

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLE KUVARS AKORT
ÇATALI SİSTEMİNİN DOĞRULANMASI VE TRANSFERRİN
BİYOSENSÖRÜ OLARAK YAPILANDIRILMASI**

AYLİN DEDEOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2018

**ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLE KUVARS AKORT
ÇATALI SİSTEMİNİN DOĞRULANMASI VE TRANSFERRİN
BİYOSENSÖRÜ OLARAK YAPILANDIRILMASI**

**VALIDATION OF THE QUARTZ TUNING FORK SYSTEM
BY ELECTROCHEMICAL METHOD AND FABRICATION
OF TRANSFERRIN DETECTING BIOSENSOR**

AYLİN DEDEOĞLU

Başkent Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOMEDİKAL Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2018

“Elektrokimyasal Yöntemle Kuvars Akort Çatalı Sisteminin Doğrulanması ve Transferrin Biyosensörü Olarak Yapılandırılması” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından, 16/08/2018 tarihinde, **BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Kıvılcım GÜCÜYENER

Üye (Danışman) : Doç. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

Üye : Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ

ONAY

/08/2018

Prof. Dr. Ömer Faruk ELALDI
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 29 /08/ 2018

Öğrencinin Adı, Soyadı : Aylin Dedeoğlu

Öğrencinin Numarası : 201610324

Anabilim Dalı : Biyomedikal Mühendisliği

Programı : Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Doç. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

Tez Başlığı : Elektrokimyasal Yöntemle Kuvars Akort Çatalı Sisteminin Doğrulanması ve Transferrin Biyosensörü Olarak Yapılandırılması

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 45 sayfalık kısmına ilişkin, 29 / 08 / 2018 tarihinde şahsım tarafından iTHENTICATE adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

Onay

29/ 08/ 2018

Doç. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

TEŞEKKÜR SAYFASI

Yüksek lisans eğitim hayatımda bana yardımını ve desteğini esirgemeyen, akademik dünyada birçok projede ve tezimde kendimi geliőtirmeme olanak sunan değerli danışmanım, Dr. Doç. Dr. Dilek Çökeliler'e ve eş danışmanım, Dr. Mehmet Altay Ünal'a,

Tez aşamamda ve diğer projelerde bana desteklerini ve yardımlarını sunan, laboratuvarlarında çalışma imkânı sağlayan sayın hocalarım, Prof. Dr. Sibel Aysıl Özcan, Doç. Dr. İ. Cengiz Koçum, Dr. Nurgül Karadaş Bakırhan'a,

Deney süreçlerinde her an yardımını hissettiğim ve benden desteklerini esirgemeyen Dr. Özlem Ertekin'e,

Eğitim hayatım boyunca, beni her daim destekleyen çok sevdiğim ve her şeyi minnettar olduğum sevgili babam Güngör Yalçın Dedeoğlu, annem Erlinda Dedeoğlu, ablam Ayla Yenidede ve çok sevgili eşi Muhammed Saim Yenidede ve biricik yeğenim Emir Yenidede'ye,

Ve teşekkür etmeye hiçbir sayfanın yetmeyeceği, en zor ve stresli günlerimde daima yanımda olan, hayatımı her daim birlikte sürdürmek istediğim Ege Soydemir'e sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Aylin Dedeoğlu

Ankara 2018

ÖZ

QTF BİYOSENSÖR YAPILANDIRILMASI VE PERFORMANS TESTLERİ

Aylin DEDEOĞLU

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Kuvars akort çatalları (QTF) günümüzde, sabit rezonans frekansı ve yüksek kalite faktörü nedeniyle osilatör devrelerinde yaygın olarak kullanılan bir elektronik elemandır. QTF'ler son yıllarda, yaygın kullanılmakta olan kuvars kristal mikrodengelemenin (QCM) ardından kütle hassas sensörler olarak kullanılmaya başlanmıştır, fakat biyosensör olarak literatürde henüz yaygın yer almamaktadır ve yeterli optimizasyon çalışmalarına sahip değildir. Bu tez çalışmasında öncelikle, daha önce yapılan bir çalışmada geliştirilmiş 32768 Hz'lik standart QTF'ler kullanılan kütle hassas bir sensör sisteminin doğrulanması gerçekleştirilmiştir. 1 Hz frekans kaymasının eşdeğer olduğu kütle değişimi ng cinsinden ifade edilmiştir. Bunun için elektrokimyasal bir hücrede kontrollü bir yük göçü ortamı, sabit potansiyel kulometri yöntemini kullanarak yaratılmış ve QTF yüzeyine kontrollü olarak kütle birikimi sağlanmıştır. Biriken kütle Faraday'ın Elektroliz Kanunlarından faydalanılarak, bilinen yük göçü üzerinden hesaplanmıştır. Hesaplanan kütle birikiminin QTF üzerinde yarattığı frekans kayması sensör sistemi üzerinden okunmuş ve kütle değişiminin yarattığı frekans değişimi ilişkisi ortaya konmuştur. Sonuç olarak bu aşamada QTF sensör sisteminde okunan 1 Hz'lik bir frekans kaymasının 0.48786 ± 0.21255 ng kütle değişimini gösterdiği belirlenmiştir. Tez çalışmasının ikinci aşamasında ise demir-eksikliğine bağlı hastalıkların en önemli biyobelirteci olan transferrinin tayinini yapan kalitatif bir kütle hassas biyosensör yapılandırılması tamamlanmıştır. Her biyosensör çalışmasında çevirici yüzeyine, bu çalışma için QTF yüzeyine, adsorpyon ile (rastgele dizilim) ve yüzey aktivasyon ajanları aracılığıyla (düzenli dizilim) biyoreseptörler tutuklanır. Bu çalışmada QTF yüzeyini, anti-transferrin antikorunun düzenli tutuklamasına hazır hale getirmek için tiyofen-3-boronik asit (T3BA) ile yüzey aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından bu işlem için en uygun yüzey aktivasyon protokolü belirlenmiştir. Daha sonra antikor tutuklanması T3BA'nın boronat bölgeleri ile antikorun ağır zincirinde bulunan CH₂ yapıları arasındaki afiniteden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Son olarak biyosensör sisteminin transferrin cevapları incelenerek performansı test edilmiştir.

Sunulan tez çalışması sonucunda ideal olarak en düşük 1,25 µg/mL transferrin bulunan bir ortamda yapılandırılan biyosensör sisteminin transferrin varlığını gösterdiği belirlenmiştir. Sunulan sistem düşük maliyetli, taşınabilir, transferrin tayini için yapılandırılmış kütle hassas bir biyosensör sistemidir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Biyosensör, Kütle Hassas Sensör, Kuvars Akort Çatalı (QTF), Transferrin

Danışman: Doç. Dr. Dilek ÇÖKELİLER, Başkent Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü.

Eş Danışman: Dr. Mehmet Altay ÜNAL, Ankara Üniversitesi, Fizik Mühendisliği Bölümü

ABSTRACT

BIOSENSOR DEVELOPMENT AND PERFORMANCE TESTS

Aylin DEDEOĞLU

Department of Biomedical Engineering

Quartz Tuning Forks (QTFs) are known as common oscillator components due to their stable resonant frequencies and high quality-factors. In recent years, QTFs have started to be implemented as transducers into sensor systems after the Quartz Crystal Microbalance (QCM) transducers. However, QTFs are still not widespread as biosensors in literature and there is a lack of its optimization studies. In the first step of the presented thesis study, a previously developed QTF mass-sensitive sensor system has been validated through an electrochemical method -coulometry. The system was utilized for applying calculations and finally formulizing the mass-change (ng) that equals for every 1 Hz frequency shift for the standard 32768Hz QTF. In order to pursue this aim, a controlled charge migration environment is created in an electrochemical cell utilizing an electrochemical method named constant potential coulometry. This ensured a controlled mass migration onto the QTF surface. The migrated mass amount was calculated according to Faraday's Laws of Electrolysis through the migrated charge values. According to Faraday's Laws of Electrolysis, the number of electrons that passes through an electrochemical cell and the element itself effects the amount of mass that deposits on an electrode. This rule is applied for the system and a mass load value was calculated. for each calculated mass a relation was set between the frequency shift. Consequently, for each 1 Hz frequency shift that is read on the QTF sensor system, 0.48786 ± 0.21255 ng mass change occurs. In the second stage of the presented study, a qualitative biosensor system that detects transferrin, which is the most important biomarker of diseases caused by iron deficiency, has been fabricated. For any biosensor study the transducer, in this case the QTF, surface is either adsorbed with a biological receptor (non-oriented immobilization) or the receptors are immobilized by surface activation methods (oriented immobilization). QTF surfaces were treated with thiophene-3-boronic acid (T3BA) for surface activation to enable oriented anti-transferrin antibody immobilization due to the affinity between boronate and CH₂ structures in the heavy chain of antibodies. The optimum surface activation

treatment protocols were determined, and immobilization protocols were applied. Lastly, the response of the biosensor system after transferrin interactions were examined and the performance of the system was tested. The presented study results show that the proposed mass-sensitive QTF biosensor indicates transferrin molecules are present in 1,25 mg/mL concentration of the analyte and is low-cost and portable.

KEYWORDS: Biosensor, Mass-sensitive sensor, Quartz Tuning Fork (QTF), Transferrin

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU, Başkent University, Department of Biomedical Engineering

Co-advisor: Dr. Mehmet Altay ÜNAL, Ankara University, Department of Physics Engineering

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
1 GİRİŞ.....	1
1.1 Sensör ve Biyosensör Kavramları.....	1
1.2 Çevirici Tipine Göre Biyosensör Sınıflandırılması.....	2
1.2.1 Elektrokimyasal çeviricili sensörler.....	2
1.2.2 Optik çeviricili sensörler.....	2
1.2.3 Kütle hassas çeviriciler, sensörler ve önemi.....	3
1.3 Kuvars Akort Çatalı Çeviricisi ve Biyomedikal Uygulamaları.....	3
1.3.1 Kuvars akort çatalı çalışma prensibi.....	3
1.3.2 Kuvars akort çatalının biyomedikal uygulamaları.....	6
1.4 Elektrokimyasal Hücre ve Kontrollü Kütle Göçü Ortamı.....	7
1.5 Transferrin Önemi ve Tayini İçin Biyosensör Yapılandırılması.....	10
2 DENEYSEL ÇALIŞMA	17
2.1 Elektrokimyasal Hücre ve Kontrollü Kütle Göçü Ortamında QTF Kalibrasyonu.....	17
2.1.1 Materyal ve metot.....	17
2.1.1.1 Elektrokimyasal deney düzeneği.....	18
2.1.1.2 Voltaj ve süre optimizasyonu.....	20
2.1.1.3 Yüzey karakterizasyonu.....	20
2.1.1.4 QTF çeviricisi üzerinde gözlenen frekans kayması ile kütle değişimi ilişkisi.....	20
2.2 Transferrin Tayinin için Kütle Hassas QTF Sensörü Yapılandırılması.....	21
2.2.1 Materyal ve metot.....	21
2.2.1.1 Tiyofen 3 boronik asit (T3BA) ile QTF yüzey aktivasyonu.....	21
2.2.1.2 Antikor (TRC-2) tutuklama.....	22
2.2.1.3 Transferrin cevabı.....	23
3 SONUÇ VE ÖNERİLER.....	25

3.1 Elektrokimyasal Hücre ve Kontrollü Kütle Göçü Ortamında QTF Kalibrasyonu.....	25
3.1.1 Kulometrik potansiyel optimizasyonu.....	25
3.1.2 Süre optimizasyonu.....	27
3.1.3 Yüzey karakterizasyonu.....	30
3.1.4 QTF çeviricisi üzerinde gözlenen frekans kayması ile kütle değişimi ilişkisi.....	33
3.2 Transferrin Tayini için Kütle Hassas QTF Biyosensör Yapılandırılması.....	34
3.2.1 QTF yüzey aktivasyonu.....	34
3.2.2 Antikor tutuklama.....	37
3.2.3 Transferrin QTF biyosensörü için kalibrasyon eğrisi.....	40
KAYNAKLAR LİSTESİ.....	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	Biyosensör sisteminin şematize edilmiş görseli.....	2
Şekil 1.2	a. QTF Sensör Sistemi, b. İçerisinde vakum ortamı bulunan silindir kapak ile kapalı hali, c. QTF'in vakumlu silindir kapağının çıkartılmış hali	5
Şekil 1.3	Biyosensörlerin literatüre girişinden itibaren kullanılan çevirici ve tayini yapılan analitleri gösteren zaman çizelgesi.....	6-7
Şekil 1.4	QTF frekans ölçüm sisteminden okunan yüzeyinde kütle birikimi yapılmamış QTF rezonans frekansının ara yüzünden okunan ham veri.....	8
Şekil 1.5	Rastgele dizilim ile antikorların çevirici yüzeyine tutuklanması, a. Antijen bağlanma bölgelerinden yüzeye tutuklanmalar b. Üstüste binmelerden dolayı antijen bağlanma bölgelerinin kapandığı tutuklamalar.....	13
Şekil 1.6	Düzenli antikor dizilimi stratejileri.....	14
Şekil 1.7	T3BA yüzey aktivasyon ajanı ile düzenli antikor dizilimi.....	14
Şekil 2.1	Deney akış şeması.....	17
Şekil 2.2	Elektrokimyasal deney düzeneği.....	18
Şekil 2.3	QTF sensör sisteminden alınan frekans ölçüm verisi.....	19
Şekil 2.4	QTF çeviricisinin bağlantı bacakları 5cm'lik bakır teller ile kaplanmıştır.	19
Şekil 3.1	-0,3V ile 0,1 V arasındaki potansiyellerde, sabit kulometri çalışma koşulları altında, 90sn, pH'sı 4,7 olan asetat tamponu içerisinde 0.05M bakır nitrat çözeltisindeki frekans farkları (Δf).....	25
Şekil 3.2	-0.3V, -0.2V, -0.1V, 0V, 0.1V potansiyel altında (sırasıyla a-e) 90sn kulometri.....	26
Şekil 3.3	Birikim Süresi sırasıyla 10sn, 20sn, 30sn, 40sn, 50sn, 60sn, 70sn, pH'sı 4,7 olan asetat tamponundaki 0,05M bakır çözeltisi içerisinde bekletilen QTFler.....	28
Şekil 3.4	10'ar saniye kulometrik uygulama sonucunda QTF çevirici yüzeyindeki iyon indirgenmesi sonucu oluşan bakır tabakalandırma. t - Δf trendi.....	29
Şekil 3.5	SEM Görüntüleri.....	30
Şekil 3.6	SEM-EDX spektrumları.....	31
Şekil 3.7	a. 60sn, b. 75sn, c. 90sn birikme sürelerinde SEM-EDX bakır kaplama spektrumları.....	32
Şekil 3.8	Artan kulometrik uygulama süreleri ile kaplanan QTF yüzeylerinin SEM-EDX element analizi.....	32
Şekil 3.9	a. Protokol I sonrası QTF frekans cevabı (Derişim 10mM, Süre: 6sa T3BA-su çözeltisi), b. Protokol II sonrası QTF frekans cevabı (Derişim 10mM, Süre: 6sa T3BA-metanol çözeltisi).....	35

Şekil 3.10	Farklı QTF yüzey aktivasyon protokollerinin karşılaştırılması.....	37
Şekil 3.11	Kaplanmamış QTF, T3BA, TRC-2 rezonans frekansı karşılaştırmaları.	39
Şekil 3.12	Antikor derişiminin optimizasyonu.....	40
Şekil 3.13	Frekans kayma hesaplamalarına göre TRC-2 çözelti dilüsyon aralığı..	41
Şekil 3.14	Sabit antikor dilüsyonlarında bekletilmiş QTF'lerin değişen antijen miktarları ile etkileşimi frekans değişimi sonuçları.....	42
Şekil 3.15	1,25 µg/mL antikor derişiminde kaplanmış QTF'lerin T3BA modifikasyonu, TRC-2 tutuklanması ve 1mg/mL derişimde antijen ile etkileşimi sonuçları.....	43

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1	Literatürde rastlanan transferrin tayini için geliştirilen biyosensör sistemleri.....	11
Çizelge 1.2	Biyosensör yüzeylerine düzenli ve rastgele antikor dizilimleri ile antikor tutuklama stratejilerinin literatür örnekleri.....	12
Çizelge1.3	Antikor tutuklama için yüzey aktivasyonu yöntemlerinin karşılaştırılması.....	15
Çizelge 3.1	Her bir QTF için 10sn-70sn birikim sürelerine göre hesaplanan Δf ve Q değerleri.....	27
Çizelge 3.2	Tabaka tabaka kaplanan QTF'lerin hesaplanan Δf , Q ve m değerleri.....	33-34
Çizelge 3.3	Protokol II ve Protokol III Frekans ve Kütle Değişimi Sonuçları Karşılaştırması.....	36
Çizelge 3.4	Protokol II ile yüzeyi aktive edilmiş QTF'lerin frekans kaymaları-kütle değişimi ve sonra 2 μ g/mL TRC-2 çözeltisine daldırılmasının ardından okunan frekans kaymaları-kütle değişimi.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği)
Δf	Frekans değişimi, kayması
AFM	Atomic Force Microscopy (Atomik Kuvvet Mikroskobu)
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
C ₁	Kapasitans değeri
CH ₂ -	Metilen
cm	Uzunluk birimi, santimetre
CO ₂	Karbondioksit
Cu	Bakır
DDS	Direct digital synthesizer
DNA	Deoksiribonükleik asit
e ⁻	Elektron
EDX	Energy dispersive X-ray analysis (Enerji dağılımlı X-ışını analizi)
EIS	Electrochemical impedance spectroscopy (Elektrokimyasal empedans spektroskopisi)
F	Frekans
Hz	Frekans birimi, Hertz
IgG	İmünoglobulin G
L ₁	İndüktans değeri
M	Molarite birimi, Molar
MAM	Marmara Araştırma Merkezi
mg	Kütle birimi, Miligram
mL	Hacim birimi, mililitre
mm	Uzunluk birimi, milimetre
mM	Molarite birimi, milimolar
ng	Kütle birimi, Nanogram
NH ₃	Amonyak
O ₂	Oksijen
Pd	Paladyum

pg	Kütle birimi, Pikogram
pH	Asitlik derecesi, Hidrojen konsantrasyonunun 10 tabanında negatif logaritması
Q	Yük indirgenmesi
Q faktörü	Rezonans devresinde kalite faktörü
QCM	Quartz crystal microbalance (Kuars kristal mikrodengeleme)
QTF	Quartz tuning fork (Kuars akort çatalı)
R	Direnç değeri
RLC	Resistor inductor capacitor (Direnç indüktans kapasitör devresi)
rpm	Revolutions per minute (dakika başına devir sayısı)
SAW	Surface acoustic wave (Yüzey akustik dalgalanma)
SEM	Scanning electron microscopy (Tarama elektron mikroskobu)
Si	Silisyum
sn	Zaman birimi, saniye
T3BA	Tiyofen 3 boronik asit
Ti	Titanyum
Torr	Basınç birimi
TRC-2	Anti-transferrin antikoru
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
V	Elektrik potansiyel birimi, Volt
X ^{+/-n}	Katyon ya da anyon
µC	Yük birimi, Mikrokulomb
µg	Kütle birimi, Mikrogram
µL	Hacim birimi, mikrolitre

1. GİRİŞ

1.1. Sensör ve Biyosensör Kavramları

Biyosensör terimi Latince kökenli olan “sensus” kelimesinden türemiştir. “Sensus”, “algılamak” anlamına gelmektedir. “Sensör” ise bir sinyali algılayıp cevap veren cihazlar olarak tanımlanabilir. Sensörler temel olarak, kimyasal ve fiziksel sensörler olarak iki sınıfa ayrılabilirler [1]. IUPAC 1991’e göre verilen tanımlamaya göre, kimyasal sensör, kimyasal bir bilgiyi (spesifik bir örnek içeriğinin derişimi veya toplam içerik analizi vb.), işlevli ve anlamlı bir analitik sinyale çeviren cihazlara denmektedir. Bu kimyasal bilgi, bir analitin kimyasal reaksiyonu ya da bir sistemin fiziksel özelliklerinden ortaya çıkabilir. IUPAC 1991’e göre fiziksel sensör ise bir sistemin fiziksel özelliklerini gösteren bilgiyi sağlayan cihazlara denmektedir [2].

Fiziksel ve kimyasal algılama tekniklerinin birleşimi olan biyosensörler, son zamanlarda ortaya çıkan sensör sınıflarından biridir ve IUPAC tarafından yirmi seneden daha fazla süre önce tanınmıştır [1]. Fakat aslında, Clark ve Lyons 1962 yılında ilk defa biyoreseptörler aracılığı ile biyo-analit tespiti gerçekleştiren sensör uygulamaları gerçekleştirmiş ve biyosensör kavramı ilk defa ortaya atılmıştır [3]. Biyoreseptörler biyokimyasal tanıma mekanizması ile çalışan, organik bir molekül çeşidi (ör. antikor, enzim, protein ya da nükleik asit) ya da canlı biyolojik sistemlerdir (ör. hücreler, dokular ya da organizmalar) [4]. Biyosensör çalışmalarında yaygın olarak kullanılan biyoreseptörler antikor, enzim, MIPler, DNA, aptamerler ve hücreler olarak verilebilir.

Yukarıda verilen biyolojik elemanları genel olarak biyosensörlerin çevirici yüzeylerinde immobilize edilmiş halde bulunmaktadır. Algılama gerçekleştikten sonra bir sinyal çevirici tarafından oluşturulur ve sinyal analitik bir sinyale çevirilir. Analitik sinyal okunabilir ve modifiye edilebilir, bu yüzden çevirici elemanı sensör sistemleri içerisinde yüksek bir öneme sahiptir.



Şekil 1.1 Biyosensör sisteminin şematize edilmiş görseli

1.2. Çevirici Tipine Göre Biyosensör Sınıflandırması

Çeviricilerin fonksiyonu, tanıyıcı tabakada oluşan maddeye özgü sinyali, bu sinyalle orantılı ölçülebilir enerjiye çevirmektir ki genel olarak bu enerji elektrik sinyali şeklindedir. Bu görev, geniş bir seçenekler yelpazesi sunan farklı tip çeviricilere düşmektedir. Örneğin; elektrokimyasal çeviriciler ile, akım değişimi (amperometrik), gerilim değişimi (potansiyometrik) ya da iletkenlik değişimi ölçülebilir. Optik çeviriciler ise elektromanyetik ışımaların emilme, yansıma, saçılma ya da tekrar yayınlama gibi etkilerinin yoğunluklarının ölçülmesi temelinde çalışır. Kütle değişimlerini ölçebilen çevirici tipleri ise kütleyle bağlı frekans değişimlerini algılayarak çalışır. Biyosensörler, çeviricilerine göre sınıflandırılabilir.

1.2.1. Elektrokimyasal çeviricili sensörler

Elektrokimyasal sensörler, elektrokimyasal bir bilgiyi işlevli bir analitik sinyale çeviren cihazlara denmektedir. Genel olarak iki temel elemandan oluşmaktadırlar, bunlar; bir kimyasal (moleküler) algılama sistemi ve bir fizikokimyasal çeviricidir. Kimyasal (moleküler) algılama sistemi, elektrokimyasal sensörün en önemli parçası olarak sayılabilir. Fizikokimyasal çevirici ise kimyasal cevabı, günümüz elektriksel enstrümanlar tarafından algılanabilecek sinyale çeviren bir cihazdır [5]. İlk elektrokimyasal biyosensör yine Clark ve Lyson tarafından 1962 yılında yapılan çalışmasında üretilmiş olup glukoz molekülünü algılamaktadır [3]. İlk ticari biyosensör ise Springs Instruments (Yellow Springs, OH, USA) tarafından 1975 yılında piyasaya sürülmüştür [5]. Glukoz biyosensörleri, önemli ve yaygın kullanılan bir elektrokimyasal sensör örneğidir. Biyolojik veya kimyasal bir sinyalin, bir elektrik sinyaline çevirilmesi amperometri, voltametri, potansiyometri veya kondüktometri ile sağlanabilmektedir. Kütle hassas bir detektör, üzerinden birim zamanda geçen çözünmüş maddenin kütlesine cevap vermektedir.

1.2.2. Optik çeviricili sensörler

Optik çeviriciler, kimyasal belirteç kaplı bir fiberoptik bileşenden oluşurlar. Konsantrasyon tespiti ya da belirli bir analitin miktarının belirlenmesi, floresan, biyoluminesans ya da kemoluminesans gibi elektromanyetik ışımaların emilme,

yansıma, saçılma ya da tekrar yayınlama gibi etkilerinin yoğunluklarının ölçülmesiyle gerçekleştirilir [6]. Bu tip sensörlerin en önemli özellikleri, küçük boyutlarda üretilebilmeleri ve düşük maliyetleridir. Bu tip çeviriciye sahip sensörlerle yapılmış, pH [7], CO₂ [8], NH₃ [9], O₂ [10], glikoz [11] ve biyokütle [12] çalışmaları literatürde yer almaktadır.

1.2.3. Kütle hassas çeviricili sensörler ve önemi

Kütle hassas biyosensörlere gravimetrik (ağırlıksal) biyosensörler de denmektedir. Mekanik çevirme yöntemleri temel olarak mekanik veya akustik dalgaların oluşması ve algılanmasına dayanmaktadır. En yaygın kütle hassas cihazlar piezoelektrik kristallere, kuvars kristal mikrodengeleme (QCM) ve yüzey akustik dalgalarıdır (SAW) [13]. Bunların yanında son zamanlarda literatürde sensör sensör ve biyosensör çalışmaları içerisinde yer almaya başlayan Kuvars Akort Çatalı (QTF) da kütle hassas bir çeviricidir.

1.3. Kuvars Akort Çatalı Çeviricisi ve Biyomedikal Uygulamaları

1.3.1. Kuvars akort çatalı çalışma prensibi

Kuvars piezoelektrik özelliğe sahip bir kristaldir. Piezo kelimesi, Yunanca'dan türetilmiştir; "sıkıştırmak, basınç uygulamak" anlamlarına gelmektedir. Piezoelektrik özelliğe sahip malzemeler, üzerlerine uygulanan mekanik basınç sonucunda elektrik alanları ya da elektrik potansiyellerinde değişime yeteneği gösterirler. Bu etki, malzemenin içindeki polarizasyon yoğunluğundaki değişimle doğrudan alakalıdır ve bu etkiye piezoelektrik etki adı verilir. Piezoelektrik malzemeler basınca bağlı elektriksel potansiyel üretirken aynı zamanda bir elektrik alan içerisine konulduğunda gerinim değişimi ve titreşme özelliği de gösterirler. Bu etkiye de ters piezoelektrik etki denir. Bu etki sayesinde Kuvars Mikrodengeleme (QCM) gibi piezoelektrik algılayıcılar ile çeşitli nem algılayıcıları, film kaplama monitörleri, gaz sensörleri ve kimyasal sensörler geliştirilmiştir [14], [15], [16], [17], [18], [19], [20]. Bunun yanında bu algılayıcılar kütle hassas bir terazi olarak çalışabilmekte ve kütle algılanmasında kullanılabilir [21]. Kuvars Akort Çatalı (QTF), kuvars tabanlı, kendinden uyarmalı ve kendinden duyarlı ve çatal şeklinde bir mekanik yapıya sahip rezanötördür. QTF'ler, müzikte kullanılan akort çatalına benzer olarak bir sürücü kuvvet – elektronik bir sinyal – ile sabit frekansta titreşme özelliği gösterirler. Ucuz,

küçük boyutlu ve seri üretime uygun olmalarının yanı sıra uzun süre sabit frekansta titreşebilmeleri nedeni ile QTF'ler elektronikte yaygın bir kullanım alanına sahiptir ve literatüre ilk olarak Forrer'in 1969'da yayınlanan çalışması ile girmişlerdir [22]. Bu çalışmanın ardından, QTF'ler, bir rezonatörün en önemli parameterelerinden olan, yüksek kalite faktörüne (Q faktörü) bağlı olarak özellikle osilatör devrelerinde ve frekans ölçüm sistemlerinde yaygın olarak kullanılarak önemli bir elektronik eleman haline gelmiştir. QTF'lerin yüksek Q faktörü çatal dişlerinin temel malzemesi olan ve akustik enerjiyi sınırlandırabilen kuvarsa ve çatal dişlerinin simetrisine bağlıdır [23]. Q faktörü, bir rezonatörün sahip olduğu kinetik ve potansiyel enerjilerin birbirine oranı ile ortamın direncine bağlıdır. Her rezanötör seri bağlı direnç-indüktör-kapasitör (RLC) devresi olarak modellenenebilir. Bu modele bağlı olarak Q faktörü elektriksel olarak aşağıdaki formül ile ifade edilir;

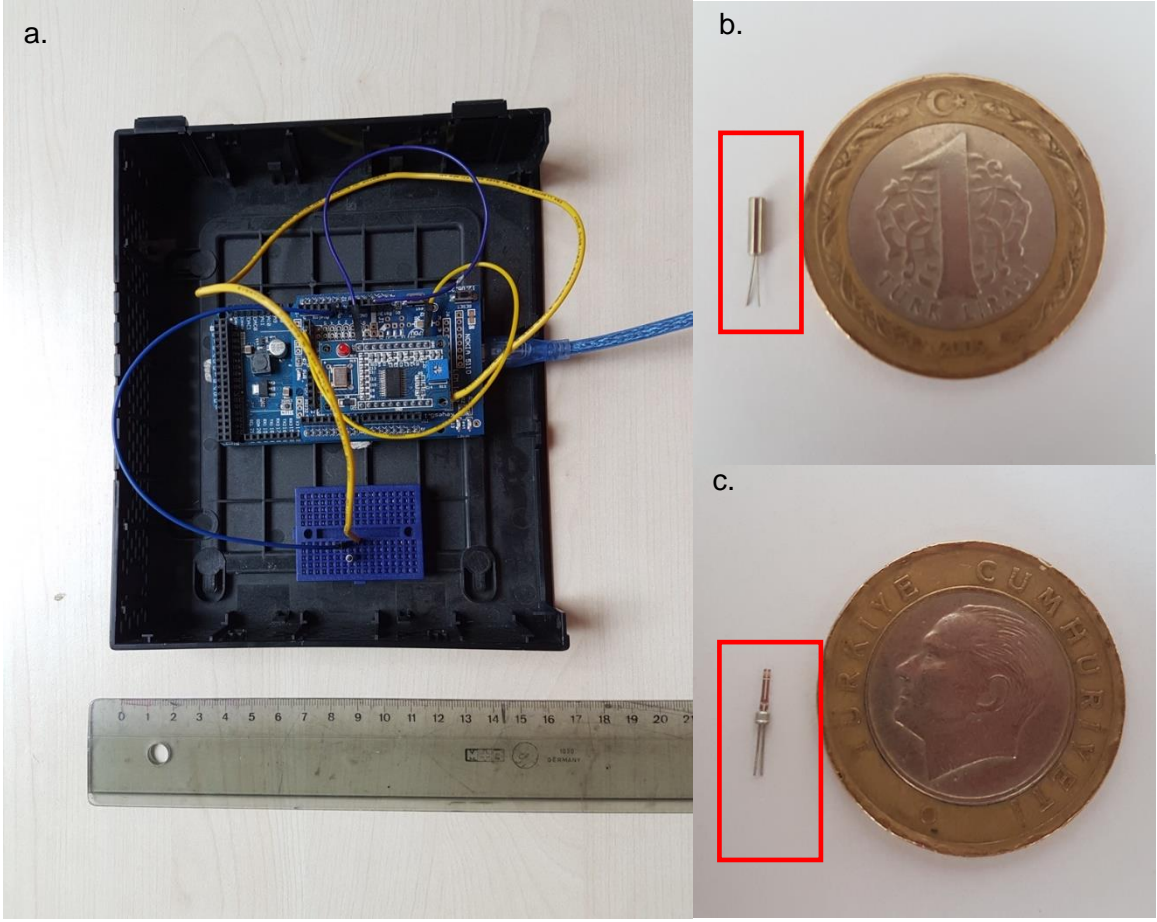
$$Q = \frac{1}{R} \sqrt{\frac{L_1}{C_1}} \quad (1.1)$$

R: Direnç değeri

L₁: İndüktans değeri

C₁: Kapasitans değeri

Görüldüğü üzere, bir devredeki enerji kaybı azaldıkça Q faktörünün değeri artar. Bu elektriksel model mekanik bir sisteme ayarlandığında, R direncinin karşılığı sisteme karşı koyan sürtünme kuvvetidir. Havanın rezanötör üzerinde oluşturduğu sürtünme kuvveti rezanötörün salınımına karşı bir direnç oluşturur ve Q faktöründe düşüş gözlenir. Bu nedenle QTF'ler ticari olarak çatalın hava ile temasını engelleyecek şekilde bir silindirik şapka ile yüksek vakumla kapatılmış olarak satılmaktadır. ($\cong 10^{-5} \text{Tor}$) [24]. QTF'lerin yüksek Q faktörü, Atomik Kuvvet Mikroskoplarında (AFM) angström seviyesinde ölçümü sağladığı için yaygın olarak kullanılmaktadır [25]. Hız ve ivme ölçümleri için gyroskop çalışmalarına da literatürde rastlanmaktadır [25], [26]. QTF sensörler kullanılarak sıvıların yoğunluk ölçümlerine yönelik çalışmalarda yüksek başarımlar elde edilmiştir [24], [27] Bunlarla birlikte; ortamın nemi, sıvıların viskozitesi, kuvvet, basınç ve sıcaklık parametrelerinin ölçümü için de QTF sensörlerin kullanıldığı çalışmalara rastlanmaktadır [14], [28]. [29], [30], [31], [32].

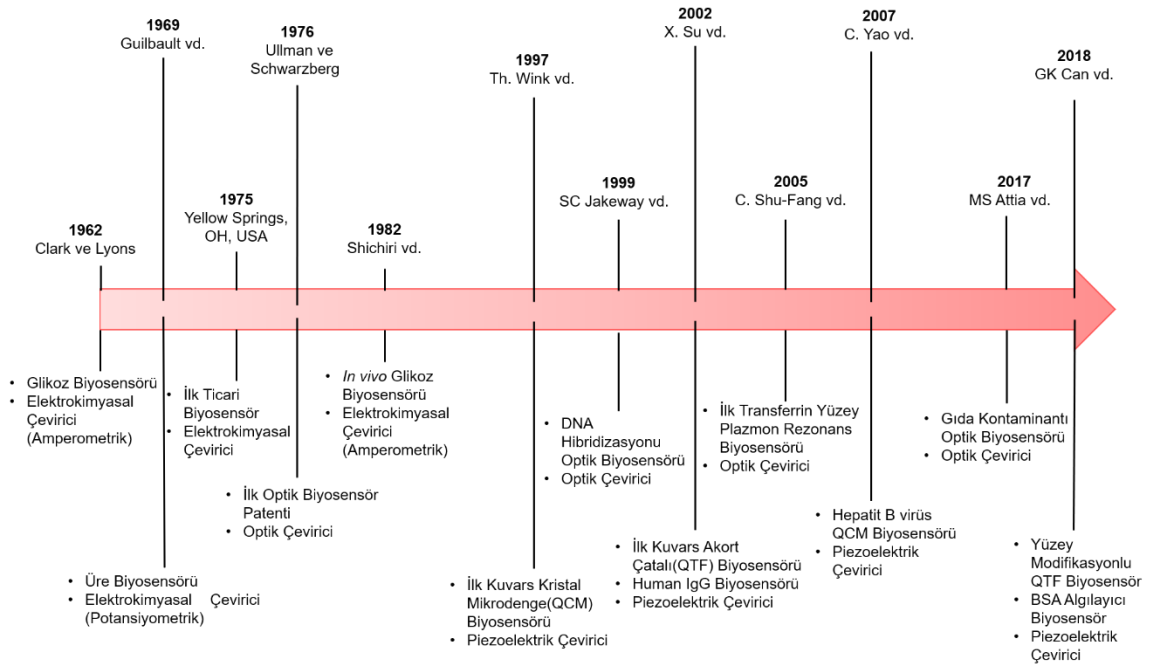


Şekil 1.2 a. QTF sensör sisteminin bilgisayara takılabilir ölçüm bölümü, b. Çeviricinin vakum ortamı bulunan silindir kapak ile kapalı hali, c. QTF'in vakumlu silindir kapağının çıkartılmış hali

Yapılan tez çalışması kapsamında kullanılan kuvars akort çatalı frekans ölçüm sistemi 2016'da yayınlanan Mehmet Altay Ünal'ın doktora tezi kapsamında geliştirilmiş olup bir patent başvurusuna sahiptir [33]. Sistem, bir kuvars akort çatalı, bu akort çatalının kendisini dışarıdan sinüs sinyali ile uyararak programlanabilir osilatör devresi ile akort çatalı tarafından orantılı olarak salınan sinüs sinyalini toplayarak genliğini ekrana aktaran elektronik birimlerden oluşmaktadır. Piezoelektrik özelliğe sahip kristaller bir osilatör devresi ile kendi doğal titreşim frekansları olan rezonans frekansında sinüs sinyali sürülmesi halinde en yüksek tepkiyi vermektedirler. Yani kendi ürettiği sinüs sinyali en yüksek genliğe sahip olmaktadır ve eğer kristal üzerine kütle ilave edilirse, rezonans frekansında bir kayma gerçekleşecektir ve bu kayma kütle ile orantılı olacaktır. Şekil 1.2 'de QTF çatalı görülmektedir. Şekilde cihazın ve QTF'lerin ebatları kıyaslanarak gösterilmiştir.

1.3.2. Kuvars akort çatalının biyomedikal uygulamaları

Rezonans frekansında meydana gelen bu kaymanın algılanması ile kütle değişiminin algılanabileceği bir QTF sensör sistemi yapılandırılabilir. Zhang ve O'Shea 2003'te 10000000 Hz lik bir QCM çeviricisi ile deneysel olarak ölçülebilecek kütle miktarı 1ng/Hz iken, 32768 Hz'lik bir QTF çeviricisi ile deneysel olarak 1,3 ng/Hz lik bir hassasiyette ölçüm yapabildiği teorik ve deneysel olarak ispatlamıştır [27] . Böylece yüksek frekanslı QCM (10000000 Hz) ile inilen hassasiyet (1 ng/Hz), ona göre oldukça düşük frekanslı QTF (32768 Hz) ile yakalanabileceği ortaya konmuştur. QTF biyosensörlerinin literatürde yer almaya başlamasının görülebileceği bir biyosensör tarihi diyagramı Şekil 1.3'te verilmiştir. Daha önce belirtilen QTF sensör çalışmalarının ardından 2002 yılında Su vd.'nin yayınladığı çalışma ile QTF biyosensörleri literatürde yer almaya başlamıştır [25]. Su vd. bu çalışmalarında QTF sensör kullanarak IgG tespitini amaçlamışlardır ve QTF sensör ile yaklaşık 2 ppm hassasiyete düşebilmişlerdir. 2010, 2011 ve 2014 yıllarında Waszczuck vd.'nin QTF biyosensör çalışması yayınlanmıştır. *Pseudomonas Aeruginosa* için antibiyotik aktivitesine bağlı biyofilm aktivitesini ölçmeyi hedefleyen çalışma grubu çalışmaları ise QTF sensörü ile endotoksin tespitini hedeflemektedir [34], [35], [36]., *Pseudomonas Aeruginosa* için biyofilm aktivitesi ölçen bir başka çalışma ise Otero vd. tarafından 2013'te yayınlanmıştır [37].



Şekil 1.3 Biyosensörlerin literatüre girişinden itibaren kullanılan çevirici ve tayini yapılan analitleri gösteren zaman çizelgesi

Biyoteknolojik süreçlerde çevresel şartların ölçümlerinde farklı tasarımlarda QTF sensörlerin kullanılabilmesi görülmektedir. QTF biyosensör çalışmaları göz önünde tutulursa; monoklonal antikör üretimi, düşük miktardaki biyolojik analitlerin tespiti (Kanda dolaşan tümör hücreleri vb.), biyolojik yolların belirlenme çalışmaları gibi biyoteknoloji ve biyomedikalle ilgili alanlarda, QTF sensörlerin ciddi kullanım potansiyelleri olacaktır.

1.4. Elektrokimyasal Hücre ve Kontrollü Kütle Göçü Ortamı

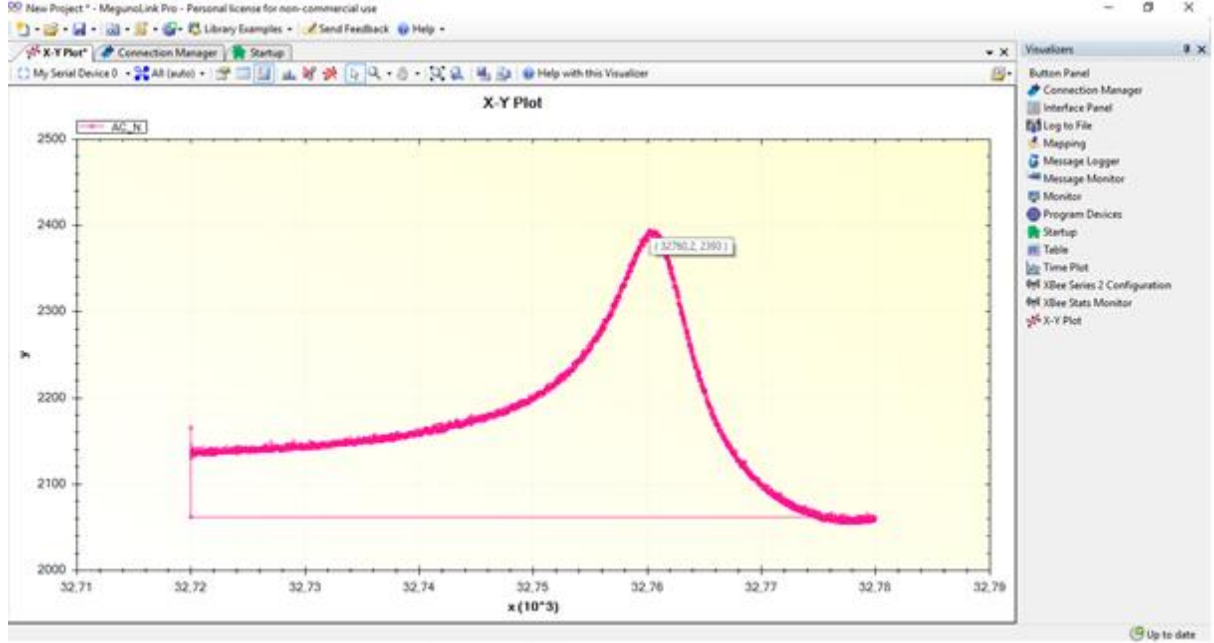
Bu tez çalışmasında elektrokimyasal bir hücre içerisinde kontrollü bir yük göçü ortamı sağlanarak QTF yüzeyinde kontrollü kütle birikimi gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerin amacı, QTF sistemindeki frekans kayması (Hz) ve kütle birikimi (pg/ng) arasındaki korelasyonu belirlemektir. Biyosensör olarak kullanılacak olan QTF sistemlerinde, QTF çeviricilerinin yüzeyleri, bir molekülü algılamak için ya da yüzeyi işlevselleştirmek için modifiye edilmelidir. Bu aşamada, yüzey aktivasyonu için oluşturulacak yüzeydeki tabakalar kütle birikimine sebep olmaktadır. Yani frekans kayması ve kütle birikimi (pg/ng) arasındaki korelasyonu belirlemek sensör sistemi için önemlidir. Bahsedilen aşamaların optimizasyonu, saturasyonu (doyumu) engellemek için büyük önem taşımaktadır. Araştırmalar sonucunda, kontrollü kütle birikimi kullanan herhangi bir elektrokimyasal yöntem ya da QTF rezonans frekansı kayması ile kütle birikimi belirleyen bir çalışma bulunamamıştır.

Kütle değişimi ve frekans kaymaları arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi için öncelikle QTF sensör sisteminden frekans kayması sonucunun nasıl elde edildiği açıklanmalıdır. QTF rezonans frekansı kaymaları (Δf), kütle birikimi olmayan QTF rezonans frekansından, kütle birikimi olan QTF rezonans frekansının matematiksel olarak çıkarılması ile elde edilir. Aşağıda verilen Sauerbrey denklemine göre Δf , QTF çevirici yüzeyi üzerindeki ng cinsinden kütle değişimine (Δm) eşittir [38].

$$S = \frac{\Delta f}{\Delta m} = -\frac{f_0}{2m} = -\frac{1}{\pi} \frac{1}{\omega^3 \ell^3} \sqrt{\frac{E_q}{\rho_q^3}} \quad (1.2)$$

Şekil 1.4.'te ise QTF sensör sisteminden okunan bir örnek ham veri gösterilmiştir. Bu örnekte ölçülen QTF silindir kapağından yeni çıkarılmış, üzerinde kütle birikimi

olmayan bir QTF'tir. Fakat görüleceği üzere rezonans frekansı tam olarak 32768Hz değil yaklaşık 32760 Hz'tir. Bu durum QTF rezonans frekansındaki kaymanın yalnızca kütle kaymasına bağlı olmadığını gösterir.



Şekil 1.4 QTF frekans ölçüm sisteminden okunan yüzeyinde kütle birikimi yapılmamış QTF rezonans frekansının ara yüzünden okunan ham veri

Sauerbrey'in Formül 1.2'de verilen denkleminde QTF'i etkileyen hiçbir ortam koşulu ele alınmamıştır. Fakat Mecea vd.'nin yaptığı bir çalışmada bir QTF kristalinin rezonans frekansının etkilendiği 5 parametre olduğu ortaya konmuş ve Formül 1.3'te verildiği gibi formülüne edilmiştir [39]. Görüldüğü üzere QTF sensörün rezonans frekansını etkileyen parametreler sırasıyla; kütle, sıcaklık, gerilim, basınç ve gaz viskozitesidir. Buna göre, içerisinde vakum koşulları bulunan silindir kapağından çıkarılan bir QTF üzerine biriken kütle miktarını belirlemek için yalnızca Sauerbrey eşitliği yeterli olmayacaktır.

$$\frac{\Delta f}{f_q} = \left(\frac{\Delta f}{f_q}\right)_M + \left(\frac{\Delta f}{f_q}\right)_T + \left(\frac{\Delta f}{f_q}\right)_S + \left(\frac{\Delta f}{f_q}\right)_P + \left(\frac{\Delta f}{f_q}\right)_\eta \quad (1.3)$$

Bu nedenle bu tez çalışmasında 32768Hz'lik QTF sensör sisteminde okunan frekans kayması ile QTF üzerindeki kütle değişimi arasında bir ilişki kurularak QTF sensör sisteminin doğrulanması hedeflenmiştir. Bunun için yapılan hesaplamalar Faraday'ın birinci ve ikinci elektroliz kanunlarına dayanarak gerçekleştirilmiştir. Faraday'ın birinci kanuna göre; elektroliz devresinden geçen madde miktarı, akan

elektrik yükü ile doğru orantılıdır. Yani, belirli birikim süresinde (t), devreden akan elektrik yükü (Q) ve akım (I) arasındaki ilişki; $Q = I \times t$ denklemi ile gösterilebilmektedir [40]. Çalışma elektrodu üzerinde biriken kimyasalın moleküler ağırlığı da elektroliz ile gerçekleşen birikimin kütesini, elektrolitten geçen elektrik miktarı gibi doğrudan etkilemektedir. Her madde kendine özgü atom ağırlığına sahiptir, yani aynı sayıdaki atom göz önünde bulundurulduğunda her bir farklı madde farklı kütleye sahiptir. Elektrot üzerinde biriken atom miktarı valans sayısına bağlıdır. Aynı miktardaki elektrik ile, valans sayısı azaldıkça biriken atom sayısı artar veya valans sayısı arttıkça biriken atom sayısı azalır. Bu nedenle, farklı elektrolitlerden geçen elektrik veya yük sabit ise, elektrot üzerinde biriken kimyasalın kütlesi, maddenin atom ağırlığı ile doğru, valansı ile ters orantılıdır. Faraday'ın ikinci elektroliz kanununa göre ise, farklı elektrolitlerin elektrolizi esnasında her hücreden geçen elektrik miktarı aynı ise, madde birikiminin kütlesi, maddenin eşdeğer ağırlığı ile doğru orantılıdır [41]. Faraday'ın bu kanunlarına göre, elektroliz ile göç eden elektrolitlerin miktarı geçen atomun cinsine ve geçen elektron sayısına bağlıdır. Bu durumda, indirgenen veya yükseltgenen atom cinsi ve geçen elektron yani yük miktarının bilindiği kontrollü bir ortam oluşturulması gerekmektedir.

Bu çalışmada, bir elektrokimyasal hücre içerisinde kontrollü yük göçü ortamının sağlanması için kulometri metodu kullanılmıştır. Kulometri, mutlak analitik bir yöntem olarak birçok bileşiğin metalini ölçmek için kullanılabilir. Elektrokimyasal redoks reaksiyonundaki toplam elektron miktarı elde edilmektedir. Fakat, voltametrik yöntemler, elektrot alanını ve analitlerin difüzyon katsayısını gerektirdiği için bu avantajı ortaya koyamazlar. Kulometri bu bilgilere ihtiyaç duymamaktadır. Ayrıca kulometri yöntemi, elektrolizi %100'lük bir verim ile sağlayabilmektedir. Bu çalışmada, elektrokimyasal teknik olarak sabit potansiyel kulometri uygulanmıştır. Sabit potansiyel kulometri, iyonlarının indirgenmesi veya yükseltgenmesi için gerekli olan elektrik yükünün (coulomb cinsinden) hesaplanması temeline dayanmaktadır. Entegre akım değerleri, göç eden yük değerini vermektedir [42].

Belirtildiği üzere, bu tez çalışmasında kulometrik yöntem ile QTF yüzeyine bakır indirgenmiştir. QTF'lerin sensör olarak kullanılmaya başlanmasından önce kuvars kristal mikrodengeleyiciler (QCM) en önemli kütle algılayıcı cihazlar olarak sayılmaktaydı. QCM'ler havadaki ya da sıvıdaki kütle değişimlerini incelemek için

kullanılabilmektedirler. Bunun yanı sıra, vakum ortamından hava veya sıvıya alınan QCM'lerin davranışları değişmektedir. Aynı zamanda ısı, hava veya sıvıların kesme gerilmesi ve başka parametreler de QCM'i etkileyebilmektedir, bu yüzden her ortam için farklı kalibrasyon gerekmektedir. Bu gerekliliklerden dolayı, ilk olarak 1990'larda bir kalibrasyon çalışması bakır elementinin kullanılması ile yapılmıştır [43], [44]. Ardından gelen QCM kalibrasyon çalışmaları da yine bakırın kristal çevirici yüzeyine elektrodpozisyonu ile kontrollü kütle birikiminin sağlanması ile yapılmıştır. Bu sayede bahsedilen çalışmalarda sensör sistemine entegre edilecek QCM çeviricilerinin hassasiyeti ve çalışma aralıkları belirlenmiştir [45], [46], [47]. QTF ise QCM'e göre daha yeni bir çevirici olmakla beraber, daha stabil ve hassastır. Fakat, QTF'ler için de benzer kalibrasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Sunulan tez çalışmasının bu aşamasında belirtilen geçmiş QCM kalibrasyon çalışmalarından faydalanılmış ve bakır elementi kullanılarak QTF çeviricisi için bir kalibrasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bunun için daha önce belirtildiği gibi elektrokimyasal bir hücre içerisinde kontrollü yük göçü ortamı sağlanılarak kontrollü bir biçimde bakır QTF yüzeyine indirgenmiştir. Hedeflenen kalibrasyon çalışmasının gerçekleştirilmesini sağlamanın yanında bakır (bir geçiş metali) sensörlerin ya da biyosensörlerin çeviricilerinin elektrokimyasal aktivitelerini arttırmak için birçok çalışmada kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Bakır ile modifiye edilmiş çeviriciler seçkin özellikler elde edebilirler. Buna örnek olarak yüzey alanının artırılması, kütle geçişi ve elektrokimyasal kataliz gibi özellikler verilebilir. Bu özelliklere ek olarak, bakır ile modifiye edilmiş çeviriciler diğer materyaller ile (nanotüpler, grafen) ya da çeviricilerle uyumludurlar ve bu birçok biyomedikal uygulamada kullanılabilir. Sonuç olarak bakır ile modifiye edilmiş QTF çeviricileri ileride, biyolojik materyalleri algılayacak sensörlerin üretiminde de tercih edilebilir [48], [49], [50].

1.5. Transferrin Önemi ve Tayini için Biyosensör Yapılandırılması

Bu tez çalışmasında QTF sensör sisteminin biyosensör olarak yapılandırılması hedeflenmiştir. Çalışmanın bu aşamasında transferrin proteininin tayinini yapacak bir QTF biyosensör sistemi geliştirilmesi için deneyler yapılmıştır. Transferrin demir eksikliği anemisi gibi hastalıklar ve birçok moleküler mekanizmada yer alması bakımından önem taşımaktadır. Çok hücreli canlılarda demir iyonunun besinlerden alınarak organizmanın diğer hücrelerine taşınması yüksek bir öneme sahiptir.

Transferrin proteini, pH'ya bağılı olarak demir tutucu ve salıcı bir özelliğe sahiptir. Bu mekanizma ortam asidikleştiğinde, transferrine bağılı olan demir moleküllerinin salınımı prensibi ile çalışmaktadır [51]. Transferrin proteini, bir molekül başına iki demir atomu taşıyabilmektedir [52]. Normal şartlar altında, vücuttaki bir demir eksikliği durumunda transferrin proteini ifadesi, dolayısıyla üretimi artmaktadır [53]. Serumdaki transferrin proteini eksikliği, demir eksikliği anemisi hastalığında yaygın görülen bir eksikliklerdir [54]. Hastalık dışında birçok moleküler mekanizmada, serumdaki transferrin molekülü oranlarının değiştiği görülmektedir. Örneğin, enflamasyon bölgelerinde, transferrin molekül miktarının, plazma protein sızıntıları olduğundan arttığı görülmektedir [54]. Bunun dışında timüs ve periferdeki T-hücresi üretiminin ilk aşamalarında transferrin proteini ve reseptörünün büyük rol oynadığı görülmektedir [55]. *In vitro* organ kültür modeli olarak, böbrek oluşumunda da ortamdaki transferrin proteini ve reseptörünün büyük bir öneme sahip olduğu görülmektedir [56]. Transferrin proteinin bütün bu özellikleri, molekülün önemli bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir, bu da bu çalışmada hedef protein olarak seçilmesindeki en önemli sebeptir. Literatürde transferrin tayini için biyosensör geliştirilmesi çalışmalarına rastlanmaktadır. Bu çalışmalar Çizelge 1.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. Literatürde rastlanan transferrin tayini için geliştirilen biyosensör sistemleri

Sensör Tipi	Algılama Limiti	Yazar	Yıl	Ref.
Piezoelektrik İmmüno-sensör	$10^{-4} - 10^{-2}$ mg/mL	E. Prusak-sochaczewski ve J. H. T. Luong	1990	[57]
Kapasitif İmmüno-sensör	0,05 - 75ng/mL	T. Yin vd.	2005	[58]
Optik İmmüno-sensör	0,1 – 20 µg/mL	X. Liu vd.	2005	[59]
Yüzey Plazmon Rezonans	0,0375–40.00 µg/mL	J. Zhang vd.	2012	[60]
Yüzey Plazmon Rezonans	0–5,228 µM	S. Chen vd.	2016	[61]
Yüzey Plazmon Rezonans	4,4nM (0,34 µg/mL)	Y. Mayang vd.	2017	[62]

Çizelge 1.1’de özetlendiği gibi literatürde farklı yaklaşımlarla transferrin tayini için biyosensör geliştirme çalışmaları bulunmaktadır, ancak kütle hassas QTF çeviricisini kullanan herhangi bir biyosensör çalışmasına rastlanmamıştır.

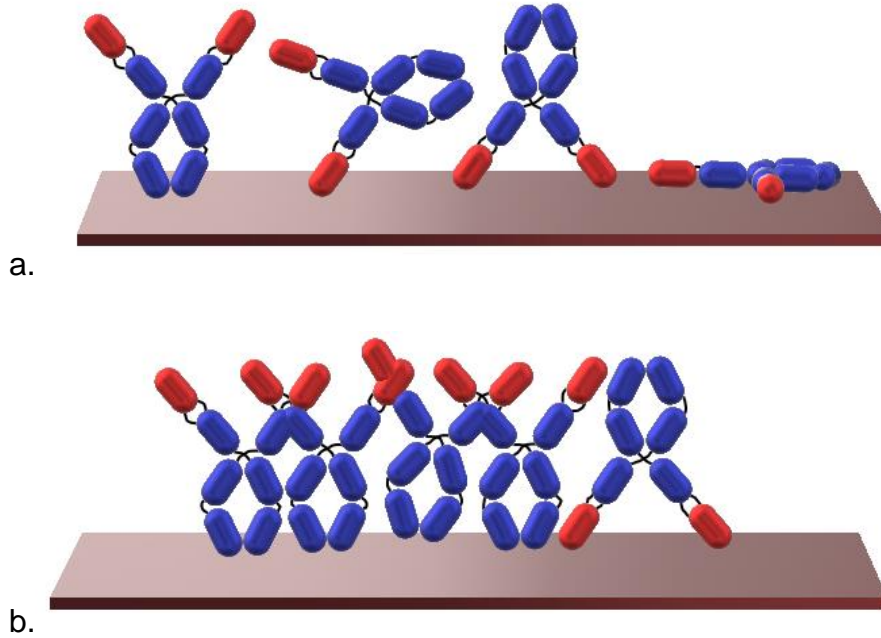
Bahsedildiği gibi, QTF’ler immüno-assay ve biyosensör sistemlerinde kullanılmaktadırlar. Immüno-assay ya da biyosensör yapılandırılmasındaki genel yaklaşım, çevirici yüzeyi aktivasyonu ile bir biyomolekülün immobilizasyonun sağlanması ve ardından analitin algılanmasıdır. Genel olarak sensör sistemlerinde kullanılan tanıyıcı biyomoleküller antikorlar ya da DNA zincirlerdir. Antikorların ideal olarak ağır zincirlerinden yüzeye tutuklanması (düzenli dizilim) hedeflenir bu sayede antikorların aktif bölgelerinin antijen ile etkileşime açık bırakılması sağlanır. Bunun yanında homojen olarak yalnızca antikor moleküllerinin yüzeye tutuklanması beklenir. Çevirici yüzeyine antikor tutuklanması için çeşitli yaklaşımlar vardır ve iki grupta ele alınabilir: (i) rastgele dizilim, (ii) düzenli dizilim. Çizelge 1.2’de bahsedilen düzenli ve rastgele dizilimlerde antikor tutuklama yaklaşımlarına literatürden örnekler listelenmiştir.

Çizelge 1.2. Biyosensör yüzeylerine düzenli ve rastgele antikor dizilimleri ile antikor tutuklama stratejilerinin literatür örnekleri

Rastgele Antikor Tutuklama Stratejileri		Düzenli Antikor Tutuklama Stratejileri	
Yöntem	Referans	Yöntem	Referans
Hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler	[63]	Protein A ve/veya Protein B ile kaplanmış çevirici	[63], [64], [65], [66]
Sülfat Dekstran kaplanmış çevirici	[64]	Kobalt yüklenmiş iminodiasetik asit resin	[67]
Polianilin kaplı polpropilen kaplanmış çevirici	[65]	Alumina fosfat kompleksleri	[68]
siyanojen bromür (CNBr)	[69]	Fosfolipidler kullanan, Langmuir Blodgett filmleri	[70]

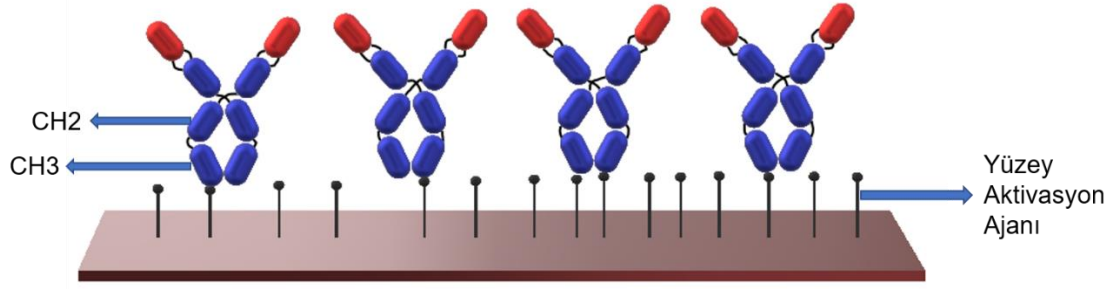
Rastgele dizilimde, genel olarak çevirici yüzeyine herhangi bir aktivasyon protokolü uygulanmaz. Bu nedenle yüzeye antikorlar, kovalent veya kovalent olmayan bağlanmalara, moleküller arası elektrostatik, hidrofobik/hidrofilik etkileşimlere bağlı olarak tutuklanır ve heterojen, rastgele dizilimlere sahiptir. Rastgele dizilim stratejileri genel olarak bir yüzey aktivasyonu protokolüne ihtiyaç duymadığı için

uygulama kolaylığı ve malzeme kullanımı açısından avantaj sağlamaktadır. Ancak pürüzsüz yüzeylerde adsorpsiyonun gerçekleşmesi zorlaşacağı için bazı çalışmalarda yüzeyin pürüzlüleştirilmesi gibi aktivasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir [71], [72]. Rastgele dizilimin, antikörlerin antijen bağlanma bölgelerinin açıkta ve/veya antijen bağlanmalarına uygun pozisyonda olmaması, protein denatürasyonu ve zayıf bağlanmalar nedeni ile biyosensör sisteminin hassasiyetini zaman içerisinde kaybetmesi (düşük stabilite) gibi dezavantajları vardır [73]. Şekil 1.5'te görülebileceği gibi antikörler antijen bağlanma bölgelerinden yüzeye tutuklanabilir veya üstüste binmelerden dolayı antijen bağlanma bölgeleri kapanabilir.



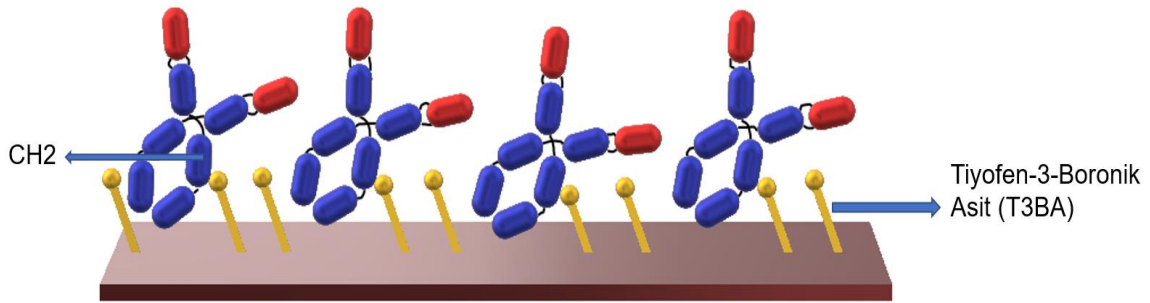
Şekil 1.5 Rastgele dizilim ile antikörlerin çevirici yüzeyine tutuklanması, a. Antijen bağlanma bölgelerinden yüzeye tutuklanmalar, b. Üstüste binmelerden dolayı antijen bağlanma bölgelerinin kapandığı tutuklanmalar

Diğer bir yaklaşım ise bahsedildiği gibi düzenli antikör dizilimi ile antikör tutuklamasıdır. Düzenli dizimler ile antikörlerin ağır zincirinden yüzeye tutuklanması, antijen bağlanma bölgeleri açıkta kalması ve üst üste binmelerin azalması sağlanır. Bu sayede biyosensörün hassasiyeti ve seçiciliği artırılır. Ayrıca rastgele dizilim stratejisinde olduğu gibi antikör denatürasyonu ihtimalini düşürdüğü için biyosensörde yüksek stabilite sağlar. Şekil 1.6.'te görüldüğü gibi düzenli dizilim genellikle kovalent bağlar ve antikörün ağır zincirindeki gruplar (CH₂ ve CH₃) ile yüzey aktivasyonunda kullanılan molekül arasındaki afiniteden faydalanılır.



Şekil 1.6. Düzenli antikor dizilimi stratejileri

Görüldüğü üzere yüzey aktivasyonu için birçok yaklaşım vardır. Yüzey aktivasyonu için bir yöntem , tiyofen-3-boronik asit (T3BA) mono-tabakalarını kullanmaktadır [74]. Boronik asit ve sakkarit afinitesi bilinmektedir. Antikorların ağır zincirinde bulunan CH2 zincirleri ile boronik asit afinitesi sayesinde düzenli antikor dizilimi ile tutuklama gerçekleştirilebilmektedir [75], [76]. Park vd. T3BA kullanarak, QCM çeviricisi üzerinde kendiliğinden oluşmuş tek-tabakalar (SAM) oluşturmuşlardır [74]. Liao vd. ise baskı devre elektrodu (screen printed electrode, SPE) üzerinde SAM-T3BA kullanarak HRP konjüge antiFab IgG immobilize etmişlerdir[77]. Bu tez çalışmasında, QTF yüzeyleri önemli bir biyobelirteç olan transferrinin antikorunun, yani anti-transferrin (TRC-2) tutuklanması için T3BA ile aktive edilmiştir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7 T3BA yüzey aktivasyon ajanı ile düzenli antikor dizilimi

Çizelge 1.1'te özetlenen transferrin tayini yapan biyosensör çalışmalarında antikor tutuklama stratejileri için yüzey aktivasyonu yaklaşımlarının avantajları ve dezavantajları Çizelge 1.3'te listelenmiştir. Verilen bu farklı tip transferrin tayini yapan biyosensörlerden hepsi yüzey aktivasyonu yaklaşımlarında düzenli antikor dizilimini hedeflemiştir. Bu sayede yüksek hassasiyetli biyosensörler geliştirmişlerdir. Ancak, verilen tüm aktivasyon protokollerinin Çizelge 1.3'te özetlendiği gibi, çok fazla malzeme kullanımı, uzun uygulama süreleri ve birden fazla aktivasyon adımı gibi dezavantajları vardır. Bunların yanında ise T3BA

aktivasyon protokolü ile tek adımda, çok daha kısa bekleme süreleri ve daha az ve düşük maliyetli malzemelerin kullanılması ile aktivasyon gerçekleştirilebilmektedir.

Çizelge 1.3. Antikor tutuklama için yüzey aktivasyonu yöntemlerinin karşılaştırılması

Yüzey Aktivasyon Molekülü	Avantajlar	Dezavantajlar	Referans
Protein A (Adsorpsiyon ile)	Düzenli antikor dizilimi	Protein A'nın adsorpsiyonunda çevirici yüzeyine zayıf bağlar oluşturması	[57]
Protein A (Gluteraldehit ile)	Düzenli antikor dizilimi	Sensör hassasiyetinin adsorpsiyon ile Protein A yüzey aktivasyonuna kıyasla düşüş	[57]
2-merkaptoetilamin (MEA) ve <i>staphylococcal</i> protein A	Düzenli antikor dizilimi	Çok uzun ve zahmetli yüzey aktivasyon protokolleri	[59]
Merkaptoasetik asit (MAA)	Düzenli antikor dizilimi	Çok adımlı yüzey aktivasyon protokolleri, çevirici yüzeyinin aktivasyon için kimyasal ve fiziksel hazırlanma süreçleri	[58]
Altın Nanorod (AuNR) kaplanmış grafen oksit (GO)	Düzenli antikor dizilimi	Birden fazla yüzey aktivasyon adımı	[60]
11-merkaptoundekanoid asit	Düzenli antikor dizilimi	Alkanetanol mono-tabakalarının oluşturulmasının ardından ester gruplarının aktive edilmesi için başka aktivasyon adımları daha içerir	[61]
4-Merkaptofenilboronik asit (4-MPBA)	Düzenli antikor dizilimi	Yüzey aktivasyonu için uzun bekleme süreleri (yaklaşık 14 sa. akış içerisinde)	[62]
T3BA	Düzenli antikor dizilimi	Tek adımda, kısa sürede ve az malzeme ile yüzey aktivasyonu	Bu tez çalışması

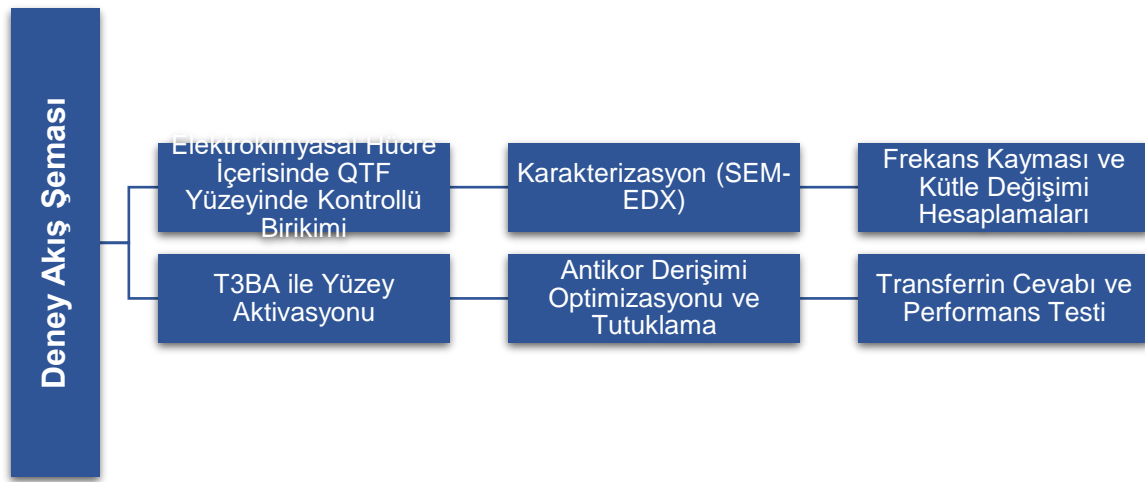
Bu tez çalışmasının transferrin tayini yapan QTF biyosensör yapılandırılması aşamasında, her QTF yüzeyi önce tiyofen-3-boronik asit (T3BA) ile aktive edilmiş, daha sonrasında anti-transferrin (TRC-2) antikorları yüzeye T3BA aracılığıyla tutuklanmıştır. Sunulan tez çalışmasında kullanılan anti-transferrin (TRC-2)

saflaştırılmış Human-Anti-Human Transferrin (TRC-2) temin edilmiştir. Saflaştırılmış antikor eldesi için öncelikle antikor kaynağı (poliklonal antikor üretimi için kan serumu, monoklonal antikor üretimi için hibridoma kültür sıvısı) santrifüjlenir. Ardından diyaliz ile protein bu sıvıdan ayrılır. Daha sonra protein fraksiyonlama yöntemi olan kromatografi ile antikorca zengin bir kesim elde edilir. Afinite kromatografisi ile spesifik antikor seçilimi yapılarak saf antikor elde edilmiş olur. Bu sayede yalnızca spesifik bir antijene afinitesi olan antikorlar saflaştırılmış olur ve anikor-antijen afinitesine dayalı tayin çalışmalarında yüksek verim sağlanır.

Son olarak, tez çalışması kapsamında tiyofen-3-boronik asit (T3BA) ile yüzey aktivasyonu gerekleştirilmif ve anti-transferrin (TRC-2) QTF biyosensörü transferrin ile etkileşime bırakılmış ve performansı llmştir.

2. DENEYSEL ÇALIŞMA

Deneysel çalışmalar Şekil 2.1.'de verilen akış şemasındaki gibi planlanmıştır. İlk aşamadan elektrokimyasal hücre içerisinde kontrollü yük göçü ile QTF yüzeyine kontrollü kütle birikimi sağlanmıştır. Ardından yapılan çalışmanın doğrulaması için karakterizasyon testleri ve 1Hz değişime eşdeğer kütle değişimi hesaplanmıştır. İkinci aşamada ise, biyosensör yapılandırılması için QTF yüzey aktivasyonu, antikor tutuklaması yapılmış ve son olarak sistemin antijene verdiği cevap test edilmiştir.



Şekil 2.1. Deney akış şeması

2.1. Elektrokimyasal Hücre ve Kontrollü Kütle Göçü Ortamında QTF Kalibrasyonu

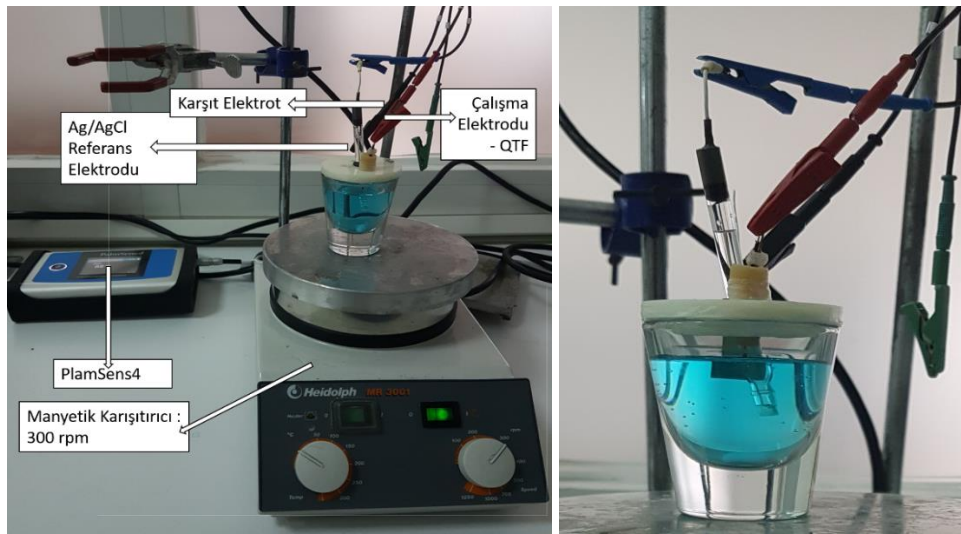
2.1.1. Materyal ve metot

Kuvars akort çatalı çeviricileri: CFS-14532768DZFB Citizen Finedevice Co Ltd. şirketinden satın alınmıştır. Bu çeviriciler, vakum altında kapatılmış silindir kaplar içerisinde gelmiştir. Silindir yapının çapı 1.50 mm olup yüksekliği ise 5.10 mm'dir. Çatalların rezonans frekansı 32768Hz'dir. Bakır nitrat trihidrat Merck şirketinden satın alınmıştır. Glasiyal asetik asit solüsyonu ve sodyum asetat trihidrat Sigma Aldrich şirketinden alınmıştır. Elektrokimyasal birikim deneyleri PalmSens4 (Dropsens, Türkiye) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. PalmSens4 USB ve batarya ile çalışan bir potansiyostat, galvanostat ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi

(EIS) için opsiyonel frekans cevap analiz cihazıdır. Bütün bakır kaplama deneyleri Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Laboratuvarı, PalmSens4 cihazı ile yapılmıştır. QTF kütle hassas sensör sistemi Ünal 2016'da açıklandığı gibi kurulmuştur. Bu sistem AD9850, yüksek-hızlı DDS çekirdeği ve bir mikrodenetleyiciden oluşmaktadır. Bu sistem hakkında detaylı bilgilere Ünal 2016'dan ulaşılabilir [33].

2.1.1.1. Elektrokimyasal deney düzeneği

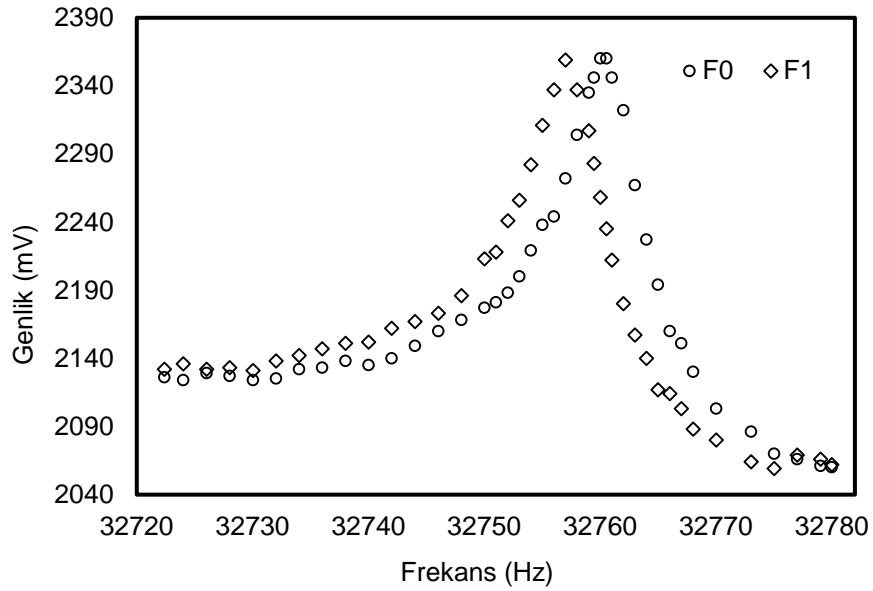
Elektrokimyasal deney düzeneği (Şekil 2.2.), Ag/AgCl referans elektrotu, platinyum tabaka şeklinde bir karşıt elektrot ve çalışma elektrotu olarak QTF çeviricilerini kullanan üç elektrotlu sistem içeren konvansiyonel elektrokimyasal bir hücreden oluşmaktadır. Hücre pH'sı 4.7 olan asetat tamponu içerisinde çözülmüş 10mL 0.05M bakır nitrat solüsyonu ile doldurulmuştur. Her QTF solüsyona 2mm derinliğinde daldırılmıştır. Her QTF'in daldırılması aşamasında derinliğin standardize edilmesi için silikon bir stoper kullanılmıştır. PalmSens4 potansiyostat cihazı her elektrokimyasal bakır birikim uygulaması için 5sn denge süresine ayarlanmıştır. Kulometrik bakır indirgenmesi Formül 3.1'de verildiği gibi suda çözülmüş bakırın 2 elektron alarak QTF yüzeyine indirgenmesi ile sağlanmıştır.



Şekil 2.2 Elektrokimyasal deney düzeneği: Kullanılan elektrotlar; Ag/AgCl referans elektrotu, platinyum plaka karşıt elektrotu ve çalışma elektrotu olarak QTF çeviriciler. Çözelti; pH'sı 4.7 olan asetat tampon çözeltisi içerisinde

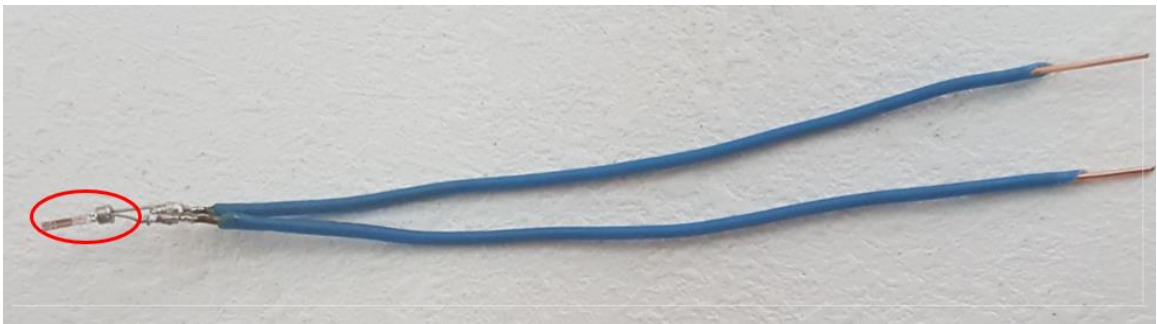
10mL, 0.05M bakır nitrat çözeltisi. Potansiyostat; PalmSense4. Manyetik karıştırıcı; 300rpm.

Kütle hassas QTF sensör sistemi ile ölçülen frekans sonuçları, dizüstü bilgisayar üzerinde kolay kullanımlı bir arayüz ile okunmuştur (detaylara Ünal 2016'dan ulaşılabilir) [33]. Her ölçüm QTF'in rezonans frekansını vermektedir. Rezonans frekansı çıkan sonuçta tepe noktasından okunmaktadır, tepe noktası, kayan frekansın en yüksek genlikte olduğu noktadır (Şekil 2.3.). Frekans farkı, modifiye edilmemiş kaplanmamış QTF frekansından ($F_0 = 32768\text{Hz}$), kütle birikmiş QTF frekansı (F_1) çıkartılarak hesaplanmaktadır. Sistem, veri transferi için dizüstü bilgisayara bir veri kablosu ile bağlıdır.



Şekil 2.3 QTF sensör sisteminden alınan frekans ölçüm verisi. Kütle birikmiş QTF frekansı (F_1); kaplanmamış QTF frekansı (F_0).

Her bir QTF bağlantı bacaklarının manipüle edilmek için kısa olması nedeni ile kullanımı ve uygulamaları kolaylaştırmak için modifiye edilmiştir. Her bağlantı bacağına 5cm'lik bakır teller Şekil 2.4.'te görüldüğü gibi lehimlenmiştir.



Şekil 2.4. QTF çeviricisinin bağlantı bacakları

2.1.1.2. Voltaj ve süre optimizasyonu

QTF yüzeyi üzerindeki bakır birikimi için optimum birikim potansiyeli ve birikim süresi, potansiyel ve uygulama süre taraması ile gerçekleştirilmiştir. Potansiyel tarama aralığı, bakırın metal yüzeylerdeki potansiyel indirgenme potansiyeli aralığına yakın olmak için -0.3V ve 0.1V arasında seçilmiştir [78]. Frekans çıkarması ve kütle birikim hesaplamaları sonucunda elde edilen veriler ile kütle birikimi ve frekans ilişkisi belirlenmiştir.

2.1.1.3. Yüzey karakterizasyonu

Yüzey karakterizasyonu tarayıcı elektron mikroskopisi (scanning electron microscopy, SEM) ile hem kaplanmamış QTF'lere hem de yüzey kaplanmış çeviriciler için uygulanmıştır. Tarayıcı Elektron Mikroskopisi Enerji Ayrımlı X-Işını Analizi (energy dispersive X-ray analysis, SEM-EDX) yüzey içeriğini belirlemek için yapılmıştır. Analizler 7 - 1,000,000x büyötmeye sahip Carl Zeiss EVO®40 cihazı ile yapılmıştır.

2.1.1.4. QTF çeviricisi üzerinde gözlenen frekans kayması ile kütle değişimi ilişkisi

Kulometrik yöntem ile elektrokimyasal hücreye seçilmiş sabit bir potansiyel (V) uygulanmıştır. Seçilmiş sabit potansiyel, elektrokimyasal hücrede spontan olmayan bir reaksiyon olmasını garantiler. QTF çevirici yüzeyleri kulometri ile pH'sı 4.7 olan asetat tamponu içerisindeki 0.05M bakır çözeltisinden indirgenen bakır ile kaplanmıştır. Bakır iyonları QTF yüzeyine elektro birikimlendiğinde, QTF rezonans frekansları, kaplanmamış QTF frekanslarından çıkartılarak Δf elde edilmiştir. Ardından Bölüm 1.4'te bahsedilen Faraday'ın Elektroliz Kanunları'ndan yola çıkılarak elde edilen teorik açıklamalar Formül 3.2'de verildiği gibi denkleştirilmiştir.

$$Q \times Eq. wt. = \Delta m \quad 3.2$$

Q: Elektrokimyasal hücreden geçen yük

Eq. wt.: İndirgenen/yükseltgenen maddenin eşdeğer ağırlığı

Δm : Kütle değişimi

Verilen denklem bakır için uygulanmıştır ($MW_{Cu} = 63,54$ g/mol).

$$Eq. wt. (Cu) = \frac{63,54}{2} = 31,77$$

$$Q \times 31,77 = \Delta m$$

2.2. Transferrin Tayini için Kütle Hassas QTF Biyosensör Yapılandırılması

2.2.1. Materyal ve metot

Kuvars akort çatalı çeviricileri: CFS-14532768DZFB Citizen Finedevice Co Ltd. şirketinden satın alınmıştır. Tiyofen-3-Boronik Asit (Lot # BGBB8189V) ve Methanol Sigma Aldrich firmasından alınmıştır. Deionize distile su (ddH_2O) BOME Sanayi Ürünleri Dış.Tic.A.Ş.'den alınmıştır. Kullanılan ddH_2O 'nun iletkenlik: 0,056 – 0,058 $\mu s/cm$, direnç: 17800 – 18100 $M\Omega\text{-cm}$, toplam silica: <3000 $\mu g/L$, klorür: <1000 ve sodyum: <1000 içerikleri verilmiştir. Human-Anti-Human Transferrin (TRC-2) ve Apo-Human (İnsan) Serum Transferrin (Sigma Aldrich) ise TÜBİTAK MAM, (Gebze, İstanbul)'da mevcut çalışma grubumuzun güçlü iş birlikleri içerisinde olduğu Doç. Dr. Selma Öztürk, Dr. Özlem Ertekin aracılığıyla alınmıştır. TRC-2 monoklonal antikör üretimi yöntemi ile edilip saflaştırılmış olarak alınmıştır. Frekans ölçümleri için aynı sensör sistemi kullanılmıştır [33].

2.2.1.1. Tiyofen-3-boronik asit (T3BA) ile QTF yüzey aktivasyonu

T3BA ile optimum yüzey aktivasyonu protokolü üç aşamalı bir deney ile kararlaştırılmıştır. Yapılan tüm deneylerde QTF'ler yalnızca çatal kısmı çözelti içerisinde kalacak şekilde aktivasyon çözeltilerine daldırılmıştır. Ardından deiyonize distile su (ddH_2O) içerisine yalnızca çatal girecek şekilde daldırılıp çıkarılarak nazik bir yıkama yapılmıştır. Her daldırma sonrası QTF'ler 40°C vakumlu ortamda 30 dakika kurumaya bırakılmıştır. Tüm aktivasyon sonrası ölçümler bu kurutma protokolünün ardından alınmıştır. Öncelikle, iki farklı çözücü içerisindeki T3BA çözeltilerinin QTF sensörü üzerindeki etkisi karşılaştırılarak uygun çözücüye karar verilmiştir. Yüzeyi aktive edilmiş QTF frekans ölçüm sonuçları, en uygun çözücüye karar vermek için karşılaştırılmıştır. Bunun için; Protokol I: 10mM T3BA-su çözeltisi,

6 sa. ve Protokol II: 10mM T3BA-metanol ,6 sa. aktivasyonları uygulanmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Ardından, anti-transferrin (TRC-2)'in immobilizasyonu için aktif boronat bölgelerinin farklı yoğunluklarda sağlanabilmesi için; Protokol II: 10mM T3BA-metanol ,6 sa. ve Protokol III: 10mM T3BA-metanol ,3 sa. ve Protokol IV: 1mM T3BA-metanol, 3 sa. aktivasyonları yapılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. T3BA-metanol çözeltisine QTF daldırma süresi 3 saate düşürülmüştür. Verilen protokollerdeki çözeltiler için öncelikle stok T3BA çözeltileri hazırlanmıştır. Stok T3BA çözeltileri, Sigma-Aldrich firmasından alınan 748633 katalog numaralı "Thiophene-3-boronic acid MIDA ester" tozundan yapılmıştır. T3BA MIDA ester molekülünün molekül ağırlığı 239,06 g/mol olarak Sigma-Aldrich firmasından gelen materyal bilgilerinde verilmiştir. Öncelikle deneyler için 10mM'lık T3BA çözeltisi 25mL su içerisinde ve diğer 10mM'lık T3BA çözeltisi 25mL metanol içerisinde hazırlanmıştır. Her bir 10mM'lık çözelti için hassas terazide 5,9765mg T3BA MIDA esteri tartılmış ve 25mL'lik su ve metanolde çözülmüştür. Daha sonra 1mM'lık T3BA-metanol çözeltisi için 10mM T3BA-metanol çözeltisine 1:10'luk seyreltme, 5mL 10mM T3BA-metanol çözeltisi ile 45mL su karıştırılarak uygulanmıştır.

2.2.1.2. Antikor (TRC-2) tutuklama

QTF/T3BA yüzeyine anti-transferrin (TRC-2) antikor daldırma yöntemi ile yüzeye tutuklama gerçekleştirilmiştir. T3BA tabakaları ile etkileşime girip tutuklanabilecek optimum antikor derişimini belirlemek için iki farklı konsantrasyonda TRC-2 çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm tutuklama deneylerinde QTF'ler yalnızca çatal kısmı çözelti içerisinde kalacak şekilde çözeltilere 10 dk. süre daldırılmış ardından kurumaya bırakılmıştır. Ardından deiyonize distile su (ddH₂O) içerisine yalnızca çatal girecek şekilde daldırılıp çıkarılarak nazik bir yıkama yapılmış ve yeniden kurumaya bırakılmıştır. Bütün kurutma işlemleri oda sıcaklığında 30 dk. boyunca bekletilme ile gerçekleştirilmiştir ve TRC-2 tutuklama sonrası tüm ölçümler kurutma protokolünün ardından alınmıştır. Öncelikle TRC-2 tutuklaması bekletme süresi Park vd.'nin çalışmalarından faydalanılarak 10 dk olarak belirlenmiştir [74]. 0,0625 µg/mL-10 µg/mL derişimleri arasındaki deney TRC-2 çözeltileri, 1mg/mL'lik TRC-2 stok çözeltisinden ddH₂O ile seyreltilerek hazırlanmıştır (0,0625 µg/mL, 0,25 µg/mL, 1 µg/mL, 1,25 µg/mL, 1,75 µg/mL, 2 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL). Verilen çözeltiler için öncelikle TRC-2 stok çözeltisi (1mg/mL) 50'şer µL'lik alikotlar halinde

saklanmıştır. Deneyleerde kullanılan en yüksek antikor derişimi 10µg/mL olduğundan, ilk olarak 1mg/ml (=1000µg/µL)'lik stok çözeltilisi 1:100 seyreltilmiştir, bu da 2µL TRC-2 stok çözeltilisinin 198 µL ddH₂O içerisinde çözünlmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu sayede 10µg/mL'lik çözeltiler elde edilmiştir. 5 µg/mL'lik TRC-2 çözeltilisi için 10µg/mL'lik çözeltili 1:2 seyreltilmiştir, bu da 40µL 10µg/mL TRC-2 çözeltilisinin 40µL ddH₂O içerisinde çözünlmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu noktadan itibaren 2,5µg/mL, 1,25µg/mL TRC-2 çözeltileri için bir önceki çözeltili kullanılarak 1:2'lik seri dilüsyon yapılmıştır. Örneğin; 2,5µg/mL'lik çözeltili için 40µL 5µg/mL TRC-2 ve 40µL ddH₂O, 1,25µg/mL TRC-2 için 40µg/mL 2,5µg/mL TRC-2 ve 40µL ddH₂O karıştırılmıştır. 2µg/mL TRC-2 çözeltilisi için, 10µg/mL'lik TRC-2 çözeltilisi tekrar hazırlanmış ve bu çözeltili 1:5 seyreltilmiştir, bu da 16µL 10µg/mL TRC-2, 64µL ddH₂O içerisinde çözünlerek hazırlanmıştır. 1µg/mL, 0,25µg/mL ve 0,0625µg/mL'lik TRC-2 çözeltileri de stok çözeltili olarak 2µg/mL'lik TRC-2 kullanılarak 1:2'lik seri dilüsyon ile hazırlanmıştır. Örneğin; 1µg/mL TRC-2 için 40µL 2µg/mL TRC-2 ve 40µL ddH₂O karıştırılmıştır. 1µg/mL'lik çözeltili tekrar 1:2'lik seri dilüsyona uğratılmış ve 0.5µg/mL'lik TRC-2 elde edilmiştir. Daha sonra 0.5µg/mL'lik TRC-2 1:2'lik seri dilüsyona uğratılmış ve 0.25µg/mL TRC-2 elde edilmiştir. 0.25µg/mL TRC-2, 1:2'lik seri dilüsyona uğradığında 0.125µg/mL, 0.125µg/mL 1:2'lik seri dilüsyon yapıldığında ise 0.0625µg/mL'lik TRC-2 çözeltilisi elde edilmiştir. Yapılan tüm seyreltmeler sonrasında tüplerde kalan sıvı 40µL hacminde eşitlenmiş ve QTF'ler 40µL'lik TRC-2 çözeltilerine daldırılmıştır.

2.2.1.3. Transferrin cevabı

QTF/T3BA yüzeyine TRC-2 tutuklanmasının ardından sensör sisteminin transferrin cevabı 2 aşamada incelenmiştir. Bunun için ilk aşamada, QTF sensör sisteminin doyum noktasına ulaşma ihtimalini düşürmek için kanda bulunan normal transferrin (4mg/mL) oranının yaklaşık 10 kat seyreltilmiş (0.4mg/mL'lik) derişimde transferrin çözeltileri 1mg/mL'lik stok solüsyonundan ddH₂O ile seyreltilerek hazırlanmıştır [79]. Bu çözeltilere 0,0625 µg/mL, 0,25 µg/mL, 1 µg/mL, 1,25 µg/mL, 1.75 µg/mL derişimlerde antikor tutuklanmış QTF'ler daldırılmıştır. Her daldırma işlemi bir önceki daldırmalarda olduğu gibi, QTF'lerin yalnızca çatal kısmının çözeltili içerisinde kalacak şekilde 10 dk. bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, deiyonize distile su (ddH₂O) içerisine yalnızca çatal girecek şekilde daldırılıp çıkarılarak nazik

bir yıkama yapılmış ve yeniden kurumaya bırakılmıştır Ardından oda sıcaklığında 30 dk. kurutma protokolü uygulanmış ve frekans ölçümleri alınmıştır. Transferrin cevabı deney planının ikinci aşamasında ise 0,0625 µg/mL, 0,25 µg/mL, 1 µg/mL, 1,25 µg/mL ve 1,75 µg/mL derişimlerde hazırlanmış TRC-2 çözeltileri ile tutuklama protokolleri uygulanmış, her biri 12'şer QTF içeren setlerden her birinin farklı bir transferrin derişimi ile etkileştirilmesinin ardından verdiği frekans cevabı incelenmiştir. Bu transferrin derişimleri 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,4 µg/mL, 1 µg/mL'dir. Bahsedilen derişimlerdeki çözeltiler için stok transferrin çözeltisi (1mg/mL) öncelikle 50'şer µL'lik alikotlar halinde ayrılarak saklanmıştır. Kullanılan en yüksek transferrin derişimi 1µg/mL olduğundan, 1mg/mL'lik transferrin stok çözeltisine önce 1:100'lük bir seyreltme uygulanmış ve 10µg/mL transferrin çözeltisi, 2µL 1mg/mL transferrin ve 198µL ddH₂O karıştırılarak elde edilmiştir. Daha sonra 10µg/mL'lik transferrin çözeltisine 1:10'luk bir seyreltme uygulanmış ve 1µg/mL transferrin çözeltisi, 20µL 10µg/mL transferrin ve 180µL ddH₂O karıştırılarak elde edilmiştir. 0,14µg/mL'lik transferrin çözeltisi için 1µg/mL'lik transferrin çözeltisine 4:10'luk bir seyreltme, 32µL 1µg/mL transferrin çözeltisi ile 48µL ddH₂O karıştırılarak uygulanmıştır. 0,1µg/mL'lik transferrin çözeltisi için ise 1µg/mL transferrin çözeltisine 1:10'luk bir seyreltme, 8µL 1µg/mL transferrin çözeltisi ile 72µL ddH₂O karıştırılarak uygulanmıştır ve 0,01µg/mL'lik transferrin çözeltisi için 0,1µg/mL'lik transferrin çözeltisine 1:10'luk bir seyreltme, 8µL 0,1µg/mL transferrin çözeltisi ile 72µL ddH₂O karıştırılarak uygulanmıştır. Sonuçta ortaya çıkan bütün transferrin çözeltilerinden 40µL hacim kullanılarak, farklı derişimlerde TRC-2 tutuklanmış QTF'ler bu çözeltilere daldırılmıştır.

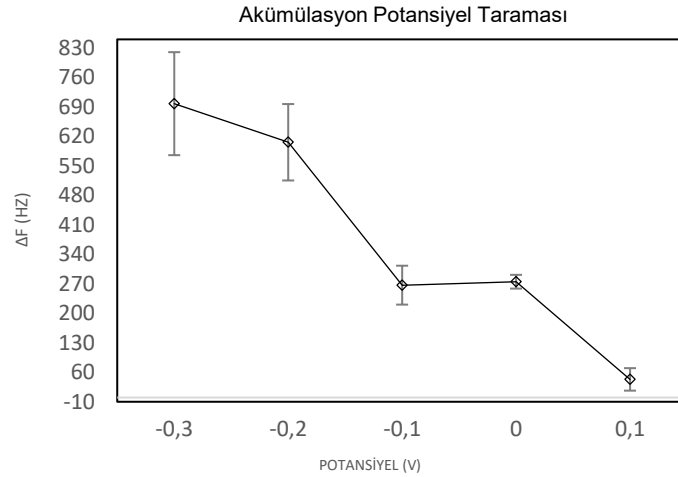
3. SONUÇ VE ÖNERİLER

3.1. Elektrokimyasal Hücre ve Kontrollü Kütle Göçü Ortamında QTF Kalibrasyonu

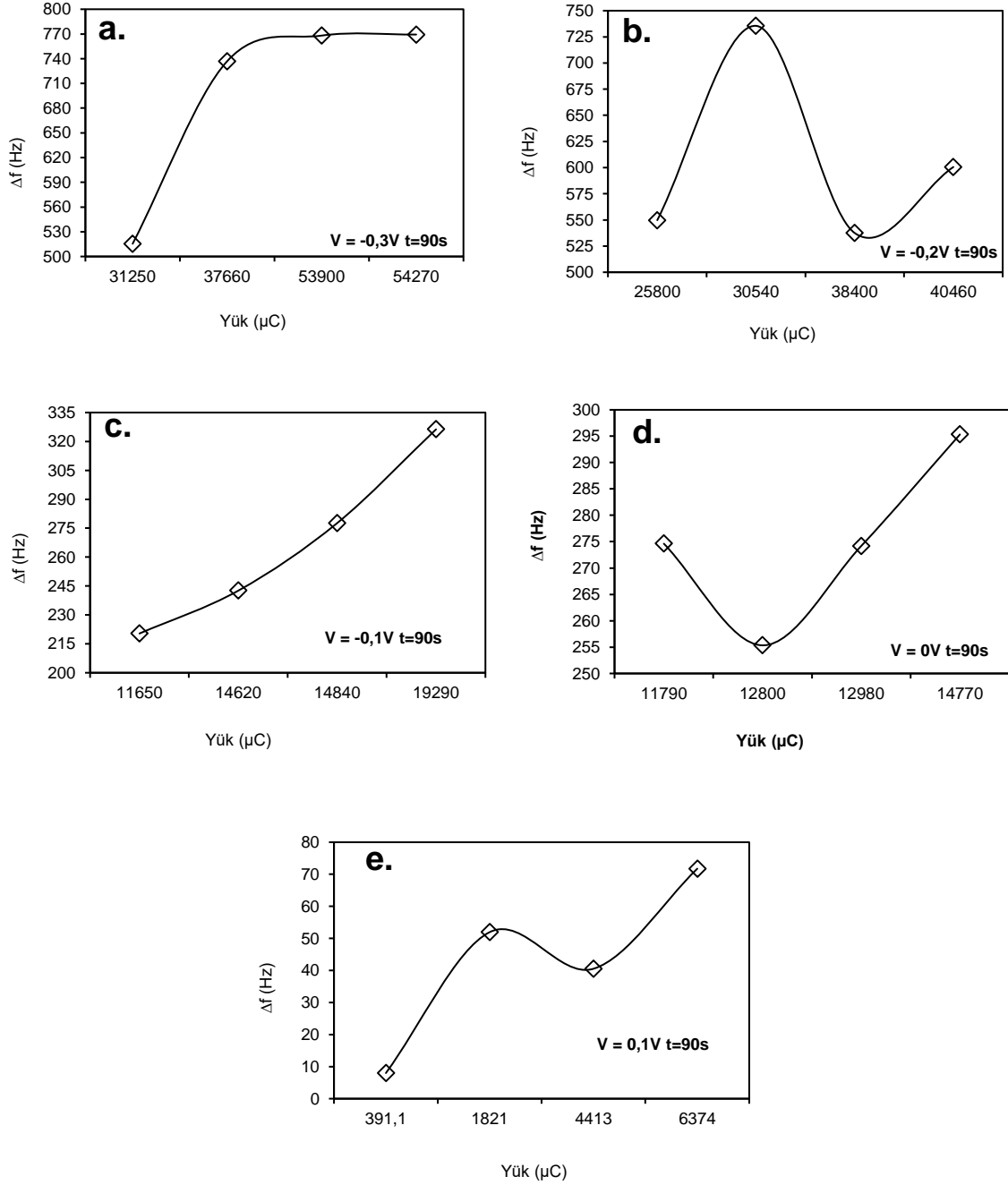
Bu çalışmada kuvars akort çatalı (QTF) çeviriciler, kulometrik bakır birikimi ile bakır kaplanmıştır. Kulometrik yöntemler kullanıldığında, seçilmiş sabit bir potansiyel (V) uygulanmalıdır. Seçilmiş sabit potansiyel, elektrokimyasal hücrede spontan olmayan bir reaksiyon olmasını garantilemektedir. QTF çevirici yüzeyler kulometri ile pH'sı 4.7 olan asetat tamponu içerisindeki 0.05M bakır çözeltisi ile kaplanmıştır. Bakır iyonları QTF yüzeyine elektrobirikimlendiğinde, QTF rezonans frekansları, kaplanmamış QTF frekanslarından çıkartılarak Δf elde edilmiştir.

3.1.1. Kulometrik potansiyel optimizasyonu

Bakır çözeltisi içerisindeki QTF çeviricisi yüzeyindeki bakır birikimi için optimum birikme potansiyelini seçmek için, sabit koşullar altında (pH'sı 4.7 olan asetat tamponu içerisinde 0.05M'lık bakır nitrat çözeltisi, 90 saniye süre) farklı potansiyellerde potansiyel tarama gerçekleştirilmiştir. Potansiyel tarama aralığı -0.3V ve 0.1V arasındadır.



Şekil 3.1 -0.3V ile 0.1 V arasındaki potansiyellerde, sabit kulometri çalışma koşulları altında, 90sn, pH'sı 4.7 olan asetat tamponu içerisinde 0.05M bakır nitrat çözeltisindeki frekans farkları (Δf).



Şekil 3.2 -0,3V, -0,2V, -0,1V, 0V, 0,1V potansiyel altında (sırasıyla a-e) 90sn kulometri uygulaması sonucunda okunan yük geçişi ve frekans kayması grafikleri

Şekil 3.2'de her bir potansiyel değer için $\Delta f - Q$ ilişki grafiklerini göstermektedir. Daha fazla kütle birikimi için daha fazla frekans farkı beklenmektedir. Yalnızca -0,1V sabit potansiyelinde 90sn kulometri elektrobirikim trendleri (Şekil 3.2.c), grafikteki lineerlikten görülebileceği gibi, stabil $\Delta f - Q$ ilişkisini göstermektedir. Sonuç olarak, -0,1V potansiyeli, QTF çevirici yüzeyindeki bakır birikimi optimum birikim potansiyeli

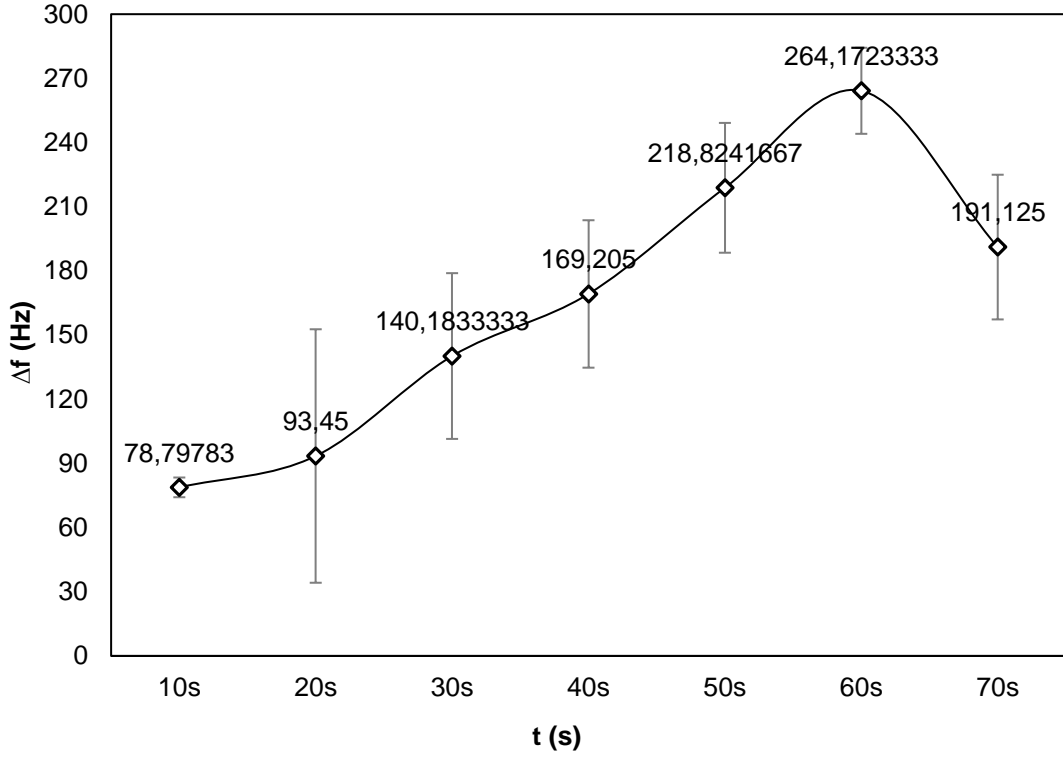
olarak seçilmiştir. Daha sonraki optimizasyon çalışmaları da bu sabit potansiyelde uygulanmıştır.

3.1.2. Süre optimizasyonu

Süre tarama çalışmaları iki aşamada uygulanmıştır. İlk aşamada, 7'şer QTF'ten oluşan 3 set QTF kulometrik birikime -0,1V altında, pH'sı 4,7 olan asetat tamponundaki 0.05M bakır nitrat çözeltisinde maruz bırakılmıştır. Her bir sette, her bir QTF için süre 10'ar saniye arttırılmıştır (10sn - 70sn). Uygulama süreleri artan bu deneyde, en düşük bakır kaplanan QTF, en kısa süre (10sn) birikim uygulanan QTF olmuştur. Fakat bütün setler içerisinde en çok bakır birikim sağlanan QTF, 70sn uygulama yapılan QTF değil, 60sn uygulama yapılan QTF'ler olmuştur (Çizelge 3.1.). Bu doyumun önemli bir göstergesidir. Frekans farkı hesaplamaları yapıldığında Çizelge 3.1.'de görüldüğü gibi, kararsızlık ve Δf değerinde bir artma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ise QTF yüzeyinde birikmiş bakırın doyma noktasına ulaştığını ve daha fazla süre uygulamalarının yüzeyden soyulma etkisine neden olacağını desteklemektedir.

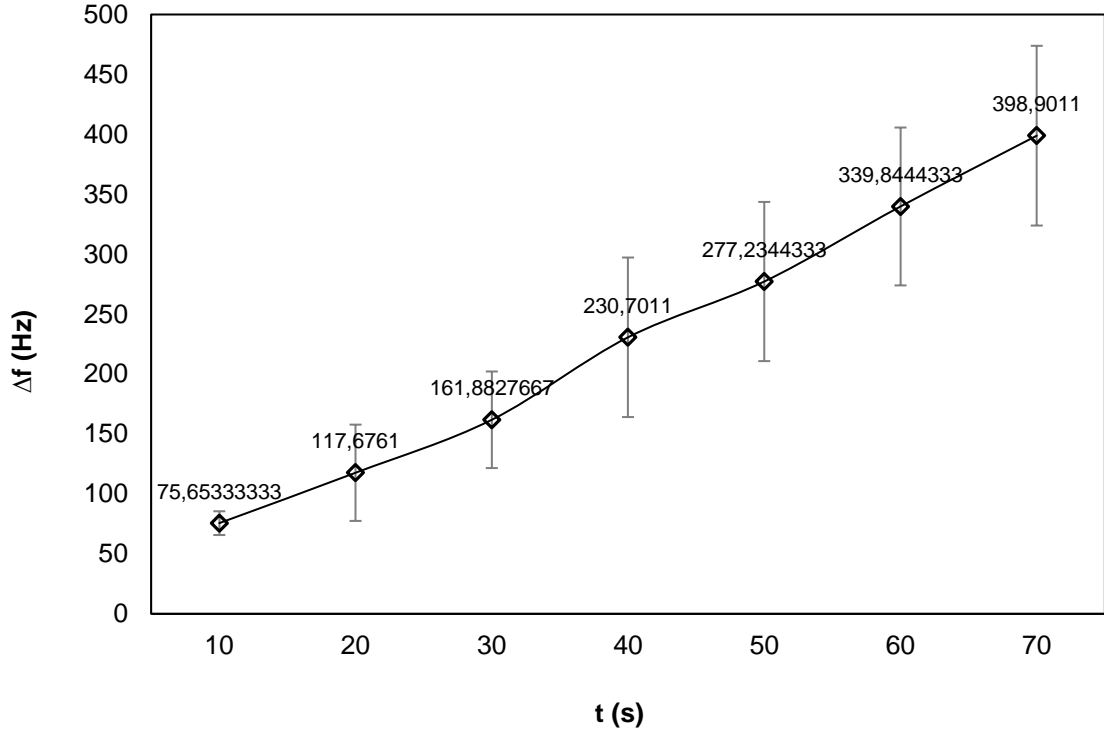
Çizelge 3.1. Her bir QTF için 10sn-70sn birikim sürelerine göre hesaplanan Δf ve Q değerleri

t (s)	Δf (Hz)	Q (μC)
10	78,80 \pm 4,61	2044,33 \pm 337,39
20	93,45 \pm 59,25	3302,67 \pm 644,75
30	140,18 \pm 38,74	4490,67 \pm 771,82
40	169,21 \pm 34,47	6191,33 \pm 1360,62
50	218,82 \pm 30,34	8124,00 \pm 2032,91
60	264,17 \pm 20,11	9431,67 \pm 989,88
70	191,13 \pm 33,82	6512,50 \pm 354,26



Şekil 3.3 Birikim süresi sırasıyla 10sn, 20sn, 30sn, 40sn, 50sn, 60sn, 70sn, pH'sı 4.7 olan asetat tamponundaki 0.05M bakır çözeltisi içerisinde bekletilen QTFler.

Süre optimizasyonun ikinci aşamasında, her QTF yüzeyi 10'ar saniye süre ile tabaka tabaka, pH'sı 4.7 olan asetat tamponu içerisinde 0.05M bakır çözeltisi ile kaplanmıştır. Her bir QTF 7 kere kaplanmış ve Q yük indirgenme değerleri potansiyostat üzerinden okunmuş ve frekans farkları her kaplama aşaması için hesaplanmıştır. Her bir 10sn'lik kulometri esnasında potansiyostattan okunan yük, Δf , ve kütle değişimi hesaplama sonuçları Çizelge 3.2.'de gösterildiği gibidir.

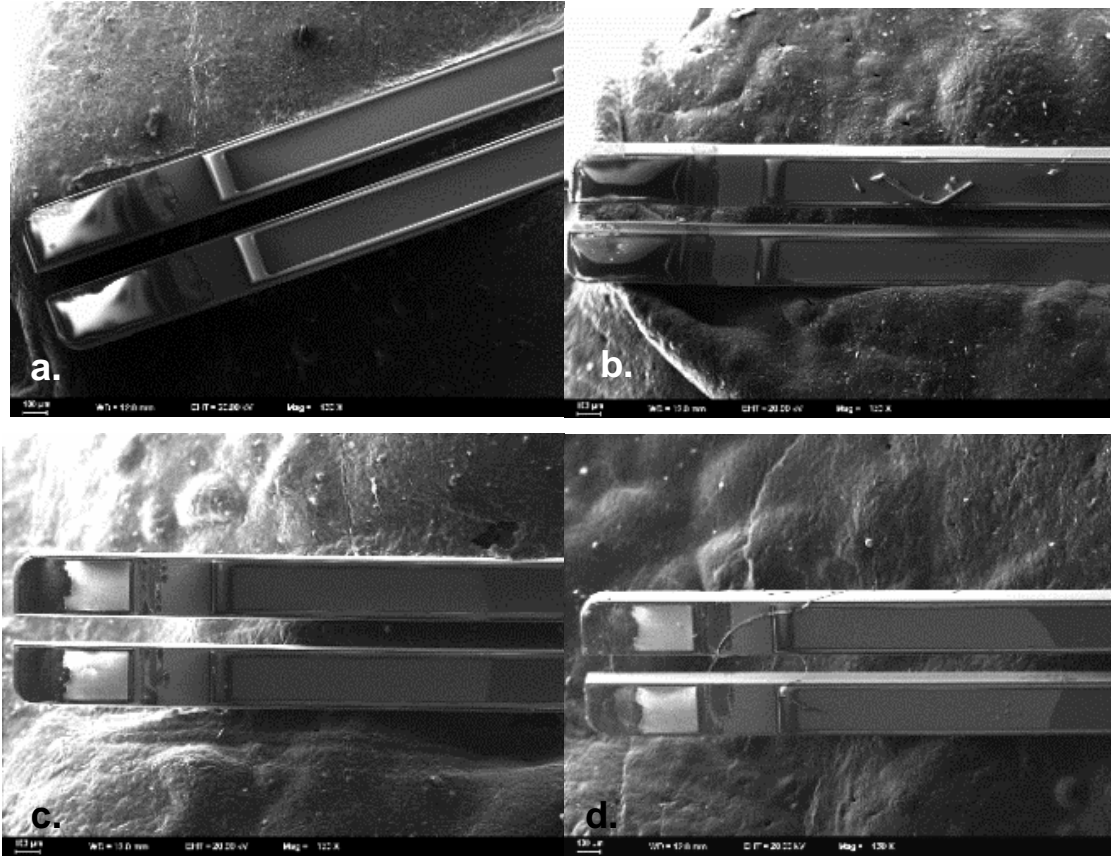


Şekil 3.4 QTF çevirici yüzeyindeki iyon indirgenmesi sonucu oluşan bakır tabakalandırma grafiği

Şekil 3.3'te görüldüğü üzere; 10'ar saniye kulometrik uygulama sonucunda t - Δf trendi verilmiştir. Her süre noktası, uygulanan aşama ile önceki uygulama aşamalarının toplamını göstermektedir. 60 sn birikim süresinde (10'ar saniyelik 6 aşamalı tabakalandırmanın toplamı) en yüksek miktarda bakır iyon indirgenmesi gözlenmiştir ve 70sn birikim süresinde ise yüklü miktarda bir düşüş gözlenmektedir. QTF yüzeylerini 10'ar saniyelik kulometri ile tabaka tabaka kaplama sonuçları, optimizasyonun birinci aşamasında çıkan doyma noktası sonuçlarını desteklemektedir. 60. saniye tabaka birikim noktasından sonra bir 10 saniye daha tabaka indirgenme süresi uygulanmıştır. Şekil 3.3.'te verilen değerlerden görülebileceği gibi bakır birikiminde doyma noktasına gelindikten sonra QTF yüzeyinde bakır birikiminde kayda değer bir düşüş olduğu görülmektedir. Bu sonuç yüzeyde bakırın indirgeyebileceği aktif bölgenin tamamının bakır ile kaplanması ile açıklanabilmektedir. Sonuç olarak 60sn uygulama süresi, QTF yüzeyinde bakır birikimi için optimum süre olarak belirlenmiştir. Buna ek olarak, Şekil 3.4'te kulometrik uygulama ile frekans değişimi arasında güçlü bir lineer ilişki görülmüştür ($R^2 = 0,996$), bu da kulometrik bakır uygulamalarının tekrarlanabilirliğini ve çoğaltılabilirliğini göstermektedir.

3.1.3. Yüzey karakterizasyonu

QTF yüzeylerinin SEM görüntüleri Şekil 3.5.'te verilmiştir ve bu görüntülerde bakır kaplamaları, kaplanmamış QTF (Şekil 3.5.a) ile kıyaslandığı zaman açıkça görülebilmektedir.

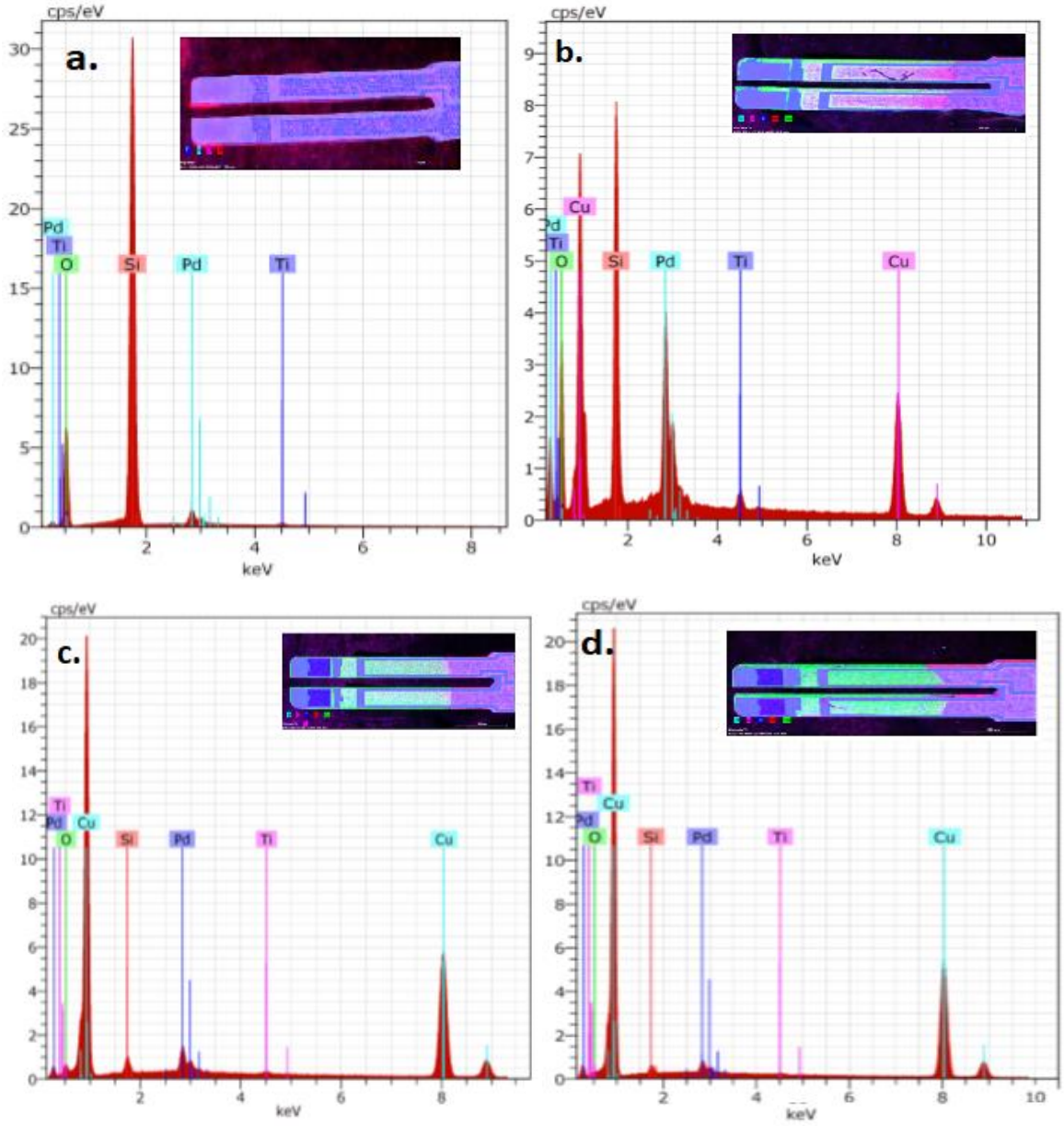


Şekil 3.5 SEM Görüntüleri; a. kaplanmamış QTF, b. 30sn bakır kaplanmış QTF, c. 45sn bakır kaplanmış QTF, d. 60sn bakır kaplanmış QTF (Çözelti: pH = 4.7, 0.05M bakır (asetat tamponu)), (Büyütme = 130x)

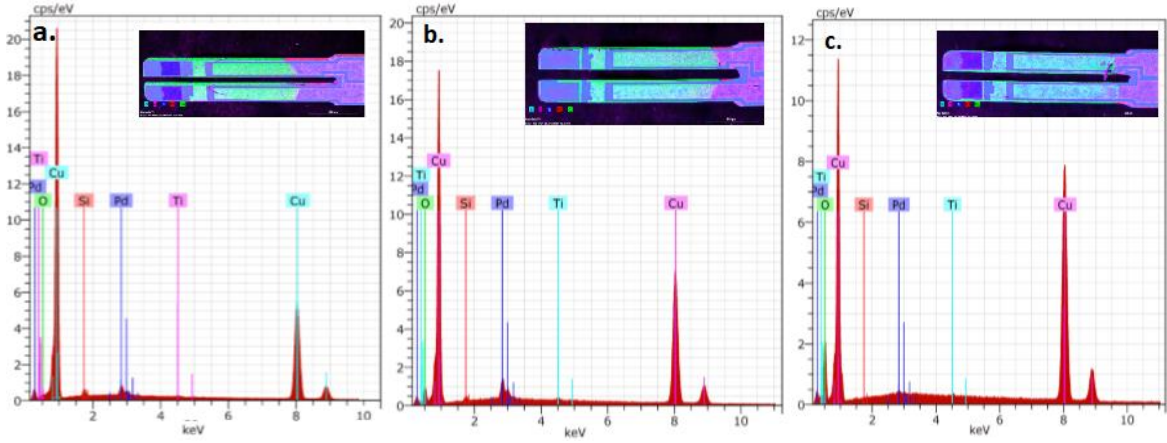
SEM-EDX analizleri, yapılan modifikasyonların karakterizasyonu için yapılmıştır. Spektra, kaplanmamış QTF'lerin herhangi bir bakır bileşiği içermediğini ve modifiye edilmiş QTF'lerin bakır ile kaplandığını göstermektedir (Şekil 3.6.). Bakırın tepe noktası ilk olarak 30 saniye kulometri sonucunda görülmektedir. Daha sonra 45. ve 60. saniyelerde bakır tepe noktası artarak devam etmektedir. Bakır tepe noktası arttıkça, QTF'in kendi bileşiklerin (Si, Pd, Ti) tepe noktaları düşmektedir.

60 saniye birikme süresi aşıldıktan sonra, 75 ve 95 saniye sürelerinde bakır tepe noktalarında kayda değer bir değişiklik gözükmemektedir (Şekil 3.7.). Bu da 60sn birikim süresinin -0,1V elektrobirikim ile pH'sı 4.7 olan asetat tamponundaki 0.05M bakır çözeltisinde, bakır kaplamanın doyma noktası olduğunu göstermektedir.

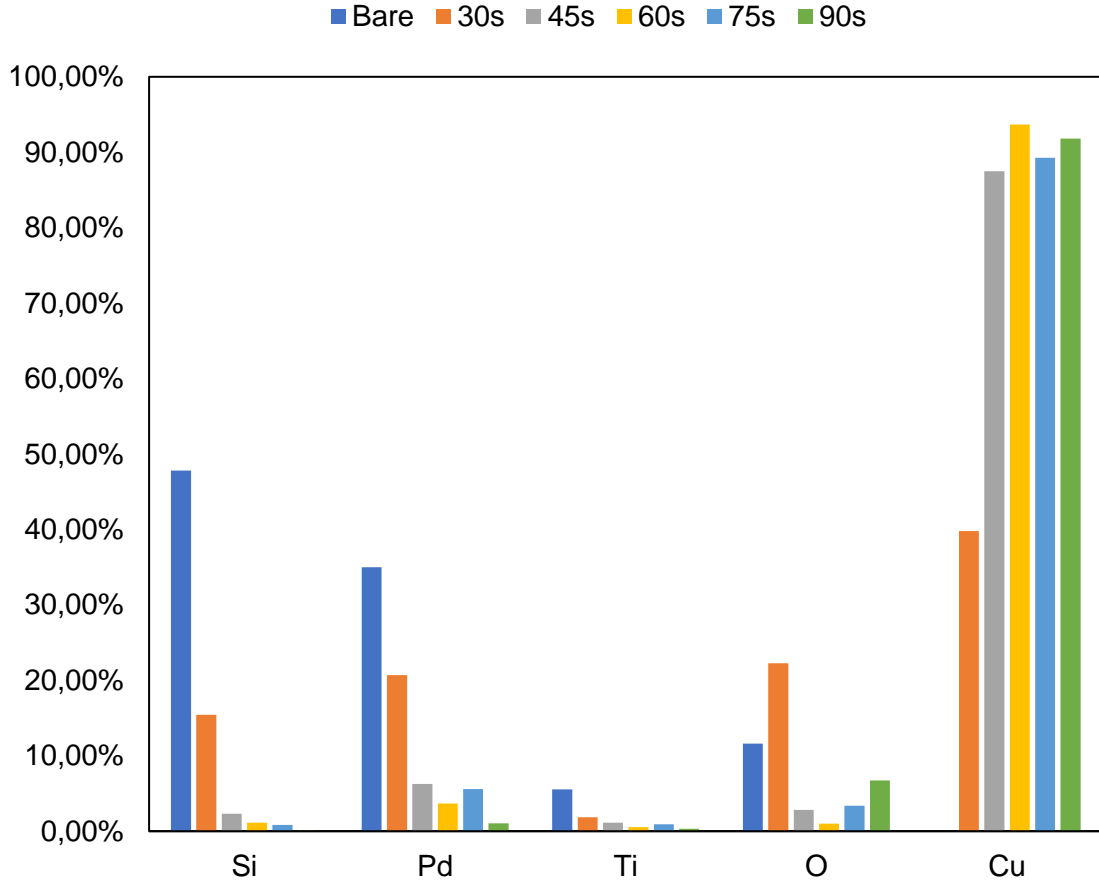
Ayrıca, 60 saniye uygulamadan sonra QTF çeviricinin kararsız bir hale geldiği görülmektedir. Bu sonuç, kulometri çalışmaları sonuçları ile uyumludur.



Şekil 3.6 SEM-EDX spektrumları. a) kaplanmamış QTF, b) 30sn bakır kaplanmış QTF, c) 45sn bakır kaplanmış QTF, d) 60sn bakır kaplanmış QTF, Sağ üst; QTF yüzey elementleri renklendirme haritaları, (Çözelti: pH = 4.7, 0.05M bakır (asetat tamponu))



Şekil 3.7 a. 60sn, b. 75sn, c. 90sn birikme sürelerinde kulometri uygulanmış QTF SEM-EDX spektrumları. Sağ üst; QTF yüzey elementleri renklendirme haritaları, (Çözelti: pH = 4.7, 0.05M bakır (asetat tamponu))



Şekil 3.8 Artan kulometrik uygulama süreleri ile kaplanan QTF yüzeylerinin SEM-EDX element analizi.

Bu bölümde açıklandığı üzere yapılan karakterizasyonda SEM-EDX yöntemi kullanılmıştır. Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy, SEM), örnek yüzeyini yüksek enerjili elektronlar ile tarama prensibiyle dayanır. SEM-EDX

(enerji dağılımı spektrometre) ise, SEM sistemi ile gönderilen enerjinin dağılımının ölçülmesi prensibi ile çalışır. Gönderilen yüksek enerjili elektronun enerjisi çarptığı atomun elektronlarına bağlı olarak enerji kaybeder. Burada dağılan enerjinin ölçülmesi ise spesifik atom tayini yapılmasını sağlar. Şekil 3.8.'de Bakır (Cu) miktarı koyu mavi barla gösterilmektedir ve kaplanmamış QTF'te Cu elementi bulunmamakta ve kaplanma süresine bağlı olarak da artmaktadır.

3.1.4. QTF Çeviricisi Üzerinde Gözlenen Frekans Kayması ile Kütle Değişimi İlişkisi

Bu çalışmada kuvars akort çatalı (QTF) çeviriciler, kulometrik bakır birikimi ile bakır kaplanmıştır. Kulometrik yöntemler kullanıldığında, seçilmiş sabit bir potansiyel (V) uygulanmalıdır. Seçilmiş sabit potansiyel, elektrokimyasal hücrede spontan olmayan bir reaksiyon olmasını garantilemektedir. QTF çevirici yüzeyler kulometri ile pH'sı 4.7 olan asetat tamponu içerisindeki 0.05M bakır çözeltisi ile kaplanmıştır. Bakır iyonları QTF yüzeyine elektro birikimlendiğinde, QTF rezonans frekansları, kaplanmamış QTF frekanslarından çıkartılarak Δf elde edilmiştir.

Bölüm 1.4'te bahsedilen teorik açıklamalar Bölüm 2.1.1.4'te açıklandığı gibi bakır için uygulanmıştır ($MW_{Cu} = 63.57 \text{ g/mol}$) ve hesaplamaların sonuçları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Bu hesaplamalar frekans kaymalarını ve potansiyostat üzerinden okunan yük verilerini göstermektedir. Hesaplama sonucuna göre QTF sensör sisteminde okunan 1 Hz frekans kaymasının yaklaşık $0.48786 \pm 0.21255 \text{ ng}$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.2 Tabaka tabaka kaplanan QTF'lerin hesaplanan Δf , Q ve m değerleri.

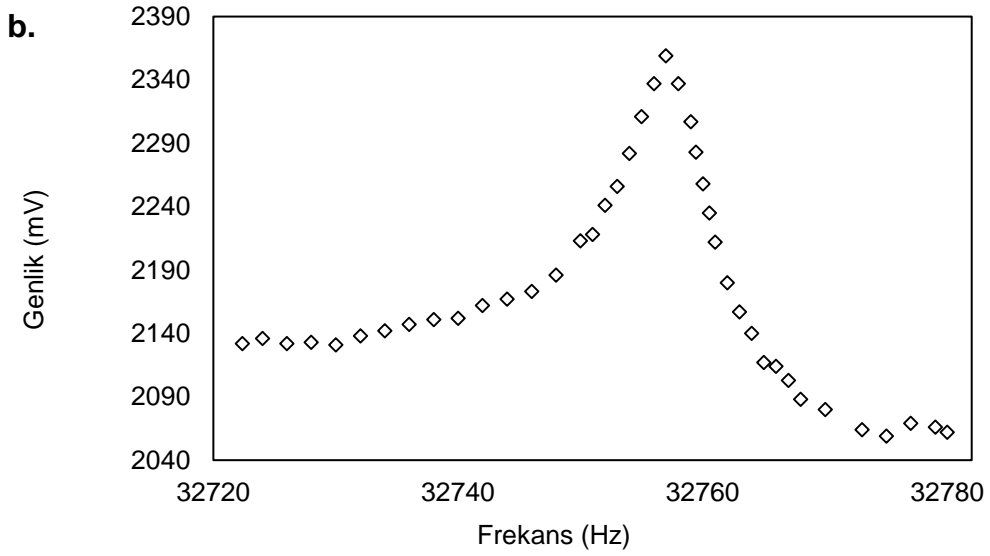
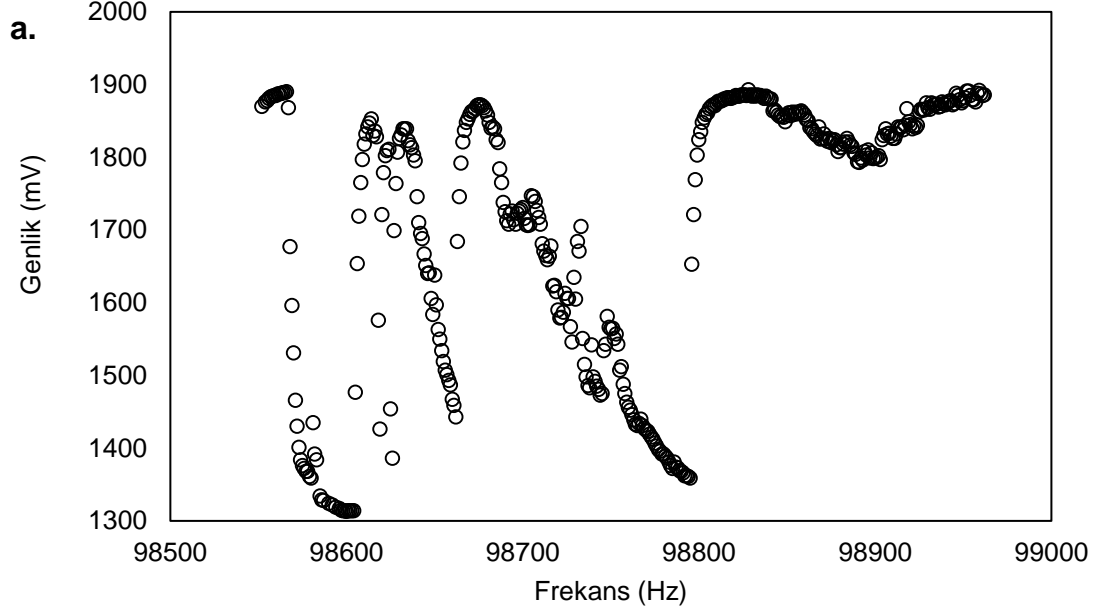
t (top)	QTF 1			QTF2			QTF3		
	Δf (Hz)	Q (μC)	M (ng)	Δf (Hz)	Q (μC)	M (ng)	Δf (Hz)	Q (μC)	M (ng)
10s	78,93	1800	57,204	64,52	1523	48,385	83,51	2078	66,018
20s	88,705	1737	55,184	10079	2259	71,768	163,53	3004	95,437
30s	134,72	2853	90,639	142,76	2339	74,310	208,17	2790	88,638
40s	154,85	3188	101,282	257,96	1685	53532	279,29	3224	102,426
50s	209,39	2634	83,682	280,22	2344	74,468	342,095	1614	51,276

60s	289,59	3180	101,028	315,55	2998	95,246	414,39	3082	97,915
70s	335,32	2908	92,387	379,81	2629	83,523	481,57	2904	92,260

3.2. Transferrin Tayini için Kütle Hassas QTF Biyosensör Yapılandırılması

3.2.1. Qtf yüzey aktivasyonu

Tiyofen-3-boronik asit (T3BA) ile optimum yüzey aktivasyonu protokolü üç aşamalı bir deney ile kararlaştırılmıştır. Öncelikle, iki farklı çözücü içerisindeki T3BA çözeltilerinde yüzeyi aktive edilmiş QTF frekans ölçüm sonuçları, en uygun çözücüye karar vermek için karşılaştırılmıştır. Daha sonra QTF yüzeyleri optimum çözücü ile oluşturulan farklı derişimlerdeki T3BA çözeltilerinde farklı sürelerde yüzey aktivasyonu için bekletilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Şekil 3.9.'da 10mM T3BA-su çözeltilisine 6 saat daldırılmış (Protokol I) ve 10mM T3BA-metanol çözeltilisine 6 saat daldırılmış (Protokol II) QTF yüzeylerinin frekans hesaplamaları bulunmaktadır. Görüldüğü gibi metanol içerisinde çözülen T3BA çözeltilisinde bekletilen QTF yüzeylerinde frekans kayması ile kütle birikimi görülmekteyken, su içerisinde çözünen T3BA çözeltilerinde bekletilen QTF'lerden anlamlı frekans cevabı alınamamıştır. Sonuç olarak Protokol II'de kullanılan çözücüye karar verilmiştir. Çizelge 3.3.'te 10mM derişimde T3BA-metanol çözeltilisinde 6 saat ve 3 saatlik QTF yüzey aktivasyon sonuçları gösterilmektedir. Ardından QTF yüzeyinde T3BA tabakalarının yoğunluğunu, T3BA'nın yüzeyde mono-tabakaların oluşma süresini kısaltmadan düşürebilmek için, çözelti 10 kat seyreltilmiştir. Böylece 1mM T3BA-metanol çözeltisi hazırlanmış ve QTFler 3 saat süre ile yüzey aktivasyonu için çözeltiliye daldırılmıştır.



Şekil 3.9 a. Protokol I sonrası QTF frekans cevabı (Derişim 10mM, Süre: 6sa T3BA-su çözeltisi), b. Protokol II sonrası QTF frekans cevabı (Derişim 10mM, Süre: 6sa T3BA-metanol çözeltisi),

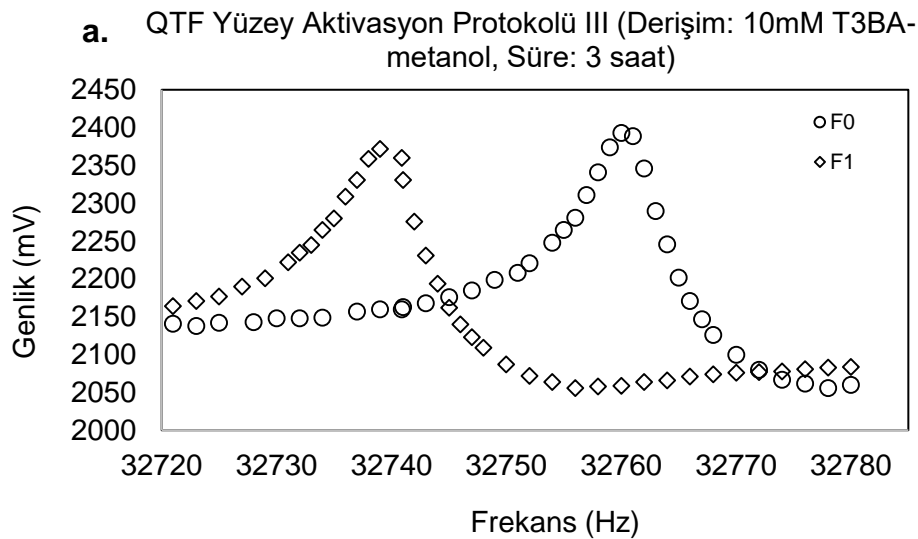
Şekil 3.9.a.'da görüleceği üzere su ile hazırlanan çözelti ile yapılan aktivasyon işleminin ardından sabit bir frekans cevabı alınamazken Şekil 3.9.b.'de metanol ile hazırlanan çözelti ile aktivasyon sonrasında bir rezonans frekansı ölçülebilmektedir. Bunun sebebi suyun buhalaşma süresinin daha uzun olması ve QTF üzerinde kalan su moleküllerinin ölçüm esnasında hareketi ve buharlaşmasının olabileceği düşünülmektedir. Bu aşamanın ardından farklı yoğunluklarda T3BA monota bakaları elde etmek için, T3BA-metanol çözeltisi ile QTF yüzeyleri farklı

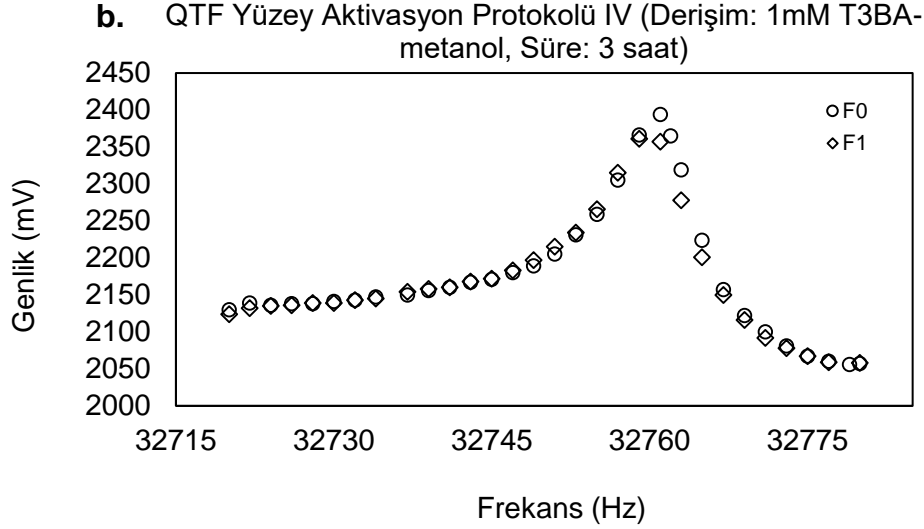
sürelerde aktive edilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çizelge 3.3.'de 10mM T3BA-metanol çözeltisinde 6 saat (Protokol II) ve 3 saatlik (Protokol III) QTF yüzey aktivasyonu sonuçları gösterilmektedir. Görüldüğü gibi T3BA tabakalarının yoğunluğu daldırma süresi azaltıldığında düşmüştür.

Çizelge 3.3 Protokol II ve Protokol III Frekans ve Kütle Değişimi Sonuçları Karşılaştırması (Protokol II: 6 sa, 10mM T3BA-Metanol, Protokol III: 3 sa, 10mM T3BA-Metanol)

Δf_{T3BA} (6h)	Δm (ng)	Δf_{T3BA} (3h)	Δm (ng)
4,4	2,1466	0,88	0,4293
11,69	5,7047	1,03	0,5025
13,05	6,3666	4,13	2,0149
16,69	8,1424	2,83	1,3782
18,76	9,1523	2,9	1,4148
32,83	16,0164	4,72	2,3003

T3BA mono-tabakalarının oluşma süresini kısaltmadan QTF yüzeyinde oluşan T3BA mono-tabakalarının yoğunluğunu azaltmak için ise T3BA-metanol çözeltisi 10 kat seyreltilmiştir. Böylece 1mM T3BA-metanol çözeltisi hazırlanmış ve QTFler 3 saat süre ile yüzey aktivasyonu için çözeltiliye daldırılmıştır (Protokol IV). 10mM ve 1mM'lık T3BA-metanol çözeltileri ile 3 saatlik uygulamalar arasındaki QTF rezonans kayma karşılaştırması Şekil 3.10.'da verilmiştir.





Şekil 3.10 Farklı QTF yüzey aktivasyon protokollerinin karşılaştırılması, a. Protokol III: 10mM T3BA-metanol 3 sa. ve b. Protokol IV: 1mM T3BA-metanol, 3 sa.

Bu sonuçlara göre seyreltme işlemi sonunda QTF üzerindeki T3BA kütle birikiminde kayda değer bir düşüş gerçekleşmiştir, bu da QTF çeviricilerin doyuma ulaşmasına engel olabilmektedir. Bu protokoller ile yüzeyi aktive edilen QTF'lerin antikor tutuklaması gerçekleştirildikten sonraki frekans kayma sonuçlarına bağlı olarak optimum protokol, Protokol IV olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Antikor tutuklama

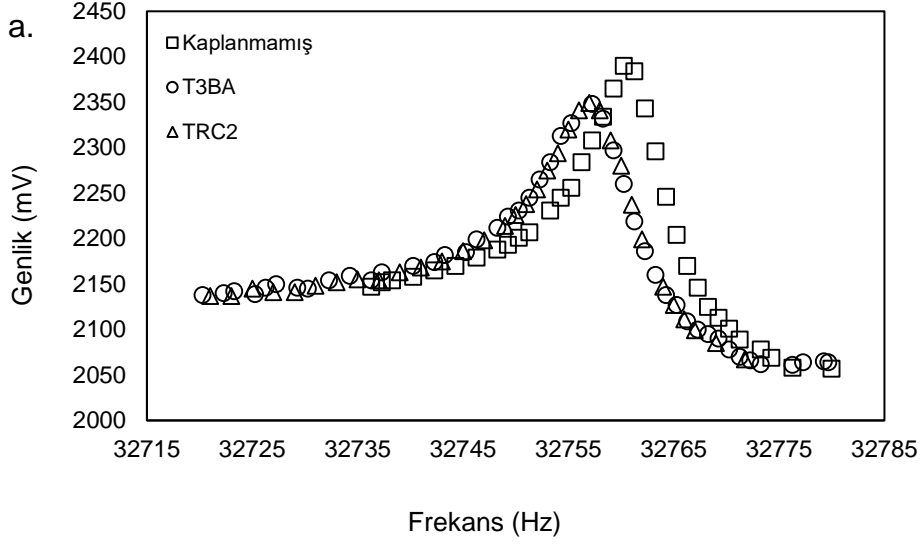
QTF/T3BA yüzeyine anti-transferrin (TRC-2) antikor tutuklama deneyleri 10 dk. daldırma yöntemi ile uygulanmıştır. T3BA yüzey aktivasyon protokollerinden en verimli antikor tutuklamanın gerçekleştiği protokolü belirlemek için iki aşamda deneyler gerçekleştirilmiştir. Öncelikle farklı TRC-2 dilüsyonu hazırlanmıştır ve TRC-2 immobilizasyon protokolleri T3BA-metanol ile yüzeyi aktive edilmiş QTF'lere 10 dakikalık bir süre ile uygulanmıştır. TRC-2 tutuklamanın ardından tüm QTF'lere deiyonize distile su ile yıkama yapılmıştır. Çizelge 3.4.'te görüleceği gibi T3BA tabakaları ve TRC-2 immünizasyonu ile kütle birikimi arasında ters orantı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar da T3BA aktif bağlanma bölgelerinde doyuma ulaşıldığını göstermektedir. Bu sebeple de T3BA tabakaları arttıkça bloklama gerçekleşmiş ve TRC-2'ye bağlı frekans kaymalarında bir düşüş gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.4 Protokol II ile yüzeyi aktive edilmiş QTF'lerin frekans kaymaları-kütle değişimi ve sonra 2µg/mL TRC-2 çözeltisine daldırılmasının ardından okunan frekans kaymaları-kütle değişimi

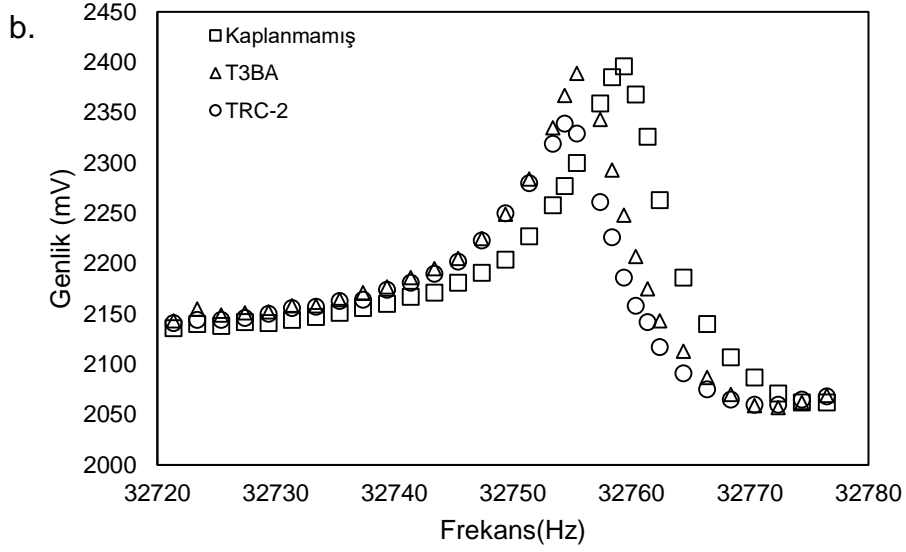
Aktivasyon sonrası frekans değişimi ve hesaplanan kütle değişimi		Antikor tutuklama sonrası frekans değişimi ve hesaplanan kütle değişimi	
Δf_{T3BA} (Hz)	ΔM (ng)	Δf_{TRC-2} (Hz)	ΔM (ng)
4,4	2,1466	8,185	3,9931
11,69333333	5,7047	7,075	3,4516
13,05	6,3666	6,91	3,3711
16,69	8,1424	4,58	2,2344
18,76	9,1523	1,533333	0,7481
32,83	16,0164	0,91	0,4440

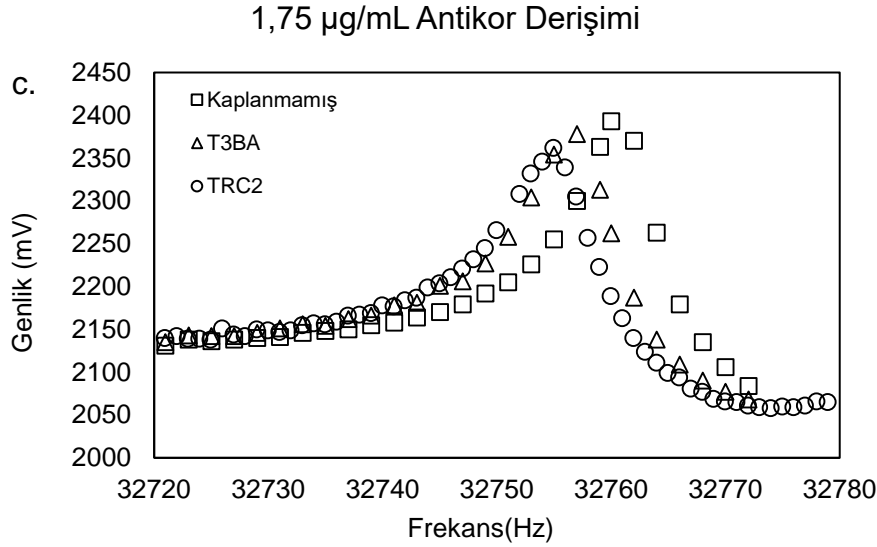
Elde edilen sonuçlara göre oluşan T3BA tek-tabakaları yoğunluğu QTF yüzeyinde arttıkça TRC-2 tutuklanma miktarında düşüş görülmektedir. Bu nedenle Protokol II (derişim; 10mM, süre; 6 sa.) yerine Protokol IV (derişim; 1mM süre; 3 sa.) ile yüzey aktivasyonu gerçekleştirilmiş QTF'ler 0,0625 µg/mL-10 µg/mL arasında hazırlanmış TRC-2 antikor çözeltilerine 10dk daldırma ile antikor tutuklama yapılmasına karar verilmiştir. Bu dilüsyonlarda gözlemlenen frekans kayma grafiklerinden örnekler Şekil 3.11.'de verilmiştir.

0,0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Antikor Derişimi



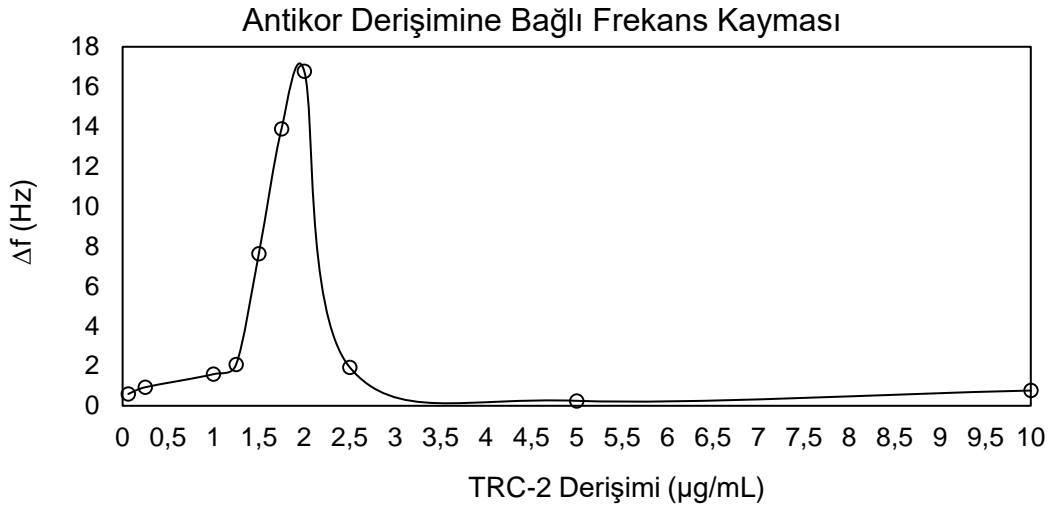
1,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Antikor Derişimi





Şekil 3.11 Kaplanmamış QTF, aktive edilmiş (T3BA), antikor (TRC-2) kaplı QTF'lerde rezonans frekansı karşılaştırmaları, Antikor derişimleri sırasıyla a. 0,0625 µg/mL, b. 1,25 µg/mL ve c. 1,75 µg/mL

Yapılan tutuklama çalışmalarının sonuçları Şekil 3.12.'de verilmiştir. QTF üzerinde en düşük anlamlı frekans kayması ve en yüksek anlamlı frekans kayması gözlenen derişim aralığı seçilmiştir (0.0625 µg/mL 2 µg/mL). Optimum antikor derişimin belirlenmesi daha yüksek antijen bağlanmaları sağlayabileceği için önemlidir.

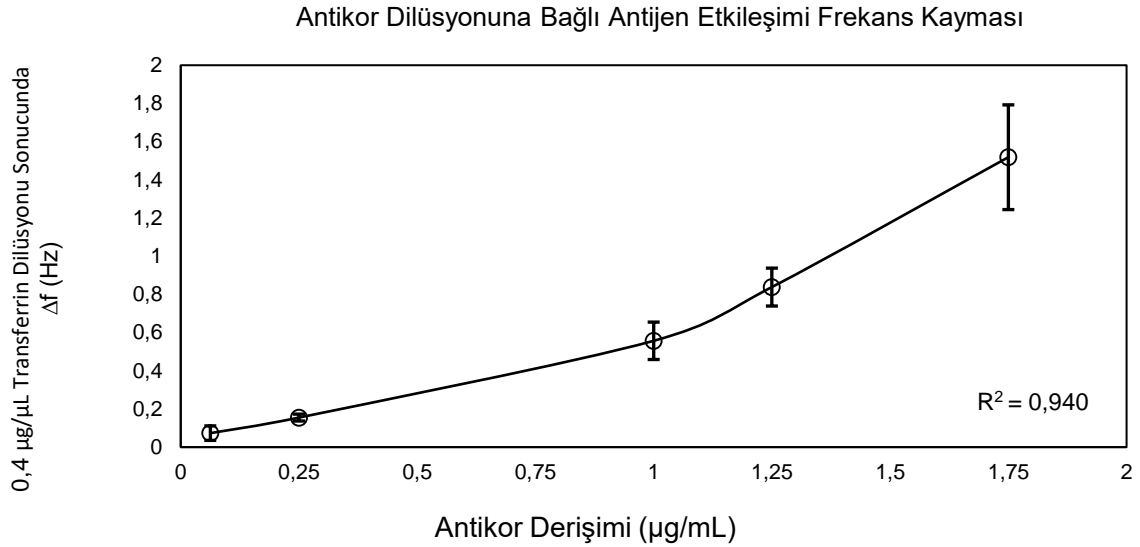


Şekil 3.12. Antikor derişiminin optimizasyonu

3.2.3. Transferrin QTF biyosensörü için kalibrasyon eğrisi

Analiz edilmesi hedeflenen transferrin molekülünün etkileşimi deneyleri iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Optimum antikor miktarının belirlenmesinde etkili olan bu

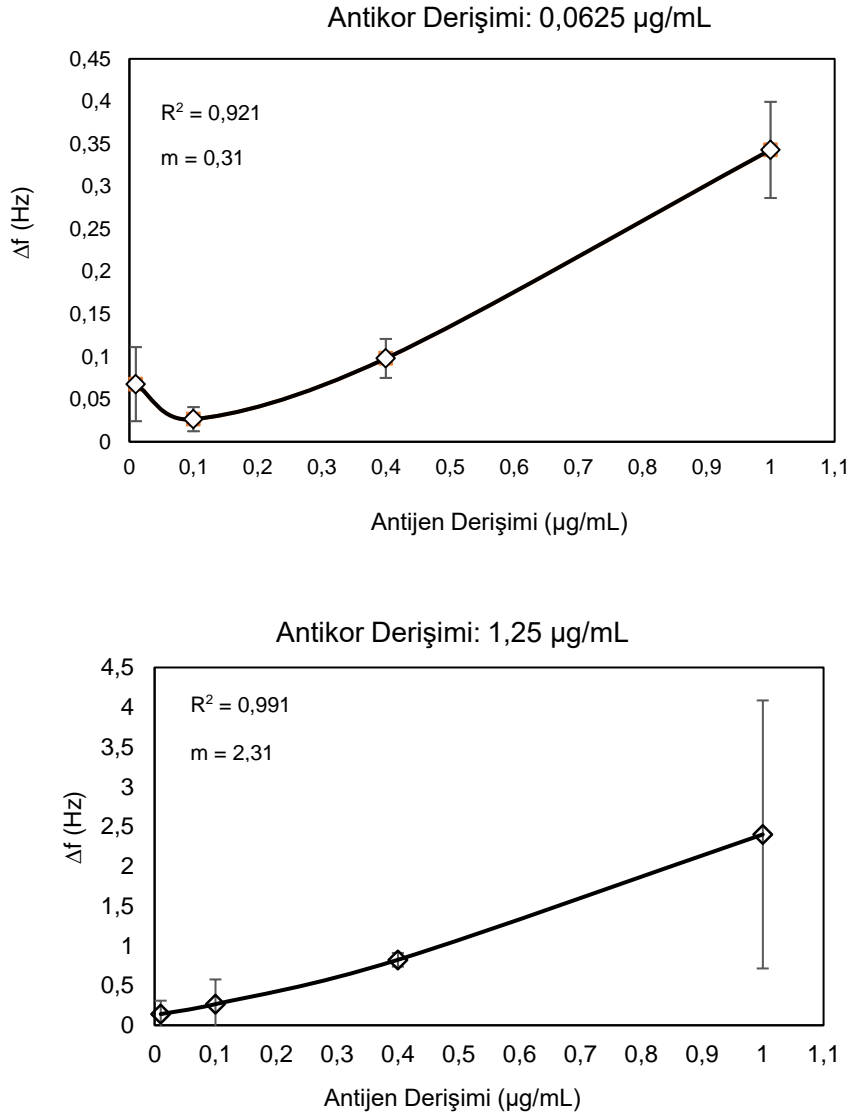
adımlardan ilki farklı antikor dilüsyonlarında kaplanmış QTF'lerin sabit derişimde antijen ile etkileştirilmesidir. Bu adım için kanda bulunan normal transferrin (4mg/mL) oranının yaklaşık 10 kat seyreltilmiş (0.4mg/mL'lik) dilüsyonlarda transferrin çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir QTF/T3BA/TRC-2 10 dakikalık daldırma protokolü ile 0.4mg/mL'lik transferin çözeltilisine daldırılmıştır. Şekil 3.13.'te verilen frekans ölçüm grafiklerinde gözlemlenebileceği gibi QTF yüzeyine tutuklanan antikorlara bağlanan transferrine bağlı gözlemlenen frekans kaymaları artan antikor konsantrasyonları ile artış göstermiştir. Buna bağlı olarak TRC-2 derişimi ile transferrine bağlı frekans kayması arasında bir lineer ilişki gözlemlenmiştir ($R^2 = 0,940$). Sonuç olarak artan antikor miktarı ile QTF yüzeyine bağlanan antijen derişiminin arttığı söylenebilmektedir.



Şekil 3.13 Frekans kayma hesaplamalarına göre TRC-2 çözeltili dilüsyon aralığı. T3BA modifikasyonu: 1mM T3BA-metanol çözeltilisi içerisinde 3 saat daldırma. TRC-2'nin en yüksek kütle birikimi 2 µg/mL derişiminde gözlemlenmiştir.

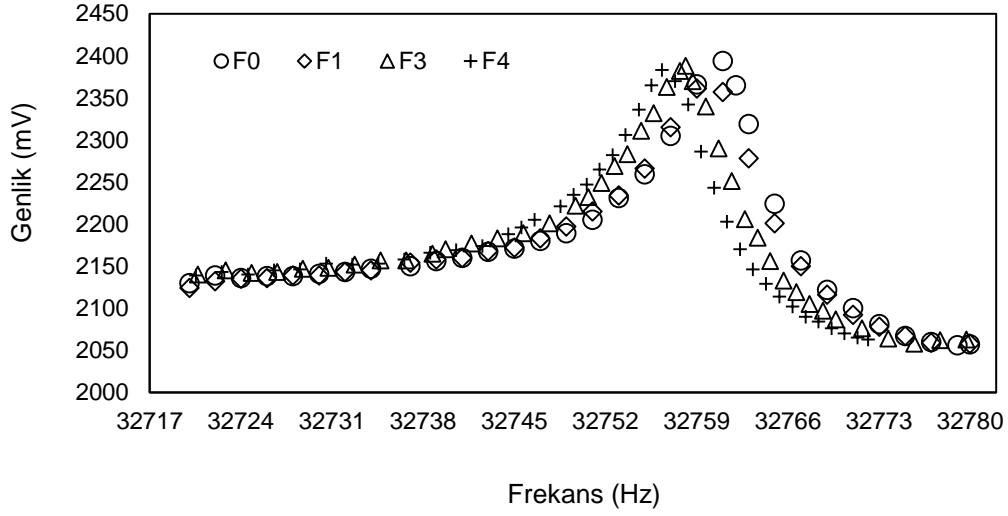
Bu adımın ardından, sabit antikor derişimlerinde kaplanmış QTF'ler 1 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.1mg/mL, 0.01 mg/mL antijen derişimlerinde 10 dk etkileşime bırakılmıştır. 0.01 mg/mL'nin altındaki derişimlerde etkileşime bırakılan QTF'lerden bir frekans cevabı alınamamıştır. Sonuçlar Şekil 3.14.'te verilmiştir. Bu sonuçlara bakılarak en güçlü lineer ilişki 1,25 µg/mL antikor derişiminde kaplanmış QTF'lerin artan değişen miktarlarda antijen derişimleri etkileşiminde tespit edilmiştir ($R^2= 0,991$).

Şekil 3.14'te verilen her iki durum için sensör hassasiyeti eğimden yola çıkılarak hesaplanmış ve en düşük derişimde (0,0625 µg/mL) antikor ile farklı antijen derişimlerinin etkileşimi sonucunda ortaya çıkan kalibrasyon grafiği için 0,31 Hz/µg/mL. En yüksek derişimde (1,25 µg/mL) antikor ile farklı derişimlerde antijen etkileşimi sonucundaki kalibrasyon grafiği için ise hassasiyet 2,31 Hz/µg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.14 Sabit antikor dilüsyonlarında bekletilmiş QTF'lerin değişen antijen miktarları ile etkileşimi frekans değişimi sonuçları. a. TRC-2 derişimi: 0,0625 µg/mL, b. TRC-2 derişimi: 0,25 µg/mL

1,25 µg/mL antikor derişiminde kaplanmış farklı QTF'lerin T3BA yüzey aktivasyonu, TRC-2 tutuklanması ve değişen miktarlarda antijen derişimleri ile etkileşiminin yarattığı frekans değişimleri sonuçlarından bir örnek Şekil 3.15.'te verilmiştir.



Şekil 3.15 1,25 µg/mL antikor derişiminde kaplanmış QTF'lerin T3BA ile aktivasyonu, TRC-2 tutuklanması ve 1mg/mL derişimde antijen ile etkileşimi sonuçları

Bu tez çalışması sonucunda ilk olarak kontrollü bir göç ortamında kütle birikimi sağlanarak bir QTF sensör sisteminin 1 Hz frekans kaymasının eşdeğer olduğu kütle değişimi ng cinsinden ifade edilmiştir. Bunun yanında kullanılan 32768 Hz'lik QTF'lerin stabil çalışma sınırı $0,32926 \pm 0,16183 - 98,063 \pm 2,00946$ ng belirlenmiştir. Sabit frekansta ve yüksek Q faktörüne bağlı yüksek stabilite gösteren QTF'lerin kütle hassas bir sensör olarak işlevselliği ortaya konmuştur. Tez çalışmasında açıklandığı gibi Faraday'ın Elektroliz Kanunları'ndan yararlanılarak elektrokimyasal hücre içerisinde kulometrik yöntemle kontrollü olarak indirgenen bakır kütlesi hesaplanmıştır. Ardından hesaplanan bu kütle birikiminin QTF'te yarattığı frekans kayması arasında bir ilişki kurulmuş ve sonuç olarak 1 Hz frekans kaymasının $0,48786 \pm 0,21255$ ng kütle değişimini gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan deneylerin sonucunda yüzeydeki kütle birikimini doğrulamak adına SEM görüntülemesi ve SEM-EDX yöntemi kullanılmıştır. Bütün bunların yanında Dr. Mehmet Altay Ünal'ın çalışmasında geliştirdiği QTF sensör sisteminin hızlı, yüksek hassasiyete sahip bir kütle hassas ölçüm sistemi olduğu doğrulanmıştır.

Yapılan çalışmanın ikinci aşamasında QTF çeviricilerinin yüzeyinin aktive edilerek antikor tutuklanmasının ardından antijen cevapları incelenip performans değerlendirilmesi yapılması ile bir biyosensör sistemi yapılandırılması ön çalışma verileri toplanmıştır. Biyosensör sisteminin algılayıcı tabakası olan anti-transferrin

antikorunun yüzeye tutuklanabilmesi için tek basamakta aktive edilmiştir. Tiyofen-3-boronik asit aktivasyon ajanı ile QTF yüzeyi aktive edilmiştir. Aktivasyon protokolleri sonucunda düşük T3BA yoğunluğunda daha yüksek antikor tutuklanması gözlemlenmiştir. Bu durum yüzeyde T3BA katmanlarının oluşmadığı bölgelerde açıkta kalan QTF yüzeyinde nonspesifik antikor adsorpsiyonu olduğuna işaret etmektedir. Bu nedenle, gelecek çalışmalarda bu ön veriden yararlanılarak geliştirilen biyosensör sisteminde yüksek spesifite sağlamak adına T3BA yüzey aktivasyonu adımının ardından bir bloklama adımı protokole eklenecektir. Bunun için QTF yüzeyinin Ti ve Pd'dan oluşan yüzeyine yönelen ve protein bağlanmasını bloke edecek bir molekül seçilecektir. Bu sayede yüzeyde oluşan boronat katmanları ile antikorların ağır zincirlerindeki CH₂ zincirleri arasındaki afiniteden faydalanılarak yüzeye antikor tutuklanması gerçekleştirildiği kesileştirilmiş olacaktır. Yüzeyde antikor tutuklanması gerçekleştirildikten sonra sistemin transferrin cevabı incelendiğinde ise QTF sensör sisteminin T3BA'ya hedeflenmiş antikor veya non-spesifik bağlanmış antikora transferrin bağlanması ile bir frekans cevabı gözlemlenerek çalışmanın amacı olan bir biyosensör yapılandırılması gerçekleştirilmiştir ve bir kalitatif biyosensör yapılandırılmasını ortaya koymaktadır.

Yapılandırılan sistem Çizelge 1.1'de verilen çalışmalarda geliştirilmiş transferrin biyosensörlerine kıyasla daha düşük maliyetli ve tek kullanımlık çeviricilere sahiptir. Tek kullanımlık çeviricili bir biyosensör yapılandırmasının, tekrar tekrar kullanılan çeviricilerde gözlenebilen ve sensör cevabının doğruluğunu etkileyen "hafıza etkisi" gibi dezavantajları yoktur. Bunların yanında Çizelge 1.1'de verildiği gibi transferrin tayinin için ağırlıklı olarak optik – yüzey plazmon rezonansı yöntemi kullanılmıştır. Yüzey plazmon rezonansı ile yapılan tayinler ışığın metalik bir yüzeyden yansımaları prensibine dayanır. Metalik bir yüzey sağlamak için biyolojik örnekler metal nanopartiküller ile aktive edilir. Bunun için en yaygın kullanılan nanopartiküller ise altındır. Bu da sistemin maliyetini arttırmaktadır. E. Prusak-sochaczewski ve J. H. T. Luong'un çalışmalarında kullanılan QCM çeviricisi QTF çeviricisine kıyasla çok daha pahalıdır [57]. Bunların yanında, transferrin tayini için yapılandırılan QTF biyosensörünün taşınabilir olması *in situ* tayin sağlamaktadır. Son olarak çalışmada kullanılan human-anti-human transferrin antikoru bahsedildiği gibi TÜBİTAK MAM, (Gebze, İstanbul)'dan. Dr. Selma Öztürk, Dr. Özlem Ertekin aracılığıyla alınmıştır. Bu sayede yüksek oranda yerli bir biyosensör yapılandırılması gerçekleştirilmiştir. İleriki

Çalışmalarda non-spesifik adsorpsiyonu engellemek adına yapılacak protokol değişiklikleri ile kantitatif, ysek hassasiyet ve seçiciliğe sahip, düşük maliyetli, taşınabilir bir kütle hassas QTF sensör sistemi yapılandırılması hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR LİSTESİ

- [1] D. Buenger, F. Topuz, ve J. Groll, "Hydrogels in sensing applications", *Progress in Polymer Science*, c. 37, sy 12, ss. 1678-1719, Ara. 2012.
- [2] A. Hulanicki, S. Glab, ve F. Ingman, "Chemical sensors: definitions and classification", *Pure and Applied Chemistry*, c. 63, sy 9, ss. 1247-1250, Oca. 1991.
- [3] L. C. Clark ve C. Lyons, "ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY", *Annals of the New York Academy of Sciences*, c. 102, sy 1, ss. 29-45, Ara. 2006.
- [4] T. Vo-Dinh ve B. Cullum, "Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics", *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, c. 366, sy 6-7, ss. 540-551, Mar. 2000.
- [5] F. Faridbod, V. K. Gupta, ve H. A. Zamani, "Electrochemical Sensors and Biosensors", *International Journal of Electrochemistry*, c. 2011, ss. 1-2, 2011.
- [6] O. S. Wolfbeis ve H. Li, "Fluorescence optical urea biosensor with an ammonium optrode as transducer", *Biosensors and Bioelectronics*, c. 8, sy 3-4, ss. 161-166, Oca. 1993.
- [7] J. W. Attridge, K. D. Leaver, ve J. R. Cozens, "Design of a fibre-optic pH sensor with rapid response", *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, c. 20, sy 5, ss. 548-553, May. 1987.
- [8] C. Munkholm, "A fiber-optic sensor for CO₂ measurement", *Talanta*, c. 35, sy 2, ss. 109-112, Şub. 1988.
- [9] M. A. Arnold ve T. J. Ostler, "Fiber optic ammonia gas sensing probe", *Analytical Chemistry*, c. 58, sy 6, ss. 1137-1140, May. 1986.
- [10] J. I. Peterson, R. V. Fitzgerald, ve D. K. Buckhold, "Fiber-optic probe for in vivo measurement of oxygen partial pressure", *Analytical Chemistry*, c. 56, sy 1, ss. 62-67, Oca. 1984.

- [11] F. Preuschoff, U. Spohn, D. Janasek, ve E. Weber, "Photodiode-based chemiluminometric biosensors for hydrogen peroxide and L-lysine", *Biosensors and Bioelectronics*, c. 9, sy 8, ss. 543-549, Oca. 1994.
- [12] B. H. Junker, D. I. C. Wang, ve T. A. Hatton, "Fluorescence sensing of fermentation parameters using fiber optics", *Biotechnology and Bioengineering*, c. 32, sy 1, ss. 55-63, Haz. 1988.
- [13] V. Gaudin, "Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review", *Biosensors and Bioelectronics*, c. 90, ss. 363-377, Nis. 2017.
- [14] D. I. Bradley vd., "Thermometry in Normal Liquid ^3He Using a Quartz Tuning Fork Viscometer", *Journal of Low Temperature Physics*, c. 171, sy 5-6, ss. 750-756, Haz. 2013.
- [15] M. A. Plunkett, Z. Wang, M. W. Rutland, ve D. Johannsmann, "Adsorption of pNIPAM Layers on Hydrophobic Gold Surfaces, Measured in Situ by QCM and SPR", *Langmuir*, c. 19, sy 17, ss. 6837-6844, Ağu. 2003.
- [16] J. Hu, F. Zhu, J. Zhang, ve H. Gong, "A room temperature indium tin oxide/quartz crystal microbalance gas sensor for nitric oxide", *Sensors and Actuators B: Chemical*, c. 93, sy 1-3, ss. 175-180, Ağu. 2003.
- [17] B. Ding, J. Kim, Y. Miyazaki, ve S. Shiratori, "Electrospun nanofibrous membranes coated quartz crystal microbalance as gas sensor for NH_3 detection", *Sensors and Actuators B: Chemical*, c. 101, sy 3, ss. 373-380, Tem. 2004.
- [18] P. Sun, Y. Jiang, G. Xie, X. Du, ve J. Hu, "A room temperature supramolecular-based quartz crystal microbalance (QCM) methane gas sensor", *Sensors and Actuators B: Chemical*, c. 141, sy 1, ss. 104-108, Ağu. 2009.
- [19] I. Hitoshi vd., "The breath ammonia measurement of the hemodialysis with a QCM-NH", *Bio-Medical Materials and Engineering*, sy 2, ss. 99-106, 2008.

- [20] R. Lucklum ve F. Eichelbaum, "Interface Circuits for QCM Sensors", içinde *Piezoelectric Sensors*, c. 5, C. Steinem ve A. Janshoff, Ed. Springer Berlin Heidelberg, 2007, ss. 3-47.
- [21] M. D. Ward ve D. A. Buttry, "In Situ Interfacial Mass Detection with Piezoelectric Transducers", *Science*, c. 249, sy 4972, ss. 1000-1007, Ağu. 1990.
- [22] M. P. Forrer, "A Flexure-Mode Quartz for an Electronic Wrist-Watch", 1969, ss. 157-162.
- [23] J.-M. Friedt ve é. Carry, "Introduction to the quartz tuning fork", *American Journal of Physics*, c. 75, sy 5, ss. 415-422, May. 2007.
- [24] J. Zhang, C. Dai, X. Su, ve S. J. O'Shea, "Determination of liquid density with a low frequency mechanical sensor based on quartz tuning fork", *Sensors and Actuators B: Chemical*, c. 84, sy 2-3, ss. 123-128, May. 2002.
- [25] X. Su, C. Dai, J. Zhang, ve S. J. O'Shea, "Quartz tuning fork biosensor", *Biosensors and Bioelectronics*, c. 17, sy 1-2, ss. 111-117, Oca. 2002.
- [26] A. G. T. Ruiter, J. A. Veerman, K. O. van der Werf, ve N. F. van Hulst, "Dynamic behavior of tuning fork shear-force feedback", *Applied Physics Letters*, c. 71, sy 1, ss. 28-30, Tem. 1997.
- [27] J. Zhang ve S. O'Shea, "Tuning forks as micromechanical mass sensitive sensors for bio- or liquid detection", *Sensors and Actuators B: Chemical*, c. 94, sy 1, ss. 65-72, Ağu. 2003.
- [28] D. Zeisel, H. Menzi, ve L. Ullrich, "A precise and robust quartz sensor based on tuning fork technology for (SF6)-gas density control", *Sensors and Actuators A: Physical*, c. 80, sy 3, ss. 233-236, Mar. 2000.
- [29] D. O. Clubb, O. V. L. Buu, R. M. Bowley, R. Nyman, ve J. R. Owers-Bradley, "Quartz Tuning Fork Viscometers for Helium Liquids", *Journal of Low Temperature Physics*, c. 136, sy 1/2, ss. 1-13, Tem. 2004.

- [30] R. Blaauwgeers *vd.*, “Quartz Tuning Fork: Thermometer, Pressure- and Viscometer for Helium Liquids”, *Journal of Low Temperature Physics*, c. 146, sy 5-6, ss. 537-562, Mar. 2007.
- [31] X. Zhou, T. Jiang, J. Zhang, X. Wang, ve Z. Zhu, “Humidity sensor based on quartz tuning fork coated with sol–gel-derived nanocrystalline zinc oxide thin film”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, c. 123, sy 1, ss. 299-305, Nis. 2007.
- [32] M. Barbic, L. Eliason, ve J. Ranshaw, “Femto-Newton force sensitivity quartz tuning fork sensor”, *Sensors and Actuators A: Physical*, c. 136, sy 2, ss. 564-566, May. 2007.
- [33] Ünal, Mehmet Altay, “Farklı tasarımlarda QTF (Quartz Tuning Fork) Sensör Üretimi”, Doktora, Ankara Üniversitesi, 2016.
- [34] K. Waszczuk *vd.*, “Evaluation of Pseudomonas aeruginosa biofilm formation using piezoelectric tuning forks mass sensors”, *Procedia Engineering*, c. 5, ss. 820-823, 2010.
- [35] T. Piasecki, G. Guła, K. Waszczuk, Z. Drulis-Kawa, ve T. Gotszalk, “Quartz Tuning Fork as in-situ Sensor of Bacterial Biofilm”, *Procedia Engineering*, c. 87, ss. 369-372, 2014.
- [36] A. Chałupniak, K. Waszczuk, K. Hałubek-Głuchowska, T. Piasecki, T. Gotszalk, ve J. Rybka, “Application of quartz tuning forks for detection of endotoxins and Gram-negative bacterial cells by monitoring of Limulus Amebocyte Lysate coagulation”, *Biosensors and Bioelectronics*, c. 58, ss. 132-137, Ağu. 2014.
- [37] J. Otero, R. Baños, L. González, E. Torrents, A. Juárez, ve M. Puig-Vidal, “Quartz tuning fork studies on the surface properties of Pseudomonas aeruginosa during early stages of biofilm formation”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, c. 102, ss. 117-123, Şub. 2013.
- [38] G. Sauerbrey, “Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und zur Mikrowagung”, *Zeitschrift für Physik*, c. 155, sy 2, ss. 206-222, Nis. 1959.

- [39] V. M. Mecea, J. O. Carlsson, P. Heszler, ve M. Bârtan, "Development and testing of a high temperature quartz crystal microbalance", *Vacuum*, c. 46, sy 7, ss. 691-694, Tem. 1995.
- [40] F. C. Strong, "Faraday's laws in one equation", *Journal of Chemical Education*, c. 38, sy 2, s. 98, Şub. 1961.
- [41] Zanello P., *Inorganic electrochemistry: theory, practice and application*. Royal Society of Chemistry, 2007.
- [42] J. J. Lingane, *Electroanalytical Chemistry*, 2. bs. New York, NY: Interscience Publishers, Inc., 1958.
- [43] C. Gabrielli, "Calibration of the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance", *Journal of The Electrochemical Society*, c. 138, sy 9, s. 2657, 1991.
- [44] U. Diebold, J.-M. Pan, ve T. E. Madey, "Growth mode of ultrathin copper overlayers on TiO₂ (110)", *Physical Review B*, c. 47, sy 7, ss. 3868-3876, Şub. 1993.
- [45] B. J. Hwang, D. T. Shieh, W. C. Chieh, D.-J. Liaw, ve L.-J. Li, "Electropolymerization of pyrrole and 4-(3-Pyrrolyl)butane-sulfonate on Pt substrate: An in situ EQCM study", *Thin Solid Films*, c. 301, sy 1-2, ss. 175-182, Haz. 1997.
- [46] K. Bizet, C. Gabrielli, ve H. Perrot, "Immunodetection by Quartz Crystal Microbalance", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, c. 89, sy 2-3, ss. 139-150, 2000.
- [47] C. Gabrielli, "Simultaneous EQCM and Ring-Disk Measurements in AC Regime Application to Copper Dissolution", *Electrochemical and Solid-State Letters*, c. 3, sy 9, s. 418, 1999.
- [48] C. M. Welch ve R. G. Compton, "The use of nanoparticles in electroanalysis: a review", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, c. 384, sy 3, ss. 601-619, Şub. 2006.

- [49] K. B. Male, S. Hrapovic, Y. Liu, D. Wang, ve J. H. . Luong, “Electrochemical detection of carbohydrates using copper nanoparticles and carbon nanotubes”, *Analytica Chimica Acta*, c. 516, sy 1-2, ss. 35-41, Tem. 2004.
- [50] J. Wang, G. Chen, M. Wang, ve M. P. Chatrathi, “Carbon-nanotube/copper composite electrodes for capillary electrophoresis microchip detection of carbohydrates”, *The Analyst*, c. 129, sy 6, s. 512, 2004.
- [51] R. R. Crichton ve M. Charloteaux-Wauters, “Iron transport and storage”, *European Journal of Biochemistry*, c. 164, sy 3, ss. 485-506, May. 1987.
- [52] A. L. Schade ve L. Caroline, “An Iron-binding Component in Human Blood Plasma”, *Science*, c. 104, sy 2702, ss. 340-341, Eki. 1946.
- [53] J. L. Miller, “Iron Deficiency Anemia: A Common and Curable Disease”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, c. 3, sy 7, ss. a011866-a011866, Tem. 2013.
- [54] M. F. Macedo ve M. de Sousa, “Transferrin and the transferrin receptor: of magic bullets and other concerns”, *Inflamm Allergy Drug Targets*, c. 7, sy 1, ss. 41-52, Mar. 2008.
- [55] M. F. Macedo, M. De Sousa, R. M. Ned, C. Mascarenhas, N. C. Andrews, ve M. Correia-Neves, “Transferrin is required for early T-cell differentiation”, *Immunology*, c. 112, sy 4, ss. 543-549, Ağu. 2004.
- [56] P. Ekblom, I. Thesleff, L. Saxen, A. Miettinen, ve R. Timpl, “Transferrin as a fetal growth factor: acquisition of responsiveness related to embryonic induction.”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, c. 80, sy 9, ss. 2651-2655, May. 1983.
- [57] E. Prusak-sochaczewski ve J. H. T. Luong, “Detection of Human Transferrin by the Piezoelectric Crystal”, *Analytical Letters*, c. 23, sy 2, ss. 183-194, Şub. 1990.
- [58] T. Yin, W. Wei, L. Yang, X. Gao, ve Y. Gao, “A novel capacitive immunosensor for transferrin detection based on ultrathin alumina sol–gel-derived films and

gold nanoparticles”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, c. 117, sy 1, ss. 286-294, Eyl. 2006.

- [59] X. Liu, Y. Sun, D. Song, Q. Zhang, Y. Tian, ve H. Zhang, “Enhanced optical immuosensor based on surface plasmon resonance for determination of transferrin”, *Talanta*, c. 68, sy 3, ss. 1026-1031, Oca. 2006.
- [60] J. Zhang vd., “A novel surface plasmon resonance biosensor based on graphene oxide decorated with gold nanorod–antibody conjugates for determination of transferrin”, *Biosensors and Bioelectronics*, c. 45, ss. 230-236, Tem. 2013.
- [61] S. Chen, Y. Liu, Z. Liu, S. Chu, ve W. Peng, “Micro-capillary-based self-referencing surface plasmon resonance biosensor for determination of transferrin”, *Applied Optics*, c. 55, sy 30, s. 8571, Eki. 2016.
- [62] Y. Mayang, X. He, L. Chen, ve Y. Zhang, “Detection of transferrin by using a surface plasmon resonance sensor functionalized with a boronic acid monolayer”, *Microchimica Acta*, c. 184, sy 8, ss. 2749-2757, Ağu. 2017.
- [63] J. Quinn vd., “The use of regenerable, affinity ligand-based surfaces for immunosensor applications”, *Biosensors and Bioelectronics*, c. 14, sy 6, ss. 587-595, Haz. 1999.
- [64] W. Lee, B.-K. Oh, Y. Min Bae, S.-H. Paek, W. Hong Lee, ve J.-W. Choi, “Fabrication of self-assembled protein A monolayer and its application as an immunosensor”, *Biosensors and Bioelectronics*, c. 19, sy 3, ss. 185-192, Kas. 2003.
- [65] D.-P. Tang, R. Yuan, ve Y.-Q. Chai, “Novel immunoassay for carcinoembryonic antigen based on protein A-conjugated immunosensor chip by surface plasmon resonance and cyclic voltammetry”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, c. 28, sy 5, ss. 315-321, May. 2006.
- [66] Y. Jung, J. Y. Jeong, ve B. H. Chung, “Recent advances in immobilization methods of antibodies on solid supports”, *The Analyst*, c. 133, sy 6, s. 697, 2008.

- [67] Srivatsa V. Rao, Kimberly W. Anderson, ve Leonidas G. Bachas, "Oriented Immobilization of Proteins", *Microchimica Acta*, c. 128, ss. 127-143, 1998.
- [68] M-A. Coletti-Previero ve A. Previero, "Alumina-Phosphate Complexes for Immobilization of Biomolecules", *Analytical Biochemistry*, sy 180, ss. 1-10, 1989.
- [69] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*. San Diego: Academic Press, 1996.
- [70] A. Barraud, H. Perrot, V. Billard, C. Martelet, ve J. Therasse, "Study of immunoglobulin G thin layers obtained by the Langmuir-Blodgett method: application to immunosensors", *Biosensors and Bioelectronics*, c. 8, sy 1, ss. 39-48, Oca. 1993.
- [71] Manuel Fuentes *vd.*, "Reversible and Strong Immobilization of Proteins by Ionic Exchange on Supports Coated with Sulfate-Dextran", *Biotechnology Progress*, c. 20, sy 4, Eyl. 2008.
- [72] S. Piletsky, E. Piletska, A. Bossi, N. Turner, ve A. Turner, "Surface functionalization of porous polypropylene membranes with polyaniline for protein immobilization", *Biotechnology and Bioengineering*, c. 82, sy 1, ss. 86-92, Nis. 2003.
- [73] A. Makaraviciute ve A. Ramanaviciene, "Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors", *Biosensors and Bioelectronics*, c. 50, ss. 460-471, Ara. 2013.
- [74] J.-Y. Park, B.-Y. Chang, H. Nam, ve S.-M. Park, "Selective Electrochemical Sensing of Glycated Hemoglobin (HbA_{1c}) on Thiophene-3-Boronic Acid Self-Assembled Monolayer Covered Gold Electrodes", *Analytical Chemistry*, c. 80, sy 21, ss. 8035-8044, Kas. 2008.
- [75] E. M. Yoo, K. R. Chintalacheruvu, M. L. Penichet, ve S. L. Morrison, "Myeloma expression systems", *Journal of Immunological Methods*, c. 261, sy 1-2, ss. 1-20, Mar. 2002.

- [76] J. A. Ho *vd.*, "Ultrasensitive electrochemical detection of biotin using electrically addressable site-oriented antibody immobilization approach via aminophenyl boronic acid", *Biosensors and Bioelectronics*, c. 26, sy 3, ss. 1021-1027, Kas. 2010.
- [77] Wei-Ching Liao ve Ja-an Annie Ho, "Improved Activity of Immobilized Antibody by Paratope Orientation Controller: Probing Paratope Orientation by Electrochemical Strategy and Surface Plasmon Resonance Spectroscopy", *Biosensors and Bioelectronics*, ss. 32-38, 2013.
- [78] B. R. James ve R. J. P. Williams, "383. The oxidation–reduction potentials of some copper complexes", *J. Chem. Soc.*, c. 0, sy 0, ss. 2007-2019, 1961.
- [79] M. E. Elsayed, M. U. Sharif, ve A. G. Stack, "Transferrin Saturation", içinde *Advances in Clinical Chemistry*, c. 75, Elsevier, 2016, ss. 71-97.