

**YÜZEY PLAZMON REZONANS TEMELLİ
İMMUNOGLOBULİN G SENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE
BASED IMMUNOGLOBULIN G SENSOR**

GİZEM ERTÜRK

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

YÜZEY PLAZMON REZONANS TEMELLİ İMMUNOGLOBULİN G SENSÖRÜNÜN HAZIRLANMASI

GİZEM ERTÜRK

ÖZ

Sunulan çalışmanın amacı, IgG tayini için F_{ab} fragmanları baskılanmış yüzey plazmon rezonans temelli biyosensör hazırlanmasıdır. Bu amaçla, SPR biyosensör allil merkaptan ile modifiye edilmiş ve allil gruplarının yönlenmesi sağlanmıştır. İlk basamakta, N-metakroil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomeri, metakriloil klorür ve L-histidin metil esterin reaksiyonu ile sentezlenmiştir. Daha sonra IgG moleküllerinin papain enzimi ile enzimatik hidrolizi sonucunda F_{ab} fragmanları elde edilmiştir. Kalıp molekül olarak kullanılan F_{ab} fragmanları ve MAH monomeri ile ön kompleks hazırlanmıştır. F_{ab} fragmanları baskılanmış SPR çipleri, farklı oranlarda EGDMA, HEMA, AIBN ve MAH- F_{ab} kompleksi varlığında hazırlanmıştır. Ayrıca kontrol deneyi için kalıp molekül olan F_{ab} fragmanları kullanılmadan aynı şekilde baskılanmamış SPR çipi de hazırlanmıştır. Hazırlanan SPR sensörler, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre, FTIR ve temas açısı ölçümleriyle karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri ve AFM görüntüleri, F_{ab} fragmanlarının çip yüzeyine hemen hemen tek tabakalı olarak baskılandığını göstermektedir. Desorpsiyon çalışmaları, kesikli sistemde 1 M NaCl (20 mM, pH:7.0 fosfat tamponu) kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış sensörlerin F_{ab} ve IgG tayin duyarlılığı, F_{ab} ve IgG çözeltileri (pH: 7.0 fosfat tamponunda) ve seyreltilmiş plazma örnekleri ile araştırılmıştır. Baskılanmış sensörler, baskılanmamışlara göre F_{ab} ve IgG'ye daha fazla duyarlılık göstermişlerdir. Farklı derişimlerdeki F_{ab} ve IgG çözeltileri adsorpsiyon kinetiklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Langmuir adsorpsiyon modeli, bu afinite sistemi için en uygun model olarak bulunmuştur ve sonuçlar baskılanmış SPR sensör yüzeyindeki IgG bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı ve tek tabakalı olduğunu göstermiştir. F_{ab} baskılanmış sensörlerin seçiciliğini göstermek için F_{ab} , IgG, sığır serum albümini (BSA) ve F_c fragmanlarının yarışmacı adsorpsiyonu araştırılmıştır. Sonuçlar, baskılanmış sensörün F_{ab} ve IgG için yüksek seçiciliğe ve duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Moleküler baskılama, F_{ab} fragmanı, F_c fragmanı, yüzey plazmon rezonans, IgG, sensör, plazma.

Danışman: Prof. Dr. M. Aşkın Tümer, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Beytepe-Ankara.

Eş Danışman: Prof. Dr. Adil Denizli, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Beytepe-Ankara.

PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE BASED IMMUNOGLOBULIN G SENSOR

GİZEM ERTÜRK

ABSTRACT

The aim of this study is the preparation of F_{ab} fragments imprinted surface plasmon resonance based biosensor for IgG detection. For this reason, SPR biosensor was modified with allyl mercaptane and the orientation of allyl groups was ensured. In the first step, MAH monomer was synthesized via a reaction between methacryloyl chloride and L- histidine methyl ester. Then, F_{ab} fragments were obtained by the enzymatic hydrolysis of IgG molecules with papain enzyme. And preorganized complex was prepared with the template molecule F_{ab} fragments and the monomer MAH. F_{ab} fragments imprinted SPR chips were prepared in the presence of different amounts of EGDMA, HEMA, AIBN and MAH- F_{ab} complex. Also non-imprinted SPR chips were prepared without F_{ab} for control experiments. Prepared SPR chips were characterized with atomic force microscopy (AFM), ellipsometer, fourier transform infrared spectrophotometry (FTIR) and contact angle measurements. The thickness measurements and AFM observations indicated that the F_{ab} fragments imprinted SPR surface was almost monolayer. Desorption studies were performed at batch system by using 1 M NaCl (20 mM, pH: 7.0, phosphate buffer). F_{ab} and IgG sensing abilities of imprinted and non-imprinted SPR sensors were investigated from F_{ab} and IgG solutions and diluted plasma samples (in pH: 7.0 phosphate buffer). Imprinted sensors showed more sensitivity to F_{ab} and IgG than non-imprinted ones. F_{ab} and IgG solutions with different concentrations were used to determine the adsorption kinetics. Langmuir adsorption model was found as the most suitable model for this affinity system and the IgG binding regions on the imprinted SPR sensor were found as homogenous and monolayer. In order to show the selectivity of the F_{ab} imprinted sensor, competitive adsorption of F_{ab} , IgG, bovine serum albumin (BSA) and F_c fragments was investigated. The results show that the imprinted sensor has high selectivity and sensitivity for F_{ab} and IgG.

Key words: Molecular imprinting, F_{ab} fragment, F_c fragment, surface plasmon resonance, IgG, sensor, plasma.

Supervisor: Prof. Dr. M. Aşkın Tümer, Hacettepe University, Department of Biology, General Biology Division, Beytepe-Ankara.

Co-Supervisor: Prof. Dr. Adil Denizli, Hacettepe University, Department of Chemistry, Biochemistry Division, Beytepe-Ankara.

TEŞEKKÜR

Lisans dönemim boyunca ve sonrasında beni hep destekleyen, bilgi ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim, her zaman yanımda olduğunu hissettiren, çok sevdiğim, değerli hocam Prof. Dr. M. Aşkın Tümer'e,

Bana biyoloji dışında daha önce bilmediğim bir dünyanın kapılarını açarak ufkumu genişleten, bu çalışmayı gerçekleştirmemde çok büyük katkıları olan, engin bilgilerinden çok şey öğrendiğim, beni her zaman destekleyen, çok sevdiğim, değerli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Çalışmalarım boyunca pratik ve teorik bilgilerini benimle paylaşan, bu çalışmada bilgi ve tecrübeleriyle en büyük desteği veren ve bu desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan, kendisinden çok şey öğrendiğim, ağabeyim, değerli hocam Dr. Lokman Uzun'a,

Bilimsel katkıları ve destekleri için hocalarım Prof. Dr. Mehmet Ali Onur'a, Doç. Dr. Handan Yavuz'a ve Yrd. Doç. Dr. Aylin Gürpınar'a,

Çalışmalarım boyunca teorik ve pratik anlamda her türlü desteği veren, bıkmadan usanmadan beni her zaman dinleyen, tüm sevinçlerimi ve üzüntülerimi paylaştığım, çok sevdiğim, canım ablam, arkadaşım Uzman Nilay Bereli'ye,

Biyokimya Araştırma Grubu'na katıldığım ilk günden beri beni hiç yalnız bırakmayan, iyi-kötü her anımda yanımda olan, çalışmalarım boyunca beni hep destekleyen, canım arkadaşlarım Canan, Ilgım, Recep, Sevgi ve Yeşeren'e,

Çalışmalarım boyunca bana hep destek olan, sıcak ve samimi bir ortamda çalışmamı sağlayan Biyokimya Araştırma Grubu'nun değerli üyeleri; Ali Derazshamshir, Alper Türkoğlu, Ayşe Müge Andaç, Bahar Ergün, Cemil Aydoğan, Deniz Türkmen, Duygu Çimen, Emel Tamahkar, Engin Bayram, Erdoğan Özgür, Erkut Yılmaz, Fatma Yılmaz, Gözde Baydemir, Gülsu Şener, Işık Perçin, İlker Koç, Kıvılcım Çaktü, Melike Özkaya Türkmen, Pınar Tekiner, Veyis Karakoç'a ve laboratuvarın neşe kaynağı Alp Denizli'ye,

Yüksek lisansım süresince maddi desteği başta olmak üzere her türlü desteğinden ötürü Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)' na,

Hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan, "iyi ki varsınız" dedirten canım aileme,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	4
2.1.1. Kovalent Baskılama.....	6
2.1.2. Non-Kovalent Baskılama.....	6
2.2. Biyomakromoleküler Baskılama.....	10
2.2.1. Protein Baskılama.....	10
2.2.2. Protein Baskılamada Karşılaşılan Zorluklar.....	13
2.2.2.1. Boyut.....	13
2.2.2.2. Karmaşık Yapı.....	13
2.2.2.3. Yapısal Esneklik.....	14
2.2.2.4. Çözünürlük.....	14
2.3. İmmunoglobülinler.....	15
2.3.1. İmmunoglobülinlerin Yapısı.....	15
2.3.2. İmmunoglobülin-G'nin Tıp Uygulamaları.....	19
2.3.3. Antikor Fragmanları.....	20
2.4. Yüzey Plazmon Rezonans.....	21
2.4.1. Yüzey Plazmon Rezonansın Teorisi.....	23

2.4.2. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler.....	28
2.4.3. SPR Biyosensör Çalışmalarında Kullanılan Biyotanıma Molekülleri..	28
2.4.4. SPR Biyosensör Çalışmalarında Yararlanılan Ölçüm Yöntemleri.....	29
2.4.5. SPR Biyosensörlerin Kullanım Alanları.....	31
3. DENEYSEL YÖNTEMLER.....	34
3.1. Kimyasal Maddeler.....	34
3.2. F _{ab} Fragmanlarının Hazırlanması.....	34
3.2.1. IgG Moleküllerinin Papain Enzimi ile Kesilmesi.....	34
3.2.2. IgG Moleküllerinin Kesilmesi Sonucunda Elde Edilen Fragmanların FPLC ile Analizi.....	35
3.2.3. SDS-PAGE Analizi.....	35
3.3. N-Metakroil-L-Histidin Metil Ester Monomerinin Sentezi.....	35
3.3.1. MAH Monomerinin Karakterizasyonu.....	36
3.3.1.1. FTIR Analizi.....	36
3.3.1.2. NMR Analizi.....	36
3.4. MAH-F _{ab} Kompleksinin Hazırlanması.....	36
3.5. Yüzey Plazmon Rezonans Çiplerinin Allil Merkaptan ile Yüzey Modifikasyonu.....	36
3.6. Yüzey Plazmon Rezonans Çip Yüzeyinde Polimer Hazırlanması.....	37
3.7. Kalıp Molekülün Uzaklaştırılması.....	38
3.8. Yüzey Plazmon Rezonans Çiplerinin Yüzey Karakterizasyonu.....	38
3.8.1. Temas Açısı Ölçümleri.....	38
3.8.2. Atomik Kuvvet Mikroskopisi.....	39
3.8.3. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi.....	39
3.8.4. Elipsometre.....	39
3.9. SPR Çiplerle Kinetik Analizler.....	40

3.10. Yarışmalı Kinetik Analizler.....	41
3.11. SPR Çipinin Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi.....	42
3.12. Doğal Kaynaktan Kinetik Analizler.....	42
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	43
4.1. IgG Molekülünün Papain Enzimi ile Kesilmesi.....	43
4.1.1. FPLC Çalışması.....	43
4.1.2. SDS-PAGE Analizi.....	46
4.2. MAH Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	47
4.3. F _{ab} Fragmanları Baskılanmış SPR Çipinin Yüzey Karakterizasyonu.....	49
4.3.1. FTIR Analizi.....	49
4.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi.....	49
4.3.3. Elipsometre Analizi.....	52
4.3.4. Temas Açısı Analizi.....	52
4.4. SPR Sensörlerle Kinetik Analizler.....	54
4.4.1. F _{ab} Derişim Çalışması.....	54
4.4.1.1. Kinetik Analizler.....	60
4.4.1.2. Denge İzoterm Modelleri.....	63
4.4.2. IgG Derişim Çalışması.....	65
4.4.2.1. Kinetik ve Denge Analizleri.....	71
4.5. Yarışmalı Kinetik Analizler.....	74
4.6. F _{ab} Fragmanları Baskılanmış Sensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi.....	78
4.7. Doğal Kaynaktan Kinetik Analizler.....	81
5. YORUM.....	86
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	90
ÖZGEÇMİŞ.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi (Uzun, 2008).....	5
Şekil 2.2. IgG molekülünün şematik gösterimi.....	17
Şekil 2.3. Yüzey plazmon rezonans oluşumunun şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.4. SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.....	23
Şekil 2.5. Dielektrik sınırlarında gerçekleşen toplam iç kırınım.....	24
Şekil 2.6. Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılıma eğrileri.....	26
Şekil 2.7. Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri (Earp ve Dessy, 1996).....	27
Şekil 2.8. SPR biyosensör çalışmalarında kullanılan ölçüm yöntemleri (a) doğrudan ölçüm yöntemi, (b) yarışmacı ölçüm yöntemi, (c) inhibisyon ölçüm yöntemi, (d) sandviç ölçüm yöntemi.....	30
Şekil 3.1. SPR çiplerinin allil merkaptan ile modifiye edilmesi ve allil gruplarının yönlendirilmesi.....	37
Şekil 3.2. SPR çip yüzeyinde polimerik film hazırlanması. (A) lamel üzerine reaksiyon karışımı damlatılır (2.5 µL); (B) SPR çip cam lamel üzerine yerleştirilir ve alttan UV-ışık uygulanır; (C) cam lamel film oluşmuş SPR çip yüzeyinden ayrılır.....	38
Şekil 3.3. GenOptics SPRiLab sistemi.....	41
Şekil 4.1. IgG molekülünün HiTrap_r Protein A kolonu ile derişim taramasının kromatogramı (akış hızı: 1mL/dak; sıcaklık: 27°C).....	43

Şekil 4.2. IgG molekülünün papain ile kesilmeden önceki kromatogramı (IgG derişimi: 0.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dak; sıcaklık: 27°C).....	44
Şekil 4.3. IgG molekülünün papain ile kesildikten sonraki kromatogramı (IgG derişimi: 0.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dak; sıcaklık: 27°C).....	44
Şekil 4.4. IgG molekülünün papain ile kesildikten sonraki kromatogramı (seyreltme oranı: 1:100; akış hızı: 1 mL/dak; sıcaklık: 27°C).....	45
Şekil 4.5. IgG molekülünün papain ile kesimi sonucunda Protein A kolonundan elde edilen IgG alt fragmanlarının SDS-PAGE görüntüsü.....	46
Şekil 4.6. MAH monomerinin sentez reaksiyonu.....	47
Şekil 4.7. MAH monomerinin ¹ H-NMR spektrumu.....	48
Şekil 4.8. MAH monomerinin FTIR spektrumu.....	48
Şekil 4.9. SPR çipinin FTIR-ATR spektrumu.....	49
Şekil 4.10. Modifiye edilmemiş SPR çipinin yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) Yüzey görüntüsü; (b) 3B görüntüsü.....	50
Şekil 4.11. F _{ab} fragmanı baskılanmış SPR çipinin yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) Yüzey görüntüsü; (b) 3B görüntüsü.....	51
Şekil 4.12. Temas açısı ölçümleri. a, b: modifiye edilmemiş SPR sensör yüzeyi; c, d: F _{ab} baskılanmış SPR sensör yüzeyi; e, f: F _{ab} baskılanmamış poli (HEMA-MAH) SPR sensör yüzeyi.....	53

Şekil 4.13. F_{ab} çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. (a) 2.0 mg/mL; (b) 2.5 mg/mL ; (c) 3.0 mg/mL; (d) 6.0 mg/mL; (e) 8.0 mg/mL; (f) 10.0 mg/mL; (g) 15.0 mg/mL derişimlerinde hazırlanmış F_{ab} çözeltileri.....	55
Şekil 4.14. F_{ab} çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı %kırılma değerleri.....	56
Şekil 4.15. F_{ab} çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensogramlar. (a) 2.0 mg/mL; (b) 2.5 mg/mL ; (c) 3.0 mg/mL; (d) 6.0 mg/mL; (e) 8.0 mg/mL; (f) 10.0 mg/mL; (g) 15.0 mg/mL derişimlerinde hazırlanmış F_{ab} çözeltileri.....	57
Şekil 4.16. F_{ab} çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensorgramlar.....	58
Şekil 4.17. F_{ab} baskılanmış SPR sensöre ait F_{ab} derişimi ile ΔR arasındaki ilişki.....	59
Şekil 4.18. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı.....	62
Şekil 4.19. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.....	64
Şekil 4.20. IgG çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. (a) 0.02 mg/mL; (b) 0.04 mg/mL ; (c) 0.06 mg/mL; (d) 0.08 mg/mL; (e) 0.10 mg/mL; (f) 0.25 mg/mL; (g) 0.50 mg/mL derişimlerinde hazırlanmış IgG çözeltileri.....	66
Şekil 4.21. IgG çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı %kırılma değerleri.....	67

Şekil 4.22. IgG çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensogramlar. (a) 0.02 mg/mL; (b) 0.04 mg/mL ; (c) 0.06 mg/mL; (d) 0.08 mg/mL; (e) 0.10 mg/mL; (f) 0.25 mg/mL; (g) 0.50 mg/mL derişimlerinde hazırlanmış IgG çözeltileri.....	68
Şekil 4.23. IgG çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensorgramlar.....	69
Şekil 4.24. F_{ab} baskılanmış SPR sensöre ait IgG derişimi ile ΔR arasındaki ilişki.....	70
Şekil 4.25. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı.....	72
Şekil 4.26. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.....	73
Şekil 4.27. 1.0 mg/mL derişiminde F_{ab} , IgG, sığır serum albumini (BSA) ve F_c fragmanlarının kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile F_{ab} baskılanmış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar.....	76
Şekil 4.28. 1.0 mg/mL derişiminde F_{ab} , IgG, sığır serum albumin (BSA) ve F_c fragmanlarının kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile F_{ab} baskılanmış SPR nanosensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensorgramlar.....	77
Şekil 4.29. 1.0 mg/mL derişiminde F_{ab} , IgG, sığır serum albumin (BSA) ve F_c fragmanlarının kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile F_{ab} baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. %Kırılma/zaman fonksiyonu...	79
Şekil 4.30. 1.0 mg/mL derişiminde F_{ab} , IgG, sığır serum albumin (BSA) ve F_c fragmanlarının kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile F_{ab} baskılanmamış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. ΔR /zaman fonksiyonu.....	80

Şekil 4.31. Plazma ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensogramlar. %Kırılma/zaman fonksiyonu.....	82
Şekil 4.32. Plazma ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensogramlar. ΔR /zaman fonksiyonu.....	83
Şekil 4.33. Plazma IgG derişimi ile SPR sinyallerinin değişimi. (a) ΔR -Eliza ve Eliza/SPR ilişkisi; (b) ΔR -Seyreltme oranı ilişkisi.....	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Modifiye edilmemiş, F_{ab} baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey temas açıları.....	52
Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri.....	61
Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.....	65
Çizelge 4.4. Kinetik hız sabitleri.....	71
Çizelge 4.5. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.....	74
Çizelge 4.6. F_{ab} ve IgG'ye göre BSA ve F_c için seçicilik ve bağıl seçicilik kat sayıları.....	81

1. GİRİŞ

Yüzey plazmon rezonans (SPR), metal yüzeye yakın kırılma indisindeki değişiklikleri ölçmede kullanılan kusursuz bir yöntemdir (Homola, 2008). 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 radyoişaretleme yöntemleri gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, protein-protein, antikor-antijen, reseptör-ligand etkileşimlerinden, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin tanımlanmasına kadar çok çeşitli biyomoleküler mekanizmaların anlaşılmasında kullanılabilir (Homola, 2008).

Moleküler baskılama; bir biyomolekül ya da sentetik bir bileşikten oluşan bir kalıp moleküle tamamlayıcı olan özgül tanıma ve bağlanma bölgeleri içeren polimer ağı oluşturma teknolojisidir. Moleküler baskılanmış polimerler sentetik polimer reseptörleri ya da sağlam yapay antikorlar (plastibadiler) olarak bilinirler ve kolay uygulanabilirlikleri, yeniden kullanılabilirlikleri, sağlam polimer ağı oluşturabilmeleri ve ucuz olmaları gibi avantajlarından ötürü bilimsel ve endüstriyel çevrelerce dikkat çekmiştir (Komiyama ve ark., 2003; Haupt, 2003). Geçen beş yılda şekerler, steroidler, pestisitler, çeşitli ilaçlar ve amino asit türevleri gibi küçük moleküllerin baskılanmasına yönelik birçok yayın yapılmıştır. Bu da moleküler baskılanmış polimerlerin kalıp moleküle özgül yüksek oranda özgül tanıma yeteneğine sahip olduğunu, uygulamalı ve analitik ayırmalarda, katı faz ekstraksiyonlarında, kimyasal sensörlerde, enzim benzeri katalizör çalışmalarında, ilaç taşıma uygulamalarında ve kütüphane görüntüleme araçları olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Yan ve Ramström, 2005; Mahony ve ark., 2005; Hall ve ark., 2005; Piletsky ve Turner, 2006; Wei ve ark., 2006). Bunun aksine büyük moleküllerin baskılanması, özellikle makromoleküler baskılama, az gelişmiş, geri kalmış bir teknolojidir.

Özellikle biyomedikal ve biyotanasal uygulamalarda biyolojik yapı ve fonksiyonun kontrolünde doğal sistemlerden yararlanmak ve bu sistemleri kullanabilmek için moleküler tanıma teknolojisine gösterilen ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Klasik bir

moleküler baskılanmış polimerde küçük kalıp molekül, polimer matriksindeki tamamlayıcı bağlanma bölgelerine doğru özgür bir şekilde hareket edebilir. Fakat makromoleküler bir kalıp molekülün bağlanma bölgelerine erişebilmesi daha zordur. Ayrıca bir makromolekülün daha karmaşık olan yapısı ve büyük boyutu, daha heterojen ve özgül olmayan bağlanmalara neden olur ve bunun sonucu olarak da baskılanmış polimer zayıf tanıma davranışı sergiler. Buna ek olarak, proteinler ve hücreler gibi bazı biyomakromoleküllerin sahip olduğu karmaşık özelliklerden dolayı, bu moleküllerin konformasyonel bütünlüğüne ve bağlanma aktivitelerine herhangi bir zarar gelmemesi için, biyomakromoleküler baskılamanın mümkün olduğunca bunların doğal ortamına yakın koşullar altında yapılması gerekir. Proteinlerin baskılanması sırasında, küçük moleküllerle çalışırken karşılaşılmayan birtakım güçlüklerle karşılaşılır. Bunlar; moleküler boyut, kompleks yapı, konformasyonel esneklik ve çözünürlüktür (Turner ve ark., 2006).

İmmunoglobulinler (Ig), kendilerinin oluşmasına neden olan antijenlerle özgül olarak birleşebilme, reaksiyonlara yol açabilme özelliğinde olan glikoprotein yapısında moleküllerdir. Bir immunoglobulin molekülünün yapısı incelendiğinde molekülün “Y” harfi şeklinde olduğu, iki adet ağır zincir ve iki adet hafif zincirden oluştuğu görülür. F_c bölgesi hemen hemen tüm Ig moleküllerinde aynı olup, Ig seçiciliği F_{ab} bölgesindeki değişimlere bağlıdır. Bütün halindeki Ig molekülünün fonksiyonel bölgesi olmasından dolayı ve küçük boyutları nedeniyle F_{ab} fragmanları, birtakım immünokimyasal tekniklerde ve deneysel uygulamalarda kullanım açısından bütün halindeki antikora kıyasla çeşitli avantajlar sunar (Beale, 1987). Özellikle moleküler baskılama çalışmalarında bütün halindeki antikor molekülünü baskılamada karşılaşılan zorlukları bertaraf etmek ve büyük protein epitoplarından kaynaklı sterik engellemeyi azaltmak amacıyla F_{ab} fragmanları tercih edilmektedir.

Bu çalışma kapsamında immunoglobulin G (IgG) tayini için F_{ab} fragmanları baskılanmış SPR temelli biyosensör hazırlanmıştır. Bu amaçla öncelikle IgG moleküllerinin papain enzimi ile enzimatik hidrolizi gerçekleştirilmiş ve bunun sonucunda elde edilen F_{ab} fragmanları SPR sensör çipi yüzeyine baskılanmıştır. Bu aşamada bir tane de F_{ab} fragmanları baskılanmamış Poli (HEMA-MAH) sensör çipi de hazırlanmıştır. Hazırlanan SPR çiplerinin yüzey karakterizasyonu atomik

kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre, temas açısı ve FTIR-ATR spektrofotometre analizleri ile yapılmış ve AFM ve elipsometre ölçümleri sonucunda F_{ab} fragmanlarının yüzeye tek tabakaya yakın bir şekilde baskılandığı gözlemlenmiştir. Hazırlanan sensörlerin IgG'ye karşı yüksek duyarlılıkları olduğu saptanmıştır. F_{ab} fragmanlarının baskılanmasıyla, proteinlerin baskılanması sırasında küçük moleküllerle çalışırken karşılaşılmayan moleküler boyut, karmaşık yapı, yapısal esneklik ve çözünürlük gibi birtakım güçlüklerin üstesinden gelinmiştir. Ayrıca IgG moleküllerinin asıl işlevsel olan bölgesi F_{ab} bölgesi olduğu için ve IgG seçiciliği de F_{ab} bölgesindeki değişimlere bağlı olduğu için, molekülün bütünü baskılamaktansa antijen bağlanmasından asıl sorumlu olan işlevsel F_{ab} bölgesini baskılayarak hem moleküler baskılama işlemi kolaylaştırılmış, hem de SPR sensörünün etkinliği artırılmıştır.

Ayrıca, hazırlanan sensörlerin sığır serum albümini (BSA) ve F_c fragmanları ile etkileşimleri ve IgG moleküllerine olan seçicilikleri incelenmiştir. Son olarak, doğal bir IgG kaynağı olan farklı oranlarda seyreltilmiş plazma örnekleri kullanılarak doğal kaynaktan IgG tayini incelenmiş ve sensörün pek çok proteinin bulunduğu bu kompleks ortamda ve yüksek seyreltme oranlarında bile ölçüm yapabildiği belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Çevre, ilaç ve biyoteknoloji alanlarında hızlı ve verimli yeni yöntemlere sürekli ihtiyaç duyulması, araştırmacıları, daha iyi, daha seçici ve daha hassas analitik çalışmaların yapılmasına yöneltmiştir. Moleküler tanıma temeline dayanan ayırma sistemleri arasında "Moleküler Baskılama" yöntemi ile hazırlanan taşıyıcılar, hedef moleküle olan yüksek seçicilikleri nedeniyle oldukça ümit vericidir. İlk defa 1972'de Günter Wulff ve çalışma grubu tarafından tanımlanan moleküler baskılama yöntemi, sentetik polimerlerde fonksiyonel grupların üç boyutlu yapılarının düzenlenmesiyle, oldukça seçici bağlanma bölgeleri elde etmek amacıyla kullanılmıştır (Wulff ve ark., 1987). Antikor gibi biyoreseptörler, yüksek seçicilikleri nedeniyle özgül antijenleri saflaştırmada kullanılan popüler ligandlardır. Fakat yüksek seçiciliği olan bu biyolojik moleküller ortam şartlarından kolay etkilenirler ve protein yapıları asidik şartlarda, yüksek sıcaklıklarda ya da proteolitik aktivite sonucunda denatüre olur. Antikor/antijen ya da enzim/substrat gibi biyolojik sistemlerin tanıma mekanizmasını polimerik yapılara aktaran teknik "Moleküler Baskılama"dır (Mosbach, 1996).

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır:

BASAMAK I: Ön-Organizasyon

Fonksiyonel gruplar içeren polimerleşebilen uygun monomerler, kalıp ya da başka bir deyişle hedef moleküle kovalent veya 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.

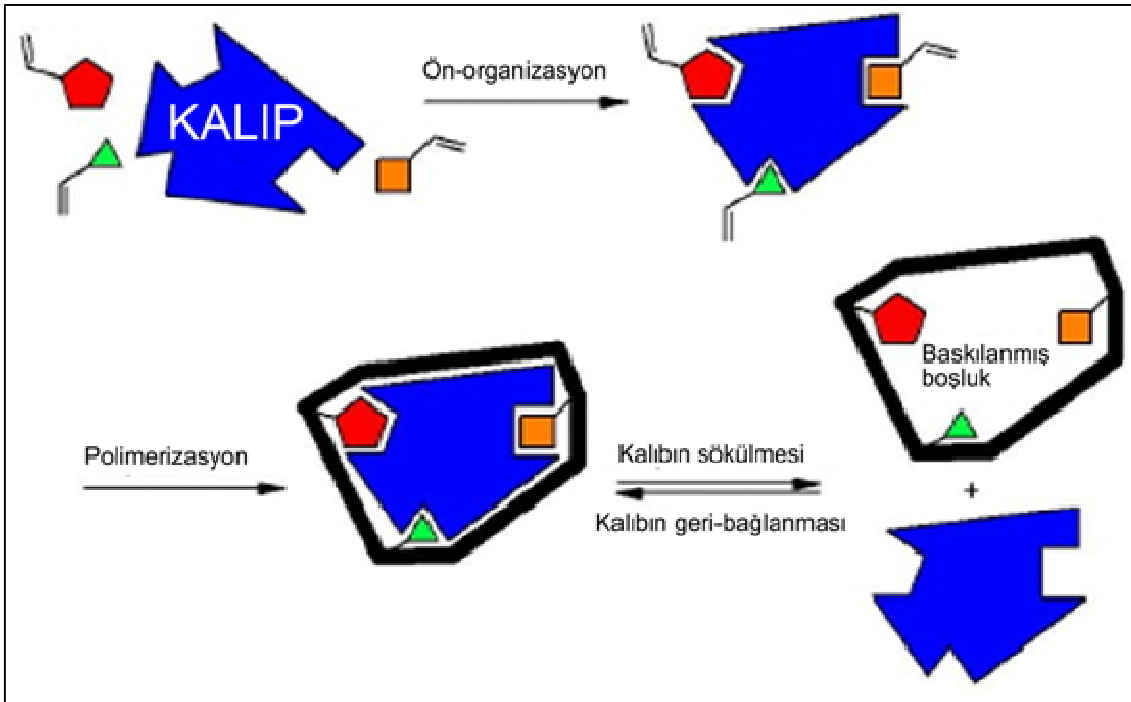
BASAMAK II: Polimerizasyon

Monomer-kalıp kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcının da kullanılmasıyla fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

BASAMAK III: Kalıp (hedef) 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.

Kalıp olarak iyonların kullanıldığı iyon baskılanmış işlemlerde, polimerik adsorbentin seçiciliği, baskılanmış iyonun yükü, boyutu, koordinasyon sayısı ve geometrisine dayanır (Cormack ve Mosbach, 1999). Metal iyonlarını adsorplamak için birçok çalışmada iyon baskılama metodu kullanılmıştır (Yavuz ve ark., 2005; Andaç ve ark., 2004; Ersöz ve ark., 2004; Say ve ark., 2003a; 2003b).



Şekil 2.1. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi (Uzun, 2008).

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP), kolay hazırlanabilir, kararlı, ucuz ve moleküler tanıma yeteneğine sahip olmaları gibi çekici özellikleriyle, yeni bir tür adsorbent olarak araştırmacıların gözdesi olmuştur.

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak, fonksiyonel monomer ile kalıp molekül arasında oluşan bağın çeşidine göre ikiye ayrılır: Kovalent baskılama ve non-kovalent baskılama.

2.1.1. Kovalent Baskılama

Polimerizasyon işleminden önce fonksiyonel monomer ile kalıp molekül birbirlerine kovalent bağlarla bağlanır. Polimerizasyon işleminden sonra kovalent bağlar kırılır ve kalıp oluşturmak amacıyla polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül, baskılanmış polimerlerle etkileştirildiğinde aynı kovalent bağ yeniden oluşur (Shea ve Dougherty, 1986).

Avantajları:

Monomer-kalıp molekül kompleksi oldukça kararlıdır ve sitokiyometrik 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.

Dezavantajları:

Monomer-kalıp molekül konjugatının sentezinde sık sık sorunlar çıkabilir ve sentez işlemi pek ekonomik değildir.

Hedef molekülün polimere tersinir olarak bağlanma sayısı sınırlıdır.

Kovalent bağ oluşumu nedeniyle bağlanma kinetikleri yavaştır.

2.1.2. Non-Kovalent Baskılama

Fonksiyonel monomer ile kalıp molekülün bağlanması non-kovalent (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve koordinasyon bağı oluşumu gibi) etkileşimlerle gerçekleşir. Polimerizasyondan sonra uygun çözücülerle kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekül ile baskılanmış polimerler non-kovalent etkileşimlerle bağlanır (Ersöz ve ark., 2005).

Avantajları:

Kovalent monomer-kalıp konjugatının sentezine gerek yoktur.

Polimerizasyondan sonra kalıp molekül polimerden kolayca uzaklaştırılır. Çünkü non-kovalent etkileşimler daha zayıftır.

Hedef molekülün bağlanma kinetiği hızlıdır.

Dezavantajları:

Polimerizasyon koşulları, non-kovalent etkileşimleri arttırmak amacıyla sınırlıdır. Fonksiyonel monomerler bağ oluşum dengesini arttırmak amacıyla fazlaca kullanılır ve özgül olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olabilir.

Görüldüğü gibi her iki yöntemin de birbirlerine göre üstünlükleri vardır. Yöntemin seçimi hedef molekülün çeşidine, yapısına, seçiciliğin derecesine, zamana ve maliyete göre değişmektedir.

Moleküler baskılama yönteminin kullanıldığı ilk yıllarda temel kavramların gelişmesi ve baskılanmış polimerlerin optimize edilmesi kovalent etkileşimlerle gerçekleştirilmiştir. Daha sonraları, non-kovalent etkileşimler uygulamadaki kolaylıkları nedeniyle daha cazip hale gelmiştir. Bununla beraber, kovalent etkileşimlerde monomer ile kalıp molekül arasında belirli bir sitokiyometrik oran vardır. Non-kovalent etkileşimlerde bağlanma sabitleri daha düşüktür ve baskılama işlemi sırasında monomerlerin bağlanma bölgelerinin ortamda fazlasıyla bulunması istenir. Sonuçta, oluşan polimerdeki bağlanma bölgeleri boşlukların içerisine tam olarak yerleşemez. Özellikle katalitik uygulamalarda ve kromatografik amaçlı çalışmalarda bu durum bir engel teşkil etmektedir. Bu yüzden, bağlanma sabitlerinin yüksek olduğu durumlarda ($K_a=10^2-10^7$), non-kovalent etkileşimlerde de sitokiyometrik oran kullanılmaktadır. Günümüzde baskılanmış polimerler temeline dayanan en etkin katalitik sistemlerde kovalent ve sitokiyometrik non-kovalent etkileşimler kullanılmaktadır (Wulff et al.,1987).

Baskılanmış boşluklardaki fonksiyonel gruplar farklı polimer zinciri bölgelerine yerleşmişlerdir ve çapraz bağlarla belirli bir yönlendirme ile durmaktadır. Böylece, moleküler tanıma polimer zincirinin düşük molekül ağırlıklı bir bölgesinde gerçekleşmez. Bunun yerine polimer zincirinin tamamı (topokimyası) moleküler tanımadan sorumludur. Bu durum, enzimlerin aktif bölgelerinin yapılarına benzetilebilir. Hedef molekül ile baskılanmış boşluk arasındaki ilişki, 100 yıl kadar önce enzim katalizi için Emil Fischer tarafından tanımlanan kilit-anahtar prensibiyle örtüşmektedir.

Moleküler baskılama işlemi için her türlü polimerizasyon (radikal, anyon, katyon ve kondenzasyon) tekniği kullanılabilir. Yeter ki polimerizasyon koşulları bileşenlere (kalıplar, çapraz bağlayıcı ajanlar, monomer ile non-kovalent etkileşimler ve diğerleri) zarar vermesin. Bununla beraber, hazırlanmasında ve uygulanmasındaki kolaylığı nedeniyle en çok radikal polimerizasyon tekniği kullanılmaktadır.

Moleküler baskılama işleminde; (1) fonksiyonel monomerler, (2) çapraz bağlayıcılar, (3) polimerizasyon için çözücüler ve (4) başlatıcılar kullanılır.

Fonksiyonel Monomerler: Kovalent baskılamada, kalıp molekül vinil gruplarına kovalent olarak bağlanır. Akrilik asit amitleri ve esterleri veya metakrilik asit en sık kullanılan monomerlerdir. Non-kovalent baskılamada, uygun fonksiyonel gruplara bağlı vinil monomerleri kullanılır.

Çapraz Bağlayıcılar: Etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve divinilbenzen (DVB) en sık kullanılan çapraz bağlayıcılardır. Bu ajanların baskılamadaki temel görevi kalıp molekül çevresinde sabit bir yapı oluşturmaktır, başka bir deyişle örgü yapısı oluşturmaktadırlar. Ayrıca baskılanmış polimerlerin çözücülerde çözünmesini engellemektedirler. Değişik çapraz bağlayıcıların kullanılması, hem kalıp molekülün bağlanma bölgelerinin yapısının korunmasını hem de kimyasal çevreden korunmasını sağlamaktadır. Etkin bir baskılama işlemi için, çapraz bağlayıcılarla fonksiyonel monomerler uyum içinde olmalıdır. Aksi takdirde fonksiyonel monomerden veya çapraz bağlayıcıdan biri polimerizasyon sırasında baskın çıkar ve kopolimerizasyon gerçekleşmez. Çapraz bağlayıcı ajanın fonksiyonel monomere oranı da önemlidir. Eğer mol oranları çok küçükse, kalıp moleküllerin 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 non-kovalent etkileşimler gösterdiği için baskılamanın etkinliği yine azalmaktadır.

Çözücüler: Çözücüler polimerizasyon ajanlarını çözmesinin yanında baskılanmış polimerlerin gözenekli bir yapıda olmasını ve hedef molekülün bağlanma hızını arttırmasını da sağlar. Bağlanan hedef molekülün polimerden salınmasını da

yapının gözenekliliği sağlar. Polimerizasyon sırasında reaksiyon sıcaklığı bölgesel olarak artar ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumuna neden olur. Çözücülerin bir diğer rolü de polimerizasyon sırasında reaksiyon ısısını eşit olarak yaymaktır.

Başlatıcılar: Radikal polimerizasyon, radikal başlatıcıların ısı bozunmasıyla başlatılabilir. Genellikle 2,2'-azobis(izobütironitril) (AIBN) ve 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (ADVN) kullanılır. Monomer ile kalıp molekül arasındaki non-kovalent etkileşimlerin çok zayıf olduğu durumlarda çok yüksek sıcaklıklara çıkılamaz. Bu koşullarda, ısı bozunma yerine UV bozunma tercih edilmektedir.

Substratların yüksek seçicilikle tanınması ve baskılanmış polimerler tarafından bağlanması, malzemenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine (esneklik, bağlanma bölgelerinin sayısı ve malzemenin yapısı gibi) bağlıdır. Moleküler baskılanmış polimerlerin daha kullanışlı olmaları için, substratın seçiciliğinin önemini yanında, uygun koşullar altında desorpsiyon ve geri bağlanma kinetiğinin de hızlı olması gerekir. Bu yüzden moleküler baskılanmış malzemelerin tasarımı yapılırken uygun bağlanma etkileşimlerinin seçimi oldukça önemlidir. Birden fazla bağlanma bölgesinin olması, monomerin bağlanma bölgeleri ile kalıp molekül arasındaki etkileşimlerin daha iyi olmasını, dolayısıyla moleküler tanımanın daha seçici olmasını sağlar. Moleküler etkileşimlerin farklılığı, seçiciliğin ve tersinirliğin derecesini etkiler. Örneğin, kovalent bağlarla oluşturulan etkileşimler oldukça özgüdür ancak geri bağlanma kinetiği yavaştır. Bununla beraber, hidrofobik etkileşimlerin kinetiği daha hızlıdır; fakat seçiciliğinde azalma gösterir. Genel olarak non-kovalent etkileşimler, birçok bileşiğe uygulanabilir olmaları, hızlı kinetiği ve daha uygun koşullarda bağ oluşumu ve kırılma özellikleri göstermeleri nedeniyle daha geniş uygulama alanlarına sahiptirler. Dahası, π - π etkileşimleri, hidrojen bağları ve metal-koordinasyon etkileşimleri gibi belirli non-kovalent etkileşimler yeni moleküler baskılanmış fonksiyonel polimerlerin tasarımı için gelecek için ümit vericidir.

Moleküler baskılanmış polimerler (MIP'ler) sentetik polimer reseptörleri ya da sağlam yapay antikolar (plastibadiler) olarak bilinirler ve kolay uygulanabilirlikleri, yeniden kullanılabilirlikleri, sağlam polimer ağı oluşturabilmeleri ve ucuz olmaları gibi avantajlarından dolayı bilimsel ve endüstriyel çevrelerce dikkat çekmiştir

(Komiya ve ark., 2003; Haupt, 2003). Geçen beş yılda şekerler, steroidler, pestisitler, çeşitli ilaçlar ve amino asit türevleri gibi küçük moleküllerin baskılanmasına yönelik birçok yayın yapılmıştır. Bu da MIP'lerin kalıp moleküle özgü yüksek oranda özgül tanıma yeteneğine sahip olduğunu, uygulamalı ve analitik ayırmalarda, katı faz ekstraksiyonlarında, kimyasal sensörlerde, enzim benzeri katalizör çalışmalarında, ilaç taşıma uygulamalarında ve kütüphane görüntüleme araçları olarak kullanılabileceğini göstermektedir (Yan ve Ramström, 2005; Mahony ve ark., 2005; Hall ve ark., 2005; Piletsky ve Turner, 2006; Wei ve ark., 2006). Bunun aksine büyük moleküllerin baskılanması, özellikle makromoleküler baskılama, az gelişmiş, geri kalmış bir teknolojidir.

Bir makromolekül, örneğin bir polimer ya da bir protein, birbirine kovalent olarak bağlı birçok küçük yapısal birimden oluşmaktadır (Hilt ve Byrne, 2004). Özellikle biyomedikal ve biyotanasal uygulamalarda biyolojik yapı ve fonksiyonun kontrolünde doğal sistemlerden yararlanmak ve bu sistemleri kullanabilmek için moleküler tanıma teknolojisine gösterilen ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Klasik bir MIP'de küçük kalıp molekül, MIP matriksindeki tamamlayıcı bağlanma bölgelerine doğru özgür bir şekilde hareket edebilir. Fakat makromoleküler bir kalıp molekülün bağlanma bölgelerine erişebilmesi daha zordur. Ayrıca bir makromolekülün daha kompleks olan yapısı ve büyük boyutu, daha heterojen ve özgül olmayan bağlanmalara neden olur ve bunun sonucu olarak da MIP zayıf tanıma davranışı sergiler. Buna ek olarak, proteinler ve hücreler gibi bazı biyomakromoleküllerin sahip olduğu kompleks özelliklerden dolayı, bu moleküllerin konformasyonel bütünlüğüne ve bağlanma aktivitelerine herhangi bir zarar gelmemesi için biyomakromoleküler baskılamanın mümkün olduğunca bunların doğal ortamına yakın koşullar altında yapılması gerekir.

2.2. Biyomakromoleküler Baskılama

2.2.1. Protein Baskılama

En önemli biyomakromoleküllerden biri olmaları sebebiyle, proteinler 35 yıl öncesinde başlayan moleküler baskılama teknolojisiyle birlikte baskılanan kalıp molekül olarak sıklıkla kullanılmışlardır, fakat bu alandaki ilerleme yavaş olmuştur (Hilt ve Byrne, 2004; Turner ve ark., 2006; Bossi ve ark., 2007). Bu teknolojinin

ilerlemedeki en büyük engel proteinlerin doğal özellikleridir. Proteinler, molekül ağırlıkları 6000 Dalton'dan milyon Dalton'lara kadar değişen biyomoleküllerdir. Bu büyük boyut, proteinin yapay bağlanma (tanıma) bölgelerine erişmesine ve bağlandıktan sonra da yeniden ayrılmasına engel olmaktadır. Ayrıca proteinin yüzeyinde çok sayıda potansiyel bağlanma bölgeleri ve fonksiyonel gruplar bulunmaktadır, bu kompleks yapı da proteinler ve MIP'ler arasındaki seçiciliğin az olmasına ve çapraz reaksiyonlara yol açabilecek özgül olmayan etkileşimlerin olabilirliğinin artmasına neden olmaktadır. Daha da önemlisi, proteinler genellikle çoğu MIP'nin sentezinde kullanılan organik çözücülerle uyuşmamaktadır. Moleküler baskılama sürecinde de sulu bir çözeltinin kullanımı fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların seçimini büyük ölçüde kısıtlamaktadır. Buna ek olarak da, suyun fonksiyonel monomerler ile hedef molekül arasındaki hidrojen bağlarının oluşumunu engellediği ve bunun için yarışmacı bir ajan olduğu belirtilmiştir (Ramström ve Ansell, 1998). Hidrojen bağlarının da en çok kullanılan ve pratikte uygulama alanı bulan non-kovalent moleküler baskılamada çok ciddi bir rol oynadığını göz önünde bulundurursak, suyun ideal çözücü olmaktan çok uzak olduğunu söyleyebiliriz. Kullanılan çözücülerle uyumsuz olmasının yanı sıra; proteinler; iyonik kuvvet, pH, sıcaklık gibi denatürasyona, konformasyonel değişime veya agregasyona neden olabilecek ekstrem koşullara karşı çok hassastır. Tüm bu faktörlerle birlikte bazı proteinleri saf olarak sentezlemenin yüksek maliyeti de birleştiğinde, etkili ve pratik protein baskılamaya giden yol oldukça çetrefilli olmaktadır (Turner ve ark., 2006).

Kalıp protein fragmanına veya baskılanan protein kısmına (bütün bir protein, proteinin bir kısmı veya proteinin küçük bir epitop parçası) göre, protein baskılama yöntemi 3 başlıkta toplanır; Yığın Baskılama, Yüzey Baskılama, Epitop Baskılama.

Yığın baskılama: Kalıp protein polimer matrisine bir bütün olarak baskılanır, fonksiyonel monomerler tarafından bütün bir molekül olarak tanınır ve tanıma bölgelerine bağlanır.

Protein baskılama için en basit, en kolay anlaşılır yöntem yığın baskılamadır. Bu yöntemin en büyük avantajı; bütün halindeki protein, ekstraksiyon ya da yıkama ile ortamdan uzaklaştırılabilir ve daha sonra MIP'deki üç boyutlu kavitelere yeniden

bağlanabilir. Proteinlerin büyük boyutlarından kaynaklı MIP ağının yoğunluğu ile birlikte sentez sırasında oluşan ve MIP yüzeyine çıkan porların sayısını ve boyutunu da kontrol etmek, etkili bir MIP dizaynı ve sentezi için gereklidir.

Yüzey baskılama: Yüzey baskılamanın temelinde yatan strateji, baskılanan bölgeleri MIP'nin yüzeyine ya da yüzeyine çok yakın olan bölgelere yerleştirmektir, böylece hedef moleküle erişim çok daha kolay olur. Yığın baskılama ile kıyaslandığında, protein transferi daha kolaydır ve bağlanma kinetiği genellikle yavaş olmasına rağmen bağlanmadaki kısıtlanma daha azdır (Bossi ve ark., 2001). Seçicilik daha azdır, çünkü proteinin sadece bir kısmı bağlanır ve tanıma bu şekilde gerçekleşir.

Yüzey baskılama, baskılanan polimerin yüzeyi üzerinde özgül kavite oluşumu ile sonuçlanır. Bu kavite, kalıp proteinin fragmanlarına veya parçalarına tamamlayıcı olan özel şekilleri veya sterik etkileri vardır. Fakat, proteinlerin kompleks yapılarından ve konformasyonel esnekliklerinden dolayı, kalıp protein ile fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimler istenildiği kadar özgül ve etkili değildir. Sonuçta, yüzey baskılanmış polimerler, çapraz reaksiyon, özgül olmayan bağlanma ve düşük seçicilik örneği sergileyebilirler. Bu yüzden, "epitop baskılama" denen ve yüzey baskılama ile yığın baskılama stratejilerini birleştiren daha gelişmiş ve etkili olan yöntem, gelecekte daha umut vaad edici görünmektedir.

Epitop baskılama: Proteinin sadece küçük bir epitop parçası kalıp olarak baskılanır, fakat sonuçta oluşan MIP'nin bütün bir proteini tanıma yeteneği vardır. Epitop, bir makromolekülün immün sistem, özellikle de antikorlar, B hücreleri veya sitotoksik T hücreleri tarafından tanınan parçasıdır. Bu mantıktan yola çıkarak, Rachkov ve Minoura bütün bir proteinin küçük ve açıktaki bir fragmanını temsil eden küçük bir peptid sekansını baskılayarak, protein baskılama için yeni bir yöntem geliştirdiler (Rachkov ve Minoura, 2001; Rachkov ve ark., 2004). Sonuçta oluşan polimer sadece küçük kalıp peptidi değil bütün bir proteini tanıma yeteneğine sahiptir. Bu yaklaşım, "epitop baskılama" olarak adlandırılır.

Epitop baskılamanın bazı avantajları vardır. Öncelikle, bir proteinin fragmanı veya küçük bir parçası ile daha özgül ve daha güçlü olan etkileşimler özgül olmayan

bağlanmayı minimuma indirirken afiniteyi artırır. İkinci olarak, organik çözücüler polimerizasyon sürecinde kullanılabilir, çünkü küçük peptid kalıpları bu çözücüler içinde daha karardır. Son olarak, epitop olarak kullanılan küçük peptidleri sentezlemek ucuzdur. Ancak fosforile peptidler gibi modifiye ve fonksiyonel peptidleri saflaştırmak ve sentezlemek zordur.

2.2.2. Protein Baskılamada Karşılaşılan Zorluklar

Biyolojik makromoleküllerin tanınması için MIP'lerin geliştirilmesi üzerine literatür çalışması yetersizdir (Dhal ve ark., 2001). Bu da geleneksel moleküler baskılama tekniklerinin, küçük biyoaktiflerden ziyade makromoleküllere uygulanabilirliğini kısıtlandırmaktadır.

Proteinlerin baskılanması sırasında, küçük moleküllerle çalışırken karşılaşılmayan birtakım güçlüklerle karşılaşılır. Bunlar; moleküler boyut, kompleks yapı, konformasyonel esneklik ve çözünürlüktür.

2.2.2.1. Boyut

Geleneksel polimer monolitleri yoğun yapıdadır, bu da makromoleküler kalıp molekülün bağlanma bölgelerine ulaşmasının veya bu bölgelerden kopmasının zor olmasına yol açar. Bu tarz zayıf kütle transferi ve sürekli olarak alıkonma, tanıma özelliklerinin yetersiz olmasına neden olur. Baskılanma sırasında MIP yüzey alanının daha iyi kontrol edilebilmesi için gözenek oluşturuu bir ajan eklenebilir (Wulff, 1995), ancak bu da genellikle bağlanma bölgelerini açığa çıkartmak için monolitin parçalanmasını ve aşındırılmasını gerektirir. Bu tarz bir işlem, bağlanma bölgelerinde hasara neden olur.

2.2.2.2. Karmaşık Yapı

Küçük kalıp moleküllerin aksine, proteinler geniş yüzey alanları üzerinden çok sayıda potansiyel bağlanma bölgesine sahiptir. Bir proteinin birbirinden farklı olan bölgeleri, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu için tanımda ve çapraz reaktivitede birtakım problemlere neden olabilir. Etkileşim bölgelerinin sayısı az fakat etkileşim güçlü olduğu zaman, MIP'lerin en yüksek seçiciliğe sahip olduğu

kabul edilir. Çoklu zayıf etkileşimler çok seçici bir MIP yapmak için çok uygun değildir ve özgül olmayan bağlanmaları desteklemektedir (Sellergren, 2001).

2.2.2.3. Yapısal Esneklik

Geleneksel baskılama yöntemleri proteinler için uygulandığı zaman, polimerizasyon koşulları da ayrıca problem yaratabilir. Polimerizasyon sırasında fizyolojik olmayan koşullar, proteinlerin denatürasyonuna neden olabilir veya proteinleri, baskılanma için uygun olmayan konformasyonların veya agregatların oluşumuna zorlar. Bir kalıp molekül için oluşturulan baskılanmış bölgelere girebilmek için protein konformasyonunu değiştirdiği zaman, bu esnek yapı seçiciliğinin etkilenmesine neden olur.

2.2.2.4. Çözünürlük

Karşılaşılan bütün bu zorluklar arasında protein baskılamayı en çok zorlaştıran faktörlerden biri de, çözücünün seçiminin kısıtlı olmasıdır. Moleküler baskılama sürecinin en önemli kısmı, hidrojen bağı gibi elektrostatik etkileşimleri maksimuma ulaştırmak için önemli rol oynayan apolar, organik çözücüler içinde gerçekleşir. Fakat birçok proteinin apolar çözücüler içindeki zayıf stabilitesi ve çözünürlüğü, bu tarz çözücülerin kullanımını kısıtlandırmaktadır. Bu, ayrıca monomerlerin seçimini de kısıtlandırır, çünkü bilinen monomerlerin çoğu suda ya hiç çözünmez ya da kısmen çözünür. Su, geleneksel moleküler baskılama için ideal çözücü olmaktan çok uzaktır, çünkü su; kalıp molekül ve monomer üzerindeki hidrojen bağı bölgeleri için yarışmacı ajandır ve bu bölgelerin oluşumunu da ayrıca engellemektedir (Ramström ve Ansell, 1998).

Şu gayet açıktır ki, proteinlerin boyutu, kompleks yapısı ve çözelti içindeki davranışları, baskılama sürecinde çok önemli rol oynamaktadır. Fakat bu süreci sınırlayan en büyük faktör, baskılama için kullanılan organik çözücülerin proteinlerin yapısı ve yüzey özellikleri üzerine olan etkisidir. Çözünürlük, polimer içeriğini ve polimerizasyon esnasında kalıp molekülün konformasyonunu koruması için gerekli olan uygun monomerlerin seçimini büyük ölçüde kısıtlandırmaktadır. Bu durum, baskılamanın sulu çözeltiler içinde yapılmasını gerekli kılar, çünkü proteinlerin analizlerde ve sensör sistemlerinde kullanımları için özgül olarak baskılanmış bölgelerin proteinlerin doğal yapılarına uydurulması gerekir.

Bağlanma bölgeleri için suyun yarışmacı ajan olarak etkisi dikkat edilmesi gereken bir husustur.

2.3. İmmunoglobülinler

Bağışıklığı, vücuda giren yabancı maddelerin nötralize edilmesi, dışarıya atılması veya metabolize edilmesi için vücudun geliştirdiği tüm fizyolojik mekanizmalar şeklinde tanımlamak mümkündür. Bir organizmaya verildiğinde antikor üretimine yol açan ve antikor ile özgül reaksiyona giren maddelere antijen ismi verilir. Bebek, uterusun steril ortamından ayrıldığı andan itibaren bakteri, virüs, mantar, protozoon ile atmosferden gelenler veya beslenme sırasında alınan maddeler gibi pek çok yabancı antijenin hücumuna uğrar. Bağışıklık sisteminin görevi, bu ajanların yerel tutulumunu veya sistemik dağılımını engellemek ya da geciktirmektir. Vücutta iki tip bağışıklık sistemi vardır: 1) Hücresel bağışıklık, 2) Humoral (sıvısal) bağışıklık. Hücresel bağışıklık, sitotoksik ve fagositik mekanizmalarla antijenik yabancı hücrelerin yok edilmesidir. Humoral (sıvısal) bağışıklık ise, kan plazmasında antikor adı verilen immünoglobülinler aracılığıyla oluşan, organizmayı antijenlere karşı koruma işlemidir. Lenfositler, vücuda giren yabancı olan bir antijeni tanıyabilme özelliğinde olan hücrelerdir. T ve B lenfositler bağışıklık tepkimelerinde birbirleriyle uyumlu bir şekilde çalışırlar. Ancak, T lenfositler hücresel bağışıklıktan, B lenfositler ise humoral bağışıklıktan sorumludurlar. T ve B lenfositler, sahip oldukları çeşitli alt birimleriyle hem hücresel hem de humoral bağışıklığı oluştururlar.

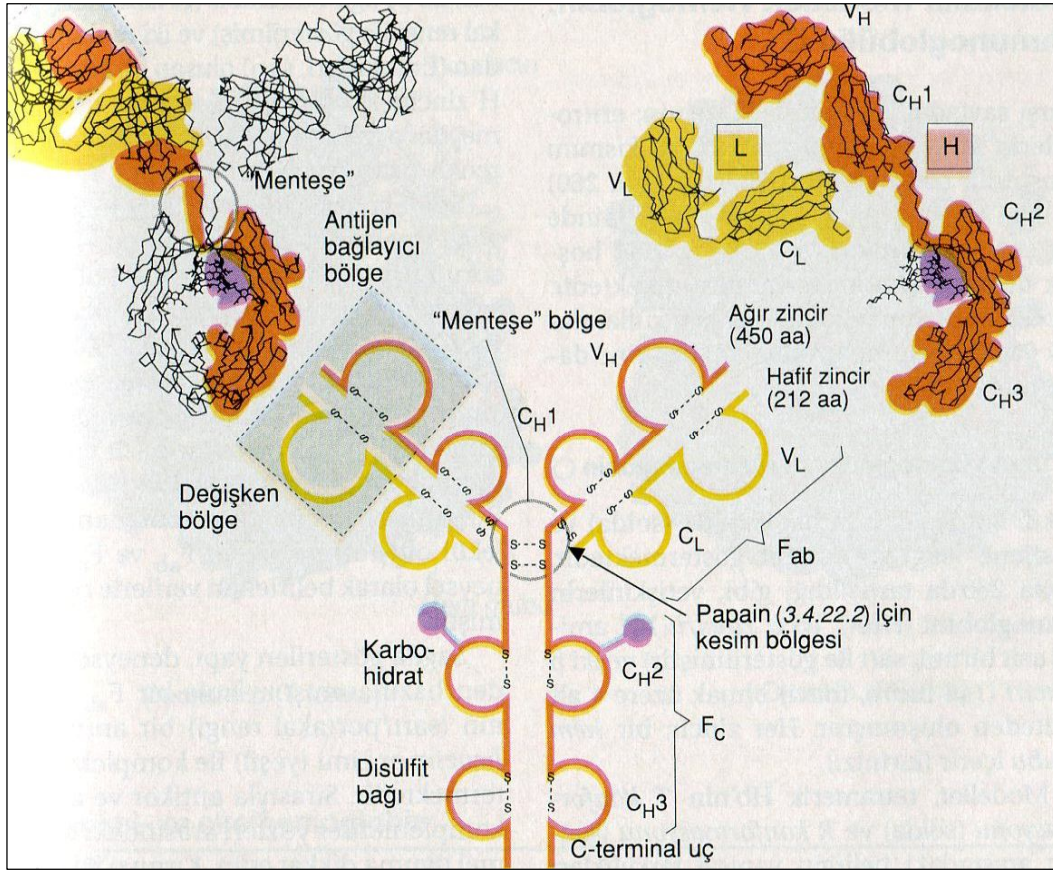
2.3.1. İmmunoglobülinlerin Yapısı

Antikorlar (immünoglobülinler), bağışık yanıt sonucunda kendilerinin oluşmasında etkin olan antijenlerle özgül olarak birleşip tepkimelere yol açabilen glikoprotein yapısındaki moleküllerdir. Antikorlar, antijenlerle uyarılan B lenfositlerin başkalaşımı ile ortaya çıkan plazma hücreleri tarafından oluşturulurlar. Antikorlar bir erişkin serumundaki protein miktarının % 25'ini oluştururlar. Başlıca beş tip immünoglobulin vardır. Bunlar; IgG, IgA, IgD, IgE ve IgM'dir.

Glikoprotein yapısındaki immünoglobülinlerin biyolojik özelliklerinin hemen hepsi yapılarındaki polipeptit birimlerine bağlıdır. İmmünoglobülinlerin iki temel işlevi

vardır. Bunlardan birincisi özgül antijenlerine bağlanmaktır. İkinci grup işlevi arasında komplement sistemi aktive etmek, opsonizasyon, sinyal iletimi yer almaktadır. Bu işlevlerin her birisi immunoglobülinin değişik bölgeleri ile ilişkilidir. Prototip olarak monomer yapıda olan IgG ele alınarak immunoglobülin yapısı açıklanabilir. Elektron mikroskobu ile incelendiğinde IgG molekülü “Y” harfi biçiminde görülür. İkişer ikişer aynı yapıda olmak üzere IgG molekülü dört adet polipeptit zincirinden oluşur (Şekil 2.2.). Bunlardan ikisi kısa ve dolayısıyla molekül ağırlığı hafif (20.000-25.500) olup bu zincirlere hafif zincirler ya da L zincirleri denir (Hafif = Light = L). Diğer iki polipeptit zinciri uzun ve dolayısıyla molekül ağırlığı yüksek (50.000-70.000) olduğundan bunlara da ağır zincirler ya da H zincirleri adı verilir (Ağır = Heavy = H). IgG molekülünde hafif (L) zincirler Y harfinin kollarında, ağır (H) zincirler ise hem kol hem de gövde kısımlarında bulunur. Kollardaki hafif ve ağır zincirler arasında ve gövdedeki iki ağır zincir arasında bulunan disülfid bağları polipeptit zincirlerini birbirlerine bağlar (Şekil 2.2.). IgG molekülünde 1320 aminoasit bulunur. Ağır zincirde 446, hafif zincirde ise 214 aminoasit saptanmıştır.

Kollardaki hem L hem H zincirlerinin bir uçları $-NH_2$ ile sonlandıklarından bu uçlara amin uçlar, zincirlerin diğer uçları $-COOH$ ile sonlandıklarından bu uçlara da karboksi uçlar adı verilir. Her polipeptit zincirinin amin uca yakın kısımları özgül antijene bağlanma bölgesi olup buna bağlı olarak aminoasit sırasında, diğer bölgelere göre birçok değişiklik görülür. Bu nedenle bu bölgelere V bölgesi (= değişken) denir. Polipeptit zincirlerinin geri kalan kısmı nispeten değişmez durum gösterdiğinden bu bölgeler C bölgesi (= değişmez) adını alır. Her polipeptit zincirinin üzerinde disülfid bağlarıyla ilmeklenmek suretiyle oluşturulan kıvrım alanları bulunur. Değişken bölgede bulunan kıvrım alanlarına V kıvrımları denir. Bunlardan H zinciri üzerindeki VH, L zincirleri üzerindeki VL kıvrımları adı verilir. Değişmez bölgedeki kıvrım alanlarına C kıvrımları denir. Y biçimindeki immunoglobülin molekülünün kollarında, V bölgesinin hemen altında, sabit bölgedeki H zinciri üzerindeki kıvrıma CH^1 , aynı bölgede L zinciri üzerindeki kıvrıma CL kıvrımları adı verilir. IgG, IgA ve IgD sınıfı globülinlerde molekülün gövde kısmında CH^2 ve CH^3 olmak üzere iki adet (CH^1 ile birlikte 3 adet), IgM ve IgE globülinlerinde gövde kısmında ise CH^2 , CH^3 ve CH^4 olmak üzere üç adet, (CH^1 ile birlikte 4 adet) sabit kıvrım bulunur.



Şekil 2.2. IgG molekülünün şematik gösterimi.

İmmunoglobülinlerin fonksiyonlarının incelenmesi için IgG molekülünü, Y'nin kollarını gövdeye birleştiği yerden üç parçaya ayıran papain enzimi ile yapılan çalışmalarda; molekülün kollarına isabet eden, antijenin bağlandığı değişken bölge ve amin uçlarının bulunduğu parçalara (iki adet) F_{ab} parçaları (antijen bağlayan fragman) adı verilir. Y şeklindeki molekülün biyolojik aktivite gösteren efektör kıvrımlarını taşıyan gövde kısmına ise F_c parçası (kristalize olabilen fragman) adı verilir. F_{ab} parçasında hem H hem de L polipeptit zincirleri, F_c parçasında yalnız H zincirleri bulunur. Pepsin enzimi ise Y şeklindeki molekülü kolların hemen altından ayırır ve sonuçta oluşan parçalardan bir tarafta kalan iki kol ve kısa bir gövdeden oluşan parçaya $F_{(ab)}$ parçası denir. Pepsinin etkili olduğu bölge çok esnek bir bölge olup buna bağlantı (menteşe=hinge) bölgesi adı verilir (Şekil 2.2.).

L polipeptit zincirleri üzerinde bir değişken V_L bölgesi, bir de değişmez C_L bölgesi bulunur. L zincirleri, üzerindeki C_L bölgelerinde görülen kimyasal yapı değişikliklerine bağlı olarak iki tipe ayrılır. Bunlardan birisi Lamda = λ , diğeri kapa = κ tipleridir. Bu yapı değişiklikleri antijenik ayrımı sağlar. Bir immunoglobülin

molekülündeki L polipeptit zincirleri ya lamda ya da kapa tipi zincirlerden oluşmuştur. Aynı immunoglobülin molekülü üzerinde hem lamda hem de kapa tipi zincirler bir arada bulunamazlar. Bir hayvandaki kapa tipi zincir taşıyan immunoglobülinlerin sayısının, lamda tipi zincir taşıyan immunoglobülinlerin sayısına oranı her tür canlı için değişmezdir. Bu oran insanlarda 2:1 dir.

İmmunoglobülinlerdeki H zincirlerindeki yapı değişikliklerine gelince: H zincirlerinin C bölgeleri arasındaki stereokimyasal ve serolojik ayırmalara göre 5 ayrı yapı saptanmıştır. Bunlar γ (gama), α (alfa), μ (mü), δ (delta) ve ϵ (epsilon) olarak adlandırılmaktadır. İmmunoglobülinlerdeki H zincirlerinin yapısı, o immunoglobülinin sınıfını belirler. IgG'de γ , IgA'da α , IgM'de μ , IgD'de δ ve IgE'de ise ϵ ağır zinciri bulunur. İmmunoglobülinlerin tüm yapısında bulunan kısımlar şunlardır: IgG'de H zincirleri olarak 2 adet γ (gama) zincirleri ve bir de iki adet L zincirleri bulunur. Bu L zincirleri de bir IgG molekülünde ya λ (lamda) ya da K (kapa) yapısındadır. Buna benzer şekilde monomer yapısındaki IgE'de iki adet ϵ (epsilon), IgD'de iki adet δ (delta) yapılarında H zincirleri ile her birinde ya λ (lamda) ya da K (kapa) yapısında ikişer adet L zincirleri bulunur. Polimer yapısındaki IgM ve dimer yapısındaki IgA immunoglobülinlerindeki H ve L zincirleri daha çok sayıdadır. H zincirleri arasındaki ve H zincirleriyle L zincirleri arasındaki bağlantıyı oluşturan disülfid bağlarının sayısı ve bağlantı yerlerinin gösterdiği değişikliklere göre IgG sınıfında 4 alt sınıf vardır: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. IgG sınıfını oluşturan IgG alt sınıfları şu oranda bulunur: IgG1 % 66, IgG2 % 23, IgG3 % 7 ve IgG4 % 4. IgA sınıfından da IgA1 ve IgA2 olarak iki alt sınıf tanımlanmıştır. İmmunoglobülin G'nin alt sınıflarının serum düzeyleri (mg/mL), IgG1 için 5-12, IgG2 için 2-6, IgG3 için 0.5-1, IgG4 için 0.2-1'dir.

Serumdaki toplam IgG miktarı,

- kronik granülom özelliği gösteren enfeksiyonlarda,
- tüm enfeksiyonlarda,
- hiperimmunizasyonda,
- yetersiz ve dengesiz beslenmede (ciddi),
- serum proteinleri arasındaki normal dengenin bozulmasında (dysproteinemia),

- aşırı duyarlılık, granülomlar, deri hastalıkları ve IgG miyelomu ile bağlantılı hastalıklarda ve
- romatoid artrit'te artarken;
- kanda IgG yokluğu ile belirgin genetik hastalıkta (agammaglobülinemia),
- lenfoid aplasia'da,
- seçici IgG, IgA eksikliğinde,
- IgA miyelom'da,
- Bence-Jones proteinemia'da (Başta multiple myeloma olmak üzere bazı kemik iliği hastalıklarında idrarda görülen protein cisimcikleri),
- kronik lenfoblastik lösemi'de azalır.

IgG alt gruplarının eksikliklerinde, IgG düzeyi normal sınırlarda olup alt grup yetmezliği vardır. Ciddi vakalarda IgG alt gruplarını içeren immunoglobülin tedavisi uygulanır.

2.3.2. İmmunoglobülin-G'nin Tıp Uygulamaları

1940'lerde Cohn ve arkadaşlarının, insan kanını fraksiyonlayarak önemli proteinlerin eldesini sağlayan kimyasal prosesi geliştirilmesiyle ilk immunoglobülin çözeltileri (sadece kas içi kullanıma uygun olan) elde edilmiştir (Cohn ve ark., 1946). Bu gelişmeyi takip eden on yıl içinde, çeşitli primer immün yetmezliklerin genetik temeli tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu buluşlar; insan immunoglobülinlerinin düzenli olarak hastalıkların tedavisinde kullanılabilmelerini sağlamış, böylece hastaların yaşam kalitesi yükseltilmiş ve yaşam süreleri arttırılmıştır. Takip eden çalışmalarda, tedavi amaçlı özgül immunoglobülin preparatları ve profilaksiye karşı özgül patojenler (hepatit B, tetanoz ve boğmaca) üretilmiştir. Bütün bu hiperimmunoglobülinler kas içi yolla uygulanmışlardır.

Enjeksiyonların acı verici, dozların sınırlı ve tekrarının zor oluşu, enjekte edilen immunoglobülinlerin kas içerisindeki proteazlar tarafından parçalanması, geriye kalan immunoglobülinlerin enjeksiyondan hemen sonra kan dolaşımına girmesinden dolayı bu tarz uygulamalar, hem hasta hem de tedaviyi uygulayan için bazı zorluklar çıkarmıştır. İmmunoglobülinlerin doğrudan kana enjeksiyonunun, IgG'nin çökmesi nedeniyle tehlikeli sonuçlara yol açtığı görülmüştür. Takip eden ilk

çalışmalar, kısmi enzimatik (pepsin ve papain proteazları) sindirim ile immunoglobülinlerin doğrudan intravenöz uygulamalarına olanak sağlamıştır.

1970`li yılların sonlarına doğru bu preparatlar kolaylıkla uygulanmaya başlamıştır. 1980`li yılların başında Imbach, Barandum ve arkadaşları; genç bir otoimmün trombositopeni ve hipergammaglobülinemi hastasında intravenöz immunoglobülin tedavisini uygulamış ve farklı bir uygulama alanı açmışlardır (Barandum ve ark., 1962).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda; intravenöz immunoglobülinler, çeşitli primer ve sekonder immün yetmezliklerin, AIDS hastalarında, prematüre, multiple miyeloma, kronik lenfotik lösemi hastalarında, ilik ve karaciğer nakillerinde, riskli karın bölgesi cerrahi operasyonlarından sonra ve yanıkların tedavisinde kullanılmaya başlamıştır (Lee ve Strand, 1997).

2.3.3. Antikor Fragmanları

IgG molekülünün fonksiyonel bölgeleri olmalarından dolayı ve küçük boyutları nedeniyle, F_{ab} ve $F_{(ab')_2}$ antikor fragmanları birtakım immünokimyasal tekniklerde ve deneysel uygulamalarda kullanım açısından çeşitli avantajlar sunar. F_{ab} fragmanlarının en büyük avantajı, antijen bağlayan en küçük parça olmalarından kaynaklanır; fakat tek değerlikli yapıları nedeniyle bazı uygulamalarda etkinliklerinde düşüş olabilir. $F_{(ab')_2}$ fragmanları ise F_c bölgesinin olmamasından, tüm IgG molekülüne kıyasla daha küçük olmasından ve iki değerlikli yapının getirdiği bazı özelliklerden dolayı kullanım avantajı sunarlar (Beale, 1987).

F_{ab} ve $F_{(ab')_2}$ fragmanları ile çalışmanın getirdiği bazı avantajlar şu şekildedir:

- F_c etkileşimlerinden kaynaklanan özgül olmayan bağlanmaların engellenmesi (birçok hücrenin F_c bölgesine bağlanan reseptörü bulunmaktadır).
- İmmünopresipitasyon ve Western blotlama yöntemlerinin de dahil olduğu çeşitli deneysel uygulamalarda Protein A'ya bağlanmanın kontrol edilebilmesi.

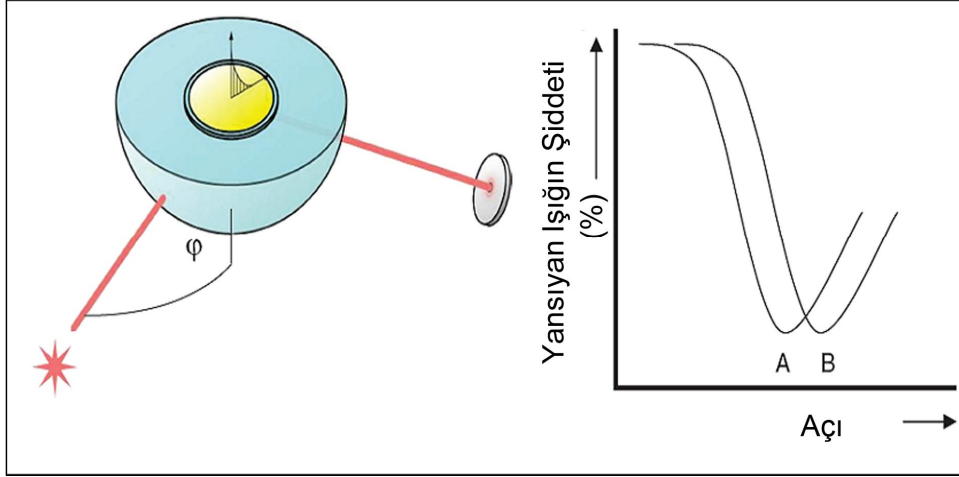
- İmmünohistokimyasal uygulamalarda boyanın doku kesitlerine daha iyi nüfuz etmesini sağlayarak daha etkili boyama işleminin gerçekleştirilebilmesi.
- X-ışını kristallografisi veya NMR kullanımına dayanan immün tanıma için yapı çalışmalarının kolaylaştırılması.
- Bütün halindeki antikora kıyasla, immünojenisiteyi azaltarak in-vivo uygulamalarda kolaylık sağlaması.
- Antijen-antikör bağlanma çalışmalarında (örneğin komplement fiksasyonunda) F_c ile ilişkili efektör fonksiyonlarının elimine edilebilmesi.
- Moleküler baskılama çalışmalarında bütün halindeki antikör molekülünü baskılamada karşılaşılan zorlukların üstesinden gelinmesi.

2.4. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)

Yüzey plazmon rezonans olgusu 1902 yılında ilk defa Wood (Wood, 1902; Wood, 1912) tarafından gözlemlenmiştir. Wood, polarize ışığı bir kırınım düzenleyici yüzeyden bir ayna üzerine yansıttığı zaman, yansıyan ışıkta aydınlık ve karanlık bantlar gözlemlenmiştir. Daha sonraki yıllarda sırasıyla Lord Rayleigh (Rayleigh, 1907) ve Fano (Fano, 1941), bu teorinin gelişimine katkıda bulunmuşlar; fakat bu olgunun tam olarak anlaşılması 1968 yılına kadar mümkün olmamıştır. 1968 yılında Otto (Otto, 1968), Kretschmann ve Raether (Kretschmann ve Raether, 1968) yüzey plazmonlarının oluşumunu rapor etmişlerdir. SPR temelli sensörlerin biyomoleküler etkileşimleri ölçmede ilk defa kullanımı ise 1983 yılında Liedberg ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Liedberg ve ark., 1983).

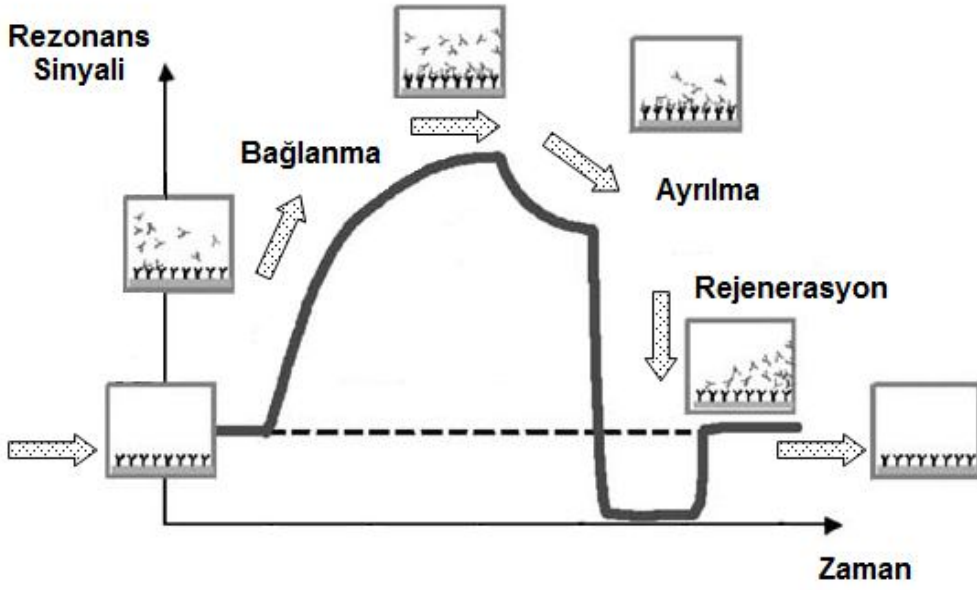
Yüzey plazmon rezonans, metal yüzeye yakın kırılma indisindeki değişiklikleri ölçmede kullanılan kusursuz bir yöntemdir (Homola, 2008). SPR yönteminde geçirgen ve farklı kırılma indisli iki ortam arasında (cam prizma ve çözelti) ince bir metal film kullanılır. Metal film genellikle altın veya gümüştür. Kritik bir açının üzerinde düzlem polarize ışık, daha yüksek kırılma indisli bir ortama girdiğinde (cam prizma) toplam iç yansımaya uğrar. Bu koşullarda kendiliğinden sönümlü dalga (evanescent wave) adı verilen ışık, metal filmin içine doğru nüfuz eder. Belirli bir kırılma açısında bu dalga, metal yüzeydeki serbest elektronların yüzey plazmonları 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 bağlanması sonucunda değiştirilebilir. Bu değişim, yüzeyin hedef moleküle göre modifiye edilmesiyle seçici hale getirilebilir. Bu da SPR biyosensörlerin temelini oluşturmaktadır.



Şekil 2.3. Yüzey plazmon rezonans oluşumunun şematik gösterimi.

Şekil 2.3'de gösterildiği gibi yıldız ile gösterilen ışık kaynağından altın kaplı sensör yüzeyi üzerine ışık gönderildiği zaman, bu ışık belli bir açı derecesinde yansır. Yansıyan ışığın yoğunluğu da disk şeklinde gösterilen dedektörde ölçülür. Sensör yüzeyi üzerinde meydana gelecek herhangi bir değişim; örneğin yüzey üzerine makromolekül adsorbsiyonu; kırılma indisinde de bir değişime neden olur. Bu da ilk durumda A olarak ölçülen açı derecesinin B noktasına kaymasına neden olur. Açıdaki bu değişim eş-zamanlı olarak gözlemlenebilir. Zamana karşı açı değişiminin gözlemlendiği grafiğe sensorgram denilmektedir.

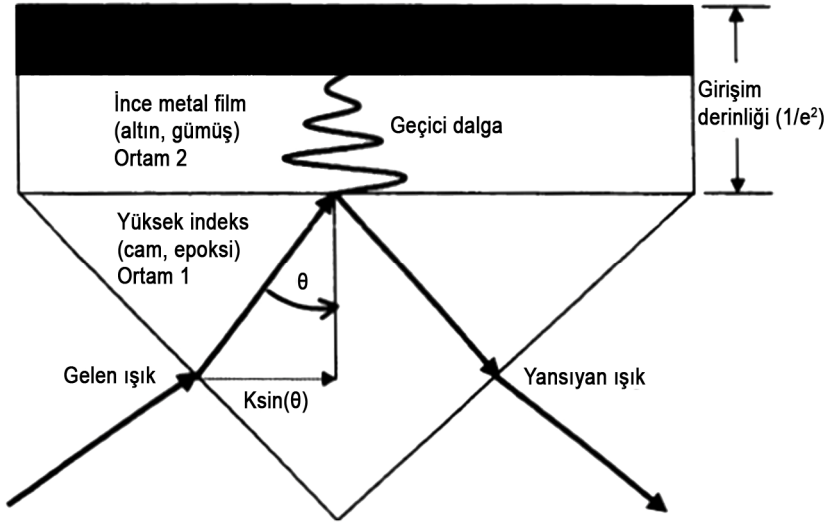


Şekil 2.4. SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.

2.4.1. Yüzey Plazmon Rezonansın Teorisi

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

Kretschmann prizma yapısı, SPR prizmalarının hazırlanmasında en sık kullanılan tasarımıdır. Şekil 2.5'de görüldüğü gibi, metal film yüzeyindeki yük yoğunluk salınımını uyaran ışık demetinin toplam iç kırılması ile oluşan geçici dalganın kullanıldığı bir yaklaşım vardır. Bu elektron salınımları yüzey plazmonları olarak adlandırılır. Geçici alanın girişim derinliği ışığın dalga boyuna, ışığın geldiği ortam ile çevresinin kırılma açısı indislerinin oranına ve fotonun parlaklığına bağlıdır. Enerji alanı yüzeyden uzaklaştıkça üstel olarak azalmaktadır. Bundan dolayı, girişim derinliği aniden düşmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Dielektrik sınırlarında 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; η_1 ve η_2 birinci ve ikinci ortamın kırılma açısı indeksi; θ 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. Çünkü, sadece bu polarizasyon metal film normaline uygun elektrik alan vektör salınımına sahiptir. Bu özellik, metal yüzeyindeki elektron plazmalarının transvers manyetik (TM) dalgası olarak adlandırılmaktadır (Szentirmay, 1992; Welford, 1991). 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:

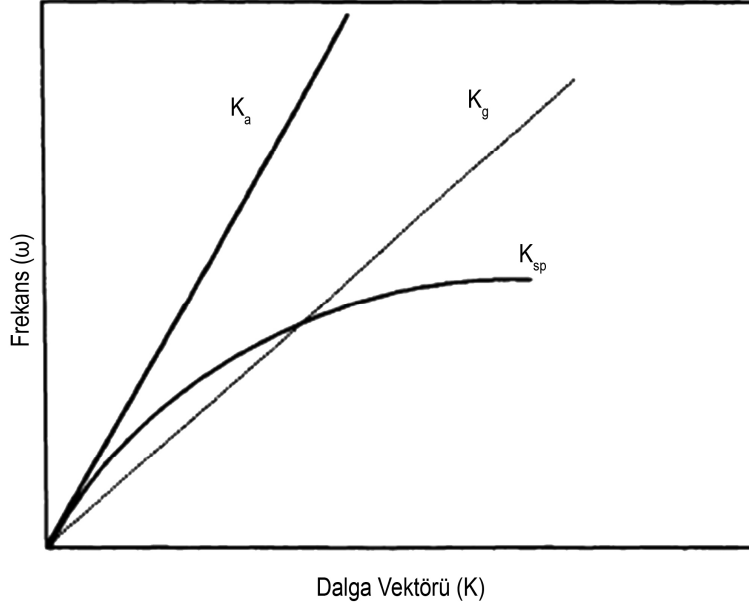
$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s}} \quad (2.2)$$

Burada; ω salınımın frekansı; c , ışık hızı; ϵ_s , metal yüzeyine temas eden örnek ortamının dielektrik fonksiyonu ve ϵ_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; θ , ışığın metal film yüzeyine geliş açısı; η_p , prizmanın kırılma açısıdır. Metal filmin üst yüzeyinde salınan ve toplanan yüzey plazmonlar, p-polarize ışığı absorplar ve toplam iç kırılmaya uğrayan ışığın parlaklığını (I_r) değiştirirler. Bundan dolayı, I_r 'e karşı geliş (veya kırınım) açısı (θ_r) grafiğe geçirildiğinde açısal parlaklık profili elde edilir. Bu profile ait grafikte, rezonans açısında keskin bir azalma gözlenir.

Bu olayın gerçekleşmesi için yüksek kırılma indeksine sahip bir prizma gerekmektedir. Çünkü, havadaki ışık yayılması ile yüzey plazmonlarının üretilmesi mümkün değildir. Yüzey plazmon rezonans sırasında, gelen ışığın ve yüzey plazmonun dalga vektörleri eşit olmalıdır. Fakat Şekil 2.6'da görüldüğü gibi, ışığın havadaki (K_a : ω/c) ve metalin plazmonundaki (K_{sp}) dağılma eğrisi kesişmemektedir. Bundan dolayı, dalga vektörü ve frekansın eşzamanlı olarak karşılaştırılmasına imkan yoktur. Bunun aksine; K_{sp} ve cam yüzeyin (K_g) dağılma eğrileri kesişmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Hava, cam ve yüzey plazmonları için dağılma eğrileri.

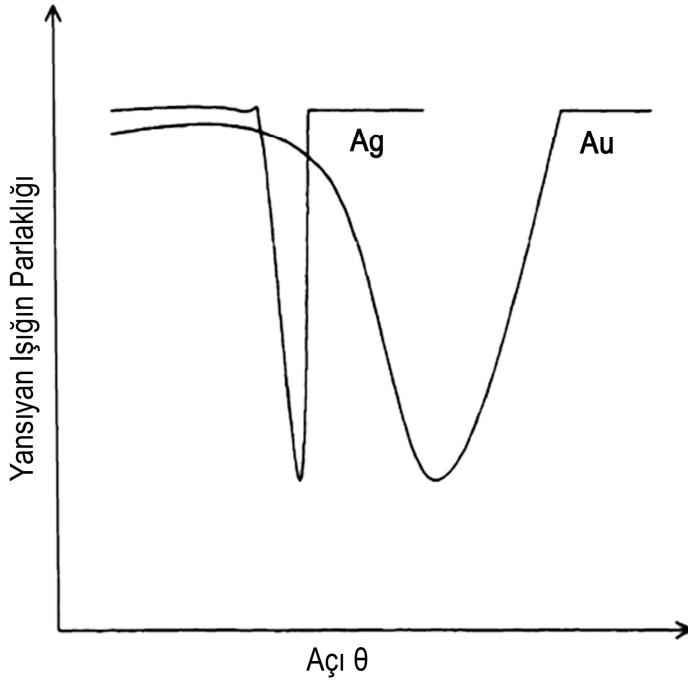
Yüzey plazmon dalga vektörü, metal filme yakın bölgedeki ortamın kırılma indeksi ile ilişkilidir. Bundan dolayı, K_{sp} eşitliği şu şekilde basitleştirilebilir:

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

Burada; η_m , metalin kırılma indeksi; η_s , örneğin kırılma indeksidir. Kompleks kırılma indeksi teriminin hayali bileşeni absorpsiyon ile ilişkilidir.

Yüzey plazmon rezonans profili, seçilen metale göre değişiklik göstermektedir. Çünkü her metal, dielektrik geçirgenlik gibi farklı özgül optik özelliklere sahiptir. Şekil 2.7’de altın ve gümüş film için, yansıyan ışığın parlaklığına karşı gelen ışığın açısını gösteren eğriler verilmektedir. Gümüş daha keskin bir rezonans pikine sahiptir. Bu rezonans piki, metal filmdeki yüzey plazmon salınımlarının kendiliğinden azalmasından kaynaklanmaktadır. Tüm yüzey plazmon metalleri, uyarılma ışığının elektrik alanının saçılmasına bağlı olarak bu salınımları azaltma eğilimindedir. Bir çok metal yüzey plazmon üretebilir. Yüzey plazmon rezonans için kullanılacak olan metal, uygun açılı ışıkla rezonansa girebilecek iletkenlik bandı

elektronlarına ve analizlerde kullanılabilmek için gerekli kimyasal modifikasyonlara uygun özelliklere sahip olmalıdır. Altın bu iki ana özelliğe birden sahip olan nadir metallere biridir. Bu özelliklere sahip olan diğer metallere göre uygulaması oldukça kolaydır. Örnek olarak, bazı elementler çok pahalıdır (indiyum); bazıları oldukça reaktiftir (sodyum); bazılarının yüzey plazmon cevapları çok geniştir (bakır, alüminyum) veya bazıları oksitlenmektedir (gümüş) (Earp ve Dessy, 1996).



Şekil 2.7. Gümüş ve altına ait yüzey plazmon eğrileri (Earp ve Dessy, 1996).

Yüzey plazmon rezonansın 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 sebep olmaktadır. Açılı kaymasının büyüklüğü kantitatif olarak kimyasal değişimle ilişkilidir. Bir immünkitte, 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 antikolar metal film üzerine özgül olmayan olarak adsorplanır. Sensöre analit içeren örnek uygulandığında; antikor ve analit bağlanması, gelen ışığın rezonans açısındaki kaymanın ölçüldüğü metal yüzeyindeki kimyasal bileşen değişimine sebep olur. Rezonans açısındaki kaymanın boyutu, örnek

içerisindeki analitin miktarı ile orantılıdır. Antikor ve analit arasındaki ilişki oldukça özgül olduğu için diğer moleküller sensör tarafından yanlışlıkla ölçülmemektedir.

2.4.2. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler

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 (Homola, 2008).

SPR temelli biyosensörler, tanıma yeteneğine sahip ve seçilmiş bir analit ile etkileşime girebilecek bir biyotanıma molekülünden ve bir SPR dönüştürücüsünden oluşan ölçüm cihazlarıdır. SPR dönüştürücüsü, analit ile biyotanıma molekülü arasındaki bağlanmayı bir çıkış sinyaline dönüştürür. Biyotanıma molekülleri, metal film yüzeyine immobilize edilirler. SPR sensör yüzeyi ile temas halinde olan sıvı bir örnek içindeki analit molekülleri biyotanıma moleküllerine bağlandıkça, bu durum sensör yüzeyindeki kırılma indisinde bir artış meydana getirir ve bu artış da optik olarak ölçülür (Homola, 2008).

Biyomolekül ile hedef analit etkileşimi sonucunda meydana gelen kırılma indisindeki değişim, sensör yüzeyi üzerindeki analit konsantrasyonuna ve moleküllerin özelliklerine bağlıdır (Homola, 2008).

2.4.3. SPR Biyosensör Çalışmalarında Kullanılan Biyotanıma Molekülleri

SPR biyosensör çalışmalarında çok çeşitli biyotanıma molekülleri kullanılmaktadır. Antikorlar diğer moleküllere kıyasla en yaygın kullanılan biyotanıma molekül sınıfını oluşturmaktadır. Antikorlar, hedef analite karşı çok yüksek afinite ve özgüllük sergileyen biyomoleküllerdir. Ayrıca, çok sayıda hedef moleküle karşı ticari olarak üretilen antikorlar da günümüzde mevcuttur. Yüksek kalitede antikor üretimi çok pahalı ve zahmetli bir süreçtir (Tomizaki ve ark., 2005). Son

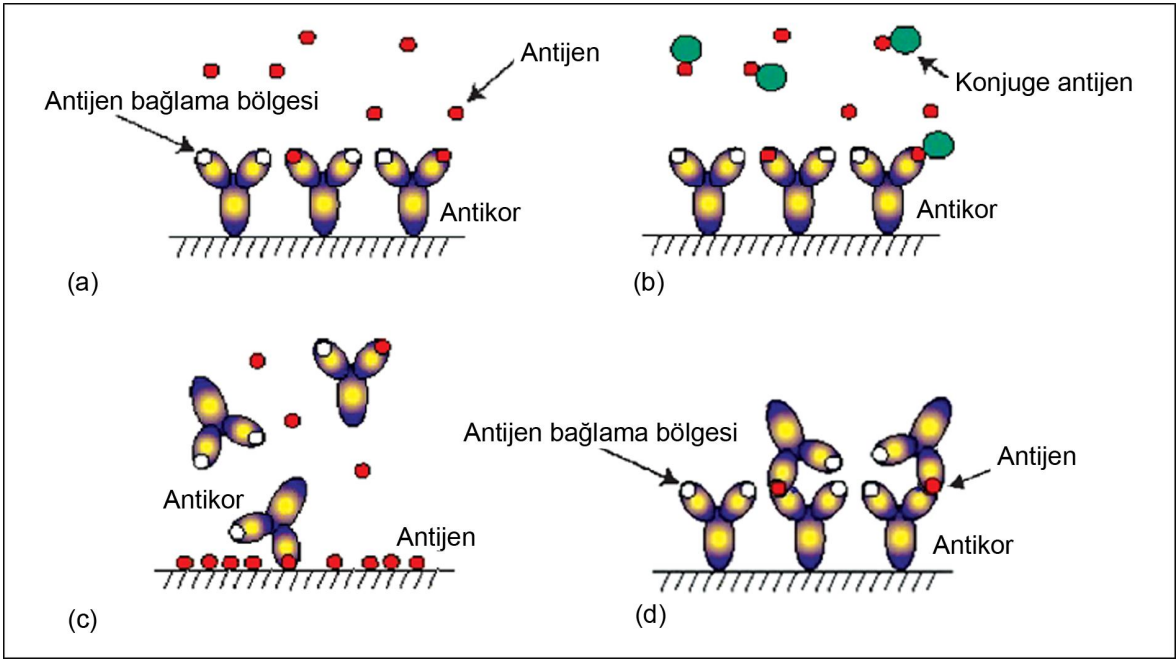
zamanlarda tek zincir antikor fragmanları (sc Fvs) da ayrıca biyotanıma molekülleri olarak kullanılmaktadır (Dunne ve ark., 2005).

SPR biyosensör çalışmalarında kullanılan diğer bir biyotanıma molekül sınıfını peptidler oluşturmaktadır. Antikorlara kıyasla peptidler daha ucuz, daha kararlı ve çalışılması daha kolay biyomoleküllerdir. Fakat, peptidler bazı durumlarda hedef moleküle karşı yüksek afinite ve özgüllükten yoksun olabilmektedirler. SPR biyosensörlerinde, peptidler genellikle antikor tayininde kullanılırlar. Örneğin, hepatit G (Rojo ve ark., 2003), herpes simplex tip1 ve tip2 virüsü (Wittekindt ve ark., 2000) ve Epstein-Barr virüsüne (Vaisocherova ve ark., 2007) karşı olan antikorların tayininde ve ağır metal (Forzani ve ark., 2005) tayininde peptidlerden yararlanılmaktadır.

Son yıllarda aptamerler de gelecek için umut verici biyotanıma molekülleri olarak SPR biyosensör çalışmalarında kullanılmaktadır. DNA veya RNA aptamerleri; küçük moleküller, proteinler, nükleik asitler ve hatta hücreler, dokular ve organizmalar gibi çeşitli moleküler hedefler için tasarlanmış tek zincir oligonükleotid sekanslarıdır (Wang ve ark., 2007; Jayasena, 1999). Ayrıca aptamer sentezi nispeten daha basittir ve tekrar üretilebilirliği yüksektir.

2.4.4. SPR Biyosensör Çalışmalarında Yararlanılan Ölçüm Yöntemleri

Kimyasal ve biyolojik analitlerin tayini için SPR sensör çalışmalarında kullanılan çeşitli ölçüm yöntemleri bulunmaktadır (Habauzit ve ark., 2007; Shankaran ve ark., 2007). Hangi ölçüm yönteminin seçileceği; hedef analit molekülünün boyutuna, mevcut biyotanıma molekülünün yani ligandın bağlanma özelliğine, ölçüm yapılacak analit derişimi aralığına ve örnek matriksine göre değişmektedir (Shankaran ve ark., 2007). En sıklıkla kullanılan ölçüm yöntemleri; (a) doğrudan ölçüm yöntemi, (b) yarışmacı ölçüm yöntemi, (c) inhibisyon ölçüm yöntemi ve (d) sandviç ölçüm yöntemidir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. SPR biyosensör çalışmalarında kullanılan ölçüm yöntemleri (a) doğrudan ölçüm yöntemi, (b) yarışmacı ölçüm yöntemi, (c) inhibisyon ölçüm yöntemi, (d) sandviç ölçüm yöntemi.

Doğrudan ölçüm yönteminde; biyotanıma molekülü, örneğin antikor, sensör yüzeyi üzerine immobilize edilir. Çözelti içindeki analit antikora bağlandıkça kırılma indisinde değişime neden olur. Bu değişim de sensör tarafından tespit edilir. Sinyal artışı analit derişimi ile doğru orantılıdır. Bu yöntem genellikle ilgilenilen analit derişimi ölçülebilir ve yeterli bir sinyal oluşturabiliyorsa tercih edilir (Homola, 2008).

Yarışmacı ölçüm yöntemi, genellikle düşük molekül ağırlığındaki antijenlerle çalışılırken tercih edilir. Bu yöntemde, özgül antikorlar sensör yüzeyine immobilize edilir. Hedef antijeni de içeren örnek çözeltisi, bir antijen konjugatı ile karıştırılır. Antijen- konjuge antijen karışımını içeren çözeltinin enjeksiyonu yapılır. Sadece konjuge antijeni içeren referans bir örneğin meydana getirdiği sinyal ile örnek çözeltisinin meydana getirdiği sinyal arasındaki fark, örnek içindeki antijen miktarını verir (Homola, 2008). Bu yöntemde örnek içindeki yüksek antijen derişimi sinyalin düşük olmasına neden olur. Çünkü daha yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu için konjuge antijen SPR'de daha güçlü bir sinyal meydana getirir.

Yarışmacı ölçüm yöntemi, genellikle toksik bileşiklerin tayininde kullanılır (Homola, 2008).

İnhibisyon ölçüm yönteminde, bu kez hedef antijen sensör yüzeyine immobilize edilir. Hedef antijeni de içeren örnek çözeltisi, bu antijene karşı olan özgül antikolar ile karıştırılır ve sensöre enjekte edilir. Antikolar hem çözeltideki antijenlere hem de sensör yüzeyindeki antijenlere bağlanır. Antijen içermeyen referans örneğin oluşturduğu sinyal ile antijeni de içeren örnek çözeltisi arasındaki sinyal farkı, örnek içindeki antijen miktarını verir. Bu yöntemde, örnek içindeki yüksek antijen derişimi sinyalin düşük olmasına neden olur (Homola, 2008).

Sandviç ölçüm yönteminde, antijene karşı olan antikor molekülleri sensör yüzeyine immobilize edilir. Antijeni de içeren örnek çözeltisinin enjeksiyonundan sonra, hedef antijen bu antikolara bağlanır. Sonraki aşamada, ikincil bir antikor uygulaması yapılır ve hedef antijen böylece bu iki antikoron sandviçi şeklinde tespit edilir. Sinyaldeki artış, antijen derişimi ile doğru orantılıdır. Bu yöntemle özgüllük ve tayin limiti (LOD) arttırılmış olur (Homola, 2008).

2.4.5. SPR Biyosensörlerin Kullanım Alanları

SPR biyosensörleri, gıda kalite kontrol analizlerinde, çevresel analizlerde ve tıpta tanı amacıyla çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Homola, 2008).

SPR biyosensör teknolojisinin gıda analizleri konusundaki geçerliliği arttıkça, bu alandaki hedef analit tespitine yönelik yapılan çalışmaların sayısı da artmaktadır. Bu alanda hedeflenen analitler arasında patojenler (Fratamico ve ark., 1998; Oh ve ark., 2002; Oh ve ark., 2003), toksinler (Nedelkov ve ark., 2000; Nedelkov ve ark., 2003; Slavik ve ark., 2002), vitaminler (Caelen ve ark., 2004; Haughey ve ark., 2005; Indyk ve ark., 2000), hormonlar (Gillis ve ark., 2002; Gillis ve ark., 2006), tanıda kullanılan antikolar (Kim ve ark., 2006), alerjenler (Mohammed ve ark., 2001; Malmheden ve ark., 2006), proteinler (Dupont ve ark., 2006; Indyk ve ark., 2006) ve kimyasal kirleticiler (Samsonova ve ark., 2004) sayılabilir.

SPR biyosensör teknolojisiyle hedeflenen ve çevresel öneme sahip analitler; pestisitler (Minunni ve Mascini, 1993; Mouvet ve ark., 1997; Haris ve ark., 1999),

aromatik hidrokarbonlar (Gobi ve ark., 2004; Kim ve ark., 2006), ağır metaller (Ock ve ark., 2001), fenoller (Soh ve ark., 2003) ve dioksinlerdir (Shimomura ve ark., 2001).

SPR'nin belki de en önemli uygulama alanlarından biri de tıpta tanı amaçlı kullanımınıdır. Normal biyolojik süreçlerde, patolojik süreçlerde veya belirli bir tedaviye karşı yürütülen farmakolojik cevaplarda önem taşıyan çeşitli moleküler biyoışaretleyicilerin hızlı, hassas ve özgül tespiti modern biyoanalitik uygulamalarda büyük önem taşımaktadır (Pejcic ve ark., 2006; Andreescu ve Sadik, 2004). SPR biyosensör teknolojilerinden bu alanda sıklıkla yararlanılmaktadır ve bu konuda hedeflenen analitler; kanser biyoışaretleyicileri, alerji biyoışaretleyicileri, kalp krizi biyoışaretleyicileri, antikolar, ilaçlar ve hormonlardır.

İnsanda kardiyak Troponin T, kalp krizi için özgül bir biyoışaretleyicidir. Dutka ve arkadaşlarının (2006) yapmış olduğu insan kardiyak Troponin T tespitine yönelik immunosensör çalışmasında, herhangi bir dilusyona gerek duyulmadan oda sıcaklığındaki serum örnekleriyle çalışılmış ve sensörün 0.05-4.5 ng/mL aralığında ölçüm yapabildiği rapor edilmiştir (Dutka ve ark., 2006).

Prostat özgül antijen (PSA), prostat kanseri ve göğüs kanseri için bir biyoışaretleyici niteliği taşıdığı için, bu kanserlerin erken teşhisinde yararlı olabileceği düşüncesiyle PSA tayinine yönelik SPR temelli bir immunosensör çalışması yapılmıştır (Choi ve ark., 2007). Yapılan çalışma sonucunda 300 fentomol seviyelerine varan hassasiyette PSA tayini yapılabildiği rapor edilmiştir.

Karsinoembriyonik antijen (CEA), tümör bağımlı bir antijendir ve pankreatik, gastrik ve kolorektal kanserler için bir biyoışaretleyici niteliğindedir (Aquino ve ark., 2004). Artan CEA seviyesi ve buna karşılık artan CEA otoantikör seviyesi, erken kanser teşhisi için bir kriter olarak kullanılabilir düşüncesiyle Ladd ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, normalden fazla eksprese olan CEA antikör seviyesine sahip bireylerle sağlıklı bireyler SPR sensörü ile kolaylıkla ayırt edilebilmiştir (Ladd ve ark., 2008).

Dünyada iki milyondan fazla hepatit B hastasının bulunduğu tahmin edilmektedir (WHO, 2008). Bu nedenle hepatit B'nin ucuz ve hızlı teşhisi için, Uzun ve arkadaşları moleküler baskılama temelli SPR biyosensör hazırlamışlar ve sensörün etkinliğini hasta plazmasından test etmişlerdir. Uzun ve ark. (Uzun ve ark., 2009) hazırladıkları biyosensörün sonuçları ile ELISA yöntemiyle elde ettikleri sonuçlar arasında %99.7 oranında uygunluk olduğunu rapor etmişlerdir.

Anılan çalışmalar, çabuk, hassas, seçici, tekrar kullanılabilir, basit ve vücut sıvılarından doğrudan ölçüm yapabilen SPR biyosensörlerin, teşhis amaçlı yeni analitik sistemlerin geliştirilmesinde umut verici yaklaşımlardan biri olduğuna örnek oluşturmaktadır.

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

3.1. Kimyasal Maddeler

F_{ab} fragmanları elde etmek için kullanılan IgG, IgG moleküllerinin enzimatik hidrolizi için kullanılan papain ve EDTA, reaksiyonu durdurmak için kullanılan iyodoasetamid, L-histidin metil ester ve metakrilil klorür Sigma (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Monomer 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve çapraz bağlayıcı etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), başlatıcı azobisizobutironitril (AIBN) ve altın çip yüzey modifikasyonunda kullanılan allil merkaptan Fluka A.G. (Buchs, İsviçre) firmasından temin edilmiştir. HEMA ve EGDMA polimerizasyon inhibitörünü uzaklaştırmak için düşük basınçta (100 mmHg) damıtılmış ve kullanılabilecek kadar 4°C'da muhafaza edilmiştir. Diğer kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan cam malzemeler bir gece boyunca 4 M nitrik asitte bekletilmiştir. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

3.2. F_{ab} Fragmanlarının Hazırlanması

3.2.1 IgG Moleküllerinin Papain Enzimi ile Kesilmesi

F_{ab} fragmanları elde etmek için insan IgG kesilmesi, 20 mM EDTA içeren 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7.0) içinde gerçekleştirilmiştir. Kesilme işlemi, 0.5 mg/mL IgG içeren kesilme çözeltisi içine enzim/antikor oranı 1:20 olacak şekilde papain ilavesi ile başlatılmıştır. Sonuçta oluşan çözelti 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kesilme çözeltisi içine 30 mM iyodoasetamid eklenmesi ile kesilme reaksiyonu durdurulmuştur.

3.2.2 IgG Moleküllerinin Kesilmesi Sonucunda Elde Edilen Fragmanların FPLC ile Analizi

IgG moleküllerinin papain enzimi ile kesilmesi sonucunda elde edilen fragmanlar, hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) ile analiz edilmiştir. Kromatografik ayırım, 2.5 x 0.7 cm Hi-Trap_r Protein A_FF kolonu üzerinden yapılmıştır. FPLC mobil fazları A ve B sırasıyla 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7.0) ve 0.1 M glisin-HCl tamponu (pH: 3.0) ile hazırlanmıştır. Kromatografik ayırma 1 mL/dak. akış hızında gerçekleştirilmiştir. %100 A tamponu ile 10 dakikalık başlangıç periyodunun ardından, %0 B'den %100 B'ye 3 dakikada ulaşan lineer gradiyent, 4 dakika %100 B elüsyon tamponu ile devam edip, 6 dakika %100 A tamponu geçişi ile son bulmuştur. 2 mL protein karışımı kolona uygulanmış, 280 nm'de absorbans gözlenmiştir. Kromatografik ayırım 27°C'de gerçekleştirilmiştir. Kolona tutunan ve kolondan tutunmadan çıkan fragmanlar, cihazın Frac920 fraksiyon ünitesi yardımıyla ayrı ayrı toplanmıştır. Bir sonraki aşamada toplanan F_{ab} ve F_c fragmanlarının liyofilizatör yardımıyla çözücü kısmı uzaklaştırılmıştır.

3.2.3. SDS-PAGE Analizi

SDS-PAGE analizi, %10'luk sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile yapılmış, Coomassie Blue ile boyama gerçekleştirilmiştir. Kuyucuklara 5 µL örnek-5 µL boya şeklinde yükleme yapılmıştır. Birinci kuyucuğa Protein A kolonundan tutunmadan çıkan F_{ab} fragmanını içeren çözelti; ikinci kuyucuğa Protein A kolonuna bağlanan ve elüsyon aşamasında elde edilen F_c fragmanını içeren çözelti yüklenmiş, üçüncü kuyucuğa ise işaretleyici proteinler (60 kDa BSA, 14.7 kDa lizozim) yüklenmiştir.

3.3. N-Metakroil-L-Histidin Metil Ester Monomerinin Sentezi

N-Metakroil-L-histidin metil ester (MAH) monomerinin sentezi için uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 5.0 g L-histidin metil ester ve 0.2 g hidrokinon, 100 mL diklorometan (CH₂Cl₂) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'a soğutulmuştur. 12.7 g trietilamin bu çözeltiliye ilave edilmiştir. 5.0 mL metakroil klorür yavaşça bu çözeltinin üstüne dökülmüştür. Bu reaksiyon karışımı azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyonun sonunda, reaksiyona girmeyen metakroil klorür, % 10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz döner buharlaştırıcıda

uzaklaştırılmış ve kalan kısım etanolde çözülmüştür. Daha sonra kristallendirme işlemi ile saf N-metakroil-L-histidin metil ester katı halde elde edilmiştir (Garipcan ve Denizli, 2002).

3.3.1. MAH Monomerinin Karakterizasyonu

3.3.1.1. FTIR Analizi

MAH monomerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılarak elde edilmiştir. MAH monomeri (2 mg), KBr (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılmış, tablet haline getirilmiş ve 4000-450 cm^{-1} dalga sayısı aralığında FTIR spektrumu çekilmiştir.

3.3.1.2. NMR Analizi

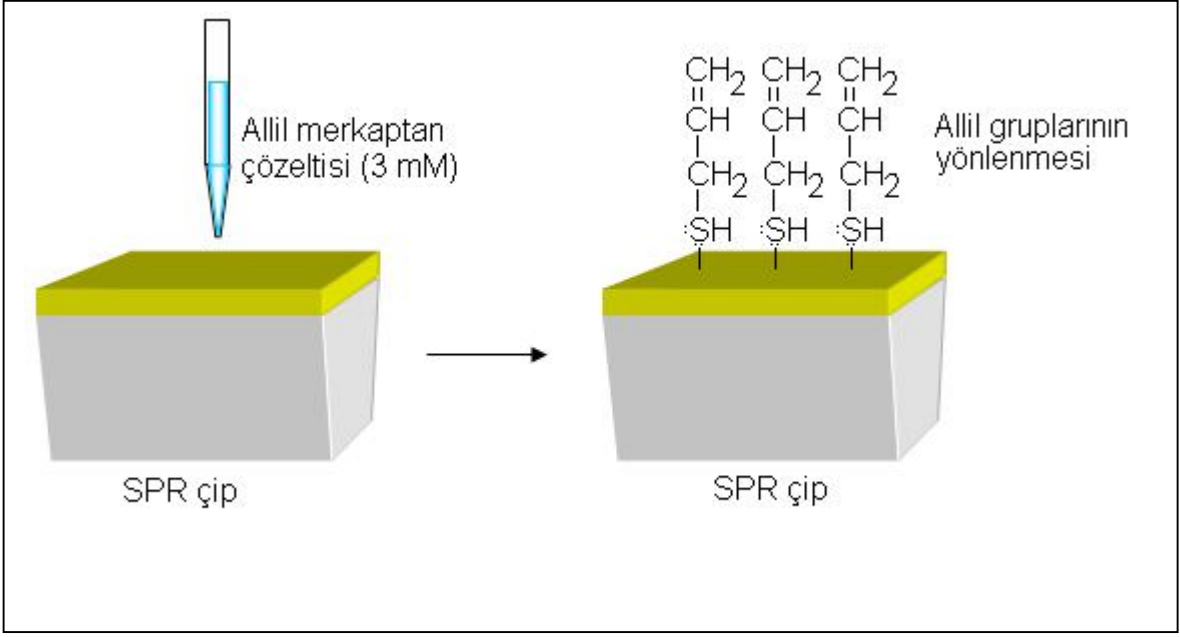
MAH monomerinin proton NMR spektrumu, CDCl_3 içerisinde JEOL GX-400 300 MHz (Japonya) NMR cihazı kullanılarak alınmıştır. Kimyasal kaymalar ppm cinsinden CDCl_3 referans alınarak rapor edilmiştir.

3.4. MAH- F_{ab} Kompleksinin Hazırlanması

F_{ab} fragmanı (kalıp molekül) ve fonksiyonel monomer olan MAH, 1.5 μmol F_{ab} ve 1.5 μmol MAH olacak şekilde 400 μL distile su içinde oda sıcaklığında 2 saat karıştırılarak MAH- F_{ab} kompleksi hazırlanmıştır.

3.5. Yüzey Plazmon Rezonans Çiplerinin Allil Merkaptan İle Yüzey Modifikasyonu

SPR çiplerinin altın kaplı yüzeyi, allil merkaptan ($\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{SH}$) ile modifiye edilmiştir. Modifikasyon öncesi altın yüzey bazik pirana çözeltisi (3:1 $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2$, v/v) ile temizlenmiştir. 20 mL bazik pirana çözeltisi içerisinde daldırılan çipler 5 dakika çözelti içerisinde bekletilmiştir. Çözeltiden çıkarılan çipler saf etil alkol ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 40°C) 3 saat kurutulmuştur. Yüzeyi temizlenen SPR çipler 3 mM allil merkaptan içeren etanol:su (4:1, v/v) çözeltisine daldırılmış ve 12 saat bekletilmiştir. Allil merkaptan çözeltisinden alınan SPR çipler saf alkol ile yıkanmış, vakum etüvünde azot atmosferinde kurutulmuştur (200 mmHg, 40°C). Modifikasyon sonucunda altın kaplı SPR çip yüzeyine allil grupları takılmıştır (Şekil 3.1).

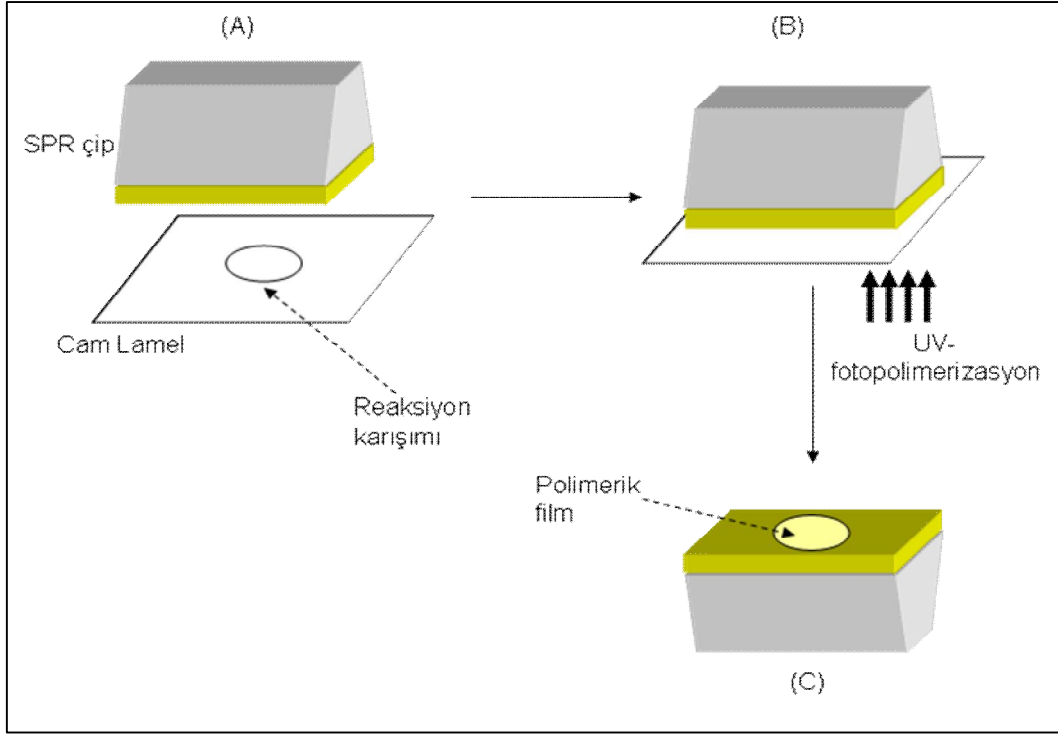


Şekil 3.1. SPR çiplerinin allil merkaptan ile modifiye edilmesi ve allil gruplarının yönlenmesi.

Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çiplerinin karakterizasyonu için temas açısı ölçümü ve atomik kuvvet mikroskobu analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.6. Yüzey Plazmon Rezonans Çip Yüzeyinde Polimer Hazırlanması

Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çiplerinin altın kaplanmış yüzeyinde F_{ab} fragmanı baskılanmış polimerler aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır: bir tüp içerisinde (uzunluk 5 cm, iç çapı 1 cm) F_{ab} -MAH ön-kompleksi (1.5:1.5 μ mol) hazırlanmıştır. F_{ab} -MAH kompleksi, 1 mL HEMA, 2 mL EGDMA çözülerek 500 μ L polimer çözeltisi hazırlanmış ve 5 mg azobisizobütironitril (AIBN) bu çözelti içerisine ilave edilerek stok reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımından 2.5 μ L numune alınarak trimetilklorosilan kaplanmış bir cam lamel üzerine damlatılmıştır. SPR çip bu çözelti üzerine ters çevrilerek konulmuştur. Polimerizasyon UV ışığı (100 W, 365 nm) ile başlatılmış ve oda sıcaklığında azot atmosferinde 30 dakika sürdürülmüştür. Polimerizasyon işleminden sonra cam lamel SPR çip yüzeyinden ayrılmıştır. Polimer kaplanmış SPR çipler önce 0.1 M HCl/metanol (1:1, v/v), daha sonra metanol ile yıkanmış ve vakum etüvünde kurutulmuştur. Polimerizasyon yöntemi Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. SPR çip yüzeyinde polimerik film hazırlanması. (A) lamel üzerine reaksiyon karışımı damlatılır (2.5 μ L); (B) SPR çip cam lamel üzerine yerleştirilir ve alttan UV-ışık uygulanır; (C) cam lamel film oluşmuş SPR çip yüzeyinden ayrılır.

3.7. Kalıp Molekülün Uzaklaştırılması

Kalıp molekül olan F_{ab} fragmanının polimerik yapıdan sökülebilmesi için desorpsiyon ajanı olarak 1 M NaCl (20 mM, pH:7.0 fosfat tamponu) çözeltisi kullanılmıştır. Kalıp molekülün desorpsiyonu kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Yüzey plazmon rezonans sensör yüzeyine baskılanan F_{ab} fragmanları üzerine desorpsiyon çözeltisi (20 mL) eklenmiştir. Çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 2 saat boyunca çalkalanmıştır (200 rpm). Desorbe edilen sensör, deiyonize su ile yıkanmış ve vakum etüvünde (200 mmHg, 25°C) kurutulmuştur.

3.8. Yüzey Plazmon Rezonans Çiplerinin Yüzey Karakterizasyonu

3.8.1. Temas Açısı Ölçümleri

Temas açısı ölçümleri KRUSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı ile yapılmıştır. SPR altın çip yüzeyine 1 damla su damlatılarak yapışık damla (Sessile Drop)

yöntemiyle temas açısı belirlenmiştir. Çip yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatmak suretiyle 10 ayrı fotoğraf 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 ve alil merkaptan ile modifiye edilmiş çip yüzeyleri için temas açısı değerleri alınan 10 ölçümün ortalama değerleri olarak hesaplanmıştır.

3.8.2. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

SPR çiplerinin altın yüzeyinin karakterizasyonu için yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılmıştır. Atomik kuvvet mikroskobu, serbest kantileverli interferometre özelliği ile 4096 x 4096 piksel çözünürlükte ölçüm alabilmektedir. Modifiye edilmemiş ve F_{ab} baskılanmış SPR çipleri 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, 256 x 256 piksel çözünürlükte, 2 x 2 μm^2 'lik bir alanda görüntülenmiştir.

3.8.3. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

F_{ab} fragmanları baskılanmış SPR çiplerinin yüzey karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. SPR çipi yüzeyin örnek yuvasına yerleştirildikten sonra, 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür.

3.8.4. Elipsometre

Hazırlanan SPR çiplerinin yüzeyindeki kalınlık ölçümleri Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) cihazı ile karakterize edilmiştir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. SPR çipi lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiş ve yüzey kalınlığı hesaplama programı için SF10 prizma+50 nm altın+50 nm polimer katmanı veri olarak öngörülmüştür.

Ölçümler sensör yüzeyinde 6 farklı noktada 3 kere tekrarlanmış ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması alınarak rapor edilmiştir.

3.9. SPR Çiplerle Kinetik Analizler

F_{ab} fragmanı baskılanmış SPR biyosensörlerin hazırlanmasından sonra hazırlanan SPR çiplerle kinetik çalışmalara geçilmiştir. Kinetik çalışmalarda 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7.0) içinde 10 mL olarak hazırlanan örnek çözeltileri ile kinetik çalışmalar yapılmıştır. Desorpsiyon ajanı olarak 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7.0) ve 1 M NaCl kullanılmıştır. IgG derişim taraması 0.02-0.50 mg/mL aralığında, F_{ab} derişim taraması ise 2-15 mg/mL aralığında hazırlanarak SPR sisteminde kinetik analizler yapılmıştır. Şekil 3.3'de GenOptics SPRiLab sistemi gösterilmektedir. Sistem, lazer kaynağı, ayna sistemi, CCD kamera sistemi, peristaltik pompa ve bilgisayardan oluşmaktadır (Şekil 3.3). F_{ab} fragmanı baskılanmış SPR çipi kinetik analiz çalışmalarında kullanılmıştır. Bu başlık altında uygulanan deneysel işlem şu şekildedir: SPR çip yüzeyi deiyonize su (50 mL) ile yıkanmıştır. Sistemden pH: 7.0 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. Bu program, dakikada yaklaşık %150 kırılma miktarı değerini ölçmekte ve anlık olarak % kırılma miktarı değişiminin gözlenmesini sağlamaktadır. Plazmon eğrileri alınması ve aynanın rezonans açısı değerine ayarlanmasının ardından, SPR sisteminden 5 dakika süreyle 20 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7.0) geçirme işlemine devam edilmiştir. Bu dengeleme basamağından sonra, farklı derişimlerde hazırlanan F_{ab} örnekleri (10 mL, 2.0 mL/dakika akış hızı) sisteme verilmiştir. Rezonans frekansındaki kayma değerleri anlık olarak gözlenmiş ve denge durumuna geldiğinde sisteme 1 M NaCl (20 mM, pH: 7.0, fosfat tamponu) çözeltisi (50 mL, 2.0 mL/dak. akış hızı) verilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra, SPR çipi fosfat tamponu (pH: 7.0, 20 mM) ve su ile yıkanmıştır. Farklı derişimlerdeki F_{ab} örnekleri ile çalışılmadan önce adsorpsiyon-desorpsiyon-rejenerasyon aşamaları tekrarlanmıştır. F_{ab} derişim taraması için uygulanan işlemlerin aynısı IgG derişim taraması için tekrarlandıktan sonra, elde edilen kinetik verileri, SPR1001 (GenOptics, Fransa) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 3.3. GenOptics SPRiLab sistemi.

3.10. Yarışmalı Kinetik Analizler

F_{ab} fragmanları baskılanmış SPR çipinin seçiciliğini göstermek için F_{ab} , IgG, sığır serum albumini (BSA) ve F_c fragmanlarının kullanılmasıyla oluşturulan tekli, ikili ve üçlü karışımlardan oluşan çözeltiler SPR sistemine verilerek yarışmalı adsorpsiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çözeltiler, fosfat tamponunda (20 mM, pH: 7.0)

1 mg/mL derişiminde hazırlanmıştır. Yarışmacı kinetik analiz çalışmaları için de daha önceden anlatıldığı gibi plazmon eğrileri alınmıştır. Hazırlanan çözeltiler sisteme enjekte edilmiş ve kinetik veriler alınarak SPR1001 (GenOptics, Fransa) yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.11. SPR Çipinin Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

F_{ab} fragmanları baskılanmış sensörün seçiciliğini göstermek için F_{ab} fragmanları baskılanmamış Poli (HEMA-MAH) SPR çipi de hazırlanmıştır. IgG, sığır serum albumini ve F_c fragmanlarının kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar sisteme gönderilmiştir. Bu çözeltiler de fosfat tamponunda (20 mM, pH: 7.0) 1 mg/mL derişiminde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin sisteme enjeksiyonundan sonra kinetik veriler alınarak SPR1001 (GenOptics, Fransa) yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.12. Doğal Kaynaktan Kinetik Analizler

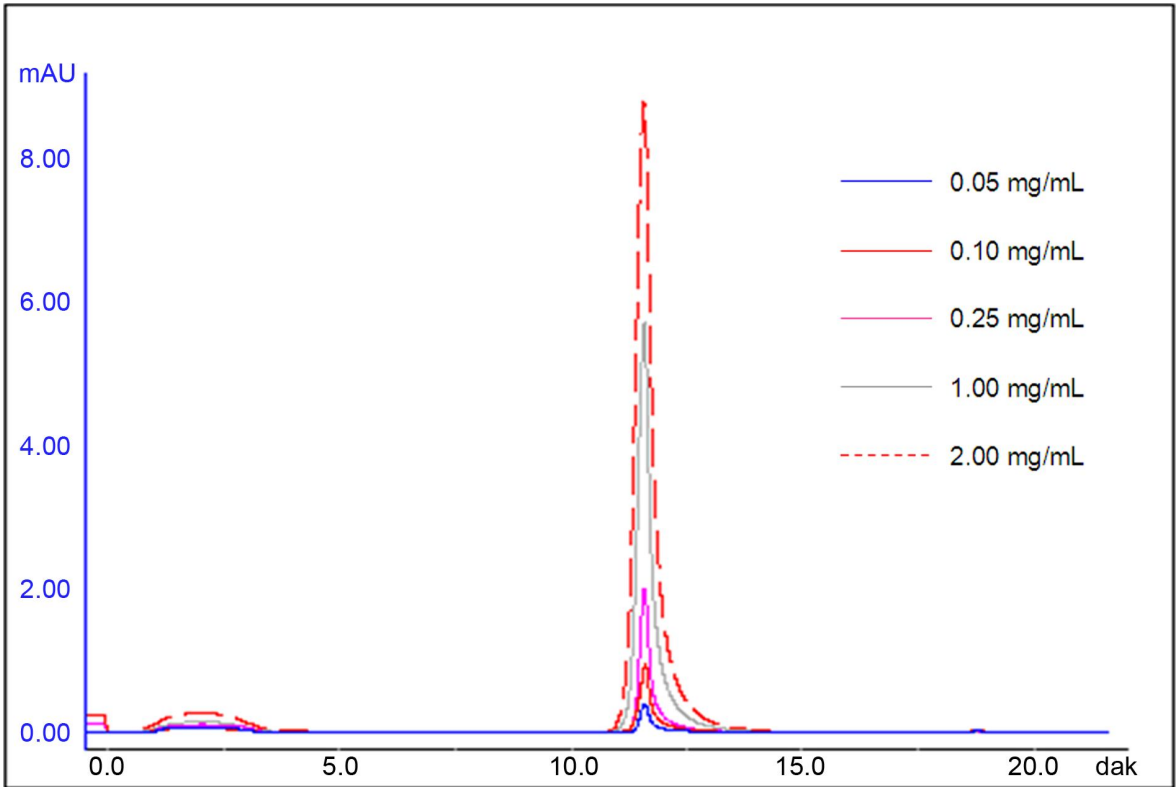
Doğal kaynaktan kinetik analiz çalışmaları için insan plazması kullanılmıştır. Bu kapsamda, gönüllü vericiden sağlanan kan örnekleri EDTA içeren tüplere alınmış ve hücrelerin ayrılması için 3800 rpm'de oda sıcaklığında 30 dakika santrifüj edilmiş ve filtre edilerek (3 μ m Sartoriusfilter), kullanılabildiği kadar -20°C 'de saklanmıştır. İnsan plazması kullanılmadan önce 37°C 'de eritilmiştir. Farklı oranlarda seyreltilen (1/800 - 1/20000) plazma örnekleri SPR sistemine enjekte edilerek sensorgramlar alınmıştır. Daha önceki sulu çözelti çalışmaları için uygulanan işlemlerin aynısı, plazma çalışmaları için de uygulanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

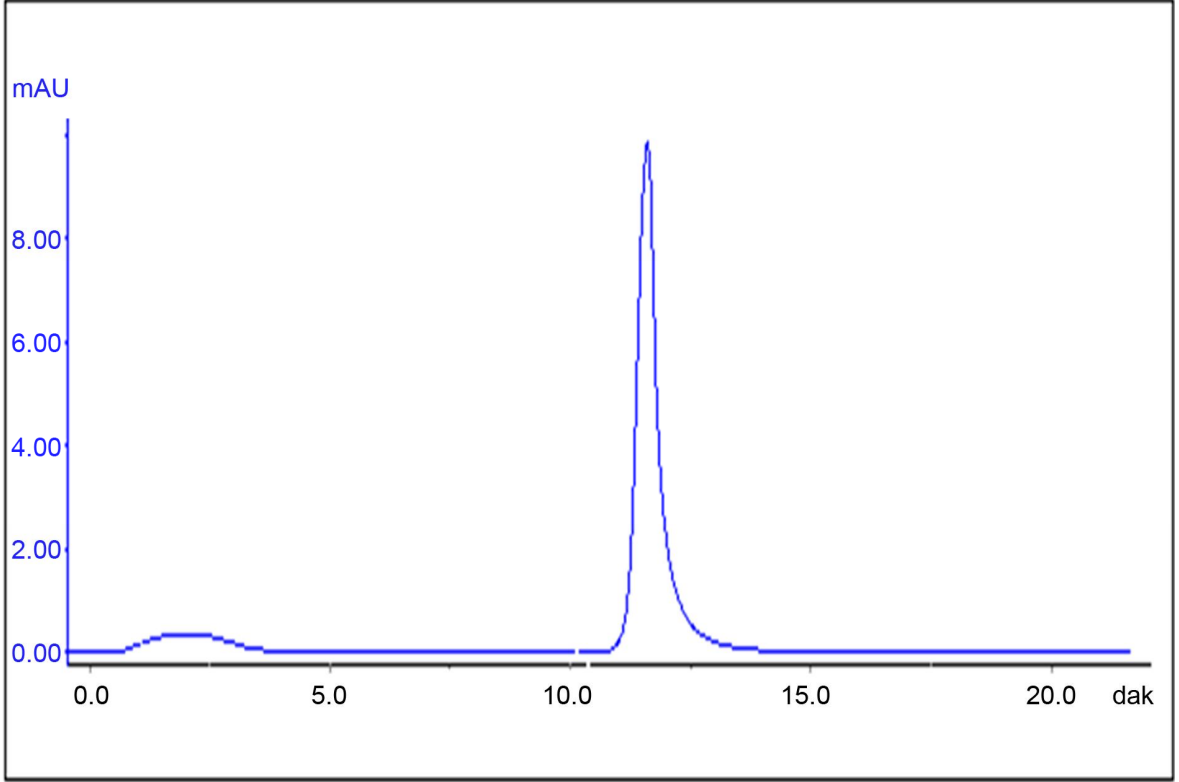
4.1. IgG Molekülünün Papain Enzimi İle Kesilmesi

4.1.1. FPLC Çalışması

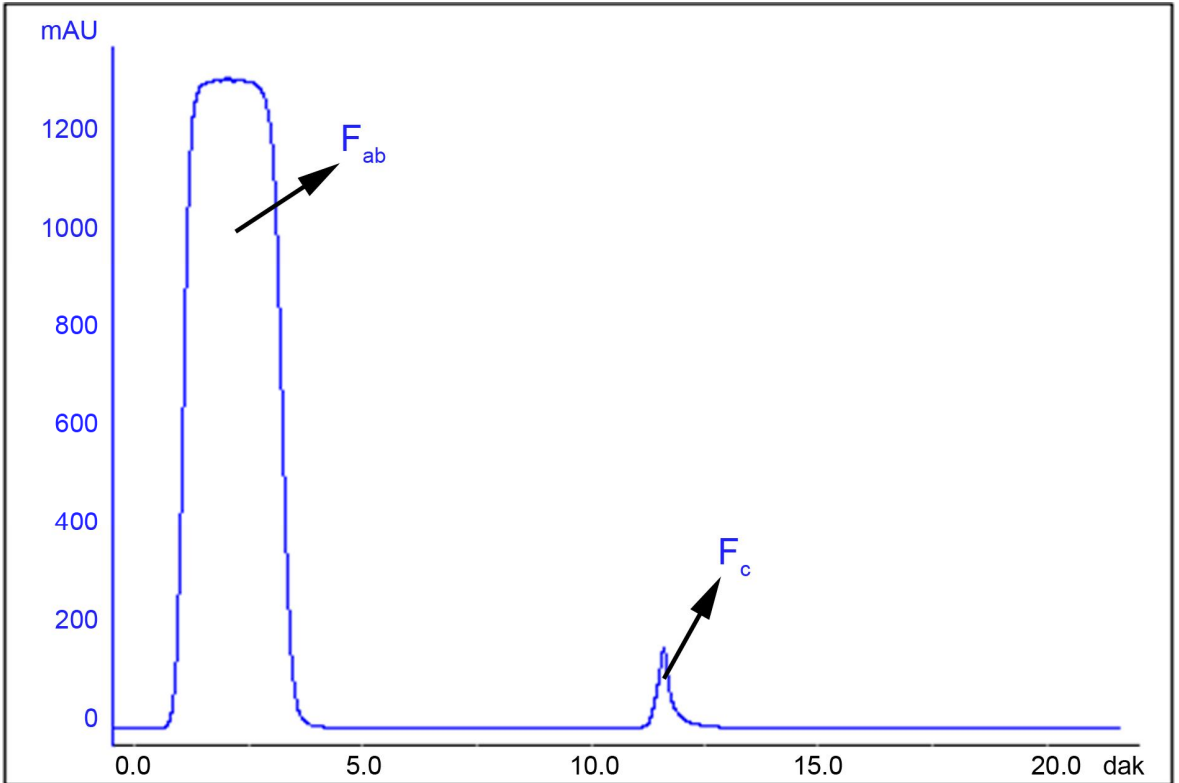
Protein A, *Staphylococcus aureus*'un hücre duvarından elde edilen ve IgG molekülünün F_c bölgesine çok yüksek afinite gösteren biyospesifik bir ligandır. Yapılan çalışma kapsamında IgG moleküllerinin papain ile kesilmesi sonucunda elde edilen fragmanlar, hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) ile ayrılmıştır. Bu amaçla GE Healthcare Protein A kolonu (HiTrap_r Protein A FF) kullanılmış ve IgG molekülünün F_{ab} ve F_c bölgeleri cihazın Frac920 fraksiyon ünitesiyle toplanmıştır.



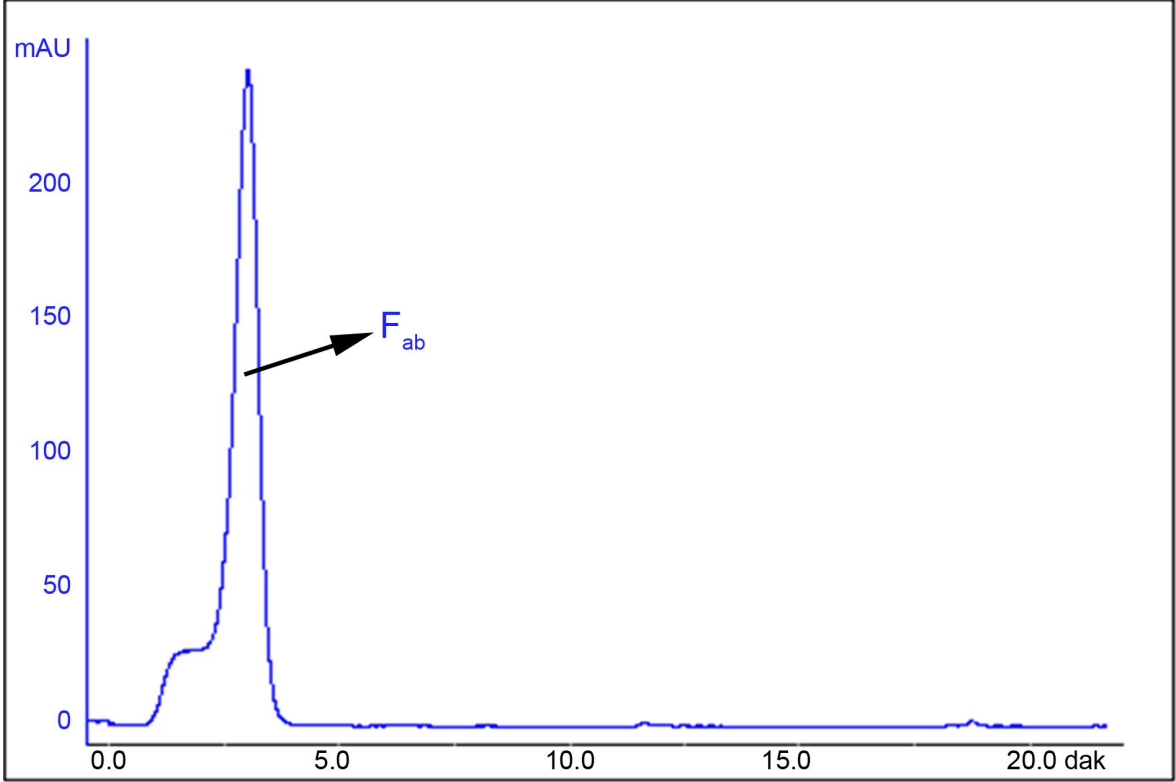
Şekil 4.1. IgG molekülünün HiTrap_r Protein A kolonu ile derişim taramasının kromatogramı (akış hızı: 1 mL/dak; sıcaklık: 27°C).



Şekil 4.2. IgG molekülünün papain ile kesilmeden önceki kromatogramı (IgG derişimi: 0.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dak; sıcaklık: 27°C).



Şekil 4.3. IgG molekülünün papain ile kesildikten sonraki kromatogramı (IgG derişimi: 0.5 mg/mL; akış hızı: 1 mL/dak; sıcaklık: 27°C).

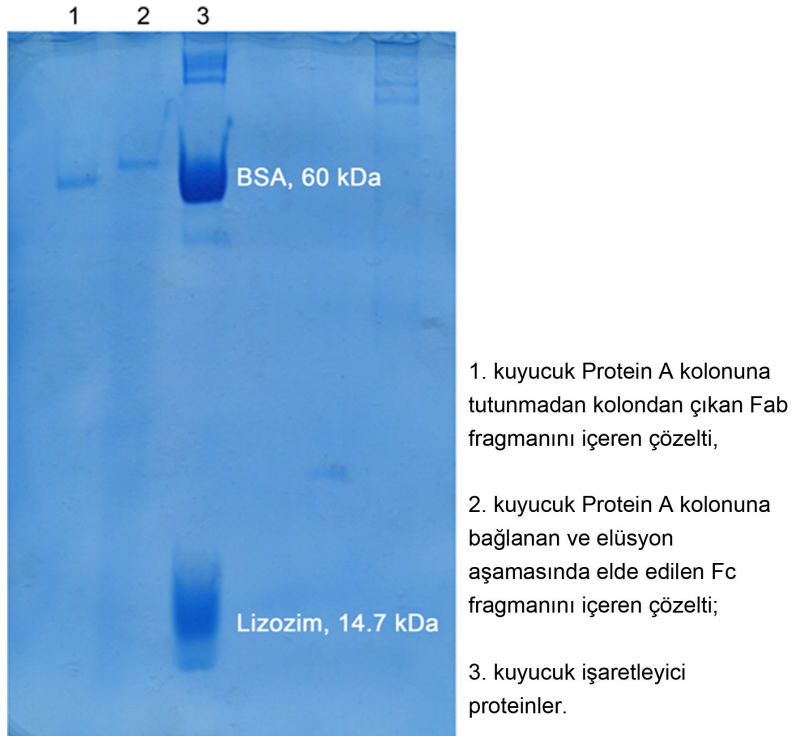


Şekil 4.4. IgG molekülünün papain ile kesildikten sonraki kromatogramı (seyreltme oranı: 1:100; akış hızı: 1 mL/dak; sıcaklık: 27°C).

FPLC sisteminin kalibrasyonu amacıyla, farklı derişimlerde IgG çözeltileri kolona yüklenmiştir. Kolonda alıkonma süresi 12 dakika olarak bulunmuştur (Şekil 4.1). Protein A kolonunun IgG molekülünün F_{ab} kısmı ile herhangi bir etkileşime girmediği, sadece F_c kısmını bağladığı yapılan çalışmalar sonucunda gözlenmiştir. Papain ile kesilmeden önce bütün halindeki IgG'ler F_c bölgesinden Protein A kolonuna bağlanmıştır. Ancak papain ile kesimden sonra, IgG molekülleri F_{ab} ve F_c olarak fragmanlarına ayrıldığı ve Protein A da IgG'leri F_c bölgesinden bağladığı için, Şekil 4.3'te görülen birinci pik IgG molekülünün F_{ab} fragmanını, ikinci pik ise F_c fragmanını temsil etmektedir. Şekil 4.4'te ise 1:100 seyreltmeden sonra IgG molekülünün enzimatik kesim sonrasındaki kromatogramı görülmektedir. Burada da yine birinci pik F_{ab} fragmanına aittir. Ancak bir önceki şekildekine göre daha düşük bir mAU değeri ve daha daralmış bir pik gözlenmiştir. Bunun sebebi seyreltmeden sonra çözelti içindeki F_{ab} miktarının seyreltme öncesine göre azalmış olmasıdır. Aynı sebepten ötürü Şekil 4.3'de F_c fragmanına ait olan ikinci pikin Şekil 4.4'de kaybolduğu görülmektedir.

4.1.2. SDS-PAGE Analizi

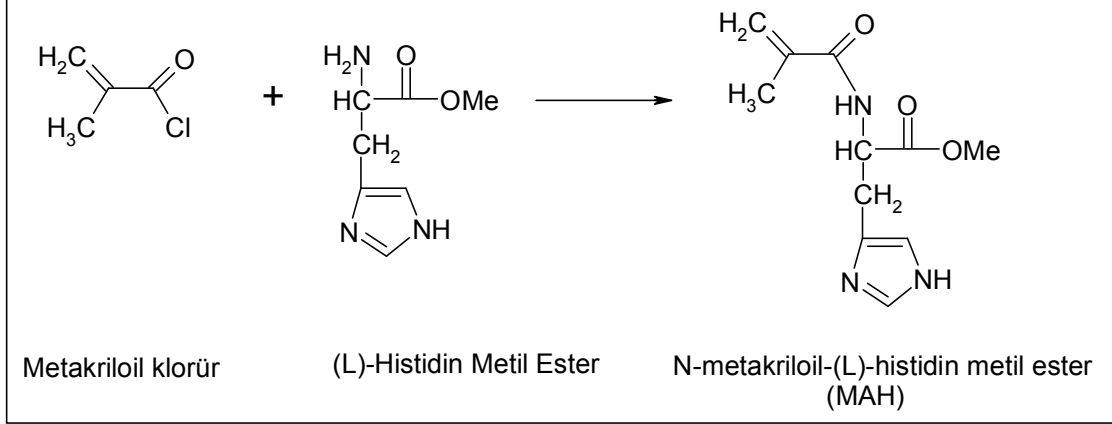
FPLC sistemi kullanılarak toplanan fraksiyonların molekül ağırlıklarının ve saflık derecelerinin belirlenmesi amacıyla sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. Hazırlanan %10'luk elektroforez jelinde yürütülen örnekler, Coomasie Blue boyama işlemi ile incelenmişlerdir (Şekil 4.5). Şekilden de görüldüğü gibi; 1. kuyucuk F_{ab} ve 2. kuyucuk F_c fragmanlarına aittir. Antikor molekülleri (IgG'ler), yaklaşık 150 kDa molekül kütlelerine sahiptir. Mentеше bölgesinden papain ile üçe bölünmesi sonucunda, molekül ağırlıkları 50 kDa civarında olan polipeptid zincirlerine ayrılmaktadır. Şekilde de yaklaşık 50 kDa civarında bandlar görülmektedir. Bandlar, oldukça temizdir. Bu durum enzimatik hidroliz ve FPLC ile fraksiyonların toplanmasının başarılı olduğunu göstermektedir. Burada not edilmesi gereken bir diğer husus ise; 1. kuyudaki bandın yoğunluğunun, 2. kuyudakinden daha yüksek olmasıdır. Bu durum; enzimatik hidroliz sonucunda 2 adet F_{ab} ve 1 adet F_c bölgesinin elde ediliyor olması ile açıklanabilir.



Şekil 4.5. IgG molekülünün papain ile kesimi sonucunda Protein A kolonundan elde edilen IgG alt fragmanlarının SDS-PAGE görüntüsü.

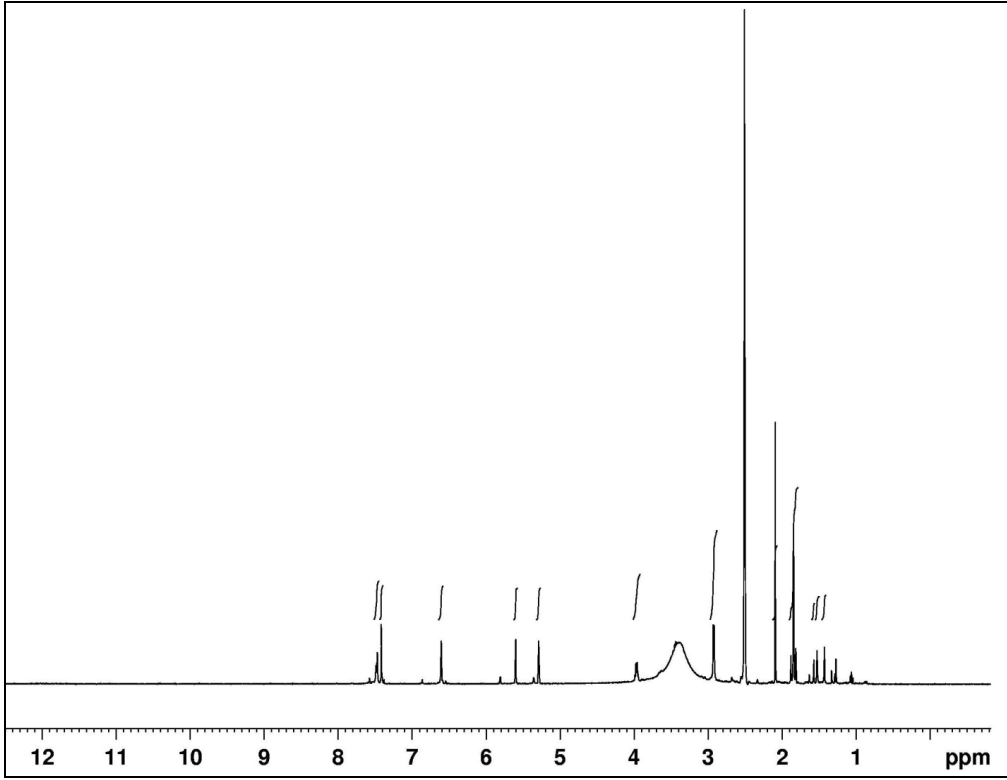
4.2. MAH Monomerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

MAH monomeri, L-histidin metil esterin metakriloyl klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir (Şekil 4.6.). Elde edilen monomer NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir.

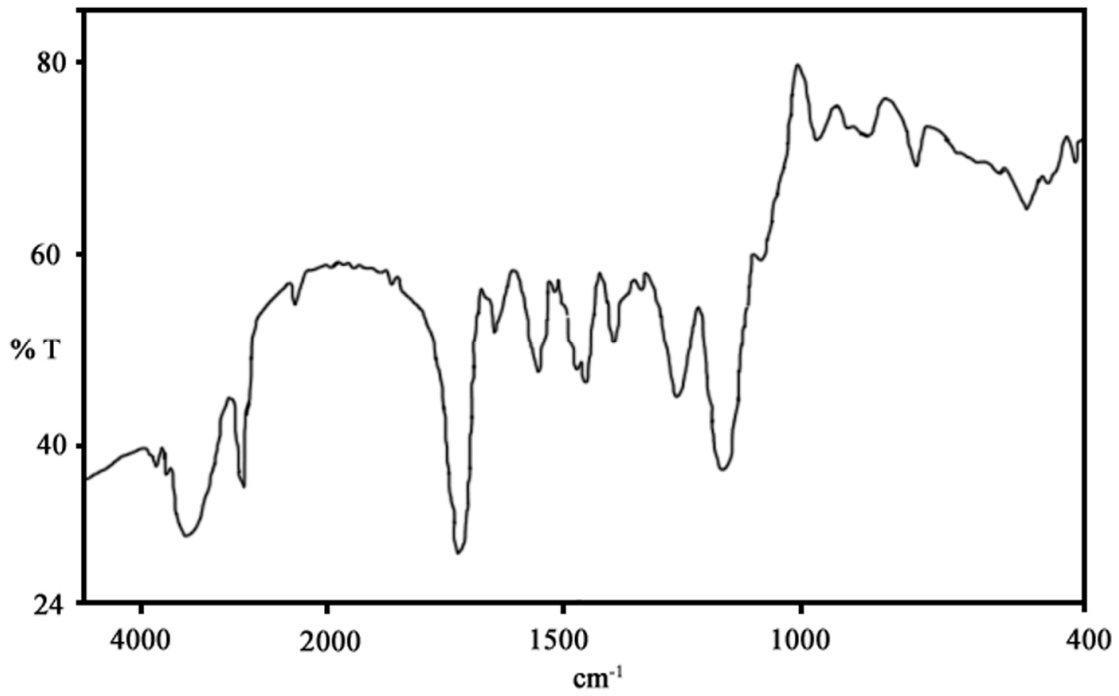


Şekil 4.6. MAH monomerinin sentez reaksiyonu.

MAH monomerinin kimyasal yapısının belirlenebilmesi için $^1\text{H-NMR}$ kullanılmıştır. Şekil 4.7.'de MAH'ın $^1\text{H-NMR}$ spektrumu gösterilmektedir. MAH monomerine ait karakteristik pikler şunlardır: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.85 (t; 3H, CH_3), 1.4 (m; 2H, CH_2), 3.42 (s; 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.28 (s; 1H, vinil H), 5.6 (s; 1H, vinil H), 6.6-6.9 (m; 5H, aromatik); 7.42 (1H, NH); 7.47 (1H, NH). MAH monomerinin yapısal karakterizasyonu için uygulanan bir diğer yöntem, FT-IR spektrofotometredir. MAH monomerine ait FT-IR spektrumu Şekil 4.8.'de verilmiştir. Şekil 4.8.'deki FTIR spektrumunda MAH monomerine ait 1724 cm^{-1} 'de karakteristik karbonil bandı; 1558 cm^{-1} ve 1651 cm^{-1} amid gerilme titreşim bandları ve 3500 cm^{-1} civarında geniş hidroksil bandı görülmektedir.



Şekil 4.7. MAH monomerinin ¹H-NMR spektrumu.

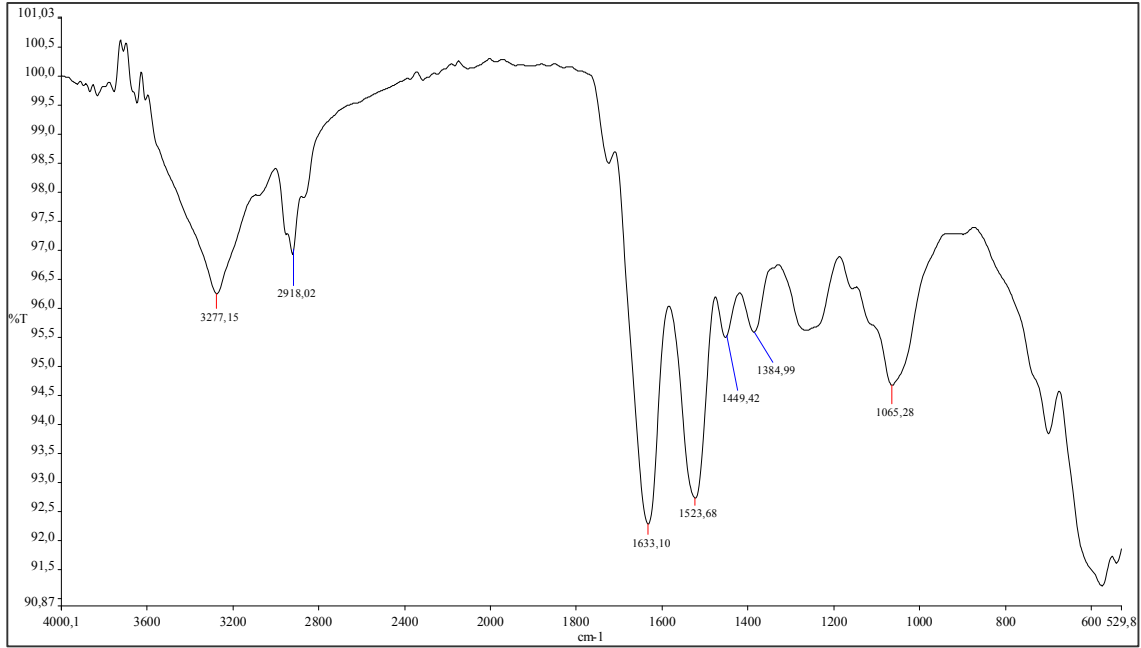


Şekil 4.8. MAH Monomerinin FTIR spektrumu.

4.3. F_{ab} Fragmanları Baskılanmış SPR Çipinin Yüzey Karakterizasyonu

4.3.1. FTIR Analizi

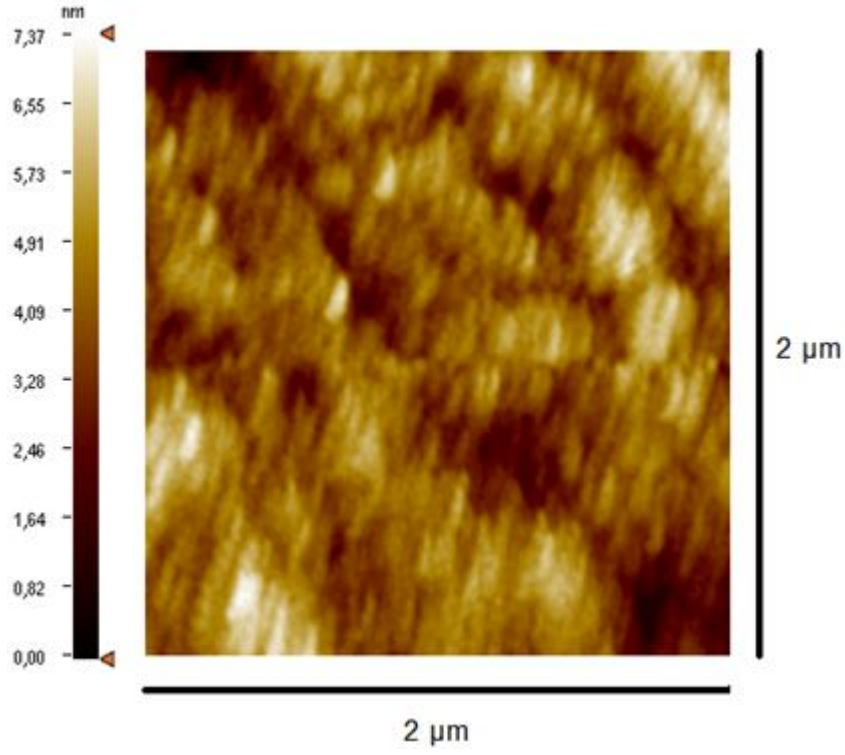
SPR sensörünün altın yüzeyinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. SPR sensör, cihazın örnek yuvasına yerleştirilmiş 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam yansıma miktarı ölçülmüştür. F_{ab} fragmanı baskılanmış SPR sensör yüzeyine ait FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.9.'da verilmiştir. Şekilden de anlaşılacağı gibi spektrumda 1633 cm⁻¹'de karbonil bandı, 1523 cm⁻¹ ve 1449 cm⁻¹'de amid bandları, 1065 cm⁻¹'de MAH monomerinden kaynaklanan imidazol halka titreşimi ve 2918 cm⁻¹'de alifatik C-H titreşimleri görülmektedir.



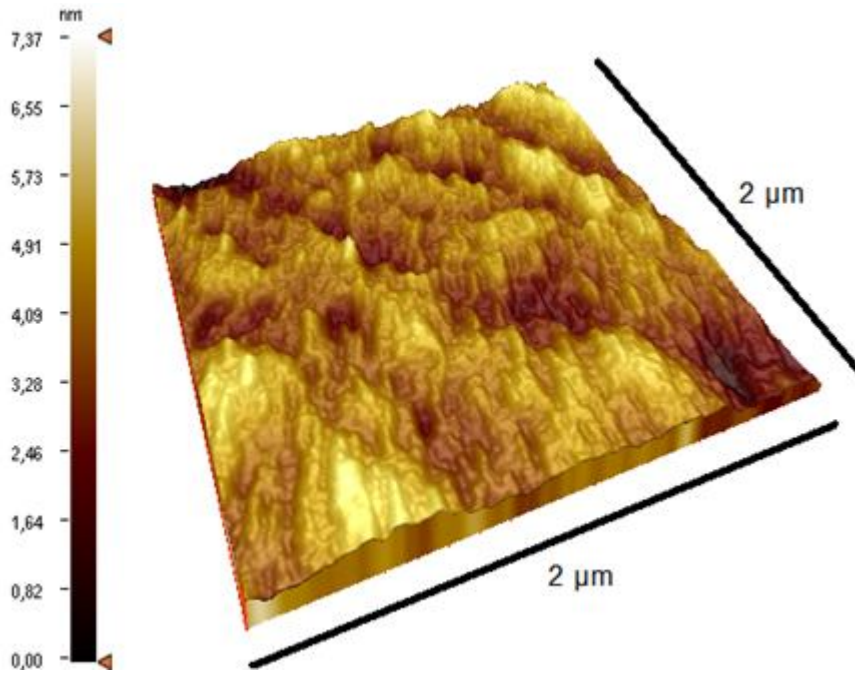
Şekil 4.9. SPR çipinin FTIR-ATR spektrumu.

4.3.2. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi

Modifiye edilmemiş ve F_{ab} baskılanmış sensörlerin yüzey morfolojisi yarı değen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Bazik pirana çözeltisi ile temizlenmiş SPR sensörün yüzey derinliği, 7.37 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10). F_{ab} fragmanı baskılanmış SPR çipinin yüzey derinliği ise yaklaşık 30 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4.11).

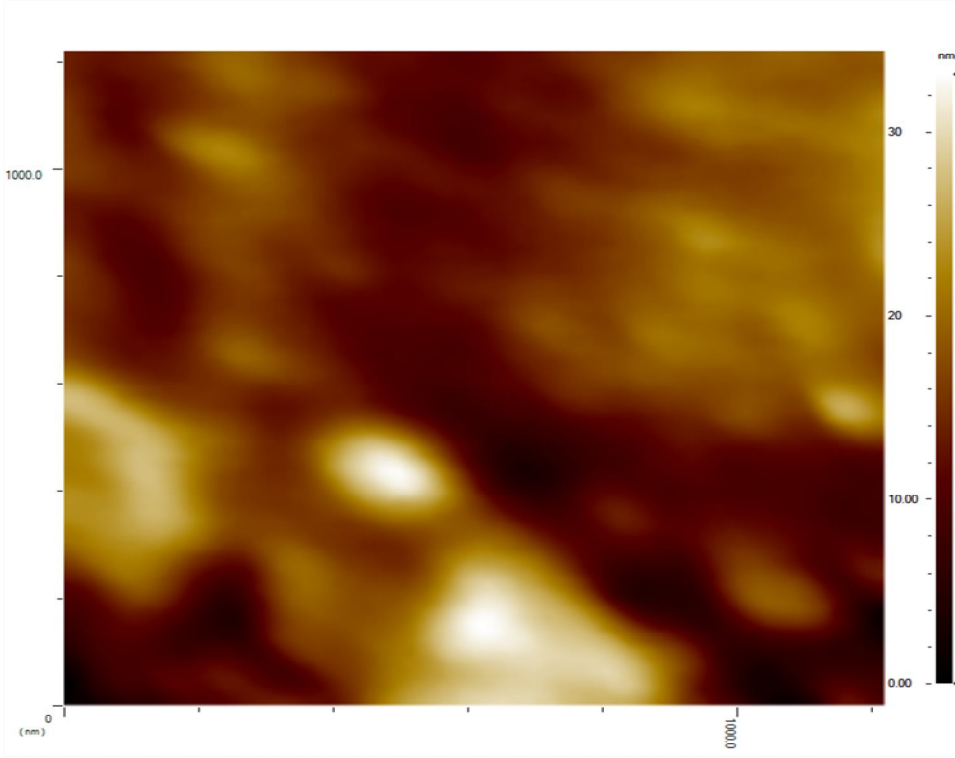


(a)

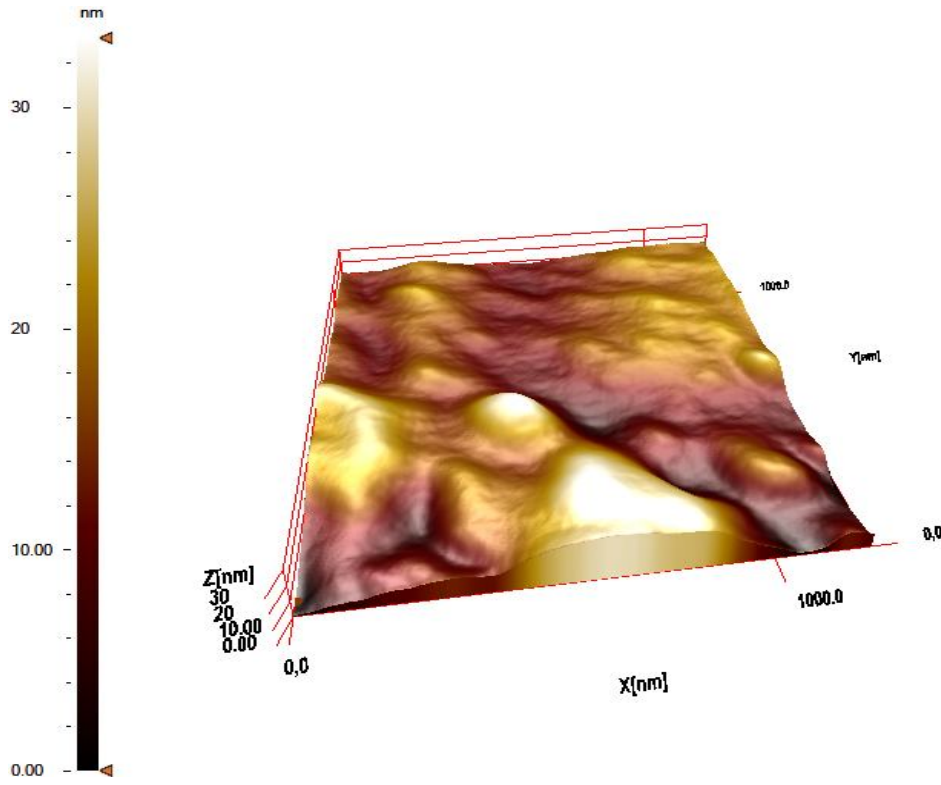


(b)

Şekil 4.10. Modifiye edilmemiş SPR çipinin yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) Yüzey görüntüsü; (b) 3B görüntüsü.



(a)



(b)

Şekil 4.11. F_{ab} fragmanı baskılanmış SPR çipinin yarı değen modda alınan AFM görüntüleri (a) Yüzey görüntüsü; (b) 3B görüntüsü.

4.3.3. Elipsometre Analizi

F_{ab} baskılanmış ve baskılanmamış Poli (HEMA-MAH) SPR sensörlerin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında gerçekleştirilmiştir. F_{ab} baskılanmış ve baskılanmamış sensörlerin ortalama kalınlık değerleri sırasıyla 20.00 ± 3.24 nm ve 18.50 ± 3.33 nm olarak hesaplanmıştır.

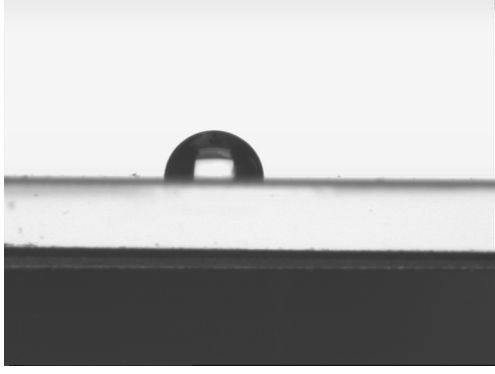
4.3.4. Temas Açısı Analizi

Modifiye edilmemiş SPR sensörün, F_{ab} fragmanı baskılanmış ve F_{ab} fragmanı baskılanmamış sensörlerin yüzey karakterizasyonu Krüss DSA100 (Hamburg, Almanya) temas açısı cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.1.'de modifiye edilmemiş SPR sensörün, F_{ab} baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey temas açıları özetlenmiştir.

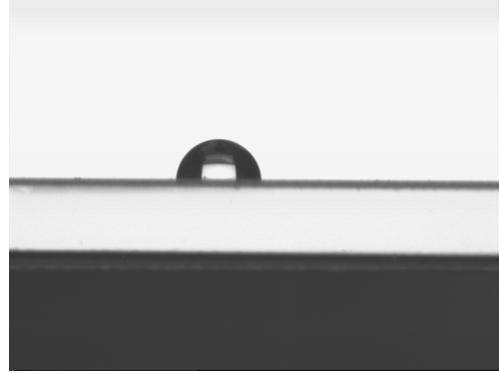
Çizelge 4.1. Modifiye edilmemiş, F_{ab} baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin yüzey temas açıları.

Yüzey	Temas Açısı, °
Modifiye edilmemiş altın yüzey	85.2
F_{ab} fragmanı baskılanmış SPR çipi	70.4
F_{ab} baskılanmamış Poli (HEMA-MAH) SPR çipi	76.8

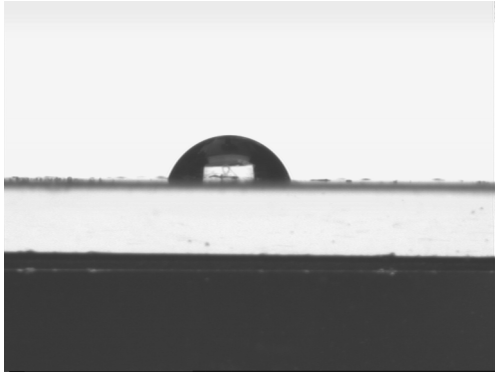
Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyinin temas açısı değeri (85.2°), F_{ab} baskılanmamış poli (HEMA-MAH) SPR çip yüzeyinde 76.8° 'ye düşmüş ve F_{ab} fragmanı baskılandıktan sonra da 70.4° 'e düşmüştür. Yüzeyin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; (i) F_{ab} baskılanmış ve baskılanmamış SPR çipleri hazırlama işlemi sırasında fonksiyonel monomer olarak MAH monomeri kullanılmıştır. MAH monomeri, amino asit (histidin) temelli bir malzeme olup oldukça hidrofilik karaktere sahiptir. Bu sebeple, yüzeye hidrofilik bir polimerin tutturulması yüzey hidrofilitatesini arttırmış ve temas açısı değerini düşürmüştür. Şekil 4.12'de temas açısı ölçümleri alınan modifiye edilmemiş, F_{ab} baskılanmış ve F_{ab} baskılanmamış SPR sensörlere ait temas açısı görüntüleri verilmiştir.



(a)



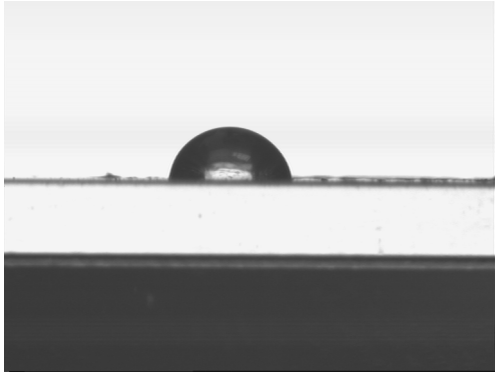
(b)



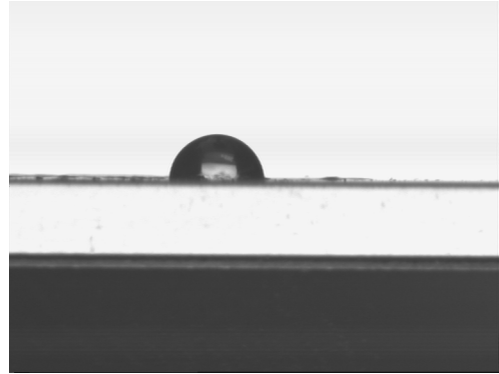
(c)



(d)



(e)



(f)

Şekil 4.12. Temas açısı ölçümleri. a, b: modifiye edilmemiş SPR sensör yüzeyi; c, d: F_{ab} baskılanmış SPR sensör yüzeyi; e, f: F_{ab} baskılanmamış poli (HEMA-MAH) SPR sensör yüzeyi.

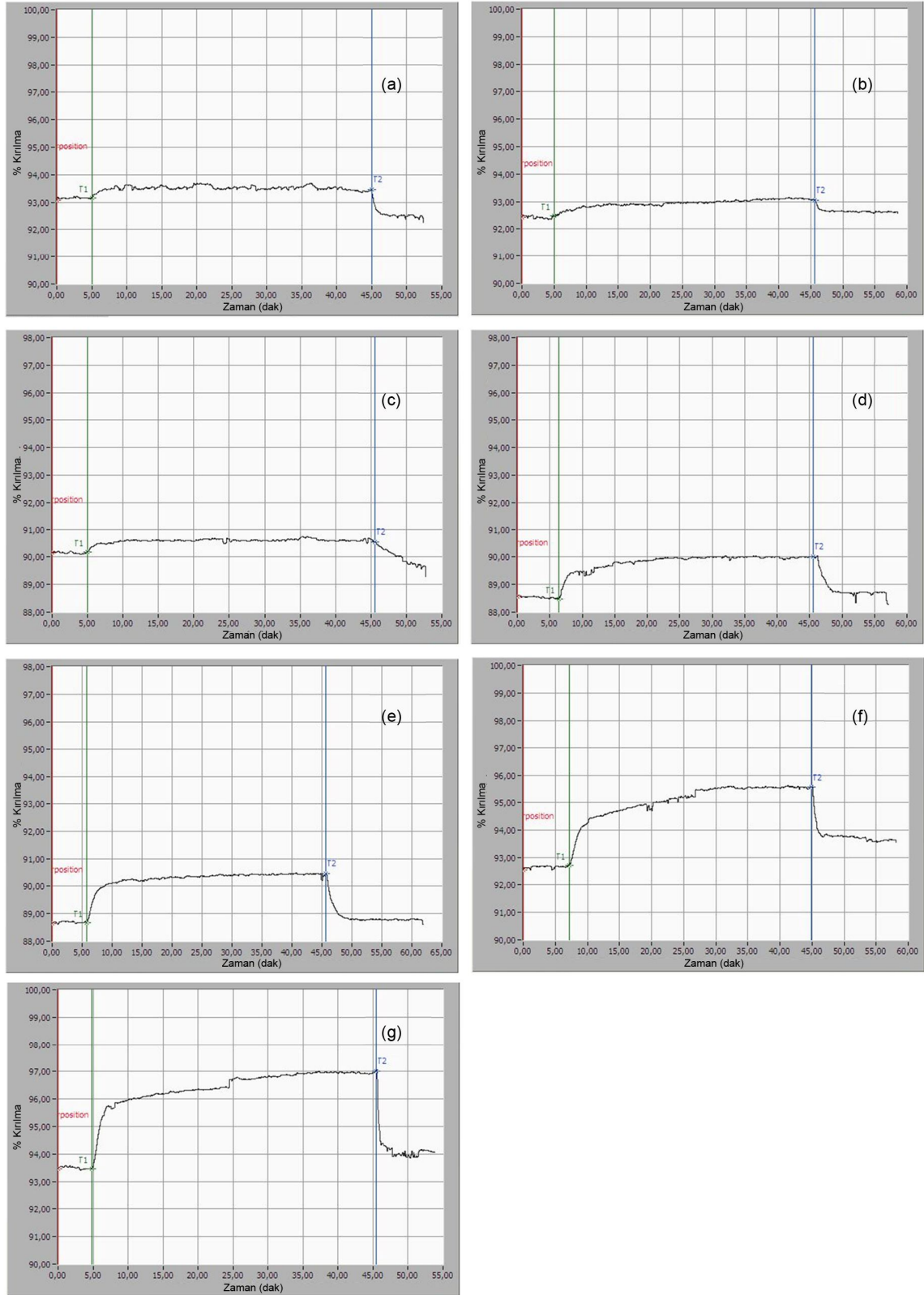
4.4. SPR Sensörlerle Kinetik Analizler

4.4.1. F_{ab} Derişim Çalışması

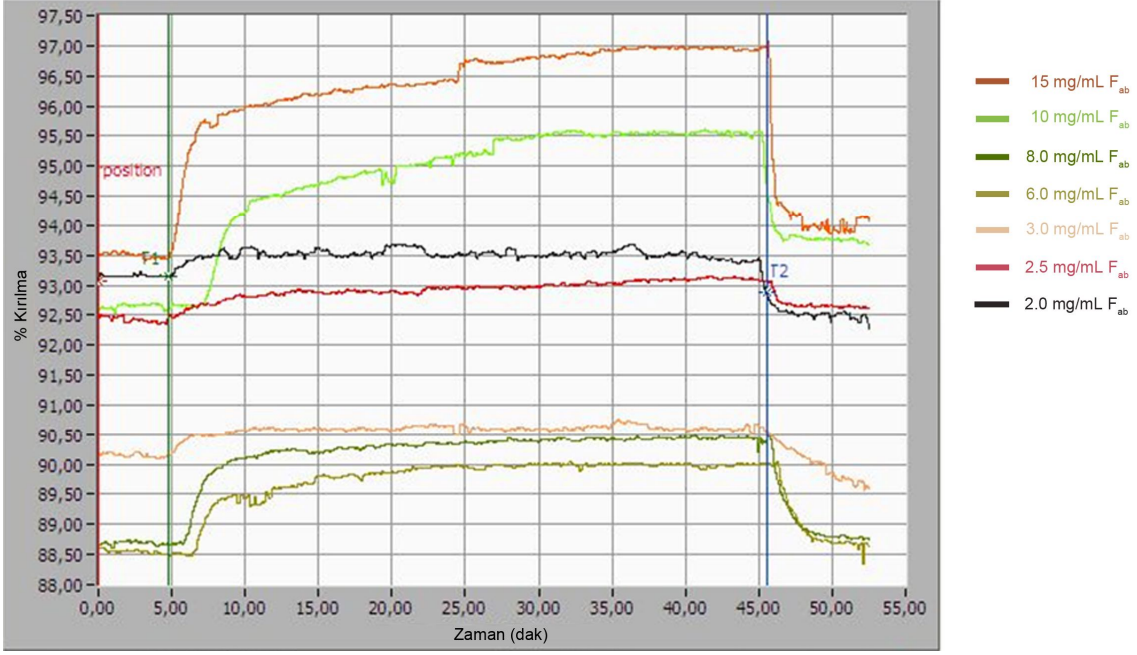
Biyomoleküllerin tayininde sıklıkla kullanılan enzim, radyo veya floresan işaretleme yöntemlerinden farklı olarak SPR temelli biyosensörler, herhangi bir işaretleme gerek duyulmadan kullanılabilirler (Homola, 2003). İşaretleme işleminin yapılmaması hem zaman kazandırmakta hem de maliyeti düşürmektedir. İşaretleyici moleküllerin ortamda bulunan diğer moleküllerle etkileşiminden dolayı yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir. SPR temelli biyosensörlerin kullanılmasıyla bu sorunlar giderilebilmektedir (Cooper ve ark., 2003). 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 (Homola, 2008).

Bu çalışma kapsamında F_{ab} fragmanları baskılanmış SPR sensörü hazırlanmıştır. SPR sinyali ile F_{ab} derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (2-15 mg/mL) F_{ab} çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığıyla SPR sensörüyle etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alınmıştır. Şekil 4.13'de farklı derişimlerde F_{ab} çözeltilerinden elde edilen sensorgramlar verilmektedir.

Şekil 4.13.'de değişik derişimlerde F_{ab} çözeltilerinin sensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi yüzeye F_{ab} uygulanmasıyla birlikte % kırılma değeri artmaktadır. Şekil 4.14.'de tüm grafikler birlikte verilmiştir. Standart bir ölçümde; sistemden öncelikle denge tamponu daha sonra sistem yeniden dengeye ulaşana kadar F_{ab} çözeltisi geçirilmiş ve son aşamada desorpsiyon çözeltisi kullanılmıştır. Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için yaklaşık 40 dakika beklenmiştir. Desorpsiyon ve rejenerasyon işlemleri yaklaşık 5 dakika içinde gerçekleştirilmiştir.



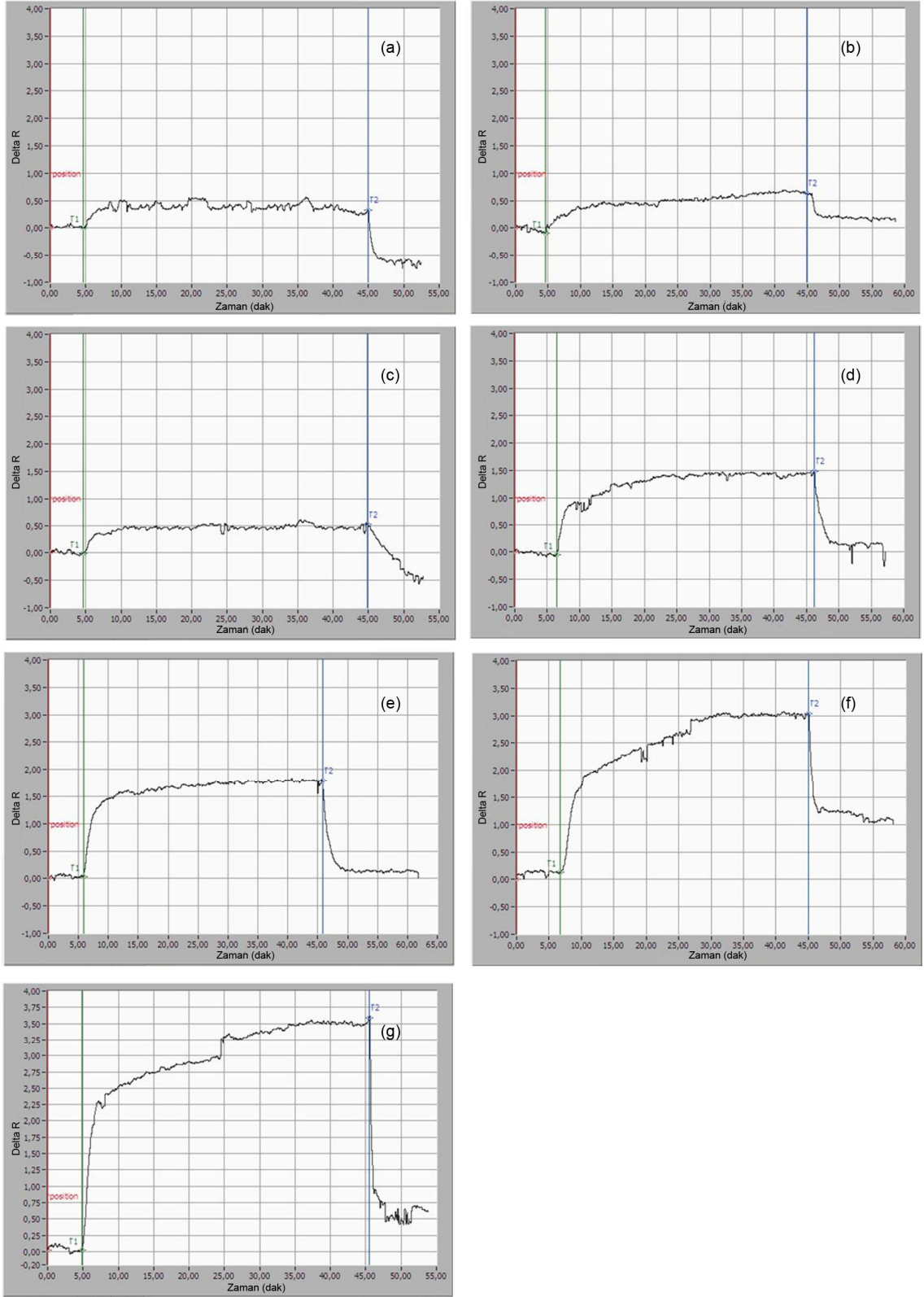
Şekil 4.13. F_{ab} çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. (a) 2.0 mg/mL; (b) 2.5 mg/mL; (c) 3.0 mg/mL; (d) 6.0 mg/mL; (e) 8.0 mg/mL; (f) 10.0 mg/mL; (g) 15.0 mg/mL derişimlerinde hazırlanmış F_{ab} çözeltileri.



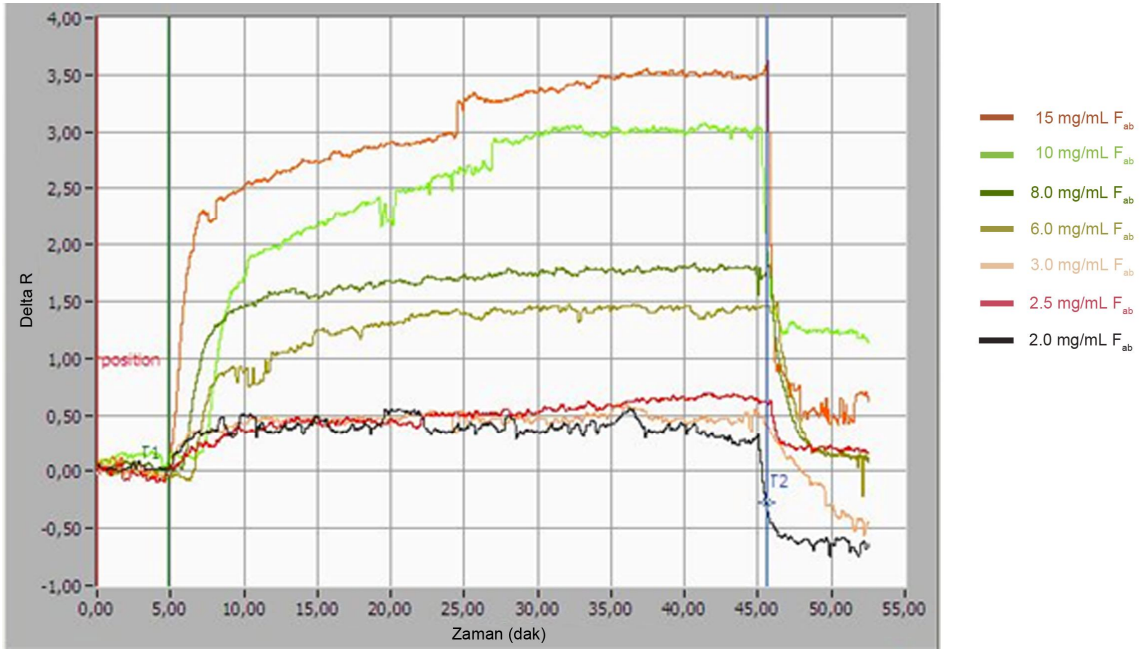
Şekil 4.14. F_{ab} çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı %kırılma değerleri.

Derişimdeki artışla birlikte %kırılma değerindeki artışın daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak çözelti ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artması gösterilebilir. Cherif ve ark. (2006) yüzey plazmon rezonans görüntüleme temelli yeni nesil peptid çipler hazırlamışlardır. Protein-peptid etkileşimlerini inceledikleri çalışmada seyreltme faktörünü 1/100'den 1/1000'e çıkardıklarında rezonans sinyalinde yaklaşık 4 kat azalma rapor etmişlerdir (Cherif ve ark., 2006).

Verilerin daha duyarlı değerlendirilebilmesi için yaygın olarak anlık % kırılma değeri ile başlangıç % kırılma değeri arasındaki farkı gösteren ΔR değerleri kullanılmaktadır (Uzun ve ark., 2009(b)). Şekil 4.15.'de farklı derişimlerdeki F_{ab} çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR değişimlerini gösteren sensorgramlar verilmektedir.



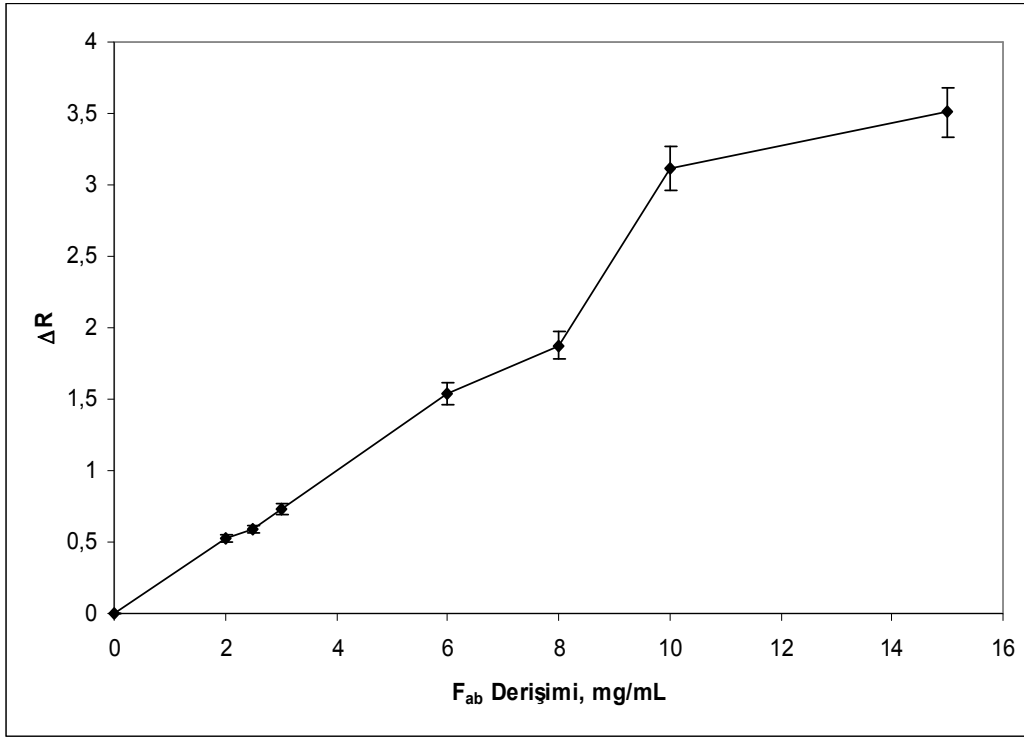
Şekil 4.15. F_{ab} çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensogramlar. (a) 2.0 mg/mL; (b) 2.5 mg/mL; (c) 3.0 mg/mL; (d) 6.0 mg/mL; (e) 8.0 mg/mL; (f) 10.0 mg/mL; (g) 15.0 mg/mL derişimlerinde hazırlanmış F_{ab} çözeltileri.



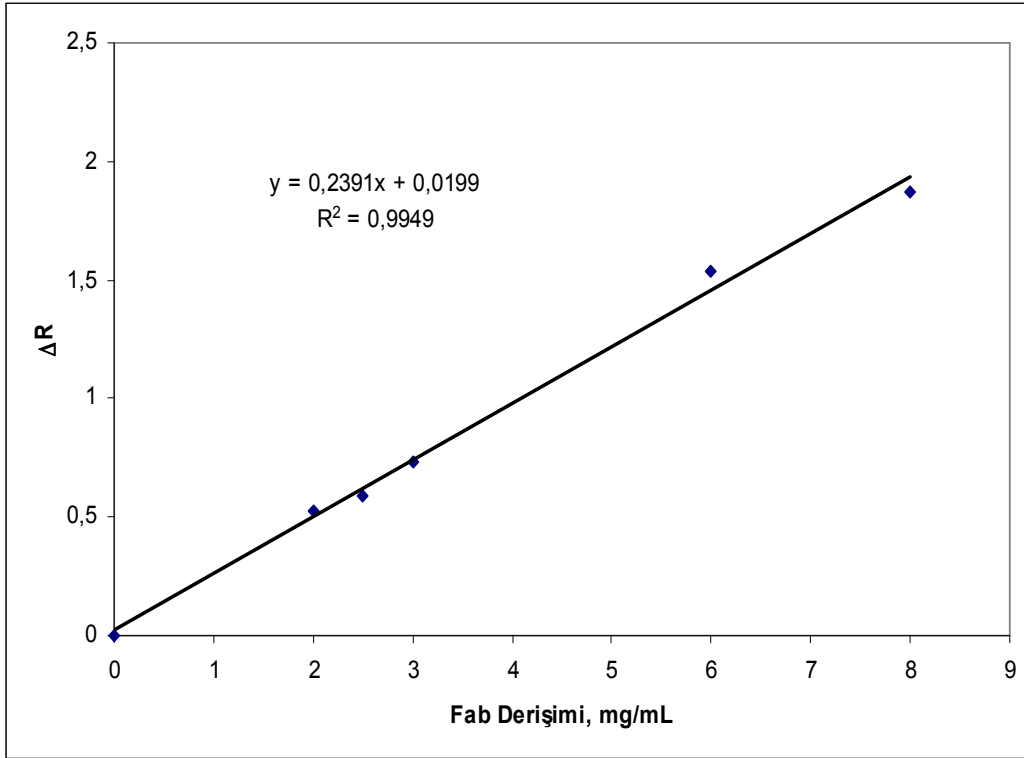
Şekil 4.16. F_{ab} çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensorgramlar.

Şekil 4.16'da görüldüğü gibi bütün ΔR 'ye karşılık zaman grafikleri birlikte çizdirildiğinde % kırılmaya karşılık zaman grafiklerine göre daha kolay incelenebilmektedir. Şekil 4.16'da görüldüğü gibi F_{ab} derişimi arttıkça ΔR değerlerinin de arttığı daha açık bir şekilde görülmektedir. Yaklaşık 10 mg/mL derişim değerinden sonra yüzeydeki aktif bölgelerin dolmasına bağlı olarak bu artış hızı azalmakta ve dengeye ulaşılmaktadır.

Şekil 4.17 (a)'da görüldüğü gibi ΔR değeri derişim arttıkça artmaktadır. ΔR değeri yaklaşık 10 mg/mL civarında dengeye ulaşmıştır. Şekil 4.17 (b)'de görüldüğü gibi 0-8 mg/mL aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y = 0.2391x + 0.0199$) ve doğrusallığı (R^2) 0.9949 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre; F_{ab} molekülleri baskılanmış bölgeye yüksek afinite ile bağlanmaktadır (Toyama ve ark., 1998). Başka bir deyişle; hazırlanan sensör, 0-8 mg/mL aralığında % 99.49 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir.



(a)



(b)

Şekil 4.17. F_{ab} baskılanmış SPR sensöre ait F_{ab} derişimi ile ΔR arasındaki ilişki.

4.4.1.1. Kinetik Analizler

- *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 hücresinde 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 (mg/mL), k_a , bağlanma hız sabiti (mL/mg.s) ve k_d , ayrılma hız sabiti (1/s)'dir. Bağlanma sabiti K_A (mL/mg), k_a ve k_d sabitlerinin oranından hesaplanır ($K_A = k_a/k_d$). Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ alınarak eşitlik basitleştirilir:

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

Bundan dolayı, bağlanma sabiti K_A , $\Delta R_{denge}/C$ 'ye karşı ΔR_{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 ΔR 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 doyunluğa erіştirmek için çok yüksek analit derişimlerine gerek olduğu için R_{maks} 'ın 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 ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleri ile ilişkili bir eğim değeri (S) vermektedir:

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

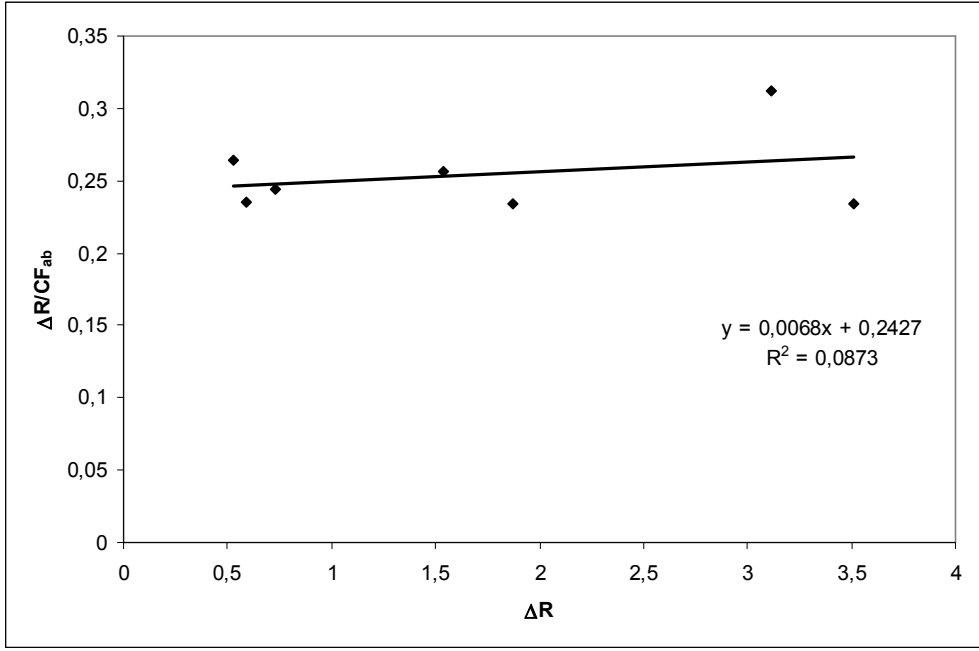
S'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru vermektedir. Teorik olarak kesim noktası k_d değerini vermektedir. Fakat, $k_a C \gg k_d$ olduğu durumlarda k_d hesaplaması için bu yöntem çok güvenilir değildir. Daha güvenilir yöntem, ayrılma kinetiğinin incelenmesidir.

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

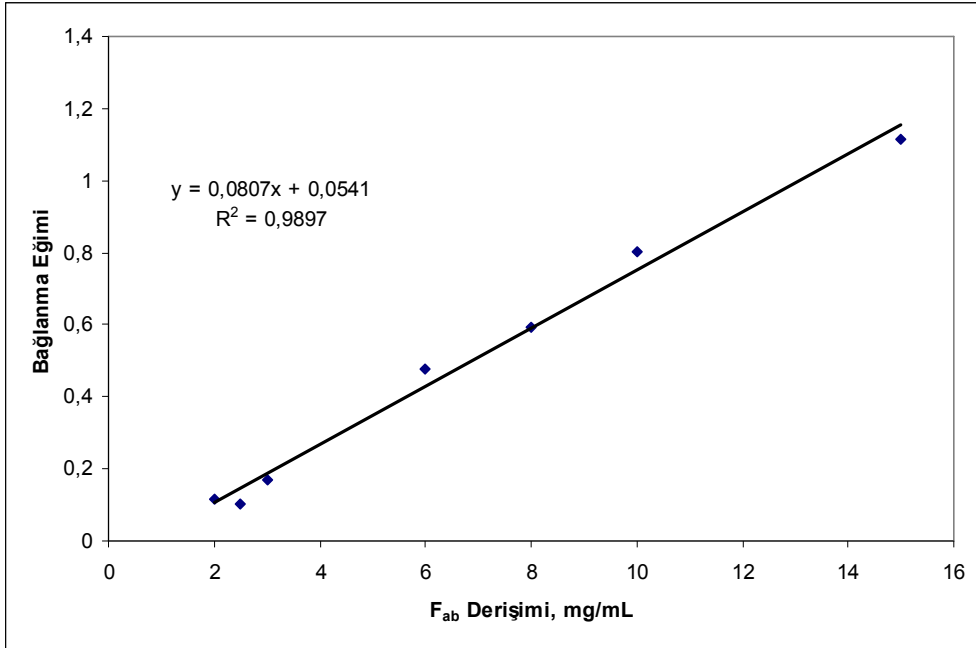
Burada; ΔR_0 ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir (Lin ve ark., 2005). Şekil 4.18'de denge analizi ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Bu doğrulara ait denklemlerden hesaplanan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri.

Denge Analiz (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
ΔR_{maks}	35.69	k_a , mg/mL.s	0.0807
K_A , mg/mL	0.0068	k_d , 1/s	0.0541
K_D , mL/mg	147.1	K_A , mg/mL	1.49
R^2	0.0873	K_D , mL/mg	0.671
		R^2	0.9897



(a)



(b)

Şekil 4.18. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı.

4.4.1.2. Denge İzoterm Modelleri

F_{ab} fragmanları baskılanmış SPR sensörü ile F_{ab} fragmanları arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla, Scatchard, Langmuir; Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri olmak üzere dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır.

$$\text{Scatchard} \quad \Delta R_{\text{denge}} / [C] = K_A(\Delta R_{\text{maks}} - \Delta R_{\text{denge}}) \quad (4.6)$$

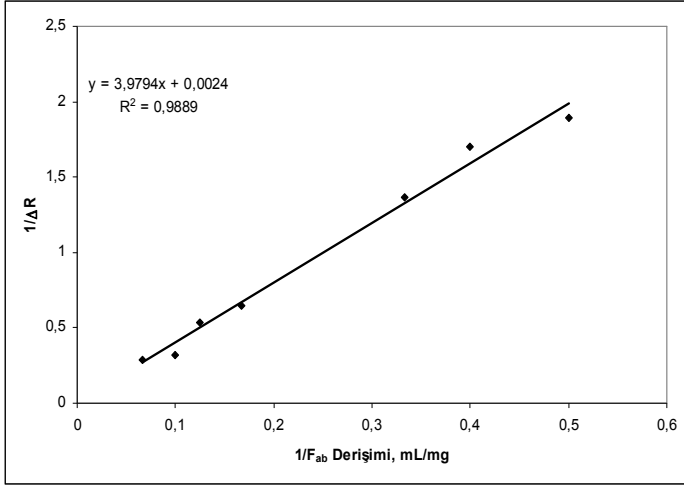
$$\text{Langmuir} \quad \Delta R = \{\Delta R_{\text{maks}}[C]/K_D + [C]\} \quad (4.7)$$

$$\text{Freundlich} \quad \Delta R = \Delta R_{\text{maks}}[C]^{1/n} \quad (4.8)$$

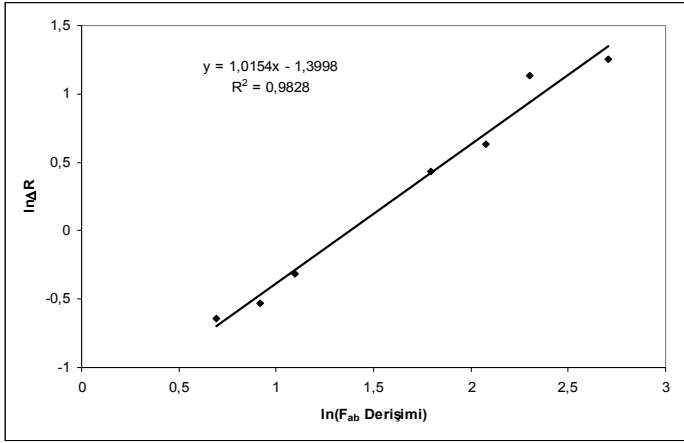
$$\text{Langmuir-Freundlich} \quad \Delta R = \{\Delta R_{\text{maks}}[C]^{1/n}/K_D + [C]^{1/n}\} \quad (4.9)$$

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

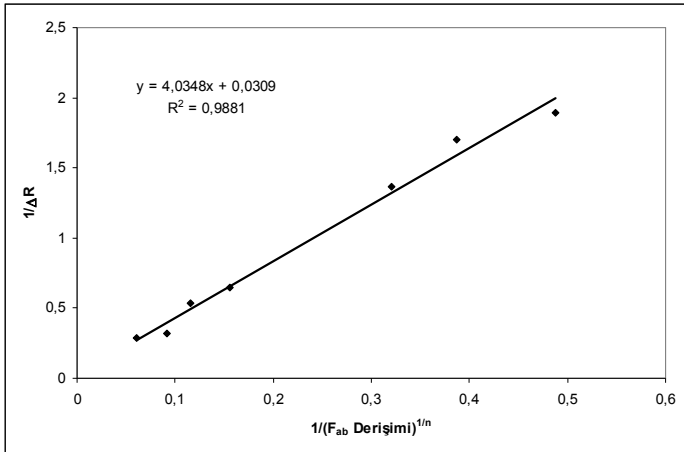
Langmuir adsorpsiyon modeli homojen, Freundlich adsorpsiyon modeli ise heterojen bağlanma varsayımına dayanır. Langmuir modeli, moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı bağlanma izotermelerinde yaygın olarak kullanılmıştır (Li ve Husson, 2006). Moleküler baskılanmış polimerlerin heterojen bağlanma bölgeleri de içerdiği rapor edilmiştir (Umpleby ve ark., 2001; Wei ve ark., 2005). Freundlich adsorpsiyon modeli, özellikle düşük derişimlerde MIP sistemlerine uygunluk göstermektedir (Umpleby ve ark., 2001). Fakat bu model, yüksek derişim değerlerinde bazı sapmalar göstermektedir. Bu sapmaları engellemek için Langmuir-Freundlich ikili modeli kullanılabilir. Bu model, heterojenite olduğu durumda çok düşük derişimlerden doygunluğa kadar MIP sistemleriyle uygunluk göstermektedir (Wei ve ark., 2005). Şekil 4.19'da Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modellerine ait grafikler verilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.19. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.

Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri.

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{maks} , mg/mL	416.6	ΔR_{maks} , mg/mL	4.054	ΔR_{maks} , mg/mL	32.37
K_D , mL/mg	1658	1/n	0.1893	1/n	0.1893
K_A , mg/mL	6.03×10^{-4}	R^2	0.9828	K_D , mL/mg	130.6
R^2	0.9889			K_A , mg/mL	7.66×10^{-3}
				R^2	0.9881

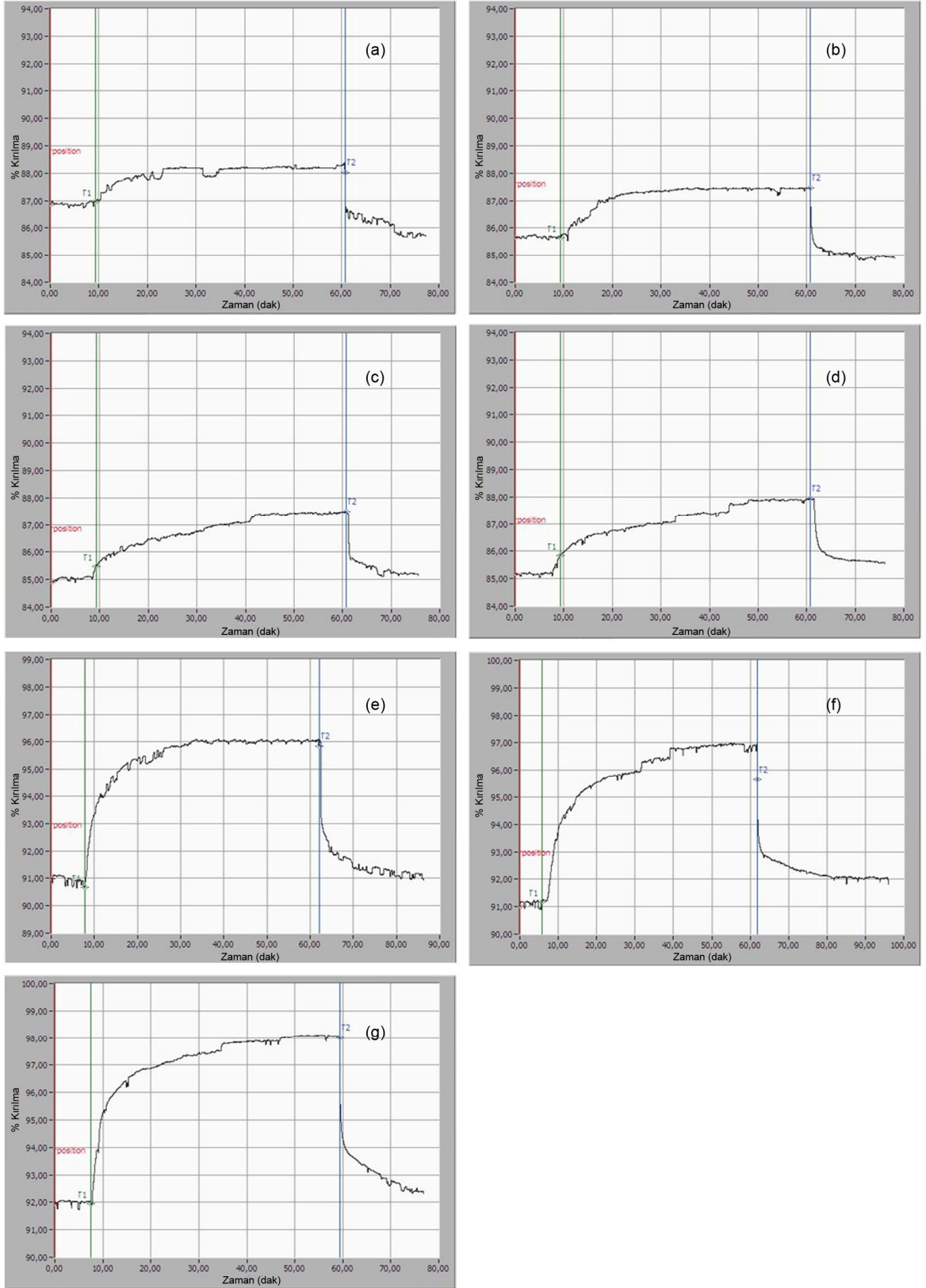
Şekil 4.19'a göre deneysel olarak elde edilen veriler Langmuir modeli ile en uyumludur ($R^2 = 0.9889$). Bu sonuç; hazırlanan baskılanmış sensör yüzeyindeki F_{ab} bağlanma bölgelerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 ve 4.3 birlikte incelendiğinde Langmuir modelinin hazırlanan sensörlere en uygun izoterm modeli olduğu görülmüştür.

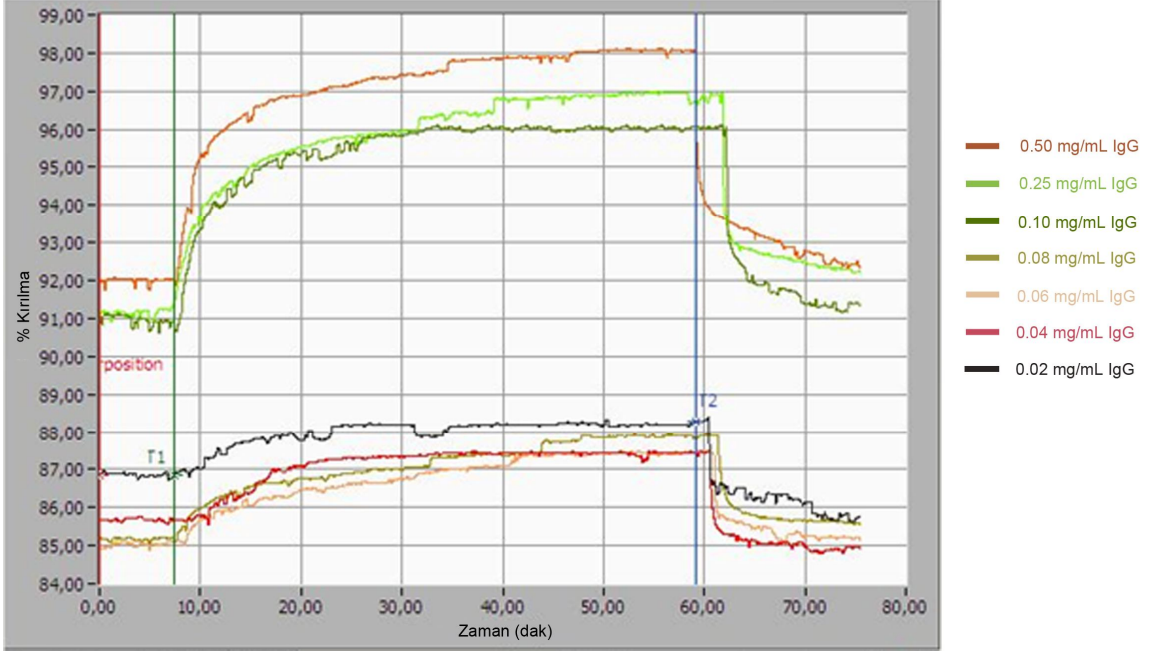
4.4.2. IgG Derişim Çalışması

Bu çalışma kapsamında IgG tayini için F_{ab} fragmanları baskılanmış SPR sensörü hazırlanmıştır. SPR sinyali ile IgG derişimi arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı derişimlerde (0.02-0.5 mg/mL) IgG çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler peristaltik pompa aracılığıyla SPR sensörüyle etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler alınmıştır. Şekil 4.20'de farklı derişimlerde IgG çözeltilerinden elde edilen sensorgramlar verilmektedir.

Şekil 4.20'de değişik derişimlerde IgG çözeltilerinin sensörlere uygulanması ile elde edilen % kırılmaya karşılık zaman grafikleri verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi yüzeye IgG uygulanmasıyla birlikte % kırılma değeri artmaktadır.



Şekil 4.20. IgG çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. (a) 0.02 mg/mL; (b) 0.04 mg/mL; (c) 0.06 mg/mL; (d) 0.08 mg/mL; (e) 0.10 mg/mL; (f) 0.25 mg/mL; (g) 0.50 mg/mL derişimlerinde hazırlanmış IgG çözeltileri.

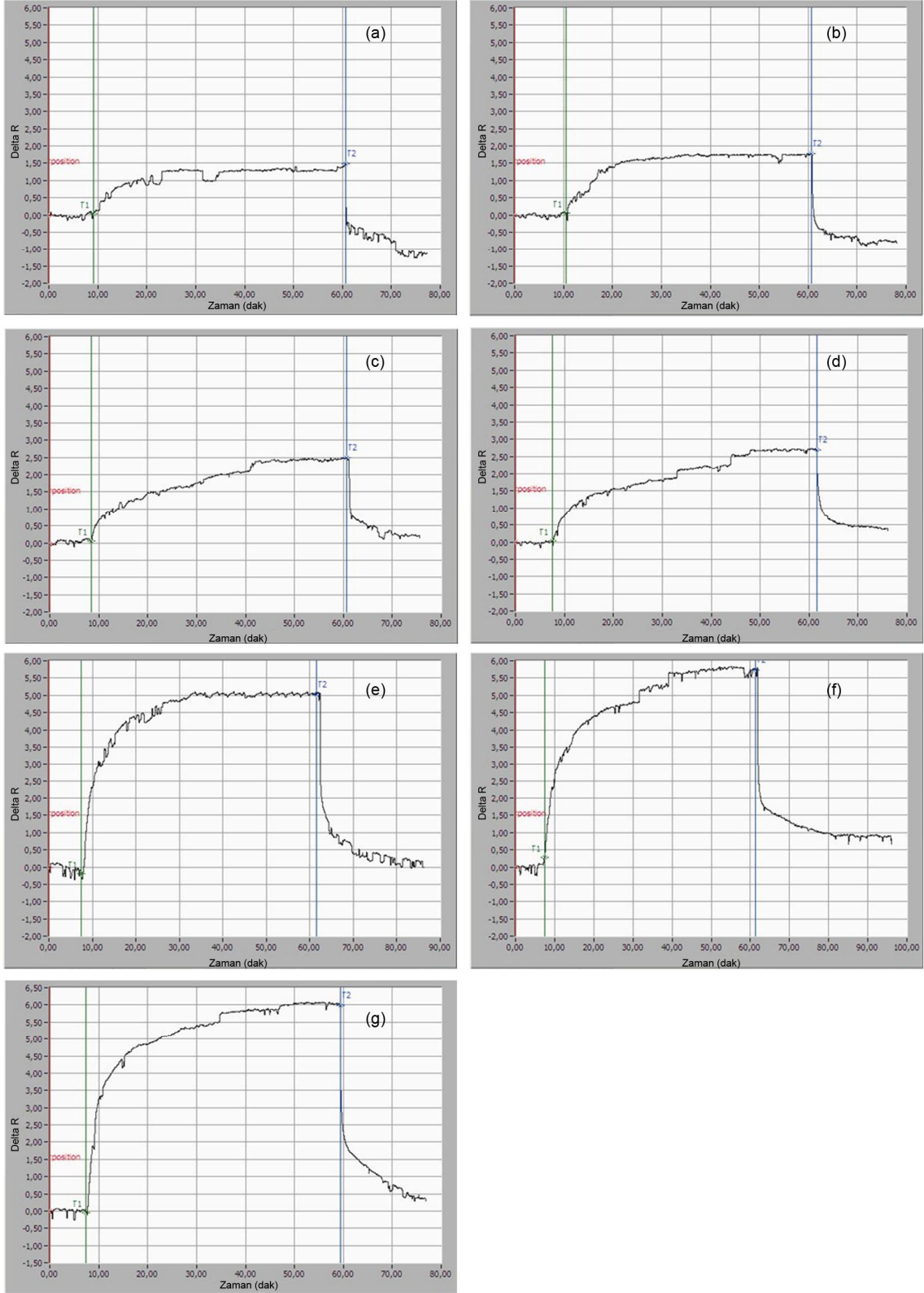


Şekil 4.21. IgG çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı %kırılma değerleri.

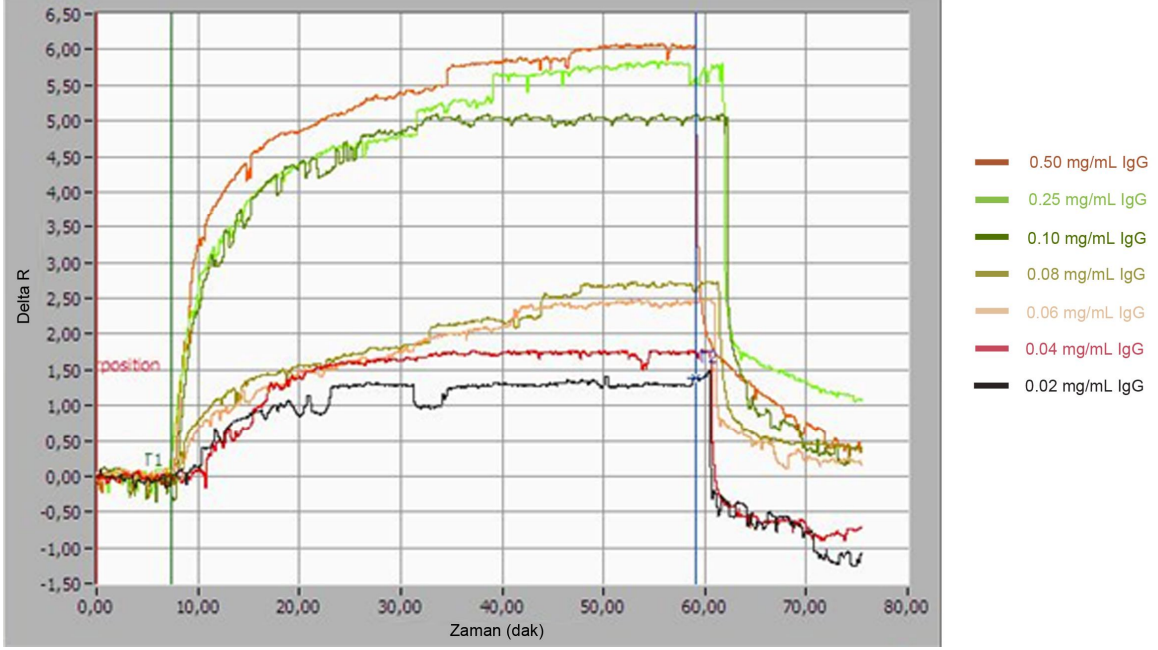
Şekil 4.21'de tüm grafikler birlikte verilmiştir. Standart bir ölçümde; sistemden öncelikle denge tamponu daha sonra sistem yeniden dengeye ulaşana kadar IgG çözeltisi geçirilmiş ve son aşamada desorpsiyon çözeltisi kullanılmıştır. Bütün ölçümlerde sistemin dengeye ulaşması için yaklaşık 50 dakika beklenmiştir. Desorpsiyon ve rejenerasyon işlemleri yaklaşık 10 dakika içinde gerçekleştirilmiştir.

Derişimdeki artışla birlikte %kırılma değerindeki artışın daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak çözelti ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artması gösterilebilir.

Şekil 4.22'de farklı derişimlerdeki IgG çözeltilerinden elde edilen zamana karşı ΔR değişimlerini gösteren sensorgramlar verilmektedir.



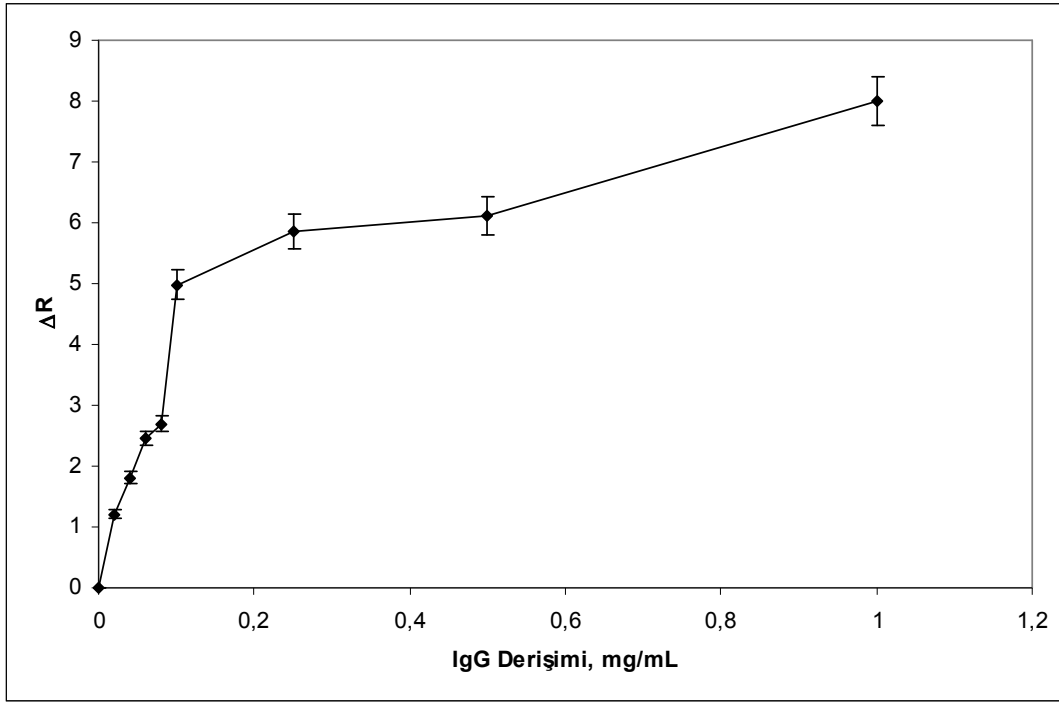
Şekil 4.22. IgG çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensogramlar. (a) 0.02 mg/mL; (b) 0.04 mg/mL; (c) 0.06 mg/mL; (d) 0.08 mg/mL; (e) 0.1 mg/mL; (f) 0.25 mg/mL; (g) 0.50 mg/mL derişimlerinde hazırlanmış IgG çözeltileri.



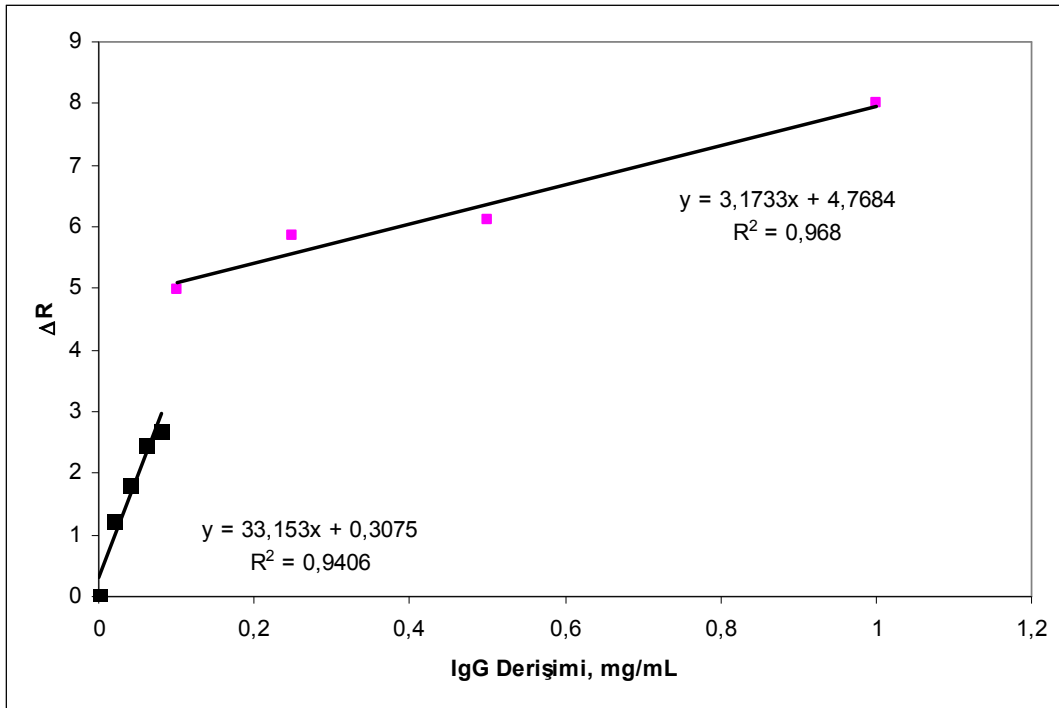
Şekil 4.23. IgG çözeltileri ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensorgramlar.

Şekil 4.23'te görüldüğü gibi bütün ΔR 'ye karşılık zaman grafikleri birlikte çizdirildiğinde % kırılmaya karşılık zaman grafiklerine göre (Şekil 4.20) daha kolay incelenebilmektedir. Şekil 4.23'te IgG derişimi arttıkça ΔR değerlerinin de arttığı daha açık bir şekilde görülmektedir. Yaklaşık 0.50 mg/mL derişim değerinden sonra yüzeydeki aktif bölgelerin dolmasına bağlı olarak bu artış hızı azalmakta ve dengeye ulaşılmaktadır.

Şekil 4.24 (a)'da görüldüğü gibi ΔR değeri derişim arttıkça artmaktadır. ΔR değeri yaklaşık 0.50 mg/mL civarında dengeye ulaşmıştır. Şekil 4.24 (b)'de görüldüğü gibi SPR sensörü, iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. Şekil 4.24 (b)'de görüldüğü gibi 0-1.0 mg/mL aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğruların denklemleri ($y = 33,153x + 0,3075$), ($y = 3,1733x + 4,7684$) ve doğrusallıkları (R^2) sırasıyla 0.9406 ve 0.968 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre; IgG molekülleri iki farklı bölgeden yüksek afinite ile bağlanmaktadır (Toyama ve ark., 1998). Başka bir deyişle; hazırlanan sensör, 0-0.08 mg/mL derişim aralığını % 94, 0.1-1.0 mg/mL aralığında derişim değerini ise % 96 doğrulukta ölçebilmektedir.



(a)



(b)

Şekil 4.24. F_{ab} baskılanmış SPR sensöre ait IgG derişimi ile ΔR arasındaki ilişki.

4.4.2.1. Kinetik ve Denge Analizleri

- Kinetik Analizler

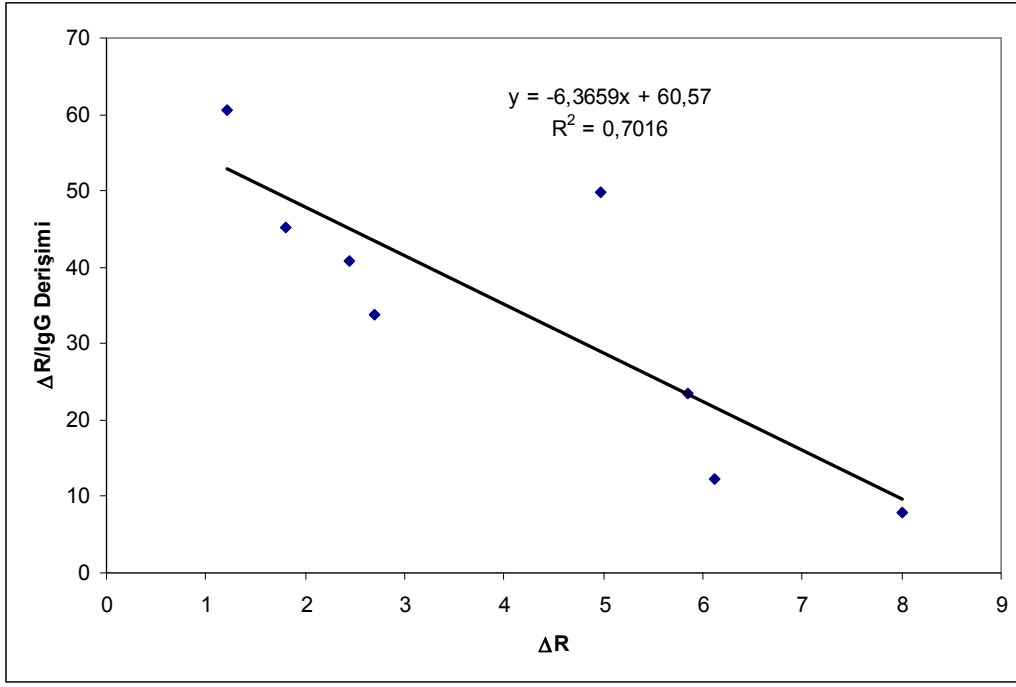
F_{ab} fragmanları baskılanmış SPR sensörlerin IgG tayin özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, sensörler farklı derişimlerde IgG çözeltileri ile etkileştirilmiştir. Elde edilen IgG sensorgramlarına matematiksel denklemler uygulanarak kinetik ve denge analizleri gerçekleştirilmiştir. Kinetik analiz sonuçları Şekil 4.25 ve Çizelge 4.4'de verilmiş, denge analiz sonuçları ise Şekil 4.26 ve Çizelge 4.5'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.4. Kinetik hız sabitleri.

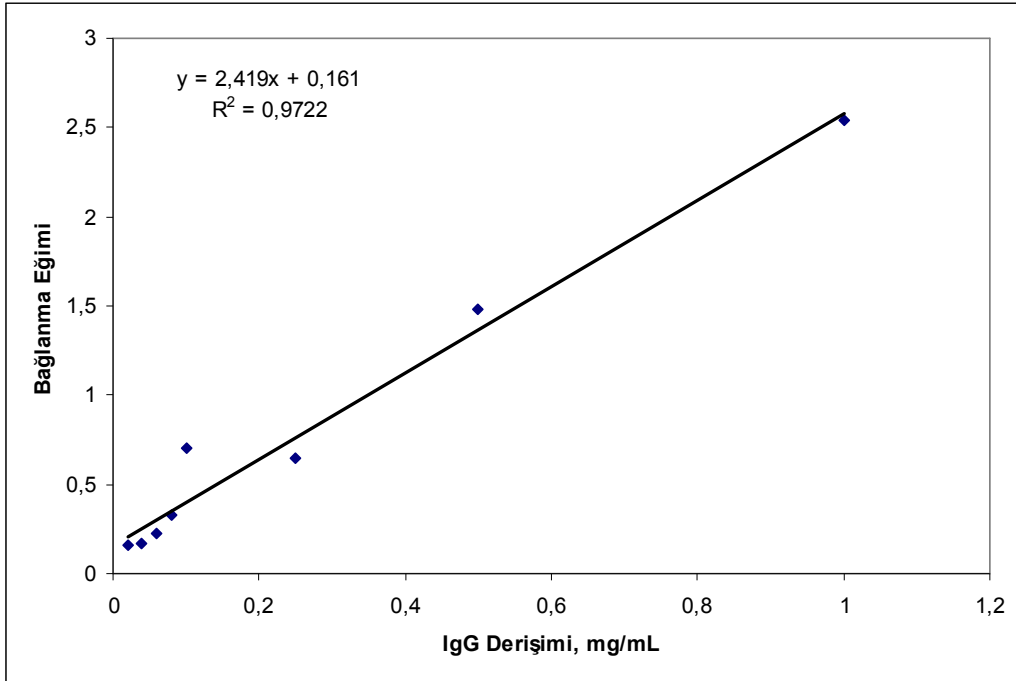
Denge Analiz (Scatchard)		Bağlanma Kinetik Analizi	
ΔR_{mak}	9.515	$k_a, \mu\text{g/ml.s}$	2.419
$K_A, \mu\text{g/ml}$	6.3659	$k_d, 1/\text{s}$	0.161
$K_D, \text{ml}/\mu\text{g}$	0.1571	$K_A, \mu\text{g/ml}$	15.025
R_2	0.7016	$K_D, \text{ml}/\mu\text{g}$	0.0666
		R^2	0.9722

- Denge İzoterm Modelleri

F_{ab} fragmanları baskılanmış SPR sensörü ile IgG arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla, Scatchard, Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) modelleri olmak üzere dört farklı izoterm modeli uygulanmıştır.

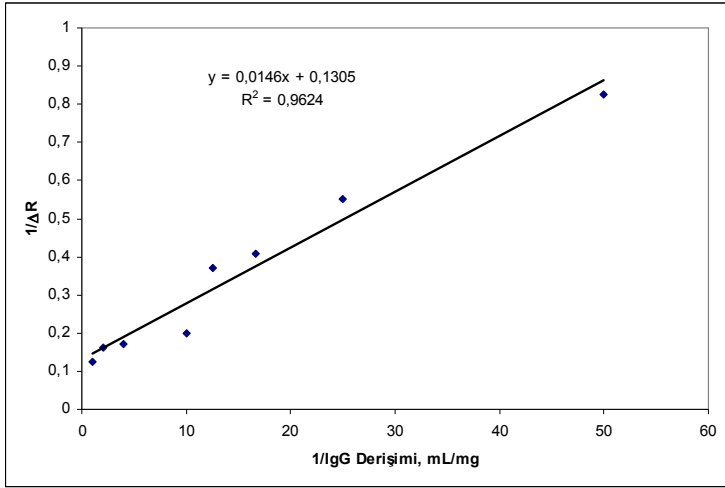


(a)

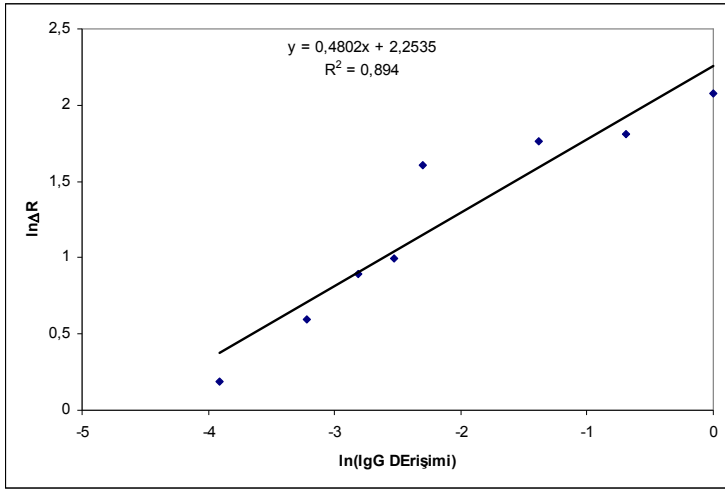


(b)

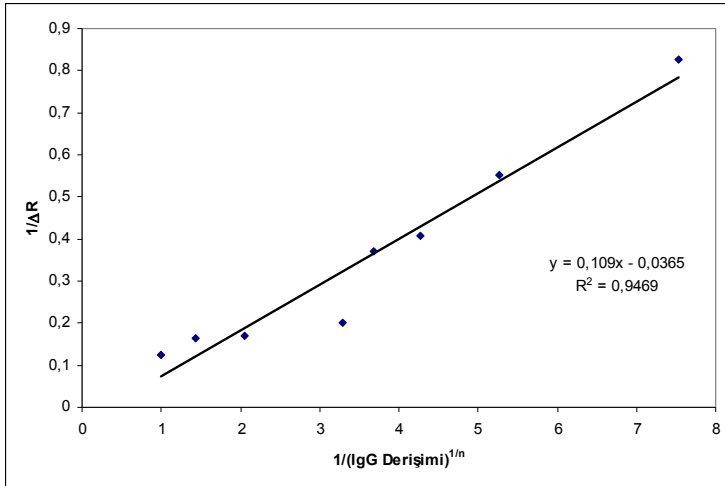
Şekil 4.25. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. (a) Denge analiz yaklaşımı (Scatchard); (b) Bağlanma kinetik yaklaşımı.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.26. Adsorpsiyon modelleri. (a) Langmuir; b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich.

Çizelge 4.5. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri

Langmuir		Freundlich		Langmuir-Freundlich	
ΔR_{maks} , mg/mL	7.67	ΔR_{maks} , mg/mL	9.52	ΔR_{maks} , mg/mL	27.43
K_D , mL/mg	0.112	1/n	0.1893	1/n	0.1893
K_A , mg/mL	8.929	R^2	0.894	K_D , mL/mg	2.99
R^2	0.9624			K_A , mg/mL	0.334
				R^2	0.9469

Şekil 4.26'ya göre deneysel olarak elde edilen veriler IgG tayininde de Langmuir modeli ile en uyumludur ($R^2 = 0.9624$). Bu sonuç; hazırlanan baskılanmış sensör yüzeyindeki IgG bağlama özelliklerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her üç izoterm modelinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5'de verilmiştir.

4.5. Yarışmalı Kinetik Analizler

BSA ve F_c fragmanlarının F_{ab} ve IgG molekülüne göre dağılıma ve seçicilik katsayıları aşağıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir:

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (4.10)$$

Eşitlikte K_d , dağılıma katsayısını (mL/g); C_i ve C_f , biyomoleküllerin başlangıç ve sonuç derişimlerini (mg/mL); V , kullanılan çözelti hacmini (mL) ve m , polimerin ağırlığını (g) ifade etmektedir. SPR sensör uygulamalarında, derişim ve kütle parametrelerinin dönüştürülmesi gerçekleştirilmektedir (Lin ve ark., 2005). Bu yaklaşımdaki temel sebepler; başlangıç ve son derişimleri arasında önemli bir fark gözlenememesi; polimerin kütesinin kesin olarak belirlenememesi ve derişimin ΔR ile doğrusal ilişkide olmasıdır.

Bu durumda; seçicilik katsayısı,

(4.11)

$$k = \Delta R_{\text{kalıp}} / \Delta R_{\text{girişimci}}$$

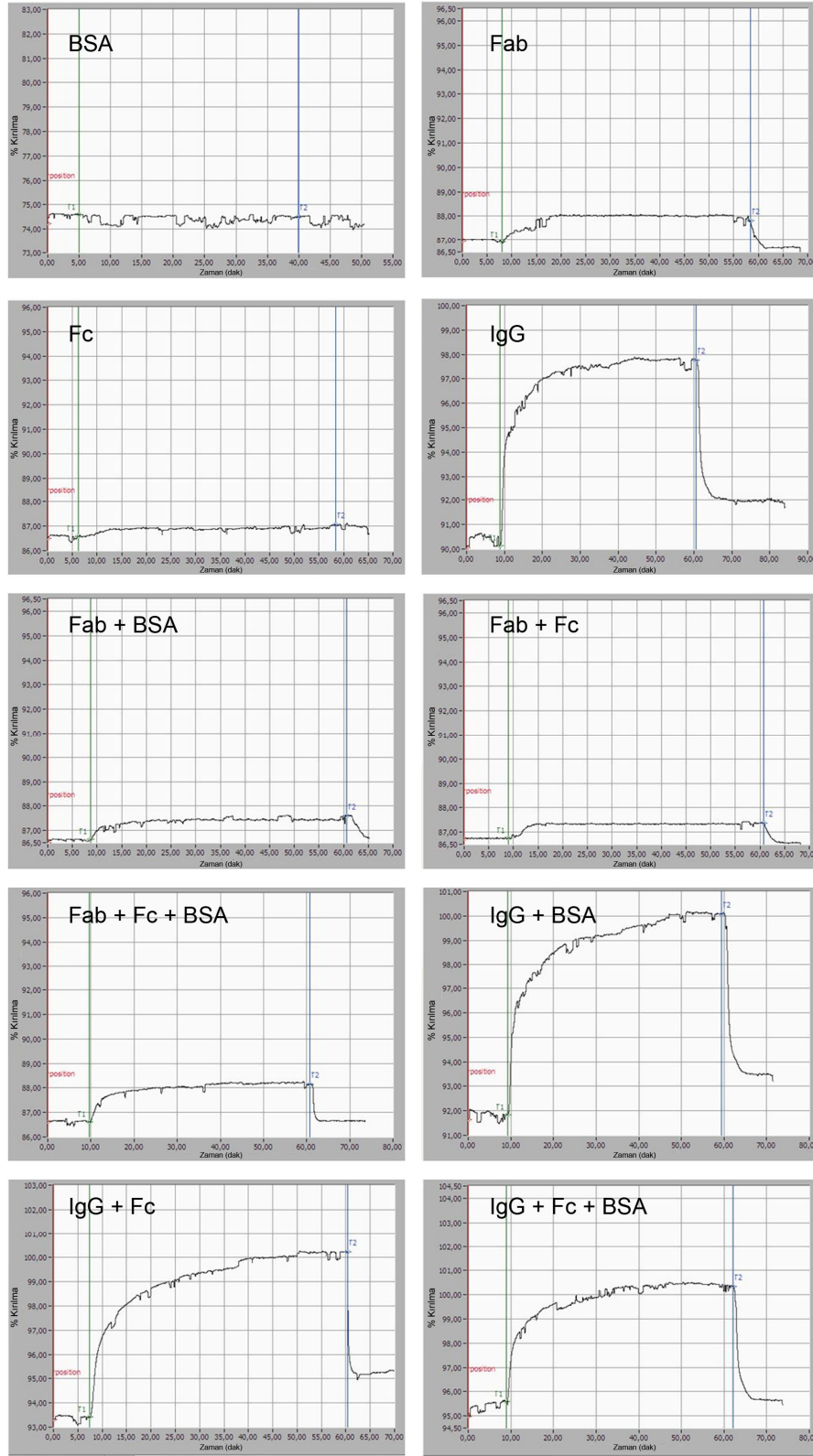
şeklinde kullanılabilir. Baskılama seçiciliğinin belirlenmesi için ise;

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}}$$

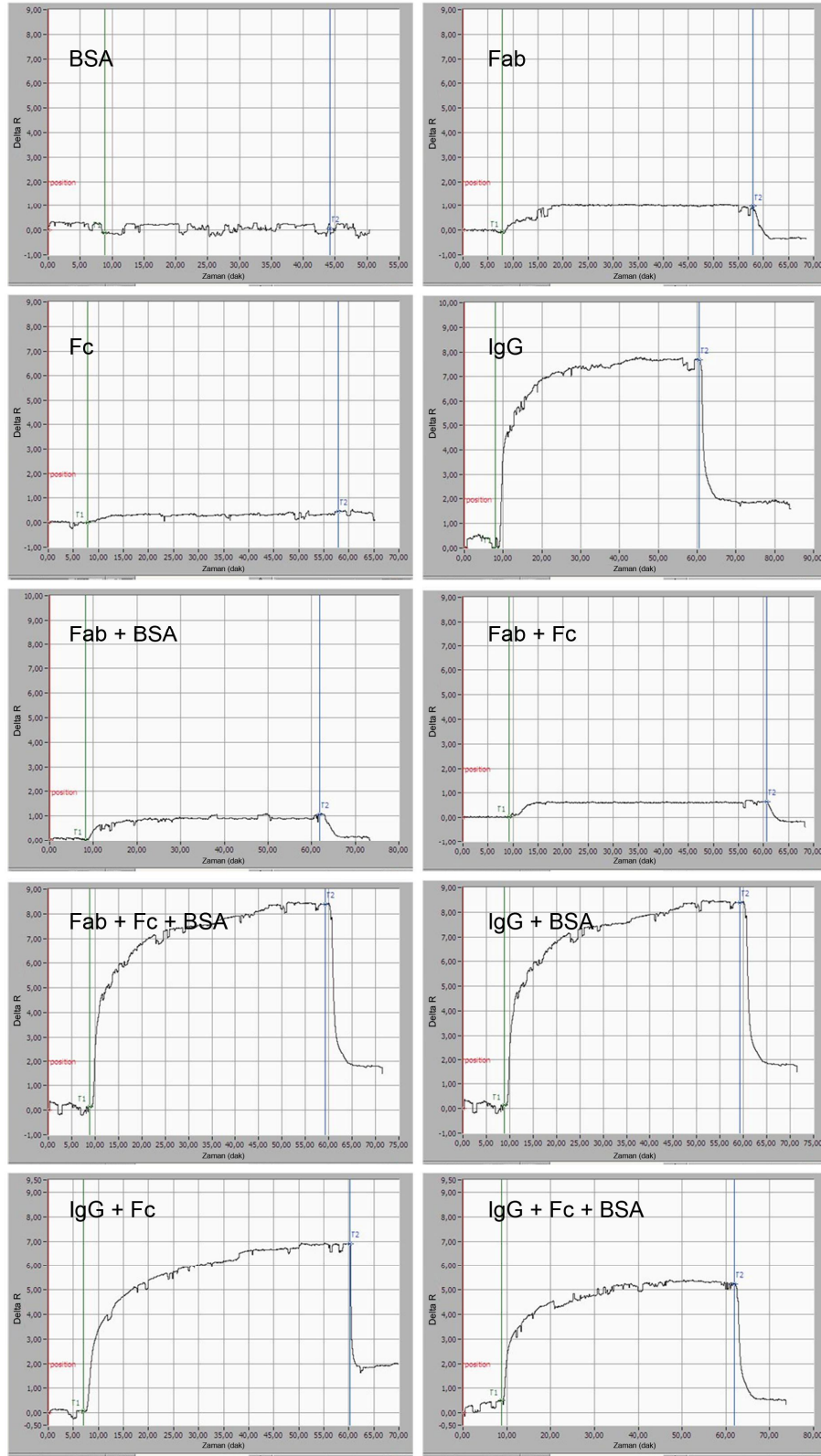
(4.12)

şeklinde ifade edilebilir.

Hazırlanan F_{ab} baskılanmış sensörün IgG'ye karşı seçiciliğinin belirlenmesi için yarışmalı adsorpsiyon deneyleri BSA, F_c fragmanları ve IgG proteinlerinin tekli, ikili ve üçlü karışım çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sensörün bu karışımlara gösterdiği tepki, Şekil 4.27'de %kırılma/zaman ve Şekil 4.28'de ΔR /zaman ilişkilerine ait sensorgramlarda görülmektedir. BSA, F_{ab} fragmanlarına yakın molekül ağırlığının olmasından, F_c fragmanları ise boyut, molekül ağırlığı ve yapı bakımından F_{ab} fragmanlarına oldukça yakın olmasından dolayı yarışmacı proteinler olarak seçilmişlerdir.



Şekil 4.27. 1.0 mg/mL derişiminde F_{ab} , IgG, sığır serum albumini (BSA) ve F_c fragmanlarının kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile F_{ab} baskılanmış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar.

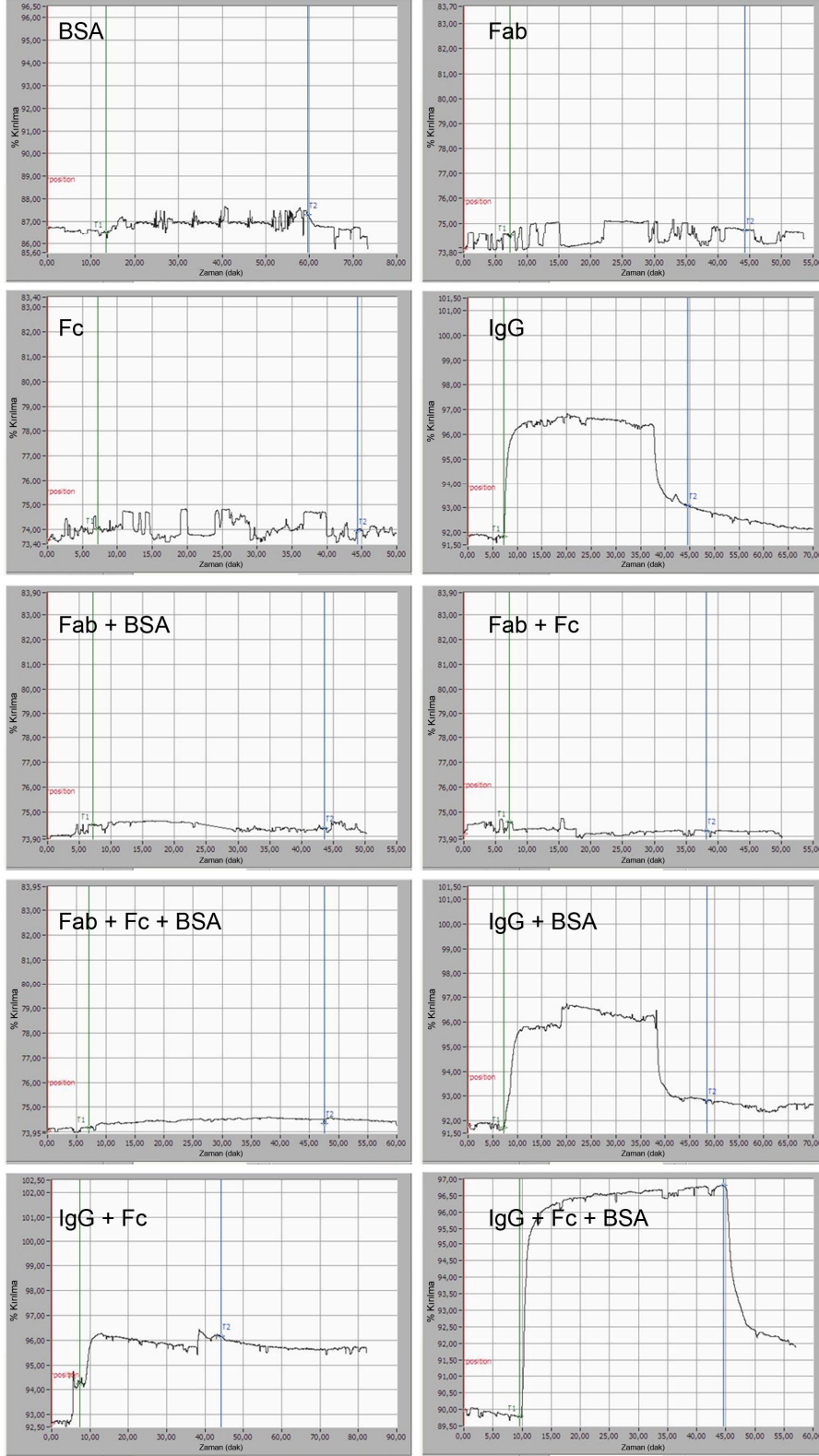


Şekil 4.28. 1.0 mg/mL derişiminde F_{ab}, IgG, siğır serum albumin (BSA) ve F_c fragmanlarının kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile F_{ab} baskılanmış SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait zamana karşı ΔR değerlerini gösteren sensorgramlar.

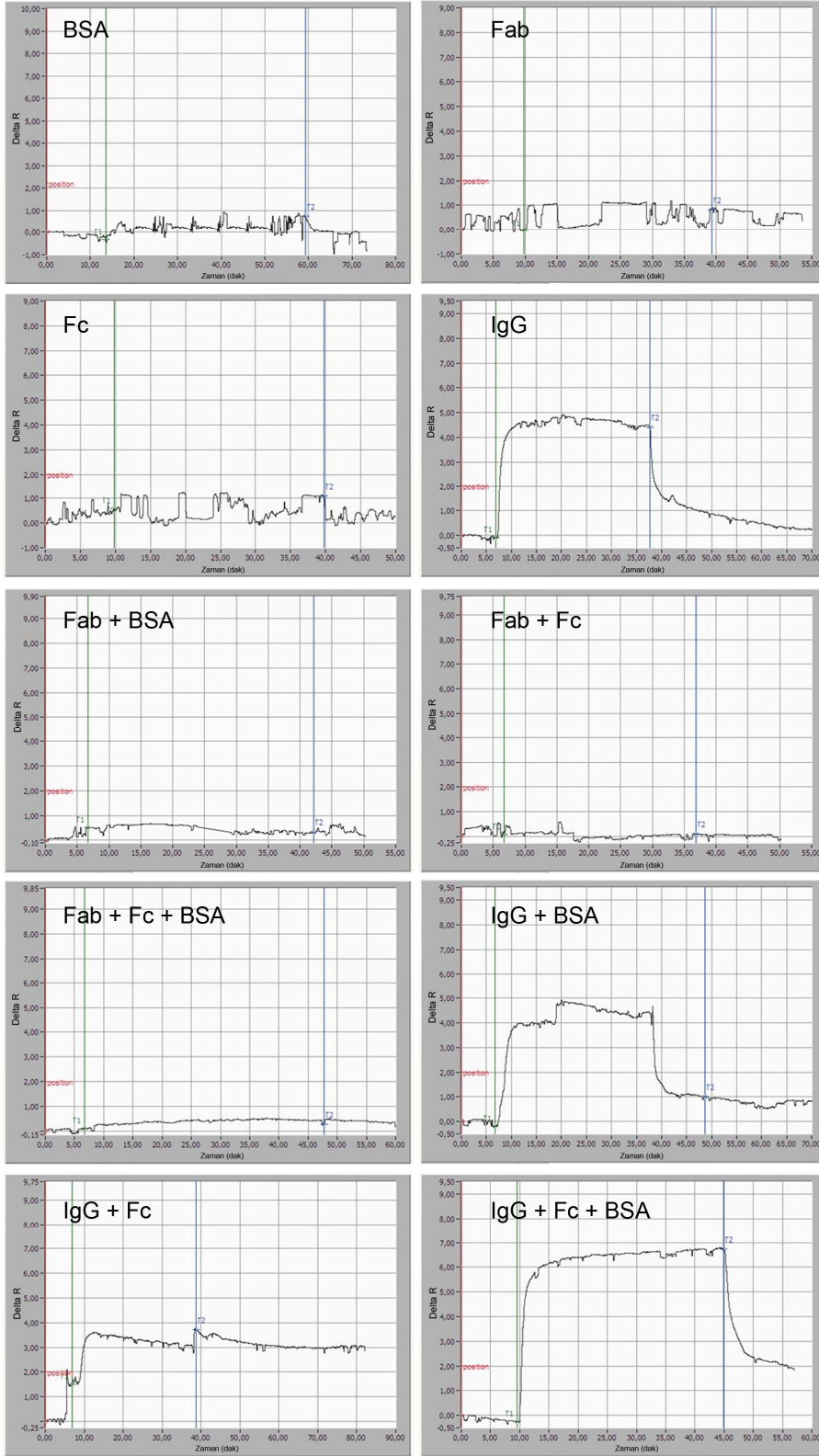
Şekil 4.27 ve 4.28 incelendiğinde; F_{ab} baskılanmış SPR sensörlerin BSA ve F_c ile herhangi bir etkileşime girmediği ve sinyal vermediği belirlenmiştir. Bu durum baskılanmış POLİ (HEMA-MAH) filmin, hem kalıp molekül olan F_{ab} 'a hem de IgG molekülüne seçici olduğunu göstermektedir. İkili ve üçlü karışımlar dikkate alındığında, hem F_{ab} içeren karışımların hem de IgG içeren karışımların gösterdiği ΔR kayma değerleri, tekli çözeltilere göre daha düşüktür. Bu durum, moleküllerin karışım halinde bir yarışmacı ajan olarak davrandığını ve ΔR kayma değerinde azalmaya sebep olduğunu göstermektedir.

4.6. F_{ab} Fragmanları Baskılanmış Sensörün Baskılama Seçiciliğinin Belirlenmesi

F_{ab} baskılanmış sensörün baskılama seçiciliğini göstermek için F_{ab} fragmanları kullanılmadan Poli (HEMA-MAH) çipi de hazırlanmıştır. F_{ab} , IgG, sığır serum albumini ve F_c fragmanlarının kullanılmasıyla oluşturulan karışımlar SPR sistemine gönderilmiştir. Bu çözeltiler fosfat tamponunda (pH: 7.0) 1 mg/mL derişiminde hazırlanmıştır. Baskılanmamış sensörün bu karışımlara gösterdiği tepki, Şekil 4.29'da %kırılma/zaman ve Şekil 4.30'da ΔR /zaman fonksiyonu olarak verilmiştir.



Şekil 4.29. 1.0 mg/mL derişiminde F_{ab} , IgG, sığır serum albumin (BSA) ve F_c fragmanlarının kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile F_{ab} baskılanmamış poli (HEMA-MAH) SPR sensörü arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. %Kırılma/zaman fonksiyonu.



Şekil 4.30. 1.0 mg/mL derişiminde F_{ab} , IgG, sığır serum albumin (BSA) ve F_c fragmanlarının kullanılmasıyla oluşturulan çözeltiler ile F_{ab} baskılanmamış poli (HEMA-MAH) SPR sensörü arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. $\Delta R/zaman$ fonksiyonu.

Şekil 4.29 incelendiğinde; F_{ab} baskılanmamış SPR sensörlerin BSA ve F_c ile herhangi bir etkileşime girmediği ve sinyal vermediği belirlenmiştir. İkili ve üçlü karışımlarda; baskılanmış SPR sensörlere benzer sonuçlar elde edildiği ve karışımların sinyal değerlerinde antagonistik bir etki olduğu görülmektedir. Baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler karşılaştırıldığında; IgG sinyalinin ΔR değerlerinin 7.90'dan 4.98'e düştüğü görülmektedir. Eşitlik 4.11 ve 4.12 kullanılarak hesaplanan seçicilik katsayıları, F_{ab} molekülüne göre; F_{ab}/IgG : 0.57, F_{ab}/BSA : 2.31, F_{ab}/F_c : 2.00 olarak hesaplanmıştır. IgG molekülüne göre seçicilik katsayıları ise; IgG/F_{ab} : 1.76, IgG/BSA : 4.07, IgG/F_c : 3.53 olarak hesaplanmıştır. Bir başka tanımla; F_{ab} baskılanmış sensör, IgG'yi F_c 'ye göre 3.53 kat, BSA'ya göre 4.07 kat seçicilikte tanımaktadır. Bağlı seçicilik değeri, 1'in ne kadar üzerinde ise baskılama işleminin o kadar etkin olduğu bilinmektedir (Zhang, Cheng ve Fu, 2002). Tirozin amino asidinin baskılandığı bir çalışmada; tirozin ile fenilalanin amino asitleri arasındaki bağlı seçicilik katsayısının 1.82 olduğu rapor edilmiştir (Zhang, Cheng ve Fu, 2002). Bereli ve ark. lizozim baskılanmış kriyojeller hazırlamışlar ve lizozimin BSA ve sitokrom c'ye göre bağlı seçicilik katsayılarını 4.6 (lizozim/BSA) ve 3.2 (lizozim/sitokrom c) olarak rapor etmişlerdir (Bereli ve ark., 2008).

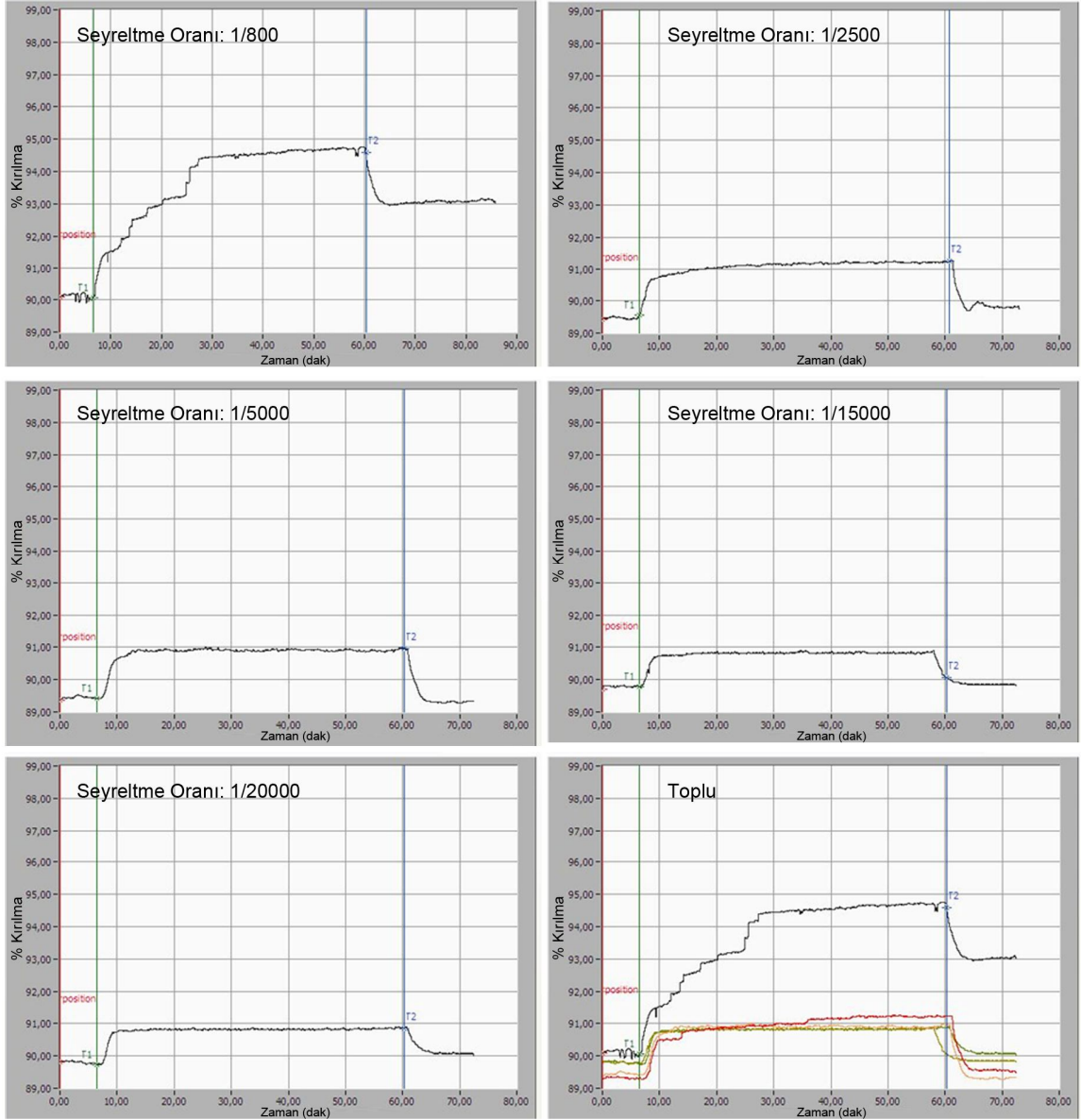
Çizelge 4.6. F_{ab} ve IgG'ye göre BSA ve F_c için seçicilik ve bağlı seçicilik katsayıları.

Protein	ΔR	MIP		NIP			k', F_{ab}	k', IgG
		$k, F_{ab}/Girişimci$	$k, IgG/Girişimci$	ΔR	$k, F_{ab}/Girişimci$	$k, IgG/Girişimci$		
F_{ab}	1.1028	-	7.1668	1.2273	-	4.0607	-	1.7649
IgG	7.9035	0.1395	-	4.9837	0.2463	-	0.5666	-
BSA	0.3763	2.9306	21.0032	0.9663	1.2701	5.1575	2.3074	4.0724
F_c	0.5797	1.9024	13.6338	1.2887	0.9524	3.8672	1.9975	3.5254

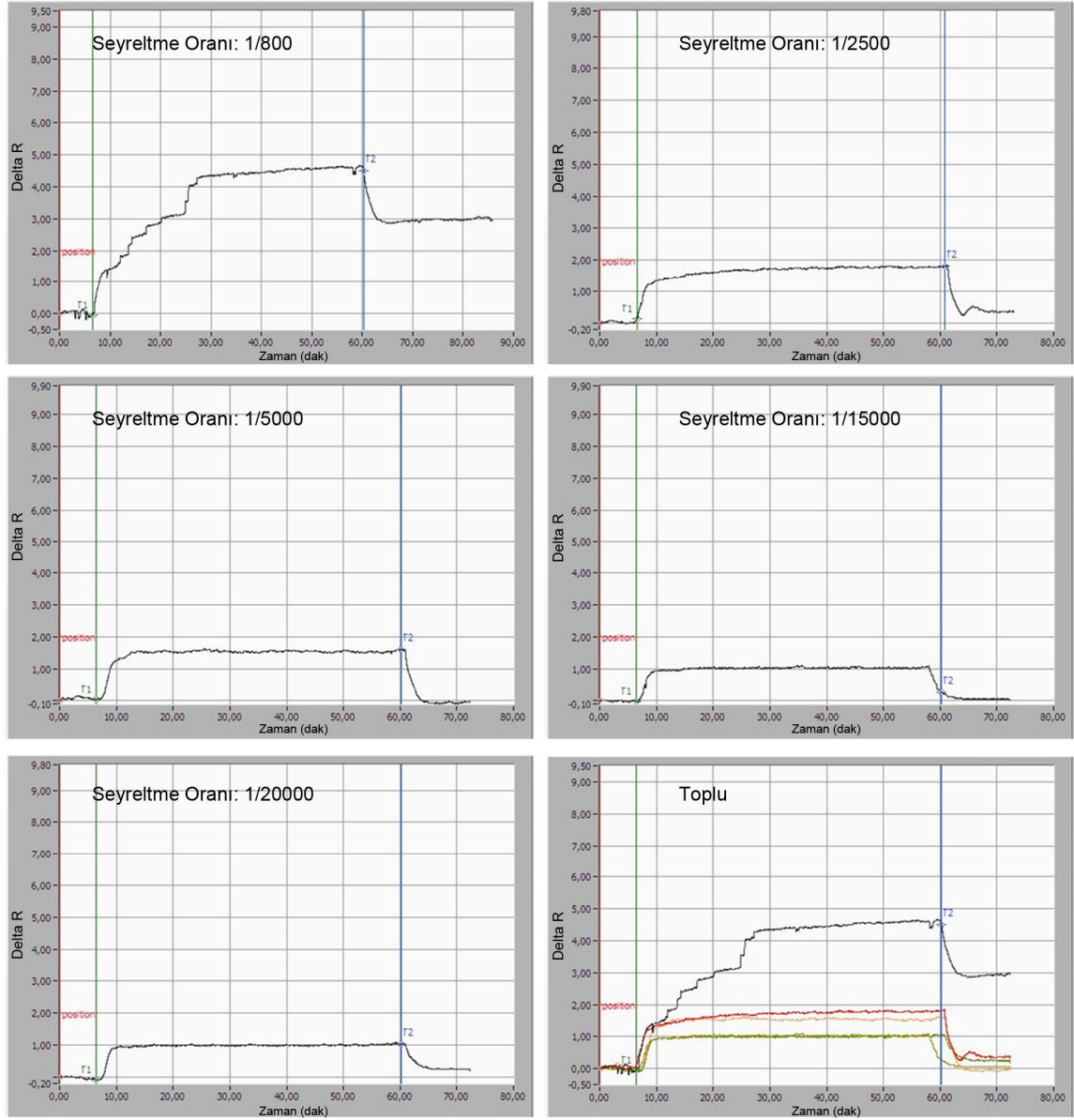
4.7. Doğal Kaynaktan Kinetik Analizler

SPR sinyali ile bir doğal kaynak olan plazma arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi için farklı oranlarda seyreltilmiş plazma örnekleriyle (1/800-1/20000 arasında) çalışılmıştır. Plazma örnekleri peristaltik pompa aracılığıyla SPR sensörle etkileştirilmiş ve SPRview yazılımı kullanılarak kinetik veriler

alınmıştır. Şekil 4.31’de farklı seyreltme oranlarında plazma örneklerinden elde edilen sensorgramlar verilmektedir.



Şekil 4.31. Plazma ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgramlar. %Kırılma/zaman fonksiyonu.

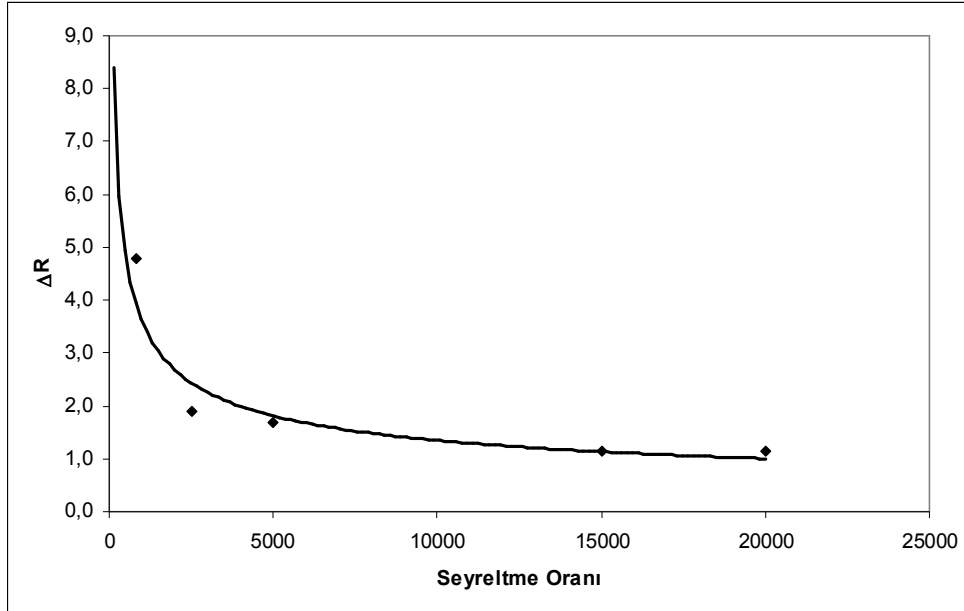
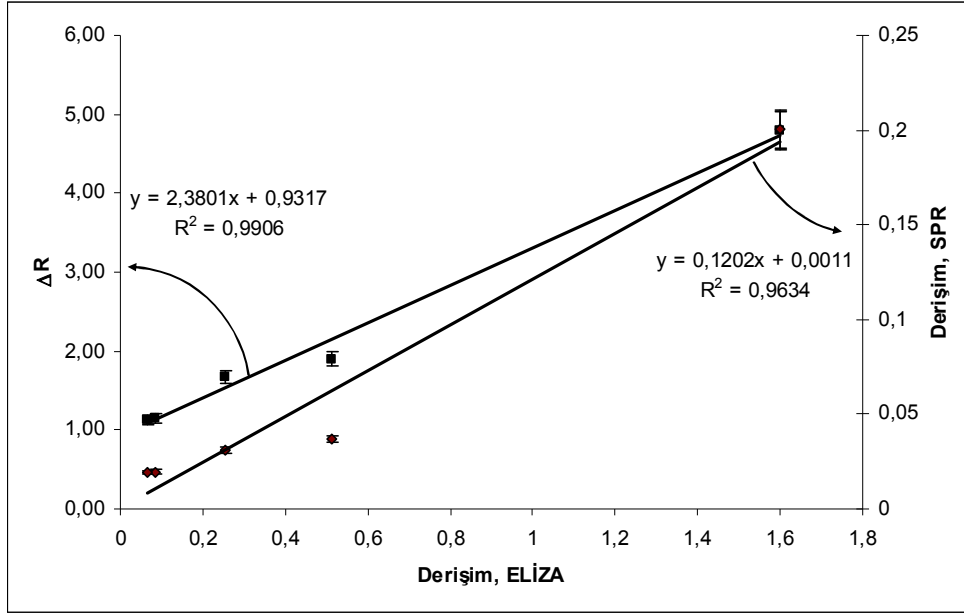


Şekil 4.32. Plazma ile SPR sensör arasındaki etkileşimlere ait sensogramlar. ΔR /zaman fonksiyonu.

Şekil 4.32'de plazma çalışmalarından elde edilen ΔR /zaman sensogramları verilmektedir. Şekillerden de görüldüğü gibi azalan seyreltme oranı (artan derişim) ile birlikte F_{ab} baskılanmış sensörün sinyal değeri artmaktadır. Oldukça yüksek seyreltme oranlarında (20000 kat, derişim: $4.27\mu M$) bile baskılanmış sensörlerin sinyal verdiği görülmektedir. Bu kapsamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçların en önemli noktası, plazma gibi kompleks bir ortamda (%91 su, %7 proteinler, %2 iyonlar, besinler, gazlar, atıklar, hormonlar) bile IgG'nin teşhis

edilebildiğinin belirlenmesidir. Sonuç olarak; F_{ab} baskılanmış sensörler, hem sulu çözeltilerden hem de doğal kaynaktan IgG tayininde başarı ile kullanılabilir.

F_{ab} baskılanmış SPR sensörünün sinyal seçiciliğinin gösterilmesi amacıyla, plazma örneklerinde gerçekleştirilen çalışmalar, ELİZA ölçümleri ile kontrol edilmiştir. Bunlara ait grafikler Şekil 4.33’de görülmektedir.



Şekil 4.33. Plazma IgG derişimi ile SPR sinyallerinin değışimi. (a) ΔR -Eliza ve Eliza/SPR ilişkisi; (b) ΔR -Seyreltme oranı ilişkisi.

SPR ölçümleri ile ELİZA ölçümleri arasında %99.1'lik bir uyum olduğu görülmüştür. SPR ile ölçülen derişim değerleri ile ELİZA ile belirlenen derişim değerleri arasında ise %96.3'lük bir doğrusallık olduğu görülmüştür.

5. YORUM

- IgG moleküllerinin enzimatik hidrolizi papain enzimi ile gerçekleştirilmiş, papain ile kesilme sonucunda elde edilen F_{ab} ve F_c fragmanları FPLC yardımıyla ayrı ayrı toplanmıştır. SDS-PAGE sonuçlarından, enzimatik hidrolizin ve FPLC ile fraksiyonların toplanmasının başarılı olduğu anlaşılmaktadır.
- IgG moleküllerinin asıl seçiciliğinden sorumlu olan ve IgG moleküllerinin antijen bağlayan parçaları olan F_{ab} fragmanları SPR çipi üzerine baskılanarak IgG tayininde kullanılmıştır.
- Baskılama işleminde fonksiyonel monomer olarak kullanılan MAH monomeri, L-histidin metil esterinin metakrilol klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilmiştir. Elde edilen monomer, NMR ve FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir.
- MAH monomerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda MAH monomerine ait karakteristik pikler şunlardır: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 1.85 (t; 3H, CH_3), 1.4 (m; 2H, CH_2), 3.42 (s; 3H, $-\text{OCH}_3$), 5.28 (s; 1H, vinil H), 5.6 (s; 1H, vinil H), 6.6-6.9 (m; 5H, aromatik); 7.42 (1H, NH); 7.47 (1H, NH).
- MAH monomerinin FTIR spektrumunda MAH monomerine ait karakteristik 1724 cm^{-1} 'de karbonil bandı; 1558 cm^{-1} ve 1651 cm^{-1} amid gerilme titreşim bandları ve 3500 cm^{-1} civarında geniş hidroksil bandları görülmektedir.
- SPR sensörlerin altın yüzeylerinin karakterizasyonu için FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılmıştır. FTIR-ATR spektrumunda spektrumda 1633 cm^{-1} 'de karbonil bandı, 1523 cm^{-1} ve 1449 cm^{-1} 'de amid bandları, 1065 cm^{-1} 'de MAH monomerinden kaynaklanan imidazol halka titreşimi ve 2918 cm^{-1} 'de alifatik C-H titreşimleri gözlenmiştir.
- Modifiye edilmemiş ve F_{ab} baskılanmış SPR sensörlerin yüzey morfolojisi yarı degen modda atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Bazik pirana çözeltisi ile temizlenmiş SPR çipinin yüzey derinliği, 7.37 nm olarak belirlenmiştir. F_{ab} fragmanları baskılanmış SPR çipinin yüzey derinliği ise yaklaşık 30 nm olarak bulunmuştur.
- F_{ab} baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin ortalama yüzey kalınlığı elipsometre cihazı kullanılarak incelenmiştir. F_{ab} baskılanmış ve baskılanmamış sensörlerin ortalama kalınlık değerleri sırasıyla 20.00 ± 3.24

nm ve 18.50 ± 3.33 nm olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar AFM sonuçları ile örtüşmektedir.

- Temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyinin temas açısı değeri (85.2°), F_{ab} baskılanmamış çipte 76.8° 'ye ve F_{ab} baskılanmış çipte 70.4° 'ye düşmüştür.
- Yüzeyin temas açısının önemli miktarda azalması, yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığını göstermektedir. Bu durum iki farklı şekilde açıklanabilir; (i) hem baskılanmış hem de baskılanmamış çiplerin hazırlanmasında fonksiyonel monomer olarak kullanılan MAH monomeri, amino asit (histidin) temelli bir malzeme olup oldukça hidrofilik karaktere sahiptir. Bu sebeple, yüzeye hidrofilik bir polimerin tutturulması yüzey hidrofilitasını arttırmış ve temas açısı değerini düşürmüştür.
- F_{ab} baskılanmış SPR sensörlerle değişik derişimlerde F_{ab} ve IgG çözeltileri etkileştirilmiştir. Derişimdeki artışla birlikte %kırılma değerindeki artışın daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun sebebi olarak çözelti ile yüzey arasındaki sürücü güç olan derişim farkının artması gösterilebilir.
- Verilerin daha duyarlı değerlendirilebilmesi için yaygın olarak anlık % kırılma değeri ile başlangıç % kırılma değeri arasındaki farkı gösteren ΔR değerleri kullanılmaktadır. ΔR 'ye karşılık zaman grafikleri birlikte çizdirildiğinde elde edilen sensorgramlar daha kolay incelenebilmektedir. F_{ab} ve IgG derişimi arttıkça ΔR değerlerinin de arttığı daha açık bir şekilde belirlenmiştir. F_{ab} için yaklaşık 10 mg/mL derişim değerinden sonra, IgG için ise yaklaşık 0.50 mg/mL derişim değerinden sonra yüzeydeki aktif bölgelerin dolmasına bağlı olarak bu artış hızı azalmakta ve dengeye ulaşılmaktadır.
- ΔR değeri F_{ab} için yaklaşık 10 mg/mL civarında dengeye ulaşmıştır. 0-8 mg/mL aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğrunun denklemi ($y = 0.2391x + 0.0199$) ve doğrusallığı (R^2) 0.9949 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre; F_{ab} molekülleri, baskılanmış bölgeye yüksek afinite ile bağlanmaktadır (Toyama ve ark., 1998). Başka bir deyişle; hazırlanan sensör F_{ab} için 0-8 mg/mL aralığında % 99.49 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir.

- ΔR değeri IgG için yaklaşık 0.50 mg/mL civarında dengeye ulaşmıştır. SPR sensörü IgG için iki farklı derişim aralığında derişim-sinyal doğrusallığı göstermektedir. 0-1 mg/mL aralığındaki veriler değerlendirildiğinde elde edilen doğruların denklemleri ($y = 33,153x + 0,3075$), ($y = 3,1733x + 4,7684$) ve doğrusallıkları (R^2) sırasıyla 0.9406 ve 0.968 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre; IgG molekülleri iki farklı bölgeden yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Başka bir deyişle; hazırlanan sensör, 0-0.08 mg/mL aralığında % 94, 0.1-1.0 mg/mL derişim aralığında ise % 96 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir.
- Langmuir modelinin hazırlanan sensörlere en uygun izoterm modeli olduğu görülmüştür. Buradan hesaplanan ΔR_{maks} değerleri deneysel değerlere oldukça yakındır.
- Seçicilik deneylerinde, F_{ab} , IgG, BSA ve F_c 'nin tekli, ikili ve üçlü çözeltileri kullanılmıştır. F_{ab} baskılanmış SPR sensörlerin BSA ve F_c ile herhangi bir etkileşime girmediği ve sinyal vermediği belirlenmiştir. Bu durum baskılanmış Poli (HEMA-MAH) filmin, hem kalıp molekül olan F_{ab} 'a hem de IgG molekülüne seçici olduğunu göstermektedir. İkili ve üçlü karışımlar dikkate alındığında, hem F_{ab} içeren karışımların hem de IgG içeren karışımların gösterdiği ΔR kayma değerleri, tekli çözeltilere göre daha düşüktür. Bu durum, moleküllerin karışım halinde bir yarışmacı ajan olarak davrandığını ve ΔR kayma değerinde azalmaya sebep olduğunu göstermektedir.
- F_{ab} baskılanmamış SPR sensörlerin BSA ve F_c ile herhangi bir etkileşime girmediği ve sinyal vermediği belirlenmiştir. İkili ve üçlü karışımlarda; baskılanmış SPR sensörlere benzer sonuçlar elde edildiği ve karışımların sinyal değerlerinde antagonistik bir etki olduğu görülmektedir. Baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler karşılaştırıldığında; IgG sinyalinin ΔR değerlerinin 7.90'dan 4.98'e düştüğü görülmektedir.
- Hesaplanan seçicilik katsayıları, F_{ab} molekülüne göre; F_{ab}/IgG : 0.57, F_{ab}/BSA : 2.31, F_{ab}/F_c : 2.00 olarak hesaplanmıştır. IgG molekülüne göre seçicilik katsayıları ise; IgG/F_{ab} : 1.76, IgG/BSA : 4.07, IgG/F_c : 3.53 olarak hesaplanmıştır. Bir başka tanımla; F_{ab} baskılanmış sensör, IgG'yi F_c 'ye göre 3.53 kat, BSA'ya göre 4.07 kat seçicilikte tanımaktadır. Bağlı seçicilik

değeri, 1'in ne kadar üzerinde ise baskılama işleminin o kadar etkin olduğu bilinmektedir

- Doğal kaynaktan IgG tayini için farklı oranlarda seyreltilmiş plazma kullanılmıştır. Azalan seyreltme oranı (artan derişim) ile birlikte F_{ab} baskılanmış sensörün sinyal değeri artmaktadır. Oldukça yüksek seyreltme oranlarında (20000 kat) bile baskılanmış sensörlerin sinyal verdiği görülmektedir.
- Bu kapsamda gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçların en önemli noktası, plazma gibi kompleks bir ortamda (%91 su, %7 proteinler, %2 iyonlar, besinler, gazlar, atıklar, hormonlar) bile IgG'nin teşhis edilebildiğinin belirlenmesidir.
- Sonuç olarak; F_{ab} baskılanmış sensörler, hem sulu çözeltilerden hem de doğal kaynaktan IgG tayininde başarı ile kullanılabilmiştir.
- F_{ab} baskılanmış SPR sensörünün sinyal seçiciliğinin gösterilmesi amacıyla, plazma örneklerinde gerçekleştirilen çalışmalar, ELİZA ölçümleri ile kontrol edilmiştir. SPR ölçümleri ile ELİZA ölçümleri arasında %99.1'lik bir uyum olduğu görülmüştür. SPR ile ölçülen derişim değerleri ile ELİZA ile belirlenen derişim değerleri arasında ise %96.3'lük bir doğrusallık olduğu görülmüştür
- Yapılan çalışma kapsamında IgG moleküllerinin enzimatik hidroliz yardımıyla molekül ağırlığı yaklaşık 1/3'üne indirilerek F_{ab} fragmanları elde edilmiştir. IgG yerine F_{ab} fragmanlarının baskılanmasıyla, proteinlerin baskılanması sırasında küçük moleküllerle çalışırken karşılaşılmayan moleküler boyut, kompleks yapı, konformasyonel esneklik ve çözünürlük gibi birtakım güçlüklerin üstesinden gelinmiştir. Ayrıca IgG moleküllerinin asıl işlevsel bölgesi F_{ab} olduğu ve IgG seçiciliği de F_{ab} bölgesindeki değişimlere bağlı olduğu için, molekülün bütünü baskılamaktansa antijen bağlanmasından sorumlu işlevsel F_{ab} bölgesini baskılayarak hem moleküler baskılama işlemi kolaylaştırılmış, hem de SPR sensörünün etkinliği arttırılmıştır.

KAYNAKLAR

- Andaç, M., Say, R., Denizli, A., **2004**, Molecular recognition based cadmium removal from human plasma, *J. Chromatogr. B*, 811, 119.
- Andreescu, S.; Sadik, O. A., **2004**, Trends and challenges in biochemical sensors for clinical and environmental monitoring, *Pure Appl. Chem.*, 76, 861.
- Barandum, S., Kistler, P., Jeanet, F., Isliker, H., **1962**, Intravenous administration of human gamma-globulin, *Vox Sang.*, 7, 157-174.
- Beale, D., **1987**, Molecular fragmentations. Some applications in immunology, *Dev Comp Immunol*, 11, 287-96.
- Bereli, N., Andaç, M., Baydemir G., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli A., **2008**, Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels. *J. Chromatogr. A*. 1190, 18-26.
- Bossi, A., **2007**, Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of art, *Biosens. Bioelectron.*, 22, 1131–1137.
- Bossi, A., **2001**, Surface-grafted molecularly imprinted polymers for protein recognition, *Anal. Chem.*, 73, 5281–5286.
- Caelen, I., Kalman, A., Wahlstrom, L., **2004**, Biosensor-based determination of riboflavin in milk samples., *Anal. Chem.*, 76, 137.
- Cherif, B., Roget, A., Villiers, C.L., Calemczuk, R., Leroy, V., Marche, P.N., Livache, T., Villiers, M.B., **2006**, Clinically Related Protein–Peptide Interactions Monitored in Real Time on Novel Peptide Chips by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Clin. Chem.*, 52(2) 255–262.
- Choi, C.W., Kang, D. Y., Jang, Y.H., Kim, H.H., Min, J., Oh, B.K., **2008**, Ultra-sensitive surface plasmon resonance based immunosensor for prostate-specific antigen using gold nanoparticle–antibody complex, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 313-314, 655-659.

- Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M., Taylor, H.L., **1946**, Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids, *J. Am. Chem. Soc.*, 68 (3), 459–475.
- Cooper, M.A., **2003**, Label-free screening of bio-molecular interactions, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 834-842.
- Cormack, P.A.G., Mosbach, K., **1999**, Molecular imprinting: Recent developments and the road ahead, *React. Funct. Polym.*, 41, 115.
- Dhal, PK., Kulkarni, M.G., Mashelkar, R.A., **2001**, Bio-imprinting: polymeric receptors with and for biological macromolecules. In: Sellergren, B., editor. *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and Their Applications in Analytical Chemistry*. New York: Elsevier.
- Dunne, L.; Daly, S.; Baxter, A.; Haughey, S.; O’Kennedy, R., **2005**, Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay for the Detection of Aflatoxin B1 Using Single-Chain Antibody Fragments, *Spectrosc. Lett.*, 38, 229.
- Dupont, D., Muller-Renaud, S., **2006**, Quantification of proteins in dairy products using an optical biosensor, *J. AOAC Int.* , 89, 843.
- Dutra, R. F., Mendes, R.K., Silva, V. L., Kubota, L.T., **2007**, Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 , 1744–1750.
- Earp, R.L., Dessy, R.E. **1996**. *Commercial Biosensors: Applications to Clinical Bioprocess and Environmental Samples*. John Wiley and Sons: New York, Chapter 4.
- Ersöz, A., Say, R., Denizli, A., **2004**, Ni(II) ion-imprinted solid-phase extraction and preconcentration in aqueous solutions by packed-bed columns, *Anal. Chim. Acta*, 502, 91.
- Ersöz, A., Denizli, A., Özcan, A., Say, R., **2005**, Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance, *Biosens. Bioelectronics*, 20, 2197.

- Fano, U., **1941**, The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves), *JOSA*, 31, 213-222.
- Forzani, E. S., Zhang, H. Q., Chen, W., Tao, N. J., **2005**, Detection of Heavy Metal Ions in Drinking Water Using a High-Resolution Differential Surface Plasmon Resonance Sensor, *Environ. Sci. Technol.*, 39, 1257.
- Fratamico, P. M., Strobaugh, T. P., Medina, M. B., Gehring, A. G., **1998**, Detection of *Escherichia coli* 0157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor, *Biotechnol. Tech.*, 12, 571.
- Garipcan, B., Denizli, A., **2002**, A Novel Affinity Support Material for the Separation of Immunoglobulin G from Human Plasma, *Macromolecular Bioscience*, 2, 135-144.
- Ge, Y., Turner, A.P.F., **2008**, Too large to fit? Recent developments in macromolecular imprinting, 26, 218-224.
- Gillis, E. H., Gosling, J. P., Sreenan, J. M., Kane, M., **2002**, Development and validation of a biosensor-based immunoassay for progesterone in bovine milk, *J. Immunol. Methods*, 267, 131.
- Gillis, E. H., Traynor, I., Gosling, J. P., Kane, M., **2006**, Improvements to a surface plasmon resonance-based immunoassay for the steroid hormone progesterone, *J. AOAC Int.*, 89, 838.
- Gobi, K., Tanaka, H., Shoyama, Y., Miura, N., **2004**, Continuous flow immunosensor for highly selective and real-time detection of sub-ppb levels of 2-hydroxybiphenyl by using surface plasmon resonance imaging, *Biosens. Bioelectron.*, 20, 350.
- Habauzit, D., Chopineau, J., Roig, B., **2007**, SPR-based biosensors: a tool for biodetection of hormonal compounds, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 1215.
- Hall, A.J., **2005**, Imprinted polymers. In *Topics in Current Chemistry Templates in Chemistry II* 249, 317–349.

- Harris, R. D., Luff, B. J., Wilkinson, J. S., Piehler, J., Brecht, A., Gauglitz, G., Abuknesha, R. A., **1999**, Integrated optical surface plasmon resonance immunoprobe for simazine detection , *Biosens. Bioelectron.*, 14, 377.
- Haughey, S. A., O’Kane, A. A., Baxter, G. A., Kalman, A., Trisconi, M. J., Indyk, H. E., Watene, **2005**, Determination of pantothenic acid in foods by optical biosensor immunoassay., *G. A. J. AOAC Int.*, 88, 1008.
- Haupt, K., **2003**, Molecularly imprinted polymers: the next generation. *Anal. Chem.*, 9, 376A–383A.
- Hilt, J.Z., Byrne, M.E., **2004**, Configurational biomimesis in drug delivery: molecular imprinting of biologically significant molecules, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56, 1599–1620.
- Homola, J., **2008**, Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem. Rev.*, 108, 462-493.
- Homola J., **2003**, Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.*, 337, 528-539.
- Indyk, H. E., Evans, E. A., Caselunghe, M. C. B., Persson, B. S., Finglas, P. M., Woollard, D. C., Filonzi, E. L. , **2000**, Determination of Biotin and Folate in Infant Formula and Milk by Optical Biosensor-Based Immunoassay , *J. AOAC Int.*, 83, 1141.
- Indyk, H.E., McGrail, I.J., Watene, G.A., Filonzi, E.L., **2007**, Optical biosensor analysis of the heat denaturation of bovine lactoferrin. *Food Chem.*, 101, 838-844.
- Jayasena, S. D., **1999**, Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics, *Clin. Chem.*, 45, 1628.
- Kim, S. J., Gobi, K. V., Harada, R., Shankaran, D. R., Miura, N., **2006**, Miniaturized portable surface plasmon resonance immunosensor applicable for onsite detection of low-molecular-weight analytes, *Sens. Actuators B*, 115, 349.
- Komiyama, M., **2003**. *Molecular Imprinting*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

- Kretschmann. E., Raether, H., **1968**, Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light *Z. Naturforsch, Teil A*, 23, 2135-2136.
- Ladd, J., Lu, H., Taylor, A.D., Goodell, V., Disis, M.L., Jiang, S., **2009**, Direct detection of carcinoembryonic antigen autoantibodies in clinical human serum samples using a surface plasmon resonance sensor, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 70 (1), 1-6.
- Lee, L.M., Strand, V., **1997**, *Intravenous immunoglobulins in clinical practice*, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Li, X., Husson, S.M., **2006**, Adsorption of dansylated amino acids on molecularly imprinted surfaces: a surface plasmon resonance study, *Biosens. Bioelectron.*, 22, 336-348.
- Liedberg, B., Nylander, C., Lunström, I., **1983**, Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing, *Sensors and Actuators*, 4, 299-204.
- Lin, L.P., Huang, L.S., Lin, C.W., Lee, C.K., Chen, J.L., Hsu, S.M., Lin, S., **2005**, Determination of binding constant of DNA-binding drug to target DNA by surface plasmon resonance biosensor technology. *Cur. Drug Target*, 5, 61-72.
- Mahony, J.O., **2005**, Molecularly imprinted polymers – potential and challenges in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* 534, 31–39.
- Malmheden-Yman I, Eriksson A, Johansson MA, Hellenäs KE., **2006**, Food allergen detection with biosensor immunoassays. *J AOAC Int* ;89(3):856-61.
- Minunni, M., Mascini, M., **1993**, Detection of Pesticide in Drinking Water Using Real-Time Biospecific Interaction Analysis (BIA), *Anal. Lett.*, 26, 1441.
- Mohammed, I., Mullett, W. M., Lai, E. P. C., Yeung, J. M., **2001**, Is biosensor a viable method for food allergen detection? , *Anal. Chim. Acta*, 444, 97–102.
- Mosbach, K., Ramström, O., **1996**, The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology, *Biotechnol.*, 14, 163.

- Mouvet, C., Harris, R., Maciag, C., Luff, B., Wilkinson, J., Piehler, J., Brecht, A., Gauglitz, G., Abuknesha, R., Ismail, G., **1997**, Determination of simazine in water samples by waveguide surface plasmon resonance., *Anal. Chim. Acta* 338,109–117.
- Nedelkov, D., Nelson, R.W., **2000a**, Exploring the limit of detection in biomolecular interaction analysis mass spectrometry (BIA/MS): detection of attomole amounts of native proteins present in complex biological mixtures. *Anal. Chim. Acta* 423: 1-7.
- Nedelkov, D., Nelson, R.W., **2000b**, Practical considerations in BIA/MS: optimizing the biosensor-mass spectrometry interface. *J. Mol. Recogn.*,13, 140-145.
- Nedelkov, D.; Nelson, R. W. **2003**, Detection of Staphylococcal Enterotoxin B via Biomolecular Interaction, *Analysis Mass Spectrometry, Appl. Environ. Microbiol.*,69, 5212.
- Ock, K., Jang, G., Roh, Y., Kim, S., Kim, J., Koh, K. , **2001**, Optical detection of Cu^{2+} ion using a SQ-dye containing polymeric thin-film on Au surface, *Microchem. J.*, 70, 301.
- Oh, B. K., Kim, Y. K., Bae, Y. M., Lee, W. H., Choi, J. W. J., **2002**, The fabrication of protein chip based on surface plasmon resonance for detection of pathogens, *Microb. Biotechnol.*, 12, 780.
- Oh, B. K., Lee, W., Lee, W. H., Choi, J. W., **2003**, Immunosensor for detection of *Legionella pneumophila* using surface plasmon resonance , *Biotechnol. Bioprocess, Eng.*, 8, 227.
- Otto, A., **1968**, Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, 216, 398-410.
- Pejcic, B., De Marco, R., Parkinson, **2006**, The role of biosensors in the detection of emerging infectious diseases., *G. Analyst*, 131, 1079.
- Piletsky, S.A. and Turner, A.P.F., **2006**, *Molecular imprinting of polymers*, Landes Bioscience, Georgetown, Texas.

- Rachkov, A., Minoura, N., **2001**, Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach., *Biochim. Biophys. Acta*, 1544, 255–266
- Rachkov, A., **2004**, Molecularly imprinted polymers prepared in aqueous solution selective for [Sar(1), Ala(8)]angiotensin II., *Anal. Chim. Acta*, 504, 191–197.
- Ramström, O., Ansell, R.J., **1998**, Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future, *Chirality*, 10, 195–209.
- Rayleigh, L., **1907**, On the Dynamical Theory of Gratings, *Proc. R. Soc. Lond. A*, 79, 399-416.
- Rajo, N., Ercilla, G., Haro, I., **2003**, GB Virus C (GBV-C) / Hepatitis G Virus (HGV): Towards the Design of Synthetic Peptides-based Biosensors for Immunodiagnosis of GBV-C / HGV Infection *Curr. Protein Pept. Sci.*, 4, 291.
- Samsonova, J. V., Uskova, N. A., Andresyuk, A. N., Franek, M., Elliott, C. T., **2004**, Biacore biosensor immunoassay for 4-nonylphenols: assay optimization and applicability for shellfish analysis, *Chemosphere*, 57, 975.
- Say, R., Birlik, E., Ersöz, A., Yılmaz, F., Gedikbey, T., Denizli, A., **2003(a)**, Preconcentration of copper on ion-selective imprinted polymer microbeads, *Anal. Chim. Acta*, 480, 251.
- Say, R., Ersöz, A., Denizli, A., **2003(b)**, Selective separation of uranium containing glutamic acid molecular-imprinted polymeric microbeads, *Sep. Sci. Technol.*, 38, 3431.
- Sellergren, B., **2001**, The non-covalent approach to molecular imprinting. In: Sellergren, B., editor. *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and Their Applications in Analytical Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 113-183.

- Shankaran, D. R.; Gobi, K. V. A.; Miura, N., **2007**, Recent Advancements in Surface Plasmon Resonance Immunosensors for Detection of Small Molecules of Biomedical, Food and Environmental Interest, *Sensors and Actuators B*, 01.121, 158.
- Shea, K., Dougherty, T., **1986**, Molecular recognition on synthetic amorphous surfaces. The influence of functional group positioning on the effectiveness of molecular recognition, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 (5), 1091–1093.
- Shimomura, M., Nomura, Y., Zhang, W., Sakino, M., Lee, K. H., Ikebukuro, K., Karube, I., **2001**, Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenyls and atrazine, *Anal. Chim. Acta*, 434, 223.
- Slavič, R., Homola, J., Brynda, E., **2002**, A miniature fiber optic surface plasmon resonance sensor for fast detection of staphylococcal enterotoxin B, *Biosens. Bioelectron. B* 17(6–7), 591–595.
- Soh, N., Watanabe, T., Asano, Y., Imato, T., **2003**, Indirect Competitive Immunoassay for Bisphenol A. Based on a Surface Plasmon Resonance Sensor, *Sensor Mater.*, 15, 423..
- Szentirmay, Z., **1991**, Surface plasmon spectroscopy of metal/dielectric structures. *Spectrochim. Acta*, 48, 9-17.
- Tomizaki, K. Y., Usui, K., Mihara, H., **2005**, Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements, *ChemBioChem*, 6, 782-799.
- Toyama, S., Shoji, A., Yoshida, Y., Yamauchi, S., and Ikariyama, Y. **1998**. Surface design of SPR-based immunosensor for the effective binding of antigen or antibody in the evanescent field using mixed polymer matrix. *Sens. Actuators B*, 52 (1-2), 65-71.
- Turner, N.W., **2006**. From 3D to 2D: a review of the molecular imprinting of proteins. *Biotechnol. Prog.* 22, 1474–1489.
- Turner, N. W., Jeans, C. W., Brain, K. R., Allender, C. J., Hlady, V., Britt, D.W., **2006**, From 3D to 2D: A Review of the Molecular Imprinting of Proteins, *Biotechnology Progress*, 22, 1474 – 1489.

- Umpleby, R.J., Baxter, S.C., Chen, Y., Shah, R.N., Shimizu, K.D., **2001**, Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir–Freundlich isotherm. *Anal. Chem.* 73, 4584–4591.
- Uzun, L., Hepatit teşhisi için tayin kitlerinin üretimi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, **2008**.
- Uzun, L., Say, R., Ünal, S., Denizli, A., **2009(a)**, Hepatitis B surface antibody purification with hepatitis B surface antibody imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-L-tyrosine methyl ester) particles. *J. Chromatogr. B.* 877, 181-188.
- Uzun, L., Say, R., Ünal, S., Denizli, A. **2009(b)**, Production of surface plasmon resonance based assay kit for hepatitis diagnosis. *Biosens. Bioelectron.*, 24, 2878–2884.
- Vaisocherova, H.; Mrkvova, K.; Piliarik, M.; Jinoch, P.; Steinbachova, M.; Homola, J., **2007**, Surface plasmon resonance biosensor for direct detection of antibody against Epstein-Barr virus, *Biosens. Bioelectron.*, 22, 1020.
- Wang, Z., Wilkop, T., Xu, D., Dong, Y., Ma, G., Cheng, Q., **2007**, Surface plasmon resonance imaging for affinity analysis of aptamer–protein interactions with PDMS microfluidic chips, *Anal. Bioanal. Chem.*, 389, 819.
- Wei, S., **2006**, Capturing molecules with templated materials - analysis and rational design of molecularly imprinted polymers. *Anal. Chim. Acta* 578, 50–58.
- Wei, J., Mu, Y., Song, D., Fang, X., Liu, X., Bu, L., Zhang, H., Zhang, G., Ding, J., Wang W., Jin, Q., Luo, G., **2003**, A novel sandwich immunosensing method for measuring cardiac troponin I in sera., *Anal Biochem.* 321, 209.
- Wei, X., Samadi, A., Husson, S.M., **2005**, Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for chromatographic separations. *Sep. Sci. Technol.*, 40, 109–129.
- Welford, K., **1991**, Surface plasmon-polaritons and their uses. *Opt. Quant. Electron.*, 23, 1-27.

- Wittekindt, C., Fleckenstein, B., Wiesmuller, K., Eing, B. R., Kuhn, **2000**, Detection of human serum antibodies against type-specifically reactive peptides from the N-terminus of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 and type 2 by surface plasmon resonance, *J. E. Virol. J. Methods*, *87*, 133.
- Wood, RW., **1902**, On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Philosophical magazine*. *4*, 396-402.
- Wood, R. W., **1912**, Diffraction gratings with controlled groove form and abnormal distribution of intensity, *Philos. Mag.*, *23*, 310–317.
- World Health Organization, **2008**. <http://www.who.int/nuvi/hepb/en/>, Accessed on July 4, 2008.
- Wulff, G., Vietmeier, J., Poll, H., **1987**, Enzyme-analogue built polymers, *22*. Influence of the nature of the crosslinking agent on the performance of imprinted polymers in racemic resolution, *Macromolecular Chemistry and Physics*, *188*, 731-740.
- Wulff G., **1995**, Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates—a way towards artificial antibodies, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl*, *34*, 1812–1832.
- Wulff, G., Grobe-Einsler, R., Sarhan, A., **1977**, *Makromol. Chem.*, *178*, 2817.
- Yan, M. and Ramström, O., **2005**, *Molecularly imprinted materials-science and technology*, 1st edn. Marcel Dekker, New York.
- Yavuz, H., Say, R., Denizli, A., **2005**, Iron removal from human plasma based on molecular recognition using imprinted beads, *Mat. Sci. Eng. C*, *25*, 52.
- Zhang, L., Cheng, G., Fu, C., **2002**, Molecular selectivity of tyrosine-imprinted polymers prepared by seed swelling and suspension polymerization. *Polym. Int.*, *51(8)* 687-692.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gizem ERTÜRK
Doğum yeri : Erzurum
Doğum tarihi : 01.01.1986
Medeni hali : Bekar
Elektronik posta adresi : gizemertrk@hacettepe.edu.tr
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : 2004-2008 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : 2008-2010 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü
Genel Biyoloji Anabilim Dalı