

**YÜZEY PLAZMON REZONANS TEMELLİ TROMBİN  
BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF A SURFACE PLASMON RESONANCE  
BASED THROMBIN BIOSENSOR**

**DEMET ATAMAN SADIK**

**Prof.Dr. İSMAİL HAKKI BOYACI**  
**Tez Danışmanı**

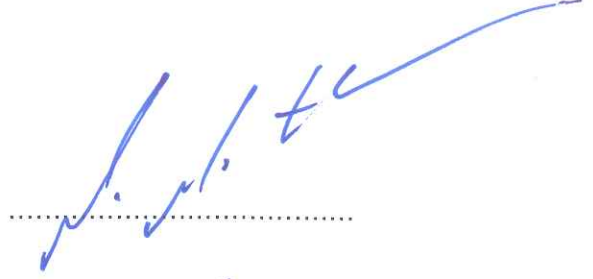
Hacettepe Üniversitesi  
Lisanüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

2017

DEMET ATAMAN SADIK'ın hazırladığı “Yüzey Plazmon Rezonans Temelli Trombin Biyosensörünün Geliştirilmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki juri tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'ında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Başkan



Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Danışman



Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

Üye



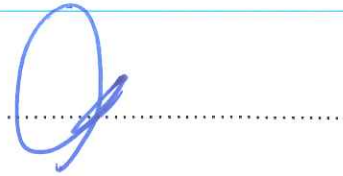
Prof. Dr. Uğur TAMER

Üye



Doç. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

Üye



Bu Tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenекle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 01.10.2022 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

26 / 04 / 2017

  
(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı  
Demet Ataman Sadık

***Canım Annem ve Babam'a  
Sevgili eşim Giray'a  
Biricik oğlum Ege'ye...***

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün akademik bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

04 /04/ 2017



Demet Ataman Sadık

## ÖZET

# YÜZEY PLAZMON REZONANS TEMELLİ TROMBİN BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

**Demet ATAMAN SADIK**

**Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İSMAİL HAKKI BOYACI**

**Nisan 2017, 110 sayfa**

Biyosensörlerin performansını arttırmak önemli bir hedef haline gelmiştir. Biyosensörlerin hassasiyetini, seçiciliğini arttırmak için, yüzeyde oluşabilecek sterik engellemelerin ve spesifik olmayan bağlanmaların azaltılması, kararlı biyolojik tanıyıcı tabaka oluşumu ve biyolojik tanıyıcı ajanın doğru pozisyonda bağlanması ve bu arada biyolojik aktivitesinin korunması gerekmektedir.

Tiyol ile modifiye edilmiş biyolojik tanıyıcı ajanların yüzeye bağlanmaları sırasında, kendiliğinden düzenlenen karışık tek tabakalar (mSAMS) ile yüzey üzerindeki yoğunluklarının azaltılması, hedef molekülü bağlama olasılıklarının artırılması için sıklıkla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir.

Çalışma kapsamında trombin ölçümü için altın yüzey üzerinde 3,3'Dithiodipropionik asit di(N-hidroksisuccinimid ester) (DSP):6-merkaptto-1-hekzanol (MCH) mSAMS oluşturularak, yüzey plazmon rezonans (YPR) temelli trombin sensörü geliştirmiştir. Yüzey immobilizasyonu gerçekleştirilirken, DSP ile birlikte kullanılan MCH ile yüzeye daha sonradan eklenecek trombin aptameri /antikorunun (biyolojik tanıyıcı ajan) yoğunluğunun azaltılması ve hedef molekülü yakalama hassasiyetinin artırılması ve yüzeye nonspesifik ve raslantısal şekilde immobilizasyonunun ve böylece aktivitesinin azalmasının önüne geçilmesi hedeflenmiştir. Altın yüzeyin kimyasal aktivasyonu için, farklı DSP:MCH oranları (2.0:2.5, 2.0:5.0, 2.0:10.0) kullanılarak, mSAMS oluşturulmuş ve bundan sonraki aşamada DSP sayesinde

trombin antikoruna veya trombin aptamerinin altın yüzey üzerine bağlanması sağlanmış ve son aşamada da oluşturulan sistemin sensör özelliği denenmiştir. Yüzey üzerinde kimyasal ve biyolojik aktivasyon ve biyosensör performansının trombin ile test edilmesi, akış hücrelerine bağlı YPR sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Trombin aptamer ve trombin antikor sensörlerinin artan konsantrasyonlarda trombine verdiği sensör cevabı ( $\Delta RU$ ), kalibrasyon grafiği olarak elde edilmiştir. Trombin aptamer sensöründe doğrusal aralık, 0.0-20.0 nM ve 20.0-100.0 nM olmak üzere iki ayrı bölgede gözükmektedir.  $R^2$  değeri birinci bölge için 0,998, ikinci bölge için 0,961 olarak hesaplanmıştır. Trombin antikor sensöründe doğrusal aralığın 22.0-100.0 nM arasında olduğu gözlemlenmiştir.  $R^2$  değeri trombin antikor sensörü için 0,992 olarak hesaplanmıştır. Bu konsantrasyon aralıkları, pıhtılaşma sırasında trombinin serum içerisinde bulunabileceği konsantrasyon aralığı (1-500 nM) içerisinde bulunmaktadır. Ölçüm sınırı (limit of detection, LOD) trombin aptamer sensörü için 9.5 nM, trombin antikor sensörü için 6.0 nM olarak hesaplanmıştır. Tayin alt sınırı (limit of quantification, LOQ) ise trombin aptamer sensörü için 30.0 nM, trombin antikor sensörü için 22.0 nM olarak hesaplanmıştır. Geliştiren her iki sensör de trombin eklenmiş gerçek serum örnekleri ile denenmiş ve trombin eklenmiş PBS örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Trombin aptamer sensöründe, trombin eklenmiş serum örneklerinden alınan  $\Delta RU$ 'nun, trombin eklenmiş PBS örneklerinden alınan  $\Delta RU$ 'ya göre iki katı daha fazla olduğu görülmüştür. Trombin antikor sensöründe ise, trombin eklenmiş serum örneklerinden alınan  $\Delta RU$ 'nun ve trombin eklenmiş PBS örneklerinden alınan  $\Delta RU$ 'nun, birbirine yakın sonuçlar verdiği görülmüştür. Bu sonuçtan yola çıkarak, DSP:MCH (2.0:2.5) arayüzeyi ile hazırlanan biyosensör sisteminde, biyolojik tanıyıcı ajan olarak antikor kullanımının kompleks serum matrisinde trombin ölçümü için daha doğru bir tercih olduğu düşünülmektedir.

Her iki sensörün de birden fazla kullanılabilme (rejenerasyon) özelliği test edilmiştir. Trombin aptamer sensöründe, trombin aptamerinin, trombinin yakalaması sonucundaki  $\Delta RU$  beş devir boyunca sabit kalmış, beşinci devirden sonra  $\Delta RU$ 'da azalma görülmüştür. Trombin antikor sensörünün rejenerasyonu edilemediği görülmüştür. Altın yüzey üzerinde 2mM DSP ve 20 mM MCH ile oluşturulan kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (SAMs), DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0) oranlarıyla oluşturulan mSAMs, X-ray fotoelektron spektroskopisi (XPS) ve attenuated total reflectance-fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (ATR-FTIR) ile

karakterize edilmiştir. Altın yüzey, DSP:MCH (2.0:2.5) molar oranıyla modifiye ve BSA bağlanmış DSP:MCH (2.0:2.5) modifiye altın yüzeylerin morfolojileri, tapping mod atomik kuvvet mikroskop (AFM) ile incelenmiştir. Yüzeylerin pürüzlülük dereceleri karşılaştırılmıştır. Altın yüzeyin yüzey pürüzlülük değeri, 1.20 nm olarak hesaplanmıştır. DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMS ile modifikasyon sonrasında, ortalama yüzey pürüzlülük değerinin 1.20 nm'den 2.20 nm'ye yükseldiği ve BSA bağlanması sonrasında 1.81 nm'ye düştüğü görülmüştür.

Tez çalışmasının sonucunda, DSP:MCH arayüzeyinin biyolojik tanıyıcı ajanların bağlanması ve biyosensör geliştirilmesi için yeni bir immobilizasyon platformu olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** biyosensör, çevirici, altın yüzey, kendiliğinden düzenlenen karışık tek tabakalar (mSAMS), biyolojik tanıyıcı ajan immobilizasyonu, yüzey plazmon rezonans (YPR), 3,3'Dithiodipropionik asit di(N-hidroksisuccinimid ester) (DSP):6-merkapt-1-hekzanol (MCH)



## **ABSTRACT**

# **DEVELOPMENT OF A SURFACE PLASMON RESONANCE BASED THROMBIN BIOSENSOR**

**Demet ATAMAN SADIK**

**Doctor of Philosophy, Nanotechnology And Nanomedicine**

**Supervisor: Prof.Dr. İsmail Hakkı Boyacı**

**April 2017, 110 pages**

Enhancing the performance of biosensors has become an important task. Some of the requirements for improving the sensitivity and selectivity of these systems includes overcoming the steric hinderance issue, providing resistance to nonspecific binding, stable biological recognition layer formation and providing upright position while retaining the biological activity of the biological recognition element during the surface immobilization process.

Formation of mixed self-assembled monolayers (mSAMs) is a commonly used procedure for diluting thiol modified biological recognition elements, so that target recognition is enhanced due to reduction in steric hinderance.

In this study, a surface plasmon resonance (SPR) based sensor was developed for thrombin detection via forming 3,3' Dithiodipropionic acid di (N-hydroxysuccinimide ester) (DSP) :6-mercapto-1-hexanol (MCH) mSAMs on gold surface. During the development of the sensor surface, DSP was utilized together with MCH 1) To decrease the biological recognition element density and hence the steric hinderance effect for improving the target recognition sensitivity. 2) To minimize the risk of a loss in the biological activity of the biological recognition element by decreasing the chance of its random and nonspecific immobilization on the surface. For the

chemical activation of the gold surface, different molar ratios of DSP:MCH (2.0:2.5, 2.0:5.0, 2.0:10.0) has been used for the formation of mSAMS and thrombin antibody or thrombin aptamer was immobilized on gold surface via DSP. The biosensor capability of the modified surface was tested by using the target molecule thrombin. The chemical and biological activation on the gold surface and the performance of the biosensor was tested using a flow-cell coupled SPR system. Both thrombin aptamer and thrombin antibody sensors' performance were tested with increasing thrombin concentrations and calibration curves were obtained. For the thrombin aptamer sensor, the linearity was observed in two different concentration regions, namely 0.0-20.0 nM and 20.0-100.0 nM range.  $R^2$  values for the first concentration region and the second concentration region were calculated as 0,998 and 0,961 respectively. The linear range for the thrombin antibody sensor was 22.0-100.0 nM.  $R^2$  value for the antibody sensor was calculated as 0,992. These ranges are within the physiological thrombin concentration range (1-500 nM) in serum during the coagulation process. Limit of Detection (LOD) for thrombin aptamer and thrombin antibody sensors were found to be 9.5 nM and 6.0 nM respectively. Limit of Quantification (LOQ) for thrombin aptamer and thrombin antibody sensors were found to be 30.0 nM and 22.0 nM respectively. Both sensors were also tested with thrombin spiked serum samples and compared with thrombin added PBS samples. For thrombin aptamer sensor, the sensor response ( $\Delta$ RU) obtained for the thrombin spiked serum samples was twice as that obtained from thrombin spiked PBS samples. As for the thrombin antibody sensor, sensor response ( $\Delta$ RU) obtained from thrombin spiked serum samples and thrombin spiked PBS samples were similar. In the light of these results, for the biosensor system prepared using DSP:MCH (2.0:2.5) as an intermediate layer, antibody usage as a biological recognition element is thought to be a better choice for the detection of thrombin in the complex serum matrixes. The regeneration capability of both sensors were also tested. For the aptamer based sensor, thrombin aptamer could be regenerated for five cycles. The change in the sensor response ( $\Delta$ RU) remained constant for five cycles and there was a decline afterwards. The antibody based sensor could not be regenerated.

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and attenuated total reflectance-fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy were used for surface characterization of 2.0 mM DSP and 20.0 mM MCH self-assembled monolayers (SAMs), DSP:MCH

(2.0:2.5) and DSP:MCH (2.0:10.0) mSAMs formed on gold surfaces. Tapping mode atomic force microscope (AFM) was utilized for the examination of surface morphology of DSP:MCH (2.0:2.5), BSA immobilized DSP:MCH (2.0:2.5) and blank surfaces. The roughness values of surfaces were determined and compared. The average surface roughness value for the gold surface were calculated as 1.20 nm. Following the formation of DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs on the surface, average surface roughness value increased from 1.20 nm to 2.20 nm and decreased to 1.81 nm following BSA binding.

Based on the results of this thesis, it was shown that DSP:MCH interface could be used as a new immobilization platform for binding biological recognition elements for the development of biosensors.

**Keywords:** biosensor, transducer, gold surfaces, mixed self-assembled monolayers (mSAMs), biological recognition element immobilization, surface plasmon resonance (SPR), 3,3' Dithiodipropionic acid di (N-hydroxysuccinimide ester) DSP : 6-mercapto-1-hexanol (MCH)

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca bana destek olan, teşvik eden, bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen, beni yönlendiren tez danışmanım Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı ve değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Mutlu'ya,

İlgi, destek ve bilgilerini benden esirgemeyen değerli hocam, Prof. Dr. Kezban Ulubayram'a,

Bu tez çalışmasını destekleyen, Proje No: 211T103 ile maddi destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), ve FHD-2016-8989 No'lu BAP projesi ile maddi destek veren Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne, FHD-2016-8989 No'lu BAP projesinde proje yürütücüsü olmayı kabul eden, Prof. Dr. Uğur Baysal'a,

YPR cihazının vanalarının teminini sağlayan Iowa State Üniversitesi'nden Prof. Dr. Müfit Akınç'a,

Tez çalışması süresince birlikte zaman geçirmekten keyif aldığım, Plazma Destekli Biyoteknoloji ve Biyomühendislik (PABB) Araştırma Grubu'ndaki değerli arkadaşlarıma ve bana her zaman destek olan ve geçirdiğim zor zamanlarda, arkadaşlıklarını ve her türlü desteklerini benden esirgemeyen, her zaman konuşmaktan keyif aldığım, beni dinleyen çok sevgili arkadaşlarım, Dr. Beyhan Günaydın Daşan, Yüksek Mühendis Tümay Temiz, Yüksek Mühendis Akif Bozkurt'a,

Zorlu deney süreçlerinde bana destek olan ve fikirlerini paylaşan, Dr. Burcu Güven'e ve bana destek olan bütün değerli laboratuvar arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her zaman beni teşvik eden, moralimi düzelten, desteklerini ve varlıklarını hep hissettiğim, sonsuz fedakarlıkları ile hep yanımda olan, 'çocuk da yaparım kariyer de' dememi sağlayan, onların sabır ve sevgisi olmadan asla başaramayacağım sevgili anne ve babama,

Birlikte olduğum son dört yıl boyunca, beni hep mutlu eden, fedakarlık yapan, unuttuğum zaman hayatımdaki güzel şeyleri hatırlatan, zor zamanlarımı kolaylaştıran, sevgili eşim Giray Sadık'a,

Doğduğu günden beri uyumlu, sakın kişiliği, gülümsemesi, kahkahaları, sıcacık avuç içleri ve komik sözleriyle hayatımızın zenginliği ve neşesi olan oğlumuz Ege Sadık'a, teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER.....	xii
ŞEKİLLER .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1. Biyosensörler .....	4
2.1.1. Biyolojik Tanıyıcı Ajanlara Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması .....	5
2.1.1.1. Enzimlerin Biyolojik Tanıyıcı Ajan Olarak Kullanıldıkları Biyosensörler.....	5
2.1.1.2. Hücre/Mikroorganizmaların Biyolojik Tanıyıcı Ajan Olarak Kullanıldıkları Biyosensörler .....	6
2.1.1.3. Antikor ve Antikor Fragmanlarının Biyolojik Tanıyıcı Ajan Olarak Kullanıldıkları Biyosensörler .....	7
2.1.1.4. Nükleik Asitlerin (RNA, DNA, Aptamer) Biyolojik Tanıyıcı Ajan Olarak Kullanıldıkları Biyosensörler.....	8
2.1.2. Biyosensörlerin Ölçüm Prensiplerine Göre Sınıflandırmaları.....	10
2.1.2.1. Elektrokimyasal Sensörler .....	10
2.1.2.1.1. Amperometrik Biyosensörler .....	10
2.1.2.1.2. Potansiyometrik Biyosensörler .....	11
2.1.2.1.3. Kondüktometrik Biyosensörler.....	11
2.1.2.1.4. İyon-Hassas Biyosensörler.....	11
2.1.2.2. Piezoelektrik Sensörler.....	12
2.1.2.3. Optik Sensörler.....	12
2.2. Yüzey Plazmon Resonans (YPR) .....	13
2.2.1. YPR Ölçüm Formatları .....	14

2.2.2. YPR'de Çevirici Olarak Kullanılan Metaller.....	15
2.2.3. YPR Biyosensörleri.....	15
2.3. Tanıyıcı Tabaka .....	18
2.3.1. Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakalar (Self Assembled Monolayers, SAMs) .....	20
2.3.2. Karışık Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakalar (Mixed Self Assembled Monolayers (mSAMs) .....	22
2.3.3. SAMs'in Karakterizasyonu.....	23
2.3.4. SAMs'in Nanoteknolojideki Önemi.....	26
2.3.5. SAMs ve mSAMs Oluşumları ile YPR Sensörlerinin Geliştirilmesi .....	26
2.3.6. Altın Yüzeylerde DSP Ara Bağlayıcı Molekül ile Gerçekleştirilen Modifikasyonlar .....	29
2.4. Trombin.....	29
2.4.1. Trombin Sensörleri .....	35
3. MATERYAL ve METOT.....	42
3.1. Materyal .....	42
3.2. Metot.....	43
3.2.1. YPR Sistemi .....	43
3.2.2. ATR-FTIR Ölçümleri .....	43
3.2.3. XPS Ölçümleri .....	43
3.2.4. AFM Ölçümleri.....	44
3.2.5. Altın Yüzeyler Üzerinde DSP, MCH ve DSP:MCH Karışımları ile Yapılan Kimyasal Modifikasyonlar.....	44
3.2.5.1. DSP ile SAMs Oluşturulması.....	44
3.2.5.2. MCH ile SAMs Oluşturulması .....	44
3.2.5.3. Farklı DSP:MCH Oranlarında Gerçekleştirilen mSAMs .....	45
3.2.6. SAMs ve mSAMs Yüzeyle Model Protein 'BSA' Bağlanması .....	46
3.2.6.1. DSP ile Modifiye Yüzeyle BSA Bağlanması .....	46
3.2.6.2. MCH ile Modifiye Yüzeyle BSA Bağlanması .....	46
3.2.6.3. Farklı DSP:MCH Oranlarıyla Modifiye Yüzeyle BSA ve Lizozim Bağlanması.....	46
3.2.6.4. DSP:MCH (2.0:2.5) ile Modifiye Altın Yüzeyle, Farklı Konsantrasyonlarda BSA ve Lizozim Bağlanması .....	47

3.2.7. Altın Yüzeyler Üzerinde DSP, MCH ve DSP:MCH Karışımları ile Yapılan Kimyasal Modifikasyonlar Sonrasında ATR-FTIR, XPS ve AFM ile Karakterizasyonu .....	47
3.2.7.1. DSP ile Modifiye Yüzeylerin ATR-FTIR ve XPS Karakterizasyonu	47
3.2.7.2. MCH ile Modifiye Yüzeylerin ATR-FTIR ve XPS Karakterizasyonu	47
3.2.7.3. DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0) mSAMs Yüzeylerin ATR-FTIR ve XPS Karakterizasyonu.....	48
3.2.7.4. Altın Yüzey, DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ve BSA Bağlanmış DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ile Modifiye Altın Yüzeylerin AFM ile Karakterizasyonu.....	48
3.2.8. Sensör Yüzeyine İmmobilize Edilecek Olan Aptamer Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Biyosensör Performansının Test Edilmesi	48
3.2.9. Trombin Aptamer Sensörünün Seçiciliğinin Belirlenmesi .....	49
3.2.10. Trombin Aptamer Sensörünün Serum Örneklerinde Denenmesi ....	50
3.2.11. Trombin Aptamer Sensörünün Rejenerasyon Denemesi.....	50
3.2.12. Sensör Yüzeyine İmmobilize Edilecek Olan Antikor Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Biyosensör Performansının Test Edilmesi	50
3.2.13. Trombin Antikor Sensörünün Seçiciliğinin Belirlenmesi .....	51
3.2.14. Trombin Antikor Sensörünün Serum Örneklerinde Denenmesi .....	51
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA .....	53
4.1. Biyosensör Arayüzeyinin Hazırlanması.....	54
4.1.1. Altın Yüzeylerin Farklı DSP Konsantrasyonları ile Modifikasyonu Sonrasında BSA Bağlanma Profilleri.....	54
4.1.2. Altın Yüzeylerin Farklı MCH Konsantrasyonları ile Modifikasyonu Sonrasında BSA Bağlanma Profilleri.....	54
4.1.3. Altın Yüzeylerin Farklı DSP:MCH Molar Oranları ile Modifikasyonu Sonrasında BSA ve Lizozim Bağlanma Profilleri.....	55
4.1.4. DSP:MCH (2.0:2.5) Molar Oranı ile Modifikasyon Sonrasında Farklı BSA ve Lizozim Konsantrasyonlarındaki Bağlanma Profilleri.....	58
4.2. Oluşturulan Arayüzeylerin Yüzey Karakterizasyonu.....	60

4.2.1. DSP, MCH ve DSP:MCH ile Modifiye Yüzeylerin ATR-FTIR Analizi ..	60
4.2.2. DSP, MCH ve DSP:MCH ile Modifiye Yüzeylerin XPS Analizi .....	63
4.2.3. Altın Yüzey, DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ve BSA Bağlanmış DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ile Modifiye Altın Yüzeylerin AFM Görüntüleri .....	69
4.3. Trombin Biyosensörlerinin Hazırlanması.....	71
4.3.1. Trombin Aptamerinin Kullanıldığı Biyosensör Sistemi .....	71
4.3.2. Trombin Aptamer Sensörü Performansının Test Edilmesi.....	73
4.3.3. Trombin Aptamer Sensörünün Seçiciliğinin Belirlenmesi .....	75
4.3.4. Trombin Aptamer Sensörünün Serum Örneklerinde Denenmesi .....	76
4.3.5. Trombin Aptamer Sensörünün Rejenerasyon Denemesi .....	77
4.3.6. Trombin Antikor Sensörü Performansının Test Edilmesi .....	79
4.3.7. Trombin Antikor Sensörünün Seçiciliğinin Belirlenmesi .....	80
4.3.8. Trombin Antikor Sensörünün Serum Örneklerinde Denenmesi .....	81
4.4. Trombin Biyosensörlerinin Karşılaştırması .....	83
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	86
KAYNAKLAR.....	92





## ÇİZELGELER

### Sayfa

Çizelge 4.1. DSP, MCH and DSP:MCH ile modifiye yüzeylerdeki moleküllere ait fonksiyonel grupların tanımı ve görüldükleri Infrared dalga numarası .....	62
Çizelge 4.2. DSP, MCH and DSP:MCH ile modifiye yüzeylerde fonksiyonel grupların XPS pik tanımlamaları.....	68
Çizelge 4.3. Trombin aptamer ve trombin antikor sensörünün karşılaştırılması ...	83
Çizelge 5.1. Trombin deteksiyonu için geliştirilen biyosensörler.....	89

# ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Biyosensör kısımları ve çalışma prensibi.....	5
Şekil 2.2. Altın yüzey üzerinde tiyol grupları içeren moleküllerle SAMs oluşturulması.....	20
Şekil 2.3. Altın yüzey üzerinde tiyol grupları içeren iki farklı molekülle mSAMs oluşturulması.....	22
Şekil 2.4. Trombin'in hemostaz sürecindeki fonksiyonları. Kısaltmalar; TAFI: trombin aktive fibrinolizis inhibitörü, Gplb: glikoprotein Iba, PAR: proteaz aktive reseptör, TM: trombomodulin, PT: Protrombin.....	30
Şekil 3.1. a) DSP b) MCH kullanarak altın yüzeylerde SAMs oluşturulması.....	45
Şekil 3.2. Farklı DSP:MCH molar oranlar kullanılarak altın yüzeylerde mSAMs oluşturulması.....	46
Şekil 3.3. DSP: MCH mSAMs yüzeylere BSA ve lizozim bağlanma mekanizması.....	47
Şekil 4.1. 0-4.0 mM aralığında DSP konsantrasyonları ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları sonrasında sabit konsantrasyonda BSA bağlanmasına bağlı $\Delta$ RU değerindeki değişimler (n=3).....	54
Şekil 4.2. 0-40.0 mM aralığında MCH konsantrasyonları ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları sonrasında sabit konsantrasyonda BSA bağlanmasına bağlı $\Delta$ RU değerlerindeki değişimler (n=3).....	55
Şekil 4.3. DSP:MCH (2.0:0, 2.0:2.5, 2.0:5.0, 2.0:10.0) molar oranları ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları sonrasında sabit konsantrasyonda protein bağlanmasına bağlı $\Delta$ RU değerlerindeki değişimler  BSA  lizozim (n=3). .....	58
Şekil 4.4. DSP:MCH (2.0:2.5) molar oranı ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları sonrasında farklı protein konsantrasyonlardaki (0.2, 0.4, 0.6 ,0.8 ve 1 mg mL <sup>-1</sup> ) bağlanmalara bağlı $\Delta$ RU değerlerindeki değişimler a) BSA b) lizozim (n=3). .....	59
Şekil 4.5. a) 2.0 mM DSP b) 20.0 mM MCH c) DSP:MCH (2.0:2.5) d) DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin infrared spektrumları .....	62

Şekil 4.6. a) modifiye olmayan yüzey b) 2.0 mM DSP c) 20.0 mM MCH d) DSP:MCH (2.0:2.5) e) DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin C 1s spektrumları .....	66
Şekil 4.7. a) modifiye olmayan yüzey b) 2.0 mM DSP c) 20.0 mM MCH d) DSP:MCH (2.0:2.5) e) DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin O 1s spektrumları .....	67
Şekil 4.8. a) modifiye olmayan yüzey b) 2.0 mM DSP c) DSP:MCH (2.0:2.5) d) DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin N 1s spektrumları .....	67
Şekil 4.9. a) modifiye olmayan yüzey b) 2.0 mM DSP c) 20.0 mM MCH d) DSP:MCH (2.0:2.5) e) DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin S 2p spektrumları .....	68
Şekil 4.10. a) Altın yüzey b) DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs c) DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs+ BSA'nın AFM görüntüleri. Görüntüler 5µm x 5 µm boyutlarında alınmıştır. Yüzeylerin 3D görüntüleri de gösterilmiştir. ....	70
Şekil 4.11. Farklı aşamalardaki modifikasyon sonrasında pürüzlülük derecesindeki değişiklikler.....	71
Şekil 4.12. Sensör hazırlama basamaklarını gösteren sensogram a) MES b) MES ile taban çizgisi oluşturma c) aptamer d) etanolamin e) PBS f) PBS ile taban çizgisi oluşturma.....	72
Şekil 4.13. a) 10.0 nM trombinin yüzeye gönderilmesi b) PBS ile yıkama c) 100.0 nM trombinin yüzeye gönderilmesi d) PBS ile yıkama sonucunda oluşan sensör cevabındaki artışların sensogram formatında görüntülenmesi .....	73
Şekil 4.14. Trombin aptamer sensörünün 0.0-150.0 nM aralığındaki konsantrasyonlarda trombine verdiği sensör cevabı (n=3).....	74
Şekil 4.15. 50.0 nM trombin ve 50.0 nM HSA bağlanması sonucunda trombin aptamer sensörü cevabındaki değişimler (n=3).....	75
Şekil 4.16. Trombin aptamer sensörünün 20.0 nM trombin eklenmiş serum ve PBS örneklerine verdiği cevaplar (n=3).....	77
Şekil 4.17. 1) 1.Trombin enjeksiyonu 2) 2. Trombin enjeksiyonu 3) 3. Trombin enjeksiyonu 4) 4. Trombin enjeksiyonu 5) 5. Trombin enjeksiyonu 6) 6. Trombin enjeksiyonu 7) 7. Trombin enjeksiyonu .....	79
Şekil 4.18. Trombin antikor sensörünün 10.0-150.0 nM aralığındaki konsantrasyonlarda trombine verdiği sensör cevabı (n=3).....	80

Şekil 4.19. 50.0 nM trombin ve 50.0 nM HSA bağlanması sonucunda trombin antikor sensörü cevabındaki değişimler (n=3).....	81
Şekil 4.20. Trombin antikor sensörünün 30.0 nM trombin eklenmiş serum ve PBS örneklerine verdiği cevaplar (n=3).....	82

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskop (Atomic Force Microscope)
ATR-FTIR	: Azaltılmış Toplam Reflektans- Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
BSA	: Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
CCD	: Yüklenme-İliştirilmiş Cihaz (Charge-Coupled Device)
CMOS	: Bütünleyici Metal Oksit Yarı İletken (Complementary Metal Oxide Semiconductor)
DEPC	: Dietil Pirokarbonat (Diethyl Pyrocarbonate)
DMSO	: Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide)
dsDNA	: Çift Sarmal DNA (Double Stranded DNA)
DSP	: 3,3'Ditiodipropionik Asit Di(N-Hidroksisuccinimid Ester) (3,3' Dithiodipropionic Acid Di (N-Hydroxysuccinimide Ester)
DTSSP	: 3,3'-Ditiobis(Sülfosuccinimidilpropionat) (3,3'-Dithiobis(Sulfosuccinimidlylpropionate)
ELAA	: Enzim Bağlı Aptamer Assay (Enzyme Linked Aptamer Assay)
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünsorbent Assay (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EDC	: 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimid (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimide)
Fab	: Antijen Bağlanma Bölgesini (Antigen Binding Fragment)
Fc	: Kristalize Bölge (Fragment Crystallizable)
HSA	: İnsan Serum Albumin (Human Serum Albumin)
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
LOD	: Ölçüm sınırı (Limit of Detection)
LOQ	: Tayin alt sınırı (Limit of Quantification)
MCH	: 6-Mercapto-1-Hexanol (6-Merkapto-1-Hekzanol)
MCU	: 11-Mercapto-1-Undecanol (11-Merkapto-1-Undekanol)
MES	: (2-(N-Morfolin) Etansülfonik Asit (2-(N-Morpholino) Ethanesulfonic Acid)

MHA	: 16-merkpto-1-heksadekanoik asit (16-mercapto-1-hexadecanoic acid)
mSAMs	: Kendiliğinden Düzenlenen Karışık Tek Tabakalar (Mixed Self Assembled Monolayers, mSAMs)
MUA	: 11-Merkaptoundekanoik Asit (11-Mercaptoundecanoic Acid)
NHS	: N-Hidroksisuccinimid (N-Hydroxysuccinimide)
NHSS	: N-Hidroksisülfo-Succinimid (N-Hydroxysulfo-Succinimide)
RI	: Kırılma İndeksi (Refractive Index)
RU	: Sensör Cevabı (Response Unit)
SAMs	: Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakalar (Self Assembled Monolayer)
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizm (Single Nucleotide Polymorphism)
SPR	: Surface Plasmon Resonance
XPS	: X-Ray Fotoelektron Spektroskopisi (X-ray Photoelectron Spectroscopy)
YPR	: Yüzey Plazmon Rezonans

# 1. GİRİŞ

Biyolojik tanıyıcı element ve çeviricinin bileşiminden oluşan biyosensörler, insan ve diğer canlılar ile doğrudan ilgili olarak, sağlık başta olmak üzere, gıda, çevre, biyoteknoloji ve biyoproses alanlarında yaygın ve etkin kullanım alanına sahiptirler. Kanseri hücrelerinin oluşumunun ve gelişiminin takibi, şeker hastalığında (tip I ve II) kan glukoz seviyesine göre anında müdahale edilebilmesi, genetik bozuklukların doğum öncesi belirlenmesi, gelişiminin izlenmesi yani tek nükleotid polimorfizm (single nucleotide polymorphism, SNP) seviyesi, AIDS gibi yaygın etkili hastalıklarda erken teşhiste, HIV takibi ve aktivite seviyesinin izlenmesi, “biyosensörlerin” sağlık alanında kullanımını öne çıkaran en önemli örneklerdir [1-4]. Biyosensörler, benzer şekilde, savunma sanayinde başta antrax (şarbon) olmak üzere biyolojik savaş ajanlarının erken tespiti, tanısı ve seviyesinin belirlenmesinde, çevresel kirliliği oluşturan faktörlerin izlenmesi (toksin, virüs, bakteri vb.), amacıyla geliştirilmiş, yüksek seviyede seçiciliğe ve hassasiyete sahip, kantitatif/kalitatif ölçüm yapılması hedeflenen, düşük ölçüm sınırı (limit of detection, LOD) olan, gerçek zamanlı sistemlerdir[5, 6].

Trombin, pıhtılaşma faktörü II olarak bilinen, fibrinojeni fibrine çevirerek, pıhtılaşmayı gerçekleştiren bir serin proteazdır. Damarda oluşan hasar sonrasındaki kan kaybı, pıhtılaşmayı sağlayan hemostaz denilen mekanizma ile gerçekleşmektedir [7]. Bu olay sırasında trombin, hızlı bir şekilde o bölgede oluşturulmaktadır. Pıhtı oluşturulması, kanama durduktan sonra pıhtılaşma sürecinin durdurulması, fibrin yapısının parçalanması (fibrinolizis) süreci, trombinin çeşitli proteolitik parçalama reaksiyonlarını gerçekleştirmesi ve kofaktörlere bağlanması ile gerçekleşmektedir. Bu süreçlerin doğru ve zamanlı bir şekilde denetlenmediği durumlarda, hemofili ve tromboz gibi hastalıklar oluşmaktadır. Trombin oluşumu, başlangıç, artış ve sonlanma olarak üç ayrı aşamada olmaktadır [8]. Pıhtı oluşumu, trombin konsantrasyonu 10 nM'a ulaştığında başlamaktadır ve artış evresinin başlangıcı ile örtüşmektedir. Pıhtılaşma reaksiyonları sırasında başlangıç ile başlayan ve artış ile devam eden süreçte, trombin konsantrasyonu 1-500 nM aralığında değişebilmekte veya 500 nM üzerine çıkabilmektedir[9]. Bu konsantrasyon aralığında gerçek zamanlı trombin ölçümü gerçekleştirebilen bir sensörün, pıhtılaşma süreci boyunca anormal trombin oluşumu ile ilgili önemli bilgi verebileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, fizyolojik olarak anlamlı bir aralık olan 1-500 nM arasında, trombin ölçümü sağlayan gerçek zamanlı bir sensörün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, altın yüzey üzerinde 3,3'Ditiodipropionik asit di(N-hidroksisuccinimid ester: 6-merkapt-1-hekzanol (3,3' Dithiodipropionic acid di (N-hydroxysuccinimide ester: 6-mercapto-1-hexanol, DSP:MCH) kendiliğinden düzenlenen karışık tek tabakalar (mixed self assembled monolayers, mSAMs) oluşturularak, trombin aptameri veya trombin antikorunun yüzeye bağlanması sağlanmıştır.

DSP, hem tiyol gruplarıyla altın yüzeye bağlanabilen, hem de aktif N-hidroksisuccinimid, (N-hydroxysuccinimide, NHS) gruplarıyla proteinlere bağlanabilen bir özelliğe sahiptir; böylece çapraz bağlayıcı görevi üstlenip, yüzeylere avidin/biyolojik tanıyıcı ajanın bağlanmasını sağlayabilmektedir [10]. MCH ise, kısa zincirli ve -OH uç grupları olan bir alkantiyol olup, sensör yüzeyine yapılan immobilizasyonlar sırasında nonspesifik olarak yüzeye bağlanan DNA ve/veya proteinleri en aza indiren ve biyolojik tanıyıcı ajanlar arasında mesafeyi arttırarak, hedef molekölü bağlama hassasiyetini arttıran ajanlar arasındadır [11-14].

Bu tez çalışması kapsamında 1) DSP ile birlikte kullanılacak olan MCH ile yüzeye daha sonradan eklenecek trombin aptameri/antikorunun (biyolojik tanıma elementinin) yüzeye spesifik olmayan ve raslantısal şekilde immobilizasyonunun ve böylece aktivitesinin azalmasının önüne geçilmesi 2) Yüzeyin kimyasal aktivasyonu sırasında, MCH ile DSP moleküllerinin arasındaki mesafeyi açarak sterik engellemeyi azaltarak, biyolojik tanıyıcı ajanının bağlanmasının arttırılması 3) Biyolojik tanıyıcı ajanının hedef molekölü algılama olasılığını arttırarak etkin bir biyosensör sisteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Altın yüzeyin kimyasal aktivasyonunda, farklı DSP ve MCH oranları kullanılarak, mSAMs oluşturulmuş ve bundan sonraki aşamada DSP'nin, çapraz bağlayıcı görevi üstlenmesiyle, trombin aptameri ya da trombin antikorunun altın yüzey üzerine bağlanması sağlanmış ve son aşamada da oluşturulan sistemin sensör özelliği, trombin ile denenmiştir. Yüzey üzerinde kimyasal ve biyolojik aktivasyon ve biyosensör performansının trombin ile test edilmesi, akış hücresine bağlı YPR sistemi ile gerçekleştirilmiştir.

Sensör yüzeyi oluşturulurken, öncelikle en fazla BSA ve lizozim bağlanmasını sağlayan DSP:MCH molar oranı 2mM DSP: 2.5 mM MCH olarak belirlenmiştir.



DSP:MCH (2.0:2.5) molar oranıyla oluşturulan mSAMs'lerde BSA ve lizozim'in en fazla bağlandıkları konsantrasyonlar belirlenmiş ve buna göre trombin aptameri ve antikorunun en fazla bağlanma konsantrasyonları belirlenmiştir. Optimize edilen parametreler ile, trombin aptameri ve trombin antikoru ile iki farklı sensör geliştirilmiş ve her iki sensör için trombin kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Her iki sensörün serum matrisinde ve PBS'de trombine verdiği sensör cevapları ( $\Delta RU$ ), birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Her iki sensörün de tekrar kullanılabilirliği (rejenerasyon) özellikleri denenmiştir. Trombin aptamerinin kullanıldığı sensör yüzeyinde beş defa yüzey rejenerasyonu yapılabildiği ve trombin ölçümü yapıldığı görülmüştür.

Altın yüzey üzerinde oluşturulan, DSP, MCH SAMs'lerin ve DSP:MCH mSAMs'lerin yüzey karakterizasyonu X-ray fotoelektron spektroskopisi (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) ve azaltılmış toplam reflektans- fourier dönüşümlü kızılötesi (attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR) spektroskopisi ile gerçekleştirilmiştir. Altın yüzey üzerinde, DSP, MCH ve her iki moleküle ait fonksiyonel gruplar her iki spektroskopik teknik ile belirlenmiş ve bu moleküllerin yüzeye Au-S bağı ile kovalent olarak bağlanmaları XPS sonuçları ile gösterilmiştir. Ayrıca altın yüzey, DSP:MCH mSAMs ile modifiye yüzey ve BSA bağlanmış DSP:MCH mSAMs yüzeyin atomik kuvvet mikroskop (atomic force microscope, AFM) görüntüleri ve pürüzlülük değerleri karşılaştırılmıştır.

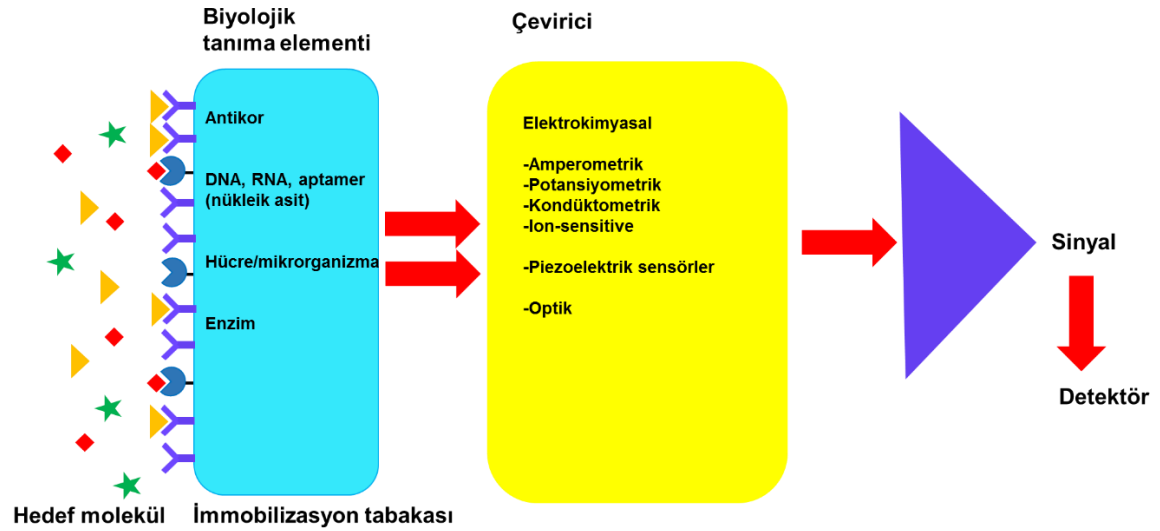
## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Biyosensörler

Biyosensör, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) tanımına göre, çeşitli biyolojik molekül ve yapıların (DNA, RNA, protein, enzim, antikor, aptamer doku, organel, hücre, reseptör vb.), seçicilik ve afinite gösterdikleri biyomoleküllere bağlanmaları sonucunda oluşan biyokimyasal reaksiyonları, ölçülebilir fiziksel ve kimyasal sinyale (elektrokimyasal, elektriksel, termal, piezoelektrik, optik) dönüştürebilen ve kantatif ve yarı kantatif analitik bilgi veren bir cihazdır [15, 16].

Biyosensör yapısı biyolojik tanıyıcı ajan, immobilizasyon tabakası ve çevirici olmak üzere üç ana kısımdan oluşmaktadır [17] (Şekil 2.1). Biyosensörlerde kullanılan çeviriciler, biyolojik tanıyıcı ajanının hedef moleküle bağlanması ile oluşan değişimin okunabilir sinyale dönüştürülmesi için kullanılmaktadırlar [18]. İdeal bir biyosensörde aranan en önemli iki özellik, biyolojik tanıyıcı ajanı ile belirlenen seçicilik ve çevirici ile belirlenen hassasiyettir [17].

Biyosensörler, kullanılan biyolojik tanıyıcı ajanlara ve neden oldukları biyokimyasal reaksiyonlara göre (DNA, RNA, aptamer (nükleik asit), antikor, hücre temelli sensörler, enzim veya immunosensörler), ya da sinyal çevirici tiplerine göre (elektrokimyasal, elektriksel, termal, piezoelektrik, optik) ya da bazen her iki sınıflandırma sisteminin birleşimine göre (amperometrik enzim sensörler, optik aptamer sensörler vb.) sınıflandırılabilir [15, 16, 18].



Şekil 2.1. Biyosensör kısımları ve çalışma prensibi

### 2.1.1. Biyolojik Tanıyıcı Ajanlara Göre Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörlerde farklı biyolojik tanıyıcı ajanlar olarak enzimler, hücre reseptörleri, tam hücreler, mikroorganizmalar, nükleik asitler (RNA, DNA, aptamer) ve antikor, antikor fragmanları kullanılabilir [17, 19].

Hücre kısımları, tam hücreler ve mikroorganizmalar ile geliştirilen biyosensör tiplerinde, patojen, toksin ölçümleri, çevresel kirlilik ve farmosatik bileşenlerin etkileri araştırılabilir ve LOD'si düşük sistemler geliştirilebilse de, biyosensör sisteminde çalışabilir halde tutulması, hangi tip hücrenin seçileceği gibi konular, bu tip biyolojik tanıyıcı ajanlar ile biyosensör geliştirilmesini zor hale getirmektedir [15, 17].

Nükleik asit, antikor ve antikor fragmanlarının kullanıldığı biyosensör sistemlerinde ise, ideal bir biyolojik tanıyıcı ajanından beklenen yüksek seçicilik, hızlı cevap, ve farklı hedef molekülleri tanıyabilme özellikleri, DNA ya da RNA'dan oluşan aptamerler ve antikorlarda bulunduğu için, bu tip biyolojik tanıyıcı ajanları biyosensör sistemlerinde sıklıkla kullanılır hale gelmiştir [4, 10, 18, 20].

#### 2.1.1.1. Enzimlerin Biyolojik Tanıyıcı Ajan Olarak Kullanıldıkları Biyosensörler

Belli moleküllere karşı seçicilik gösteren ve onların ürünlere dönüşmesini sağlayan enzimlerin biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanıldığı biyosensörler bulunmaktadır [15]. Kullanılan enzimler, altı farklı kategoride değerlendirilmektedir. Oksidoredüktazlar, transferazlar, ligazlar, liyazlar, hidrolazlar ve izomerazlar sırasıyla oksidasyon/redüksiyon reaksiyonları, molekül gruplarının bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlamak, iki moleküle birbirine bağlamak, C-C, C-N, C-O

bağlarını kırmak, hidrolitik parçalama ve molekül içerisindeki değişikliklerden sorumlu olmaktadır.

Enzim temelli sensörlerde, genellikle elektrokimyasal çeviriciler kullanılmakta ve farklı stratejiler kullanılarak hammaddelerin ürünlere dönüşmesi gözlemlenebilmektedir. Bunlar, oksidaz, bakteri veya maya tarafından yan hammaddenin tüketilmesinin izlenmesi, oluşan hidrojen peroksidad, hidrojen iyonu ya da karbondioksit gibi ürün ya da ürünlerin izlenmesi ya da redoks enziminin aktif bölgesinden elektrokimyasal çeviriciye elektron aktarılmasının izlenmesi olarak sıralanabilmektedir [16].

Ticari olarak en ön yaygın olarak bilinen glukoz sensörlerinde, glukoz oksidaz veya glukoz dehidrogenaz enzimlerinin kullanılarak, kanda glukoz ölçümü sağlanmaktadır [15]. Glukoz dışında askorbat, amino asit, alkol, kolesterol, fruktos gibi farklı moleküllerin ölçümü için de geliştirilen enzim biyosensörler bulunmaktadır. Enzim biyosensörlerinin performansını etkileyen en önemli faktörler, pH, sıcaklık değişimi, yanlış immobilizasyon sonucunda biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanılan enzim aktivitesinin azalması olarak bilinmektedir.

#### **2.1.1.2. Hücre/Mikroorganizmaların Biyolojik Tanıyıcı Ajan Olarak Kullanıldıkları Biyosensörler**

Genel olarak hücre sensörleri olarak bilinen bu sınıftaki biyosensörlerde, biyolojik tanıyıcı ajan olarak, tam hücre, belli bir hücre içerisindeki bir organel (mitokondri), hücre duvarı ya da mikroorganizma kullanılmaktadır [15, 16]. Özellikle bakteri ya da mayanın biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanıldığı biyosensörlerde, yüksek hassasiyet, düşük maliyet, hızlı cevap ve bakteri ve maya fazla miktarda üretilbildikleri için, geniş test popülasyonları ile çalışma imkanı bu tip biyosensörlerin avantajları arasındadır [17].

Atık su, su kirliliğini tayin etmekte kullanılan mikroorganizma temelli sensörler, daha önceden test amaçlı kullanılan memeli hayvanlar, kuş ve balıkların yerine geçmektedir. Aynı zamanda periplazmik enzim içeren hücreler biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanıldıklarında enzimlerin yerine daha ucuz bir alternatif olarak kullanılmaktadır.

Biyomedikal araştırmalar, farmasotik bileşenlerinin hücre üzerine etkilerinin araştırılması, gıda güvenliğinin araştırılması gibi ölçümlerde gerçek zamanlı hızlı ve hassas ölçümler alınabilse de, hücre seçimi, çoğaltılmaları ve immobilizasyon

sonrasında ya da ölçüm sırasında canlı kalmaları gibi faktörler bu tip sensörlerin kullanılmasındaki zorluklar arasındadır [21].

### **2.1.1.3. Antikor ve Antikor Fragmanlarının Biyolojik Tanıyıcı Ajan Olarak Kullanıldıkları Biyosensörler**

Antikorlar, biyolojik sistemlerde yüzlerce aminoasitin oluşturduğu, non-kovalent etkileşimler ve disülfür bağlarla birbirine bağlanmış iki ağır ve iki hafif zincirden oluşan büyük moleküllerdir [22]. Ağır ve hafif zincirin birleştiği N-terminal bölgesinde, antijen bağlanma bölgesi yer alır ve sadece belli tip bir antijeni (hedef molekül) bağlama özelliğine sahiptir [15, 22].

Antikorlar yüksek seçicilik ve afinite ile spesifik antijenlerine bağlanabilmektedir. Bu biyomoleküler etkileşim temel alınarak geliştirilen biyosensörlere antikor sensörleri ya da immunosensörler adı verilmektedir [19].

Geliştirilen antikor sensörlerinde, farklı şekillerde antijen-antikor etkileşimleri gözlemlenmektedir. Bunlardan bir tanesi, yüzeye antikorun bağlanması sonucunda çözelti içerisindeki hedef molekülün ölçümüdür [23, 24]. Ölçüm için, etiketleme gerektiren biyosensör sistemlerinde, bu tip bir ölçüm için, floresans ya da enzim etiketli sekonder antikor veya floresans etiketli hedef molekül veya biyolojik tanıyıcı ajanının olması gerekmektedir [25-27]. YPR ya da kuartz kristal mikrobalsans (quartz crystal microbalance, QCM) gibi biyosensörlerde ise, etiketlemeye gerek kalmadan antijen ya da antikorun yüzeye bağlanması sonucunda kırılma indeksi (refractive index, RI) ya da frekansdaki değişime bağlı olarak ölçüm gerçekleştirilmektedir [10, 28].

Antijenin küçük moleküler ağırlıkta olması durumunda ise, yüzeye antijen bağlandıktan sonra, antijen-antikor karışım çözeltisi yüzeye gönderilip, karışımdaki antijen konsantrasyonundaki azalışa göre, antikorun yüzeydeki antijene bağlanma miktarı ve buna göre de ölçüm sinyali artmaktadır [29, 30]. Bu tip sistemlerle, eser miktarda olan önemli bir üre metaboliti estriol (E3), sudaki bir cyanobakteri ürünü olan mikrosystinler ve çeşitli hastalıklara neden olan  $\beta$ -agonistlerin ölçümü gerçekleştirilmiştir [31-33].

Yüksek seçicilikle gerçekleşen antikor-antijen etkileşimleri temel alınarak oluşturulan biyosensör sistemlerinin LOD'lerinin azaltılması ve hassasiyetlerinin artırılması için altın nanopartikül (AuNP) ya da karbon nanotüp gibi nanoyapılar çevirici olarak kullanılmaktadır [34-36]. Nanoyapıların antikor sensörleri dahil diğer

biyosensör sistemlerinin performanslarını arttırmalarındaki en önemli etkenler 1) yüzey alanlarının fazla olmasıyla, daha fazla biyolojik tanıyıcı ajan bağlanıyor olması 2) kendilerine has mekanik ve optik özelliklerinin olmasıdır [37]. Nanoyapıların çevirici olarak kullanılmasının dışında, antikor sensörlerinin hassasiyetlerini arttırmak için, yüzey immobilizasyonu sırasında antikorlar arası mesafeleri açmak ya da biyolojik tanıyıcı ajan olarak antikor fragmanları olan sadece antijen bağlanma bölgesini (antigen binding fragment, Fab) yüzeye immobilize etmek gibi yöntemler geliştirilmiştir [23, 38].

#### **2.1.1.4. Nükleik Asitlerin (RNA, DNA, Aptamer) Biyolojik Tanıyıcı Ajan Olarak Kullanıldıkları Biyosensörler**

Nükleik asitlerin biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanıldıkları ilk olarak geliştirilen biyosensörler, birbiriyle tamamlayıcı iki farklı dizilimdeki DNA zincirinin adenin/timin, guanin/sitozin eşleşmesine bağlı olarak hibridizasyon yapması temel alınarak geliştirilen ölçümü sistemleridir [12, 39].

Çift sarmal DNA (double stranded DNA, dsDNA)'nın, bir zincirinin yüzeye immobilizasyonu sonrasında, örnek içerisindeki diğer zincirin yüzeye bağlı zincire hibridasyonu sonrasında, dsDNA oluşumuna bağlı olarak, kullanılan çevirici tipine göre, elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ya da termal bir sinyale dönüşmektedir [39]. Zincirlerin eşleşmesi, spesifik olduğu için, örnek içerisinde bulunan başka DNA zincirlerinin dizilim farkından dolayı, bu eşleşme çok zayıf olup, kararlı bir dsDNA yapısı oluşmamakta ve beklenen sinyal görülmemektedir. Bu tip DNA biyosensörleri, Tay Sachs veya sistik fibros gibi hastalıkların teşhisinde kullanılan SNP ölçümleri, kanser ve viral enfeksiyon sonucunda değişen gen ifade değişim ölçümleri, gıda güvenliğinde önemli olan genetiği değiştirilmiş organizmaların ölçümlerinde kullanılmakta olup, hızlı, basit, seçici ve ucuz ölçümler için potansiyel oluşturmaktadır [3, 39-42]. Bunun dışında kanser ilaçlarının DNA'ya bağlanmasını incelemek için de geliştirilen DNA biyosensörleri mevcuttur [12].

Belli dizilimdeki tek zincir DNA (single stranded DNA, ssDNA) ya da RNA oligonükleotitlerinin, DNA ya da RNA dışında farklı hedef moleküllere yüksek seçicilikle bağlandığı, Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) metodunun keşfedilmesi ile ortaya çıkmıştır [43]. Bu metodla belli bir hedef moleküle karşı seçicilik ve yüksek afinite ile bağlanan oligonükleotit seçimi iki aşamada olmaktadır. Birinci aşamada geniş bir oligonükleotit havuzu seçilmektedir.

İkinci aşamada, afinite kromotografi kolonuna bağlanan hedef molekül üzerinden geçirilen farklı oligonükleotitlerin bazıları hedef moleküle spesifik veya spesifik olmayarak bağlanmakta, diğerleri kolon yüzeyinden ayrışmaktadır. Kolona spesifik olmayarak bağlanan oligonükleotitler de yıkama ile kolon yüzeyinden ayrılmaktadır. Bu işlemin aynı döngü ile tekrarlanması sonucunda hedef moleküle yüksek afinite ve seçicilik gösteren oligonükleotitler PCR ile çoğaltılmaktadır [43, 44].

Aptamer olarak bilinen bu oligonükleotitlerin, seçicilikle bağlandığı hedef moleküller arasında protein, amino asit, organik moleküller, hücreler, bakteriler, metal iyonlar mevcuttur [10, 18, 43, 45, 46]. Hedef moleküllerine gösterdikleri yüksek afinite (pikomolar nanomolar aralığında ayrışma sabiti (Kd)) ve yüksek seçicilikten (hedef molekül ile benzerlik gösteren yapılarla hedef molekülü ayırabilme özelliği) dolayı aptamerler, antikorlar kadar sık kullanılan bir biyolojik tanıyıcı ajan haline gelmişlerdir [18, 46, 47]. Buna ek olarak aptamerler kimyasal olarak sentezlenebildikleri ve antikorlar gibi hayvan içerisinde bir antijen'e karşı geliştirilmedikleri için, herhangi bir hedef molekül için düşük maliyette elde edilebilirler [18, 46]. Bu özellikleri, poliklonal antikor üretiminde ortaya çıkan her üretimde farklı verim alınması riskini de ortadan kaldırmaktadır [10, 48]. Kimyasal olarak sentezlenebilmeleri ve farklı koşullarda seçilebilmeleri, *in vitro* koşullarda elde edilen rekombinant antikorlar hariç, sadece fizyolojik koşullarda elde edilen ve kararlılık gösteren antikorlara karşı avantaj sağlamaktadır [46, 48]. Buna ek olarak, farklı grupların çalışmaları sonucunda biyolojik ve kimyasal modifikasyonlarının (biyotin, enzim floresans problemleri ve nanopartiküller ile etiketleme) kolay olduğu ve modifikasyon sonrası afinitelerinde bir değişiklik olmadığı belirtilmektedir [10, 18, 46, 48]. Ayrıca hedef moleküllerinin ve belli iyonların varlığında katlanabilir bir yapı göstermeleri ve bu yapının eski haline dönebiliyor olduğu bilinmektedir [18, 48, 49]. Bu özellikle birlikte düşük moleküler ağırlığına sahip olmaları, kararlı bir yapıya sahip olmalarını sağlamaktadır [18].

Immunoglobulin E (IgE)'ye karşı geliştirilen iki tip QCM sensörünün bir tanesinde biyolojik tanıyıcı ajan olarak anti-IgE, diğerine IgE aptamer'i immobilize edilmiş, ve iki biyolojik tanıyıcı ajanının performansları karşılaştırılmıştır [10]. Her iki sensörün LOD'leri aynı olmakla birlikte, doğrusallık aralığının aptamer sensöründe daha geniş olduğu, görülmüştür. Bunun nedeni, aptamerin küçük bir molekül olmasından dolayı, yüzeye daha sık olarak immobilizasyonun gerçekleştiği ve dolayısıyla

sensörün daha yüksek konsantrasyonda IgE ile doyuma ulaştığı olarak yorumlanmıştır. Ayrıca aynı çalışmada, aptamer sensöründe farklı tampon çözeltileri ile yüzey rejenerasyonu yapılabildiği ve antikor sensöründe bunun gerçekleşmediği görülmüştür. Buna ek olarak, yüzey kararlılığı ve raf ömrünün aptamer sensöründe daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Aptamerlerin bilinen en önemli dezavantajı, nükleaz (DNAse, RNAse) varlığında parçalanabilmeleridir [48].

### **2.1.2. Biyosensörlerin Ölçüm Prensiplerine Göre Sınıflandırmaları**

Biyosensörlerin ölçüm prensiplerine göre sınıflandırılmaları, çeviricinin biyolojik tanıyıcı ajanının hedef moleküle bağlanmasını farklı tiplerde sinyale dönüştürmesine göre (elektrokimyasal, kütle artışına bağlı (piezoelektrik) ve optik) olmaktadır [50, 51].

#### **2.1.2.1. Elektrokimyasal Sensörler**

Elektrokimyasal biyosensörler, elektrokimyasal çeviriciye sahip biyosensör sistemleridir. Biyolojik tanıyıcı ajanının hedef moleküle bağlanması sonucunda oluşan kimyasal reaksiyonların, iyon ya da elektron oluşturması ya da tüketmesi, çözeltinin elektrik akımı ya da potansiyel gibi ölçülebilir özelliklerini değiştirmektedir. Bu değişimlerin elektrokimyasal çevirici ile ölçülebilir sinyale dönüştürülmesi prensibine göre çalışan elektrokimyasal biyosensörler, amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik ve iyon-hassas olarak dört farklı grup altında incelenmektedir.

##### **2.1.2.1.1. Amperometrik Biyosensörler**

Elektrokimyasal biyosensörler altında en yaygın olarak bilinen biyosensörler, amperometrik biyosensörlerdir [15]. Çalışma prensibi, elektroaktif olan bir molekülün indirgenmesi ya da yükseltgenmesi sonucunda oluşan akımın ölçülmesi temeline dayanmaktadır [16]. Bir referans elektroda göre, Au, platinyum (Pt) veya karbon (C) temelli tek bir çalışma elektrodu ya da bir dizi elektrod üzerinde sabit bir potansiyel sağlanması ile akım ölçülmektedir. Oluşan akım, elektroaktif molekülün konsantrasyonu ya da onun oluşum ya da tüketim hızı ile ilişkilendirilmektedir. Genellikle, 1) Elektrod üzerinde immobilize olan enzim tarafından gerçekleştirilen oksidasyon/redüksiyon reaksiyonları sonucunda 2) Enzim tarafından gerçekleştirilen hidroliz/fosforilasyon reaksiyonları sonrasında gerçekleşen oksidasyon/redüksiyon reaksiyonları sonucunda 3) Biyolojik tanıyıcı ajanının hedef



molekölü yakalamasından dolayı gerçekleşen oksidasyon/redüksiyon reaksiyonları sonucunda oluşan akım değişimleri ölçülmektedir. Amperometrik biyosensörler medyatör olan bilinen düşük moleküler ağırlıklı redoks çiftlerinin kullanımı ile, enzimin redoks merkezinde oluşan elektronları elektroda taşınmasını ve akımda değişim sağlamaktadırlar.

#### **2.1.2.1.2. Potansiyometrik Biyosensörler**

Potansiyometrik ölçümler, iyon-seçici membrane ile ayrılan indikator ve referans elektrod ya da iyon-seçici membrane ile ayrılan iki referans elektrod arasında oluşan potansiyel farkını, iki çözelti arasında akımın olmadığı durumlarda ölçme prensibine dayanmaktadır [15, 16]. En sıklıkla kullanılan potansiyometrik elektrodlar arasında, pH elektrodları,  $F^-$ ,  $I^-$ ,  $CN^-$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $NH_4^+$  gibi iyon seçici elektrodlar ve  $CO_2$  ve  $NH_3$  gibi gaz seçici elektrodlar bulunmaktadır. İyon-seçici membrane ile ayrılan indikator ve referans elektrod arasındaki potansiyel fark, iyon aktivitesi ya da gaz konsantrasyonunun logaritması ile orantılıdır [16].

#### **2.1.2.1.3. Kondüktometrik Biyosensörler**

Biyokimyasal reaksiyonlar sırasında oluşan iyon ya da elektronlar, çözeltinin iletkenliğini değiştirmektedir [15, 16]. Genellikle enzim reaksiyonları sonrasında, çözeltideki elektriksel direnç ya da iletkenliğin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Ureaz enziminin veya çoğu biyolojik membran reseptörlerinin gerçekleştirdiği reaksiyonlar, iyon kondüktometrik biyosensörler ile izlenmektedir [52]. Düşük hassasiyete sahip bir ölçüm olduğu için, genellikle enzim içeren bir sensör ve enzim içermeyen bir sensör arasındaki ölçüm farkı alınmaktadır.

#### **2.1.2.1.4. İyon-Hassas Biyosensörler**

Daha önce potansiyometrik biyosensörler altında tanımlanan iyon-hassas biyosensörler, IUPAC'ın hazırladığı teknik rapora göre, elektrokimyasal sensörler altında dördüncü bir sınıf olarak tanımlanmaktadır [53]. İyon-hassas alan etkili transistör, çözeltideki iyon konsantrasyonunu ölçen bir alan etkili transistördür. Alan etkili transistörler, elektrik alan etkisi kullanılarak kontrol edilen yarı iletken cihazlardır. Bu tip transistörler, çözeltideki iyon ile etkileşime girdiği zaman yüzey elektrik potansiyeli değişmekte ve ölçülmektedir [15].

### **2.1.2.2. Piezoelektrik Sensörler**

Kütle hassas olarak da bilinen piezoelektrik biyosensörlerde, piezoelektrik çeviriciler kullanılmaktadır. Bu tip biyosensörler, quartz, çinko oksit veya alüminyum nitrit gibi piezoelektrik özelliği olan materyallerin kullanıldığı çeviriciler bulundurmaktadır [15]. Ancak genellikle quartz-kristal kaplı altın elektrodlar kullanılmaktadır. Piezoelektrik çeviricilere belli bir frekansta elektrik sinyali uygulanması ile, sabit frekansta titreşimleri sağlanmaktadır. Titreşim frekansı, uygulanan elektriksel frekansa ve kristalin kütlesine bağlı olarak değişmektedir.

Moleküllerin yüzeye bağlanması, biyolojik tanıyıcı ajan-hedef molekül etkileşimlerinde, yüzeydeki kütle artmakta ve bunun sonucunda kristalin titreşim frekansı değişmektedir. Elektriksel olarak ölçülen bu değişim, yüzeye bağlanan veya kopan moleküllerin kütlesini belirlemek için kullanılmaktadır.

QCM dışında, en fazla kullanılan piezoelektrik sensörler mikrokantilever ve surface acoustic wave (yüzey akustik dalga sensörleri, SAW) sensörleridir [1, 3, 10].

### **2.1.2.3. Optik Sensörler**

Optik biyosensörler, biyomedikal, insan sağlığı, ilaç araştırmalarında, çevresel kirliliği araştırmalarında en sıklıkla kullanılan ve farklı uygulamaları olan güçlü analiz sistemleridir [54, 55].

Optik biyosensörlerin diğer biyosensörlere göre avantajları arasında, optik biyosensörlerle sürekli ölçüm yapılabilme kapasitesi, mikrofluidik sistemlerle bütünleyici metal oksit yarı iletken (complementary metal oxide semiconductor, CMOS) ve yüklenme-iliştirilmiş cihaz (charge-coupled device, CCD) detektörler gibi optik bileşenlerin kolay integrasyonları, quantum dot (QD), metallik nanopartiküllerin (Au, Ag, Pd vb.) optik özelliklerinden dolayı hassasiyet'i artırma, LOD düşürme ve birden fazla molekülü aynı anda algılayabilme özellikleri gösterilmektedir [54, 55]. Optik biyosensörler ölçüm çeşitlerine göre iki temel sınıfa ayrılmaktadırlar. Etiketlenerek yapılan ölçüm (florofor, lüminofor, enzim ve nanopartikül ile biyolojik tanıyıcı ajanların ya da hedef molekülün etiketlenmesi) ve etiket kullanılmadan yapılan ölçüm prensibiyle çalışan optik biyosensörler [56, 57].

Floresans etiketli ölçümlerde, biyolojik tanıyıcı ajanlar ya da hedef moleküller floresans özellikteki moleküllere bağlanmaktadır. Floresans özellikteki molekülün belli dalga boyunda verdiği emisyon sayesinde hedef molekül ya da hedef molekülün biyolojik tanıyıcı ajan ile etkileşimi algılanmaktadır. Bu tip ölçümlerde,

LOD'si tek bir moleküle indirgenebilse de, floresans etiketlemeden dolayı, etiketlenen molekülün yapısının ya da fonksiyonunun değişme olasılığı bulunmaktadır [55]. Aynı zamanda floresans etiketleme birden fazla basamak içermektedir [51]. Buna kıyasla etiket kullanılmadan yapılan ölçümde moleküller doğal, etiketsiz hallerinde algılanmaktadır. Daha kolay ve ucuz olmasının dışında, bu yöntemle kinetik ve kantatif ölçümler yapılabilmektedir. Etiket kullanılmadan ölçüm yapan optik biyosensörlerin bir kısmı çevirici yüzeylere bağlanan molekülden dolayı, RI' deki kaymaları ölçen sistemlerdir. RI'deki değişimleri ölçen optik biyosensörler altı farklı tiptedir 1) Yüzey plazmon rezonans temelli biyosensörler 2) Interferometre temelli biyosensörler 3) Optik waveguide temelli biyosensörler 4) Optik ring resonator temelli biyosensörler 5) Optik fiber temelli biyosensörler 6) Photonic crystal temelli biyosensörler [55].

## **2.2. Yüzey Plazmon Resonans (YPR)**

YPR, elektromanyetik uyarım (ışık) sonucunda, ışık dalgalarının metal-dielektrik ara yüzeyinde iletim elektronları ile etkileşime geçmesi sonucunda elektronların ışık dalgası ile aynı rezonansta salınım göstermesidir [58, 59]. Rezonans eşleşmesi, metal yüzey üzerindeki RI değişimlerine karşı duyarlılık göstermektedir. YPR biyosensörlerinde, metal yüzey üzerine immobilize edilmiş biyolojik tanıyıcı ajanının çözelti içerisindeki hedef molekülünü yakalaması sonucunda, metal yüzey üzerindeki RI artmaktadır [51]. RI'daki artış, genellikle rezonans açısı ya da dalgaboyu kaymalarının ölçülmesi ile tespit edilmektedir [58, 59].

Lokalize yüzey plazmon rezonans (LYPR)'de ise, gönderilen ışık, nanopartikül ya da başka nanoyapılar gibi dalgaboyundan daha küçük yapılarla etkileştiği için, aynı rezonansta gerçekleşen plazmon salınımı nanoyapı etrafında yerel olarak gerçekleşmektedir [51, 58, 59]. Kullanılan malzemenin yapısı, şekli, boyutu ve malzeme içeriği, plazmon rezonansının büyüklüğü, dalgaboyu genişliği ve kayma miktarı gibi spektral özellikleri etkilemektedir. LYPR'de yerel olarak gerçekleşen plazmon salınımından dolayı, hassasiyet daha fazla olsa da kısa aralıktaki değişimler sözkonusu olduğunda iki algılama metodu da benzerlik göstermektedir [60]. Buna ek olarak ticari olarak YPR cihazları ve bu cihazlarla ilgili teknolojik gelişmeler daha fazla bulunmaktadır [51, 58].

YPR biyosensörleri, hedef moleküle olan seçicilik, afinite ve biyomoleküler etkileşimlerin kinetiği hakkında bilgi vermektedir [39, 58]. YPR biyosensör

teknolojisinin avantajları şu şekilde sıralanmaktadır. 1) Kullanılan biyolojik tanıyıcı ajan ya da hedef molekülün floresans ya da karakteristik absorpsiyon ve de saçılma özellikleri olmaksızın, birbirlerine bağlanmaları sonucunda rezonans açığı ya da dalgaboyunda kayma gibi özelliklerle tespit edilebilmesi 2) Etiket kullanılmadan ölçüm yapılabilmesi 3) Gerçek zamanlı ölçüm gerçekleştirilebilmesi 4) Tek bir ölçüm ya da sürekli ölçüm alınabilmesi [51]. YPR biyosensör teknolojisinin en büyük dezavantajı, etikete bağlı olmayan ölçüm yapılmasından dolayı, ölçülen optik sinyalin biyolojik tanıyıcı ajanının hedef moleküle olan seçiciliğine bağlı olmasıdır. Çözelti içerisinde hedef moleküle benzeyen bir molekülün olması halinde, spesifik algılamaya bağlı olarak gerçekleşen sensör cevabı etkilenebilmektedir.

### **2.2.1. YPR Ölçüm Formatları**

YPR biyosensör sistemlerinde, biyolojik tanıyıcı ajanının çözelti içerisinde hedef molekülü tanıması ve bu bağlanmanın sensör cevabı olarak görülebilmesi için üç farklı ölçüm formatı geliştirilmiştir [51, 59].

Direk ölçüm formatında hedef molekül, metal yüzey üzerine immobilize edilen biyolojik tanıyıcı ajan ile etkileşimi sonucunda ölçüm gerçekleşmektedir. Biyolojik tanıyıcı ajanının hedef moleküle bağlanması ölçülebilir bir sinyal olduğunda, bu tip ölçüm tercih edilmekte ve hedef molekülün konsantrasyonu RI artışı ile doğrudan orantılı olmaktadır.

LOD'yi azaltmak için kullanılan ikinci bir format sandviç formatı olarak bilinmektedir. Bu tip ölçüm formatında iki aşamalı ölçüm gerçekleşmektedir. İlk aşamada yüzeye immobilize biyolojik tanıyıcı ajan (genellikle aptamer ya da antikor) hedef molekülü yakalamakta, ikinci aşamada yine hedef moleküle bağlanan sekonder antikorlar yüzeye gönderilmektedir. Sekonder antikorlar daha önceden yüzeyde yakalanan hedef moleküllere bağlandıkları zaman, bağlanan molekül sayısı arttığı için sensör cevabı da artmaktadır.

Üçüncü ölçüm formatı LOD'yi azalttığı gibi aynı zamanda küçük moleküllerin ölçümüne olanak vermektedir. Bu tip ölçüm formatında örnek, antikor ile karıştırılmakta ve bu karışım, hedef molekülün bağlandığı sensör yüzeyine gönderilmektedir. Karışımda sabit tutulan antikor miktarı yüzeye bağlanmış olan hedef moleküle bağlandığı zaman, sensör cevabında bir artış görülmektedir. Ancak örnek içerisinde hedef molekül bulunduğu takdirde, yüzeydeki hedef moleküle bağlanma az olacağından, sensör cevabında azalma görülmektedir. Ayrıca, Au, Pd,

Pt gibi nanopartiküllerin etiket olarak kullanılarak sensör cevabını ve hassasiyetini daha fazla arttırdığı bilinmektedir [59].

### **2.2.2. YPR'de Çevirici Olarak Kullanılan Metaller**

YPR biyosensör uygulamalarında en sıklıkla kullanılan metaller altın ya da gümüşdür [58]. Bu metallerin tercih edilmelerinin nedenleri biyosensör uygulamaları için kolay modifikasyonları, plazmon rezonans için uygun zemin oluşturmaları ve rezonans dalgaboyu kaymalarının görünür spektrumda olması olarak sıralanabilmektedir [58, 61-65]. Gümüş yüzeyler daha uzun süreli yüzey plazmon rezonans etkisi sağlar ve dolayısıyla biyomolekül bağlanmalarına daha duyarlıdır ancak çabuk oksitlenmeleri söz konusu olduğundan, bu özellik yüzey kararlılığını bozmaktadır. Bu yüzden biyosensör uygulamalarında altın yüzeyler daha çok tercih edilmektedir [58].

### **2.2.3. YPR Biyosensörleri**

Hormon, antikor ve diğer proteinlerin ölçümü için kullanılan ve yüksek hassasiyette ve seçicilikte ölçüm yapabilen enzim bağlı immünsorbent assay (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), radyoimmün test (radioimmunoassay, RIA) gibi immunoassay metotlarında, örneklerin taşınması ve uzun sürede sonuçların değerlendirilmesi gibi limitasyonlar bulunmaktadır. HPLC /UV ve LC/MS gibi diğer analitik metodlarla ise, pahalı, zaman alan ölçümler gerçekleşmekte ve örneklerin önceden konsantrasyonunun arttırılması gerekmektedir [66, 67]. Bu yüzden rutin ve araştırma uygulamaları için, analitik metodların avantajlarına sahip, ancak hızlı, kolay kullanımlı, düşük maliyetli, biyosensörler yapılmasına ihtiyaç duyulmuştur [68].

YPR biyosensörlerinin, diğer optik biyosensörlerine göre en önemli avantajı, biyomoleküllerin etiketlenmesine gerek kalmadan gerçek zamanlı ölçüm yapabilmeleridir [69]. Bu şekilde biyolojik tanıyıcı ajanının hedef moleküle bağlanıp bağlanmadığının yanısıra, aynı zamanda bağlanma kinetiği ve analiz süresi hakkında da bilgi edinilebilmektedir [66, 67, 70-72].

YPR biyosensörlerinde en sıklıkla kullanılan biyolojik tanıyıcı ajanlar, seçiciliklerinden dolayı antikor ve aptamer ve daha az sıklıkla kullanılan antikor fragmanlarıdır [4, 48, 73-76].

Antikorum biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanıldığı bazı YPR biyosensörleri, biyolojik sistemlerdeki, basik fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor,

bFGF), kan pıhtılaşma faktörü (blood coagulation factor VIII, FVIII), insan tiroid uyarıcı hormon (human tyroid stimulating hormone, hTSH), insan büyüme hormonu (human growth factor, hGH), insan folikül uyarıcı hormon (human follicule stimulating hormone, hFSH) ve insan luteinleştirici hormon (human lutenizing hormone, hLH) gibi önemli protein ve hormonların gerçek örneklerde ölçümleri için geliştirilmiştir [66, 73, 74].

bFGF için geliştirilen antikor temelli YPR biyosensöründe, karboksimetildekstran kaplı altın yüzeyde, (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid/ N-hidroksisuccinimid (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide / N-hydroxysuccinimide, EDC/NHS reaksiyonu ile karboksil grupları aktive edilmiş ve bFGF yüzeye bağlanmıştır. Öncelikle, farklı anti-bFGF monoklonal antikorlar yüzeye gönderilerek, bFGF'e en fazla afinite gösteren antikor belirlenmiştir. Daha sonra bu antikor kullanılarak yapılan biyosensörde, farklı konsantrasyonlarda bFGF ölçümü gerçekleştirilmiştir [73].

hTSH, hGH, hFSH, hLH hormonlarının ölçümü için geliştirilen antikor temelli YPR biyosensöründe, antikor konsantrasyonunun optimizasyonu ve en fazla seçicilik gösteren monoklonal antikor belirlenmesi ile, serum ve idrar örneklerinde seyreltme yapılmadan ölçüm alınabilmektedir [66]. MUA ile SAM oluşturulmuş yüzeyler, EDC/NHS ile aktive edilmiş ve anti-kortisol ve anti-kortison antikorları yüzeye bağlanmış ve geliştirilen YPR biyosensörü ile idrar örneklerinde kortisol ve kortison ölçümü sağlanmıştır [70]. Bunun yanısıra patlayıcı olarak kullanılan 2,4,6-trinitrotoluen (2,4,6- trinitrotoluene, TNT), herbisit olarak kullanılan ve insan sağlığına zararlı olduğu bilinen izoproturon (isoproturon, IPU) ve siyanobakterilerin oluşturduğu mikrosystinlerin ve bitki virüslerinin ölçümü için geliştirilen YPR biyosensör sistemleri bulunmaktadır [67, 69, 71, 77]. Bu sistemlerin geliştirilmesinde hedeflenenler arasında, hızlı, gerçek zamanlı ölçüm yapabilen, taşınabilir ve antijen-antikor etkileşimlerini yüksek hassasiyette algılayabilen biyosensörler yapılabilmesidir. Bunun gerçekleştirilmesi için, antikor ya da hedef molekülün çevirici yüzeye bağlanma konsantrasyonlarının belirlenmesi, bağlandıkları ara yüzey yapısının belirlenmesi, kullanılan tampon çözelti ve uygun antikorların seçilmesi gibi optimizasyonlar gerçekleştirilmektedir [66, 67].

FVIII ve TNT gibi düşük moleküler ağırlığa sahip hedef moleküllerin algılanmasının hedeflendiği antikor temelli YPR biyosensör sistemlerinde, sistem hassasiyetini

arttırmak için, hedef moleküller yüzeye bağlanıp çözelti içerisinde antikor gönderilmektedir [74, 77]. Bu yöntemin kullanılması aynı zamanda farklı antikolar gönderilerek, hedef moleküle en seçici antikorun seçilmesi için de önemlidir. Buna ek olarak, hassasiyeti arttırmak için, biyolojik tanıyıcı ajan /hedef molekül bağlanması için farklı yüzeylerin hazırlandığı ve karşılaştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır [70]. Bu yüzeylere örnek olarak, EDC/NHS reaksiyonu ile aktive edilmiş yüzeye biyolojik tanıyıcı ajan /hedef molekülünün kovalent olarak bağlanması, neutravidin-biyotin etkileşimi ile kovalent olmayan şekilde bağlanması, hedef molekül-protein konjuge yapıların EDC/NHS reaksiyonu ile aktive edilmiş yüzeye kovalent olarak veya boş yüzeye bağlanmaları gösterilebilmektedir [67]. Antikor'un biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanıldığı başka bir YPR biyosensöründe, DSP ara bağlayıcı olarak kullanılarak Protein A'nın yüzeye kararlı ve düzenli şekilde bağlanması sağlanmıştır [78]. Kararlı bir şekilde yüzeye bağlanabilen Protein A, Immunoglobulin G (IgG) antikorunun kristalize bölge (fragment crystallizable, (Fc)'sine bağlanarak, antikorun yüzeye düzgün şekilde immobilizasyonunu gerçekleştirmiştir. Yönlendirilmiş immobilizasyon sayesinde, antikorun Fab bölgelerinin, daha fazla miktarda antijen bağlanması sağlanmış ve biyosensör hassasiyeti arttırılmıştır [78].

Aptamerin biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanıldığı bazı YPR biyosensörleri, kan, idrar ve başka biyolojik sıvıların içerisinde bulunan ve hastalıkların erken teşhisi için önemli biyomarkerların ölçümü, mikroorganizma ve virüslerin ölçümü ve kanser testleri gibi önemli klinik uygulamalar için geliştirilmektedir [56, 79]. Bu biyomarkere örnek olarak trombin, IgE, retinol binding protein 4 (retinol bağlama protein 4, RBP4), interferon gamma, (interferon gama, IFN), HIV-Tat gibi proteinler verilebilmektedir [4, 56]. IgE ölçümü için anti-IgE aptameri, EG<sub>6</sub>-COOH: EG<sub>3</sub>-OH ile oluşturulan mSAMS yüzeylere kovalent olarak bağlanarak bir YPR biyosensörü geliştirilmiştir [80]. Aynı çalışmada, hassasiyeti arttırmak için, anti-IgE aptameri bağlı yüzeylere hedef molekül olan IgE gönderildikten sonra anti-IgE antikorunu enjekte edilerek, başka bir YPR biyosensörü geliştirilmiştir. Her iki sensörün doğrusal aralığı aynı olmakla birlikte, sandviç formatı ile geliştirilen ikinci sensörün LOD'sinin 2.07 ng ML<sup>-1</sup>, direk ölçüm formatı ile hazırlanan sensörün ise 3.44 ng ML<sup>-1</sup> olduğu görülmüştür. Tip 2 Diyabet ile ilişkilendirilen RBP4'ün serum örneklerinde ölçümü için aptamer temelli YPR biyosensörü geliştirilmiştir [81]. Yedi farklı tek

zincir DNA aptamerinin SELEX ile seçilmesi ve bu aptamerlerin arasında RBP4'e karşı en seçici aptamerin belirlenmesinden sonra, geliştirilen YPR biyosensörünün hassasiyetinin, ELISA metotuna göre daha fazla olduğu belirtilmiştir. Trombin'e farklı bölgelerinden bağlanan aptamerler kullanılarak, sandviç formatı ile geliştirilen başka bir biyosensörde, LYPR ve interferometry teknikleri birleştirilmiştir [82]. Tiyol uca sahip trombin aptameri (aptamer-I) ve MCH karışımı ile altın kaplı nanoyapıların üzerinde bir tanıyıcı tabaka oluşturulmuş ve trombin belli konsantrasyonlarda yüzeye gönderilmiştir. Daha sonra ikinci aptamer (aptamer-II) 'nin trombin'in farklı bir bölgesine bağlanması sağlanmış ve trombin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Trombin için LOD'sinin 1nM olduğu görülmüştür. Bir başka çalışmada, hepatit C virüs (hepatit C virus, HCV) 'üne yüksek seçicilik ve afinite ile bağlanabilen RNA aptamerlerinin SELEX ile seçilmesinden sonra, denge sabitlerinin belirlenmesi, geliştirilen YPR biyosensörü ile gerçekleştirilmiştir [83]. HCV'nin NS3 proteinin, proteaz kısmına yüksek seçicilik ve afinite ile bağlanabilen RNA aptamerlerinin SELEX ile seçilmesinden sonra, bu aptamerlerden G9-1 aptamerinin, proteazda bağlandığı bölgenin belirlenmesi, proteazda yapılan alanin taraması sonucunda geliştirilen YPR biyosensörü ile gerçekleştirilmiştir [84].

### **2.3. Tanıyıcı Tabaka**

Biyosensör yapımında biyolojik tanıyıcı ajanın yüzey üzerine immobilizasyonu kovalent olmayan bağlama (fiziksel tutunma) veya kovalent olan bağlama (kimyasal tutunma) olarak gerçekleştirilmektedir [20, 85]. Fiziksel tutunma, yüzey ve biyolojik tanıyıcı ajan arasında hidrojen bağı, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler oluşmasıyla gerçekleşmektedir. Bu sayede, yüzey özelliklerinde, dolayısıyla çevirici olarak kullanılan materyallerin özelliklerinde oluşabilecek hasar en aza indirgenmiş olmaktadır [35, 36]. Aynı zamanda yüzey immobilizasyonu sırasında biyolojik tanıyıcı ajanının biyolojik aktivitesinin korunması sağlanmaktadır. Bu son özellik, biyolojik tanıyıcı ajanının hedef moleküle yüksek afinite ve seçicilikle bağlanması açısından önem taşımaktadır. Ancak, hidrojen bağı, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler gibi zayıf bağlanmalar ile gerçekleşen fiziksel tutunmada, biyolojik tanıyıcı ajanının yüzey üzerinden kopma riski yüksektir [85]. Ayrıca bazı kaynaklara göre biyolojik tanıyıcı ajanının yüzeye bağlanmasının heterojen bir yapıda, zayıf ve rastgele olmasından dolayı biyolojik aktivitesinin düşmesi, diğer bir deyişle hedef molekülü bağlama olasılığının azalması riski de bulunmaktadır [76, 86].



Fiziksel tutunmaya kıyasla kimyasal tutunmada biyolojik tanıyıcı ajanının yüzeye immobilizasyonu kovalent olarak bağlanma ile gerçekleşmektedir [20]. Kovalent olarak gerçekleştirilen immobilizasyonlara verilebilecek bazı örneklere; 1) Au, Ag ve Cu gibi metallere veya CdSe, ZnS gibi yarı iletkenlere tiyol/disülfür bağı ile bağlanan moleküller [87-89]. 2) Yüzeyi amin grupları ile aktive etmek ve glutaraldehit bifonksiyonel dialdehit ara bağlayıcı molekülünün aldehit gruplarının amin gruplarına bağlanması ile gerçekleşen ve glutaraldehit'de açıkta bulunan diğer aldehit gruplarının biyolojik tanıyıcı ajanı veya proteinin amin grupları ile bağlanması ile gerçekleşen yüzey modifikasyonları verilebilmektedir [90].

Kimyasal tutunma ile gerçekleştirilen immobilizasyonlarda yüzey özelliklerinde ve biyolojik tanıyıcı ajanının biyolojik aktivitesinde değişme riski daha fazla olmakla birlikte, kovalent olarak bağlanmadan dolayı kararlı bir biyolojik tanıma tabaka oluşumuna katkı sağlanmaktadır [20, 85, 91]. Buna ek olarak, kovalent bağlanmanın yüksek seçiciliğe sahip olmasından dolayı, biyolojik tanıyıcı ajanının amin grupları ile spesifik olmayan bir şekilde bağlanma olasılığı ve hedef moleküle bağlanan bölgesinin kapanma olasılığı daha düşüktür. Bu iki önemli özellikten dolayı, yüzey modifikasyonlarında kimyasal tutunma, fiziksel tutunma yöntemine göre daha çok tercih edilmektedir.

Kovalent bağlanma için gerekli olan fonksiyonel grupları içermeyen biyolojik tanıyıcı ajanının yüzeye immobilizasyonu, gerekli fonksiyonel gruplarla modifiye edilmeleri ile ya da ara bağlayıcı moleküller aracılığı ile gerçekleşmektedir [20, 92, 93].

Ayrıca her iki yöntemde de spesifik olmayan protein bağlanmalarını önlemek amaçlı yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu nedenlerle biyosensör sistemlerinde 1) Yüzey immobilizasyon yöntemlerinde spesifik olmayan bağlanmaları engelleyen, 2) Oriented immobilization (yönlendirilmiş immobilizasyon) ile biyolojik tanıyıcı ajanının doğru şekilde yüzeye bağlanmasını ve hedef molekülünü tanımasını sağlayan ve 3) Biyolojik tanıyıcı ajanının yüzeye kararlı bir şekilde bağlanmasını sağlayan tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tip biyosensörlerin geliştirilmesine temel olabilecek, biyolojik tanıyıcı ajanının bağlandığı yüzeyin kimyasının belirlenmesi üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır [94-97]. Yüzey kimyası üzerine yapılan araştırmalarda başlıca konular arasında üç farklı sistem bulunmaktadır. 1) Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (self assembled monolayers, SAMs) - alifatik ve aromatik yapıdaki tiyol, disülfür, amin,

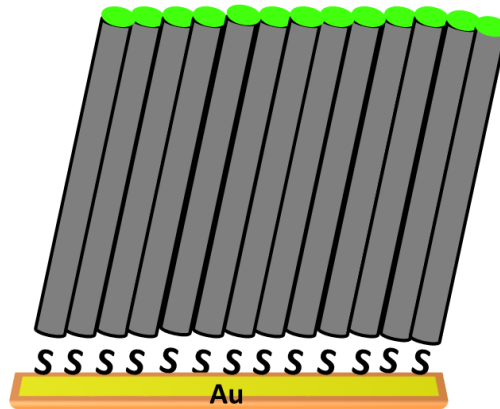
silan veya asit gibi fonksiyonel grupları olan organik moleküllerin altın veya diğer metaller üzerinde oluşturdukları tabakalar 2) Langmuir-Blodgett tek ve çoklu tabakalar 3) Fonksiyonelize polimer yüzeyler [94].

Bu sistemlerden SAMs ve Langmuir-Blodgett tabakalar, sırasıyla kimyasal tutunma ve fiziksel tutunmaya örnek olup, biyosensör uygulamalarında sıklıkla kullanılanlar arasında yer almaktadır [98]. İki sistem karşılaştırıldığında amfifilik moleküllerin yüzeye fiziksel tutunmaları ile gerçekleşen Langmuir-Blodgett tabakaları daha az kararlı yapıda olup, sıcaklık değişimleri veya çözeltiliye maruz kalma iki boyutlu yapılarını değiştirebilmektedir. Buna kıyasla, SAMs ile oluşturulan yüzeyler, daha düzenli, kararlı yapıda olup ve oluşumları kontrol edilebilir olduğu için Langmuir-Blodgett sistemlerine tercih edilmektedirler.

### 2.3.1. Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakalar (Self Assembled Monolayers, SAMs)

SAMs, çözelti ya da gaz fazındaki moleküllerin altın ve gümüş gibi farklı düzlemsel metal yüzeyler, metal oksit ve nanoyapılar üzerine kendiliğinden adsorpsiyonu ile oluşan yapılardır [88, 97]. Seçilen organik moleküllerin tiyol, disülfür, amin, silan veya asit gibi fonksiyonel grupları ile yüzeye kovalent bağlanmaları sonucunda gerçekleşen SAMs, yüzey üzerinde kalınlıkları kontrol edilebilir ince organik film oluşmasını sağlayan bir yöntemdir [98].

Farklı organik molekül/yüzey kombinasyon olasılıklarına rağmen, tiyol grupları içeren organik moleküller ve altın yüzeyler ile gerçekleştirilen modifikasyonlar en sıklıkla araştırılanlar arasında bulunmaktadır [64, 95, 97, 99, 100] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Altın yüzey üzerinde tiyol grupları içeren moleküllerle SAMs oluşturulması

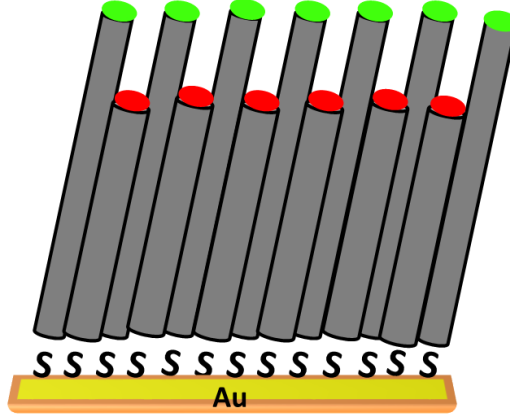
Bunun nedenleri, kükürt içeren organik moleküllerin altın yüzeye bağlanması ile oluşan SAMs'de ileri derecede yapısal düzen olması, katı-sıvı, katı-gaz arayüzündeki fonksiyonel grupların esneklikleri, oluşumlarının ve analizlerinin kolay olması olarak sıralanmıştır [97]. Ayrıca bu tip moleküllerin adsorpsiyonu için, altının gümüş ve bakır gibi diğer metallerle tercih edilmesinin bir nedeni, bu metallerin oksitlenmesi sonucunda, yüzey modifikasyonunda sorunlar ortaya çıkmasıdır [64, 101]. Buna ek olarak altın, düzlemsel, partikül veya film olarak farklı şekillerde temin edilebilmekte ve üzerlerinde oluşan SAMs'in yapısı, kompozisyonu ve bağlanma özelliklerinin karakterizasyonu kolay olmaktadır [20].

Altın yüzeyler üzerine alkantiyoller, dialkyldisülfürler ve dialkyl sülfürler gibi kükürt içeren organik moleküllerin adsorpsiyonu ile oluşan SAMs, yüzey özelliklerinin araştırılması (hidrofobik veya hidrofilik), yük transferi ve elektrostatik etkileşimlerin anlaşılması, biyosensör uygulamaları ve yüzeyin trombosit bağlayabilme kapasitesinin değerlendirilmesi gibi farklı alanlarda kullanılan ve araştırılan bir konu olmuştur [12, 13, 64, 65, 88, 94, 97, 99, 100, 102].

SAMs ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları, sahip olduğu bazı avantajlardan dolayı özellikle biyosensör uygulamaları için tercih edilir hale gelmiştir. Bu avantajlar sırasıyla 1) SAMs oluşturmak için kullanılan organik molekülün yüzeye bağlanma için gerekli fonksiyonel grubunun yüzey afinitesine bağlı olarak (tiyol gruplarının (-SH) altına olan ya da fosfonik asitlerin alümin, titanya ve indiyum kalay oksit'e olan afinitesi) kendiliğinden oluşumları [94, 103] 2) Kolay oluşumları ve kararlı yapıları 2) Sıkı ve düzenli yapılarından dolayı, membran benzeri mikroçevre oluşturmaları ve bu sebeple biyolojik moleküllerin immobilizasyonu için uygun ortam yaratmaları 3) Fonksiyonel grupların seçimine göre, hidrofobik ya da hidrofilik bir yüzey yaratabilmeleri 4) Oluşumları için az miktarda (düşük konsantrasyonda) molekülün yeterli olması 5) AFM ve taramalı tünelleme mikroskopu (scanning tunneling microscope, STM) ile protein adsorpsiyonu, DNA hibridasyonu, antijen-antikor etkileşimi gibi moleküler düzeyde bilgi edinilmesine olanak sağlamaları 6) Oluşumlarının kontrol edilebilir olmaları 7) Temas açısı ölçümleri gibi fiziksel yöntemler ve XPS, yakın kenar X-ışını absorpsiyon ince yapı spektroskopisi (near edge X-ray absorption fine structure, NEXAFS), Raman Spektroskopisi ve FTIR gibi spektroskopik yöntemler ile kolayca karakterize edilebilmeleridir [65, 94-98, 104-106].

### 2.3.2. Karışık Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakalar (Mixed Self Assembled Monolayers (mSAMs))

Tiyol grupları içeren iki farklı molekülün yüzeye bağlanması sonucunda yüzey üzerinde mSAMs yapıları oluşmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Altın yüzey üzerinde tiyol grupları içeren iki farklı molekülle mSAMs oluşturulması

Bu yapılar üzerine gerçekleştirilen ilk çalışmalardan birinde, 1) farklı zincir uzunluklarındaki 2) farklı uç fonksiyonel gruplara sahip 3) farklı bağlanma gruplarına sahip iki tür molekülün altın yüzeye bağlanmaları karşılaştırılmaktadır [107]. Yine aynı çalışmada çözelti seçiminin SAMs yapısı üzerine etkileri ve mSAMs'i oluşturan moleküllerin yüzeye bağlanma mekanizmaları incelenmektedir.

Çözelti içerisinde aynı zincir uzunluğunda farklı iki molekülün çözülden sadece düşük konsantrasyondaki molekül ile yüzeyde mSAMs oluşturmaları veya uzun zincirli tiyolların kısa zincirli tiyollara kıyasla daha hızlı yüzeye bağlanmaları, mSAMs oluşumlarının kinetik olarak kontrolden daha çok termodinamik olarak kontrol edildiklerini göstermektedir.

Farklı bağlanma grupları içeren iki farklı molekülün yüzeye bağlanma tercihleri incelendiği zaman, tiyol ve fosfin bağlanma gruplarının benzer afinite gösterdikleri, ancak tiyol bağlanma gruplarının izonitril bağlanma gruplarına göre altın yüzeye daha çok afinite gösterdikleri görülmektedir.

Temas açısı ölçüm sonuçlarına göre, aynı uzunlukta farklı uç grupları (polar ve polar olmayan) içeren iki farklı molekül mSAMs oluşturdıkları zaman, yüzeyde iki farklı bölge oluşturmadıkları gözlemlenmektedir. Ayrıca polar uç grupları içeren molekülün oranı karışımda arttığı zaman, SAMs arayüzünde hidrojen bağları

oluşturarak kararlı bir yapı oluşturduğu ancak azaldığı zaman polar uç grupları arasında hidrojen bağlarının azaldığı görülmektedir. Uç gruplarının birbirleriyle oluşturduğu hidrojen bağların güçlü olduğu durumlarda, farklı çözücü seçimlerinin uç gruplar arası hidrojen bağlarını ve ayrıca uç grup ve çözücü etkileşimlerinin SAMs-çözücü arayüzünü kontrol ederek SAMs oluşumunu etkilediği gözlemlenmektedir. Buna ek olarak, uç gruplarının çözelti içerisinde ne kadar çözüldüğüne bağlı olarak, altın yüzey üzerine bağlanma tercihleri incelenmiştir. Aynı yazarların farklı bir makalesinde farklı uzunluktaki zincirlere sahip tiyollü moleküllerin yüzeye bağlanma tercihleri ve bu moleküllerin farklı uç gruplara sahip olanları ile SAMs yapısındaki değişimler incelenmiştir [96]. Farklı uzunluktaki iki molekülün farklı uç grupları olmaları durumunda, monolayer arayüzünün düzenli, SAMs yapıların çözeltiye bakan kısmının düzensiz olduğu görülmüştür. Farklı uzunluktaki iki molekülün aynı uç grupları olmaları durumunda ise, SAMs yapıların çözeltiye bakan kısmının düzensiz olduğu ancak hidrofobik özellikte olduğu anlaşılmıştır.

### **2.3.3. SAMs'in Karakterizasyonu**

SAMs yapılarının yüzey üzerinde oluşturulmaları, karakterizasyonları ve bunun sonucunda arayüzlerin anlaşılması, farklı uygulamalar için önem taşımaktadır [108]. Bu uygulamalara yüzey özelliklerinin anlaşılması, elektronik cihazların performanslarını arttırmak için kaplamalar, yüzey üzerine hücre tutunması, protein bağlanması, yıpranmalara karşı koruma, biyomembran modellerinin oluşturulması, iyon taşınım ve elektron aktarım çalışmalar için model sistemlerinin oluşturulması, örnek gösterilebilmektedir [109, 110]. SAMs oluşumları için gümüş, bakır, platinyum gibi metaller kullanılıyor olsa da, en çok kullanılan metal altın olmuştur. Bunun sebepleri arasında, altının oksidasyon ya da yıpranmaya karşı dayanıklı olmasının yanısıra, laboratuvar şartları altında yavaş kirlenmeleri, tiyol, disülfür gibi bağlanma grupları-yüzey arasındaki etkileşimlerin ve farklı uzunluktaki alkantiyolların SAMs yapısına etkisinin incelenmesi sayılabilmektedir [108, 109]. Ayrıca altının düşük kimyasal reaktivitesi, elektrokimyasal ve spektroskopik tekniklerle yüzey karakterizasyonuna imkan tanımaktadır. Altın yüzey üzerinde SAMs oluşumları üzerine yapılan ilk karakterizasyonlar, elipsometry, temas açısı ölçümleri ve infrared spektroskopi ile yapılmıştır [108].

Farklı disülfürlerin, çözelti içerisinde altın yüzeyler üzerinde oluşturdukları yapıların kalınlığı, hidrofobik-hidrofilik özellikleri ve fonksiyonel grupların yüzeye olan açılı incelenmiştir. Bu karakterizasyonlar sırasında disülfür bağının yüzeye nasıl bağlandığı (disülfür bağı kırılarak ya da kırılmayarak) bilinmiyor olsa da, aynı yazarların daha sonraki çalışmalarında disülfür bağının kırıldığı ve moleküllerin tiyol grupları ile Au-S bağı oluşturarak yüzeye bağlandıkları görülmektedir [111, 112]. Ultra Yüksek Vakum (Ultra High Vacuum, UHV) şartlarında, metantiyol ve dimetil disülfürün altın yüzeylere bağlanmaları XPS, infrared spektroskopi, yüksek çözünürlüklü elektron enerji kaybı spektroskopi (high resolution electron energy loss spectroscopy, EELS) ile yapılan karakterizasyonlar ile karşılaştırılmıştır. Dimetil disülfür altın yüzeye disülfür bağının kırılması sonucunda, metantiyolun S-H bağının kırılmaması sonucunda immobilize olduğu için metantiyoldan daha güçlü bağlandığı gözlemlenmiştir [111]. Ayrıca organik disülfürlerin çözelti içerisinde altın yüzeylere bağlanmaları XPS ile incelenmiş, disülfürlerin UHV şartlarında olduğu gibi benzer şekilde altın yüzeye bağlandıkları görülmüştür. Elipsometry ölçümleri, farklı uzunluktaki alkil gruplarına sahip organik disülfürler ile oluşturulan SAMs yapı kalınlıkları hakkında bilgi verirken, infrared spektroskopi ve elektron mikroskopi ölçümleri moleküllerin yüzey üzerinde yönelmeleri, yüzeye yakınlıkları hakkında bilgi vermektedir [112].

Daha sonraki yıllarda, alkantiyolların çözelti içerisinde altın yüzeyler üzerinde oluşturdukları SAMs yapıları elipsometry, infrared spektroskopi, XPS ve elektrokimyasal metotlar, temas açısı ölçümleri kullanılarak incelenmiştir [96, 97, 107, 109].

Genel yapısı  $(CH_3(CH_2)_nSH)$  olan ( $n = CH_2$  grubunun sayısı) alkantiyollarda beklenen ve ölçülen SAMs kalınlıklarının farkının  $n$  sayısına bağlı olarak değiştiği elipsometry tekniği ile görülmüştür [109]. Aynı çalışmada infrared spektroskopi sonuçlarına göre, alkantiyolların yüzey üzerindeki sıklıkları, zincir yapılarının yüzey üzerinde yönelmeleri, kristal benzeri yapıların oluşmasının  $n$  sayısı ile belirlendiği anlaşılmıştır. Uzun zincirli alkantiyolların dik konumdan  $20-30^\circ C$  açı ile uzaklaştığı, sık ve kristal benzeri düzenli yapılar oluşturduğu ve kısa zincirli alkantiyollarda ise zincirler arası etkileşimlerin azaldığı, düzensiz yapılar oluştuğu gözlemlenmiştir. Elektrokimyasal metodlar ile yapılan ölçümlerde ise, elektron aktarımı ve kapasitans ölçümleri ile uzun ve kısa zincirli alkantiyollarla oluşan SAMs yapıların yapısal

bozuklukları ve genel yapıları hakkında bilgi sahibi olunmuştur. Bu ölçümlerin sonucunda uzun zincirli alkantiyolların oluşturduğu sık ve düzenli yapıların elektron transferini ve iyon geçirgenliğini azalttığı, kısa zincirli alkantiyolların düzensiz yapılarının elektron transferini ve iyon geçirgenliğini arttırdığı görülmüştür.

Bir başka çalışmada, genel yapısı  $X(CH_2)_m-S-(CH_2)_nY$  olan dialkyl disülfürlerin aynı ve farklı m ve n sayılarına ait dialkyl disülfürlerin alkol ve metanol çözeltilerinden altın yüzeyler üzerinde oluşturduğu SAMs yapıları incelenmiştir [113]. XPS, elipsometry, infrared spektroskopi ve temas açısı ölçümleri sonucunda yapısal kararlılığın ve yapısal düzenin oluşan tabakanın makroskopik özellikleri (yüzeyin hidrofilik veya hidrofobik olması) ile ilişkisi belirlenmiştir. Aynı ve farklı m ve n sayılarına (simetrik ve antisimetrik yapıya sahip) ait dialkyl disülfürlerin, uç gruplarının içeriğine, oluşturdukları yapının sıklığına ve düzenine göre, yüzeyin hidrofobik veya hidrofilik olması ve SAMs genel yapısı belirlenmektedir. Antisimetrik dialkyl disülfürlerde, uzun zincirin kısa zincirden daha uzun olması ve uzun zincirin metil uç gruplu olması durumunda, uzun zincirin kısa zincir üzerine katlandığı ve yüzey özelliğinin hidrofobik olduğu görülmüştür. Simetrik dialkyl disülfürlerde, metil ve karboksil uçlu zincirlerin eşit olması durumunda, yüzey özelliğinin hidrofilik olduğu görülmüştür. Ayrıca dialkyl disülfürlerle oluşturulan SAMs yapıların alkantiyollarla oluşturulan yapılardan daha düzensiz olduğu belirtilmiştir.

Genel yapısı  $SH-(CH_2)_n-SH$  olan alkantiyolların oluşturduğu SAMs yapıları, yansıma-absorpsiyon infrared spektroskopi (reflectance-absorption infrared spectroscopy, RAIRS), spektroskopik elipsometry ölçümleri ile karakterize edilmiştir [114]. Oksijeni uzaklaştırılmış ya da uzaklaştırılmamış farklı çözeltilerin, karanlık ya da aydınlık ortamda oluşturdukları SAMs yapıları karşılaştırılmıştır. En düzenli alkantiyol SAMs yapılarının karanlık ortamda, oksijeni uzaklaştırılmış hekzan çözeltilerinden oluştuğu görülmüştür. Aromatik tiyolların altın yüzeyler üzerinde oluşturduğu yapılar, fotoemiyon spektroskopi (photoemission spectroscopy, PES) ve NEXAFS ile yüzey üzerinde karakterize edilmiştir [110]. Moleküllerin yüzeye hangi açı ile durduğu (moleküler yönlendirme), kimyasal bağ ve elektronik yapıları karşılaştırılmıştır. Farklı karakterizasyonlar sonucunda, yük transferi, yüzey morfolojisi, oluşan yapıların sıklığı, moleküler yönlendirme gibi özelliklerin uygulamaya yönelik değiştirilebilir olduğu görülmüştür.

#### **2.3.4. SAMs'in Nanoteknolojideki Önemi**

SAMs yapılar, yüzey üzerinde oluşturdukları ince film tabakaları ile 1-3 nm kalınlığına sahip nanoyapılardır[96, 97]. SAMs'in moleküler bileşenlerinin oluşturduğu kompozisyon, SAMs'in yüzeyde atomik kompozisyonunu belirlemektedir[88]. SAMs'in bu özelliği, yüzeyde organik ya da organometallik yapıların oluşturulmasına ve değiştirilmesine, kısaca kontrol edilebilmelerine olanak vermektedir. SAMs yapıları belli avantajlara sahip olmalarından dolayı, nanoteknoloji alanındaki araştırmalar açısından uygun olarak nitelendirilmektedirler. Bu avantajlar sırasıyla 1) Kolay oluşturulabilmeleri 2) Nanometre boyutundaki nesnelerin (ince film, nanotel veya başka nanoyapılar) kararlılıklarını arttırmak için uygun bileşenlere sahip olmaları 3) Moleküler seviyedeki yapılarla makroskopik arayüz özellikleri (yüzey gerilimi, adhesyon vb.) arasında bağlantı kurabilmeleri 4) Moleküler tanıma gibi dış çevrede gerçekleşen olayları, metalik yapıların optik ve elektronik özellikleri ile birleştirebilmeleri olarak sıralanabilmektedirler[88].

#### **2.3.5. SAMs ve mSAMs Oluşumları ile YPR Sensörlerinin Geliştirilmesi**

SAMs'in immobilizasyon tabakasını oluşturmadaki avantajlarından ve tiyol gruplarının (-SH) altın yüzeylere olan afinitelerinden dolayı, altın-tiyol tek tabakaları oluşturarak gerçekleştirilen SAMs, biyosensör uygulamaları için araştırılan bir konu haline gelmiştir. Tiyol grupları ile modifiye edilmiş biyolojik tanıyıcı ajanları (antikor, DNA, peptit, aptamer) altın yüzeylere kovalent olarak bağlanabilmekte ve oluşan SAMs arayüzey ile biyosensörler geliştirilebilmektedir [13, 20, 76].

Altın nanopartiküllerin çevirici olarak kullanıldığı bir biyosensör sisteminde, tiyol grupları ile modifiye edilmiş aptamer, altın nanopartikül üzerine bu sayede immobilize edilmiş ve kanser hücresi ölçümü için kullanılmıştır [115]. Hazır YPR çipleri ile yapılan başka bir çalışmada, çip yüzeyi insan büyüme hormonu antikoru (human growth hormone antibody, anti-HGH) yapısında bulunan disülfür bağlarının 2-merkaptotilamin (2-mercaptoethylamine, 2-MEA) ile parçalanması sonucu açığa çıkan tiyol grupları ile yüzeye modifiye edilmiş ve hedef molekülü olan HGH'a bağlanması YPR ile ölçülmüş ve aynı çalışmada farklı immobilizasyon tekniklerinin kullanıldığı yöntemler karşılaştırılmıştır [76]. 11-merkaptoundekanoik asit (11-mercaptoundecanoic acid, MUA) ile oluşturulan SAMs yüzeylerde, MUA' ların karboksil gruplarının EDC/NHS ile reaksiyonu sonucu NHS-ester oluşturulmuş ve bu yüzey, biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanılan anti-HGH ile modifiye edilmiştir.



Tiyol grupları ile modifiye ya da yapısında tiyol grupları olan biyolojik tanıyıcı ajanlarının altın yüzeyine kovalent olarak bağlanması, ya da biyolojik tanıyıcı ajanlarının tiyol grubu içeren ara bağlayıcı bir molekülle yüzeye bağlanması sıklıkla kullanılan bir yöntem olsa da, biyolojik tanıyıcı ajanlarının nükleotit bazlarının serbest NH grupları ile de altın yüzeye spesifik olmayan bir şekilde immobilize olabileceği bilinmektedir [11, 20]. Spesifik olmayan bir şekilde bağlanma, biyolojik tanıyıcı ajanının yapısının bozulmasına, biyolojik aktivitesinin düşmesine ve aynı zamanda hedef molekülü bağlama bölgesinin yüzeye bağlanarak fonksiyonunu yitirmesine neden olabilmektedir [85]. Ayrıca sık bir şekilde yüzeye immobilize olan biyolojik tanıyıcı ajanlarının hedef molekülü bağlama bölgelerinin sterik engellemeye bağlı olarak kapanmasından dolayı, hedef molekülü bağlama kapasitesinin azalması söz konusudur.

Uzun zincirli alkantiyollar yüzey üzerinde düzenli ve sıkı SAMs yapıları oluşturdukları ve elektron aktarımı ve iyon geçirgenliğini azalttıkları için bu sistemleri incelemek için model yapılar oluşturmaktadırlar [109]. Ancak protein ve biyolojik tanıyıcı ajan bağlanması, moleküler etkileşimleri inceleme gibi sensör uygulamalar için, tek tip molekülden oluşan sıkı, SAMs yüzeylere, biyomolekül bağlanma etkinliği, sterik engellemelerden dolayı azalmaktadır [11]. İki farklı molekülün yüzeye bağlanması sonucunda oluşan mSAMs ile, farklı kimyasal yapı özellikleri bir araya getirilerek, yüzey fonksiyonu arttırılmaktadır [116].

Biyosensör geliştirilmesinde mSAMs iki farklı şekilde oluşturulabilmektedir. 1) Biyolojik tanıyıcı ajanının başka bir tiyollü molekül ile karıştırılarak yüzeyde mSAMs oluşturulması- Bu şekilde oluşturulan mSAMs'de, biyolojik tanıyıcı ajanının yüzey üzerindeki yoğunluğunu azaltmak ve hedef molekülü bağlama kapasitesini arttırmak için kısa zincirli tiyollü moleküller ile birlikte immobilize edilmektedirler [14, 20, 104].

Yüzeyde mSAMs oluşturmanın başka bir avantajı da, spesifik olmayan şekilde yüzeye bağlanan biyolojik tanıyıcı ajanlarının yüzeyden uzaklaştırması ve altın yüzeyde boş olan kısımların tiyol grupları ile kaplanması sonucunda, diğer proteinlerin spesifik olmayan şekilde bağlanmasının da önüne geçilmiş olmasıdır. Bu yöntem kullanılarak yapılan bir çalışmada, farklı Salmonella serotiplerinde bulunan disakkarid çeşitleri, tiyol grupları ile modifiye edilip, 11-merkaptto-1-undekanol (11-mercaptop-1-undecanol, MCU) ile karıştırılarak hazır YPR çipleri

yüzeyleri üzerlerinde mSAMs oluşturulmuş, antikor bağlanmaları YPR görüntüleme, kızılötesi yansıma absorpsiyon spektroskopisi (infrared reflection absorption spectroscopy, IRAAS) ve AFM ile test edilmiştir [117]. Başka bir çalışmada, tiyol gruplarına konjuge edilmiş DNA problrarı, MCH ile karıştırılarak mSAMs oluşturulma ile yüzey immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve tek baz DNA mutasyon ölçümü YPR ile ölçülmüştür [13]. Bunlara ek olarak, MCU kullanılarak altın yüzeyde oluşturulan karışık DNA /alkantiyol tek tabakalarda, DNA immobilizasyon süresini sabit tutarak farklı MCU süreleri ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonlarında, hedef molekül olan tamamlayıcı DNA'ya hibridizasyon verimliliği, <sup>32</sup>P-radyometrik assay ve YPR ile ölçülmüştür [11]. Başka bir çalışma grubunun gerçekleştirdiği araştırmada, aynı biyolojik tanıyıcı ajanına farklı uzunluktaki tiyol grupların bağlanması ile yüzeyden uzaklaşmalarının ve MCH/MCU ile oluşturdukları mSAMs yüzeylerde hassasiyete olan etkisine bakılmıştır [118].

2) Biyolojik tanıyıcı ajanı yüzeye bağlayan ara bağlayıcı bir molekül ile başka bir tiyollü molekül karıştırılarak mSAMs oluşturulması-Biyolojik tanıyıcı ajanının yüzey immobilizasyonu için, tiyol içeren başka bir ara bağlayıcı bir molekül ile yüzeye bağlanması ve tiyollü bir molekül ile karıştırılması sonucunda oluşturulan mSAMs ile biyosensör sistemleri geliştirilmiştir. 16-merkapt-1-heksadekanoik asit (16-mercapto-1-hexadecanoic acid, 16-MHA) ve MCH'nin oluşturduğu mSAMs yüzeylerde, avidin immobilizasyonu için karboksil grupları EDC/NHS reaksiyonu ile aktive edilmiş ve yüzeye biyotinlenmiş biyolojik tanıyıcı ajan bağlanarak biyosensör sistemi geliştirilmiştir [12]. Bir başka araştırma grubunun yaptığı çalışmada, 11-Merkaptondekanoik asit (11-Mercaptondecanoic acid, 11-MUA) ve 3-merkaptopropanol (3-mercapto-1-propanol, 3-MPOH)'in oluşturduğu mSAMs yüzeylerde, 11E5 antikor immobilizasyonu için aynı şekilde yüzey aktivasyonu yapılmış ve *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) ölçümü sağlanmıştır [23]. Farklı uzunluk ve uç gruplarına sahip alkantiyoller ile 11-MUA karıştırılarak mSAMs yüzeylerin Protein A bağlama kapasiteleri karşılaştırılmıştır. IgG antikorlarının Fc bölgelerine bağlanabilen Protein A'nın en fazla IgG bağlayan mSAMs yüzeyleri biyosensör arayüzeyi olarak seçilmiştir [116].

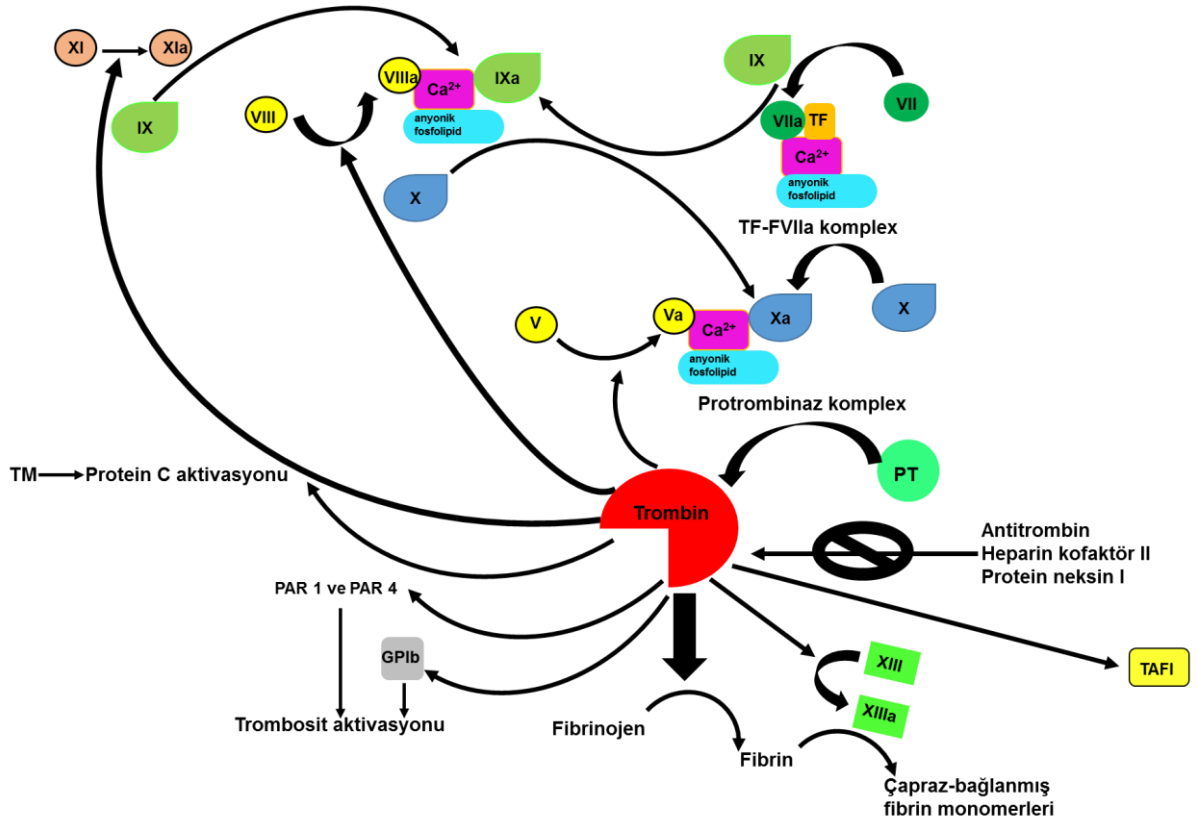
### **2.3.6. Altın Yüzeylerde DSP Ara Bağlayıcı Molekül ile Gerçekleştirilen Modifikasyonlar**

Ara bağlayıcı moleküller, yüzeye kovalent olarak bağlanmak için gerekli fonksiyonel gruplara sahip olmayan biyolojik tanıyıcı ajan ya da proteinler ile yüzey arasında ara tabaka oluşturup yüzeye bağlanmalarını sağlamaktadırlar [92, 93]. Yüzey ve biyolojik tanıyıcı ajan arasında bir bağlantı sağlamalarının dışında, biyolojik tanıyıcı ajanlarının kararlı, spesifik olarak bağlanmalarını ve aynı zamanda çözelti ortamına doğru yönlendirerek hedef molekülü yakalama olasılıklarını arttırmaktadırlar [12, 119]. DSP, yüzey modifikasyonunda kullanılan ara bağlayıcı bir moleküldür [10]. Yapısında disülfür bağ bulunduran ve altın yüzeyin indirgeyici özelliğinden dolayı, disülfür bağının kırılması ile, altına bağlanabilen bir succinimidyl alkandisülfürdür. Yapısındaki NHS ile yüzeye bağlanacak protein ya da biyolojik tanıyıcı ajanının yapısındaki serbest amin grupları ile peptit bağı oluşturmaktadır. Farklı çalışmalarda altın yüzeylere kovalent olarak enzim, antikor ya da biyotinlenmiş biyolojik tanıyıcı ajan bağlamak için avidin bağlamak için kullanılmıştır [92, 93, 120]. Bunların yanısıra, yüzeye bağladığı proteinin yüzeydeki konsantrasyonunu arttırdığı belirtilmiştir [119]. Altın yüzeylerin kimyasal modifikasyonu için DSP ve NHS esterleri tek başına kullanıldığı gibi, sırasıyla DSP ve NHS esterlerinin, enzim immobilizasyonu ve AFM ile protein görüntüleme için CH<sub>3</sub>-sonlu ve daha uzun alkantiyoller ile yüzey üzerindeki immobilizasyonlarının seyreltikleri bilinmektedir [121-123].

### **2.4. Trombin**

Pıhtılaşma faktörü II olarak da bilinen trombin, fizyolojik ortamda çözünür haldeki fibrinojeni çözünmeyen fibrin'e çeviren ve bu sayede pıhtılaşma sağlayan bir serin proteazdır [7, 124]. Trombin, kimyasal yapı ve fonksiyon olarak kimotripsin ve tripsin gibi diğer serin proteazlara benzemektedir [7, 125]. Ancak kendi substratlarına ve kofaktörlerine olan seçiciliği ve belli inhibitörlerin trombinin etkisizleştirerek pıhtılaşma reaksiyonlarını durdurması, trombinin molekül yapısına bağlıdır [126]. Herhangi bir nedenden dolayı damarda oluşan bir hasar sonrasında pıhtılaşmayı sağlayan bir dizi sürece hemostaz denmektedir. Hemostaz süreci için trombin oluşumu, önemli bir rol oynamaktadır [125]. Trombin oluşumu, başlangıç, artış ve sonlanma olarak üç ayrı evre izlemektedir [8]. Başlangıç evresinde trombin az miktarda oluşmakta, artış evresinde pozitif geri-besleme mekanizmaları ile

'trombin patlaması' denilen süreç gerçekleşmekte ve sonlanma evresinde trombin miktarının azalması gerçekleşmektedir [7, 8, 126]. Damarda oluşan hasar sonrasında, damar dışındaki bölgelerde olan doku faktörü (tissue factor-TF), kan içerisine salgılanması sonrasında Faktör VIIa (FVIIa) 'ya bağlanmakta ve oluşan TF-FVIIa yapısı öncelikle Faktör X (FX)'u aktive ederek, Faktör Xa (FXa)'yı oluşturmaktadır. Başlangıç evresinde, inaktif trombin formu olan protrombin, Faktör Xa (FXa) tarafından trombin'e çevrilmekte ancak az miktarda trombin oluşmaktadır. Başta az miktarda salgılanan trombin, pozitif geri-besleme mekanizmaları ile kendi salgısını arttırmaktadır [7, 125, 126]. Trombinin pozitif-geri besleme mekanizmaları ile kendi oluşumunu artırma ve azaltma döngüsü (Şekil 2.4)'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Trombin'in hemostaz sürecindeki fonksiyonları. Kısaltmalar; TAFI: trombin aktive fibrinolizis inhibitörü, GplIb: glikoprotein I $\beta$ , PAR: proteaz aktive reseptör, TM: trombomodulin, PT: Protrombin

Trombin ilk salgılanmasından sonra, Faktör V (FV), Faktör VIII (FVIII), Faktör XI (FXI)'lerin yapısında bulunan B bölgesini aktif bölgeden keserek sırasıyla Faktör Va (FVa), Faktör VIII a (FVIIIa), Faktör XIa (FXIa) faktörlerin oluşumunu sağlamaktadır

[7, 126]. FVa ve FXa oluşumu ile birlikte; FVa, FXa, anyonik fosfolipid ve  $Ca^{+2}$ 'den oluşan protrombinaz kompleksi oluşmaktadır. FVa, protrombinaz kompleksine katılarak; FVIIIa (FVIIIa, IXa, anyonik fosfolipid ve  $Ca^{+2}$ ) Xase yapısına katıldıktan sonra FXa oluşumunu sağlayarak, trombin salgısını arttırmaktadır. FXIa ise FIXa oluşumunu sağlayarak trombin oluşumuna katkıda bulunmaktadır [7, 125, 126]. Trombin hemostaz'ı oluşturmak için birçok substrat ile etkileşime girmektedir. Kan pıhtılaşmasına en doğru etkiyi fibrinojen ile etkileşime girerek gerçekleştirmektedir. Trombinin fibrinojeni parçalaması sonrasında fibrinojen yüzeyindeki polimerizasyon bölgelerinin açığa çıkması ile, fibrin monomerleri non-kovalent olarak bir araya gelmektedirler [126]. Aynı zamanda trombin, Faktör XIII (FXIII)'ün yapısındaki katalitik görevi olan A bölgelerinden, B bölgelerini keserek transglutaminaz enzimi Faktör XIIIa (FXIIIa)'yı oluşturmaktadır [7]. Fibrin monomerlerinin kovalent yapıda birbirleriyle bağlanmaları, (FXIIIa)'nın yanyana bulunan fibrin monomerlerinin glutamin ve lizin aminoasitlerini çapraz bağlaması ile gerçekleşmektedir. Bu reaksiyon kan pıhtılaşmasını sağlayan fibrin'in kararlı bir yapıda olmasını sağlamaktadır. Fibrin'in kararlı yapısını arttıran bir başka mekanizma da, karboksipepsitaz enzimi olan trombin aktive fibrinolizis inhibitörü (thrombin activated fibrinolysis inhibitor, TAFI)'ın, trombomodulin'e bağlanması sonucunda, aktif yapı TAFIa oluşması ile gerçekleşmektedir [125]. Bunun sonucunda TAFIa, fibrin yapısı içerisinde bulunan lizin aminoasitlerini çıkararak, fibrinolitik enzimler tarafından tanınmasını ve fibrinin parçalanması adı verilen fibrinolizis'i engellemektedir. Trombin aynı zamanda başka mekanizmalar ile kan pıhtılaşmasına yardımcı olmaktadır. Bunlardan bir tanesi trombin'in trombosit üzerindeki proteaz aktive reseptör (protease activated receptor, PAR)' a bağlanarak trombosit aktivasyonunu gerçekleştirmesidir [126]. PAR1 aktivasyonu için pikomolar düzeyde trombin konsantrasyonu yeterli olmakta ancak PAR4 reseptörleri daha yüksek düzeyde trombin konsantrasyonu ( $>10$  nM) ile aktive edilmektedirler [7]. Trombosit aktivasyonu aynı zamanda, trombinin integral membran protein olan ve PAR1 aktivasyonu sırasında kofaktör görevi gören glikoprotein Iba (glycoprotein Iba, GIIb)'ine bağlanması ile de gerçekleşmektedir [126]. GIIb aynı zamanda von-Willebrand faktörüne bağlanarak hasarlı bölgeye trombosit kümelenmesi sağlamaktadır [7].

Hasar görmüş bölgede kapanma olacak kadar pıhtı oluştuktan sonra, trombin'in kan pıhtılaşma bölgesinden ayrılarak hasar görmemiş damar bölgesindeki endotel doku üzerinde bulunan trombomodulin (TM)'ine bağlanması sonucunda protein C (PC) aktive edilmektedir [125]. PC, FVa ve FVIII'nin inaktivasyonunu gerçekleştirerek, trombin oluşumunu engellemekte ve pıhtılaşmayı azaltmaktadır [126]. Trombin'in doğrudan PC'yi aktive etmesi az bir verimle gerçekleşmektedir [125]. Ancak trombin, trombomodulin'i kofaktör olarak kullandığı durumlarda, trombin ve PC endotel doku üzerinde yakınlaşmakta ve reaksiyon verimi artmaktadır. Trombin'in pıhtılaşma sürecini sonlandıran, antitrombin (antithrombin, AT), heparin kofaktör II (heparin cofactor II, HPCII), proteaz neksin I (protease nexin I, PNI) gibi serpin proteaz ailesine ait başka inhibitörler de bulunmaktadır [126]. HPCII ve AT inhibitörlerinden AT'nin, pıhtılaşma sürecinde başka serin proteazlara da bağlandığı ancak HPCII'nin trombine olan seçiciliğinin çok yüksek olduğu bilinmektedir [7, 126]. Her iki inhibitörün de heparan sülfat gibi glikosaminglikanlara bağlanmaları halinde trombin'i engelleme reaksiyonunun hızını arttırdığı bilinmektedir [7]. Antitrombin'in trombin'e bağlanması sonrasında trombin'i engellediği ancak bu reaksiyonun endotel doku üzerinde bulunan heparin sülfat'a bağlanması ile reaksiyon hızının 1000 kat arttığı bilinmektedir. Bu şekilde, hasar gören bölgede trombin sayesinde oluşan pıhtılaşma süreci bölge kapandıktan sonra yine trombin'in geri-besleme mekanizması ile durdurulmaktadır.

Trombin yapısı içerisinde, *fibrinojen bağlanma bölgesi* olarak bilinen eksosit I, *heparin bağlanma bölgesi* olarak bilinen eksosit II,  $\gamma$ -döngüsü, 60-döngüsü ve aktif bölge bulunmaktadır [7, 125]. Trombin konsantrasyonunun düzgün denetlenmesi, substrat, kofaktör ve inhibitörlerinin trombin yapısındaki bu bölgelere bağlanması ile gerçekleşmektedir [125, 126]. Trombinin eksosit I bölgesine fibrinojen dışında, FV, FVIII, trombomodulin kofaktörleri, HPCII gibi inhibitörler ve PAR1, PAR4 bağlanmaktadır [7, 126]. FXIII'ün, eksosit I bölgesine bağlanması fibrin aracılığıyla dolaylı olarak gerçekleşmektedir. Fibrinojen-trombin etkileşimi ve FXIII'ün PAR1 ve PAR4'ün bağlanması eksosit I bölgesi dışında trombinin aktif bölgesi ile de gerçekleşmektedir [7]. Eksosit II bölgesine heparin dışında FV, FVIII, trombomodulin kofaktörlerinin, PAR1, PAR4'ün ve antitrombinin, trombin aktivesini azaltmak için kofaktör olarak kullandığı heparinin bağlandığı bilinmektedir [7, 126]. Trombosit aktivasyonunda görev alan G1b $\alpha$  proteininin, eksosit II bölgesi ile

etkileşime geçtiği ve eksosit I'e bağlanmadığı eksosit I ve eksosit II bölgelerinde gerçekleştirilen çeşitli mutasyonlarla belirlenmiştir [127, 128]. Trombin'in aynı bölgesine bağlanabilen farklı substrat, kofaktör ve inhibitörlerin bağlanmaları ve ayrılmaları; konsantrasyonları, ve o bölgeye olan afinitelerine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Buna örnek olarak, fibrin ve trombomodulinin trombinin eksosit I bölgesine bağlanması ve trombinin trombomodulin'i tercih etmesi gösterilmektedir [125]. Trombin'in trombomodulin'i tercih etmesinin nedeni, trombomodulinin bağlanma sırasında eksosit I bölgesinde daha fazla aminoasit ile etkileşime geçmesi ve trombin'in trombomodulin'e olan afinitesinin daha fazla olmasıdır. Kan pıhtılaşma sürecinde trombin'in, farklı substrat ve kofaktörlere ve pıhtılaşma tamamlandıktan sonra trombomodulin ve diğer inhibitörlere bağlanmasının doğru şekilde gerçekleşmemesi ve vücuttaki trombin konsantrasyonunun kontrollü bir şekilde ayarlanmadığı durumlarda, hemofili ya da tromboz gibi hastalıklar oluşmaktadır [8, 125].

Kan pıhtılaşması sürecinde doğru ve zamanlı trombin oluşumunun eksikliğinde, hemofili hastalığı ortaya çıkmaktadır [7]. Trombin'in kontrollü bir şekilde denetlenmediği durumlarda ise, hasarlı bölgenin ötesinde hasarlı olmayan bölgelere de yayılması durumunda tromboz hastalığı oluşmaktadır. Trombin oluşumundaki artış evresinde gerçekleşen trombin patlamasında önemli rol oynayan FVIII ve FIX eksiklikleri, sırasıyla hemofili A ve hemofili B hastalıklarına neden olmaktadır [129]. Hemofilik plazmada FVIII, FIX ve FXI eksiklikleri sonucunda, trombin patlaması gerçekleşmemekte ve TAFI aktivasyonu gerçekleşmediği için, normal plazma sürecinden üç kat daha hızlı fibrinoliziz gerçekleşmektedir. Fibrin yapılarının kolay parçalanmasından dolayı kanama zor durdurulmaktadır. Normal plazmada ise pıhtılaşma sürecinde trombin patlaması evresinde gerçekleşen TAFI aktivasyonu ile fibrinoliziz engellenmekte ve kararlı fibrin yapısının uzun süre korunması ile hasarlı bölgedeki kanama durdurulmaktadır. Tromboz hastalığı için ise, protein C ve protein S eksikliği, faktör V Leiden, protrombin yapısındaki mutasyonlar, FVIII, FIX, FXI ve fibrinojen oluşumundaki artışlar risk faktörleri arasında olabilmektedir [8]. Ayrıca tromboz hastalığına risk yaratabilecek çevresel faktörler olarak, doğum kontrol hapları, yaş, alkol ve sigara kullanımı gösterilmektedir.

Aynı zamanda trombin, kanser ve Alzheimer gibi birçok hastalık ile ilişkilendirilmektedir [130]. Tau proteininin ve amiloid öncü protein (amyloid

precursor protein, APP) parçalanması, tau fragmanları ve A $\beta$  peptitleri oluşturmaları, Alzheimer hastalığında önemli rol oynamaktadır [131]. Trombinin Alzheimer hastalarının beyinlerinde görüldüğü ve bu parçalanmaları PAR-1 ve PAR-4 reseptörleri ile gerçekleştirdikleri bilinmektedir [132]. Trombin ve kanser arasındaki ilişkinin, trombinin fibrin oluşumuna ve hücre çoğalmasına olan etkisi, damar geçirgenliğini arttırması, trombosit aktivasyonu, vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF) ve diğer büyüme faktörlerinin oluşumlarını tetiklemesinden dolayı olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [124]. İnsan fibroblast ve tümör hücrelerinin trombin ile inkübasyonu sonucunda, VEGF mRNA ifadelerine Northern blot analizi ile bakılmış ve mRNA ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. mRNA ifadesinin artması ile aynı zamanda VEGF protein ifade ve salgılanmasının da arttığı gözlemlenmiştir [133]. Trombinin, trombosit-tümör kümelenmesi, hücre bölünmesi, tümör büyümesi, metaztas ve tümör oluşumuna bağlı damarlanmayı başlatması ile ilgili olduğu düşünülmektedir [124]. Trombin, tümör hücreleri üzerindeki alpha IIb beta 3 integrin proteinin oluşumunu arttırması ile, tümör hücrelerinin tutunmasına olanak vermektedir [134]. Aynı zamanda trombin düz kaslarda hücre bölünmesini, nükleer faktör kappa B (nuclear factor kappa B ,NF- $\kappa$ B) aktivasyonu ile ve trombosit-aktive büyüme faktörü ve bFGF salınımı arttırması ile gerçekleştirmektedir.

Trombin, hücresel etkilerini trombositlerin üzerinde bulunan PAR ile ortaya koymaktadırlar [126]. Trombinin, PAR-1'i aktive ederek, hücre bölünmesini, DNA sentezini direk olarak ya da diğer mitojenler ile eş zamanlı gerçekleştirdiği ve metaztası tetiklediği de bilinmektedir [135]. Buna ek olarak trombin oluşumunun trombosit aktivasyonu ve fibrin oluşumunu başlatması da metaztası tetiklemektedir. Benzer şekilde, kanser oluşumu da tromboz hastalığına neden olmaktadır. Kanser hücrelerinde TF miktarının artması sonucunda TF-FVIIa yapısı oluşumu ile geri besleme mekanizmalarını ile trombin oluşumunu arttırmakta ve tromboz hastalığı oluşmaktadır. Trombinin aynı zamanda tümör hücrelerini besleyen damarlanmayı da pıhtılaşmaya bağlı ya da pıhtılaşmadan bağımsız mekanizmalar ile gerçekleştirdiği bilinmektedir [124]. Trombin pıhtılaşmayı başlatarak, trombosit aktivasyonu ve fibrin birikimini sağlayarak damarlanmayı arttırmaktadır [135]. Ayrıca pıhtılaşma mekanizmasından bağımsız olarak, PAR-1'i aktive ederek, sinyal iletimi süreci ile



VEGF, angiopoietin-2, metalloproteinases 1 ve 2 gibi büyüme faktörlerinin hücre üzerindeki sayılarının arttırdığı bilinmektedir [133, 136, 137].

#### **2.4.1. Trombin Sensörleri**

Kan pıhtılaşma sürecinde önemli bir rol oynayan trombinin, hemofili, tromboz gibi hastalıkların dışında, kanser ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların oluşumuna ve ilerlemesine neden olması, tayinine yönelik analiz yöntemlerinin artmasına ve biyosensörlerin geliştirilmesine neden olmuştur. Bunun dışında, trombinin biyosensörlerin geliştirilmesinde model olarak kullanılmasının başka nedenleri de bulunmaktadır. Trombinin fibrinojen bağlanma bölgesi olarak bilinen eksosit I ve heparin bağlanma bölgesi olarak bilinen eksosit II bölgelerine bağlanabilen sırasıyla 15-baz ve 29-baz uzunluğunda, iki farklı aptamer bulunmaktadır [47, 138]. Bu aptamerlerin trombine farklı afinitelerle farklı bölgelerine bağlanmaları, sandviç yöntemi kullanılarak trombinin tayinine olanak vermektedir [139]. Ayrıca her iki aptamer, trombine bağlanmaları halinde G-quadrupleks yapısına dönüşmektedirler. DNAzim olarak bilinen G-quadrupleks yapısı, hemin kofaktörü kullanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yardımıyla, oksidasyon reaksiyonları gerçekleştirmekte ve bu da trombin tayininde kullanılan bir yöntem olmaktadır [140]. Buna ek olarak, trombine bağlanmaları halinde yapısal değişikliğe giren trombin aptamerleri, floresans ve absorbans yöntemlerinin kullanıldığı analiz yöntemlerinde trombin tayininde kullanılmaktadır [141-143]. Trombinin katalitik özelliği kullanılarak, trombin tayinine yönelik biyosensör sistemleri de geliştirilmektedir [144]. 15-baz uzunluğunda olan 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' dizilimine sahip trombin aptameri, SELEX yöntemi ile seçilen ve başka nükleik asitlere bağlanmayarak sadece protein'e seçicilik gösteren ilk aptamer olarak bilinmektedir [47]. Ayrıca bu aptamerin *in vitro* ortamda trombinin gerçekleştirdiği fibrin- pıhtı oluşumunu durdurduğu bilinmektedir. Bu trombin aptamerinin trombine bağlanma özelliği kullanılarak, enzim bağlı aptamer assay (enzyme linked aptamer assay, ELAA) ve karışık ELISA/ELAA formatları optimize edilmiştir [48]. İlk aptamer bazlı trombin biyosensörü, Potyrailo ve grubu tarafından geliştirilmiştir [145]. Trombin aptameri, floresans etiket ile etiketlenmiş ve yüzeye kovalent olarak bağlanmıştır. Çözeltideki trombine bağlanması sonucunda floresans anisotropy'deki değişiklikler ile trombin tayini gerçekleşmiştir. 15-bazlık trombin aptamerinin kullanılarak geliştirilen bir biyosensörde, trombin aptameri 5' kısmından CH<sub>2</sub> grubu

ile uzatılarak, mikro boncuklara kovalent olarak bağlanmış ve optik görüntüleme fiber mikrokuyucuklarına dağıtılmıştır [146]. Sabit konsantrasyonda floresans etiketli trombin ile farklı konsantrasyonlardaki etiketlenmemiş trombin yüzeye gönderilerek, floresans miktarındaki azalma gözlemlenmiştir. Kullanılan floresans etiketli trombinin konsantrasyonuna bağlı olarak, LOD'si, 1-10 nM arasında olan bir trombin sensörü geliştirilmiştir. QD etiketi kullanılarak geliştirilen bir başka biyosensör sisteminde, altın yüzeye kovalent olarak bağlanan trombin aptamerine, QD etiketli trombin bağlanmış ve etiketlenmemiş trombin gönderilerek, elektrokimyasal değişim gözlemlenmiştir. Bu şekilde geliştirilen biyosensör sisteminin LOD'sinin 0.5 pM olduğu görülmüştür [147].

YPR ölçümleri için hazırlanan karboksil uçlu çapraz-bağlı BSA filmleri (cross-linked BSA films, cBSA film) ile modifiye altın yüzeylerin, karboksilmetil dekstran ile modifiye hazır YPR çiplerin trombin ölçüm performansları karşılaştırılmıştır [148]. Her iki yüzeye streptavidin veya avidin bağlanmış ve biyotin uçlu trombin aptameri yüzeye kovalent olarak bağlanmıştır. LOD'leri, streptavidin bağlı cBSA film ve hazır YPR çiplerin sırasıyla 3 nM ve 2.5 nM, avidin bağlı yüzeylerde 5-5.5 nM arası olarak belirlenmiştir. YPR biyosensörü olarak geliştirilen bir başka sistemde, 3-merkaptopropionik asit (3-mercaptopropionic acid, MPA) ile oluşturulan SAMs yüzeyler, EDC/NHS ile aktive edilmiş ve amin-uçlu trombin aptameri bağlanan yüzeyler, farklı konsantrasyonda trombin tayini için kullanılmış ve doğrusal aralığı 5-1000 nM olarak belirlenmiştir [149]. Farklı bir YPR platform olarak bilinen bi-cell YPR platformunda üzerine yerleştirilen trombin aptameri bağlanmış altın yüzeyler üzerinden düşük hacimli akış kanalından trombin çözeltisi geçirilerek, trombin tayini gerçekleştirilmiştir [150]. Tampon çözeltisindeki LOD'si 25 nM olarak belirlenirken, PBS ile seyreltilmiş serum içerisindeki trombin LOD'si 50 nM olarak belirlenmiştir. Son yıllarda LYPR sensörlerinin hassasiyetini arttırmaya yönelik çalışmalar da bulunmaktadır [151]. Farklı büyüklük ve şekildeki nanoyapılar, LYPR sinyal plasmon rezonansının büyüklüğü, dalgaboyu genişliği ve kayma miktarı gibi spektral özellikleri etkilemektedir. Bu özellikten yararlanılarak geliştirilen bir LYPR sensöründe sinyal güçlendirmesi için AuNP/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküllerin oluşturduğu nanohibrit yapılar kullanılmıştır. AuNP/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartiküller ile oluşturulan nanohibrit yüzeylere bağlanan 29 bazlık aptamer ile trombin bağlanması gerçekleşmiş ve yüzeye trombin gönderilmiştir. Daha sonra, glukoz

oksidaz enzimi ile etiketlenmiş 15 bazlık trombin aptamerinin trombine farklı bir bölgeden bağlanması gerçekleştirilmiştir. Ortama glukoz gönderilerek,  $Au^{+3}$ 'den  $Au^0$  oluşması sağlanmış ve AuNP çapında artma sağlanarak, sinyal artması gerçekleştirilmiştir. Doğrusal aralığı 0.2 -10 nM arasında, LOD'si 0.2 nM olan bir trombin sensörü geliştirilmiştir. Altın nanopartikül ve altın film yüzeylerin bir arada kullanılarak geliştirilen bir başka YPR biyosensöründe, sinyal artışı sağlanarak LOD'sinin düşürülmesi hedeflenmiştir [152]. Sandviç formatı ile altın nanopartikül ve altın yüzeyin birbirine yaklaşması, ve ikisi arasındaki elektromanyetik eşleşmeden dolayı sinyal artışı, trombine farklı yerlerden bağlanabilen iki farklı aptamer ile sağlanmıştır. Streptavidin kaplı altın yüzeye, biyotinlenmiş 15 bazlık trombin aptameri bağlanmış ve yüzeye trombin gönderilmiştir. Yüzeye sonradan gönderilen altın nanopartikül etiketli 29 bazlık trombin aptamerinin trombine bağlanması ile sinyal artışı sağlanmış ve LOD'si 0.1 nM olan bir biyosensör geliştirilmiştir. Altın nanoyapıların ve sandviç ölçüm formatının kullanıldığı bir başka YPR biyosensöründe, farklı şekil ve büyüklükte olan nanoyapıların sinyal artışına olan etkileri karşılaştırılmıştır [153]. Altın yüzeye kovalent olarak bağlanmış trombin aptameri, farklı şekil ve büyüklükte olan nanoyapılar ile etiketlenmiş trombin antikoru ile birlikte sandviç formatında trombin tayini için kullanılmıştır. Farklı nanoyapıların YPR sinyal güçlendirmesi, altın yüzey ile nanoyapıların elektromanyetik eşleştirme ve nanoyapıların YPR sistemi üzerindeki kütle artışına olan etkileri açısından karşılaştırılmıştır. LOD'leri, 1aM-1fM arasında değişen YPR sensörleri geliştirilmiştir. Trombin tayini için, YPR sensörlerinde, sinyali güçlendirme ve bununla birlikte LOD'yi azaltmak için kullanılan yöntemlerden biri de iki farklı altın nanopartikül şekli kullanılarak geliştirilen YPR sistemleridir [154]. Trombin antikoru bağlı yüzeye, trombin gönderilmesinden sonra, PolyA uçlu trombin aptameri ve daha sonra PolyT uçlu altın nanorod gönderilmiş ve trombin tayini gerçekleştirilmiştir. Daha sonra sinyal güçlendirmesi olarak, PolyA uçlu başka bir altın nanopartikül gönderilmiş ve YPR sensör cevabındaki değişim gözlemlenmiştir. Bu YPR sensörünün LOD'si çok düşük (0.1aM) olmakla birlikte, doğrusal aralığı dar bir aralıktadır. DNA miktarını arttırarak sinyal güçlendirme sağlayan yuvarlanan çember amplifikasyonu (rolling circle amplification, RCA)'nın nanoyapılar ile birlikte kullanıldığı YPR sensörleri de bulunmaktadır [155]. Altın yüzeye kovalent olarak bağlanan trombin aptamerine trombin gönderilmesinden sonra, ucuna primer

dizilimi eklenmiş ikinci trombin aptameri trombinin farklı bir bölgesine bağlanmıştır. Prob olarak adlandırılan primer dizilimine eşlenik olan başka bir dizilim, altın nanopartiküller ile etiketlenmiş ve yüzeye gönderilmiştir. RCA reaksiyonu, DNA polimeraz ve deoksiribonükleotid trifosfat (deoxyribonucleotide triphosphate, dNTPs) eşliğinde başlatılmış ve ardışık tekrar bölgelerinin artması sağlanmıştır. Birçok altın nanopartikül bağlı probun primer dizilimine bağlanması ile sinyal güçlendirmesi gerçekleştirilmiştir. Sadece trombinin altın yüzeydeki aptamere bağlanması ile LOD'si 1 nM iken, altın nanopartikül bağlı probun yüzeye gönderilmesi ile LOD'si 0.1 pM'a düşürülmüştür.

Son yıllarda sinyal güçlendirmesi ve LOD'nin azaltılması etiketleme yapılarak, YPR sensörleri geliştirilmektedir. Ancak YPR sensörlerinde biyomoleküler etkileşim, RI'daki değişimlere bağlı olarak tespit edilebildiği için, etiketlemeye gerek kalmadan geliştirilen YPR sensörleri de bulunmaktadır [156]. Farklı optik, mekanik ve termal özellikleri ile bilinen grafen altın yüzeye elektrostatik etkileşimlerle bağlanmıştır. Daha sonra yüzeye kovalent olmayarak bağlanan trombin aptameri, çözelti içerisindeki trombin ile etkileşime girerek, yüzeyden ayrılmıştır. Trombin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak, YPR dalgaboyunda azalma görülmüştür. Doğrusal aralığı, 0.08 – 200 nM arasında olan ve LOD'si 0.03 nM olan bir YPR sensörü geliştirilmiştir.

YPR sensörlerinin mikroarray formatlarına uyarlanması, ve birden fazla hedef molekülün aynı anda tayini, YPR görüntüleme ve YPR faz görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesi ile ortaya çıkmıştır [157, 158]. RNA aptamerlerinin biyolojik tanıyıcı ajan olarak ssDNA aptamerlerine göre daha fazla tercih edilmelerinin en önemli nedeni, ortamda bulunabilecek RNase enzimi tarafından daha kolay parçalanabilir olmasıdır. Bu nedenle, RNA aptamer mikroarray sisteminin geliştirilmesi için, mikrofluidik çip düzeneğinde dsDNA'dan T7RNA polimeraz enzimi ile RNA aptameri ve bağlanma dizilimi içeren bir RNA dizilimi sentezlenmiştir. Yüzeyde kovalent olarak bağlanan bağlanma dizilimine eşlenik DNA dizilimi ile, RNA aptamerleri yüzeye immobilize edilmiş, YPR görüntüleme sistemi ile trombin ve başka proteinlerin tayini için kullanılmıştır [157].

Elektrokimyasal olarak aktif bir etiket olan metilen blue (methylene blue, MB) ile etiketlenmiş olan trombin aptameri, yüzeye kovalent olarak altın elektroduna bağlanmış ve yüzey ile spesifik olmayan bir şekilde etkileşimden dolayı, MB yüzeye

yaklaşmış ve elektron aktarımında artış gözlemlenmiştir [159]. Trombinin yüzeye gönderilmesi ile, trombin aptameri G-guadrupleks yapısına bürünmüş ve MB etiketi yüzeyden uzaklaşarak elektrik aktarımında azalma görülmüştür. Geliştirilen bu biyosensör sisteminin LOD'si 6.4 nM olarak belirlenmiştir. İki farklı trombin aptameri kullanılarak geliştirilen bir başka elektrokimyasal biyosensör sisteminde, sandviç formatında trombin tayini gerçekleştirilmiş, doğrusal aralık 40-100 nM arası, LOD'si 10 nM olarak belirlenmiştir [139]. Trombin-aptamer bağlanmasının sinyalinin elde etmek için, yüzeye tayin için gönderilen ikinci trombin aptameri glukoz dehidrogenaz enzimi ile etiketlenmiştir. Yüzeye bağlanan aptamer-trombin ve enzim etiketli aptamer kompleksi oluşuktan sonra, glukoz varlığında elektrik akımındaki artma gözlemlenmiştir. Trombin tayini için geliştirilen bir başka elektrokimyasal biyosensör sisteminde, SAMs oluşumu sonrasında yüzeyde oluşan kimyasal tabaka, biyolojik tanıyıcı ajanının yüzeye bağlanması ve trombin ölçümü, her aşama sonrasında gerçekleşen yük-aktarım direncindeki artma gözlemlenmiştir [160]. Geliştirilen bu biyosensör sisteminin doğrusal aralığı 5-35 nM arası, LOD'si 2 nM olarak belirlenmiştir. Trombin-aptamer etkileşimi sonucunda, elektrokimyasal olarak aktif olan bir etiketin, bağlandığı aptamer tarafından bırakılması sonucunda, elektrik akımındaki azalma ölçülmüş, doğrusal aralık 0-50.8 nM ve LOD'si 11 nM olarak belirlenmiştir [161]. Farklı formatlarda geliştirilen elektrokimyasal trombin sensörlerinin doğrusal aralık ve LOD'leri birbirleriyle karşılaştırılmıştır [144]. Enzim etiketli sandviç formatında, trombinin yüzeye bağlanması sonrasında HRP-enzim etiketli aptamerine bağlanmasını algılayan ve trombinin katalitik özelliği kullanılarak geliştirilen üç tip biyosensörde, ikinci sistemin en düşük LOD'ye (3.5 nM) sahip olduğu gözlemlenmiştir. Aynı grup tarafından geliştirilen bir başka sensörde, redoks etiketli trombin aptamerinin, trombin varlığında yapısal değişikliğe girmesi sonucunda, redoks etiketinin altın yüzeye yaklaşması ile redoks özelliğindeki değişimler gözlemlenmiştir [162].

Başka bir elektrokimyasal biyosensörde, trombin aptameri altın yüzeye kovalent olarak bağlanmış, trombin-aptamer etkileşiminden sonra, trombin yapısı bozularak, yük-aktarım direncinde artış sağlanmış ve LOD'si 0.01 pM'a düşürülmüştür [163]. Trombin antikoru ve aptamerinin bir arada kullanıldığı sandviç formatında geliştirilen bir biyosensör sisteminde, antikor yüzeye kovalent olarak bağlanmış, trombin yüzeye gönderilmiş ve elektrokimyasal olarak aktif olan bir etikete bağlı trombin

aptameri ölçüm için kullanılmış ve elektrik akımındaki artış gözlemlenmiştir [164]. Geliştirilen bu biyosensör sisteminde, doğrusal aralığın 1-60 nM ve LOD'sinin 0.5 nM olduğu gözlemlenmiştir. MB ve enzim etiketli geliştirilen elektrokimyasal sensörler dışında, QD etiketi kullanılarak da geliştirilen elektrokimyasal sensörler bulunmaktadır [165]. Yüzeğe SH- grupları kovalent olarak 15 bazlık trombin aptameri bağlanmıştır. QD etiketli eşlenik olan başka bir dizilim, yüzeğe gönderilerek trombin aptameri ile hibridize edilmiştir. Trombin aptamerinin trombin bağlanması ve QD etiketli eşlenik dizilimi bırakması sonucunda, elektrokimyasal sinyalde düşme gerçekleşmiş ve LOD'si 2.7 aM olan bir biyosensör geliştirilmiştir. QD'nin floresans etiketi olarak kullanıldığı trombin biyosensörleri de bulunmaktadır [166]. Trombine bağlanan QD etiketli iki farklı aptamerin, trombin varlığında bir araya gelmeleri sonucunda, QD dimer veya oligomerleri oluşmuş ve QD difüzyon zamanındaki değişim, floresans korelasyon spektroskopisi ile ölçülmüştür. Trombin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak, QD difüzyon zamanında artış gözlemlenmiştir. Doğrusal aralığı 5-500 nM olan ve LOD'si 2.6 nM olan bir biyosensör geliştirilmiştir. Biyoluminesans enerji aktarımı (bioluminescence energy transfer, BRET) tekniği kullanılarak geliştirilen bir başka trombin biyosensöründe, trombin tayini için, altın nanopartiküllerin, lusiferaz enziminin gerçekleştirdiği bir reaksiyon sonucunda oluşan bioluminesansı söndürmesinden faydalanılmıştır [167]. Altın nanopartiküle kısa bir peptit ile bağlanan lusiferaz enzimi, trombin varlığında peptitin lusiferaza bağlandığı bölgeden kesilerek, lusiferazın altın nanopartikülden uzaklaşması sağlanmıştır. Bu şekilde lusiferazın oluşturduğu bioluminesans özelliği tekrar ortaya çıkmaktadır. Trombin konsantrasyonundaki artış ve artan bioluminesans sinyali ile doğrudan bir korelasyon görülmüştür. İdrar ve tampon çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen ölçümlerde doğrusal aralığın 8nM-8µM arasında ve LOD'sinin 80 pM olduğu görülmüştür.

Altın ve gümüş nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonans özelliklerinin aralarındaki mesafeye bağlı olduğu ve bu mesafeye bağlı olarak renk değişimi olduğu bilinmektedir [168]. Altın kaplı mikrofluidik kanallara trombin aptameri kovalent olarak bağlanmış ve yüzeğe trombin ve gümüş nanopartikül etiketli diğer aptamer çözelti karışımı gönderilmiştir. Trombin konsantrasyonuna bağlı olarak, gümüş nanopartikül etiketli aptamerin trombine bağlanması ve gümüş nanopartiküllerin

yanyana gelmeleriyle renk değişimi gözlemlenmiştir. LOD'si 20 pM olan bir biyosensör geliştirilmiştir.

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Materyal

DSP, MCH, dimetil sülfoksit (dimethyl sulfoxide, DMSO)  $\geq 99.9\%$ , sığır serum albümin (bovine serum albumin, BSA), insan serum albumin (human serum albumin, HSA), lizozim ve tampon çözelti hazırlanması için (2-(N-morfolin)etansülfonik asit (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid, MES), karboksil gruplarının blokasyonu için etanolamin ( $\geq 98\%$ ), ve insan plazmasından izole edilmiş trombin, insan serumu ve dietil pirokarbonat (diethyl pyrocarbonate, DEPC)  $\geq 97\%$ , cut-off değeri 100 kDa olan santrifüj filtreler Sigma Aldrich (St. Louis, MO) firmasından, saf etanol ( $99.5\%$ ) Merck KgaA (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. BSA ve lizozim bağlanma deneyleri için, 0.05 M MES tampon çözeltisi hazırlanmış ve 3M NaOH çözeltisi ile pH değeri 6.5 olarak ayarlanmış ve her kullanımdan önce 0.2 $\mu$ m'lik filtre ile filtrelenerek kullanılmıştır. 0.2  $\mu$ m'lik filtreler, Merck KgaA (Cork, İrlanda) firmasından sağlanmıştır. Aptamer sensörü için kullanılan 15 bazlık trombin aptamerinin, trombin'in fibrinojen bağlanma bölgesi olarak bilinen eksosit I bölgesine bağlandığı ve Kd değerinin 100 nM olduğu daha önceden Bock grubu tarafından belirlenmiştir [47]. 15 bazlık 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' dizilimine sahip trombin aptameri, AlphaDNA (Montreal, Quebec, Canada) firması tarafından sentezlenmiş ve HPLC ile saflaştırılmıştır. Trombin antikoru, Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, IL) firması tarafından sağlanmıştır. Trombin aptameri ve antikoru, 0.05 M MES tampon çözeltisi (pH 6.5) içinde çözülmüştür. Trombin çözeltisi ve spesifik olmayan bağlanmaları yüzeyden uzaklaştırmak için 10 mM KCl, 50 mM NaCl içeren 10 mM PBS çözeltisi (pH 7.4) kullanılmıştır. Karboksil gruplarının blokasyonu için 1.0 M etonamin çözeltisi kullanılmıştır. Trombin aptameri ve trombin çözeltisi ve spesifik olmayan bağlanmaları ortadan kaldırmak için kullanılan tüm tampon çözeltileri ve deiyonize su kullanımdan önce sterilizasyon amaçlı 0.2 $\mu$ m filter ile filtrelenmiş ve 121° C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Ayrıca trombin aptamerinin degradasyonunu engellemek için, kullanılan malzemeler ve deney gerçekleştirilen alan, DEPC-H<sub>2</sub>O ile temizlenmiştir. YPR çipler üzerindeki altın yüzeyler, ön temizleme olmadan kullanılmıştır. Tekrar kullanım için altın yüzeyler, kimyasal ve biyolojik modifikasyon sonrasında %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:3) pirana çözeltisi ile temizlenmiş ve deiyonize su ile yıkanmıştır.



### **3.2. Metot**

#### **3.2.1. YPR Sistemi**

Altın yüzeylerin YPR ölçümleri için Spreeta YPR Sistemi (Texas Instruments, Inc., Dallas, TX) kullanılmıştır. Sistem entegre detektöre sahip (model TSPR1K23) altın kaplı sensör yüzeyine, üç kanallı akış hücresine, elektronik kontrol kutusuna sahiptir. Yüzey modifikasyonu için çözeltilerin yüzeyden geçirilmesi, Goldman şırınga pompa sistemi (Biasis Ltd. Sti, Ankara, Turkey) ve dört yöllü çevirme vanalarıyla (Upchurch Scientific Inc., Oak Harbor) kontrol edilmiştir. Işık kaynağı olarak kullanılan LED ile yüzeye near-infrared ışık yönlendirilmekte ve altın yüzeyden yansımaktadır. Altın yüzeye moleküllerin bağlanması ile kütle artışı gerçekleşmekte ve yansımadaki değişim zamana karşı RI'daki değişim olarak ölçülmektedir. Çalışmada kullanılan YPR sistemi 1.320 ile 1.368 arasındaki RI değişimlerini gösterebilmektedir ve yaklaşık olarak  $5 \times 10^{-6}$  RI hassasiyetine sahiptir. Zamana bağlı sensör cevabındaki (Response Units (RU)) ( $1RU = 10^{-6}$  RI) değişimler sensogram formatında elde edilmiştir.

#### **3.2.2. ATR-FTIR Ölçümleri**

ATR-FTIR spektrumları, Nicolet iS50 (Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) cihazı kullanılarak alınmıştır. Her bir ölçüm için  $4 \text{ cm}^{-1}$  çözünürlükte 128 tarama alınmıştır. Her modifikasyon için iki paralel örnekte, yüzey üzerinde üç nokta incelenmiştir. Geçirgenlik spektrumları,  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  dalgasayısı aralığında alınmıştır. Background ölçüm için düz altın yüzey kullanılmış ve modifiye yüzeylerden alınan ölçümlerden çıkarılmıştır.

#### **3.2.3. XPS Ölçümleri**

XPS ölçümleri K $\alpha$  cihazında (Thermo Scientific, Rockford, IL, ABD) monokromatik Al x-ray kaynağı kullanılarak  $400 \mu\text{m}$  büyüklüğünde bir alanda gerçekleştirilmiştir. Sistem içerisinde, yüzey nötralizasyonu için 300 microA floodgun kullanılmıştır. Genel ve detaylı taramalar N, C, O, S atomları için (N 1s, C 1s, O 1s, S 2p) gerçekleştirilmiştir. Bütün modifiye örneklerde, N 1s, C 1s, O 1s, S 2p ölçümlerinin her biri için 50 tarama, Au 4f için 10 tarama toplam 1 saatte yapılmıştır. Kör örnek için N 1s, C 1s, O 1s ve S 2p ölçümleri 10'ar tarama ile gerçekleştirilmiştir. Spektrumların analizi XPSPeak Fit (Version 4.1) yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

### **3.2.4. AFM Ölçümleri**

Boş altın yüzey, DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ve 0.8 mg mL<sup>-1</sup> BSA bağlanmış DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs yüzeylerin AFM görüntüleri, Asylum Research MFP-3D Atomik Kuvvet Mikroskobu (Oxford Instruments, Santa Barbara, CA) ile alınmıştır. Görüntüler, Al kaplı silikon tapping mod kantilever ile, kuvvet sabiti, 40 N/m olacak şekilde, 300 kHz rezonans frekansı ile alınmıştır.

### **3.2.5. Altın Yüzeyler Üzerinde DSP, MCH ve DSP:MCH Karışımları ile Yapılan Kimyasal Modifikasyonlar**

#### **3.2.5.1. DSP ile SAMs Oluşturulması**

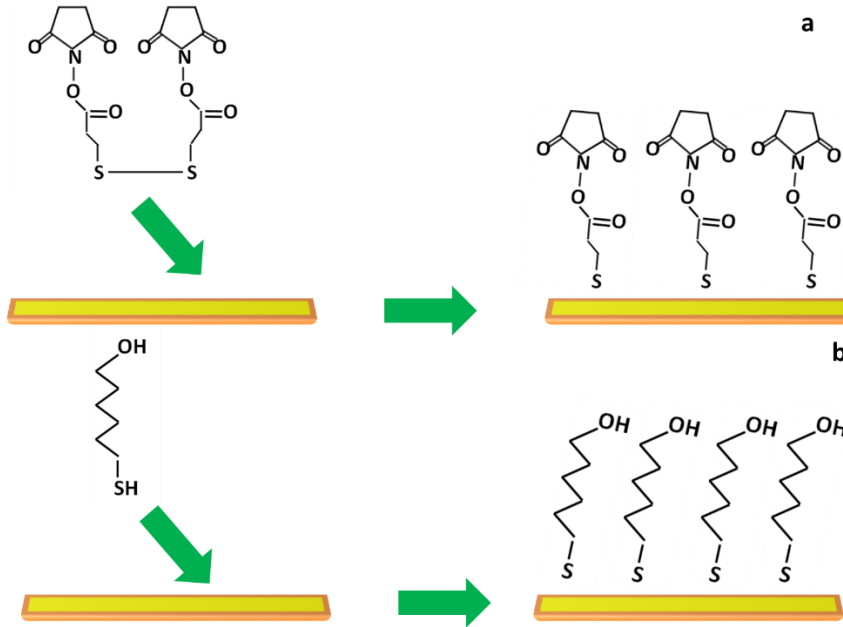
DSP'nin çözünürlük aralığının belirlenmesi için bir dizi deney gerçekleştirilmiştir. Öncelikle 4.0 ve 10.0 mM DSP çözeltileri oluşturularak bir set (4.0 ve 10.0 mM DSP çözeltileri) durağan ve bir set (4.0 ve 10.0 mM DSP çözeltileri) karıştırılmalı ortamda gece boyunca ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonuçlar, DSP'nin 10.0 mM konsantrasyonda her iki koşulda çöktüğü ve 4.0 mM konsantrasyonda çözündüğünü göstermiştir. DSP çözünürlüğünün üst sınırını belirlemek için, 5.0, 7.0 and 9.0 mM DSP çözeltileri oluşturulmuş ve sabit halde gece boyunca bekletilmiştir. DSP'nin, 7.0 and 9.0 mM konsantrasyonunda çöktüğü, sadece 5.0 mM konsantrasyonda çözündüğü görülmüştür. Bu yüzden çözünürlük aralığı, 0.0-5.0 mM olarak belirlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak YPR deneyleri için, altın yüzeylerin, Şırınga pompa sistemi kullanılarak DMSO:etanol (%20:%80) içerisinde hazırlanmış farklı DSP konsantrasyonlarındaki (0.0-5.0 mM) çözeltilerle modifiye edilmesine karar verilmiştir. Belirtilen DSP konsantrasyonları ile SAMs, 10 µl dk<sup>-1</sup> akış hızında gece boyunca oluşturulmuştur. SAMs oluşturulmasından sonra, spesifik olmayan bağlanmaları kaldırmak için yüzey DMSO: etanol (20%:80%) (15 dk) ve deiyonize su (1 saat) ile 50 µl dk<sup>-1</sup> akış hızında yıkanmıştır.

#### **3.2.5.2. MCH ile SAMs Oluşturulması**

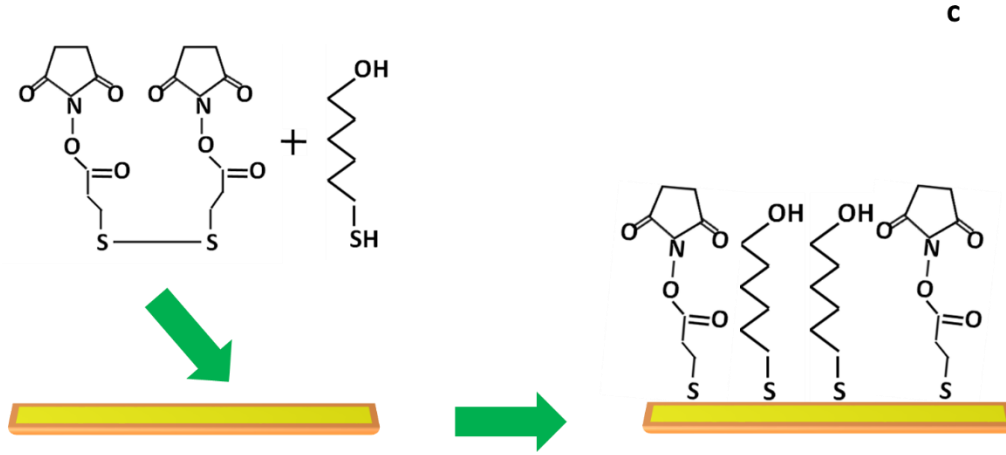
Gerçekleştirilen YPR deneylerinde, altın yüzeyler Goldman şırınga pompa sistemi kullanılarak saf etanol içerisinde hazırlanmış farklı MCH konsantrasyonlarındaki (0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 mM) çözeltilerle modifiye edilmiştir. Belirtilen MCH konsantrasyonları ile SAMs, 10 µl dk<sup>-1</sup> akış hızında gece boyunca oluşturulmuştur. SAMs oluşturulmasından sonra, spesifik olmayan bağlanmaları kaldırmak için yüzey saf etanol (15 dk) ve deiyonize su (1 saat) ile 50 µl dk<sup>-1</sup> akış hızında yıkanmıştır.

### 3.2.5.3. Farklı DSP:MCH Oranlarında Gerçekleştirilen mSAMs

Altın yüzey modifikasyonu için DSP:MCH molar oranları 2.0:0.0, 2.0:2.5, 2.0:5.0, 2.0:10.0 olarak seçilmiştir. mSAMs, daha önce DSP ve MCH ile oluşturulan SAMs yüzeylerinde olduğu gibi,  $10 \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında gece boyunca gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Ancak bu şekilde, ertesi gün YPR sinyalinin görülmediği gözlemlenmiştir. Bu sonucun, sensör yüzeyinin tamamen kapanmasına ve gelen ışığın sensör yüzeyi üzerinden yansımamasına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu yüzden modifikasyonlar, aynı hızla ( $10 \mu\text{l dk}^{-1}$ ) 1,5 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. SAMs oluşturulmasından sonra, spesifik olmayan bağlanmaları kaldırmak için yüzey DMSO: etanol (20%:80%) (15 dk) ve deiyonize su (1 saat) ile  $50 \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında yıkanmıştır. DSP ve MCH SAMs ve DSP:MCH mSAMs oluşma mekanizması Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de görüldüğü gibidir.



Şekil 3.1. a) DSP b) MCH kullanarak altın yüzeylerde SAMs oluşturulması



Şekil 3.2. Farklı DSP:MCH molar oranlar kullanılarak altın yüzeylerde mSAMs oluşturulması

### 3.2.6. SAMs ve mSAMs Yüzeyle Model Protein 'BSA' Bağlanması

#### 3.2.6.1. DSP ile Modifiye Yüzeyle BSA Bağlanması

Farklı DSP konsantrasyonları (0.0-4.0 mM) ile SAMs oluşturulmasından sonra gerçekleştirilen ve spesifik olmayan bağlanmaları ortadan kaldırmak için yapılan yüzey yıkamasından sonra, MES tampon çözeltisi üç kanaldan 20 µl /dak hız ile gönderilmiş ve taban çizgisi oluşturulmuştur. Daha sonra MES tampon içerisinde çözülmüş 0.8 mg mL<sup>-1</sup> BSA, aynı hız ile iki kanaldan 1 saat boyunca geçirilmiş ve daha sonra yüzey, MES tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Bir kanal kontrol olarak kullanılmış ve sadece MES tampon çözeltisi yüzeyden aynı süre boyunca geçirilmiştir. Kontrol kanalının RU değeri, diğer iki kanaldan elde edilen RU değerinden çıkarılmış ve BSA bağlanması, YPR sensör cevabı (ΔRU) olarak sensogram formatında elde edilmiştir.

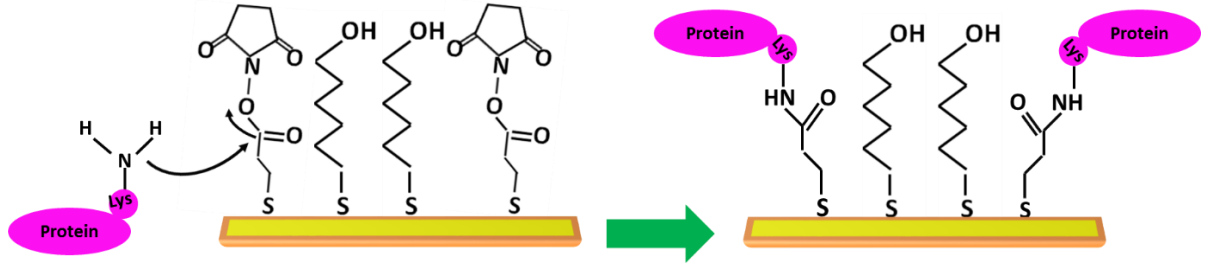
#### 3.2.6.2. MCH ile Modifiye Yüzeyle BSA Bağlanması

Farklı MCH konsantrasyonları (0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 mM) ile SAMs oluşturulmasından sonra bölüm 3.2.6.1'deki prosedür uygulanmış ve ΔRU 'daki değişimler olarak sensogram formatında elde edilmiştir.

#### 3.2.6.3. Farklı DSP:MCH Oranlarıyla Modifiye Yüzeyle BSA ve Lizozim Bağlanması

Farklı DSP:MCH molar oranları (2.0:0.0, 2.0:2.5, 2.0:5.0, 2.0:10.0) ile modifiye olan altın yüzeylere, BSA ve lizozim (0.8 mg mL<sup>-1</sup>) bağlanması aynı prosedür ile gerçekleştirilmiş (bölüm 3.2.6.1) ve ΔRU'daki değişimler olarak sensogram

formatında elde edilmiştir. DSP: MCH mSAMS yüzeylere BSA ve lizozim bağlanma mekanizması Şekil 3.3'de görüldüğü gibidir.



Şekil 3.3. DSP: MCH mSAMS yüzeylere BSA ve lizozim bağlanma mekanizması

#### 3.2.6.4. DSP:MCH (2.0:2.5) ile Modifiye Altın Yüzeye, Farklı Konsantrasyonlarda BSA ve Lizozim Bağlanması

DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye altın yüzeylere farklı konsantrasyonlarda BSA ve lizozim bağlanması (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 mg mL<sup>-1</sup>) aynı prosedür ile gerçekleştirilmiş (bölüm 3.2.6.1) ve  $\Delta$ RU'daki değişimler olarak sensogram formatında elde edilmiştir.

#### 3.2.7. Altın Yüzeyler Üzerinde DSP, MCH ve DSP:MCH Karışımları ile Yapılan Kimyasal Modifikasyonlar Sonrasında ATR-FTIR, XPS ve AFM ile Karakterizasyonu

##### 3.2.7.1. DSP ile Modifiye Yüzeylerin ATR-FTIR ve XPS Karakterizasyonu

Altın yüzeyler DMSO:etanol (20%:80%) içerisinde hazırlanmış 2.0 mM DSP çözeltisi içerisinde bir gece boyunca bekletilmiştir. SAMS oluşturulmasından sonra, spesifik olmayan bağlanmaları kaldırmak için yüzey sırasıyla DMSO:etanol (20%:80%) (15 dk) ve deiyonize su (1 saat) ile yıkanmış ve ölçüm öncesi kuru azot ile yüzeyler kurutulmuştur. Daha sonra ATR-FTIR ve XPS ile karakterizasyon gerçekleştirilmiştir.

##### 3.2.7.2. MCH ile Modifiye Yüzeylerin ATR-FTIR ve XPS Karakterizasyonu

Altın yüzeyler saf etanol içerisinde hazırlanmış 20.0 mM MCH çözeltisi içerisinde bir gece boyunca bekletilmiştir. SAMS oluşturulmasından sonra, spesifik olmayan bağlanmaları kaldırmak için yüzey sırasıyla saf etanol (15 dk) ve deiyonize su (1 saat) ile yıkanmış ve ölçüm öncesi kuru azot ile yüzeyler kurutulmuştur. Daha sonra ATR-FTIR ve XPS ile karakterizasyon gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.7.3. DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0) mSAMs Yüzeylerin ATR-FTIR ve XPS Karakterizasyonu**

Altın yüzeyler DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0) oranlarıyla hazırlanmış çözeltiler içerisinde 1,5 saat bekletilmiştir. SAMs oluşturulmasından sonra, spesifik olmayan bağlanmaları kaldırmak için yüzey sırasıyla DMSO:etanol (20%:80%) (15 dk) ve deiyonize su (1 saat) ile yıkanmış ve ölçüm öncesi kuru azot ile yüzeyler kurutulmuştur. Daha sonra ATR-FTIR ve XPS ile karakterizasyon gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.7.4. Altın Yüzey, DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ve BSA Bağlanmış DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ile Modifiye Altın Yüzeylerin AFM ile Karakterizasyonu**

Üç farklı yüzeyin AFM karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Birinci yüzey boş altın yüzey olup, hiçbir modifikasyon yapılmamıştır. İkinci altın yüzeyde, DSP:MCH (2.0:2.5) oranıyla oluşturulan mSAMs, bölüm 3.2.7.3 'deki prosedür ile gerçekleştirilmiştir. Üçüncü yüzeyde ise, DSP:MCH (2.0:2.5) oranıyla oluşturulan mSAMs, MES tampon içerisinde ile hazırlanmış  $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$  BSA çözeltisi içerisinde 1 saat boyunca bekletilmiş ve daha sonra yüzey, MES tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Bütün ölçümlerden önce kuru azot ile altın yüzeyler kurutulmuştur. Daha sonra AFM ile karakterizasyon gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.8. Sensör Yüzeyine İmmobilize Edilecek Olan Aptamer Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Biyosensör Performansının Test Edilmesi**

Farklı DSP:MCH (2.0:0, 2.0:2.5, 2.0:5.0, 2.0:10.0) molar oranları kullanılarak oluşturulan mSAMsde en fazla BSA ve lizozim bağlanmasının DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye yüzeylerde olduğu gözlemlenmiştir. İki farklı moleküler ağırlığa sahip BSA ve lizozim'in en fazla bağlandıkları konsantrasyonlar  $5.7 \times 10^{-5}$  ve  $8.96 \times 10^{-6}$  M olup, interpolasyon sonrasında 4851 Da moleküler ağırlığa sahip trombin aptamerinin en fazla bağlanma konsantrasyonu  $6.54 \times 10^{-5}$  M ( $0.3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) olarak belirlenmiştir. Sensör yüzeyi oluşturma aşamasında, öncelikle DSP:MCH (2.0:2.5) molar oranıyla oluşturulan DSP:MCH çözeltisi yüzeyden  $10 \text{ } \mu\text{L dk}^{-1}$  akış hızıyla, 1,5 saat süre ile geçirilmiştir. mSAMs oluşturulmasından sonra, spesifik olmayan bağlanmaları kaldırmak için yüzey sırasıyla DMSO:etanol (20%:80%) (15 dk) ve deiyonize su (1 saat) ile  $50 \text{ } \mu\text{L dk}^{-1}$  akış hızında yıkanmıştır. Daha sonra akış hızı  $20 \text{ } \mu\text{L dk}^{-1}$  düşürülerek, yüzeye 0.05 M MES (pH 6.5) tampon çözeltisi gönderilmiş ve taban çizgisi oluşturulmuştur ve aynı tampon çözeltisi içerisinde çözülmüş,

interpolasyon ile belirlenen konsantrasyonda ( $0.3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) trombin aptameri  $20 \text{ } \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında yüzeye gönderilerek DSP:MCH mSAMS yüzeylere kovalent olarak bağlanmış ve spesifik olmayan bağlanmaları yüzeyden uzaklaştırmak için yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yüzeyde açıkta kalan karboksil gruplarının blokasyonu için  $1.0 \text{ M}$  etanolamin,  $20 \text{ } \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında 50 dakika boyunca yüzeyden geçirilmiştir.  $10 \text{ mM KCl}$ ,  $50 \text{ mM NaCl}$  içeren  $10 \text{ mM PBS}$  ( $\text{pH } 7.4$ ) ile taban çizgisi oluşturulmuş,  $0.0-150.0 \text{ nM}$  trombin konsantrasyonlarında  $500 \mu\text{l}$  trombin gönderilmiş ve  $\Delta\text{RU}$ 'daki değişim gözlemlenmiştir. Oluşturulan taban çizgisi ile yıkama sonrası arasındaki fark,  $\Delta\text{RU}$ , trombin bağlanma miktarını göstermektedir. 15 bazlık trombin aptamerinin trombine bağlanması için gerekli quadruplex yapısının oluşabilmesi için en uygun tampon çözelti koşulları Baldrich grubu tarafından araştırılmıştır [48]. Düşük sıcaklıklarda ( $4^\circ\text{C}$ ), tampon çözelti içerisindeki KCl içeriğinin önemli olmadığı, ancak yüksek sıcaklıklarda ( $37^\circ\text{C}$ ),  $10.0-50.0 \text{ mM}$  aralığında KCl içeren tampon çözeltisinin, KCl'ün olmadığı tampon çözeltisine göre LOD'sini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Farklı tampon çözeltilerinin trombin aptamerinin trombine bağlanması için gerekli optimum çözelti koşulları,  $10.0 \text{ mM KCl}$ ,  $50.0 \text{ mM NaCl}$  içeren  $10.0 \text{ mM PBS}$  ( $\text{pH } 7.4$ ) olarak belirlenmiştir. Bu yüzden taban çizgisinin oluşturulması ve trombinin, trombin aptameri bağlanmış sensör yüzeyine gönderilmesi, bu çözelti içerisinde gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.9. Trombin Aptamer Sensörünün Seçiciliğinin Belirlenmesi**

Trombin aptamerinin yüzeye immobilizasyonu sonrasında, geliştirilen biyosensörün seçiciliğinin belirlenmesi için, kan serum yapısında en yüksek konsantrasyonda bulunan insan serum albumin olarak bilinen ve model protein olarak seçilen HSA'ya, verdiği  $\Delta\text{RU}$  incelenmiş ve trombin'e verdiği  $\Delta\text{RU}$  ile karşılaştırılmıştır. Yüzey, DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye edilmiş, daha sonra spesifik olmayan bağlanmaları ortamdaki uzaklaştırmak için DMSO:etanol ve deiyonize su ile yıkanmıştır.  $0.05 \text{ M MES}$  ( $\text{pH } 6.5$ ) tampon çözeltisi ile taban çizgisi oluşturulduktan sonra, sensör yüzeyine yine aynı tampon ile hazırlanan  $0.3 \text{ mg mL}^{-1}$  aptamer çözeltisi  $20 \text{ } \mu\text{l dk}^{-1}$  akış hızında yüzeye gönderilerek DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye edilmiş sensör yüzeyine kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. Yüzeyde açıkta kalan karboksil gruplarının blokasyonu için  $1.0 \text{ M}$  etanolamin kullanılmıştır. Daha sonra  $10 \text{ mM KCl}$ ,  $50 \text{ mM NaCl}$  içeren  $10 \text{ mM PBS}$  ( $\text{pH } 7.4$ ) ile taban çizgisi oluşturulmuş, ve  $50.0 \text{ nM}$  konsantrasyonundaki  $500 \mu\text{l}$  HSA gönderilmiş, aynı tampon çözeltisi ile yıkama

gerçekleştirilmiştir. HSA'nın yüzeye bağlanmasıyla gerçekleşen  $\Delta RU$ , trombin'in yüzeye bağlanmasıyla gerçekleşen  $\Delta RU$  ile karşılaştırılmıştır.

### **3.2.10. Trombin Aptamer Sensörünün Serum Örneklerinde Denenmesi**

Geliştirilen aptamer biyosensörünün serum örneklerinde trombin'e verdiği  $\Delta RU$  tampon çözeltide verdiği  $\Delta RU$  ile kıyaslanmıştır. Altın kaplı yüzeyin kimyasal aktivasyonu ve aptamer immobilizasyonu bölüm 3.2.8' de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Serum örnekleri, 100 kDa ve üzerindeki molekülleri diğerlerinden ayıran santrifüj filtreden geçirilerek, 1:4 oranında PBS ile seyreltilmiş ve son konsantrasyon 20.0 nM olacak şekilde trombin eklenmiştir. 10 mM KCl, 50 mM NaCl içeren 10 mM PBS (pH 7.4) ile taban çizgisi oluşturulmuştur. Trombin eklenmiş serum örnekleri sensör yüzeyine gönderilmiş ve trombinin yüzeye bağlanması incelenmiştir. Daha sonra aynı tampon çözeltisi ile yıkanmıştır.

### **3.2.11. Trombin Aptamer Sensörünün Rejenerasyon Denemesi**

Geliştirilen aptamer sensörünün birden fazla kullanılabilme özelliği test edilmiştir. Altın kaplı yüzeyin kimyasal aktivasyonu ve aptamer immobilizasyonu bölüm 3.2.7' de, trombin çözeltisi bölüm 3.2.10'de belirtildiği gibi hazırlanmış ve taban çizgisi oluşturulduktan sonra, sensör yüzeyine gönderilmiştir. Trombin bağlanmasından sonra sonra aynı tampon çözeltisi ile yıkama gerçekleştirilmiş ve daha sonra 10 s boyunca rejenerasyon çözeltisi olan 10 mM KCl, 50 mM NaCl 10 mM PBS (pH 7.4) içerisindeki %0.05 w/v SDS çözeltisi,  $20\mu\text{l dk}^{-1}$  hız ile yüzeyden geçirilmiştir. Yüzeye 10 mM KCl, 50 mM NaCl 10 mM PBS (pH 7.4) çözeltisi gönderildikten sonra, taban çizgisi oluşturulmuş ve 20.0 nM trombin, 1:4 (Serum:PBS (1:4)) çözeltisi içerisinde tekrar gönderilmiştir.  $\Delta RU$ 'daki sinyal azalınca kadar, yüzey rejenerasyonu işlemi tekrarlanmıştır.

### **3.2.12. Sensör Yüzeyine İmmobilize Edilecek Olan Antikor Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Biyosensör Performansının Test Edilmesi**

Farklı DSP:MCH molar oranları (2.0:0.0, 2.0:2.5, 2.0:5.0, 2.0:10.0) kullanılarak oluşturulan mSAMsde en fazla BSA ve lizozim bağlanmasının DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye yüzeylerde olduğu gözlemlenmiştir. İki farklı moleküler ağırlığa sahip BSA ve lizozim'in en fazla bağlandıkları konsantrasyonlar  $5.7 \times 10^{-5}$  ve  $8.96 \times 10^{-6}$  M olup, interpolasyon sonrasında 70 kDa moleküler ağırlığa sahip trombin antikorunun en fazla bağlanma konsantrasyonu  $6.36 \times 10^{-6}$  M ( $0.4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) olarak belirlenmiştir. Sensör yüzeyi oluşturma aşamasında, öncelikle DSP:MCH (2.0:2.5) molar oranıyla



oluşturulan DSP:MCH çözeltisi yüzeyden 10 µl dk<sup>-1</sup> akış hızıyla, 1,5 saat süre ile geçirilmiştir. mSAMs oluşturulmasından sonra, spesifik olmayan bağlanmaları kaldırmak için yüzey sırasıyla DMSO:etanol (20%:80%) (15 dk) ve deiyonize su (1 saat) ile 50 µl dk<sup>-1</sup> akış hızında yıkanmıştır. Daha sonra akış hızı 20 µl dk<sup>-1</sup> düşürülerek, yüzeye 0.05 M MES (pH 6.5) tampon çözeltisi gönderilmiş ve taban çizgisi oluşturulmuştur ve aynı tampon çözeltisi içerisinde çözünmüş, interpolasyon ile belirlenen konsantrasyonda (0.4 mg mL<sup>-1</sup>) trombin antikoru 20 µl dk<sup>-1</sup> akış hızında yüzeye gönderilerek DSP:MCH mSAMs yüzeylere kovalent olarak bağlanmış ve yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yüzeyde açıkta kalan karboksil gruplarının blokasyonu için 1.0 M etanolamin, 20 µl dk<sup>-1</sup> akış hızında 50 dakika boyunca yüzeyden geçirilmiştir. 10 mM KCl, 50 mM NaCl içeren 10 mM PBS (pH 7.4) ile taban çizgisi oluşturulmuş, 10.0-150.0 nM trombin konsantrasyonlarında 500µl trombin gönderilmiş ve ΔRU'daki değişim gözlemlenmiştir.

### **3.2.13. Trombin Antikor Sensörünün Seçiciliğinin Belirlenmesi**

Trombin antikorunun yüzeye immobilizasyonu sonrasında, geliştirilen biyosensörün seçiciliğinin belirlenmesi için, kan serum yapısında en yüksek konsantrasyonda bulunan ve model protein olarak seçilen HSA'ya verdiği ΔRU incelenmiş ve trombin'e verdiği ΔRU ile karşılaştırılmıştır. Yüzey, DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye edilmiş, daha sonra spesifik olmayan bağlanmaları ortamdaki uzaklaştırmak için DMSO:etanol ve deiyonize su ile yıkanmıştır. 0.05 M MES (pH 6.5) tampon çözeltisi ile taban çizgisi oluşturulduktan sonra, sensör yüzeyine yine aynı tampon ile hazırlanan 0.4 mg mL<sup>-1</sup> antikor çözeltisi 20 µl dk<sup>-1</sup> akış hızında yüzeye gönderilerek DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye edilmiş sensör yüzeyine kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. Yüzeyde açıkta kalan karboksil gruplarının blokasyonu için 1.0 M etanolamin kullanılmıştır. Daha sonra 10 mM KCl, 50 mM NaCl içeren 10 mM PBS (pH 7.4) ile taban çizgisi oluşturulmuş, ve 50.0 nM konsantrasyonundaki 500µl HSA gönderilmiş, aynı tampon çözeltisi ile yıkama gerçekleştirilmiştir. HSA'nın yüzeye bağlanmasıyla gerçekleşen ΔRU, trombin'in yüzeye bağlanmasıyla gerçekleşen ΔRU ile karşılaştırılmıştır.

### **3.2.14. Trombin Antikor Sensörünün Serum Örneklerinde Denenmesi**

Geliştirilen antikor biyosensörünün serum örneklerinde trombin'e verdiği ΔRU, tampon çözeltide verdiği ΔRU ile kıyaslanmıştır. Altın kaplı yüzeyin kimyasal aktivasyonu ve antikor immobilizasyonu bölüm 3.2.12' de belirtildiği gibi

gerçekleştirilmiştir. Serum örnekleri, 100 kDa ve üzerindeki molekülleri diğerlerinden ayıran santrifüj filtreden geçirilerek, 1:4 oranında PBS ile seyreltilmiş ve son konsantrasyon 20.0 nM olacak şekilde trombin eklenmiştir. 10 mM KCl, 50 mM NaCl içeren 10 mM PBS (pH 7.4) ile taban çizgisi oluşturulmuştur. Trombin eklenmiş serum örnekleri sensör yüzeyine gönderilmiş, daha sonra aynı tampon çözeltisi ile yıkanmış ve  $\Delta$ RU 'daki değişim gözlemlenmiştir.

#### 4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Tez çalışmasında, trombin oluşumu evrelerinden, artış evresi olarak trombin patlaması denilen ve trombin konsantrasyonunun 1-500 nM arası değiştiği süreçte, trombin konsantrasyonunun bu aralıkta arttığını gösteren, trombin ölçümü sağlayan gerçek zamanlı bir sensörün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Sensör yüzeyi, kimyasal modifikasyon ve biyolojik modifikasyon olarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Kimyasal modifikasyon ile arayüzey hazırlanmış, biyolojik modifikasyon ile biyolojik tanıyıcı ajanının hazırlanan yüzeye bağlanması ile sensör yüzeyi tamamlanmıştır.

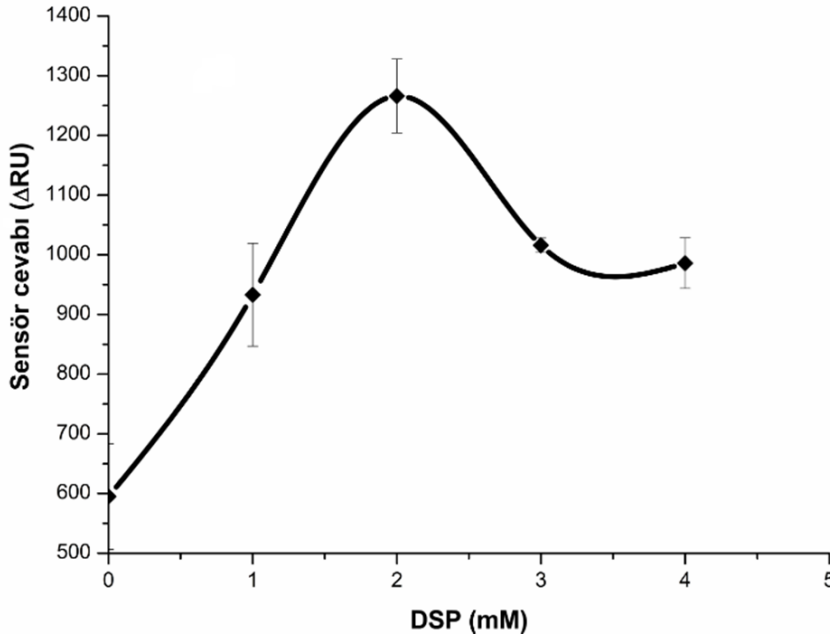
Tez çalışmasının ilk aşamasında, optimum protein/biyolojik tanıyıcı ajan bağlayabilen DSP:MCH arayüzeyinin belirlenebilmesi için, bir dizi optimizasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Farklı DSP:MCH molar oranlarıyla hazırlanan yüzeylerde, en fazla BSA bağlanan arayüzeyin belirlenmesinin ardından, aynı deneyler lizozim ile tekrarlanmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Daha sonra, en fazla protein bağlanan DSP:MCH arayüzeyine farklı konsantrasyonlarda BSA ve lizozim gönderilerek, farklı büyüklükteki moleküllerin en fazla bağlandıkları konsantrasyonlar belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, interpolasyon hesaplamaları ile biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanılacak olan trombin aptamerinin ve trombin antikorunun en fazla bağlandıkları konsantrasyonlar belirlenmiştir. Optimize edilen parametreler ile biyosensör performansı test edilmeden önce, arayüzeylerin yüzey karakterizasyonu, XPS, ATR-FTIR ve AFM ile gerçekleştirilmiştir.

İkinci aşamada, optimum parametrelerle kimyasal ve biyolojik modifikasyon basamakları gerçekleştirilip sensör yüzeyi hazırlanmıştır. Hazırlanan her iki biyosensörün performansı farklı konsantrasyonlarda trombin konsantrasyonu ile denenmiş ve kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Her iki biyosensörün trombine olan seçiciliğinin belirlenmesi için, HSA kullanılmıştır. Gerçek örnek denemeleri için, belli konsantrasyonda trombin, serum:PBS (1:4) matriksi içerisine eklenmiş ve  $\Delta RU$  değeri aynı konsantrasyonda trombin eklenmiş PBS örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Her iki biyosensörde rejenerasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir.

#### 4.1. Biyosensör Arayüzeyinin Hazırlanması

##### 4.1.1. Altın Yüzeylerin Farklı DSP Konsantrasyonları ile Modifikasyonu Sonrasında BSA Bağlanma Profilleri

Farklı DSP konsantrasyonlarıyla (0.0-4.0 mM) modifiye edilen altın yüzeylere sabit konsantrasyonda ( $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) BSA bağlanmaları, ayrı sensogramlarda ( $\Delta\text{RU}$ -zaman) elde edilmiş ve her sensogramdan elde edilen sonuçlar tek bir grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 4.1). Yüzeyde artan DSP konsantrasyonlarına bağlı olarak, BSA bağlanmasında da bir artış gözlemlenmiş ve en fazla bağlanmanın 2.0 mM DSP modifiye yüzeylerde ( $1266 \pm 62$ ) olduğu görülmüştür. Daha yüksek DSP konsantrasyonlarıyla yapılan modifikasyonlarda, BSA bağlanmasındaki azalmaya bağlı olarak  $\Delta\text{RU}$  değerinde azalma görülmüş ve 3.0 mM DSP'de  $\Delta\text{RU}$  değerinin platoya ulaştığı görülmüştür.

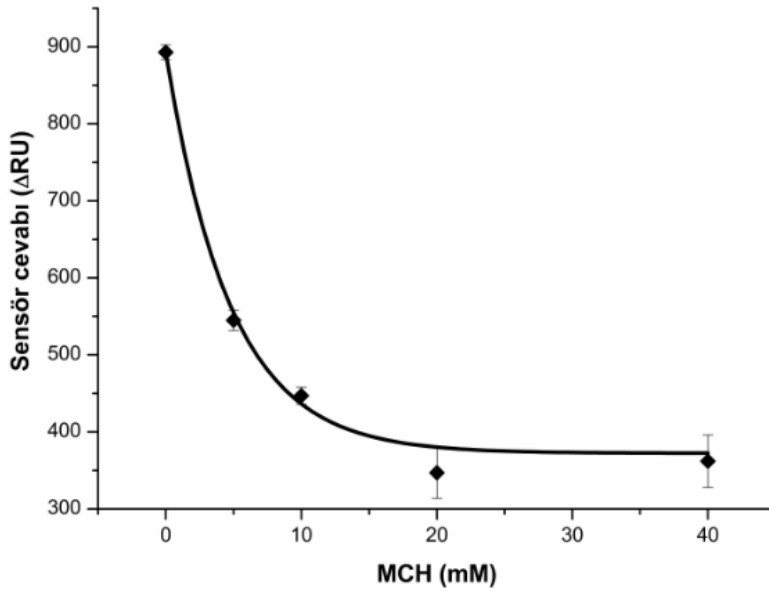


Şekil 4.1. 0-4.0 mM aralığında DSP konsantrasyonları ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları sonrasında sabit konsantrasyonda BSA bağlanmasına bağlı  $\Delta\text{RU}$  değerindeki değişimler ( $n=3$ ).

##### 4.1.2. Altın Yüzeylerin Farklı MCH Konsantrasyonları ile Modifikasyonu Sonrasında BSA Bağlanma Profilleri

MCH yüzey modifikasyonlarında yüzeye bağlanan biyolojik tanıyıcı ajan miktarını azaltmak ve spesifik olmayan protein/DNA bağlanmalarını en aza indirmek için kullanılan bir alkentiyoldür [13]. Farklı MCH konsantrasyonlarıyla (0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 mM) modifiye edilen altın yüzeylere sabit konsantrasyonda ( $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) BSA bağlanmaları, ayrı sensogramlarda ( $\Delta\text{RU}$ -zaman) elde edilmiş ve her

sensogramdan elde edilen sonuçlar tek bir grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 4.2). Altın yüzeylerde artan MCH konsantrasyonlarına bağlı olarak, BSA bağlanmasında bir azalış gözlemlenmiştir. Bu sonucun yüzeyde MCH immobilizasyonu sonrasında protein bağlanmasını azaltması sonucu olduğu düşünülmektedir.  $\Delta RU$  değerinin, 20.0 mM MCH ile modifiye yüzeylerdeki BSA bağlanmasına bağlı olarak minimum platoya ( $347 \pm 33$ ) ulaştığı gözlemlenmiştir. Yüzeylerin daha yüksek MCH konsantrasyonlarıyla modifikasyonu sonucunda BSA bağlanmasında kayda değer bir değişim görülmemiştir (40.0 mM MCH ile modifiye yüzeyler için  $362 \pm 34$ ). Bu sebeple, yüzeylerde daha yüksek konsantrasyonlarla modifikasyon gerçekleştirilmemiştir.



Şekil 4.2. 0-40.0 mM aralığında MCH konsantrasyonları ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları sonrasında sabit konsantrasyonda BSA bağlanmasına bağlı  $\Delta RU$  değerlerindeki değişimler (n=3).

#### 4.1.3. Altın Yüzeylerin Farklı DSP:MCH Molar Oranları ile Modifikasyonu Sonrasında BSA ve Lizozim Bağlanma Profilleri

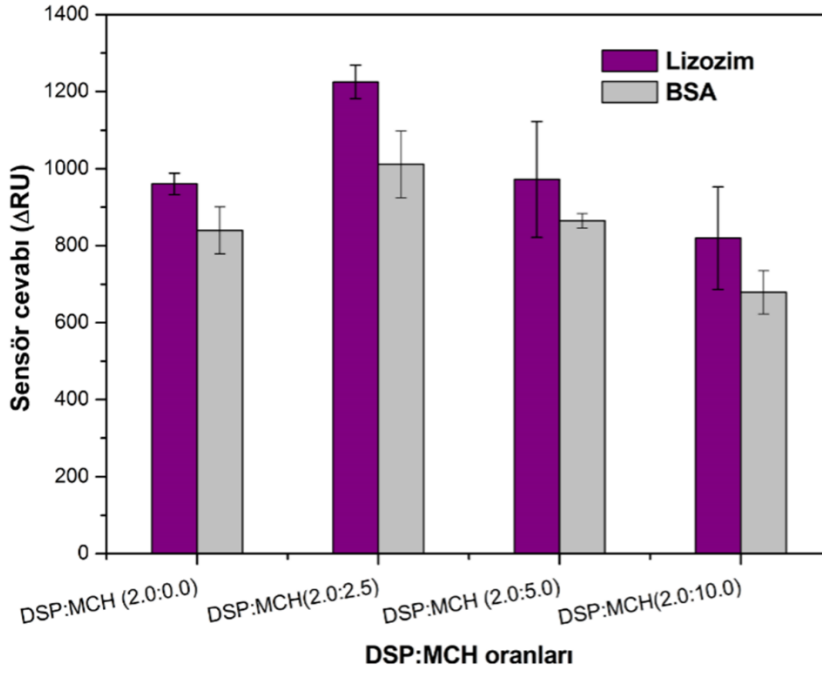
Daha önceki çalışmalar, MCH ve MCU gibi alkantiyollerin altın yüzeye bağlanmaları halinde biyolojik tanıyıcı ajan yoğunluğunun ve aynı zamanda spesifik olmayan DNA/protein bağlanmalarının azaldığını göstermiştir [12-14]. Bu iki molekülün bu fonksiyonlarından dolayı sterik engellemeyi azalttığı ve hedef molekülü tanımayı arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, yüzey modifikasyonu sırasında öncelikle DSP ile proteinin yüzeye spesifik bağlanması hedeflenmektedir. DSP'nin MCH ile



kullanılması ile de MCH'nin OH- gruplarından dolayı spesifik olmayan proteinleri ve aynı zamanda yüzeye bağlanan DSP miktarını ve dolayısıyla sterik engellemeyi azaltarak protein bağlanmasını artırması hedeflenmektedir. En fazla BSA bağlanmasının 2.0 mM DSP ile modifiye yüzeylerde, en az BSA bağlanmasının ise 20.0 mM MCH ile modifiye yüzeylerde olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, DSP ve MCH kullanılarak oluşturulan mSAMs'de, farklı DSP:MCH molar oranları (2.0:0.0, 2.0:2.5, 2.0:5.0, 2.0:10.0, 2.0:20.0), farklı DSP ve MCH konsantrasyonları ile modifikasyon sonrasındaki BSA bağlanma profillerine bağlı olarak belirlenmiştir.

**BSA bağlanması:** BSA bağlanma prosedürü sonrasında, farklı molar oranlardaki DSP:MCH modifikasyonu sonrasında sabit konsantrasyonda BSA bağlanması ( $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) ayrı sensogramlarda ( $\Delta\text{RU}$ - zaman) elde edilmiş ve her sensogramdan elde edilen sonuçlar tek bir grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 4.3). Elde edilen sonuçlara göre, en fazla BSA bağlanması DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye yüzeylerde gerçekleşmiştir. DSP:MCH (2.0:0.0) ve DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye yüzeylerdeki BSA bağlanma farkı,  $171 \Delta\text{RU}$  olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, yüzey üzerinde MCH bağlanmasının DSP bağlanmasını azalttığı olarak yorumlanmıştır. MCH'nun altın yüzeye bağlanması ile, DSP moleküllerinin yüzey üzerinde bağlanma sıklığını ve birbirlerine olan yakınlığını azaltarak sterik engellemeyi en aza indirdiği ve bu şekilde protein bağlanma olasılığını arttırdığı düşünülmektedir. Ancak DSP:MCH karışımlarında MCH'nin konsantrasyonu 2.5 mM 'dan daha fazla artırıldığında, BSA bağlanmasının azaldığı görülmüştür. Bunun nedeninin DSP'nin yüzeyde çok seyrelmesi sonucunda, protein bağlanma yerlerinde azalması olarak yorumlanmıştır. BSA bağlanmasında, DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerde, DSP:MCH (2.0:5.0) ile modifiye yüzeylere göre belirgin bir azalma olduğu gözlemlenmiştir ( $250 \Delta\text{RU}$ ). Bu sebeple DSP:MCH (2.0:20.0) ile modifiye yüzey modifikasyonuna gerek görülmemiştir.

**Lizozim bağlanması:** DSP:MCH (2.0:0.0) ve DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye yüzeylerde protein bağlanma farkı, BSA bağlanma profillerinde görülmüş olsa da, MCH'nin sterik engellemeyi azaltma özelliği, BSA (67 kDa)'nın büyük bir molekül olmasında dolayı, belirgin bir şekilde görülmediği düşünülmüştür. Daha küçük bir molekülün, MCH'nin uçlarında bulunan OH-gruplarını daha az kapatarak, MCH'nin sterik engellemeyi azaltma özelliğini arttıracakları düşünülmüştür. Bu yüzden farklı DSP:MCH molar oranlarıyla modifiye olan yüzeylere protein bağlanma deneyleri, lizozim (14 kDa) kullanılarak tekrarlanmış (Şekil 4.3) ve sonuçlar BSA bağlanma

profilleri ile kıyaslanmıştır. Bu sonuçlara göre, sabit konsantrasyonda ( $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) lizozim bağlanması yine BSA bağlanmasında olduğu gibi en fazla DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye yüzeylerde olduğu görülmüştür. Ancak iki data seti karşılaştırıldığında, DSP:MCH (2.0:0.0) ve DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye yüzeylere protein bağlanma farkının lizozim datasında BSA datasına kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür [BSA datasındaki  $\Delta\text{RU} = 171$  ve lizozim datasındaki  $\Delta\text{RU} = 264$ ] (Şekil 4.3). Beklenildiği üzere, lizozim daha küçük bir molekül olduğu için, MCH'nun protein bağlanmasındaki artışı sağlama özelliği, daha belirgin hale gelmiştir. Buna ek olarak,  $\Delta\text{RU}$ 'da genel bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuç, BSA'ya göre daha küçük bir molekül olan lizozim'in daha fazla yüzeye bağlanması sonucunda ( $\Delta\text{RU}$ ) sinyalinin artması olarak yorumlanmıştır. Bazı çalışmalar, küçük moleküllerin büyük moleküllere kıyasla daha fazla yüzeye bağlandığını göstermektedir [10]. IgE'ye seçicilik gösteren iki farklı biyolojik tanıyıcı ajan ile iki tip QCM sensörü geliştirilmiştir. İki sensörün de LOD'lerinin aynı olmasına rağmen, aptamer-temelli sensörün doğrusal aralığının antikör-temelli sensöre göre daha geniş olduğu belirtilmiştir. Bunun nedeni olarak da, küçük bir molekül olan aptamerin antikora göre daha fazla yüzeye bağlanması sonucunda daha fazla hedef molekülü yakalaması gösterilmiştir.



Şekil 4.3. DSP:MCH (2.0:0, 2.0:2.5, 2.0:5.0, 2.0:10.0) molar oranları ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları sonrasında sabit konsantrasyonda protein bağlanmasına bağlı  $\Delta$ RU değerlerindeki değişimler  BSA  lizozim (n=3).

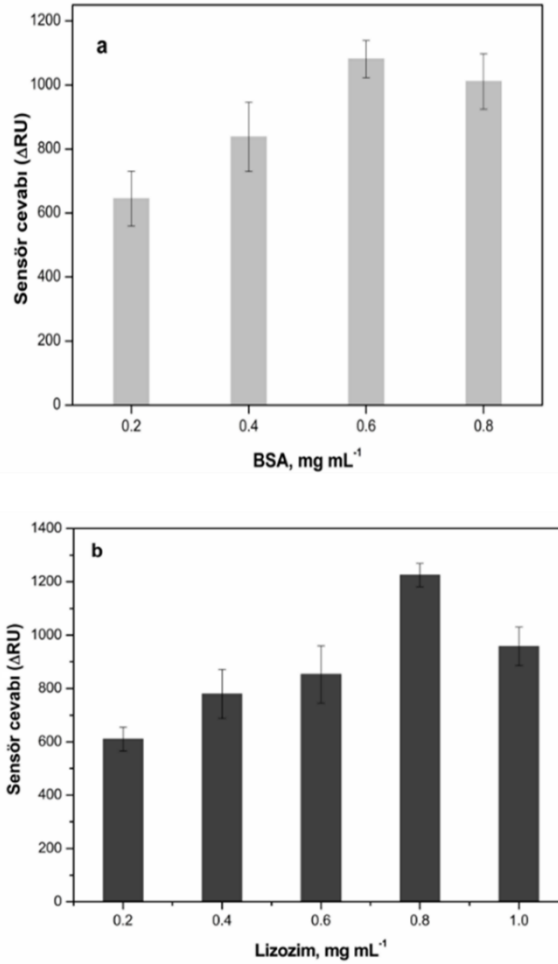
#### 4.1.4. DSP:MCH (2.0:2.5) Molar Oranıyla Modifikasyon Sonrasında Farklı BSA ve Lizozim Konsantrasyonlarındaki Bağlanma Profilleri

**BSA bağlanması:** DSP:MCH (2.0:2.5) molar oranıyla modifiye yüzeye farklı konsantrasyondaki BSA bağlanması ( $0.2, 0.4, 0.6$  ve  $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$ ) ayrı sensogramlarda ( $\Delta$ RU-zaman) elde edilmiş ve her sensogramdan elde edilen sonuçlar tek bir grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 4.4a). Şekil 4.4a'da gösterildiği üzere,  $0.6 \text{ mg mL}^{-1}$  konsantrasyonuna kadar BSA bağlanmasında bir artma, bu konsantrasyondan sonra bir azalma görülmüştür. Büyük bir molekül olan BSA ( $\sim 67 \text{ kDa}$ )'nın  $0.6 \text{ mg mL}^{-1}$ 'den daha yüksek konsantrasyonlarda yüzeye bağlanmasının azalması, yüksek konsantrasyonlarda sterik engellemeye bağlı olarak yüzeye bağlanamaması ve dolayısıyla yüzeyin bu konsantrasyonda doyuma ulaşması olarak açıklanabilmektedir.

**Lizozim bağlanması:** Aynı deneyler lizozim ile tekrarlandığında, en fazla protein bağlanmasının  $0.8 \text{ mg mL}^{-1}$  konsantrasyonunda olduğu, ve daha yüksek konsantrasyonlarda bağlanmada azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4b). DSP:MCH (2.0:2.5) molar oranıyla modifiye yüzeye, en fazla bağlanma



konsantrasyonun lizozim ve BSA'da farklı olması, iki molekülün farklı büyüklüğe sahip olmaları ile açıklanabilmektedir. Lizozim, BSA'ya göre daha küçük bir molekül olduğu için, aynı şartlarda daha yüksek lizozim konsantrasyonları yüzeyi doyuma ulaştırdığı düşünülmüştür. Lizozim ve BSA için en fazla bağlanma konsantrasyonları sırasıyla 0.80 ve 0.60 mg mL<sup>-1</sup> olmakla birlikte, mol L<sup>-1</sup> birimine çevrildiğinde, bu değerler 5.7x10<sup>-5</sup> ve 8.96 x10<sup>-6</sup> M'dir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, interpolasyon sonrasında 4851 Da moleküler ağırlığa sahip trombin aptamerinin ve 70 kDa moleküler ağırlığa sahip trombin antikorunun sırasıyla en fazla bağlanma konsantrasyonları 6.54 x10<sup>-5</sup> M (0.3 mg mL<sup>-1</sup>) ve 6.36 x10<sup>-6</sup> M (0.4 mg mL<sup>-1</sup>) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. DSP:MCH (2.0:2.5) molar oranı ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları sonrasında farklı protein konsantrasyonlardaki (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1 mg mL<sup>-1</sup>) bağlanmalara bağlı ΔRU değerlerindeki değişimler a) BSA b) lizozim (n=3).

Optimum BSA/lizozim bağlanmasının gerçekleştiği yüzey olan DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs arayüze trombin aptameri/antikorunun immobilize edilerek, biyosensör performansının test edilmesinden önce, elde edilen arayüzeylerin yüzey karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

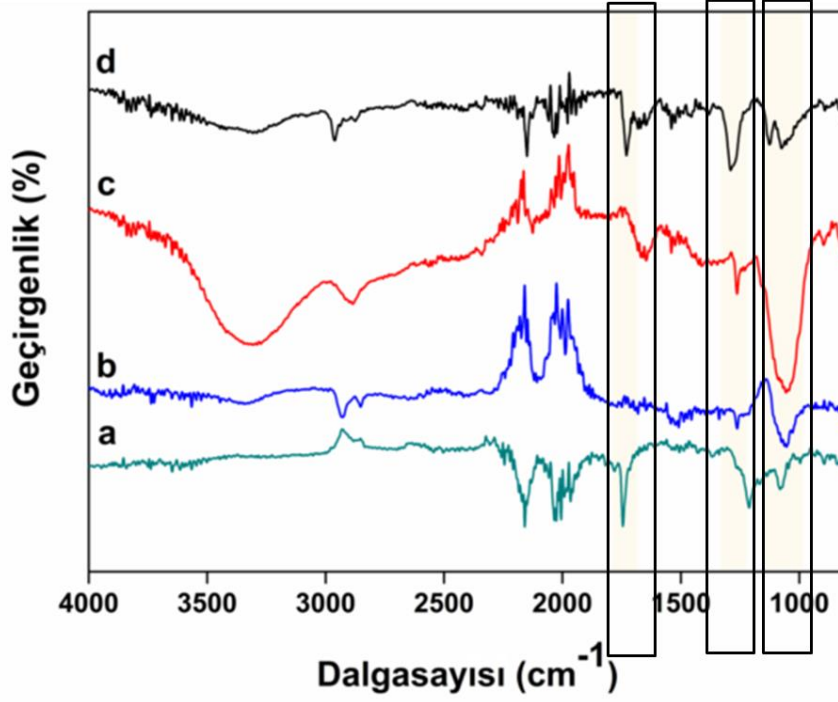
Farklı DSP konsantrasyonu kullanılarak altın yüzeyler üzerinde oluşturulan SAMs'in BSA bağlanma profilleri incelendiğinde (bölüm 4.1.1), en fazla BSA bağlanmasının 2.0 mM DSP ile modifiye yüzeylerde olduğu gözlemlenmiştir. Farklı MCH konsantrasyonu kullanılarak altın yüzeyler üzerinde oluşturulan SAMs'in BSA bağlanma profilleri incelendiğinde (bölüm 4.1.2), en az BSA bağlanmasının 20.0 mM MCH ile modifiye yüzeylerde olduğu gözlemlenmiştir. Altın yüzeyler üzerinde, farklı DSP:MCH oranlarıyla gerçekleştirilen mSAMs'in BSA bağlanma profilleri incelendiğinde (bölüm 4.1.3), en fazla bağlanmanın DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs üzerinde, en az bağlanmanın ise, DSP:MCH (2.0:10.0) mSAMs üzerinde olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, 2.0 mM DSP, 20.0 mM MCH, DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerde en fazla ve en az BSA bağlanmalarının, yüzey üzerinde varolan moleküllerden kaynaklandığını göstermek için, o moleküllere ait fonksiyonel gruplar, öncelikle ATR-FTIR ve XPS analizleri ile belirlenmiştir. XPS ve ATR-FTIR ile gerçekleştirilen karakterizasyonlar, YPR sonuçları ile eş zamanlı gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, altın yüzey, DSP:MCH (2.0:2.5) ve BSA bağlanmış DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs altın yüzeylerin pürüzlülük dereceleri AFM ile belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır.

## **4.2. Oluşturulan Arayüzeylerin Yüzey Karakterizasyonu**

### **4.2.1. DSP, MCH ve DSP:MCH ile Modifiye Yüzeylerin ATR-FTIR Analizi**

2.0 mM DSP, 20.0 mM MCH, DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin ATR-FTIR spektrumları Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Fonksiyonel grupların yorumlanması Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. DSP molekülüne ait NHS fonksiyonel grubun ve N-hidroksisülfo-succinimid (N-hydroxysulfosuccinimide, NHSS) ester grubuna ait karakteristik bantlar daha önceki çalışmalarda karakterize edilmiştir [169, 170]. N-C-O ve C-N-C fonksiyonel gruplar yaklaşık olarak  $1078\text{ cm}^{-1}$  ve  $1220\text{ cm}^{-1}$ 'de görülmüştür. Buna ek olarak, NHS karbonilleri ve NHSS ester'in karbonil (C=O) gerilimleri  $1747 - 1820\text{ cm}^{-1}$  arasında üç ayrı bant olarak görülmüştür [169, 170]. Bu bantlar sırasıyla düşük enerj bantlarında

görülen (1747 and 1792  $\text{cm}^{-1}$ ) NHS karbonillerinin (C=O) asimetric, simetric gerilimleri, ve buna ek olarak NHS ve NHSS ester'inin karbonil (succinimidyl grubuna ait C=O) gerilimine ait daha yüksek enerji bandına görülen 1820  $\text{cm}^{-1}$ 'dir. 2.0 mM DSP ile modifiye yüzeylerde, succinimidyl'e ait N-C-O, C-N-C, fonksiyonel gruplarını gösteren bantlar sırasıyla 1080 ve 1214, NHS karbonil grubuna ait C=O, 1746  $\text{cm}^{-1}$  'de, görülmüştür (Şekil 4.5a). 20.0 mM MCH ile modifiye yüzeylerde ise, C-O fonksiyonel grubuna ait gerilim, beklenen aralıkta (1000-1100  $\text{cm}^{-1}$ ) , 1101  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülmüştür[171] (Şekil 4.5b). Beklenildiği üzere, MCH ile modifiye yüzeylerde, DSP molekülünün C-N-C fonksiyonel grubuna ve NHS karbonil grubuna ait bantlar gözükmemektedir. Bunun dışında  $\text{CH}_2$  fonksiyonel grubunun, CH gerilimine ait bantlar 2871  $\text{cm}^{-1}$  ve 2915  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülmüştür[169, 172] (Şekil 4.5b). DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye yüzeylerde, her iki moleküle ait fonksiyonel grupların bantları [1055  $\text{cm}^{-1}$  (N-C-O) ve/veya (C-O), 1264  $\text{cm}^{-1}$  (C-N-C), 1643  $\text{cm}^{-1}$  (C=O)], ve [2892  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  fonksiyonel grubuna ait CH gerilimi)] Şekil 4.5c'de gösterilmiştir. Bu yüzeylerde 1055  $\text{cm}^{-1}$  ait bantın belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır. Bunun nedeni, aynı yüzeyde DSP molekülüne ait N-C-O ve MCH moleküle ait C-O fonksiyonel grupların olması olarak yorumlanmıştır. 3330  $\text{cm}^{-1}$  'de görülen bandın MCH molekülünün uç tarafında bulunan OH fonksiyonel grubuna ait olduğu düşünülmektedir [172]. Buna ek olarak, DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye yüzeylerde, DSP'nin NHS karboniline (C=O) ait fonksiyonel grubunun 1746  $\text{cm}^{-1}$  'den 1643  $\text{cm}^{-1}$ 'ye olan bant kayması, DSP molekülünün fonksiyonel gruplarının, MCH molekülünün fonksiyonel gruplarına yakın olmasından dolayı kaynaklanıyor olabilir. Bu bant kayması, DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerde görülmemiş olsa da, her iki moleküle ait bütün karakteristik bantlar görülmüştür. Bunlar sırasıyla; [1073 $\text{cm}^{-1}$  (N-C-O), 1290  $\text{cm}^{-1}$  (C-N-C), 1731  $\text{cm}^{-1}$  (NHS karboniline ait C=O)], 2959  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  fonksiyonel gruplarına ait CH gerilimi)] ve [3325  $\text{cm}^{-1}$  (MCH'nun OH fonksiyonel grubu)], Şekil 4.5d'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. a) 2.0 mM DSP b) 20.0 mM MCH c) DSP:MCH (2.0:2.5) d) DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin infrared spektrumları

Çizelge 4.1. DSP, MCH and DSP:MCH ile modifiye yüzeylerdeki moleküllere ait fonksiyonel grupların tanımı ve görüldükleri Infrared dalganumarası

Dalga numarası, $\text{cm}^{-1}$		Fonksiyonel Grup Tanımı
		<b><u>DSP SAMs</u></b>
1080	$\nu$ (N-C-O)	succinimid'e ait N-C-O fonksiyonel grubu
1214	$\nu_a$ (C-N-C)	NHS fonksiyonel grubuna ait asimetric CNC gerilimi
1746	$\nu_a$ (C=O)	NHS karboniline ait asimetric gerilim
		<b><u>MCH SAMs</u></b>
1101	$\nu$ (C-O)	MCH'nun uç tarafındaki C-O grubu
2871	$\nu$ (C-H)	$\text{CH}_2$ grubuna ait simetric C-H gerilimi
2915	$\nu$ (C-H)	$\text{CH}_2$ grubuna ait asimetric C-H gerilimi
		<b><u>DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs</u></b>

1055	$\nu(\text{N-C-O})$	succinimid'e ait N-C-O fonksiyonel grubu
1264	$\nu_a(\text{C-N-C})$	NHS fonksiyonel grubuna ait asimetric CNC gerilimi
1643	$\nu_a(\text{C=O})$	NHS karboniline ait asimetric gerilim
2892	$\nu(\text{C-H})$	$\text{CH}_2$ grubuna ait simetric C-H gerilimi
3330	$\nu(\text{O-H})$	MCH'nun OH fonksiyonel grubu
		<b><u>DSP:MCH (2.0:10.0) mSAMs</u></b>
1073	$\nu(\text{N-C-O})$	succinimid'e ait N-C-O fonksiyonel grubu
1290	$\nu_a(\text{C-N-C})$	NHS fonksiyonel grubuna ait asimetric CNC gerilimi
1731	$\nu_a(\text{C=O})$	NHS karboniline ait asimetric gerilim
2959	$\nu(\text{C-H})$	$\text{CH}_2$ grubuna ait asimetric C-H gerilimi
3325	$\nu(\text{O-H})$	MCH'nun OH fonksiyonel grubu

#### 4.2.2. DSP, MCH ve DSP:MCH ile Modifiye Yüzeylerin XPS Analizi

2.0 mM DSP, 20.0 mM MCH, DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin elementel ve fonksiyonel grup içeriklerini belirlemek için, modifikasyon öncesi ve sonrası yüzeylerin XPS analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen XPS sonuçları, infrared sonuçları ile tutarlı olup, yüzey modifikasyonu için kullanılan DSP ve MCH moleküllerine ait fonksiyonel grupların yüzey üzerinde bulunduğunu göstermektedir. Bu iki moleküle ait elementlere dair (DSP için C, O, N, S) ve (MCH için C, O, S), XPS taramaları, her bir farklı modifikasyona göre gerçekleştirilmiş ve modifiye olmayan örnek ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.6-4.9, Çizelge 4.2). Aynı zamanda, modifikasyon sonrasında bağlanma enerjilerinde olası pik kaymalarını izlemek için, modifiye olmayan yüzey dahil, diğer bütün modifiye örneklerden de Au 4f için XPS taraması alınmıştır.

Modifiye olmayan yüzey dahil, her örnekten alınan C 1s spektrumunda, çevresel karbon kontaminasyonundan kaynaklanan ve 284.6 eV'de görülen pik görülmüştür [173] (Şekil 4.6). 2.0 mM DSP, 20.0 mM MCH, DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerde, 284.6 eV'de görülen pik alanının altında, çevresel karbonun dışında DSP ve MCH moleküllerine ait C-C, C-H fonksiyonel gruplarına ait pik bulunmaktadır (Şekil 4.6b-e). Modifiye olan yüzeylerde, modifiye olmayan

yüzeyden farklı olarak, 284.6 eV bağlanma enerjisinden farklı bağlanma enerjilerinde gözükken diğer pikler, yüzeye bağlanan moleküllerin fonksiyon gruplarının varlığını göstermektedir. DSP modifiye yüzeylerde, C 1s spektrumunda 286.3 ve 288.7 eV'de görülen pikler, C-O ve C=O karbonil gruplarına ait piklerdir [174, 175] (Şekil 4.6b).

Daha önceki bir çalışmada 3,3'Ditiobis (sülfosuccinimidilpropionat) (3,3'Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionate),DTSSP) ile modifiye altın yüzeylerde XPS karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. DSP ile benzerlik gösteren bu molekülün, C 1s spektrumunda, 288.4 eV'de bulunan pikin, NHS esterinin –CO-NH- fonksiyonel grubuna ait olduğu belirtilmiştir [176]. Ayrıca başka bir makalede, karbon fiberlerinin nitrik asit ile oksidasyonu sonrasında, C 1s spektrumunda karbona ait farklı oksidasyon aşamalarını gösteren farklı pikler tanımlanmıştır [177]. 287.6-287.7 eV arasındaki piklerin karbonil gruplarına ait olduğu, 288.6-289 eV arasındaki piklerin karboksil veya ester gruplarına ait olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, DSP ile modifiye yüzeylerin C 1s spektrumunda, birbirine çok yakın olarak tanımlanan DSP'nin karbonil and ester grupları, ayrı pikler olarak gözükme de, 288.7 eV'de görülen pik, karbonil veya ester grubuna ait C=O'nun yüzey üzerinde olduğunu göstermektedir (Şekil 4.6b). MCH ile modifiye yüzeylerin C 1s spektrumunda 286.5eV bağlanma enerjisinde gözükken pik, MCH molekülünün ucunda bulunan C-O fonksiyonel grubunu temsil etmektedir [175] (Şekil 4.6c). Beklenildiği üzere, MCH ile modifiye yüzeylerin C 1s spektrumunda, DSP ile modifiye yüzeylerin C 1s spektrumunda 288.7 eV bağlanma enerjisinde gözükken C=O grubuna ait pik gözükmemektedir. DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin C 1s spektrumları (Şekil 4.6d ve e), DSP ve MCH modifiye yüzeylerle karşılaştırıldığında (Şekil 4.6b ve c), her iki molekülün fonksiyonel gruplarına ait pikler görülmektedir. DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin C 1s spektrumlarında sırasıyla 288.7 ve 288.2 eV'de görülen pikler DSP molekülüne ait C=O fonksiyonel grup olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.6d ve e). Yine DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin C 1s spektrumlarında, MCH molekülüne ait C-O fonksiyonel grubuna ait pikler sırasıyla 286.3 ve 286.4 eV bağlanma enerjilerinde görülmüştür. Daha önceden belirtildiği gibi, modifiye olan yüzeylerin spektrumlarında 284.7 eV bağlanma enerjisinde görülen

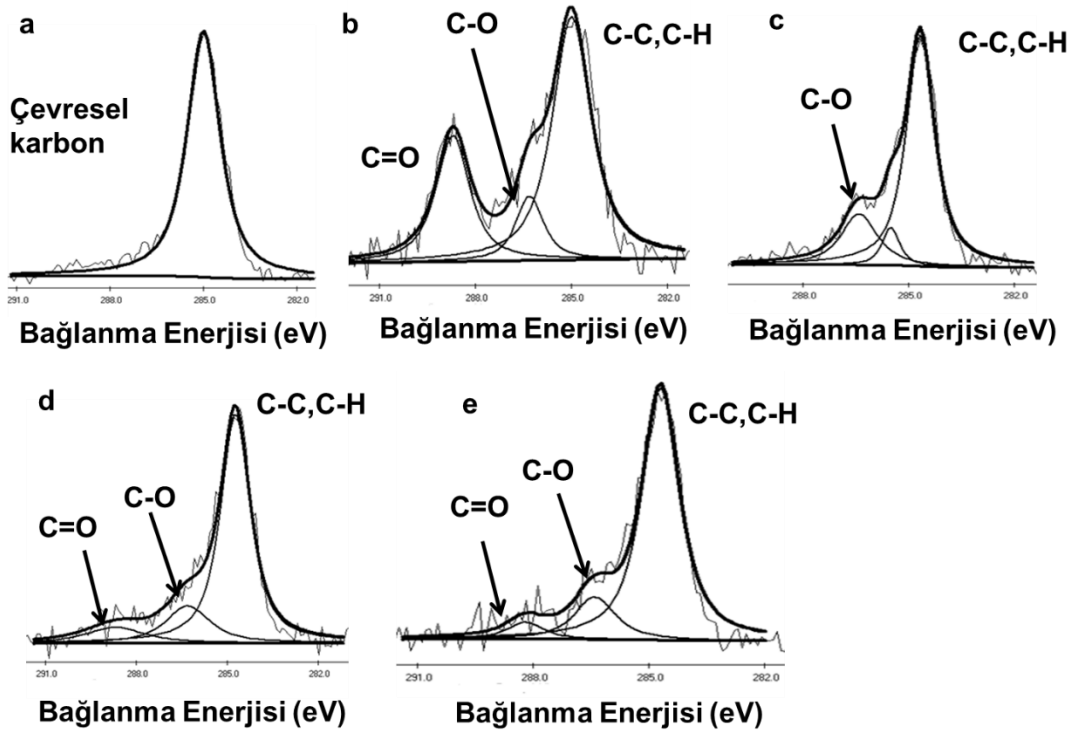
pikin, çevresel karbonun dışında alifatik karbonları (C-C,C-H) tanımladığı düşünülmektedir.

Modifiye olmayan yüzeye ve bütün modifiye yüzeylere ait O 1s spektrumlarında, 532 eV'de görülen pik, kısmen çevresel oksijenin yüzey üzerinde varlığını göstermektedir (Şekil 4.7a-e). Ancak, başka bir makalede, 532.1 eV'de görülen pik, DSP molekülüne ait C=O fonksiyonel grubu olarak tanımlanmıştır [174]. Buna ek olarak, fuleren polymerleri sentezinde, 531.2 ve 532.5 eV'de görülen pikler, O=C ve O-C olarak tanımlanmıştır [178]. Ayrıca, karbon fiberlerin oksidasyonu sonucunda 531.2-531.6 ve 532.8-533.1 eV'de görülen pikler, sırasıyla C=O, C-OH ve/veya C-O-C fonksiyonel gruplara ait olduğu belirtilmiştir [177]. Dolayısıyla, C-OH (532.6 eV) ve C=O (532.1 eV) pikleri bütün modifiye örneklerin (2.0 mM DSP, 20.0 mM MCH, DSP:MCH (2.0:2.5) ve DSP:MCH (2.0:10.0)) O 1s spektrumunda görülen 532 eV altında olabilir (Şekil 4.16b-e). Ancak, kesin olarak birşey söylenemeyeceği için, O 1s spektrumları fonksiyonel gruplar hakkında kesin bilgi vermemektedir.

DSP and DSP:MCH (2.0:2.5, 2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin N 1s spektrumlarında, sırasıyla 401.2, 401.2 and 400.8 eV'de pikler görülmektedir (Şekil 4.8b-d). Bu pik, NHS fonksiyonel grubuna ait tek nitrogenin varlığını göstermektedir [174, 176, 179]. Modifiye olmayan yüzeyde gözükmemektedir (Şekil 4.8a).

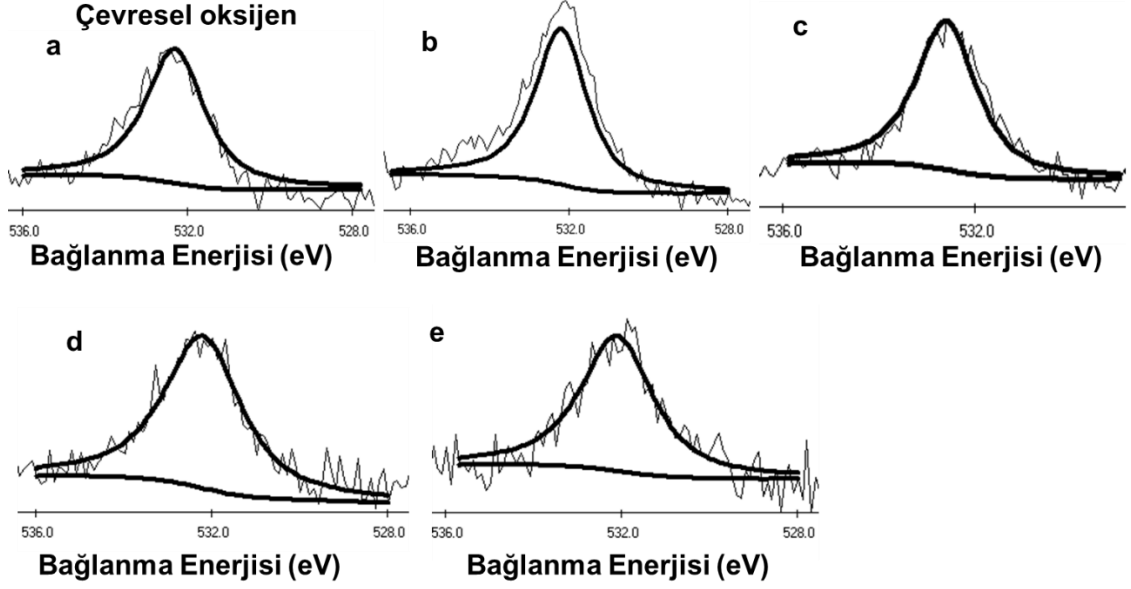
Farklı makalelerde, disülfürlerin alkantiyollere benzer bir mekanizma ile, altın yüzeylere adsorbe olduğu belirtilmiştir [64, 65, 94, 100]. Bu mekanizmaya göre, disülfürler, S-S bağının altının indirgeyici özelliğinden dolayı kırılıp yüzeye tiyol gruplarıyla bağlanmakta ve Au-S bağını oluşturmaktadırlar. Bu sonuçlara paralel olarak, diğer makalelerde de DSP, NHSS and NHS türevi moleküllerin (disülfür içeren benzer yapıda moleküller) XPS S 2p spektrumları ile, indirgeyici maddeler kullanılmadan, S-S bağlarının kırıldığı ve Au-S bağı oluşarak, bu moleküllerin kovalent olarak altın yüzeye bağlandığı gösterilmiştir [174, 176, 179]. Bütün örneklerin S 2p spektrumları, Şekil 4.9'de gösterilmiştir. DSP, MCH ve DSP:MCH (2.0:2.5, 2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerde, 162 eV'de görülen pik (Şekil 4.9b-e), Au-S bağının oluşması ile moleküllerin spesifik ve kovalent olarak yüzeye bağlandığını göstermektedir [61, 99, 180]. 163.3 eV'de gözükken ve daha küçük olan pik, genelde modifikasyon çalışmalarında yüzeyde kalabilen, bazı bağlanmayan ve/veya spesifik olmayan tiyoller olarak nitelendirilmiştir. [62, 176]. Ancak Volkert'in araştırma grubuna göre, 162 ve 163 eV'de görülen her iki pik de tiyollu

moleküllerin kovalent olarak bağlanmalarını ve  $\geq 164$  eV'de görülen pik ise bağlanmayan tiyolleri göstermektedir [181]. Buna ek olarak, Pham ve araştırma grubu,  $\sim 163$  eV'de görülen pikin, spesifik bağlanma olarak tanımlamıştır [63]. DSP:MCH ile modifiye örneklerde, spesifik tiyol bağlanmalarının hangi molekülden (DSP veya MCH) geldiği belirlenemese de, C 1s, N 1s veya O 1s spektrumları, her iki molekülden de gelen fonksiyonel grupların yüzeyde varlığını göstermektedir. ATR-FTIR sonuçları da benzer yönde olup, ek olarak XPS sonuçları ile bu moleküllerin yüzeye spesifik ve kovalent olarak bağlandıkları gösterilmiştir.

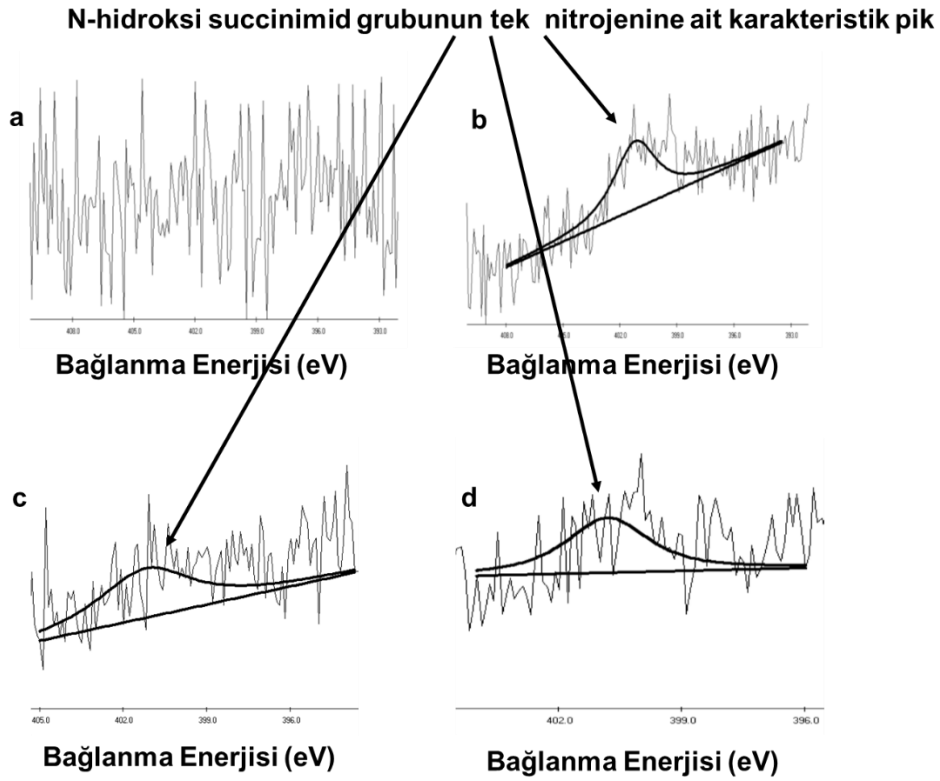


Şekil 4.6. a) modifiye olmayan yüzey b) 2.0 mM DSP c) 20.0 mM MCH d) DSP:MCH (2.0:2.5) e) DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin C 1s spektrumları

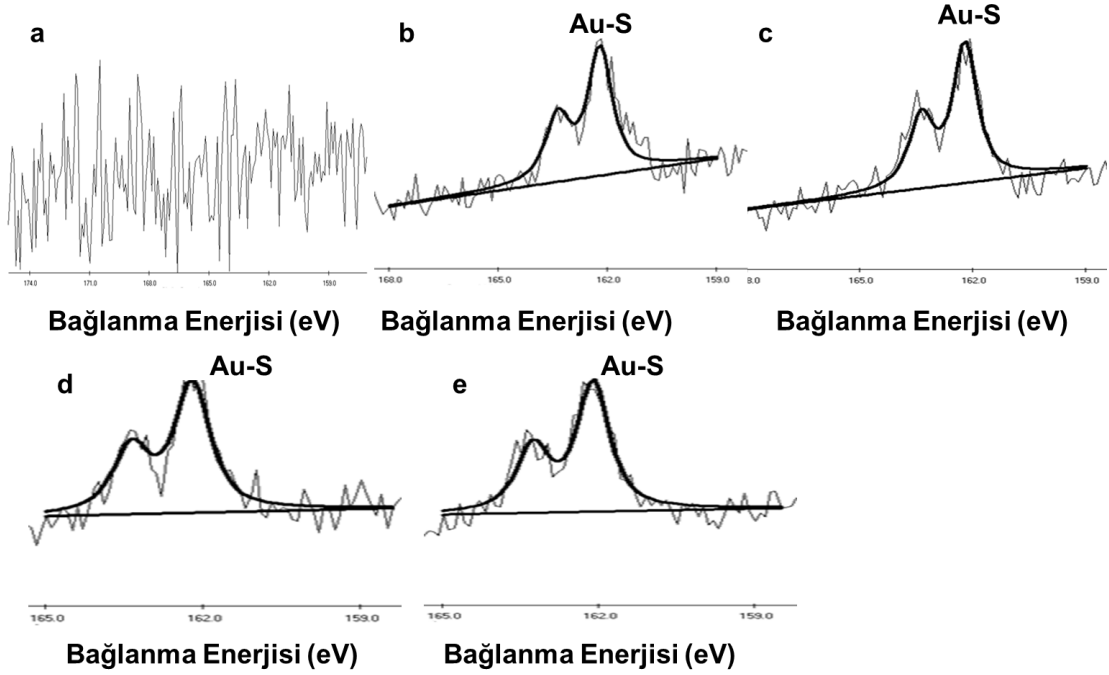




Şekil 4.7. a) modifiye olmayan yüzey b) 2.0 mM DSP c) 20.0 mM MCH d) DSP:MCH (2.0:2.5) e) DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin O 1s spektrumları



Şekil 4.8. a) modifiye olmayan yüzey b) 2.0 mM DSP c) DSP:MCH (2.0:2.5) d) DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin N 1s spektrumları



Şekil 4.9. a) modifiye olmayan yüzey b) 2.0 mM DSP c) 20.0 mM MCH d) DSP:MCH (2.0:2.5) e) DSP:MCH (2.0:10.0) ile modifiye yüzeylerin S 2p spektrumları

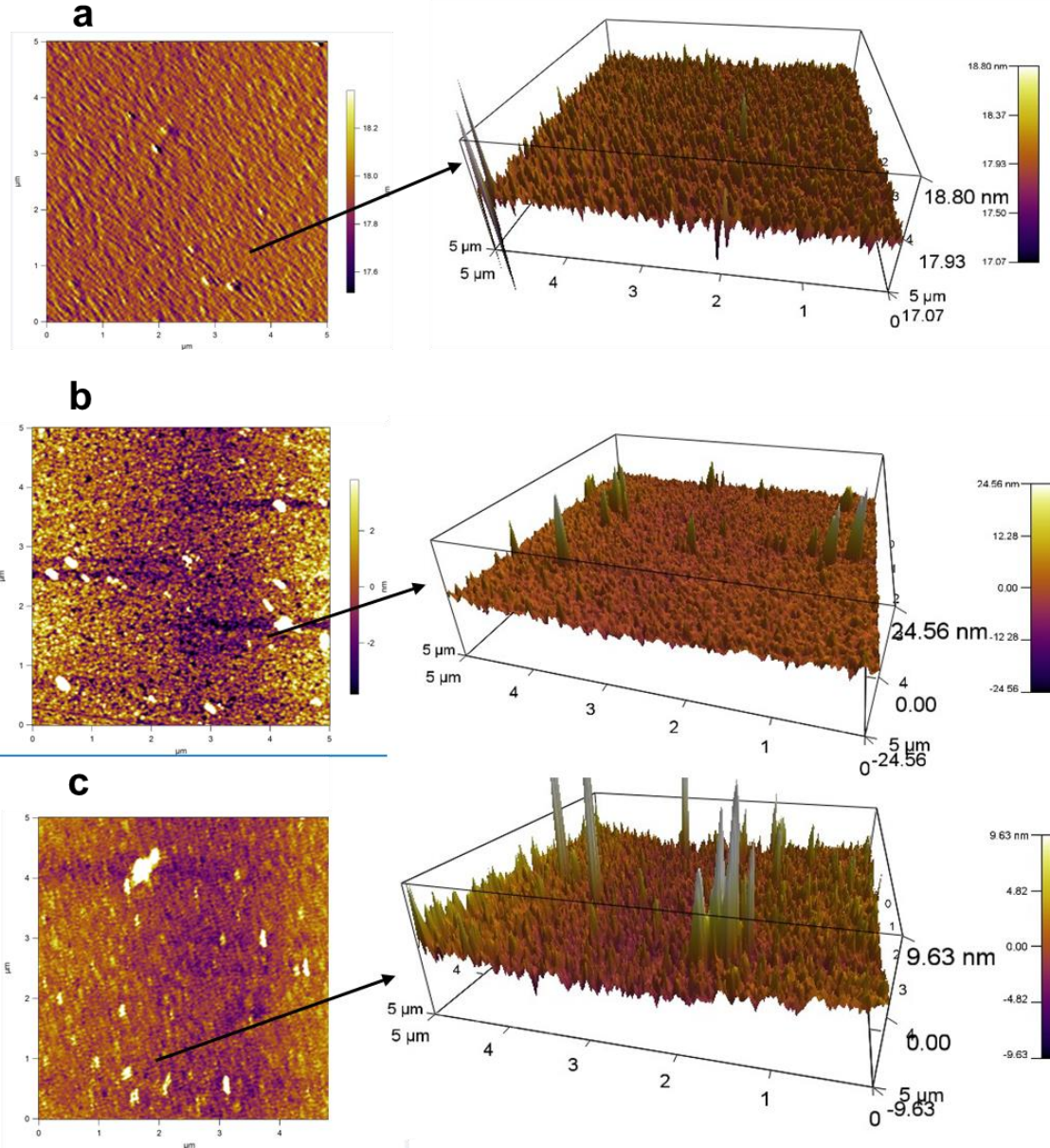
Çizelge 4.2. DSP, MCH and DSP:MCH ile modifiye yüzeylerde fonksiyonel grupların XPS pik tanımlamaları

Spektrumlar	Bağlanma Enerjisi (eV)				
	Kör	DSP	MCH	DSP:MCH (2.0:2.5)	DSP:MCH (2.0:10.0)
C 1s	285.0	285.0	284.6	284.7	284.7
		286.3	286.5	286.3	286.4
		288.7		288.7	288.2
O 1s	532.3	532.2	532.6	532.2	532.1
N 1s	-	401.2		401.2	400.8
S 2p	-	162.2	162.2	162.2	162.1
		163.7	163.3	163.4	163.3

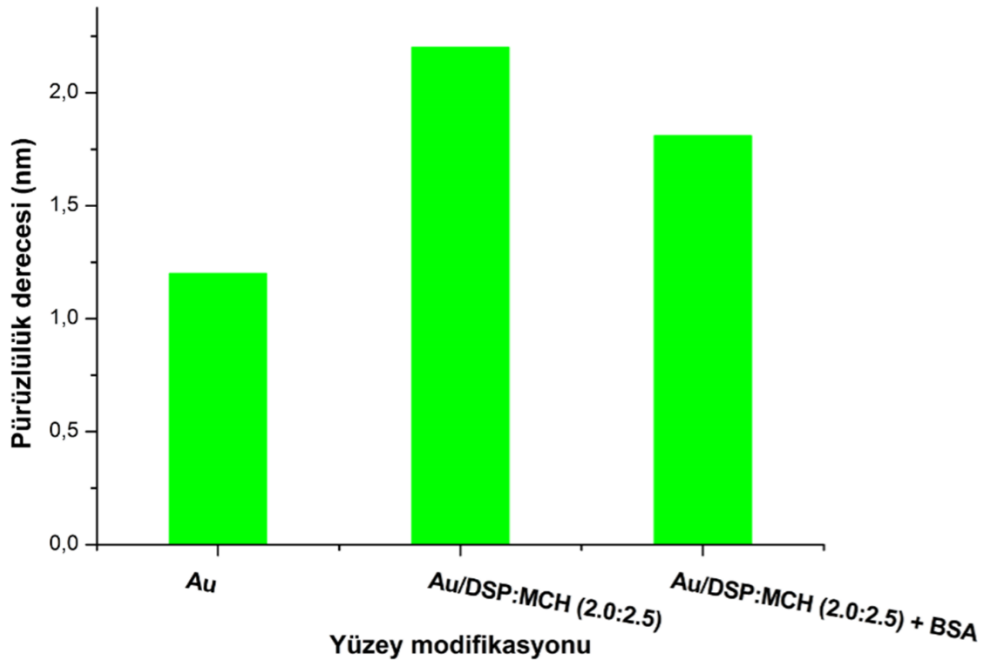
#### **4.2.3. Altın Yüzey, DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ve BSA Bağlanmış DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ile Modifiye Altın Yüzeylerin AFM Görüntüleri**

Şekil 4.10'da boş altın yüzey, DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ve 0.8 mg mL<sup>-1</sup> BSA bağlanmış DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ile modifiye altın yüzeylerin, 5 µm x 5 µm boyutlarında AFM görüntüleri, gösterilmektedir. Altın yüzey ve modifiye olmuş altın yüzeyler arasındaki fark gözükmemektedir. 3-boyutlu (3D) görüntülerde, örnekler arasındaki ortalama yükseklikteki değişiklikler gözükmemektedir.

Altın yüzeyin ortalama yüzey pürüzlülük değeri 1.20 nm olarak hesaplanmıştır. DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ile modifikasyon sonrasında, ortalama yüzey pürüzlülük değerinin 1.20 nm'den 2.20 nm'ye yükseldiği ve BSA bağlanması sonrasında 1.81 nm'ye düştüğü görülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. a) Altın yüzey b) DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMS c) DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMS+ BSA'nın AFM görüntüleri. Görüntüler  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  boyutlarında alınmıştır. Yüzeylerin 3D görüntüleri de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı aşamalarda modifikasyon sonrasında pürüzlülük derecesindeki değişiklikler

ATR-FTIR ve XPS teknikleri kullanılarak gerçekleştirilen yüzey karakterizasyonları sonucunda, DSP veya MCH ile modifiye SAMs yüzeylerde, DSP veya MCH moleküllerine ait fonksiyonel grupların varlığı tespit edilirken, DSP:MCH mSAMs yüzeylerde, her iki moleküle ait fonksiyonel grupların olduğu anlaşılmıştır. Buna ek olarak, XPS karakterizasyonu sonucunda, S 2p spektrumlarından alınan sonuçlara göre, 162 eV bağlanma enerjisinde görülen ve Au-S bağı gösteren karakteristik pik, bu moleküllerin altın yüzeye tiyol grupları ile kovalent bağlandıklarını göstermiştir. AFM tekniği ile, yüzey pürüzlülük derecelerinin her modifikasyon aşamasında değiştiği görülmüş ve moleküler seviyede görüntülenmiştir.

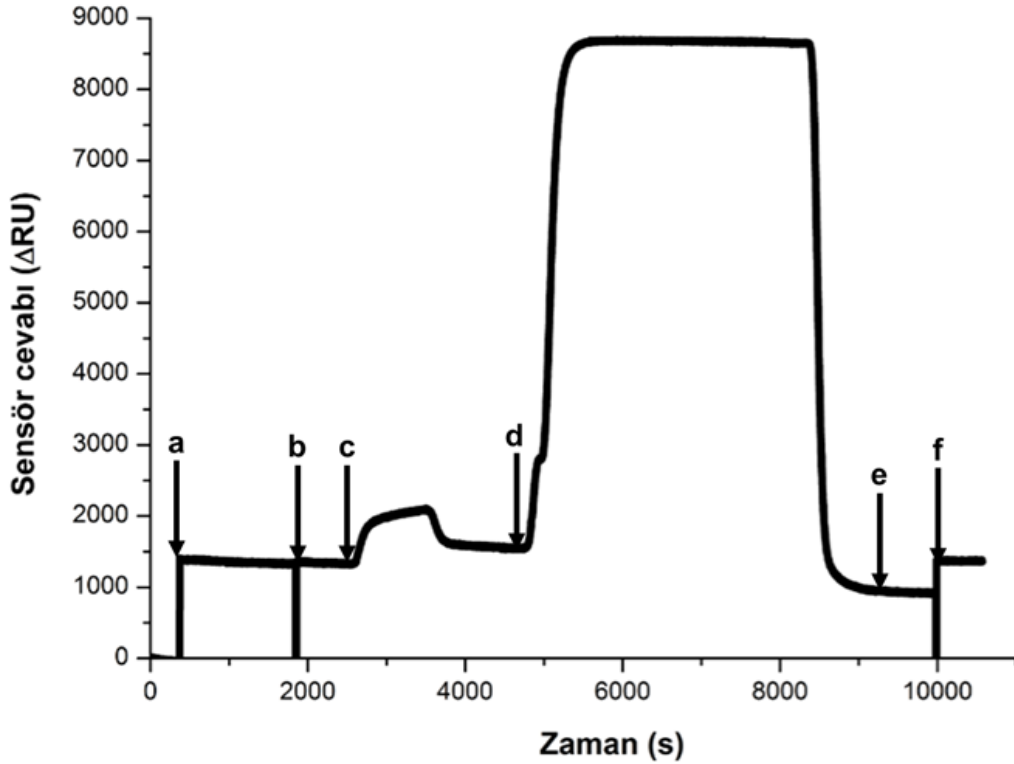
Yüzey karakterizasyonu gerçekleştirildikten sonra optimize edilen parametrelerle trombin tayinine yönelik biyosensör hazırlanmasına karar verilmiştir.

### 4.3. Trombin Biyosensörlerinin Hazırlanması

#### 4.3.1. Trombin Aptamerinin Kullanıldığı Biyosensör Sistemi

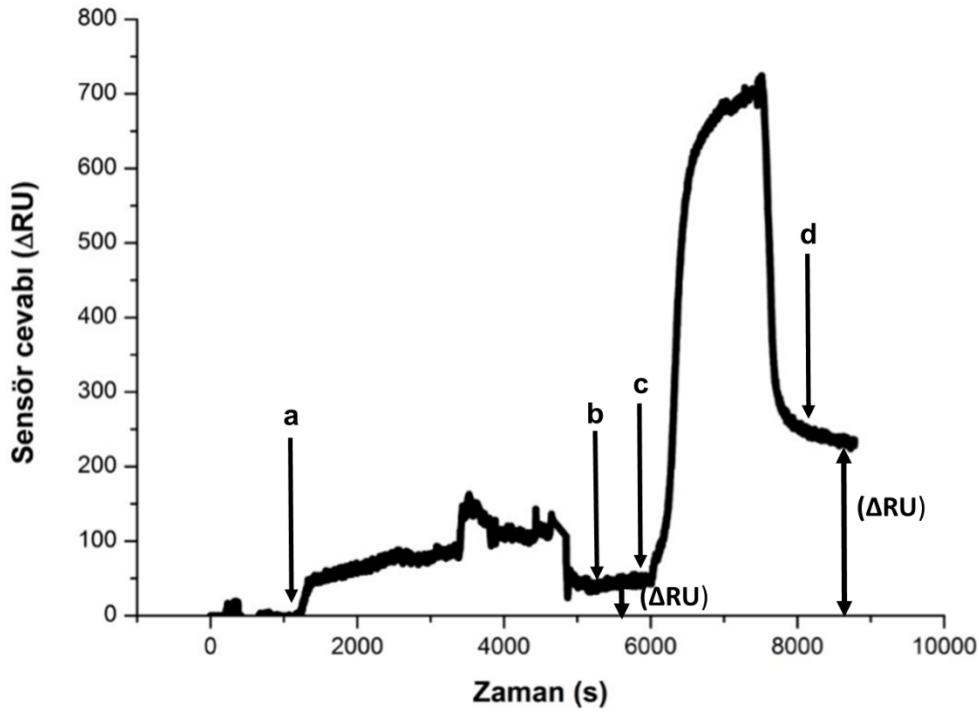
Aptamerin altın yüzeye kovalent olarak bağlanmasının sağlanması için, öncelikle altın yüzeyde DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs oluşturulmuştur. Altın yüzeye 0.05 M MES (pH 6.5) tamponu gönderilmiş ve taban çizgisi oluşturulmuştur. Bir sonraki adımda, bölüm 4.1.4'de belirlenen  $6.54 \times 10^{-5}$  M ( $0.3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) konsantrasyonunda

0.05 M MES (pH 6.5) tampon çözeltisi ile hazırlanan trombin aptameri çözeltisi altın yüzeye gönderilmiş ve kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır. Yüzeyde açıkta kalan karboksil gruplarının blokasyonu için 1.0 M etanolamin kullanılmıştır. Daha sonra 10 mM KCl, 50 mM NaCl içeren 10 mM PBS (pH 7.4) tampon çözeltisi altın yüzeyden geçirilmiş ve aynı çözelti ile taban çizgisi oluşturulmuştur. Sensör yüzeyi hazırlama aşamalarında,  $\Delta$ RU'daki değişimleri gösteren sensogram Şekil 4.12 'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Sensör hazırlama basamaklarını gösteren sensogram a) MES b) MES ile taban çizgisi oluşturma c) aptamer d) etanolamin e) PBS f) PBS ile taban çizgisi oluşturma

Bir sonraki aşamada, aynı tampon çözeltisinde 10.0 nM konsantrasyonda trombin gönderilmiş, yüzeyden spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için yıkama amaçlı, aynı tampon çözeltisi yüzeyden geçirilmiştir. Daha sonra rejenerasyon yapılmadan aynı tampon çözeltisinde 100.0 nM konsantrasyonda trombin yüzeye gönderilmiştir. Bu şekilde, hazırlanan biyosensörün çalışabildiği gösterilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. a) 10.0 nM trombinin yüzeye gönderilmesi b) PBS ile yıkama c) 100.0 nM trombinin yüzeye gönderilmesi d) PBS ile yıkama sonucunda oluşan sensör cevabındaki artışların sensogram formatında görüntülenmesi

#### 4.3.2. Trombin Aptamer Sensörü Performansının Test Edilmesi

Aynı prosedür (bölüm 4.3.1) kullanılarak, geliştirilen biyosensörün farklı trombin konsantrasyonlarına olan  $\Delta RU$ , ayrı sensogramlarda elde edilmiş ve her sensogramdan elde edilen sonuçlardan kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

Trombin aptamer sensörünün, 0.0-150.0 nM arasında konsantrasyonlarda trombin'e verdiği  $\Delta RU$ , Şekil 4.14'deki gibidir. Elde edilen kalibrasyon grafiği sonuçlarına göre, doğrusal aralık, 0.0-20.0 nM ve 20.0-100.0 nM olmak üzere iki ayrı bölgede gözükmetedir.  $R^2$  değeri birinci bölge için 0,998 ve ikinci bölge için 0,961 olarak hesaplanmıştır. 150.0 nM trombin konsantrasyonunda sensör yüzeyinin doyumluğa ulaştığı görülmüştür. Trombin aptamer sensörünün LOD'si 9.5 nM olarak Denklem 1 ve Denklem 2'ye göre hesaplanmıştır[182].

$$S_m = \bar{S}_{bl} + kS_{bl}, \text{ (Denklem 1)}$$

$S_m$ : gürültüden ayırt edilebilen en düşük sinyal

$\bar{S}_{bl}$ : sadece PBS çözeltilisinden (kör) alınan ortalama  $\Delta RU$

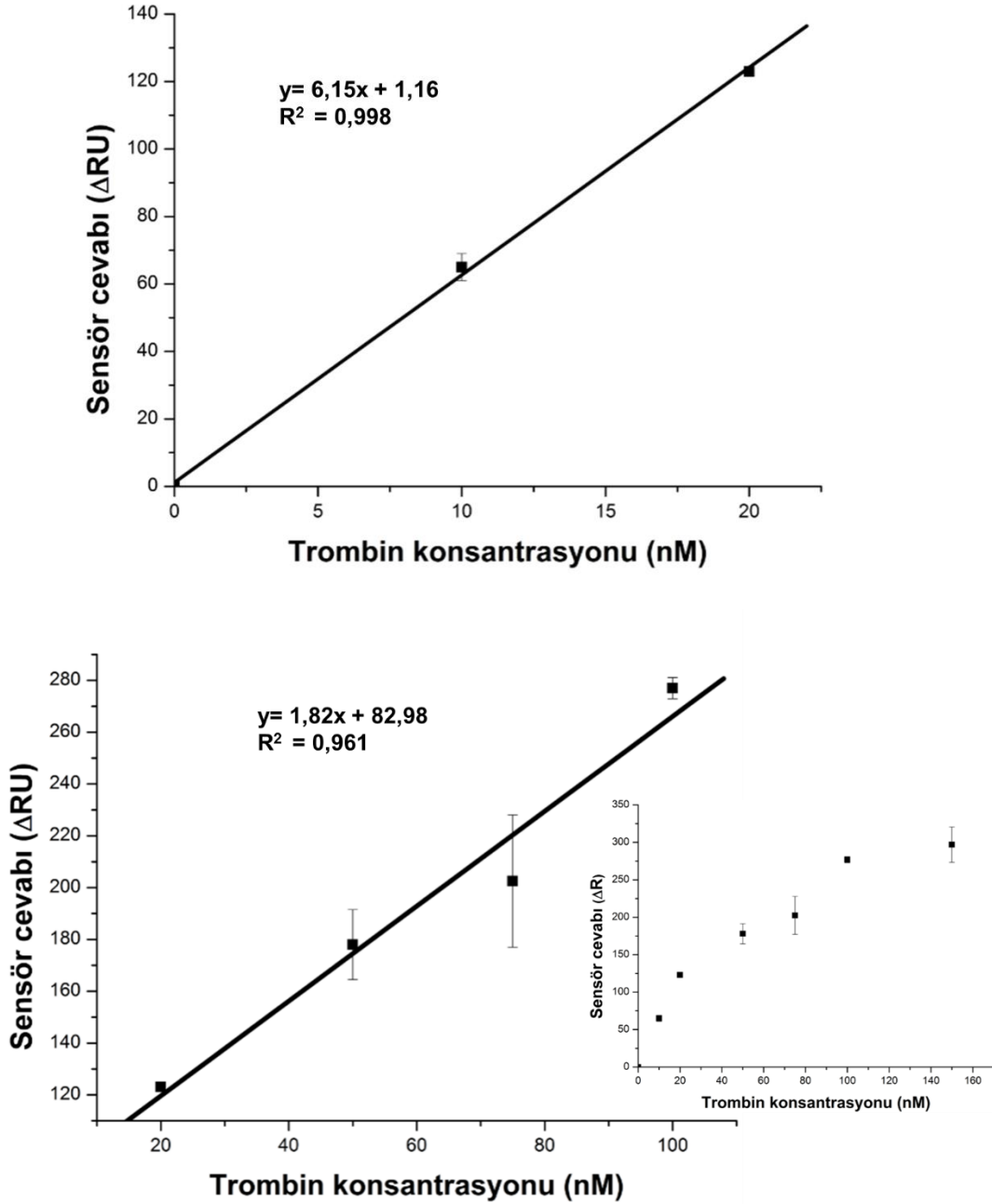
k (sabit) = 3

$s_{bl}$ : kör'den alınan standart sapma

$$c_m = (S_m - \bar{S}_{bl}) / m = k s_{bl} / m = 3 s_{bl} / m \quad (\text{Denklem 2})$$

$c_m$ : LOD konsantrasyonu, m: eğim

Tayin alt sınırı (Limit of Quantification, LOQ) değeri,  $10 s_{bl} / m$  olarak hesaplanmış ve 30.0 nM bulunmuştur.

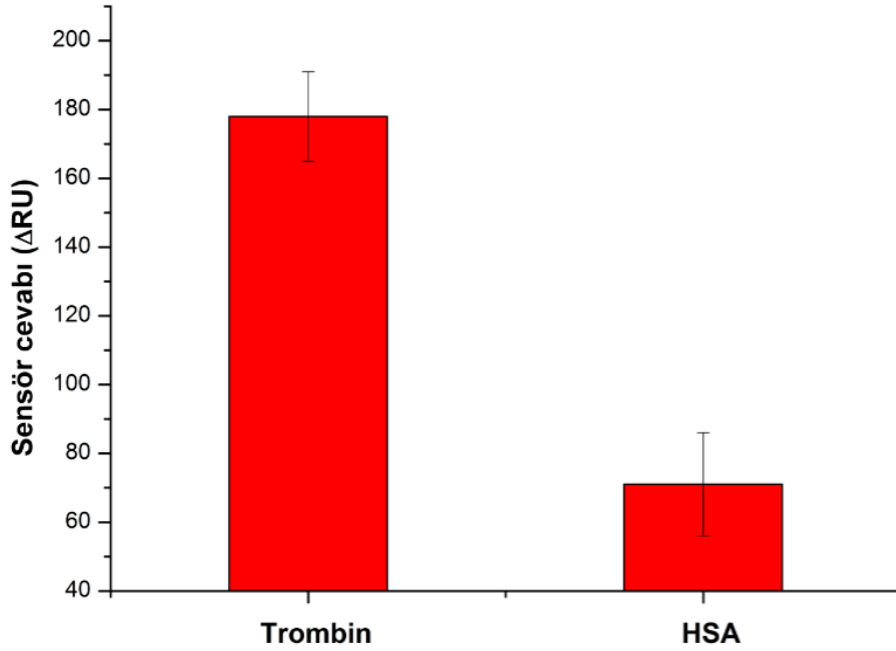


Şekil 4.14. Trombin aptamer sensörünün 0.0-150.0 nM aralığındaki konsantrasyonlarda trombine verdiği sensör cevabı (n=3).



### 4.3.3. Trombin Aptamer Sensörünün Seçiciliğinin Belirlenmesi

Aynı prosedür (bölüm 4.3.1) ile trombin aptamerinin yüzeye immobilizasyonu sonrasında, geliştirilen biyosensörün seçiciliğinin belirlenmesi için, hedef molekül olan trombin yerine, aynı konsantrasyonda HSA'ya verdiği  $\Delta RU$  incelenmiş ve trombinden alınan  $\Delta RU$  ile karşılaştırılmıştır. Fizyolojik ortamda, trombin oluşum evrelerinden artış evresinde, 1-500 nM aralığında trombin konsantrasyonu değişmekte ve seçilen 50 nM konsantrasyon bu aralığa denk gelmektedir[9]. Serumda bulunan HSA, serum toplam proteinin yaklaşık %50'sini oluşturmakta ve seçilen 50 nM konsantrasyon HSA'nın serum içerisindeki gerçek konsantrasyonunu yansıtmamaktadır [183]. Ancak gerçekleştirilen seçicilik deneyi, geliştirilen biyosensörün aynı konsantrasyonda başka bir protein olan HSA ve hedef molekül olan trombine verdiği  $\Delta RU$ 'ların karşılaştırılması açısından önemlidir. 50.0 nM trombin bağlanması ve 50.0 nM HSA bağlanması ile oluşan  $\Delta RU$ 'ların karşılaştırılması Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

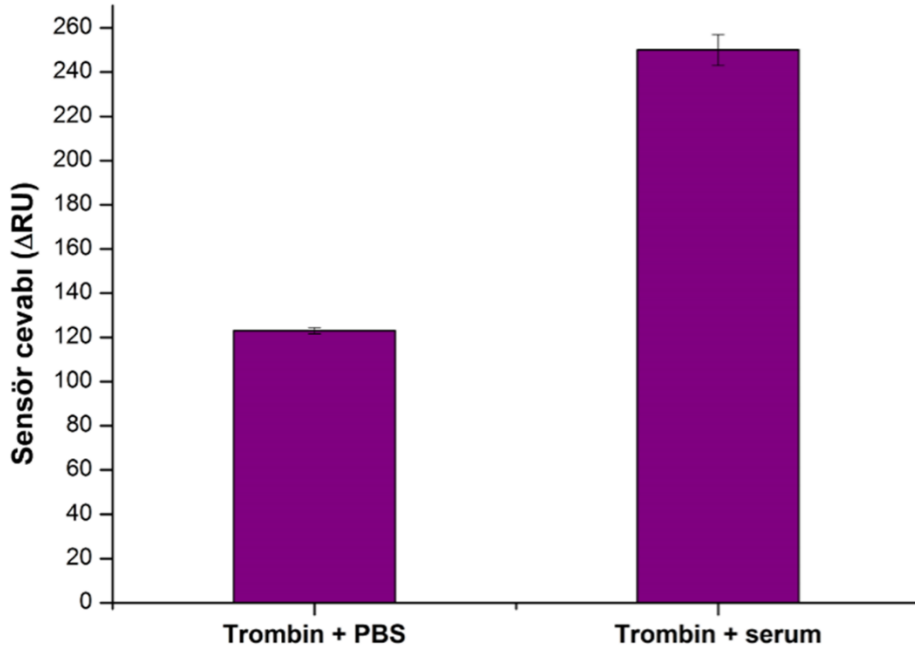


Şekil 4.15. 50.0 nM trombin ve 50.0 nM HSA bağlanması sonucunda trombin aptamer sensörü cevabındaki değişimler (n=3).

Trombin aptamer sensöründe, trombin için  $178 \pm 13$   $\Delta$ RU değerinde bir değişim görölürken, aynı miktarda HSA için  $71 \pm 15$   $\Delta$ RU elde edilmiştir. Beklenildiği üzere, geliştirilen biyosensör, HSA'ya kıyasla trombine seçicilik göstermektedir. Spesifik olmayarak HSA'nın az da olsa bağlandığı görölmektedir. Ancak bu değer trombin için elde edilen LOD ve LOQ değerlerine karşılık gelen  $\Delta$ RU'ların altında kalmakta olup, sensör başarısını etkilemediği düşünölmektedir.

#### **4.3.4. Trombin Aptamer Sensörünün Serum Örneklerinde Denenmesi**

Aptamer biyosensörünün gerçek örneklerdeki performansını incelemek için, serum örneklerinden alınan  $\Delta$ RU, aynı konsantrasyon trombin içeren PBS örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Öncelikle gerçek örneklerde serum matriksindeki bileşenlerin girişimini en aza indirmek için en uygun seyreltme koşulları incelenmiş ve serumun PBS ile seyreltme oranı 1:4 (Serum:PBS (1:4)) olarak belirlenmiştir. Santrifüj filtreden geçirilen serum örneklerine trombin eklenmiş ve son konsantrasyon 20.0 nM olacak şekilde PBS ile seyreltilmiştir. Sensör yüzeyi hazırlandıktan sonra PBS tampon çözeltisi ile taban çizgisi oluşturulmuş ve yüzeye gönderilmiştir. Aynı konsantrasyonda trombin içeren PBS tampon çözeltisinden alınan  $\Delta$ RU ve trombin eklenmiş serum örneklerinden alınan  $\Delta$ RU karşılaştırması Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



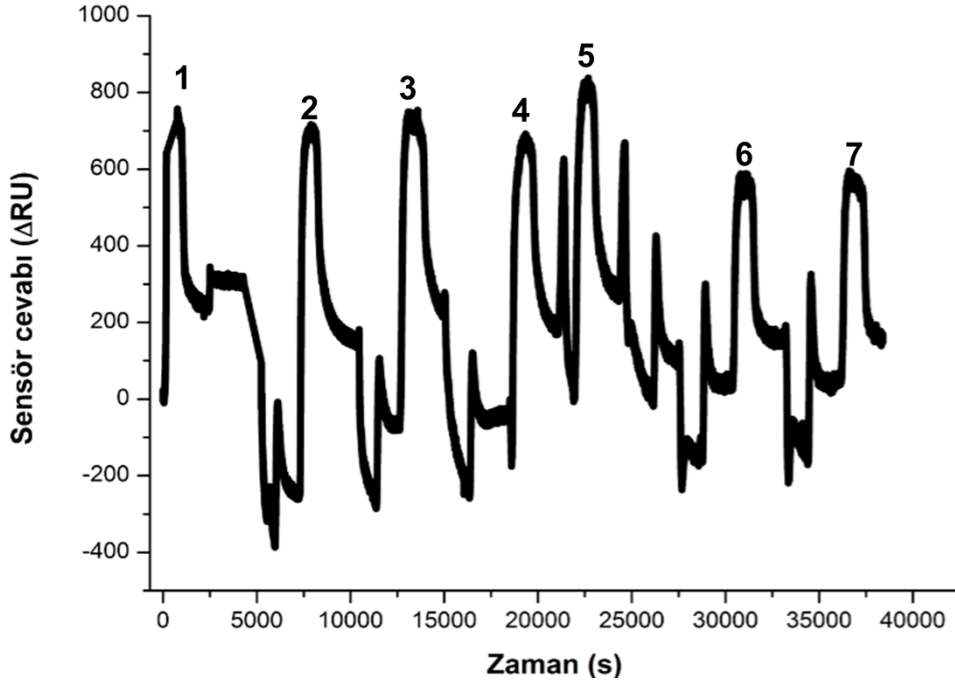
Şekil 4.16. Trombin aptamer sensörünün 20.0 nM trombin eklenmiş serum ve PBS örneklerine verdiği cevaplar (n=3).

Trombin eklenmiş serum örneğindeki  $\Delta RU$  ( $250 \pm 7$ ), PBS içerisinde hazırlanmış trombin çözeltisinden alınan  $\Delta RU$  ( $123 \pm 1$ )' dan daha fazla çıkmıştır. Bu sonuç, serum içerisinde bulunan proteinlerin, spesifik olmayan bir şekilde sensör yüzeyine bağlandığını göstermektedir. Serum örnekleri cut-off değeri 100 KDa olan filtreden geçirilmiştir. Bu yüzden 100 KDa ve üzerindeki moleküler ağırlığa sahip fibrinojen ve yüksek moleküler ağırlıklı globulinler, filtre üzerinde kalmaktadır. Ancak HSA ve hemoglobin gibi 66-67 kDa ağırlığındaki proteinler, filtreden geçerek serum içerisine aktarılmaktadır. Serum örnekleri daha sonra 1:4 oranında PBS ile seyreltilmiştir. Ancak HSA ve hemoglobin gibi proteinlerin yüzeye spesifik olmayarak bağlanmasının önüne geçilememiştir. Sensör yüzeyindeki karboksil gruplarının kapatılması için farklı blokasyon ajanlarının denenmesi ve blokasyon süresinin optimize edilmesinin spesifik olmayan bağlanmaları engelleyeceği düşünülmektedir.

#### 4.3.5. Trombin Aptamer Sensörünün Rejenerasyon Denemesi

Baldrich ve grubu tarafından, tiyol uçlu 15 bazlık 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' dizilimine sahip trombin aptamerin altın yüzeylere immobilizasyonu sonrasında oluşturulan biyosensörde, trombin aptamerinin trombinden ayrılması ve sensör

yüzeyinin tekrar kullanılabilmesi için, rejenerasyon çözeltileri olarak, 50 mM glycine, 0.05% w/v SDS ve 2 M NaCl olmak üzere üç farklı çözelti denenmiştir [48]. En etkili rejenerasyon çözeltisinin, 2 M NaCl olduğu görülmüştür. Yazarlar, bunun sebebini, 2M NaCl çözeltisinin, bu trombin aptamerinin yapısını bozmadan, trombin bağlanma çözeltisi rejenerasyon çözeltisi ile değiştirildiği anda, quadrupleks katlanmasının tekrar oluşmasına olanak vermesi ve trombini bağlamasını sağlaması olarak yorumlamışlardır. Ancak bu tez çalışması içerisinde aynı trombin aptameri ile geliştirilen biyosensörde, 2 M NaCl çözeltisi ile rejenerasyon sağlanamamıştır. Yüzey rejenerasyonu, 0.05% w/v SDS ile sağlanabilmiştir. Altın kaplı yüzeyin kimyasal aktivasyonu ve aptamer immobilizasyonu sonrasında 10 mM KCl, 50 mM NaCl 10 mM PBS (pH 7.4) ile taban çizgisi oluşturulmuştur. Santrifüj filtreden geçirilen serum örneklerine trombin eklenmiş ve son konsantrasyon 20.0 nM olacak şekilde 1:4 (Serum:PBS(1:4)) oranında, PBS ile seyreltilmiş ve yüzeye gönderilmiştir. Trombin bağlanmasından sonra aynı tampon çözeltisi ile yıkama gerçekleştirilmiş ve yüzeye 10 mM KCl, 50 mM NaCl 10 mM PBS (pH 7.4) içerisindeki %0.05 w/v SDS gönderilmiştir. Yüzeye tekrar 10 mM KCl, 50 mM NaCl 10 mM PBS (pH 7.4) gönderildiğinde, yüzeye immobilize edilen trombin aptamerinin, trombinden ayrıldığı ve  $\Delta RU$  sinyalinin aptamerin bağlandığı taban çizgisine geri döndüğü gözlemlenmiştir. Aynı çözelti içerisinde çözünen trombin tekrar gönderildiğinde, trombin aptamerinin trombine bağlandığı görülmüştür. Trombin aptamerinin trombine bağlanması sonucundaki  $\Delta RU$  beş devir boyunca sabit kalmış, beşinci devirden sonra  $\Delta RU$  'da azalma görülmüştür (Şekil 4.17).

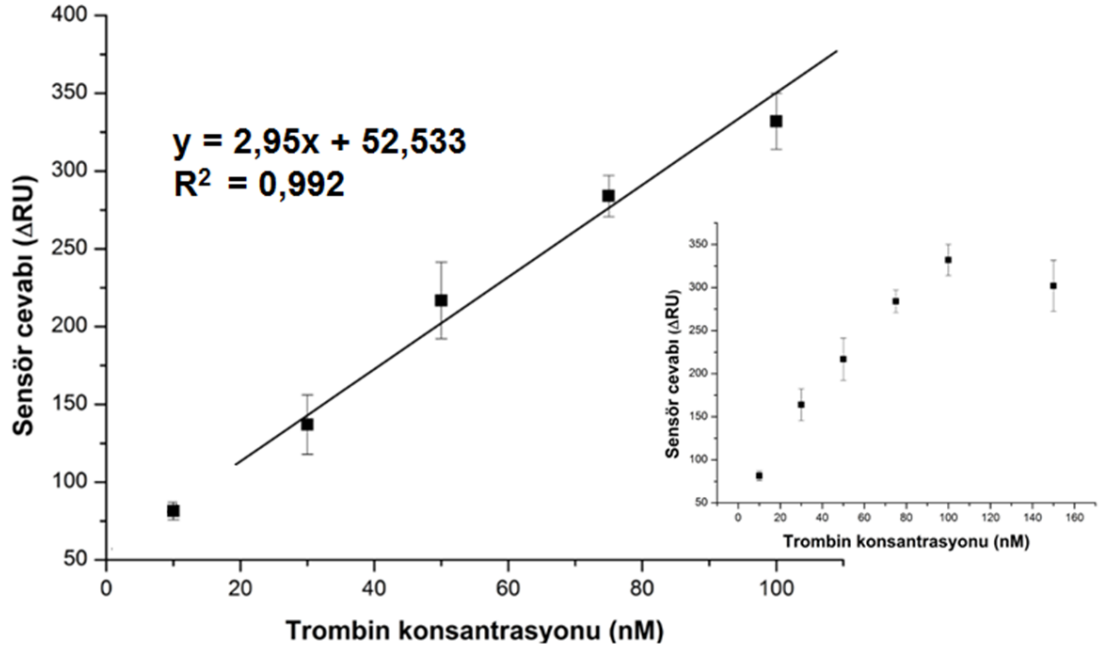


Şekil 4.17. 1) 1.Trombin enjeksiyonu 2) 2. Trombin enjeksiyonu 3) 3. Trombin enjeksiyonu 4) 4. Trombin enjeksiyonu 5) 5. Trombin enjeksiyonu 6) 6. Trombin enjeksiyonu 7) 7. Trombin enjeksiyonu

#### 4.3.6. Trombin Antikor Sensörü Performansının Test Edilmesi

Aynı prosedür (bölüm 4.3.1) kullanılarak, yüzeye bölüm 4.1.4'de belirlenen  $6.36 \times 10^{-6}$  M ( $0.4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) konsantrasyonunda trombin antikoruna gönderilmiş ve sensör yüzeyi hazırlanmıştır. Elde edilen biyosensörün farklı trombin konsantrasyonlarına olan  $\Delta\text{RU}$ , ayrı sensogramlarda elde edilmiş ve her sensogramdan elde edilen sonuçlardan kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

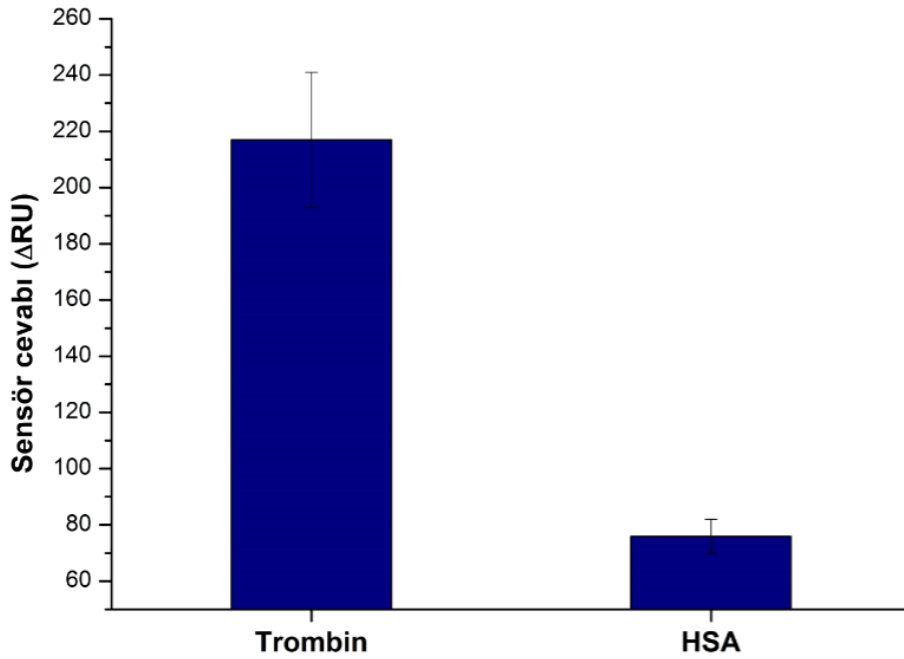
Trombin antikor sensörünün, 10.0-150.0 nM aralığındaki trombine verdiği  $\Delta\text{RU}$ , Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiği sonuçlarına göre, doğrusal aralığın, 22.0-100.0 nM arasında olduğu görülmüş ve  $R^2$  değeri 0,992 olarak hesaplanmıştır. 150.0 nM trombin konsantrasyonuna olan  $\Delta\text{RU}$ 'dan elde edilen standart sapmanın yüksek olması gözönüne alındığında, 150.0 nM trombin konsantrasyonunda sensör yüzeyinin doyumuna ulaştığı anlaşılmaktadır. Trombin antikor sensörünün LOD değeri 6.0 nM, LOQ değeri 22.0 nM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.18. Trombin antikor sensörünün 10.0-150.0 nM aralığındaki konsantrasyonlarda trombine verdiği sensör cevabı (n=3).

#### 4.3.7. Trombin Antikor Sensörünün Seçiciliğinin Belirlenmesi

Trombin antikorunun yüzeye immobilizasyonu sonrasında, geliştirilen biyosensörün seçiciliğinin belirlenmesi için, hedef molekül olan trombin yerine, başka bir proteine verdiği  $\Delta RU$  incelenmiş ve trombinden alınan  $\Delta RU$  ile karşılaştırılmıştır. 50.0 nM trombin bağlanması ve 50.0 nM HSA bağlanması ile oluşan  $\Delta RU$ 'ların karşılaştırması **Şekil 4.19**'de gösterilmiştir. Seçilen konsantrasyonların nedenleri bölüm 4.3.3'de açıklanmıştır.



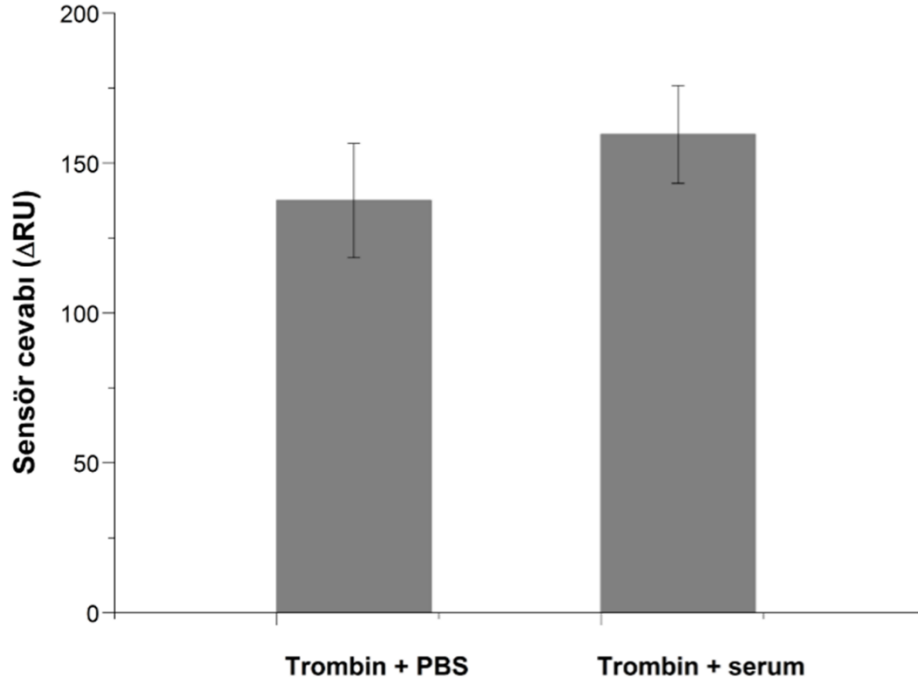
Şekil 4.19. 50.0 nM trombin ve 50.0 nM HSA bağlanması sonucunda trombin antikor sensörü cevabındaki değişimler (n=3).

Trombin antikor sensöründe, trombin için 217 ±24 ΔRU değerinde bir değişim gösterirken, aynı miktarda HSA için 76 ±7 ΔRU elde edilmiştir. Trombin aptamer sensörü ile benzer sonuçlar elde edilmiş ve trombin antikor sensörünün trombine seçicilik gösterdiği anlaşılmıştır. Spesifik olmayarak yüzeye az da olsa bağlanan HSA'dan alınan ΔRU, trombin antikor sensörünün LOD ve LOQ değerlerine karşılık gelen ΔRU 'lardan daha az olduğu görülmektedir.

#### 4.3.8. Trombin Antikor Sensörünün Serum Örneklerinde Denenmesi

Antikor biyosensörünün gerçek örneklerdeki performansını incelemek için, serum örneklerinden alınan ΔRU, aynı konsantrasyon trombin içeren PBS örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Öncelikle gerçek örneklerde serum matrisindeki bileşenlerin girişimini en aza indirmek için en uygun seyreltme koşulları incelenmiş ve serumun PBS ile seyreltme oranı 1:4 (Serum: PBS (1:4)) olarak belirlenmiştir. Santrifüj filtreden geçirilen serum örneklerine trombin eklenmiş ve son konsantrasyon 30.0 nM olacak şekilde PBS ile seyreltilmiştir. Sensör yüzeyi hazırlandıktan sonra PBS tampon çözeltisi ile taban çizgisi oluşturulmuş ve yüzeye gönderilmiştir. Aynı konsantrasyonda trombin içeren PBS tampon çözeltisinden

alınan  $\Delta RU$  ve trombin eklenmiş serum örneklerinden alınan  $\Delta RU$  karşılaştırması **Şekil 4.20**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Trombin antikor sensörünün 30.0 nM trombin eklenmiş serum ve PBS örneklerine verdiği cevaplar (n=3).

Trombin eklenmiş serum örneğindeki  $\Delta RU$  ( $159 \pm 16$ ) ile PBS içerisinde hazırlanmış trombin çözeltisinden alınan  $\Delta RU$  ( $137 \pm 19$ ) arasında fark görülmektedir. Antikor sensöründe, aptamer sensöründe olduğu gibi, serum içerisinde bulunan proteinler, spesifik olmayan bir şekilde sensör yüzeyine bağlanmaktadır. Bu sonucun bölüm 4.3.4'de tartışılan nedenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak bu farkın aptamer sensörüne göre daha az olduğu anlaşılmaktadır.

Her iki biyosensör için elde edilen veriler doğrultusunda, bir sonraki bölümde kıyaslamaları yapılmıştır.



#### 4.4. Trombin Biyosensörlerinin Karşılaştırması

Geliştirilen biyosensör özelliklerinin karşılaştırılması Çizelge 4.3 'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Trombin aptamer ve trombin antikor sensörünün karşılaştırılması

Sensör Özellikleri	Trombin Aptamer Sensörü		Trombin Antikor Sensörü	
LOD	9.5 nM		6.0 nM	
LOQ	30.0 nM		22.0 nM	
Doğrusal Aralık	0.0-20.0 nM (birinci bölge) 20.0-100.0 nM (ikinci bölge)		22.0-100.0 nM	
Seçicilik	Biyosensör yüzeyine gönderilen protein (50.0 nM)	Sensör cevabı ( $\Delta$ RU)	Biyosensör yüzeyine gönderilen protein (50.0 nM)	Sensör cevabı ( $\Delta$ RU)
	Trombin	178 $\pm$ 13	Trombin	217 $\pm$ 24
	HSA	71 $\pm$ 15	HSA	76 $\pm$ 7
Trombin eklenmiş PBS/Serum örneklerinden alınan sensör cevabı ( $\Delta$ RU)	PBS/serum örnekleri	Sensör cevabı ( $\Delta$ RU)	PBS/serum örnekleri	Sensör cevabı ( $\Delta$ RU)
	20.0nM Trombin + PBS	123 $\pm$ 1	30.0 nM Trombin + PBS	137 $\pm$ 19
	20.0nM Trombin + serum	250 $\pm$ 7	30.0 nM Trombin + serum	159 $\pm$ 16
Rejenerasyon özelliği	5 defa		-	

Trombin aptamer ve trombin antikor sensörleri karşılaştırıldığı zaman, LOD değerlerinin sırasıyla 9.5 nM ve 6.0 nM olduğu, LOQ değerlerinin ise sırasıyla 30.0

nM ve 22.0 nM olduğu görülmektedir. LOD ve LOQ değerleri kıyaslandığında, aradaki hassasiyet farkının fazla olmamasına rağmen, trombin antikor sensörü ile daha hassas ölçüm yapılabildiği anlaşılmaktadır. Trombin aptamer sensörü için doğrusal aralığın 0.0-20.0 nM ve 20.0-100.0 nM olmak üzere iki farklı bölgede olduğu görülmektedir. Trombin antikor sensörü için doğrusal aralığın 22.0-100.0 nM arasında olduğu görülmektedir.

Her iki biyosensörün de seçicilik performansları kıyaslandığı zaman, her iki biyosensörün HSA'ya verdiği  $\Delta$ RU'nun benzer olup (trombin aptamer sensörü;  $71 \pm 15 \Delta$ RU, trombin antikor sensörü;  $76 \pm 7 \Delta$ RU) LOD ve LOQ değerleri için alınan  $\Delta$ RU 'larının altında olduğu görülmekte (Şekil 4.14 ve Şekil 4.18) ve sensör başarısını etkilemediği düşünülmektedir. Çizelge 4.3'te de görüldüğü gibi, trombinden alınan  $\Delta$ RU'nun trombin antikor sensöründe, trombin aptamer sensörüne kıyasla % 20 daha fazla olduğu görülmüştür (trombin aptamer sensörü;  $178 \pm 13 \Delta$ RU, trombin antikor sensörü;  $217 \pm 24 \Delta$ RU). Antikor olarak poliklonal antikor kullanılmış olup, bu tip antikorun seçicilik gösterdiği antijenlerdeki farklı epitoplara bağlanabilme özelliği bulunmaktadır. Trombin aptamerine kıyasla trombin'e farklı bölgelerden bağlanabilen bu antikorun daha fazla trombin bağladığı ve bu sonuca sebep olduğu düşünülmektedir.

Her iki biyosensörün de trombin eklenmiş serum ve trombin eklenmiş PBS örneklerine verdiği  $\Delta$ RU değerleri kıyaslanmıştır. Trombin eklenmiş serum örneğindeki  $\Delta$ RU değeri trombin aptamer sensörü için,  $250 \pm 7$  olup, PBS içerisinde hazırlanmış trombin çözeltisinden alınan  $\Delta$ RU' dan ( $123 \pm 1$ ) iki kat daha fazla çıkmıştır. Trombin eklenmiş serum örneğindeki  $\Delta$ RU değeri trombin antikor sensörü için  $159 \pm 16$  olup, PBS içerisinde hazırlanmış trombin çözeltisinden alınan  $\Delta$ RU' dan ( $137 \pm 19$ ) daha fazla çıkmıştır. Ancak antikor sensöründen alınan  $\Delta$ RU'larda, trombin eklenmiş serum ve PBS örnekleri arasındaki farkın, aptamer sensörüne kıyasla daha az olduğu gözlemlenmiştir. Trombin antikor sensöründe trombin eklenmiş serum ve PBS örnekleri için alınan  $\Delta$ RU'lar, aptamer sensörüne kıyasla birbirlerine daha yakın olduğu için, trombin antikorunun trombin aptamerine göre, diğer proteinlerin olduğu serum matrisinde trombine daha fazla seçicilik gösterdiği düşünülmektedir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak, hem PBS çözeltisi içerisinde hem de kompleks serum matrisinde trombin tayini için, DSP:MCH (2.0:2.5) arayüzeyi ile hazırlanan

biyosensör sisteminde, antikorun, biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanımının, aptamer'e göre daha doğru bir tercih olduğu düşünülmektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Biyosensör performansını belirleyen en önemli iki parametre, hassasiyeti belirleyen biyolojik tanıyıcı ajanının çevirici yüzeye bağlanması için kullanılan immobilizasyon teknikleri ve seçiciliği belirleyen biyolojik tanıyıcı ajanıdır. Yapılan çalışmalarda, immobilizasyon tekniklerinin, spesifik olmayan bağlanmayı önleme, biyolojik tanıyıcı ajanının yüzeye bağlanma yoğunluğu ve hedef molekül bağlama kapasitesini artırması ve yüzey rejenerasyon kapasitesi açısından karşılaştırıldığı bilinmektedir. Benzer şekilde, seçilen biyolojik tanıyıcı ajanının büyüklüğüne bağlı olarak sekonder yapısının farklı olması, hedef moleküle olan afinitesi, hedef molekülün bağlanma bölgelerine erişimi, hedef moleküle bağlanma özelliğini etkilemektedir. Ayrıca biyolojik tanıyıcı ajanının seçiciliği, çözelti içinde ve hedef moleküle benzer yapıda olan moleküller varlığında hedef moleküle bağlanmasını belirlemektedir.

Bu tez çalışmasında, farklı fonksiyonlara sahip DSP ve MCH, aynı yüzeyde bir arada kullanılarak, mSAMS oluşturulmuştur. MCH immobilizasyonu sağlanarak, DSP molekülünün yüzeydeki yoğunluğu azaltılması hedeflenmiştir. Bu sayede ara bağlayıcı molekül olarak kullanılan DSP'nin, trombin aptameri/antikorunu kovalent olarak bağlayan fonksiyonel gruplarının, trombin aptameri/antikoruna olan erişimin artırılması hedeflenmiştir. Aynı zamanda trombin aptameri/antikorunun yüzey üzerindeki mesafelerini arttırarak hedef molekülü bağlama hassasiyetinin artırılması hedeflenmiştir. Oluşturulan yüzeyin sensör özelliğinin test edilmesi için trombin aptamer/antikorunun seçicilik gösterdiği trombin seçilmiştir. Trombin'e seçicilik gösteren 15-bazlık trombin aptameri ve trombin antikoru biyolojik tanıyıcı ajan olarak DSP:MCH karışımı ile hazırlanan arayüze bağlanmış ve geliştirilen sensörler karşılaştırılmıştır.

Artan DSP ve MCH konsantrasyonlarıyla hazırlanan yüzeylerin, sırasıyla BSA bağlamadaki artış ve azalışları,  $\Delta RU$  olarak gösterilmiştir. Sensogramlardan elde edilen verilerden sırasıyla en fazla ve en az BSA bağlanmaları 2.0 mM DSP ile modifiye yüzeylerde ve 20.0 mM MCH ile modifiye yüzeylerde olduğu gözlemlenmiştir. DSP modifikasyonu sonrasında yüzeyde NHS-karbonil gruplarının artması sonucu, daha fazla BSA bağlanması beklenen bir sonuçtur. Ancak 2.0 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda sterik engellemeye bağlı olarak BSA bağlanmasında bir düşme gözlemlenmiştir. Benzer şekilde  $-OH$  uç gruplarına sahip MCH'nin proteinleri yüzeyden uzaklaştırma özelliği sayesinde, artan MCH

konsantrasyonlarıyla modifiye olan yüzeylerde, BSA bağlanmasında bir azalış görülmüştür. En fazla ve en az BSA bağlanan DSP ve MCH konsantrasyonları temel alınarak, farklı DSP:MCH molar oranları belirlenmiş ve mSAMs oluşturulmuştur. Farklı DSP:MCH karışımları ile modifiye olan yüzeylerde en fazla BSA bağlanmasının 2.0 mM DSP: 2.5 mM MCH yüzeylerinde olduğu görülmüş, karışımda artan MCH konsantrasyonları ile BSA bağlanmasının azaldığı görülmüştür. Daha küçük bir molekül olan lizozim ile benzer sonuç gözlemlenmiştir. Ancak DSP:MCH (2.0:0) ve DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye yüzeylere protein bağlanma farkının lizozim kullanıldığı zaman daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuç, lizozimin daha küçük olmasına bağlı olarak, yüzeyde MCH'nin -OH gruplarını daha az kapatması sonucunda MCH'nin yüzeyde DSP'yi seyreltme özelliğini arttırarak, DSP:MCH (2.0:2.5) ile modifiye yüzeyde daha fazla protein bağlanması olarak yorumlanmıştır. Yüzeyde seyreltme ajanı olarak bilinen MCH ve MUA gibi moleküller, kısa zincirli olup, biyolojik tanıyıcı ajanları ya da ara bağlayıcı moleküller ile mSAMs oluşturmaktadırlar [12-14]. MCH'nin ara bağlayıcı moleküller ile birlikte kullanıldığı durumlarda, ara bağlayıcı molekülün biyolojik tanıyıcı ajanını bağlaması için EDC/NHS aktivasyonuna gerek duyulmuştur [12, 184]. Bu tez çalışması, MCH'nin, yapısındaki NHS-karbonil gruplarından dolayı, EDC/NHS aktivasyonuna gerek duymayan bir ara bağlayıcı molekülle mSAMs oluşturulan ilk çalışmadır. Ayrıca, DSP ve NHS-ester ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonlarında, enzim bağlanması ve AFM ile tek protein görüntüleme için yüzeyde DSP ve NHS-ester'leri seyreltmek için sırasıyla CH<sub>3</sub>-uçlu ve daha uzun alkantiyollar kullanılmıştır [120, 122, 123]. Ancak DSP'nin benzer zincir uzunluğunda kısa zincirli -OH uçlu seyreltme ajanı ile kullanılmasına literatürde rastlanılmamıştır.

Başka bir çalışmada, -COOH uçlu MUA molekülü farklı zincir uzunluklarında alkantiyollarla mSAMs oluşturmuş ve protein A bağlanma kapasiteleri karşılaştırılmıştır [116]. Benzer zincir uzunluklarına sahip -COOH uçlu MUA ve -OH uçlu MCU ile mSAMs oluşturulması sonucunda, -COOH grubunun -OH grubu ile yakın mesafede olmasından ve -OH grubu ile hidrojen bağı oluşturmasından dolayı, -COOH grubunun deprotonasyonu gerçekleşmiştir. Bunun sonucunda -COOH grubunun reaktivitesi azalmış ve EDC/NHS aktivasyonu gerçekleşememiş ve kovalent olarak protein bağlanması azalmıştır. Bu sebeple, çalışmanın başında

benzer zincir uzunluğunda olan DSP ve MCH'nun bir arada kullanılmasının bazı problemleri de beraberinde getirebileceği düşünülmüştür. Ancak bu iki molekül benzer zincir uzunluğunda olmalarına rağmen, MCH'nin –OH grupları, DSP'nin yapısı içerisinde bulunan NHS-ester'inin C=O gruplarına karşı reaktivite göstermemektedir. Buna ek olarak, protein bağlanması NHS karbonil grubu (C=O) ile gerçekleşmekte ve –OH gruplarına daha uzak mesafede bulunmaktadır. Bu düşünceye paralel olarak, alınan sonuçlar doğrultusunda, farklı DSP:MCH molar oranları ile gerçekleştirilen mSAMs ile DSP'nin protein bağlama kapasitesinin belli bir MCH konsantrasyonuna kadar arttığı, dolayısıyla MCH'nin seyreltme fonksiyonunu yapabildiği ve DSP'nin NHS karbonil (C=O) gruplarının, proteinlere karşı reaktif olduğu gösterilmiştir.

Yüzey modifikasyonu sonrasında, altın yüzey üzerinde DSP ve MCH moleküllerine ait fonksiyonel grupların varlığı, SAMs ve mSAMs yüzeylerde ATR-FTIR ve XPS ile karakterize edilmiş ve yüzeye kovalent olarak bağlandıkları XPS ile doğrulanmıştır. Farklı yüzeylerin AFM görüntüleri ile, altın yüzey, DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs ve BSA bağlanmış DSP:MCH (2.0:2.5) mSAMs altın yüzey pürüzlülük dereceleri karşılaştırılmıştır.

En son aşamada, en fazla protein bağlanan DSP:MCH (2.0:2.5) yüzeylere trombin antikoru veya trombin aptameri kovalent olarak bağlanmış ve geliştirilen YPR temelli sensör, trombin ile test edilmiştir.

Trombin tayini için daha önceden geliştirilen biyosensörlerde, kullanılan çevirici yüzey ve ölçüm şekli bağımsız olarak, biyolojik tanıyıcı ajan ve hedef molekülün etiketlenmeden gerçekleştirildiği ölçümlerde, LOD değerlerinin 2.0-50.0 nM arası değiştiği görülmüştür [139, 149, 150]. Trombin LOD'sini düşürmek için, farklı floresans, QD, MB gibi etiketlerin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Direk ölçüm formatı kullanılarak, biyolojik tanıyıcı ajanının ya da hedef molekülün etiketlenmesi ile LOD'si pM'dan düşük nM konsantrasyonlar arası değişen biyosensörler geliştirilmiştir [146, 147, 159, 161]. Optik biyosensörlerde, trombin LOD'sini düşürmek için, sandviç ölçüm formatı kullanılarak, altın nanopartiküllerin altın yüzeylerle elektromanyetik eşleşme sonrasında YPR sinyalini artırma, altın nanopartiküllerin farklı yapı ve boyutlarda LYPR dalgaboyu genişliği ve kayma miktarını değiştirme, altın nanopartiküllerin yüzey üzerinde kütle artışı sağlayarak YPR sinyalini artırma özelliklerinden faydalandığı görülmektedir [152, 153]. Bu

tip trombin biyosensörlerinde LOD değerinin 0.1 aM'a kadar düştüğü görülmüştür[154]. Sandviç ölçüm formatı kullanılarak renk değişimine bağlı ölçüm yapan başka bir trombin biyosensöründe ise LOD'si 20.0 pM olarak ölçülmüştür[168].

Bu tez kapsamında, yeni bir kimyasal modifikasyon ile sensör yüzeyi hazırlanmış, hazırlanan yüzeye bağlanan biyolojik tanıyıcı ajan ya da seçicilik gösterdiği hedef molekül etiketlenmeden, direk ölçüm formatı kullanılarak YPR temelli iki trombin biyosensörü geliştirilmiştir. Trombin aptamerinin biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanıldığı sensörde doğrusal aralık, 0.0-20.0 nM ve 20.0-100.0 nM olmak üzere iki ayrı bölgede görülmüştür. Trombin antikorun biyolojik tanıyıcı ajan olarak kullanıldığı sensörde ise doğrusal aralık 22.0-100.0 nM olarak belirlenmiştir. LOD değerleri, trombin aptamer sensörü için 9.5 nM olarak, trombin antikor sensörü için 6.0 nM olarak belirlenmiştir. LOQ değerleri ise, trombin aptamer sensörü için 30.0 nM olarak, trombin antikor sensöründe ise 22.0 nM olarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları ile, başka çalışmalardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması Çizelge 5.1'de gösterilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen biyosensörlerin LOD'lerinin, daha önce etiket kullanılmayarak geliştirilen biyosensörlerin LOD'leriyle karşılaştırıldığında benzer konsantrasyonlarda olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.1. Trombin deteksiyonu için geliştirilen biyosensörler

Hedef molekül	Aptamer /antikor	Deteksiyon formatı	Çevirici	Doğrusal aralık	LOD	Referans
Trombin	Aptamer	Etiketsiz deteksiyon (iki farklı yüzey)	YPR	-	2.5 nM-3 nM 5 nM-5.5 nM	[148]
Trombin	Aptamer	Etiketsiz deteksiyon	YPR	5 nM-1000 nM	5 nM	[149]
Trombin	Aptamer	Etiketsiz deteksiyon	YPR	-	25 nM (tampon çözelti) 50 nM (serum/tampon)	[150]
Trombin	Aptamer	Etiketsiz deteksiyon	Elektrokimyasal	5 nM-35 nM	2 nM	[160]
<b>Trombin</b>	<b>Aptamer</b>	<b>Etiketsiz deteksiyon</b>	<b>YPR</b>	<b>0-20 nM ve 20 nM-100 nM</b>	<b>9.5 nM</b>	<b>Bu çalışma</b>

<b>Trombin</b>	<b>Antikor</b>	<b>Etiketsiz deteksiyon</b>	<b>YPR</b>	<b>22 nM-100 nM</b>	<b>6.0 nM</b>	<b>Bu çalışma</b>
Trombin	AuNP/lusiferas enzimi	Etiketli deteksiyon	Biyolumin esans	8 nM-8000 nM	80 pM	[167]
Trombin	QD/avidin Aptamer-eşlenik DNA zinciri/biyotin	Etiketli deteksiyon	Elektroki myasal	2.7 aM-2.7 nM	2.7 aM	[165]
Trombin	QD/aptamer	Etiketli deteksiyon	Elektroki myasal	-	0.5 pM	[147]
Trombin	MB-Aptamer	Etiketli deteksiyon	Elektroki myasal	-	6.4 nM	[159]
Trombin	MB-Aptamer	Etiketli deteksiyon	Elektroki myasal	0-50.8 nM	11 nM	[161]
Trombin	Altın yüzey /aptamer (1) ve AgNP/aptamer (2)	Sandviç etiketli deteksiyon	Absorban s	-	20 pM	[168]
Trombin	AuNP /Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanohibrit / aptamer (1) ve glukoz etiketli aptamer (2)	Sandviç etiketli deteksiyon	LYPR	0.2 nM - 10 nM	0.2 nM	[151]
Trombin	QD-aptamer (1) QD-aptamer (2)	Sandviç etiketli deteksiyon	Floresans	5 nM- 500 nM	2.6 nM	[166]
Trombin	Altın yüzey /aptamer (1) ve AuNP/aptamer (2)	Sandviç etiketli deteksiyon	YPR	-	0.1 nM	[152]
Trombin	Altın yüzey /aptamer (1) ve altın nanoyapı/ aptamer (2)	Sandviç etiketli deteksiyon	YPR	-	1 aM-1fM	[153]
Trombin	Altın yüzey /antikor ve altın nanorod/ aptamer	Sandviç etiketli deteksiyon	YPR	0.1 aM- 2 aM	0.1 aM	[154]
Trombin	Altın yüzey /aptamer (1) ve primer dizilim/ aptamer (2)	Sandviç etiketli deteksiyon	YPR	-	0.1 pM	[155]
Trombin	Altın yüzey /aptamer (1) ve enzim etiketli/ aptamer (2)	Sandviç etiketli deteksiyon	Elektroki myasal	40 nM - 100 nM	10 nM	[139]
Trombin	Altın yüzey /antikor ve MB/aptamer	Sandviç etiketli deteksiyon	Elektroki myasal	1-60 nM	0.5 nM	[164]



Trombin	Aptamer-(1) Aptamer (2)	Sandviç etiketli deteksiyon	Elektroki myasal	-	80 nM	[162]
---------	----------------------------	--------------------------------	---------------------	---	-------	-------

Her iki sensörün de, LOD'lerinin daha düşük seviyelere düşürülmesi için, aynı arayüzey ile yeni ölçüm formatlarının denenmesi gerekmektedir. Antikor temelli veya aptamer temelli sensörde, sandviç ölçüm formatı ile yüzeye trombin bağlanmasından sonra, QD veya altın nanorod, altın küre gibi farklı altın nanoyapılarla ya da enzim ile etiketlenen aptamer/antikor çözeltilerinin yüzeye gönderilmesi ile LOD'sinin düşürüleceği düşünülmektedir.

Farklı biyolojik tanıyıcı ajanlarının, ölçüm formatlarının, kullanılan etiketlerin, LOD'leri ve doğrusal aralık üzerindeki etkileri daha önceki çalışmalar kapsamında araştırılmıştır. Ancak bugüne kadar yapılan çalışmalar kapsamında çok farklı mSAMS yüzeylerin yüzey özellikleri karakterize edilmiş olsa da, biyolojik tanıyıcı ajanlarının çevirici yüzeye bağlanması için kullanılan immobilizasyon yüzeylerinin çeşitliliğinde bir duraklama görülmektedir. Biyolojik tanıyıcı ajanın genellikle yüzeye doğrudan ya da en çok kullanılan MHA/karboksilmetil dekstran gibi EDC/NHS aktivasyonu gerektiren ara modifikasyonlar ile bağlandığı gözlemlenmiştir. Farklı arayüzeylerin denenmesi ve karşılaştırılması az sayıda çalışmada bulunmaktadır. Kullanılan immobilizasyon tekniklerinin hassasiyet üzerindeki etkisi düşünüldüğü zaman, bilinen ve sıklıkla kullanılan arayüzeyler ve immobilizasyon tekniklerinin, yeni geliştirilen arayüzeyler ile sensör uygulamalarında kıyaslanmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda, tez çalışmasında, DSP:MCH karışımı ile yeni bir arayüzey geliştirilmiş ve sensör performansı, literatürde model protein olarak bilinen trombin ile denenmiştir. Trombin'e seçicilik gösteren her iki biyosensörde de, nonspesifik bağlanmaların azaltılması için farklı yüzey kapatma ajanlarının kullanılması ya da farklı yüzey kapatma sürelerinin denenmesi ile farklı proteinlerin olduğu karmaşık serum matris ortamında seçicilik özelliğinin arttırılacağı düşünülmektedir. Bu arayüzeyin aynı zamanda başka biyolojik tanıyıcı ajan-hedef molekül etkileşimlerini incelemek amacıyla yeni biyosensörlerin geliştirilmesi için de kullanılabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] Wu, G. H.; Datar, R. H.; Hansen, K. M.; Thundat, T.; Cote, R. J.; Majumdar, A., Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers, *Nature Biotechnology*, 19, 856-860, **2001**.
- [2] Subramanian, A.; Oden, P. I.; Kennel, S. J.; Jacobson, K. B.; Warmack, R. J.; Thundat, T.; Doktycz, M. J., Glucose biosensing using an enzyme-coated microcantilever, *Applied Physics Letters*, 81, 385-387, **2002**.
- [3] Hansen, K. M.; Ji, H. F.; Wu, G. H.; Datar, R.; Cote, R.; Majumdar, A.; Thundat, T., Cantilever-based optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches, *Analytical Chemistry*, 73, 1567-1571, **2001**.
- [4] Tombelli, S.; Minunni, M.; Luzzi, E.; Mascini, M., Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein, *Bioelectrochemistry*, 67, 135-141, **2005**.
- [5] Zhang, B.; Dallo, S.; Peterson, R.; Hussain, S.; Weitao, T.; Ye, J. Y., Detection of anthrax lef with DNA-based photonic crystal sensors, *Journal of Biomedical Optics*, 16, 127006, **2011**.
- [6] Koch, S.; Wolf, H.; Danapel, C.; Feller, K. A., Optical flow-cell multichannel immunosensor for the detection of biological warfare agents, *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 779-784, **2000**.
- [7] Huntington, J. A., Molecular recognition mechanisms of thrombin, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3, 1861-1872, **2005**.
- [8] Brummel-Ziedins, K. E.; Vossen, C. Y.; Butenas, S.; Mann, K. G.; Rosendaal, F. R., Thrombin generation profiles in deep venous thrombosis, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3, 2497-2505, **2005**.
- [9] Shevchenko, Y.; Francis, T. J.; Blair, D. A.; Walsh, R.; DeRosa, M. C.; Albert, J., In situ biosensing with a surface plasmon resonance fiber grating aptasensor, *Analytical Chemistry*, 83, 7027-7034, **2011**.
- [10] Liss, M.; Petersen, B.; Wolf, H.; Prohaska, E., An aptamer-based quartz crystal protein biosensor, *Analytical Chemistry*, 74, 4488-4495, **2002**.
- [11] Gong, P.; Lee, C. Y.; Gamble, L. J.; Castner, D. G.; Grainger, D. W., Hybridization behavior of mixed DNA/alkylthiol monolayers on gold: characterization by surface plasmon resonance and <sup>32</sup>P radiometric assay, *Analytical Chemistry*, 78, 3326-3334, **2006**.

- [12] Tsai, W.-C.; Hsu, Y.-H., Development of a Surface Plasmon Resonance-Based DNA Sensor and Its Application for Screening DNA-Targeted Anticancer Drugs, *Analytical Letters*, 45, 1495-1505, **2012**.
- [13] Milkani, E.; Morais, S.; Lambert, C. R.; McGimpsey, W. G., Detection of oligonucleotide systematic mismatches with a surface plasmon resonance sensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 1217-1220, **2010**.
- [14] Kick, A.; Boensch, M.; Kummer, K.; Vyalikh, D. V.; Molodtsov, S. L.; Mertig, M., Controlling structural properties of self-assembled oligonucleotide-mercaptohexanol monolayers, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 172, 36-41, **2009**.
- [15] Monošík, R.; Stredánský, M.; Šturdík, E., Biosensors - classification, characterization and new trends, *Acta Chimica Slovaca*, 109-120, **2012**.
- [16] Thevenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors and Bioelectronics*, 16, 121-131, **2001**.
- [17] Eltzov, E.; Marks, R. S., Whole-cell aquatic biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 895-913, **2011**.
- [18] Feng, C.; Dai, S.; Wang, L., Optical aptasensors for quantitative detection of small biomolecules: a review, *Biosensors and Bioelectronics*, 59, 64-74, **2014**.
- [19] Holford, T. R.; Davis, F.; Higson, S. P., Recent trends in antibody based sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 34, 12-24, **2012**.
- [20] Balamurugan, S.; Obubuafo, A.; Soper, S. A.; Spivak, D. A., Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 1009-1021, **2008**.
- [21] Wang, P.; Xu, G.; Qin, L.; Xu, Y.; Li, Y.; Li, R., Cell-based biosensors and its application in biomedicine, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108, 576-584, **2005**.
- [22] Wright, K., *Antibodies (A laboratory Manual): By E Harlow and D Lane. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. Headington Hill Hall: Vol. 17;1989*.
- [23] Puttharugsa, C.; Wangkam, T.; Huangkamhang, N.; Gajanandana, O.; Himananto, O.; Sutapun, B.; Amarit, R.; Somboonkaew, A.; Sriksirin, T., Development of surface plasmon resonance imaging for detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) using specific monoclonal antibody, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 2341-2346, **2011**.

- [24] Then, W. L.; Aguilar, M. I.; Garnier, G., Quantitative blood group typing using surface plasmon resonance, *Biosensors and Bioelectronics*, 73, 79-84, **2015**.
- [25] Zhang, C. Y.; Johnson, L. W., Single quantum-dot-based aptameric nanosensor for cocaine, *Analytical Chemistry*, 81, 3051-3055, **2009**.
- [26] Kim, G. I.; Kim, K. W.; Oh, M. K.; Sung, Y. M., The detection of platelet derived growth factor using decoupling of quencher-oligonucleotide from aptamer/quantum dot bioconjugates, *Nanotechnology*, 20, 175503, **2009**.
- [27] Chang, H.; Tang, L.; Wang, Y.; Jiang, J.; Li, J., Graphene fluorescence resonance energy transfer aptasensor for the thrombin detection, *Analytical Chemistry*, 82, 2341-2346, **2010**.
- [28] Trevino, J.; Calle, A.; Rodriguez-Frade, J. M.; Mellado, M.; Lechuga, L. M., Determination of human growth hormone in human serum samples by surface plasmon resonance immunoassay, *Talanta*, 78, 1011-1016, **2009**.
- [29] Fernandez, F.; Hegnerova, K.; Piliarik, M.; Sanchez-Baeza, F.; Homola, J.; Marco, M. P., A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1231-1238, **2010**.
- [30] Fernandez, F.; Pinacho, D. G.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M. P., Portable surface plasmon resonance immunosensor for the detection of fluoroquinolone antibiotic residues in milk, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5036-5043, **2011**.
- [31] Jiang, X.; Waterland, M.; Blackwell, L.; Wu, Y.; Jayasundera, K. P.; Partridge, A., Sensitive determination of estriol-16-glucuronide using surface plasmon resonance sensing, *Steroids*, 74, 819-824, **2009**.
- [32] Hu, C.; Gan, N.; Chen, Y.; Bi, L.; Zhang, X.; Song, L., Detection of microcystins in environmental samples using surface plasmon resonance biosensor, *Talanta*, 80, 407-410, **2009**.
- [33] Suherman; Morita, K.; Kawaguchi, T., Highly selective and sensitive detection of  $\beta$ -agonists using a surface plasmon resonance sensor based on an alkanethiol monolayer functionalized on a Au surface, *Biosensors and Bioelectronics*, 67, 356-363, **2015**.
- [34] Wang, G.; Wang, Y.; Chen, L.; Choo, J., Nanomaterial-assisted aptamers for optical sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 1859-1868, **2010**.

- [35] Chen, R. J.; Zhang, Y.; Wang, D.; Dai, H., Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization, *Journal of the American Chemical Society*, 123, 3838-3839, **2001**.
- [36] Chen, R. J.; Bangsaruntip, S.; Drouvalakis, K. A.; Kam, N. W.; Shim, M.; Li, Y.; Kim, W.; Utz, P. J.; Dai, H., Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4984-4989, **2003**.
- [37] Yoon, H.; Lee, S. H.; Kwon, O. S.; Song, H. S.; Oh, E. H.; Park, T. H.; Jang, J., Polypyrrole nanotubes conjugated with human olfactory receptors: high-performance transducers for FET-type bioelectronic noses, *Angewandte Chemie International Edition England*, 48, 2755-2758, **2009**.
- [38] Lee, W.; Oh, B.-K.; Lee, W. H.; Choi, J.-W., Immobilization of antibody fragment for immunosensor application based on surface plasmon resonance, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40, 143-148, **2005**.
- [39] Zhai, J.; Cui, H.; Yang, R., DNA based biosensors, *Biotechnology Advances*, 15, 43-58, **1997**.
- [40] Karamollaoğlu, İ.; Öktem, H. A.; Mutlu, M., QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs), *Biochemical Engineering Journal*, 44, 142-150, **2009**.
- [41] Mariotti, E.; Minunni, M.; Mascini, M., Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection, *Analytica Chimica Acta*, 453, 165-172, **2002**.
- [42] François, H.; Natalija, B.; Wilfried, G.; Martin, H.; Christoph, G.; Hans Peter, L., Analyzing Gene Expression Using Combined Nanomechanical Cantilever Sensors, *Journal of Physics: Conference Series*, 61, 450-453, **2007**.
- [43] Clark, S. L.; Remcho, V. T., Aptamers as analytical reagents, *Electrophoresis*, 23, 1335-1340, **2002**.
- [44] Macaya, R. F.; Schultze, P.; Smith, F. W.; Roe, J. A.; Feigon, J., Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 3745-3749, **1993**.
- [45] Hianik, T.; Ostatna, V.; Zajacova, Z.; Stoikova, E.; Evtugyn, G., Detection of aptamer-protein interactions using QCM and electrochemical indicator methods, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 291-295, **2005**.

- [46] Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D., Homogeneous assays using aptamers, *Analyst*, 136, 257-274, **2011**.
- [47] Bock, L. C.; Griffin, L. C.; Latham, J. A.; Vermaas, E. H.; Toole, J. J., Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, *Nature*, 355, 564-566, **1992**.
- [48] Baldrich, E.; Restrepo, A.; O'Sullivan, C. K., Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance, *Analytical Chemistry*, 76, 7053-7063, **2004**.
- [49] Marathias, V. M.; Bolton, P. H., Determinants of DNA quadruplex structural type: sequence and potassium binding, *Biochemistry*, 38, 4355-4364, **1999**.
- [50] Mutlu, M., *Biosensors in Food Processing, Safety, and Quality Control*. CRC Press; **2016**.
- [51] Homola, J., Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 528-539, **2003**.
- [52] Cullen, D. C.; Sethi, R. S.; Lowe, C. R., Multi-analyte miniature conductance biosensor, *Analytica Chimica Acta*, 231, 33-40, **1990**.
- [53] Thevenot, D. R.; Tóth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S., Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification, *Pure and Applied Chemistry*, 71, 2333-2348, **1999**.
- [54] Ligler, F. S., Perspective on optical biosensors and integrated sensor systems, *Analytical Chemistry*, 81, 519-526, **2009**.
- [55] Fan, X.; White, I. M.; Shopova, S. I.; Zhu, H.; Suter, J. D.; Sun, Y., Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review, *Analytica Chimica Acta*, 620, 8-26, **2008**.
- [56] Hong, P.; Li, W.; Li, J., Applications of Aptasensors in Clinical Diagnostics, *Sensors*, 12, 1181-1193, **2012**.
- [57] Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D., Optical detection systems using immobilized aptamers, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 3725-3736, **2011**.
- [58] Hoa, X. D.; Kirk, A. G.; Tabrizian, M., Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress, *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 151-160, **2007**.
- [59] Guo, X., Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review, *Journal of Biophotonics*, 5, 483-501, **2012**.

- [60] Haes, A. J.; Van Duyne, R. P., A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 920-930, **2004**.
- [61] Nelson, K. E.; Gamble, L.; Jung, L. S.; Boeckl, M. S.; Naeemi, E.; Golledge, S. L.; Sasaki, T.; Castner, D. G.; Campbell, C. T.; Stayton, P. S., Surface Characterization of Mixed Self-Assembled Monolayers Designed for Streptavidin Immobilization, *Langmuir*, 17, 2807-2816, **2001**.
- [62] Azzam, E. M. S.; Bashir, A.; Shekhah, O.; Alawady, A. R. E.; Birkner, A.; Grunwald, C.; Wöll, C., Fabrication of a surface plasmon resonance biosensor based on gold nanoparticles chemisorbed onto a 1,10-decanedithiol self-assembled monolayer, *Thin Solid Films*, 518, 387-391, **2009**.
- [63] Pham, T.; Jackson, J. B.; Halas, N. J.; Lee, T. R., Preparation and characterization of gold nanoshells coated with self-assembled monolayers, *Langmuir*, 18, 4915-4920, **2002**.
- [64] Porter, L. A.; Ji, D.; Westcott, S. L.; Graupe, M.; Czernuszewicz, R. S.; Halas, N. J.; Lee, T. R., Gold and Silver Nanoparticles Functionalized by the Adsorption of Dialkyl Disulfides, *Langmuir*, 14, 7378-7386 **1998**.
- [65] Szafranski, C. A.; Tanner, W.; Laibinis, P. E.; Garrell, R. L., Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Aromatic Thiols and Disulfides on Gold Electrodes, *Langmuir*, 14, 3570-3579, **1998**.
- [66] Trevino, J.; Calle, A.; Rodriguez-Frade, J. M.; Mellado, M.; Lechuga, L. M., Surface plasmon resonance immunoassay analysis of pituitary hormones in urine and serum samples, *Clinica Chimica Acta*, 403, 56-62, **2009**.
- [67] Herranz, S.; Bockova, M.; Marazuela, M. D.; Homola, J.; Moreno-Bondi, M. C., An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 2625-2634, **2010**.
- [68] Zavali, M.; Petrou, P. S.; Goustouridis, D.; Raptis, I.; Misiakos, K.; Kakabakos, S. E., A regenerable flow-through affinity sensor for label-free detection of proteins and DNA, *Journal of Chromatography B*, 878, 237-242, **2010**.
- [69] Gutierrez-Aguirre, I.; Hodnik, V.; Glais, L.; Rugar, M.; Jacquot, E.; Anderluh, G.; Ravnikar, M., Surface plasmon resonance for monitoring the interaction of Potato virus Y with monoclonal antibodies, *Analytical Biochemistry*, 447, 74-81, **2014**.

- [70] Frasconi, M.; Mazzarino, M.; Botre, F.; Mazzei, F., Surface plasmon resonance immunosensor for cortisol and cortisone determination, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 2151-2159, **2009**.
- [71] Gouzy, M. F.; Kess, M.; Kramer, P. M., A SPR-based immunosensor for the detection of isoproturon, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 1563-1568, **2009**.
- [72] Kumbhat, S.; Sharma, K.; Gehlot, R.; Solanki, A.; Joshi, V., Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52, 255-259, **2010**.
- [73] Zhu, G.; Yang, B.; Jennings, R. N., Quantitation of basic fibroblast growth factor by immunoassay using BIAcore 2000, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 281-290, **2000**.
- [74] Pfliegerl, K.; Hahn, R.; Schallaun, E.; Josic, D.; Jungbauer, A., Quantification of plasma-derived blood coagulation factor VIII by real-time biosensor measurements, *Journal of Chromatography B*, 752, 335-347, **2001**.
- [75] Dillon, P. P.; Killard, A. J.; Daly, S. J.; Leonard, P.; O'Kennedy, R., Novel assay format permitting the prolonged use of regeneration-based sensor chip technology, *Journal of Immunological Methods*, 296, 77-82, **2005**.
- [76] Kausaite-Minkstiniene, A.; Ramanaviciene, A.; Kirlyte, J.; Ramanavicius, A., Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor, *Analytical Chemistry*, 82, 6401-6408, **2010**.
- [77] Mizuta, Y.; Onodera, T.; Singh, P.; Matsumoto, K.; Miura, N.; Toko, K., Development of an oligo(ethylene glycol)-based SPR immunosensor for TNT detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 191-197, **2008**.
- [78] Hirlekar Schmid, A.; Stanca, S. E.; Thakur, M. S.; Thampi, K. R.; Raman Suri, C., Site-directed antibody immobilization on gold substrate for surface plasmon resonance sensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 113, 297-303, **2006**.
- [79] Strehlitz, B.; Nikolaus, N.; Stoltenburg, R., Protein Detection with Aptamer Biosensors, *Sensors (Basel)*, 8, 4296-4307, **2008**.
- [80] Kim, Y. H.; Kim, J. P.; Han, S. J.; Sim, S. J., Aptamer biosensor for label-free detection of human immunoglobulin E based on surface plasmon resonance, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 139, 471-475, **2009**.
- [81] Lee, S. J.; Youn, B. S.; Park, J. W.; Niazi, J. H.; Kim, Y. S.; Gu, M. B., ssDNA aptamer-based surface plasmon resonance biosensor for the detection of retinol



binding protein 4 for the early diagnosis of type 2 diabetes, *Analytical Chemistry*, 80, 2867-2873, **2008**.

[82] Kim, D.-K.; Kerman, K.; Hiep, H. M.; Saito, M.; Yamamura, S.; Takamura, Y.; Kwon, Y.-S.; Tamiya, E., Label-free optical detection of aptamer–protein interactions using gold-capped oxide nanostructures, *Analytical Biochemistry*, 379, 1-7, **2008**.

[83] Lee, S.; Kim, Y. S.; Jo, M.; Jin, M.; Lee, D. K.; Kim, S., Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358, 47-52, **2007**.

[84] Hwang, J.; Fauzi, H.; Fukuda, K.; Sekiya, S.; Kakiuchi, N.; Shimotohno, K.; Taira, K.; Kusakabe, I.; Nishikawa, S., The RNA aptamer-binding site of hepatitis C virus NS3 protease, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279, 557-562, **2000**.

[85] Altintas, Z.; Uludag, Y.; Gurbuz, Y.; Tothill, I., Development of surface chemistry for surface plasmon resonance based sensors for the detection of proteins and DNA molecules, *Analytica Chimica Acta*, 712, 138-144, **2012**.

[86] Ko, S.; Park, T. J.; Kim, H. S.; Kim, J. H.; Cho, Y. J., Directed self-assembly of gold binding polypeptide-protein A fusion proteins for development of gold nanoparticle-based SPR immunosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 2592-2597, **2009**.

[87] Nam, J. M.; Thaxton, C. S.; Mirkin, C. A., Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins, *Science*, 301, 1884-1886, **2003**.

[88] Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M., Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, *Chemical Reviews*, 105, 1103-1170, **2005**.

[89] Cheng, A. K. H.; Su, H.; Wang, Y. A.; Yu, H.-Z., Aptamer-Based Detection of Epithelial Tumor Marker Mucin 1 with Quantum Dot-Based Fluorescence Readout, *Analytical Chemistry*, 81, 6130-6139, **2009**.

[90] Turhan, A. B.; Ataman, D.; Sen, Y.; Mutlu, M.; Özbay, E., Nanofabrication and plasma polymerization assisted surface modification of a transducer based on localized surface plasmon resonance of gold nanostructure arrays for biosensor applications, *Journal of Nanophotonics*, 6, 061602-1-061602-12, **2012**.

- [91] Park, T. J.; Hyun, M. S.; Lee, H. J.; Lee, S. Y.; Ko, S., A self-assembled fusion protein-based surface plasmon resonance biosensor for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome, *Talanta*, 79, 295-301, **2009**.
- [92] Darder, M.; Takada, K.; Pariente, F.; Lorenzo, E.; Abruña, H. D., Dithiobissuccinimidyl Propionate as an Anchor for Assembling Peroxidases at Electrodes Surfaces and Its Application in a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Biosensor, *Analytical Chemistry*, 71, 5530-5537, **1999**.
- [93] Arya, S. K.; Chornokur, G.; Venugopal, M.; Bhansali, S., Dithiobis(succinimidyl propionate) modified gold microarray electrode based electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of cortisol, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 2296-2301, **2010**.
- [94] Whitesides, G. M.; Laibinis, P. E., Wet chemical approaches to the characterization of organic surfaces: self-assembled monolayers, wetting, and the physical-organic chemistry of the solid-liquid interface, *Langmuir*, 6, 87-96, **1990**.
- [95] Bain, C. D.; Whitesides, G. M., Formation of two-component surfaces by the spontaneous assembly of monolayers on gold from solutions containing mixtures of organic thiols, *Journal of the American Chemical Society*, 110, 6560-6561, **1988**.
- [96] Bain, C. D.; Whitesides, G. M., Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the length of the alkyl chain, *Journal of the American Chemical Society*, 111, 7164-7175, **1989**.
- [97] Bain, C. D.; Troughton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G., Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold, *Journal of the American Chemical Society*, 111, 321-335, **1989**.
- [98] Chaki, N. K.; Vijayamohan, K., Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 1-12, **2002**.
- [99] Castner, D. G.; Hinds, K.; Grainger, D. W., X-ray Photoelectron Spectroscopy Sulfur 2p Study of Organic Thiol and Disulfide Binding Interactions with Gold Surfaces, *Langmuir*, 12, 5083-5086, **1996**.
- [100] Biebuyck, H. A.; Bain, C. D.; Whitesides, G. M., Comparison of Organic Monolayers on Polycrystalline Gold Spontaneously Assembled from Solutions Containing Dialkyl Disulfides or Alkanethiols, *Langmuir*, 10, 1825-1831, **1994**.
- [101] Laibinis, P. E.; Whitesides, G. M.; Allara, D. L.; Tao, Y. T.; Parikh, A. N.; Nuzzo, R. G., Comparison of the Structures and Wetting Properties of Self-

Assembled Monolayers of Normal-Alkanethiols on the Coinage Metal-Surfaces, Cu, Ag, Au, *Journal of the American Chemical Society*, 113, 7152-7167, **1991**.

[102] Shen, C. H.; Lin, J. C., Surface characterization and platelet compatibility evaluation of binary mixed self-assembled monolayers containing novel sulfonic acid terminated alkanethiol, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 156-163, **2010**.

[103] Khassanov, A.; Steinruck, H. G.; Schmaltz, T.; Magerl, A.; Halik, M., Structural investigations of self-assembled monolayers for organic electronics: results from X-ray reflectivity, *Accounts of Chemical Research*, 48, 1901-1908, **2015**.

[104] Lee, C. Y.; Gong, P.; Harbers, G. M.; Grainger, D. W.; Castner, D. G.; Gamble, L. J., Surface coverage and structure of mixed DNA/alkylthiol monolayers on gold: characterization by XPS, NEXAFS, and fluorescence intensity measurements, *Analytical Chemistry*, 78, 3316-3325, **2006**.

[105] Tan, H.; Zhan, T.; Fan, W. Y., Direct functionalization of the hydroxyl group of the 6-mercapto-1-hexanol (MCH) ligand attached to gold nanoclusters, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 21690-21693, **2006**.

[106] Cheng, F.; Gamble, L. J.; Castner, D. G., XPS, TOF-SIMS, NEXAFS, and SPR characterization of nitrilotriacetic acid-terminated self-assembled monolayers for controllable immobilization of proteins, *Analytical Chemistry*, 80, 2564-2573, **2008**.

[107] Bain, C. D.; Evall, J.; Whitesides, G. M., Formation of Monolayers by the Coadsorption of Thiols on Gold - Variation in the Head Group, Tail Group, and Solvent, *Journal of the American Chemical Society*, 111, 7155-7164, **1989**.

[108] Nuzzo, R. G.; Allara, D. L., Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, 105, 4481-4483, **1983**.

[109] Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D., Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry, *Journal of the American Chemical Society*, 109, 3559-3568, **1987**.

[110] Chen, W.; Wee, A. T. S., Synchrotron PES and NEXAFS studies of self-assembled aromatic thiol monolayers on Au(1 1 1), *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 172, 54-63, **2009**.

- [111] Nuzzo, R. G.; Zegarski, B. R.; Dubois, L. H., Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on gold(111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, 109, 733-740, **1987**.
- [112] Nuzzo, R. G.; Fusco, F. A.; Allara, D. L., Spontaneously organized molecular assemblies. 3. Preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces, *Journal of the American Chemical Society*, 109, 2358-2368, **1987**.
- [113] Troughton, E. B.; Bain, C. D.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G.; Allara, D. L.; Porter, M. D., Monolayer films prepared by the spontaneous self-assembly of symmetrical and unsymmetrical dialkyl sulfides from solution onto gold substrates: structure, properties, and reactivity of constituent functional groups, *Langmuir*, 4, 365-385, **1988**.
- [114] Hamoudi, H.; Guo, Z.; Prato, M.; Dablemont, C.; Zheng, W. Q.; Bourguignon, B.; Canepa, M.; Esaulov, V. A., On the self assembly of short chain alkanedithiols, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10, 6836-6841, **2008**.
- [115] Medley, C. D.; Smith, J. E.; Tang, Z.; Wu, Y.; Bamrungsap, S.; Tan, W., Gold nanoparticle-based colorimetric assay for the direct detection of cancerous cells, *Analytical Chemistry*, 80, 1067-1072, **2008**.
- [116] Briand, E.; Salmain, M.; Compere, C.; Pradier, C. M., Immobilization of Protein A on SAMs for the elaboration of immunosensors, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53, 215-224, **2006**.
- [117] Grant, C. F.; Kanda, V.; Yu, H.; Bundle, D. R.; McDermott, M. T., Optimization of immobilized bacterial disaccharides for surface plasmon resonance imaging measurements of antibody binding, *Langmuir*, 24, 14125-14132, **2008**.
- [118] Peeters, S.; Stakenborg, T.; Reekmans, G.; Laureyn, W.; Lagae, L.; Van Aerschot, A.; Van Ranst, M., Impact of spacers on the hybridization efficiency of mixed self-assembled DNA/alkanethiol films, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 72-77, **2008**.
- [119] Sask, K. N.; Zhitomirsky, I.; Berry, L. R.; Chan, A. K.; Brash, J. L., Surface modification with an antithrombin-heparin complex for anticoagulation: studies on a model surface with gold as substrate, *Acta Biomaterialia*, 6, 2911-2919, **2010**.

- [120] Gamero, M.; Pariente, F.; Lorenzo, E.; Alonso, C., Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 2038-2044, **2010**.
- [121] Cabrita, J. F.; Abrantes, L. M.; Viana, A. S., N-Hydroxysuccinimide-terminated self-assembled monolayers on gold for biomolecules immobilisation, *Electrochimica Acta*, 50, 2117-2124, **2005**.
- [122] Hobara, D.; Uno, Y.; Kakiuchi, T., Immobilization of horseradish peroxidase on nanometer-scale domains of phase-separated binary self-assembled monolayers formed by coadsorption on Au(111), *BUNSEKI KAGAKU*, 51, 455-460, **2002**.
- [123] Yadavalli, V. K.; Forbes, J. G.; Wang, K., Functionalized self-assembled monolayers on ultraflat gold as platforms for single molecule force spectroscopy and imaging, *Langmuir*, 22, 6969-6976, **2006**.
- [124] Franchini, M.; Mannucci, P. M., Thrombin and cancer: from molecular basis to therapeutic implications, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 38, 95-101, **2012**.
- [125] Crawley, J. T.; Zanardelli, S.; Chion, C. K.; Lane, D. A., The central role of thrombin in hemostasis, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5 95-101, **2007**.
- [126] Davie, E. W.; Kulman, J. D., An overview of the structure and function of thrombin, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32 3-15, **2006**.
- [127] Li, C. Q.; Vindigni, A.; Sadler, J. E.; Wardell, M. R., Platelet glycoprotein Ib alpha binds to thrombin anion-binding exosite II inducing allosteric changes in the activity of thrombin, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 6161-6168, **2001**.
- [128] De Cristofaro, R.; De Candia, E.; Landolfi, R.; Rutella, S.; Hall, S. W., Structural and functional mapping of the thrombin domain involved in the binding to the platelet glycoprotein Ib, *Biochemistry*, 40, 13268-13273, **2001**.
- [129] Lippi, G.; Franchini, M.; Guidi, G. C., Diagnostic approach to inherited bleeding disorders, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45, 2-12, **2007**.
- [130] Deng, B.; Lin, Y.; Wang, C.; Li, F.; Wang, Z.; Zhang, H.; Li, X. F.; Le, X. C., Aptamer binding assays for proteins: the thrombin example--a review, *Analytical Chimica Acta*, 837, 1-15, **2014**.
- [131] Williams, A. D.; Portelius, E.; Kheterpal, I.; Guo, J.-t.; Cook, K. D.; Xu, Y.; Wetzel, R., Mapping A $\beta$  Amyloid Fibril Secondary Structure Using Scanning Proline Mutagenesis, *Journal of Molecular Biology*, 335, 833-842, **2004**.

- [132] Sokolova, E.; Reiser, G., Prothrombin/thrombin and the thrombin receptors PAR-1 and PAR-4 in the brain: localization, expression and participation in neurodegenerative diseases, *Thrombosis and Haemostasis*, 100, 576-581, **2008**.
- [133] Huang, Y. Q.; Li, J. J.; Hu, L.; Lee, M.; Karpatkin, S., Thrombin induces increased expression and secretion of VEGF from human FS4 fibroblasts, DU145 prostate cells and CHRF megakaryocytes, *Thrombosis and Haemostasis*, 86, 1094-1098, **2001**.
- [134] Snyder, K. M.; Kessler, C. M., The pivotal role of thrombin in cancer biology and tumorigenesis, *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 34, 734-741, **2008**.
- [135] Franchini, M.; Montagnana, M.; Targher, G.; Manzato, F.; Lippi, G., Pathogenesis, clinical and laboratory aspects of thrombosis in cancer, *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 24, 29-38, **2007**.
- [136] Huang, Y. Q.; Li, J. J.; Hu, L.; Lee, M.; Karpatkin, S., Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells, *Blood*, 99, 1646-1650, **2002**.
- [137] Duhamel-Clerin, E.; Orvain, C.; Lanza, F.; Cazenave, J. P.; Klein-Soyer, C., Thrombin receptor-mediated increase of two matrix metalloproteinases, MMP-1 and MMP-3, in human endothelial cells, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17, 1931-1938, **1997**.
- [138] Tasset, D. M.; Kubik, M. F.; Steiner, W., Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes, *Journal of Molecular Biology*, 272, 688-698, **1997**.
- [139] Ikebukuro, K.; Kiyohara, C.; Sode, K., Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2168-2172, **2005**.
- [140] Kong, D.-M.; Xu, J.; Shen, H.-X., Positive Effects of ATP on G-Quadruplex-Hemin DNAzyme-Mediated Reactions, *Analytical Chemistry*, 82, 6148-6153, **2010**.
- [141] Hamaguchi, N.; Ellington, A.; Stanton, M., Aptamer Beacons for the Direct Detection of Proteins, *Analytical Biochemistry*, 294, 126-131, **2001**.
- [142] Li, J. J.; Fang, X.; Tan, W., Molecular Aptamer Beacons for Real-Time Protein Recognition, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292, 31-40, **2002**.
- [143] Wang, W.; Chen, C.; Qian, M.; Zhao, X. S., Aptamer biosensor for protein detection using gold nanoparticles, *Analytical Biochemistry*, 373, 213-219, **2008**.

- [144] Mir, M.; Vreeke, M.; Katakis, I., Different strategies to develop an electrochemical thrombin aptasensor, *Electrochemistry Communications*, 8, 505-511, **2006**.
- [145] Potyrailo, R. A.; Conrad, R. C.; Ellington, A. D.; Hieftje, G. M., Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors, *Analytical Chemistry*, 70, 3419-3425, **1998**.
- [146] Lee, M.; Walt, D. R., A Fiber-Optic Microarray Biosensor Using Aptamers as Receptors, *Analytical Biochemistry*, 282, 142-146, **2000**.
- [147] Hansen, J. A.; Wang, J.; Kawde, A. N.; Xiang, Y.; Gothelf, K. V.; Collins, G., Quantum-dot/aptamer-based ultrasensitive multi-analyte electrochemical biosensor, *Journal of the American Chemical Society*, 128, 2228-2229, **2006**.
- [148] Polonschii, C.; David, S.; Tombelli, S.; Mascini, M.; Gheorghiu, M., A novel low-cost and easy to develop functionalization platform. Case study: aptamer-based detection of thrombin by surface plasmon resonance, *Talanta*, 80, 2157-2164, **2010**.
- [149] Zheng, R.; Park, B. W.; Kim, D. S.; Cameron, B. D., Development of a highly specific amine-terminated aptamer functionalized surface plasmon resonance biosensor for blood protein detection, *Biomedical Optics Express*, 2, 2731-2740, **2011**.
- [150] Mani, R. J.; Dye, R. G.; Snider, T. A.; Wang, S.; Clinkenbeard, K. D., Bi-cell surface plasmon resonance detection of aptamer mediated thrombin capture in serum, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4832-4836, **2011**.
- [151] Yan, J.; Wang, L.; Tang, L.; Lin, L.; Liu, Y.; Li, J., Enzyme-guided plasmonic biosensor based on dual-functional nanohybrid for sensitive detection of thrombin, *Biosensors and Bioelectronics*, 70, 404-410, **2015**.
- [152] Bai, Y.; Feng, F.; Zhao, L.; Wang, C.; Wang, H.; Tian, M.; Qin, J.; Duan, Y.; He, X., Aptamer/thrombin/aptamer-AuNPs sandwich enhanced surface plasmon resonance sensor for the detection of subnanomolar thrombin, *Biosensors and Bioelectronics*, 47, 265-270, **2013**.
- [153] Kwon, M. J.; Lee, J.; Wark, A. W.; Lee, H. J., Nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance detection of proteins at attomolar concentrations: comparing different nanoparticle shapes and sizes, *Analytical Chemistry*, 84, 1702-1707, **2012**.
- [154] Baek, S. H.; Wark, A. W.; Lee, H. J., Dual Nanoparticle Amplified Surface Plasmon Resonance Detection of Thrombin at Subattomolar Concentrations, *Analytical Chemistry*, 86, 9824-9829, **2014**.

- [155] He, P.; Liu, L.; Qiao, W.; Zhang, S., Ultrasensitive detection of thrombin using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensors by aptamer-based rolling circle amplification and nanoparticle signal enhancement, *Chemical Communications (Camb)*, 50, 1481-1484, **2014**.
- [156] Wang, L.; Zhu, C.; Han, L.; Jin, L.; Zhou, M.; Dong, S., Label-free, regenerative and sensitive surface plasmon resonance and electrochemical aptasensors based on graphene, *Chemical Communications (Camb)*, 47, 7794-7796, **2011**.
- [157] Chen, Y.; Nakamoto, K.; Niwa, O.; Corn, R. M., On-chip synthesis of RNA aptamer microarrays for multiplexed protein biosensing with SPR imaging measurements, *Langmuir*, 28, 8281-8285, **2012**.
- [158] Zhou, W. J.; Halpern, A. R.; Seefeld, T. H.; Corn, R. M., Near infrared surface plasmon resonance phase imaging and nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance phase imaging for ultrasensitive protein and DNA biosensing with oligonucleotide and aptamer microarrays, *Analytical Chemistry*, 84, 440-445, **2012**.
- [159] Xiao, Y.; Lubin, A. A.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W., Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor, *Angewandte Chemie International Edition England*, 44, 5456-5459, **2005**.
- [160] Radi, A. E.; Acero Sanchez, J. L.; Baldrich, E.; O'Sullivan, C. K., Reusable impedimetric aptasensor, *Analytical Chemistry*, 77, 6320-6323, **2005**.
- [161] Bang, G. S.; Cho, S.; Kim, B. G., A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 863-870, **2005**.
- [162] Mir, M.; Katakis, I., Aptamers as elements of bioelectronic devices, *Molecular BioSystems*, 3, 620-622, **2007**.
- [163] Xu, Y.; Yang, L.; Ye, X.; He, P.; Fang, Y., An Aptamer-Based Protein Biosensor by Detecting the Amplified Impedance Signal, *Electroanalysis*, 18, 1449-1456, **2006**.
- [164] Kang, Y.; Feng, K.-J.; Chen, J.-W.; Jiang, J.-H.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q., Electrochemical detection of thrombin by sandwich approach using antibody and aptamer, *Bioelectrochemistry*, 73, 76-81, **2008**.
- [165] Lu, L.; Li, J.; Kang, T.; Cheng, S., Bi-functionalized aptasensor for ultrasensitive detection of thrombin, *Talanta*, 138, 273-278, **2015**.



- [166] Yin, J.; Zhang, A.; Dong, C.; Ren, J., An aptamer-based single particle method for sensitive detection of thrombin using fluorescent quantum dots as labeling probes, *Talanta*, 144, 13-19, **2015**.
- [167] Chen, L.; Bao, Y.; Denstedt, J.; Zhang, J., Nanostructured bioluminescent sensor for rapidly detecting thrombin, *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 83-89, **2016**.
- [168] Zhao, Y.; Liu, X.; Li, J.; Qiang, W.; Sun, L.; Li, H.; Xu, D., Microfluidic chip-based silver nanoparticles aptasensor for colorimetric detection of thrombin, *Talanta*, 150, 81-87, **2016**.
- [169] Grubor, N. M.; Shinar, R.; Jankowiak, R.; Porter, M. D.; Small, G. J., Novel biosensor chip for simultaneous detection of DNA-carcinogen adducts with low-temperature fluorescence, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 547-556, **2004**.
- [170] Frey, B. L.; Corn, R. M., Covalent Attachment and Derivatization of Poly(L-lysine) Monolayers on Gold Surfaces As Characterized by Polarization-Modulation FT-IR Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 68, 3187-3193, **1996**.
- [171] Gultekinoglu, M.; Tunc Sarisozen, Y.; Erdogan, C.; Sagiroglu, M.; Aksoy, E. A.; Oh, Y. J.; Hinterdorfer, P.; Ulubayram, K., Designing of dynamic polyethyleneimine (PEI) brushes on polyurethane (PU) ureteral stents to prevent infections, *Acta Biomaterialia*, 21, 44-54, **2015**.
- [172] Tan, H.; Zhan, T.; Fan, W. Y., Direct functionalization of the hydroxyl group of the 6-mercapto-1-hexanol (MCH) ligand attached to gold nanoclusters, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 21690-21693, **2006**.
- [173] Hamwi, A.; Latouche, C.; Marchand, V.; Dupuis, J.; Benoit, R., Perfluorofullerenes: Characterization and structural aspects, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 57, 991-998, **1996**.
- [174] Lim, C. Y.; Owens, N. A.; Wampler, R. D.; Ying, Y.; Granger, J. H.; Porter, M. D.; Takahashi, M.; Shimazu, K., Succinimidyl ester surface chemistry: implications of the competition between aminolysis and hydrolysis on covalent protein immobilization, *Langmuir*, 30, 12868-12878, **2014**.
- [175] Rats, D.; Vandenbulcke, L.; Herbin, R.; Benoit, R.; Erre, R.; Serin, V.; Sevely, J., Characterization of diamond films deposited on titanium and its alloys, *Thin Solid Films*, 270, 177-183, **1995**.
- [176] Jiang, L.; Glidle, A.; Griffith, A.; McNeil, C. J.; Cooper, J. M., Characterising the formation of a bioelectrochemical interface at a self-assembled monolayer using

X-ray photoelectron spectroscopy, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 42, 15-23, **1997**.

[177] Gardner, S. D.; Singamsetty, C. S. K.; Booth, G. L.; He, G.-R.; Pittman, C. U., Surface characterization of carbon fibers using angle-resolved XPS and ISS, *Carbon*, 33, 587-595, **1995**.

[178] Delpoux, S.; Beguin, F.; Benoit, R.; Erre, R.; Manolova, N.; Rashkov, I., Fullerene core star-like polymers - 1. Preparation from fullerenes and monoazidopolyethers, *European Polymer Journal*, 34, 905-915, **1998**.

[179] Delamarche, E.; Sundarababu, G.; Biebuyck, H.; Michel, B.; Gerber, C.; Sigrist, H.; Wolf, H.; Ringsdorf, H.; Xanthopoulos, N.; Mathieu, H. J., Immobilization of antibodies on a photoactive self-assembled monolayer on gold, *Langmuir*, 12, 1997-2006, **1996**.

[180] Zhang, S.; Leem, G.; Lee, T. R., Monolayer-Protected Gold Nanoparticles Prepared Using Long-Chain Alkanethioacetates, *Langmuir*, 25, 13855-13860, **2009**.

[181] Volkert, A. A.; Subramaniam, V.; Ivanov, M. R.; Goodman, A. M.; Haes, A. J., Salt-mediated self-assembly of thioctic acid on gold nanoparticles, *ACS Nano*, 5, 4570-4580, **2011**.

[182] Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R., *Principles of Instrumental Analysis*. Thomson Brooks/Cole; **2007**.

[183] Schowen, R. L., *Principles of biochemistry 2nd ed. (Lehninger, Albert L.; Nelson, David L.; Cox, Michael M.)*. American Chemical Society; **1993**.

[184] Tsai, W. C.; Pai, P. J. R., Surface plasmon resonance-based immunosensor with oriented immobilized antibody fragments on a mixed self-assembled monolayer for the determination of staphylococcal enterotoxin B, *Microchimica Acta*, 166, 115-122, **2009**.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri :

Adı Soyadı : Demet ATAMAN SADIK

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Evli

E-posta : demet.ataman@gmail.com

Adresi : Ortadoğu Sitesi 1550 cad. 1594.sok No:28, Çiğdem Mahallesi, Ankara

### Eğitim :

Lise : TED Ankara Koleji

Lisans : Ortadoğu Teknik Üniversitesi

Yüksek Lisans : Ortadoğu Teknik Üniversitesi (1. Yüksek Lisans)

ve Tennessee Üniversitesi (2. Yüksek Lisans)

Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

### Yabancı Dil ve Düzeyi : İngilizce (Akıcı)

**İş Deneyimi** : 2007-2010 Tetra Teknolojik Sistemler Ltd. Şirketi'inde PerkinElmer ve Caliper Life Science cihazları ile ilgili birim başkanı

### Deneyim Alanları :

Biyokimya, organik sentez, SPR, biyosensör uygulamaları

**Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi** : Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma

Kurumu (TÜBİTAK), Proje No: 211T103 , 25,000 TL

Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)

Proje No: FHD-2016-8989, 25,000 TL

### Tezden Üretilmiş Yayınlar :

### Gönderilmiş Yayın

D. Ataman Sadık, H. Ekski-Kocak, G. Ertuş, İ. Hakkı Boyacı, M. Mutlu, '**Mixed-monolayer of N-hydroxysuccinimide-terminated cross-linker and short**

**alkanethiol to improve the efficiency of biomolecule binding for high-performance SPR biosensor'**, Sensors and Actuators B, 2017, revizyonlu hali gönderildi.

### **Üretilcek Yayınlar**

D. Ataman Sadık, İ. Hakkı Boyacı, M. Mutlu, Comparison of an aptamer-based and antibody-based sensor on a new intermediate layer for the detection of thrombin

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

Ozan Selvi, Burak Turhan, Demet Ataman, Ekmel Özbay, Mehmet Mutlu, "Characterization of Aptamer Immobilized Gold Nanoparticles", (sözlü sunum), 7<sup>th</sup> International Conference on Polymer and Textile Biotechnology, 2-4 Mart, 2011, Milano, İtalya.

Adil Burak Turhan, Demet Ataman, Yasin Şen, Mehmet Mutlu, Ekmel Özbay, "Preparation of Gold Nanodot Array Transducer for Biosensors and Testing its Performance with Thrombin Aptamer" (poster sunum), Biosensors 2012, 15-18 Mayıs 2012, Cancun, Meksika

Adil Burak Turhan, Demet Ataman, Yasin Şen, Mehmet Mutlu, Ekmel Özbay, "Preparation of Gold Nanodot Array Transducer for Biosensors and Testing its Performance with Thrombin Aptamer" (sözlü sunum), Nano TR 8, 25-29 Haziran 2012, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye

Demet Ataman Sadık, İsmail Hakkı Boyacı, Mehmet Mutlu, "Development of a Surface Plasmon Resonance (SPR) based sensor for thrombin via formation of 3,3' dithiodipropionic acid di(n-hydroxysuccinimide ester) (DSP) / 6-mercapto-1-hexanol (MCH) mixed monolayers" (sözlü sunum), 2<sup>nd</sup> International Congress on Biosensors, 10-12 June 2015, Gediz University, İzmir, Turkey



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

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
Nanoteknoloji ve Nanotıp ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 26/04/2017

Tez Başlığı / Konusu: Yüzey Plazmon Rezonans Temelli Trombin Biyosensörünün Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 91 sayfalık kısmına ilişkin, 26/04/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1'dür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

26.04.2017

Tarih ve İmza

**Adı Soyadı:** Demet Ataman Sadık  
**Öğrenci No:** N10145120  
**Anabilim Dalı:** Nanoteknoloji ve Nanotıp  
**Programı:** Doktora  
**Statüsü:**  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı

(Unvan, Ad Soyad, İmza)