

**OKRATOKSİN A TAYİNİ İÇİN
NANOLİF KAPLI KÜTLE HASSAS İMMÜNOSENSÖR
HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF NANOFIBER COATED
MASS SENSITIVE IMMUNOSENSOR FOR OCHRATOXIN A
DETECTION**

ÖZGE DİNCEL

PROF. DR. SELMA MUTLU
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEKLİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2015

ÖZGE DİNCEL' in hazırladığı "**Okrotoksin A Tayini için Nanolif Kaplı Kütle Hassas İmmünoşensör Hazırlanması**" adlı bu çalışma aşığıdaki jüri tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Faruk BOZOĞLU

Başkan

.....

Prof. Dr. Selma MUTLU

Danışman

.....

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Üye

.....

Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Üye

.....

Doç. Dr. Ali BOZBEY

Üye

.....

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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
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 üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

04/08/2015

ÖZGE DİNCEL

ÖZET

OKRATOKSİN A TAYİNİ İÇİN NANOLİF KAPLI KÜTLE HASSAS İMMÜNOSENSÖR HAZIRLANMASI

Özge DİNCEL

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Selma MUTLU

Ağustos 2015, sayfa 57

Mikotoksinler olarak adlandırılan toksik mantar metabolitleri yiyeceklerin kontaminasyonunun temel sebebi olarak uzun zamandır bilinmekte ve kanser, tümör gibi tehlikeli hastalıklar oluşturabilmektedir. Bir mikotoksin çeşidi olan okratoksinler *Aspergillus* ve *Penicillium* mantar türleri tarafından üretilmektedir. Okratoksin üreten mantarlar en çok arpa, mısır, buğday, yulaf, çavdar, yarfıstığı, üzüm suyu, şarap, kakao, kuru meyveler, baharatlar gibi besin maddelerinin üzerinde bulunur. Bu grubun ana toksini insanlarda kansere ve böbrek hasarlarına yol açan Okratoksin A (OTA)'dır. Ülkemizde yetiştirilen tarım ürünlerindeki OTA varlığı ve bu mikotoksinin düşük miktarlarının insan sağlığına sebebiyet verdiği zararlar nedeni ile getirilen yasal sınırlamalar hassas tekniklerle OTA tayini gerekliliğini arttırmıştır. Mikotoksin tayininde kullanılan yurt dışı kaynaklı cihazların analiz süresi uzundur, pahalı bir sistemdir ve analiz için teknik elemana ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden bu çalışmada mikotoksin tayini için; kısa sürede cevap veren, pahalı ucuz ve sahada uzman personele ihtiyaç duymadan düşük derişimlerdeki mikotoksin seviyelerini algılayabilen bir biyosensör tasarlanması hedeflenmiştir.

Biyosensörün tanıyıcı tabakasındaki antikor ve ortamda bulunan antijen etkileşiminin meydana getirdiği kütle değişimleri QCM ile çok hassas ölçülebilir. Bu çalışmada, QCM altın yüzeyleri, yüzey alanını arttırmak için elektro-eğirme yöntemi ile selüloz asetat (CA) nanoliflerle kaplanmıştır. Böylece antikor-antijen etkileşimine dayanarak oluşturulan OTA tayini için hazırlanan kütle hassas immünosensörün yüzey alanı, dolayısıyla hassasiyeti arttırılmıştır. 1 mg/ml OTA antikoru (anti-OTA) ya kontrol olarak hazırlanan boş QCM'e ya da elektro-eğirilmiş CA kaplı QCM'e (ES-QCM) kimyasal olarak aktive edilmiş aldehit grupları aracılığı ile immobilize edilmiştir. Boş QCM'in altın yüzeyleri çapraz bağlayıcı olan sisteamin ve glutaraldehit ile aldehit grubu elde etmek üzere aktive edilmiştir. Anti-OTA immobilizasyonundan sonra, boş QCM'lerin performansları BSA bağlı OTA (OTA-BSA) (10-250 ng/ml) ile test edilmiştir. ES-QCM'ler için lif oluşturmak amacı ile hazırlanan selüloz asetat polimer çözeltisi kütlece %15 oranında CA ve kütlece 3:1 oranında aseton/N,N dimetilasetamid içermektedir. Oluşturulan liflerin ortalama çapı 200 nm civarındadır. Aldehit grupları CA liflerde sodyum periyodat oksidasyonu ile oluşturulduktan sonra liflere antikor immobilize edilmiştir. ES-QCM'in performansını test etmek için ise OTA (0,5-20 ng/ml) ya da BSA-OTA (10-250 ng/ml) kullanılmıştır. Yüzeye adsorblanan OTA miktarı, toksin bağlanmaları ile oluşan frekans kaymaları hesaplanarak belirlenmiştir. Boş QCM'in ve ES-QCM'in kalibrasyon eğrileri doğrulukları açısından karşılaştırılmış, ES-QCM'in algılama limiti belirlenmiştir. Hazırlanan immünosensörün seçiciliği "sitrinin" (100,250 ng/ml) ile test edilmiş, anti-OTA ile arasında etkileşim gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: okratoksin A, elektro-eğirme, kuvars kristal mikroterazi, immünosensör.

ABSTRACT

PREPARATION OF NANOFIBER COATED MASS SENSITIVE IMMUNOSENSOR FOR OCHRATOXIN A DETECTION

Özge DİNCEL

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Selma MUTLU

August 2015, 57 pages

Toxic fungal metabolites, so-called mycotoxins, have long been recognized as the major cause of feed toxicosis, and may also constitute a serious hazard to human health such as cancer and tumour. Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by several species of *Aspergillus* and *Penicillium*. OTA can be found in foods such as corn, wheat, oat, rye, peanut, grape juice, wine, cacao, dried fruits, spices. This group's main toxin is ochratoxin A which causes cancer in humans and kidney damage. Determination of ochratoxin A has increased the need for sensitive techniques because of the presence of OTA in agricultural products grown in our country and the legal restrictions about this toxin that is damaging to human health in small quantities. Mycotoxin analysis period is long, the system is expensive and technical staff is needed for analysis. So in this study, the aim is to create a biosensor for the determination of mycotoxins that can detect lower concentrations of mycotoxin levels and also have a fast response time, portable, enable in-situ analysis without needing an expert. Mass changes caused by the interaction of antibody and antigen on the recognition layer of the biosensor can be measured with precision by QCM.

In this study, quartz crystal microbalance surface was coated with cellulose acetate (CA) film via electrospinning method for increasing the surface area. It is

expected to increase the sensitivity of mass sensitive immunosensor prepared for ochratoxin A (OTA) utilizing the high selective behavior of the antigen-antibody interaction. 1 mg/ml OTA antibody (anti-OTA) was immobilized on the blank QCM as control surface or electrospun coated QCM (ES-QCM) by means of chemically active aldehyde groups. Blank QCM gold surface was activated with cysteamine and glutaraldehyde cross-linker to obtain aldehyde groups. After the anti-OTA immobilization, blank QCM's performance was tested with BSA conjugated OTA (10-250 ng/ml). For the ES-QCM, CA lifs were prepared from 15% (w/w) CA solution in acetone/DMAC (3:1). The average diameters of the CA lifs were about 200 nm. The aldehyde groups were produced in the CA lif matrix by NaIO_4 oxidation. Then, anti-OTA was immobilized on the CA lifs. The antigens that bound anti-OTA on ES-QCM were OTA (0.5-20 ng/ml) or BSA conjugated OTA (10-250 mg/ml). The amount of adsorbed OTA was determined by calculating the frequency shift due to binding of toxin on the surface. The calibration curves of the blank QCM and ES-QCM were obtained and these curves were compared with in terms of linearity and the detection limit of ES-QCM was determined. Selectivity of the immunosensor was tested with OTA like molecule "citrinin" (100, 250 ng/ml) and no cross-reactivity were observed.

Keywords: ochratoxin A, electrospinning, quartz crystal microbalance, immunosensor

TEŞEKKÜR

Söz konusu tez çalışmasının yürütülmesinde tez danışmanım ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Selma Mutlu' ya, başından sonuna kadar büyük emeği bulunan değerli eski tez danışman hocam, sayın Prof. Dr. Mehmet Mutlu' ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışması için gerekli olan maddi desteği sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimine,

Tez çalışma sürecinde ihtiyacım olan laboratuvar bilgilerini bana öğretmiş olan, deneyimlerini paylaşan Yrd. Doç. Dr. Baran Önal Ulusoy' a,

Deneylerde yardımlarını esirgemeyen ve çözüm önerileri ile destekleyen Cumhuriyet Karadeniz' e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez sürecini kolay bir şekilde atlatmamda emeği büyük olan, bilgisini, ilgisini, desteğini eksik etmeyen, az ve öz dostlarımdan Sevde Altuntaş,

Tez oluşumunda bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan ve her düştüğümde beni kaldıran Önder Dincel ve Can Pervane

Ve her zaman yanımda olan, her kararımda beni destekleyen sevgili annem ve babam, desteğinizle yazılan her satır için teşekkür ediyorum, iyi ki varsınız.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	viii
ŞEKİLLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Biyosensörler	3
2.1.1 Biyosensör Tanımı	3
2.1.2 Biyosensörlerin Genel Tasarım Prensipleri	3
2.1.3 Biyosensörlerin Sınıflandırılması.....	5
2.1.4 Biyosensörlerin Performans Parametreleri	8
2.2 İmmüno-sensörler	11
2.2.1 Elektrokimyasal İmmüno-sensörler	13
2.2.2 Manyetik İmmüno-sensörler	13
2.2.3 Optik İmmüno-sensörler.....	13
2.2.4 Kütle Hassas İmmüno-sensörler	14
2.3 Elektro-Eğirme	19
2.3.1 Çalışma Prensipleri.....	20
2.3.2 İşlem Parametreleri.....	21
2.3.3 Elektro-Eğirilmiş Selüloz Asetat (CA) Lifler	24
2.4 Okratoksin A (OTA)	24
2.4.1 Okratoksin A Yapısı	24
2.4.2 Analiz Teknikleri.....	25
2.5 Tez Çalışmasında Kullanılan Yüzey Analiz Yöntemleri.....	26
2.5.1 Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi - Azaltılmış Toplam Yansıma.....	26

2.5.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi	26
3 MATERYAL VE METOD	27
3.1 . Materyal	28
3.2 Metod	30
3.2.1 Elektro-Eğirme Çalışmaları	30
3.2.2 Elektrot Yüzeyi Kimyasal Aktivasyonu	30
3.2.3 Tanıyıcı Tabakanın Oluşturulması	32
3.2.4 İmmüno sensörün Performansının Belirlenmesi	32
3.2.5 Yüzey Karakterizasyonu	33
4 DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1 Elektro-Eğirme Çalışmaları	36
4.2 QCM' lerin Yüzey Modifikasyonu ve Karakterizasyonu	40
4.2.1 Boş QCM Modifikasyonları	40
4.2.2 ES-QCM Modifikasyonları	44
4.3 Antikor İmmobilizasyonu	46
4.4 Frekans Ölçümleri.....	47
4.5 OTA İmmüno sensör Deneyleri.....	48
4.6 Seçiciliğin Test Edilmesi	50
5 SONUÇ	52
6 KAYNAKLAR	53
7 ÖZGEÇMİŞ	57

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1. Biyosensör performansını belirlemek için kullanılan değişken parametreleri.....	8
Çizelge 2.2. Biyosensörlerin performans parametreleri.....	10
Çizelge 3.1. Altın yüzey modifikasyonunda kullanılan kimyasalların kapalı ve açık formülleri.....	29
Çizelge 3.2. CA lif modifikasyonunda kullanılan kimyasalların kapalı ve açık formülleri.....	29
Çizelge 4.1. Elektro-eğirmede kullanılan işlem parametreler.....	36
Çizelge 4.2. Elektro-eğirme ile oluşturulan selüloz asetat fiberlerin deasetilleme ve oksitleme parametreleri.....	45
Çizelge 4.3. Boş QCM ve ES-QCM' in modifikasyonlardan sonraki frekans değişimleri.....	47
Çizelge 4.4 Boş QCM ve ES-QCM' in çeşitli konsantrasyonlarda OTA ve OTA-BSA' ya karşı gösterdikleri frekans değişimleri.....	49
Çizelge 4.5. OTA ES-QCM immünossensörün seçiciliğinin sitrinine karşı test edilmesi.....	51

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Biyosensörün temel kısımları.....	3
Şekil 2.2. Biyosensörlerin çevirici kısımlarına göre genel sınıflandırılması.....	10
Şekil 2.3. Antikor yapısının genel gösterimi.....	12
Şekil 2.4. a) Direkt tutuklama yöntemini, b) yerdeğişimi yöntemini, c) rekabet yöntemini temsil etmektedir	17
Şekil 2.5. Elektro-eğirme sisteminin şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.6. OTA moleküler yapısı	24
Şekil 3.1. Kuvars kristal mikroterazinin ön ve arka görünümü.....	29
Şekil 3.2. Kuvars kristal mikroterazi temizleme aşamaları.....	31
Şekil 3.3. QCM frekans ölçüm düzeneği	33
Şekil 3.4. QCM' in toksinlerle etkileştirildiği deney düzeneği.....	33
Şekil 3.5. İmmünoensör hazırlama basamaklarının şematik görünümü. A) Boş QCM Modifikasyonları. B)ES-QCM Modifikasyonu	34
Şekil 4.1. a) 1, b) 2 numaralı örneğin boncuklu lifleri ve çaplarının SEM ile elde edilen görüntüleri.....	37
Şekil 4.2. 4 numaralı örnekteki liflerin ve lif çaplarının SEM görüntüleri	38
Şekil 4.3. 6 numaralı örnekteki liflerinin morfolojisi	38
Şekil 4.4. 7 numaralı örnekteki liflerinin morfolojisi	39
Şekil 4.5. Elektro-eğirme ile QCM yüzeyinde oluşturulan selüloz asetat liflerin SEM görüntüsü ve histogram grafiği	40
Şekil 4.6. QCM yüzeyinde amin grubu oluşumu sonrası FTIR-ATR spektrumu ...	41
Şekil 4.7. %2,5 glutaraldehit ile etkileşimde sonraki QCM' in FTIR-ATR spektrumu	42
Şekil 4.8. %5 glutaraldehit ile etkileşimde sonraki QCM' in FTIR-ATR spektrumu	42
Şekil 4.9. Boş, sisteamin (cys) ile muamele edilmiş, sisteamin (cys) ve glutaraldehit (glu) ile muamele edilmiş QCM' lerin FTIR-ATR spektrumlarının karşılaştırılması	43

Şekil 4.10. Deasetilleme öncesi (a) ve sonrası (b) temas açısı görüntüleri	44
Şekil 4.11. Deasetilleme öncesi ve sonrası selüloz asetat liflerin FTIR-ATR spektrumu.....	45
Şekil 4.12. Deasetillenmiş ve oksitlenmiş selüloz asetat liflerin FTIR-ATR spektrumu.....	46
Şekil 4.14. ES-QCM' in ve QCM' in çeşitli derişimlerde OTA-BSA çözeltilerine karşı frekans sapmalarını gösteren kalibrasyon eğrileri	49
Şekil 4.15. ES-QCM' in OTA çözeltilerine karşı frekans sapmalarını gösteren kalibrasyon eğrisi.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Δf	Frekans Değişimi
f_0	Kuvars Kristalin Rezonans Frekansı
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
Δm	Kütle Değişimi
A	Alan
g	Gram
cm	Santimetre
ρ_q	Kuvars Kristalin Yoğunluğu
μ_q	Kuvars Kristalin Kayma Katsayısı
s	Saniye
ρ_L	Çözeltinin Yoğunluğu
M	Molarite
kg	Kilogram
μg	Mikrogram
ng	Nanogram
ml	Mililitre
°C	Santigrat
ppm	Milyonda Bir birim
kV	Kilovolt

Kısaltmalar

OTA	Okratoksin A
OTB	Okratoksin B
OTC	Okratoksin C
ELISA	Enzim-Bağlı-İmmün Assay

TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
SPR	Yüzey Plazmon Rezonansı
SAW	Yüzey Akustik Dalga
BAW	Yığın Akustik Dalga
QCM	Kuvars Kristal Mikroterazi
DMF	N,N-Dimetilformamid
CA	Selüloz Asetat
FTIR	Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi
FTIR-ATR	Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi - Azaltılmış Toplam Yansıma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
ES-QCM	Yüzeyi Elektro-Eğirme Yöntemiyle Arttırılmış Kuvars Kristal Mikroteraziler
Anti-OTA	Okratoksin A Antikoru
OTA-BSA	Sığır Serum Albümin Bağlı Okratoksin A
DMAC	N,N-Dimetilasetamid
KOH	Potasyum Hidroksit
NaIO ₄	Sodyum Periyodat

1 GİRİŞ

Mantarlar, antibiyotik gibi insanlar için yaralı olan bazı ikincil metabolitler üretirler. Ancak mantarların bazı metabolitleri canlı hücreler için toksiktir. Bu tür toksinlere mikotoksin adı verilmektedir. Bu toksinler çeşitli besinlerde, uygunsuz üretim ve depolama koşullarından dolayı bulunabilmektedir [1]. Yaygın görülen bir mantar toksini olan okratoksin, *Aspergillus* ve *Penicillium* mantarlarının bazı türleri tarafından üretilmektedir. Bu toksin grubunun en yaygın rastlanana okratoksin A'dır. Okratoksin A (OTA) kahve, üzüm, bazı tahıllar ve hayvan yemlerinde bulunabilmektedir [2]. OTA temel toksik etkisi özellikle böbreklerde görülmekte, insanlarda "Balkan Endemik Nefropatisi" adlı böbrek rahatsızlığına neden olmaktadır [2]. Bu mantar toksini için dünyada birçok ülke tarafından yasal sınırlandırmalar getirilmiştir [3,4]. Ülkemizde belirlenen maksimum limitler çeşitli gıdalarda 0,5-10 µg/kg arasında değişmektedir. Yetiştirilen tarım ürünlerindeki OTA varlığı, bununla ilgili getirilen yasal sınırlandırmalar ve düşük miktarda toksinin insan sağlığına verdiği hasarlardan dolayı hassas yöntemlerle OTA tayini gerekliliği artmıştır.

OTA tayini için çeşitli kromatografik ve immünolojik yöntemler mevcuttur. Bunlardan en çok kullanılanlarının arasında "ince tabaka kromatografisi" (TLC), "yüksek performanslı sıvı kromatografisi" (HPLC) ve "enzim-bağlı-immün assay" (ELISA) sayılabilir. Bu yöntemlerin uzun zaman alması, pahalı olması, kapsamlı temizleme işlemlerinin bulunması ve çok miktarda solventle çalışılması gibi dezavantajları bulunmaktadır [5,6].

Geleneksel yöntemlerin zor olması, uzmanlık gerektirmesi ve uzun zaman alması nedeniyle gıda örneklerinde OTA miktarı belirlenmesi için, kısa sürede cevap verebilen, pahalı ucuz ve uzman personel gerektirmeyen analiz cihazlarına ihtiyaç olduğu açıktır. Bu nedenle bu çalışmada, diğer yöntemlere alternatif olarak kullanılacak bir immünosensör tasarlanmıştır. Bu immünosensör, çevirici kısmı piezoelektrik sistem ile donatılmış bir kütle hassas sensördür. Sensörün hassasiyetini arttırmak amacı ile sensör yüzeyi elektro-eğirme ile selüloz asetat liflerle kaplanmıştır. Yüzeylerde ıslak kimya yöntemleri ile antikor immobilize edebilecek fonksiyonel gruplar oluşturulmuştur. Antikorlar, çeşitli konsantrasyonlarda antijen çözeltileri ile etkileştirilmiş, elde edilen frekans

sapmaları ile kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Sensörün seçiciliği ve ölçüm sınırı belirlenerek, OTA tayini için kütle hassas bir immünosensör hazırlanması hedeflenmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Biyosensörler

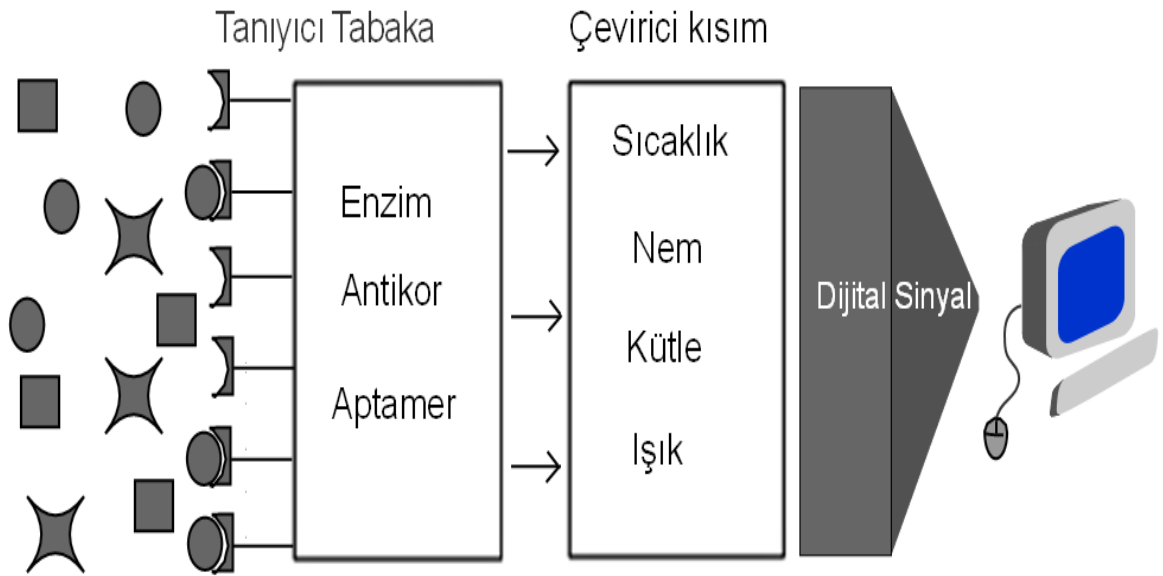
Yaşanılan çevreyi duyu organları ile belirli sınırlar çerçevesinde algılamaya çalışan canlılar, aldıkları sinyalleri beyinde anlamlı bilgilere dönüştürürler. Belirli bir madde artık sadece canlı sistemle değil elektronik ve biyolojik kısımlar içeren çeşitli aygıtlarla da algılanabilmektedir. “Biyosensör” adı verilen bu aygıtlar, sınırlandırılmış duylar ile miktarı ölçülemeyecek birçok kimyasalı yüksek teknolojide çevirici sistemleri ile algılanabilir sinyallere çevirebilen cihazlardır.

2.1.1 Biyosensör Tanımı

Duyarga, yani sensör anlamına gelen kelime Türkçede hem canlılarda duyu algılama organı hem de nesneyi algılayan aygıtlar için kullanılabilir. “Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin” (IUPAC) tanımına göre ise biyosensörler “izole enzimler, bağışıklık sistemi elemanları, dokular, organeller ve bütün hücrelerdeki belli biyokimyasal reaksiyonları kullanarak genellikle elektriksel, termal ve optik sinyallerle kimyasal bileşikler algılayan bir araçtır” [7].

2.1.2 Biyosensörlerin Genel Tasarım Prensipli

Bir biyosensör temel olarak üç kısımdan oluşur; tanıyıcı tabaka, çevirici kısım ve elektronik kısım (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Biyosensörün temel kısımları

2.1.2.1 Tanıyıcı Tabaka

Tanıyıcı tabaka biyolojik molekülleri içeren tabakadır. Bu tabakada analiz edilecek maddeyi (analit) ve onu tanıyacak olan biyoreseptörü içermektedir. Biyolojik analitler doku, mikroorganizmalar, organeller, enzimler, hücre reseptörleri, enzimler, antijenler, nükleik asitler olabilirken biyoreseptör kısmı enzim, antikor, aptamer gibi biyolojik ajanları içermektedir [8]. Tanıyıcı tabakada esas dikkat edilmesi gereken biyoreseptörün hedef analite olan özgüllüğüdür. Bunun için antijenle anahtar kilit uyumu sağlayabilen doğal yapılandırılmış antikolar kullanıldığı gibi, çeşitli yollarla sentezlenebilen nükleik asit, protein gibi biyomolekülleri özgül olarak tanıyabilen sentetik bir nükleik asit yapısında bulunan aptamerler de kullanılmaktadır. Biyoreseptörler, çevirici tabaka ile yakından ilişkili ya da bu tabaka ile bütünleşmiş halde bulunmaktadır [8].

2.1.2.2 Çevirici Kısım

Biyosensörün tanıyıcı tabakasında analit ile biyoreseptör etkileşimi sonucunda ortaya çıkan sıcaklık, gerginlik, nem, basınç, kütle, ışık gibi fiziksel değişkenleri algılayabilmek için bu değerlerin evrensel ve kolay erişilebilir sinyallere çevrilmesi gerekmektedir [9].

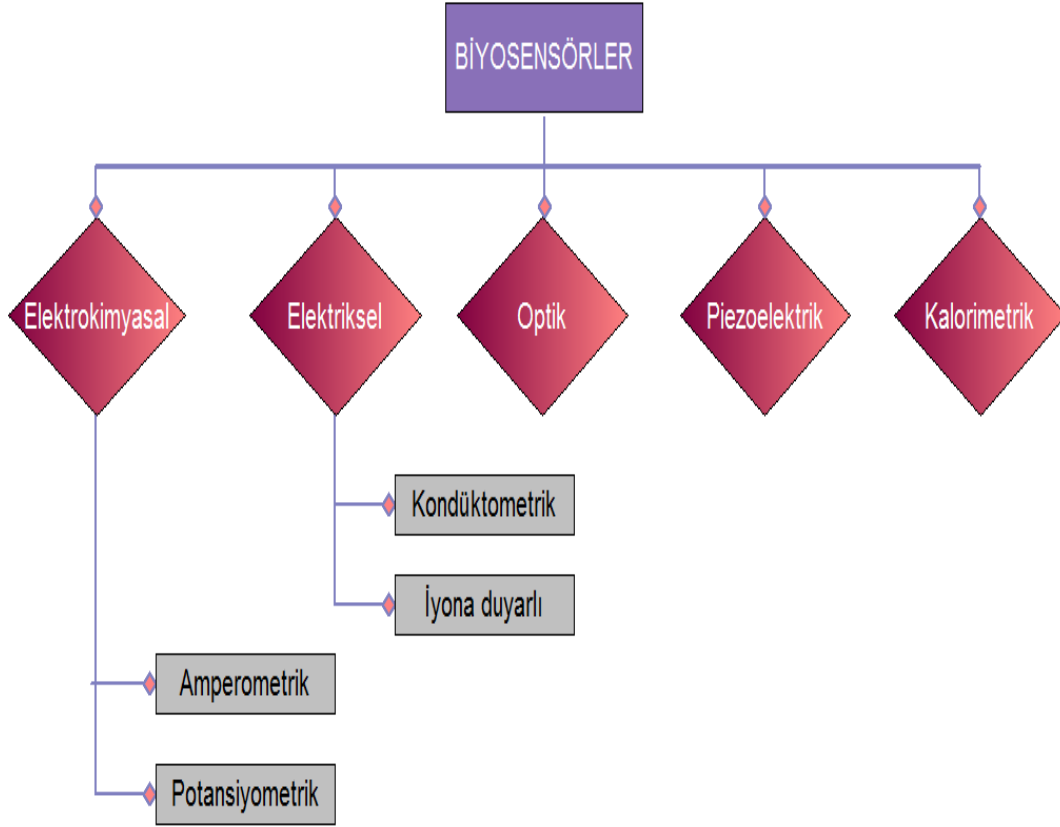
Elektrokimyasal çeviriciler voltaj, akım veya iletkenlik değişimlerini ölçmektedir. Voltajdaki değişimi inceleyen potansiyometrik sensörler, belirli kimyasal türlere hassas elektrotların kullanımını içermektedir. Akım değişimini ölçen amperometrik sensörler ve iletkenlik değişimlerini ölçen kondüktometrik sensörler ise genellikle üzerine biyoreseptörlerin immobilize edildiği, gerilim altındaki iki elektrot levhayı içermektedir [9]. Optik çeviriciler, ışık çeviricilerinden gelen voltaj sinyallerini ölçmektedir [9]. Piezoelektrik çeviriciler antijen, nükleik asit, substrat gibi hedef moleküllerinin immobilize biyoajan ile saptanması için kullanılan kütle algılayıcılardır [9].

2.1.2.3 Elektronik Kısım

Çevirici tabakada dönüştürülen fiziksel değişkenler, genellikle voltaj olarak karşımıza çıkmaktadır [9]. Oluşturulan dijital sinyaller, bilgisayarlara aktarılır böylece verilerin değerlendirilmesi, görüntülenmesi ve depolanması sağlanmaktadır.

2.1.3 Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Genellikle, birçok dönüştürücü elektrokimyasal, elektriksel, optik, piezoelektrik ve termal sinyalleri algılayabilmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Biyosensörlerin çevirici kısımlarına göre genel sınıflandırılması

2.1.3.1 Elektrokimyasal Biyosensörler

Bu tür dönüştürücülerin temel prensibi immobilize biyomolekülün ve hedef analitin ürettiği kimyasal reaksiyonlara dayalıdır. Tanıyıcı tabaka elemanlarının kimyasal özellikleri sayesinde sıvı karışım ya da solüsyonun elektrik akımları ve elektriksel potansiyelleri ölçülebilmektedir [10].

2.1.3.1.1 Amperometrik

Yaygın olarak kullanılmakta olan bir biyosensör çeşitidir. Birçok biyokimyasal elektriksel düşünüm sayesinde akımsal değerleri okunarak sınıflandırılabilen ve ölçümleri yapılabilir [11]. Amperometrik biyosensörler, potansiyel değişim odaklı sensörlere oranla daha duyarlı ve büyük üretim için daha uygundur [12]. Elektrot genellikle sadece metalden ya da film ile kaplanmış biyoelement katmandan yapılmaktadır [13]. Son zamanlarda kullanılan yöntem ise karbon nano

tüplerin amperometrik biyosensörlerde kullanımınıdır [14]. Potansiyel uygulandığında elektroaktif parçacıklar enzimsel tabakada aktif hale gelip genellikle kolaylıkla ölçülebilir akım değerleri oluşturmaktadır [15].

2.1.3.1.2 Potansiyometrik

Akım oluşmayan iyon seçici zar tarafından ayrılmış iki çözeltinin arasında oluşan potansiyel değişimi ölçen dönüştürücülerdir [10]. Hemen hemen tüm potansiyometrik sensörler cam elektrotlu, metal oksit temelli olanları ticari olarak bulmak mümkün olmakta ve ince film teknolojisiyle daha küçük sensörler üretilmektedir [10].

2.1.3.2 Elektriksel Biyosensörler

2.1.3.2.1 Kondüktometrik

Biyokimyasal bir reaksiyon oluştuğunda serbest ve bağlı elektron, iyon değişimlerinden dolayı çözeltinin genel iletkenlik veya yalıtkanlık değerleri değişmektedir [10]. İletkenlik veya yalıtkanlık temelli elektriksel sensörler çözeltinin elektriksel iletkenliğini veya direncini ölçer [10]. İletkenlik değişimi ölçümü genellikle düşük duyarlılıkta olmaktadır çünkü alternatif akım uygulandığında istenmeyen manyetik etkiler, çift tabakanın da yüklenmesi ve polarizasyonun bölgesel değişimi gibi etkenler daha düşük duyarlılığa sebebiyet vermektedir [15].

2.1.3.2.2 İyona Duyarlı

İki ayrı elektrotun metal, oksit veya yarı iletken alan etkili özelliklerinden yararlanılarak oluşturulan bu sensörler iyon alışverişine bağlı dönüştürücülerdir [10].

2.1.3.3 Optik Biyosensörler

Bu tür dönüştürücülerde ölçülen değer ışık dalgası temellidir ve genellikle bu tür dönüştürücüler ışığın kırınımı özelliği temel alınarak oluşturulmaktadır [10]. Floresan, sıklıkla biyosensörlerde seçicilik ve duyarlılık özelliklerinden yararlanarak ölçüm yapmak için kullanılır ve bu temelli tespit ve ölçüm cihazları ışığı tutma ve yansıtma durumlarına bakılarak ölçüm yapılmaktadır [10].

2.1.3.4 Piezoelektrik Biyosensörler

Piezoelektrik kristallerin kullanıldığı kütle hassas sensörler, oluşan kütle değişimlerini nanogram/cm² mertebelerinde algılayabilen cihazlardır. Kütle ölçümlerini rezonans frekanslarındaki sapmalara bağlı olarak ölçülebilmektedirler. Piezoelektrik kristal yüzeyinde oluşan kütle değişiminin frekans cinsinden tanımlanması eşitlik 2.1' de gösterilen "Sauerbrey" denklemine göre yapılmaktadır [16,17].

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \Delta m \quad (2.1)$$

Denklemden Δf frekans sapmasını (Hz), f_0 kuvars kristalin rezonans frekansını (Hz), Δm kuvars kristal üzerinde kütle birikimi ya da azalımı sonucu oluşan kütle değişimini (g), A kuvars kristal üzerindeki elektrotun yüzey alanını (cm²), ρ_q kuvars kristalin yoğunluğunu, μ_q kuvars kristalin kayma katsayısını temsil etmektedir.

Sıvı çözeltilerde yapılan ölçümler için ise Sauerbrey denklemi eşitlik 2.2' deki hali ile kullanılmaktadır [18].

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_L \rho_L}{\pi \rho_q \mu_q}} \quad (2.2)$$

Bu denklemden bir önceki denklemden farklı olarak bulunan η_L çözeltilerin viskozitesini (g cm⁻¹ s⁻¹), ρ_L (g cm⁻³) çözeltilerin yoğunluğunu ifade etmek için kullanılmıştır [18].

Piezoelektriksel çeviriciler genellikle ağırlık değişim tespitinde kullanılmaktadır. Bu tür sensörlerin yararı etiketleme ihtiyacı olmamasıdır [19]. Piezoelektrik özellikli kristaller kullanılarak yapılan tasarlanan bu sensörler, alternatif akım uygulandığında titreşim oluşturmakta ve bu titreşim ölçülmektedir [10]. Ayrıca piezoelektrik kristaller veya materyaller üzerine bir cisim konulduğunda bunların ürettiği titreşim değerleri değişmekte ve bu değişimler ölçülebilmektedir. Üzerine ağırlık konulduğunda bu sensör titreşimi azalmakta ve değerindeki değişim sayesinde kütle değişimi miktarı hesaplanabilmektedir [10].

2.1.3.5 Kalorimetrik (Termometrik)

Bu tür biyosensörler sabit biyomoleküllerin sıcaklık sensörlerinin üzerine yerleştirilmesiyle oluşmakta, burada analitle reaksiyona giren biyo komponent sıcaklık üretmekte ve reaksiyon oranı ve miktarıyla sıcaklıkta değişime yol açmaktadır [10]. Değişen sıcaklık değerine göre reaksiyona giren molekül miktarı tespit edilebilmektedir [10].

2.1.4 Biyosensörlerin Performans Parametreleri

Biyosensör oluşturulması büyük ölçüde tanıyıcı tabakadaki biyolojik elementlere bağlıdır. Bir biyosensörün reaksiyona girmesi durumunda elektrotunda oluşan ve uygulanan işlem ve yöntemler oldukça karmaşıktır. Bu karmaşıklık birçok değişken değerinin sensör performansını etkilemesinden doğmaktadır. Doğrusal ya da doğrusal olmayan değişken değerlerinin, sensörün limit değerlerinin ve kalite faktörünün hesaplanmasını araştırmak için göz önünde bulundurulmalıdır [20]. Doğrusal ve doğrusal olmayan değişken parametreleri çizelge 2.1' de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1 Biyosensör performansını belirlemek için kullanılan değişken parametreleri [20].

Değişken Parametreleri	Değişken Parametrelerinin İçerikleri
Elektrot değişkenleri	Materyal Yüzey Alanı Geometri Yüzey Yapısı
Kütle Transfer Değişkenleri	Yayılm Difüzyon Yüzey Yoğunluğu Emilim
Elektriksel Değişkenler	Potansiyel Akım Yük Empedans

Elektrolit Değişkenleri	Elektriksel olarak aktif olan maddelerin yoğunluğu pH Değeri Çözücü
Dış Değişkenler	Sıcaklık Basınç Süre Örnek düzlem yapısı Elektriksel ve manyetik girişimler ve etkiler
Potansiyel Gürültü Değişkenleri	Termal Gürültü Elektrokimyasal Gürültü Çevresel Gürültüler (Elektromanyetik Gürültü vb)
Reaksiyon Değişkenleri	Kinetik ve termodinamik reaksiyon cevapları Reaksiyon ürünleri veya maddelerinin kararlılığı Reaksiyon oranını belirleyen değerler

Bir sensör tasarlanırken özellikle ihtiyaçlara yönelik özel gereksinimleri karşılamak üzere tasarım yapmak esastır. Bu sebeptendir ki, bütünsel olarak sensörü değerlendirmek ve ölçmek için temel reaksiyonlara ve temel algı adımlarına özellikle yoğunlaşılıp bu adımların analizlerini yapmak zorunludur [20]. Ayrıca, karmaşık olan sensör analizinde, analizler çoklu boyutlarda yapılmalı yani halihazırda çok fazla olmayan değiştirilebilir değerlerin bulunduğu bir algoritma düzenlenip ilişkiler nümerik olarak tanımlanıp kompleks ortak matris oluşturulmalıdır çünkü ancak bu şekilde biyosensörün moleküler boyutta ve genel anlamda gerçeğe yakın performansı değerlendirilip ölçülmüş ve formül edilmiş olur [20]. Kaçınılmaz olan dış etkiler ve reaksiyon etkileri difüzyon, enzim ve elektron transfer kinetiği gibi değerlerin etkileri her zaman göz önünde bulundurulmalıdır. Sıcaklığın etkisi yok sayılamaz bir etkidir, çünkü difüzyon, seçicilik ve genel anlamda biyosensörün performansı sıcaklığa bağlı bir değişkenlerdir [20].

Biyosensörün performans parametreleri ve bu parametrelerin içerikleri çizelge 2.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 Biyosensörlerin performans parametreleri [20]

Performans Parametreleri	Parametre İçerikleri
Ana performans ölçüm parametreleri	Analit Analitin tanınması için kullanılan biyomolekül Seçicilik Hassasiyet Dinamik Aralık Ölçüm Sınırı Tepki Süresi Yeniden kullanılabilirlik yeniden işlev görme Kesinlik Uzun süre kullanılabilme ve saklama Kalibrasyon eğrisi oluşturma Temel düzeye ulaşma süresi
Diğer ek özellik ve performans ölçüm parametreleri (özellikle ticarileştirilmesi için kullanılanlar)	Ölçüm birim maliyeti Ölçüm Süresi Isınma Süresi Örnek Hacmi Ölçüm Sıcaklığı Boyutları ve Ağırlığı Kullanım Süresi ve Ömrü

Genel maliyeti

Temin ve Ulaştırma Süresi

Kullanım Kolaylığı ve Dayanıklılığı

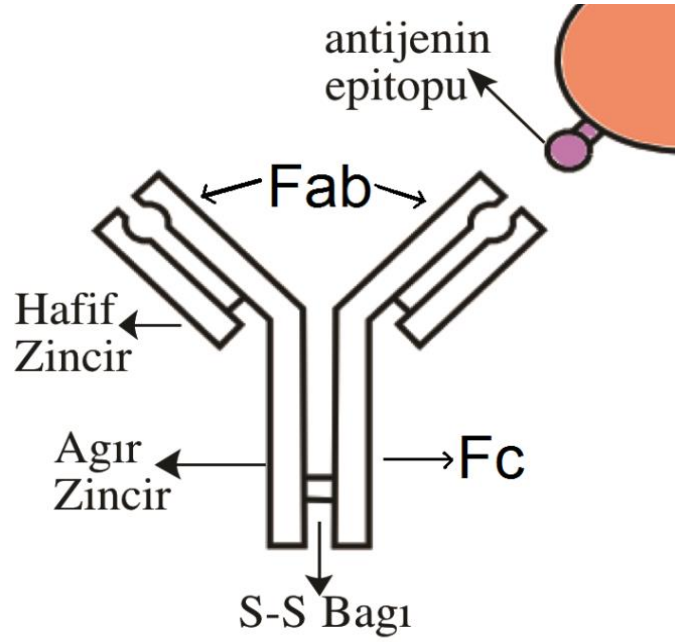
Bakım Gerektirme ve Tekrarlanma Süresi

Bilgi İşleme ve Depolama

Biyosensörü optimize ederken dikkat edilmesi gereken en önemli husus parçaların ve birçok diğer parametrelerin birbirleriyle etkileşimde bulunarak etkilenmelerini mümkün oldukça en aza indirmektir [20].

2.2 İmmünosensörler

Antikorlar, canlı vücuduna giren yabancı maddelere karşı üretilen ve immünglobulinler olarak bilinen glikoprotein yapısında bir immün sistem elemanıdır. Antikorlar genel olarak ağır ve hafif zincir olmak üzere iki farklı zincirden oluşmaktadır ve bir çift ağır ve bir çift hafif zincir, di-sülfit köprüleri ve kovalent olmayan etkileşimlerle Y şeklinde bir yapı oluşturmaktadır [21]. Antikorlar, kendilerine özgü olan antijenleri ile kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanmak sureti ile reaksiyona girmektedirler. Bu reaksiyon geri dönüşümlüdür ve parçalanmış kimyasal bulunmamaktadır. Antikorum antijen dışı farklı gruplarla etkileşime girme durumunda ise çapraz reaksiyon oluşumu gözlenir [22]. Antijenler üzerlerinde antikorların bağlandığı özel bölgeler bulundurmaktadır bunlara “epitop” adı verilmektedir. Antikorum şematik görünümü şekil 2.3’ te gösterilmektedir.



Şekil 2.3 Antikor yapısının genel gösterimi

Poliklonal antikorlar, antijen üzerindeki farklı epitoplara tanıyabilmektedir ve tipik olarak tavşan, keçi ve koyundan elde edilmektedir [23]. Monoklonal antikorlar ise, hibridoma teknolojisi [24] ile yaygın olarak fare kullanılarak üretilmektedir. Bu antikorlar ise antijenin tek bir epitopunu tanımaktadır bu yüzden yüksek antijen özgüllüğü gerektiren çalışmalar için monoklonal antikorlar daha uygun bulunmaktadır [22].

İmmüno-sensör, antijen ve antikor etkileşimini kullanan bir çeşit biyosensördür. Antikor ve antijeni arasında yüksek derecede özgül moleküler tanıma ve afinite olduğundan immüno-sensörlerin özgülüğü ve hassasiyeti genelde diğer sensörlere göre daha yüksektir [25]. Antikor ve antijenin afinite sabiti genellikle $10^8 M^{-1}$ 'dir ve $10^{15} M^{-1}$ 'lere kadar çıkabilmektedir ve bu değer biyoajan olarak kullanılabilen enzim gibi diğer moleküllerin afinite sabitinden ($10^6 M^{-1}$) oldukça yüksektir [25].

İmmüno-sensörler, immün sistem elemanlarından antijen ve antikorun tanıyıcı tabakada kullanıldığı, bu tabakadan gelen sinyallerin çevirici kısımda uygun verilere çevirilerek dijital ortama aktarıldığı sistemlerdir. Antijen-antikor etkileşiminden yararlanılan bu sistemde, bu etkileşimi çeşitli yollarla algılanılabilir sinyallere dönüştürebilen cihazlar kullanılmaktadır. Antikor antijen etkileşimi ile kütle, ısı, elektrik potansiyeli gibi özgül fizikokimyasal değişimler oluşturulmaktadır ve bu değişimler, immüno-sensörün çevirici kısmı yardımı ile kullanıcı tarafından

yorumlanabilecek sinyallere çevirmektedir [22]. Elektrokimyasal, manyetik, optik ve kütle değişimlerini algılayan çevirici türlerini içeren çeşitli immünosensörler bulunmaktadır. İmmünosensörlerin hassasiyeti, çevirici türünün özelliklerine ve antikorun kalitesine göre değişmektedir [22].

2.2.1 Elektrokimyasal İmmünosensörler

Elektrokimyasal immünosensörlerin prensibi, çevirici olarak kullanılan elektroda, özgül antikorunu bağlayarak, bu bağlanma olayını elektriksel sinyale çevirmektir [22]. Bu biyosensörler, genel olarak iki çeşit çevirici tipine dayanmaktadır; amperometrik, potansiyometrik.

2.2.1.1 Amperometrik

Çoğu amperometrik biyosensörler, üzerinde çalışılan elektrotta oksitlenebilen ya da indirgenebilen bir elektroaktif ürün oluşturan, enzim temelli sistemlerden yararlanırlar [22]. Bu yöntemin önceden belirlenmiş kalınlıkta üzerinde malzeme biriktirilerek üretilen tek kullanımlık elektrokimyasal elektrotların üretim kapasitesini içeren bazı dezavantajları bulunmaktadır [26].

2.2.1.2 Potansiyometrik Platformlar

Potansiyometrik biyosensörlerde, potansiyel sinyaldeki değişimden yararlanılmaktadır. Biyolojik molekülü tanıma süreci referans elektrot tarafından saptanır ve bu biyosensör formatı tipik olarak yarı geçirgen dış tabaka ve üreaz gibi bioaktif elementten oluşmaktadır [27].

2.2.2 Manyetik İmmünosensörler

Manyetik biyosensörlerde manyetik alan içinde saptanabilecek uygun ligantlarla kaplı manyetik boncuklar kullanılmaktadır [22]. Manyetik sistemlerin bazı avantajları vardır örneğin analiz için seçilen örneği kontamine eden maddelerinin manyetik özellikleri yoksa, spesifik olmayan sinyaller minimize edilmiş olmaktadır [22].

2.2.3 Optik İmmünosensörler

Optik çeviricilerle ışığın ya da floresansın ölçümüne dayanmaktadır. “Yüzey plazmon rezonansı” (SPR), hemisferik prizma ile altın gibi metalik yüzeylerin monokromatik ışık kaynağı tarafından aydınlatılması sonucunda oluşan doğal bir olaydır [22]. Ortaya çıkan serbest elektronlar, yankılanan ve ışık absorblayan

elektromanyetik dalgaları üretirler ve özgül dalga boyu ya da açı kırılma indeksinin fonksiyonu olarak bulunmakta ve çip üzerindeki kütle ile ilişkilendirilmektedir [22].

2.2.4 Kütle Hassas İmmünosensörler

Antikor ve antijenin oluşturduğu immüno etkileşimin özgüllüğü çok hassas olan doğal piezoelektrik çeviricilerle birleşince, güçlü temelli bir immünosensör geliştirilmiş olmaktadır [25]. Piezoelektrik esasında bir kütle dengesi olduğu için, immüno reaksiyonun direkt kütlece saptanmasında kullanılabilir. Kütlelerin direkt olarak saptanması, çoğu immünosensör formatının gerektirdiği etiketleme işlemini ya da cevap yaratmak için ikinci bir antikor kullanma ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır [25].

İmmünosensörlerin geliştirilmesinde piezoelektrik cihaz olarak “yığın akustik dalga” (BAW) ya da “yüzey akustik dalga” (SAW) kullanılmaktadır. SAW aletler, piezoelektrik tabla yüzeyine yerleştirilmiş, birbirine kenetlenmiş iki elektrottan oluşmaktadır ve alternatif akım bu elektrotlardan geçirildiğinde, piezoelektrik materyal üzerinde dalga başlatılmış olur [25]. Yüzeye kütle eklenmesi, dalga yoğunluğunda bir değişime neden olmakta ve böylece frekans değişimi olarak izlenilebilmektedir. SAW piezoelektrik aletlerde kullanılan kuvars kristaller genelde ST kesimdir ($-49^{\circ}00'$) dir ve frekansları 30-200 MHz arasında değişmektedir [25]. Teorik olarak SAW aletler BAW aletlere göre daha hassastır çünkü SAW aletler daha yüksek frekanslarda salınım yapabilmektedir ama bu iki aleti karşılaştırdığımızda pratik kullanımla ilgili problemler yaşandığı için, SAW aletler immünosensör geliştirme çalışmalarında çok az sıklıkla kullanılmaktadır [25]. BAW aletler ise genellikle AT kesim ($+35^{\circ}15'$) kuvars kristal disklerden oluşur [25]. Bu piezoelektrik kristaller genellikle altın ya da gümüş elektrotlar arasına sıkıştırılmış halde bulunmaktadır. Genel olarak bu kristaller 5-20 MHz rezonans frekanslarına sahip olmaktadır. Kristalin yüzeyindeki kütle miktarı değiştiği zaman, sabit olan frekans değişecektir. Yüzeyde biriktirilen kütle arttırıldıkça, frekansta bir düşüş oluşacaktır. İmmünosensör geliştirme çalışmalarında 10 MHz temel frekanslı kristaller sıklıkla kullanılmaktadır ancak yüksek frekanslı piezoelektrik kristaller en hassas olanlarıdır ancak çözelti içerisinde çalışılırken ağır bir madde yüklendiğinde sağlamlıklarında problem yaşanabilmektedir [25]. Düşük frekanslı kristaller ise daha az hassas olmalarında rağmen, sıvı çözeltilerin akış hücreindeki hareketinden ve yüzeye ağır molekül ağırlıklı kütle eklemelerinden

daha az etkilenmektedir. Kristal seçimi kullanılacak uygulama göz önünde bulundurularak, kristalin sağlamlığına ve hassasiyetine göre yapılmalıdır.

2.2.4.1 Tanıyıcı Tabaka Oluşturma Yöntemleri

Tanıyıcı tabaka oluşturulurken, tanıyıcı tabakada kullanılan biyomolekül olan antikorun yüzeye uygun biçimlerde ve aktif olacak biçimde bağlanması, antijeni ile uygun koşullarda ve pozisyonlarda etkileşmesi önemlidir.

2.2.4.1.1 Antikor İmmobilizasyonu

Kristal yüzeye antikorun doğru immobilizasyonu, sensörün bütün olarak performansının oluşturulmasında etkin rol oynayan önemli bir etmendir. İmmobilize tabakanın kararlılığı, uyum sağlayabilirliği ve yenilenebilirliği sensörün hassasiyetini, ömrünü, tekrar kullanılabilirliğini ve potansiyel uygulamalarını etkilemektedir [25].

İmmobilizasyonun özellikleri, immünoensörün sağlamlığı ve tutarlı sonuçlar alınabilmesi için gereken önemli bir faktördür. Bunu için sensör yüzeyine yapılacak olan kaplamanın uzun ömürlü olması gerekmektedir. Ayrıca yüzeye tutturulan biyomolekül tabakası yeterli ömre sahip olmalıdır. Yüzey ise kimyasal ve mekaniksel olarak sağlam olmalı, yıkamaya dayanıklı olmalı ve protein tabaka farklı koşullara dayanıklı olmalıdır [25]. Eğer sensör ticarileştirilmek isteniyorsa, çok sağlam tabakaların oluşturulması beklenmektedir, bu tabakalar basit depolama koşulları altında en az bir yıla kadar kararlı kalabilmelidir [25].

İmmobilize antikorun oryantasyonu, sensör hassasiyeti için çok önemli bir parametredir. Yüksek derişimlerde immobilize edilen antikorlar her zaman yüksek hassasiyet gösteremez. İmmobilize antikorlar rastgele biçimde yüzeye immobilize edilmişse, antikorların bir kısmı antijen bağlamak için uygun düzende bulunmayabilmektedir. Düzenli bir şekilde immobilize edilmelerine rağmen antikorlar “Fab” kısımlarından immobilize edilmişse, kısmen ya da tamamen aktivitelerini yitireceklerdir bu yüzden en çok istenilen immobilizasyon yöntemi ise antikorların “Fc” bölgelerinden bağlanmasıdır [25]. Böylece antikorların bağlanma kısımları düzgün yerleştirilmiş olup, antijen bağlayıcı kısımları antijen içeren çözeltiye doğru uzanmış halde olacaktır.

Farklı kristallerde tekrar edilebilir immobilizasyon tabakası üretimi de immünoensör için önemlidir. Benzer kristaller toplu halde yapılandırılabilir olsa

bile, toplu oluşturulan bu kristallerin de tekrar yapılandırılabilir olması gerekmektedir. İmmobilize edilecek tabakalar birbirlerinden az miktarda farklı ise, her kristalin hassasiyeti az miktarda farklı olur ve bu durum hatalar yol açabilir bu yüzden genelde uygulanabilen en kolay metotlar insan müdahalesini en az gerektiren metotlardır çünkü bunların tekrar edilebilirliği yüksektir [25].

Yüzey kaplamasının homojenliği ya da dağıtımı hassasiyetin altın elektrot merkezinde daha yüksek olmasından dolayı çok önemlidir bu yüzden en hassas piezoelektrik kristaller, merkezine daha çok bağlanılabilen kristaller olacaktır [25] Yani aynı miktarda kenarlarında daha çok biyomolekül bağlayabilen kristallerin hassasiyeti, orta kısımlarına daha çok bağlanılabilene göre daha düşük olacaktır.

İmmobilize antikorun miktarı da sensörün hassasiyetini etkileyen çok önemli bir faktördür. İmmüno-sensörün yeterli miktarda antikor bağlayabilecek potansiyele sahip olması gerekmektedir, çünkü genelde bir problem yaratmamasına rağmen aşırı miktarda immobilize edilen antikorlar sterik engel yaratarak sensörün hassasiyetini azaltabilmektedir [25].

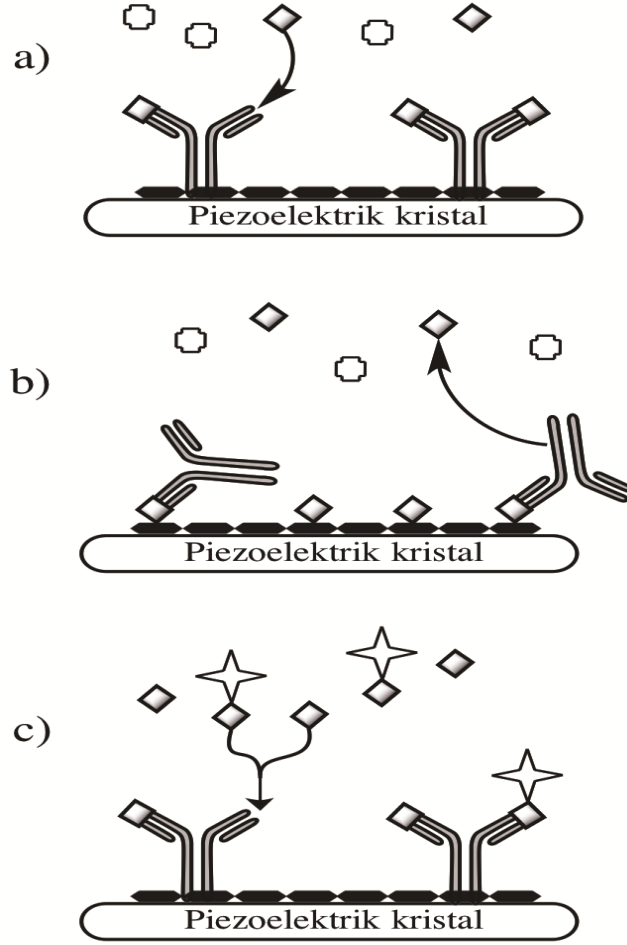
Yüzeye antikor immobilizasyonunda çeşitli immobilizasyon teknikleri kullanılmaktadır. Antikor genelde immüno-sensör yüzeyine kovalent olmayan etkileşimlerle ya da kovalent etkileşimlerle immobilize edilebilmektedir. Kovalent olmayan metotlardan bahsedecek olursak, antikor immobilizasyonunda kullanılan ve en basit metot olarak bilinen fiziksel adsorbsiyonu içermektedir. Bu yöntem antikor çözeltisinin yüzeye eklenmesini ve yüzeyin adsorbsiyonunun sağlanmasını içermektedir. Antikorlar yüzeye "van der Waals", hidrojen ve hidrofobik etkileşimlerle bağlanmaktadır [25]. Altın yüzeylerde antikorların yüzeye immobilizasyonuna tiyol grupları yardımcı olmaktadır. Bu yöntem antikorun üç boyutlu yapısına herhangi bir etkide bulunmamaktadır. Yine de bu yöntemde rastgele yerleştirilmelerden dolayı kaynaklanan bazı aktivite kayıpları ortaya çıkabilmektedir.

Kovalent bağlanmalar, adsorbsiyona göre daha kararlı tabakalar oluşturur. Ancak bu yöntem uzun ve karmaşık immobilizasyon yöntemleri içermektedir. Kovalent bağlanma sonucu antikorlarda en iyi sağlamlık ve genişlemiş kullanım ömrü gözlemlenmekte, çözeltiler yüksek iyonik özelliğe sahip olmadıkları sürece yüzeylerden neredeyse hiç antikor kaybı görülmemektedir [25]. Genel olarak

bağlanmalar yüzeylerde oluşturulan aktif bağlama grupları arasında gerçekleştirilmekte böylece antikorun aktivitesinde bir değişiklik olmamaktadır.

2.2.4.1.2 Antijen - Antikor Etkileşimleri

Antijen ve antikorun, piezoelektrik immüno-sensör sistemleri aracılığı ile birbirleriyle etkileşimi için bazı yöntemler kullanılmaktadır. Tutuklama, yer değişimi ve rekabet gibi etkileşimleri içeren bu yöntemler şekil 2.4' te özetlenmiştir.



Şekil 2.4 a) Direkt tutuklama yöntemini, b) yer değişimi yöntemini, c) rekabet yöntemini temsil etmektedir [25].

Direkt tutuklama yöntemi immüno-sensörlerde sıklıkla kullanılan bir etkileşim yöntemidir. Öncelikle etiketsiz uygulamadan yararlanan basit formatı piezoelektrik çeviriciler için avantaj yaratan bu yöntem özgül antikorun yüzeye immobilizasyonu ile oluşturulan altın yüzeyin modifikasyonunu içermektedir [25]. Antikor ile kaplanmış piezoelektrik kristal, antijenini içeren çözeltiliye daldırıldığında, antijen bağlanması frekans değişimine neden olacaktır. Böyle bir durumda oluşan frekans değişimi, eklenen kütle ile böylece analit derişimi ile orantılı olmaktadır.

Direkt olmayan tutuklamalar kullanılabilir. Bu yöntem genellikle biyoajan derişiminin tespit edilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Direkt olmayan tutuklamalarda antijen yüzeye immobilize edilmektedir. Böylece çözeltilerden anikoronun yüzeye tutuklanması amacı ile kullanılmaktadır. Önceden kaplanmış kristaller de çözeltilere yerleştirilerek maddedeki özgül analitin derişimi dakikalar içinde saptanabilmekte ve bu yöntemde fazladan deney aşamalarına ya da yıkama basamaklarına ihtiyaç olmamaktadır [25].

Tutuklama yöntemi ile oluşturulan immünosensörler, sahada analizlerde kullanılmak için portatif sensörlerin geliştirilmesinde kısmen kullanışlı olmaktadır. Önceden kaplanarak hazırlanmış kristaller, portatif aletlerle uzman personele ihtiyaç olmadan kullanılabilir.

Yer derişimi yöntemi, analit yeterli ağırlığa sahip olmadığında sıklıkla antikoron büyük olan kütesinden yararlanılarak önemli frekans derişimlerine neden olabilecek sistemler için kullanılmaktadır [25]. Bu yöntemde kristal, uygun immobilizasyon tabakaları ile oluşturularak antijen immobilize edilmesi için modifiye edilmektedir. Yüzeye antijen immobilize edildikten sonra, onunla etkileşecek antikoru daha sonra yüzeye eklenmektedir. Yüzeye tutuklanan antikor, çözeltideki serbest antijene yüksek afinite gösterecek ve immobilize antijenle yer deriştirecektir ve kütledeki toplam derişim, serbest analit derişimi ile orantılı olacaktır [25]. Antijenine göre daha yüksek molekül ağırlığına sahip olan antikor sayesinde, düşük molekül ağırlıklı analitlerin ölçülmesi kolaylaştırılmaktadır.

Düşük moleküler ağırlıklı molekülleri saptamada kullanılan diğeri bir yöntem ise rekabettir. Bu yöntemin avantajı ise, sıklıkla biyomolekül etiketlemelerinin kullanılıyor olmasıdır, yöntem için sıklıkla hazır olarak bulundurulan konjuge işaretli biyomoleküller kullanılmaktadır [25].

Yarışmalı format da, direkt tutuklamalarda olduğu gibi hazırlanmaktadır. Antikor immobilize kristal, antijen içeren çözeltiler ve konjuge antijen içeren çözeltilerin karışımına maruz bırakılmaktadır. Konjuge antijen, immobilize anikoru özgül olarak bağlayarak frekans derişimi oluşturmaktadır ve serbest analit derişimi arttırıldığında immobilize antikoron özgül bağlanma kısımları için konjuge analitle daha çok yarışacak, böylece frekans derişimleri elde edilecektir [25].

2.2.4.2 Ölçüm Yöntemleri

QCM immüno-sensör analizleri genelde sıvı fazda yürütülmektedir. Ölçümler ise daldırıp kurutmak ya da direkt çözeltide ölçüm olmak üzere iki farklı yolla gerçekleştirilmektedir [25].

Daldırıp kurutma yöntemi kristalin havada kurutulmuş frekansının ölçülmesi esasına dayanır. Bağlanma ya da immobilizasyonun tamamlanmasını sağlayacak yeterli süreden sonra kristaller yıkanır ve kurutulur, frekanslar kuru halde hava ortamında tekrar kayıt edilir [25]. Çeşitli işlemlerden önceki ve sonraki frekans farkının alınması ile elde edilen frekans değişimi, yüzeye tutuklanan edilen örneğin derişimi ile orantılıdır. Daldırıp kurutma yöntemi, kristalin iki tarafının kullanılabilirdiği zamanlarda avantaj oluşturmakta, ayrıca bu yöntemde vizkozite gibi çözelti etkenleri elimine edilmektedir [25].

Direkt çözeltide yapılan ölçümlerde çevresel değişimlerden daha az etkilenilmekte ve daha çok tekrar edilebilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Akış hücresinde sıvının akışından dolayı sensörün hassasiyeti azaltılmaktadır. Üzerinde tabaka oluşturulan kristalin çözelti içerisindeki frekans değişimi cevabı vizkozite, sıvının sıcaklığı ve immobilize tabakanın kalınlığı gibi birçok faktöre bağlı olmaktadır [25]. Direkt analizler genelde akış hücreleri ile gerçekleştirilmektedir. Akış hücreleri, kristalin ön tarafında bulunan iletken yüzeyin çözelti ile etkileşimini sağlamaktadır. Analizler durgun ya da akış halindeki çözeltilerle yürütülebilmekle birlikte akış içerisindeki çözeltilerin kullanımı çok fazla hacimde örnek yüzeyden geçirildiği için sensörün hassasiyetini arttırmaktadır [25].

2.3 Elektro-Eğirme

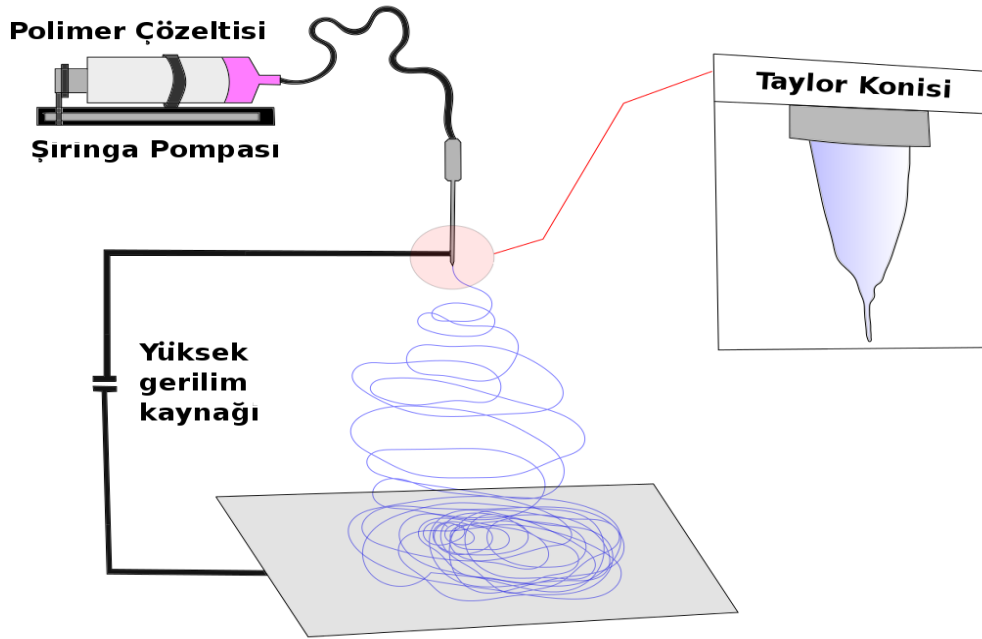
Nanolifler, yüzey alanlarının hacimlerine oranı çok yüksek olup, yüzey fonksiyonları esnek ve daha büyük liflere göre daha üstün mekanik özelliklere sahiptirler [28]. Nanoliflerin uygulama alanlarından bazıları: doku mühendisliğinde iskele oluşturma, filtreleme cihazları, sensörlerdir [29].

Nanolifler, yüzey alanları arttırılmış olmalarından dolayı birçok bilimsel uygulama alanlarında kullanılabilirler. Polimer lif malzemelerin çapları nanometre değerlerine indirildiğinde yüksek yüzey alanı hacim oranları, yüzey fonksiyonlarında esneklik, diğer bilinen malzeme formlarına göre daha üstün

mekaniksel performans göstermeleri gibi yeni karakteristik özellikler göstermektedir [30].

2.3.1 Çalışma Prensibi

Elektro-eğirme nanolif üretmek için uygun bir tekniktir [31]. Elektrostatik kuvvetler vasıtasıyla liflerin eğirme süreci elektro-eğirme olarak bilinir. Elektro-eğirme yöntemiyle mikronaltı seviyede lif üretilmektedir [32]. Elektro-eğirme yöntemi ile lifler elektriksel kuvvet vasıtasıyla üretilmektedir. Polimer çözeltisinden elektro-eğirilmiş lif elde etmek için, genellikle su gibi uçuculuğu düşük olan çözücüler kullanılır. Polimer çözeltisi damlasına yüksek gerilim uygulanmaktadır, damla yüzeyindeki yük damlanın yüzey gerilimini aştığında damladan ince bir jet elektroda bağlı metalik yüzeye doğru uzanır [33]. Elektro-eğirme yöntemi için kullanılan cihaz basit bir yapıya sahip olup, negatif ve pozitif polariteye sahip yüksek gerilimli elektrik kaynağı ve çözeltiyi şırıngadan alüminyum gibi iletken toplayıcıya tüplerden ya da kılcallardan taşıyan şırınga pompasından oluşur [34]. Elektro-eğirme sürecinin şematik gösterimi şekil 2.5' te görülmektedir.



Şekil 2.5 Elektro-eğirme sisteminin şematik gösterimi

Lifin çapı ve morfolojisi çözelti içeriği, uygulanan gerilim, toplayıcı uzaklığı ve tipinin dahil olduğu elektro-eğirme süreci değişkenlerinin tümüne bağlı olarak değişir [33]. Jet oluşumu süreci üzerinde temel çalışmalar 1960' lı yıllarda Taylor tarafından başlatılmıştır. Taylor 1969 yılında elektrik alanın uygulanmasıyla iğne

ucunda oluşan polimer damlanın şeklini incelemiş ve konik bir şekle sahip olup jetlerin koninin ucundan çıktığını göstermiştir [35]. “Taylor Konisi” olarak adlandırılan bu şekil lif oluşumu sürecinde genişlemeli hız gradiyentin başlangıcını tanımladığından önemlidir [36].

2.3.2 İşlem Parametreleri

Elektro-eğrilmiş nanolif yapısını etkileyen bazı değişkenler vardır. Bunlar, polimer çözeltisi parametreleri, uygulanan gerilim sıcaklık ve toplayıcı etkisini kapsayan süreç parametreleri ve ortam parametreleri olmak üzere sınıflandırılabilir.

2.3.2.1 Çözelti Parametreleri

Elektro-eğirmede polimer, çözelti haline getirilmektedir. Elektro-eğirmeyi etkileyen polimer çözeltisi parametreleri diğer parametrelere göre daha önemlidir. Genellikle yüksek moleküler ağırlıklı bir polimerin çözücünde çözünmesi, daha düşük moleküler ağırlıklı aynı polimerin çözünmesine göre çözeltinin viskozitesi daha yüksek olur. Çözünenin moleküler ağırlığının artması çözeltinin derişiminin artması ve vizkozitenin artması ile özdeştir. Bu durum elektro-eğirme esnasında jetin sürekliliğinin sağlanması ve damlacık oluşumun engellenmesi için gerekli olan çözelti içinde daha çok polimer zinciri dolaşıklığına neden olmaktadır [37]. Minimum miktarda polimer zinciri dolaşıklığı ve dolayısıyla viskozitenin elektro-eğirme için gerekli olmasına rağmen, viskozitenin fazla yüksek olması çözeltinin şırınga iğnesinden pompalanmasını zorlaştırır. Öte yandan vizkozitenin yeteri kadar yüksek olması lif çapların artmasına neden olabilen ikincil jetlerin ana jetten koparak oluşumunu engelleyebilir. Yüksek derişimin etkisi de daha küçük biriktirme alanıyla gözlenir. Arttırılmış derişim, çözeltinin viskozitesinin iğne ucundan çıkan jetin bükülme kararsızlığının başlangıç mesafesini arttıracak kadar güçlü olması anlamına gelir [37]. Sonuç olarak jet yörüngesi kısalır, bu kısalmış jet yörüngesi aynı zamanda çözeltinin daha az esnek olması anlamına gelir ve daha büyük lif çapı oluşumuna neden olur [37]. Elektro-eğirmenin başlangıcı yüklü çözeltinin yüzey gerilimini aşmasını gerektirir. Etanol gibi yüzey gerilimi düşük olan çözücü eklenerek pürüzsüz liflerin oluşumu desteklenir [37].

Elektro-eğirme yüzeydeki yüklerin birbirlerini itmesi çözeltinin uzamasına yol açmaktadır. Dolayısıyla çözeltinin iletkenliği arttırıldığında elektro-eğirme jeti ile daha çok yükler taşınabilir. Çözeltinin iletkenliği iyonların eklenmesiyle

arttırılabilmektedir. Bu yüzden, az miktarda tuz çözeltiye eklendiğinde çözelti tarafından taşınan artan yük miktarı çözeltinin esnekliğini artırır [37]. Bunun sonucunda boncuklu lif oluşumu yerine sürekli lifler oluşur. Ayrıca, arttırılmış çözelti esnekliği daha küçük çaplı lif oluşumuna katkı sağlar. Yüksek iletkenliğe sahip çözücü ile hazırlanan çözeltiler genellikle boncuksuz lif oluşumunu sağlamakta olup, iletken olmayan çözeltilerde ise lif oluşumu gözlenmemektedir [37]. İyon boyutlarının, liflerin morfolojisi üzerinde etkisi olabilir örneğin küçük iyonlar elektro-eğirme jeti üzerinde daha yüksek boyuna kuvvet oluşturması nedeniyle daha küçük çaplı liflerin oluşmasını sağlar [37]. İletkenliği arttırmanın başka bir yöntemi de çözeltinin pH değerini değiştirmektir. Elektro-eğirme selüloz asetat çözeltisi, bazik ortamda nötral ortama göre lif çapında belirgin bir azalmaya neden olmaktadır [38]. Bazik ortamda selüloz asetat deasetilasyona uğradığından, OH iyonlarının çözeltinin iletkenliği ve esnekliği üzerinde daha büyük bir etkisi olabilir.

Çözelti dielektrik sabitinin elektro-eğirme üzerinde önemli derecede etkisi vardır. Genel olarak yüksek dielektrik sabiti olan bir çözelti boncuk oluşumunu ve elektro-eğirilmiş lifin çapını azaltmaktadır. Çözeltinin dielektrik özelliğini arttırarak lif morfolojisini geliştirmek için çözeltiye “N,N-dimetilformamid” (DMF) gibi çözücüler eklenebilir [37]. Elektro-eğirmede lifin bükülme kararsızlığı da dielektrik özelliğinin artmasıyla artar. Bu durum liflerin biriktirme alanının artmasıyla oluşturulmaktadır. Ayrıca bu durum jet yörüngesinin artması nedeniyle lif çapının azalmasına da neden olmaktadır.

2.3.2.2 Süreç Parametreleri

Bu değerler çözelti parametrelerinden daha az önemli olmasına rağmen lif yapısı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Uygulanan gerilim ve sonucunda ortaya çıkan elektrik alan esneme, gerilme ve hızlandırma değerlerine etki ederek liflerin biçimsel oluşumlarında önemli bir etki oluşturmaktadır [37]. Gerilim değeri arttıkça çözeltide elektriksel kuvvetler arttığı için elektrik alan ve etkisi arttıkça parçacık boyutunda liflerde daha büyük esneme ve gerilme oluşmaktadır [37]. Gerilimin arttırılması lifin çapının azalmasının yanında daha çözücünün hızlı buharlaşmasını sağlamaktadır. Lif çapını etkileyen diğer bir sebepte elektro-eğirme jetinin uçuş süresidir. Uzun uçuş süresi birikme düzleminde toplanma olmadan önce daha çok

lifin esnemesine neden olmaktadır. Bu sebeple, kritik değerlere yakın gerilim uygulanması düşük çaplarda lif oluşmasını sağlamaktadır.

Toplayıcının sabit olup olmaması da elektro-eğirme yöntemi uygulama sürecinde önemli bir etkiye sahiptir. Toplayıcı levha olarak makara sistemi kuru ve düzenli yerleşmiş lifler toplamak ve oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu sistemde çözücü liflerden daha hızlı ayrılmakta ve buharlaşması için yeterli sreye sahip olmaktadır. Bu tarz dönen bir toplayıcı özellikle özel lif ihtiyacı olduğunda liflerin şekil oluşum kalitesini artırmaktadır [37].

şıringa iğnesi i tarafının çapı da elektro-eğirme üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Düşük i çapa sahip iğnelerle daha ince lif elde edilebilmektedir. Ancak polimer çözeltisi kuruyup tıkanmalar yapabilmekte, bu durum da eğirilmif fiberlerin dış görünümünde önemli bozukluğa neden olmaktadır. Tıkanmalar ise polimer çözeltideki çözücü oranını arttırılarak giderilebilir.

Birçok durumlarda eğirilme süresi ve elektrik alan kuvveti elektro-eğirme sürecini etkilediği bilinmektedir. Aynı zamanda u ve toplayıcı arasındaki değişken uzaklık değerleri uçuş süresi ve elektrik alandan etkilenmektedir [37]. Ayrık lifler elde edebilmek için çözücülerin tamamının buharlaştırılması gerekmektedir. İletken levha ve şıringa iğnesi arasındaki uzaklık azaltıldığında ise, çözücünün buharlaşma vakti azaltılmif olmaktadır. Bu yüzden yapifık ve düzensiz dış görünümlü lifler elde edilebilmektedir.

2.3.2.3 Ortam Parametreleri

Nemlilik elektro-eğirme işlemi sırasında polimer çözücünün performansını etkileyebilmektedir. Yüksek nemli ortamdaki normal ortama taşınan liflerde su yoğunlaşması lif yüzeyinde gözlemlenmektedir [37]. Ortamın nem değeri çözelti içerisindeki çözücünün buharlaşma miktarını belirlemektedir. Nem oranı düşük olan ortamlarda çözelti daha çabuk buharlaşmaktadır. Bu ortamlarda iğne tıkanmaları daha az oluşmakta ve elektro-eğirme süreci daha hızlı gerçekleşmektedir.

Kapalı elektro-eğirme sistemlerde, sıcaklık, nem, basıncı kontrolü gerçekleştirilmektedir. Basıncın düşürülmesi iğne ucundaki çözeltide akmalara neden olmakta bu da koni oluşumunu engelleyebilmektedir.

2.3.3 Elektro-Eğirilmiş Selüloz Asetat (CA) Lifler

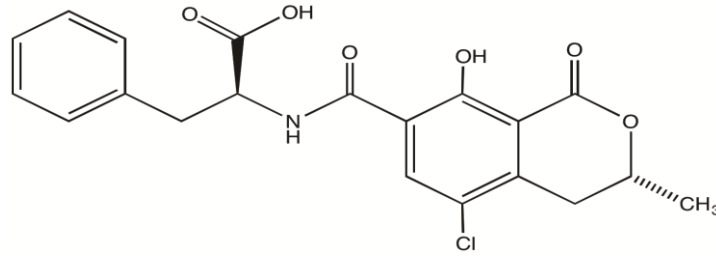
Selüloz, bitkilerde bulunmasından dolayı dünyada yaygın olarak kullanılan bir polimerdir. Tekstil, kâğıt ve yiyecek sanayide uzun yıllardır kullanılmaktadır. Sentetik plastiklerin icadından sonra selüloza olan ihtiyaç azalmıştır. Ancak, doğa dostu özelliğiyle yani yenilebilirlik, sürdürülebilirlik ve doğada kolayca parçalanabilirlik özelliklerinden dolayı yeniden önem kazanmıştır. Nano boyutta selüloz lifleri doku iskelesi, yara sargılama ve filtreleme gibi birçok önemli uygulamalarda kullanılabilir. Elektro-eğirilmiş selüloz lifleri oluşturmak için genelde selüloz asetattan yararlanılmaktadır. Selüloz asetat kolaylıkla çözelti haline getirilebilmekte ve selüloza dönüşebilmektedir. Biyolojik olarak aktif maddelerin hareketsizleştirilmesinde, ilaç yüklü elektro-eğirilmiş maddelerde, hücre kültürlerinde ve doku mühendisliğinde, nano materyal yüklü antimikrobiyal dokularda, biyo ayırıştırma ve arıtma gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır [39].

2.4 Okratoksin A (OTA)

Gıdalarda mikrobiyal kaynaklı toksik bileşikler, bakteri toksinleri ve mantar toksinleridir. Gıdalar üzerinde üreyen küfler, bu ürünlerde insan ve hayvanlara toksik etkili metabolitler oluşturmaktadırlar. Bu metabolitlere mikotoksin adı verilmektedir. Mantarlar insan için yararlı olan antibiyotik ve fermentasyon ürünleri gibi bazı ikincil metabolitler üretirler. Ancak mantarların çeşitli metabolitleri canlı hücreler için toksiktir. Bu toksinler çeşitli besin maddelerinde, üretim ve depolamadaki çevresel koşullara bağlı olarak bulunabilmektedir. Okratoksin, *Aspergillus* ve *Penicillium*' un bazı türleri tarafından üretilen bir mikotoksindir [1]. Bu grubun ana toksini diğerlerine göre daha toksik olan ve daha yaygın görülen OTA' dır.

2.4.1 Okratoksin A Yapısı

Mantarların ikincil metabolitlerinden olan okratoksinler, "izokumarin" kısmı ve amid bağ ile bağlı "fenilalanin" kısmından oluşmaktadır. OTA, klorlanmıştır bu da doğal ürünlerde pek karşılaşılmayan bir özelliktir [40].



Şekil 2.6 OTA moleküler yapısı

Okratoksin B (OTB), OTA gibi klorlanmamıştır. Okratoksin C (OTC) ise, OTA' nın etil esteridir, OTB ve OTC' ler daha az toksik olduğu için sensör çalışmalarında daha az yaygın olarak kullanılmaktadır [40]. Bu yüzden okratoksinle alakalı çoğu çalışma, okratoksin A tayinine yöneliktir.

2.4.2 Analiz Teknikleri

Okratoksin A, bazı tahıllar, bira, şarap, kakao, kahve gibi gıdaların yanı sıra hayvan yemi kontaminasyonu sonucu et ürünlerinde de bulunabilmektedir [2]. OTA' nın temel etkisi nefrotoksisitedir ve insanlarda “Balkan Endemik Nefropatisi” adı verilen böbrek hasarına neden olmaktadır [2]. Avrupa birliği ülkelerinde [3] ve Türkiye’ de bazı gıdalarda okratoksin A için maksimum limitler belirtilmiştir [4]. Bu limitler Türkiye için 0,5-10 µg/kg arasında değişmektedir. Ülkemizde yetiştirilen tarım ürünlerindeki Okratoksin A varlığı ve bu mikotoksinin düşük miktarlarının insan sağlığına verdiği zararlar nedeni ile getirilen yasal sınırlamalar hassas tekniklerle okratoksin A tayini gerekliliğini arttırmıştır.

Okratoksin A' nın insan ve hayvan sağlığı açısından önemli bir mikotoksin olması nedeniyle, gıda ve yemlerde miktarının belirlenmesi için çeşitli kromatografik ve immünokimyasal metotlardan yararlanılmaktadır. Bu yöntemlerin en çok kullanılanları arasında ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), enzim-bağlı-immün assay (ELISA) sayılabilir. İnce tabaka kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografi yöntemlerinin uzun zaman alması, örneğe kapsamlı bir temizleme işlemi uygulanması, çok fazla miktarda çözeltiyle çalışılması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır [5]. ELISA yönteminin ise basit olması, kısa sürede çok sayıda analiz yapılabilmesi, fazla solventle çalışılmaması gibi avantajları bulunmaktadır. Buna karşın, mikotoksinlerin ürüne homojen bir şekilde yayılmamasından dolayı, ELISA yönteminde az miktarda örnek kullanılması en önemli sorunu oluşturmaktadır [6].

2.5 Tez Çalışmasında Kullanılan Yüzey Analiz Yöntemleri

2.5.1 Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi - Azaltılmış Toplam Yansıma (FTIR-ATR)

“Fourier transform infrared spektroskopisi” (FTIR) kızılötesi ışınları kullanarak örnek üzerinde moleküler bağlar üzerinde titreşim oluşturup yansıma oluşması sonucu değişen frekansı tespit edip bu değişim miktarına göre görüntüleme yapan sistemdir [41]. Bu tür spektroskopi genellikle kimyasal bağlar içeren ve bu bağlar hakkında detaylı bilgi gerektiren örneklerin incelenmesinde kullanılmaktadır. Bu spektroskopide kızılötesi ışın öncelikli olarak yüksek yansıma indeksine sahip kristal içerisinden örnekle buluşmaktadır. Örneğe ulaşan ışınlar 1-2 mikron derinliğinde örneğe nüfuz edip yapısal özelliğinden kaynaklanan kırınım sonucunda değişen ışın hüzmesi toplanarak optik alıcılardan alına görüntü işlenerek kullanıcıya sunulmaktadır.

2.5.2 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Vakumlu bir ortamda elektron huzmesinin örnek materyal ile etkileşime girerek bu etkileşim sonucu manyetik ve elektrik dalgaların yayılması sonucu ve bu yayılımın alıcılar tarafından toplanarak yüksek çözünürlükte grafiksel olarak gösterilmesi sistemine denir.

SEM de bir örneği incelemek için belli başlı adımlar vardır. Bu adımların en önemli si ve başlıcası örnek hazırlama adımıdır. Metalik kaplama yapılması gereken örnek çok ince nanometre kalınlığında bir altın, platin veya paladyum alaşımlı metalik film ile kaplanır [41]. Odaklanmış elektronlar örnekle ilişkilendirilip sinyal ve ışımaya yol açmaktadır. Bu sinyal işaret işleme yöntemi ile gözle görülebilir şekiller oluşturulmaktadır.

3 MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, kütle hassas biyosensörlerin performansını doğrusallık ve hassasiyet bazında arttırmak amacı ile, yüzeyi elektro-eğirme yöntemiyle arttırılmış kuvars kristal mikroteraziler (ES-QCM), okratoksin A (OTA) miktar tayini için çevirici olarak kullanılmıştır. Yüzeyi işlem görmemiş “boş” kuvars kristal mikroteraziler (QCM) ile yüzeyi arttırılmış “ES-QCM” ler, okratoksin A molekülü ile etkileşime seçici olarak giren okratoksin A antikoru (anti-OTA) ile kaplanmış ve hazırlanan bu iki immünosensörün performansı karşılaştırılmıştır. Seçiciliği test etmek için sitrinin kullanılmıştır. Tez kapsamında sunulan çalışma dört ana başlıkta incelenebilir:

1. Elektro-eğirme çalışmaları
2. Elektrot yüzey kimyasal aktivasyonu
 - 2.1. Boş QCM altın yüzeyinde aldehit grubu oluşturma
 2. ES-QCM yüzeyinde aldehit grubu oluşturma
3. Tanıyıcı tabakanın oluşturulması
4. İmmünosensörün performansının belirlenmesi

Tez kapsamında QCM yüzeyinin elektro-eğirme yöntemi ile arttırılarak performansının arttırılması, böylece düşük derişimlerde OTA miktarlarının sistem tarafından algılanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda öncelikle selüloz asetat CA lifler işlem parametreleri (gerilim, levhalar arası uzaklık) değiştirilerek ince ve boncuksuz bir biçimde elde edilmiş böylece ES-QCM oluşturulmuştur. QCM performansını yorumlayabilmek için hem yüzeyi elektro-eğirme ile arttırılmış QCM yüzeylerinde, hem de boş QCM yüzeylerinde aldehit fonksiyonel grubu oluşturulmuştur. Boş QCM’ de aldehit grubu oluşumu için öncelikle yüzeyde sisteamin ile amin grubu oluşturulmuş, bu grupla bağ yapması için yüzey glutaraldehit ile etkileştirilmiş ve böylece yüzeylerinde antikorda bulunan amin grupları ile tepkimeye girebilecek aldehit grubu elde edilmiştir. ES-QCM’ ler için ise liflerden öncelikle asetil gruplarının ayrılması gerçekleştirilmiştir. Deasetillenen lifler sonrasında sodyum periyodat ile oksitlenerek yüzeylerinde aldehit grubu oluşturulmuştur. Aldehit grubu oluşturulan ES-QCM yüzeylerine anti-OTA çözültisi

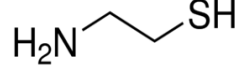
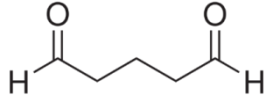
damlatılarak, yüzeye antikor immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra, ES-QCM' lere ve boş QCM' lere öncelikle molekül ağırlığındaki farklılığın etkisini azaltmak amacı ile sığır serum albümin bağlı oktatoksin A (OTA-BSA) immobilize edilmiştir. QCM ile etkileştirilen farklı derişimlerdeki toksinlerin oluşturduğu frekans değişimleri tablo edilerek boş QCM ve ES-QCM için OTA-BSA kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve bu iki eğri karşılaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra ES-QCM' in sadece OTA içeren çözeltilerle (0,5-20 ng/ml) etkileşmesi gerçekleştirilmiş, immobilizasyon sonucu oluşan frekans değişimlerinden yararlanarak ES-QCM' in OTA için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. QCM' in seçiciliğini test etmek için ise OTA çalışmalarında yaygın kullanılan sitrinin (100, 250 ng/ml) kullanılmıştır. ES-QCM' ler 10 ng/ml OTA-BSA ile etkileştirildikten sonra, anti-OTA' larının bir bölümünün tanıyıcı bölgesi açıkta olan immünosensör, 100 ve 250 ng/ml sitrinin ile etkileştirilip, frekans değişimleri incelenmiştir.

3.1. Materyal

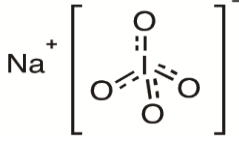
Altın yüzeyde fonksiyonel grup oluşturmak amacı ile sisteamin (cys) ve glutaraldehitin (glu) sulu çözeltileri (%25 v/v), aldehit amin etkileşimini güçlendirmek için kullanılan sodyum siyanoborohidrit, altın yüzey alanını arttırmak için kullanılan selüloz asetat (asetil içeriği %39,8), selüloz asetatı çözmek için kullanılan N,N-dimetilasetamid ve aseton, selüloz asetat liflerin deasetilasyonu için kullanılan potasyum hidroksit ve oksidasyonu için kullanılan sodyum periyodat Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, USA) firmasından satın alınmıştır. İmmünosensörün tanıyıcı tabakasını oluşturacak olan *Aspergillus ochraceus* Okratoksin A antikorunu GenWay Biotech, Inc (San Diego) firmasından temin edilmiştir. Antijen olarak kullanılan OTA (*Aspergillus ochraceus*) ve Ochratoxin A-BSA conjugate (*Aspergillus ochraceus*) Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, USA) firmasından satın alınmıştır. Oluşturulan immünosensörün seçiciliğinin test edilmesinde kullanılan sitrinin ise, Santa Cruz Biotechnology, Inc (US & Canada) firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan bütün kimyasallar analitik standartlardadır.

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar ya direkt altın yüzey modifikasyonu için ya da selüloz asetat lif modifikasyonu için kullanılmıştır. Bu araştırmada kullanılan bazı kimyasalların molekül formülleri çizelge 3.1 ve çizelge 3.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Altın yüzey modifikasyonunda kullanılan kimyasalların kapalı ve açık formülleri

Kimyasal	Kapalı Molekül Formülü	Açık Molekül Formülü
Sisteamin	$\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	
Glutaraldehit	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$	

Çizelge 3.2. CA lif modifikasyonunda kullanılan kimyasalların kapalı ve açık formülleri

Kimyasal	Kapalı Molekül Formülü	Açık Molekül Formülü
Potasyum hidroksit	KOH	$\text{K}-\text{OH}$
Sodyum periyodat	NaIO_4	$\text{Na}^+ \left[\text{IO}_4 \right]^-$ 

Tez çalışmasında hazırlanan kütle hassas sensörde çevirici olarak, kararlı yapısı ve yüksek sıcaklıklarda piezoelektrik özelliklerini kaybetmemeleri nedeniyle Maxtek Inc., (ABD) firmasından temin edilen kuvars kristaller kullanılmıştır. Eylemsiz olmaları nedeniyle altın elektrotlu, rezonans frekansı 5 MHz olan ve BT kesimden daha kararlı ve sıcaklık katsayıları $1 \text{ ppm}/^\circ\text{C}$ olan AT kesme tipi kristaller tercih edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Kuvars kristal mikroterazinin ön ve arka görünümü

Çalışmada kristal tutucu (CHC 100C Holder) Maxtek Inc. (ABD) firmasından temin edilmiş olup 10 cm uzunluğunda, CPVC yapısındadır. Deneylerde kullanılan QCM kristal frekansları 5 MHz, AT kesim, parlatılmış ve mat yüzeyli titanyum/altın kaplamadır. Sıvı ortamda QCM ile biyomolekül etkileşimi için akış hücresi (Maxtek Ltd. FC-550) kullanılmıştır.

Kuvars kristal yüzey alanlarını arttırmak amacı ile QCM yüzeyi elektro-eğirme yöntemi ile kaplanmıştır. GAMMA High Voltage Research Inc. (ABD) firmasından temin edilen güç kaynağının [doğru akım (DC) 30 kV] negatif ucu toplayıcı levhaya, pozitif ucu ise şırınga iğnesine bağlanmıştır. Şırınga pompası (NE 300, New Era Pump System Inc. ABD) yardımıyla polimer çözeltisi sisteme gönderilmiştir.

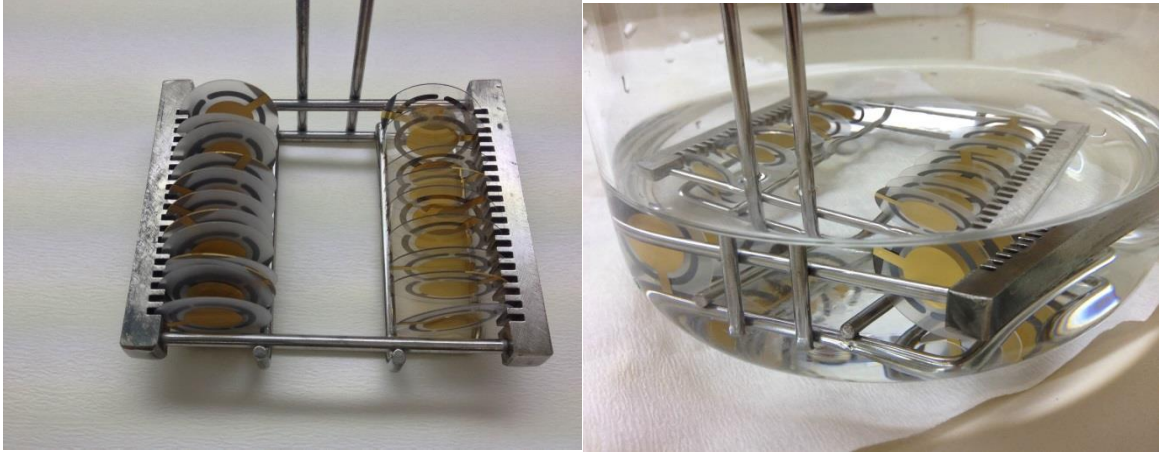
3.2 Metod

3.2.1 Elektro-Eğirme Çalışmaları

Elektro-eğirme yöntemiyle yüzeylerde boncuksuz, ince ve sürekli nanolif yapı elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için daha önce araştırma grubumuzda yapılan çalışmalar da [42-44] göz önünde bulundurularak bazı parametreler sabit tutulmuş ve yeni sistem için ideal koşullar belirlenmiştir. Şırınga içine yerleştirilecek olan polimer çözeltisi kütlice %15 oranında selüloz asetat (CA) ve %85 kütlice 3:1 oranında aseton/N,N dimetilasetamit içermektedir. Çözeltilerin her biri yüksek oranda aseton içerdiğinden ve aseton, kaynama noktası yaklaşık 56°C olan oldukça uçucu bir çözücü olduğundan tüm çözeltiler 100 ml hacimdeki kahverengi şişelerde hazırlanmış ve çift tıpa-kapak ile korunmuştur. Ayrıca her adımda dala kontrolleri yapılmıştır. Homojen çözeltiler manyetik karıştırıcıda gece boyunca çözeltilerin karıştırılması sonucunda elde edilmiştir.

3.2.2 Elektrot Yüzeyi Kimyasal Aktivasyonu

QCM' ler kullanılmadan önce yüzey temizliğinin sağlanması gerekmektedir. Bunun için hacimce 3:1 oranında sülfürik asit ve %30 hidrojen peroksit kullanılarak hazırlanan pirana çözeltisine 5 saniye süre ile daldırılarak temizlenen QCM'ler daha sonra etanol ve ultra saf su ile durulanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Kuvars kristal mikroterazi temizleme aşamaları

3.2.2.1 QCM Yüzeyinde Aldehit Grubu Oluşturma

Öncelikle bir ucunda $-SH$ diğer ucunda $-NH_2$ grubu bulunan bir çapraz bağlayıcı olan sisteamin ile altın yüzeye sahip QCM' lerde amin grubu oluşturulması sağlanmıştır. Bunun için 20mM sisteamin çözeltisi sodyum asetat tamponu (pH:5.5) ile hazırlanmış, altın yüzeyler bu çözeltide oda sıcaklığında 20 saat bekletilmiştir. Yüzeyde amin grubu oluşturulduktan sonra yüzeyler, iki ucunda aldehit bulunan bir çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit ile aktifleştirilmiştir. BU kademedede pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış hacimce % 2,5' lik glutaraldehit çözeltisi kullanılmıştır. Serbest amin uçları ile glutaraldehitin aldehit uçları reaksiyona girerek şift baz reaksiyonu ile bağlanmaktadır. Glutaraldehit çözeltisi yüzeye damlatılıp, 5 saat bekletildikten sonra ultra saf su ve tampon çözeltiyle 5 dakika boyunca yıkanmıştır.

3.2.2.2 ES-QCM Yüzeyinde Aldehit Grubu Oluşturma

Elektro-eğirme ön deneylerinde altın elektrotlar yerine alüminyum folyolar yüzeyinde, elektro-eğirme işlemi ile selüloz asetat lifleri oluşturulmuştur. Öncelikle selüloz asetat liflerden deasetilleme işlemi sonucunda asetil gruplarının ayrılması sağlanmıştır [45]. Bu işlem için etanol içinde 0,5M KOH çözeltisi hazırlanmış, liflerin üzerinde damlatılarak yarım saat beklenmiş, su ile yıkama yapıldıktan sonra $60^{\circ}C$ ' de vakumlu fırında lifler kurutulmuştur. Deasetilasyon ile yüzeyde OH grubu oluşturulan liflerin yüzeyi, sodyum periyodat ile okside edilerek yüzeyde aldehit grubu oluşumu sağlanmıştır. Bunun için 2mg/ml-10mg/ml $NaIO_4$ çözeltileri hazırlanmıştır. Çalkalamalı su banyosunda okside edilen örnekler, $60^{\circ}C$ ' de vakumlu fırında kurutulmuştur.

3.2.3 Tanıyıcı Tabakanın Oluşturulması

Sisteamin ve glutaraldehit çapraz bağlayıcıları ile modifiye edilen yüzeylerde, son olarak aldehit grubunun varlığının gözlenmesi ile tanıyıcı tabaka çalışmalarına geçilmiştir. Tanıyıcı biyomolekül olarak kullanılacak olan antikörlerin üç boyutlu yapısının ve aktivitesinin zarar görmemesi gerekmektedir. Bu nedenle tekrar dondurup çözündürme basamaklarından zarar görmemesi için -20 °C' de saklanan antikörler (5mg/ml) parçalara (aliquout) ayrılmış, oluşturulan stoklar tekrar -20 °C' ye yerleştirilmiştir. Herhangi bir kontaminasyondan kaçınmak için bu çalışmalar steril koşullarda gerçekleştirilmiştir. Küçük hacimlere ayrılan antikörler, çözündürüleceği zaman, +4 °C' de su banyosunda bekletilmiştir. Bu çözünmeden sonra kullanım süresince antikörler +4 °C' de buzdolabında saklanmıştır. Piyasadan temin edilen anti-OTA içerisinde koruyucu (sodyum azid) içerdiğinden, çözündürmeden sonra +4 °C' de 2-3 ay saklanabilmektedir. Dilüe antikörler ise +4 °C' de en düşük 1 mg/ml derişimlerinde olacak biçimde saklanmıştır.

Altın yüzeyde oluşturulan aldehit grubu ile, antikordaki amin grubu arasında şift baz formasyonu oluşmaktadır. Şift baz oluşumunu, kararlı sekonder amin bağına indirgemek, sodyum siyanoborohidrit ile mümkündür [46]. Bu amaçla 5M sodyum siyanoborohidrit 1N NaOH içerisinde hazırlanmış ve bu çözelti her 1 ml antikör çözeltisine 1 µl olacak şekilde eklenmiştir. Yüzeylerinde aldehit grubu oluşturulmuş altın elektrotlar üzerine, 30 µl 1 mg/ml antikör çözeltisi yayılmıştır. Bu halde elektrotlar 1 gece, +4 °C' de buzdolabında bekletilmiştir.

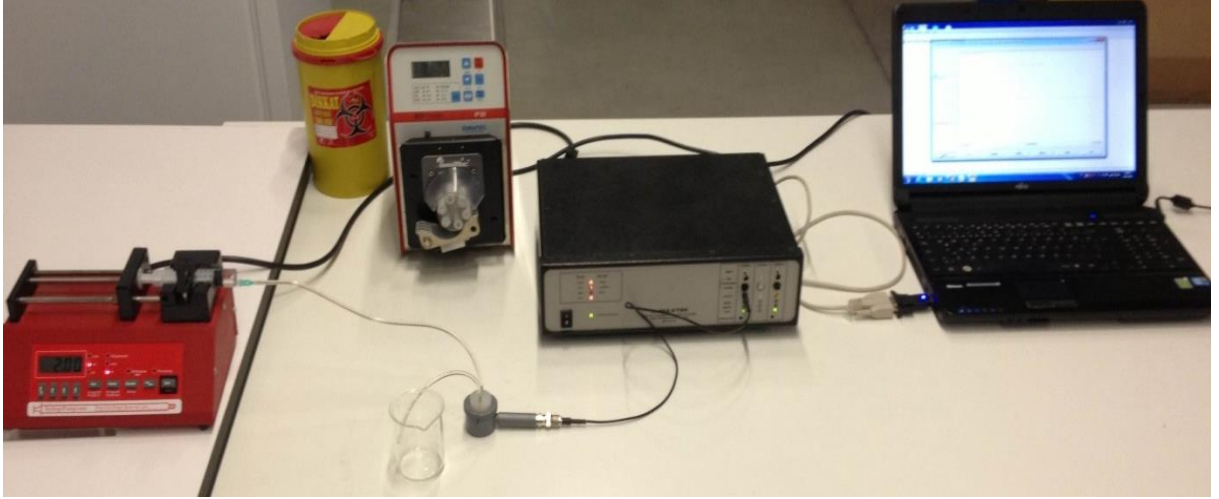
3.2.4 İmmünosensörün Performansının Belirlenmesi

Tanıyıcı tabakanın analiti olan okratoksin A oldukça toksik ve teratojen etkileri olan bir mantar toksini olduğu için, çalışmalar çok dikkatle ve titizlikle sürdürülmüştür. Her çalışma biyogüvenlik kabini ya da çeker ocak içinde yapılmıştır. Toksin ile kontamine olan malzemeler çamaşır suyu ile muamele edilerek kilitlenebilen çöp kutularına atılmıştır. Toksinle temas eden yüzeyler de önce metanol ile daha sonra çamaşır suyu ile temizlenmiştir. Toksinli cam malzemeler ise, önce metanol ile çalkalanmış, sonrasında çamaşır suyu ile 2 saat, %5 aseton içinde yarım saat bekletip durularak dekontaminasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

OTA ışığa duyarlı bir kimyasal olduğu için bütün stok ve standart çözeltiler kahverengi amberli şişelerde hazırlanmıştır. 0,5-250 ng/ml derişimlerindeki OTA-

BSA ve 0,5-100 ng/ml derişimlerindeki OTA (1mg/ml metanol içinde) standart çözeltileri, 0,5 M pH 9.6 karbonat tamponu ile hazırlanmıştır. Önceden metanolde çözümlenerek buzdolabında saklanan 1 mg/ml sitrinin, 0,5 M karbonat tamponu (pH 9.6) ile 100 ve 250 ng/ml derişimlerinde hazırlanmıştır.

Her aşamada kütle birikimi ya da kaybı ile oluşan frekans değişimleri Research Quartz Crystal Microbalance (RQCM) sistemi ile ölçülmüştür. Hazırlanan QCM'lerin frekans ölçümü için kullanılan düzenek şekil 3.3' teki gibidir.



Şekil 3.3. QCM frekans ölçüm düzenneği.

QCM'lerin toksinlerle etkileşimi ise biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4).



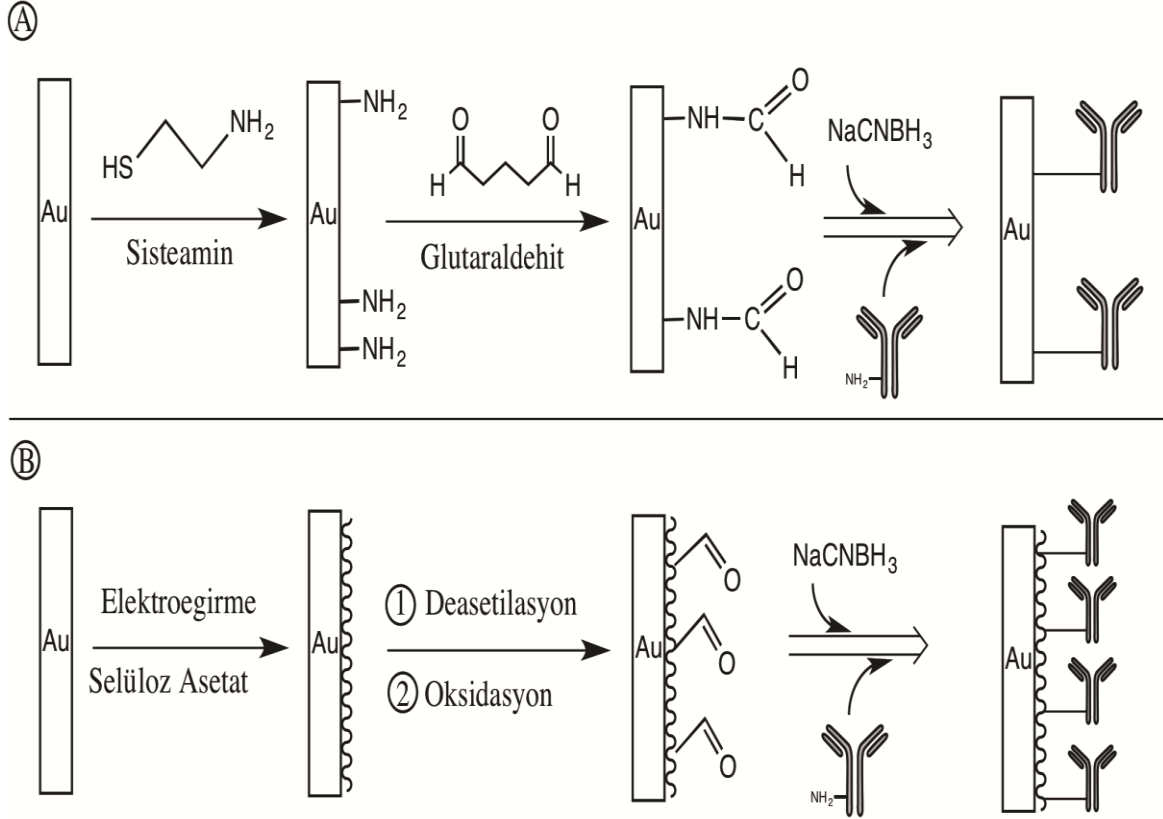
Şekil 3.4 QCM'lerin toksinlerle etkileştirildiği deney düzenneği

3.2.5 Yüzey Karakterizasyonu

Yüzeyde modifikasyonlar sonucu oluşturulan fiziksel ve kimyasal değişimler SEM ve FTIR-ATR ile ölçülmüştür. Elektro-eğirme öncesi ve sonrası kristallerdeki

frekans farkı ölçüldükten sonra ve kristal yüzeylerinin karakterizasyonu Raith e_LiNE Nanolithography System ve FEI Nova NanoSEM 430 cihazları ile yapılmıştır. Yüzeylerin kimyasal yapıları FTIR-ATR (Perkin Elmer Spektrum 100 FTIR, ABD) ile analiz edilmiştir.

Tez çalışmasında OTA immünosensör hazırlanması için gerçekleştirilen çalışmaların basamakları şematik olarak şekil 3.5' teki gibi özetlenebilir.



4 DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, kuvars kristal mikroterazi (QCM) yüzeyinin elektro-eğirme yöntemi ile artırılarak immünosensör olarak kullanımındaki performansının artırılması, böylece düşük derişimlerde okratoksin A (OTA) miktarlarının sistem tarafından algılanması amaçlanmıştır. QCM performansının değişimini takip edebilmek için hem yüzeyi elektro-eğirme ile artırılmış QCM yüzeylerinde, hem de boş QCM yüzeylerinde benzer fonksiyonel gruplar oluşturulmuştur. Yüzeyi elektro-eğirme ile artırılan QCM' de (ES-QCM) antikor ile etkileşecek fonksiyonel grup olarak aldehit grubu oluşturulduğundan, boş QCM yüzeyinde de aynı fonksiyonel grup oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu yüzden bu tezin ilk aşamasında boş QCM altın yüzeyinde öncelikle elektro-eğirme yapmadan aldehit grubu oluşturulmuştur. Aldehit grubu oluşumu için öncelikle yüzeyde sisteamin ile amin grubu oluşturulmuş, bu grupla bağ yapması için yüzey glutaraldehit ile aktive edilmiş ve böylece boş QCM yüzeylerinde antikor ile etkileşecek olan aldehit grubu elde edilmiştir. Yüzeylerinde aldehit grubu oluşturulmuş altın elektrotlar üzerine, antikor çözeltisi damlatılarak, yüzeye antikor immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çeşitli derişimlerde (10-250 ng/ml) hazırlanan sığır serum albümin bağlı okratoksin A (OTA-BSA) çözeltisi ile yüzeyine antikor immobilize edilmiş QCM' ler etkileştirilmiştir. QCM ile etkileştirilen farklı derişimlerdeki toksinlerin oluşturduğu frekans değişimleri grafiğe aktarılarak boş QCM için OTA-BSA kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Tezin ikinci aşamasında QCM' in yüzeyi elektro-eğirme ile artırılarak performansı incelenmiştir. Öncelikle seçilen selüloz asetat (CA) polimerinden ultra ince lif eldesi sağlanmıştır. Sonrasında CA lif yüzeyine antikorların bağlanabileceği aldehit grubu oluşturma aşamalarına geçilmiştir. Bunun için liflerden öncelikle asetil gruplarının ayrılması gerçekleştirilmiştir. Deasetillenen lifler sonrasında sodium periyodat ile oksitlenerek yüzeylerinde aldehit grubu oluşturulmuştur. Aldehit grubu oluşturulan ES-QCM yüzeylerine antikor çözeltisi damlatılarak, yüzeye antikor immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra, boş QCM' lere sadece OTA-BSA immobilize edilebildiğinden dolayı ES-QCM' lerin performansı daha sonra karşılaştırılabilmesi için, ES-QCM' ler de çeşitli derişimlerde hazırlanan (10-250 ng/ml) OTA-BSA çözeltileri ile etkileştirilmiştir. QCM' ler ile etkileştirilen farklı derişimlerdeki toksinlerin oluşturduğu frekans

değişimleri tablo edilerek boş QCM ve ES-QCM için OTA-BSA kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve bu iki eğri karşılaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra ES-QCM' in sadece OTA içeren çözeltilerle etkileşmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için farklı derişimlerde hazırlanan OTA çözeltileri (0,5-20 ng/ml) ES-QCM' ler ile etkileştirilmiş, immobilizasyon sonucu oluşan frekans değişimlerinden yararlanarak ES-QCM' in OTA için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Tezin son kısmında ise QCM' in performansı incelenmiştir. Bu amaçla OTA-BSA için oluşturulan boş QCM' in kalibrasyon eğrisi ile OTA-BSA için oluşturulan ES-QCM' in kalibrasyon eğrisi karşılaştırılıp performansları grafiklere göre değerlendirilmiştir. Seçicilik ise OTA çalışmalarında yaygın kullanılan sitrinin ile test edilmiştir. Sitrinin 100 ve 250 ng/ml derişimlerinde hazırlanmıştır. ES-QCM' ler 10 ng/ml OTA-BSA ile etkileştirildikten sonra, okratoksin A antikorlarının (anti-OTA) bir bölümünün tanıyıcı bölgesi açıkta olan immünosensör, 100 ve 250 ng/ml sitrinin ile etkileştirilip, frekans değişimleri incelenmiştir.

4.1 Elektro-Eğirme Çalışmaları

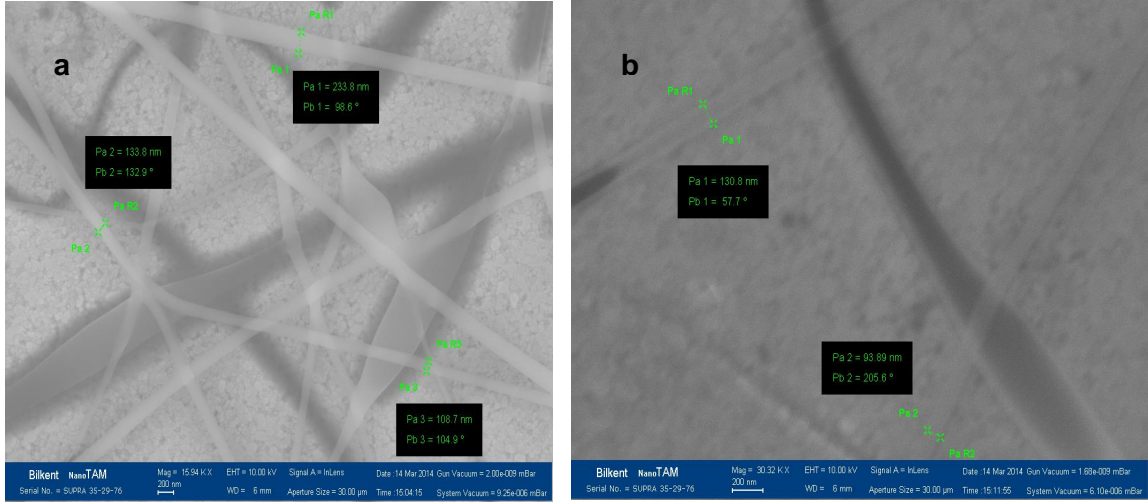
Kütlece %15 selüloz asetat çözeltisi yatay sistemde 0,7 mm iğne çapı, sıcaklık, nem, işlem süresi sabit tutularak işlem parametrelerinin (iğne ve toplayıcı levha arasındaki mesafe, uygulanan gerilim) değiştirilmesi ile sistem parametreleri optimize edilmiştir. İğne ve toplayıcı levha arasındaki mesafe 15-17 cm arasında değiştirilirken, 10-15 kV aralığında yüksek gerilim uygulanmıştır. Polimer sisteme 0,1 ml/sa hızıyla beslenmiştir. Çizelge 4.1' de gösterilen 1 den 7' ye kadar olan örneklere değişik parametrelerde elektro-eğirme işlemi yapılmıştır.

Çizelge 4.1 Elektro-eğirmede kullanılan işlem parametreleri

Örnek	1	2	3	4	5	6	7
Plakalar Arası Mesafe (cm)	15	15	15	15	15	17	17
Gerilim (kV)	15	13	12	11	10	11	12

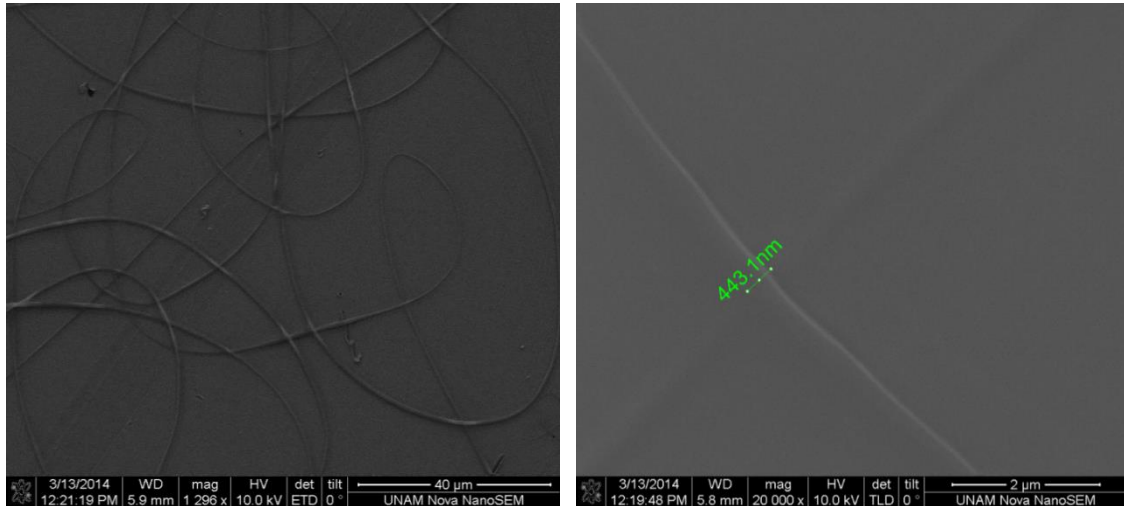
Elektro-eğirme işlemleri sonucunda elde edilen örnekler elektro-eğirme öncesi ve sonrası kristallerdeki frekans farkı ölçüldükten sonra kristal yüzeylerinin karakterizasyonu SEM ile gerçekleştirilmiştir. 1-5 arası örneklerde diğer parametreler sabit tutulurken uygulanan gerilim düşürülmüştür. Bu örneklerin lif

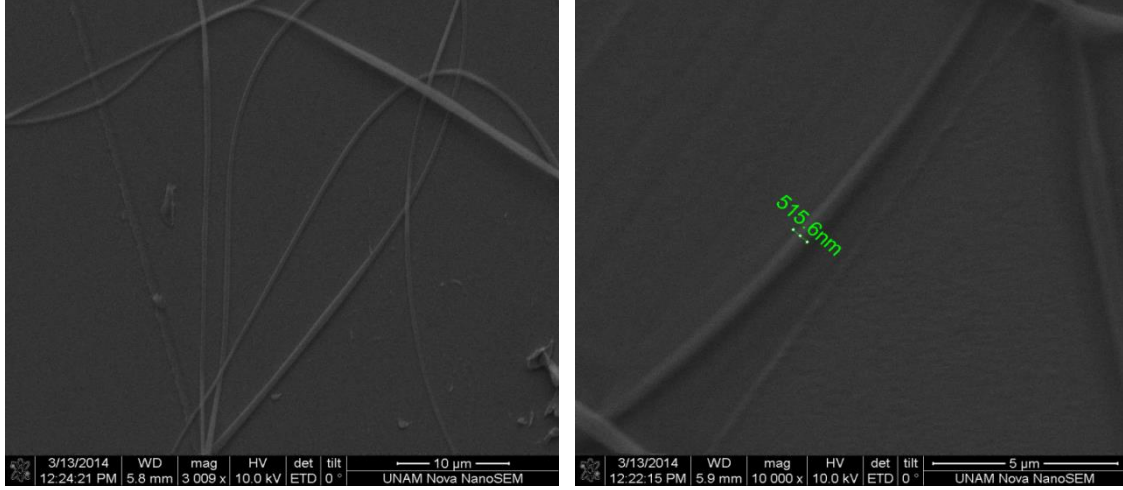
yapıları incelendiğinde ince fakat sürekli liflerin değil boncuklu liflerin olduğu görülmüştür (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 a) 1, b) 2 numaralı örneğin boncuklu lifleri ve çaplarının SEM ile elde edilen görüntüleri

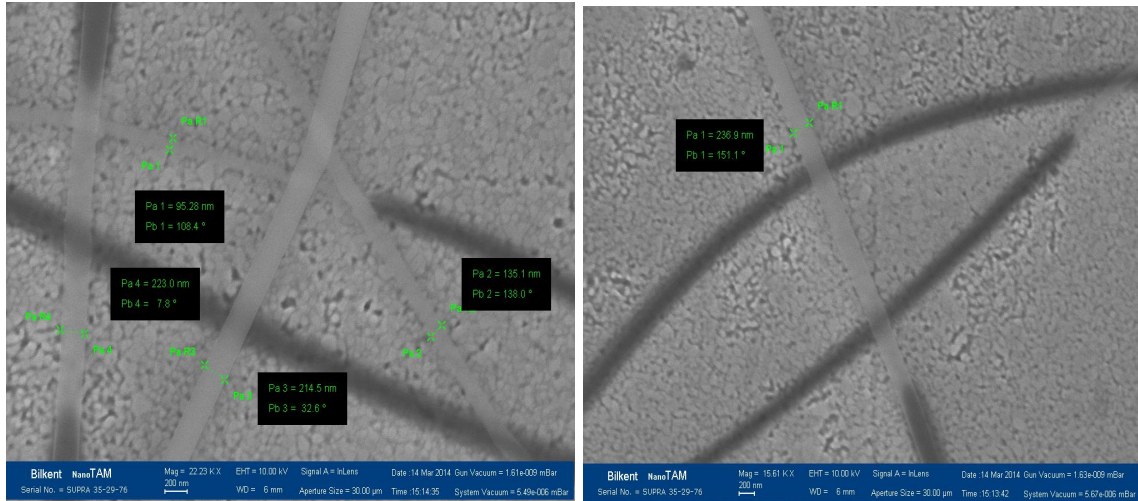
Elde edilen görüntüler sonucunda diğer parametreler sabit tutulurken plakalar arası gerilimin 4 örneğine 11 kV uygulanması ile selüloz asetat liflerindeki boncuklu yapının ortadan kalktığı ve bu kritik voltaj değerinde daha homojen liflerin elde edilebildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).





Şekil 4.2 4 numaralı örnekteki liflerin ve lif çaplarının SEM görüntüleri

5. örnekte 10kV' a düşürülen voltaj değerinde elektro-eğirme yapılabilmesi için kritik voltajın aşılamadığı ve Taylor konisinin oluşturulamadığı görülmüş, gerilim daha fazla düşürülmemiştir. Bu aşamadan sonra en iyi lif morfolojisine sahip olan 4 numaralı örnekte gözlemlenen lif çaplarını düşürmek için 6 numaralı örnekte gerilim elektro-eğirme için uygun bulunan 11kV değerinde sabitlenmiş, plakalar arası mesafe artırılarak (17cm) daha ince lif elde edilmeye çalışılmıştır. Sonucunda lif çaplarının küçüldüğü görüntülenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. 6 numaralı örnekteki liflerinin morfolojisi

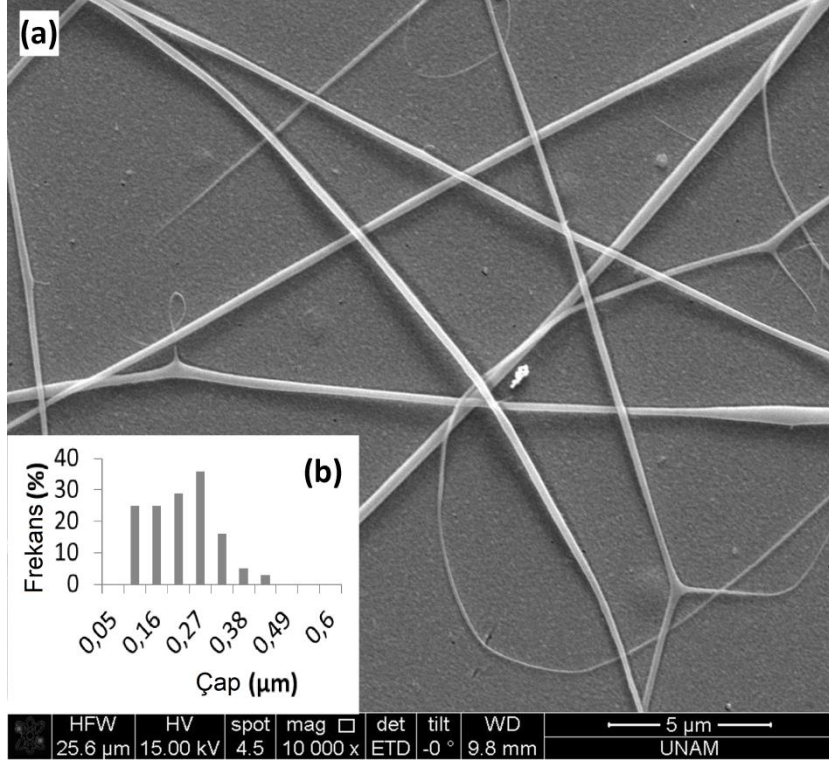
6 numaralı örnekte denenen parametrelerden bu kez sadece gerilim artırılarak 7 numaralı örneğe elektro-eğirme işlemi gerçekleştirilmiş, fakat boncuk oluşumunun tekrarlandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 7 numaralı örnekteki liflerinin morfolojisi

Elektro-eğirme deneyleri sonucunda, en uygun parametreler kütlece %15 selüloz asetat %85 kütlece 3:1 oranında aseton/N,N dimetilasetamit (DMAC) kullanılarak hazırlanan, besleme hızı 0,1 ml/sa, plakalar arası mesafe 17 cm, plakalar arası gerilim 11kV olarak uygulanan 6 numaralı örnekteki parametreler olarak belirlenmiştir.

Elektro-eğirme sonucunda uygun bulunan çözelti parametreleri ve fiziksel parametreler olan 17 cm plakalar arası mesafe, 11 kV gerilim uygulanarak kuvars mikro terazi yüzeyleri 0,1 ml/sa akış hızı ile 90 saniye boyunca selüloz asetat lifleri ile kaplanmıştır. En uygun parametreler ile kaplamadan sonra çekilen SEM görüntüsü ve oluşturulan histogram grafiği Şekil 4.5' teki gibidir.

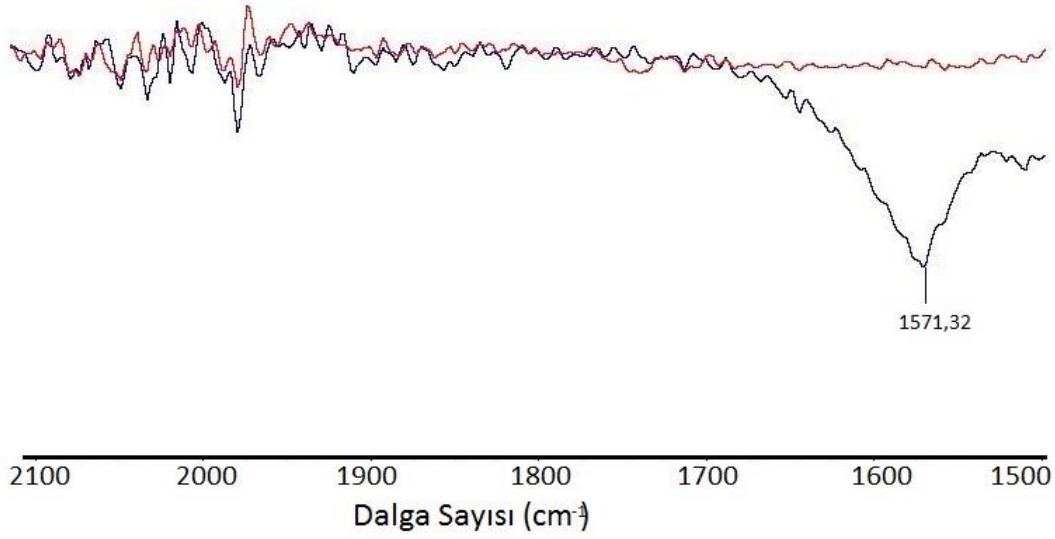


Şekil 4.5 a) Elektro-eğirme ile QCM yüzeyinde oluşturulan selüloz asetat liflerin SEM görüntüsü, b) histogram grafiği.

4.2 QCM' lerin Yüzey Modifikasyonu ve Karakterizasyonu

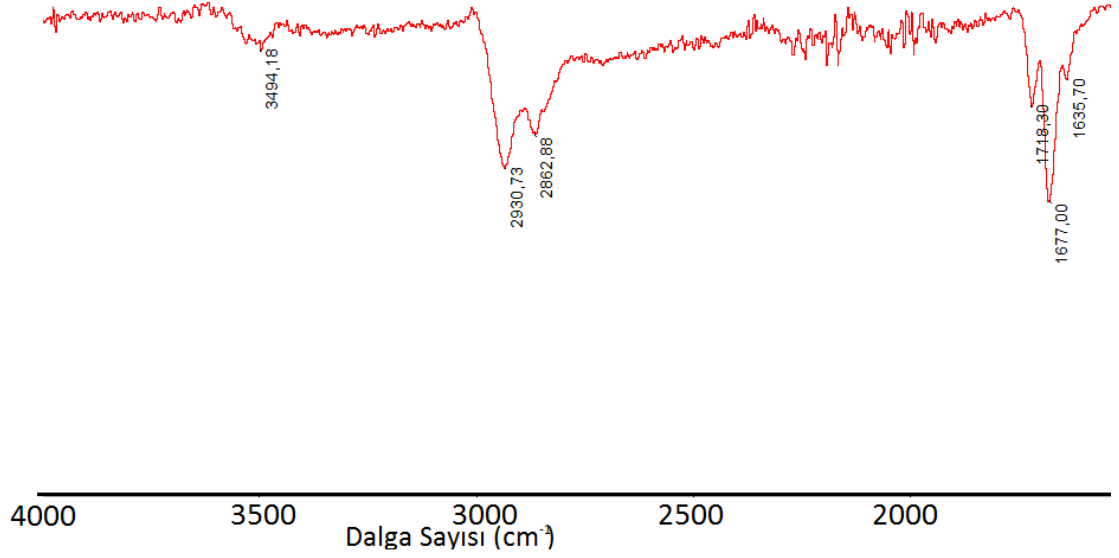
4.2.1 Boş QCM Modifikasyonları

Öncelikle bir ucunda -SH diğer ucunda -NH₂ grubu bulunan bir çapraz bağlayıcı olan sisteamin ile altın yüzeyde amin grubu oluşturulması sağlanmıştır. Bunun için 20mM sisteamin çözeltisi sodyum asetat tamponu (pH:5.5) ile hazırlanmış, altın yüzeyler bu çözeltide oda sıcaklığında 20 saat bekletilmiştir. Yüzeylerin kimyasal yapıları FTIR-ATR ile analiz edilmiştir, grafiği Şekil 4.6' daki gibidir.

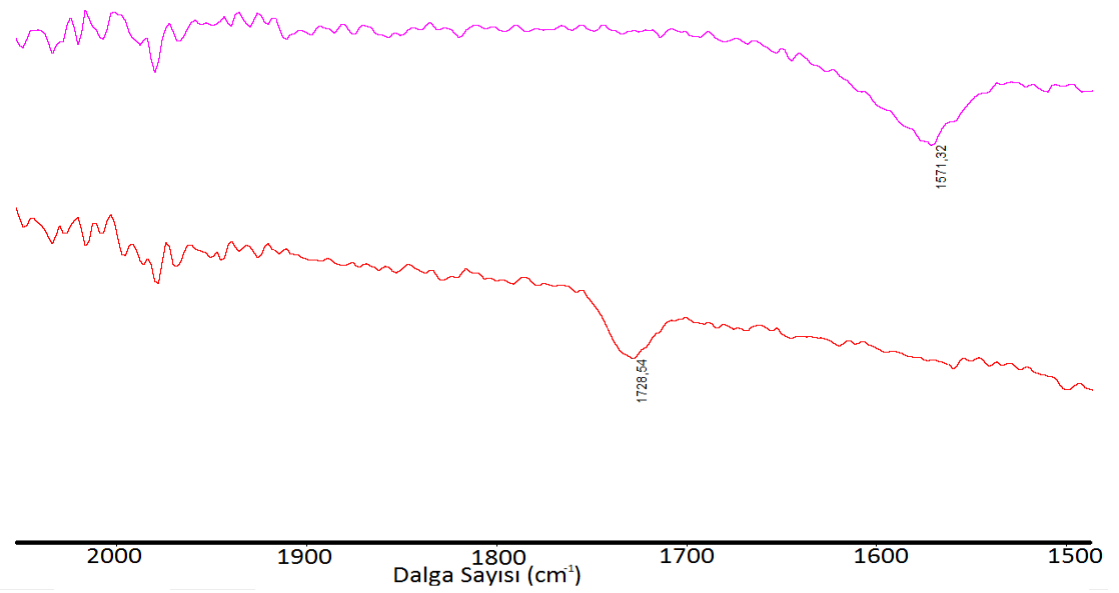


Şekil 4.6 QCM yüzeyinde amin grubu oluşumu sonrası FTIR-ATR spektrumu

Spektrumda 1571 cm^{-1} de gözlenen geniş bant, amin grubuna ait gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Yüzeyde amin grubu oluşturulduktan sonra yüzeyler, iki ucunda aldehit bulunan bir çapraz bağlayıcı olan glutaraldehit kimyasalı ile aktive edilmiştir. pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış % 2,5 (v/v) lik glutaraldehit çözeltisi kullanılmıştır. Serbest amin uçları ile glutaraldehitin aldehit uçları reaksiyona girerek schiff baz reaksiyonu ile bağlanmaktadır [46]. %2,5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi yüzeye damlatılıp, 5 saat bekletildikten sonra deiyonize su ve tampon çözeltiyle 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Yüzeylerin glutaraldehit ile aktivasyonu sonrası, 1728 cm^{-1} de aldehit grubundan kaynaklanan C=O bandı gözlenmiştir (Şekil 4.7).

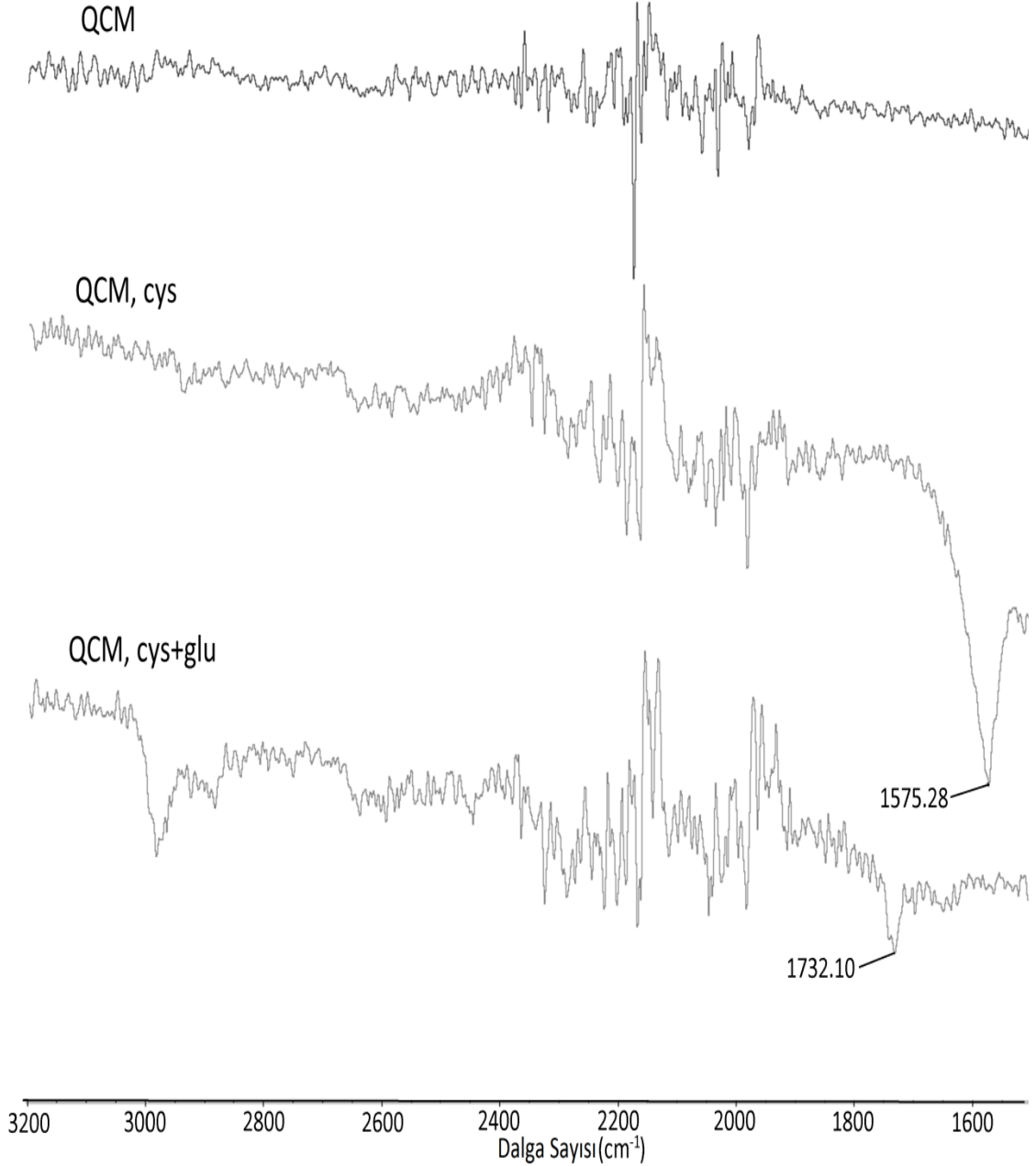


Şekil 4.7 %2,5 glutaraldehit ile etkileşimde sonraki QCM' in FTIR-ATR spektrumu Sisteamine ve glutaraldehit ile etkileştirilen yüzeyde, açıkta amin gruplarının halen bulunduğunu görülmektedir. Bu problem glutaraldehit kimyasalının derişimi %5' e kadar arttırarak çözülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 %5 glutaraldehit ile etkileşimde sonraki QCM' in FTIR-ATR spektrumu

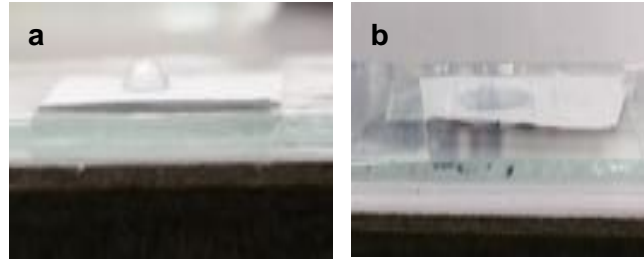
Şekil 4.9’ da kimyasal modifikasyon basamakları gösterilmektedir. Bu grafikte en üstte gösterilen eğri, boş altın yüzeyin FTIR-ATR ile karakterizasyonunu göstermektedir. Sisteamin immobilizasyonu ile oluşan amin grubunun piki ortada bulunan eğride gözlemlenmektedir. Daha sonra glutaraldehit immobilizasyonu ile yüzeydeki bütün amin grupları kaplanmış ve yerini açıkta kalan aldehit gruplarına bırakmıştır. En altta verilen eğri de bu durumu göstermektedir.



Şeki 4.9 Boş, sisteamin (cys) ile muamele edilmiş, sisteamin (cys) ve glutaraldehit (glu) ile muamele edilmiş QCM' lerin FTIR-ATR spektrumlarının karşılaştırılması

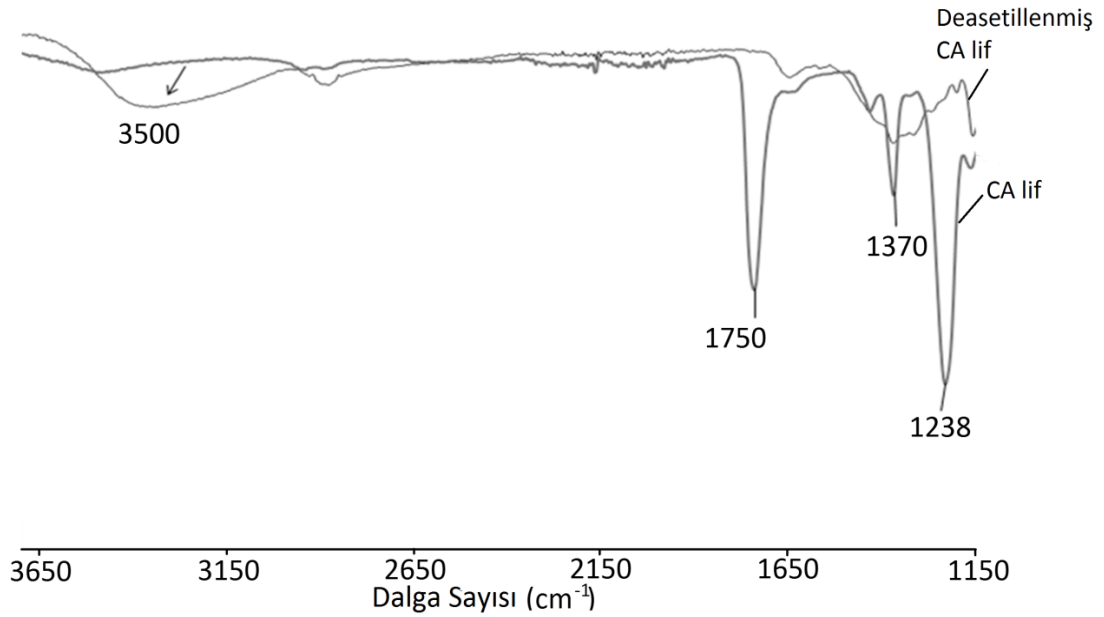
4.2.2 ES-QCM Modifikasyonları

Elektro-eğirme ön deneylerinde altın elektrotlar yerine alüminyum folyolar yüzeyinde, elektro-eğirme işlemi ile selüloz asetat lifleri oluşturulmuştur. Öncelikle selüloz asetat liflerden deasetilleme işlemi sonucunda asetil gruplarının ayrılması sağlanmıştır [47]. Bu işlem için etanol içinde 0,5 M potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi hazırlanmış, liflerin üzerinde damlatılarak yarım saat beklenmiş, su ile yıkama yapıldıktan sonra 60°C' de vakumlu fırında lifler kurutulmuştur. Selüloz asetat liflerinden asetat grupları uzaklaştırılarak, yüzey hidrofilikleştirilmiştir ve bu hidrofiliklik temas açısı ölçümleri ile doğrulanmıştır. Temas açısı deasetilasyon öncesi ortalama 58,56 değerindeyken, deasetilasyon sonrasında ölçülemeyecek kadar düşmüştür (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Deasetilleme öncesi (a) ve sonrası (b) temas açısı görüntüleri

Yüzeyi hidrofilikleştiren OH grubu bantları FTIR-ATR da 3500 cm^{-1} değerinde gözlemlenmektedir. Aynı zamanda asetil grupları yüzeylerden ayrılacağı için asetil grubu bantlarında, deasetillenmemiş örneklerle göre azalma gözlemlenmiştir (1750 cm^{-1} C=O, 1370 cm^{-1} C-CH₃, 1238 cm^{-1} C-O-C) (Şekil 4.11).



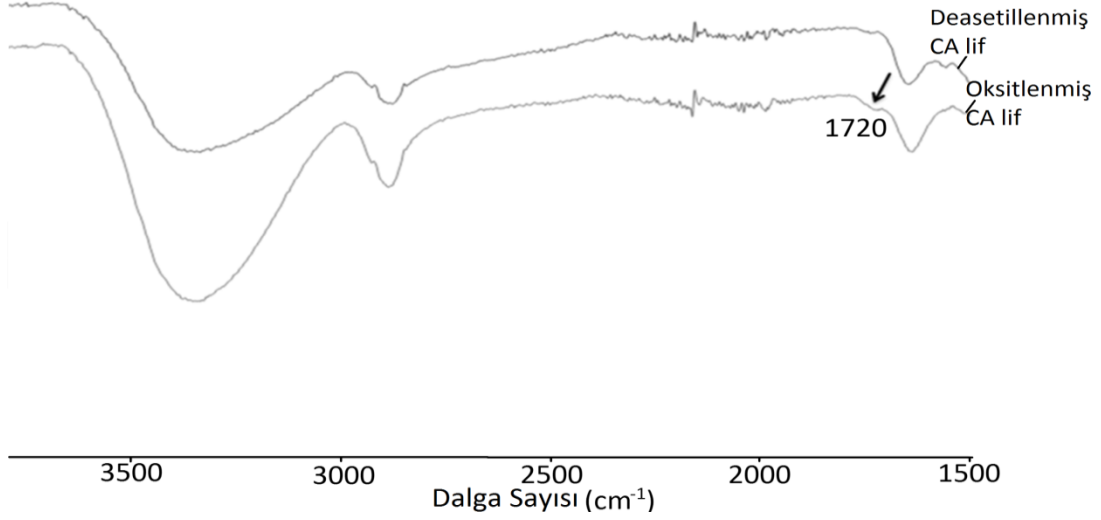
Şekil 4.11 Deasetilleme öncesi ve sonrası selüloz asetat liflerin FTIR-ATR spektrumu

Deasetilasyon ile yüzeyde OH grubu oluşturulan fiber yüzeyi, sodyum periyodat (NaIO_4) ile okside edilerek yüzeyde aldehit grubu oluşumu sağlanmıştır. Bunun için 2 mg/ml - 10 mg/ml NaIO_4 çözeltileri hazırlanmıştır. Çalkalamalı su banyosunda okside edilen örnekler, 60°C ' de vakumlu fırında kurutulmuştur. Özetle gerçekleştirilen işlem parametreleri çizelge 4.2' deki gibidir.

Çizelge 4.2 Elektro-eğirme ile oluşturulan selüloz asetat fiberlerin deasetilleme ve oksitleme parametreleri

Örnek	Elektro-eğirme	Deasetilleme	Oksidasyon
1	%15 (w/w) CA DMAC/Aseton (3:1)	—	—
2	%15 (w/w) CA DMAC/Aseton (3:1)	0.5M KOH 60°C vakumda kurutma	—
3	%15 (w/w) CA DMAC/Aseton (3:1)	0.5M KOH 60°C vakumda kurutma	2mg/ml NaIO_4 60°C vakumda kurutma
4	%15 (w/w) CA DMAC/Aseton (3:1)	0.5M KOH 60°C vakumda kurutma	5mg/ml NaIO_4 60°C vakumda kurutma
5	%15 (w/w) CA DMAC/Aseton (3:1)	0.5M KOH 60°C vakumda kurutma	8mg/ml NaIO_4 60°C vakumda kurutma
6	%15 (w/w) CA DMAC/Aseton (3:1)	0.5M KOH 60°C vakumda kurutma	10mg/ml NaIO_4 60°C vakumda kurutma

FTIR-ATR sonuçlarına göre 3 numaralı örneklerde 1720 cm^{-1} dalga sayısında aldehit grubu bandı elde edilmiştir (Şekil 4.12).

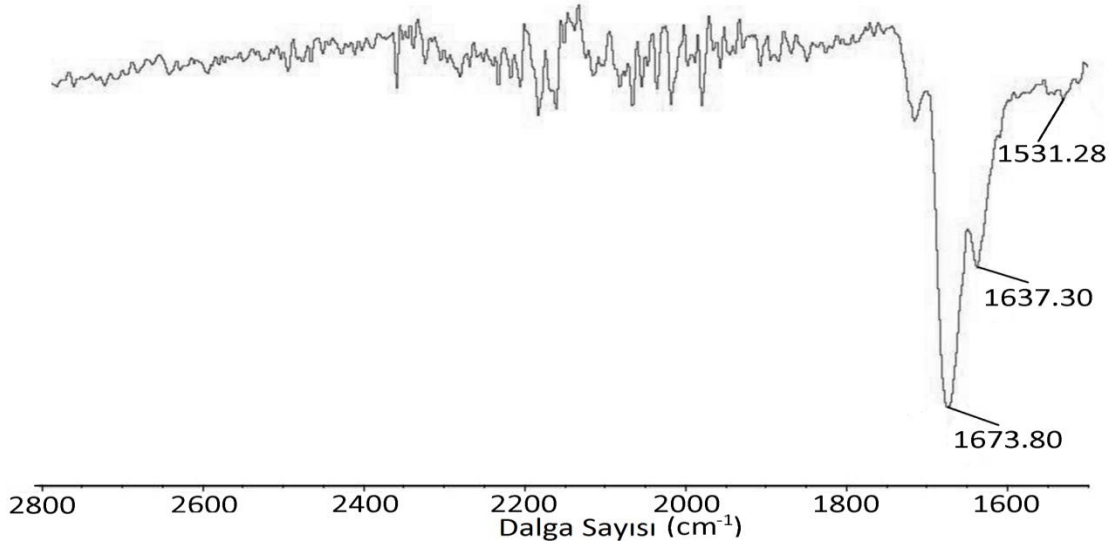


Şekil 4.12 Deasetillenmiş ve oksitlenmiş selüloz asetat liflerin FTIR-ATR spektrumu

Yüzeyde aldehit grupları elde edildikten sonra, yüzeye antikor immobilizasyonu deneylerine geçilmiştir.

4.3 Antikor İmmobilizasyonu

Sisteamin ve glutaraldehit çapraz bağlayıcıları ile modifiye edilen yüzeylerde, son olarak aldehit grubunun varlığının gözlenmesi ile antikor çalışmalarına geçilmiştir. Yüzeylerinde aldehit grubu oluşturulmuş QCM üzerine, $30\ \mu\text{l}$ $1\ \text{mg/ml}$ antikor çözeltisi yayılmıştır. Bu halde elektrotlar 1 gece, $+4^\circ\text{C}$ ' de buzdolabında bekletilmiştir. Antikor immobilizasyonundan sonra elde edilen FTIR-ATR verileri grafikteki gibidir.



Şekil 4.13 Antikor immobilizasyonundan sonra QCM' in FTIR-ATR spektrumu

Antikor immobilizasyonundan sonra 1500-1560 cm^{-1} dalga sayıları arasında pikler oluşan amid bağları göstermektedir. 1600-1700 cm^{-1} arasında oluşan pikler antikorun yapısında bulunan alfa heliks ve beta pilli yapılarından kaynaklanmaktadır [48]. Böylece antikorun yüzeydeki varlığı gösterilmiştir.

4.4 Frekans Ölçümleri

Her aşamada kütle birikimi ya da kaybı ile oluşan frekans değişimleri Research Quartz Crystal Microbalance (RQCM) sistemi ile ölçülmüştür. Frekans değişimleri, boş QCM aşamasından başlayarak, her basamakta beş dakika boyunca ölçülmüş ve yorumlanmıştır. Boş QCM' in ve ES-QCM' in modifikasyonlardan sonra oluşturduğu frekans sapmaları çizelge 4.3' te gösterilmektedir.

Çizelge 4.3 Boş QCM ve ES-QCM' in modifikasyonlardan sonraki frekans değişimleri

Metod // Yüzey	Frekans Sapması ^a (Hz)	
	Boş QCM	ES-QCM
Selüloz asetat elektro-eğirme	—	1244.7 ± 15.1
Selüloz asetat fiber deasetilasyon ve oksidasyon	—	58.6 ± 7.3
Sisteamin ve glutaraldehit ile altın yüzey modifikasyonu	297.0 ± 9.1	—
Anti-OTA immobilizasyonu	1109.6 ± 8.8	2337.4 ± 10.2

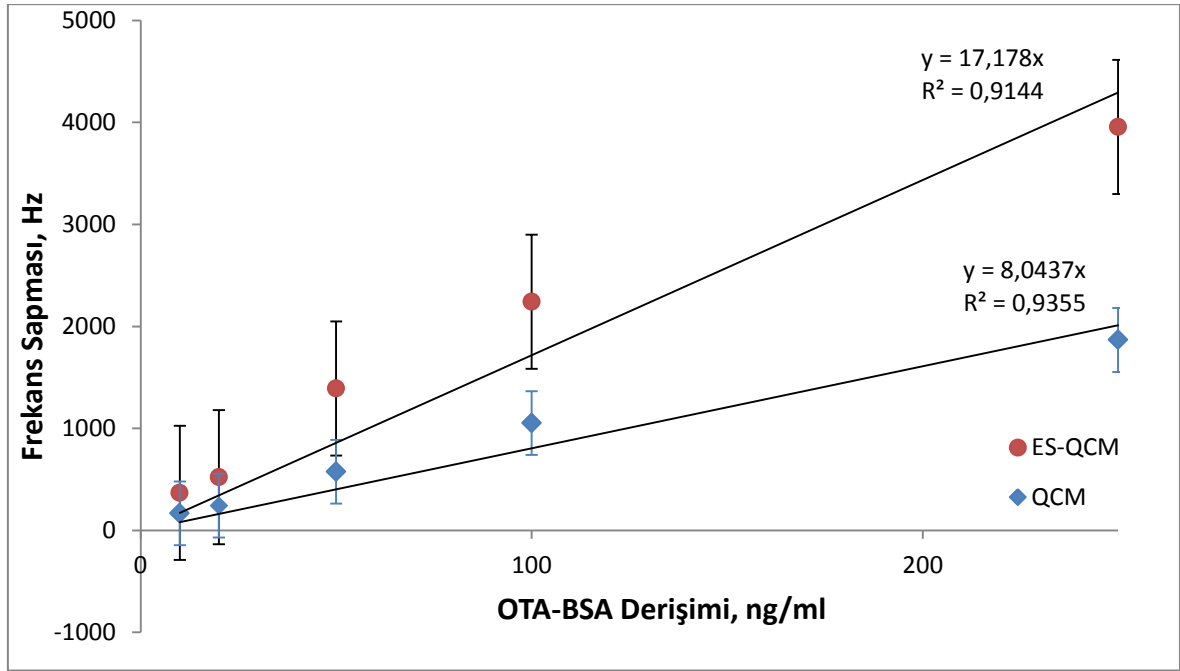
^a Ölçümlerin ortalaması.

Çapraz bağlayıcı ve biyoajan immobilizasyonu sonucunda yüzeylerinde kütle biriken QCM' lerin frekansları azalmıştır. Aynı şekilde, elektro-eğirme yöntemi ile yüzey alanı arttırılmış QCM' lerin de frekanslarında düşüş oluşmaktadır. Elektro-eğirme yöntemi ile yüzeyi polimer ultra ince liflerle kaplanan QCM' lerde, yüzeye 90 saniyeden daha uzun süre kaplama yapıldığında QCM' lerin kristalliğinin yüksek voltajlara maruz kalmaktan dolayı hasar gördüğü, bu yüzden frekans değerlerinin ölçülemediği görülmüştür. Ayrıca yüzeyi selüloz asetat liflerle kaplanan QCM' lerin üzerlerine yüklenen ağırlıktan sonra, performanslarının düşmemesi gerekmektedir. Bu yüzden yüzeyi yeterli ağırlıkta selüloz asetat liflerle kaplamak, bu tür riskleri azaltmaktadır.

ES-QCM' de antikor immobilizasyonundan sonra oluşan frekans değişimi, boş QCM' e göre daha yüksek olmuştur. Bu da ES-QCM' in daha fazla antikor immobilize edebileceğini göstermektedir.

4.5 OTA İmmünosensör Deneyleri

Antikor immobilize boş QCM' lere öncelikle yüksek derişimlerde OTA ile muamele edilmiş, OTA' nın düşük moleköl ağırlığından dolayı yeterli frekans değişimi elde edilememiştir. Bu yüzden boş QCM çalışmalarına BSA bağlı Okratoksin A (OTA-BSA) ile devam edilmiştir. Antikor immobilizasyonu basamağından sonra ES-QCM ve boş QCM' lerin çeşitli derişimlerde (10-250 ng/ml) OTA-BSA ile etkileştirilmesi aşamasına geçilmiştir. QCM' lerin toksinlerle etkileşimi, biyogüvenlik kabini içerisinde, akış hücresi ile gerçekleştirilmiştir. Akış hücresine bağlanan her bir QCM' in yüzeyinden öncelikle karbonat tamponu (pH:9.6) 7 ml/sa akış hızında geçirilmiş ve 10 dakika boyunca frekansı ölçülmüştür. Frekans değeri sabitlenen QCM' lere daha sonra çeşitli derişimlerde OTA-BSA çözeltileri ile aynı akış hızında muamele edilmiş, sonra tekrar yüzey karbonat tamponu ile yıkanmış ve oluşan frekans düşüş değeri kaydedilmiştir. Bu frekans değeri değerlerine dayanarak oluşturulan ES-QCM ve QCM kalibrasyon eğrileri grafikteki gibidir.



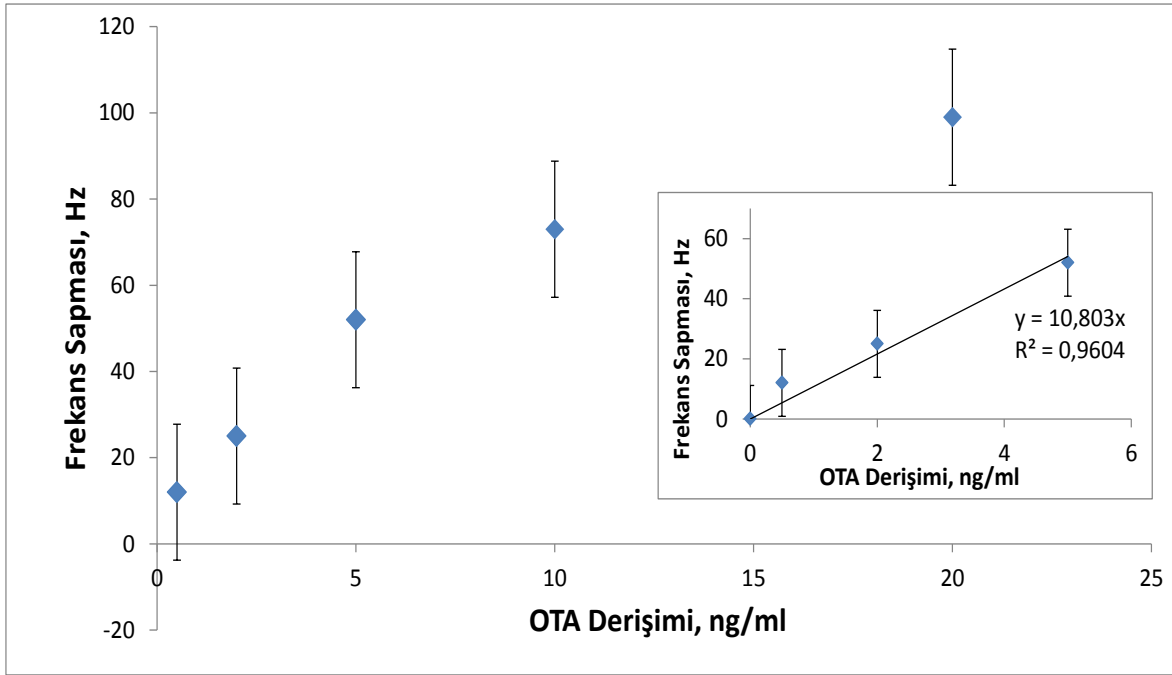
Şekil 4.14 ES-QCM' in ve QCM' in çeşitli derişimlerde OTA-BSA çözeltilerine karşı frekans sapmalarını gösteren kalibrasyon eğrileri

Grafikten anlaşılacağı üzere, ES-QCM' in, aynı derişimlerde OTA-BSA' ya karşı gösterdiği frekans kayması, QCM' e göre daha yüksek olmuştur. Bu da oluşturulan immünosensörün hassasiyetinin arttırıldığıнын bir göstergesidir. Bu aşamadan sonra boş QCM, OTA içeren çözeltilerle etkileştirilmiş ancak OTA' nın düşük moleküler ağırlığından dolayı yeterli frekans değişimleri elde edilememiştir (Çizelge 4.4). Bu yüzden ES-QCM sadece OTA içeren çözeltilerle etkileştirilmiştir.

Çizelge 4.4 Boş QCM ve ES-QCM' in çeşitli konsantrasyonlarda OTA ve OTA-BSA' ya karşı gösterdikleri frekans değişimleri

Derişimler	Frekans Değişimleri (Hz)	
	Boş QCM	ES-QCM
10-250 ng/ml OTA-BSA	0 – 2000	0 – 5000
0,5-20 ng/ml OTA	—	0 – 120

Bunun için farklı derişimlerde hazırlanan OTA çözeltileri (0,5-20 ng/ml) ES-QCM' ler ile etkileştirilmiş, immobilizasyon sonucu oluşan frekans değişimlerinden yararlanarak ES-QCM' in OTA için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 ES-QCM' in OTA çözeltilerine karşı frekans sapmalarını gösteren kalibrasyon eğrisi.

Şekil 4.15' te ES-QCM' in çeşitli derişimlerdeki OTA derişimlerine karşı verdiği frekans değişimleri gösterilmektedir. Bu grafikten 0,5-20 ng/ml OTA derişimlerine denk gelen frekans kaymalarını gösteren noktalar ve 0,5-5 ng/ml OTA derişimleri için oluşturulan lineer kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Elde edilen biyosensörün LOD değeri 0,2 ng/ml olarak hesaplanmıştır.

4.6 Seçiciliğin Test Edilmesi

Bu çalışmada seçicilik OTA immünosensör çalışmalarında sıklıkla kullanılan sitrinin ile test edilmiştir [45]. Bu aşamada sitrininin anti-OTA ile çapraz reaksiyona girip girmediği frekans değişimleri ile ölçülmüştür. Yapılan deneylerde, ES-QCM' in 10 ng/ml OTA-BSA için verdiği frekans değişiminin 367.3 ± 3.1 Hz değerinde olduğu bulunmuştur. Geliştirilen immünosensör, bu derişimde alınan frekans sapmasına karşı, aynı hacimde daha yüksek derişimlere daha yüksek frekans değişimleri ile tepki vermiştir. Yani en düşük derişimlerdeki OTA-BSA' da alınan bu frekans değerine göre, antijeni ile henüz etkileşmemiş anti-OTA' lar bulunmaktadır. 10 ng/ml OTA-BSA ile etkileştirildikten sonra, anti-OTA' larının bir bölümünün aktif bölgesi açıkta olan immünosensör, 100 ve 250 ng/ml sitrinin ile etkileştirilip, frekans değişimleri incelenmiştir. Oluşabilecek bu çapraz reaksiyonu test etmek için oluşan frekans değişim değerleri çizelge 4.5' teki gibidir.

Çizelge 4.5 OTA ES-QCM immünosensörün seçiciliğinin sitrinine karşı test edilmesi

Eklenen Derişimler (ng/ml)		Frekans Sapması ^a (Hz)
OTA-BSA	Sitrinin	
10	—	367.3 ± 3.1
10	100	372.1 ± 3.4
10	250	363.6 ± 5.3

^a Ortalama ± Standart sapma (n=5)

Elde edilen frekans değişimlerinin, sadece OTA-BSA varlığında elde edilen frekans değişimi ile benzer olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısı ile sitrinin ve OTA-BSA ile etkileştirilen ES-QCM' lerdeki anti-OTA antikoları sitrininle çapraz reaksiyona girmeyerek OTA-BSA' ları tercih etmiş, sitrinin etkileşimi bakımından anlamlı bir frekans değişim değeri vermemiştir ve bu da seçiciliğın yeterli olduğunun bir göstergesidir.

5 SONUÇ

Bu araştırmada QCM yüzeyinin elektro-eğirme yöntemi ile arttırılarak performansının arttırılması, böylece yüzeye daha fazla immünoajan yerleştirerek düşük derişimlerde OTA miktarlarının sistem tarafından algılanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda elde edilen sonuçlar maddeler halinde özetlenmiştir.

1- CA liflerin, inceliği kadar homojenliği de önemli bir parametredir. İleri çalışmalarda daha homojen liflerle daha geniş derişimlerde doğrusallığa sahip kalibrasyon eğrileri elde edilebilir. Ayrıca CA lifler her ne kadar suda çözünmeler de, akış hücresi ile su ile sürekli etkileşim altında olan ES-QCM' in yüzeyinden kopmalar meydana gelebilmektedir. İleriki çalışmalar bu problemi en aza indirgeyecek şekilde gerçekteştirilmelidir.

2- Elektro-eğirme sonucu elde edilen CA fiberler ile QCM yüzey alanı arttırılmış, böylece yüzeye daha yoğun biyoajan yerleştirilebilmiştir. ES-QCM kalibrasyon eğrisi boş QCM kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldığında daha yüksek performansta çalışabildiği gözlemlenmiştir. Ayrıca boş QCM tarafından düşük moleküler ağırlığından dolayı ölçülemeyen okratoksin A, ES-QCM ile ölçülebilmifitir. Bu sonuç da QCM' lerde OTA tayini için yapılan araştırmalarda OTA-BSA ve OTA' yı birlikte kullanma zorunluluğunu ortadan kaldıracabilir bir sonuçtur.

3- Oluşturulan ES-QCM, kalibrasyon eğrisine göre ölçebildiği düşük derişimler ile gıda örneklerinde ileriki çalışmalarda test edilerek uygulama alanı geliştirilebilir niteliktedir.

4- Seçicilik sitrinin ile test edildiğinde ise elde edilen frekans değişimlerinin, sadece OTA varlığında elde edilen frekans değişimi ile benzer olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısı ile sitrinin-OTA ile etkileştirilen ES-QCM' lerdeki anti-OTA antikorları sitrininle çapraz reaksiyona girmeyerek sadece OTA' ları tercih etmiş, sitrinin etkileşimi bakımından anlamlı bir frekans değişim değeri vermemiştir ve bu da seçiciliğin yeterli olduğunu düşündürmektedir.

6 KAYNAKLAR

- [1] Bayman, P., Baker, J. L., Ochratoxins: a global perspective. *Mycopathologia*, 162(3), 215-223, **2006**.
- [2] Magan, N., Olsen, M. , *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, Vol. 103, Woodhead Publishing, **2004**.
- [3] Regulation, E. C. (1881). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, *Off. J. Eur. Union*, L364, **2006**.
- [4] Türk Gıda Kodeksi, Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ, *Resmi Gazete 26879*, Tebliğ No: 2008/26, 17 Mayıs, **2008**.
- [5] Dixon-Holland, D. E., Pestka, J. J., Bidigare, B. A., Casale, W. L., Warner, R. L., Ram, B. P., Hart, L. P., Production of sensitive monoclonal antibodies to aflatoxin B1 and aflatoxin M1 and their application to ELISA of naturally contaminated foods, *Journal of Food Protection®*, 51(3), 201-204, **1988**.
- [6] Var, I., Kabak, B., Özkarslı, M., Mikotoksin Aranmasında Kullanılan Analiz Yöntemleri, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 02 (11), 1-11, **2004**.
- [7] Nagel B, Dellweg D, Gierasch LM, Glossary for Chemists of Terms Used in Biotechnology (IUPAC Recommendations 1992), *Pure and Applied Chemistry*, 64(1): 143-168, **1992**.
- [8] Songjun Li, Jagdish Singh, He Li, Ipsita A. Banerjee, *Biosensor Nanomaterials*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2011**.
- [9] Yoon, J. Y., *Introduction to Biosensors: From Electric Circuits to Immunosensors*, Springer Science & Business Media, **2012**.
- [10] Monošík, R., Stredánský, M., Šturdík, E., Biosensors-classification, characterization and new trends, *Acta Chimica Slovaca*, 5(1), 109-120, **2012**.
- [11] Heller, A., Amperometric biosensors, *Current opinion in biotechnology*, 7(1), 50-54, **1996**.
- [12] Ghindilis, A. L., Atanasov, P., Wilkins, M., Wilkins, E., Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches, *Biosensors and Bioelectronics*, 13(1), 113-131, **1998**.
- [13] Wang, J., Towards genelectronics: electrochemical biosensing of DNA hybridization, *Chemistry-A European Journal*, 5(6), 1681-1685, **1999**.

- [14] Jacobs, C. B., Peairs, M. J., Venton, B. J., Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules, *Analytica Chimica Acta*, 662(2), 105-127, **2010**.
- [15] Mohanty, S. P., Kougiyanos, E., Biosensors: a tutorial review, *Potentials, IEEE*, 25(2), 35-40, **2006**.
- [16] Sauerbrey, G., Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, *Zeitschrift für physik*, 155(2), 206-222, **1959**.
- [17] Çökeliler, D., *Alfatoksin Tayini İçin Plazma Polimerizasyon Yöntemi ile Kütle Hassas İmmünosensör Hazırlanması*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2006**.
- [18] Kanazawa, K. K., Gordon, J. G., Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid, *Analytical Chemistry*, 57(8), 1770-1771, **1985**.
- [19] Janshoff, A., Galla, H. J., Steinem, C., Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors: An Alternative to Optical Biosensors, *Angew. Chem. Int. Ed*, 39, 4004-4032, **2000**.
- [20] Alkire, R. C., Kolb, D. M., Lipkowski, J., Ross, P. N., *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Applications and Recent Developments*, (Vol. 26). John Wiley & Sons, **2013**.
- [21] Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., Kuby Immunology. 4th. Edition, *USA. W.*, **2000**.
- [22] Byrne, B., Stack, E., Gilmartin, N., O'Kennedy, R., Antibody-based sensors: Principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins, *Sensors*, 9(6), 4407-4445, **2009**.
- [23] Leenaars, M., Hendriksen, C. F., Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations, *Ilar Journal*, 46(3), 269-279, **2005**.
- [24] Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldron, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K., Murray, P. G., Demystified...: monoclonal antibodies, *Molecular Pathology*, 53(3), 111, **2000**.
- [25] Vaughan, R. D., Guilbault, G. G., Piezoelectric immunosensors, *Piezoelectric Sensors* (pp. 237-280), *Springer Berlin Heidelberg*, **2007**.
- [26] Palchetti, I., Mascini, M., Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(2), 455-471, **2008**.

- [27] 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(1), 3-13, **2003**.
- [28] Zhang, Y., Lim, C. T., Ramakrishna, S., Huang, Z. M., Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(10), 933-946, **2005**.
- [29] Kwon, I. K., Kidoaki, S., Matsuda, T., Electrospun nano-to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential, *Biomaterials*, 26(18), 3929-3939, **2005**.
- [30] Z. M. Huang, Y. Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, *Composites Science and Technology* 63, 2223–2253, **2003**.
- [31] Y. Ahn, D.-H. Hu, J. H. Hong, S. H. Lee, H. J. Kim, H. Kim, Effect of co-solvent on the spinnability and properties of electrospun cellulose nanofiber, *Carbohydrate Polymers*, 89, 340– 345, **2012**.
- [32] R. Konwarh, N. Karak, M. Misra, Electrospun cellulose acetate nanofibers: The present status and gamut of biotechnological applications, *Biotechnology Advances*, 31, 421–437, **2013**.
- [33] M. W. Frey, Electrospinning Cellulose and Cellulose Derivatives, *Polymer Reviews*, 48(2), 378-391, **2008**.
- [34] Subbiah, T., Bhat, G. S., Tock, R. W., Parameswaran, S., Ramkumar, S. S., Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 96(2), 557-569, **2005**.
- [35] Taylor, G., Electrically driven jets, In *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*(Vol. 313, No. 1515, pp. 453-475). The Royal Society, **1969**.
- [36] Buchko, C. J., Chen, L. C., Shen, Y., Martin, D. C., Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films, *Polymer*, 40(26), 7397-7407, **1999**.
- [37] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim and Z. Ma, An Introduction to Electrospinning and Nanofibers, *World Scientific Publishing*, **2005**.
- [38] Son, W. K., Youk, J. H., Lee, T. S., & Park, W. H., Electrospinning of ultrafine cellulose acetate fibers: studies of a new solvent system and deacetylation of ultrafine cellulose acetate fibers, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 42(1), 5-11, **2004**.

- [39] Konwarh, R., Misra, M., Mohanty, A. K., Karak, N., Diameter-tuning of electrospun cellulose acetate fibers: A Box–Behnken design (BBD) study, *Carbohydrate polymers*, 92(2), 1100-1106, **2013**.
- [40] Bayman, P., & Baker, J. L., Ochratoxins: a global perspective, *Mycopathologia*, 162(3), 215-223, **2006**.
- [41] Merrett, K., Cornelius, R. M., McClung, W. G., Unsworth, L. D., Sheardown, H., Surface analysis methods for characterizing polymeric biomaterials. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 13(6), 593-621, **2002**.
- [42] Rodoplu, D., *İmmünosensör Uygulamaları için Elektroeğirme Yöntemi Kullanılarak Polimer Kaplamalı Kuvars Kristal Mikrobalans (QCM) Hazırlanması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.
- [43] Ziğal N., *Nanolif kaplı kuvars kristal mikroterazi yüzeyler ile kütle hassas biyosensörlerin performanslarının geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2012**.
- [44] Rodoplu, D., Y. Sen, M. Mutlu, Modification of quartz crystal microbalance surfaces via electrospun nanofibers intended for biosensor applications, *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 5: 444-451, **2013**.
- [45] Tsai, W.C., Hsieh C.K., QCM –Based Immunosensor for the Determination of Ochratoxin A, *Analytical Letters*, 40, 1979-1991, **2007**.
- [46] Hermanson, Greg T. *Bioconjugate Techniques*. Academic press, **2013**.
- [47] Huang, X.J., Chen, P.C., Huang, F., Ou, C., Chen, M.R., Xu, Z.K., Immobilization of *Candida rugosa* lipase on electrospun cellulose nanofiber membrane, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70, 95-100, **2011**.
- [48] Boulet, M., Byrne, B., Sergei, G.K., High-Throughput Thermal Stability Analysis of a Monoclonal Antibody by Attenuated Total Reflection FT-IR Spectroscopic Imaging, *Analytical Chemistry*, 86, 9786-9793, **2014**.

7 ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Özge Dincel

Doğum Yeri : Gebze

Medeni Hali : Evli

E-posta : ozgedincel@gmail.com

Adresi : TOBB ETÜ Teknoloji Tasarım Merkezi 208 Lab.

Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce

İş Deneyimi

Deneyim Alanları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: 013D09602007. Okratoksin A Tayini için Kütle Hassas İmmünoşensör Hazırlanması, 2013-2015. Bütçe: 12595,00 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

O. Dincel, M. Mutlu, "Design of mass sensitive immunosensor exchanged with electrospinning method for ochratoxin A detection", BIYOMUT, İstanbul, 2014.

O. Dincel, M. Mutlu, "High performance mass sensitive immunosensor for ochratoxin A detection", Journal of Biotechnology : Progress in Biotechnology: EuroBiotech 2015 , 208: 16-17, 2015.