



# **BAKIR TAYİNİ İÇİN YÜZEY PLAZMON REZONANS TEMELLİ BİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI**

## **PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE BASED BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF COPPER**

**Volkan SAFRAN**

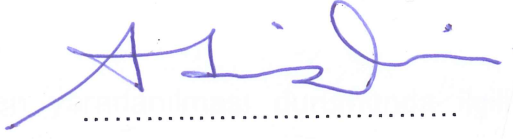
**PROF. DR. NECDET SAĞLAM**  
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

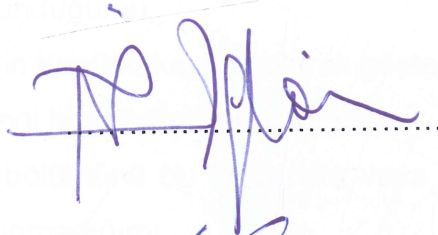
2016

**Volkan SAFRAN** 'ın hazırladığı "Bakır Tayini İçin Yüzey Plazmon Rezonans Temelli Biyosensörlerin Hazırlanması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil Denizli  
Başkan

: 

Prof. Dr. Necdet Sağlam  
Danışman

: 

Yrd. Doç. Dr. Mesut Şam  
Üye

: 

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

23 / 06 / 2016

Volkan SAFRAN

## ÖZET

# BAKIR TAYİNİ İÇİN YÜZEY PLAZMON REZONANS TEMELLİ BİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

**Volkan SAFRAN**

**Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM**

**Haziran 2016, 109 sayfa**

Wilson hastalığı (WH) bakırın böbrek, beyin ve korneada aşırı depolanmasıyla karakterize kalıtsal bakır metabolizma bozukluğuyla ilgili otozomal resesif bir hastalıktır. Hastalık teşhis edilmez ve semptomları giderilmezse genellikle ölümcüldür. Kanda serbest (bağlı olmayan) bakır konsantrasyonları artar ve hücrelerde oksidatif hasara neden olabilir. WH hastalığı ilk olarak 1912 yılında Kinneer Wilson tarafından siroza yol açan karaciğer hastalığının da eşlik ettiği ölümcül nörolojik hastalık olarak tanımlandı [1]. 1993 yılında ise WH'da anormal ATP7B geni tespit edildi [2]. Bu gen bakırın taşınmasından sorumlu P-tip adenozin trifosfataz (ATPaz) enzimini kodlar. ATP7B proteininin yokluğunda yada fonksiyonlarının azalmasıyla bakırın karaciğer hücrelerinden safraya atılması azalır. Buda hepatik bakır birikmesi ve biriken bakırın nihayetinde kana karışarak özellikle beyin, böbrek ve korneada birikerek hasara sebep olması demektir.

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) hazırlanması kolay, ucuz, kararlı, moleküler tanıma yeteneği olan ve ayrıca büyük miktarlarda üretilebilen ve tekrar kullanılabilen

malzemelerdir. Bu yüzden, MIP'ler yapay molekül tanıyan malzemeler olarak tanımlanabilir. Adsorpsiyon temelli moleküler tanıma teknikleri hedef molekülleri için gösterdikleri yüksek seçicilikten dolayı bazı alanlarda dikkatleri üzerine çekmiştir.

Biyolojik cevabı, elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar "Biyosensörler" olarak tanımlanırlar. Yüzey plazmon rezonans (SPR) yöntemi, biyomoleküler etkileşimlerden kaynaklanan metal yüzeye yakın kırılma indisindeki değişiklikleri ölçmede kullanılan kusursuz bir yöntemdir. SPR biyosensörlerin eş-zamanlı ölçüm yapabilme, yüksek hassasiyet ve sipesifiklik, herhangi bir işaretleyici ajana ihtiyaç duymama gibi üstün özelliklerinden dolayı son zamanlarda bir çok değişik analit türünün araştırılması uygulamalarında oldukça popüler olmuştur [3]. MIP'lar son zamanlarda SPR biyosensörlerin yüzeyinde biyotanıma yüzeyleri oluşturmak için kullanılmaktadır [4].

Sunulan çalışmada,  $\text{Cu}^{+2}$  baskılanmış SPR temelli biyosensör hazırlanarak bakır (II) iyonunun ( $\text{Cu}^{+2}$ ) sulu çözeltiden,  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu spike edilmiş fizyolojik serum çözeltisi ve yapay idrardan tayini amaçlandı. Bu amaçla öncelikle  $\text{Cu}^{+2}$  iyonları ile koordinasyon yapabilecek N-Metakroil-(L)-Sistein Metil Ester (MAC) monomeri sentezlendi. Sonrasında, MAC monomeri, kalıp molekül olarak kullanılan  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu ile etkileştirilerek MAC- $\text{Cu}^{+2}$  ön-kompleksi hazırlandı. Optimum kalıp molekül  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu, MAC monomer oranı,  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun farklı oranlarda MAC monomeri ile karıştırılarak UV-görünür bölge spektrofotometre kullanılmasıyla tespit edildi. Daha sonra hazırlanan MAC- $\text{Cu}^{+2}$  ön-kompleksi 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve çapraz bağlayıcı etilenglikol dimetakrilat (EDMA) monomerleri varlığında karıştırılarak polimerizasyon için monomer fazı hazırlandı. Polimerizasyon sonunda  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmış PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  nanopartiküller elde edildi.  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmış PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  nanopartiküller iki-fazlı mini-emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile hazırlandı. Faz I; PVA (100 mg), SDS (15 mg) ve  $\text{NaHCO}_3$ 'ün (12.5 mg) 5.0 mL deiyonize su içinde çözülmesiyle hazırlandı. Faz II; PVA (50 mg) ve SDS'in (50 mg) 100 mL deiyonize suda çözülmesiyle hazırlandı. MAC- $\text{Cu}^{+2}$  ön-kompleksi (0.10; 0.05 mmol) 2-hidroksietil metakrilat (HEMA; 0.05 mmol) ve çapraz bağlayıcı etilenglikol dimetakrilat' dan (EDMA; 0.10 mmol) oluşan monomer fazında çözülerek yağ fazı elde edilmiştir. Yağ fazı faz I'e yavaşça eklenmiştir. Karışım, 25000 rpm de homojenizatörde homojenize edildikten sonra Faz II ile karıştırılmıştır. Sodyum bisülfid

(125 mg) ve amonyum persülfat (125 mg) başlatıcılarının eklenmesinden sonra polimerizasyon işlemi 40 °C de 24 süreyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kontrol deneyi için kalıp molekül olan  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu kullanılmadan, baskılanmamış PHEMAC nanopartiküller SPR biyosensör için hazırlanmıştır.

Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyonu Fourier transform-Attenuated total reflektans (FTIR-ATR) spektroskopisi, zeta boyut analizi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve elementel analiz ile yapılmıştır. Hazırlanan PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve PHEMAC SPR biyosensörleri atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre ve temas açısı (CA) ölçümleriyle karakterize edilmiştir. Parçacık boyut analizi ve  $\text{Cu}^{+2}$  baskılanmış PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  nanopartiküllerin polidispersite değerinin ( $\text{PDI} = 0.059$ ) küçük olması sebebiyle boyut dağılımının oldukça homojen olduğu (46.10 nm) görüldü. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinden elde edilen nanopartiküllerin farklı oranlarda büyütülmüş fotoğraflarından anlaşıldığı üzere ortalama boyut dağılımının 40-50 nm arasında olduğu görüldü. AFM görüntülerinden  $\text{Cu}^{+2}$  baskılanmış PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve baskılanmamış PHEMAC biyosensörlerin ortalama yüzey pürüzlülüğü sırasıyla 5.51 nm ve 4.33 nm olarak bulunmuştur.  $\text{Cu}^{+2}$  baskılanmış PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve baskılanmamış PHEMAC biyosensörlerin pürüzlülük değerlerindeki farklılık;  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörün yüzeyine başarılı bir şekilde baskılandığını göstermektedir.

Adsorpsiyon çalışmaları için sırasıyla 0.1 nM, 0.25 nM, 1.0 nM, 2.5 nM, 10 nM, 25 nM ve 100 nM  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarını içeren çözeltiler 10 mM pH 5.0 fosfat tamponu kullanılarak hazırlandı. Desorpsiyon çalışmaları için de metal-şelatör ajanı içeren 0.005 M etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltileri kullanılmıştır. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve PHEMAC SPR biyosensörlerin  $\text{Cu}^{+2}$  tayin seçiciliği,  $\text{Ni}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  iyonlarının bulunduğu çözeltiler kullanılarak araştırılmıştır. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörü, PHEMAC SPR biyosensörüne göre  $\text{Cu}^{+2}$  'ye karşı daha fazla seçicilik göstermiştir. Hazırlanan yapay idrar ve fizyolojik serum çözeltilerine  $\text{Cu}^{+2}$  spike edilmesiyle hazırlanan örneklerle de kinetik çalışmalar yapılmıştır. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensör ile  $\text{Cu}^{+2}$  çözeltileri arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla Scatchard, Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) olmak üzere dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır. Langmuir adsorpsiyon modeli, bu afinite sistemi için en

uygun model olarak bulunmuş ve sonuçlar PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensör yüzeyindeki Cu<sup>+2</sup> bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı ve tek tabakalı olduğunu göstermiştir. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla Cu<sup>+2</sup> iyonunu içeren çözeltiler SPR sistemine tekrarlı (4 kez) bir şekilde enjekte edilmiş ve reflektansları ölçülmüştür. Ölçümlerin kesinlik değerini tespit etmek için PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün gün içi ve günler arası Cu<sup>+2</sup> iyonuna karşı verdiği sinyal şiddetinin tekrarlanabilirlik çalışmaları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve % RSD değerleri olarak verilmiştir. Kesinlik çalışmaları %RSD değerinin <1.5 olması sebebiyle metodunun tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Sonuçlar, PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün Cu<sup>+2</sup> için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** biyosensör, moleküler baskılama, wilson hastalığı, yüzey plazmon rezonans.



## **ABSTRACT**

# **PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE BASED BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF COPPER**

**Volkan SAFRAN**

**Master of Science, Division of Nanotechnology and Nanomedicine**

**Supervisor: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM**

**June 2016, 109 pages**

Wilson disease is a rare autosomal recessive inherited disorder of copper metabolism that is characterized by excessive deposition of copper in the liver, brain, and cornea. Wilson disease is often fatal if not recognized and treated when symptomatic. When free copper (unbound) increased in blood and it can cause oxidative damage to cells. Wilson disease (WD) was first described in 1912 by Kinneer Wilson as a familial, lethal neurological disease accompanied by chronic liver disease leading to cirrhosis [1]. In 1993, the abnormal ATP7B gene in WD was identified [2]. This gene, encodes a metal-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATPase), which is expressed mainly in hepatocytes and functions in the transmembrane transport of copper within hepatocytes. Absent or reduced function of ATP7B protein leads to decreased hepatocellular excretion of copper into bile. This results in hepatic copper accumulation and injury. Eventually, copper is released into the bloodstream and deposited in other organs, notably the brain, kidneys, and cornea.

Molecularly imprinted polymers (MIP) have been the most popular materials due to materials that are easy to prepare, less expensive, stable, have talent for molecular recognition and also can be manufactured in large quantities with good reproducibility. MIPs are used for creation of biorecognitive surfaces on the SPR biosensors. Therefore, MIPs can be considered as artificial recognition media. Molecular recognition-based adsorption techniques have received much attention in several fields because of their high selectivity for target molecules.

Devices which convert biological response to electrical signals are defined as "Biosensors". Surface plasmon resonance (SPR) biosensors are used to measure changes in the refractive index due to the biomolecular interaction occurring at the surface of the SPR sensor. Because of unique properties of SPR biosensors, i.e., real-time measurement, high specificity and sensitivity, no need to labeling, the applications of them have been getting more popular for investigation of several analyte molecules [3]. Recently, MIPs are used for creation of biorecognitive surfaces on the SPR biosensors [4].

In this study preparation of copper (II) ion ( $\text{Cu}^{+2}$ ) imprinted SPR based biosensors to determine  $\text{Cu}^{+2}$  ion both from aqueous,  $\text{Cu}^{+2}$  ion spiked isotonic serum and artificial urine solution was aimed. For this purpose, N-Metakriloil-(L)-cysteine methyl ester (MAC) monomer which has capability of binding by coordination to  $\text{Cu}^{+2}$  ion was synthesized. After then, MAC- $\text{Cu}^{+2}$  precomplex was synthesized by interacting of MAC monomer with template  $\text{Cu}^{+2}$  ion. To define optimum ratio between template  $\text{Cu}^{+2}$  ion and MAC monomer,  $\text{Cu}^{+2}$  ion and MAC monomer were mixed in a different ratios and optimum ratio was determined by using UV-visible region spectrophotometry.

MAC- $\text{Cu}^{+2}$  precomplex was mixed in the presence of crosslinker ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) and secondary monomer 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) to prepare monomer phase. At the end of the polymerization  $\text{Cu}^{+2}$  ion imprinted PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  nanoparticles were attained.

$\text{Cu}^{+2}$  ion imprinted PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  nanoparticles were prepared by two-phase mini-emulsion polymerization method. The first aqueous phase was prepared by dissolving

of PVA (100 mg), SDS (15 mg) and  $\text{NaHCO}_3$  (12.5 mg) in 5.0 mL deionized water. The second phase was prepared by dissolving of PVA (50 mg) and SDS (50 mg) in 100 mL of deionized water. Prepared MAC- $\text{Cu}^{+2}$  pre-complex (0.10; 0.05 mmol) was dissolved in a monomer mixture of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA; 0.05 mmol) and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA; 0.10 mmol) to form oil phase. The oil phase was slowly added to the first aqueous phase. In order to obtain mini-emulsion, the mixture was homogenized at 25000 rpm by a homogenizer. After homogenization, mixture was added to the phase II. Then, initiators, sodium bisulfite (125 mg) and ammonium persulfate (125 mg), were added into the solution. Polymerization was continued for 24 h. Besides this, for control experiment, the non-imprinted PHEMAC nanoparticles were synthesized by applying same procedure with imprinted nanoparticles except addition of template  $\text{Cu}^{+2}$  ions.

Prepared nanoparticles were characterized by Fourier transform infrared-attenuated total reflectance (FTIR-ATR) spectroscopy, zeta sizer analysis, scanning electron microscopy (SEM) and elemental analysis. Prepared  $\text{Cu}^{+2}$  imprinted PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  and non imprinted PHEMAC SPR biosensors were characterized by atomic force microscope (AFM), ellipsometer, contact angle (CA) measurements. Size distribution of  $\text{Cu}^{+2}$  imprinted PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  nanoparticles was estimated by Zeta sizer measurements and because of low polydispersity index value ( $\text{Pdi}=0.059$ ) homogeneous average nanoparticle size distribution was attained (46.10 nm). Size of nanoparticles was determined by Scanning electron microscopy measurements between 40-50 nm. Surface roughness measurements were obtained by Atomic force microscopy (AFM) and images showed that roughness of  $\text{Cu}^{+2}$  imprinted PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  and non imprinted nanoparticles was estimated as 5.51 and 4.33 nm respectively. Roughness difference between  $\text{Cu}^{+2}$  imprinted PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  and non imprinted PHEMAC nanoparticles show that imprinting process of  $\text{Cu}^{+2}$  ions was performed successfully.

Adsorption studies were performed by 0.1 nM, 0.25 nM, 1.0 nM, 2.5 nM, 10 nM, 25 nM ve 100 nM  $\text{Cu}^{+2}$  ion solutions prepared by 10 mM pH 5.0 phosphate buffer solution. Desorption studies were carried out by using 0.005 M

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution which was used as metal-chelator agent. Selectivity studies of PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC SPR biosensors for Cu<sup>+2</sup> determination, were investigated by using solutions of Ni<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup> ions as a samples. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biosensor showed higher selectivity than PHEMAC SPR biosensor for Cu<sup>+2</sup> ion. Adsorption studies also were made for samples prepared by Cu<sup>+2</sup> ion spiked artificial urine and isotonic serum solutions. To determine the adsorption model of interactions between Cu<sup>+2</sup> solution and PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biosensor, four different adsorption models such as Scatchard, Langmuir, Freundlich and Langmuir-Freundlich (LF) were performed. Langmuir adsorption model was found most applicable model for this affinity system and results showed that Cu<sup>+2</sup> affinity regions on surface of PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biosensor were homogeneously distributed and have monolayer structure.

Repeatability experiments of PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biosensor was performed four times (4 times) by using Cu<sup>+2</sup> ion containing solutions and reflectance values were measured. Precision studies were carried out to ascertain the reproducibility of the proposed method. The results of intraday and interday precision studies was reported as %RSD and showed good reproducibility with percent relative standard deviation less than <1.5. Results showed that, PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biosensor had high selectivity and sensitivity for Cu<sup>+2</sup> ion.

**Keywords:** biosensor, molecular imprinting, Wilson disease, surface plasmon resonance.

## TEŞEKKÜR

Öncelikle beni bugünlere getiren her koşulda yanımda olan ve beni destekleyen değerli aileme,

Tez çalışmalarım süresince, çok yoğun çalışma programları olmasına rağmen bana zaman ayıran, her türlü konuda destek olan, fikirleri ile yol gösteren, tez danışmanım sayın Prof. Dr. Necdet Sağlam ve Biyokimya Laboratuvarı'nda çalışmamıza olanak sağlayan Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Değerli bilgi birikimi, düşünceleri ve ihtiyacım olduğunda bana yol gösteren Yrd. Dr. Fatma Yılmaz 'a,

Tez çalışmalarım boyunca bana bilgi birikimlerini aktaran Duygu Sarı ve Ali Derazshamshir' e,

Tez çalışmalarında beni yalnız bırakmayan değerli arkadaşlarım Onur Pulcuoğlu, Berkin Dilsiz, Burcu Güven, Şebnem Açıkbaş ve Ezgi Emül' e,

Çok teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	ix
İÇİNDEKİLER .....	x
ŞEKİLLER .....	xiv
ÇİZELGELER .....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xviii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	5
2.1. Biyosensörler .....	5
2.1.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması .....	8
2.1.1.1. Biyotanıma Elemanlarına Göre Sınıflandırma .....	8
2.1.1.1.1. Enzimler .....	8
2.1.1.1.2. Antiadiler .....	8
2.1.1.1.3. Nükleik Asitler .....	8
2.1.1.2. Dönüştürücülerine Göre Sınıflandırma .....	9
2.1.1.2.1. Optik Sensörler .....	9
2.1.1.2.2. Elektrokimyasal Sensörler .....	9
2.1.1.2.3. Piezoelektrik Sensörler .....	13
2.1.1.3. Çevresel Görüntülemeye Biyosensörler .....	12
2.1.2. Biyosensör Teknolojisinin Bugünü ve Geleceği .....	13
2.1.2.1. Sürekli Görüntüleme .....	13
2.1.2.2. Çoklu Analit Tespiti .....	13
2.1.2.3. Minyatürleştirme .....	14
2.1.2.4. Yeni Duyu Elemanları .....	14
2.1.2.5. Ticari Biyosensörler .....	14
2.2. Yüze Plazmon Rezonans (SPR) .....	16
2.2.1. Yüze Plazmon Rezonans Teorisi .....	16
2.2.2. SPR Biyosensörler .....	22

2.3. Moleküler Baskılama .....	24
2.3.1. Moleküler Baskılama Tekniği.....	27
2.3.1.1. Ön-kompleks Oluşumu Safhası .....	27
2.3.1.2. Polimerizasyon Safhası .....	28
2.3.1.3. Kalıp (Hedeflenen) Molekölün Uzaklaştırılması Safhası .....	28
2.3.1.4. Moleküler Baskılanmış Polimerin Özelliklerine Etki Eden Parametreler .....	29
2.3.1.4.1. Kalıp (Hedef) Molekül .....	30
2.3.1.4.2. Fonksiyonel Monomerler. ....	30
2.3.1.4.3. Çapraz Bağlayıcılar .....	31
2.3.1.4.4. Çözücüler .....	32
2.3.1.4.5. Başlatıcılar .....	33
2.3.1.4.6. Sıcaklık.....	33
2.3.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri .....	33
2.3.2.1. Kovalent Baskılama.....	34
2.3.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama .....	34
2.3.3. Baskılama İşleminin Kontrolü .....	35
2.3.4. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları .....	36
3. MATERYAL VE METOD .....	38
3.1. Kimyasal Malzemeler .....	38
3.2. SPR Biyosensörlerin Hazırlanmasında Kullanılan Çip Yüzeyinin Temizlenerek Hazırlanması .....	39
3.3. N-Metakroil-(L)-Sistein Metil Ester (MAC) Monomerinin Sentezi.....	39
3.4. MAC-Cu <sup>+2</sup> Ön-Kompleksinin Hazırlanması.....	40
3.5. Cu <sup>+2</sup> İyonu Baskılanmış PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> (MIP) ve Cu <sup>+2</sup> İyonu Baskılanmamış PHEMAC (NIP) Nanopartiküllerinin Hazırlanması .....	40
3.6. Sentezlenen MAC Monomerinin,Cu <sup>+2</sup> İyonu Baskılanmış PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> (MIP) ve Cu <sup>+2</sup> İyonu Baskılanmamış PHEMAC (NIP) Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu ...	41
3.6.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi .....	41
3.6.2. Zeta Boyut Analizi .....	42
3.6.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	43
3.6.4. Elementel Analiz.....	43

3.7. Kalıp Molekülün Desorpsiyonu .....	43
3.8. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC Nanopartiküller ile SPR Biyosensörlerin Hazırlanması .....	44
3.9. Hazırlanan PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC Biyosensörlerin Karakterizasyonu .....	45
3.9.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi (AFM) .....	45
3.9.2. Elipsometre Ölçümleri .....	46
3.9.3. Temas Açısı Ölçümleri .....	47
3.10. SPR Sensör ile Plazmon Ölçümleri .....	48
3.10.1. Kinetik Analizler .....	48
3.10.2. Yarışmalı Kinetik Analizler .....	50
3.10.3. Baskılama Seçiciliğini Belirleme Çalışmaları .....	50
3.10.4. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları .....	51
3.10.5. Tekrar Kullanılabilirliğin İstatiksel Analizleri .....	51
3.11. Yapay İdrar ve Fizyolojik Serum Çözeltileri İçin Kinetik Analizler .....	52
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA .....	53
4.1. MAC-Cu <sup>+2</sup> Ön-kompleks Analizinin Belirlenmesi ve PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> Nanopartikül Optimizasyonunun Yapılması .....	53
4.2. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC SPR Biyosensörlerin Karakterizasyonu .....	54
4.2.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi .....	55
4.2.1.1. MAC Monomerinin ve MAC-Cu <sup>+2</sup> Ön-kompleksinin FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi .....	55
4.2.1.2. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC Nanopartikül FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi .....	55
4.2.2. Zeta Boyut Analizi .....	59
4.2.3. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi .....	60
4.2.4. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi .....	61
4.2.5. Elipsometre Analizi .....	64
4.2.6. Temas Açısı Ölçümleri .....	64
4.3. SPR Biyosensörlerle Kinetik Analizler .....	66
4.3.1. Denge Analizi .....	73
4.3. Bağlanma Kinetik Analizi .....	73



4.4. Denge İzoterm Modelleri .....	75
4.5. Yarışmalı Kinetik Analizler .....	77
4.6. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> SPR Biyosensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi .....	79
4.7. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> SPR Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi .....	83
4.8. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> Biyosensörün Yapay İdrar ve Serum Örneklerinde Cu <sup>+2</sup> İyonu Tayini İçin Kullanımı .....	85
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	88
KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ .....	109

## ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Dielektrik sınırlarda gerçekleşen toplam iç kırınım.....	17
Şekil 2.2. Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılma eğrileri. ....	20
Şekil 2.3. Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri [88]. ....	21
Şekil 2.4. Tipik bir SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.5. Kovalent Baskılama Şeması.....	25
Şekil 2.6. Şematize edilmiş MIP .....	29
Şekil 3.1. Biyokimya ABD Laboratuvarı'ndaki Nanopartiküllerin boyut analizinin yapılması için kullanılan analizör. ....	42
Şekil 3.2. Nanopartiküllerin çip yüzeyine damlatılmasının şematize edilmesi. ....	44
Şekil 3.3. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC Nanopartiküller ile biyosensör hazırlanmasında kullanılan sistem a) spin coater b) UV lamba. ....	45
Şekil 3.4. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC Biyosensörlerin yüzey karakterizasyonu için kullanılan Atomik Kuvvet Mikroskopu cihazının görüntüsü.....	46
Şekil 3.5. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC Biyosensörlerin yüzey karakterizasyonu için kullanılan Elipsometre cihazının görüntüsü. ....	47
Şekil 3.6. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC Biyosensörlerin temas açısı ölçümlerinde kullanılan Atomik Kuvvet Mikroskopu cihazının görüntüsü.....	48
Şekil 3.7. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC Biyosensörlerin plazmon rezonans ölçümlerinin yapıldığı cihazın görüntüsü. ....	50
Şekil 4.1. MAC-Cu <sup>+2</sup> ön-kompleksin spektrofotometrik ölçümü. ....	54
Şekil 4.2. MAC monomeri ve MAC-Cu <sup>+2</sup> ön-kompleksine ait FTIR-ATR spektrumu. .	56
Şekil 4.3. MAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> nanopartiküle ait FTIR-ATR spektrumu. ....	57
Şekil 4.4. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC nanopartiküle ait FTIR-ATR spektrumu.....	57
Şekil 4.5. MAC monomeri ile Cu <sup>+2</sup> arasındaki koordinasyonla oluşan MAC-Cu <sup>+2</sup> ön-kompleksin moleküler formülü. ....	58
Şekil 4.6. N-metakroil-(L)-Sistein Metil Ester (MAC) monomerinin Metakroil Klorürden ve L-Sistein Metil Ester' den oluşum reaksiyonu. ....	58
Şekil 4.7. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> nanopartiküllerin (a) hacimce (b) sayıca boyut dağılımı. ....	60

Şekil 4.8. Cu <sup>2+</sup> iyonu baskılanmamış ve baskılanmış nanopartiküllerin SEM görüntüleri (a) PHEMAC (b) PHEMAC-Cu <sup>2+</sup> .....	61
Şekil 4.9. PHEMAC-Cu <sup>2+</sup> SPR biyosensörün AFM görüntüsü.....	62
Şekil 4.10. PHEMAC SPR biyosensörün AFM görüntüsü. ....	63
Şekil 4.11. PHEMAC-Cu <sup>2+</sup> (a) ve PHEMAC (b) SPR biyosensörlerin elipsometre ölçümünde alınan üç boyutlu görüntüsü.....	64
Şekil 4.12. Çip yüzeyinin su temas açısı ölçüm görüntüleri (a) Boş altın, (b) Modifiye edilmemiş PHEMAC altın yüzeyi, (c) PHEMAC-Cu <sup>2+</sup> SPR biyosensör yüzeyi .....	65
Şekil 4.13.a. 0.1 nM Cu <sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sensorgram. ....	67
Şekil 4.13.b. 0.25 nM Cu <sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sensorgram. ....	67
Şekil 4.13.c. 1.0 nM Cu <sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sensorgram. ....	67
Şekil 4.13.d. 2.5 nM Cu <sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sensorgram. ....	68
Şekil 4.13.e. 10 nM Cu <sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sensorgram. ....	67
Şekil 4.13.f. 25 nM Cu <sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sensorgram. ....	69
Şekil 4.13.g. 100 nM Cu <sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sensorgram. ....	70
Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki Cu <sup>2+</sup> iyon çözeltileri ve PHEMAC-Cu <sup>2+</sup> SPR biyosensörü arasındaki etkileşimlerin zamana göre ΔR değerleri. ....	71
Şekil 4.15. PHEMAC-Cu <sup>2+</sup> SPR biyosensörün farklı konsantrasyonlardaki Cu <sup>2+</sup> iyonlarına cevabı, ΔR arasındaki ilişki. (a) Bütün Cu <sup>2+</sup> iyonu konsantrasyon aralığı için (b) iki farklı Cu <sup>2+</sup> iyonu konsantrasyon aralığı (0.1-2.5 ve 10-100 nM) için. ....	72
Şekil 4.16. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. Denge analiz yaklaşımı (Scatchard) (a) Bağlanma kinetik yaklaşımı (b). ....	74
Şekil 4.17. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.....	76
Şekil 4.18. 100 nM derişiminde yarışmacı olarak kullanılan Zn <sup>2+</sup> biyomolekülleri ile hazırlanmış çözeltili ile PHEMAC-Cu <sup>2+</sup> SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının ΔR-zaman grafikleri. ....	78
Şekil 4.19. 100 nM Ni <sup>2+</sup> derişiminde yarışmacı olarak kullanılan Ni <sup>2+</sup> biyomolekülleri ile hazırlanmış çözeltili ile PHEMAC-Cu <sup>2+</sup> SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının ΔR-zaman grafikleri. ....	78

Şekil 4.20. 100 nM $\text{Cu}^{+2}$ ve yarışmacı olarak kullanılan 100 nM $\text{Zn}^{+2}$ ve 100 nM $\text{Ni}^{+2}$ ile hazırlanmış iyon çözeltileri için PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$ SPR biyosensörün verdiği sinyal cevaplarının $\Delta R$ -zaman grafiklerinin karşılaştırılması.....	79
Şekil 4.21. 100 nM derişiminde yarışmacı olarak kullanılan $\text{Zn}^{+2}$ biyomolekülleri ile hazırlanmış çözelti ile PHEMAC SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının $\Delta R$ -zaman grafiği.....	80
Şekil 4.22. 100 nM derişiminde yarışmacı olarak kullanılan $\text{Ni}^{+2}$ biyomolekülleri ile hazırlanmış çözelti ile PHEMAC SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının $\Delta R$ -zaman grafiği.....	81
Şekil 4.23. 100 nM derişiminde yarışmacı olarak kullanılan $\text{Zn}^{+2}$ ve $\text{Ni}^{+2}$ iyonlarının ve $\text{Cu}^{+2}$ iyonu ile hazırlanmış çözelti ile PHEMAC SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının $\Delta R$ -zaman grafiklerinin karşılaştırılması.....	81
Şekil 4.24. 100 nM derişiminde $\text{Cu}^{+2}$ iyonlarıyla hazırlanmış çözelti ile PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$ ve PHEMAC SPR biyosensörlerin verdiği sinyal cevabının $\Delta R$ -zaman grafiklerinin karşılaştırılması .....	83
Şekil 4.25. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$ biyosensörün tekrar kullanılabilirliği için 100 nM $\text{Cu}^{+2}$ çözeltisi için SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının $\Delta R$ -zaman grafikleri. ....	84
Şekil 4.26. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$ biyosensörün 100 nM $\text{Cu}^{+2}$ iyonu etkileşmiş yapay idrar örneği için SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının $\Delta R$ -zaman grafikleri. ....	87
Şekil 4.27. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$ biyosensörün 100 nM $\text{Cu}^{+2}$ iyonu etkileşmiş serum örneği için SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının $\Delta R$ -zaman grafikleri.....	87

## ÇİZELGELER

### Sayfa

Çizelge 2.1. Geleneksel analitik teknikler ile biyosensörlerin özellikleri bakımından karşılaştırılması. ....	7
Çizelge 2.2. Biyosensörlerin tarihteki gelişim süreci .....	7
Çizelge 2.3. Biyosensörlerin Dönüştürücülerine Göre Sınıflandırılması .....	10
Çizelge 2.4. Çeşitli çevre kirleticilerinin tespitinde kullanılan biyosensörler. ....	12
Çizelge 3.1. MAC-Cu <sup>+2</sup> Ön-Kompleksinin Hazırlanma oranları .....	40
Çizelge 3.2. Cu <sup>+2</sup> baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ve PHEMAC nanopartiküllerin hazırlanma reçetelesi .....	41
Çizelge 4.1. Cu <sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan MAC monomeri, Cu <sup>+2</sup> iyonu, çapraz bağlayıcı EDMA ve HEMA oranı. ....	53
Çizelge 4.2. Boş altın çip yüzeyi, Modifiye edilmemiş PHEMAC ve modifiye edilmiş PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> SPR biyosensörlerin yüzeylerinin su temas açıları. ....	65
Çizelge 4.3. Kinetik hız sabitleri.....	74
Çizelge 4.4. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri. ....	76
Çizelge 4.5. PHEMAC-Cu <sup>+2</sup> ye göre Zn <sup>+2</sup> ve Ni <sup>+2</sup> iyonları için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları .....	83
Çizelge 4.6. Tekrarlanabilirliği gösteren kesinlik değerleri .....	84
Çizelge 4.7. Gün içi kesinlik.....	85
Çizelge 4.8. Günler arası kesinlik .....	85
Çizelge 4.9. Yapay idrar hazırlanmasında kullanılan organik ve inorganik malzemeler .....	85

# SİMGELER VE KISALTMALAR

## SİMGELER

- C : Analit derişimi (nM)  
k<sub>a</sub> : Bağlanma hız sabiti (nM<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>)  
k<sub>d</sub> : Ayrılma hız sabiti (s<sup>-1</sup>)  
K<sub>A</sub> : Bağlanma sabiti (nM<sup>-1</sup>)  
K<sub>D</sub> : Ayrılmaz sabiti (nM)

## KISALTMALAR

- MAC : N-Metakroil-(L)-Sistein Metil Ester  
Cu<sup>+2</sup> : Bakır iyonu  
HEMA : 2-Hidroksietil Metakrilat  
EDMA : Etilen Glikol Dimetakrilat  
FTIR-ATR : Fourier transform-Attenuated Total Reflektans (FTIR-ATR)  
MIP : Moleküler Baskılanmış Polimer  
NIP : Baskılanmamış Polimer  
SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu  
APS : Amonyum Persülfat  
PVA : Polivinil Alkol  
SDS : Sodyum Dodesil Sülfat  
NaHCO<sub>3</sub> : Sodyum Bikarbonat  
EDTA : Etilendiamin Tetraasetikasit  
NaHSO<sub>4</sub> : Sodyum Metabisülfat

# 1. GİRİŞ

Polimer-fonksiyonlandırılmış nanokompozitler (PFNCs) hem nanopartiküllerin (NPs) hemde polimerlerin üstün özelliklerini birleştiren malzemelerdir. Yüzey alanının hacme oranının büyük olması, yüksek mekanik dayanıklılık, polimer matrikse uyumluluk gibi özellikler PFNCs'in eşsiz özelliklere sahip olmasını sağlamışlardır [5].

Günümüzün en büyük çevre sorunlarından birisi metallerin sebep olduğu çevre problemleridir. Metaller, doğal kolloitlere adsorbe olarak ve hatta yaşayan canlılar tarafından biriktirilerek hareket yetenekleri ve dolayısıyla sudaki çözünürlükleri artan biyobozunmayan malzemelerdir. Biyobozunur olmayan metallerin insan sağlığına zararları oldukça fazladır. Bu yüzden ağır metallerin etkin bir şekilde uzaklaştırılabilmesi uygulamalarında kullanılabilecek polimer-fonksiyonlandırılmış nanokompozitlere (PFNCs) olan talep oldukça artmaktadır. PFNC malzemeler nanopartiküllere özgü yüzey özelliklerini korurlarken, polimerik matriks olarak kullanılan destek malzemeleri yüksek stabilite, ya da işlenebilirlik gibi özellikler katarlar. Bu nanopartikül-matriks materyalleri kirliliğe sebep olan hedef metallerin uzaklaştırılmasında polimer matriksin metalin bağlanabileceği fonksiyonel grupları sağlayabilmesine olanak sağladığı için ve aynı zamanda rejenerasyon ve tekrar kullanılabilirliğe olanak sağladığı için oldukça ilgi çekicidir [6,9]. Bu özellikler bu malzemeleri metallerin bulunduğu sulu ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılabilmesine yönelik kullanım için gelecek vadeden malzemeler sınıfına sokmaktadır [10].

Çevresel bakır birikmesi insan sağlığı, organizmaları ve ekosistemin güvenliğini ciddi bir şekilde tehdit etmektedir. Bakır iyonu ya kofaktör olarak ya da metal-koenzimlerinin yapısal bileşeni olarak organizmanın çeşitli fizyolojik işlemlerinde kritik rol oynar [11]. Bununla birlikte aşırı doz yüklenmesi koşullarında, Alzheimer, Menkes ya da Wilson hastalığına sebep olur [12]. Ek olarak artan bakır miktarı onkogenik BRAF sinyalini aktive ederek kanser oluşumuna sebep olmaktadır [13]. Çevre koruma ajansı, EPA tarafından içme sularında izin verilen bakır üst limiti 20 µM dır. Bununla birlikte içme sularındaki çok daha fazla olan bakır miktarı insan sağlığını oldukça fazla etkilemektedir [14]. Bu yüzden güvenilir çevresel bakır tayini oldukça önemlidir. Günümüze kadar en çok kullanılan bakır tayin yöntemleri İndüklenmiş Plazma

Spektroskopisi (ICP-MS) ve atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS)'dir [15, 16]. Bu metodların yüksek etkinlik gibi avantajları olmasına rağmen, uzun tayin süreleri, pahalı ve karışık cihaz sistemlerini gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu yüzden eser miktardaki bakır tayini için basit metodların geliştirilmesi bilim insanlarını bu alan ile ilgilenmeye zorlamışlardır. Son zamanlarda kolorimetrik sensörler, elektrokimyasal teknikler ve floresans prob lar bakır iyonunun tayininde yaygın olarak kullanılmaktadır [17-24]. Fakat bu materyallerin sentez ve dizaynı yeni floresans prob oluşturmanın zorlukları nedeniyle oldukça zor ve karmaşıktır.

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) sentetik tanıma elemanlarının hazırlanmasında kullanılan en etkin ve yaygın yöntemlerden biridir. Bu tekniğin en önemli özelliği basit ve ucuz olmasıdır. Moleküler baskılanmış polimerler seçiciliğinin iyi olması ve mekanik özelliklerinin mükemmel olması gibi üstün özelliklere sahiptir. Bu polimerler yüksek sıcaklık, asidik ve bazik koşullara, organik çözücüler ile muameleye dayanıklıdır. Biyolojik reseptörlere göre üstün özellikleri mevcuttur. Bu doğal reseptörü bulunmayan analitler için de sensör geliştirme olanağı sağlaması açısından önemlidir. Bu özellikleri nedeniyle MIP'ler eczacılık, ziraat, gıda, yaşam ve çevre bilimleri gibi birçok alanda tanıma elemanı olarak geniş çapta kullanılabilirler [25]. Temel kullanım alanı seçici ayırma olmasına rağmen, aktif moleküllerin tayini, ilaçlar ve kirleticiler için MIP temelli sensörlerin geliştirilmesi amacıyla kullanımı son yıllardaki en iddialı konulardan biridir [26]. Biyosensörlerde sinyal, analitin moleküler tanıma katmanında bulunan tanıma elemanına bağlanması ile oluşur. Çevirici bu sinyali ölçülebilir bir büyüklüğe dönüştürür ve ölçüm sonucunun elde edilmesini sağlar. Tanıma elemanı olarak biyomoleküller yerine MIP'ler kullanıldığında da aynı prensip geçerlidir.

Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarını içeren reseptörler ve uygun çeviricilerin bir arada bulunduğu basit analitik cihazlardır. Geleneksel analitik tekniklerle karşılaştırıldığında biyosensörler, hızlı ve eş-zamanlı tayin, düşük maliyet, taşınabilirlik, basit kullanım, örnek hazırlama işleminin kolaylığı gibi birçok özelliğe sahiptir. Biyosensörler genel olarak biyolojik tanıma elemanları ve dönüştürücülerine göre iki grup altında sınıflandırılmaktadırlar. Biyolojik tanıma elemanlarına göre olan sınıflandırmada; enzim, antikor, nükleik asit temelli biyosensörler olarak;



dönüştürücülerine göre yapılan sınıflandırmadaysa; elektrokimyasal, optik, piezoelektrik sensörler olarak sınıflandırılır [27].

SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan biyomoleküllerin etkileşimlerini ölçebilirler. Bu özellikleri nedeniyle, moleküler etkileşimlerin anlaşılabilmesi için bu cihazların önemi artmıştır. Etkileşimleri eş zamanlı, doğrudan ölçülmek; kinetik, termodinamik parametrelerin, derişimin veya ligandlarla analitler arasındaki etkileşimlerin belirlenebilmesini sağlamaktadır. SPR temelli biyosensörlerin hızlı cevap süresi ve yüksek seçiciliği vardır. Enzim veya radyo işaretleme yöntemleri gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında SPR biyosensörler sahip oldukları bu özelliklerden dolayı, protein-protein, antibadi-antijen, reseptör-ligand etkileşimlerinin tayininden düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tanımlanmasına kadar değişen çok çeşitli biyomoleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılabilir [28,29].

Sunulan çalışma kapsamında  $Cu^{+2}$  iyon tanıma bölgelerine sahip SPR biyosensörler hazırlanmış ve çalışma aşağıdaki başlıklar altında gerçekleştirilmiştir:

- N-Metakroil-(L)-Sistein Metil Ester (MAC) Monomeri sentezlenmiştir.
- MAC monomeri ve kalıp molekül olarak  $Cu^{+2}$  iyonu etkileştirilerek MAC- $Cu^{+2}$  ön-kompleksi hazırlanmıştır.
- $Cu^{+2}$  iyonu baskılanmış PHEMAC- $Cu^{+2}$  (MIP) ve  $Cu^{+2}$  iyonu baskılanmamış PHEMAC (NIP) nanopartiküller hazırlanmıştır.
- Sentezlenen MAC monomerinin,  $Cu^{+2}$  iyonu baskılanmış PHEMAC- $Cu^{+2}$  (MIP) ve  $Cu^{+2}$  iyonu baskılanmamış PHEMAC (NIP) nanopartiküllerinin karakterizasyonu FTIR-ATR ve elementel analiz ile gerçekleştirilmiştir.
- Kalıp molekül olan  $Cu^{+2}$  iyonu uzaklaştırılmıştır.
- $Cu^{+2}$  iyonu baskılanmış PHEMAC- $Cu^{+2}$  (MIP) ve  $Cu^{+2}$  iyonu baskılanmamış PHEMAC (NIP) nanopartiküller ile SPR biyosensörler hazırlanmıştır.
- Hazırlanan PHEMAC- $Cu^{+2}$  ve PHEMAC biyosensörlerin karakterizasyonu, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre ve temas açısı ölçümleriyle karakterize edilmiştir.

- Adsorpsiyon alışmaları için 10 mM pH 5.0 fosfat tamponu kullanılırken, desorpsiyon çalışmaları için 0.005 M EDTA içeren çözelti kullanılmıştır.
- Hazırlanan PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün farklı konsantrasyonlarda Cu<sup>+2</sup> iyonu tayinde kullanımı için kinetik çalışmalar yapılmıştır.
- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC biyosensörlerin Cu<sup>+2</sup> iyonu için seçicilik çalışmaları yapılmıştır.
- PHEMA-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC SPR biyosensörlerinin Cu<sup>+2</sup> iyonu tayinde tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.
- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün yapay idrar çözeltisi ve fizyolojik serum çözeltisine spike edilen Cu<sup>+2</sup> iyonu tayinde kullanımı araştırılmıştır.
- Tekrarlanabilirlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesi yapılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Biyosensörler

İçinde biyolojik maddeyi tanımlayacak reseptörler ve çeviriciler bulunan karmaşık olmayan aletlerdir. Standart analiz yöntemleri ile kıyaslandığında bu sensörler daha çabuk, daha ucuz, portatif, kolay uygulanabilirlik ve basitlik açısından standart yöntemlerin önüne geçmektedir [30]. Biyosensörler basit olarak biyolojik tanıma elemanları ve dönüştürücülerine göre olmak üzere iki sınıfa ayrılmıştır.

Biyolojik tanıma elemanlarına göre olan sınıflandırmada;

Enzim

Antikor

Nükleik Asit Temelli biyosensörler olarak

Dönüştürücülerine göre yapılan sınıflandırmadaysa;

Elektrokimyasal,

Optik,

Piezoelektrik,

Termal sensörler olarak sınıflandırılır [31].

İnsanları ve çevreyi tehlikeye atan kimyasallar, toksitler, patojenler gibi zararlıların bulunması ve analiz edilmesi açısından büyük öneme sahiptir. Yüksek tespit oranına olan kütle-spektrofotometresi ile kullanılan sıvı-gaz kromatografileri gibi standart yöntemler zaten kullanılmaktadır. Ama sıvı-gaz kromatografi gibi standart yöntemler uzun analiz sürelerine, yüksek maliyetlere, özel yetiştirilmiş elemalar gibi negatif özelliklere sahiptir. Birde bu yöntemlerle insanları ve çevreyi tehlikeye atan maddelerin daimi takip edilebilme olasılığı yoktur. Düzgün ve kaliteli analiz yapabilmek için hassasiyeti yüksek, kolay, ucuz, hızlı, portatif yöntemlere gerek duyulmaktadır. Biyosensörler üste belirtildiği gibi olumlu niteliklere sahiptirler. Bu nedenle insanları ve çevreyi tehlikeye atan zararlı maddelerin analizinde çok iyidirler [30]. Biyosensörler, biyolojik maddeyi tanımlayacak reseptörler ve çeviriciler içine dahil edilmiş, biyolojik tanımlama materyali ile analitik bilgiler doğrultusunda tespit

eden alet olarak Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) tarafından tanımlanmıştır. Biyosensörler, tanımlama materyali ile tanımlanması istenilen maddenin oluşturduğu kimyasal bağları ve reaksiyonları kolay anlaşılabilen sinyallere çevirime özelliğine sahip olan basit, ucuz kullanımı kolay tanımlama materyalleridir.

Çizelge 2.1.'de standart yöntemler ile biyosensörler arasındaki farklar görölmektedir.

Biyosensörler insanları ve çevreyi tehlikeye atan maddelerin analizinde standart yöntemlere göre daha avantajlıdır. Biyosensörlerin avantajı standart yöntemlerin analizine göre daha hızlı, ucuz, portatif ve örnekleme işleminin daha kolay olmasıdır.

Ama bazı biyosensörlerin dezavantajları vardır. Artık aynı anda birçok maddeyi tanımlayabilirken, genelde biyosensörle yalnızca bir tane maddeyi tanımlayacak şekildedir [30].

Biyosensör kavramı ilk kez Clark ve Lyons adlı araştırmacılar tarafından 1962 senesinde duyulmuştur. Clark ve Lyons diyaliz membranı ile tasarlanmış oksijen elektroduna, glukozoksidaz enzimi bağlayarak kanın glukoz seviyesini tespit etmişlerdir[32]. İlk kez 1962 yılında kullanılmış olmalarına rağmen daha öncelerde biyosensörlerin yapımını ve ar-ge'sine yardımcı olacak bir sürü bilimsel araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalar Çizelge 2.2'de belirtilmiştir [33].

Bir biyosensör çevirici ile biyoreseptörün birleşmesiyle oluşmaktadır. Biyoreseptörler hedef maddeye hassas biyolojik bütünlerdir. Biyosensörün hedef madde ile biyoreseptörün bağlanması dolaylı olarak ortaya çıkan biyokimyasalları sinyale çeviren bölümü nede çevirici denir. Biyosensörün ürettiği sinyaller doğrudan hedef maddenin oranıyla orantılıdır. Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarının vede sinyal dönüştürücülerine göre iki sınıfa ayrılmıştır. Dönüştürücüye göre yapılan ayırmada kendi içinde optik, piezoelektrik ve elektrokimyasal biyosensörler olarak 4 gruba ayrılmıştır [31]. Biyolojik tanımlama elemanlarına göre de antibadi, enzim ve nükleik asit bazlı 3 gruba ayrılmıştır [34].

Çizelge 2.1. Geleneksel analitik teknikler ile biyosensörlerin özellikleri bakımından karşılaştırılması [30].

Biyosensörler	Geleneksel Analitik Teknikler
Çabuk ve anında analiz	Uzun sürede analiz
Ucuz fiyat	Yüksek maliyet
Portatif	Laboratuvar şartları gerekliliği
Kullanımı kolay	Eğitim sonrası kullanım
Düşük teknoloji	Maliyeti fazla teknoloji
Örneğin hazırlanması kolaylığı	Örneğin uzun süreçte hazır hale getirilebilmesi
Düşük miktarda organik çözücü ihtiyacı	Daha fazla organik çözücü ihtiyacı
Sadece hedef maddenin analizi	Farklı maddelerin de analiz çıktısında bulunması
Ticari olarak kullanılabilme durumu limitlidir	Ticari olarak yüksek oranda kullanılabilirler
Ayarlanamazlar	Ayarlanabilirler
Duyarlıdırlar	Duyarlıdırlar
Özgüldürler	Özgüldürler
Tekrar kullanılabilirler	Tekrar kullanılabilirler

Çizelge 2.2. Biyosensörlerin tarihteki gelişim süreci [33].

Tarihler	Bilimsel Gelişmeler
1916	Protein immobilizasyonunda literatüre geçen ilk çalışma
1922	Camdan yapılmış olan pH elektrodunun üretimi
1956	Oksijen elektrodu keşif
1962	Biyosensörlerin glikoz ölçümü tabanlı ilk defa tanımlanması(ilk amperometrik biyosensör)
1969	Ürenin analiz edilebilmesi için üreazın immobilize edildiği elektrotların kullanılması(ilk potensiyometrik biyosensör)
1970	Sıcaklık dedektörlerinin icadı
1972-1975	Biyosensör üretiminin ticarileşmesi
1975	İmmünoensör üretimi ve mikroorganizma bazlı biyosensörlerin icadı
1980	Canlı hücrelerdeki kan gazlarının analiz edebilen fiber optik bazlı pH sensörünün üretimi
1982	Fiber optik bazlı biyosensör teknolojisi ile glikoz ölçümü
1983	İmmünoensörlerin yüzey plazmon rezonans bazlı icadı
1987	Ticari adı MediSense ExacTech olan glikoz sensörünün icadı
1990	SPR bazlı biyosensörlerin Pharmacia BIAcore markası adı altında üretimi
1992	Taşınabilir kan analizi yapan sistemin üretilmesi (İ-STAT)
1996	Abbott 867 milyon dolar karşılığında MediSense' i bünyesine katmıştır.
2003	Abbott 392 milyon dolar karşılığında İ-STAT' ı bünyesine katmıştır
2004	Abbott 1.2 milyar dolar karşılığında Therasense' i bünyesine katmıştır.

## **2.1.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması**

### **2.1.1.1. Biyotanıma Elemanlarına Göre Sınıflandırma**

#### **2.1.1.1.1. Enzimler**

Enzim biyosensörlerin gelişmesinin temel bileşenidir. Bu Biyosensörler bağlanacak olan molekülün yapısına göre, özel olarak seçilen enzimler kullanılmaktadır. Dünya genelinde en çok bu tip sensör kullanılmaktadır. Pazarın %90'lık kısmını oluşturmaktadır. Kandaki glikoz seviyesini ölçmekte kullanılmaktadır [35]. Günümüzde bu tip biyosensörler için birçok çalışma yürütülmüştür. Oksidoredüktazlar [36], Liyazlar sitrikasit [37], Malat [35], Askorbat [38], Alkol [39], Kolesterol [40], Gliserol [35]; Aminoasitler [41], Kaptan [42], Atrazin [43], Sukroz [44] gibi birçok örnek mevcuttur.

Uygun pH'ın kullanımı, sıcaklık ve kofaktörleri değiştiren nedenler, bu tip biyosensörün performansının üzerinde etkiye sahiptirler. İmmobilizasyonun sonucundan ve sensörün üzerindeki enzimin miktarı gibi değişkenler elektrotun performansının nedenleridir [35].

#### **2.1.1.1.2. Antiadiler**

Bir sürü aminoasidin belirli bir düzene göre sıralandırılmasıyla oluşturulmuş karmaşık moleküllerdir. Yabancı maddeye özel antibadi aşırı duyarlılıkla maddeyle bağ yapar ve antibadinin bu duyarlılığından dolayı hedef madde ile yapacağı bağ immünosensörlerin temel etkenidir [35]. Bu sensörler kansere neden olan hücrenin takibinde ve analizinde [45], bu hücrelerin işaretleyicisinin saptanmasında [46], bakterilerin ve virüslerin tespitinde [30], toksitlerin tespitinde kullanılmak için tasarlanmıştır [47].

#### **2.1.1.1.3. Nükleik Asitler**

Nükleik asit bazlı biyosensör nükleotit ipliklerine sırayla yerleştirilmiş tanımlayıcıların oluşturduğu birimlerin, birbirleri ile yüksek baz tabanlı uyumlarından ötürü hassas ve fazla seçiciliktedirler. Nükleik asitlerin sade ya da yapay hallerinden ötürü biyosensörlerin tanımlayıcı materyalleridirler. Günümüzde genelde yapay

oligodeoksiribonükleotitler DNA'nın genetik benzerliğini ve ya farklılığını tespit eden sensörlerin probudur.

### **2.1.1.2. Dönüştürücülerine Göre Sınıflandırma**

Bu sınıflandırmada biyosensörler optik, elektrokimyasal, piezoelektrik sensörler diye 3 sınıfa ayrılmıştır (Çizelge 2.3).

#### **2.1.1.2.1. Optik Sensörler**

Optik Biyosensörler gıda sanayi, sağlık, yaşam alanı analizin yapılmasında kullanılmaktadır[48]. Biyoloji, nanoteknoloji, optik teknolojinin birleşmesiyle gıda, sağlık gibi sektörlerde uygulanmasında önemli bir yeri vardır. Birçok optik biyosensör entegre üzerindeki ligand ve hedef madde arasında oluşan bağdan dolayı yüzeyin özelliklerinin değişimini kullanmaktadır.

Görünen bölgedeki UV ışını spektro-metrisi makro analitik kimyanın en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde insanlığı ve çevreyi tehlikeye atan maddelerin analizinde kalorimetrik yöntemler kullanılır. Genellikle analiz için rengin ve ışık yoğunluğunun değişimi kullanılmaktadır.

Floresans yöntemi belirginliği, hassasiyeti, özel işaretleme sistemi ve belirlenebilir floresan benzeri niteliklerinden ötürü optik biyosensörlerin temelinde çok cana kullanılmaktadır. Floresdan yönteminin diğerlerinden farkı cazip özellikleri olmasına rağmen, floresan boyalarının pahalı olmasından dolayı ve az bir ömrü olmasından mütevekkil bu yöntemin dezavantajlarındandır.

#### **2.1.1.2.2. Elektrokimyasal Sensörler**

Bu tip sensörler genelde sağlık sektörü, çevre analizi gibi biyoloji temelli yürütülen işlemlerde etkin bir rol üstlenmektedir. Örnekleme yapılmadan direk ölçüm yapılarak hızlı bir şekilde sonuç veren sensörlerdir. Elektrotun cinsine göre bu sensörler -50°C ile 1500°C derecelerde çalışabilmektedirler. Elektrokimyasal Biyosensörler kullanım yerlerine göre amperometrik ve potansiyometrik olarak iki sınıfta ayrılır. FTIR ve UV-

Spektrometrisine göre daha basit sonuç alır. Kullanımı kolay, bakım gerektirmeyen daha basit cihazlardır. Elektrokimyasal sensörler sinyali doğrudan in-situ eder. Gerçek zamanlı olarak bilgi verir. Ama hassaslık ve ölçüm sınırı açısından standart yöntemleri geçemez. Sensörün ürettiği sinyal ısı, basınç ve kimyasal şartlardan dolayı etkilendiğinden bu tip sensörleri kullanması gereken bireylerin bunlara dikkat etmesi gerekmektedir [49].

### 2.1.2.1.3. Piezoelektrik Sensörler

Saf silisyum dioksit den oluşan quars kristali biyosensörlerin önemli bir parçası olan piezoelektrik sensörlerin temelidir. Quars dünyada çok rahat bulunan bir kristal olduğu için bu sensörler düşük maliyetlidir. Yüksek çözünürlüğe ve kütle duyarlılığına sahiptirler [50]. Piezoelektrik sensörler sensörün yüzündeki kütle birikiminden dolayı titreşimleri algılayarak bunları sinyale çeviren bir yapıya sahiptir. Piezoelektrik sensörün avantajı analiz yöntemine çok kolay ve hızlı bir şekilde eklenebilmeleridir [51].

Bu sensör sağlık, gıda, çevre analizi gibi sektörlerde kullanılmaktadır[52]. Piezoelektrik bazlı sensörler ek olarak bozunmanın farklı işlem basamaklarında ve bazı pillerin elektrik yükünün takibinde kullanılır [53].

Çizelge 2.3. Biyosensörlerin Dönüştürücülerine Göre Sınıflandırılması

Sensörün Türü	Sensörün Çeşiti	Sensörün Kullanımı Bazlı Oluşan Avantajlar	Sensörün Kullanımı Bazlı Oluşan Dezavantajlar	Bilgilerin Kaynakları
Optik	Yüzey plazmon rezonans	Farklı spektroskopik faaliyetler yürütülebilir, Elektromagnetik bazlı maruz kaldığı faktörlerden etkilenmemektedir, Elektrik bazlı tehlikeli bir durum	Işıksal etkileşimlerden fazla etkilenebilmektedir, Matrikslerdeki birikim dolayısıyla yön bazlı uzunluğu değişkenlik göstermektedir.	Okumura ve ark., 2001; Parab ve ark., 2010; Wang ve ark., 2012



		oluşma durumu oldukça nadir gerçekleşmektedir.		
	Floresans	İşlem basamakları natürel olarak ilerlemektedir, Fotonlar multi olarak uyarılabilmektedir, Dışarıdan işleme dahil edilecek bir enzime ihtiyaç duyulmamaktadır.	Florofor bazlı toksik etki, Biyolojik işlem basamaklarında istenmeyen etkileşimler gerçekleşebilmektedir.	Goh ve ark., 2002; Bateman ve ark., 2007;
Elektro-kimyasal	Amperometrik	Sinyal/ses oranında oldukça yüksek sonuç vermektedirler. Düşük analit tüketimi	Analit akış hızına bağımlılık Analitin tüketimi	Velusamy ve ark., 2010; Miao ve ark., 2013
	Potantiyometrik	Kısa cevap zamanı Lineer cevap Renk ve bulanıklılık değişikliklerinden etkilenmez Zararlı değil	Elektrotlar foullenebilir, Referans elektrot gereklidir, Nernst eşitliğinde sapma	İnoe ve ark., 2010; Zelada-Guillen ve ark., 2012
Kütle	Piezoelektrik	Elektromanyetik alan ve radyasyona duyarlı değildir, Hızlı cevap süresi, Azaltılmış etkileşim etkileri.	Artı bir kütle ve frekans değişiklikleri arasında doğru bir korelasyonun olmayışı, Yüksek sıcaklıklar iç rezistansta düşüşe neden olur.	Xiong ve ark., 2012; Guo ve ark., 2012;

### 2.1.1.3. Çevresel Görüntülemelerde Biyosensörler

Doğadaki değişimlerin takibi açısından Biyosensörler çevresel analizde büyük öneme sahiptir. Biyosensörlerin ucuz, portatif ve hızlı sonuç vermesinden ötürü çevresel görüntülemelerde kullanmak için çok idealdir. Çevresel analizlerde biyosensörlerin kullanılması, biyosensörlerin gelişiminde büyük ilerleme sağlamıştır. Biyosensörler organik-inorganik zararlıların kimsal analizinde ve biyolojik-ekolojik değerlendirmelerde kullanılmaktadır [54].Çizelge 2.4'de çevresel uygulamalar için kullanılan biyosensörler listelenmiştir.

Çizelge 2.4. Çeşitli çevre kirleticilerinin tespitinde kullanılan biyosensörler.

Çevresel kirletici	Dönüştürücü eleman	Biyotanıma elemanı	Kaynak
DCMU herbisiti	Optik (Raman Spektroskopisi)	Kloroplast organeli	Açıkbaş, 2016
Endokrin ediciler tahrip	Optik (SPR)	Östrojen reseptörü	Seifert ve ark. 1999
Endokrin ediciler tahrip	Elektrokimyasal (Amperometrik)	Enzimatik (Tirozinaz)	Dempsey ve ark. 2004
Karbaril	Optik (SPR)	Antibadi	Mauriz ve ark. 2006
PCBs	Optik (floresan)	Antibadi	Endo ve ark. 2005
Organofosforlu bileşikler	Elektrokimyasal (Amperometrik)	Enzim (Organofosforlu hidrolaz)	Prakash Deo ve ark. 2005
Fenoller	Elektrokimyasal (Amperometrik)	Enzimatik	Nistor ve ark. 2002
Propanil	Optik (floresan)	Antibadi	Tschmelak ve ark. 2004
Bisfenol A	Optik (floresan)	Antibadi	Rodriguez-Mozaz ve ark. 2005
Bisfenol A	Optik (SPR)	Antibadi	Marchesini ve ark. 2005
Nitrat	Optik (floresan)	Recombinant <i>Escherichia coli</i>	Taylor ve ark. 2004
Benzen ve türevleri	Optik (luminisans)	Recombinant <i>Escherichia coli</i>	Berno ve ark. 2004
Antibiyotikler	Optik (floresan)	Antibadi	Tschmelak ve ark. 2005

## **2.1.2. Biyosensör Teknolojisinin Bugünü ve Geleceği**

Biyosensör teknolojisi özellikle son yirmi beş yıldır yeni malzemelerin yapım teknikleri, yeni sinyal iletim araçları ve aletleri kontrol eden güçlü bilgisayar programlarıyla gelişmekte olan ve hızlı bir şekilde büyüyen bir alandır [55]. Geçmişten bu güne biyosensörlerin geliştirilmesi üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen, hala daha gelişmiş ve güvenilir aletlerin yapımı konusunda engeller vardır. Aşağıda verilen bölümde biyosensör araştırmalarından beklenen gidişata değinilmiştir [54].

### **2.1.2.1. Sürekli Görüntüleme**

Su sistemlerinde kirlenici derişimleri, su akıntısına giren girdiler ve değışkenler neticesinde sürekli değıştiğinden dinamiktir. Birçok biyosensör kolay, hızlı ve yerinde ölçüm sağlayabilecek sürekli görüntüleme sistemleri olarak geliştirilmektedir [56, 57]. Bu biyosensörler aynı zamanda çeşitli boşaltma ve kirlilik olaylarında hızlı tespit gerektirecek kirliliklerin haritalanması için yararlıdır [58]. Gu ve arkadaşları 2000'li yılların başında bir su arıtma tesisinin akıntılarının toksisitesini görüntülemek için yeni bir erken uyarı protokolü uygulamışlardır [59].

### **2.1.2.2. Çoklu Analit Tespiti**

Birkaç analiti aynı anda tespit edebilen sensörler daha az zamanda daha az numune ve kimyasal kullandıklarından dolayı çevresel görüntüleme için uygun aletlerdir. Yüksek miktarda küçültülmüş sinyal dönüştürücü elemanlara sahip büyük ölçekli sensör platformları birçok numunenin izlenimine paralel olarak real time ölçüm sağlar ve bu, biyosensör araştırmalarında önemli bir itici güçtür [60]. Son yıllarda yerinde analiz için tasarlanan taşınabilir bir SPR immünosensör gibi aynı anda benzopiren ve 2-hidroksibifenil çoklu analit tespitlerinin çeşitli örnekleri literatürde görülmektedir [61]. İnce multielektrot tek kullanımlık çok analit tespiti sağlayan enzim biyosensörü, paraoksan ve karbofuran pestisitlerinin bulunduğu bir karışımdan analit ayrımı yapmak için geliştirilmiştir [62]. Farmasötiklerin, antibiyotiklerin, hormonların, endokrin bozucu kimyasalların ve pestisitlerin tespiti çoklu analit tespit eden immünosensörler

tarafından başarılmıştır [63, 64, 65]. Son zamanlarda kuantum noktalar çoklu analit tespiti için kullanılmaktadır [66].

### **2.1.2.3. Minyatürleştirme**

Mikroelektronik ve mikroakışkanlardaki gelişmeler analitik sistemlerin boyutlarının küçültülmesine olanak sağlar. Boyutta meydana gelen bu küçülme daha az kimyasal kullanımı ve atık oluşumuna neden olacağı gibi daha düşük hacimlerde çalışmaya da olanak sağlar [67]. Boyutta meydana gelecek küçülmeyle biyosensörler ucuz, elde taşınabilen, hızlı ve güvenilir ölçümler alan analitik cihazlar olabilirler. Biyosensörlerdeki küçülme özellikle implante bir biyosensör için sürekli in vivo görüntülemeye [68] ve ve farmasötik görüntülemeye çok önemli bir yere sahiptir [69] Çevresel görüntülemeye bir sensörün boyutu çok önemli olmasa da, küçültülmüş bir teknolojinin kullanımı kullanılan kimyasalın miktarında ve akışkanı kontrol etmek için gerekli enerji kullanımında düşüşe neden olacaktır [68]. Bu aynı zamanda analitik performans üzerinde analiz zamanını düşürme, güvenilirlik ve hassasiyet arttırarak olumlu bir etki yaratır (70). Diğer bir taraftan küçük boyut özellikle alan çalışmalarında kullanılan taşınabilir biyosensörlerin tasarımında tercih edilir [69].

### **2.1.2.4. Yeni Duyu Elemanları**

Moleküler tanıma bileşenlerinin afinitesi, özelliği ve toplu üretimindeki gelişmeler tamamen tespit teknolojilerinin başarısı veya başarısızlığına bağlıdır. Çünkü gelecekteki biyosensör gelişmelerindeki hayati yön kolay üretilecek ve geniş bir seçicilik özelliğine sahip olacak yeni duyu elemanlarının üretimine bağlı gibi gözükmektedir. Şu anda, enzim ve antibadi gibi çeşitli biyomoleküller üzerine yapılan üretim ve çalışmalar önemli bir zaman ve bilgi gerektirmektedir [69]. Moleküler baskılanmış polimer yukarıda bahsi geçen sınırlamaların üstesinden gelen ümit verici alternatifler olarak düşünülür [71].

### 2.1.2.5. Ticari Biyosensörler

Araştırma laboratuvarlarında büyük miktarda biyosensör üretilmektedir ve bu alandaki ilgili araştırmalar son derece önemlidir. Fakat çok az uygulamaya yönelik sistem ticari başarı kazanabilmektedir. Bu günlerde medikal uygulamalar için birçok ticari biyosensör varken [72], besin, ziraat, savunma sanayi, veterinerlik ve çevresel kontrol gibi alanlarda da oldukça büyük bir pazar vardır. Ancak medikal teşhis için geliştirilen aletlerin birçoğu çevre sorunlarına yönelik biyosensör pazarı için adapte edilebilir [73]. Çevresel biyosensör talebi medikal teşhis için kullanılanlardan büyük ölçüde daha az gibi gözükse de çevre sorunlarına karşı toplumda gelişen hassasiyet ve devlet yatırımları [74] biyosensörlerle kirlenici ve diğer çevresel tehditleri ölçmeyi amaçlamaktadır [69].

Yüzey plazmon rezonans biyosensörler çevresel görüntüleme için en başarılı ticari ürünlerdendir. BIACORE AB (Uppsala, İsveç), orijinal BIACORE'un çeşitli ürünlerinin yanı sıra değiştirilebilir otomasyon dereceleri ve parametre özelliklerini sunan diğer yapılandırma sistemlerini içeren birçok biyosensörü piyasaya sürmüştür[75]. Diğer yüzey plazmon rezonans ticari biyosensörleri IBIS sistem (Windsor Scientific, Berks, Birleşik Krallık), CELLIA sensör (Nippon Laser and Electronics Labs, Hokkaido, Japonya), Spreeta (Texas Instruments, Dallas, TX, ABD), the BIOS-1 sistem (Windsor Scientific), SENSIA (Madrid, İspanya) [76], BioTul AG (Münih, Almanya) [77], NanoDev (Ankara, Türkiye) (<http://www.nanodev.com.tr/>).

REMEDIOS, hücre temelli bir biyosensör, kirli toprağın tespiti için kullanılabilir. Bu sensör tüm hücre olarak kullanılan organizmanın metabolik aktivitesini etkileyecek herhangi bir zehirli maddeyi tespit eder. Unisense (Aarhus, Danimarka) ve NECi' nin nitrat biyosensörü [78], nitrat tayini için piyasaya sırasıyla mikrobiyal ve enzimatik biyosensörler sürmüşlerdir. CALUX sistem (Amsterdam, Hollanda) dioksin ve dioksin benzeri bileşiklerin tespiti ve ölçümü için kullanılır [79]. Caliper Technologies, Cepheid, Nanogen, ACLARA BioSciences, MICROGEN Systems ve Lawrence Livermore Laboratories gibi firmalar mikrobiyal ajanları tespitini ve tanımlanmasını sağlamak için mikro boyutta sistemler geliştirmektedirler [80].

## **2.2. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)**

Yüzey plazmon olgusu ilk defa 1902 yılında Wood tarafından gözlemlenmiştir [81]. Wood yaptığı çalışmada polarize ışığın bir kırınım düzenleyici yüzeyinden bir aynaya yansıttığı zaman aynada karanlık ve aydınlık bantlar tespit etmiştir. Wood'dan sonra sırasıyla Lord Rayleigh ve Fano teorisinin gelişimine katkıda bulunmuşlardır. Ancak yapılan bu çalışmalara rağmen yüzey plazmon rezonans olgusunun tam olarak anlaşılması 1968 yılına kadar mümkün olmamıştır. Bu tarihte Otto ve Kretschmann yüzey plazmon rezonansların oluşumunu rapor etmişlerdir[82]. Elde edilen bu gelişmeler yüzey plazmon rezonans olgusuna dayalı yüksek seçicilikte sensörlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. SPR temelli ilk biyosensörü 1980'lerde Liedberg ve arkadaşları hazırlamışlardır. Bu tarihten sonra bu konuda yapılan çalışmaların sayısı giderek artmıştır [83, 84].

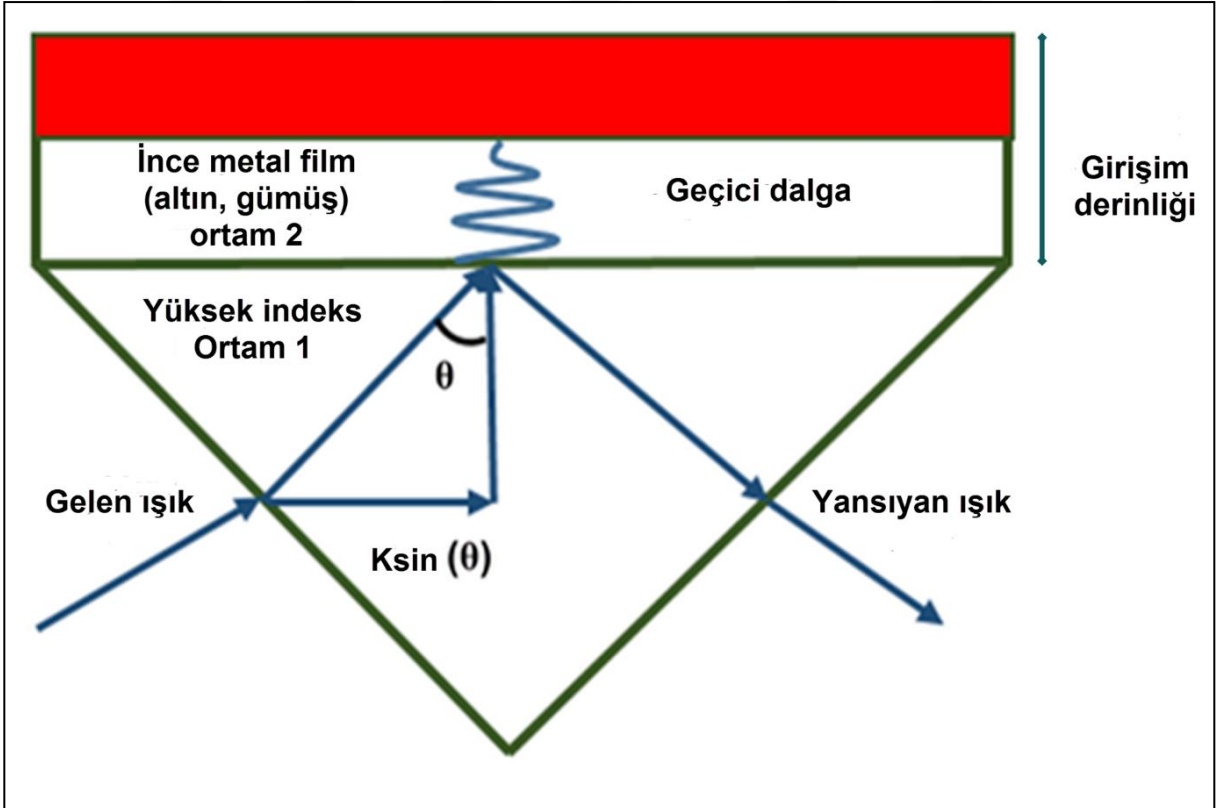
Yüzey plazmon rezonans, metal yüzeye yakın kırılma indisindeki değişimi ölçerek basit ve doğrudan ölçüm yapan bir tekniktir. Yüzey plazmon rezonans yönteminde geçirgen ve farklı kırılma indisli iki ortam arasında (cam prizma ve çözelti) ince bir metal film kullanılır. Metal film genellikle altın veya gümüştür. Kritik bir açının üzerinde düzlem polarize ışık, daha yüksek kırılma indisli bir ortama girdiğinde (cam prizma) toplam iç yansımaya uğrar. Bu durumda kendiliğinden sönümlü dalga (evanescent wave) adı verilen ışık, metal filmin içine doğru nüfuz eder. Belirli bir kırılma açısında bu dalga, metal yüzeydeki serbest elektronların yüzey plazmonları oluşturmaya sebep olur ve yansıyan ışığın yoğunluğu düşer. Bu olaya yüzey plazmon rezonans denir ve sadece rezonans açısı denilen belirli bir açıda gözlenir. Rezonans açısı, yüzeye analit eklenmesiyle değiştirilebilir. Bu değişim yüzeyin hedef moleküle göre modifiye edilmesiyle seçici hale getirilebilir. Bu da SPR biyosensörlerin temelini oluşturmaktadır [85].

### **2.2.1. Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi**

Yüzey plazmon rezonans teorisi, enerji taşıyan ışık fotonunun metalin elektronları ile birleşmesi veya enerji transferi ilkesine dayanmaktadır. Birleşmenin (veya enerji transferinin) gerçekleştiği ışığın geliş açısı her metal ve metal yüzeyinin çevresine

göre değişmektedir. Işık fotonları ve metal yüzeyindeki elektronlar arasında bir eşleşme ve/veya rezonans yakalandığında enerji transferi gerçekleşir. Bu enerji transferi, metal filmin alt yüzeyinden yansıyan ışığın miktarının ölçülmesiyle belirlenebilir. Her ışık birçok açıda yansırken, ışığın bir bölümü rezonans açısında absorplanmaktadır.

Kretschmann prizma yapısı, yüzey plazmon rezonans prizmalarının hazırlanmasında en sık kullanılan tasarımdır. Şekil 2.1' de görüldüğü gibi, metal film yüzeyindeki yük yoğunluk salınımını uyaran ışık demetinin toplam iç kırılması ile oluşan kendiliğinden sönümlü dalganın kullanıldığı bir yaklaşım vardır. Bu elektron salınımları, yüzey plazmonları olarak adlandırılmaktadır. Geçici alanın girişim derinliği ışığın dalga boyuna, ışığın geldiği ortam ile çevresinin kırınım açısı indekslerinin oranına ve fotonun parlaklığına bağlıdır. Enerji alanı yüzeyden uzaklaştıkça üstel olarak azalmaktadır. Bundan dolayı, girişim derinliği aniden düşmektedir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Dielektrik sınırlarda gerçekleşen toplam iç kırınım [170].

Girişim derinliği aşağıdaki eşitlikle tanımlanmaktadır:

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{\eta_1^2 \sin^2 \theta - \eta_2^2}} \quad (2.1)$$

Burada;

- $\eta_1$  ve  $\eta_2$ , birinci ve ikinci ortamın kırınım açısı indeksi,
- $\theta$ , ışığın metal yüzeye geliş açısıdır.

Metal yüzeye uygun p-polarize ışık, metal film ile birleşmek için prizmanın içerisine girer. Sadece p-polarize ışık plazmon oluşumuna sebep olmaktadır. Bunun nedeni sadece bu polarizasyonun metal film normaline uygun elektrik alan vektör salınımına sahip olmasıdır. Bu özellik, metal yüzeyindeki elektron plazmalarının transvers manyetik (TM) dalgası olarak adlandırılmaktadır [86, 87]. Oysa s-polarize transvers elektrik (TE) polarizasyonu yüzey plazmonlarını oluşturamamaktadır. Çünkü s-polarize ışığın elektrik alan vektörü, metal filme paralel olarak oluşmaktadır. Salınımların dalga vektörü ( $K_{sp}$ ) aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s}} \quad (2.2)$$

Burada;

- $\omega$ , salınımın frekansı,
- $c$ , ışık hızı,
- $\epsilon_s$ , metal yüzeyine temas eden örnek ortamının dielektrik fonksiyonu,
- $\epsilon_m$ , metalin dielektrik fonksiyonudur.

Gelen ışığın bir bileşenine ait dalga vektörü aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:



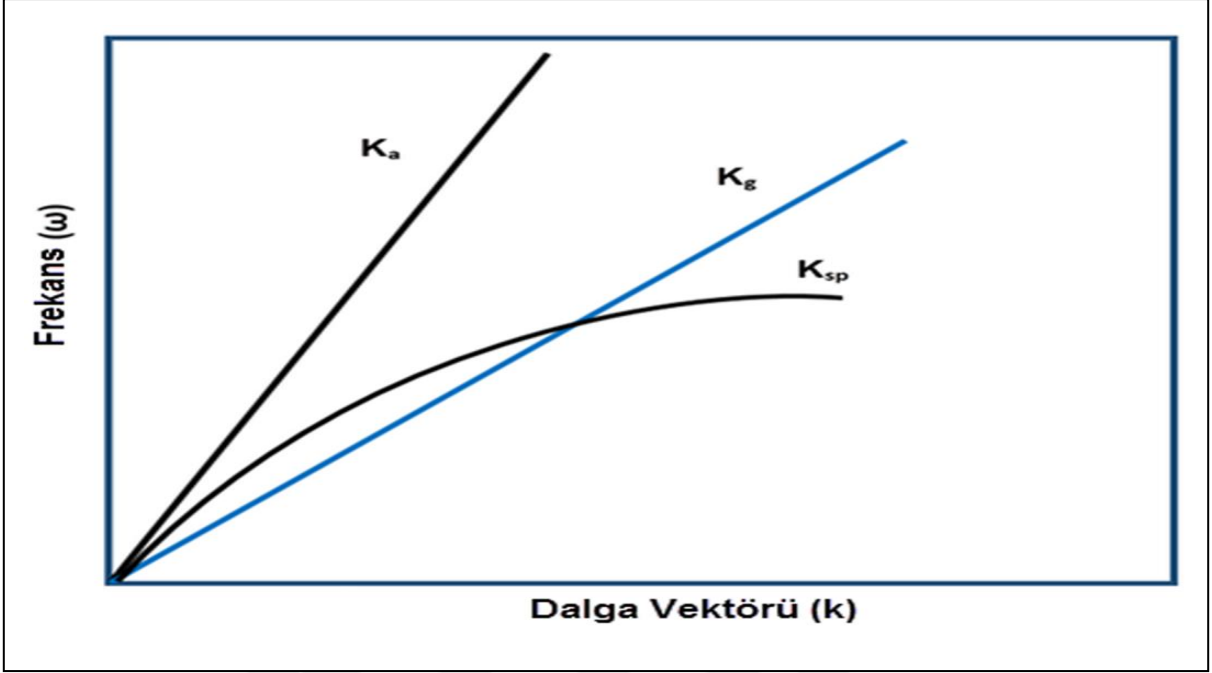
$$K_x = \frac{\omega}{c} \eta_p \sin \theta \quad (2.3)$$

Burada;

- $\theta$ , ışığın metal film yüzeyine geliş açısı,
- $\eta_p$ , prizmanın kırınım açısıdır.

Metal filmin üst yüzeyinde salınan ve toplanan yüzey plazmonları, p-polarize ışığı absorplar ve toplam iç kırınımına uğrayan ışığın parlaklığını ( $I_r$ ) değiştirir. Bu nedenle,  $I_r$ 'e karşı geliş (veya kırınım) açısı ( $\theta_r$ ) grafiğe geçirildiğinde açısal parlaklık profili elde edilir. Bu profile ait grafikte, rezonans açısında keskin bir azalma gözlenir.

Bu olayın gerçekleşmesi, yüksek kırınım indeksine sahip bir prizma gerektirmektedir. Bu tip bir prizmaya gereksinim, havadaki ışık yayılması ile yüzey plazmonların üretilmemesinden kaynaklanmaktadır. Yüzey plazmon rezonans sırasında, gelen ışığın ve yüzey plazmonun dalga vektörleri eşit olmalıdır. Fakat Şekil 2.2' de görüldüğü gibi, ışığın havadaki ( $K_a: \omega/c$ ) ve metalin plazmonundaki ( $K_{sp}$ ) dağılma eğrisi kesişmemektedir. Bundan nedenle, dalga vektörü ve frekansı eşzamanlı olarak karşılaştırılmasına imkân yoktur. Bunun tersine;  $K_{sp}$  ve cam yüzeyin ( $K_g$ ) dağılma eğrilerinin kesişmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılma eğrileri. [170]

Yüzey plazmon dalga vektörü, metal filme yakın bölgedeki ortamın kırınma indeksi ile ilişkilidir. Bundan dolayı,  $K_{sp}$  eşitliği şu şekilde basitleştirilebilir:

$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\eta_m^2 \eta_s^2}{\eta_m^2 + \eta_s^2}} \quad (2.4)$$

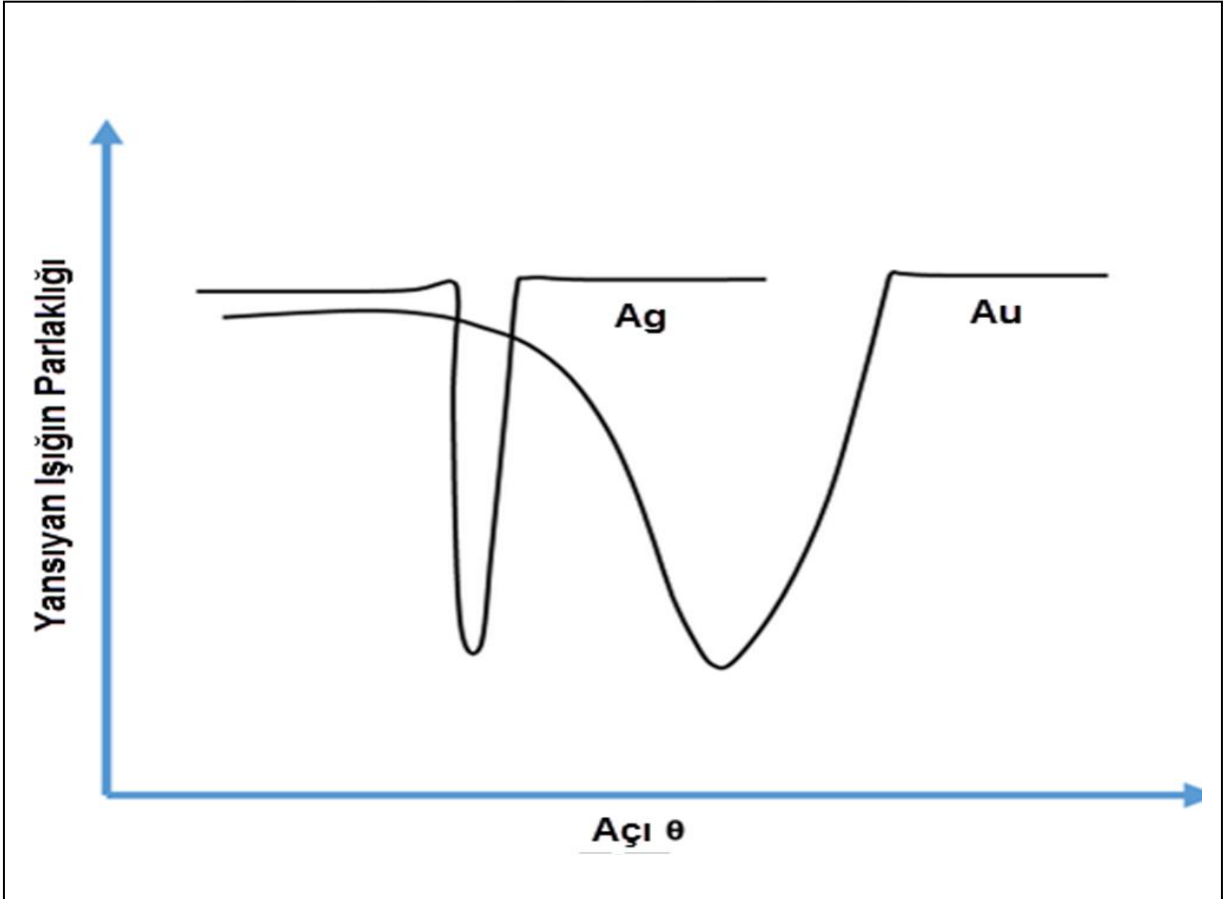
Bu formülde;

- $\eta_m$ , metalin,
- $\eta_s$ , örneğin kırınım indeksleridir.

Kompleks kırınım indeksi teriminin karmaşık bileşeni, absorbans ile ilişkilidir.

Yüzey plazmon rezonansın profili, seçilen metale göre değişiklik göstermektedir. Çünkü her metal, dielektrik geçirgenlik gibi farklı özgül optik özelliklere sahiptir. Şekil 2.3' de altın ve gümüş film için, yansıyan ışığın parlaklığına karşı gelen ışığın açısını

gösteren eğriler verilmiştir. Gümüş daha keskin bir rezonans pikine sahiptir. Bu rezonans piki, metal filmdeki yüzey plazmon salınımlarının kendiliğinden azalması nedeniyle olmaktadır. Tüm yüzey plazmon metalleri, uyarılma ışığının elektrik alanının saçılmasına bağlı olarak bu salınımları azaltma eğilimindedir. Birçok metal yüzey plazmon üretebilir. Yüzey plazmon rezonans için kullanılacak olan metal, uygun açılı ışıkla rezonansa girebilecek iletkenlik bandı elektronlarına ve sensör olarak kullanılabilmek için gerekli kimyasal modifikasyonlar için uygun özelliklere sahip olmalıdır. Altın belirtilen iki temel özelliğe birden sahip olan nadir metallere biridir. Bu özelliklere sahip olan diğer metallerde göre uygulaması oldukça kolaydır. Örnek olarak, indiyum gibi bazı elementler çok pahalıdır; sodyum gibi elementler oldukça reaktiftir; bakır, alüminyum gibi bazılarının yüzey plazmon cevapları çok geniştir veya gümüş gibi bazı elementler oksitlenmektedir [88].



Şekil 2.3. Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri [88].

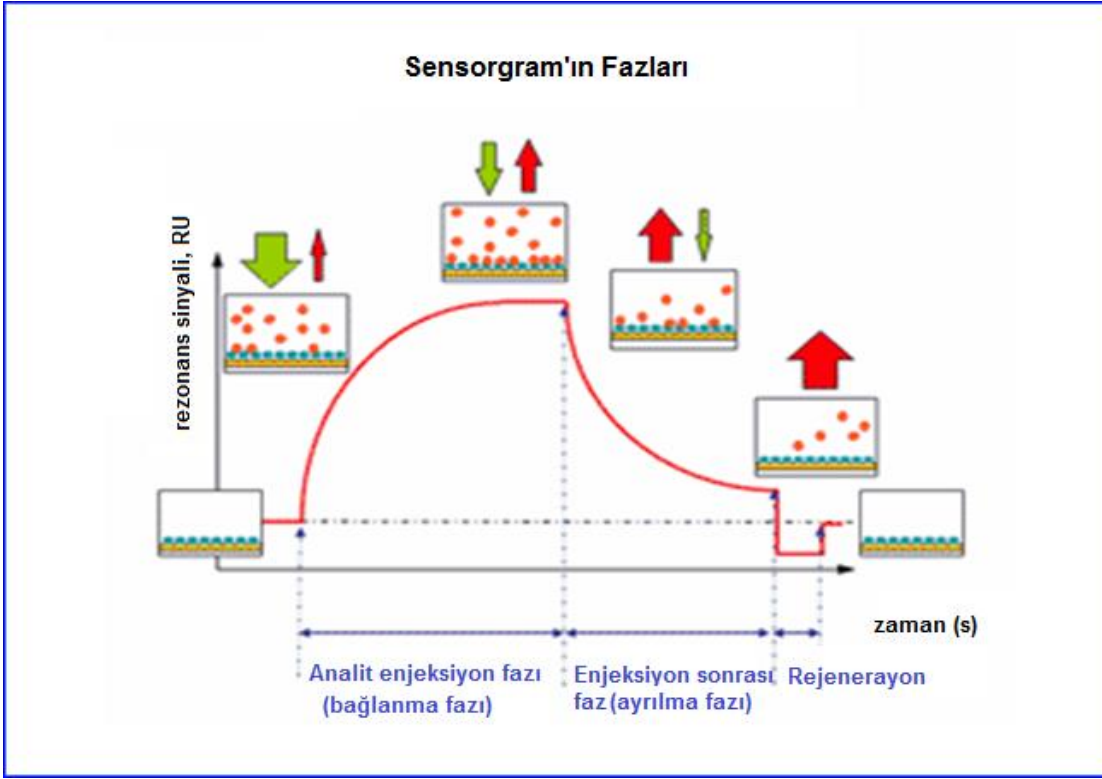
Yüzey plazmon rezonansın (SPR) analitik bir cihaz olarak kullanılması, plazmon alanı aralığındaki çevrenin kimyasal bileşimindeki değişimin sebep olduğu ışığın rezonans açısındaki kaymanın ölçülmesine dayanmaktadır. Kimyasal bileşenlerdeki değişim absorplanan ışığın geliş açısında kaymaya neden olmaktadır. Açık kaymasının büyüklüğü, nicel olarak kimyasal değişimle ilgilidir. Bir sensörde, ince metal film üzerine substrat bağlanmış bir prizma (genel olarak cam ve plastik) üzerine uygulanır. Daha sonra özel bir analite (hormon, ilaç, tümör belirteci vb.) özgül moleküller metal film üzerine non-spesifik olarak adsorplanır. Sensöre analit içeren örnek uygulandığında gerçekleşen etkileşim (antibadi ve analit bağlanması gibi) gelen ışığın rezonans açısındaki kaymanın ölçüldüğü metal yüzeyindeki kimyasal bileşen değişimine neden olur. Rezonans açısındaki kaymanın boyutu, örnek içerisindeki analitin miktarı ile orantılıdır. Moleküller arasındaki ilişki oldukça özgül olduğundan dolayı diğer moleküller sensör tarafından ölçülememekte ve çapraz-reaktivite gözlenmemektedir.

### **2.2.2. SPR Biyosensörler**

SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan biyomoleküllerin etkileşimlerini ölçebilirler. Bu özellikleri nedeniyle, moleküler etkileşimlerin anlaşılması için bu cihazların önemi artmıştır. Etkileşimleri eş zamanlı, doğrudan ölçülebilmek; kinetik, termodinamik parametrelerin, derişimin veya ligandlarla analitler arasındaki etkileşimlerin belirlenebilmesini sağlamaktadır. SPR temelli biyosensörlerin hızlı cevap süresi ve yüksek seçiciliği vardır. Enzim veya radyoişaretleme yöntemleri gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında SPR biyosensörler sahip oldukları bu özelliklerden dolayı, protein-protein, antibadi-antijen, reseptör-ligand etkileşimlerinden düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tanımlanmasına kadar değişen çok çeşitli biyomoleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılabilir [89].

Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörler, metal yüzeyinde biyo-tanımayı sağlayacak bölgelerin oluşturulmasıyla elde edilir. Biyo-tanımayı sağlamak için antibadiler [90] ya da nanopartiküller kullanılabilir [91]. Hedef molekülü içeren çözelti

biyosensörle etkileştiğinde hedef molekül sensör yüzeyine bağlanır ve yüzeyin yoğunluğunun artmasına neden olur. Yüzeydeki yoğunluk artışı yüzeyin kırılma indisinin artmasına neden olur. Kırılma indisindeki bu artış ise rezonans açısının kayması ile sonuçlanır. Bu etki zamana bağlı olarak incelenirse Şekil 2.4' deki benzer bir sensorgram elde edilir. Şekil 2.4'de görüldüğü gibi, yüzeye analit bağlanması ile rezonans açısı artmaktadır. Desorpsiyon çözeltisinin sisteme verilmesiyle analit, yüzeyden ayrılmaya başlar ve belli süre sonra sinyal tekrar eski seviyesine döner.



Şekil 2.4. Tipik bir SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.

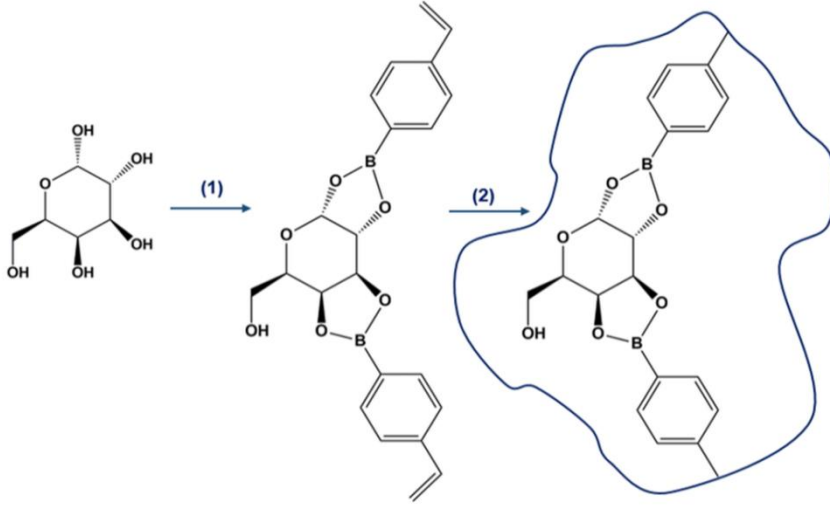
Yaşam bilimlerinde ve farmasötik çalışmalarda makromoleküllerin ve onların etkileşimlerinin araştırılması için SPR biyosensörlerden yararlanılmaktadır. Ayrıca SPR biyosensörler çevresel kirleticilerin tespitinde [92, 93, 94], gıda teknolojisinde [95, 96, 97], hastalıkların teşhisinde [98, 99, 100] kullanılmaktadır.

Son yıllarda besin ve su kaynaklı patojenik bakterilerinin tespiti için immüno-sensör geliştirilmesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır [101, 102, 103]. Yüzey plazmon rezonan temelli biyosensörler bu tip tespite yönelik hazırlanan immüno-sensörlerden

biridir. Önemli zirai patojenlerden biri olan *Phytophthora infestans*'ın tespitine yönelik hazırlanan SPR temelli biyosensörde tespit sınırı  $2.2 \times 10^6$  spor/mL olarak tespit edilmiştir [104]. Yapılan başka bir çalışmada  $1 \times 10^6$  mL'de *Salmonella Typhimurium*'un varlığı tespit edilmiştir [105]. Mauriz ve arkadaşları SPR temelli taşınabilir immünosensör ile doğal su örneklerinden karbonil analizi yapmışlardır [106]. Ortalama 15 nm büyüklüğündeki kolloid altın nanopartiküllerle güçlendirilmiş SPR temelli biyosensör ile 7.5 dakika gibi kısa bir sürede 14 pg/mL derişiminde estrol-16-glusuronit tespiti sağlanmıştır [107]. Yapılan diğer bir çalışmada sudan profenofos tespiti için SPR temelli moleküler baskılanmış çok ince bir film tanıma elemanı olarak kullanılmıştır [108].

### **2.3. Moleküler Baskılama**

Çevrede toksik etki yaratan, biyoterörizme sebep olan ya da çevredeki moleküllerin faaliyetlerini gözlemlemek doğayı ve insanlığa korumak adına ciddi bir öneme sahiptir. Bu moleküller arasından analiz yapılması için hedef alınacak olan moleküle özgü, önceden belirlenmiş seçicilik ve afiniteye sahip kimyasal ve biyolojik moleküller gerekmektedir. Bu işlemler için canlı organizmalar kullanıldığında 'moleküler tanıma' olarak adlandırılan moleküler yapılardaki yapısal ayrışmalar sonrasında birbirleriyle reaksiyona girerler. Protein ve nükleik asitlerdeki ligand seçiciliği özelliği ve kararlılık problemleri bu yapıların abiyotik çevrelerde kullanımının daha kısıtlı olmasına sebep olmaktadır. Bu kısıtlamalar bilim adamlarını doğal eşlenikleriyle aynı seçiciliğe ve etkinliğe sahip yapay biyo-tanıma sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmasına sevketmiştir. Bu alana yönelik çalışmalar sonrasında Moleküler Baskılama teknolojisi yapay molekülleri tanımak adına alternatif bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır. Moleküler baskılama tekniği 1972 yılında Günter Wulff ve çalışma ekibi tarafından tanımlanmıştır. Wulff ve ekibinin çalışmalarının devamında enzim tepkimelerindeki substratların, ürünlerin ve geçiş analoglarının kullanımıyla 'yapay enzim' dahi elde edilebileceği saptanmıştır [109].



Şekil 2.5. Kovalent Baskılama Şeması [109].

Bilim adamları moleküler baskılama teknolojisine daha detaylı hakim olabilmek adına antijen-antibadi, enzim-substrat, hormon-reseptör, DNA ve RNA arasındaki etkileşimler üzerinde çalışmalar yürütmektedirler.

Moleküler baskılama yöntemi farklı matrislerden iyonlar, organik moleküller ve biyomoleküllerin yüksek seçicilikte ayrılabilmesi için, akıllı polimerlerin üretilerek farklı uygulamalarda kullanılmasını yaygınlaştıran yeni bir teknolojidir [110].

Afinite bazlı ayırıştırma işlemleri ya da enzimatik kataliz gibi biyotanıma dayanan işlemlerde moleküller arasındaki etkileşimler oldukça önemli bir yere sahiptir. Moleküler baskılama teknolojisi sayesinde tespit edilmesi hedeflenen farklı bileşikler için seçici olarak istenilen özelliklerde polimer yapımı mümkün kılınmıştır. Bu teknikte kullanılan kalıp moleküller vasıtasıyla spesifik katalik ve tanıma bölgeleri oluşumu sağlanmaktadır [111].

Moleküler baskılama tekniği, sıkı çapraz bağlı polimer matrisin içinde boşluklar yaratılması prensibi ile uygulanmaktadır. Buradaki boşluklar kalıp molekülün boyutu ve şeklini tanıyabilmektedir. Desorpsiyon yöntemlerinden birisi ile kalıp molekülü uzaklaştırılarak, sabit pozisyonda bulunan fonksiyonel grupların ortaya çıkması ile kalıp moleküle eşlenik yapı oluşmaktadır. Hazırlanmış olan polimer, bu kalıp molekülü boyut, yapı ve fizikokimyasal özellikler bakımından tanıyarak, ortamın şartları

farketmeksizin bu kalıbın hem seçici hem de şekilde bağlanmaktadır. Moleküler baskılanmış olan polimer (MIP) bir kalıp molekülü, fonksiyonel monomerler ve çözücü içerisinde ihtiyaç duyulan başlatıcıyı içeren bir karışımdan oluşturulmaktadır. Polimerizasyon işlemi süresince kalıp molekül ile fonksiyonel monomer aralarında oluşmuş olan çapraz bağlayıcı moleküller ile çevrelenmektedir. Bu sayede kalıp molekül hapsedilerek üç boyutlu bir polimer ağı oluşumu gerçekleştirilmektedir. Sonraki aşamada kalıp molekülün uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirilir. Kalıp molekülün uzaklaştırılması sonrası polimer ağına oluşan boşluklar kalıp moleküle özgü büyüklüğe, şekle ve moleküler etkileşime sahiptir. Moleküler baskılama teknolojisindeki gerekli ön koşul monomer ile kalıp molekül arasında kararlı bir kompleks oluşturulmasıdır [112].

Moleküler baskılanmış polimerler seçicilik bakımından benzersiz özelliklere sahip olmaları dışında fiziksel ve kimyasal dış etkilere karşı oldukça direnç göstermektedirler. Moleküler baskılanmış polimerler organik ve inorganik çözücülere ve mekanik strese rağmen istenilen sonucu verebilmektedir [109]. Bu benzersiz seçicilik ve dış etmenlere karşı dirençli özellikleri moleküler baskılama teknolojisinin kromotagrafi, saflaştırma, katalizleme işlemleri, sensör yapımı, ilaç salınımı gibi çok geniş ve bilim insanları için insanlığa ciddi katkı verebilecekleri kritik alanlarda tanıma ve ayırma amaçlı tespitlerde kullanılmaktadır. Çoğu teknolojik sisteme göre sistem oluşturulması süresindeki gereksinimler daha kolay ve ucuzdur. Değiş etmenlere karşı olan dirençleriyle analiz mezziyetlerinde değişim olmadan birkaç sene boyunca saklanabilmektedirler [28, 113, 115].

Molekül baskılanmış kalıp moleküller sistemden çözücüyle çıkarıldıktan sonra kendilerine özgü boyut ve şekli tanımlama özellikleri dolayısıyla bu teknolojiye kalıp molekül olarak birçok farklı partikül ya da molekül kullanılabilmektedir. Örneğin öğtölmüş net bir şekilde sahip olmayan partiküller, düzgün şekilli partiküller, nanopartiküller, çelik kolondaki monolitler, kapiler kolondaki monolitler, açık boru kapilerdeki katmanlar, yüzeye tutturulmuş ince tabakalar, membranlar ve kompozitler moleküler baskılama tekniği ile tespit edilebilmektedir. Bu kadar geniş alandaki maddelerin tespit edilmesi dolayısıyla da moleküler baskılama tekniği ile ilgili çalışmaların karakterizasyon, optimizasyon ve sonuç aşamalarını içeren birçok



bilimsel çalışma görmek mümkündür. Bu akademik çalışmalarda kiral tanıma [116, 117], ve kapiler elektrokromotografi (CEC) [118, 119, 120] geniş bir yer tutmaktadır. MIP teknolojisi ile membran, partikül ve monolit kullanımı gibi daha spesifik formlarla ilgili de bilimsel çalışmalar görülmektedir [121]. Yine MIP katı faz ekstraksiyonu (SPE) ile zenginleştirilmede [122], ilaç salınım sistemlerinde [123], antibadiler için yapay enzim ya da reseptör [124, 125] olarak kullanılabilir. Bu çalışmalara ek olarak MIP teknolojisinde matrikse iletken polimerlerin sokulduğu farklı konularda da çeşitli çalışmalar yapılmıştır [126].

MIP teknolojisi kullanılarak üretilen sensörler ticarileştirme imkanlarının büyüklüğü dolayısıyla da güncel bir konu olarak ele alınmaktadır. Ticari olarak kullanıma uygun olma sebepleri arasında benzersiz bir seçicilik ve yüksek afinite ve kararlılık, düşük maliyetli ve işlem basamaklarının mikroüretime uygun olması sebep gösterilebilmektedir [127]. MIP kullanımının sağladığı bu avantajlar dolayısıyla zamanla biyosensör geliştirilmesinde kullanıma tercihinin fazlalaşmasına sebep olmuştur. MIP' ta kimyasal bazlı sensör çalışmaları oldukça yoğunlaşmasına rağmen, elektrokimyasal ve optik sensörler üzerine de ciddi çalışmalar olduğu görülmektedir [128, 129]. MIP teknolojisi ile geliştirilen sensörlerine bakıldığında şekerler, nükleik asit ve amino asit türevleri, herbisitler, ilaçlar, toksinler ve çözücülere özgü sensörler üretildiği ve bu üretimlerin rapor edildiği görülmektedir [127]. MIP tekniği bu kadar geniş alanda ciddi sonuçlar vermesi dolayısıyla son yıllarda araştırmacıların daha fazla yöneldiği bir alandır [130].

### **2.3.1. Moleküler Baskılama Tekniği**

Moleküler baskılama tekniği üç temel işlem adımıyla gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.6).

#### **2.3.1.1. Ön-kompleks Oluşumu Safhası**

Fonksiyonel monomerle kalıp molekül yapısıyla polimerizasyon işlemini gerçekleştirecek bir ön kompleks oluşturur. Bu işlem süresince faaliyet gösteren fonksiyonel monomerler, seçici etkileşime girmesi istenen fonksiyonel grupları ve

polimerizasyon işleminin gerçekleşmesini sağlayacak doymamış bağlara sahip olma özelliği taşımaktadır. Kalıp molekülün etrafının fonksiyonel monomerlerle çevrelendiği ve etkileşime girdiği bu işlem basamağında çıktı olarak oluşan 3 boyutlu yapı ve bu işleme özgü kimyasal reaksiyonlar ciddi bir öneme sahiptir.

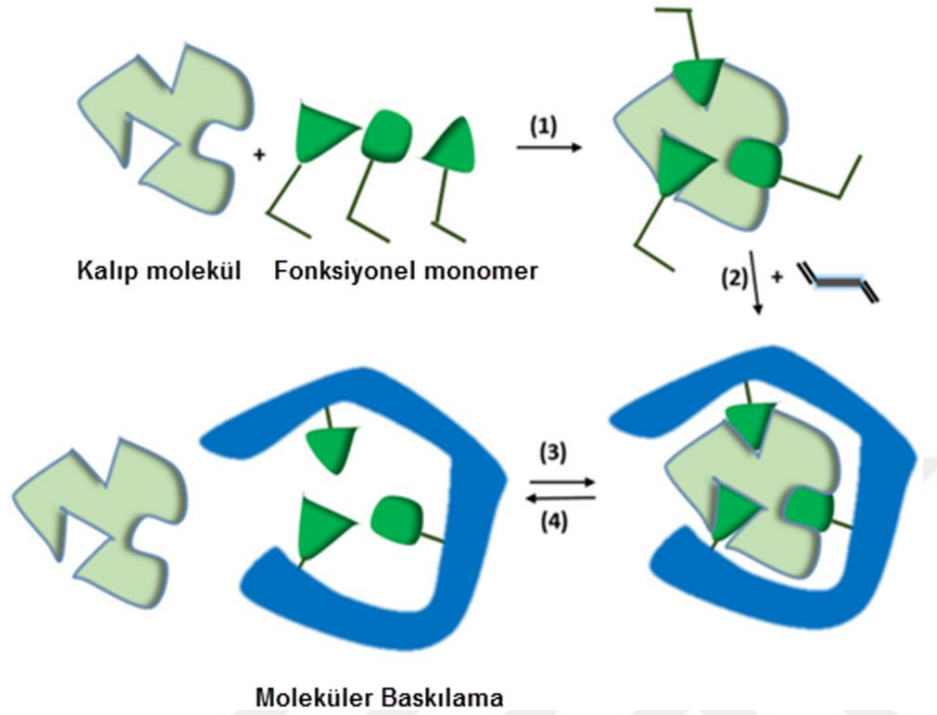
### **2.3.1.2. Polimerizasyon Safhası**

Bir önceki işlem basamağının çıktısı olan fonksiyonel monomer ve kalıptan oluşan 3 boyutlu kompleks, işlemde kullanılan moleküllerle uyum gösterecek olan uygun çapraz bağlayıcının kullanılmasıyla fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilmektedir.

### **2.3.1.3. Kalıp (Hedeflenen) Molekülün Uzaklaştırılması Safhası**

Kalıp molekül polimerden hedef moleküle özgü boşluklar kalması amacıyla uzaklaştırılmaktadır. Bu yaratılan boşluklar kalıp molekülü boyut, yapı ve fizikokimyasal özellikler bakımından tanıyarak, hem etkin hem de seçici şekilde kalıbı moleküle bağlamaktadır [131].

Moleküler baskılama tekniğinin istenilen sonuçları elde etmek adına kalıp molekülün, fonksiyonel monomerin, çapraz bağlayıcının, polimerizasyon aşaması için gerekli çözücünün ve başlatıcının seçimleri çok önemlidir.



Şekil 2.6. Şematize edilmiş MIP [170].

#### 2.3.1.4. Moleküler Baskılanmış Polimerin Özelliklerine Etki Eden Parametreler

Polimerizasyon sonrasında oluşturulmuş matrisin yapısı moleküler baskılamada çok kritiktir. Çünkü matris içerisindeki oyukların spesifik yapısı, polimer zincirinin düzenlenişi ve molekül ağırlığı yüksek olmayan kalıpla direk olarak ilgilidir. Polimerin sertlik miktarı ile kalıp molekülün uzaklaştırılması sonrasında oluşmuş olan oyukların şekillerini korumasıyla direk olarak ilişkilidir. Polimer sertliğinin yeterli miktarda sağlam bir yapı oluşturabilmesi adına da kaydadeğer bir miktarda çapraz bağlayıcı kullanılmaktadır. Baskılanacak olan substratın uygun şekilde yönlendirilmesi kalıp molekülün polimere bağlanması ile gerçekleşmektedir. Moleküler baskılama tekniğinde elde edilebilecek en ideal spesifiklik ve seçicilik miktarı çapraz bağlayıcıların seçimine, miktarına ve uygun monomer seçimine direk olarak bağlıdır.

#### **2.3.1.4.1. Kalıp (Hedef) Molekül**

Kalıp molekül fonksiyonel monomerlerle kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleksin oluşumunu istenilen şekilde sağlayacak fonksiyonel grupların baskılanan kalıp molekülde bulunması çok önemlidir. Kalıp molekül içerisinde elektrostatik etkileşme yaratabilen (amid grupları, amino, hidroksil ve karboksil) ve hidrojen bağı olan bölgeler kompleks oluşturulması gayesiyle daha fazla seçilen bölgelerdir. Kalıp molekülün kimyasal reaksiyonların gerçekleştiği süreçte kararlı bir durumda olması gereklidir. Buna uygun örnek olarak ısı başlatıcı seçimi yapılırsa kalıp molekülün ya da ön polimerizasyonda ile oluşturulmuş kompleksin yüksek ısı kaynaklı parçalanmaya uğramaması gerekliliği gösterilebilir. Kalıp molekül konformasyonunun yapısı moleküler baskılama tekniğinin başarılı sonuç verebilmesinde ana etmenlerden birisi olduğundan dolayı bu yapıda meydana gelebilecek değişiklikler işlemin başarısını direkt olarak etkileyebilmektedir [132]. Proteinler, karbonhidratlar, aminoasitler, koenzimler, pestisitler, hormonlar, ilaçlar, iyonlar ve nükleotid bazlar baskılanacak molekül olarak tercih edilebilmektedir [133].

#### **2.3.1.4.2. Fonksiyonel Monomerler**

Moleküler baskılama tekniği ile yürütülen çalışmalarda fonksiyonel monomer işlevi için daha çok akrilik ve vinil grup içeren monomerlerin serbest radikal polimerleşmesi sonucunda oluşan organik polimerlerin seçildiği gözlemlenmiştir. Bu polimerlere ek olarak polisiloksan ve polistiren içeren çalışmaların da rapor edildiği görülmüştür.

Moleküler baskılama tekniğinde fonksiyonel monomerler bağlanma bölgelerinde gerçekleşen bağlanma etkileşimlerinin kalitesini belirlemektedir. Ek olarak, fonksiyonel monomer seçiminin önemini sistemden sökülen kalıp molekülün, sisteme geri bağlanış sürecindeki bağları da fonksiyonel monomerlerle yapması göstermektedir. Kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki bağlanma gruplarının uyuşması ile baskılama sürecinin ve çıktı olarak oluşan kompleksin kalitesi belirlenmektedir. Fonksiyonel monomerin bağlanmaya elverişli olan bölge sayısı bu kaliteyi direkt olarak belirleyen bir etmendir. Kopolimerizasyon basamağı fonksiyonel monomerler ile kalıp molekülün birbirleriyle girdiği elektronik ve sterik

etkileşim sonucunda gerçekleşmektedir. İhtiyaca göre kullanılmak üzere seçilen fonksiyonel monomerler asit, baz ya da nötral özelliklere sahip olabilirler. Baskılama kovalent olarak gerçekleşirse kalıp molekül ile vinil gruplarının bağlanması gerçekleşir. Moleküler baskılamada en çok tercih edilen fonksiyonel monomerler metakrilik asit, akrilik asit esterleri ve amitleridir.

Biyolojik reseptörler çözünür, esnek ve sadece bir tane bağlanma bölgesi içerirken, çözünmez ve rijit yapılarla baskılanan polimerler çok daha fazla bağlanma bölgesi içermektedir. Kullanılan çözücülerin polar olması durumunda akrilamidler kuvvetli hidrojen bağları yapmaları dolayısıyla tercih edilmektedir. Polar olmayan gruplarda ise farklı fonksiyonel monomerler kullanılabilir.

#### **2.3.1.4.3. Çapraz Bağlayıcılar**

Çapraz bağlayıcılar hem bağlanma bölgelerini sabitleyerek, hem de mekanik kararlılık sağlayarak morfolojinin kontrolüne imkan sağlamaktadırlar. Çapraz bağlayıcılar aynı zamanda polimerlerin çözücü içerisinde çözünmesini daha fazla zorlaştırdıkları için pratikteki kullanımlarını kolaylaştırmaktadırlar.

MIP hazırlanması esnasında diğer bir kritik nokta da çapraz bağlayıcının seçimidir. Çapraz bağlayıcı, kalıbın polimerden uzaklaştırılması sonrasında kararlı ve analiti hafızasında tutan polimer bir ağ örgüsü oluşturmak için kullanılmaktadır [134]. Çapraz bağlayıcı, matriksin morfolojisinin kontrol altında tutulmasını (jel tipi, makro gözenekli ya da mikro jel halinde olması), baskılanmış molekülün veya iyonun bağlanma bölümlerinin kararlı olmasını, polimer matriksin mekanik kararlılığının yüksek olmasını sağlamaktadır. Yüksek oranda çapraz bağlanma ile, polimer matriksin çözücüde çözünmesi önlenmektedir ve kullanımı kolaylaşmaktadır. Etkin bir baskılama yapılabilmesi için çapraz bağlayıcının reaktifliğiyle fonksiyonel monomerin reaktifliğinin uygun olması ve çapraz bağlayıcı ajanın fonksiyonel monomere olan mol oranı oldukça önemlidir. Eğer sistem bu özellikleri taşımazsa fonksiyonel monomerden veya çapraz bağlayıcıdan biri polimerizasyon sırasında baskın çıkabilir ve kopolimerizasyon işlemi homojen olarak gerçekleşemez. Farklı çapraz bağlayıcı/fonksiyonel monomer derişim oranları moleküler baskılı polimerlerdeki farklı

sayıda bağlanma bölgelerinin var olmasına neden olur ve bu durum da seçicilik miktarına etki edebilmektedir [135]. Eğer mol oranları çok küçük bir değere sahipse, kalıp molekülün bağlanma bölgeleri birbirlerine çok yakın olabilmektedir. Kalıp molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır ve etkin bir sonuca ulaşılamaz. Çok büyük mol oranlarında da çapraz bağlayıcılar fonksiyonel monomerlerle veya hedef molekülle kovalent olmayan etkileşim göstermesi sonucu baskılamanın etkinliği daha fazla azalmaktadır [136]. Etilen glikol dimektarilat (EDMA) ve divinil benzene (DVB) çapraz bağlayıcıları molekül baskılama işleminin organik çözücü kullanılarak yapıldığı durumlarda tercih edilmektedir. Baskılama işleminin daha etkili olabilmesi için çapraz bağlayıcının reaktivitesi ile fonksiyonel monomerin reaktifliği birbirine yakın olmalıdır.

#### **2.3.1.4.4. Çözücü**

Molekül baskılamada çözücüler polimerleşme süresince gözenek yapıcı ve yeniden bağlanma ortam sağlayıcısı olarak görev yaparlar. Oluşturulan gözeneklerin görevi yeniden bağlanmanın kolay gerçekleşmesini sağlayan kütle aktarımına olanak sağlamasıdır.

Çözücüler, polimerizasyonda baskılanacak molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı gibi tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasını ve polimerde gözeneklerin oluşmasını sağlar. Makrogözenekli polimerin hazırlanması aşamasında; çözücü, gözeneklerin yapısı ve seviyesi, morfolojisi, ve topla gözenek hacmini kontrol etmek için önemli bir unsurdur. Çözücünün baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu artırma gibi bir görevide vardır. Gözeneklilik bağlanan hedef molekülün polimerden salınmasını kolaylaştırır. Çözücünün baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu artırma gibi bir görevide vardır. Gözeneklilik bağlanan hedef molekülün polimerden salınmasını kolaylaştırır. Çözücülerin bir diğer görevide polimerizasyon sırasında reaksiyon ısısını eşit olarak yaymaktır. Aksi taktirde, polimerizasyon sırasında reaksiyon sıcaklığı bölgesel olarak artar ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna neden olur. Çözücü seçimi baskılamanın türüne bağlıdır. Kovalent

baskılamada, tüm bileşenleri iyi çözebilecek birçok çözücü kullanılabilir. Kovalent olmayan baskılamada, etkileşimin oluşumunu ve baskılama etkisini artırmak için çözücü seçimi daha önemlidir [137]. Polimerizasyon çözücüsü, monomerlerle baskılanacak molekül arasındaki hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler gibi polar etkileşimlerin oluşmasını sağlamak için az polar ve aprotik olmalıdır. Genellikle sentez için polar olmayan organik çözücülerin kullanıldığı MIP'ler polar organik çözücülerin kullanıldığı MIP'lerden daha iyi seçiciliğe sahiptir [138]. Hazırlanan polimerin analite seçiciliği ile oluşan kavitenin analite tam uygun boyutta olması yani ne çok dar need çok gevşek olması çözücü seçimine bağlıdır.

#### **2.3.1.4.5. Başlatıcılar**

Radikalik polimerizasyon, radikal başlatıcıların ısısal bozunmasıyla başlatılabilir. Monomer ile kalıp molekül arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin çok zayıf olduğu durumlarda çok yüksek sıcaklıklara çıkılamaz. Düşük sıcaklıklarda etkili olan fotokimyasal başlatıcılar tercih edilir. Genellikle 2,2'-azobisizobütironitril (AIBN) ve 2,2'-azobis 2,4-dimetilvaleronitril (ADVN) kullanılır. Bu koşullarda, ısısal bozunma yerine UV bozunma tercih edilmektedir.

#### **2.3.1.4.6. Sıcaklık**

Kalıp molekül ve monomer arasındaki denge pozisyonu hem sıcaklığın hemde basıncın ürünüdür [139].

Önceki çalışmalar göstermiştir ki düşük sıcaklıklar, oldukça kuvvetli olan elektrostatik etkileşimler yüzünden MIP de tercih edilmektedir. Düşük sıcaklıklarda polimerleşme yavaş ve zincir oluşumu monomer-kalıp oluşumuna müdahale etmemektedir.

### **2.3.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri**

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan bağın çeşidine göre ikiye ayrılır. Bunlar kovalent ve kovalent olmayan baskılamadır.

### **2.3.2.1. Kovalent baskılama**

Ön organizasyonlu moleküler baskılama yaklaşımında, polimerizasyondan önce baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomerler arasında kuvvetli, tersinir bir kovalent düzenleme oluşur. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp oluşturmak amacıyla polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül baskılanmış polimerlerle etkileştirdiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşur [140,141].

#### **Avantajları:**

Monomer-kalıp kompleksi oldukça kararlıdır ve sitokiyometrik oranlarda gerçekleşir. Polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve polar solventler gibi) istenildiği gibi uygulanabilir, çünkü konjugatlar kovalent bağlarla oluşturulmuştur ve oldukça kararlıdır [142].

#### **Dezavantajları:**

Monomer-kalıp molekül konjugatının sentezinde sık sık sorunlar çıkabilir ve sentez prosesi pek ekonomik değildir. Hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı sınırlıdır. Kovalent bağ oluşumu nedeni ile bağlanma kinetiği yavaştır [143].

### **2.3.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama**

Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması non-kovalent (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, koordinasyon bağı oluşumu) etkileşimlerle gerçekleşir. Polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır [144].

#### **Avantajları:**

Kovalent monomer-kalıp konjugatının sentezine gerek yoktur. Polimerizasyondan sonra kalıp molekül polimerden kolayca uzaklaştırılır, çünkü non-kovalent etkileşimler daha zayıftır. Hedef molekülün bağlanma kinetiği hızlıdır [145].



### **Dezavantajları:**

Polimerizasyon koşulları, non-kovalent etkileşimleri artırmak amacıyla sınırlıdır. Fonksiyonel monomerler, bağ oluşum dengesini artırmak amacıyla fazlaca kullanılır ve non-spesifik bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olabilir [146]. Moleküler etkileşimlerin farklılığı, seçiciliğin ve tersinirliğin derecesini etkiler. Örneğin kovalent bağlarla oluşturulan etkileşimler oldukça spesifiktir. Ancak geri bağlanma kinetiği yavaştır. Bununla beraber, hidrofobik etkileşimlerin kinetiği daha hızlıdır fakat seçiciliğinde azalma gösterir. Genel olarak non-kovalent etkileşimler birçok bileşiğe uygulanabilir olmaları, hızlı kinetiği ve daha uygun koşullarda bağ oluşumu ve kırılma özellikleri göstermeleri nedeniyle daha geniş uygulama alanlarına sahiptir. Dahası  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi non-kovalent etkileşimler yeni moleküler baskılanmış fonksiyonel polimerlerin tasarımı için gelecek vaat etmektedirler.

### **2.3.3. Baskılama İşleminin Kontrolü**

Moleküler baskılanmış plimerlerin yüksek seçicilikte tanınması ve baskılanmış polimerler tarafından bağlanması, materyalin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Moleküler baskılanmış polimerlerin daha kullanışlı olmaları için, substratın seçiciliğinin önemi yanında, uygun koşullar altında desorpsiyon ve geri bağlanma kinetiğinin de hızlı olması gerekir. Bu yüzden moleküler baskılanmış materyallerin tasarımı yapılırken uygun bağlanma etkileşimlerinin seçimi çok önemlidir. Birden fazla bağlanma bölgesinin olması, monomerin bağlanma bölgeleri ile kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin daha iyi olması, dolayısıyla moleküler tanımanın daha seçici olmasını sağlar.

Yapılan çalışmalar baskılanmamış polimer ile karşılaştırmalı olarak yürütülür. Bu polimer kalıp molekülün yokluğunda aynı polimerizasyon işlemi uygulanarak elde edilir. Baskılanmamış polimerler, baskılanmış polimerlerle spesifik boşluklar dışında aynı kimyasal özelliklere sahiptir. Bu yüzden baskılanmış polimerlerle kalıp molekül arasında gelişen etkileşimlerin doğası, baskılanmamış polimerlerle kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin doğasıyla aynıdır. Fark bu etkileşimlerin gücü arasındadır.

Eğer polimerizasyon basamağı esnasında iyi tanımlanmış boşluklar oluşturulmuşsa baskılanmış polimerdeki etkileşimler daha güçlüdür. Etkileşimdeki bu hassasiyet, kalıp molekülün üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır. Boşlukların varlığı baplanma deneyleri ve kromatografik ölçümler gibi çeşitli yöntemlerle incelenebilir. Polimerlerin seçicilikleri, baskılanmış/baskılanmamış polimerlerle etkileştirilmesi; baskılanmış ve baskılanmamış polimerlere ait dağılım katsayılarının ( $k$ ) hesaplanması ve baskılama faktörü olarak değerlendirilen bağıl dağılım katsayısının ( $k'$ ) belirlenmesiyle gösterilir. Bu yaklaşım sıvı kromatografisi (LC) ve katı faz ekstraksiyonu (SPE) uygulamalarında baskılanmış polimerlerin karakterizasyonu içinde kullanılır [147].

#### **2.3.4. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Uygulama Alanları**

Moleküler baskılanmış polimerler farmakolojik, analitik ve biyolojik seçici moleküler tanıma alanları, kontrollü salınım sistemleri, sensörlerde tanıma elemanı olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar [148]. Sıvı kromatografi, kapiler elektroforez, kapiler elektrokromatografi ve katı faz ekstraksiyon gibi analitik tekniklerde MIP'lerin kullanımına yönelik çalışmalar sürekli artmaktadır.

Kimya ve ilaç endüstrisindeki artan pazar fırsatlarına bağlı olarak moleküler baskılanmış polimerlerin su saflaştırma ve atık malzeme değerlendirme işlemleri gibi ayırma alanındaki uygulamaları giderek genişlemektedir. Sadece kromatografi kolonlarının satışının yılda 500 milyon ABD dolarına yaklaştığı ve membrane ayırma teknolojisi pazarında yıllık 1 milyar ABD doları civarında büyüme olduğu tahmin edilmektedir. Moleküler baskılanmış malzemelerin afinite ayırma, katı faz ekstraksiyonu ve sert şartlar altında (organik ve toksik ortamlar, düşük ya da yüksek pH'lar, yüksek sıcaklıklar ve basınç gibi) ayırma alanında bu pazarda %1-3 oranda yer alması beklenmektedir.

MIP adsorbentler, ilaçların katı faz ekstraksiyonunda, proteinlerin, amino asitlerin, DNA ve RNA'nın, peptidlerin, hormonların ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır [149]. MIP'lerin bir diğer potansiyel kullanım alanı olan bazı temel

araştırmalar, ilaç tasarımı, optik gibi alanlarda önemli olan kiral bileşiklerin ayrılmasıdır.

Bir diğer uygulama alanı ise sensörlerde tanıma elemanı olarak kullanımlarıdır [150]. Bir kimyasal veya byosensr, bir tanıma elementi ve onunla bağlantılı transduser içerir ve bu transduserin görevi, analitin bağlanmasıyla oluşan değişimi, ölçülebilir bir dış sinyale dönüştürmektir. Bu sensörlerde kullanılan biyomoleküller çoğunlukla zayıf fiziksel ve kimyasal kararlılık gösterirler, bu nedenle yapay reseptörlere duyulan ilgi artmaktadır. Özellikle MIP'ler zorlayıcı şartlarda gösterdikleri dayanıklılık ve yüksek seçicilikte tanıma bölgelerine sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedir. MIP temelli ilk sensor baskılı-polimer membrane ince filmi içeren bir alan-etki kapasitrdr ve analitin bağlanmasıyla kapasitansta meydana gelen değişim ölçülmüştür [151]. Daha sonra ise elektrokimyasal ve optik [152] transduserlere dayalı başka sensörler geliştirilmiştir.

Moleküler baskılamayla hazırlanan polimerler aminoasit türevleri, ilaçlar ve şeker türevlerinin kiral ayırımı için, organic reaksiyonlarda enzim benzeri olarak ve iyon seçici absorbanlar olarak başarıyla kullanılmaktadır. Son yıllarda moleküler baskılama temelli elektrokimyasal ve optik sensörler hakkındaki yayınlaraın sayısı hızla artmaktadır [153].

### 3. MATERYAL VE METOD

Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaları aşağıdaki maddeler halinde özetlemek mümkündür;

- Kimyasal malzemeler,
- SPR biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan ip yüzeyinin temizlenerek hazırlanması,
- N-Metakroil-(L)-Sistein Metil Ester (MAC) Monomerinin Sentezi,
- MAC-Cu<sup>+2</sup> n-kompleksinin hazırlanması,
- Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> (MIP) ve Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmamış PHEMAC (NIP) nanopartiküllerinin hazırlanması,
- Sentezlenen MAC monomerinin, iyonu baskılanmış (MIP) ve Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmamış PHEMAC (NIP) nanopartiküllerin karakterizasyonu,
- Kalıp molekül olan Cu<sup>+2</sup> iyonunun uzaklaştırılması,
- Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> (MIP) ve Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmamış PHEMAC (NIP) nanopartiküller ile SPR biyosensörün hazırlanması,
- Hazırlanan PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC biyosensörlerinin karakterizasyonu,
- Hazırlanan PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki Cu<sup>+2</sup> iyonu tayininde kullanılarak kinetik çalışmalarının yapılması,
- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC biyosensörlerin seçicilik çalışmalarının yapılması,
- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC SPR biyosensörlerinin tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi,
- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün yapay idrar ve fizyolojik serum çözeltisine spike edilen Cu<sup>+2</sup> iyonu tayininin incelenmesi,
- Tekrarlanabilirlik çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesinin yapılması

#### 3.1. Kimyasal Malzemeler

Yapılan tez alışması H.. Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Monomer fazı oluşturmak için kullanılan, L-sistein metil ester, 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), amonyum persülfat (APS), etilenglikol dimetakrilat (EDMA) Sigma firmasından temin edilmiştir (St. Loui, MO, ABD).

Bakır(II)nitrat trihidrat  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ , Polivinil alkol (PVA), sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ), sodyum metabisülfat ( $\text{NaHSO}_4$ ), sodyum hidroksit (NaOH), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), potasyum bromür (KBr) ve analitik saflıkta olan diğer kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından ve deneylerde kullanılan yapay idrar örneği ise BIORAD (Liquichek Urine Chemistry Control)'dan temin edilmiştir.

Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

Cam malzemeler kullanılmadan önce seyreltilmiş nitrik asit çözeltisi içerisinde bekletilerek saf suyla yıkandıktan sonra kullanılmıştır.

### **3.2. SPR Biyosensörlerin Hazırlanmasında Kullanılan Çip Yüzeyinin Temizlenerek Hazırlanması**

SPR sensörün yüzeyinin temizlenmesi ve bir sonraki aşama olan nanopartükül damlatılarak nanosensör hazırlanabilmesi için altın yüzey asidik pirana çözeltisi (3:1  $\text{H}_2\text{SO}_4$ : $\text{H}_2\text{O}_2$ , v/v) ile temizlenmiştir. 20 mL asidik pirana çözeltisi içine daldırılan altın yüzeyler 30 saniye çözelti içinde kalmıştır. Çözeltiden çıkarılan biyosensör saf etil alkol ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) 3 saat kurutularak nanopartikül damlatılması için hazır hale getirilmiştir.

### **3.3. N-Metakroil-(L)-Sistein Metil Ester (MAC) Monomerinin Sentezi**

5.0 g L-sistein ve 0.2 g hidrokinon 100 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  çözeltisinde çözülerek, sıcaklık °C'a getirilmiştir. Ardından sırasıyla çözeltiliye 13.0 g trietilamin ve 4.0 mL metakroil klorür yavaş bir şekilde eklenmiştir. Bu reaksiyon  $\text{N}_2$  (azot) atmosferinde 2 saat boyunca manyetik karıştırıcı da döndürülmüştür. Reaksiyon ortamında tepkimeye girmeden kalan metakroil klorür %10'luk NaOH çözeltisiyle ekstrakte edilmiştir. Sulu kısmın

buharlaştırılması sonucu kalan MAC etil alkol ile çözülerek deneyde kullanılacak hale getirilmiştir [174].

### 3.4. MAC-Cu<sup>+2</sup> Ön-Kompleksinin Hazırlanması

Kalıp molekül olan Cu<sup>+2</sup> iyonu için iyon kaynağı olarak bakır nitrat trihidrat (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O kimyasalı ve fonksiyonel monomer olarak da N-metakroil-(L)-sistein metil esterin farklı miktarları alınarak bakır iyonu ile ön kompleksi gerçekleştirilmiştir. Alınan mol oranları aşağıdaki çizelgede görülmektedir. Kalıp molekül ve monomer oranı UV-VIS spektrofotometresiyle incelenerek 0.1 mmol:0.05 mmol olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. MAC-Cu<sup>+2</sup> Ön-Kompleksinin Hazırlanma oranları

Oran (MAC:Cu <sup>+2</sup> )	MAC monomer	Kalıp molekül, Cu <sup>+2</sup>
1:1	0.05 mmol	0.05 mmol
2:1	0.10 mmol	0.05 mmol
3:1	0.15 mmol	0.05 mmol

### 3.5. Cu<sup>+2</sup> İyonu Baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> (MIP) ve Cu<sup>+2</sup> İyonu Baskılanmamış PHEMAC (NIP) Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve baskılanmamış PHEMAC nanopartiküller iki fazlı mini-emülsiyon yöntemi kullanılarak aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

Monomer fazın hazırlanması için; 53.4 µL MAC (0.10 mmol) monomeri ve 12 mg Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O (0.05 mmol) deney kabına alınarak 2.0 saat süre ile rotatörde karıştırılarak ön-kompleks hazırlanmıştır. Daha sonra ön-kompleks içerisine 6.5 (0.05 mmol) 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan etilenglikol dimetakrilat' dan (EDMA) 19.8 µL (0.10 mmol) ilave edilerek homojen bir karışım elde edilene kadar karıştırılmıştır. Faz I ve faz II olarak adlandırılan dağıtma fazları ise; Faz I için 0.1 g PVA, 15 mg SDS ve 12.5 mg sodyum bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) 5.0 mL su ile karıştırılarak; faz II için ise, 0.05 g polivinil alkol (PVA), 0.05 g yüzey aktif madde sodyum dodesil sülfat (SDS) üzerine 100 mL su eklenerek

manyetik karıştırıcı altında 3 saat karıştırılarak aynı şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan monomer fazı, faz I içerisine eklenmiştir. Karışım, mini-emülsiyon olması için 25000 rpm' de 30 dk boyunca homojenize (T10, Ika Labortechnik, Almanya) edilmiştir. Kalıp molekülünde bulunduğu bu mini-emülsiyon yavaşça faz I' e eklemiştir. Karışım cam polimerizasyon reaktörüne alınmıştır. Reaktör 500 rpm ve 40°C' a getirilmiştir (Radleys Carousel 6, Essex, İngiltere). Karışımın sıcaklığı 40°C' a geldiğinde içerisine 125 mg Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ve 125 mg APS eklenerek 40°C' da ve 600 rpm' de 24 saat süre ile polimerizasyona bırakılmıştır. Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> nanopartikülleri deiyonize su, etil alkol ve tekrar deiyonize su ile yıkanarak reaksiyona girmeden kalan monomer, sürfaktant madde ve başlatıcıdan uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi 9000 rpm' de 45 dk süre ile santrifüjlenerek (Allegra-64R Beckman Coulter, ABD) yapılmış ve yıkama ortamından nanopartiküller alınarak 4°C' da saklanmıştır. Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmamış PHEMAC nanopartikülleri polimerizasyon ortamında kalıp molekül Cu<sup>+2</sup> iyonu olmadan aynı işlemler uygulanarak sentezlenmiştir. Çizelge 3.2 Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerizasyon reçetesini göstermektedir. Reçetedeki monomer fazında gösterilen 12 mg Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O bileşiği baskılanmamış olan polimer için eklenmemiştir.

Çizelge 3.2. Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC nanopartiküllerin hazırlanma reçetesi

Monomer Fazı	Faz I	Faz II
53.4 µL MAC 12 mg Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .3H <sub>2</sub> O 6.5 µL HEMA 19.8 µL EDMA 125 mg APS	100 mg PVA 15 mg SDS 12.5 mg NaHCO <sub>3</sub> 5 mL deiyonize su	50 mg PVA 50 mg SDS 100 mL deiyonize su

### 3.6. Sentezlenen MAC Monomerinin, Cu<sup>+2</sup> Baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> (MIP) ve Cu<sup>+2</sup> Baskılanmamış PHEMAC (NIP) Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

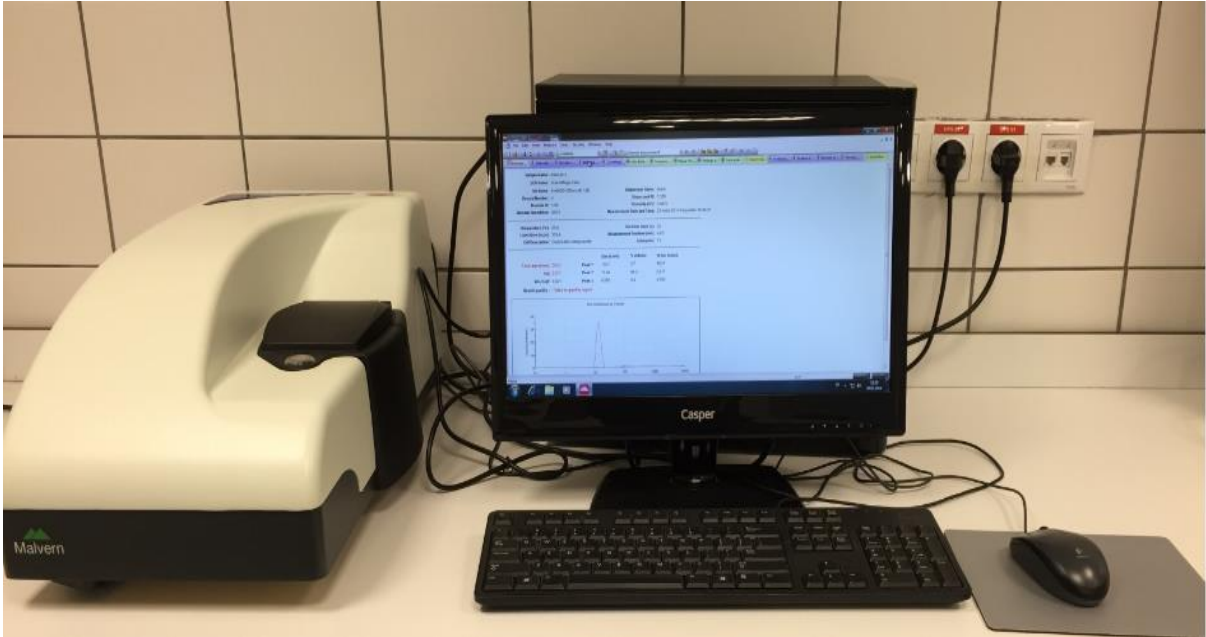
#### 3.6.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

Sentezlenen MAC monomeri, Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> (MIP) ve Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmamış PHEMAC (NIP) nanopartiküllerinin yapısı FTIR-ATR

spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılarak çekilmiştir. Analizden önce polimer örnekleri vakum etüvünde 24 saat kurutulmuştur. FTIR-ATR spektrumlarının elde edilmesi amacıyla 2.0 mg örnek, 98.0 mg KBr ile karıştırılarak havanda dövülmüş ve hidrolik preste 600 kg/cm basınçta 10 dakika bekletilerek ince bir tablet haline getirilmiştir. Hazırlanan tabletin 4600-400  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında spektrumu alınmıştır.

### 3.6.2. Zeta Boyut Analizi

Sentezlenen  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmış PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  nanopartiküllerin boyut analizi Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile ölçülmüştür. Analizde deiyonize suyun yoğunluğu; 0.88 mPa.s ve kırınma indeksi; 1.33 olarak kullanılmıştır. Zeta boyut analizi için; sentezlenen nanopartiküllerin 3 mL' lik çözeltisi alınarak boyut analizörünün örnek haznesine yerleştirilmiştir. Işık saçılması  $90^\circ$  lik geliş açısında ve oda sıcaklığında tayin edilmiştir. Işık saçılma sinyalleri partikül sayısı olarak hesaplanmıştır ve ölçümler üç kez tekrarlanmıştır. Şekil 3.1 Zeta boyut analizörünün resmini göstermektedir.



Şekil 3.1. Biyokimya ABD Laboratuvarı'ndaki Nanopartiküllerin boyut analizinin yapılması için kullanılan analizör.



### 3.6.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Hazırlanan  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmış PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve baskılanmamış PHEMAC nanopartiküllerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (JEOL, JSM 5600, Tokyo, Japan) ile incelenmiştir. Bu amaçla nanopartiküller iletken bir yapıştırıcıyla SEM örnek plakası üzerine tutturulmuştur. Daha sonra örnek yüzeyleri vakum altında 200 Å kalınlığında metalik altın ile kaplanarak yüzey iletken hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler SEM örnek yuvasına yerleştirilerek farklı büyütme oranlarında fotoğrafları çekilmiştir.

### 3.6.4. Elementel Analiz

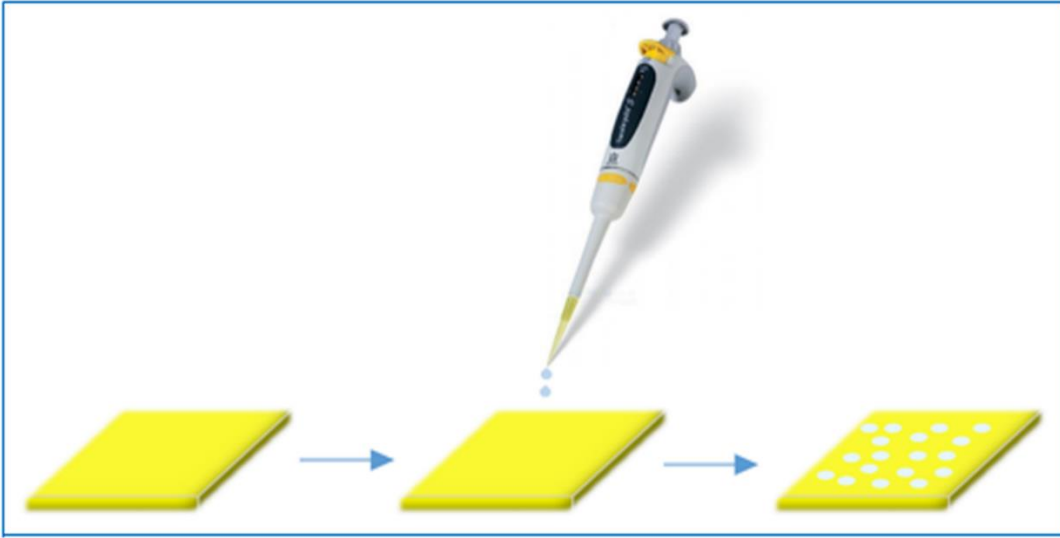
Sentezlenen PHEMAC nanopartiküllerin yapısındaki MAC miktarının belirlenmesi için elementel analiz yapılmıştır. Analiz için, 1.0 mg nanopartikül elementel analiz cihazının (Leco, CHNS-932, ABD) alüminyumdan oluşan hücreesine yerleştirilerek  $\pm 0.0001$  g duyarlılıkta tartılmıştır. Cihazda gerçekleşen yakma işlemi sonucunda örnekteki karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N) ve kükürt (S) miktarı % olarak hesaplanmıştır. Yapıya katılan MAC monomerinin miktarı Sisteindeki kükürt sitokiyometrisi üzerinden hesaplanmış ve 51  $\mu\text{mol/g}$  olarak bulunmuştur.

### 3.7. Kalıp Molekülün Desorpsiyonu

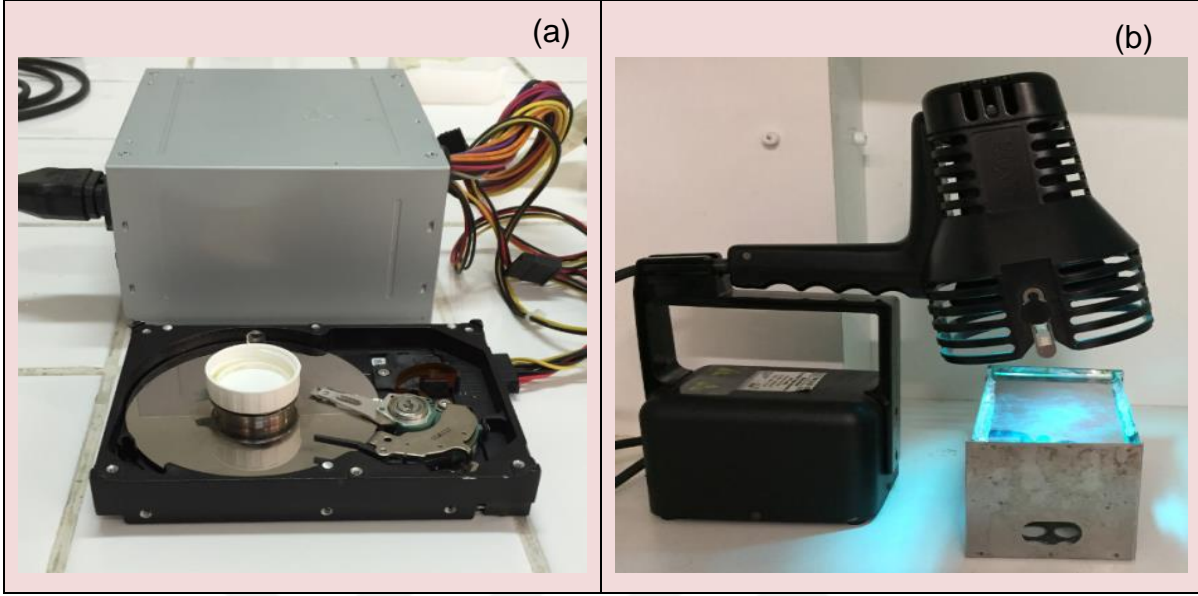
Hazırlanan PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  biyosensöründen kalıp molekül olan  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun uzaklaştırılması için etilendiamin tetra asetik asitin (EDTA) 0.005 M' lik çözeltisi kullanılmıştır. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  biyosensörü 20 mL EDTA çözeltisi içine konularak oda sıcaklığında çalkalama banyosunda bekletilmiştir. Her yirmi dakikada bir desorpsiyon çözeltisi yenilenerek işlemler tekrarlanmıştır. Bu işleme değiştirilen desorpsiyon çözeltisinin içerisinde kalıp molekül olan bakır 280 nm' de UV-VIS spektrofotometresinde tayin edilmeyinceye kadar devam edilmiştir.

### 3.8. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC Nanopartiküller ile SPR Biyosensörlerin Hazırlanması

Yüzey plazmon rezonans biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan altın çiplerin yüzeyi etil alkol ile temizlenerek, kurutulmuştur. Temizlenen bu çiplerden birinin üzerine PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> nanopartikül çözeltisinden, diğerinin üzerine de PHEMAC nanopartikül çözeltisinden 20 µL ilave edilmiştir. Nanopartiküllerin sensör yüzeyinde homojen olarak dağılması için döndürmeli kaplayıcı (spin coater) cihazı kullanılmıştır. Sensörlerin üzerine damlatılan nanopartiküllerin, sensör yüzeyine tutunması için 2 saat süre ile UV ışığı altında bekletilmiştir. Şekil 3.2. nanopartiküllerin çip yüzeyine damlatılmasını şematize ederken Şekil 3.3. Nanopartiküller ile biyosensör hazırlanmasında kullanılan sistemi göstermektedir.



Şekil 3.2 Nanopartiküllerin çip yüzeyine damlatılmasının şematize edilmesi [170].



Şekil 3.3. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC Nanopartiküller ile biyosensör hazırlanmasında kullanılan sistem a) spin coater b) UV lamba.

### 3.9. Hazırlanan PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC Biyosensörlerin Karakterizasyonu

#### 3.9.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi (AFM)

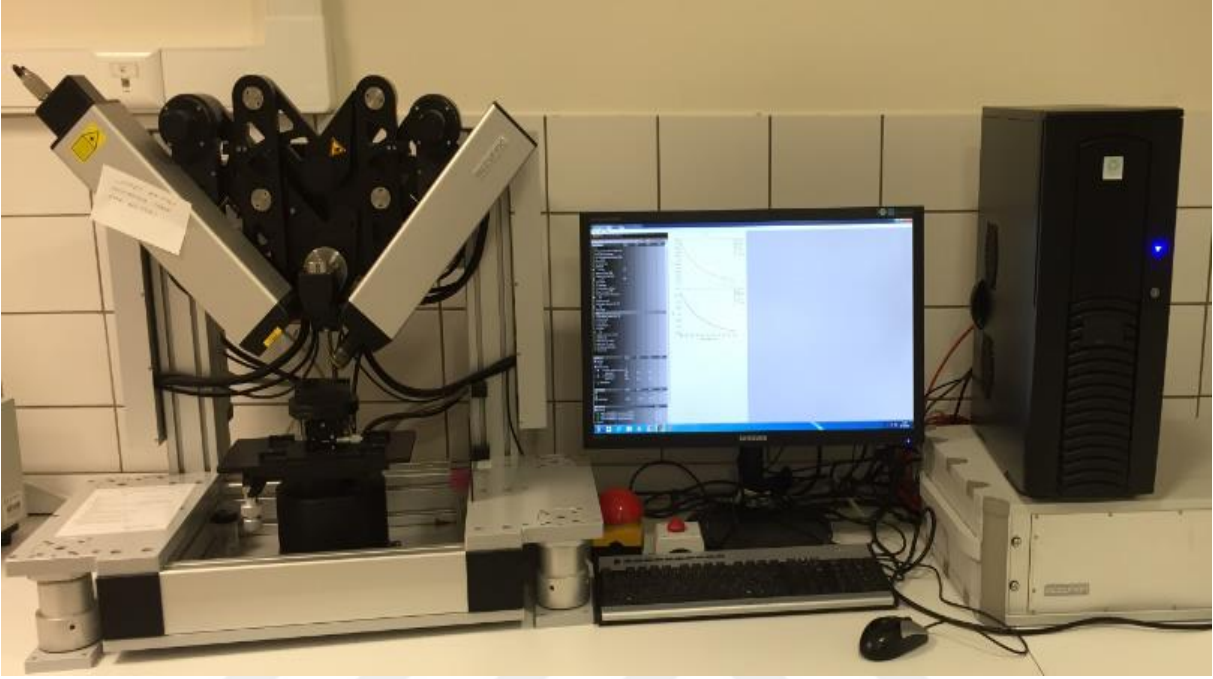
Yüzey plazmon rezonans biyosensör yüzeylerinin karakterizasyonu için, serbest kantileverli inferometre özelliği bulunan 4096 x 4096 piksel çözünürlükte ölçüm alabilen atomik kuvvet mikroskobu (Veeco MultiMode V, USA) kullanılmıştır. Ölçüm sırasında SPR biyosensörler iki taraflı karbon tutucu bantlara yerleştirilerek hava ortamında görüntüleri alınmıştır. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC nanopartikül biyosensörlerin yüzey morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Ölçümler salınım rezonans frekansı 315 kHz, titreşim genliği 1 VRMS, boş titreşim genliği 2 VRMS olacak şekilde ayarlanmış ve 2 µm/s tarama hızı, 256 x 256 piksel çözünürlükte ve 1 x 1 µm' lik bir bölgenin görüntüsü alınarak yapılmıştır.



Şekil 3.4. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC Biyosensörlerin yüzey karakterizasyonu için kullanılan Atomik Kuvvet Mikroskobu cihazının görüntüsü

### 3.9.2. Elipsometre Ölçümleri

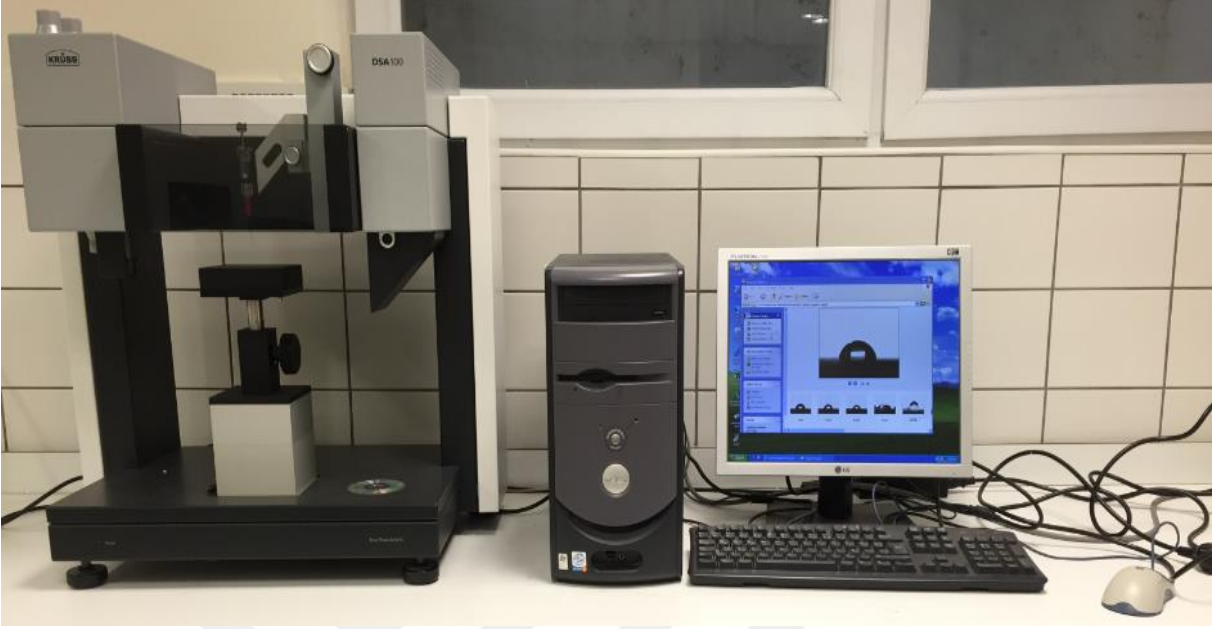
Hazırlanan PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC yüzey plazmon rezonans biyosensörlerinin yüzeyinde bulunan nanopartiküllerin kalınlığı EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile ölçülmüştür. Kalınlık ölçümleri 62° lik bir geliş açısında ve 532 nm' lik bir dalga boyunda yapılmıştır. SPR biyosensörleri sırayla lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiş ve yüzey kalınlığının hesaplamasını sağlayan programda BK7 + 50 nm altın + 70 nm polimer katmanı verisi olarak düşünülmüştür. Ölçümlerden elde edilen değerler sensörün yüzeyindeki 6 farklı noktasında 3 defa tekrarlanmıştır. Tespit sonuçları bulunan verilerin ortalaması hesaplanarak rapor edilmiştir. Şekil 3.5 PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC yüzey plazmon rezonans biyosensörlerinin yüzeyinde bulunan nanopartiküllerin kalınlığını ölçen cihazı göstermektedir.



Şekil 3.5. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC Biyosensörlerin yüzey karakterizasyonu için kullanılan Elipsometre cihazının görüntüsü.

### 3.9.3. Temas Açısı Ölçümleri

SPR sensörlerin temas açısının ölçüm değerleri KRÜSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazının kullanılması ile sırayla yapılmıştır. Yüzey plazmon rezonans sensör yüzeyine 1 damla su damlatılmış ve yapışık damla metoduyla temas açısının belirlenmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Çip yüzeyinde değişik noktalara su damlatılıp 10 farklı görüntü alınarak, her bölgede farklı temas açıları saptanmıştır. Saptanan temas açısı sonuçları damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı olarak belirlenmiştir. Belirlenen temas açısı noktalarının ortalaması alınarak ortalama temas açısı sonuçları saptanmıştır. Ölçümler Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC, Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmamış PHEMAC ve boş altın çip yüzeyi üzerinde sırayla yapılmıştır.



Şekil 3.6. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC Biyosensörlerin temas açısı ölçümlerinde kullanılan Atomik Kuvvet Mikroskobu cihazının görüntüsü.

### 3.10. SPR Sensör ile Plazmon Ölçümleri

PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC biyosensörlerinin yüzey plazmon eğrileri SPRimager II (GWC Technologies, WI, USA) cihazı ile yapılmıştır. Biyosensör hazırlanmasında kullanılan altın kaplanmış SPR çipler (SPR-1000-050 SPR CHIP GWC) Genoptics, Orsay, Fransa firmasından temin edilmiştir. SPR biyosensörler, 25.0x12.5 mm yüzey alanına sahip olup, 50 nm kalınlıkta altın kaplamadan oluşmaktadır. Görüntü alınması sırasında ışığın PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC biyosensörlerine ulaşma açısı değiştirilerek (48.7-56.7°) ışığın % kırılma değerleri alınmıştır. Elde edilen veriler ışığında yüzey plazmon eğrileri, ışığın geliş açısına karşı % kırılma miktarı ve eğimi grafiğe geçirilerek rapor edilmiştir.

#### 3.10.1. Kinetik Analizler

Biyosensörler hazırlandıktan sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir. Kinetik çalışmalar, farklı konsantrasyonlardaki Cu<sup>+2</sup> iyonu çözeltileri ile yapılmıştır. Çözeltiler yedi farklı derişimde; 0.1 nM, 0.25 nM, 1.0 nM, 2.5 nM, 10 nM, 25 nM ve 100 nM olacak şekilde

pH 5.0 fosfat tamponuyla hazırlanmıştır. Bu çözeltiler cihazın örnek kısmına sırayla verilerek adsorpsiyon-desorpsiyon çalışmalarını kapsayan kinetik analizleri yapılmıştır. Aşağıda SPRimager II sistemi görülmektedir. Sistem, lazer kaynağı, ayna sistemi, kamera, peristaltik pompa ve yazılım programının bulunduğu bilgisayardan oluşmaktadır.  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmış PHEMAC-  $\text{Cu}^{+2}$  nanopartiküllerinden yapılmış olan biyosensör, kinetik analizler de kullanılmıştır. Ayrıca kalıp molekülün bulunmadığı PHEMAC sensörünün de kinetik davranışı incelenmiştir. Kinetik analizleri incelemek üzere;  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmış PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve baskılanmamış PHEMAC sensörlerinin yüzeyi deiyonize su ile yıkanmıştır. Sistemden fosfat tamponu geçirilerek, yüzey plazmon eğrileri alınmış ve rezonans kırılma açısı belirlenmiştir. Cihaz belirlenen kırılma açısına ayarlanarak, çalışmalar bu açı üzerinden sürdürülmüştür. Kinetik analizler, kinetik görüntüleme programının bulunduğu SPRview yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Program, dakikada yaklaşık olarak % 150 kırılma miktarı değerini ölçebildiğinden dolayı, anlık olarak % kırılma miktarı değişiminin gözlenmesine imkan vermektedir. Rezonans kırılma açısı belirlendikten sonra, sistemdeki ayna rezonans açısı değerine ayarlanarak 10 dakika süre ile sistemden fosfat tamponu geçirilmeye devam edilmiştir. Sistem dengeye ulaştıktan 3 dakika sonra farklı konsantrasyonlarda hazırlanan  $\text{Cu}^{+2}$  iyon çözeltileri sırayla 2.0 mL/dk akış hızında SPR sistemine peristaltik pompa kısmından verilmiştir. Rezonans frekansında elde edilen kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş ve sinyaller dengeye geldiğinde sisteme 0.005 M derişimdeki EDTA çözeltisi (desorpsiyon çözeltisi 2.0 mL/dk akış hızında) verilerek  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun ortamdaki uzaklaşması sağlanmıştır. Desorpsiyon işleminden sonra veriler kaydedilerek, sistemden tekrar deiyonize su ve ardından fosfat tamponu geçirilerek dengeye getirilmiştir. Dengeye ulaşan sistemde diğer konsantrasyonlarda hazırlanmış  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu çözeltilerinin kinetik çalışmaları da aynı yöntemler tekrarlanarak yapılmıştır.



Şekil 3.7. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC Biyosensörlerin kinetik analizlerinin yapıldığı SPR ölçüm cihazının görüntüsü.

### 3.10.2. Yarışmalı Kinetik Analizler

Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> biyosensörün Cu<sup>+2</sup> iyonuna olan seçiciliğini göstermek için pH 5.0 tamponuyla 100 nM olarak ayrı ayrı hazırlanan Ni<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup> çözeltileri SPR sistemine ayrı ayrı verilerek adsorpsiyon çalışmaları incelenmiştir. Yarışmalı analizler için de sistemde kinetik analizlerde uygulanan yöntem izlenerek; rezonans frekansının belirlenmesi, adsorpsiyon ve desorpsiyon çalışmalarının sırayla uygulanması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

### 3.10.3. Baskılama Seçiciliğini Belirleme Çalışmaları

Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> nanopartikülleri yanında hazırlanan Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmamış PHEMAC nanopartikülleri baskılama seçiciliğini belirlemede kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında ayrı ayrı hazırlanan 100 nM derişimindeki Cu<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> ve Zn<sup>+2</sup> çözeltileri sırayla PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC biyosensörleri kullanılarak



SPR sistemine verilmiş ve baskılama seçiciliği belirlenmiştir. Ayrıca baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerinin  $\text{Cu}^{+2}$  iyon çözeltisi için çakıştırılmış plazmon grafiği oluşturulmuştur.

#### **3.10.4. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları**

$\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmış PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 100 nM derişiminde hazırlanmış  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu içeren çözeltiler SPR sistemine verilmiştir. Sistem uygun rezonans frekansına ayarlanmış ve pH 5.0 tamponuyla dengeye getirilmiştir. Daha sonra dengeye gelen sisteme  $\text{Cu}^{+2}$  iyon çözeltisi verilerek rezonans kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş, sistem dengeye gelince desorpsiyon çözeltisi geçirilmiş ve bakır ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu işlemler sistemde gün içinde 4 kez günler arası olarak da 3 gün süre ile yapıp istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

#### **3.10.5. Tekrar Kullanılabilirliğin İstatiksel Analizleri**

PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 100 nM derişimlerde  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu içeren çözeltiler SPR sistemine tekrarlı bir şekilde enjekte edilerek, PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörün gün içi ve günler arası  $\text{Cu}^{+2}$  iyonuna karşı verdiği sinyal şiddetinin tekrarlanabilirlik çalışmaları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve tekrarlanabilirliği gösteren kesinlik değerleri yüzde bağıl standart sapma (%RSD) değerleri olarak hesaplanmıştır. 100 nM  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu konsantrasyonunda tekrarlanabilirlik için 4 ölçüm yapılırken, gün için kesinlik için aynı konsantrasyonda 3 kez ölçüm yapılmış her ölçüm kendi içinde değerlendirilmiştir. Günler arası kesinlik içinse arka arkaya 3 gün aynı konsantrasyonda ölçüm yapılmıştır.

### 3.11. Yapay idrar ve Fizyolojik Serum Çözeltileri İçin Kinetik Analizler

Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> nanopartiküllerinden oluşturulmuş SPR biyosensörüyle yapay idrar ve fizyolojik serum çözeltilerine spike edilmiş Cu<sup>+2</sup> iyonu içeren örneklerin analizi yapılmıştır. Yapay idrar ve fizyolojik serum çözeltileri 100 nM derişiminde Cu<sup>+2</sup> iyonlarıyla spike edilerek hazırlanmış ve SPR sistemine verilerek uygun rezonans kırılma açısındaki kinetik analizleri yapılmıştır.



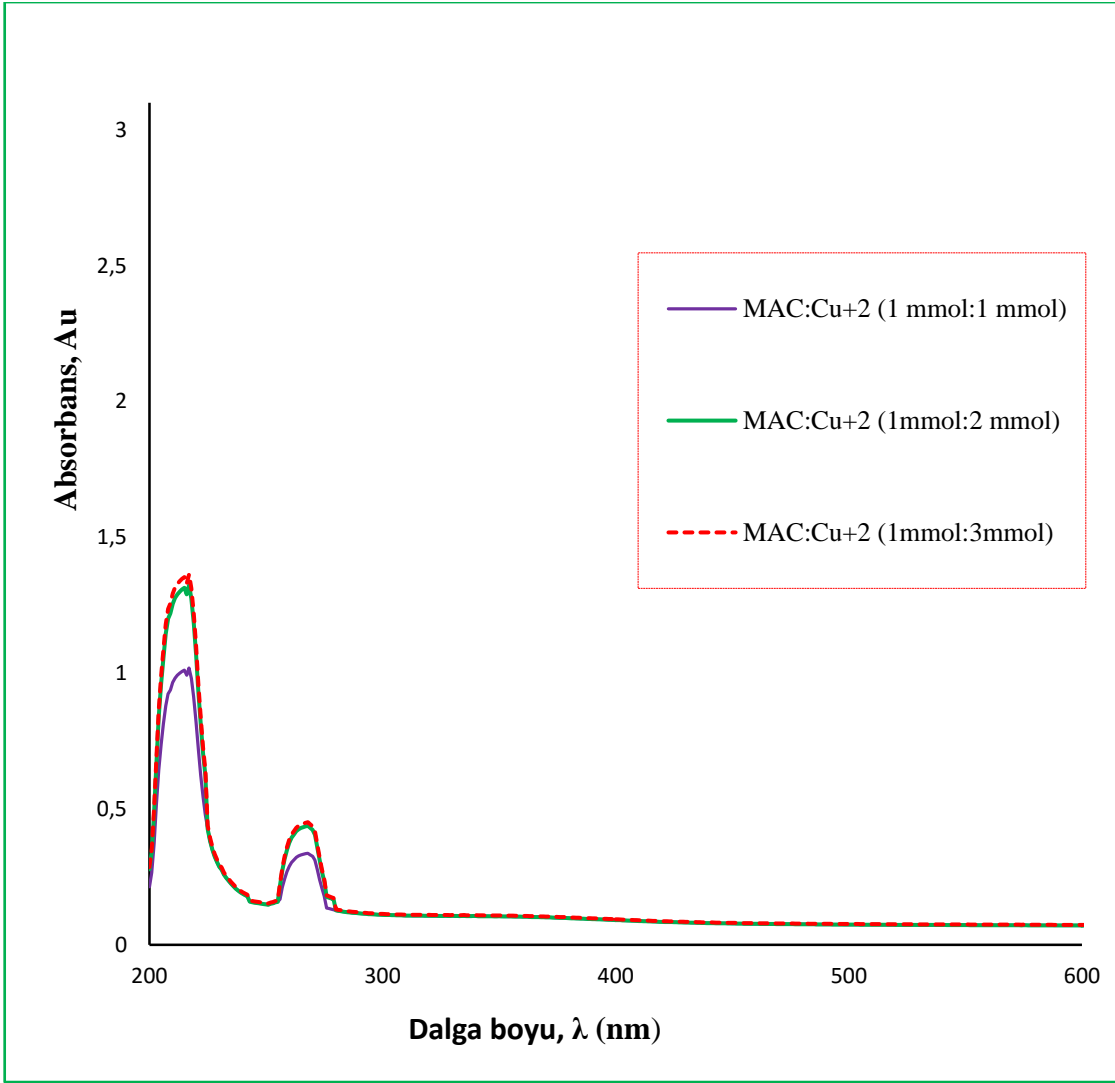
## 4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. MAC-Cu<sup>2+</sup> Ön-kompleks Oranın Belirlenmesi ve PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> Nanopartikül Optimizasyonunun Yapılması

MAC-Cu<sup>2+</sup> ön-kompleksi, kalıp molekül olarak Cu<sup>2+</sup>, fonksiyonel monomer olarak MAC monomerinin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.1 de, Cu<sup>2+</sup> iyonlarıyla ön-kompleks yapacak farklı fonksiyonel monomer oranlarında hazırlanan ön-kompleksin optimizasyonunu gösterilmiştir. Optimizasyon ölçümleri spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1'de gösterilen MAC-Cu<sup>2+</sup> ön-kompleksinin spektrofotometrik ölçümü incelendiğinde 2 mmol:1 mmol (MAC: Cu<sup>2+</sup>) oranından sonra elde edilen spektrumdaki MAC-Cu<sup>2+</sup> kompleksleşmesinden meydana gelen sinyal şiddetinin artmasının sona erdiği tespit edilmiş ve polimerleşme bu oran üzerinden gerçekleştirilmiştir. Farklı monomer template oranlarında hazırlanan nanopartiküller ile yapılan kinetik çalışmalarında ΔR değerinin 2 mmol:1 mmol oranından sonra değişmediği görülmüş ve yapıya katılan HEMA ve EDMA'nın oranları sırasıyla 0.05 ve 0.1 mmol olarak bulunmuştur. Cu<sup>2+</sup> iyonu baskılanmamış PHEMAC nanopartiküller aynı oranlarda ama ortama Cu<sup>2+</sup> iyonu eklenmeden hazırlanmıştır.

Çizelge 4.1. PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve PHEMAC nanopartiküllerin sentezi için optimize edilen monomer ve kalıp molekül, Cu<sup>2+</sup> oranları.

Nanopartikül	Oran (MAC:Cu <sup>2+</sup> )	MAC	Cu <sup>2+</sup>	HEMA	EDMA
PHEMAC-Cu <sup>2+</sup>	2:1	0.10 mmol	0.05 mmol	0.05 mmol	0.10 mmol
PHEMAC	2:-	0.10 mmol	-	0.05 mmol	0.10 mmol



Şekil 4.1. MAC-Cu<sup>2+</sup> ön-kompleksin spektrofotometrik ölçümü.

#### 4.2. PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve PHEMAC SPR Biyosensörlerin Karakterizasyonu

PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve PHEMAC SPR biyosensörlerin karakterizasyonu FTIR-ATR, Taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre ve temas açısı ölçümleriyle sağlanmıştır.

#### **4.2.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi**

MAC monomerinin, MAC-Cu<sup>+2</sup> ön-kompleksinin, Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> iyonu biyosensörün, Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmamış PHEMAC sensörün karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Hazırlanan numuneler, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür. MAC monomerinin ve MAC-Cu<sup>+2</sup> ön-kompleksinin FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.2 de verilirken PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC SPR biyosensörlerin yüzeyine ait FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.3'de verilmiştir.

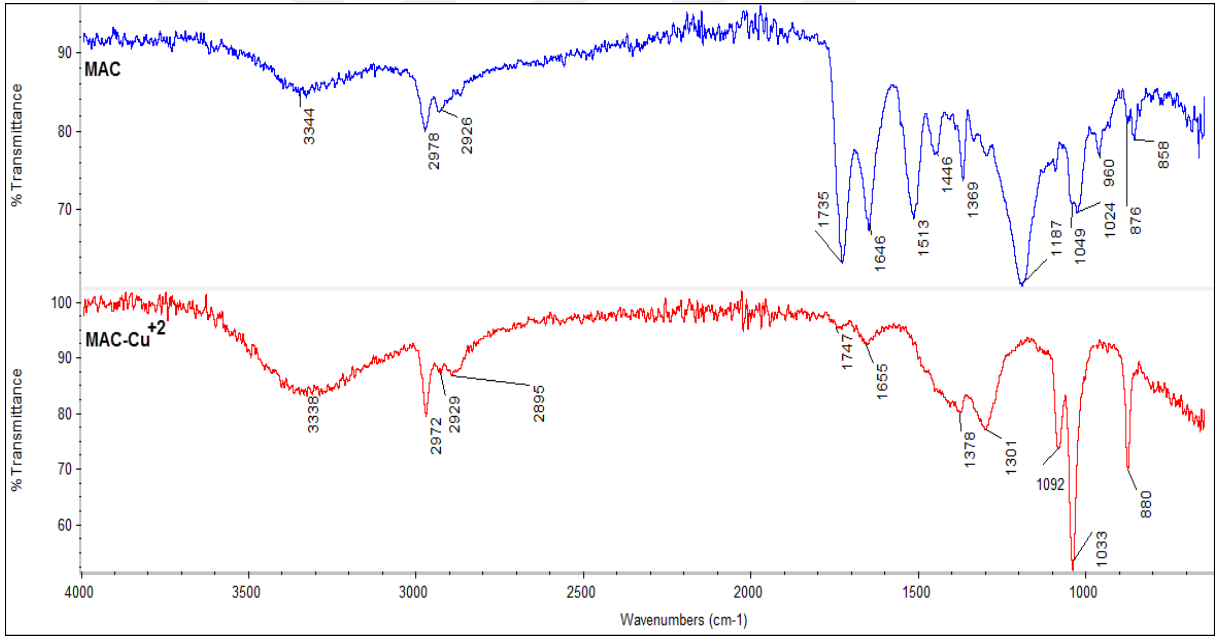
##### **4.2.1.1. MAC Monomerinin ve MAC-Cu<sup>+2</sup> Ön-kompleksinin FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi**

MAC Monomerinin FTIR-ATR spektrumunda karakteristik amid I ve amid II bandları sırasıyla 1646 ve 1513 de 3344 cm<sup>-1</sup> ise -NH grubuna ait gerilme bandları gözlenmektedir. Karboksilik aside bağlı -OH grubunun gerilme bandı da -NH'a ait gerilme bandıyla aynı bölgede geniş pik olarak örtüşmektedir. Karboksilik asit C=O gerilme bandı 1735 cm<sup>-1</sup> de, -SH gerilme bandları 1187 ve 960 cm<sup>-1</sup> de bulunmaktadır ( Şekil 4.2. ). MAC-Cu<sup>+2</sup> kompleksinin FTIR-ATR spektrumunda 450-500 cm<sup>-1</sup> aralığında disülfid bağlarını gösteren bandın olmaması Cu<sup>+2</sup> iyonunun sisteini sistine yükseltgemediğini göstermektedir. Aynı şekilde MAC-Cu<sup>+2</sup> ön-kompleksinde -SH gruplarına ait 1187 cm<sup>-1</sup> ve 960 cm<sup>-1</sup> deki gerilme bandlarının yok olması -SH gruplarının Cu(II) iyonu koordinasyon yaparak sisteine koordine olduğunu göstermektedir.

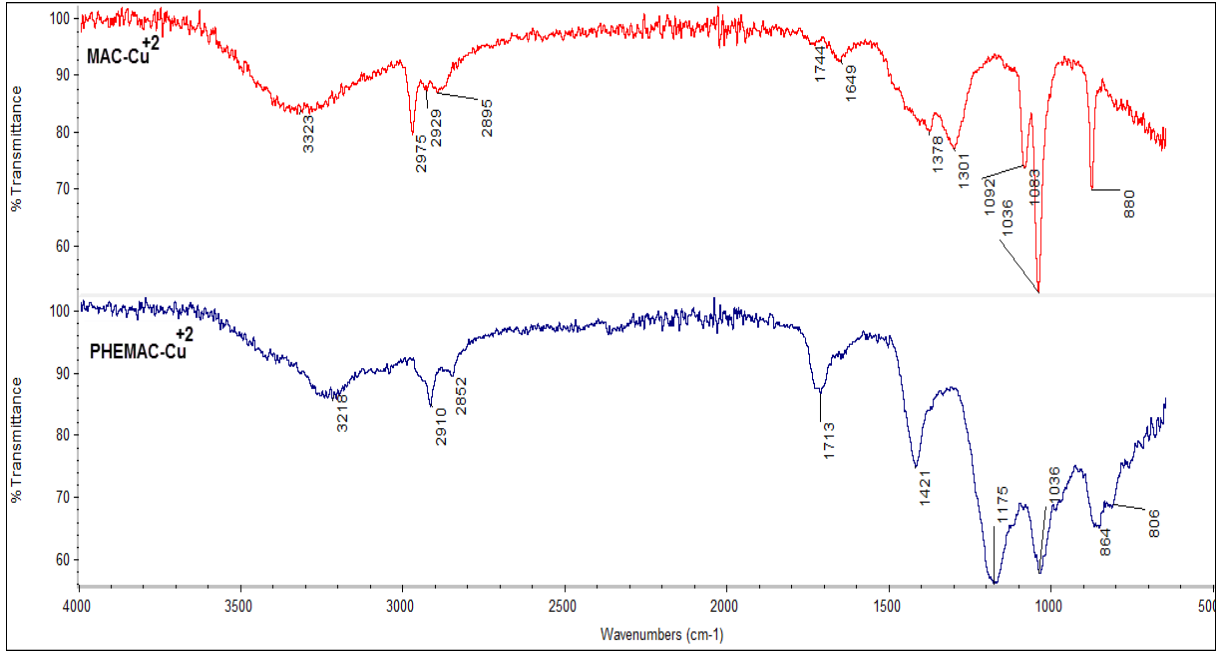
##### **4.2.1.2. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC Nanopartikül FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi**

Mini-emilsüyon polimerizasyon yöntemiyle MAC-Cu<sup>+2</sup> ön-kompleksi ve HEMA monomeri kullanılarak PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> nanopartikülleri sentezlenmiştir. MAC-Cu<sup>+2</sup> ön-kompleksi ve PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> nanopartiküllerine ait FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.4 te gösterilmiştir. 1713 cm<sup>-1</sup> deki bandın sinyal şiddetinin artması, 1092 cm<sup>-1</sup> deki

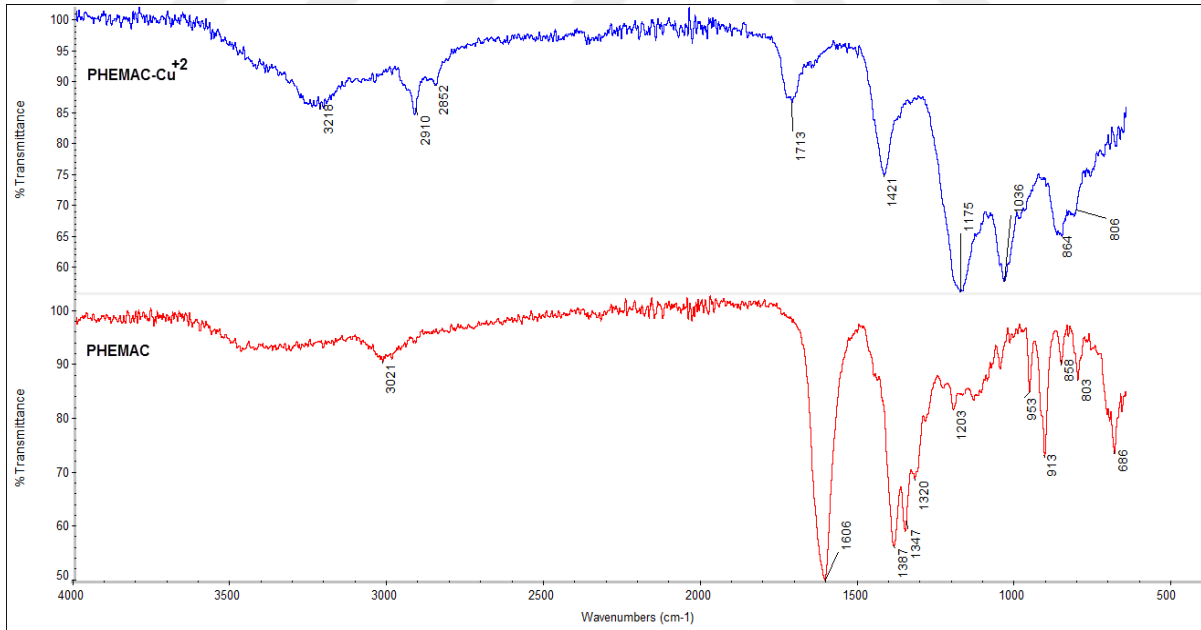
koordine olmuş  $-S-Cu^{+2}$  bağlarının  $1175\text{ cm}^{-1}$  e kayması MAC- $Cu^{+2}$  ön kompleksinin PHEMAC- $Cu^{+2}$  yapısına girdiğini göstermektedir. Şekil  $Cu^{+2}$  koordine olmamış yani baskılanmamış PHEMAC nanopartiküllerin FTIR-ATR yapısına bakıldığında  $1606\text{ cm}^{-1}$  deki bandın MAC'ın HEMA'nın yapısına  $Cu^{+2}$  iyonunun koordine olmadan katılımıyla nanopartikül elde edilmesi sonucu oluşan karboksil-karbonil ( $-COO$ ) grubuna ait olduğu görülmektedir. Şekil 4.4  $Cu^{+2}$  baskılanmış PHEMAC- $Cu^{+2}$  ve baskılanmamış PHEMAC nanopartiküllerine ait FTIR-ATR spektrumu'nu göstermektedir. MAC- $Cu^{+2}$  ön-kompleksi ve PHEMAC nanopartikülüne ait polimerik yapının moleküler formülleri sırasıyla Şekil 4.5.a ve Şekil 4.5.b de verilmiştir.



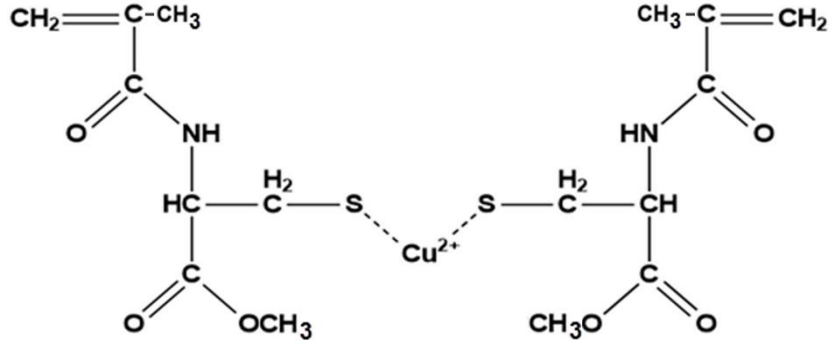
Şekil 4.2. MAC monomeri ve MAC- $Cu^{+2}$  ön-kompleksine ait FTIR-ATR spektrumu.



Şekil 4.3. MAC-Cu<sup>+2</sup> ön-kompleks ve PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> nanopartiküle ait FTIR-ATR spektrumu.



Şekil 4.4. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC nanopartiküle ait FTIR-ATR spektrumu.

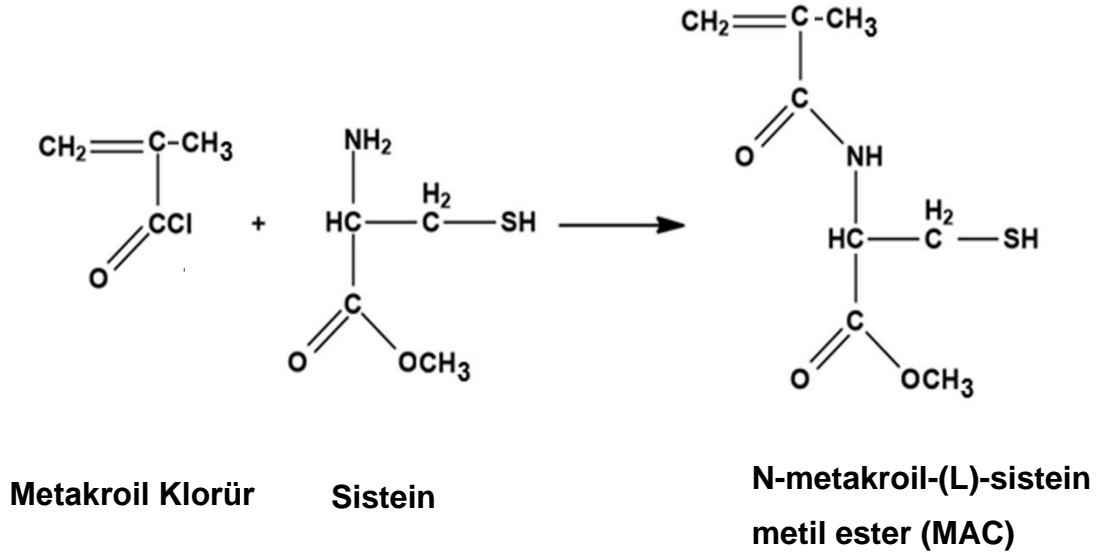


N-metakroil-(L)-sistein metil ester (**MAC**)

$\text{Cu}^{+2}$

N-metakroil-(L)-sistein metil ester (**MAC**)

Şekil 4.5. MAC monomeri ile  $\text{Cu}^{+2}$  arasındaki koordinasyonla oluşan  $\text{MAC-Cu}^{+2}$  ön kompleksin moleküler formülü.



Şekil 4.6.N-metakroil-(L)-Sistein Metil Ester (MAC) monomerinin Metakroil Klorürden ve L-Sistein Metil Ester' den oluşum reaksiyonu.

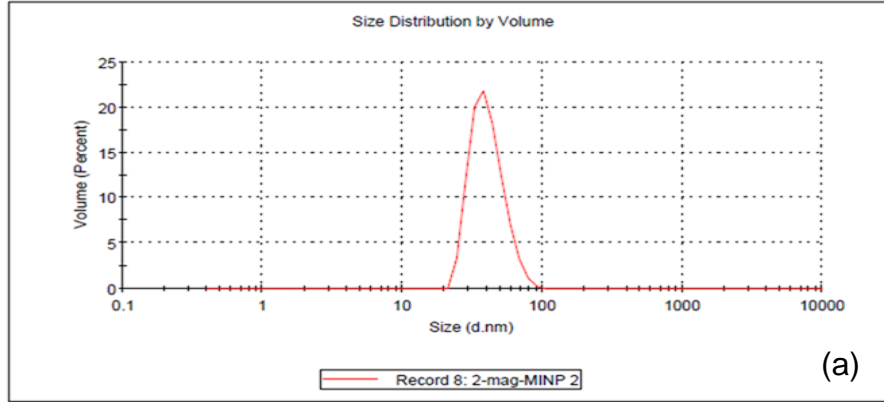


#### 4.2.2. Zeta Boyut Analizi

Sentezlenen  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmış PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  nanopartiküllerin boyut analizi Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile ölçülmüştür. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  partiküllerin boyut analizi hem sayıca hemde hacimce yapılmış polidispersite indeksi PDI: 0.059 olarak tespit edilen partiküllerin dağılımın homojen olduğu görülmüştür. Partiküllerin ortalama boyutları 46.10 nm olarak ölçülmüştür. Ölçümler üç kez tekrarlanmıştır. Şekil 3.2 Zeta boyut analizörünün resimini göstermektedir. Şekil 4.7.a. ve Şekil 4.7.b sırasıyla hacimce ve sayıca boyut dağılımını göstermektedir.

#### Results

	Size (d.n...	% Volume:	St Dev (d.n...
<b>Z-Average (d.nm):</b> 46,10	<b>Peak 1:</b> 41,02	100,0	11,45
<b>PdI:</b> 0,059	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,947	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Result quality</b> Good			

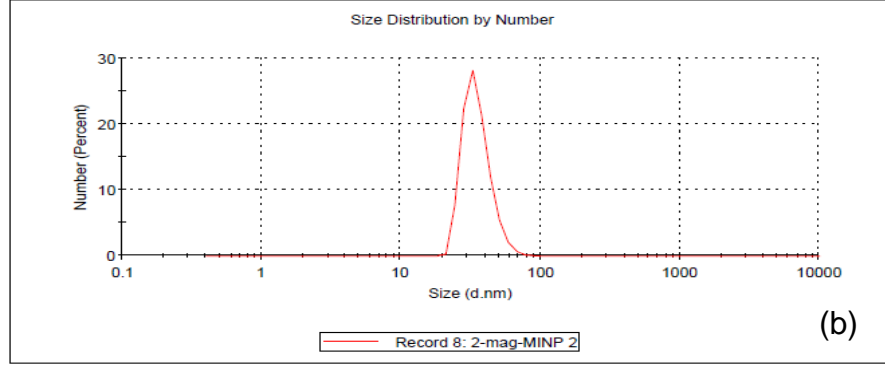


(a)

## Results

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d...
Z-Average (d.nm): 46,10	Peak 1: 35,29	100,0	8,282
Pdl: 0,059	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,947	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

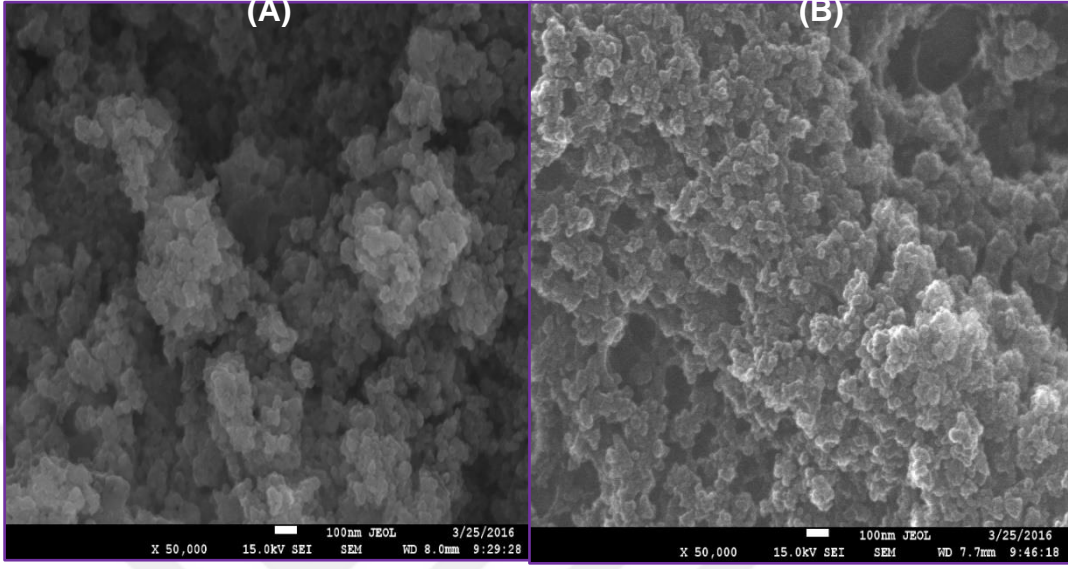
Result quality **Good**



Şekil 4.7. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> nanopartiküllerin (a) hacimce (b) sayıca boyut dağılımı.

### 4.2.3. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

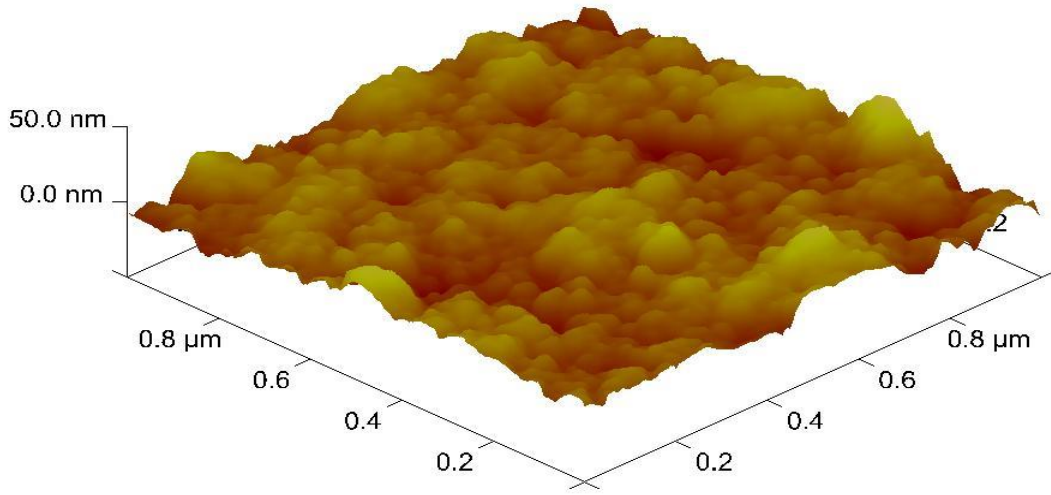
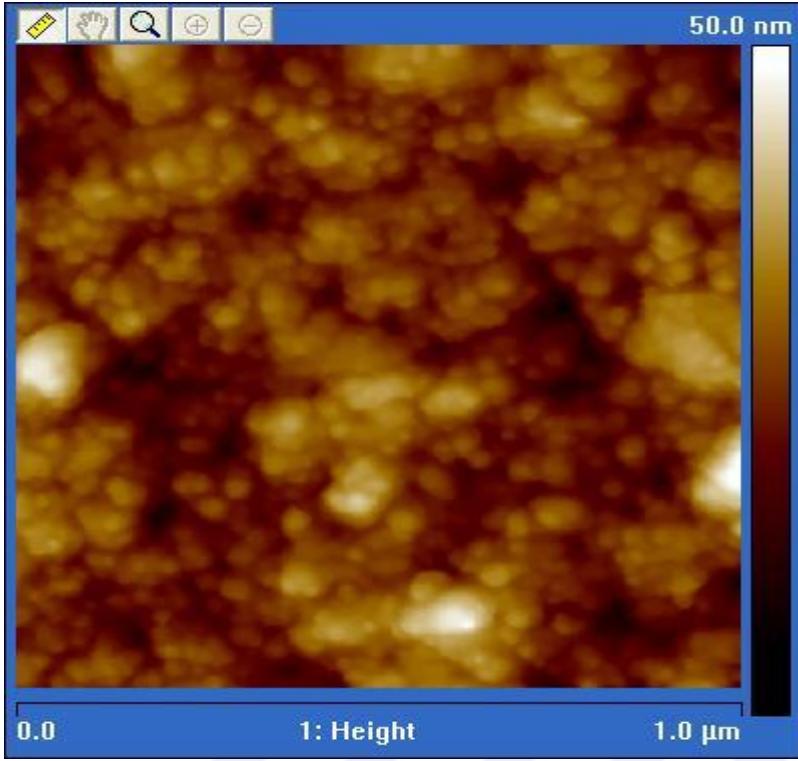
Baskılanmış ve baskılanmamış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC nanopartiküllerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskop (SEM) fotoğrafları ile görüntülenmiştir. Şekil 4.8.a ve 4.8.b da görüldüğü gibi nanopartiküllerin ortalama boyutu 40 nm' dir. Baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve baskılanmamış PHEMAC nanopartiküllerin SEM fotoğrafları X50 000 büyütme oranında görüntülenmiştir.



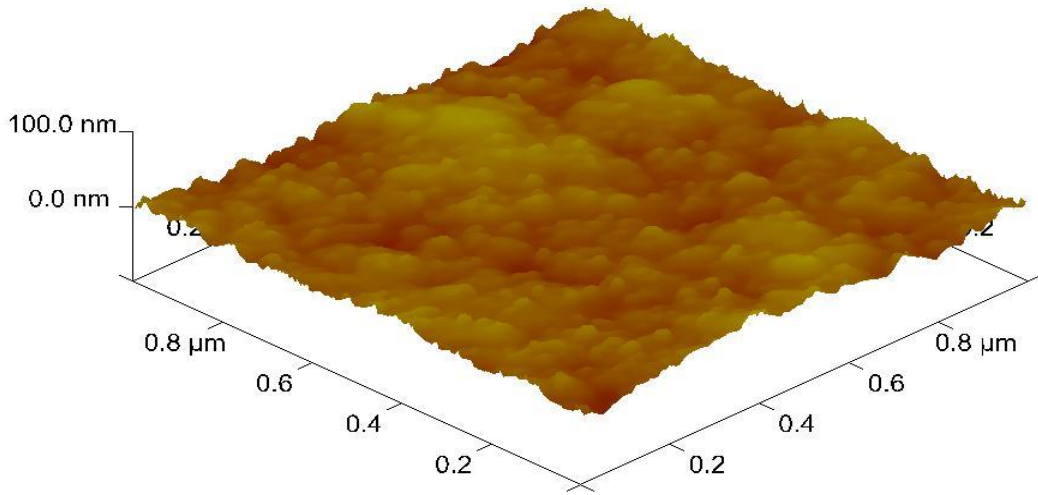
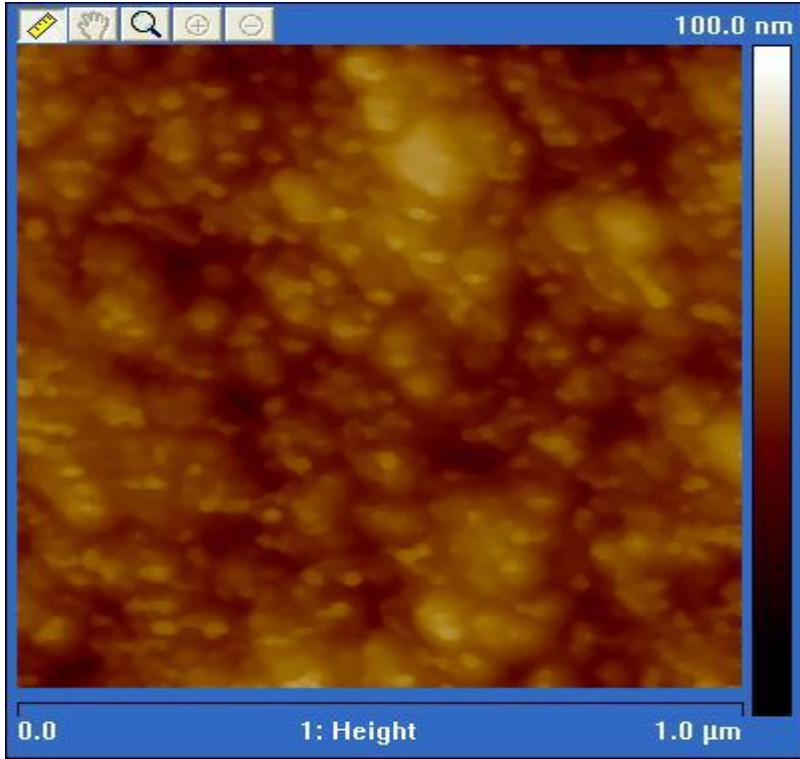
Şekil 4.8. Cu<sup>2+</sup> iyonu baskılanmamış ve baskılanmış nanopartiküllerin SEM görüntüleri (a) PHEMAC (b) PHEMAC-Cu<sup>2+</sup>.

#### 4.2.4. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve PHEMAC nanopartikül biyosensörlerin yüzey morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Farklı oranlarda büyütölen PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve PHEMAC biyosensörlerin ortalama pürüzlölüğü 5.51 nm ve 4.33 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Bu sonuçlar; PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve PHEMAC SPR biyosensörün altın yüzeyine başarılı bir şekilde tutunduğunu göstermektedir. PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve PHEMAC biyosensörlerin yarı değen modda AFM görüntüleri Şekil 4.9 ve 4.10' da verilmiştir. Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 a göre PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve PHEMAC biyosensörleri altın yüzeye homojen bir şekilde tutturulmuştur.



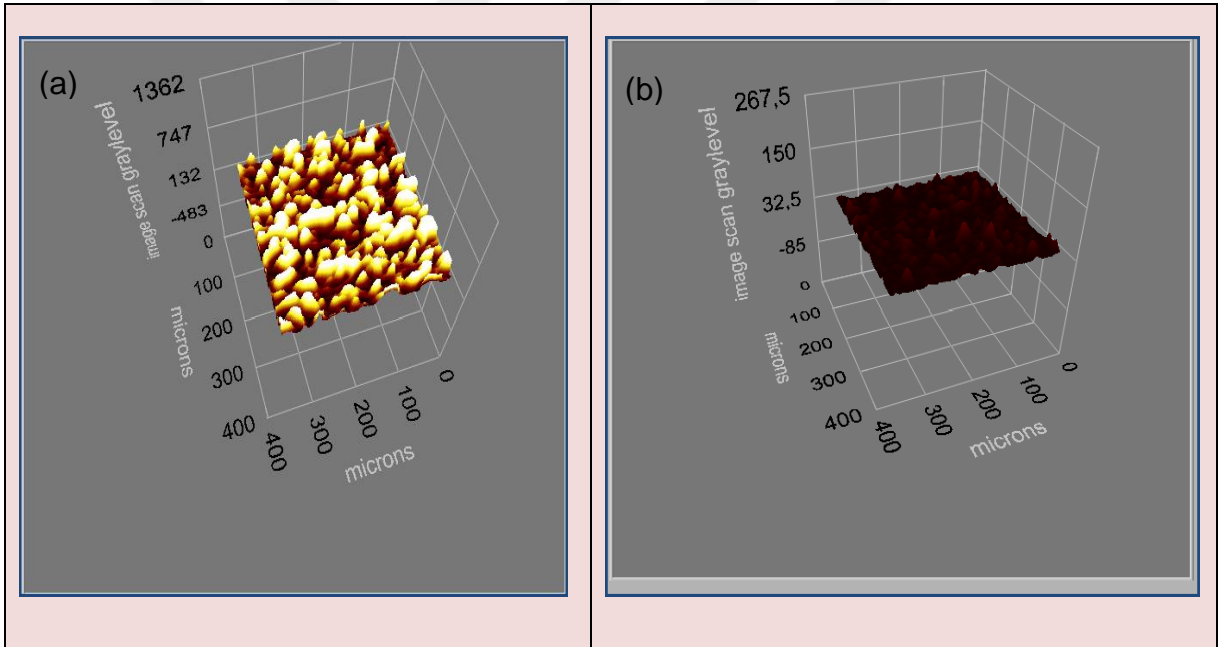
Şekil 4.9. PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> SPR biyosensörün AFM görüntüsü.



Şekil 4.10. PHEMAC SPR biyosensörün AFM görüntüsü.

#### 4.2.5. Elipsometre Analizi

PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve PHEMAC SPR biyosensörlerin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir (Şekil 4.11). Elipsometrik ölçümler 532 nm dalga boyunda, 62°' lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve PHEMAC SPR biyosensörlerinin ortalama kalınlık değeri 87.0±2.2 nm ve 75.0±1.0 nm olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.11.a ve 4.11.b baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve baskılanmamış PHEMAC SPR biyosensörlerin elipsometre ölçümlerini göstermektedir. Elipsometre ölçümlerinden çıkan yüzey kalınlıklarının daha büyük olmasının muhtemel sebebi nanopartiküllerin zeta boyut analizinde de görüldüğü gibi dağılımının 100 nm ye kadar çıkabilmesindedir.



Şekil 4.11. PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> (a) ve PHEMAC (b) SPR biyosensörlerin elipsometre ölçümünde alınan üç boyutlu görüntüsü.

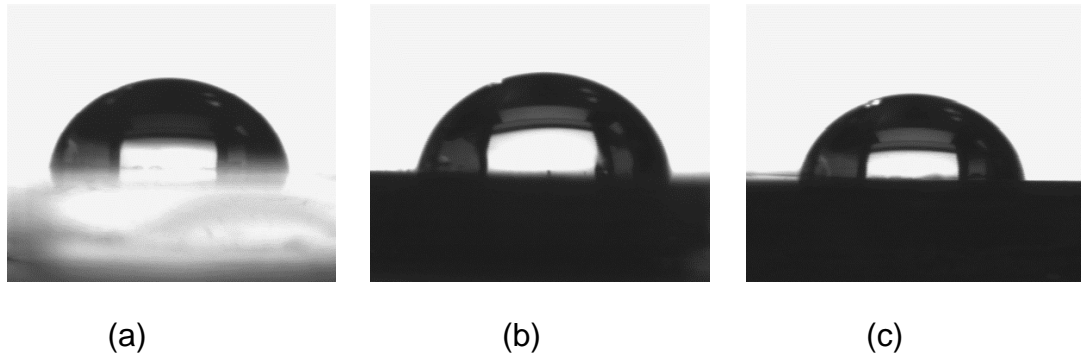
#### 4.2.6. Temas Açısı Ölçümleri

Cu<sup>2+</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve baskılanmamış PHEMAC SPR biyosensörlerin yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Tablo 4.2'de Cu<sup>2+</sup> baskılanmış ve baskılanmamış,

PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> ve PHEMAC SPR biyosensörlerin yüzeylerinin su temas açıları özetlenmiştir. Su temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi Cu<sup>2+</sup> baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> SPR biyosensör yüzeyinin temas açısı değeri 81.5° iken, baskılanmamış PHEMAC SPR biyosensör yüzeyinin su temas açısı 62.7° dir. Cu<sup>2+</sup> baskılanmış SPR biyosensör yüzeyinin su temas açısı ise 55.9°' ye düşmesi yapıya su ile koordinasyon yapabilen Cu<sup>2+</sup> iyonlarının girdiğini göstermektedir. Yüzeylerin su temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeylerin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. Bu durum su ile koordinasyon yapan bir molekülün yapıya girmesinden dolayı malzemenin hidrofilik bir karakter kazanması sebebiyledir. Şekil 4.12.a, 4.12.b ve 4.12.c'de su temas açısı ölçümleri alınan boş altın çip yüzeyi, Cu<sup>2+</sup> baskılanmamış PHEMAC ve Cu<sup>2+</sup> baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> SPR biyosensörlerine ait temas açısı görüntüleri verilmiştir.

Çizelge 4.2. Boş altın çip yüzeyi, Modifiye edilmemiş PHEMAC ve modifiye edilmiş PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> SPR biyosensörlerin yüzeylerinin su temas açıları.

Yüzey	Su temas açısı,°
Boş	81.5
PHEMAC	62.7
PHEMAC-Cu <sup>2+</sup>	55.9



Şekil 4.12. Çip yüzeyinin su temas açısı ölçüm görüntüleri (a) Boş altın, (b) Cu<sup>2+</sup> baskılanmamış PHEMAC altın yüzeyi, (c) PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> SPR biyosensör yüzeyi.

### 4.3. SPR Biyosensörlerle Kinetik Analizler

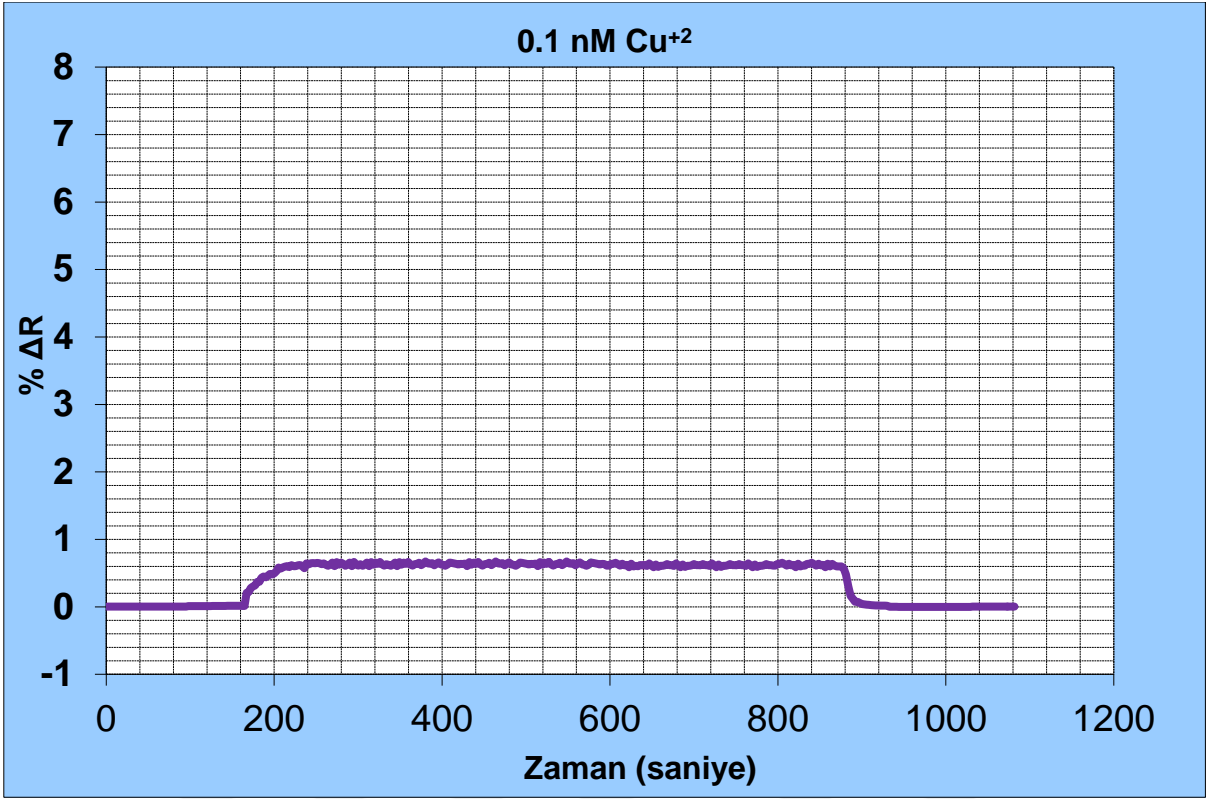
Biyomoleküllerin tayininde sıklıkla kullanılan enzim, radyo veya floresan işaretleme yöntemlerinden farklı olarak SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye gerek duyulmadan kullanılabilirler [73]. İşaretleme işleminin yapılmaması hem zaman kazandırmakta hem de maliyeti düşürmektedir. İşaretleyici moleküllerin ortamda bulunan diğer moleküllerle etkileşiminden dolayı yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir. SPR temelli biyosensörlerin kullanılmasıyla bu sorunlar giderilebilmektedir [173]. Ayrıca bu sensörlerde analit ve yüzey etkileşimi gerçek zamanlı ve doğrudan ölçülebilmektedir. Bu özellik nicel olarak kinetik, termodinamik ve derişim parametrelerinin belirlenmesini veya nitel olarak ligand ve analit arasındaki ilişkinin karakterize edilmesini sağlamaktadır [28].

Bu çalışma kapsamında PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC SPR biyosensörler hazırlanmıştır. SPR sinyali ile Cu<sup>+2</sup> iyon derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (0.1-100 nM) Cu<sup>+2</sup> iyon çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığı ile SPR temelli biyosensörler ile etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alınmıştır. Şekil 4.13' de farklı derişimlerde hazırlanan Cu<sup>+2</sup> iyon çözeltilerinden elde edilmiş sensogramlar verilmiştir.

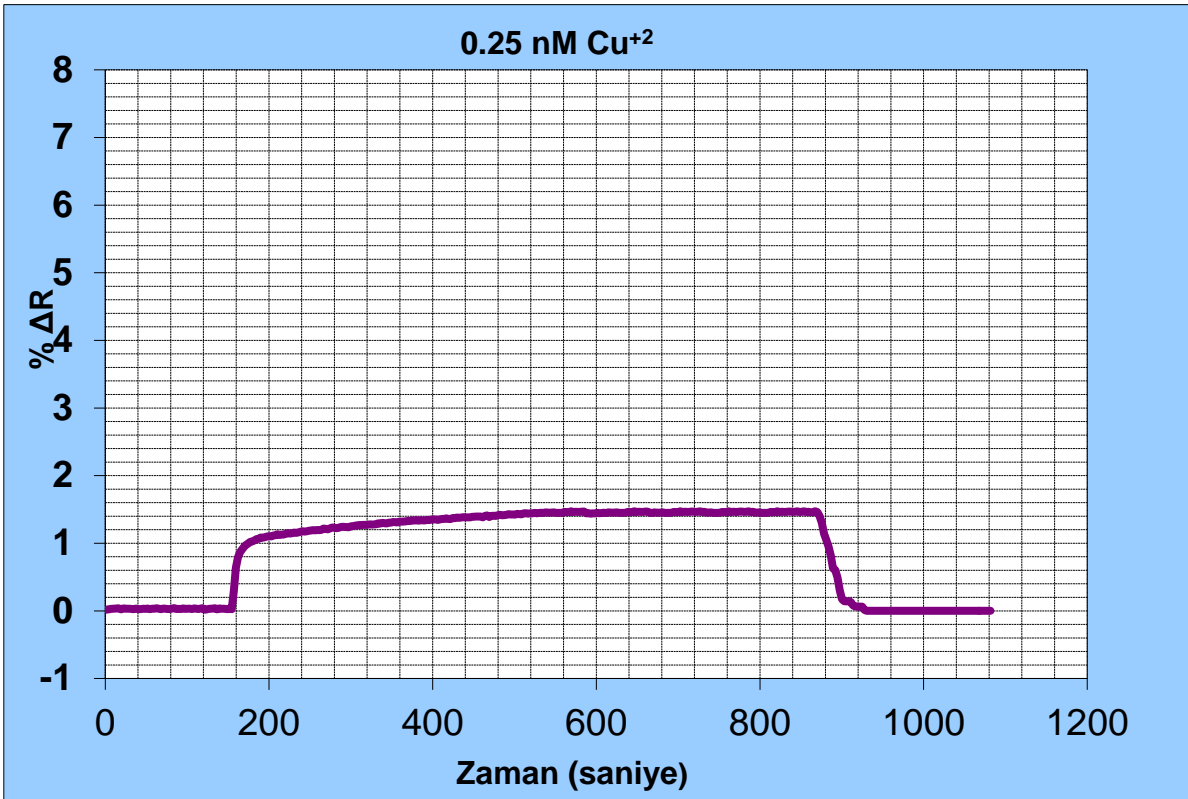
Şekil 4.13'de farklı derişimlerde Cu<sup>+2</sup> iyon çözeltilerinin PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensöre uygulanması ile elde edilen % kırılmaya ( $\Delta R$ ) karşılık zamanı gösteren grafikler (a) 0.1 nM; (b) 0.25 nM; (c) 1.0 nM; (d) 2.50 nM; (e) 10 nM; (f) 25 nM (g) 100 nM Cu<sup>+2</sup> iyonu konsantrasyonları için verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi biyosensör yüzeyine Cu<sup>+2</sup> iyonu uygulanmasıyla birlikte % kırılma değeri artmaktadır.

Şekil 4.14 'de tüm grafikler bir arada verilmiştir. Standart bir ölçümde, sistemden öncelikle denge tamponu daha sonra sistem dengeye ulaşana kadar Cu<sup>+2</sup> iyon çözeltisi geçirilmiş ve son aşamada desorpsiyon çözeltisi kullanılmıştır. Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için 10 dakika beklenilmiştir. Desorpsiyon ve rejenerasyon işlemleri yaklaşık 10 dakika içinde gerçekleştirilmiştir.

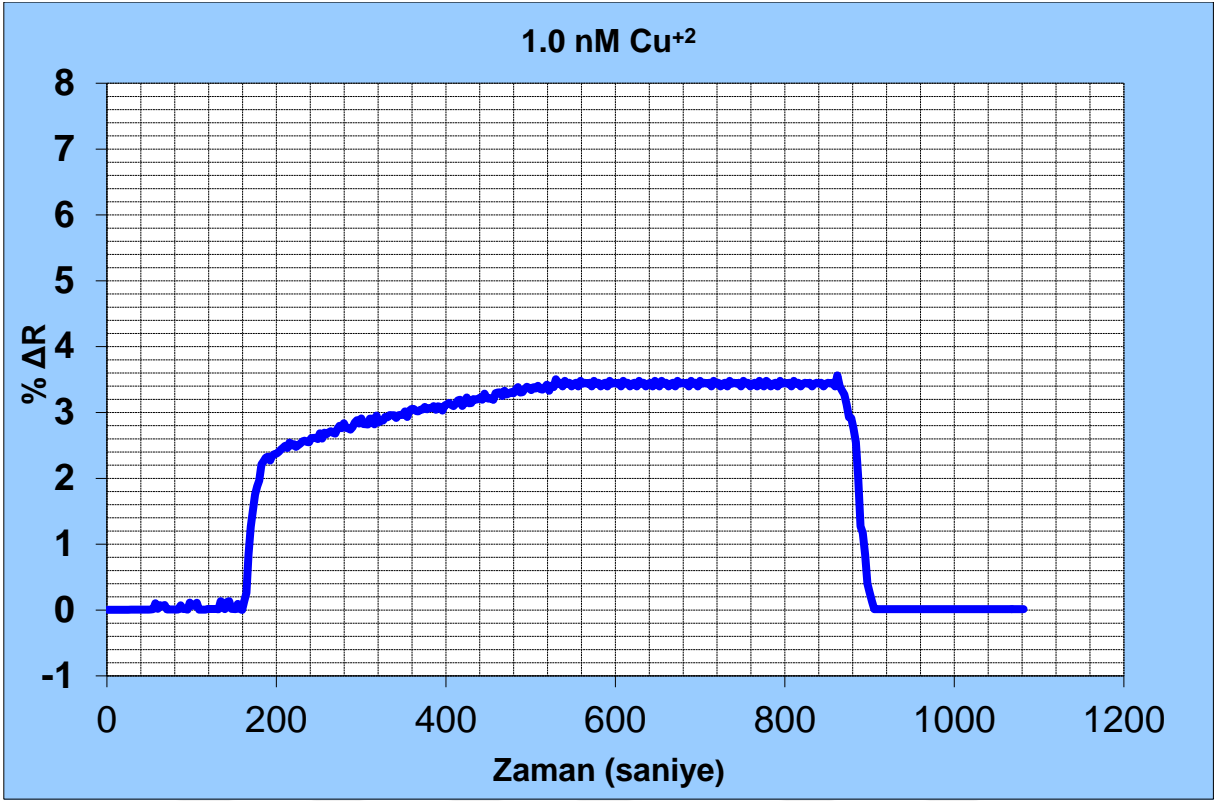




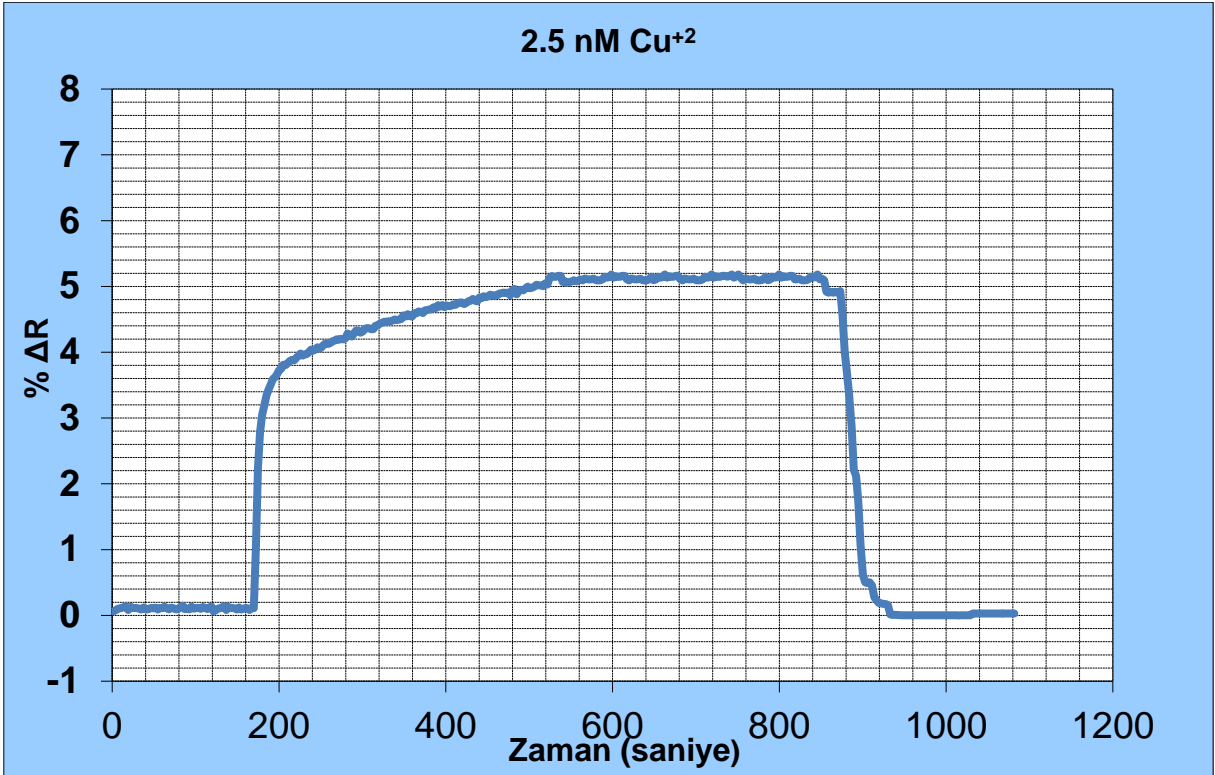
Şekil 4.13.a. 0.1 nM Cu<sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sensorgram.



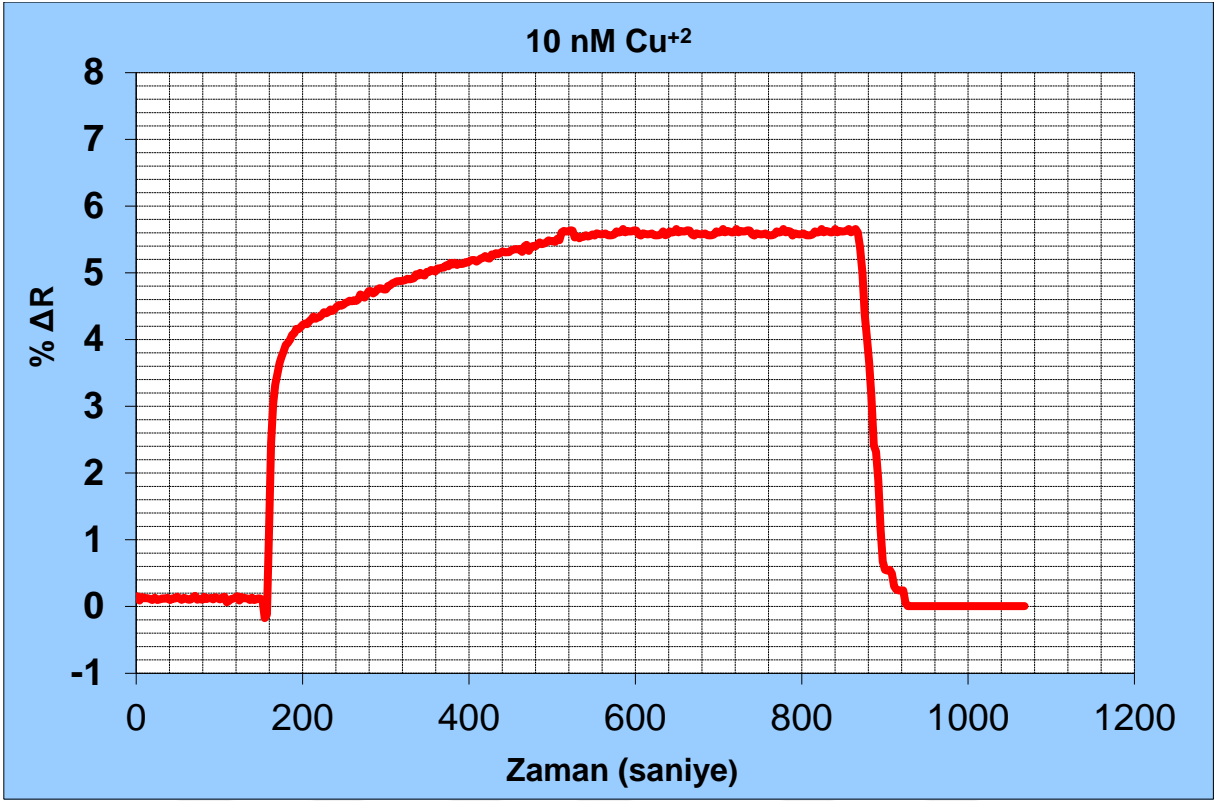
Şekil 4.13.b. 0.25 nM Cu<sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sensorgram.



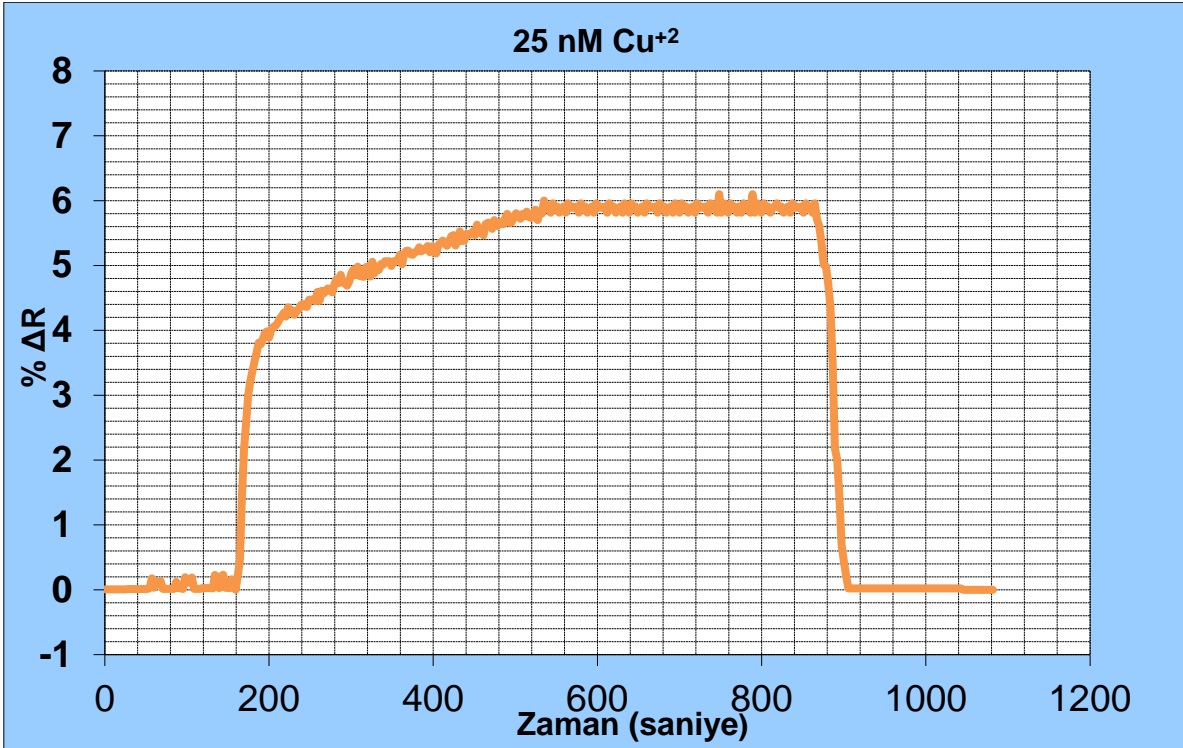
Şekil 4.13.c. 1.0 nM Cu<sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sensorgram.



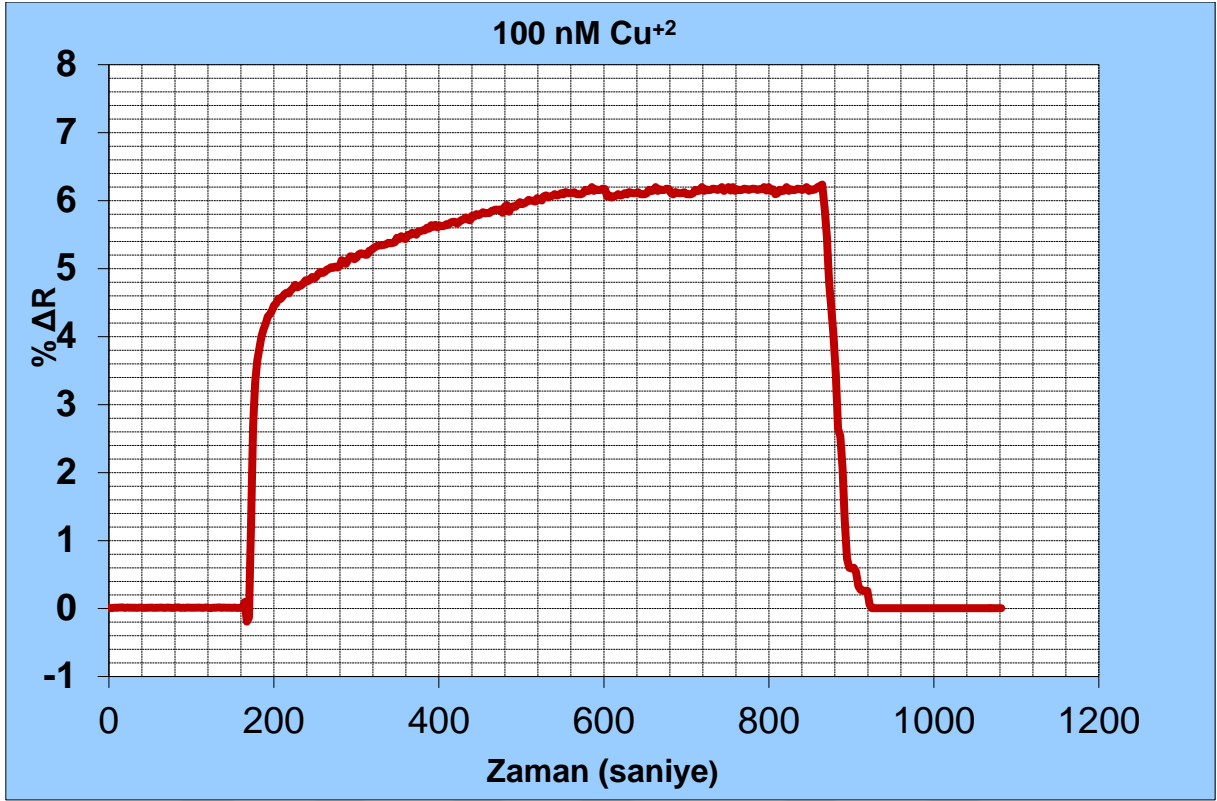
Şekil 4.13.d. 2.5 nM Cu<sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sensorgram.



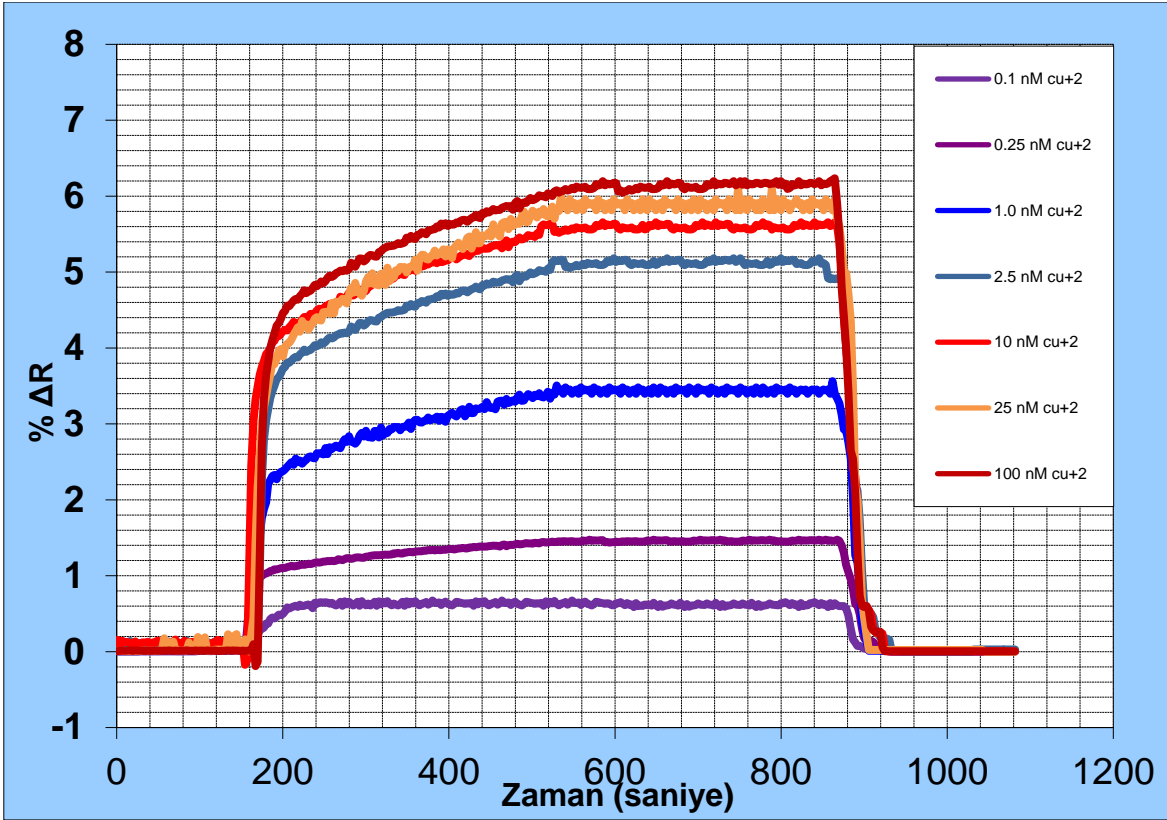
Şekil 4.13.e. 10 nM Cu<sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sersorgram.



Şekil 4.13.f. 25 nM Cu<sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sersorgram.

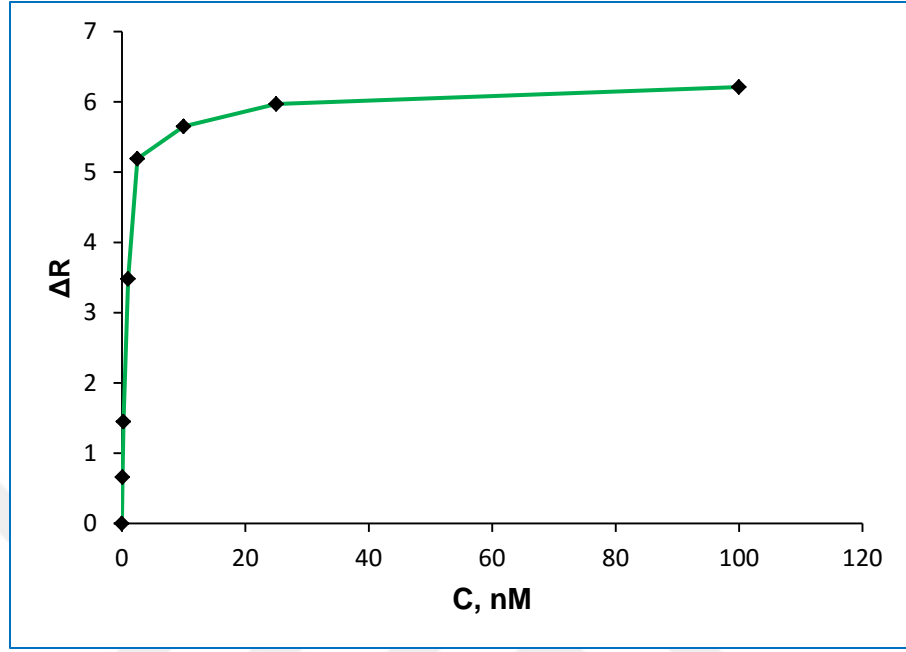


Şekil 4.13.g. 100 nM Cu<sup>2+</sup> iyonu için elde edilen sersorgram.

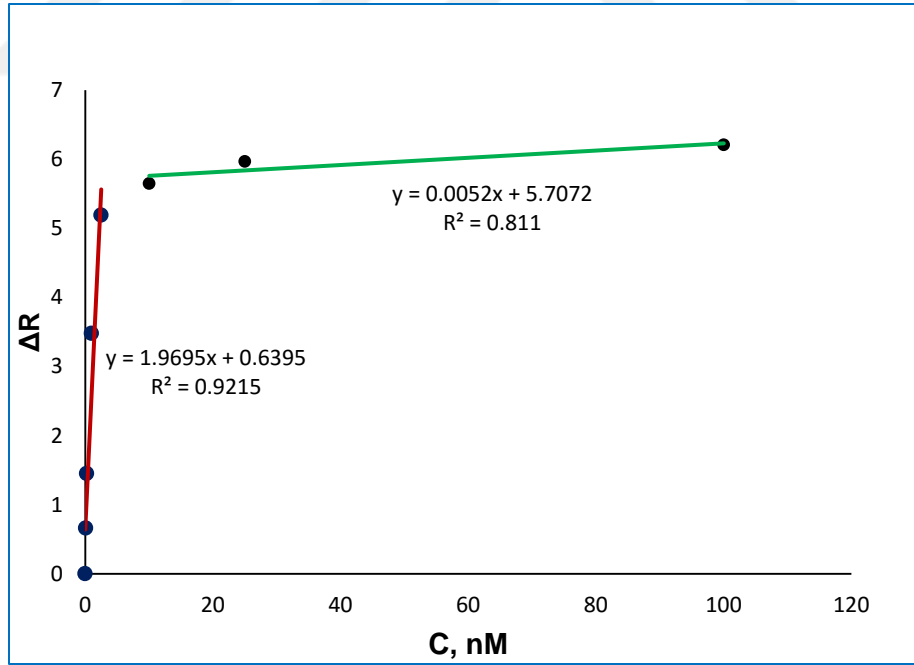


Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki  $\text{Cu}^{+2}$  iyon çözeltileri ve PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörü arasındaki etkileşimlerin zamana göre  $\Delta R$  değerleri.

Şekil 4.15 PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörün  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu için, derişim-sinyal doğrusallığını göstermektedir. Şekil 4.15 a ve 4.15.b' de görüldüğü gibi 0.1-100 nM konsantrasyon aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğruların denklemi ve doğrusallığı ( $y=1.9695x+0.6395$ ;  $R^2=0.9215$ ) ve ( $y= 0.00525x+5.7072$ ;  $R^2 = 0.811$ ) olarak hesaplanmıştır. İki farklı doğru denkleminin olması ve düşük konsantrasyonlardaki doğru denkleminin regresyon katsayısını yüksek olması;  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu moleküllerinin iki farklı bağlanma kinetiği gösterirken düşük konsantrasyonlardaki bağlanmanın yüksek afinite ile gerçekleştiğini göstermektedir. Başka bir deyişle; hazırlanan PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensör, 0.1-2.5 nM konsantrasyon aralığında % 92 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir.



(a)



(b)

Şekil 4.15. PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> SPR biyosensörün farklı Cu<sup>2+</sup> iyonlarına cevabı, ΔR arasındaki ilişki. (a) Bütün Cu<sup>2+</sup> iyonu konsantrasyon aralığı için (b) iki farklı Cu<sup>2+</sup> iyon konsantrasyon aralığı (0.1-2.5 ve 10-100 nM) için.

#### 4.3.1. Denge Analizi

Toplam ligand miktarı ( $[B]_0$ ), yüzeyin maksimum analit bağlama kapasitesi olarak tanımlanırsa; diğer tüm derişim değerleri SPR sinyali olarak ifade edilebilir. Böylelikle kütlelerin derişime dönüştürölme işleminin yapılmasına gerek kalmayacaktır. Serbest analit derişiminin akış hücreinde sabit kaldığı yalancı-birinci derece koşulları altında bağlanma şu şekilde ifade edilir:

$$d\Delta R / dt = kaC (\Delta R_{maks} - \Delta R) - kd\Delta R \quad (4.1)$$

Burada;  $d\Delta R/dt$ , SPR sinyalinin değişim hızı;  $R$  ve  $R_{maks}$ , bağlanma ile ölçülen ve maksimum sinyal;  $C$ , analit derişimi ( $nM$ ),  $ka$ , bağlanma hız sabiti ( $nM^{-1}.s^{-1}$ ) ve  $kd$ , ayrılma hız sabiti ( $s^{-1}$ )'dir. Bağlanma sabiti  $KA$  ( $nM^{-1}$ ),  $ka$  ve  $kd$  sabitlerinin oranından hesaplanır ( $KA=ka/kd$ ). Denge durumunda,  $d\Delta R/dt=0$  alınarak eşitlik basitleştirilir:

$$\Delta R_{denge} / C = KA\Delta R_{mak} - KA\Delta R_{denge} \quad (4.2)$$

Bundan dolayı, bağlanma sabiti  $KA$ ,  $\Delta R_{denge}/C$ 'ye karşı  $\Delta R_{denge}$  grafiğinden hesaplanır. Ayrılma sabiti  $KD$  ise;  $1/KA$  eşitliği ile hesaplanabilir.

#### 4.3.2. Bağlanma Kinetik Analizi

Eşitlik 4.1 tekrar düzenlendiğinde;

$$d\Delta R/dt = kaC\Delta R_{maks} - (kaC + kd)\Delta R \quad (4.3)$$

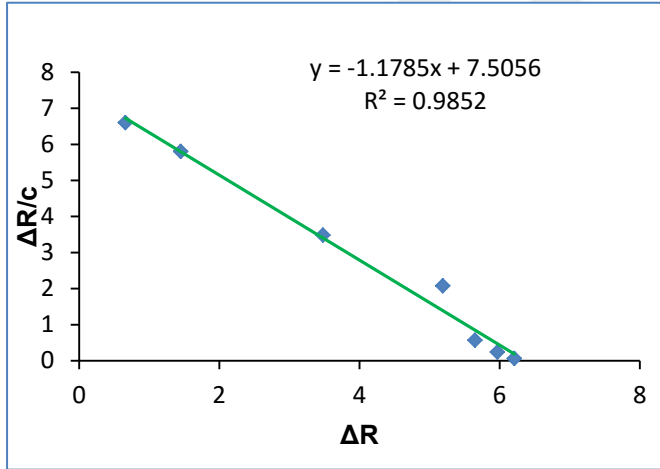
eşitliği elde edilir. Buradan, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen  $d\Delta R/dt$ 'ye karşı  $\Delta R$  grafiğinin, eğimi  $-(kaC + kd)$  olan bir doğru verdiği görölmektedir. Başlangıç bağlanma hızı analit derişimiyle doğrusal bir ilişki içerisinde ve kantitatif olarak derişim belirlenmesinde kullanılır. Eğer  $R_{maks}$  değeri biliniyorsa, tek bir sensorgram kullanılarak  $ka$  ve  $kd$  değerleri hesaplanabilir. Yüzeyi tamamen doygunluğa erişirmek için çok yüksek analit derişimleri gerekli olduğu için  $R_{maks}$ 'un deneysel olarak belirlenmesi zordur. Tercih edilen yaklaşım, birçok farklı analit derişimlerinde bağlanma sensorgramlarının alınmasıdır. İleri ve geri yöndeki hızların analizi için çizilen  $d\Delta R/dt$ 'ye karşı  $\Delta R$  grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri ( $S$ ) vermektedir:

$$S = kaC + kd \quad (4.4)$$

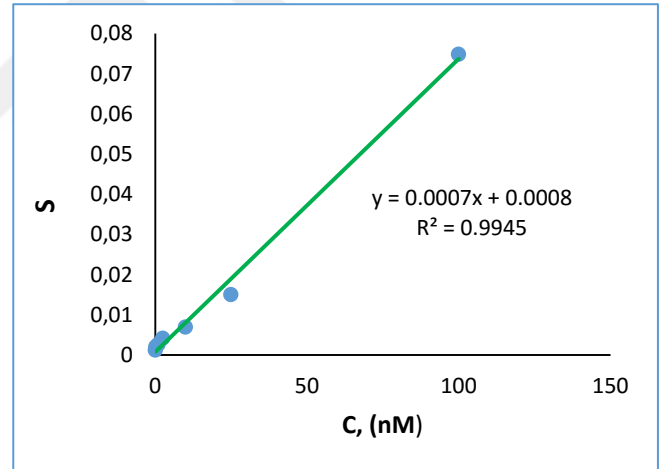
S'ye karşı C grafiği, eğimi ka olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası kd değerini vermektedir. Fakat, kaC >> kd olduğu durumlarda kd hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = kd (t - t_0) \quad (4.5)$$

Burada;  $\Delta R_0$  ve  $\Delta R_t$ , ayrılma eğrisindeki  $t_0$  ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir [144]. Şekil 4.16.a ve 4.16.b'de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan  $\Delta R_{maks}$ ,  $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_A$  ve  $K_D$  değerleri Çizelge 4.3'te özetlenmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.16. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. Denge analiz yaklaşımı (Scatchard)

(a) Bağlanma kinetik yaklaşımı (b).

Çizelge 4.3. Kinetik hız sabitleri

Denge Analiz (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
$\Delta R_{maks}$ ,	6.41	$k_a$ , $nM^{-1} \cdot s^{-1}$	0.002
$K_A$ , $nM^{-1}$	1.17	$k_d$ , $s^{-1}$	0.306
$K_D$ , nM	0.84	$K_A$ , $nM^{-1}$	0.065
$R^2$	0.98	$K_D$ , nM	15.314
		$R^2$	0.919



#### 4.4. Denge İzoterm Modelleri

PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensör ile Cu<sup>+2</sup> iyon çözeltisi arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Scatchard, Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri.

$$\text{Scatchard} \quad \Delta R_{\text{denge}} / [C] = KA(\Delta R_{\text{maks}} - \Delta R_{\text{denge}})$$

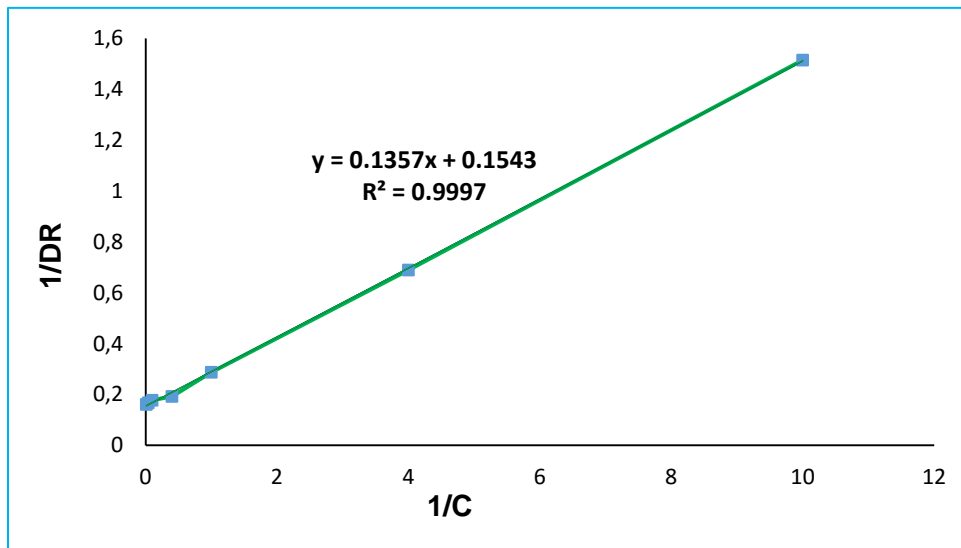
$$\text{Langmuir} \quad \Delta R = \{\Delta R_{\text{maks}}[C] / KD + [C]\}$$

$$\text{Freundlich} \quad \Delta R = \Delta R_{\text{maks}}[C]^{1/n}$$

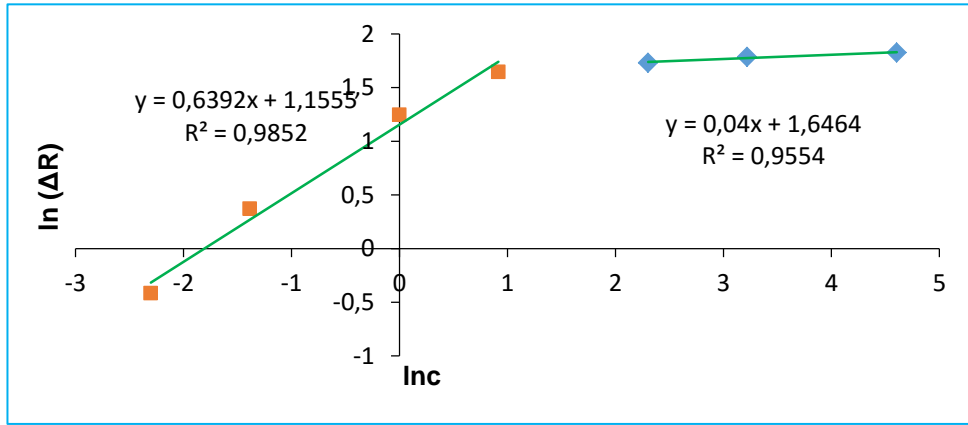
$$\text{Langmuir-Freundlich} \quad \Delta R = \{\Delta R_{\text{maks}}[C]^{1/n} / KD + [C]^{1/n}\}$$

Burada;  $\Delta R_{\text{maks}}$ , maksimum SPR sinyal kayması;  $\Delta R_{\text{denge}}$ , denge halindeki SPR sinyal kayması;  $[C]$ , analit derişimi (nM);  $KA$  ( $\text{nM}^{-1}$ ), bağlanma denge sabiti;  $KD$  (nM), ayrılma denge sabiti;  $1/n$ , Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.

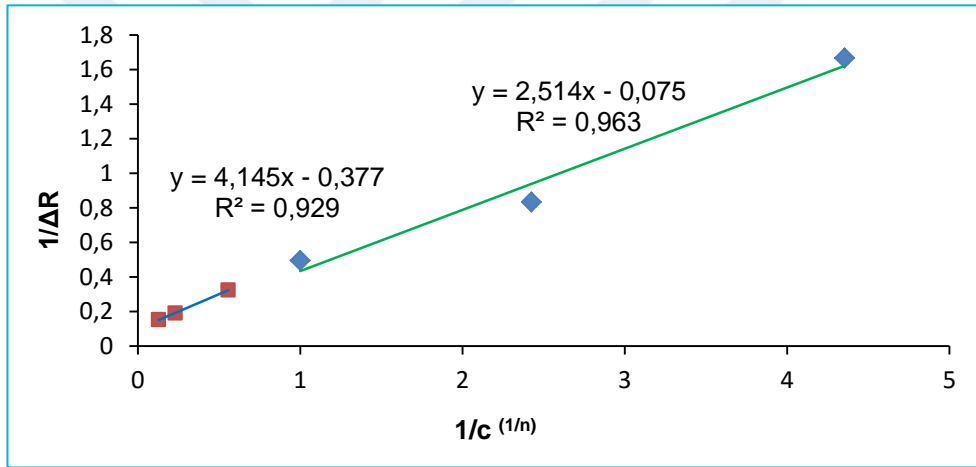
Şekil 4.17'ye göre deneysel olarak elde edilen veriler Cu<sup>+2</sup> iyonu tayinine en uygun model Langmuir modelidir ( $R^2 = 0.9997$ ). Bu sonuç, hazırlanan Cu<sup>+2</sup> iyonu baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensör yüzeyindeki Cu<sup>+2</sup> iyonu bağlanma özelliklerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.17. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich

Çizelge 4.4. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
$\Delta R_{maks,}$	6.48	$\Delta R_{maks,}$	3.15	$\Delta R_{maks,}$	13.3
$K_D, nM$	0.87	$1/n$	0.639	$1/n$	0.639
$K_A, nM^{-1}$	1.14	$R^2$	0.985	$K_D, nM$	33.3
$R^2$	0.999			$K_A, nM^{-1}$	0.03
				$R^2$	0.963

#### 4.5. Yarışmalı Kinetik Analizler

Zn<sup>+2</sup> ve Ni<sup>+2</sup> iyonları için Cu<sup>+2</sup> iyonuna göre dağılıma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (4.6)$$

Eşitlikte K<sub>d</sub>, dağılıma katsayısını (mL/g); C<sub>i</sub> ve C<sub>f</sub>, biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini (nM); V, kullanılan çözelti hacmini (mL) ve m, polimerin ağırlığını (g) ifade etmektedir. SPR sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmektedir[144]. Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi; polimerin kütlesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin ΔR ile doğrusal ilişkide olmasıdır. Bu durumda seçicilik katsayısı,

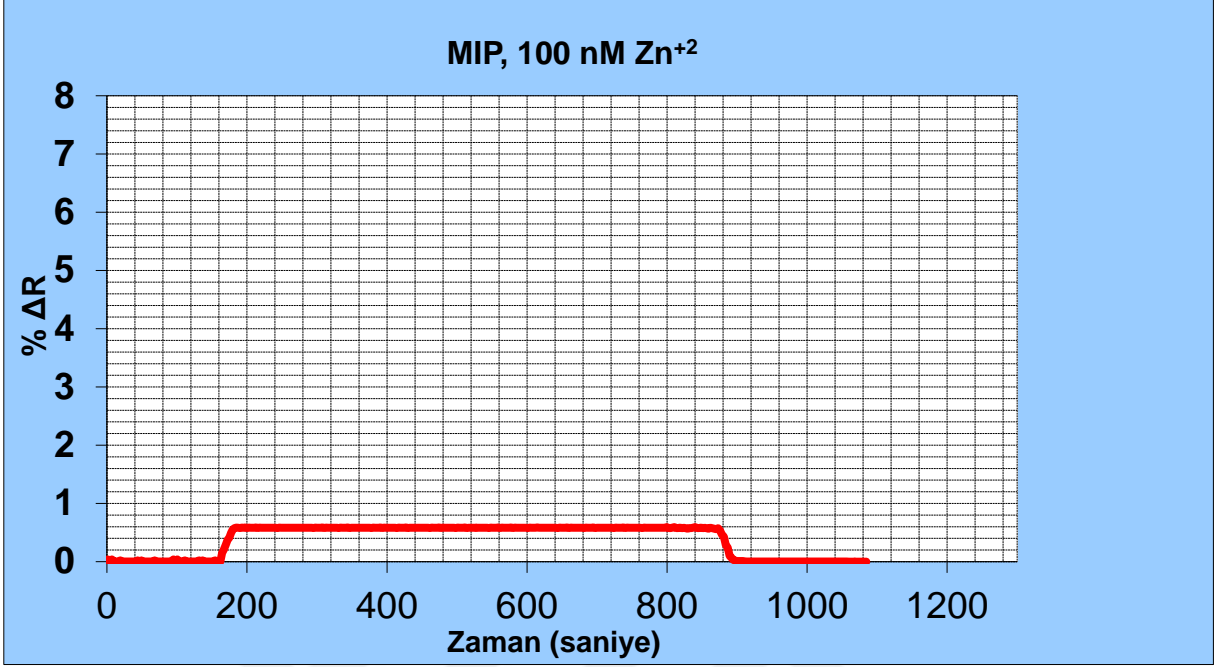
$$k = \Delta R_{\text{kalıp}} / \Delta R_{\text{girişimci}} \quad (4.7)$$

şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi ise;

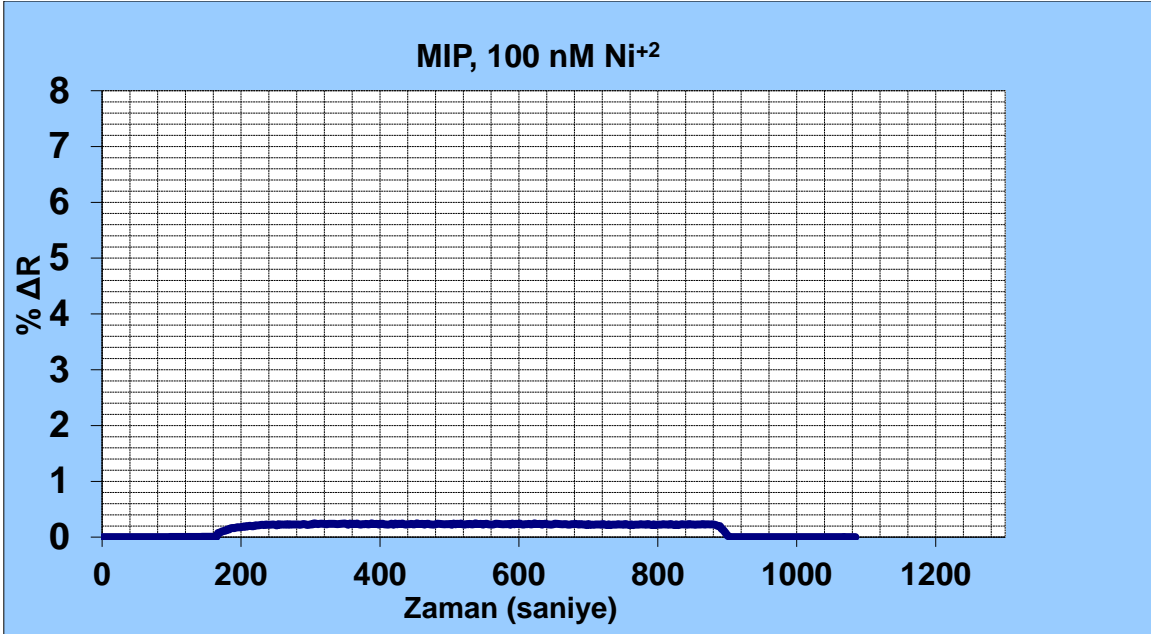
$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad (4.8)$$

şeklinde ifade edilebilir. Hazırlanan PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörünün Cu<sup>+2</sup> iyonuna karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon çalışması Zn<sup>+2</sup> ve Ni<sup>+2</sup> metal iyonlarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

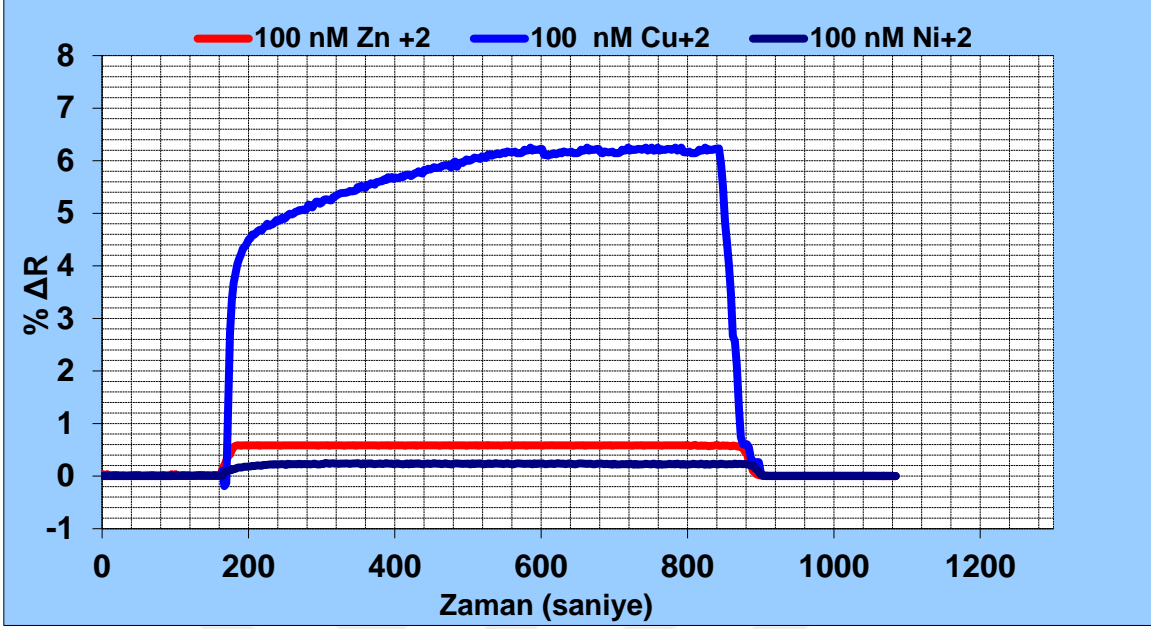
Şekil 4.18 ve Şekil 4.19 deki Zn<sup>+2</sup> (100 nM) ve Ni<sup>+2</sup> (100 nM) iyon çözeltilerine karşı PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün verdiği cevabın sersogramı incelendiğinde; PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün Zn<sup>+2</sup> ve Ni<sup>+2</sup> molekülleriyle spesifik bir etkileşime girmedığı ve dikkate değer bir sinyal vermediği belirlenmiştir. Bu durum PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün, Cu<sup>+2</sup> iyonuna seçici olduğunu göstermektedir. Şekil 4.20 ise 100 nM Cu<sup>+2</sup> ve yarışmacı olarak kullanılan 100 nM Zn<sup>+2</sup> ve 100 nM Ni<sup>+2</sup> ile hazırlanmış iyon çözeltileri için PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün verdiği sinyal cevaplarının ΔR-zaman grafiklerinin karşılaştırılmasını göstermektedir.



Şekil 4.18. 100 nM derişiminde yarışmacı olarak kullanılan Zn<sup>2+</sup> biyomolekülleri ile hazırlanmış çözelti ile PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının ΔR-zaman grafikleri.



Şekil 4.19. 100 nM derişiminde yarışmacı olarak kullanılan Ni<sup>2+</sup> biyomolekülleri ile hazırlanmış çözelti ile PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının ΔR-Zaman grafikleri.

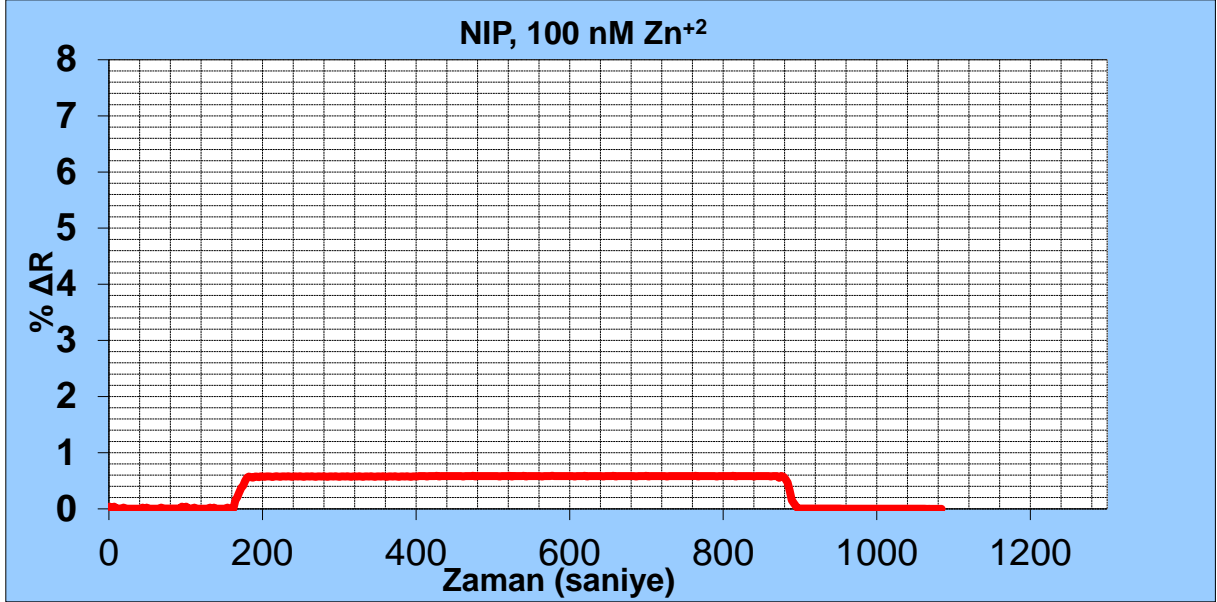


Şekil 4.20. 100 nM  $\text{Cu}^{+2}$  ve yarışmacı olarak kullanılan 100 nM  $\text{Zn}^{+2}$  ve 100 nM  $\text{Ni}^{+2}$  ile hazırlanmış iyon çözeltileri için PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörün verdiği sinyal cevaplarının  $\Delta R$ -zaman grafiklerinin karşılaştırılması.

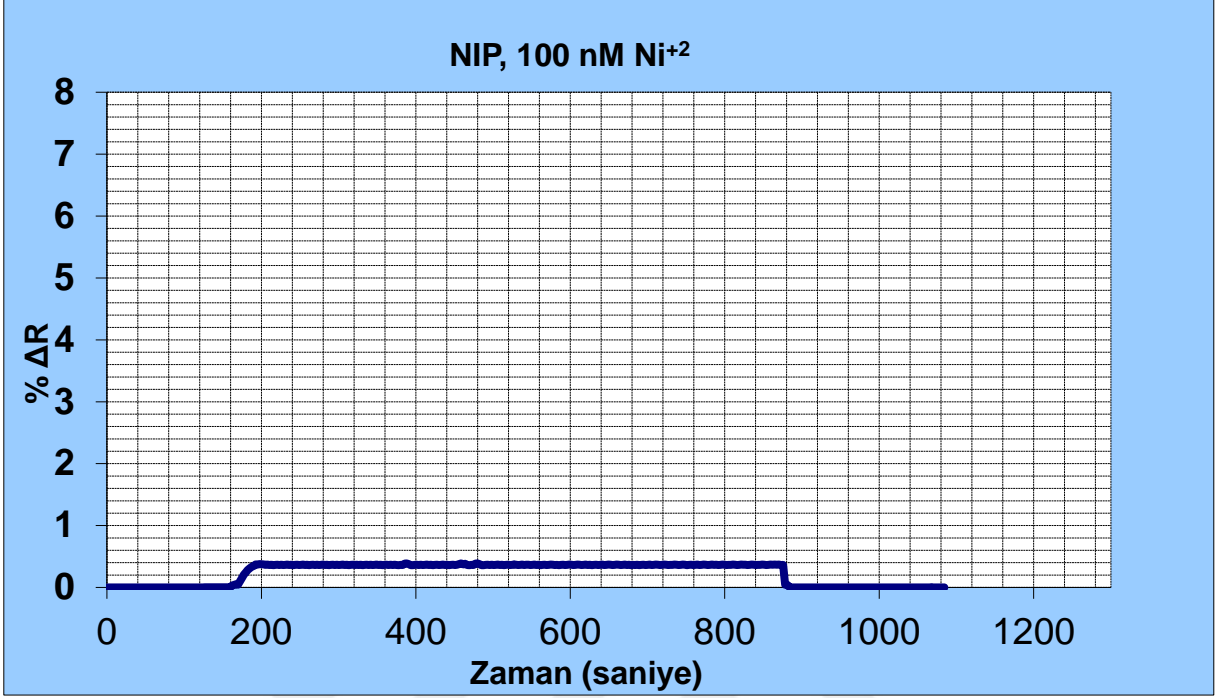
#### 4.6. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$ SPR Biyosensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu kullanılmadan PHEMAC biyosensörü hazırlanmıştır.  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$  biyomoleküllerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler (100 nM) SPR sistemine verilmiştir. Bu çözeltiler fosfat tamponunda (pH 5.0) hazırlanmışlardır. Şekil 4.21 ve Şekil 4.22 için  $\Delta R$  kırılma/zaman grafikleri sırasıyla  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$  için, Şekil 4.23 ise 100 nM  $\text{Cu}^{+2}$ , 100 nM  $\text{Zn}^{+2}$  ve 100 nM  $\text{Ni}^{+2}$  derişimdeki iyonlarla hazırlanmış çözeltiler ile elde edilen sensorgramların karşılaştırılmasını, son olarak da Şekil 4.24 ise  $\text{Cu}^{+2}$  baskılanmış PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmamış PHEMAC SPR biyosensörlerin 100 nM  $\text{Cu}^{+2}$  için verdiği sinyal cevaplarının  $\Delta R$ -zaman grafiklerinin karşılaştırılmasını göstermektedir. Şekil 4.24 incelendiğinde;  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmamış SPR NIP biyosensörün,  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu ile dikkate değer bir etkileşime girmediği ve sinyal şiddetinin düşük olduğu gözlenmiştir.  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler karşılaştırıldığında;  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu sinyalinin 6.27'den 1.31'e düştüğü görülmektedir (Çizelge 4.3). Eşitlik 4.7 ve 4.8 kullanılarak hesaplanan seçicilik

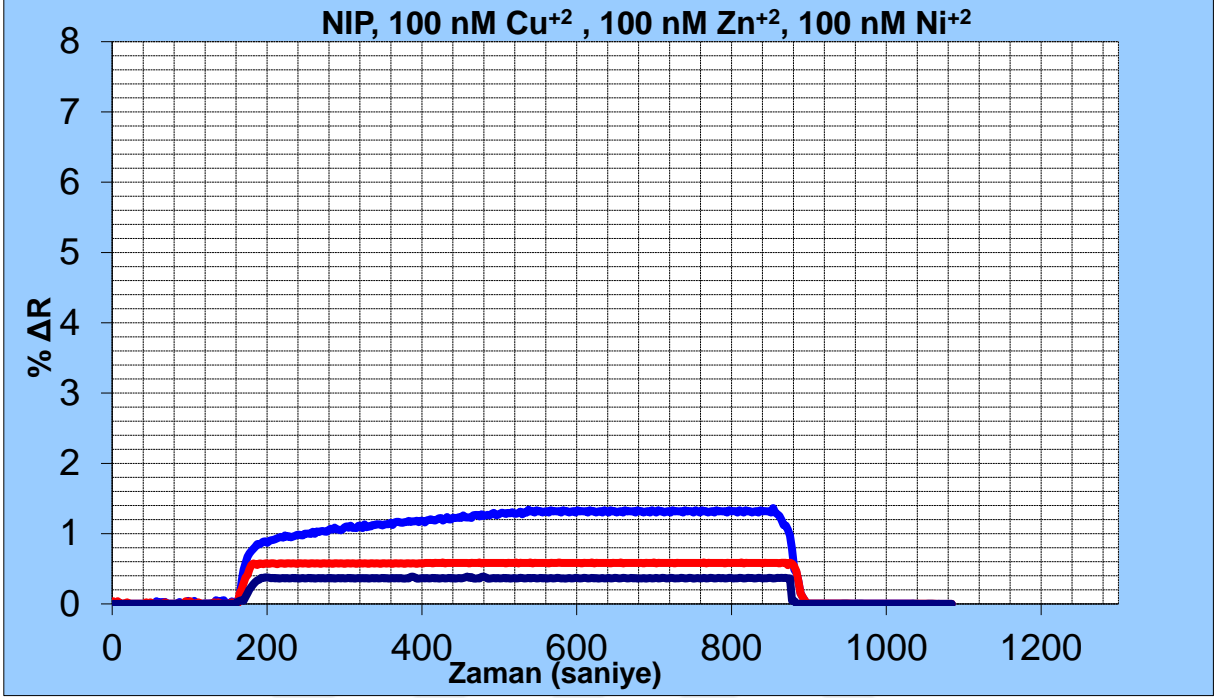
katsayıları,  $Zn^{+2}$  için 10.70 (baskılanmış), 2.29 (baskılanmamış);  $Ni^{+2}$  için 28.22 (baskılanmış), 3.63 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur. Bağlı seçicilik değerleri  $Zn^{+2}$  için 4.67,  $Ni^{+2}$  için 7.7 olarak bulunmuş, baskılama faktörünün  $kMIP/kNIP=4.74$  olarak hesaplanması baskılama işleminin etkin bir şekilde başarılı olduğunu göstermektedir [6, 7].



Şekil 4.21. 100 nM derişiminde yarışmacı olarak kullanılan  $Zn^{+2}$  biyomolekülleri ile hazırlanmış çözelti ile PHEMAC SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının  $\Delta R$ -zaman grafiğı.

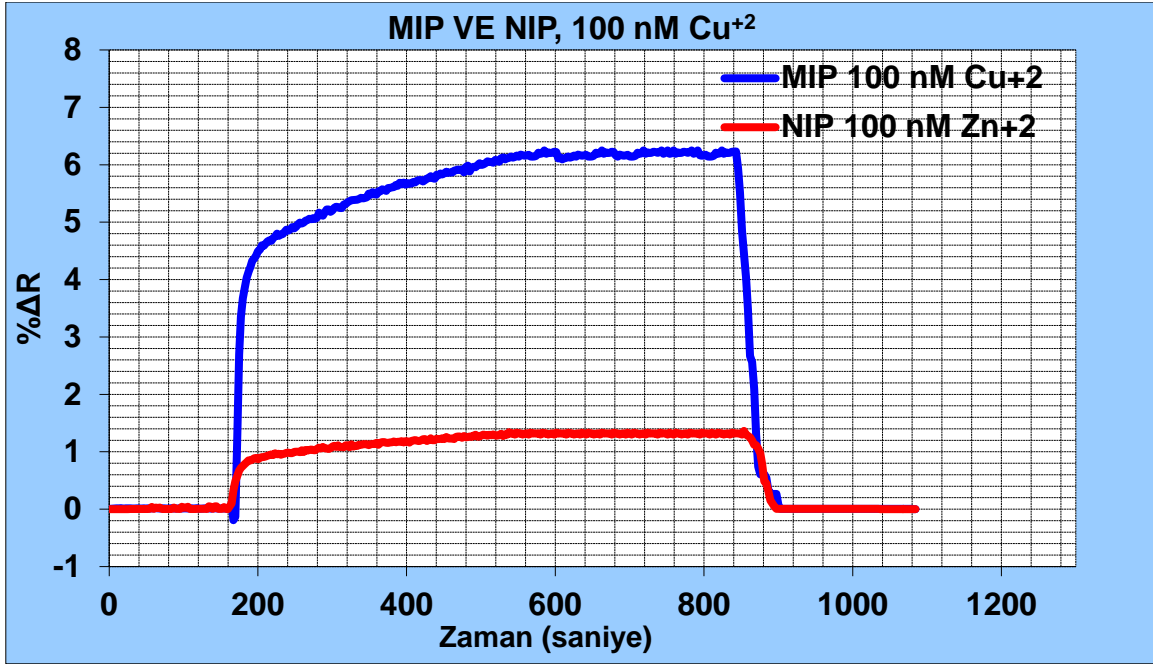


Şekil 4.22. 100 nM derişiminde yarışmacı olarak kullanılan Ni<sup>2+</sup> biyomolekülleri ile hazırlanmış çözelti ile PHEMAC SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının ΔR-zaman grafiğı.



Şekil 4.23. 100 nM derişiminde yarışmacı olarak kullanılan Zn<sup>2+</sup> ve Ni<sup>2+</sup> iyonlarının ve Cu<sup>2+</sup> iyonu ile hazırlanmış çözelti ile PHEMAC SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının ΔR-zaman grafiklerinin karşılaştırılması.





Şekil 4.24. 100 nM derişiminde  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarıyla hazırlanmış çözelti ile PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve PHEMAC SPR biyosensörlerin verdiği sinyal cevabının  $\Delta R$ -zaman grafiklerinin karşılaştırılması.

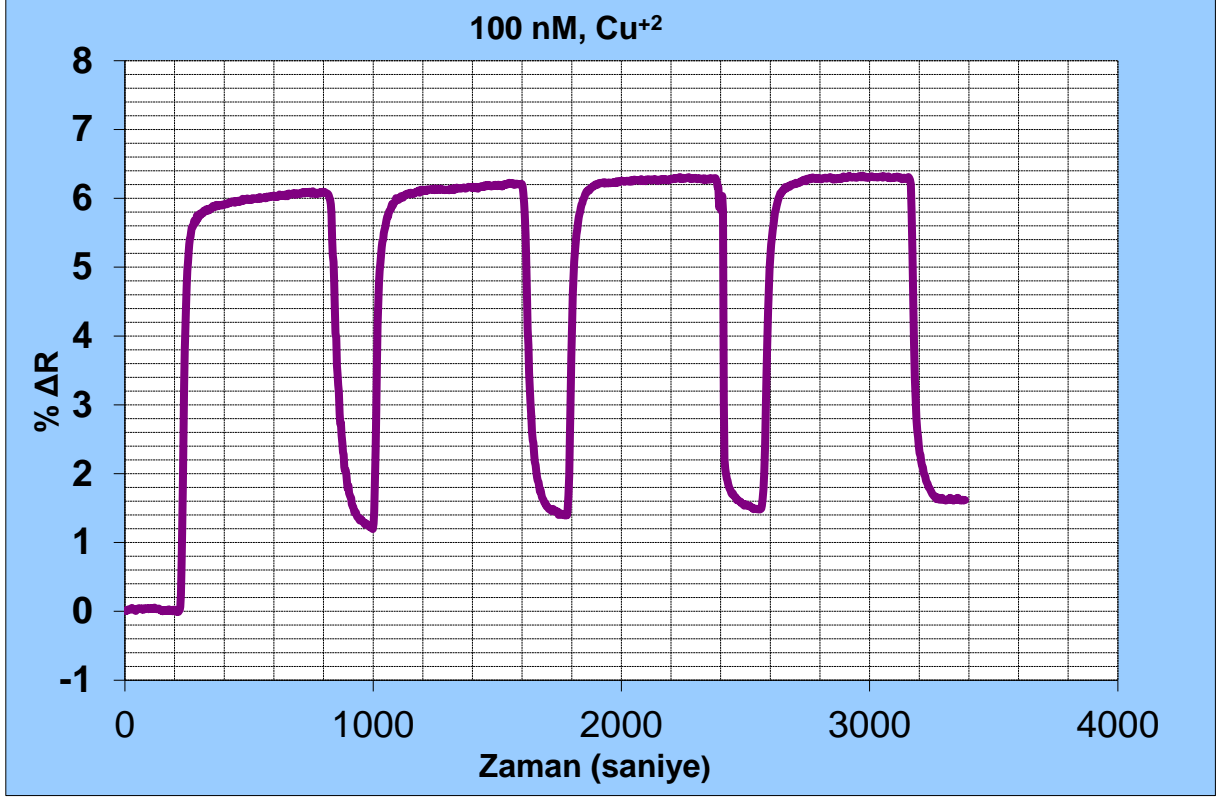
Çizelge 4.5. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$ 'ye göre  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Ni}^{+2}$  için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları

Metal iyonu	MIP		NIP		
	$\Delta R$	k	$\Delta R$	k	k'
$\text{Cu}^{+2}$	6.21	-	1.31	-	-
$\text{Zn}^{+2}$	0.58	10.70	0.57	2.29	4.67
$\text{Ni}^{+2}$	0.22	28.22	0.36	3.63	7.77

#### 4.7. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$ SPR Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 100 nM derişimlerde  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu içeren çözeltiler SPR sistemine tekrarlı (4 kez) bir şekilde enjekte edilmiş ve sonuçlar şekil 4.25'de verilmiştir. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörün gün içi ve günler arası  $\text{Cu}^{+2}$  iyonuna karşı verdiği sinyal şiddetinin tekrarlanabilirlik çalışmaları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve tekrarlanabilirliği

gösteren kesinlik değerleri yüzde bağıl standart sapma (%RSD) değerleri olarak hesaplanmıştır. 100 nM konsantrasyonunda  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunda tekrarlanabilirlik için 4 ölçüm yapılırken, gün için kesinlik için aynı konsantrasyonda 3 kez ölçüm yapılmış her ölçüm kendi içinde değerlendirilmiştir. Günler arası kesinlik içinse 3 gün arka arkaya ölçüm yapılmıştır. Çizelge 4.4 tekrarlanabilirliğin, 4.5 Gün içi kesinliğin ve 4.6 ise günler arası kesinliğin değerlerini vermektedir.



Şekil 4.25. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  biyosensörün tekrar kullanılabilirliği için 100 nM  $\text{Cu}^{+2}$  iyon çözeltisi için SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının  $\Delta R$ -zaman grafikleri.

Çizelge 4.6. Tekrarlanabilirliği gösteren kesinlik değerleri

Konsantrasyon (nM)	$\Delta R$	İstatiksel Analiz
100	6,21	
100	6,23	Ortalama- 6,215
100	6,20	STD-0,01291
100	6,22	% RSD- 0,207722

Çizelge 4.7. Gün içi kesinlik

Konsantrasyon (nM)	$\Delta R1$	$\Delta R2$	$\Delta R3$	Ortalama %RSD
100	6,21	6,19	6,19	
100	6,22	6,21	6,22	
100	6,19	6,22	6,20	
100	6,21	6,20	6,20	
% RSD	0,202707	0,208057	0,202871	0,204545

Çizelge 4.8. Günler arası kesinlik

Konsantrasyon (nM)	1.Gün $\Delta R$	2.Gün $\Delta R$	3.Gün $\Delta R$	Ortalama % RSD
100	6,20	6,18	6,20	
100	6,18	6,20	6,19	
100	6,19	6,21	6,18	
100	6,17	6,20	6,21	
% RSD	0,208730	0,203034	0,208393	0,206719

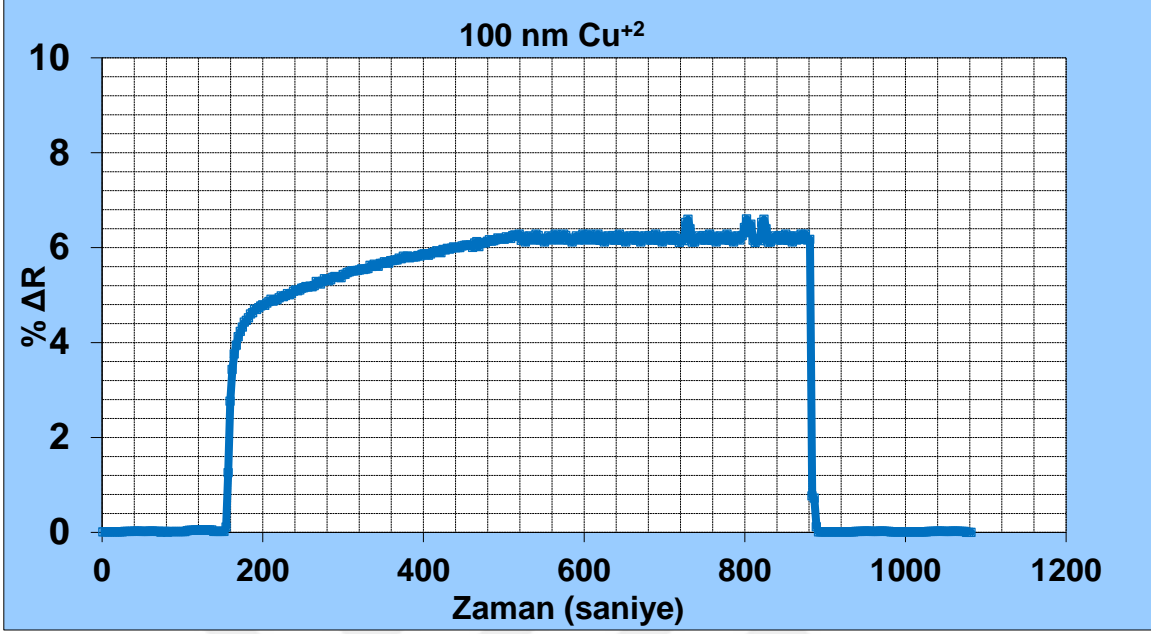
#### 4.8. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> Biyosensörün Yapay İdrar ve Serum Örneklerinde Cu<sup>+2</sup> Tayini İçin Kullanımı

Wilson hastalığı Cu<sup>+2</sup> iyonlarının birikmesiyle endike fetal olabilen bir metal zehirlenmesidir. İdrarda 250 µg/L'nin ve serumda 40 mg/L nin üzerinde birikmesi hastalık indikatörü olabilir. PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> biyosensör yapay idrar ve fizyolojik serum çözeltisinden Cu<sup>+2</sup> iyonu tayini için kullanıldı. İdrar da ki Cu<sup>+2</sup> iyonu tayini için yapay idrar çözeltisi ile hazırlanan örnek 100 nM Cu<sup>+2</sup> iyonu ile spike edilerek baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR sensör yüzeyi ile etkileştirildi.  $\Delta R$ -zaman grafiği incelendiğinde spike edilen örneğin  $\Delta R$  değerinin 6.14 birim olduğu ve 100 nM'lık sulu çözeltide hazırlanan Cu<sup>+2</sup> iyonu için alınan sinyalin ( $\Delta R=6.21$ ) şiddetinden daha az olduğu görülmüştür. Yapay idrarda tespit edilen Cu<sup>+2</sup> iyonuna ait sinyalin daha az olmasının muhtemel sebebi yapay idrara spike işleminin yapılmasından önce idrarda doğal olarak bulunan Na<sup>+1</sup>, K<sup>+1</sup> gibi çözünmüş tuzlara ek olarak, üre gibi metabolizma

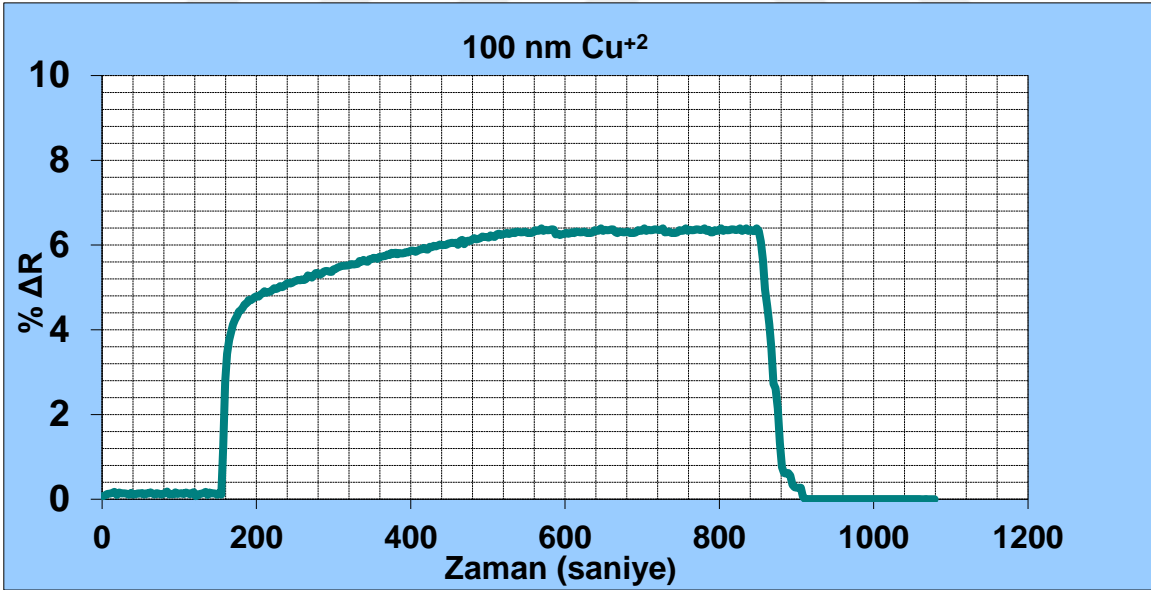
artıklarının sterik etki yapması ya da yarışmacı ajan gibi davranabilmesidir. Fizyolojik serum içindeki  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarını tayin edebilmek için serum örneği olarak izotonik NaCl çözeltisi (% 0.9 w/w) kullanıldı ve serum çözeltisi 100 nM  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarıyla spike edildi. Ortamda yarışmacı olarak davranabilecek metabolizma artıklarının olmaması sebebi ile serumdaki  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarının sinyal şiddeti sulu çözeltide hazırlanan örneğe sayısal değer olarak yakın olarak tespit edilmiştir ( $\Delta R=6.36$ ). Şekil 4.26 ve Şekil 4.27 sırası ile 100 nM spike edilmiş yapay idrar ve fizyolojik serum örneklerinin PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  biyosensörü için sinyal cevabının sensorgramlarını göstermektedir. Yapay idrar örneği, Avrupa komisyonu “Referans Materyaller ve Ölçümler” merkezinin hazırlamış olduğu rapora göre, doğal idrar örneğinin simule edilmesiyle hazırlanmış tır (X yaygın adı aşağıda). İçerik Çizelge 4.7 de tablo halinde özetlenmiştir.

Çizelge 4.9 Yapay idrar hazırlanmasında kullanılan organik ve inorganik malzemeler [176]

Kimyasal Bileşenler ve Miktarları: İnorganik ve Organik bileşenler	
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0.100 g
<b>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0.089 g
<b>NaCl</b>	0.634 g
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	0.161 g
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	0.258 g
<b>Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>	0.297 g
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	0.034 g
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O,</b>	0.100 g
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0.011 g
<b>NaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	0.003 g
<b>Üre</b>	2.427 g
<b>Ürik asit</b>	0.034 g
<b>Kreatinin</b>	0.090 g



Şekil 4.26. PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> biyosensörün 100 nM Cu<sup>2+</sup> iyonu etkileşmiş yapay idrar örneği için SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının ΔR-zaman grafikleri.



Şekil 4.27. PHEMAC-Cu<sup>2+</sup> biyosensörün 100 nM Cu<sup>2+</sup> iyonu etkileşmiş serum örneği için SPR biyosensörün verdiği sinyal cevabının ΔR-zaman grafikleri.

## 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

- $\text{Cu}^{+2}$  iyon tayini için PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensör hazırlanmasında kullanılan MAC- $\text{Cu}^{+2}$  ön-kompleksi, kalıp molekül olarak  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun, fonksiyonel monomer olarak MAC monomerinin kalıp molekül ve monomer oranının 1:2 mmol şeklinde UV spektrofotometresi kullanılarak belirlenmesiyle hazırlanmıştır.
- PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörü, hazırlanan MAC- $\text{Cu}^{+2}$  ön-kompleksi ve etilenglikol dimetakrilat (EDMA) varlığında AIBN başlatıcısı kullanılarak hazırlanmıştır. Kalıp molekül, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı oranı 1:2:2 mmol, oranında belirlenmiştir.
- Hazırlanan PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  SPR biyosensörden kalıp molekül olan  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun uzaklaştırılması için 0.005 M EDTA çözeltisi kullanılmıştır.
- $\text{Cu}^{+2}$  iyonu baskılanmamış PHEMAC SPR biyosensör, kalıp molekül olan  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu eklenmeden, aynı reçete ile hazırlanmıştır.
- PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve PHEMAC SPR biyosensörleri Fourier transform-Attenuated Total Reflektans (FTIR-ATR) Spektroskopisi, Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), Elipsometre ve Temas açısı ölçümleriyle karakterize edilmiştir.
- PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve PHEMAC SPR biyosensörlerin yüzeylerinin karakterizasyonu için yapılan FTIR-ATR spektrofotometresinde; PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  nanokürelerine ait FTIR-ATR spektrumunda gösterildiği gibi.  $1713 \text{ cm}^{-1}$  deki bandın sinyal şiddetinin artması,  $1092 \text{ cm}^{-1}$  deki koordine olmuş  $-\text{S}-\text{Cu}^{+2}$  bağlarının  $1175 \text{ cm}^{-1}$ 'e kayması MAC- $\text{Cu}^{+2}$  ön kompleksinin PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  yapısına girdiğini göstermektedir.  $\text{Cu}^{+2}$  koordine olmamış yani baskılanmamış PHEMAC nanopartiküllerin FTIR yapısına bakıldığında  $1606 \text{ cm}^{-1}$  deki bandın MAC'ın HEMA'nın yapısına  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun koordine olmadan katılımıyla nanopartikül elde edilmesi sonucu oluşan karboksil-karbonil ( $-\text{COO}$ ) grubuna ait olduğu görülmektedir. Bantların varlığı baskılamayı göstermektedir.
- PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve PHEMAC SPR biyosensörlerin yüzey morfolojisi atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterize edilmiştir. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve PHEMAC SPR biyosensörlerin ortalama pürüzlülükleri  $5.51 \text{ nm}$  ve  $4.33 \text{ nm}$  olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar;  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun SPR biyosensörün altın yüzeyine başarılı ve homojen bir şekilde tutunduğunu göstermektedir.
- PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve PHEMAC SPR biyosensörlerin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve PHEMAC SPR biyosensörlerin ortalama kalınlık değeri  $87.0 \pm 2.2 \text{ nm}$  ve  $75.0 \pm 1.0 \text{ nm}$  olarak hesaplanmıştır.
- PHEMAC- $\text{Cu}^{+2}$  ve PHEMAC SPR biyosensörlerin bir diğer yüzey karakterizasyonu ıslanabilirliği gösteren hidrofilitiyi ölçen temas açısı ölçüm

cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Su temas açısı ölçümlerinden modifiye edilmemiş, PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC SPR SPR biyosensör yüzeylerinin su temas açısı değerleri sırasıyla 81.5°, 62.7° ve 58.8° dir. Yüzeylerin su temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeylerin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir.

- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC SPR biyosensörlerinin hazırlanmasından sonra farklı konsantrasyonlardaki Cu<sup>+2</sup> iyonu için sinyal cevabının karşılaştırılabilmesi için kinetik çalışmalara geçilmiştir.
- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensör artan derişimlerde hazırlanmış Cu<sup>+2</sup> çözeltileriyle etkileştirilmiştir. Artan derişimlerle birlikte  $\Delta R$  değerlerinde de bir artış görülmüştür. Bunun nedeni; biyosensör yüzeyi ile çözelti arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artmasıdır.
- $\Delta R$ 'ye karşılık zaman grafikleri bir arada çizildiğinde grafikleri daha kolay incelenebilmektedir. Bu grafiklerden derişimin artmasıyla  $\Delta R$  değerlerinin arttığı açık bir şekilde görülmektedir.
- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensör iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. 0.1–2.5 nM derişim aralığında alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi  $y=1,9695x+0,9395$  ve doğrusallığı ( $R^2$ ) 0,9215; 10–100 nM derişim aralığında alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi  $y=0,0052x+5,7072$  ve doğrusallığı ( $R^2$ ) 0,8110 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu verilerle SPR sensör, 0.1–2.5 nM aralığında %92, 10-100 nM aralığında %81 doğrulukta ölçüm yapmaktadır.
- Langmuir modelin hazırlanan SPR sensöre en uygun izoterm modeli olduğu görülmüştür. Hesaplanan  $\Delta R_{maks}$  değeri (6.48) deneysel değere (6.21) oldukça yakındır. Langmuir denkleminden hesaplanan  $K_A$  ve  $K_D$  değerleri sırasıyla 1.19 ve 0.84 olarak hesaplanmıştır.
- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve PHEMAC SPR biyosensörlerin seçiciliğini göstermek için biyosensörler yarışmacı iyon olarak seçilen Zn<sup>+2</sup> ve Ni<sup>+2</sup> iyonlarıyla etkileştirilmiş verilen sinyalin cevabı incelenmiştir.
- Hazırlanan Cu<sup>+2</sup> baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve baskılanmamış PHEMAC SPR biyosensörlerin Cu<sup>+2</sup>'ye karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları Zn<sup>+2</sup> ve Ni<sup>+2</sup> iyonlarının çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cu<sup>+2</sup> baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR sensörün Cu<sup>+2</sup>'ye verdiği sinyal cevabının değeri ( $\Delta R$ ) 6.21 iken, aynı derişimlerde hazırlanan Zn<sup>+2</sup> ve Ni<sup>+2</sup> çözeltilerine verdiği sinyal değeri sırasıyla 0.58 ve 0.22'tür. Bu sonuçlara göre hazırlanan PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> sensör Cu<sup>+2</sup>'yi Zn<sup>+2</sup> göre 10.70, Ni<sup>+2</sup> göre 28.22 kat daha duyarlı tayin etmektedir. Etkileşimdeki bu hassasiyet kalıp molekül olan Cu<sup>+2</sup>'nin üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır. Eşitlik 4.7 ve 4.8 kullanılarak hesaplanan seçicilik katsayıları, Zn<sup>+2</sup> için 10.70

(baskılanmış), 2.29 (baskılanmamış); Ni<sup>+2</sup> için 28.22 (baskılanmış) 3.63 (baskılanmamış) olarak bulunmuştur.

- Cu<sup>+2</sup> baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> biyosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için Cu<sup>+2</sup> baskılanmamış PHEMAC (NIP) biyosensör hazırlanmış, Cu<sup>+2</sup> iyonuna karşı verdiği SPR sinyalinin  $\Delta R$  cevabı ölçülmüştür. Cu<sup>+2</sup> baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> ve baskılanmamış PHEMAC SPR sensörler karşılaştırıldığında Cu<sup>+2</sup> sinyal cevabının 6.21'den 1.31'e düştüğü görülmektedir. Baskılama faktörünün  $k_{MIP}/k_{NIP}=4.74$  olarak hesaplanması baskılama işleminin etkin bir şekilde başarıldığını göstermektedir.
- Cu<sup>+2</sup> baskılanmış PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğine bakmak için; aynı derişimlerde PHEMAC içeren çözeltiler 4 kez SPR sistemine verilmiş ve hazırlanan SPR sensörün Cu<sup>+2</sup> tayin miktarında önemli bir düşüş olmadan Cu<sup>+2</sup>'yi iyi bir şekilde tayin ettiği görülmüştür.
- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliğini incelenmek amacıyla Cu<sup>+2</sup> iyonu içeren çözelti SPR sistemine verilmiş ve hazırlanan PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün Cu<sup>+2</sup> iyon tayini için verdiği sinyal cevabında önemli bir düşüş olmadan Cu<sup>+2</sup> 'yi tayin ettiği görülmüştür.
- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensörün gün içi ve günler arası Cu<sup>+2</sup> iyonuna karşı verdiği sinyal cevabının şiddetinin tekrarlanabilirlik çalışmaları istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve % RSD değerleri <1.5 olarak bulunmuştur.
- PHEMAC-Cu<sup>+2</sup> SPR biyosensör, yapay idrar ve fizyolojik serum çözeltilerinden Cu<sup>+2</sup> tayini için kullanılmış ve metabolizma artıklarının SPR biyosensörün Cu<sup>+2</sup> tayinine etkileri incelenmiştir. Yapay idrar ortamında bulunan metabolik artıkların sterik etkiye neden oldukları görülürken, fizyolojik serumda bu etkiye rastlanmamıştır.



## KAYNAKLAR

- [1] Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 1912;34:295-507. 6. Bearn AG. A genetical analysis of thirty families with Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Ann Hum Genet*, 24:33-43, 1960.
- [2] Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet*;5:327-337, 1993.
- [3] Shina, Y.B., Kimb, H.M., Junga, Y., Chunga, B.H., *Sens. Actuators B*, 150:1–6, 2010.
- [4] Riskin, M., Tel-Vered, R., Frasconi, M., Yavo, N., Willner, I., *Chem. Eur. J.* 16 7114–7120, 2010.
- [5] Giusy Lofrano, Maurizio Carotenuto, Giovanni Libralato, Rute F. Domingos, Arjen Markus, Luciana Dini, Ravindra Kumar Gautam, Daniela Baldantoni, Marco Rossi Sanjay K. Sharma, Mahesh Chandra Chattopadhyaya, Maurizio Giugni, Sureyya Meric, Polymer functionalized nanocomposites for metals removal from water and wastewater: An overview; *Water Research Volume 92*, 1 April, 22–37, 2016
- [6] B. Pan, B. Pan, W. Zhang, L. Lv, Q. Zhang, S. Zheng, Development of polymeric and polymer-based hybrid adsorbents for pollutants removal from waters, *Chem. Eng. J.*, 151, 19–29, 2009.
- [7] X. Zhao, L. Lv, B. Pan, W. Zhang, S. Zhang, Q. Zhang, Polymer-supported nanocomposites for environmental application: a review, *Chem. Eng. J.*, 170, 381–394, 2011.
- [8] Y.-T. Zhou, H.-L. Nie, C. Branford-White, Z.-Y. He, L.-M. Zhu, Removal of  $\text{Cu}^{+2}$  from aqueous solution by chitosan-coated magnetic nanoparticles modified with alpha-ketoglutaric acid *J. Colloid Interface Sci.*, 330, 29–37, 2009.

- [9] N.N. Nassar, Rapid removal and recovery of Pb(II) from wastewater by magnetic nanoadsorbents, *J. Hazard. Mater.*, 184 , 538–546, 2010.
- [10] M. Ghorbani, H. Eisazadeh, Removal of COD, color, anions and heavy metals from cotton textile wastewater by using polyaniline and polypyrrole nanocomposites coated on rice husk ash., 2011
- [11] B. Reinhammar, R. Malkin, P. Jensen, B. Karlsson, L.E. Andréasson, R. Aasa, T. Vänngård, B. Malmström, A new copper(II) electron paramagnetic resonance signal in two laccases and in cytochrome c oxidase, *J. Biol. Chem.*, 255, 5000–5003, 1980.
- [12] L. Hou, M.G. Zagorski, NMR reveals anomalous copper(II) binding to the amyloid Aβ peptide of Alzheimer's disease, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 9260–9261, 2006.
- [13] D.C. Brady, M.S. Crowe, M.L. Turski, G.A. Hobbs, X. Yao, A. Chaikuad, S. Knapp, K. Xiao, S.L. Campbell, D.J. Thiele Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis, *Nature*, 509, 492–496, 2014.
- [14] Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories [S], United States Environmental Protection Agency, 2012.
- [15] J.O. Nriagu, Toxic metal pollution in Africa, *Sci. Total Environ.*, 121, 1–37, 1992.
- [16] J.W. Olesik, Elemental analysis using ICP-OES and ICP/MS, *Anal. Chem.*, 63, 12–21, 1991
- [17] J. Chen, K.C. Teo Determination of cadmium copper, lead and zinc in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction, 1993.
- [18] T. Lou, L. Chen, Z. Chen, Y. Wang, L. Chen, J. Li Colorimetric detection of trace copper ions based on catalytic leaching of silver-coated gold nanoparticles *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 3, 4215–4220, 2011.

- [19] S. Wang, Z. Chen, L. Chen, R. Liu, L. Chen Label-free colorimetric sensing of copper (II) ions based on accelerating decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using gold nanorods as an indicator *Analyst*, 138, 2080–2084, 2013.
- [20] S. Wang, Z. Chen, L. Chen, R. Liu, L. Chen Label-free colorimetric sensing of copper (II) ions based on accelerating decomposition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> using gold nanorods as an indicator *Analyst*, 138, 2080–2084, 2013.
- [21] L.P. Singh, J.M. Bhatnagar Copper(II) selective electrochemical sensor based on Schiff Base complexes *Talanta*, 64, 313–319, 2004.
- [22] E. Rossinyol, A. Prim, E. Pellicer, J. Rodríguez, F. Peiro, A. Cornet, J.R. Morantea, B. Tianb, T. Bob, D. Zhao Mesostructured pure and copper-catalyzed tungsten oxide for NO<sub>2</sub> detection *Sens. Actuators B—Chem.*, 126, 18–23, 2007.
- [23] C. Yu, J. Zhang, J. Li, P. Liu, P. Wei, L. Chen Fluorescent probe for copper (II) ion based on a rhodamine spirolactame derivative: and its application to fluorescent imaging in living cells *Microchim. Acta*, 174, 247–255, 2011.
- [24] C. Yu, J. Zhang, R. Wang, L. Chen Highly sensitive and selective colorimetric and off-on fluorescent probe for Cu<sup>+2</sup> based on rhodamine derivative *Org. Biomol. Chem.*, 8, 5277–5279, 2010.
- [25] Ye, L., Haupt, K., *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 1887, 2004.
- [26] Andersson, L.I., Miyabayashi, A., O'Shannessy, D.J., Mosbach, K., *J. Chromatogr. A*, 516-323, 1999.
- [27] van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., De Coen, W., Dubruel, P., Blust, R., Robbens, J., Recent advances in recognition elements of the food and environmental biosensors: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1178-1194, 2010.
- [28] Homola, J., Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species, *Chemical Reviews*, 108, 462-493, 2008.
- [29] Stephenson, C.J., Shimizu, K.D., *Polym. Int.*, 56-482, 2007.

- [30] . Halim, M., Conte, P. ve Piccolo, A., Potential Availability of Heavy Metals to Phytoextraction from Contaminated Soils by Exogenous Humic Substances. *Chemosphere*, 52, 265, 2003.
- [31] Samarghandi, M.R., Nouri, J., Mesdaghinia, A.R., Mahvi, A.H., Nasser, S. ve Vaezi, F., Efficiency Removal of Phenol, Lead and Cadmium by Means of UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Processes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 4, 19-25, 2007.
- [32] Necla Çağlarımak, A. Zeki Hepçimen, Ağır Metal Toprak Kirliliğinin Gıda Zinciri ve İnsan Sağlığına Etkisi, *Akademik Gıda*, 8 (2) , 31-35, 2010.
- [33] Albering, J.H., van Leuson, S.M., Moonen, E.J.C., Attogewerff, J.A., Kleinjans, J.C.S., Human health risk assessment: A case study involving heavy metal soil contamination after the flooding of river meuse during the winter of 1993-1994. *Environmental Health Perspectives*, 107(1): 1-13, 1999.
- [34] Lacatusu, R., Dumitru, M., Risvoneanu, I., Ciobanu, C., Lungu, M., Corstea, S., Kovacsovics, B., Baci, C., Soil pollution by acid rains and heavy metals in Zlatna region, Romania., 817-820. In D.E.Stott, R.H. Mohtar and G.C. Steinhardt (eds). *Sustain the Global Farm. Selected papers from the 10th International Soil Conversation Organization Meeting held Purdue Univ., USA. May 24-29, 1999.*
- [35] Lacatusu, R., Appraising levels of soil contamination and pollution with heavy metals in Development or planning the suitable use of land resources. Published by the European Soil Bureau, Joint Research Centre, 393-402, 1998.
- [36] Sevinç ADİLOĞLU, M.Turgut SAĞLAM, Karayolu Kenarlarındaki Tarım Arazilerindeki Topraklarda Ekstrakte Edilebilir Kobalt (Co) İçerikleri, *AKU J. Sci. Eng.* 15 035403, 24-29, 2015.
- [37] Sutherland, R. A., Bed sediment-associated trace metals in an urban stream, Oahu, Hawaii. *Environmental Geology* 39: 611-627, 2000.
- [38] Zheng, N., Wang, Q., Liang, Z., Zheng, D., Characterization of heavy metal concentrations in the sediments of three freshwater rivers in Huludao City, Northeast China. *Environ Pollut* 154: 135142, 2008.

- [39] Tunca, E., Ucuncu, E., Kurtulus, B., Ozkan, A. D., Atasagun, S., Accumulation trends of metals and a metalloid in the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* from Lake Yenicaga (Turkey). *Chemistry and Ecology* 29: 754-769, 2013.
- [40] Alkan, N., Alkan, A., Akbas, U., Fisher, A., Metal Pollution Assessment in Sediments of the Southeastern Black Sea Coast of Turkey. *Soil & Sediment Contamination* 24: 290-305, 2015.
- [41] El-Said, G. F., Draz, S. E., El-Sadaawy, M. M., Moneer, A. A., Sedimentology, geochemistry, pollution status and ecological risk assessment of some heavy metals in surficial sediments of an Egyptian lagoon connecting to the Mediterranean Sea. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 49: 1029-44, 2014.
- [42] Candeias, C., Ávila, P. F., Da Silva, E. F., Ferreira, A., Durães, N., Teixeira, J. P., Water-rock interaction and geochemical processes in surface waters influenced by tailings impoundments: Impact and threats to the ecosystems and human health in rural communities (Panasqueira mine, Central Portugal). *Water, Air, and Soil Pollution* 226, 2015.
- [43] İsmet BALIK, Evren TUNCA, Sedimentteki Metal Kirliliğini Değerlendiren Yöntemler Üzerine Bir Derleme Cilt: 1 Sayı: 1, 32-42, 2015.
- [44] Pahlsson, A.M.B., Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants: A Literature Review. *Water Air Soil Pollut ion*, 47(3):287-319, 1989.
- [45] Gasic, K., & Korban, S.S. Heavy Metal Stress. In: *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Eds: Madhava Rao, K.V., Raghavendra A.S. & Janardhan Reddy, Springer, Netherlands K., 219-254., 2006.
- [46] Phillips, D.J.H., The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*, 31:193–200. doi: 10.1016/0025-326X(95)00194-R, 1995.
- [47] Uluturhan, E., Kucuksezgin, F.. Heavy metal contaminants in Red Pandora (*Pagellus erythrinus*) tissues from the Eastern Aegean Sea, Turkey. *Water Research*, 41:1185–1192. doi: 10.1016/j.watres.2006.11.044, , 2007

- [48] Mordoğan, H., Yaramaz, Ö., Alpbaz, A., Homa Dalyanı sedimentlerinde bazı ağır metallerin (Fe, Ni, Co, Mn, Sb) derişimlerinin araştırılması. *Ege J Fish Aqua Sci*, 8(29-30): 44-50, 1990.
- [49] Egemen, Ö., Sunlu, U., Kaymakçı, A., Heavy metal concentrations in some molluscs and in surficial sediments from Izmir Bay/Turkey. 35. CIESM kongresi, 35:250-251, 1998.
- [50] Sunlu, U., Egemen, Ö., Homa Dalyanı ve Izmir Körfezinin (Ege Denizi) farklı bölgelerindeki kirlenme durumu ile bazı ekonomik balık türlerinde ağır metal düzeylerinin araştırılması. *Ege J Fish Aqua Sci*, 15(3-4): 241261. 1998.
- [51] Atılğan İ., Egemen Ö., Güllük ve Homa Lagünü sedimentlerinde karbon, yanabilen madde ve bazı ağır metal (Cu, Zn) düzeylerinin karşılaştırmalı olarak araştırılması. *Ege J Fish Aqua Sci*, 18(1-2): 225232, 2001.
- [52] Uluocak, B.H., Egemen, Ö., İzmir ve Aliağa Körfezi'nde mevsimsel olarak avlanan bazı ekonomik balık türlerinde organik klorlu pestisit kalıntılarının araştırılması. *Ege J Fish Aqua Sci*, 22 (1-2): 149-160, 2005.
- [53] Dora, E.Ç., Sunlu, U., Ergen, Z., Heavy metal concentrations in Hediste diversicolor (Polychaeta) and sediments from Homa Lagoon (Izmir Bay/Turkey). 38. CIESM kongresi, 38:253, 2007.
- [54] Uluturhan, E., Kontas, A., Can, E., Sediment concentrations of heavy metals in the Homa Lagoon (Eastern Aegean): Assessment of contamination and ecological risks. *Marine Pollution Bulletin*, 62(9):1989–1997. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.06.019, 2011.
- [55] van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., De Coen, W., Dubruel, P., Blust, R., Robbens, J., Recent advances in recognition elements of the food and environmental biosensors: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1178-1194, 2010.
- [56] Koyun, A., Ahlatcıoğlu, E. ve Koca İpek, Y., Biosensors and Their Principles, A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones, Prof. Sadik Kara (Ed.), ISBN: 978-953-51-0609-8, InTech, 2012

- [57] Clark, LC Jr., Lyons, C., Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29-45, 1962.
- [58] Setford, S.J., Newman, J.D., *Enzyme Biosensors*. Bölüm 2; 29-60. Barredo, J.L. *Microbial Enzymes and Biotransformations*. Springer, 2005.
- [59] Luong, J.H.T., Male, K.B., Glennon, J.D., Biosensor technology: Technology push versus market pull, *Biotechnology advances*, 26, 492-500, 2008.
- [60] Monošík, R., Stred'ansky, M. ve Šturdik, E. *Acta Chim. Slov.* (2012) 5; 109-120 (d)
- [61] Huang, J., Li, J., Yang, Y., Wang, X., Wu, B., Anzai, J.I., Osa, T. ve Chen, Q., Development of an amperometric L-lactate biosensor based on L-lactate oxidase immobilized through silica sol-gel film on multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticle modified glassy carbon electrode, *Materials Science and Engineering: C*, 28, 1070-1075, 2008.
- [62] Maines, A., Prodromidis, M.I., Tzouwara-Karayanni, S.M., Karayannis, M.I., Ashworth, D. ve Vadgama, P., An Enzyme Electrode for Extended Linearity Citrate Measurements Based on Modified Polymeric Membranes, *Electroanalysis*, 12, 1118-1123, 2000.
- [63] Wang, X., Watanabe, H. ve Uchiyama, S., Amperometric L-ascorbic acid biosensors equipped with enzyme micelle membrane, *Talanta*, 74, 1681-1685, 2008.
- [64] Smutok, O., Ngounou, B., Pavlishko, H., Gayda, G., Gonchar, M., Schuhmann, W., A reagentless bienzyme amperometric biosensor based on alcohol oxidase/peroxidase and an Os-complex modified electrodeposition paint, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113, 590-598, 2006.
- [65] Umar, A., Rahman, M.M., Vaseem, M. ve Hahn, Y.B., Ultra-sensitive cholesterol biosensor based on low-temperature grown ZnO nanoparticles, *Electrochemistry Communications*, 11, 118-121, 2009.

- [66] Pollegioni, L., Piubelli, L., Sacchi, S., Pilone, M.S., Molla, G., Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1373-1394, 2007.
- [67] Choi, J.W., Kim, Y.K., Song, S.Y., Lee, I.H. Ve Lee, W.H., Optical biosensor consisting of glutathione-S-transferase for detection of captan, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 1461-1466, 2003.
- [68] Andreou, V.G. ve Clonis, Y.D., Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazine, *Analytica Chimica Acta*, 460, 151-161, 2002.
- [69] Soldatkin, O.O., Peshkova, V.M., Dzyadevych, S.V., Soldatkin, A.P., Jaffrezic-Renault, N. ve Elskaya, A.V., Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor, *Materials Science and Engineering: C*, 28, 959-964, 2008.
- [70] Mathotra, R., Patel, V., Vaque, J.P., Gutkind, J.S. ve Rusling, J.F., Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Oral Cancer Biomarker IL-6 Using Carbon Nanotube Forest Electrodes and Multilabel Amplification, *Analytical Chemistry*, 82, 3118-3123, 2010.
- [71] Mani, V., Chikkaveeraiah, B.V., Patel, V., Gutkind, J.S. ve Rusling, J.F., Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and Multienzyme-Particle Amplification, *ACS Nano*, 3, 585-594, 2009.
- [72] Kadir, M.K.A., Tohill, I.E., Development of an Electrochemical Immunosensor for Fumonisin Detection in Foods Toxins, 2, 382-398, 2010.
- [73] Homola J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 337, 528-539, 2003.
- [74] Guth, U., Vonau, W. ve Zosel, J., Recent developments in electrochemical sensor application and technology—a review, *Measurement Science and Technology*, 20, 1-14, 2009.
- [75] Lucklum, R. ve Hauptmann, P., Acoustic microsensors—the challenge behind microgravimetry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 667–682, 2006.



- [76] Kimmel, D., LeBlanc, G., Meschievitz, M. ve Cliffler, D., Electrochemical Sensors and Biosensors, *Analytical Chemistry*, 84, 685–707, 2012.
- [77] Yang, Z-p. ve Zhang, C-j., Designing of MIP-based QCM sensor for the determination of Cu(II) ions in solution, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 142, 210-215, 2009.
- [78] Casteleiro-Roca, J.L., Calvo-Rolle, J.L., Meizoso-Lopez, M.C., Pinón-Pazos, A. ve Rodríguez-Gómez, B.A., New approach for the QCM sensors characterization, *Sensors and Actuators A: Physical*, 207, 1-9, 2014.
- [79] Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J. ve Barceló, D. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 1025-1041, 2006.
- [80] Sheehan, D.A., Quinn, J., Daly, C.L., Dillon, P., O’Kennedy, R., The Development of Novel Miniaturized Immuno-sensing Devices: A Review of a Small Technology with a Large Future, *Analytical Letters*, 36, 511–537, 2003.
- [81] Bhattacharyya, J., Read, D., Amos, S., Dooley, S., Killham, K., Paton, G.I., Biosensor-based diagnostics of contaminated groundwater: assessment and remediation strategy, *Environmental Pollution*, 134, 485–492, 2005.
- [82] Han, T-S., Sasaki, S., Yano, K., Ikebukuro, K., Kitayama, A., Nagamune, T., Karube, I., Flow injection microbial trichloroethylene sensor, *Talanta*, 57, 271–276, 2002.
- [83] Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, D.W., Roig ,B., Gonzalez, C., A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive, *Talanta* 69, 302–322, 2006.
- [84] Gu, M.B., Kim, E.J., Cho, J., Hansen, P.D., The Continuous Monitoring of Field Water Samples with a Novel Multi-Channel Two-Stage Mini-Bioreactor System, *Environmental Monitoring and Assessment*, 70, 71–81, 2001.
- [85] Haes, A.J., Van Duyne, R.P., A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance

Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles, *Journal of American Chemical Society*, 124, 10596–10604, 2002.

[86] Kawazumi, H., Gobi, V., Ogino, K., Maeda, H., Miura, N., Compact surface plasmon resonance (SPR) immunosensor using multichannel for simultaneous detection of small molecule compounds, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108, 791–796, 2005.

[87] Bachmann, T.T., Schmid, R.D., A disposable multielectrode biosensor for rapid simultaneous detection of the insecticides paraoxon and carbofuran at high resolution, *Analytica Chimica Acta*, 401, 95–103, 1999.

[88] Rodriguez-Mozaz, S., Reder, S., Lopez de Alda, M., Gauglitz, G. ve Barceló, D., Simultaneous multi-analyte determination of estrone, isoproturon and atrazine in natural waters by the RIver ANALyser (RIANA), an optical immunosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 633–640, 2004.

[89] Barzen, C., Brecht, A. ve Gauglitz, G., Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 289–295, 2002.

[90] Tschmelak, J., Proll, G. ve Gauglitz, G., Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example, *Talanta* 65, 313–323, 2005.

[91] Goldman, E.R., Clapp, A.R., Anderson, G.P., Uyeda, H.T., Mauro, J.M., Medintz, I.L., Mattoussi, H., Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents, *Analytical Chemistry*, 76, 684–688, 2004.

[92] Sequeira, M., Bowden, M., Minogue, E., Diamond, D., Towards autonomous environmental monitoring systems, *Talanta* 56, 355–363, 2002.

[93] Suzuki, H., Microfabrication of chemical sensors and biosensors for environmental monitoring, *Materials Science and Engineering: C*, 12, 55–61, 2000.

[94] Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J. ve Barceló, D. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 1025-1041, 2006.

- [95] Bange, A., Halsall, H.B., Heineman, W.R., Microfluidic immunosensor systems, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2488–2503, 2005.
- [96] Çaktü, K., Kolesterol baskılanmış eş-boyutlu Poli(GMA-MAT) mikrokürepoli(HEMA) kriyojel kompozit sistemlerinin hazırlanması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009.
- [97] Alocilja, E.C., Radke, S.M., Market analysis of biosensors for food safety, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 841–846, 2003.
- [98] Tothill, I.E., Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector, *Computers and Electronics in Agriculture*, 30, 205–218, 2001.
- [99] Kroger, S., Piletsky, S., Turner, A.P.F., Biosensors for marine pollution research, monitoring and control, *Marine Pollution Bulletin*, 45, 24–34, 2002.
- [100] Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O’Kennedy, R., Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 3–13, 2003.
- [101] Mauriz, E., Calle, A., Abad, A., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barceló, D. ve Lechuga, L.M., Determination of carbaryl in natural water samples by a surface plasmon resonance flow-through immunosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2129–2136, 2006.
- [102] Rich, R.L. ve Myszka, D.G., Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis, *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 54–61, 2000.
- [103] Glazier, S.A., Campbell, E.R., Campbell, W.H., Construction and Characterization of Nitrate Reductase-Based Amperometric Electrode and Nitrate Assay of Fertilizers and Drinking Water, *Analytical Chemistry*, 70, 1511–1515, 1998.
- [104] Behnisch, P.A., Hosoe, K. ve Sakai, S-i., Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds — a review of bioassay/biomarker technology, *Environment International*, 27, 413–439, 2001.

- [105] Iqbal, S.S., Mayo, M.W., Bruno, J.G., Bronk, B.V., Batt, C.A., Chambers, J.P., A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents, *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 549–578, 2000.
- [106] Wood, R.W., On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical magazine*, 4, 396-402, 1902.
- [107] Schasfoort R.B.M., Tudos A.J., (eds), *Handbook of surface plasmon resonance*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2008.
- [108] Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*, 4, 29-304, 1983.
- [109] Nylander, C., Liedberg, B., Lind, T., Gas detection by means of surface plasmons resonance, *Sensors and Actuators B*, 3, 79-88, 1982.
- [110] Şener, G., Nanopartiküllerle duyarlılığı artırılmış yüzey plasmon rezonans biyosensörlerin hazırlanması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2009.
- [111] Szentirmay, Z., Surface plasmon spectroscopy of metal/dielectric structures. *Spectrochimica Acta*, 48, 9-17, 1991.
- [112] Welford, K., Surface plasmon-polaritons and their uses, *Optical and Quantum Electronics*, 23, 1-27, 1991.
- [113] Earp, R.L., Dessy, R.E., *Commercial Biosensors: Applications to Clinical Bioprocess and Environmental Samples*. John Wiley and Sons: New York, Chapter 4, 1996.
- [114] McDonagh, C., Burke, C.S., MacCraith, B.D., Optical chemical sensors, *Chemical Reviews*, 108, 400-422, 2008.
- [115] Holford, T.R.J., Davis, F., Higson, S.P.J., Recent trends in antibody based sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 34, 12-24, 2012.
- [116] Türkoğlu, E.A. Yüzey plazmon rezonans temelli antibadi sensörlerin hazırlanması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010.

- [117] Nakamura, C., Hasegawa, M., Nakamura, N., Miyake, J., Rapid and specific detection of herbicides using a self-assembled photosynthetic reaction center from purple bacterium on an SPR chip, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 599-603, 2003.
- [118] Miura N., Sasaki, M., Gobi, K.V., Kataoka, C., Shoyama, Y., Highly sensitive and selective surface plasmon resonance sensor for detection of sub-ppb levels of benzo[a]pyrene by indirect competitive immunoreaction method, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 953-959, 2003.
- [119] Strong, A., Stimpson, D.I., Bartholomew, D.U., Jenkins, T.F., Elkind, J.L., Detection of trinitrotoluene (TNT) extracted from soil using a surface plasmon resonance (SPR)-based sensor platform. *SPIE*, 3710, 362-372, 1999.
- [120] Oh, B.K., Kim, Y.K., Bae, Y.M., Lee, W.H., Choi, J.W., Detection of *Escherichia coli* O157, H7 using immunosensor based on surface plasmon resonance, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 780-786, 2002.
- [121] Taylor, A.D., Ladd, J., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., Jiang, S., Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 752-758, 2006.
- [122] Lotierzo, M., Henry, O.Y.F., Piletsky, S., Tothill, I., Cullen, D., Kania, M., Hock, B., Turner, A.P.F., Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 145-152, 2004.
- [123] Uzun, L., Say , R., Ünal, S., Denizli, A., Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2878–2884, 2009.
- [124] Ladd, J., Boozer, C., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., Jiang, S., DNA-directed protein immobilization on mixed self-assembled monolayers via a Streptavidin bridge, *Langmuir*, 20, 8090-8095, 2004.
- [125] Stigter, E.C., Jong, G.J., Van Bennekom, W.P., An improved coating for the isolation and quantitation of interferon-gamma in spiked plasma using surface plasmon resonance (SPR), *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 474-482, 2005.

- [126] Bokken, G.C.A.M., Corbee, R.J., van Knapen, F., Bergwerff, A.A., Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor, *FEMS Microbiology Letters*, 222, 75–82, 2003.
- [127] Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O'Kennedy, R., Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 3–13, 2003.
- [128] Vaughan, R.D., O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G., Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 635–638, 2001.
- [129] Skottrup, P., Nicolaisen, M., Justesen, A.F., Rapid determination of *Phytophthora infestans* sporangia using a surface plasmon resonance immunosensor, *Journal of Microbiological Methods*, 68, 507–515, 2007.
- [130] Lan, Y-b., Wang, S-z., Yin, Y-g., Hoffmann, W.C., Zheng, W-z., Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Detection of *Salmonella Typhimurium* in Chicken Carcass, *Journal of Bionic Engineering*, 5, 239–246, 2008.
- [131] Mauriz, E., Calle, A., Abad, A., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barceló, D., Lechuga, L.M., Determination of carbaryl in natural water samples by a surface plasmon resonance flow-through immunosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2129-2136, 2006.
- [132] Jiang, T., Zhao, L., Chu, B., Feng, Q., Yan, W., Lin, J-M., Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17 $\beta$ -estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography, *Talanta*, 78, 442-447, 2009.
- [133] Dong, J., Gao, N., Peng, Y., Guo, C., Lv, Z., Wang, Y., Zhou, C., Ning, B., Liu, M., Gao, Z., Surface plasmon resonance sensor for profenofos detection using molecularly imprinted thin film as recognition element, *Food Control*, 25, 543-549, 2012.
- [134] Wulff, G., Poll, H.G., Enzyme-analogue built polymers, 23. Influence of the structure of the binding sites on the selectivity for racemic resolution, *Makromolekular Chemistry and Physics*, 188, 4, 741-748, 1987.

- [135] Sönmezler, M., Kuartz Kristal Mikroterazi (QCM) Temelli Histidin Sensörler, H.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2011.
- [136] Haupt, K., Molecularly imprinted polymers: The next generation, *Analytical Chemistry*, 75, 376A-383A, 2003.
- [137] Mayers, A.G., Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry, *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 321–332, 1997.
- [138] Rao, T.P., Daniel, S., Gladis, J.M., Tailored materials for preconcentration or separation of metals by ion-imprinted polymers for solid-phase extraction (IIP-SPE), *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 28-35, 2004.
- [139] Haupt, K., Ye, L., Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1887-1897, 2004.
- [140] Yavuz, H., Karakoc, V., Turkmen, D., Say, R., Denizli, A., Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles, *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 8-15, 2006.
- [141] Owens, P.K., Karlsson, L., Lutz, E.S.M., Andersson, L.I., Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 146–154, 1999.
- [142] Ansell, D.J., Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1809–1835, 2005.
- [143] Schweitz, L., Spéigel, P., Nilsson, S., Approaches to molecular imprinting based selectivity in capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 22, 4053–4063, 2001.
- [144] Liu, C., Lin, C., An insight into molecularly imprinted polymers for capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 25, 3997–4007, 2004.
- [145] Liu, Z., Zheng, C., Yan, C., Gao, R., Molecularly imprinted polymers as a tool for separation in CEC, *Electrophoresis*, 28, 127–136, 2007.

- [146] Ulbricht, M., Membrane separations using molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography B*, 804, 113–125, 2004.
- [147] Dias, A.C.B., Figueiredo, E.C., Grassi, V., Zagatto, E.A.G., Arruda, M.A.Z., Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis, *Talanta*, 76, 988–996, 2008.
- [148] Byrne, M.E., Park, K., Peppas, N.A., Molecular imprinting within hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 149–161, 2002.
- [149] Lavignac, N., Allender, C.J., Brain, K.R., Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays, *Analytica Chimica Acta*, 510, 139–145, 2004.
- [150] Fernandez-Gonzalez, A., Guardia, L., Badia-Lainio, R., Diaz-Garcia, M.E., Mimicking molecular receptors for antibiotics-analytical implications, *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 949–957, 2006.
- [151] Öpik, A., Menaker, A., Reut, J., Syritski, V., *Proc. Est. Acad. Sci.* 2009, 58 (1), 3–11.
- [152] Piletsky, S.A., Alcock, S., Turner, A.P.F., Molecular imprinting; at the edge of the third millennium, *Trends in Biotechnology*, 19, 9-12, 2001.
- [153] Blanco-Lopez, M.C., Lobo-Castanon, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tunon-Blanco, P., Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers, *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 36–48, 2004.
- [154] Liu, Z., Zheng, C., Yan, C., Gao, R., Molecularly imprinted polymers as a tool for separation in CEC, *Electrophoresis*, 28, 127–136, 2007.
- [155] Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., Elgersma, A.V., Yano, K., Karube, I., Parhometz, Yu, P., El'skaya, A.V., Atrazine sensing by molecularly imprinted membranes, *Biosensors and Bioelectronics*, 10, 959-964, 1995.
- [156] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H., *Molecular imprinting (from fundamentals to applications)*, Wiley-VCH Verlag, 2003.



- [157] Davies, M.P., De Biasi, V., Perrett, D., Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 504, 7-14, 2004.
- [158] Cormack, P.A.G., Mosbach, K., Molecular imprinting: recent developments and the road ahead, *Reactive and Functional Polymers*, 41, 115-124, 1999.
- [159] Idziak, L., Benrebouh, A., Deschamps, F., Simple NMR experiments as a means to predict the performance of an anti-17 alpha-et hynylestradiol molecularly imprinted polymer. *Analytica Chimica Acta*, 435, 137-140, 2001.
- [160] Dickert, F., Hayden, O., Imprinting with sensor development on the way to synthetic antibodies, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 364, 506-511, 1999.
- [161] Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z., 2004. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *Journal of Chromatography B*, 804, 173-182, 2004.
- [162] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H., *Molecular imprinting (from fundamentals to applications)*, Wiley-VCH Verlag, 2003.
- [163] Yu, C., Mosbach, K., Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers, *The Journal of Organic Chemistry*, 62, 4057-4064, 1997.
- [164] Andersson, L.I., Ekberg, B., Mosbach, K., Synthesis of a New Amino Acid Based Cross-Linker for Preparation of Substrate Selective Acrylic Polymers, *Tetrahedron Letters*, 26, 3623-3624, 1985.
- [165] Shea, K.J., Dougherty, T.K., Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition, *Journal of America Chemical Society*, 108, 1091-1093, 1986.
- [166] Molinelli, A., *Molecular imprinted polymers: towards a rational understanding of biomimetic materials*, Georgia institute of technology. In partial fulfillment of the requirement for the degree of the doctor of philosophy in chemistry, 2004.
- [167] Ikegami, T., Mukawama, T., Nariai, H., Takeuchi, T., Bishenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting, *Analytica Chimica Acta*, 504, 131-135, 2004.

- [168] Steinke, J., Sherrington, D.C., Dunkin, I.R., Imprinting of synthetic polymers using molecular templates, *Advances in Polymer Science*, 123, 80-125, 1995.
- [169] Ersöz, A., Denizli, A., Özcan, A., Say, R., Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2197-2202, 2005.
- [170] Chapter 20: Surface Plasmon Resonance Based Nanosensors for Detection of Triazinic Pesticides in Agricultural Foods, *New Pesticides and Soil Sensors, Nanotechnology in Food Industry (Multi-Volume SET I-X, Fatma Yılmaz, Yeşeren Saylan, Semra Akgönüllü, Duygu Çimen, Ali Derazshamshir, Nilay Bereli, Adil Denizli, (Baskıda)*
- [171] Katz, A., Davis, M.E., Investigation into the mechanism of molecular recognition with imprinted polymers, *Macromolecules*, 32, 4113-4121, 1999.
- [172] Pichon, V., Chapuis-Hugon, F., Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants, *Analytica Chimica Acta.*, 622, 48-61, 2008.
- [173] Zhong, N., Byun, H.S, Bittman, R., Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinted polymers, *Tetrahedron Letter*, 42,1839-41, 2001.
- [174] Odabaşı, M., Denizli, A., Polyhydroxyethylmethacrylate based magnetic DNA-affinity beads for anti-DNA antibody removal from systemic lupus erythematosus patient plasma, *Journal of Chromatography B*, 760, 137-148, 2001.
- [175] Haginaka, J., Kagawa, C., Retentivity and enantioselectivity of uniformly sized molecularly imprinted polymers for d-chlorpheniramine and d-brompheniramine in hydro-organic mobile phases, *Ansl. Bioanal. Chem*, 378, 1907-1912, 2004.
- [176] X. Systematic comparisons of artificial urine formulas for in vitro cellular study Somchai Chutipongtanate, Visith Thongboonkerd. *Analytical Biochemistry* 402, 110–112, 2010.
- [177] Levi R., McNiven S., Piletsky S.A., Cheong, S.H., Yano, K., Karube, I., Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers, *Analytical Chemistry*, 69, 2017-2021, 1997.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Volkan Safran  
Doğum Yeri : Çankaya/ Ankara  
Doğum Yılı : 1990  
Medeni Hali : Bekar  
E-posta : volkansafran@hotmail.com  
Adresi : Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Araştırma Lab 1.  
06800 Beytepe, Çankaya / ANKARA

## Eğitim

Lise : Gazi Anadolu Lisesi / ANKARA  
Lisans : Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü  
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp A.B.D

## Yabancı Dil ve Düzeyi

## Deneyim Alanları

## Aldığı Ödüller ve Dereceler

## Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

## Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

