

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ÜRİK ASİT TAYİNİNE YÖNELİK YENİ BİR BİYOSENSÖR TASARIMI

Erkan OĞUZ

TIBBİ BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Levent KAYRIN

ADANA-2018

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ÜRİK ASİT TAYİNİNE YÖNELİK YENİ BİR BİYOSENSÖR TASARIMI

Erkan OĞUZ

**TIBBİ BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Levent KAYRIN**

**Bu tez, Çukurova üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
TYL-2016-5598 No'lu proje ile desteklenmiştir.**

**Tez No:.....
ADANA-2018**

KABUL ONAY

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tezli Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

“Ürik Asit Tayinine Yönelik Yeni Bir Biyosensör Tasarımı”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 03 / 08 / 2018

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Levent KAYRIN
Çukurova Üniversitesi
Başkan



Prof. Dr. AYLIN SEPİCİ DİNÇEL
Gazi Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Abdullah TULI
Çukurova Üniversitesi
Üye



Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof.Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca benden desteklerini esirgemeyen, her konuda rahatlıkla ulaşıp danıştığım, tezimin belirlenmesinde ve yürütmesinde büyük yardımlarını gördüğüm, engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, danışman hocam; Prof. Dr. Levent KAYRIN'a, bilimsel vizyonumun gelişmesinde gösterdiği katkılardan dolayı Prof. Dr. Abdullah TULİ'ye, tez çalışmama yardımı ve katkılarından dolayı, son ana kadar yanımda bulunarak destek gösteren değerli arkadaşım Doktora öğrencisi Umut KÖKBAŐ'a ve bölüm sekreterimiz Perihan ÖZENÇE'ye çalışma dönemim boyunca aynı sıcak ortamı paylaştığım ve bana destek olmaktan hiçbir zaman kaçınmayan tüm çalışma arkadaşlarıma ve bölümümüz personellerine, tüm hayatım boyunca sevgi, saygı ve desteklerini esirgemeyen hayattaki en değerli varlıklarım olan babama, anneme, eşime ve çocuklarıma en içten duygularıyla sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Erkan OĞUZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyosensörlere Genel Bakış	3
2.2. Biyosensörlerin Tarihçesi	3
2.3. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonları	4
2.3.1. Biyoaktif Tabaka	5
2.3.2. Transduser (Sinyal İletici)	6
2.3.2.1. Amperometrik Transduserler	6
2.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	7
2.4.1. Biyoaktif Tabakada Kullanılan Biyobileşen Türüne Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması	7
2.4.1.1. Doku Biyosensörleri	7
2.4.1.2. Mikrobiyal Biyosensörler	7
2.4.1.3. Enzim Temelli Biyosensörler	8
2.4.1.4. DNA Temelli Biyosensörler	9
2.4.1.5. Antikor/Antijen Temelli Biyosensörler (İmmüno Biyosensörler) ...	9
2.4.2. Sinyal İletici Sistemlerine Göre Biyosensörler	9
2.4.2.1. Elektrokimya Esaslı Enzim Biyosensörleri	9
2.4.2.2. Amperometrik Esaslı Enzim Biyosensörleri	10
2.4.2.3. Voltametri	11
2.4.2.4. Dönüşümlü Voltametri	12

2.4.2.5. Voltametrik Teknikte Kullanılan Cihazlar.....	13
2.5. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri	13
2.5.1. Adsorpsiyon	13
2.5.2. Tutuklama	14
2.5.3. Çapraz Bağlama	14
2.5.4. Kovalent Bağlama.....	15
2.6. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemlerinin Üstünlükleri	15
2.7. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler	15
2.7.1. Kullanım Ömrü	15
2.7.2. Kalibrasyon İhtiyacı.....	15
2.7.3. Tekrarlanabilirlik	16
2.7.4. Kararlılık	16
2.7.5. Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı	16
2.7.6. Seçici Özellik	17
2.7.7. Duyarlılık	17
2.7.8. Hızlı Cevap Zamanı	17
2.7.9. Hızlı Geriye Dönme Zamanı.....	18
2.7.10. Basitlik ve Ucuzluk.....	18
2.7.11. Küçültülebilirlik ve Sterilize Edilebilirlik.....	18
2.8. Ürik Asit.....	18
2.8.1. Ürik Asidin Genel Özellikleri	19
2.8.2. Ürik Asit Oluşumu (Pürin Nükleotit Katabolizması)	19
2.8.3. Pürin Metabolizması Bozuklukları	20
2.8.3.1. Hiperürisemi	20
2.8.3.2. Gut.....	21
2.8.3.3. Pürinler İçin Kurtarma Yolu (Salvage Yolu).....	20
2.8.3.4. Lesch-Nyhan Sendromu.....	21
2.8.3.5. Von Gierke Hastalığı	22
2.8.3.6. Hipoürisemi.....	22
2.8.3.7. Ksantinüri.....	22
2.9.4. Ürik Asidin Tayin Yöntemleri	22
2.10. Ürikaz Enzimi (Ürat oksidaz, E.C. 1.7.3.3)	24

2.10.1. Ürikaz Enzimi İlgili Önceki Çalışmalar.....	25
2.11. Biyosensörde Kullanılan Biyoaktif Tabaka Bileşenleri.....	26
2.11.1. Jelatin	26
2.11.2. Glutaraldehit.....	27
2.11.3. Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin : BSA)	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Gereçler	29
3.1.1. Cihazlar	29
3.1.2. Kimyasallar	29
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler	30
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Ürik Asit Tayinine Yönelik İmmobilize Edilmiş Biyosensör Hazırlanması	31
3.2.2. Ürikaz Temelli Biyosensörün Ölçüm Prosedürü	32
3.2.3. İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	33
3.2.3.1. Sığır Serum Albumin Miktarının Biyosensör Cevabına Etkisi	33
3.2.3.2. Glutaraldehit Yüzdesinin Biyosensör Cevabına Etkisi	33
3.2.3.3. Jelatin Miktarının Biyosensör Cevabına Etkisi	34
3.2.4. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	34
3.2.4.1. pH Optimizasyonu	34
3.2.4.2. Uygun Tampon Konsantrasyonu	34
3.2.4.3. Optimum Sıcaklık	35
3.3. Biyosensörün Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar.....	35
3.3.1. Doğrusal Ölçüm Aralığının Belirlenmesi	35
3.3.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği	35
3.3.3. Raf Ömrünün Belirlenmesi	35
4. BULGULAR	36
4.1. Biyosensörde Çalışma Koşullarının Optimizasyonu	36
4.1.1. Çalışma Aralığının Belirlenmesi.....	36
4.1.2. Optimum Tarama Hızı Değerlerinin Belirlenmesi.....	37
4.1.3. Çalışma Tamponu ve Optimum pH Değerinin Belirlenmesi.....	38
4.1.4. Optimum Tampon Derişiminin Belirlenmesi	39

4.1.5, Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....	41
4.2. Biyosensörde Biyoaktif tabakanın Optimizasyonu	42
4.2.1. Sığır Serum Albumin Derişiminin Optimizasyonu.....	42
4.2.2. Gluteraldehit Derişiminin Optimizasyonu	44
4.2.3. Jelatin Derişiminin Optimizasyonu.....	45
4.3. Biyosensörün Karakterizasyon alışmalarına İlişkin Bulgular	47
4.3.1. Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı	47
4.3.2. Raf Ömrünün Belirlenmesi	48
4.3.3. Biyosensörde Ölçüm Tekrarlanabilirliği.....	49
5. TARTIşMA	51
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİş	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:	Sayfa No
Şekil 1.1. Ürikazın kataliz reaksiyonu.....	2
Şekil 2.1. Biyosensörün genel yapısı.....	4
Şekil 2.2. Enzim biyosensörünün genel çalışma ilkesi.....	10
Şekil 2.3. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi	11
Şekil 2.4. Tersinir tepkimelerde elde edilen dönüşümlü voltamogram	12
Şekil 2.5. Voltametik analizde kullanılan sistem	13
Şekil 2.6. Enzim molekülünün glutaraldehit ile çapraz bağlanması.....	14
Şekil 2.7. Ürik asit formülü	18
Şekil 2.8. Ürik asit kristalleri.....	18
Şekil 2.9. Pürin metabolizması.....	19
Şekil 2.10. Ürik asitin ürikaz etkisiyle yıkılması sonucu allantoin oluşumu.....	20
Şekil 2.11. Gut hastalığının klinik görünümleri	21
Şekil 2.12. Lesch- Nyhan sendromunun klinik görünümleri.....	22
Şekil 2.13. Glutaraldehit'in çizgi modeli	27
Şekil 2.14. Glutaraldehit'in top çubuk modeli	27
Şekil 2.15. BSA'ya ait üç boyutlu yapı.....	28
Şekil 3.1. Biyosensör düzeneği	32
Şekil 3.2. Ürik asidin allantoin'e yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı	33
Şekil 4.1. Döngüsel voltammogram	36
Şekil 4.2. Biyosensörün tarama hızı ölçümlerini gösteren döngüsel voltammogramlar.....	37
Şekil 4.3. pH değişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.....	38
Şekil 4.4. pH değişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisi	39
Şekil 4.5. Optimum tampon derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi	40
Şekil 4.6. Optimum tampon derişiminin bulunması amacıyla değişik tampon derişimlerinin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.7. Geliştirilen biyosensör için optimum sıcaklık ölçümlerinin Lineer Sweep gösterimi.....	41
Şekil 4.8. Geliştirilen biyosensör için optimum sıcaklık eğrisi	42
Şekil 4.9. BSA derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.....	43
Şekil 4.10. BSA miktarındaki derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.11. Glutaraldehit derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.....	44
Şekil 4.12. Glutaraldehit derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisi.....	45

Şekil 4.13. Jelatin derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi.....	46
Şekil 4.14. Jelatin derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisi	46
Şekil 4.15. Geliştirilen ürik asit enzim elektrodun cevabına substrat derişiminin etkisi	47
Şekil 4.16. Geliştirilen ürik asit enzim elektrot ile farklı derişim aralıklarında elde edilen kalibrasyon eğrisi	48
Şekil 4.17. Biyosensörün raf ömrü	49
Şekil 4.18. Sığır Serum Albumin-Jelatin/Ürikaz/Glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik için Lineer Sweep gösterimi	50
Şekil 5.1. Farklı asetetat tampon derişimlerine bağlı olarak gerçekleşen cevap akımları	53
Şekil 5.2. Farklı BSA konsantrasyonlarının biyosensör cevabına etkisi	54
Şekil 5.3. Farklı jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi.....	55
Şekil 5.4. Farklı glutaraldehit derişimlerinin biyosensör cevabına etkisi.....	56

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Biyosensör bileşenlerinin içeriği.....	5
Tablo 2.2. Enzim biyosensörleri için kullanılan farklı transduserler.....	6
Tablo 4.1. Biyosensörünün tekrarlanabilirliği çizelgesi	50



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	: Sığır Serum Albumin
BSS	: Bağlı Standart Sapma
C	: Analit Derişimi
ES	: Enzim Substrat
E_{ind}	: İndirgenmiş Enzim
E_{yük}	: Yükseltgenmiş Enzim
GA	: Glutaraldehit
G	: Grafit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
K_m	: Michaelis Menten Sabiti
LS	: Lineer Sweep Yöntemi
mM	: Mili Molar
MOPS	: (3-(N- morfolino) Propan Sülfonik Asit
nm	: Nanometre
QCM	: Kuartz Kristal Mikrobals
SS	: Standart Sapma
U	: Ünite
UOX	: Ürikaz
UV	: Ultraviyole Işınları
VK	: Varyasyon Katsayısı
X	: Ortalama Değer

ÖZET

Ürik Asit Tayinine Yönelik Yeni Bir Biyosensör Tasarımı

Ürik asit insanlarda pürinlerin katabolizması sonucu oluşan son üründür. Biyolojik sıvılarda ürik asidin miktarı gut hastalığı, Lesch-Nyhan sendromu, böbrek hastalığı ve Von Gierke hastalığı gibi birçok hastalığın teşhisindeki rolünden dolayı tayini tıbbi açıdan büyük önem taşımaktadır.

Günümüzde ürik asit tayininde kolorimetrik, kromatografik, spektrofotometrik gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin genel olarak zaman alıcı ve pahalı sistemler olmasından dolayı, biyosensör temelli yöntemler tercih edilmeye başlanmıştır. Biyosensörlerin diğer yöntemlerden en önemli avantajı, tayin edilecek maddeler için ekonomik, pratik ve özgün olmasıdır.

Bu çalışmada, ürik asit tayini için yeni bir amperometrik biyosensör geliştirildi.

Ürik asit tayinine yönelik bu çalışmada ürikaz enzimi, sığır serum albumin/jelatin ve glutaraldehit ile çapraz bağlanarak grafit elektrot yüzeyine sabitlenmiş ve geliştirilen biyosensör ile ürik asit ölçümleri 0.1 V'ta alınmıştır.

Tasarlanan biyosensörün optimizasyon çalışmalarında biyoaktif tabaka için, BSA miktarı, glutaraldehit %'si ve jelatin miktarı optimizasyonu, çalışma koşullarının optimizasyonunda ise tarama hızı, pH, sıcaklık ve tampon derişimi belirlendi. Son olarak biyosensör karakterizasyon çalışmalarında tayin aralığı, raf ömrü ve ölçüm tekrarlanabilirliği analizleri yapıldı.

Biyoaktif tabakanın optimizasyonunda sığır serum albumini miktarı 0,03 gr, glutaraldehit yüzdesi % 2,5 ve jelatin miktarı 0,45 gr olarak bulundu. Optimum çalışma koşullarının belirlenmesinde asetat tamponunu pH 6,5 ve 0,1 M derişiminde saptanırken, tarama hızı 0,05 V/s ve sıcaklık 35 °C olarak belirlendi. Karakterizasyon çalışmalarında ise gözlenebilme sınırı $2,5 \times 10^{-7}$ M doğrusal aralık $2,5 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-3}$ M olarak bulundu. 40. günün sonunda biyosensör yanıtının % 82,5'a kadar korunduğu, 0,5 mM ürik asit derişimi kullanılarak yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarında (n=15), standart sapma (SS) = 0,1 ve % varyasyon katsayısı (VK) = 0,2 olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler: Grafit elektrot, ürik asit biyosensörü, ürikaz, amperometri

ABSTRACT

A New Designed Biosensor For The Uric Acid Determination

Uric acid is the end result of the catabolism of the purines in humans. The amount of uric acid in biological fluids is important in the diagnosis of many diseases. These diseases are diseases such as gout disease, Lesch-Nyhan syndrome, kidney disease and Von Gierke's disease. Because of these reasons, uric acid determination is of great medical importance.

Today, different colorimetric, chromatographic and spectrophotometric methods are used for determination of uric acid. However, biosensor based methods are preferred because they are generally time consuming and costly systems. The most important advantage of biosensors over other methods is that they are economical, practical and specific for the substances to be determined.

In this study, a new amperometric biosensor was developed for uric acid determination.

In this study for the determination of uric acid, uricase enzyme on the graphite electrode by using BSA/gelatin and crosslinking by glutaraldehyde. Measurements were carry out at 0,1 V.

During the optimization studies the amount of gelatin, bovine serum albumin and glutaraldehyde were determined. For the optimization working condition pH, temperature, scanning rate and buffer concentration were carry out. Afterwards, some parameters such as linearty, repeatability of the measurements and shelf life were carry out.

From the bioactive layer optimization studies; gelatin, bovine serum albumin amount and optimal percentage glutaraldehyde were determined as 0,45 gr, 0,030 gr and % 2,5 for the BSA-Gelatin/uricase/glutaraldehyde modified biosensor. Asetat buffer of pH 6,5 and 0,1 M, scanning rate of 0,05 V/s, temperature 35 °C were determined as a optimum working conditions.

It was determined that limit of detection $2,5 \times 10^{-7}$ M and linear results are obtained between the ranges of $2,5 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-3}$ M for üric acid concentration. As for shelf life studies, at the end of 40th day of response has been preserved by 82,5%, repeatability of the measurement (n=15) standard deviation (SS) = 0,1 and % coefficient of variation (VK) = 0,2 respectively.

Key Words: Uric acid biosensor, Graphite electrode, Uricase, Amprometri

1. GİRİŞ

Tamamen okside olmuş bir pürin bazı olan ürik asit, insanlarda pürin bazları yıkımının son ürünüdür. Ürik asit tayini, biyomedikal ve klinik uygulamalarda oldukça önemlidir. Çünkü kanda ürik asit 5,75' ten yüksek pH'larda monosodyum tuzu olan urat formunda bulunmaktadır. Sodyum uratın serumda çözünebilirliğinin azaldığı duruma hiperürisemi adı verilir¹. Hiperüriseminin, başta gut hastalığı ve Lesch-Nyhan sendromu olmak üzere böbrek hastalıkları, hipertansiyon ve kalp damar hastalığı (kardiyovasküler) türü rahatsızlıklarla ilgisi olduğu birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir.¹ Dolayısı ile biyolojik sıvılarda ürik asidin miktarı birçok hastalığın teşhisinde önem arz etmektedir.² Pürin katabolizmasında, ürik asidin allantoine oksidasyonundan sorumlu olan ürikaz (ürat oksidaz, E.C.1.7.3.3) enzimi serumda ürik asit derişimini saptamada, klinik teşhis enzimi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır¹.

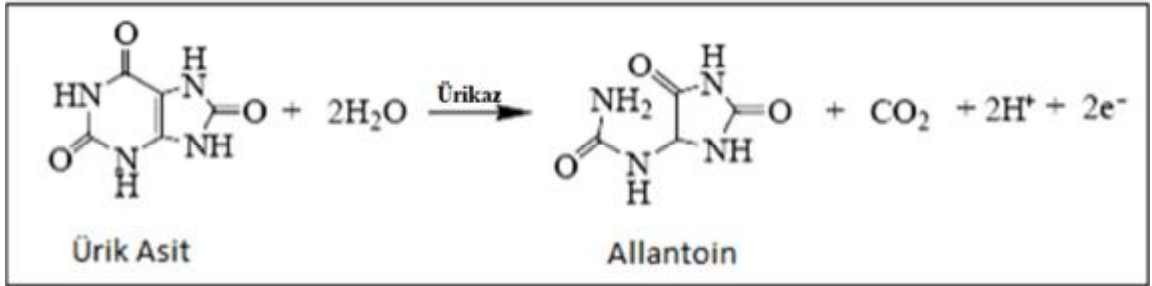
Günümüzde ürik asit tayinine yönelik kolorimetrik, kromotografik spektrofotometrik ve biyosensör temelli birçok yöntem kullanılmaktadır. Biyosensörler genel anlamda, fizik, kimya, biyoloji ve biyokimya gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden faydalanılarak ve biyolojik moleküllerin ya da sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanır. "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) ise, "kimyasal bir bileşiğe ya da iyon karşısı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren küçültülmüş cihazlar" olarak tanımlanmış ancak biyosensör teknolojisinin şuan ki durumu göz önüne alındığında bu tanım da yetersiz kalmıştır.²⁻³⁻⁴ Bunların içinde biyosensör temelli yöntemler; tüm vücut sıvılarında kullanılabilirliği, ek işlemler olmaksızın kolay hazırlanması, özgünlüğü, kısa sürede sonuç vermesi ve ekonomik açıdan uygunluğu nedeniyle tercih edilmektedir. Literatürde ürik asit tayinine yönelik geliştirilmiş çeşitli potansiyometrik ve amperometrik enzim sensörlerine rastlanmaktadır.²⁻³

Amperometrik biyosensörler sabit bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alan sensörlerdir. Akım yoğunluğu çalışma elektrodunda yükseltgenen ($E_{yük}$) veya indirgenen (E_{ind}) elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur. Sinyal, elektrot yüzeyine olan kütle aktarım hızına bağlıdır. Elektroaktif bir ürünün salınımı ya da

reaktifin biyokatalitik reaksiyona bağlı olarak tüketimi grafit elektrot gibi inert bir çalışma elektrodunda doğrudan bağlanılarak ölçülebilir. İkinci elektrot ise referans elektrot olarak iç görür.⁵⁻⁶

Biyolojik aktif materyal olarak enzim içeren biyosensörler, temel olarak elektrokimyasal sinyalleri alan bir elektrot ve bu elektrot üzerine immobilize edilmiş enzim veya enzimleri içermektedir.

rikaz, rik asit tayininde analitik reaktif olarak, özellikle biyosensör uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.



şekil 1.1 rikazın kataliz reaksiyonu

şekil 1.1’de rikazın kataliz reaksiyondan da görüldüğü gibi, ürikaz enzimi, bir elektrot yüzeyine immobilize edildiği zaman amperometrik olarak belirlenebilecek olan ürik asit bulundurmaktadır. Bu çalışmada ürik asite duyarlı, üzerine ürikaz enzimi immobilize edilerek bir biyosensör hazırlanmış ve immobilizasyon parametreleri ile çalışma koşullarının optimizasyonu, elektrodun raf ömrü ve tekrarlanabilirliği gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensörlere Genel Bakış

Biyosensörler genel anlamda, fizik, kimya, biyoloji ve biyokimya gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden faydalanılarak ve biyolojik moleküllerin ya da sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem kabiliyetinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanır. "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) ise, "kimyasal bir bileşiğe ya da iyon karşılığında verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren güçlendirilmiş cihazlar" olarak tanımlamaktadır.

Biyosensörler, başta sağlık sektöründe birçok hastalık ve biyolojik moleküllerin algılanmasında, izlenmesi ve tanınmasında ayrıca diğer sektörlerde çevre kirliliğinin izlenmesinde, gıda analizlerinde, kimyasal silahların analizinde ve kimya endüstrisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Diğer yöntemlere göre daha doğru, güvenilir, hızlı, düşük maliyetli, uzman gerektirmeyen ve basit kurulumu gibi avantajlarının olması biyosensörlerin akıl almaz bir şekilde hızla geliştirilmesinin en önemli nedenleridir.

2.2. Biyosensörlerin Tarihçesi

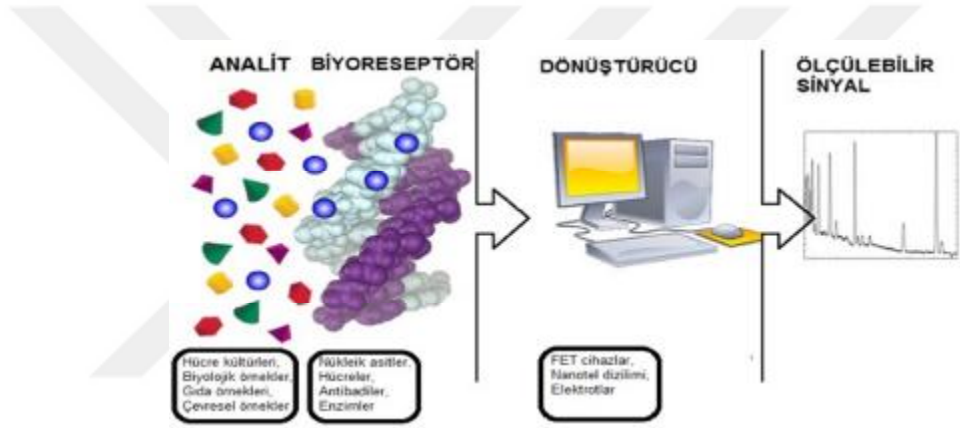
İlk biyosensör çalışmaları 1950'li yılların ortalarında L.C. Clark'ın Cincinnati Hastanesinde (Ohio, A.B.D) ameliyat sırasında hasta kanının O_2 miktarının amperometrik bir elektrotla izlenmesiyle başlamıştır.⁷ Bilimsel anlamda "biyosensör" tanımı ilk olarak 1962 yılında Clark ve Lyons sayesinde gerçekleşmiştir. Clark ve Lyons'un tanımladığı biyosensör, glukoz oksidaz enzimiyle Clark tipi bir O_2 elektrodunun birlikte kullanılmasıyla oluşan amperometrik biyosensördür.⁸⁻⁹ Daha sonra, 1967 yılında Updike ve Hicks bir oksijen elektrodunu glukoz oksidaz enzimi tutuklanmış polimer jel tabakasıyla kaplayarak bir çalışma elektrodu hazırlamışlar ve bu elektroda ilk defa "enzim elektrodu" adını vermişlerdir.¹⁰ 1974 yılında Yellow Springs Instruments (Model 23 YSI, Yellow Springs, OH) firması ilk defa bir biyosensör ürününü piyasaya sürmüştür. Bu gelişmenin ardından pek çok biyosensör daha da geliştirilerek ticari anlamda piyasada yerini almıştır.

2.3. Biyosensörlerin Yapısı ve Fonksiyonları

Biyosensörler, genel olarak üç temel bileşenden oluşur.

Bunlar;

1. Analiz edilecek madde ile etkileşime giren biyoaktif tabaka (biyoreseptör ya da biyokomponent)
2. Etkileşim sonucu fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen transduser (Sinyal Dönüştürücüler)
3. Sinyalleri alıp ölçebilen bir “kaydedici” yani bir ölçüm cihazıdır.



Şekil 2.1. Biyosensörün genel yapısı

Bir biyosensörde temel amaç biyolojik bir olayın elektriksel sinyale çevrilmesidir.¹²

Günümüzde biyosensörler için biyokomponent ve sinyal iletici olarak birçok madde ve sistem bulunmaktadır. Bunların en önemli olanları tablo 2.1’de verilmektedir.

Tablo 2.1 Biyosensör bileşenlerinin içeriği

Analit	Biyokomponent (Biyoaktif Tabaka)	Transduser (Sinyal İletici Sistem)
ü Metal	ü Enzimler	Elektrokimya esaslı
ü Hormonlar	ü Antikor	ü Amperometri
ü Enzimler	ü Hücre	ü Potansiyometri
ü Substrat	ü Doku	
ü Aktivatör-inhibitör	ü Mikroorganizmalar	Optik esaslı
ü Antikor-antijen	ü Nükleik asit	ü Fotometri
ü Nükleik asit	ü Lipidler	ü Fluorometri
ü Mikroorganizma	ü Hücre organelleri	ü Biyoluminesans
ü Virüsler	ü Reseptörler	
		Piezoelektrik
		ü QCM (kuartz kristal mikrobals)
		ü Mikrokantilever

2.3.1. Biyoaktif Tabaka

Biyosensörün yapısında yer alan biyoaktif tabakaya biyoreseptör ya da biyokomponent denir. Bir biyoreseptörün görevi analizlenecek maddeyi dönüşüme uğratmak ve bu dönüşüme eşlik eden değişimlerin dönüştürücü tarafından algılanabilir hale getirilmesidir. Biyosensörlerde, biyokomponent olarak enzimlerin yanı sıra doku kültürleri, mikroorganizmalar, organeller, doku kesitleri, antikorlar, nükleik asitler ve biyolojik membranlar içine yerleştirilmiş kimyasal reseptörlerde kullanılırlar. Bunların içinde biyoaktif tabakada en yaygın tercih edilen biyokomponent türü enzimlerdir.

Enzim-substrat etkileşiminin ilk adımı analitin protein moleküllerine bağlanmasıdır. Dönüşüme uğrayan analitteki herhangi bir fizikokimyasal değişim transduser tarafından sinyale dönüştürülür. Bu sinyaller elektronik devreler aracılığıyla kaydediciye aktararak kaydedilir.¹³

2.3.2. Transduser (Sinyal İletici)

Transdüser (Sinyal İletici), çevirici elektrottur. Biyoreseptör-analit etkileşmesi sonucu gerçekleşen biyolojik tepkimeyi ölçebilir fiziksel bir sinyale dönüştürerek bu sinyalin daha okunabilir ve kaydedilebilir bir şekle girmesini sağlar.

Tablo 2.2’de enzim biyosensörleri için kullanılan farklı sinyal iletici ve alınan yanıtlar görülmektedir. Biyokimyasal tepkime türüne göre sinyal iletici seçilir. Elektrodlar amperometrik ve potansiyometrik ölçümlerde kullanılır ve burada hedef analittir. (O₂ elektrodunda çözülmüş O₂, pH elektrodunda H⁺iyonu gibi).¹³

Tablo 2.2. Enzim biyosensörleri için kullanılan farklı transduserler

Transduser (Sinyal İletici)		Yanıt
Elektrokimyasal	Amperometrik	Uygulanan akım
	Potansiyometrik	Voltaj
	Kondüktometrik	Empedans
Optik	Kolorimetrik	Renk
	Luminesans	Işık şiddeti
	Floresans	Işık şiddeti
Kalorimetrik	Termistör	Sıcaklık

2.3.2.1. Amperometrik Transduserler

Bugün piyasada bulunan ticari biyosensör cihazlarının çoğunluğu amperometrik enzim biyosensörü tipindedir. Amperometrik biyosensörler referans elektroda sabit bir potansiyel uygulayarak çalışma elektrodunun yüzeyindeki yükseltgenen ve indirgenen türlerin oluşturduğu akımın ölçülmesi prensibine dayanır (Şekil 2.3). Amperometrik biyosensörlerin çok tercih edilmesinin nedeni bu biyosensörlerin redoks enzimleri tabanlı olması ve birçok bileşikle (organik asitler, şekerler, aldehitler ve fenoller vs.) üzerinde etkileşebilen oksidoredüktaz sınıfı enzimlerin kolayca temin edilebilmesidir.¹⁴

2.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

2.4.1. Biyoaktif Tabakada Kullanılan Biyobileşen Türüne Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörleri biyoaktif tabakada kullanılan biyobileşen türüne göre genel olarak beş gruba ayrılır.⁷³ Bunlar;

1. Doku temelli
2. Mikrobiyal kökenli
3. Enzim temelli
4. DNA temelli biyosensörler
5. Antikor/Antijen temelli biyosensörler (İmmünosensörler)

2.4.1.1. Doku Biyosensörleri

1981’ de ilk defa bitki dokusu temelli elektrot hazırlanmasından sonra, birçok bitki dokusu temelli biyosensör geliştirilmiştir. Bitki dokusu temelli biyosensörlerin birçoğu; amperometrik elektrotlar, potansiyometrik transduserler ya da bu sistemlerin gaz duyarlı elementler ile ortak kullanımını sonucu oluşturulur.²¹ Bitki doku materyalleri kullanılarak oluşturulan biyosensörler, izole enzimlerle oluşturulan biyosensörlere bir alternatif olarak görülebilir.²² Doku biyosensörlerin avantajları enzimin saflaştırılmasının ortadan kalkması, bazı enzimler için doğal ortamda artan kararlılık ve düşük maliyetli olmasıdır.²³

Hayvansal ve bitkisel dokuların organelleri, kimi enzimlerce zengin olduğundan dolayı, bu enzimlerin, izole edilmiş preparatların yerine doğrudan biyosensör hazırlanmasında kullanılır.²⁴

2.4.1.2. Mikrobiyal Biyosensörler

Mikroorganizmalar, biyosensörlerin biyoaktif tabaka materyalleri olarak pek çok avantaja sahiptirler. *Esherichia coli* hücresinde 3000’den fazla enzim bulunduğu bilinmektedir. Gelişmiş hücrelerdeki enzim sayısının çok daha fazla olduğu gerçeği unutulmamalıdır. Saf enzimlerle gerçekleştirilen biyotransformasyon tepkimeleri bu enzimi içeren hücre ile de gerçekleştirilebilir. Bunun için tek şart hedeflenen

biyotransformasyon tepkimesinin hücrenin içerdiği diğer enzimler tarafından etkilenmemesidir.

Günümüze kadar bilinen enzimlerin % 90'ından fazlası hücre içindedir. Bu bakımdan, hücre içi enzimlerin kaynağı olarak bütün hücrelerin kullanımı, çeşitli endüstriyel işlemlerde saflaştırılmış enzimlere karşı daha iyi bir alternatif olarak düşünülmektedir. Biyosensörlerde enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların kullanımı, enzim saflaştırılmasının uzun ve pahalı işlemlerini gerektirmez, enzimler doğal çevresinden ayrılmadığından daha uzun süre aktivitelerini kaybetmeden durabilir ve ağır metaller gibi dıştan gelen toksiklerin inaktivasyonundan korunurlar. Ancak mikroorganizmaların bütün hücreler olarak kullanıldığı biyosensörler, enzim esaslı biyosensörlerle karşılaştırıldığında daha yavaş biyosensör cevabı vermesi dezavantajdır. Mikrobiyal biyosensörler daha çok gıda ve çevre analizleride tercih edilmektedir.²⁵

2.4.1.3. Enzim Temelli Biyosensörler

Biyosensörlerin tarihsel geçmişine bakıldığında, bu alandaki ilk çalışmaların enzim sensörleriyle (amperometrik ve potansiyometrik temelli) başladığı görülmektedir. 1962 de Clark ve Lyons ve 1967 de Updike ve Hick tarafından rapor edilen glukoz tayinine yönelik glukoz oksidaz enzim elektrodları bu konudaki ilk örnekleri oluşturmaktadır.¹⁷ Biyosensör hazırlamada saf enzimleri kullanmak; özgünlük bakımından avantajlı fakat saf enzimin pahalı olması nedeniyle bir dezavantajdır.

Temel bilimlerdeki ilerlemeler enzimlerin yanı sıra diğer biyolojik materyallerin fonksiyonlarının da çok daha ayrıntılı bir şekilde ortaya çıkarılmasına olanak sağlamıştır.¹⁸ Bu ilerlemelerin doğal bir sonucu olarak farklı biyolojik materyallerin ve iletim sistemlerinin ortak kullanılmasıyla çok çeşitli biyosensörler geliştirilmiş ve geliştirilmeye de devam ettiğine değişik yayınlarda rastlanmaktadır.¹⁸⁻¹⁹ Bugünkü sonuca bakıldığında, hangi temel iletim sistemi söz konusu olursa olsun pratik ve ticari uygulamalarda enzim elektrotlarının büyük bir üstünlüğü açık ara öndedir.¹⁹ Ancak elektrokimyasal esaslı olanların tartışılmaz bir ağırlığı vardır. Bu sonuçtaki canlı sistemlerle ilgili en büyük etmen hemen hemen her türlü maddenin doğrudan ya da dolaylı olarak analizinde kullanılabilen birçok enzimin varlığıdır.

Bilinen enzimlerin yanı sıra bilinmeyenlerin potansiyel varlığı, piyasada yüzlerce ticari enzim preparatının bulunabilirliği ve bu sayının her geçen gün artması enzim sensörlerinin tartışılmaz üstünlüğünün devam edeceğinin bir göstergesidir.²⁰

2.4.1.4. DNA Temelli Biyosensörler

Biyokomponent olarak tek zincirli DNA oligomerlerinin kullanıldığı biyosensörlerdir. DNA yapısının aydınlatılması, hibridizasyon, amplifikasyon ve rekombinant DNA teknolojilerinin gelişimi DNA sensörlerinin geliştirilmesine öncülük etmektedir. Genel olarak DNA sensörleri, yüzeyine immobilize haldeki tek zincirli DNA probu ile belirli bir hastalığı simgeleyen tek zincirli DNA parçasının hibridizasyonu prensibine dayanır.

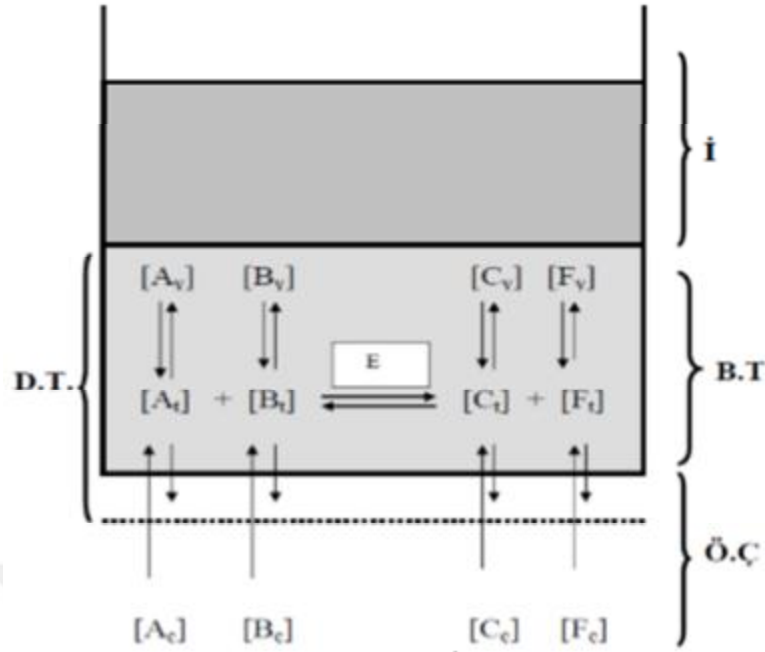
2.4.1.5. Antikor/Antijen Temelli Biyosensörler (İmmünosensörler)

Biyokomponent olarak antikorların kullanıldığı biyosensörler antikor temelli biyosensörler olarak adlandırılır. Vücuda giren yabancı organizmalara (virüs, bakteri vs.) veya onların protein ürünlerine karşı bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen protein yapılı maddelere antikor denir. Antikorlar ve antijenler arasında özgül etkileşim olduğundan immünosensörler ile özgül ve duyarlı analizler yapılabilir.

2.4.2. Sinyal İletici Sistemlerine Göre Biyosensörler

2.4.2.1. Elektrokimya Esaslı Enzim Biyosensörleri

Enzim temelli biyosensörlerde çoğunlukla elektrokimyasal esaslı ileticiler kullanılmaktadır. Bu ileticiler amperometri ya da potansiyometri ilkelerine göre ölçümler alabildiğinden genellikle oksidoredüktaz (elektron açığa çıkaran enzimler) sınıfı enzimler kullanılmaktadır.²⁶



Şekil 2.2. Enzim Biyosensörünün Genel Çalışma İlkesi²⁷ (A: Substrat, B: Kosubstrat veya Koenzim, C ve F: Ürünler, Ç: Ölçüm çözeltisi içindeki, T: biyoaktif tabakadaki ve Y: elektrot yüzeyindeki derişimler. D.T: Difüzyon tabakası, Ö.Ç: Ölçüm çözeltisi, B.T: Biyoaktif tabaka, İ: İletici)

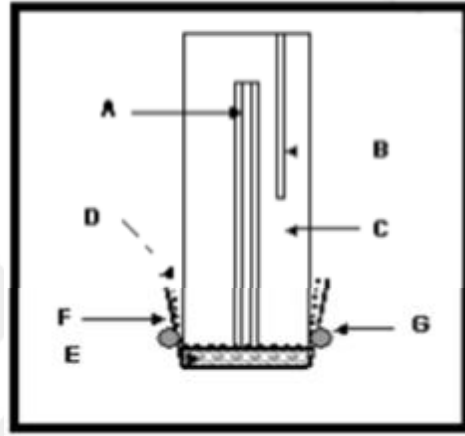
Bir enzim biyosensörü şekilden de görüldüğü üzere A substratı elektrot yüzeyine sabitlenmiş enzim tarafından B koenziminin yardımıyla C ve F'ye dönüştürülür. Bu dönüşüm sonrasında elektrot yüzeyindeki madde derişimlerinde farklılaşma iletici tarafından sinyal olarak yansıtılır ve kaydedicide kaydedilir.²⁸

2.4.2.2. Amperometrik Esaslı Enzim Biyosensörleri

Amperometri genel olarak sabit uygulanan bir potansiyelde elektrokimyasal bir hücredeki akım değerlerinin ya da yoğunluğunun ölçümüne dayanır. Akım yoğunluğu, çalışma elektrodu yüzeyinde yükseltgenme veya indirgenmeleri gerçekleşen, çözeltideki elektrokimyasal olarak aktif türlerin bir fonksiyonu olarak tanımlanır. Bu türlerin derişimleri ile akım doğru orantılıdır.²⁹

Amperometride elektroaktif bir ürünün salınması ya da reaktifin biyokatalitik reaksiyona bağlı olarak tüketimi, grafit gibi inert bir çalışma elektrodunda doğrudan izlenebilir. Elektrot materyalinin biyokatalitik bileşen ve elektrot yüzeyi arasında bir yük aktarım yolu sağlamak için elektron vericileri ya da alıcıları ile modifiye edilmesi de ilgi çeken bir yaklaşımdır. Böylece, elektrottaki elektronların aktarımı daha düşük

potansiyelerde gerçekleşebilir ve bozucu türlerin etkisi azaltılabilir. Bu yaklaşımın bir yararı da belirli tepkimelerin (örneğin oksidaz enzimlerine dayananların) oksijen bağımlılığına son vermesidir. İletici sistem olarak amperometrik sensörün, potansiyometrik biyosensörden farkı ürünlerden sinyal oluşturan türün elektrot yüzeyinde tüketilmesidir.³⁰



Şekil 2.3. Amperometrik esaslı bir biyosensörün şematik gösterimi (A: çalışma elektrodu (Pt), B: referans elektrot (Ag/AgCl), C: elektrolit çözelti (KCl), D: iç gaz geçirgen membran (teflon), E: immobilize enzimi içeren biyoaktif tabaka, F: dış koruyucu membran)

2.4.2.3. Voltametri

Maddelerin elektriksel davranışlarını ve elektrik enerjisi ile kimyasal tepkimeler arasındaki ilişkileri inceleyen bilim dalına elektrokimya, elektrokimyasal bir hücre vasıtasıyla bir çözeltinin elektriksel özelliklerini inceleyen analitik yöntemlere ise elektroanalitik kimya denir.³⁶ Elektroanalitik kimya iki temel alt birimde incelenebilir. Bunlar;

Potansiyometri: Hücre potansiyel değişimini inceler.

Voltametri: Uygulanan anodik veya katodik potansiyelle akım değişimini inceler.

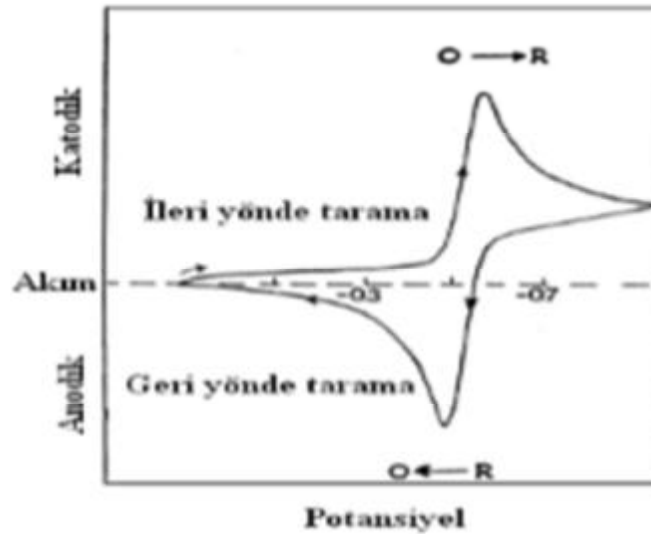
Voltametrik yöntemlerde, uygulanan potansiyel, elektrot yüzeyinde, elektrokimyasal indirgenme veya yükseltgenme ile elektroaktif türlerin derişiminde bir değişime neden olur. Bu potansiyel ve derişim arasındaki ilişkinin incelendiği yöntem

voltametri ve voltametrizde elde edilen akım-potansiyel eğrisine de voltamogram adı verilmektedir.³⁷

2.4.2.4. Dönüşümlü Voltametri

Elektrokimyasal uygulamalar içinde en yaygın kullanılan tekniklerden biri dönüşümlü voltametri tekniğidir. Dönüşümlü voltametri genellikle elektrokimyasal bir analizde kullanılacak olan maddelerin elektriksel davranışlarını incelemek amacıyla kullanılır. Voltametri tekniği elektroanalitik kimyada genellikle ilk uygulanan ve redoks işlemleri üzerine ortamın etkisinin değerlendirilmesinde, reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılmasında, reaksiyon ürünlerinin kararlılığının incelenmesinde, modifiye yüzeylerin elde edilmesinde ve çeşitli redoks problemlerin kullanımı ile kaplamanın ve karmaşık yapıların aydınlatılmasında oldukça sık kullanılan bir yöntemdir.³⁶⁻³⁸

Dönüşümlü voltametri tekniği ile gerilimin bir fonksiyonuna karşı akım değeri ölçülmektedir. Öncelikle başlangıç ve bitiş potansiyellerini belirten bir aralık belirlenir. Sonra başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline doğru sabit hızda tarama yapılır. Tarama yükseltgenme veya indirgenme yönünde uygulanabilir. Her iki yöndeki tarama hızı aynı olmalıdır. Daha sonra tarama aynı sabit hızda ters yönlü yani bitiş potansiyelinden başlangıç potansiyeline doğru tekrar uygulanır. Sürekli değişen belirli aralıktaki potansiyel değerlerine karşı akımdaki değişim grafiğe geçirilir. Bu grafik dönüşümlü voltamogram olarak adlandırılmaktadır.³⁹

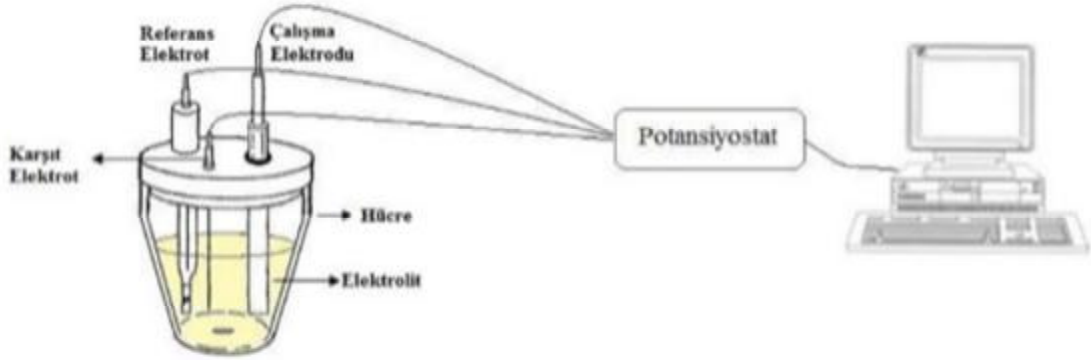


Şekil 2.4. Tersinir tepkimelerde elde edilen dönüşümlü voltamogram⁴⁰

2.4.2.5. Voltametrik Teknikte Kullanılan Cihazlar

Voltametrik analizde kullanılan elektrokimyasal hücre analit ve destek elektrolit adı verilen çözelti içerisinde daldırılmış üç elektrottan oluşur. Bu üç elektrot;

1. Çalışma elektrodu: Tepkimenin gerçekleştiği elektrottur.
2. Referans elektrot: Potansiyel kontrolünün gerçekleştirildiği elektrottur.
3. Karşıt (Yardımcı) elektrot: Çalışma Elektrodundaki ohmik düşmeden kaynaklanan potansiyel değişmesini önlemek için kullanılan yardımcı karşıt elektrottur.⁴¹



Şekil 2.5. Voltametrik analizde kullanılan sistem⁴²

2.5. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyokomponent, uygun bir immobilizasyon yöntemiyle transdusere bağlanır. Bunun için çok çeşitli immobilizasyon yöntemleri vardır. Seçilecek olan immobilizasyon yöntemi biyokomponent yapısına uygun olarak belirlenir. Genel olarak adsorpsiyon, tutuklama, çapraz bağlama ve kovalent bağlama yöntemleri tercih edilmektedir.

2.5.1. Adsorpsiyon

Bu yöntem, enzim immobilizasyonunda kullanılan en basit ve en eski yöntemlerden biridir. Kararlılığı çok az olduğundan tercih edilmemektedir. Ancak, immobilizasyon işleminin basit oluşu ve immobilizasyon sırasında enzim

saflaştırmasına da olanak sağlaması bu yöntemin avantajıdır. Bu yöntemde, biyokomponentin transüdüre nonkovalent etkileşimler (hidrojen bağı, çoklu tuz köprüleri ve Van der Walls kuvvetleri) ile absorblanması prensibine dayanır. Selüloz, silika jel ve cam, enzimleri adsorplamak için kullanılan başlıca absorbanlardır.³¹

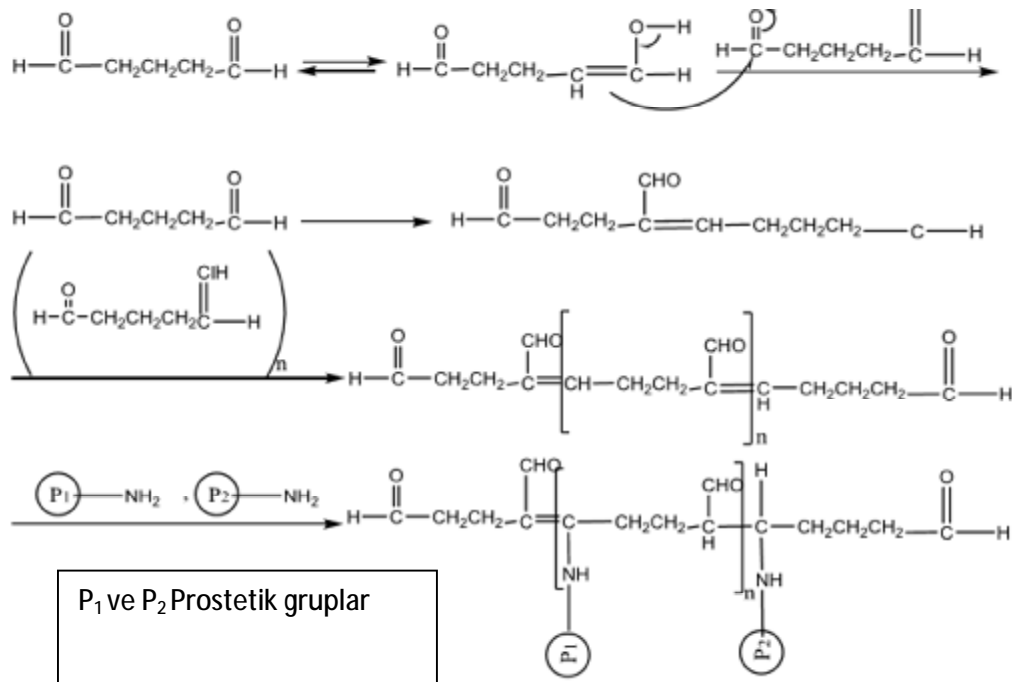
2.5.2. Tutuklama

Büyük molekül kütleli biyomoleküllerin, bir membran veya tabaka içinde hapsedilmesi ile yapılan immobilizasyon işlemidir. Enzimler, polimer jel tabakalarda, akrilamit polimerlerinde, silikon lastiği ve PVC’de tutuklanabilirler.³²⁻³³

2.5.3. Çapraz bağlama

Biyomoleküllerin, glutaraldehit ve hekzametilen diizosiyanat gibi reaktiflerin kullanılarak biyokomponent ile absorban arasında çözünmeyen kompleksler oluşturmasıdır. Aralarında en çok kullanılan çapraz bağlama ajanı glutaraldehittir.³³⁻³⁴

Kovalent bağlama ile enzim veya protein yapısındaki gibi birçok biyoaktif bileşenlerin önemli immobilizasyon reaksiyonlarından birisi olan glutaraldehit ile çapraz bağlama reaksiyon mekanizması şekil 2.6’da görülmektedir.³⁵



Şekil 2.6. Enzim molekülünün glutaraldehit ile çapraz bağlanması.

2.5.4. Kovalent Bağlama

Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında bağlanma, enzimin katalitik aktivitesi için gerekli olmayan gruplar (Tiyol, hidroksil, amino grup, karboksil gibi nükleofilik özelliği olan gruplar) üzerinden gerçekleşir. Bağlanma, molekül içi bağlanma olduğu için oldukça kuvvetli ve sağlamdır. Biyokomponentlerin bu yöntemle immobilizasyonu sıcaklık, pH ve iyon şiddeti gibi dış etkenlere karşı direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü uzatır.³⁶

2.6. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemlerinin Üstünlükleri

İmmobilize enzimlerin, diğer enzimlere göre üstünlükleri aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- İmmobilize enzim, serbest enzime göre daha kararlıdır.
- Sıcaklık ve pH gibi ortam şartlarına karşı daha dayanıklıdır.
- Birden fazla ve uzun süre kullanılabilir.
- Ürün oluşumu daha kolay kontrol altında tutulabilir.
- İmmobilize enzimlerin bozulma olasılığı daha düşüktür.
- İmmobilize enzimler, tepkime sonunda ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabildikleri için çok basamaklı tepkimeler içinde uygundur.

2.7. İdeal Bir Biyosensörün Sahip Olması Gereken Özellikler

2.7.1. Kullanım Ömrü

Biyosensörün kullanım ömrünü kısıtlayan en önemli faktör biyolojik çeviricinin aktivitesindeki azalmadır. Bu durum ayrıca, biyosensörün kalibrasyon sıklığı, stabilite, tekrarlanabilirlik gibi diğer parametrelerini de etkilemektedir.¹⁴ Özellikle biyobileşeni enzim olan biyosensörlerde enzimler sıcaklık, pH değişimi gibi dış etkilerden çabuk etkilenirler ve özelliklerini yitirirler.

2.7.2. Kalibrasyon İhtiyacı

Tüm biyosensörlerin karakteristik bir kalibrasyon cetveli vardır. İdeal bir biyosensörün en az kalibrasyona gereksinmesi istenir. Kaliteli bir üretim şartında

tasarlanmış bir biyosensör bile 4-8 ay sonra tamamıyla yanlış ölçüm yapabilir. Bu yüzden biyosensörler kullanım ömürleri boyunca, sıklıkla kalibre edilmelidirler.

2.7.3. Tekrarlanabilirlik

Bir biyosensörün en önemli özelliği tekrarlanabilirlik özelliğidir. Tekrarlanabilirlik belirli bir zaman dilimi içinde gerçekleştirilen bir seri deney verisinin kendi aralarındaki uyum derecesi göstermektedir.¹⁵ Ayrıca tekrarlanabilirlik, rastgele veya belirsiz hataların bir ölçüsüdür ve hesaplanmasında standart sapma, varyans ve varyans katsayısı olarak verilen üç sayısal ölçüt kullanılır. İdeal bir biyosensörde, elektrotun aynı koşullar altında arka arkaya yapılan ölçümlerde aynı sonuçların okunması istenir. Pratikte pek mümkün olmasa da bu durum göz önüne alınmalı yapılan çalışmalarda tekrarlanabilirlik parametresi mutlaka incelenmelidir. Tekrarlanabilirlik ne kadar iyi olursa biyosensörün uygulamalarının da o kadar iyidir denebilir. Biyosensör sistemlerinde yapılan tayinlerde beklenen tekrarlanabilirlik bağıl standart sapma, (% BSS) değeri % 5 - 10'dur.¹⁶

2.7.4. Kararlılık

Kararlılık biyosensör ile yapılan bir dizi ölçüm sonucunda biyomolekülün aktivitesindeki değişim sonucu çıkış sinyalindeki değişimin toplam ölçüm sayısı ile ya da gün sayısı ile ifade edilmesidir. İdeal biyosensör için elektrot kararlılığının yüksek olması istenir. Biyoaktif bileşenin kararlı olması ise çok sayıda analize imkân vereceği için biyosensöre ekonomik olma avantajı sağlar. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına, elektrodun cinsine, biyosensör hazırlama yöntemine ve dönüştürücüye bağlıdır. Kararlılık özellikle sıcaklık, pH, ortam oksijen miktarı ve nem gibi değişkenlerin çözeltide sabit olarak kalmalarıdır.¹⁵

2.7.5. Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı

Tayin aralığı ile kastedilen, akım-derişim eğrisinin lineer olduğu bölgedir. Kalibrasyon grafiğinde substrat derişimiyle akım farkı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığına “doğrusal aralık” ya da “tayin aralığı” denir. Bu doğrusal grafiğin en alt sınırı da “tayin sınırı” olarak tanımlanır.

Amperometrik esaslı enzim sensörlerinde substrat (veya ürün) derişimi ile akım arasında doğrusal grafikler elde edilir. Genelde tayin sınırının mM altı değerlerin (10^{-5} M'dan daha düşük) biyosensör tarafından ölçülmesi istenir. Amperometrik esaslı enzim sensörlerinde bu değerlere erişebilmek mümkündür.

2.7.6. Seçici Özellik

Bir analitik yöntemin seçiciliği, numune matrisinde bulunan diğer türlerden etkilenmeden tayin edebilme özelliğidir. Biyosensörlerdeki biyoaktif bileşen özgün, kararlı, yalnızca analit derişimine duyarlı olmalı ve diğer kimyasal türlerden etkilenmemelidir. Biyoaktif bileşenin özgün olması, girişim yapabilecek türleri içeren karmaşık içerikli ölçüm ortamlarında detaylı ön işlem yapmaksızın analize imkân sağlar. Eğer yeterli seçicilik mevcut değilse bu eksiki gidermek için uzun ek işlemler gerekir.

2.7.7. Duyarlılık

Biyosensöre immobilize edilmiş biyolojik materyalin sadece belirli maddelere karşı duyarlı olması ideal biyosensörlerin özelliklerindedir. Kalibrasyon duyarlılığı ölçümün yapıldığı derişime karşılık gelen noktada kalibrasyon eğrisinin eğimi olarak tanımlanmaktadır. Biyosensörün kalibrasyon eğrisinin eğimi, cevap değişimi/analit konsantrasyonu (CD/AD)'dır.¹⁵ Eğim değeri arttıkça duyarlılıkta da artış olur. Sensörün büyüklüğü, ölçüm ortamına doğru kimyasal türün kütle aktarım hızı gibi faktörler duyarlılığı etkileyen faktörlerdir.

2.7.8. Hızlı Cevap Zamanı

Hızlı cevap zamanı algılayıcıların giriş parametresinde değişime karşı tepki vermesinin bir ölçüsü olarak tanımlanmaktadır. Kararlı hal akım zamanı ölçüm hücreğine her bir analit eklenmesi ile belirlenir ve kararlı hal akım cevaplarının % 90'ına ulaşması için gerekli süreden cevap zamanı anlaşılabilir.¹⁵ Örneğin elde edilen eğride piklerin şekli yayvan ve geniş ise cevap zamanı uzun yani yavaş, tersi söz konusu ise cevap zamanı kısadır denir.

2.7.9. Hızlı Geriye Dönme Zamanı:

Geriye dönme zamanı örneğin amperometrik çalışmalarda ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini gösterir. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra sabit akım değerleri kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnek de aynı süre sonra ilave edilebilir.

2.7.10. Basitlik ve Ucuzluk

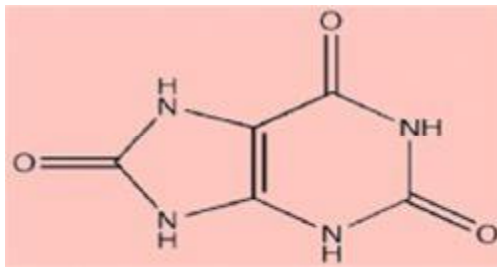
Ucuz, tasarımı basit ve kullanımı kolay biyosensörler tercih edilir. Bu nedenle geliştirilen günümüzdeki biyosensörler ilk biyosensörlere göre karmaşık ve de pahalı yapılarından arındırılmış, basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyeti düşürülmüştür.

2.7.11. Küçültülebilirlik ve Sterilize Edilebilirlik

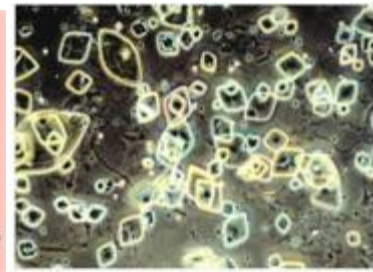
Elektrotlarının sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi biyosensör tasarımında önemli bir avantajdır. Buna karşın, biyosensör yapısına giren biyolojik bir materyalin fiziksel dayanıklılığı, sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametredir.

2.8. Ürik Asit

Kapalı formülü $C_5H_4N_4O_3$ olan ürik asidin (2,6,8- triokspürin) IUPAC ismi: 7,9-dihidro-1H-pürin-2,6,8(3H)-trione'dir. 2,6,8-triokspürin şeklinde de okunur. Temel bileşeni, nükleik asitlerin yapı taşı olan pürin halkasıdır. Ürik asidin molekül ve kristal tanecik yapısı sırasıyla şekil 2.7'de ve şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Ürik asit formülü



Şekil 2.8. Ürik asit kristalleri

2.8.1. Ürik Asidin Genel Özellikleri

Ürik asidin genel özellikleri aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır.

- Saf ve katı haldeki ürik asit beyaz toz şeklindedir.
- Kristaller dörtgen, kama, halter ve fiçî şeklindedir. Beyaz, sarı, kırmızı veya kahve renkli olabilir.
- Asidik özellik gösterir.
- Isıtma ile parçalanır.
- Yoğunluğu 1,87 g/cm³'dir.
- Sudaki çözünürlüğü çok azdır.
- Moleküler ağırlığı 168 g/mol'dür.
- Asitlik sabiti (pKa): 5,8'dir.

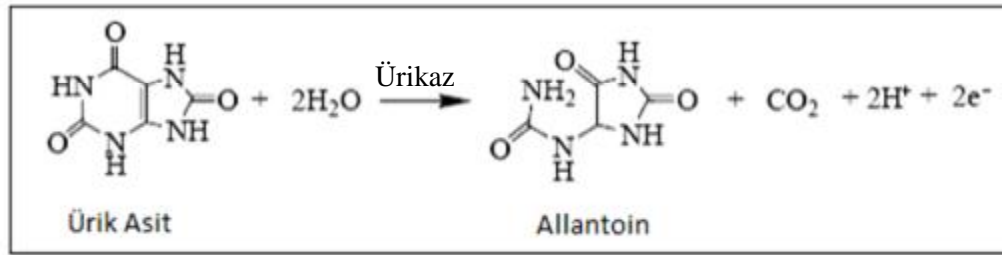
2.8.2. Ürik Asit Oluşumu (Pürin Nükleotid Katabolizması)

Pürin nükleotidlerinin katabolizması, karaciğerde pürin nükleotidi yapısından fosfat grubunun 5-nükleotidaz enzim etkisiyle ayrılmasıyla başlar ve son olarak açığa çıkan ksantin, ksantin oksidaz etkisiyle ürik asite yükseltgenmesi ile sonlanır. Yükseltgenme tepkimesi sırasında elektron alıcı molekül oksijendir (Şekil 2.9) .

Maymunlar, sürüngenler, kuşlar ve diğer bazı hayvanlarda pürin katabolizmasının atılan son ürünü ürik asittir. Yetişkin bir insanda ürik asidin atılım hızı yaklaşık 0,6 gr/24 saattir.



Memelilerin çoğunda ve birçok omurgalıda ürik asidin ürikaz etkisiyle yıkılması sonucu allantoin oluşur. (Şekil 2.10) Bu nedenle serum ürik asit seviyeleri düşük düzeydedir (<2 mg/dl). Fakat insanlarda ürikaz geninin evrimi sürecinde 820 milyon yıl önce olduğu varsayılan mutasyon sebebiyle, ürikaz enzimi işlev gösteremez ve bu nedenle serum ürik asit seviyeleri diğer memelilere göre daha yüksektir (>2 mg/dl).⁴⁴



Şekil 2.10. Ürik asidin ürikaz etkisiyle yıkılması sonucu allantoin oluşumu

2.8.2.1. Pürinler İçin Kurtarma Yolu (Salvage Yolu)

Normal hücresel nükleik asitlerin döngüsünden veya diyetten yıkılmadan gelen pürinler, tekrar nükleozid trifosfatlara çevrilerek vücutta kullanılır. Buna pürinlerin kurtarma yolu denir. De novo sentez oldukça masraflıdır, yüksek enerjili fosfat harcanır. Ayrıca eritrositlerde amidotransferaz olmadığından, de novo olamaz. Bu yolda iki enzim görev alır, adeninfosforiboziltransferaz (APRT) ve hipoksantin-guanin fosforiboziltransferaz (HGPRT). Her ikisi de 5-fosfo-d-ribozil-1-pirofosfatı (PRPP) riboz-5-P kaynağı olarak kullanır.

2.8.3. Pürin Metabolizması Bozuklukları

2.8.3.1. Hiperürisemi

Hiperürisemi, kanda ürik asit düzeyinin normalden fazla olmasıdır. Gut, nükleik asitlerden zengin diyetle beslenme, nükleik asit yıkılım ve oluşumun arttığı hemolitik anemi, hücre proliferasyonu ve hücre nekrozunun arttığı neoplazi durumları, ürik asit atılımının bozulduğu böbrek hastalığı, polisitemiler, psoriasis, akut açlık, doku harabiyeti, pernisiyöz anemi, gebelik toksemisi, Lesch-Nyhan sendromu, Von Gierke hastalığı gibi birçok durumda hiperürisemi gözlenir.

2.8.3.2. Gut

Primer olarak kanda aşırı miktarda ürik asit bulunması (hiperürisemi) ile karakterize bir hastalıktır. Primer gut, çoğunlukla erkeklerde ve 40-60 yaşlarında görülür. Çeşitli hastalık veya intolerans durumlarına bağlı olarak oluşan hiperürisemi sekonder gut olarak bilinmektedir. Gut, kanda ve dokularda ürik asit derişiminin artmasına bağlı bulgularla özgündür. % 80 olguda ürik asidin renal atılımı azalmıştır. Yüksek pürinli diyet, asidoz, aşırı alkol alınması, düşük doz aspirin alınması, kalp yetmezliği, laktat infüzyonları, kassal faaliyet gutu ağırlaştırıcı etmenlerdir. Gut hastalığında eklemler, sodyum urat kristallerinin anormal birikimi yüzünden iltihaplı, ağrılı ve artritik olur. Hiperüriseminin en önemli etkileri, uratin böbreklerde çökerek böbrek yetmezliğine yol açması ve eklemlerde yüksek miktarda sodyum urat kristalleri biriktirmesidir. Gut tedavisi için ksantin oksidazı inhibe eden allopurinol kullanılmaktadır. Şekil 2.11' de gut hastalığının klinik görünümü gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Gut hastalığının klinik görünümleri

2.8.3.3. Lesch-Nyhan Sendromu

Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz aktivitesinin eksikliğiyle ortaya çıkan ve hemen hemen yalnızca erkek çocuklarda görülen genetik hastalıktır. Belirtileri karmaşıktır. Bu genetik hastalığa sahip çocuklarda hastalık 2 yaşında kendini göstermektedir. Bazen zayıf koordinasyon ve zihinsel gerilik gözlenebilir. Düşmanca ve kendilerine zarar veren el ve ayak parmaklarını, dudaklarını ısırma gibi davranışlar gösterebilirler. Hasta çocuklarda koreoateozis ve spastisite ile birlikte serebral felç görülür. Şekil 2.12' de Lesch- Nyhan sendromunun klinik görünümü verilmiştir.



Şekil 2.12. Lesch- Nyhan sendromunun klinik görünümüleri

2.8.3.4. Von Gierke Hastalığı

Glukoz-6-fosfataz eksikliği sebebiyle pentoz fosfat yolu aktivitesinin artışına ve riboz-5-fosfat artışıyla pürin aşırı üretimine bağlı olarak hiperürisemi ile özdeşir.

2.8.3.5. Hipöürisemi

Kanda ürik asit düzeyinin normalden az olmasıdır. Wilson hastalığı, ksantinüri, Fanconi sendromu, adenzin deaminaz eksikliği, pürin nükleozid fosforilaz eksikliği gibi durumlarda hipöürisemi gözlenir.

2.8.3.6. Ksantinüri

Ksantin oksidaz eksikliği sebebiyle ksantin böbrek taşları oluşumu ve hipöürisemi ile özdeşir.

2.9.4. Ürik Asidin Tayin Yöntemleri

Ürik asit miktarlarını belirlenmek için kullanılan standart metotlar aşağıdaki gibi sıralanabilir.

1. Spektrofotometrik ve Enzimatik
2. Kromatografik
3. Polarografik
4. Kolorimetrik
5. Biyosensör temelli yöntemler

1. Spektrofotometrik ve Enzimatik Yöntemle Ürik Asit Tayini:

Ürik asit reaktifi Synchron CX sistemi kalibratörü ile birlikte kullanıldığında vücut sıvılarındaki ürik asit derişimi kantitatif olarak tayin edilir. Ürik asit reaktifi ürik asit derişiminin bir zamanlı bitiş noktası yöntemiyle ölçülmesinde kullanılır. Ürik asit, ürikaz ile yükseltgenerek allantoin ve hidrojen peroksit üretilir. Hidrojen peroksit renkli bir ürün üretilmesi için peroksidazla katalize edilen bir reaksiyonda 4-aminoantipirin (4-AAP) ve 3,5-dikloro-2hidroksibenzen sülfonat ile reaksiyona girer.

Synchron CX sistemi uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran 1 kısım numuneye 25 kısım reaktiftir. Sistem 520 nm'deki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki ürik asit derişimi ile doğru orantılıdır.

2. Kromatografik Yöntemler

a) Spektrometrik Yöntem: Ters faz kromatografisi prensibine dayanır. Serum ve idrardaki ürik asite bakılır. Bu yöntemin avantajı diğer yöntemlere göre daha özgün ve hassas olamasıdır. Serum ve idrardaki ürik asidi kantitatif olarak ölçer. HPLC metodunda, 235 nm veya 280 nm'deki spektrofotometrik ölçümlü ters faz kromatografisi kullanılır.

b) Elektrokimyasal Yöntem: İyon değişim ayırımına dayanan yöntemdir. Yine serum ve idrarda bakılır. Bu yöntemin avantajı ise daha duyarlılık ve özgünlük gösteren sabit faz iyon değişimini içeren, elektrokimyasal yöntemin kullanılmış olmasıdır. Amperometrik ölçümün hassasiyeti mg/L'dir. Yöntem, 10 ve 200 mg/L arasında lineerdir.

3. Polarografik

Özgül bir elektrot yardımıyla, ürikaz etkisi esnasında tüketilen O₂ ölçülmesi prensibine dayanır. Oksijen tüketim oranı, ürik asit derişimi ile orantılıdır. Serum ve idrardaki ürik asit derişimini ölçmek için kullanılır. Yaygın olarak kullanılan bir metot değildir.

4. Kolorimetrik

Ürikaz enzimi reaksiyonunun öncesindeki ve sonrasındaki iyot ile kolorimetrik titrasyon sonucu oluşan toplam indirgenmiş maddelerin ölçümü esasına dayanır. İki ölçüm arasındaki fark ürik asit miktarı ile ilgilidir.

5. Biyosensör Temelli Yöntemler

Ürikaz reaksiyonlarda çoğunlukla reaksiyon ürünü olarak H_2O_2 açığa çıkar. Hazırlanan enzim elektrotların çoğu, uygulanan sabit potansiyelde çalışma elektrodunun yüzeyinde enzimatik reaksiyon sonunda oluşan H_2O_2 ' in yükseltgenmesi esasına dayanmaktadır. Yükseltgenmenin meydana geleceği bir potansiyelde çalışıldığında devreden geçen anodik akım oluşan hidrojen peroksidin derişimi, dolayısıyla ürik asit derişimi ile orantılıdır.

Son yıllarda geliştirilen ölçüm tekniklerinden en önemlisi biyosensör temelli ölçüm tekniğidir.

Çünkü geleneksel tekniklere göre birçok avantaj sağlamaktadır. Örneğin biyosensörlerde kullanılan biyolojik algılayıcı sistemin seçiciliği; örnek ön hazırlığına ve fazla miktarda örneğe bağlı kalmadan kompleks karışımlarda dahi gerçek zamanlı analiz için çok yüksek özgünlükte cihazların geliştirilmesine elverişli olmasıdır. Biyosensörler ayrıca çok yüksek hassasiyete, ölçüm hızına, basit kullanıma sahip ve çoğaltılabilir analitik cihazlardır.

2.10. Ürikaz Enzimi (Ürat oksidaz, E.C. 1.7.3.3)

Pürin katabolizmasında, ürik asidin allantoin oksidasyonundan sorumlu enzimdir. Ürikaz enzimi, öncelikle düşük K_m değerine sahip olması ve kararlılığını koruyabilmesinden dolayı serumda ürik asit derişimini saptamada klinik teşhis enzimi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.⁴⁶⁻⁴⁷⁻⁴⁸ Bu enzim klinikte yalnızca teşhis enzimi olmayıp, aynı zamanda ürik asit metabolizmasındaki bozukluklardan kaynaklan hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Ürikaz enzimi, plazma ürik asit seviyelerini düşürücü ilaçlar arasında da yer almaktadır.⁴⁹

Ayrıca ürikaz enzimi, klinik uygulamalar dışında kozmetik, saç boyama ve dalgalandırmada kullanılmıştır ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Son yıllarda yapılan pek

çok çalışmada ise, ürikaz enzimi, ürik asit miktarının saptanmasında, biyosensörlerin yapımında kullanılmıştır.⁵⁰⁻⁵¹⁻⁵²⁻⁵³

2.10.1. Ürikaz Enzimi İlgili Önceki Çalışmalar

1. Arora vd. (2007) tarafından indiyum kalay oksit (ITO) kaplanmış cam substratlara poli(anilin) film elektrokimyasal olarak biriktirilmiş ve bu film üzerine ürikaz glutaraldehit ile çapraz bağlama yöntemi ile immobilize ederek hazırlanmış olduğu amperometrik ürik asit biyosensörü ile optimum pH'ı 6,5 (0,05 M Tris-HCl tamponu), optimum sıcaklığı 35°C ve cevap zamanı 60 saniye olarak belirtilmiştir.
2. Zhang vd. (2007) tarafından BSA ve glutaraldehit kullanılarak ürikaz immobilize ederek hazırlanmış olduğu oksijen probuna dayanan ürik asit biyosensörü ile optimum pH 8,0 fosfat tamponunda, sıcaklığı 10 °C – 45 °C aralığında olduğunu, tekrarlanabilirlik çalışmasında % BSS % 3,1 (n=7), raf ömrünün en az 3 ay olduğunu belirtilmiştir.
3. Montalbini ve arkadaşları yaptıkları çalışmada değişik kaynaklardan saflaştırdıkları ürikazlarda optimum pH ve sıcaklık çalışması yapmışlar ve genellikle enzimin pH = 8,0 - 9,5 arasında kararlı olduğunu ve sıcaklık çalışmalarında ise enzimin 30 °C – 40 °C arasında maksimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.⁵⁴
4. Janguo ve arkadaşları *Candida* türlerinden saflaştırdıkları ürikaz enziminin optimum pH'sını 8,5 optimum sıcaklığını ise 30 °C olarak bulmuşlardır.⁵⁵
5. Alamillo ve arkadaşları tek hücreli yeşil bir alg olan *Chlamydomonas reinhardtii*'den saflaştırdıkları ürikaz için optimum pH= 8,5 ve optimum sıcaklığı 40 °C olarak belirlemişlerdir.⁵⁶
6. Arora vd. (2009) ürik asit tayini için ürikaz-epoksi reçine biyokompozit membranını kullanarak çözünmüş oksijenin ölçülmesine dayanan biyosensörde, optimum pH 8,5, (0,02 M Tris-HCl tamponu) optimum sıcaklık 35 °C belirtmişlerdir. Ayrıca yöntemin doğruluğunun belirlenmesi için serumda geliştirilen yöntemle elde edilen ürik asit değerleri standart enzimatik kolorimetrik yöntem değerleri ile kıyaslandığında $y = 0,984x + 0,0674$ ($r = 0,98$)

iyi bir korelasyon elde edilmiştir. 60 gün boyunca 100 kullanım sonunda elektrot başlangıç aktivitesinin % 68'sini korumuştur.

7. Wang vd. (2007) tarafından poli(maleimidostiren) ve poli(stiren) modifiye altın elektroda ürikaz immobilize edilerek amperometrik bir ürik asit biyosensörü ile yapılan çalışmada ürik asit derişimini 0,01 M, optimum pH 8,5 fosfat tamponunda, optimum sıcaklığı 30 °C olarak belirtmiştir. Elektrot 21 günlük depolama süreci sonunda başlangıç aktivitesinin %13'ünü kaybetmiştir.
8. Jiang vd. (2007) iyonik sıvıda (1-etil-3-metilimidazol-etil sülfat) poli(anilin) ile hazırladıkları modifiye ürik asit biyosensörü ile cevap akımı 0,20 – 0,50 V aralığında artan potansiyelle artmış ve cevap zamanı kısalmış, optimum çalışma potansiyeli olarak +0,40 V olarak alınmış. Bu potansiyelde optimum pH, pH 2–12 aralığında cevap akımı artan pH ile arttığından optimum pH'nın bulunamadığını belirtmişlerdir.

2.11. Biyosensörde Kullanılan Biyoaktif Tabaka Bileşenleri

Bu bölümde ürikaz enziminin immobilizasyonda kullanılan jelatin ve glutaraldehit hakkında genel bilgi verildi.

2.11.1. Jelatin

Jelatin, kollajenin hidroliziyle elde edilen bir proteindir ve karakteristik olarak yapısında yüksek oranda glisin, prolin ve hidroksiprolin amino asitlerini içermektedir. Bu amino asitler sayesinde jelatin üçlü heliks bir yapı oluşturur ve jelleşme özelliği kazanır.⁵⁷

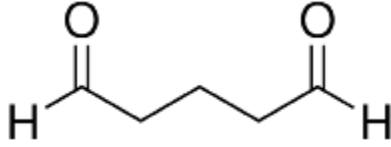
Ucuz ve kolay bulunur olması yanında, immobilizasyon materyali olarak kullanılan diğer polisakkaritlerin aksine jel oluşumu için herhangi bir moleküle, iyon, tuza ya da pH ayarlanmasına gerek duyulmaması ve tamponda çözülüp ısıtıldıktan sonra tekrar oda sıcaklığına getirildiğinde jel kıvamını alması gibi özelliklerinden dolayı jelatin iyi bir immobilizasyon malzemesidir.

Termal ve mekanik kararlılığının artırılması amacıyla immobilizasyonda çoğunlukla çapraz bağlayıcı ajan, bir reaktif olan glutaraldehit ile birlikte kullanılmaktadır.⁵⁸

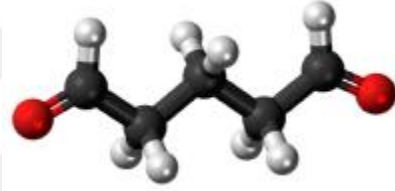
2.11.2. Glutaraldehit

Glutaraldehit, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda çoğunlukla kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir. Biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, hücre doku gibi biyoaktif materyallerin, jelatin, kollajen ve kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehit ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır.⁵⁹

Yöntem kolay uygulanabilir olması yanında immobilize sistemin termal ve operasyonel aynı zamanda da depo kararlılığını artırması tercih edilme nedenlerindedir.⁶⁰ Glutaraldehit'in çizgi yapısı şekil 2.13'de gösterilmiştir.



Şekil 2.13. Glutaraldehit'in çizgi modeli

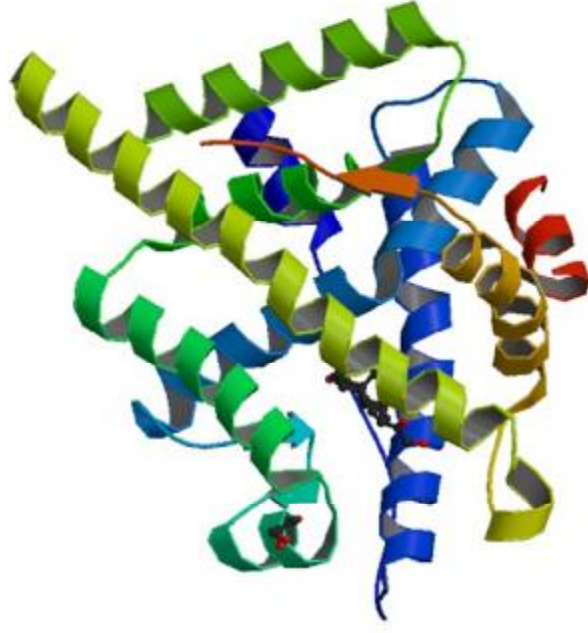


Şekil 2.14. Glutaraldehit'in top çubuk modeli

2.11.3. Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin: BSA)

Sığır serum albümini sığır kanından izole edilen bir kan proteindir. İnsan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasındaki en yaygın proteindir ve kanda bulunan proteinlerin % 60'ını oluşturur. Sığır serum albümini dolaşım sisteminin majör çözümlü bileşenidir bu nedenle birçok fizyolojik fonksiyonu vardır.

İmmobilizasyon çalışmalarında enzimle yapılan çapraz bağ sayısını azaltarak enzimin aktivitesinin düşmesinin engellenmesi ve özellikle tutuklama yöntemlerinde çapraz bağlayıcılarla oluşturulan çapraz bağ sayısını arttırmak amacıyla kullanılır.



Şekil 2.15. BSA' ya ait üç boyutlu yapı

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan araç-gereç ve kimyasallar aşağıdaki gibidir.

3.1.1. Cihazlar

- Ø Grafit Çalışma Elektrodu (CHI, A.B.D)
- Ø Palm Sens Biyosensör (Hollanda)
- Ø Platin Tel Yardımcı Elektrot (CHI 115, A.B.D)
- Ø Ag/AgCl Referans Elektrot (CHI 111, A.B.D)
- Ø P1000 ve P20 Otomatik Pipetleri (Gilson, Fransa)
- Ø Termostatlı su banyosu (Nuve, TR)
- Ø Manyetik Karıştırıcı (Tüv Bayern, Almanya)
- Ø pH Metre (Mettler Toledo)
- Ø Hassas Terazi (Mettler AJ100)
- Ø UV-1601 Spektrofotometre (Shimadzu)
- Ø Sonikatör (Resonik 1016, Türkiye)

3.1.2. Kimyasallar

- Ø Monosodyumhidrojenfosfat NaH_2PO_4 (Merck)
- Ø Disodyumhidrojenfosfat Na_2HPO_4 (Merck)
- Ø Sodyum asetat trihidrat (Merck)
- Ø Asetik asit (Merck)
- Ø Glisin (Sigma)
- Ø Distile/Bidistile su
- Ø Glutaraldehit (Sigma)
- Ø NaOH (Sigma)
- Ø HCl (Sigma)
- Ø Alümina (Sigma)
- Ø Alümina solüsyonları
- Ø % 96 Etanol (Sigma)
- Ø Sığır Serum Albümini (Sigma)

- Ø Jelatin (Sigma)
- Ø Ürik Asit (Sigma)
- Ø Ürikaz Enzimi (Sigma)

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

Fosfat tamponu: 0,1 M Fosfat tamponu hazırlandı (Disodyumhidrojenfosfat ve monosodyumhidrojenfosfat) ve çözeltinin pH'ı 0,1 M NaOH ve HCl kullanılarak 7,0' e ayarlandı. Farklı derişimlerdeki ve pH daki tampon çözeltileri hazırlamak için de aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Asetik asit/asetat tamponu: 0,1 M Asetik asit/Asetat tamponu hazırlandı (Sodyumasetat trihidrat ve asetik asit) ve çözeltinin pH'ı 0,1 M NaOH ve HCl kullanılarak 6,5'e ayarlandı. Farklı derişimlerdeki ve pH daki tampon çözeltileri hazırlamak için de aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Glisin/NaOH tamponu: 0,1 M Glisin/NaOH ile hazırlanan çözeltinin pH'ı 0,1 M NaOH ve HCl ile 9,0'a ayarlandı Farklı derişimlerdeki ve pH daki tampon çözeltileri hazırlamak için de aynı yol izlendi. Tampon çözelti buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Serbest ürikaz enzimi: Deney sırasında kullanılacak olan enzim çözeltisi buzdolabında bekletildi. Çözelti uzun süre kullanılmadığı zaman derin dondurucuda saklandı.

Ürik asit çözeltisi: 0,84 gr tartılan katı ürik asit 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisinde çözüldükten sonra derişimi 0,1 M ve pH'sı 6,5 olan asetat tamponuyla tamamlanarak 0,5 mM derişimde 10 ml stok çözeltisi olarak hazırlandı. Bu çözeltiden belirli bir miktar alınarak ve aynı şekilde 0,1 M asetat tamponu ile seyreltilerek farklı derişimlerde ürik asit çözeltileri hazırlandı. Çözelti buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Sodyum hidroksit çözeltisi: Katı haldeki sodyum hidroksit saf suda çözümlenerek 0,1 M derişimde çözelti hazırlandı.

Hidroklorik asit çözeltisi: Derişik HCl saf su ile seyreltilerek 0,1 M derişimde çözelti hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ürik Asit Tayinine Yönelik İmmobilize Edilmiş Biyosensör Hazırlanması

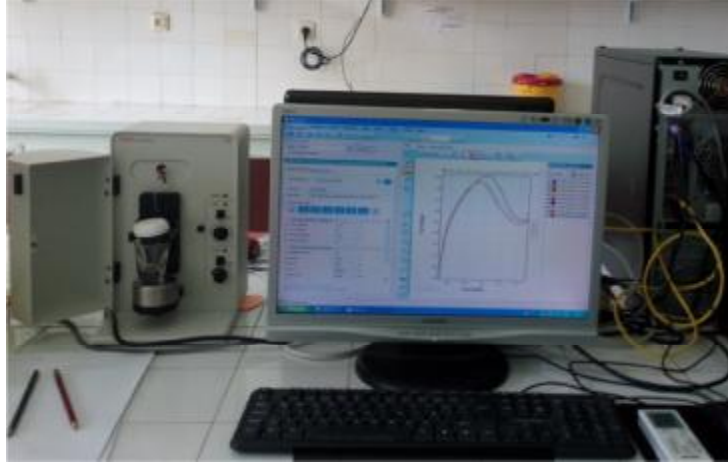
Öncelikle grafit elektrot fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal yöntemlerle temizlendi.

Temizlik aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir.

- I. Bir miktar gama alümina solüsyonu kadife yüzey üzerine damlatıldı. Daha sonra grafit elektrot kadifeye yüzey üzerine hafif bir şekilde halkalar çizerek gezdirildi. Böylece yüzeydeki tabaka ve/veya herhangi bir kirlilik mekanik olarak giderilmiş oldu.
- II. Grafit elektrot distile suyla durulanır sonra absorblanmış partikülleri uzaklaştırmak için 5-10 dk % 96'lık etanolde ve sonikatör içinde bekletildi. Tekrar distile suyla durulandı ve sonra 10 dk distile su içerisinde sonikatörde bekletildi.
- III. Grafit elektrot yüzeyinin elektrokimyasal olarak temizlenmesi için 0,1 N HCl çözeltisi içerisinde +1,0 ve -1,0 potansiyelleri arasında en az onbeş tane döngüsel voltammogram alındı.

Biyosensörün biyoaktif tabakasını oluşturmak için 45 mg jelatin ve 30 mg BSA, 300 µL asetat tamponu pH 6,5 içerisinde çözülüp 35° C'de 20 dakika bekletildi. Karışımın 10 µL'si, 30 µL daha önce hazırlanan enzim çözeltisi ile karıştırılarak elde edilen toplam hacim 40 µL olarak grafit çalışma elektrodu üzerine yayıldı. Elektrot +4° C' de 1 saat bekletildikten sonra fiziksel olarak bağlanması amacı ile 1 saat UV ışık altında bekletildi. Daha sonra % 2.5'lik glutaraldehit çözeltisinde 5 dakika çapraz bağlanmanın gerçekleştirilmesi sağlandı. Son olarak elektrot, içerisinde pH 6,5'de asetat tamponu bulunan tepkime hücresine alındı. Bütün deneyler aynı elektrot tipi kullanılarak yapıldı.

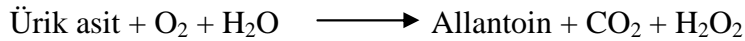
Hazırlanan biyosensör ile ölçüm çalışmalarının yapıldığı düzeneğin fotoğrafı şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Biyosensör düzeneği

3.2.2. Ürikaz Temelli Biyosensörün Ölçüm Prosedürü

Ürik asit biyosensörünün hazırlanması için kullanılan çalışma elektrodu grafit elektrottur. Ürik asit tayini için kullanılan enzimatik tepkimelerde çoğunlukla reaksiyon ürünü olarak H_2O_2 açığa çıkar. Hazırlanan enzim elektrotların çoğu, uygulanan sabit potansiyelde çalışma elektrodunun yüzeyinde enzimatik reaksiyon sonunda oluşan H_2O_2 'in yükseltgenmesi esasına dayanmaktadır.⁶⁸⁻⁷⁰ H_2O_2 oluşumu aşağıda gösterilmiştir.

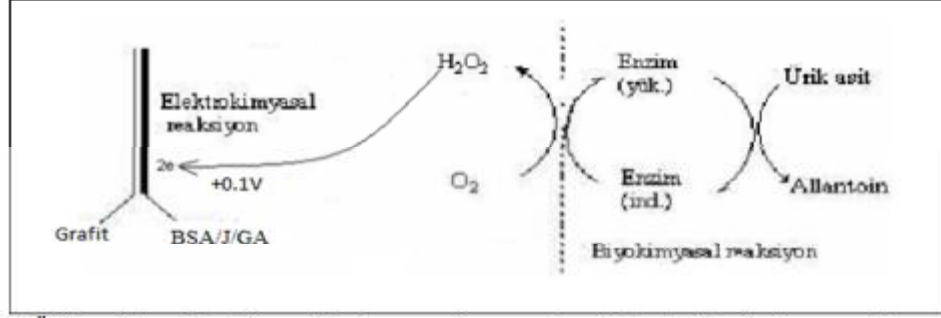


Oluşan hidrojen peroksit, grafit elektrot yüzeyinde sabit bir potansiyelde aşağıdaki reaksiyona göre yükseltgenmektedir.⁷¹



Yükseltgenmenin meydana geleceği bir potansiyelde çalışıldığında devreden geçen anodik akım oluşan hidrojen peroksitin derişimi, dolayısıyla ürik asit derişimi ile orantılıdır.

Bu çalışmada grafit elektrodu ile enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan hidrojen peroksitin dolayısıyla ürik asidin ölçülmesinde çözültide ve elektrot yüzeyinde gerçekleşen olaylar şematik olarak aşağıdaki şekilde gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Ürik asidin allantoina yükseltgenmesi sırasında elektrot yüzeyinde gerçekleşen elektron aktarımı

3.2.3. İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Ürikaz temelli biyosensör için en iyi cevabın elde edilebileceği immobilizasyon koşullarının tespit edilmesi amaçlandı. Bu amaçla BSA, glutaraldehit ve jelatin, miktarının biyosensör cevabı üzerine etkileri araştırıldı. İmmobilizasyonun her bir parametresinin optimum miktarının belirlenmesi için, diğer değişkenler sabit tutularak optimizasyonu belirlenecek parametre değiştirilip biyosensör hazırlandı ve amaçlanan ölçümler alındı.

3.2.3.1. Sığır Serum Albumin Miktarının Biyosensör Cevabına Etkisi

BSA miktarının biyosensör cevabına etkisinin belirlenmesi için farklı BSA derişimlerinde elektrot hazırlandı. Hazırlanan her bir elektrotla yapılan ölçümlerden elde edilen akım farkı ve substrat derişimi arasındaki grafikten en uygun BSA miktarı belirlendi. Bu amaçla 0,015 gr, 0,03 gr, 0,045 gr, 0,06 gr ve 0.12 gr BSA içeren biyosensörler hazırlandı. Ölçümler 0,5 mM ürik asit derişimde ve pH 6,5'da asetat tamponunda gerçekleştirildi.

3.2.3.2. Glutaraldehit Yüzdesinin Biyosensör Cevabına Etkisi

Biyosensör için en uygun BSA miktarı belirlendikten sonra glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla BSA miktarı 0.030gr olacak şekilde sabit tutularak sadece glutaraldehit yüzdesi değiştirilerek % 1,5; % 2; % 2,5; % 3 ve % 3,5 oranında glutaraldehit ile biyosensörler hazırlandı. Ölçümler 0,5 mM derişimde ve pH 6,5 asetat tamponunda gerçekleştirildi.

3.2.3.3. Jelatin Miktarının Biyosensör Cevabına Etkisi

Hazırlanan biyosensör için en uygun jelatin miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi incelenmek amacıyla farklı jelatin miktarı ile elektrot hazırlandı. Hazırlanan her bir elektrotla yapılan ölçümlerden elde edilen akım farkı ve substrat derişimi arasındaki grafikten en uygun jelatin miktarı belirlendi. Bunun için BSA miktarı 0,30 gr ve glutaraldehit yüzdesi % 2,5 olacak şekilde sabit tutularak 0,225 gr, 0,45 gr, 0,67 gr, 0,90 gr ve 1,2 gr jelatin içeren biyosensörler hazırlandı. Ölçümler 0,5 mM ürik asit derişimde ve pH 6,5 asetat tamponunda gerçekleştirildi.

3.2.4. Biyosensörün Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

Biyosensörün çalışma koşullarını optimize ederek en iyi biyosensör cevabını verdiği koşulların bulunması için çalışma aralığı, optimum tarama hızı değerleri, tampon pH'ı, derişimi ve sıcaklığın biyosensör cevabına etkileri incelendi ve her birinin maksimum değerlerinin biyosensör cevabına karşı grafikleri çizildi.

3.2.4.1. pH Optimizasyonu

pH: 5,0; 5,5; 6,0 ve 6,5'de 0,1 M asetik asit/asetat; 7,0; 7,5; 8,0 olan 0,1 M sodyum fosfat tamponları ve pH 8,5; 9,0; 9,5 olan 0,1 M glisin/NaOH tamponları hazırlandı. En iyi biyosensör cevabının hangi pH değeri ile alındığı belirlendi. Ölçümler 0,5 mM standart ürik asit çözeltisi derişiminde yapıldı. Çalışma sonucunda tampon pH'ı ve maksimum değerlerinin biyosensör cevabı arasında grafik çizilerek optimum pH belirlendi.

3.2.4.2. Uygun Tampon Derişimi

Hazırlanan biyosensörün optimum pH değeri ve bu pH değerindeki uygun tampon sisteminin belirlenmesinden sonra tampon derişimlerinin biyosensör cevabı üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, hazırlanan biyosensörler için farklı derişimlerdeki tamponlarla ölçümler gerçekleştirildi. Bu amaçla bir önceki çalışmada en uygun tampon sistemi olarak belirlenen asetat tamponunun (pH 6,5) 50 mM, 100 mM ve 200 mM derişimleri ile çalışıldı. Ölçümler 0,5 mM standart ürik asit çözeltisi derişiminde yapıldı. Çalışma sonucunda tampon derişimi ve maksimum değerlerinin biyosensör cevabı arasında grafik çizilerek optimum pH belirlendi.

3.2.4.3. Optimum Sıcaklık

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50 ve 55 °C'da ölçümler gerçekleştirilerek geliştirilen biyosensör için biyosensör cevapları incelendi. Ölçümler 0,5 mM standart ürik asit çözeltisi derişiminde ve 0,1 M pH 6,5 asetat tamponunda yapıldı. Çalışma sonucunda sıcaklık ve % enzim aktivitesi arasında grafik çizilerek optimum sıcaklık belirlendi.

3.3. Biyosensörün Karakterizasyonuna Yönelik Çalışmalar

Ürikaz biyosensörün çalışma koşulları ve biyoaktif tabaka bileşenlerinin optimizasyonlarından sonra belirlenen optimum koşullarda bir biyosensör hazırlandı ve biyosensörün karakterizasyon çalışmalarına geçildi.

3.3.1. Doğrusal Ölçüm Aralığının Belirlenmesi

Geliştirilen biyosensörün çalışma koşulları optimizasyonlarından sonra belirlenen optimum koşullarda bir biyosensör hazırlandı. Ürik asidin farklı derişimleri için ölçümler alındı. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen amperometrik cevap akımları ve ürik asit derişimleri arasındaki lineer bir artış gözlemlendi. Ölçüm aralığı elde edilen grafiğin doğrusal eğimi çizilerek saptandı.

3.3.2. Analiz Sonuçlarının Tekrarlanabilirliği

Hazırlanan biyosensörle yapılan analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi için belirlenen optimum koşullarda, ürik asidin 0,5 mM derişimi için arka arkaya ölçümler alındı. Ölçümlere ilişkin standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanarak biyosensörün tekrar kullanılabilirliği incelendi.

3.3.3. Raf Ömrünün Belirlenmesi

Hazırlanan biyosensör ile aktivitesini kaybetmeden ne kadar süre boyunca ölçüm alabileceğini belirlemek için optimum koşullarda bir biyosensör hazırlandı. Bu biyosensör ile 40 gün boyunca ürik asidin 0,5 mM derişimi için ölçümler alındı. Ölçüm alındıktan sonra bir sonraki gün ölçüm almak üzere biyosensör + 4 °C'de buzdolabında bekletildi. İlk gün alınan ölçümün aktivitesi % 100 olarak kabul edildi. 40 gün boyunca alınan ölçümlerin biyosensör cevapları % aktivite cinsinden verildi.

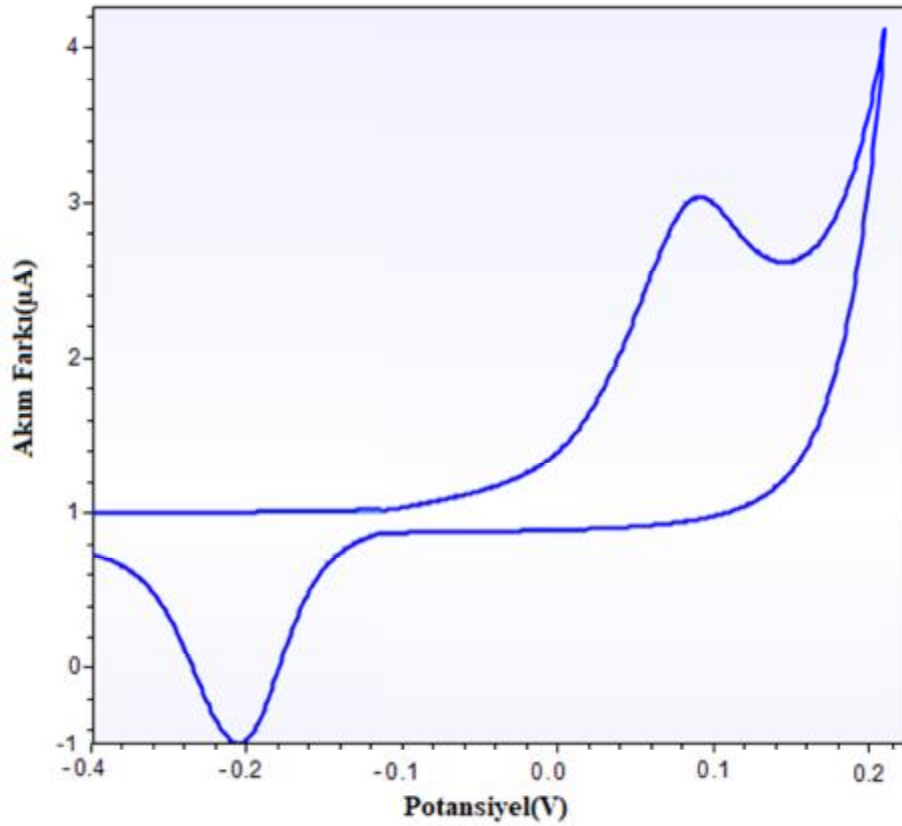
4. BULGULAR

4.1. Biyosensörde Çalışma Koşullarının Optimizasyonu

Tasarlanan ürik asit biyosensörünün ölçüm koşullarını saptamak için daha önceden ürikaz enzimi ile yapılmış çalışmalar göz önüne alındı ve tüm optimizasyon çalışmaları boyunca 0,5 mM ürik asit kullanıldı. Değerler saptandıkça optimum değerler kullanılmaya başlandı.

4.1.1. Çalışma Aralığının Belirlenmesi

Çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla daha önceden yapılmış olan çalışmalar göz önüne alınarak ve BSA- Jelatin kullanılarak hazırlanan biyosensörde kutupların bir ucu elektroda diğer ucu ise ölçüm hücrelerine daldırılarak sabitlendi ve şekil 4.1'de görülen döngüsel voltammogram alındı.



Şekil 4.1. Döngüsel voltammogram (Ölçümler % 2,5 glutaraldehit ve 35⁰C de pH 6,5 olan 0,1 M asetat tamponunda yapıldı.)

Döngüsel voltammogramdan alınan sonuçlar doğrultusunda çalışmalara 0,1 V sabit akımda devam edildi. Lineer Sweep ölçüm verileri aşağıdaki gibi tercih edildi:

E condition : -1,2 V

T condition: 0 V

E deposition : -1,0 V

T deposition: 0 V

T eq: 8 s

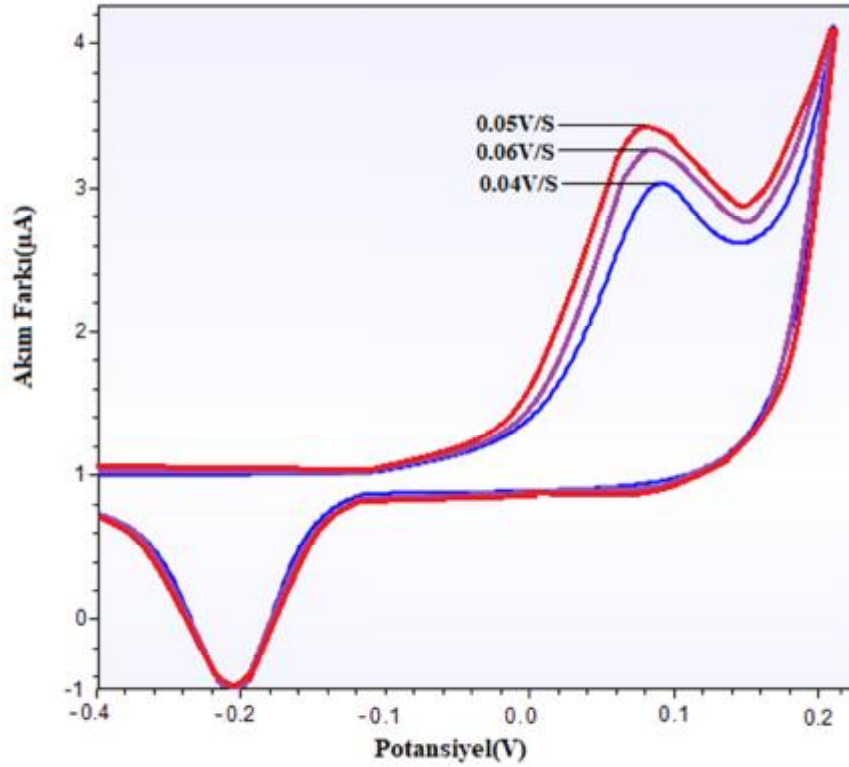
E begin: 0,8 V

E end: 1,2 V

E step: 0,003 V

4.1.2. Optimum Tarama Hızı Değerlerinin Belirlenmesi

Tarama hızının biyosensör cevabı üzerine etkileri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.2.'de verilmiştir.

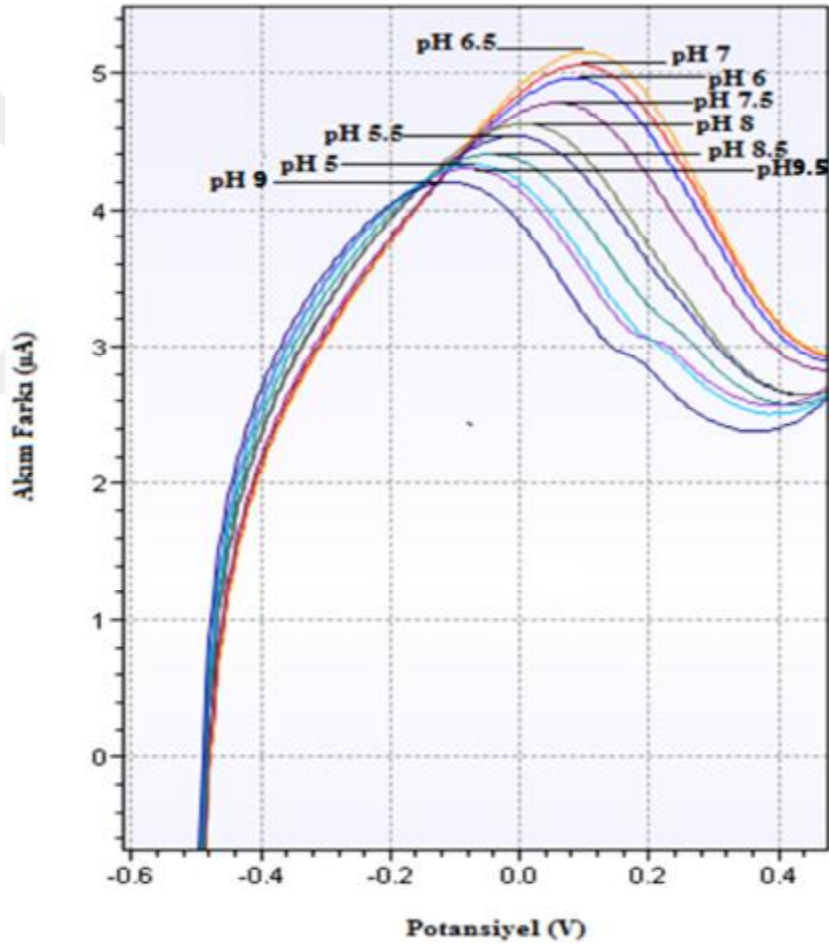


Şekil 4.2. Biyosensörün tarama hızı ölçümlerini gösteren döngüsel voltammogramlar (Ölçümler % 2,5 glutaraldehyt ve 35 °C de pH'sı 6,5 olan 0,1 M asetat tamponunda yapıldı.)

Sonuçta üç farklı tarama hızı ile yapılan ölçümler içinde en yüksek akım ve pik oluşturan tarama hızı 0,05 V/s olarak belirlenmiştir.

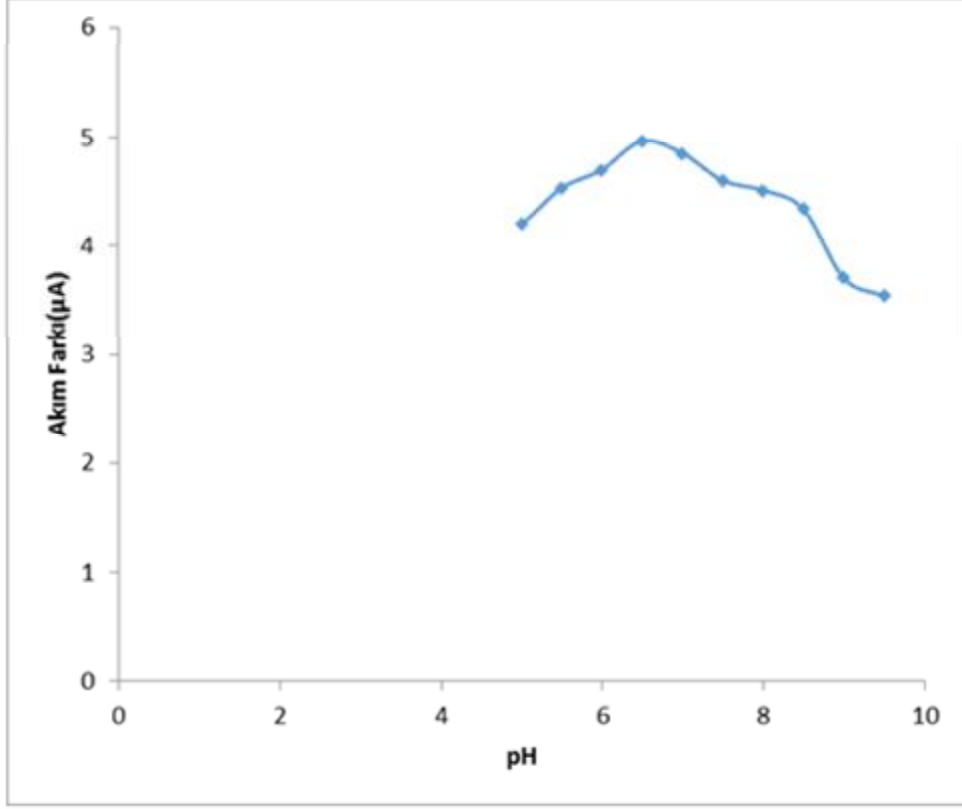
4.1.3. Çalışma Tamponu ve Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Çalışma tamponu ve optimum pH değerinin belirlenmesi için pH 5,0; 5,5; 6,0 ve 6,5’de 0,1 M asetik asit/asetat; pH 7,0; 7,5; 8,0’de olan 0,1 M sodyum fosfat tamponları ve pH’sı 8,5; 9,0; 9,5 olan 0,1 M glisin/NaOH tamponu kullanarak ölçümler gerçekleştirildi ve Lineer Sweep eğrileri elde edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. pH değişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi (Ölçümler % 2,5 glutaraldehit, 0,05 V/s tarama hızı ve 35⁰C de yapıldı).

Eğrilere ait maksimum akım farkı değerinin pH'ye karşı grafiği şekil 4.4' de gösterildiği gibidir.

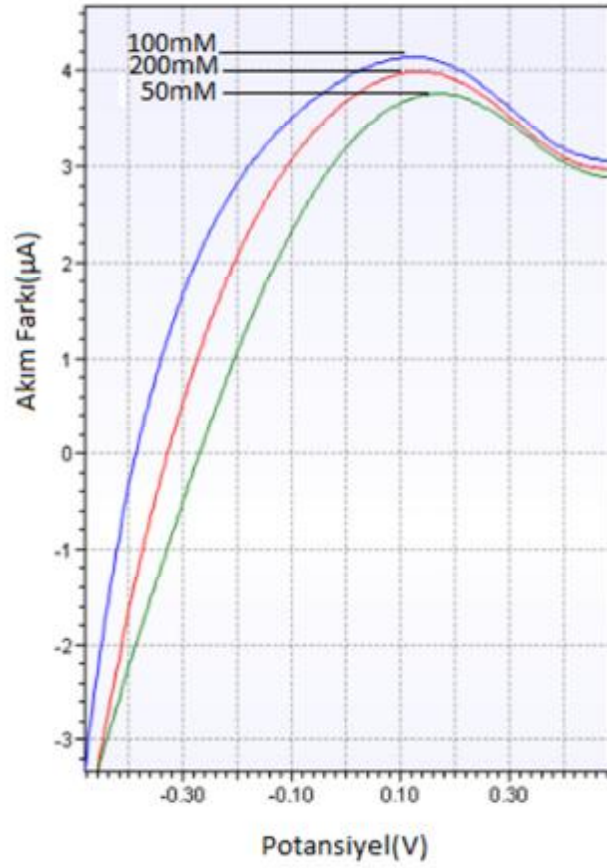


Şekil 4.4. pH değişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisi

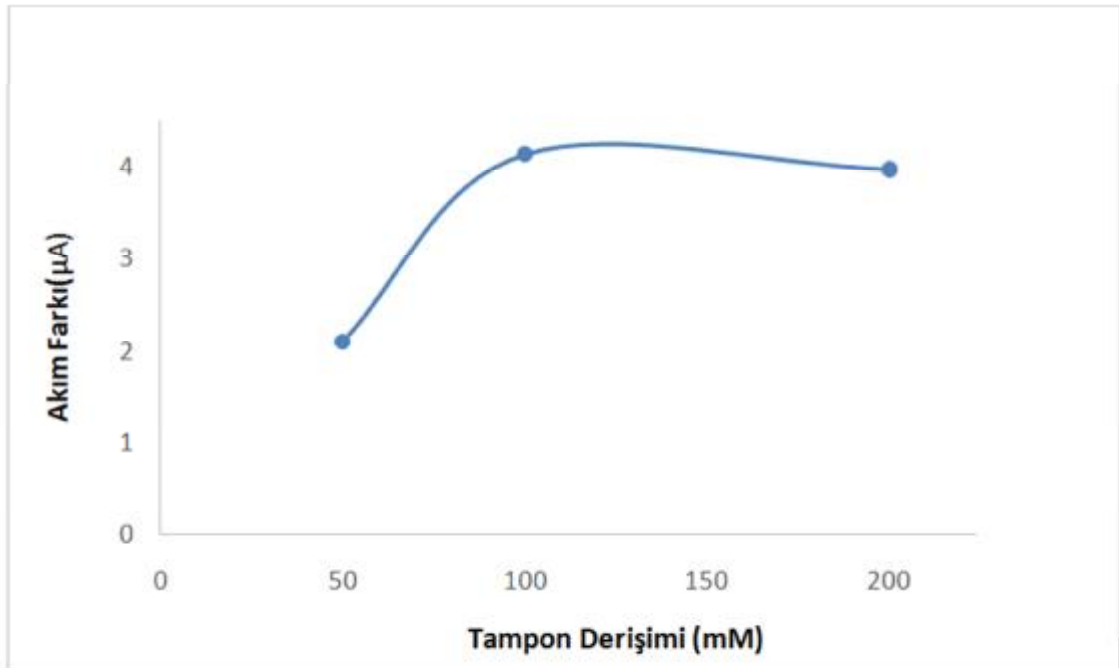
Maksimum ölçüm değeri pH 6,5’de 0,1 M asetat tamponu kullanılarak saptanmıştır.

4.1.4. Optimum Tampon Derişiminin Belirlenmesi

Optimum tampon derişiminin belirlenmesi amacıyla pH 6,5’de derişimi 50 mM, 100 mM ve 200 mM olan asetat tamponu kullanılarak tampon derişim optimasyonu gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.5. Optimum tampon derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Linear Sweep gösterimi (Ölçümler % 2,5 glutaraldehit, 0,05 V/s tarama hızı ve 35 °C de pH'sı 6,5 olan asetat tamponunda yapıldı).

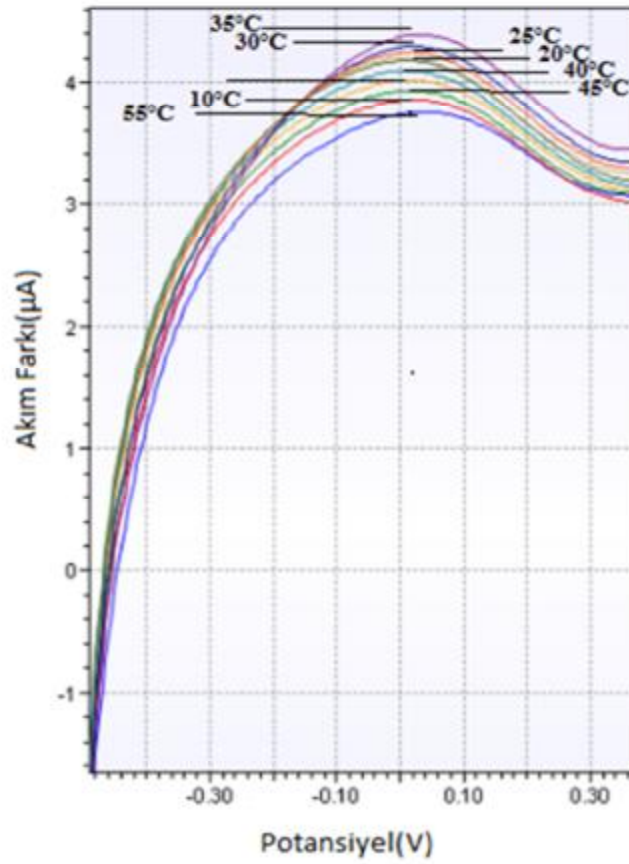


Şekil 4.6. Optimum tampon derişiminin bulunması amacıyla değişik tampon derişimlerinin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Şekil 4.5.'deki eğrilere ait maksimum ölçüm değerleri, tampon derişimine karşı gafiksel olarak gösterildiğinde (Şekil 4.6) maksimum değerin 0,1 M asetat tamponu derişiminde olduğu saptanmıştır.

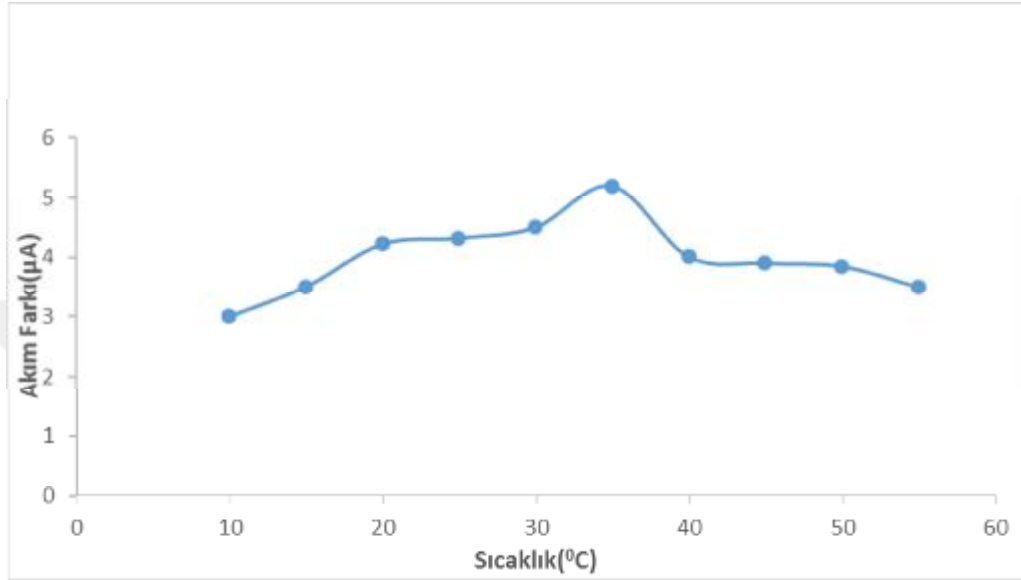
4.1.5 Optimum Sıcaklık Değerin Belirlenmesi

Ölçümlerde kullanılacak optimum sıcaklık değerin belirlenmesine yönelik çalışmalarda 10 °C – 55 °C aralığında biyosensör ile ölçümler alınarak akım farkı değeri saptanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Geliştirilen biyosensör için optimum sıcaklık ölçümlerinin Linear Sweep gösterimi (Ölçümler değışen sıcaklıkta % 2,5 glutaraldehit, 0,05 V/s tarama hızı ve de pH 6,5 olan 0,1 M asetat tamponu kullanılarak yapıldı.)

Şekil 4.7'deki eğrilere ait akım farkı ölçüm değerleri, sıcaklığa karşı grafiksel olarak gösterildiğinde (Şekil 4.8) maksimum sıcaklık değerinin 35 °C olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.8. Geliştirilen biyosensör için optimum sıcaklık eğrisi

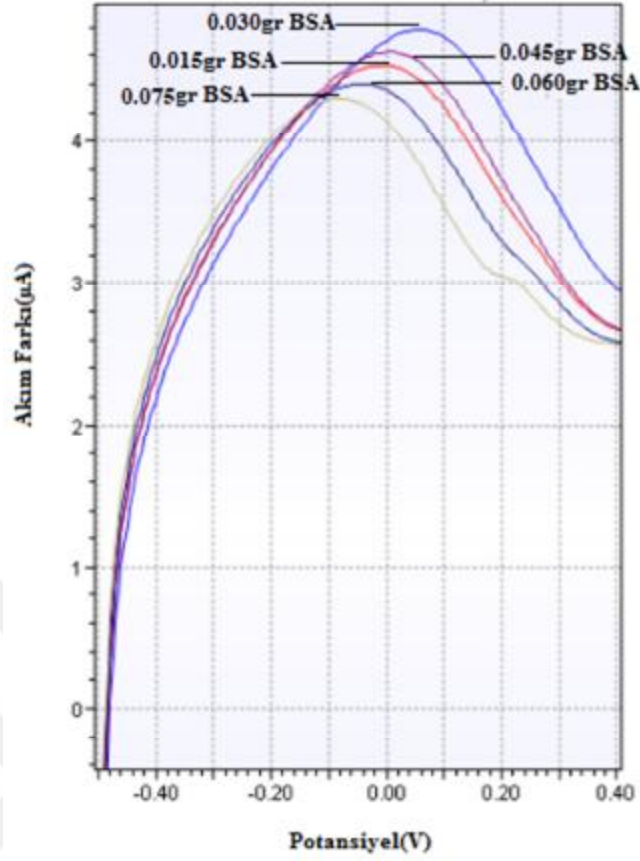
4.2. Biyosensörde Biyoaktif Tabakanın Optimizasyonu

Geliştirilen ürik asit biyosensörü için ölçüm koşulları, bölüm 4.1'de yapılmış olan çalışmalar göz önüne alınarak gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışmalarından elde ettiğimiz; 0,05 V/s tarama hızı ve 35 °C de pH 6,5 olan 0,1 M asetat tamponu ve 0,5 mM ürik asit çözeltisi kullanıldı.

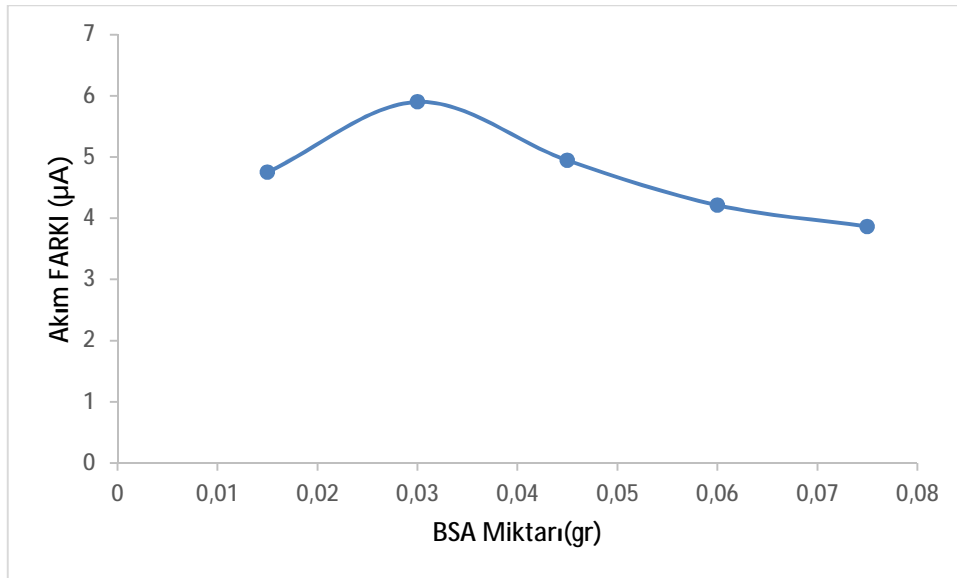
Sığır serum albümini, jelatin ve glutaraldehit değerleri saptandıkça bulunan optimum değerler kullanılmaya başlandı.

4.2.1. Sığır Serum Albumin Derişiminin Optimizasyonu

Farklı BSA derişimine sahip çözeltiler kullanarak hazırlanan beş farklı sığır serum albumin-jelatin/ürrikaz/glutaraldehit modifiye biyosensörü ile yapılan denemelerde alınan cevaplar Şekil 4.9'daki gibidir.



Şekil 4.9. BSA derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Linear Sweep gösterimi (Ölçümler % 2,5 glutaraldehit, 0,05 V/s tarama hızı ve 35 °C de pH'sı 6,5 olan 0,1 M asetat tamponunda yapıldı ve ürik asit çözeltisinin derişimi 0,5 mM idi).

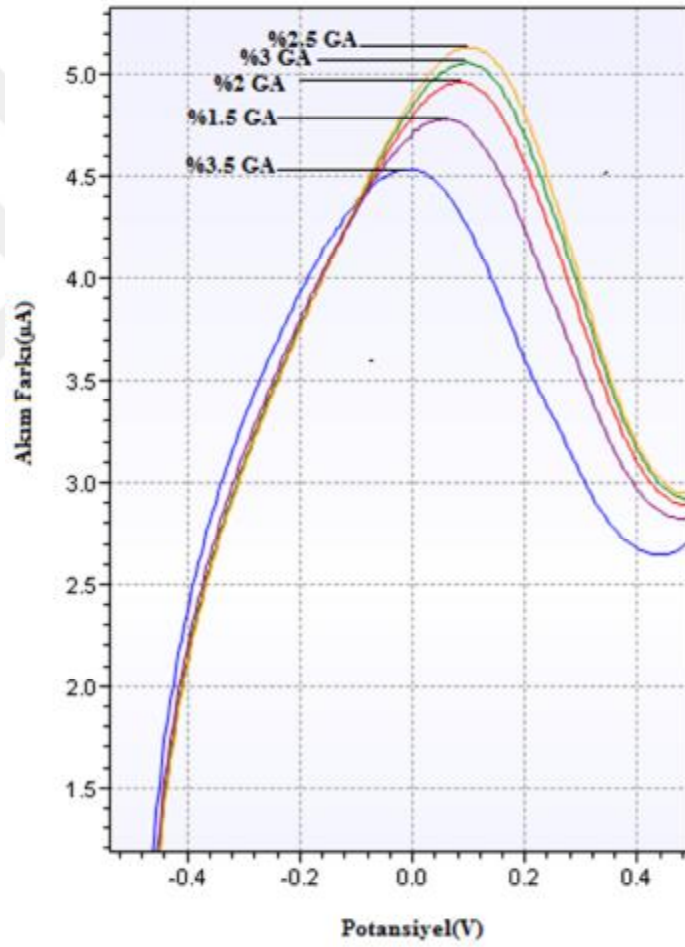


Şekil 4.10. BSA miktarındaki derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisi

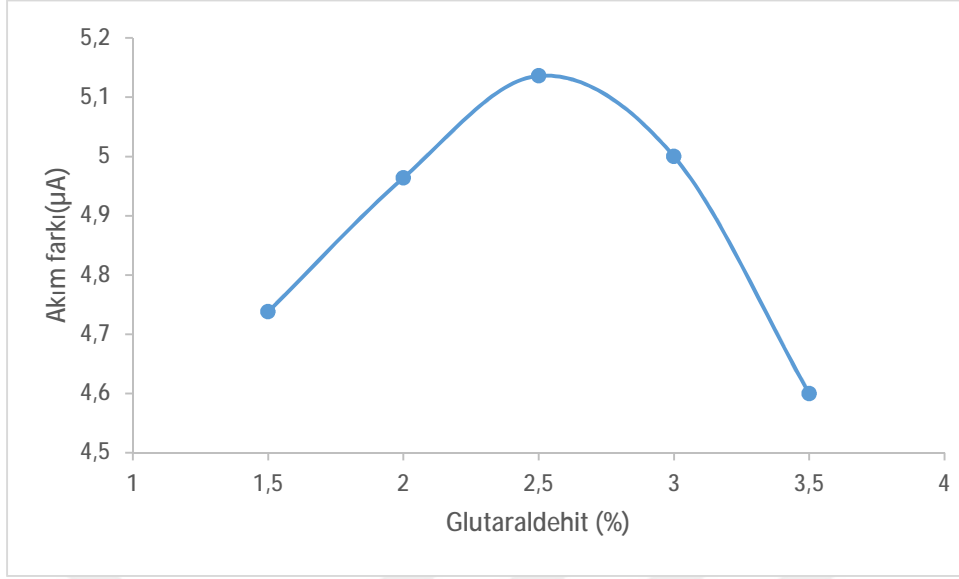
Şekil 4.9'dan elde edilen değerler Şekil 4.10' da yerine konduğunda yüksek akım farkına sahip BSA miktarının 0,03 gr olduğu belirlenmiştir.

4.2.2. Glutaraldehit Derişiminin Optimizasyonu

Ürik asit tayinine yönelik hazırlanan enzimatik biyosensörde, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan farklı derişimlerdeki glutaraldehitin biyosensör cevabı üzerine etkisi incelenmiş ve sonuçlar şekil 4.11.'de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.11. Glutaraldehit derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi (Ölçümler değişik glutaraldehit, derişimleri, 0,05 V/s tarama hızı ve 35 °C de pH'sı 6,5 olan 0,1 M asetat tamponu ve 0,5 mM ürik asit çözeltisi kullanılarak yapıldı)

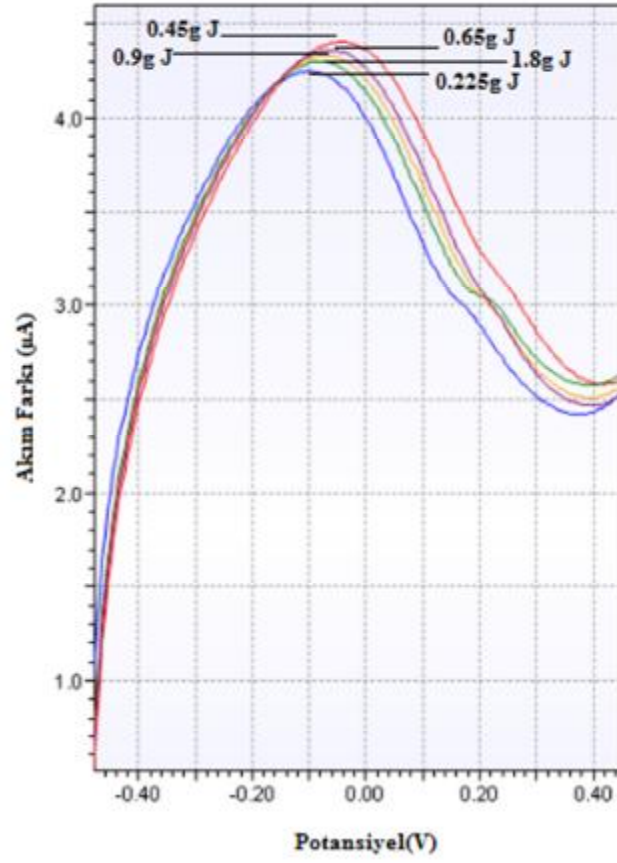


Şekil 4.12. Glutaraldehyt derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisi

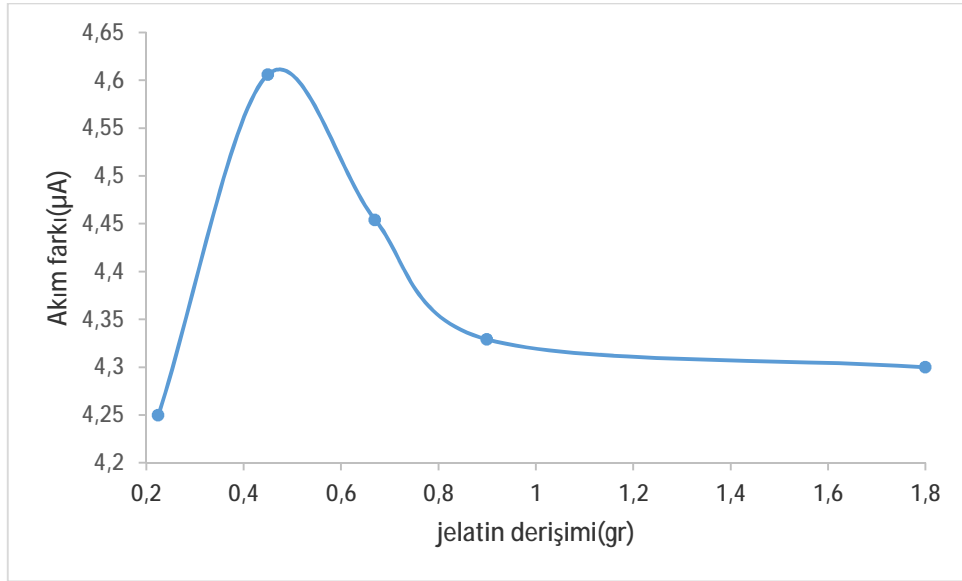
Şekil 4.11'den elde edilen değerler Şekil 4.12'de yerine konduğunda yüksek akım farkına sahip glutaraldehyt derişiminin % 2,5 olduğu belirlenmiştir.

4.2.3. Jelatin Derişiminin Optimizasyonu

Farklı jelatin derişimine sahip enzim çözeltileri kullanarak hazırlanan beş farklı sığır serum albumin-jelatin/ürrikaz/glutaraldehyt modifiye biyosensör ile yapılan denemelerde alınan cevaplar Şekil 4.13'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Jelatin derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisini gösteren Lineer Sweep gösterimi (Ölçümler % 2,5 glutaraldehit, 0,05 V/s tarama hızı ve 35 °C de pH 6,5 olan 0,1 M asetat tamponunda ve 0,5 mM ürik asit çözeltisi kullanıldı).



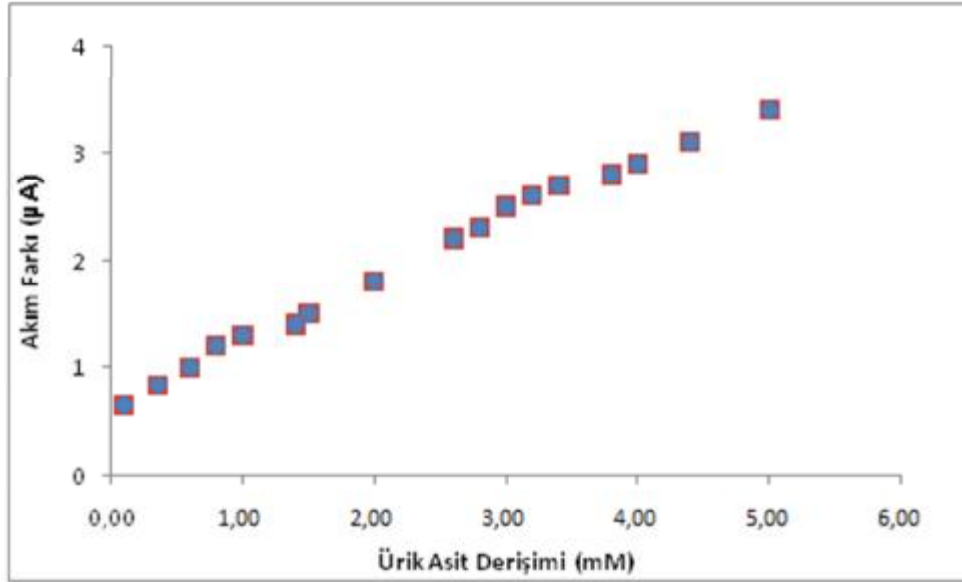
Şekil 4.14. Jelatin derişiminin biyosensör cevabı üzerine etkisi

Şekil 4.13'den elde edilen değerler Şekil 4.14' de yerine konduğunda yüksek akım farkına sahip jelatin miktarının 0,45 gr olduğu belirlenmiştir.

4.3. Biyosensörün Karakterizasyon Çalışmalarına İlişkin Bulgular

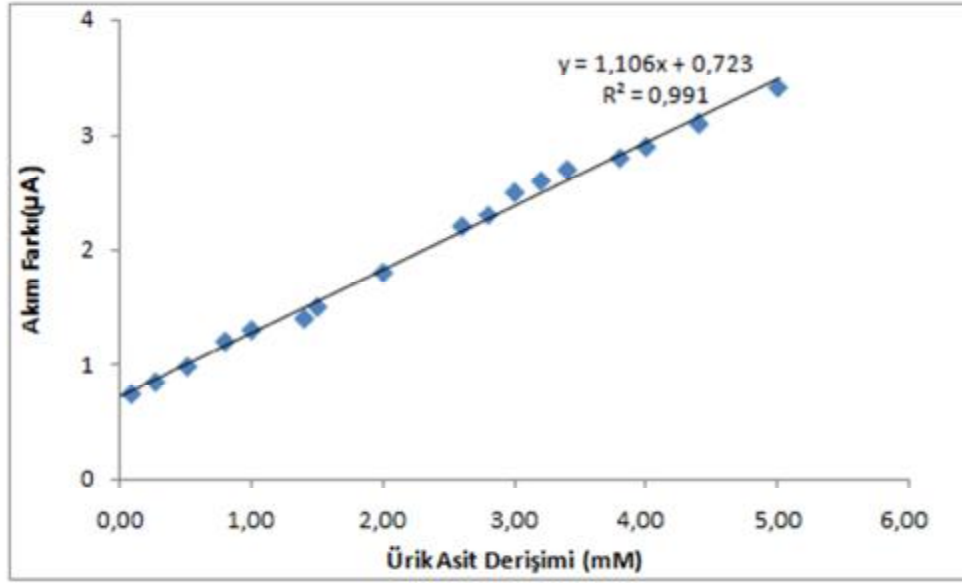
4.3.1. Tayin Aralığı ve Tayin Sınırı

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensör ile ürik asidin belirlenebileceği tayin aralığının tespit edilmesi için standart olarak kullanılan ürik asidin farklı derişimlerinde ölçümler alındı.



Şekil 4.15. Geliştirilen ürik asit enzim elektrodun cevabına substrat derişiminin etkisi (Ölçümler % 2,5 glutaraldehit, 0,05 V/s tarama hızı ve 35 °C de pH 6,5 olan 0,1 M asetat tamponunda ve farklı derişimlerde ürik asit çözeltisi kullanıldı).

Şekil 4.15'deki değerlere lineer regresyon analizi uygulandığında ürik asit için doğrusal çalışma aralığı şekil 4.16' de gösterilmektedir.

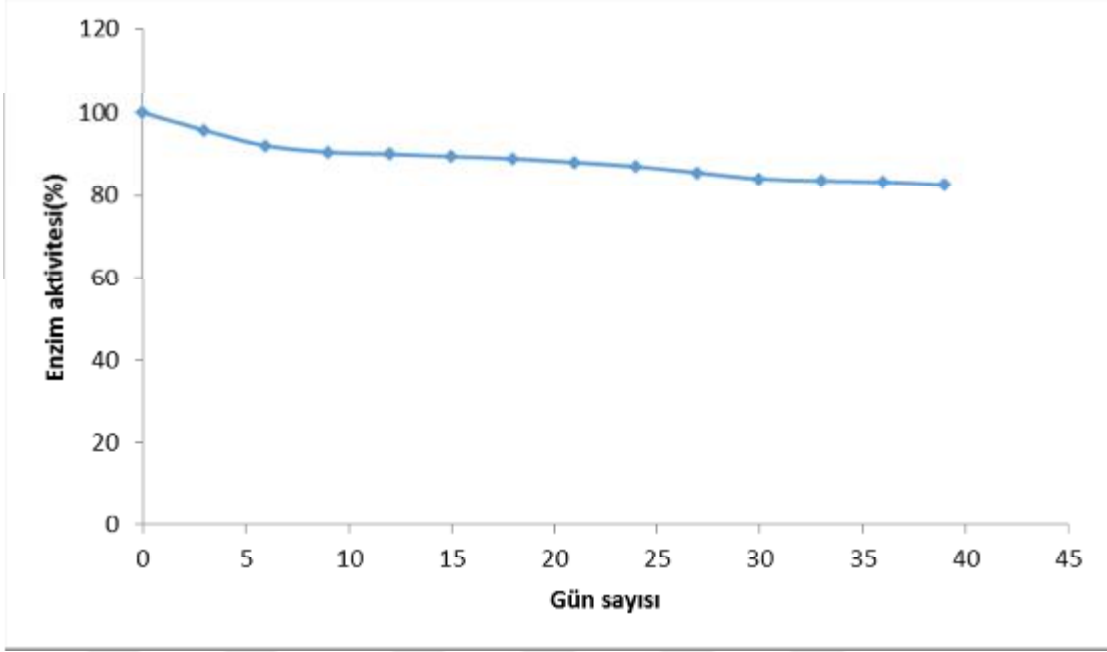


Şekil 4.16. Geliştirilen ürik asit enzim elektrot ile farklı derişim aralıklarında elde edilen kalibrasyon eğrisi

Şekil 4.16'da verilen değerler kullanılarak gözlenebilir maksimum sınırı 5×10^{-3} M, doğrusal çalışma aralığı ise $2,5 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-3}$ M olarak bulundu.

4.3.2. Raf Ömrünün Belirlenmesi

Tasarlanan biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi amacıyla bölüm 3.3.3'de bahsedilen işlemler uygulanarak elde edilen değerler grafiğe geçirilmiştir. Geliştirilen biyosensörün raf ömrünün belirlenmesi amacıyla yapılan işlemlerde elektrot $+4^{\circ}\text{C}$ 'da buzdolabında bekletilmiştir.



Şekil 4.17. Biyosensörün raf ömrü (Ölçümler % 2,5 glutaraldehit, 0,05 V/s tarama hızı ve 35 °C de pH 6,5 olan 0,1 M asetat tamponunda yapıldı ve 0,5 mM ürik asit çözeltisi kullanıldı.)

40 gün boyunca yapılan ölçümler sonucunda immobilize enzim aktivitesinin % 82,5 oranında korunduğu saptanmıştır (Şekil 4.17).

4.3.3. Biyosensörde Ölçüm Tekrarlanabilirliği

Bu çalışmada geliştirilen ürik asit biyosensörünün ölçüm tekrarlanabilirliği araştırıldı.

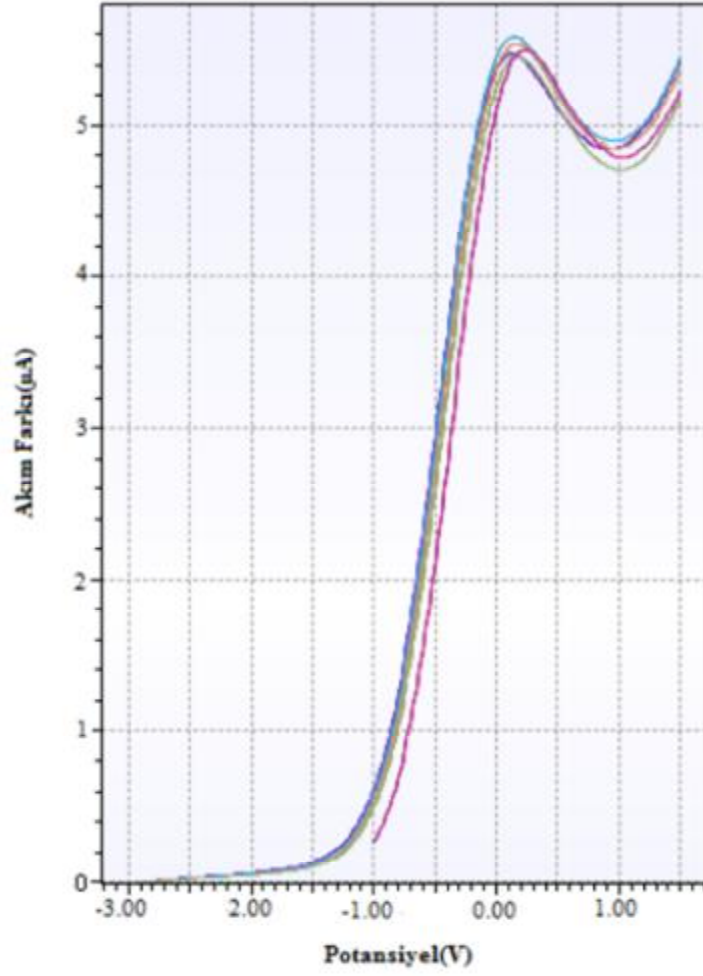
Ölçüm hücresi içerisine 0,5 mM ürik asit çözeltisinden 50'şer µL ekleme yaparak ve aynı standart eğri kullanmak şartı ile ölçümler alındı. 15 kez tekrar edilen ölçümlere ait ortalama değer (X), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (%VK) Tablo 4.1'de verilmiştir. Tabloya ait Lineer Sweep gösterimi Şekil 4.18'de verilmektedir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde biyosensör ile alınan yanıtların tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğu saptandı.

- Varyasyon katsayısı: Standart sapmanın ortalamaya göre değişimidir. Aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır.

$$VK = 100 \cdot (s/x)$$

Tablo 4.1. Biyosensörünün tekrarlanabilirliği çizelgesi

Deneme sayısı	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	X	S.S	C.V
Bulunan ürik asit derişimi mg/dL	50	50	50.1	50	50.1	50.2	49.9	50	50.1	49.9	49.8	50	49.9	50	50	50	0.1	0.2



Şekil 4.18. Sığır Serum Albumin-Jelatin/Ürikaz/Glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik için Linear Sweep gösterimi (Ölçümler % 2,5 glutaraldehit, 0,05 V/s tarama hızı ve 35 °C de pH 6,5 olan 0,1 M asetat tamponunda yapıldı ve 0,5 mM ürik asit çözeltisi kullanıldı.)

5. TARTIŞMA

Biyosensörler, bir fizikokimyasal çevirici ile biyolojik yapıları birleştiren analitik cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensör, bir veya bir grup analit (analiz edilecek madde) miktarı ile orantılı olarak sürekli sayısal elektrik sinyali (elektriksel, optiksel vs.) üretir.

Biyosensörler genel olarak üç temel bileşenden oluşur. Bunlar, seçici tanıma mekanizmasına sahip “biyokomponent”, bu biyokomponentin analit ile etkileşimi sonucu oluşan fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürülebilen çevirici ve bu sinyalleri ileten iletici(tranducer)’lerdir. Bu bileşenlerden en önemlisi, tayin edilecek maddeye karşı son derece seçimli fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren, biyokomponenttir.

Biyokomponent, analit üzerinde moleküler değişime ve dönüşüme neden olmakta ve bu dönüşüm sonucu ortamda oluşan sinyal takip edilerek sonuca gidilmektedir. Bu amaçla saf enzim sistemleri, mikroorganizmalar ve bitkisel ya da hayvansal doku parçaları gibi birçok biyomolekül kullanılmaktadır. Bu tez kapsamında biyomolekül olarak ürikaz enzimi ve amperometrik biyosensör kullanılmıştır. Bu tür biyosensörlerde temel prensip bir kimyasal tepkimenin iyon ya da elektronları üretmesi ya da tüketmesidir. Enzim temelli biyosensörlerde elektrokimyasal esaslı ileticiler kullanılır. Bu ileticiler ile amperometri ilkesine göre ölçüm alınabildiğinden amperometride özellikle oksidoreüktaz sınıfı enzimler kullanılır. Ürik asidin ürikaz enzimi ile katalizi esnasında çözeltilinin elektriksel özelliklerinde değişimler olur ve bu değişimler elektriksel sinyale dönüştürülür ve ölçülerek kaydedilir.

İnsanlar da pürin metabolizmasının son ürünü ürik asittir. Biyolojik sıvılarda ürik asidin miktarı birçok hastalığın (Gut hastalığı, Lesch-Nyhan sendromu, böbrek hastalığı ve Von Gierke hastalığı gibi.) teşhisinde oldukça önemlidir. Ayrıca kuvvetli bir antioksidan olan ürik asit bu özelliğinden dolayı radikalik oksijen türlerini yok eder ve başta lipit peroksidasyonu olmak üzere doku hasarlarını önlemede önemli rol oynar. Bu nedenlerden dolayı ürik asit tayini tıbbi açıdan oldukça büyük önem taşımaktadır.

Ürik asit tayininde günümüzde çeşitli kolorimetrik, polarografik, kromatografik, spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bunlar genel olarak zaman alıcı

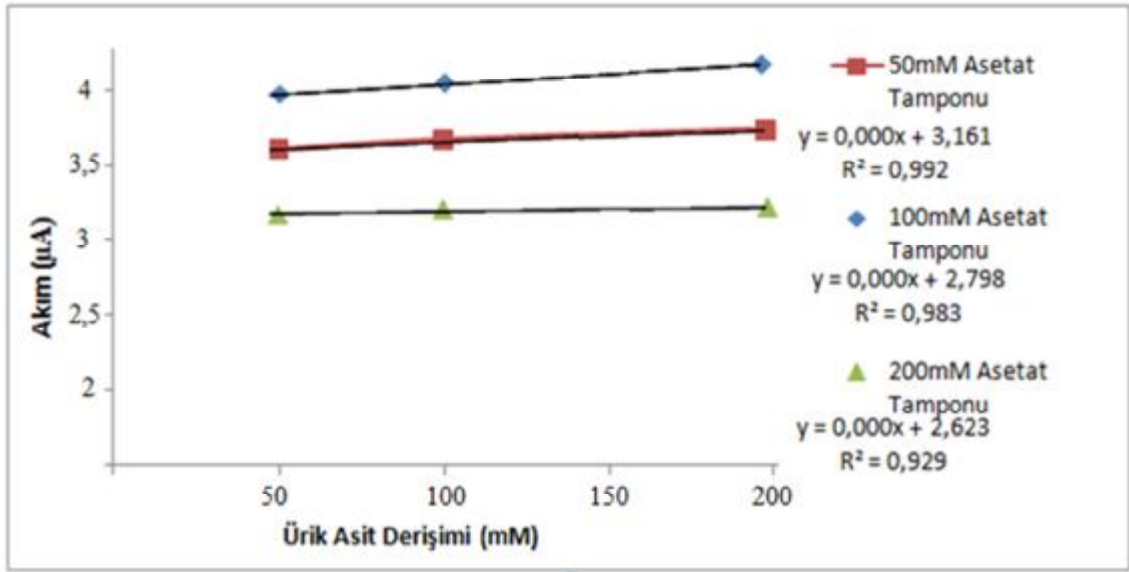
ve pahalı sistemlerdir. Bu nedenle ürik asit derişiminin daha kısa sürede, daha düşük maliyetle daha doğru ölçüm yapan sistemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

Bu tez kapsamında ürik asit derişiminin daha hızlı ve daha ucuz ölçümüne olanak sağlayan Grafit/BSA-J/Ürikaz modifiye biyosensör geliştirildi. Geliştirilen bu biyosensörün çalışma koşulları ve biyoaktif tabakanın optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı. Çalışma koşullarının optimizasyonunda öncelikle tarama hızı ile çalışma aralığı belirlenerek optimum pH, sıcaklık ve tampon derişimleri bulundu.

Deney koşulları protein yapısındaki enzimlerin katalitik aktiveleri için oldukça önemlidir. Enzimlerin katalitik aktivelerini etkileyen en önemli etken ortamın pH'sıdır. Bu nedenle immobilizasyon sonrasında pH, aktivite ilişkisindeki değişimler, enzim proteinin yapı-işlev ilişkisini anlamak ve biyosensörün optimum çalışma koşullarının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Optimum pH değerini belirlemek için ortam koşullarının pH'sı; asetik asit tamponu ile pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 sodyum fosfat tamponu ile pH 7,0; 7,5; 8,0 ve glisin/NaOH tamponu ile pH 8,5; 9,0; 9,5 olacak şekilde ölçümler alındı. Yapılan ölçümler sonucu maksimum ölçüm değeri asetik asit tamponu ile pH 6,5'de gözlenmiştir (Şekil 4.4). Literatür çalışmaları sonucunda ürikaz enziminin çalışma aralığının pH'sının 5,0 ila 9,0 arasında olduğuna rastlanmıştır.^{62, 63, 63, 64, 65} Bizim bulduğumuz pH 6,5 değerinin literatürlerdeki değerler arasında olması biyosensör çalışmaları sırasında enzimin optimum pH değerinde çalıştığının ve pH değerine bağlı herhangi bir aktive kaybının olamadığının göstergesidir.

Optimum sıcaklığın belirlenmesine yönelik çalışmalarda sıcaklık değerleri 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C ve 55 °C olarak alındı. Yapılan çalışma sonucunda sıcaklık ve enzim aktivitesi arasındaki grafikten maksimum aktivite için optimum sıcaklık 35 °C olarak bulundu (Şekil 4.8). Literatüre bakıldığında farklı kaynaklardan elde edilen ürikaz enzimi için çalışma sıcaklığının 30 - 40 °C aralığında olduğu görülmektedir.^{65, 67, 68}

Optimum tampon derişimini belirlemek için ölçüler pH 6,5'de derişimi 50 mM, 100 mM ve 200 mM olmak üzere 3 farklı asetat tamponunda çalışıldı. (Şekil 4.6.)



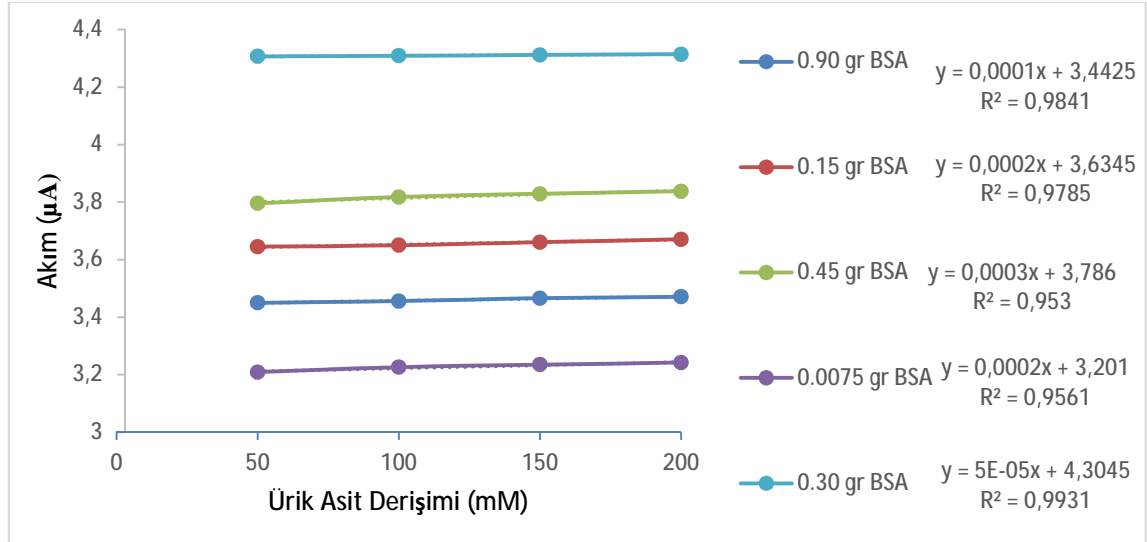
Şekil 5.1. Farklı asetat tampon derişimlerine bağlı olarak gerçekleşen cevap akımları

alışmalar sonucunda pH 6,5’de ve 0,1 M asetat tamponu kullanılarak yapılan ölçümlerde maksimum değere ulaşıldığı ve iyon şiddetinin enzim aktivitesi üzerinde etkisinin çok fazla olmadığı gözlemlendi. Diğer yandan bu yöntemin değişik ürik asit derişimini belirlemek amacıyla yapıldığı dikkate alındığında normal bir ürik asit örneğinin (0,5 mM) aşağısında ve yukarısında yapılan ölçümlerde ürik asit derişiminden kaynaklı bir etkinin gözlenmediği ve tüm derişimler için doğrusal bir sonuç grafiği elde edilmiştir. ($R^2=0.983$) (Şekil 5.1).

Değişik birçok işlemden ve özellikle de klinik süreçlerde enzimler, substrat ile karışırılır ve ürüne dönüşüm gerçekleştirilir ve sonrasında enzimler geri kazanılamaz. Bu duruma ekonomik açıdan bakıldığında oldukça maliyetli olduğu görülmektedir. Bu nedenle enzimlerin immobilize edilerek defalarca kullanılmaları oldukça ekonomiktir. Buna bağlı olarak enzimlerin immobilizasyonu ile elde edilen biyoaktif tabaka; biyosensörlerin kararlılığı ve tekrar kullanılabilmesi açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Biyoaktif tabakanın optimizasyonunu değerlendirmek için BSA, jelatin ve glutaraldehit kullanılarak her birinin farklı derişimlerinin enzim aktivitesine etkileri araştırıldı.

Geliştirdiğimiz biyosensördeki biyoaktif tabakada BSA’nın kullanılmasının amacı hem çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit ile yapılan çapraz bağ sayısını arttırmak hem de enzimle yapılan bağ sayısını azaltarak enzimin aktivitesinin düşmesinin

engellenmesidir. Çalışmamızda 5 farklı derişimde BSA kullanıldı ve en iyi sonuç 0,030 gr BSA kullanıldığında elde edildi (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

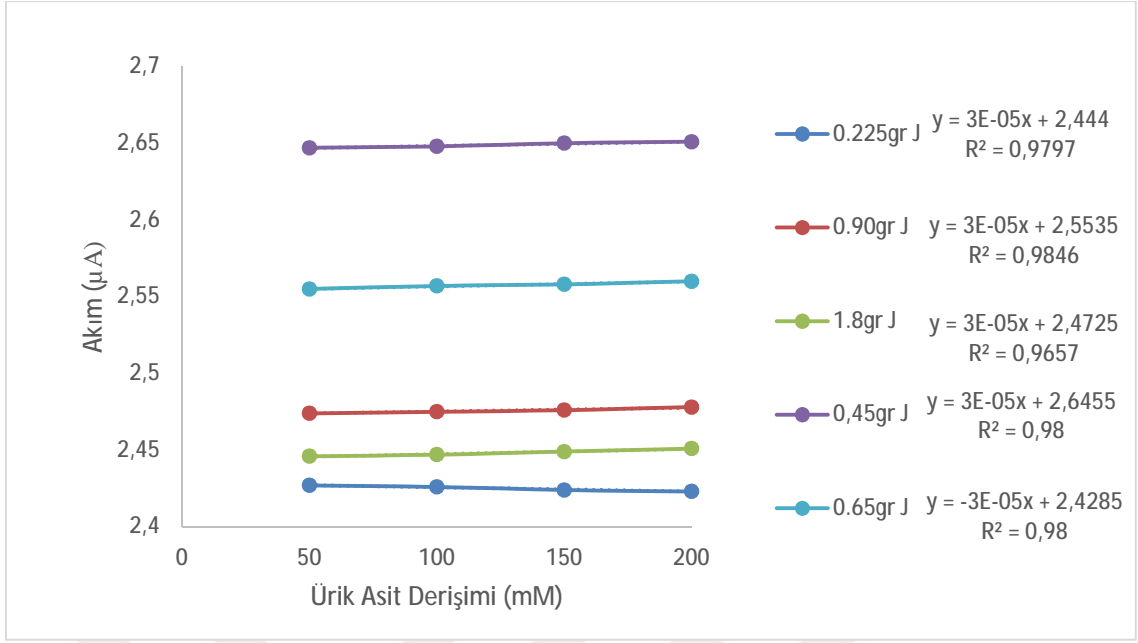


Şekil 5.2. Farklı BSA derişimlerinin biyosensör cevabına etkisi

Şekil 5.2’de görüldüğü gibi BSA miktarının optimum değerin üzerinde olması (0,090 gr ve 0,045 gr) çapraz bağ sayısını arttırdığından biyosensör cevabında azalmaya neden olmuştur. Diğer yandan BSA miktarının optimum değerin altında olması (0,015 gr ve 0,0075 gr), bağ sayısını biyoaktif tabakadaki toplam çapraz bağ azaltmasına rağmen aynı esnada enzim-BSA, enzim-jelatin ve enzim-enzim çapraz bağ sayısında artmaya neden olur. Bu nedenle BSA miktarındaki azalma biyosensör cevabını düşürebilir.

Farklı ürik asit derişimleri kullanılarak alınan ölçümlerde ürik asit miktarının farklı BSA derişimlerinden etkilenmediği şekil 5.2’de gözlenmektedir. Bu gözlemden BSA miktarının enzimin aktif bölgesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

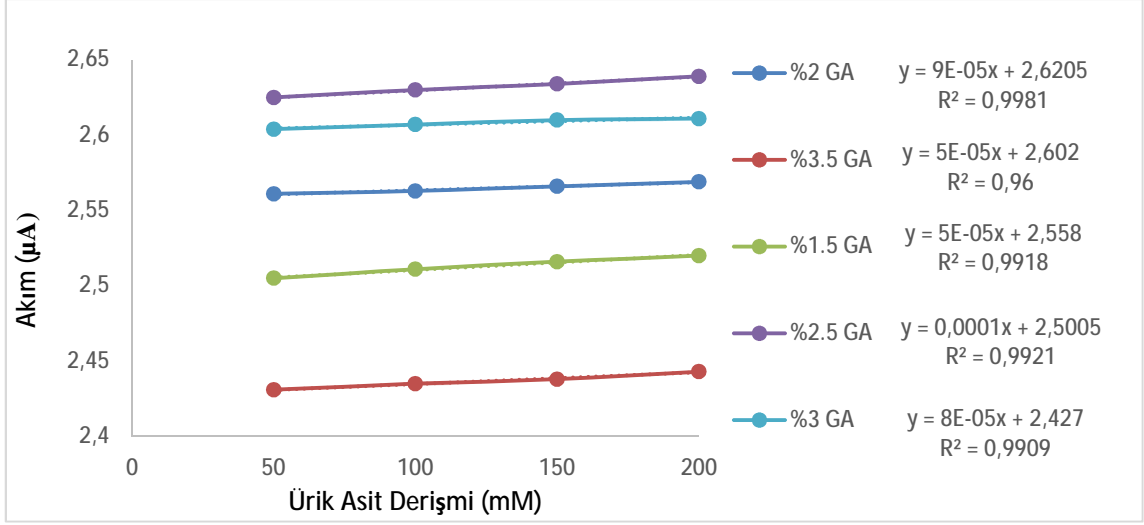
Geliştirilen biyosensörde jelatin miktarının biyosensör cevabına olan etkisi de araştırıldı. Jelatin biyosensör çalışmalarında termal ve mekanik kararlılığın artırılması amacıyla immobilizasyonda genelde çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit ile beraber kullanılır.¹⁷



Şekil 5.3.Farklı jelatin miktarının biyosensör cevabına etkisi

Şekil 5.3’de görüldüğü üzere jelatin miktarının optimum değerden fazla olması membran kalınlaşması ve oksijen ile substratın biyoaktif tabaka içerisine difüzyonunu engellemektedir ve bu nedenle jelatin miktarındaki artma biyosensör cevabında azalmaya neden olmuştur. Diğer yandan jelatin miktarının optimum değerden az olması çapraz bağ sayısını azaltacağından biyosensör cevabında düşmeye neden olmuştur. 0,45 gr jelatin ile hazırlanan biyosensör hem daha kararlı hem de ürik asit derişim aralığında daha mükemmel doğrusallık gösterdiğinden tercih edilmiştir ($R^2 = 0.98$) (Şekil 5.3).

Son olarak glutaraldehit yüzdesinin biyosensör cevabı üzerine etkisi araştırıldı. Farklı % derişimlerinde glutaraldehit çözeltileri ile biyosensör hazırlandı (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Bu grafiklerde akım farkına bakılarak en yüksek akım farkı % 2,5’lik glutaraldehit derişimli çözelti ile hazırlanan biyosensör tercih edilmiştir.



Şekil 5.4. Farklı glutaraldehit derişimlerinin biyosensör cevabına etkisi

Glutaraldehit miktarı arttıkça, biyoaktif tabakanın daha dar olması beklenir. Bu sebeple fazla glutaraldehit miktarında biyosensör cevabının düşük olması beklenen bir sonuçtur. Düşük glutaraldehit miktarı ile hazırlanan biyosensörde biyokomponentler arasındaki çapraz bağ sayısının azalması substratın biyoaktif tabakadan kaçışına imkan verebilir ve çapraz bağ sayısındaki azalış oksijenin tepkime ortamından biyoaktif tabakaya difüzyonunu kolaylaştıracağından oksijen derişimiyle orantılı olması gereken devreden akım miktarını etkileyecektir.

Bütün bu veriler ışığında biyosensörün diğer yöntemlerden maliyet, doğruluk, hızlı ve daha duyarlılığı açısından avantajlı olduğu söylenebilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada tasarlanan biyosensör sisteminde grafit elektrot yüzeyine ürikaz enziminin immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve ürik asit tayini yapılmıştır. Yapılan çalışmada biyosensör sistemini oluşturmak için ürikaz enzimi, BSA, jelatin ve glutaraldehit aracılığıyla elektrot yüzeyine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir (BSA-Jelatin/ürikaz/glutaraldehit). Oluşturulan bu sistem 0,1V'ta amperometrik metotla gerçekleştirilmiştir. Literatürlerde de değişik destek materyallerle yapılmış potansiyel çalışmalarında 0,1V, 0,3V, 0,4V ve 0,7V potansiyellerde çalışıldığına rastlanmıştır.^{64,69,70}

Tasarlanan biyosensörün optimizasyon çalışmalarında ilk olarak biyoaktif tabaka için, BSA miktarı, jelatin miktarı ve glutaraldehit %'sinin optimizasyonu, daha sonra çalışma koşullarının optimizasyonunda tarama hızı, pH, sıcaklık ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu belirlendi. Son olarak biyosensör karakterizasyon çalışmaları için raf ömrü ve ölçüm tekrarlanabilirliği analizleri yapıldı.

Biyoaktif tabakanın optimizasyonunda sığır serum albümini miktarı 0,03 gr, glutaraldehit yüzdesi % 2,5 ve jelatin miktarı 0,45 gr olarak bulundu. Optimum çalışma koşullarının belirlenmesinde asetat tamponunu pH 6,5 ve 0,1 M, tarama hızı 0,05 V/s, sıcaklık 35 °C olarak belirlendi. Karakterizasyon çalışmalarında ise raf ömrünün 40. Günün sonunda yanıtın % 82,5'a kadar korunduğu, 0,5 mM ürik asit derişimi kullanılarak yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarında (n=15), standart sapma (SS) = 0,1 ve % varyasyon katsayısı (VK) = 0,2 olarak bulundu.

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan biyosensör ile ürik asidin belirlenebileceği tayin aralığının tespit edilmesi için standart olarak kullanılan ürik asidin farklı derişimlerde ölçümler alındı. Bu ölçümler arasında doğrusal bir eğri veren $2,5 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-3}$ M ürik asit derişimi aralığı ürik asidin tayin sınırı olarak belirlendi (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

Raf ömrü çalışmalarında 40 gün boyunca yapılan ölçümler sonucunda immobilize enzim aktivitesinin % 82,5 oranında korunduğu saptanmıştır. Bulunan sonuç literatür değerleri ile karşılaştırıldığında hazırlanan biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin oldukça iyi olduğu söylenebilir.^{71,72}

Tekrarlanabilirlik çalışmalarında ise art arda yapılan ölçümler sonucu değerlerin birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak bu yüksek lisans tezi kapsamında, grafit elektrot ile ürik asit tayinine yönelik tasarlanan biyosensörün geliştirilecek ürikometreler için iyi bir prototip olacak ve ayrıca literatüre önemli katkılar sağlayacak veriler elde edilmiştir.



KAYNAKLAR

1. **Ertan, F., Aksöz, E.**, “Aspergillus nigerden ürikaz enziminin üretilmesi ve aktiviteye etkili bazı faktörlerin belirlenmesi”, Turk J Biol., 24: 11-23 (2000).
2. **Bhargava, A. K., LaI, H. and Pundir, C. S.**, “Discrete analysis of serum uric acid with immobilized uricase and peroxidase”, J. Biochem. Biophys. Methods., 39: 125-136 (1999).
3. **Biosens Bioelectron.** 2008 Feb 28;23(7):1083-100. Epub 2007 Nov 1. Recent advances in cholesterol biosensor. Arya SK(1), Datta M, Malhotra BD.
4. **Ahmadinezhad, A. and Chen, A.** High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol. Biosens Bioelectron. 2011 Jul 15;26(11):4508-13.
5. **Akyılmaz, e. and Dinçkaya E.** A mushroom (Agaricus bisporus) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum. Talanta. 2000 53,505-9.
6. A novel non-competitive amperometric immunosensor by using thiourea-glutaraldehyde-modified gold electrode for immunoglobulin M detection. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2013,41, 389-94.
7. **Koyuncu D., Pekyardimci S., Kilic E.** ”A new Amperometric Carbon Paste Enzyme Electrode for Ethanol Determination” Analytical Letters, 40: 1904-1922, 2007.
8. **Zhang J, Barajas JF, Burdu M, Ruegg TL, Dias B, Keasling JD.** Development of a Transcription Factor Based Lactam Biosensor. Acs Synthetic Biology. PMID 27997130 DOI:10.1021/ACSSYNB.6B00136.
9. **Ahmad R, Tripathy N, Park JH, Hahn YB.** Chem Commun (Camb). 2015 Aug 4;51(60):11968-71.
10. **Updike, S.J., Hicks, G.P., 1967.** The enzyme electrode, Nature, 214, 986-988.
11. <https://www.doktorix.com/urik-asit-metabolizmasi-2/>
12. **Senthamizhan A, Balusamy B, Uyar T.** Anal Bioanal Chem. 2016 Feb;408(5):1285-306.
13. **Telefoncu, A., 1999.** Biyosensörler (Telefoncu, A., Ed.) s. 193-248, Ege Üniversitesi, İzmir.
14. **Altikatoglu, M., Karakus, E., Erci, V., Pekyardimci, S., & Isildak, I. (2013).** Novel creatine biosensors based on all solid-state contact ammonium-selective membrane electrodes. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 41(2), 131-136.
15. **Thevenot, D. R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S., 1999,** “Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification”, Pure Appl. Chem., 71, 12, 2333-2348.
16. **Eggins, B., 1996,** “Biosensors An Introduction” (1st ed.), John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
17. **Akyılmaz, E. and Dinçkaya, E.,** A new enzyme electrode based on ascorbate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of l-ascorbic acid. Talanta. 1999,50,87-93.
18. **Odaci D, Timur S, Telefoncu A.** A microbial biosensor based on bacterial cells immobilized on chitosan matrix. Bioelectrochemistry. 2009, 75,77-82.

19. **Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E., 2005.** Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate. *Talanta* 65,998–1002.
20. **Telefoncu, A. (1999).** Biyoreseptör immobilizasyonu. *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu'nda sunuldu, Kuşadası*, 42-61.
21. **Baoxin, L, Zhuzun, Z. , Yan, J. , 2002,** Plant tissue based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling, *Biosensor and Bioelectronic*, 17, 585-589.
22. **Sidwell, J.S. , Rechnitz, G.A. , 1986,** Progress and challenges for biosensors using plant tissue materials, *Biosensors And Bioelectronics*, 2 (4), 221-233.
23. **Macholan, L, 1987,** Recent progress in developing enzyme and tissue-based membrane electrodes, *Acta Biotechnol*, 7, 69, 547-553.
24. **Telefoncu, A. , 1999,** *Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu-Biyosensörler*, (Telefoncu,A., v.d.), Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi-İzmir, sayfa:1-2.
25. **La Belle, J.T.; Adams, A. ;Lin, C.E.; Engelschall.; E.; Pratt, B. Cook C.B.,**Self-monitoring of tear glucose: the development of a tear based glucose sensor as an alternative to self-monitoring of blood glucose. *Chem Commun (Camb)*. **2016** 52(59) 9197-204.
26. **Coulet PR, Bardeletti G.** Biosensor-based instrumentation. *Biochem Soc Trans*. **1991**;19:1-4.
27. **Akyılmaz E, Baysal SH, Dinçkay, E.** Investigation of metal activation of a partially purified.
28. **Dinçkaya E.** *Biyosensörler*. İzmir, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, **1999**.
29. **Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Martelet , C. and Jaffrezic-Renault, N. 2008.** Amperometric enzyme biosensors: past, present and future. *ITBM-RBM*, 29, 171–180.
30. **Dinçkaya, E;Akyılmaz, E.;Akgol, S.;Tatar Onal, S.;Zihnioglu, F. and Telefoncu, A.,**AA Novel catechol oxidase enzyme electrode for the determination of catechol, *Biosci Biotechnol Biochem*.**1998**, 62,2098-100.
31. **Akyüz, E. (2011).** Ürik Asit Tayini İçin Yeni Bir Biyosensör Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 26-34.
32. **Muhammet, S. M. (2008).** Kolesterol Tayini İçin Biyosensör Hazırlanması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-35.
33. **Telefoncu, A. (1999).** Biyoreseptör immobilizasyonu. *Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu'nda sunuldu, Kuşadası*, 42-61.
34. **Guilbault, G. G., Kauffmann, J. M. (1987).** Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9, 95-113.
35. **Telefoncu, A., 1997.** *Enzimoloji*, Ege Üniversitesi, İzmir, 380 s.
36. **Karadeniz, H. (2008).** *Biyomoleküler Algılamaya Yönelik Elektrokimyasal Sensörlerin Tasarımı ve Uygulamaları*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 15-26.

37. **Dönmez, S. (2014).** Hepatit C'nin Belirlenmesine Yönelik Yeni Bir DNA Biyosensörünün Hazırlanması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 33-42.
38. **Wang, J. (2000).** Analytical Electrochemistry, 2. baskı, New York: John Wiley and Sons., 28-33.
39. **Çavdar, S. (2008).** Mycobacterium Tuberculosis Bakterisinin Rifampine Karşı Geliştirdiği Direnç Mutasyonlarının Elektrokimyasal Biyosensörü ile Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 6-22.
40. **Uzun, D. (2013).** Bazı İndol Türevli Schiff Bazlarının Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi, Karbon Yüzeyine Bağlanma Özellikleri ve Analitik Uygulamaları, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-26.
41. **Dönmez, S. (2014).** Hepatit C'nin Belirlenmesine Yönelik Yeni Bir DNA Biyosensörünün Hazırlanması, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 33-42.
42. **Çoban, E. (2010).** Formaldehide Dehydrogenase Enzimi Kullanılarak Amperometrik Formaldehit Biyosensörlerinin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gebze İleri Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 12-14.
43. **David L.Nelson, Michael M. Cox** Lehninger Biyokimyanın İlkeleri Ankara: Palme Yayınevi,2013:892.
44. **Keha E.E., Küfrevioğlu Ö. Ğ., 2004,** Biyokimya, Erzurum, 197-208.
45. **Akyılmaz E., Sezgintürk E., Dinckaya M.K., 2003,** A biosensor based on urate oxidase - peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine Talanta, 73-79.
46. **Liu, J., Li, G., Liu, H., Zhou, X.,** Purification and properties of uricase Candida sp. and its application of uric acid analysis in serum, Appl. Biochem. Biotechnol., 47, 1, 57 - 63, **1994.** 4.
47. **Yeldandi, A.V., Wang, X., Alvares, K., Kumar, S., Rao, M.S., Reddy, J.K.,** Human urate oxidase gene: Cloning and partial sequence analysis reveal a stop codon within the fifth exon., Biochem, Biophys.Res.Comm., 171, 2, 641 - 646, **1990.** 5.
48. **Bhargava, A. K., Lal, H., Pundir, C.S.,** Discrete analysis of serum uric acid with immobilized uricase and peroxidase, J. Biochem., Biophys., Methods, 39,3,125-136,**1999.**
49. **Pawlotsky, Y.,** Hyperuricemia and gout: therapeutic indications. Rev. Prat., 44, 2, 206 - 209,**1994.**
50. **Kan, J.Q., Zhou, F., Mu, S.L., Shi, Y.J.,** Effect of alpha, alpha'- bipyridine on activity of the polyaniline uricase electrode, Sens., Act., B- Chem., 30,1, 7-10,**1996.**
51. **Miland. E., Ordóeres, A.J.M., Blanco, P.T., Smyth, M.R., Fagain, C.O.,** Poly (o - aminophenol) - modified bienzyme carbon - pastle electrode for the detection of uric acid, Talanta, 43, 5, 785 - 796,**1996.**
52. **Hasebe, Y., Nawa, K., Ujita, S., Uchiama, S.,** High sensitive flow detection of uric acid based on an intermediate regeneration of uricase, Analyst., 123, 8, 1775-1780,**1998.**
53. **Nakaminami, T., Ito, S., Kuwabata, S., Yoneyama, H.,** Uricase-catalysed oxidation of uric acid artificial electron acceptor and fabrication of amperometric uric acid sensors with use of a redox ladder polymer, Anal. Chem.,71, 10, 1928-1934, **1999.**

54. **Montalbini, P., Redondo, J., Cabellero, J. L., Cardenas, J. and Pineda, M.,** “Uricase from leaves: its purification and characterization from three different higher plants” , *Planta* .,202: 277-283 (1997).
55. **Jianguo, L., Gaoxiang, L., Hong, L. and Xiukai, Z.,** “Purification and properties of uricase from candida sp. and its application in uric acid analysis in serum”, *Applied biochemistry and biotechnology*” , 47: 57-63 (1994).
56. **Alamillo, J. M., Cardenas, J. and Pineda, M.,** “Purification and molecular properties of urate oxidase from chlamydomonas reinhardtii” , *Biochimica and biophysica acta.*,1076: 203-208 (1991).
57. **Rose P. J., Mark H. F., Bikales N. M., Overberg C. G., Menges G., Kroschwitz J. I., 1987,** *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, 2nd. Ed., Wiley Interscience, New York, (7), 89.
58. **Scardi V., 1987,** *Immobilization of Enzymes and Microbial Cells in Gelatin*, *Methods in Enzymology*, (135), 293-294.
59. **Guilbault, G. G., Kauffmann, J. M. (1987).** *Enzyme-based Electrodes as Analytical Tools. Biotechnology and Applied Biochemistry*, 9, 95-113.
60. **Akyilmaz, E. 2002.** *Alkol tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi. Doktora Tezi. Bornova İZMİR.*
61. **Mulchandani, A.,**“Enzim and microbial biosensors techniques and protocols”,*Methods in Biotechnology* ,Ed: Mulchandani, A., Rogers, K. R., Humana press Inc, Totowa, 3-11 (1998) .
62. **Castillo-Ortega, M. M., Rodriguez, D. E., Encinas, J. C., Plascencia, M., Mendez-Velarde, F. A., Olayo, R.,** “Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(n-butyl metacrylate) composites” , *Sensors and Actuators* ., B85: 19-25 (2002).
63. **Ndamanisha, J. C., Guo, L.,** “Electrochemical determination of uric acid at ordered mesoporous carbon functionalized with ferrocenecarboxylic acidmodified electrode” , *Biosensors and bioelectronics* ., 23: 1680-1885 (2008).
64. **Kuwabata, S., Nakaminami, T., Ito, S., Yoneyama, H.,** “Preparation and properties of amperometric uric acid sensors” , *Sensors and Actuators* ., B52: 72-77 (1998).
65. **Zhang, F., Wrang, X., Ai, S., Sun, Z., Wan Q., Zhu, Z., Xian, Y., Jin, L., Yamamoto, K.,** “Immobilization of uricase on ZnO nanorods for a reagentless uric acid biosensor” , *Analytica Chimica Acta.*, 519: 155-160 (2004).
66. **Dinçkaya, E., Akyilmaz, E., and Akgöl S.,** “ Urate oxidase electrode based on dissolved oxygen probe for urine uric acid determination” *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics.*, 37: 67-70 (2000).
67. **Jiang, Y., Wang, A., Kan, J.,** “Selective uricase biosensor based on polyaniline synthesized in ionic liquid” , *Sensors and Actuators* ., B124: 529-534 (2007).
68. **Moraes, M. L., Filho, U. P. R., Oliveira, O. N., Ferreira, M.,** “Immobilization of uricase in layer-by-layer films used in amperometric biosensors for uric acid” , *J Solid State Electrochem* ., 11: 1489-1495 (2007).
69. **Çete, S., Yaşar, A. And Arslan, F.,** “An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polypyrrole film” , *Artificial Cells,Blood Substitutes, and Biotechnology.*, 35: 607-620 (2007).

70. **Kan, J., Pan, X., Chen, C.**, “Polyaniline-uricase biosensor prepared with template process” , Biosensors and Bioelectronics ., 19: 1635-1640 (2004).
71. **Matos R. C., Augelli, A. M., Lago, C. L. and Angnes, L.**, “Flow injection analysis-amperometric determination of ascorbic and uric acids urine using arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium” , Anal. Chim. Acta., 404: 151-157 (2000).
72. **Castillo, M. M., Rodriquez, D. E., Encinas, J. C. and Plascencia, M.**, “Conductometric uric acid and urea biosensor prepared from electroconductive polyaniline-poly(n-butyl methacrylate) composites” , Sensors and Actuators ., B85: 19-25 (2002).
73. **Kökbaşı, U., Kayrı, L., Tuli, A.** "Biyosensörler ve Tıpta Kullanım Alanları". Arşiv Kaynak Tarama Dergisi 22 (2014): 499-513



ÖZGEÇMİŞ

Adana'da 27.02.1977'de doğdu. İlköğrenimini Göztepe İlkokulu'nda, ortaöğrenimini Dosteller Ortaokulu'nda ve lise öğrenimini Karşıyaka Endüstri Meslek Lisesin'de Kimya bölümünde tamamladı. Lisans eğitimini Erciyes Üniversitesi Kimya Bölümü'nde 2000'de tamamladı. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda 2014'de yüksek lisans programına başladı. 18 yıldır çeşitli kurumlarda kimya öğretmeni olarak çalışmaktadır.

