



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KARSİNOEMBRYONİK ANTİJEN TAYİNİ
İÇİN APTAMER ESASLI YÖNTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ

Aslı ERKAL AYTEMUR

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Aralık-2023
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Aslı ERKAL AYTEMUR tarafından hazırlanan “Karsinoembriyonik Antijen Tayini için Aptamer Esaslı Yöntemlerin Geliştirilmesi” adlı tez çalışması 14 / 12 / 2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Ecir YILMAZ

.....

Danışman

Prof. Dr. İbrahim Ender MÜLAZIMOĞLU

.....

Üye

Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN

.....

Üye

Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA

.....

Üye

Prof. Dr. Fatih DURMAZ

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Şerife Yurdağül KUMCU
FBE Müdürü

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 122Z678 numaralı 1002 projesi ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 221410001 numaralı Doktora Tez Projesi ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Aslı ERKAL AYTEMUR

Aralık, 2023

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KARSİNOEMBRYONİK ANTİJEN TAYİNİ İÇİN APTAMER ESASLI YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Aslı ERKAL AYTEMUR

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. İbrahim Ender MÜLAZIMOĞLU
İkinci Danışman: Prof. Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ

2023, 83 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. İbrahim Ender MÜLAZIMOĞLU
Prof. Dr. Ecir YILMAZ
Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN
Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA
Doç. Dr. Fatih DURMAZ

Bu tez çalışmasında, kanser teşhis tekniklerinden birisi olan karsinoembriyonik antijen (CEA) proteininin tayini için iki farklı analitik kullanılarak aptasensör geliştirilmiştir. Her bir analitik teknik için CEA'ye spesifik iki farklı aptamer kullanılmıştır. Analitik tekniklerden ilki, elektrokimyasal yöntem ile modifiye edilmiş piezokristal üzerine bağlanan aptamerler kullanılarak kuartz kristal mikrobals (QCM) tekniği ile CEA tespittir. Diğer analitik teknik ise yüzey plazmon rezonans ile güçlendirilmiş içten tam yansımali elipsometri (SPRe-TIRE) ile CEA tespittir. Bu çalışmada, CEA spesifik aptamerler, sırasıyla, 5'- GGGG CGAC GTTG AGAT TCCG CTTG TGTA TTAG TAGT CCCC-3' (antiCEA1, $K_D = 37,8$ nM) ve 5'-ATAC CAGC TTAT TCAA TTGG GGTA GGGG GCGA AGCG ATAC CCTA ATCA GC-3' (antiCEA2, $K_D = 3,9$ nM) dizilimindedir.

Her iki analitik teknik için kullanılan aptamer platformları çeşitli yöntemlerle karakterize edildikten sonra iki farklı aptamer için CEA aptasensörleri geliştirilmiştir. QCM tekniği kullanılarak antiCEA1 ve antiCEA2 aptamerleriyle geliştirilen CEA tayin yönteminde 0,1-25 ng/mL CEA derişimi aralığında çalışan sensör geliştirilmiştir. Bu QCM sensör, sırasıyla $y=0,25452x+0,31227$ ve $y=0,15113x+0,2659$ eşitlikleri ile doğrusal kalibrasyon eğrisi vermiştir. QCM aptasensörlerin tespit sınırları (LOD, sinyal/gürültü oranı 3 olacak şekilde) antiCEA1 platformu için 0,102 ng/mL ve antiCEA2 platformu için 1,416 ng/mL olmuştur. SPRe-TIRE tekniğiyle geliştirilen yöntemlerde ise 0,01-500 ng/mL CEA derişimi aralığında aralığında antiCEA ve antiCEA2 aptasensörleri için, $y=0,9764x+4,7766$ ve $y=0,6571x+1,9496$ doğrusal denklemleri ifade edilen kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. SPRe-TIRE yönteminden elde edilen LOD değerleri

sırasıyla 0,1 ve 2,9 pg/mL olmuştur. Her iki teknikle geliştirilen aptasensörlerin kalibrasyon eğrilerinin belirleme katsayısı (R^2 cinsinden) 0,9870 ile 0,9955 arasında bulunmuştur.

Daha yüksek analiz performansına sahip antiCEA1 aptasensör platformları için girişim yapması muhtemel α -fetoprotein (AFP), kanser antijen -125 (CEA-125) ve vasküler endotelial büyüme faktörü -165 (VEGF-165) türlerinin girişim etkilerine incelenmiştir. Girişim yapma ihtimali olan türler CEA varlığında 500 ng/mL derişimde eklenerek QCM ve SPRe-TIRE için girişim nedeniyle sinyal değışim miktarları %1,0 ile %4,1 aralığında elde edilmiştir.

Geliştirilen antiCEA1 aptasensörlerinin validasyon testlerinde, gerçek numuneleri temsil etmek üzere insan kan serumu içersine standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. QCM tekniğinde 0,1 ve 10 ng/mL CEA ve SPRe-TIRE tekniğinde ise 1,00 ve 50 ng/mL CEA standardı eklenerek gerçekleştirilen testlerde yöntemlerin geri kazanım değeri %95,5 ile %103,5 arasında bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Aptasensör; Dönüşümlü voltametri (CV), Karsinoembriyonik antijen (CEA), Kuartz kristal mikrobals (QCM), Yüzey plazmon rezonans ile güçlendirilmiş içten tam yansmalı elipsometri (SPRe-TIRE)

ABSTRACT

PhD THESIS

DEVELOPMENT OF APTAMER-BASED METHODS FOR CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN DETERMINATION

Aslı ERKAL AYTEMUR

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

Advisors: Prof. Dr. İbrahim Ender MÜLAZIMOĞLU
Prof. Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ

2023, 83 Pages

Jury

Prof. Dr. İbrahim Ender MÜLAZIMOĞLU
Prof. Dr. Ecir YILMAZ
Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN
Prof. Dr. Mustafa TOPKAFA
Assoc. Prof. Dr. Fatih DURMAZ

In this study, aptamer-based methods were developed with two different techniques for the determination of carcinoembryonic antigen (CEA) protein, which is one of the cancer diagnostic techniques. Two different CEA-specific aptamers were used for each analytical technique. The first method is based on the determination of CEA by quartz crystal microbalance (QCM) technique after two separate selective aptamers are bonded to the piezocrystal with electrochemical nanofilm. The other method is CEA determination with the help of selective aptamers using the surface plasmon resonance enhanced total internal reflection ellipsometry (SPRe-TIRE) method. In this study, the CEA-specific aptamers were 5'-GGGG CGAC GTTG AGAT TCCG CTTG TGTA TTAG TAGT CCCC-3' (antiCEA1, K_D = 37.8 nM) and 5'-ATAC CAGC TTAT TCAA TTGG GGTA GGGG GCGA AGCG ATAC CCTA ATCA GC-3' (antiCEA2, K_D = 3.9 nM), respectively.

After both aptamer platforms were characterized by various techniques, CEA analysis methods were developed for two different aptamers. In the CEA determination method developed with antiCEA1 and antiCEA2 aptamers using the QCM technique, the equations $y=0.25452x+0.31227$ and $y=0.15113x+0.2659$ were obtained, respectively, in the concentration range of 0.1-25 ng/mL. The detection limits of the methods (LOD, S/N=3) were determined as 0.102 ng/mL for the antiCEA1 platform and 1.416 ng/mL for the antiCEA2 platform. In the methods developed with the SPRe-TIRE technique, linear equations $y=0.9764x+4.7766$ and $y=0.6571x+1.9496$ were obtained, respectively, for antiCEA1 and antiCEA2 aptamer platforms in the concentration range of 0.01-500 ng/mL. The LOD values of the methods

were determined as 0.1 and 2.9 pg/mL, respectively. In the regression analyzes performed in all methods were developed with both techniques, the R^2 values ranged between 0.9870 and 0.9955.

For antiCEA1 aptasensor platforms with higher analysis performance, the interference effects of α -fetoprotein (AFP), cancer antigen-125 (CEA-125) and vascular endothelial growth factor-165 (VEGF-165) species were investigated. Potentially interfering species were added at a concentration of 500 ng/mL in the presence of CEA, and the signal change due to interference was obtained for QCM and SPRe-TIRE in the range of 1.0% to 4.1%.

In the validation tests of the developed antiCEA1 aptasensors, the standard addition method to human blood serum was used to represent real samples. The recovery values of the methods were found between 95.5% and 103.5% by spiked 0.1 and 10 ng/mL CEA for QCM technique and 1.00 and 50 ng/mL CEA for SPRe-TIRE technique.

Keywords: Aptasensör, Carcinoembryonic antigen (CEA), Cyclic voltammetry (CV), Quartz crystal microbalance (QCM), Surface plasmon resonance-enhanced total internal reflection ellipsometry (SPRe-TIRE)

ÖNSÖZ

Çağımızın yaygın ve ölümcül hastalıklarından biri olan kanser türlerinin tedavisi kadar erken ve doğru teşhisi de önemlidir. Bu amaçla her gün yeni kanser teşhis yöntemleri geliştirilmektedir. Bunlardan birisi de pek çok kanser türünde takip edilmesi gereken CEA tayinidir. CEA, literatürde pek çok teknikle analiz edilmesine rağmen “Surface plasmon resonance-enhanced total internal reflection ellipsometry” (SPRe-TIRE) ile tayin edilmemiş ve bu tez çalışmasıyla birlikte ilk defa bir tayin yöntemi geliştirilmiştir. Ayrıca elektrokimyasal nanofilm esaslı QCM tekniğine dayalı bir aptasensör de ilk defa geliştirilmiştir.

Doktora tez çalışmalarımda desteğini ve bilgi birikimini esirgemeyen, anlayışı ve hoşgörüsü ile hep yanımda olan danışmanım Prof. Dr. İbrahim Ender MÜLAZIMOĞLU’na, akademik hayata adım atmama vesile olan, bilgisi ve yönlendirmeleri ile hayatıma ışık tutan, tez yazımı süresince her bir soruma sabırla tek tek cevap veren değerli hocam Prof. Dr. Zafer ÜSTÜNDAĞ ve gölgesini üzerimden eksik etmeyen değerli hocam Prof. Dr. İlknur ÜSTÜNDAĞ’a, akademik olarak oldukça yeni olan aptasensör uygulamaları ile ilgili bilgisi, tez konseptinin geliştirilmesi, teorik ve deneysel çalışmaların değerlendirilmesi konusunda büyük destek aldığım Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, yoluma ve hayatıma eşlik eden beni ben yapan sevgili eşim Harun AYTEMUR ve kalbimin asıl sahibi minik oğlum Eren AYTEMUR’a, her anımda yanımda ve destekçi olan sevgili aileme minnettârim.

Çalışmaların tamamlanması için 122Z678 numaralı “1002-A Hızlı Destek” projesiyle finansal destek sağlayan TÜBİTAK’a ve 221410001 numaralı Doktora Tez Projesi desteği için Necmettin Erbakan Üniversitesi’ne teşekkür ederim.

Aslı ERKAL AYTEMUR
KONYA-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Karsinoembriyonik Antijen.....	4
1.1.1. Karsinoembriyonik antijen tayinleri	5
1.1.2. Aptamer esaslı karsinoembriyonik antijen tayinleri	5
1.2. Biyosensörler.....	6
1.2.1. Biyosensörlerin kullanım alanları	7
1.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Teknikler	7
1.3.1. Kuartz kristal mikrobals (QCM)	7
1.3.2. Yüzey plazmon rezonans ile güçlendirilmiş içten tam yansımali elipsometri (SPRe-TIRE).....	10
1.3.3. Dönüşümlü voltametri (CV)	12
1.3.4. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)	13
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar	20
3.2. Kuartz Kristal Mikrobals Ölçümü Esaslı Aptasensörlerin Hazırlanması.....	25
3.2.1. Elektrokimyasal ve kimyasal nanofilmlerin hazırlanması.....	25
3.2.2. Modifiye yüzeylerin karakterizasyonu	28
3.2.3. QCM ile CEA tayin yöntemi uygulamaları	29
3.3. Yüzey Plazmon Rezonans ile Güçlendirilmiş İçten Tam Yansımali Elipsometri (SPRe-TIRE) İçin Aptasensörlerin Hazırlanması	29
3.3.1. Cam slaytların altın kaplanması.....	30
3.3.2. SF10/Cr/Au yüzeyine merkaptofenil nanofilmlerin modifikasyonu ve karakterizasyon çalışmaları.....	30
3.3.3. SF10/Cr/Au/4MF yüzeyine AuNPs ve aptamerlerin immobilizasyonu ...	31
3.3.4. SPRe-TIRE tekniğiyle ile CEA tayin yöntemi uygulamaları	31

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	34
4.1. Kuartz Kristal Mikrobalans Tekniğiyle Aptamer Esaslı CEA Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi.....	34
4.1.1. QCM tekniği için hazırlanan yüzeylerin ve AuNP'ların karakterizasyonu	34
4.1.2. QCM tekniği ile CEA analizi için yöntem geliştirme.....	41
4.2. Yüzey Plazmon Rezonans ile Güçlendirilmiş İçten Tam Yansımali Elipsometri (SPRe-TIRE) Tekniğiyle Aptamer Esaslı CEA Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi ..	55
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	71
5.1. Kuartz Kristal Mikrobalans Tekniğiyle Aptamer Esaslı CEA Tayini İçin Sonuçlar ve Öneriler	71
5.2. Yüzey Plazmon Rezonans ile Güçlendirilmiş İçten Tam Yansımali Elipsometri (SPRe-TIRE) Tekniğiyle Aptamer Esaslı CEA Tayini İçin Sonuçlar ve Öneriler	72
6. KAYNAKLAR	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Δ	: Delta, faz değişimi (elipsometride bir terim)
Ψ	: Psi, kutuplanmadaki genlik oranı (elipsometride bir terim)
Ω	: Ohm

Kısaltmalar

CEA	: Karsinoembriyonik antijen
SPRe-TIRE	: Yüzey Plazmon Rezonans ile Güçlendirilmiş İçten Tam Yansımali Elipsometri
QCM	: Kuartz Kristal Mikrobals
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
IARC	: Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı
AuNP	: Altın Nanoparçacık
CV	: Dönüşümlü Voltmetri
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonans
EIS	: Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
ELISA	: Enzim bağı immunoanaliz
SERS	: Yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılması
4ATF	: 4-aminotiyofenol
4MB	: 4-merkaptobenzen
4MF	: 4-merkaptofenol
4MB-DAT	: 4-merkaptobenzen diazonyum tuzu
SF10	: Kırılma indisi bilinen bir cam slayt/substrat
$K_3Fe(CN)_6$	: Potasyum ferrisiyanür
$K_4Fe(CN)_6$	: Potasyum ferrosiyanür
Rct	: Yük aktarım direnci
XPS	: X-ışınları fotoelektron spektroskopisi
SEM	: Taramalı elektron mikroskopisi
TEM	: Geçirimli elektron mikroskopisi
EDX	: Enerji dağılımlı X-ışınları
AntiCEA1	: CEA'ya duyarlı aptamer-1
AntiCEA2	: CEA'ya duyarlı aptamer-2
PBS	: Fosfat tampon çözeltisi
RSD	: Bağlı standart sapma
RPM	: Round per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
RE	: Bağlı hata
S/N	: Sinyal-gürültü oranı
Δm	: Kütle değişimi
K_D	: Afinite değeri
SD	: Standard Sapma

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. 2020 yılı yeni kanser vaka tanısı oranları	2
Çizelge 1.2. WHO-IARC, 2020 yılı dünyadaki kanser kaynaklı ölüm sayıları ve oranları	3
Çizelge 2.1. CEA tayini için geliştirilen yöntemler ve analitik performansları	17
Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan Anti-CEA1 ve Anti-CEA2 Aptamerleri	20
Çizelge 3.2. AntiCEA1'in sekonder yapılarının enerji dağılımı değerleri	21
Çizelge 3.3. AntiCEA2'in sekonder yapılarının enerji dağılımı değerleri	24
Çizelge 3.4. CTRL-Aptamerin sekonder yapısının enerji dağılımı değerleri.....	25
Çizelge 4.1. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 'ün (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP yüzeylerindeki dönüşümlü voltamogramlarından (TH= 200 mV/s, Ag/AgCl/KCl _(doy) 'e karşı) elde edilen pik akımı ve potansiyel değerleri	40
Çizelge 4.2. Altın slayt üzerindeki 4MF nanofilmin kalınlığı.....	41
Çizelge 4.3. Geliştirilen yöntemlere ait analitik parametre verileri (n=5).....	47
Çizelge 4.4. Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik performansı	50
Çizelge 4.5. AntiCEA1 platformu üzerinde girişim yapması muhtemel 500ng/mL'deki bazı türlerin, 10 ng/mL CEA'nın analizine etkileri (%Δm değişimi).....	53
Çizelge 4.6. İnsan serumu örneklerinden antiCEA1 sensör platformu üzerinde CEA'nın analitik geri kazanım değerleri (N = 5).....	54
Çizelge 4.7. Altın slayttaki 4 MF nanofilmin elipsometri ile kalınlık değeri	57
Çizelge 4.8. Geliştirilen yöntemlere ait analitik parametreler (n=5)	68
Çizelge 4.9. Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik performansı (ortalama± σ)	69
Çizelge 4.10. 500 ng/mL konsantrasyonlu bazı türlerin 50 ng/mL CEA analiz yöntemi üzerine etkileri (AntiCEA1 aptasensörü için).....	69
Çizelge 4.11. İnsan serumu örneklerinden antiCEA1 sensör platformu üzerinde CEA'nın analitik geri kazanım değerleri (N = 5).....	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. WHO-IARC, 2020 yılı dünyadaki yeni kanser vaka tanısı oranları.....	2
Şekil 1.2. WHO-IARC, 2020 yılı dünyadaki kanser kaynaklı ölüm sayıları.....	3
Şekil 1.3. Biyosensörlerin genel yapısı.....	7
Şekil 1.4. Kuartz kristal mikrobalsans cihazı	9
Şekil 1.5. Dönüşümlü voltametriye uygulanan potansiyelin zamanla değişimi	12
Şekil 1.6. Dönüşümlü voltamogramların Amerikan ve IUPAC sistemlerindeki gösterimi	13
Şekil 2.1. WoS taramasında “carcinoembryonic antigen” anahtar kelimesiyle bulunan çalışmaların alanlara dağılımı.....	15
Şekil 2.2. WoS taramasında “determination of carcinoembryonic antigen” anahtar kelimesiyle bulunan çalışmaların alanlara dağılımı.....	15
Şekil 2.3. WoS taramasında “Aptasensor + carcinoembryonic antigen” anahtar kelimesiyle bulunan çalışmaların alanlara dağılımı.....	16
Şekil 3.1. AntiCEA1’in sekonder yapısı.....	21
Şekil 3.2. AntiCEA2’in sekonder yapısı ($\Delta G = -4,29$ kcal/mol)	22
Şekil 3.3. AntiCEA2’in sekonder yapısı ($\Delta G = -4,07$ kcal/mol)	23
Şekil 3.4. CTRL-Aptamer’in sekonder yapısı ($\Delta G = 0,27$ kcal/mol)	25
Şekil 3.5. 4ATF’nin diazolanarak 4MB-DAT’a dönüştürülmesi ve diazonyum tuzu indirgenmesiyle Au-4MF yüzeyinin hazırlanması	26
Şekil 3.6. 4MB filminin elektrokimyasal olarak Au kristal yüzeyinde elde edilmesinin şematik gösterimi ve 4MB-DAT’unun Au kristal elektrot üzerine dönüşümlü voltametri ile üç döngü modifikasyon voltamogramı (Referans elektrot: Ag/AgCl/KCl _{doy} ; Tarama hızı: 200 mV/s).	27
Şekil 3.7. Au-4MF-AuNP yüzeyinin şematik olarak hazırlanışı	28
Şekil 3.8. CEA analiz yöntemi için SPRe-TIRE sensör platformunun şematik gösterimi	32
Şekil 4.1. AuNP’ların mor ötesi-görünür bölge (UV-Vis) spektrumu	34
Şekil 4.2. AuNP’ların TEM görüntüsü	35
Şekil 4.3. AuNP’ların SEM görüntüsü	36
Şekil 4.4. AuNP’ların EDX spektrumu	36
Şekil 4.5. Au ve Au-4MF yüzeyinde C _{1s} için yüksek çözünürlüklü XPS spektrumu	37
Şekil 4.6. Au ve Au-4MF yüzeyinde S _{2p} için yüksek çözünürlüklü XPS spektrumu	38
Şekil 4.7. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ ’ün (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP yüzeylerindeki dönüşümlü voltamogramları (TH= 200 mV/s, Ag/AgCl/KCl _(doy) referans elektrotuna karşı)	40
Şekil 4.8. AntiCEA1 ile immobilize edilmiş QCM sensörlerinde çeşitli konsantrasyonlarda CEA’nın saptanmasına yönelik sensorgramlar	42
Şekil 4.9. AntiCEA2 ile immobilize edilmiş QCM sensörlerinde çeşitli konsantrasyonlarda CEA’nın saptanmasına yönelik sensorgramlar	43
Şekil 4.10. AntiCEA1 üzerinde immobilize edilmiş CEA için kalibrasyon eğrisi.....	43
Şekil 4.11. AntiCEA2 üzerinde immobilize edilmiş CEA için kalibrasyon eğrisi.....	44
Şekil 4.12. AntiCEA1 üzerinde immobilize edilmiş çeşitli CEA konsantrasyonları için yarı-logaritmik kalibrasyon eğrisi.....	45
Şekil 4.13. AntiCEA2 üzerinde immobilize edilmiş çeşitli CEA konsantrasyonları için yarı-logaritmik kalibrasyon eğrisi.....	45
Şekil 4.14. AntiCEA1-CEA etkileşimlerinin kinetiği	47
Şekil 4.15. AntiCEA2-CEA etkileşimlerinin kinetiği	48
Şekil 4.16. AntiCEA1 aptameri için belirlenen K _D değerlerinin dağılımı.....	49
Şekil 4.17. AntiCEA2 aptameri için belirlenen K _D değerlerinin dağılımı.....	50

Şekil 4.18. AntiCEA1 platformunda gün içi doğruluk çalışması için alınan sensorgramlar.....	51
Şekil 4.19. AntiCEA1 platformunda günler arası doğruluk çalışması için alınan sensorgramlar.....	52
Şekil 4.20. AntiCEA2 platformunda gün içi doğruluk çalışması için alınan sensorgramlar.....	52
Şekil 4.21. AntiCEA2 platformunda günler arası doğruluk çalışması için alınan sensorgramlar.....	53
Şekil 4.22. Girişim çalışmalarının QCM sensorgramları	54
Şekil 4.23. İnsan serumu örneklerinden antiCEA1 sensör platformu üzerinde 1.0 ve 10 ng/mL CEA'nın eklendiği QCM sensorgramları (N = 5)	55
Şekil 4.24. 4MB-DAT'nun SF10/Cr/Au elektrot yüzeyi üzerindeki 200 mV/s tarama hızındaki çoklu voltamogramı (Ag/AgCl/KCl _(doy) 'e karşı)	56
Şekil 4.25. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 'nın (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP elektrotları üzerinde dönüşümlü voltamogramları (TH: 200 mV/s, Ag/AgCl/KCl _(doy) referans elektrotuna karşı)	57
Şekil 4.26. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 'nın (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP elektrotları üzerinde dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen katodik pik akımı değerleri (TH: 200 mV/s, Ag/AgCl/KCl _(doy) referans elektrotuna karşı)	58
Şekil 4.27. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 'nın (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP elektrotları üzerinde: EIS tekniğiyle elde edilen Nyquist eğrileri (Referans elektrot Ag/AgCl/ idi) KCl _(doy) , Tarama hızı 200 mV/s, 300kHz-0,2 Hz aralığında).....	59
Şekil 4.28. 1 mM K ₃ Fe(CN) ₆ /K ₄ Fe(CN) ₆ 'nın (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP elektrotları üzerinde: EIS tekniğiyle elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan Rct değerlerinin sütun grafiği	59
Şekil 4.29. Au-4MF-AuNP'nin C _{1s} dar bölge yüksek çözünürlüklü X-ışını fotoelektron spektrumu.....	60
Şekil 4.30. Au-4MF-AuNP'nin S _{2p} dar bölge yüksek çözünürlüklü X-ışını fotoelektron spektrumu.....	61
Şekil 4.31. CEA için bağıl aptasensör cevabına karşılık platformda kullanılan antiCEA1 aptamer konsantrasyonu ilişkisi.....	62
Şekil 4.32. CEA için bağıl aptasensör cevabına karşılık platformda kullanılan antiCEA2 aptamer konsantrasyonu ilişkisi.....	63
Şekil 4.33. AntiCEA1 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA'nın sensör cevap eğrileri.....	64
Şekil 4.34. AntiCEA2 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA'nın sensör cevap eğrileri.....	64
Şekil 4.35. AntiCEA1 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA'nın kalibrasyon grafiği	66
Şekil 4.36. AntiCEA2 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA'nın kalibrasyon grafiği	66
Şekil 4.37. AntiCEA1 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA'nın yarı-logaritmik kalibrasyon grafiği	67
Şekil 4.38. AntiCEA1 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA için yarı-logaritmik kalibrasyon grafiği	67

1. GİRİŞ

Kanser kelimesi M.Ö 3.yy’a dayanan Latince kökenli bir kelime olup yengeç anlamına gelen “canker/carcinos” kelimelerinden türetilmiştir. O dönemde şişmiş damarlar, bir yengecin bacaklarına benzetilmiş ve Hipokrat tarafından kullanılmıştır. Yunan hekim Galen ise şişme anlamına gelen “oncos” terimini tercih etmiştir (Baykara, 2016).

Kanser, bireyin büyüme ve gelişimini sağlayan kontrol mekanizmalarının işlevini kaybetmesi sonucu kontrolsüz bölünen ve çoğalan hücreler sonucu doku veya organlarda görülen bir hastalık türüdür (Cooper, 2000). Dünya’da en çok görülen ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır. Sadece ABD’de 2018’de 1,7 milyon, 2020’de 1,8 milyon yeni kanser vakası tespit edilmiş her iki yılda da yaklaşık 600 bin kanser kaynaklı ölüm rapor edilmiştir (Lin ve ark., 2021).

Yüzden fazla kanser türü vardır ve çeşitli standartlar getirilerek tedaviler ile ilgili büyük ilerleme kaydedilmiştir. Bu çeşitli standartlara rağmen bu hastalık bireye özgü karakteristik bir yapı göstermektedir ve DNA yapısındaki farklılıklar, tedaviye cevap verme şeklini değiştirmektedir. (Sun ve ark., 2019). Günümüzün teknoloji koşullarında çeşitli tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemler başta olmak üzere çeşitli aşilar ve gen terapi yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır.

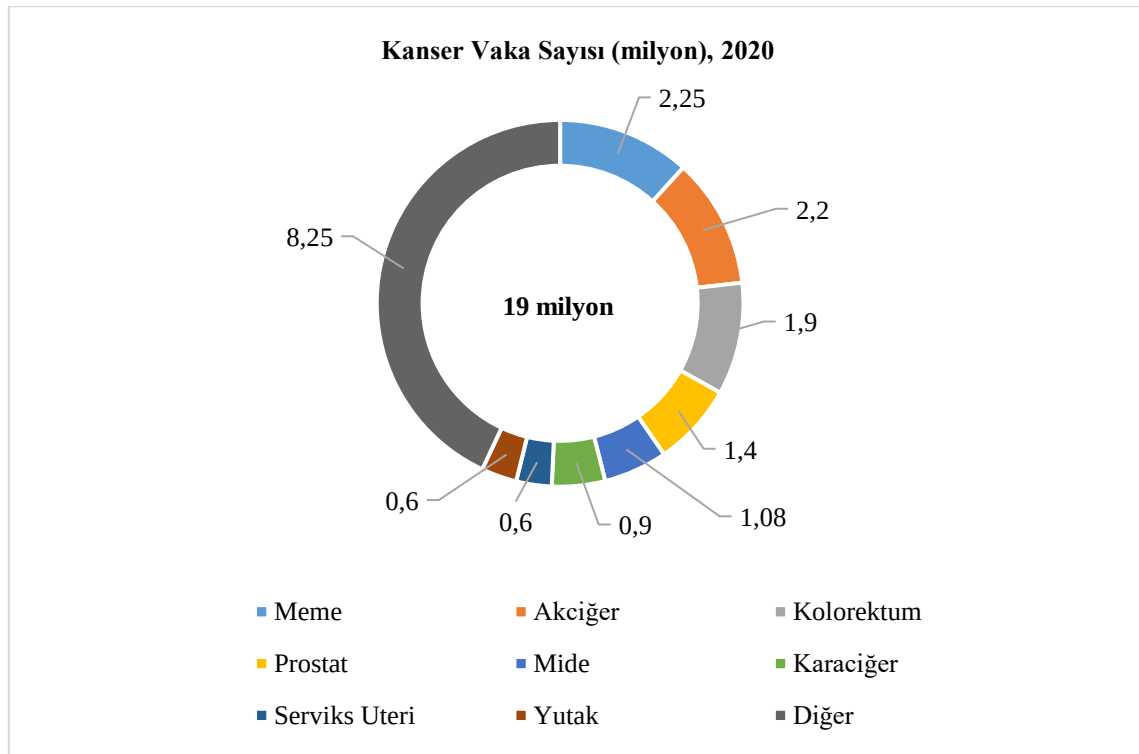
Ölümcul bir hastalık türü olan kanserin tedavisi kadar teşhisi de önemlidir. Özellikle erken evrelerde teşhisi hayati önem taşır. Çünkü erken teşhis ile kanser türü yayılmadan hızlı tedaviye başlanarak hemen önlem alma imkânı ortaya çıkar. Geç teşhiste aynı durum söz konusu değildir. Gecikmiş teşhisin neden olduğu ölüm oranları endişe verici seviyededir (Raymond ve ark., 2020) Bunu önlemenin tek yolu erken teşhis tanı yöntemlerinin geliştirilmesidir. Bu erken teşhis yöntemleriyle belirlenecek akciğer, rektum, kolon ve meme kanserlerine önlem alma işlemi de erkenden başlayacağı için hayatta kalma oranı da hızla artacaktır (American Cancer Society, 2018).

Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), 2020 yılında dünyadaki kanser çeşitliliği ve ölüm oranları ile ilgili veriler sunmuştur. Dünya kanser istatistiklerinden alınan her yaş ve her iki cinsiyeti de içeren bir çalışma yayınlanmıştır. Çizelge 1.1 ve Şekil 1.1’de değerleri verilen dünya kanser istatistiklerinden elde edilen verilere göre, 2020 yılında dünya çapında tahmini 19 milyon kişiye yeni kanser teşhisi konulmuştur. Bu yeni teşhislerin %11,7’si meme, %11,4’ü akciğer, %10’u kolorektum, %7,3’si prostat ve geri kalanı ise diğer kanser türlerine aittir. 2020 yılında yapılan bu

çalışmada meme kanserinin dünya genelinde en fazla tanı alan kanser türü olduğu rapor edilmiştir.

Çizelge 1.1. 2020 yılı yeni kanser vaka tanısı oranları

2020 Yılı Kanser Türü	Vaka Sayısı, milyon	% Vaka
Meme	2,25	11,7
Akciğer	2,2	11,4
Kolorektum	1,9	10
Prostat	1,4	7,3
Mide	1,08	5,6
Karaciğer	0,9	4,7
Serviks Uteri	0,6	3,1
Yutak	0,6	3,1
Diğer	8,25	42,9

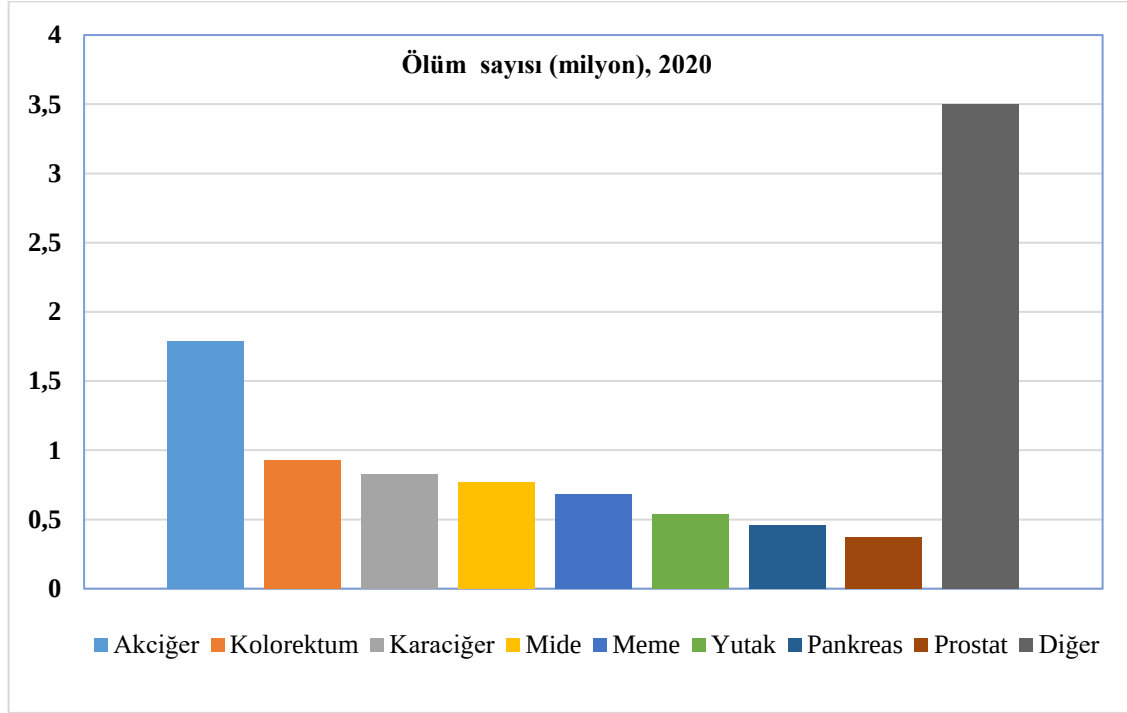


Şekil 1.1. WHO-IARC, 2020 yılı dünyadaki yeni kanser vaka tanısı oranları

Çizelge 1.2 ve Şekil 1.2’de bulunan dünya kanser istatistikleri verilere göre yine her yaştan ve her iki cinsiyetten 2020 yılı kanser türüne göre ölüm oranları verilmiştir. Dünya genelinde 2020 yılında; yaklaşık 1,8 milyon kişi akciğer, 930 bin kişi kolorektal, 830 bin kişi karaciğer, 650 bin kişi meme ve 5 milyon kişi diğer kanser türleri olmak üzere yaklaşık 9 milyon kişi kanser nedeniyle ölmüştür.

Çizelge 1.2. WHO-IARC, 2020 yılı dünyadaki kanser kaynaklı ölüm sayıları ve oranları

2020 Yılı Kanser Türü	Ölüm Sayısı, milyon	Ölüm Oranı, %
Akciğer	1,79	18
Kolorektum	0,93	9,4
Karaciğer	0,83	8,3
Mide	0,77	7,7
Meme	0,68	6,9
Yutak	0,54	5,5
Pankreas	0,46	4,7
Prostat	0,37	3,8
Diğer	3,5	35,7

**Şekil 1.2.** WHO-IARC, 2020 yılı dünyadaki kanser kaynaklı ölüm sayıları

Dünya genelinde oldukça büyük yeni vaka ve ölüm oranına sahip bu hastalık için alınabilecek en önemli önlemlerden biri erken teşhistir. Kanser erken teşhisi için kullanılan yöntemlerin en yaygını ise kanda biyobelirteç tayinidir. Her kanser türü için bir veya birden fazla biyobelirteç olabilir. En yaygın kanser türleri için biyobelirteçlerin bazıları; akciğer kanseri için CEA, CA19-9 (Karbon Hidrat Antijen 19-9), SCC (Skumöz hücreli karsinom), CYFRA21-1(Sitokeratin fragman-19), NSE (Nöron Spesifik Elonaz), miR-106a-5p (Mikro RNA106a-5p), KRAS (K-Ras Proteini), ALK (Anaplastic lymphoma(yağ bezesi) kinase); kolon kanseri için CEA, CA19-9, CA24-2(Karbonhidrat antijen 24-2); karaciğer kanser için AFP (Alfa-Fetoprotein), CEA, miR-1005p,mir-122, HCCR-1; meme kanseri için CEA, CA27-29 (Karbonhidrat antijen 2-29), CA125 (Karbonhidrat antijen 125), CA15-3 (Karbonhidrat antijen 15-3), HER2 (İnsan epidermal büyüme faktör reseptörü 2), BRCA1 (Meme ve Yumurtalık kanseri yatkınlık genleri), ErB2(Erb-b2 Tirozin kinaz reseptörü), miR-155, miR-261, EGFR (Glomerüler filtrasyon

hızı), Mucin-1, VEGF165 (Vasküler endotelyal büyüme faktörü - 165) vb. belirlenmiştir. (Torul, 2016; Topkaya ve ark., 2016).

Bu çalışmada, dünyada çok sık rastlanan ve ölüm oranları çok yüksek olan kolon, rektum, pankreas, meme, akciğer ve yumurtalık kanserinde önemli bir erken teşhis indikatörü görevi gören karsinoembriyonik antijen glikoproteininin (CEA) düşük konsantrasyonlarda analizine yönelik aptamer esaslı tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Çalışmada hazırlanan sensör platformları üzerine CEA'ya karşı afinitesi yüksek aptamerler bağlanarak, elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS, impedimetri), elipsometri ve kuartz kristal mikrobals teknikleriyle analiz yöntemleri geliştirilmiştir.

1.1. Karsinoembriyonik Antijen

Kanser, insan sağlığını tehdit eden küresel ölçekli ölümcül bir hastalıktır ve erken teşhisi tedavi bakımından çok önemli bir rol oynar (Hasanzadeh ve ark., 2017). Kanser biyobelirteçleri, kanserin riskini, oluşumunu ve hasta sonuçlarını gösteren karakteristik ölçütlerdir (Wu ve ark., 2020). Bu belirteçlerin tayini ile erken bir aşamada tespit edilebilir ve teşhis konulabilirse tedavi kolaylaşır, hayatta kalma şansı önemli ölçüde artar (Altıntaş ve ark, 2011). Kolon, pankreas, akciğer, yumurtalık, meme ve prostat kanser teşhisi için iyi bilinen biyobelirteçlerden birisi CEA'dır. CEA, kötü huylu tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunur, sağlıklı insanlarda genel olarak bulunmayan ancak özellikle bazı kanser türlerinde, kanser hastası kişinin kanında bulunabilen bir glikoproteindir. (Aldilaijan ve ark., 2023). CEA oldukça kararlı bir moleküldür, tümör belirteci olarak klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. İnsan kanında bulunan CEA seviyesi, birçok kanser tayininde kullanılan bir belirteç olarak onkolojide büyük bir yer edinmektedir. CEA tayini tek başına kanser hastalığı teşhisi için yeterli değildir, kanserden şüphelenilen, özellikle CEA'nın kanda görülebildiği kanser türlerinde destekleyici bir belirteç olarak kullanılabilir (Sürmegözlüer ve Uluçay, 2013). Kanser nüks ve metastaz durumu için kanda ve tümör yüzeyinde bulunması nedeni ile kanda ve kist sıvılarında CEA tayini sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle kanserli tümörlerin alınması ameliyatlarının öncesi ve sonrası CEA tayinleri, cerrahi sonuçlar ile ilgili büyük ölçüde fikir vermektedir. Aynı zamanda kanser tedavi için sıklıkla kullanılan kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerinin öncesi ve sonrası kan analizinde de CEA tayini önemli rol oynamaktadır. (Hasanzadeh ve ark., 2017). CEA'yı tayin etmek için seçici ve kararlı bir yöntem geliştirmek erken tedavi ve başarı şansı için oldukça önemlidir.

1.1.1. Karsinoembriyonik antijen tayinleri

Biyolojik moleküllerin klasik yöntemlerle analizleri, tam teşekküllü bir laboratuvar isteyen, maliyeti yüksek ve zaman alıcı tekniklerden oluşmaktadır. Bunun yerine zaman bakımından çok daha hızlı ve maliyet bakımından daha uygun bütçeli analizlere imkân sağlayan biyoafinite esasına dayalı çeşitli biyosensörler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu sensörlerde, hız ve uygun bütçeli analize imkân tanınmasının yanı sıra, güvenilir bir analitik hassasiyete sahip olma beklentisi vardır. Bu amaçla literatürde optik, piezoelektrik, elektrokimyasal ve spektroskopik tekniklerle analiz yöntemleri geliştirilmektedir (Parihar ve ark., 2023). Bu durum CEA tayini için de geçerlidir. Optik analiz yöntemleri, biyokimyasal ve çevresel analitleri tespit etmek açısından daha hızlı ve basit yöntemler olduğu için günümüzde daha çok tercih edilen yöntem olarak yer almaktadır. Elektrokimyasal tayin yöntemleri ise oldukça yüksek hassasiyete sahip olduğu için, boyutlarının küçük ve maliyetlerinin az olmasından dolayı en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu tekniklerin gelişmesiyle birlikte kanda CEA tespiti için birçok yöntem geliştirilmiştir. Genellikle antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen araması yapılabilen enzime bağlı immünoassay yöntemi (ELİSA) (Crulhas ve ark., 2021; Tang ve ark., 2008; Rosa ve Kumakura, 1995), radyometrik sensör (Nicholson ve ark., 2015; Szturmowicz ve ark., 1995), florometrik (Qiu ve ark., 2017), piezoelektrik (Shen ve ark., 2005), yüzey plazmon rezonans (Wu ve ark., 2020), yüzey akustik dalga (SAW) (Jandas ve ark., 2020) ve elektrokimyasal (Guo ve Feng, 2022; Cai ve ark., 2012) yöntemler ile CEA tayini yapılmaktadır (Wu ve ark., 2020).

1.1.2. Aptamer esaslı karsinoembriyonik antijen tayinleri

Aptamer, rastgele seçilmiş tek sarmallı DNA veya RNA oligonükleotitlerdir ve yaklaşık 1994 yıllarında çeşitli analitler için çeşitli aptamerler geliştirilmeye başlanmıştır (Xiang ve ark., 2020; Ma ve ark., 2018). Aptamerler, geleneksel antikor tabanlı yöntemlere göre birçok avantaj sunar. Örneğin, aptamerler daha hızlı ve daha kolay üretilir, daha düşük maliyetlidir ve daha uzun raf ömrüne sahip olabilir (Khang ve ark., 2017). Aptamerler, analitik seçicilik ve duyarlılık için geliştirilir ve sensör çalışmaları için kullanılır. (Thiviyanathan ve Gorenstein, 2012; Song ve ark., 2012). Böylece herhangi bir analitik etiket gerektirmeden (label free) direk tayinlerde kullanılabilir (de Melo ve ark., 2020; Poksinski ve Arwin, 2004; Garcia-Caurel, 2013; Üstündağ ve ark., 2011).

Bununla birlikte bazı dezavantajları da vardır; aptamerlerin kullanımı henüz geleneksel yöntemler kadar yaygın değildir bu nedenle daha fazla araştırma ve doğrulama gerektirir.

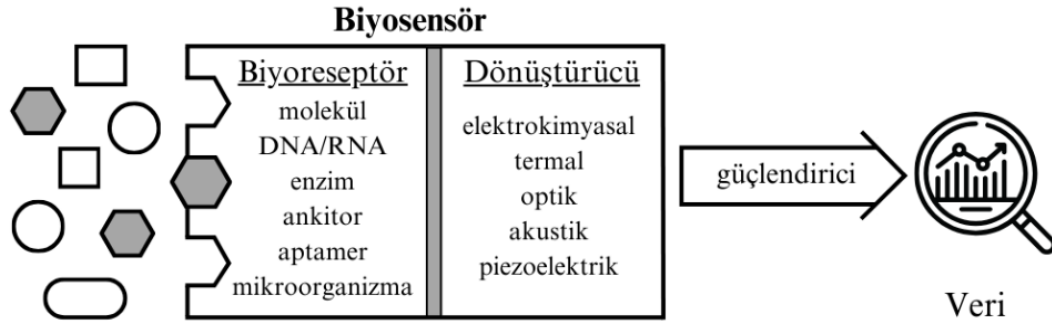
1.2. Biyosensörler

Biyosensörler, biyolojik esaslı tanı elemanı kullanan sensörlerdir. Sensör mekanizmasıyla analiz sağlayan, algıladığı biyolojik cevapları elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlardır. Analizi yapılması gereken maddelerin sıvı veya gaz ortamda hem nicel hem nitel tayinini yapabilmektedir. Biyosensörler fizik, kimya, biyoloji, medikal alanların multidisipliner çalışması ile geliştirilen yapılardır. En yaygın tıp alanında olmak üzere, savunma, mühendislik, eczacılık, tarım, gıda alanında kullanılabilmektedir (Campanella ve Tomassetti, 2019; Blum ve Coulet, 1991). Biyosensör kullanımının en büyük avantajı eş zamanlı cevap verebilmesi ve maddeye özgü bir duyarlılığa sahip olmasıdır. Sıcaklık ve pH gibi ortam koşullarına karşı duyarlı olması ise sensörün ömrünü kısaltmaktadır ve bu yüzden yöntemin dezavantajlı olduğu durumlar ortaya çıkmaktadır (Ustabaş, 2010).

Biyosensörlerin tercih edilmesi ve yaygınlaşması, seçiciliğinin yüksek ve özgün olması, tekrarlanabilirliği, hızlı yanıt süresi, taşınabilirliği, ucuzluğu, tasarımı kolay olması, kararlılığı ve duyarlılığının yüksek olması gibi özelliklerinden meydana gelmektedir (Bakay, 2019).

Biyosensörler iki temel kısımdan oluşurlar. Bunlar, biyoalgılama yapan reseptör kısmı ve transdüserden oluşur. Genellikle biyoalgılama kısmı, enzimler, antikorlar, DNA tabanlı oligonükleotidler ve aptamerlerden oluşur. Algılanan materyalin analitik veriye dönüştürülmesini transdüserler sağlar. Genellikle elektrokimyasal sistemler, kromatografi, spektroskopi, optik, piezoelektrik, termal ve manyetik cihazlar transdüser olarak örneklendirilebilir (Tüylek, 2021). Daha detaylı olarak, kırılma indisine bağlı optik sistemler, ışık absorpsiyonu ve termal özelliğın bir arada kullanıldığı optotermal sistemler, termal sistemler, bir yüzeye tutunan analit miktarını ölçen kütle hassasiyetli sensörler, kütle değişimini frekans değişimi olarak algılayan piezoelektrik sistemler, yüzeyde analitin tutunması ile meydana gelen akustik dalğanın yayılma hızındaki değişime dayalı sensörler, elektroaktif bir analitin ölçülmesine dayalı elektrokimyasal sistemler, elektriksel sistemler, metal oksit ve organik esaslı yarı iletken sistemler, elektrolitik iletkenliğe dayalı sistemler, manyetik akı değişimine dayalı sistemler, paramanyetik

değişimlere bağlı manyetik sistemler ve radyasyon esaslı sistemler dönüştürücü olarak kullanılmaktadır (Ziğal, 2012).



Şekil 1.3. Biyosensörlerin genel yapısı

1.2.1. Biyosensörlerin kullanım alanları

Biyosensörler kullanımı oldukça yaygınlaşan multidisipliner çalışmalarla birçok alanda analiz imkânı sağlamaktadır. Bu sensörün ilk kullanımı ise kanda bulunan glikoz seviyesinin ölçümü için tasarlanması ile başlamıştır. Sonrasında kullanım alanları gittikçe yaygınlaşmış ve gelişmiştir. Tıp alanında, biyobelirteç tayini, hormon, enzim, bakteri, virüs, glikoz vb. gibi moleküllerin teşhisi ve tayini için kullanılmaktadır (Turner ve ark., 1987). X-ışınları gibi zararlı ışınlardan korumaya yönelik çalışmalarda, DNA analizlerinde, ilaç-DNA etkileşimlerinde, ilaç analizlerinde, ilaç etkileşimlerinin belirlenmesinde, çevre alanında hava, toprak ve su analizlerinde, çevre kirliliği incelemesinde, toksik madde analizinde savunma alanında ise biyoreaktör kontrol ve analitik çalışmalarında kullanılmaktadır. (Bakay, 2019).

1.3. Tez Çalışmasında Kullanılan Teknikler

Tez çalışmasında kuartz kristal mikrobals (QCM) ve yüzey plazmon rezonans ile güçlendirilmiş içten tam yansımali elipsometri (SPRe-TIRE) sensör teknikleri ile CEA için analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Dönüşümlü voltametri (CV) ve Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) yöntemleri karakterizasyon çalışmalarında yardımcı teknikler olarak kullanılmıştır.

1.3.1. Kuartz kristal mikrobals (QCM)

Bir kuvvet uygulandığında elektrik enerjisi, bir elektrik potansiyeli uygulandığında ise fiziksel boyutlarda değişim gösteren maddelere piezoelektrik malzeme adı verilir. QCM kütle algılayıcı bir teknik olup piezoelektrik özelliktedir. Piezoelektrik malzemelere uygulanan mekanik basınçla, malzemenin elektrik alan ya da

potansiyelindeki bir potansiyelinde bir fark meydana gelir. İlk piezoelektrik kristal, 1880 yılında Jaques ve Pierre Curie tarafından keşfedilmiştir. Jaques ve Curie, bazı kristal malzemelere dışarıdan bir mekanik basınç uygulandığında bu basıncın büyüklüğüne bağlı bir potansiyel farkı oluştuğunu öne sürmüşlerdir. Sonraki yıllarda yapılan araştırmalarla, bu potansiyel farkın kristal yüzeyine uygulanan mekanik etkinin doğrudan bir sonucu değil; bu mekanik etkiye bağlı olarak meydana gelen gerilimden dolayı kristal yapıdaki boyut değişimleri ile ilgili olduğu anlaşılmıştır. Mekanik etkiyle birlikte kristal yüzeyde titreşim meydana gelmekte ve yapıdaki atomlar deforme forma geçip tekrar eski halini almaktadır. Atomların bu birim zamandaki konum değişimi ve tekrar eski haline dönmesi olayına osilasyon (salınım) frekansı adı verilir. QCM sensörler, kütle değişimli mekanik etki değişimlerine bağlı olduğundan kütleye bağlı değişimleri izlemekte yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Her kütle değişimiyle birlikte salınım frekans farkı (Δf) ortaya çıkmaktadır. Sensörlerde sıcaklıktan ve nemden kaynaklı frekans farkında etkilenmenin en az gözlemlendiği kristal kesim açısına A-T açısı adı verilir. Buna göre kesilmiş kristallere A-T kesimli kristal adı verilir.

Kuartz kristalin salınım frekans değişimi (Δf) ile kütle değişimleri (Δm) arasındaki ilişkiyi Sauerbrey (1959), “Sauerbrey Eşitliği” ile ifade etmiştir;

$$\Delta f = - \frac{2 \Delta m f_o^2}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}} = - \frac{2 f_o^2}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}} \cdot \Delta m \quad (1.1)$$

Bu eşitlikte; f_o , kristalin temel salınım frekansına (Hz); Δf , ölçülen frekans farkına (Hz); Δm , birim alandaki kütle değişimine (g/cm^3); ρ_q , kristalin yoğunluğunu (2.648 g/cm^3); μ_q ise A-T kesim kristal için kuvarsın kesim katsayısına ($2,947 \times 10^{11} \text{ g/cm.s}^2$) karşılık gelir (Sauerbrey, 1959; Garcia-Jareno, 2000).

İlk QCM çalışmaları katı faz ölçümler için kullanılmış fakat osilatör (uygun salınım) devrelerinin geliştirilmesiyle birlikte sıvı fazda da ölçümler yapılmıştır. 1997 yılında Kanazawa ve Gordon tarafından (Kanazawa ve ark., 1997) sıvının yoğunluğu ($\rho_1 - \rho_L$), viskozitesi (η) ve kuvars kristal rezonatörün frekansı arasındaki ilişkiyi veren eşitlik geliştirilmiştir. Buna göre eşitlik;

$$\Delta f = - f_o^{3/2} \sqrt{\frac{\rho_1 \eta_1}{\pi \sqrt{\rho_q \mu_q}}} \quad (1.2)$$

şeklindedir. Sistem iki tabakalı ise frekans değişimleri, her değişim için toplanır.

$$\Delta f = \Delta f_m + \Delta f_1 = -f_o^2 \left(\frac{\Delta m s}{F_q p_q A_{el}} + \sqrt{\frac{\rho_1 \eta_1}{f_o \pi \rho_q \mu_q}} \right) \quad (1.3)$$

Burada; f_o (Hz), rezonans frekansı; F_q (Hz.cm²/ng), kristalin frekans sabiti ($F_q = \frac{1}{4} f_o \cdot d_q$); d_q (mm), kristal kalınlığı; A_{el} (mm²), kristal rezonatörün elektrot boyutu; P_q (g/cm³), kristalin yoğunluğu; η_1 (kg/m.s), sıvının viskozitesi; ρ_1 (g/cm³), sıvının yoğunluğu olarak ifade edilir.

QCM çalışmalarında analitik etikete ihtiyaç duyulmamaktadır. Ölçüm için şartların sağlanması gerekmektedir. Örneğin, Yüzey alanını artırmak için veya tanı elemanını yüzeye bağlamak için kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (silanlama, tiyolleme, amitleşme, esterleşme) veya elektrokimyasal modifikasyon gibi etkileşimlere ihtiyaç vardır. QCM sensörlerinin kullanım kolaylığı, cihaz ve sarflarının pahalı olmaması avantajları arasındadır. Ayrıca QCM kristalleri defalarca kullanılabilir. Ayrıca QCM kristalleri defalarca kullanılabilir.



Şekil 1.4. Kuartz kristal mikrobals cihazı

Bu çalışmada, CEA analizinde hassas bir teknik olan QCM kullanılmıştır. Bir aptasensör platformu oluşturmak amacı ile daha kompakt ve daha pürüzsüz bir yüzey olması için tiyol köprülü bir nanofilm diazonyum tuzunun elektrokimyasal indirgenmesi yoluyla QCM kristaline kovalent olarak bağlanmıştır (Nigmatullin ve ark., 2010). Elipsometri ve CV teknikleri ile karakterize edilen bu yüzey modifikasyonu ile tek

tabakaya oldukça benzeyen bir film oluşturulmuştur (Üstündağ ve ark., 2009; Turan ve ark., 2008). Altın nanoparçacıklar (AuNP) bu yapıya bağlanmış ve iki farklı aptamer bu nanoparçacıklara immobilize edilerek CEA tayini gerçekleştirilmiştir. CEA aptamerleri ve CEA arasındaki etkileşim, kinetik analiz ve analitik performans özelliklerini elde etmek için gerçek zamanlı olarak izlenmiştir. Bu çalışma, QCM tabanlı CEA aptasensörlerinin geliştirilmesi için ilk çalışma niteliğindedir.

1.3.2. Yüzey plazmon rezonans ile güçlendirilmiş içten tam yansımali elipsometri (SPRe-TIRE)

1902 yılında Wood tarafından yapılan bir çalışmada polarize ışığın bir kırınım düzenleyici yüzeyinden bir aynaya doğru yansıtıldığında karanlık ve aydınlık bantlar görülmüştür (Wood, 1902; Kumar ve ark., 2023). Rayleigh ve Fano bu teoremin gelişimine katkıda bulunmuşlar (Shaimanov, 2018). Bu kırınım desenleri yüzey plazmonunun uyarılmasında kullanılabilir. Bununla birlikte eşzamanlı Otto, Kretschmann ve Raether yüzey plazmon rezonans (SPR) olayının kesin tanımını yapmışlardır (Otto, 1968; Kretschmann ve Raether, 1968). 1980'lerde ise SPR temelli ilk sensör Liedberg ve arkadaşları tarafından hazırlanmıştır (Liedberg ve ark., 1983). SPR, metal yüzeye yakın filmlerin kırılma indisindeki değişimi ölçerek basit ve doğrudan ölçüm yapan bir tekniktir (Yusmawati ve ark., 2007). Geçirgen olan ve farklı kırılma indislerine sahip iki ortam arasında çözelti-prizma nano boyutlu altın veya gümüş kullanmak suretiyle bu yüzeylerde meydana gelen değişimler optik olarak incelenir (Divya ve ark., 2022). Polarize ışık, kritik açıyla cam prizma gibi kırılma indisi yüksek bir ortama girdiğinde toplam iç yansımaya uğrar. Bu esnada sönümlü (evanescent) adı verilen elektromanyetik dalgalar meydana gelir ve metal filmin içine doğru ilerler (Goswami ve ark., 2015). Böylece belirli bir kırılma açısında bu dalgalar, metal yüzeydeki serbest elektronlar ile eşleşerek ve rezonansa girerek yüzey plazmon rezonansını oluşturur (Capelli ve ark., 2023). Bu plazmon rezonansı malzemedeki küçük değişimlerde bile (optik dalga boyunun 1/1000'i hassasiyette) optik ölçümlere olanak sağlar (Barnes ve Sambles, 1987).

Bir sensörün performansını etkileyen en önemli unsurlardan birisi şüphesiz yüzey etkileşimleridir. Elipsometri yöntemi de yüzey etkileşimlerini inceleyen sistemlerden biridir. Bir elipsometri sisteminde, lineer olarak polarize edilmiş bir ışığın belirli koşullarda bir yüzeyden yansımaları ile elde edilen eliptik olarak polarizlenmiş lazer ışınları kullanılır. Sistemdeki optik bileşenler yansıma sonucu eliptikliğin nasıl değiştiğini belirler ve bu durumda yüzey filmleri için optik sabitler, filmlerin kalınlığı vb.

parametreler belirlenebilir (Arwin, 2000). Kırınım indisi daha yüksek olan bir ortamdan daha düşük bir ortama gelen bu ışınlar, ara yüzeyde içten tam yansıma meydana getirir ve teknik, TIRE ismini alır (Poksinski ve Arwin, 2003). SPR tekniği gibi elipsometri tekniği de yüksek hassasiyete sahip olan sistemlerden birisidir. Güçlendirilmiş içten tam yansımali elipsometri (TIRE) ölçümüne dayalı sistemler, bir plazmon rezonans ile desteklenecekse yüzeyin, plazmon oluşumuna müsaade edecek şekilde tasarlanması gerekir. Bunun için prizmanın alt kısmı ile analit çözeltisi arasındaki cam slayt üzerine geçirgen bir metal nanofilm kaplanır. Eğer metal film içeren ve plazmon oluşumuna müsait bir elipsometri uygulaması yapılırsa, yeterince hassas ölçümlere olanak tanıyan klasik elipsometrik ölçümlerden çok daha hassas bir teknik elde edilir. Tekniğin ismi SPRe-TIRE olarak isimlendirilir (Üstündağ ve ark., 2011). Sensörler çalışmaları için uygun yüzeyler oluşturulduğunda bu yöntem ile sensör parametrelerinin yanı sıra yüzey/analit arasındaki afinitenin kinetiği de incelenebilir (Üstündağ ve ark., 2011).

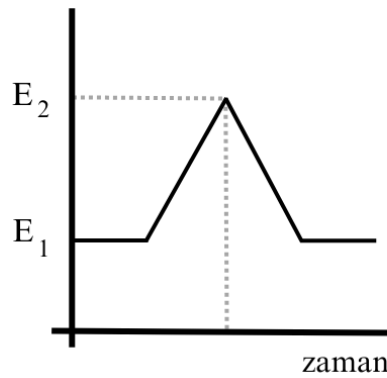
Elipsometride iki farklı elipsometrik fonksiyon olan Δ (Delta) ve Ψ (Psi) ile biyoafinite sistemlerinin analizi gerçekleştirilmektedir (Arwin, 2000). Yüzeyden veri olarak elde edilen bu elipsometrik fonksiyonlar, yüzey özelliklerini $\pm 0,001$ hassasiyetle tanımlayabilmektedir (Johs ve Herzinger, 2008). Çok tercih edilen fonksiyonlardan biri olan ve faz kayması olarak da adlandırılan Δ , yüzeyde biriken malzemelerin dielektrik fonksiyonlarına duyarlıdır. Ψ ise polarize monokromatik ışığın şiddetindeki değişimlere bağlı bir dielektrik fonksiyonudur. (Tolmachev ve ark., 2022). Her iki elipsometrik değişken, SPR destekli TIRE uygulamalarında ara yüzdeki değişimlere bağlıdır (Arwin ve ark., 2008). Yukarıda anlatıldığı gibi, sensör sinyalini TIRE aracılığıyla geliştirmek için, içten tam yansımayı artıran bir Kretschmann konfigürasyonu ve plazmon rezonans oluşumu için ince bir altın katman kullanılmaktadır (Nabok ve Tsargorodskaya, 2008). Rezonans sağlandığında, yüzey-analit etkileşimiyle birlikte faz kayması daha duyarlı hale gelir. Bu plazmon rezonans koşulları, AuNP'ların tercih edilmesiyle daha da etkinleştirilebilir (Çağlayan, 2018).

Bu tez çalışmasıyla birlikte tampon çözeltide ve gerçek numune olarak insan kan serumunda CEA'yı belirlemek için **ilk defa** bir SPRe-TIRE uygulaması gerçekleştirilmiştir. CEA analitine karşı yüzeydeki afiniteyi sağlamak için aptamerlerden yararlanılmıştır. Bu amaçla, CEA'ya karşı literatürde rapor edilmiş iki farklı afiniteye ve sekanslara sahip aptamer kullanılmıştır. Bu aptamerlerin afinitesi $K_d \approx 37,8$ nM (de Melo ve ark., 2020) ve 3,9 nM (Wang ve ark., 2019) olarak rapor edilmiştir. Sensör yüzeyi

olarak; Cr ve Au film kaplanmış SF10 cam slayt üzerinde 4-merkaptobenzendiazonyum tuzunun (4MB-DAS) elektrokimyasal indirgenmesi ile 4-merkaptofenil (4MF) filmleri oluşturulmuştur. Yüzeye, plazmon rezonansı artırmak amacıyla ve bağlaç olması için AuNP'lar bağlanmıştır.

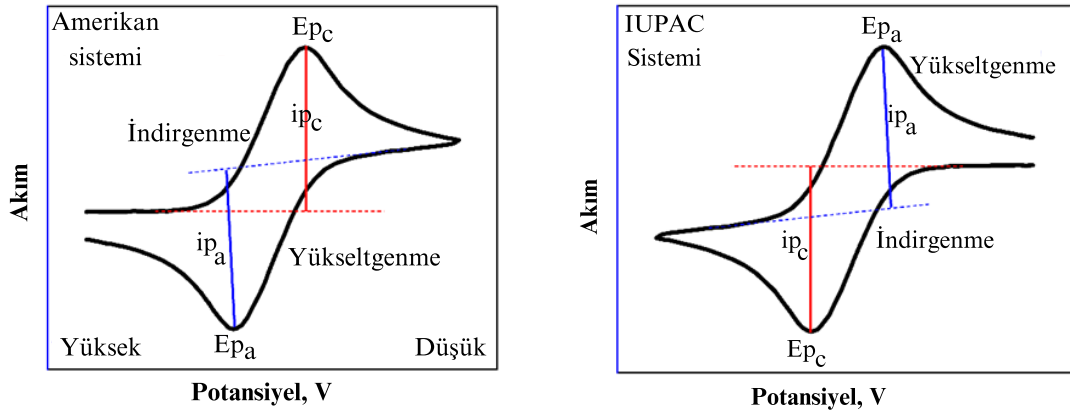
1.3.3. Dönüşümlü voltametri (CV)

Dönüşümlü voltametri, asılı cıva elektrot, klasik bir katı elektrot veya perde baskılı elektrot üzerine uygulanan potansiyelin kontrol edilmesine ve hücreden küçük bir akım geçmesine dayanan elektroanalitik bir yöntemdir (Gosser, 1994). CV, genellikle moleküler türlerin indirgeme ve yükseltgenme (oksidasyon) mekanizmalarını araştırmak için yaygın olarak kullanılan güçlü bir elektrokimyasal tekniktir. CV aynı zamanda kataliz de dahil olmak üzere elektron transferi içeren kimyasal reaksiyonları incelemek için kullanılır (Eisenhart ve Dempsey, 2018). CV'nin temel özelliklerinden birisi, belirli potansiyel aralığında, farklı tarama hızlarında, elektroaktif türün pik seperasyonu ve akımı takip edilerek türün elektrot yüzeyinde adsorpsiyon, difüzyon ve elektron aktarım reaksiyon mekanizması belirlenebilir. Ayrıca katodik veya anodik reaksiyon mekanizması, türün tersinirliği ve kinetik parametreleri de bulunabilir. Şekil 1.5'te görüldüğü üzere belirli bir tarama hızında E_1 potansiyelinden E_2 potansiyeline doğru tarama yapılır, sonra tekrar E_1 potansiyeline geri dönlür. Son potansiyel olarak E_1 yerine başka bir potansiyelde de işlem tamamlanabilir.



Şekil 1.5. Dönüşümlü voltametri de uygulanan potansiyelin zamanla değişimi

Uygulanan potansiyel değerleri arasındaki dönüşümlü voltamogram (akım-potansiyel grafiği) literatürde iki türlü ifade edilebilir. Amerikan ve IUPAC sistemine göre dönüşümlü voltamogramları Şekil 1.6'da verilmiştir.



Şekil 1.6. Dönüşümlü voltamogramların Amerikan ve IUPAC sistemlerindeki gösterimi

Bütün voltametrik tekniklerle yapılan analizler için analitin difüzyon kontrollü elektron aktarımının sağlanıp sağlanmadığını anlamak için CV tekniğiyle tarama hızı çalışmaları yapılır. Randles-Sevcik eşitliğine uyup uymadığı, pik akımı-tarama hızının karekökü grafiğinden kontrol edilir. Randles-Sevcik eşitliği aşağıda verilmiştir (Bard ve Faulkner, 2001).

$$i_p = 0,446nFAC \sqrt{\frac{n F v D_0}{R T}} \quad (1.4)$$

Bu eşitlikte i_p , pik akımı; n , elektron aktarım sayısı, F , Faraday sabiti, v , tarama hızı (V/s); A , elektrot yüzey alanı (cm^2); D_0 , difüzyon katsayısı (cm^2/s) ve C , analitin konsantrasyonudur. Bu eşitliğe göre, bir analitin difüzyon kontrollü elektron aktarımı, i_p - $v^{1/2}$ arasındaki doğrusal grafikten ispatlanır (Eisenhart ve Dempsey, 2018).

1.3.4. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS)

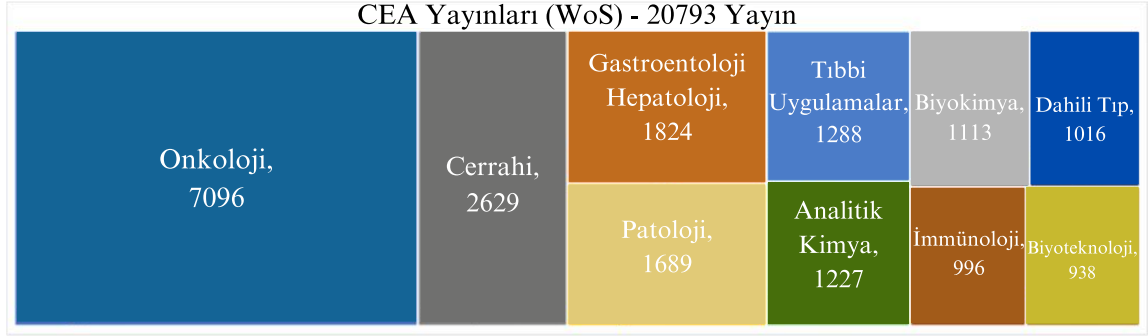
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi, bir sistemdeki elektriksel dirençlerini ve yüzey özelliklerini analiz edebilen önemli bir yöntemdir. 1980’li yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Kütle değişimlerine ve yüzeyde gerçekleşen olaylara karşı duyarlılığı nedeniyle membran-çözeltili ara yüzey karakterizasyonu, korozyon mekanizmalarının tespiti, elektrot yüzeyindeki bağlanmaların ve yüzey karakterizasyonlarının izlenmesi için uygundur. İmpedans spektroskopisi biyosensörlerin hazırlanma aşamalarının ve maddeye özgü etkileşimlerinin incelenmesi için yoğunlukla kullanılmaya başlanmıştır. (Mengüllüoğlu, 2018). EIS sistemine genellikle küçük genlikli potansiyel gönderilir. Bu potansiyelin frekans değişimi ile impedans ölçümü yani tayin yapılır. V_0 ve I_0 maksimum değere ulaştığında potansiyel-zaman ve akım-zaman grafikleri arasında faza kayması

ölçülür. İmpedans karmaşık bir değerdir ve genlik açısındaki farklılıklarla birlikte potansiyel-zaman fonksiyonunu kıyaslayarak faz kaymasını da gösterir. (Yeşiller, 2014).



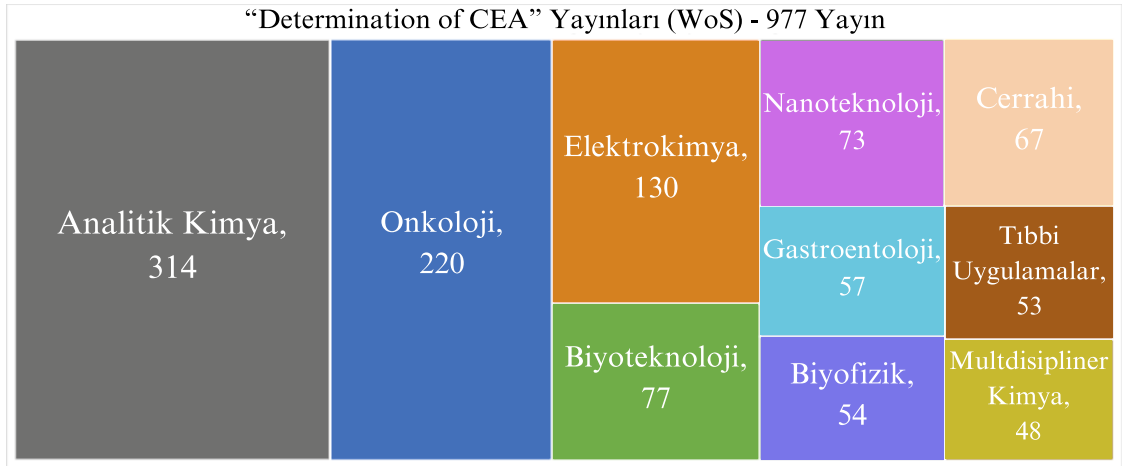
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu bölümde, analiz yöntemi geliştirilecek olan CEA hakkında genel bilgi derlemesinin yanı sıra aptamer esaslı CEA sensörler hakkında literatür bilgisi araştırılmıştır. 9 Aralık 2023 tarihli “Web of Science” (WoS) taramasında, “carcinoembryonic antigen” anahtar kelimesiyle 20.793 çalışmaya rastlanmıştır. Şekil 2.1’de detaylı alanlar yer almaktadır.



Şekil 2.1. WoS taramasında “carcinoembryonic antigen” anahtar kelimesiyle bulunan çalışmaların alanlara dağılımı

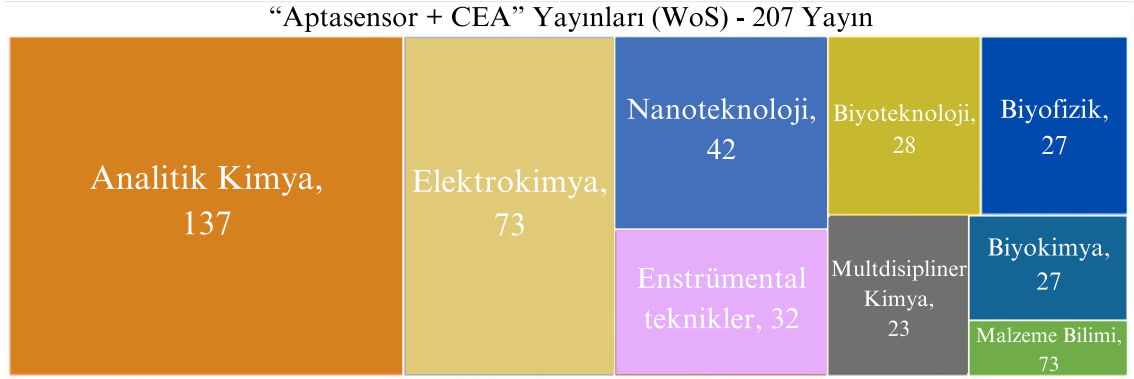
Anahtar kelimeler biraz daha spesifik olarak “determination of carcinoembryonic antigen” şeklinde değiştirildiğinde 977 çalışma tespit edilmiştir. Bu çalışmaların alanlara göre dağılımı Şekil 2.2’de verilmiştir. Bu çalışmalar içinde 59 adet derleme makale (review article) yer almaktadır.



Şekil 2.2. WoS taramasında “determination of carcinoembryonic antigen” anahtar kelimesiyle bulunan çalışmaların alanlara dağılımı

Analitik kimya bu alandaki çalışmaların yaklaşık %32’sini oluştururken, onkoloji çalışmaları yaklaşık %22’sini, elektrokimya çalışmaları yaklaşık %13’ünü, biyoteknoloji çalışmaları yaklaşık %8’ini, nanoteknoloji çalışmaları yaklaşık %7’sini kapsamaktadır.

“Aptasensor + carcinoembryonic antigen” anahtar kelimesiyle 207 eser bulunmuştur. Şekil 2.3’te alanlara dağılımı görülmektedir.



Şekil 2.3. WoS taramasında “Aptasensor + carcinoembryonic antigen” anahtar kelimesiyle bulunan çalışmaların alanlara dağılımı

Tezin temelini oluşturan kuartz kristal mikrobals destekli CEA sensörler konusunu içeren “quartz crystal microbalance + carcinoembryonic antigen” anahtar kelimesiyle 24 adet çalışma bulunmuştur. Ancak aptamer veya aptasensör esaslı bir QCM dokümanına rastlanmamıştır. Bu, tezin orijinallliğini artırmaktadır.

Bir diğer WoS taramasında da yine tezin temelini teşkil eden elipsometrik CEA analizine yönelik sadece bir makale bulunmuştur. Bu makale, bu tez çalışmasından basılmış yayındır (Erkal Aytemur ve ark., 2023). Bu çalışmanın aynı zamanda yüzey plazmon rezonans ile güçlendirilmiş bir elipsometrik çalışma olması da tezin orijinallliği daha da artırmaktadır. Özellikle fizik alanında malzeme karakterizasyonunda kullanılan elipsometrenin sensör çalışmalarında kullanılması son on yıldır yaygınlaşmaya başlamıştır (Li ve ark., 2018). Ülkemizde ise bu alanda birçok orijinal makale ve derleme makaleleri ile Prof. Dr. Mustafa Oğuzhan Çağlayan ve ekibi öncülük etmektedir. (Üstündağ ve ark., 2011; Çağlayan ve ark., 2022; Şahin ve ark., 2023; Ertan ve Çağlayan, 2021; Çağlayan ve Üstündağ, 2020) öncülük etmektedir. Dünyada da sayılı ekipler (Wang ve ark., 2013; Ikeda ve ark., 2021; Chegal ve ark., 2005) elipsometrik sensörler alanında çalışmalar yapmaktadır.

Literatürde farklı kan serumlarında CEA seviyeleri bildirilmiş olmasına rağmen, serumda kritik CEA seviyeleri 5-10 ng/mL'den yüksek olduğunda kanserle ilişkili bir durumda, kanserden şüphelenilmektedir (Hall ve ark., 2019). Bu nedenle, insan kan serumundaki CEA konsantrasyonu, kanser başlangıç tespiti ve dolayısıyla erken teşhis

için büyük önem arz ettiği gibi tekrarlanan bir vakanın erken tespiti için de çok önemlidir (Li ve ark., 2017; Sun ve ark., 2013).

Son yıllarda yapılan çalışmalar da uzun süreli immunoanaliz protokolleri yerine, CEA'nın yüzeyde kolaylıkla tespit edilebileceği çalışmalar ön plana çıkmaya başlamıştır (Wu ve ark., 2020; Ren ve ark., 2019). Aşağıdaki Çizelge 2.1'de genel olarak geliştirilen bazı CEA analiz yöntemlerinin özeti yer almaktadır.

Çizelge 2.1. CEA tayini için geliştirilen yöntemler ve analitik performansları

Teknik	Çalışma Aralığı	LOD, ng/mL	Referans
Elektrokimyasal (Amperometri)	1 – 200 ng/mL	0.5 ng/mL	(Shu ve ark., 2013)
Elektrokimyasal (İmpedimetri)	0.05 – 20 ng/mL	0.023 pg/mL	(Zhao ve ark., 2017)
Elektrokimyasal (Voltametri)	1 – 1000 ng/mL	0.517 ng/mL	(Xiang ve ark., 2017)
Elektrokimyasal (Potensiyometri)	0.01 – 100 ng/mL	7.3 pg/mL	(Chen ve ark., 2021)
Kolorimetri	0 – 120 ng/mL	3 ng/mL	(Luo ve ark., 2015)
SPR	1 – 250 ng/mL	0.3 ng/mL	(Guo ve ark. 2017)
Floresans	0.4 – 100 ng/mL	0.316 ng/mL	(Bao ve ark., 2018)
Kemilüminesans	0 – 200 ng/mL	0.58 ng/mL	(Khang ve ark., 2017)
LC*-tabanlı algılama platformu	0.05 – 50 pg/mL	0.12 pg/mL	(Ren ve Jang, 2019)
SERS*	1.0 – 1000 ng/mL	1.0 ng/mL	(Carneiro ve ark., 2019)
SERS	1 – 50 ng/mL	0.1 ng/mL	(Lin ve ark., 2016)
Floresans immunoanaliz*	0.1 – 200 ng/mL	0.041 ng/mL	(Ly ve ark., 2018)
Elektrokimyasal immunoanaliz	1.0 – 40 ng/mL	0.0158 ng/mL	(Zhao ve ark., 2019)
QCM immunoanaliz	1.0 – 15 ng/mL	0.86 ng/mL	(Liao ve ark., 2016)
QCM immunoanaliz	3.0 – 50 ng/mL	1.5 ng/mL	(Tang ve ark., 2006)
QCM immunoanaliz	0.1 – 100 ng/mL	0.09 ng/mL	(Jandas ve ark., 2020)
QCM immunoanaliz	0.01–100 ng/mL	0.008 ng/mL	(Chi ve ark., 2020)
SPRe-TIRE*	0,01 – 500 ng/mL	0,1 pg/mL	(Erkal Aytemur ve ark., 2023)**
QCM aptasensor	0.1 – 25 ng/mL	0.102 pg/mL	Bu çalışma

*LC: sıvı kromatografisi; SERS: yüzeyde güçlendirilmiş raman saçılması; immunoanaliz: antikor veya antijenlerden yararlanılarak geliştirilen biyokimyasal bir yöntemdir; SPRe-TIRE: Yüzey plazmon rezonans ile güçlendirilmiş içten tam yansımali elipsometri

** Bu tez çalışmasından üretilmiştir.

Xiang ve arkadaşları tarafından (2020) yayımlanan derleme makalede, aptamer esaslı CEA sensörler hakkında detaylı bilgiler verilmiştir. Çalışmada aptamer tabanlı optik CEA biyosensörlerinin “gıda güvenliği, yaşam bilimleri, çevresel kontrol ve tıbbi testler konusunda ilerlemeler kaydettiği belirtilmiştir. Aptamer-CEA etkileşimi sonucu analitle ilişkili olarak optik sinyallerin elde edildiği bu tekniğin oldukça yaygınlaşmaya başladığı yüksek seçicilik ve duyarlılığa sahip olduğu rapor edilmiştir. Optik tekniklerle aptamer esaslı CEA analizlerinin etiketsiz, hızlı ve pratik uygulamalara imkân tanıdığı belirtilmiştir. Bu tekniklerden birisi kolorimetrik biyosensör tekniğidir. Düşük maliyeti ve görsel takip kolaylığı bakımından cazip sensör tekniklerinden biridir.

Damborsky ve arkadaşlarının (2016) yayınladığı derleme makalede ise genelde optik biyosensörlerin özelde ise SPR'nin iyi bir biyolojik tanıma ve algılama yapabilen analitik bir cihaz olduğundan bahsedilmiştir. Optik biyosensörlerin temel amacının diğer biyosensörlerde olduğu gibi enzim, antikor, antijen, reseptör, nükleik asit, hücreler ve dokular dahil olmak üzere birçok biyolojik unsur kullanarak analitin konsantrasyonu ile doğrudan orantılı sinyal üretmek olduğu belirtilmiştir. Biyolojik unsurun analit ile olan etkileşimini tespit etmek için kullanılan SPR sensörlerine ait çalışmaları içeren bir derleme yapılmıştır. SPR'ın fiziki olarak ilk kullanımı 1902 yıllarında gözlenmiştir. Ve 1983 yılında SPR ilk kez biyomolekül etkileşimlerini tespit etmek için kullanılmıştır.

Long ve arkadaşları (2013) aptamerlerin, DNA ve RNA sarmallarından, SELEX yöntemi ile rastgele seçilen tek sarmallı yapılar olduğunu tanımlamıştır. Hedefine seçici olarak bağlanan aptamer; aptamer ve hedef arasındaki etkileşim, yapının uyumluluğu, aromatik halkaların istiflenmesi, hidrojen bağlanması, elektrostatik ve van der Waals etkileşimlerini veya tüm bunların kombinasyonunu içerir. Özgün karakteristik yapısı nedeniyle antikorlara iyi bir alternatiftir ve biyosensör çalışmalarına yeni bir dönem başlatmıştır. Ağır metal, amino asitler, proteinler, peptitler, nükleotitler ve ilaçlar gibi küçük organik ve inorganik bileşikler hedef alan aptamerler üretilebilir. Kolayca sentezlenir, saflaştırma işlemleri kolay ve ucuzdur, antikordan daha kararludur ve bozunmaya karşı daha dirençlidir. Bir ışık kaynağı, bir dedektör, bir transdüksiyon yüzeyi, bir prizma, antijen, antikor, aptamer gibi bir biyolojik tanıma molekülü ve bir akış sisteminden oluşan SPR biyosensörü kullanıldığını ifade etmişlerdir.

Aldewachi ve arkadaşları ise 2017 yılında yaptıkları çalışmalarda, AuNP bağlı aptamerlerin CEA etkileşimlerinin kolorimetrik ölçümleri ile ilgili çalışmalar yapmıştır. Altın Nanopartiküller renkli biyosensörler geliştirilmesi için oldukça uygun bir platforma sahiptir. Boyutlarına, fonksiyonlarına, şekillerine agregasyon durumlarına bağlı olarak farklı renkler gösterebilirler. Nanopartiküllerin bir araya gelmesi veya dağılması ile oluşan renk değişikliklerinden yararlanarak biyosensörler geliştirilmiştir.

Esseghaier ve çalışma arkadaşları 2014 yılında, optik teknik olan yüzey plazmon rezonans (SPR) tekniğini aptasensör tabanlı CEA analizinde kullanılmıştır. SPR tekniğinin oldukça yüksek hassasiyetli olması, etiketsiz ve gerçek zamanlı ölçüme imkân tanınması bu tekniği popüler hale getirmiştir. Karboksi terminalli 30 nm çapında manyetik parçacık süspansiyonu 5 dakika boyunca ultrasonik banyoya konuldu ve pH 5,5'te 10mM potasyum fosfat ve 0,15 M NaCl ile hazırlanan tampon ile 3 kez yıkandı. Yıkandığı

manyetik nano parçacıklar peptit, EDC, NHS ile çalkalanarak oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırıldı. Yine üç kez yıkanarak çiftlenmemiş nanoparçacıklar uzaklaştırıldı. Nanoparçacık blokaj tamponunda 1 saat boyunca inkübasyonu engellendi ve saklama tamponun 4°C’de saklandı. Prostata özgü kanser antijeninin tayin edecek biyosensör geliştirildi. SPR tekniği ile prostat kanserini çok küçük konsantrasyonlarda tespit edilebilmesi sağlandı.

Jeong ve arkadaşları, 2018 yılında yazdıkları makalede CEA tayininde kullanılan aptamer esaslı optik teknik olarak floresans tekniğini ele almıştır. Floresans tekniği, çok yönlülüğe sahip, basit, hassasiyeti yüksek, çoklu analit tespitine imkân veren, numuneye zarar vermeyen tekrarlanabilir bir tekniktir. Floresans sinyallerini nanoboyutlu yüzeylerde çalışılmış ve biyosensör uygulamaları için oldukça verimli olduğu görülmüştür.

Son yıllarda literatürde oldukça fazla yer edinen bir diğer teknik ise aptamer esaslı CEA analiz tekniği olarak elektrokimyasal tekniklerdir. Elektrokimyasal teknikler, enzim, antikor, DNA/RNA, vb. biyomoleküllerin tespitinde oldukça etkin olarak kullanılmaktadır. İmpedimetrik, amperometrik, voltametrik ve potansiyometrik teknikler yaygın olarak tercih edilmektedir (Zhou ve ark., 2017; Shu ve ark., 2013; Xiang ve ark., 2017; Park ve ark., 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

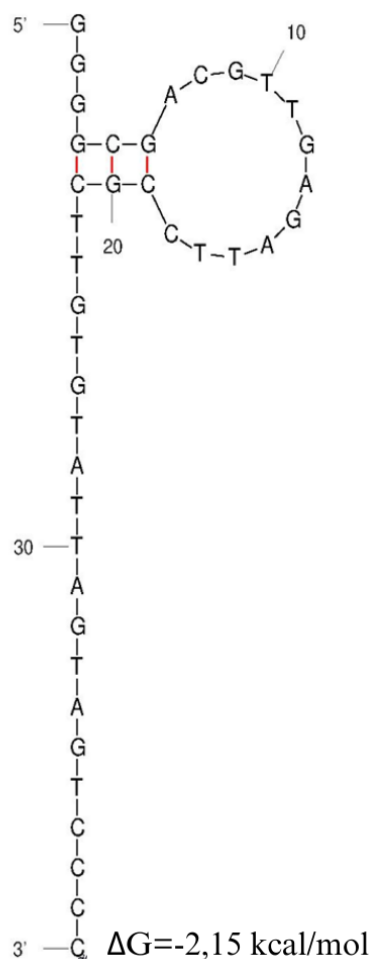
3.1. Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal ve çözücüler yüksek saflıkta Merck (Almanya) ve Sigma-Aldrich (ABD) markadır. Aptamerler, Sentromer (Türkiye)’den temin edilmiştir. Saf su, ultra saf su (UPW) özelliğinde olup Human Power 1⁺, (18,3 MΩcm, G. Kore,) sistemi ile elde edilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler Gamry Referans-300 (ABD) galvanostat-potansiyostat elektrokimyasal ölçüm sistemine bağlı bir C3 hücre standı üzerinde üçlü elektrot sisteminde alınmıştır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl_(doy) ve yardımcı (karşıt) elektrot olarak platin tel kullanılmıştır. Çalışma elektrotu, çalışmanın türüne göre farklı olarak kullanılmıştır. Elipsometrik (Optosense, Türkiye) sensör uygulamalarında altın nanofilm kaplanmış SF-10 cam slayt kullanılırken, QCM (SRS, QCM-200, ABD) ölçümlerinde altın kristal kullanılmıştır. Elektrokimyasal karakterizasyonlarda 1,6 mm çaplı altın elektrot (BASI-MF-2014, USA) tercih edilmiştir. XPS (PHI 5000 Versa Probe, ULVAC-PHI., ABD) ölçümleri altın kaplı cam slayt üzerinde alınmıştır. Elipsometre ile kalınlık ölçümleri ELX-02C/01-R (Almanya) elipsometre cihazı ile altın nanofilmle kaplı SF-10 camı üzerinden elde edilmiştir. Nanoparçacık TEM görüntüsü, JEOL Ltd., (Japonya) ile alınmıştır. SEM görüntüleri ve EDX verileri ise, Nova (NanoSEM-650, Belçika) marka SEM cihazından elde edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan aptamerler aşağıda Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan Anti-CEA1 ve Anti-CEA2 Aptamerleri

Aptamer	Sekanslar	Ayrışma sabitleri (nM)	Referanslar
AntiCEA1	5'-SH-C ₆ H ₁₂ -GGGG CGAC GTTG AGAT TCCG CTTG TGTA TTAG TAGT CCCC-3'	37,8	de Melo ve ark., 2020
AntiCEA2	5'-SH-C ₆ H ₁₂ -ATAC CAGC TTAT TCAA TTGG GGTA GGGG GCGA AGCG ATAC CCTA ATCA GC-3'	3,9	Wang ve ark., 2019
CTRL-Aptamer	5'-HS-(CH ₂) ₆ -CGGG AATT CTGG CTCT GCGA CATG A-3'	-	-

Bu çalışmada kullanılan, AntiCEA1 için (GGGG CGAC GTTG AGAT TCCG CTTG TGTA TTAG TAGT CCCC) “<http://www.unafold.org/>” adresinden sekans bilgileri elde edilmiştir. Şekil 1.1Şekil 3.1’de 0,1 M [Na⁺] iyon konsantrasyonunda ve 25 °C sıcaklıkta tek bir olasılıklı sekonder yapısı verilen AntiCEA1’in serbest enerjisi ΔG =-2.15 kcal/mol’dür (Zuker, 2003).



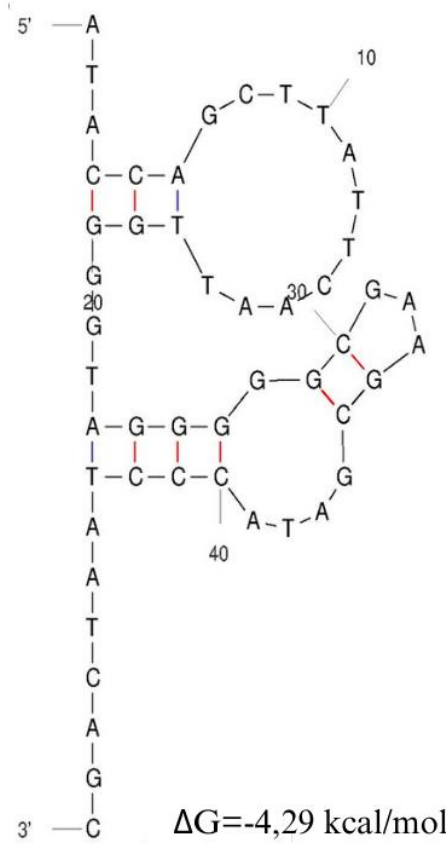
Şekil 3.1. AntiCEA1'in sekonder yapısı

Yukarıda sekonder yapısı verilen antiCEA'nın termodinamik enerji dağılımı değerleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Çizelgede aptamerin yapısal bileşenlerine karşılık sekonder yapı bileşenlerinin serbest enerji değerleri yer almaktadır.

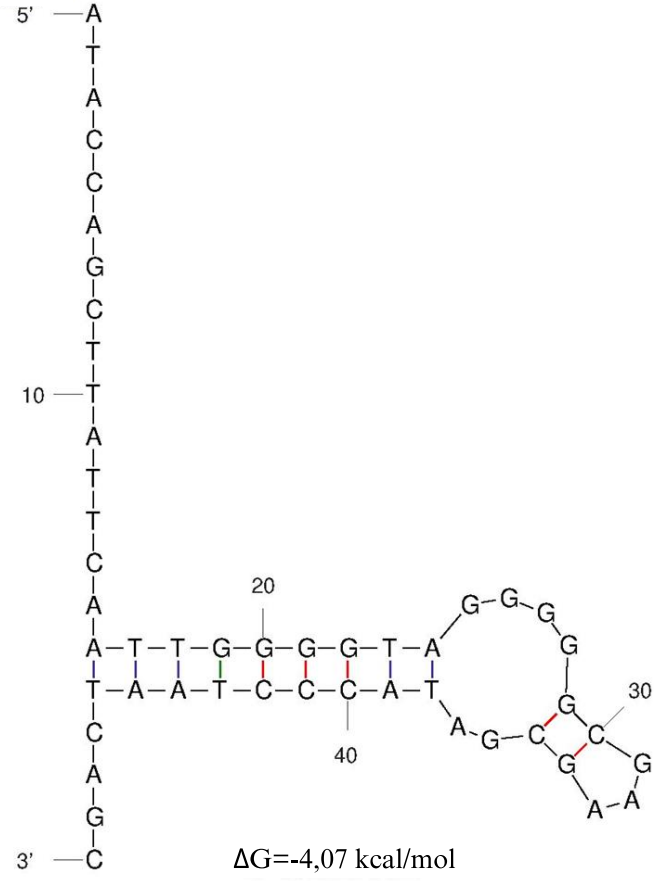
Çizelge 3.2. AntiCEA1'in sekonder yapılarının enerji dağılımı değerleri

Yapısal bileşen	δG	Açıklama
Dış halka	-1,3	22 ss baz & 1 kapama sarmalı
Yığın	-2,28	Dış kapama çifti: G4-C21
Yığın	-2,24	Dış kapama çifti:c5-g20
Sarmal	-4,52	3 baz çift
Sac Tokası	3,50	Kapama çifti: G6-C19

AntiCEA1’de olduğu gibi “<http://www.unafold.org/>” adresinden antiCEA2’nin sekans (ATAC CAGC TTAT TCAA TTGG GGTA GGGG GCGA AGCG ATAC CCTA ATCA GC) bilgileri girilmiş ve Şekil 3.2’de ($\Delta G = -4,29$ kcal/mol için) ve Şekil 3.3’te ($\Delta G = -4,07$ kcal/mol için) 0,1 M [Na⁺] iyon konsantrasyonunda ve 25 °C sıcaklıkta iki olasılıklı sekonder yapılar elde edilmiştir.



Şekil 3.2. AntiCEA2'in sekonder yapısı ($\Delta G = -4,29 \text{ kcal/mol}$)



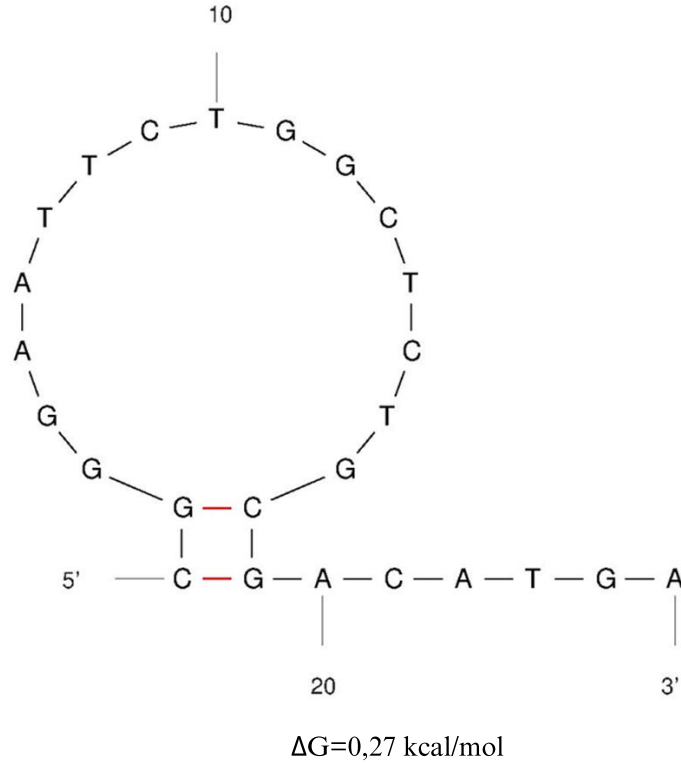
Şekil 3.3. AntiCEA2'in sekonder yapısı ($\Delta G = -4.07$ kcal/mol)

Çizelge 3.3'te her iki sekonder yapının enerji dağılımları, 0,1 M [Na⁺] iyon konsantrasyonunda ve 25 °C sıcaklık için verilmiştir.

Çizelge 3.3. AntiCEA2'in sekonder yapılarının enerji dağılımı değerleri

ΔG , kcal/mol	Yapısal bileşen	δG	Açıklama
-4,29	Dış halka	-2,54	13 ss baz & 2 kapama sarmalı.
	Yığın	-1,28	Dış kapama çifti: A24-T43
	Yığın	-1,83	Dış kapama çifti: G25-C42
	Yığın	-1,83	Dış kapama çifti: G26-C41
	Sarmal	-4,94	4 baz çift
	İç halka	3,77	Dış kapama çifti: G27-C40
	Yığın	-2,28	Dış kapama çifti: G29-C35
	Sarmal	-2,28	2 baz çift
	Saç tokası	1,36	Kapama çifti: C30-G34
	Yığın	-1,83	Dış kapama çifti: C4-G20
	Yığın	-1,47	Dış kapama çifti: C5-G19
	Sarmal	-3,30	3 baz çift
	Saç tokası	3,64	Kapama çifti: A6-T18
-4,07	Dış halka	-0,23	19 ss baz & 1 kapama sarmalı.
	Yığın	-0,87	Dış kapama çifti: A16-T46
	Yığın	-1,01	Dış kapama çifti: T17-A45
	Yığın	0,66	Dış kapama çifti: T18-A44
	Yığın	-0,16	Dış kapama çifti: G19-T43
	Yığın	-1,83	Dış kapama çifti: G20-C42
	Yığın	-1,83	Dış kapama çifti: G21-C41
	Yığın	-1,46	Dış kapama çifti: G22-C40
	Yığın	-0,58	Dış kapama çifti: T23-A39
	Sarmal	-7,08	9 baz çift
	İç halka	4,16	Dış kapama çifti: A24-T38
	Yığın	-2,28	Dış kapama çifti: G29-C35
	Sarmal	-2,28	2 baz çift
	Saç tokası	1,36	Kapama çifti: C30-G34

Çalışmada kullanılan kontrol aptamer için (CTRL-Aptamer) (CGGG AATT CTGG CTCT GCGA CATG A) "<http://www.unafold.org/>" adresinden sekans bilgileri girilerek 0,1 M [Na⁺] iyon konsantrasyonunda ve 25 °C sıcaklıkta beş farklı sekonder yapı elde edilmiştir. Bu beş yapının da serbest enerji değerlerinin pozitif olduğu görülmüştür. En düşük serbest enerji değerine sahip ($\Delta G = 0,27$ kcal/mol'dür) ve diğerlerine göre daha kararlı halinin sekonder yapısı Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. CTRL-Aptamer'in sekonder yapısı ($\Delta G = 0,27 \text{ kcal/mol}$)

Çizelge 3.4'te ise 25 °C sıcaklıkta serbest enerji değeri 0,27 kcal/mol olan kararlı yapının enerji dağılımları sunulmuştur.

Çizelge 3.4. CTRL-Aptamerin sekonder yapısının enerji dağılımı değerleri

Yapısal bileşen	δG	Açıklama
Dış halka	-0,84	6 ss baz & 1 kapama sarmalı.
Yığın	-2,24	Dış kapama çifti: C1-G19
Sarmal	-2,24	2 baz çift
Saç tokası	3,35	Kapama çifti: G2-C18

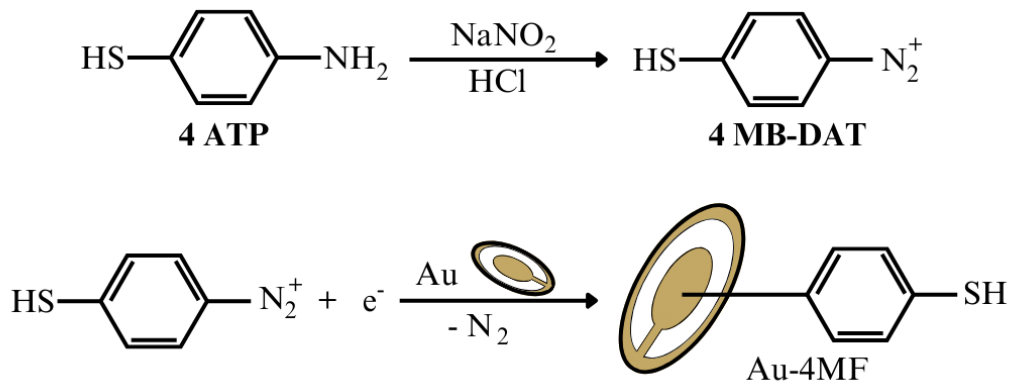
3.2. Kuartz Kristal Mikrobaleans Ölçümü Esaslı Aptasensörlerin Hazırlanması

3.2.1. Elektrokimyasal ve kimyasal nanofilmlerin hazırlanması

Altın kaplı QCM kristali üzerinde CV tekniği kullanılarak diazonyum indirgenmesi yöntemiyle 4-merkaptobenzen diazonyum tuzu (4MB-DAT), 4-merkaptobenzen (4MB) olarak yüzeye kovalent bağ ile bağlanmıştır. 4-aminotiyofenol (4ATF, 4-merkaptanilin, 125,19 g/mol), Morita ve arkadaşlarının (Morita ve ark., 2004; İsbir ve ark., 2006) geliştirdiği sulu ortam sentezi ile diazonyum tuzuna (4-merkaptobenzen diazonyum tuzu, 4MB-DAT) dönüştürülmüştür. Bunun için 100 mg 4ATF alınarak küçük bir beherde 20 mL 0,5 M HCl içerisinde çözülmüştür. Buz banyosu içinde soğutulmuş sıcaklığın 0°C olması sağlanmıştır. 4ATF'nin mol sayısının 4 katı olacak şekilde yaklaşık 221 mg NaNO₂ (69 g/mol), çözülebilecek çok az miktarda saf su

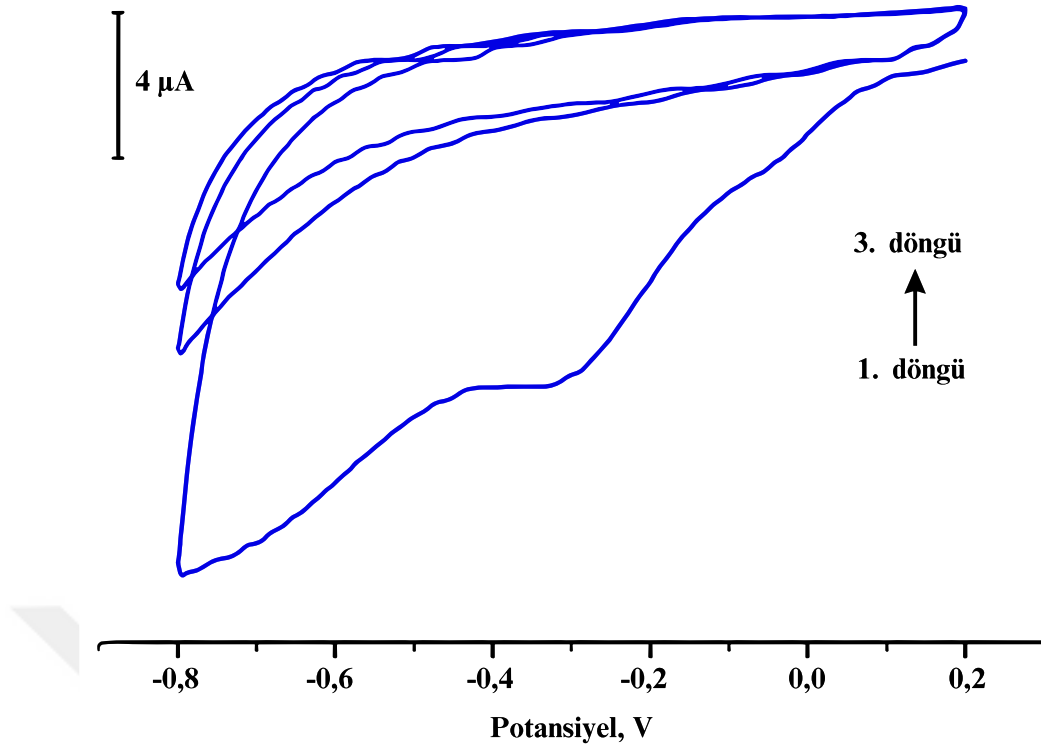
ile (yaklaşık 1-2 mL) çözelti haline dönüştürülerek buz banyosu içerisinde 0°C'ye kadar soğutulması sağlanmıştır. Asidik ortamda hazırlanan 4ATF çözeltisi içerisine damla damla NaNO₂ çözeltisi damlatılmış ve bir manyetik karıştırıcı üzerinde hızla karıştırılmıştır (400 rpm). Gaz çıkışı tamamlana kadar karıştırma işlemine devam edilmiştir. Karışımın sıcaklığının 4°C'yi geçmemesi için gerektiğinde diazonyum çözeltisi (4MB-DAT) buz banyosunda bir süre bekletilmiştir. Hazırlanan çözeltinin, buzdolabının derin dondurucu kısmında muhafazası sağlanmıştır. Çözeltiler kullanım öncesi oda sıcaklığında bir ultrasonik banyo (Bandelin, Almanya) içerisinde 5 dakika kadar sonike edilmiştir.

QCM sistemine bağlı Au kristal, 4MB-DAT ile elektrokimyasal olarak modifiye edilmiştir. Modifikasyon öncesi kristal NH₃/H₂O₂/Su (1:1:5, v: v:v) çözeltisinde 65 °C'de 1 dakika kaynatılarak temizlenmiştir. QCM sistemine bağlı bulunan Au kristal elektrotu, aynı zamanda üçlü elektrot sistemine çalışma elektrotu olarak bağlanmıştır. Referans elektrot olarak Ag/AgCl/KCl(doy), karşıt elektrot olarak ise Pt tel kullanılmıştır. Elektrokimyasal modifikasyon ölçümleri Referans-300 (Gamry, ABD) elektroanalizör sistemi ile alınmıştır. Şekil 3.5'te, 4ATF'den elde edilen diazonyum tuzu (4MB-DAT) ve diazonyum tuzunun elektrokimyasal indirgenmeyle 4MF'in QCM kristaline bağlanması şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.5. 4ATF'nin diazolanarak 4MB-DAT'a dönüştürülmesi ve diazonyum tuzu indirgenmesiyle Au-4MF yüzeyinin hazırlanması

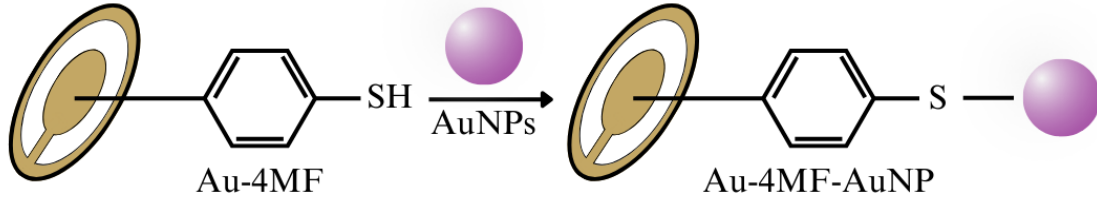
Şekil 3.6'da 4MB-DAT'ın Au kristal elektrot üzerindeki 3 döngülük dönüşümlü voltamogramı görülmektedir. Elde edilen nanofilm Au-4MF (4-merkaptofenil modifiye edilmiş altın yüzey) olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 3.6. 4MB filminin elektrokimyasal olarak Au kristal yüzeyinde elde edilmesinin şematik gösterimi ve 4MB-DAT'unun Au kristal elektrot üzerine dönüşümlü voltametri ile üç döngü modifikasyon voltamogramı (Referans elektrot: Ag/AgCl/KCl_{doy.}; Tarama hızı: 200 mV/s).

Elde edilen Au-4MF yüzeyi üzerine altın nanoparçacıklar (AuNPs) bağlanabilmesi için sitrat indirgenmesi yöntemiyle (Turkevich & Frens yöntemi) kolloidal olarak AuNPs sentezlenmiştir (Frens ve ark., 1973; Turkevich ve ark., 1951). Bir balon içerisine 150 mL saf suda çözünmüş, konsantrasyonu 2,2 mM olacak şekilde trisodyum sitrat (Na₃cit) konduktan sonra ortalama 90°C'ye kadar ısıtılarak yaklaşık 400-500 rpm'de uzun süre karıştırılmıştır. Şiddetli karıştırma işlemi devam ederken üzerine 1 mL, 25 mM HAuCl₄ damla damla eklenmeye başlanmıştır. Kaynama sıcaklığına yakın renk bordo-kırmızıya döndüğünde musluk suyu ile balonun dışı hızla soğutulmuştur. Böylece nanoparçacıkların çekirdeklerinin daha fazla büyümesinin önüne geçilmiştir. Elde edilen AuNPs kolloidal çözeltisi 200 nm'lik filtreden geçirildikten sonra 2-3 mL'lik ependorf kaplara alınarak 20.000 rpm'de 10°C'de santrifüj (Hermle Z36-HK, Almanya) edilmiştir. Elde edilen bordo çökelekler 2 defa saf su ile (UPW) ve 2 defa etanol ile yıkanarak aynı şartlarda santrifüj edilmiştir. Çökelek halindeki AuNPs'lar 100 mL etanol çözeltisine alınarak sonike edildikten sonra buzdolabında saklanmıştır. Stok nanoparçacık çözeltisi yaklaşık 10 dakika sonikatör içinde sonike edildikten sonra 10 mL'si alınarak Au/4MB kristalinin bulunduğu hücre içine eklenmiştir. Dört saat beklenerek kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (SAM) modifikasyonu ile AuNPs'ın,

Au-4MF yüzeyindeki tiyol (-SH) grubuna bağlanması sağlanmıştır (Güzel ve ark., 2010). Elde edilen yüzey, Au-4MF-AuNP olarak kısaltılmış ve Şekil 3.7’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Au-4MF-AuNP yüzeyinin şematik olarak hazırlanışı

AuNP ile modifikasyonun ardından, 5'-ucunda SH ile modifiye edilmiş aptamerler her bir QCM kristaline immobilize edilmiştir. Bu amaçla, Au-4MF-AuNP yüzeylerine 1 μM antiCEA1 ve antiCEA2'nin PBS (pH=7,4) içindeki çözeltileri peristaltik pompa kullanılarak dakikada 20 μL akış hızında gönderilmiş ve 30 dk'da yüzeylerin modifiye olması sağlanmıştır. Aptamer modifiye edilen yüzeyler antiCEA1 ve antiCEA2 platformları olarak isimlendirilmiştir.

3.2.2. Modifiye yüzeylerin karakterizasyonu

Elde edilen altın nanoparçacıkların karakterizasyonu, ultraviyole-görünür bölge (uv-vis) spektrofotometresi (Shimadzu UV2550, Japonya), taramalı elektron mikroskobu (SEM, Nova, NanoSEM-650, Belçika) ve enerji dağılımlı X-ışını (EDX) aksesuarı kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca altın nanoparçacıkların karakterizasyonu geçirimli elektron mikroskobu (TEM, JEOL Ltd., Tokyo, Japonya) ile gerçekleştirildi. Elektrokimyasal diazonyum tuzu indirgeme yöntemiyle hazırlanan Au-MF nanofilm karakterizasyonu için, her aşamada elipsometrik kalınlık ölçümleri (ELX-02C/01-R Elipsometre, Almanya) kullanıldı. Bu süreçte, 70°'lik açıyla ve 532 nm dalga boyunda monokromatik yeşil lazer ışık kaynağı ile SF10 camı/Cr (3 nm) /Au (32 nm) /organik nanofilm/hava modeline göre Ψ ve Δ değerleri kullanılarak (Üstündağ ve ark., 2009; Turan ve ark., 2008; Üstündağ ve ark., 2011; Erkal ve ark., 2011) yüzey filminin kalınlığı belirlenmiştir.

Ayrıca, Au-MF-AuNP yüzeyinin X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS, PHI 5000-Versa Probe, Φ ULVAC-PHI. Inc., Japonya/ABD) ile karakterizasyonu yapılmıştır. C_{1s} ve S_{2p} dar bölge yüksek çözünürlüklü XPS spektrumları yorumlanmıştır.

Elektrokimyasal karakterizasyon için, bir QCM kristali yerine 1,6 mm çapında BASI-MF-2014 (ABD) altın elektrot kullanılmıştır. 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ redoks probunun altın ve modifiye elektrot yüzeylerindeki davranışları CV ile incelenmiştir.

3.2.3. QCM ile CEA tayin yöntemi uygulamaları

Modifiye QCM kristalleri (Au-4MF-AuNP-AntiCEA1 ve Au-4MF-AuNP-AntiCEA2) üzerine oda sıcaklığında ($24 \pm 1^\circ C$) 20 μL akış hızıyla 0,1; 0,5; 1,0; 5, 10 ve 25 ng/mL konsantrasyonlarında standart CEA çözeltileri (PBS içinde, pH=7,4) gönderilerek kalibrasyon çalışmaları yapılmıştır. Aksi belirtilmedikçe, ölçümler ve analizler analitik koşulları sağlamak için en az üç kez gerçekleştirilmiş ve ilgili sonuçlar bu tekrarların aritmetik ortalaması ve standart sapması ($\pm \sigma$) olarak ifade edilmiştir. QCM kütle değişimi (Δm), zamana karşı kaydedilmiştir. Elde edilen QCM sensorgramlarından yola çıkarak, tek bir bağlanma kinetiği modeli kullanılarak karmaşık oluşum kinetiği için analiz edilmiş ve QCM yüzeyindeki aptamerin afinitesi (K_D) belirlenmiştir. Ayrıca, denge durumundaki Δm değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Kontrol aptamerine (CTRL-aptamer) non-spesifik bağlanmayı değerlendirmek için tüm prosedürler benzer şekilde uygulanmıştır. QCM sensör yöntemlerinin doğruluğu ve kesinliği, standart CEA analitleri (0,5 ve 10 ng/mL) için geliştirilen yöntem koşullarında, aynı gün içinde (gün içi) ve ardışık 5 gün boyunca (günler arası) belirlenmiştir. Girişim testleri, sensöre sırasıyla CA125, VGF165 ve AFP interferanslarını tek tek ve aynı anda göndererek çalışılmıştır. Yöntemin validasyonu için gerçek numune olarak insan serumu kullanılarak yapılmıştır. CEA standartları serum içine eklenerek sırasıyla 1,0 ve 10 ng/mL spike edilmek suretiyle (eklenerek) daha iyi sonuç veren sensörü için geri kazanım değerleri belirlenmiştir.

3.3. Yüzey Plazmon Rezonans ile Güçlendirilmiş İçten Tam Yansımali Elipsometri (SPRe-TIRE) İçin Aptasensörlerin Hazırlanması

Aşağıda aşama aşama SPRe-TIRE sensör yüzeylerinin hazırlanması, karakterizasyonu ve CEA uygulaması için yöntem geliştirilmesi için yapılan deneyler yer almaktadır (Erkal Aytemur ve ark., 2023).

3.3.1. Cam slaytların altın kaplanması

Cam slaytların altın kaplaması için 2,5 cm x 2,5 cm boyutunda kesilmiş SF10 cam slaytları, üzerindeki organik kirleticilerin ve yağ kalıntılarının temizlenmesi için nitrik asit/su (1:3; v/v) çözeltisi içinde kaynama noktasında 30 dakika tutulmak suretiyle temizlenmiştir. Daha sonra bir plazma sisteminde 30 dakika oksijen plazma ile muamele edilerek yüzeylerin metal kaplamaya hazır hale getirilmesi sağlanmıştır. Sonra kullanılacak slaytlar bir fiziksel buhar biriktirme (PVD, Nanovak, Türkiye) sisteminde sırasıyla 2 nm Cr ve 32 nm Au (532 nm yeşil lazer altında, 63° geliş açısında plazmon rezonansı elde edebilmek için) ile kaplanmıştır (Üstündağ ve ark., 2011). Bu kaplanmış yüzey SF10/Cr/Au olarak kısaltılmıştır.

3.3.2. SF10/Cr/Au yüzeyine merkaptofenil nanofilmlerin modifikasyonu ve karakterizasyon çalışmaları

4-Merkaptobenzen diazonyum tuzu (4MB-DAS), literatürde Morita ve çalışma grubunun geliştirdiği yöntemle sulu ortamda 4-aminotiyofenolün (4ATF, 4-merkaptolanilin, 125.2 g/mol) diazolanması ile sentezlenmiştir (Morita ve ark.,2004). Bunun için 100 mg of 4ATF, 20 mL 0,5 M HCl'de çözülmüş ve manyetik karıştırıcı üzerinde, bir buz banyosu içinde sıcaklığı 0°C'de sabit tutulmuştur. Manyetik karıştırıcının karıştırma hızı 400 rpm'de tutulmuş, çözelti üzerine 0°C'de soğutulmuş, 2 mL saf suda çözülmüş 221 mg NaNO₂ (69 g/mol) çözeltisinden damla damla eklenmiştir. Gaz çıkışı tamamlanana kadar karıştırma işlemi devam etmiş, buz banyosuyla diazonyum çözeltisinin sıcaklığının +4°C'nin üzerine çıkması engellenmiştir.

SF10/Cr/Au slayt çalışma elektrotu olarak hazırlanmış 4MB-DAS çözeltisine daldırılarak Ag/AgCl/KCl_{doy} referans elektrotu ve platin tel yardımcı elektrotu eşliğinde diazonyum tuzunun indirgenerek iletken slayt üzerine kovalent bağlanması sağlanmıştır. Elektrokimyasal modifikasyon ölçümleri Reference-300 elektroanalizör sistemi ile elde edilmiştir. Diazonyum tuzunun indirgenmesiyle oluşan 4MF radikalleri, nanofilm olarak SF10/Cr/Au elektrot üzerine bağlanmış; yüzey, SF10/Cr/Au/4MF olarak isimlendirilmiştir. Nanofilm kaplı modifiye elektrot, CV ve EIS ile karakterize edilmiştir. SF10/Cr/Au/4MF yüzeylerinde C_{1s} ve S_{2p} bağlanma enerjilerine ait XPS spektrumları,

Al-K α radyasyon (1486.6 eV) kaynaklı X-ışını fotoelektron spektrometresi (XPS, PHI 5000-Versa Probe, Φ ULVAC-PHI. Inc., Japonya/ABD) kullanılarak elde edilmiştir.

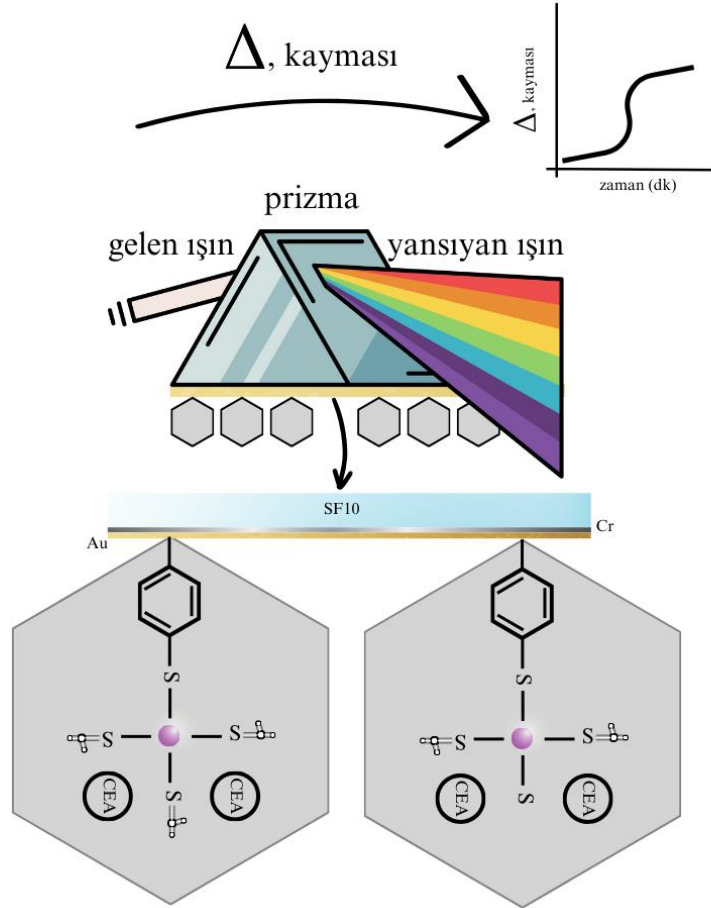
3.3.3. SF10/Cr/Au/4MF yüzeyine AuNPs ve aptamerlerin immobilizasyonu

Altın nanoparçacıkların (AuNPs) sentezi literatüre göre koloidal yöntemle yapılmıştır (Huang ve Yang, 2003). Sentez için 1,0 mM 25 mL aurik asit (HAuCl₄) bir ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde cam bir balona alındıktan sonra kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Üzerine 2,5 mL indirgeyici ajan olan %1'lik trisodyum sitrat (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O) çözeltisi damla damla ilave edilmiştir. Damlatma esnasında çözeltinin şiddetli bir şekilde karıştırılmıştır (400 rpm). Bordo rengin oluşmasıyla birlikte 1 dk. kadar karıştırma işlemi devam etmiş ve ardından içerisinde koloidal çözelti bulunan cam balonun musluk suyu ile aniden soğutulması sağlanmıştır (Nguyen ve ark., 2010). Koloidal çözelti 15.000 rpm'de 10 dakika ultrasantrifüj (Hermle Z36-HK, Almanya) ile santrifüj edilmiştir. Çöken nanoparçacıklar sırasıyla UPW ve etanol ile üçer defa yıkarak santrifüjlenmiştir. Sonra 25 mL'lik etanol çözeltisine alınarak buzdolabında saklanmıştır. Sentezlenen AuNP çözeltisinden 1'er mL alınıp SF10/Cr/Au/4MF yüzeyine damlatılarak SAM modifikasyonu ile tiyol (SH) uçlu yüzeye nanoparçacıkların bağlanması sağlandı. Daha sonra nanoparçacık içeren yüzeyler, PBS (pH 7.4) içinde 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 μ M antiCEA1 ve 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 μ M antiCEA2 olacak şekilde hazırlanmış aptamer çözeltileriyle etkileştirilerek aptamerlerin yüzeye bağlanması sağlandı (de Melo ve ark., 2020; Wang ve ark., 2019). Bu aptamerlerin CEA ile etkileşimi sonucu elipsometrik parametrelerden Δ 'nın değişimi incelenerek optimize aptamer konsantrasyonları belirlenmiştir. 5' terminalinden SH-C₆H₁₂ ile önceden modifiye edilerek temin edilen aptamerler, SH etkileşimi yoluyla AuNPs yüzeyinde immobilize edilmiştir. Yüzeye bağlanacak aptamer (antiCEA1 ve antiCEA2) konsantrasyonları 500 ng/mL CEA için SPRe-TIRE uygulamaları kullanılarak belirlenmiştir. İnkübasyon süreleri, literatürdeki kendiliğinden düzenlenen tek tabaka modifikasyonları incelenerek aptamerlerin yüzeye bağlanması için 2 saat olarak belirlenmiştir. (Park ve ark.,2004; Çağlayan ve ark.,2009).

3.3.4. SPRe-TIRE tekniğiyle ile CEA tayin yöntemi uygulamaları

Elipsometri ölçümlerinde, yüzeyde plazmon rezonansı oluşması istendiği için tam yansımali Kretschmann konfigürasyonu kullanılmıştır (Nabok ve Tsargorodskaya, 2008). Bunun için ölçümler SPR oluşumu için uygun kalınlıkta (32 nm) altın kaplama ile hazırlanan yüzey üzerinde 532 nm monokromatik yeşil lazer kullanılarak alınmıştır. Δ ve

ψ değerlerinin sıfırlama prosedürüne göre ölçüm aralığı geçen süreye bağlıdır ve sunulan verilere göre bu süre 5 saniyedir. Elipsometri ölçümleri için akış hızı 3 $\mu\text{L/s}$ ve hacim 50 μL olarak seçilmiştir. SPR akış hücresinde oda sıcaklığında Δ değerleri ölçülmüştür. Aptamer platformunun bulunduğu hücreye önce tampon çözelti gönderilmiş ve elde edilen Δ değerleri blank olarak kabul edilerek sonradan farklı konsantrasyonlarda gönderilen analit değerlerinden çıkarılmıştır. Geliştirilen CEA sensör platformunun şematik diyagramı Şekil 3.8'de verilmiştir (Erkal Aytemur ve ark., 2023).



Şekil 3.8. CEA analiz yöntemi için SPRe-TIRE sensör platformunun şematik gösterimi

AntiCEA1 ve antiCEA2 aptamer platformlarında geliştirilen CEA analiz yönteminin doğruluk ve kesinlik parametreleri gün içi ve günler arası (ardışık 5 gün) olarak (N=5) belirlenmiştir. CEA ile girişim yapması muhtemel α -fetoprotein (AFP), kanser antijeni 125 (CA 125) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF-165) türleri için girişim çalışmaları yapılmıştır. Sisteme 50 ng/mL CEA ile birlikte 500 ng/mL konsantrasyona sahip girişim yapması muhtemel bu türler gönderilerek sensör performansı daha yüksek olan AntiCEA1 platformu üzerinde girişim etkileri incelenmiştir. AntiCEA1 sensör platformu üzerinde geliştirilen yöntemin validasyonu,

ticari insan serumu örneği kullanılarak 1 ve 50 ng/mL konsantrasyonlu CEA standartları (N=5) spike edilerek yöntemin geri kazanım değeri hesaplanarak belirlenmiştir.



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

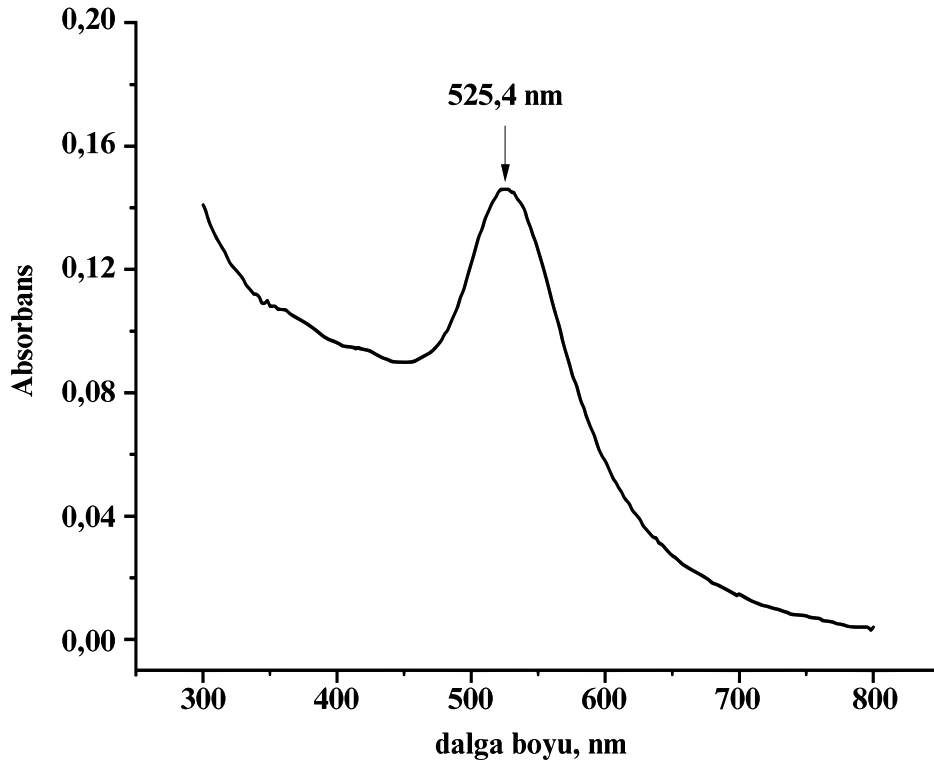
QCM ve SPRe-TIRE yöntemleriyle geliştirilen yöntemler iki farklı bölümde ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

4.1. Kuartz Kristal Mikrobalans Tekniğiyle Aptamer Esaslı CEA Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi

Bu çalışma için QCM tekniği için hazırlanan yüzeyler ve AuNP'lar ayrı ayrı karakterize edilmiştir.

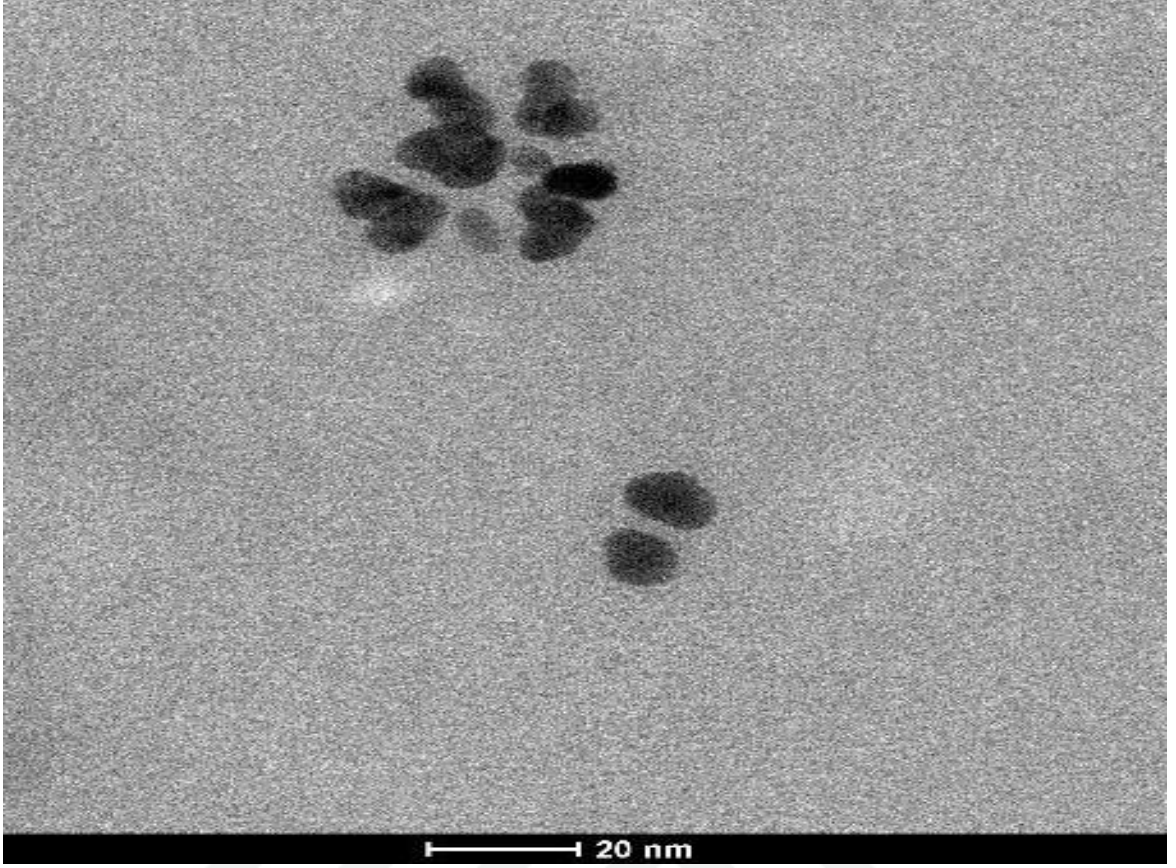
4.1.1. QCM tekniği için hazırlanan yüzeylerin ve AuNP'ların karakterizasyonu

QCM aptasensörü için hazırlanan koloidal AuNP'lar (suda) mor ötesi-görünür bölge spektroskopisi ile karakterize edilmiş ve 525,4 nm'deki absorbans spektrumu Şekil 4.1'de verilmiştir. Spektrum değerlendirildiğinde Mie Teorisine göre 525 nm'deki nanoparçacıkların boyutları yaklaşık 15 nm civarındadır (Oldenburg, 2000). Karakterizasyon sonuçları, modifikasyona yönelik AuNP'lerin başarılı ve homojen sentezini doğrulamıştır.



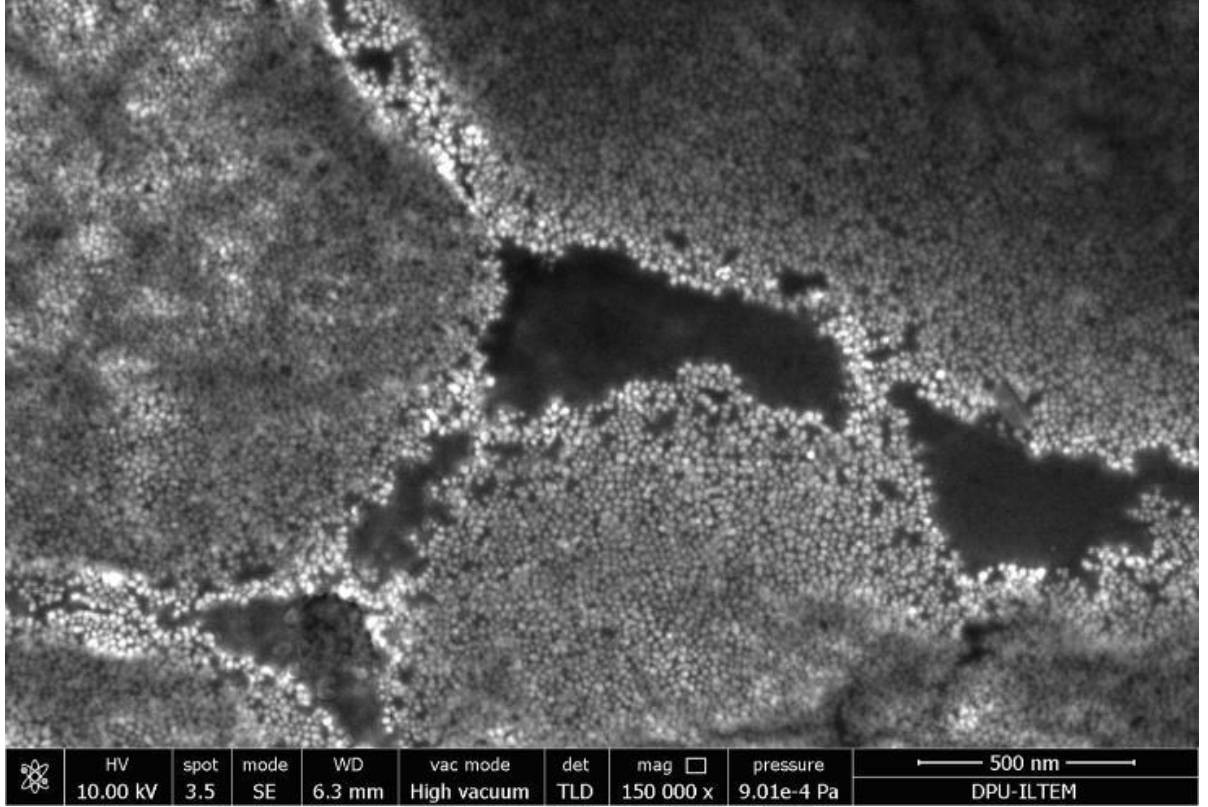
Şekil 4.1. AuNP'ların mor ötesi-görünür bölge (UV-Vis) spektrumu

Aynı zamanda altın nanoparçacıklar, TEM ve SEM görüntüleri alınarak karakterize edilmiştir. Şekil 4.2'de yaklaşık 15 nm boyutlu AuNP'ların SEM görüntüleri verilmiştir. Bu değer, Mie Teorisinde hesaplanan değer ile uyumludur.

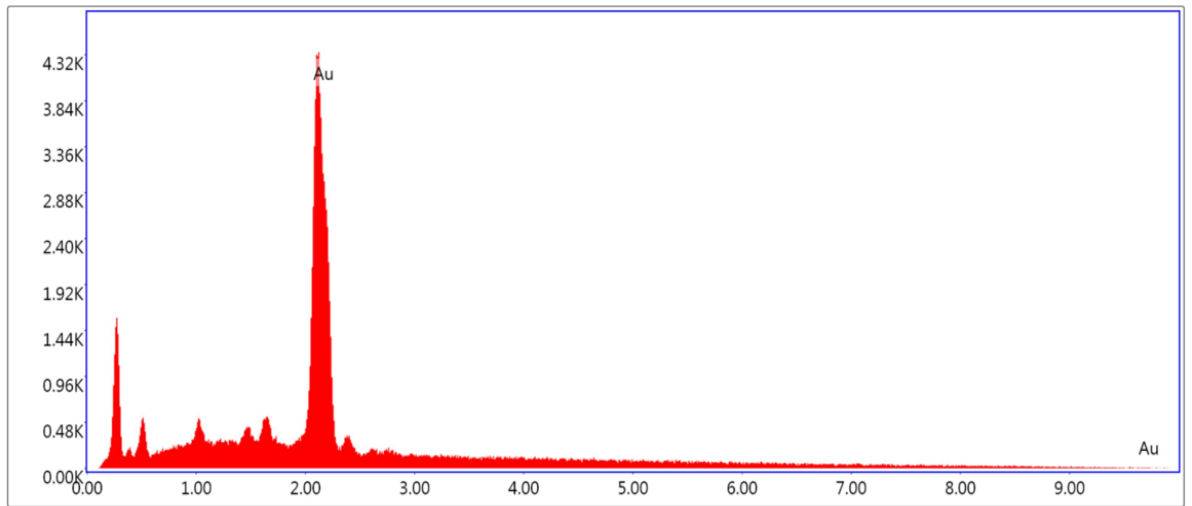


Şekil 4.2. AuNP'ların TEM görüntüsü

Şekil 4.3'te 150.000x (kat) büyütülmüş AuNP'ların SEM görüntüleri verilmiştir. Nanoparçacıkların homojenliği bakımından görüntü önemlidir. SEM görüntüsü alınırken aynı zamanda Şekil 4.4'teki EDX spektrumu da alınarak AuNP'ların varlığı spektrum üzerinde 2 keV (Wang ve ark., 2016) civarında Au piki olarak görünmektedir.

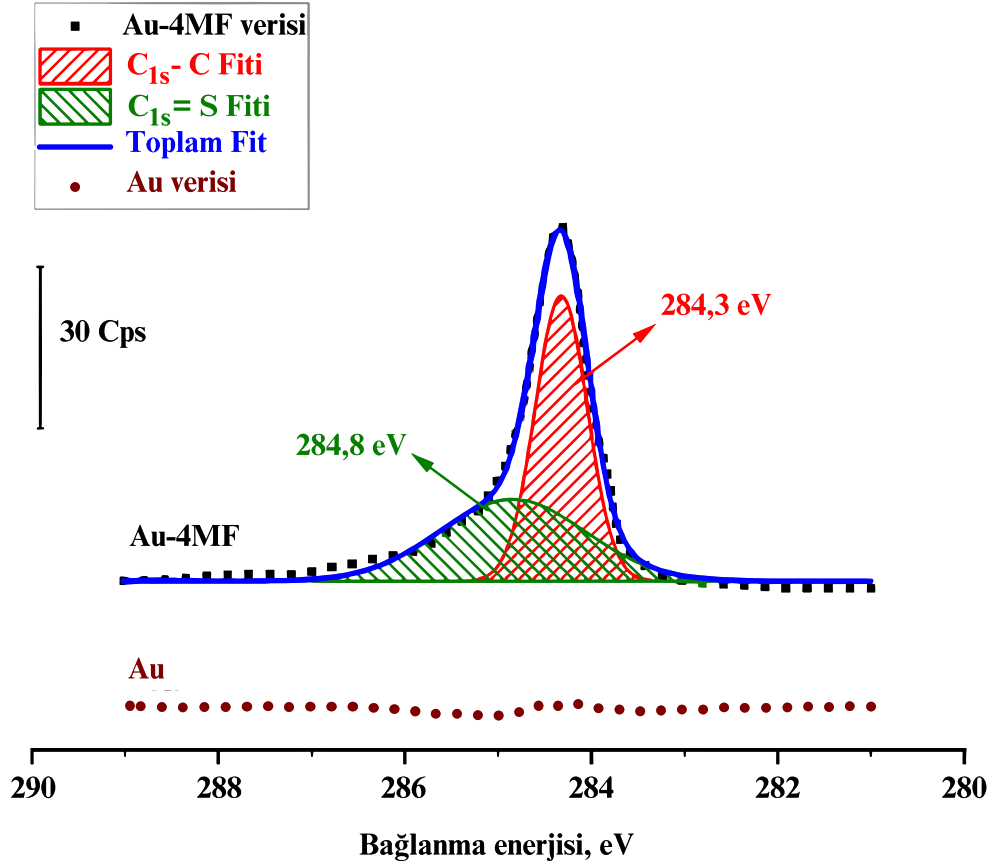


Şekil 4.3. AuNP'ların SEM görüntüsü



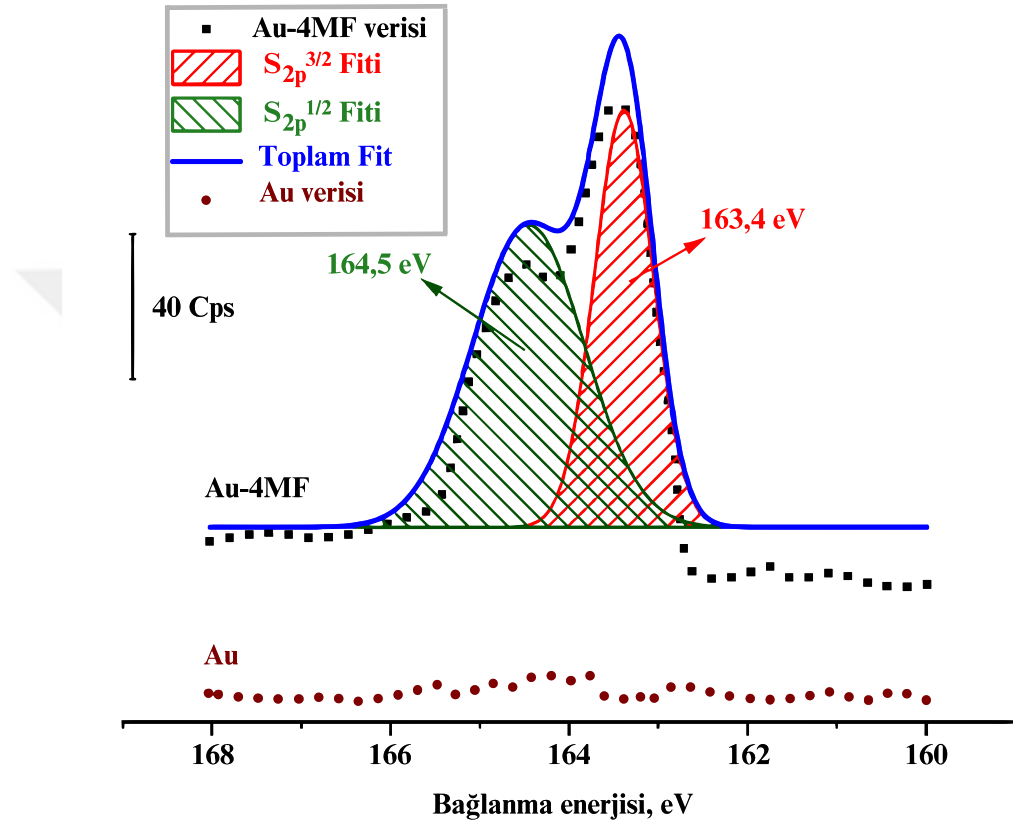
Şekil 4.4. AuNP'ların EDX spektrumu

32 nm altın nanofilm kaplı SF10 slayt ve 4-merkaptofenil ile modifiye edilmiş, SF10-Au-4MF yüzeylerinin C_{1s} ve S_{2p} yüksek çözünürlüklü dar bölge spektrumları Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Şekil 4.5'te Au-4MF yüzeyinden elde edilen C_{1s} bölgesinin fit edilmesiyle 285,6 eV'da aromatik $C = C$ ve 283,5 eV'da C-S'ye karşılık gelen iki temel pik gözlemlenmiştir (de Morais ve ark., 2015).



Şekil 4.5. Au ve Au-4MF yüzeyinde C_{1s} için yüksek çözünürlüklü XPS spektrumu

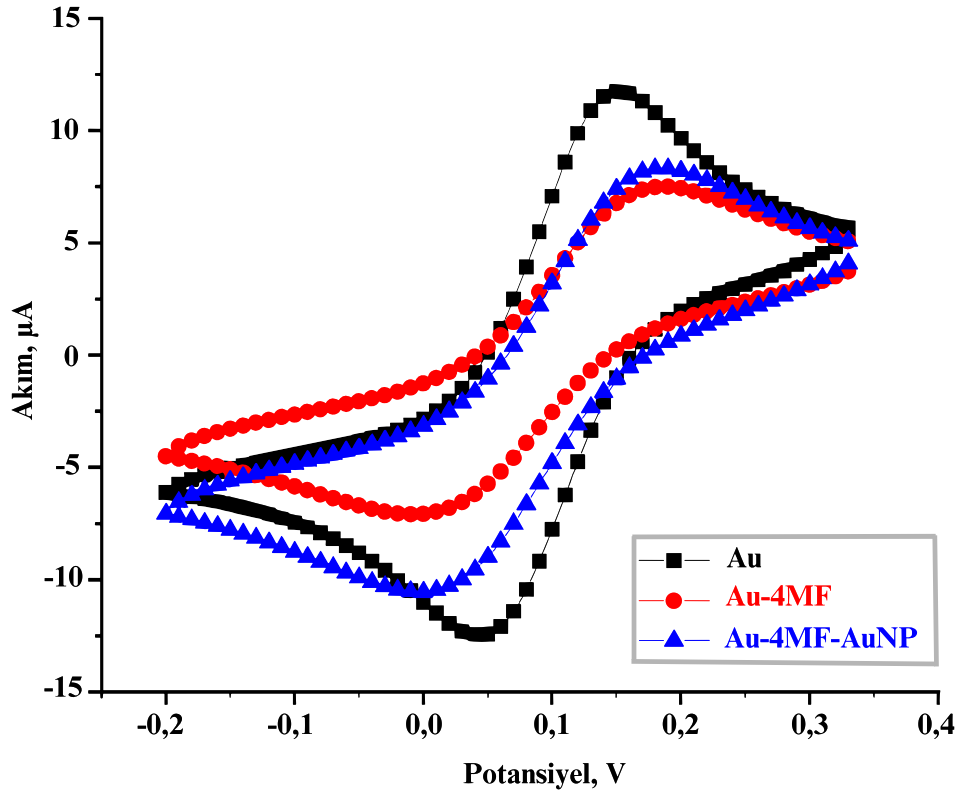
Şekil 4.6’da aynı yüzeyde S_{2p} bağlanma enerjilerine ait spektrum fit edildiğinde 164,5 eV ($S_{2p}^{1/2}$) ve 163,4 eV ($S_{2p}^{3/2}$)’da iki temel pik elde edilmiştir (Soltani ve ark., 2023; Yeter ve ark., 2021). XPS ölçümleri, Au-4MF yüzeyindeki aromatik C ve S atomlarının varlığını kanıtlamıştır. Au kaplı cam slayt yüzeyde bu pikler görülmemekle birlikte gürültü şeklinde yer almaktadır.



Şekil 4.6. Au ve Au-4MF yüzeyinde S_{2p} için yüksek çözünürlüklü XPS spektrumu

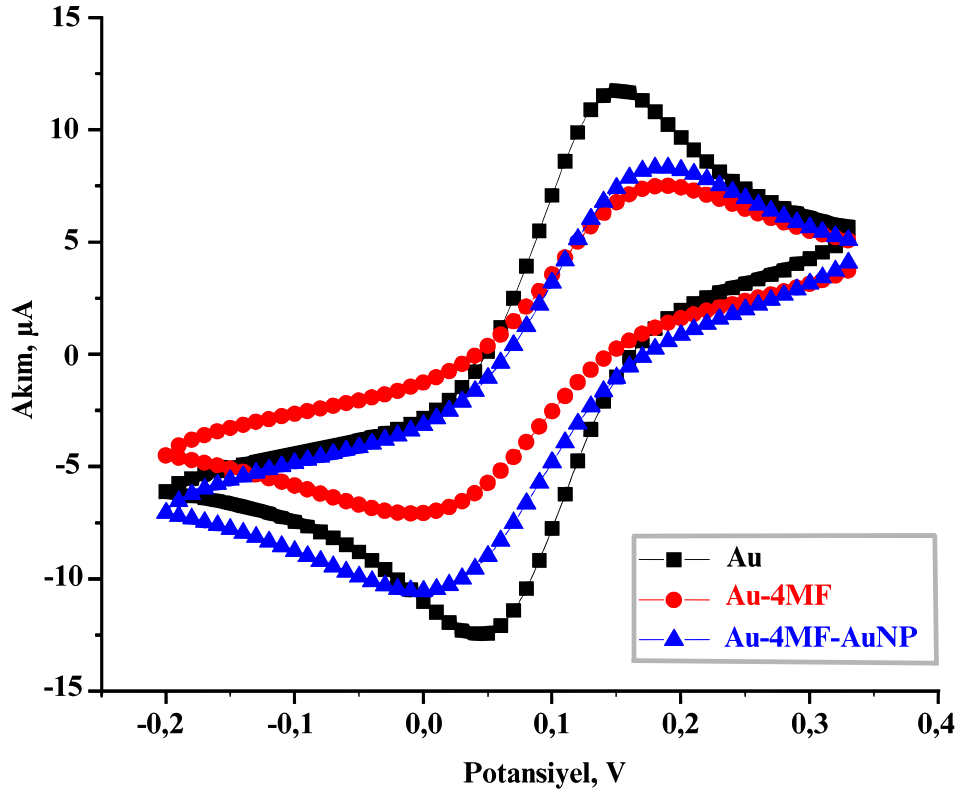
Ayrıca Au elektrot (MF2014, BASI, ABD) kullanılarak hazırlanan yüzeylerin dönüşümlü voltametri ile karakterizasyonları çalışılmıştır (Albayatı ve ark., 2023;

Deveci ve ark., 2012; Mülazımoğlu ve ark., 2011).



Şekil 4.7. 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ 'ün (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP yüzeylerindeki dönüşümlü voltamogramları (TH= 200 mV/s, Ag/AgCl/KCl_(doy) referans elektrotuna karşı)

Şekil 4.17'de, 0,1 M KCl ile hazırlanan 1 mM potasyum ferrisiyanürün ($K_3Fe(CN)_6$) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP yüzeylerindeki dönüşümlü voltamogramları gösterilmektedir.



Şekil 4.7. 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ 'ün (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP yüzeylerindeki dönüşümlü voltamogramları (TH= 200 mV/s, Ag/AgCl/KCl_(doy) referans elektrotuna karşı)

Redoks probunun Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP üzerindeki anodik tepe akım değerleri sırasıyla $10,453 \pm 0,093$, $4,976 \pm 0,016$ ve $6,793 \pm 0,044$ μA olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Pik akımlarının değişmesi, yüzeylerin modifiye edildiğini ve birbirinden farklı olduğunu göstermektedir. QCM tekniğinde elektriksel iletkenliğin bir önemi olmadığından, modifiye yüzeylerde pik akımı değerinin, Au elektrot yüzeyine göre düşük çıkmasının bir önemi olmadığı düşünülmüştür.

Çizelge 4.1. 1 mM $K_3Fe(CN)_6$ 'ün (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP yüzeylerindeki dönüşümlü voltamogramlarından (TH= 200 mV/s, Ag/AgCl/KCl_(doy)'e karşı) elde edilen pik akımı ve potansiyel değerleri

Elektrot	Pik potansiyeli, V		Pik akımı, μA	
	Anodik	Katodik	Anodik	Katodik
Au (MF2014)	0,146	0,043	$10,453 \pm 0,093$	$10,634 \pm 0,145$
Au-4MF	0,177	0,01	$4,976 \pm 0,016$	$5,468 \pm 0,045$
Au-4MF-AuNP	0,180	0,015	$6,793 \pm 0,044$	$7,285 \pm 0,047$

Elektrot yüzeyindeki nanofilm katmanının tek tabaka olması, deneylerin tekrarlanabilirliği açısından önemlidir. Tek tabaka oluşumu ise elipsometre ile kalınlık ölçümleri yapılarak belirlenebilir. Au-4MF nanofilminin kalınlığı elipsometrik ölçümlerle karakterize edilmiştir. Dönüşümlü voltametrimin her bir döngü sayısı ile diazonyum tuzunun indirgenmesi sonucu elde edilen nanofilmlerin kalınlıkları

Çizelge 4.2'de verilmiştir. Ölçümler üç farklı noktada beşer ölçüm ortalaması için elde edilmiştir. Birinci dönüşümlü voltamogram sonucu oluşan nanofilmin ortalama kalınlığı, üç nokta için ($n = 5$) $1.21 \pm 0,17$ nm olarak ölçülmüştür. Bu sonuç, dönüşümlü voltametrinin ilk döngüsü sırasında tek tabakanın oluştuğunu ve nanofilmin eşit bir şekilde dağıldığını göstermektedir. Döngü sayısı arttıkça, yüzeye bağlanan moleküller üzerine diazonyum indirgenmesiyle oluşan yeni radikallerin bağlanması sonucu çok tabakalı filmler oluşur (Brooksby, 2004). Tek tabaka oluşumuna en yakın kalınlığın ilk döngüden sonra oluştuğu gözlemine dayanarak sensör çalışmaları için tek bir döngünün yeterli olduğu belirlenmiştir (Erkal Aytemur ve ark., 2023).

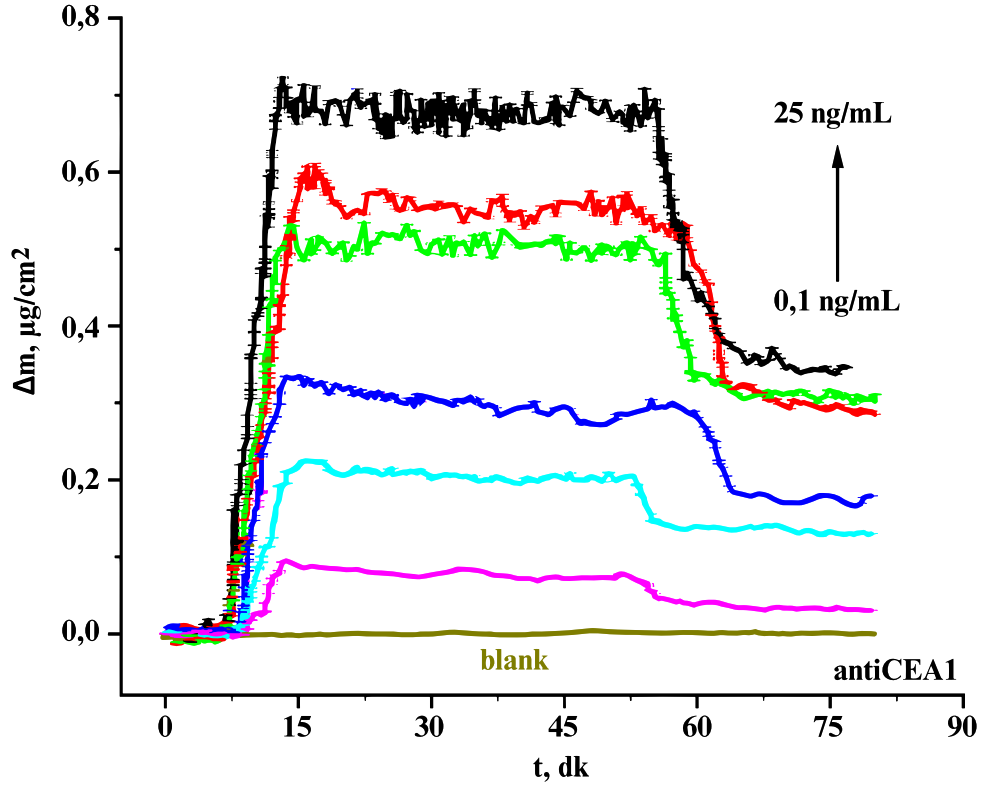
Çizelge 4.2. Altın slayt üzerindeki 4MF nanofilmin kalınlığı

CV döngü sayısı	Bağıl kalınlık (nm, n=5)			Kalınlık ortalaması $\pm$ SD, nm
	1.nokta	2.nokta	3.nokta	
1	1,32	1,12	1,12	1,21 $\pm$ 0,17
	1,05	1,26	1,26	
	1,08	0,98	0,98	
	1,41	0,83	0,83	
	1,20	1,02	1,02	
2	2,83	2,38	2,27	2,59 $\pm$ 0,22
	2,45	2,54	2,93	
	2,35	2,78	2,86	
	2,41	2,63	2,45	
	2,85	2,49	2,68	
3	3,42	3,15	3,47	3,32 $\pm$ 0,18
	3,17	3,12	3,08	
	3,45	3,27	3,19	
	3,16	3,45	3,27	
	3,28	3,63	3,63	

4.1.2. QCM tekniği ile CEA analizi için yöntem geliştirme

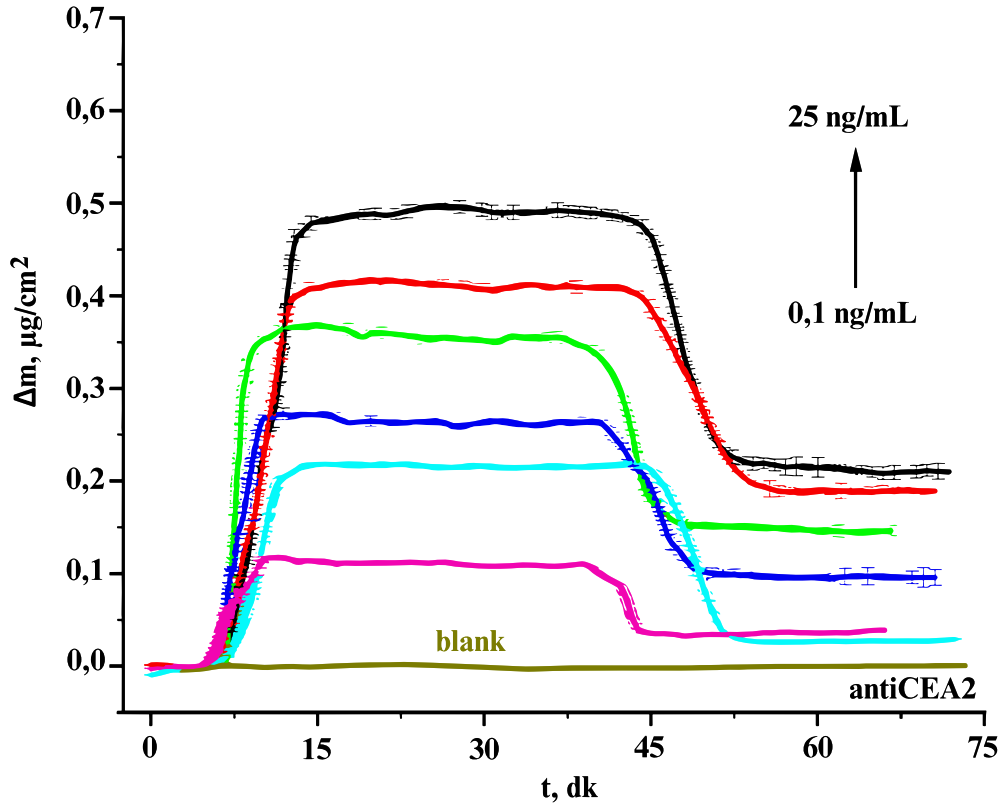
QCM kristalinin modifikasyonu ile elde edilen Au-4MF-AuNP yüzeyi üzerine aptamerlerin immobilizasyonu sonucu elde edilen antiCEA1 ve antiCEA2 platformlarına 0,1 ng/mL ile 25 ng/mL aralığındaki (0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25 ng/mL konsantrasyonlar için PBS'de, pH:7,4) CEA standart çözeltileri gönderilerek QCM ile bağlanma sensorgramları elde edilmiştir. **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**'de ve **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**'da antiCEA1 ve antiCEA2 bağlı yüzeylerde, çeşitli konsantrasyonlarda CEA için sensorgramlar görülmektedir. Her iki sensorgramda da CEA aptamer ile CEA arasındaki bağlanmanın enjeksiyondan sonraki ilk 5 dakika içerisinde dengeye ulaştığı gözlemlendi. 40-50 dakika civarında, ayrışma sürecini başlatmak

için sensör yüzeyine yalnızca tampon çözeltisi (PBS, pH:7,4) gönderilmiştir. Analiz, ayrışma süreci sırasında dengeye ulaşıldığında sonlandırılmıştır.



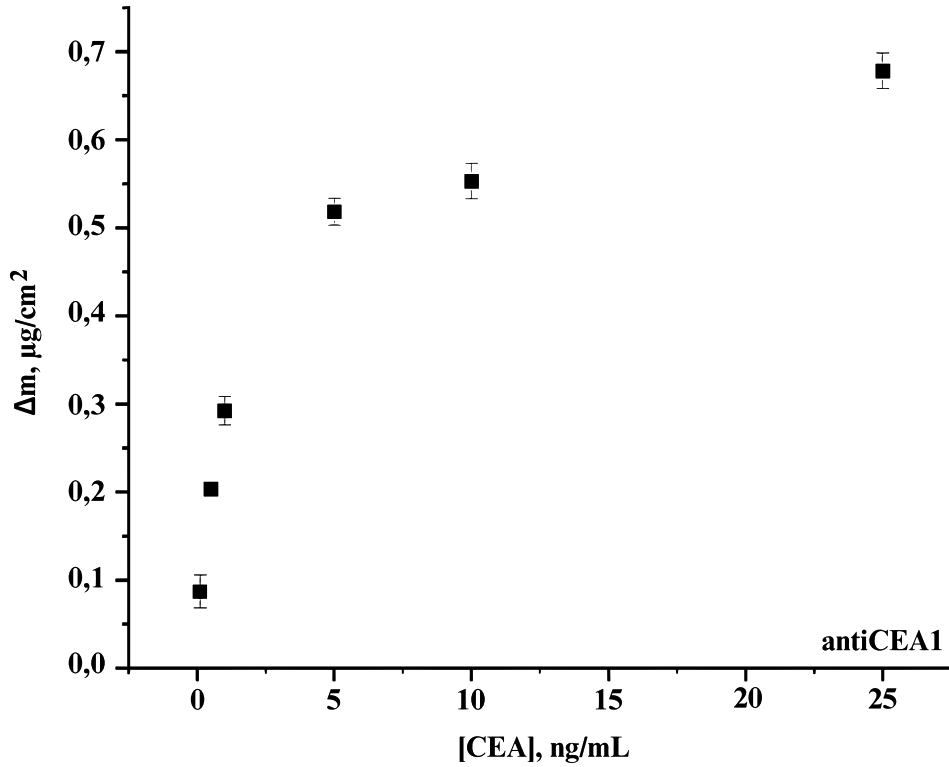
Şekil 4.8. AntiCEA1 ile immobilize edilmiş QCM sensörlerinde çeşitli konsantrasyonlarda CEA'nın saptanmasına yönelik sensorgramlar

Şekil 4.8'den görüldüğü gibi, antiCEA1 aptamer ile immobilize edilen yüzeylerde elde edilen Δm ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) değerleri, Şekil 4.9'daki antiCEA2 aptamer ile immobilize edilen yüzeylerden elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında Δm cevabı bakımından biraz daha yüksek bulunmuştur (25 ng/mL CEA için yaklaşık %40 daha yüksek). Bu fark, antiCEA1 immobilize QCM sensörünün alt tayin sınırına (LOD) da yansımaktadır. Her iki sensör platformunun bağlanma kinetiği oda sıcaklığında benzer davranış sergilemiştir. 5 tekrar için elde edilen gürültü değerleri her iki platform için de yaklaşık olarak aynı olup, alınan sinyale göre küçük bulunmuştur. Dengeye ulaşıldıktan sonraki bekleme süresinde meydana gelen dalgalanmaların oda sıcaklığındaki küçük değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

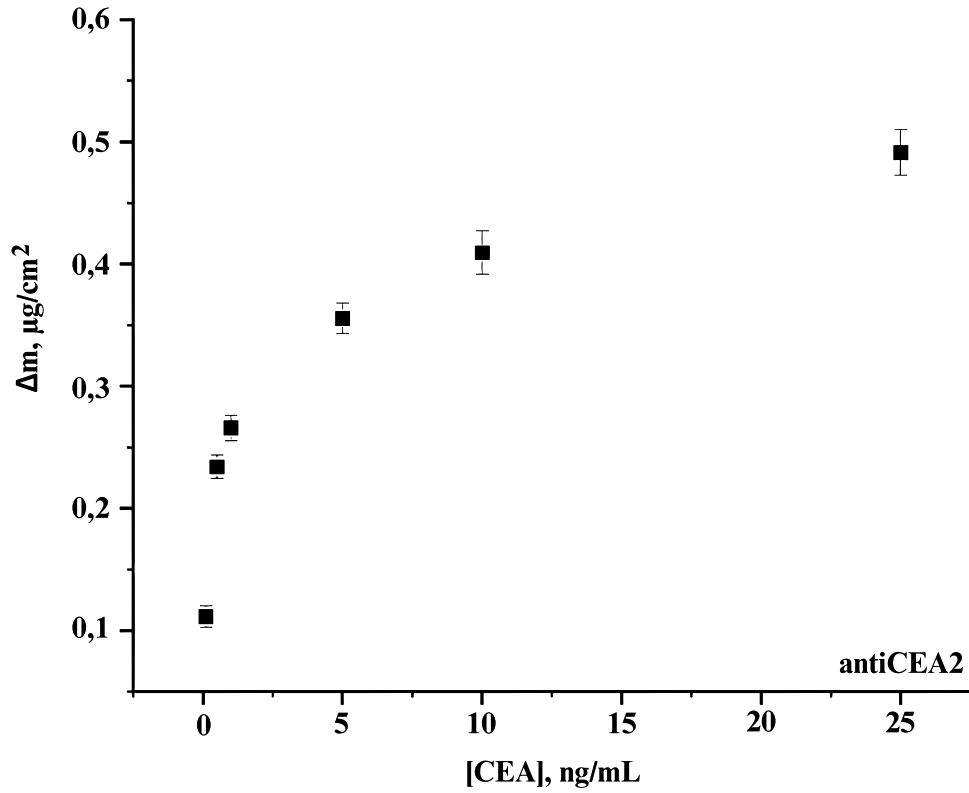


Şekil 4.9. AntiCEA2 ile immobilize edilmiş QCM sensörlerinde çeşitli konsantrasyonlarda CEA'nın saptanmasına yönelik sensorgramlar

Her iki QCM sensörünün kalibrasyon eğrileri, bağlanma denge değerleri (Δm sinyali) kullanılarak hesaplanmış ve Şekil 4.10'de ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

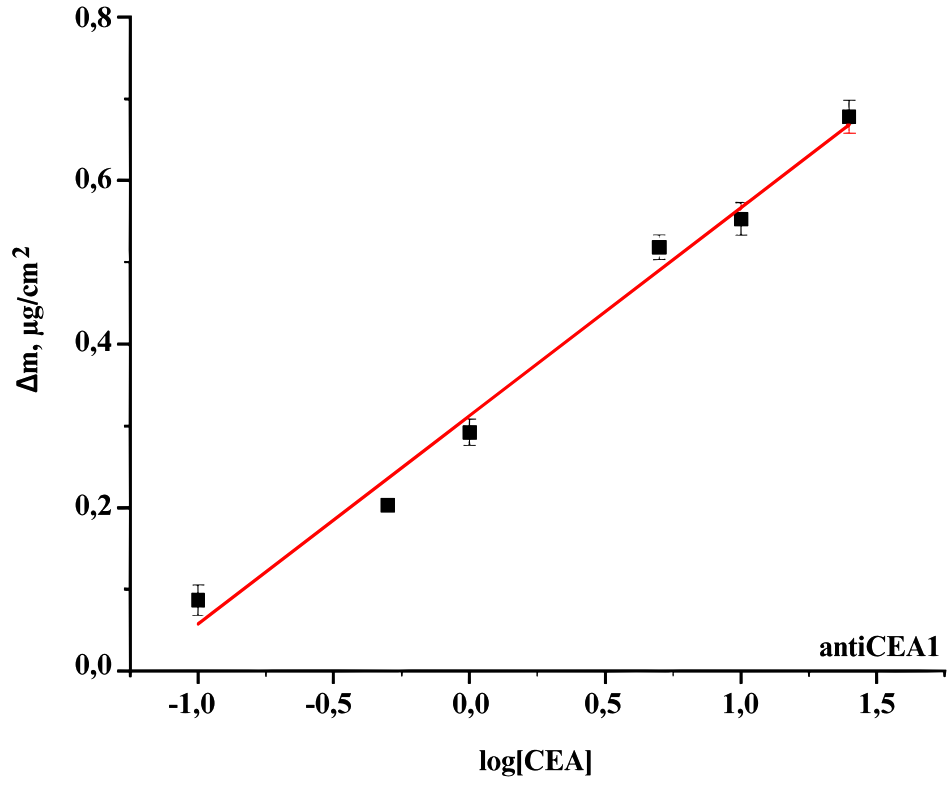


Şekil 4.10. AntiCEA1 üzerinde immobilize edilmiş CEA için kalibrasyon eğrisi

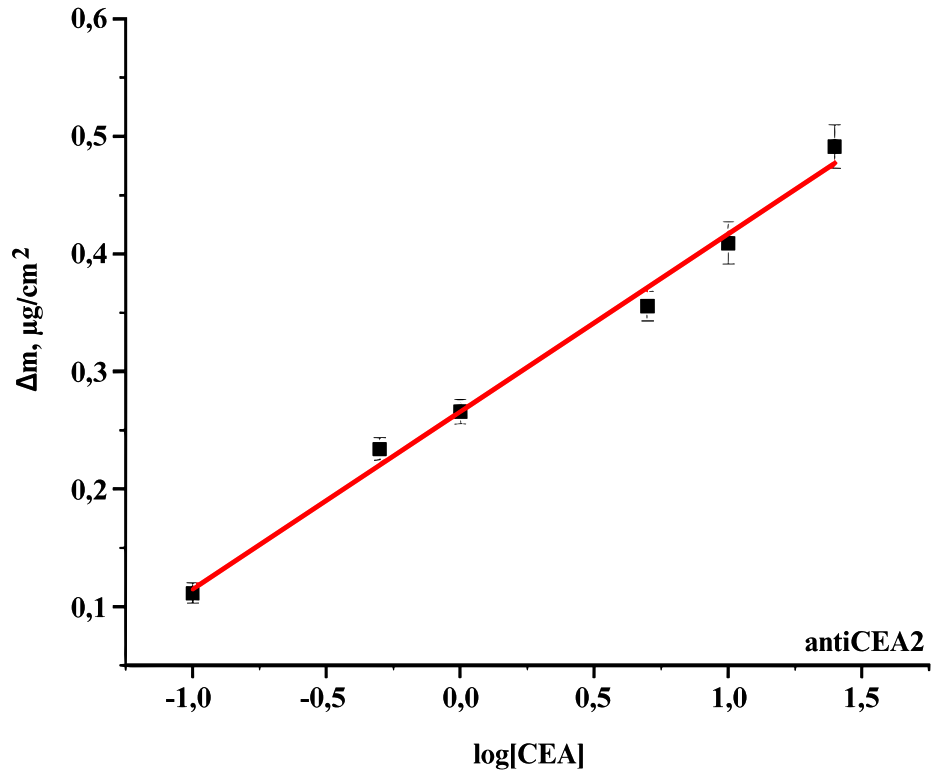


Şekil 4.11. AntiCEA2 üzerinde immobilize edilmiş CEA için kalibrasyon eğrisi

Aptamerler ve CEA arasındaki etkileşim, logaritmik bir kalibrasyon eğrisi vermiştir. Yarı logaritmik sensör kalibrasyon eğrileri, R^2 değerleri yaklaşık 0,99 olacak şekilde elde edilmiştir. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te iki farklı aptamer platformu üzerinde $\log[CEA]$ için lineer kalibrasyon eğrileri olarak verilmiştir.



Şekil 4.12. AntiCEA1 üzerinde immobilize edilmiş çeşitli CEA konsantrasyonları için yarı-logaritmik kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.13. AntiCEA2 üzerinde immobilize edilmiş çeşitli CEA konsantrasyonları için yarı-logaritmik kalibrasyon eğrisi

Aptamerlerin seçimi sırasında rastgele havuz kullanılarak gerçekleştirilen üssel seçim yöntemi, doğası gereği hedefe en yüksek afinite ile bağlanan oligonükleotid sekansının seçilmesini sağlamaktadır. Ancak, yüzey etkileşimleri ile spesifik olmayan sinyalin alınma olasılığını ortadan kaldırmak için CTRL aptameri immobilize edilmiş QCM sensör ile de kontrol analizi gerçekleştirilmiştir. Kontrol aptamerinin yukarıda belirtilen yöntem ile immobilizasyonunun ardından, diğer aptamerler ile aynı yöntemle CEA ile etkileştirilmesi sonucu, sensör sinyalinde yalnızca gürültü seviyesi dahilinde bir değişiklik elde edilmiştir ($\Delta m = 0,008 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). QCM yüzeyinde CEA-aptamer etkileşimi haricinde spesifik olmayan etkileşimlerin olmadığı doğrulanmıştır.

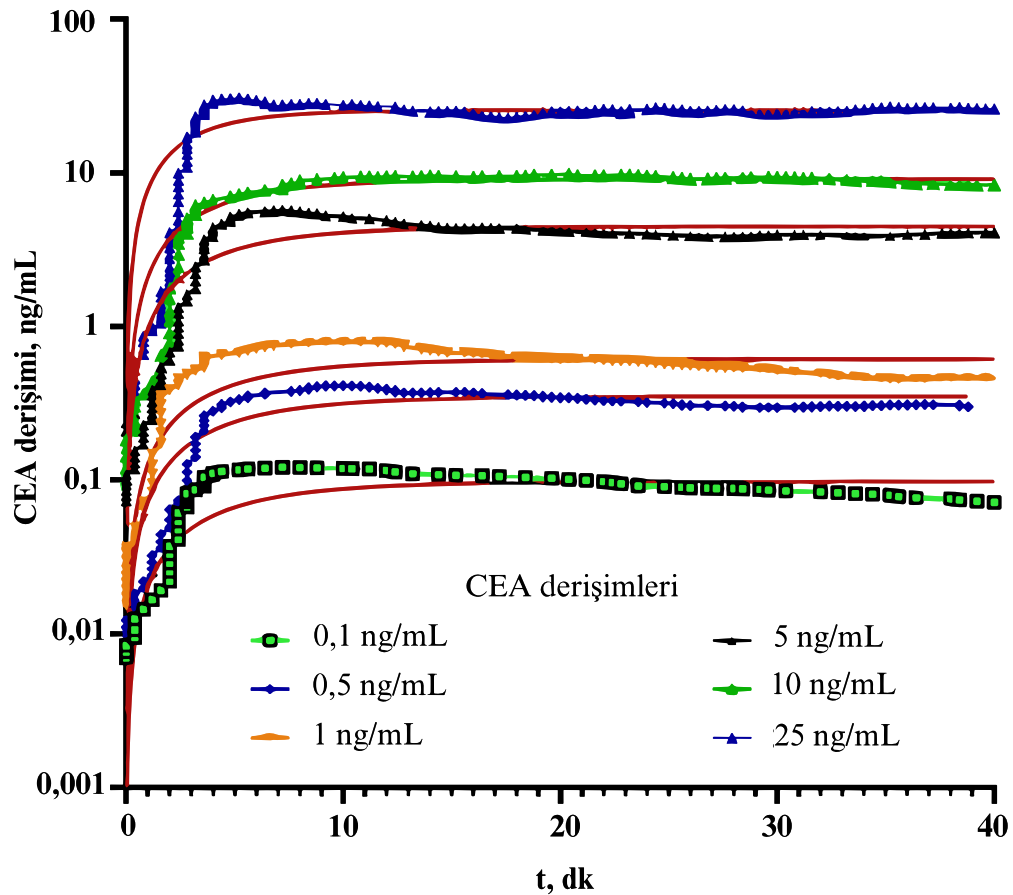
Bağlanma bölgelerinin sayısını değerlendirmek için elde edilen kalibrasyon eğrileri hem Langmuir hem de Freundlich kinetiğine uymuştur. Her iki bağlantı da 0,998 ve üzeri belirleme katsayılarıyla sonuçlanmıştır; bu, CEA ile antiCEA aptamerler arasındaki kompleks oluşumunun her iki izoterme de bağlı olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak Langmuir izoterminin sonuçlarına dayanarak CEA-antiCEA aptamer kompleksi oluşumunun tek bir bağlanma bölgesi yoluyla meydana geldiği tahmin edilmektedir. Freundlich kinetiğine uymasının sebebi aptamere tek noktadan bağlanan CEA proteini üzerine başka CEA protein tabakalarının bağlanması olabilir. Bu durumda çoklu noktalardan bağlanma gibi bir algılama durumu mümkündür.

Geliştirilen her iki sensörün analitik parametreleri Çizelge 4.3'te özetlenmiştir. AntiCEA1 ile yapılan çalışmada $\Delta m = 0,25452 \times \log[\text{CEA}] + 0,31227$ olarak hesaplanmış, tüm kalibrasyon ölçümlerinden maksimum standart sapmanın ($\sigma=0,02$) üç katı olarak hesaplanan LOD değeri 0,102 ng/mL olarak bulunmuştur. Benzer şekilde diğer aptamer olan AntiCEA2 platformu için $\Delta m = 0,15113 \times \log[\text{CEA}] + 0,2659$ denklemi bulunmuştur. Tüm kalibrasyon ölçümlerinden maksimum standart sapmanın ($\sigma = 0,04$) üç katı olarak hesaplanan LOD değeri 1,416 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu sensör analitik performans değerleri, literatürde CEA tespiti için kullanılan sensörlerle uyumludur. Ancak QCM platformu için daha düşük bir tespit limiti beklenebilirdi. Yine de sinyal-gürültü oranı ($S/N = 3$) ve sensorgramlardaki dalgalanmalar nedeniyle ve özellikle de sıcaklığa bağlı değişimler nedeniyle sensörün LOD ve LOQ değerleri beklenenden yüksek değerde elde edilmiştir. Ancak bu sonuçlara rağmen LOD ve LOQ değerlerinin CEA tespitinde pratik uygulama için yeterli olduğu sonucuna varılabilir.

Çizelge 4.3. Geliştirilen yöntemlere ait analitik parametre verileri (n=5)

Analitik özellik	Değer	
	AntiCEA1	AntiCEA2
Regresyon denklemi	$y = 0,25452x + 0,31227$	$y = 0,15113x + 0,2659$
Eğimin standart hatası	0,01461	0,0067
Kesim noktası standart hatası	0,0127	0,0060
R ²	0,9870	0,9923
Doğrusal aralık (ng/mL)	0,1-25	0,1-25
Veri noktası sayısı	6	6
Alt tayin sınırı (ng/mL)	0,102	1,416
Kantitatif tayin sınırı (ng/mL)	0,306	4,248

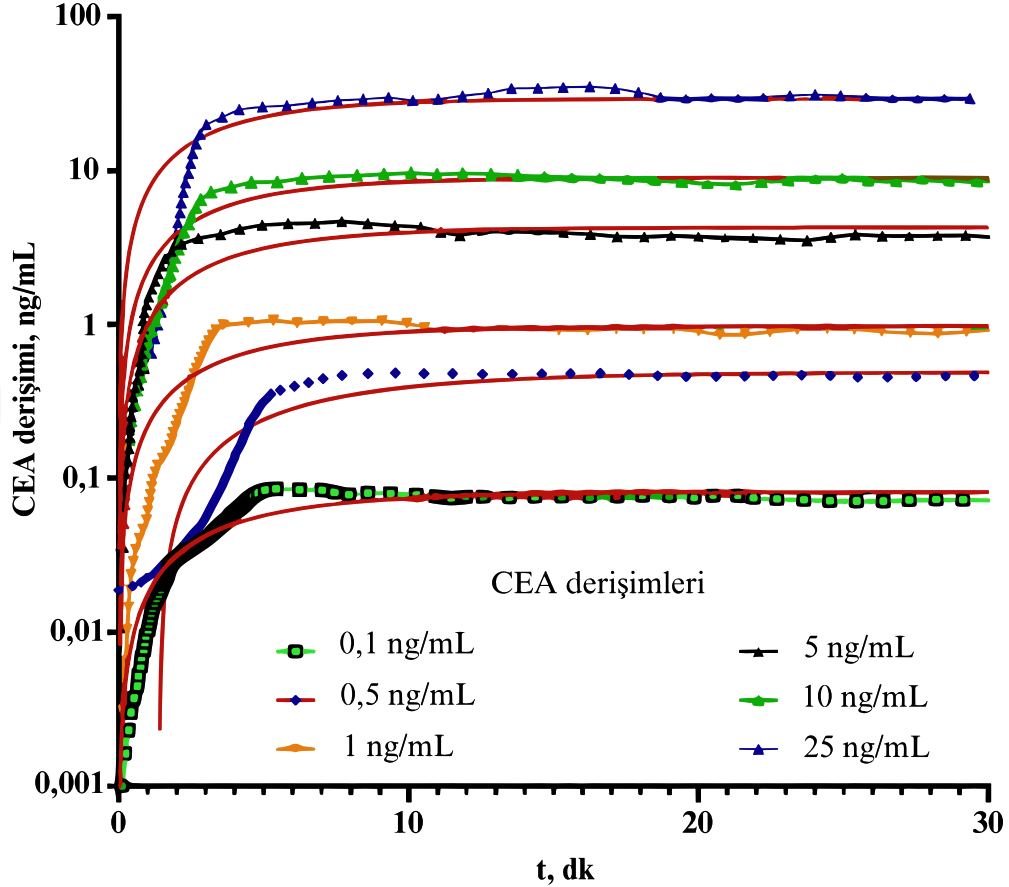
QCM'den elde edilen gerçek zamanlı bağlanma verilerinin avantajı kullanılarak kompleks oluşumunun kinetiği ve afinitesi belirlenmiştir. Hem antiCEA1 hem de antiCEA2 aptamerlerinin karmaşık kinetiği, QCM verileri kullanılarak incelenmiş ve afinite sabitleri hesaplanmıştır. Enjekte edilen standart CEA konsantrasyonuna karşı antiCEA1 ve antiCEA2 aptamerleri için elde edilen kinetik veriler için eşzamanlı grafikler Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.14. AntiCEA1-CEA etkileşimlerinin kinetiği

Sensörden elde edilen konsantrasyonlar kalibrasyon eğrisinden okunmuştur. Bu konsantrasyonda tek bir etkileşim noktasına sahip kompleks için birleşme kinetiği modeline karşılık gelen fit (uyum) sonuçları kırmızı çizgilerle verilmiştir. Afinite sabiti

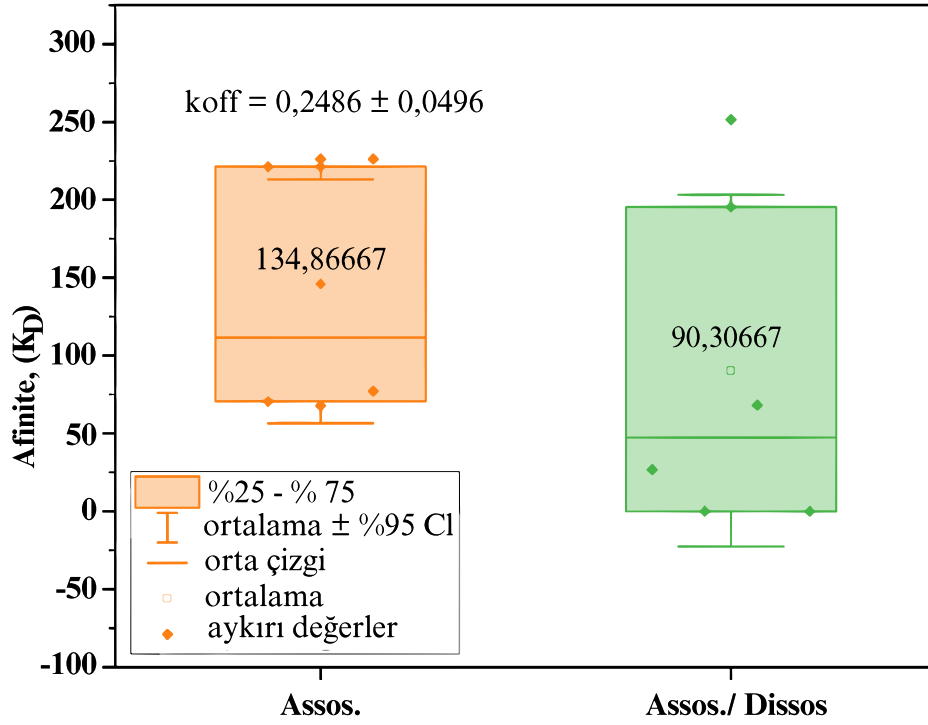
(K_D), hem birleşme/ayırma eğrilerini kapsayan hem de bu eğrilerden belirlenen k_{off} değerleri kullanılarak yalnızca bağlanma eğrilerine bakılarak değerlendirilmiştir. Buradaki amaç, gürültülü QCM çevrimiçi verilerinden K_D değerini mümkün olduğunca doğru bir şekilde tespit etmektir.



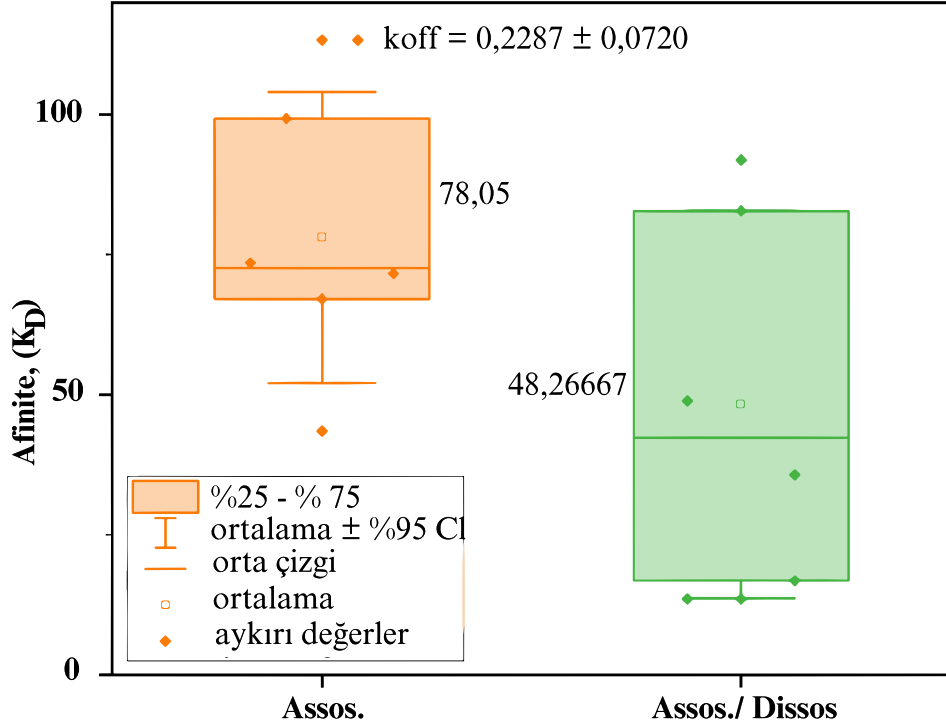
Şekil 4.15. AntiCEA2-CEA etkileşimlerinin kinetiği

Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de sırasıyla antiCEA1 ve antiCEA2 aptamerleri için belirlenen K_D değerlerinin dağılımı gösterilmiştir. AntiCEA1 ve antiCEA2 için birleşme/ayırma (assosiasyon/dissosiasyon) verilerinden hesaplanan K_D değerleri, CEA için 180 kDa’lık bir molekül ağırlığı varsayılarak sırasıyla 90 ng/mL (0,27 nM) ve 48 ng/mL (0,5 nM) olarak bulunmuştur. Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de görüldüğü gibi birleşme/ayırma eğrilerinden hesaplanan K_D değerlerinin dağılımı, doğrudan birleşme eğrilerinden elde edilen K_D değerine göre daha geniştir. Bunun nedeni, QCM’de zamanla ve uzun vadeli çevrimiçi ölçümlerde akış ve ortam sıcaklığının ölçülen değerlerde sapmalara neden olabilmesidir. Bu sapma, model uydurmanın kalitesini düşürür ve yerleştirme sırasında R^2 değerinin 0,90’ın altına düşmesine sebep olur. Yalnızca birleşme eğrilerinden elde edilen nispeten sabit k_{off} değerlerinin (sırasıyla $0,2486 \pm 0,04961/\text{dk}$ ve $0,2287 \pm 0,07201/\text{dk}$) doğrudan modellemeye yerleştirilmesiyle, standart sapma dikkate

alınarak dağılımın antiCEA1 için $134,87 \pm 74,7$ ng/mL ($0,75 \pm 0,42$ nM) ve antiCEA2 için $78,05 \pm 24,78$ ng/mL ($0,43 \pm 0,14$ nM) olduğu anlaşılmıştır. Bu değerler, her iki aptamer için rapor edilen 37,8 nM ve 3,9 nM değerleri ile karşılaştırılabilir sonuçlar vermedi. Ancak dönüştürücü (transduser) tipindeki ve ölçüm yöntemindeki farklılıklar, yüzeyde kütle aktarımı sınırlaması olmadığında farklı afinite ölçümleriyle sonuçlanabilir (Johansson, 2010).



Şekil 4.16. AntiCEA1 aptameri için belirlenen K_D değerlerinin dağılımı



Şekil 4.17. AntiCEA2 aptameri için belirlenen K_D değerlerinin dağılımı

Çalışmanın bir sonraki aşamasında önerilen yöntemin ve QCM sensörlerinin kesinlik ve doğruluk parametreleri incelenmiştir. Bu amaçla gün içi ve günler arası (ardışık 5 gün) testler yapılmış olup, sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir.

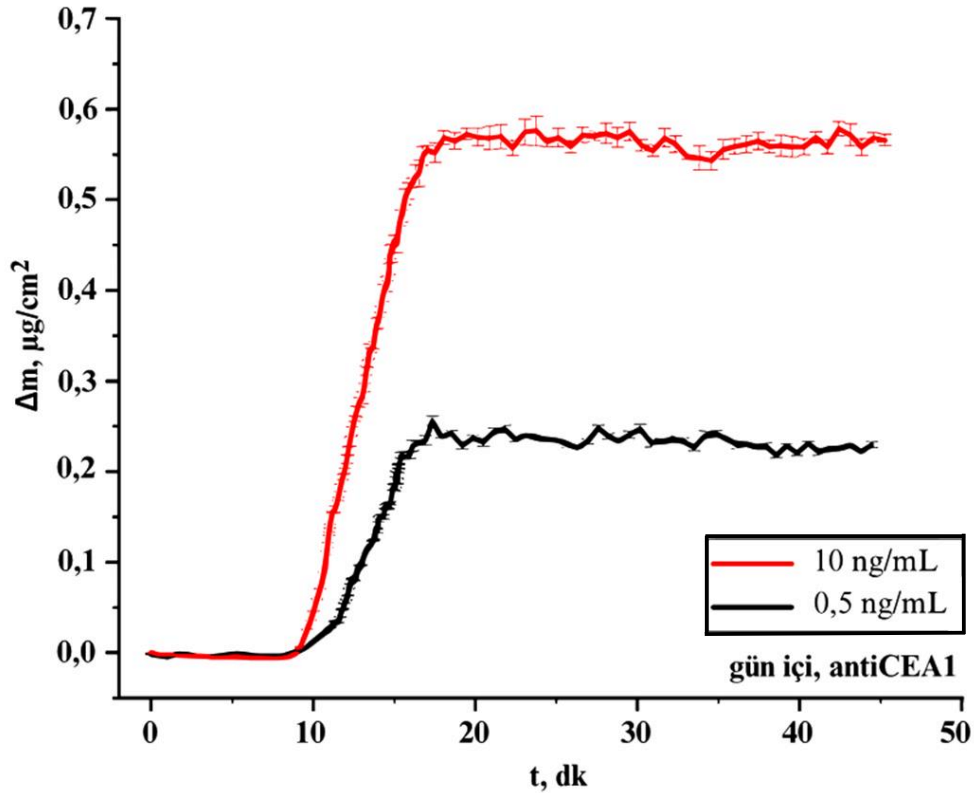
Çizelge 4.4. Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik performansı

*%RSD ve %RE		Aptamer	[CEA], ng/mL	
			0.500	10.00
Gün içi	Bulunan değer	antiCEA1	0,486±0,017	9,637±0,184
		antiCEA2	0,511±0,022	9,814±0,224
	%RSD	antiCEA1	3,50	1,91
		antiCEA2	4,31	2,28
	%RE	antiCEA1	-2,80	-3,63
		antiCEA2	2,20	-1,86
Günler arası*	Bulunan değer	antiCEA1	0,494±0,016	10,046±0,227
		antiCEA2	0,519±0,012	9,859±0,218
	%RSD	antiCEA1	3,24	2,26
		antiCEA2	2,31	2,21
	%RE	antiCEA1	-1,20	0,46
		antiCEA2	3,80	-1,41

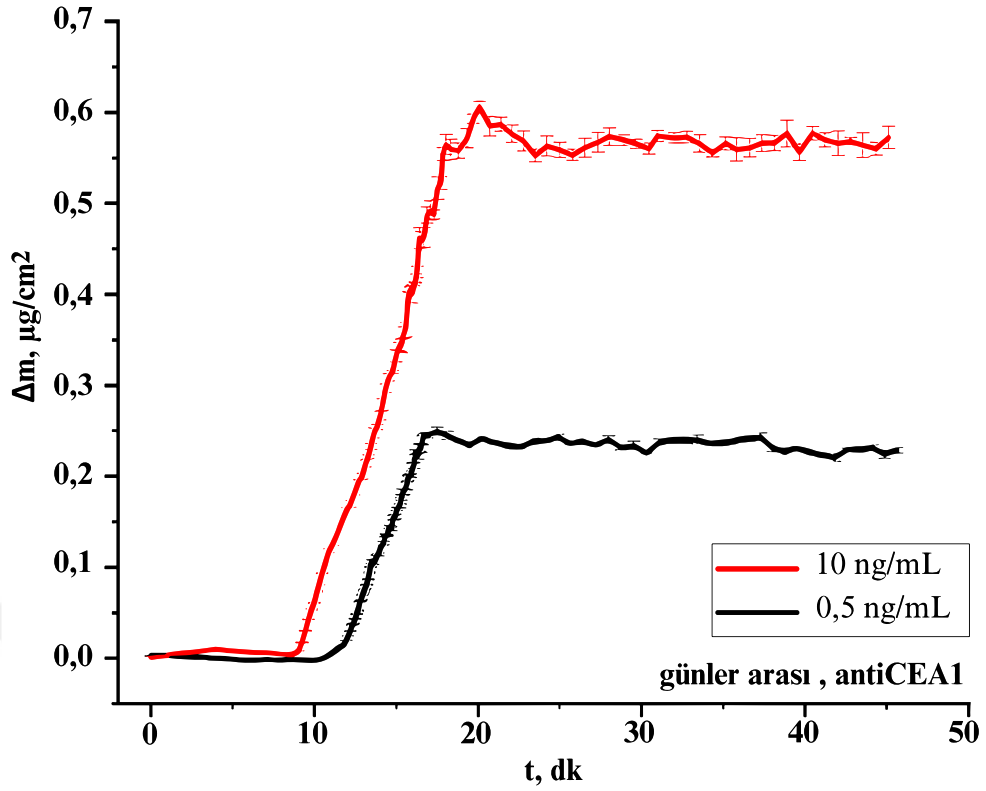
*%RSD: yüzde bağıl standart sapma; %RE: yüzde bağıl hata, Günler arası (ardışık beş gün)

Beş numune için gün içi kesinlik ve doğruluk sonuçları elde edilmiş; kesinlik % RSD ve doğruluk %RE olarak verilmiştir. Bu sonuçlara göre 0,5 ve 10 ng/mL CEA için

%RSD 1,9 ile 4,3 arasında değişirken %RE 3,6 ile 2,2 arasında değişmektedir. Günler arası analizler sonuçlarına göre 0,5 ve 10 ng/mL CEA konsantrasyonları için %RSD değeri 2,2 ile 3,2 arasında değişirken %RE değeri 1,4 ile 3,8 arasında değişmektedir. Her iki aptasensör için hassasiyet ve doğruluk değerleri %5'in altında bulunmuştur, bu da başarılı analitik sonuçlara işaret etmektedir. AntiCEA1 platformu üzerinde 0,5 ng/mL ve 10 ng/mL CEA için gün içi ve günler arası doğruluk tayini için alınan sensorgramları sırasıyla Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da verilmiştir.

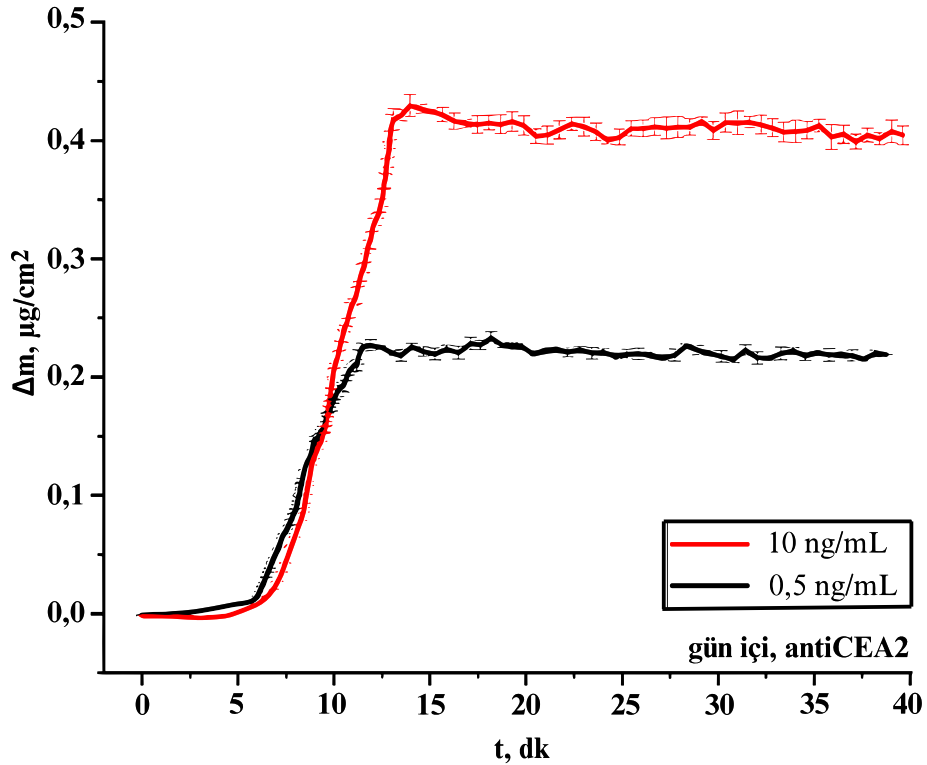


Şekil 4.18. AntiCEA1 platformunda gün içi doğruluk çalışması için alınan sensorgramlar

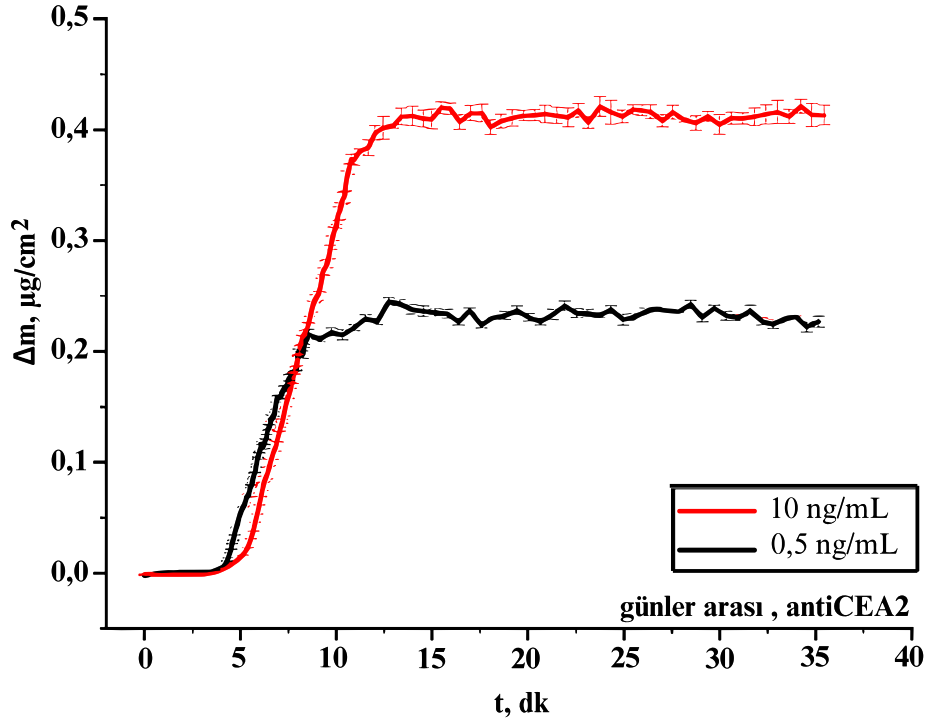


Şekil 4.19. AntiCEA1 platformunda günler arası doğruluk çalışması için alınan sensorgramlar

Aynı şekilde AntiCEA2 platformu üzerinde 0,5 ng/mL ve 10 ng/mL CEA için gün içi ve günler arası doğruluk tayini için alınan sensorgramları Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'te verilmiştir.



Şekil 4.20. AntiCEA2 platformunda gün içi doğruluk çalışması için alınan sensorgramlar



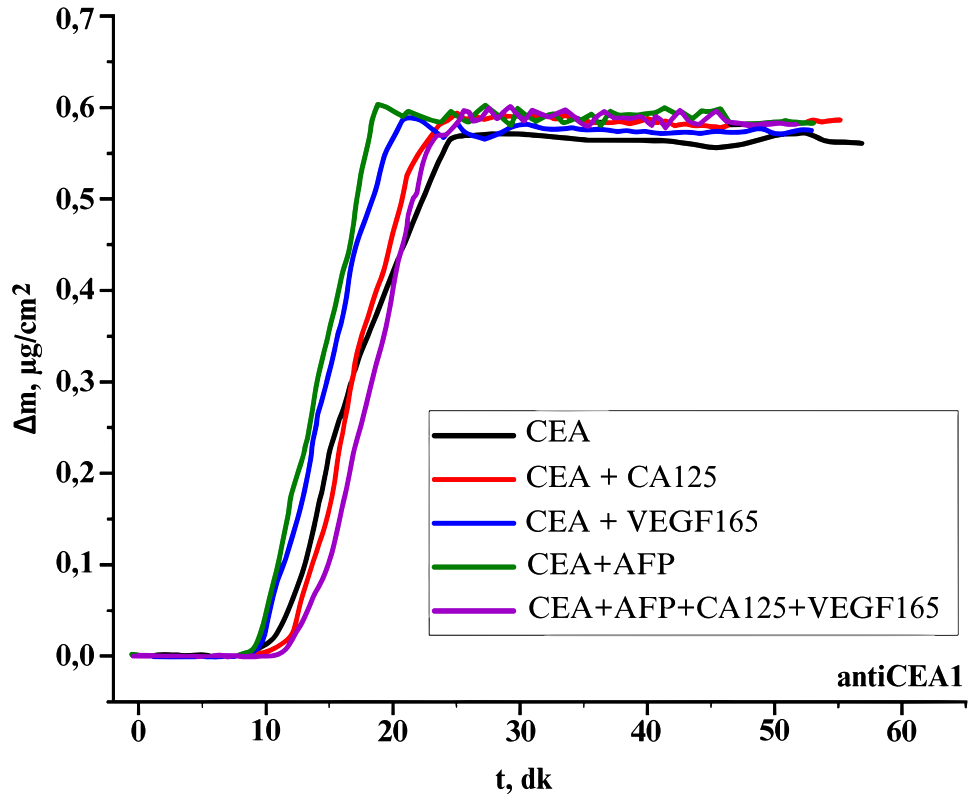
Şekil 4.21. AntiCEA2 platformunda günler arası doğruluk çalışması için alınan sensorgramlar

CEA ile girişim yapması muhtemel AFP, CA125 ve VEGF165 türleri için antiCEA1 aptamer platformu üzerinde girişim testleri yapılmıştır. 500 ng/mL konsantrasyonda bulunan AFP, CA125 ve VEGF165 gibi CEA ile 10 ng/mL CEA'nın birlikte ikili karışım şeklinde gönderilmesi sonucu elde edilen Δm sinyal değişim yüzdeleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. AntiCEA1 platformu üzerinde girişim yapması muhtemel 500ng/mL'deki bazı türlerin, 10 ng/mL CEA'nın analizine etkileri (% Δm değişimi)

Girişim yapması muhtemel türler	% Δm değişimi
AFP	+4,1
CA 125	+3,0
VEGF-165	+1,0
AFP+ CA 125+ VEGF-165	+3,9

Girişim deneylerinde tüm ölçümlerde %5'in altında bir pozitif bir sapmayla sonuçlanmıştır. Girişim yapması muhtemel türler ile CEA'nın ikili ve çoklu karışımlarının eşzamanlı sensorgramları Şekil 4.22'te verilmiştir.



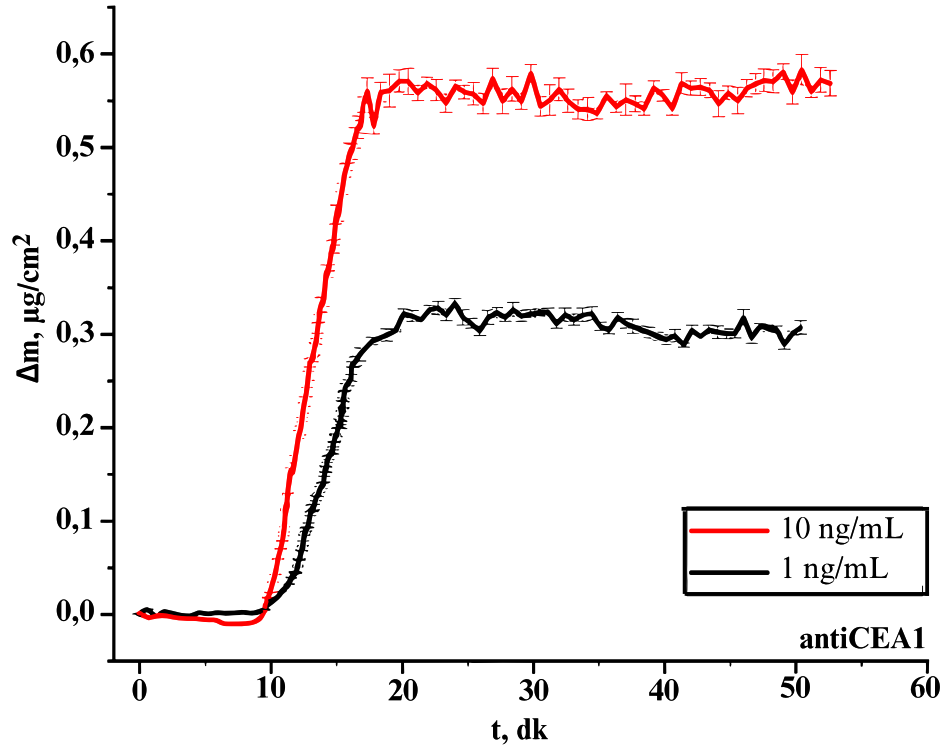
Şekil 4.22. Girişim çalışmalarının QCM sensorgramları

Son olarak, geliştirilen sensörün analitik geri kazanım performansı insan serumuna iki farklı konsantrasyonda eklenen (spike edilen) CEA'nın diğerine (antiCEA2 platformu) göre daha iyi performans gösteren antiCEA1 platformu üzerinde tespit edilmesiyle değerlendirilmiş, sonuçlar Çizelge 4.6'da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. İnsan serumu örneklerinden antiCEA1 sensör platformu üzerinde CEA'nın analitik geri kazanım değerleri (N = 5)

Spike miktarı (ng/mL)	Bulunan CEA miktarı (ng/mL)	% Geri kazanım
1,0	0,954± 0,280	95,4
10	9,72± 0,32	97,2

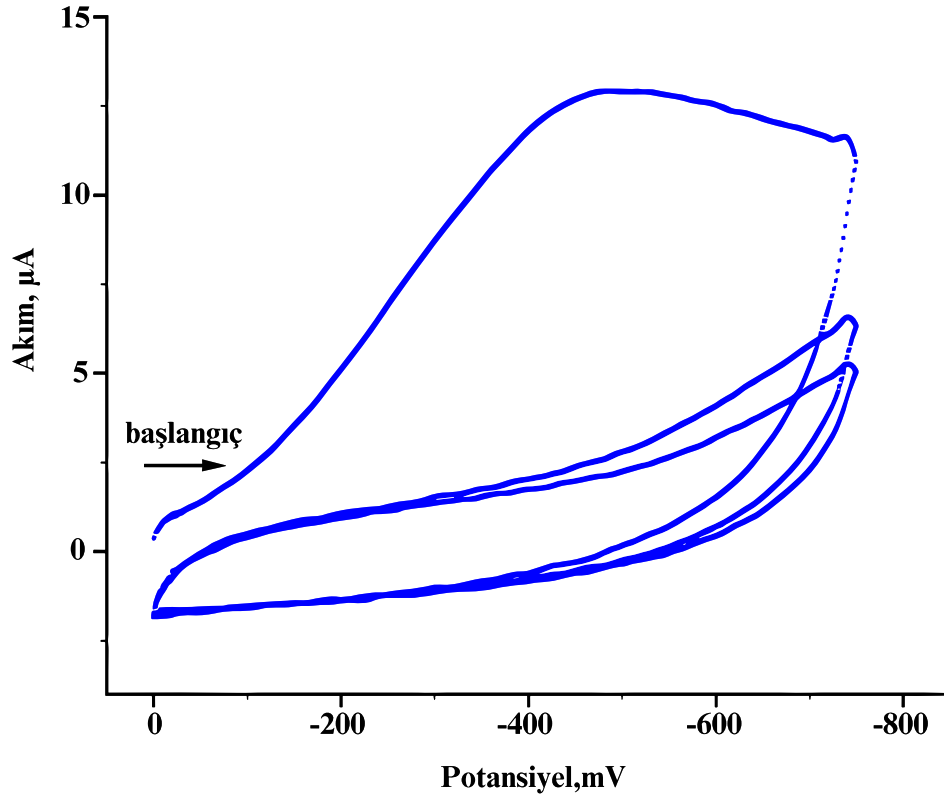
İnsan serumu örneği üzerine 1,0 ve 10 ng/mL CEA spike edilerek geliştirilen yöntemin performansı % geri kazanım değeri olarak belirlenmiştir. Geri kazanım yüzdeleri minimum %95,4 bulunmuştur. Bu sonuç analitik açıdan oldukça başarılıdır ve bu çalışmada geliştirilen QCM aptasensörlerini kullanarak gerçek örneklerde CEA'yı tespit etme yeteneğini göstermektedir. AntiCEA1 platformu üzerinde, ticari insan serumu numunesine spike edilen CEA'nın QCM sensorgramları Şekil 4.23'te verilmiştir.



Şekil 4.23. İnsan serumu örneklerinden antiCEA1 sensör platformu üzerinde 1.0 ve 10 ng/mL CEA'nın eklendiği QCM sensorgramları (N = 5)

4.2. Yüzey Plazmon Rezonans ile Güçlendirilmiş İçten Tam Yansımalı Elipsometri (SPRe-TIRE) Tekniğiyle Aptamer Esaslı CEA Tayini İçin Yöntem Geliştirilmesi

Şekil 4.24'te Au kaplı SF10 cam slayt (SF10/Cr/Au) üzerinde 4MF nanofilmi, 4MB-DAT'nun CV tekniği kullanılarak 3 döngülü voltamogramıyla elde edilmiştir.



Şekil 4.24. 4MB-DAT'nun SF10/Cr/Au elektrot yüzeyi üzerindeki 200 mV/s tarama hızındaki çoklu voltamogramı (Ag/AgCl/KCl_(doy)'e karşı)

İlk döngüde, 4MB-DAT'nun indirgenme pik akımı büyük ölçüde azalmış ve neredeyse tüm yüzeyin kaplandığını göstermiştir. Son döngü ile birlikte indirgenme piki tamamıyla yok olmuştur. Bu durum yüzeyin modifiye olduğunu göstermektedir (İsbir ve ark., 2005).

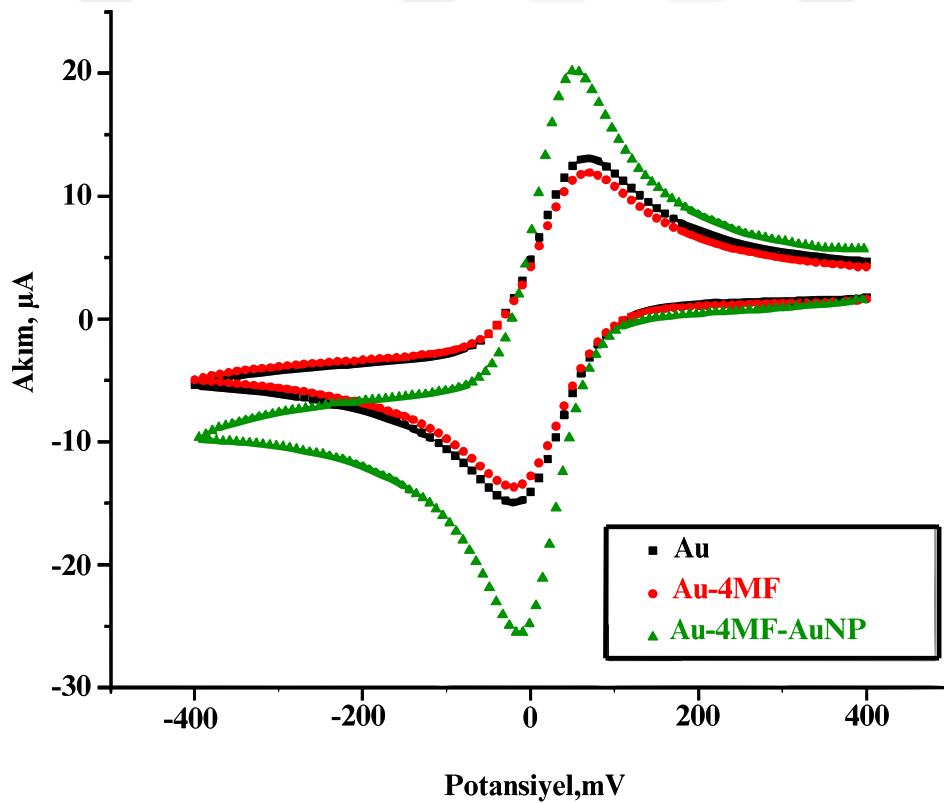
Au kaplı cam slayt üzerindeki 4MF filminin kalınlığını belirlemek için elipsometre ile ölçümler alınmıştır. Her numune tabaka kalınlığının belirlenmesi amacıyla 10 farklı noktadan 5 tekrarlı yapılan ψ ve Δ ölçümleri elipsometrik modele uyarlanmıştır. Modifikasyon döngüsü sayısının katman oluşumu üzerindeki etkisini araştırmak için hava/organik katman/Au film/Cr film/substrat (SF10) şeklinde beş katmanlı bir model uygulanmıştır. Model parametreleri sırasıyla SF10 cam substratı, Cr katmanı, Au katmanı ve 4MF organik katmanı için kırılma indisleri (ve bazılarının k değerleri) sırasıyla $n = 1,73793$; $n = 3,0390$ ve $k = 3,330$; $n = 0,4137$ ve $k = 2,4083$; $n = 1,4600$ şeklindedir (Erkal Aytemur ve ark., 2023). Model sonrasında elde edilen kalınlık değerleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Görüldüğü gibi ilk döngü sonrasında kalınlık 1,2 nm civarına çıkmıştır. Ayrıca 2. ve 3. döngülerde kalınlığın yaklaşık bir dengeye ulaştığı

görülmektedir. Kalınlık model başına elde edildiğinden, verilen kalınlık değerleri 4MF nanofilmin yüzeyde birikmesinin bir ölçüsü olarak düşünülmelidir.

Çizelge 4.7. Altın slayttaki 4 MF nanofilmin elipsometri ile kalınlık değeri

CV döngü sayısı	Bağıl kalınlık $\pm$ SD, nm (n=5)
1	1,247 $\pm$ 0,078
2	2,435 $\pm$ 0,135
3	2,995 $\pm$ 0,184

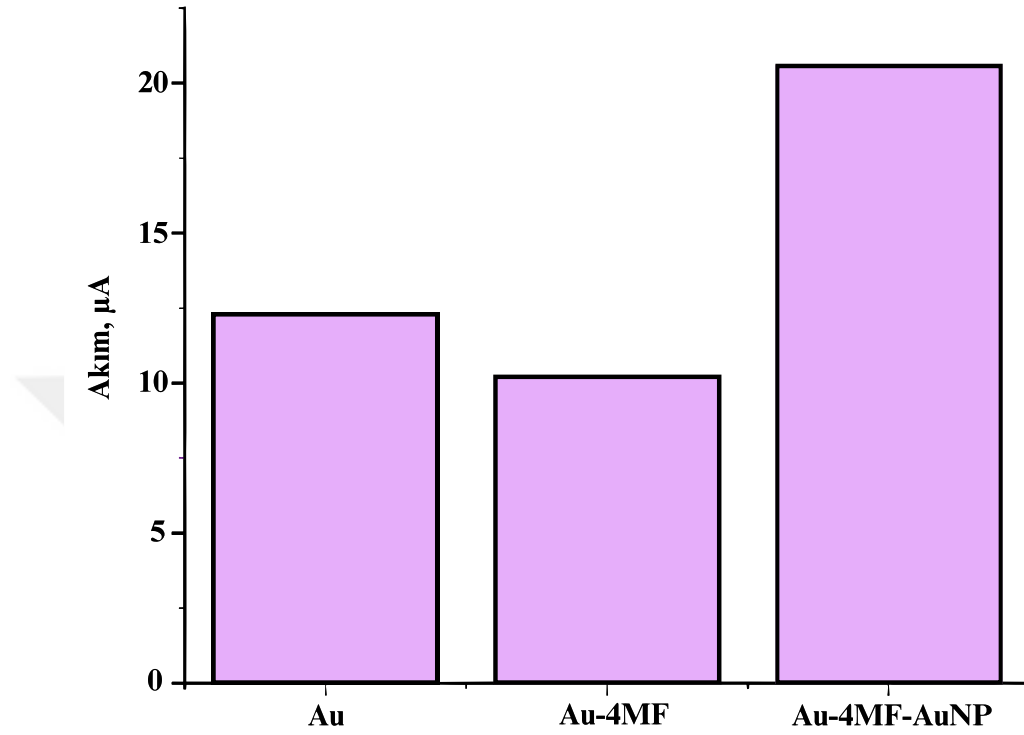
Şekil 4.25'te, 36 mM 4-aminotiyofenol ve 144 mM NaNO₂'in 0,5 M HCl içindeki çözeltilerinin bir buz banyosunda karıştırılmasıyla elde edilen 4-merkaptobenzendiazonyum tuzunun (4MB-DAT) SF10/Cr/Au elektrot yüzeyi üzerindeki 200 mV/s tarama hızındaki voltamogramları görülmektedir.



Şekil 4.25. 1 mM K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆'nın (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP elektrotları üzerinde dönüşümlü voltamogramları (TH: 200 mV/s, Ag/AgCl/KCl_(doğ) referans elektrotuna karşı)

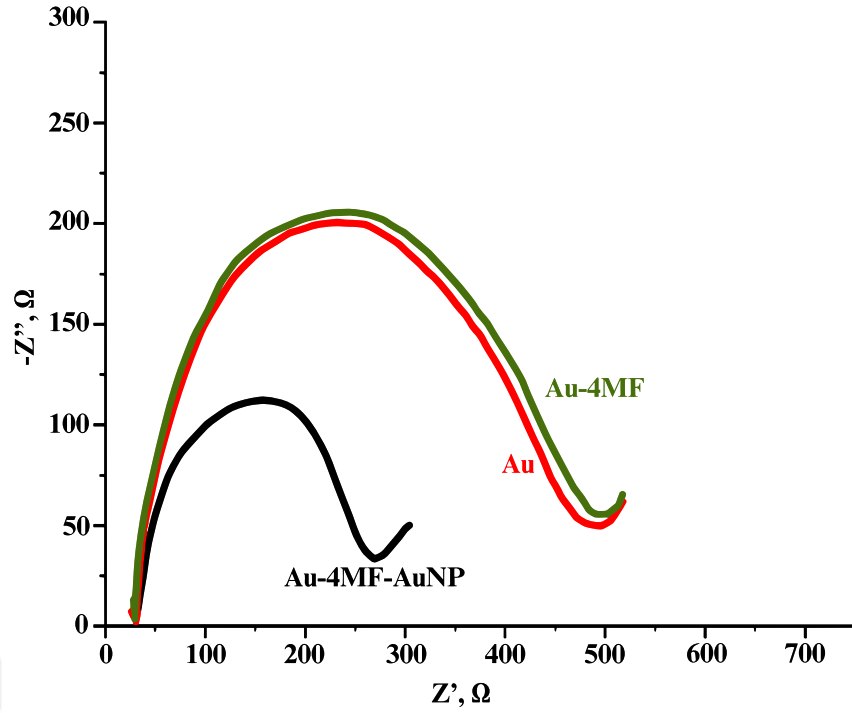
Nanofilmin elektrokimyasal karakterizasyonu CV ve EIS ile gerçekleştirilmiştir. Teknikler için altın nanofilm kaplı cam slayt yerine 1,6 mm çapında altın disk elektrot (BAS, MF-2014, ABD) kullanılmıştır. 1 mM K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆'nın (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP elektrotları üzerinde CV ölçümleri elde edilen voltamogramların katodik akım değerleri Şekil 4.26'daki sütun grafikte gösterilmiştir.

Redoks probun pik akımının değişmesi, yüzeyin modifiye olduğuna işarettir. Au-4MF-AuNP elektrot üzerinde redoks probun pik akımının artması, elektrotun iletkenliğinin arttığını veya elektrot yüzey alanının arttığını gösterir. Bu durumlar modifikasyondan kaynaklanır.



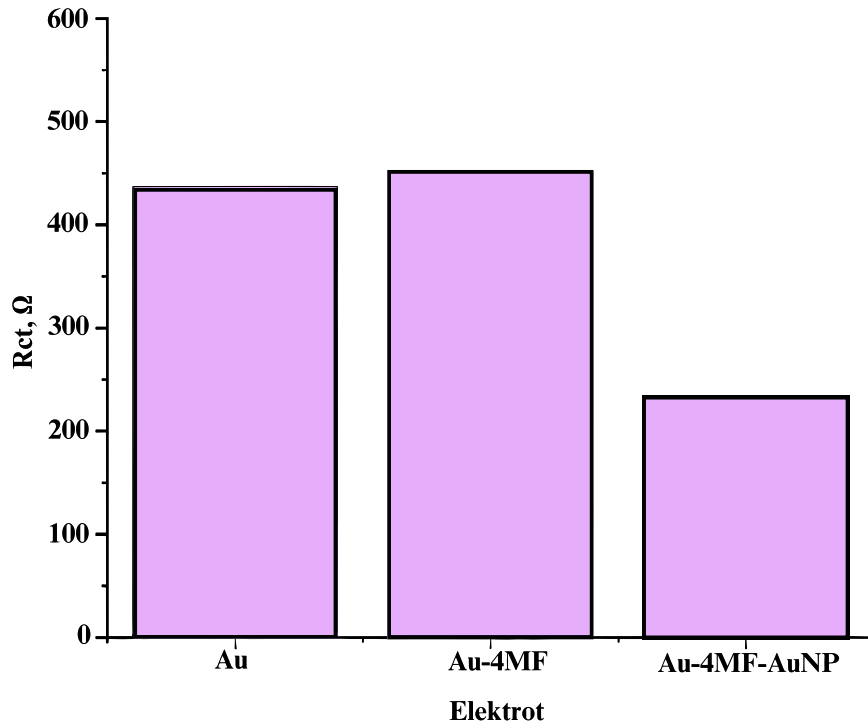
Şekil 4.26. 1 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 'nın (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP elektrotları üzerinde dönüşümlü voltamogramlarından elde edilen katodik pik akımı değerleri (TH: 200 mV/s, Ag/AgCl/KCl_(doy) referans elektrotuna karşı)

Bir diğer karakterizasyon ise, elektrokimyasal impedans spektroskopisidir. Aynı elektrotlar üzerinde redoks prob çiftinin yük aktarım direnci Şekil 4.27'de incelenmiştir. Nyquist eğrileri, difüzyon etkili sabit faz elemanı (Warburg etkili CPE hücresi) şeklinde fit edilmiş R_{ct} değerleri hesaplanmıştır. Redoks prob çiftinin yük aktarım direnci AuNP modifiye yüzeyde azalmıştır. Sonuçlar CV ile uyumludur.



Şekil 4.27. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nın (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP elektrotları üzerinde: EIS tekniğiyle elde edilen Nyquist eğrileri (Referans elektrot Ag/AgCl/ idi) $KCl_{(doy)}$, Tarama hızı 200 mV/s, 300kHz-0,2 Hz aralığında)

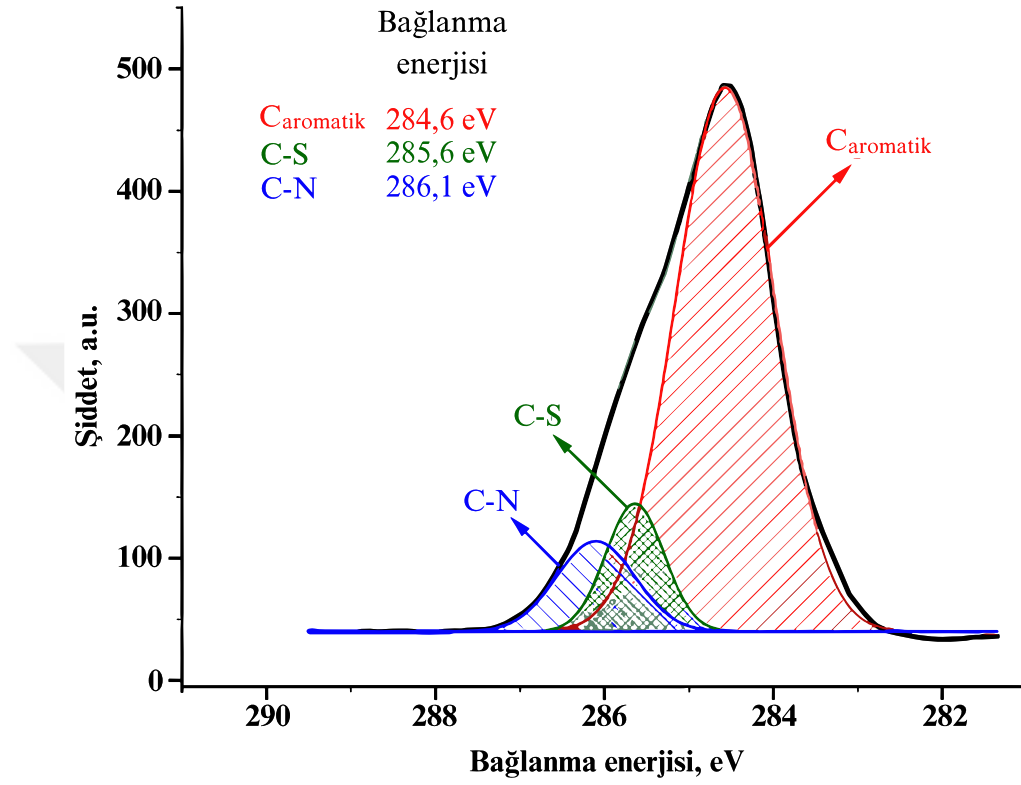
Elde edilen Nyquist eğrilerinden redoks çiftinin elde edilen yük aktarım dirençleri değerleri sütun grafik halinde Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



Şekil 4.28. 1 mM $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 'nın (0,1 M KCl içinde) Au, Au-4MF ve Au-4MF-AuNP elektrotları üzerinde: EIS tekniğiyle elde edilen Nyquist eğrilerinden hesaplanan Rct değerlerinin sütun grafiği

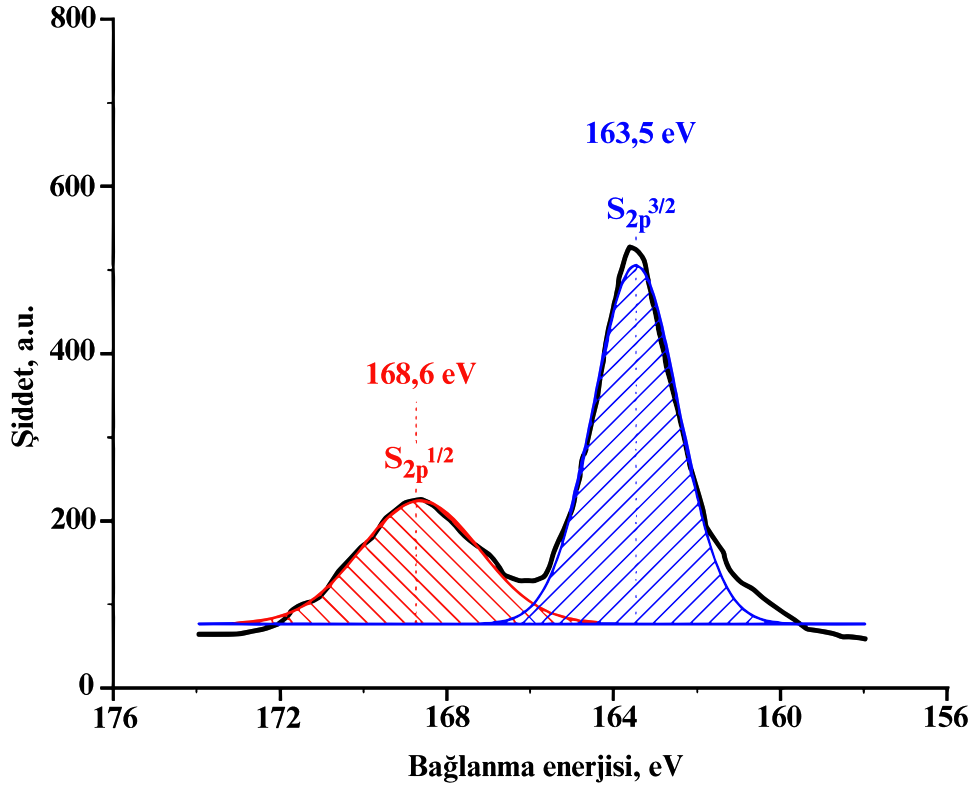
CEA analizi için aptamer bağlamadan önce sensörün son hali olan Au-4MF-AuNP yüzeyi XPS kullanılarak karakterize edilmiş ve yüzeydeki C_{1s} ve S_{2p} elementlerinin varlığı elde edilen dar bölge XPS spektrumlarından anlaşılmıştır.

Au-4MF-AuNP yüzeyinin C_{1s} dar bölge XPS spektrumu, Şekil 4.29'da verilmiştir.



Şekil 4.29. Au-4MF-AuNP'nin C_{1s} dar bölge yüksek çözünürlüklü X-ışını fotoelektron spektrumu

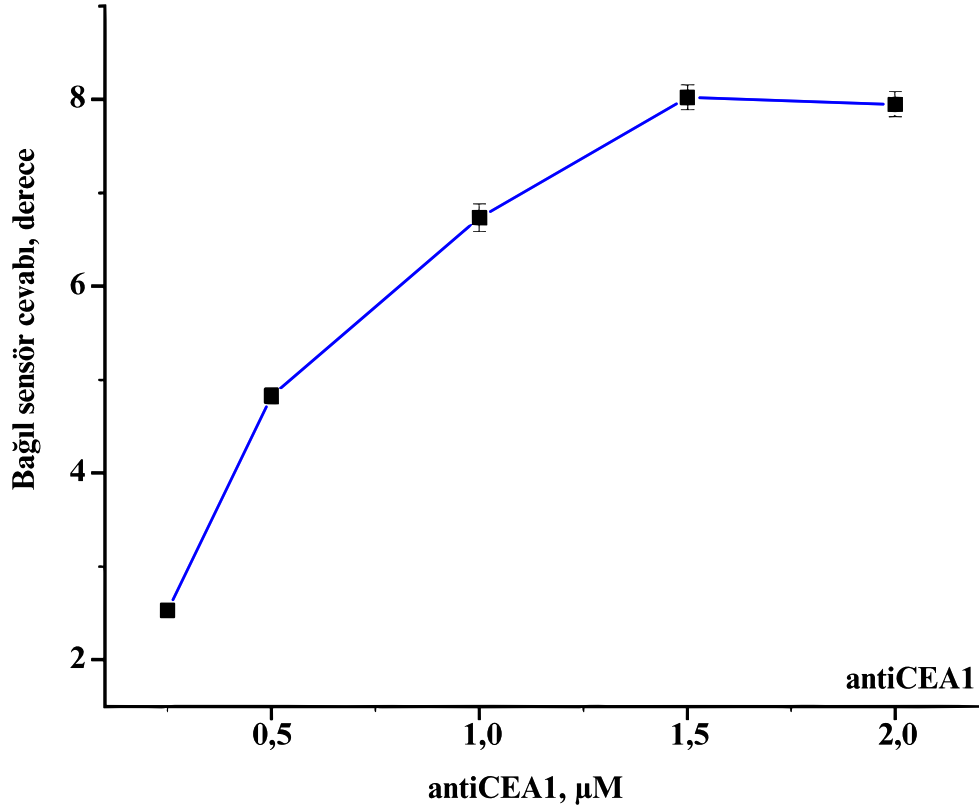
Aynı yüzeyin S_{2p} dar bölge XPS spektrumu Şekil 4.30'de verilmiştir.



Şekil 4.30. Au-4MF-AuNP'nin S_{2p} dar bölge yüksek çözünürlüklü X-ışını fotoelektron spektrumu

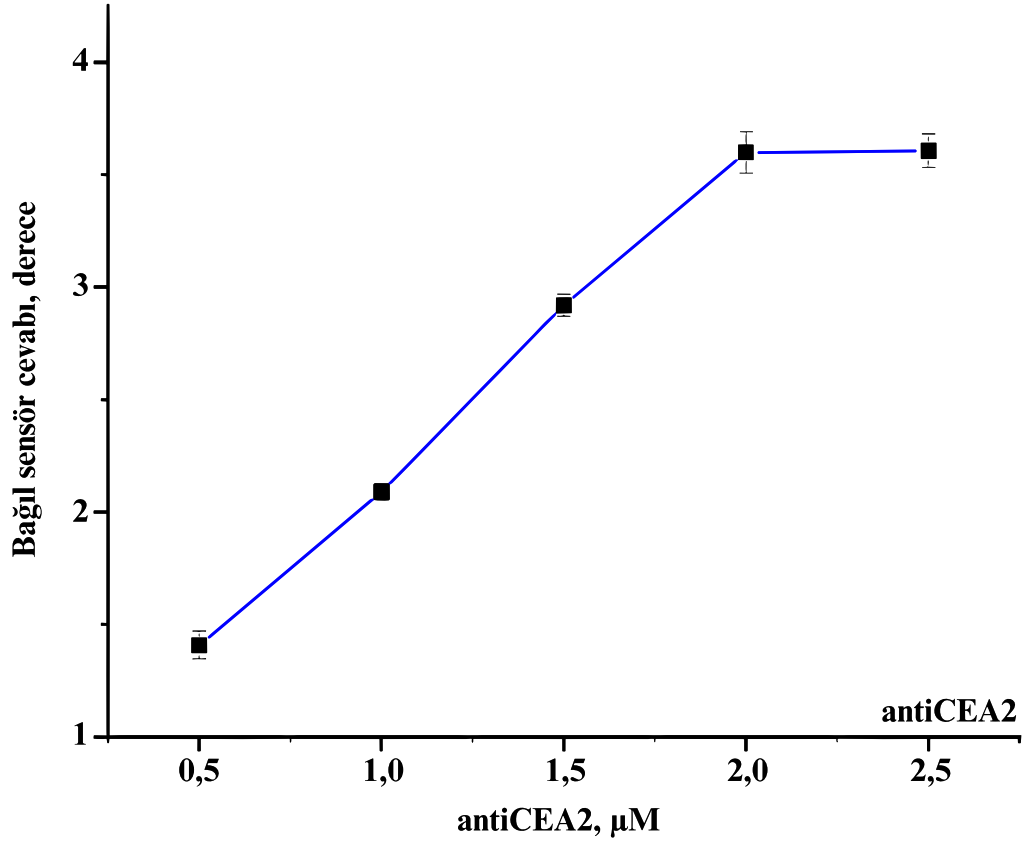
C_{1s} 'e ait XPS spektrumu yaklaşık 285 eV'de geniş bir bant olarak gözlenmiştir. Bu pik fit edildiğinde üç farklı C1'in bağlanma enerjilerine karşılık geldiği anlaşılmaktadır. Bunlar, C_{arom} , C-S ve C-N'nin C_{1s} pikleri olup sırasıyla 284.6, 285.6 ve 286.1 eV'da pik vermektedir (Güzel, 2010) C_{arom} , fenil kaynaklı karbon varlığını gösterir. Merkaptofenil kaynaklı S bağlı karbonun (C-S) bağlanma enerjisi -SH grubunun varlığını gösterir. Ayrıca C-N bağlanma enerjisi, modifikasyon için kullanılan MB-DAT sentezinde kullanılan ve ürüne safsızlık olarak tutunan 4ATF'den kaynaklanır. Şekil 4.30'daki 168,6 eV ve 163,5 eV olan S_{2p} pikleri ($2p^{1/2}$ ve $2p^{3/2}$) yüzeyde -SH gruplarının varlığını gösterir (Ekşi ve ark., 2013).

CEA sensörü geliştirmek için sensör yüzeyine bağlanması gereken antiCEA1 ve antiCEA2 aptamer konsantrasyonu optimize edilmiştir. Bunun için, 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; ve 2,0 μM antiCEA1 (PBS içinde, pH=7,4) yüzeye 2 saatte (Park ve ark., 2004; Caglayan ve ark., 2009) İmmobilize edildikten sonra SPRe-TIRE yöntemiyle 500 ng/mL CEA'nın aptasensör cevapları alınmıştır. Şekil 4.31'de maksimum sensör cevabının 1,5 μM 'lık antiCEA1 aptameriyle alındığı görülmektedir. Benzer şekilde 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 μM antiCEA2 (PBS içinde, pH=7,4) yüzeye 2 saatte immobilize edildikten sonra SPRe-TIRE yöntemiyle 500 ng/mL CEA'nın aptasensör cevapları alınmıştır.



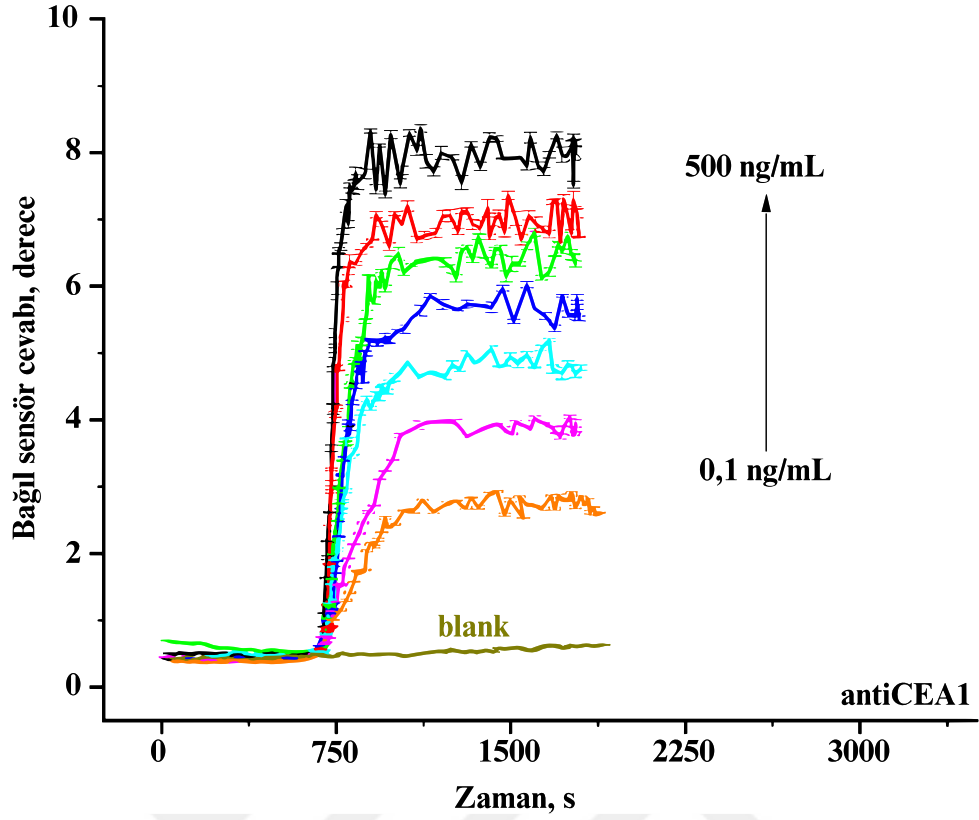
Şekil 4.31. CEA için bağıl aptasensör cevabına karşılık platformda kullanılan antiCEA1 aptamer konsantrasyonu ilişkisi

Şekil 4.32’de maksimum sensör cevabının 2,0 μM ’lık antiCEA2 immobilizasyonu ile alındığı anlaşılmıştır. Sensör çalışmalarında Au-4MF-AuNP yüzeyleri 1,5 μM ’lık antiCEA1 ve 2,0 μM ’lık antiCEA2 ile immobilize edilerek CEA ölçümleri alınmıştır.

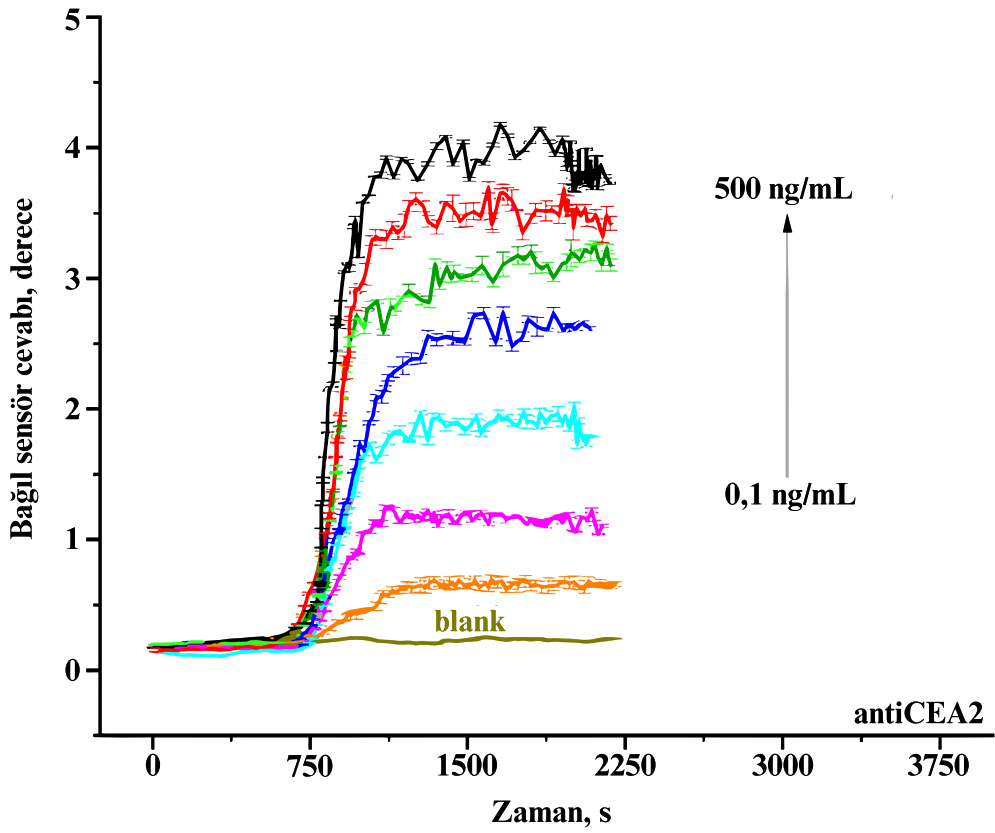


Şekil 4.32. CEA için bağli aptasensör cevabına karşılık platformda kullanılan antiCEA2 aptamer konsantrasyonu ilişkisi

Optimum şartlarda hazırlanan sensör çipleri üzerinde CEA analizleri yapılmıştır. Bu amaçla 0,01 ng/mL - 500 ng/mL konsantrasyon aralığında (0,01; 0,1; 1,0; 10,0; 50,0; 200; 500ng/mL, PBS, pH=7,4) CEA çözeltileri hazırlandıktan sonra SPRe-TIRE ölçümleri alınmıştır. Sensör kalibrasyon grafikleri, PBS'den elde edilen boş sinyalden CEA varken elde edilen sinyallerin çıkarılmasıyla elde edildi. CEA analit konsantrasyonlarına karşılık antiCEA1 platformu üzerinde bağli sensör cevap verileri Şekil 4.33'te verilmiştir. Her bir veri beş ölçüm ortalaması olarak verilmiştir. Benzer şekilde CEA analit konsantrasyonlarına karşılık antiCEA2 platformu üzerinde bağli sensör cevap verileri Şekil 4.34'te sunulmuştur.



Şekil 4.33. AntiCEA1 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA'nın sensör cevap eğrileri

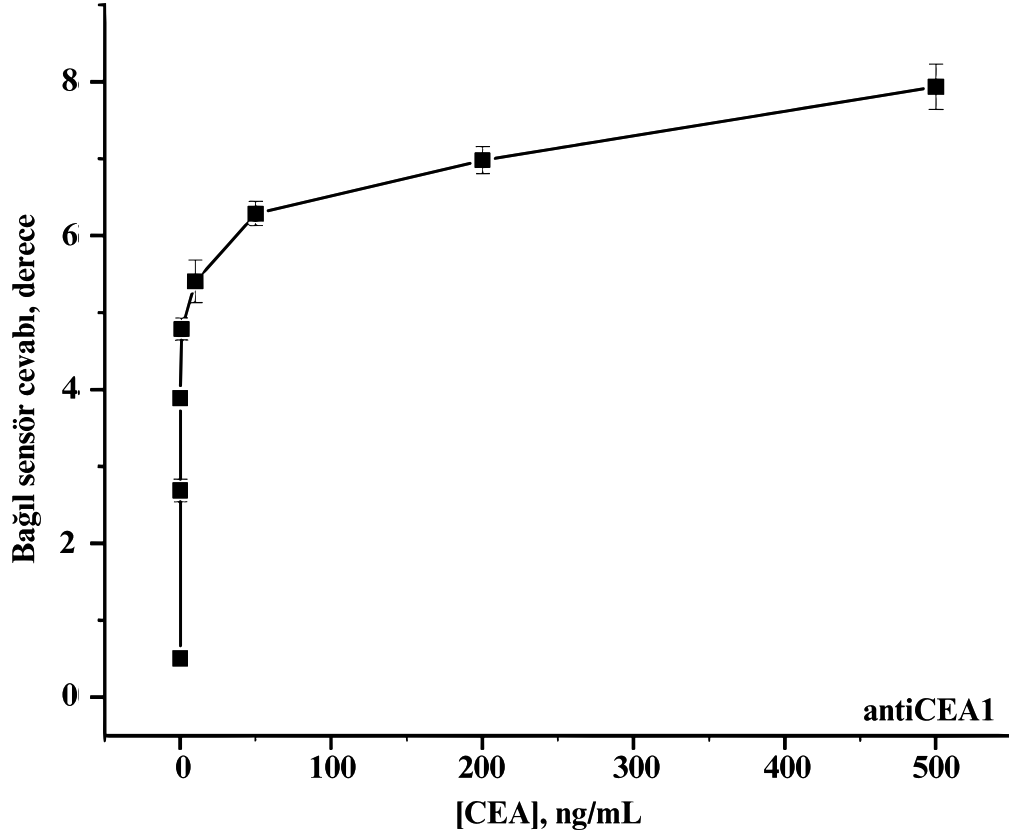


Şekil 4.34. AntiCEA2 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA'nın sensör cevap eğrileri

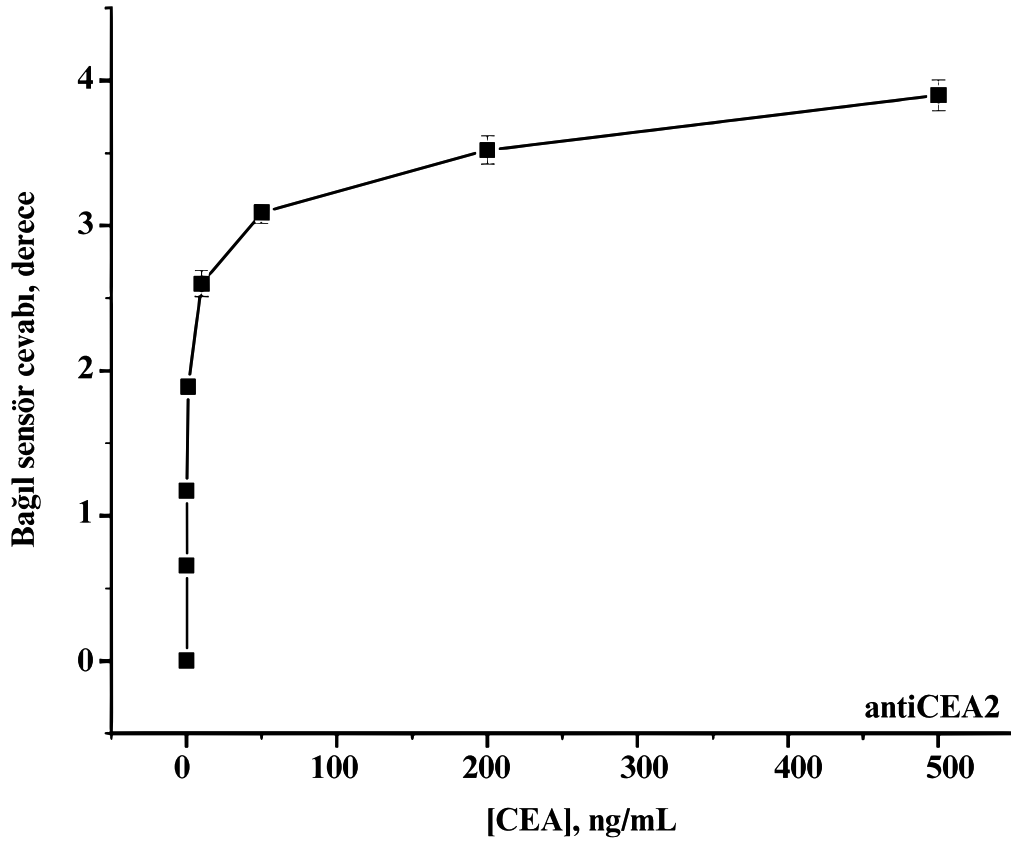
Gerçek zamanlı kalibrasyon eğrilerinden sensör platformuyla düşük CEA konsantrasyonlarında arasında nispeten düşük bir etkileşim sergilendiği gözlenmiştir. Şekil 4.33 ve Şekil 4.34'te görüldüğü gibi, her iki sensör platformu için sensör cevapları oldukça benzerdir. Her iki aptasensör platformu için enjeksiyondan yaklaşık 5 dakika sonra platolar gözlenmiştir. Göreceli sensör tepkisi açısından karşılaştırıldığında antiCEA1 için elde edilen faz kaymasının, aynı konsantrasyonda antiCEA2 probundan elde edilenden yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu görüldü. Ancak bu sonuç, Δ cinsinden daha düşük sinyallerin zayıf analitik performansın kanıtı olarak kabul edilebileceği anlamına gelmez. Ayrıca yüzey etkileşimi sırasında yüzeyde oluşan filmin moleküler yoğunluğundaki fark, faz kaymasını değiştiren tek faktör değildir. Benzer davranış daha önce Hg^{2+} iyon tespiti için aptamerler kullanılarak yapılan bir çalışmada da gözlenmiştir (Çağlayan, 2020). Çalışmada, yüzeydeki film yoğunluğu Hg^{2+} -aptamer etkileşiminden sonra önemli ölçüde değişmemiştir. Sonuç olarak sensörün analitik performans değerlendirmesi açısından bakıldığında, bağlı sensör sinyal yoğunluğu her iki aptamer için farklı olsa da elde edilen sinyallerin buradaki CEA konsantrasyonu aralığında ayrılması için yeterli kabul edilmiştir.

Sensör davranışının, yüzeydeki sınırlı sayıda mevcut bölge (aptamer problemleri) ile etkileşime giren analit için beklenen logaritmik bir cevap olduğu belirlendi. AntiCEA1 probuyla geliştirilen aptasensörün kalibrasyon eğrisi Şekil 4.35'te verilmiştir.

AntiCEA2 probuyla geliştirilen aptasensörün kalibrasyon eğrisi ise Şekil 4.36'da verilmiştir. AntiCEA1 ve antiCEA2 aptamerlerini taşıyan her iki sensör çipi için bu eğriler, ilgili sensör tepkisinin büyüklüğü haricinde benzerlik göstermiştir.

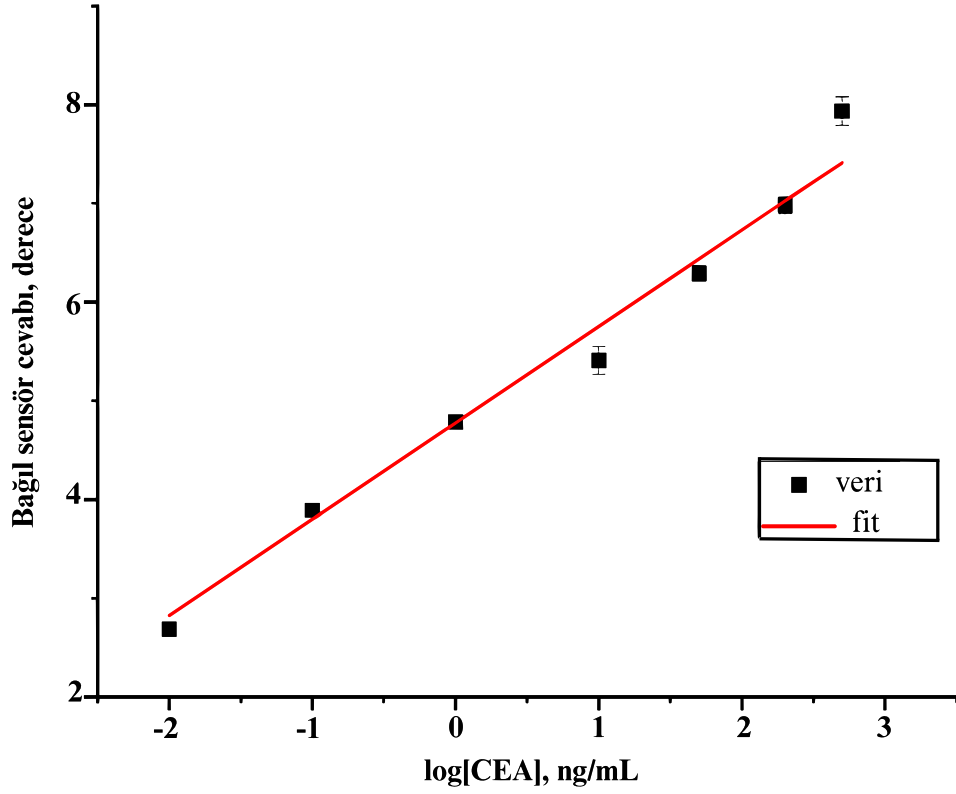


Şekil 4.35. AntiCEA1 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA'nın kalibrasyon grafiği

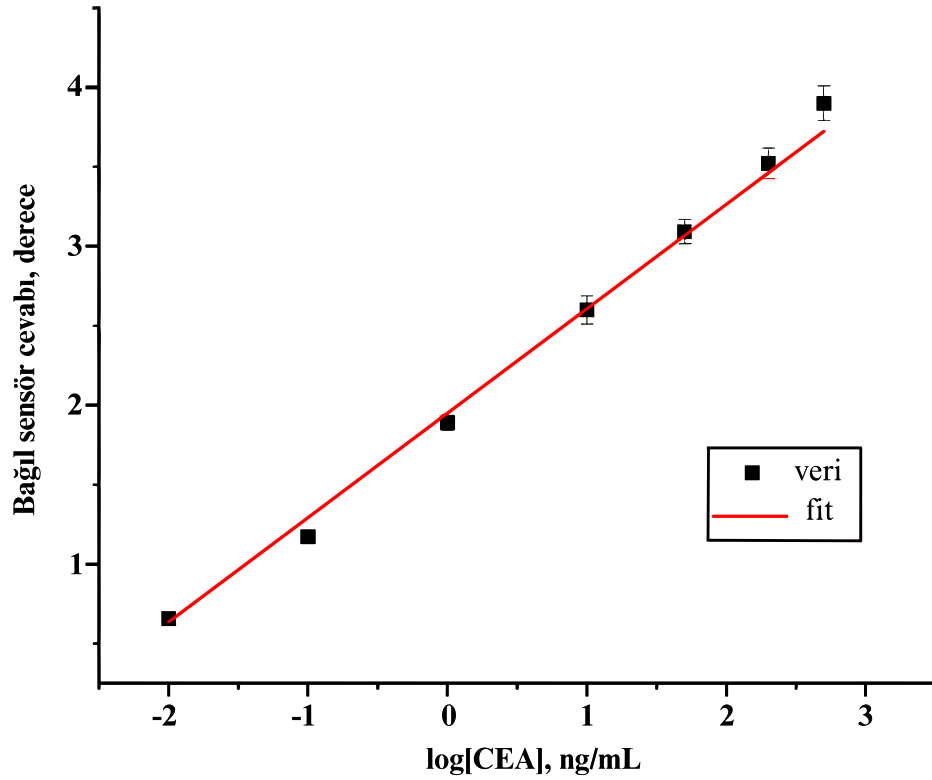


Şekil 4.36. AntiCEA2 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA'nın kalibrasyon grafiği

Her iki sensör grafiği de Şekil 4.37 ve Şekil 4.38’de yarı-logaritmik ölçekte $>0,98$ ’lik bir R^2 değeri ile doğrusal olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.37. AntiCEA1 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA’nın yarı-logaritmik kalibrasyon grafiği



Şekil 4.38. AntiCEA1 platformu üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki CEA için yarı logaritmik kalibrasyon grafiği

Bu kalibrasyon eğrilerinden elde edilen analitik parametreler Çizelge 4.8'de özetlenmiştir. Bağlı sensör cevabının yoğunluğu nedeniyle antiCEA1 aptamerini taşıyan sensör çipinden daha yüksek bir cevap ($\sim 4,8 \Delta$, derece) elde edilirken antiCEA2 için 1,9 civarında bulunmuştur. Analitik açıdan her iki sensör platformunun hassasiyetinin bir ölçüsü olan kalibrasyon grafiklerinin eğimleri, antiCEA1 için $0,98 \Delta/\log [\text{CEA}]$ ve antiCEA2 için $0,66 \Delta/\log [\text{CEA}]$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, antiCEA1 probu kullanılarak hazırlanan CEA sensörünün, önerdiğimiz SPRe-TIRE platformunda analitik performans açısından daha hassas olduğunu göstermektedir.

Bu hassasiyet aynı zamanda sinyal-gürültü oranı (S/N) dikkate alınarak hesaplanan tespit ve ölçüm sonuçlarına da yansımıştır. Her iki sensör platformu için tekrarlanan analizlerden elde edilen standart sapmaların ortalamaları, gürültü seviyeleri olarak kabul edilmiştir. S/N oranı 3 kullanılarak belirlenen LOD değeri antiCEA1 probunu taşıyan sensör için $0,1 \text{ pg/mL}$ iken antiCEA2 probunu taşıyan sensör için $2,9 \text{ pg/mL}$ 'dir. Bağlı sensör tepkilerinde 2 kat fark olmasına rağmen LOD açısından bu farkın yaklaşık 30 kat olduğu görüldü. Bu, kısaca düşük konsantrasyon seviyelerinde CEA etkileşimine cevap olarak faz kayması (Δ) açısından yetersiz sinyal ayrımının bir sonucu olarak antiCEA2 platformundan elde edilen gürültünün bir sonucu olabilir. Yine bu, daha düşük afiniteye sahip probun bir sonucu olabileceği gibi, her iki probun aynı analit ile etkileşimindeki farklılıklar ve bir prob olarak her iki aptamer dizisinin uzunluğu ve fonksiyonel gruplarının bir sonucu olabilir. Kantitatif tayin sınırları (LOQ) da hesaplandı. LOQ değerleri antiCEA1 ve antiCEA2 problemleri için sırasıyla $0,3 \text{ pg/mL}$ ve $8,7 \text{ pg/mL}$ olarak bulundu.

Çizelge 4.8. Geliştirilen yöntemlere ait analitik parametreler (n=5)

Analitik özellik	Değer	
	AntiCEA1	AntiCEA2
Regresyon denklemi	$y=0,9764x+4,7766$	$y=0,6571x+1,9496$
Eğimin standart hatası	0,0468	0,0199
Kesim noktası standart hatası	0,0686	0,0359
R^2	0,9886	0,9955
Doğrusal aralık (ng/mL)	0,01-500	0,01-500
Veri noktası sayısı	7	7
Alt tayin sınırı (pg/mL) (S/N=3)	0,1	2,9
Kantitatif tayin sınırı (pg/mL)	0,3	8,7

AntiCEA1 ve antiCEA2 aptamerini taşıyan SPRe-TIRE sensör platformlarının kesinlik ve doğruluk testleri çalışılarak gün içi ve ardışık beş gün için günler arası olarak sonuçlar Çizelge 4.9'da verildi. 1.0 ng/mL ve 50 ng/mL CEA için gün içi ve günler arası test sonuçlarına göre hem bağlı standart sapma hem de bağlı hata %5'in altında

bulunmuştur. Bu sonuçların her ikisi de analitik performans gereksinimlerini karşılamaktadır. Her iki sensör platformu için de bağıl standart hata $-\%5$ ile $+\%5$ arasında değerlendirilmiştir. Bu doğruluk ve kesinlik sonuçları, düşük konsantrasyonlarda CEA'nın tespiti için özel olarak kullanılması amaçlanan bu sensör platformunun analitik olarak umut verici olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.9. Geliştirilen yöntemin gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik performansı (ortalama $\pm\sigma$)

		Aptamer	[CEA], ng/mL	
			1.00	50.00
Gün içi	Bulunan sonuç	antiCEA1	1,036±0,050	50,92±1,75
		antiCEA2	1,050±0,027	51,32±0,24
	% RSD	antiCEA1	4,83	3,44
		antiCEA2	2,57	0,47
	%RE	antiCEA1	3,60	1,84
		antiCEA2	5,00	2,64
Günler arası	Bulunan sonuç	antiCEA1	0,951±0,045	48,58±1,27
		antiCEA2	1,032±0,048	47,78±2,25
	% RSD	antiCEA1	4,73	2,61
		antiCEA2	4,65	4,71
	%RE	antiCEA1	-4,90	-3,55
		antiCEA2	3,20	-4,44

Aptamerlerin farklı girişim yapması muhtemel türlere karşı başarısı bilinmesine rağmen bu çalışmada farklı türlerle girişim testleri yapılmıştır. Aptamerler doğası gereği farklı türlere karşı seçici olarak geliştirilmiştir. Bu çalışmada kullandığımız ve bildirdiğimiz iki aptamer (antiCEA1 ve antiCEA2), CEA'ya olan yüksek afinitesi için seçilmiştir. Bu çalışmada kullanılan tüm girişimciler, CEA'nın konsantrasyonunun 10 katı olarak şekilde eklenmiştir (yani 50 ng/mL'ye karşı 500 ng/mL). Seçilen türler AFP, CA125 ve VEGF-165'tir. Bu türlerin, antiCEA1 platformunda CEA analiz yönteminin performansı üzerindeki etkileri Çizelge 4.10'da verilmiştir. En yüksek girişim etkisi $\%2,1$ 'lik Δ kayması ile CA125 türünden kaynaklanmıştır. Bu değer $\%5$ 'in çok altında kabul edilebilir sınır içerisinde. Bu nedenle önemli bir girişim etkisinin bulunmadığına karar verilmiştir.

Çizelge 4.10. 500 ng/mL konsantrasyonlu bazı türlerin 50 ng/mL CEA analiz yöntemi üzerine etkileri (AntiCEA1 aptasensörü için)

Girişim yapması muhtemel türler	% Δ sinyal değişimi
α -Fetoprotein	+1,4
CA-125	+2,1
VEGF-165	+1,7

AntiCEA1 sensör platformu üzerinde geliştirilen yöntemin gerçek numune üzerinde validasyonu için ticari insan serumu örneğine 1,0 ve 50 ng/mL CEA spike

edilerek % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 4.11’den görüldüğü gibi geri kazanımlar %95,5 –104 arasında bulunmuştur. Elde edilen bu geri kazanım değerleri, analitik gerekliliklerin kabul edilebilir sınırları içinde bulunmuştur.

Çizelge 4.11. İnsan serumu örneklerinden antiCEA1 sensör platformu üzerinde CEA'nın analitik geri kazanım değerleri (N = 5)

Numune	Spike miktarı (ng/mL)	Bulunan CEA miktarı (ng/mL)	% Geri kazanım
I	1	1,04 ± 0,02	104
	50	47,75± 2,16	95,5
II	1	0,98± 0,02	98,0
	50	51,76± 1,65	103,5

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Kuartz Kristal Mikrobals Tekniğiyle Aptamer Esaslı CEA Tayini İçin Sonuçlar ve Öneriler

Tezin bu kısmı, iki farklı aptamer (antiCEA1 ve antiCEA2) kullanılarak, CEA tespiti için bir QCM aptasensörünün geliştirilmesi sonuçlarını sunmaktadır. Sensör platformları hazırlanırken, CV kullanılarak 4MB-DAT'nun indirgenmesi yoluyla 4MF nanofilminin altın kaplı QCM kristal yüzeylerine elektrokimyasal olarak bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra, sensörün performansını arttırmak için yüzeydeki tiyol (-SH) uçlarına AuNP'lar bağlanmıştır. Son olarak elde edilen Au-4MF-AuNP yüzeyindeki altın nanoparçacıklara iki farklı aptamer olan antiCEA1 ve antiCEA2 bağlanmıştır.

Hazırlanan sensör platformlarının hazırlık aşamalarında kullanılan nanoparçacıklar mor ötesi-görünür bölge spektroskopisi, TEM, SEM ve EDX teknikleriyle karakterize edilmiştir. QCM kristali üzerine modifiye edilen yüzeyler (Au, Au-4MF, Au-4MF-AuNP) de elektrokimyasal CV yöntemiyle karakterize edilmiştir. Au-4MF-AuNP yüzeyindeki C ve S atomları, C_{1s} ve S_{2p} dar bölge XPS spektroskopisiyle bağlanma enerjileri kontrol edilerek karakterize edilmiştir.

Altın kristal yüzeyine modifiye edilecek 4MF nanofilmin kalınlığı bir elipsometre yardımıyla kontrol edilerek modifikasyonun tek döngüde yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Yüzeye bağlanan analit kütlesi bakımından çok hassas bir teknik olan QCM kristalinin substrat kısmına modifiye edilecek nanofilm tek tabakalı ve oldukça hafif olmalıdır. Aksi halde tekniğin hassasiyeti azalır ve bağıl hata miktarı artabilir.

CEA analiz yöntemi geliştirmek için 0,1 ng/mL ile 25 ng/mL arasında değişen geniş bir CEA konsantrasyonu aralığında QCM ölçümleri alınarak kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Logaritmik konsantrasyon türünde bir değerlendirmeye doğrusal kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Yöntemin alt tayin sınırı ($S/N=3$) antiCEA1 platformu üzerinde 102 pg/mL ve antiCEA2 platformu üzerinde 1,42 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bu LOD değerleri, CEA tespiti için literatürde bildirilen farklı tekniklerin sonuçlarıyla uyumludur (Çizelge 2.1). Ayrıca, gün içi ve günler arası bu sonuçlara göre 0,5 ve 10 ng/mL CEA için %RSD değeri 2,2 ile 3,2 arasında değişirken %RE değeri -1,4 ile 3,8 arasında hesaplanmıştır. Her iki aptasensörün kesinlik ve doğruluk (% bağıl hata olarak) değerleri %5'in altında bulunmuştur. Analitik sonuçlar bakımından sensör cevapları tatmin edici değerlerdedir.

Ayrıca aptasensörlerin kinetik analizine göre afinite (KD) değerleri antiCEA1 için $0,43 \pm 0,14$ nM ve antiCEA2 için $0,75 \pm 0,42$ nM olarak hesaplanmıştır. Elde edilen iki farklı aptamer için KD değerleri literatürde belirtilen KD değerlerinden oldukça düşük bulunmuştur.

CEA ile girişim yapması muhtemel AFP, CA-125 ve VEGF-165 gibi türler için girişim deneyleri yapılmıştır. Sensör performans bakımından daha iyi olan antiCEA1 sensörü ile 500 ng/mL konsantrasyondaki bu türler arasında 10 ng/mL CEA maksimum %4,1'lik bir sinyal değişimi (Δm) olarak başarıyla tayin edilebilmiştir. Son olarak antiCEA1 aptasensörün gerçek numune performansı insan serumu numuneleri kullanılarak test edilmiş, geri kazanım değerleri, %95,4 ve %97,2 olarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Özetle, bu çalışma, QCM platformu ile CEA'nın hassas ve spesifik tespiti için iki farklı aptasensörün başarılı bir şekilde kullanıldığını vurgulayarak, gelişmiş CEA tespit metodolojileri için ümit verici sonuçlar elde edilmiştir.

5.2. Yüzey Plazmon Rezonans ile Güçlendirilmiş İçten Tam Yansımali Elipsometri (SPRe-TIRE) Tekniğiyle Aptamer Esaslı CEA Tayini İçin Sonuçlar ve Öneriler

Bu çalışmada SF10 cam yüzeyi Cr ve Au nanotabakalarıyla kaplandıktan sonra elektrot olarak kullanılarak Au yüzey kısmına 4MF molekülleri 4-MB-DAT indirgenmesiyle elektrokimyasal olarak bağlanmıştır. Literatürde özellikle SPR, QCM, Elipsometri gibi sensör tekniklerinde elektrokimyasal nanofilm oluşturma işlemi çok yaygın olmamakla birlikte oldukça düzgün ve sıkı istiflenmiş yüzeyler elde edilmiştir. Elde edilen Au-4MF yüzeyindeki nanofilm kalınlığı bir elipsometre ile kontrol edildi. elipsometrik sistemler 200 nm'ye kadar oluşturulan nanofilmleri rahatlıkla ölçebilir. Bu çalışmada dönüşümlü voltametri ile üç döngünün tamamlanması sonucu oluşan voltamogramdan modifikasyonun da tamamlandığı, yaklaşık 3 nm kadar bir film oluştuğu anlaşılmıştır. Au-4MF yüzeyindeki tiyol uçlarına AuNP bağlanarak daha çok aptamerin bağlanabileceği bir yüzey (Au-4MF-AuNP) geliştirilmiştir. Nanoparçacık ve yüzey filmleri çeşitli tekniklerle (XPS, CV, EIS) karakterize edilmiştir. AuNP ihtiva eden yüzeye bağlanacak antiCEA1 ve antiCEA2 aptamerlerinin konsantrasyonları optimize edildikten sonra 0,01 ng/mL - 500 ng/mL CEA (PBS içinde, pH=7,4) konsantrasyon aralığında kalibrasyon çalışmaları yapılmıştır. AntiCEA1 ve antiCEA2 aptamerleri içeren iki farklı platform için LOD değerleri sırasıyla 0,1 pg/mL ve 2,9 pg/mL olarak bulunmuştur. Yöntemin doğruluk (% bağıl hata bakımından) ve kesinlik (% bağıl standart

sapma olarak) değeri gün içi ve günler arası olarak tespit edilmiştir. Yöntemin doğruluk ve kesinliği yüksek bulunmuştur. Öte yandan, önerdiğimiz platformun seçiciliği de test edilmiş ve girişim yapması muhtemel AFP, CA125 ve VEGF-165 türlerinin analiz yönteminin bozucu etkisi araştırılmıştır. %3'ten daha az bir maksimum sapma ile yöntemin girişimcilere karşı cevabı oldukça başarılı bulunmuştur. Yöntemin ticari olarak temin edilen insan serumundaki performansı başarıyla test edilmiştir. Geri kazanım değerleri %95 ile %105 arasındadır. Bu çalışmadaki sensör performansı çoğunlukla sensör çalışmalarında yaygın olarak kullanılan elektrokimyasal, optik, spektroskopik ve kromatografik tespit stratejilerinden daha iyi bir performans göstermiştir (Çizelge 2.1). Ayrıca bu çalışmada, diğer platformlara kıyasla ilk kez SPRe-TIRE tekniği kullanılarak elektrokimyasal olarak indirgenmiş diazonyum tuzu üzerinde kendiliğinden birleşen tek tabaka oluşumu kullanılarak yeni bir tespit stratejisi uygulanması da bu tür çalışmalara öncülük edecektir. Elipsometrik ölçümlerin biyolojide, özellikle sağlık uygulamalarında büyük bir potansiyeli vardır. Bu çalışmada SPRe-TIRE aptasensörünün CEA tespiti için potansiyeli başarıyla ortaya konmuş ve bu platformun klinik uygulamalarda uygulanmasına yönelik ileri çalışmalara öncülük edeceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmadzadeh-Raji, M., Ghafar-Zadeh, E. and Amoabediny, G., 2016, An optically-transparent aptamer-based detection system for colon cancer applications using gold nanoparticles electrodeposited on indium tin oxide, *Sensors*, 16 (7), 107-116.
- Akdemir, B., Güneş, S. and Genç, A., 2009, Artificial neural network training models in prediction of concrete compressive strength using euclidean normalization method, *3rd Int. Conf. on Complex Systems and Applications-ICCSA 2009*, Le Havre-France, 160-165.
- Albayatı, S.H.M., Üstündağ, Z., and Soylu, P., 2023, A novel molecularly imprinted electrochemical sensor for the ultrasensitive detection of tert-butylhydroquinone in edible oils, *Analytical Biochemistry*, 682, 115348.
- Aldewachi, H., Chalati, T., Woodroffe, M.N., Bricklebank, N., Sharrack, B. and Gardiner, P., 2017, Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors, *Nanoscale*, 10, 18–33.
- Aldilaijan, A.F., Kim, Y.I., Kim, C.W., Yoon Y.S., Park I.J., Lim S.B., Kim J. and Kim J.C., 2023, Clinical implication of tissue carcinoembryonic antigen expression in association with serum carcinoembryonic antigen in colorectal cancer, *Scientific Reports*, 13, 7616.
- Altintas, Z., Uludag, Y., Gurbuz, Y. and Tothill, I. E., 2011, Surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of the cancer biomarker carcinoembryonic antigen, *Talanta*, 86, 377-383.
- Arwin, H., 2000, Ellipsometry on thin organic layers of biological interest: characterization and applications. *Thin Solid Films*, 377-378, 48-56.
- Arwin, H.; Poksinski, M. and Johansen, K., 2008, Enhancement in ellipsometric thin film sensitivity near surface plasmon resonance conditions, *Physica Status Solidi (a)*, 205 (4), 817-820.
- Bao, B., Su, P., Zhu, J., Chen, J., Xu, Y., Gu, B., Liu, Y., Wang, L., 2018, Rapid aptasensor capable of simply detect tumor markers based on conjugated polyelectrolytes, *Talanta*, 190, 204–209.
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R., 2001, Electrochemical methods, 2nd edition, *John Wiley and Sons, Inc.*, New York, 1-833.
- Barnes, W.L. and Sambles, J.R., 1987, Thin Langmuir-Blodgett films studied using surface plasmon polaritons, *Surface Sci.*, 183, 189-200.
- Baykara O., 2016, Current Modalities in Treatment of Cancer, *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, Cilt: 5 Sayı: 3, 154 – 165.
- Blum, L.J. and Coulet, P.R., 1991, Biosensor principles and applications., Berkeley/California.
- Brooksby, P.A. and Downard, A.J., 2004, Electrochemical and Atomic Force Microscopy Study of Carbon Surface Modification via Diazonium Reduction in Aqueous and Acetonitrile Solutions, *Langmuir*, 20(12), 5038-5045.
- Cai, Y., Li, H., Li, Y., Zhao, Y., Ma, H., Zhu, B., Xu, C., Wei, Q., Wu, D. and Du, B., 2012, Electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen based on signal amplification strategy of nanotubular mesoporous PdCu alloy. *Biosensors and Bioelectronics*, 36 (1), 6-11.

- Campanella, L. and Tomassetti, M., 2019, The Applications of Sensors and Biosensors in Investigating Drugs, Foods, and Nutraceuticals. *Sensors (Basel)*, 2, 19(15), 3395.
- Capelli D., Scognamiglio, V. and Montanari, R., 2023, Surface plasmon resonance technology: Recent advances, applications and experimental cases, *Trends in Analytical Chemistry*, 163, 117079.
- Carneiro, M.C.C.G., Sousa-Castillo, A., Correa-Duarte, M.A. and Sales, M.G.F., 2019, Dual biorecognition by combining molecularly-imprinted polymer and antibody in SERS detection. Application to carcinoembryonic antigen, *Biosensors and Bioelectronics*, 146, 111761.
- Chegal, W., Cho, H. M., Cho, Y. J., Kim, Y. P. and Kim, H. S., 2005, Imaging ellipsometry combined with surface plasmon resonance for real-time biospecific interaction analysis, *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering*, 6008.
- Chen, Y., Li, B., Lyu, P., Kwok, H., Ge, L. and Wu, Q., 2021, Boronate ester bond-based potentiometric aptasensor for screening carcinoembryonic antigen-glycoprotein using nanometer-sized CaCO_3 with ion-selective electrode, *Anal. Bioanal. Chem.*, 413, 1073-1080.
- Chi, L., Xu, C., Li, S., Wang, X., Tang, D. and Xue, F., 2020, In situ amplified QCM immunoassay for carcinoembryonic antigen with colorectal cancer using horseradish peroxidase nanospheres and enzymatic biocatalytic precipitation, *Analyst*, 145(18), 6111-6118.
- Cooper G. M., 2000, *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sinauer Associates, Washington, D.C, Sunderland, Mass., pages 689.
- Crulhas B., Basso C. R., Castro G. R. and Pedrosa V. A., 2021, Recent Advances Based on a Sensor for Cancer Biomarker Detection, *ECS J. Solid State Sci. Technol.*, 10 (4) 047004.
- Çağlayan, M. O., 2018, Plasmon resonance-enhanced internal reflection ellipsometry for the trace detection of mercuric ion, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 15 (4), 909-914.
- Çağlayan, M. O., 2020, Mercuric ion detection by plasmon-enhanced spectrophotometric ellipsometer using specific oligonucleotide probes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 241, 118682.
- Çağlayan, M. O., Sayar, F., Demirel, G., Garipcan, B., Otman, B., Celen, B. and Pişkin, E., 2009, Stepwise Formation Approach to Improve Ellipsometric Biosensor Response. *Nanomedicine*, 5, 152–161.
- Çağlayan, M.O. and Üstündağ, Z., 2020, Saxitoxin aptasensor based on attenuated internal reflection ellipsometry for seafood, *Toxicon*, 187, 255-261.
- Çağlayan, M.O., Üstündağ, Z., Şahin, S., 2022, Spectroscopic ellipsometry methods for brevetoxin detection, *Talanta*, 237.122897.
- Damborsky, P., Svitel, J. and Katrlík, J., 2016, Optical biosensors, *Essays Biochem*, 60, 91–100.

- De Melo, I. A., Correa, C. R., da Silva, C. P., de Goes, A. M., Gomes, D. A. and de Andrade, A. S. R., 2020, DNA Aptamers Selection for Carcinoembryonic Antigen (CEA). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 30, 127278.
- De Moraes, A., Alves, J., Lima, A., Lira-Cantu, M. And Nogueira, A., 2015, Enhanced photovoltaic performance of inverted hybrid bulk-heterojunction solar cells using TiO₂ /reduced graphene oxide films as electron transport layers, *Journal of Photonics for Energy*, 5, 057408.
- Dela Rosa, A. M. and Kumakura, M., 1995, Trapping method of antibodies on surfaces of polymerizing discs for enzyme immunoassay, *Analytica Chimica Act.*, 312 (1), 85-94.
- Deveci, P., Taner, B., Üstündağ, Z., Kılıç, Z., Solak, A.O. and Özcan, E., 2012, Synthesis of Some Azacrown Derivatives and Fabrication of Their Nanofilms on the Glassy Carbon Surface, *J Solid State Electrochem* 16, 985–992.
- Divya, J., Selvendran, S., Sivanantha Raja, A. and Sivasubramanian, A., 2022, Surface plasmon based plasmonic sensors: A review on their past, present and future, *Biosensors and Bioelectronics: X*, 11,100175.
- Eisenhart, T.T. and J.L., 2018, Dempsey, A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Educ.*, 95 (2), 197–206.
- Ekşi, H., Üstündağ, Z., Solak, A. and Güzel, R., 2013, Synthesis, characterization and application of silver nanoparticle-thiophenol nanocomposite film on the glassy carbon surface. *Surface and Interface Analysis*, 1821–1829.
- Erkal, A., Aşık, İ., Yavuz, S., Kariper, A. and Üstündağ, Z., 2016, Biosensor Application of Carbonaceous Nanocoil Material: Preparation, Characterization, and Determination of Dopamine and Uric Acid in the Presence of Ascorbic Acid, *Journal of The Electrochemical Society*, 163 (5), H269.
- Erkal Aytemur, A., Şahin, S., Üstündağ, Z, Mülazımoğlu, İ.E. and Caglayan, M.O., 2023 Determination of carcinoembryonic antigen (CEA) by surface plasmon resonance-enhanced total internal reflection ellipsometry (SPRe-TIRE), *Instrumentation Science & Technology*.
- Ertan, T. and Caglayan, M.O., 2021, An ellipsometric biosensor using aptamer for the detection of mercuric ions. *Chem. Pap.*, 75, 89–97.
- Esseghaier, C., Suaifan, G.A.R.Y., Ng, A. and Zourob, M., 2014, One-step assay for opticalprostate specific antigen detection using magnetically engineered responsive thinfilm, *J. Biomed. Nanotechnol.* 10, 1123–1129.
- Frens, G., 1973, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature Physical Science*, 241, 20-22.
- Garcia-Caurel, E., Martino, A., Gaston, J-P. and Yan, L., 2013, Application of spectroscopic ellipsometry and mueller ellipsometry to optical characterization, *Applied Spectroscopy*, 67,1-21.
- García-Jareño, J.J., Gabrielli, C. and Perrot, H., 2000, Validation of the mass response of a quartz crystal microbalance coated with Prussian Blue film for ac electrogravimetry, *Electrochemistry Communications*, 2 (3), 195-200.
- Goswami, N., Saha, A. and Ghosh, A., 2015, Optical amplification using surface plasmon resonance with total internal reflection, *Optik*, 126, 2115–2120.

- Guo Y and Feng L., 2022, Highly Sensitive Detection of Carcinoembryonic Antigen via an Electrochemical Platform Fabricated by AuNPs/Streptavidin/Reduced Graphene Oxide. *Front. Chem.*, 12 (10), 898924.
- Guo, C., Su, F., Song, Y., Hu, B., Wang, M., He, L., Peng, D. and Zhang, Z., 2017, Aptamer-templated silver nanoclusters embedded in zirconium metal-organic framework for bifunctional electrochemical and SPR aptasensors toward carcinoembryonic antigen, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9, 41188–41199.
- Güzel, R., Üstündağ, Z., Ekşi, H., Keskin, S., Taner, B., Durgun, Z. G., Turan, A. A. İ. and Solak, A. O., 2010, Effect of Au and Au@Ag core-shell nanoparticles on the SERS of bridging organic molecules. *Journal of Colloid and Interface Science*, 351 (1), 35-42.
- H. Khang, K. Cho, S. Chong and J.H. Lee, 2017, All-in-one dual-aptasensor capable of rapidly quantifying carcinoembryonic antigen, *Biosens. Bioelectron.*, 90, 46–52.
- H. Ren and C.-H. Jang, 2019, A Simple Liquid Crystal-based Aptasensor Using a Hairpin-shaped Aptamer for the Bare-Eye Detection of Carcinoembryonic Antigen, *BioChip J.*, 13, 352-361.
- H. Shu, W. Wen, H. Xiong, X. Zhang and S. Wang, 2013, Novel electrochemical aptamer biosensor based on gold nanoparticles signal amplification for the detection of carcinoembryonic antigen, *Electrochem. Commun.* 37, 15–19.
- Hall, C., Clarke, L., Pal, A., Buchwald, P., Eglinton, T., Wakeman, C. and Frizelle, F., 2019, A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice, *Ann Coloproctol*, 35 (6), 294-305.
- Hasanzadeh, M., Shadjou, N., Lin, Y. and Guardia, M., 2017, Nanomaterials for use in immunosensing of carcinoembryonic antigen (CEA): Recent advances, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 86, 185-205.
- Huang, H. and Yang, X., 2003, Chitosan Mediated Assembly of Gold Nanoparticles Multilayer, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 226, 77–86.
- Ikeda, M., Matsui, H., Yano, Y., Yamahara, H. and Tabata, H., 2021, Integrating zeolite nanoparticles with plasmonic waveguides for ellipsometric detection of acetone gas molecules, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 344, 130310.
- Izabella Abreu de Melo, M., Rodrigues Correa, C., da Silva Cunha, P., Miranda de Góes, A., Assis Gomes, D. and Silva Ribeiro de Andrade, A., 2020, DNA aptamers selection for carcinoembryonic antigen (CEA). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 30 (15), 127278.
- İsbir, A. A., Solak, A. O., Üstündağ, Z., Bilge, S., Natsagdorj, A., Kilic, E. and Kilic, Z., 2005, The Electrochemical Behavior of Some Podands at a Benzo[c]Cinnoline Modified Glassy Carbon Electrode. *Anal. Chim. Acta*, 547, 59–63.
- Jandas, P.J., Luo, J., Quan, A., Qiu, C., Cao, W., Fu, C. and Fu, Y. Q., 2020, Highly selective and label-free Love-mode surface acoustic wave biosensor for carcinoembryonic antigen detection using a self-assembled monolayer bioreceptor, *Applied Surface Science*, 518, 146061.
- Jandas, P.J., Luo, J., Quan, A., Qiu, C., Cao, W., Fu, C. and Fu, Y. Q., 2020, Graphene oxide-Au nano particle coated quartz crystal microbalance biosensor for the real time analysis of carcinoembryonic antigen, *RSC Advances*, 10 (7), 4118-4128.

- Jeong, Y., Kook, Y.M., Lee, K. and Koh, W.G., 2018, Metal enhanced fluorescence (MEF) for biosensors: general approaches and a review of recent developments, *Biosens. Bioelectron.*, 111, 102–116.
- Johansson, T., 2010, Affinity Measurements Using Quartz Crystal Microbalance (QCM), in: R. Kontermann, S. Dübel (Eds.), *Antibody Engineering*, Springer, Berlin Heidelberg, 683-693.
- Johs, B. and Herzinger, C. M., 2008, Quantifying the accuracy of ellipsometer systems. *Physica Status Solidi C*, 5 (5), 1031-1035.
- Kanazawa, K.K., 1997, Mechanical behaviour of films on the Quartz microbalance, *Faraday Discussion*, 107, 77-90.
- Khang, H., Cho, K., Chong, S. and Lee, J.H., 2017, All-in-one dual-aptasensor capable of rapidly quantifying carcinoembryonic antigen, *Biosens. Bioelectron.*, 90, 46–52.
- Kretschmann, E. and Raether, H., 1968, Radiative decay of non-radiative surfaceplasmons excited by light, *Z., Naturforsch*, 23 a, 2135-2136.
- Kumar, D., Sharma, G.K. and Kumar, M., 2023, Surface plasmon resonance sensor for chemical and bio-sensing application: A review, *Materials Today: Proceedings*, 74, 259–262.
- Lan, L., Yao, Y., Ping, J. and Ying, Y., 2017, Recent advances in nanomaterial-based biosensors for antibiotics detection, *Biosens. Bioelectron.* 91, 504–514.
- Li, K., Wang, S., Wang, L., Yu, H., Jing, N., Xue, R. and Wang, Z., 2018, Fast and Sensitive Ellipsometry-Based Biosensing, *Sensors*, 18, 15.
- Li, N.-L., Jia, L.-P., Ma, R.-N., Jia, W.-L., Lu, Y.-Y., Shi, S.-S. and Wang, H.-S., 2017, A novel sandwiched electrochemiluminescence immunosensor for the detection of carcinoembryonic antigen based on carbon quantum dots and signal amplification, *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 453-460
- Liao, J., Lu, M. and Tang, D., 2016, Enhanced sensitivity of quartz crystal microbalance immunosensor via back-conjugation of biofunctionalized magnetic beads with an external magnetic field, *Biochemical Engineering Journal*, 114, 276-282.
- Liedberg, B., Nylander, C. and Lundstrom, I., 1983, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*, 4, 29-304.
- Lin, L.P., Tham, SY., Loh, HS. and Tan, M. T. T., 2021, Biocompatible graphene-zirconia nanocomposite as a cyto-safe immunosensor for the rapid detection of carcinoembryonic antigen. *Sci Rep.*, 11, 22536.
- Lin, Y., Xu, G., Wei, F., Zhang, A., Yang, J. and Hu, Q., 2016, Detection of CEA in human serum using surface- enhanced Raman spectroscopy coupled with antibody-modified Au and γ -Fe₂O₃@ Au nanoparticles., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 121, 135-140.
- Long, F., Zhu, A. and Shi, H., 2013, Recent advances in optical biosensors for environmental monitoring and early warning, *Sensors* 13, 13928–13948.
- Luo, C., Wen, W., Lin, F., Zhang, X., Gu, H. and Wang, S., 2015, Simplified aptamer-based colorimetric method using unmodified gold nanoparticles for the detection of carcinoma embryonic antigen, *RSC Adv.*, 5, 10994–10999.

- Lv, S., Tang, Y., Zhang, K. and Tang, D., 2018, Wet NH₃-Triggered NH₂-MIL-125(Ti) Structural Switch for Visible Fluorescence Immunoassay Impregnated on Paper, *Analytical Chemistry*, 90 (24),14121-14125.
- Ma, C., Liu, H., Zhang, L., Li, H.,Yan, M., Song, X. and Yu, J., 2018, Multiplexed aptasensor for simultaneous detection of carcinoembryonic antigen and mucin-1 based on metal ion electrochemical labels and Ru(NH₃)₆⁽³⁺⁾ electronic wires, *Biosensors and Bioelectronics*, 99, 8–13.
- Mengüllüoğlu, U., 2018, Ferritin Tayinine Yönelik Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Esaslı İmmunosensör Geliştirilmesi, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 1-151.
- Morita, K., Yamaguchi, A. and Teramae, N., 2004, Electrochemical modification of benzo-15-crown-5 ether on a glassy carbon electrode for alkali metal cation recognition. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 563 (2), 249-255.
- Mülazımoğlu, İ.E., Üstündağ, Z., Özkan, E. and Solak, A.O., 2011, Covalent grafting of three flavonoids onto the glassy carbon electrode surface by cyclic voltammetry, *Reviews in Analytical Chemistry*, 30, 177-185.
- Nabok, A. and Tsargorodskaya, A., 2008, The method of total internal reflection ellipsometry for thin film characterization and sensing. *Thin Solid Films*, 516 (24), 8993-9001.
- Nguyen, D. T., Kim, D.-J., So, M. G. and Kim, K.-S., 2010, Experimental Measurements of Gold Nanoparticle Nucleation and Growth by Citrate Reduction of HAuCl₄. *Adv. Powder Technol.*, 21, 111–118.
- Nicholson, B.D., Shinkins, B., Pathiraja, I., Roberts, N.W., James, T.J, Mallett S., Perera, R., Primrose, J.N. and Mant, D., 2015, Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer, *Cochrane Database Syst Rev.*, 10 (12), CD011134.
- Nigmatullin, R., Baleanu, D., Dinç, E., Üstündağ, Z., Solak, A.O. and Kargin, P., 2010, Analysis of a Nanofilm of the Mercaptophenyl Diazonium Modified Gold Electrode Within New Statistical Parameters, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, 7, 562-570.
- Oldenburg, S., 2000, Light scattering from gold nanoshells, Doktora Tezi, *Rice Üniversitesi*, Houston, Teksas.
- Otto, A., 1968, Excitation of non-radiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Z. Phys.*, 216: 398-410.
- Parihar, A., Choudhary, N.K., Sharma, P. and Khan, R., 2023, Carbon nanomaterials-based electrochemical aptasensor for point-of-care diagnostics of cancer biomarkers, *Materials Today Chemistry*, 30, 101499.
- Park, J.W., Na, W. and Jang, J., 2016, One-pot synthesis of multidimensional conducting polymer nanotubes for superior performance field-effect transistor-type carcinoembryonic antigen biosensors, *RSC Adv.*, 6, 14335–14343.
- Park, S., Brown, K. A. and Hamad-Schifferli, K., 2004, Changes in Oligonucleotide Conformation on Nanoparticle Surfaces by Modification with Mercaptohexanol. *Nano Lett.*, 4, 1925–1929.
- Poksinski, M and Arwin, H., 2003, In situ monitoring of metal surfaces exposed to milk using total internal reflection ellipsometry, *Sensors and Actuators B*, 94, 247-252.

- Poksiniski, M. and Arwin, H., 2004, Protein monolayers monitored by internal reflection ellipsometry, *Thin Solid Films*, 455-456, 716-721.
- Qiu, Z., Shu, J. and Tang, D., 2017, Bioresponsive Release System for Visual Fluorescence Detection of Carcinoembryonic Antigen from Mesoporous Silica Nanocontainers Mediated Optical Color on Quantum Dot-Enzyme-Impregnated Paper, *Analytical Chemistry*, 89 (9), 5152-5160.
- Raymond E, Thieblemont C, Alran S. and Faivre S., 2020, Impact of the COVID-19 Outbreak on the Management of Patients with Cancer. *Target Oncol.*, 15(3), 249-259.
- Ren, H. and Jang, C.-H., 2019, A Simple Liquid Crystal-based Aptasensor Using a Hairpin-shaped Aptamer for the Bare-Eye Detection of Carcinoembryonic Antigen, *BioChip Journal*, 13 (4), 352-361.
- Sauerbrey, G. Z., 1959, The use of quartz oscillators for weighing thinlayers and for microweighing, *Phys*, 155, 206–222.
- Shaimanov, A.N., Orlikovsky, N.A., Khabushev, E.M., Zverev, A.V., Pishimova, A.A., Sharonov, G.V., Yankovskii, G.M., Rodionov, I.A. and Baryshev, A.V., 2018, Interfering surface and localized plasmon: Tuning the Wood anomaly for biosensing, Photonics and Nanostructures, *Fundamentals and Applications*, 32,1–5.
- Shen, G.-Y., Wang, H., Deng, T., Shen, G.-L. and Yu, R.-Q., 2005, A novel piezoelectric immunosensor for detection of carcinoembryonic antigen, *Talanta*, 67 (1), 217-220.
- Shu, H., Wen, W., Xiong, H., Zhang, X. and Wang, S., 2013, Novel electrochemical aptamer biosensor based on gold nanoparticles signal amplification for the detection of carcinoembryonic antigen, *Electrochem. Commun.*, 37,15–19.
- Soltani, N., Hassan, Q., Noroozifar, M. and Kerman, K., 2023, Au Nanoparticles on 4-Thiophenol-Electrodeposited Carbon Surfaces for the Simultaneous Detection of 8-Hydroxyguanine and Guanine, *Chemosensors*, 11 (6), 326.
- Song, K.M., Lee, S. And Ban, C., 2012, Aptamers and their biological applications, *Sensors*, 12, 612-631.
- Sun, G., Lu, J., Ge, S., Song, X., Yu, J., Yan, M. and Huang, J., 2013, Ultrasensitive electrochemical immunoassay for carcinoembryonic antigen based on three-dimensional macroporous gold nanoparticles/graphene composite platform and multienzyme functionalized nanoporous silver label. *Analytica Chimica Acta*, 775, 85-92.
- Sun, Y., Zhu, S., Ma, K., Liu, W., Yue, Y., Hu, G., Lu, H. and Chen, W., 2019, Identification of 12 cancer types through genome deep learnin, *Scitific Reports*, 9, 17256.
- Sürmegözlüer, O. ve Uluçay, Ö., 2013, Genel Cerrahi Kliniğinde Yatan Hastalarda AFP, CEA, CA19-9, CA125 ve PSA Düzeylerinin Analizi, *Konuralp Tıp Dergisi*, 5 (3), 13-17.
- Szturmowicz, M., Tomkowski, W., Fijalkowska, A., Sakowicz, A. and Filipecki, S., 1995, 1268 Is an increased carcinoembryonic antigen (CEA) concentration in pericardial fluid an indication of malignant pericarditis?, *European Journal of Cancer*, 31, S264.

- Şahin, S., Üstündağ, Z. and Çağlayan, M.O., 2023, Spectroscopic ellipsometry-based aptasensor platform for bisphenol a detection, *Talanta*, 253, 123885.
- Tang, D., Yuan, R. and Chai, Y., 2008, Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Clinical Immunoassay Using Thionine-Doped Magnetic Gold Nanospheres as Labels and Horseradish Peroxidase as Enhancer, *Analytical Chemistry*, 80 (5), 1582-1588.
- Tang, D.Q., Zhang, D.J., Tang, D.Y. and Ai, H., 2006, Amplification of the antigen–antibody interaction from quartz crystal microbalance immunosensors via back-filling immobilization of nanogold on biorecognition surface, *Journal of Immunological Methods*, 316 (1), 144-152.
- Thiviyanathan, V. and Gorenstein, D. G., 2012, Aptamers and the next generation of diagnostic reagents, Proteomics, *Clinical Applications*, 6,563-573.
- Turner, A., Karube, I. and Wilson, G. S., 1987, Biosensors: fundamentals and applications, *Oxford Üniversitesi*.
- Tolmachev, V. A., Gushchina, E. V., Nyapshaev, I. A. and Zharova, Y. A., 2022, Spectroscopic ellipsometry study of dielectric functions of Ag films and chemically deposited layers of Ag nanoparticles on silicon, *Thin Solid Film*, 756, 139352.
- Topkaya, S. N., Azimzahed, M. and Ozsoz, M., 2016, Electrochemical Biosensors for Cancer Biomarkers Detection Recent Advanced and Challenges, *Electroanalysis*, 28 (7), 1402-1419.
- Torul, H., 2016, Kâğıt Tabanlı Mikro Akışkan Çiplerin Geliştirilmesi; Kan Matriksinde Glikoz ve Kanser Biyobelirteç Tayini, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-180.
- Turan, A., Üstündağ, Z., Solak, A., Kilic, E. and Avseven, A., 2008, Characterization of a 2-Benzo[c]cinnoline Modified Glassy Carbon Electrode by Raman Spectroscopy, Electrochemical Impedance Spectroscopy, and Ellipsometry, *Electroanalysis*, 20, 1665-1670.
- Turkevich, J., Stevenson, P.C. and Hillier, J., 1951, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal, Discuss. *Faraday Soc.*, 11, 55-75.
- Tüylek, Z., 2021, Biyoteknolojide Biyosensör ve Biyoçip Uygulamaları, *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4 (3), 468-490.
- Ustabaş, S., 2010, Glukoz Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-85.
- Üstündağ, Z. and Solak, A.O., 2009, EDTA modified glassy carbon electrode: Preparation and characterization, *Electrochimica Acta*, 54, 6426-6432.
- Üstündağ, Z., Çağlayan, M. O., Güzel, R., Pişkin, E. and Solak, A. O., 2011, A novel surface plasmon resonance enhanced total internal reflection ellipsometric application: electrochemically grafted isophthalic acid nanofilm on gold surface, *Analyst*, 136 (7), 1464-1471.
- Üstündağ, Z., Turan, A., Solak, A., Kilic, E. and Avseven, A., 2009, Analysis of 2-Benzo[c]cinnoline Nanofilm at the Gold Surface, *Instrumentation Science and Technology*, 37, 284-302.

- Wang, C., Singh, P., Kim, Y.J., Mathiyalagan, R., Myagmarjav, D., Wang, D., Jin, C.-G. and Yang, D.C., 2016, Characterization and antimicrobial application of biosynthesized gold and silver nanoparticles by using *Microbacterium resistens*, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44, 1714-1721.
- Wang, Q.-L., Cui, H.-F., Du, J.-F., Lv, Q.-Y. and Song, X., 2019, In Silico Post-Select Screening and Experimental Characterizations for Acquisition of High Affinity DNA Aptamers against Carcinoembryonic Antigen, *RSC Adv.*, 9, 6328-6334.
- Wang, Z., Liu, W., Wang, C., Kan, Q., Chen, S. and Chen, H., 2013, Surface plasmon resonance enhanced ellipsometric analysis for monitoring of cobalt electrochemical reaction in solution, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 181, 221-226.
- Wood, R. W., 1902, On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical magazine*, 4, 396-402.
- Wu, Q., Ningbo, L., Wang, Y., Yanchao, X., Jiandong, W., Guangri, J., Fujian, J., Xuedong, F., Fangfang, C. and Xiaoqiang, C., 2020, Ultrasensitive and Selective Determination of Carcinoembryonic Antigen Using Multifunctional Ultrathin Amino-Functionalized Ti3C2-MXene Nanosheets, *Analytical Chemistry*, 92 (4), 3354-3360.
- Wu, Q., Li, N., Wang, Y., Xu, Y., Wu, J., Jia, G., Ji, F., Fang, X., Chen, F. and Cui, X., 2020, Ultrasensitive and Selective Determination of Carcinoembryonic Antigen Using Multifunctional Ultrathin Amino-Functionalized Ti3C2-MXene Nanosheets, *Analytical Chemistry*, 92 (4), 3354-3360.
- Xiang, J., Pi, X., Chen, X., Xiang, L., Yang, M., Ren, H., Shen, X., Qi, N. and Deng, C., 2017, Integrated signal probe based aptasensor for dual-analyte detection, *Biosens. Bioelectron.*, 96, 268-274.
- Xiang, W., Lv, Q., Shi, H., Xie, B. and Gao, L., 2020, Aptamer-based biosensor for detecting carcinoembryonic antigen, *Talanta*, 214, 120716.
- Yeşiller, Ş. G., 2014, Enzim Aktivitesinin Tayinine Yönelik Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensör Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri, Enstitüsü*, Tekirdağ, 1-66.
- Yeter, E.Ç., Şahin, S., Caglayan, M.O. and Üstündağ, Z., 2021, An electrochemical label-free DNA impedimetric sensor with AuNP-modified glass fiber/carbonaceous electrode for the detection of HIV-1 DNA, *Chemical Papers*, 75 (1), 77-87.
- Yusmawati, W.Y.W., Chuah, H.P. and Yunus, W.M.M., 2007, Optical properties and sugar content determination of commercial carbonated drinks using surface plasmon resonance, *American Journal of Applied Sciences*, 4 (1), 01-04.
- Zeng, R. and Tang, D., 2020, Magnetic bead-based photoelectrochemical immunoassay for sensitive detection of carcinoembryonic antigen using hollow cadmium sulfide, *Talanta*, 219, 121215.
- Zhao, X., Wang, W., Liu, L., Hu, Y., Xu, Z., Liu, L., Wu, N. and Li, N., 2019, Microstructure evolution of sandwich graphite oxide/interlayer-embedded Au nanoparticles induced from γ -rays for carcinoembryonic antigen biosensor, *Nanotechnology*, 30 (49), 495501.
- Zhou, X., Guo, S., Gao, J., Zhao, J., Xue, S. and Xu, W., 2017, Glucose oxidase-initiated cascade catalysis for sensitive impedimetric aptasensor based on metal-organic

frameworks functionalized with Pt nanoparticles and hemin/G-quadruplex as mimicking peroxidases, *Biosens. Bioelectron.*, 98, 83–90.

Ziğal, N., 2012, Nanolif Kaplı Kuvars Kristal Mikroterazi Yüzeyler ile Kütle Hassas Biyosensörlerin Performansının Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.

Zuker, M., 2003, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31 (13), 3406-15.

