

**LİZOZİM TAYİNİ İÇİN LİZOZİM BASKILANMIŞ YÜZEY
PLAZMON REZONANS ÇİPLER**

**LYSOZYME IMPRINTED SURFACE PLASMON
RESONANCE CHIPS FOR LYSOZYME DETECTION**

ŞEYMA ERİŞ

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

LİZOZİM TAYİNİ İÇİN LİZOZİM BASKILANMIŞ YÜZEY PLAZMON REZONANS ÇİPLER

Şeyma ERİŞ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Ocak 2024, 55 sayfa

Vücutta doğal bir antimikrobiyal savunma mekanizmasına yardımcı olan lizozim, çeşitli dokularda bulunarak mikroorganizmaların hücre duvarlarını parçalayarak etki gösterir. Bu özelliği sayesinde, vücudu bir dizi patojen mikroorganizmadan koruyan önemli bir bileşen olarak kabul edilir. Alzheimer, Chron gibi bazı hastalıkların teşhisi için lizozim tespiti kritik bir öneme sahiptir. Bu tez çalışması, moleküler baskılama tekniğini kullanarak hazırlanan lizozim baskılanmış yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörlerin, sulu çözeltiler ve yapay örnekler üzerinde lizozim tayini için kullanılmasını içermektedir. Altın nanopartiküllerin (AuNP) kullanıldığı bu çalışmalarda, AuNP'lerin sağladığı sinyal kazancı dikkat çekicidir. Lizozim baskılanmış polimerik film (MIP), lizozim baskılanmış altın nanopartikül temelli polimerik film (AuNP-MIP) ve baskılanmamış altın nanopartikül temelli polimerik film (AuNP-NIP) SPR sensörleri, analizler ve karşılaştırmalar üzerinden detaylı bir şekilde incelenmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış biyosensörlerin lizozim tespit duyarlılığı, lizozim çözeltileri (pH: 7.4 fosfat tamponunda), yapay idrar, yapay gözyaşı ve yapay plazma kullanılarak araştırılmıştır. Lizozim baskılanmış ve altın nanopartikül kullanılarak hazırlanan sensörler, baskılanmamış ve altın nanopartikül kullanılarak hazırlanmış sensörlere göre

lizozime daha fazla duyarlılık göstermiştir. Adsorpsiyon kinetiklerinin belirlenmesi için farklı derişimlerde lizozim çözeltileri kullanılmıştır. AuNP-MIP SPR sensörde kinetik analiz verileri kullanılarak en düşük tayin limiti (LOD) 0.008 µg/mL ve en düşük miktar limiti (LOQ) 0.026 µg/mL olarak hesaplanmıştır. MIP sensörlerde ise bu değerler LOD 0.095 µg/mL iken LOQ 0.317 µg/mL olarak belirlenmiştir. Lizozim baskılanmış AuNP-MIP ve MIP sensörlerin seçiciliğini göstermek için lizozim, miyoglobin ve hemoglobin yarışmacı ajanları kullanılmıştır. Seçicilik deneyleri sonucunda, lizozimin hazırlanan AuNP-MIP ve MIP sensörlere yüksek seçicilik ve duyarlılıkta olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, lizozim tespiti alanında yeni ve etkili sensörlerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Lizozim, biyosensör, moleküler baskılama, yüzey plazmon rezonans.

ABSTRACT

LYSOZYME IMPRINTED SURFACE PLASMON RESONANCE CHIPS FOR LYSOZYME DETECTION

Şeyma ERİŞ

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

January 2024, 55 pages

Lysozyme, a natural antimicrobial defense mechanism in the body, acts by breaking down the cell walls of microorganisms and is found in various tissues. Due to this property, it is considered an important component that protects the body from a range of pathogenic microorganisms. The detection of lysozyme is crucial for the diagnosis of certain diseases such as Alzheimer's and Crohn's. This thesis involves the use of molecular imprinting techniques to prepare lysozyme-imprinted surface plasmon resonance (SPR) sensors for the determination of lysozyme in aqueous solutions and artificial samples.

In these studies, gold nanoparticles (AuNPs) are used, and the signal amplification provided by AuNPs is remarkable. Lysozyme-imprinted polymeric film (MIP), lysozyme-imprinted gold nanoparticle-based polymeric film (AuNP-MIP), and non-imprinted gold nanoparticle-based polymeric film (AuNP-NIP) surface plasmon resonance (SPR) sensors have been thoroughly examined through analyses and comparisons. The lysozyme detection sensitivity of imprinted and non-imprinted biosensors is investigated using lysozyme solutions (pH: 7.4 phosphate buffer), artificial urine, artificial tears, and artificial plasma. Sensors prepared with lysozyme imprinting and gold nanoparticles show higher

sensitivity to lysozyme compared to non-imprinted and gold nanoparticle-prepared sensors.

Lysozyme solutions at different concentrations are used to determine the adsorption kinetics. Using kinetic analysis data from AuNP-MIP SPR sensors, the limit of detection (LOD) is calculated as 0.008 $\mu\text{g/mL}$, and the limit of quantification (LOQ) is 0.026 $\mu\text{g/mL}$. For MIP sensors, these values are determined as LOD 0.095 $\mu\text{g/mL}$ and LOQ 0.317 $\mu\text{g/mL}$, respectively. To demonstrate the selectivity of lysozyme-imprinted AuNP-MIP and MIP sensors, competitive agents such as myoglobin and hemoglobin are used. Selectivity experiments show that lysozyme exhibits high selectivity and sensitivity for the prepared AuNP-MIP and MIP sensors.

The results of this study contribute to the development of new and effective sensors in the field of lysozyme detection.

Keywords: Lysozyme, biosensors, molecular printed, surface plasmon resonance.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca engin bilgi birikimi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini, güler yüzünü benden esirgemeyen çok kıymetli danışman hocam Prof.Dr. Adil DENİZLİ'ye,

Çalışmalarım boyunca, sonsuz sabrı ve anlayışıyla bu süreçte ilerleyebilmemi sağlayan ve sevgisini eksik etmeyen, beni her zaman cesaretlendiren çok değerli hocam Doç.Dr. Duygu ÇİMEN'e,

Beni her zaman güler yüzleriyle karşılayan ve desteklerini hissettiren değerli BİOREG ailesine ve hocalarına,

İlk iş hayatına adım attığım dönemde birlikte çalışma fırsatına sahip olduğum, iş arkadaşından çok bana yol gösterici olan, her zaman daha iyiye gitmemi teşvik eden, bu yolculukta yardımlarını ve tecrübelerini benden hiç esirgemeyen çok değerli hocalarım Dr. Esra KENDİR TEKGÜL'e ve Doç.Dr. Atakan TEKGÜL'e,

Bu süreçte desteğini ve tavsiyelerini benden esirgemeyen, enerjisiyle beni her daim motive eden canım hocam Esra ARMAN KARAASLAN'a,

Hayatımın bütün anlarında yanımda olan, bıkmadan usanmadan beni dinleyen, yanımdayken tüm dertlerimi unuttuğum, akademik başarısını örnek aldığım can yoldaşım, sevgili dostum Araş.Gör. H.Kübra Özdoğan'a,

Bana iyi bir insan olmayı öğreten, sevgileriyle büyüterek beni bu noktaya getiren, desteklerini her zaman arkamda hissettiğim canım annem Kadriye ERİŞ'e, canım babam Yusuf ERİŞ'e ve bir tanecik abim Burak ERİŞ'e,

Bu yolculuğu bitirebilmemde büyük katkısı olan, beni her koşulda destekleyen, düştüğüm zamanlarda kalkıp devam etmemi sağlayan yol arkadaşım Ömer Faruk RESULOĞLU'na,

sonsuz teşekkür ederim..

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Lizozim	4
2.1.1. Lizozim Tayin Yöntemleri	7
2.2. Moleküler Baskılama Yöntemi	8
2.2.1. Moleküler Baskılama Teknikleri	12
2.2.1.1. Kovalent Baskılama	12
2.2.1.2. Kovalent Olmayan Baskılama	12
2.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)	13
2.3.1. Yüzey Plazmon Rezonans Sensörler	15
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	17
3.1. Kimyasal Malzemeler	17
3.2. SPR Sensör Yüzey Modifikasyonu	17
3.3. Lizozim Baskılanmış ve Baskılanmış SPR Sensörlerin Hazırlanması	17
3.3.1. AuNP-MIP sensörlerin hazırlanması	19
3.3.2. AuNP-NIP sensörlerin hazırlanması	19
3.3.3. MIP sensörlerin hazırlanması	20
3.4. Karakterizasyon Çalışmaları	20
3.4.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi	20
3.4.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu(TEM)	21
3.4.3. Temas Açısı Ölçümleri	21

3.5. Kinetik Analizler	22
3.5.1. Seçicilik Çalışmaları	23
3.5.2. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları	23
3.5.3. Yapay plazma, gözyaşı ve idrar örneklerinden lizozim tayini	24
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	25
4.1. SPR Sensörlerin Karakterizasyon Çalışmaları	25
4.1.1. Temas Açısı Ölçümleri	25
4.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskopisi.....	26
4.1.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM).....	26
4.2. Kinetik Analizler	27
4.3. SPR Sensörlerin Seçiciliklerinin İncelenmesi.....	36
4.4. Yapay plazma, idrar ve göz yaşı örneklerden lizozim tayini.....	39
4.5. Tekrar Kullanabilirliğin İncelenmesi	41
5. YORUM	43
6. KAYNAKLAR	46
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	54
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hindi Yumurta Lizozim Kompleksinin X-Ray Yapısı.....	4
Şekil 2.2. Lizozim Kimyasal Yapısı	5
Şekil 2.3. Moleküler Baskılama Yönteminin Şematik Gösterimi	10
Şekil 2.4. Yüzey plazmon rezonans sensörün şematik gösterimi.	14
Şekil 3.1. Lizozim Baskılanmış SPR Sensörlerin Hazırlanmasının Şematik Gösterimi	18
Şekil 3.2. Temas Açısı Ölçüm Cihazı	22
Şekil 3.3. SPR Sensör Analiz Cihazı.....	23
Şekil 4.1. Modifiye edilmemiş SPR altın çip yüzeyi (A), MIP (B), AuNP-MIP (C) ve AuNP-NIP (D) SPR sensör yüzeylerinin temas açısı fotoğrafları	25
Şekil 4.2. SPR sensör yüzeylerin yarı temas modunda alınan AFM görüntüleri A) Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, B) MIP, C) AuNP-MIP ve D) AuNP-NIP sensör yüzeyleri.....	26
Şekil 4.3. AuNP-MIP sensör yüzeyinin TEM görüntüsü.....	27
Şekil 4.4. AuNP-MIP SPR sensörün 0.01-500 µg/mL arasındaki lizozim derişimleri için elde edilen sensorgramları.	28
Şekil 4.5. MIP SPR sensörün 0.5-500 µg/mL arasındaki lizozim derişimleri için elde edilen sensorgramları.	28
Şekil 4.6. 0.01-500 µg/mL aralığında lizozim derişimi ile %ΔR arasındaki ilişki.	29
Şekil 4.7. 0.01-500 µg/mL aralığında lizozim derişimi ile %ΔR arasındaki ilişki.	30
Şekil 4.8. Bağlanma kinetik yaklaşımı (A) ve Denge analiz yaklaşımı (B).	33
Şekil 4.9. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri.....	35
Şekil 4.10. AuNP-MIP (A) ve AuNP-NIP (B) SPR sensörlere ait seçicilik sensorgramları.....	37
Şekil 4.11. AuNP-MIP SPR sensör ile yapay plazma, yapay idrar ve yapay gözyaşı örneklerinde lizozim tayinine ait kinetik analiz sensorgramları.	40
Şekil 4.12. AuNP-MIP SPR sensörün tekrar kullanılabilirlik sensorgramı.....	41
Şekil 4.13. AuNP-MIP SPR sensörün farklı zamanlarda tekrar kullanılabilirlik sensorgramı	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Çeşitli lizozim kaynaklarında bulunan lizozim miktarları	6
Çizelge 2.2. Lizozimin kimyasal özellikleri.....	6
Çizelge 2.3. Çeşitli örneklerde bulunan lizozim içerikleri.....	7
Çizelge 2.4. Doğal Biyomolekül ve MIP arasındaki farklar	10
Çizelge 2.5. Moleküler Baskılama Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları	15
Çizelge 4.1. Lizozim tespitine yönelik literatürdeki bazı çalışmalar	31
Çizelge 4.2.Kinetik hız sabitleri	34
Çizelge 4.3.Adsorpsiyon izoterm modellerin parametreleri	36
Çizelge 4.4. Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

kDa: Kilo dalton

C : Analit derişimi

k_a : Bağlanma hız sabiti

k_d : Ayrılma hız sabiti

K_A : Bağlanma sabiti

K_D : Ayrılmaz sabiti

Kısaltmalar

SPR Yüzey Plazmon Rezonans

MIP Moleküler Baskılanmış Polimer

AuNP-MIP Altın Nanopartikül ile Modifiye Moleküler Baskılanmış Polimer

AuNP-NIP Altın Nanopartikül ile Modifiye Baskılanmamış Polimer

ELISA Enzime Bağlı Immünosorban Yöntem

AIBN Azoizobisbütironitril

EGDMA Etilen Glikol Dimetakrilat

HEMA 2-hidroksietilmetakrilat

HPLC Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi

LOD En düşük tayin limiti

LOQ En düşük miktar limiti

1. GİRİŞ

Antimikrobiyal bir enzim olarak bilinen lizozim, vücutta yer alan birçok dokuda bulunmaktadır. Lizozim, hidrolitik olarak çalışır ve bakteri, virüs ve mantar gibi mikroorganizmaların hücre duvarını parçalar. Böylece, vücudun bakteri, virüs ve mantar gibi mikroorganizmalara karşı korunmasına yardımcı olan sistemin bir parçası haline gelmektedir [1]. Özellikle beyaz kan hücreleri ve mukoza dokularında fazla miktarda bulunmaktadır. Vücudun direncini arttırmada öneme sahip olan lizozim, enfeksiyon, soğuk algınlığı, bronşit, astım, lösemi, kanser, Crohn hastalığı ve romatoid artrit gibi birçok hastalığın tanısında da büyük öneme sahiptir [2]. Lizozimin elde edildiği en yaygın kaynak olarak tavuk yumurtası akı gösterilmektedir.

Kimyasal yöntemler, lizozimin kimyasal özelliklerini kullanarak tespitini sağlar ve genellikle reaktiflerle yapılan özel reaksiyonlara dayanır [3]. Enzimatik yöntemler, lizozimin doğal bir enzim olduğu gerçeğinden yola çıkarak spesifik enzimatik reaksiyonları kullanır [4]. İmmünolojik yöntemler, lizozim moleküllerini özel antikolar aracılığıyla tanıyarak tespit eder ve genellikle immünolojik reaksiyonlara dayalıdır [5]. Spektroskopik yöntemler ise lizozimin özellikle UV-Vis spektroskopisi veya kızılötesi spektroskopi gibi ölçüm tekniklerini kullanarak analizini sağlar [6]. Her bir yöntemin kendine özgü avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Kimyasal yöntemler genellikle düşük maliyetlidir ancak spesifiklikleri konusunda sınırlamalara sahip olabilir. Enzimatik yöntemler, doğal bir süreçle çalıştıkları için spesifik ve hassas olabilir, ancak bazı durumlarda zaman alıcı olabilir. İmmünolojik yöntemler, yüksek spesifiklik ve duyarlılık sunabilir, ancak maliyeti ve karmaşıklığı artırabilir. Spektroskopik yöntemler ise non-invaziv olmaları ve hızlı sonuçlar sağlamaları bakımından avantajlıdır, ancak ekipman maliyeti yüksek olabilir. Bu çeşitlilik nedeniyle, lizozim tayininde kullanılacak en uygun yöntemin seçimi, örnek türü, miktarı ve kalitesi gibi faktörlere bağlı olarak yapılmalıdır. Her bir yöntemin özellikleri ve avantajları göz önüne alınarak, analiz sürecinin gereksinimlerine en iyi şekilde uyan yöntem seçilmelidir [7].

Protein yapılarını belirlemek amacıyla 20. yüzyılın başlarında başlayan moleküler baskılama tekniği, moleküler kilitle uyumlu bir moleküler anahtar oluşturma metodunu ifade etmektedir [8]. Moleküler baskı tekniği, belirli bir şekli, boyutu ve fonksiyonel grupları uygun şekilde tamamlayabilen özel bağlanma bölgelerine sahip moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP) üretilmesini amaçlayan bir yöntemdir [9]. Bu tekniğin temel prensibi, bir hedef molekül ile etkileşime giren ve ardından bu molekülün bir kalıbını oluşturan bir polimer materyalin oluşturulmasıdır. Bu polimer materyal, hedef molekülle özdeş olan veya onunla benzer özelliklere sahip olan özel bağlanma bölgelerine sahiptir. MIP'ler, bu benzersiz bağlanma bölgeleri aracılığıyla hedef molekülle seçici bir etkileşim sağlarlar. Bu seçicilik, moleküler baskılama tekniğini, biyokimyasal analiz, ilaç geliştirme ve kimyasal algılama gibi birçok alanda kullanışlı kılmaktadır [10]. Moleküler baskılama tekniği, özelleştirilebilir yapısı sayesinde birçok farklı uygulama alanında kullanılabilir olacak geniş bir potansiyele sahiptir. Bu yöntem, moleküler düzeyde tanıma ve algılama süreçlerini anlama, kontrol etme ve optimize etme açısından önemli bir araç olarak bilim dünyasına katkı sağlamaktadır [11].

Yüzey plazmon rezonans(SPR) temelli sensörler, sensör yüzeyi yakınındaki kırılma indisi değişikliklerinden dolayı bağlanma olaylarının hızlı, işaretleme gerektirmeden eş zamanlı izlenmesi avantajını optik biyosalgılama avantajı ile sunmaktadır [12].

1990'ların sonlarından bu yana, SPR sensörleri hem yaşam bilimlerinde hem de farmasötik araştırmalarda biyomoleküler etkileşimlerin incelenmesinde ana araç haline gelmiştir [13]. Ayrıca tıbbi teşhis, çevresel izleme ve gıda güvenliği gibi önemli alanlarda kimyasal ve biyolojik maddelerin tespitinde de gün geçtikçe daha fazla uygulanmaktadır [14]. SPR sensörlerinin bu geniş uygulama yelpazesi, bilimsel araştırmalardan endüstriyel uygulamalara kadar birçok alanda önemli bir etki yaratmıştır. Bu sensörler, hem temel bilim araştırmalarında hem de pratik uygulamalarda biyomoleküler etkileşimlerin anlaşılması ve izlenmesinde güçlü ve esnek bir araç olarak öne çıkmaktadır [15].

Bu çalışmada, lizozim tespiti için altın nanopartiküllerle modifiye edilmiş bir SPR sensör hazırlanmış ve lizozim gerçek zamanlı olarak tayin edilmiştir. Altın

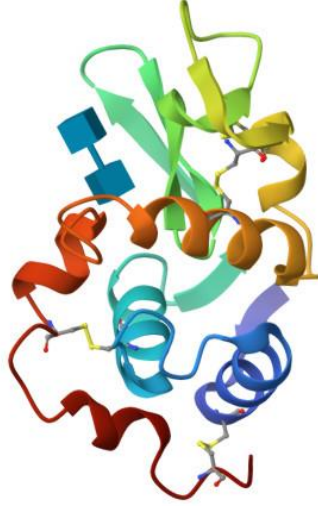
nanopartiküller, lizozimin tespit limitini düşürmek ve sensör sinyal kazancını artırmak amacıyla kullanılmıştır.

Ayrıca, bu çalışmada polimerik film temelli bir yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörü kullanılmış ve bu sensörün miyoglobin ve hemoglobin gibi diğer moleküllerle etkileşimleri ile lizozime olan seçiciliği incelenmiştir. Altın nanopartiküllerle modifiye edilen SPR sensörün, farklı biyomoleküllerle etkileşim kapasitesini değerlendirmek için yapılan bu deneyler, sensörün geniş uygulanabilirlik ve yüksek seçicilik yeteneklerini göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, moleküler baskılanmış SPR sensörün, biyolojik örneklerde lizozim tespiti için duyarlı ve güvenilir bir araç olarak potansiyel taşıdığını ortaya koymaktadır.

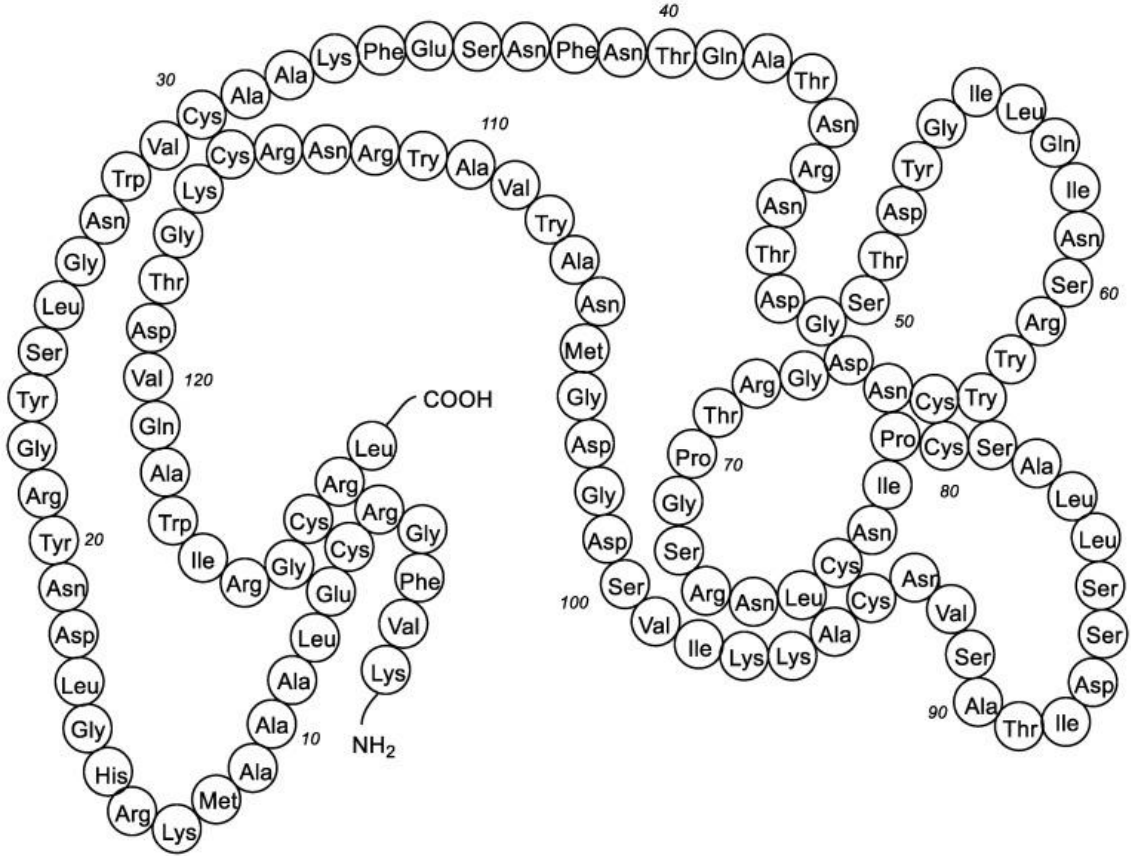
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lizozim

Lizozim, 1922 yılında Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir. Muramidaz olarak da adlandırılan lizozim, bakteriler, bakteriyofajlar, mantarlar, bitkiler ve memeliler gibi çeşitli organizmalarda yaygın olarak bulunur [16]. Gram-pozitif bakterilere karşı etkinliği ile bilinen proteinlerden bir tanesidir. Bakterinin peptidoglikan hücre duvarında yer alan N-asetil muramik asit ve N-asetil glukozamin arasındaki glikozidik bağları kırar [17]. Bakteri hücre duvarlarını parçaladığı için vücudun kendi antibiyotiği olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 2.1. Hindi Yumurta Lizozim Kompleksinin X-Ray Yapısı.



Şekil 2.2. Lizozim Kimyasal Yapısı [18]

Bunlara ek olarak, tıpta, gıda endüstrisinde şarap, peynir ve sosis üretiminde antibakteriyel bir madde olarak kullanılmaktadır. Protein ve enzim çalışmalarında da büyük bir öneme sahiptir [19]. 1965 yılında X-ışını kristalografisi ile yapısını atomik çözünürlükte çözen ilk enzimdir [20]. Lizozim, tükürük, gözyaşı, idrar, dalak gibi birçok vücut sıvısı ve dokuda bulunmaktadır. İnsan sütünde de bulunan lizozim emzirme ile çocuklara geçer ve bağışıklık sistemlerini oluşturmada yardımcıdır [21].

Çizelge 2.1 Çeşitli lizozim kaynaklarında bulunan lizozim miktarları

Lizozim Kaynağı	Lizozim Miktarı
Tavuk Yumurtası Akı	2500-3500 µg/mL
Ördek Yumurtası Akı	1000-1300 µg/mL
Kaz Yumurtası Akı	500-700 µg/mL
Gözyaşı	3000-5000 µg/mL
İnsan Sütü	55-75 µg/mL
İnek Sütü	10-15 µg/mL
Dalak	50-160 mg/kg
Timus	60-80 mg/kg
Pankreas	20-35 mg/kg

Lizozim moleküler ağırlık olarak 129 amino aside sahiptir ve yaklaşık 14 kDa ile 15 kDa'dır. Yaklaşık olarak pH 11 izoelektrik noktasına sahiptir [22]. Alzhemir, meme kanseri ve romatoid artrit gibi çeşitli hastalıkların teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [23]. Artan lizozim seviyesi, lösemi ve menenjit gibi hastalıklar için de spesifik olmayan bir göstergedir. Lizozim miktarının yüksek olması, yara sıvısında enfeksiyona beyin omurilik sıvısında bakteriyel menenjite ve idrarda lösemiye işaret edebilmektedir [24].

Çizelge 2.2. Lizozimin kimyasal özellikleri

Özellik	Değer
Moleküler Ağırlık	14,700
Alt Birim Sayısı	1
Aminoasit	129
pI	10,7
Disülfid Bağ	4
% Karbonhidrat	0

İnsanlarda, farklı vücut sıvılarında farklı konsantrasyonlarda lizozim bulunmaktadır. Lizozimin küçük bir protein olması, protein tayininde tercih sebebi olmaktadır [25].

Çizelge 2.3. Çeşitli örneklerde bulunan lizozim içerikleri

Kaynak	İçerik
Süt	40-500 µg/mL
Plasenta	15-20 µg/mL
Tükürük	150-200 µg/mL
İdrar	< 4 µg/mL
Plazma	4-13 µg/mL
Gözyaşı	7000 ± 20% µg/mL
Mukus	250-500 µg/mL

2.1.1. Lizozim Tayin Yöntemleri

Özellikle bakteri, mantar ve bazı bitkilerin hücre duvarlarını parçalamak için etkili olan lizozimin tespiti için birkaç yöntem bulunmaktadır. Litik aktivitenin *Micrococcus lysodeikticus* hücreleri ile belirlenmesi ve enzim bağlantılı immünosorbent deneyleri (ELISA) çoğunlukla uygulanan yöntemlerdir [16]. Bu yöntemlerin saptama limitinin düşük olması, rutin analizlerin imkansızlığı, karışan maddelerden dolayı hatalı ölçüm gibi bazı dezavantajları vardır. ELISA, düşük saptama limiti, yüksek özgüllük ve duyarlılığı nedeniyle umut verici bir yöntem olmasına rağmen, yöntem hala çözüm beklemektedir [19, 26]. Lizozim belirleme yöntemlerinde enzim aktivitesine dayalı mikrobiyolojik testler kullanılmış, ancak alternatif HPLC yöntemleri de geliştirilmiştir. Spektrofotometri yöntemi ile lizozim konsantrasyonu belirlenebilmektedir. Bu yöntemle lizozim çözeltisini belirli bir dalga boyundaki ışığa maruz bırakarak, absorbans ölçümleri ile lizozim konsantrasyonu hesaplanabilmektedir [27]. Lizozim tayini için kullanılan yöntemler arasında olan elektroforez ile lizozimin diğer proteinlerden ayrılması ve tanınması için kullanılabilir. Bu yöntemde ise, lizozim, bir jel üzerinde

elektrik alan içerisinde hareket ettirilerek farklı proteinlerden ayrılması sağlanmaktadır [28].

Lizozim tespitiyle ilgili literatürde yapılan çalışmalarda, genellikle farklı örnek tiplerinin analiz edildiği ve bu örneklerin çeşitliliğinin dikkat çekici olduğu gözlenmektedir. Bu örnekler arasında yapay tükürük, tavuk yumurtası akı, seyreltilmemiş serum, süt ve şarap gibi çeşitli matrisler bulunmaktadır. Bu çeşitlilik, lizozim tespiti için geliştirilen yöntemlerin pratik uygulanabilirliğini ve yaygınlığını artırmak için önemli bir katkı sağlar.

Öte yandan, yüzey modifikasyonu için kullanılan organikler de çalışmalara göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, Poly-scopoletin film, PEDMAH NP, PMAPA NP, rGO ve AgNP'ler gibi çeşitli organik materyaller bu amaçla kullanılmıştır. Bu organikler, yüzeydeki etkileşimleri ve özellikleri değiştirerek lizozim tespitine olan hassasiyeti ve özgüllüğü artırabilirler.

Bu çalışmalarda, hem analiz edilen örneklerin farklılığı hem de yüzey modifikasyonunda kullanılan organiklerin çeşitliliği nedeniyle kinetik çalışma aralığı ve saptama sınırı da değişkenlik göstermektedir. Örneğin, bazı organik modifikasyonlar lizozimin yüzeydeki etkileşimini artırırken, bazıları ise analiz duyarlılığını artırmak için kullanılabilir. Dolayısıyla, her bir çalışmanın özellikleri ve amaçlarına bağlı olarak, belirli bir kinetik çalışma aralığı ve saptama sınırı tercih edilmiştir. Bu da lizozim tespiti alanında yapılan araştırmalarda çeşitlilik ve yenilikçilik sağlar.

2.2. Moleküler Baskılama Yöntemi

1972'de ilk olarak Günter Wulff ve arkadaşları tarafından açıklanan moleküler baskılama teknolojisi, moleküler boyutta anahtar-kilit ilişkisi olarak tanımlanabilir. Bu teknolojide amaç, yapay tanıma bölgeleri yaratmaktır [29]. Hedef molekül için seçici ve spesifik tanıma bölgelerine sahip matriksleri kullanarak ayırma ve saflaştırma yapılabilmektedir [30]. Moleküler baskılı polimerler ise hedeflenen molekül için sentetik reseptörler olarak ifade edilebilir. Polimerik malzeme, kalıp (hedef) molekül varlığında sentezlendikten sonra, kalıp molekül polimer matriksinden uzaklaştırılır ve böylece kalıp molekülün şekil ve boyutuna uygun boşluklar içeren ve çok yüksek seçicilikle kalıp moleküle yeniden bağlanabilen polimerik malzeme meydana getirilmiş olur [31]. Bu polimerlerin en önemli avantajları, baskılama yönteminde kullanılan hedef molekül için yüksek seçicilik

ve afinitiyeye sahip olmalarıdır. Moleküler baskılama yönteminde kullanılan malzemeler; fonksiyonel monomerler, çapraz bağlayıcılar, polimerizasyon için çözücüler ve başlatıcılar olarak sıralanmaktadır [32]. Fonksiyonel monomerler, bağlanma etkileşimlerini gerçekleştirirken, çapraz bağlayıcılar ise kalıp molekül etrafında sabit bir yapı oluşturarak bu yapıyı kontrol etmektedirler. Çözücüler, polimerleşme adımında kullanılan bütün bileşenlerin tek fazda bulunmasını ve baskılanmış polimerin gözenekli bir yapıda olmasını sağlamaktadır. Başlatıcılar ise, radikal polimerizasyonda radikal başlatıcıların ısıl bozunması ile başlatılmasına katkı sağlamaktadır [9]. Etkili bir baskılama gerçekleştirebilmek için bu parametrelerin optimizasyonu büyük öneme sahiptir .

Nükleik asitler ve proteinler gibi biyolojik sistemlere kıyasla yüksek fiziksel dayanıklılık, kuvvet, yüksek sıcaklık ve basınç karşısında direnç sergilemektedirler [33]. Moleküler olarak baskılanmış polimerler ve bunların çeşitli transdüser platformlarıyla birleştirilmesi, birçok analitin tespiti için umut verici yaklaşımlardan birisi haline gelmiştir. Son yıllarda, özellikle kromatografi, biyosensör, ilaç salınımı ve kataliz gibi çok sayıda uygulama alanında kullanılmaktadır.

Sentezin kolay ve ucuz bir şekilde gerçekleştirilebilmesi bu tekniğin en önemli avantajlarıdır ve bunların yanı sıra doğal tanıma elementlerine karşı daha birçok avantajı bulunmaktadır [34].

Moleküler baskılama yöntemi temelde üç basamakta meydana gelmektedir:

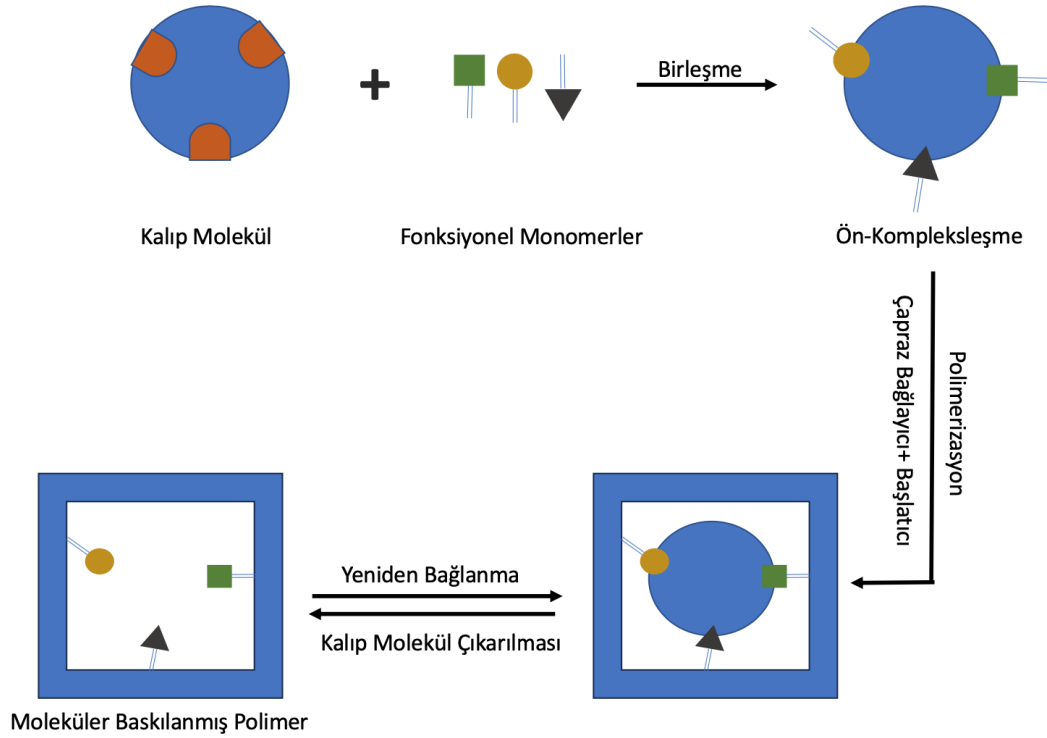
Ön-komplekleşme: Hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özelliklerinin önemli olduğu bu etkileşimde, uygun fonksiyonel gruba sahip olması ve polimerleşebilen monomer hedef molekül ile kovalent veya kovalent olmayan etkileşimlerle kompleks oluşturmaktadır [35].

Polimerizasyon: Fonksiyonel bir monomer üzerinden polimerleşme, uygun bir başlatıcı ve çapraz bağlayıcı kullanılarak monomer-hedef molekül kompleksi oluşturulmasıyla gerçekleştirilir [36].

Hedef molekülün uzaklaştırılması: Hedef molekül, uygun çözücü veya çözücü karışımları kullanılarak polimerik yapıdan uzaklaştırılır [37].

Çizelge 2.4. Doğal Biyomolekül ve MIP arasındaki farklar [38]

Doğal Biyomoleküller	Moleküler Baskılanmış Polimerler
Düşük kararlılık	Düşük/yüksek pH'larda, basınçta ve sıcaklıkta kararlı
Pahalı malzemeler (enzim ve reseptörler)	Kolay ve ucuz hazırlık
Susuz ortamda genellikle düşük performans	Organik çözücülerde çalışabilir
Farklı tanıma elementleri farklı gerekliliklere sahiptir (pH, iyonik kuvvet, sıcaklık)	Minimal gereklilikleri olduğundan MIP'e dayalı multisensörlerin dizaynı kolaydır.



Şekil 2.3. Moleküler Baskılama Yönteminin Şematik Gösterimi

Şekil 2.3'te açıkça gösterildiği gibi, moleküler baskılama yönteminde, kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında birleşme gerçekleşerek bir ön-kompleks oluşturulur. Bu ön-kompleksleşme aşaması, moleküler baskılama sürecinde kritik bir adımdır. Daha sonra, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı maddeler

eklenerek polimerizasyon aşamasına geçilir ve polimerizasyon süreci başlar. Bu adımda, kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşimler, polimerin oluşumu için temel yapı taşlarını sağlar.

Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, bağlanmamış kalıp molekülleri uygun bir çözelti kullanılarak ortamdan uzaklaştırılır ve geriye sadece polimer materyali kalır. Bu aşama, baskılanmış polimerin oluşturulması ve kalıp molekülün geride bıraktığı boşlukların kapsanması anlamına gelir. Sonuç olarak, elde edilen polimer materyali, orijinal kalıp molekülünün bir "aynı" veya tanıtıcı bir kopyası olan bir moleküler baskı özelliğine sahip olur. Bu moleküler baskılama süreci, belirli moleküllerin tanınması, ayrılması veya algılanması gibi uygulamalarda etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır [39].

Moleküler baskılama tekniği, genellikle kovalent ve kovalent olmayan baskılama olmak üzere iki temel yaklaşıma dayanır. Bu teknikler, fonksiyonel monomer ve kalıp molekül arasındaki bağ çeşidine bağlı olarak belirlenir [40]. Kovalent baskılama, kalıp molekül ile fonksiyonel monomer arasında kovalent bağlar oluşturulması esasına dayanır. Bu bağlar, özellikle kalıp molekül ile monomer arasında belirli bir tanıma ve bağlanma yeteneği sağlar. Bu sayede, baskılanmış sensörler özel bir hedef molekülüne karşı daha seçici ve duyarlı hale gelir [41].

Öte yandan, kovalent olmayan baskılama, kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasında kovalent bağ oluşturmadan, non-kovalent etkileşimler kullanarak gerçekleşir. Bu etkileşimler genellikle hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri ve elektrostatik etkileşimleri içerir [42]. Kovalent olmayan baskılama yöntemi, daha esnek ve çeşitli koşullara uygundur, çünkü kovalent bağ oluşturmak yerine moleküller arasındaki zayıf bağlantıları kullanır. Bu, çeşitli analitleri hedefleyebilen ve geniş bir uygulama yelpazesi sunabilen baskılanmış sensörlerin tasarımında avantaj sağlar [43]. Sonuç olarak, moleküler baskılama tekniği, hedef molekülün spesifik tanınması ve tespiti için kullanılan etkili bir strateji olarak öne çıkar. Kovalent ve kovalent olmayan baskılama yöntemleri, sensörlerin tasarımında esneklik sağlar ve çeşitli uygulamalarda kullanılacak özel ve duyarlı biyosensörlerin geliştirilmesine olanak tanır [44].

2.2.1. Moleküler Baskılama Teknikleri

2.2.1.1. Kovalent Baskılama

Kovalent baskılama tekniği, bir veya daha fazla polimerize edilebilir fonksiyonel monomerin kullanımıyla ayırt edilir, bu monomerler kuvvetli ve tersinir kovalent bağlar oluşturabilen kalıp moleküllere bağlanırlar. Bu yaklaşım, özellikle spesifik bir tanıma ve bağlanma yeteneği gerektiren hedef moleküllerin tespiti için etkili bir strateji sunar [45]. Polimerizasyon sürecinden sonra, kovalent bağlar kırılabilir ve bağlanma bölgesinde kalan işlevsellik, kovalent bağın yeniden kurulmasıyla hedef moleküle özgül bir şekilde etkileşime girebilir [46]. Bu yaklaşımın avantajı, işlevsel grupların yalnızca kalıp moleküle etkileşmesidir. Bu durum, baskılanmış polimerin sadece hedef moleküle özgül bir etkileşime girmesini sağlar. Ancak, bu yöntemle sınırlı sayıda bileşik, özellikle alkoller, ketonlar, aldehitler, karboksilik asitler ve aminler gibi belirli kimyasal grupları içeren hedef moleküller, başarıyla baskılanabilir. Kovalent bağ oluştuğu için bağlanma kinetikleri genellikle daha yavaş bir şekilde gerçekleşir. Bu yavaş bağlanma kinetikleri, kovalent baskılama tekniğinin bazen daha uzun analiz sürelerine ihtiyaç duyabileceği anlamına gelir. Bununla birlikte, özellikle belirli hedef moleküllerin seçici tespiti gerektiği durumlarda, kovalent baskılama tekniği, özgüllük ve seçicilik açısından yüksek performans sergileyebilen bir moleküler tanıma stratejisi olarak öne çıkar. Bu avantajlar, özellikle biyosensör uygulamalarında ve biyolojik analitlerin tespitinde kullanılmak üzere tasarlanan moleküler baskılama sensörlerinin geliştirilmesinde değerli bir yöntem olarak kabul edilir [47].

2.2.1.2. Kovalent Olmayan Baskılama

Bu baskılama tekniği, hedef molekülün spesifik tanınması ve tespiti için kullanılan etkili bir stratejidir. Bu teknikte, fonksiyonel monomer ve hedef molekül arasındaki etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları ve koordinasyon bağları gibi kovalent olmayan bağlanmalar aracılığıyla bir araya getirilir [48]. Fonksiyonel monomer, hedef molekül ile belirli kimyasal özelliklere sahip olacak şekilde tasarlanır, bu da spesifik tanıma ve bağlanma yeteneğini sağlar. Bu etkileşimler, moleküler baskılama polimerinin oluşumunu başlatır ve özellikle hedef molekül ile monomer arasında kuvvetli bir ilişki oluşturulmasını mümkün kılar [49].

Polimerizasyon aşamasından sonra, elde edilen baskılanmış polimer matrisi, kalıp molekülü içerir. Bu aşamada, kalıp molekül polimer matrisinden uygun çözücü kullanılarak uzaklaştırılır. Kalıp molekülün çıkartılması, baskılanmış polimerin içerisinde hedef molekül ile birebir bağlantı kurmaya hazır hale gelmesini sağlar. Ardından, hedef molekül ile baskılanmış polimer arasında kovalent olmayan etkileşimler aracılığıyla birleşim gerçekleşir. Bu bağlantılar, önceki etkileşimlerin devamı niteliğindedir ve hedef molekülün özgül algılanmasını ve tanınmasını sağlar [50].

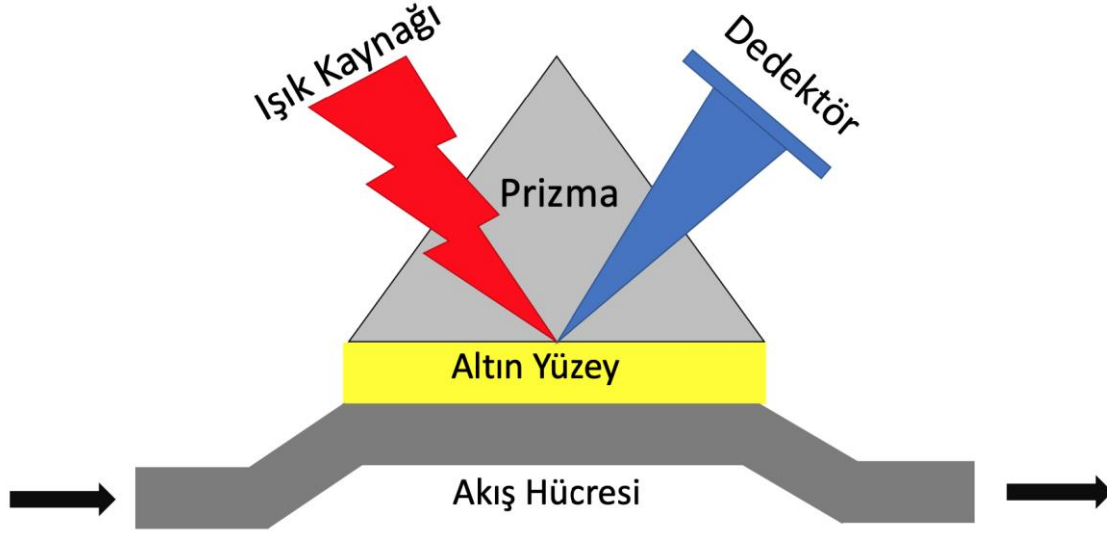
Bu süreç, sonunda baskılanmış polimerin hedef molekül ile özgül bir kompleks oluşturduğu bir biyosensör elde edilmesini sağlar. Moleküler baskılama tekniği, özellikle biyolojik ve kimyasal analitlerin tespiti amacıyla yüksek seçicilik ve duyarlılık gerektiren birçok uygulamada kullanılmaktadır. Bu, özelleştirilebilir tasarımı ve geniş bir analit yelpazesi üzerinde etkili çalışabilme özelliği ile moleküler baskılamanın önemini vurgular.

2.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)

SPR, ilk kez 1902 yılında Wood tarafından, polarize ışığı metal destekli bir kırınım ızgarasına tuttuğunda, yansıyan ışıkta olağandışı koyu ve açık bantlardan oluşan bir modelin ortaya çıkması ile gözlemlenmiştir [51]. Yüzey plazmon rezonansı, molekül etiketlemesine gerek duyulmaması, ek reaktifler, tahliller veya zahmetli olabilecek numune hazırlama adımları gerektirmemesi sebebi ile tercih edilen bir analiz yöntemidir. Yüzey plazmon rezonansı, moleküler bağlanma olaylarının neden olduğu kırılma indisindeki değişikliklere basitçe yanıt verebilen bir tekniktir [52].

SPR algılama sistemi, sensör çipi, ışık kaynağı ve detektörden oluşmaktadır [53]. Yüzey plazmon rezonansı, gelen ışığın bir fotonu metal bir yüzeye, tipik olarak bir altın yüzeye, çarptığında meydana gelmektedir. Belirli bir geliş açısında, ışık enerjisinin bir kısmı metal yüzey tabakasındaki elektronlarla birleşir ve uyarıldıkları için hareket ederler. Bu durumda elektron hareketleri artık plazmon olarak adlandırılmakta ve metal yüzeye paralel olarak yayılmaya devam etmektedir. SPR algılaması, bir dedektörde elde edilen yansıyan ışıktaki değişikliklerin ölçülmesiyle gerçekleşir. Tipik bir SPR biyosensörünün algılama

sınırı 10 pg/mL olarak belirtilmektedir. [54] SPR algılamasının çalışma mantığı Şekil 2.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Yüzey plazmon rezonans sensörünün şematik gösterimi.

Şekil 2.4'de gösterildiği üzere, altın çip yüzeyi, ışık kaynağı ile uyarıldığında, yansıyan ışıktaki kırılma indisi değişiklikleri, altın çip yüzeyinden geçirilen örneğin varlığını sistem üzerindeki dedektöre iletmektedir. Yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörleri, bu özelliği kullanarak, örnekle etkileşime giren moleküllerin tespitini gerçekleştirmektedir. Işığın altın çip yüzeyindeki kırılma indisinden kaynaklanan bu veri, SPR sensörünün örnek tayini yapabilme yeteneğine olanak sağlamaktadır [55, 56].

Altın çip yüzeyinin uyarılmasıyla başlayan bu süreç, örnekle etkileşime geçen moleküler düzenlemelerin neden olduğu kırılma indisi değişikliklerini ölçerek, sistem tarafından algılanmasını içerir [57]. Bu veri, SPR sensörünün yüzeyindeki biyomoleküler etkileşimleri izlemek ve analiz etmek için kullanılır. Bu teknoloji, özellikle biyolojik ve kimyasal moleküllerin tespiti, miktarının belirlenmesi ve etkileşim mekanizmalarının anlaşılması gibi birçok uygulamada önemli bir araç olarak kullanılmaktadır [58].

Yüzey plazmon rezonans sistemi avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Çizelge 2.5.'de bunlardan bazıları belirtilmiştir.

Çizelge 2.5. Moleküler Baskılama Tekniğinin Avantaj ve Dezavantajları

Avantaj	Dezavantaj
Etiketlemeye ihtiyaç duymaz	Immobilizasyon etkileri
Gerçek zamanlı, devamlı ölçüm	Bağlanma olaylarında yapısal engel
Farklı moleküller için genel bir yöntem	Spesifik olmayan bağlanma
Hızlı test	Sınırlı kütle taşınımı
Yüksek hassasiyet	Kontrol deneyi gerekli
Küçük hacimde numune kullanma	Verilerin yanlış yorumlanması
Spesifik bölgede bağlanma	Pahalı biyosensör çip ve ekipmanları

2.3.1. Yüzey Plazmon Rezonans Sensörler

1982'de Liedeberg ve Nylander tarafından yüzey plazmon rezonansının (SPR) optik bir sensör olarak faydası gösterilmiştir. O zamandan bu yana SPR, kimya, fizik ve biyoloji arasında ortak bir platform kurulmasını kolaylaştırarak yüzey kimyasına bir destek sağlamıştır [59]. SPR, akademi, endüstri ve teknolojiyi kapsayan binlerce araştırma makalesini kapsayan bir optik biyosensör olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [60].

Son yıllarda, yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörleri, sağladığı avantajlar nedeniyle tıbbi teşhis, çevresel izleme, gıda güvenliği ve güvenliği alanlarında giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Bu teknolojik gelişmeler, kimyasal ve biyolojik maddelerin tespiti konusundaki ihtiyaçları karşılamak, analitik süreçleri geliştirmek ve daha hassas, hızlı sonuçlar elde etmek amacıyla yapılan araştırmalarda önemli bir role sahiptir [61].

SPR tabanlı sensörler, özellikle biyomoleküler etkileşimlerin anlaşılmasında ve çeşitli analitik uygulamalarda kullanımıyla dikkat çekmektedir. Bu sensörler,

etkileşen moleküller arasındaki bağlantıları eş zamanlı ve doğrudan ölçerek, analiz süreçlerini hızlandırır ve sonuçların güvenilirliğini artırır. Tıbbi teşhis alanında, özellikle hastalıkların erken teşhisi ve biyolojik belirteçlerin tespiti gibi klinik uygulamalarda SPR sensörleri kritik bir rol oynamaktadır [62]. Gıda güvenliği ve çevresel izleme konularında ise SPR sensörleri, zararlı kimyasalların ve patojenlerin tespiti gibi sorunlara çözüm sunarak, güvenli ve sürdürülebilir bir çevre ile sağlıklı gıda üretimi için önemli bir araç haline gelmiştir. Bu nedenle, SPR sensörleri, multidisipliner birçok alanda kullanılabilirliği ve etkinliği ile ön plana çıkan önemli bir analitik araçtır [63].

SPR sensörlerinde prob moleküller öncelikle sensör yüzeyine immobilize edilir. Hedef moleküllerin solüsyonu yüzeyle temas ettirildiğinde, afinite etkileşimi yoluyla bir prob-hedef bağlanması meydana gelir ve sonuç olarak SPR sensör yüzeyinde kırılma indisinde bir artışa neden olur [64].

Son yıllarda, bir dizi tıbbi rahatsızlıktan (Alzheimer, hepatit, diyabet, lösemi ve kanser gibi) muzdarip hastalardan toplanan biyosıvılardaki antikörlerin, proteinlerin, enzimlerin, ilaçların, küçük moleküllerin, peptitlerin ve nükleik asitlerin izlenmesine yönelik ilk örnekler ortaya çıkmıştır ve diğerlerinin yanı sıra prostat ve meme kanserleri klinik kimyada yüzey plazmon rezonansın ilerlemesini göstermektedir [65]. Biyomoleküllerin afinite bağlanmasının izlenebilmesi için en güçlü yöntem olarak SPR sensörler gösterilmektedir [66].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

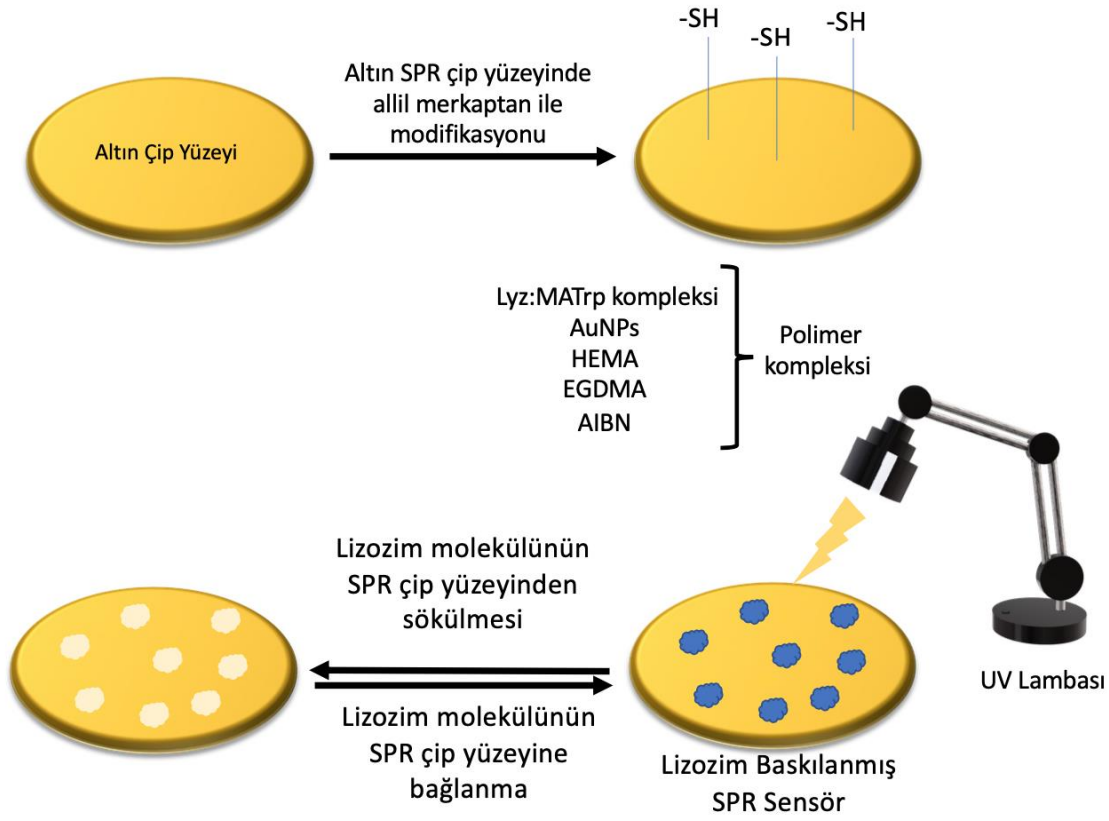
2-hidroksietilmetakrilat (HEMA), azoizobisbütironitril (AIBN), etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), allil merkaptan, yapay gözyaşı (Bausch & Lomb, Rochester, ABD) ve yapay plazma Sigma Aldrich, ABD firmasından satın alınmıştır. Lizozim, Fluka firmasından temin edilmiştir. SPR sensör çipler Genoptics firmasından temin edilmiştir. Analitik saflıkta olan diğer bütün kimyasallar ise Merck firmasından satın alınmıştır.

3.2. SPR Sensör Yüzey Modifikasyonu

Yüzey plazmon rezonans çip yüzeyine lizozim baskılamadan önce yüzeyde bağlı olarak bulunan organiklerden kurtulmak amacıyla (3:1 v/v, H₂SO₄:H₂O₂) oranında hazırlanan pirana çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra etil alkol ile yıkanıp, deiyonize su ile durulanmıştır. Sıcaklığı 40°C'ye ayarlı olan etüvde kurutulmaya bırakılmıştır. Bu işlemde sonra yüzey organik bağlamaya uygun hale getirilmiştir ve tiyol gruplarını bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Tiyol grubunu (-SH) oluşturmak için allil merkaptan kullanılmıştır.

3.3. Lizozim Baskılanmış ve Baskılanmış SPR Sensörlerin Hazırlanması

Bu tez çalışmasında, altın nanopartiküller kullanılarak lizozim baskılanmış (AuNP-MIP) ve baskılanmış (AuNP-NIP) SPR sensörler ile altın nanopartiküller kullanılmadan lizozim baskılanmış (MIP) SPR sensör hazırlanmıştır.



Şekil 3.1. Lizozim Baskılanmış SPR Sensörlerin Hazırlanmasının Şematik Gösterimi

Şekil 3.1.'de detaylı olarak gösterildiği üzere, altın çip yüzeyi başlangıçta allil merkaptan ile modifiye edilmiştir. Bu modifikasyon adımı, altın yüzeyin özel tiyol gruplar (-SH) ile donatılmasını sağlar ve moleküler baskılama sürecinin temelini oluşturur. Daha sonra, polimer kompleksi eklenerek, UV lamba altında gerçekleştirilen bir polimerizasyon adımıyla altın çip yüzeyi modifiye edilir. Bu adım, -SH grupları arasında çapraz bağlar kurarak, polimerin oluşumunu tetikler ve moleküler baskılama için bir matrisin oluşturulmasını sağlar.

Polimerizasyon adımı tamamlandıktan sonra, lizozim molekülleri uygun desorpsiyon ajanı kullanılarak yüzeyden uzaklaştırılır. Desorpsiyon işlemi, lizozim moleküllerinin polimer matrisi içindeki boşluklara yerleşmelerini ve böylece moleküler baskılama işleminin tamamlanmasını sağlar. Bu aşamadan sonra, altın çip yüzeyi, özgün lizozim moleküllerinin izlerini taşıyan bir moleküler baskılama matrisi ile kaplanmış olur.

Bu karmaşık ancak hassas süreç, altın çip yüzeyinin özel bir şekilde modifiye edilmesi, polimerizasyon adımı ve desorpsiyon işlemi arasındaki etkileşimleri içerir. Bu sayede, moleküler baskılama tekniği, belirli bir hedef molekülün tanımlanması veya tespiti için özel olarak tasarlanmış yüzeylerin üretilmesini sağlar. Bu teknik, sensörlerde ve moleküler tanı uygulamalarında kullanılmak üzere tasarlanan özelleştirilebilir yüzeylerin oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır.

3.3.1. AuNP-MIP sensörlerin hazırlanması

N-Metakrilolil-L-triptofan (MATrp) monomeri lizozim baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörlerin hazırlanmasında fonksiyonel monomer olarak kullanılmıştır [67]. Lizozim (Lyz) baskılanmış polimerik filmin hazırlanması için ilk olarak 1 mmol lizozim ile 2 mmol MATrp kompleksi oluşturularak ön-polimerizasyon karışımı 30 dakika 20 rpm hızında rotatörde karıştırılmıştır. Daha sonra Lyz:MATrp ön polimerizasyon kompleksine 2 mmol AuNP'ler eklenerek kalıp molekül, monomer ve AuNP'ler arasında koordinasyonu sağlamak için 30 dakika boyunca 20 rpm hızında karıştırılmıştır. Bu karışıma çapraz bağlayıcı olarak 2 mmol EGDMA ve 1 mmol HEMA monomeri eklenmiştir. Hazırlanan bu polimerizasyon karışımına başlatıcısı olarak 2 mg AIBN eklenmiştir. Bu polimerizasyon karışımı tiyol grupları ile işlevselleştirilmiş olan SPR çip yüzeyine 4 µL damlatılarak spin coater cihazı ile çip yüzeyinde homojen bir dağılım olması amaçlanmıştır. SPR çip yüzeyinde polimerik filmin oluşması için UV lamba altında (365 nm, 100 W) 30 dakika boyunca polimerleşme tepkimesi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. AuNP-NIP sensörlerin hazırlanması

Lizozim baskılanmamış AuNP-NIP sensör kalıp molekül olarak kullanılan lizozim kullanılmadan AuNP-MIP sensörü hazırlama prosedürü adımları kullanılarak aynı şekilde hazırlanmıştır. İlk olarak, 2 mmol MATrp monomeri ve 2 mmol AuNP 30 dakika boyunca 20 rpm hızında rotatörde karıştırılmıştır. Bu karışıma, çapraz bağlayıcı olarak 2 mmol EGDMA ve 1 mmol HEMA monomeri eklenmiştir. Bu polimerizasyon karışımına başlatıcısı olarak kullanılan 2 mg AIBN ilave edilmiştir.

Hazırlanan karışım, SPR çip yüzeyine 4 µL damlatılarak çip yüzeyindeki homojenizasyonu sağlama amacıyla spin coater cihazı kullanılmıştır. SPR çip yüzeyinde polimerik filmin oluşması için UV lamba altında (365 nm, 100 W) 30 dakika boyunca polimerleşme tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Son adım olarak da, kalıp molekül lizozim molekülünün SPR sensör yüzeyinden %10'luk (v/v) etilen glikol çözeltisi ile uzaklaştırılmıştır. Desorbe edilen SPR sensör yüzeyi deiyonize su:etil alkol karışımı ile 1 saat boyunca yıkanmış ve etüvde kurutulmuştur.

3.3.3. MIP sensörlerin hazırlanması

Lizozim baskılanmış SPR sensörlerin hazırlanması için ilk olarak 1 mmol lizozim ile 2 mmol MATrp monomerinden oluşan Lyz:MATrp ön polimerizasyon karışımı 30 dakika boyunca 20 rpm hızında rotatörde karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan ön polimerizasyon karışımına 2 mmol EGDMA ve 1 mmol HEMA monomeri eklenmiştir. Bu polimerizasyon karışımına başlatıcı olarak 2 mg AIBN ilave edilmiştir. Hazırlanan bu karışım, tiyol grupları ile yüzeyi modifiye edilen SPR çip yüzeyine 4 µL damlatılarak çip yüzeyindeki homojenizasyonu sağlama amacıyla spin coater cihazı kullanılmıştır. SPR çip yüzeyinde polimerik filmin oluşması için UV lamba altında (365 nm, 100 W) 30 dakika boyunca polimerleşme tepkimesi gerçekleştirilmiştir. Son adım olarak da, kalıp molekül lizozim molekülünün SPR sensör yüzeyinden %10'luk (v/v) etilen glikol çözeltisi ile uzaklaştırılmıştır. Desorbe edilen SPR sensör yüzeyi deiyonize su:etil alkol karışımı ile 1 saat boyunca yıkanmış ve etüvde kurutulmuştur.

3.4. Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu Analizi

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), polimerlerden seramiklere, camdan biyolojik numunelere kadar geniş bir yüzey yelpazesini nano ölçekte ve yüksek çözünürlükte görüntüleyebilen son derece güçlü cihazlardır. AFM, materyallerin ve örneklerin yüzey özelliklerini incelemek, nano yapıları gözlemlemek ve moleküler düzeyde detaylı analizler yapmak için kullanılmaktadır. Bu çalışmada, modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, AuNP-MIP, AuNP-NIP ve MIP SPR sensör

yüzeylerinin karakterizasyonu, Nanomagnetics Instruments tarafından üretilen atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SPR çipleri, örnek tutucuya çift yüzlü karbon bantla sabitlenmiş ve görüntüleme çalışmaları hava ortamında, 341.30 kHz salınım rezonans frekansı ve yarı modda gerçekleştirilmiştir. Titreşim ve boş titreşim genliği sırasıyla $1 V_{RMS}$ ve $2 V_{RMS}$ 'tir. Örnekler, 2 $\mu\text{m/s}$ tarama hızı ve 256x256 piksel çözünürlükte SPR çip yüzeyleri için ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$)'lik bir alandan görüntüler elde edilmiştir. Bu sonuçlar, SPR sensörlerin nano ölçekteki yüzey karakterizasyonunda ve moleküler etkileşimlerin anlaşılmasında atomik kuvvet mikroskoplarının değerli bir araç olduğunu vurgulamaktadır [68].

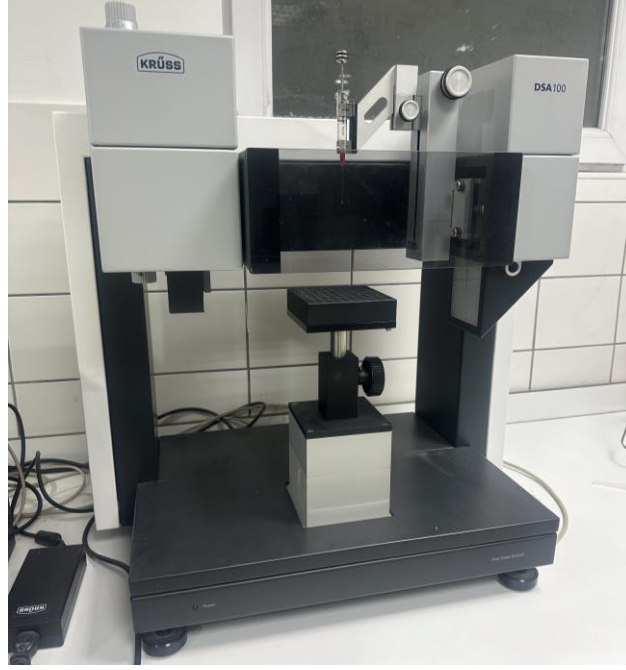
3.4.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu(TEM)

AuNP'lerin morfolojisi, geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) kullanılarak detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir. Bu amaçla, AuNP'ler öncelikle bakır kaplı bir ızgaraya yerleştirilmiş ve ardından oda sıcaklığında kurutulmuştur. TEM mikrografları, yüksek çözünürlüklü bir TEM mikroskobu olan FEI Tecnai G2 F30 modeli kullanılarak 200 kV enerjide alınmıştır. Bu işlem, nanoparçacıkların boyutu, şekli ve dağılımı gibi kritik özelliklerinin belirlenmesi için yapılmıştır. Özellikle, TEM görüntüleme teknikleri, nanomalzemelerin yapısal ve morfolojik özelliklerini incelemek için yaygın olarak kullanılan güçlü araçlardır. Bu nedenle, AuNP'lerin karakterizasyonunda TEM analizi, malzemenin özelliklerinin anlaşılmasına ve belirlenmesine büyük katkı sağlamıştır.

3.4.3. Temas Açısı Ölçümleri

SPR sensör yüzeylerinin su temas açısı ölçümlerini belirlemek için KRUSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. SPR sensörlerinin yüzeylerine, yapışık damla yöntemi kullanılarak su damlatılarak hidrofilité özellikleri belirlenmiştir. Çip yüzeyinin farklı bölgelerine su damlatılmış ve her bir bölge için detaylı fotoğraflar çekilmiştir. Bu fotoğraflar, her bir alanın temas açısını belirlemek için kullanılmıştır. Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi ile AuNP-MIP, MIP ve AuNP-NIP SPR sensör yüzeyleri için belirlenen temas açısı değerleri DSA2 yazılımı kullanılarak belirlenmiş ve 10 ayrı ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Temas açısı değerleri, analiz sürecinde DSA2 yazılımı

kullanılarak belirlenmiştir. Bu ölçümler, her bir sensör yüzeyinin hidrofiliti özelliklerini belirlemede kullanılan etkili bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Elde edilen hidrofiliti verileri, yüzey modifikasyonlarının su ile etkileşim yetenekleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek ve sensör performansının anlaşılmasına katkıda bulunmak adına önemli bir referans sağlamaktadır [69].



Şekil 3.2. Temas Açısı Ölçüm Cihazı

3.5. Kinetik Analizler

SPR imager II cihazı kullanılarak AuNP-MIP, AuNP-NIP ve MIP SPR sensörlerin kinetik analizleri incelenmiştir. Lizozimi tayin etmek amacıyla, pH 7.4 fosfat tamponunda hazırlanan 0.5-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişiminde lizozim sulu çözeltilerinden kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. İlk olarak kinetik analizlere başlamadan önce, SPR sensör yüzeyinden 2 dakika boyunca 1.0 M pH 7.4 fosfat tamponu akış hızı 2 mL/dk akış hızında geçirilmiştir. Daha sonra, 0.5-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aralığında farklı derişimlerde lizozim çözeltileri hazırlanmış 2 mL/dk akış hızında SPR sistemi üzerinde 5 dakika süresince çalıştırılmıştır. Son olarak 2 dakika boyunca etilen glikol desorpsiyon çözeltisi SPR sisteminden geçirilmesi ile kinetik analizler tamamlanmıştır. Denge-adsorpsiyon-desorpsiyon basamaklarından oluşan tüm kinetik analizlerde toplam analiz süresi dahil tüm adımlar yaklaşık 9 dakikada

gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sensorgram sonuçlarına göre zamana karşı ışığın kırılma indisi değişimi ($\% \Delta R$) hesaplanarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.3. SPR Sensör Analiz Cihazı

3.5.1. Seçicilik Çalışmaları

Lizozim baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörün seçiciliği için lizozim (MA: 14.3 kDa) molekülüne karşı benzer molekül yapısı ve molekül ağırlıklarına göre hemoglobin (Hb, MA: 64.5 kDa) ve miyoglobin (MA: 17kDa) yarışmacı ajan olarak seçilmiş ve kinetik analizler yapılmıştır. İlk olarak, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimlerinde hazırlanan lizozim, miyoglobin ve hemoglobin hazırlanarak sisteme tek tek verilmiş sonrasında ikili miyoglobin+hemoglobin karışımı ve üçlü lizozim+miyoglobin+hemoglobin karışımları hazırlanarak kinetik analizler yapılmıştır. Diğer kinetik analizlerde olduğu gibi 2 dakika dengeleme tamponu olan pH 7.4 fosfat tamponu, 5 dakika adsorpsiyon çözeltisi ve 2 dakika %10'luk etilen glikol desorpsiyon çözeltisi şeklinde tüm kinetik analizler tamamlanmıştır. Analiz sonrasında elde edilen veriler SPRview yazılım programı ile belirlenmiştir.

3.5.2. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları

Lizozim baskılanmış SPR sensörlerinin tekrar kullanılabilirlik özellikleri, aynı gün içinde arka arkaya dört kez ölçüm yapılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, uzun vadeli kullanılabilirlik performansını değerlendirmek amacıyla, farklı zaman

aralıklarında (1.ay, 2.ay, 4.ay ve 6.ay gibi) 50 µg/mL derişiminde hazırlanan lizozim sulu çözeltileri kullanılarak denge-adsorpsiyon-desorpsiyon-rejenerasyon döngüsü gerçekleştirilmiştir. Bu döngüler, 2.0 mL/dakika akış hızında tekrarlanmış ve elde edilen sensör verileri detaylı bir şekilde analiz edilmiştir.

SPR sensörlerinden alınan sensorgram verileri üzerinde gerçekleştirilen kinetik analizler sonucunda elde edilen %ΔR değerleri, sensörlerin tekrar kullanılabilirliği hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu değerler, sensörlerin lizozim tespiti için hassasiyet ve istikrarını değerlendirmek üzere kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, lizozim baskılanmış SPR sensörlerinin hem aynı gün içinde hem de uzun vadeli periyotlarda güvenilir ve tekrar kullanılabilir özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bu özellik, sensörün pratik uygulamalarda sürekli ve etkili bir şekilde kullanılabilmesi açısından önemlidir.

3.5.3. Yapay plazma, gözyaşı ve idrar örneklerinden lizozim tayini

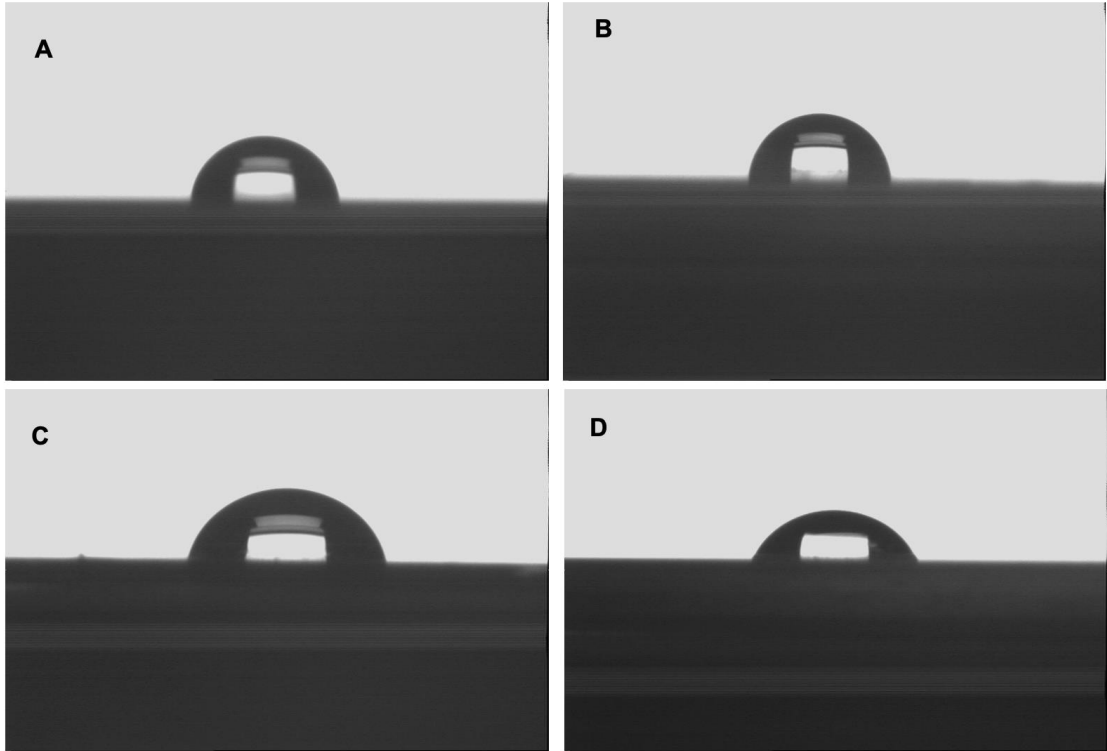
Lizozim içeren yapay plazma, yapay gözyaşı ve yapay idrar sıvılarında lizozimi tespit etmek için lizozim baskılanmış SPR sensörleri de kullanılabilir. Bu çalışmada kullanılan yapay plazma ve yapay gözyaşı hazır olarak satın alınmıştır. Yapay idrar ise laboratuvar ortamında hazırlanma prosedürüne uygun şekilde hazırlanmıştır. Yapay idrar saf su içerisinde, pH 6.0 olacak şekilde, 170 mM üre, 2.0 mM sitrik asit, 7 mM KH₂PO₄, 7 mM K₂HPO₄, 25 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂, 90 mM NaCl, 2.0 mM MgSO₄, 10 mM Na₂SO₄ ve 25 mM NH₄Cl çözünerek hazırlanmıştır [70]. Yapay plazma, yapay gözyaşı ve yapay idrar çözeltileri 10 µg/mL derişiminde lizozim çözeltileri hazırlanmıştır. Lizozimi tayin etmek amacıyla öncelikle sistemden pH 7.4 fosfat tamponu geçirilmiş, sonrasında yapay plazma, yapay gözyaşı ve yapay idrar çözeltilerinde 10 µg/mL lizozim derişiminde hazırlanan çözeltiler ayrı ayrı sisteme verilmiş ve son olarak %10'luk etilen glikol desorpsiyon çözeltileri sistemden geçirilerek kinetik analizler tamamlanmıştır. Bu deneyler sonucunda elde edilen sensorgramlar gerçek zamanlı olarak analiz edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. SPR Sensörlerin Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.1. Temas Açısı Ölçümleri

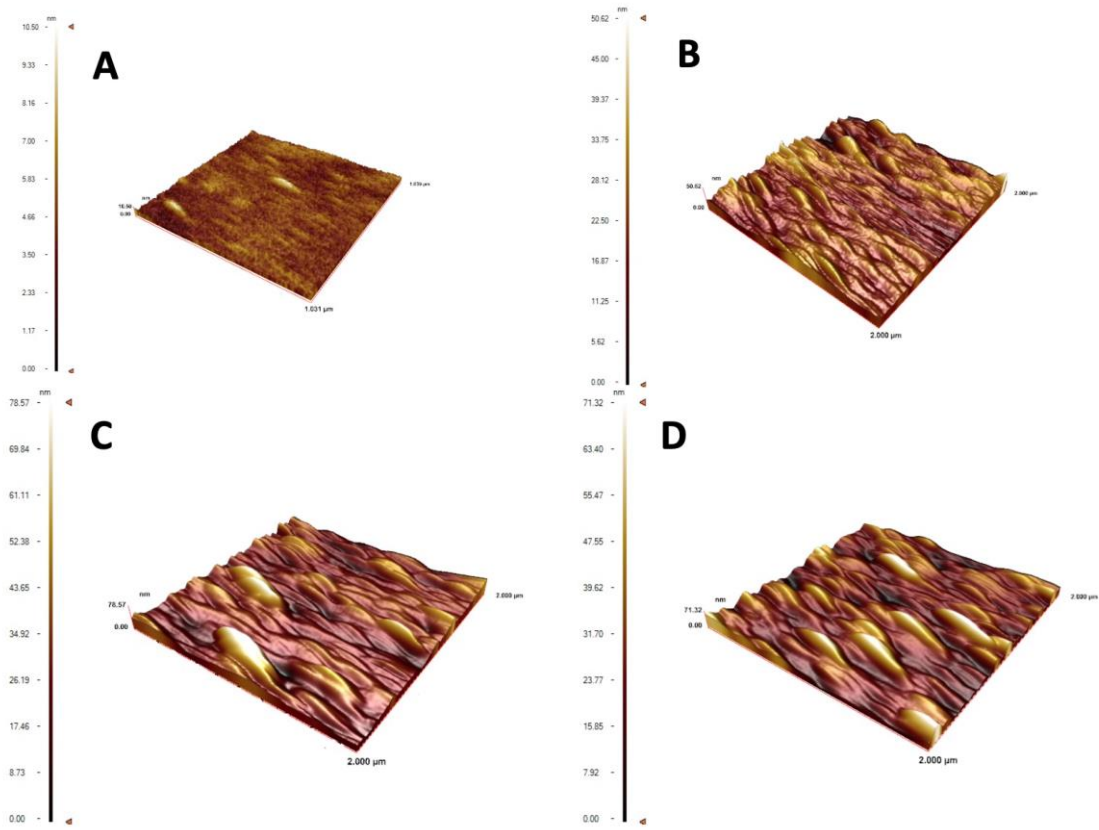
KRUSS DSA100 cihazı kullanılarak yapışık damla yöntemi ile modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi ile AuNP-MIP, AuNP-NIP ve MIP SPR sensör yüzeylerinin temas açısı ölçümleri yapılmıştır. Her çip yüzeyine bir damla su damlatılmış ve 10 farklı temas açısı ölçümleri yapılarak ortalamaları alınmıştır. Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyinin temas açısı 79.4° iken, MIP SPR sensör yüzeyinin temas açısı 82.9° dir. MIP SPR sensör yüzeyindeki polimerik filmde hem lizozim hem de MATrp monomerinin hidrofobik özelliklerinden dolayı temas açısı artmıştır. AuNP-MIP SPR sensör yüzeyinin temas açısı 78.2° iken AuNP-NIP SPR sensör yüzeyinin temas açısı ise 77.4° dir. SPR sensör yüzeyindeki polimerik film içine hidrofilik özelliğe sahip AuNP eklenmesi ile hazırlanan AuNP-MIP ve AuNP-NIP SPR sensörlerin yüzey temas açılarının azalmasına sebep olmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Modifiye edilmemiş SPR altın çip yüzeyi (A), MIP (B), AuNP-MIP (C) ve AuNP-NIP (D) SPR sensör yüzeylerinin temas açısı fotoğrafları

4.1.2. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, MIP, AuNP-MIP ve AuNP-NIP SPR sensör yüzeylerinin yüzey pürüzlülük karakterizasyonu AFM cihazı kullanılarak yapılmıştır. Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, MIP, AuNP-MIP ve AuNP-NIP SPR yüzeylerinin pürüzlülüğü sırası ile 10.50 nm, 50.62 nm, 78.57 nm ve 71.32 nm bulunmuştur (Şekil 4.2). AFM sonuçları incelendiğinde allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çip yüzeylerine lizozim baskılamanın başarılı bir biçimde baskılandığı sonucuna varılmıştır.

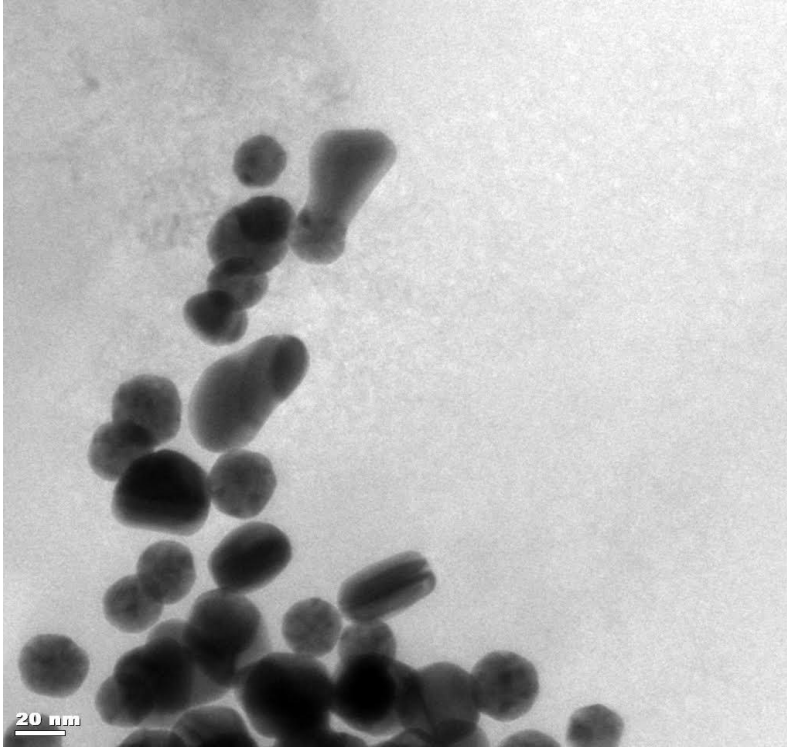


Şekil 4.2. SPR sensör yüzeylerin yarı temas modunda alınan AFM görüntüleri A) Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, B) MIP, C) AuNP-MIP ve D) AuNP-NIP sensör yüzeyleri

4.1.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobuyla elde edilen Şekil 4.3'teki görüntüye göre, altın nanopartiküllerin belirgin bir küresel yapıya sahip olduğu gözlemlenmektedir. Görüntüdeki analizlere dayanarak, altın nanopartiküllerin ortalama boyutlarının

50.0-60.0 nanometre arasında olduğu belirlenmiştir. Bu nanopartiküllerin homojen dağılımı ve belirgin şekli, yapılan deneyler sürecindeki kontrolün ve karakterizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini işaret etmektedir. Bu bulgular, altın nanopartiküllerin özellikle belirli uygulamalar için istenen boyut ve şekilde üretildiği ve karakterize edildiği sonucunu desteklemektedir. Geçirimli elektron mikroskopuyla yapılan bu analiz, malzemenin yapısal özelliklerini anlamak ve ilgili uygulamalar için uygunluğunu değerlendirmek açısından önemlidir.

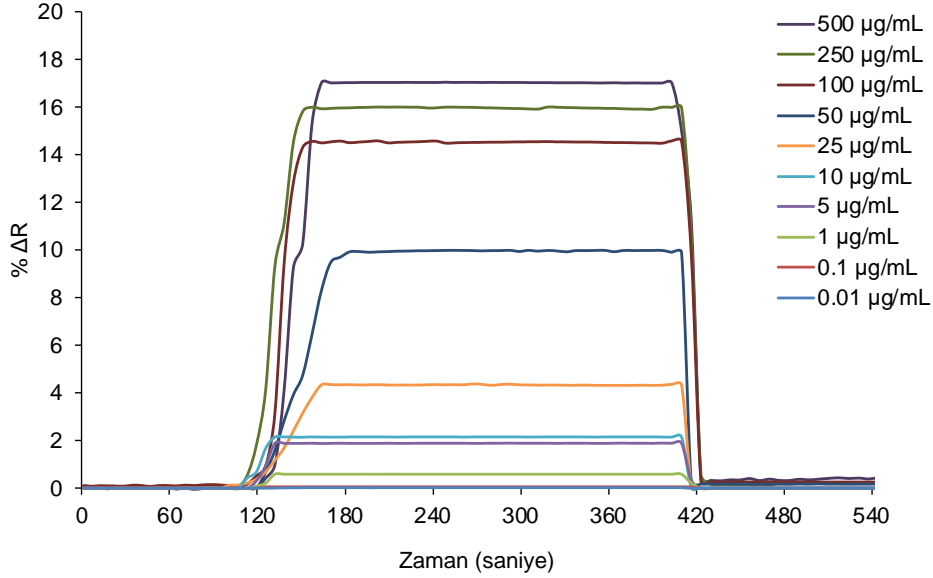


şekil 4.3. AuNP-MIP sensör yüzeyinin TEM görüntüsü

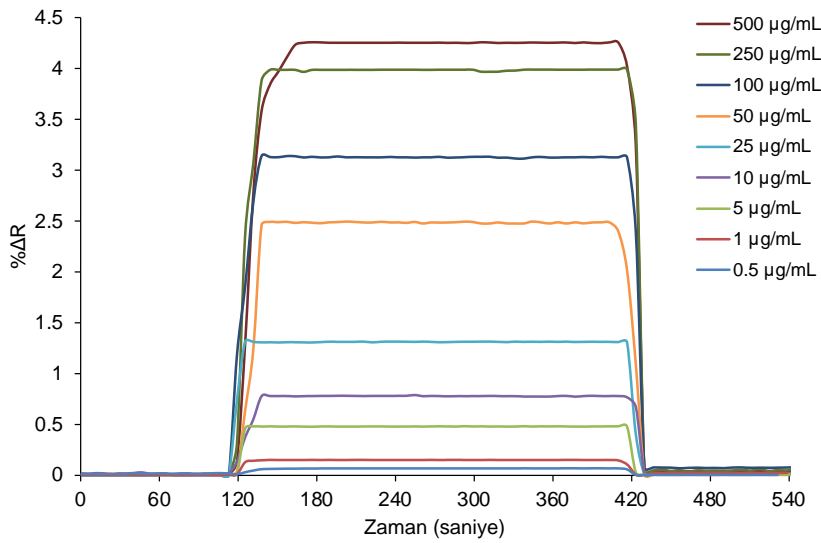
4.2. Kinetik Analizler

Farklı derişimlerde lizozim sulu çözeltilerinden ve yapay idrar, plazma ve gözyaşı örneklerinden gerçek zamanlı olarak lizozim tespit edebilmek için MIP, AuNP-MIP ve AuNP-NIP SPR sensörler hazırlanmıştır. Bu çalışmada kinetik çalışmalar için GWC, SPRImager II (WI, ABD) marka SPR cihazı kullanılmıştır. Farklı derişimlerde hazırlanan sulu lizozim çözeltileri sisteme ayrı ayrı verilerek SPRview programı ile rezonans frekansındaki değişimler anlık olarak takip edilmiş ve kinetik analiz sonuçları şekil 4.4. ve şekil 4.5.'te verilmiştir. Kinetik analizlerde SPR sensör yüzeyinden ilk olarak 2 dakika dengeleme tamponu

olarak pH: 7.4 fosfat tamponu geçirilerek sistem dengeye getirilmiştir. Daha sonra farklı derişimlerde (0.01-500 µg/mL) sahip lizozim çözeltileri 2 mL/dk akış hızında 5 dakika boyunca SPR sistemine ayrı ayrı verilmiş ve son olarak da 2 dakika boyunca desorpsiyon çözeltilisi olarak %10'luk etilen glikol çözeltilisi sistemden geçirilerek kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Denge-adsorpsiyon-desorpsiyon dahil tüm adımlar yaklaşık 9 dakikada gerçekleştirilmiştir.

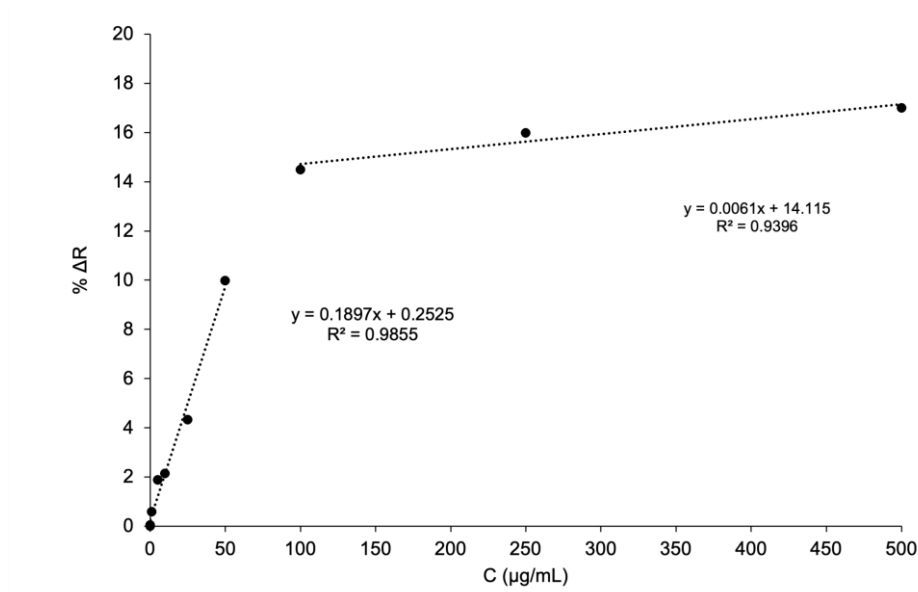


Şekil 4.4. AuNP-MIP SPR sensörün 0.01-500 µg/mL arasındaki lizozim derişimleri için elde edilen sensorgramları.



Şekil 4.5. MIP SPR sensörün 0.5-500 µg/mL arasındaki lizozim derişimleri için elde edilen sensorgramları.

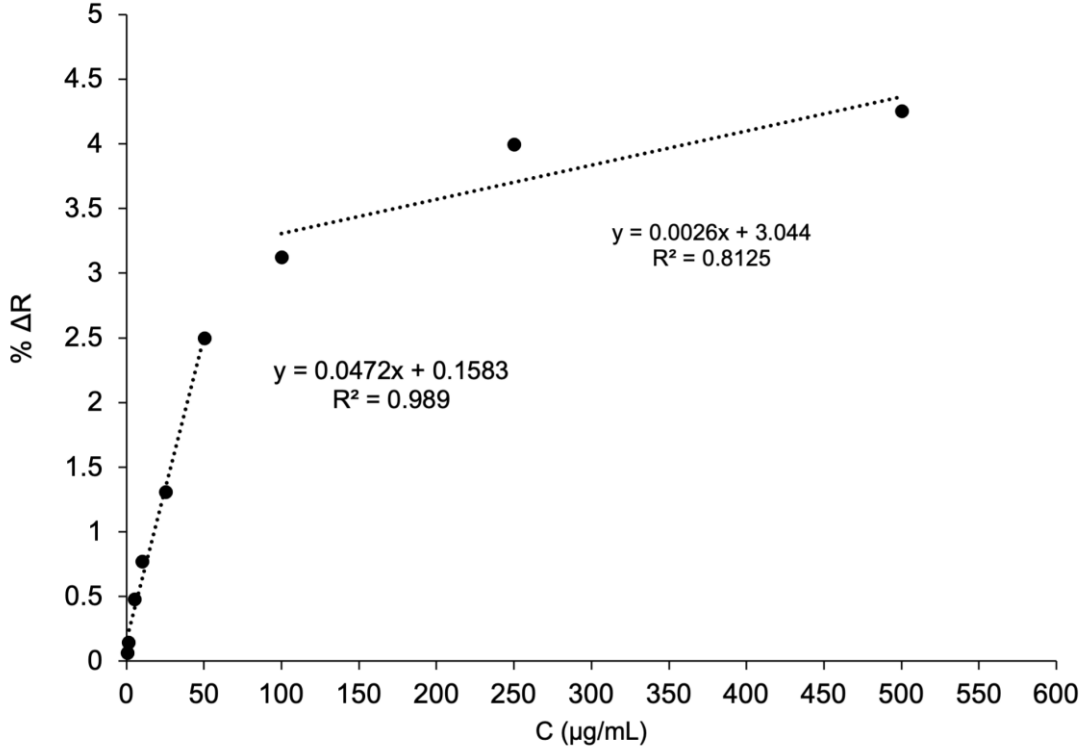
Şekil 4.6'da görüldüğü üzere AuNP-MIP SPR sensörü için 0.01-500 µg/mL lizozim derişim aralığında alınan veriler incelendiğinde elde edilen doğrunun denklemi $y=0.1897x+0.2525$ ve doğrusallık katsayısı ise (R^2) 0.9955 iken 100-500 µg/mL lizozim derişim aralığında alınan verilerde ise; elde edilen doğrunun denklemi $y=0.0061x+14.115$ ve doğrusallık katsayısı ise (R^2) 0.9396 olarak hesaplanmıştır. AuNP-MIP SPR sensörde kinetik analiz verileri kullanılarak en düşük tayin limiti (LOD: 3s/m) ve en düşük miktar limiti (LOQ: 10s/m) değerleri hesaplanmıştır. 's' ve 'm' sırasıyla sensöre denge çözeltisi verildiğinde elde edilen sinyal değeri (ΔR) ölçümlerine ait standart sapma değeri ve kalibrasyon grafiğinin eğimini ifade etmektedir. Denge çözeltisi için (ΔR) değeri elde edilen 5 ölçümün ortalaması hesaplanarak, ayrıca ölçümlerin standart sapmaları ile SPR sensörler için sırasıyla 0.0005 olarak belirlenmiştir. Buna göre kalibrasyon grafiğine ait $y=0.1897x+0.2525$ denklemi kullanılarak LOD 0.008 µg/mL ve LOQ 0.026 µg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. 0.01-500 µg/mL aralığında lizozim derişimi ile %ΔR arasındaki ilişki.

MIP SPR sensörü için 0.5-50 µg/mL ve 100-500 µg/mL lizozim derişim aralığında alınan verilerden elde edilen doğru denklemleri sırası ile $y=0.0472x+0.1583$ ve doğrusallık katsayısı (R^2) 0.989 ve $y=0.0026x+3.044$ ve doğrusallık katsayısı (R^2) 0.8125 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7). MIP SPR sensörde kinetik analiz verileri

kullanılarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Denge özeltisi için (ΔR) değeri elde edilen 5 ölçümün ortalaması hesaplanarak, ayrıca ölçümlerin standart sapmaları ile SPR sensörler için sırasıyla 0.0015 olarak belirlenmiştir. Buna göre kalibrasyon grafiğine ait $y=0.0472x+0.1583$ denklemini kullanarak LOD 0.095 $\mu\text{g/mL}$ iken LOQ 0.317 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir.



şekil 4.7. 0.01-500 $\mu\text{g/mL}$ aralığında lizozim derişimi ile $\% \Delta R$ arasındaki ilişki.

Literatürde lizozim tespitine yönelik yapılan çalışmalar aşağıda bulunan izelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Lizozim tespitine yönelik literatürdeki bazı çalışmalar

Sensör Tipi	Kinetik Çalışma Aralığı	Saptama Sınırı	Analiz Edilen Örnek	Yüzey Modifikasyonu	Kaynak
Elektrokimyasal	20 μ M - 150 nM	62 nM ve 141 nM	Yapay Tükürük	Poly-scopoletin film	[71]
SPR	1 - 500 nM	0.66 nM	Tavuk Yumurtası Akı	PMAPA NP	[72]
SPR	0 - 40 μ g/mL	3.5 nM	Seyreltilmemiş Serum	rGO	[73]
L-SPR	3- 150 nM	1.5 nM	Süt	AgNP	[74]
SPR	21-1400 nM	0.084 nM	Tavuk Yumurtası Akı	PEDMAH NP	[75]
SPR	0.05 - 80 μ g/mL	2.4 nM	Şarap	Aptamer	[76]
SPR	0.01 - 500 μ g/mL	0.095 μ g/mL	Yapay Plazma	AuNP	Bu tez çalışması
			Yapay Gözyaşı		
			Yapay İdrar		

Analitin serbest hali akış hücresine sabit bir şekilde bağlandığında, bu bağlanmanın birinci dereceden koşullar altında nasıl değiştiğini ifade etmek için aşağıdaki denklem kullanılır:

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

Yukarıdaki denklemde, $d\Delta R/dt$ SPR sinyalindeki değişim hızını, R ve R_{maks} , bağlanma ile ölçülen maksimum sinyali, C (μ g/mL) analit derişimini, k_a (mL/ μ g.s) bağlanma hız sabitini ve k_d (1/s) ayrılma hız sabitini temsil etmektedir.

Bağlanma sabiti K_A ise şu şekilde hesaplanır:

$$K_A = k_a / k_d \quad (4.2)$$

Denge durumunda, $d\Delta R/dt=0$ olur ve bu durumda denklem basitleştirilir ve şu hale gelir:

$$\Delta R_{denge} / C = K_A \Delta R_{maks} - K_A \Delta R_{denge} \quad (4.3)$$

Bu denklem, bağlanma sabiti K_A 'ya bağlı bir denklem sağlar, böylece K_A , $\Delta R_{\text{denge}}/C$ 'ye karşı ΔR_{denge} grafiğinden hesaplanabilir. Ayrılma sabiti K_D , $1/K_A$ 'dır. Eşitlik 4.2 ve Eşitlik 4.3 kullanarak, K_D yerine k_d/k_a yazılarak denklem yeniden düzenlenir:

$$d\Delta R/dt = k_a C \Delta R_{\text{maks}} - (k_a C + k_d) \Delta R \quad (4.4)$$

Bu denklemin verdiği, eğimi $-(k_a C + k_d)$ olan bu doğru, etkileşim kontrollü kinetikler için çizilen $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafiğidir. Başlangıç bağlanma hızı analitiğinin doğrusalık sağlaması nedeniyle, kantitatif derişim belirlenirken kullanılır. Bu, belirli bir analit maddesinin bir yüzeye bağlanma hızının, başlangıç konsantrasyonuyla doğru orantılı olduğu anlamına gelir. Dolayısıyla, analitin belirli bir konsantrasyonu ile bağlanma hızı arasındaki ilişkiyi belirlemek için başlangıç bağlanma hızı analitiği kullanılabilir.

R_{maks} değeri bilindiğinde, tek bir sensorgram kullanılarak k_a (bağlanma hızı sabiti) ve k_d (ayrılma hızı sabiti) değerleri belirlenebilir. Ancak, bu yöntemin uygulanması yüzey doygunluğu için yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyar ve bu da deneysel olarak R_{maks} 'ın belirlenmesini zorlaştırır. Bu nedenle, genellikle farklı analit konsantrasyonlarında bağlanma sensorgramlarının alınması tercih edilir. Bu yaklaşım, farklı konsantrasyonlarda bağlanma hızının değerlendirilmesine ve daha sonra bu verilerin analiz edilmesine olanak tanır. $d\Delta R/dt$ 'ye karşı ΔR grafikleri, ileri ve geri yöndeki hız sabitleriyle ilişkili olan bir eğim değerine (S) karşılık gelir. Bu eğim değeri, bağlanma ve ayrılma hız sabitleriyle ilişkilidir ve bu nedenle bu grafiklerin analizi, analitin bağlanma kinetiğinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabilir.

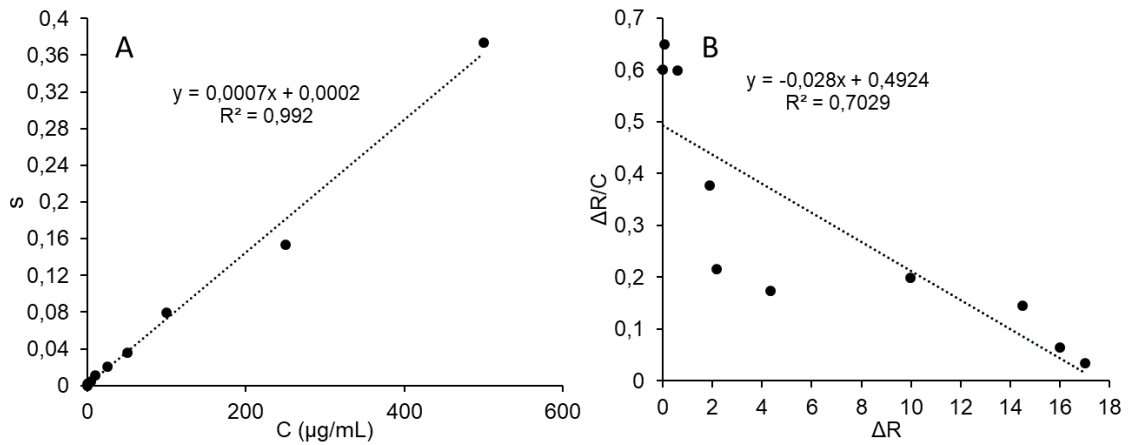
$$S = k_a C + k_d \quad (4.5)$$

S 'ye karşı C grafiği, eğimi k_a olan bir doğru verir, bu doğru teorik olarak C eksenini kestiğinde k_d değerini verir. Ancak, bu yaklaşım her zaman kesin ve doğru

sonuçlar vermeyebilir. Çünkü deneylerde çeşitli faktörler, özellikle deneysel hatalar ve sistemsel varyasyonlar, hesaplamaları etkileyebilir. Örneğin, arka plan gürültüsü, yüzey özelliklerindeki değişiklikler veya analitik kimyasal etkileşimler gibi faktörler, sonuçları etkileyebilir ve kesim noktasının doğruluğunu etkileyebilir. Bu nedenle, ayrışma kinetiğinin daha iyi anlaşılması için genellikle daha fazla analiz yapılması gereklidir. Ayrışma kinetiği, analitin yüzeyden ayrılma hızını ifade eder ve bu da bağlanma kinetiği kadar önemlidir. Bu kinetik süreç, analitlerin bağlanma sitesinden nasıl ayrıldığını ve bu ayrılmanın hızını tanımlar. Dolayısıyla, bağlanma ve ayrılma kinetiğinin birlikte incelenmesi, analitlerin yüzeye bağlanma davranışının daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına yardımcı olabilir. Ayrıca, k_d değerinin hesaplanması için farklı yöntemler ve kontrol deneylerinin kullanılması da yaygındır. Bu, kesinliği artırabilir ve sonuçların güvenilirliğini sağlayabilir. Özetle, bağlanma ve ayrılma kinetiğinin kapsamlı bir şekilde incelenmesi, biyosensör çalışmalarında analitlerin yüzeye bağlanma ve ayrılma davranışlarının daha iyi anlaşılmasına ve bu bilgilerin daha doğru bir şekilde kullanılmasına olanak tanır.

$$\ln(\Delta R_0 / \Delta R_t) = k_d (t - t_0) \quad (4.6)$$

Burada, ΔR_0 ve ΔR_t , ayrılma eğrisindeki t_0 ve t anlarındaki SPR sinyal değerleridir.



Şekil 4.8. Bağlanma kinetik yaklaşımı (A) ve Denge analiz yaklaşımı (B).

Çizelge 4.2.Kinetik hız sabitleri

Bağlanma Kinetik Analizi	Denge Analizi (Scatchard)
$k_a, (\mu\text{g/mL})^{-1}\text{s}^{-1}$: 0.0007	ΔR_{maks} : 17.59
k_d, s^{-1} : 0.0002	$K_A, (\mu\text{g/mL})^{-1}$: 0.028
$K_A, (\mu\text{g/mL})^{-1}$: 3.5	$K_D, (\mu\text{g/mL})$: 35.71
$K_D, (\mu\text{g/mL})$: 0.285	R^2 : 0.7029
R^2 : 0.992	

Adsorpsiyon izoterm modelleri, hem heterojen hem de homojen bağlanma bölgelerini hesaba katarak malzemelerin adsorpsiyonunu analiz etmek için geliştirilmiştir. Bu modeller, moleküler tanıma amacıyla moleküler baskılanmış polimerlere uygulanabilir. Adsorpsiyon izoterm modelleri, analitler ile MIP yüzeyleri arasındaki etkileşimleri karakterize ederek adsorpsiyon kimyasını anlamayı ve MIP'lerin bağlanma özelliklerini sayısal olarak tanımlamayı amaçlar.

Lizozim baskılanmış SPR sensör için elde edilen kinetik veriler ile Langmuir (Eşitlik 4.7), Freundlich (Eşitlik 4.8) ve Langmuir–Freundlich (Eşitlik 4.9) adsorpsiyon izoterm modelleri incelenmiştir. Bu üç modelin eşitlikleri aşağıdaki gibidir:

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

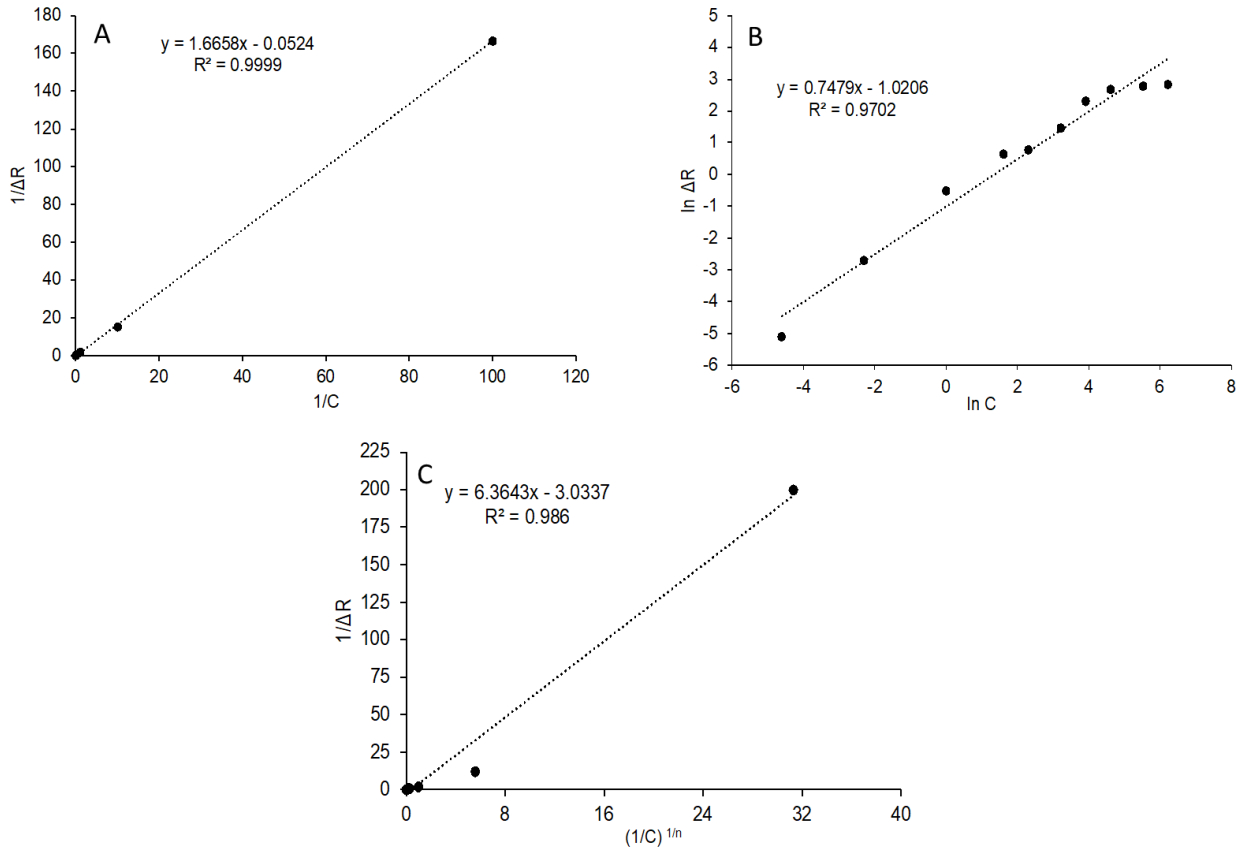
$$\Delta R = \Delta R_{\text{maks}} C^{1/n} \quad (4.8)$$

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

Kinetik analizde en yüksek SPR sinyal kayması ΔR_{maks} olarak ifade edilirken,

$d\Delta R/dt$ sinyal değişimin hızını, ΔR_{denge} denge halindeki sinyal kaymasını, C ($\mu\text{g/mL}$) analit derişimini, K_A ($\mu\text{g/mL}$)⁻¹ bağlanma denge sabitini, K_D ($\mu\text{g/mL}$): ayrışma denge sabitini, $1/n$ Freundlich yüzey heterojenite indeksini temsil eder.

Şekil 4.9.'da gösterildiği üzere, Langmuir, Freundlich ve Langmuir–Freundlich olmak üzere üç farklı adsorpsiyon izoterm modeli uygulanarak AuNP-MIP sensör ile lizozim çözeltisi arasında meydana gelen etkileşim türü belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, Şekil 4.9.'a dayanarak elde edilen veriler, lizozim tayini için en uygun modelin Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli olduğunu göstermiştir. AuNP-MIP sensörün yüzeyine kaplanan filmin tek tabakalı bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. Çizelge 4.2'de hesaplanan ΔR_{maks} , K_A ve K_D kinetik sabitleri özetlenmiştir. Matematiksel hesaplamalara göre elde edilen korelasyon katsayıları karşılaştırıldığında, Langmuir adsorpsiyon izoterm modelinin ($R^2=0.9999$) Freundlich adsorpsiyon izoterm modeline ($R^2=0.9702$) göre daha yüksek bir korelasyon katsayısına sahip olduğu gözlemlenmiştir.



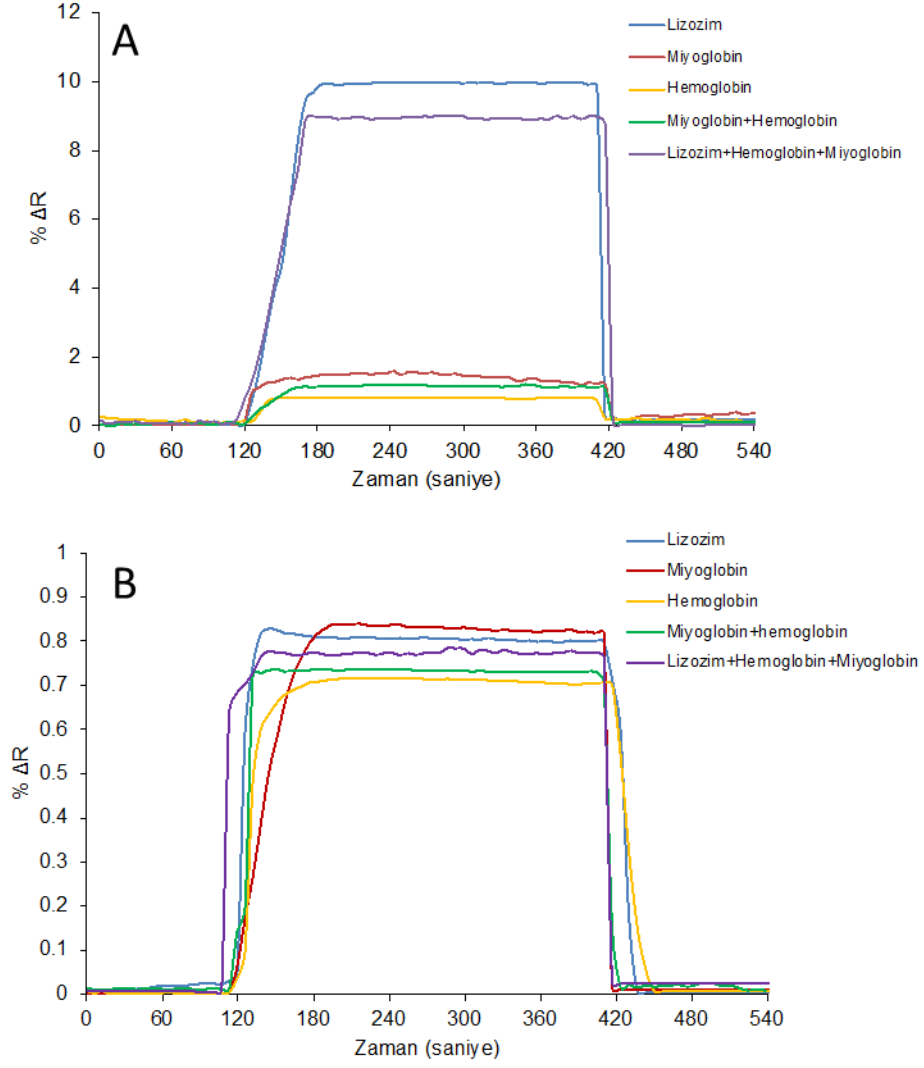
Şekil 4.9. (a) Langmuir; (b) Freundlich; (c) Langmuir-Freundlich adsorpsiyon izoterm modelleri

Çizelge 4.3.Adsorpsiyon izoterm modellerin parametreleri

Langmuir	Freundlich	Langmuir-Freundlich
ΔR_{maks} : 19.08 K_D , ($\mu\text{g/mL}$): 31.79 K_A , ($\mu\text{g/mL}$) ⁻¹ : 0.031 R^2 : 0.999	ΔR_{maks} : 2.77 $1/n$: 0.7479 R^2 : 0.9702	ΔR_{maks} : 0.329 $1/n$: 0.7479 K_D , ($\mu\text{g/mL}$): 0.2.09 K_A , ($\mu\text{g/mL}$) ⁻¹ : 0.476 R^2 : 0.986

4.3. SPR Sensörlerin Seçiciliklerinin İncelenmesi

Seçicilik çalışmalarında yarışmacı ajan olarak şekil, boyut ve moleküler ağırlığı bakımından lizozim molekülüne benzer hemoglobin ve miyoglobin kullanılmıştır. Fosfat tamponunda (pH 7.4) 50 $\mu\text{g/mL}$ derişiminde hazırlanan yarışmacı ajanlar hemoglobin ve miyoglobin ilk olarak ayrı ayrı sisteme verilmiş sonrasında ikili hemoglobin+miyoglobin karışımı ve üçlü lizozim+hemoglobin+miyoglobin karışımı SPR sistemine verilerek kinetik analizler yapılmıştır. Şekil 4.10. A'da AuNP-MIP sensör için yarışmacı ajanlar miyoglobin ve hemoglobinin lizozim kadar SPR sensör yüzeyine bağlanamadığı dolayısıyla SPR sensörün lizozime karşı seçici olduğu gösterilmiştir. Ayrıca karmaşık ortamda lizozimin etkisiyle yine sinyal cevabında artış olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 4.10.B'de SPR sensorgramları verilen AuNP-NIP kinetik analizlerinde, moleküler baskılamanın etkisini göstermek amacıyla yapılmıştır. AuNP-MIP deneylerinde yapıldığı gibi 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik çözeltiler ayrı ayrı sisteme verilerek sensör cevapları gerçek zamanlı olarak gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, AuNP-NIP sensörün yarışmacı ajanlara ve lizozime karşı olan bağlanma kinetiğinin AuNP-MIP sensörlere göre daha düşük olduğu ve hatta lizozime karşı da seçici olmadığını göstermiştir.



Şekil 4.10. AuNP-MIP (A) ve AuNP-NIP (B) SPR sensörlere ait seçicilik sensogramları

Aşağıda yer alan eşitliklerle, lizozim, miyoglobin ve hemoglobin moleküllerine göre dağılıma ve seçicilik katsayıları belirlenmiştir.

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

$$k = \Delta R_{\text{lizozim}} / \Delta R_{\text{yarışmacı}} \quad (4.11)$$

$$k' = k_{\text{MIP}} / k_{\text{NIP}} \quad (4.12)$$

Yukarıda verilen denklemlerde kullanılan fonksiyon değişkenlerde dağılma katsayısı K_d ($\mu\text{g/mL}$)⁻¹, kullanılan nükleozidlerin ilk ve son derişimleri C_i ve C_f ($\mu\text{g/mL}$), çözelti hacmi V (mL) ve polimerin kütlesi m (g) ile ifade edilmektedir.

Eşitlik 4.11 seçicilik katsayısını (k) belirlerken kullanılırken, Eşitlik 4.12 bağıl seçicilik katsayılarını (k') belirlerken kullanılmaktadır. Karşılaştırılan lizozim baskılanmış ve baskılanmamış SPR sensörler arasında, lizozim için sinyalde önemli bir düşüş tespit edilmiştir, bunun sonucunda lizozim baskılanmış sensörün hemoglobin ve miyogloblin için tepkisinin daha zayıf olduğu belirlenmiştir. Bağıl seçicilik katsayılarına (k') dayanarak, lizozim baskılanmış SPR sensörünün lizozim, hemoglobin ve miyogloblin gibi moleküllere karşı seçiciliğinin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, lizozim baskılanmış SPR sensörün, diğer moleküllerin adsorpsiyonuna karşı daha etkili bir baskılama faktörüne sahip olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, moleküler baskılanmış filmlerin adsorpsiyon seçiciliğini artırma potansiyeline sahip olduğunu ve spesifik tanıma bölgelerinin diğer moleküller için daha az uygun hale geldiğini öne sürmektedir. Bu, moleküler tanıma ve ayırma uygulamalarında moleküler baskılanmış filmlerin önemli bir rol oynayabileceğini gösterir. Bu filmler, özellikle belirli bir hedef molekülün seçici bir şekilde yakalanması ve tespit edilmesi gerektiği durumlarda kullanılabilir.

Çizelge 4.4. Seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları

Kullanılan moleküller	AuNP-MIP		AuNP-NIP		k'
	ΔR	k	ΔR	k	
Lizozim	9.94	-	0.81	-	-
Miyogloblin	1.49	6.67	0.83	0.97	6.88
Hemogloblin	0.78	12.74	0.71	1.14	11.18
Miyogloblin+Hemogloblin	1.15	8.64	0.73	1.11	7.78
Lizozim+Miyogloblin+Hemogloblin	8.98	1.11	0.79	1.02	1.08

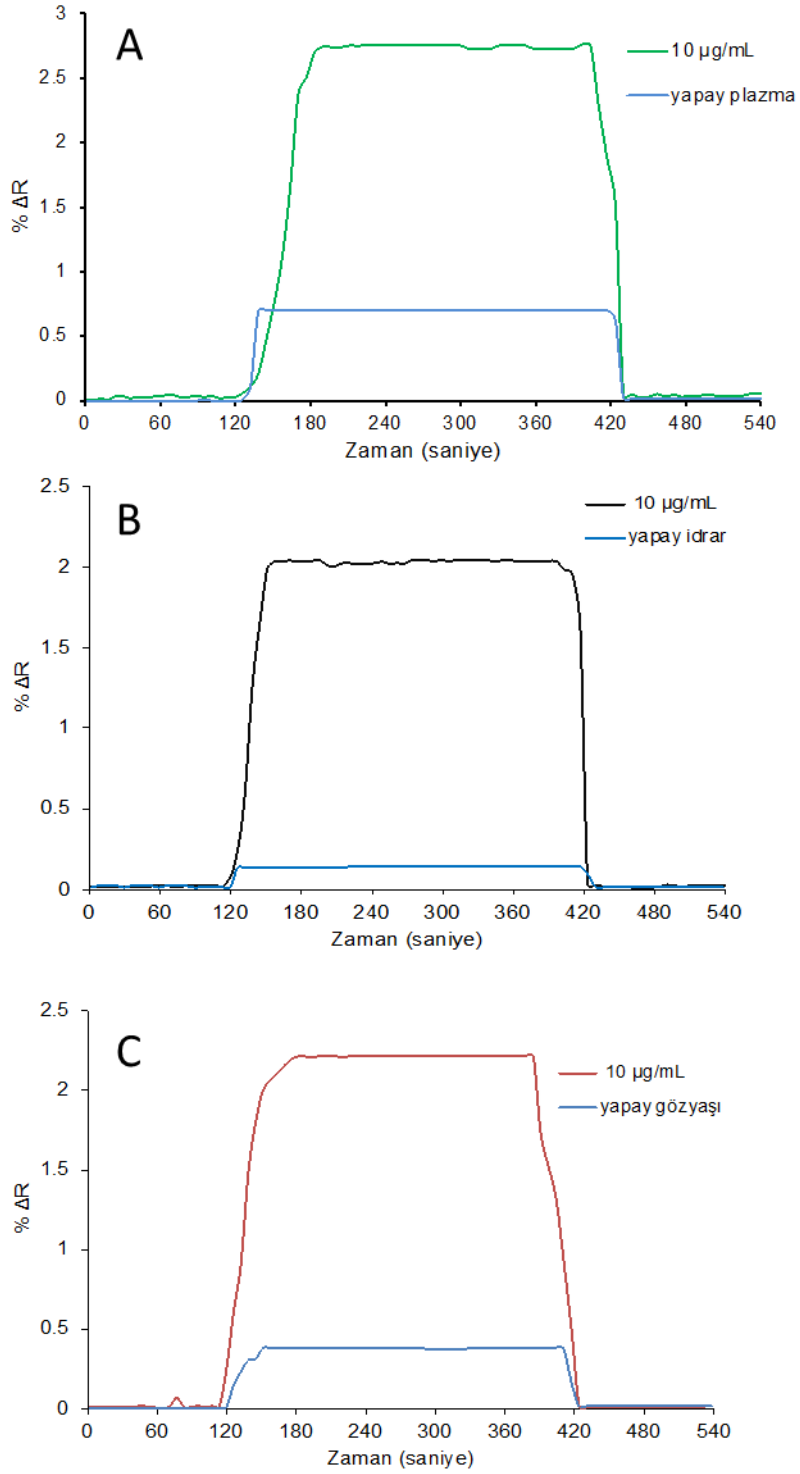
4.4. Yapay plazma, idrar ve göz yaşı örneklerden lizozim tayini

Yapay idrar, plazma ve gözyaşı örneklerinde lizozimi tayini için AuNP-MIP SPR sensörler kullanılabilir. Bu amaçla, yapılan bu çalışmada 10 µg/mL'lik lizozim içeren yapay idrar, yapay plazma ve yapay gözyaşı çözeltileri hazırlanmış ve Şekil 4.11.'de AuNP-MIP sensörle yapılan bu deneylerin kırılma indisi değişimleri gösterilmiştir. İlk olarak, yapay plazma çözeltisinde 10 µg/mL derişiminde lizozim çözeltisi hazırlanmıştır. 2 dakika boyunca pH 7.4 fosfat tamponu sisteme verilerek sistem dengeye getirilmiş sonrasında 5 dakika boyunca sadece yapay plazma çözeltisi sisteme verilmiş ve son aşama olarak da 2 dakika boyunca desorpsiyon çözeltisi olan %10'luk etilen glikol çözeltisi sistemden geçirilmiştir (Şekil 4.11. A). Aynı işlem 10 µg/mL lizozim içeren yapay plazma çözeltisi için de gerçekleştirilmiş olup iki sensorgram Şekil 4.11. A'da verilmiştir.

Yapay idrar çözeltisi, yapay plazma deneylerinde yapıldığı gibi 10 µg/mL lizozim içeren çözelti hazırlanarak AuNP-MIP SPR sensör ile kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Öncelikle sisteme, sırasıyla 2 dakika fosfat tamponu, 5 dakika yapay idrar çözeltisi ve 2 dakika %10'luk etilen glikol çözeltisi verilmiştir. 10 µg/mL derişimde lizozim içeren yapay idrar çözeltisi için de aynı işlemler yapılmıştır ve alınan sensorgramlar Şekil 4.11. B'de gösterilmiştir.

Yapay idrar ve yapay plazma çalışmalarında da anlatıldığı gibi yapay gözyaşı deneyleri de 10 µg/mL lizozim içeren çözelti hazırlanarak AuNP-MIP SPR sensör ile kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Öncelikle sisteme, sırasıyla 2 dakika fosfat tamponu, 5 dakika yapay gözyaşı çözeltisi ve 2 dakika %10'luk etilen glikol çözeltisi verilmiştir. 10 µg/mL derişimde lizozim içeren yapay gözyaşı çözeltisi için de aynı işlemler yapılmıştır ve alınan sensorgramlar Şekil 4.11. C'de gösterilmiştir.

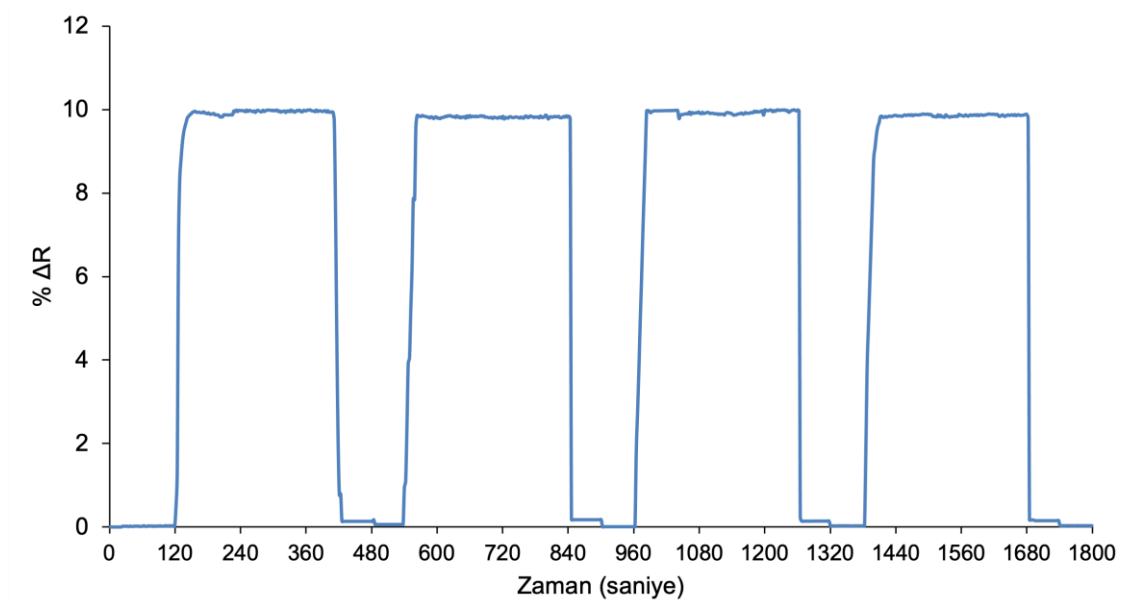
SPR kinetik analizlerinde yapay plazma, idrar ve göz yaşı örneklerine 10 µg/mL lizozim eklendiğinde geri kazanımlar sırasıyla 99.78, 99.71 ve 99.89 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. AuNP-MIP SPR sensör ile yapay plazma, yapay idrar ve yapay gözyaşı örneklerinde lizozim tayinine ait kinetik analiz sensorgramları.

4.5. Tekrar Kullanabilirliğin İncelenmesi

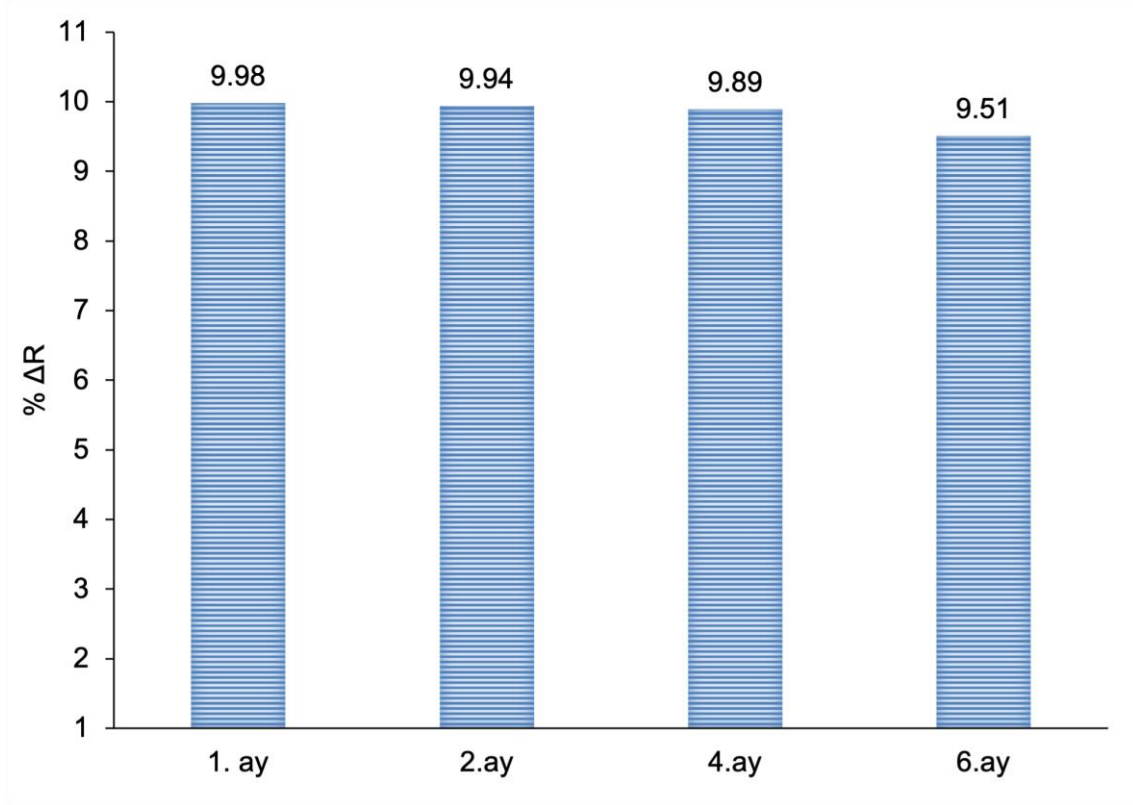
AuNP-MIP SPR sensörün tekrar kullanılabilirliğini gösterme amacıyla 50 µg/mL içeren lizozim çözeltisi sisteme peş peşe 4 kez verilerek gerçek zamanlı sensör verileri elde edilmiştir. Kinetik analiz bölümünde de anlatıldığı gibi deneyler ilk olarak 2 dakika pH 7.4 fosfat tamponu, sonrasında 5 dakika boyunca 50 µg/mL içeren lizozim çözeltisi ve en son da 2 dakika %10'luk etilen glikol desorpsiyon çözeltisi ile SPR sisteminden geçirilerek kinetik analizler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.12'de görüldüğü gibi AuNP-MIP sensör, 4 döngü boyunca tekrarlanabilir tepki göstermiş olduğu gözlemlenmiş ve SPR sensörün yüzde olarak verimi 98.6 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.12. AuNP-MIP SPR sensörün tekrar kullanılabilirlik sensorgramı

AuNP-MIP SPR sensörün tekrar kullanılabilirliği, farklı aylarda test edilmiş ve 50 µg/mL derişimde lizozim içeren sulu çözeltiler kullanılarak hazırlanan örneklerle kinetik analizler gerçekleştirilmiştir, bu sonuçlar Şekil 4.13'te gösterilmiştir. Elde edilen kinetik analiz sonuçları, SPR sensorgramlarından çıkarılarak AuNP-MIP SPR sensörün verimliliğinin %95 olarak hesaplandığını göstermiştir. Bu bulgular, AuNP-MIP SPR sensörlerinin farklı zamanlarda tekrar tekrar kullanılabilirlik açısından yüksek kinetik verimlilik ve kararlılık sergilediğini ortaya koymaktadır. Bu özellik, sensörün uzun vadeli performansının değerlendirilmesi ve çeşitli uygulama senaryolarında güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi açısından

önemlidir. Verimlilik oranının yüksek olması, sensörün tekrar kullanılabilirliği konusunda güçlü ve istikrarlı bir performans sergilediğini vurgulamaktadır. Bu sonuçlar, AuNP-MIP SPR sensörlerinin pratik uygulamalarda sürekli ve etkili bir şekilde kullanılabilme potansiyelini desteklemektedir.



Şekil 4.13. AuNP-MIP SPR sensörün farklı zamanlarda tekrar kullanılabilirlik sensorgramı

5. YORUM

- Bu tez çalışmasında, moleküler baskılama yöntemi kullanılarak hedef molekül olan lizozim moleküle özgü ve yüksek seçicilikte lizozim baskılanmış ve baskılanmamış altın nanopartikül temelli yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörler hazırlanmıştır.
- İlk olarak, SPR altın çip yüzeyi, asidik pirana çözeltisi kullanılarak temizlenmiş ve ardından etil alkol ile yıkanarak temizlenmiştir.
- Daha sonra, SPR çip yüzeyinde tiyol grupları oluşturmak amacıyla altın çip yüzeyine allil merkaptan çözeltisi damlatılmış ve 24 saat boyunca immobilizasyon sağlanmıştır.
- Lizozim molekülünün tespiti için önceden belirlenmiş olan hedef molekül miktarı sabit tutularak, lizozim tayini için ön kompleks oluşturulmuştur. Bu ön kompleks, lizozim molekülü ve MATrp monomerin bir araya getirilmesiyle hazırlanmıştır.
- Bu ön kompleks, belirli derişimlerde lizozim içermekte olup, hedef molekülün tespiti için özel olarak hazırlanmıştır. Bu adım, moleküler baskılama sürecinin temelini oluşturur ve lizozim molekülünün özel olarak tanınmasını sağlamak üzere özel olarak tasarlanan yüzeylerin oluşturulmasına olanak tanır.
- Bu tez çalışması, moleküler baskılanmış yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörlerin, çeşitli vücut sıvılarından lizozim tayini yapabilme kabiliyetini ortaya koymakla kalmayıp aynı zamanda altın nanopartikül kullanımının sinyaldeki kazanç ne kadar faydalı olduğunu da göstermiştir.
- Öncelikle, moleküler baskılama tekniği kullanılarak hazırlanan SPR sensörler, lizozim molekülüne özgü yüksek seçicilik ve duyarlılık sergilemiştir.
- Bu sensörler, farklı vücut sıvılarından elde edilen örnekler üzerinde başarılı bir şekilde lizozim tespiti gerçekleştirmiştir. Yapay plazma, idrar ve gözyaşı gibi farklı vücut sıvılarından alınan örneklerde, moleküler baskılama tekniği kullanılarak hazırlanan SPR sensörlerinin istikrarlı ve güvenilir bir şekilde lizozim tespiti yapabildiği gözlemlenmiştir.

- Ayrıca, altın nanopartiküllerin kullanımıyla elde edilen sinyal kazancının, moleküler baskılanmış SPR sensörlerinin performansını önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Altın nanopartiküllerin katkısıyla sensörlerin duyarlılık seviyeleri artarken, ölçüm sonuçlarındaki sinyal-gürültü oranında da belirgin bir iyileşme sağlanmıştır. Bu durum, altın nanopartiküllerin kullanımının, moleküler baskılama teknolojisinin duyarlılık ve ölçüm hassasiyetine olumlu bir katkı sunduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, moleküler baskılanmış SPR sensörlerinin biyomedikal ve klinik uygulamalarda başarıyla kullanılacak potansiyeli olduğunu vurgular.
- Hedef molekül olan lizozimi çip yüzeyine bağlamak için önce yüzey, asidik piranha çözeltisi ile hidrosilleştirilmiş ve ardından -SH gruplarına bağlanmıştır. Modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyinin temas açısı 79.4° iken, MIP SPR sensör yüzeyinin temas açısı 82.9° dir. Hem lizozim hem de MATrp monomerinin hidrofobik özelliklerinden dolayı temas açısı artmıştır.
- AuNP-MIP SPR sensör yüzeyinin temas açısı 78.2° iken AuNP-NIP SPR sensör yüzeyinin temas açısı ise 77.4° dir. SPR sensör yüzeyindeki polimerik film içine hidrofilik özelliğe sahip AuNP eklenmesi ile hazırlanan AuNP-MIP ve AuNP-NIP SPR sensörlerin yüzey temas açılarının azalmasına sebep olmuştur. Bu sonuçlar, özellikle nanoteknolojinin ve nanomalzemelerin biosensör teknolojilerinde potansiyel uygulamalarını anlamak adına önemli bilgiler sunmaktadır.
- SPR sensör yüzeylerinin yüzey pürüzlülüğü AFM cihazı ile belirlenmiş ve modifiye edilmemiş SPR çip yüzeyi, MIP, AuNP-MIP ve AuNP-NIP SPR sensör yüzeylerinin pürüzlülüğü sırası ile 10.50 nm, 50.62 nm, 78.57 nm ve 71.32 nm bulunmuştur. Bu sonuçları, allil merkaptan ile modifiye edilmiş SPR çip yüzeyine lizozim molekülünün başarılı bir biçimde baskılandığı sonucuna varılmasını sağlamaktadır.
- Farklı yapay örneklerden, çeşitli lizozim derişimleri içeren örnek setleri hazırlanmıştır. Her bir örnek seti için belirlenen lizozim derişiminin artmasıyla birlikte, sistemde gözlemlenen kırılma indisi de belirgin bir

şekilde artış göstermiştir. Bu bilgiler biyosensör teknolojileri ve analitik uygulamalarda kullanılabilir potansiyel bilimsel bulgular sunmaktadır.

- Ayrıca altın nanopartikül ile yüzeyi işlevselleştirilmiş çip yüzeyinden daha yüksek sinyal alınmış olup, gürültünün de azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, altın nanopartiküllerin kullanımının çip yüzeyinin özelliklerini arttırdığını ve analiz sonuçlarının duyarlılık ve güvenilirlik açısından daha avantajlı hale geldiğini göstermektedir.
- Art arda gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik deneyleri, hazırlanan çip yüzeyinin tekrar tekrar kullanılabilir özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Bu tekrarlanabilirlik özellikleri, çipin dayanıklılığını ve uzun ömürlülüğünü vurgular, böylece birçok analiz veya ölçüm süreci boyunca güvenilir sonuçlar alınabilir. Yapılan deneylerde çip yüzeyinin stabilitesi ve performansının zaman içinde değişmediği gözlemlenmiştir. Bu durum, hazırlanan çip yüzeyinin SPR sensör uygulamalarında kullanılabilir güvenilir bir analitik platform olma potansiyelini artırır.

6. KAYNAKLAR

- [1] G. Lesniewski, J. Stangierski, What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? - A review, *Trends in Food Science & Technology*, 71 (2018) 46-51.
- [2] P. Ferraboschi, S. Ciceri, P. Grisenti, Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic, *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10 (2021).
- [3] K.A. Kirk, A. Vasilescu, D. Andreescu, D. Senarathna, S. Mondal, S. Andreescu, Collision-Based Electrochemical Detection of Lysozyme Aggregation, *Analytical Chemistry*, 93 (2021) 2026-2037.
- [4] G. Melinte, G. Selvolini, C. Cristea, G. Marrazza, Aptasensors for lysozyme detection: Recent advances, *Talanta*, 226 (2021) 122169.
- [5] X. Huang, S. Sang, Z. Yuan, Q. Duan, X. Guo, H. Zhang, C. Zhao, Magnetoelastic Immunosensor via Antibody Immobilization for the Specific Detection of Lysozymes, *ACS Sensors*, 6 (2021) 3933-3939.
- [6] J. Wang, Y. Yan, S. Chang, Y. Han, Y. Geng, Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy detection of absorption manner of lysozyme based on nanodots arrays, *Applied Surface Science*, 509 (2020) 145332.
- [7] G. Leśniewski, T. Yang, Lysozyme and its modified forms: A critical appraisal of selected properties and potential, *Trends in Food Science & Technology*, 107 (2021) 333-342.
- [8] M. Arabi, A. Ostovan, J. Li, X. Wang, Z. Zhang, J. Choo, L. Chen, Molecular Imprinting: Green Perspectives and Strategies, *Advanced Materials*, 33 (2021) 2100543.
- [9] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, Molecular imprinting: perspectives and applications, *Chemical Society Reviews*, 45 (2016) 2137-2211.
- [10] S.A. Zaidi, Molecular imprinting: A useful approach for drug delivery, *Materials Science for Energy Technologies*, 3 (2020) 72-77.
- [11] E.N. Ndunda, Molecularly imprinted polymers—A closer look at the control polymer used in determining the imprinting effect: A mini review, *Journal of Molecular Recognition*, 33 (2020) e2855.
- [12] Y. Saylan, S. Akgönüllü, D. Çimen, A. Derazshamshir, N. Bereli, F. Yılmaz, A. Denizli, Development of surface plasmon resonance sensors based on

molecularly imprinted nanofilms for sensitive and selective detection of pesticides, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241 (2017) 446-454.

[13] Q. Wang, Z.H. Ren, W.M. Zhao, L. Wang, X. Yan, A.S. Zhu, F.M. Qiu, K.K. Zhang, Research advances on surface plasmon resonance biosensors, *Nanoscale*, 14 (2022) 564-591.

[14] M. Piliarik, H. Vaisocherová, J. Homola, Surface plasmon resonance biosensing, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 503 (2009) 65-88.

[15] Z. Huo, Y. Li, B. Chen, W. Zhang, X. Yang, X. Yang, Recent advances in surface plasmon resonance imaging and biological applications, *Talanta*, 255 (2023) 124213.

[16] Y.H. Liao, M.B. Brown, G.P. Martin, Turbidimetric and HPLC assays for the determination of formulated lysozyme activity, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 53 (2001) 549-554.

[17] G. Sener, E. Ozgur, E. Yilmaz, L. Uzun, R. Say, A. Denizli, Quartz crystal microbalance based nanosensor for lysozyme detection with lysozyme imprinted nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2010) 815-821.

[18] T. Wu, Q. Jiang, D. Wu, Y. Hu, S. Chen, T. Ding, X. Ye, D. Liu, J. Chen, What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review, *Food chemistry*, 274 (2019) 698-709.

[19] M.-L. Vidal, J. Gautron, Y. Nys, Development of an ELISA for Quantifying Lysozyme in Hen Egg White, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 2379-2385.

[20] R.M. Banciu, N. Numan, A. Vasilescu, Optical biosensing of lysozyme, *Journal of Molecular Structure*, 1250 (2022) 131639.

[21] N. Bellassai, R. D'Agata, G. Spoto, Plasmonic aptasensor with antifouling dual-functional surface layer for lysozyme detection in food, *Analytica Chimica Acta*, 1283 (2023) 341979.

[22] P. Subramanian, A. Lesniewski, I. Kaminska, A. Vlandas, A. Vasilescu, J. Niedziolka-Jonsson, E. Pichonat, H. Happy, R. Boukherroub, S. Szunerits, Lysozyme detection on aptamer functionalized graphene-coated SPR interfaces, *Biosensors and Bioelectronics*, 50 (2013) 239-243.

[23] S. Ghosh, N.I. Khan, J.G. Tsavalas, E. Song, Selective Detection of Lysozyme Biomarker Utilizing Large Area Chemical Vapor Deposition-Grown

Graphene-Based Field-Effect Transistor, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6 (2018).

[24] H.R. Culver, M.E. Wechsler, N.A. Peppas, Label-Free Detection of Tear Biomarkers Using Hydrogel-Coated Gold Nanoshells in a Localized Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor, *ACS Nano*, 12 (2018) 9342-9354.

[25] L. Zhu, Z. Hu, Y. Shen, Y. Wang, Preparation and application of lysozyme molecularly imprinted surface plasmon resonance biosensors, *Microchemical Journal*, 190 (2023) 108665.

[26] A.J. van Hengel, Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389 (2007) 111-118.

[27] P.M. Castillo, F.J. Fernández-Acejo, J.M. Carnerero, R. Prado-Gotor, A. Jimenez-Ruiz, Colorimetric, Naked-Eye Detection of Lysozyme in Human Urine with Gold Nanoparticles, *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 11 (2021).

[28] M. Hou, M. Zhang, L. Chen, K. Gong, C. Pan, Y. Wang, Amplification of lysozyme signal detected in capillary electrophoresis using mixed polymer brushes coating with switchable properties, *Talanta*, 202 (2019) 426-435.

[29] J. Pu, H. Wang, C. Huang, C. Bo, B. Gong, J. Ou, Progress of molecular imprinting technique for enantioseparation of chiral drugs in recent ten years, *Journal of Chromatography A*, 1668 (2022) 462914.

[30] L.I. Andersson, Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 745 (2000) 3-13.

[31] D. Çimen, N. Bereli, M. Andaç, A. Denizli, Molecularly imprinted cryogel columns for Concanavalin A purification from jack bean extract, *Separation Science Plus*, 1 (2018) 454-463.

[32] N. Tarannum, S. Khatoon, B.B. Dzantiev, Perspective and application of molecular imprinting approach for antibiotic detection in food and environmental samples: A critical review, *Food Control*, 118 (2020) 107381.

[33] G. Vasapollo, R.D. Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective, *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (2011) 5908-5945.

- [34] D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, Molecularly Imprinted Surface Plasmon Resonance Sensor-Based Devices for Clinical Applications, *Biomedical Materials & Devices*, 1 (2023) 202-212.
- [35] S. Akgönüllü, A. Denizli, Molecular imprinting-based sensors: Lab-on-chip integration and biomedical applications, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 225 (2023) 115213.
- [36] N. Nawaz, N.K. Abu Bakar, H.N. Muhammad Ekramul Mahmud, N.S. Jamaludin, Molecularly imprinted polymers-based DNA biosensors, *Analytical biochemistry*, 630 (2021) 114328.
- [37] B. Fresco-Cala, A.D. Batista, S. Cárdenas, Molecularly Imprinted Polymer Micro- and Nano-Particles. A review, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25 (2020).
- [38] F. Bonini, S. Piletsky, A.P. Turner, A. Speghini, A. Bossi, Surface imprinted beads for the recognition of human serum albumin, *Biosensors & bioelectronics*, 22 (2007) 2322-2328.
- [39] G. Wulff, Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates— A Way towards Artificial Antibodies, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34 (1995) 1812-1832.
- [40] C.C. Hwang, W.C. Lee, Chromatographic characteristics of cholesterol-imprinted polymers prepared by covalent and non-covalent imprinting methods, *Journal of chromatography. A*, 962 (2002) 69-78.
- [41] P. Gorai, Y. Mizuno, M. Kumar, R. Jha, Molecular Imprinting Polymer Nanoparticles Coupled with an Optical Sensor for Sensitive and Label-Free Detection of p-Cresol, *ACS Applied Nano Materials*, 6 (2023) 12946-12956.
- [42] G. Aylaz, M. Andaç, A. Denizli, M. Duman, Recognition of human hemoglobin with macromolecularly imprinted polymeric nanoparticles using non-covalent interactions, *Journal of Molecular Recognition*, 34 (2021) e2935.
- [43] S.N.N.S. Hashim, R.I. Boysen, L.J. Schwarz, B. Danylec, M.T.W. Hearn, A comparison of covalent and non-covalent imprinting strategies for the synthesis of stigmasterol imprinted polymers, *Journal of Chromatography A*, 1359 (2014) 35-43.
- [44] C. Dong, H. Shi, Y. Han, Y. Yang, R. Wang, J. Men, Molecularly imprinted polymers by the surface imprinting technique, *European Polymer Journal*, 145 (2021) 110231.

- [45] L. Effting, M.C. Prete, A. Urbano, L.M. Effting, M.E.C. González, A. Bail, C.R.T. Tarley, Preparation of magnetic nanoparticle-cholesterol imprinted polymer using semi-covalent imprinting approach for ultra-effective and highly selective cholesterol adsorption, *Reactive and Functional Polymers*, 172 (2022) 105178.
- [46] T. Sajini, B. Mathew, A brief overview of molecularly imprinted polymers: Highlighting computational design, nano and photo-responsive imprinting, *Talanta Open*, 4 (2021) 100072.
- [47] C. Alexander, H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, J. O'Mahony, M.J. Whitcombe, Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *Journal of molecular recognition : JMR*, 19 (2006) 106-180.
- [48] A. Lusina, M. Cegłowski, Molecularly Imprinted Polymers as State-of-the-Art Drug Carriers in Hydrogel Transdermal Drug Delivery Applications, *Polymers*, 14 (2022) 640.
- [49] H. Wu, G. Lin, C. Liu, S. Chu, C. Mo, X. Liu, Progress and challenges in molecularly imprinted polymers for adsorption of heavy metal ions from wastewater, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 36 (2022) e00178.
- [50] A.A. Ensafi, P. Nasr-Esfahani, Chapter 2 - Fundamental aspects of molecular imprinting, in: M.P. Sooraj, A.S. Nair, B. Mathew, S. Thomas (Eds.) *Molecularly Imprinted Polymer Composites*, Woodhead Publishing 2021, pp. 5-20.
- [51] R.W. Wood, On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum, *Proceedings of the Physical Society of London*, 18 (1902) 269.
- [52] K.R. Srivastava, S. Awasthi, P.K. Mishra, P.K. Srivastava, Chapter 13 - Biosensors/molecular tools for detection of waterborne pathogens, in: M.N. Vara Prasad, A. Grobelak (Eds.) *Waterborne Pathogens*, Butterworth-Heinemann 2020, pp. 237-277.
- [53] F. Özdemircan, Theory and applications of surface plasmon resonance sensors *Elektrik-Elektronik Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Orta Doğu Teknik Üniversitesi*, 2021, pp. 163.
- [54] T. Nguyen, The effectiveness of online learning: Beyond no significant difference and future horizons, *MERLOT Journal of online learning and teaching*, 11 (2015) 309-319.

- [55] M. Jalilzadeh, D. Çimen, E. Özgür, C. Esen, A. Denizli, Design and preparation of imprinted surface plasmon resonance (SPR) nanosensor for detection of Zn(II) ions, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 56 (2019) 877-886.
- [56] D. Çimen, N. Bereli, S. Günaydın, A. Denizli, Molecular imprinted nanoparticle assisted surface plasmon resonance biosensors for detection of thrombin, *Talanta*, 246 (2022) 123484.
- [57] Z.T. Kurt, D. Çimen, A. Denizli, N. Bereli, Development of Optical-Based Molecularly Imprinted Nanosensors for Adenosine Detection, *ACS Omega*, 8 (2023) 18839-18850.
- [58] D. Çimen, S. Aslıyüce, T.D. Tanalp, A. Denizli, Molecularly imprinted nanofilms for endotoxin detection using an surface plasmon resonance sensor, *Analytical biochemistry*, 632 (2021) 114221.
- [59] S.S. Atale, S. Dyawanapelly, D.D. Jagtap, R. Jain, P. Dandekar, Understanding the nano-bio interactions using real-time surface plasmon resonance tool, *International Journal of Biological Macromolecules*, 123 (2019) 97-107.
- [60] P. Singh, SPR Biosensors: Historical Perspectives and Current Challenges, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 229 (2016) 110-130.
- [61] D. Çimen, N. Bereli, S. Günaydın, A. Denizli, Detection of cardiac troponin-I by optic biosensors with immobilized anti-cardiac troponin-I monoclonal antibody, *Talanta*, 219 (2020) 121259.
- [62] D. Çimen, N. Bereli, A. Denizli, Surface Plasmon Resonance Based on Molecularly Imprinted Polymeric Film for L-Phenylalanine Detection, *Biosensors*, 11 (2021) 21.
- [63] I. Göktürk, M. Bakhshpour, D. Çimen, F. Yılmaz, N. Bereli, A. Denizli, SPR Signal Enhancement With Silver Nanoparticle-Assisted Plasmonic Sensor for Selective Adenosine Detection, *IEEE Sensors Journal*, 22 (2022) 14862-14869.
- [64] H.H. Nguyen, J. Park, S. Kang, M. Kim, Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications, *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15 (2015) 10481-10510.
- [65] J.-F. Masson, Surface Plasmon Resonance Clinical Biosensors for Medical Diagnostics, *ACS Sensors*, 2 (2017) 16-30.

- [66] D. Çimen, R. Üzek, S. Günaydın, A. Denizli, Real-Time Detection of Fibrinogen via Imprinted Recognition Sites, *ChemistrySelect*, 6 (2021) 9435-9441.
- [67] F. Yılmaz, N. Bereli, H. Yavuz, A. Denizli, Supermacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography, *Biochemical Engineering Journal*, 43 (2009) 272-279.
- [68] O. Payton, A.R. Champneys, M.E. Homer, L. Picco, M.J. Miles, Feedback-induced instability in tapping mode atomic force microscopy: theory and experiment, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 467 (2011) 1801-1822.
- [69] E. Bormashenko, Contact angles of rotating sessile droplets, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 432 (2013) 38-41.
- [70] Q. Zhang, L. Jing, J. Zhang, Y. Ren, Y. Wang, Y. Wang, T. Wei, B. Liedberg, Surface plasmon resonance sensor for femtomolar detection of testosterone with water-compatible macroporous molecularly imprinted film, *Analytical biochemistry*, 463 (2014) 7-14.
- [71] T. Di Giulio, E. Mazzotta, C. Malitesta, Molecularly Imprinted Polyscopoletin for the Electrochemical Detection of the Chronic Disease Marker Lysozyme, *Biosensors*, 11 (2020).
- [72] Y. Saylan, F. Yılmaz, A. Derazshamshir, E. Yılmaz, A. Denizli, Synthesis of hydrophobic nanoparticles for real-time lysozyme detection using surface plasmon resonance sensor, *Journal of molecular recognition : JMR*, 30 (2017).
- [73] A. Vasilescu, S. Gáspár, M. Gheorghiu, S. David, V. Dinca, S. Peteu, Q. Wang, M. Li, R. Boukherroub, S. Szunerits, Surface Plasmon Resonance based sensing of lysozyme in serum on *Micrococcus lysodeikticus*-modified graphene oxide surfaces, *Biosensors & bioelectronics*, 89 (2017) 525-531.
- [74] K. Shrivastava, N. Nirmalkar, M.K. Deb, K. Dewangan, J. Nirmalkar, S. Kumar, Application of functionalized silver nanoparticles as a biochemical sensor for selective detection of lysozyme protein in milk sample, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 213 (2019) 127-133.
- [75] G. Sener, L. Uzun, R. Say, A. Denizli, Use of molecular imprinted nanoparticles as biorecognition element on surface plasmon resonance sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 160 (2011) 791-799.

[76] L. Mihai, A. Vezeanu, C. Polonschii, A. Camelia, G. Radu, A. Vasilescu, Label-Free Detection of Lysozyme In Wines Using An Aptamer Based Biosensor And SPR Detection, *Sens. Actuators, B*, 206 (2015) 198-204.