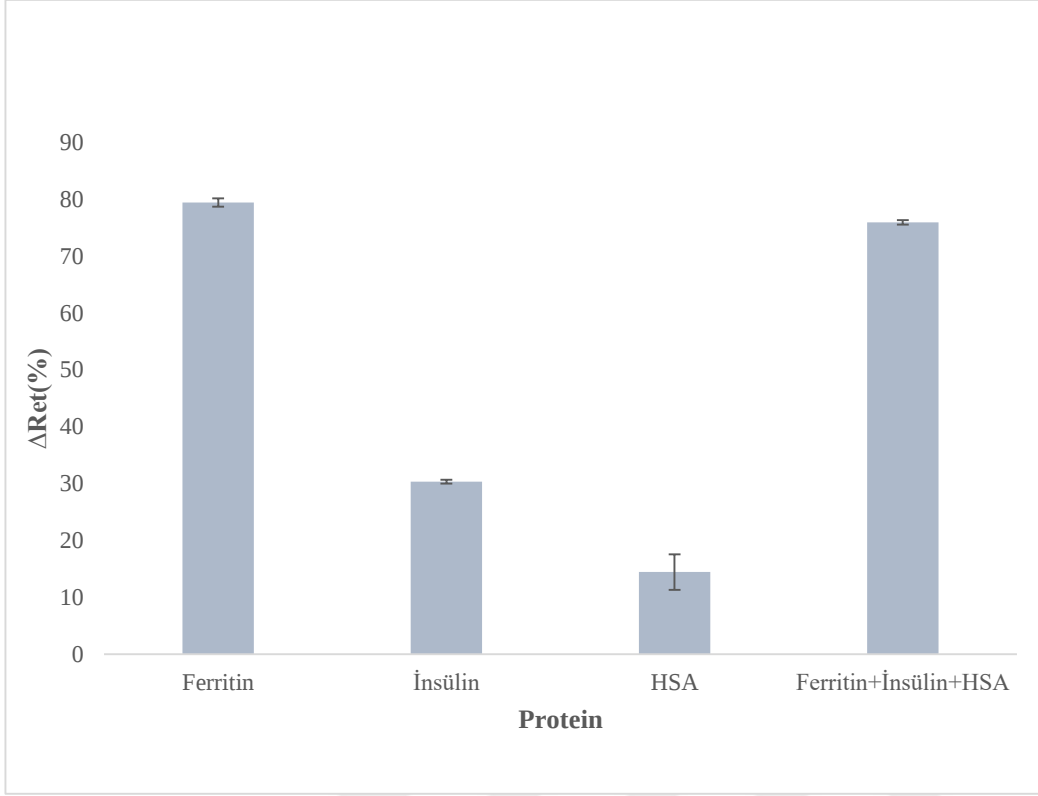
Şekil 3.18 Ferritin biyosensörünün tekrarlanabilirliği.

Biyosensörün tekrarlanabilirlik özelliğinin belirlenebilmesi için 2,5 pg/mL için elde edilen verilerin ($n=5$) ortalama değer ($\bar{X}$), standart sapma (S.S.) ve varyasyon katsayısı (V. K.) değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar sırasıyla 2,51 pg/mL, $\pm 0,071$ pg/mL ve % 2,82'dir. Sonuçlar, biyosensörün tekrarlanabilirlik için makul sınırlar içinde olduğunu, dolayısıyla ferritin biyosensöründen tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebileceğini gösterdi. Geliştirilen biyosensör için tayin limiti değeri (limit of detection – LOD) $3 S_b/m$ formülüne göre hesaplandı (Vega et al. 2007). Formülde m kalibrasyon grafiğine ait olan doğru denkleminin eğimini, S_b ise söz konusu grafiğe ait olan en düşük konsantrasyonun standart sapma değerini ifade etmektedir. Tayin sınırı (LOD) 4,4 fg/mL'dir. Bu da biyosensörün oldukça düşük tayin limitine sahip olduğunu göstermektedir.

3.4.4 Biyosensörün seçimliliği

Bir analit için yeni bir tayin yöntemi geliştirilirken, hedef madde için yüksek hassasiyete sahip bir sistem geliştirmek kadar, ilgilenilen maddeye yüksek düzeyde seçimli olması da oldukça önemli bir parametredir. Bir başka deyişle, geliştirilen biyosensör hedef madde için yüksek, bunun dışındaki diğer nonspesifik maddeler içinse düşük seçimlilik özelliği göstermelidir (Holford, Davis, and Higson 2012). Bu amaçla geliştirilen biyosensörün insülin ve insan serum albüminine (HSA) karşı seçimliliği test edildi.

Tez çalışmasının bu aşamasında optimum koşullarda hazırlanan farklı biyosensörlere ferritin, insülin ve HSA çözeltileri 30'ar dakika boyunca inkübe edildi. Çözeltilerin konsantrasyonları, kullanılan proteinlerin serumdaki normal değerleri dikkate alınarak hazırlandı. Buna göre ferritin, insülin ve HSA konsantrasyonları sırasıyla 200, 1300 ve 3800 pg/mL olarak hazırlandı. Denemeler, her bir proteinin çözeltisiyle ayrı ayrı yapıldıktan sonra, tüm proteinlerin belirtilen konsantrasyonlardaki karışımını içeren farklı bir çözeltisi ile de tekrar edildi (n=3).



Şekil 3.19 Biyosensörün seçimliliği.

Tablo 3.12 Biyosensörün ferritin, insülin, HSA ve bu üç proteinin karışımını içeren protein çözeltilerine karşı verdiği yanıt.

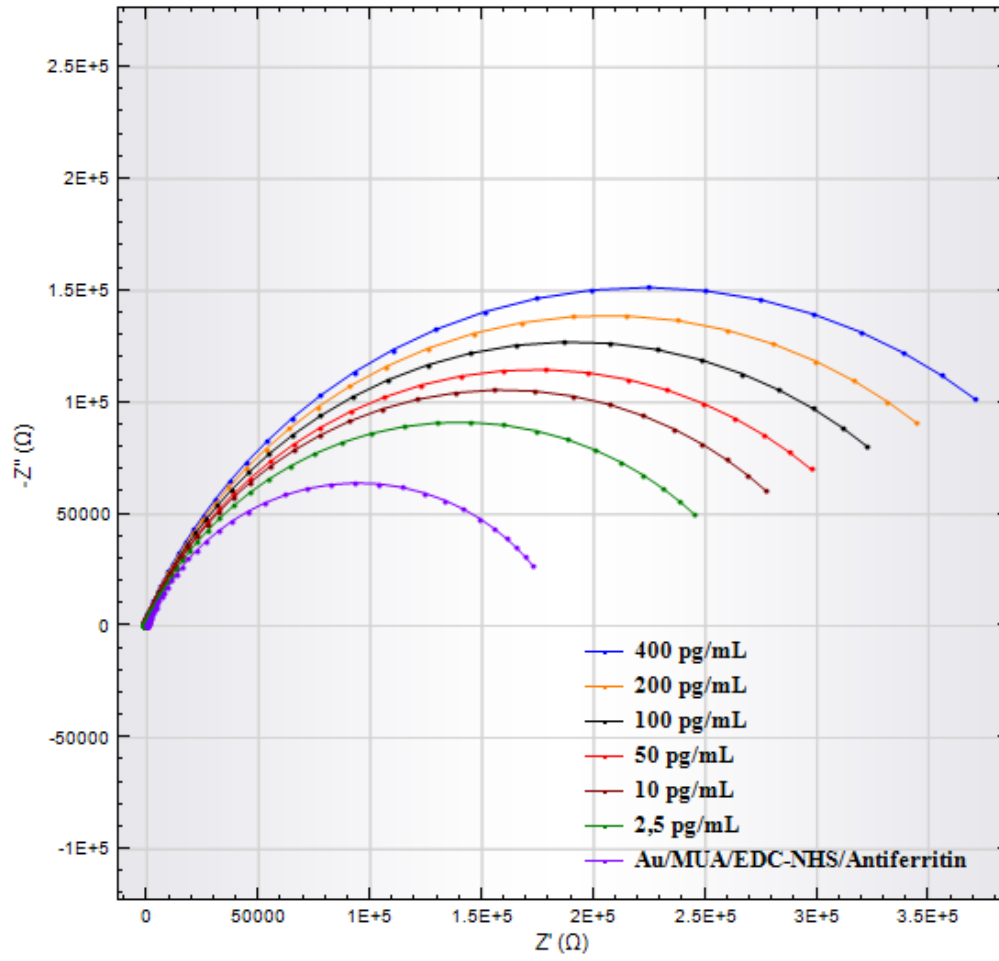
Protein	Konsantrasyon (pg/mL)	ΔRet (%)
Ferritin	200	79,95
İnsülin	1300	30,57
HSA	3800	16,66
Ferritin+İnsülin+HSA	200+1300+3800	75,65

Her bir çözeltiye ait denemeler üç kez tekrar edildi. Elde edilen ΔRet değerlerinin ortalamaları alınarak standart sapmalar hesaplandı. Elde edilen verilerle Şekil 3.19'daki grafik elde edildi. Bu grafiğe göre 200 pg/mL ferritin proteini, antikor immobilize edilmiş biyosensörün cevabını % 79,95 oranında arttırdı. Bu denli yüksek bir artış insülin ve HSA için söz konusu olmasa da, insülinin girişim etkisi % 30,57 düzeyinde olup, göz ardı edilemeyecek büyüklüktedir. HSA ise diğer iki proteine göre %16,66'lık bir cevap artışıyla daha düşük bir etki gösterdi. Üç proteinin karışımından oluşan çözelti ile yapılan ölçümlerde ise %75,65 oranında bir artış kaydedildi. Bu sonuç ferritin ile elde edilen sonuca çok yakındır. Dolayısıyla insülin ve HSA, ferritin varlığında antikor ile etkileşim için yarışmalı bir tepkimeye girmiş; fakat ferritinin yüksek spesifikliği nedeniyle ferritin – antiferritin kompleksi oluşmuş ve bu nedenle neredeyse sadece ferritinin olduğu koşullarda gösterdiği sinyal artış oranını göstermiş olabilir.

Bu sonuç, biyosensörün ferritine karşı yüksek düzeyde seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.

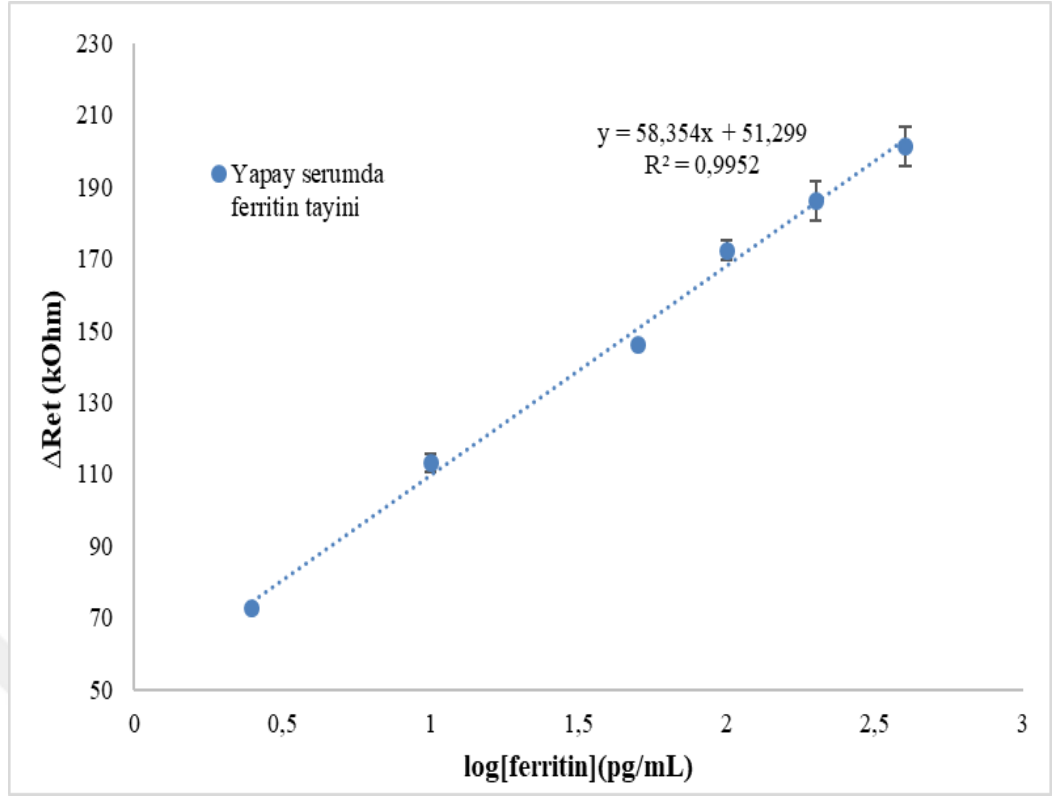
3.4.5 Yapay serumda ferritin tayini

Tez çalışmalarının son bölümünde, optimize edilmiş şartlarda hazırlanan biyosensör ile yapay serumda hazırlanan ferritinin farklı konsantrasyonları kullanılarak impedans ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucunda elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 3.20'de gösterilmiştir. Bu eğrilerden hesaplanan ΔRet değerleri ve ferritin konsantrasyonlarının değerleri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 3.21'de yer almaktadır.



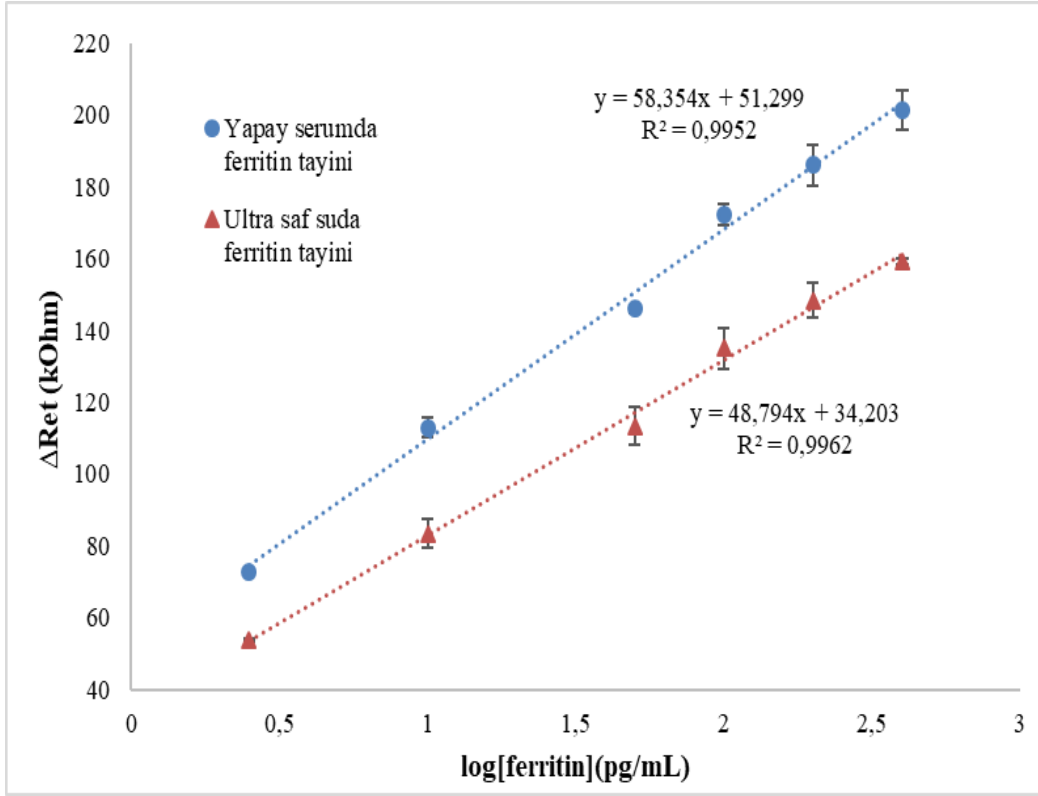
Şekil 3.20 Yapay serumda hazırlanan ferritin çözeltileri ile yapılan impedans ölçümlerinden elde edilen Nyquist eğrileri.

Bu eğrilerden hesaplanan ΔR_{et} değerleri ve ferritin konsantrasyonlarının değerleri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 3.21’de yer almaktadır.



Şekil 3.21Yapay serum kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiği (n=3).

Yapay serum ile hazırlanan ferritin çözeltilerinin farklı konsantrasyonları ile gerçekleştirilen ölçümler (n=3) sonucunda, doğrusallık katsayısı yüksek bir kalibrasyon eğrisi elde edildi. Bu eğriye ilişkin eğim değeri 58,354'tür. Bu değer ultra saf suda hazırlanan ferritin ile yapılan ölçümler sonucunda oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğim değerine (48,794) yakındır; ancak bu değerden yüksektir.



Şekil 3.22 Yapay serum ve ultra saf suda çözülen ferritin ile oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılması.

Şekil 3.22’de, farklı ortamlarda hazırlanan ferritin ile yapılan impedans ölçümleri sonucunda elde edilen kalibrasyon eğrileri yer almaktadır. Her iki denemede de doğrusallık katsayısı yüksek eğriler elde edilmektedir. İki eğrinin eğimleri arasında meydana gelen fark, yapay serum çözeltisinde yer alan tuzlar ve diğer biyomoleküllerin etkisiyle meydana gelmiştir. Ancak 3 tekrarlı deneylerin birbirleriyle uyumlu sonuç vermesi ve aradaki eğim farkının az olması, geliştirilen biyosensörün doğal serum örneklerinde de kullanım potansiyelinin olduğunu, söz konusu örneklerde de hassas ve girişimci etkilerinden uzak tayin yapılabileceğini göstermektedir.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS), elektrokimyasal sistemlerin karakterizasyonunda kullanılabilen bir deneysel yöntemdir. Bu yöntem, incelenen elektrokimyasal sistem üzerinde bir dizi frekans taraması yaparak impedans ölçümüne olanak tanır. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi yöntemi, elektrokimyasal sistemlerin elektrokimyasal karakteristikleri ile ilgili bilgi sağlama konusundaki en etkin ve en güvenilir yöntemlerden biridir. Elde edilen bilgiler söz konusu sistemlerin çift katman kapasitansı, difüzyon impedansı, yük aktarım ve yük taşıma işlemlerinin oranının belirlenmesi ve çözelti direnci ile ilgilidir. EİS, özellikle de birden fazla basamaklı reaksiyonların yer aldığı sistemlerde, sistemin elektron taşınım reaksiyonlarının, kaplamalı kimyasal reaksiyonların, adsorpsiyon proseslerinin ve bağlanma – ayrışma özellikli kimyasal proseslerin anlaşılmasına olanak tanıyan günümüzün en önemli tekniklerinden biri haline gelmiştir.

Bu tez projesi kapsamında, ferritin proteininin tayine yönelik bir biyosensör sistemi geliştirildi. Yüzey modifikasyon çalışmalarının her basamağı, elektrokimyasal impedans spektroskopisi ve döngüsel voltammetri ölçümleri ile test edildi ve sensör yüzey karakterizasyonlarındaki farklanmalar, duyarlı bir şekilde ölçülerek tespit edildi.

Çalışmalarda, ilk olarak altın elektrodun modifikasyon yöntemleri geliştirildi. Bunun için elektrot yüzeyinde ilk olarak SAM tabakası oluşturularak, kullanılacak biyomolekülün elektrot yüzeyine iyi bir şekilde bağlanabilmesi için yüzey modifikasyonu gerçekleştirildi. Bu aşamada, 11 – MUA kullanıldı ve SAM oluşumunun optimizasyonu için optimum 11 – MUA derişimi ve optimum inkübasyon süreleri belirlendi. İkinci aşamada, 11 – MUA uçlarının aktivasyonu için EDC – NHS kimyasından yararlanıldı. Optimum EDC – NHS konsantrasyonları belirlendi. Son aşamada ise antiferritin yüzeye immobilizasyonu ile ferritin tayini yapıldı.

Denemeler sonucunda optimum 11 – MUA konsantrasyonu, optimum inkübasyon süresi, optimum EDC – NHS konsantrasyonları sırasıyla 2,5 mM, 16 saat, 0,3 M – 0,1 M olarak belirlendi.

EDC-NHS çözeltisinde gerçekleştirilen aktivasyondan en iyi verimi alabilmek için, işlemin sabit ve çalkalamalı ortamlarda ayrı ayrı denemeleri yapıldı. Sonuçlar, çalkalamalı ortamda yapılan inkübasyondan daha yüksek antijen immobilizasyonu verimi alındığını gösterdi.

Antikoru en uygun konsantrasyonu ve en uygun inkübasyon süresi ise sırasıyla 10 ng/mL ve 30 dakika olarak belirlendi.

Ferritinin tayini aşamasında, yüzeyde antikor – antijen etkileşimi için gerekli zamana yönelik çalışmalar yapıldı. Bu amaçla gerçekleştirilen denemeler neticesinde, en iyi yanıtların 30 dakikalık ferritin inkübasyonları ile alındığı anlaşıldı.

Karakterizasyona ilişkin çalışmalarda, biyosensör sisteminin doğrusal tayin aralığı, tekrar üretilebilirliği ve tekrarlanabilirliği belirlendi. 2,5 – 400 pg/mL ferritin konsantrasyonu aralığında alınan sonuçların doğrusal olduğu saptandı. Literatürde Chou ve arkadaşları tarafından geliştirilen yüzey plazmon rezonansı (SPR) temelli biyosensör ile 0,2 – 200 ng/mL aralığında ferritin tayini yapılabilmektedir (S. F. Chou et al. 2004). Yang ve arkadaşları tarafından geliştirilen amperometrik biyosensör ile 1 – 5 ng/mL ve 5 – 120 ng/mL aralığında ferritin tayini gerçekleştirilmiştir (Yang et al. 2009).

5 tekrarlı denemelerde alınan birbirine yakın sonuçlar, tekrar üretilebilir ve tekrarlanabilir bir biyosensör sisteminin geliştirilebildiğini kanıtladı. 2,5 pg/mL ferritin konsantrasyonu için alınan 5 farklı ölçüm sonucunda ortalama değer ($\bar{X}$), standart sapma (S.S.) ve varyasyon katsayısı (V. K.) değerleri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar sırasıyla 2,51 pg/mL, $\pm 0,071$ pg/mL ve % 2,82'dir. Tayin sınırı (LOD) 4,4 fg/mL, olarak bulundu.

Geliştirilen biyosensör sisteminin seçicilik özelliğine yönelik yapılan çalışmalarda, serumda bulunma potansiyeli olan proteinler olan insülin ve HSA ile ölçümler alındı. Bu ölçümler sonucunda biyosensörün R_{et} değerindeki artış oranı insüline ve HSA'ya karşı sırasıyla % 30,57 ve % 16,66 olarak kaydedildi. Aynı koşullarda hazırlanan biyosensörün R_{et} değerindeki artış oranı ferritin için % 79,95 düzeyindedir. Söz konusu proteinlerin birlikte bulunduğu çözelti ortamında R_{et} değerindeki artışın % 75,65 düzeyinde olması, geliştirilen biyosensörün diğer proteinler varlığında ferritine karşı daha duyarlı olduğunu, diğer proteinlerin girişim etkilerinin zayıf kaldığını gösterdi.

Yapay serumda hazırlanan ferritin çözeltilerinin 2,5 - 10 – 50 – 100 – 200 – 400 pg/mL’lik derişimleri ile yapılan ölçümler sonucunda elde edilen sonuçlarla doğrusal tayin aralığında belirlenen kalibrasyon eğimine yakın değerde bir eğim değeri elde edildi ve yüksek değerde doğrusallık katsayısı elde edildi. Bu sonuç, serum ferritin düzeylerini belirlemede kullanılma potansiyeli olan bir biyosensör geliştirildiğini göstermektedir.

Geliştirilen biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon basamaklarına ilişkin elde edilen sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 Ferritin tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçları.

Optimizasyon Adımları	
Antijen türü	Ferritin H zinciri
Çözücü	Ultra saf su
11 – MUA konsantrasyonu	2,5 mM
11 – MUA inkübasyon süresi	16 saat
EDC – NHS derişimi	0,3 – 0,1 M
EDC – NHS inkünasyon yöntemi	Karıştırmalı ortam
Antikor derişimi	10 ng/mL
Antikor inkübasyon süresi	30 dakika
Ferritin inkübasyon süresi	30 dakika

Karakterizasyon Adımları

Doğrusal tayin aralığı	2,5 – 400 pg/mL ferritin $y=49,11x+35,483$ $R^2=0,9955$
	1 $y = 48,036x + 33,273$ $R^2=0,9971$
	2 $y = 48,558x + 31,339$ $R^2=0,9930$
Tekrar üretilebilirlik	3 $y = 48,506x + 36,763$ $R^2=0,9964$
	4 $y = 46,100x + 35,93$ $R^2=0,9966$
	5 $y = 48,140x + 36,237$ $R^2=0,9960$
Tekrarlanabilirlik	$(\bar{X})= 2,51$, S.S.= 0,071 ve V. K.= % 2,82 LOD= 4,4 fg/mL
Seçimlilik	$\Delta Ret_{\text{Ferritin}}=\%79,95$ $\Delta Ret_{\text{İnsülin}}=\%30,57$ $\Delta Ret_{\text{HSA}}=\%16,66$ $\Delta Ret_{\text{Ferritin+İnsülin+HSA}}=\%75,65$
Yapay serumda doğrusal tayin aralığı	2,5 – 400 pg/mL ferritin $y=58,345x+51,299$ $R^2=0,9952$

Tez projesi kapsamında yapılan tüm deneylerin her aşamasında uygulanan impedans ölçümlerinde, EİS'nin duyarlı, hassas, herhangi bir işaretleyiciye ihtiyaç duymayan ve katalitik özellik göstermeyen moleküllerin de kullanıldığı sensörlerde cevap verme gibi üstün özelliklerinden yararlanıldı. Bu yöntemle geliştirilen biyosensör sistemi, hâlihazırda ferritin tayini için kullanılan yöntemlere düşük maliyeti, tekrarlanabilir sonuçları, düşük tayin alt sınırı ve hızlı tayin (yaklaşık 37 dakika) imkânı gibi özellikleriyle güçlü bir alternatif olma potansiyeli taşımaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdelghani, A., S. Hleli, and K. Cherif. 2002. "Optical and Electrochemical Characterization of Self-Assembled Octadecyltrichlorosilane Monolayer on Modified Silicon Electrode." *Materials Letters* 56(6): 1064–68.
- Alfonta, Lital et al. 2001. "Chronopotentiometry and Faradaic Impedance Spectroscopy as Signal Transduction Methods for the Biocatalytic Precipitation of an Insoluble Product on Electrode Supports: Routes for Enzyme Sensors, Immunosensors and DNA Sensors." *Biosensors and Bioelectronics* 16(9–12): 675–87.
- Alkhateeb, Ahmed A., Bing Han, and James R. Connor. 2013. "Ferritin Stimulates Breast Cancer Cells through an Iron-Independent Mechanism and Is Localized within Tumor-Associated Macrophages." *Breast Cancer Research and Treatment* 137(3): 733–44. <http://link.springer.com/10.1007/s10549-012-2405-x> (April 7, 2018).
- Anh, Tuan Mai et al. 2004. "Conductometric Tyrosinase Biosensor for the Detection of Diuron, Atrazine and Its Main Metabolites." *Talanta* 63(2): 365–70. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914003006635?via%3Dihub> (November 2, 2017).
- Barbaro, Aurelio et al. 1992. "CHEMFET Devices for Biomedical and Environmental Applications." *Advanced Materials* 4(6): 402–8. <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.19920040605> (November 2, 2017).
- Bartlett, Philip N. (Philip Nigel). 2008. *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*. John Wiley & Sons. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=UE2TS6K3Pz0C&oi=fnd&pg=PR5&ots=7v-3X_jcOn&sig=Injbv-cGWO0ObdIDijN0cQkbWpk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (November 1, 2017).
- Bedford, Erin E. et al. 2014. "Effect of SAM Chain Length and Binding Functions on Protein Adsorption: β -Lactoglobulin and Apo-Transferrin on Gold." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 116: 489–96. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776514000320> (February 19, 2018).
- Bordi, F., C. Cametti, and A. Gliozzi. 2002. "Impedance Measurements of Self-Assembled Lipid Bilayer Membranes on the Tip of an Electrode." *Bioelectrochemistry* 57(1): 39–46.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- “Bottom-up Approach to Interface Engineering - Molecular Self-Assembly on Metal Surfaces | Nanotech | Centro Universitario de Los Valles.” <http://nanotech.cuvalles.udg.mx/en/bottom-approach-interface-engineering-molecular-self-assembly-metal-surfaces> (December 10, 2017).
- Bryjak, Jolanta, Paulina Kruczkiewicz, Adriana Reku, and Wanda Peczyńska-Czoch. 2007. “Laccase Immobilization on Copolymer of Butyl Acrylate and Ethylene Glycol Dimethacrylate.” *Biochemical Engineering Journal* 35: 325–32. https://ac.els-cdn.com/S1369703X07000502/1-s2.0-S1369703X07000502-main.pdf?_tid=17c9443e-c8b3-11e7-a64d-00000aacb35e&acdnat=1510605898_e34418c774c398b4267f613fa8cb7205 (November 13, 2017).
- Cai, Wei et al. 2017. “An Electrochemical Impedance Biosensor for Hg²⁺ Detection Based on DNA Hydrogel by Coupling with DNAzyme-Assisted Target Recycling and Hybridization Chain Reaction.” *Biosensors and Bioelectronics* 98(May): 466–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.025>.
- Caras, Steve., and Jifi Janata. 1980. “Field Effect Transistor Sensitive to Penicillin.” *Analytical Chemistry* 52(12): 1935–37. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac50062a035> (November 2, 2017).
- Caruso, Frank et al. 1995. “Investigation of Immuno-Reactions in a Flow-Injection System Using Surface Plasmon Resonance.” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 103(3): 147–57. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/092777579503230B?via%3Dihub> (November 15, 2017).
- Cazzola, M et al. 1985. “Immunological Reactivity of Serum Ferritin in Patients with Malignancy.” *Tumori* 71(6): 547–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4082287> (February 16, 2018).
- Chaki, Nirmalya K., and K. Vijayamohanan. 2002a. “Self-Assembled Monolayers as a Tunable Platform for Biosensor Applications.” *Biosensors and Bioelectronics* 17(1–2): 1–12.
- Chaki, Nirmalya K., and K. Vijayamohanan. 2002b. “Self-Assembled Monolayers as a Tunable Platform for Biosensor Applications.” *Biosensors and Bioelectronics* 17(1–2): 1–12. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566301002779> (February 18, 2018).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chakraborty, Baidarbhi et al. 2013. "Lipoprotein(a), Ferritin, and Albumin in Acute Phase Reaction Predicts Severity and Mortality of Acute Ischemic Stroke in North Indian Patients Background: Inflammation Plays a Crucial Role in the Pathogenesis and Prognosis of." *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 22: e159–67. [http://www.strokejournal.org/article/S1052-3057\(12\)00357-6/pdf](http://www.strokejournal.org/article/S1052-3057(12)00357-6/pdf) (April 9, 2018).
- Cheng, Tzong-Jih, Tsun-Mei Lin, and Hsien-Chang Chang. 2002. "Physical Adsorption of Protamine for Heparin Assay Using a Quartz Crystal Microbalance and Electrochemical Impedance Spectroscopy." *Analytica Chimica Acta* 462(2): 261–73. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267002003355>.
- Cheung, Karen, Shady Gawad, and Philippe Renaud. 2005. "Impedance Spectroscopy Flow Cytometry: On-Chip Label-Free Cell Differentiation." *Cytometry Part A* 65A(2): 124–32. <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20141> (November 10, 2017).
- Chou, Howard a et al. 2003. "In v I v O CH 3 (CH 2) 11 SAu SAM Electrodes in the Beating Heart : In Situ Analytical Studies Rele v Ant to Pacemakers and Interstitial Biosensors." 18: 11–21.
- Chou, Shu Fen, Win Lin Hsu, Jing Min Hwang, and Chien Yuan Chen. 2004. "Development of an Immunosensor for Human Ferritin, a Nonspecific Tumor Marker, Based on Surface Plasmon Resonance." *Biosensors and Bioelectronics* 19(9): 999–1005. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566303003208> (March 1, 2018).
- Christian G. Bauer, † et al. 1996. "Zeptomole-Detecting Biosensor for Alkaline Phosphatase in an Electrochemical Immunoassay for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid." <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac960218x> (October 31, 2017).
- Clark, Lc C, and C Lyons. 1962. "Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery." *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 102(1): 29–45. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x/full%5Cnhttp://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Colapicchioni, C., A. Barbaro, F. Porcelli, and I. Giannini. 1991. "Immunoenzymatic Assay Using CHEMFET Devices." *Sensors and Actuators: B. Chemical* 4(3–4): 245–50. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0925400591801173?via%3Dihub> (November 2, 2017).
- Collings, A. F., and Frank Caruso. 1997. "Biosensors: Recent Advances." *Reports on Progress in Physics* 60(11): 1397–1445.
- Collings, A, and Frank Caruso. 1997. "Reports on Progress in Physics Related Content Trends in Interfacial Design for SPR Based Immunoassays Dhesingh Ravi Shankaran and Norio Miura." *Rep. Prog. Phys* 60. <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0034-4885/60/11/005/pdf> (November 12, 2017).
- D'Orazio, Paul. 2003. "Biosensors in Clinical Chemistry." *Clinica Chimica Acta* 334(1–2): 41–69.
- Dandliker, W. B. et al. 1967. "The Effect of Chaotropic Ions on the Dissociation of Antigen-Antibody Complexes." *Biochemistry* 6(5): 1460–67. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00857a031> (February 16, 2018).
- Daniels, Jonathan S, and Nader Pourmand. 2007. "Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges." *Electroanalysis* 19(12): 1239–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18176631> (December 18, 2017).
- Ding, Shinn Jyh et al. 2005a. "Impedance Spectral Studies of Self-Assembly of Alkanethiols with Different Chain Lengths Using Different Immobilization Strategies on Au Electrodes." *Analytica Chimica Acta* 554(1–2): 43–51.
- . 2005b. "Impedance Spectral Studies of Self-Assembly of Alkanethiols with Different Chain Lengths Using Different Immobilization Strategies on Au Electrodes." *Analytica Chimica Acta* 554(1–2): 43–51. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267005014431> (February 13, 2018).
- Eggins, Brian R. 2002. *Chemical Sensors and Biosensors*. J. Wiley. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=ERGSaMZPM9sC&oi=fnd&pg=PR15&ots=7Iq_ulhs10&sig=PS1-SiG_2nyS94Qj6VyUFFhVlOg&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (October 30, 2017).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ekeroth, Johan et al. 2002. "Monitoring the Interfacial Capacitance at Self-Assembled Phosphate Monolayers on Gold Electrodes upon Interaction with Calcium and Magnesium." *Analytical Chemistry* 74(9): 1979–85.
- Farrell, Svetlana, Niina J. Ronkainen-Matsuno, H. Brian Halsall, and William R. Heineman. 2004. "Bead-Based Immunoassays with Microelectrode Detection." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379(3): 358–67. <http://link.springer.com/10.1007/s00216-004-2632-z> (November 2, 2017).
- Fernández-Fernández, María, M Ángeles Sanromán, and Diego Moldes. 2013. "Recent Developments and Applications of Immobilized Laccase." *Biotechnology Advances* 31: 1808–25. https://ac.els-cdn.com/S073497501200064X/1-s2.0-S073497501200064X-main.pdf?_tid=443f880c-c971-11e7-a9ea-00000aab0f26&acdnat=1510687577_59ef566818c8aaa5fbd70a4dc8b0e145 (November 14, 2017).
- Fischer, M. J. 2010. "Amine Coupling through EDC/NHS: A Practical Approach." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 627: 55–73. http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-670-2_3 (February 20, 2018).
- Geddes, N J, E M Paschinger, J F Raboltb, and F Caruso. 1995. "Surface Chemical Activation of Quartz Crystal Microbalance Gold Electrodes - Analysis by Frequency Changes , Contact Angle Measurements and Grazing Angle FTIR." *Thin Solid Films* 260(2): 192–99. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040609094064741?via%3Dihub> (November 15, 2017).
- Gooding, J Justin, Freya Mearns, Wenrong Yang, and Jingquan Liu. 2003. "Self-Assembled Monolayers into the 21st Century: Recent Advances and Applications." *Electroanalysis* 15(2): 81–96. <http://dx.doi.org/10.1002/elan.200390017>.
- Grieshaber, Dorothee, Robert MacKenzie, Janos Vörös, and Erik Reimhult. 2008. "Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures." *Sensors* 2008, Vol. 8, Pages 1400-1458 8(3): 1400–1458. <http://www.mdpi.com/1424-8220/8/3/1400> (October 31, 2017).
- Guan, Jian Guo, Yu Qing Miao, and Qing Jie Zhang. 2004. "Impedimetric Biosensors." *Journal of bioscience and bioengineering* 97(4): 219–26.
- Gufler, Petra C., Dietmar Pum, Uwe B. Sleytr, and Bernhard Schuster. 2004. "Highly Robust Lipid Membranes on Crystalline S-Layer Supports Investigated by Electrochemical Impedance Spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1661(2): 154–65.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guilbault, George G., M. Pravda, M. Kreuzer, and C. K. O'Sullivan. 2004. "Biosensors—42 Years and Counting." *Analytical Letters* 37(8): 1481–96. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/AL-120037582>.
- Hafeman, Dean G, J Wallace Parce, and Harden M McConnell. 1988. "Light-Addressable Potentiometric Sensor For Biochemical Systems." *Science* 240(4856): 1182–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3375810> (November 2, 2017).
- Hamed, Amira I., and Wael Ahmed Yousry. 2012. "Correlation between Serum Ferritin and Insulin Resistance in Hepatitis C-Infected Egyptian Patients." *Egyptian Liver Journal* 2(2): 31–36. <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=01438841-201204000-00001> (April 9, 2018).
- Harrison, Pauline M., and Paolo Arosio. 1996. "The Ferritins: Molecular Properties, Iron Storage Function and Cellular Regulation." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1275(3): 161–203.
- HAZARD, JOANNE T., and JAMES W. DRYSDALE. 1977. "Ferritinaemia in Cancer." *Nature* 265(5596): 755–56. <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/265755a0> (February 16, 2018).
- Heinze, Jürgen. 1993. "Ultramicroelectrodes in Electrochemistry." *Angewandte Chemie International Edition in English* 32(9): 1268–88. <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.199312681> (November 2, 2017).
- Hleli, S. et al. 2006. "Atrazine Analysis Using an Impedimetric Immunosensor Based on Mixed Biotinylated Self-Assembled Monolayer." *Sensors and Actuators, B: Chemical* 113(2): 711–17. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400505006581#fig1> (February 13, 2018).
- Holford, Timothy R.J., Frank Davis, and Séamus P.J. Higson. 2012. "Recent Trends in Antibody Based Sensors." *Biosensors and Bioelectronics* 34(1): 12–24. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566311006919> (February 28, 2018).
- Hou, Yanxia et al. 2006. "Immobilization of Rhodopsin on a Self-Assembled Multilayer and Its Specific Detection by Electrochemical Impedance Spectroscopy." *Biosensors and Bioelectronics* 21(7): 1393–1402.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ibarra-Escutia, Pedro et al. 2010. "Amperometric Biosensor Based on a High Resolution Photopolymer Deposited onto a Screen-Printed Electrode for Phenolic Compounds Monitoring in Tea Infusions." *Talanta* 81(4–5): 1636–42. https://ac.els-cdn.com/S0039914010002110/1-s2.0-S0039914010002110-main.pdf?_tid=ee3f4bea-c970-11e7-a1b9-00000aacb360&acdnt=1510687433_f0265c5632434cc1c0ea237c6618d247 (November 14, 2017).
- Jacobs, A et al. 1972. "Ferritin in the Serum of Normal Subjects and Patients with Iron Deficiency and Iron Overload." *BMJ: British Medical Journal* 4(5834): 206–8. <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.4.5834.206>.
- Jain, Sachin, Vidhi Gautam, and Sania Naseem. 2011. "Acute-Phase Proteins: As Diagnostic Tool." *Journal of pharmacy & bioallied sciences* 3(1): 118–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21430962> (April 9, 2018).
- Jay, K et al. "World â€™ S Largest Science , Technology & Medicine Open Access Book Publisher Self - Assembled Monolayers of of Carbohydrate Carbohydrate Self-Assembled Monolayers Derivatives on Gold Gold Surfaces."
- Jenkins, Sarah H., William R. Heineman, and H. Brian Halsall. 1988. "Extending the Detection Limit of Solid-Phase Electrochemical Enzyme Immunoassay to the Attomole Level." *Analytical Biochemistry* 168(2): 292–99. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269788903211?via%3Dihub> (October 31, 2017).
- Jiang, Tongbo et al. 1995. "Capillary Enzyme Immunoassay with Electrochemical Detection for the Determination of Atrazine in Water." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(4): 1098–1104. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00052a044> (November 1, 2017).
- K'Owino, Isaac O., and Omowunmi A. Sadik. 2005. "Impedance Spectroscopy: A Powerful Tool for Rapid Biomolecular Screening and Cell Culture Monitoring." *Electroanalysis* 17(23): 2101–13.
- Katz, Eugenie, and Itamar Willner. 2003a. "Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors." *Electroanalysis* 15(11): 913–47.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- . 2003b. “Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors.” *Electroanalysis* 15(11): 913–47. file:///C:/Users/umut/Desktop/Katz_et_al-2003-Electroanalysis.pdf (February 5, 2018).
- Kırkalı, Ziya et al. 1999. “Serum Ferritin as a Clinical Marker for Renal Cell Carcinoma: Influence of Tumor Size and Volume.” *Urologia Internationalis* 62(1): 21–25. <https://www.karger.com/Article/FullText/30349> (February 16, 2018).
- Kissinger, Peter, and William R. Heineman. 1996. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. Marcel Dekker, Inc. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300299025> (November 1, 2017).
- Krishna, Gowri et al. 2001. “Tethered Bilayer Membranes Containing Ionic Reservoirs: The Interfacial Capacitance.” *Langmuir* 17(16): 4858–66.
- Krommenhoek, E. E. et al. 2006. “Monitoring of Yeast Cell Concentration Using a Micromachined Impedance Sensor.” *Sensors and Actuators, B: Chemical* 115(1): 384–89. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400505008221> (November 10, 2017).
- League of nations. Secretariat. Information section., and (L. 1929. 2 Journal of the International Federation of Clinical Chemistry *The League from Year to Year*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10148952> (November 1, 2017).
- Lee, Hye-Jin et al. 2009. “A Sensitive Method to Detect Escherichia Coli Based on Immunomagnetic Separation and Real-Time PCR Amplification of Aptamers.” *Biosensors and Bioelectronics* 24(12): 3550–55. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566309002723> (February 20, 2018).
- Lee, Jung Wook, Sang Jun Sim, Sung Min Cho, and Jeewon Lee. 2005. “Characterization of a Self-Assembled Monolayer of Thiol on a Gold Surface and the Fabrication of a Biosensor Chip Based on Surface Plasmon Resonance for Detecting Anti-GAD Antibody.” *Biosensors and Bioelectronics* 20(7): 1422–27. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566304002040> (February 18, 2018).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, Juan et al. 2011. "Carboxymethylated Dextran-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Regenerable Bioseparation." *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 11(11): 10187–92. <http://www.ingentaconnect.com/content/10.1166/jnn.2011.5002> (February 20, 2018).
- Lisdat, F., and D. Schäfer. 2008. "The Use of Electrochemical Impedance Spectroscopy for Biosensing." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391(5): 1555–67. <http://link.springer.com/10.1007/s00216-008-1970-7> (November 6, 2017).
- Liu, Yuxin et al. 2003. "Novel Approach to Form and Pattern Sol – Gel Glass Thin and Thick Films." 88: 75–79.
- Lukina, E. A., A. A. Levina, R. A. Mokeeva, and Tokarev YuN. 1993. "The Diagnostic Significance of Serum Ferritin Indices in Patients with Malignant and Reactive Histiocytosis." *British journal of haematology* 83(2): 326–29. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.1993.tb08289.x> (February 16, 2018).
- Macdonald, J. Ross. 1987. "Impedance Spectroscopy and Its Use in Analyzing the Steady-State AC Response of Solid and Liquid Electrolytes." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 223(1–2): 25–50. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/002207288785249X> (November 6, 2017).
- Meadows, David. 1996. "Recent Developments with Biosensing Technology and Applications in the Pharmaceutical Industry." *Advanced Drug Delivery Reviews* 21(3): 179–89.
- Mimica, Danica et al. 2004. "Biomimetic Electroreduction of O₂ by Hemoglobin in a Surfactant Film: Preliminary Electrochemical Impedance Spectroscopy Insight." *Electroanalysis* 16(19): 1632–36.
- Mishra, Geetesh K., Atul Sharma, and Sunil Bhand. 2015. "Ultrasensitive Detection of Streptomycin Using Flow Injection Analysis-Electrochemical Quartz Crystal Nanobalance (FIA-EQCN) Biosensor." *Biosensors and Bioelectronics* 67: 532–39. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566314007209> (February 20, 2018).
- Mohanty, Saraju P., and Elias Koucias. 2006. "Biosensors: A Tutorial Review." *IEEE Potentials* 25(2): 35–40. <http://ieeexplore.ieee.org/document/1649009/> (October 23, 2017).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moritz, W. et al. 1992. "Diversiform Applications of LaF₃ for Chemical Semiconductor Sensors." *Sensors and Actuators: B. Chemical* 7(1–3): 497–500. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/092540059280351W> (November 10, 2017).
- Muhammad-Tahir, Zarini, and Evangelyn C. Alocilja. 2003. "A Conductometric Biosensor for Biosecurity." In *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, 813–19. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566303000204?via%3Dihub> (November 2, 2017).
- Nakajima, Naoki, and Yoshito Ikada. 1995. "Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media." *Bioconjugate Chemistry* 6(1): 123–30. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc00031a015> (February 20, 2018).
- Nam, Kwangwoo, Tsuyoshi Kimura, and Akio Kishida. 2008. "Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents." *Macromolecular Bioscience* 8(1): 32–37. <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.200700206> (February 20, 2018).
- Noah, Naumih M. et al. 2011. "Immunosensors for Quantifying Cyclooxygenase 2 Pain Biomarkers." *Clinica Chimica Acta* 412(15–16): 1391–98. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898111002117?via%3Dihub> (February 7, 2018).
- Papariello, G. J., A. K. Mukherji, and C. M. Shearer. 1973. "A Penicillin Selective Enzyme Electrode." *Analytical Chemistry* 45(4): 790–92. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60326a032> (November 2, 2017).
- Park, In-Seon, Woo-Yeon Kim, and Namsoo Kim. 2000. "Operational Characteristics of an Antibody-Immobilized QCM System Detecting Salmonella Spp." *Biosensors and Bioelectronics* 15(3–4): 167–72. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566300000531> (February 16, 2018).
- Puchades, R., and A. Maquieira. 1996. "Recent Developments in Flow Injection Immunoanalysis." *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 26(4): 195–218. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408349608050574> (November 1, 2017).
- Purrucker, Oliver, Heiko Hillebrandt, Klaus Adlkofer, and Motomu Tanaka. 2001. "Deposition of Highly Resistive Lipid Bilayer on Silicon-Silicon Dioxide Electrode and Incorporation of Gramicidin Studied by Ac Impedance Spectroscopy." *Electrochimica Acta* 47(5): 791–98.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Quan, Xinfeng, Jeffrey D Madura, and Geoffrey R Hutchison. "Self-Assembled Monolayer Piezoelectrics: Electric-Field Driven Conformational Changes." <https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/1706/1706.08993.pdf> (February 20, 2018).
- Rodríguez-Delgado, Melissa M. et al. 2015. "Laccase-Based Biosensors for Detection of Phenolic Compounds." *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 74: 21–45. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993615002290#f0015> (November 13, 2017).
- Rogers, K. R. 2006. "Recent Advances in Biosensor Techniques for Environmental Monitoring." *Analytica Chimica Acta* 568(1–2): 222–31. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267006000742> (October 30, 2017).
- Ronkainen-Matsuno, Niina J., Jennifer H. Thomas, H. Brian Halsall, and William R. Heineman. 2002. "Electrochemical Immunoassay Moving into the Fast Lane." *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 21(4): 213–25. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993602004016?via%3Dihub> (October 31, 2017).
- Saberi, Fatemeh et al. 2016. "Development of Surface Plasmon Resonance-Based Immunosensor for Detection of Brucella Melitensis." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 27(11): 1960–65. <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0103-5053.20160085> (February 20, 2018).
- Sam, S. et al. 2010a. "Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces." *Langmuir* 26(2): 809–14. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la902220a> (February 13, 2018).
- . 2010b. "Semiquantitative Study of the EDC/NHS Activation of Acid Terminal Groups at Modified Porous Silicon Surfaces." *Langmuir* 26(2): 809–14. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la902220a> (February 19, 2018).
- "Scopus - Analyze Search Results." <https://www.scopus.com/term/analyzer.uri?sid=a9b5111b79ff4e74ca20fa89c5b076ab&origin=resultslist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY%28biosensor%29&sort=plf-f&sdt=b&sot=b&sl=24&count=62947&analyzeResults=Analyze+results&txGid=3cefc7f4b66ab49d4ccd5388adc4a9cc#zip> (April 7, 2018).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sharma, R. et al. 2016. "Label-Free Electrochemical Impedance Biosensor to Detect Human Interleukin-8 in Serum with Sub-Pg/ml Sensitivity." *Biosensors and Bioelectronics* 80: 607–13. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656631630135X> (February 16, 2018).
- Shishkanova, T. V., R. Volf, M. Krondak, and V. Král. 2007. "Functionalization of PVC Membrane with Ss Oligonucleotides for a Potentiometric Biosensor." *Biosensors and Bioelectronics* 22(11): 2712–17. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566306005495?via%3Dihub> (November 2, 2017).
- Sonuç, Münteşa Nur, and Mustafa Kemal Sezgintürk. 2014. "Ultrasensitive Electrochemical Detection of Cancer Associated Biomarker HER3 Based on Anti-HER3 Biosensor." *Talanta* 120: 355–61. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914013009788> (February 28, 2018).
- Stevens, Priscilla Wilkins, Maria R. Hansberry, and David M. Kelso. 1995. "Assessment of Adsorption and Adhesion of Proteins to Polystyrene Microwells by Sequential Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Analysis." *Analytical Biochemistry* 225(2): 197–205. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326978571144X> (February 15, 2018).
- Su, Xiao Li, and Yanbin Li. 2004. "A Self-Assembled Monolayer-Based Piezoelectric Immunosensor for Rapid Detection of Escherichia Coli O157:H7." *Biosensors and Bioelectronics* 19(6): 563–74. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566303002549> (February 18, 2018).
- Thomas, Jennifer H. et al. 2003. "Microdrop Analysis of a Bead-Based Immunoassay." *Microchemical Journal* 74(3): 267–76. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X03000365?via%3Dihub> (November 2, 2017).
- Tlili, Chaker et al. 2005. "Electrochemical Impedance Probing of DNA Hybridisation on Oligonucleotide-Functionalised Polypyrrole." *Talanta* 68(1): 131–37. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914005002572> (February 13, 2018).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Touitou, Yvan et al. 1985. "Plasma Ferritin in Old Age. Influence of Biological and Pathological Factors in a Large Elderly Population." *Clinica Chimica Acta* 149(1): 37–45. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009898185902712> (September 1, 2017).
- Trojanowicz, Marek, Malgorzata Szewczynska, and Marzena Wcislo. 2003. "Electroanalytical Flow Measurements-Recent Advances." *Electroanalysis* 15(5–6): 347–65. <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.200390041> (November 1, 2017).
- Turner, Anthony P F, Beining Chen, and Sergey A. Piletsky. 1999. "In Vitro Diagnostics in Diabetes: Meeting the Challenge." *Clinical Chemistry* 45(9): 1596–1601.
- Ulman, Abraham. "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers." <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr9502357> (February 6, 2018).
- Vallejo, A E, and C A Gervasi. 2002. "Impedance Analysis of Ion Transport through Gramicidin Channels in Supported Lipid Bilayers." *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* 57(1): 1–7.
- Vega, D. et al. 2007. "Electrochemical Detection of Phenolic Estrogenic Compounds at Carbon Nanotube-Modified Electrodes." *Talanta* 71(3): 1031–38. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914006004000> (February 28, 2018).
- Walters, G O, F M Miller, and And M Worwood. 1973. "Serum Ferritin Concentration and Iron Stores in Normal Subjects." *J. clin. Path* 26: 770–72.
- Wang, Joseph. 2006. Analytical Electrochemistry, Third Edition *Analytical Electrochemistry, Third Edition*. Wiley-VCH. https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=ZgUa4WbLMKkC&oi=fnd&pg=PR7&dq=J.+Wang,+Analytical+Electrochemistry,+John+Wiley+%26+Sons+VCH,+Hoboken,+New+Jersey,+USA,+2006+&ots=Ja7S1vjP_s&sig=P-ZhkeXM9gX9RR3BJ0GQ72OXH-4&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false (October 31, 2017).
- Wang, Wei et al. 2010. "Serum Ferritin: Past, Present and Future." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1800(8): 760–69. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416510000851?via%3Dihub> (February 15, 2018).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- . 2013. “Ferritin H Is a Novel Marker of Early Erythroid Precursors and Macrophages.” *Histopathology* 62(6): 931–40.
<http://doi.wiley.com/10.1111/his.12101> (April 9, 2018).
- Wightman, R. Mark. 1981. “Microvoltammetric Electrodes.” *Analytical Chemistry* 53(9): 1125A–1134A.
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00232a004> (November 2, 2017).
- Wijayawardhana, C. Ajith et al. 1999. “Rotating Disk Electrode Amperometric Detection for a Bead-Based Immunoassay.” *Journal of Electroanalytical Chemistry* 468(1): 2–8.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072899001151?via%3Dihub> (November 1, 2017).
- Wijayawardhana, C. Ajith, H. Brian Halsall, and William R. Heineman. 1999. “Micro Volume Rotating Disk Electrode (RDE) Amperometric Detection for a Bead-Based Immunoassay.” In *Analytica Chimica Acta*, Elsevier, 3–11.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326709900570X?via%3Dihub> (November 1, 2017).
- Wink, Th, S J Van Zuilen, A Bult, and W P Van Bennekom. “Tutorial Review Self-Assembled Monolayers for Biosensors.”
<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/1997/AN/A606964I> (February 18, 2018).
- Worwoon, M. et al. 1980. “Binding of Serum Ferritin to Concanavalin A: Patients with Hemozygous ?? Thalassaemia and Transfusional Iron Overload.” *British Journal of Haematology* 46(3): 409–16.
- Xiao, Kun et al. 2017. “Use of Quantum Dot Beads-Labeled Monoclonal Antibody to Improve the Sensitivity of a Quantitative and Simultaneous Immunochromatographic Assay for Neuron Specific Enolase and Carcinoembryonic Antigen.” *Talanta* 164: 463–69.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914016309493#f0040> (February 21, 2018).
- Xiao, Yi, Rebecca Y Lai, and Kevin W Plaxco. 2007. “Preparation of Electrode-Immobilized, Redox-Modified Oligonucleotides for Electrochemical DNA and Aptamer-Based Sensing.” *Nature Protocols* 2(11): 2875–80.
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2007.413>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yagiuda, Kaoru et al. 1996. "Development of a Conductivity-Based Immunosensor for Sensitive Detection of Methamphetamine (Stimulant Drug) in Human Urine." In *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, 703–7. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566396859203?via%3Dihub> (November 2, 2017).
- Yakovleva, Julia, and Jenny Emnéus. 2008. "Electrochemical Immunoassays." *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications*: 377–410.
- Yang, Xia et al. 2009. "Porous Redox-Active Cu₂O-SiO₂ nanostructured Film: Preparation, Characterization and Application for a Label-Free Amperometric Ferritin Immunosensor." *Talanta* 78(2): 596–601. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008008989> (March 1, 2018).
- Yao, Toshio. 1983. "A Chemically-Modified Enzyme Membrane Electrode as an Amperometric Glucose Sensor." *Analytica Chimica Acta* 148(C): 27–33. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267000851491?via%3Dihub> (November 15, 2017).
- Ye, Jian Shan, Angelica Ottova, H. Ti Tien, and Fwu Shan Sheu. 2003. "Nanostructured Platinum-Lipid Bilayer Composite as Biosensor." *Bioelectrochemistry* 59(1–2): 65–72.
- Ye, Peng et al. 2006. "Nanofibrous Poly(acrylonitrile-Co-Maleic Acid) Membranes Functionalized with Gelatin and Chitosan for Lipase Immobilization." *Biomaterials* 27(22): 4169–76. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206002572> (February 20, 2018).
- Yin, Ping, Christopher J. Burns, Peter D.J. Osman, and Bruce A. Cornell. 2003. "A Tethered Bilayer Sensor Containing Alamethicin Channels and Its Detection of Amiloride Based Inhibitors." *Biosensors and Bioelectronics* 18(4): 389–97.
- Zandman-Goddard, Gisele, and Yehuda Shoenfeld. 2007. "Ferritin in Autoimmune Diseases." *Autoimmunity Reviews* 6(7): 457–63. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568997207000377?via%3Dihub> (April 9, 2018).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zhao, Guang-Chao, Li Zhang, Xian-Wen Wei, and Zhou-Sheng Yang. 2003. "Myoglobin on Multi-Walled Carbon Nanotubes Modified Electrode: Direct Electrochemistry and Electrocatalysis." *Electrochemistry Communications* 5(9): 825–29.
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388248103002005>.
- Zhao, Xiaoli et al. 2008. "Preparation of Alkanethiolate-Functionalized Core/Shell Fe₃O₄@Au Nanoparticles and Its Interaction with Several Typical Target Molecules." *Analytical Chemistry* 80(23): 9091–96.
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac801581m> (February 20, 2018).
- Zheng, Jack Y., and Linda J. Janis. 2006. "Influence of pH, Buffer Species, and Storage Temperature on Physicochemical Stability of a Humanized Monoclonal Antibody LA298." *International Journal of Pharmaceutics* 308(1–2): 46–51.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517305007076>
 (February 16, 2018).
- Zull, James E. et al. 1994. "Problems and Approaches in Covalent Attachment of Peptides and Proteins to Inorganic Surfaces for Biosensor Applications." *Journal of Industrial Microbiology* 13(3): 137–43.
<http://link.springer.com/10.1007/BF01583997> (November 12, 2017).

ÖZGEÇMİŞ

02.01.1984 Hatay/Antakya doğumlu.

Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı.

Eğitim Bilgileri:

İlkokul: Sümerler İlkokulu – Hatay/Antakya

Ortaokul – Lise: Hatay Osman Ötken Anadolu Lisesi - Hatay/Antakya

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü - İzmir

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı - İzmir

Doktora: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı – İzmir

İdari ve Akademik Görevleri (1 adet)

- Araş. Gör., 2008-

Mesleki Faaliyetleri (13 adet)

- Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü 3. Kariyer Günleri ve Bitirme Projeleri Sergisi, 2014-2015 Öğretim Yılı, İzmir, 11-12 Haziran, 2015

- Türkiye'de Bilim Politikaları Temel Bilimlerin Sorunları ve Çözüm Önerileri - Panel - İzmir, 15 Mayıs, 2014

- Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü 2. Kariyer Günleri ve Bitirme Projeleri Sergisi, 2013-2014 Öğretim Yılı, İzmir, 23-24 Haziran, 2014

- Bilimde Etik Konferansı, Türk Biyokimya Kongresi, İzmir, 4 Kasım , 2013

- 1. Ege Nanoteknoloji Günleri, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 18-19 Nisan, 2013

- Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü 1. Kariyer Günleri ve Bitirme Projeleri Sergisi, 2012-2013 Öğretim Yılı, İzmir, 14-15 Haziran, 2013

- Cost Action B28 - 8th Management Committee and WG1, WG2, WG3, WG4 and WG5 Meetings – Workshop on “Array Technologies”, May 5-6, Marmara University Campus, Sultanahmet, İstanbul, Turkey, 2010

- Emin Dikman 1. Lisansüstü Uygulamalı Elektrokimya Yaz Okulu 14-17 Eylül, İzmir, 2010

- Ege Ar-Ge ve Teknoloji Günleri - AreGE, Kim. Bilimler ve Müh. Bilimleri Alanında poster ile katılım, 01-03 Aralık, 2010

- Kök Hücre Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET) 16 Mart, 2009

- 3. Ulusal HPLC ve MASS Spektrometri Çalıştayı ve Sempozyumu (Uluslararası Katılımlı), GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı 20-23 Mayıs, 2008

- Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET) 7 Mart, 2008

- Kanser Biyokimyası Sempozyumu Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET) 2 Mart, 2007

Uzmanlık Alanları

- Biyokimya (1010400)

İndekslerce Taranan Dergilerdeki Yayınları (2 adet)

- 2012, Umut Mengüllüoğlu, Çağrı Altuğ, H. Deniz Ertuğrul, Abdülkerim Yıldız, E. Melis Ekici & Erhan Dinckaya, α -Amylase Monitoring by a Novel Amperometric Biosensor Based on Au Electrode: Its Optimization, Characterization, and Application, Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology, 40(1-2), 97-102.

- 2011, Çağrı Altuğ, Umut Mengüllüoğlu, Elif Kurt, Secil Kaya and Erhan Dinckaya, A Novel Biosensor Based on Glucose Oxidase for Activity Determination of α – Amylase, Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology, 39(5), 298-303.

Uluslararası Toplantılarda Sunulan Bildirileri (7 adet)

- Umut MENGÜLLÜOĞLU, Erhan DİNÇKAYA, Development of a Novel Biosensor for the Determination of Aflatoxin B1 by Using Electrochemical Impedance Spectroscopy, 3rd International Conference on Biosensing Technology, 12-15 May, 2013, Sitges, Spain.

- Hüsniye KAHRAMAN, Ayten Gizem ÖZBEK, Çağrı ALTUĞ, Umut MENGÜLLÜOĞLU, Erhan DİNÇKAYA, Electrochemical Impedance Spectroscopy Based on Biosensor for the Determination of Cytochrome c, 19th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED2013), 12 – 15 November, 2013, Kuşadası, Turkey.

- Umut MENGÜLLÜOĞLU, Çağrı ALTUĞ, Arzu SAKALLI, NevİN GENÇ, Erhan DİNÇKAYA A Novel Polypyrrole-Based Amperometric Biosensor for Uric Acid Determination, The 10th workshop on biosensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis, June 19th - 22nd, 2011, Weimar, Germany.

- Umut MENGÜLLÜOĞLU, Erhan DİNÇKAYA IMDEDIMETRIC AFLATOXIN B1 DETERMINATION BY USING POLYPYRROLE – COATED BIOSENSOR, 9th International Electrochemistry Meeting, September 25-29, 2011, İzmir, TURKIYE.

- Umut MENGÜLLÜOĞLU, Çağrı ALTUĞ, Sinan AKGÖL, Erhan DİNÇKAYA, Adil DENİZLİ A Novel Electrochemical Impedance Biosensor Based on Cysteine Containing Nano-sized Polymeric Material for Detection of Fe³⁺ Values in Blood Samples, The Vth International Bioengineering Congress, June 16-19, 2010, İzmir, TURKIYE.

- Çağrı ALTUĞ, Elif KURT, Seçil KAYA, Umut MENGÜLLÜOĞLU, Erhan DİNÇKAYA Development and Optimization of a Novel Glucose Oxidase Biosensor for α -Amylase Activity Determination, 8th International Electrochemistry Meeting in Turkey, October 8-11, 2009, Antalya, TURKIYE.

- Umut MENGÜLLÜOĞLU, Elif KURT, Seçil KAYA, Çağrı ALTUĞ, Erhan DİNÇKAYA Characterization of a Novel Biosensor Based on Glucose Oxidase for Activity Determination of α -Amylase, 8th International Electrochemistry Meeting in Turkey, October 8-11, 2009, Antalya, TURKIYE.

Ulusal Toplantılarda Sunulan Bildirileri (3 adet)

- Çağrı ALTUĞ, Umut MENGÜLLÜOĞLU, Abdulkemir YILDIZ, E. Melis EKİCİ, H. Deniz ERTUĞRUL, Erhan DİNÇKAYA Amperometrik Glukoz Biyosensörü ile α -Amilaz Aktivitesi Tayinine Yönelik Yeni Bir Ölçüm Yöntemi, 24. Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran-2 Temmuz, 2010, Zonguldak, TÜRKİYE.

- Umut MENGÜLLÜOĞLU, Ç. ALTUĞ, C. URAL, İ. C. BARIŞ, İ. ERTEKİN, E. DİNÇKAYA α -Amilaz Aktivitesi Tayinine Yönelik Yüzey Korozyonunu Esas Alan Yeni Bir Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensör Sistemi, XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Ekim 27 - 30, 2010, Eskişehir, TÜRKİYE.

- Umut MENGÜLLÜOĞLU, Emel Başak GENCER, Ferhat Can ÖZKAYA, Çağrı ALTUĞ, Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK, Erhan DİNÇKAYA Ebegümece (*Malva sylvestris*) Bitkisinden Kısmi Saflaştırmayla Elde Edilen Sülfite Oksidaz Enzimi İle Sülfite Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi, 23. Ulusal Kimya Kongresi, 16-20 Haziran, 2009, Sivas, TÜRKİYE.

Bilimsel Kuruluş Üyelikleri (2 adet)

- Biyokimyagerler Derneği

- Kimyagerler Derneği