

**CCP ANTİKORLARININ TAYİNİ İÇİN YÜZEY PLAZMON  
REZONANS TEMELLİ BİYOSENSÖRLERİN  
HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE  
BASED BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF ANTI-  
CCP ANTIBODIES**

**Hüseyin DİBEKKAYA**

**PROF. DR. ADİL DENİZLİ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2015

**HÜSEYİN DİBEKKAYA'nın hazırladığı 'CCP Antikorlarının Tayini için Yüzey Plazmon Rezonans Temelli Biyosensörlerin Hazırlanması' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.**

Prof. Dr.Adil Denizli

Başkan ve Danışman .....

Prof. Dr.Sema Bektaş

Üye .....

Prof. Dr.Serap Şenel

Üye .....

Prof. Dr.Handan Yavuz Alagöz

Üye .....

Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz

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 kurullar 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 üniversitesinde veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

10.03.2015

HÜSEYİN DİBEKKAYA

## ÖZET

# CCP ANTİKORLARININ TAYİNİ İÇİN YÜZEY PLAZMON REZONANS TEMELLİ BİYOSENSÖRLERİN HAZIRLANMASI

**HÜSEYİN DİBEKKAYA**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil Denizli**

**Mart 2015,107 sayfa**

Romatoid artrit (RA) sık rastlanan kronik eklem iltihabı ile tanımlanan bir otoimmün hastalıdır. Dünya nüfusunun yaklaşık %1'i RA hastalığından muzdariptir. Kadınları erkeklerden daha fazla (3-5 kat) etkilemektedir. RA'nın hem eklemel hem de sistemik etkileri vardır. Şimdiye kadar RA teşhisinde en yaygın olarak romatoid faktör (RF) tayini kullanılmaktadır. Romatoid faktörler gamma globulinler ile reaksiyona giren ve genellikle IgM sınıfı antikorlardır. RA hastalarının %60 ile %80'inde bulunurlar. RF, RA için hassas ama spesifik olmayan bir işaretleyicidir. Çünkü sağlıklı bireylerde veya diğer otoimmün hastalığı olan bireylerde de bulunur.

RA hastalarının %40-60'ında epidermal flagrine karşı antikorlar gözlenir. Sitrülin, flagrin molekülünde bulunan nadir bir aminoasittir. Son araştırmalarda sitrülinin,

filagrindeki antijenik epitopun yapısal bir parçası olduğu gösterilmiştir. Siklik peptid içeren sitrulin antikoru (anti-cyclic citrullinated peptide, anti-CCP) RA için yeni ve RF'den çok daha spesifik (anti-CCP: %96-%100, RF: %63) bir parametre olarak bildirilmektedir. Ayrıca CCP ile RF'in duyarlılıkları arasında belirgin bir fark yoktur (anti-CCP: %80, RF: %79). CCP'ye karşı oluşan antikoru, çoğunlukla IgG sınıfındadır. Hastaların %70 ile %80'inde hastalığın erken aşamasında, çoğunlukla hastalığın semptomları ortaya çıkmasından çok önce tespit edilebilir.

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP) hazırlanması kolay, ucuz, kararlı, moleküler tanıma yeteneği olan ve ayrıca büyük miktarlarda üretilebilen ve tekrar kullanılabilen malzemelerdir. Bu yüzden, MIP'ler yapay molekül tanıyan malzemeler olarak tanımlanabilir. Adsorpsiyon temelli moleküler tanıma teknikleri hedef molekülleri için gösterdikleri yüksek seçicilikten dolayı bazı alanlarda dikkatleri üzerine çekmiştir.

Yüzey plazmon rezonans (SPR), metal yüzeye yakın kırılma indisindeki değişiklikleri ölçmede kullanılan kusursuz bir yöntemdir. SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye gerek olmaksızın biyomoleküller arasındaki etkileşimleri ölçmede kullanılabilir. Etkileşimleri eş zamanlı, doğrudan ölçebilmek kinetik veya termodinamik parametrelerin, derişimin veya ligand-analit arasındaki etkileşimlerin belirlenebilmesini sağlamaktadır. SPR temelli biyosensörler, hızlı cevap süresine ve yüksek seçiciliğe sahip olduğu için enzim veya radyoışaretleme yöntemleri gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, protein-protein, antikor-antijen, reseptör-ligand etkileşimlerinden, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tanımlanmasına kadar çok çeşitli biyomoleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılabilir.

Sunulan çalışmanın amacı, anti-CCP antikor tayini için anti-CCP baskılanmış yüzey plazmon rezonans temelli biyosensör hazırlamaktır. Bu amaçla, SPR biyosensör allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve allil gruplarının yönlendirilmesi sağlanmıştır. İlk basamakta, akrilamid (AAm) monomeri, kalıp monomer olarak kullanılan anti-CCP ile etkileştirilerek anti-CCP/AAm ön-kompleksi sentezlenmiştir. Optimum kalıp molekül ve monomer oranını belirlemek için anti-CCP ve farklı oranlarda AAm karıştırılmış ve optimum oran UV-görünür bölge spektrofotometre kullanılarak tespit edilmiştir. Daha sonra anti-CCP molekülleri çapraz bağlayıcı

metilen bisakrilamid (MBAAm) varlığında anti-CCP/AA ön-kompleks ile reaksiyona sokularak moleküler baskılanmış (anti-CCP/PAAm) SPR biyosensörü elde edilmiştir. Baskılamada amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED) işleminde başlatıcı çifti olarak kullanılmıştır. Ayrıca kontrol deneyi için kalıp molekül olan anti-CCP molekülü kullanılmadan, baskılanmamış (PAAm) SPR biyosensörü de hazırlanmıştır. Hazırlanan anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörler, FTIR-ATR, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre ve temas açısı ölçümleriyle karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri ve AFM görüntüleri, anti-CCP moleküllerinin biyosensör yüzeyine hemen hemen tek tabakalı olarak baskılandığını göstermektedir. Adsorpsiyon çalışmaları için 10 mM pH 7.0 fosfat tamponu kullanılırken, desorpsiyon çalışmaları için de %1 Tween 20, %10 asetik asit (HAc) içeren çözelti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin anti-CCP tayin seçiciliği, anti-CCP, immunoglobulin M (IgM) ve sığır serum albümin (BSA) çözeltileri (pH 7.0 fosfat tamponunda) ve seyreltilmiş plazma örnekleri ile araştırılmıştır. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörü, PAAm SPR biyosensörüne göre IgM ve BSA'ya daha fazla seçicilik göstermiştir. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör ile anti-CCP çözeltisi arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla Scatchard, Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) olmak üzere dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır. Langmuir adsorpsiyon modeli, bu afinite sistemi için en uygun model olarak bulunmuş ve sonuçlar anti-CCP/PAAm SPR biyosensör yüzeyindeki anti-CCP bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı ve tek tabakalı olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün anti-CCP için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-CCP, biyosensör, moleküler baskılama, romatoid artrit, yüzey plazmon rezonans.

## **ABSTRACT**

### **PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE BASED BIOSENSOR FOR DETERMINATION OF ANTI-CCP ANTIBODIES**

**HÜSEYİN DİBEKKAYA**

**Master of Science, Division of Bioengineering**

**Supervisor: Prof. Dr. Adil Denizli**

**March 2015,107 pages**

Rheumatoid arthritis (RA) suffers up to 1% of the world's population, affecting females to a greater extent (3–5 fold) than males. RA mainly affects joints, also has systematic effects on body. The most commonly performed serological test in suspected RA cases is the determination of rheumatoid factors (RF). RF are antibodies (predominantly of class IgM) which react with gamma globulins and occur in 60-80% of RA patients. RF are a sensitive, but not very specific marker for RA since they also occur in healthy individuals or patients with autoimmune diseases.

In 40-60% of RA patients autoantibodies against epidermal filaggrin are exhibit in their serum. In recent years it has been shown that the rare amino acid citrulline, which is present in filaggrin, is a substantial component of the antigenic epitope. It has been reported in studies that cyclic peptide containing citrulline antibodies (anti-cyclic citrullinated peptide, anti-CCP) reported as more specific test than RF parameter (Anti-CCP: 96-100%, RF: 63%) for RA diagnosis. Beside this, there is no significant difference in sensitivity (Anti-CCP: 80%, RF: 79%). Antibodies

against CCP are predominantly of IgG class. They can be found in the serum of 70%-80% of patients very early during the development of the disease, often even many years before the onset of the first symptoms.

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

Surface plasmon resonance (SPR) biosensors use a special mode of the metal-dielectric waveguide to measure changes in the refractive index due to the biomolecular interaction occurring at the surface of the SPR biosensor. SPR biosensors show the most advanced and mature label-free optical biosensor technology. Because of unique properties of SPR biosensors, such as real-time measurement, high specificity and sensitivity, no need to labeling, the applications of them have been getting more popular for investigation of several analyte molecules.

The aim of the study, to prepare anti-CCP imprinted SPR based biosensors to diagnose anti-CCP antibodies. For this purpose, SPR biosensors were modified with allyl mercaptan, thus allyl groups are orientated. At first step, anti-CCP/AAm precomplex was synthesized by interacting acrylamid (AAm) monomer with template molecule anti-CCP. To define optimum template molecule and monomer ratio, anti-CCP and AAm mixed in different ratios and optimum ratio was determined by using UV-visible region spectrophotometry. Then, molecular imprinted (anti-CCP/PAAm) SPR biosensor was obtained by reacting anti-CCP with anti-CCP/AAm precomplex in presence of crosslinker methylene bisacrylamide (MBAAm). During imprinting process ammonium persulfate (APS) and N,N,N',N'-tetramethylenediamine (TEMED) were used as initiator and activator couple. Besides this, for control experiment, nonimprinted (PAAm) SPR



biosensor was prepared without using anti-CCP template molecule. Prepared anti-CCP/PAAm and PAAm SPR biosensors were characterized with FTIR-ATR, atomic force microscope (AFM), ellipsometer and contact angle measurements. Thickness measurements and AFM images showed that anti-CCP molecules were almost imprinted as monolayer. While 10 mM pH 7.0 phosphate buffer was used for adsorption studies, desorption studies was carried out by using 1% Tween 20 and 10% acetic acid (HAc) containing solution. Selectivity of anti-CCP/PAAm and PAAm SPR biosensors for anti-CCP determination, were investigated by using immunoglobulin M (IgM) and bovine serum albumin (BSA) solutions (in pH 7.0 phosphate buffer) and diluted plasma samples. Anti-CCP/PAAm SPR biosensor showed higher selectivity than PAAm SPR biosensor for IgM and BSA. To determine the adsorption model of interaction between anti-CCP solution and anti-CCP/PAAm SPR biosensor, four different adsorption models such as Scatchard, Langmuir, Freundlich and Langmuir-Freundlich (LF) were performed. Langmuir adsorption model was found most applicable model for this affinity system and results showed that anti-CCP affinity regions on surface of anti-CCP/PAAm SPR biosensor were homogeneously distributed and had a monolayer structure. Results also showed that, anti-CCP/PAAm SPR biosensor had high selectivity and sensitivity for anti-CCP antibodies.

**Keywords:** Anti-CCP, biosensor, molecular imprinting, rheumatoid arthritis, surface plasmon resonance.

## TEŞEKKÜR

*Tez çalışmalarım süresince, çok yoğun çalışma programları olmasına rağmen bana zaman ayıran, her türlü konuda destek olan, fikirleri ile yol gösteren, tez danışmanı hocam sayın Prof. Dr. Adil Denizli'ye,*

*Değerli bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmam üzerinde büyük yardımları dokunan sayın Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz'a,*

*Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım da her zaman yanımda olan, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, kardeşim Yeşeren Saylan'a,*

*Başta sayın Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz ve Doç. Dr. Lokman Uzun olmak üzere tüm BIOREG üyelerine,*

*Ve bugüne kadar bana her türlü desteği gösteren sevgili eşim ve aileme teşekkür ederim.*

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	1
ABSTRACT .....	4
TEŞEKKÜR .....	7
İÇİNDEKİLER.....	8
ŞEKİLLER .....	12
ÇİZELGELER .....	14
TABLolar.....	15
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	16
1. GİRİŞ.....	17
2. GENEL BİLGİLER .....	19
2.1. Moleküler baskılama teknolojisi.....	19
2.1.1. Moleküler baskılama tekniği.....	21
2.1.2. Moleküler baskılama yönteminde kullanılan malzemeler .....	22
2.1.2.1. Kalıp molekül .....	23
2.1.2.2. Fonksiyonel monomerler .....	23
2.1.2.3. Çapraz bağlayıcılar .....	23
2.1.2.4. Çözücüler .....	24
2.1.2.5. Başlatıcılar .....	25
2.1.2.6. Sıcaklık .....	25
2.1.3. Moleküler baskılama yöntemleri .....	26
2.1.3.1. Kovalent baskılama .....	26

2.1.3.2. Kovalent olmayan baskılama.....	26
2.1.4. Baskılama işleminin kontrolü .....	27
2.1.5. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulama alanları.....	29
2.2. Biyosensörler .....	30
2.2.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması .....	35
2.2.1.1. Biyotanıma elemanlarına göre sınıflandırma .....	35
2.2.1.1.1. Enzimler .....	35
2.2.1.1.2. Antikorlar .....	35
2.2.1.1.3. Nükleik asitler.....	35
2.2.1.2. Dönüştürücülerine göre sınıflandırma.....	36
2.2.1.2.1. Optik sensörler .....	36
2.2.1.2.2. Elektrokimyasal sensörler .....	36
2.2.1.2.3. Piezoelektrik sensörler .....	37
2.2.1.2.4. Çevresel görüntüleme de biyosensörler.....	39
2.2.2. Biyosensör teknolojisinin bugünü ve geleceği.....	39
2.2.2.1. Sürekli görüntüleme.....	39
2.2.2.2. Çoklu analit tespiti .....	39
2.2.2.3. Minyatürleştirme .....	40
2.2.2.4. Yeni duyu elemanları .....	40
2.2.3. Ticari biyosensörler.....	41
2.3. Yüzey plazmon rezonans (SPR) .....	41
2.3.1. Yüzey plazmon rezonans teorisi .....	43
2.3.2. SPR biyosensörler .....	48

2.4. Romatoid artrit (RA) .....	50
2.5. Anti siklik sitr�llenmiş peptit antikorları (anti-CCP) .....	51
3. DENEYSEL ALIşMALAR.....	53
3.1. Kimyasal malzemeler .....	53
3.2. SPR biyosensörlerin altın yüzeyinin allil merkaptan ile yüzey modifikasyonu	54
3.3. Anti-CCP/akrilamid (AAm) �n-kompleksinin hazırlanması .....	55
3.4. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün hazırlanması .....	55
3.5. Kalıp molekülün uzaklaştırılması.....	56
3.6. Baskılanmamış (PAAm) SPR biyosensörünün hazırlanması .....	56
3.7. Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin karakterizasyonu .....	57
3.7.1. FTIR-ATR spektrofotometre analizi.....	57
3.7.2. Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) analizi .....	57
3.7.3. Elipsometre analizi.....	58
3.7.4. Temas açısı �l�mleri .....	59
3.8. Yüzey plazmon rezonans sistemi ile plazmon �l�mleri .....	60
3.9. Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin kinetik analizler .....	61
3.10. Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin baskılama seçiciliğinin belirlenmesi.....	62
3.11. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi	62
3.12. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün kan plazmasından anti-CCP tayini için kullanımı.....	62
4. SONUÇLAR VE TARTIşMA.....	64
4.1. Anti-CCP/akrilamid (AAm) �n-kompleksinin hazırlanması .....	64

4.2. PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin karakterizasyonu .....	64
4.2.1. FTIR-ATR spektrofotometre analizi.....	64
4.2.2. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi .....	66
4.2.3. Elipsometre analizi.....	67
4.2.4. Temas açısı ölçümleri .....	68
4.3. SPR biyosensörlerle kinetik analizler .....	70
4.4. Denge izoterm modelleri .....	79
4.5. Yarışmalı kinetik analizler .....	82
4.6. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi ...	84
4.7. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.	86
4.8. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün kan plazmasından anti-CCP tayini için kullanımı.....	87
5. YORUM.....	88
6. KAYNAKLAR.....	92
7. ÖZGEÇMİŞ .....	106

## ŞEKİLLER

- Şekil 2.1. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi.
- Şekil 2.2. Dielektrik sınırlarda gerçekleşen toplam iç kırınım.
- Şekil 2.3. Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılıma eğrileri.
- Şekil 2.4. Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri.
- Şekil 2.5. Tipik bir SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.
- Şekil 2.6. Proteinlerin sitrülmesi.
- Şekil 3.1. Allil merkaptan ile yüzey modifikasyonu ve allil gruplarının yönlendirilmesi.
- Şekil 3.2. Döndürmeli kaplama cihazı ve UV lambasının optik fotoğrafları.
- Şekil 3.3. FTIR-ATR spektrofotometre cihazının optik fotoğrafı.
- Şekil 3.4. Atomik kuvvet mikroskobu cihazının optik fotoğrafı.
- Şekil 3.5. Elipsometre cihazının optik fotoğrafı.
- Şekil 3.6. Temas açısı cihazının optik fotoğrafı.
- Şekil 3.7. SPR sisteminin optik fotoğrafı.
- Şekil 4.1. Anti-CCP/AAm ön-kompleksinin spektrofotometrik ölçümü.
- Şekil 4.2. PAAm SPR biyosensöre ait FTIR-ATR spektrumu.
- Şekil 4.3. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensöre ait FTIR-ATR spektrumu.
- Şekil 4.4. PAAm SPR biyosensörün AFM görüntüsü.
- Şekil 4.5. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün AFM görüntüsü.
- Şekil 4.6. PAAm (a) ve anti-CCP/PAAm (b) SPR biyosensörlerin elipsometrik ölçümde alınan üç boyutlu görüntüsü.
- Şekil 4.7. Modifiye edilmemiş altın yüzeyinin temas açısı ölçüm fotoğrafı.
- Şekil 4.8. PAAm SPR biyosensör yüzeyinin temas açısı ölçüm fotoğrafı.
- Şekil 4.9. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör yüzeyinin temas açısı ölçüm fotoğrafı.
- Şekil 4.10. Farklı derişimlerde anti-CCP çözeltilerinin anti-CCP/PAAm SPR biyosensöre uygulanması ile elde edilen zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramları: (a) 1 RU/mL (66 ng/mL); (b) 5 RU/mL (330 ng/mL); (c) 20 RU/mL (1320 ng/mL); (d) 50 RU/mL (3300 ng/mL); (e) 100 RU/mL (6600 ng/mL); (f) 200 RU/mL (13200 ng/mL).
- Şekil 4.11. Farklı derişimlerdeki anti-CCP çözeltileri ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramları.
- Şekil 4.12. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör ve  $\Delta R$  arasındaki ilişki.

Şekil 4.13. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. Denge analiz yaklaşımı (Scatchard) (a); Bağlanma kinetik yaklaşımı (b).

Şekil 4.14. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.

Şekil 4.15. IgM biyomolekülü ile hazırlanmış çözelti ile anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.

Şekil 4.16. BSA biyomolekülü ile hazırlanmış çözelti ile anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.

Şekil 4.17. Anti-CCP biyomolekülü ile hazırlanmış çözelti ile PAAm SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.

Şekil 4.18. IgM biyomolekülü ile hazırlanmış çözelti ile PAAm SPR biyosensörünün zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.

Şekil 4.19. BSA biyomolekülü ile hazırlanmış çözelti ile PAAm SPR biyosensörünün zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.

Şekil 4.20. Anti-CCP/PAAmSPR biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini gösteren zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.

Şekil 4.21. Kan plazmasından anti-CCP tayini için anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün kullanımını gösteren zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.



## ÇİZELGELER

Çizelge 4.1. Kinetik hız sabitleri.

Çizelge 4.2. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.

Çizelge 4.3. Anti-CCP'ye göre IgM ve BSA için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

## **TABLolar**

Tablo 2.1. Geleneksel analitik teknikler ile biyosensörler arasındaki özelliklerin karşılaştırılması [2].

Tablo 2.2. Biyosensörlerin tarihçesi [58].

Tablo 2.3. Dönüştürücülerine göre biyosensörler.

Tablo 4.1. Modifiye edilmemiş (boş), PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin yüzeylerinin su temas açısı değerleri.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\Delta R$	Delta kırılma
$R_{maks}$	Maksimum SPR sinyal kayması
C	Analit derişimi (RU/mL),
$k_a$	Bağlanma hız sabiti (RU/mL.s)
$k_d$	Ayrılma hız sabiti (1/s)
$K_A$	Bağlanma sabiti (RU/mL)
$K_D$	Ayrılma sabiti (mL/RU)
1/n	Freundlich yüzey heterojenite indeksi
k	Seçicilik katsayısı
k'	Bağıl seçicilik katsayısı

### Kısaltmalar

Anti-CCP	Anti-siklik sitrüllenmiş peptit
RA	Romatoid artrit
RF	Romatoid faktör
AAm	Akrilamid
MBAAm	Metilenbisakrilamid
RU	Relatif Birim
IgM	İmmünoglobulin M
BSA	Sığır serum albümin
SPR	Yüzey plazmon rezonans
QCM	Kuartz kristal mikroterazi
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
FTIR-ATR	Fourier transform infrared spektroskopisi-Zayıflatılmış toplam yansıma

# 1. GİRİŞ

Moleküler baskılama tekniği, oldukça çapraz bağlı polimer matriks içerisinde boşluklar oluşturulması temeline dayanmaktadır. Bu boşluklar, kalıp molekülün boyut ve şeklini tanıma özelliğine sahiptir. Kalıp molekülün herhangi bir desorpsiyon yöntemi ile uzaklaştırılması, sabit pozisyonlardaki fonksiyonel grupların ortaya çıkmasını sağlayarak, kalıp moleküle eşlenik yapı oluşturmaktadır. Hazırlanan polimer, kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanıyarak, herhangi bir ortamda bu kalıbı seçici ve etkin bir şekilde bağlamaktadır. Moleküler baskılanmış polimer (MIP), bir kalıp molekülü, fonksiyonel monomer ve bir çözücü içindeki başlatıcıyı içeren bir karışımdan hazırlanır. Polimerizasyon boyunca kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında oluşan kompleks çapraz bağlayıcı monomer ile çevrelenerek polimerleştirilir. Böylelikle kalıp molekülün hapsedildiği üç boyutlu polimer ağı oluşturulur. Kalıp molekülün uzaklaştırılması oluşan boşluklar şekil, büyüklük ve moleküler etkileşimler açısından kalıp moleküle özgüdür. Moleküler baskılama için ön koşul, kalıp molekül ve monomer arasında kararlı bir kompleks oluşumudur [1].

Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarını içeren reseptörler ve uygun çeviricilerin bir arada bulunduğu basit analitik cihazlardır. Geleneksel analitik tekniklerle karşılaştırıldığında biyosensörler, hızlı ve gerçek zaman tespiti, düşük maliyet, taşınabilirlik, basit kullanım, örnek hazırlama işleminin kolaylığı gibi birçok özelliğe sahiptir [2]. Biyosensörler, genel olarak biyolojik tanıma elemanları ve dönüştürücülerine göre iki sınıf altında sınıflandırılmaktadırlar. Biyolojik tanıma elemanlarına göre olan sınıflandırmada; enzim, antikor, nükleik asit temelli biyosensörler olarak; dönüştürücülerine göre yapılan sınıflandırmadaysa; elektrokimyasal, optik, piezoelektrik sensörler olarak sınıflandırılır [3,4].

Yüzey plazmon rezonans (SPR) temelli biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan biyomoleküllerin etkileşimlerini ölçebilirler. Bu özellikleri nedeniyle, moleküler etkileşimlerin anlaşılması için bu cihazların önemi artmıştır. Etkileşimleri eş zamanlı, doğrudan ölçebilmek; kinetik, termodinamik parametrelerin, derişimin veya ligandlarla analitler arasındaki etkileşimlerin belirlenebilmesini sağlamaktadır. SPR temelli biyosensörlerin hızlı cevap süresi ve

yüksek seçiciliği vardır. Enzim veya radyoışaretleme yöntemleri gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında SPR biyosensörler sahip oldukları bu özelliklerden dolayı, protein-protein, antikor-antijen, reseptör-ligand etkileşimlerinden düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tanımlanmasına kadar değişen çok çeşitli biyomoleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılabilir [5].

Sunulan tez çalışması kapsamında anti-CCP tanıma bölgelerine sahip SPR biyosensörler hazırlanmış ve çalışma aşağıdaki başlıklar altında gerçekleştirilmiştir:

- SPR biyosensör, allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve allil gruplarının yönlendirilmesi sağlanmıştır.
- Akrilamid (AAm) monomeri, kalıp monomer olarak kullanılan anti-CCP ile etkileştirilerek anti-CCP/AAm ön-kompleksi hazırlanmıştır.
- Anti-CCP molekülleri çapraz bağlayıcı metilen bisakrilamid (MBAAm) varlığında ön-kompleks anti-CCP/AAm ile reaksiyona sokularak moleküler baskılanmış (anti-CCP/PAAm) SPR biyosensörü elde edilmiştir.
- Ayrıca kontrol deneyi için kalıp molekül olan anti-CCP molekülü kullanılmadan, baskılanmamış (PAAm) SPR biyosensörü de hazırlanmıştır.
- Hazırlanan anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörler, FTIR-ATR, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre ve temas açısı ölçümleriyle karakterize edilmiştir.
- Adsorpsiyon çalışmaları için 10 mM pH 7.0 fosfat tamponu kullanılırken, desorpsiyon çalışmaları için de %1 Tween 20, %10 asetik asit (HAc) içeren çözelti kullanılmıştır.
- Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin anti-CCP seçiciliği, anti-CCP, IgM, BSA çözeltileri ve seyreltilmiş plazma örnekleri ile araştırılmıştır.
- Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.
- Langmuir adsorpsiyon modeli, bu afinite sistemi için en uygun model olarak bulunmuş ve sonuçlar anti-CCP/PAAm SPR biyosensör yüzeyindeki anti-CCP bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı ve tek tabakalı olduğunu göstermiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Moleküler baskılama teknolojisi

Çevresel faaliyetleri izleme, biyoterörizm tespiti ve besinlerdeki toksik kirleticilerin analizi için hedef moleküle özgü, önceden belirlenmiş seçicilik ve afiniteye sahip biyolojik ve kimyasal moleküllere olan ihtiyaç her zamankinden daha fazladır. Canlı organizmalar söz konusu olduğunda moleküler yapılar “moleküler tanıma” olarak adlandırılan yapısal ayırım yapabilme yeteneğini kullanarak birbiriyile etkileşip reaksiyona girerler. Bilim insanları bunun altındaki mekanizmayı anlamaya antikor-antijen, enzim-substrat, hormon-reseptör, DNA ve RNA arasındaki etkileşimleri ortaya koyarak çalışmaktadırlar. Protein ve nükleik asit gibi yapıların, ligand seçiciliği özellikleri yanında kararlılık problemleri abiyotik çevrelerde kullanımını kısıtlamaktadır. Bu durum doğal eşlenikleriyle aynı seçiciliğe ve etkinliğe sahip yapay biyo-tanıma sistemlerinin geliştirilmesini tetiklemiştir. “Moleküler Baskılama”, yapay moleküler tanıma için alternatif sağlamak için ortaya çıkan yeni bir teknolojidir. Moleküler baskılama yöntemi farklı matrikslerden iyonlar, organik moleküller ve biyomoleküllerin yüksek seçicilikte ayrılabilmesi için, akıllı polimerlerin üretilerek farklı uygulamalarda kullanılmasını yaygınlaştıran yeni bir teknolojidir [6].

Enzimatik kataliz ya da afiniteye dayalı ayırım gibi biyotanıma esaslı yöntemlerde moleküller arası etkileşimler önemlidir. Moleküler baskılama yöntemi aracılığı ile farklı bileşikler için seçici istenilen özelliklerde polimer yapımı mümkündür. Bu teknik kalıp moleküllerin kullanımıyla spesifik katalitik ve tanıma bölgelerinin oluşumuna olanak sağlar [7].

Moleküler baskılama tekniği, oldukça çapraz bağlı polimer matriks içerisinde boşluklar oluşturulması temeline dayanmaktadır. Bu oyuklar kalıp molekülün boyut ve şeklini tanıma özelliğine sahiptir. Kalıp molekülün herhangi bir desorpsiyon yöntemi ile uzaklaştırılması, sabit pozisyonlardaki fonksiyonel grupların ortaya çıkmasını sağlayarak, kalıp moleküle eşlenik yapı oluşturmaktadır. Hazırlanan polimer, kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanıyarak, herhangi bir ortamda bu kalıbı seçici ve etkin bir şekilde bağlamaktadır.

Moleküler baskılanmış polimer (MIP), bir kalıp molekülü, fonksiyonel monomer ve bir çözücü içindeki başlatıcıyı içeren bir karışımdan hazırlanır. Polimerizasyon boyunca kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında oluşan kompleks çapraz bağlayıcı monomer ile çevrelenerek polimerleştirilir. Böylelikle kalıp molekülün hapsedildiği üç boyutlu polimer ağı oluşturulur. Kalıp molekülün uzaklaştırılması oluşan boşluklar şekil, büyüklük ve moleküler etkileşimler açısından kalıp moleküle özgüdür. Moleküler baskılama için ön koşul kalıp molekül ve monomer arasında kararlı bir kompleks oluşumudur [1].

Moleküler baskılanmış polimerler, kalıp molekül için eşsiz seçiciliğe sahip olmalarının yanısıra mekanik stres, ısı, asit, baz, su ve organik çözücülere karşı oldukça dirençlidirler [8]. Bu teknik; kromatografi, saflaştırma, kataliz, sensör, ilaç salınımı ve ön örnek uygulamaları gibi oldukça geniş bir alanda tanıma ve ayırma amaçlı kullanılmaktadır. Elde edilmeleri kolay ve ucuzdur. Performansında değişiklik olmaksızın bir kaç yıl boyunca saklanabilirler [9-11].

Moleküler baskılanmış polimerler, farklı yöntemlerle öğütülmüş partiküller, nanopartikül, farklı formlarda monolitler, açık boru kapilerde katman, yüzey tutturulmuş ince tabaka, membran ve kompozit şeklinde olabilir. Moleküler baskılama ile ilgili çalışmaların karakterizasyonu, optimizasyonu ve sonuçları hakkında birçok derleme yazılmıştır. Bu derlemelerin çoğu kiral tanıma [12,13] ve kapiler elektrokromatografi [14-16] hakkındadır. MIP'de monolit, partikül ve membran kullanımı gibi spesifik formlar ile ilgili derlemeler yazılmıştır [17]. MIP, katı faz ekstraksiyonu ile zenginleştirme işlemlerinde [18], ilaç salınım sistemlerinde [19], antikolar için reseptör ya da yapay enzim olarak [20,21] kullanılmaktadır. Bütün bunların dışında matrikse iletken polimerlerin sokulduğu MIP'nin farklı çalışma konularında çalışılmıştır [22].

MIP'nin sensörlerde kullanımı ise oldukça devasa ticari pazar alanına sahip olması nedeni ile güncel bir konudur. MIP temelli oldukça fazla sensör çalışması olmasına rağmen, bazı çalışmalar elektrokimyasal ve optik sensörler gibi belirli konular üzerine yoğunlaşmıştır. Bu polimerlerin bazıları monoklonal antikolar ve reseptörler gibi doğal tanıma sistemleriyle karşılaştırılabilir ölçüde yüksek seçicilik ve afiniteye sahiptirler. Bu da onları oldukça uygun bir kimyasal sensör üyesi

yapmaktadır. Sentetik reseptörler için kullanılan pek çok polimerin kaotik yapısı, heterojen gözenek büyüklüğü dağılımı ve bağlanma bölgelerinin matriks boyunca yer alması genellikle kütle aktarımını yavaşlatır. Her zaman problem olmamasına karşın bu özellikler moleküler baskılanmış polimerlerin genel uygulamalarda doğal reseptörlerin yerini almalarını önlerler. Bu problemi aşmak için nano yapılar devreye sokulmaya başlanmıştır. Nanopartiküller ve nanofilmler, biyomedikal, optik ve elektronik alandaki geniş uygulama alanı nedeni ile yığın malzemeler ile atomik ya da moleküler yapılar arasında bir köprü oldukları için çok büyük ilgi uyandırmaktadır [23].

### **2.1.1. Moleküler baskılama tekniği**

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.1)

#### ***I. Basamak: Ön-kompleksleşme***

Fonksiyonel grup içeren polimerleşebilen uygun monomerler, kalıp moleküle kovalent yada kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanarak kompleks oluşturur. Bu basamakta, kalıp etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir yapı oluşumu söz konusudur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutar.

#### ***II. Basamak: Polimerizasyon***

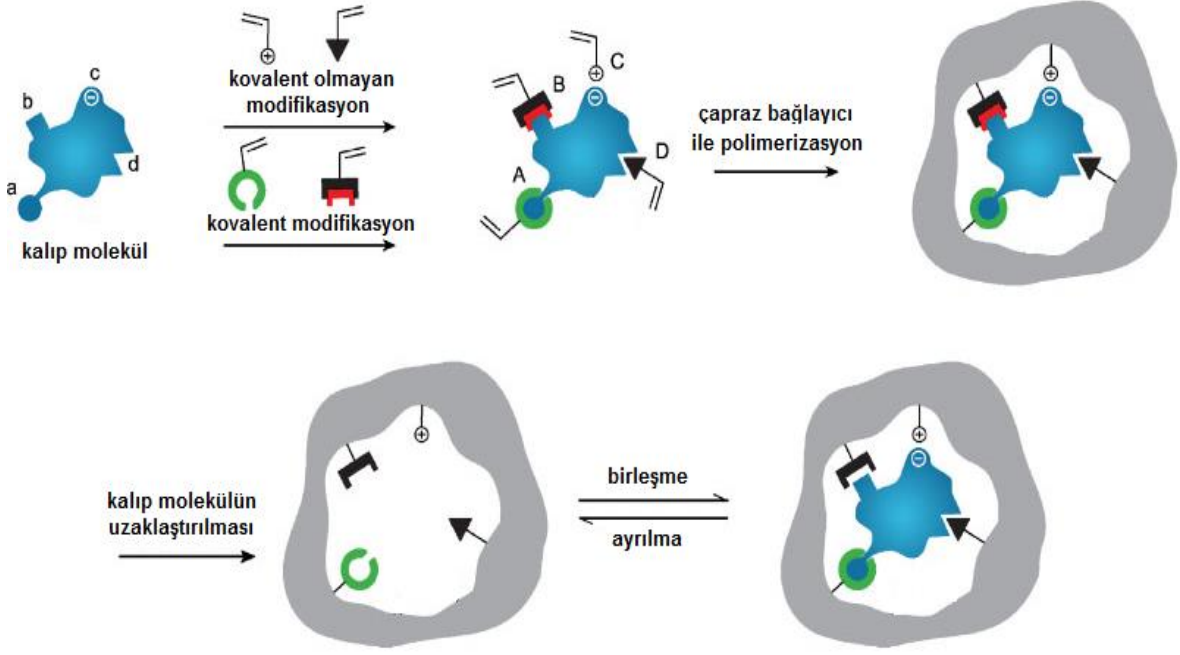
Monomer-kalıp ön-kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcısında kullanılmasıyla fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

#### ***III. Basamak: Kalıp molekülün uzaklaştırılması***

Yapıda hedef molekülün yerini alacak boşlukların oluşturulması amacıyla, kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Uygun koşullar altında, bu boşluklar kalıp molekülün boyutunu, yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanır, seçici ve etkin olarak kalıp molekülü bağlar [24].

Kalıp molekülün, fonksiyonel monomerin, çapraz bağlayıcının, çözücünün ve başlatıcının seçimin etkin bir şekilde yapılması moleküler baskılama için çok önemlidir.





Şekil 2.1. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi [25].

### 2.1.2. Moleküler baskılama yönteminde kullanılan malzemeler

Polimer matrisin yapısı moleküler baskılamada çok önemlidir. Oyukların spesifik yapısı sadece düşük molekül ağırlıklı kalıpların etkisi ile değil, polimer zincirinin düzenlenişi ile de ilgilidir. Polimerin sertliği oyukların kalıp molekül uzaklaştırıldıktan sonra şekillerini korumasına olanak sağlar. Buda yüksek oranda çapraz bağlayıcının kullanılması ile gerçekleşir. Kalıp molekülün polimere bağlanması baskılanacak substratı yönlendirir. Optimum spesifiklik ve seçiciliğe sahip polimerler uygun monomer ve çapraz bağlayıcı seçimi ile elde edilir.

Matriks yapısı, matriks konfigürasyonu, matriksin doğası, kullanılan kalıp, çapraz bağlanmanın derecesi gibi matriksin karakteristik özelliklerini belirleyen etkenler yeniden bağlanma üzerinde oldukça etkilidir. Polimer matriksteki fonksiyonel monomerin polimerin yapısına rastgele girişi özgüllüğü azaltır. Polimerizasyon sırasında kalıp ve monomer arasındaki etkileşim oldukça kuvvetli olmalıdır. İdeal olan kovalent etkileşimlerdir fakat desorpsiyonda yaşanan sıkıntılar ve yavaş bağlanma kinetiği tercih edilmesini engellemektedir. Moleküler baskılanmış polimerlerin en ideali desorpsiyon ve tekrar bağlanma için ılımlı koşulların olduğu kovalent olmayan bağlanmadır.

### **2.1.2.1. Kalıp molekül**

Baskılanan kalıp molekülün, fonksiyonel monomerle kompleks yapacak fonksiyonel grupları içermesi en önemli parametrelerden biridir. Kalıp molekülün hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşim (karboksil, amino, hidroksil ve amid grupları) yapabilecek bölgeleri kompleks oluşumu için en çok tercih edilen bölgelerdir. Ayrıca kalıp molekül kimyasal reaksiyonun gerçekleştiği koşullar altında kararlı kalmalıdır. Örneğin; ısı bir başlatıcı seçildiği takdirde kalıp molekülün (ve/veya ön polimerizasyon kompleksin) yüksek sıcaklıklarda yapısında parçalanma olmaması yada UV ışık ile başlatılan polimerizasyon koşullarında oluşturulan ön-kompleks kararlılığı göz önüne alınmalıdır. Kalıp molekülün konformasyonundaki ufak değişiklikler bile baskılama işleminin başarısını etkilemektedir [26]. Baskılanacak molekül olarak ilaçlar, aminoasitler, karbohidratlar, proteinler, nükleotid bazlar, hormonlar, pestisitler, koenzimler ve iyonlar kullanılabilir [27].

### **2.1.2.2. Fonksiyonel monomerler**

Fonksiyonel monomerler bağlanma bölgelerindeki bağlanma etkileşimlerinden sorumludur. Moleküler baskılı polimerlerde kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki geri-bağlanma basamağı çok önemli olduğu için fonksiyonel monomerlerin seçimi kritiktir. Fonksiyonel monomer için anahtar eleman, etkileşimin gerçekleşmesi için uygun bağlanma bölgelerinin sayısıdır. Kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki sterik ve elektronik etki sayesinde kopolimerizasyon gerçekleşir. Asidik, bazik ve nötral özelliklere sahip yaygın olarak kullanılan bazı fonksiyonel monomerler vardır.

Rijit ve çözünmez yapıdaki baskılanmış polimerler oldukça fazla bağlanma bölgelerine sahipken, biyolojik reseptörler esnek, çözünür ve tek bağlanma bölgesine sahiptir. Genellikle polar olmayan çözücülerde hazırlanan polimerlerde farklı fonksiyonel monomerler kullanılabilmesine rağmen, polar çözücülerde kuvvetli hidrojen bağları yapan akrilamidler kullanılabilir.

### **2.1.2.3. Çapraz bağlayıcılar**

Çapraz bağlayıcılar hem bağlanma bölgelerini sabitleyerek hem de mekanik kararlılık sağlayarak morfolojinin kontrolüne imkan verirler. Çapraz bağlayıcılar

aynı zamanda polimerlerin çözücüde çözünmesini zorlaştırdıkları için pratikteki kullanımlarını kolaylaştırır.

MIP hazırlanırken bir diğer önemli nokta çapraz bağlayıcının seçimidir. Çapraz bağlayıcı, kalıbın polimerden uzaklaştırılmasından sonra kararlı ve analiti hafızasında tutan polimer ağ örgüsü oluşturmak için kullanılır [28]. Çapraz bağlayıcı, matriksin morfolojisinin kontrol edilmesini (jel tipi, makro gözenekli ya da mikrojel halinde olması), baskılanmış molekülün veya iyonun bağlanma bölümlerinin kararlı olmasını, polimer matriksin mekanik kararlılığının yüksek olmasını sağlar. Yüksek oranda çapraz bağlanma, polimer matriksin çözücüde çözünmesini önler ve kullanımı kolaylaştırır. Etkili bir baskılama için çapraz bağlayıcının reaktifliği ile fonksiyonel monomerin reaktifliğinin uygunluğu, çapraz bağlayıcı ajanın fonksiyonel monomere olan mol oranı önemlidir. Aksi takdirde fonksiyonel monomerden veya çapraz bağlayıcıdan biri polimerizasyon sırasında baskın çıkabilir ve homojen kopolimerizasyon gerçekleşemez. Farklı çapraz bağlayıcı/fonksiyonel monomer derişim oranları moleküler baskılı polimerlerdeki farklı sayıda bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olur ve buda seçiciliği etkiler [29]. Eğer mol oranları çok küçükse, kalıp molekülün bağlanma bölgeleri birbirlerine çok yaklaşır. Hedef molekülün bağlanma bölgeleri komşu bölgeler tarafından kapatılır ve etkin bir sonuç elde edilemez. Çok büyük mol oranlarında da çapraz bağlayıcılar fonksiyonel monomerlerle veya kalıp molekülle kovalent olmayan etkileşimler göstermesi sonucu baskılamanın etkinliği yine azalmaktadır [30]. Etkin bir baskılama için çapraz bağlayıcının reaktivitesi fonksiyonel monomerin reaktifliğine yakın olmalıdır.

#### **2.1.2.4. Çözücüler**

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

Çözücüler, polimerizasyonda baskılanacak molekül, fonksiyonel monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı gibi tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasını ve polimerde gözeneklerin oluşmasını sağlar. Makrogözenekli polimerin hazırlanması

aşamasında; çözücü, gözeneklerin yapısı ve seviyesi, morfolojisi ve topla gözenek hacmini kontrol etmek için önemli bir unsurdur. Çözücünün baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu artırma gibi bir görevde vardır. Gözeneklilik bağlanan hedef molekülün polimerden salınmasını kolaylaştırır. Çözücünün baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomer arasındaki kompleks oluşumunu artırma gibi bir görevde vardır. Gözeneklilik bağlanan hedef molekülün polimerden salınmasını kolaylaştırır. Çözücülerin bir diğer görevde polimerizasyon sırasında reaksiyon ısısını eşit olarak yaymaktır. Aksi takdirde, polimerizasyon sırasında reaksiyon sıcaklığı bölgesel olarak artar ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna neden olur. Çözücü seçimi baskılamanın türüne bağlıdır. Kovalent baskılamada, tüm bileşenleri iyi çözebilecek birçok çözücü kullanılabilir. Kovalent olmayan baskılamada, etkileşimin oluşumunu ve baskılama etkisini artırmak için çözücü seçimi daha önemlidir [24]. Polimerizasyon çözücüsü, monomerlerle baskılanacak molekül arasındaki hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimler gibi polar etkileşimlerin oluşmasını sağlamak için az polar ve aprotik olmalıdır. Genellikle sentez için polar olmayan organik çözücülerin kullanıldığı MIP'ler polar organik çözücülerin kullanıldığı MIP'lerden daha iyi seçiciliğe sahiptir [31]. Hazırlanan polimerin analite seçiciliği ile oluşan boşluğun analite tam uygun boyutta olması yani ne çok dar ne de çok gevşek olması çözücü seçimine bağlıdır.

#### **2.1.2.5. Başlatıcılar**

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

#### **2.1.2.6. Sıcaklık**

Kalıp molekül ve monomer arasındaki denge pozisyonu hem sıcaklığın hem de basıncın ürünüdür [32]. Önceki çalışmalar göstermiştir ki düşük sıcaklıklar, oldukça kuvvetli olan elektrostatik etkileşimler yüzünden MIP'de tercih edilmektedir. Düşük

sıcaklıklarda polimerleşme yavaş ve zincir oluşumu monomer-kalıp oluşumuna müdahale etmemektedir.

### **2.1.3. Moleküler baskılama yöntemleri**

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan bağın çeşidine göre kovalent ve kovalent olmayan baskılama olmak üzere ikiye ayrılır:

#### **2.1.3.1. Kovalent baskılama**

Ön organizasyonlu moleküler baskılama yaklaşımında, polimerizasyondan önce baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomerler arasında kuvvetli, tersinir bir kovalent düzenleme oluşur. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp oluşturmak amacıyla polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül baskılanmış polimerlerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşur [33-34].

#### ***Avantajları:***

Monomer-kalıp kompleksi oldukça kararlıdır ve stokiometrik oranlarda gerçekleşir. Polimerizasyon koşulları (yüksek sıcaklık, yüksek veya düşük pH ve polar çözücüler gibi) istenildiği gibi uygulanabilir. Çünkü konjugatlar kovalent bağlarla oluşturulmuştur ve oldukça kararlıdır [35].

#### ***Dezavantajları:***

Monomer-kalıp molekül konjugatının sentezinde sık sık sorunlar çıkabilir ve sentez yöntemi pek ekonomik değildir. Hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı sınırlıdır. Kovalent bağ oluşumu nedeni ile bağlanma kinetiği yavaştır [36].

#### **2.1.3.2. Kovalent olmayan baskılama**

Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması kovalent olmayan (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, koordinasyon bağ oluşumu) etkileşimlerle gerçekleşir. Polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanır [37].

### **Avantajları:**

Kovalent monomer-kalıp konjugatının sentezine gerek yoktur. Polimerizasyondan sonra kalıp molekül polimerden kolayca uzaklaştırılır, çünkü kovalent olmayan etkileşimler daha zayıftır. Hedef molekülün bağlanma kinetiği hızlıdır [38].

### **Dezavantajları:**

Polimerizasyon koşulları, kovalent olmayan etkileşimleri artırmak amacıyla sınırlıdır. Fonksiyonel monomerler, bağ oluşum dengesini artırmak amacıyla fazlaca kullanılır ve spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olabilir [39]. Moleküler etkileşimlerin farklılığı, seçiciliğin ve tersinirliğin derecesini etkiler. Örneğin kovalent bağlarla oluşturulan etkileşimler oldukça spesifiktir. Ancak geri bağlanma kinetiği yavaştır. Bununla beraber, hidrofobik etkileşimlerin kinetiği daha hızlıdır fakat seçiciliğinde azalma gösterir. Genel olarak kovalent olmayan etkileşimler birçok bileşiğe uygulanabilir olmaları, hızlı kinetiği ve daha uygun koşullarda bağ oluşumu ve kırılma özellikleri göstermeleri nedeniyle daha geniş uygulama alanlarına sahiptir. Dahası  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler gibi kovalent olmayan etkileşimler yeni moleküler baskılanmış fonksiyonel polimerlerin tasarımı için gelecek vaat etmektedirler.

#### **2.1.4. Baskılama işleminin kontrolü**

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

Yapılan çalışmalar baskılanmamış polimer ile karşılaştırmalı olarak yürütülür. Bu polimer kalıp molekülün yokluğunda aynı polimerizasyon işlemi uygulanarak elde

edilir. Baskılanmamış polimerler, baskılanmış polimerlerle spesifik boşluklar dışında aynı kimyasal özelliklere sahiptir. Bu yüzden baskılanmış polimerlerle kalıp molekül arasında gelişen etkileşimlerin doğası, baskılanmamış polimerlerle kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin doğasıyla aynıdır. Fark bu etkileşimlerin gücü arasındadır. Eğer polimerizasyon basamağı esnasında iyi tanımlanmış boşluklar oluşturulmuşsa baskılanmış polimerdeki etkileşimler daha güçlüdür. Etkileşimdeki bu hassasiyet, kalıp molekülün üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır. Boşlukların varlığı bağlanma deneyleri ve kromatografik ölçümler gibi çeşitli yöntemlerle incelenebilir. Polimerlerin seçicilikleri, baskılanmış/baskılanmamış polimerlerle etkileştirilmesi; baskılanmış ve baskılanmamış polimerlere ait dağılım katsayılarının ( $k$ ) hesaplanması ve baskılama faktörü olarak değerlendirilen bağıl dağılım katsayısının ( $k'$ ) belirlenmesiyle gösterilir [40].

#### **2.1.5. Moleküler baskılanmış nanofilmler**

Bir mikrometreden daha az kalınlıkta olan baskılanmış nanomalzemeler, nanofilmlerin kimyasal sensörlerde uygulama alanı bulması, son yıllarda araştırmacıları bu konuda çalışmaya yöneltmiştir [41,42]. Moleküler baskılanmış nanofilmlerin yüzey/hacim oranı yüksek ve bağlanma kinetiği hızlıdır. Ayrıca bu malzemeler hedef moleküllerin tayini için doğrudan elektrokimyasal elektrot [43], kuvars kristal mikroterazi (QCM) [44-47] ve yüzey plazmon rezonans (SPR) [48,49] yüzeyinde sentezlenebilir. Bu özellikler, moleküler baskılanmış nanofilmlerin sıklıkla tercih edilmesinin sebeplerindedir. Nanofilmler, döndürmeli kaplama yöntemi ile kolaylıkla hazırlanabilmektedir. Film kalınlığı, döndürmeli kaplama hızının değiştirilmesiyle ve aynı zamanda da düşük molekül ağırlığında polimerlerin ortama eklenmesiyle kolaylıkla ayarlanabilir [50]. Örneğin; QCM çipi üzerinde 400 nm kalınlığında heksaklorobenzen baskılanmış polimer film, monomerlerin döndürmeli kaplama yöntemiyle ince bir tabaka oluşturularak hazırlanmıştır. Bu sensörler, yüksek seçicilik ve duyarlılık ile 10-12 M'in altında tayin limiti ve 10 saniye gibi kısa bir cevap süresi göstermişlerdir [51].

Schmidt ve arkadaşları ise ince kaplanmış MIP nanofilmlerin morfolojisinin ayarlanması için farklı doğrusal polimerler kullanmışlardır [52]. Doğrusal polimerin

uzaklaştırılması ile farklı gözenekli yapıdaki propranolol baskılanmış nanofilmler elde edilmiştir.

Ayrıca farklı nanoüretim teknikleri kullanılarak elde edilen nanoboşluklu filmler üzerine MIP nanofilmlerin kaplanması mümkündür. Örneğin; Yang ve arkadaşları nanoboşluklu alimüna membranlar kullanarak silika nanotüp filmler sentezlemişlerdir. Moleküler baskılanmış filmler, doğrudan östrojenin seçici olarak ayrılması için kullanılmıştır. Nanoyapılar sadece yüzey alanını arttırmak ve bağlanma bölgelerine erişim kolaylığı sağlamakla kalmayıp; aynı zamanda, yüzey özelliklerinin (ıslanma özelliği gibi) değiştirilmesine de olanak sağlamaktadır [53].

#### **2.1.6. Moleküler baskılanmış nanomalzemelerin avantajları**

Son zamanlarda nanoteknolojinin ve yüzey kimyasının moleküler baskılama yönteminde kullanılmaya başlanması ve baskılanmış nanomalzemelerin biyotanı ve kimyasal sensörlerde geniş uygulama alanı bulmasına sebep olmuş ve araştırmacıları bu alandaki çalışmalara yöneltmiştir [54-58]. Nanoboyuttaki partiküllerin baskılanmış bölgeleri, yüzeyde ya da yüzeye çok yakındadır. Böylelikle bu yapıdaki baskılanmış malzemelerin bağlanma kinetiğinin hızlanması ve kapasitenin, baskılanmış bölgelere erişim kolaylığının büyük oranda artması beklenmektedir. Baskılanmış filmlerle ve yüzey baskılanmış malzemelerle karşılaştırıldığında; baskılanmış nanomalzemelerin hedef moleküle daha fazla afinitesi ve seçiciliği vardır ve tanıma bölgeleri daha homojen dağılmıştır [59].

#### **2.1.7. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulama alanları**

Moleküler baskılanmış polimerler farmakolojik, analitik ve biyolojik seçici moleküler tanıma alanları, kontrollü salınım sistemleri, sensörlerde tanıma elemanı olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadırlar [60]. Sıvı kromatografi, kapiler elektroforez, kapiler elektrokromatografi ve katı faz ekstraksiyon gibi analitik tekniklerde MIP'lerin kullanımına yönelik çalışmalar sürekli artmaktadır [61,62].

Kimya ve ilaç endüstrisindeki artan pazar fırsatlarına bağlı olarak moleküler baskılanmış polimerlerin su saflaştırma ve atık malzeme değerlendirme işlemleri gibi ayırma alanındaki uygulamaları giderek genişlemektedir. Sadece kromatografi



kolonlarının satışının yılda 500 milyon ABD dolarına yaklaştığı ve membran ayırma teknolojisi pazarında yıllık 1 milyar ABD doları civarında büyüme olduğu tahmin edilmektedir. Moleküler baskılanmış malzemelerin afinite ayırma, katı faz ekstraksiyonu ve sert şartlar altında (organik ve toksik ortamlar, düşük ya da yüksek pH'lar, yüksek sıcaklıklar ve basınç gibi) ayırma alanında bu pazarda %1-3 oranda yer alması beklenmektedir [63].

MIP adsorbentler, ilaçların katı faz ekstraksiyonunda, proteinlerin, aminoasitlerin, DNA ve RNA'nın, peptidlerin, hormonların ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılmaktadır [64]. MIP'lerin bir diğer potansiyel kullanım alanı olan bazı temel araştırmalar, ilaç tasarımı, optik gibi alanlarda önemli olan kiral bileşiklerin ayrılmasıdır [65-67].

Bir diğer uygulama alanı ise sensörlerde tanıma elemanı olarak kullanımlarıdır. Bir kimyasal veya biyosensör, bir tanıma elementi ve onunla bağlantılı dönüştürücü içerir ve bu dönüştürücünün görevi, analitin bağlanmasıyla oluşan değişimi, ölçülebilir bir dış sinyale dönüştürmektir. Bu sensörlerde kullanılan biyomoleküller çoğunlukla zayıf fiziksel ve kimyasal kararlılık gösterirler. Bu nedenle yapay reseptörlere duyulan ilgi artmaktadır. Özellikle MIP'ler zorlayıcı şartlarda gösterdikleri dayanıklılık ve yüksek seçicilikte tanıma bölgelerine sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedir. MIP temelli ilk sensör baskılanmış polimer membran ince filmi içeren bir alanetki kapasitörüdür ve analitin bağlanmasıyla kapasitansta meydana gelen değişim ölçülmüştür [68]. Daha sonra ise elektrokimyasal [69,70] ve optik [71,72] dönüştürücülere dayalı başka sensörler geliştirilmiştir [73].

Moleküler baskılamayla hazırlanan polimerler aminoasit türevleri, ilaçlar ve şeker türevlerinin kiral ayırımı için, organik reaksiyonlarda enzim benzeri olarak ve iyon seçici absorbanlar olarak başarıyla kullanılmaktadır. Son yıllarda moleküler baskılama temelli elektrokimyasal ve optik sensörler hakkındaki yayınların sayısı hızla artmaktadır [74].

## **2.2. Biyosensörler**

Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarını içeren reseptörler ve uygun çeviricilerin bir arada bulunduğu basit analitik cihazlardır. Geleneksel analitik

tekniklerle karşılaştırıldığında biyosensörler, hızlı ve gerçek zaman tespiti, düşük maliyet, taşınabilirlik, basit kullanım, örnek hazırlama işleminin kolaylığı gibi birçok özelliğe sahiptir [2]. Biyosensörleri genel olarak biyolojik tanıma elemanları ve dönüştürücülerine göre iki sınıf altında sınıflandırılmak mümkündür.

Biyolojik tanıma elemanlarına göre olan sınıflandırmada;

- Enzim,
- Antikor,
- Nükleik asit temelli biyosensörler [3],

Dönüştürücülerine göre yapılan sınıflandırmada ise;

- Elektrokimyasal,
- Optik,
- Piezoelektrik,
- Termal sensörler olarak sınıflandırılır [4].

Çevre ve besinlerde bulunan kimyasal bileşikler, toksinler ve patojenler gibi kirleticilerin tespiti ve görüntülenmesi insan sağlığı ve çevre için hayati önem taşımaktadır. Kütle spektrofotometresiyle birlikte kullanılan sıvı ve gaz kromatografileri gibi yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip geleneksel analitik teknikler hali hazırda mevcuttur. Fakat söz konusu bu teknikler zaman alıcı, pahalı ve bu tekniklerle ilgili eğitim almış personele ihtiyaç duyar. Bunun yanı sıra bu tekniklerle çevre ve besinlerdeki kirleticilerin sürekli izlenmesi mümkün değildir. İyi bir görüntülemeyi başarmak için duyarlı, basit, hızlı, maliyeti düşük ve taşınabilir metotlara ihtiyaç vardır. Biyosensörler yukarıda bahsedilen pozitif özelliklere sahiptirler ve bu yüzden çevre ve besinlerin görüntülenmesinde idealdirler [2]. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) terminolojisine göre biyosensörler, biyolojik bir tanıma elemanı kullanarak analitik bilgiler ihtiva eden reseptör ve çeviricilerin entegre edildiği cihazlardır. Biyosensörler tanıma elemanlarıyla hedef analit arasındaki reaksiyon ve bağlanmaları uygun bir sinyal dönüştürücü metotla anlamlı bir sinyale dönüştüren tanıma elemanlarıdır. Tablo 2.1 geleneksel analitik teknikler ile biyosensörler arasındaki özellikleri karşılaştırmaktadır.

Biyosensörlerin besin ve çevredeki kirletici tespiti üzerinde geleneksel analitik tekniklere göre birçok avantajı vardır. Bu avantajlar biyosensörlerin geleneksel analitik tekniklere göre hızlı, maliyetlerinin düşük, taşınabilir olmaları ve örnek hazırlama işleminin basit olmasıdır. Fakat bazı biyosensörler hala birkaç dezavantaja sahiptirler. Son zamanlarda birden fazla analiti tespit edebilecek sensörler tasarlanmasına rağmen, çoğunlukla biyosensörler sadece bir analitin tespitine olanak sağlamaktadırlar [2].

İlk biyosensör 1962 yılında Clark ve Lyons tarafından ortaya atılmıştır. Araştırmacılar diyaliz membran kullanılmış oksijen elektroduna glikoz oksidaz enzimini tutturarak kandaki glikoz düzeyini ölçmüşlerdir [75]. Her ne kadar biyosensörler 1962 yılında bilim dünyasına duyurulmuş olsa da 1962 yılının öncesinde biyosensörlerin icadını destekleyen ve sonrasında gelişimi ve geliştirilmesine katkı sağlayacak birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar Tablo 2.2' de belirtilmiştir [76].

Biyosensörler, biyoreseptör ve çevirici gibi iki elemanın bir araya gelmesiyle oluşmuş yapılardır. Biyoreseptör substrat, eşlenik DNA ve antijen gibi analitleri tanıyan immobilize olmuş duyarlı biyolojik yapılardır. Çeviriciler ise biyoreseptörler ile analitler arasında gerçekleşen etkileşimlerden kaynaklanan biyokimyasal sinyalleri dönüştüren elemanlardır. Üretilen sinyalin yoğunluğu direk veya aksine analitin derişimiyle orantılıdır. Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarının ve sinyal dönüştürücülerin temel ilkelerine bağlı olarak sınıflandırılırlar. Dönüştürücülere göre yapılan sınıflandırmada biyosensörler elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve termal sensörler olarak sınıflandırılır [4]. Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanlarına göre ise enzim, antikor, nükleik asit temelli biyosensörler olarak sınıflandırılabilirler [3].

Tablo 2.1. Geleneksel analitik teknikler ile biyosensörler arasındaki özelliklerin karşılaştırılması [2].

<b>Biyosensörler</b>	<b>Geleneksel Analitik Teknikler</b>
Hızlı ve gerçek zaman tespiti	Zaman alıcı
Düşük maliyet	Pahalı
Taşınabilir	Laboratuvarda görüntüleme
Basit kullanım	Eğitimli laboratuvar personeli
Basit cihazlar	Yüksek teknolojiye sahip aletler
Örnek hazırlamanın işleminin basitliği	Kapsamlı örnek hazırlama gerekliliği
Daha az organik çözücü tüketimi	Daha fazla organik çözücü tüketimi
Tek analit tespiti	Birden fazla analit tespiti
Sınırlı ticari kullanılabilirlik	Ticari kullanılabilirlik
Ayarlanmaz	Ayarlanır
Duyarlı	Duyarlı
Özgül	Özgül
Tekrar kullanılabilir	Tekrar kullanılabilir

Tablo 2.2. Biyosensörlerin tarihçesi [76].

<b>Tarih</b>	<b>Bilimsel Gelişme</b>
1916	Proteinlerin immobilizasyonu üzerine ilk rapor
1922	İlk cam pH elektrodu
1956	Oksijen elektrodunun bulunması
1962	İlk biyosensör tanımı
1969	İlk potansiyometrik biyosensör
1970	İyon seçici alan etki transistörünün bulunması
1972-1975	İlk ticari biyosensör
1975	İlk mikroorganizma temelli biyosensör
1980	<i>In vivo</i> kan gazları için ilk fiber optik pH sensörü
1982	İlk fiber optik temelli biyosensör
1983	İlk yüzey plazmon rezonans immünosensör
1987	MediSense ExacTech glikoz biyosensör
1990	Pharmacia BIACore SPR temelli biyosensör sistemi
1992	i-STAT elde taşınabilen kan analiz edici cihaz
1996	MediSense'inAbbott'a 867 milyon dolara satışı
2003	İ-STAT'ın Abbott'a392 milyon dolarasatışı
2004	Therasense'inAbbott'a 1.2 milyar dolar satışı

## **2.2.1. Biyosensörlerin sınıflandırılması**

### **2.2.1.1. Biyotanıma elemanlarına göre sınıflandırma**

#### **2.2.1.1.1. Enzimler**

Enzimler biyosensörlerin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılan malzemelerdir. Bu tip biyosensörler istenilen molekül için özgül olan enzimleri kullanırlar. Ticari olarak en başarılı biyosensörler dünya biyosensör pazarının yaklaşık %90'lık kısmını oluşturan ve kan örneklerindeki glikoz düzeyini ölçen biyosensörlerdir [77]. Biyosensör yapımı için bugüne kadar birçok enzim kullanılmıştır. Örneğin oksidoredüktazlar; laktat [78], malat [79], askorbat [80], aminoasitler [81], alkol [82], kolesterol [83], gliserol [84], transferazlar; asetik asitlerin biyosensör analizlerinde [85], kaptan [86] veya atrazin [87] gibi ksenobiyotiklerin belirlenmesinde, hidrolazlar; sukroz [8], liyazlar; sitrikasit analizlerinde [89], ligazlar; DNA nokta mutasyon tespitinde kullanılırlar [90]. Enzim yükleme uygun pH'nın kullanımı sıcaklık ve kofaktörleri etkileyen bazı faktörler enzim temelli biyosensörün performansı üzerine etki ederler. İmmobilizasyon metodu ve sensör yüzeyindeki enzimin kalınlığı gibi faktörlerde elektrot performansını etkileyen diğer faktörlerdir [91].

#### **2.2.1.1.2. Antikorlar**

Antikor çok düzenli bir sırada düzenlenmiş yüzlerce aminoasitten meydana gelmiş kompleks bir biyomoleküldür. Antijene özgül antikor yüksek bir seçicilikle antijene bağlanır. Antikorların bu eşsiz özelliği özgül bir analite olan ilginin kullanacağı immünosensörlerdeki kullanımında önemlidir [91]. İmmünosensörler kanser hücrelerinin izlenmesinde [92] veya onların işaretleyicilerinin tespitinde [93], bakteri ve virüslerinin [1] ve toksinlerin [94] tespiti için tasarlanırlar.

#### **2.2.1.1.3. Nükleik asitler**

Nükleik asit temelli biyosensörler nükleotit iplikleri boyunca sıralı tamamlayıcı bölümler arasındaki güçlü baz eşlerinden dolayı yüksek seçicilik ve hassasiyete sahiptirler. Nükleik asit (nükleik asitin doğal veya biyoesinlenmiş formu) nükleik asit temelli biyosensörlerde biyolojik tanıma elemanı olarak kullanılırlar. Son zamanlarda genellikle yapay oligodeoksiribonükleotitler DNA hibridizasyon sensörlerinde ölçüm ucu olarak kullanılmaktadırlar.

### **2.2.1.2. Dönüştürücülerine göre sınıflandırma**

Dönüştürücülerine göre biyosensörler optik, elektrokimyasal ve piezoelektrik biyosensörler olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.3).

#### **2.2.1.2.1. Optik sensörler**

Optik biyosensörler besin sanayi, tıp ve çevrenin görüntülenmesinde kullanılan güçlü cihazlardır [5]. Biyolojik çeşitliliğin modern mikroelektronik ve optoelektrik ile bir araya gelmesi, yukarıda sayılan sektörlerdeki uygulamalarda büyük bir analitik potansiyel sunmaktadır. Çoğu optik biyosensör yüzeyindeki ligand analit arasındaki etkileşimlerden kaynaklanan yüzey özelliklerinin değişimindeki ölçümleri temel almaktadır. Adsorpsiyon, floresans ve yüzey plazmon rezonans gibi çeşitli fiziko-kimyasal olgular farklı biyosensör çeşitlerinde kullanılmaktadır.

Görünür bölge UV adsorpsiyon spektrofotometresi makro ölçekli analitik kimyada en anlaşılır tekniktir. Bu uygulamada, besin kirleticilerinin tespiti için kalorimetrik uygulamalar kullanılır. Çoğu durumda teşhis için renkteki ve optik yoğunluktaki değişiklikler yeterlidir.

Floresan anlaşılabilirliği, yüksek seçiciliği, ayırt edici işaretleme teknikleri ve birçok elde edilebilir florofor gibi özelliklerinden dolayı optik temelli tespit için yaygın şekilde kullanılan bir metottur. Floresan tespit diğer tekniklere göre birçok üstünlüğü olsa da, floresan boyaların kısmen daha pahalı oluşu, sınırlı raf ömrü ve diğer kimyasal faktörlerden sıklıkla etkilenmeleri bu tekniğin dezavantajları arasında sayılabilir [95].

#### **2.2.1.2.2. Elektrokimyasal sensörler**

Elektrokimyasal sensörler sanayi, trafik, çevre ve medikal görüntülemelerde, metabolizmanın araştırılması ve biyolojik süreçlerin kontrolünde sıklıkla kullanılan sensörlerdir. Bu sensörler örnekleme ihtiyacı duymadan kimyasalların *in situ* ölçümünde gerçek zamanlı bilgi veren güçlü aletlerdir. Kullanılan elektrota bağlı olarak elektrokimyasal sensörler -30°C ile 1600°C arasındaki sıcaklıklarda kullanılabilirler. Elektrokimyasal sensörler kendi aralarında amperometrik veya potansiyometrik modda kullanılırlar.

Elektrokimyasal sensörler FTIR ve UV spektrofotometresi, kütle spektrometresi ve

kromatografik tekniklerle (gaz kromatografisi ve yüksek performans sıvı kromatografisi) karşılaştırıldığında veri alma ve süreçleri yürütmede gerekli olan elektronik aletlerin kurulumu gibi uygulamalarla karşılaştırıldığında daha basit bir tekniktir. Bakımı ve kalibrasyonu için gerekli olan uğraş nispeten daha azdır. Sensör sinyalleri direk *in situ* elde edilebilir ve süreçlerin kontrolü için gerçek zamanlı bilgi sağlar. Diğer yandan elektrokimyasal sensörler kararlılık ve tespit sınırı açısından laboratuvarlardaki yukarıda bahsedilen standart metotları değiştiremezler. Elektrokimyasal sensörler basit olmalarına rağmen, bu sensörü kullanan kişilerin sensör sinyalleri üzerine etki edecek sıcaklık, basınç ve kimyasal kompozisyon gibi ölçüm şartlarına etki edecek ileri bilgiye sahip olması gerekmektedir [96].

#### **2.2.1.2.3. Piezoelektrik sensörler**

Kuartz kristal mikroterazi (QCM) fiziksel, kimyasal ve biyolojik sensörlerin ön önemli çeşitlerinden biri olup, maliyeti düşük, yüksek çözünürlükte ve kütleyle duyarlı bir cihazdır [97]. QCM, sensör yüzeyinde biriken kütleden kaynaklanan sallanma frekansındaki değişiklikleri temel alan bir çalışma prensibine sahiptir. Bu aletin en önemli avantajlarından biri, farklı kaplamalar uygulanarak birçok analizi tespit etmek için kolayca adapte edilebilir [98].

Bir kütle sensörü olarak QCM, biyokimya, gıda, çevre ve klinik analizler gibi birçok alanda kullanılır [99]. Bu sensörler aynı zamanda farklı bozunma süreçlerinin ve kurşun asit pillerinin yük durumlarının izlenmesinde de kullanılmaktadırlar [100].



Tablo 2.3. Dönüştürücülerine göre biyosensörler.

Sensör	Çeşit	Avantajları	Dezavantajları	Kaynaklar
Optik	Yüzey plazmon rezonans	Çok sayıda spektroskopik özellik kullanılabilir; birçok özelliği bulunmaktadır; elektromanyetik etkileşimlerden etkilenmez; elektriksel bir tehlikeye maruz kalma ihtimali azdır.	Işık etkileşimlerine maruz kalır; matriks şişmesinden dolayı yön uzunluğu değişkendir.	[101]; [102]; [103]
	Floresans	Doğal bir süreçtir; çoklu foton uyarılır; ekzojen bir enzim için ihtiyaç yoktur.	Floroфор toksisitesi; normal biyolojik süreçler ile etkileşim.	[104]; [105]; [106]
Elektro-kimyasal	Amperometrik	Yüksek sinyal/ses oranı; düşük analit tüketimi.	Analit akış hızına bağımlılık; analitin tüketimi	[107]; [108]
	Potansiyometrik	Kısa cevap zamanı; doğrusal cevap; renk ve bulanıklılık değişikliklerinden etkilenmez; zararlı değil.	Elektrotlar kirlenebilir; referans elektrot gereklidir; Nernst eşitliğinde sapma	[109]; [110]
Kütle	Piezoelektrik	Elektromanyetik alan ve radyasyona duyarlı değildir; hızlı cevap süresi; azaltılmış etkileşim etkileri.	Artı bir kütle ve frekans değişiklikleri arasında doğru bir korelasyonun olmayışı; yüksek sıcaklıklar iç rezistansta düşüş.	[111]; [112]; [113]

#### **2.2.1.2.4. Çevresel görüntülemelerde biyosensörler**

Çevresel görüntülemelerdeki cihaz ve sistemlere olan gereksinim birçok çevresel öneme sahip analiti mümkün olduğunca hızlı ve ucuz şekilde analiz edecek, bunun yanı sıra bölgede çalışma imkânı sağlayacak daha uygun metotlar ve yeni teknolojilerin geliştirilmesini tetiklemektedir. Bu bakımdan son yıllarda biyosensörler etkili bir izleme için yukarıda önerilen cihaz ve sistemler açısından büyük bir potansiyel göstermektedir. Biyosensörler, organik ve inorganik kirleticilerin kimyasal izlemesi için veya biyolojik/ekolojik kalite elemanlarının değerlendirilmesinde çevresel kalite görüntüleme araçları olarak kullanılabilirler [114].

#### **2.2.2. Biyosensör teknolojisinin bugünü ve geleceği**

Biyosensör teknolojisi özellikle son yirmi beş yıldır yeni malzemelerin yapım teknikleri, yeni sinyal iletim araçları ve aletleri kontrol eden güçlü bilgisayar programlarıyla gelişmekte olan ve hızlı bir şekilde büyüyen bir alandır [115]. Geçmişten bugüne biyosensörlerin geliştirilmesi üzerine birçok çalışma yapılmasına rağmen, hala daha gelişmiş ve güvenilir aletlerin yapımı konusunda engeller vardır [114].

##### **2.2.2.1. Sürekli görüntüleme**

Su sistemlerinde kirletici derişimleri, su akıntısına girenler ve değişkenler neticesinde sürekli değiştiğinden dinamiktir. Birçok biyosensör kolay, hızlı ve yerinde ölçüm sağlayabilecek sürekli görüntüleme sistemleri olarak geliştirilmektedir [116,117]. Bu biyosensörler aynı zamanda çeşitli boşaltma ve kirlilik olaylarında hızlı tespit gerektirecek kirliliklerin haritalanması için yararlıdır [118]. Gu ve arkadaşları 2000'li yılların başında bir su arıtma tesisinin akıntılarının toksisitesini görüntülemek için yeni bir erken uyarı protokolü uygulamışlardır [119].

##### **2.2.2.2. Çoklu analit tespiti**

Birkaç analiti aynı anda tespit edebilen sensörler daha az zamanda daha az örnek ve kimyasal kullandıklarından dolayı çevresel görüntüleme için uygun cihazlardır. Yüksek miktarda küçültülmüş sinyal dönüştürücü elemanlara sahip büyük ölçekli sensör platformları birçok örneğin izlenimine paralel olarak gerçek zamanlı ölçüm

sağlar ve bu, biyosensör araştırmalarında önemli bir itici güçtür [120]. Son yıllarda yerinde analiz için tasarlanan taşınabilir bir SPR immünosensör gibi aynı anda benzopiren ve 2-hidroksibifenil çoklu analit tespitlerinin çeşitli örnekleri literatürde görülmektedir [121]. İnce çoklu elektrot tek kullanımlık çok analit tespiti sağlayan enzim biyosensörü, paraoksan ve karbofuran pestisitlerinin bulunduğu bir karışımdan analit ayrımı yapmak için geliştirilmiştir [122]. Farmasötiklerin, antibiyotiklerin, hormonların, endokrin bozucu kimyasalların ve pestisitlerin tespiti çoklu analit tespit eden immünosensörler tarafından başarılmıştır [123-125]. Son zamanlarda kuantum noktalar çoklu analit tespiti için kullanılmaktadır [126].

### **2.2.2.3. Minyatürleştirme**

Mikroelektronik ve mikroakışkanlardaki gelişmeler analitik sistemlerin boyutlarının küçültülmesine olanak sağlar. Boyutta meydana gelen bu küçülme daha az kimyasal kullanımı ve atık oluşumuna neden olacağı gibi daha düşük hacimlerde çalışmaya da olanak sağlar [127]. Boyutta meydana gelecek küçülmeye biyosensörler ucuz, elde taşınabilen, hızlı ve güvenilir ölçümler alan analitik cihazlar olabilirler. Biyosensörlerdeki küçülme özellikle bir biyosensör için sürekli *in vivo* ve farmasötik görüntüleme [128] çok önemli bir yere sahiptir [114]. Çevresel görüntüleme bir sensörün boyutu çok önemli olmasa da, küçültülmüş bir teknolojinin kullanımı kullanılan kimyasalın miktarında ve akışkanı kontrol etmek için gerekli enerji kullanımında düşüşe neden olacaktır [128]. Bu aynı zamanda analitik performans üzerinde analiz zamanını düşürme, güvenilirlik ve hassasiyet artırarak olumlu bir etki yaratır [129]. Diğer bir taraftan küçük boyut özellikle alan çalışmalarında kullanılan taşınabilir biyosensörlerin tasarımında tercih edilir [114].

### **2.2.2.4. Yeni duyu elemanları**

Moleküler tanıma bileşenlerinin afinitesi, özelliği ve toplu üretimindeki gelişmeler tamamen tespit teknolojilerinin başarısı veya başarısızlığına bağlıdır. Çünkü gelecekteki biyosensör gelişmelerindeki hayati yön kolay üretilecek ve geniş bir seçicilik özelliğine sahip olacak yeni duyu elemanlarının üretimine bağlı gibi gözükmektedir. Şu anda, enzim ve antikor gibi çeşitli biyomoleküller üzerine yapılan üretim ve çalışmalar önemli bir zaman ve bilgi gerektirmektedir [114].

Moleküler baskılanmış polimer yukarıda bahsi geçen sınırlamaların üstesinden gelen ümit verici alternatifler olarak düşünülür [130].

### **2.2.3. Ticari biyosensörler**

Araştırma laboratuvarlarında büyük miktarda biyosensör üretilmektedir ve bu alandaki ilgili araştırmalar son derece önemlidir. Fakat çok az uygulamaya yönelik sistem ticari başarı kazanabilmektedir. Bu günlerde medikal uygulamalar için birçok ticari biyosensör varken [131] besin, ziraat, savunma sanayi, veterinerlik ve çevresel kontrol gibi alanlarda da oldukça büyük bir pazar vardır. Ancak medikal teşhis için geliştirilen aletlerin birçoğu çevre sorunlarına yönelik biyosensör pazarı için adapte edilebilir [132]. Çevresel biyosensör talebi medikal teşhis için kullanılanlardan büyük ölçüde daha az gibi gözükse de çevre sorunlarına karşı toplumda gelişen hassasiyet ve devlet yatırımları [133] biyosensörlerle kirlenici ve diğer çevresel tehditleri ölçmeyi amaçlamaktadır [114].

Yüzey plazmon rezonans biyosensörler çevresel görüntüleme için en başarılı ticari ürünlerdendir. BIACORE AB (Uppsala, İsveç), orijinal BIAcore'un çeşitli ürünlerinin yanı sıra değiştirilebilir otomasyon dereceleri ve parametre özelliklerini sunan diğer yapılandırma sistemlerini içeren birçok biyosensörü piyasaya sürmüştür [134]. Diğer yüzey plazmon rezonans ticari biyosensörleri IBIS sistem (Windsor Scientific, Berks, Birleşik Krallık), CELLIA sensör (Nippon Laser and Electronics Labs, Hokkaido, Japonya), Spreeta (Texas Instruments, Dallas, TX, ABD), the BIOS-1 sistem (Windsor Scientific), SENSIA (Madrid, İspanya) [135], BioTul AG (Münih, Almanya) [136], NanoDev (Ankara, Türkiye) [137].

Caliper Technologies, Cepheid, Nanogen, ACLARA BioSciences, MICROGEN Systems ve Lawrence Livermore Laboratories gibi firmalar mikrobiyal ajanları tespitini ve tanımlanmasını sağlamak için mikro boyutta sistemler geliştirmektedirler [138].

### **2.3. Yüzey plazmon rezonans (SPR)**

Yüzey plazmon olgusu ilk defa 1902 yılında Wood tarafından gözlemlenmiştir [139]. Wood yaptığı çalışmada polarize ışığın bir kırınım düzenleyici yüzeyinden

bir aynaya yansıttığı zaman aynada karanlık ve aydınlık bantlar tespit etmiştir. Wood'dan sonra sırasıyla Lord Rayleigh ve Fano teorisinin gelişimine katkıda bulunmuşlardır. Ancak yapılan bu çalışmalara rağmen yüzey plazmon rezonans olgusunun tam olarak anlaşılması 1968 yılına kadar mümkün olmamıştır. Bu tarihte Otto ve Kretschmann yüzey plazmon rezonansların oluşumunu rapor etmişlerdir [140]. Elde edilen bu gelişmeler yüzey plazmon rezonans olgusuna dayalı yüksek seçicilikte sensörlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. SPR temelli ilk biyosensörü 1980'lerde Liedberg ve arkadaşları hazırlamışlardır. Bu tarihten sonra bu konuda yapılan çalışmaların sayısı giderek artmıştır [141,142].

SPR spektroskopisi, yüksek duyarlılığı ve basit kurulumundan dolayı popüler bir metod haline gelmiş, özel bir çeşit yüzey duyarlı optik sinyal dönüştürme tekniğidir. İlk başta ince filmlerin ve metal-dielektrik arabirimlerinin karakterizasyon metodu olarak geliştirilmiştir. Sonraları SPR kullanımı, doğrudan metal tabanlar üzerinde meydana gelen fiziksel ve kimyasal değişimleri içeren uygulamalar için, yani immobilize biyomoleküllerin etkileşimleri için kullanılmaya başlanmıştır. SPR biyosensörlerinin; DNA, RNA, proteinler, farmasötikler ve diğer ilaçlar gibi önemli biyomolekülleri tanıyabildiğinin vurgulandığı makalelerde son on yıl içinde önemli ölçüde artış olmuştur [143-145]. Antikor antijen etkileşimleri çok spesifik olduğu gibi, afinite biyosensörleri sinyal dönüşüm modu SPR ile birlikte, işaretli molekül kullanmaya gerek kalmadan biyomoleküler etkileşimlerin incelenmesine olanak sağlar [146,147] O zamandan beri, SPR kullanımı diğer sensör formatları ile kullanımı da yaygınlaşmıştır. SPR'nin yüksek dayanıklılığı ve kurulum ayarlarına ve kullanılan tanıma moleküllerine bağlı olarak, pikomolar seviyelerine kadar hassasiyetde ölçüm yapabilme kapasitesi olduğu ortaya konmuştur. Yerinde analiz için de talep artmıştır. SPR temelli sensörler bu amaca hizmet edebilir ve hatta zorlu koşullarda bulunan eser miktardaki çevre kirleticilerinin ve kirliliklerin tayini için geliştirilebilir [148].

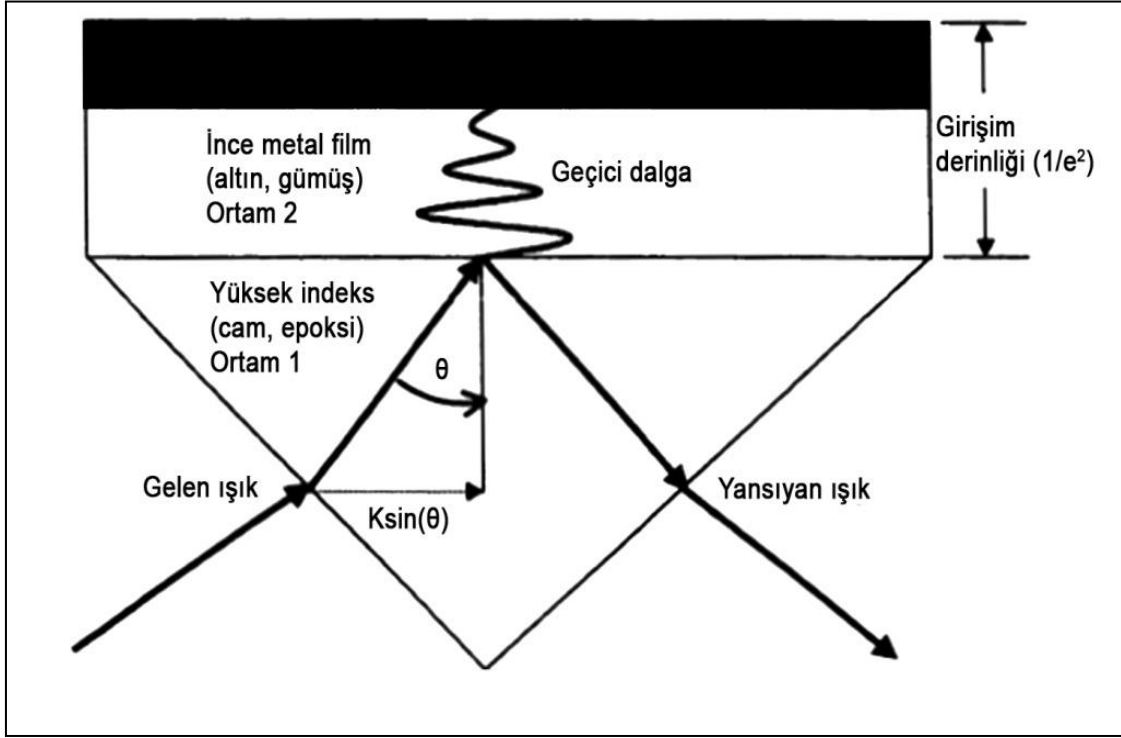
Yüzey plazmon rezonans, metal yüzeye yakın kırılma indisindeki değişimi ölçerek basit ve doğrudan ölçüm yapan bir tekniktir [5]. Yüzey plazmon rezonans yönteminde geçirgen ve farklı kırılma indisli iki ortam arasında (cam prizma ve çözelti) ince bir metal film kullanılır. Metal film genellikle altın veya gümüştür. Kritik

bir açının üzerinde düzlem polarize ışık, daha yüksek kırılma indisli bir ortama girdiğinde (cam prizma) toplam iç yansımaya uğrar. Bu durumda kendiliğinden sönümlü dalga adı verilen ışık, metal filmin içine doğru nüfuz eder. Belirli bir kırılma açısında bu dalga, metal yüzeydeki serbest elektronların yüzey plazmonları oluşturmasına sebep olur ve yansıyan ışığın yoğunluğu düşer. Bu olaya yüzey plazmon rezonans denir ve sadece rezonans açısı denilen belirli bir açıda gözlenir. Rezonans açısı, yüzeye analit eklenmesiyle değiştirilebilir. Bu değişim yüzeyin hedef moleküle göre modifiye edilmesiyle seçici hale getirilebilir. Bu da SPR biyosensörlerin temelini oluşturmaktadır [149].

### **2.3.1. Yüzey plazmon rezonans teorisi**

Yüzey plazmon rezonans teorisi, enerji taşıyan ışık fotonunun metalin elektronları ile birleşmesi veya enerji transferi ilkesine dayanmaktadır. Birleşmenin (veya enerji transferinin) gerçekleştiği ışığın geliş açısı her metal ve metal yüzeyinin çevresine göre değişmektedir. Işık fotonları ve metal yüzeyindeki elektronlar arasında bir eşleşme ve/veya rezonans yakalandığında enerji transferi gerçekleşir. Bu enerji transferi, metal filmin alt yüzeyinden yansıyan ışığın miktarının ölçülmesiyle belirlenebilir. Her ışık birçok açıda yansırken, ışığın bir bölümü rezonans açısında absorplanmaktadır.

Kretschmann prizma yapısı, yüzey plazmon rezonans prizmalarının hazırlanmasında en sık kullanılan tasarımdır. Şekil 2.2' de görüldüğü gibi, metal film yüzeyindeki yük yoğunluk salınımını uyaran ışık demetinin toplam iç kırılması ile oluşan kendiliğinden sönümlü dalganın kullanıldığı bir yaklaşım vardır. Bu elektron salınımları, yüzey plazmonları olarak adlandırılmaktadır. Geçici alanın girişim derinliği ışığın dalga boyuna, ışığın geldiği ortam ile çevresinin kırınım açısı indekslerinin oranına ve fotonun parlaklığına bağlıdır. Enerji alanı yüzeyden uzaklaştıkça üstel olarak azalmaktadır. Bundan dolayı, girişim derinliği aniden düşmektedir.



Şekil 2.2. Dielektrik sınırlarda gerçekleşen toplam iç kırınım.

Girişim derinliği aşağıdaki eşitlikle tanımlanmaktadır:

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

Burada;

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

Metal yüzeye uygun p-polarize ışık, metal film ile birleşmek için prizmanın içerisine girer. Sadece p-polarize ışık plazmon oluşumuna sebep olmaktadır. Bunun nedeni sadece bu polarizasyonun metal film normaline uygun elektrik alan vektör salınımına sahip olmasıdır. Bu özellik, metal yüzeyindeki elektron plazmalarının transvers manyetik (TM) dalgası olarak adlandırılmaktadır [150,151]. Oysa s-polarize transvers elektrik (TE) polarizasyonu yüzey plazmonlarını oluşturamamaktadır. Çünkü s-polarize ışığın elektrik alan vektörü, metal filme

paralel olarak oluşmaktadır. Salınımların dalga vektörü ( $K_{sp}$ ) aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

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

Burada;

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

Gelen ışığın bir bileşenine ait dalga vektörü aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

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

Burada;

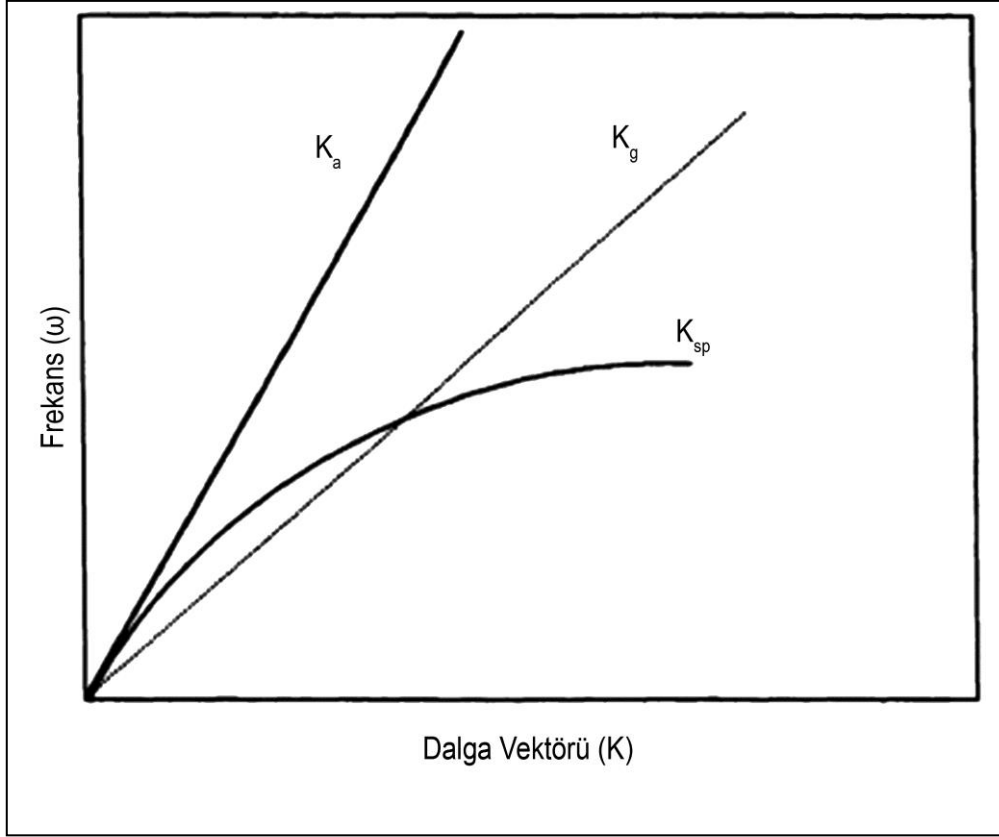
- $\theta$ , ışığın metal film yüzeyine geliş açısı,
- $\eta_p$ , prizmanın kırınım açısıdır.

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

Bu olayın gerçekleşmesi, yüksek kırınım indeksine sahip bir prizma gerektirmektedir. Bu tip bir prizmaya gereksinim, havadaki ışık yayılması ile yüzey plazmonların üretilmemesinden kaynaklanmaktadır. Yüzey plazmon rezonans sırasında, gelen ışığın ve yüzey plazmonun dalga vektörleri eşit olmalıdır. Fakat



Şekil 2.3'de görüldüğü gibi, ışığın havadaki ( $K_a$ :  $\omega/c$ ) ve metalin plazmonundaki ( $K_{sp}$ ) dağılma eğrisi kesişmemektedir. Bundan nedenle, dalga vektörü ve frekansı eşzamanlı olarak karşılaştırılmasına imkân yoktur. Bunun tersine;  $K_{sp}$  ve cam yüzeyin ( $K_g$ ) dağılma eğrilerinin kesişmektedir.



Şekil 2.3. Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılma eğrileri.

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

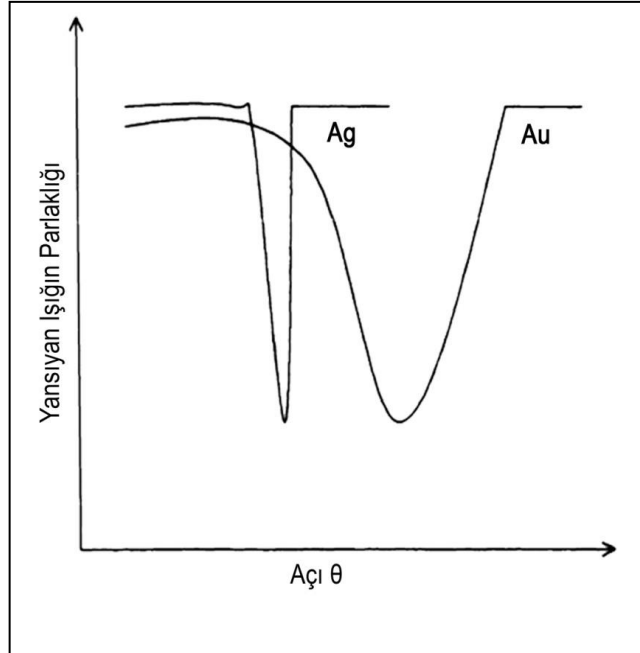
$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\eta_m^2 \eta_s^2}{\eta_m^2 + \eta_s^2}} \quad (2.4)$$

Bu formülde;

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

Kompleks kırınım indeksi teriminin karmaşık bileşeni, absorbans ile ilişkilidir.

Yüzey plazmon rezonansın profili, seçilen metale göre değişiklik göstermektedir. Çünkü her metal, dielektrik geçirgenlik gibi farklı özgül optik özelliklere sahiptir. Şekil 2.4' de altın ve gümüş film için, yansıyan ışığın parlaklığına karşı gelen ışığın açısını gösteren eğriler verilmiştir. Gümüş daha keskin bir rezonans pikine sahiptir. Bu rezonans piki, metal filmdeki yüzey plazmon salınımlarının kendiliğinden azalması nedeniyle olmaktadır. Tüm yüzey plazmon metalleri, uyarılma ışığının elektrik alanının saçılmasına bağlı olarak bu salınımları azaltma eğilimindedir. Birçok metal yüzey plazmon üretebilir. Yüzey plazmon rezonans için kullanılacak olan metal, uygun açılı ışıkla rezonansa girebilecek iletkenlik bandı elektronlarına ve sensör olarak kullanılabilmek için gerekli kimyasal modifikasyonlar için uygun özelliklere sahip olmalıdır. Altın belirtilen iki temel özelliğe birden sahip olan nadir metallere biridir. Bu özelliklere sahip olan diğer metallerde göre uygulaması oldukça kolaydır. Örnek olarak, indiyum gibi bazı elementler çok pahalıdır; sodyum gibi elementler oldukça reaktiftir; bakır, alüminyum gibi bazılarının yüzey plazmon cevapları çok geniştir veya gümüş gibi bazı elementler oksitlenmektedir [152].



Şekil 2.4. Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri [152].

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

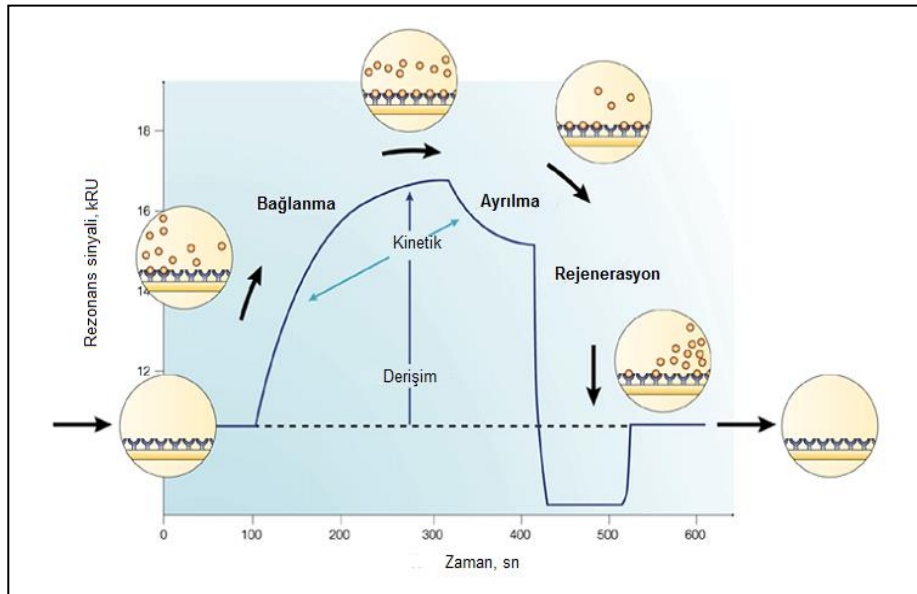
### **2.3.2. SPR biyosensörler**

SPR temelli sensör uygulamaları 1980'lerin başlarından beri çalışılmasına rağmen, MIP'lerin ilk kez SPR ile birlikte tanıma elementi olarak başarılı şekilde kullanılması 1990'ların sonlarını bulmuştur. MIP-SPR sensörlerin kullanılmasında karşılaşılan temel zorluk duyarlılıktır. Özellikle hedef molekül tanıma bölgelerindeki etkileşimler tarafından uyarılan kırılım indisi değişimleri evanesans alanları tarafından saptanacak kadar hassas olmayabilir. Sonuç olarak, saptama ancak yüksek derişim seviyelerinde yapılabilir. Fakat polimerleştirme tekniklerindeki gelişmeler ile yüzey baskılama, yüzey plazmon dalgaları tarafından saptanabilen hassas kırılım indisi oluşturabilecek polimer filmlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu günlerde, MIP-SPR sensörler işaretleyici moleküle ihtiyaç duymadan tanıma teknolojisi avantajına sahiptir ve tanıma filmlerinin hazırlanmasında sadece düşük maliyetli malzemelerin gerekmektedir [148].

SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye ihtiyaç duymadan biyomoleküllerin etkileşimlerini ölçebilirler. Bu özellikleri nedeniyle, moleküler etkileşimlerin anlaşılması için bu cihazların önemi artmıştır. Etkileşimleri eş zamanlı, doğrudan ölçülmek; kinetik, termodinamik parametrelerin, derişimin

veya ligandlarla analitler arasındaki etkileşimlerin belirlenebilmesini sağlamaktadır. SPR temelli biyosensörlerin hızlı cevap süresi ve yüksek seçiciliği vardır. Enzim veya radyoışaretleme yöntemleri gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında SPR biyosensörler sahip oldukları bu özelliklerden dolayı, protein-protein, antikor-antijen, reseptör-ligand etkileşimlerinden düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tanımlanmasına kadar değişen çok çeşitli biyomoleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılabilir [5].

Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörler, metal yüzeyinde biyo-tanımayı sağlayacak bölgelerin oluşturulmasıyla elde edilir. Biyotanımayı sağlamak için antikorlar [153] ya da nanopartiküller kullanılabilir [154]. Hedef molekülü içeren çözelti biyosensörle etkileştiğinde hedef molekül sensör yüzeyine bağlanır ve yüzeyin yoğunluğunun artmasına neden olur. Yüzeydeki yoğunluk artışı yüzeyin kırılma indisinin artmasına neden olur. Kırılma indisindeki bu artış ise rezonans açısının kayması ile sonuçlanır. Bu etki zamana bağlı olarak incelenirse Şekil 2.5' deki gibi bir sensorgram elde edilir. Şekil 2.5'de görüldüğü gibi, yüzeye analit bağlanması ile rezonans açısı artmaktadır. Desorpsiyon çözeltisinin sisteme verilmesiyle analit, yüzeyden ayrılmaya başlar ve belli süre sonra sinyal tekrar eski seviyesine döner.



Şekil 2.5. Tipik bir SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.

Yaşam bilimlerinde ve farmasötik çalışmalarda makromoleküllerin ve onların etkileşimlerinin araştırılması için SPR biyosensörlerden yararlanılmaktadır. Ayrıca SPR biyosensörler çevresel kirleticilerin tespitinde [155-157], gıda teknolojisinde [158-160], hastalıkların teşhisinde [49, 161, 162] kullanılmaktadır.

Son yıllarda besin ve su kaynaklı patojenik bakterilerinin tespiti için immüno-sensör geliştirilmesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır [163,164]. Yüzey plazmon rezonans temelli biyosensörler bu tip tespite yönelik hazırlanan immüno-sensörlerden biridir. Önemli zirai patojenlerden biri olan *Phytophthora infestans*'ın tespitine yönelik hazırlanan SPR temelli biyosensörde tespit sınırı  $2.2 \times 10^6$  spor/mL olarak tespit edilmiştir [165]. Yapılan başka bir çalışmada  $1 \times 10^6$  mL'de *Salmonella Typhimurium*'un varlığı tespit edilmiştir [166]. Mauriz ve arkadaşları SPR temelli taşınabilir immüno-sensör ile doğal su örneklerinden karbonil analizi yapmışlardır [135]. Ortalama 15 nm büyüklüğündeki kolloid altın nanopartiküllerle güçlendirilmiş SPR temelli biyosensör ile 7.5 dakika gibi kısa bir sürede 14 pg/mL derişiminde estrol-16-glusuronit tespiti sağlanmıştır [167]. Yapılan diğer bir çalışmada sudan profenofos tespiti için SPR temelli moleküler baskılanmış çok ince bir film tanıma elemanı olarak kullanılmıştır [168].

#### **2.4. Romatoid artrit (RA)**

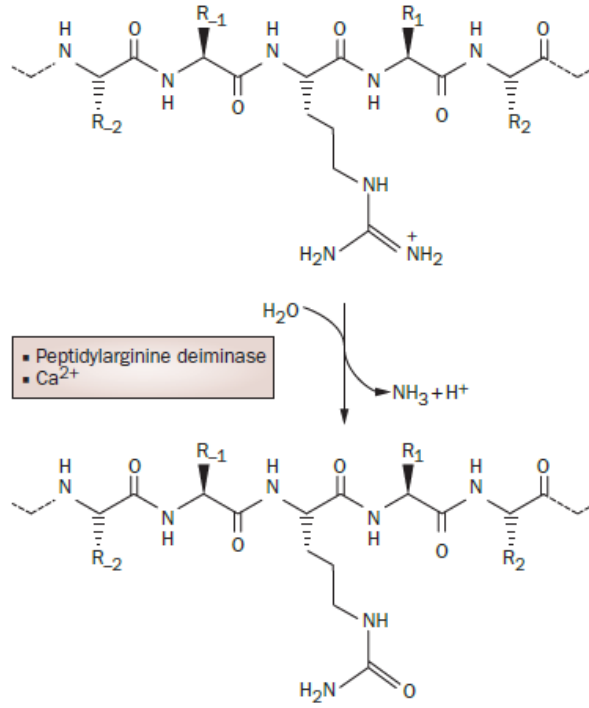
Romatoid artrit (RA) sık rastlanan kronik eklem inflamatuvarı ile tanımlanan bir otoimmün hastalıdır. Dünya nüfusunun yaklaşık %1'i RA hastalığından muzdariptir, kadınları erkeklerden daha fazla (3-5 kat) etkilemektedir [169]. RA, eklem sinovyumunun immün sistem hasarı neticesinde birincil olarak etkilendiği en sık sistemik inflamatuvar otoimmün hastalıktır. Hastalığın ciddiyetine göre, cilt, kan damarları, iç organların tutulumu gibi eklem dışı bulguları da vardır. Yetersiz tedavi edildiği takdirde yaşam kalitesinde azalma, morbidite ve mortalitede artışa neden olur [170].

Önceleri RA tanısı; klinik belirtilerin değerlendirilmesi, her ikisi de kısmen duyarlı olan fakat klinik spesifiktikten yoksun ve erken evrede semptomatik olmayan hastalığı saptayamayan romatoid faktörü (RF) ve C-reaktif protein gibi akut faz reaktiflerini kapsayan otoantikör serolojisi ile yapılmıştır [169].

1998'de Schellekens ve arkadaşları sitrülünün, yukarıda bahsedilen RA spesifik antikorlar tarafından tanınan antijenik tanınmasında asıl bileşeni olduğunu göstermiştir [171]. Bu keşif anti-siklik sitrülünmüş peptit antikor testlerinin (anti-CCP) testlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır ve RA tanısında daha yardımcı olduğunu kanıtlamıştır [172].

## **2.5. Anti-siklik sitrülünmüş peptit antikorları (Anti-CCP)**

Sitrülenme vücutta ölen hücrelerin içinde meydana gelen normal fizyolojik bir olaydır. Bu yüzden, immün sistemin normal koşullarda sitrülünlenmiş proteinler ile karşılaşmadığını anlamak önemlidir. Kısa süre sonra ölen hücrelerin fenotipinde meydana gelen değişim ile birlikte, makrofajlar ve apoptetik hücrelerin yok edilmesinde aktif hücreler tarafından sindirilirler. Bu ölü hücrelerin sindirilmesinde bir yetersizlik veya verimsizlik olduğunda, örneğin çok sayıda hücre ölümü gerçekleştiği durumlarda, peptidilarginin deiminaz (PAD) enzimi ve sitrülünmüş proteinler nekrotizan hücrelerden sızabilir ve immün sistem ile karşılaşabilir. Dışarı salınan PAD enzimi arjinin içeren birçok ekstraselüler proteinin sitrülünlenmesine neden olur. Böylelikle büyük bir sitrülünlenmiş antijen havuzu yaratır. Yangı sırasında, birçok hücre apoptoz ve nekroz ile ölür. Hem hayvan modellerindeki yangılarda hem de RA hastası veya RA hastası olmayan hastalarda yangılı siyovinal dokularda da sitrülünmüş protein bulmak mümkündür [173]. Bununla birlikte, sitrülünmüş proteinlerin bulunması mutlaka APCA oluşumuna neden olmaz. Bu antikorların üretilmesi kuvvetli şekilde hastanın genetik geçmişine bağlıdır.



Şekil 2.6. Proteinlerin sitrüllemesi.

Sitrülleme peptidilargininin peptidilsitrüline post translasyonel dönüşümüdür (arjinin yan zincirinin guanidin grupları üreido gurubuna dönüşür) ve peptidilarginin deaminaz enzimine bağlı olarak Ca<sup>2+</sup> tarafından katalizlenir. R<sub>2</sub> ve R<sub>2</sub>, sitrüllemiş kalıntıya yan taraflarından hücum eden aminoasitlerin yan zincirlerini ifade eder [173].

Sitrüllemiş peptidleri tanıyan anti-siklik sitrüllemiş peptid (anti-CCP) antikolar IgG antikolarıdır ve RA'nın erken teşhisinde RF ile karşılaştırıldığında daha yüksek spesiflik göstermektedirler. Anti-CCP testleri geleneksel olarak tabaka temelli ELISA yöntemleri ile yapılmaktadır ve birçok farklı üreticiden temin etmek mümkündür. Bununla birlikte rastgele erişimli analizörler optimize edilmiş iş akışı ve iyileştirilmiş analiz süresi sunmaktadır [169]. CCP2 ve CCP3 antikolarının kullanıldığı ELISA testleri çok iyi performans göstermektedir [174].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaları aşağıdaki başlıklar altında toplamak mümkündür:

- Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörün, allil merkaptan ile modifiye edilmesi ve allil gruplarının yönlendirilmesi,
- Anti-CCP/akrilamid (AAM) ön-kompleksinin hazırlanması,
- Anti-CCP baskılanmış (anti-CCP/PAAm) SPR biyosensörünün hazırlanması,
- Kalıp molekülün uzaklaştırılması,
- Baskılanmamış (PAAm) SPR biyosensörünün hazırlanması,
- Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin karakterizasyonu,
- Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin sulu çözeltilerden farklı derişimdeki anti-CCP adsorpsiyonu için SPR analizlerinin gerçekleştirilmesi,
- Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerinin immünoglobulin M (IgM) ve sığır serum albümin (BSA) bulunduğu ortamda seçiciliğinin incelenmesi,
- Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi.
- Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün kan plazmasından anti-CCP tayini için kullanımı

#### 3.1. Kimyasal malzemeler

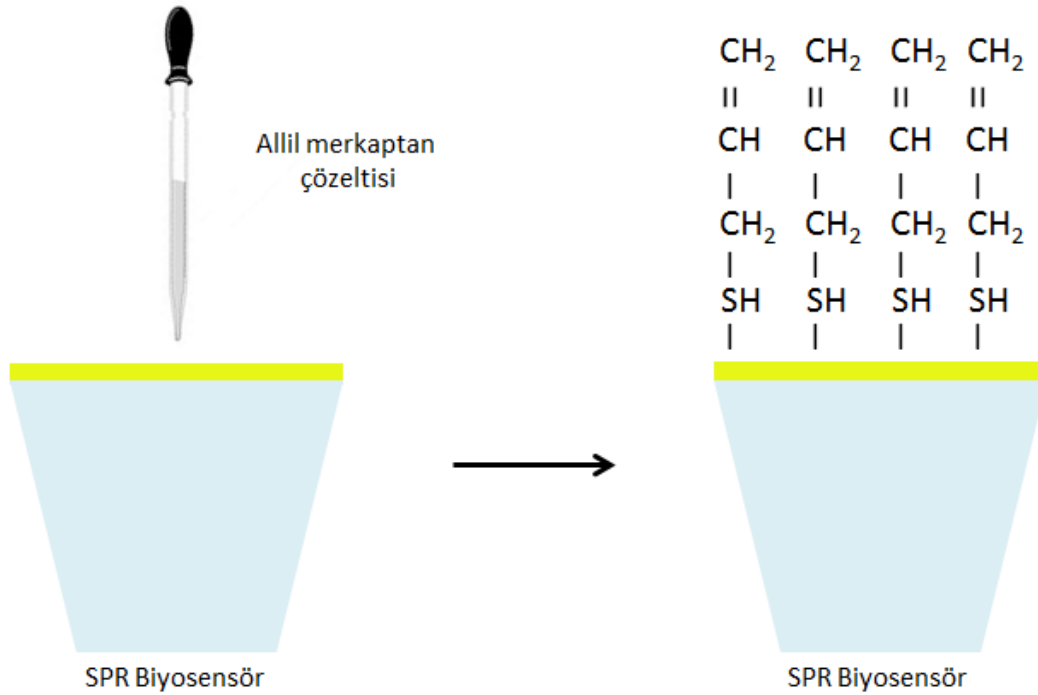
Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör nanofilminin hazırlanmasında kullanılan temel bileşenlerden allil merkaptan, akrilamid (AAM), N,N-metilenbisakrilamid (MBAAm), amonyum persülfat (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin (TEMED), seçicilik çalışmasında kullanılan immünoglobulin M (IgM) ve sığır serum albümin (BSA) (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir ve analitik safıktadır. Reaktifler kullanılabildiği kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve iyon



değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun direnci 18.25 MΩ/cm'dir.

### 3.2. SPR biyosensörlerin altın yüzeyinin allil merkaptan ile yüzey modifikasyonu

SPR biyosensörlerin altın yüzeyinin modifikasyonu allil merkaptan ( $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$ ) ile yapılmıştır (Şekil 3.1). Modifikasyon öncesi altın yüzey asidik pirana çözeltisi ile temizlenmiştir. 20 mL asidik pirana çözeltisi içine daldırılan altın yüzeyler 20 saniye çözelti içinde kalmıştır. Çözeltiden çıkarılan biyosensör saf etil alkol ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) 3 saat kurutulmuştur. Yüzeyi temizlenen SPR biyosensörlerin yüzeyine 5 µL allil merkaptan damlatılmış ve 12 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda biyosensörler etil alkol ile yıkanmış ve azot atmosferinde kurutulmuştur. Modifikasyon sonucunda altın kaplı SPR biyosensörlerin yüzeyine allil grupları takılmıştır.



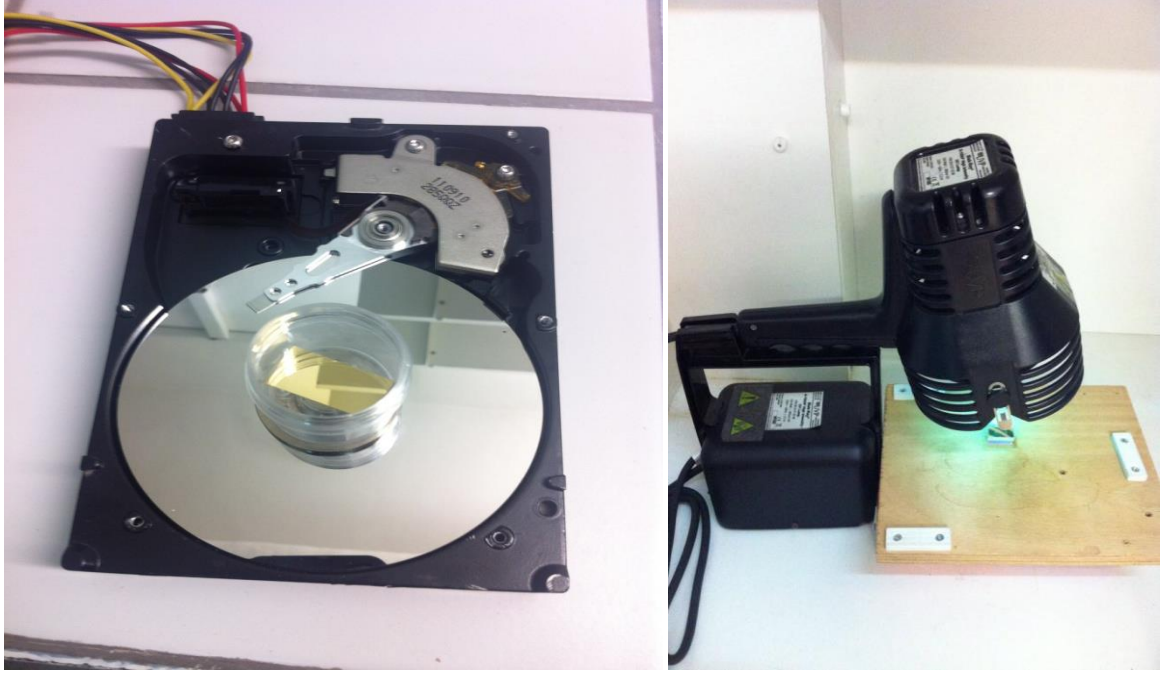
Şekil 3.1. Allil merkaptan ile yüzey modifikasyonu ve allil gruplarının yönlendirilmesi.

### **3.3. Anti-CCP/akrilamid (AAM) ön-kompleksinin hazırlanması**

Anti-CCP/akrilamid (AAM) ön-kompleksi kalıp molekül olarak anti-CCP, fonksiyonel monomer olarak akrilamid (AAM) monomerinin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Bunun için 45 µL anti-CCP ve 21 mg akrilamid 500 µL su içerisinde çözünerek 30 dakika manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Monomer kalıp oranını belirlemek için UV-görünür bölge spektrofotometre ölçümleri yapılmıştır. Kalıp molekül ve monomer oranı 1.0 µmol:0.3 mmol şeklinde belirlenmiştir. Bu orandan sonraki oranda spektrum absorbansında değişiklik olmadığı görülmüş ve ön-kompleks oranı bu şekilde belirlenmiştir.

### **3.4. Anti-CCP/PAAM SPR biyosensörünün hazırlanması**

Anti-CCP/PAAM SPR biyosensörü, anti-CCP/AAM ön-kompleksi ve N,N-metilenbisakrilamid (MBAAM) çapraz bağlayıcısı kullanılarak hazırlanmıştır (Şekil 3.2). Hazırlanmış anti-CCP/AAM ön-kompleksi içine 3.1 mg MBAAM çapraz bağlayıcı eklenerek sonikatörde 10 dakika çözümleri sağlanmıştır. Başlatıcı/aktifleştirici çifti olarak 2 µL (%10) APS ve 2 µL TEMED eklendikten sonra daha önceden alillenmiş SPR biyosensör üzerine 10 µL damlatılmış ve döndürmeli kaplama cihazı yardımıyla homojen bir şekilde SPR biyosensörün üzerine kaplanmıştır. Hazırlanan SPR biyosensör, UV lamba altına konularak 30 dakika fotopolimerizasyon yöntemi ile polimerleşme sağlanmıştır. Reaksiyona girmeyen monomer ve safsızlıklar metil alkol çözeltisi ile uzaklaştırılmıştır. Kalıp molekül, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı oranı 1 µmol:0.3 mmol:0.02 mmol şeklindedir. Çözelti içindeki monomer yüzdesi 4.8% (w/v) olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Döndürmeli kaplama cihazının ve UV lambasının optik fotoğrafları.

### 3.5. Kalıp molekülün uzaklaştırılması

Hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensörden kalıp molekül olan anti-CCP'nin uzaklaştırılması için pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde çözölen %10'luk asetik asit (HAc) ve %1'lik Tween 20 çözöltisi kullanılmıştır. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör oda sıcaklığında pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde çözölen %10'luk HAc ve %1'lik Tween 20 çözöltisiyle her 10 dakikada bir desorpsiyon çözölti yenilenerek bir saat boyunca yıkanmıştır. Bu işlem kalıp molekülün 280 nm'de UV-görünür bölge spektrofotometresiyle tayin edilmeyene kadar birkaç kez tekrarlanmıştır.

### 3.6. Baskılanmamış (PAAm) SPR biyosensörünün hazırlanması

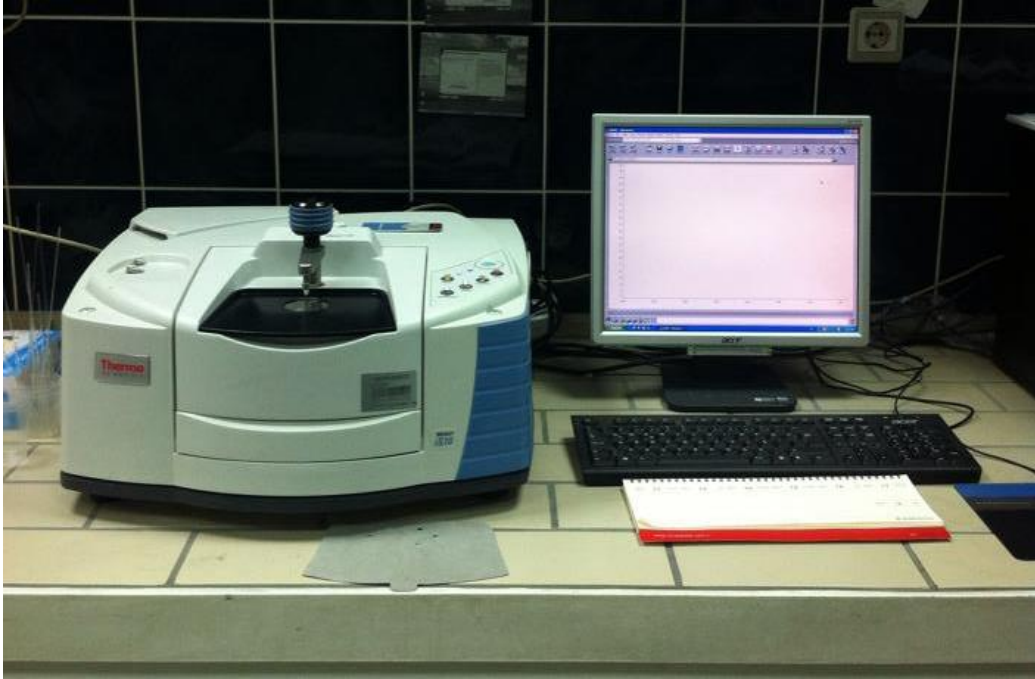
PAAm SPR biyosensörü, kalıp molekül olan anti-CCP eklenmeden aynı reçete ile hazırlanmıştır.

### 3.7. Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin karakterizasyonu

Allil merkaptan ile modifiye edilen anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerinin karakterizasyonu FTIR-ATR, atomik kuvvet mikroskobu, elipsometre ve temas açısı ölçümleriyle sağlanmıştır.

#### 3.7.1. FTIR-ATR spektrofotometre analizi

Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır (Şekil 3.3). Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörler, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür.



Şekil 3.3. FTIR-ATR spektrofotometre cihazının optik fotoğrafı.

#### 3.7.2. Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) analizi

Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılmıştır. Şekil 3.4'te gösterilen atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile

4096x4096 piksel gibi çok yüksek çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörler çift yüzlü karbon bant ile örnek tutucuya yerleştirilmiştir. Görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı degen modda gerçekleştirilmiştir. Salınım rezonans frekansı, 341.30 Hz olarak uygulanmıştır. Titreşim genliği, 1  $V_{RMS}$  ve boş titreşim genliği ise 2  $V_{RMS}$ 'dir. Örnekler 2  $\mu\text{m/s}$  tarama hızında, 256x256 piksel çözünürlükte, 2x2  $\mu\text{m}^2$ 'lik bir alanın görüntüsü olarak alınmıştır.

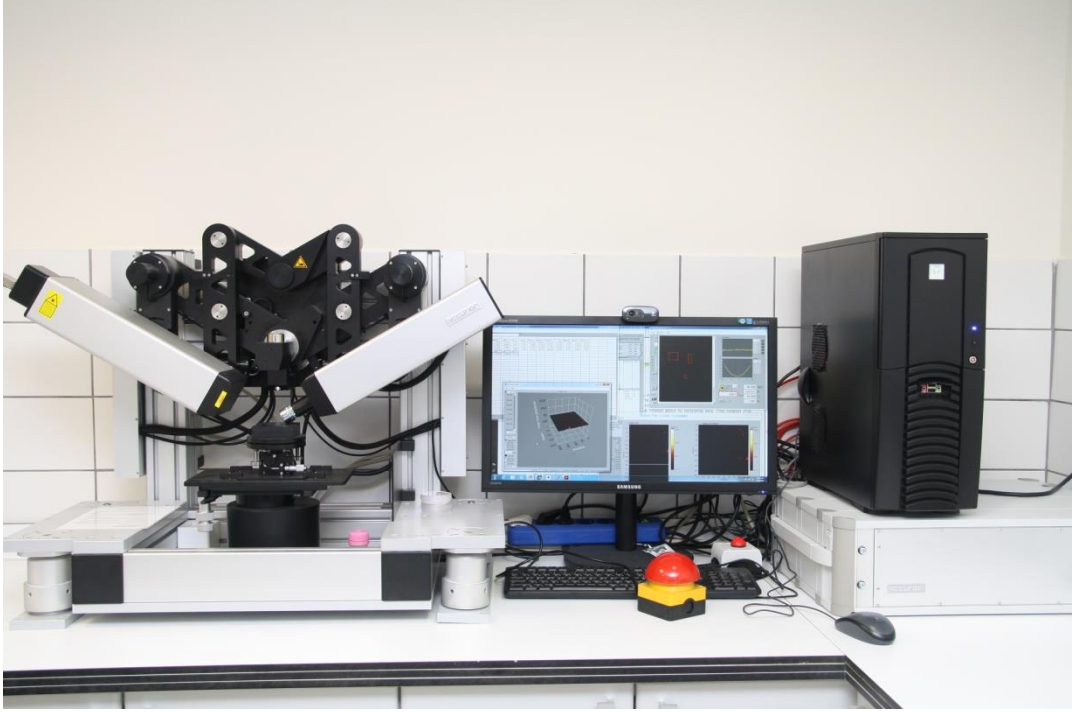


Şekil 3.4. Atomik kuvvet mikroskobu cihazının optik fotoğrafı.

### 3.7.3. Elipsometre analizi

Hazırlanan anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerinin yüzeylerindeki nanofilmin kalınlıkları elipsometrele ölçülmüştür (Şekil 3.5). Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörleri lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiş ve yüzey

kalınlığı hesaplama programı için SF10 prizma+50 nm altın veri olarak öngör÷lmüştür. Ölçümler biyosensörlerin yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlanmış ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edilmiştir.

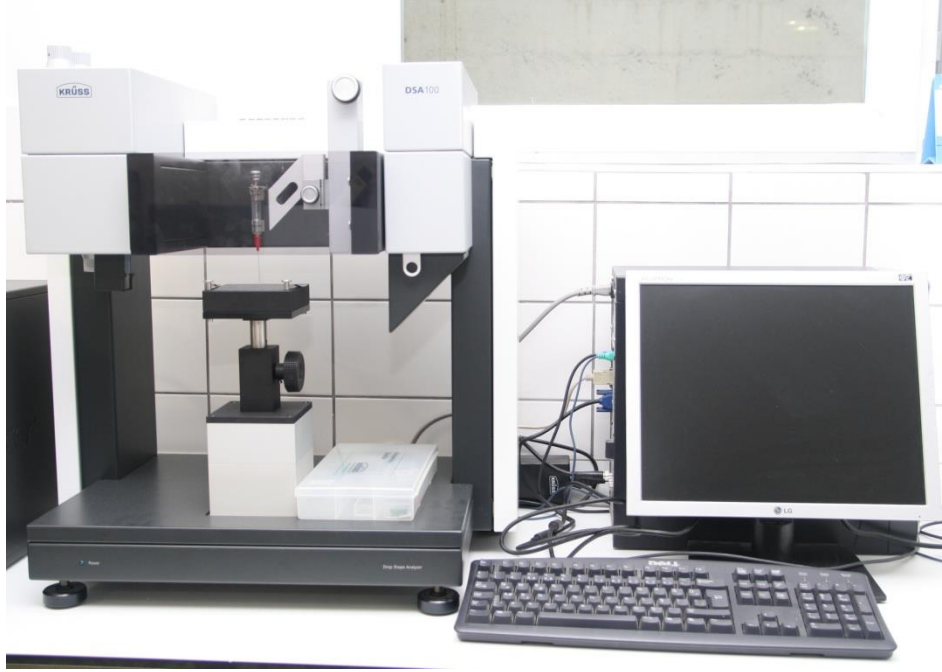


Şekil 3.5. Elipsometre cihazının optik fotoğrafı.

#### 3.7.4. Temas açısı ölçümleri

Modifiye edilmemiş, anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6). Modifiye edilmemiş, anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla yöntemiyle temas açısı belirlenmiştir. Modifiye edilmemiş, anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin bölgelerinin farklı bölgelerine su damlatarak fotoğraflar çekilmiş ve her biri için ayrı temas açısı belirlenmiştir. Belirlenen temas açısı değerleri damlacığın katı ile sol temas noktasından alınan soldan temas açısı; sağ temas noktasından alınan sağdan temas açısı olarak belirlenmiştir. Ayrıca her iki noktanın ortalaması olan ortalama temas açısı değerleri elde edilmiştir. Modifiye edilmemiş, anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin yüzeyleri için temas açısı değerleri alınan 10 ölçümün ortalama değerleri hesaplanmıştır. Temas açısı

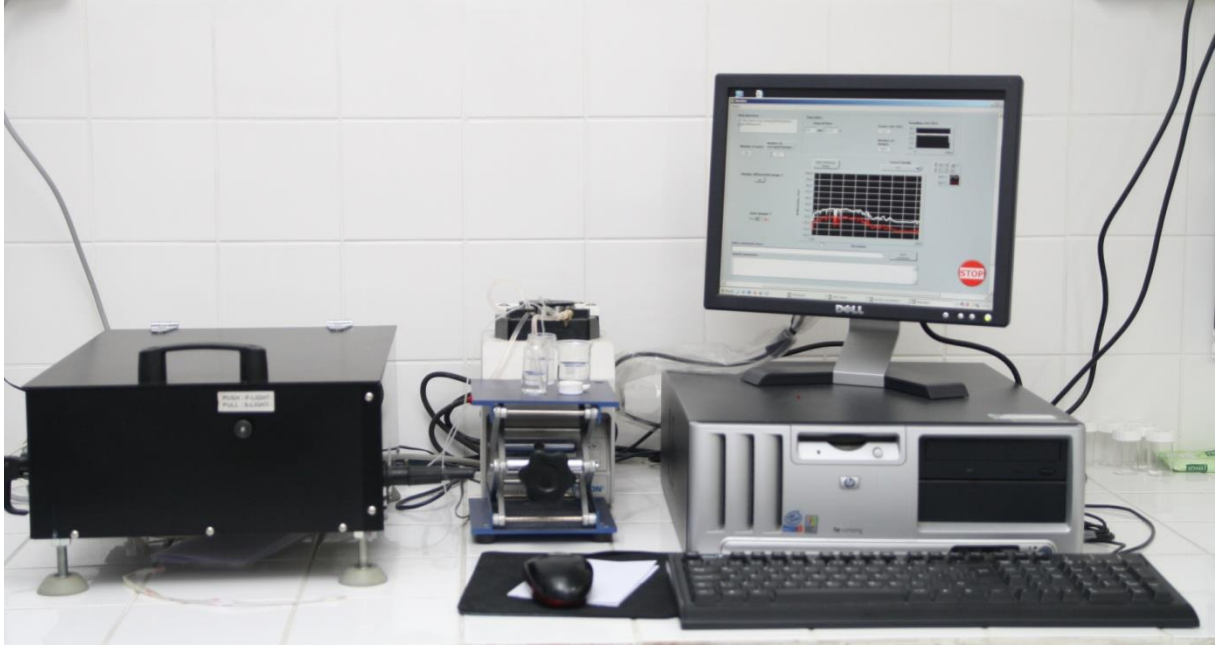
değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.6. Temas açısı cihazının optik fotoğrafı.

### 3.8. YüzeY plazmon rezonans sistemi ile plazmon ölçümleri

Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin yüzeY plazmon eğrileri yüzeY plazmon rezonans sistemi SPRiLab (GenOptics, Orsay, Fransa) ile alınmıştır (Şekil 3.7). Altın kaplanmış SPR biyosensörler Genoptics firmasından (Orsay, Fransa) temin edilmiştir. SPR biyosensörler, 25.0 mmx12.5 mm yüzeY alanına sahip 50 nm kalınlıkta altın kaplanmış olarak temin edilmiştir. Görüntü alınması sırasında ışığın anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensöre ulaşma açısı değiştirilerek (48.7-56.7°) ışığın kırılma değerleri farkı alınmıştır. Elde edilen değerler incelenmiş ve yüzeY plazmon eğrileri ışığın geliş açısına karşı kırılma değerleri farkı ve eğimi grafiğe geçirilerek rapor edilmiştir.



Şekil 3.7.SPR sisteminin optik fotoğrafı.

### 3.9. Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin kinetik analizler

Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin hazırlanmasından sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir. Kinetik çalışmalar, farklı derişimlerdeki anti-CCP çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler pH 7.0 fosfat tamponuyla 1 RU/mL-200 RU/mL arasındaki çözeltilerin derişimi IgG çözeltilisinin(0.1-2.0 mg/mL) kalibrasyon grafiğı çizilerek tespit edilmiş ( $y= 1.505x-0.012$ ,  $R^2=0.994$ ) ve bu çözeltilerin her birinden 20  $\mu$ L alınarak 5.0 mL'ye seyreltilmiş farklı derişimlerdeki (66-13200 ng/mL) çözeltiler hazırlanarak SPR sistemine verilmiştir. Şekil 3.7'de GenOptics SPRiLab sistemi gösterilmektedir. GenOptics SPRiLab, lazer kaynağı, ayna sistemi, CCD kamera sistemi, peristaltik pompa ve bilgisayardan oluşmaktadır. Yüzeyine anti-CCP baskılanmış nanofilm tutturulan SPR biyosensör, kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrıca PAAm SPR biyosensörün de kinetik davranışı incelenmiştir. Bu aşamada kullanılan deneysel işlem şu şekildedir: Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin yüzeyi deiyonize su (50 mL) ile yıkanmıştır. Sistemden fosfat tamponu geçerken yüzey plazmon eğrileri alınmış ve rezonans kırılma açısı belirlenmiştir. Cihaz bu kırılma açısına ayarlanmış ve kinetik çalışmalar bu açı değerinde gerçekleştirilmiştir. Kinetik analiz çalışmalarında SPRview yazılımının kinetik görüntüleme programı kullanılmıştır. Plazmon eğrileri



alınması ve aynanın rezonans açısı değerine ayarlanmasının ardından, SPR sisteminden 10 dakika süreyle fosfat tamponu (pH 7.0) geçirilmeye devam edilmiştir. Bu dengeleme basamağından sonra, farklı derişimlerdeki anti-CCP çözeltileri teker teker (10 mL, 2.0 mL/dk akış hızı) sisteme verilmiştir. Rezonans frekansındaki kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş ve denge durumuna geldiğinde sisteme %10'luk HAc ve %1'lik Tween 20 içeren çözelti (10 mL, 2.0 mL/dk akış hızı) verilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra, anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensör su ile rejenere edilmiş ve fosfat tamponu (pH 7.0) ile yeniden dengeye getirilmiştir. Farklı derişimlerdeki anti-CCP çözeltileri sisteme verilmeden önce adsorpsiyon-desorpsiyon-temizleme aşamaları tekrarlanmıştır.

### **3.10. Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin baskılama seçiciliğinin belirlenmesi**

Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin baskılama seçiciliğini göstermek için, immünoglobulin M (IgM) ve sığır serum albümin (BSA) molekülüyle etkileşimi incelenmiştir (13200 ng/mL). Hazırlanan çözeltilerin sisteme enjeksiyonundan sonra sensorgramlar elde edilmiştir.

### **3.11. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi**

Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmek amacıyla 330 ng/mL derişimlerde hazırlanmış anti-CCP içeren çözeltiler SPR sistemine verilmiştir. Bu işlem dört kez tekrar edilmiştir.

### **3.12. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün kan plazmasından anti-CCP tayini için kullanımı**

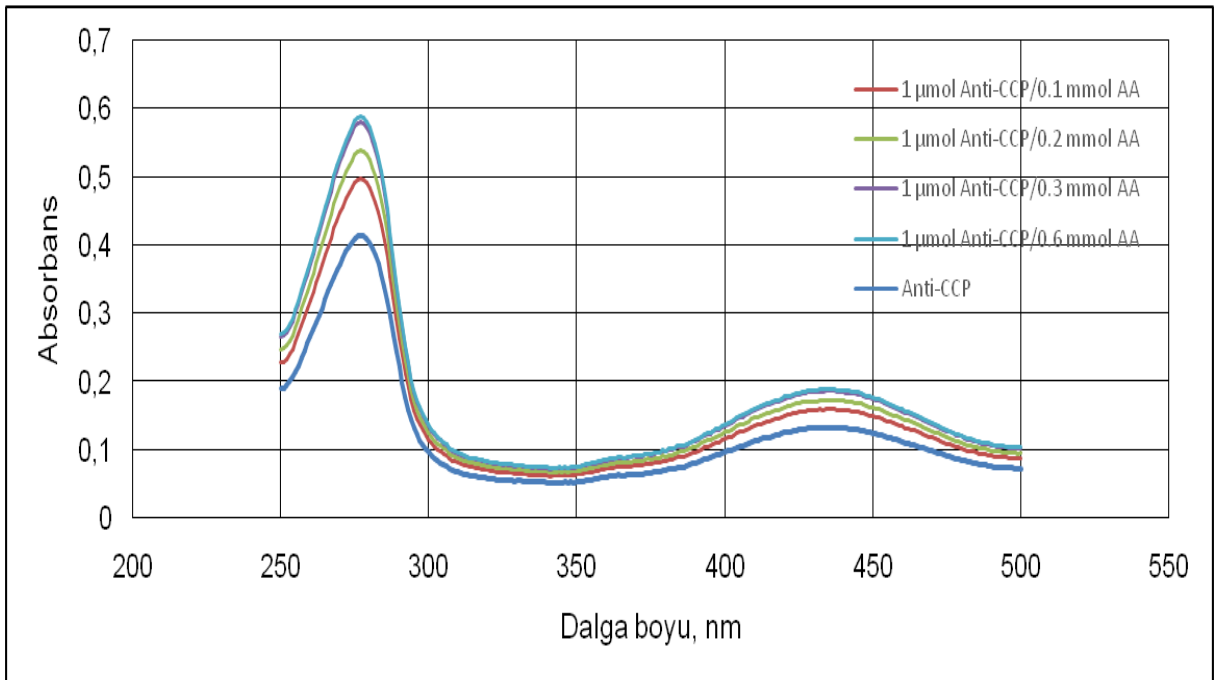
Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör, kan plazmasından anti-CCP tayini için kullanılmıştır. Bunun için antikoagülsüz deney tüpüne alınan taze insan kanı, pıhtılaştıktan sonra 5000 rpm'de santrifüjlenmiş, plazma kısmı hücrelerden ayrılmıştır. Plazma alınarak 1/100 oranında izotonik serumla seyreltilmiş ve

albüminin uzaklaştırılması için doymuş amonyum sülfatla muamele edilmiştir. Albümin uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen plazma örneğinin 5 mL'si alınmış 200 RU/mL'lik çözeltiden 20 µL alınmış (13200 ng/mL) ve plazma örneğine eklenmiştir. Daha sonra anti-CCP/PAAm SPR biyosensörde analiz gerçekleştirilmiş ve denge çözeltisi olarak izotonik serum çözeltisi kullanılmıştır. Sistemden izotonik çözeltisi geçerken yüzey plazmon eğrileri alınmış ve rezonans kırılma açısı belirlenmiştir. Cihaz bu kırılma açısına ayarlanmış ve plazmadan elde edilen çalışmalar bu açı değerinde gerçekleştirilmiştir. İzotonik serum çözeltisi ile dengelenen anti-CCP/PAAm SPR biyosensör yüzeyi daha sonra anti-CCP içeren plazma örneği ile muamele edilmiş, elde edilen veriler hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensör plazma ortamında bulunan anti-CCP miktarını tayininde kullanılmıştır.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Anti-CCP/akrilamid (AAM) ön-kompleksinin hazırlanması

Anti-CCP/AAM ön-kompleksi, kalıp molekül olarak anti-CCP, fonksiyonel monomer olarak AAM monomerinin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1'de gösterilen anti-CCP/AAM ön-kompleksinin spektrofotometrik ölçümü incelendiğinde 1.0  $\mu\text{mol}$ :0.3 mmol oranında spektrumdaki AAM'den gelen kaymaların sona erdiği tespit edilmiş ve polimerleşme bu oran üzerinden gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Anti-CCP/AAM ön-kompleksinin spektrofotometrik ölçümü.

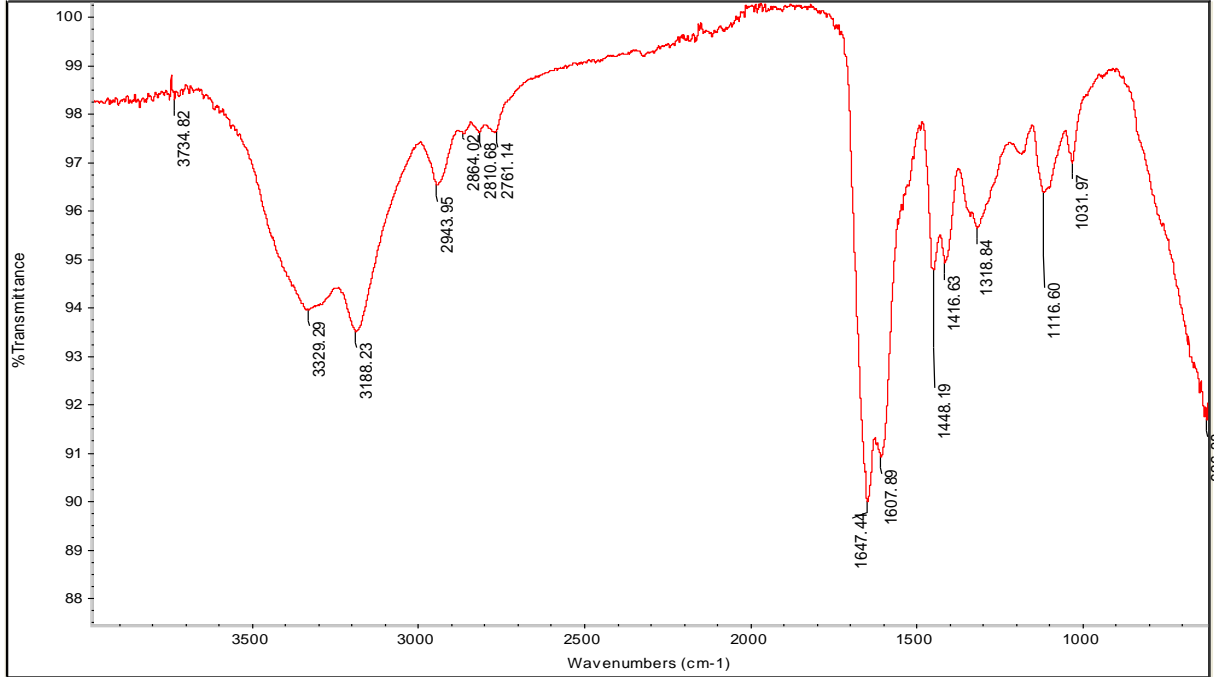
### 4.2. Anti-CCP/PAAM ve PAAM SPR biyosensörlerin karakterizasyonu

Anti-CCP/PAAM ve PAAM SPR biyosensörlerin karakterizasyonu FTIR-ATR, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre ve temas açısı ölçümleriyle sağlanmıştır.

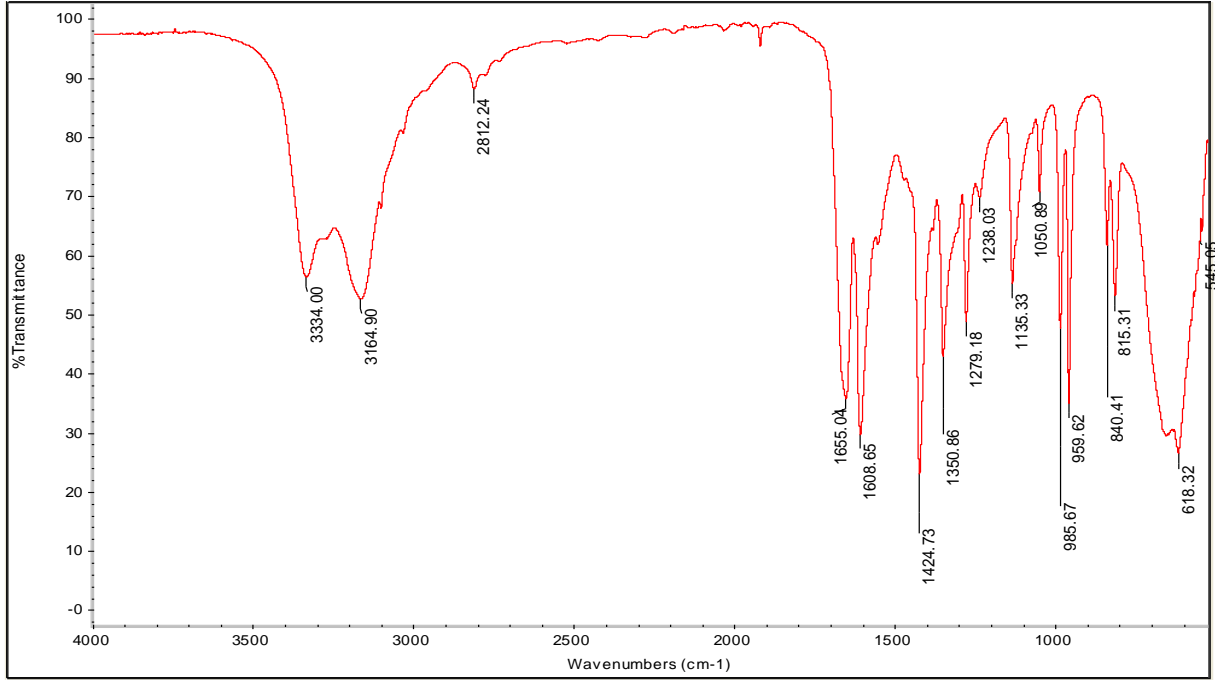
#### 4.2.1. FTIR-ATR spektrofotometre analizi

Anti-CCP/PAAM ve PAAM SPR biyosensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific,

Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörler, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür. PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin yüzeyine ait FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de verilmiştir. Şekillerden de anlaşılacağı üzere 3329  $\text{cm}^{-1}$ 'deki geniş pik  $\nu(\text{N-H})$  asimetrik gerilim bandına ait iken; 2943  $\text{cm}^{-1}$ 'deki keskin band alifatik  $\nu(-\text{CH}_3)$  bandına ait olup; 1647  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik  $\nu(\text{C=O})$  bandına aittir. 1607  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen band  $\text{NH}_2$  grubuna ait amid II  $\nu(\text{N-H})$  eğilme bandıdır. 1609  $\text{cm}^{-1}$ 'deki monomere ait  $\nu(\text{C=C})$  bandının yok olmuş olması ve 1666  $\text{cm}^{-1}$ 'deki monomere ait  $\nu(\text{C=O})$  amid I bandının 1647  $\text{cm}^{-1}$ 'ye kayması polimerleşmenin gerçekleştiğini göstermiştir. 1647  $\text{cm}^{-1}$ 'deki  $\nu(\text{C=O})$  bandının 1655  $\text{cm}^{-1}$ 'ye kayması baskılamanın başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermiştir.



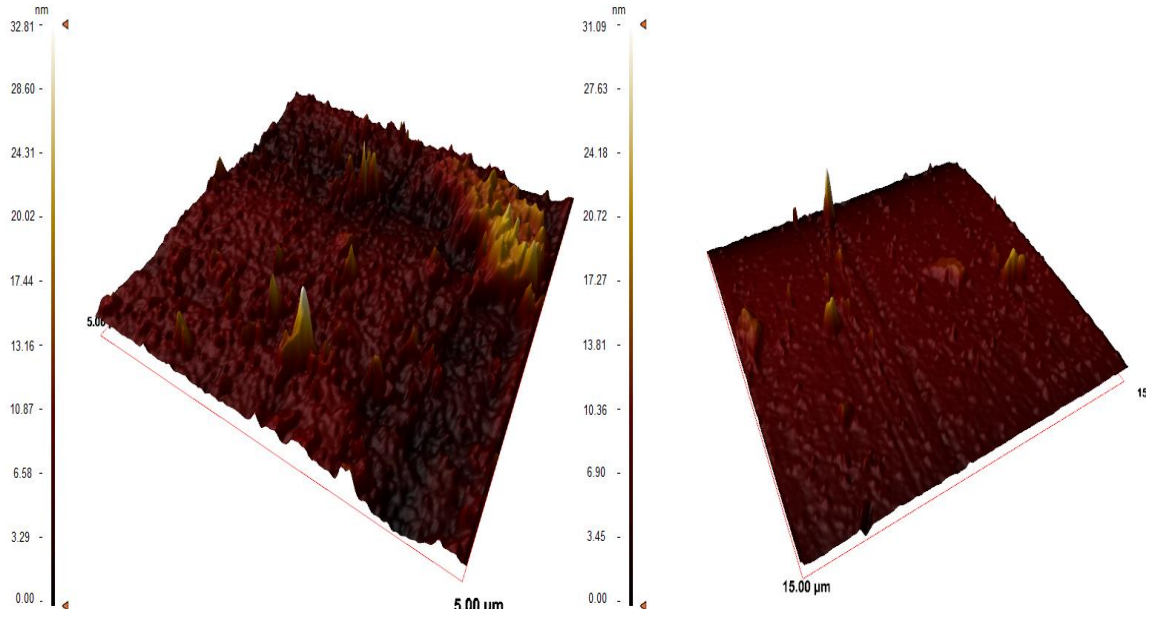
Şekil 4.2. PAAm SPR biyosensöre ait FTIR-ATR spektrumu.



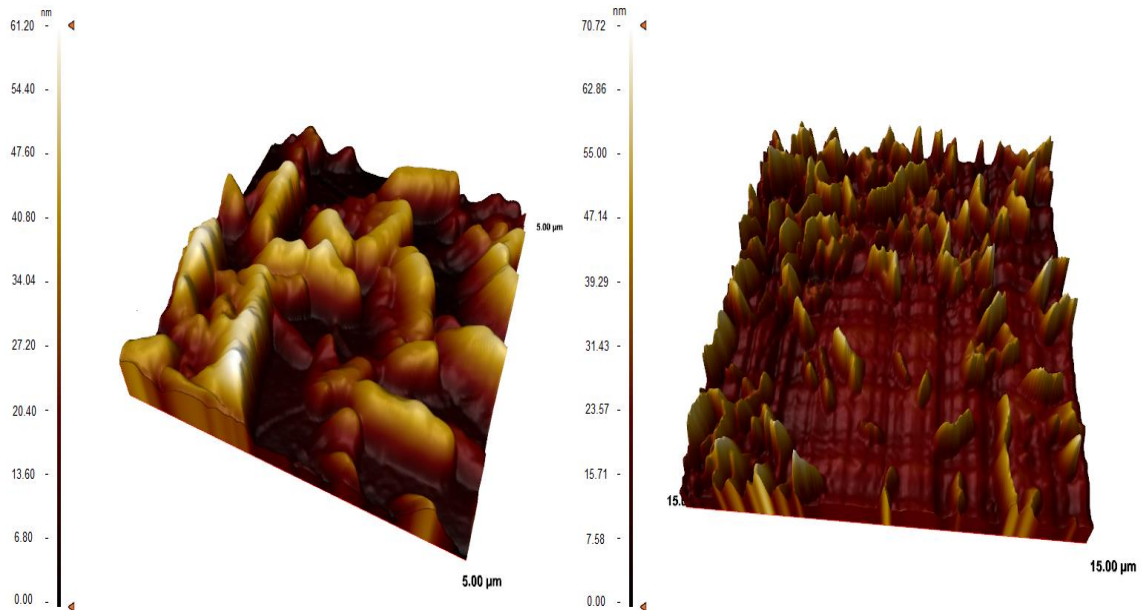
Şekil 4.3. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensöre ait FTIR-ATR spektrumu.

#### 4.2.2. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi

Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin yüzey morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Farklı oranlarda büyütölen PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin yüzey derinlikleri, 18.55 nm ve 26.38 nm olarak belirlenmiştir. PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin ortalama pürüzlölölüğü 0.95 nm ve 3.34 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Bu sonuçlar; anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün altın yüzeyine başarılı bir şekilde tutunduğunu göstermektedir. PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin yarı değen modda AFM görüntöleri Şekil 4.4 ve 4.5'de verilmiştir. Şekil 4.5'e göre anti-CCP/PAAm yüzeye homojen bir şekilde tutturulmuştur.



Şekil 4.4. PAAm SPR biyosensörün AFM görüntüsü.

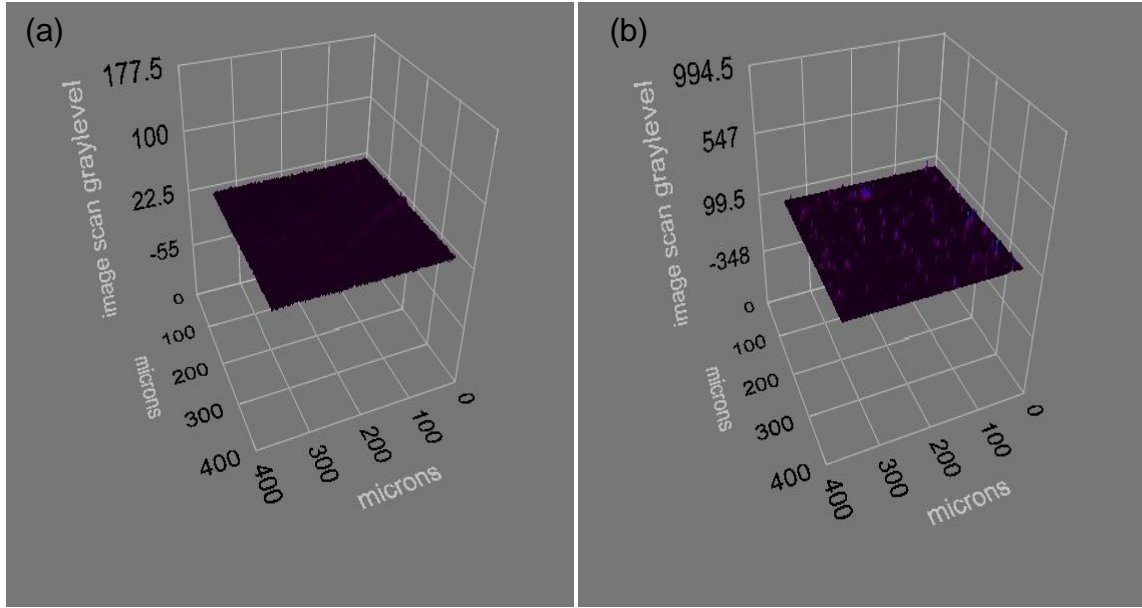


Şekil 4.5. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün AFM görüntüsü.

#### 4.2.3. Elipsometre analizi

Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir (Şekil 4.6). Elipsometrik ölçümler 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. PAAm ve anti-

CCP/PAAm SPR biyosensörlerin ortalama kalınlık değeri  $43.0 \pm 3.8$  nm ve  $46.6 \pm 2.0$  nm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. PAAm (a) ve anti-CCP/PAAm (b) SPR biyosensörlerin elipsometrik ölçümde alınan üç boyutlu görüntüsü.

#### 4.2.4. Temas açısı ölçümleri

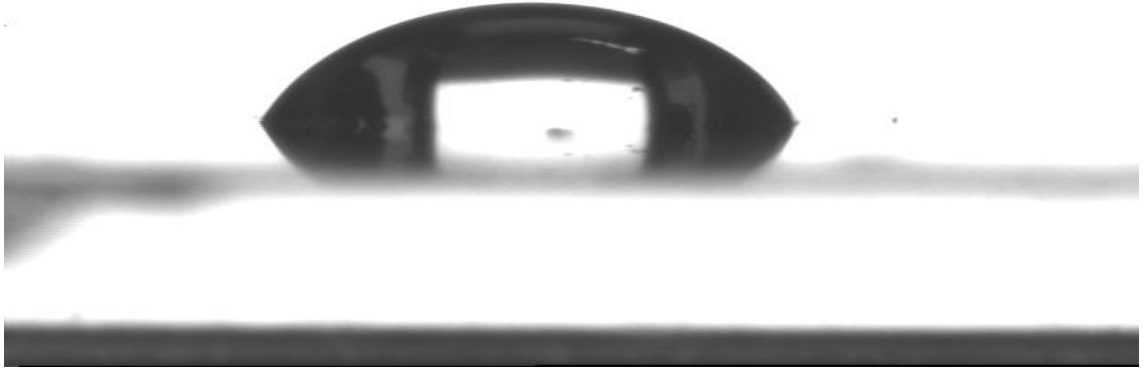
Modifiye edilmemiş, PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Tablo 4.1’de modifiye edilmemiş, PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin yüzeylerinin temas açıları özetlenmiştir.

Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş SPR biyosensör yüzeyinin temas açısı değeri  $81.5^\circ$  iken, PAAm SPR biyosensör yüzeyinin temas açısı  $72.4^\circ$  ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensör yüzeyinin temas açısı ise  $58.8^\circ$ ’ye düşmüştür. Yüzeylerin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeylerin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: Anti-CCP tayin işlemi için hazırlanan SPR biyosensörlerin hazırlanmasında akrilamid kullanılmıştır. AAm ve anti-CCP hidrofilik karakterde bir malzeme olduğundan dolayı, yüzeye hidrofilik bir polimerin tutturulması yüzey hidrofilitasını arttırmış ve temas açısı değerini düşürmüştür. Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9’da temas açısı

ölçümleri alınan modifiye edilmemiş, PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlere ait temas açısı görüntüleri verilmiştir.

Tablo 4.1. Modifiye edilmemiş (boş), PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin yüzeylerinin temas açısı değerleri.

Yüzey	Temas açısı, °
Boş	81.5
PAAm	72.4
Anti-CCP/PAAm	58.8

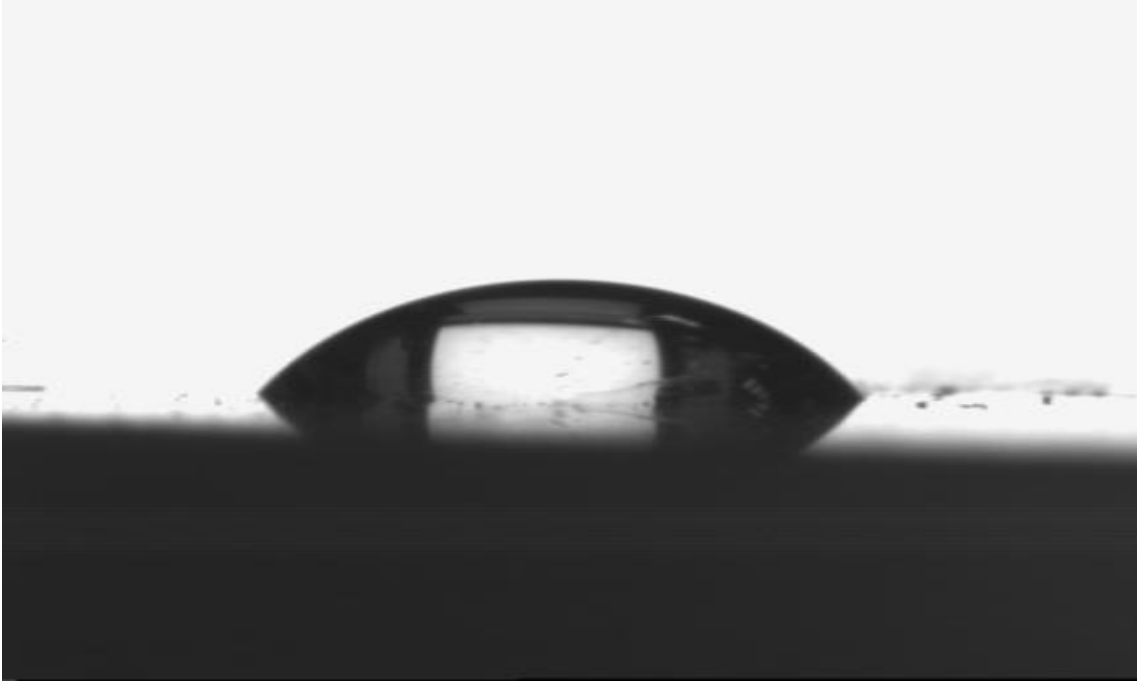


Şekil 4.7. Modifiye edilmemiş altın yüzeyinin temas açısı ölçüm fotoğrafı.





Şekil 4.8. PAAm SPR biyosensör yüzeyinin temas açısı ölçüm fotoğrafı.



Şekil 4.9. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör yüzeyinin temas açısı ölçüm fotoğrafı.

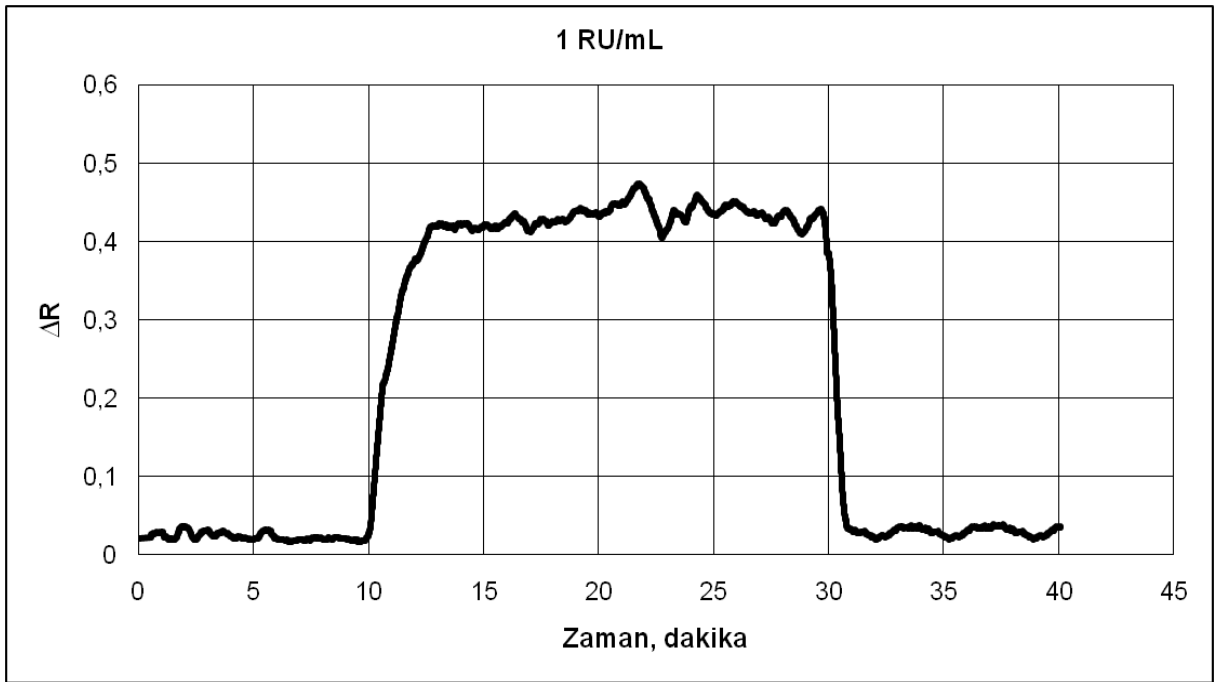
### 4.3. SPR biyosensörlerle kinetik analizler

Biyomoleküllerin tayininde sıklıkla kullanılan enzim, radyo veya floresan işaretleme yöntemlerinden farklı olarak SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretlemeye

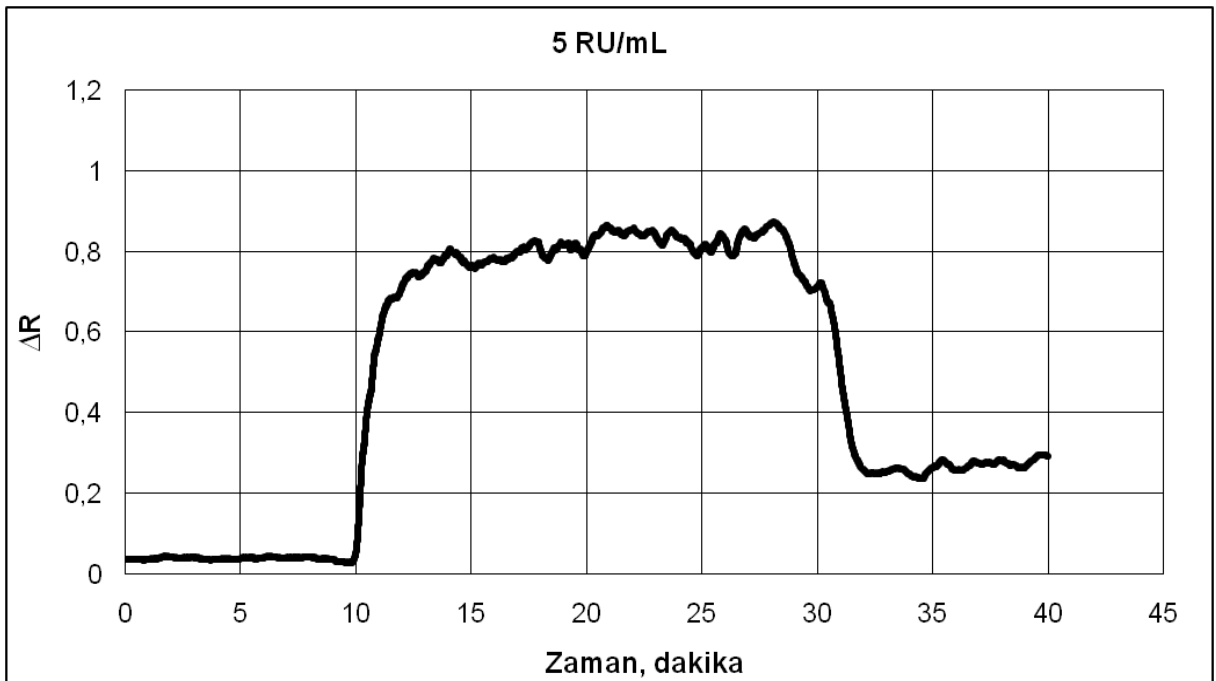
gerek duyulmadan kullanılabilirler [144]. İşaretleme işleminin yapılmaması hem zaman kazandırmakta hem de maliyeti düşürmektedir. İşaretleyici moleküllerin ortamda bulunan diğer moleküllerle etkileşiminden dolayı yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir. SPR temelli biyosensörlerin kullanılmasıyla bu sorunlar giderilebilmektedir [146]. Ayrıca bu sensörlerde analit ve yüzey etkileşimi gerçek zamanda ve doğrudan ölçülebilmektedir. Bu özellik nicel olarak kinetik, termodinamik ve derişim parametrelerinin belirlenmesini veya nitel olarak ligand ve analit arasındaki ilişkinin karakterize edilmesini sağlamaktadır [5].

Bu çalışma kapsamında anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörler hazırlanmıştır. SPR sinyali ile anti-CCP derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (1-200 RU/mL (66-13200ng/mL)) anti-CCP çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığı ile anti-CCP/PAAm SPR biyosensörü ile etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alınmıştır. Şekil 4.10'da farklı derişimlerde hazırlanan anti-CCP çözeltilerinden elde edilmiş sensorgramlar verilmiştir.

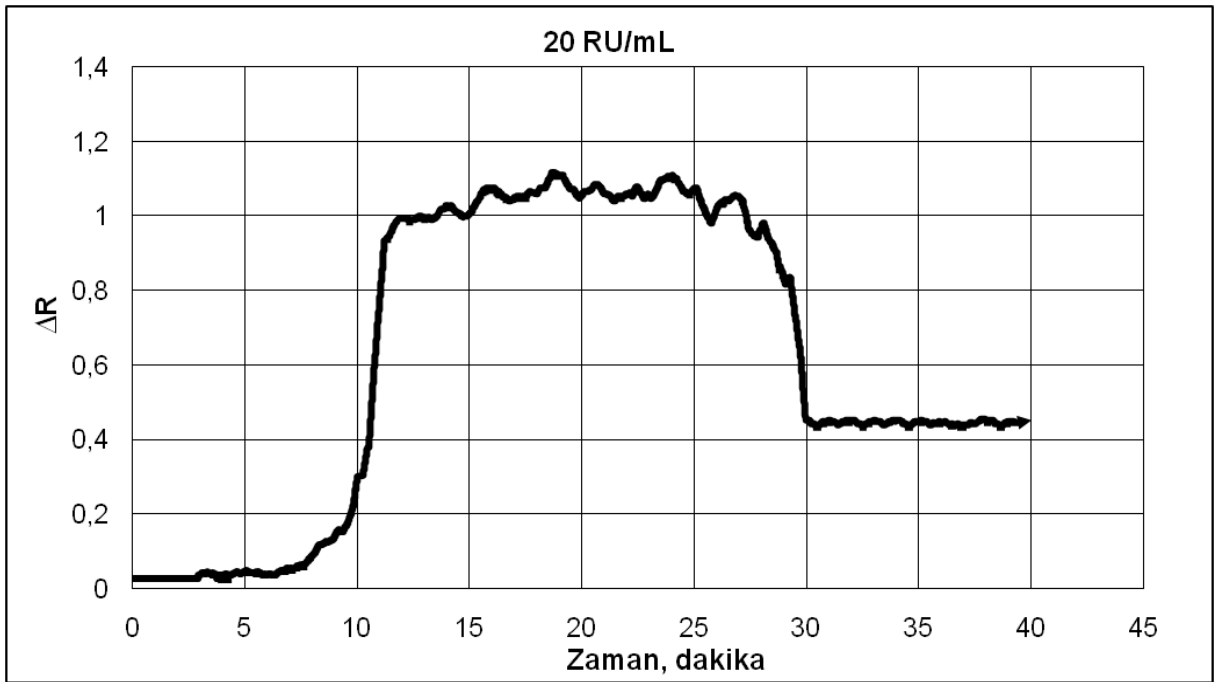
Şekil 4.11'de tüm sensorgramlar bir arada verilmiştir. Standart bir ölçümde, sistemden öncelikle denge tamponu daha sonra sistem yeniden dengeye ulaşana kadar anti-CCP çözeltisi geçirilmiş ve son aşamada desorpsiyon çözeltisi kullanılmıştır. Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için 30 dakika beklenilmiştir. Desorpsiyon ve rejenerasyon işlemleri yaklaşık 10 dakika içinde gerçekleştirilmiştir.



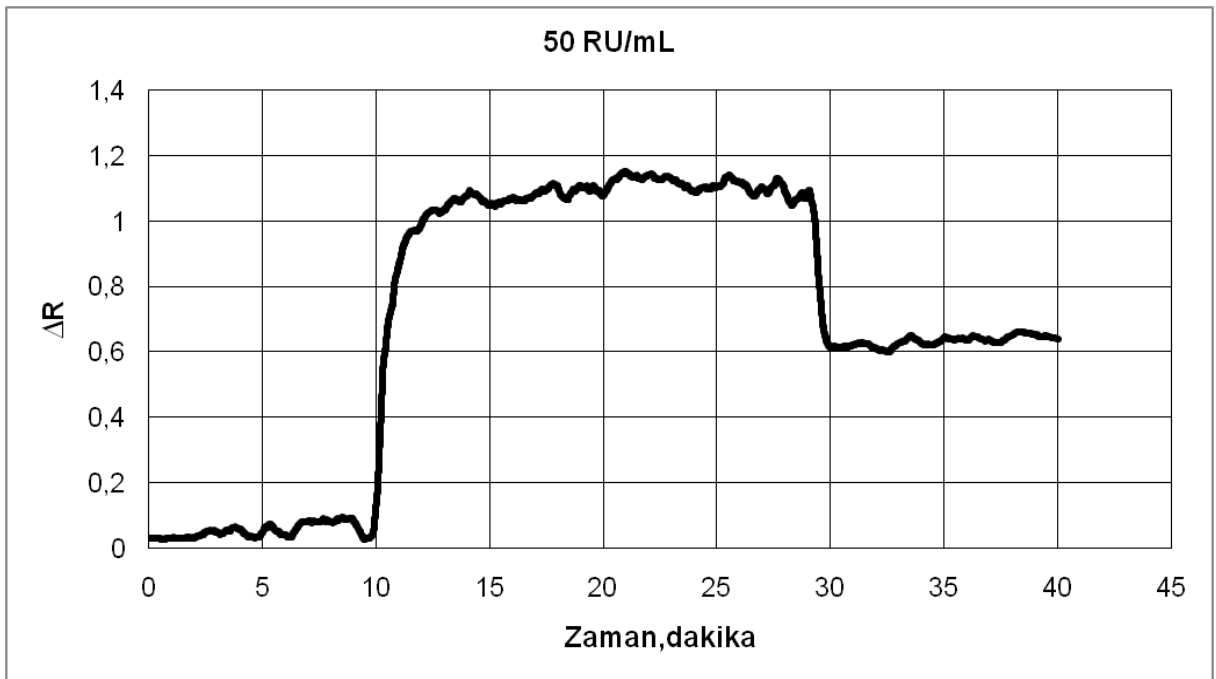
(a)



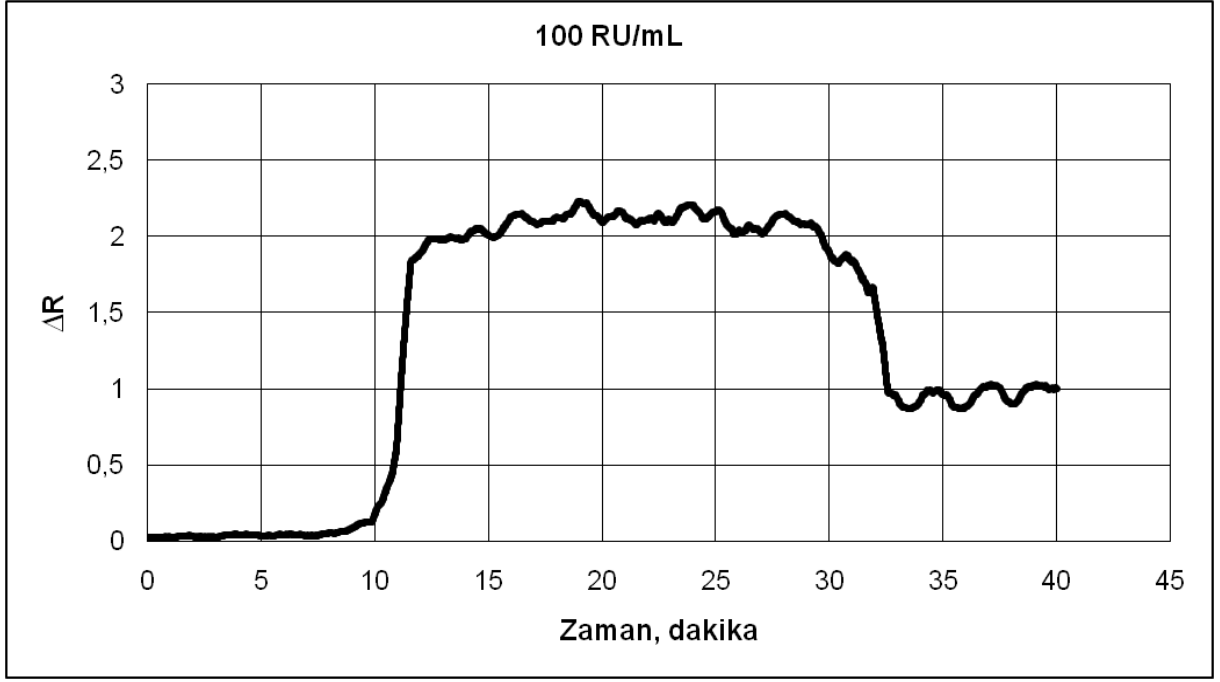
(b)



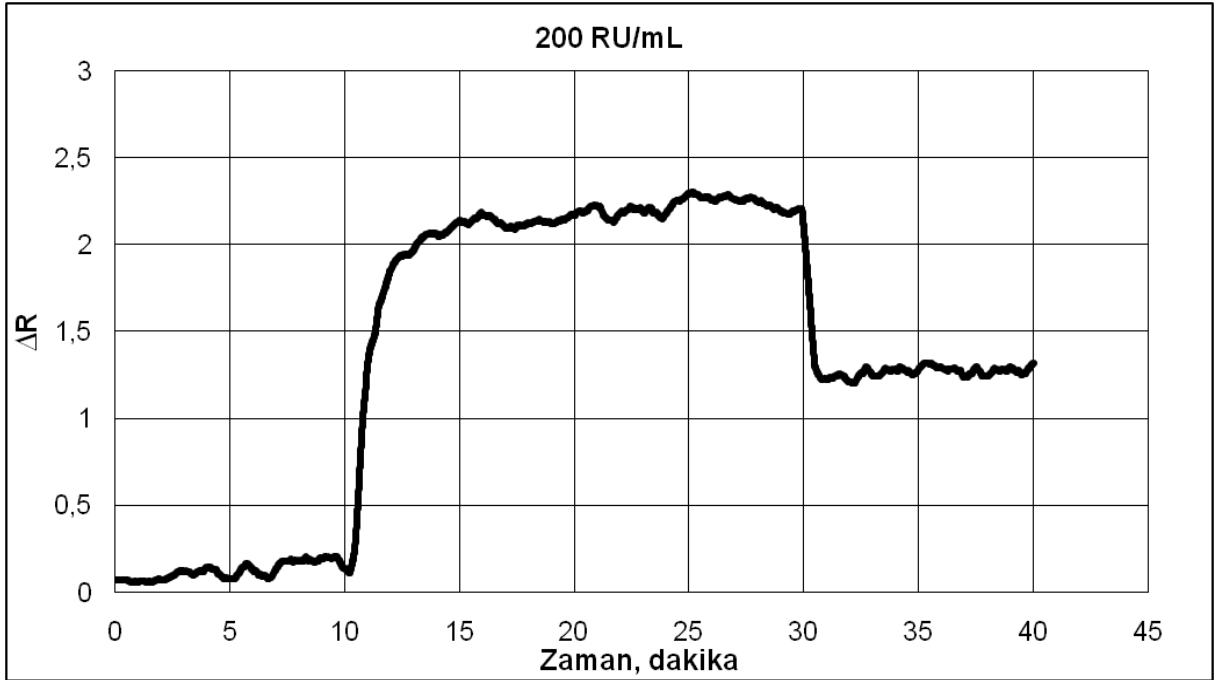
(c)



(d)

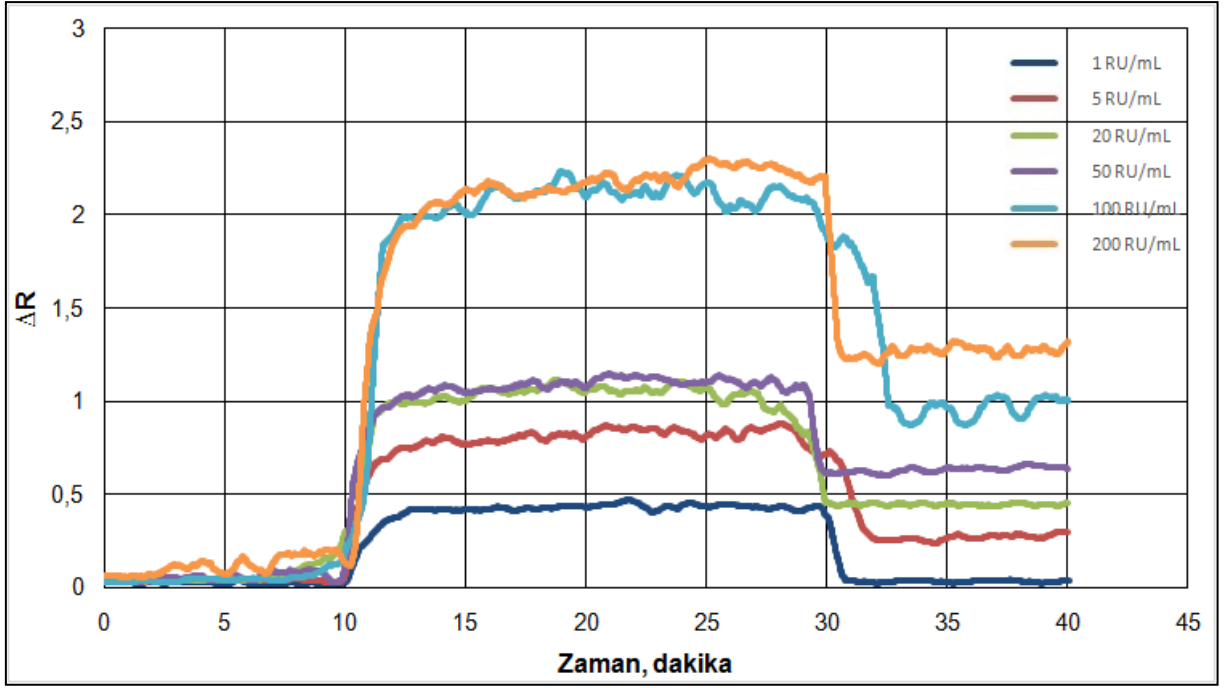


(e)



(f)

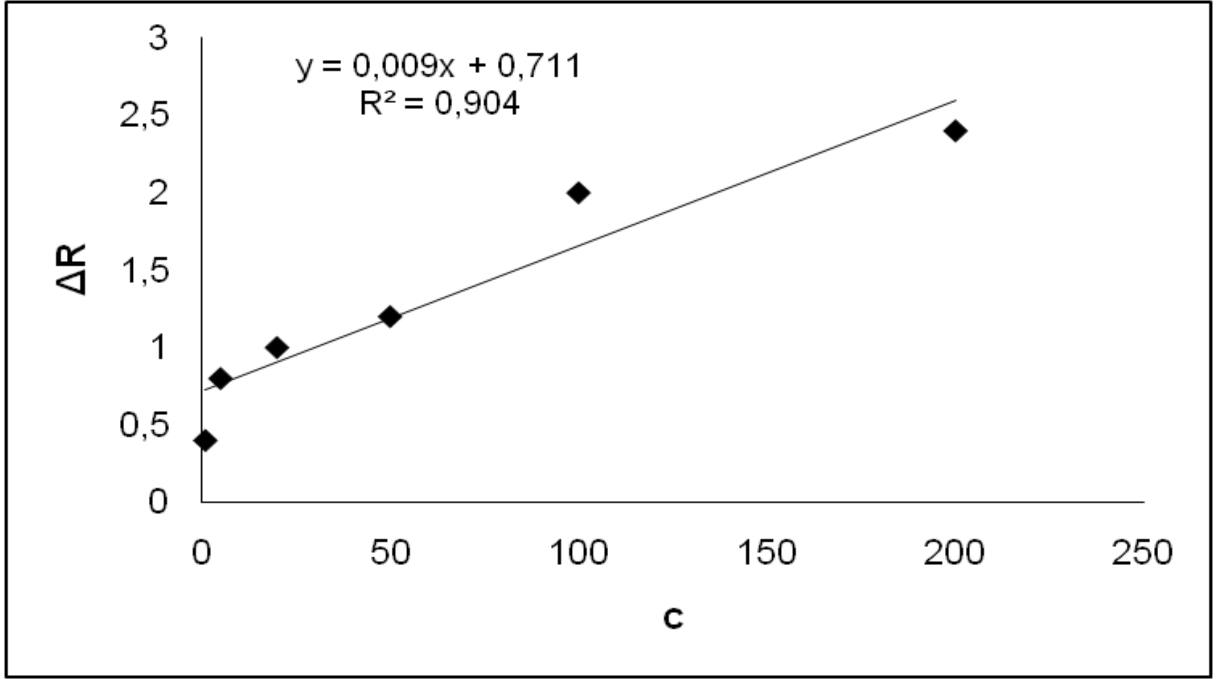
Şekil 4.10. Farklı derişimlerde anti-CCP çözeltilerinin anti-CPP/PAAm SPR biyosensöre uygulanması ile elde edilen zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramları: (a) 1 RU/mL (66 ng/mL); (b) 5 RU/mL (330 ng/mL); (c) 20 RU/mL (1320 ng/mL); (d) 50 RU/mL (3300 ng/mL); (e) 100 RU/mL (6600 ng/mL); (f) 200 RU/mL (13200 ng/mL).



Şekil 4.11. Farklı derişimlerdeki anti-CCP çözeltileri ve anti-CCP/ SPR biyosensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramları.

Şekil 4.11'de görüldüğü gibi anti-CCP/PAAm SPR biyosensör, derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Ayrıca Şekil 4.12'de 1-200 RU/mL (66-13200 ng/mL) aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ( $y = 0.009x + 0.711$ ) ve doğrusallığı ( $R^2=0.904$ ) olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre; anti-CCP molekülleri tek bölgeden yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Başka bir deyişle; hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensör, 66-13200 ng/mL aralığında %90 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir.

Anti-CCP IgG antikorlarının izoelektrik noktası 6.95 [175] olduğundan kullanılan tampon (pH 7.0) ortamında nötr davranış sergilemiş ve bu ortamda AAm iyonlaşmadığı için iyonik etkileşimler minimize edilerek bağlanma hidrojen bağlarıyla gerçekleşmiş olur.



Şekil 4.12. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör ve  $\Delta R$  arasındaki ilişki.

#### - Denge analizi

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

$$d\Delta R / dt = k_a C (\Delta R_{maks} - \Delta R) - k_d \Delta R \quad (4.1)$$

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

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

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

#### - Bağlanma kinetik analizi

Eşitlik 4.1 tekrar düzenlendiğinde;

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{maks} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (4.3)$$

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

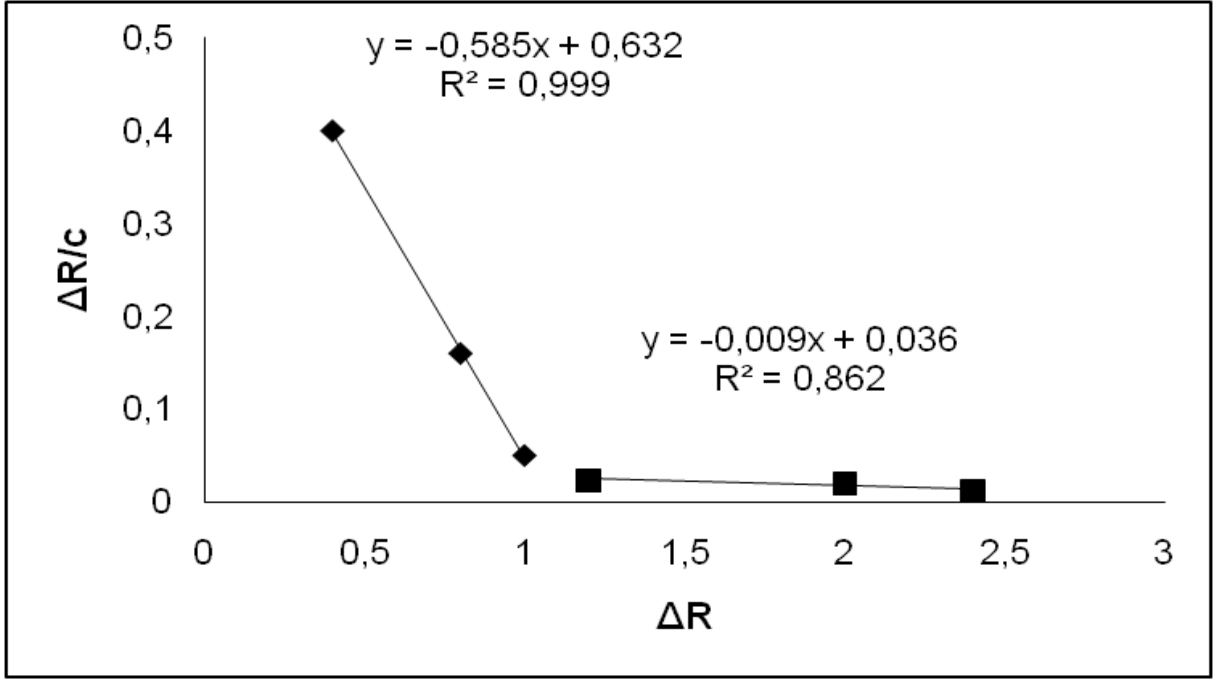
$$S = k_a C + k_d \quad (4.4)$$

S'ye karşı C grafiği, eğimi  $k_a$  olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası  $k_d$  değerini vermektedir. Fakat,  $k_a C \gg k_d$  olduğu durumlarda  $k_d$  hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

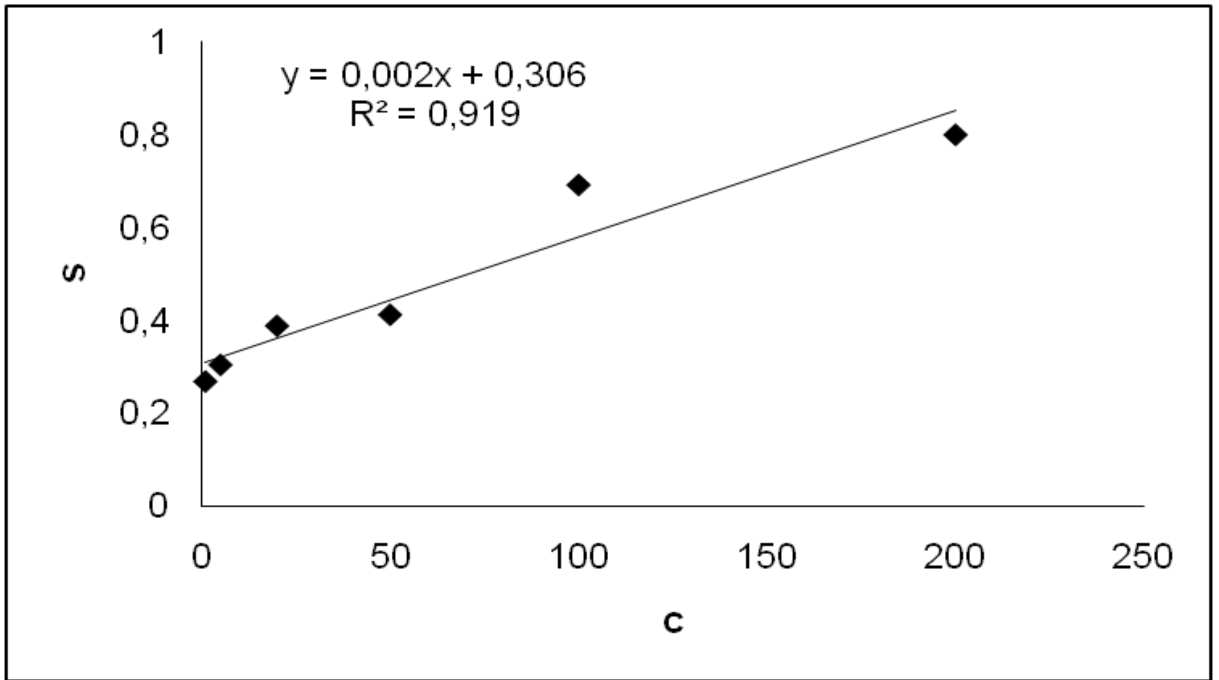
$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (4.5)$$

Burada;  $\Delta R_0$  ve  $\Delta R_t$ , ayrılma eğrisindeki  $t_0$  ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir [175]. Şekil 4.13'de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan  $\Delta R_{maks}$ ,  $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_A$  ve  $K_D$  değerleri Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.





(a)



(b)

Şekil 4.13. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. Denge analiz yaklaşımı (Scatchard) (a); Bağlanma kinetik yaklaşımı (b).

Çizelge 4.1. Kinetik hız sabitleri.

Denge analiz (Scatchard)		Bağlanma kinetik analizi	
$\Delta R_{maks}$ , RU/mL	1.080	$k_a$ , RU/mL.s	0.002
$K_A$ , RU/mL	0.585	$k_d$ , 1/s	0.306
$K_D$ , mL/RU	1.709	$K_A$ , RU/mL	0.065
$R^2$	0.999	$K_D$ , mL/RU	15.314
		$R^2$	0.919

#### 4.4. Denge izoterm modelleri

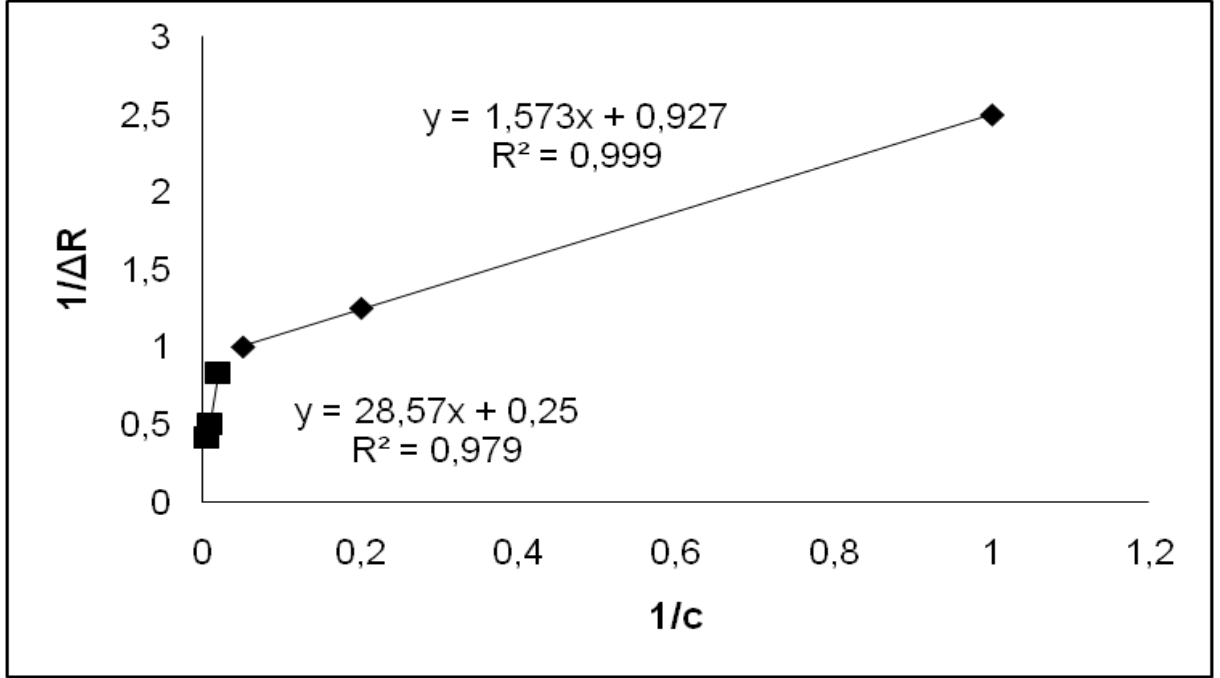
Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör ile anti-CCP çözeltisi arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır: Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri.

Scatchard	$\Delta R_{denge} / [C] = K_A(\Delta R_{maks} - \Delta R_{denge})$
Langmuir	$\Delta R = \{\Delta R_{maks} [C] / K_D + [C]\}$
Freundlich	$\Delta R = \Delta R_{maks} [C]^{1/n}$
Langmuir-Freundlich	$\Delta R = \{\Delta R_{maks} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n}\}$

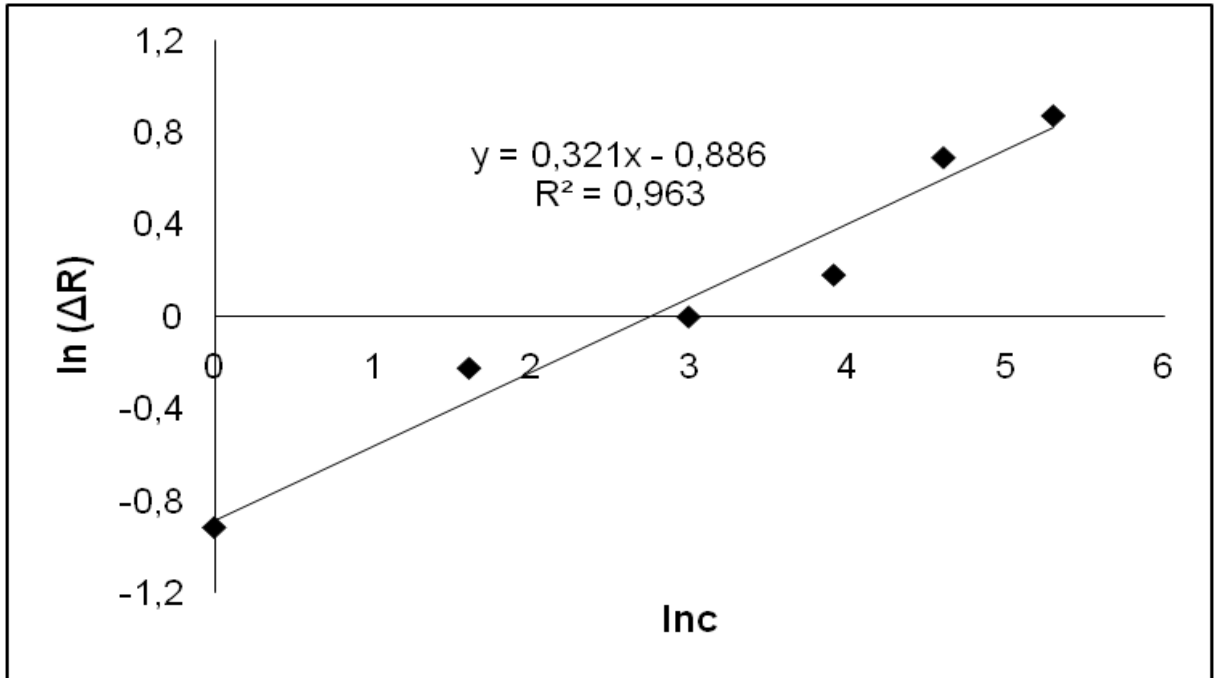
Burada;  $\Delta R_{maks}$ , maksimum SPR sinyal kayması;  $\Delta R_{denge}$ , denge halindeki SPR sinyal kayması;  $[C]$ , analit derişimi (RU/mL);  $K_A$  (RU/mL), bağlanma denge sabiti;  $K_D$  (mL/RU), ayrılma denge sabiti;  $1/n$ , Freundlich yüzey heterojenite indeksidir.

Şekil 4.14'e göre deneysel olarak elde edilen veriler anti-CCP tayinine en uygun model Langmuir modelidir ( $R^2 = 0.999$ ). Bu sonuç, hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensör yüzeyindeki anti-CCP bağlanma özelliklerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanal etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her

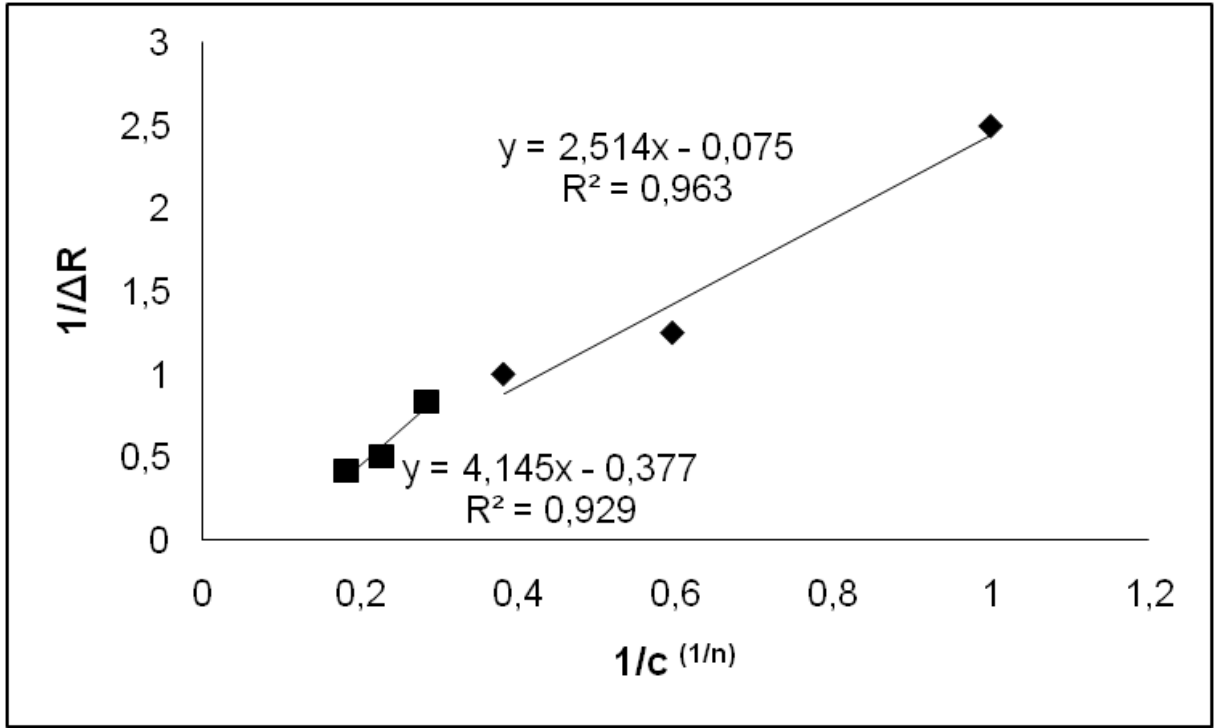
üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir. Son olarak anti-CCP/PAAm SPR biyosensör ile miktar tayin edebilecek sınır değeri (LoD-Limit of Detection) hesaplanmıştır. Yapılan hesaplara göre LoD 11.66 ng/mL olarak bulunmuştur. Ayrıca 66 ng/mL için 3 tekrarda hesaplanan göreceli standart sapma (RSD) %2.41 olarak bulunmuştur.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.14. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.

Çizelge 4.2. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
$\Delta R_{maks}$ , RU/mL	1.079	$\Delta R_{maks}$ , RU/mL	0.412	$\Delta R_{maks}$ , RU/mL	13.33
$K_D$ , mL/RU	1.697	1/n	0.321	1/n	0.321
$K_A$ , RU/mL	0.589	$R^2$	0.963	$K_D$ , mL/RU	33.511
$R^2$	0.999			$K_A$ , RU/mL	0.026
				$R^2$	0.929

#### 4.5. Yarışmalı kinetik analizler

IgM ve BSA için anti-CCP molekülüne göre dağılıma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

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

Eşitlikte  $K_d$ , dağılıma katsayısını (mL/RU);  $C_i$  ve  $C_f$ , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini (RU/mL);  $V$ , kullanılan çözelti hacmini (mL) ve  $m$ , polimerin ağırlığını (g) ifade etmektedir. SPR biyosensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmektedir [176]. Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi; polimerin kütlesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin  $\Delta R$  ile doğrusal ilişkide olmasıdır.

Bu durumda seçicilik katsayısı,

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

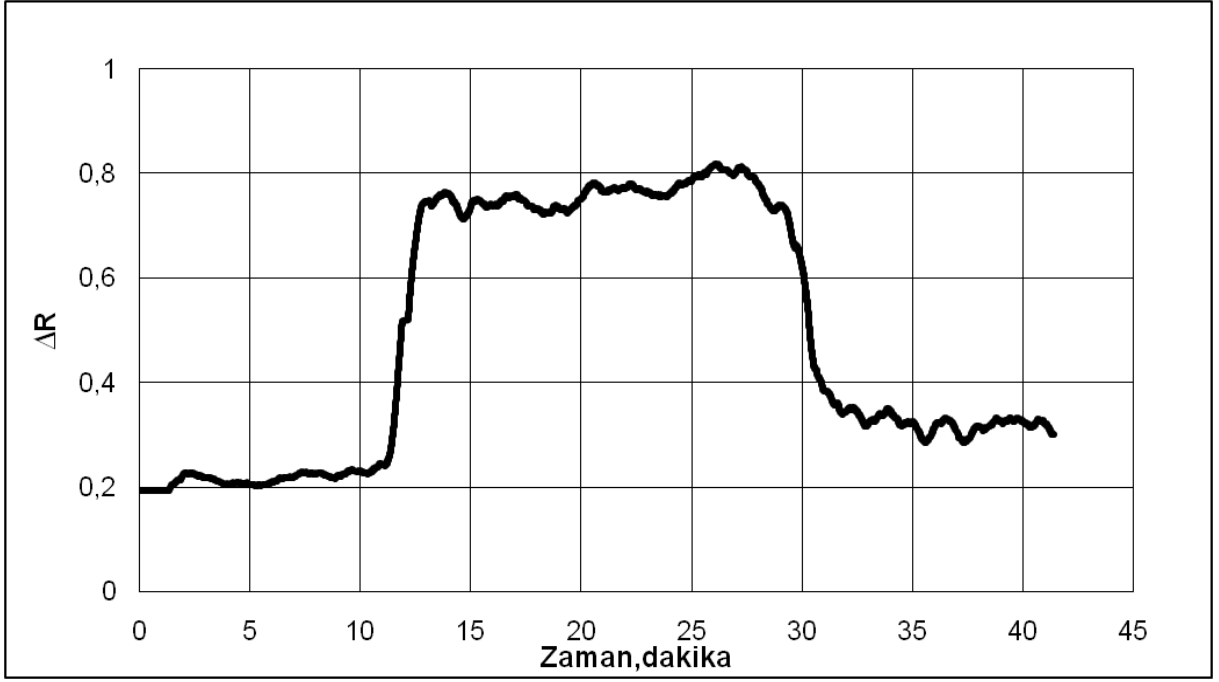
şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi ise;

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

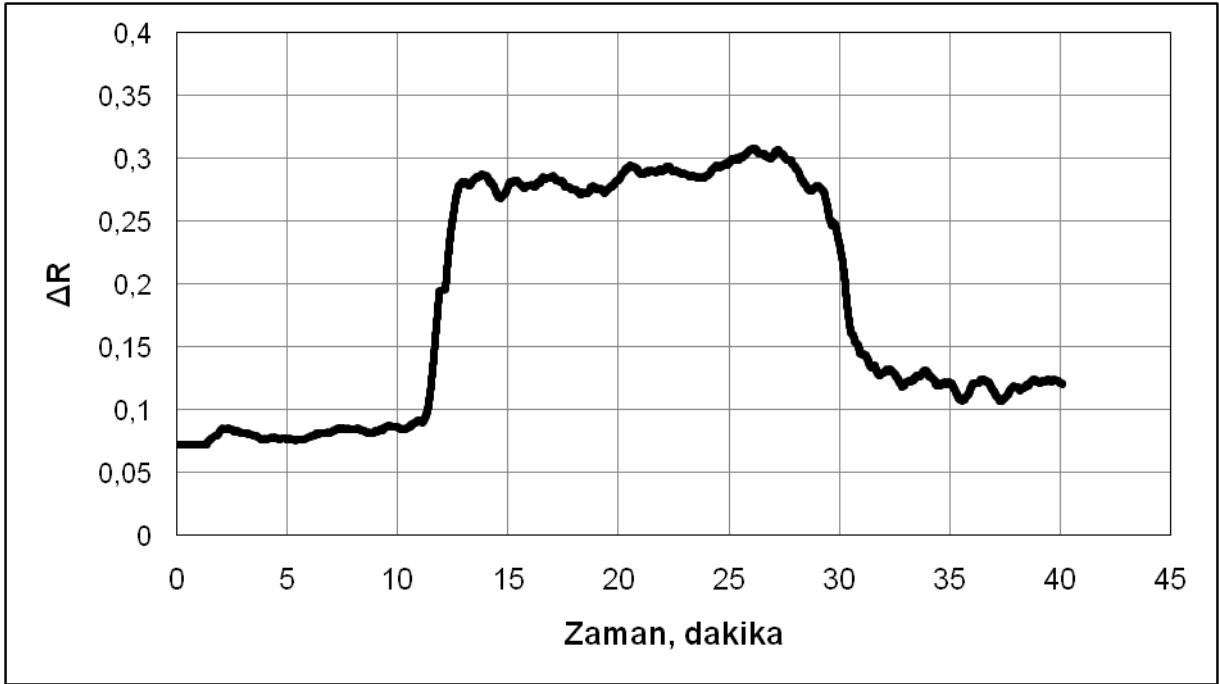
şeklinde ifade edilebilir.

Hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün anti-CCP'ye karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon çalışması IgM ve BSA biyomolekülleri kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'daki IgM ve BSA molekülleriyle anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün etkileşimine ait sensorgramlar incelendiğinde; anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün IgM ve BSA molekülleriyle spesifik bir etkileşime girmediği ve dikkate değer bir sinyal vermediği belirlenmiştir. Bu durum anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün, anti-CCP molekülüne seçici olduğunu göstermektedir.



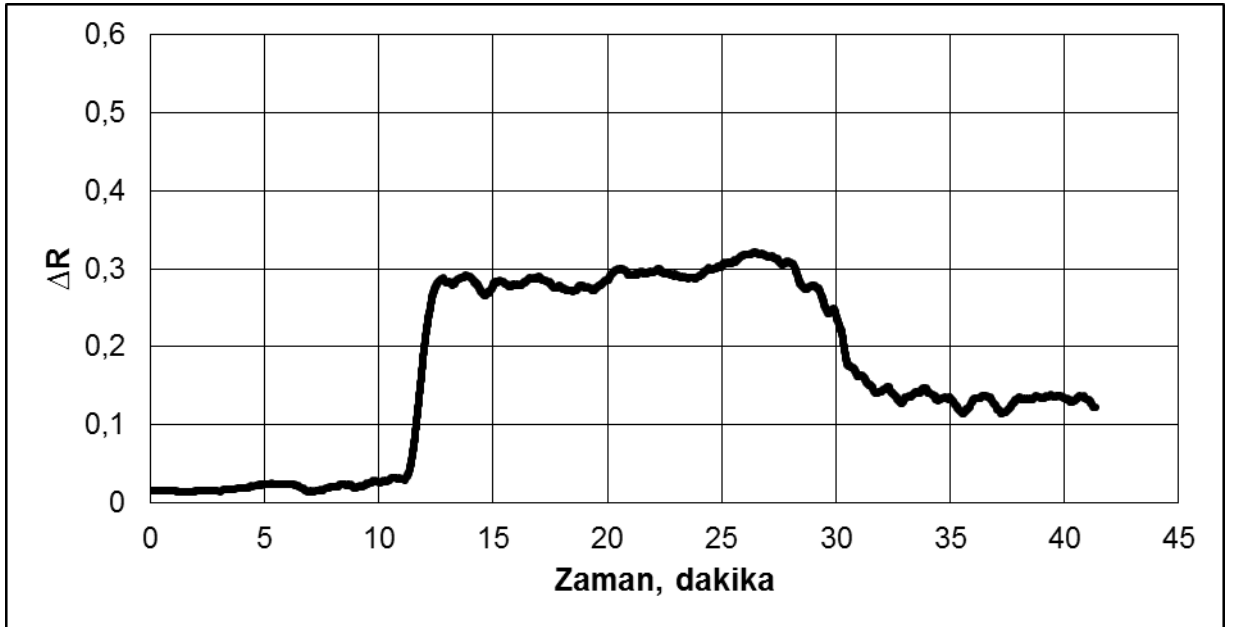
Şekil 4.15. IgM biyomolekülü ile hazırlanmış çözelti ile anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.



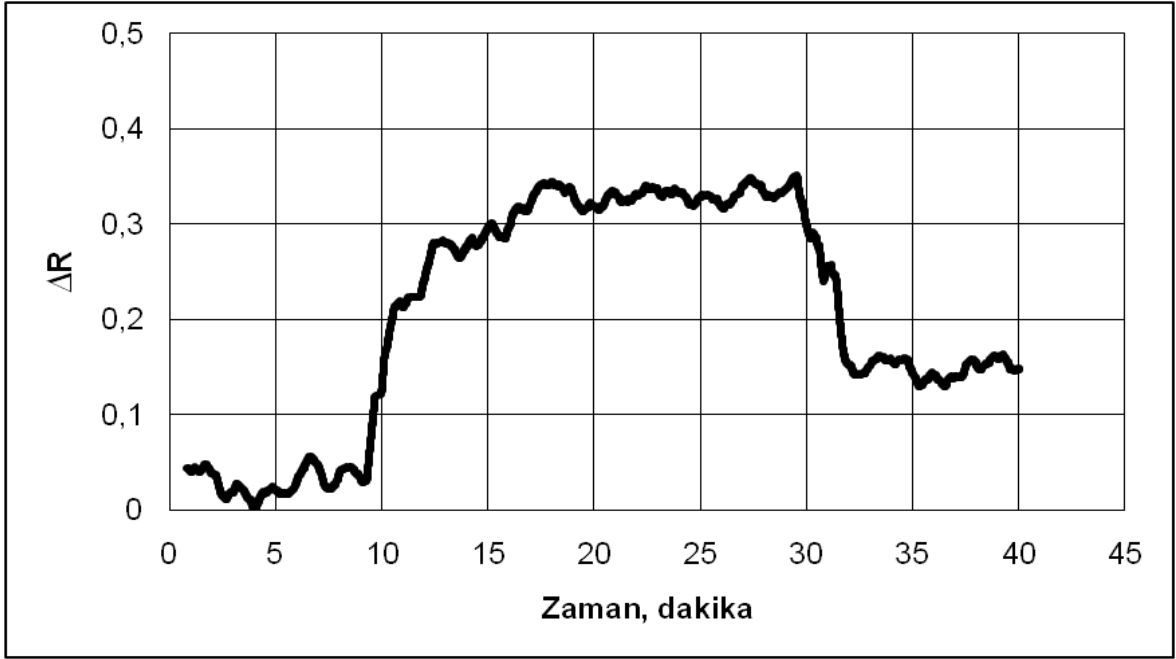
Şekil 4.16. BSA biyomolekülü ile hazırlanmış çözelti ile anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.

#### 4.6. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün baskılama seçiciliğinin belirlenmesi

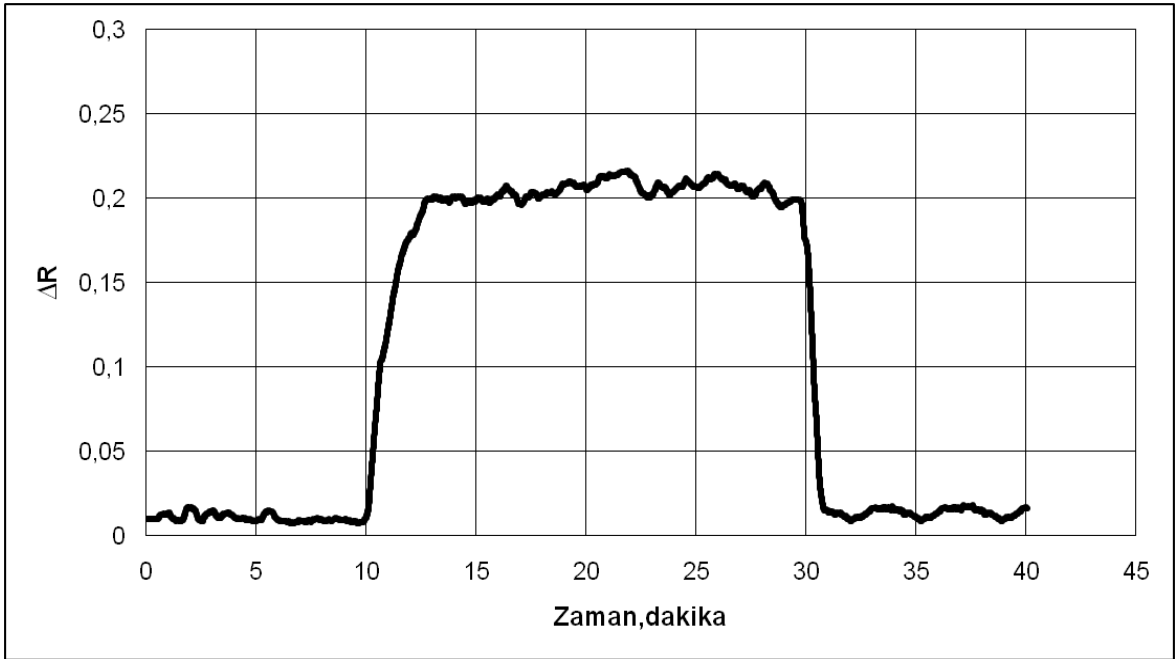
Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün baskılama seçiciliğini göstermek için anti-CCP kullanılmadan PAAm SPR biyosensörü hazırlanmıştır. IgM ve BSA biyomoleküllerinin kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler SPR sistemine verilmiştir. Bu çözeltiler fosfat tamponunda (pH 7.0) 13200 ng/mL derişimde hazırlanmışlardır. Şekil 4.17'de anti-CCP biyomolekülü ile hazırlanmış çözelti ile PAAm SPR biyosensörün verdiği zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı görülmektedir. Yine Şekil 4.18'de ve Şekil 4.19'da zamana karşı sensorgramları IgM ve BSA için verilmiştir. Şekil 4.19 incelendiğinde; PAAm SPR biyosensörün IgM ve BSA ile herhangi bir etkileşime girmediği ve anlamlı bir sinyal vermediği gözlenmiştir. Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörler karşılaştırıldığında; anti-CCP sinyalinin 2.4'den 0.42'e düştüğü görülmektedir (Çizelge 4.3). Eşitlik 4.7 ve 4.8 kullanılarak hesaplanan seçicilik katsayıları, IgM için 0.8 (anti-CCP/PAAm), 0.35 (PAAm); BSA için 0.3 (anti-CCP/PAAm), 0.23 (PAAm) olarak bulunmuştur. Bağlı seçicilik değeri, 1'in ne kadar üzerindeyse baskılama işleminin o kadar etkin olduğu bilinmektedir [177,178].



Şekil 4.17. Anti-CCP biyomolekülü ile hazırlanmış çözelti ile PAAm SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.



Şekil 4.18. IgM biyomolekülü ile hazırlanmış çözelti ile PAAm SPR biyosensörünün zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.



Şekil 4.19. BSA biyomolekülü ile hazırlanmış çözelti ile PAAm SPR biyosensörünün zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.

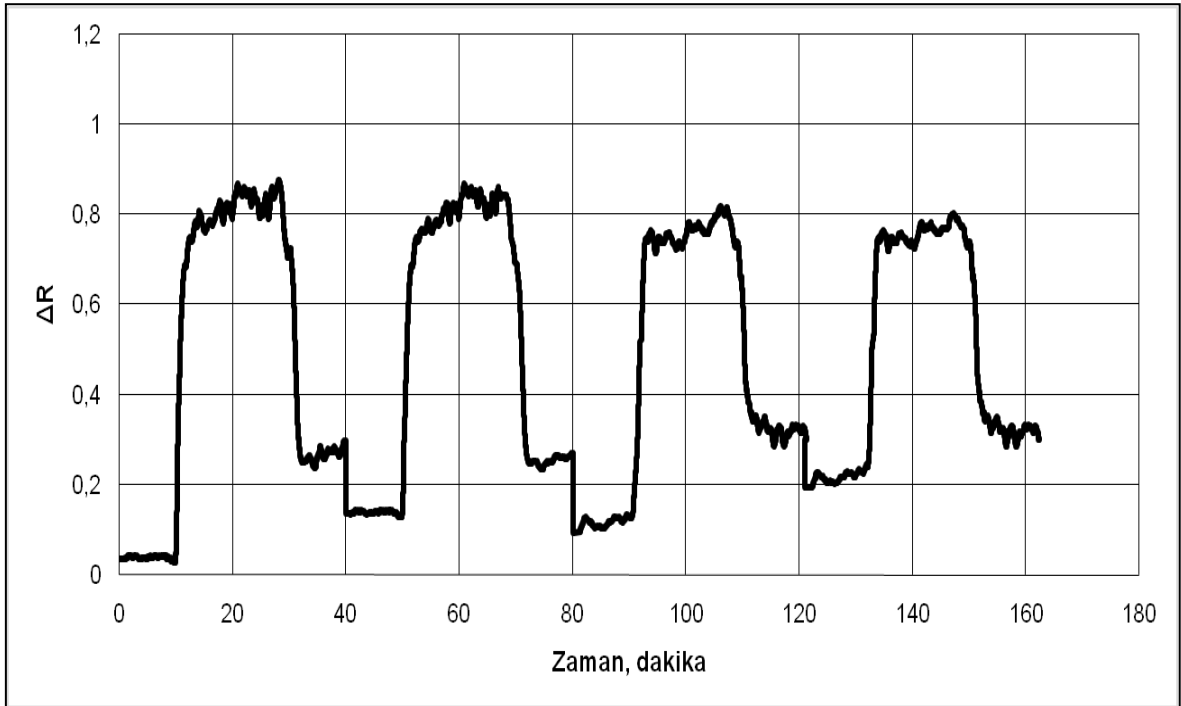


Çizelge 4.3. Anti-CCP'ye göre IgM ve BSA için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları.

Biyomolekül k'	Anti-CCP/PAAm			PAAm	
	$\Delta R$		k	$\Delta R$	k
<b>Anti-CCP</b>	2.4	-	0.42	-	-
<b>IgM</b>	0.8	3.0	0.35	1.2	2.5
<b>BSA</b>	0.3	8.0	0.23	1.8	4.4

#### 4.7. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi

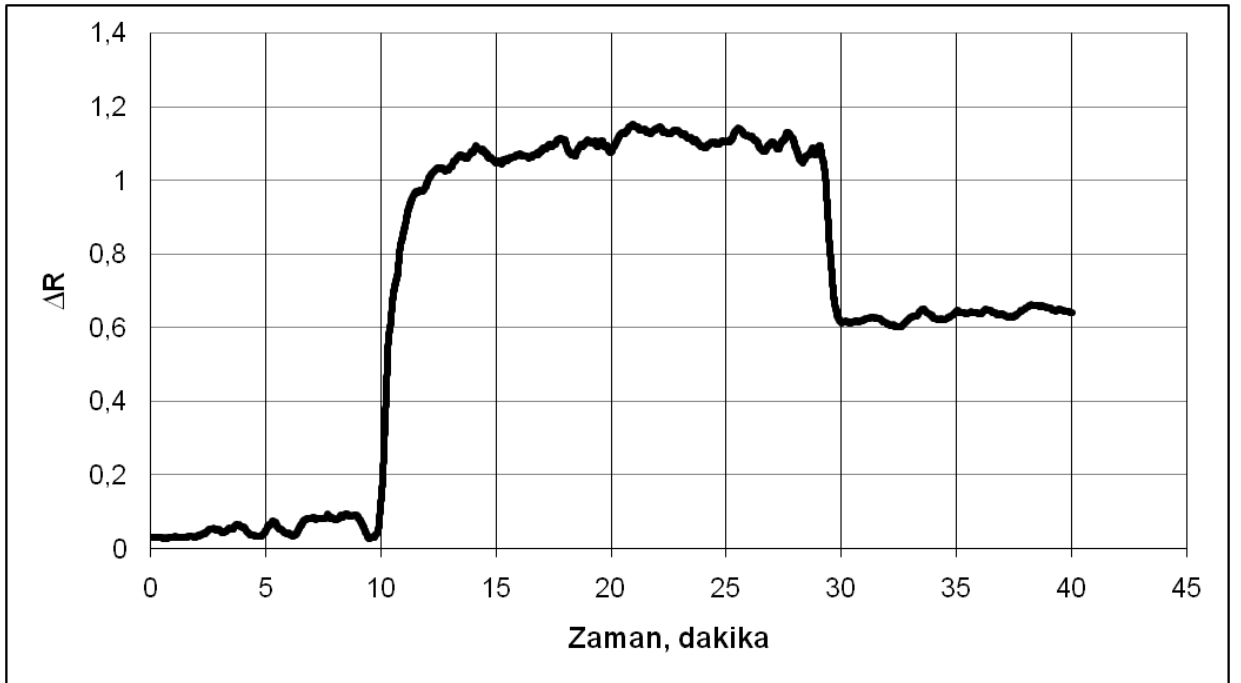
Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 330 ng/mL derişimlerde anti-CCP içeren çözeltiler SPR sistemine tekrarlı (4 kez) bir şekilde enjekte edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.20'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün herhangi bir performans kaybı olmadan kullanılabileceği gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini gösteren zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.

#### 4.8. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün kan plazmasından anti-CCP tayini için kullanımı

Sağlıklı bir bireyden alınan kan örneğinden elde edilen plazma örneği anti-CCP (3300 ng/mL) ile eklenerek anti-CCP/PAAm SPR biyosensör yüzeyi ile etkileştirilmiştir. Zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı incelendiğinde  $\Delta R$ 'deki artışın 50 RU/mL (3300 ng/mL)lik derişime denk geldiği daha önceden çizilmiş olan  $\Delta R$ 'nin derişime karşı olan grafiğinden tespit edilmiştir.



Şekil 4.21. Kan plazmasından anti-CCP tayini için anti-CCP/PAAm SPR biyosensörünün kullanımını gösteren zamana karşı  $\Delta R$  sensorgramı.

Hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensör ile tayin edilen miktarın, yapılan çalışmalarda belirlenen çeşitli tayin sınırlarından (4.1 RU/mL [179]; 9 RU/mL [180]) daha alt sınırlara inilmiş, tek basamakta, 10 saniye gibi kısa bir sürede ve güvenilir bir şekilde ölçüm yapabildiği gösterilmiştir.

## 5. YORUM

- Kalıp molekül ve monomer oranı 1.0  $\mu\text{mol}$ :0.3 mmol şeklinde belirlenen anti-CCP/akrilamid (AAm) ön-kompleksi kalıp molekül olarak anti-CCP, fonksiyonel monomer olarak akrilamid monomerinin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir.
- Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörü, anti-CCP/AAm ön-kompleksi ve N,N-metilenbisakrilamid (MBAAm) varlığında APS ve TEMED başlatıcı/aktifleştirici çifti kullanılarak hazırlanmıştır. Kalıp molekül, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı oranı 1.0  $\mu\text{mol}$ :0.3 mmol:0.02 mmol, monomer yüzdesi de 4.8 % olarak belirlenmiştir.
- Hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensörden kalıp molekül olan anti-CCP'nin uzaklaştırılması için pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde çözülen %10'luk asetik asit (HAc) ve %1'lik Tween 20 çözeltisi kullanılmıştır.
- Kalıp molekül olan anti-CCP eklenmeden PAAm SPR biyosensörü, aynı reçete ile hazırlanmıştır.
- Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörleri FTIR-ATR, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre ve temas açısı ölçümleriyle karakterize edilmiştir.
- Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin yüzeylerinin karakterizasyonu için yapılan FTIR-ATR spektrofotometresinde 3329  $\text{cm}^{-1}$ 'deki geniş pik  $\nu(\text{N-H})$  asimetrik gerilim bandına ait iken; 2943  $\text{cm}^{-1}$ 'deki keskin band alifatik  $\nu(-\text{CH}_3)$  bandına ait olup; 1647  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik  $\nu(\text{C=O})$  bandına aittir. 1607  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen band  $\text{NH}_2$  grubuna ait amid II  $\nu(\text{N-H})$  eğilme bandıdır. 1609  $\text{cm}^{-1}$ 'deki monomere ait  $\nu(\text{C=C})$  bandının yok olması

olması ve  $1666\text{ cm}^{-1}$ 'deki monomere ait  $\nu(\text{C}=\text{O})$  amid I bandının  $1647\text{ cm}^{-1}$ 'ye kayması polimerleşmenin gerçekleştiğini göstermiştir.  $1647\text{ cm}^{-1}$ 'deki  $\nu(\text{C}=\text{O})$  bandının  $1655\text{ cm}^{-1}$ 'ye kayması baskılamanın başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermiştir.

- Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin yüzey morfolojisi atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterize edilmiştir. PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin yüzey derinlikleri,  $18.55\text{ nm}$  ve  $26.38\text{ nm}$ , ortalama pürüzlülükleri  $0.95\text{ nm}$  ve  $3.34\text{ nm}$  olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar; anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün altın yüzeyine başarılı ve homojen bir şekilde tutunduğunu göstermektedir.
- Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin ortalama kalınlık değeri  $43.0\pm 3.8\text{ nm}$  ve  $46.6\pm 2.0\text{ nm}$  olarak hesaplanmıştır.
- Modifiye edilmemiş, PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensörlerin bir diğer yüzey karakterizasyonu temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Su temas açısı ölçümlerinden modifiye edilmemiş, PAAm ve anti-CCP/PAAm SPR biyosensör yüzeylerinin su temas açısı değerleri sırasıyla  $81.5^\circ$ ,  $72.4^\circ$  ve  $58.8^\circ$ 'dir. Yüzeylerin su temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeylerin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir.
- Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin hazırlanmasından sonra kinetik çalışmalara geçilmiştir.
- Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör  $66\text{-}13200\text{ ng/mL}$  derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir.  $66\text{-}13200\text{ ng/mL}$  derişim

aralığında alınan veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi  $y=0.009x+0.711$  ve doğrusalılığı  $R^2=0,904$  olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu verilerle anti-CCP/PAAm SPR biyosensör, 66-13200 ng/mL aralığında %90, doğrulukta ölçüm yapmaktadır.

- Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör artan derişimlerde hazırlanmış anti-CCP çözeltileriyle etkileştirilmiştir. Artan derişimlerle birlikte  $\Delta R$  değerlerinde de bir artış görülmüştür. Bunun nedeni; biyosensör yüzeyi ile çözelti arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artmasıdır.
- Langmuir modelin hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensöre en uygun izoterm model olduğu görülmüştür. Hesaplanan  $\Delta R_{maks}$  değeri (1.079) deneysel değere yakın olduğu görülmüştür. Langmuir denkleminde hesaplanan  $K_A$  ve  $K_D$  değerleri sırasıyla 1.697 ve 0.589 olarak hesaplanmıştır.
- Anti-CCP/PAAm ve PAAm SPR biyosensörlerin anti-CCP'ye seçiciliğini göstermek için yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları IgM ve BSA molekülüyle etkileşimi incelenmiştir. Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörü anti-CCP'ye verdiği sinyal değeri ( $\Delta R$ ) 2.4 iken aynı derişimlerde hazırlanan IgM ve BSA sinyal değerleri sırasıyla 0.8 ve 0.3'tür. Ayrıca PAAm SPR biyosensörü anti-CCP'ye verdiği sinyal değeri ( $\Delta R$ ) 0.42 iken aynı derişimlerde hazırlanan IgM ve BSA sinyal değerleri sırasıyla 0.35 ve 0.23'tür. Bu sonuçlara göre hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensörü anti-CCP'ye IgM ve BSA'ya göre 3 ve 8 kat; PAAm SPR biyosensörü de 2.5 ve 4.4 kat daha seçicidir. Etkileşimdeki bu hassasiyet kalıp molekül olan anti-CCP'nin üç boyutlu yapısının polimerik hafızaya alınmasından kaynaklanmaktadır.
- Anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmek amacıyla 330 ng/mL derişimlerde hazırlanmış anti-CCP içeren çözeltiler SPR sistemine verilmiş ve hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensörün

anti-CCP tayin miktarında önemli bir düşüş olmadan anti-CCP'yi iyi bir şekilde tespit ettiği görülmüştür.

- Anti-CCP/PAAm SPR biyosensör, kan plazmasından anti-CCP tayini için kullanılmıştır.
- Sağlıklı bir bireyden alınan kan örneğinden elde edilen plazma örneği anti-CCP (330 ng/mL) ile eklenerek anti-CCP/PAAm SPR biyosensör yüzeyi ile etkileştirilmiştir. Elde edilen  $\Delta R$  sensorgram 50 RU/mL (3300 ng/mL)lik derişime denk geldiği daha önceden çizilmiş olan  $\Delta R$ 'nin derişime karşı olan grafiğinden tespit edilmiştir.
- Hazırlanan anti-CCP/PAAm SPR biyosensör ile tayin edilen miktarın, yapılan çalışmalarda belirlenen çeşitli tayin sınırlarının da altında, tek basamakta, 10 saniye gibi kısa bir sürede ve güvenilir bir şekilde ölçüm yapabildiği gösterilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Mayers, A.G., Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry, *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 321–332, 1997.
- [2] van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., De Coen, W., Dubruel, P., Blust, R., Robbens, J., Recent advances in recognition elements of the food and environmental biosensors: A review, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1178-1194, 2010.
- [3] Luong, J.H.T., Male, K.B., Glennon, J.D., Biosensor technology: Technology push versus market pull, *Biotechnology Advances*, 26, 492-500, 2008.
- [4] Koyun, A., Ahlatcıoğlu, E. ve Koca İpek, Y., Biosensors and Their Principles, A Roadmap of Biomedical Engineers and Milestones, Prof. Sadik Kara (Ed.), ISBN: 978-953-51-0609-8, InTech, 2012, <http://www.intechopen.com/books/a-roadmap-of-biomedical-engineers-and-milestones/biosensor-and-theirprinciples>.
- [5] Homola, J., Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species, *Chemical Reviews*, 108, 462-493, 2008.
- [6] Sönmezler, M., Kuartz Kristal Mikroterazi (QCM) Temelli Histidin Sensörler, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2011.
- [7] Haupt, K., Molecularly imprinted polymers: The next generation, *Analytical Chemistry*, 75, 376A-383A, 2003.
- [8] Wulff, G., Poll, H.G., Enzyme-analogue built polymers, 23. Influence of the structure of the binding sites on the selectivity for racemic resolution, *Makromolekular Chemistry and Physics*, 188, 4, 741-748, 1987.
- [9] Rao, T.P., Daniel, S., Gladis, J.M., Tailored materials for preconcentration or separation of metals by ion-imprinted polymers for solid-phase extraction (IIP-SPE), *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 28-35, 2004.
- [10] Haupt, K., Ye, L., Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1887-1897, 2004.
- [11] Yavuz, H., Karakoç, V., Türkmen, D., Say, R., Denizli, A., Synthesis of cholesterol imprinted polymeric particles, *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 8-15, 2006.
- [12] Owens, P.K., Karlsson, L., Lutz, E.S.M., Andersson, L.I., Molecular imprinting for bio- and pharmaceutical analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 146–154, 1999.
- [13] Ansell, D.J., Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1809–1835, 2005.

- [14] Schweitz, L., Spégel, P., Nilsson, S., Approaches to molecular imprinting based selectivity in capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 22, 4053–4063, 2001.
- [15] Liu, C., Lin, C., An insight into molecularly imprinted polymers for capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 25, 3997–4007, 2004.
- [16] Liu, Z., Zheng, C., Yan, C., Gao, R., Molecularly imprinted polymers as a tool for separation in CEC, *Electrophoresis*, 28, 127–136, 2007.
- [17] Ulbricht, M., Membrane separations using molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography B*, 804, 113–125, 2004.
- [18] Dias, A.C.B., Figueiredo, E.C., Grassi, V., Zagatto, E.A.G., Arruda, M.A.Z., Molecularly imprinted polymer as a solid phase extractor in flow analysis, *Talanta*, 76, 988–996, 2008.
- [19] Byrne, M.E., Park, K., Peppas, N.A., Molecular imprinting within hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 149–161, 2002.
- [20] Lavignac, N., Allender, C.J., Brain, K.R., Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays, *Analytica Chimica Acta*, 510, 139–145, 2004.
- [21] Fernandez-Gonzalez, A., Guardia, L., Badia-Lainio, R., Diaz-Garcia, M.E., Mimicking molecular receptors for antibiotics-analytical implications, *Trends in Analytical Chemistry*, 25, 949–957, 2006.
- [22] Öpik, A., Menaker, A., Reut, J., Syriski, V., Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, 2009, 58 (1), 3–11.
- [23] Blanco-Lopez, M.C., Lobo-Castanon, M.J., Miranda-Ordieres, A.J., Tunon-Blanco, P., Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers, *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 36–48, 2004.
- [24] Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T., Asanuma, H., Molecular Imprinting: from Fundamentals to Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 9-19, 2003.
- [25] Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L.I., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., O'Mahony, J., Whitcombe, M.J., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition*, 19, 106–180, 2006.
- [26] Davies, M.P., De Biasi, V., Perrett, D., Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers, *Analytica Chimica Acta*, 504, 7-14, 2004.
- [27] Cormack, P.A.G., Mosbach, K., Molecular imprinting: recent developments and the road ahead, *Reactive and Functional Polymers*, 41, 115-124, 1999.



- [28] Idziak, L., Benrebouh, A., Deschamps, F., Simple NMR experiments as a means to predict the performance of an anti-17 alpha-et hynylestradiol molecularly imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*, 435, 137-140, 2001.
- [29] Dickert, F., Hayden, O., Imprinting with sensor development on the way to synthetic antibodies, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 364, 506-511, 1999.
- [30] Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z., Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterization, *Journal of Chromatography B*, 804, 173-182, 2004.
- [31] Yu, C., Mosbach, K., Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers, *The Journal of Organic Chemistry*, 62, 4057-4064, 1997.
- [32] Andersson, L.I., Ekberg, B., Mosbach, K., Synthesis of a new amino acid based cross-linker for preparation of substrate selective acrylic polymers, *Tetrahedron Letters*, 26, 3623-3624, 1985.
- [33] Shea, K.J., Dougherty, T.K., Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition, *Journal of America Chemical Society*, 108, 1091-1093, 1986.
- [34] Molinelli, A., Molecular imprinted polymers: towards a rational understanding of biomimetic materials, Georgia Institute of Technology, USA, 2004.
- [35] Ikegami, T., Mukawama, T., Nariai, H., Takeuchi, T., Bishenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting, *Analytica Chimica Acta*, 504, 131-135, 2004.
- [36] Steinke, j., Sherrington, D.C., Dunkin, I.R., Imprinting of synthetic polymers using molecular templates, *Advances in Polymer Science*, 123, 80-125, 1995.
- [37] Ersöz, A., Denizli, A., Özcan, A., Say, R., Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2197-2202, 2005.
- [38] Sellergen, B., Lepistö, M., Mosbach, K., Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing non-covalent interaction-NMR and chromatographic studies on the nature of recognition, *Journal of America Chemical Society*, 110, 5853-5860, 1988.
- [39] Katz, A., Davis, M.E., Investigation into the mechanism of molecular recognition with imprinted polymers, *Macromolecules*, 32, 4113-4121, 1999.
- [40] Pichon, V., Chapuis-Hugon, F., Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants, *Analytica Chimica Acta*, 622, 48-61, 2008.
- [41] Lieberzeit, P.A., Gazda-Miarecka, S., Halikias, K., Schirk, C., Kauling, J., Dickert, F. L., Imprinting as a versatile platform for sensitive materials-

nanopatterning of the polymer bulk and surfaces, *Sensors and Actuators B:Chemical*, 111-112, 259-263, 2005.

[42] Yang, H.H., Zhang, S-Q., Yang, W., Chen, X-L., Zhuang, Z-X., Xu, J.G., Wang, X.R., Molecularly imprinted sol-gel nanotubes membrane for biochemical separations, *Journal of the American Chemical Society*, 126, 4054-4055, 2004.

[43] Riskin, M., Tel-Vered, R., Bourenko, T., Granot, E., Willier, I., Imprinting of molecular recognition sites through electropolymerization of functionalized Au nanoparticles; development of electrochemical TNT sensor based on  $\pi$ -donor acceptor interactions, *Journal of America Chemical Society*, 130, 9726-9733, 2008.

[44] Piacham, T., Josell, A., Arwin, H., Prachayasittikul, V., Ye, L., Molecularly imprinted polymer thin films on quartz crystal microbalance using a surface bound photo-radical initiator, *Analytica Chimica Acta*, 536, 191-196, 2005.

[45] Say, R., Gültekin, A., Özcan, A.A., Denizli, A., Ersöz, A., Preparation of new molecularly imprinted quartz crystal microbalance hybride sensor system for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine determination, *Analytica Chimica Acta*, 640, 82-86, 2009.

[46] Ersöz, A., Denizli, A., Ozcan, A., Say, R., Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2197-2202, 2005.

[47] Ersöz, A., Diltemiz, S.E., Ozcan, A.A., Denizli, A., Say, R., Synergie between molecular imprinted polymer based on solid-phase extraction and quartz crystal microbalance technique for 8-OHdG sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 742-747, 2008.

[48] Li, X., Husson, S.M., Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: a surface plasmon resonance study, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 336-348, 2006.

[49] Uzun, L., Say, R., Ünal, S., Denizli, A. Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2878-2884, 2009.

[50] Guan, G., Liu, B., Wang, Z., Zhang, Z., Imprinting of Molecular Recognition Sites on Nanostructures and Its Applications in Chemosensors, *Sensors*, 8, 8291-8320, 2008.

[51] Das, K., Penelle, J., Rotello, V.M., Selective picomolar detection of hexachlorobenzene in water using a quartz crystal microbalance coated with a molecularly imprinted polymer thin film, *Langmuir*, 19, 3921-3925, 2003.

[52] Schmidt, R.H., Mosbach, K., Haupt, K. A., Simple method for spin-coating molecularly imprinted polymer films of controlled thickness and porosity, *Advanced Materials*, 16, 719-722, 2004.

- [53] Yang, H.H., Zhang, S.Q., Chen, X.L., Zhuang, Z.X., Xu, J.G., Wang, X.R., Magnetite-containing spherical silica nanoparticles for biocatalysis and bioseparations, *Analytical Chemistry*, 76, 1316-1321, 2004.
- [54] Xie, C., Liu, B., Wang, Z., Gao, D., Guan, G., Zhang, Z., Molecular imprinting at walls of silica nanotubes for TNT recognition, *Analytical Chemistry*, 80, 437-443, 2008.
- [55] Xie, C., Zhang, Z., Wang, D., Guan, G., Gao, D., Liu, J., Surface molecular self-assembly strategy for TNT imprinting of polymer nanowire/nanotube arrays, *Analytical Chemistry*, 78, 8339-8346, 2006.
- [56] Gao, D., Zhang, Z., Wu, M., Xie, C., Guan, G., Wang, D., A surface functional monomer-directing strategy for highly dense imprinting of TNT at surface of silica nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 7859-7866, 2007.
- [57] Lu, C., Zhou, W., Han, B., Yang, H., Chen, X., Wang, X., Surface-imprinted core-shell nanoparticles for sorbent assays, *Analytical Chemistry*, 79, 5457-5461, 2007.
- [58] Vandeveld, F., Belmont, A-S., Pantigny, J., Haupt, K., Hierarchically nanostructured polymer films based on molecularly imprinted surface-bound nanofilaments, *Advanced Materials*, 19, 3717-3720, 2007.
- [59] Guan, G., Zhang, Z., Wang, Z., Liu, B., Gao, D., Xie, C., Single-hole hollow polymer microspheres toward specific high-capacity uptake of target species, *Advanced Materials*, 19, 2370-2374, 2007.
- [60] Zhong, N., Byun, H.S, Bittman, R., Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinted polymers, *Tetrahedron Letter*, 42, 1839-41, 2001.
- [61] Andersson, H.S., Karlsson, J.G., Piletsky, S.A., Schmidt, K., Mosbach, K., Nicholls, I.A., Study of nature of recognition in molecularly imprinted polymers, influence of monomer-template ratio and sample load on retention and selectivity, *Journal of Chromatography A*, 848, 39-49, 1999.
- [62] Haupt, K., Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry, *Analyst*, 126, 747-756, 2001.
- [63] Piletsky, S.A., Alcock, S., Turner, A.P.F., Molecular imprinting; at the edge of the third millennium, *Trends in Biotechnology*, 19, 9-12, 2001.
- [64] Odabaşı, M., Denizli, A., Polyhydroxyethylmethacrylate based magnetic DNA-affinity beads for anti-DNA antibody removal from systemic lupus erythematosus patient plasma, *Journal of Chromatography B*, 760, 137-148, 2001.
- [65] Sellergen, B., Imprinted dispersion polymers: a new class of easily accessible affinity stationary phases, *Journal of Chromatography A*, 673, 133-141, 1994.
- [66] Takeuchi, T., Haginaka, J., Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography B*, 728, 1-20, 1999.

- [67] Haginaka, J., Kagawa, C., Retentivity and enantioselectivity of uniformly sized molecularly imprinted polymers for d-chlorpheniramine and d-brompheniramine in hydro-organic mobile phases, *Journal of Chromatography B*, 804, 19-24, 2004.
- [68] Hedborg, E., Winqvist, F., Lundstrom, I., Andersson, L.I., Mosbach, K., Some studies of molecularly-imprinted polymer membranes in combination with field-effect devices, *Sensors and Actuators A-Physical*, 37, 796-799, 1993.
- [69] Piletsky, S.A., Piletskaya, E.V., Elgersma, A.V., Yano, K., Karube, I., Parhometz, Yu, P., El'skaya, A.V., Atrazine sensing by molecularly imprinted membranes, *Biosensors and Bioelectronics*, 10, 959-964, 1995.
- [70] Kriz, D., Mosbach, K., Competitive amperometric morphine sensor based on agarose immobilized molecularly imprinted polymer, *Analytica Chimica Acta*, 300, 71-75, 1995a.
- [71] Kriz, D., Ramström, O., Svenson, A., Mosbach, K., Introducing biomimetic sensor based on molecularly imprinted polymers as a recognition elements, *Analytical Chemistry*, 67, 2142-2144, 1995b.
- [72] Levi R., McNiven S., Piletsky S.A., Cheong, S.H., Yano, K., Karube, I., Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers, *Analytical Chemistry*, 69, 2017-2021, 1997.
- [73] Haupt, K., Mosbach, K., Plastic antibodies: developments and applications, *Trends in Biotechnology*, 16, 468-475, 1998.
- [74] McDonagh, C., Burke, C.S., MacCraith, B.D., Optical chemical sensors, *Chemical Reviews*, 108, 400-422, 2008.
- [75] Clark, LC Jr., Lyons, C., Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29-45, 1962.
- [76] Setford, S.J., Newman, J.D., Enzymatic Biosensors, *Molecular Biotechnology*, 32, 249-268, 2006.
- [77] Monošík, R., Stred'ansky, M., Šturdik, E., Application of Electrochemical Biosensors in Clinical Diagnosis, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 26, 22-34, 2012.
- [78] Huang, J., Li, J., Yang, Y., Wang, X., Wu, B., Anzai, J.I., Osa, T. ve Chen, Q., Development of an amperometric L-lactate biosensor based on L-lactate oxidase immobilized through silica sol-gel film on multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticle modified glassy carbon electrode, *Materials Science and Engineering: C*, 28, 1070-1075, 2008.
- [79] Monošík, R., Stred'ansky, M., Greif, G., Šturdik, E., Comparison of biosensors based on gold and nanocomposite electrodes for monitoring of malic acid in wine, *Central European Journal of Chemistry*, 10, 157-164, 2012.

- [80] Wang, X., Watanabe, H. ve Uchiyama, S., Amperometric L-ascorbic acid biosensors equipped with enzyme micelle membrane, *Talanta*, 74, 1681-1685, 2008.
- [81] Pollegioni, L., Piubelli, L., Sacchi, S., Pilone, M.S., Molla, G., Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1373-1394, 2007.
- [82] Smutok, O., Ngounou, B., Pavlishko, H., Gayda, G., Gonchar, M., Schuhmann, W., A reagentless bienzyme amperometric biosensor based on alcohol oxidase/peroxidase and an Os-complex modified electrodeposition paint, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113, 590-598, 2006.
- [83] Umar, A., Rahman, M.M., Vaseem, M. ve Hahn, Y.B., Ultra-sensitive cholesterol biosensor based on low-temperature grown ZnO nanoparticles, *Electrochemistry Communications*, 11, 118-121, 2009.
- [84] Monošík, R., Ukropcova, D., Stred'ansky, M. ve Šturdik, E., Multienzymatic amperometric biosensor based on gold and nanocomposite planar electrodes for glycerol determination in wine, *Analytical Biochemistry*, 421, 256-261, 2012.
- [85] Mieliauskiene, R., Nistor, M., Laurinavicius, V. ve Csoregi, E., Amperometric determination of acetate with a tri-enzyme based sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113, 671-676, 2006.
- [86] Choi, J.W., Kim, Y.K., Song, S.Y., Lee, I.H. Ve Lee, W.H., Optical biosensor consisting of glutathione-S-transferase for detection of captan, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 1461-1466, 2003.
- [87] Andreou, V.G. ve Clonis, Y.D., Novel fiber-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazine, *Analytica Chimica Acta*, 460, 151-161, 2002.
- [88] Soldatkin, O.O., Peshkova, V.M., Dzyadevych, S.V., Soldatkin, A.P., Jaffrezic-Renault, N. ve Elskaya, A.V., Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor, *Materials Science and Engineering: C*, 28, 959-964, 2008.
- [89] Maines, A., Prodromidis, M.I., Tzouwara-Karayanni, S.M., Karayannis, M.I., Ashworth, D. ve Vadgama, P., An Enzyme Electrode for Extended Linearity Citrate Measurements Based on Modified Polymeric Membranes, *Electroanalysis*, 12, 1118-1123, 2000.
- [90] Pang, L., Li, J., Jiang, J., Shen, G. ve Yu, R., DNA point mutation detection based on DNA ligase reaction and nano-Au amplification: A piezoelectric approach, *Analytical Biochemistry*, 358, 99-103, 2006.
- [91] Monošík, R., Stred'ansky, M. ve Šturdik, E., *Acta Chimia Slovenica*, 5, 109-120, 2012.
- [92] Mathotra, R., Patel, V., Vaque, J.P., Gutkind, J.S. ve Rusling, J.F., Ultrasensitive Electrochemical Immunosensor for Oral Cancer Biomarker IL-6

Using Carbon Nanotube Forest Electrodes and Multilabel Amplification, *Analytical Chemistry*, 82, 3118-3123, 2010.

[93] Mani, V., Chikkaveeraiah, B.V., Patel, V., Gutkind, J.S. ve Rusling, J.F., Ultrasensitive Immunosensor for Cancer Biomarker Proteins Using Gold Nanoparticle Film Electrodes and Multienzyme-Particle Amplification, *ACS Nano*, 3, 585-594, 2009.

[94] Kadir, M.K.A., Tothill, I.E., Development of an Electrochemical Immunosensor for Fumonisin Detection in Foods Toxins, 2, 382-398, 2010.

[95] Pilolli, R., Monaci, L., Visconti, A., Advances in biosensor development based on integrating nanotechnology and applied to food-allergen management, *Trends in Analytical Chemistry*, 47, 12-26, 2013.

[96] Guth, U., Vonau, W. ve Zosel, J., Recent developments in electrochemical sensor application and technology—a review, *Measurement Science and Technology*, 20, 1-14, 2009.

[97] Lucklum, R. ve Hauptmann, P., Acoustic microsensors—the challenge behind microgravimetry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 667–682, 2006.

[98] Kimmel, D., LeBlanc, G., Meschievitz, M. ve Cliffel, D., Electrochemical Sensors and Biosensors, *Analytical Chemistry*, 84, 685–707, 2012.

[99] Yang, Z-p. ve Zhang, C-j., Designing of MIP-based QCM sensor for the determination of Cu(II) ions in solution, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 142, 210-215, 2009.

[100] Casteleiro-Roca, J.L., Calvo-Rolle, J.L., Meizoso-Lopez, M.C., Pinón-Pazos, A. ve Rodríguez-Gómez, B.A., New approach for the QCM sensors characterization, *Sensors and Actuators A: Physical*, 207, 1-9, 2014.

[101] Okumura, S., Akao, T., Mizuki, E., Ohba, M., Inouye, K., Screening of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin on the artificial phospholipid monolayer incorporated with brush border membrane vesicles of *Plutella xylostella* by optical biosensor technology, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 47, 177–188, 2001.

[102] Parab, H.J., Jung, C., Lee, J.H., Park, H.G., A gold nanorod-based optical DNA biosensor for the diagnosis of pathogens, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 667–673, 2010.

[103] Wang, Y., Knoll, W., Dostalek, J., Bacterial Pathogen Surface Plasmon Resonance Biosensor Advanced by Long Range Surface Plasmons and Magnetic Nanoparticle Assays, *Analytical Chemistry*, 84 (19), 8345–8350, 2012.

[104] Goh, Y.Y., Freceer, V., Ho, B., Ding, J.L., Rational design of green fluorescent protein mutants as biosensor for bacterial endotoxin, *Protein Engineering*, 15, 493–502, 2002.

- [105] Bateman, R.M., Hodgson, K.C., Kohli, K., Knight, D., Walley, K.R., Endotoxemia increases the clearance of mPEGylated 5000-MW quantum dots as revealed by multiphoton microvascular imaging, *Journal of Biomedical Optics*, 12 (6), 064005–064008, 2007.
- [106] Li, N., Cheng, X.R., Brahmendra, A., Prashar, A., Endo, T., Guyard, C., Terebiznik, M., Kerman, K., Photonic crystals on copolymer film for bacteria detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 354–358, 2013.
- [107] Velusamy, V., Arshak, K., Korosynska, O., Oliwa, K., Adley, C., An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors, *Biotechnology Advances*, 28, 232–254, 2010.
- [108] Miao, P., Han, K., Qi, J., Zhang, C., Liu, T., Electrochemical investigation of endotoxin induced limulus amebocyte lysate gel-clot process, *Electrochemistry Communications*, 26, 29–32, 2013.
- [109] Inoue, K.Y., Ino, K., Shiku, H., Matsue, T., Electrochemical detection of endotoxin using recombinant factor C zymogen, *Electrochemistry Communications*, 12, 1066–1069, 2010.
- [110] Zelada-Guillen, G.A., Sebastian-Avila, J.L., Blondeau, P., Riu, J., Rius, F.X., Label-free detection of *Staphylococcus aureus* in skin using real-time potentiometric biosensors based on carbon nanotubes and aptamers, *Biosensors and Bioelectronics*, 31, 226–232, 2012.
- [111] Xiong, X.L., Wang, S.M., Zhang, Y., Chen, L.C., *Applied Mechanics and Materials*, 874, 195–196, 2012.
- [112] Guo, X., Lin, C., Chen, S., Ye, R., Wu, V.C.H., A piezoelectric immunosensor for specific capture and enrichment of viable pathogens by quartz crystal microbalance sensor, followed by detection with antibody-functionalized gold nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 38, 177–183, 2012.
- [113] Ren, J., Ma, L., Li, Z., Lin, Q., Huang, H., Yi, S., Simultaneous and early detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to antituberculosis drugs using an indirect series piezoelectric system, *Biosensors and Bioelectronics*, 43, 115–119, 2013.
- [114] Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M.J. ve Barceló, D. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 1025-1041, 2006.
- [115] Sheehan, D.A., Quinn, J., Daly, C.L., Dillon, P., O’Kennedy, R., The Development of Novel Miniaturized Immuno-sensing Devices: A Review of a Small Technology with a Large Future, *Analytical Letters*, 36, 511–537, 2003.
- [116] Bhattacharyya, J., Read, D., Amos, S., Dooley, S., Killham, K., Paton, G.I., Biosensor-based diagnostics of contaminated groundwater: assessment and remediation strategy, *Environmental Pollution*, 134, 485–492, 2005.

- [117] Han, T-S., Sasaki, S., Yano, K., Ikebukuro, K., Kitayama, A., Nagamune, T., Karube, I., Flow injection microbial trichloroethylene sensor, *Talanta*, 57, 271–276, 2002.
- [118] Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, D.W., Roig, B., Gonzalez, C., A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive, *Talanta* 69, 302–322, 2006.
- [119] Gu, M.B., Kim, E.J., Cho, J., Hansen, P.D., The Continuous Monitoring of Field Water Samples with a Novel Multi-Channel Two-Stage Mini-Bioreactor System, *Environmental Monitoring and Assessment*, 70, 71–81, 2001.
- [120] Haes, A.J., Van Duyne, R.P., A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles, *Journal of American Chemical Society*, 124, 10596–10604, 2002.
- [121] Kawazumi, H., Gobi, V., Ogino, K., Maeda, H., Miura, N., Compact surface plasmon resonance (SPR) immunosensor using multichannel for simultaneous detection of small molecule compounds, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108, 791–796, 2005.
- [122] Bachmann, T.T., Schmid, R.D., A disposable multielectrode biosensor for rapid simultaneous detection of the insecticides paraoxon and carbofuran at high resolution, *Analytica Chimica Acta*, 401, 95–103, 1999.
- [123] Rodriguez-Mozaz, S., Reder, S., Lopez de Alda, M., Gauglitz, G. ve Barceló, D., Simultaneous multi-analyte determination of estrone, isoproturon and atrazine in natural waters by the River ANALyser (RIANA), an optical immunosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 633–640, 2004.
- [124] Barzen, C., Brecht, A. ve Gauglitz, G., Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 289–295, 2002.
- [125] Tschmelak, J., Proll, G., Gauglitz, G., Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example, *Talanta*, 65, 313–323, 2005.
- [126] Goldman, E.R., Clapp, A.R., Anderson, G.P., Uyeda, H.T., Mauro, J.M., Medintz, I.L., Mattoussi, H., Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents, *Analytical Chemistry*, 76, 684–688, 2004.
- [127] Sequeira, M., Bowden, M., Minogue, E., Diamond, D., Towards autonomous environmental monitoring systems, *Talanta*, 56, 355–363, 2002.
- [128] Suzuki, H., Microfabrication of chemical sensors and biosensors for environmental monitoring, *Materials Science and Engineering: C*, 12, 55–61, 2000.
- [129] Bange, A., Halsall, H.B., Heineman, W.R., Microfluidic immunosensor systems, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2488–2503, 2005.



- [130] Çaktü, K., Kolesterol baskılanmış eş-boyutlu Poli(GMA-MAT) mikroküre-poli(HEMA) kriyojel kompozit sistemlerinin hazırlanması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009.
- [131] Alcocilja, E.C., Radke, S.M., Market analysis of biosensors for food safety, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 841–846, 2003.
- [132] Tothill, I.E., Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector, *Computers and Electronics in Agriculture*, 30, 205–218, 2001.
- [133] Kroger, S., Piletsky, S., Turner, A.P.F., Biosensors for marine pollution research, monitoring and control, *Marine Pollution Bulletin*, 45, 24–34, 2002.
- [134] Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O’Kennedy, R., Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water, *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 3–13, 2003.
- [135] Mauriz, E., Calle, A., Abad, A., Montoya, A., Hildebrandt, A., Barcel’o, D., Lechuga, L.M., Determination of carbaryl in natural water samples by a surface plasmon resonance flow-through immunosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 2129–2136, 2006.
- [136] Rich, R.L. ve Myszka, D.G., Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis, *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 54–61, 2000.
- [137] NanoDev İnternet Sitesi: <http://www.nanodev.com.tr/>
- [138] Iqbal, S.S., Mayo, M.W., Bruno, J.G., Bronk, B.V., Batt, C.A., Chambers, J.P., A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents, *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 549–578, 2000.
- [139] Wood, R.W., On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical magazine*, 4, 396-402, 1902.
- [140] Schasfoort R.B.M., Tudos A.J., (eds), Handbook of surface plasmon resonance. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2008.
- [141] Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I., Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*, 4, 29-304, 1983.
- [142] Nylander, C., Liedberg, B., Lind, T., Gas detection by means of surface plasmons resonance, *Sensors and Actuators B*, 3, 79-88, 1982.
- [143] Liedberg, B., Nylander, C., and Lundstrom, I., *Biosensors and Bioelectronics*, 10, i–ix, 1995.
- [144] Homola J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 337, 528-539, 2003.
- [145] Homola, J., Yee, S.S., and Gauglitz, G., *Sensors and Actuators B*, 54, 3–15, 1999.

- [146] Cooper, M.A., *Analytic Bioanalytical Chemistry*, 377, 834–842, 2003.
- [147] Dudak, F.C. and Boyacı, I.H., *Journal of Biotechnology*, 4, 1003–1011, 2009.
- [148] Gauglitz, G., Moore, David S., Cyago, A., Advincula, R. Handbook of Spectroscopy, 4 Volume Set, 2nd Edition, Chapter 33, 1234, 1235, 1240, 1241, 2014.
- [149] Şener, G., Nanopartiküllerle duyarlılığı artırılmış yüzey plazmon rezonans biyosensörlerin hazırlanması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2009.
- [150] Szentirmay, Z., Surface plasmon spectroscopy of metal/dielectric structures. *Spectrochimica Acta*, 48, 9-17, 1991.
- [151] Welford, K., Surface plasmon-polaritons and their uses, *Optical and Quantum Electronics*, 23, 1-27, 1991.
- [152] Earp, R.L., Dessy, R.E., Commercial Biosensors: Applications to Clinical Bioprocess and Environmental Samples. John Wiley and Sons: New York, Chapter 4, 1996.
- [153] Holford, T.R.J., Davis, F., Higson, S.P.J., Recent trends in antibody based sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 34, 12-24, 2012.
- [154] Türkoğlu, E.A. Yüzey plazmon rezonans temelli antikör sensörlerin hazırlanması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010.
- [155] Nakamura, C., Hasegawa, M., Nakamura, N., Miyake, J., Rapid and specific detection of herbicides using a self-assembled photosynthetic reaction center from purple bacterium on an SPR chip, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 599-603, 2003.
- [156] Miura N., Sasaki, M., Gobi, K.V., Kataoka, C., Shoyama, Y., Highly sensitive and selective surface plasmon resonance sensor for detection of sub-ppb levels of benzo[a]pyrene by indirect competitive immunoreaction method, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 953-959, 2003.
- [157] Strong, A., Stimpson, D.I., Bartholomew, D.U., Jenkins, T.F., Elkind, J.L., Detection of trinitrotoluene (TNT) extracted from soil using a surface plasmon resonance (SPR)-based sensor platform. *SPIE*, 3710, 362-372, 1999.
- [158] Oh, B.K., Kim, Y.K., Bae, Y.M., Lee, W.H., Choi, J.W., Detection of Escherichia coli O157, H7 using immunosensor based on surface plasmon resonance, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 780-786, 2002.

- [159] Taylor, A.D., Ladd, J., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., Jiang, S., Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 752-758, 2006.
- [160] Lotierzo, M., Henry, O.Y.F., Piletsky, S., Tothill, I., Cullen, D., Kania, M., Hock, B., Turner, A.P.F., Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 145-152, 2004.
- [161] Ladd, J., Boozer, C., Yu, Q., Chen, S., Homola, J., Jiang, S., DNA-directed protein immobilization on mixed self-assembled monolayers via a Streptavidin bridge, *Langmuir*, 20, 8090-8095, 2004.
- [162] Stigter, E.C., Jong, G.J., Van Bennekom, W.P., An improved coating for the isolation and quantitation of interferon-gamma in spiked plasma using surface plasmon resonance (SPR), *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 474-482, 2005.
- [163] Bokken, G.C.A.M., Corbee, R.J., van Knapen, F., Bergwerff, A.A., Immunochemical detection of Salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor, *FEMS Microbiology Letters*, 222, 75-82, 2003.
- [164] Vaughan, R.D., O'Sullivan, C.K., Guilbault, G.G., Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 635-638, 2001.
- [165] Skottrup, P., Nicolaisen, M., Justesen, A.F., Rapid determination of *Phytophthora infestans* sporangia using a surface plasmon resonance immunosensor, *Journal of Microbiological Methods*, 68, 507-515, 2007.
- [166] Lan, Y-b., Wang, S-z., Yin, Y-g., Hoffmann, W.C., Zheng, W-z., Using a Surface Plasmon Resonance Biosensor for Rapid Detection of *Salmonella Typhimurium* in Chicken Carcass, *Journal of Bionic Engineering*, 5, 239-246, 2008.
- [167] Jiang, X., Waterland, M., Blackwell, L., Wu, Y., Jayasundera, K.P., Partridge, A. Sensitive determination of estriol-16-glucuronide using surface plasmon resonance sensing, *Steroids*, 74, 819-824, 2009.
- [168] Dong, J., Gao, N., Peng, Y., Guo, C., Lv, Z., Wang, Y., Zhou, C., Ning, B., Liu, M., Gao, Z., Surface plasmon resonance sensor for profenofos detection using molecularly imprinted thin film as recognition element, *Food Control*, 25, 543-549, 2012.
- [169] Block, R.D., Jenkins, S.M., Dalenberg, D.A., Balsanek, J.G., Snyder, M.R., Saenger, A.K., Analytical and clinical comparison of anti-CCP assays with rheumatoid factor for the diagnosis of rheumatoid arthritis, *Clinica Chimica Acta*, 413, 1015-1017, 2012.
- [170] Akcan, R., Ailesel Akdeniz ateşi hastalarının anti-CCP seviyelerinin Romatoid Artrit Hastaları ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırılması, Gülhane Askeri

Tıp Akademisi, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2010.

[171] Schellekens, G.A., De Jong, B.A., Van den Hoogen, F.H., Citrullin is an essential constituent of antigenic determinants recognized by RA, specific autoantibodies, *Journal Clinical Invest.*, 101:273–78, 1998.

[172] Schellekens, G.A., Visser, H., De Jong, B.A., The diagnostic properties of RA antibodies to cyclic citrullinated peptide, *Arthritis Rheum*,43,155–63, 2000.

[173] van Venrooij, W. J., Joyce J. B. C., van Beers, Pruijn J.M., Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future, *Nature Reviews Rheumatology*,7, 391-398, 2011.

[174] Harich, R., Roger, C., Garnier, L., Bienvenu, J., Fabien, N., Comparison of anti-CCP autoantibodies measurement by ELISA and a bead-based assay in a large patient cohort, *Clinical Biochemistry*, 47, 485–488, 2014.

[175] Y. Saylan, N.Bereli, L. Uzun, A. Denizli, Monolithic Boronate Affinity Columns for IgG Separation, *Separation Science and Technology*, 49, 1555–1565, 2014.

[176] Prakash Deo, R., Wang, J., Block, I., Mulchandani, A., Joski, K.A., Trojanowicz, M., Scholz, F., Chen, W. ve Lin, Y., Determination of organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor, *Analytica Chimica Acta*, 530, 185-189, 2005.

[177] Zhang, L., Cheng, G., Fu, C., Molecular selectivity of tyrosine-imprinted polymers prepared by seed swelling and swelling and suspension polymerization, *Polymer International*, 51; 687-692, 2002.

[178] Özgür, E. Östradiol tayini için moleküler baskılanmış sensörlerin hazırlanması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2011.

[179] Coenen, D., Verschueren, P., Westhovens, R. and Bossuyt, X., Technical and Diagnostic Performance of 6 Assays for the Measurement of Citrullinated Protein/Peptide Antibodies in the Diagnosis of Rheumatoid Arthritis, *Clinical Chemistry*, 53, 498–504, 2007.

[180] Cai, B., Wang, L., Liu, J., Feng, W., Performance evaluation of Elecsys analysis system for anti-cyclic citrullinated peptide detection in comparison with commercially available ELISA assays in rheumatoid arthritis diagnosis, *Clinical Biochemistry*, 44, 989–993, 2011.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Hüseyin Dibekkaya

Doğum Yeri: Kardjali, Bulgaristan

Doğum Tarihi: 19/04/1986

Medeni Hali: Evli

E-posta: hdibekkaya@gmail.com

Adresi: Yaşamkent Mah. Perge 2 Konutları Başak Apt. No:11/27 Ankara

### Eğitim

Lise: Bursa Erkek Anadolu Lisesi, Bursa, 2004

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Ankara, 2008

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik ABD, Ankara

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce: Çok iyi

### İş Deneyimi

Euroimmun Türkiye, İstanbul, Türkiye, Teknik Destek ve Aplikasyon Uzmanı, 2010 – 2013

Nova Biomedical, Boston, Amerika Birleşik Devletleri, Orta Doğu, Afrika ve Doğu Avrupa Aplikasyon ve Destek Uzmanı, 2013 – Halen.

### Deneyim Alanları

Otoimmün Diagnostik, ELISA, Western Blot, IIF (İndirekt immün floresan) Test Sistemleri, Biosensörler, Biosensör Teknolojileri.

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

### Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

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

- 24-27 Ağustos 2014, 20th International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2014), Muğla, Türkiye. Surface Plasmon Resonance Based Biosensor for Determination of Anti-CCP Antibodies.
- 4-6 Eylül 2014, 8. Ulusal Afinité Teknikleri Kongresi, Konya, Türkiye. Yüzey Plazmon Rezonans Temelli Biyosensörlerin Hazırlanması ve Antikor Tayininde Kullanılması.