



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YÜZEY PLAZMON REZONANS İLE ENZİM TEMELLİ

BİYOSENSÖR TASARIMI

Ayşegül ÜNAL

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ANAkkALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ



YÜZEY PLAZMON REZONANS İLE ENZİM TEMELLİ
BİYOSENSÖR TASARIMI

Ayşegöl ÜNAL

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 26/08/2020

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Zikriye ÖZBEK

ANAkkALE

Ayşegül ÜNAL tarafından Doç. Dr. Zikriye ÖZBEK yönetiminde hazırlanan ve 26/08/2020 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Yüzey Plazmon Rezonans ile Enzim Temelli Biyosensör Tasarımı**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Doç. Dr. Zikriye ÖZBEK

Başkan

.....

Doç. Dr. Yaser AÇIKBAŞ

Üye

.....

Dr. Öğr. Üyesi Sibel ŞEN

Üye

.....

Doç. Dr. Pelin KANTEN

Müdür

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Sıra No:

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Ayşegül ÜNAL

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Zikriye ÖZBEK'e,

Önerileriyle tezime katkıda bulunan değerli hocam Prof. Dr. Özlem YAYINTAŞ'a ve saygıdeğer eşi Prof. Dr. Ahmet Nuri YAYINTAŞ'a

Çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen sevgili kuzenim Eda SERİM'e

Hayatımın her evresinde bana destek olan değerli annem Gönül ÜNAL ve babam Ünsal ÜNAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayşegül ÜNAL
Çanakkale, Ağustos 2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	Deoksiribo nükleik asit
RNA	Ribo Nükleik asit
SPR	Yüzey Plazmon Rezonansı
nm	Nanometre
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
pH	Hidrojenin Gücü
ATP	Adenozin trifosfat
f	Frekans
ω	Açısal frekans
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
HRP	Hidrojen peroksit
Pc	Bilgisayar
QCM	Kuvartz Kristal mikro terazisi
LED	Işık Yayan Diyot
LSPR	Lokalize Yüzey Plazmon Rezonansı
ε	Nispi geçirgenlik
t	Süre
g	Gram
mmol	Mili mol
°C	Derece santigrat
%	Yüzde
ml	Mili litre
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
Pd/C	Karbon üzerinde paladyum
HCl	Hidroklorik asit
H ₂	Hidrojen
nm	Nanometre
mm	Millimetre
N ₂ O ₂	Dinitrojen dioksit

NH ₃	Amonyak
Hg	Cıva
mM	Milimolar
SA	Salik asit
NaCl	Sodyum Klorür
Dk	Dakika
M	Molar
HA	Hemaglutinin
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
Mm	Mikrometre
Au	Altın
N	Azot
O	Oksijen
Cm	Santimetre
KCl	Potasyum klorür
PBS	Tampon çözeltisi
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
Na ⁺²	Sodyum iyonu
ConA	Concanavalin A
Mg	Milligram
AgAuNP	Gümüş altın nanoparçacığı
H ₂ SO ₄	Silfirik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HBN	Hegzoganal bor nitrür
µl	Mikrolitre
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
mmHg	Millimetre cıva
HbA1C	Hemoglobin A1C
anti HbA1C	Anti-hemoglobin A1C antikoru
anti Hb	Anti-hemoglobin antikoru
µg	Mikrogram

IgG	İmmünoglobulin G
SERS	Yüzeyi arttırılmış Raman spektroskopisi
ng	Nanogram
UV	Morötesi ışık
μM	Mikromolar
$^{\circ}/\text{s}$	Derece/saniye
MCU	Mikrodenetleyici
3D	3 boyutlu
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
K_2HPO_4	Dipotasyum fosfat
W	Watt
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
AgNO_3	Gümüş nitrat
BSA	Sığır serum albumin
ppm	milyonda bir birim
FOSPR	Fiber optik yüzey plazmon rezonansı
LOD	Algılama limiti
ZnO	Çinko oksit
NO_2	Azot dioksit
CO_2	Karbondioksit
LPG	Likit petrol gazı
TiO_2	Titanyumdioksit
CH_2O	Formaldehit
N_2	Azot
CO	Karbonmonoksit
keV	Kiloelktronvolt
$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	Etanol
NO_3	Nitrat
H_2O	Su
SnO_2	Kalay Oksit
Å	Ångström

He	Helyum
Ne	Neon
LRSPR	Uzun menzilli yüzey plazmon rezonansı
Mg	Magnezyum



ÖZET

YÜZEY PLAZMON REZONANS İLE ENZİM TEMELLİ BİYOSENSÖR TASARIMI

Ayşegül ÜNAL

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Zikriye ÖZBEK

03/09/2020

Neredeyse yirmi yıl önce algılamak için yüzey plazmon rezonans (SPR) fenomeninin ilk uygulamasından bu yana, bu yöntem hem enstrümantasyon geliştirme hem de uygulamalar açısından büyük adımlar atmıştır. SPR sensör teknolojisi ticarileştirildi ve SPR biyosensörleri biyomoleküler etkileşimleri karakterize etmek ve ölçmek için merkezi bir araç haline geldi. Bu tez SPR teknolojisindeki önemli gelişmeleri gözden geçirmeye çalışmaktadır. Ana uygulama alanları ana hatlarıyla belirtilmiş ve SPR sensör teknolojisi uygulama örnekleri sunulmuştur.

Yüzey plazmon rezonans (SPR) tabanlı biyosensör, en gelişmiş etiketsiz, gerçek zamanlı algılama teknolojilerinden biridir. Farklı bilimsel geçmişlere sahip çok sayıda araştırma grubu, SPR biyosensörlerinin uygulamasını araştırmış ve yeni, ilgili enstrümantasyona yol açan yüzey plazmonu polartonlarının temel yönlerini incelemiştir. Sonuç olarak, bu alan gelişen algılama teknolojisinin ön saflarında yer almaya devam etmektedir. Bu tez, SPR ile ilgili enstrümantasyon alanındaki optik platformlar, nano ölçekli yaklaşım ve yeni materyalleri içeren yeni gelişmeleri vurgulamaktadır. SPR tabanlı biyosensördeki mevcut eğilimler tanımlanır ve SPR biyosensör teknolojisinin gelecekteki yönü geniş ölçüde tartışılmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, Yüzey plazmon rezonans, Amperometrik, Optik

ABSTRACT

ENZYME BASED BIOSENSOR DESIGN WITH SURFACE PLASMON RESONANCE

Ayşegül ÜNAL

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Bioengineering and Materials Engineering Department

Advisor: Assoc.Prof. Dr. Zikriye ÖZBEK

03/09/2020

Since the first application of the surface plasmon resonance (SPR) phenomenon to detect almost twenty years ago, this method has made great strides in both instrumentation development and applications. SPR sensor technology has been commercialized, and SPR biosensors have become a central tool for characterizing and measuring biomolecular interactions. This thesis attempts to review important developments in SPR technology. The main application areas are outlined and SPR sensor technology application examples are presented.

Surface plasmon resonance (SPR) based biosensor is one of the most advanced unlabeled, real-time detection technologies. Numerous research groups with diverse scientific backgrounds have explored the application of SPR biosensors and investigated key aspects of surface plasmon polaritons that led to new, relevant instrumentation. As a result, this area remains at the forefront of developing sensing technology. This thesis highlights new developments in the field of instrumentation related to SPR, including optical platforms, nanoscale approach and new materials. Current trends in the SPR-based biosensor are identified and the future direction of SPR biosensor technology is widely discussed.

Keywords: Biosensor, Surface plasmon resonance, Amperometric, Optical

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1. Biyosensör	1
1.1.1. Elektrokimyasal Biyosensörler	3
Potansiyometrik Biyosensörler	4
Amperometrik/Voltametrik Biyosensörler	4
Empedans Biyosensörler	6
1.1.2. Kalorimetrik Biyosensörler	7
1.1.3. Piezoelektrik Biyosensörler.....	8
1.1.4. Optik Biyosensörler	9
1.2. Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR).....	10
BÖLÜM 2	
MATERYAL METOD.....	11
2.1. SPR.....	11
2.2. Yüzey Plazmon Rezonans Sensörlerinin Başlıca Uygulama Alanları.....	13
2.2.1. Bor Türevleri ile SPR Çalışmaları.....	13
2.2.2. Hemoglobın Türevleri ile SPR Çalışmaları	23
2.2.3. Süt İle Yapılan SPR Çalışmaları	31
2.2.4. Gaz Sensör SPR Çalışmaları	38
BÖLÜM 3	
SONUÇLAR	47
3.1. Bor ve Türevleri ile Çalışma Sonuçları.....	47

3.2. Hemoglobin Türevleri ile Çalışma Sonuçları.....	56
3.3. Süt ve Türevleri ile Çalışma Sonuçları	68
3.4. Gaz Sensör Çalışma Sonuçları.....	74
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	I



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Biyosensörün yapısı ve bileşenleri	2
Şekil 2: Elektrokimyasal biyosensörlerin yapısı	3
Şekil 3: Potansiyometrik Biyosensörlerin çalışma prensibi	4
Şekil 4: Amperometrik/Voltametrik biyosensörlerin çalışma prensibi	5
Şekil 5: Empedans biyosensörünün yapısı	6
Şekil 6: Akış enjeksiyon kalorimetrik biyosensörün prensibi. (1) numune kabı; (2) tampon kabı; (3) enjeksiyon valfi; (4) peristaltik pompa; (5) termoelektrik termostat; (6) enzim reaksiyon hücresi; (7) referans hücresi; (8) ısıpıl sensörü; (9) A / D dönüştürücü	7
Şekil 7: Piezoelektrik biyosensörünün (a) üstten görünümü. (b) en-kesit görünümü	8
Şekil 8: SPR biyosensör prensipleri (a) Uyarılmış yüzey plazmonları için üç katmanlı geometri. Bir yüzey plazmon dalgası, metal arayüzde uyarılır. (b) SPR reaksiyonu	10
Şekil 9: Evanescent dalga üretimi	11
Şekil 10: P-polarize ışının SPR sisteminde hareketi	11
Şekil 11: (a) Otto konfigürasyonu, (b) Kretschmann konfigürasyonu	13
Şekil 12: (a) Tri-izopropil borat sentezi. (b) N, N-Dibenzil-4-bromo anilin sentezi. (c) Trimerik-4- (N, N-dibenzilamino) -fenilboronik asit sentezi. (d) 4-Aminofenil boronik asit (4-APBA) sentezi	15
Şekil 13: 4-APBA ve SA'nın bağlanmasından sonra SPR sensörlerinin yanıtları	16
Şekil 14: SA, hidroksil grupları yoluyla 4-APBA'ya bağlanması	17
Şekil 15: SA hareketsiz SPR sensörü kullanıldığında artan HA konsantrasyonlarına sahip yansıtma (%) sensogramı	17
Şekil 16: 4-APBA – SA sabitlenmiş SPR sensörünün Langmuir grafiği	18
Şekil 17: 0,16 mM HA'nın hareketsizleştirilmesinden sonra SPR sensörünün yüzey morfolojisi	19
Şekil 18: SPR nanosensörlerinin Concanavalin A'ya göre seçiciliğinin karşılaştırılması	19
Şekil 19: ABA-BPA'nın sentetik yöntemi	20
Şekil 20: Fiber optik algılama sisteminin şematik diyagramı	21
Şekil 21: SPR algılama bölgesinde dekorasyon prosedürü ve sakarit tespitinde uygulama	22
Şekil 22: LSPR ve SERS yoluyla HbA1C'yi saptamak için biyomoleküllerin konjugasyonunu gösteren şematik diyagramlar. (a – d) LSPR kullanılarak tespit için biyomoleküllerin AuNPs-montajlı PET film üzerine bağlanması için deneysel prosedür. (e) SERS kullanılarak tespit için anti-Hb-Cy3'ün HbA1c'ye konjugasyonu	24
Şekil 23: Sensör modifikasyon sürecinin şeması	25
Şekil 24: Tüm SPR sisteminin şematik gösterimi: (a) sistem blok şeması; (b) 3D baskı hızlı prototipleme ile tasarlanan SPR biyosensing platformu; (c) elektrik devre blok şeması; (d) akış hücresi diyagramı	27
Şekil 25: SPR nanofilminin şematik hazırlanması	29

Şekil 26: (a)HbA1c seviyesinin çip üzerinde belirlenmesi için sığır serum albümini (BSA) ile birleştirilmiş plazmonik Ag nanotellerinin topluluğunun şematik gösterimi. (b)Numunelerin tellerin (i) üzerine düşürülmesinden, proteinlerin (ii) ve etkileşim plazmonu/proteinin (iii) adsorpsiyonundan yapılan deneylerin adımlarının ayrıntılı açıklaması.....	30
Şekil 27: Çipin hazırlanmasının açıklaması. (i) Her iki 20 dakika boyunca aseton ve sonra izopropil alkol içinde ön-ultrasonikasyon. (ii) (3-merkaptopropil) trimetoksi-silan biriktirme. (iii) Ag nanotel immobilizasyonu. (iv) BSA immobilizasyonu	35
Şekil 28: MEL taşınması için polimer inklüzyon membran aparatı	34
Şekil 29: Yüzey polimerizasyonu ile SPR çipinin hazırlanmasının şematik gösterimi	36
Şekil 30: (A) Phillips CM20 ile alınan α -kazein nanoMIP'lerin TEM görüntüsü. (B) AFM kovalent olarak bağlanmış nanoMIP'ler. (C) Boncuk bazlı yöntemden sentezlenen nanoMIP tabanlı bir biyosensör için tipik sensorgram. (D) α -kazein nanoMIP tabanlı biyosensör (n = 3) için doğrusal olmayan ($R^2 = 0.9934$) ve doğrusal kalibrasyon ($R^2 = 0.9779$) grafiği.....	37
Şekil 31: Plazma deşarj bariyeri ile substrat tedavisinin şematik diyagramı.....	41
Şekil 32: Numuneden gaz akacak ve spektrumdaki farklı değişiklikleri algılayacak optik kurulumun şeması.....	43
Şekil 33: (A) Fabrikasyon LRSPR Sensör yapısının resimsel temsili	44
Şekil 34: Geliştirilmiş gaz hücresi resimsel temsili	45
Şekil 35: Mevcut çalışmada kullanılan gaz algılama LRSPR kurulumunun resimsel temsili.....	46
Şekil 36: Boronik asit türevlerinin şeker (A) Fenilboronik asit (B) ABA-PBA ile etkileşimi	48
Şekil 37: ABA-PBA ve ABBA modifiye fiber-optik SPR'nin PH'a bağlı yanıt sensörü (10 mM fruktoz çözeltisi)	49
Şekil 38: Algılamadan önce suya daldırma ile su daldırma arasındaki fark yanıtı.....	50
Şekil 39: ABA-PBA modifiye fiber optik SPR sensörünün rejenerasyon kabiliyeti.....	51
Şekil 40: PBS (A) SPR spektrumunda 5 μ g/ml ConA saptamak için L-PBA modifiye probunun temsili SPR gerçek zamanlı spektrumu, ConA (B) SPR gerçek zamanlı sensorgramı, zirveleri ile bağlandığında rezonans dalga boyu uzun dalga boyuna geçer SPR spektrumu 2,5 saniyede bir toplanmıştır.....	52
Şekil 41: ConA (glikoprotein), HRP (glikoprotein) ve Mg (glikoprotein olmayan) ile fiber optik SPR sensörü etkileşimi. Yenilenme tamponu (A) L-PBA SAM (B) S-PBA SAM olarak EtOH / PBS (hac/hac = 3/1 pH = 3)	53
Şekil 42: ConA tespiti için L-PBA, S-PBA ve RNase B ile modifiye edilmiş fiber optik SPR sensörleri. Kontrol grubu olarak değiştirilmemiş sensör. ConA konsantrasyonu, 0,2 μ g / ml ila 5 μ g / ml arasında değişmektedir	54
Şekil 43: Dökme bor nitrür (eğri a) ve HBN nanosets (eğri b) XRD paterni (A); (B) dökme bor nitrürün SEM görüntüleri; AgN AuNPs-HBN nanokompozitinin (C) HBN nanosetsleri (D) TEM ve (E) EDX görüntüleri; (F) MIP / Ag @ AuNPs-HBN, (G) NIP / Ag @ AuNPs-HBN'nin SEM görüntüleri	55
Şekil 44: AuNP'lerin kendi kendine bir araya getirildiği polimer filmin SEM görüntüsü.....	57

Şekil 45: Anti-HbA1c konsantrasyonunun optimizasyonu, HbA1c ve anti-HbA1c arasındaki bağlanma afinitesi ile belirlenir. Cys-protein G konjuge LSPR çipinin absorbansına karşı anti-HbA1c (●) ve HbA1c (■) absorbans değerlerindeki artışlar, farklı anti-HbA1c konsantrasyonlarında 540 nm'de ölçülmüştür.....	58
Şekil 46: HbA1c'nin kantitatif analizi. (a) Farklı HbA1c seviyelerinin konjügasyonundan önce ve sonra 480-570 nm aralığında ölçülen LSPR çipinin absorpsiyon spektrumları (3,19, 5,92, 10,7 ve % 14). (b) HbA1c içeriğine karşı absorbans değişikliğinin kalibrasyon grafiği. HbA1c içeriği arttıkça absorbans değerindeki değişim orantılı olarak artmıştır	59
Şekil 47: NaCl ölçüm eğrileri: (a) farklı NaCl çözeltisi konsantrasyonları için tepki; (b) Δ RU'ya karşı kırılma indisi	60
Şekil 48: Temas açısı ölçümü. a) Çıplak Au filmi. b) 20 dakika UV maruziyetinden sonra Au film. c) Au/MUA/MPA SAM. d) Au/MUA/MPA/aptamer film.....	61
Şekil 49: Farklı HbA1c konsantrasyonları için sistem yanıtları	62
Şekil 50: VPBA kaplı nanofilm SPR çipinin FTIR spektrumu. Çıplak SPR çip yüzeyi (B), alil merkaptan modifiye SPR çip yüzeyi (C), VPBA kaplanmamış nanofilm SPR çip yüzeyi (D) ve VPBA kaplı nanofilm SPR çip yüzeyinin (E) elipsometri görüntüleri	63
Şekil 51: A. Alil merkaptan modifiye, B. VPBA kaplanmamış nanofilm ve C. VPBA kaplı nanofilm SPR çip yüzeyleri temas açısı görüntüleri.....	64
Şekil 52: (a) Nanotellerin yüzeyin üstüne dağılımının SEM mikrografı. Ölçek çubuğu: 5 μ m. (b) Nanotel kaynaklarının yüksek çözünürlüklü SEM mikrografı. Ölçek çubuğu: 500 nm. (c) Dokunma modunda çalıştırılan AFM görüntüsü. Renk çubuğu maksimum yüksekliği gösterir. (d) Ölçülen D-aralığına sahip tek bir Ag nanotelinin HR-TEM görüntüsü, iç kısım SAED modelini gösterir. (e) İlgili FFT modeli. (f) Çip üzerinde biriken dökme Ag nanotelleri ve Ag nanotellerinin x-ışını kırınım modeli	66
Şekil 53: (a) BSA ile kaplanmış nanotellerin panoramik SEM görüntüsü, Ölçek çubuğu = 5 μ m. (b) Yüksek çözünürlüklü SEM, Ölçek çubuğu = 0,5 μ m. (c) Dokunma modunda çalıştırılan AFM görüntüsü. Renk çubuğu maksimum yüksekliği gösterir. (d) Doğal ve BSA kaplı nanotellerin soğurulması.....	67
Şekil 54: 11-MUA SAM sensör yüzeyine anti- α kazein ve anti-IgG kontrolünün SPR sensorgramı. İşlevselleştirme, 50 mL'lik bir EDC / NHS enjeksiyonundan sonra her bir antikorun 50 mL'lik bir enjeksiyonundan oluşuyordu. Yüzey BSA enjeksiyonu ve ardından etanolamin ile bloke edildi	69
Şekil 55: Vericiden çıkarılan ve alıcı aşamaya taşınan% MEL miktarı.....	73

BÖLÜM 1

Giriş

Gündelik yaşantımızda birçoğunun sensör olduğunun farkında olmadan yüzlerce sensör kullanılmaktadır. Diyabet hastalarının kullandığı glikozetreler, sıcaklık ve nem sensörleri, fotosel ışıklar, arabalarda yakıt göstergeleri, mikrofonlar bu sensörlere örnek olarak verilebilir.

Tüm canlılar yaşadıkları ortam ile kendi bünyelerinde bulunan fiziksel ve kimyevi biyolojik sensörler vasıtasıyla iletişime geçmektedir. Beş duyu yardımıyla görebilir, koklayabilir, tadabilir, duyabilir ve hissedebilirler. Tüm canlı bedenleri bütün yönleriyle bir biyosensördür. Zira canlı vücudunda var olan organik ve inorganik maddelerin dengesi değiştiğinde çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Bir diğer deyişle vücuttaki maddelerin dengesindeki ufak değişimlere göre vücut bir sensör gibi reaksiyon vermektedir. Ama canlı vücudundaki rastgele bir maddenin miktarı konusunda kesin bilgiye ulaşabilmek için biyolojik sinyalleri elektrik sinyallerine çeviren duyarlı biyolojik sensörlerle ölçüm alınması gereklidir.

Biyosensörler canlı ile ilgili olan bir hayli alanda kullanılmaktadır. Bir sensörün biyosensör olabilmesi için sensöre biyofonksiyon özelliği eklenmelidir. Bu işlem, üretilen biyosensörün çalışma alanını belirlemektedir. Zira sensörü kullanılacağı biyolojik malzemelere karşı seçici duruma getiren faktör sensöre bağlanmış biyolojik moleküllerden oluşmaktadır. Bu moleküller enzim, protein, DNA, RNA gibi moleküller olabilir. Böyle bir durumda sensör ve yüzeyine bağlanan molekül çalışma konusuna uygunlukta seçilmelidir.

Biyosensörler yüksek hassasiyet, mükemmel özgüllük, iyi stabilite, kolay kullanım, hızlı tepki ve uygun maliyetli analizin tercih edilen özelliklerine sahip olduklarından en son yapılan araştırmaların odağı olmuştur. Son yirmi yılda, Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) biyosensörleri biyomoleküler etkileşimlerin gerçek zamanlı tespiti için benzersiz özellikleri nedeniyle önemli ve kullanışlı bir araç olarak ortaya çıkmıştır. SPR teknolojisi, kırılma indislerindeki değişimin, analit moleküllerinin sensör çipi üzerindeki belirli bir immobilize liganda bağlanma süreci boyunca ölçüm tekniğine dayanır. SPR sensörleri, tıbbi teşhis, kimyasal algılama, protein-protein hidridizasyonu, enzim tespiti gibi çevresel algılama uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.1. Biyosensör

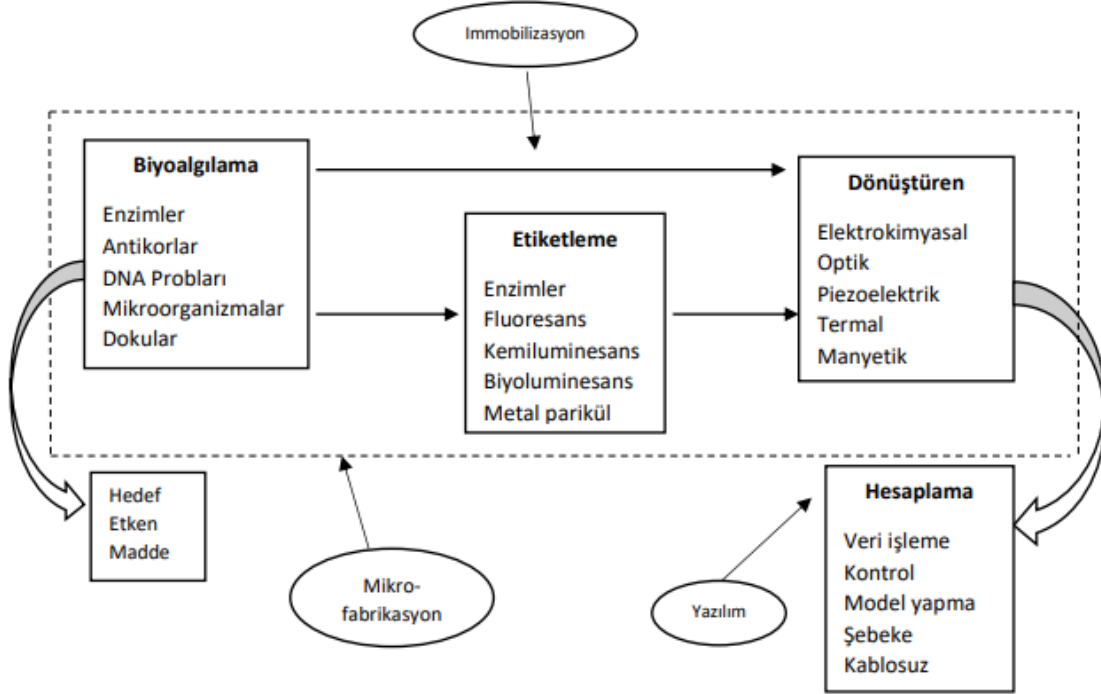
Tarihte ilk biyosensör olarak tanımlanan ilk cihaz, 1950 yılında Clark ve Lyson tarafından üretilmiştir. Bu çalışmada enzim elektrodu üzerine çalışılmış ve oksido-indirgeyici enzim platin elektrodun yanına immobilize edilmiştir. Kullanılan temel madde glikozdur. Çalışma prensibi platin ve gümüş elektrotlar arsına uygulanan gerilim oksijeni indirgeyecek ve oksijen konsantrasyonuyla orantılı bir elektrik akımı ölçülmesi temelindedir (Clark & Lyons, 2006). Bu çalışma, biyolojik numunelerle çalışma kültürüne yeni bir boyut getirmiştir ve hayatın her alanında kullanılan sensörlerde kökten bir değişime yol açmıştır.

Biyosensörler diğer bir deyişle biyoalgılayıcılar, biyolojik bir sensörü ve fizikokimyasal dönüştürücü olan cihazlardır. Amacı ise, analiz edilecek moleküllerin miktarı oranınca kesintisiz rakamsal elektrik sinyali üretmektir. Biyomolekül, çevirici ve elektronik

bölümler olmak üzere üç bileşenden oluşur. Bu bileşenlerin en önemlisi ise, enzim-substrat (kimyasal dönüşüm modellerini bulmak için kullanılan molekül-alttaş) ilişkisine benzer çalışma prensibine sahip biyomoleküldür.

Biyomolekülleri, biyoafinite (biyoilgi) ajanları ve biyokatalitik ajanlar olarak iki gruba ayırmak mümkündür. Biyoafinite ajanlarında kullanılan moleküllerin oluşturduğu yapı sonucu ortamda ışığın kırılması, ışığın emilmesi gibi fiziksel değişiklikler olurken; biyokatalitik ajanların bulunduğu ortamda analiz edilecek maddede kimyasal değişimler oluşur ve bu değişim değerleri okunur. Biyoafinite ajanları; DNA, antikor, antijen gibi moleküller oluştururken, biyokatalitik ajanları; enzim ya da mikroorganizmalar oluşturur (Mohammadinejad, Oskuee, Eivazzadeh-Keihan, Rezayi, Baradaran, Maleki & Guardia 2020).

Biyosensörlerin çevirici bileşeni, biyogılgılacı ve analiz edilecek maddenin etkileşime girmesi ile oluşan fiziksel sinyali elektriksel sinyale dönüştürerek sinyali işlemeye ve okumaya olanak veren bileşendir.



Şekil 1: Biyosensörün yapısı ve bileşenleri

Biyosensörler hayatımızın birçok alanında yer alır. Tıbbi uygulamalar, tarımsal kullanım, hayvancılık, gıda endüstrisi, askeriye ve benzeri geniş kullanım yelpazesine sahiptir fakat genellikle insan sağlığını etkileyen olaylarda doğrudan kullanılır.

Biyosensörler çevirici türlerine göre sınıflara ayrılırlar. Elektrokimyasal biyosensörler, Fiziksel biyosensörler, Giyilebilir biyosensörler, Optik biyosensörler olarak ayırmak mümkündür.

Bir biyosensörde olması gereken özellikler duyarlı olması, seçici olması, ölçüm aralığının genişliği, ölçüm süresinin kısalığı, tutarlı olması, tespit sınırı aralığı, ömür uzunluğu ve kararlılıktır.

Duyarlılık; Biyosensörlerin analit konsantrasyonuna bağlı olan her değişimi ekran üzerinde gösterebilme özelliğidir.

Seçicilik; Biyosensörlerin sadece kullanılan analite özel olduğunun ifadesi olup başka analitlerle reaksiyona girmeme durumudur.

Ölçüm aralığı; Her cihazın ölçüm alabileceği analit konsantrasyonu farklıdır. Analit konsantrasyonu ölçüm alınabilecek aralıkta olmalıdır.

Ölçüm süresi; Biyosensörlerin analit konsantrasyonunda olan değişimlere karşı verdiği yanıtın %63'ünün ölçülmesidir. Bir açıdan biyosensörün hızını ifade etmektedir.

Tutarlılık; Biyosensörlerin analit konsantrasyonları karşısında tutarlılığını ifade etmektedir. Cihazın doğruluğunu belirtir.

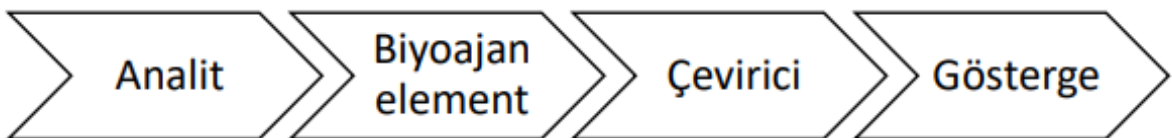
Ömür; Biyosensörlerin verimli bir şekilde çalışma ömrünü ifade etmektedir.

Kararlılık; Biyosensörlerin belirlenen bir süre içerisinde cihazdaki duyarlılık değişimlerinin değerlendirilmesidir (Asyalı, Kara ve Yılmaz, 2014).

1.1.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

Çeşitli algılama teknikleri arasında, elektrokimyasal biyosensörler, üstün hassasiyetleri ve özgüllükleri nedeniyle pestisitler, nörokimyasallar, nefes analizi, mikotoksinler, alg toksinleri ve patojenler gibi çeşitli hedeflerin etkili bir şekilde algılanması için adaylar olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, bu elektrokimyasal sensörlerin duyarlılığı esas olarak çeşitli nanomalzemeler (NM'ler) kullanan dönüştürücü birimlerin elektrokimyasal özelliklerine bağlıdır. Bu nedenle, gıda matrislerinde hassas ve doğru analizin gerçekleştirilmesi için nanomalzemelerin birleştirilmesi yoluyla dönüştürücülerin iletkenliğini arttırmak için çaba gösterilmiştir (Wang & Lin, 2020).

Bugüne kadar, gıda numunelerindeki toksisitenin değerlendirilmesine izin vermek için çeşitli tiplerde transdüksiyon üniteleri (örn. Potansiyometrik, amperometrik, voltametrik, kapasitif, iyon duyarlı alan etkili transistörler ve iletkenometrik prensip) geliştirilmiştir ve kullanılmıştır. Elektrokimyasal sensörler yaygın olarak iki kategoriye ayrılır: statik (elektrotlar ve analitler arasında akım akışı olmaz) ve dinamik prensip (oksidasyon veya indirgeme olaylarından kaynaklanan akım vardır). İlkinde, potansiyometrik transdüksiyon üniteleri en önemli seçenekler arasındadır. Buna karşılık, amperometrik (deney sırasında sabit potansiyel) ve voltametrik yaklaşımlar (deney sırasında değişken potansiyel) ikincisi için tercih edilmektedir (Gupta, Raza, Bhardwaj, Vikrant, Kim & Bhardwaj, 2020).

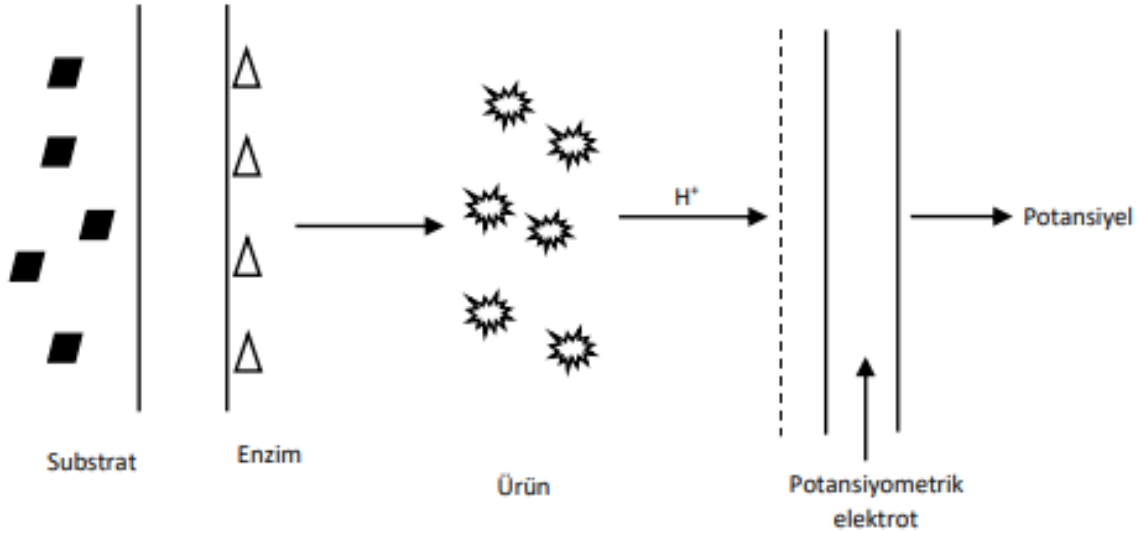


Şekil 2: Elektrokimyasal biyosensörlerin yapısı

Potansiyometrik Biyosensörler

Çalışma prensibi elektrot üzerinde gerilim farkı oluşma üzerine kuruludur. Bu işlemi yaparken kullanılan iyon ile bu iyonla uyumlu zar geçirgenliğini arttıran bileşiğe bağlanması sırasında oluşan elektiriksel gerilimi farkını izler. Enzimleri işlemek için potansiyometrik elektrotlar ile kullanılan çeşitli kimyasal yapılar bulunur. Alan etkili transistörler (Field Effect Transistor, FET), boyutlarının küçük olması ve kompakt yapısı kullanıcıya kolaylık sağladığından en sık kullanılan transistörlerdir. Dört tip FET kullanılmaktadır.

- Çözeltideki iyonları ayırtıran iyon seçici alan etkili transistörler (Ion Selective Field Effect Transistors, ISFETs),
- Enzime uygun substratları ya da enzim reaksiyonunu gözlemlemek için kullanılan enzim alan etkili transistörler (Enzyme Field Effect Transistors, ENFETs),
- Antikor antijen etkileşimini inceleyen immüno alan etkili transistörler (Immuno Field Effect Transistors, IMFETs),
- Tepkime sırasında yaşanan değişiklikler üzerinden sonuca varan kapatılmış geçiş alan etkili transistörler (Suspended Gate Field Effect Transistors, SGFETs).

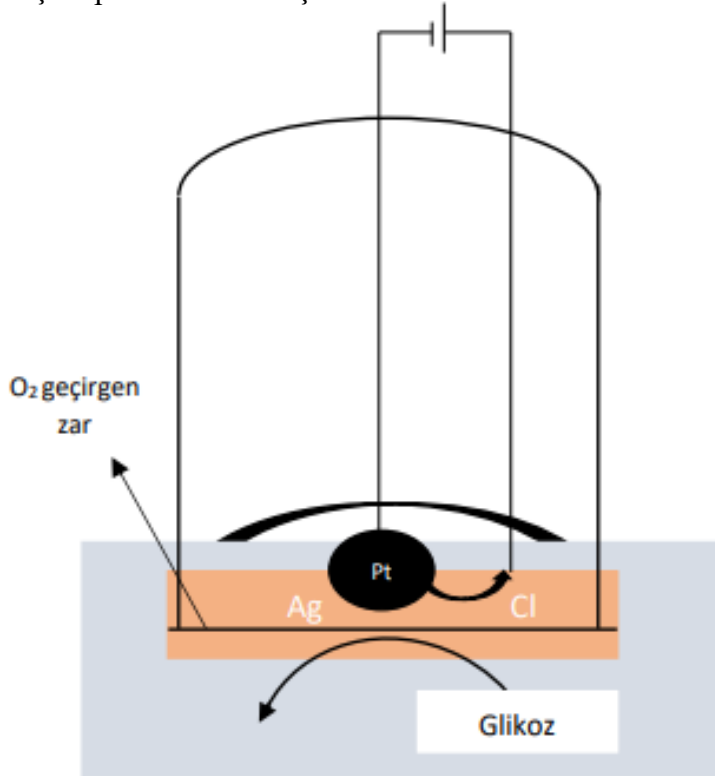


Şekil 3: Potansiyometrik Biyosensörlerin çalışma prensibi

Amperometrik/Voltametrik Biyosensörler

Amperometrik cihazlar, bir biyokimyasal reaksiyonda elektroaktif bir türün oksidasyonundan veya azaltılmasından kaynaklanan akımı sürekli ölçtüğü için bir tür elektrokimyasal sensördür. Clark oksijen elektrotları, belki de oksijen konsantrasyonu ile orantılı olarak bir akımın üretildiği en basit amperometrik biyosensör formlarının temelini temsil eder. Bu, belirli bir potansiyelde bir Ag/AgCl referans elektroduna referansla platin çalışan bir elektrotta oksijenin azaltılmasıyla ölçülür. Tipik olarak, akım sabit bir potansiyelde

ölçülür ve buna amperometri denir. Potansiyelin kontrollü varyasyonları sırasında bir akım ölçülürse, buna voltametri denir. Ayrıca, doğrusal bir potansiyel aralıkta ölçülen akımın tepe değeri, analitin, yani elektroaktif türlerin yığın konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Tüm protein analitleri kendiliğinden elektrokimyasal reaksiyonlarda redoks partnerleri olarak işlev görmediğinden, bu cihazlar analitin çalışan elektrottaki elektrokimyasal reaksiyonu için çoğunlukla aracılı elektrokimya kullanır. Bu genellikle dolaylı algılama sisteminin dezavantajına rağmen, amperometrik cihazların potansiyometrik cihazlardan daha üstün bir duyarlılık sağladığı iddia edilmektedir. Amperometrik bir cihaza örnek olarak hidrojen peroksitin amperometrik tespitine dayanan glikoz biyosensörü verilebilir. İleri gebelik testlerinde insan koryonik gonadotropin sub-alt birim (β HCG) seviyelerini ölçmek için immünoensing teknikleri ile kombinasyon halinde çok somut bir amperometri uygulaması kullanılmaktadır. Yu, Chong, Zhang, Ma & Li, (2020) manyetik mikro parçacıkları amperometrik biyosensörlerinde biyo-bileşen bağlanmasını ve yüzey reaksiyonlarını arttırmak için bir araç olarak kullanmışlardır. Amperometrik yöntemler kullanarak Kueng, Kranz, & Mizaikoff, (2004) 10 nmol/l'lik bir tespit limiti ile fizyolojik pH değerlerinde adenosin-5'-trifosfatın (ATP) saptanması için bir biyo-duyarlılık tekniği geliştirmiştir (Grieshaber, MacKenzie, Vörös & Reimhult 2008). Şekil 4'te Amperometrik/Voltametrik biyosensörlerin çalışma prensibi verilmiştir.

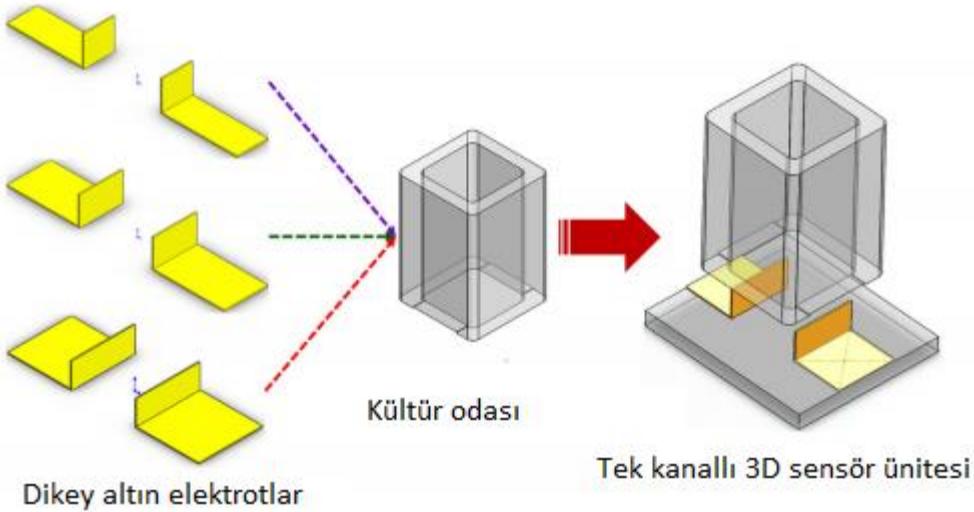


Şekil 4: Amperometrik/Voltametrik biyosensörlerin çalışma prensibi

Empedans Biyosensörler

Elektrokimyasal empedans spektroskopisinin (EIS) ilk yayını 1975'e dayanmaktadır. Sinüzoidal olarak değişen küçük bir potansiyel U 'nun uygulanmasıyla, sonuçta ortaya çıkan akım tepkisi ölçülür. Uygulanan potansiyelin uyarma frekansını f bir frekans aralığı boyunca değiştirerek, sistemin karmaşık empedansı, gerçek ve hayali empedans bileşenlerinin toplamı, frekansın bir fonksiyonu olarak (yani açısal frekans ω) hesaplanabilir. EIS, bir elektrokimyasal sistemin iletkenliğini/öz direncini veya kapasitansını etkileyebilecek herhangi bir içsel malzeme özelliğini veya spesifik işlemleri inceleme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle EIS, biyosensör transdüksiyonu için, polimer bozunması çalışması gibi materyallerin geliştirilmesi ve analizinde faydalı bir araçtır. Örneğin, iletken elektrotları yalıtım polimerleri ile kaplayarak ve daha sonra bunu bir enzimatik reaksiyona sokarak, polimer kaplamanın doğrudan veya dolaylı olarak bozulması incelenebilir. Reaksiyon sırasında mevcut serbest iyonlar polimere nüfuz edebiliyorsa, polimerin yalıtıcı doğası tehlikeye girecek ve dönüştürücü elemanın değiştirilmiş empedans özelliklerine yol açacaktır. Elektrokimyasal EIS'nin yeni bir örneği, bir hidrojen peroksit (HRP) biyosensörünün üretim sürecini karakterize etmek için kullanılmasıdır (Gabriela Montaño-Figueroa, Wheelis, Hedden, Alshareef, Dammanna, Shaik & Quevedo-Lopez, 2018).

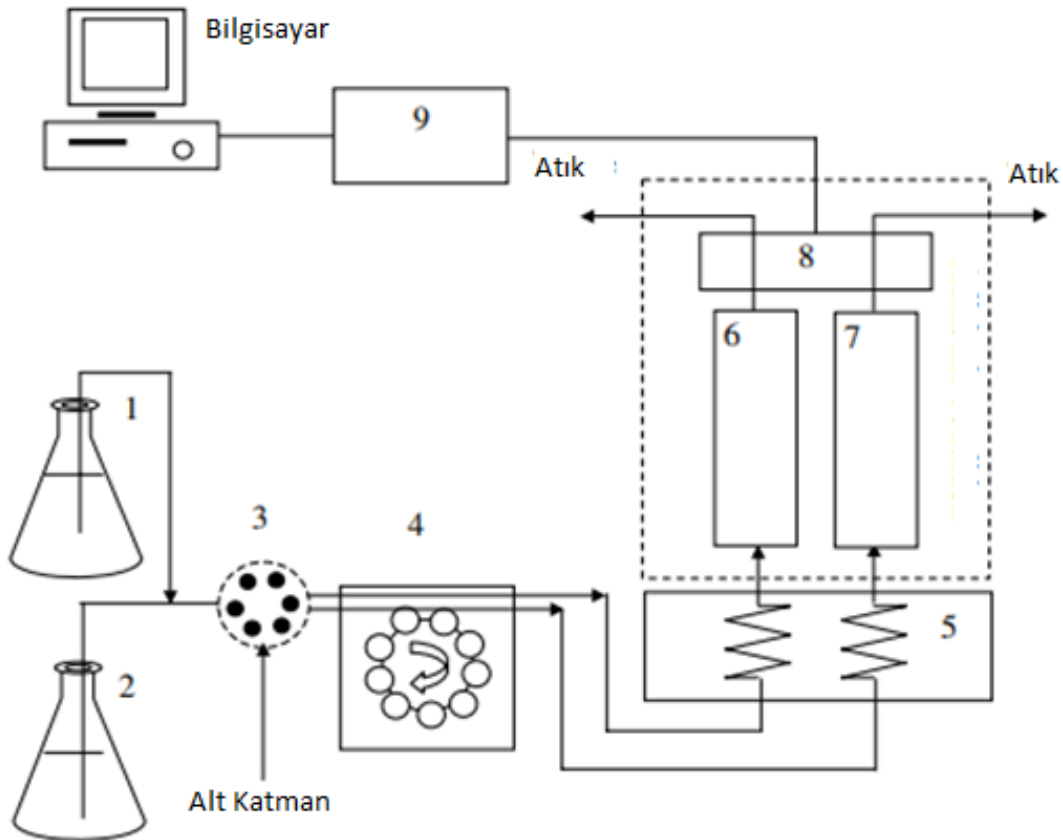
Elektrokimyasal algılama için empedans teknikleri, modifiye edilmiş elektrotların yüzeylerindeki biyolojik tanıma olaylarından kaynaklanan elektriksel özelliklerdeki değişiklikleri izlemek için yararlıdır. Örneğin, elektrotun iletkenliğindeki değişiklikler, elektrot yüzeyi üzerindeki protein immobilizasyonu ve antikör-antijen reaksiyonlarının bir sonucu olarak ölçülebilir (Grieshaber ve diğerleri, 2008).



Şekil 5: Empedans biyosensörünün yapısı (Pan, Hu, Wei, Gong, Zhang, Wan & Wang, 2018)

1.1.2. Kalorimetrik Biyosensörler

Şekil 6, kalorimetrik biyosensörün şemasını göstermektedir. Ön işlemden geçirilmiş numune (meyveler, sebzeler, vb.) Numune kabında (1) saklanır ve sabit inkübasyonlu ikiz kanallı bir peristaltik pompa (4) ile belirli inkübasyon süresi içinde sisteme akar. Substrat, sisteme enjeksiyon valfi (3) vasıtasıyla niceliksel olarak girer ve ölçülecek çözeltiyi oluşturmak için tamponla karıştırılır. Çözeltinin iki akımı, sabit bir sıcaklığa ulaşmak için termoelektrik termostadı (5) geçirir, daha sonra aynı zamanda sırasıyla enzim reaksiyon hücresine (6) ve referans hücresine (7) girer. Belirsiz ısıнын etkisini neredeyse ortadan kaldıracak şekilde ayarlanan referans hücre, enzimatik reaksiyon hücresi ile özdeş bir yapıya (8 · 80 mm) sahiptir. Enzimatik reaksiyon, enzim reaksiyon hücresinde meydana gelir, ancak referans hücrede gerçekleşmez. Bu nedenle, iki hücrenin çıkışlarında bir sıcaklık farkı vardır. Sıcaklık farkı sinyalleri, iki bağlantısı sırasıyla enzim reaksiyon hücresi ve referans hücresinin çıkışlarına yerleştirilen termopil sensörü (8) tarafından alınır. A/D dönüştürücü (9), ısıpıl sensörü ile kişisel bilgisayar (PC) arasına bağlanmıştır. Bir tümleştirme programı kullanılarak çözümlenir (Zheng, Hua, Sun, Xiao, Xu & Wang, 2006).



Şekil 6: Akış enjeksiyon kalorimetrik biyosensörün prensibi. (1) numune kabı; (2) tampon kabı; (3) enjeksiyon valfi; (4) peristaltik pompa; (5) termoelektrik termostat; (6) enzim reaksiyon hücresi; (7) referans hücresi; (8) ısıpıl sensörü; (9) A / D dönüştürücü (Zheng ve diğerleri, 2006).

1.1.3. Piezoelektrik Biyosensörler

“Piezoelektrik” terimi, Yunanca “basmak için” anlamına gelen piezen anlamına gelir. Piezoelektriklik üzerine ilk araştırma, yüzeylere mekanik bir stres uygulandığını gözlemleyen Jacques ve Pierre Curie tarafından yapılmıştır. Curies ayrıca bu kristaller arasında bir voltaj uygulamasının karşılık gelen bir mekanik zorlamaya neden olduğu ters piezoelektrik etkisini doğrulamıştır. Kristal substrat boyunca alternatif bir elektrik alanının uygulanması, alternatif bir gerinim alanı ile sonuçlanır. Bu, kristalde titreşimli veya salınımlı bir harekete neden olarak akustik duran dalgaların oluşmasına neden olur. Çeşitli kriterlere bağlı olarak, osilatör, karakteristik bir rezonans frekansında titreşim için güçlü bir tercih gösterir.

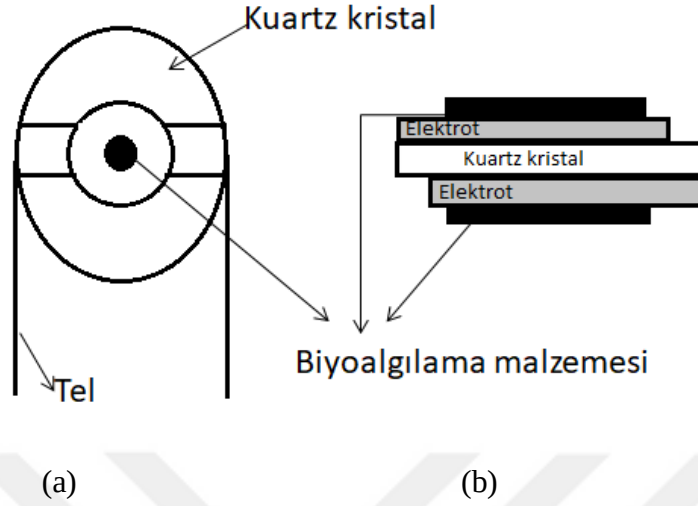
Birçok malzeme türü (kuvars, turmalin, lityum niobat veya tantalat, yönlendirilmiş çinko oksit veya alüminyum nitrit) piezoelektrik etki gösterir, ancak kuvarsın özellikleri onu analitik uygulamalarda kullanılan en yaygın kristal türü yapar. Biyosensörlerde en çok kullanılan cihazlar genellikle AT-kesimli kuvars kristalleri kullanan toplu akustik dalga (BAW) tabanlıdır.

Akustik dalgalar, dalga yönlendirme yapısının tipi (dökme malzeme, yüzey ve plaka) ve parçacığın yer değiştirmesiyle dalganın yayılma yönüne (boyuna, enine) veya yüzeye (yatay, dikey) göre ayrılır. Yığın dalgalar malzemenin hacminden geçerek ilerler.

AT-kesim kristali tipik olarak +35150 °’lik bir açıda kesilir ve oda sıcaklığında veya yakınında sıfır frekans sıcaklık katsayısına sahiptir, bu da sıcaklıktan dolayı minimum frekans değişiklikleri ile sonuçlanır. AT-kesim kristalleri kalınlık kesme modunda salınır.

Sıvı algılama sisteminde bir piezoelektrik kristal için görülen frekans değişimini hangi parametrelerin belirlediğini tanımlayan çalışmalar bir dizi araştırmacı tarafından yapılmıştır. Bu çalışmalardan rezonans frekansı, arayüzey sıvı özelliklerine (yani yoğunluk, viskozite, iletkenlik ve dielektrik sabiti), ince film sertliğine ve elektrot morfolojisine bağlı olarak sonuçlanmıştır.

Piezoelektrik kristaller, küçük boyutları, yüksek hassasiyetleri, inşaat ve işletme kolaylığı, hafifliği ve gereken düşük güçleri nedeniyle mikro teraziler ve bir mikro viskometre olarak kullanılmıştır. Kuvars-kristal mikro terazisi (QCM) geleneksel olarak ince film biriktirme kontrolü, dağlama çalışmaları, aerosol kütle ölçümleri ve uzay sistemi kontaminasyon çalışmaları gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. Bununla birlikte, son zamanlarda, analiz alanına piezoelektrik cihazların uygulanmasına duyulan ilgi artmıştır, çünkü kristal üzerinde uygun bir tanıma katmanı veya molekülü kaplandığında moleküler algılama için birçok fırsatın açılacağı anlaşılmıştır. Özellikle, piezoelektrik biyosensörler gıda, çevresel ve klinik analizlerinde geniş bir uygulama alanı bulmuşlardır (Tombelli, Minunni & Mascini, 2005).



Şekil 7: Piezoelektrik biyosensörünün (a)üstten görünümü. (b)en-kesit görünümü

1.1.4. Optik Biyosensörler

Optik biyosensörler, optik lifler üzerinden iletim sistemi prensibine dayanarak çalışır. Lifler üzerine, seçilen molekül uygun bir yöntemle immobilize edilmelidir. İmmobilizasyon sonrasında oluşan etkileşim ile ortaya çıkan değişimler ölçülür. Optik biyosensörlerin çalışmasının temelinde absorpsiyon, fluoresans gibi temel kimya ilkelerinden yararlanılır (Li, 2006).

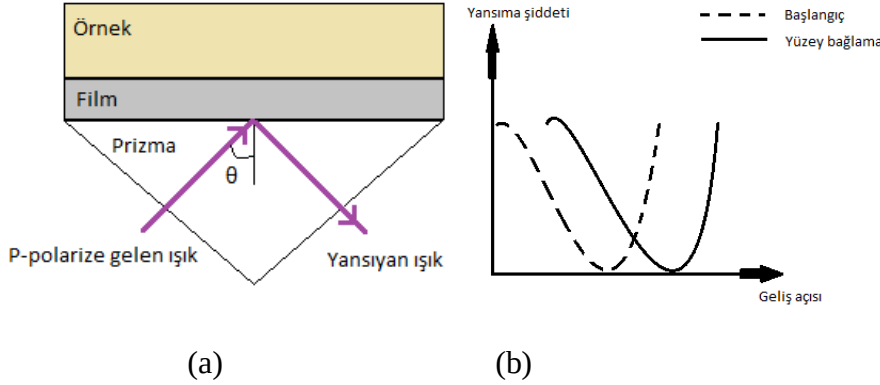
Optik biyosensörler biyomühendislikte ve biyomedikal mühendislikte en sık kullanılan sensörler arasında yer almaktadır. Parmaktan nabız ölçme optik sensörlere verilebilecek bir örnektir. Bu işlem için kırmızı dalga boyuna yakın bir LED ışık kaynağı ve fotoreseptör kullanılmaktadır. Parmak ya da kulak memesi gibi daha ince ve ışığı kolaylıkla geçirebilecek bir bölgeye yerleştirilen ışık kaynağından çıkan ışık, içerisinden geçtiği dokuda bir miktar soğurulur ve alıcıya ulaşır. Dokuda bulunan kan miktarı kalbin atımı ile artıp azaldığı için, buna bağlı soğurulma oranında değişmektedir. Bu şekilde kan hacim sinyali elde edilir. Kan hacim sinyalindeki her bir dalga kan atımını ifade ettiğinden kalp atım hızı (nabız) elde edilmiş olur (Asyalı ve diğerleri, 2014).

Aynı temel prensibi kullanan bir başka sistem ise pulse oksimetrelerdir. Bu cihazlar kandaki oksijeni invaziv olmayan bir yöntem ile ölçmek için kullanılmaktadır. Kanda oksijen, hemoglobin molekülleriyle taşınmaktadır. Oksijen hemoglobine bağlandığında farklı bir molekül oluşturduğundan, oksijen bağlanmamış hemoglobine göre ışığı soğurma oranı farklı olmaktadır. Bu farklılığı tespit etmek için pulse oksimetrelerde iki ışık kaynağı bulunmaktadır. Kırmızı LED ışık kaynağı ve kızılötesi ışık kaynağı kullanılır. Oksijen bağlanmış hemoglobin molekülü kızılötesi dalga boyunu daha çok soğururken, oksijen bağlanmamış hemoglobin molekülleri kırmızı LED ışığı daha fazla soğurur. Soğurulmayan ışıklar alıcı tarafından toplanmaktadır. Dokuda hangi dalga boyunun ne kadar soğurulduğu, alıcıya ulaşan iki dalga boyunun birbirlerine oranı bilgisi kanın oksijenlenme oranını vermektedir (Asyalı ve diğerleri, 2014).

1.2. Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)

Yüzey plazmon rezonansın çalışma prensibi optik biyosensörler prensiplerine dayanır. Son on yılda, biyolojik ve kimyasal açıdan optik sensörlerin kullanımı önemli ölçüde arttı ve bu alanda araştırmalar yoğunlaşmaya başladı. İlk optik sensörler absorpsiyon spektrumundaki değişiklikleri ölçmek üzere tasarlansa da, zamanla sistem üzerinde köklü değişiklikler meydana geldi. Günümüzde ise floresan, lüminesans, fosforesans, interferometri gibi çeşitli ilkelere temellendirilebilir (Homola, Yee & Gauglitz, 1999).

Tanım olarak Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR), metal tabaka (altın, gümüş ya da bakır) üzerine absorplanan seçilmiş ince malzemenin kırılma indisini ölçmek adına tasarlanmış spesifik cihazdır. Açısı bilinen ışık metal tabak üzerine gönderildiğinde, ışığın bir bölümü plazmon elektronlarla etkileşime girer. Etkileşim sonucu ışığın geliş açısında değişim oluşur. Bu değişim metal tabaka üzerine bağlanan malzeme ve ortama gönderilen substrat arasındaki etkileşimi görmemizi sağlar. Açıdaki değişim etkileşim olup olmadığı hakkında çıkarım yapmayı sağlar (Zhao, Tong, Xia & Peng., 2019).



Şekil 8: SPR biyosensör prensipleri (a) Uyarılmış yüzey plazmonları için üç katmanlı geometri. Bir yüzey plazmon dalgası, metal arayüzde uyarılır. (b) SPR reaksiyonu

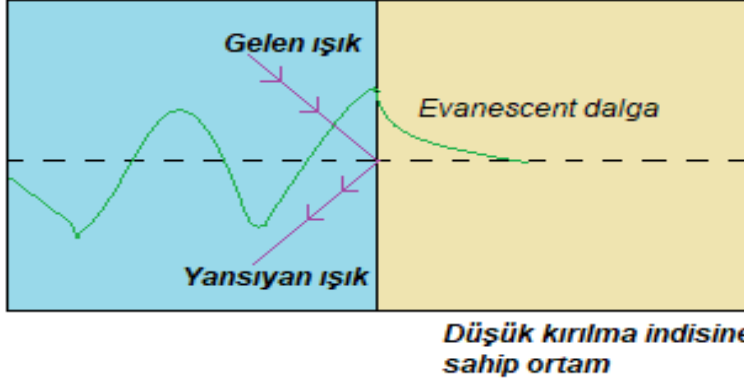
BÖLÜM 2

Materyal Metod

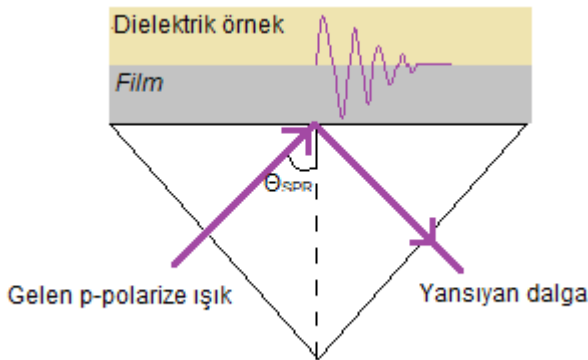
2.1.SPR

SPR'ın çalışma şartlarını fiziksel olarak incelerken öncelikle evanescent dalga terimini tanımlamak gerekmektedir. Evanescent dalga; elektromanyetik bir dalga olarak yayılmayan, fakat enerjisini kaynak çevresinde uzamsal olarak konsantre olan salınımlı bir elektrik ve/veya manyetik alan olarak tanımlanmaktadır. Elektromanyetik bir dalga olsa bile, elektrik veya manyetik alanın, birçok dalga boyundan uzakta gözlemlenen yayılma dalgasına atfedilmeyen bileşeni, sürekli bir alandır. Bu dalgaların yayılım sabiti SPR sistemlerinde kritik bir öneme sahiptir (Yu, Chong, Zhang, Ma & Li, 2020). Şekil 9'da Evanescent dalga üretimi, Şekil 10'da p-polarize ışının SPR sisteminde hareketi gösterilmiştir.

Yüksek kırılma indisine sahip ortam



Şekil 9: Evanescent dalga üretimi



Şekil 10: P-polarize ışının SPR sisteminde hareketi

Radyoaktif olmayan bir elektromanyetik yüzey dalgası, negatif dielektrik malzeme yüzeyiyle aynı yönde ilerler. Dış ortam (hava, su gibi ortamlar) ile sınırda olduğundan

titreşimler iletken yüzey molekülleri ile etkileşime geçer. Bu sınır, çok ince bir sınır olduğundan ortamda oluşacak her hangi bir değişim sonucu etkiler.

Her malzemeye dielektrik dış çevre ile yüzey arasında bağımlı bir frekans ile tanımlanan homojen bir süreklilikle işlem sağlamak sonuca ulaşmanın en kolay yoludur. Dielektrik fonksiyon olarak isimlendirelen bu olay karmaşık bir geçirgenliktir. SPR terimlerini ve varlığını elektronik olarak açıklayabilmek için, iletkenin dielektrik sabitinin bir kısmı negatif olmalı ve dielektrikten daha büyük olmalıdır. Bu olay, hava/metal ve su/metalik arayüzlerin kızılötesi görünür dalga boyu bölgelerinde oluşur.

Lokalize SPR (LSPR) hassasiyeti artırmak için metalik nanoparçacıkların SPR sisteminde kullanıldığı sistemlerdir. SPR sistemine lokalize edilen metal nanoparçalar, gönderilen ışık ile etkileştiğinde bir kısım foton parçaları emilirken, bir kısım foton parçaları etrafa saçılır. LSPR uyarıldığında oluşan yansıma ve soğuma SPR'a göre daha fazla olur (Chen, Liu, Yang, Wilkinson & Zhou, 2019).

Yüzey plazmonunda rezonansın sürekliliğini sağlamak için elektron bombardımanı ya da ışık demeti (görünür veya kızılötesi) kullanılır. Gelen ışın, plazmonun hızıyla eşleşmelidir. P-polarize ışık durumunda, ışığı camdan geçirerek dalga sayısı ve kırınım açısı yaratmak mümkündür. S-polarize durumda ise polarizasyon varış düzlemine dik bir durumda geldiğinden elektronik yüzey plazmonu sürülemez olur. Elektronik ve manyetik yüzey plazmonu Denklem 2.1 ilişkisine uymaktadır.

$$K(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2 t_1 t_2}{\epsilon_1 t_1 + \epsilon_2 t_2}} \quad (2.1)$$

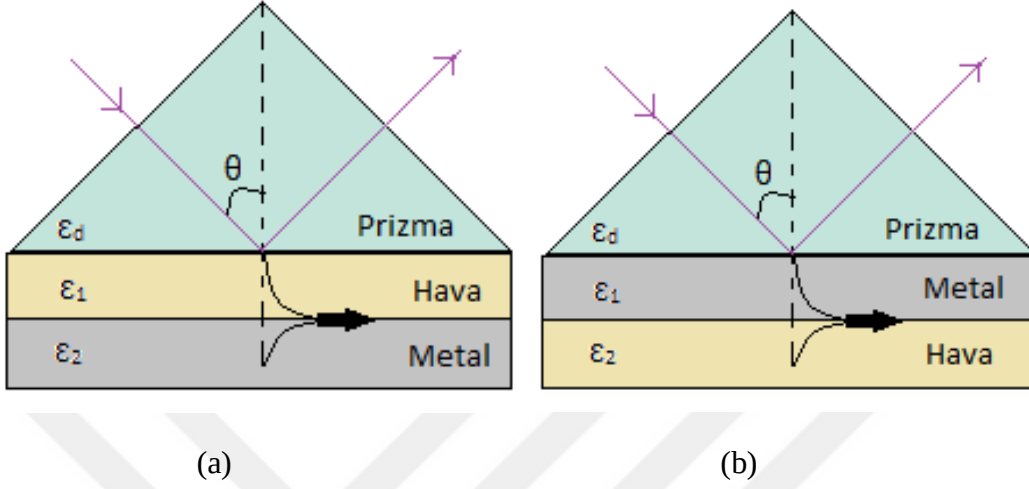
Denklem 1'e göre nispi geçirgenlik(ϵ) ve süre(t), maddenin (metal film 1, cam blok 2) açısal frekansı (ω) ve vakumdaki ışığın hızı (c) nispi geçirgenliğidir.

SPR sisteminin iki konfigürasyonu bulunmaktadır. Otto konfigürasyonunda ışık bir cam bloğu (tipik olarak bir prizma duvarını) aydınlatır ve tamamen dahili olarak yansıtılır. Bir bakıma, ince bir metal film prizma, yüzeydeki prizma dalgalarıyla etkileşir ve böylece duvarın yakınında olan ve hızla kaybolan dalga plazmonu tarafından yönlendirilir. Bu konfigürasyonda hava kullanırken Kretschmann konfigürasyonunda, hava kullanılmaz. Metal tabaka ile prizmanın birleştiği yüzeyde dalgalar oluşur (Kumar, Yadav, Kushwah & Srivastava, 2020). Şekil 11'de Otto konfigürasyonu ve Kretschmann konfigürasyonu farkı gösterilmiştir.

P-polarize ışık yüzey plazmonlarının uyarılmasını sağlarken metal ile prizma yüzeyinde evanescent dalgaların üretimini sağlar. Oluşan bu dalgalar yüzey plazmon dalgalarıyla rezonans hale gelir. Kretschmann konfigürasyonunda havanın ortamda olmaması rezonans durumu daha fazla olur ve elde edilen sonuçların daha doğru olmasını sağlar. Bu nedenle Kretschmann konfigürasyonu daha sık tercih edilir (Hançe, 2018).

Yüzey plazmonu da dahil olmak üzere bir çok spektroskopik ölçüm, yüzey duyarlılığı floresansını, Raman saçılımını ve ikinci harmonik oluşumu arttırmak adına kullanılmıştır. Teknik olarak minimum yansıma açısı (maksimum emme açısı) ölçümü yaygındır. Tespit

mekanizması adsorbe edilmiş moleküllere, rezonant değişen koşulların refraktif lokal indeksinde değişikliklere neden olan yüzey plazmon dalgalarına dayanır.



Şekil 11: (a) Otto konfigürasyonu, (b) Kretschmann konfigürasyonu

SPR'in sabit bağlanmasında iki afinite ligantının belirleneceği bağlanma sabiti belirlenmelidir. Bu sabit denge değeridir. Bu değer herhangi bir reaksiyonda olduğu gibi dinamik SPR parametreleri ve ayırma hızınının, ilişki hızına bölünmesi ile bulunur. Bunun için besleme ligantı kristalli dekstran yüzeyi üzerinde sabitlenir. Bir mikro sistem sayesinde besleme tabasına analit çözelti eklenir. SPR sinyalindeki artış analit besleme ligantının bağlanması olarak yorumlanır. Bağlama sürecinden sonra, istenen analit (tipik olarak tampon) içeren çözelti, besleme ligantı ile analit arasındaki kompleksi ayırır. Analit besleme ligantı ayrılmış olur. Bu işlem sonrasında SPR sisteminde azalma gözlemlenir. Oluşan iki sinyalden balans ayırma sabiti (sabit bağlanma, K_d) değeri hesaplanır. K_a : kaynak ve K_{off} : ayrılma hızı olmak üzere K_d yi veren bağıntı Denklem 2.2' de verilmiştir.

$$K_d = \frac{K_{off}}{K_a} \quad (2.2)$$

2.2. Yüzey Plazmon Rezonans Sensörlerinin Başlıca Uygulama Alanları

2.2.1. Bor Türevleri ile SPR Çalışmaları

4000 yıldır varlığı bilinen bor, 2800 yıl önce porselen temizleme, mumyalama temizlik ve yara tedavisinde kullanılmıştır. Bir element olarak bor 1808 yılında Gay-Lussac ile Baron Louis Thenard tarafından bulunmuştur (Karaağaç, 2015). Simgesi B ve atom numarası 5 olan bor elementi, ametal ile metal arası yarı iletken özellik göstermektedir. Bordan elde edilen bor mineralleri sanayide sayısız alanda kullanılmaktadır. Bor minerallerinden elde edilen boraks ve borik asit özellikle nükleer alanda, savunma sanayinde, jet ve roket yakıtlarında, sabun, deterjan, lehim, fotoğrafçılık alanlarında, cam elyafında ve kağıt sanayinde kullanılmaktadır.

Zhang,, Zhang, Terrill, & Bohn tarafından 1998 yılında yapılan (Au, Ag) -alkantiyolat elektrolit sistemlerinde tam ve kısmi tek katmanların birleştirilmiş ikinci harmonik üretimi,

yüzey plazmon rezonansı ve AC empedans çalışmaları adlı araştırmada, optik ikinci harmonik üretim, çift katman içindeki potansiyellerde tam ve kısmi alkanetiolat kendinden birleştirilmiş mono katmanların varlığında, Ag ve Au elektrolit arayüzlerini problamak için yüzey plazmon rezonansı ve AC empedans ölçümleriyle birleştirilmiştir. Tek cıvalı bor katkılı silikonlar kullanılmıştır.

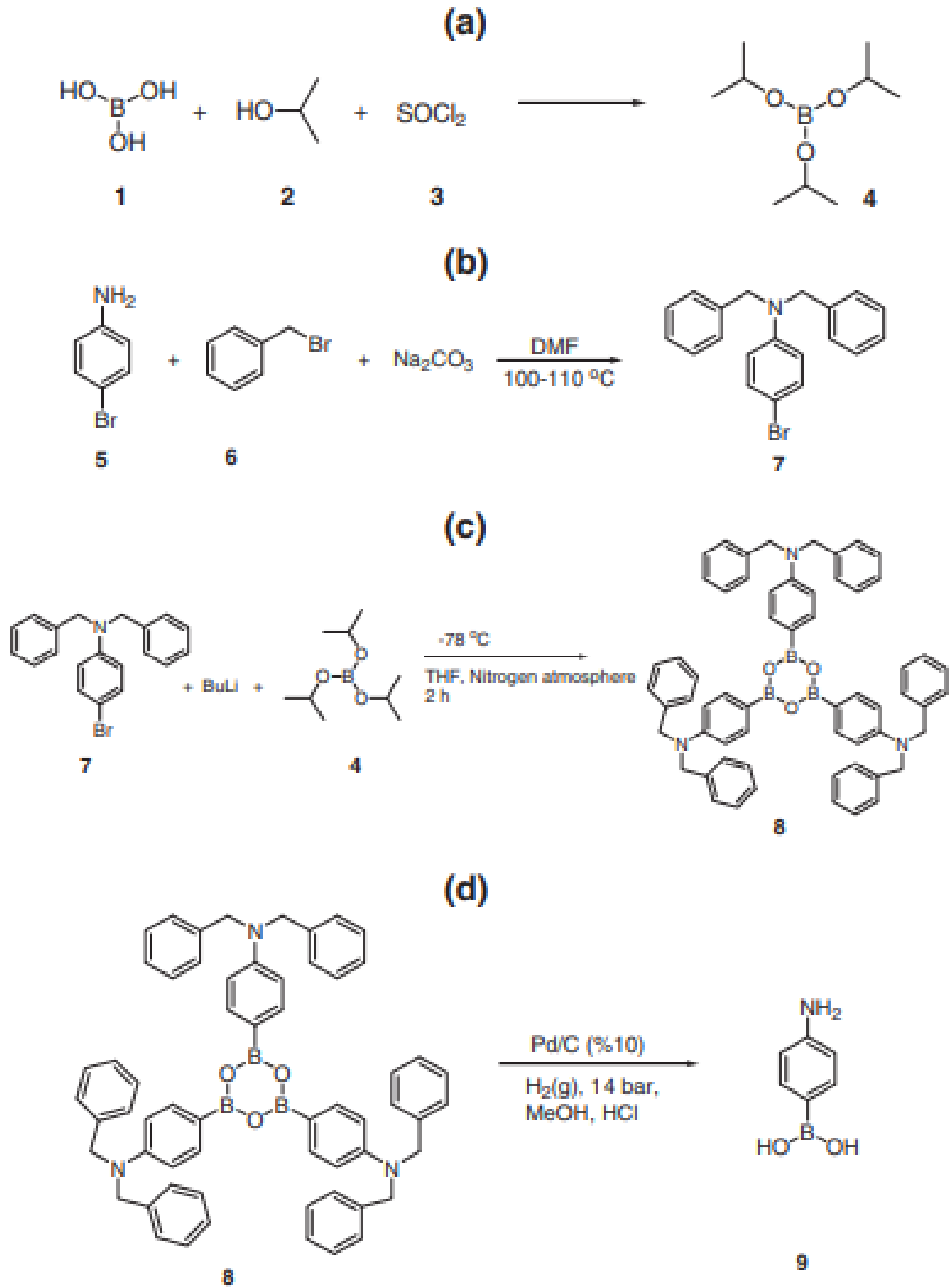
Hwang, Jeon, Lee, Lee, Jeong, Claesson & Boo, (2017) tarafından yapılan ‘Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensör Uygulaması için Bor Nanotel Dizilerinde Kendinden Şablonlu 3 Boyutlu Altın Nanopartiküllerin Büyümesi’ adlı çalışmada, SPR’ın metal nanopartiküller, metal hat ızgaraları ve metal filmlerdeki tüm diziler gibi nanoyapıların şekli, boyutu ve aralığı kontrol edilerek ayarlanabilirlik özelliği kullanılmıştır. Ancak, 3B metal yapıların topografyası ile SPR arasındaki açık ilişki tam olarak anlaşılmamıştır. Bu bağlamda, yarı iletken nanotelin modifiye edilmiş büyümesine dayanan yeni bir 3B metal nanoyapı türü öneriyor ve sunulmuştur. Bu nedenle, bir yapı taşı olarak dikey olarak hizalanmış bor nanotel üzerinde kendinden şablonlu 3D Au nanopartiküllerin üretimi sunulmaktadır.

Mokkath (2019) tarafından yapılan çalışmada, bor (B) ve fosfor (P) katkılı silikon (Si) nanokristallerde ayarlanabilir yüzey plazmon rezonanslarının (SPR’ler) keşfi, üzerine çalışılmıştır. Hesaplama açısından verimli zamana bağlı yoğunluk-fonksiyonel teori hesaplamalarını kullanarak, katkı maddesi konumlarının bir fonksiyonu olarak B ve P katkılı Si NP’lerin optik yanıt modülasyonlarını araştırılmıştır. Daha spesifik olarak, katkılı Si NP’lerin optik özelliklerinin önemli ölçüde katkı atomunun konumuna bağlı olduğunu ve yüzey katkısı yoluyla maksimum spektral yoğunluk geliştirmenin elde edilebileceğini gösterilmiştir.

Diltemiz, Ersöz, Hür, Keçili, ve Say (2013) tarafından yapılan araştırmada başlangıç bileşiği olarak borik asit kullanılmış ve tri-izopropil borat sentezlenmiştir. Şekil 12’de görüldüğü gibi reaksiyonlar sıra ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucunda katalizör süzülüp çözücü buharlaştırılmıştır. Açık kahverengi 4-aminofenil boronik asit (4-APBA) (2,27 g, %96 verim) elde edilmiştir.

Altın kaplı (kalınlık 50 nm) SPR çipleri (25 mm x 12,5 mm) kullanılmıştır. Plazmon eğrilerini incelemek için SPRview yazılımı kullanılmıştır. SPR çipinin yüzeyi 11-merkaptoundekanoik asit ile modifiye edilmiştir. Tiyol gruplarının SPR çipleri üzerine tatbik edilmesi için elektrotlar ve çipler 4 saat boyunca etanol içinde 10 mM 11-merkaptoundekanoik asit çözeltisine daldırılmıştır. Daha sonra sınırsız tiyol gruplarının sensör yüzeylerine çıkarılması için üç kez etanol ile iyice durulanmış ve vakum altında azot gazı ile (200 mm Hg, 40°C) kurutulmuştur.

11-merkaptoundekanoik asit (MUA) çözeltisi kullanılarak karboksil uygulamasından sonra, 4-APBA’nın SPR çipleri yüzeyine homojen immobilizasyonu için, sensör yüzeyleri sırasıyla 16 mM 4-APBA ve 16 mM SA çözeltileri ile etkileşime girmiştir, frekans kayması ve yansıma açısı izlenerek bağlanma verimliliği belirlenmiştir. Şekil 13, 4-APBA ve SA’nın bağlanmasından sonra SPR sensörlerinin yanıtlarını göstermektedir. Şekil 14’de şematik olarak görüldüğü gibi SA, hidroksil grupları yoluyla 4-APBA’ya bağlanmıştır.

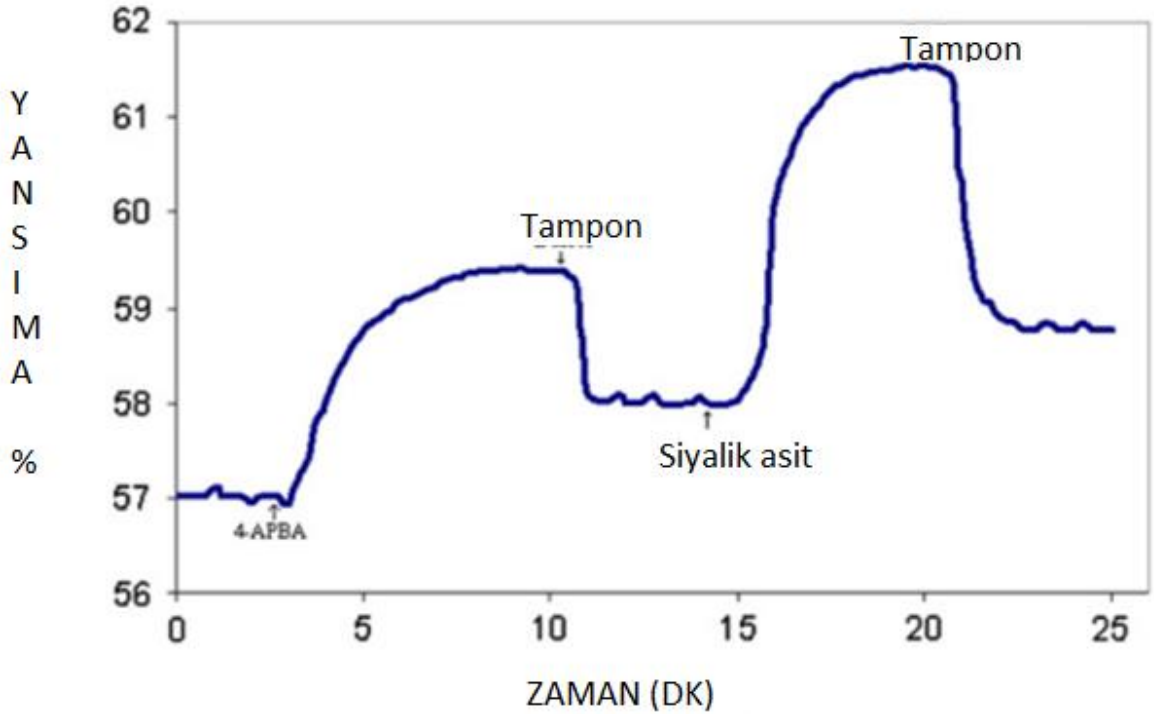


Şekil 12: (a) Tri-izopropil borat sentezi. (b) N, N-Dibenzil-4-bromo anilin sentezi. (c) Trimerik-4- (N, N-dibenzilamino) -fenilboronik asit sentezi. (d) 4-Aminofenil boronik asit (4-APBA) sentezi (Diltemiz ve diğerleri, 2013)

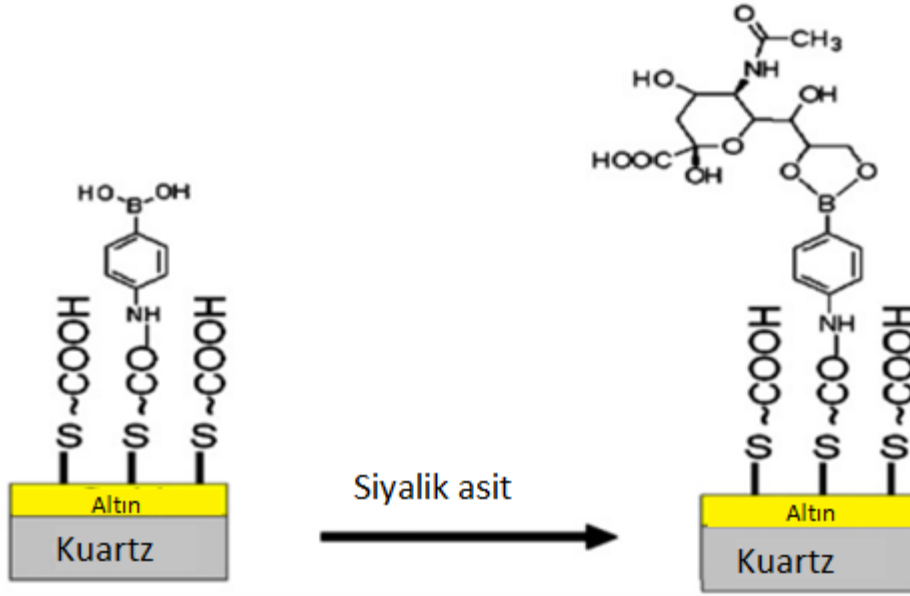
Sulu çözeltiden HA'nın gerçek zamanlı tespiti için 4-APBA ve SA hareketsizleştirilmiş SPR çipleri kullanılmıştır. SPR çipleri dengeleme tamponu (pH:7,4 HEPES tamponu, 30 ml, 1,5 ml dk⁻¹ akış hızı) ile yıkanmıştır ve sensör tepkileri izlenmiştir. Çiplere 0,01 mM-0,16 mM aralığında farklı konsantrasyonlarda sulu HA çözeltileri uygulanmıştır. Frekans kaymaları ve yansıtıcılık özelliği izlenmiştir.

Kinetik analiz için siyalik asitle hareketsizleştirilmiş SPR çipleri kullanılmıştır. SPR çipi pH 7,4 fosfat tamponu (50 ml, 1 ml dk⁻¹ akış hızı) ve sonra deiyonize su (50 ml, 1 ml dk⁻¹ akış hızı) ile yıkanmıştır. Su sirkülasyonu sırasında yüzey plazmon eğrileri alınmış ve rezonans açısı belirlenmiştir. Ayna sistemi rezonans açısına göre düzenlenmiş ve kinetik çalışmalar bu açı değerinde uygulanmıştır. Plazmon eğrileri aldıktan ve aynayı rezonans açısında düzenledikten sonra, SPR sisteminden 5 dakika boyunca su sirkülasyonu olmuştur. Daha sonra, SPR sistemine (25 ml ve 1,0 ml dk⁻¹ akış hızı) 0,01-0,16 mM aralığında çeşitli HA konsantrasyonları uygulanmıştır. Yansıtma (%) değişiklikleri anında izlenmiş ve yaklaşık 30 dakikada plato değerine ulaşmıştır. Her HA konsantrasyonu için adsorpsiyon-desorpsiyon-temizleme aşamaları tekrarlanmıştır.

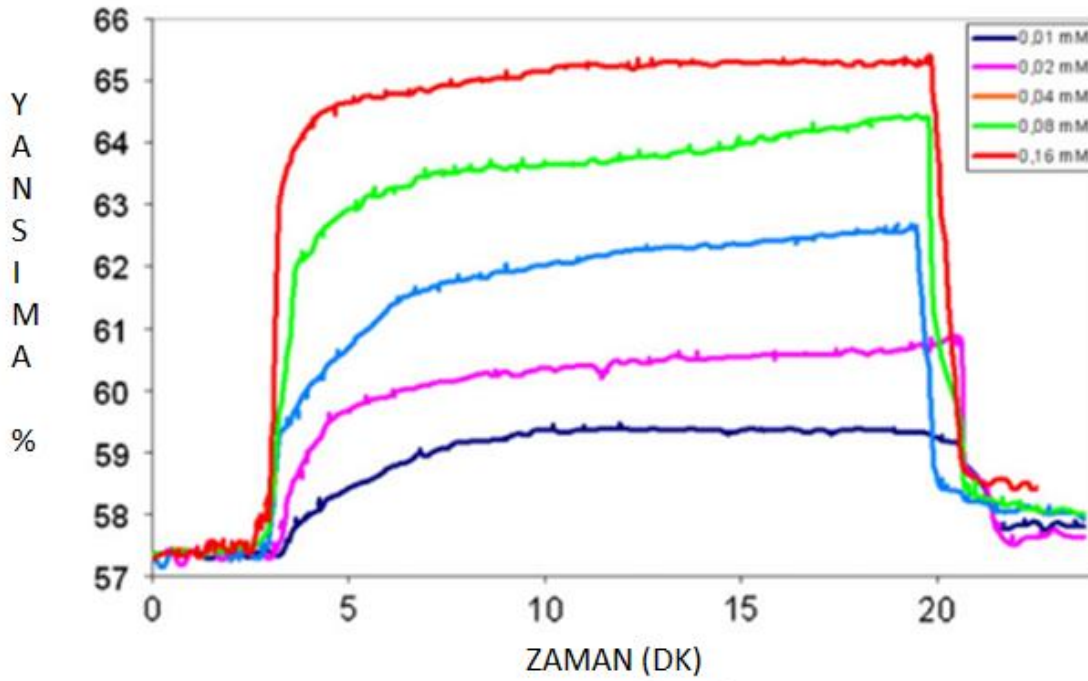
Elde edilen kinetik verileri analiz etmek için SPR1001 yazılımı kullanılmıştır. Şekil 15, SA hareketsiz SPR sensörü kullanıldığında artan HA konsantrasyonlarına sahip yansıtma (%) sensogramını gösterir. SA hareketsizleştirilmiş sensör yüzeyi ile HA arasındaki bağlanma etkileşimleri Langmuir adsorpsiyon izotermi kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 16). Denklem (3) bu amaçla kullanılmıştır.



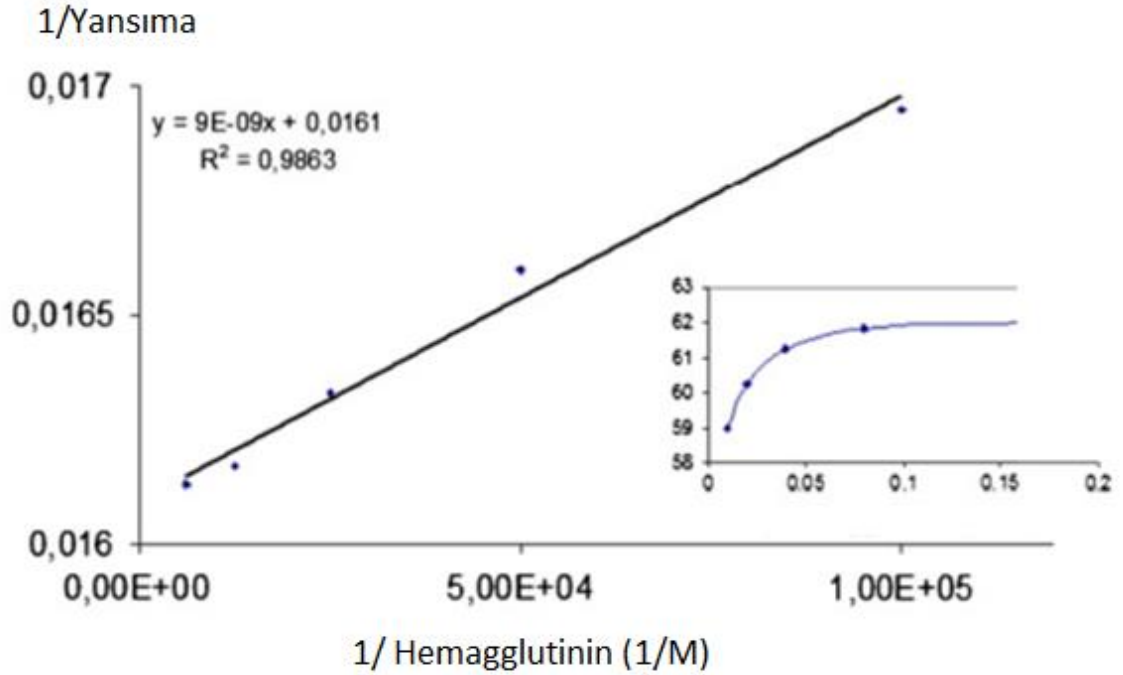
Şekil 13: 4-APBA ve SA'nın bağlanmasından sonra SPR sensörlerinin yanıtları (Diltemiz ve diğerleri, 2013)



Şekil 14: SA, hidroksil grupları yoluyla 4-APBA'ya bağlanması (Diltemiz ve diğerleri, 2013)



Şekil 15: SA hareketsiz SPR sensörü kullanıldığında artan HA konsantrasyonlarına sahip yansıtma (%) sensogramı (Diltemiz ve diğerleri, 2013)



Şekil 16: 4-APBA – SA sabitlenmiş SPR sensörünün Langmuir grafiği (Diltemiz ve diğerleri, 2013)

$$\frac{1}{R_1} = \frac{1}{R_{max}K_A} \frac{1}{C} + \frac{1}{R_{max}} \quad (2.3)$$

Bu denklemde;

R_1 : HA enjeksiyonundan sonra SPR sinyali,

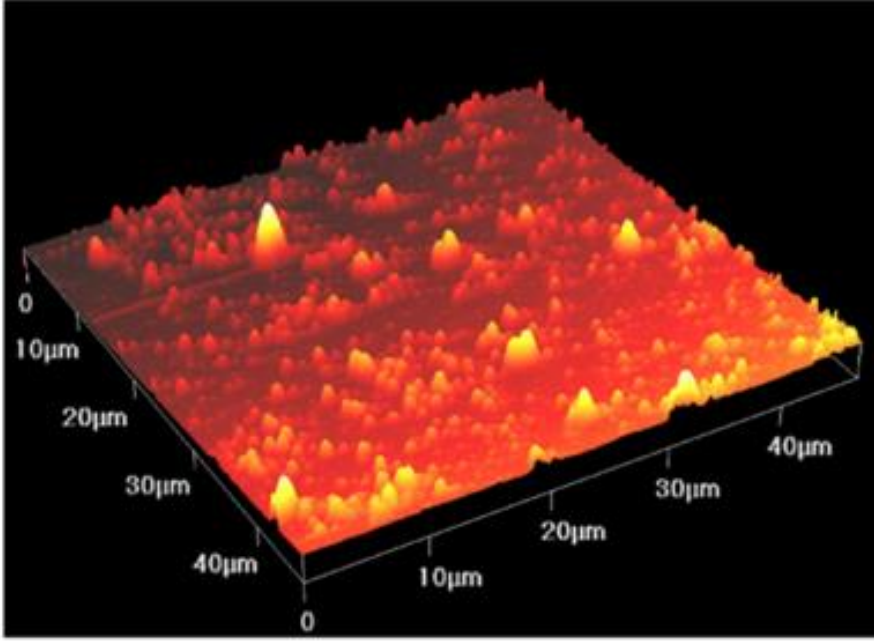
C : HA konsantrasyonu,

R_{max} : Sonsuz HA konsantrasyonu için denge sinyali,

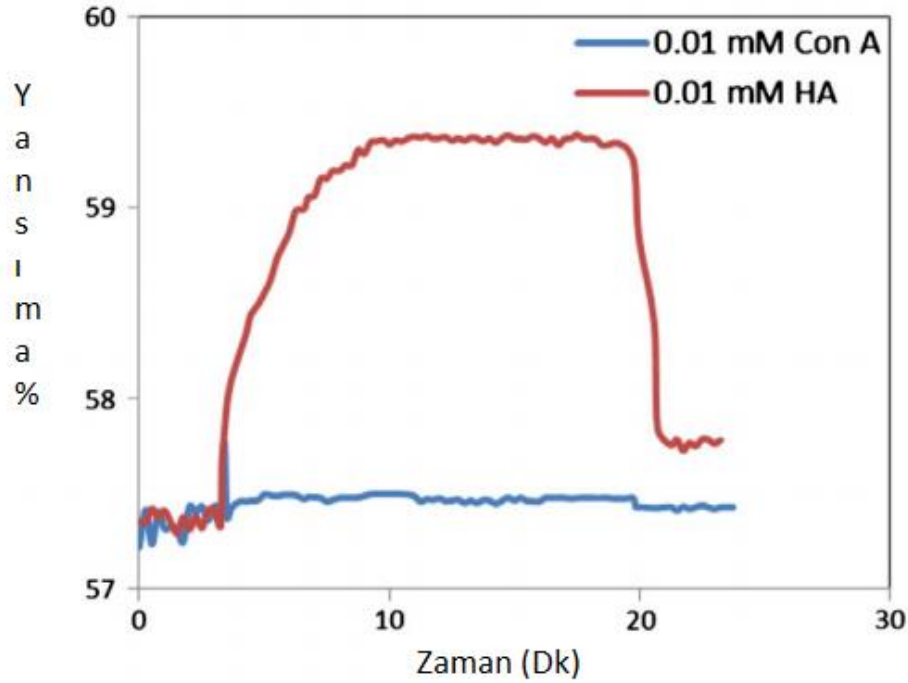
K_A : Afinite sabitidir.

Şekil 17, 0,16 mM HA'nın hareketsizleştirilmesinden sonra SPR sensör yüzeyinin AFM görüntüsünü göstermektedir. Şekilde görüldüğü gibi HA moleküllerinin, sensör yüzeyindeki SA moleküllerine homojen olarak bağlandığı söylenebilir.

4-APBA ve SA hareketsizleştirilmiş SPR nanosensörlerinin seçiciliğini ve özgüllüğünü belirtmek için deneyler yapılmıştır. Bu nedenle, SPR nanosensörlerine çözeltiler (0,01 mM, pH: 7,4 fosfat tamponu) uygulanmıştır. Şekil 18'de görüldüğü gibi, SPR nanosensörleri sırasıyla çözelti ($\Delta f=3,331$ ve $\Delta R=0,261$) herhangi bir yanıt vermemiştir. Ayrıca, nanosensörlerin HA moleküllerine spesifik tepkileri, $\Delta f=39,951$ ve $\Delta R=2,027$ 'dir. Seçicilik oranı, moleküllerin SPR yanıt verilerinin bölünmesiyle hesaplandı ve 7,77 bulunmuştur.

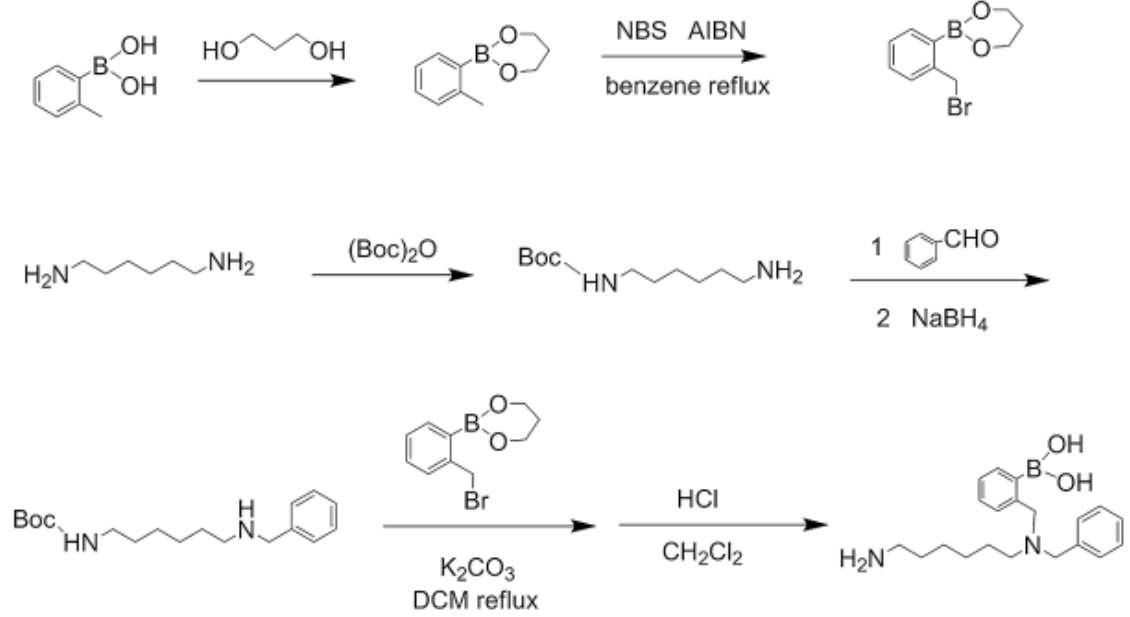


Şekil 17: 0,16 mM HA'nın hareketsizleştirilmesinden sonra SPR sensörünün yüzey morfolojisi (Diltemiz ve diğerleri, 2013)



Şekil 18: SPR nanosensörlerinin Concanavalin A'ya göre seçiciliğinin karşılaştırılması (Diltemiz ve diğerleri, 2013)

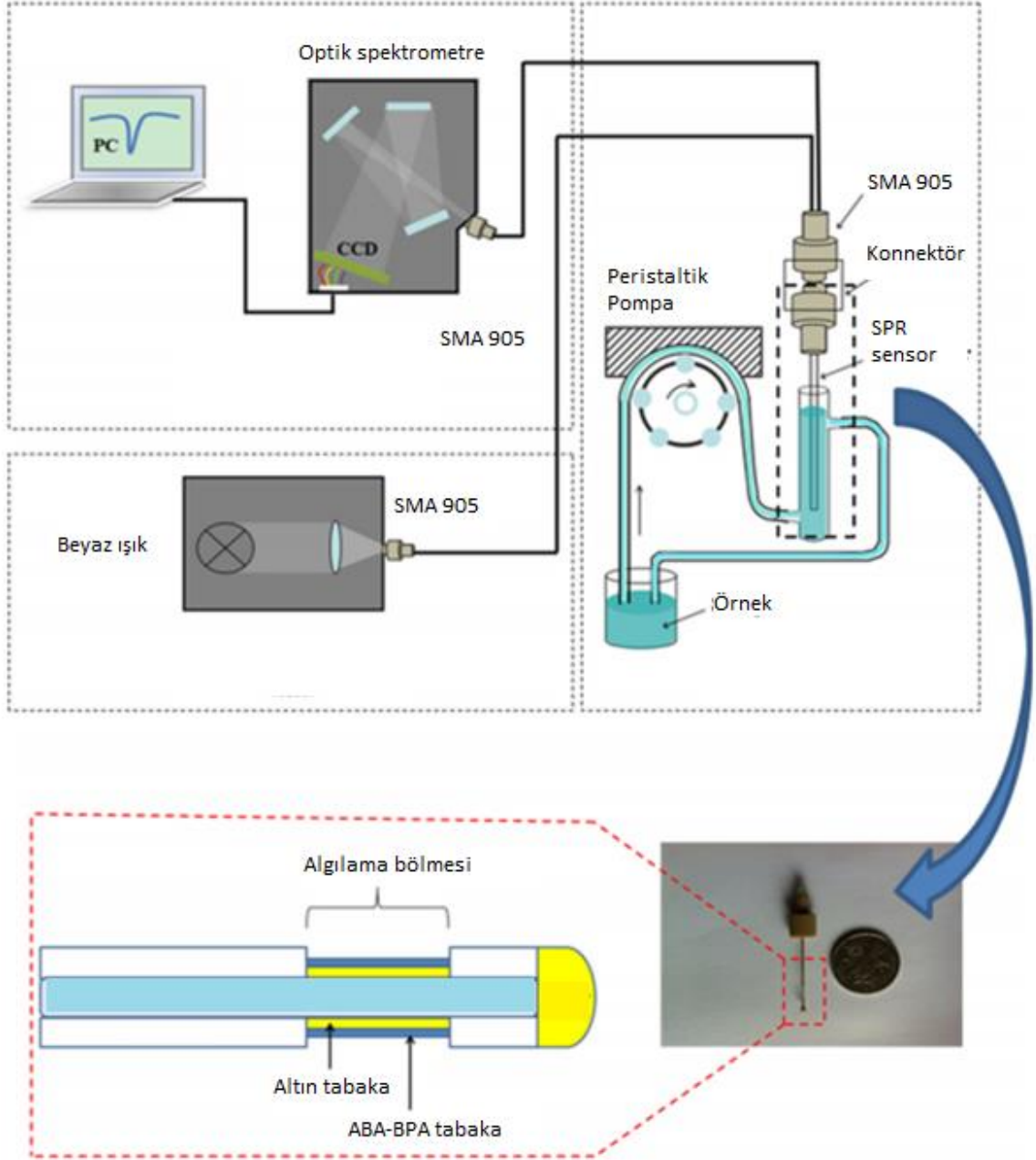
Qian, Liang, Ma, Zhang, Zhao, & Peng (2015) tarafından yapılan araştırmada borik asidin geri dönüşümlü kompleksler oluşturarak cis-diol konfigürasyonunu tanıyabilme özelliğini kullanarak sakarit tespitinde kullanmışlardır. Boronik asit ve sakarit etkileşimlerinin çoğu bazik çözeltide (pH>8.5) gerçekleşmekteyken biyolojik tespit için nötr bir ortama ihtiyaç duyulmaktadır. Bu dezavantajı ortadan kaldırabilmek adına fenilboronik asit türevi üçüncül amin ile sentezlenmiştir. Şekil 19'da çalışmada kullanılan 2 - (((6-aminoheksil) (benzil amino) metil) fenil boronik asit (ABA-PBA)'in sentetik yöntemi verilmiştir.



Şekil 19: ABA-BPA'nın sentetik yöntemi (Qian ve diğerleri, 2015)

Çalışmada kullanılan fiber optik prob, çekirdek çapı 400 μm ve sayısal elyaf açıklığı 0,37 olan çok modlu optik elyaftan yapılmıştır. Lif 45 mm uzunluğunda kesilir. Algılama bölgesinde, 5 mm uzunluktaki kaplama elyaftan çıkarılır. Elyaf uç yüzü ince zımpara kağıdı ile düz bir şekilde taşlanır ve alkol ve deiyonize su ile temizlenir. 300 nm Ag filmi, ışık yansıması için bir ayna olarak fiber uç yüzüne püskürtülür. Daha sonra, fiber-optik algılama bölgesine sırasıyla bir çift krom (2 nm) ve altın (yaklaşık 60 nm) püskürtülür. Şekil 20'de, fiber optik algılama sisteminin şematik diyagramını gösterilmektedir.

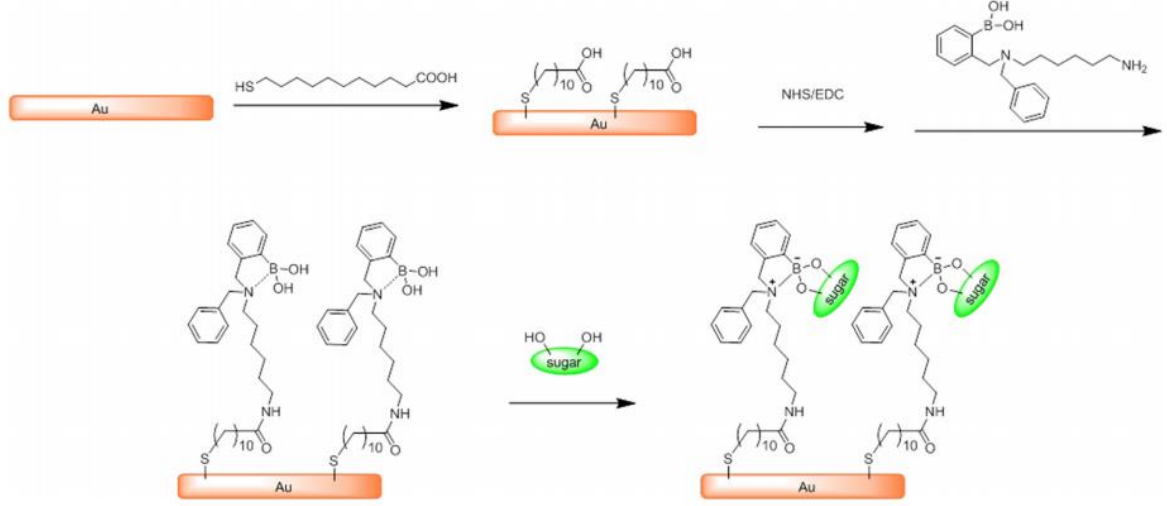
Spektrometrenin optik çözünürlüğü 0,25 nm ve tespit aralığı 477 nm ila 929 nm'dir. SPR probunda aynı tür lif kullanan ışık demetini iletmek için kendinden yapılmış bir Y tipi fiber atlama kablosu uygulanmıştır. Işık kaynağından gelen ışık algılama bölgesine girmiş ve yüzey plazmon dalgası Au tabakasının dış sınırında uyarılmıştır. Daha sonra yansıyan ışık spektrometreye girmiş ve sinyali bir bilgisayara aktarılmıştır. Veri işleme ve analiz programı olarak LabVIEW kullanılmıştır.



Şekil 20: Fiber optik algılama sisteminin şematik diyagramı (Qian ve diğerleri, 2015)

Au-kaplamalı fiber-optik SPR probu, algılama bölgesinde bir karboksil sonlandırılmalı kendiliğinden monteli monolayer (SAM) oluşturmak için gece boyunca 11-Merkaptoundekanoik aside (EtOH içinde 10 mM) daldırılmıştır. Daha sonra etanol ve deiyonize su ile durulanmıştır. Elyaf, 15 dakika boyunca 0,5 M NHS/EDC çözeltisine daldırılmıştır, deiyonize su ve metanol ile durulanmıştır. Daha sonra ABA-PBA çözeltisine (MeOH içinde 20 mM) aktarılmış ve 12 saat tutulmuştur.

Çalışmada 3 çeşit (glukoz, fruktoz ve mannoz) monosakkarit üzerinde çalışılmıştır. Konsantrasyonlar, 10 mM ila 50 mM arasında değişmektedir. Temodize edilmiş SPR fiber prob sakarit çözeltisine daldırıldığında, rezonans dalga boyu, sakaritin konsantrasyonu ve yapısındaki değişikliklerle değişecektir. Algılama bölgesinin kimyasal modifikasyon prosedürü ve bunun boronik asit ve sakarit arasındaki etkileşimi Şekil 21'de gösterilmektedir.



Şekil 21: SPR algılama bölgesinde dekorasyon prosedürü ve sakarit tespitinde uygulama (Qian ve diğerleri, 2015)

Qian, Zhang, Yuan, Ji, Liu, Zhao, Han & Peng (2018) tarafından yapılan bir diğer araştırmada boronik asidi glikoprotein tespitinde kullanmışlardır. Fenilboronik asidin (PBA) tetrahedral formunu stabilize etmek için glikoprotein tarafından sunulan N ve O atomlarının nötr ortamdaki glikoproteinlere bağlanabileceği saptanmıştır. Ortamın pH'ı asit olduğunda, ester bağı kırılacak ve boronik asit grubu yenilenecektir.

Algılama lifi olarak çekirdek çapı 400 µm ve sayısal açıklığı 0,37 olan çok modlu bir fiber kullanılmıştır. Fiber optik SPR probunun üretimi için, ilk olarak, elyaf 7 cm uzunluğunda kesilmiştir. Daha sonra, plastik kaplama ve kaplama, algılama yüzeyi olarak fiberin merkezi çevresinde 5 mm uzunluğunda çıkarılmıştır. Son olarak, 2 nm kalınlığında Cr kaplama ve daha sonra 50 nm Au kaplama iyon ışını püskürtme biriktirme ile algılama bölgesine püskürtülmüştür. Elyafın algılama kısmı, algılama sistemine iki SMA905 konnektörü ile bağlanmıştır. Algılama işleminde, bir halojen ışık kaynağı fiber optik SPR probuna bağlanmıştır. Toplam iç yansıma ile ışık, fiber ile metal katman arasındaki arayüzde yüzey plazmonları ile etkileşime geçmiştir. SPR sensörünün iletim spektrumunda, bir spektrometre ile ölçülen bir rezonans bulunmuştur. Sinyal, geliştirilen bir Labview programı tarafından analiz ve işleme için gerçek zamanlı olarak bilgisayara aktarılmıştır.

PBS'de modifiye edilmiş fiber-optik SPR sensörleri, PBS'de glikoproteinleri tespit etmek için kullanılmıştır. Rejenerasyon tamponu etanol, PBS olarak kullanılmıştır. Protein ve protein etkileşimlerinde, RNaz B tarafından modifiye edilen prob, HEPES tamponunda farklı

ConA konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. ConA, yapıyı stabilize etmek için genellikle Mn^{2+} ve Ca^{2+} 'ye ihtiyaç duymaktadır. Ca^{2+} ve Mn^{2+} , PBS birikmesine neden olacaktır. Bu yüzden PBS yerine HEPES tamponu seçilmiştir. Ayrıca, ConA'yı soymak ve sensör yüzeyini yeniden oluşturmak için 8M üre kullanılmıştır (Qian ve diğerleri, 2018).

Özkan, Atar ve Yola (2019) tarafından yapılan araştırmada bor nitrürü kanser tedavisi için kullanılmaktadır. Hekzoganal bor nitrür (hBN) nanoyapı geliştirilmiştir. 10,0 mg/ml hBN nano kompoziti ile 2,0 mg/ml fonksiyonelleştirilmiş gümüş altın nanoparçacıkları (AgAuNP) karışımı 10 saat ultrasonikasyona tabi tutulmuştur.

SPR yüzeyi ilk olarak asidik piranha çözeltisi ile temizlenmiştir. Temiz SPR yüzeyi AET işlevselleştirilmiş çekirdek kabuğu nanoparçacıkları-hegzoganal bor nitrür (Ag@AuNPs-HBN) nanokompozit çözeltisine (1,0 M) daldırıldıktan sonra, modifiye edilmiş yüzey yüzeyleri azot atmosfer altında kurutulmuştur.

Ag@AuNPs-HBN nanokompozit değiştirilmiş SPR çipi üzerinde etoposid baskılı sensörün geliştirilmesi gerçekleştirilmiştir. 25 µl nihai çözelti, 15 saniye boyunca homojen ince filmler yapan "spin kaplama yöntemi" kullanılarak 2-aminoetantiol işlevselleştirilmiş Ag@AuNPs-HBN nanokompozit ile SPR çipine bırakılmıştır. Polimerizasyon 30 dakika boyunca UV ışığı (365 nm) ile gerçekleştirildikten sonra, çip vakumlu fırında kurutulmuştur. Baskı seçiciliği, etoposidsiz baskılı olmayan/Ag@AuNPs-HBN/SPR kullanılarak analiz edilmiştir.

Etoposit ve metakriloylamidoglutamik asit arasındaki elektrostatik kuvvetler sayesinde, yığın sisteminde desorpsiyon maddesi olarak 1,0 M NaCl kullanılmıştır. Ag@AuNPs-HBN nanokompozit değiştirilmiş SPR çipi (baskılı polimer/Ag@AuNPs-HBN/SPR) üzerine etoposit baskılanmış polimer 1,0 M NaCl çözeltisine (50 ml) daldırılmıştır. SPR çipi vakum altında azot gazı (200 mmHg, 25°C) ile kurutulmuştur (Özkan ve diğerleri, 2019).

2.2.2. Hemoglobin Türevleri ile SPR Çalışmaları

Hemoglobin A1C (HbA1C) kişiye şeker hastası tanısı koymak ya da tedavinin işlevselliğini ölçmek amacıyla yapılan kan tahlilidir. HbA1C, uzun süre yüksek kan şekere maruz kaldığında ortaya çıkan bir hemoglobin türevidir. Bu özelliği ile diyabet hastalarının üç aylık ortalama kan şekerini ölçmek amacıyla testler yapılmaktadır. Bilim insanları bu testleri hızlandırmak ya da daha efektif hale getirmek adına HbA1C üzerinde çalışmalar yapmaktadır.

Liu, Chen, Shih, Chang & Chen (2008) tarafından yapılan araştırmada, yüzey plazmon rezonansı kullanılarak fenilboronat tek tabakası ve glikozlu hemoglobin arasındaki tanıma etkileşiminin incelenmesi üzerine çalışılmıştır. Boronat, HbA1c'yi taklit eden antikora sahip olduğundan, genellikle HbA1c'yi saptamak için kullanılır. Bununla birlikte, fenilboronik asit türevlerinin oranı ve diol bileşimi, çözeltinin pH'ı ve fenilboronik asit türevlerinin stereoyapısı gibi faktörler, fenilboronik asit türevleri ve diol bileşimi arasındaki etkileşimleri etkileyebileceği bildirilmiştir.

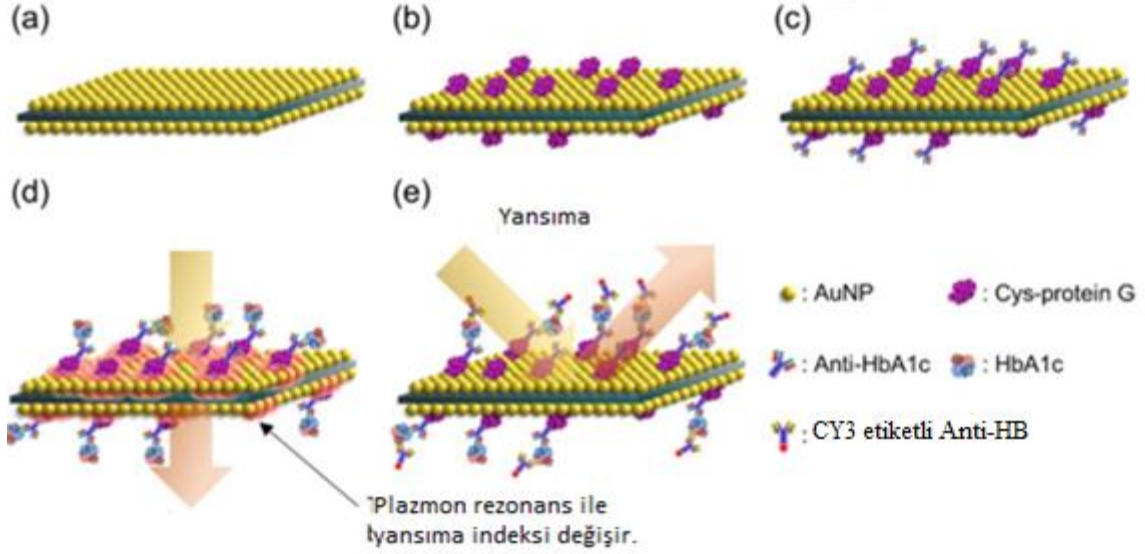
Sun, Wu, Chang, Chen, & Liu (2020) tarafından yapılan çalışmada, glikatlanmış hemoglobin (HbA1c), diyabetin izlenmesi ve teşhisi için önemli bir belirteç olarak geniş çapta

araştırılmıştır. Aptamerlerin yüksek seçiciliği, kolay hazırlanması ve uygun şekilde korunmasının avantajları nedeniyle, son yıllarda aptasensörler kullanılarak glikolize hemoglobin tespiti üzerine araştırmalar büyük ilgi görmüştür. Bununla birlikte, çözeltinin pH'ı ve tuz konsantrasyonu ve aptamerin yapısı gibi faktörler, HbA1c ile aptamer arasındaki etkileşimleri etkileyebilir. Bu çalışmada faktörler SPR kullanılarak değerlendirilmiştir.

Heo, Kwak, Lee, Kim, Lee, Kim, Kwon, Kim, & Huh (2017) tarafından yapılan araştırmada HbA1C testine yenilik getirmek adına bu ürün üzerinde çalışma yapılmıştır. Altın (III) klorür trihidrat, sodyum sitrat dehidrat, gliserol (% 99,0), Anti-hemoglobin A1C antikoru (Anti-HbA1C), antihemoglobin antikoru (anti-Hb) ve hedef antijen olarak HbA1C kullanılmıştır.

Lokalize SPR (LSRP) çipinin duyarlılığı, gliserol çözeltisinin kırılma indisine karşı absorpsiyon kalibrasyon eğrisi ile belirlenmiştir. Deiyonize su veya gliserol çözeltileri ile doldurulmuş bir küvet içinde tutulan LSPR çipinin absorpsiyon değerleri, UV vis spektrometresi ile 540 nm'de ölçülmüştür. Deiyonize suda ağırlıkça % 5, 15, 25 ve % 40'a seyreltilmiş deiyonize su ve gliserol çözeltilerinin kırılma endeksleri sırasıyla 1,33030, 1,33880, 1,35106, 1,36404 ve 1,38413'tür.

Altın nanoparçacıklarına (AuNP'lere) ardışık olarak konjüge edilen protein konsantrasyonlarının optimizasyonu, protein bağlama deneyi ile belirlenmiştir. İlk olarak, anti-HbA1c'yi AuNP'lere bağlamak için $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ sistein bakımından zengin protein G bağlayıcı (Cys-protein G) kullanılmıştır. $100 \mu\text{g/ml}$ Cys-protein G, 10 dakika boyunca AuNP'lere reaksiyona sokulmuştur. Daha sonra anti-HbA1c ($0,1-100 \mu\text{g ml}^{-1}$), 1:200 seyreltilmiş HbA1C'yi yakalamak için 10 dakika süreyle Cys-protein G'ye konjüge edilmiştir. HbA1C konsantrasyonu, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ anti-Hb kullanılarak optimize edilmiştir. HbA1C'nin saptanması Şekil 22'da gösterilmektedir. İlk olarak, AuNP'lerin kendi kendine bir araya getirilen tek tabakası, AuNP'lerin polimer substratı üzerine bırakılması için benzer yöntem kullanılarak plastik film üzerine bırakılmıştır (a). Cys-protein G, Cys-protein G'nin sistein tortusuna dahil edilen S-H grubu tarafından AuNP'ler konjüge edilmiştir (b). Cys protein G, Au üzerinde immobilizasyon için sistein açısından zengin tortu ve antikor konjügasyonu için protein G'nin amino asit dizisinden oluşmaktadır. Sistein, S-H grubuna sahip olan ve Au ile kovalent bir bağ oluşturduğu iyi bilinen amino asitlerden biridir. IgG'nin bir izotipi olan anti-HbA1C'nin antijenik olmayan bağlayıcı fragmanına (Fc fragmanı) iyi bağlanmış sispotein G Şekil 22 c'de gösterilmektedir. HbA1C, anti-HbA1C antikorunun bir antijenik bağlama fragmanına (Fab fragmanı) spesifik olarak konjüge edilmiştir (d). Hedef protein genellikle, bu çalışmada protein konjügasyonu prosedürü gibi immünoanaliz temelli bir SPR sensöründeki proteinlerin seri konjügasyonu kullanılarak saptanmıştır. Son olarak, Cy3-etiketli anti-Hb (anti-Hb-Cy3) hedef proteine reaksiyona sokulmuştur (e). Anti-Hb-Cy3'ün saptanması, Cy3, Raman aktif boyasının parmak izi bölgesinde SERS analizi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

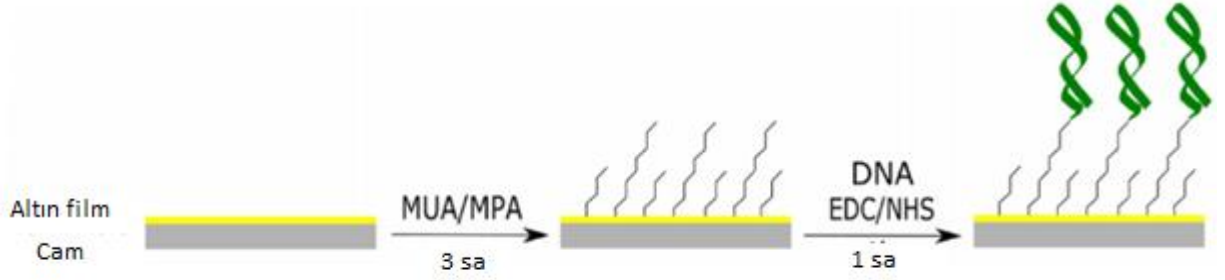


Şekil 22: LSPR ve SERS yoluyla HbA1C'yi saptamak için biyomoleküllerin konjugasyonunu gösteren şematik diyagramlar. (a – d) LSPR kullanılarak tespit için biyomoleküllerin AuNPs-montajlı PET film üzerine bağlanması için deneysel prosedür. (e) SERS kullanılarak tespit için anti-Hb-Cy3'ün HbA1c'ye konjugasyonu (Heo ve diğerleri, 2017)

HbA1C'nin SERS tekniği ile saptanması, LSPR analizleri için bir dizi protein konjugasyonundan sonra gerçekleştirilmiştir. LSPR çipi üzerindeki antijenlerin konjugasyonunun tamamlanmasından sonra, Cy3 etiketli anti-Hb (anti-Hb-Cy3), Raman spektrumunu ölçmek için farklı konsantrasyonlarda (50 ng/ml – 5 µg/ml) LSPR çipleri ile reaksiyona sokulmuştur (Heo ve diğerleri, 2017).

Zhang, Chang, Settu, Chen, & Liu (2019) tarafından yapılan araştırmada HbA1C testinin daha hızlı sonuç vermesi amacıyla çalışılmıştır. Altın sensör çipi öncelikle sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi ile yıkanmış ve 20 dakika süre ile UV-ozona maruz bırakılmıştır. Sensör çipi daha sonra 3 saat 10 mM 3-merkaptopropiyonik asit ve 11- merkaptoundekanoik aside (hacim oranı 10:1) daldırılmıştır. Sonrasında sensör çipi etil alkol ile durulanmıştır ve çip 1 saat boyunca 1 µM DNA, 5 mM 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC) ve 3 mM N-hidroksi süksinimid (NHS) içeren bir çözelti içinde inkübe edilmiştir. Son olarak HbA1C'ye özgü aptamer dizisi ile hareketsizleştirilmiş altın sensör çipi deiyonize su içinde durulanarak azot tabancası ile kurutulmuştur. Aptamer sensörün hazırlama işlemi Şekil 23'de gösterilmiştir. Geliştirilen hızlı prototipleme açısı tarama SPR sistemi blok diyagramı Şekil 24a'da gösterilmektedir ve gerçekleştirilen SPR cihazı Şekil 24b'de gösterilmektedir. Lazer kaynağından gelen ışık önce bir polarizör tarafından p-polarize edilmiştir, daha sonra üçgen bir prizma ile sensör yüzeyine yansıtılmıştır. Sensör yüzeyinden yansıyan ışık bir fotodiyot ile toplanmıştır. Toplanan ham sinyal, ev yapımı bir amplifikatör devresi ile amplifiye edilmiş ve ATmega2560 mikroişlemcinin yerleşik ADC (analogdan dijitale dönüştürücü) birimi tarafından örneklenmiştir. Dönen platform, sistemi 40° ila 72° arasında taramaya yönlendirebilir. Ölçümler yapılırken, tüm SPR spektrumunu taramak yerine

rezonans açısı çevresinde 3° 'lik bir açı $0,3^\circ/\text{s}$ hızında taranmıştır. Örneği taşımak için bir peristaltik pompa kullanılmıştır.

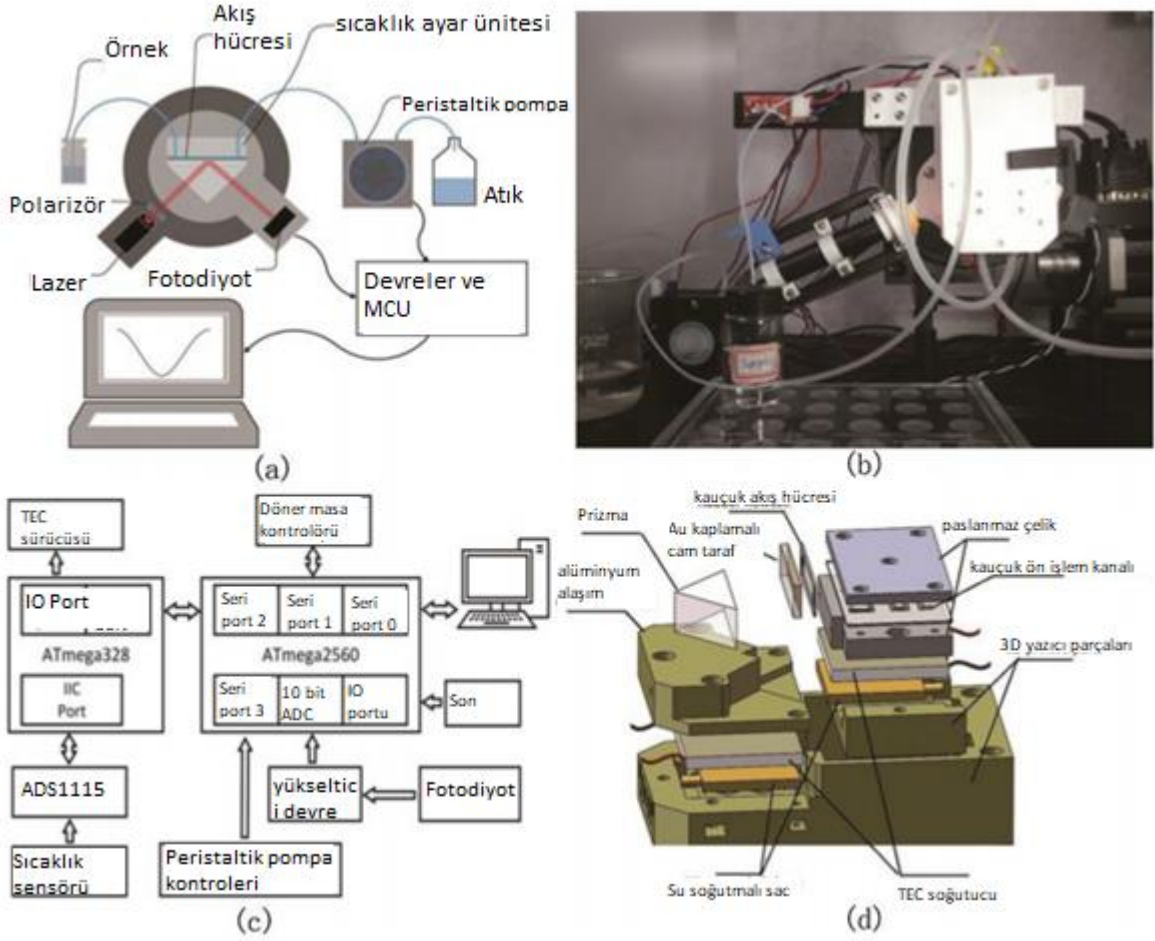


Şekil 23: Sensör modifikasyon sürecinin şeması (Zhang ve diğerleri, 2019)

Şekil 24c, önerilen SPR sistemi ile ilişkili elektrik devresinin blok diyagramını göstermektedir. Sistem donanımını kontrol etmek için iki mikrodenetleyici birimi (MCU) kullanılmıştır. Döner platform, mekanik tahrik ünitesi ve bir uç durdurma sensöründen oluşmaktadır. Uç durdurma sensörü, koordinat başlangıç referansı olarak kullanılmıştır. Peristaltik pompa ve ATmega328 dahil olmak üzere yukarıda belirtilen tüm bileşenler, farklı portlar üzerinden ATmega2560 tarafından kontrol edilmiştir.

SPR hızlı prototipleme sistemi, 3D baskılı bileşenlerle oluşturulmuştur. İki döner platform kullanılmıştır ve dönen platformlara bir 3D baskılı optik platform takılmıştır. Lazer kaynağı ve fotodiyot, 3D baskılı tutucularla optik platforma kolayca monte edilebilmektedir. Akış hücresi modülü, bir kauçuk akış hücresi, paslanmaz aksesuarlar, 3D baskılı bileşenler ve bir kauçuk numune ön işleme kanalından oluşmaktadır. Tüm akış hücresi modülünün düzeni Şekil 24d'de gösterilmiştir. Hacim $65\ \mu\text{l}$ ve boyut $5,3\ \text{mm} \times 23\ \text{mm} \times 0,5\ \text{mm}$ olan kauçuk akış hücresi, masaüstü kesici Silhouette Portrait kullanılarak tasarlanmış ve yapılmıştır. Ayrıca, bir ön işlem kanalı kauçuk filminden yapılmış ve Silhouette Portrait tarafından kesilmiştir. Numunenin ana akış hücresine ulaşmadan önce kararlı bir deneysel sıcaklığa ulaşmasını sağlamak için, ön işleme kanalı mümkün olduğunca uzun olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu bileşenler, sıcaklığı sabit tutulan paslanmaz bir bloğa monte edilmiştir. Au-kaplanmış cam slayt ve prizma arasında bir boşluk sağlamak için kırılma indisi eşleştirme yağı kullanılmıştır.

NaCl çözeltisinin kırılma indisi kolayca elde edilebildiğinden, farklı konsantrasyonlarda NaCl çözeltisi (% 0,5, % 1, % 2, % 3 ve % 4) hazırlanmış ve geliştirilen sistemin çözünürlüğünü belirlemek için standart numune çözeltileri olarak kullanılmıştır. Numune iletim hızı $50\ \mu\text{l}/\text{dk}$ ve sistem sıcaklığı 20°C olarak ayarlanmıştır. NaCl konsantrasyonları için sistem yanıtı kaydedilmiş ve sistem çözünürlüğünü hesaplamak için kullanılmıştır.



Şekil 24: Tüm SPR sisteminin şematik gösterimi: (a) sistem blok şeması; (b) 3D baskı hızlı prototipleme ile tasarlanan SPR biyosensing platformu; (c) elektrik devre blok şeması; (d) akış hücresi diyagramı (Zhang ve diğerleri, 2019)

Deiyonize su analit olarak kullanılmış ve rezonans açısı izlenmiştir. Numune iletim hızı 50 µl/dk olarak ayarlanmıştır. Deney sırasında sıcaklık aralığı 20°C–28°C’dir. Akış hücresindeki kabarcıklardan kaçınmak için deneyin sıcaklığı kademeli olarak artırılmış ve azaltılmıştır.

Su temas açısı bir Tianmin temas açısı ölçer ile ölçülmüştür. SPR sensör çipi, temas açısı ölçerin düzlemine monte edilmiştir. Sensör çip yüzeyine dört mikrolitre deiyonize su damlatılmıştır. Damlacık kesiti imalatçı tarafından sağlanan yazılım ile kaydedilmiştir. Temas açısı, açık kaynaklı yazılım ImageJ kullanılarak kesitsel görüntüden hesaplanmıştır.

Geliştirilen sistemin kinetik parametre ölçüm kapasitesi, HbA1C-spesifik aptamer kullanılarak onaylanmıştır. Aptamer ve HbA1C arasındaki afinite etkileşimleri, birleşme hızı sabiti k_{bhs} , ayrışma hızı sabiti k_{ahs} ve denge birleşme sabiti k_{dbs} ile karakterize edilmiştir. Deney verileri, 1:1 etkileşim modeli $A+B=AB$ ile donatılmıştır; buradaki A, enjekte edilen analit; B, hareketsizleştirilmiş ligand ve AB, analit-ligand kompleksidir. Prensip olarak, etkileşim işlemi Denklem 2.4’te gösterildiği gibi tarif edilebilir. Burada SPR sisteminin yanıt

sinyali R [AB] ile orantılıysa, maksimum yanıt sinyali R_m başlangıçtaki [B] ile orantılıdır, k_{app} görünür reaksiyon hızı sabitidir ve t etkileşim süresidir. Denklem 2.5, k_{app}'den k_{bhs} ve k_{ahs}'den elde edilmektedir. K_{app} ve [A] arasındaki ilişkiyi türetmek için bir dizi A çözeltisi konsantrasyonu kullanılmıştır ve Denklem 2.5'ten bir regresyon eğrisi elde edilmiştir. Denklem 2.5'de k_{bhs}, regresyonun eğimi, k_{bhs} regresyon eğrisinin kesişim noktasıdır ve K_{ahs}, k_{bhs}/ k_{ahs} olarak hesaplanmaktadır (Zhang ve diğerleri, 2019).

$$R = \frac{k_{bhs}[A]R_m}{([A]k_{bhs} + k_{ahs})} [1 - e^{-k_{app}t}], k_{app} = [A]k_{bhs} + k_{ahs} \quad (2.4)$$

$$\begin{cases} k_{app1} = [A_1]k_{bhs} + k_{ahs} \\ k_{app2} = [A_2]k_{bhs} + k_{ahs} \\ k_{appn} = [A_n]k_{bhs} + k_{ahs} \end{cases} \quad (2.5)$$

Çalışır, Bakhspour, Yavuz, ve Denizli (2020) tarafından yapılan araştırmada, HbA1C testinin hassasiyeti üzerine çalışma yapılmıştır. Literatüre kazandırılmaya çalışılan bir diğer yanılık ise çalışmada boronat esaslı yüzey plazmon rezonans sensörü kullanılmasıdır. Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), 2-hidroksimetilmetakrilat (HEMA) polimerizasyonu, dipotasyum hidrojen fosfat (K₂HPO₄), mono potasyum fosfat (KH₂PO₄), allil merkaptan ve 4-vinil fenil boronik asit (VPBA) kullanılmıştır.

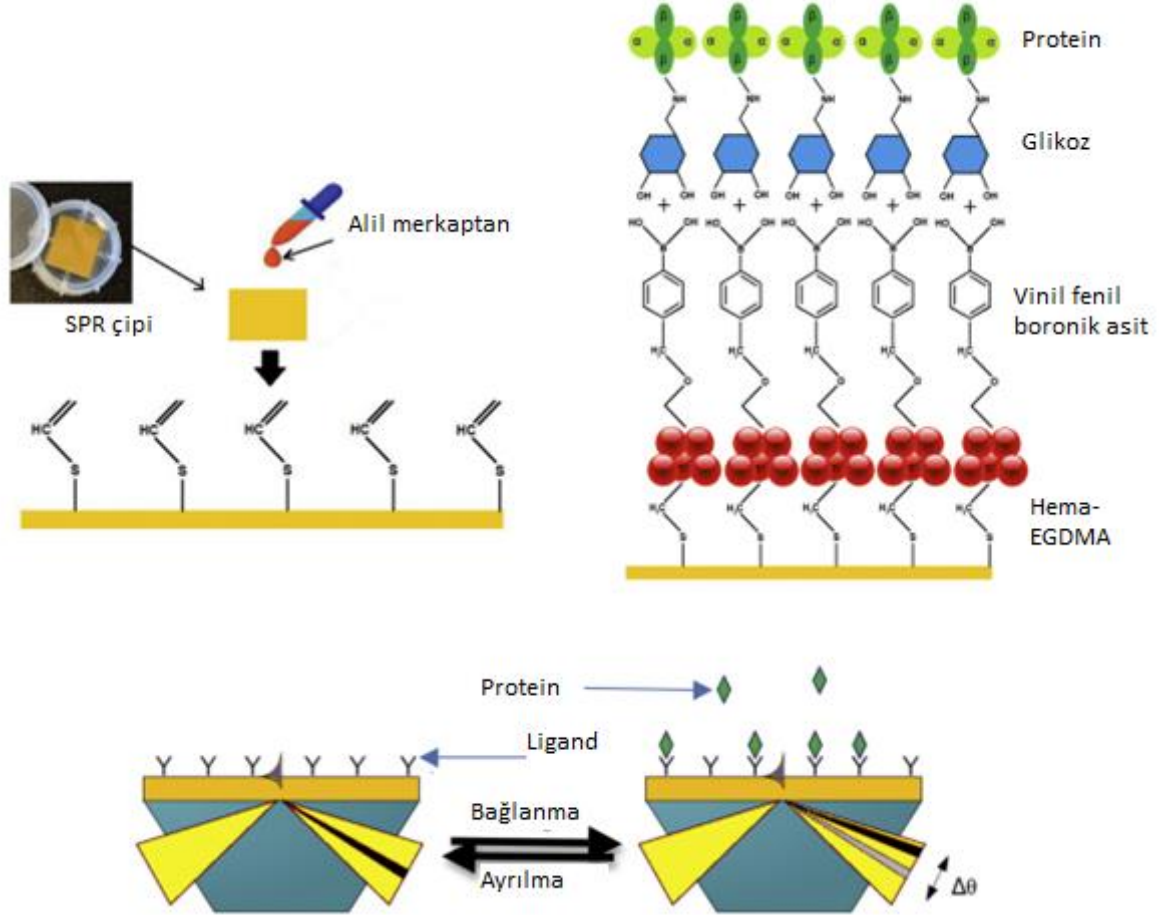
SPR çiplerinin yüzey modifikasyonundan önce, altın yüzeyler 10 ml saf etil alkol, arıtılmış su ve sülfürik asit/hidrojen peroksit ile asidik piranha çözeltisi ile ayrı ayrı yıkanmıştır. 37°C'nin altında kurutulmuştur. SPR altın çip yüzeyi, merkaptan çözeltisi asılanarak inkübe edilmiştir. Daha sonra alkolle temizlenmiş ve vakumla kurutulmuştur.

Monomer olarak HEMA, çapraz bağlayıcı olarak EGDMA ve 4-vinil fenil boronik asit (VPBA) içeren bir stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltiye polimerizasyon başlatıcı olarak α azoisobutyronitril (AIBN) ilave edilmiş ve çözünmesine izin verilmiştir. Polimerizasyon için 20–25 dakika boyunca azotlu bir ortamda 100 W ve 365 nm UV ışık altında tutulmuştur (Şekil 25). Beklenen polimerizasyon gözlemlendikten sonra, yüzey asetat tamponu ve saf su ile yıkanmıştır.

Boronik asit bazlı nanofilm kaplı ve kaplanmamış SPR çip yüzeyleri, Fourier dönüşümü kızılötesi spektrofotometre yayıflatılmış toplam yansıma spektrofotometresi (FTIR-ATR), elipsometre (Nanofilm EP3, Almanya) ve su temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. SPR çiplerinin tüm kalınlık ölçümleri için otomatik sıfırlamalı görüntüleme elipsometresi kullanılmıştır. Tüm ölçümler 5 nm dalga boyunda ve 50°'lik bir insidans açısı ile gerçekleştirilmiştir.

Boronik asit bazlı nanofilm kaplı sensörlerin hazırlanmasından sonra kinetik çalışmalara başlanmıştır. HbA1C'nin izoelektrik noktası literatürden pH=6,74 olarak alınmıştır. Bu değere dayanarak ölçümler, yakın pH aralıklarında yapılmış ve pH 6'da optimum sinyal elde edilmiştir. Numuneler, pH 6 fosfat tamponunda hazırlanmıştır ve 10 ml'lik bir hacimdeki çözeltiler deney için hazır hale getirilmiştir. Desorpsiyon çözeltisi olarak

pH 7,4 fosfat tamponu ve 0,1 M NaCl çözeltileri kullanılmıştır. Konsantrasyon taramaları 10–200 µg/ml konsantrasyon aralığında gerçekleştirilmiştir.

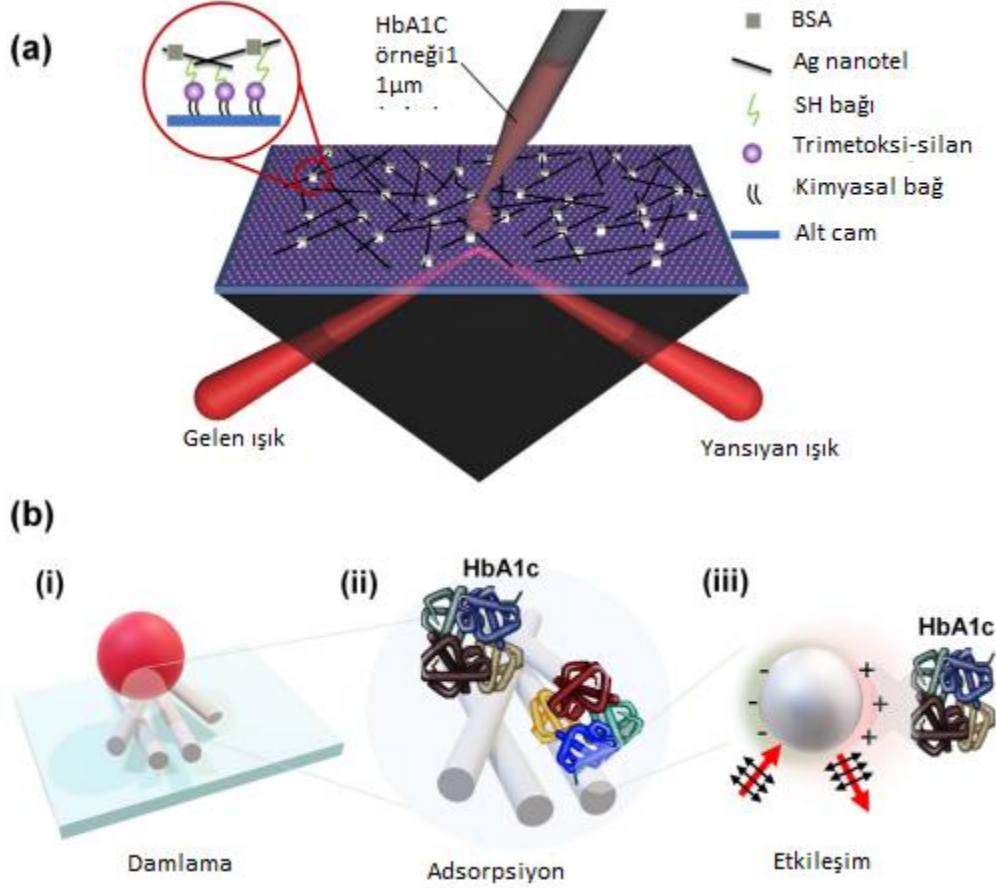


Şekil 25: SPR nanofilminin şematik hazırlanması (Çalışır ve diğerleri, 2020)

Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarında, pH 6 tamponu denge için 3 dakika geçirilmiştir, daha sonra aynı konsantrasyondaki numune 10 dakika geçirilmiştir ve son olarak pH 7,4 tamponundaki desorpsiyon çözeltisi 3 dakika geçirilmiştir. Bu işlem 5 kez tekrarlanmış ve son olarak yeniden kullanılabilirlik sensorgramı elde edilmiştir (Çalışır ve diğerleri, 2020).

Zhang, Li, Yang, Chang, & Simone (2020) tarafından yapılan araştırmada, HbA1C tespitinde Ag-nanotelleri kullanılmıştır. Kullanılan HbA1C örnekleri liyofilize HbA1C kalibratörlerinden yapılmıştır. Liyofilize HbA1C kalibratörleri, gerçek kan örneği olan paketlenmiş insan eritrositlerinden hazırlanan hemolizatlardır. Kalibratörler ilk önce 0,5 ml deiyonize su ile sulandırılmıştır. Materyali çözmek amacıyla 10 dakika boyunca yavaş yavaş karıştırılmıştır. Yeniden oluşturulan kalibratörler test için kan örneği oluşturmak üzere deiyonize su içinde 1:100 oranında seyreltilmiştir.

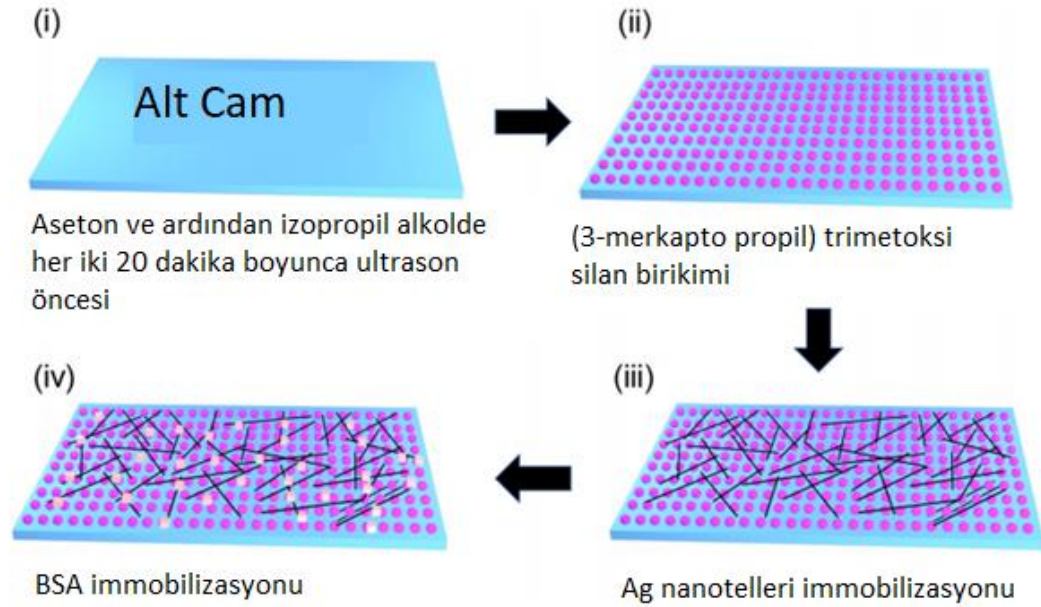
Şekil 26a'da çalışma şeması gösterilmiştir. Düzensiz dört boyutlu nanoteller, kompleks numunelerde glikatlı hemoglobinin plazmonik algılanması için bir LSPR çipi üzerinde oluşturulmuştur. Nanoteller tarafından oluşturulan hidrofobik yüzey, damlayı korumaktadır (Şekil 26b, i); daha sonra numune yüzeyde adsorbe edilirken Ag-nanotellerinin atomları ölçümlere izin vermek için lazer (Şema 26b, ii) tarafından uyarılmıştır. Metal yapıların atomları gelen ışıkla etkileşime girer ve lokal bir yük yoğunluğu salınımı ile konsantre bir elektrik alanı oluşturulmuştur. Bu, metalik yapıların yakınında yerel bir alan geliştirmesi oluşturan LSPR'dir (Şema 26b, iii). Poliol yöntemiyle Ag nanotel çözeltisi sentezlenmiştir.



Şekil 26: (a)HbA1c seviyesinin çip üzerinde belirlenmesi için sıgır serum albümini (BSA) ile birleştirilmiş plazmonik Ag nanotellerinin topluluğunun şematik gösterimi. (b)Numunelerin tellerin (i) üzerine düşürülmesinden, proteinlerin (ii) ve etkileşim plazmonu/proteinin (iii) adsorpsiyonundan yapılan deneylerin adımlarının ayrıntılı açıklaması (Zhang ve diğerleri, 2020)

Şekil 27'te gösterildiği gibi, bir camının (16 mm x 16 mm), aseton ve izopropil alkol içine ultrasonikleştirme yoluyla her iki yüzü de 20 dakika boyunca temizlenmiştir. Bir vakum sistemi ve bir ev yapımı fırında kimyasal buhar biriktirme yoluyla hedef molekül (3-merkaptopropil) trimetoksi-silan ile immobilize edilmiştir. Bir hedef camın 5 µl'lik bir hacmi düşürülmüş ve molekül buharlaştırılmıştır ve daha sonra substrat ile eşit şekilde inkübe

edilmiştir. (3 merkaptopropil) trimetoksi-silan, silan ucuna cam lamı tuttururken Ag-nanotellerini tiol ucu ile kapatmıştır. Substrat sırasıyla yumuşak toluen ve metanol akımı ile durulanmış ve yumuşak hava akışında kurutulmuştur. Saflaştırılmış Ag nanotel çözeltisi, tiyolün üstüne bırakılmış ve oda sıcaklığında 24 saat süreyle kurutulmuştur. Substrat, substrat üzerinde greft oluşturmeyen ve aynı zamanda Ag nanotel bağlantılarını kaynaklayan nanotelleri çıkarmak için daha sonra 30 dakika boyunca suda ultrasonikleştirme ile işlem gördürülmüştür. Sisteamin hidroklorür çözeltisi ile kapatma, 4°C'de 150 dakika inkübasyondan sonra elde edilmiştir. Glutaraldehit çözeltisi (ağırlıkça % 2,5), 4 dakikalık bir sıcaklıkta 150 dakikalık bir inkübasyondan sonra hareketsizleştirilmiştir. Son olarak çip, 4°C'de 12 saat süreyle ağırlıkça % 1 sığır serum albümini (BSA) - 1 M pH=7,4 fosfat tampon çözeltisine (PBS) daldırılmıştır ve su akışı altında yıkanmıştır (Zhang ve diğerleri, 2020).



Şekil 27: Çipin hazırlanmasının açıklaması. (i) Her iki 20 dakika boyunca aseton ve sonra izopropil alkol içinde ön-ultrasonikasyon. (ii) (3-merkaptopropil) trimetoksi-silan biriktirme. (iii) Ag nanotel immobilizasyonu. (iv) BSA immobilizasyonu (Zhang ve diğerleri, 2020)

2.2.3. Süt İle Yapılan SPR Çalışmaları

İnek sütü, dünya çapında en yaygın alerjen gıda olarak sayılmaktadır ve halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Alerjik özellik bir takım süt proteinleri tarafından tetiklenebilen bağışıklık sisteminin olumsuz enflamatuar tepkisinden kaynaklanır. İnek sütünde en az 25 protein tespit edilmiştir. Sütte alerjik reaksiyona neden olduğu bilinen bazı ana alerjenler sığır albümini, kazein ve β -laktoglobulindir. Süt proteinlerinin %80'lik kısmı kazeinden oluşmaktadır. Çocukların %0,6-2,5'inin, yetişkinlerin %1'inin süte karşı alerjisi olduğu tahmin edilmektedir (Ashley, Piekarska, Segers, Trinh, Rodgers, Willey & Tothill, 2017).

Mazumdar, Hartmann, Kämpfer & Keusgen (2007) tarafından yapılan çalışmada, SPR cihazı, sütteki Salmonella tespiti için hızlı, basit ve spesifik bir immünolojik test geliştirmek

için kullanılmıştır. Salmonella kontaminasyonu pastörize süt dahil tüm gıdalarda iyi bilinmektedir. SPR analizi, yakalama ve saptama antikoru olarak Salmonella'ya karşı poliklonal bir antikor kullanılarak bir sandviç model olarak geliştirilmiştir. SPR testini kullanarak, *S. typhimurium*'u hem süt hem de tampon sisteminde 1.25×10^5 hücre ml⁻¹ konsantrasyonuna kadar saptamak mümkün olmuştur.

Ashley & Li (2013) tarafından yapılan çalışmada, minimum numune hazırlama ile süt numunelerinde katalaz tespiti için aptamer bazlı bir SPR biyosensörün geliştirilmesini rapor edilmiştir. Bir biyotin etiketli aptamer, afinite yakalama ile bir altın yüzeye immobilize edilmiştir. Nanomolar aralıkta bir saptama sınırı bulunmuş ve tamponda katalaz için 15-1000 nM dinamik bir aralık oluşturulmuştur ve aptamer, katalaza karşı iyi bir özgüllük göstermiştir. Bu biyosensör, sütteki mastitis hastalığının önemli bir göstergesi olan süt örneklerinde katalaz tespitinde kullanıma potansiyeline sahiptir.

Fernández, Hegnerová, Piliarik, Sanchez-Baeza, Homola & Marco (2010) tarafından yapılan çalışma, süt örneklerinde eşzamanlı multianalit antibiyotik tespiti için altın kırınım ızgara yüzeyinin plazmonuna dayanan yeni bir taşınabilir altı kanallı SPR biyosensörün geliştirilmesini açıklamaktadır. Bu çalışma için üç önemli antibiyotik ailesinden (FQ'lar: florokinolonlar, SA'lar: sülfonamidler ve CAP: fenikoller) temsili türdeşler seçilmiştir. Çipler, polietilenglikol (PEG) birimleri içeren iki tip merkaptto alkil reaktifi kullanılarak hazırlanan önceden oluşturulmuş, kendi kendine birleştirilmiş bir tek katman (m-SAM) aracılığıyla haptanize proteinlerle kovalent olarak biyofonksiyonel hale getirilmiştir. Elde edilen tespit edilebilirlik çok iyidir ve tam yağlı süt numuneleri, temizleme adımları olmadan doğrudan analiz edilebilir düzeydedir.

Ashley ve diğerleri (2017) tarafından yapılan araştırmada halk sağlığı sorunu olan sütün alerjik etkisi üzerinde çalışılmıştır. Asetik asit, a-kazein, 11-merkaptoundekanoik asit %95, yağsız süt, fosfat tamponlu salin (PBS), sodyum asetat ve sülfürik asit % 95,0-98,0, BSA protein kullanılmıştır.

Sensör çipleri, gece boyunca etanol (100 ml) içerisinde çözündürülmüş 5 mM'lik bir 11-MUA çözeltisine daldırılmıştır. Nihai sensör çipleri daha sonra reaksiyonu söndürmek için su ve ardından etanol ile durulanmış ve hızla azot ile kurutulmuştur. Sensörler kullanıma kadar 4°C'de saklanmıştır.

Sensör çipi makineye yerleştirilmiş, akış hücresinin akış tamponu olarak 10 mM PBS pH 7,4 kullanılmıştır. Makine daha sonra antikor immobilizasyonundan önce üç kez akış tamponu ile astarlanmıştır. Yüzey immobilizasyonu için, akış hızı 10 ml dk⁻¹ olarak ayarlanmıştır. Hareketsizleştirme protokolü için, sensör yüzeyine iki spot kanal üzerine 50 ml 0,1 M N-hidroksisüksinimid (NHS) / 0,4 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) karışımı enjekte edilmiştir. Daha sonra antikorlar, bir amin birleştirme reaksiyonu yoluyla sensör yüzeyine bağlanmıştır. Her bir antikorun 50 mg ml⁻¹'i, 10 mM sodyum asetat tamponu pH 4,0 içerisinde çözündürülmüş ve 50 ml a-kazein antikoru, birinci yere enjekte edilmiştir ve 50 ml kontrol antikor IgG, ikinci yere enjekte edilmiştir. Sensör yüzeyi daha sonra her iki noktaya 50 ml, 30 mg ml⁻¹ BSA enjekte edilmiştir, ardından 50 ml, 1 M

etanolamin pH 8,5 enjekte edilerek bloke edilmiştir. Kırılma endeksindeki değişiklik her enjeksiyondan sonra kaydedilmiştir ve sinyal sabit bir duruma ulaşmıştır.

a-Kazein standartları, katı proteinin 10 mM sodyum borat tamponu pH 9,0 içinde çözülmesi yoluyla günlük olarak hazırlanmıştır. Her stoğun konsantrasyonları BCA protein deneyi kullanılarak belirlenmiştir. Standartlar ayrıca 10 mM PBS pH 7,4'te seri seyreltme ile çalışma aralığına seyreltilmiştir.

Tüm bağlanma deneyleri, ilk olarak sensör yüzeyini üç kez 10 mM PBS tamponu pH 7,4 ile hazırlayarak gerçekleştirilmiştir. Her enjeksiyon döngüsü, 25 ml dk^{-1} akış hızında iki noktaya enjekte edilen 75 ml a-kazein standardı enjeksiyonundan (0,195-12,5 ppm) oluşmaktadır. Yanıtlar, ayrılma fazının (3 dakika) bitiminden sonra ölçülmüştür; kontrol yanıtı, her enjeksiyon için analit tepkisinden çıkarılmış ve protein konsantrasyonuna karşı çizilmiştir. Standart deneyler iki kez gerçekleştirilmiştir. Sensör yüzeyi daha sonra 75 ml'lik 50 mM NaOH enjeksiyonu ile rejenere edilmiştir. Sensörün özgüllüğü, β -laktoglobülin (BLG) ve k-kazein enjeksiyonu ile belirlenmiştir. Her protein, aynı tahlil koşulları kullanılarak α -kazein standartlarıyla aynı konsantrasyon aralığında sensör yüzeyine enjekte edilmiştir.

Çivili a-kazein numuneleri asit çökeltmesi ve ardından jel filtrasyonu ile hazırlanmıştır. a-Kazein standardı son durulama örneklerine (0,5-12 ppm) eklenmiştir. Her örneğe 4 ml 10 mM sodyum asetat tamponu pH 4,0 ilave edilmiştir ve 5 dakika 1000 g^{-1} 'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra çözünen madde çıkarılmış ve prosedür 2 kez daha tekrarlanmıştır. Son yıkamada, sodyum asetat kalıntısı uzaklaştırılmış ve çöktiyi çözmek için 0.5 ml 10 mM sodyum borat tamponu, pH 9,0 eklenmiştir. G-25 spin tuzak kolonları, 8 ml 10 mM PBS pH 7,4 ile dengelenmiştir. Daha sonra her numune jel filtrasyon kolonuna ilave edilmiş ve 2 dakika 1000 g^{-1} 'de döndürülmüştür. Elüte edilen numune toplanmış ve doğrudan numune yüzeyine numune olarak enjekte edilmiştir. Çivili numuneler için yanıtlar, a-kazein standartları için tarif edilenle aynı koşullar kullanılarak ölçülmüştür (Ashley ve diğerleri, 2017).

Daems, Lu, Delpont, Orbie, Aernouts, Adriaens, Huybrechts, Saeys, Spasic & Lammertyn (2017) fiber optik SPR sensörü kullanarak sütteki progesteronu saptamak adına çalışma yapılmıştır. Progesteron-sığır serum albümin (P4-BSA) konjugatı, anti-progesteron ile spesifik tespit immobilizasyonu optimize edildikten sonra sığır sütünde olarak ilgili konsantrasyonları belirlemek için bir fiberoptik SPR (FO-SPR) rekabetçi inhibisyon deneyi geliştirilmiştir.

FO-SPR cihazı bir HL-FHSA tungsten halojen lamba, bir UV-VIS spektrofotometre ve bir FOSPR sensör ucundan oluşmaktadır. Değiştirilebilir FO-SPR sensör uçları, halojen lambadan beyaz ışığı FO-SPR sensör ucuna ve tekrar spektrofotometreye yönlendirmek için SMA tipi bir konektör vasıtasıyla çatallı bir optik FO-SPR sensörüne bağlanmıştır. Sensör ucunun altın yüzeyindeki bağlanma fenomenleri, spektrofotometre tarafından kaydedilen tipik spektral rezonans SPR-dipte bir kaymaya neden olmaktadır.

FO-SPR verileri denklem 2.6 ile incelenmiştir. A_1 minimum asimptottur (sıfır standart konsantrasyonda yanıt değeri), A_2 maksimum asimptottur (sonsuz standart konsantrasyon için

yanıt değeri), x hedef konsantrasyondur, x_0 bükülme noktasıdır, p Hill'in eğimidir (eğrinin dikliği) ve y FO-SPR kaymasıdır.

$$y = A_2 \frac{(A_1 - A_2)}{1 + (\frac{x}{x_0})^p} \quad (2.6)$$

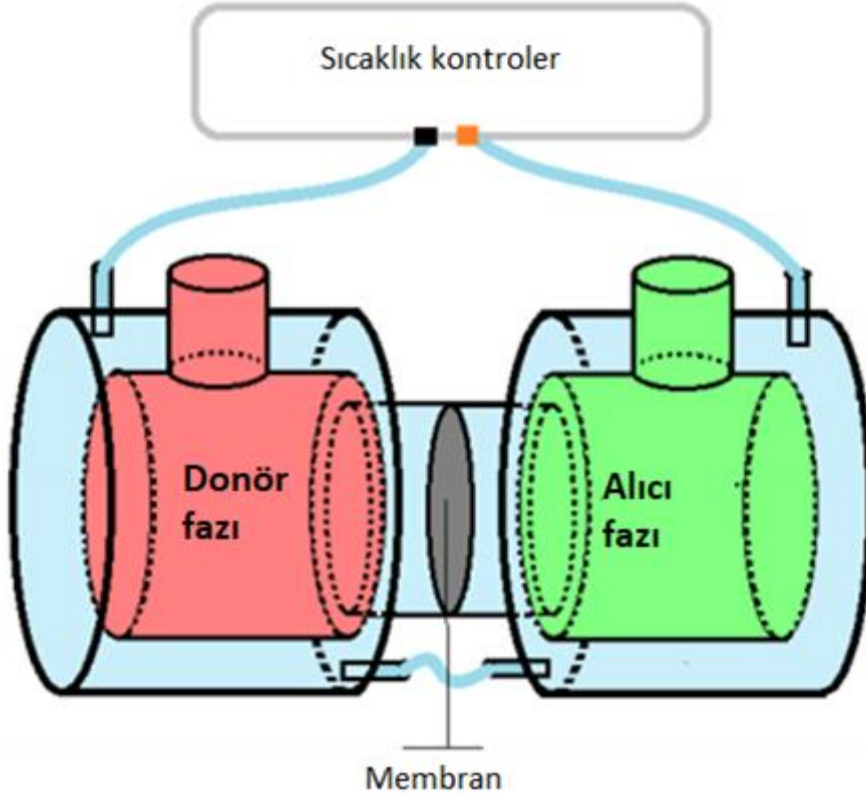
Kurulan biyo-tahlillerin algılama limitini (LOD) hesaplamak için denklem 2.7 kullanılmıştır. Bu denklemde $LOD_y = y_0 - 3s_0$ y_0 ile birlikte 0 ng/ml P4 için ortalama yanıtı ve s_0 , y_0 için ortalama standart sapmadır (Daems ve diğerleri, 2017).

$$LOD_x = x_0 \sqrt[p]{\frac{(A_1 - A_2)}{((LOD_y - A_2) - 1)}} \quad (2.7)$$

Onac, Alpoguz, Yola ve Kaya (2018) tarafından karbon nanotüp inklüzyon polimerik membran kullanarak melamin tayini için bir yüzey plazmon rezonansı geliştirilmiştir. Tek aşamalı, seçici ve duyarlı bir şekilde moleküler baskılı polimerik filmler ile melamin tayinine izin veren düşük maliyetli bir biyosensör hazırlanmıştır. Bu amaçla, bir süt numunesinden melamin tayinine yönelik moleküler baskılı sensörler geliştirilmiştir. Çalışma üç aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada melamin, nanomalzemeler eklenerek geliştirilen yeni nesil karbon nanotüp membran ile taşınmıştır. İkinci aşamada, melamin tayini için baskılı biyosensör çipleri üretilmiştir. Son aşamada, bir yüzey plazmon rezonans sisteminde melaminin belirlenmesi ve kinetik analizi için hazırlanan biyosensör çipleri kullanılmıştır.

Selüloz tri asetat (CTA), bir karbon nanotüp polimer inklüzyon membranında (CNT/PIM) kullanılan bir zarın hazırlanması için 0.200 g ağırlığında destek olarak kullanılmıştır. CTA, 15 ml diklorometan içerisinde çözündürülmüş ve % 1 ağırlık miktarına CNT ilave edilmiştir. Çözelti, 3 saat karıştırılmıştır. Daha sonra çözelti, 25°C'de 1 saat boyunca bir ultrasonik banyoda homojenleştirilmiştir, böylece CNT polimer çerçevesine nüfuz edebilmiştir. Diğer tarafta, 10 ml diklorometana 0,40 ml 2-nitrofenil oktil eter (2-NPOE) ve Aliquat 336 ilave edilmiştir ve 3 saat karıştırılmıştır. 3 saatin sonunda iki çözelti birlikte 3 saat daha karıştırılmıştır. Son olarak, çözelti bir cam plakaya dökülmüş ve gece boyunca buharlaştırılmıştır. İçerilen zar üzerine soğuk su dökülmüş ve zar cam plakadan ayrılmıştır.

CNT/PIM deneylerinde melaminin taşınması için hazırlanan zar, bir difüzyon hücreindeki bölmeler arasına yerleştirilmiştir. Difüzyon hücresi, Şekil 28'de görüldüğü gibi iki özdeş bölmeden oluşmaktadır. Difüzyon hücrelerinin sol tarafında (donör çözeltisi) 0,1 M HCl içinde melamin çözeltisi (30 ppm) vardır. Sağ tarafta pH5'te (asetik asit/amonyum asetat) bir tampon çözelti vardır; bu, bir alıcı fazdır. Her iki faza bir manyetik karıştırıcı yerleştirilmiştir ve CNT/PIM taşıma çalışmaları boyunca sabit bir hızda (500 rpm) tutulmuştur. Deneyler, bir sıcaklık kontrolörü ile sabit bir sıcaklığa (25°C) ulaşmıştır. Örnekler (1 ml) her iki fazdan belirli zaman aralıklarında alınmış ve SPR ile melamin tayini için cam tüplerde tutulmuştur.

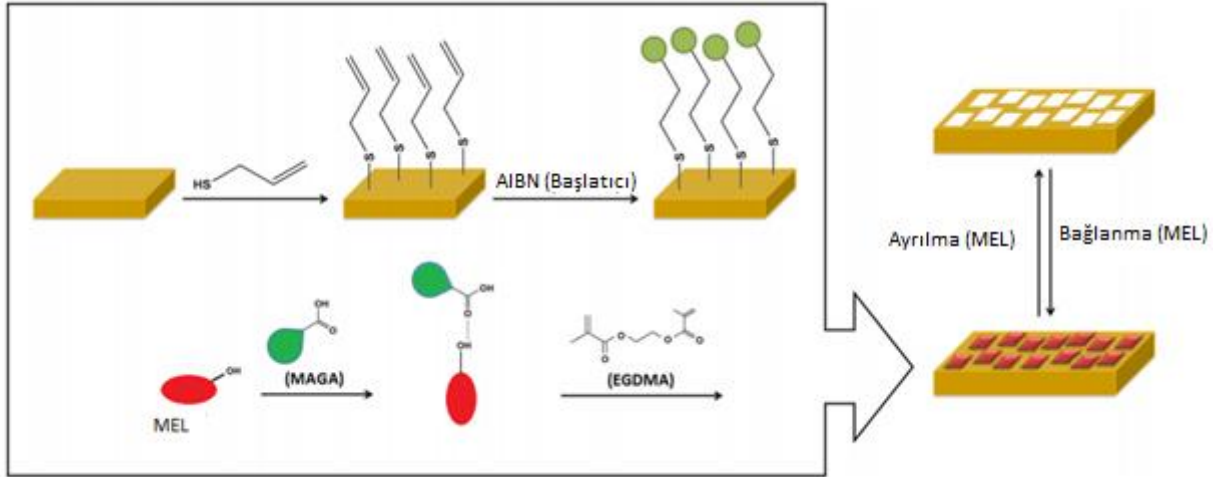


Şekil 28: MEL taşınması için polimer inklüzyon membran aparatı (Onac ve diğerleri, 2018)

SPR çipinin altın yüzeyini $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$ ile değiştirmek için çip, 20 ml asidik piranha çözeltisi (3:1 H_2SO_4 : H_2O_2 , hac/hac) ile yıkanmıştır. SPR çipi, 5 dakika boyunca temizleme çözeltisine daldırıldıktan sonra, etil alkol ile yıkanmış ve 2 saat boyunca invakum fırın (200 mmHg, 35°C) kurutulmuştur. Vinil gruplarının altın yüzeye girmesine izin vermek için çip, 24 saat boyunca kendiliğinden monteli mono tabaka oluşturmaya izin veren 3,0 M $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$ içeren bir etanol/su (4:1, hac/hac) çözeltisine daldırılmıştır. Daha sonra etil alkol ile temizlenmiş ve azot atmosferi altında kurutulmuştur (Yola, Eren ve Atar, 2014).

$\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$ modifiye SPR çipi üzerinde AMIK baskılı p(HEMA-MAAsp) filmi hazırlanmıştır. Geliştirilen SPR çipleri, sıcaklık ve basınç dalgalanmaları olmadan kapalı kutuda saklanmıştır (Yola, Eren ve Atar, 2014a).

MAGA monomeri ve MEL molekülleri arasında elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağı vardır (Şekil 29). Bu etkileşimleri kırmak için 1,0 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır. MEL imprinted p (HEMAGA) yüzeyi 25 ml 1,0 M NaCl çözeltisine daldırılmıştır. MEL çıkarıldıktan sonra SPR yüzeyi azot gazı ile kurutulmuştur (Yola, Atar ve Erdem 2015).

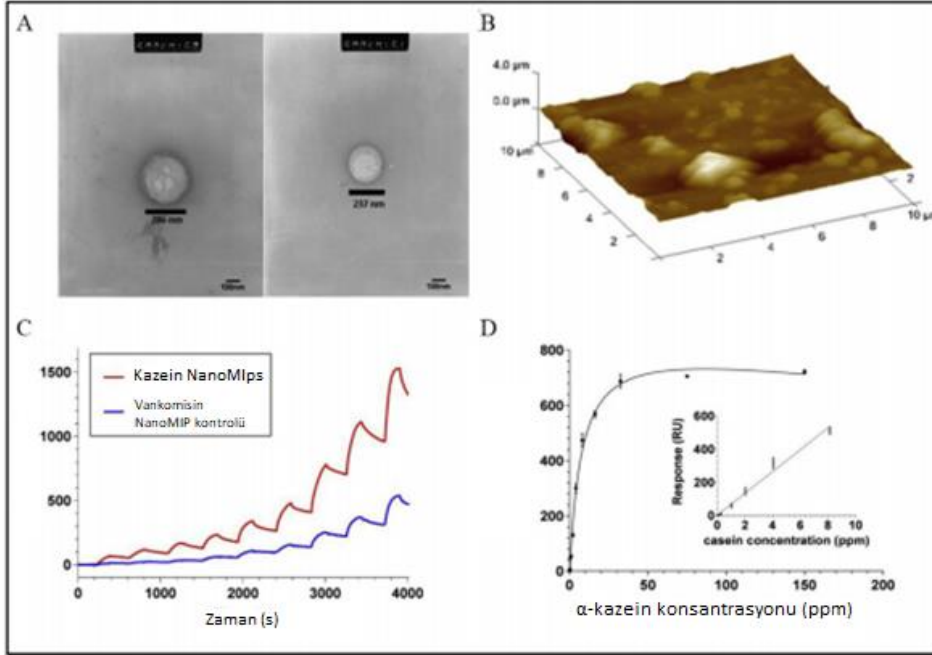


Şekil 29: Yüzey polimerizasyonu ile SPR chipinin hazırlanmasının şematik gösterimi (Yola ve diğerleri, 2015)

SPR sensörü dengeleme tamponu (2.0 ml/dakika akış hızı ile 0,1 M fosfat tamponu (pH 6.5)) ile yıkandıktan sonra, SPR sistemine (2.0 ml/dakika akış hızı) MEL çözeltileri (5 ml) uygulanmıştır. Rezonans frekansı yaklaşık 50 dakikada plakaya ulaştı. Desorpsiyon çalışmaları, 1,0 M NaCl çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Her MEL konsantrasyonu için adsorpsiyon-desorpsiyon-rejenerasyon aşamaları tekrarlanmıştır (Yola ve diğerleri, 2015).

Zhou, Qi, Wang, Qian, Liu, Wang & Fu (2019) alerjen gıdalar üzerine çalışma yapmışlardır. Araştırmada, a1-kazeinin N ve C terminallerine karşılık gelen peptit segmentleri, spesifik protein bölgelerine yüksek afiniteye sahip spesifik antikorlar elde etmek için immünojenler olarak seçilmiştir. 0,87 mg/ml tespit sınırı ile çiğ sütte bu antikor kaplı yüzey kullanılarak 150'den fazla çeşit tespit gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, bu yöntem sadece tam a1-kazein miktarını ölçmek için uygulanabilir ve süt ürünlerinde a1-kazeinin bozunmasını ölçmemektedir.

Çalışmada, bir cam slayt substratı üzerindeki altın film ilk olarak SPR sinyalini yükseltmek için bir silika nanoparçacık tabakası ile modifiye edilmiştir. 10 ng/ml'lik LOD, AuNP'lerin amplifikasyonu olmadan optik SPR'ninkinden 6 kat daha küçüktür. Büyükbaş hayvan acaseinine yüksek afinite ile moleküler baskılı polimer nanoparçacıkları (nanoMIP'ler) sentezlenmiştir ve LOD ($127 \pm 97,6$ ng/ml) ile yıkama numunelerindeki yıkama örneklerindeki a-kazeini izlemek için nanoMIP bazlı bir SPR biyosensörü (Şekil 30) tasarlamıştır.



Şekil 30: (A) Phillips CM20 ile alınan α -kazein nanoMIP'lerin TEM görüntüsü. (B) AFM kovalent olarak bağlanmış nanoMIP'ler. (C) Boncuk bazlı yöntemden sentezlenen nanoMIP tabanlı bir biyosensör için tipik sensorgram. (D) α -kazein nanoMIP tabanlı biyosensör ($n = 3$) için doğrusal olmayan ($R^2 = 0.9934$) ve doğrusal kalibrasyon ($R^2 = 0.9779$) grafiği (Zhou ve diğerleri, 2019)

Kaushik, Tiwari, Deep & Sinha (2019) sığır serum albümininin (BSA) etiketsiz tespiti için Molibden disülfid (MoS_2) ile modifiye edilmiş altın fiber içeren bir FOSPR biyosensörü rapor etmiştir. Bu yeni yaklaşımda, MoS_2 modifiye edilmiş algılama probunun $0,29 \mu\text{g/ml}$ LOD ile duyarlılığı, MoS_2 üst katmanı olmayan FOSPR biyosensörü ($\text{LOD } 0,45 \mu\text{g/ml}$ idi) ile karşılaştırıldığında iyileştirilmiştir. Ek olarak, SPR biyosensörleri, yüksek verimli multipleks analizi için tek bir gıda örneğinde çoklu alerjenlerin yakalanmasına izin vermektedir. Billakanti ve diğerleri, (2010) Hem ham hem de işlenmiş süt numunelerinde (alfa, beta, sığır serum albümini, laktoferrin ve immünoglobulin G dahil) beş çeşit peynir altı suyu proteinini eşzamanlı olarak ölçebilen SPR bazlı bir teknik tarif etmiştir. Tomassetti ve diğ. parti ve akış modlarına sahip bir SPR biyosensörü ve bir altın film sinyal amplifikasyon tekniği kullanılarak laktoferrinin saptanması için yeni bir yöntem önermiştir (Tomassetti ve diğerleri, 2013). LOD, akış modunda 10^{-8} M ve parti modunda 10^{-7} M kadar düşüktür. SPR biyosensörleri, karışan maddelere yanıt değeri %5'i aşmayacak şekilde süt alerjen tespiti için dikkate değer bir doğruluk gösterirken, geleneksel immünoanalizler laktalbumin ve laktoglobulinin müdahalesi nedeniyle yanlış pozitif sonuçlara eğilimlidir (Zhou ve diğerleri, 2019).

2.2.4. Gaz Sensör SPR Çalışmaları

İçinde yaşadığımız hava ortamı, birçoğunun ihtiyaç duyduğu ve bazıları canlı varlıklar için tehlikeli olan çeşitli gaz türlerinden oluşmaktadır. Endüstrinin birçok alanda hızlı büyümesi, tehlikeli gaz emisyonları ile çevremizi sessizce kirletmiştir. Endüstriyel tesislerin yakınında çalışanlar ve insanlar rutin veya zaman zaman zehirli gazlar tarafından tehdit altındadır. Boğulma ve patlamalar nedeniyle can kaybını azaltmak için gaz sensörleri ölümcül gazların analizinde ve kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır (Palanisamy ve diğerleri 2020).

Challener (1999) tarafından yapılan araştırmada, bir yüzey plazmon rezonans sensörü, gümüş bir filmle kaplanmış dönen bir optik disk ve kalınlık gradyanlı şeffaf bir dielektrik film kullanılarak tasarlanmıştır. Amonyacı tespit ederek tekniği göstermek için yüzeyde reseptör olarak bir pH indikatörü kullanılmıştır.

Nooke, Beck, Hertwig, Krause, Krüger, Lohse, Steinbach, (2011) tarafından yapılan çalışmada, ~ 43 nm kalınlığında altın tabakalarının SPR etkisine dayanan bir elipsometrik gaz sensörü araştırılmıştır. Altın tabakayı kontaminasyondan korumak ve tespit limitlerini iyileştirmek için altın tabakalar 5–6 nm kalınlığında organik C:H veya inorganik metal oksitler TiO_2 veya ZrO_2 ile kaplanmıştır. Ek katmanlar uzun vadeli stabiliteyi artırırken, metal oksit katmanlar C:H'den daha iyi koruma sağladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, ek katmanlar, C:H durumunda algılama sınırlarını bir büyüklük sırası ve oksitler durumunda iki büyüklük sırası azaltmıştır. Saptama limitlerinin ayrıca ek katmanların hazırlık türüne (sol-jel işlemi veya fiziksel buhar biriktirme) bağlı olduğu gösterilebilir.

Jory, Vukusic, P & Sambles (1994) tarafından yapılan çalışmada, yüzey plazmon rezonansı fenomeni kullanılarak bir prototip gaz sensörünün geliştirilmesi için iyi bir temel oluşturulmuştur. Azimut olarak bükülmüş bir metal kırınım ızgarası üzerinde bir yüzey plazmonunu uyarak, olukları geliş düzlemine dik değildir ve uygun giriş ve çıkış polarizasyonu seçimi ile, bir rezonans maksimumu tespit edilir. Sensörün çalışması, bu rezonans maksimumunun zayıf sinyalin arka planında ölçülmesine dayanır ve fiber optikler vasıtasıyla hem kaynaktan hem de detektörden uzakta yapılmış bir algılama başlığı içerir. Gümüş kaplı bir ızgara yüzeyinde -0,9 nm izopropil alkolün yoğunlaşmasının uzaktan algılanmasıyla kullanımı gösterilmiştir.

Paliwal, Sharma, Tomar & Gupta (2017) karbon monoksit (CO) tespiti için çinko oksit (ZnO) bileşiği kullanarak optik gaz sensörü üzerinde çalışmışlardır. Altın (Au) kaplı prizma üzerinde biriktirilen ZnO algılama filmi kullanarak oda sıcaklığında çalışan CO gaz sensörü SPR ölçümü kullanılarak geliştirilmiştir.

Kretschmann konfigürasyonu, laboratuarda monte edilmiş bir SPR ölçüm sistemi yardımıyla prizma/altın arayüzünde, açılı BK-7 cam prizma ($n_p = 1,517$) ve 40 nm ince Au film kullanarak yüzey plazmonu (SP) modlarını uyarmak için kullanılmıştır. ZnO ince filmlerin bırakılmasından önce altın kaplı substratlar ve prizmalar, stabilize edilmiş SPR modunu elde etmek için 1 saat boyunca 300 °C'de havada tavlanmıştır. SPR ölçümleri, prizma/Au/ZnO/hava sistemini ışınlamak için bir p-polarize He-Ne lazeri ($\lambda = 633$ nm) kullanarak açısal sorgulama yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Gaz algılamasını

gerçekleştirmek için teflondan yapılmış özel bir gaz hücresi üretilmiştir. Hücre, hedef gaz moleküllerinin gaza duyarlı katmanla (ZnO) doğrudan temas halinde olacağı şekilde Au'ya sahip prizmayı ve gaz hücresiyle temas halinde gaza duyarlı kaplamayı (prizma/Au/ZnO/hava) tutturmak için bir düzenlemeye sahiptir. Mevcut çalışmada, gaz hücresi, hazneyi boşaltmak için kullanılan 10^{-2} T derecesinde bir vakum oluşturmak için mekanik bir döner pompa ile bağlanmıştır. Hemen, haznede oluşturulan vakumdan sonra döner pompa kapatılır ve hedef gaz olmadan (0 ppm) SPR yansıtma eğrisi kaydedildi. SPR ölçümünden sonra, vakum oluşturmak için döner pompa tekrar çalıştırılmış ve belirli bir konsantrasyondaki hedef gaz, döner pompayı kapattıktan sonra kalibre edilmiş bir iğne valfi kullanılarak numune hücresine yerleştirilmiştir. Bu, hedef gazın belirli bir konsantrasyonu için tekrarlanmıştır. Statik modda, sabit konsantrasyonlu hedef gaz, gaz hücresinin içine yerleştirilmiş ve tüm olay açısı aralığı için SPR yansıtma eğrisi kaydedilmiştir. Geçici ölçümler için prizma/Au/ZnO/hava sistemi, minimum SPR yansıtmasının elde edildiği bir konuma ayarlanmıştır. Yansıtılan ışığın yoğunluğunu zamanın bir fonksiyonu olarak sabit bir açıyla ölçmek için bilgisayarla bağlantılı bir CCD kamera kullanılmıştır. Yansıyan ışığın yoğunluğundaki ani değişiklik, CCD kamera kullanılarak hem (1) spesifik konsantrasyonda hedef gazın gaz hücresine sokulduğu süre boyunca hem de (2) odadan çıkarıldığı zaman kaydedilmiştir. Sensörün geri kazanılması için (prizma/Au/ZnO/hava), hedef gaz, bir döner pompa kullanılarak bölmeden dışarı atılmış ve ardından taze temiz havayı gaz hücresine doldurulmuştur. Sensörün seçiciliği, NO₂, CO₂, NH₃, H₂ ve LPG gibi diğer hedef gazlar için prizma/Au/ZnO sisteminin gaz algılama tepkisini ölçerek test edilmiştir.

ZnO ince filmler, rf magnetron püskürtme tekniği ile hazırlanmıştır. ZnO ince filminin kalınlığı, çalışma boyunca 200 nm'de sabit tutulmuştur. Substrat sıcaklığının, özellikle yüzey morfolojisinde biriken ince filmin kalitesi ve özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir, bu da Au-ZnO arayüzündeki yüzey plazmonunun yayılmasını etkileyebilir. Dolayısıyla, bu çalışmada ZnO ince filmler farklı substrat sıcaklıklarında (150 °C ila 300 °C) büyütülmüştür. Yatırılan ZnO ince filmlerinin yapısal ve morfolojik özellikleri, sırasıyla X-Ray difraktometre ve atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) teknikleri kullanılarak incelenmiştir (Paliwal ve diğerleri, 2017).

Kim, Hong, Choi & Hong (2019) tarafından yapılan araştırmada, titan dioksit (TiO₂)/Au hibrit ince filmi geliştirerek oda sıcaklığında formaldehit (CH₂O) gazı biyosensörü üzerine çalışılmıştır. Algılama sistemi, geliştirilmiş bir sinyal dönüştürücü algoritması ve oda sıcaklığında çalışan bir algılama arayüzü olarak ligand modifiye edilmiş TiO₂/Au hibrid ince film kullanılarak oldukça hassas inceleme gerçekleştirebilen yeni bir mikro akışkan gaz kanalı ile geliştirilmiş bir Kretschmann konfigürasyonuna dayanmaktadır. Formaldehit tespiti bu kavramı test etmek için seçilmiştir, çünkü formaldehit insan ekshalasyonunda var olan bilinen bir meme kanseri biyobelirteçidir. Algılama sistemimizin arayüzü formaldehite maruz kaldığında, ligand ve analit arasındaki etkileşimin altın ince filmin SPR profillerinde değişiklikleri incelenmiştir.

TiO₂/Au ince filmi, bir TiO₂ etanol çözeltisinden Au ince film üzerine spin kaplama yoluyla imal edildikten sonra 20 dakika boyunca 400 °C'de kalsinasyon yapılmıştır. Daha

sonra TiO₂/Au ince filmi, aminle modifiye edilmiş TiO₂/Au hibrid ince filmi üretmek için 1 saat boyunca 1,0 mg/ml'lik bir PEI etanoik çözeltisine daldırılmıştır.

SPR sistemi, azaltılmış toplam yansıma (ATR) kullanılarak Kretschmann konfigürasyonunda kullanılmıştır. SPR sisteminin ışık kaynağı, 770 nm pik dalga boyuna sahip ışık yayan bir diyottur. Kama şekilli p-polarize ışık demeti, kırılma endeksinin 1,518 olduğu silindirik bir prizma (BK-7) içinden geçtikten sonra metal bir çipe ulaşmıştır. Işık kaynağının geliş açısı 38,76 ile 45,47° arasındadır. Au çipinden yansıyan ışığın şiddeti, Şarj Bağlantılı Cihaz kullanılarak elde edilmiştir. Au ince filmin bir substratı olarak 12 mm (genişlik) × 12 mm (uzunluk) × 0,3 mm (yükseklik) BK-7 cam kullanılmıştır. SPR algılama sisteminin üç kanalı vardır. Üç kanaldan biri referans kanalı, diğerleri ise örnek kanal olarak kullanılmıştır. Parazit sinyalleri, referans kanalının sinyalinin, numune kanallarının sinyalinden çıkarılmasıyla ortadan kaldırılmıştır. Zamanla çözülen SPR açısı kaymaları, yansıtma değişikliğinin ΔR 'nin SPR açısı kayması $\Delta \theta_{SPR}$ ile doğrusal olarak korelasyona girmesini sağlayan bir sabitleme yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Sabit bir açıdaki yansıma verileri bilgisayar üzerinden gerçek zamanlı olarak elde edilmiştir.

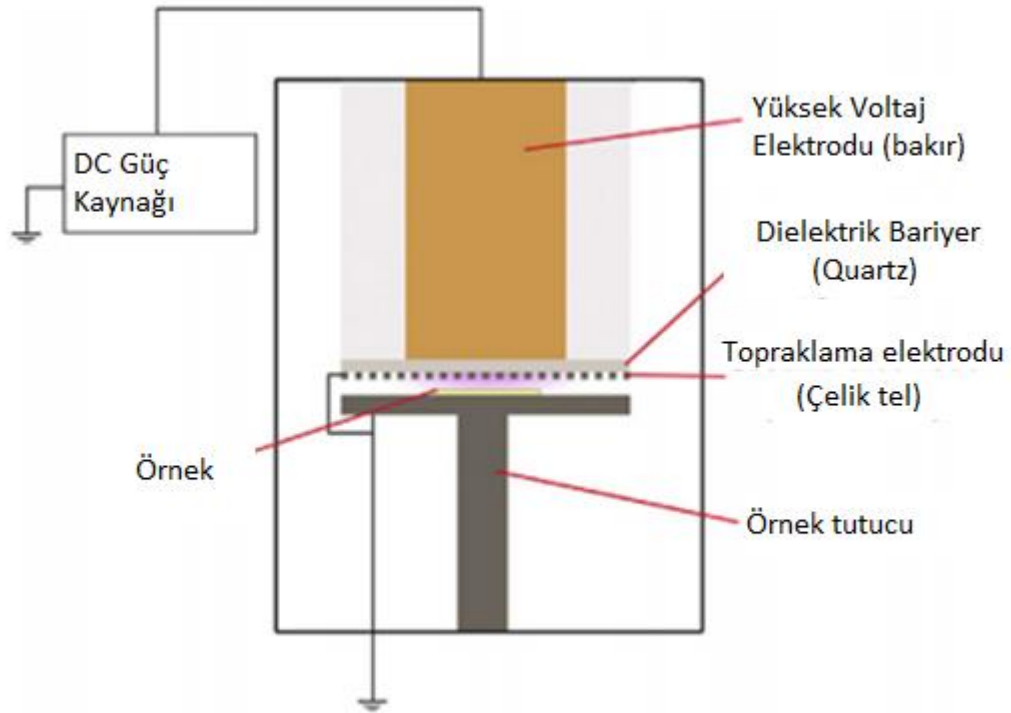
Oda sıcaklığı koşullarında (25 ± 1 temperature sıcaklık ve $\% 40 \pm 5$ bağıl nem) çalışabilen bir gaz üretimi ve SPR algılama sistemi geliştirilmiştir. Standart formaldehit gazı, bir veya daha fazla bileşenin madde miktarı fraksiyonu (miktar fraksiyonu) için izlenebilir değerlere sahip silindirlerde kalibrasyon gazı karışımlarının hazırlanması için bir gravimetrik yöntemi belirleyen ISO 6142 ile hazırlanmıştır. Standart formaldehit gazı, buharlaştırılmış formaldehit ve dengeli azot gazından oluşmaktadır. Formaldehit silindire sıvı halde sokulmuş ve silindirde tamamen buharlaştırılmıştır. Standart gazdaki nihai formaldehit konsantrasyonu 10,7 ppm dir.

Formaldehit gazının akış hızı, 0,1 ila 4,0 ppm arasındaki konsantrasyonlarda çeşitli standart formaldehit formları hazırlamak için 2.0×10^{-3} l/dk ila 49.6×10^{-3} l/dk aralığına ayarlanmıştır. N₂ gazının akış hızı $102,0 \times 10^{-3}$ l/dk'da tutulmuştur. Standart formaldehit gazları, PEI ile modifiye edilmiş TiO₂/Au hibrid ince film üzerine örnek kuyusunun bir girişine enjekte edilmiştir. Ligandlar ve formaldehit gazları arasındaki etkileşimle indüklenen PEI ile modifiye edilmiş TiO₂/Au hibrid ince filmin ara yüzünün SPR sinyalleri daha sonra ölçülmüştür. Yansıtıcılıkta sinyal değişiklikleri toplanmış ve her bir formaldehit gaz konsantrasyonu için standart sapma belirlenmiştir (Kim ve diğerleri, 2019).

Fallah, Asadishad, Shafiei, Shokri, Javadianaghezi, Mohammed & Hamidi (2020) tarafından yapılan araştırma, CO gazı tespiti için ZnO nanorodlarının kullanımı üzerinedir. Silisyum dioksit (SiO₂) yüzeyinde büyütülen ZnO nanorodları üzerine kaplanmış altın nanopartiküllerde (NP) Plasmon rezonans pik kayması ile karbon monoksit gazını saptamak için basit bir teknik gösterilmektedir. Yapı, çok düşük CO gaz konsantrasyonlarını algılamak için kullanılmaktadır (1 ppm ila 15 ppm). NP'lerin ZnO nano çubuklara kaplanması, yüzey/hacim oranını arttırmaktadır böylece cihaz hassasiyetini arttırılmış olur. Bu sonuç, hızlı ve yüksek tepki ile basit ve hassas bir sensör yapmanıza izin vermektedir.

Şekil 31, substratın yüzey modifikasyonu için dielektrik bariyer deşarj plazmasının bir şemasını göstermektedir. Bakır yapımı üst elektrot, dielektrik bariyeri olarak kullanılmak

üzere 1 mm kalınlığında kuvars ile kaplanmıştır. İkinci elektrot, homojen plazma oluşturmak için kuvars ile temas halinde olan paslanmaz çelik topraklı bir ağıdır. Plazma, elektrik yüklü parçacıkların ve son derece reaktif nötr parçacıkların iyonize bir gazdır. Bunların tümü, doğrudan reaksiyonla veya elastik çarpışma ile malzemenin yüzeyi ile reaksiyona girecektir. Plastik, metal, cam, tekstil ve geri dönüştürülmüş veya kompozit malzemeler gibi malzemelerin yüzey sterilizasyonunu için plazma, basınçlı hava akışının yüksek frekanslı, yüksek voltajlı elektrik deşarjını geçtiği bir küvet içinde oluşturulmuştur. Atmosferik plazma ile temizlik, kimyasal olarak kararlı, yüksek oranda yapışkan maddelerin de çıkarılmasını sağlar ve pratik olarak tüm parça şekillerine sorunsuz bir şekilde uygulanmıştır.



Şekil 31: Plazma deşarj bariyeri ile substrat tedavisinin şematik diyagramı (Fallah ve diğerleri, 2020).

Topraklanmış bir numune tutucu, topraklanmış ağıdan 2 mm mesafede yerleştirilmiştir. Plazmayı oluşturmak için elektrotlara uygulanan güç kaynağı, 0-14 keV arasında değişen 6 kHz DC darbeli yüksek voltajdır. Cam substratlar 1×1 cm²'lik parçalar halinde kesilmiş ve daha sonra bu örnekler DBD plazması ile işlemden geçirilmek üzere bir numune tutucu üzerine konulmuştur. Bu çalışmada sabit giriş gerilimi 11 keV ve 0.51 W/cm² deşarj gücü yapılmıştır. 5 dakika boyunca lissajous eğrileri ile belirlenmiştir.

ZnO NR'ler, cam substratlar (3×1 cm²) üzerinde hidrotermal işlem kullanılarak büyütmüştür. ZnO NP'lerin kolloidal çözeltisini sentezlemek için, 1 saat boyunca 60 °C'de 20 ml etanolde (C₂H₆O, % 99,7 saflık) hazırlanan 1 mM çinko asetat (ZnC₄H₆O₄, % 99 saflık)

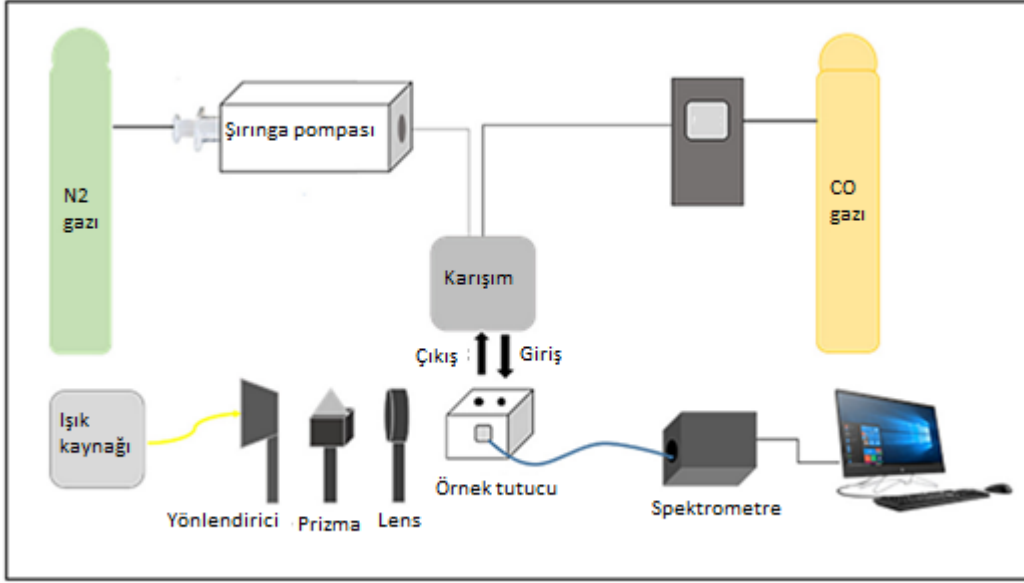
çözeltisi kullanılmıştır. Tohum katmanını çöktürmek için, temizlenmiş cam numuneler sıcaklığın 60 °C'deki sıcaklığını koruyarak sıcak bir plakaya yerleştirilmiştir. Daha sonra, 100 µl çinko asetat çözeltisi damlatılmıştır. Düşme işlemi 8-10 kez tekrarlanmıştır. Bundan sonra numuneler 1 saat boyunca 350 °C'de tutulmuştur. Nanorodlar, 10 mM çinko nitrat heksahidrat [Zn (NO₃)₂ · 6H₂O, % 99] ve 10 mM heksametilentetramin (CH₁₂N₄, % 99,5) içeren sulu bir çözeltinin öncü çözelti olarak kullanıldığı hidrotermal işlem kullanılarak büyütülmüştür. Beher içinde karıştırılır ve 95 °C'de ısıtılmıştır. Hidrotermal reaksiyon süresi 5 ila 20 saat arasında değişmiş ve nanorodların sabit bir büyüme oranını korumak için, eski öncü çözelti hidrotermal işlemin sonuna kadar her 5 saatte bir yeni çözelti ile doldurulmuştur. Son olarak, ZnO nanorod kaplamalı, öncü çözeltiden geri çekildi ve birkaç kez DI su ile iyice durulanmıştır. Daha sonra 90°C'de fırında ve annelidde kurutulmuş, sonra 250 °C'de fırında 2 saat kurutulmuştur.

Hazırlanan numune, Faz buhar biriktirme (PVD) yöntemi ile altın (Au) kaplama için kullanılmıştır. SiO₂ substratları üzerindeki ZnO nanorodlarının yüzeyi üzerine yaklaşık 30 nm Au ince bir tabaka kaplanmıştır.

Son adımda, Şekil 32'de gösterildiği gibi, nanorodların düşük maliyetli gaz algılama cihazına doğru gaz akışının (özellikle CO) optik özellikleri üzerindeki etkisi incelenmeye çalışılmıştır. Gerekli gazı düşük özgül konsantrasyon formuyla (1 ppm ile 20 ppm) tedarik etmek için, bu kurulum iki gaz kapsülü, N₂ taşıyan gaz ve CO gazı olarak hazırlanmıştır. CO gazı konsantrasyonunu seyreltmek ve sistemden akan gazın hızını ayarlamak için sırasıyla şırınga pompası ve MFC kullanılmıştır. Şırınga pompası ve MFC'den akış hızı ve gaz enjeksiyon hızı yaklaşık 1 litre/dakika (1LPM) olarak sabitlenmiştir. Daha sonra yansıma spektrumu her 10 saniyede bir kaydedilmiştir. Enjekte edilen gazın kesin oranını hesaplamak için bu denklem 2.8 kullanılır.

$$C_1V_1 = C_2(V_2 + V_1) \quad (2.8)$$

C₁, CO gazının konsantrasyonudur. V₁ enjeksiyon hacmidir, C₂ gerekli konsantrasyon ve V₂ taşıyıcı gaz hacmidir. Tüm numuneler yaklaşık 180 saniye boyunca gaz akışına maruz bırakılmıştır. Daha sonra veriler ±1 ppm hata aralığı gösterilerek analiz edilmiştir. Konsantrasyonun ZnO nanorodlarının yanıtı üzerindeki etkisini gözlemlemek için, 1 ila 15 ppm arasındaki farklı CO gaz konsantrasyonları gaz odasından 10-60 saniye boyunca ayrı ayrı akıtılmıştır. Uygun gaz konsantrasyonunu sağlamak için, istenen gaz ve N₂'nin akışı kontrol edilmiştir.



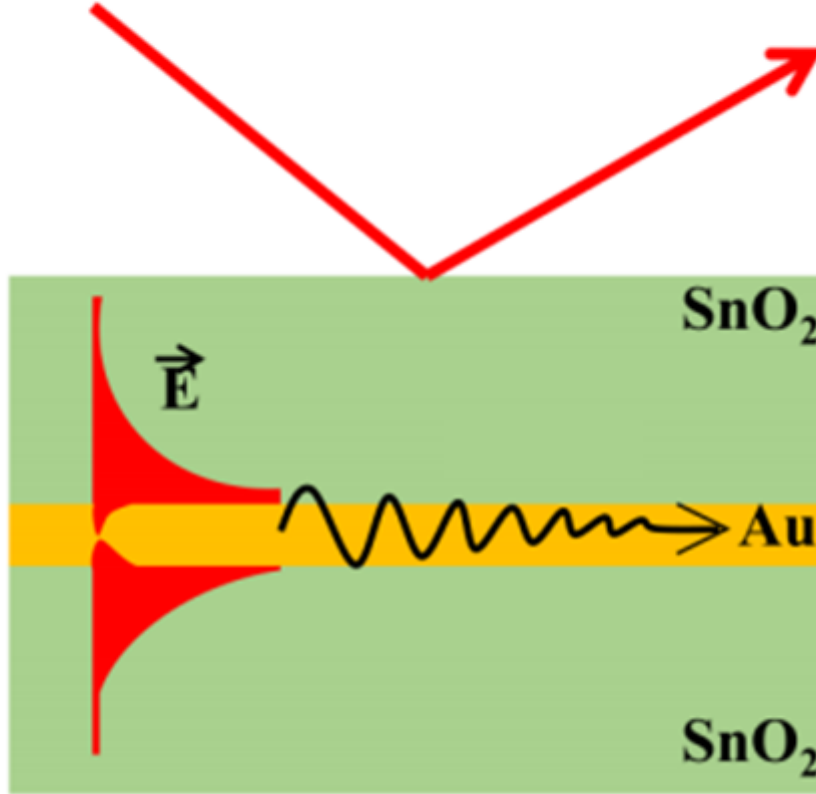
Şekil 32: Numuneden gaz akacak ve spektrumdaki farklı değişiklikleri algılayacak optik kurulumun şeması (Fallah ve diğerleri, 2020).

Jain, Paliwal, Gupta & Tomar (2020) tarafından yapılan araştırma, oda sıcaklığında çalışan NO₂ gaz sensörü üzerinedir. Uzun Menzilli Yüzey Plazmonları (LRSP'ler), NO₂ gazını tespit etmek için Kretschmann konfigürasyonu kullanılarak kalay oksit (SnO₂)/Au/SnO₂/prizma yapısında kullanılmıştır. İki farklı kalınlıkta SnO₂ ince filmleri büyütülür ve ince SnO₂ filmi, keskin LRSP rezonans (LRSPR) yansıtma eğrisiyle sonuçlanmıştır. Optimize edilmiş SnO₂/Au/SnO₂/prizma konfigürasyonunu kullanan LRSPR bazlı oda sıcaklığı (22 °C) ile çalışan gaz sensörü, NO₂ gazını geniş bir konsantrasyon aralığında etkili bir şekilde tespit etmek için geliştirilmiştir.

RF Sputtering tekniği, 20 mT biriktirme basıncında kalay metal hedef (4 inç çap, %99,999 saf) kullanılarak BK7 cam prizması üzerinde SnO₂ ince filmlerinin bırakılması için kullanılmıştır. SnO₂ ince film kalınlığı, hedef NO₂ gazına maksimum yanıtın elde edilebilmesi için yarı maksimumda (FWHM) minimum kayıp ve dar tam genişlikte en iyi LRSPR yansıtma eğrisini elde etmek için optimize edilmiştir. SnO₂/prizma yapılarının üstünde, optimize edilmiş 20 nm altın ince bir film termal buharlaştırma tekniği kullanılarak bırakılmıştır. Benzer biriktirme koşulları altında ve aynı kalınlık altında başka bir SnO₂ tabakası Au/SnO₂/Prizma düzenlemesi üzerinde bırakılmış ve sonuç olarak LRSP'leri uyarmak için SnO₂/Au/SnO₂/prizma konfigürasyonu elde edilmiştir. İstenilen kristallliği elde etmek için 300°C sıcaklıkta biriktirilen SnO₂ ince filmlerin bir sıcaklığında tavlama, tüplü bir fırında 3 saat boyunca hava ortamında gerçekleştirilmiştir. LRSP'lerin uyarılması için imal edilmiş yapının şeması, Şekil 33'de gösterilmiştir. SnO₂ kalınlığı (i) 110 nm ve (ii) 205 nm olan iki farklı LRSPR yapısı (SnO₂/ Au / SnO₂/ prizma) hazırlanmıştır.

SnO₂ filmlerinin yapısal özelliklerini analiz etmek için X-ışını kaynağı ($\lambda = 1.54\text{\AA}$) olarak CuK α ile X ışını kırınım tekniği kullanılmıştır. Büyütülmüş SnO₂ filmlerinin optik özelliği, UV-Görünür bir spektrofotometre ile 200 nm ila 1100 nm arasındaki dalga boyu aralığını analiz etmiştir. Bir He-Ne lazeri (p-polarize; Dalga boyu, $\lambda = 633\text{ nm}$) kullanılarak hazırlanan hava/SnO₂/Au/SnO₂/Prizma yapısındaki LRSP'leri uyarmak için bir şirket içi kurulum kullanılmıştır.

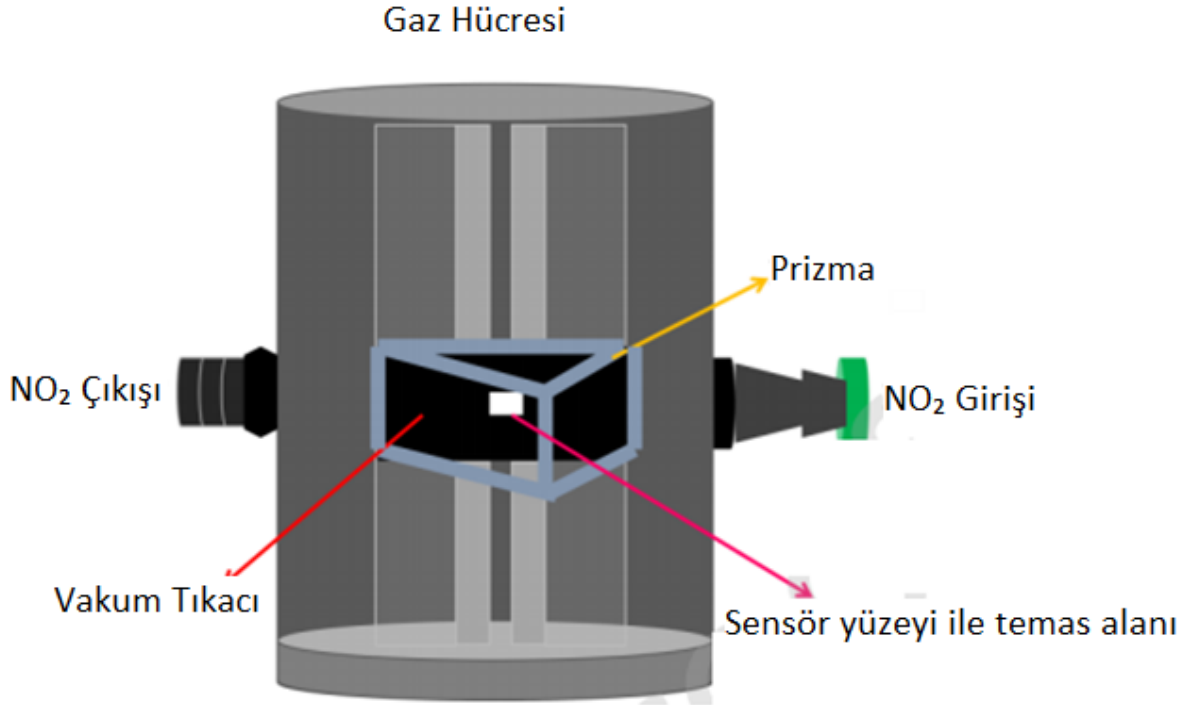
He-Ne Lazer



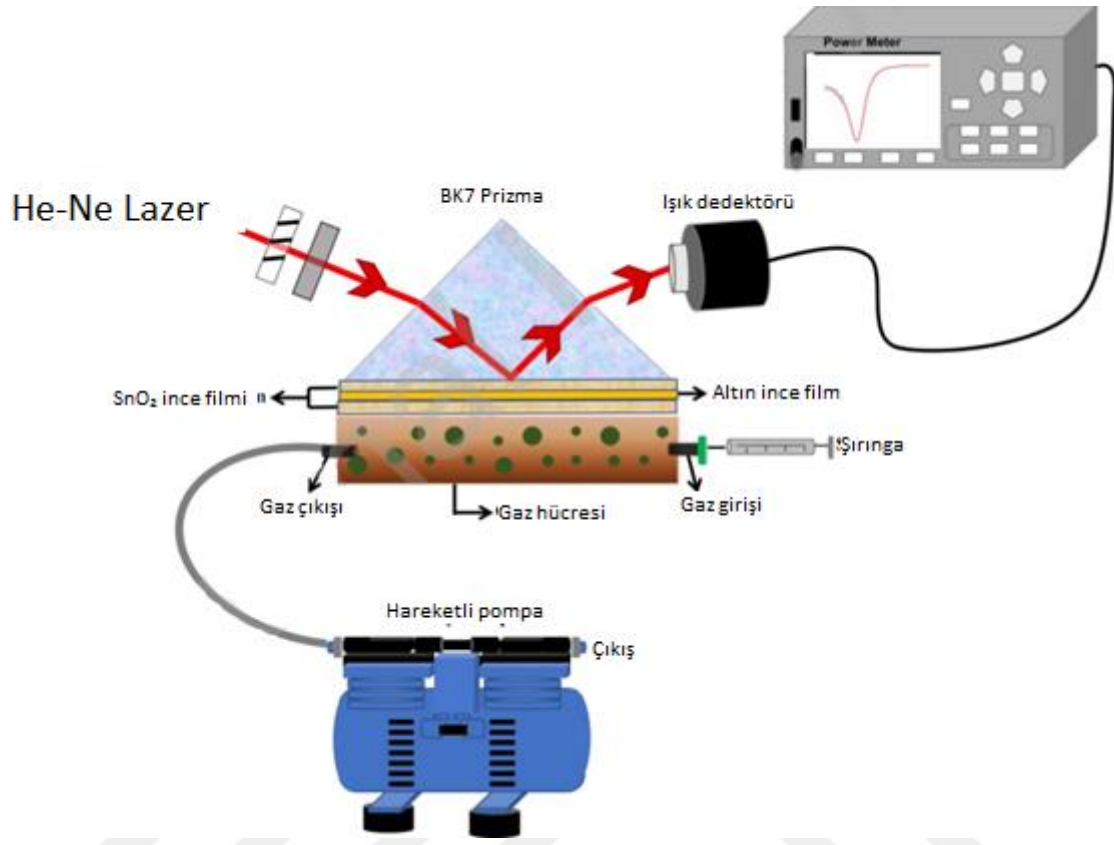
Şekil 33: (A) Fabrikasyon LRSPR Sensör yapısının resimsel temsili (Jain ve diğerleri, 2020).

Deneyssel olarak elde edilen LRSPR yansıtma eğrileri ve karşılık gelen teorik Fresnel denklemleri arasındaki bağlantı, SnO₂ ince filmlerinin kırılma indisi ve dielektrik sabitini elde etmek için yapılmıştır. LRSPR yapısını kullanarak gaz algılama ölçümlerini gerçekleştirmek için, şeması Şekil 34'de gösterilen teflon yapımı gaz hücresi kullanılmıştır. Hedef NO₂ gazının belirli bir konsantrasyonu, kalibre edilmiş sızıntılar kullanılarak iğne valfleri vasıtasıyla hücreye sokulmuştur. Hücrede yabancı gaz moleküllerinin bulunmadığından emin olmak için gaz hücresi içinde $\sim 10^{-3}$ Torr mertebesinde vakum oluşturmak için gaz çıkış bağlantısına bir döner pompa bağlanmıştır. Daha sonra, temiz kuru (sentetik) hava ile birlikte bilinen NO₂ gazı konsantrasyonu, gaz hücresi içindeki basınç, hedef gaz dışında başka hiçbir karışan gaz bulunmadığından emin olmak için atmosfer basıncına ulaşana kadar gaz hücresine

yerleştirilmiştir. $\text{SnO}_2/\text{Au}/\text{SnO}_2/\text{Prizma}$ LRSPR yapısındaki üst SnO_2 katmanının yüzeyi, eklenen NO_2 gazı ile etkileşime girmiştir. Gaz algılama düzeneğinin tam düzenlenmesi Şekil 35'de gösterilmiştir. NO_2 gazının algılama ölçümleri hem geçici hem de statik modlarda gerçekleştirilmiştir. Statik modda, NO_2 gazı varlığında LRSPR konfigürasyonunun yansıma eğrileri bir detektör ve bir optik güç ölçer kullanılarak bir dönme aşaması yardımıyla lazerin olay açısını değiştirerek kaydedilmiştir. Numune hücreinden NO_2 gazı pompalanmış ve $\text{SnO}_2/\text{Au}/\text{SnO}_2/\text{prizma}$ yapısındaki açık SnO_2 yüzeyinin başlangıçtaki elektronik özelliklerine geri dönebilmesi için gaz hücrelerine temiz hava verilmiştir. Geçici mod için, sensör yapısı LRSPR minima konumuna ayarlanmış ve dedektör, bir bilgisayara entegre edilmiş bir CCD kamera ile değiştirilmiştir. CCD kamera rezonans açısı konumuna yansıyan ışığın yoğunluğunu kaydetmektedir. Sırasıyla gaz hücrelerine girmek için farklı NO_2 gazı konsantrasyonları yapılmış ve yansıyan şiddetler ölçülmüştür. Fabrikasyon optik sensörün seçiciliği, CO_2 , Aseton, NH_3 ve H_2 gibi çeşitli girişim gazlarının gaz hücrelerinden geçirilmesiyle değerlendirilmiş ve karşılık gelen LRSPR yansıtma eğrileri kaydedilmiştir.



Şekil 34: Geliştirilmiş gaz hücresi resimsel temsili (Jain ve diğerleri, 2020).



Şekil 35: Mevcut çalışmada kullanılan gaz algılama LRSPR kurulumunun resimsel temsili (Jain ve diğerleri, 2020).

BÖLÜM 3

Sonuçlar

3.1. Bor ve Türevleri ile Çalışma Sonuçları

Zhang, ve diğerleri tarafından 1998 yılında yapılan çalışma sonucu, Au ve Ag yüzeylerinde SAM'lere farklı zincir uzunluklarına sahip alkanethioller oluşturulmuştur. Bu alkanetiyolat SAM'lerin Ag üzerindeki düşük frekanslı dielektrik davranışı AC empedans ölçümleri ile incelenmiştir. Yapılan araştırma sonucu borun SPR sistemlerinde kullanılabileceğinin önü açılmıştır.

Hwang ve diğerleri (2017) tarafından yapılan çalışma sonucunda, metal nanoyapıların topografyası ile SPR arasındaki karşılıklı ilişki çalışmaları için kullanılabilecek, kendi kendine plaka ile dikey olarak sıralı 3D Au nanopartiküllerin bir dizisini imal etmek için kolay bir yaklaşım önerilmiştir. Yaklaşım, oksit destekli bor nanotel büyümesinin kombinasyonuna dayanmaktadır. Yeni önerilen ve gösterilen 3D Au nanoyapı, SPR üzerindeki yapısal etkilerin çalışmaları ve SPR tabanlı biyoalgılama cihazlarının geliştirilmesi için kullanılabilir. Ayrıca bu sonuç, çeşitli malzemelerin dikey olarak hizalanmış 1D nano yapılarının büyümesine genişletilebilir bir yaklaşım olduğu gözlemlenmiştir.

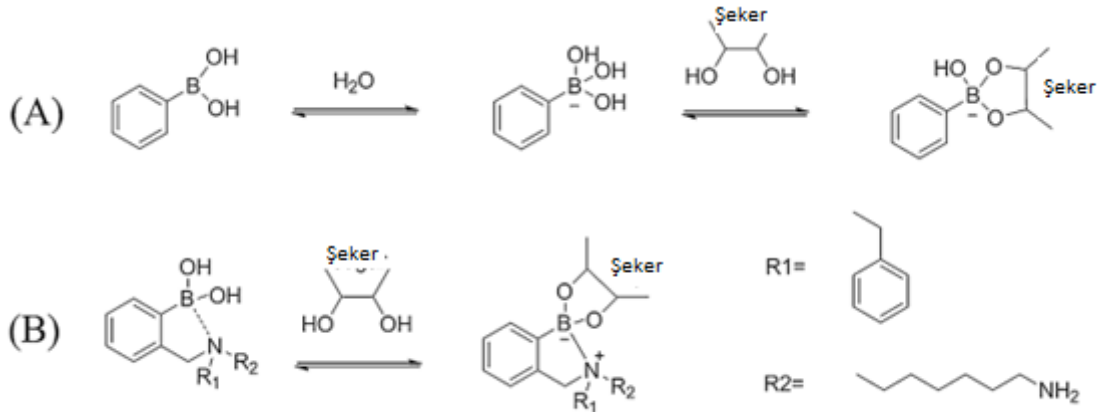
Mokkath (2019) tarafından yapılan çalışma sonucunda, altın ve gümüşten yapılan tipik asil metal NP'ler kullanılarak, boyutlarının, şekillerinin ve bileşimlerinin modifikasyonu yoluyla yalnızca pasif SPR ayarı elde edilebildiği tespit edilmiştir. Son zamanlarda, serbest taşıyıcı yoğunlukları ve SPR'leri doping yoluyla dramatik bir şekilde modüle edilebildiğinden, B ve P katkılı Si NP'lere ilgi artmıştır. TD-DFT hesaplamalarını kullanarak, B/P katkı atomunun konumunun Si NP'lerin optik özellikleri üzerinde güçlü bir etkisi olduğunu gösterilmiştir. B ve P katkılı Si NP'lerin optik özelliklerine ilişkin elde edilen sonuçların yeni Si bazlı plazmonik materyallerin geliştirilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Literatürde SPR ve QCM bazlı sensörlerin HA, doğal reseptörler ve influenza virüsü arasındaki moleküler etkileşimler hakkında bilgi sağladığı bildirilmiştir (Amano & Cheng, 2005). Örneğin, Sato, Ishii, Ohtake, Kyasuke, Terabayashi, Kawanishi & Okahata (1999), influenza A virüsünün membranlardaki monosialoganglioside bağlanmasını incelemek için QCM'yi kullanmışlardır. Schofield ve Dimmock (1996), influenza virüsünün yakalanması için monoklonal antikor HC10 sabitlenmiş karboksillenmiş dekstran polimer matris kaplı SPR çipini kullanmışlardır. Ayrışma hızı sabiti ve birleşme hızı sabiti, afinite ELISA ve Takemoto ve diğerleri (1996) influenza HA ve hücre yüzeyi reseptörü SA arasındaki etkileşimi incelemek için bir bağlanma deneyi geliştirmiştir. Ancak SA ve HA molekülleri ile etkileşim yoluyla HA'nın tespit limiti hakkında herhangi bir çalışma rapor edilmemiştir. SA ve 4 APBA esaslı sentetik reseptör yönteminin, literatürde belirtilen diğer HA tespit yöntemlerinden daha uyumlu tespit sınırına sahip olduğunu söylenebilir (Diltemiz ve diğerleri, 2013).

Ayrıca, influenza tespiti için kullanılan özellikli çalışmaların çoğu kısa raf ömrünün kısılması, denatüre edici problemler, spesifik ekipman ve pahalı antikor-antijen etkileşimlerine sahiptir. Bu nedenle, bu dezavantajların üstesinden gelmek için yeni yöntemlerin araştırılması gerekmektedir. Diltemiz ve diğerleri (2013) tarafından yapılan

çalışmada, uzun raf ömrü, kolay saklama koşulları, influenza tespiti için basit ve düşük maliyetli özelliklere sahip yeni biyosensör sistemleri elde edilmiştir. Bu yeni sistem biyolojik reseptörlere de çok iyi bir alternatif olabilir. Sonuçlar HA tespitinin sadece QCM ve SPR nanosensörleri kullanılarak gerçekleştirildiğini göstermekle kalmayıp, aynı zamanda özel durumlarla (eğitim personeli ve kabin) influenza tespiti için de potansiyel olarak kullanılabilir (Diltemiz ve diğerleri, 2013).

Boronik asit ve sakarit etkileşiminin mekanizması Şekil 36'te gösterilmektedir. Sulu çözeltide OH, elektron eksikliği olan B atomuna saldırır ve sp²'den sp³ hibridizasyonuna dönüştürür. Boronik asidin tetrahedral formu, diol bileşiklerine daha fazla afinite gösterir, bu nedenle boronik asit-diol etkileşimi alkalın durumda iyi performans gösterir. Sakkaritleri nötr bir ortamda sıkıca yakalamak için, özellikle üçüncül amin formunda boronik asit grubunun yakınına azot atomu eklenir. Azot, borona doğru elektron vericisidir. Molekül içi etkileşim olmasına rağmen, azot, tetrahedral sp³ hibridize bor parçasını stabilize edebilir, bu da boronik asit-sakarit etkileşimini geliştirir ve çalışan PH'yi nötr ortama indirir (Qian ve diğerleri, 2015). Bor ve azot etkileşiminin geçerliliğini doğrulamak için, boronik asit moleküllerinin pKa'sını elde etmek için spektrofotometrik yöntem kullanıyoruz ve kontrol molekülü olarak 3-aminobenzenboronik asit (ABBA) seçildi. Boronik asidin UV absorpsiyon spektrumu, farklı PH çözeltilerinde trigonal formdan tetrahedral forma dönüşümle değişecektir. ABA-PBA'nın pKa'sı 6,8'dir. Aynı yöntemi kullanarak, ABBA'nın pKa (9,0) değeri de tespit edilmiştir, bu önceki rapora uygundur (Yan, Springsteen, Deeter & Wang, 2004). ABBA ile karşılaştırıldığında, ABA-PBA'nın düşük pKa'sı sakariti nötr durumda sıkıca bağlayabileceği anlamına gelir.

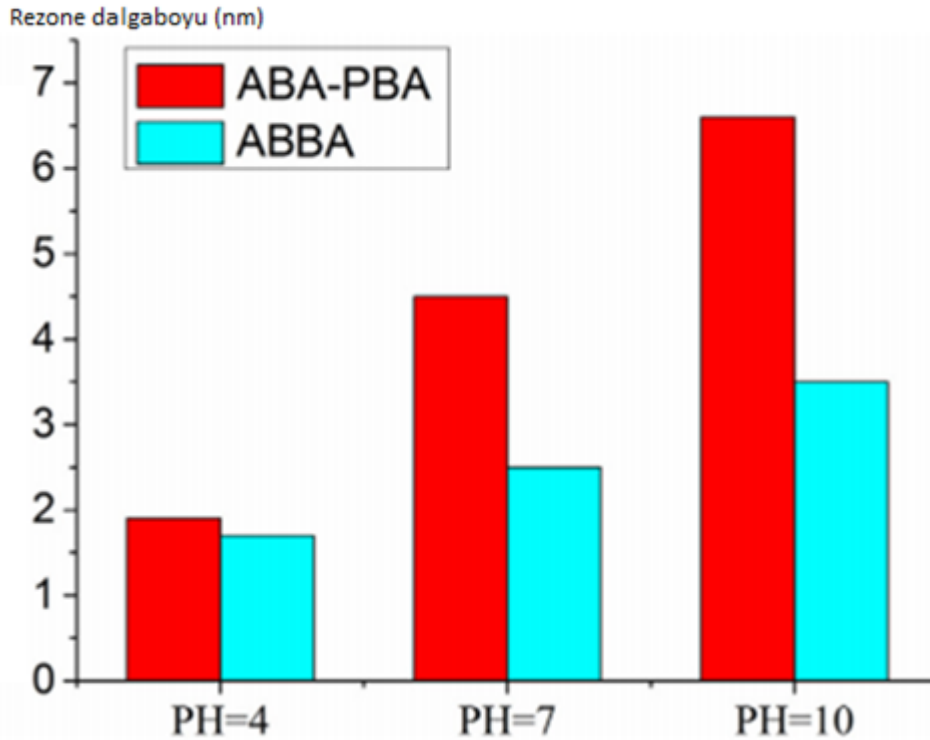


Şekil 36: Boronik asit türevlerinin şeker (A) Fenilboronik asit (B) ABA-PBA ile etkileşimi (Qian ve diğerleri, 2015).

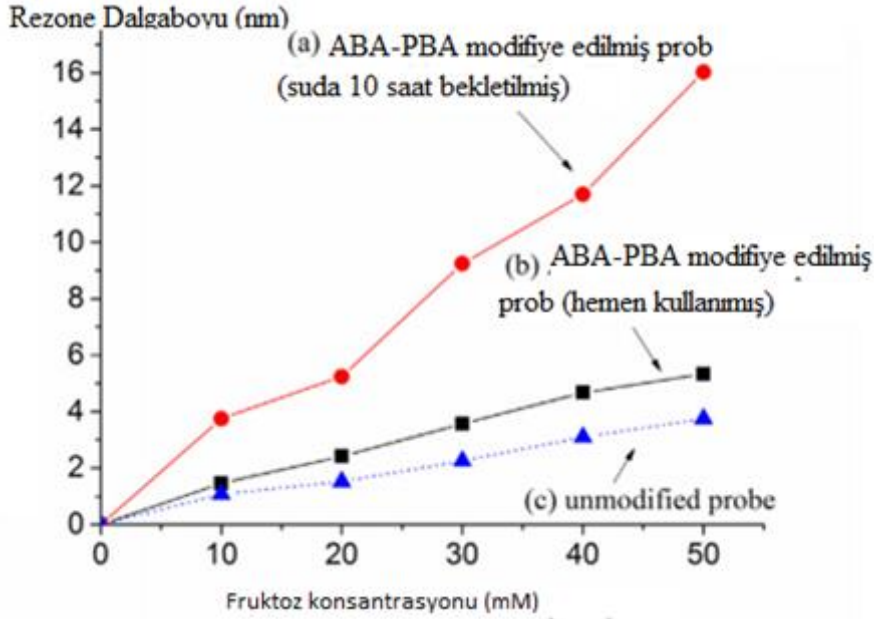
Fiber optik SPR sensörünü ABA-PBA ile aynı prosedürle ABBA ile donatılır. Şekil 37, ABA-PBA ve ABBA modifiye probalarının farklı PH'lı früktoz çözeltisine (10 mM) tepkisini göstermektedir. PH = 4'te, her iki prob da değiştirilmemiş probun tepkisine çok yakın olan fruktoza benzer düşük tepki gösterir. Bu, iki tür boronik asidin asidik durumda sakarit ile

bağlanamayacağı anlamına gelir. PH = 7'de, ABA-PBA modifiye edilmiş prob sinyal güçlendirmeyi göstermeye başlamıştır. Ancak, ABBA modifiye edilmiş probdaki geliştirme etkisi açık değildir. PKa testine rağmen, PH = 7'de çoğu ABBA molekülünün, sakkariti iyi bağlayamayan trigonal formda olduğunu bilinmektedir. Ve ABA-PBA'nın pKa'sı 6,8'dir, bu halihazırda tetrahedral formda boronik asitlerin yarısına sahip olduğu anlamına gelmektedir, böylece sakariti bir dereceye kadar bağlayabilir. Ayrıca, PH = 10'da, her iki prob da sinyal gelişimini gösterir ve ABA-PBA modifiye prob, fruktoz çözeltisine daha yüksek yanıt alır.

Sakkarit tespiti için ABA-PBA modifiye sensörünü kullanılmıştır. İlk önce, AB-PBA film'i prob üzerine yükler ve hemen tespit için kullanılmıştır. Değiştirilmemiş prob ile karşılaştırıldığında belirgin bir sinyal artışı yoktur. Ancak APA-PBA modifiye probunu kullanımdan önce 10 saat gibi bir süre suya batırıldığında, sinyal yanıtı önemli ölçüde iyileşir. Şekil 36'da, prob (b) probdan (c) sadece biraz daha yüksek tepki gösterir. 50 mM fruktoz çözeltisinde, (b) ve (c) 'nin rezonans dalga boyu kayması sırasıyla 5,33 nm ve 3,74 nm'dir. Aksine, (a) probunun tepkisi aynı konsantrasyon altında keskin bir şekilde 16,03 nm'ye sıçramıştır. Deney boyunca, altın yüzeydeki boronik asit gruplarının dimerik veya trimerik durumda olduğunu, bu nedenle sakarit ile tamamen bağlanamayacağını tahmin edilmektedir. Ek olarak, metanol fenilboronik asit parçası ile bağlanabilir ve esteri PhB (OMe) 2 parçası ile oluşturabilir (Springsteen & Wang, 2002). Bir süre suya daldırılarak, bu ester durumlarını giderebilir ve sakarit çözeltilerinde önemli bir tepki verebilir.



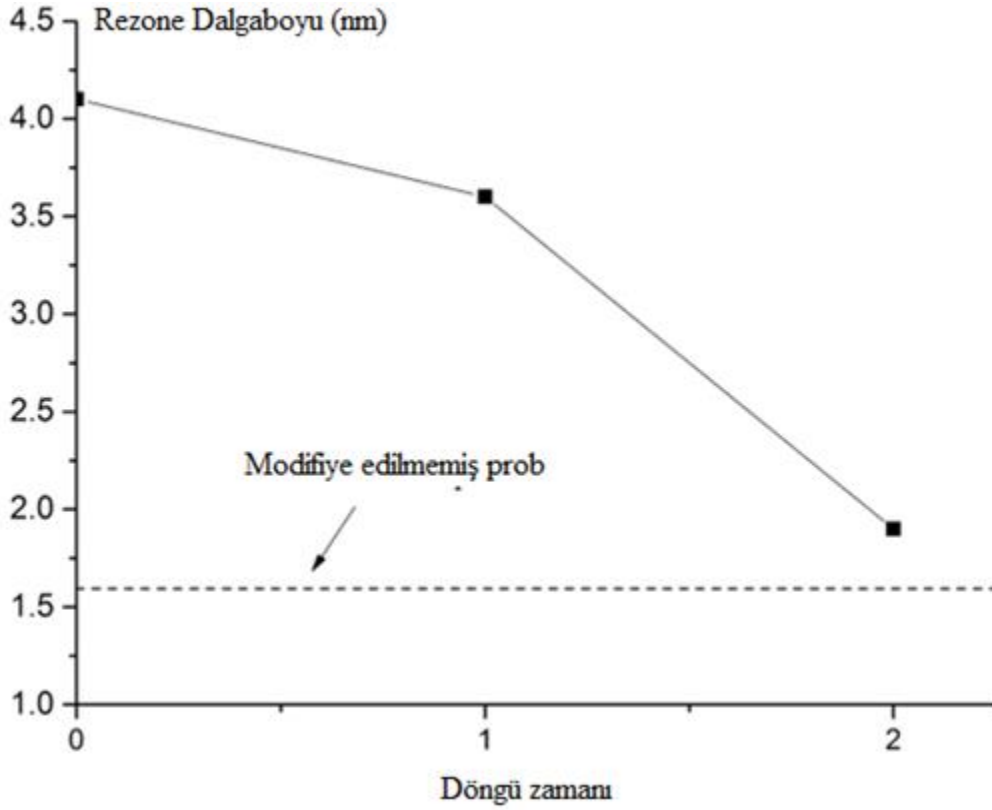
Şekil 37: ABA-PBA ve ABBA modifiye fiber-optik SPR'nin PH'a bağlı yanıt sensörü (10 mM fruktoz çözeltisi) (Qian ve diğerleri, 2015)



Şekil 38: Algilamadan önce suya daldırma ile su daldırma arasındaki fark yanıtı (Qian ve diğerleri, 2015)

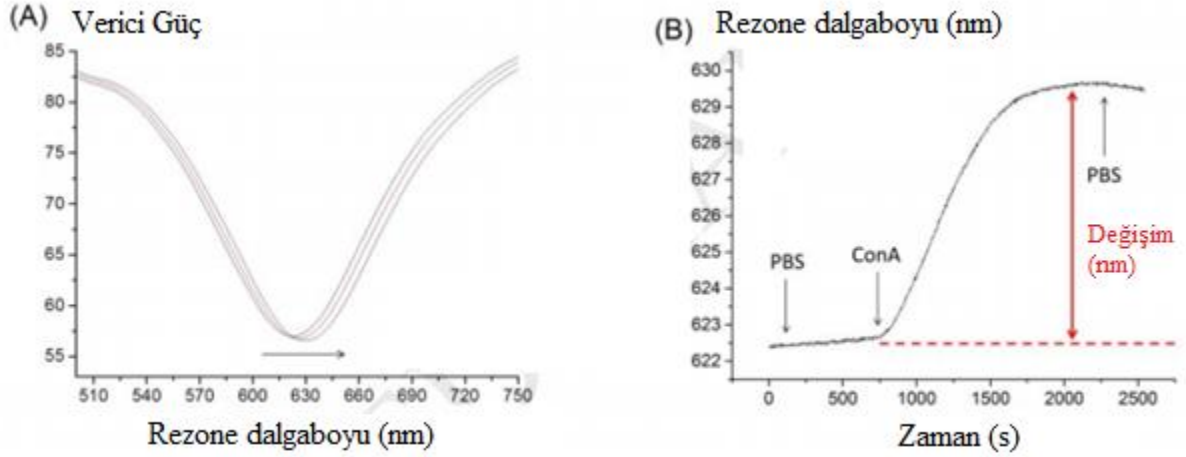
10 mM fruktoz çözeltisine daldırılarak ABA-PBA modifiye edilmiş probun rejenerasyon kabiliyetini test ediyoruz ve deiyonize su ile bağlanmayı ayırır (Şekil 39). Tarih, rejeneratif süreyi arttırarak probun tepkisinin azaldığını gösterir. Probun iki kez rejenere edildikten sonra fruktoza açık bir yanıtı yoktur.

Boronik asit modifiyeli SPR sensörünün seçiciliğini incelemek için diğer iki tür sakkarit, glikoz ve mannoz eklenmiştir. Değiştirilmemiş probalar da kontrol olarak test edilmiştir. ABA-PBA modifiye probunun fruktoz için en yüksek seçiciliği gösterdiği açıktır. Ayrıca, saptama sınırı (LOD), işlenmemiş malzemenin üç standart sapması ($3 \times 0,22$) ile belirlenir. APA-BPA modifiye edilmiş sonda ile fruktoz çözeltisinin LOD'u, değiştirilmemiş sonda ile 1 mM ile karşılaştırıldığında 0,2 mM'dir. Seçici düzen, bir önceki rapora uygun olan fruktoz > glikoz > mannozdur. Kontrol gruplarındaki probalar, farklı sakarit çözelti türlerinde benzer düşük tepki gösterir. Bu nedenle, yüksek cevabı ABA-PBA ve fruktoz arasındaki yüksek bağlantı sabitine atfetmek mantıklıdır. Dahası, farklı yapıya sahip boronik asit, farklı sakarit türlerine bağlanabilir. Bu yöntemi kullanarak, boronik asidin yapısını değiştirerek farklı sakarit tespit edilebilir. Dahası, glikoprotein hücre-hücre etkileşimi ve tanınmasında önemli roller oynar. Boronik asit ile dekore edilmiş SPR sensörleri, glikoprotein etkileşimini incelemek için yararlı bir araç olabilir.



Şekil 39: ABA-PBA modifiye fiber optik SPR sensörünün rejenerasyon kabiliyeti (Qian ve diğerleri, 2015)

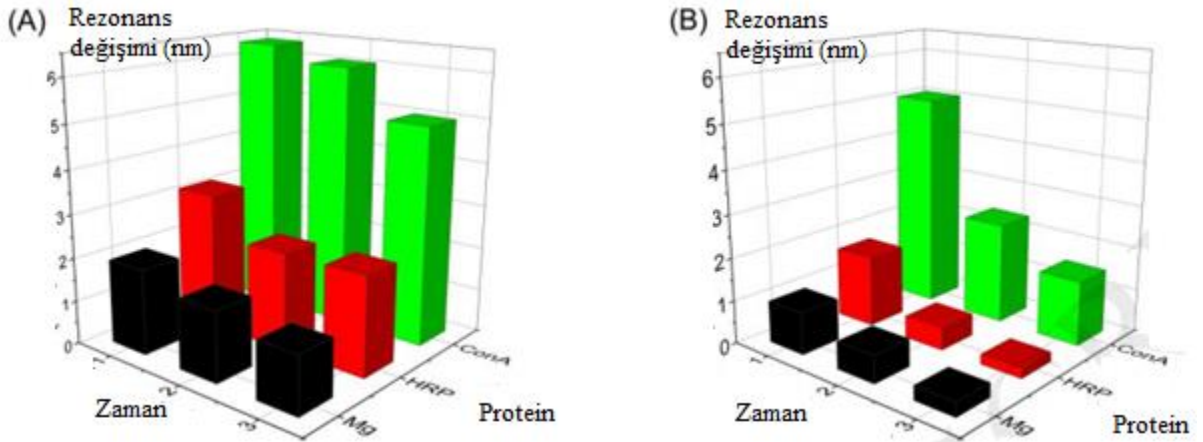
Qian ve diğerleri (2018) tarafından yapılan çalışmada Şekil 40, hedef analitlere bağlanırken fiber optik SPR sensörünün yanıtını göstermektedir. L-PBA SAM fiberin algılama bölgesine yüklendi ve PBS tamponunda 5 $\mu\text{g/ml}$ ConA saptanmıştır. Şekil 40 (A), SPR sensörünün rezonans emme spektrumunu göstermektedir. Işık dalgası metal dielektrik ara birimindeki bir yüzey plazmonuyla birleştiğinde ve rezonans spektrumunda bir düşüşe neden olmaktadır. Her spektrum 2,5 saniyede ölçülmüştür ve rezonans piki gerçek zamanlı olarak hesaplanmıştır. Rezonans dalga boyu, PBA modifiye edilmiş prob ConA ile etkileşime girdiğinde uzun dalga yönüne doğru kaymıştır. Şekil 40 (B), L-PBA SAM ve ConA arasındaki bağlama işlemi sırasında rezonans tepe kaymasını göstermektedir. ConA sensör yüzeyine tamamen takıldığında sinyal kayması doymuştur. Doymuş dalga boyu kayması proteinin belirli konsantrasyonda sinyal yanıtı olarak kullanılmıştır.



Şekil 40: PBS (A) SPR spektrumunda 5 $\mu\text{g/ml}$ ConA saptamak için L-PBA modifiye probunun temsili SPR gerçek zamanlı spektrumu, ConA (B) SPR gerçek zamanlı sensorgramı, zirveleri ile bağlandığında rezonans dalga boyu uzun dalga boyuna geçer SPR spektrumu 2,5 saniyede bir toplanmıştır (Qian ve diğerleri, 2018)

Fiber optik SPR sensörleri üzerindeki L-PBA ve S-PBA'yı modifiye edilmiştir ve glikoproteini tespit etmek için kullanılmıştır. L-PBA SAM, proteinlerin uygun pozisyonlara yapışması için daha fazla alan ve esnek bağlanma yerleri sağlayabilir. Böylece, L-PBA SAM'ın S-PBA SAM'dan daha fazla glikoproteini bağlayabilmesi beklenmektedir. Bunu doğrulamak için, glikoprotein ve boronik asit etkileşimi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan iki glikoprotein (ConA, HRP) test edilmiştir. Kontrol grubu olarak glikoprotein olmayan Mg kullanılmıştır. Tüm protein konsantrasyonları 5 $\mu\text{g/ml}$ 'dir.

Şekil 41'de gösterildiği gibi, ConA, glikoprotein, L-PBA ve S-PBA SAM'da en güçlü etkileşime sahiptir. HRP, glikoprotein, SPR sensöründe nispeten güçlü bir yanıtı sahiptir. Ve glikoprotein olmayan Mg'nin de rezonans kaymasını belirli bir dereceye kadar indükleyebileceği tespit edilmiştir, çünkü proteinler PBA'yı hidrofobik, iyonik güç ve yük transfer etkileşimleri gibi ikincil etkileşimlere bağlayabilme kabiliyetine sahiptir. Bu nedenle, glikoprotein tespiti için PBA SAM, boronik afinite ve ikincil etkileşim gibi çoklu bir etkileşimdir. Glikoprotein olmayan, sadece boronik asit ile ikincil etkileşim gösterir. Dolayısıyla, PBA modifiye SPR sensöründe Mg'nin algılama sinyali ConA ve HRP'den çok daha düşüktür.



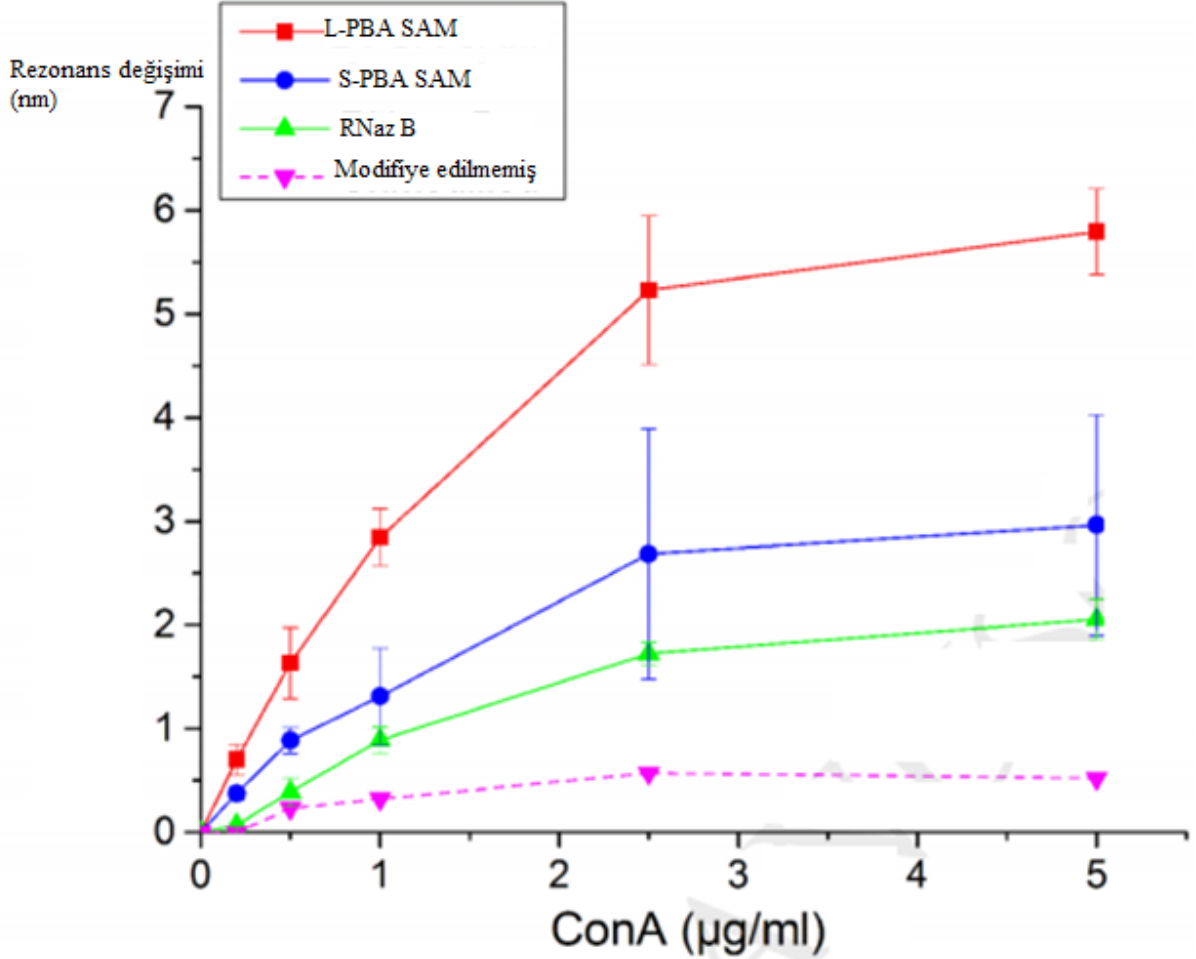
Şekil 41: ConA (glikoprotein), HRP (glikoprotein) ve Mg (glikoprotein olmayan) ile fiber optik SPR sensörü etkileşimi. Yenilenme tamponu (A) L-PBA SAM (B) S-PBA SAM olarak EtOH / PBS (hac/hac = 3/1 pH = 3) (Qian ve diğerleri, 2018)

Şekil 41 (A) ve (B) ile karşılaştırıldığında, L-PBA SAM'a sahip fiber optik SPR sensörlerinin beklendiği gibi daha fazla glikoprotein eklediği tespit edilmiştir. S-PBA SAM'a sahip sensör, glikoproteine çok daha düşük bir tepkiye sahiptir. Çünkü S-PBA SAM, protein emilimini sınırlayan yeterli alan sağlayamamıştır. Ayrıca PBA SAM için daha uzun alkil zinciri, hem glikoprotein hem de glikoprotein içermeyen absorpsiyona katkıda bulunabilir. Bu nedenle, uzun zincirli PBA SAM sensörü, glikoprotein için duyarlılığı artırabilir, ancak seçiciliği geliştiremez.

ConA'nın 0,2 µg/ml ila 5 µg/ml arasında olduğunu saptayarak L-PBA, S-PBA ve RNaseB modifiye sensörler arasındaki glikoprotein afinitesini karşılaştırılmıştır. Değiştirilmemiş sensör bir kontrol grubu olarak da kullanılmıştır. L-PBA ve S-PBA tabanlı sensörlerde PBA ve ConA yakınlığı çoklu etkileşimler yoluyla gerçekleşmektedir. Boronik asit, glikoproteinde cis-diol gruplarına bağlanabilir. İyonik, hidrojen bağı ve koordinasyon etkileşimi gibi ikincil etkileşimler de glikoproteine karşı bağlanma kapasitesinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır. Bunun aksine, RNase B ve ConA etkileşimi, daha önce bildirilmiş olan yaygın bir protein-protein etkileşimidir (Zschieschang ve diğerleri, 2008). RNase B ve ConA etkileşimi hidrojen bağları, van der Waals kuvveti ve çoklu değerlidir (Weis ve Drickamer, 1996).

Şekil 42, L-PBA SAM modifiye sensörünün ConA'ya karşı S-PBA SAM ve RNase B tabanlı sensörlerden daha yüksek bir afiniteye sahip olduğunu göstermektedir. Hem L-PBA hem de S-PBA SAM modifiye sensörleri ConA algılamada RNase B tabanlı sensörden daha güçlü tepki göstermektedir. Concanavalin A için doğrusal algılama aralığı her üç sensör türü için (L-PBA, S-PBA, RNase B) 0-2,5 µg / ml'dir. Algılama sınırı (LOD), sistem arka plan gürültüsünün üç standart sapması ($3\sigma = 0,08\text{nm}$) ile hesaplanır. ConA için LOD, L PBA SAM içinde 0,029 µg/ml (0,29 nM), S-PBA SAM içinde 0,038 µg/ml (0,38 nM) 'dir. Ayrıca, kelepçe

yazılımı ile ConA ve PBA (L-PBA'da $6,9 \times 10^4$ ve S-PBA'da $3,7 \times 10^4$) arasındaki ilişki sabit oranlarını (Kac) hesaplanmıştır. Buna karşılık, RNase B tabanlı sensörde, ConA'nın LOD'u sadece $0,11 \mu\text{g/ml}$ 'dir, bu da L-PBA'dan çok daha yüksektir. Bu sonuçlardan, boronik asit-glikoprotein arasındaki etkileşimin protein-protein etkileşiminden daha güçlü olduğu sonucuna varılmıştır.

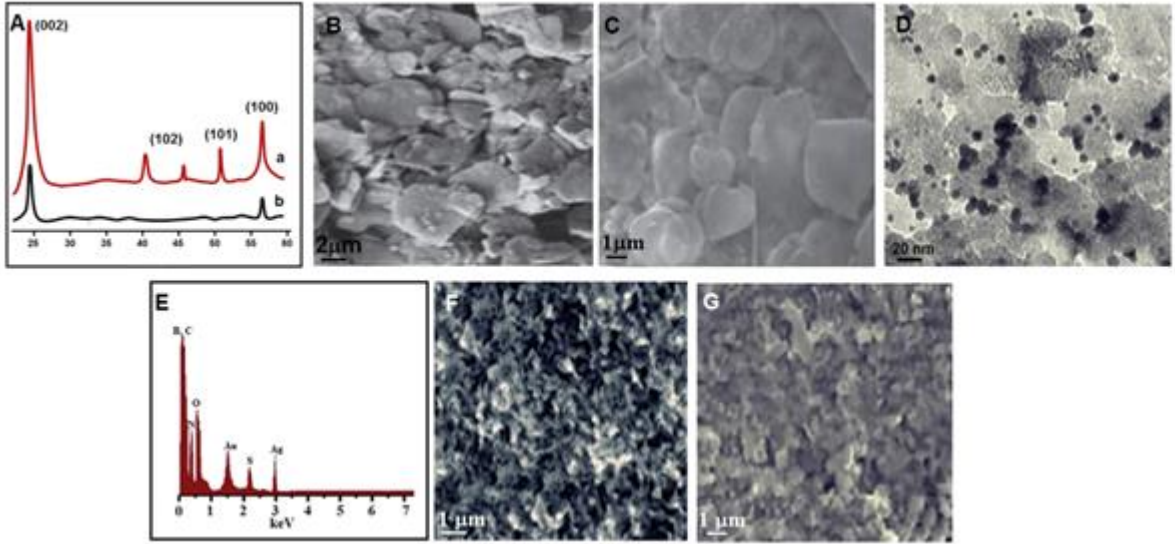


Şekil 42: ConA tespiti için L-PBA, S-PBA ve RNase B ile modifiye edilmiş fiber optik SPR sensörleri. Kontrol grubu olarak değiştirilmemiş sensör. ConA konsantrasyonu, $0,2 \mu\text{g} / \text{ml}$ ile $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ arasında değişmektedir (Qian ve diğerleri, 2018).

Boronik asit ve türevleri, çevrede daha kararlı olan kimyasal bileşiklerdir. Dolayısıyla boronik asit, spesifik tanıma proteinlerinden daha kolay bozulabilen spesifik tanıma proteinlerinden daha fazla potansiyel uygulamaya sahip olabilir. Ek olarak, PBA modifiye sensörleri ConA'yı yüzeye bağlayabilir. Hareketsiz hale getirilmiş ConA ayrıca T hücresi ve diğer kanser hücresi türleri gibi bazı reseptörleri karakterize edebilir ve bu da gelecekteki araştırmalarda umut vericidir.

Boronik asit-glikoprotein arasındaki kovalent bağ çok sıkıcıdır ve ayrılması zordur. PBA sensörlerinin tekrar üretilebilirliğini artırmak için ConA ayrışması için farklı türde yenileme çözümlerini test edilmektedir. Tüm rejenerasyon çözeltileri, boronik asit-karbonhidrat ayrışması için asidik ortam gerekli olduğundan pH = 3 koşulunda hazırlanmıştır. Etanol / PBS/HCl rejenerasyon çözeltisinde, etanol, glikoprotein ayrışmasına neden olacak ve protein yapısını korumak için kullanılan hidrojen bağını koparıırken protein denatürasyonunu yapacaktır. Ayrıca, pH'ı HCl ile 3'e ayarlanan 8M üre içeren başka bir çözeltiyi test edilmiştir. Üre ayrıca hidrojen bağlarını bozarak proteini denatüre etme yeteneğine sahiptir. Son rejenerasyon çözeltisi, HCl ile asidik PBS'dir. Protein denatüranları (etanol veya üre) olmadan, sadece asit ortamının algılama yüzeyini oluşturan proteinleri çıkaramadığını göstermektedir (Qian ve diğerleri, 2018).

Şekil 43(A), MIP/SPR, MIP/HBN/SPR, MIP/AuNPs-HBN/SPR ve MIP/Ag@AuNPs-HBN/SPR gibi farklı MIP sensörlerinin sinyaller üzerindeki etkilerini gösterir. Şekil 41(A)'ya göre, en yüksek SPR sinyalleri, 1,0 ng mL⁻¹ ETO varlığında MIP / Ag @ AuNPs-HBN / SPR kullanılarak elde edilmiştir. Bu durum CV ve EIS sonuçları ile uyumludur. Bor nitrür nanosheets ve çekirdek kabuğu nanopartiküller (Atar ve Yola, 2018) arasındaki sinerjistik etki nedeniyle, MIP / Ag @ AuNPs-HBN / SPR'de optimum sensör sinyali elde edilmiştir (Özkan ve diğerleri, 2019).



Şekil 43: Dökme bor nitrür (eğri a) ve HBN nanosets (eğri b) XRD paterni (A); (B) dökme bor nitrürün SEM görüntüleri; AgNPs-HBN nanokompozitinin (C) HBN nanosetsleri (D) TEM ve (E) EDX görüntüleri; (F) MIP / Ag @ AuNPs-HBN, (G) NIP / Ag @ AuNPs-HBN'nin SEM görüntüleri (Özkan ve diğerleri, 2019)

Farklı pH'a sahip tampon çözeltileri test edilmiştir (Şekil 43B). SPR sensörlerine verilen yanıtlar kademeli olarak pH 6,0'a kadar artmıştır. Glutamik aside (pKa1:2,10, pKa2:4,07) dayanan MAGA monomeri nedeniyle monomerin karboksilik asit grupları, pH değerindeki artışla negatif yüklüdür. Bu gruplar polar ETO grupları ile etkili bir şekilde

etkileşime girmiştir. Bu durum sayesinde sensör-analitin afinitesi artmıştır. Bununla birlikte, pH 6,0'dan sonra, ETO'nun anyon formuna dönüşümü meydana gelmiş ve sensör-analitin afinitesi azalmıştır. Bu nedenle, bu çalışmada optimum pH değeri 1,0 ng mL⁻¹ ETO varlığında pH 6.0'dır ($\Delta R = 11,413$) (Şekil 43C).

Şekil 43, MIP/Ag@AuNPs-HBN/SPR'deki SPR sinyalleri ve ETO miktarı arasındaki ilişkiyi göstermektedir (boş çözeltiden 1,00 ng mL⁻¹ ETO'ya). Regresyon denklemi MIP için $y (\Delta R) = 11.073 \times (\text{ng mL}^{-1}) - 0,0388$ şeklindedir, bu nedenle bu çalışma MIP/Ag@AuNPs-HBN/SPR'nin ETO analitine karşı daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Ag@AuNPs-HBN/SPR'nin diğer analitik yöntemlere kıyasla daha yüksek hassasiyet gösterdiği bulunmuştur (Özkan ve diğerleri, 2019).

Sonuç olarak, bor madeni çalışması kolay olduğundan ve çok sayıda alanda çalışılabilme özelliğinden dolayı seçilmiştir. Çalışmalar sonucu bor sensörlerinin farklı alanlarda seçici, hassas ve tekrarlanabilir özelliklerine vurgu yapılmıştır. Dünya kaynaklarının %73'üne sahip Türkiye'de bor alanında çalışmalara ağırlık verilmesi gerektiği düşünülmektedir.

3.2. Hemoglobin Türevleri ile Çalışma Sonuçları

Liu ve diğerleri (2008) tarafından yapılan araştırmada elde edilen sonuçlar, kompleks ve Lewis bazlarını oluşturmak için pH değerinin HbA1c ve fenilboronik asidi etkileyen önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Bu, fenilboronik asidin stereoyapısını, sakarin ile kolayca bağlanmak için B(OH)₃ oluşturacak şekilde değiştirebilir. Sonuçlar ayrıca bir SPR biyosensörün HbA1c ölçümünün doğruluğunu ve doğruluğunu iyileştirmek için hassas bir teknik olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu çalışma, SPR'nin HbA1c'nin fenilboronik asit tek tabakasına bağlanmasını spesifik etkileşimle başarılı bir şekilde tespit edip ölçebildiğini göstermiştir. Bu metodoloji, klinik teşhiste yararlı olabilir ve HbA1c bağlanma kabiliyeti için bir tahlil görevi görebileceği bildirilmiştir.

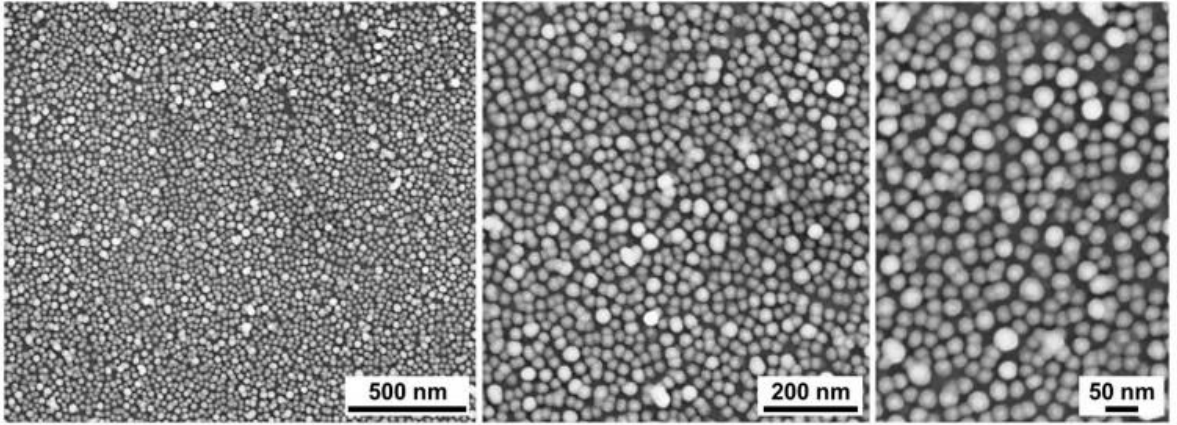
Sun ve diğerleri (2020) tarafından yapılan çalışma sonucunda, pH ve tuz konsantrasyonunun aptamer ile HbA1c arasında bir kompleks oluşumunu büyük ölçüde etkileyebileceğini göstermektedir. Aptamerin stereoyapısında, döngü L1, glikolize hemoglobini tanımak için önemli bir motif olabileceği bildirilmiştir. Sonuçlar ayrıca, bir SPR aptamer biyosensör kullanımının, HbA1c ölçümünün doğruluğunu ve doğruluğunu iyileştirmek için hassas bir teknik olabileceğini göstermiştir.

Heo ve diğerleri (2017) tarafından yapılan çalışmada Şekil 42, AuNP'ler ile kaplanmış plastik film yüzeyinin taramalı elektron mikroskopisi (SEM) görüntüsünü göstermektedir. Işık kaynağı ile etkileşime giren AuNP'lerin yüzey alanındaki artış LSPR sensörünün absorbans hassasiyetini artırır çünkü LSPR'nin absorbansı genellikle substrat üzerinde hareketsiz hale getirilen AuNP sayısı arttıkça artar. Şekil 22, AuNP'lerin, plastik film bazlı yongaların absorbans hassasiyetinin mevcut yöntemlerden daha üstün olduğunu gösteren yakın paketli bir tek tabakalı oluşturduğunu göstermektedir. LSPR çipi kırılma indeksi sensörü olduğundan, LSPR çipinin kırılma indeksi hassasiyetini belirlenmiştir. LSPR çiplerinin hassasiyetini doğrulamak için, Şekil 42'de gösterildiği gibi sırasıyla artan konsantrasyonlara (ağırlıkça % 5,

15, 25 ve % 40) sahip Gly çözeltilerine daldırılmış LSPR çiplerinin absorpsiyon spektrumlarını ölçülmüştür. Konsantrasyondaki değişiklik ile ilişkili 540 nm, 500-580 nm aralığında en yüksektir. Bu nedenle, 540 nm'de farklı Gly konsantrasyonlarının absorbansı karşılaştırılmıştır.

Sistein, bir tiol fonksiyonel grubuna bağlı olarak AuNP'ye kovalent olarak bağlanan bir amino asit olarak bilinir. Ek olarak protein G, anti-Hb'yi yakalayabilen antikor bağlayıcı proteinlerden biridir. Bu nedenle Cys protein G, anti-Hb'yi AuNP'ye bağlayan bir çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır ve AuNP'lere reaksiyona sokulmuştur. Cys-protein G'nin reaksiyonundan sonra 0,1, 1, 10 ve 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ anti-HbA1c, Cys protein G ile birleştirilmiştir ve daha sonra HbA1c (% 10.7), AuNP'ler üzerinde anti-HbA1c'ye reaksiyona sokulmuştur.

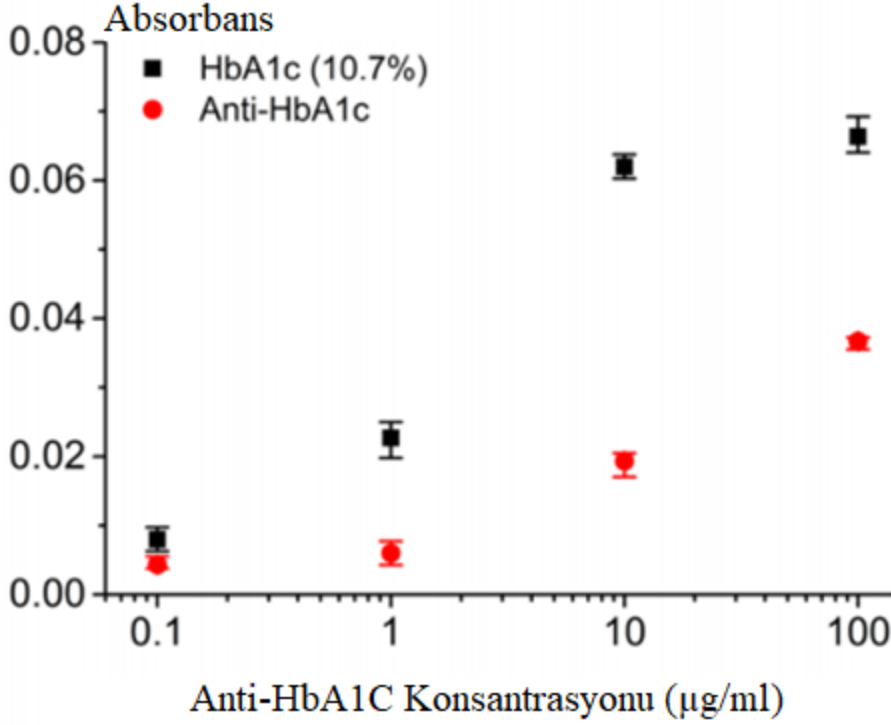
Şekil 45, anti-HbA1c ile konjüge edilmiş LSPR yongasının (●) ve HbA1c konjüge edilmiş LSPR yongasının (■) absorbansındaki artışı gösterir. Anti-HbA1c konjüge LSPR çipinin absorbansındaki artış, artan anti-HbA1c konsantrasyonları ile kademeli olarak artmıştır. Öte yandan, HbA1c ile konjüge LSPR çipinin absorbansındaki artış, anti-HbA1c ile konjüge edilmiş LSPR çipinin absorbansına kıyasla hızla 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 'e kadar artmıştır ve 10 $\mu\text{g/ml}$ 'den daha yüksek konsantrasyonda neredeyse doymuştur. Reaksiyona girmiş anti-HbA1c konsantrasyonu 0,1, 1, 10 ve 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olduğundan, HbA1c konjüge LSPR çipinin anti-HbA1c ile konjüge LSPR çipine karşı absorbansındaki artış değerleri sırasıyla 0,0007, 0,0127, 0,0313 ve 0,0227'dir. Bu sonuçlar, anti-HbA1c ve HbA1c'nin bağlanmasının, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ anti-HbA1c'de doymuş olduğunu ve sonuç olarak optimal anti-HbA1c konsantrasyonunun, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ olduğu belirler.



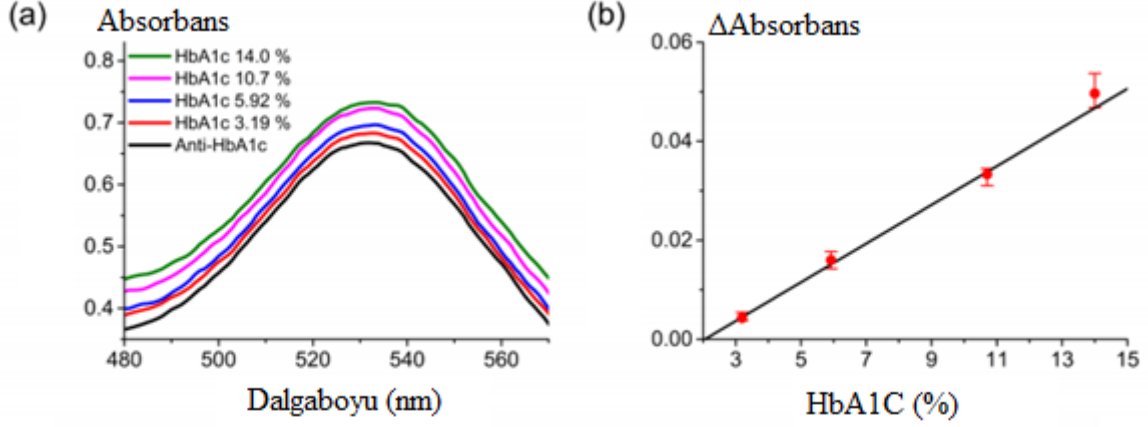
Şekil 44: AuNP'lerin kendi kendine bir araya getirildiği polimer filmin SEM görüntüsü (Heo ve diğerleri, 2017)

Anti-HbA1c konsantrasyonunun optimizasyonuna dayanarak, LSPR çiplerindeki AuNP'lere sırasıyla 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Cys-protein G ve 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ anti-HbA1c eklenmiştir. Daha sonra, çeşitli HbA1c seviyeleri anti-HbA1c ile konjüge LSPR çiplerine reaksiyona sokuldu. Şekil 44, HbA1c ile konjüge LSPR çiplerinin absorpsiyon spektrumlarının ve HbA1c seviyesine karşı 540 nm'de absorbansın kalibrasyon grafiğinin gösterildiğini göstermektedir. LSPR çipine reaksiyona giren HbA1c seviyesi arttıkça, maksimum emilim zirvesi anti-HbA1c

seviyesine karşı arttırılmıştır. Ayrıca, 540 nm'deki absorbans, HbA1c seviyesi arttıkça doğrusal olarak artmıştır ($R^2 = 0,9819$). Özet olarak, HbA1c'nin tespiti için LSPR çipinin performansı, floresan boyaların veya ikincil antikorların herhangi bir ek etiketlenmesi olmaksızın çeşitli HbA1c seviyelerinin LSPR tespiti temelinde ayırt edilebilirliği ile başarıyla gösterilmiştir (Heo ve diğerleri, 2017).

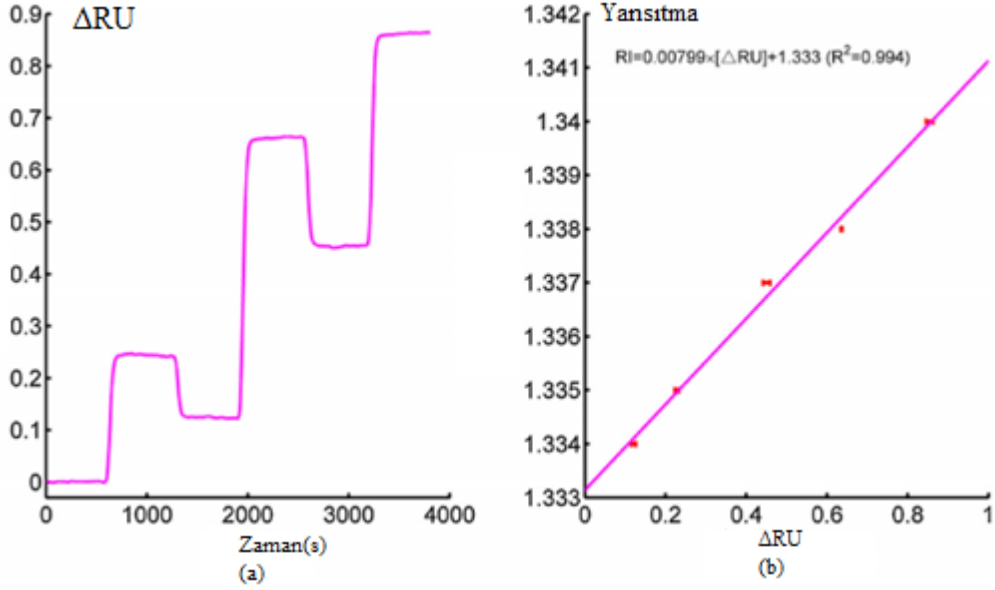


Şekil 45: Anti-HbA1c konsantrasyonunun optimizasyonu, HbA1c ve anti-HbA1c arasındaki bağlanma afinitesi ile belirlenir. Cys-protein G konjuge LSPR çipinin absorbansına karşı anti-HbA1c (●) ve HbA1c (■) absorbans değerlerindeki artışlar, farklı anti-HbA1c konsantrasyonlarında 540 nm'de ölçülmüştür (Heo ve diğerleri, 2017)



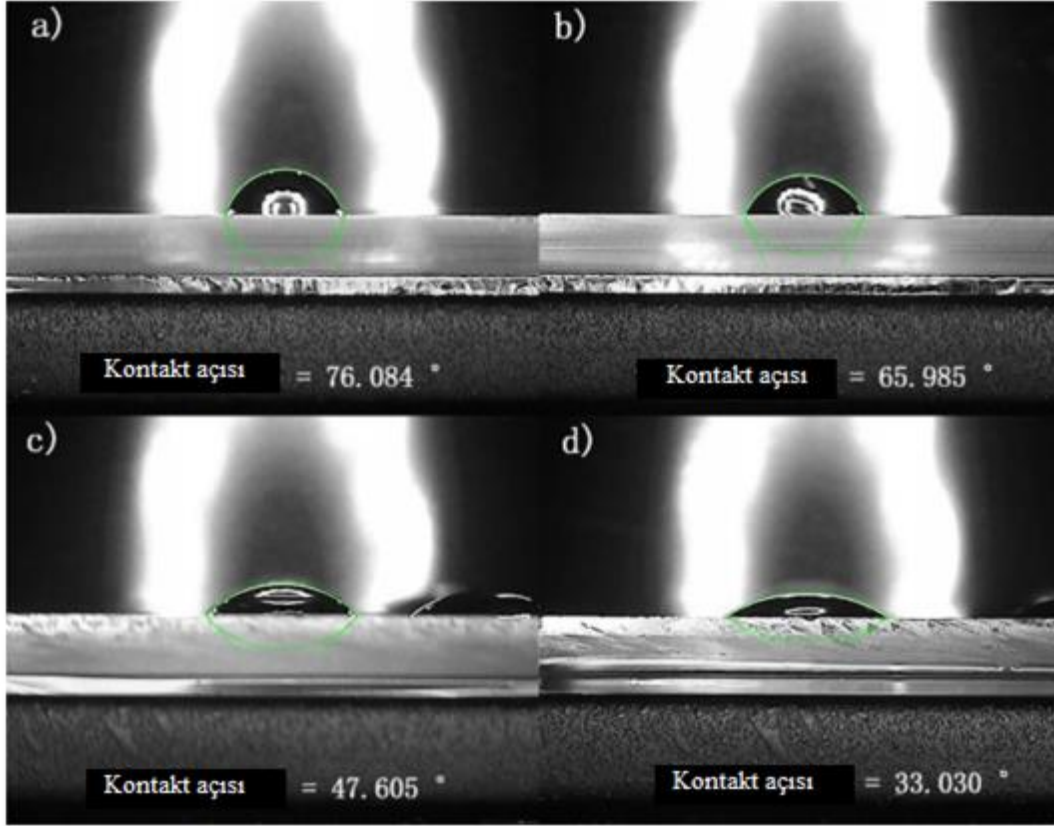
Şekil 46: HbA1c'nin kantitatif analizi. (a) Farklı HbA1c seviyelerinin konjügasyonundan önce ve sonra 480-570 nm aralığında ölçülen LSPR çipinin absorpsiyon spektrumları (3,19, 5,92, 10,7 ve % 14). (b) HbA1c içeriğine karşı absorbans değişikliğinin kalibrasyon grafiği. HbA1c içeriği arttıkça absorbans değerindeki değişim orantılı olarak artmıştır (Heo ve diğerleri, 2017)

Zhang ve diğerleri (2019) tarafından yapılan çalışmada şu sonuçlara ulaşılmıştır. 3D yazdırılan bileşenlerin gücü ve hassasiyeti, geliştirilen sistemin performansını etkileyebilmektedir. Metal malzemelerin aksine, üzerine bir lazer veya fotodiyot monte edildiğinde, basılı PLA bileşenleri büyük ölçüde deforme olabilir. 3D baskılı parçaların çekme mukavemeti esas olarak dolgu yoğunluğundan etkilenmiştir. Bu nedenle, dolgu yoğunluğu mümkün olduğunca yüksek olmalıdır. %50 dolum yoğunluğu mukavemet, baskı süresi ve malzeme maliyeti arasındaki değiş tokuş için uygundur. 3D yazdırılan parçaların yanlış algılanması, optik yol veya montaj sorunlarında hizalama sorunlarına neden olmuş olabilir. Yazıcının mekanik ayarının ideal olduğu düşünülürse, yazdırılan parçaların hassasiyeti, meme çaplarından ve baskı katman kalınlığından etkilenmektedir. Meme çapı, xy düzlemindeki hassasiyeti etkilerken, tabaka kalınlığı z eksen boyunca hassasiyeti etkilemiştir. Bu hatalar tasarım aşamasında telafi edilmelidir. Geliştirilen sistemin açısal çözünürlüğünü değerlendirmek için, deiyonize su cevabı arka plan sinyali olarak kullanılmıştır ve sinyal gürültü seviyesi, sistemin açısal çözünürlüğü olarak görülebilen $0,0008^\circ$ 'dır. Farklı NaCl konsantrasyonları için sistem tepkisi Şekil 45a'da gösterilmiştir. Elde edilen regresyon denklemi, Şekil 45b'de gösterildiği gibi $RI = 0,00799 \times [\Delta RU] + 1,333$ ($R^2 = 0,994$) idi; burada RU, yanıt biriminin kısaltmasıdır (derece cinsinden rezonans açısı) ve ΔRU , temel sinyale karşılık gelen rezonans açısı; duyarlılık $0,00799^\circ/RIU$ idi. Kırılma endeksinin çözünürlüğü, gürültü seviyesi ve hassasiyetin ürünü olarak elde edilebilir. Geliştirilen sistemin $6,39 \times 10^{-6}$ RIU'luk yüksek kırılma indeksi çözünürlüğü sergilediği anlaşılabılır.



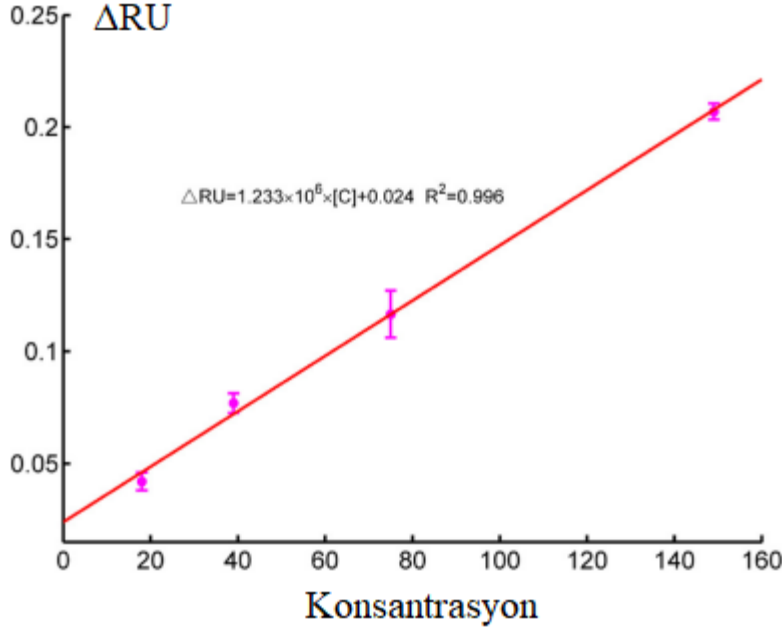
Şekil 47: NaCl ölçüm eğrileri: (a) farklı NaCl çözeltisi konsantrasyonları için tepki; (b) ΔRU 'ya karşı kırılma indisi (Zhang ve diğerleri, 2019)

SPR sistemi ve algılama çipi ile biyosensör deneyi öncesinde, değiştirilmiş sensör yüzeyinin etkinliğinin doğrulanması gerekiyordu. Temas açısı ölçümü, sensör işlevselliği sırasında her adımı incelemek için güçlü bir araçtır. Temas açısı ölçümünün sonuçları Şekil 46'da gösterilmektedir. Çıplak Au yüzeyi $76,084^\circ$ 'lik bir temas açısı değeri sergilemiştir. 20 dakika UV maruziyetinden sonra temas açısı $65,985^\circ$ 'ye düşmüştür. Temas açısındaki bu azalma, UV maruziyetinin Au film üzerindeki safsızlıkları etkili bir şekilde giderdiğini göstermiştir. Au filmde MUA/MPA kendinden montajlı mono tabakalar oluşturulduğunda, temas açısı $47,605^\circ$ olmuştur ve bu, MUA/MPA kendi kendine monte edilen tek tabakalı (SAM) hidrofilik bir alan olan $eCOOH$ ile sonlandırıldığını gösterir. Daha sonra, DNA'nın MUA/MPA SAM üzerine immobilizasyonundan sonra, temas açısı MUA/MPA SAM'ın $46,720^\circ$ 'den $33,030^\circ$ 'ye düşmüştür. $21,911^\circ$ DNA immobilizasyonundan sonra temas açısındaki azalma, DNA'nın sensör yüzeyi üzerinde başarılı bir immobilizasyonunu doğrulamıştır.



Şekil 48: Temas açısı ölçümü. a) Çıplak Au filmi. b) 20 dakika UV maruziyetinden sonra Au film. c) Au/MUA/MPA SAM. d) Au/MUA/MPA/aptamer film (Zhang ve diğerleri, 2019)

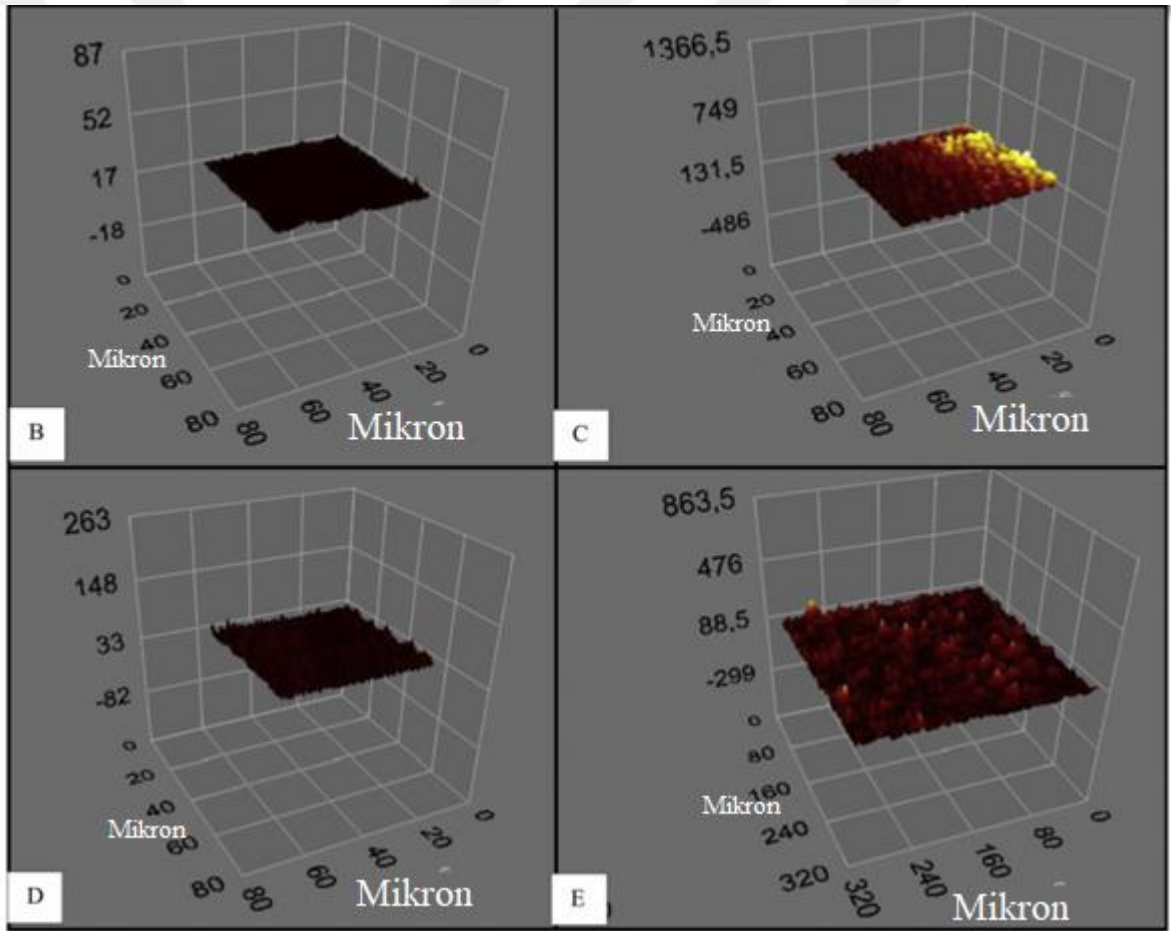
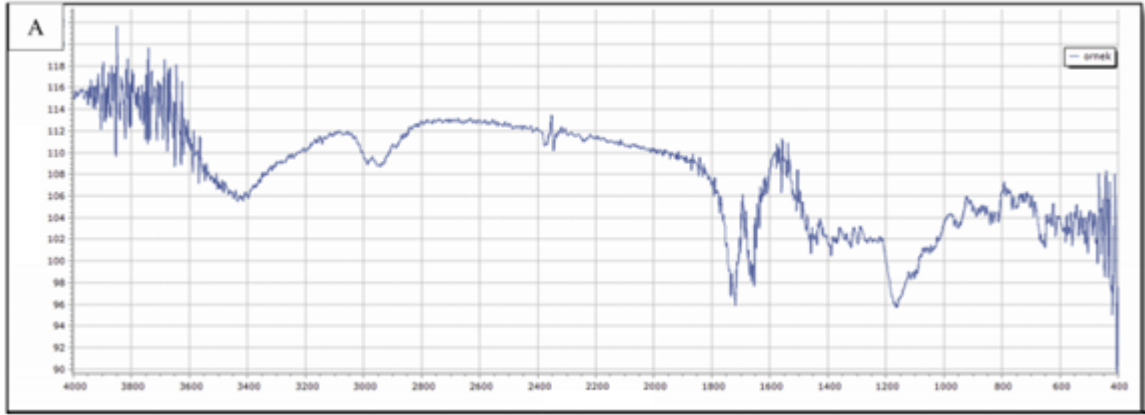
Klinik teşhis uygulaması için saptanabilir aralığı tahmin etmek için, fizyolojik aralıktan (3-13 mg/ml) çok daha düşük olan 18 nM (1,22 µg/mL) ile 147 nM (10,00 µg / mL) arasında bir HbA1c konsantrasyon aralığı tasarlanmıştır. Bilinen miktarlarda HbA1c ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Şekil 47, 18 ila 147 nM arasında değişen HbA1c konsantrasyonları ile aptasensörün SPR sistemi yanıtlarını göstermektedir. HbA1c ile sensör yüzeyi üzerindeki hareketsizleştirilmiş aptamer arasındaki bağlanma etkileşimi, Şekil 47'de görüldüğü gibi, sistem tepkisinin artan HbA1c konsantrasyonu ile lineer olarak artmasına neden olmuştur. 1 nM (0,070 µg/mL)dir. SPR sisteminin çok küçük kan numuneleri üzerinde ölçüm yapabilmesi, substrat girişimini azaltabilir ve sinyal/gürültü oranını artırabilir ve HbA1c saptamasının doğruluğunu daha da geliştirebilir. Bu nedenle, geliştirilen SPR HbA1c saptama sistemi, klinik tanı için HbA1c konsantrasyonunu ölçmek için umut verici bir yöntem olarak düşünülebilir. Ancak, gerçek numunenin bin kat seyreltilmesi şimdilik pratik olmayabilir. Ancak bu çalışma, gelecekte HbA1c'yi saptamak için 1 µL veya daha az gerçek örnek kullanan bir HbA1c aptasensörünün potansiyelini göstermektedir.



Şekil 49: Farklı HbA1c konsantrasyonları için sistem yanıtları (Zhang ve diğerleri, 2019)

Çalışır ve diğerleri (2020) tarafından yapılan çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir. FTIR spektrometresi, 4000-400 cm^{-1} bantlar arasında VPBA kaplı çipin yüzey karakterizasyonu için seçilmiş ve Şekil 50A'da verilmiştir. Nanofilm yapısında EGDMA varlığı, 1140 cm^{-1} tepe noktasında CeO titreşimleri ile kendini göstermektedir. OeH gerginliği 3467 cm^{-1} 'de gösterilmiştir. Ek olarak, 1450 ve 2950 cm^{-1} pikleri fenil grupları için tipik piklerdir. Karbonil gerginliği 1720 cm^{-1} 'de ve 1375 cm^{-1} 'de görülür. Ek olarak, BeC gerilmesi, 1140 cm^{-1} 'de bir tepe noktası vererek boronik bazlı polimerin varlığını teyit ederek de verilmiştir.

Boş, sadece allil merkaptan modifiyeli, VPBA kaplanmamış nanofilm ve son olarak VPBA kaplı nanofilm SPR çiplerinin kalınlığı elipsometri ile ölçülmüş ve Şekil 50 (B – E) gösterilmiştir. Alil merkaptan modifiye SPR çipinin yüzey kalınlığı elipsometri analizi ile $32 \pm 1,2$ nm elde edilmiştir. Ayrıca, çıplak SPR talaş yüzeyi $48 \pm 2,1$ nm ve VPBA SPR talaş yüzey kalınlığı ile kaplanmış nanofilm $50 \pm 4,1$ nm olarak ölçülmüştür. Bu ölçümlere dayanarak nanofilmlerin yüzeye homojen olarak uygulandığını söylemek mümkündür.

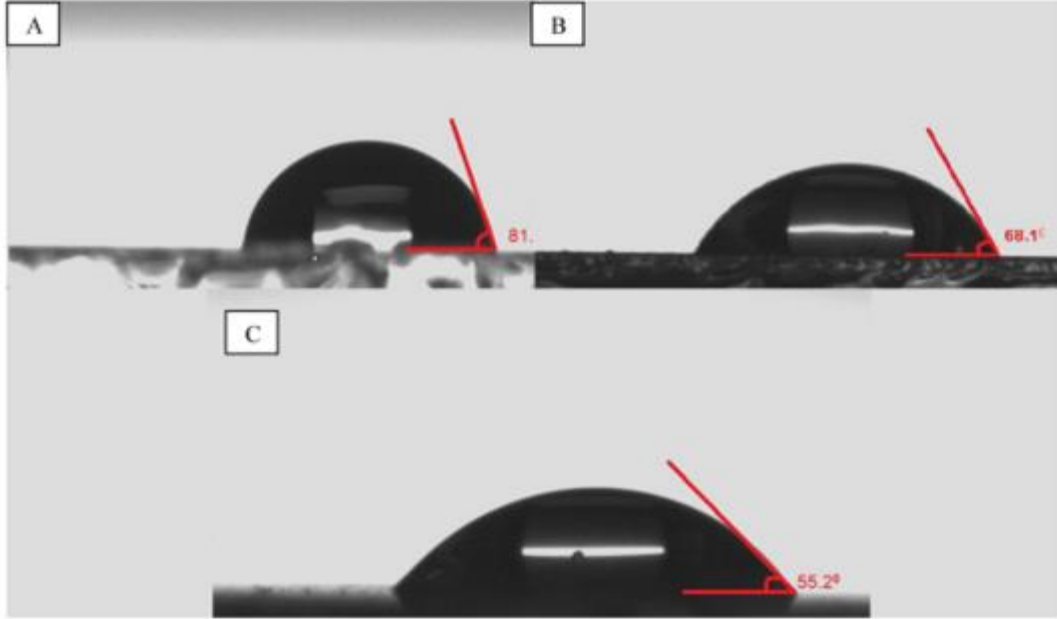


Şekil 50: VPBA kaplı nanofilm SPR çipinin FTIR spektrumu. Çıplak SPR çip yüzeyi (B), alil merkaptan modifiye SPR çip yüzeyi (C), VPBA kaplanmamış nanofilm SPR çip yüzeyi (D) ve VPBA kaplı nanofilm SPR çip yüzeyinin (E) elipsometri görüntüleri (Çalışır ve diğerleri, 2020)

Katı yüzeye temas eden bir sıvı belirli bir miktarda açı oluşturur. Bu açı temas edilen katı madde ve temas sıvısına ve yüzeyin tanınması için iyi verilere bağlı olarak değişir. Temas

açısı 90 dereceden fazla ise, yüzeyin hidrofobik olduğu söylenebilir. Modifiye edilmiş allil merkaptan, VPBA kaplanmamış nanofilm ve VPBA kaplı nanofilm SPR çip yüzeylerinin temas açıları alınmıştır.

Çalışmada, HbA1c numuneleri 10, 50, 75, 100, 120, 150 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda pH 6,0 tampon çözeltilerinde hazırlanmış ve bunların sensörgramları grafik ile birlikte Şekil 51'de gösterilmiştir. İlk olarak, pH 6,0 tampon çözeltisi, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca sistemden geçirilmiş, daha sonra belirtilen konsantrasyonlarda HbA1c çözeltilerinden biri 8 dakika geçirilmiş, daha sonra pH 7,4 desorpsiyon çözeltisi 2 dakika ile çıkarılmıştır. HbA1c konsantrasyonu arttıkça, oda sıcaklığında 10 µg/ml⁻²⁰⁰ µg/ml konsantrasyonları arasında yapılan 7 farklı numunede açıkça artış gözlenmiştir. 10–200 µg/ml konsantrasyon aralığından alınan doğrusal grafiğin denklemi $y = 0,0548x - 1,6212$ olarak hesaplanır. Bu denklemin doğrusallığı $R^2 = 0,9471$ olarak elde edilir. R^2 bağlanma ile orantılı olduğundan, bağlanma %98,67 doğrusallık olarak belirlenir. Tüm tespit deneyleri kopyalar halinde yapılır. Tekrarlanan deneyler ve istatistiksel deney sonuçları için, ortalama değerleri ve nispi standart sapmaları (RSD) belirlemek için standart istatistiksel yöntemler kullanılmıştır. Hata payını belirlemek için her bir numune seti için %96 güven aralıkları hesaplanır. Tespit limiti (LOD) ve niceleme limiti (LOQ) değerleri Denklemlere göre teyit edilmiştir.



Şekil 51: A. Alil merkaptan modifiye, B. VPBA kaplanmamış nanofilm ve C. VPBA kaplı nanofilm SPR çip yüzeyleri temas açısı görüntüleri (Çalışır ve diğerleri, 2020).

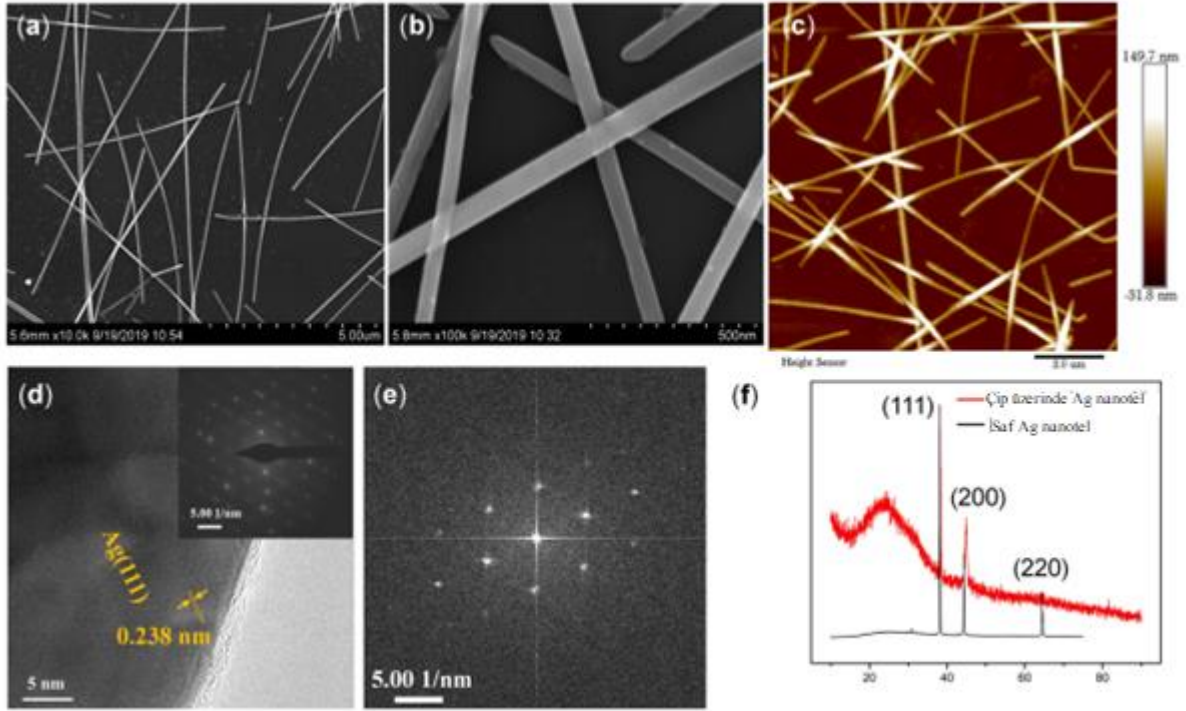
Boronik asit bazlı yüzey plazmon rezonans sensörünün seçiciliğini belirlemek için yapay plazma ile ölçümler yapılmıştır. HbA1c'nin boronik aside cis-diol etkileşimine dayanan yüksek afinitenin, plazmada IgG, HSA ve Hb için eşit derecede yüksek afinite gösterip göstermediğini görmek için ölçümler yapılmıştır. 120, 150, 200 µg/ml'lik bir konsantrasyonda

tüm farklı numunelerin sensogramı ve yapay plazmaya 30, 50, 120 µg/ml'lik bir konsantrasyonda HbA1c ilave edilerek elde edilen sensogramlar elde edilmiştir. HbA1c bağlanma sinyalinin IgG, Hb ve HSA ile karşılaştırma deneyi farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre, boronik asit ve karşılaştırma molekülleri arasında ihmal edilebilir etkileşim vardır.

Tekrar kullanılabilirlik çalışmasında, 75 µg/ml'lik bir konsantrasyonda pH 6,0 tamponundaki HbA1c çözeltisi, oda sıcaklığında sisteme verilmiştir. Tampon sisteminden geçtikten sonra, numune yaklaşık 5 dakika süreyle verilmiştir ve 3 dakika sonra desorpsiyon çözeltisi geçirilmiştir, aynı prosedür 5 kez tekrarlanmıştır. Hemen hemen aynı ΔR değeri her tekrarlanan numune için elde edilmiştir (Çalışır ve diğerleri, 2020).

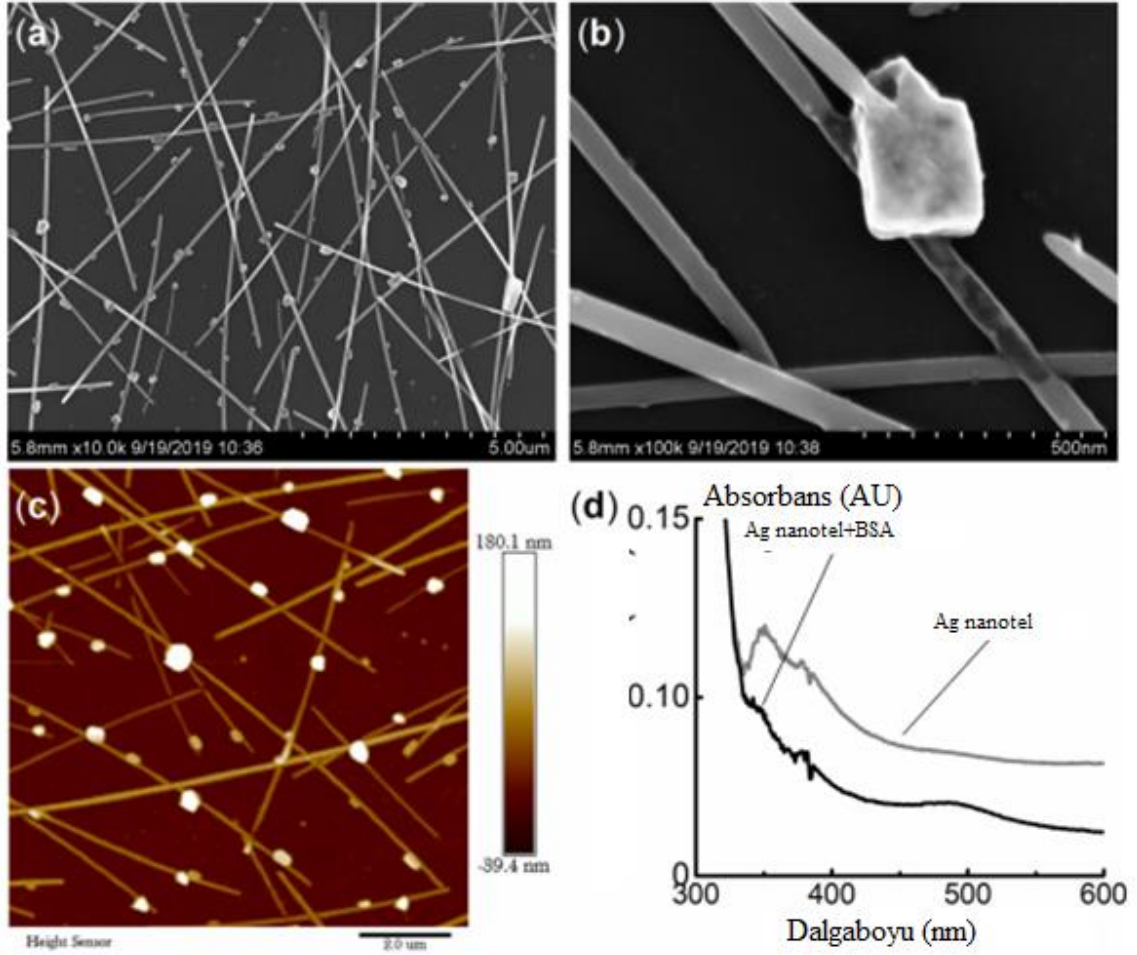
Zhang ve diğerleri (2020) tarafından yapılan çalışma sonuçları şunlardır. Çipin tasarımı, proteini sıvı içermeyen bir düzenekte örneklemek ve test etmek için tasarlanmıştır. Ag-nanotelleri, (3 merkaptopropil) trimetoksi-silanın tiol ucu ile kimyasal bir bağ oluşturarak substrat üzerine aşılmıştır. Ag-nanotelleri çözeltisinin farklı konsantrasyonları hazırlanmış ve test edilmiştir, ancak 2×10^7 Ag nanotelleri/cm²'den daha yüksek konsantrasyonlar için nanotellerin çoklu katmanları gözlemlenmiştir, nanoteller 2×10^6 Ag nanotelleri/cm²'den daha düşük konsantrasyonlar için çok geniş yayılmıştır. Şekil 52'deki paneller, nanotellerin kapak camının üstüne montajını belgelemektedir. Şekil 52a, cam yüzeyinin üstündeki nanotellerin panoramik bir SEM görüntüsüdür; bu, Ag-nanotelleri çözeltisinin yüzeye düşürülmesinden sonra, metalik nanoyapıların cam yüzeye rastgele, ancak düzgün bir şekilde dağıldığını kanıtlamıştır. Mekansal düzenleme, 92,7°'lik bir temas açısına (τcont) sahip bir hidrofobik yüzeye yol açmıştır. Şekil 52b'deki yüksek çözünürlüklü SEM, ultrasonizasyon sırasında substrat yüzeyinde meydana gelen hafif ısıtma işlemi nedeniyle nanoteller arasında oluşturulan kaynak noktasını vurgulamaktadır. Şekil 52c'de temassız kılavuz çekme modunda çalıştırılan atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ile elde edilen yüzey topolojisi analizi gösterilmektedir. Hareketsizleştirilmiş Ag-nanotellerinin maksimum kalınlığı yaklaşık 150 nm'dir. Ayrıca, nanoteller arasındaki ortalama aralık (nanometre) karakteristik boyutundan önemli ölçüde yüksek olan ($1.5 \pm 0,5$) µm ölçülmüştür.

Ag nanotel yapısı ayrıca TEM ve XRD ile karakterize edilmiştir. HR-TEM görüntüsü, bitişik kafes arasındaki bir D-aralığının 2,38 Å olarak ölçüldüğü Şekil 52d'de gösterilmiştir. Karşılık gelen SAED paterni ve FFT paternleri (Şekil 52e), Ag-nanotellerinin sırasıyla tekli Ag {111}, {200} ve {220} düzlemleri ile kristal yapısını ortaya koymuştur. Cam yüzeydeki nanotel döşemesinin kristalografik konfigürasyonu, {111} kristal düzlemi için 38,1°'de, {200} kristal düzlemi için 44,3°'de ve {220} için 64,4°'de karakteristik difraktometrik tepe noktaları (2θ) sergilemiştir. XRD paterninde 25°'de gözlemlenen geniş kırınım piki, şekilsiz olan substrat camına atfedilmiştir (Şekil 52f). XRD paterninden, kafes sabiti 4,086 Å olarak hesaplanmıştır; bu, yığın Ag (4,09 Å) değerine yakındır. Bu Ag'in yüz-merkez-kübik (fcc) yapısını göstermiştir. Kırılma indisi (n) 1,51816 olarak ölçülmüştür.



Şekil 52: (a) Nanotellerin yüzeyin üstüne dağılımının SEM mikrografı. Ölçek çubuğu: 5 μm . (b) Nanotel kaynaklarının yüksek çözünürlüklü SEM mikrografı. Ölçek çubuğu: 500 nm. (c) Dokunma modunda çalıştırılan AFM görüntüsü. Renk çubuğu maksimum yüksekliği gösterir. (d) Ölçülen D-aralığına sahip tek bir Ag nanotelinin HR-TEM görüntüsü, iç kısım SAED modelini gösterir. (e) İlgili FFT modeli. (f) Çip üzerinde biriken dökme Ag nanotelleri ve Ag nanotellerinin x-ışını kırınım modeli (Zhang ve diğerleri, 2020)

Protein testi sırasında spesifik olmayan adsorpsiyonu azaltmak için BSA, bir sisteamin/glutaraldehit fonksiyonel katmanı yoluyla nanotellere kovalent olarak bağlanmıştır. Şekil 50a, BSA'nın muntazam dağılımını gösterirken, Şekil 53b, muhtemelen glutaraldehitin hidrofobikliğinden ve ayrıca fonksiyonel sisteaminin nanoteller üzerindeki dağılımından kaynaklanan nanotellerin üstünde kübik düzenlemeyi vurgulamaktadır. Yüzey topolojisi, Şekil 53c'deki AFM araştırmasının sonuçları ile gösterildiği gibi adsorbe edilmiş protein tarafından modifiye edilmemiştir ve temas açısı (τ_{cont}), BSA immobilizasyonundan sonra $89,1^\circ$ olarak ölçülmüştür. Yüzeyin hidrofobik karakteri, çipin ilginç bir özelliğini temsil etmiştir çünkü ölçüm sırasında numuneyi koruyabilmiştir. Doğal ve BSA kaplı nanotellerin absorbansının ölçümü Şekil 53d'de gösterilmektedir ve çıplak nanotellerin tepe noktasını $\lambda = 350 \text{ nm}$ 'de vurgulamaktadır. Protein çipi kapladığında sinyal zayıflamıştır; ayrıca BSA'ya özgü absorbans pik değeri $\lambda = 470 \text{ nm}$ 'de kaydedilmiştir.



Şekil 53: (a) BSA ile kaplanmış nanotellerin panoramik SEM görüntüsü, Ölçek çubuğu = 5μm. (b) Yüksek çözünürlüklü SEM, Ölçek çubuğu = 0,5 μm. (c) Dokunma modunda çalıştırılan AFM görüntüsü. Renk çubuğu maksimum yüksekliği gösterir. (d) Doğal ve BSA kaplı nanotellerin soğurulması (Zhang ve diğerleri, 2020)

LSPR davranışı, düzenek kullanılarak kırmızı lazer uyarımı altında bir plazmonik deney ile incelenmiştir. Substratın açısı ile çözülmüş uzak alan ölçümü TM polarizasyonu altında yapılmıştır. İnsidans açısı rezonans açısına yaklaşılarak ve oradan uzaklaşarak taranarak çözülmüş yansıma spektrumu geliştirmiştir. Doğal ve kaplanmış nanoteller, nanotellerin hassasiyetini önemli ölçüde etkileyen bir kayma ile farklı rezonans açıları göstermiştir. BSA'nın adsorpsiyonu ile rezonans $\theta_{inc} = 47,2^\circ$ açısına kaymıştır. Yansıma spektrumu, çıplak ve BSA için $(0,95 \pm 0,04)$ nm ve $(5,3 \pm 0,01)$ nm olarak ölçülen tam genişlikte yarı maksimum (FWHM) ekstrakte etmek için bir Lorentz fonksiyonuna yerleştirilmiştir. FWHM'nin genişliği plazmon sönümüyle ilişkilendirilmiştir, bu nedenle hem çıplak hem de kaplanmış nanoteller için kaydedilen düşük değerler çipin iyi bir hassasiyetini doğrulamıştır (Zhang ve diğerleri, 2020).

Sonuç olarak çağımızın hastalığı olan diyabet üzerine araştırmalar yapılmış ve SPR sensörü üretilerek, tanı konulması ya da tedavi işlevselliğinin takibinin daha hızlı ve daha kolay olması üzerine çalışmalar yapılmıştır. Alınan sonuçlara yapılan çalışmalar gelecek vadetmektedir.

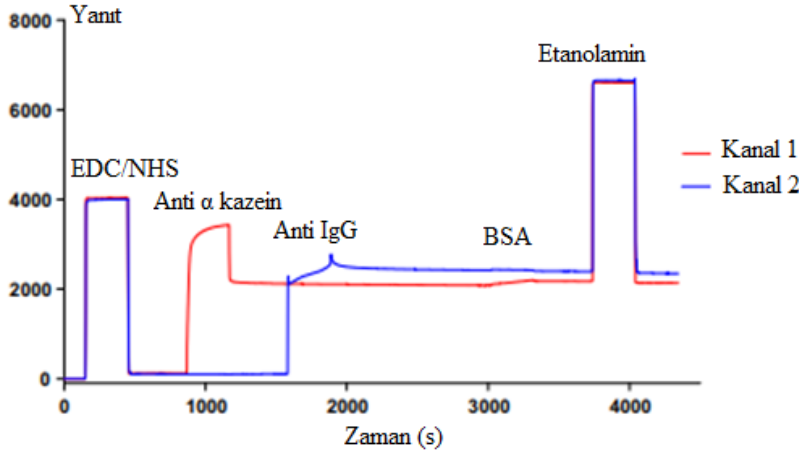
3.3. Süt ve Türevleri ile Çalışma Sonuçları

Mazumdar ve diğerleri (2007) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, Sütte Salmonella tespiti için herhangi bir numune hazırlığı gerektirmeden hızlı ve basit bir SPR tabanlı immünolojik test oluşturulmuştur. Test, küvet bazlı SPR cihazında geliştirilmiştir. Her numunenin analizi için gereken süre, bağlanma olaylarının gerçek zamanlı verilerine sahip olmanın ek avantajı ile sadece 1 saattir. Salmonella tespiti için geliştirilen testin özgüllüğü, E. coli kullanılarak bir negatif çapraz reaktivite testiyle açıkça desteklenmektedir. Sütte Salmonella tespiti için bu SPR bazlı tahlilin basitliği, gıda mikrobiyolojik güvenliği için hızlı bir tespit aracı olarak gıda endüstrisinde kullanılacak SPR tekniğinin potansiyelini açıkça göstermektedir.

Fernández ve diğerleri (2010) tarafından yapılan çalışmada, tam yağlı süt örneklerinde eş zamanlı olarak üç farklı familyadan antibiyotik kalıntılarının yerinde analizi için optik etiketsiz bir multianalit immünosensör geliştirilmiştir. Dönüştürücü, iyi bilinen SPR prensibine dayanmaktadır, ancak bu durumda özel bir kırınım ızgarası (SPRCD, yüzey plazmon birleştirici ve dağıtıcı), yüzey plazmonlarının eşzamanlı uyarılmasına ve kırılan ışığın dağılımına ve bu da konuma duyarlı birinci dereceden dalga boyuna neden olmuştur. Cihaz taşınabilir, küçük boyutlu ve bilgisayara bir USB bağlantı noktası üzerinden bağlanan altı kanallı bir cihazdır ve harici bir güç kaynağına ihtiyaç duymamaktadır İmmünosensör saha kullanımı için uygundur ve aynı numunenin replikat sayısını artırmak, aynı analit için 6 numunenin ölçülmesine izin vermek gibi farklı konfigürasyonlarda kullanılmasına izin veren farklı kanallar nedeniyle veya bu durumda çiftlerde üç analit olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir. Ayrıca, matrisin neden olduğu istenmeyen spesifik olmayan sinyallerin bir referans kanalı kullanılarak düzeltilmesi mümkündür.

Ashley & Li (2013) tarafından yapılan çalışmada, sığır katalazının etiketsiz tespiti için SPR bazlı bir aptamer biyosensör başarıyla geliştirilmiştir. Sensörün, kazein, laktoglobulin ve sığır albümini gibi diğer süt proteinleri ile karşılaştırıldığında sığır katalazına karşı iyi bir özgüllüğe sahip olduğu ve nanomolar aralığa kadar duyarlı olduğu gösterilmiştir. Biyosensör, minimum numune hazırlama ile ve LOD veya standart sapma üzerinde fazla bir etki olmaksızın süt numunelerinde katalaz tespitine de izin verir. Düşük konsantrasyondaki geri kazanımlar, daha yüksek konsantrasyonlara kıyasla %100'e yakındır, bu da SPR bazlı biyosensörlerin yüksek moleküler ağırlıklı hedeflerin saptanmasında bir üst limite sahip olduğunu göstermektedir. SPR bazlı biyosensörlerde aptamerlerin kullanımı büyük bir potansiyel gösterir ve antikorlar gibi diğer ligand tiplerine göre bariz avantajlara sahiptir. Bu sensör, sütteki mastitis hastalığının önemli bir göstergesi olan süt örneklerinde katalaz tespitinde potansiyel olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir.

Ashley ve diğerleri (2017) tarafından yapılan çalışmada kazein antikoru bir kontrol olarak hareketsizleştirilmiştir. Kovalent immobilizasyon yapılmadan önce antikorumun immobilizasyonu için optimum tampon pH'ı seçmek üzere pH keşfi gerçekleştirilmiştir. Bu, EDC/NHS ile yüzey aktivasyonu olmayan sensör çipi kullanılarak yapılmıştır. En iyi pH'ın pH 4,0 olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, başka deneylerde antikoru hareketsizleştirmek için pH 4,0 kullanılmıştır. Hareketsizleştirildikten sonra, her iki noktadaki sensör yüzeyi BSA ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve ardından etanolamin (1 M) ile bloke edilmiştir. Düşük pH'lı bir rejenerasyon tamponunun kullanılması sensör yüzeyinde protein çökmesine neden olacağından sensör yüzeyini yeniden oluşturmak için her kazein enjeksiyonundan sonra NaOH (50 mM) uygulanmıştır. Çalışma tamponu olarak 10 mM PBS pH 7,4 kullanılmıştır. Sensör çipi üzerindeki her bir antikor bağlanma seviyesi için ortalama tepki 42000 tepki birimi (RU)'dir ve tipik bir sensorgram Şekil 52'de gösterilmiştir. Yakalama antikorumun pH ve konsantrasyonu, sırasıyla en yüksek derecede hareketsizliği verecek şekilde optimize edilmiştir. 10 mM sodyum asetat (pH 4,0) içerisinde karıştırılmış $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ anti α -kazein, en yüksek derecede hareketsizliği vermiştir. Etkinleştirilmemiş sensör ile protein adsorpsiyon seviyesinin, aktivasyon sonrasında yüzey yükündeki değişiklik nedeniyle her zaman bir EDC/NHS aktif yüzey üzerinde aynı hareketsizleştirme seviyesine dönüşmediğini belirtmek gerekir. Ancak bu durumda, iki yüzey tipi ile optimize edilmiş immobilizasyon tamponu arasında çok az fark vardır. BSA ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$) ve etanolamin (1 M) ile bloke edilmiş bir sensör üzerinde farklı konsantrasyonlarda α -kazein enjeksiyonlarının spesifik olmayan bağlanmayı azaltmak için optimal olduğu bulunmuştur ve bu koşullar tümünde kullanılmıştır.



Şekil 54: 11-MUA SAM sensör yüzeyine anti- α kazein ve anti-IgG kontrolünün SPR sensorgramı. İşlevselleştirme, 50 mL'lik bir EDC / NHS enjeksiyonundan sonra her bir antikorun 50 mL'lik bir enjeksiyonundan oluşuyordu. Yüzey BSA enjeksiyonu ve ardından etanolamin ile bloke edildi (Ashley ve diğerleri, 2017)

Sensörlerin CIP atık suyundaki α -kazeini tespit etme yeteneğini test etmek için bağlanma deneyi, CIP son durulama suyu örneklerinden ekstrakte edilen farklı konsantrasyonlarda kazein enjekte edilerek gerçekleştirilmiştir. Kazeinin benzersiz özellikleri

nedeniyle, protein asidik koşullar kullanılarak diğer süt proteinlerinden kolayca ayrılabilir. Kazein, 10 mM sodyum asetat ilave edilerek ve 1000 g⁻¹'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek özümlemıştır. Çökelti, birkaç kez asetat tamponu ile yıkanmıştır. Çökelti, pH 9,0'da 10 mM borat tamponu ile yeniden oluşturulmuş ve PBS ile dengelenmiş bir G-25 spin kolonu içinde değiştirilmiştir. Asit çökeltisi, diğer proteinler, yağlar ve karbonhidratlar gibi diğer makromoleküllerin uzaklaştırılması için kullanılırken jel sütunu, CIP numunelerinden deterjan dahil küçük moleküllerin çıkarılmasına izin vermiştir.

A-kazein için antikor bazlı bir SPR sensörü başarıyla üretilmiştir. Sensör, 57,8 ng ml⁻¹ LOD gösteren ELISA gibi diğer geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında iyi hassasiyet göstermiştir. A-kazein antikoru, bir dizi aralıkta analite seçici olarak bağlanabilmiş ve 50 mM NaOH'nin, sensörün yüzeyini yeterince yenilediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, tam yenilenmeyi sağlamak için daha fazla optimizasyon gereklidir. Sensörün daha yüksek konsantrasyonlarda iyi geri kazanımlar sağladığı bulunmuştur ve jel filtrasyonu ile asit çökeltme kombinasyonunun potansiyel olarak gıda örneklerinden süt proteinleri için bir ekstraksiyon yöntemi olarak kullanılabilir (Ashley ve diğerleri, 2017).

Daems ve diğerleri (2017) tarafından hazırlanan çalışmada, süt numunelerindeki P4 konsantrasyonunu ölçmek için FO-SPR üzerine inhibisyon biyo-analizi uygulanmıştır. Bu tip biyo-analiz, düşük molekül ağırlıklı hedefler için SPR bazlı sensörlerin hassasiyeti genellikle yeterli olmadığından seçilmiştir. Çözelti içindeki serbest P4 ve FO-SPR sensörü uç yüzeyi üzerinde hareketsizleştirilen P4-BSA konjugatı, tespit antikoru (anti-p4) için etkileşime girmiştir. LOD'u iyileştirmek için, tespit antikorunun FO-SPR sensör ucuna bağlanmasıyla üretilen sinyal, GAM antikoru (GAM-Au NP) ile fonksiyonelleştirilmiş Au NP'lerin bağlanması yoluyla büyütülmüştür. CiFO-SPR biyo-tahlili için tekrarlanabilir bir kalibrasyon eğrisi elde etmek amacıyla, tahlilin üç ana yönü öncelikle tampon koşullarında optimize edilmiştir: (i) P4-BSA konjugatının FO-SPR sensör ucu yüzeyine immobilizasyonu, (ii) sinyal GAM-Au NP'lerle amplifikasyon ve (iii) monoklonal anti-P4 Ab ile spesifik saptama. Bu parametreler FO-SPR kaymasının boyutu, tekrarlanabilirlik, duyarlılık ve LOD esas alınarak değerlendirilmiştir.

İlk olarak, FO-SPR sensör ucu üç farklı P4-BSA konsantrasyonu (25, 50 ve 100 mg/ml) ile işlevselleştirilmiştir. Hem 50 hem de 100 mg ml⁻¹ P4-BSA konjugatı ile immobilizasyon, %5'in altında varyasyon katsayıları ile en yüksek ve en çok tekrarlanabilir FO-SPR kaymalarına neden olmuştur. Biyolojik tahlilin maliyetini en aza indirmek için, aksi belirtilmedikçe, immobilizasyon için 50 mg ml⁻¹ seçilmiştir. Özel olmayan bağlanma seviyesini ölçmek için, FO-SPR sensörü uç yüzeyi üzerinde P4-BSA konjugatı olmadan testler yapılmıştır. Bu, % 2,4'lük bir CV ile 0,06 nm'lik ihmal edilebilir bir kaymaya neden olmuştur. Ayrıca, antiP4 Ab, P4 için spesifiktir, çünkü P4 içermeyen BSA, FO-SPR sensörü uç yüzeyinde hareketsiz kılındığında hiçbir FO-SPR kayması gözlemlenmemiştir.

İkincisi, Au NP'lerin sinyal amplifikasyonu üzerindeki rolü, serbest anti-P4 Ab'nin FO-SPR sensörü uç yüzeyine ve Au NP'lere fonksiyonelleştirildiğinde aynı antikora doğrudan bağlanmasının karşılaştırılmasıyla incelenmiştir. Her iki durumda da, FO-SPR sensörü uç yüzeyi 100 µg ml⁻¹ P4-BSA konjugatı ile fonksiyonelleştirilmiştir. Anti-P4 Ab, Au NP'lerde

(11 ± 1 nm, $n = 3$) serbest anti-P4 Ab'ye ($3,4 \pm 0,2$ nm, $n = 3$) kıyasla hareketsizleştirildiğinde FO-SPR kaymasında 3,3 kat artış elde edilmiştir. Ayrıca, Au NP'lerin konsantrasyonunun sinyal amplifikasyonu verimliliğinde önemli bir rol oynadığı da gözlenmiştir. CiFO-SPR biyo-tahlilinde GAM-Au NP'lerin başlangıç konsantrasyonunun 0,5 ila 1 optik yoğunluk arasında iki katına çıkarılmasıyla, 30 dakika sonra FO-SPR kayması iki katına çıkarılmıştır. Önemli olarak, hem çıplak Au NP'ler hem de GAM-Au NP'ler için, FO-SPR sensör ucu yüzeyinde hareketsiz hale getirilen BSA ve P4-BSA konjugatı ile etkileşim, ihmal edilebilir FO-SPR kaymalarıyla sonuçlanmış ve bu, spesifik bir bağlanma olmadığını kanıtlamıştır.

Üçüncü olarak, anti-P4 Ab konsantrasyonunun kalibrasyon eğrisinin şekli ve buna bağlı olarak LOD üzerindeki etkisi incelenmiştir. Dört farklı anti-P4 Ab konsantrasyonu tampon koşullarında test edilmiştir: 0,1, 0,2, 0,4 ve 0,8 $\mu\text{g ml}^{-1}$. İlk iki koşul için, bağlanma kinetiklerini hızlandırmak için GAM-Au NP konsantrasyonu iki katına çıkarılmıştır (ml başına 7×10^{11} ila 14×10^{11} AuNP). Farklı anti-P4 Ab konsantrasyonlarından elde edilen FO-SPR kaymaları, P4 konsantrasyonlarının (0, 1, 2, 5 ve 10 ng ml^{-1}) bir fonksiyonu olarak çizilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin dikliği, biyo-tahlilin duyarlılığı için bir kriter olarak, daha düşük p değerine sahip daha dik kalibrasyon eğrileri ile kullanılmıştır. Bu nedenle p değeri, 0,8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ anti-P4 Ab için $2,0 \pm 0,6$ nm'den 0,1 mg mL⁻¹ anti-P4 için $1,1 \pm 0,2$ 'ye düşerek daha hassas bir kalibrasyon eğrisi ile sonuçlanmıştır. Buna uygun olarak, LOD 5.7 ng ml^{-1} 'den 0.7 ng ml^{-1} P4'e düşmüştür. Dahası, CV 0,1 ve 0,2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ saptama Ab için en düşük, yani % 9'dur. Sonuç olarak, en düşük anti-P4 Ab konsantrasyonu en iyi tekrarlanabilirliği, en yüksek hassasiyeti ve en düşük LOD'yi göstermiştir.

Sütte P4 miktarının belirlenmesi için kurulan ciFO-SPR biyo-tahlili, altı farklı inekten alınan altı büyükbaş süt örneği ölçülerek, sütte P4 miktarının en yaygın olarak kullanılan yöntemi olan cELISA'ya karşı onaylanmıştır. Bu numuneler ineklerden sıcakta alınmıştır, bu nedenle tipik olarak düşük bir P4 seviyesine ($<3,5$ ng ml^{-1}) sahiptir. Numuneler iki aşamadan oluşan minimal bir numune hazırlama prosedürü ile işlenmiştir: (i) 37°C'de 10 dakika inkübe etmek ve (ii) numuneyi tamponda anti-P4 Ab ile seyreltmek. Altı büyükbaş hayvan örneğindeki P4 konsantrasyonları, süt standartlarında kalibrasyon eğrisi kullanılarak ciFO-SPR biyosensörü ile belirlenmiştir. CiFO-SPR ($n = 4$) ve cELISA ($n = 6$) için ortalama CV sırasıyla %14 ve %22'dir. CiFO-SPR biyo-tahlili ile nicelenen P4 konsantrasyonları, karşılık gelen cELISA sonuçları ile doğrusal olarak korelasyon göstermiştir ($R^2 < 0,95$). Ayrıca, ICC'nin 0.97 ($n < 6$) olduğu hesaplanmıştır.

Doğrulukta ve sonuçta ortaya çıkan zamandaki ilerlemelere rağmen, P4'ün otomatik ve uygun maliyetli testlerle laboratuvar dışı taraması hala zordur. Sığır sütündeki P4'ü ölçmek için yeni teknikler araştırmak amacıyla, şirket içinde geliştirilmiş bir FO-SPR biyosensörü, rekabetçi bir inhibisyon biyo-tahlili oluşturmak için araştırılmıştır. Tasarlanan ciFOSPR biyo analizi, ilk olarak (i) FO-SPR sensör ucu, (ii) anti-P4 antikoru ve (iii) GAM-Au NP'leri üzerinde hareketsizleştirilecek P4-BSA konjugatının konsantrasyonunun belirlenmesiyle optimize edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, çivili tampon numuneleri için ciFO-SPR biyo-tahlili ve 1 ile 10 ng ml^{-1} arasındaki biyolojik olarak ilgili konsantrasyon aralığında süt standartları ile oluşturuldu ve sonuçta sırasıyla 0,6 ng ml^{-1} ve 0,5 ng ml^{-1} P4 LOD elde edilmiştir. Ayrıca,

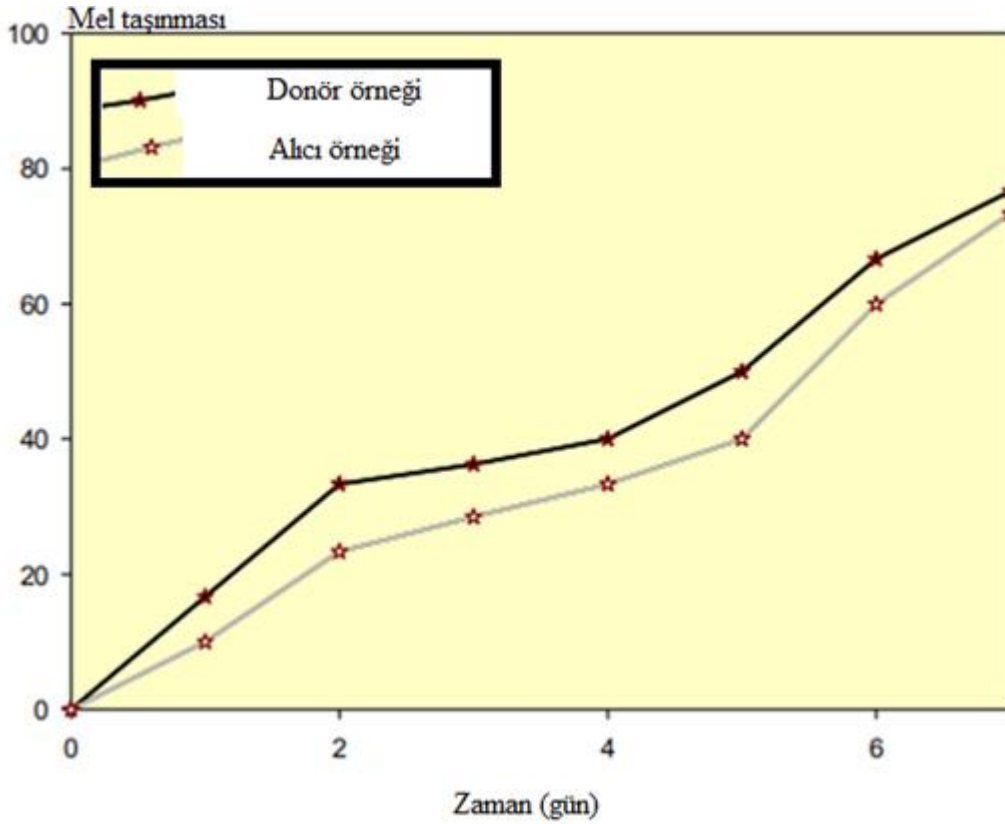
oluşturulan ciFO-SPR biyo-tahlilinin sonuçlanma süresi, benzer bir LOD ve tahlil duyarlılığı ile sonuçlanacak şekilde 20 dakika altında azaltılmıştır. Son olarak, biyo-tahlil bir referans cELISA tekniğine karşı onaylanmıştır. Isıya karşılık gelen düşük konsantrasyon aralığında, sığır sütü numuneleri için ciFO-SPR biyosensörü ile elde edilen sonuçlar, cELISA'ninkilerle çok iyi ilişkilidir ve 0,97 ICC ile sonuçlanmıştır. Sonuç olarak, geliştirilen platform, yanal akış tahlilinin kullanım kolaylığı ve maliyet etkinliğini bir ELISA testinin otomasyonunun doğruluğu, hassasiyeti ve olasılığı ile birleştirmiştir. Gelecekte yapılacak çalışmalar, bu ciFO-SPR biyo-tahlilini süt ineklerinin üreme döngüsünü izlemek için bir süt çiftliğinde otomatik bir sağım robotuna entegre etmeye odaklanacaktır (Daems ve diğerleri, 2017).

Onac ve diğerleri (2018) tarafından yapılan çalışmada, Artan MEL konsantrasyonuna sahip sensorgramlar, SPR nanosensorunun sinyalinin konsantrasyonla doğrusal olarak arttığını göstermektedir. SPR tepkileri, 0,1-2,0 nM'den MEL konsantrasyonları ile lineerdir. Bu durum doğrudan sıvı ve katı fazlar arasındaki konsantrasyon farkını tanımlayan temel adsorpsiyon olaylarıyla ilgilidir. Bu fazlar, MEL moleküllerini spesifik ligandlar/oyuklarla etkileşime girmek için yüzeyden geçirir. MEL'in regresyon denklemi ($y = 9,7656x - 0,1914$). Kalibrasyon grafiğinin her noktası 6 bağımsız ölçümden elde edilen ortalama değere karşılık gelmektedir.

Bir donör fazör olarak 0,1 M HCl içinde 30 ppm MEL çözeltisi, melaminin CNT/PIM'den taşınmasını araştırmak için kullanılmıştır. Taşıma deneyleri 7 gün sonra 500 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Numuneler elektro analitik sensör (SPR) ile belirlenmiştir. MEL'in taşınması, Şekil 53'te gösterildiği gibi artan zamanla artmıştır. %76,66 MEL, verici fazdan çıkarılmış ve % 73,33 MEL'yi alıcı faza taşımıştır.

Süt numunesi, nakil deneylerine başlamadan önce ön işlemden geçirilmiştir. Süt örneği (5 ml), 25 saniye boyunca 1,0 ml tri kloro asetik asit (TCA) ile karıştırılmıştır ve 15 dakika boyunca 4500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Elde edilen santrifüjlenmiş bir başka cam tüp aktarılmış ve aynı işlem iki kez uygulanmıştır. Toplanan santrifüjler 0,5 µm çapından süzölmüştür. Son olarak, santrifüjleme, MEL'in taşınması için bir donör faz olarak difüzyon hücresine yerleştirilmiştir. Taşıma deneyleri 10 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Melamin, 10 gün sonunda %82,87 alıcı faza taşınmıştır.

Çalışma, tek aşamalı, seçici ve hassas bir şekilde moleküler baskılı polimerik filmler ile melaminin belirlenmesine izin veren düşük maliyetli bir biyosensör hazırlamaya çalışmıştır. MEL'in taşınması, yeni nesil karbon nanotüp membranları ile gerçekleştirilmiştir. MEL'in süt gibi gerçek örneklerden taşınabileceği gösterilmiştir. Modifiye edilmiş CNT/PIM membranı, MEL'in süt numunesinden taşınması için nispeten iyi seçiciliğe sahiptir; membran deneylerinin sonuçları nedeniyle çalışmamız gerçek örneklerde uygulanabilir. Değiştirilmiş CNT / PIM kararlı, geri dönüştürülebilir ve mükemmel taşıma aktivitesi göstermiştir. Bu nedenle, süt tedavisi için kullanılabilir. Hazırlanan SPR tabanlı biyosensör yongaları hızlı tepki süresini ve yüksek seçiciliği önlemektedir. Bu çalışmada hazırlanan biyosensör, hızlı ve



Şekil 55: Vericiden çıkarılan ve alıcı aşamaya taşınan% MEL miktarı (Onac ve diğerleri, 2018)

gerçek zamanlı tanımlama, düşük maliyet, taşınabilirlik, basit kullanım ve örnek hazırlama kolaylığı gibi geleneksel analitik tekniklerle karşılaştırıldığında birçok özelliğe sahiptir (Onac ve diğerleri, 2018).

Zhou ve diğerleri (2019) tarafından yapılan çalışmada, mevcut araştırma durumu hakkında genel bir bakış sağlamakta ve gıda matrislerinde gıda alerjenlerinin analizi için kullanılan prospektif SPR biyosensörlerini tanıtılmaktadır. Şu anda, FOSPR, SPRI ve LSPR gibi farklı durumlar ve talepler için hedef gıda alerjenlerini tanımlamak, yakalamak ve ölçmek için üç tip SPR biyosensörü yaygın olarak uygulanmaktadır. Genel olarak FOSPR, küçük boyutu ve esnek tasarımı nedeniyle gıda alerjenlerinin uzun mesafeli ve gerçek zamanlı tespiti için uygundur. SPRI biyosensörü, prob dizileri ile yüzlerce gıda alerjenini aynı anda izleyebilir. LSPR biyosensörü, bir veya daha fazla gıda örneğindeki gıda alerjenlerinin gerçek zamanlı tespiti için çoklanmış bir biyosensör olarak tasarlanabilir. Bununla birlikte, geleneksel SPR teknolojileri çeşitli performans sınırlamalarından muzdariptir: (1) gıda numunelerindeki çoklu alerjenleri aynı anda analiz etmek zordur; (2) SPR ekipmanları çok büyük ve pahalıdır, bu nedenle gıda alerjeninin tüketici dostu tespiti için uygulanamaz. Malzeme ve teknolojilerin geliştirilmesi ile SPRI biyosensörü, bir veya daha fazla gıda matrisinde yüzlerce gıda alerjenini izlemek için doğru, hızlı, düşük maliyet ve son derece hassas bir yöntem sağlamak üzere LSPR ve TSPR ile birleştirilebilir. Akıllı telefonlar ve belirli uygulamalar, gıda

alerjeninin yerinde ve tüketici dostu tespiti için mobil cihazlar ve POC cihazları geliştirmek için SPRI ve TSPR tekniğine entegre edilebilir. LSPR biyosensörleri, gıda analizinde pratik biyosensör uygulamaları için floresan, PRET ve SERS gibi diğer tanımlama tekniklerine bağlanabilir. LSPR ayrıca, metal ızgaraların yüzeylerinde elektrik alanını daha da heyecanlandırarak TSPR substratlarından gelen sinyali arttırmak için kullanılabilir. Görüntüleme teknolojileri ve mikroakışkan teknolojileri ile birlikte TSPR tekniği, pratik uygulamalar için bir biyosensör olarak geliştirilebilir. Bu nedenle, esnek, ultra hassas ve oldukça spesifik bir yöntem olarak, SPR biyosensörleri gelecek için büyük bir potansiyele sahiptir ve gıda üreticileri, gıda işlemeçileri ve gıda güvenliği kontrol departmanları için büyük bir avantaj sağlayabilir.

Sonuç olarak süt özellikle alerjen çalışmalarda kullanılabilir. SPR sensörleri ile süt proteinleri üzerinde çalışmalar SPR sensörlerinin hassaslığı ve kolay kullanım özelliklerinden tercih edilmektedir.

3.4. Gaz Sensör Çalışma Sonuçları

Challener (1999) tarafından yapılan çalışmanın sonucunda, oldukça hassas sensörlerde yüzey plazmon rezonansından yararlanmak için çeşitli teknikler kullanılmıştır. Genel olarak, bu yaklaşımlar, pahalı ve karmaşık bir aparat gerektirmiştir. Sensör diski yaklaşımıyla, rezonans kaymasını algılamanın ucuz bir yolunu gösterilmiştir. Bu teknikteki temel yeni fikir, transdüksiyon yaklaşımını açığa, dalga boyu veya konum ölçümünden zamana dayalı bir ölçüme dönüştürmektir; bu, basit ve ucuz elektroniklerle çok doğru bir şekilde gerçekleştirilebilir. Dahası, kompakt disk oynatıcıların kayan optik kafalı rastgele erişim yaklaşımını kopyalayarak, bu yaklaşım, çok az ek maliyetle tek bir disk üzerindeki birden çok algılama bölgesine kolayca genişletilebilir. Sensör diski ayrıca çok çeşitli farklı analitleri test etmek için çıkarılabilir ve değiştirilebilir ve kompakt disk endüstrisi için geliştirilmiş standart düşük maliyetli, seri üretim teknikleriyle kalıplanabilir. Tasarlanan sistem, birkaç saniyelik entegrasyon süresinde 10 ppbv'nin altında arka plan gürültüsüyle sınırlı bir hassasiyete sahip bir amonyak gazı sensörü olarak gösterilmiştir. Ek çalışma gerektiren konular arasında, dalga boyu stabilize lazerlerle uzun vadeli sapmanın azaltılması, geliştirilmiş seçiciliğe sahip çoklu reseptör katmanlarının kullanılması ve sıcaklık ve nemdeki değişiklikler gibi yardımcı etkileri düzeltmek için referans kanallarının dahil edilmesi yer alır.

Nooke ve diğerleri (2011) tarafından yapılan çalışmada, SPR etkisi ile ~ 43 nm kalınlığında altın tabakada elipsometrik gaz tespiti yapılmıştır. Ölçümler, bir bakır ölçüm hücresinde Kretschmann konfigürasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Altın katmanlarını kontaminasyondan korumak ve algılama yeteneklerini geliştirmek için altın, sırasıyla 5–6 nm kalınlığında C:H, TiO₂ ve ZrO₂ katmanlarıyla kaplanmıştır. Ek katmanlar, SPR açısının saf altın üzerindeki SPR etkisine göre daha yüksek değerlere kaymasına neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, altın tabakasının sülfürlerle kirlenmesi ve dolayısıyla zamanla hassasiyet kaybının önüne geçilmiştir. Özetle altın katmanların ek katmanlarla değiştirilmesi, duyarlılık kadar sensörün kullanım ömrünü uzatan bir gelişmedir. Bu ölçüm yöntemine dayalı

olarak sensörün endüstride uygulama için kullanılmasına yönelik araştırmalar, planlanan sonraki adımlar olduğu bildirilmiştir.

Jory ve diğerleri (1994) tarafından yapılan çalışmada, yüzey plazmon rezonansı olgusunu kullanan bir gaz sensörünün geliştirilmesi rapor edilmektedir. Birkaç özellik varlığı bildirilmiştir. İlk olarak, diğer SPR gaz algılama yöntemlerinden daha iyi sinyal-gürültü oranları sağlayan bir maksimum rezonans kullanılmıştır. İkincisi, ucuz bir polikromatik LED ışık kaynağı kullanılmıştır. Üçüncüsü, dalga boyu rezonansını bir voltaja dönüştürmek için tek bir dalga boyu kod çözücü kullanılır ve dördüncü olarak, fiberoptik bağlantı, algılama kafasının kaynaktan ve detektörden uzağa yerleştirilmesine kolaylıkla izin verdiği gösterilmiştir. Son olarak, bu yeni düzenlemeyi, parlak bir LED kaynağı ve çıkışı ölçmek için hassas bir voltmetre kullanarak, bu basit sistem, birden az atomik tek tabakanın 20 nm kalınlığındaki bir üst tabakadaki bir değişikliğe karşılık gelen bir hassasiyet verdiği gözlemlenmiştir. 20 nm'lik bir film için eşdeğer olarak bu, kırılma indisinde 0.02'lik bir değişikliklerdir. Sinyal-gürültü oranında daha fazla iyileştirmenin bu hassasiyeti en az on kat artıracak tahmin edilmektedir.

Paliwal ve diğerleri (2017) tarafından yapılan çalışmada, SPR çalışmaları için, ZnO ince filmler aynı kaplama koşulları altında Au kaplamalı prizma (prizma/Au) üzerine bırakılmıştır. SPR ölçümleri, değişen substrat sıcaklığı altında büyütülen ZnO ince filmlere sahip prizma/Au/ZnO/hava sistemi için açısal sorgulama modunda $\lambda = 633$ nm'de gerçekleştirilmiştir. Kretschmann konfigürasyonu, yansıma açısı (sembollerin) olay açısındaki değişikliklerle ölçülmesi için kullanılmıştır. Prizma/Au/hava sisteminin SPR yansıtma eğrisinin önceki çalışmalarımıza zaten dahil edildiğine dikkat etmek önemlidir. SPR rezonans açısının (θ_{SPR}), büyüme sıcaklığındaki 100 °C'den 250 °C'ye yükselme ile sürekli olarak düşük bir açıya 54.4°'den 44.2°'ya kaydığı bulunmuştur. Büyüme sıcaklığını 300 °C'ye daha da artırarak, rezonans açısı θ_{SPR} biraz daha yüksek açıya, yani 44,3°'ya doğru kaymıştır. ZnO ince filmdeki stres 250 °C'ye kadar büyüme sıcaklığındaki artışla azaldığı ve dielektrik sabitinde veya kırılma endeksinde azalmaya neden olduğu görülmüştür. Bu rezonans açısındaki azalma (θ_{SPR}) olarak yansıtılır. Dolayısıyla, SPR sonuçları yapısal çalışmalara uygundur. Bir başka önemli SPR parametresi, ZnO filminin büyüme sıcaklığındaki artışla azalan SPR eğrisinin FWHM'sidir, bu da emilim kayıplarında bir azalmaya işaret eder. XRD analizinden gözlemlendiği gibi, ZnO ince filmlerinin tane büyüklüğü, büyüme sıcaklığındaki artışla birlikte artar, tane sınırı saçılımına ve dolayısıyla emilim kayıplarında azalmaya neden olur. biriktirme sıcaklığındaki 100 °C'den 250 °C'ye arttıkça, R_{min} değerinin de azaldığını belirtmek önemlidir. Ayrıca, büyüme sıcaklığının 300 °C'ye yükseltilmesi, R_{min} 'de hafif bir artışa neden olur. R_{min} (yani minimum yansıtma) geri saçılmış alanla ilişkili olabilir. R_{min} değeri ne kadar düşükse, geri saçılmış alan o kadar az olur ve bu nedenle 300 °C substrat sıcaklığında biriken ZnO filmi için düşük kayıplar olur, R_{min} 'deki hafif artış bu filmlerdeki kayıplarda bir artışı gösterir. Tüm filmlerin karmaşık dielektrik sabiti ve kırılma indisini tahmin etmek için teorik simülasyonlar ve deneysel sonuçlar kullanılmıştır.

Dielektrik sabitinin filmdeki stres azalması ile azaldığı bildirilmektedir. İnce filmlere stresin sokulması, bağlanan ZnO ince filmlerindeki bağ uzunluğundaki değişiklik ve lokal simetri farklılığından kaynaklanabilir. Polar c eksenini boyunca hafif bir yapısal bozulma ve

lokal mikroinhomogenetlerin varlığı dipollere yol açarak dielektrik dispersiyona neden olabilir. Bu mikrogijyojenetiklerin hazırlanan ZnO filmlerine daha fazla stres getirmesi beklenir, burada filmler stressiz filmlere kıyasla yüksek dielektrik dispersiyona yol açar. Mevcut çalışmada, 250 °C'de büyütülen ZnO ince filmi minimum strese sahiptir. Bu, ZnO ince filmin dielektrik sabiti ve kırılma indisinde 250 °C'ye kadar büyüme sıcaklığında artışa neden olur. Ayrıca, R_{min} ve FWHM'deki bir azalma, 250 °C substrat sıcaklığına kadar büyütülen film için dielektrik kaybında ve yok olma katsayısında bir azalmaya yol açar ve daha sonra R_{min} 'deki hafif artış nedeniyle 300 °C'de büyütülen film için artar. Bu nedenle, daha az algılama uygulaması için minimum R_{min} , θ_{SPR} ve FWHM (200 nm kalınlık ve 250 °C substrat sıcaklığı) ile keskin bir SPR eğrisi gösteren optimize edilmiş ZnO ince filmi kullanılır.

ZnO algılama katmanı kullanılarak CO gaz tespiti için oldukça hassas ve verimli bir SPR gaz sensörü (prizma/Au/ZnO) üretilmiştir. 200 nm kalınlığında ve 250 °C substrat sıcaklığında büyütülen optimize edilmiş ZnO ince filmi, geniş konsantrasyon aralığında (0,5 ila 100 ppm) CO gazına karşı geliştirilmiş ve stabil bir algılama tepkisi sergilemiştir. Geliştirilen sensör, CO gazına hızlı bir tepki (1 s) ve yüksek hassasiyet (0,091 %/ppm) göstermiştir. Seçicilik çalışmaları ayrıca geliştirilen SPR sensörünün CO'ya karşı oldukça hassas olduğunu ve diğer gazlarla (NH_3 , CO_2 , NO_3 , LPG, H_2) önemsiz parazit olduğunu göstermektedir (Paliwal ve diğerleri, 2017).

Kim ve diğerleri (2019) tarafından yapılan çalışmada SPR biyosensör platformu, gaz fazı optimize edilmiş bir SPR sisteminde ligand modifiye TiO_2 /Au hibrid ince film kullanılarak tespit yöntemine dahil edilmiş ve bir sinyal dönüştürücü algoritması kullanılarak güçlendirilmiştir. Tespit yöntemi, formaldehit için seçici olan bir ligand olarak işlev gören bir amin (NH_2) içeren polietilenimin (PEI) ile modifiye edilmiş TiO_2 nanoparçacıklarının ve algılama platformunda yüzey kimyasını stabilize etmek için sinyal amplifikatörleri olarak kullanılan TiO_2 nanoparçacıklarının kullanıldığı bir Au ince filmin kullanılmasını içermektedir.

Formaldehit moleküllerinin, elektron transferi yoluyla amin grupları için spesifik bir afiniteye sahip olduğu bilinmektedir ve kasyonların varlığı formaldehit için adsorpsiyon afinitesini önemli ölçüde arttırmaktadır. Elektrostatik etkileşimi indüklemek ve formaldehit için amin ligandına adsorpsiyon afinitesini arttırmak için, PEI ile modifiye edilmiş TiO_2 nanoparçacıklarının terminal grubu, asidik koşullar altında işlem yoluyla $-NH_2$ 'den $-NH_3^+$ 'a değiştirilmiştir.

PEI ile modifiye edilmiş TiO_2 nanopartikülleri, düz bir yüzeyden çok daha yüksek bir formaldehit reseptör konsantrasyonu sağlar ve bu yöntem kullanılarak spesifik adsorpsiyonun meydana geldiği varsayılır. Bu nedenle, PEI ligandı içeren bir Au ince filmin ara yüzünün, formaldehitin saptanmasında kullanım için mükemmel bir aday olduğu ortaya çıkmış ve daha düşük bir tespit sınırıyla sonuçlanmıştır. Ek olarak, TiO_2 nanoparçacıklarının optik özellikleri, bir SPR sisteminde amplifiye edilmiş sinyal transdüksiyonu için uzamsal olarak uzatılmış arayüzey elektrik alanlarının problemleri olarak işlev gören bir dielektrik aralık katmanı olarak işlev görmelerine yol açtığından, algılama platformu daha hassas ve kararlıdır. Bu nedenle, yaygın olarak dağılmış adsorpsiyon bölgelerinin entegrasyonu, bir sinyal amplifikatörü olarak

arayüzey algılama katmanının dielektrik özellikleri ve sinyal takma algoritması, optik sabitlerde önemli değişikliklere neden olabilir.

Algılama prensibine dayanarak, formaldehitin doğru algılanmasını teşvik etmek için bir gaz seyreltme kızığını bir SPR algılama sistemine entegre edilmiştir. İlk önce, 10,7 ppm basınçlı formaldehit (azot ile dengelenmiş) akış ölçere gönderilmiştir. Ölçülen formaldehit akışı daha sonra seyreltme odasındaki akış ölçere göre oldukça saf azot ile karıştırılmıştır. Ters akışı önlemek için, seyreltme kamberünün bir atık havalandırma hattı bir kontrol valfi vasıtasıyla otomatik olarak basınçsız hale getirilmiştir. Seyreltilmiş formaldehit akışı debimetrede tekrar ölçülmüş ve daha sonra SPR sensörüne beslenmiştir. Ek olarak, SPR sensörünün taban çizgisini stabilize etmek için debimetrede saf azot akışı ölçülmüş ve SPR algılama sistemine enjekte edilmiştir.

Ayrıca, yüksek derecede hassasiyetle gaz algılama elde etmek için optik bir kısım ve bir ölçüm algoritması geliştirilmiştir. SPR sensör sistemi, ışığın düşük açısal aralığa girmesine ve gaz fazının düşük kırılma endeksine uymasına izin vermiştir. Öte yandan, ölçüm algoritması açısından, SPR eğrisinin yarı maksimumundaki (FWHM) tam genişliğin hava fazında çok dar olduğu bir özelliği kullanarak hassasiyeti en üst düzeye çıkarmak için sinyal sabit açılı modda ölçülmüştür. Sabit açılı mod genellikle SPR eğiminin kaymasından kaynaklanan SPR eğrisindeki yansıtıcılığı ölçmektedir. Açı, maksimum yansıtıcılık değişikliğini elde etmek için SPR eğrisinin bükülme noktasını bulmak için ayarlanabilir. Bükülme noktası, yansıma kaymasının açı kaymasına karşı en hassas başlangıç açısını veya en yüksek eğimini veren SPR eğrisinin ikinci türevinden belirlenebilir. Bu nedenle, SPR eğrisinin FWHM'si ne kadar dar olursa, yansıtmadaki değişiklik o kadar artar. Tipik bir sabit açılı modun dar dinamik aralığını dengelemek için en uygun sabit açığı belirlemek için yeni algoritmamızı uygulanmıştır. Algoritma, SPR dip eğrisinin sol tarafındaki $R^2 = 0,99$ doğrusal aralığında minimum yansıma yoğunluğu ile optimal sabit açığı belirlemek için normalleştirilmiş ham eğrinin sigmoid asimetric fitting ile lineer regresyon uydurma ve farklılaşmasını kullanmıştır.

Sonuç olarak, ligand ile modifiye edilmiş TiO_2/Au hibrid ince film kullanılarak formaldehitin hassas ve oda sıcaklığında çalıştırılan tespiti ve miktarının belirlenmesi için bir SPR gaz biyosensör platformu açıklanmaktadır. Gaz biyosensör yönteminin temeli, gelişmiş bir sinyal dönüştürücü algoritması ile gelişmiş bir Kretschmann konfigürasyonu, yüksek hassasiyetli niceleme için yeni bir mikroakışkan gaz kanalı ve bir algılama arayüzü olarak amin modifiye edilmiş bir TiO_2/Au hibrid ince film içerir. Sonuçlar, algılama sistemi oda sıcaklığında çalıştırılabilir. SPR profillerinde hızlı tepki süresi ile önemli değişiklikler göstermiştir. Tespit sınırının 0,2 ppm olduğu belirlendi; bu, meme kanseri için mevcut tanı kriterleri seviyesinden yaklaşık 3-6 kat daha duyarlıdır. 0,2 ila 1,8 ppm arasında değişen formaldehit konsantrasyonları için doğrusal bir tepki gözlenmiştir. Meme kanseri kriterleri aralığının yaklaşık 0,45 ila 1,20 ppm, sistemimiz için oda sıcaklığında lineer algılama tepkisi aralığındadır. SPR gaz biyosensörümüzün diğer kanserler ve metabolik bozukluklar gibi diğer biyosensör alanlara uygulanabileceği sonucuna varılmıştır (Kim ve diğerleri, 2019).

Fallah ve diğerkleri (2020) tarafından yapılan çalışmada, 1 ppm ila 15 ppm arasındaki farklı CO konsantrasyonlarında normalleştirilmiş değışen SPR yoğunluğu, ψ delta ve ψ imal grafiğı, her bir numune için her 60 saniyede bir ölçülen spektrumdan hesaplanmıştır.

Sonuçlar hızlı cevabın ZnO NRS ve 30 nm altın ince bir tabakaya sahip numuneler için olduğunu göstermektedir. Numuneler daha sonra 0,5 x 0,5 cm boyutlarında bir SiO₂ substratı üzerine kaplanmış ZnO NR'ler ve Au nanopartiküller ile hazırlanmıştır. ZnO nanorodlarının iyi hizalanmış ve düzgün bir şekilde büyüdüğünü görülmektedir. XRD deseni, ZnO nanorodlarının yüksek oranda kristalli olduğunu ve toz kırınım standartlarından (JCPDS) 366 1451 doğrulanmış altıgen wurtzit yapısını sergilediğini göstermektedir. Maksimum XRD tepe yoğunluğu, 34,42°, ZnO'nun (20) düzlemine tekabül eder, bu da yetiştirilen ZnO nanorodlarının well ekseninde iyi yönlendirildiğini ve ZnO nanorodlarının tercih edilen büyümesinin doğrultusu boyunca olduğunu göstermektedir.

Dört farklı konsantrasyonda CO gazı için değışen yansıma yoğunluğu, CO konsantrasyonunu artırarak yoğunluğun arttırıldığını açıkça göstermektedir, dolayısıyla sinyalin yükselmesi, iletkenlik artışı ile geçirgenlikte artışa bağı yoğunluk artışını gösterir. CO olmayan durumla karşılaştırarak, CO yanıtı kullanılan tüm konsantrasyonlar için ilk 10 saniye sonra doymuştur: 1, 5, 10 ve 15 ppm. Kurulum, 1 ppm CO kadar düşük yanıt vermeyi başarmıştır. Bu teknik, bu zehirli gazı çok düşük konsantrasyonda ölçmeyi mümkün kılar ve bu seviyede tespit edilmesi genellikle zordur.

CO'yu saptamak için basit ve düşük maliyetli bir gaz sensörü oluşturmak üzere ZnO nanorodlarının SiO₂ substratı üzerindeki yansımasından yararlanılarak uygulanmıştır. ZnO nanorodları hidrotermal yöntemle SiO₂ substratının yüzeyi üzerinde büyütülmüştür. SPR etkisi için ince bir Au nanopartikül tabakası ZnO NR'leri kaplamıştır. Sonuçlar, sensörün düşük konsantrasyonlarda daha yüksek bir yanıtı sahip olduğunu göstermiştir. CO gazı, 15 ppm 15 ppm için 10 saniye sonra en yüksek yanıtı sahiptir, bundan sonra doymuş hale gelir (Fallah ve diğerkleri, 2020).

Jain ve diğerkleri (2020) tarafından yapılan çalışmada, LRSPR yansıtma eğrileri, $\lambda=633$ nm'de iki farklı kalınlıkta (110 nm ve 205 nm) SnO₂ filmleri olan Hava/SnO₂/Au/SnO₂/Prizma yapıları için kaydedilmiştir. Rezonans açısı olarak bilinen 34.5° olay açısında minimum yansıma değeri ($R_{min} = 0,25$) ulaşarak yansıma değeri, olay açısının arttırılmasında önemli ölçüde azalmış (θ_{spr}) ve daha sonra olay açısının daha da arttırılmasıyla artmaya başlamıştır. Hava/SnO₂/Au/SnO₂/prizma konfigürasyonu için Airspr'de daha yüksek bir değere doğru önemli bir kayma gözlemlenmiştir. Algılanan kayma, simetrik SnO₂/Au/SnO₂/prizma yapısı durumunda LRSP dalgalarının uyarılmasına, Au/prizma yapısı durumunda metal ve dielektrik arayüzündeki SP dalgaları uyarımına kıyasla atfedilebilir. SnO₂/Au/SnO₂/prizma yapısında SnO₂ filmlerinin kalınlığının 110 nm'den 205 nm'ye yükselmesiyle, rezonans eğrisinde daha yüksek açıya kayda değer bir kayma gözlenir (θ_{spr} 42,13°'den 47,0°'ye kayar). LRSPR eğrilerinde gözlenen kayma, film kalınlığı değıştikçe SnO₂ filminin dielektrik sabitindeki değışiklikle ilişkili olabilir. Hem R_{min} hem de FWHM değerkleri SnO₂ film kalınlığındaki artışla azalmıştır. FWHM ve R_{min} değerkleri genellikle dielektrik ince filmlerde meydana gelen kayıplarla ilişkilidir. Kristalit boyutu arttıkça tane sınırları da buna bağı olarak azalır ve bu da

daha az saçılma merkezinin bulunmasına yol açar. Daha az saçılma merkezinin varlığı, dielektrik kayıplarını azaltır. Bu nedenle, LRSPR eğrisinin FWHM ve R_{min} değeri, filmin kristalit boyutu ve kalınlığındaki artışla azalır.

Farklı kalınlıkta büyütülmüş SnO_2 filmlerinin kırılma indisi ve dielektrik sabiti değerleri, deneysel olarak elde edilen yansıma eğrilerinin Hava/Au/Prizma ve Hava/ SnO_2 /Au/ SnO_2 /Prizma yapılarının teorik olarak karşılık gelen Fresnel denklemleri ile oturtulmasıyla elde edilmiştir.

Literatürde bildirildiği gibi, hava dielektrik sabiti ($\epsilon_{air} = 1,0$) ve cam prizma ($\epsilon_p = 1,517$), Hava/Au/Prizma SPR konfigürasyonu için en uygun eğriden altın filmin dielektrik sabitini tahmin etmek için kullanılmıştır ve yaklaşık $-11,8+2,76i$ olduğu ortaya çıkmıştır. Elde edilen Au dielektrik sabiti ayrıca biriken SnO_2 filmlerinin dielektrik sabiti değerini tahmin etmek için kullanılmıştır. Her iki SnO_2 filminin tahmini dielektrik sabiti, rapor edilen değerlerle uyumlu olan yok olma katsayısını ve kırılma endeksini hesaplamak için kullanılmıştır.

UV-Görünür çalışmalardan $\lambda=633$ nm'de tahmini kırılma indisi değerleri, LRSPR ölçümleri ile elde edilenlerle iyi bir şekilde örtüşmektedir. 205 nm kalınlığındaki SnO_2 filmlili Hava/ SnO_2 /Au/ SnO_2 /Prizma konfigürasyonu için elde edilen LRSPR eğrisinin 110 nm ince film kullanılarak elde edilene kıyasla daha keskin olduğunu belirtmek gerekir. Bu nedenle, 205 nm kalınlığında SnO_2 ince filmlili SnO_2 /Au/ SnO_2 /Prizma'nın simetrik LRSPR sisteminin, üstün algılama tepkisi sunması beklenir ve NO_2 gaz tespiti için kullanılır.

Özetle, SnO_2 /Au/ SnO_2 /prizma yapısı LRSP'lerin uyarılması için optimize edilmiştir ve algılama matrisi olarak SnO_2 kullanılarak çok düşük konsantrasyonda (0,5 ppm) NO_2 gazının oda sıcaklığı tespiti için kullanılmıştır. Geliştirilen LRSPR gaz sensörü, oda sıcaklığında hızlı tepki süresi (0,1 sn) ile yüksek hassasiyet (0,2 °/ppm) göstermiştir. LRSPR yapısındaki SnO_2 üst katmanının (SnO_2 /Au/ SnO_2 /prizma) elektronik özelliklerindeki değişiklik, hedef NO_2 gazına maruz kaldığında SnO_2 -Au arayüzündeki yüzey plazmon dalgalarının elektrik alan profilini modüle eder ve bu nedenle plazmonu bozar rezonans koşulları, LRSPR rezonans eğrisinde önemli bir kaymaya yol açar. Mevcut çalışma, yüksek hassasiyetli ve oda sıcaklığında çalışan optik sensörlerin geliştirilmesi için faydalı olacak LRSPR bazlı gaz sensörlerinin derinlemesine anlaşılmasını sağlamaktadır (Jain ve diğerleri, 2020).

Sonuç olarak, SPR ile gaz sensörü çalışmalarında zehirli gazlar üzerine çalışmalar yapılmış ve insan sağlığının korunması üzerine adımlar atılmıştır. Günümüzde gerçekleşen Covid-19 virüsünün solunum yoluyla yayılması sebebiyle, SPR ile bu konu üzerinde çalışmalar yapılabilir. Ortamdaki havada var olan virüs tespit edilebilir.

Kaynaklar

- Amano, Y., ve Cheng, Q. (2005) Detection of influenza virus: traditional approaches and development of biosensors. *Anal Bioanal Chem* 381(1):156-64. [https://doi:10.1007/s00216-004-2927-0](https://doi.org/10.1007/s00216-004-2927-0)
- Ashley, J., ve Li, S. F. Y. (2013). An aptamer based surface plasmon resonance biosensor for the detection of bovine catalase in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 48, 126–131. [https://doi:10.1016/j.bios.2013.04.009](https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.009)
- Ashley, J., Piekarska, M., Segers, C., Trinh, L., Rodgers, T., Willey, R., ve Tothill I. E. (2017). An SPR based sensor for allergens detection. *Biosensors and Bioelectronics* 88 109-113. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.07.101>
- Asyalı, M. K., Kara, S., ve Yılmaz, B. (2014). *Biyomedikal Mühendisliğin Temelleri* (s. 177-178; 190-192)
- Atar, N., ve Yola, M. L. (2018) Core-Shell Nanoparticles/Two-Dimensional (2D) Hexagonal Boron Nitride Nanosheets with Molecularly Imprinted Polymer for Electrochemical Sensing of Cypermethrin. *Journal of The Electrochemical Society*, 165, 5. [https://doi:10.1149/2.1311805jes](https://doi.org/10.1149/2.1311805jes)
- Billakanti, J. M., Fee, C. J., Lane, F. R., Kash, A. S., ve Fredericks, R. (2010). Simultaneous, quantitative detection of five whey proteins in multiple samples by surface plasmon resonance. *International Dairy Journal*, 20(2), 96–105. [https://doi:10.1016/j.idairyj.2009.08.008](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.08.008)
- Challener, W. (1999). A surface plasmon resonance gas sensor in a “compact disc” format. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 56(3), 254–258. [https://doi:10.1016/S0925-4005\(99\)00194-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(99)00194-X)
- Chen, Y., Liu, J., Yang, Z., Wilkinson, J. S., ve Zhou, X. (2019). Optical biosensors based on refractometric sensing schemes: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 111693. [https://doi:10.1016/j.bios.2019.111693](https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111693)
- Clark, L. C., ve Lyons, C. (2006). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102(1), 29–45. [doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x)
- Çalışır, M., Bakhspour, M. Yavuz, H., ve Denizli, A. (2020) HbA1c detection via high-sensitive boronate based surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 306 127-561. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127561>
- Daems, D., Lu, J., Delport, F., Orbie, L., Aernouts, B., Adriaens, I., Huybrechts, T., Saeys, W., Spasic, D., ve Lammertyn, J. (2017). Competitive inhibition assay for the detection

- of progesterone in dairy milk using a fiber optic SPR biosensor. *Analytica Chimica Acta* 950 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.005>
- Diltemiz, S. E., Ersöz, A., Hür, D., Keçili, R., ve Say, R. (2013). 4-Aminophenyl boronic acid modified gold platforms for influenza diagnosis. *Materials Science and Engineering C* 33 824-830. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.007>
- Fallah, H., Asadishad, T., Shafiei, M., Shokri, B., Javadianaghezi, S., Mohammed, W. S., ve Hamidi, S. M. (2020). Utilizing ZnO Nanorods for CO gas detection by SPR technique. *Optics Communications* 463 125490. <https://doi.org/10.1016/j.optcom.2020.125490>
- Fernández, F., Hegnerová, K., Piliarik, M., Sanchez-Baeza, F., Homola, J., & Marco, M.-P. (2010). A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4), 1231–1238. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.012>
- Gabriela Montaña-Figueroa, A., Wheelis, S. E., Hedden, B. M., Alshareef, N. H., Dammanna, D., Shaik, H., ve Quevedo-Lopez, M. (2018). Detection of Apoptotic and Live Pre-Osteoblast Cell Line Using Impedance-based Biosensors with Variable Electrode Design. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.11.057>
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., ve Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors-Sensor Principles and Architectures. *Sensors* 8(3), 1400–1458. <https://doi.org/10.3390/s80314000>
- Gupta, R., Raza, N., Bhardwaj, S. K., Vikrant, K., Kim, K., Bhardwaj, N. (2020). Advances in nanomaterial-based electrochemical biosensors for the detection of microbial toxins, pathogenic bacteria in food matrices. *Journal of Hazardous Materials* 123379. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123379>
- Hançe, S. (2018). Biyosensör uygulamaları için yüzey plazmon rezonansı deneysel sisteminin oluşturulması. (Yüksek lisans tezi). Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 506650).
- Heo, N. S., Kwak, C. H., Lee, H., Kim, D., Lee, S. Kim, G. Kwon, S., Kim, W. S., ve Huh, Y. S. (2017). Simple diagnosis of HbA1c using the dualplasmonic platform integrated with LSPR and SERS. *Journal of Crystal Growth* 469 154-159. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2016.09.039>
- Homola, J., Yee, S. S., ve Gauglitz, G. (1999). Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B* 54 3–15 [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(98\)00321-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(98)00321-9)

- Hwang, K.-H., Jeon, S.-H., Lee, J.-S., Lee, G.-H., Jeong, Y. S., Claesson, P., ... Boo, J.-H. (2017). Growth of Self-Template 3D Gold Nanoparticles on Boron Nanowire Arrays for Surface Plasmon Resonance Biosensor Application. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14191-5>
- Jain, S., Paliwal, A., Gupta, V., ve Tomar M. (2020). Long Range Surface Plasmons assisted highly sensitive and room temperature operated NO₂ gas sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 311 127897. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127897>
- Jory, M. J., Vukusic, P. S., ve Sambles, J. R. (1994). Development of a prototype gas sensor using surface plasmon resonance on gratings. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 17(3), 203–209. [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(93\)00871-u](https://doi.org/10.1016/0925-4005(93)00871-u)
- Karaağaç, A. (2015) Endüstriyel bor atıklarından borun geri kazanımı ve nanoboroksit eldesi. (Yüksek lisans tezi) Ulusal Tez Merkezi veri tabanından erişildi (Tez No. 421372).
- Kaushik, S., Tiwari, U. K., Deep, A., ve Sinha, R. K. (2019). Two-dimensional transition metal dichalcogenides assisted biofunctionalized optical fiber SPR biosensor for efficient and rapid detection of bovine serum albumin. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43531-w>
- Kim, J., Hong, U. G., Choi, Y., ve Hong, S. (2019). Enhancing the evanescent field in TiO₂/Au hybrid thin films creates a highly sensitive room-temperature formaldehyde gas biosensor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 182 110303. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.033>
- Kueng, A., Kranz, C., & Mizaikoff, B. (2004). Amperometric atp biosensor based on polymer entrapped enzymes. *Biosensors & Bioelectronics* 19(10), 1301–1307. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.11.023>
- Kumar, A., Yadav, A. K., Kushwah, A. S., ve Srivastava, S. K. (2020). A comparative study among WS₂, MoS₂ and Graphene based surface plasmon resonance (SPR) sensor. *Sensors and Actuators Reports*, 100015. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2020.100015>
- Li, Y. (2006). Section 2.3 Biosensors, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in *CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology*. Çevirmenler: Demircioğlu, P., ve Bögrekçi, İ.
- Liu, J.-T., Chen, L.-Y., Shih, M.-C., Chang, Y., ve Chen, W.-Y. (2008). The investigation of recognition interaction between phenylboronate monolayer and glycated hemoglobin using surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*, 375(1), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.01.004>

- Mazumdar, S. D., Hartmann, M., Kämpfer, P., ve Keusgen, M. (2007). Rapid method for detection of Salmonella in milk by surface plasmon resonance (SPR). *Biosensors and Bioelectronics*, 22(9-10), 2040–2046. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.09.004>
- Mohammadinejad, A., Oskuee, R. K., Eivazzadeh-Keihan, R., Rezayi, M., Baradaran, B., Maleki, A., ve Guardia, M. (2020). Development of biosensors for detection of alpha-fetoprotein: as a major biomarker for Hepatocellular carcinoma. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 115961. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115961>
- Mokkath, J. H. (2019). Optical excitations of boron and phosphorous doped silicon nanoparticles: a computational study. *Chemical Physics Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2019.01.019>
- Nooke, A., Beck, U., Hertwig, A., Krause, A., Krüger, H., Lohse, V. ve Steinbach, J. (2011). Ellipsometric detection of gases with the surface plasmon resonance effect on gold top-coated with sensitive layers. *Thin Solid Films*, 519(9), 2659–2663. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.11.091>
- Onac, C., Alpoguz, H. K., Yola, M. L., ve Kaya, A. (2018). Transport of melamine by a new generation of nano-material membranes containing carbon nanotubes and determination with surface plasmon resonance. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 45 467-470. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.003>
- Özkan, A., Atar, N., ve Yola, M. L. (2019). Enhanced surface plasmon resonance (SPR) signals based on immobilization of core-shell nanoparticles incorporated boron nitride nanosheets: Development of molecularly imprinted SPR nanosensor for anticancer drug, etoposide. *Biosensors and Bioelectronics* 130 293-298. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.053>
- Qian, S., Liang, Y., Ma, J., Zhang, Y., Zhao, J., ve Peng, W. (2015). Boronic acid modified fiber optic SPR sensor and its application in saccharide detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* 220 1217-1223. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.06.107>
- Qian, S., Zhang, Y., Yuan, H., Ji, W., Liu, Y., Zhao, J., Han, M., ve Peng, W. (2018). Boronic acid functionalized fiber-optic SPR sensors for high sensitivity glycoprotein detection. *Sensors and Actuators B: Chemical* 260 976-982. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.036>
- Palanisamy, P., Chavali, M., Kumar, E. M., ve Etika, K. C. (2020) Chapter 10 - Hybrid nanocomposites and their potential applications in the field of nanosensors/gas and biosensors. *Nanofabrication for Smart Nanosensor Applications* 253-280. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820702-4.00011-8>

- Paliwal, A., Sharma, A., Tomar, M., ve Gupta, V. (2017) Carbon monoxide (CO) optical gas sensor based on ZnO thin films. *Sensors and Actuators B: Chemical* 250 679-685. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.064>
- Pan, Y., Hu, N., Wei, X., Gong, L., Zhang, B., Wan, H., ve Wang, P. (2018). 3D cell-based biosensor for cell viability and drug assessment by 3D electric cell/matrigel-substrate impedance sensing. *Biosensors and Bioelectronics*. <https://doi:10.1016/j.bios.2018.09.046>
- Sato, T., Ishii, M., Ohtake, F., Kyasuke, N., Terabayashi, T., Kawanishi, Y., ve Okahata, Y. (1999). Binding affinity of GM3 lactone for influenza virüs. *Glycoconjugate Journal* volume 16, 223-227. <https://doi.org/10.1023/A:1007028421092>
- Schofield, D. J., ve Dimmock, N. J. Determination of affinities of a panel of IgGs and Fabs for whole enveloped (influenza A) virions using surface plasmon resonance. *J Virol Methods* 62(1) 33-42. [https://doi: 10.1016/0166-0934\(96\)02086-1](https://doi: 10.1016/0166-0934(96)02086-1).
- Springsteen, G., ve Wang, B. (2002). A detailed examination of boronic acid–diol complexation. *Tetrahedron* 58, 26 5291- 5300. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00489-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00489-1)
- Sun, D., Wu, Y., Chang, S.-J., Chen, C.-J., & Liu, J.-T. (2020). Investigation of the Recognition Interaction Between Glycated Hemoglobin and Its Aptamer by Using Surface Plasmon Resonance. *Talanta*, 121466. <https://doi:10.1016/j.talanta.2020.121466>
- Takemoto, D. K., Skehel, J. J., ve Wiley, D. C. A surface plasmon resonance assay for the binding of influenza virus hemagglutinin to its sialic acid receptor. *Virology* 15 217(2) 452-8. <https://doi: 10.1006/viro.1996.0139>.
- Tomassetti, M., Martini, E., Campanella, L., Favero, G., Sanzò, G., ve Mazzei, F. (2013). Lactoferrin determination using flow or batch immunosensor surface plasmon resonance: Comparison with amperometric and screen-printed immunosensor methods. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 179, 215–225. <https://doi:10.1016/j.snb.2012.09.096>
- Tombelli, S., Minunni, M., ve Mascini, M. (2005). Piezoelectric biosensors: Strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices. *Methods*, 37(1), 48–56. doi:10.1016/j.ymeth.2005.05.005
- Wang, L., ve Lin, J. (2020). Recent Advances on Magnetic Nanobead Based Biosensors: from Separation to Detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 115915. <https://doi:10.1016/j.trac.2020.115915>

- Weis, W., ve Drickamer, K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem* 65 441-73. <https://doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002301>.
- Yan, J., Springsteen, G., Deeter, S., ve Wang, B. (2004). The relationship among pKa, pH, and binding constants in the interactions between boronic acids and diols—it is not as simple as it appears. *Tetrahedron* 60, 49 11205-11209. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.08.051>
- Yola, M. L., Eren, T., ve Atar, N. (2014). Molecular imprinted nanosensor based on surface plasmon resonance: Application to the sensitive determination of amoxicillin. *Sensors and Actuators B: Chemical* 195 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.011>
- Yola, M. L., Eren, T., ve Atar, N. (2014a). Determination of amikacin in human plasma by molecular imprinted SPR nanosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 198 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.02.107>
- Yola, M. L., Atar, N., ve Erdem, A. (2015). Oxytocin imprinted polymer based surface plasmon resonance sensor and its application to milk sample. *Sensors and Actuators B: Chemical* 221 842-848. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.07.004>
- Yu, D. H., Blankert, B., Bodoki, E., Bollo, S., Vire, J. C., Sandulescu, R., Nomura, A., Kauffmann, J. M. (2006). Amperometric biosensor based on horseradish peroxidase-immobilised magnetic microparticles. *Sensors and Actuators B-Chemical* 113(2), 749–754 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.07.026>
- Yu, H., Chong, Y., Zhang, P., Ma, J., ve Li, D. (2020). A D-shaped fiber SPR sensor with a composite nanostructure of MoS₂-graphene for glucose detection. *Talanta*, 219, 121324. <https://doi:10.1016/j.talanta.2020.121324>
- Zhang, C. G., Chang, S. J., Settu, K., Chen, C. J., ve Liu, J. T. (2019). High-sensitivity glycated hemoglobin (HbA1c) aptasensor in rapid prototyping surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B: Chemical* 279 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.077>
- Zhang, H., Li, D., Yang, Y., Chang, H., ve Simone, G. (2020). On-resonance islands of Ag-nanowires sense the level of glycated hemoglobin for diabetes diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical* 321 128-451. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128451>
- Zhang, Y., Zhang, Y., Terrill, R. H., ve Bohn, P. W. (1998). Coupled second-harmonic generation, surface plasmon resonance and AC impedance studies of full and partial monolayers in (Au,Ag)-alkanethiolate electrolyte systems. *Thin Solid Films*, 335(1-2), 178–185. [https://doi:10.1016/s0040-6090\(98\)00879-7](https://doi:10.1016/s0040-6090(98)00879-7)

- Zhao, Y., Tong, R., Xia, F., ve Peng, Y. (2019). Current status of optical fiber biosensor based on surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*, 111505. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111505>
- Zheng, Y.-H., Hua, T.-C., Sun, D.-W., Xiao, J.-J., Xu, F., ve Wang, F.-F. (2006). Detection of dichlorvos residue by flow injection calorimetric biosensor based on immobilized chicken liver esterase. *Journal of Food Engineering*, 74(1), 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.02.009>
- Zhou, J., Qi, Q., Wang, C., Qian, Y., Liu, G., Wang, Y., ve Fu, L. (2019). Surface plasmon resonance (SPR) biosensors for food allergen detection in food matrices. *Biosensors and Bioelectronics* 142 111-449. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111449>
- Zschieschang, U., Halik, M., ve Klauk H. (2008). Microcontact-printed self-assembled monolayers as ultrathin gate dielectrics in organic thin-film transistors and complementary circuits. *Langmuir* 4 24(5) 1665-9. [https://doi: 10.1021/la703818d](https://doi.org/10.1021/la703818d).