

**KONKANAVALİN A BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON
REZONANS TEMELLİ BİYONSENSÖRÜN
HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE
BASED BIOSENSORS CONCANAVALIN A IMPRINTED**

YEŞİM ERDOĞAN

PROF. DR MEHMET ALİ ONUR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2022

ÖZET

KONKANAVALİN A BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS TEMELLİ BİYONSENSÖRÜN HAZIRLANMASI

Yeşim ERDOĞAN

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Ocak 2022, 71 sayfa

Bu tez kapsamında, Konkanavalin A tayini için Konkanavalin A baskılanmış yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörler hazırlanmıştır. Bu amaçla, ilk olarak SPR biyosensör çip yüzeyi allil merkaptan ile modifiye edilmiştir. Daha sonra N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomeri kullanılarak Konkanavalin A kalıp molekülü ile birlikte farklı molar oranlarında ön polimerizasyon kompleksleri oluşturulmuştur. Ön kompleks, fonksiyonel monomer olarak kullanılan HEMA, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan EGDMA ile oluşturulan polimer karışımı içerisine katılmış ve AIBN başlatıcısı varlığında SPR çip yüzeyinde UV ışığı kullanılarak polimerleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak Konkanavalin A kalıp molekülü kullanılmadan aynı işlemler gerçekleştirilmiş ve Konkanavalin A baskılanmamış SPR biyosensörler hazırlanmıştır. Hazırlanan SPR çipler atomik kuvvet mikroskobu (AFM), elipsometre ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmiştir. Konkanavalin A molekülü için uygun pH değerinin belirlenmesi amacı ile Konkanavalin A baskılanmış biyosensör ile pH 4, 5, 6, ve 7.4 fosfat tamponları ile hazırlanmış Konkanavalin A çözeltileri kullanılarak pH taraması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sensorgramlar ile Konkanavalin A molekülü için uygun pH değeri 7.4 fosfat tamponu olarak tespit edilmiştir. Daha sonra farklı derişimlerdeki Konkanavalin A

zelteleri (0.01-50 ng/mL) ile kinetik analiz yapilarak SPR biyosensörün ölçüm hassasiyeti belirlenmiştir. Ölçüm sonuçlarından elde edilen sensorgramlar sonucunda hazırlanan baskılanmış biyosensörün doğruluğu (0.01-5 ng/mL) derişim aralığında %99; (10-50 ng/ml) aralığında ise %96 doğrulukta ölçüm yapmaktadır. Tayin limiti (LOD) 0.0011 ng/mL ve tayin sınırı (LOQ) 0.0038 ng/mL olduğu hesaplanmıştır. Farklı derişimlerde hazırlanmış Konkanavalin A çözeltileri bağlanma kinetiğinin belirlenmesi amacı ile kullanmıştır. Hazırlanmış olan biyosensör için en uygun adsorpsiyon modeli Langmuir olarak tespit edilmiştir. Seçicilik çalışmaları, Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler ile moleküler yapı bakımından benzer olan sığır serum albumin (BSA) ve miyoglobin (Myg) yarışmacı molekülleri ile gerçekleştirilmiştir. Gerçek örnek çalışmaları için soya fasulyesinden Konkanavalin A molekülü saflaştırılmıştır. Gerçek örnekten hazırlanan örneklerin Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör ile kinetik analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sensorgramlar ile Konkanavalin A miktarı ve geri kazanım hesaplanmıştır. Konkanavalin A molekölünün yapay kontrol plazma ortamındaki uygunluğunu belirlemek amacıyla yapay kontrol plazma içerisinde farklı derişimlerde hazırlanmış Konkanavalin A çözeltilerinin baskılanmış SPR biyosensör ile kinetik analizleri gerçekleştirilmiş, elde edilen sensorgramlar ile Konkanavalin A miktarı ve geri kazanım hesaplanmıştır. Konkanavalin A molekölünün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi amacıyla aynı gün içerisinde peş peşe 4 tekrarlı analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca farklı zamanlardaki biyosensör kullanılabilirliğini test etmek amacıyla 1., 2., 4. ve 6. aylarda kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün Konkanavalin A tayini için hassas, hızlı, uzun ömürlü ve maliyetli bir teknik olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Moleküler Baskılanmış Polimerler, Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensör, Konkanavalin A

ABSTRACT

PREPARATION OF SURFACE PLASMON RESONANCE BASED BIOSENSORS CONCANAVALIN A IMPRINTED

Yeşim ERDOĞAN

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

January 2022, 73 pages

Within the scope of this thesis, a Concanavalin A imprinted surface plasmon resonance (SPR) biosensor was prepared for the determination of Concanavalin A. At the beginning, the surface of the SPR biosensor chip was modified using allyl mercaptan. Then, a pre-polymerization complex was generated utilizing N-methacryloyl-(L)-histidine methyl ester (MAH) monomer in various molar ratios with the Concanavalin A template molecule. The pre-complex, HEMA as the functional monomer, was added to the polymer mixture prepared using EGDMA as the crosslinker and polymerized using UV light on the surface of the SPR chip in the presence of the AIBN initiator. The same methods were repeated without utilizing the Concanavalin A template molecule as a control, and a non-imprinted SPR biosensor based on Concanavalin A was created. Atomic force microscopy (AFM), ellipsometry, and contact angle measurements were used to characterize the manufactured SPR chips. pH scanning was used to establish the optimal pH value for the Concanavalin A molecule using Concanavalin A solutions made with pH 4, 5, 6, and 7.4 phosphate buffers and a Concanavalin A suppressed biosensor. The sensorgrams obtained indicated that the proper pH for the Concanavalin A molecule

is 7.4 phosphate buffer. The sensitivity of the SPR biosensor was then tested using kinetic analysis with Concanavalin A solutions ranging from 0.01 to 50 ng/mL. The accuracy of the imprinted biosensor created from sensorgrams derived from the measurement data was 99 percent in the concentration range (0.01-5 ng/mL); it was measured with 96 percent accuracy in the concentration range (10-50 ng/mL). The limit of detection (LOD) was determined to be 0.0038 ng/mL at the limit of quantification (LOQ) of 0.0011 ng/mL. The binding kinetics of Concanavalin A were determined using solutions produced at various concentrations. The Langmuir was proven to be the best appropriate adsorption model for the developed biosensor. Selectivity researches were conducted using SPR biosensors that were either suppressed or not suppressed with Concanavalin A, as well as competing molecules such as bovine serum albumin (BSA) and myoglobin (Myg), which have a similar molecular structure. Concanavalin A was isolated from soybean for use in real sample studies. The kinetic analysis of samples made from the genuine sample was carried out using the Concanavalin A suppressed SPR biosensor, and the quantity of Concanavalin A and recovery were determined using the sensorgrams obtained. To evaluate the Concanavalin A molecule's suitability for use in the artificial control plasma environment, kinetic analyses of Concanavalin A solutions prepared at various concentrations in the artificial control plasma were performed using the suppressed SPR biosensor, and the amount of Concanavalin A and recovery was calculated using the sensorgrams obtained. Four sequential analyses were performed on the same day to determine the reusability of the Concanavalin A molecule. Additionally, kinetic analyses were conducted at 1, 2, 4, and 6 months to determine the biosensor's applicability at various time points. Concanavalin in its prepared state A suppressed SPR biosensor has been shown to be a sensitive, rapid, long-lasting, and cost-effective method for determining Concanavalin A.

Keywords: Molecularly Imprinted Polymers, Surface Plasmon Resonance Biosensors, Concanavalin A,

TEŞEKKÜR

Bilgi ve birikimi ile akademik olarak heyecanlanmamı sağlayıp yüksek lisans sürecine başlamama vesile olan, yardımcı, anlayışlı ve yol gösteren pek değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Ali Onur'a,

Çalışmalarım boyunca birçok konuda benden yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini her daim aktaran, anlayışlı ve güleryüzlü sevgili hocam Dr. Duygu Çimen'e,

Bilgi ve desteği ile tez çalışmamda büyük emeği olan hocam Doç. Dr. Nilay Bereli'ye,

Yüksek lisans tez çalışmalarım süresince desteğini ve olanaklarını eksik etmeyen, akademik anlamda feyz aldığım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Bu yorucu ve stresli süreçte bana anlayışla yaklaşan ve bu günlere gelmemde çok büyük emekleri olan başta babam, annem ve biricik ağabeyime,

Kendime inanmama ve bu sürece başlamama vesilen olan, desteğini ve sevgisini esirgemeyen sevgili Yiğitcan Yeşilata'ya,

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, FYL-2020-18784 nolu kapsamlı Araştırma Projesi Desteğiyle gerçekleştirilmiştir.

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi	3
2.1.1. Moleküler Baskılama Tekniği	3
2.1.2. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Bileşenleri	8
2.1.2.1. Kalıp Molekül	8
2.1.2.2. Fonksiyonel Monomerler	9
2.1.2.3. Çapraz Bağlayıcılar	10
2.1.2.4. Çözücüler	11
2.1.2.5. Başlatıcılar	11
2.1.2.6. Polimerizasyon Koşulları	12
2.1.3. Moleküler Baskılama Teknikleri	13
2.1.3.1. Yığın Baskılama	13
2.1.3.2. Yüzey Baskılama	14
2.1.3.3. Epitop Baskılama	14
2.2. Biyosensörler	14
2.2.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	15
2.2.1.1. Biyoreseptörler	16
2.2.1.2. Dönüştürücüler	17
2.3. Yüzey Plazmon Rezonans	19

2.3.1. YüzeY Plazmon Rezonans Teorisi	20
2.3.2. YüzeY Plazmon Rezonans Temelli Biyosensörler	23
2.4. Konkanavalin A	26
3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR	29
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	30
3.2. YüzeY Plazmon Rezonans (SPR) Temelli Biyosensörün Altın Çip YüzeYinin Modifikasyonu	30
3.3.Fonksiyonel Monomer ve Kalıp Molekül ile Ön Kompleksin Oluşturulması	31
3.4.Konkanavalin A Baskılanmış ve Baskılanmamış SPR Biyosensörlerin Hazırlanması	32
3.5. Kalıp Molekülün Uzaklaştırılması	33
3.6.Karakterizasyon Çalışmaları	34
3.6.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi	34
3.6.2. Elipsometre Ölçümleri	34
3.6.3. Temas Açısı Ölçümleri	35
3.7. Kinetik analizler	35
3.7.1. pH Çalışması	35
3.7.2. Farklı Derişimlerde Hazırlanmış Konkanavalin A Sulu Çözeltilerinin Konkanavalin A Baskılanmış Biyosensörle Kinetik Analizleri	37
3.7.3. Seçicilik Çalışmaları	37
3.7.4. Soya Fasulyesinden Konkanavalin A Tayini	38
3.7.5. Tekrar Kullanılabilirliğin İncelenmesi	38
3.7.6. Yapay Kontrol Plazma Ortamında Farklı Derişimlerde Hazırlanmış Konkanavalin A Çözeltilerinin Miktarının Konkanavalin A Baskılanmış Biyosensörle Belirlenmesi	38
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	39
4.1. Ön Polimerizasyon Kompleksin Hazırlanması ve Hedef Molekül ile Monomer Oranlarının Belirlenmesi	39
4.2. Karakterizasyon Çalışmaları	41
4.2.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi	41
4.2.2. Elipsometre Ölçümleri	43
4.2.3. Temas Açısı Ölçümleri	45

4.3. Kinetik Analizler	46
4.3.1. pH Çalışması.....	46
4.3.2. Farklı Derişimlerde Hazırlanmış Konkanavalin A Sulu Çözeltilerinin Konkanavalin A Baskılanmış Biyosensörle Etkileşimi	47
4.3.3 Denge ve Bağlanma Kinetik Analizi.....	50
4.3.4. Denge İzoterm Modelleri	55
4.1.4. Seçicilik Analizleri.....	58
4.1.5. Soya fasulyesinden (Jack Bean) Konkanavalin A tayini.....	61
4.1.7. SPR Biyosensörlerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	64
5.YORUM.....	67
6.KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kovalent baskılama yönteminin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2. Kovalent olmayan baskılama yönteminin şematik gösterimi	6
Şekil 2.3. Moleküler baskılama tekniğinin gösterimi [22]	8
Şekil 2.4. Moleküler baskılama için kullanılan yaygın monomerler. (A) Kovalent. (1) 4-Vinil benzen borik asit; (2) 4-vinil benzaldehit; (3) 4-vinil anilin; (4) tert-bütül p-vinil fenil karbonat (B) Kovalent olmayan. (5) akrilik asit (AA); (6) metakrilik asit (MAA); (7) 3-florametil akrilik asit (TFMAA); (8) metil metakrilat (MMA); (9) p-vinil benzoik asit [1]	9
Şekil 2.5. Moleküler baskılama için kullanılan yaygın çapraz bağlayıcılar. (A) Kovalent (B) Kovalent olmayan. (1) (37) trietil izosiyanürat (TAIC); bis- (1-(tert)-bütül peroksi)-1-metiletil-benzen (BIPB); dikumil peroksit (B) Kovalent olmayan. (4) etilen glikol dimetakrilat (EGDMA); (5) N,N' -metilendiakrilamit (MBAA); (42) divinilbenzen (DVB); (43) 1,3-diizopropenil benzen; (44) N,N' -1,4-fenilendiakrilamin; (45) 2,6- bisakrilamidopiridin; (46) N,O- bisakriloil-fenilalaninol [1]	10
Şekil 2.6. Moleküler baskılama için kullanılan yaygın başlatıcılar [20]......	12
Şekil 2.7. Biyosensörün şematik gösterimi [42]	15
Şekil 2.8. Krestchman konfigürasyonunun gösterimi	21
Şekil 2.9. Dağılma eğrileri.....	23
Şekil 2.10. SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi.....	25
Şekil 2.11. SPR biyosensörün şematik gösterimi	26
Şekil 2.12. Konkanavalin A'nın tetramerik yapısının şematik gösterimi	27
Şekil 3.1. Yüzey plazmon rezonans temelli SPR biyosensörün yüzey modifikasyonunun	30
Şekil 3.2. MAH:Ni(II):Con A kompleksinin şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.3. Konkanavalin A Baskılanmış SPR Biyosensörün Hazırlanmasının Gösterimi	33
Şekil 3.4. EP3-Nulling Elipsometre Cihaz Görseli.....	35
Şekil 3.5. SPR Cihaz Görseli	36

Şekil 4.1. Farklı molar oranlarında MAH:Ni(II):Con A ön polimerizasyon kompleksleri ile hazırlanan Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler ait SPR sensorgramları (A) ve $IF:\% \Delta R_{MIP}/\% \Delta R_{NIP}$ değerleri (B).	40
Şekil 4.2. Konkanavalin A baskılanmış (A) ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerin (B) yarı temas modunda alınan AFM 3B görüntüsü ($1 \times 1 \mu m^2$).	42
Şekil 4.3. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş (A), Konkavalin A baskılanmış (B) ve baskılanmamış (C) SPR çip yüzeylerinin elipsometrik ölçümünde alınmış olan 3 boyutlu görüntüler	44
Şekil 4.4. Modifiye edilmemiş SPR altın çip yüzeyi (A), Konkanavalin A baskılanmış (B) ve baskılanmamış SPR (C) çip yüzeylerinin temas açısı fotoğrafları.	45
Şekil 4.5. Farklı fosfat tamponlarında hazırlanan Konkanavalin A çözeltisi ve SPR biyosensör arasındaki etkileşimlere ait SPR sensorgramları.....	46
Şekil 4.6. Konkanavalin A sulu çözeltisi ile Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgram grafiği (A: 0.01-50 ng/mL, B: 0.01-0.5 ng/mL).....	48
Şekil 4.7. 0.01-50 ng/mL aralığında Konkanavalin A derişimi ile $\% \Delta R$ arasındaki ilişki.	49
Şekil 4.8. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi (Denge analiz yaklaşımı (A) ve Bağlanma kinetik yaklaşımı (B)).....	54
Şekil 4.9. Langmuir (A), Freundlich (B) ve Langmuir-Freundlich (C) adsorpsiyon izoterm modelleri.....	56
Şekil 4.10. Konkanavalin A baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR biyosensörüne ait sensorgramlar	59
Şekil 4.11. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör ile soya fasulyesinden elde Konkanavalin A'nın tayinine ait kinetik analiz sensorgramları.	61
Şekil 4.12. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör ile yapay plazma örneklerinde Konkanavalin A tayinine ait kinetik analiz SPR sensorgramları (A) ve kalibrasyon grafiği (B).	64
Şekil 4.13. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün aynı gün içindeki tekrar kullanılabilirliği (a: adsorpsiyon, b: desorpsiyon, c: rejenerasyon).	65
Şekil 4.14. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün farklı zamanlarda tekrar kullanılabilirliği.	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Konkanavalin A tayini için literatürde yer alan çalışmalar	50
Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri.....	55
Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri	57
Çizelge 4.4 Konkanavalin A (Con A), sığır serum albumin (BSA) ve miyoglobin (Myg) için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları	60
Çizelge 4.5 Konkanavalin A baskılanmış SPR sensörlerin jack bean örneklerinde bulunan Konkanavalin A Analiz Sonuçları (n:3)	62
Çizelge 4.6 Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün yapay plazma örneklerinde bulunan Konkanavalin A tayini için kinetik analiz sonuçları (n:3).....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

η	Yüzey kırılma indisi
λ	Yayıma Dalga Boyu
ω	Salınım Frekansı
c	Vakumdaki Işık Hızı
β	Dalga Yayılma Numarası
R	Toplam Yansıma
k_m	Kütle Aktarım Hız Sabiti
$k_a - k_d$	Kompleks Oluşum Hız Sabitleri
C	Analit Derişimi
K_A	Bağlanma Sabiti
K_D	Ayrılma Sabiti
μm	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
ng	Nanogram
mg	Miligram
g	Gram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre

Kısaltmalar

SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
SPP	Yüzey Plazmon-Polariton
SPW	Yüzey Plazmon Dalgası
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
NIP	Baskılanmamış Polimerler
HEMA	Hidroksietil metakrilat
EGDMA	Etilen Glikol Dimetakrilat
BSA	Sığır Serum Albumin
MAH	N-metakriloil-(L)-histidin ester
MAA	Metakrilik Asit
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
MIT	Moleküler Baskılama Teknolojisi
TM	Enine Manyetik Dalga
AIBN	Azobisizobütironitril
SPW	Yüzey Plazmon Dalgası
UV	Ultraviyole

QCM

Kuars Kristal Mikro Terazisi

1. GİRİŞ

Moleküler baskılama teknolojisi (MIT) genellikle bir moleküler kilit yapma yöntemi olarak tanımlanır. Bu teknik, şekil, boyut ve fonksiyonel gruplar açısından şablon moleküllü tamamlayıcı, özel bağlanma bölgelerine sahip, tamamlayıcı polimerler oluşturmayı sağlar. Tanıma özgüllüğü ve uygulama evrenselliği gibi benzersiz özellikler sayesinde moleküler baskılanmış polimerler geniş bir uygulama yelpazesi bulmuştur ve biyolojik uygulamalar için gün geçtikçe geliştirilmektedir [1]. Moleküler baskılanmış polimer sentez prosedürü önemli bir süreçtir ve çok çeşitli protokoller mevcuttur. Baskı için kullanılan şablonlar aminoasitlerden bakterilere kadar değişkenlik gösterir. Düşük maliyet, hızlı hazırlık, stabilite ve tekrarlanabilirlik en önemli avantajlarından birkaçıdır [2].

Biyosensör kelimesi Cammann ile ilk kez duyulmuştur ve anlamlandırılması IUPAC ile oluşturulmuştur. Biyosensörler, biyolojik bir bilgiyi elektrik sinyaline dönüştüren analitik cihazlardır. Enzim bazlı, doku bazlı, immünoensör, optik, termal ve piezoelektrik gibi çeşitli biyosensör türleri mevcuttur [3]. Optik biyosensörler 1990'ların başından beri ticari olarak temin edilmekte ve yaşam bilimlerindeki birçok araştırmada yaygın olarak kullanılmaktadır. Optik biyosensörler, biyosensör yüzeyine bağlı reseptörler ile yüzeyin üzerindeki çözelti içerisindeki ligandlar arasındaki etkileşimleri karakterize etmek için sönümlü dalga olgusunu kullanır. En iyi bilinen optik biyosensörlerin çoğu yüzey plazmon rezonansını kullanır. Burada, yüzeye immobilize edilmiş reseptöre bağlanan moleküller yüzeye yakın bir ortamda kırılma indisini değiştirir. Bu değişiklik bağlanan analit miktarının, reseptöre olan afinitesinin ve ayrılma kinetiğinin gerçek zamanlı olarak izlenmesini mümkün kılar [4].

Radyoaktif, kromojenik, floresan ve diğer etiketler uzun süredir immünojenik testler ve reseptör bağlama çalışmaları dahil olmak üzere biyomoleküler etkileşimleri tespit etmenin temelini sağlamışlardır. Fakat son on yılda etiketsiz biyosensör teknolojisinde benzeri görülmemiş bir büyüme olmuştur. Bunlardan biri olan optik temelli yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörler, biyomoleküler etkileşimlerin gerçek zamanlı izlenmesi için en güçlü optik algılama platformu olarak ortaya çıkmıştır. SPR, klinik uygulanabilirliği de dahil olmak üzere birçok uygulama için moleküler etkileşimlerin hızlı ve rutin analizini mümkün kılar. Küçük hacimlerde örneklem numunelerinin kullanılabilirliği, sensör çiplerinin yeniden kullanılabilirliği, analizi yapılan numunenin

saflaştırılmasına gerek olmaması gibi faydalarından ötürü maliyet açısından da daha avantajlı bir uygulamadır [5].

Sunulan tez çalışması kapsamında, moleküler baskılama tekniği kullanılarak Konkanavalin A molekülünü tanıma bölgelerine sahip optik temelli SPR biyosensör hazırlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle yüzey plazmon temelli rezonans biyosensörünün çip yüzeyi allil merkaptan ile modifiye edilmiştir. Daha sonra Konkanavalin A (Con A) baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR biyosensörler hazırlanmış ve SPR biyosensörlerinin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörünün farklı pH'larda fosfat tampon solüsyonu ile hazırlanmış Konkanavalin A çözeltilerindeki adsorpsiyonunun gözlenmesi için SPR kinetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca farklı derişimlerde hazırlanmış Konkanavalin A çözeltilerinin baskılanmış SPR biyosensördeki adsorpsiyonunun gözlenmesi için de SPR kinetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün seçicilik çalışmaları için farklı molar oranlarda sığır serum albümin (BSA), Miyoglobulin (Myg) ve Konkavalin A içeren çözeltiler ile SPR kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir. Baskılanmış SPR biyosensörünün, soya fasulyesinden (jack bean) özütü elde edilip farklı derişimlerde hazırlanmış Konkanavalin A çözeltilerindeki adsorpsiyonunun gözlenmesi için SPR kinetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapay kontrol plazma ortamında farklı derişimlerde hazırlanmış Konkanavalin A sulu çözeltilerinin baskılanmış biyosensör ile kinetik analizleri yapılarak geri kazanımı belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler baskılama teknolojisi (MIT), dayanıklı tanıma materyalleri dizayn etmek için antikorlar ve biyolojik reseptörler gibi doğal tanıma varlıklarını taklit edebilen uygulanabilir sentetik bir yaklaşımdır [6,7]. Doğadaki tanımayı taklit edebilen sentetik malzemelerin oluşturulması son zamanlarda önemli çalışma alanı olmuştur. MIT, aminoasitler ve proteinler [8,9], nükleotid türevleri [10], kirleticiler [11,12], ilaçlar ve yiyecekler [13,14] gibi hem kimyasal hem de biyolojik molekülleri tanıyabilen gelecekte birçok alanda kullanılabilecek bir yöntem olarak görülmektedir. Moleküler baskılama, sensör tasarımlarında, tanıma ve teşhiste, çevre analizlerinde kullanılmakta ve geliştirilmektedir.

Moleküler baskılanmış polimer temel olarak bir analit ve fonksiyonel bir monomer arasındaki kompleks oluşumuna dayanmaktadır. Bir çapraz bağlayıcı maddenin de olması durumunda üç boyutlu bir polimer ağı oluşturulur. Polimerizasyon işleminden sonra analit (şablon) polimerden çıkartılır. Şekil, boyut ve kimyasal özellikleri bakımından analit ile uyumlu bölgelere sahip bir moleküler olarak baskılanmış polimer oluşturulmuş olur. Genellikle analit ve polimer matrisi içerisindeki fonksiyonel gruplar arasındaki moleküler arası etkileşimler tanıma ve bağlanma olayını yönlendirir. Böylece elde edilen moleküler baskılanmış polimer seçici olarak şablon molekülü tanıyabilir ve bağlanır. Moleküler baskılı polimerlerin temel avantajları hedef moleküle özgü afinite ve seçicilik göstermesidir. Baskılanmış polimerler proteinler, nükleik asitler gibi biyolojik sistemlerle karşılaştırıldığında daha yüksek fiziksel dayanıklılığa, yüksek sıcaklık ve basınca karşı dirençliliğe, çözücülere karşı stabiliteye sahiptir [15]. Ayrıca, sentezlenmeleri daha ucuz, saklanma ömürleri ise yüksektir. Moleküler baskılanmış polimerler, tanıma kapasitelerini koruyarak oda sıcaklığında birkaç yıl durabilirler.

2.1.1. Moleküler Baskılama Tekniği

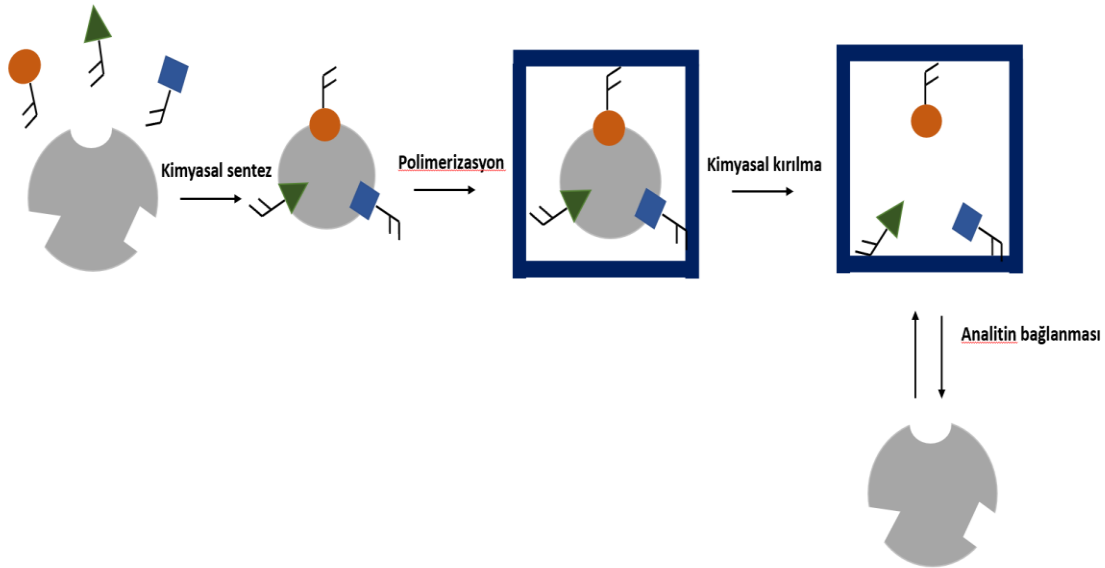
Moleküler baskılama tekniği en basit haliyle üç ana adımdan meydana gelmektedir.

1) Ön-kompleksleşme

Kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki kompleksin kovalent, kovalent olmayan ya da yarı kovalent etkileşimlerle oluşumuna dayanmaktadır.

a) Kovalent Yaklaşım:

Kovalent yaklaşımda [16,17]; kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında iki yönlü bir kovalent bağlanma meydana gelir. Çapraz bağlayıcı ile kopolimerizasyondan sonra baskılanan molekül yüksek çapraz bağlı polimerden kimyasal olarak ayrılır. Bu metot kovalent olmayan yaklaşıma göre daha homojen bağlanma bölgelerinin oluşumunu sağlar. Yine de, polimer matrisi içerisinde kalıp molekülü uzaklaştırmak için asit hidrolizi gibi ek bir prosedüre ihtiyaç vardır [10]. Wulff ve arkadaşları kovalent baskı yöntemiyle vinil fenil boranat gibi polimerize edilebilir bir fonksiyon içeren spesifik şeker ve aminoasit türevlerini moleküler baskılanmış polimer olarak sentezlediler. Polimerizasyondan sonra şeker parçasını hidrolize ettiler ve polimeri seçici bağlanma için kullandılar. Sonuç olarak kovalent baskılama için çapraz bağlayıcının maksimizasyonu ile moleküler baskılanmış polimerin seçiciliğinin arttığını gözlemlemişlerdir.



Şekil 2.1. Kovalent baskılama yönteminin şematik gösterimi

Avantajları:

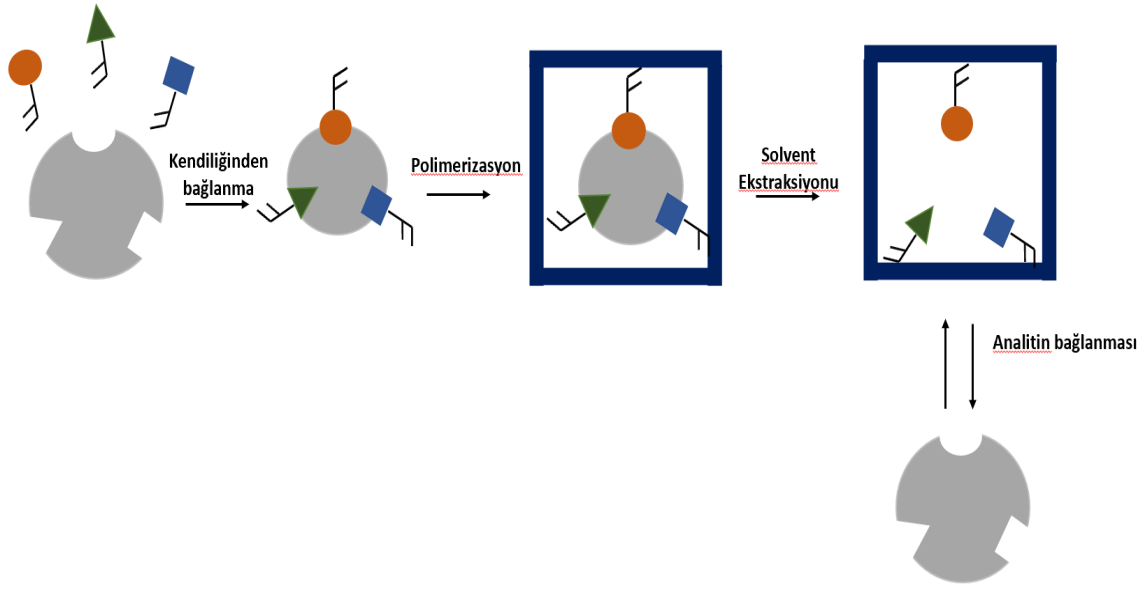
- Fonksiyonel monomer ile şablon molekül arasındaki etkileşim çok kararlıdır.
- Kararlı bir yapıda olduğu için sıcaklık, pH ve polar çözücüler gibi dış etkenler istenilen şekilde ayarlanabilir.
- Yapısal olarak homojen bağlanma bölgeleri dağılımı olur.
- Yüksek seçici bağlanma bölgeleri vardır.
- Fonksiyonel monomer kalıntıları kalıp ile ilişkili bölgelerde konumlanır.

Dezavantajları:

- Polimerizasyon aşamasından sonra kalıp molekülün uzaklaştırılması için ek prosedürlere ihtiyaç vardır.
- Kovalent bağ oluşumundan ötürü bağlanma kinetiği çok yavaştır.
- Sentez yöntemi ekonomik değildir [18].

b) Kovalent Olmayan Yaklaşım:

Bu yöntem kolaylığı sebebiyle moleküler baskılanmış polimer hazırlamak için en çok kullanılabilmektedir. Kovalent olmayan yaklaşımda [17,19]; polimerizasyondan önce monomer ve kalıp molekül arasında zayıf etkileşimlerin oluşumu söz konusudur. Bu etkileşimler; hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimleri, iyon çiftleri, van der waals kuvvetleridir. Kovalent olmayan protokol kullanılarak bağlanma bölgelerine daha fazla işlevsellik eklenebilir [20]. Ayrıca, kovalent olmayan yaklaşımlar, doğada gözlemlenen tanıma modeline çok benzemektedir [10].



Şekil 2.2. Kovalent olmayan baskılama yönteminin şematik gösterimi

Avantajları:

- Kovalent olmayan yaklaşım, nispeten daha basit deneysel adımlara sahiptir ve bu sebeple daha hızlıdır.
- Kalıp molekülün uzaklaştırılması daha kolaydır.
- Daha yüksek afiniteye sahip bağlanma bölgeleri oluşur.

Dezavantajları:

- Polimerizasyon koşulları sınırlıdır.
- Fonksiyonel monomerlerin çok kullanılması spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olabilir.
- Etkileşimler daha hızlıdır fakat seçiciliği daha azdır [18].

c) Yarı-Kovalent Yaklaşım:

Bu yaklaşım ise; metotların bir melezidir. Polimerizasyondan önce kalıp molekül ve monomer arasında kovalent bağlar oluşur. Kalıp molekül polimer matrisinden uzaklaştırıldıktan sonra, analitin baskılanmış polimere yeniden bağlanması kovalent olmayan etkileşimler ile olur. Genel olarak yarı kovalent yaklaşımla elde edilen MIP'ler kovalent olmayan polimerlere kıyasla daha homojen bağlanma bölgeleri ve daha yüksek bağlanma kapasitesine sahiptir [10].

Avantajları:

- Spesifik olmayan bağlanmalar düşüktür.
- Hızlı yeniden bağlanma kinetiğine sahiptir.

Dezavantajları:

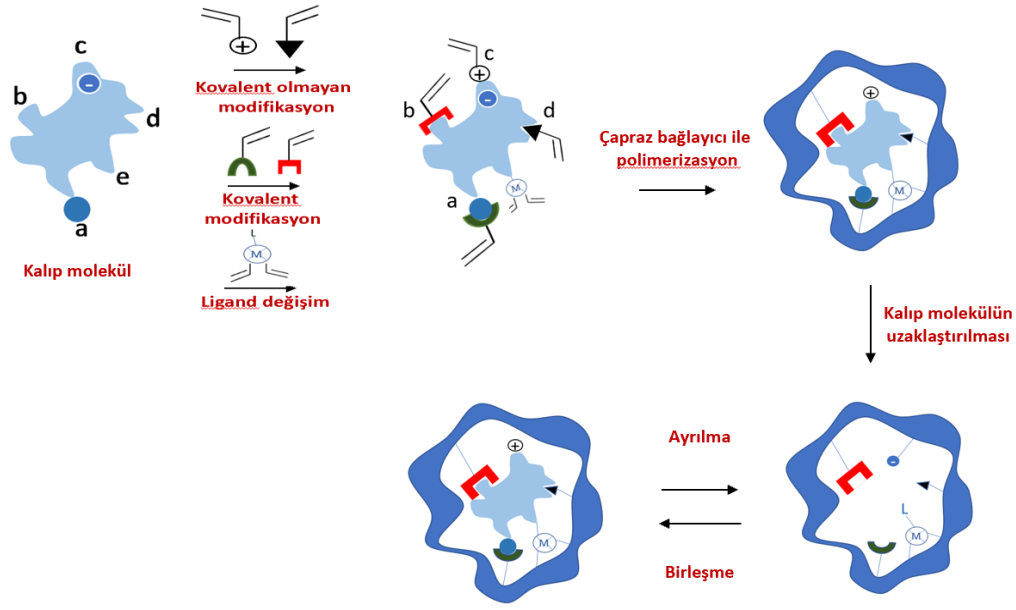
- Ek sentez basamağı gerekir. Bunlar; monomer ve kalıp kompleksi arasındaki kovalent bağların oluşumu ve ardından polimer ve kalıp arasındaki bağların polimerizasyon adımından sonra ayrılmasıdır.

2) Polimerizasyon

Bu aşamada, ortamda bir çapraz bağlayıcı maddenin de olmasıyla üç boyutlu bir polimer ağ [21] oluşturulur. Çoğu MIP serbest radikal polimerizasyonu kullanılarak vinil/akrilik monomerlerin çapraz bağlayıcı bir ajan ile kullanılmasıyla elde edilen yüksek düzeyde çapraz bağlı organik polimerlere dayanır. Serbest radikal polimerizasyonu MIP elde etmede en çok kullanılan sentetik metottür. Genellikle hafif reaksiyon koşulları altında (ör: ortam sıcaklığı ve atmosfer basıncı) yığın ya da çözelti halinde gerçekleştirilir ve monomerlerdeki fonksiyonel gruplara ve sistemdeki safsızlıklara (ör: su) toleranslı bir sistemdir. Farklı kimyasal yapıdaki birçok başlatıcı serbest radikal polimerizasyonunda kullanılabilir [10].

3) Kalıp molekülün uzaklaştırılması

Polimerizasyon prosesinden sonra, kalıp molekül polimer ağından çıkartılır ve özel tanıyıcı bölgelere sahip polimer matris oluşturulur. Moleküler tanımayı, kalıp molekül ve fonksiyonel gruplar arasındaki hidrojen bağları, dipol-dipol gibi moleküler arası etkileşimler yönlendirir. Böylece, elde edilen polimer seçici olarak sadece kalıp molekülü tanıyıcı ve bağlanır. (Şekil 2.3.)



Şekil 2.3. Moleküler baskılama tekniğinin gösterimi [22]

2.1.2. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Bileşenleri

Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezi, kalıp molekül ile fonksiyonel monomerin kompleksleşmesi, ardından bu monomerlerin bir çapraz bağlayıcı ve başlatıcı yardımıyla kalıp molekül etrafında polimerizasyonunu içerir. Polimerizasyondan sonra kalıp molekül ve monomerler arasındaki etkileşimi bozmak için bir çözücüyle yıkama işlemi gerekir. Böylece boyut, şekil bakımındaki kalıp molekülü tamamlayıcı bağlanma bölgeleri olan boşluklar meydana gelir. Bu sebeple, MIP’i oluşturan kimyasal reaktiflerin seçimi oldukça mantıklı olmalıdır [11].

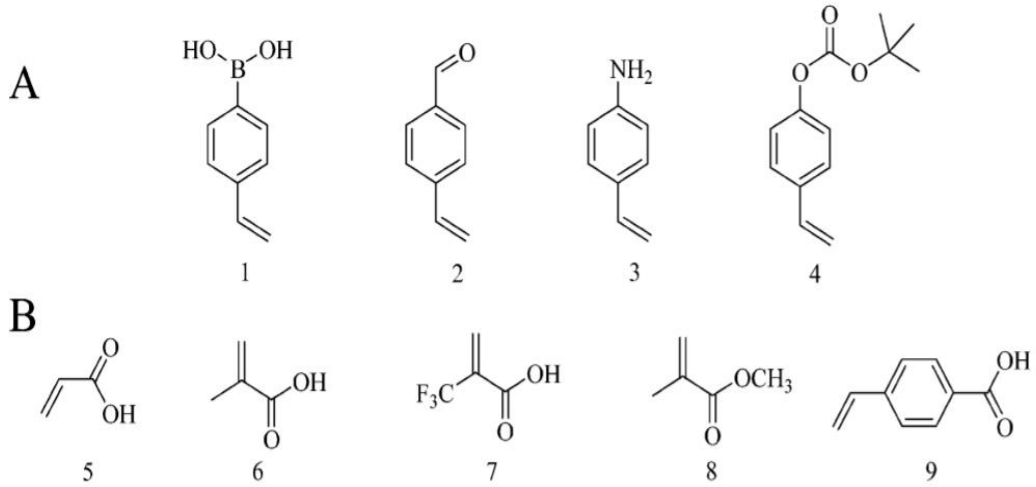
2.1.2.1. Kalıp Molekül

Tüm moleküler baskı proseslerinde kalıp molekül, fonksiyonel monomere bağlı grupların organizasyonunu yönetmesi açısından merkezi bir öneme sahiptir. Her molekül bu proses için birçok nedenden ötürü tam uygun değildir. Serbest radikal polimerizasyonuna uyum göstermesi için polimerizasyon koşulları altında inert olmalıdır. Bu nedenle eğer kalıp molekül reaksiyonlara katılırsa veya herhangi bir nedenden ötürü stabil olmazsa alternatif baskı stratejilerinin araştırılması gerekebilir. Bu nedenlerden ötürü kalıp moleküle sorulması gereken sorular şunlardır.

- 1) Kalıp molekül polimerize oluyor mu?
- 2) Kalıp molekül serbest radikal polimerizasyonunu inhibe edici veya geciktirici bir potansiyel taşıyor mu? (ör: Tiyol grup)
- 3) Kalıp molekül yüksek sıcaklıklarda veya UV ışınına maruz kaldığında stabil olacak mı? (ör: Kimyasal başlatıcı olarak AIBN kullanılıyor ise; yaklaşık 60°C sıcaklıkta stabil olmalıdır) [20].

2.1.2.2. Fonksiyonel Monomerler

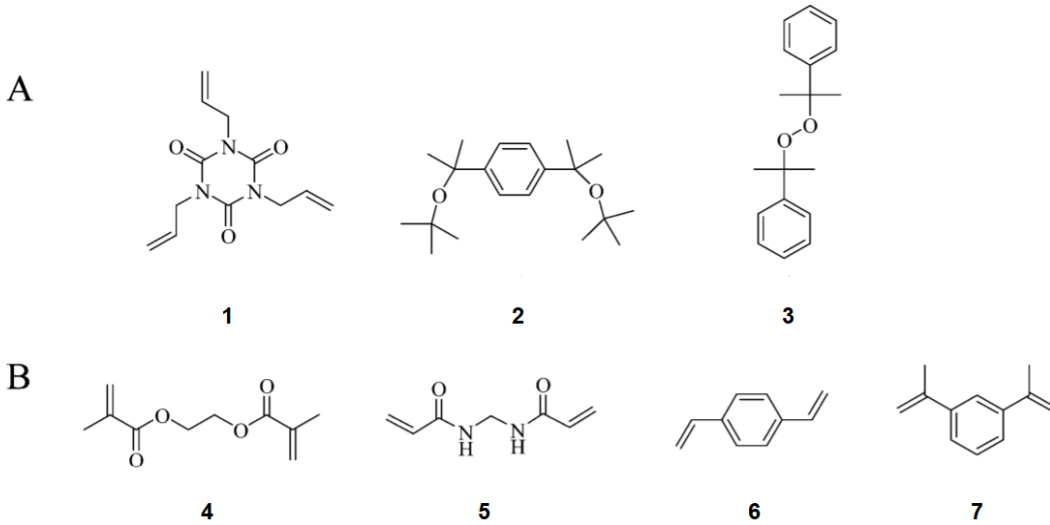
Fonksiyonel monomerin dikkatli seçimi kalıp molekül ve substratlar ile tamamlayıcı bir etkileşim sağlamak için önemli noktalardan birisidir. Kovalent baskılama için, kalıp molekülün, fonksiyonel monomer oranına göre değiştirilmesine gerek yoktur çünkü kalıp molekül kovalent olarak bağlanabilir fonksiyonel monomerin sayısını belirler. Fonksiyonel monomer sitokiyometrik oranda bağlanır. Kovalent olmayan baskılama için, optimal kalıp molekül monomer oranı, artan kalıp molekül ile birkaç polimerin değerlendirilmesiyle ampirik olarak elde edilir [23].



Şekil 2.4. Moleküler baskılama için kullanılan yaygın monomerler. (A) Kovalent. (1) 4-Vinil benzen borik asit; (2) 4-vinil benzaldehit; (3) 4-vinil anilin; (4) tert-bütül p-vinil fenil karbonat (B) Kovalent olmayan. (5) akrilik asit (AA); (6) metakrilik asit (MAA); (7) 3-florametil akrilik asit (TFMAA); (8) metil metakrilat (MMA); (9) p-vinil benzoik asit [1]

2.1.2.3. Çapraz Bağlayıcılar

Seçicilik, baskılı polimerin sentezinde kullanılan çapraz bağlayıcı ajanın türünden ve miktarından çok etkilenmektedir. Çapraz bağlayıcının üç temel görevi mevcuttur. Birincisi, çapraz bağlayıcı ister jel tipi, makro gözenekli ya da mikrojel tozu olsun polimer matrisinin morfolojisini kontrol etmede önemlidir. Bağlanma bölgesinin stabilize edilmesine hizmet eder. Polimer matrisine mekanik stabilite kazandırır. Bu sebeple, gözenek yapısı değişken olmayan ve yeterli mekanik stabiliteye sahip polimerik ürünler oluşturabilmek için genellikle çapraz bağlayıcı oranı üst seviyelerde tutulur. Dolayısıyla bu oran tanıma bölgelerin stabilitesini korumaya yetecek kadar yüksek olmalıdır. Genellikle çapraz bağlayıcı oranı %80 olan polimerler sıklıkla kullanılır. Moleküler baskılamaya uyumlu oldukça fazla çapraz bağlayıcı bilinmektedir ve birkaçı kalıp molekül ile eş zamanlı olarak kompleks oluşturabilir. Bu sebeple fonksiyonel monomer olarak davranır [20].



Şekil 2.5. Moleküler baskılama için kullanılan yaygın çapraz bağlayıcılar. (A) Kovalent (B) Kovalent olmayan. (1) (37) triilil izosiyaniürat (TAIC); bis- (1-(tert)-bütil peroksi)-1-metiletil-benzen (BIPB); dikumil peroksit (B) Kovalent olmayan. (4) etilen glikol dimetakrilat (EGDMA); (5) N,N' -metilendiakrilamit (MBAA); (42) divinilbenzen (DVB); (43) 1,3-diizopropenil benzen; (44) N,N' -1,4-fenilendiakrilamin; (45) 2,6-bisakrilamidopiridin; (46) N,O- bisakriloil-fenilalaninol [1]

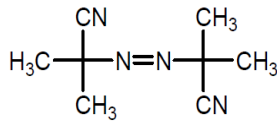
2.1.2.4. Çözücüler

Büyüyen polimerlerin polimerizasyon ortamındaki çözünürlüğü, polimerin çökelip çökelmeyeceğini veya çözünmüş halde kalıp kalmayacağını belirler. Bu özellik, mikro yapıyı yani çapraz bağlanma noktalarının homojen dağılımını ve moleküler baskılı polimerin makroskobik görünümünü belirler. Çözücünün hacmi, büyümenin boyutunu ayarlamak için değiştirilebilir. Çözücü, polimerizasyonun tüm bileşenlerini tek fazda bir araya getirmeye yarar ve sentezlenen materyalin dokusunu (gözenek boyutu dağılımı) ve fiziksel formunu belirler. Kovalent olmayan baskılamada seçilen porojen, ön polimerizasyon karışımındaki kalıp molekül ve monomer kompleksinin kararlılığını güçlü bir şekilde etkiler. Organik çözücülerin bazı özellikleri (ör: polarite, dielektrik sabiti) moleküler baskılamada büyük etkiye sahiptir. Bu bağlamda, toluen ve kloroform gibi aprotik ve apolar organik çözücüler hidrojen bağları [24,25] gibi kovalent olmayan etkileşimlerle monomer-kalıp molekül kompleksinin oluşumunu destekler. Buna karşı, metanol ve su gibi oldukça polar protik çözücüler ise bu tür etkileşimleri bozar. Dolayısıyla, eğer tanıma hidrojen bağlarına dayanıyorsa, baskılama verimi önemli bir şekilde düşer. Buna karşın kompleksleşme, hidrofobik kuvvetlere dayanıyorsa polar çözücüler polimerizasyon için doğru seçenek olacaktır [26].

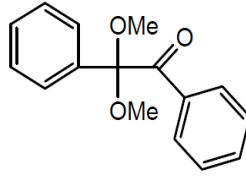
2.1.2.5. Başlatıcılar

Çoğu moleküler baskılanmış polimer, serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenir. İşlem 3 adımdan meydana gelir. Bunlar; başlama, büyüme ve sonlanmadır. Birinci aşama, başlatıcının ayrılmasıyla bir radikal oluşumudur. Başlatıcı konsantrasyonun artması, polimerizasyon hızını artırır fakat daha düşük molekül ağırlıklı polimerlerin oluşumunu sağlar. Serbest radikal polimerizasyonunda sık yer verilen başlatıcılar azo ve perokso bileşikler, redoks sistemleri ve foto başlatıcılardır [27].

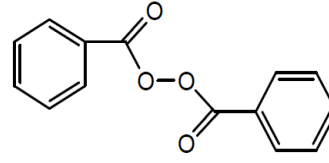
Azo başlatıcılardan serbest radikallerin üretimi, bileşiğin maksimum absorpsiyon dalga boyunda UV ışınıyla ya da ayrışma sağlayan bir sıcaklıkta ısıtılarak gerçekleştirilebilir. En çok kullanılan azo başlatıcılar izobütironitril (AIBN)'dir. Organik peroksit bileşiklerden hidroperoksitler, dialkilperoksitler ve peresterler suda çözünür olmaları avantajıyla serbest radikal polimerizasyonu için uygundur [28].



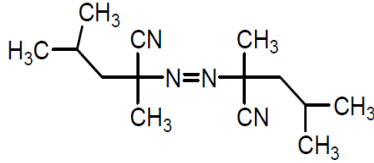
azobisisobutyronitrile



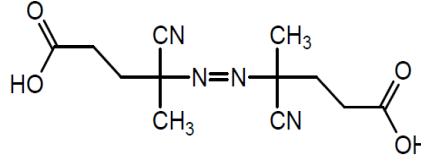
dimethylacetal of benzil



benzoylperoxide



azobisdimethylvaleronitrile



4,4'-azo(4-cyanovaleric acid)

Şekil 2.6. Moleküler baskılama için kullanılan yaygın başlatıcılar [20].

2.1.2.6. Polimerizasyon Koşulları

Çeşitli çalışmalar, MIP sentezi için daha düşük sıcaklıklarda yapılan polimerizasyonun, daha yüksek sıcaklıklarda yapılan polimerizasyona göre daha yüksek seçici polimerler oluştuğunu göstermiştir. Polimerizasyon sıcaklığı için çoğunlukla 60 °C kullanılır. Ayrıca polimerizasyon reaksiyonunun başlaması çok hızlı ise kontrol etmesi daha zor olur. Bu da moleküler baskılı polimerlerin düşük tekrarlanabilirliği ile sonuçlanır. Bu nedenle daha tekrarlanabilir bir polimerizasyon elde etmek için daha uzun bir reaksiyon süresine sahip olmalı ve nispeten düşük sıcaklıklar tercih edilmelidir. Kompleksleşmenin hidrojen bağıyla yürütüldüğü durumlarda daha düşük polimerizasyon sıcaklıkları tercih edilir ve düşük sıcaklıklarda verimli bir şekilde çalışabildikleri için fotokimyasal olarak aktif başlatıcılar tercih edilebilir. Termal olarak polimerize edilmiş polimerlerin, daha düşük sıcaklıklarda polimerize edilmiş polimerlere kıyasla seçiciliklerinin azalmasının nedeni de Le Chatelier ilkesine dayandırılır. Bu ilke, daha düşük sıcaklıkların ön-polimer kompleksini karmaşık bir oluşuma sürükleyeceği ve böylece oluşan bağlanma yerlerinin sayısını ve kalitesini artıracığı yönündedir [20].

2.1.3. Moleküler Baskılama Teknikleri

Moleküler baskılı polimerler, fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasında gerçekleşen etkileşimlerle oluşan yapının çapraz bağlı bir monomer ile kopolimerizasyonu ile hazırlanır. Kalıp molekül polimerizasyon sonrası baskılanmış malzemeden çıkartıldığında şekil, boyut ve kimyasal işlevsellik bakımından kalıp molekülü tamamlayıcı belirli boşluklar kalır [22]. Moleküler baskılı polimerler saflaştırma, izolasyon, kiral ayırma, kataliz ve biyosensörler gibi birçok uygulamada başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [29]. Baskılı moleküllerin biyosensör yüzeyine basılması için birçok moleküler baskılama yöntemi vardır. Bunlar üç ana kategoride toplanabilir.

- 1) Yığın Baskılama
- 2) Yüzey Baskılama
- 3) Epitop Baskılama

2.1.3.1. Yığın Baskılama

Yığın baskılamada kalıp molekül, polimer matriksine bir bütün olarak basılır ve polimerizasyondan sonra moleküler baskılı malzemeden tamamen çıkarılması gerekir. Bir sonraki adımda, polimerden küçük parçalar oluşturmak için mekanik olarak ezilir ve parçalar fraksiyonlanır. Bu şekilde, kalıp moleküle özgü, seçici parçalar elde edilir [30,31].

Proteinlerin kalıp olarak kullanılması diğer metotlara göre özellikle sensör uygulamalarında avantajlıdır [32,33]. Kalıp molekül tümüyle baskılandığı için, hedef yapıyla tamamen uyum içerisinde olacaktır ama büyük yapıların olması durumunda bu metodun bazı dezavantajları vardır. Çünkü polimerizasyon prosesi boyunca proteinin yapısal stabilitesini koruması oldukça zordur. Dahası, kalıp molekülün boyutuna bağlı olarak büyük baskılı alanlar oluştuğunda, bu boşluklar küçük çapraz reaktivite ve düşük seçicilikte polipeptitler için de çekici hale gelmektedir [34]. Yığın polimerizasyonundaki kalın yapı nedeniyle, kalıp molekül polimer matriksinde çok derinlere gömülebilir bu da erişilebilirliğin düşmesine ve uzun yanıt sürelerine sebep olur. Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için yüzey ve epitop gibi farklı baskı teknikleri geliştirilmiştir [29].

2.1.3.2. Yüzey Baskılama

Yüzey baskılamada, bir substratın yüzeyinde yüksek tanıma bölgeleri oluşturulur [35]. Bu bölgeler uygun bağlanma kinetikleri ile daha kolay erişilebilir olmaktadır. Kalıp molekül ve polimer etkileşimleri yığın baskılamada olduğu gibi sınırlı değildir [36,37]. Bu yüzden, özellikle proteinlerin baskılanması dahil en popüler ve uygulanabilir yöntemdir. Yüzey baskılamada diğer yöntemlere kıyasla daha az kalıp molekül kullanılır çünkü kalıp molekül sadece yüzeyi kaplama aşamasında kullanılır [38]. Bu yöntemin ana dezavantajı ise, baskılı bölgelerin azlığından dolayı daha düşük hassasiyete sahip olmasıdır [39]. Yüzey baskılı polimerler, hücreler, mikroorganizmalar ve proteinler dahil birçok farklı türde analit için geniş çaplı kullanılmaktadır [29].

2.1.3.3. Epitop Baskılama

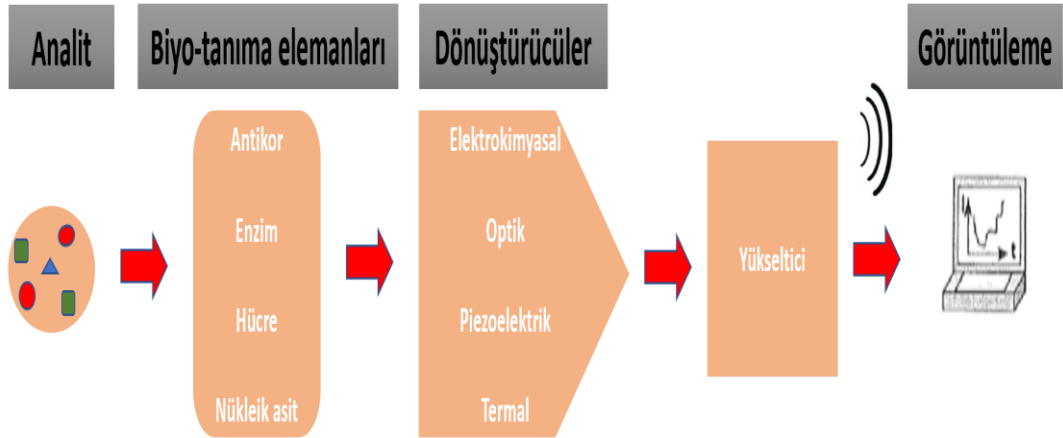
Rachkov ve Minoura tüm molekülün bir şablon olarak kullanılması için alternatif bir metot önerdi. Bu yöntemde, hedef proteinin terminal zincirlerinden biriyle aynı diziyeye sahip olan bir alan şablon olarak kullanılır. Bu epitop yaklaşımında peptit epitopu monomerlerin polimerize edildiği cam-silikon bir yüzeye kovalent olarak bağlanır. Bu yolla, hedef molekül ile cam-silikon yüzeyinin de çıkarılmasıyla moleküler baskılanmış bir film üretilir. Epitop baskılama yaklaşımında, bir makro molekülün küçük bir kısmı kullanılarak daha spesifik ve güçlü etkileşimler elde edilir. Bu nedenle, spesifik olmayan bağlanma en aza indirilebilir ve afinite geliştirilebilir. Proteinlerin 'C terminali' baskılama işlemi için epitop olarak seçilir çünkü bu bölgeler genellikle post-translasyonel değişikliklere daha az eğilimlidir. Nishino ve diğerlerine göre [40] özgün bir tanıma oluşturmak için gereken minimum peptit uzunluğu yaklaşık 9 aminoasit kadar olmalıdır. Kısa epitoplar daha kompleks ikincil ve üçüncül yapılar yerine peptidin birincil yapısını hedefler. Bu nedenle, bu yaklaşım sadece genomik bilgiye göre hedef proteinlerin yakalanması için umut vericidir.

2.2. Biyosensörler

Biyosensörler günümüzde birçok hastalığın tanı ve tedavisinde, çevresel görüntülemeye, gıda kontrolü, ilaç keşfi, adli tıp ve biyomedikal araştırmalar gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Biyosensörler, bir analitin konsantrasyonu ile orantılı sinyaller üreterek biyolojik ve kimyasal reaksiyonları ölçen bir cihazdır. Hastalık görüntülemeye, ilaç

keşfinde ve kirleticilerin tespitinde, hastalığa neden olan mikroorganizmalar ve vücut sıvılarından (kan, tükürük, idrar vb.) hastalık belirteçlerinin tayininde kullanılmaktadır. Biyosensörler analit, biyoreseptör, dönüştürücü, elektronikler ve görüntüleme biriminden oluşmaktadır.

Analit, tespit edilmesi istenen ilgi çekici bir maddedir. Analiti özel olarak tanıyan bir molekül ise biyoreseptör olarak kullanılır. Enzimler, hücreler, antikolar, nanopartiküller biyoreseptörlerden birkaçıdır. Dönüştürücü ise; sinyali işleyen ve görüntüleme için hazırlayan parçasıdır. Sinyallerin analogtan dijitale dönüştürülmesini ve amplifikasyonunu sağlayan karışık devrelerden oluşan bir parçadır. İşlenen sinyaller daha sonra sensörün görüntüleme birimi tarafından ölçülür [41].



Şekil 2.7. Biyosensörün şematik gösterimi [42]

2.2.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler genellikle tanıma elemanına ve dönüştürücülerine göre iki sınıfa ayrılmaktadır.

Biyoreseptörlerine göre sınıflandırıldığında

- Enzimler
- Antikolar
- Nükleik asitler
- Hücreler

Dönüştürücülerine göre sınıflandırmada ise;

- Elektrokimyasal
- Optik
- Kütle esaslı (piezoelektrik)
- Termal olarak sınıflandırılır. [43]

2.2.1.1. Biyoreseptörler

2.2.1.1.1. Enzimler

Enzim kullanılan biyosensörlerde, hedef moleküle özgü ve ürün oluşumunu direkt olarak katalizleyen enzimler kullanılır. Piyasada bulunan en başarılı biyosensörler ise; glukoz oksidaz ve glukoz dehidrojenaz kullanan kandaki glikoz tayini için geliştirilen biyosensörlerdir. Enzim bazlı biyosensörlerin performansını etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar; enzimin yüklenmesi, uygun bir pH, sıcaklık ve bazı durumlarda bir kofaktör enzimin yeteneklerini korumaya yardımcı olur. Bir diğer faktör de, enzimi tutmak için kullanılan immobilizasyon yönteminin türü ve sensör üzerindeki enzim katmanının kalınlığıdır [43].

2.2.1.1.2. Antikorlar

Bir antikor, yüzlerce ayrı dizide düzenlenmiş yüzlerce ayrı amino asitten oluşan karmaşık bir biyomoleküldür. Antijene özgü bir antikor, oldukça benzersiz bir şekilde antijene uyar. Antikorların bu eşsiz özelliği, ilgili analitin sadece antikor bağlanma bölgesine uyduğu immüno biyosensörlerdeki yararlılıkları açısından önemlidir [44]. Biyomoleküler etkileşimler, oluşturulan test formatına göre iki kategoriye ayrılır. Birinci kategori doğrudan formattır. Bu formatta immobilize edilmiş hedef molekül ve ligand arasındaki ilişkiye ya da immobilize edilmiş ligandın hedef molekül ile doğrudan etkileşimine dayanır. İmmüno sensörler için, yerinde inkübasyon ve ardından floresan bir analitin doğrudan ölçümünü içerir. Floresan olmayan analit sistemleri için ise; yerinde inkübasyonun ardından florofor etiketli ikinci bir antikorun geliştirilmesi izler [43].

2.2.1.1.3. Nükleik asitler

Bir diğer biyotanıma mekanizması ise; genetiğin yapı taşları olan DNA ve RNA'nın hibridizasyonunu içerir. Son on yılda nükleik asitler, biyoreseptörler ve biyoçip

teknolojisine artan bir ilgi olmuştur. DNA molekülünün belirli bir bölümünü oluşturan bazların sekansı biliniyorsa, tamamlayıcı bir sekans sentezlenebilir ve optik olarak saptanabilir bir şekilde etiketlenebilir. Çift sarmallı bir DNA'yı tek sarmala indirgeyip daha sonra tamamlayıcı yapı eklenir ve etiketli sekans hedef molekül üzerine hibridize olmuş olur [44].

2.2.1.1.4. Hücreler

Bu biyoreseptörler ya hücre/mikroorganizma ya da spesifik hücrenel bir türe bağlanma yeteneğine sahip reseptörlerdir. Bu reseptör sınıfının kullanılmasındaki en büyük avantajlardan biri sinyal amplifikasyonu nedeniyle çok düşük seviyede tespit limitine sahip olmasıdır. Bu tip biyoreseptörlerle geliştirilen birçok biyosensör, katalitik ya da psödo-katalitik özelliklere dayanır. Mikrobiyal biyosensörlerde canlı ve cansız mikrobiyal hücreler kullanılır. Canlı hücreler, hücrenin solunum ve metabolik fonksiyonlarını kullanır ve böylece analit bu işlemlerin bir inhibitörü ya da substratı olarak izlenebilir. Bakteriler ve mantarlar gibi mikroorganizmalar, toksisite göstergesi olarak veya belirli maddelerin ölçümü için kullanılmıştır. Bitki dokuları ise sahip oldukları enzimatik yolların bir sonucu olarak etkili katalizör oldukları için bitki bazlı biyosensörlerde kullanılır [44].

2.2.1.2. Dönüştürücüler

2.2.1.2.1. Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensörler kendi kendilerine yetebilen özel cihazlardır. Elektrokimyasal bir dönüştürücü elemanıya, biyolojik tanıma bileşenini de kullanarak niceliksel ya da yarı-niceliksel analit bilgileri sağlar. Elektrokimyasal dönüştürücülerin yüksek hassasiyet, kullanım ve yapım kolaylığı, taşınabilirlik, düşük maliyet gibi birçok avantajı vardır. Reaksiyon hacminden bağımsızdır ve bu yüzden çok küçük hacimli numuneleri bile ölçebilir. Sensör alt tabakası çalışma, referans ve karşı bir elektrot içerir. Klasik enzim elektrotlarından çok işlevli minyatür enzim sensörlerine ve basit mikrobiyal elektrotlardan ultra hassas immüno sensörlere kadar birçok evrim geçirmiştir. Günümüzde elektrokimyasal sensörlerin çoğu, elektron tüketen ve elektrokimyasal dedektör tarafından analiz edilebilen sinyalleri algılayan enzimatik katalitik reaksiyonlara bağlıdır. Bir sinyali elektrokimyasal olarak tespit etmek için çeşitli izleme teknikleri

vardır. Bunlar; ölçülebilir bir yük birikimi oluşturmak veya potansiyeli oluşturma, empedansı ölçme, ortamın iletken özelliklerini farklı elektrotlar arasında değiştirme veya akımdaki değişiklikleri ölçmektir. Bu algılama mekanizmalarına göre potansiyometrik, empedimetrik, kondüktometrik ve amperometrik biyosensörler vardır [45].

2.2.1.2.2. Optik Biyosensörler

Optik biyosensörler yüksek hassasiyetleri ve sezgisellikleri nedeniyle en umut verici sensörler olarak kabul edilir. Biyomoleküllerin etkileşimini gerçek zamanlı olarak ve yerinde tespit etmek için geliştirilen bu teknik, biyomoleküllerin immobilize edilmiş reseptörlere bağlanmasından sonra optik özelliklerde değişikliğe neden olmuştur. Optik biyosensörler kullanımlarına göre yüzey plazmon rezonansı (SPR), Raman ve Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi ve floresans olarak ikiye ayrılmaktadır.

2.2.1.2.3. Kütle Esaslı (piezoelektrik) Biyosensörler

Kütle tabanlı biyo algılamada, analitlerin tanınması için, piezoelektrik sensörler, kuvars kristal mikro terazisi (QCM) ve yüzey akustik dalgası gibi farklı sensör türlerine karşılık gelen bir değişiklikle belirlenen kütle değişikliklerinden yararlanan birçok kütle tabanlı biyosensör uygulamaları bulunmaktadır. Piezoelektrik biyosensörler, belirli bir frekanstaki salınımlı elektrik sinyaliyle birleştirilmiş belirli bir frekansta bir titreşim üretir, böylece salınım frekansı, kristalin kütlelerinin neden olduğu uygulanan elektrik frekansına büyük ölçüde bağımlıdır. Biyo tanımadan kaynaklanan kütle değişimi, kristallerin salınım frekansında değişikliğe yol açar. Elektrik sinyalinin karşılık gelen varyasyonuna göre kütle farkı değerlendirilebilir. Piezokristallerde piezoelektrik etki, kristalin malzemelerdeki tersine dönme simetrisinden değil, kristaldeki mekanik kuvvetler ile elektriksel durum arasındaki etkileşimden kaynaklanır. Bununla birlikte, ikinci bir olgu da asimetrik bir yük ortamında örgü noktasında iyonlar tarafından indüklenebilir. Ek olarak, mekanik kuvvet etkisi ile elektrik durumu arasındaki geçiş tersine çevrilebilir bir süreçtir. Bu durumda doğrudan piezoelektrik üreten malzemeler aynı zamanda ters piezoelektrik de üretecektir [45].

2.2.1.2.4. Termal Biyosensörler

Termal biyosensörler, biyolojik reaksiyonların temel özelliklerinden olan (endotermik/ekzotermik) reaksiyon sırasında absorplanan ya da salınan ısı enerjisinin

ölçümüne dayanır. Kalorimetrik tabanlı biyosensörler, çözülmüş durumdaki biyomolekülün yapısal dinamiklerini ya da reaksiyonun kapsamını (katalizör için) hesaplamak için direkt olarak ısı değişimini ölçer. Kalorimetrik cihazlar, deneysel prosedürlerin uzunluğu, sıcaklık ölçümlerindeki spesifik ve spesifik olmayan ısı değişimlerini ayıramaması sebebiyle sınırlı kullanılmaktadır. Fakat son zamanlarda, mikrolektromekanik sistemlerin (MEMS) termal sensörlerde kullanılması ile yüksek hassasiyet, düşük ölçüm süresi ve güç tüketimine sahip biyosensörler geliştirilmiştir [46].

2.3. Yüzey Plazmon Rezonans

Yüzey plazmonları ilk olarak Robert W. Wood tarafından 1902 yılında keşfedilmiştir [47]. Çalışmasında ise; polarize bir ışığı bir kırınım düzenleyici yüzeyinden aynaya yansıtmıştır ve ayna yüzeyinde karanlık ve aydınlık bantlar olduğunu fark etmiştir. Lord Rayleigh ve Fano'da fikrin gelişimine fayda sağlamışlardır. Fakat bu plazmon olgusunun tam anlaşılması 1968'li yıllara kadar sürmüştür. 1980'lerde biyolojik ve kimyasal etkileşimleri incelemek için SPR ve ilişkili teknikler kullanıldı [48]. SPR olgusu kullanılarak geliştirilen ilk sensör ise Liedberg ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Artık SPR biyosensörleri moleküler etkileşimleri ölçmek için yerleşik bir yöntem haline geldi. SPR tabanlı cihazlar etiketleme gereksinimleri olmaksızın gerçek zamanlı olarak biyomoleküler etkileşimin analizine izin verir. Bunlar antikor-antijen, ligand-reseptör, protein-nükleik asit gibi etkileşimleri içerir [49–51] SPR tabanlı biyosensörler birçok kalitatif ve kantitatif uygulamalar için kullanılır. Kantitatif uygulamalar içerisinde; reaksiyon kinetiği (k_a , k_d) ve afinite sabitleri, moleküler etkileşimler için denge sabitleri (K_d), termodinamikleri, sitokiyometri ve ligand-reseptör arasındaki ilişki mekanizmasını belirlemek için kullanılabilir. Kalitatif uygulamalar arasında ise; küçük molekül ve ilaç taraması, epitop haritalama, özgüllük analizi ve küçük ölçekli afinite akış saflaştırması vardır [52]. Yüzey plazmon rezonans tabanlı optik biyosensörler artık çok çeşitli makromoleküler etkileşimlerin kinetiğini, yüksek ve düşük afiniteli küçük molekül etkileşimlerini tanımlamak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

SPR tekniği genel olarak, metalik bir film üzerindeki yüzey plazmonlarının fotonlar tarafından uyarılması ve böylece bir fotonun bir yüzey plazmonuna dönüştürülmesine dayanmaktadır. Gelen ışık genellikle metalik filmin zıt tarafında bulunur çünkü fotonlar çarptığı yüzeydeki yüzey plazmonlarını uyaramazlar. Fotonlar metalik filme geçici bir

ışık alanı oluştururlar. Normalde bu alandan foton taşınması gerçekleşmez ancak belirli bir açıda gelen fotonlar alandan geçebilir ve metalik filmin adsorbat tarafındaki yüzey plazmonlarını uyarabilir. Bir plazmon uyarıldığında bir foton, belirli bir açıda yansıyan ışıktaki bir düşüş oluşturarak kaybolur. İmmobilize edilmiş hedefe herhangi bir bağlanma olursa kırılma indisi değişir ve bu da SPR açısında değişmeye yol açar. Yansıtılan ışığın yoğunluğundaki değişimler gerçek zamanlı olarak izlenir. SPR sinyalinin değişim hızları, reaksiyonun birleşme ve ayrılma fazları için görünür hız sabitleri verecek şekilde analiz edilebilir. Bu değerlerin oranı denge sabitini verir. SPR sinyalindeki değişimin boyutu, immobilize edilen kütle ile de doğru orantılıdır [53].

2.3.1. Yüzey Plazmon Rezonans Teorisi

Bir yüzey plazmon dalgası (SPW), dielektrik ve metal arasındaki sınır boyunca yayılan ve yarı-serbest elektron plazması gibi davranan elektromanyetik bir dalgadır. Yüzey plazmon dalgası enine manyetik (TM) bir dalgadır. Transvers manyetik dalga olarak da adlandırılan bu dalgayı sadece p-polarize ışık oluşturur. Bunun sebebi, metal yüzeyine uygun ve sadece metal yüzeyinde bir elektrik alan vektör salınımına sahip olmasındandır. Yayılma sabiti ve elektromanyetik alan dağılımı ile karakterize edilir. Bir yüzey plazmon dalgasının yayılma sabiti (K_{sp}) aşağıdaki şekilde ifade edilir. Burada ' ω ' salınım frekansı, ' c ' ışık hızıdır. ϵ_s ve ϵ_m sırasıyla dielektrik ve metalin dielektrik sabitidir. Bu denklem, ϵ_m negatifse ve mutlak değeri ϵ_s ' den küçükse bir yüzey plazmon dalgasını tanımlar. Bu durum, birçok altının kullanıldığı SPR biyosensörlerde uygulanmıştır [54].

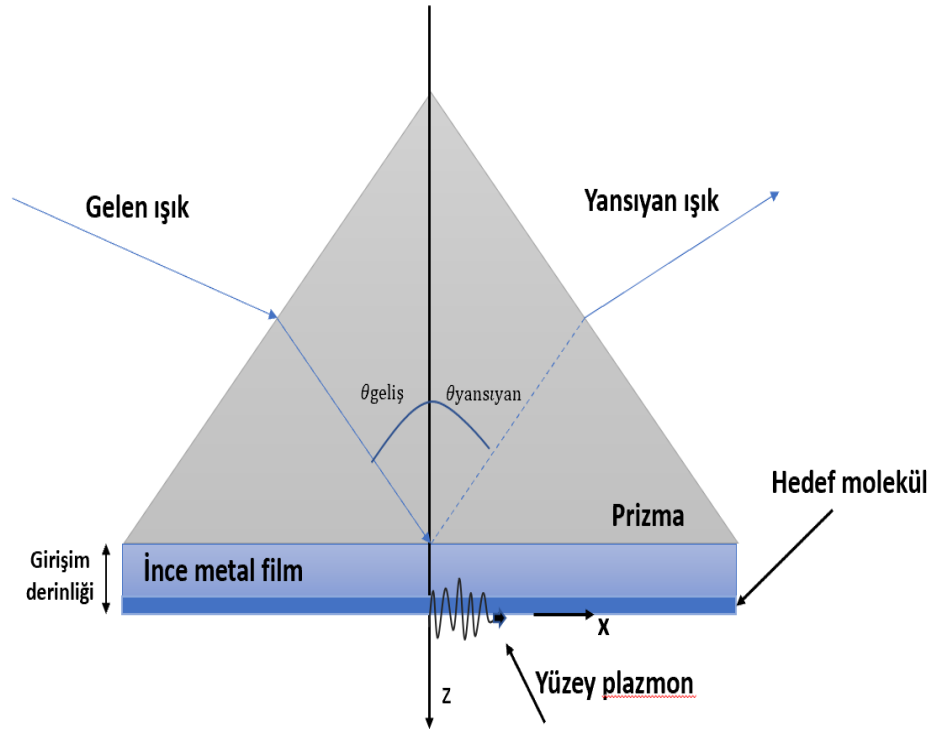
$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_s}{\epsilon_m + \epsilon_s}} \quad (2.1)$$

Gelen ışığın bir bileşenine ait dalga vektörü ise aşağıdaki şekilde ifade edilir. Burada ' η_p ' prizmanın kırınım açısı, ' θ ' ise ışığın metal yüzeyine geliş açısıdır.

$$K_x = \frac{\omega}{c} \eta_p \sin \theta \quad (2.2)$$

Teori, enerji yüklü bir ışık fotonunun metalin yüzey elektronlarını indüklemesiyle bir enerji transferinin gerçekleşmesine dayanır. Sadece rezonans açısında bir enerji aktarımı gerçekleşir. Aktarılan enerji ise; metalin alt yüzeyinden yansıyan ışığın miktar tayini ile saptanabilir. Yansıyan ışığın bir kısmı rezonans açısında adsorbe edilir.

Kretschmann konfigürasyonu yüzey plazmon polariton rezonanslarının gözlemlendiği ilk kurulumlardan birisidir. Bu konfigürasyon Otto ile dielektrik geçirgenliklerini ölçmek için kullanıldı. Bu konfigürasyonda, ince metal bir film ve analit dielektrik prizmanın tabanında biriktirilir. *P*-polarize ışık demeti prizmaya iletilir. Prizmanın dielektrik geçirgenliği ϵ_p , analitinkinden daha büyük olduğunda toplam iç yansımanın meydana geldiği kritik bir açı vardır. Toplam iç yansıma açısından daha büyük olan bir açıda, metaldeki kayıplardan dolayı yansıma katsayısında keskin bir minimum gözlenir. Bu olgu genellikle azaltılmış toplam yansıma olarak değerlendirilir [55].



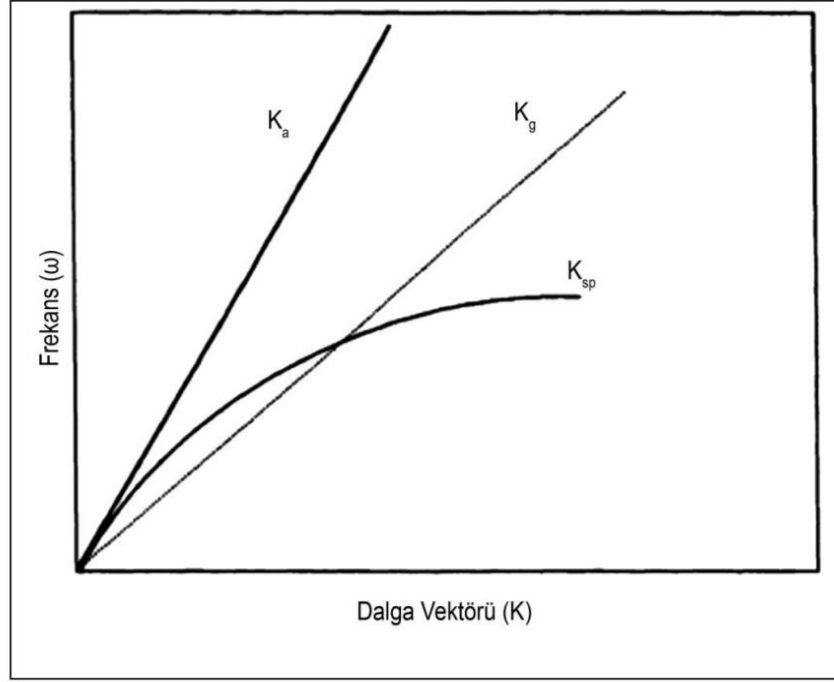
Şekil 2.8. Kretschman konfigürasyonunun gösterimi

Şekil 2.8’de gösterildiği gibi gelen ışık genellikle metalik filmin adsorbat kısmının zıt tarafından gelir. Çünkü fotonlar ışık çarpılan taraftaki yüzey plazmonlarını harekete

geçirmez. Fotonlar metal filmin içine doğru sönümlü dalga alanını indükler. Normalde bu alan boyunca fotonların taşınması gerçekleşmez fakat belirli bir açıyla gelen fotonlar geçebilir ve metalik filmin yüzey plazmonlarını uyarır. Girişim derinliği, gelen ışığın dalga boyuna, ışığın bulunduğu alan ile çevresi arasındaki kırılma indeksleri arasındaki farka ve ışık fotonunun parlaklığına bağlıdır. Bir plazmon uyarıldığında bir foton kaybolur ve belirli bir açıda yansıyan ışıkta bir düşüş meydana gelir. Adsorbatın kırılma indisine bağlı olan açı yük bağlaşımlı cihaz (CCD) ile ölçülür. Girişim derinliği aşağıdaki formül ile hesaplanır. ‘ θ ’ ışığın metal yüzeyine geliş açısı; η_1 ve η_2 ise birinci ortam ile ikinci ortam arasındaki kırınım açısı indeksidir.

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi\sqrt{\eta_1^2 \sin^2 \theta - \eta_2^2}} \quad (2.3)$$

Protein adsorpsiyonu durumunda, tampon solüsyonunun kırılma indisi ile adsorbatın kırılma indisi arasındaki fark çoğu proteinin refraktif indeksi hemen hemen aynı olduğundan dolayı kolaylıkla adsorbat kütesine ve kalınlığına dönüştürülebilir [55]. Yüzey plazmon rezonans olayının olabilmesi için gelen ışığın dalga vektörü ile yüzey plazmonun dalga vektörü eşit olmalıdır. Bu sebeple havadan ışık yayılması ile metal filmin yüzeyinde bir plazmon oluşmaz. Şekil.2.9’da görüldüğü gibi cam yüzeyin dağılım eğrisi (K_g) ile metal plazmonunun dağılım eğrisi (K_{sp}) kesişmektedir. Havanın dağılım eğrisi (K_a) ile kesişmemektedir.



Şekil 2.9. Dağılma eğrileri

Metal filmin yüzeyine yakın olan alanın kırınım indeksi yüzey plazmon dalga vektörü ile bağlantılıdır. Bu sebeple eşitlik aşağıdaki şekilde sadeleştirilebilir.

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

Bu eşitlikte;

- η_m , metalin,
- η_s , örneğin kırınım indeksidir.

2.3.2. Yüzey Plazmon Rezonans Temelli Biyosensörler

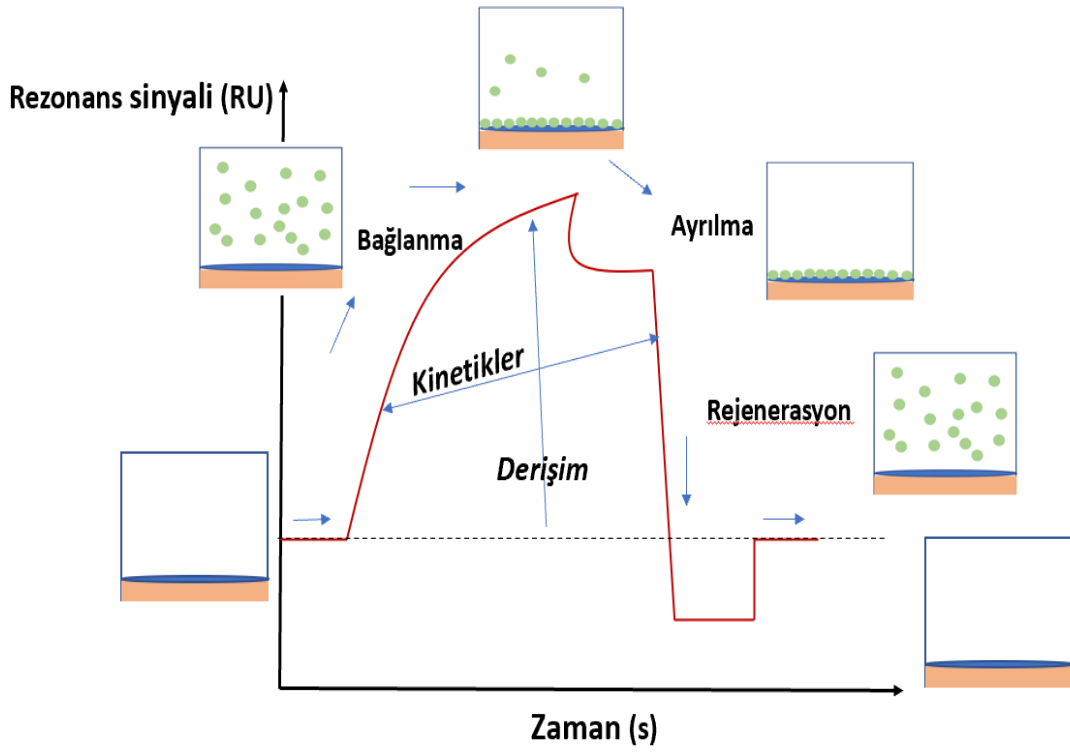
Yüzey plazmon rezonansa dayalı optik afinite biyosensörler, en gelişmiş, etiketlemeye ihtiyaç duyulmayan optik algılama teknolojilerinden birini sunar [53,56]. Sensör

yüzeyinde hareketsiz hale getirilmiş bir molekül ve çözeltideki etkileşen molekül arasındaki etkileşimi gösterme yeteneği SPR biyosensörlerini tıbbi teşhis [57,58], çevresel izleme [59], gıda güvenliği [51,60] ve bununla ilişkili kimyasal ve biyolojik maddelerin tespiti için de giderek daha fazla kullanılmaktadır [61].

SPR afinite biyosensörleri üç ana parçadan oluşmaktadır.

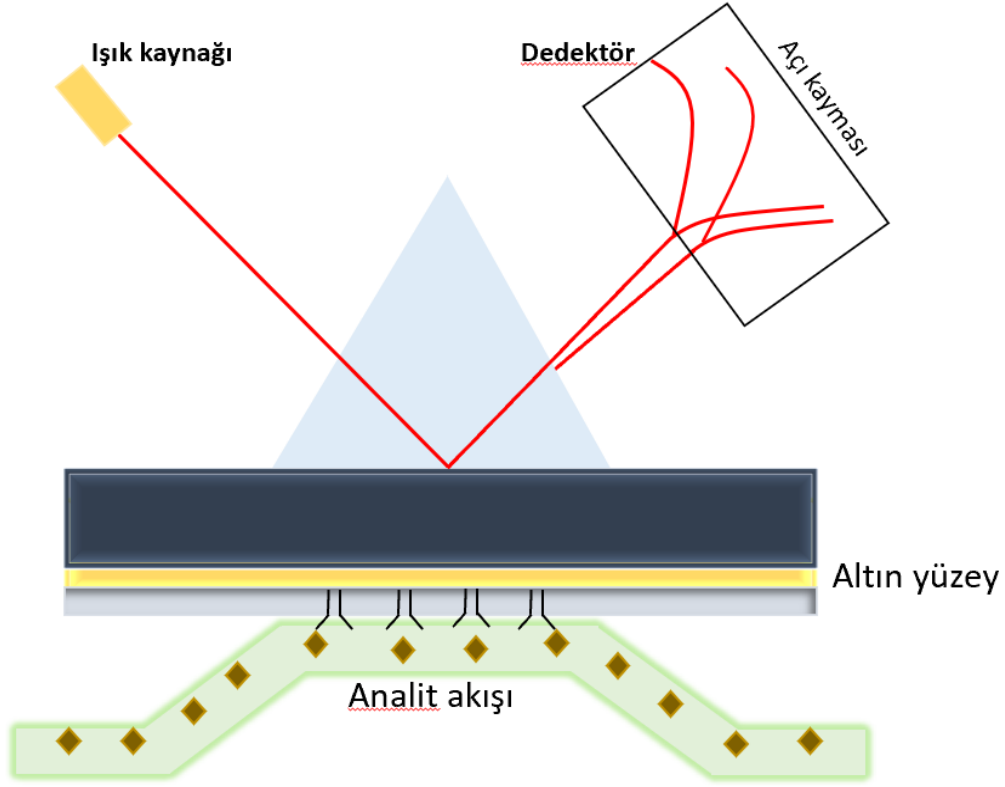
- Optik okuyucu
- Biyo-tanıma elemanı
- Örnek hazırlama ve iletme sistemi

Günümüzde çok sayıda SPR okuyucu ticari olarak mevcuttur. Tasarımları farklılık gösterse de altında yatan fiziksel ilkeler aynıdır. Bir SPR biyosensörün optik okuyucusunda bir ışık dalgası, özel bir manyetik alanda yüzey plazmonunu uyarır. Yüzey plazmonu, ince bir metal film boyunca yayılır. Metal yüzeyinin yakınında kırılma indisindeki herhangi bir değişiklik, yüzey plazmonunun hızında bir değişikliğe neden olur. Öncelikle, analite özgü bir biyotanıma elemanı metal yüzeyine immobilize edilir. Biyotanıma elemanlarının ortak özelliği analite yüksek afinite göstermeleri, biyolojik olarak aktivitelerinin stabil olması, özgüllük, doğrudan immobilize etmek için fonksiyonel gruplara sahip olmalarıdır. Biyotanıma için antikorlar, antijenler, peptitler ya da nanopartiküller en sık kullanılanlardır. Hedef molekülü içeren bir sıvı numune sensör yüzeyi ile temas ettirilirse, biyotanıma elemanları tarafından yakalanır. Bağlanma, sensör yüzeyinde yoğunluğu artırır ve yüzeye yakın bir yerde kırılma indisinde bir değişikliğe yol açar. Kırılma indisindeki bu değişim rezonans açısında kaymaya sebep olur. Bu değişiklik optik okuyucu tarafından zamana bağlı olarak ölçülebilir. Sıvı numune, bir dağıtım sistemi kullanılarak sensör yüzeyinden geçirilir. Bağlanma aşamasından sonra ortama bir desorpsiyon çözeltisinin verilmesiyle bağlanan hedef moleküller tekrar yüzeyden ayrılır ve sinyal tekrar başlangıçtaki pozisyonuna geri döner [7].



Şekil 2.10. SPR biyosensör sensorgramının şematik gösterimi

SPR biyosensörler, biyomoleküller ve bunların etkileşimleriyle ilgili araştırmada önemli bir rol oynamakta ve kimyasal-biyolojik maddelerin tespiti ve tanımlanması için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Büyük ve orta büyüklükteki analitlerin saptanmasında özellikle başarılı olmuştur. Bakteriler gibi büyük analitlerin tespit limitleri için hala geliştirilmektedir. SPR cihazlarının minyatürleştirilmesi, daha sağlam biyomoleküler tanıma elemanlarının geliştirilmesi, yüksek özgüllük ve uzun depolama ömrü, mikro akışkan cihazlara sahip sensör platformları, uygulamaya özel entegre sistemler oluşturmak için hala üzerinde çalışılmaktadır [54]. Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörlerin, tanıyıcı kısmının düşük maliyetli ve ufak olması ve düşük hacimlerde örnek ile çalışmaya olanak sağlaması, akış sistemine monte edilebilir olması, sıvı veya gaz fazda uygulanabilmeleri, çok sayıda farklı sensör yüzeyi hazırlanarak çok sayıda tayin yapılabilmesi ve eş zamanlı ölçüm yapmaya olanak vermesi gibi avantajlarından dolayı birçok analitik uygulamalarda geniş bir kullanım alanı kazanmaya başlamışlardır [7].

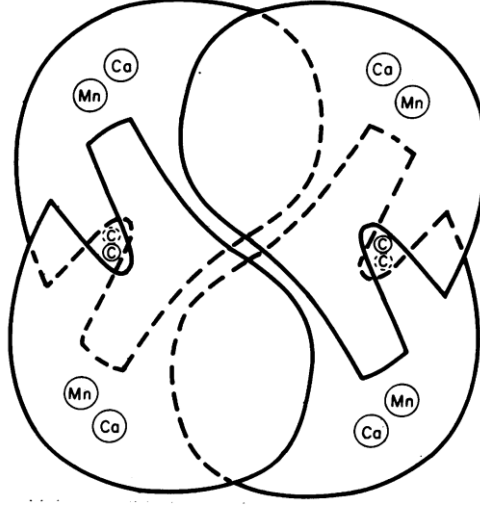


Şekil 2.11. SPR biyosensörün şematik gösterimi

2.4. Konkanavalin A

Lektinler, 1980 yılında hücreleri, polisakkaritleri, glikokonjugatları aglütine eden immün sistem kaynaklı olmayan karbonhidrat bağlayıcı proteinler olarak tanımlanmıştır. Bitkisel lektin sınıfından olan ve 1916 yılında *Canavalia ensiformis*'ten elde edilen Konkanavalin A, Ca^{2+} / Mn^{2+} bağlı, mannoz ve glukoz bağlayıcı baklagil lektinidir. Konkanavalin A'nın olgun monomeri 2 paralel olmayan β tabakasını oluşturan 237 aminoasit kalıntısından oluşur [62]. Glikoproteinlerin ve şekerlerin tespiti aynı zamanda saflaştırılması için en çok çalışılan lektinlerden birisidir [63]. Con A yaklaşık 104 kDa moleküler ağırlığa sahiptir [64]. Baklagil lektinlerinin ilk örneklerinden biri olan Konkanavalin A, birbirinin aynı alt birimlerinden oluşan bir alt birim proteinidir. Alt birimler genellikle pH 6'nın altında dimerler, pH 7 civarlarında ise tetramerler oluşturmak üzere birleşirler. Çalışmalarda protomerlerin kubbe şeklinde olduğunu ve yaklaşık olarak 42 Å yükseklik x 40 Å genişlik x 39 Å kalınlıkta olduğunu

göstermiştir [65]. Her bir alt birim paralel olmayan iki büyük kıvrımlı tabaka içerir ve alt birimler dimer ve tetramerler oluşturmak üzere birleşirler.



Şekil 2.12. Konkanavalin A'nın tetramerik yapısının şematik gösterimi

Konkanavalin A hem karbonhidrat bağlayıcı hem de hidrofobik bölgeler içermektedir. Bu hidrofobik bölgeler de non-polar bileşikler bağlarlar [66]. Bağlanma afinitelerinden dolayı glikoproteinlerin karmaşık bir ortamdan ayrılması, yapısal ve fonksiyonel olarak incelenmesi, kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığın biyo-belirteçlerinin keşfine izin vermektedir. Lektinlerin anti-viral, anti-fungal, mitojenik ve anti-kanser gibi biyolojik aktiviteleri iyi bilinmektedir [67,68].

Kanser hastalığının giderek artan bir problem olması tedavi seçeneklerinin önemini gün geçtikçe arttırmaktadır. Kanser tedavisi için kullanılan kemoterapötikler hızla büyüyen malign hücrelerini baskılamamanın yanı sıra etraftaki sağlıklı olan hücrelere ciddi yan etkiler gösterirler. Bu sebeple malign hücrelerini hedefleyip ayırt edebilecek yeni ve daha seçici ajanlar geliştirmek kanser hastalarının prognozunu geliştirecektir. Lektinler glikolizasyonun derecesine göre kanserli dokulara farklı bağlanma paternleri sergilerler ve bu nedenle sadece teşhis amaçlı değil anti-kanser ajanı olarak da kullanılabilirler [69]. Lektinlerin kanser çalışmalarında kullanılmasında ortaya konulan fikirlerden birisi ise ilacın tümörlü dokuya lokalize olmasını sağlamaktır. İlacın tümörlü dokudaki yoğunluğunun artırılması amacı ile ilacı spesifik bir karbonhidrat yapısı ile bağladıktan sonra hastanın vücuduna verilmesi yönündedir. Bu doğrultuda kanser hastalarının ve

aynı zamanda sağlıklı bireylerin proteinlerinin tanımlanması, araştırılması ve karşılaştırılması çalışmaları yapılmıştır. Bu sebeple protein düzeyindeki çalışmalar yaygın bir araştırma alanı bulmuştur ve yüzyılın en önemli keşiflerinden birisidir [70].

Lektinler kanser hücrelerinin ölümünü uyarabilir ve bu sebeple gelecekte umut verici bir kanser ajanı olarak görülmektedir. Çalışmalar, bitkisel lektinlerin kanser hücre hatlarında apoptozu indüklediği ve anti-proliferatif etki gösterdiğini ortaya koymuştur [69]. MannoZ ve glikoz özgülüğü ile iyi bilinen bir protein olan Konkanavalin A'nın insan melanom A375 hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri kaspaz ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca düşük Konkanavalin A seviyeleri karaciğerdeki doğuştan gelen bağışıklık hücrelerini aktive etmiştir ve fare modellerinde Kolon-26 kanser hücreleri üzerinde inhibitör etkiler göstermiştir [69]. Bir diğer çalışmada ise; yüksek dozda Konkanavalin A'nın hepatomda karaciğerde tümörü infiltre eden lenfositleri aktive ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca, lenfosit aktivasyonu olmadan da karaciğerdeki tümör nodül yapılarını inhibe etmiştir. Lektin kaynaklı kanser hücresi ölümlerinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması, yeni ajan ve ilaçların geliştirilmeleri için yeni bir perspektif açmıştır [71].

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır. Bunlar;

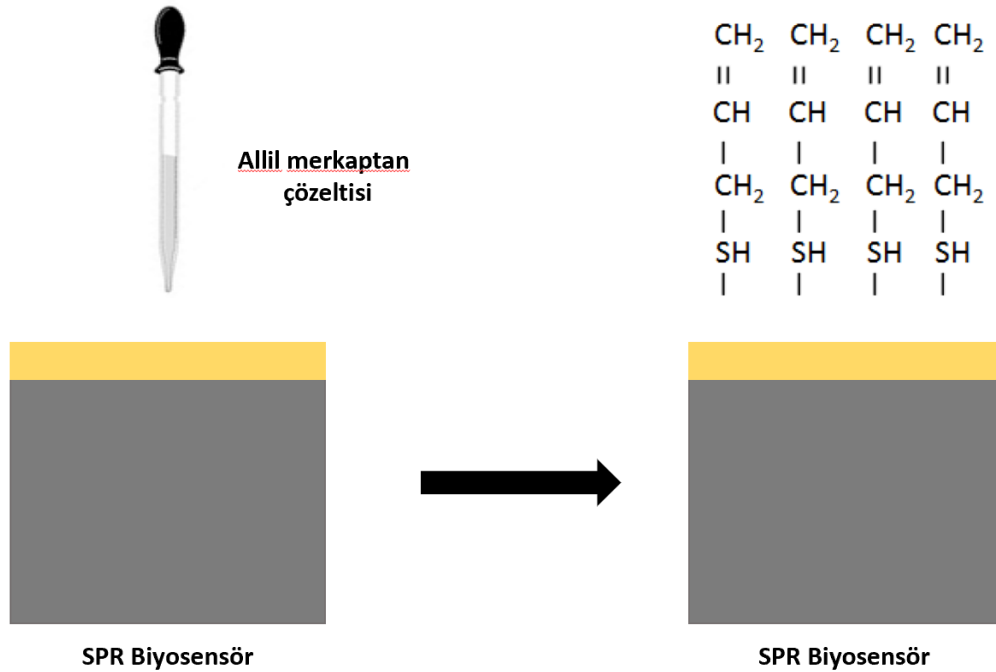
- Yüzey plazmon rezonans (SPR) çipin altın yüzeyinin allil merkaptan ile yüzey modifikasyonu,
- Fonksiyonel monomer ve kalıp molekül ile ön polimerizasyon kompleksinin oluşturulması,
- Konkanavalin A (Con A) baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR biyosensörlerin hazırlanması,
- Konkanavalin A baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR biyosensörlerinin yüzey karakterizasyonu,
- Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörünün farklı pH tamponlarında Konkanavalin A adsorpsiyonu için SPR kinetik analizlerinin gerçekleştirilmesi,
- Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörünün farklı derişimlerde hazırlanmış Konkanavalin A çözeltilerindeki adsorpsiyonu için SPR kinetik analizlerinin gerçekleştirilmesi,
- Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin seçicilik çalışmaları yarışmacı molekül olarak sığır serum albümin (BSA) ve Miyoglobulin (Myg) molekülleri ile incelenmesi,
- Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğinin incelenmesi,
- Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün soya fasulyesinden (jack bean) elde edilen özüte farklı derişimlerde hazırlanmış Konkanavalin A sulu çözeltilerinin adsorpsiyonu için SPR kinetik analizlerinin gerçekleştirilmesi,
- Yapay kontrol plazma ortamında farklı derişimlerde hazırlanmış Konkanavalin A sulu çözeltileri Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörler ile kinetik analizler yapılarak geri kazanımlar araştırılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Konkanavalin A, 2,2'-azobisisobütironitril (AIBN), çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), seçicilik çalışmasında kullanılan sığır serum albümin (BSA) ve miyoglobulin (Myg) Sigma (St. Louis, ABD) firmasından elde edilmiştir. 2-hidrosetil metakrilat (HEMA) Sigma (Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer tüm kimyasal sarf malzemeler analitik saflıktadır.

3.2. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Temelli Biyosensörün Altın Çip Yüzeyinin Modifikasyonu

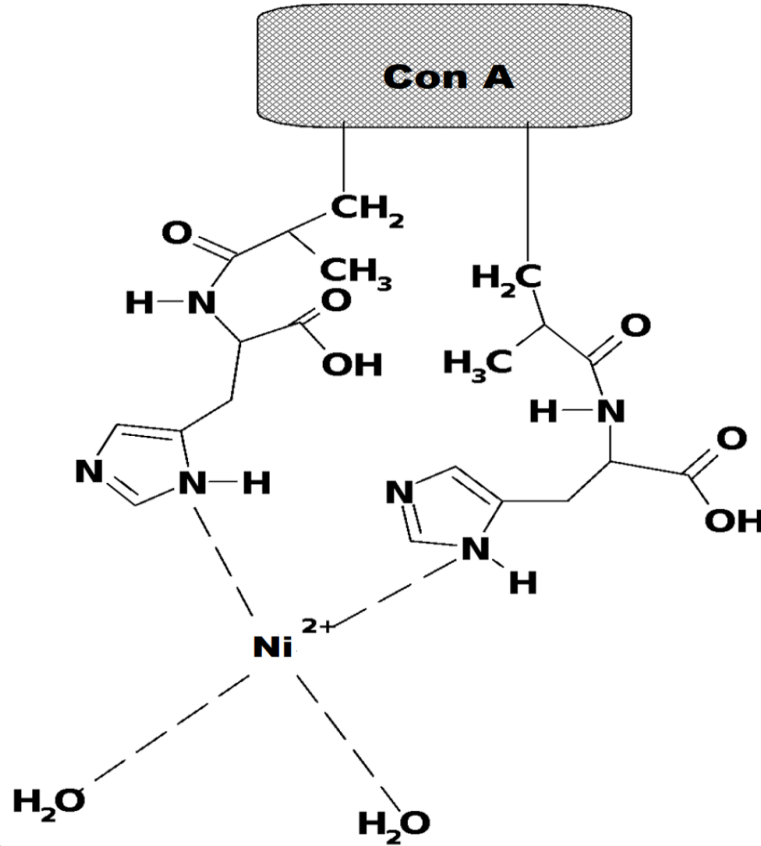
SPR çip yüzeyi öncelikle 10 mL asidik pirana çözeltisi (3:1, H₂SO₄:H₂O₂, v/v) ile temizlenerek hidroksile edilmiştir. SPR çip yüzeyinde polimerik film oluşturulmadan önce çip yüzeyi allil merkaptan (CH₂CHCH₂SH) ile modifiye edilmiştir. Modifiye edilen SPR çip yüzeyi saf etanol ve su ile yıkanarak 1 saat etüvde (40°C) kurutulmuştur. SPR çip yüzeyinin modifikasyonu Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Yüzey plazmon rezonans temelli SPR biyosensörün yüzey modifikasyonunun şematik gösterimi

3.3.Fonksiyonel Monomer ve Kalıp Molekül ile Ön Kompleksin Oluşturulması

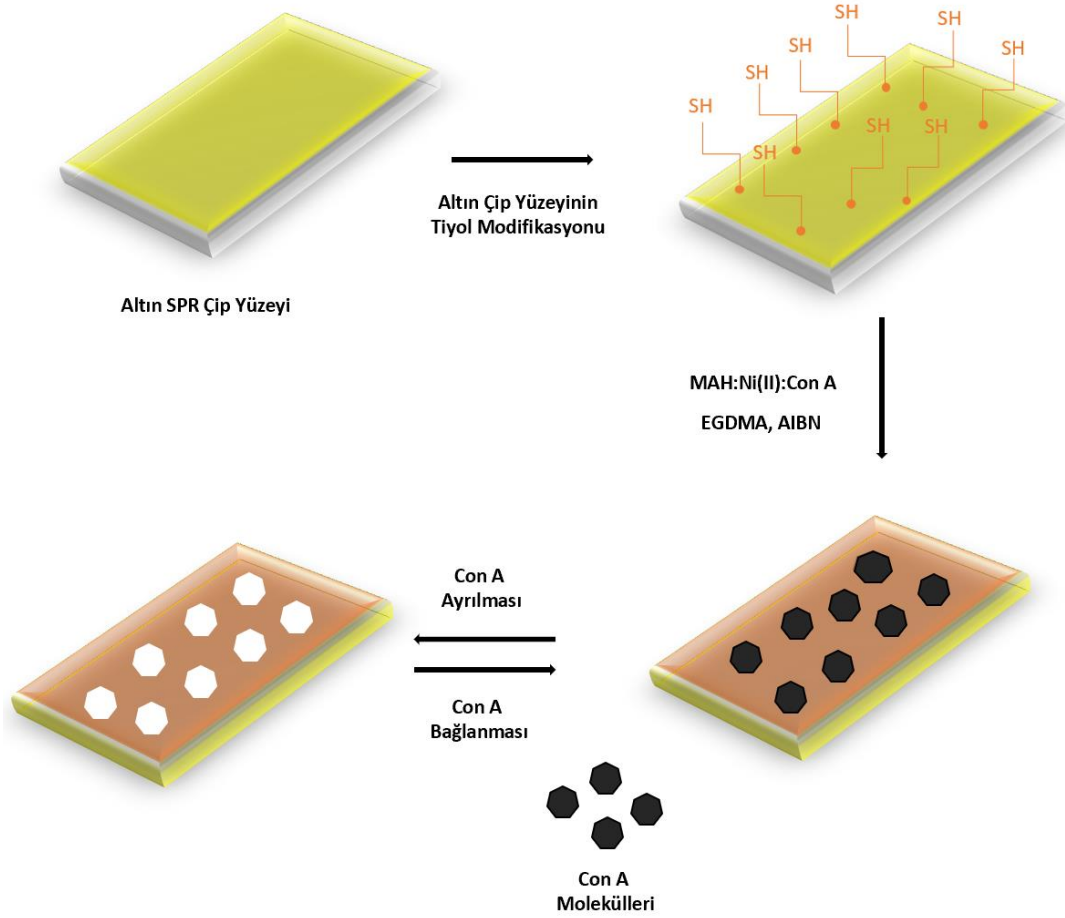
Sunulan tez çalışmasında, Konkanavalin A (Con A) tayini için Konkanavalin A baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR temelli biyosensörler hazırlanmıştır. Kalıp molekül olarak kullanılan Konkanavalin A, monomer olarak N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) kullanılmıştır. Denizli ve ark. tarafından sentezlenen ve rapor edilen N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) polimerik film sentezinde fonksiyonel monomer olarak kullanılmıştır [51]. İlk olarak, MAH (0.223 g, 1.0 mmol) 3 mL etanol yavaş bir şekilde ilave edildi ve oda sıcaklığında nikel nitrat ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (0.290 g, 1.0 mmol) çözeltisi ile MAH-Ni(II) kompleksi oluşturulmuştur [63]. Daha sonra hazırlanan MAH-Ni(II) kompleksi ve farklı derişim oranlarındaki kalıp molekül (Con A) ile ön polimerizasyon kompleksleri hazırlanmıştır. (Şekil 3.2) MAH:Ni(II):Con A birleşme oranlarını tayin etmek için farklı molar oranlarındaki MAH:Ni(II):Con A (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 M) kompleksleri oluşturulmuş ve Con A baskılanmış ve baskılanmamış polimerik filmler hazırlanmıştır. Daha sonra Con A sulu çözeltisi kullanılarak baskılama faktörü ($\% \Delta R_{\text{MIP}} / \% \Delta R_{\text{NIP}}$) hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. MAH:Ni(II):Con A kompleksinin şematik gösterimi

3.4.Konkanavalin A Baskılanmış ve Baskılanmamış SPR Biyosensörlerin Hazırlanması

Konkanavalin A (Con A) baskılanmış SPR çiplerin (MIP) hazırlanmasında ilk olarak MAH:Ni(II) ile Con A arasında farklı molar oranlarında ön polimerizasyon kompleksi oluşturulmuştur. Daha sonra fonksiyonel monomer olarak 1.2 mL HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak 56.5 μ L (EGDMA) hazırlanmıştır. Ön polimerizasyon kompleksi MAH:Ni(II):Con A bu monomer karışımına eklenerek homojen bir karışım oluşturulmuştur. Bu polimer karışımına başlatıcı olarak 4 mg AIBN eklenmiş ve allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çip yüzeyine 4 μ L polimer karışımından damlatılıp kaplama cihazı (Spin Coater, LAURELL, WS 650Mz-23NPP, USA) ile döndürerek çip yüzeyine homojen olarak dağılımı sağlanmıştır [73]. SPR çip yüzeyine damlatılarak UV ışığı ile 30 dakika muamele edilmiş ve polimer karışımının foto polimerizasyon ile polimerleşmesi sağlanmıştır. Polimerleşmeyen monomerler etil alkol ile ortandan elimine edilmiştir. Con A baskılanmamış SPR çipler (NIP) de aynı prosedür kullanarak hazırlanmıştır. Sadece kalıp molekül (Con A) eklenmeden polimer karışımı hazırlanmış ve aynı proseslerden geçirilmiştir. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörlerin hazırlanmasını gösteren şematik gösterim Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Konkanavalin A Baskılanmış SPR Biyosensörün Hazırlanmasının Gösterimi

3.5. Kalıp Molekülün Uzaklaştırılması

MAH: Ni(II) ile Con A arasındaki etkileşimin temelinde ikincil kuvvetler vardır. Bu etkileşimi kırabilecek desorpsiyon ajanı olarak 0.1 M NaCl çözeltisi seçilmiştir. Con A baskılanmış SPR çip, desorpsiyon çözelti (0.1 M NaCl) ile çalkamalı inkübatörde oda sıcaklığında (18-25°C), 2 saat boyunca muamele edilmiştir. Desorpsiyon işlemine tabi tutulan SPR biyosensör, deiyonize su ile yıkanarak vakum etüvünde (200 mmHg, 25°C) kurutulmuştur.

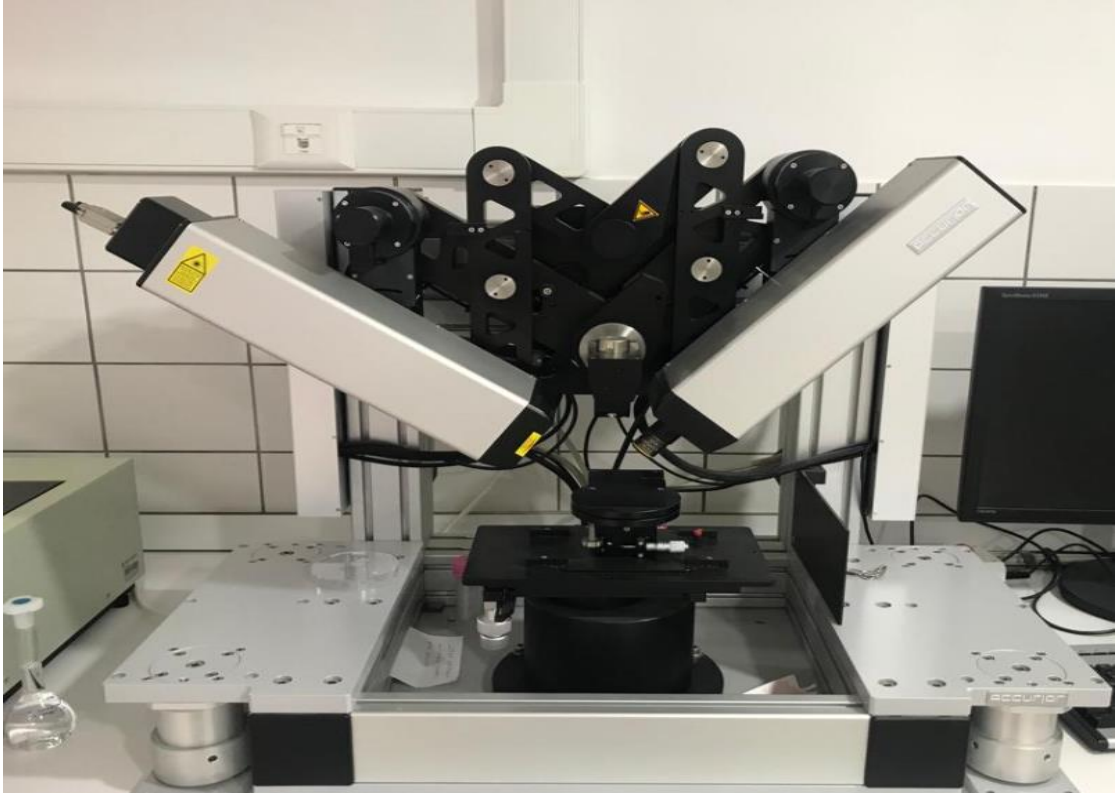
3.6.Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

Atomik kuvvet mikroskobu, polimerler, seramikler, cam ve biyolojik numuneler dahil olmak üzere hemen hemen her tür yüzeyi nano ölçüde, yüksek çözünürlükle görüntüleyebilen cihazlardır. Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR çip yüzeylerinin karakterizasyonu atomik kuvvet mikroskobu (Nanomagnetics Instruments, Oxford, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. SPR çipler örnek tutucuya çift yüzü karbon bant kullanılarak sabitlenmiş ve görüntüleme çalışmaları hava ortamında, yarı degen modda, 341.30 kHz salınım rezonans frekansı ile uygulanmıştır. Titreşim ve boş titreşim genliği sırasıyla 1 V_{RMS} ve 2 V_{RMS}'dir. Örnekler (2 µm/s) tarama hızı ve (256 x 256 piksel) çözünürlük ile Konkanavalin A baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR çip yüzeyleri için (1x1 µm²)'lik bir alanın görüntüleri alınmıştır [74].

3.6.2. Elipsometre Ölçümleri

Elipsometri, SPR çip yüzeyini kaplayan polimerlerin kalınlığını ölçmek için kullanılan bir alettir. Çalışma prensibi, ışığın farklı yüzeylerdeki yansıması veya iletilmesi arasındaki değişikliklerin ölçülmesine ve sonucun malzemenin kalınlığı ile ilişkilendirilmesine dayanır. Bu çalışmada, allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çip yüzeyi, Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR çiplerin yüzey kalınlıkları EP3-Nulling Elipsometre cihazı ile ölçülmüştür ölçümler, 532 nm dalga boyunda, 62°'lik bir geliş açısında, çip yüzeyindeki 6 farklı noktada, 3 kez tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar elde edilen değerlerin ortalaması hesaplanarak belirlenmiştir [75].



Şekil 3.4. EP3-Nulling Elipsometre Cihaz Görseli

3.6.3. Temas Açısı Ölçümleri

Modifiye edilmemiş SPR çip, Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR çip yüzeylerinin ölçümleri KRÜSS DSA100 cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Çiplerin yüzeylerine 1 damla su damlatılarak yapışık damla yöntemiyle analiz edilmiştir. Çip yüzeyinin birden fazla farklı bölgesine su damlatılmış ve fotoğraflar çekilmiştir. Görüntüsü alınan her bir alan için bir temas açısı belirlenmiştir. Modifiye edilmemiş SPR çip, Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR çipler için temas açısı değerleri için 10 farklı ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Temas açısı değerleri DSA2 yazılımı ile hesaplanmıştır [76]

3.7. Kinetik analizler

3.7.1. pH Çalışması

Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörün Konkanavalin A sulu çözeltisi ile kinetik çalışmaları SPRImager II (GWC Technologies, Madison, WI, USA)

sistemi (Şekil 3.5) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygun pH değerinin belirlenmesi için her biri 10 ng/mL derişiminde hazırlanmış pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.4 ve 8.0 fosfat tampon çözeltiler ile Konkanavalin A çözeltileri hazırlanmıştır. Kinetik analiz için öncelikle sisteme çalışılacak pH aralığına uygun tampon solüsyonu 2 dakika boyunca 2mL/dakika akış hızında verilmiş ve SPR çip yüzeyinin dengeye gelmesi sağlanmıştır. Bütün kinetik analiz çalışmalarında kinetik görüntüleme için SPRview yazılımı kullanılmıştır. Sistem 2 dakika süresince dengeye geldikten sonra hazırlanan Konkavalin A sulu çözeltisi sisteme 6 dakika boyunca 2 mL/dakika akış hızında verilmiştir. Sistem dengeye geldikten sonra 0.1 M NaCl çözeltisi ile 2 dakika boyunca 2 mL/dakika akış hızında desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon aşamasından sonra bir sonraki analizi gerçekleştirilecek pH değerine uygun tampon solüsyonu sisteme verilip sensör yüzeyinin dengeye gelmesi sağlanarak tüm pH değerleri için sırasıyla ölçümler gerçekleştirilmiştir. Her kinetik analiz için toplam analiz süresi 10 dakikadır. Analiz sonrasında elde edilen veriler SPRview yazılım programı ile belirlenmiştir. Elde edilen kinetik analiz sonuçları SPR sensorgramlarında % kırılma indisi ($\% \Delta R$) değerleri olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. SPR Cihaz Görşeli

3.7.2. Farklı Derişimlerde Hazırlanmış Konkanavalin A Sulu Çözeltilerinin Konkanavalin A Baskılanmış Biyosensörle Kinetik Analizleri

Uygun pH'nın belirlenmesi çalışmasından sonra farklı derişimlerde hazırlanmış Konkanavalin A çözeltileri ile derişim taraması çalışması gerçekleştirilmiştir. Konkanavalin A çözeltileri pH 7.4 fosfat tamponuyla 0.01 ng/mL-50 ng/mL derişim aralığında hazırlanmıştır. SPR çip yüzeyinin dengeye gelmesi için pH 7.4 fosfat tampon çözeltisi 2 dakika boyunca 2 mL/dakika verilmiş ve SPR çip yüzeyinin dengeye gelmesi sağlanmıştır. Sistem 2 dakika süresince dengeye geldikten sonra ilk olarak 0.01 ng/mL derişimde hazırlanmış çözelti 6 dakika 2 mL/dakika akış hızında sisteme verilmiştir. Süre bitiminde 0.1 M NaCl çözeltisi ile 2 dakika boyunca 2 mL/dakika akış hızında desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler hazırlanmış tüm derişimler için tekrarlanmıştır. Analiz sonrasında elde edilen veriler SPRview yazılım programı ile belirlenmiştir. Elde edilen kinetik analiz sonuçları SPR sensorgramlarında % ΔR değerleri olarak hesaplanmıştır.

3.7.3. Seçicilik Çalışmaları

Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün seçiciliğinin belirlenmesi için Konkanavalin A baskılanmamış biyosensör hazırlanmıştır. Konkanavalin A (Con A, molekül ağırlığı: 25.5 kDa) baskılanmış SPR biyosensörün seçicilik çalışmaları için yarışmacı molekül olarak miyoglobulin (Myg, molekül ağırlığı: 17 kDa) ve sığır serum albümin (BSA, molekül ağırlığı: 66 kDa) kullanılmıştır. Bunun için her biri 10 μ g/mL derişimde olacak şekilde hazırlanmış BSA, Myg ve Con A çözeltileri tek tek Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış biyosensörler için ayrı olarak sisteme verilerek kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ikili olarak hazırlanmış BSA + Myg ve son olarak BSA + Myg + Con A çözeltileri üçlü olarak sisteme verilmiştir. Bu çözeltiler diğer kinetik çalışmalarda uygulanan protokolle aynı şekilde yani 2 dakika pH 7.4 fosfat tamponu, 6 dakika örnek çözeltisi ve 2 dakika ise 0.1 M NaCl desorpsiyon çözeltisi geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Analiz sonrasında elde edilen veriler SPRview yazılım programı ile belirlenmiştir. Elde edilen kinetik analiz sonuçları SPR sensorgramlarında % ΔR değerleri olarak hesaplanmıştır.

3.7.4. Soya Fasulyesinden Konkanavalin A Tayini

Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün soya fasulyesinden elde Konkanavalin A özütü için kinetik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle 25 gr. soya fasulyesi manyetik karıştırıcıdaki pH 8.0 Tris HCl tampon çözeltisi içinde 1 gece bekletilmiştir. Bütün gece karışan karışım 15 dakika, 4°C, 8000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda supernatant toplanmıştır ve başka bir santrifüj tüpü içerisine alınmıştır. 2 mL supernatant çözeltisi ayrı bir şişeye alınıp içerisine 2.5 ng/mL Con A çözeltisi ilave edilmiştir. Başka bir şişe içerisine tekrar 2 mL supernatant alınıp 1.5 ng/mL Con A çözeltisi ilave edilmiştir. Hazırlanmış olan bu çözeltiler ve saf numune Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörde kinetik analizler yapılmıştır [63].

3.7.5. Tekrar Kullanılabilirliğin İncelenmesi

Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliği hem aynı gün içerisinde art arda 4 kez ölçüm yapılarak, hem de 1.ay, 2.ay, 4.ay ve 6. ay gibi farklı zamanlarda 10 ng/mL derişimde hazırlanmış Konkanavalin A sulu çözeltileri ile kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kinetik analiz sonuçları SPR sensorgramlarında %ΔR değerleri olarak hesaplanmıştır.

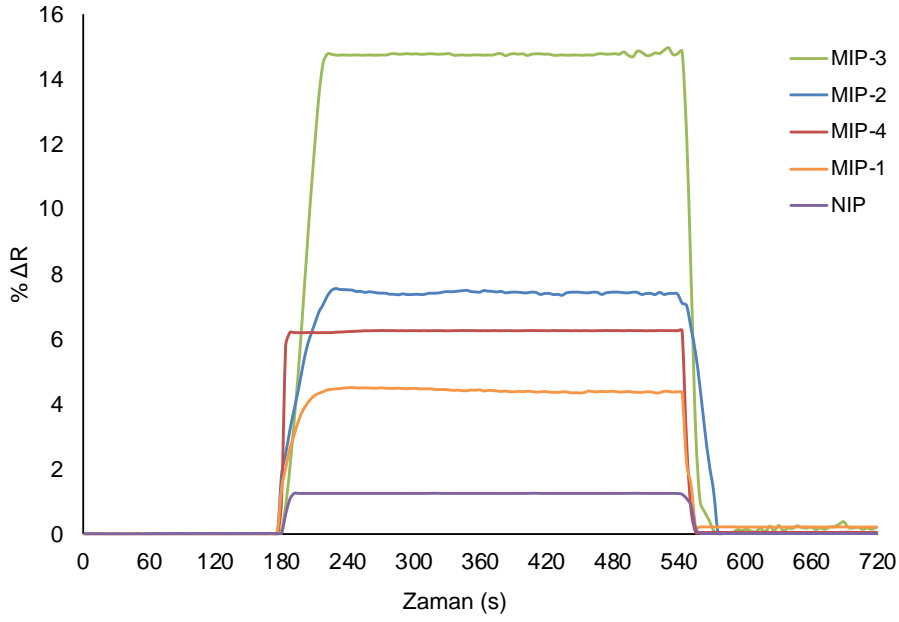
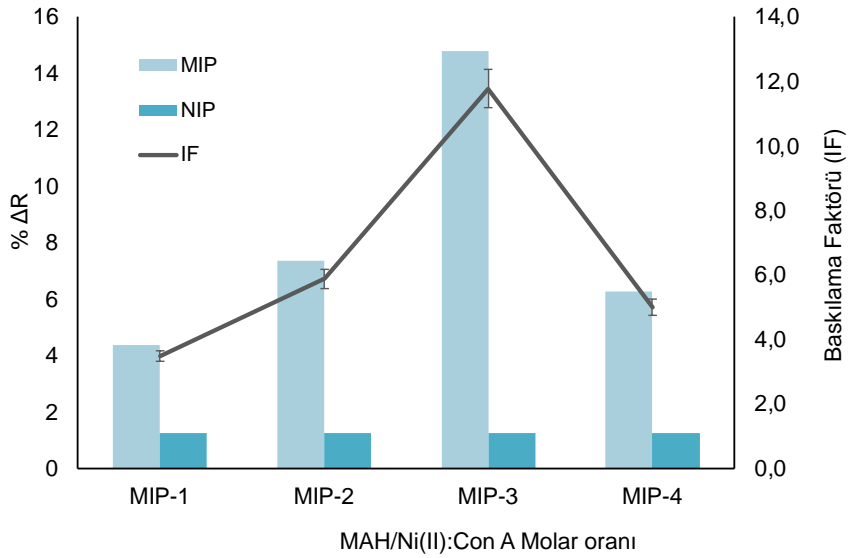
3.7.6. Yapay Kontrol Plazma Ortamında Farklı Derişimlerde Hazırlanmış Konkanavalin A Çözeltilerinin Miktarının Konkanavalin A Baskılanmış Biyosensörle Belirlenmesi

Yapay kontrol plazma içerisinde saf numune, 1 ng/mL ve 5 ng/mL derişimlerinde Con A içeren, toplam hacmi 2 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlanmıştır. SPR çip yüzeyinin dengeye gelmesini sağlamak için önce 2 dakika süresince izotonik çözelti 2 mL/dakika verilmiş ve SPR çip yüzeyinin dengeye gelmesi sağlanmıştır. Sistem 2 dakika süresince dengeye geldikten sonra önce saf numune 2 dakika 2 mL/dakika akış hızında sisteme verilmiştir. Süre bitiminde 0.1 M NaCl çözeltisi ile 2 dakika boyunca 2 mL/dakika akış hızında desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 1 ng/mL ve 5 ng/mL derişimde hazırlanmış çözeltiler sırasıyla aynı şekilde sisteme verilmiş ve bu işlemler hazırlanmış tüm derişimler için tekrarlanmıştır. Kinetik analiz sonrasında elde edilen veriler SPRview yazılım programı ile belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Ön Polimerizasyon Kompleksin Hazırlanması ve Hedef Molekül ile Monomer Oranlarının Belirlenmesi

Konkanavalin A kalıp molekülü, N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomeri ile farklı molar oranlarında karıştırılarak MAH:Ni(II):Con A ön polimerizasyon kompleksleri hazırlanmıştır. MAH:Ni(II):Con A ön polimerizasyon kompleksini oluşturmadan sitokiyometrik olarak birleşme oranlarını tayin etmek için farklı molar oranlarında MAH:Ni(II):Con A (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 M) kompleksleri hazırlanmıştır. Farklı molar oranlarında hazırlanan MAH:Ni(II):Con A kompleksleri 1:1 M oranı için MIP-1, 1:2 M oranı için MIP-2, 1:4 M oranı için MIP-3 ve 1:8 M oranı için MIP-4 kısaltmaları kullanılmıştır. MAH:Ni(II) miktarı sabit tutularak kalıp molekül Con A miktarı değiştirilerek hazırlanan Con A baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR çipler hazırlanmıştır. 10 ng/mL Con A sulu çözeltisi ile SPR sensorgramları alınarak % ΔR değerleri belirlenmiş ve Şekil 4.1A ve şekil 4.1B'de şematik olarak gösterilmiştir. En yüksek kırılma indisi değeri 1:4 M oranında (MIP-3) hazırlanan ön polimerizasyon kompleksinde gözlenmiştir. Bu sebeple, bütün kinetik çalışmalarda ön polimerizasyon kompleksi bu hedef molekül-monomer oranı (1:4 M veya MIP-3) kullanılarak Konkanavalin A baskılanmış SPR çipler hazırlanmıştır.

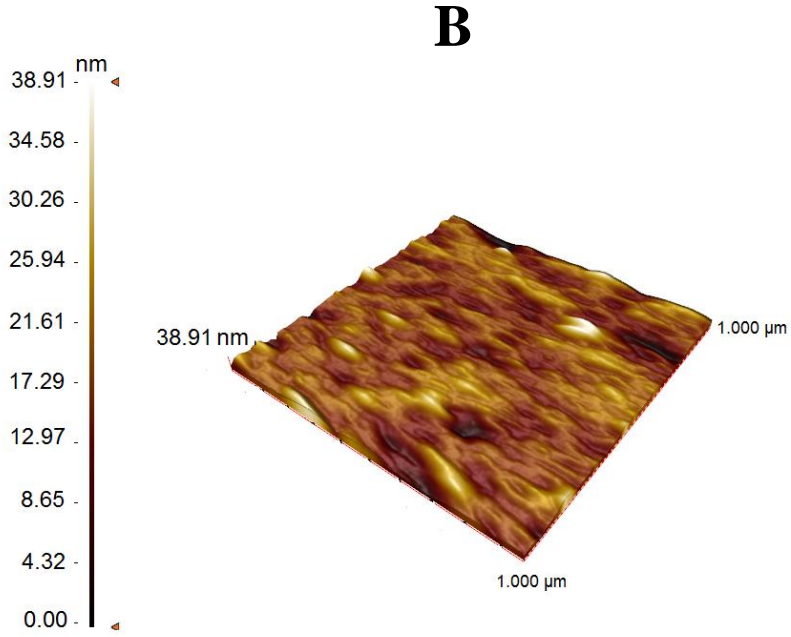
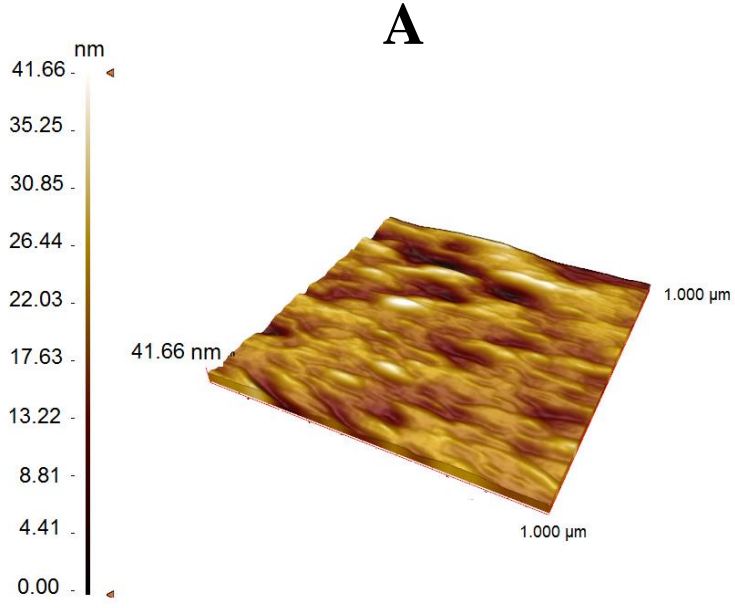
A**B**

Şekil 4.1. Farklı molar oranlarında MAH:Ni(II):Con A ön polimerizasyon kompleksleri ile hazırlanan Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler ait SPR sensorgramları (A) ve $IF = \frac{\% \Delta R_{MIP}}{\% \Delta R_{NIP}}$ değerleri (B). (Farklı molar oranlarında hazırlanan MAH:Ni(II):Con A kompleksleri 1:1 M oranı için MIP-1, 1:2 M oranı için MIP-2, 1:4 M oranı için MIP-3 ve 1:8 M oranı için MIP-4 kısaltmaları kullanılmıştır.)

4.2. Karakterizasyon alışmaları

4.2.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi

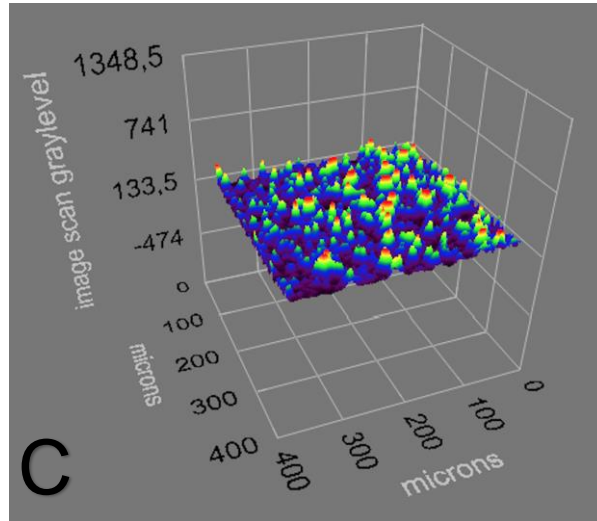
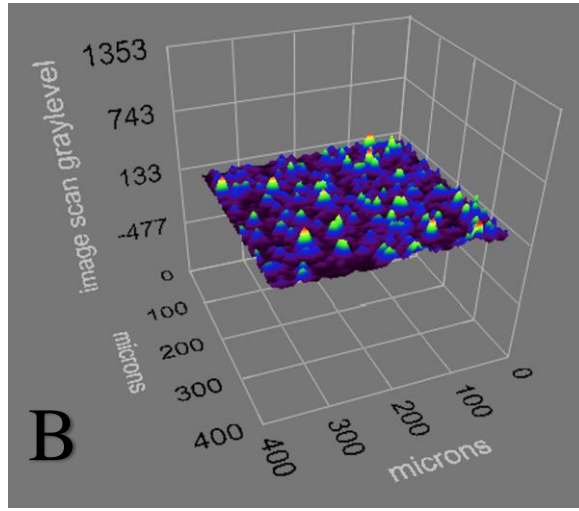
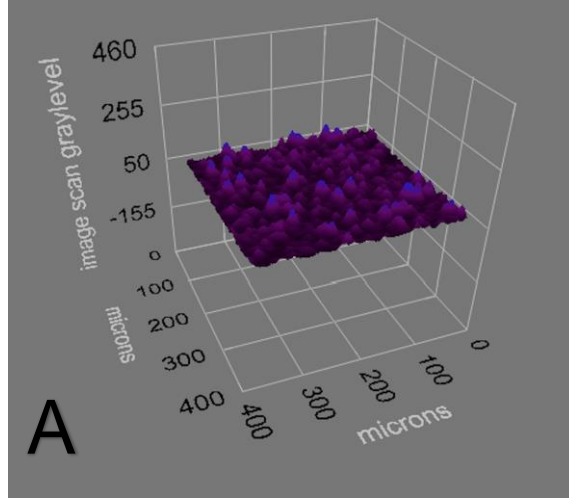
Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR temelli hazırlanan ip yüzeylerinin görüntüsü atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak görüntülenmiştir. Konkanavalin A molekülü baskılanmamış SPR ip yüzeyinin pürüzlülüğü 38.91 nm iken, Konkanavalin A baskılanmış SPR ip yüzeyinin pürüzlülüğü 41.66 nm bulunmuştur (şekil 4.2). AFM sonuçlarındaki bu fark Konkavalin A moleklnn SPR ip yüzeyine başarılı bir biçimde baskılandığı sonucuna varmamızı sağlamaktadır.



Şekil 4.2. Konkanavalin A baskılanmış (A) ve baskılanmamış SPR sensör yüzeylerin (B) yarı temas modunda alınan AFM 3B görüntüsü ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$).

4.2.2. Elipsometre Ölçümleri

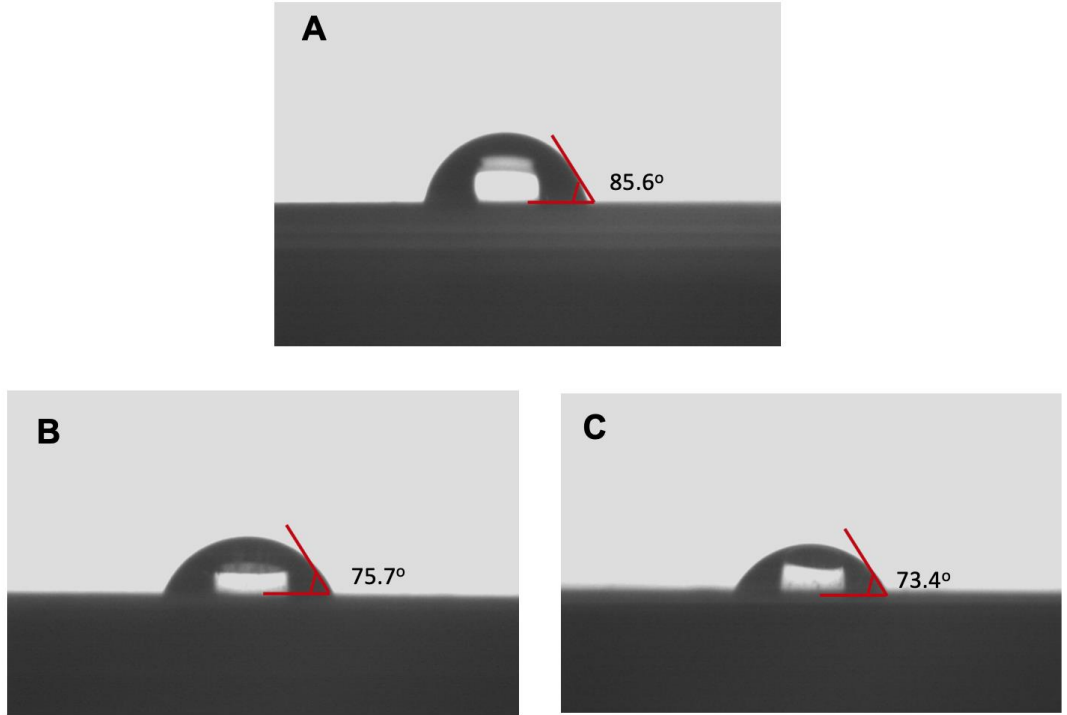
Elipsometre, SPR çip yüzeylerin optik özelliklerinin karakterizasyonu ve ölçümü için kullanılan çok hassas bir tekniktir. Teknik temel olarak ışık alanlarının polarizasyon evrelerindeki değişimin ölçülmesine dayanır. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş, Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR çip yüzeylerinin polimerik film kalınlık ölçümü EP3-Nulling Elipsometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. 658 nm dalga boyunda ve 65°'lik bir geliş açısıyla belirlenmiştir. Ölçümler, SPR çip yüzeylerinde 5 farklı noktada ve 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar bu ölçümlerin ortalaması olarak verilmektedir. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çip yüzeyinin ortalama yüzey kalınlığı 62.8 nm, Konkanavalin A baskılanmamış (NIP) SPR çip yüzeyinin ortalama yüzey kalınlığı 106 nm ve Konkanavalin A baskılanmış (MIP) SPR çip yüzeyinin ortalama yüzey kalınlığı 110 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Allil merkaptan ile modifiye edilmiş (A), Konkavalin A baskılanmış (B) ve baskılanmamış (C) SPR çip yüzeylerinin elipsometrik ölçümünde alınmış olan 3 boyutlu görüntüler

4.2.3. Temas Açısı Ölçümleri

Modifiye edilmemiş SPR çip, Konkavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR çip yüzeylerinin temas açısı ölçümleri Krüss DSA100 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bir damla su üç farklı çip yüzeyine damlatılıp temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyinin temas açısı 82.6° iken, Konkavalin A baskılanmış SPR çip yüzeyinin temas açısı 75.7° dir (Şekil 4.4). Konkavalin A baskılanmamış SPR çip yüzeyinin temas açısı ise 73.7° dir. Sonuçlar doğrultusunda, Konkavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR çip yüzeyleri hazırlamak için kullanılan MAH monomeri ortamın hidrofilitesini arttırmış dolayısıyla temas açısının azalmasına neden olmuştur [77].

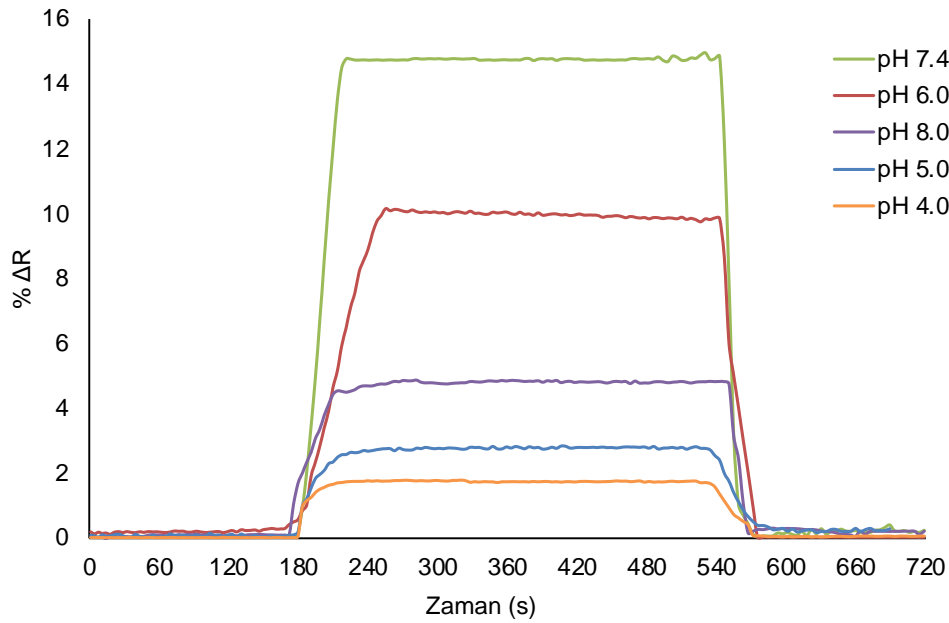


Şekil 4.4. Modifiye edilmemiş SPR altın çip yüzeyi (A), Konkavalin A baskılanmış (B) ve baskılanmamış SPR (C) çip yüzeylerinin temas açısı fotoğrafları.

4.3. Kinetik Analizler

4.3.1. pH Çalışması

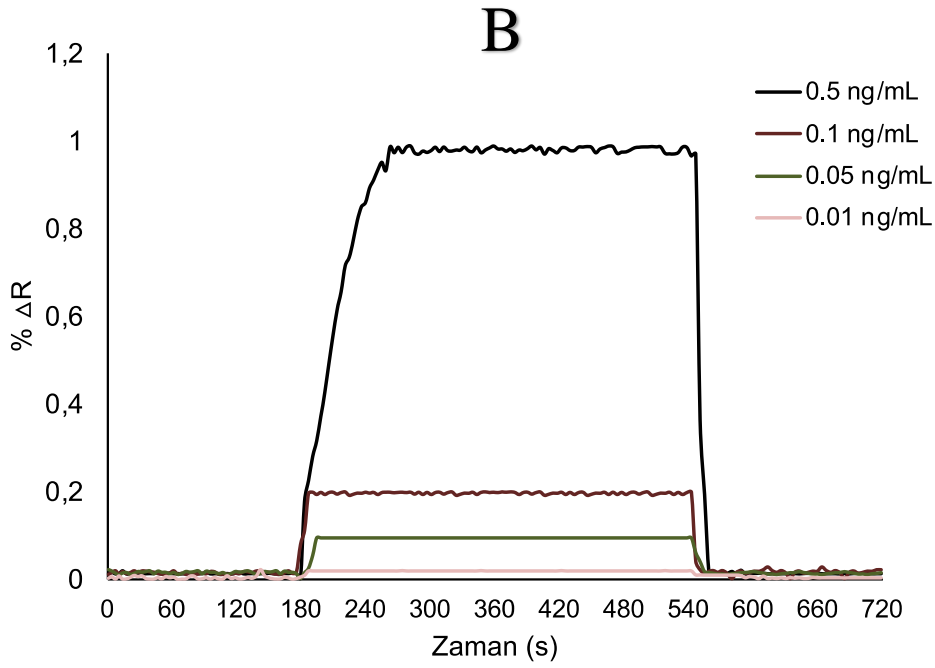
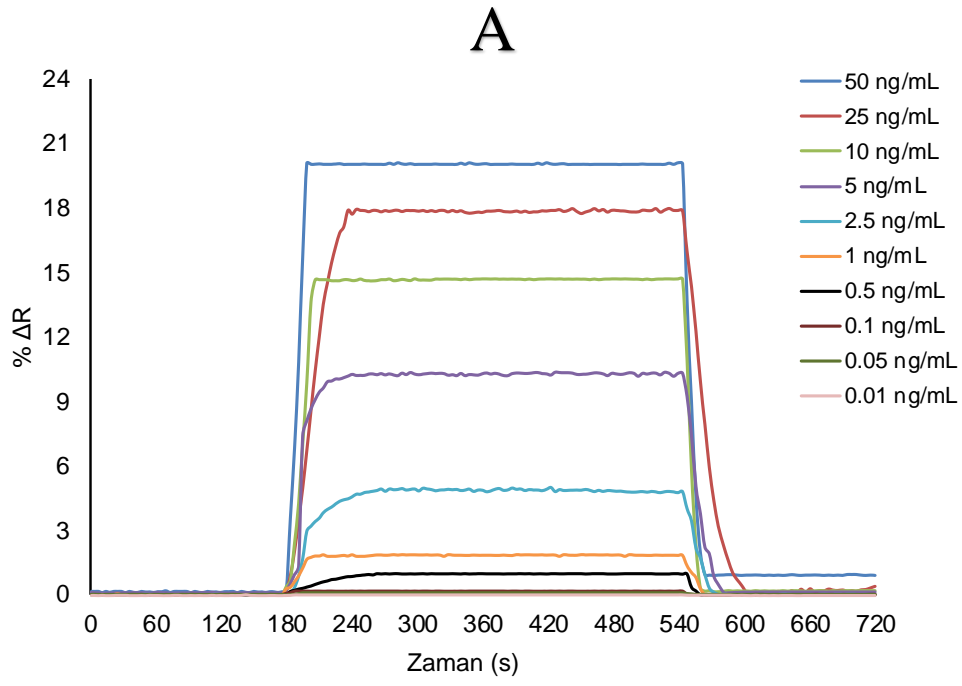
İlk olarak, kinetik analizlerden önce Konkanavalin A molekülü için uygun pH ortamının değerinin belirlenmesi amacıyla pH taraması çalışması gerçekleştirilmiştir. Aynı Konkanavalin A derişiminde farklı fosfat tamponlarında (pH 4, 5, 6, 7.4 ve 8) hazırlanmış Konkanavalin A sulu çözeltileri Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör ile etkileşime sokularak SPRview yazılımı ile kinetik veriler elde edilmiştir. Şekil 4.5’de farklı pH aralığında hazırlanmış Konkavanalin A sulu çözeltilerinin kinetik analiz sonuçlarından elde edilen sensorgramlar gösterilmiştir. Şekil 4.5’de görüldüğü üzere pH 7.4 fosfat tamponunda hazırlanmış Konkanavalin A sulu çözeltisinde en yüksek % kırılma indisi (% ΔR) değeri gözlenmiştir. Biyosensör yüzeyine bağlanan Konkanavalin A miktarındaki artışla doğru orantılı olarak kırılma indisi değerinin artması Konkanavalin A proteini için en uygun pH değerinin 7.4 olduğunu göstermektedir.



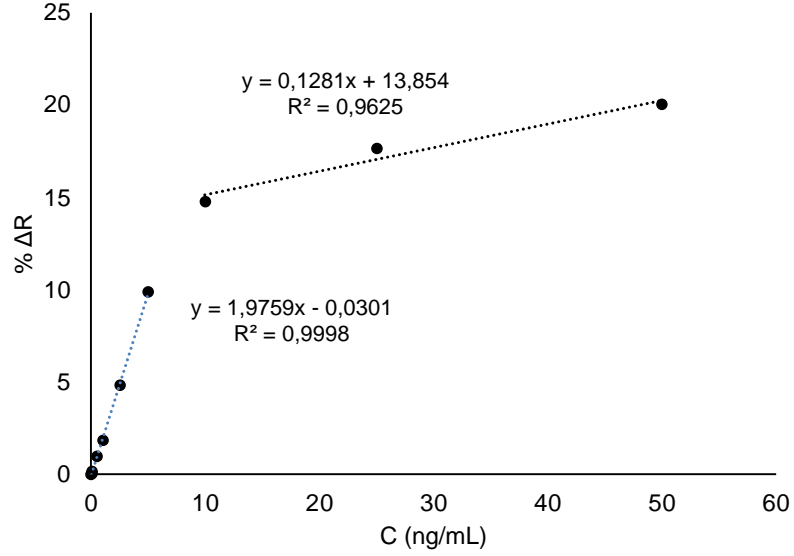
Şekil 4.5. Farklı fosfat tamponlarında hazırlanan Konkanavalin A çözeltisi ve SPR biyosensör arasındaki etkileşimlere ait SPR sensorgramları

4.3.2. Farklı Derişimlerde Hazırlanmış Konkanavalin A Sulu Çözeltilerinin Konkanavalin A Baskılanmış Biyosensörle Etkileşimi

Konkanavalin A sulu çözeltilerinden Konkanavalin A tayini için, Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör hazırlanmıştır. Bunun için 0.01-50 ng/mL derişim aralığında Konkanavalin A sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör ile etkileşime sokulup SPRview programı ile de sensorgramlar elde edilmiştir. Kinetik analiz sonuçları Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Görüldüğü üzere sonuçları % kırılma indisine karşı zaman grafiği ile ifade edilmiştir. Konkavalin A derişimi arttıkça doğru orantılı bir şekilde kırılma indisi değerinde de artış gözlenmiştir. Bunun sebebi, Konkanavalin A çözeltisi ile biyosensör yüzeyi arasındaki itici güç olan derişim farklılığının arttığını göstermektedir.



Şekil 4.6. Konkanavalin A sulu çözeltisi ile Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör arasındaki etkileşimlere ait sensorgram grafiği (A: 0.01-50 ng/mL, B: 0.01-0.5 ng/mL).



Şekil 4.7. 0.01-50 ng/mL aralığında Konkanavalin A derişimi ile %ΔR arasındaki ilişki.

Şekil 4.7’de görüldüğü üzere SPR biyosensör iki farklı derişim aralığına sahip Konkanavalin A çözeltileri arasında derişim-sinyal doğrusallığı göstermiştir. 0.01-5 ng/mL aralığında alınan veriler incelendiğinde elde edilen doğrunun denklemi $y=1,9759x-0,0301$ olarak bulunmuştur ve doğrusallık katsayısı ise (R^2) 0,998’dir. 10-50 ng/mL aralığında alınan veriler incelendiğinde ise; elde edilen doğrunun denklemi $y=0,1281x + 13,854$ ve doğrusallık katsayısı ise (R^2) 0,9625 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu veriler doğrultusunda SPR biyosensör 0.01- 0.05 ng/mL aralığında %99; 10 - 50 ng/mL aralığında ise %96 doğrulukta ölçüm yapmaktadır.

Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörde kinetik analiz verileri kullanılarak tayin sınırı (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Tayin sınırının (LOD) hesaplanmasında $3s/m$ denklemi kullanılmıştır. Bu denklemde, ‘s’ biyosensöre denge çözeltilisi verildiğinde elde edilen sinyal değeri (ΔR) ölçümlerine ait standart sapma değeri ve ‘m’ ise kalibrasyon grafiğinin eğimini ifade etmektedir. Denge çözeltilisi için (ΔR) değeri elde edilen 5 ölçümün ortalaması hesaplanarak, ayrıca ölçümlerin standart sapmaları ile SPR biyosensörler için sırasıyla 0.00075 olarak belirlenmiştir. Buna göre kalibrasyon grafiğine ait $y=1.9759x-0.0301$ denklemi kullanılarak tayin sınırı (LOD) 0.0011 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Tayin limiti ise; $10s/m$ eşitliğinden yararlanılmış ve tayin limiti (LOQ) 0,0038 ng/mL olarak belirlenmiştir [73].

Konkanavalin A tayinine yönelik literatürde yapılan çalışmalar Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Çizelgede görüldüğü üzere yapılan çalışmalar genellikle elektrokemilüminesans sensör çalışmalarını içermektedir. Çizelgede de verilmiş olan çalışmaların sonuçları geliştirilen sensörlerin istenen sonuçları sağladığını göstermektedir. Sunulan tez çalışması kapsamında yapılan SPR temelli biyosensörün de diğer çalışmalara göre tayin limitinin düşük olduğu gösterilmiştir.

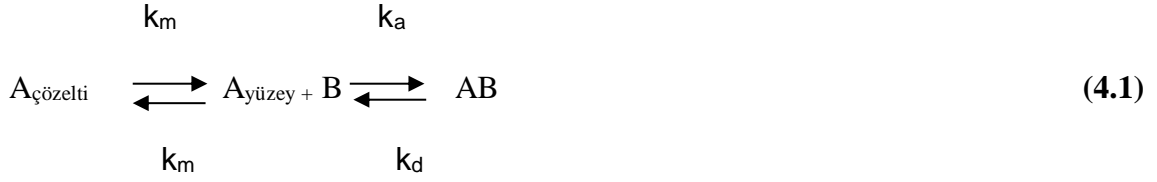
Çizelge 4.1. Konkanavalin A tayini için literatürde yer alan çalışmalar

Kullanılan yöntem	Tayin aralığı	Tayin sınırı (LOD)	Kaynak
SPR sensör	$1 \times 10^3 - 2 \times 10^4$ ng/mL	3.9×10^2 ng/mL	[78]
Elektrokemilüminesans sensör	1.0 pg/mL - 1.0 µg/mL	0.15 pg/mL	[79]
FRET bazlı sensör	$2.0 \times 10^{-2} - 1.0$ µM	0.8 nM	[80]
Elektrokemilüminesans sensör	0.5 pq/mL - 100 ng/mL	0.18 pg/mL	[81]
Elektrokemilüminesans sensör	1.0×10^{-4} ng/µL - 10 ng/mL	3.0×10^{-5} ng/mL	[82]
Elektrokimyasal sensör	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^4$ ng/mL	2.2 fg/mL	[83]
Elektrokemilüminesans sensör	1.0 - 20 ng/mL	0.31 ng/mL	[84]
SPR biyosensör	0.01-50 ng/mL	0.0011 ng/mL	Sunulan Tez Çalışması

4.3.3 Denge ve Bağlanma Kinetik Analizi

Rezonans sinyallerindeki değişim miktarı SPR biyosensörlerde yüzdesel kırılma ile ifade edilir. Değişimler zamana bağlı sensorgramlar ile ifade edilir. Biyosensör yüzeyi ve biyosensör yüzeyine bağlanan analit arasındaki bağlanma kinetiği hesaplanabilir.

Aşağıdaki denklemde k_m : analit yüzeyden kütle aktarım hız sabitidir. k_d ve k_a kompleks oluşum hız sabitleridir.



İdeal ortamda, analitin biyosensör yüzeyine bağlanması veya biyosensör yüzeyinden tekrar ayrılması bağlanma kinetiğinde bir değişikliğe neden olmaz. Sadece biyosensör yüzeyinden tekrar ayrılma hızı bağlanmasına göre daha hızlı ise değişikliğe neden olur. Kompleks oluşum hızı aşağıdaki tanımlanmaktadır.

$$d[AB] / dt = k_a [A] [B]_0 - [AB] - k_d [AB] \quad (4.2)$$

Eşitlikte; $[AB]$: bağlanan analit miktarı, $[A]$: serbest analit miktarı, $[B]_0$ biyosensörün toplam ligand yoğunluğunu ifade etmektedir.

$[B]_0$ biyosensör yüzeyinin maksimum seviyede analit bağlama kapasitesi olarak tanımlandığında diğer değerler SPR sinyalini ifade edebilmektedir. Yalancı-birinci derece şartları altında yani serbest analit derişiminin akış hücresinde sabit kaldığı durumda bağlanma aşağıdaki gibi gösterilir.

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

$d\Delta R / dt$: SPR sinyalinin derişim hızıdır. R_{maks} ve R : bağlanma ile ölçülen maksimum sinyaldir. C (ng/mL): analit derişimidir. k_a , bağlanma hız sabiti (mL/ng.s) ve k_d , ayrılma hız sabiti'ni (1/s) gösterir.

Denge halinde, $d\Delta R/dt=0$ alınır ve eşitlik aşağıdaki şekilde sadeleşir.

$$\Delta R_{\text{denge}} / C = K_A \Delta R_{\text{maks}} - K_A \Delta R_{\text{denge}} \quad (4.4)$$

$\Delta R_{\text{denge}}/C$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden, K_A : bağlanma sabitini, K_D ise ayrılma sabitini ifade eder.

$$K_A = k_a/k_d$$

$$K_D = 1/K_A$$

4.3'te verilen eşitlik tekrar düzenlendiğinde;

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{\text{maks}} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (4.5)$$

eşitliği elde edilir. Etkileşim kontrollü kinetikler için $d\Delta R/dt$ 'ye karşı % ΔR grafiğine geçirildiğinde elde edilen doğrunun eğimi $-(k_a C + k_d)$ 'dir. Analit derişimiyle başlangıç bağlanma hızı doğru orantılıdır ve derişimin kantitatif olarak belirlenmesi için kullanılır. R_{maks} değeri ile ise tek bir sensorgram kullanılarak k_a ve k_d değerleri hesaplanmasında kullanılmaktadır. R_{maks} 'ın deneysel olarak SPR biyosensör yüzeyinin tamamen doygunluğa ulaşması için daha fazla analit derişimleri gerekmektedir.

$$d \Delta R/dt = k_a C \Delta R_{\text{maks}} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (4.6)$$

S hız analizi için çizilmiş olan ΔR grafiğinin eğimidir.

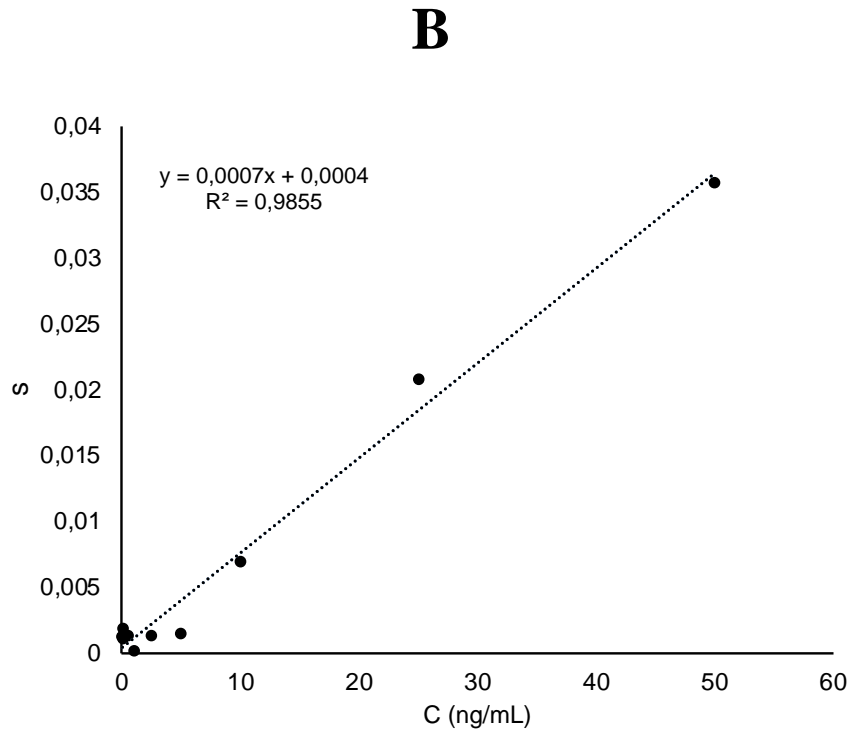
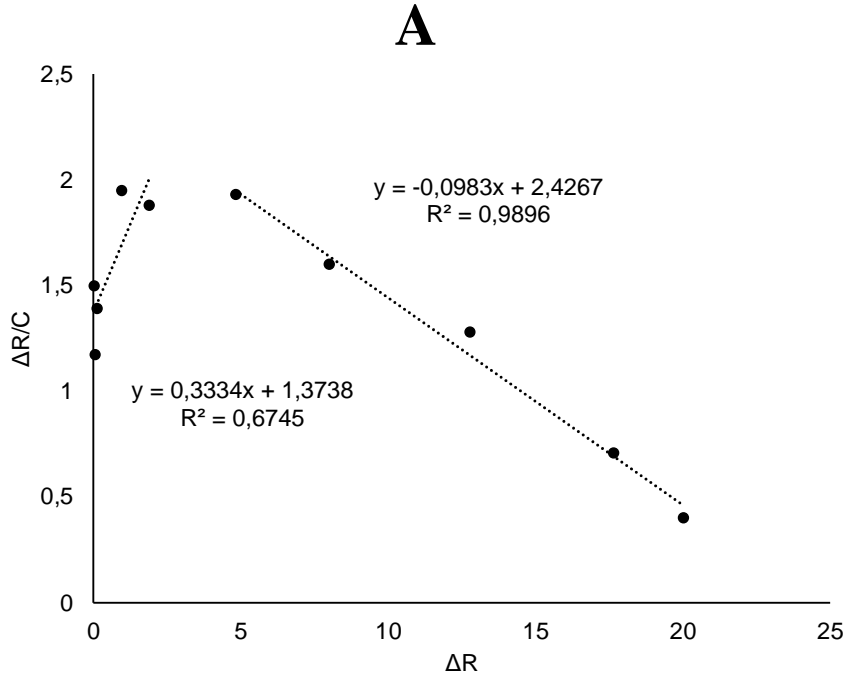
$$S = k_a C + k_d$$

$$(4.7)$$

$k_a C$ 'nin k_d 'den çok daha büyük olduğu koşullarda ayrışma kinetiğinin de hesaplanması gerekmektedir. Bu da R_0 'ın R_t 'ye göre değişiminin eksponansiyel olarak tersinin alınması ile belirlenmektedir.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (4.8)$$

Denge ve bağlanma kinetik analizleri Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Bu grafiklerdeki noktalara denklemlerin uygulanması ile bulunan ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi (Denge analiz yaklaşımı (A) ve Bağlanma kinetik yaklaşımı (B)).

Çizelge 4.2. Kinetik hız sabitleri

Denge Analizi (Scatchard)	Bağlanma Kinetik Analizi
ΔR_{maks} : 24.69	k_{as} , (ng/mL.s): 0.0007
K_A , (ng/mL): 0.0983	k_{ds} , (1/s): 0.0004
K_D , (mL/ng): 10.17	K_A , (ng/mL): 1.75
R^2 : 0.9896	K_D , (mL/ng): 0.571
	R^2 : 0.9855

4.3.4. Denge İzoterm Modelleri

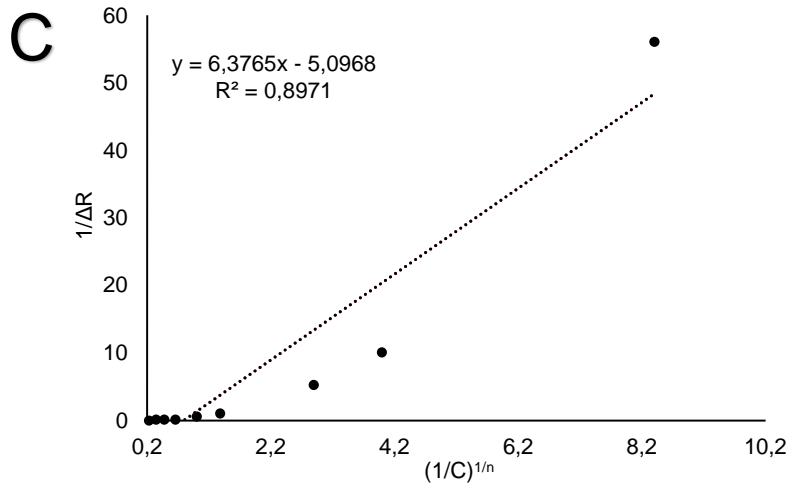
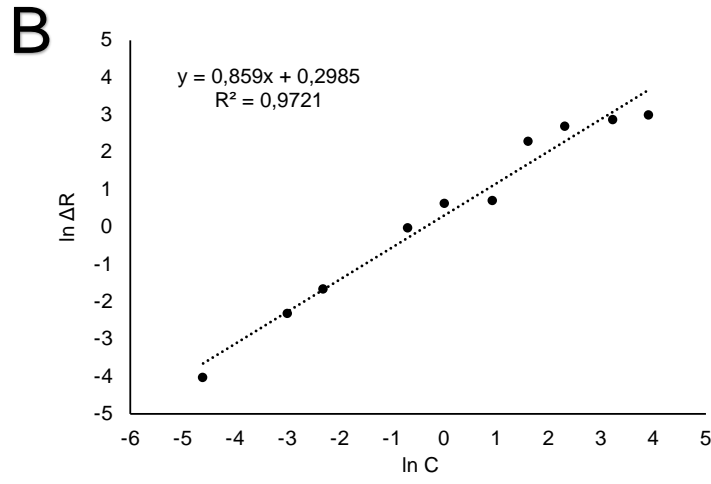
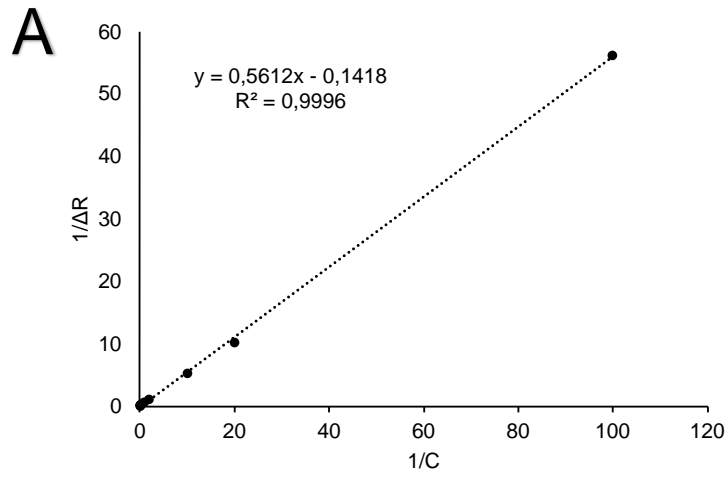
Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün Konkanavalin A molekülleri ile etkileşimini göstermek amacıyla üç farklı izoterm modelleri ile incelemeler yapılmıştır. Bunlar; Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich (LF) izoterm modelleridir.

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

$$\text{Freundlich} \quad \Delta R = \Delta R_{maks} [C]^{1/n} \quad (4.10)$$

$$\text{Langmuir-Freundlich} \quad \Delta R = \{ \Delta R_{maks} [C]^{1/n} / K_D + [C]^{1/n} \} \quad (4.11)$$

Bu izoterm modellerinde ΔR_{maks} ; olabilecek maksimum SPR sinyal kaymasını ifade etmektedir. ΔR_{denge} ise; denge halindeki SPR sinyal kaymasını ifade eder. $[C]$ analit derişimini (ng/mL); K_A (ng/mL) bağlanma denge sabitini; K_D (mL/ng) ayrışma denge sabitini; $1/n$ ise Freundlich yüzey heterojenite indeksini ifade etmektedir. Bahsedilen 3 farklı adsorpsiyon izoterm modeli, biyosensör yüzeyinin hedeflenen moleküle spesifik olmasından dolayı hedef molekülü tanıyıp bağlanması ve daha sonra ayrılması ile biyosensör yüzeyindeki değişen homojenliğin tespit edilmesi amacıyla kullanılır. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör ile Konkanavalin A molekülü arasındaki etkileşime ait Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich modellerini gösteren grafikler Şekil 4.9'da gösterilmektedir.



Şekil 4.9. Langmuir (A), Freundlich (B) ve Langmuir-Freundlich (C) adsorpsiyon izoterm modelleri

Langmuir izoterm modelinde; SPR biyosensör yüzeyine adsorplanan madde ile maksimum doyum noktasına ulaşıldığında biyosensör yüzeyi homojen bir şekilde tek tabaka olur. Bu süreçte adsorplanan madde miktarı sabit kalır. Freundlich izoterm modelinde ise; SPR biyosensör yüzeyinde çeşitli adsorpsiyon bölgeleri bulunmaktadır. Bu sebeple heterojen bir yüzeye sahiptir. Langmuir- Freundlich izoterm modelinde ise; adsorplanan madde ile doygunluğa ulaşana dek heterojenite ile ilgili bilgi vermiştir ve adsorpsiyon davranışının daha uygun olduğu görülmüştür [60,85]

Çizelge 4.3. Langmuir, Freundlich ve Langmuir-Freundlich parametreleri

Langmuir	ΔR_{maks} , (ng/mL): 7.05 K_D , (mL/ng): 3.96 K_A , (ng/mL): 0.25 R^2 : 0.9996
Freundlich	ΔR_{maks} , (ng/mL): 1.348 $1/n$: 0.859 R^2 : 0.9721
Langmuir-Freundlich	ΔR_{maks} , (ng/mL): 0.196 $1/n$: 0.859 K_D , (mL/ng): 1.25 K_A , (ng/mL): 0.79 R^2 : 0.8971

Çizelge 4.3'ten elde edilen veriler doğrultusunda Konkanavalin A tayinine en uygun model Langmuir modelidir (R^2 : 0.9996). Bu sonuçtan yola çıkıldığında, hazırlanmış Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör yüzeyine bağlanan Konkavalin A moleküllerinin homojen bir dağılıma sahip olduğunu, eşit enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermiştir.

4.1.4. Seçicilik Analizleri

Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin seçicilik analizleri için moleküler yapı açısından benzer olan sığır serum albumin (BSA) ve miyogloblin (Myg) yarışmacı molekül olarak seçilmiştir. Bu çalışmada her biri 10 ng/mL derişimde olacak şekilde hazırlanmış BSA, Myg ve Con A çözeltileri tek tek sisteme verilerek kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ikili olarak hazırlanmış BSA + Myg ve üçlü olarak hazırlanmış Con A + BSA + Myg çözeltileri SPR sistemine verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde hazırlanan Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörde en yüksek kırılma indisi Konkanavalin A çözeltisinden elde edilmiştir. Miyogloblin ve sığır serum albumin ile Konkanavalin A içeren çözeltilere kıyasla daha az etkileşime girdiği gözlenmiştir (Şekil 4.10).

Konkanavalin A molekülüne göre, miyogloblin ve sığır serum albumin moleküllerinin dağılıma ve seçicilik katsayıları aşağıda belirtilen eşitlik ile belirlenmiştir.

$$K_d = [(C_i - C_f)/C_f] \times V/m \quad (4.12)$$

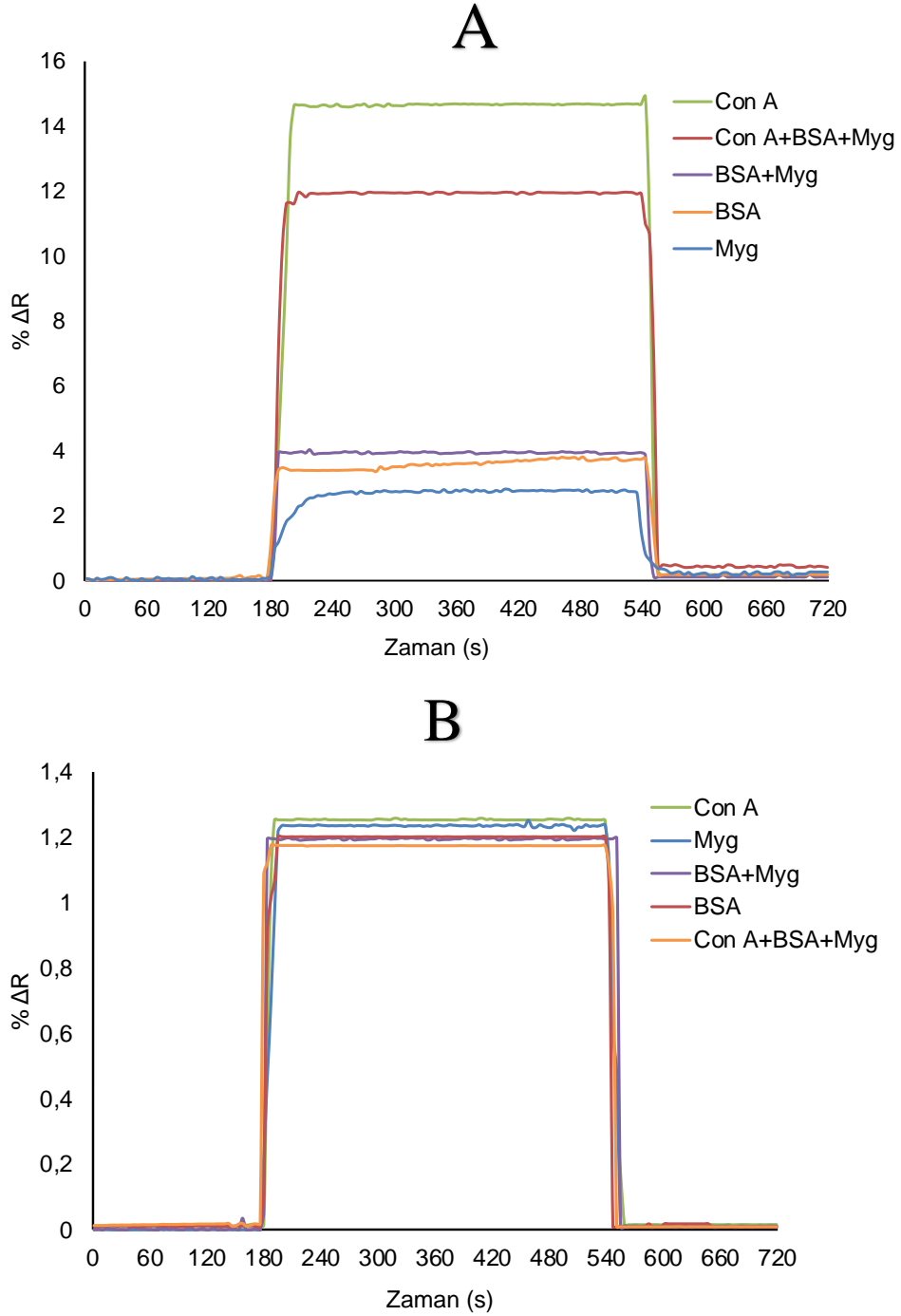
Bu eşitlikte; K_d (mL/ng): dağılıma katsayısı, C_i ve C_f (ng/mL): moleküllerin ilk ve son derişimleri, V (mL): kullanılan çözelti hacmi, m (g): polimerin kütlesini gösterir. Seçicilik katsayısı (k) ve bağıl seçicilik katsayıları (k') ise aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır [86]

$$k = \Delta R_{\text{hedef molekül}} / \Delta R_{\text{yarışmacı}} \quad (4.13)$$

$$k' = k_{\text{baskılanmış}} / k_{\text{kontrol}} \quad (4.14)$$

Hazırlanan Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün seçiciliğinin belirlenmesi için Konkanavalin A baskılanmamış SPR biyosensör hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan Con A, Myg ve BSA çözeltileri ile tekli, daha sonra BSA ve Myg ile ikili ve Con A, BSA ve Myg çözeltilerinin karışımı ile üçlü çözeltiler hazırlanarak kinetik analizler Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış biyosensörler ile gerçekleştirildi. Sensorgramlar incelendiğinde Konkanavalin A baskılanmış biyosensörde yalnızca

Konkanavalin A ile gerçekleştirilen kinetik analizde en yüksek kırılma indisinin ($\% \Delta R$) görüldüğü gözlenmiştir.



Şekil 4.10. Konkanavalin A baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) SPR biyosensörüne ait sensorgramlar

Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış biyosensör üzerinden bir karşılaştırma yapıldığında ise; ΔR değerinin 14.77'den 1.25'e azaldığı gözlenmiştir. (Çizelge 4.4). Hesaplanan bağıl seçicilik katsayıları (k') >1 ise yapılmış olan moleküler baskılama işleminin başarılı olduğunu göstermektedir.

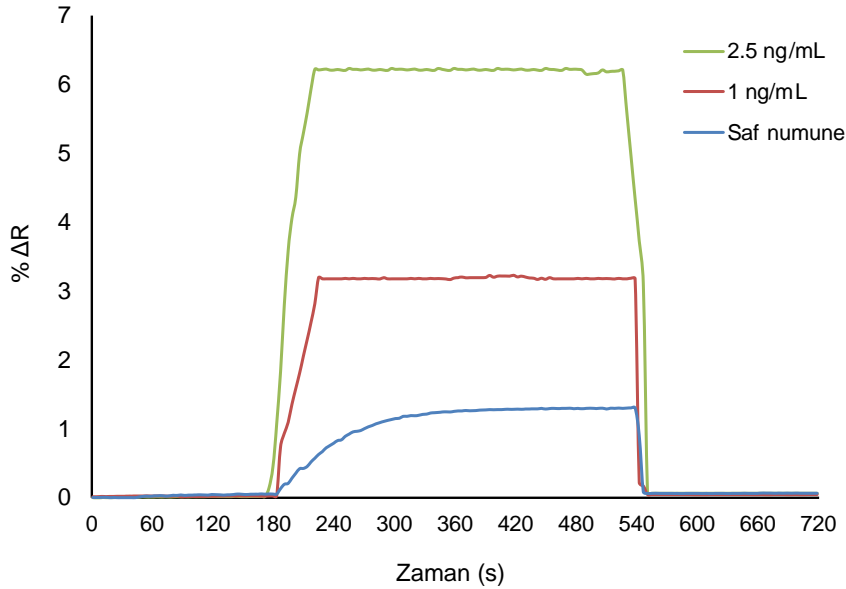
Sonuçlar, Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörünün BSA ve Myg için tepkisinin Şekil 4.10'da da görüldüğü üzere Konkanavalin A'dan daha düşük olduğunu göstermektedir. Con A/BSA ve Con A/Myg için Con A baskılanmış SPR biyosensörünün bağıl seçicilik katsayıları (k'), sırasıyla 3.88 ve 5.25 katıdır (Çizelge 4.4). Ayrıca, Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörünün seçiciliği, $\Delta R_{MIP}/\Delta R_{NIP}$ olarak belirlenen baskılama faktörü (IF) ile hesaplanmıştır. SPR biyosensörün Con A, BSA ve Myg molekülleri ile ilgili baskılama faktörleri sırasıyla 11.78, 3.04 ve 2.24 olarak hesaplanmıştır. Konkanavalin A için baskılama faktörü, diğer yarışmacı moleküllerin IF'lerinden daha yüksek olduğu görünmektedir. Bu sonuçlar, moleküler baskılanmış polimerik filmin adsorpsiyon seçiciliğini önemli ölçüde artırabileceğini ve spesifik tanıma bölgelerinin diğer moleküller için uygun olmadığını göstermektedir [60]

Çizelge 4.4 Konkanavalin A (Con A), sığır serum albumin (BSA) ve miyogloblin (Myg) için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları

Molekül Adları	MIP		NIP		k'
	Biyosensörler		Biyosensörler		
	ΔR	k	ΔR	k	
Con A	14.77	-	1.25	-	-
BSA	3.65	4.05	1.20	1.04	3.88
Myg	2.77	5.33	0.24	1.02	5.25
BSA+Myg	3.94	3.75	1.19	1.05	3.57
Con A+BSA+Myg	11.97	1.23	1.17	1.07	1.15

4.1.5. Soya fasulyesinden (Jack Bean) Konkanavalin A tayini

Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün soya fasulyesinden elde Konkanavalin A özütünden tayini için kinetik analizler yapılmıştır. Saf numune içerisinde örneklem ayrılarak 2.5 ng/mL ve 1.0 ng/mL derişiminde ticari ürün ile hazırlanan Konkanavalin A sulu çözeltilerinden eklenmiştir. Hazırlanmış olan çözeltiler Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör ile kinetik analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11). Şekil 4.11’de görüldüğü gibi sisteme öncelikle 2 dakika boyunca tampon solüsyon (pH 7.4 fosfat tamponu) verilmiş ve SPR biyosensör yüzeyinin dengeye gelmesi sağlanmıştır. İşlem bitiminde soya fasulyesinden elde edilen Konkanavalin A çözeltisi (saf numune) sisteme verilmiş ardından desorpsiyon solüsyonu ile (0.1 M NaCl) bağlanan Konkanavalin A molekülleri uzaklaştırılmıştır. Sırasıyla 1.0 ng/mL ve 2.5 ng/mL derişimindeki çözeltiler için de aynı işlemler tekrarlanmıştır. Kinetik analizler sonucunda elde edilen sensorgramlar elde edilen $\% \Delta R$ değerleri $y=1,9759x-0,0301$ denkleminde yerine konulduğunda çözeltiler içerisindeki Konkanavalin A miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör ile soya fasulyesinden elde Konkanavalin A'nın tayinine ait kinetik analiz sensorgramları.

SPR kinetik analizlerinde soya fasulyesi özütüne 1.0 ng/mL Konkanavalin A eklendiğinde geri kazanım %96 iken 2.5 ng/mL derişimde Konkanavalin A eklendiğinde geri kazanım %99.40 olarak hesaplanmıştır. Soya fasulyesinden Konkanavalin A tayini için yapılan kinetik analizler sonucunda elde edilen veriler kullanılarak tayin sınırı (LOD) ve tayin limiti (LOQ) değerleri de hesaplanmıştır. Kör çözelti için (ΔR) değeri 5 ölçümün ortalaması alınarak, ölçümlere ait standart sapma değeri ile birlikte SPR biyosensörler için sırasıyla 0.0008 olarak belirlenmiştir. Buna göre kalibrasyon grafiğine ait $y=1.9759x-0.0301$ denklemi kullanılarak tayin sınırı 0.0012 ng/mL ve tayin limiti 0,0040 ng/mL olarak bulunmuştur.

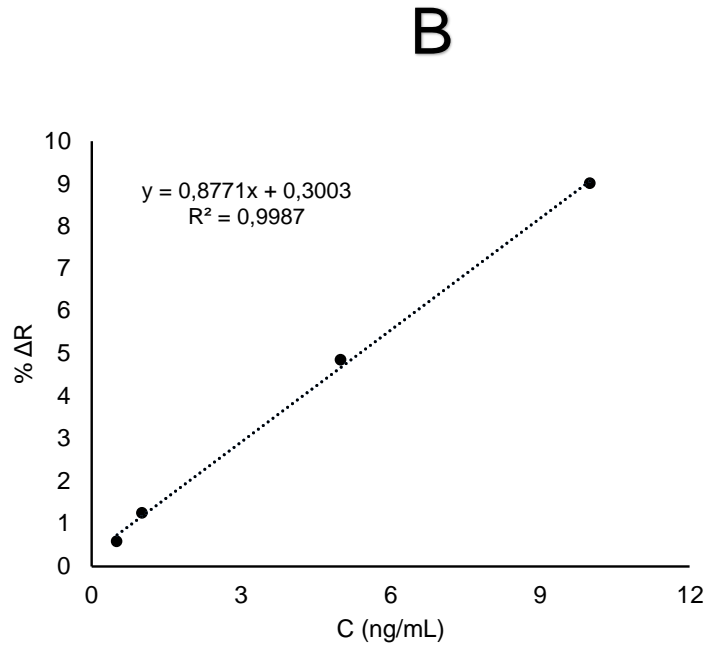
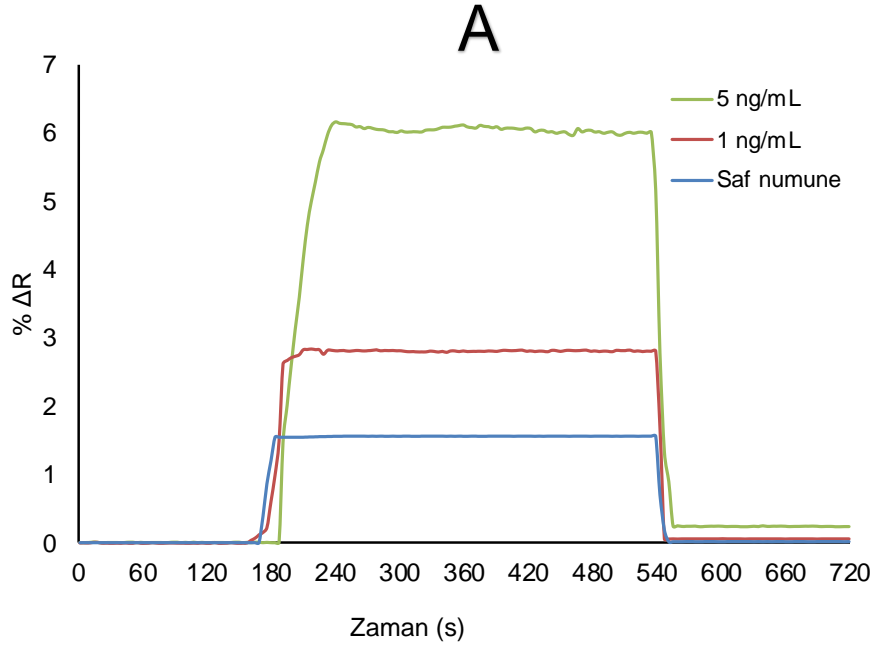
Çizelge 4.5 Konkanavalin A baskılanmış SPR sensörlerin jack bean örneklerinde bulunan Konkanavalin A Analiz Sonuçları (n:3)

Eklene Con A Miktarı (ng/mL)	Bulunan Con A Miktarı (ng/mL)	Geri Kazanım (%)
1.0 ng/mL	0.963±0.009	96.25±0.009
2.5 ng/mL	2.485±0.006	99.40±0.231

4.1.6. Yapay Kontrol Plazma Ortamında Farklı Derişimlerde Hazırlanmış Konkanavalin A Örneklerinin Konkanavalin A Baskılanmış Biyosensörle Kinetik Analizleri

Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün yapay kontrol plazma ortamından Konkanavalin A tayini için kinetik analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için yapay kontrol plazma içerisine 1 ng/mL ve 5 ng/mL derişimlerinde Konkanavalin A içeren sulu çözeltiler hazırlanmıştır. SPR biyosensörde kinetik analizler gerçekleştirilmiş ve sensorgramlar elde edilmiştir (Şekil 4.12). Elde edilen $\% \Delta R$ değerleri $y=0.8771x+0.3003$ denkleminde yerine konulduğunda çözeltiler içerisindeki Konkanavalin A miktarları hesaplanmıştır. Tayin sınırı (LOD) ve tayin limiti (LOQ) hesaplamak için denge çözelti için (ΔR) elde edilen 5 datanın ortalaması hesaplanıp,

ölçülen data'lara ait standart sapma değeri ile birlikte SPR biyosensörler için sırasıyla 0.0004 olarak belirlenmiştir. Buna göre kalibrasyon grafiğine ait $y=0.8771x+0.3003$ denklemi kullanılarak tayin sınırı (LOD) 0.0014 ng/mL ve tayin limiti (LOQ) 0,0046 ng/mL olarak belirlenmiştir.



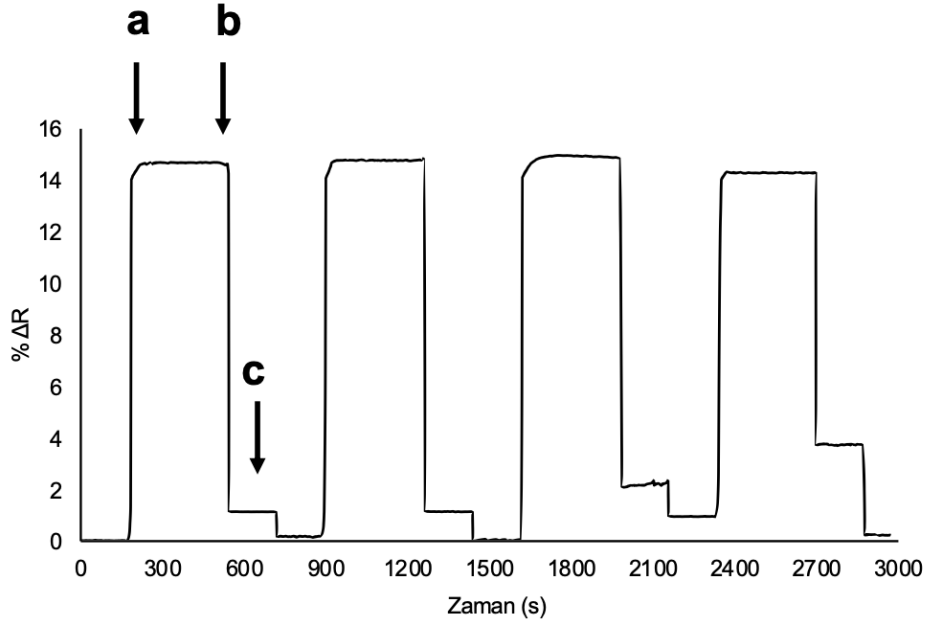
Şekil 4.12. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör ile yapay plazma örneklerinde Konkanavalin A tayinine ait kinetik analiz SPR sensorgramları (A) ve kalibrasyon grafiği (B).

Çizelge 4.6 Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün yapay plazma örneklerinde bulunan Konkanavalin A tayini için kinetik analiz sonuçları (n:3).

Eklenen Konkanavalin A Miktarı (ng/mL)	Bulunan Konkanavalin A Miktarı (ng/mL)	Geri Kazanım (%)
	SPR	SPR
1.0 ng/mL	0.978±0.005	97.75±0.500
5.0 ng/mL	4.943±0.009	98.85±0.191

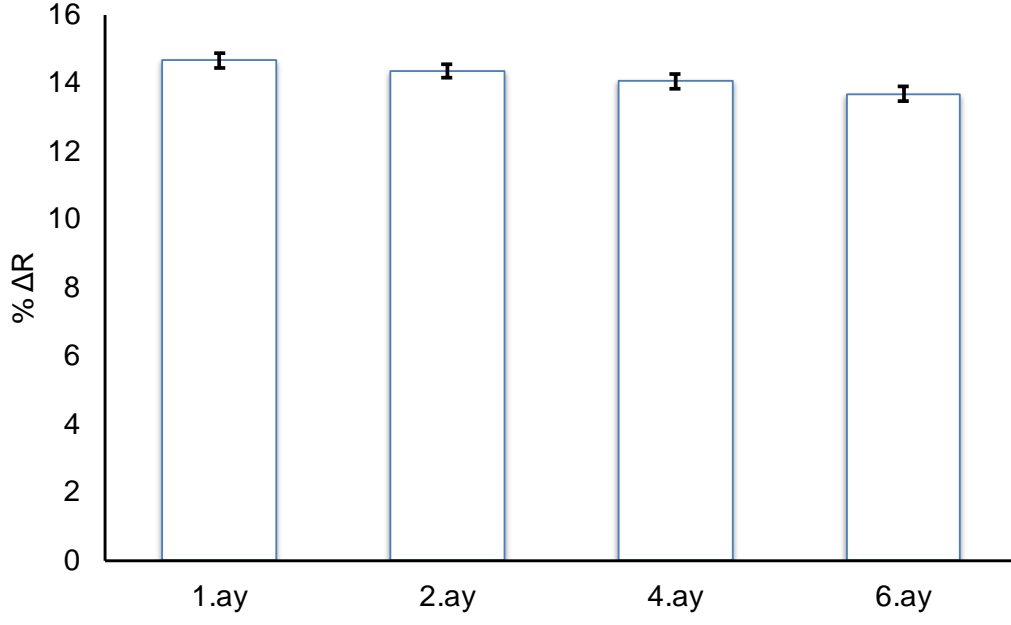
4.1.7. SPR Biyosensörlerin Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

Konkanavalin A tayini için SPR biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan moleküler baskılama yönteminin en önemli özelliği sentezlenen polimerik yapının çevre koşullarına karşı dayanıklı olmasıyla raf ömürlerinin uzun ve tekrar tekrar kullanılabilir olmalarıdır [87]. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliğinin kanıtlanması amacıyla aynı gün içerisinde peş peşe 4 tekrarlı kinetik analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13). Tekrar kullanımın belirlenmesi için kinetik analizler 2 dakika pH 7.4 fosfat tamponu, 6 dakika örnek çözeltisi ve 2 dakika ise 0.1 M NaCl desorpsiyon çözeltisi geçirilerek gerçekleştirilmiştir. Analiz sonrasında elde edilen veriler SPRview yazılım programı ile belirlenerek elde edilen kinetik analiz sonuçları SPR sensorgramlarında % ΔR değerleri olarak hesaplanmıştır. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörlerde art arda yapılmış olan bu analize sırasında SPR sinyalinde bir azalma gözlenmemiş ve verimlilik değeri %97.45 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün aynı gün içindeki tekrar kullanılabilirliği (a: adsorpsiyon, b: desorpsiyon, c: rejenerasyon).

Farklı zamanlarda da (1.ay, 2.ay, 4.ay ve 6. Ay sonra) Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün tekrar kullanılabilirliği test edilmiş ve 10 ng/mL derişimde hazırlanmış Konkanavalin A sulu çözeltileri ile kinetik analizler gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.14). Elde edilen kinetik analiz sonuçları SPR sensorgramlarından SPR biyosensoörün verimliliğini %92.15 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, Konkanavalin A baskılanmış, SPR biyosensoörlerin tekrar tekrar kullanılabilirliğinin farklı zamanlarda da kinetik analizlerde verimliliğinin ve kararlılığın yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.14. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün farklı zamanlarda tekrar kullanılabilirliği.

5.YORUM

Bu tez çalışmasında, moleküler baskılama tekniği kullanılarak Konkanavalin A tayini için yüksek seçicilikte Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensör tasarlanmıştır. İlk olarak, SPR çip yüzeyi asidik pirana çözeltisi ile temizlenerek hidroksile edilmiştir ve daha sonra allil merkaptan ile modifiye edilmiştir. Ön polimerizasyon kompleksini hazırlamak için kalıp molekül olarak kullanılan Konkanavalin A, monomer olarak N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) kullanılmıştır. MAH:Ni(II):Con A ön polimerizasyon kompleksini oluşturmadan sitokiyometrik olarak birleşme oranlarını tayin etmek için farklı molar oranlarında MAH:Ni(II):Con A (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 M) kompleksleri ile baskılanmış ve baskılanmamış SPR çipler hazırlanmıştır. Elde edilen sensorgramlar incelendiğinde kırılma indisi 1:4 M oranına ön polimerizasyon kompleksinde hazırlanan SPR biyosensör kinetik analizinde artarak devam etmiş, 1:8 M oranında ön polimerizasyon kompleksinde hazırlanan SPR biyosensör kinetik analizinde ise azalma göstermiştir. Bu sebeple uygun ön polimerizasyon kompleks molar oranı 1:4 M olarak belirlenmiştir.

SPR biyosensörlerinin yüzey karakterizasyonu yarı temas modunda atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile görüntülenmiştir. Baskılama yapılmamış SPR çip yüzeyinin pürüzlülüğü 38.91 nm iken, baskılama işlemi yapılan SPR çip yüzeyi 41.66 nm bulunmuştur. Bu sonuç baskılama işleminin başarılı gerçekleştiğini ve bundan dolayı yüzeyin pürüzlülüğünde bir artış olduğunu göstermektedir.

Allil merkaptan ile modifiye edilmiş, Konkanavalin A baskılanmış ve baskılanmamış SPR çip yüzey kalınlık ölçümü elipsometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmiş SPR çip yüzey kalınlığı 62.8 nm, Konkanavalin A baskılanmamış SPR çip ortalama yüzey kalınlığı 106 nm ve Konkanavalin A baskılanmış SPR çip ortalama yüzey kalınlığı 110 nm olarak bulunmuştur.

Karakterizasyon işlemleri bittikten sonra kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Tüm kinetik analizlerde 2 dakika tampon çözeltisi ile yüzeyin dengeye gelmesinin sağlanması, 6 dakika kullanılan çözelti ile adsorpsiyon süreci, 2 dakika ise desorpsiyon işlemi için kullanılmış, toplam 10 dakika kinetik analiz süresi olarak belirlenmiştir.

Kinetik analizlerde ilk olarak Konkanavalin A molekülü için uygun pH değerinin belirlenmesi amacıyla farklı fosfat tamponlarında pH taraması çalışması

gerçekleştirilmiştir. Sensorgramlar SPRview yazılımı ile incelenmiştir. pH 7.4 fosfat tamponunda en yüksek kırılma indisi görülmüştür ve en uygun pH değeri belirlenmiştir.

Bir diğer kinetik analiz çalışmasında ise farklı derişimlerde hazırlanmış Konkanavalin A çözeltisine ait sensorgramlar elde edilmiştir. Çalışma neticesinde Konkanavalin A derişimi arttıkça kırılma indisi yüzdesinde de bir artış görülmüştür. Buradan Konkanavalin A çözeltisi ile SPR biyosensör yüzeyi arasındaki itici güç olan derişim farklılığının arttığı sonucuna varabiliriz. Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörler için kinetik analiz verileri kullanılarak Langmuir, Freundlich ve Langmuir- Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde en uygun modelin Langmuir izoterm modeli olduğu sonucuna varılmıştır.

Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün Konkanavalin A molekülüne karşı seçiciliğini belirlemek amacıyla sığır serum albümin ve miyogloblin yarışmacı molekülleri ile seçicilik analizleri gerçekleştirilmiştir. Kinetik analizler incelendiğinde Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün Konkanavalin A molekülü ile girdiği etkileşimde en yüzde yüksek kırılma indisi değeri gözlenmiştir. Bu da Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörün Konkanavalin A molekülüne karşı özgünlüğünü göstermektedir.

Konkanavalin A baskılanmış biyosensörün gerçek örnekten analizi için soya fasulyesinden Konkanavalin A izole edilmiştir. Saf gerçek numune ve saf numune içerisine 2.5 ng/mL ve 1.0 ng/mL derişiminde ticari ürün ile hazırlanan Konkanavalin A çözeltileri kullanılarak kinetik analizler yapılmış, sensorgramlar alınarak miktar ve geri kazanımlar hesaplanmıştır. Ayrıca yapay kontrol plazma ortamında hazırlanan 1.0 ng/mL ve 5.0 ng/mL derişimlerdeki Konkanavalin A çözeltileri ile de sensorgramlar elde edilmiş ve geri kazanım hesaplanmıştır.

Konkanavalin A baskılanmış SPR biyosensörlerin tekrarlanabilirliğinin ve biyosensörün kullanım ömrünün tespiti amacıyla aynı gün içerisinde peş peşe 4 tekrarlı kinetik analizler yapılmış ek olarak 1.ay, 2.ay, 4.ay ve 6. aylarda aynı kinetik analizler tekrarlanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, Konkanavalin A tayin analizlerinde SPR biyosensörün performansında dikkate değer bir azalma olmadığı gözlemlenmiştir.

6.KAYNAKLAR

- [1] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, *Chem. Soc. Rev.* 45 (2016) 2137–2211.
- [2] Z. El-Schich, Y. Zhang, M. Feith, S. Beyer, L. Sternbæk, L. Ohlsson, M. Stollenwerk, A.G. Wingren, *Biotechniques* 69 (2020) 407–420.
- [3] P. Mehrotra, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 6 (2016) 153–159.
- [4] M.A. Cooper, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 515–528.
- [5] C.D. Helmerhorst, Erik; Chandler; David J; Nussio, Matt; Mamotte, *Clin Biochem Rev.* 33 (n.d.) 161–173.
- [6] T. Takagishi, I.M. Klotz, *Biopolymers* 11 (1972) 483–491.
- [7] A. Poma, A.P.F. Turner, S.A. Piletsky, *Trends Biotechnol.* 28 (2010) 629–637.
- [8] A. Bossi, F. Bonini, A.P.F. Turner, S.A. Piletsky, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1131–1137.
- [9] S. Scorrano, L. Mergola, R. del Sole, G. Vasapollo, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 1735–1743.
- [10] L. Longo, G. Vasapollo, *Mini. Rev. Org. Chem.* 5 (2008) 163–170.
- [11] V. Pichon, F. Chapuis-Hugon, *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 48–61.
- [12] F.G. Tamayo, J.L. Casillas, A. Martin-Esteban, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1234–1240.
- [13] F. Puoci, G. Cirillo, M. Curcio, F. Iemma, U.G. Spizzirri, N. Picci, *Anal. Chim. Acta* 593 (2007) 164–170.
- [14] C. Baggiani, L. Anfossi, C. Giovannoli, *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 29–39.
- [15] G. Vasapollo, R. Del Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 5908–5945.
- [16] A.G. Mayes, M.J. Whitcombe, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1742–1778.
- [17] D.A. Spivak, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1779–1794.
- [18] K.Ç. GÜLER, DİKLOFENAK BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS TEMELLİ BİYOSENSÖRÜN HAZIRLANMASI, 2014.
- [19] X. Jiang, N. Jiang, H. Zhang, M. Liu, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 355–368.
- [20] H. Yan, H.R. Kyung, *Int. J. Mol. Sci.* 7 (2006) 155–178.
- [21] O. Ramström, K. Mosbach, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3 (1999) 759–764.
- [22] C. Alexander, H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, J. O'Mahony, M.J. Whitcombe, *J. Mol. Recognit.* 19 (2006) 106–180.
- [23] H. Kim, D.A. Spivak, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 11269–11275.
- [24] R.J. Umpleby, G.T. Rushton, R.N. Shah, A.M. Rampey, J.C. Bradshaw, J.K. Berch, K.D. Shimizu, *Macromolecules* 34 (2001) 8446–8452.
- [25] I. Mijangos, F. Navarro-Villoslada, A. Guerreiro, E. Piletska, I. Chianella, K. Karim, A. Turner, S. Piletsky, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 381–387.
- [26] S.A. Piletsky, H.S. Andersson, I.A. Nicholls, *Macromolecules* 32 (1999) 633–636.
- [27] K. H. E. Müller, Axel, Matyjaszewsk, *Controlled and Living Polymerizations: From Mechanisms to Applications*, 2009.
- [28] C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*, 2013.
- [29] G. Ertürk, B. Mattiasson, *Sensors (Switzerland)* 17 (2017) 1–17.
- [30] O. Brüggemann, K. Haupt, L. Ye, E. Yilmaz, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 15–24.
- [31] P.A. Lieberzeit, S. Gazda-Miarecka, K. Halikias, C. Schirk, J. Kauling, F.L. Dickert, *Sensors Actuators, B Chem.* 111–112 (2005) 259–263.
- [32] U. Latif, A. Mujahid, A. Afzal, R. Sikorski, P.A. Lieberzeit, F.L. Dickert, *Anal.*

- Bioanal. Chem. 400 (2011) 2507–2515.
- [33] T.P. Rao, R. Kala, S. Daniel, *Anal. Chim. Acta* 578 (2006) 105–116.
- [34] M.J. Whitcombe, I. Chianella, L. Larcombe, S.A. Piletsky, J. Noble, R. Porter, A. Horgan, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 1547–1571.
- [35] P. Zahedi, M. Ziaee, M. Abdouss, A. Farazin, B. Mizaikoff, *Polym. Adv. Technol.* 27 (2016) 1124–1142.
- [36] X. Hu, G. Li, J. Huang, D. Zhang, Y. Qiu, *Adv. Mater.* 19 (2007) 4327–4332.
- [37] L. Qin, X.W. He, X. Yuan, W.Y. Li, Y.K. Zhang, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3375–3385.
- [38] A.L. Hillberg, M. Tabrizian, *Itbm-Rbm* 29 (2008) 89–104.
- [39] A. Mujahid, N. Iqbal, A. Afzal, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1435–1447.
- [40] H. Nishino, C.S. Huang, K.J. Shea, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 45 (2006) 2392–2396.
- [41] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, P. Estrela, *Essays Biochem.* 60 (2016) 1–8.
- [42] S.K. Sharma, N. Sehgal, A. Kumar, 3 (2003) 307–316.
- [43] R. Monošík, M. Stredánský, E. Šturdík, *Acta Chim. Slovaca* 5 (2012) 109–120.
- [44] T. Vo-Dinh, B. Cullum, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 366 (2000) 540–551.
- [45] F. Yang, Y. Ma, S.G. Stanciu, A. Wu, *Nanobiosensors* (2020) 23–44.
- [46] V. Naresh, N. Lee, *Sensors (Switzerland)* 21 (2021) 1–35.
- [47] R. Wood, *Philosophical Mag.* 4 (1902) 396–402.
- [48] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, 10 (1995).
- [49] F. Blaesing, C. Weigel, M. Welzeck, W. Messer, *Mol. Microbiol.* 36 (2000) 557–569.
- [50] D. Çimen, S. Aslıyüce, T.D. Tanalp, A. Denizli, *Anal. Biochem.* 632 (2021).
- [51] A. Çimen, D., Üzek, R., Günaydın, S., & Denizli, *ChemistrySelect* 6 (2021) 9435–9441.
- [52] P. Pattnaik, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 126 (2005) 79–92.
- [53] J. Homola, *Chem. Rev.* 108 (2008) 462–493.
- [54] J. Homola, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 528–539.
- [55] A.P. Vinogradov, A. V Dorofeenko, A.A. Pukhov, A.A. Lisyansky, (n.d.) 1–23.
- [56] C. Boozer, G. Kim, S. Cong, H.W. Guan, T. Londergan, *Curr. Opin. Biotechnol.* 17 (2006) 400–405.
- [57] D. Çimen, N. Bereli, S. Günaydın, A. Denizli, *Talanta* 219 (2020) 121259.
- [58] D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, *Biosensors* 11 (2021).
- [59] Y. Saylan, S. Akgönüllü, D. Çimen, A. Derazshamshir, N. Bereli, F. Yılmaz, A. Denizli, *Sensors Actuators, B Chem.* 241 (2017) 446–454.
- [60] N. Bereli, D. Çimen, S. Hüseyinli, A. Denizli, *J. Food Sci.* 85 (2020) 4152–4160.
- [61] R.L. Rich, D.G. Myszká, *J. Mol. Recognit.* 18 (2005) 431–478.
- [62] W. wen Li, J. ying Yu, H. long Xu, J. ku Bao, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414 (2011) 282–286.
- [63] D. Çimen, N. Bereli, M. Andaç, A. Denizli, *Sep. Sci. Plus* 1 (2018) 454–463.
- [64] G. Razym, M. Bakhshpour, H. Yavuz, Ç. Kip, A. Tuncel, A. Denizli, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1136 (2020) 121852.
- [65] G.N. Reeke, J.W. Becker, B.A. Cunningham, J.L. Wang, I. Yahara, G.M. Edelman, *Adv. Exp. Med. Biol.* 55 (1975) 13–33.
- [66] N. Idil, I. Perçin, V. Karakoç, H. Yavuz, N. Aksöz, A. Denizli, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 134 (2015) 461–468.
- [67] E.G. De Mejia, T. Bradford, C. Hasler, *Nutr. Rev.* 61 (2003) 239–246.
- [68] A. Meyer, W. Rypniewski, M. Szymański, W. Voelter, J. Barciszewski, C. Betzel, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1784 (2008) 1590–1595.

- [69] G. V. Faheina-Martins, A.L. da Silveira, B.C. Cavalcanti, M. V. Ramos, M.O. Moraes, C. Pessoa, D.A.M. Araújo, *Toxicol. Vitro*. 26 (2012) 1161–1169.
- [70] I.J. Goldstein, H.C. Winter, R.D. Poretz, Chapter 12 Plant Lectins: Tools for the Study of Complex Carbohydrates, Elsevier Masson SAS, 1997.
- [71] R. Akçapınar, B. Garipcan, V. Goodarzi, L. Uzun, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 578 (2021) 42–62.
- [72] E.H. Kim, D.E. Misek, *Int. J. Proteomics* 2011 (2011) 1–10.
- [73] N. Bereli, D. Çimen, A. Denizli, *IEEE Sens. J.* 21 (2021) 13215–13222.
- [74] O. Payton, A.R. Champneys, M.E. Homer, L. Picco, M.J. Miles, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 467 (2011) 1801–1822.
- [75] S. Faalnouri, D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, *ChemistrySelect* 5 (2020) 4761–4769.
- [76] E.E. Bormashenko, in: 432, 2013, pp. 38–41.
- [77] F. Kartal, D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, *Mater. Sci. Eng. C* 97 (2019) 730–737.
- [78] C.F. Huang, G.H. Yao, R.P. Liang, J.D. Qiu, *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 305–310.
- [79] C. Wang, M. Li, P. Wang, D. Liu, *Microchim. Acta* 187 (2020).
- [80] Q. Chen, W. Wei, J.M. Lin, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4497–4502.
- [81] X. Li, Y. Wang, L. Shi, H. Ma, Y. Zhang, B. Du, D. Wu, Q. Wei, *Biosens. Bioelectron.* 96 (2017) 113–120.
- [82] H. Zhang, C. Zhang, D. Liu, F. Zuo, S. Chen, R. Yuan, W. Xu, *Biosens. Bioelectron.* 120 (2018) 40–46.
- [83] H. Sha, Y. Zhang, Y. Wang, H. Ke, X. Xiong, N. Jia, *Biosens. Bioelectron.* 124–125 (2019) 59–65.
- [84] J. Zhang, S. Chen, Y. Ruo, X. Zhong, X. Wu, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 447–453.
- [85] S.K. Papageorgiou, F.K. Katsaros, E.P. Kouvelos, N.K. Kanellopoulos, *J. Hazard. Mater.* 162 (2009) 1347–1354.
- [86] D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, *Photonic Sensors* 12 (2022) 117–129.
- [87] D. Çimen, A. Denizli, *Photonic Sensors* 10 (2020) 316–332.

