

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**149962**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PIEZOELEKTRİK KUARTZ KRİSTAL  
MİKROBALANS SİSTEMİNE DAYALI GLİKONİK ASİT  
BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

**Şükran ŞEKER**

**Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN**

**149962**

**ANKARA**

**2005**

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Temel Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06.07.2005

Başkan

Ünvanı, Adı ve Soyadı, Üniversitesi,

PROF. DR. ESMA KILIÇ

ANKARA ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ

ÜYE

PROF.DR.Y. MURAT ELÇİN

A.Ü. FEN FAKÜLTESİ

ÜYE

PROF.DR. SİBEL ÖZKAN

A.Ü. ECZACILIK FAKÜLTESİ

ÜYE

PROF. DR. ADNAN KENAR

A.Ü. FEN FAKÜLTESİ

ÜYE

DOÇ.DR. HAKAN AYHAN

H.Ü. MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ

## **Piezoelektrik Kuartz Kristal Mikrobalans Sistemine Dayalı Glikonik Asit Biyosensörünün Geliştirilmesi**

### **ÖZET**

Bu çalışma, glikoz oksidaz (GOx) tarafından glikozun oksidasyon ürünü olan glikonik asidin belirlenmesi amacıyla geliştirilen bir piezoelektrik (PZ) glikoz biyosensörünü tanımlamaktadır. GOx, inkübasyon sonrası katalitik reaksiyon çözeltisi içerisinde kolay ayrılabilmesi, kitosan küreler içerisinde immobilize edildi ve oluşan glikonik asit, enzim moleküllerinin girişim etkisi olmadan belirlendi. PZ kuartz kristaller, fulleren C60/PVC membran ile kaplandı; fulleren C60'ın, güçlü nükleofilik özelliği sayesinde elektronca zengin glikonik asit molekülleri ile etkileşime girmesi beklendi. Bu etkileşim kaplanan PZ kristalin titreşim frekansındaki değişim ile izlendi. C60-kaplı PZ kuartz kristal sensörünün, frekans cevabı üzerine; kaplama kalınlığı, glikoz konsantrasyonu, girişim etkisi, pH ve sıcaklığın etkileri incelendi. Sonuç olarak, sensör üzerine glikonik asidin adsorpsiyonundan dolayı titreşim frekansı azaldı. Frekans cevabındaki doğrusallık, 2-13 µg C60 arasında ölçüldü; deneyler boyunca 5 µg C60/kristal kaplama miktarı kullanıldı. Atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri, sensör kaplamalarının tamamen aynı şekil ve boyutlardaki C60 kümelerinden oluştuğunu gösterdi. 37°C sıcaklık ve pH 7.4'ün, glikonik asidin, PZ sensör ile analizi için uygun olduğu bulundu. Frekans değişimi ve glikoz konsantrasyonu arasındaki ilişkinin, ölçülebilir insan kan glikoz seviyesini de kapsayan 50-300 mg/dL glikoz aralığında, ( $1.5 \times 10^{-3}$ - $6.0 \times 10^{-3}$  M) doğrusal olduğu bulundu. PZ sensör ayrıca üre, askorbik asit, sistein, aseton, etanol ve amonyak gibi bazı maddeler varlığında glikonik aside, oldukça iyi seçicilik gösterdi.

*Anahtar Kelimeler: Piezoelektrik biyosensör, Glikonik asit sensörü, Piezoelektrik kuartz kristal, Kuartz kristal mikrobalans, Fulleren, Nanobiyomalzemeler, Nanobiyoteknoloji.*

## **Development of a Gluconic Acid Biosensor Based on Piezoelectric Quartz Crystal Microbalance System**

### **ABSTRACT**

This work describes a piezoelectric (PZ) glucose biosensor which is developed for the detection of gluconic acid, an oxidation product of glucose by glucose oxidase (GOx) in aqueous solutions. GOx was immobilized within chitosan spheres to permit its easy removal from the catalytic reaction solution after incubation, and monitoring of the formed gluconic acid, devoid of the interfering effects of the enzyme molecules with the sensor. PZ quartz crystals were coated with fullerene C60/PVC membrane; fullerene C60 was expected to interact with the electron-withdrawing gluconic acid molecules through a strong nucleophilic attack. The interaction was followed by the change in the oscillating frequency of the coated PZ crystals. The effects of coating load, glucose concentration, interfering species, pH, and temperature on the frequency response of the C60-coated PZ quartz crystal sensor were investigated. As the result, the oscillating frequency decreased owing to the adsorption of gluconic acid on the sensor. While a good linearity in frequency response was measured between 2-13  $\mu\text{g}$  C60, a coating load of 5  $\mu\text{g}$  C60/crystal was used during the experiments. Atomic force microscopy demonstrated that the sensor coatings were composed of spherical C60 aggregates with quite uniform shape and size. A pH of 7.4 and a temperature of 37°C were found to be optimal for the analysis of gluconic acid with the PZ sensor, in correlation with the physiological conditions. Importantly, the relationship between glucose concentration and frequency shift was found to be quite linear between 1.5-6.0  $\times 10^{-3}$  M range, corresponding to *ca.* 50-300 mg/dL of glucose, which is within measurable human blood glucose values. The PZ sensor also exhibited comparatively good selectivity for gluconic acid with respect to some other species, *e.g.* urea, ascorbic acid, cysteine, acetone, ethanol and ammonia.

**Key Words:** *Piezoelectric biosensor, Gluconic acid sensor, Piezoelectric quartz crystal, Quartz crystal microbalance, Fullerene, Nanobiomaterials, Nanobiotechnology.*

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın bir bölümü, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nün BIBAP 152 no'lu projesi kapsamında desteklenmiştir.

Çalışmalarım boyunca yardım ve katkılarını esirgemeyen, bilgi ve önerileriyle beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e, görüş ve önerilerini esirgemeyen, bu çalışmanın gerçekleşmesinde büyük emeği bulunan Sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan NAZIR'a ve her zaman ve her konuda yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Şükran ŞEKER

Ankara, Temmuz 2005

## SİMGELER DİZİNİ

AFP	Alfa ( $\alpha$ )-fetoprotein
BAW	Bulk Acoustic Wave (Hacim Akustik Dalga)
BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albümini)
EDA	Etilendiamin
GA	Glutaraldehit
GOx	Glikoz oksidaz
HSA	Human Serum Albumin (İnsan Serum Albümini)
PEI	Poli(etenimin)
PHEMA	Poli(2-hidroksietil metakrilat)
POD	Peroksidaz
PVC	Poli(vinil klorür)
PZ	Piezoelektrik
QCM	Quartz Crystal Microbalance (Kuartz Kristal Mikrobalans)
SAM	Self-Assembled Monolayer (Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabaka)
SAW	Surface Acoustic Wave (Yüzey Akustik Dalga)
PMEA	Poli(2-metoksietilakrilat)
PP	Polipropilen
TSM	Thickness Shear Mode

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2-1. Biyosensörün yapısı.....	10
Şekil 2.2. Sağ $\alpha$ -kuartz ve sol $\alpha$ -kuartz kristal formları.....	15
Şekil 2.3. Kristal kesim tipleri.....	15
Şekil 2.4. Kuartz kristalin titreşim modları.....	16
Şekil 2.5. Farklı kristal kesim tipine sahip kristallerin titreşim frekanslarının sıcaklık ile ilişkisi.....	17
Şekil 2.6. AT-kesim kristallerin titreşim frekansının sıcaklıkla değişimi.....	18
Şekil 2.7. Piezoelektrik kuartz kristal mikrobalans sistemi deney düzeneği.....	19
Şekil 2.8. Piezoelektrik sensörler için deney düzeneği ve piezoelektrik kuartz kristal..	20
Şekil 2.9. Gaz sensörleri için deney düzeneği.....	20
Şekil 2.10. Sıvı sistemler için geliştirilen çalışma düzeneği.....	21
Şekil 2.11. Sıvı sistemler için geliştirilen çalışma düzeneği.....	22
Şekil 2.12. Fulleren C60.....	29
Şekil 2.13. Fulleren C70.....	29
Şekil 2.14. Karbon nanotüp.....	29
Şekil 2.15. Genel olarak fullerenin verebildiği reaksiyonlar.....	30
Şekil 2.16. Fullerenlerin (C60, C70) primer ve sekonder aminlerle reaksiyonu.....	21
Şekil 4.1. Kuartz kristalin kaplama konsantrasyonu (çalışma aralığı).....	38
Şekil 4.2. AFM görüntüleri.....	39
Şekil 4.3. Kaplama kalınlığının PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.4. PH'ın PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.5. Sıcaklığın PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.6. $\beta$ -D-Glikoz konsantrasyonunun C60/PVC kaplı PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.7. D-Glikoz içeren reaksiyon çözeltisi içerisinde bulunan bazı organik ve inorganik maddelerin PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkileri.....	44
Şekil 4.8. Serbest glikoz oksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	44

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Biyosensörlerde kullanılan transdüser sistemleri, ölçüm modları ve tipik uygulamalar.....	11
Çizelge 2.2. Biyosensörler kullanılarak analizi yapılan bazı maddeler.....	12





## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Çalışmanın Kapsamı.....	1
1.2. Kaynak Özetleri.....	3
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>10</b>
2.1. Biyosensörler.....	10
2.1.1. Biyosensörlerin genel kullanım alanları.....	11
2.1.2. Biyosensörlerin özellikleri.....	13
2.2. Piezoelektrisite ve Kuartz Kristaller.....	14
2.2.1. Piezoelektrik kavramı.....	14
2.2.2. Kuartz kristaller.....	14
2.2.2.1. Kuartz kristal kesim tipleri.....	15
2.2.2.2. Kristal kesim tipi ile sıcaklık ilişkisi.....	16
2.3. Kuartz Kristal Mikrobals Sistemleri.....	18
2.3.1. Gaz fazındaki analizler için geliştirilen QCM sistemi.....	20
2.3.2. Çözelti ortamındaki analizler için geliştirilen QCM sistemi.....	21
2.4. Sauerbrey Eşitliği.....	23
2.5. Akustik Dalga (Acoustic Wave) Sensörler.....	23
2.6. QCM Biyosensörlerinin Hazırlanmasında Temel Kavramlar.....	24
2.6.1. Kristal yüzeyinin modifikasyonu.....	25
2.6.3. İmmobilizasyon yöntemleri.....	27
2.7. Glikoz Analizlerinin Önemi.....	28
2.8. Fulleren.....	29
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	<b>32</b>
3.1. Materyal.....	32
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. Deney düzeneğinin hazırlanması.....	34

3.2.2. Piezoelektrik kristallerin kaplanması.....	34
3.2.3. Fulleren membranın optimizasyonu.....	34
3.2.4. Uygun matriks miktarının seçimi.....	35
3.2.5. Yüzey topografisinin incelenmesi.....	35
3.2.6. Glikoz oksidaz enziminin immobilizasyonu.....	35
3.2.7. Glikonik asidin oluşturulması ve kristallerle etkileştirme.....	36
3.2.8. Serbest glikoz oksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	36
3.2.9. Glikonik asitin C60 Kaplı PZ-QCM ile Analizi.....	37
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>38</b>
4.1. C60 ve C60/PVC Membranları İçin Çalışma Aralıklarının Belirlenmesi.....	38
4.2. AFM ile Yüzey Topografilerinin İncelenmesi.....	39
4.3. Kaplama Miktarının Etkisi.....	40
4.4. pH Etkisi.....	40
4.5. Sıcaklığın Etkisi.....	41
4.6. Glikonik Asit Konsantrasyonunun Etkisi.....	42
4.7. Girişim Etkisi Yapabilecek Maddelerin Etkisi.....	43
4.8. Serbest glikoz oksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	44
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>45</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>47</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>49</b>
EK 1.....	49
EK 2.....	50
EK 3.....	51
EK 4.....	52
EK 5.....	53
EK 6.....	54
EK 7.....	55
EK 8.....	56

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Çalışmanın Kapsamı

Biyosensörler, bir transdüser ve içerdiği biyolojik aktif materyal ile biyokimyasal sinyalleri elektrik sinyallerine dönüştürebilen analitik cihazlardır. Basit ve düşük maliyetli olmaları, hızlı cevap verme süresine sahip olmaları, çok az aktif materyale ihtiyaç göstermeleri ve yüksek hassasiyetli cihazlar olmaları gibi avantajlarından dolayı, biyosensörler, başta biyotıp olmak üzere farklı bir çok alanda kullanılmaktadır. Günümüzde biyosensör çalışmaları, ziraatte, hayvan hastalıklarının analizinde, hava kirliliğinde, su ve mikrobiyal içeriklerinin tayininde, klinik teşhiste ve biyomedikal uygulamalarda, fermentasyon analizi ve kontrolünde, endüstriyel gazların ve sıvıların kontrolünde, patlayıcı ve askeri alanlarda, vd. olmak üzere çok geniş bir çalışma sahasında devam etmektedir.

Biyosensör sistemlerinde, optik, elektrokimyasal, termometrik, manyetik veya piezoelektrik gibi farklı transdüser sistemleri kullanılmaktadır (Cooper ve Cass 2004). Piezoelektrik (PZ) biyosensörlerde transdüser sistemi olarak piezoelektrik kuartz kristaller kullanılmaktadır. PZ biyosensörler, DNA, protein, antikor, mikroorganizma gibi çeşitli biyokimyasal materyallerin belirlenmesinde; oldukça hassas ve seçici olması, herhangi bir işaretleyiciye gerek duyulmaması gibi avantajlara sahip olmasından dolayı sıkça kullanılmaktadır (King Jr 1964, Gizeli vd. 1997, Rickert vd. 1997).

Piezoelektrik kristallerin titreşim frekansları, yüzeylerinde meydana gelen kütle artışı sonucunda bir azalma göstermektedir. Meydana gelen frekans değişimi, kristalin temel frekansına ( $F_0$ ), kristal üzerinde biriken maddenin miktarına ( $M$ ), kristalin elektrot yüzeyinin alanına ( $A$ ) bağlıdır ve Sauerbrey eşitliği ile hesaplanmaktadır (Sauerbrey 1959):  $\Delta F = -2.3 \times 10^6 \times F_0 \times (M/A)$ . Kuartz kristal üzerine biriken maddeler için teorik belirleme limiti  $10^{-12}$  g olarak belirlenmiştir (Tomita ve Guilbault 1980). PZ kristallerin sahip olduğu bu kütle hassasiyeti neticesinde, çözelti ortamında veya gaz halinde bulunan analitin oldukça hassas bir şekilde belirlenebilmesini sağlayan PZ sensör sistemleri geliştirilmiştir.

Piezoelektrik sensör çalışmalarında kristal öncelikle, tayini yapılmak istenen gruba duyarlı bir materyal ile kaplanır. Kaplamadan dolayı kristalin yüzeyindeki kütle artışı nedeniyle kristalin titreşim frekansı düşer. Kristalin bu yeni frekansı, temel titreşim frekansı olarak

ölçülür ve kaydedilir. Ardından kristal, tayin edilmek istenen analiti bulduran ortama konulur. Tayin edilmek istenen maddenin kristal üzerine adsorpsiyonu nedeniyle, kristal yüzeyinde birikir. Meydana gelen kütle artışı kristalin titreşim frekansını tekrar düşürür. Kristalin sabit potansiyeldeki bu yeni titreşim frekansı, osilatör tarafından yükseltılarak frekans sayıcıya gönderilir. Frekans sayıcıda okunan değer ile kristalin sahip olduğu temel frekans değeri arasındaki fark alınır ve yukarıda verilen eşitlik yardımıyla kristal yüzeyine adsorplanan madde miktarı hesaplanır. Bu basit uygulama, QCM çalışmalarında en çok tercih edilen yöntemdir. Öte yandan, tayin edilmek istenen grubu bulduran ortam da önemlidir.

Fulleren C60 yapısında bulunan 60  $\pi$ -elektronu sebebiyle nükleofilik özelliğe sahiptir ve glikonik asit, gibi elektron yoğunluğu bulduran çeşitli organik maddeler ile reaksiyona girebilmektedir (Chao ve Shih 1998). Bu çalışmalarda fulleren C60'ın sahip olduğu 60  $\pi$ -elektronu da dikkate alınarak piezoelektrik özellik gösteren kristallerde kaplama malzemesi olarak kullanılmıştır.

Kan glikoz seviyesinin belirlenmesi diyabetin (*Diabetes mellitus*) teşhisinde büyük bir öneme sahiptir. Glikoz seviyesinin belirlenmesinde elektrokimyasal, spektrofotometrik, amprometrik, polarimetrik gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin çoğu, zaman alıcı ve maliyetlidir. Geliştirilen piezoelektrik glikonik asit biosensörünün, konvansiyonel immünteşislere göre bazı avantajları bulunmaktadır. Herhangi bir işaretleyici (flüoresans, kemilüminesans gibi) kullanılmadan ve numunenin çeşitli reaktiflerle muamelesine gerek duyulmadan, glikozun hızlı bir şekilde belirlenmesi mümkündür. Analiz için numunenin çok az miktarı yeterli olabilmektedir.

Bu çalışmada, kitosan küreler içrisine immobilize edilen glikoz oksidaz tarafından glikozun enzimatik oksidasyonu sonucu oluşan glikonik asitin; kristal kaplama materyali olarak seçilen fulleren C60 ile kaplı PZ kristaller üzerine adsorpsiyonu daldırma ve kurutma ölçüm tekniği kullanılarak incelendi. Bu çalışma için gerçekleştirilen işlemler sırasıyla, piezoelektrik kuartz kristallerin fulleren membranla kaplanması, glikozun glikoz oksidaz ile enzimatik reaksiyonunun gerçekleştirilmesi, kaplı kristallerin reaksiyon çözeltisi ile muamele edildikten sonra membran üzerine bağlanmanın gerçekleştirilme düzeyinin belirlenmesi işlemleridir. Tayin işlemleri, kaplanmamış kristalin kullanıldığı kör deney paralelinde yürütüldü ve çalışmanın her basamağının anında kontrol edilebilmesi mümkün oldu. Sonuçlar, her deney basamağının ardından başka bir işlem gerek duyulmadan çok kısa bir süreçte edildi.

## 1.2. Kaynak Özetleri

Piezoelektrik kuartz kristaller kullanılarak geliştirilen biyosensörler ilk kez 1964 yılında W. H. King tarafından, kimyasal örneklerin analizinde kullanılmıştır. Son yıllarda, 'Kuartz Kristal Mikrobals' sistemine dayalı immün- ve DNA sensörlerinin klinik analizlerde başarılı bir şekilde kullanılabilceğini gösteren çalışmalar yapılmaktadır. Mannelli vd. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, genetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizmalarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada, tek zincirli DNA problemleri, sensör yüzeyine immobilize edilmişlerdir. Prob dizileri, organizmanın genomunda, transfer edilebilir genin ekspresyonunun düzenlendiği Nos terminatör ve 35S promotör gen bölgelerine spesifik dizilerdir. pBI121 plazmidinden izole edilen bu bölge PCR ile çoğaltıldıktan sonra, tek zincir halinde getirilip, piezoelektrik kuartz kristal üzerindeki membrana immobilize edilen komplementer problemler ile etkileştirilmiştir. Hibridizasyon reaksiyonundan önce ve sonra okunan frekansların değerlendirilmesiyle, kristal yüzeyinde hibridizasyon reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada, Akdeniz popülasyonunda  $\beta$ -Thalassaemia hastalığına neden olan,  $\beta$ -globin geninin, kodon 39 bölgesinde, C-T değişimi sonucu oluşan nokta mutasyonunun, DNA piezoelektrik biyosensörü kullanılarak belirlenmesi çalışılmıştır. (Minunni vd. 2003). Bu çalışmada, 39. kodon çevresindeki bölgeye spesifik 25 merli, 5' ucu biyotinlenmiş oligonükleotit problemler, streptavidin ile kaplanmış altın elektrotlu 10 MHz AT-kesim kuartz kristalin yüzeyine immobilize edilmiştir. Bu problemler, mutasyonlu 39. kodon bölgesine komplementer (Prob 2) ve normal 39. kodon bölgesine komplementer (prob 1) olan oligonükleotitlerdir. Bu çalışma için, Thalassaemia hastalarının (%100 TAG), taşıyıcıların (%50 CAG + %50 TAG) ve normal bireylerin kanlarından izole edilen DNA'nın 39. kodon ve çevresindeki gen bölgesi PCR tekniği kullanılarak amplifiye edilmiştir. Problemlerin immobilize edildiği 10 MHz'lik AT-kesim kristaller, çoğaltılan dizileri içeren çözeltiler ile ayrı ayrı muamele edilerek, hibridizasyondan önce ve sonraki frekansların karşılaştırılmasıyla kristaller üzerinde hibridizasyonun olup olmadığı belirlenmiştir.

Duman vd. (2003), plazma-yük boşaltma reaktör sistemi (glow-discharge reaktörü) kullanarak kaplanan kristallerin kullanıldığı piezoelektrik biyosensör geliştirmiştir. Bu çalışmada, gümüş elektrotlu 10 MHz AT-kesim kristallerin yüzeyi, plazma yük boşaltma reaktör sisteminde, etilen diamin monomeri kullanılarak gerçekleştirilen plazma



polimerizasyonu sonucunda ince bir EDA-plazma filmi ile kaplanmıştır. Kristal yüzeyi üzerinde oluşturulan bu membran, yapı gereği serbest amino grupları içermektedir. Amino gurupları içeren bu yüzey daha sonra gluteraldehit ile modifiye edilerek, yüzey üzerinde, probun 5' ucundaki amino grubundan yüzeye kimyasal olarak bağlanabileceği aldehit gurupları oluşturulmuştur.

5'-G TGT TTG CCT GTT CTC AGA C-3' (prob 1)

5'-GTC TGA GAA CAG GCA AAC A-3' (prob 2)

Prob 1 ve prob 2 oligonükleotitlerin oluşturduğu çift zincirin sonunda, prob 1'in 5' ucunda bulunan fazla bazdan kaynaklanan amino grubu bulunmaktadır. Prob 1'in (ligandın) immobilizasyonu, çift zincirdeki serbest amino grubu ile yüzey üzerindeki aldehit grubu arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu meydana gelmiştir. Immobilizasyon reaksiyonu tamamlandıktan sonra sıcaklık değiştirilerek immobilize çift zincirin denatürasyonu gerçekleştirilmiş ve ligandın (prob 1'in) kristal üzerindeki immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Chou vd. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, kendiliğinden düzenlenen tek tabaka tekniği (self-assembled monolayer, SAM) ve polietilenimin (PEI) polimeri kullanılarak hazırlanan PZ kristal üzerine, insan  $\alpha$ -fetoproteinine (AFP) özgü antikorların, gluteraldehit ile çapraz bağlama yöntemi kullanılarak immobilizasyonu sonucunda, insan AFP'inin belirlenmesine yönelik piezoelektrik immüno-sensör geliştirilmiştir. Çalışmada, PEI membran üzerine immobilize edilen antikorların, SAM tekniği kullanılarak hazırlanan kristal üzerine immobilize edilen antikordardan daha fazla aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Aynı kaplama tekniği kullanılarak geliştirilen bir başka çalışma, insan serum albümininin (Human Serum Albumin, HSA) belirlenmesine yöneliktir (Saber vd. 2002). Bu çalışmada, kuartz kristaller, plazma yük boşaltma reaktör sisteminde, EDA monomerinin plazma polimerizasyonu ile kaplanmışlardır. Anti-HSA antikorları, yüzey üzerinde gluteraldehit ile modifiye edilerek oluşturulan amino gurupları aracılığıyla immobilize edilmiştir. Kuartz kristal üzerine antikorun immobilizasyonu, pH, antikor konsantrasyonu ve zaman parametrelerinin değiştirilmesiyle optimize edilmiştir. Çalışmada çözelti içindeki HSA'nın belirlenmesi için iki yöntem geliştirilmiştir: Daldırma-kurutma (dip and dry) yöntemi olarak adlandırılan birinci yöntemde, frekans değişimi, HSA çözeltisi ile anti-HSA

immobilize edilmiş kristallerin etkileşiminden bir saat sonra belirlenmiştir. Direkt yöntemde ise, kristalin frekans değişimi, bir saat boyunca sürekli olarak takip edilmiştir.

Plazma-yük boşaltma sistemi ile kaplanmış kuartz kristal ile oluşturulmuş başka bir QCM sensöründe, metalotiyoncinin (MT) kadmiyum ve çinko iyonlarıyla yaptığı kompleksleşme reaksiyonu incelenmiştir (Saber ve Pişkin 2003). Metalotiyoncinler, düşük molekül kütleli, sistince zengin ve ağır metal iyonlarını (özellikle  $Cd^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$ ) bağlayabilen proteindir. Fizyolojik rolleri, ağır metal iyonlarının depolanması ve ağır metallerin detoksifikasyonunu sağlamaktır. MT'ler, aromatik amino asitleri içermemeleri ve metal iyonlarını bağlayabilen özellikleri ile tanınmaktadırlar. Ağır metal iyonları MT'lerin sistin kalıntısına, tiyol bağları ile bağlanırlar. MT'lerin ağır metal iyonlarıyla etkileşiminin incelendiği çalışmada, model olarak çoğunlukla, fare karaciğeri MT parçası olan 'Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala' oligopeptidi kullanılmıştır.

Çalışmada, MT modeli olarak kabul edilen oligopeptit, (Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala), glow-discharge reaktöründe, etilen diamin plazma ile muamele edilerek kaplanmış ve glutaraldehyt (GA) ile modifiye edilmiş 10 MHz AT-ticim kuartz kristallerin üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Cd ve Zn iyonlarını belirli miktarlarda içeren çözeltilerle etkileştirilerek, QCM sisteminde frekans değişimleri belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, immobilize MT molekülleri ile etkileşen  $Zn^{+2}$  iyonlarının miktarının,  $Cd^{+2}$  iyonlarının miktarından daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Dört farklı immobilizasyon yönteminin çalışıldığı bir başka QCM DNA sensöründe, hibridizasyon reaksiyonu incelenmiştir (Tombelli vd. 2002). Bu dört farklı immobilizasyon yönteminde, hibridizasyon reaksiyonunun derecesi ve belirlenmesi çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda, karboksillenmiş dextran tabakasına bağlı streptavidin üzerine, biyotinlenmiş problemlerin immobilizasyonu ile oluşturulmuş DNA sensörü üzerinde, hibridizasyon reaksiyonunun daha hassas bir şekilde belirlendiği gözlenmiştir. Deneyler sırasında, kuartz kristal yüzey üzerinde, spesifik olmayan adsorpsiyonların gerçekleşmediğinin gösterilmesi amacıyla, komplementer olmayan oligonükleotitler ile deneyler tekrarlanmıştır.

Zhou vd. (2002) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada, QCM sistemi ile hepatit B virüsünün (HBV) belirlenmesi amaçlanmıştır. Hepatit B, özellikle Çin'de yaygın olarak görülen, bulaşıcı bir hastalıktır. İnsan kanındaki virüs nükleik asidi konsantrasyonunun belirlenmesi, hastalığın teşhis ve tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada,

HBV nükleik asit problemleri, altın elektrotlu 9 MHz AT-kesim piezoelektrik kuartz kristaller üzerine immobilize edilmiştir. Kuartz kristaller, polietilenimin-gluteraldehit yöntemi ve fiziksel adsorpsiyon yöntemleri kullanılarak hazırlanmıştır. Çalışmanın sonucunda, HBV nükleik asit problemlerinin immobilizasyonunda PEI-Glu yönteminin, fiziksel adsorpsiyon yöntemine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Piezoelektrik immünsensör uygulamalarından birinde, *Salmonella typhimurium* mikroorganizmasının belirlenmesi hedeflenmiştir (Babacan vd. 2000). Kristal yüzeyinin kaplanması için, iki farklı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerden ilki, polietilenimin ile kaplanan kristalin gluteraldehit ile modifiye edilerek, yüzeyde serbest aldehit gruplarının oluşturulduğu, PEI-GA yöntemidir. Diğer yöntemde ise, hücre duvarı proteini olan protein A kaplama materyali olarak kullanılmıştır. Protein A, IgG molekülünün Fc bölgesi ile etkileşmesini sağlayan bağlanma bölgeleri içermektedir. Çalışmada, altın elektrotlu piezoelektrik kuartz kristallerin yüzeyi her iki yöntem kullanılarak kaplanmış ve yüzeye anti-*Salmonella* antikoru immobilize edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, altın elektrotlu piezoelektrik immünsensör uygulamalarında, protein A yöntemi ile kaplanan kristallerin, PEI-GA yöntemi ile kaplanan kristallerden daha kullanışlı ve hassas olduğu belirlenmiştir.

Vaughan vd (2001) tarafından yapılan bir çalışmada ise, *Listeria monocytogenes* mikroorganizmasının altın elektrotlu, tiyosiyalikasit ile kaplanmış kuartz kristal kullanılarak belirlenmesi çalışılmıştır. Çalışmada anti-*Listeria monocytogenes* antikoru kaplanmış kristal üzerine immobilize edilmiştir. Antikoru immobilize edildiği kuartz kristalin, aktivitesini kaybetmeden on kez kullanıldığı ve kuru olarak yirmibeş gün saklanabildiği belirlenmiştir.

Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada, HSA analizleri için piezoelektrik immünsensör geliştirilmiştir (Návrátlová vd. 2001). Klinik örneklerde HSA miktarının belirlenmesi, ileri aşama böbrek hastalıklarının (end stage renal disease) erken dönemde teşhisi için önemlidir. Hastalığın erken dönemde teşhisi ile nefropatik komplikasyonlar önlenmektedir. Bu sebeple, idrardaki HSA konsantrasyonunun artması anlamına gelen albüminüri seviyesinin tesbiti önem kazanmıştır. Çalışmada, albüminüri seviyesinin piezoelektrik immünsensörler kullanılarak belirlenmesi, maliyetin düşük oluşu ve sonucun daha kısa zamanda belirlenebilmesi sebebiyle, analiz sonuçlarının örtüştüğü standart reflektometrik teşhise göre daha avantajlı olduğu belirtilmiştir.



Chuang ve Shih (2001) tarafından yapılan çalışmada ise, kuartz kristalin kaplama materyali olarak, karbon allotrobu olan fulleren C60 kullanılmıştır. Fulleren C60, yapı gereği 60  $\pi$ -elektronu içermektedir. Bu özellik fullerene, amino grubu gibi elektronegatif gruplara bağlanabilme yeteneği kazandırmıştır. Bu çalışmada, C60 ile kaplı piezoelektrik kristal, glikozun glikoz oksidaz tarafından yükseltgenmesi sonucu oluşan glikonik asidi belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Glikoz oksidaz enzimi fulleren C60 ile kaplı silika üzerine immobilize edilmiştir. Çözeltiye daldırılan fulleren kaplı kuartz kristal, fulleren kaplı silika üzerine immobilize edilen glikoz oksidaz enzimi tarafından oluşturulan glikonik asiti, frekansında meydana gelen değişim ile belirlemiştir.

Bir başka glikoz sensörü çalışmasında ise, piezoelektrik kristaller fullerenin kriptandlı türevi olan fulleren-kriptand 22 maddesi ile kaplanmıştır (Chang ve Shih 2000). Kriptand 22 yapay makrosiklik bir maddedir. Kriptand 22 ve 18-taç-ctcr gibi makrosiklik polimerler su ve organik çözücülerde kolaylıkla çözünürler, fakat fulleren ile verdikleri türler hidrofobik maddeler olduklarından suda çözünmezler ve kaplama materyali olarak kullanılabilirler.

Fulleren-kriptand-22 kaplı sensör, glikozun glikoz oksidaz tarafından yükseltgenmesi sonucu oluşan glikonik asidi belirlemeye yöneliktir. Glikonik asidin fulleren-kriptand 22 kaplı piezoelektrik sensör üzerine adsorpsiyonu sonucunda kristalin frekansında meydana gelen azalma kristal yüzeyinde adsorplanan glikonik asit miktarıyla orantılıdır. Çalışmada, glikoz içeren çözelti içine belli miktarda glikoz oksidaz enzimi ilave edilerek reaksiyon başlatılmış ve reaksiyon sonucu oluşan glikonik asit miktarı frekans değişimi ile belirlenmiştir. Oluşan glikonik asit miktarından çözelti içinde mevcut glikoz miktarına geçilmiştir. Çalışmada ayrıca, insan kanında belirli miktarlarda bulunan, askorbik asit, sistein, galaktoz, tirozin, ürik asit ve bazı metal iyonlarının, analiz sonucuna etkileri incelenmiş ve bu maddelerin girişim etkilerinin bulunmadığı belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca, fulleren-kriptand 22 kaplı piezoelektrik glikoz sensörünün pH, kaplama kalınlığı, glikoz konsantrasyonu gibi parametrelere karşı frekans değişimleri incelenmiştir.

Aynı kaplama materyali kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise, immobilize ve çözülmüş üreaza dayalı olarak geliştirilen üre sensöründe, üreaz enziminin üre ile enzimatik reaksiyonu sonucunda oluşan amonyum iyonunun belirlenmesi hedeflenmiştir (Wei ve Shih 2000). Çalışmada üreaz, fulleren ve polivinil klorür ile oluşturulan membran üzerine immobilize edilmiştir. Kanda bulunması muhtemel olan bazı metal iyonları, glikoz, askorbik asit gibi maddelerin frekans değişimine etkileri incelenerek, sensörün

spesifikliği araştırılmıştır. Ayrıca, kaplama miktarı, üreaz aktivitesi, üre konsantrasyonu, çözücü ve pH parametrelerinin frekans değişimine etkileri incelenmiştir.

Shih vd (2001) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, fulleren-kriptand 22 ve fulleren-dibenzo-16-taç-5 kaplı piezoelektrik kristal sensörler, organik ve inorganik maddelerin analizi için geliştirilmiştir. Çalışmada ilk olarak, fulleren ile organik maddeler arasındaki etkileşimler, fulleren kaplı sensörler kullanılarak incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, alkoller, aldehytler, karboksilik asitler gibi organik maddelerin fulleren üzerine fiziksel olarak, 1,3-dienler, alkinler, ditiyoller ve aminlerin fulleren yüzeyine kimyasal olarak adsorbe olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, fulleren C60-kriptand 22 kaplı piezoelektrik sensörün, olefinler, aminler, karboksilik asitler ve aldehytler gibi bazı organik molekülleri hassas bir şekilde tesbit ettiği belirlenmiştir. Sensör, polar ve polar olmayan organik gazların analizi için kullanılmıştır. Elde edilen analiz sonucunun, gaz kromatografisinde termal iletkenlik dedektörünün verdiği sonuçlar ile örtüştüğu belirlenmiştir. Ayrıca, fulleren C60-kriptand 22 ve fulleren C60-dibenzo-16-taç-5 kaplı sensörler ile bazı polar ve polar olmayan organik moleküllerin, metal iyonlarının analiz sonuçlarının, ticari sıvı kromatografisi dedektörlerinin verdikleri sonuçlar ile örtüştüğu belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada ise, fulleren C60 kaplı piezoelektrik gaz sensörler kullanılarak fulleren C60 ile bazı organik moleküller ile etkileşimler incelenmiştir (Chao ve Shih 1998). Çalışmanın sonucunda incelenen organik moleküllerin fulleren C60'a olan ilgileri sırasıyla, karboksilik asitler > aldehytler > aminler > alkoller > ketonlar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca polar organik moleküller arasında aminler ve ditiyollerin fullere kimyasal olarak adsorbe oldukları, diğerlerinin ise fiziksel olarak adsorbe oldukları belirlenmiştir.

Pan ve Shih (2004) tarafından yapılan çalışmada ise, 10 MHz AT-kesim kuartz kristaller C60-anti-insan IgG ve C60-anti-hemoglobin ile kaplanarak, insan IgG ve hemoglobin analizine dayalı antikor sensörleri geliştirilmiştir. Çalışmada öncelikle, kuartz kristaller fulleren C60/PVC ile spin kaplama yöntemi ile kaplanıp, ayrı ayrı, anti-IgG ve anti-hemoglobin antikorlarının belirli miktardaki çözeltileriyle etkileştirilerek, antikorların kristallerin yüzeyine adsorpsiyonu sağlanmıştır. Kristal yüzeyindeki fulleren üzerine adsorpsiyonun olup olmadığı, FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. İmmünsensörler üre, ürik asit, sistcin, tirozin, askorbik asit ve metal iyonlarını içeren çözeltilerle etkileştirilip, kristallerin frekans değişimleri belirlenerek, immün sensörlerin spesifikliği incelenmiştir.

Başka bir çalışmada ise, gümüş elektrotlu 9 MHz AT-kesim kuartz kristaller, poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA), poli(2-metoksietilakrilat) (PMEA) ve polipropilen (PP) ile kaplanıp, bu polimerler üzerine insan fibrinojeni ve siğir serum albümini (bovine serum albumin, BSA) proteinlerinin adsorpsiyonları karşılaştırılmıştır (Tanaka vd. 2001). Çalışmanın sonucunda, biyouyumlu bir polimer olan PMEA üzerine proteinlerin adsorpsiyonunun diğer polimerlere oranla daha güçlü olduğu ve adsorpsiyonun kantitatif analizinin daha kolay yapılabildiği belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada ise, dengue (*denque*) virüsünün teşhis için yönelik bir immünsensör geliştirilmiştir (Su vd. 2003). Çalışmada, dengue virüs zar proteinini olan protein E ve, virüsün enfekte ettiği hücreler tarafından eksprese edilen NS-1 proteinine (non-structural 1 protein) özgü olan monoklonal antikorlar ile kaplanan 9 MHz AT-kesim QCM sistemi geliştirilmiştir. Üç farklı immobilizasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemler, glutaraldehit yöntemi, protein A yöntemi ve karbodiimid (1-etil-3-(3-dimetil-amino propil) karbodiimid, EDC) yöntemidir. Yapılan araştırmalar sonucunda, bu immobilizasyon yöntemlerinden protein A yönteminin, diğer yöntemlere oranla daha uygun olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, immün sensörün hassasiyetinin, ELISA yöntemine oranla 100 kat daha fazla olduğu ve bu sebeple hastalığın erken safhalarında kanda az miktarda bulunan virüsün QCM sistemi ile kolaylıkla belirlenebileceği ve hastalığın daha fazla yayılmadan erken dönemde teşhisinin mümkün olduğu belirtilmiştir.

Marx vd. (2001) QCM sisteminin farklı bir uygulaması olan hücre biyosensörü çalışmıştır. Bu çalışmada Nocodazole adı verilen ve hücrelerdeki mikrotübüllerin depolimerizasyonuna neden olan bir ilacın farklı dozlarında; endotel hücrelerin kristal yüzeyi üzerine bağlanmaları incelenmiştir. Çalışmada, altın elektrotlu PZ kristal, serum içeren büyüme ortamına yerleştirildikten sonra, ortama endotel hücreler ilave edilip, meydana gelen frekans değişimleri eş zamanlı olarak belirlenmiştir.

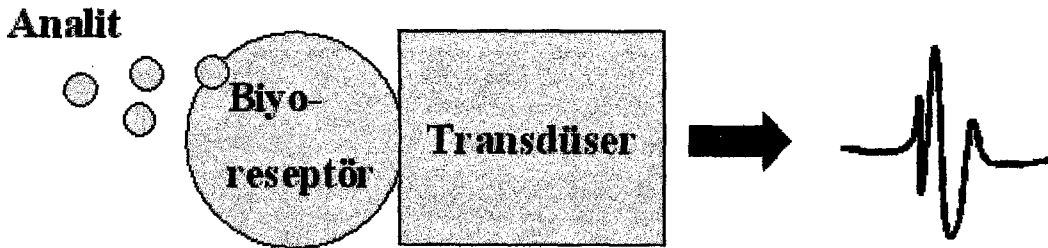
## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Biyosensörler

Biyosensörler, biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir elektrik sinyallerine dönüştürebilen bir transdüser ile, spesifik ve biyolojik olarak aktif bileşenlerden oluşturulmuş analitik cihazlardır. Biyosensörler, biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanılarak ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak tanımlanabilirler.

Bir biyosensör reseptör ve dedektör olmak üzere iki temel bileşenden oluşmaktadır. Reseptör, enzim, antikor, lipid, vd. olabilen seçici kısımdır. Dedektör, transdüserden gelen elektrik sinyallerini tayin eden kısımdır. Transdüser ise, kimyasal veya fiziksel etkileşimleri elektrik sinyallerine dönüştürebilen kısımdır. Piezoelektrik biyosensörlerde transdüser olarak kuartz kristaller kullanılmaktadır.

Biyosensörlerde temel amaç, analizi yapılacak madde (analit) ile biyoaktif bir bileşenin spesifik olarak etkileşimi sonucu ortaya çıkan elektrik sinyallerinin bir transdüser sistemiyle belirlenmesidir. Sistemin özelliğine bağlı olarak yükseltici, mikroişlemci, dijital görüntüleyici gibi kısımlar sistem içinde yer alabilmektedir. Şekil 2.1'de genel olarak bir biyosensörün temel yapısı görülmektedir.



Şekil 2-1. Biyosensörün yapısı

*Çizelge 2.1. Biyosensörlerde kullanılan transdüser sistemleri, ölçüm modları ve tipik uygulamalar*

<b>Transduser Sistem</b>	<b>Ölçüm Modu</b>	<b>Tipik uygulamalar</b>
İyon seçici elektrot	Potansiyometrik	Biyolojik ortamdaki iyonlar, enzim elektrotları
Gaz-algılayıcı elektrot	Potansiyometrik	Gazlar, enzimler, organeller, hücre ve doku elektrotları
Alan Etkili (field effect) elektrot	Potansiyometrik	İyonlar, gazlar, enzim substratları, immünolojik analitler
Optoelektronik ve fiberoptik cihazlar	Optik	pH, enzimler, immünolojik analitler
Termistörler	Kalorimetrik	Enzimler, organeller, gazlar, antibiyotikler ve vitaminler
Enzim elektrotları	Amperometrik	Enzimler, immünolojik sistemler
Kondüktometre	Kondüktans	Enzim substratları
Piezoelektrik kristaller	Akustik (kütle)	Enzimler, uçucu gazlar ve sıvılar

Biyosensörlerde kullanılan biyoaktif bileşenler amaca göre iyonoforlar, antikolar, enzimler, nükleik asitler, lipozomlar, biyomembranlar (örneğin; membran reseptörleri), hücre organelleri (örneğin; mitokondri), hücreler, doku kesitleri ve homojenatları olabilmektedir. Biyosensörlerde, biyoaktif bileşenin, tayin edilecek madde ile etkileştiğinde oluşan sinyalin iletim ve ölçümünde, genel olarak, çizelge 2.1.'de belirtilen transdüser sistemleri kullanılmaktadır (Kumar 2000).

### **2.1.1. Biyosensörlerin genel kullanım alanları**

Üretilen biyosensörlerin çoğunun tıp alanında kullanıldığı ve bunun da ağırlıklı olarak glikoz tayinine yönelik enzim esaslı biyosensörlerden oluştuğu görülmektedir. Doğal olarak, son yıllardaki bilimsel ve teknolojik gelişmeler diğer bazı biyosensör türlerinin de bu pazarda paylarının hızlı bir şekilde artmasına yol açmıştır. Ancak enzimlerin çok yüksek sayı ve çeşitliliği ve çok farklı kullanım alan ve amaçlarından yararlanılabilir olmaları, bu pazarda egemenliğin enzim esaslı biyosensörlerde olması sonucunu doğurmaktadır. Genel kullanım alanları incelendiğinde biyosensörlerin,

- Klinik teşhisler ve tıbbi analizler,
- Tarım ve veterinerlik analizleri,
- Proses kontrolleri (fermentasyon kontrolleri ve analizi),
- Gıda analizleri,
- Mikrobiyoloji (bakteriyal ve viral analizler),
- Farmasötik ve ilaç analizleri,
- Çevresel analizler (kirlilik kontrolleri),
- Endüstriyel ve toksik gazların analizi,
- Askeri ve savunma faaliyetleri, gibi pek çok alanda uygulama bulduğu görülmektedir.

Çizelge 2.2.'de biyosensör sistemleri kullanılarak analizi yapılabilen analitler örnekleri ile verilmiştir (Kumar 2000).

*Çizelge 2.2. Biyosensörler kullanılarak analizi yapılan bazı maddeler*

<b>Analit</b>	<b>Örnekler</b>
Solunum gazları	O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>
Anestezik gazlar	N <sub>2</sub> O, Halotan
Toksik gazlar	H <sub>2</sub> S, Cl, CO, NH <sub>3</sub>
Tutuşabilir gazlar	CH <sub>4</sub>
İyonlar	H <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>+</sup> , fosfatlar, ağır metal iyonları
Metabolitler	Glikoz, üre
İz metabolitler	Hormonlar, steroidler, ilaçlar
Toksik gazlar	Benzen, toluen
Proteinler ve nükleik asitler	DNA, RNA
Antijenler ve antikolarlar	İnsan Ig, anti-insan Ig
Mikroorganizmalar	Virüsler, bakteriler, parazitler



### 2.1.2. Biyosensörlerin özellikleri

Biyosensörleri esas alan analiz sistemlerinin avantaj ve dezavantajlarını belirleyen temel özellikler aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

Biyosensörlerdeki biyoaktif bileşen spesifik ve kararlı olmalıdır. Biyoaktif bileşenin spesifik olması girişim yapabilecek maddeleri içeren karışımların detaylı ön işlem yapılmaksızın analizine imkan verir. Biyoaktif bileşenin kararlı olması çok sayıda analize imkan vereceği için biyosensörün ekonomik olmasına zemin hazırlamaktadır. Biyosensörlerdeki temel reaksiyonun fiziksel koşullardan olabildiğince az etkilenmesi istenir. Bu özellik fiziksel koşulların değişebildiği laboratuvar dışı koşul ve ortamlarda da güvenilir analizlerin yapılabilmesine imkan verir. Biyosensör cevaplarının doğru, duyarlı ve tekrarlanabilir olması büyük önem taşır. Cevap zamanının kısa olması genelde biyosensörlerin tercihli olarak kullanımlarına yol açan en önemli faktörlerden biridir. Biyosensörlerde biyoaktif bileşenin *in vivo* ölçümler için biyoyumlu olması beklenir. Ölçüm ünitesinin ucuz ve taşınabilir olması değişik alanlarda yaygın kullanımına imkan verir.

Biyosensörler düşük maliyette seri olarak büyük miktarlarda üretilebilirler. Özellikle tek kullanımlık şekilde standardize edilebilen biyosensör türleri, kullanım kolaylığını arttırabildiği gibi kullanacak kişilerin de detaylı bir tecrübeye sahip olmasını gerektirmez. Bu nedenle yaygın kullanım olanakları ortaya çıkar.

Biyosensör teknolojileri çeşitli alanlarda pek çok bilim alanındaki bilgi birikimini gelişmeler paralelinde ve gereksinimler doğrultusunda kullanarak çok hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Biyosensörlerin klasik tayin yöntemlerine göre çoğu zaman spesifik ve duyarlı sonuçların pratik ve kısa sürede alınmasını sağlamaları, tekrar kullanılabilir ya da düşük maliyetle tek kullanımlık olarak üretilebilmeleri bu sistemlerin en önemli avantajlarıdır.

## 2.2. Piezoelektrisite ve Kuartz Kristaller

### 2.2.1. Piezoelektrik kavramı

Piezoelektrisite kavramı, ilk kez 1880 yılında Paul Jacques ve Pierre Curie tarafından tanımlanmıştır. Piezoelektrik olguyu bulan Pierre Curie ve Paul Jacques Curie, bazı kristal türlerinin, üzerine bir ağırlık konduğunda ya da eksenleri boyunca sıkıştırıldıklarında, kristalin yüzeyleri arasında bir gerilimin oluştuğunu gözlemlemişlerdir. 'Piezoelektrik etki' adını verdikleri bu olayın keşfini bir yıl sonra da ters piezoelektrik etkinin açıklanması izlemiştir.

Yunancada 'bastırmak' anlamına gelen "piezein" ön ekinden türetilen 'piezoelektrik' kavramı basitçe, üzerine mekanik bir basınç uygulanan bazı kristal ve seramik malzemelerde bir elektriksel gerilimin oluşması olarak tanımlanabildiği gibi; bu ifadenin tam tersi olarak, yüzeyine gerilim uygulandığında kristalin şeklini hafifçe değiştirmesi olarak da tanımlanmaktadır. Bu şekil değişikliği kalıcı değildir. Uygulanan gerilim boyunca kristal, orijinal şekli etrafında titreşmektedir.

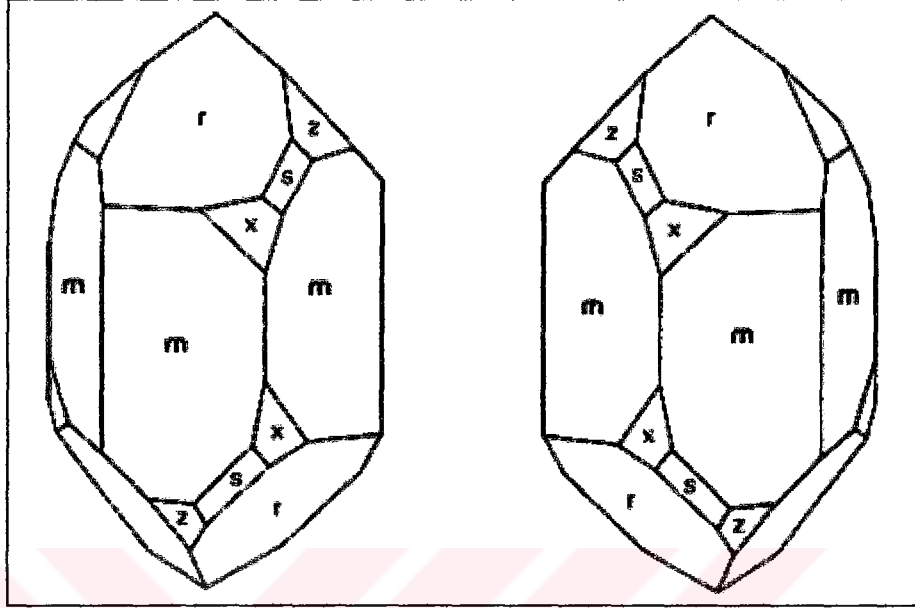
### 2.2.2. Kuartz kristaller

Piezoelektrik özelliğe sahip kuartz,  $\text{SiO}_2$  monokristalidir. Herbir birim hücresi üç tane  $\text{SiO}_2$  molekülünden oluşan kuartz kristali, çoğu kimyasal çözücülerden etkilenmediği gibi, kristal yapısını çok yüksek sıcaklıklara kadar koruyabilmektedir. Kuartz kristalin doğada  $\alpha$ -kuartz ve  $\beta$ -kuartz olmak üzere iki farklı formu bulunmaktadır.  $573^\circ\text{C}$  inversiyon sıcaklığında  $\alpha$ -kuartz,  $\beta$ -kuartza tersinir olarak dönüşmektedir (Faccio vd 1995).  $\beta$ -kuartz, sadece inversiyon noktasının üzerindeki sıcaklıklarda oluştuğu için görebildiğimiz tüm kuartz kristaller  $\alpha$ -kuartz formdadır. Kristalin bu formu,  $573^\circ\text{C}$  sıcaklığına kadar piezoelektrik özelliğini kaybetmeden kararlı olabilmektedir.

Piezoelektrik sensör uygulamalarda yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olması ve suda çözünmemesinden dolayı, kristalin  $\alpha$ -kuartz formu kullanılmaktadır.



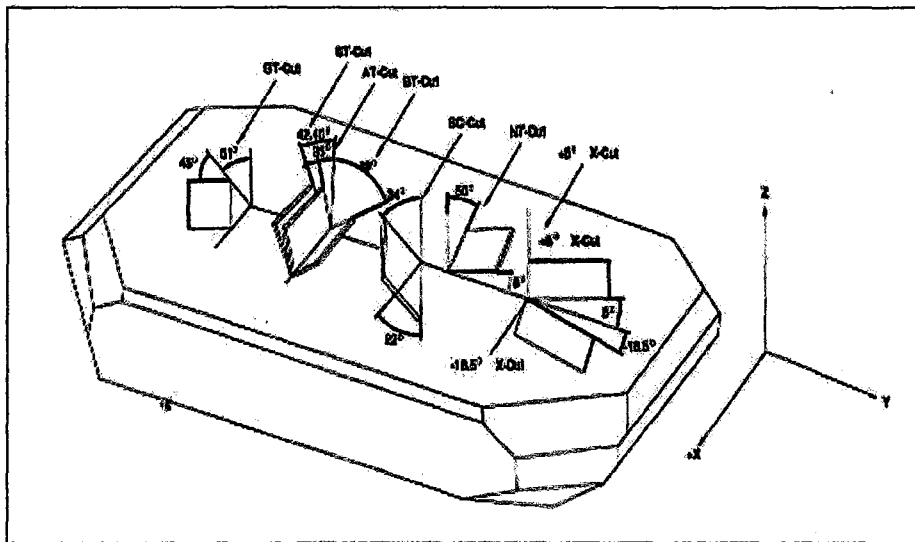
$\alpha$ -kuartz polarize ışık düzlemini sağa veya sola çevirmesine göre, birbirlerinin ayna görüntüsü olan 'sağ ve sol kuartz' olmak üzere iki enantiyomorfik formda bulunmaktadır. Şekil 2.2.'de kuartz kristalin iki enantiyomorfik formu görülmektedir.



Şekil 2.2. Sağ  $\alpha$ -kuartz (solda) ve sol  $\alpha$ -kuartz (sağda) kristal formları

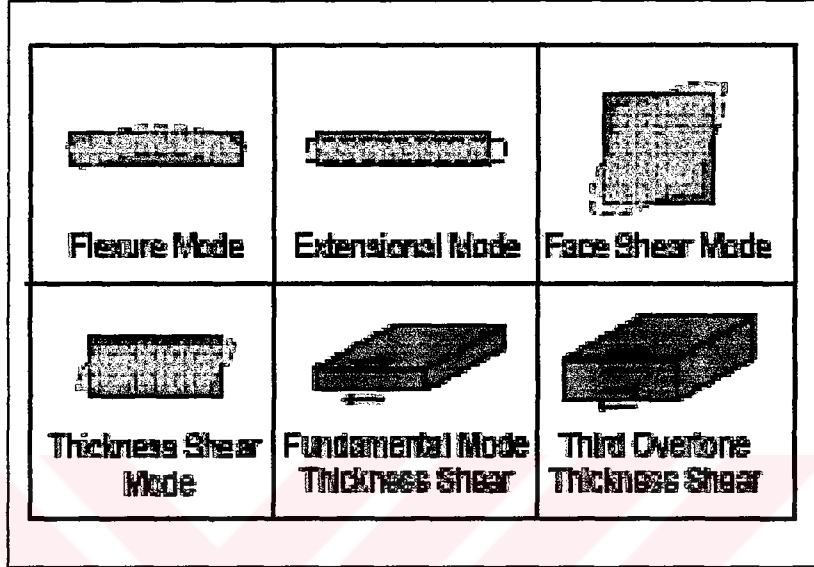
### 2.2.2.1. Kuartz kristal kesim tipleri

Kuartz kristalin farklı açılardan kesimi sonucunda farklı özelliklere ve titreşim modlarına sahip kristal türleri oluşmaktadır. Şekil 2.3.'de kuartz kristal üzerinde farklı açılarda gerçekleştirilen kesimler sonucu oluşan kristal türleri görülmektedir.



Şekil 2.3. Kristal kesim tipleri

SiO<sub>2</sub> kristaline enerji verilecek olursa, kristal belli frekansta ve belli modlarda titreşmeye başlamaktadır (Şekil 2.4.). Kuartz kristallerin titreşim modları, a) eğilme (bending), b) uzama (extension), c) face shear, d) thickness shear'dır (Faccio vd 1995).



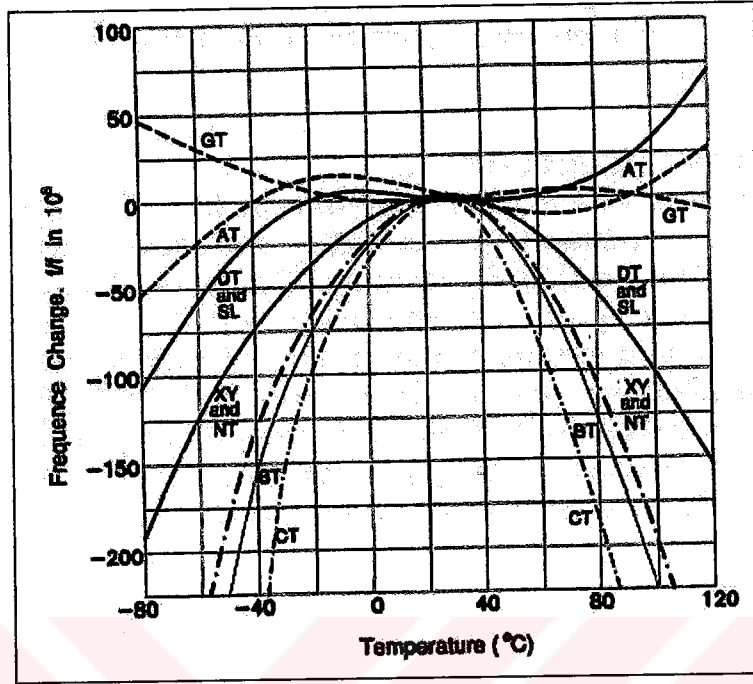
Şekil 2.4. Kuartz kristalin titreşim modları

Thickness shear modunda (TSM) titreşim hareketi kristal yüzeyine paraleldir. Kristalin titreşim frekansı, boyutuna, yoğunluğuna, kesim türüne ve titreşim moduna bağlıdır. Titreşimin thickness shear modu, kütle değişimlerine en hassas moddur. AT ve BT kesim kristaller thickness shear modunda titreşen kristal türleridir. PZ biyosensör çalışmalarında sıcaklık değişimlerinden en az etkilenen kristal türü olan AT kesim kristaller kullanılmaktadır.

#### 2.2.2.2. Kristal kesim tipi ile sıcaklık ilişkisi

Bir kuartz kristalin titreşim frekansı, kristalin yoğunluğuna, kesimine, titreşim moduna ve geometrik boyutuna bağlı olduğu gibi, sıcaklık, basınç ve nem gibi çevresel koşullardan da etkilenmektedir. Bazı piezoelektrik çalışmalarda kristalin frekansının stabil olması son derece önemlidir. Sıcaklık değişimleri kuartz plakının boyutunu ve elastiklik sabitini değiştirmektedir. Şekil 2.5'de farklı tür kristallerin, sıcaklık karşısındaki frekans

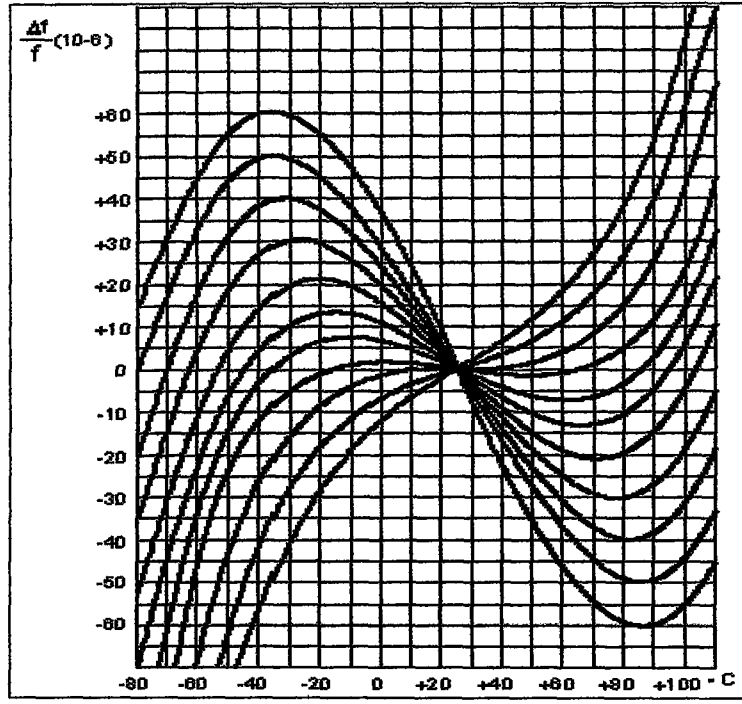
değişimleri görülmektedir. Piezoelektrik uygulamalarda kullanılacak kristalin türü bu özellikler göz önüne alınarak seçilmektedir.



Şekil 2.5. Farklı kristal kesim tipine sahip kristallerin titreşim frekanslarının sıcaklık ile ilişkisi

Kristalin titreşim frekansının sıcaklıkla önemli ölçüde değiştiği H, BT, GT veya CT kesim kristaller, sıcaklık sensörleri gibi uygulamalarda tercih edilmektedir. Piezoelektrik sensör uygulamalarında, kuartz kristallerin mevcut kesim tipleri içinde, sıcaklık değişimlerinden en az etkilenen, oda sıcaklığında en kararlı kristal tipi olan AT-kesim kuartz kristalleri tercih edilmektedir.

Şekil 2.6.'da AT-kesim kristallerin titreşim frekanslarının sıcaklık değişimleri ile ilişkisi görülmektedir.



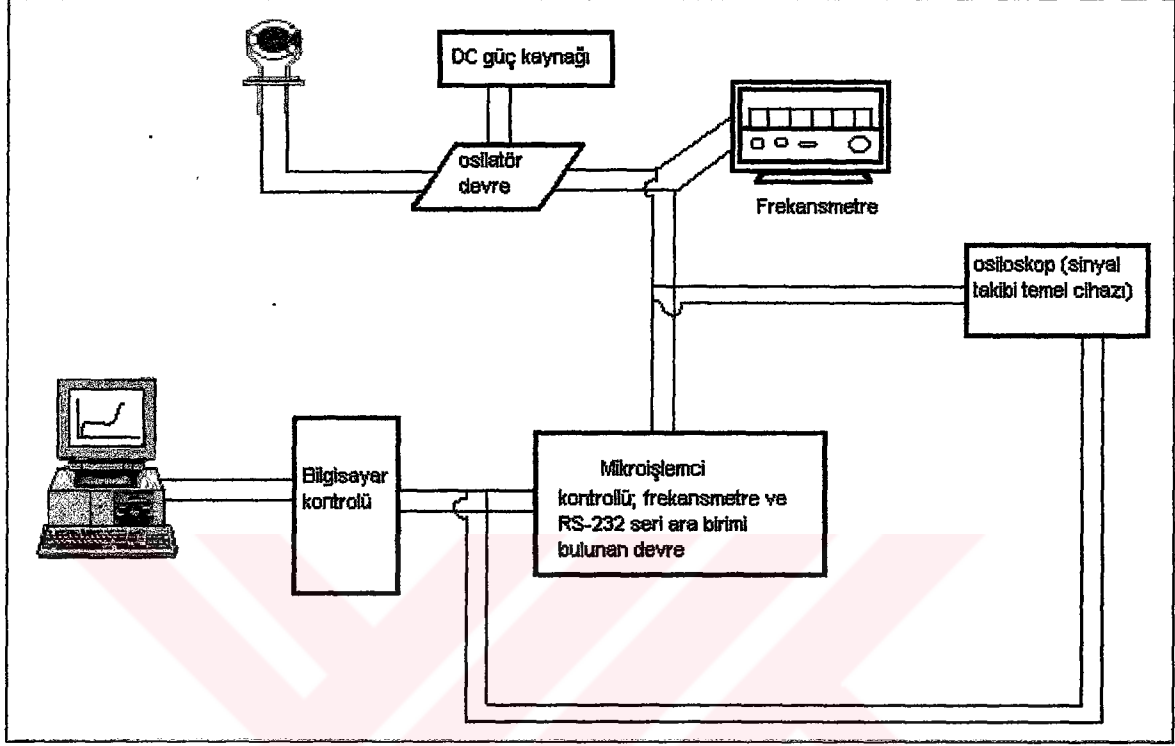
Şekil 2.6. AT-kesim kristallerin titreşim frekansının sıcaklıkla değişimi

### 2.3. Kuartz Kristal Mikrobals Sistemi

Piezoelektrik biyosensörler, kimyasal ve biyolojik sıvılarda bulunan maddelerin analizleri için geliştirilen ve Kuartz Kristal Mikrobals (Quartz Crystal Microbalance, QCM) olarak tanımlanan sistemlerdir. Piezoelektrik biosensör uygulamalarında genellikle analizi yapılacak madde ile spesifik olarak etkileşen materyal PZ kristal yüzeyine immobilize edilir. Kristal üzerine immobilizasyondan dolayı kristalin yüzeyindeki kütle artışı nedeniyle kristalin titreşim frekansı düşer. Kristalin titreşim frekansı ölçülür ve kaydedilir. Kristal, analizi yapılacak maddeyi bulduran ortama yerleştirilir. Analizi yapılacak madde affinite ve adsorpsiyon nedeniyle, kristal yüzeyinde birikir. Meydana gelen kütle artışı kristalin titreşim frekansını tekrar düşürür. Frekans sayıcıda okunan değer ile kristalin sahip olduğu temel frekans değeri arasındaki fark alınarak kristal yüzeyine adsorplanan madde miktarı hesaplanır.

QCM sensör sistemi genel olarak, piezoelektrik kuartz kristaller, kristal yüzeyleri arasına belirli voltta gerilim uygulayan bir güç kaynağı, uygulanan bu gerilim karşısında kristalin titreşmesini sağlayan geri dönüşümlü (feedback) bir osilatör ve frekans ölçümünü gerçekleştirecek bir frekansmetreden oluşmaktadır. Frekansmetre dışında, frekansı elektrik

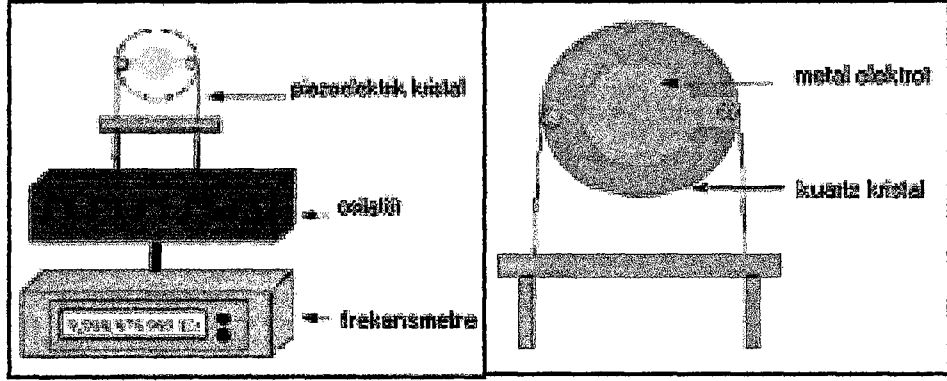
sinyaline dönüştürerek frekans ölçümlerinin bilgisayar ortamında alınmasını sağlayacak F/V dönüştürücüler de QCM sisteminde kullanılabilir.



Şekil 2.7. Piezoelektrik kuartz kristal mikrobalans sistemi deney düzeneği

QCM sisteminde kuartz kristal, iki metal elektrot arasına yerleştirilmiştir. Bu elektrotlar arasına uygulanan gerilim karşısında kuartz kristal belirli bir frekansta titreşmektedir. Kristal yüzeyinde sadece bu elektrotlar arasında kalan bölge piezoelektrik olarak aktiftir. Bu sebeple titreşim elektrot tabakasının olduğu yerde maksimumdur. Kristal üzerinde o bölgeden uzaklaştıkça titreşim hızı bir şekilde azalmaktadır.

Piezoelektrik kuartz kristallerin yüzeylerinde meydana gelen kütle artışı sonucu, belirli şiddette uygulanan gerilim karşısında sahip oldukları titreşim frekanslarında meydana gelen değişim, kristal yüzeyine adsorplanan analitin kütlesine bağlıdır. Analit çözeltisiyle muamele edilen kristalin titreşim frekansındaki değişimin belirlenmesiyle kalitatif analizler yapılabilirken; aynı şartlarda, belirli konsantrasyonlarda hazırlanan analit çözeltileri ile muamele edilen kristalin frekans değişimleri belirlenerek, elde edilen verilerden çizilen, “frekans değişimi-analit konsantrasyonu” grafiğinden yararlanılarak, konsantrasyonu bilinmeyen analitin kantitatif analizi yapılabilir.

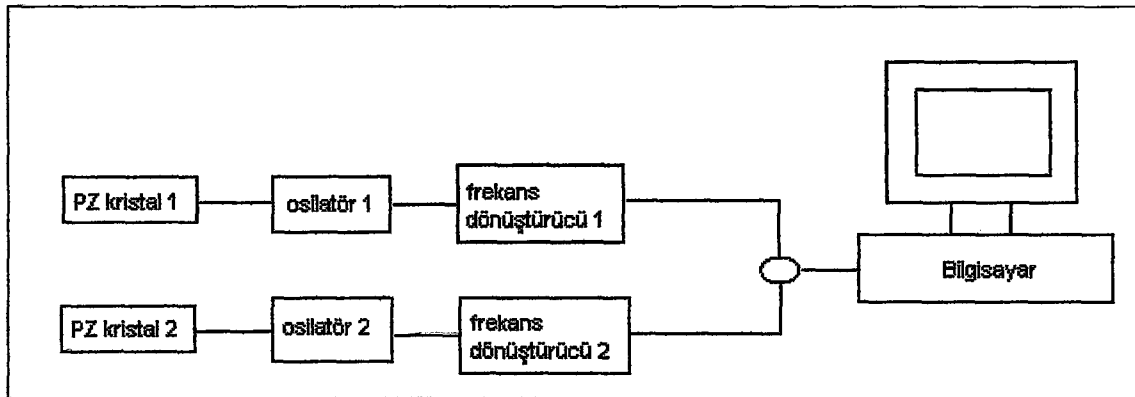


Şekil 2.8. Piezoelektrik sensörler için deney düzeneği ve piezoelektrik kuartz kristal

Bu basit uygulama, QCM çalışmalarında en çok tercih edilen yöntemdir. Öte yandan, tayin edilmek istenen grubu bulunduran ortam da önemlidir. Ortamın gaz, sıvı ve akışkan sıvı olması hallerine göre QCM sisteminin tasarımı farklılık gösterir.

### 2.3.1. Gaz fazındaki analizler için geliştirilen QCM sistemi

QCM, gaz fazında veya sıvı ortamlarda bulunan biyolojik veya kimyasal maddelerin eş zamanlı analizlerinde sıkça kullanılmaktadır. QCM sisteminin deney düzeneğinde bir takım değişiklikler yapılarak, gaz veya sıvı ortamlarda bulunan maddelerin eş zamanlı analizlerinin yapılabilmesine olanak sağlanmıştır. Şekil 2.9'da gaz sensörleri için geliştirilen QCM sisteminin tipik şeması görülmektedir.

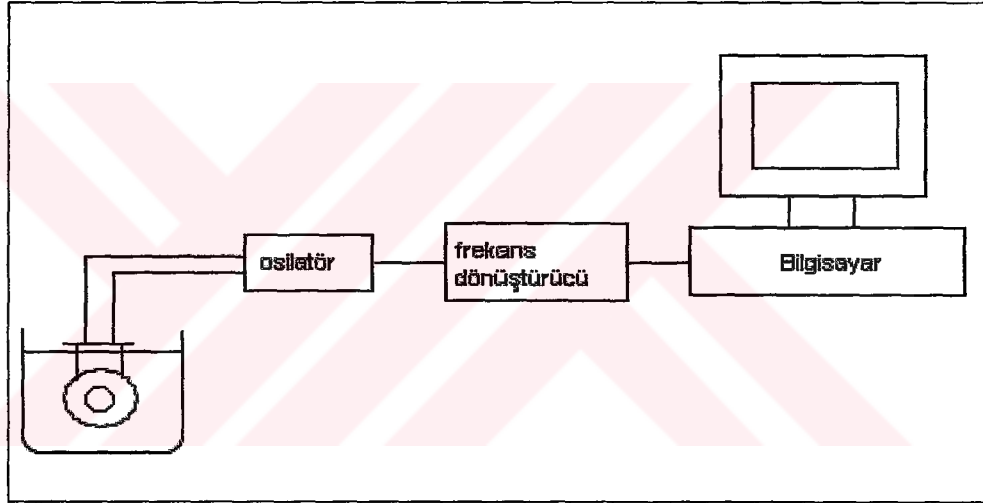


Şekil 2.9. Gaz sensörleri için deney düzeneği

Sistemde sıcaklık ve basınç değişimlerinden kaynaklanan istenmeyen sinyallerin frekans değişimine etkisini azaltmak için, membran ile kaplanmamış ikinci bir kuartz kristal osilatör sistemi ile tamamlanmıştır.

### 2.3.2. Çözelti ortamındaki analizler için geliştirilen QCM sistemi

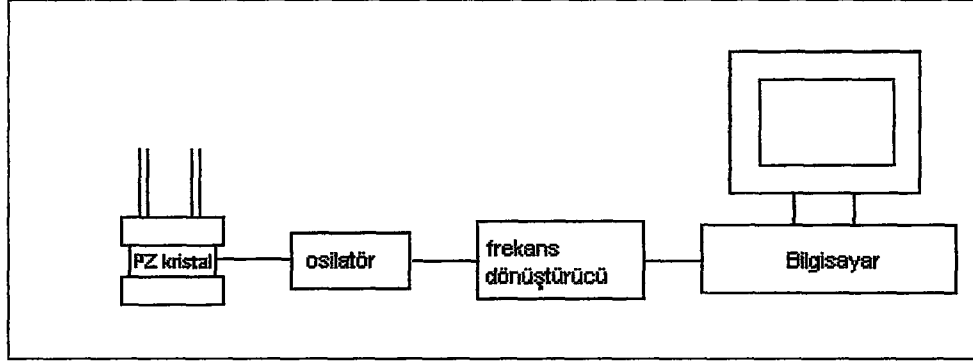
Sıvı sistemlerdeki analizler için ise, iki tip ölçüm sistemi geliştirilmiştir. Şekil 2.10'da görülen QCM sisteminde, PZ kuartz kristal analizi yapılacak maddenin bulunduğu çözelti ortamına daldırılarak, frekans değişimleri ölçülmektedir.



Şekil 2.10. Sıvı sistemler için geliştirilen çalışma düzeneği

Bu sistemde kristalin tamamı iletken çözelti içine daldırıldığında, kristalin her iki elektrodu sıvı ile temas ettiği için meydana gelen kısa devre sonucunda kristal titreşmeyi durdurduğundan frekansı okunamamaktadır. Çözelti ortamında bulunan analitin gaz fazına dönüştürülmesi veya daldırma ve kurutma (dip and dry) yöntemi gibi uzun ve zaman alıcı yöntemlerle çözelti içinde bulunan maddenin analizi gerçekleştirilmektedir (Saber vd 2002). Çözelti içindeki analizlerde karşılaşılan bu problemleri çözmek için, çözelti içine daldırıldığında kristalin titreşmesini engellemeyen osilatör akımının geliştirilmesiyle veya kristalin sadece tek yüzeyinin çözelti ile temas etmesini sağlayacak düzeneğin (şekil 2.11) geliştirilmesiyle bu sorunlara çözüm bulunmuştur. Şekil 2.11'de görülen ikinci QCM sisteminde, kristalin sadece bir yüzeyi sıvı ile temas ederken diğer yüzeyi ise, hava ile temas etmektedir.





*Şekil 2.11. Sıvı sistemler için geliştirilen çalışma düzeni*

Bu sistemde, tamamen çözelti içine daldırılan kristalin bir yüzeyi maske ile kaplanarak yüzeyin çözelti ile teması engellenir. Böylelikle sistem ile eş zamanlı ölçümlerin alınması mümkün olmaktadır. Bu sistemlerde, kristal yüzeyi üzerinde zamanla meydana gelen değişimlerin, kristalin frekans değişimleri incelenerek anında belirlenmesi mümkün olmaktadır.

*Daldırma ve kurutma yöntemi:*

Çözelti içinde bulunan maddelerin analizinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, kristal üzerine immobilize edilen biyolojik olarak aktif materyal ile çözelti içerisinde bulunan analit arasındaki reaksiyon çözelti ortamında gerçekleşirken; kristalin son frekansının ölçümü, kristal çözelti içinden çıkarılıp kurutulduktan sonra havada gerçekleştirilmektedir. Kristalin frekansını ölçmeden önce üzerinde spesifik olmayan bağlanmaların uzaklaştırılması için birkaç kez yıkanmalıdır.

Yöntemde, kristal üzerine immobilizasyon işleminden sonra kristalin frekansı kaydedilir. Ardından PZ kristal, immobilize edilen madde ile çözelti içinde bulunan analitin etkileşmesine olanak sağlayan zaman periyodu boyunca çözelti içine daldırılır. Bu etkileşim fiziksel veya kimyasal adsorpsiyon şeklinde olabilir. PZ kristal çözelti içinden çıkarıldıktan sonra, spesifik olmayan bağlanmaların uzaklaştırılması için yıkanır. Yıkama işleminden sonra kurutulan kristalin titreşim frekansı ölçülerek frekans değişimi hesaplanır.

Çözelti içindeki maddelerin analizleri için geliştirilen daldırma ve kurutma yöntemi zaman alıcı olduğundan ve deney sonuçlarının eş zamanlı olarak belirlenememesinden dolayı pek tercih edilmemektedir. Bu yöntem yerine, osilatör akımının geliştirildiği veya kristalin



sadece tek yüzeyinin sıvı ile temas ettiği sistemlerle, frekans değişimlerinin eş zamanlı olarak belirlenebilmesi mümkün olmaktadır.

#### 2.4. Sauerbrey Eşitliği

Piezoelektrik biyosensörlerde, QCM sisteminin kalbi olarak adlandırılan piezoelektrik kuartz kristallerin her iki yüzeyinde bulunan metal (Au, Ag, Al, Ni, vb.) elektrotlar, uygun bir membran ile kaplanarak analizi yapılacak olan madde ile spesifik olarak etkileşen ligand bu membran üzerine immobilize edilmektedir. Elektrot yüzeyindeki membrana immobilize edilen ligand ile spesifik olarak etkileşen analitin konsantrasyonu ile kristalin titreşim frekansı birbirleriyle ilişkilidir. Kristalin üzerine binen yük ne kadar fazla ise, titreşim frekansı o kadar azalmaktadır. Elektrot yüzeyleri arasındaki kütle artışı ile, thickness shear modunda titreşen AT-kesim kuartz kristalin frekans değişimi arasındaki bağıntı, ilk kez 1959 yılında, Sauerbrey tarafından tanımlanmıştır (Sauerbrey 1959):

$$\Delta F = -2.26 \times 10^6 \times F_0^2 \times (\Delta M/A)$$

Bağıntıda,

$\Delta F$ , frekans farkı, Hz

$\Delta M$ , kristal yüzeyine kaplanan ve kristal yüzeyinde adsorblanan kütle, g

$A$ , kristal yüzey alanı,  $\text{cm}^2$

$F_0$ , kristalin temel titreşim frekansı, MHz'dir.

#### 2.5. Akustik Dalga (Acoustic Wave) Sensörler

Hemen hemen tüm akustik dalga cihazlarında ve sensörlerinde akustik dalga üretmek için piezoelektrik materyaller kullanılır. Akustik dalga sensörleri ve cihazlarında kullanılan piezoelektrik materyaller, kuartz ( $\text{SiO}_2$ ), lityum tantalat ( $\text{LiTaO}_3$ ) ve lityum niyobat

(LiNbO<sub>3</sub>)'tır. Genel olarak piezoelektrik cihazlar hacim akustik dalga (bulk acoustic wave, BAW) ve yüzey akustik dalga (surface acoustic wave, SAW) olmak üzere iki sınıfa ayrılır (Bunde vd 1998).

#### *Hacim akustik dalga sensörler*

BAW sensörler, thickness shear moduna sahip rezonatörlerdir. Bu sebeple TSM olarak adlandırıldıkları gibi, sistemde piezoelektrik kuartz kristaller kullanıldığı için kuartz kristal mikrobalsans olarak da adlandırılmaktadırlar. TSM sistemlerinde kullanılan kristallerin elektrotları arasına uygulanan gerilim, kristalin şekil deformasyonu ile sonuçlanmaktadır. TSM rezonatörlerinde 5-30 MHz arasındaki frekans değerlerinde titreşen kristaller kullanılmaktadır. Üretimi ve kullanımı zor olan daha ince TSM sistemleri ile yüksek frekanslarda çalışabilmek mümkündür.

#### *Yüzey akustik dalga sensörler*

SAW sistemleri akustik sensörlerin tamamen farklı bir sınıfıdır. Sistemde elektrotlar kristalin aynı yüzeyi üzerinde bulunur. SAW sensörlerinde 25-500 MHz frekans değerlerinde titreşen kristaller kullanılmaktadır. Bu sistemlerin sıvı ile temaslarında yüzey dalgalarında aşırı derecede bir azalma meydana gelir. Bu sebeple biyosensör uygulamalarında biyolojik çözeltiler SAW sistemleri için problemler oluşturduğundan, SAW sisteminden daha az hassas olmasına rağmen, QCM sistemi biyosensör uygulamalarında daha sık kullanılmaktadır.

## **2.6. QCM Biyosensörlerinin Hazırlanmasında Temel Kavramlar**

QCM biyosensörlerinin hazırlanmasında ilk işlem, biyomoleküllerin yüzey üzerine immobilizasyonları için kristal yüzeylerinin modifikasyonudur. Modifikasyon basamağı sonucunda, yüzey üzerinde moleküllerin immobilizasyonu sağlayacak, yüksek yoğunlukta fonksiyonel gruplar oluşturulur. Ardından ligantlar, modifiye edilen kristal yüzeyi üzerine çeşitli yöntemler ile immobilize edilir.

### 2.6.1. Kristal yüzeyinin modifikasyonu

Piezoelektrik biyosensör uygulamalarında, ligandın kristal üzerine immobilizasyon işleminden önce, yüzey üzerine immobilizasyon için gerekli fonksiyonel grupların oluşturulması için kristal yüzeyinin modifiye edilmesi gerekmektedir. Modifikasyon işleminden önce, kullanılan yöntemden bağımsız olarak, kristal üzerine immobilizasyonu engelleyebilecek maddelerin kristal yüzeyinden uzaklaştırılması için, elektrot yüzeylerinin uygun yöntemlerle temizlenmesi gerekmektedir. Modifikasyon işlemi, a) polimer kaplama ve b) kimyasal modifikasyon yöntemleri ile yapılmaktadır.

Polimer kaplama yöntemi için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Immobilizasyon için uygun polimer kristal yüzeyine,

- Glow discharge (plazma-yük boşaltma),
- Spin coating (döndürerek kaplama),
- Dipping (daldırma),
- Elektrokimyasal birikme, gibi yöntemler ile kaplanmaktadır.

Kristal yüzeyinin kimyasal modifikasyonunda ise, kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (self-assembled monolayer, SAM) tekniği kullanılmaktadır. Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar, katı bir yüzey (cam veya silisyum oksit) ile moleküler fonksiyonel gruplar arasında meydana gelebilecek bir bağlanma sonucunda, substrat yüzeyi üzerinde belirli bir düzene göre adsorbe olan moleküllerin oluşturduğu tek tabakalardır. Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar, altın üzerinde alkantiyolat tek tabakalar ve alkilsiloksan tek tabakalar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

#### *Altın üzerinde alkantiyol tek tabakalar*

Altın üzerinde alkantiyolat tek tabakalarda, altın yüzey üzerine tiyol çözeltilisinden uzun zincirli alkantiyollerin (RSH, R=X(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, n=11-18) adsorpsiyonuna dayanmaktadır.



Altın yüzey üzerine, alkantiyoller kükürt atomları üzerinden koordine olmaktadır. Alkantiyoller

yüzeye yaklaşık 30°'lik bir açı ile adsorbe olmuşlardır. Farklı tiyol çözeltileri kullanımıyla yüzey üzerinde istenilen fonksiyonel gruplara (X) sahip, dolayısıyla istenilen fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip tek tabakaların oluşturulması mümkündür. Tek tabakalar oluşturulduktan sonra yüzey uygun kimyasallarla modifiye edilerek istenilen özelliklere sahip tek tabakalar oluşturulabilmektedir. Tek tabakanın özellikleri ayrıca, iki veya daha fazla alkantiyol çözeltisi kullanılarak farklı fonksiyonel grupları içeren tek tabakaların oluşturulmasıyla daha fazla kontrol edilebilmektedir.

Alkantiyol tek tabakalar, birkaç ay etanol veya su içerisinde ya da havada kararlı olarak kalmaktadır. 70°C'dan daha yüksek sıcaklıklarda altın yüzey üzerindeki tiyoller desorbe olurken, oksijen varlığında UV ışığa maruz bırakıldıklarında fotooksidize olurlar.

#### *Alkilsiloksan tek tabakalar*

Alkilsiloksan tek tabakalar, alkiltrioklorosilan (veya alkiltrietoksisilan) ile hidrosillenmiş yüzey (cam veya silisyum oksit) arasındaki reaksiyon sonucu oluşturulurlar. Bu tek tabakalar üzerindeki siloksan grupları hem birbirleriyle, hem de yüzey üzerindeki hidroksil grupları ile çarpaz bağlar yapmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı alkantiyol tek tabakalara oranla termal olarak daha kararlıdır. Alkilsiloksan tek tabakaların dezavantajı ise alkantiyol tek tabakalara oranla yapısal olarak daha az sıralı olmalarıdır.

#### **2.6.2. Ligandın modifikasyonu**

İmmobilizasyonun, fonksiyonel gruplar içeren kristal yüzeyi ile ligant arasında meydana gelecek reaksiyon sonucu gerçekleşeceği durumlarda ligant üzerinde fonksiyonel gruplar oluşturmak için ligandın modifikasyonu gerekmektedir. Kullanılan immobilizasyon yöntemine ve kristal yüzeyi üzerindeki fonksiyonel gruplara bağlı olarak ligant modifiye edilir (L-NH<sub>2</sub>, L-COOH, L-CHO, L-SH, L-OH, L-biyotin; L=Ligand). Ligand, immobilizasyon için gerekli fonksiyonel gruplar bulundurmadığında modifiye edilir.

### 2.6.3. İmmobilizasyon yöntemleri

Biyosensör uygulamalarında, immobilizasyon basamağı, analiz sonuçlarının doğru, hassas ve güvenilir bir şekilde elde edilebilmesi bir başka deyişle, kuartz kristal yüzeyinde etkili algılama bölgeleri oluşturulması ve spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi açısından oldukça önemli bir basamaktır. İmmobilizasyon yönteminin, analizi yapılacak madde ile spesifik olarak etkileşecek maddenin aktivitesini, minimum seviyede etkileyecek en uygun immobilizasyon yöntemi olması gerekmektedir. QCM biyosensör uygulamalarında PZ kristal üzerine immobilizasyon için genel olarak dört farklı yöntem geliştirilmiştir. İmmobilizasyon için kullanılan yöntemler:

- Gluteraldehit ile çapraz bağlama,
- Avidin/biyotin etkileşimi ile kovalent bağlama,
- Polimer veya jel yapılı matrikslerin kullanımı,
- Protein A yöntemi,
- Kristal üzerine fiziksel adsorpsiyon, yöntemleridir.

Proteinler, fiziksel veya kimyasal etkilerle kolay denatüre olabilen oldukça hassas biyolojik maddelerdir. Proteinlerin aktivitelerini kaybetmemeleri için, üç boyutlu konformasyonlarının immobilizasyon işlemleri boyunca korunması gerekmektedir. Bu durum, biyosensör uygulamalarında dikkat edilmesi gereken oldukça önemli bir noktadır. Gluteraldehit (GA), çapraz bağlayıcı bir madde olmasından dolayı, özellikle proteinlerin üç boyutlu yapılarının korunmasında oldukça etkili bir reaktiftir. Dolayısıyla, proteinlerin kristal yüzeyi üzerine immobilizasyonunda oldukça sık kullanılmaktadır (Babacan vd 2000).

Fiziksel adsorpsiyon, immobilize edilecek madde ile kristal yüzeyi üzerinde meydana gelen elektrostatik etkileşim sonucunda gerçekleşen bağlanmaya dayanmaktadır. Kristal yüzeyine maddenin direkt fiziksel adsorpsiyonu ile gerçekleştirilen immobilizasyon yöntemi, bir çok çalışmada oldukça basit bir yöntem olması dolayısıyla kullanılmıştır (Zhou vd 2002, Tsai ve Lin 2004). Fiziksel adsorpsiyonun ucuz ve basit bir yöntem olması

gibi avantajlarının yanında; yüzey üzerinde düzenli olmayan bir dağılımın meydana gelmesi, fiziksel olarak adsorbe olan maddelerin yüzey üzerinden kolaylıkla ayrılabilmesi, yüzey üzerinde spesifik olmayan bağlanmaların meydana gelmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlar, yöntemin immobilizasyon çalışmalarında tercih edilmemesine sebep olmaktadır.

Protein A, tek polipeptit zincirinden oluşan, 42000 Da molekül kütlesindeki bakteri hücre duvarı proteindir. Protein A, bir çok immüoglobülin molekülünün Fc bölgesi ile etkileşebilmektedir ve bu özelliğinden dolayı piezoelektrik immünbiosensör çalışmalarında, antikorların immobilizasyon işlemleri için tercih edilen bir proteindir (Zhang vd 2003, Chou vd 2002). Bu immobilizasyon yönteminin dezavantajı ise, protein A'nın, antikorların Fc bölgesi ile olan etkileşiminin spesifik olmaması ve sensörün kullanım ömrünün kısa olmasıdır.

Avidin/biyotin etkileşimine dayanan immobilizasyon yöntemi özellikle piezoelektrik DNA biosensör uygulamalarında tercih edilen bir yöntemdir (Mannelli vd 2003, Minunni vd 2003). Avidin ve biyotin arasındaki etkileşimin afinite sabitinin oldukça yüksek olması, biyotinli ligantın, avidin ile kaplanmış sensör yüzeyine immobilizasyonunun daha etkili olmasını sağlamaktadır. Avidin ve biyotin arasında meydana gelen bağ, pH ve yıkama gibi fiziksel etkilere karşı dayanıklıdır. Bu özellik, bu yöntem ile oluşturulan biosensörlere kararlılık ve kullanım ömürlerinin fazla olması gibi avantajlar sağlamaktadır.

## **2.7. Glikoz Analizlerinin Önemi**

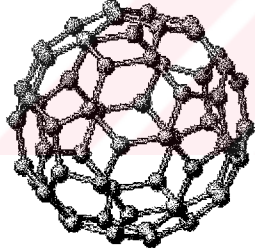
Glikoz insan karbonhidratlarının temel bileşenidir. İnsanlarda kan şekeri düzeyi, kanda bulunan glikoz miktarı olarak adlandırılmaktadır. Sağlıklı bir insanın tokluk kan glikoz seviyesi (70-110 mg/dL) civarındadır. Bu seviye pankreasta salgılanan insülin ve glukagon hormonları ile kontrol edilmektedir. Kan şekeri 70 mg/dL'nin altındaki değerler hipoglisemi (düşük kan şekeri); 180 mg/dL'nin üstündeki değerler hiperglisemi (yüksek kan şekeri) olarak adlandırılmaktadır. Kan glikoz seviyesinin belirlenmesi diyabetin (Diabetes mellitus) teşhisinde büyük bir öneme sahiptir. Diyabet, insülin hormonunun eksikliği, yetersizliği veya etkisizliği nedeniyle hiperglisemi ile birlikte özel komplikasyonlara yol açan bir hastalıktır. Glikoz seviyesinin belirlenmesinde



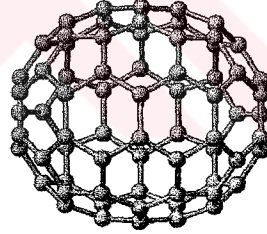
elektrokimyasal, spektrofotometrik, amperometrik, polarimetrik gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin çoğu, zaman alıcı ve maliyetlidir.

## 2.8. Fulleren

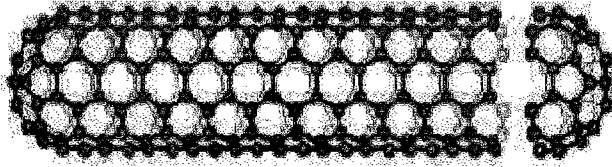
Karbonun bilinen iki allotropu olan grafit ve elmas ek olarak, 1985 yılında karbonun üçüncü allotropu “fullerenler” (Şekil 2.12.), sonraki çalışmalarda ise dördüncü allotropu, “nano-tüpler” (Şekil 2.14) keşfedilip tanımlanmışlardır (Kroto vd. 1985). Yaklaşık olarak  $7 \text{ \AA}$  çapında futbol topu şeklinde yapılar olan fullerenler, 1985 yılında ünlü mimar Buckminster Fuller tarafından keşfedilmiştir. Buckminster fullerenler, ‘bucky balls’ olarak da bilinirler. Bulunduğu tarihten itibaren araştırmacıların oldukça ilgisini çekmiştir ve şu an üzerinde bir çok araştırma yapılmaktadır. Süperiletken özellik gösterdiği bilinmektedir. Kafes içine değişik iyonlar yerleştirilip ilginç elektronik özellikler elde edilmektedir. Kübik bir kristal yapısı vardır. C70, C76 gibi türevleri de mevcuttur. Fulleren C60’daki karbon atomları, 12 adet pentagonal, 20 adet hegzagonal yapıdan meydana gelmiştir.



Şekil 2.12. Fulleren C60



Şekil 2.13. Fulleren C70



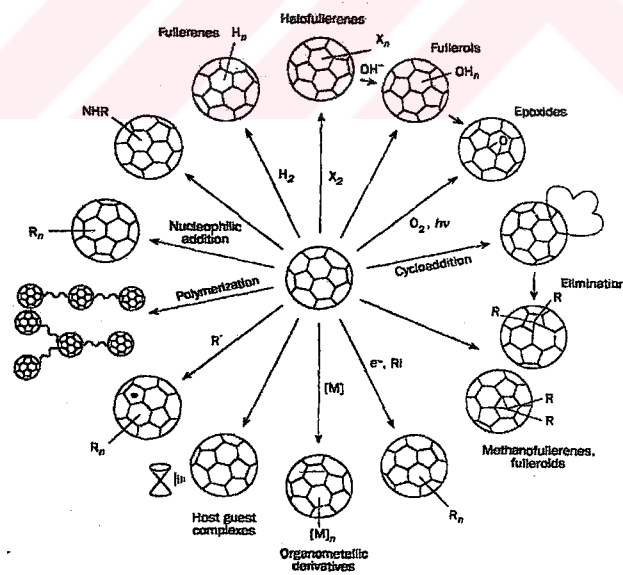
Şekil 2.14. Karbon nanotüp

Nanotüpler konusundaki çalışmalar ve bulgular, 10 yıl gibi kısa sayılacak bir sürede büyük bir gelişme göstermiştir. Nanotüplerin elde edilmesindeki yöntemlerin gelişmesiyle,

istenilen boyut ve şekilde nanotüpler elde edilebilmektedir. Bu konudaki çalışmalarla özellikle teknolojiye kullanım için seri üretim tekniklerinin kısa bir sürede geliştirilmesi beklenmektedir.

Fullerenler (C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>) van der Waals kuvvetleri ile bir arada tutulan, kafes yapısı oldukça rijit moleküler katılardır. Fulleren moleküllerinin serbest hale geçmesi için C-C kovalent bağlarının kırılması gerekmediğinden, çözünme ve buharlaştırma işlemleri daha ılıman koşullarda gerçekleşmektedir. Fullerenler, organik çözücülerde çözünebilir, elektronları iyi delokalize edebildiği ve sınır yüzey formüllerinde elektron boşluğu bulundurduğu için, nükleofilik özelliklerine bağlı olarak başka gruplarla reaksiyon verebilirler (Şekil 2.15).

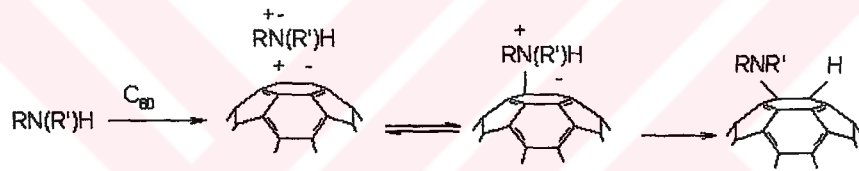
Alternatif malzemeler hazırlamaya duyulan ihtiyaç nedeniyle fullerenler, piezoelektrik özellik gösteren kristallerle de çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda C<sub>60</sub>'ın sahip olduğu 60 π-elektronu da dikkate alınarak piezoelektrik özellik gösteren kristallerde kaplama malzemesi olarak kullanılmış, apolar ve bazı polar organik moleküllerin adsorpsiyonu test edilmiştir (Shih vd. 2001). Diğer taraftan fullerenin, üzerinde iyon seçici olarak davranabilen polar grup bulunduran türevlerinden hazırlanan membranların davranışlarının incelenmesinden elde edilen sonuçlar da oldukça cesaret vericidir (Shih ve Lin 2003). Bu çalışmalar, C<sub>60</sub>'ın bir kimyasal sensör olarak da kullanılabilirliğini göstermektedir.



Şekil 2.15. Genel olarak fullerenin verebildiği reaksiyonlar



Nükleofilik özelliklerine bağlı olarak fullerenler (C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>) primer ve sekonder aminlerle reaksiyon vermektedir (Şekil 2.16). Bu reaksiyonda, birinci basamakta aminden C<sub>60</sub>'a bir elektron transfer edilir, ikinci basamakta pozitif yüklü amin grubu ile C<sub>60</sub> mono anyon radikali arasında yeniden düzenlenme olmaktadır ve yeşil renkli ürünler oluşmaktadır. Son basamakta ise azota bağlı hidrojen C<sub>60</sub>'a aktarılır ve nötral katılma ürünleri oluşur. Tersiyer aminlerin kullanılması halinde sterik rezonans etkisi nedeniyle fulleren-amin katılma ürünleri elde edilememektedir. Ayrıca katılma reaksiyonunda birden fazla amin grubunun fullerene bağlanabildiği de rapor edilmiştir. Örnek olarak, propil amin ile olan reaksiyonda bir C<sub>60</sub> molekülüne, 20 propilamino grubunun bağlı olduğu kütle spektrometresi ile gösterilmiştir [C<sub>60</sub>(C<sub>3</sub>H<sub>9</sub>N)<sub>n</sub>]. Bundan başka fullerenler, -COOH ve -CHO grubu bulunduran bileşiklerle de doğrudan reaksiyon vermektedirler (Hirsch 1994).



**Şekil 2.16.** Fullerenlerin (C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>) primer ve sekonder aminlerle reaksiyonu

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada, kaynağı *Aspergillus niger* olan Tip II sınıfındaki glikoz oksidaz enzimi (GOx;  $\beta$ -D-glikoz; oksijen-1-oksidoredüktaz; E.C 1.1.3.4.) kullanıldı. Sigma'dan temin edilen GOx enzimine ilave bir saflaştırma yapılmadı.

Kaynağı ham yaban turbu (Horseradish crude) olan peroksidaz enzimi (POD; E.C 1.11.1.7), Sigma'dan temin edildi (65 purpurogallin U/mL katı madde). POD çözeltisi, bidestile suda ve mililitresinde 60 ünite purpurogallin bulunacak şekilde enzim aktivitesi deneyi için taze olarak hazırlandı.

o-Dianizidindihidroklorür (% 97; 3,3'-dimetoksi benzin) Aldrich firmasından temin edildi. Enzimatik reaksiyonda boyar madde olarak kullanılmak üzere 2,1 mg, 1 mL bidestile suda çözüldü ve stok çözelti olarak saklandı (3.1 mL'deki konsantrasyonu 0,21 mM).

D-Glikoz, suda üç farklı yapısı denge halinde bulunan, altı karbonlu bir şekerdir. Bu yapılar,  $\alpha$ -anomeri (% 36,5),  $\beta$ -anomeri (% 63,5) ve aldehit formudur (% 0,003) (Okuda ve Miva 1973). Çalışmada kullanılan GOx enzimi (E.C 1.1.3.4),  $\beta$ -D-glikozu büyük ölçüde katalizlediği için, D-glikozun (Sigma, ABD) bidestile suda hazırlanan çözeltisi, mutorotasyonun tamamlanması için bir gün bekletildikten sonra kullanıldı.

Çalışmada kullanılan kitosan [(1 $\rightarrow$ 4) bağlı 2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranoz, düşük viskozite] Sigma'dan temin edildi. Kitosan (% 2 a/h), sodyum klorür (% 0,8 a/h) ve askorbik asitten (% 2 a/h) oluşan polikatyonik çözelti, homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırıldı. Çözünmeyen katı safsızlıkların ayrılabilmesi ve berrak bir çözelti elde edilebilmesi amacıyla bir gece + 4°C'de bekletildi.

Sodyumtripolifosfat ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ) tamponu (pH 7,4; 0,1 M), 0,6 g sodyumtripolifosfat (Sigma) 100 mL serum fizyolojik (bidestile suda % 0,85'lik NaCl çözeltisi) içerisinde çözümlenerek hazırlandı.

Asetat tamponları dört farklı pH'da (pH 3,6, 4,6, 5,1 ve 5,6 ) hazırlanarak kullanıldı: pH 3,6 tamponu (0,05 M), 46,3 mL 0,2 M asetik asit ve 3,7 mL 0,2 M sodyum asetat çözeltilerinden oluşan karışım, bidestile suyla 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. pH 4,6 tamponu (0,05 M), 25,5 mL 0,2 M asetik asit ve 24,5 mL 0,2 M sodyum asetat

çözeltilerinden oluşan karışım, bidestile suyla 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. pH 5,1 tamponu (0,05 M), 12,7 mL 0,2 M asetik asit ve 37,3 mL 0,2 M sodyum asetat çözeltilerinden oluşan karışım, bidestile suyla 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. pH 5,6 tamponu (0,05 M), 4,8 mL 0,2 M asetik asit ve 45,2 mL 0,2 M sodyum asetat çözeltilerinden oluşan karışım, bidestile suyla 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Fosfat tamponları üç farklı pH'da (pH 5,7, 7,4 ve 8,0) hazırlanarak kullanıldı. pH 5,7 tamponu (0,05 M), 93,5 mL 0,2 M monobazik sodyum fosfat ve 6,5 mL dibazik sodyum fosfat çözeltilerinden oluşan karışım, bidestile suyla 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. pH 7,4 tamponu (0,05 M), 19 mL 0,2 M monobazik sodyum fosfat ve 81 mL dibazik sodyum fosfat çözeltilerinden oluşan karışım, bidestile suyla 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. pH 8,0 tamponu (0,05 M), 5,3 mL 0,2 M monobazik sodyum fosfat ve 94,7 mL dibazik sodyum fosfat çözeltilerinden oluşan karışım, bidestile suyla 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Karbonat tamponları iki farklı pH'da (pH 9,2 ve 9,9) hazırlanarak kullanıldı. pH 9,2 tamponu (0,05 M), 4 mL 0,2 M sodyum karbonat ve 46,0 mL 0,2 M sodyum bikarbonat çözeltilerinden oluşan karışım, bidestile suyla 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. pH 9,9 tamponu (0,05 M), 25 mL 0,2 M sodyum karbonat ve 25 mL 0,2 M sodyum bikarbonat çözeltilerinden oluşan karışım, bidestile suyla 200 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

Çalışmada, kristalleri kaplamak için kullanılan fulleren C60 (%99,5; Aldrich) çözeltisi, 1 mg PVC ve 1 mg fullerenin 400 µL toluen çözeltisi içinde çözülmesiyle hazırlandı.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Deney düzeneğinin hazırlanması**

Çalışmada 10 MHz'lik AT-kesim kuartz kristaller, kristal yüzeyleri arasına belirli voltta gerilim uygulayan bir güç kaynağı, uygulanan bu gerilim karşısında kristalin titreşmesini sağlayan bir osilatör ve frekans ölçümünü gerçekleştirecek bir frekansmetre, deney sisteminde ölçülen elektriksel sinyallerinin görüntülenmesinde, dolayısıyla elektriksel sinyallerin takibinde ve tipinin belirlenmesinde kullanmak amacıyla bir osiloskop, osiloskobun ayarlanmasını ve deney sisteminin kontrolünü sağlayacak bir adet frekans jeneratörü, ölçülen frekansın bilgisayara aktarılması veya frekansın voltaja dönüştürülmesi ve voltajın bilgisayara aktarılması için gerekli olan devre kartları (F/V dönüştürücü, RS-232 seri arabirim osilatör, vb.) uygun bir şekilde bağlanarak piezoelektrik sensör sistemi oluşturuldu.

### **3.2.2. Piezoelektrik kristallerin kaplanması**

Çalışmalarda 10 MHz'lik 3.4 mm çapında gümüş elektrotlu AT-kesim kuartz kristaller kullanıldı. Kristallerin kaplanmadan önceki frekansları ( $F_0$ ) kaydedildi. Kristaller farklı miktarlarda fulleren C60 ve fulleren C60/poli (vinil klorür) 'ın toluen içinde 5 dakika sonikasyonu sonrası çözülerek hazırlanan çözeltilerin 2  $\mu\text{L}$ 'si (1  $\mu\text{L}$  + 1  $\mu\text{L}$ ) kristalin her iki elektrot yüzeyi üzerine mikropipet ile damlatılarak kaplandı. Kaplama sonrası oda sıcaklığında çözücünün buharlaşması için birkaç dakika beklendikten sonra, kristallerin frekansı ( $F_1$ ) kaydedildi.

### **3.2.3. Fulleren membranın optimizasyonu**

Çalışmanın ilk aşamasında, piezoelektrik kuartz kristal üzerine kaplanacak fulleren C60 membranının uygun miktarı belirlendi. Fulleren C60 membranının uygun miktarını belirlemek için belli hacimde uygun bir çözücü içinde hazırlanan farklı konsantrasyonlarda fulleren çözeltilerinin 1  $\mu\text{L}$ 'si, fundamental frekansı ( $f_0$ ) ölçülmüş kuartz kristallerin her

iki elektrot yüzeyi üzerine mikropipet yardımıyla damlatılarak, çözücünün buharlaşması için kristal birkaç dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından kurutulan kristallerin frekansı ( $f_1$ ) kaydedildi. Elde edilen verilerle her basamaktaki  $\Delta f$  ( $f_0 - f_1$ ) değerleri hesaplanarak  $\Delta f - \mu\text{g}$  fulleren/kristal grafiği çizildi. Farklı fulleren miktarlarına bağlı olarak frekans değişimleri grafik üzerinde incelenerek, kristal için en uygun fulleren miktarı belirlendi.

#### **3.2.4. Uygun matriks (PVC) miktarının seçimi**

Fulleren için çalışma aralığı belirlendikten sonra, fullerenin kristal yüzeyinde daha uzun süre kalmasını sağlayacak poli(vinil klorür) matriksinin uygun kaplama miktarı belirlendi. Çalışma için en uygun PVC miktarının, fullereni ne çözelti ortamında kristal yüzeyinde tutamayacak kadar az, ne de fullerenin ligand ile etkileşmesini engelleyecek kadar çok olmamasına çalışıldı. Kaplama çalışmalarında kullanılan fulleren miktarı kadar PVC kullanıldı.

#### **3.2.5. Yüzey topografisinin incelenmesi**

Fulleren ve fulleren/PVC kaplanmış yüzeylerin topografisi, AFM (*atomic force microscopy*) tekniği kullanılarak incelendi. Bu amaçla, havada temas modunda çalışan bir TopoMetrix TMX 2000 Explorer model AFM kullanıldı. Bu işlemler için yüzeyler, 1 mg C60 ve (1+1) mg C60/PVC içeren, 2 mL'lik çözeltilerle kaplandı. Yüzeyler, 20x20  $\mu\text{m}$  ile 150x150  $\mu\text{m}$  aralığında değişen tarama ve 1 nN ile 5 nN kuvvet aralıklarında incelendi.

#### **3.2.6. Glikoz oksidaz enziminin immobilizasyonu**

Glikoz oksidaz enziminin kristal yüzeyi üzerine kontrolsüz olarak adsorpsiyonunu engellemek için tüm çalışmalar boyunca, kitosan küreler içerisine immobilize edilen GOx kullanıldı. Immobilizasyon işleminde, 500  $\mu\text{L}$  asetat tamponu (pH: 5,1; 0,05 M) içerisinde 40 mg GOx enzimi (GOx; E.C 1.1.3.4) çözülerek hazırlanan çözelti, % 2 askorbik asit içeren 10 mL kitosan çözeltisi ile karıştırıldı. Karışım +4°C'de 5 dakika vortekslendikten

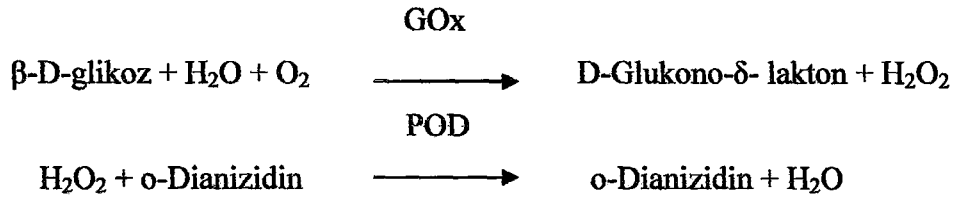
sonra, 22 G uçlu bir enjektör içerisine konularak, damlalar halinde sodyumtripolifosfat çözeltisi içerisine +4°C’de ilave edildi. Oluşan küreler manyetik karıştırıcı yardımıyla, 15 dakika kadar karıştırıldı. Sonuçta çapı 900-1400 µm aralığında olan küreler elde edildi. Oluşan küreler immobilize olmayan GOx enziminin ortamdan uzaklaştırılması için bidestile suda 4-5 kez yıkandı. İmmobilize GOx bidestile su içerisinde 4°C’de saklandı.

### 3.2.7. Glikonik asitin oluşturulması ve kristallerle etkileştirme

Asetat tamponu (pH: 5,1; 0,05M) ve belli miktar β-D-glikoz içeren reaksiyon karışımı, 35°C’de 10 dakika ön inkübasyonda tutulduktan sonra reaksiyon ortamına immobilize GOx enzimi ilave edilerek enzimatik reaksiyon başlatıldı. İnkübasyon süresinin sonunda enzim, reaksiyon ortamından alınarak reaksiyon sonlandırıldı. Kaplı kristaller glikonik asit içeren reaksiyon çözeltisi içerisinde 1 dakika bekletildi. Islak kristaller kurumaları için oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi.

### 3.2.8. Serbest glikoz oksidaz aktivitesinin belirlenmesi

GOx’ın enzimatik aktivitesi kolorimetrik bir yöntemle spektrofotometrik olarak ölçüldü. Aktivite ölçümü ile ilgili enzimatik reaksiyonlar aşağıda verilmiştir.



Glikoz oksidaz (oksijen 1-oksidoredüktaz E C.1.1.3.4), β-D-glikozu moleküler oksijen varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve D-glikonik asite dönüştürmektedir. 31 mg/mL β-D-glikoz, 0,21 g/mL o-dianizidin ve peroksidaz (POD) enzimi içeren 3,1 mL reaksiyon çözeltisi (0,05 M asetat tamponu; pH 5,1), 10 dakika 35°C’de ön inkübasyonda tutulduktan sonra, GOx enzimi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. İnkübasyon süresi olarak seçilen 4 dakikanın sonunda 500 nm’de absorbans değerleri okundu.



### 3.2.9. Glikonik asidin C60 kaplı PZ-QCM ile tayini

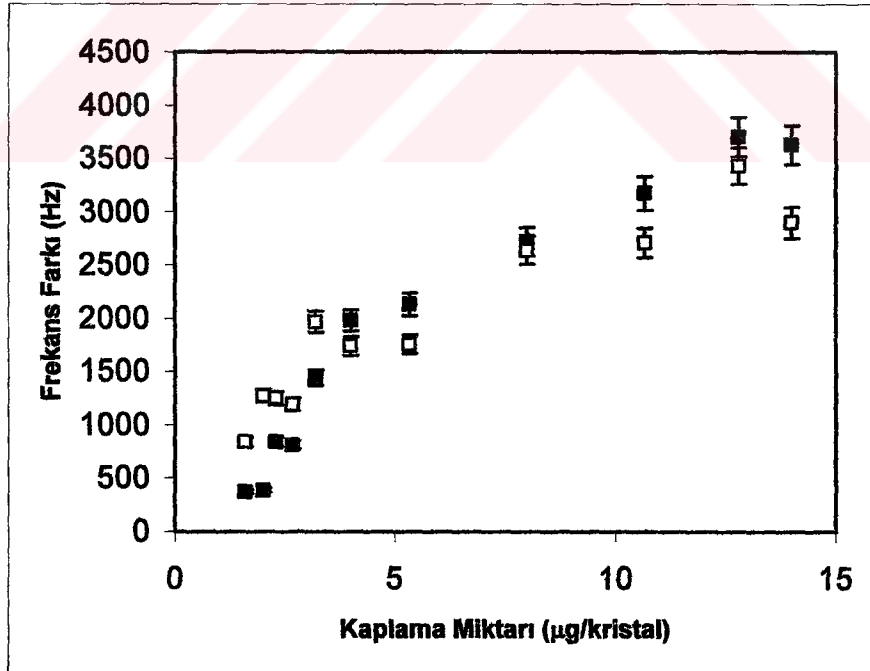
Çalışmada 0,05 M asetat tamponu (pH 5,1) içerisine  $\beta$ -D-glikoz ilave edilerek 10 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında immobilize glikoz oksidaz reaksiyon ortamına ilave edilerek enzimatik reaksiyon başlatıldı. Reaksiyonun dördüncü dakikasında, immobilize GOx ortamdaki uzaklaştırılarak enzimatik reaksiyon durduruldu. Çalışmada kullanılacak kristallerin kaplanmadan önceki ve kaplandıktan sonraki frekansları kaydedildi. Kaplı kristaller glikonik asit içeren reaksiyon çözeltisi içerisine daldırılarak birer dakika bekletildi. Kristaller oda sıcaklığında kurutulduktan sonra frekans değişimleri belirlenerek glikonik asitin analizi gerçekleştirildi.



#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. C60 ve C60/PVC Membranları İçin Çalışma Aralıklarının Belirlenmesi

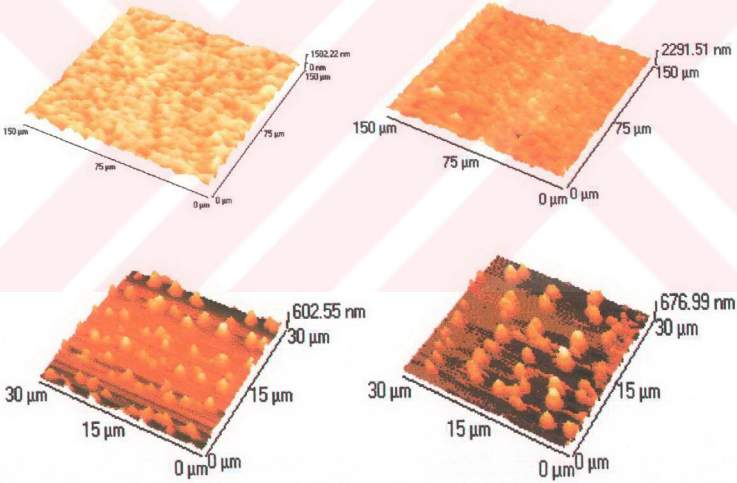
Çalışmalarda 10 MHz'lik 3,4 mm çapında gümüş elektrotlu AT-kesim kuartz kristaller kullanıldı. Kristallerin kaplanmadan önceki frekansları ( $F_0$ ) kaydedildi. Kristaller farklı miktarlarda fulleren C60 ve fulleren C60/poli (vinil klorür) 'ün toluen içinde 5 dakika sonikasyonu sonrası çözülerek hazırlanan çözeltilerin 2  $\mu\text{L}$ 'si (1  $\mu\text{L}$  + 1  $\mu\text{L}$ ) kristalin her iki elektrot yüzeyi üzerine mikropipet ile damlatılarak kaplandı. Kaplama sonrası oda sıcaklığında çözücünün buharlaşması için birkaç dakika beklendikten sonra, kristallerin frekansı ( $F_1$ ) kaydedildi. Kristallerin frekans değişimleri ( $\Delta f = F_0 - F_1$ ), her bir kaplama miktarı için ayrı ayrı hesaplanarak kristal üzerindeki kaplama miktarı ile frekans değişimini gösteren grafik elde edildi (Şekil 4.1.). Böylece 10 MHz'lik PZ kristallerin fulleren C60/PVC için çalışma aralığı 2-14  $\mu\text{g}$ /kristal olarak belirlendi. Elde edilen bu veriler sonucunda PZ kristaller için en uygun kaplama miktarı 5  $\mu\text{g}$  C60-5  $\mu\text{g}$  PVC/kristal seçildi.



Şekil 4.1. Kuartz kristalin kaplama konsantrasyonu (çalışma aralığı): C60 için (■), C60/PVC için (□).

## 4.2. AFM ile Yüzey Topografilerinin İncelenmesi

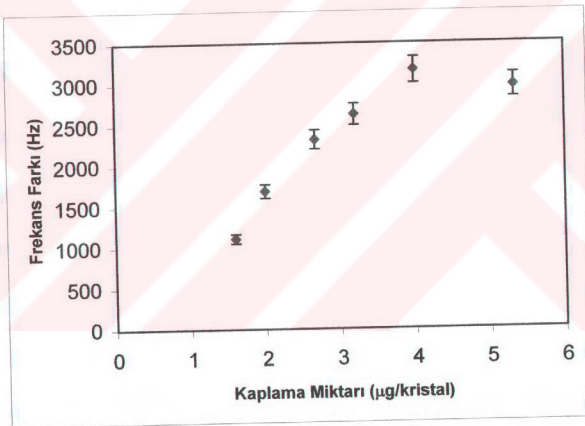
Kaplama topografisini ve yüzey morfolojisini incelemek için fulleren C60 ve fulleren C60/PVC ile kaplanan cam ve kristal yüzeyleri üzerinde AFM (Atomic Force Microscopy) çekimleri yapıldı. Şekil 4.2'de C60 kaplı PZ kristal, C60 ve C60/PVC kaplı cam yüzeylerin çekilen AFM görüntüleri görülmektedir. PZ kristal yüzeyi gözenekli bir yapıya sahip olduğu için C60 kaplı kristal yüzeyinden elde edilen AFM görüntüleri yüzey topografisinin incelenmesi için tercih edilmedi. Bu sebeple C60 ve C60/PVC için AFM çekimleri parlatılmış cam yüzey üzerinde alındı. Cam yüzey üzerinde yer alan C60 kümelerinin boyutu yaklaşık olarak 1000-2000 nm gözlenirken, C60/PVC için ise 2000-3000 nm olarak gözlemlendi.



**Şekil 4.2.** AFM görüntüleri: Boş kristal yüzeyi (sol üstte), C60-kaplı kristal yüzeyi(sağ üstte), C60-kaplı cam yüzey (sol altta) ve C60/PVC-kaplı cam yüzey (sağ altta).

### 4.3. Kaplama Miktarının Etkisi

Farklı miktarlarda fulleren C60/PVC ile kaplanan PZ sensör ile aynı konsantrasyonda glikoz kullanılarak oluşan glikonik asitin belirlenmesi üzerine kaplama miktarının etkisi incelendi. Kaplanmadan önceki frekansları ölçülen kristaller, farklı miktarlardaki C60/PVC içeren çözeltilerle kaplanarak frekans değişimleri kaydedildi. Kristallerin her biri, aynı konsantrasyonda glikonik asit içeren reaksiyon çözeltisinin içerisinde birer dakika bekletilerek, oda sıcaklığında kurumaya bırakıldıktan sonra PZ kristallerin son frekansları ölçüldü. Fulleren membran kullanılarak hazırlanan kristallerin seçiciliğini test etmek amacıyla, yapılan işlemlere paralel olarak kaplanmamış kristal ile aynı işlemler tekrar edildi.

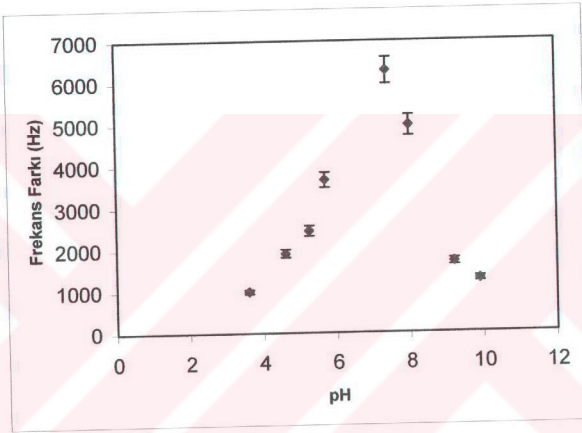


**Şekil 4.3.** Kaplama kalınlığının PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkisi (immobilize GOx, D-glikoz, 37°C).

### 4.4. pH Etkisi

Farklı pH'larda (3,6, 4,6, 5,6, 5,7, 7,4, 8,0, 9,2, 9,9) gerçekleştirilen enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan glikonik asitin PZ glikonik asit sensörü ile belirlenmesi üzerine pH'nın etkisi incelendi. Farklı pH'larda gerçekleştirilen enzimatik reaksiyon sonucunda ortamda

oluşan glikonik asit, en uygun kaplama miktarı (5 µg C60-5 µg PVC/kristal) olarak seçilen miktar ile kaplanan kristaller ile belirlendi. Kristallerin kaplanmadan önceki ve kaplandıktan sonraki frekansları ölçülerek frekans değişimleri kaydedildi. C60 kaplı PZ kristaller reaksiyon çözeltileri içerisine daldırılarak birer dakika beklendikten sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan kristallerin son frekansları ölçülerek frekans değişimleri kaydedildi. Fulleren membran kullanılarak hazırlanan kristallerin seçiciliğini test etmek amacıyla, yapılan işlemlere paralel olarak kaplanmamış kristal ile aynı işlemler tekrar edildi.

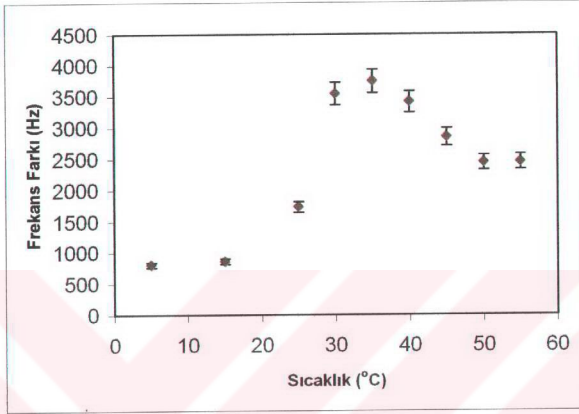


*Şekil 4.4. PH'ın PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkisi (immobilize GOx, D-glikoz, 37°C).*

#### 4.5. Sıcaklığın Etkisi

Çalışmada aynı miktarda glikozun kullanıldığı enzimatik reaksiyon farklı sıcaklıklarda (5, 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55°C) gerçekleştirilerek oluşan glikonik asidin C60 kaplı PZ kristaller ile belirlenmesi incelendi. Çalışmada kullanılacak kristallerin kaplanmadan önceki frekansları kaydedildikten sonra, uygun miktardaki C60/PVC ile kaplanarak frekansları kaydedildi. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen enzimatik reaksiyon sonucu, glikonik asit içeren reaksiyon çözeltisi içerisinde, C60 kaplı kristaller birer dakika bekltilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan kristallerin frekansları ölçülerek

son frekansları kaydedildi. Fulleren membran kullanılarak hazırlanan kristallerin seçiciliğini test etmek amacıyla, yapılan işlemlere paralel olarak kaplanmamış kristal ile aynı işlemler tekrar edildi.



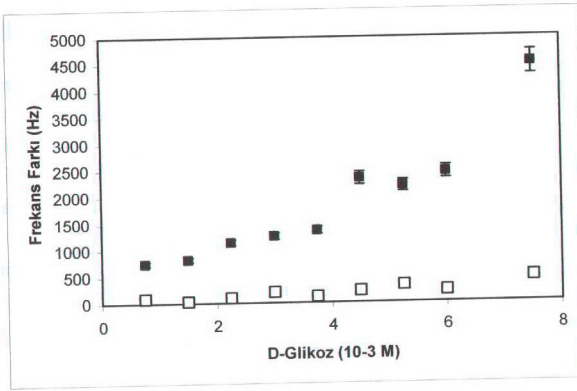
Şekil 4.5. Sıcaklığın PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkisi (immobilize GOx,  $\beta$ -D-glikoz).

#### 4.6. Glikonik Asit Konsantrasyonunun Etkisi

Çalışmada 0,05 M asetat tamponu içerisine farklı konsantrasyonlarda  $\beta$ -D-glikoz ilave edilerek enzimatik reaksiyon gerçekleştirildi.

Glikozun, glikoz oksidaz ile oksidasyonu sonucunda oluşan farklı konsantrasyonlardaki glikonik asiti içeren reaksiyon çözeltileri içerisinde aynı miktar C60/PVC kaplı PZ kristaller birer dakika bekletilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan kristallerin son frekansları ölçülerek frekans değişimleri hesaplandı. Şekil 4.6'da da görüldüğü gibi glikoz konsantrasyonu ile kristallerin frekans değişimleri arasında doğrusal bir ilişki belirlendi. Fulleren membran kullanılarak hazırlanan kristallerin seçiciliğini test etmek amacıyla, yapılan işlemlere paralel olarak kaplanmamış kristal ile aynı işlemler tekrar edildi.

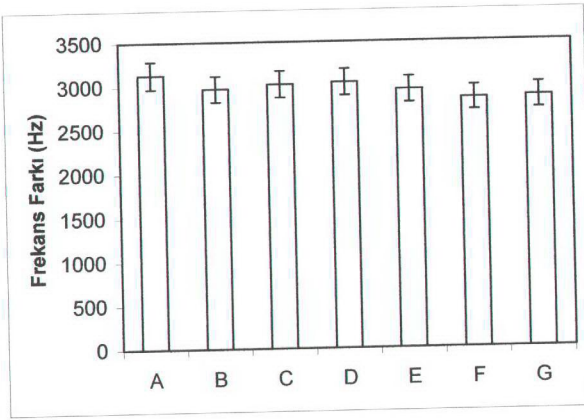




**Şekil 4.6.**  $\beta$ -D-Glikoz konsantrasyonunun C60/PVC kaplı (\*) ve boş kristalin (°) frekans değişimi üzerine etkisi

#### 4.7. Girişim Etkisi Yapabilecek Maddelerin Etkisi

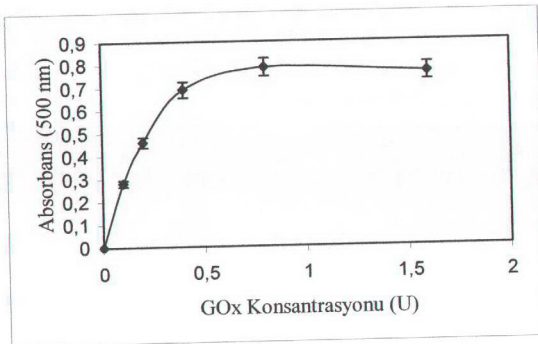
PZ sensörün seçiciliğini incelemek için 0,05 M asetat tamponu içerisinde glikozun glikoz oksidaz ile verdiği enzimatik reaksiyon, ortamda glikoz yanında, insan kanında bulunan askorbik asit, üre, aseton, etanol, amonyak gibi maddeler varlığında gerçekleştirildi. Reaksiyonlar sonucunda ortamda glikonik asit yanında girişim etkisi yapabilecek maddelerin bulunduğu reaksiyon çözeltileri içerisinde kaplı kristaller ayrı ayrı daldırılarak birer dakika bekletildi. Kristaller oda sıcaklığında kurutulduktan sonra son frekansları ölçülerek frekans değişimleri kaydedildi. Fulleren membran kullanılarak hazırlanan kristallerin seçiciliğini test etmek amacıyla, yapılan işlemlere paralel olarak kaplanmamış kristal ile aynı işlemler tekrar edildi.



**Şekil 4.7.** D-Glikoz içeren reaksiyon çözeltisi içerisinde bulunan bazı organik ve inorganik maddelerin PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkileri. (A)  $5 \times 10^{-3}$  M D-Glikoz, (B)  $5 \times 10^{-3}$  M D-Glikoz ve  $2 \times 10^{-4}$  M sistein, (C)  $5 \times 10^{-3}$  M D-Glikoz ve  $2 \times 10^{-4}$  M askorbik asit, (D)  $5 \times 10^{-3}$  M D-Glikoz ve  $2 \times 10^{-4}$  M üre, (E)  $5 \times 10^{-3}$  M D-Glikoz ve  $10^{-3}$  M aseton, (F)  $5 \times 10^{-3}$  M D-Glikoz ve  $10^{-3}$  M etanol, (G)  $5 \times 10^{-3}$  M D-Glikoz ve  $10^{-3}$  M  $\text{NH}_4^+$

#### 4.8. Serbest Glikoz Oksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

31 g/mL  $\beta$ -D-glikoz, 0,21 g/mL o-dianizidin ve peroksidaz (POD) enzimi içeren 3,1 mL reaksiyon çözeltisi (0,05 M asetat tamponu; pH 5,1), 10 dakika  $35^\circ\text{C}$ 'de ön inkübasyona tutulduktan sonra, GOx enzimi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. İnkübasyon süresi olarak seçilen 4 dakikanın sonunda 500 nm'de absorbands değerleri okundu.



**Şekil 4.8.** Serbest glikoz oksidaz aktivitesinin belirlenmesi

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, glikozun glikoz oksidaz ile moleküler oksijen varlığında oksidasyonu sonucunda oluşan glikonik asitin belirlenmesi amacıyla fulleren C60 ile kaplı 10 MHz'lik AT-kcsim kristallerin kullanıldığı QCM sistemi geliştirildi. İlk olarak çalışmada kullanılacak PZ kristaller farklı miktarlarda fulleren C60 ve C60/PVC ile kaplanarak kristallerin bu membranlar için çalışma aralıkları belirlendi (Şekil 4.1). Kristaller için en uygun kaplama miktarı seçilirken, kristalin hassasiyetini arttırmak için düşük miktarlardaki kaplamalar tercih edilmedi. Yüksek değerlerdeki kaplama miktarlarında ise, kaplamadan kaynaklanan frekans düşüşünün yanısıra; yüzey üzerinde gerçekleşen glikonik asit birikiminden kaynaklanan, aşırı frekans düşüşü gözlemlendi ve dolayısıyla kristal yüzeyinde fazla miktarda madde birikiminden dolayı, kristalin titreşim frekansı okunamadı. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak, kristaller için en uygun kaplama miktarı 5 µg C60/kristal olarak belirlendi.

Fulleren C60 molekülü yapı itibarıyla 60 tane  $\pi$ -elektronuna sahip olmasından dolayı glikonik asit gibi nükleofilik özellik gösteren maddeler ile reaksiyona girmektedir. Bunu test etmek için C60/PVC ile kaplı PZ kristaller, glikozun katalitik oksidasyonu sonucunda oluşan glikonik asit çözeltisi içersine daldırılarak, kristalin frekans değişimi belirlendi. 1,5-4,0 µg C60-PVC/kristal konsantrasyon aralığında kaplanan kristaller ile anlamlı sonuçlar elde edildi. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi kaplama miktarı arttıkça C60 ile etkileşen glikonik asit miktarı arttığından kristallerin frekans değişimleri de artış gösterdi.

C60 ve C60/PVC ile kaplı PZ kristal üzerinde alınan AFM ölçümleri, kristal yüzeyinin oldukça gözenekli olmasından dolayı, kaplama topografisinin ve morfolojisinin incelenmesi için sağlıklı sonuçlar vermedi. Bu sebeple, C60 ve C60/PVC, parlatılmış cam yüzey üzerine kaplanarak, AFM çekimleri bu yüzeyler üzerinde gerçekleştirildi. Cam yüzey üzerindeki AFM görüntüsünde, C60'ın yaklaşık 1000-2000 nm boyutunda, 600-700 nm uzunluğunda küresel agregatlar halinde homojen bir şekilde dağıldığı görüldü. Kristal kaplama malzemesi olarak fullerenin seçilmesiyle ilgili olarak yaptığımız ön denemelerde, fullerenin yüzeye homojen dağılmış 1000-2000 nm'lik kümeler halinde kaplandığını gözlemlendi (Şekil 4.2). Nükleofilik güce bağlı olarak verdiği reaksiyonlar da dikkate alındığında fullerenin, iyi bir kaplama malzemesi ve adsorplayıcı olduğu belirlendi.

Analizler süresince, kaplanmamış kristal ile, aynı işlemler tekrar edilerek, fulleren membran kullanılarak hazırlanan kristallerin seçiciliği test edildi. Çalışmalarda, yapılan analiz işlemlerine paralel olarak, kaplı kristaller ile yapılan tüm işlemler, kaplanmamış kristal ile tekrar edildi. Çalışmalar sonucunda boş kristallerin frekans değişimleri kaydedildi ve boş kristalin frekansında hemen hemen bir değişimin olmadığı belirlendi. Sonuçlar neticesinde, glikonik asidin, sadece fulleren membran ile kaplı kristaller üzerine adsorbe olduğu belirlendi.

Şekil 4.4'de görüldüğü gibi enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH değeri olan 7.4'de maksimum frekans değişimi gözlemlendi. Bu pH değerinden daha asidik ve daha bazik ortamlarda ölçülen frekans değişimleri pH 7.4'de belirlenen frekans değişiminden daha düşük olduğu belirlendi.

Şekil 4.5'de görüldüğü gibi, 10-37°C arasındaki sıcaklıklarda, PZ kristallerin frekans değişiminde sıcaklıkla bir artış belirlenirken, 37°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda frekans değişimlerinin sıcaklıkla azaldığı gözlemlendi. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık olan 37°C sıcaklıkta maksimum frekans değişimi gözlemlendi.

1,5-6,0x10<sup>-3</sup> M aralığında konsantrasyonlarda β-D-glikoz kullanılarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda, β-D-glikoz konsantrasyonu ile kristalin frekans değişimi arasında lineer bir ilişki elde edildi (Şekil 4.6). Bu değer insan kan glikoz seviyesinin (50-300 mg/dL) ölçülebilen aralığına denk gelmektedir. Deneyler boyunca, kaplanmamış kristaller negatif kontrol deneyleri için kullanılarak, boş kristallerin frekansında bir değişim olmadığı belirlendi.

Şekil 4.7'de frekans değişimlerinden de anlaşılacağı gibi, ortamda girişim etkisi yapabilecek maddeler varken, kaplı kristaller ile aynı koşullarda analizler gerçekleştirildi ve her bir ortamda gerçekleştirilen analizler sonucunda kristallerin frekans değişimleri kaydedildi ve hesaplanan frekans değişimlerinin hemen hemen aynı olduğu, dolayısıyla C60 kaplı PZ kristallerin sadece glikonik asite cevap verdiği belirlendi.

Tüm bu çalışmalar sonucunda, C60 kaplı PZ-QCM sisteminin, glikozun oksidasyon ürünü olan glikonik asitin belirlenmesi için uygun bir sistem olduğu anlaşıldı.



## KAYNAKLAR

- Babacan, S., Pivarnik, P., Letcher, S., Rand, A. G. 2000. Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. *Biosensor & Bioelectronics*, 15; 615-621.
- Bunde, R. L., Jarvi, E.J., Rosentreter, J.J. 1998. Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta*, 46; 1223-1236.
- Chang, M. S. and Shih, J. S. 2000. Fullerene-cryptand-coated piezoelectric crystal membrane glucose enzyme sensor. *Sensors and Actuators B*, 67; 275-281.
- Chao, Y. C. and Shih, J. S. 1998. Adsorption study of organic molecules on fullerene with piezoelectric crystal detection system. *Analytica Chimica Acta*, 374; 39-46.
- Chuang, C. W. and Shih, J. S. 2001. Preparation and application of immobilized C60-glucose oxidase enzyme in fullerene C60-coated piezoelectric quartz crystal glucose sensor. *Sensors and Actuators B*, 81; 1-8.
- Chou, S. F., Hsu, W. L., Hwang, J. M., Chen, C. Y. 2002. Determination of  $\alpha$ -Fetoprotein in human serum by a quartz crystal microbalance-based immunosensor. *Automation and Analytical Techniques*, 48:6; 913-918.
- Duman, M., Saber, R., Pişkin, E. 2003. A new approach for immobilization of oligonucleotides onto piezoelectric quartz crystal for preparation of a nucleic acid sensor for following hybridization. *Biosensor & Bioelectronics*, 18; 1355-1363.
- Faccio, M., Feri G., Mancini F., Di Rosa P. 1995. Resonating quartz sensors. *Sensors for Domestic Applications*. Eds. D'Amico A. And Sberveglieri G., WSP, Italy, pp.71-86.
- Gizeli, E., Liley, M., Lowe, C.R., Vogel, H. 1997. Antibody binding to a functionalized supported lipid layer: a direct acoustic immunosensor. *Anal. Chem.* 69; 4808-4813.
- Hirsch, A. 1994. *The Chemistry of Fullerenes*. George Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- King Jr, W.H. 1964. Piezoelectric sorption detector. *Anal. Chem.* 36; 1735-1738.
- Kroto, H.W., Heath, J.R., O'Brien, S.C., Curl, R.F., Smalley, R. 1985. C60-buckminsterfullerene. *Nature*, 318; 162-163.
- Kumar, A. 2000. Biosensor based on piezoelectric crystal detectors: Theory and application. *JOM-c*, 52:(10).
- Mannelli, I., Minunni, M., Tombelli, S., Mascini, M. 2003. Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organism (GMOs) detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 18; 129-140.
- Marx, K. A., Zhou, T., Montrone, A., Schulze, H., Braunhut, S. J. 2001. A quartz crystal microbalance cell biosensor: detection of microtubule alterations in living cell at nM nocodazole concentrations. *Biosensors and Bioelectronics*, 16; 773-782.
- Minunni, M., Tombelli, S., Scielzi, R., Mannelli, I., Mascini, M., Gaudiano, C. 2003. Detection of  $\beta$ -Thalassemia by a DNA piezoelectric biosensor coupled with polymerase chain reaction. *Analytica Chimica Acta*, 481; 55-64.

- Nnávrátílová, I., Skládal, P., Viklický, V. 2001. Development of piezoelectric immunosensors for measurement of albuminuria. *Talanta*, 55; 831-839.
- Okuda, J. and Miwa, I. 1973. Glucose methods of biochem. *Anal. Chem.*, 21; 155-189.
- Pan, N. Y. and Shih, J. S. 2004. Piezoelectric crystal immunosensors based on immobilized fullerene C60-antibodies. *Sensors and Actuators B*, 98; 180-187.
- Rickert, J., Brecht, A., Gopel, W. 1997. QCM operation in liquids: constant sensitivity during formation of extended protein multilayers by affinity. *Anal. Chem.*, 69; 1441-1448.
- Saber, R., Mutlu, S., Pişkin, E. 2002. Glow-discharge treated piezoelectric quartz crystals as immunosensors for HSA detection. *Biosensor & Bioelectronics*, 17; 727-734.
- Saber, R. and Pişkin, E. 2003. Investigation of complexation of immobilized metallothioncin with Zn(II) and Cd(II) ions using piezoelectric crystals. *Biosensor & Bioelectronics*, 18; 1039-1046.
- Sauerbrey, G. 1959. The use of quartz oscillators for weighing thin layers and for microweighing. *Z. Phys.* 155; 206-222.
- Shih, J. S., Chao, Y.C., Sung, M. F., Gau, G. J., Chiou, C. S. 2001. Piezoelectric crystal membrane chemical sensors based on fullerene C60. *Sensors and Actuators B*, 76; 374-353.
- Shih, J. S. and Lin, H. B. 2003. Fullerene C60-cryptand coated surface acoustic wave quartz crystal sensor for organic vapors. *Sensors and Actuators B*, 92; 243-254.
- Su, C. C., Wu, T. Z., Chen, L. K., Yang, H. H., Tai, D. F. 2003. Development of immunochips for the detection of dengue viral antigens. *Analytica Chimica Acta*, 479; 117-123.
- Tanaka, M., Mochizuki, A., Motomura, T., Shimura, K., Onishi, M., Okahata, Y. 2001. In situ studies on protein adsorption onto a poly(2-methoxyethylacrylate) surface by a quartz crystal microbalance. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 193; 145-152.
- Tombelli, S., Maccini, M., Turner, A. P. F. 2002. Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals. *Biosensor & Bioelectronics*, 17; 929-936.
- Tomita, Y. and Guilbault, G. G. 1980. Coating for a piezoelectric crystal sensitive to organophosphorus compounds. *Anal. Chem.*, 52; 1484-1489.
- Vaughan, R. D., O'Sullivan, C. K., Guilbault, G. G. 2001. Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Enzyme and Microbial Technology*, 29; 635-638.
- Wei, L. F. and Shih, J. S. 2000. Fullerene-cryptand coated piezoelectric crystal urea sensor based on urcase. *Analytica Chimica Acta*, 437; 77-85.
- Zhou, X., Liu, L., Hu, M., Wang, L., Hu, J. 2002. Detection of hepatitis B virus by piezoelectric biosensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27; 341-345.



**Ek 1.** Kuartz kristalin C60 için kaplama konsantrasyonu (çalışma aralığı)

$F_{0(1)}$ , MHz	$F_{0(2)}$ , MHz	$F_{1(1)}$ , MHz	$F_{1(2)}$ , MHz	$\Delta F$ (ortalama), Hz	$\mu\text{g C60/Kristal}$
9,9944	9,99431	9,99404	9,99393	370	1,6
9,99444	9,9944	9,99406	9,99401	385	2
9,99442	9,99461	9,99358	9,99377	840	2,3
9,9944	9,99465	9,99364	9,99379	810	2,67
9,99451	9,99441	9,99306	9,99298	1440	3,2
9,99443	9,99451	9,9926	9,99238	1980	4
9,99445	9,99461	9,99301	9,99179	2130	5,33
9,99442	9,99451	9,99171	9,99178	2720	8
9,99463	9,99443	9,99141	9,9913	3175	10,67
9,99467	9,99449	9,99111	9,99064	3705	12,8
9,99463	9,99428	9,99075	9,9909	3630	14

$F_{0(1)}$ : 1 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{0(2)}$ : 2 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{1(1)}$ : 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{1(2)}$ : 2 no'lu kaplı kristalin frekansı

**Ek 2.** Kuartz kristalin C60/PVC için kaplama konsantrasyonu (çalışma aralığı)

$F_{0(1)}$ , MHz	$F_{0(2)}$ , MHz	$F_{1(1)}$ , MHz	$F_{1(2)}$ , MHz	$\Delta F$ (ortalama), Hz	$\mu\text{g C60-PVC/Kristal}$
9,99407	9,9945	9,9933	9,9936	835	1,6
9,99453	9,99346	9,99322	9,99223	1270	2
9,99429	9,9935	9,993	9,99229	1250	2,3
9,99432	9,99451	9,99314	9,99331	1190	2,67
9,99441	9,99449	9,99229	9,99268	1965	3,2
9,99452	9,99456	9,9928	9,9928	1740	4
9,99449	9,99464	9,9925	9,99312	1755	5,33
9,99466	9,99445	9,99178	9,99205	2640	8
9,99487	9,99451	9,99214	9,99182	2710	10,67
9,99447	9,99489	9,99129	9,99121	3430	12,8
9,99451	9,99542	9,99163	9,9925	2900	14

$F_{0(1)}$ : 1 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{0(2)}$ : 2 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{1(1)}$ : 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{1(2)}$ : 2 no'lu kaplı kristalin frekansı

**Ek 3.** Kaplama kalınlığının PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkisi

$F_{k\ddot{a}r}$ (9,99704)	$F_{0(1)}$ , MHz	$F_{0(2)}$ , MHz	$F_{1(1)}$ , MHz	$F_{21}$ , MHz	$F_{12}$ , MHz	$F_{22}$ , MHz	$\Delta F$ (ortalama), Hz	$\mu\text{g C60-}$ PVC/Kristal
9,99685	9,99765	9,99756	9,9971	9,9966	9,99609	9,99539	1110	1,6
9,99687	9,99684	9,99746	9,99579	9,99636	9,99396	9,99482	1686	2
9,99691	9,99546	9,99698	9,99366	9,99513	9,99139	9,99276	2319	2,67
9,99688	9,99745	9,99636	9,9949	9,99386	9,99214	9,99137	2626	3,2
9,99684	9,99789	9,99674	9,99284	9,99174	9,98983	9,98842	3165	4
9,99686	9,99683	9,99645	9,99005	9,99015	9,98695	9,98731	2970	5,33

$F_{0(1)}$ : 1 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{0(2)}$ : 2 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{1(1)}$ : 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{1(2)}$ : 2 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{2(1)}$ : Reaksiyon çözeltisinde bekletilmiş 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{2(2)}$ : Reaksiyon çözeltisinde bekletilmiş 2 no'lu kaplı kristalin frekansı

**Ek 4.** pH'ın PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkisi

$F_{kör}$ (9,99567)	$F_{0(1)}$ , MHz	$F_{0(2)}$ , MHz	$F_{1(1)}$ , MHz	$F_{1(2)}$ , MHz	$F_{2(1)}$ , MHz	$F_{2(2)}$ , MHz	$\Delta F$ (ortalama) , Hz	pH
9,99546	9,99735	9,99696	9,99512	9,99495	9,99431	9,99377	996	3,6
9,99543	9,9968	9,9968	9,99415	9,9946	9,99221	9,99272	1908	4,6
9,99544	9,9971	9,99702	9,9952	9,9949	9,99296	9,99224	2450	5,26
9,99548	9,9969	9,9972	9,99485	9,9957	9,99109	9,99212	3666	5,7
9,99546	9,997	9,9966	9,9951	9,99525	9,98857	9,9892	6288	7,4
9,99542	9,99715	9,9968	9,99528	9,99496	9,99035	9,98995	4970	8
9,99545	9,9972	9,99685	9,99532	9,99514	9,99364	9,99343	1691	9,2
9,99543	9,99712	9,99704	9,99515	9,9952	9,99398	9,99383	1271	9,9

$F_{0(1)}$ : 1 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{0(2)}$ : 2 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{1(1)}$ : 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{1(2)}$ : 2 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{2(1)}$ : Reaksiyon çözeltisinde bekletilmiş 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{2(2)}$ : Reaksiyon çözeltisinde bekletilmiş 2 no'lu kaplı kristalin frekansı

**Ek 5. Sıcaklığın PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkisi**

$F_{kor}$ (9,99671)	$F_{0(1)}$ , MHz	$F_{0(2)}$ , MHz	$F_{1(1)}$ , MHz	$F_{1(2)}$ , MHz	$F_{2(1)}$ , MHz	$F_{2(2)}$ , MHz	$\Delta F$ (ortalama), Hz	Sıcaklık (°C)
9,99607	9,99705	9,99696	9,99495	9,9951	9,99422	9,99427	806	5
9,99653	9,99685	9,99705	9,99512	9,99515	9,99419	9,99439	860	15
9,99629	9,9971	9,99702	9,99502	9,9952	9,99332	9,99341	1733	25
9,99632	9,9969	9,99712	9,99517	9,99525	9,99159	9,99181	3550	30
9,99641	9,99705	9,99665	9,99505	9,99514	9,9915	9,9912	3750	35
9,99652	9,99715	9,99675	9,99527	9,99503	9,99206	9,99141	3416	40
9,99649	9,99704	9,99685	9,99512	9,99498	9,99217	9,99222	2855	45
9,99666	9,99682	9,99704	9,99485	9,99504	9,99259	9,99243	2441	50
9,99687	9,99725	9,99686	9,99516	9,99507	9,99283	9,99256	2453	55

$F_{0(1)}$ : 1 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{0(2)}$ : 2 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{1(1)}$ : 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{1(2)}$ : 2 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{2(1)}$ : Reaksiyon çözeltisinde bekletilmiş 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{2(2)}$ : Reaksiyon çözeltisinde bekletilmiş 2 no'lu kaplı kristalin frekansı

**Ek 6.**  $\beta$ -D-Glikoz konsantrasyonunun C60/PVC kaplı PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkisi

$F_{kor}$ (9,99565)	$F_{0(1)}$ , MHz	$F_{0(2)}$ , MHz	$F_{1(1)}$ , MHz	$F_{1(2)}$ , MHz	$F_{2(1)}$ , MHz	$F_{2(2)}$ , MHz	$\Delta F$ (ortalama), Hz	$\beta$ -D- Glikoz ( $10^{-3}M$ )
9,99556	9,99505	9,99496	9,99312	9,99173	9,99241	9,99095	745	0,75
9,99562	9,99685	9,99505	9,99515	9,99165	9,99424	9,99093	815	1,5
9,99555	9,9971	9,99502	9,99523	9,99169	9,99403	9,99061	1140	2,25
9,99545	9,9969	9,99512	9,99412	9,99142	9,99291	9,99011	1257	3
9,99554	9,99705	9,99465	9,9952	9,99165	9,99392	9,9902	1365	3,75
9,99543	9,99515	9,99475	9,9931	9,99165	9,9909	9,98917	2340	4,5
9,99533	9,99504	9,99485	9,9927	9,99152	9,99038	9,98944	2197	5,25
9,99543	9,99582	9,99504	9,9934	9,9916	9,99106	9,98903	2452	6
9,99518	9,99625	9,99386	9,9941	9,99006	9,9899	9,98526	4500	7,5

$F_{0(1)}$ : 1 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{0(2)}$ : 2 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{1(1)}$ : 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{1(2)}$ : 2 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{2(1)}$ : Reaksiyon çözeltisinde bekletilmiş 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{2(2)}$ : Reaksiyon çözeltisinde bekletilmiş 2 no'lu kaplı kristalin frekansı



**Ek 7.** D-Glikoz içeren reaksiyon çözeltisi içerisinde bulunan bazı organik ve inorganik maddelerin PZ sensörün frekans değişimi üzerine etkileri

$F_{kör}$ (9,99410)	$F_{0(1)}$ , MHz	$F_{0(2)}$ , MHz	$F_{1(1)}$ , MHz	$F_{1(2)}$ , MHz	$F_{2(1)}$ , MHz	$F_{2(2)}$ , MHz	$\Delta F$ (ortalama), Hz	İnterfere edici
9,99302	9,99715	9,99612	9,99654	9,99402	9,9933	9,991	3130	-
9,99298	9,9969	9,99514	9,99571	9,99305	9,9928	9,99002	2970	sistein
9,99101	9,99627	9,99714	9,99543	9,99496	9,9925	9,99185	3020	askorbik asit
9,99103	9,99449	9,99628	9,99293	9,99405	9,98995	9,99095	3040	üre
9,99197	9,99513	9,99596	9,9937	9,9938	9,99078	9,99082	2950	aseton
9,99098	9,99715	9,99654	9,99556	9,9944	9,99257	9,99169	2850	etanol
9,9901	9,9962	9,99704	9,99403	9,99502	9,99125	9,99206	2870	$NH_4^+$

$F_{0(1)}$ : 1 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{0(2)}$ : 2 no'lu kaplanmamış kristalin frekansı

$F_{1(1)}$ : 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{1(2)}$ : 2 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{2(1)}$ : Reaksiyon çözeltisinde bekletilmiş 1 no'lu kaplı kristalin frekansı

$F_{2(2)}$ : Reaksiyon çözeltisinde bekletilmiş 2 no'lu kaplı kristalin frekansı

**Ek 8.** Serbest glikoz oksidaz aktivitesinin belirlenmesi

GOx Konsantrasyonu (U)	Absorbans (500 nm)
1,6	0,764
0,8	0,785
0,4	0,690
0,2	0,460
0,1	0,280

## ÖZGEÇMİŐ

1981 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1999 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2003 yılında Kimyager ünvanı ile mezun oldu.