

**BAZI HASTALIKLARIN ERKEN TEŞHİSİ İÇİN
YENİ BİYOALGILAMA SİSTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Burcu ÖZCAN

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK
2015**

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI HASTALIKLARIN ERKEN TEŞHİSİ İÇİN YENİ
BİYOALGILAMA SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Burcu ÖZCAN

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. MUSTAFA KEMAL SEZGİNTÜRK

TEKİRDAĞ-2015

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında, Burcu ÖZCAN tarafından hazırlanan “ Bazı Hastalıkların Erken Teşhisi için Yeni Biyoalgılama Sistemlerinin Geliştirilmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

İmza :

Üye : Prof. Dr. Yusuf DİLGİN

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. İbrahim İsmet ÖZTÜRK

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI HASTALIKLARIN ERKEN TEŞHİSİ İÇİN YENİ BİYOALGILAMA SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Burcu ÖZCAN

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Geleceğin "mucize materyali" olarak adlandırılan grafen, bal peteğine benzer hegzagonal örgüye sahip bir atom kalınlığında karbon atomlarından oluşan çok ince, çok dayanıklı ve çok sert bir materyaldir. İki boyutlu yapısından (2D) dolayı geniş yüzey alanı sağlayan grafit temelli malzemelerin temel yapı taşı olan grafenin, hızlı elektron taşınımı, yüksek ısı ve elektrik iletkenliği, mükemmel mekanik sağlamlık ve biyouyumluluk gibi özellikler sergilemesi bu materyalin saydam iletken elektrotlar, biyosensörler ve elektrokimyasal sensörler gibi pek çok alanda uygulanabilirliğini sağlamaktadır. Moleküler şaperonlar olarak bilinen ısı şok proteinleri (HSP), özellikle ısı, zehirli metaller, hastalıklar ve diğer strese neden olan zararlı uyarıcılara maruz kalındığında hücrelerde sentezlenirler. Ayrıca, HSPler birçok kanser türlerinde gereğinden fazla üretilirler. Bu protein ailesi arasında, HSP70 hemen hemen tüm hücrelerde bulunan, stresle uyarılabilir ana proteindir.

Bu tez çalışmasında, HSP70 tayini için bir biyosensör geliştirilmesi amaçlandı. İlk olarak, grafen camı karbon elektrot üzerine kaplandı. Daha sonra antiHSP70 nin EDC/NHS kullanılarak grafenle kaplanmış yüzey üzerine kovalent olarak bağlanması sağlandı. Döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile immobilizasyon adımları ve HSP70' in elektrot yüzeyine bağlanması incelendi. Biyosensörün başarılı sonuçlar vermesi için tüm adımlar optimize edildi. Yapılan biyosensör gerçek serumda denendi ve geleceğe yönelik umut vaad edici sonuçlar elde edildi.

Anahtar Kelimeler: grafen, HSP70, döngüsel voltametri (CV), elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), biyosensör

2015, 60 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

DEVELOPMENT OF A NEW BIOSENSOR SYSTEM FOR EARLY DIAGNOSIS OF SOME DISEASE

Burcu ÖZCAN

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Graphene called as “miracle material of the future” is formed by one- atom- thick carbon atoms. It is very thin, durable and rigid material and has a lot of features such as rapid electron transport, high electric conductivity, great mechanical stability and biocompatibility. Due to these features, the graphene can be used in many areas such as biosensors and electrochemical sensors. Heat-shock proteins (HSP), referred to as molecular chaperones, are highly conserved proteins which are synthesized especially in cells under a variety of harmful stimuli, including heat, toxic metals, diseases, and other stressors. Moreover, HSPs are over expressed in a wide range of human cancers. Among this protein family, HSP70 is the major stress-inducible protein that is abundantly and ubiquitously expressed in all cells.

In this study, it is aimed to design a biosensor for determination of HSP70 (heat shock protein). Firstly, the glassy carbon electrode was covered with graphene. Later, antiHSP70 was covalently immobilized onto graphene layer by using EDC/NHS. The immobilization of antiHSP70 and HSP70 protein binding onto the electrode surface were monitored by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. All important steps of this study were optimized to obtain better biosensor response. This biosensor was applied with human blood serum and hopeful results were obtained.

Keywords: graphene, HSP70, cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), biosensor

2015, 60 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLOLAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
TEŞEKKÜR	ix
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL BİLGİLER	3
2.1. Grafen	3
2.1.1.Grafenin keşfi	3
2.1.2.Grafenin yapısı	3
2.1.3. Grafen sentezi	5
2.1.4. Grafenin özellikleri.....	7
2.1.5. Grafenin avantajları	10
2.1.6. Grafenin kullanıldığı yerler	11
2.1.7. Grafenle İlgili Yapılan Çalışmalar	13
2.2.Kanser Biyomarkerları	14
2.3. HSP (Isı Şok Proteini)	15
2.3.1. HSP60.....	18
2.3.2. HSP90.....	18
2.3.3.HSP70.....	19
2.3.4. HSP70 ile yapılan biyosensör çalışmaları	20
2.4. Elektrokimya	21
2.4.1.Voltametri.....	22
2.5. Biyosensörler.....	25
2.5.1. Elektrokimyasal biyosensörler	27
2.5.2. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS).....	28
3. MATERYAL ve METOD	30
3.1. Materyal.....	30
3.2 Elektrokimyasal Ölçümler	30
3.3. Ölçüm Prosedürleri.....	30
3.4. Optimizasyon Basamakları.....	34

3.4.1. Grafen miktarı optimizasyonu	34
3.4.2. EDC/NHS konsantrasyonunun belirlenmesi	34
3.4.3. AntiHSP70 konsantrasyonu optimizasyonu	35
3.4.4. Anti-HSP70 inkübasyon süresinin optimizasyonu	35
3.4.5. HSP70 inkübasyon süresinin optimizasyonu	35
3.5. Biyosensörün Analitik Çalışmaları.....	35
3.5.1. Tekrarlanabilirlik	35
3.5.2. Tekrar üretilebilirlik	35
3.5.3. Sabit frekansta impedans ölçümleri.....	36
3.5.4. Biyosensörün gerçek örneklere uygulanabilirliğinin incelenmesi	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	37
4.1. Biyosensörlerin İmmobilizasyon Basamakları	37
4.2. Biyosensörlerin Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular	39
4.2.1. Grafen konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi.....	39
4.2.2. Anti HSP70 konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi	41
4.2.3. Anti HSP70 inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi	44
4.2.4. HSP70 inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi	46
4.3. Biyosensörün Analitik Çalışmaları.....	48
4.3.1. Standart Grafik	48
4.3.2. Tekrarlanabilirlik	50
4.3.3. Tekrar üretilebilirlik	51
4.3.4. Sabit frekansta impedans ölçümleri sonuçları	51
4.3.5. Grafen temelli antiHSP70 biyosensörün Taramalı Elektron Mikroskopuyla (SEM) yüzey morfolojisi analizi.....	52
4.3.6. Kramers Kronig	54
4.3.7. Biyosensörün Gerçek Örneklere Uygulanabilirliğinin İncelenmesi.....	55
5) SONUÇ	56
6) KAYNAKÇA	57
ÖZGEÇMİŞ	60

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2. 1. Bazı Hsp'ler yerleşim yerleri ve işlevleri.....	16
Tablo 3.1. HSP70 tayinine yönelik grafen temelli biyosensör sisteminin hazırlanma prosedürü.....	33
Tablo 4. 1. Grafen miktarı optimizasyon grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri.....	40
Tablo 4. 2. Anti HSP70 konsantrasyonu optimizasyon grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri...	43
Tablo 4.3. Anti HSP70 inkübasyon süresinin optimizasyon grafiklerinin R^2 leri ve denklemler.....	45
Tablo 4. 4. HSP70 inkübasyon süresinin optimizasyon grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri..	47
Tablo 4.5. Tekrar Üretilebilirlik.....	51
Tablo 4.6. AntiHSP70 temelli biyosensörün farklı aşamalarında Kramers-Kronig transformu.....	55
Tablo 4.7. Serum örneklerinde HSP70 analizi.....	55
Tablo 5.1. Optimizasyon basamakları ve seçilen değerler.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Grafenin yapısı.....	4
Şekil 2.2. Grafen ve grafen temelli fulleren, nanotüp ve grafit yapıları.....	5
Şekil 2.3. Grafen yapısı.....	6
Şekil 2.4. Grafen kaplı elektrotun ferrisiyanür çözeltisindeki tersinir elektrokimyasal davranışı gösteren ve destek elektrolit için verdiği voltammogramlar.....	8
Şekil 2.5. Ürik asit ve askorbik asit karışımının camısı karbon ve grafen modifiye camısı karbon elektrot üzerinde verdiği voltammogramlar.....	9
Şekil 2.6. Bir grafen düzlüğün band yapısı.....	10
Şekil 2.7. HSP70 in sentezlenen zincirleri stabilize etmesi.....	17
Şekil 2.8. Protein katlanmasında HSP ler.....	18
Şekil 2.9. HSP70 (ADP bağlı yapı).....	19
Şekil 2.10. Genel elektrokimyasal hücre şeması.....	21
Şekil 2.11. Pik potansiyellerini ve akımlarının gösteren klasik bir dönüşümlü voltammogram.....	24
Şekil 2.12. Biyosensörlerin sınıflandırılması.....	25
Şekil 2.13. Empedans vektörünün belirtildiği Nyquist eğrisi.....	29
Şekil 3.1. Ölçüm Sistemi.....	31
Şekil 4.1. İmmobilizasyon adımlarına ait A) EIS eğriler ve B) CV voltammogramları C) Hazırlanan biyosensör için geliştirilen eşdeğer devre modeli.....	37
Şekil 4.2. İmmobilizasyon adımlarına ait sistematiik diyagram.....	39
Şekil 4.3. Grafen miktarının biyosensör cevabının üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.4. Optimizasyon sonucu belirlenen 0,2 mg grafenle hazırlanan biyosensörün A) EIS spektrumları ve B) CV voltammogramları.....	41
Şekil 4.5. Anti HSP70 konsantrasyonunun biyosensör cevabının üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.6. Optimizasyon sonucu belirlenen 40µg/mL antiHSP70 ile hazırlanan biyosensörün A) EIS eğrileri ve B) CV voltammogramları.....	43
Şekil 4.7. Anti HSP70 inkübasyon süresinin biyosensör cevabının üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.8. Optimizasyon sonucu belirlenen 60 dakikalık inkübasyon süresi antiHSP70 ile hazırlanan biyosensörün A) EIS eğrileri ve B) CV voltammogramları.....	46
Şekil 4.9. HSP70 inkübasyon süresinin biyosensör cevabının üzerine etkisi.....	47
Şekil 4.10. Optimizasyon sonucu belirlenen 60 dakikalık inkübasyon süresi HSP70 ile hazırlanan biyosensörün A) EIS eğrileri ve B) CV voltammogramları.....	48
Şekil 4.11. Kalibrasyon eğrisi.....	49
Şekil 4.12. Tasarlanan biyosensörün artan HSP-70 konsantrasyonuyla elde edilen A) EIS spektrumu ve B) CV voltammogramı.....	50
Şekil 4.13. Sabit frekansta impedans ölçümü.....	52
Şekil 4.14. Hazırlanan biyosensöre ait SEM görüntüleri.....	53
Şekil 4.15. Hazırlanan biyosensörün Kramers Kronig transformu.....	54

KISALTMALAR DİZİNİ

AA	: askorbik asit
AgCl	: gümüş klorür
ATPaz	: adenin trifosfataz
AuNP	: altın nanopartikül
Au-Pd	: altın-paladyum
BSA	: bovin serum albumin
C	: karbon
CNT	: karbon nanotüp
Cu	: bakır
CV	: Dönüştürme Voltametri
DA	: dopamin
DC	: Doğru akım
DNA	: deoksiribonükleik asit
DPV	: diferansiyel puls voltametri
EDC	: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EIS	: Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
fg	: femtogram
GCE	: camı karbon elektrot
GO	: grafen oksit
GOD	: glukoz oksidaz
H ₂ O ₂	: hidrojen peroksit
HAuCl ₄	: altın (III) klorür hidrat
HCl	: hidroklorik asit
HNO ₃	: nitrik asit
HOPG	: yüksek derecede yönlenmiş pirolitik grafit
HPV	: insan papillom virüsü

HSP	: ısı şok protein
Hz	: Hertz
I	: akım
KCl	: potasyum klorür
k_e	: elektron transfer hız sabiti
LOD	: Tayin limiti
LOQ	: Ölçüm limiti
mL	: mililitre
mM	: milimolar
μg	: mikrogram
NaOH	: sodyum hidroksit
NHS	: N-hidroksisüksinimid
Ni	: nikel
O ₂	: oksijen
pg	: pikogram
RIA	: Radyo İmmün test
R _{ct}	: yük transfer direnci
R ²	: regresyon katsayısı
SAM	: kendi kendine oluşan tek tabakalar
SEM	: taramalı elektron mikroskopu
SWV	: kare dalga voltametri
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskopu
V	: volt
Z	: impedans değeri

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım ve tez hazırlama sırasında ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK' e,

Bugünlere gelmemde en büyük emeęe sahip olan maddi ve manevi olarak her zaman desteklerini gördüğüm aileme,

Çalışmalarım sırasında hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Münteha Nur SONUÇ KARABOĞA, Çiğdem SAYIKLI ŐİMŐEK'e ve dostum Burçak DEMİRBAKAN' a,

Sonsuz teőekkürlerimi sunuyorum.

Bu araştırma kapsamında kullanılan tüm kimyasal, cihaz ve donanım, 113 Z 678 numaralı TÜBİTAK projesi tarafından sağlanmıştır. Katkılarından dolayı TÜBİTAK' a teőekkürlerimi sunarım.

1.GİRİŞ

Genel anlamda biyosensörler; biyoloji, fizik, kimya, biyokimya, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden multidisipliner bir anlayış çerçevesinde faydalanılarak ve biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlar olarak bilinirler.

Bütün organizmalar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* kullanımı için temel olmuştur. Canlılar teknolojilerin hayal bile edemeyeceği duyarlılık özelliğine sahiptirler. Örneğin bazı köpeklerin koku almaları insanlardan 100.000 kat daha hassastır. Yılan balıkları tonlarca su içerisine ilave edilen birkaç damla yabancı maddeyi derhal farkedebilir. Kelebekler partnerlerinin yaydığı birkaç molekül bile algılar. Algılar ise zehirli maddelere karşı çok duyarlıdır. Canlıların bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörleri meydana getirmiştir (**Otlu 2010**).

Son yıllarda bilim ve teknolojiadaki hızlı gelişmeler biyosensör kavram ve tanımlarında da önemli genişlemelere ön ayak olmuştur. Canlı yaşamın önemli unsurlarından olan görme, işitme, koklama, tad alma, dokunma gibi algılama mekanizmaları doğal ve en mükemmel biyosensör sistemler olarak düşünüldükleri için biyosensör çalışmalarına güzel örnek olurlar.

Günümüzde görme, işitme gibi yeteneklerini kaybetmiş kişilerin bu yeteneklerini tekrar yerine koyacak yapay sistemler üzerinde yoğun araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Tıp alanındaki bilim adamlarıyla ortak çalışmayı gerektiren bu araştırmalar da biyosensör alanına dahil tutulabilirler. Bununla birlikte, bugün biyosensörlerden bahsedilince ilk akla gelen daha genel ve yaygın kullanım imkanına sahip, analiz amacına yönelik biyoanalitik sistemlerdir.

Biyosensörlerin tarihi 50'li yılların ortalarında L.C.Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde (Ohio, ABD) ameliyat sırasında kanın O₂ miktarını bir elektrod ile izlemesiyle başlar. 1962 yılında Clark ve Lyons glukoz oksidaz (GOD) enzimini O₂ elektrodu ile kombine ederek kanın glukoz düzeyini ölçebildiler. Böylece yeni bir analitik sistem oluştu. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifisikliğini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin

(elektrot) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağına sahip olmuştur.

Bir biyolojik sıvıdaki glukoz ve çözünmüş oksijen elektrod etrafındaki membranı geçerek elektrot yüzeyine ulaştığında glukoz oksitlenerek glukonik aside dönüşür ve bu sırada O₂ kullanılır. Ortamdaki glukoz bittiğinde O₂ elektrodu ile başlangıçtaki ve reaksiyon sonundaki çözünmüş O₂ miktarı belirlenir. Aradaki fark ortamdaki glukozun oksidasyonu için harcanan O₂ olup buradan biyolojik sıvıdaki glukoz miktarı bulunur. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateryalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini yapılabilir. Böylece hazırlanan analiz sistemlerine biyosensörler denir (**Aykut 2006**).

Bu tez çalışmasında da, HSP70 (ısı şok proteini) tayinine yönelik bir biyosensör tasarlanması hedeflenmiştir. Bunun için camsı karbon elektrot yüzeyi grafenle kaplanmıştır. Böyle bir yöntem zahmetli, uzun süreli ve oldukça pahalı klinik tanı yöntemleriyle karşılaştırıldığında umut vaat eden alternatif bir tanı yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.KURAMSAL BİLGİLER

2.1. Grafen

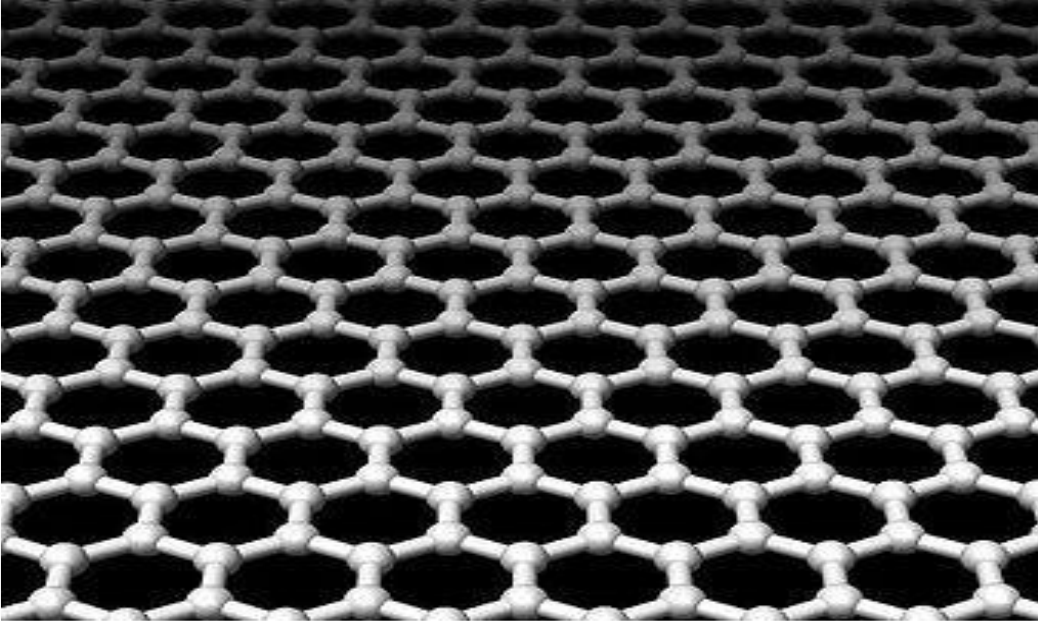
2.1.1.Grafenin keşfi

Grafenin keşfiyle, şimdiye kadar bilinmeyen bir malzeme sınıfı ortaya çıkmıştır. 2B kristal malzemeler son zamanlarda tespit edilmiş ve karakterizasyon tekniklerinin ilerlemesiyle de analiz edilmeye başlanmıştır. Grafen dendiğinde, Novoselov ve Geim isimleri akla gelmesine rağmen aslında grafen adı literatürde daha önce geçmiş ve şekli tasvir edilmiştir. Ancak sentezi gerçekleştirilememiş, elektronik özellikleri hakkında bilgiler ortaya çıkarılmıştır. Grafene en çok yaklaşan bilim adamı Shioyama 2001 yılında yayınladığı makalesinde grafenle ilgili olarak elastiklik özelliğini öne sürmüştü, bu özelliğin yanısıra 400 °C sıcaklığın üstünde yanma ve π - π etkileşimi sonucunda beklenen bükülme gibi pek çok özelliği de çalışmasında belirtmiştir. Ancak, izoprenin potasyumla etkileştirilerek, grafitin grafene ayrıştırıldığı çalışmasında grafenin karakterizasyonunu yapamamıştır (**Shioyama 2001**). Bu eksiklik, belki de kendisini 2011 Nobel Ödülü'nden alıkoymuştur.

Grafen ilk olarak Geim ve Novoselov tarafından 2004 yılında yüksek derecede yönlenmiş pirolitik grafitten (HOPG) mekanik ayrıştırma yoluyla elde edilmiştir. Bu yöntemde Geim ve arkadaşları yapıştırıcı bantı yüksek derecede yönlenmiş pirolitik grafit üzerine tekrar tekrar yapıştırıp çekerek tekli grafit katmanından oluşan grafeni izole etmeyi başarmışlardır. (**Novoselov 2004**). Bu buluş, 2010 yılı Fizik Nobel'iyle ödüllendirilmiştir.

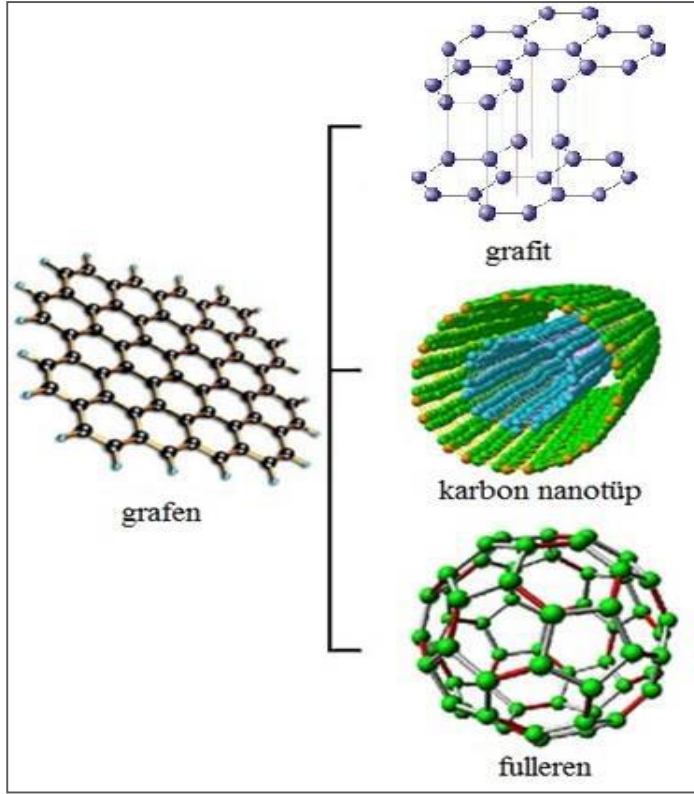
2.1.2.Grafenin yapısı

Grafen bazlı nanomateryaller özellikle fizikçiler, kimyacılar için ilgi odağı olmuştur. Geleceğin "mucize materyali" olarak adlandırılan grafen, bal peteğine benzer hegzagonal örgüye sahip bir atom kalınlığında karbon atomlarından oluşan çok ince, çok dayanıklı ve çok sert bir materyaldir. Grafeni bu kadar özel yapan ve araştırmalarda çok ilgi görmesini sağlayan, sahip olduğu eşsiz özellikleridir. Karbon nanotüplerin ve fullerenlerin aksine altı halkalı karbon atomları düzlemsel bir yapıda bağlanmışlardır. Ayrıca grafen 2630 m²/g gibi son derece yüksek bir yüzey alanına sahiptir (**Stankovich 2006**). Yani, 1 g grafen ile çeyrek futbol sahası kadar bir alan kaplanabilir. Aynı miktar ticari grafit tozu sadece 0,02 m² yüzeyi kaplar. Grafenin yapısı Şekil 2.1. de gösterilmektedir.



Şekil 2. 1. Grafenin yapısı

İki boyutlu malzeme olan grafen; fulleren, karbon nanotüp gibi materyaller için bir yapıtaşı olarak düşünülebilir. Şekil 2.2.'de gösterildiği gibi, grafenden yola çıkılarak farklı malzemeler elde edilebilmektedir. Bu malzemeler içerisinde en çok bilinenleri fulleren, karbon nanotüp ve grafitir. Grafen kendi içerisinde küp oluşturacak şekilde katlanırsa fulleren yapısı elde edilir. Fullerenler sıfır boyutlu yapılar olarak bilinmektedirler. Eğer grafen yapısı kendi eksenini etrafında sarılır ise nanotüpler oluşur. Nanotüpler bir boyutlu yapılardır. Birden fazla grafen tabakası üst üste dizilirse grafit yapısı elde edilir. Grafit üç boyutlu bir malzemedir. Özellikle grafen tabakasının farklı şekillerde katlanmasıyla elde edilen sıfır, bir ve iki boyutlu yapılar kuantum sınırlama etkisine sahip olduklarından elektronik araştırma alanında oldukça yoğun ilgi görmektedirler.



Şekil 2. 2. Grafen ve grafen temelli fulleren, nanotüp ve grafit yapıları

2.1.3. Grafen sentezi

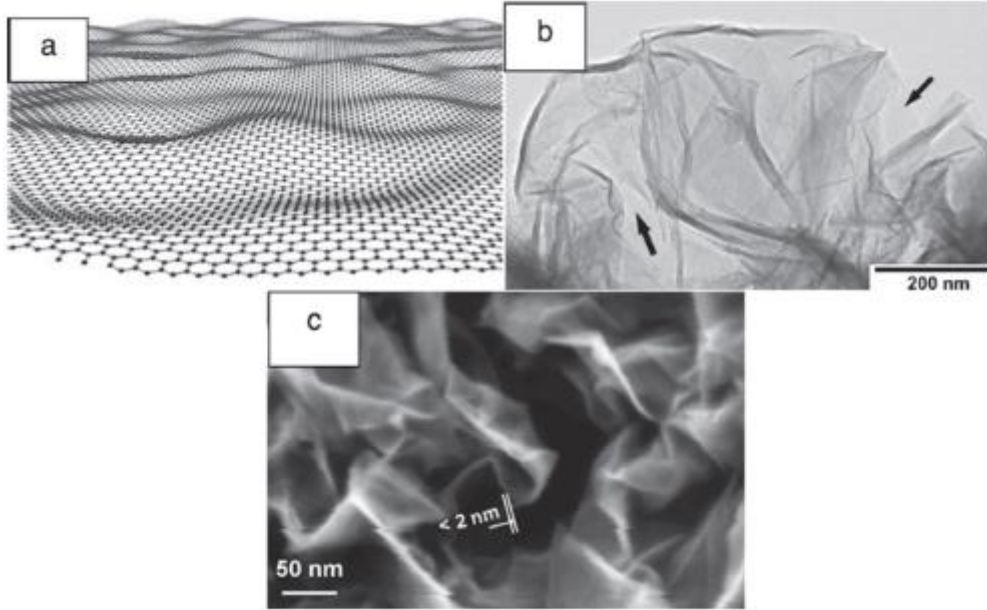
Grafenin elektrokimyasal özelliklerinin anlaşılması için ilk olarak grafenin sentezlenme yöntemlerinin anlaşılması gerekir. Grafen sentezi için geliştirilen birçok yöntem vardır. İlk olarak 2004 te, Novoselov ve arkadaşları grafen levhaların, yüksek derecede yönlendirilmiş pirolitik grafitin (HOPG) mekanik eksfoliasyonu (katman katman ayırma) yöntemi ile hazırlanması üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmalarlarıyla 2010 Fizik Nobel Ödülü'ne layık görülmüşlerdir (**Novoselov ve ark. 2004**). Novoselov ve arkadaşları (2004) yapıştırıcı bantı HOPG üzerine yapıştırıp çekerek ve banta aktarılan grafitte tekrar başka bant yapıştırmak ve bu işi sürekli yapmak kaydıyla grafeni izole etmişlerdir. Mekanik ayrıştırma yönteminde ayrıştırma yoluyla grafenin tekrarlanabilir sentezi ilk olarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yapılan teknikler dünyanın hemen hemen her yerinde ki bilim adamlarına grafen tabakalarını izole etme imkanı sunmuştur. Bu sentezler sonucunda elde edilen grafenin, günümüz teknolojisinin sunduğu avantajları daha da geliştirerek teknolojinin yakın gelecekteki seyrini değiştireceği öngörülmektedir.

Diğer metot, grafitin hafifçe eksfoliasyonudur, ama bu yöntemde verim çok düşüktür (**Hernandez ve ark. 2008**). Grafen ayrıca ultra yüksek vakum altında SiC levhanın termal

bozunması veya metal substratı (rutenyum (Sutter 2008), Ni (Kim ve ark. 2009), Cu (Li ve ark. 2009)) üzerinde C çöktürme yöntemleriyle de elde edilir.

Bu sentez yöntemleri grafenin elektronik uygulamalarda kullanılması için uygun olan yöntemlerdir. Diğer sentez yöntemi, grafit oksitin kimyasal veya termal indirgenmesidir. Bu yöntem ayrıca grafen sentezinin en ekonomik yöntemidir (Geim ve ark. 2009). Elektrokimyada kullanılan grafenin çoğu, grafit oksitin indirgenmesi metoduyla üretilir. Grafit oksit indirgenmesi ile elde edilen ve fonksiyonlanmış grafen levha veya kimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit olarak da adlandırılan grafen birçok fonksiyonel gruba sahiptir. Bu özelliği birçok elektrokimyasal uygulamalarda avantaj sağlamaktadır.

Grafit oksitin indirgenmesi ile üretilen fonksiyonlanmış grafen, örgü yapısının bozulmasından dolayı büzüşmüş bir yapı olarak gözlemlenir ve bu bozulmamış saf grafende gözlenen dalgalı yapıdan farklıdır. Şekil 2.3. te bu görüntüler verilmiştir.



Şekil 2. 3. Grafen Yapısı a) Saf grafenin yapısal modeli b) grafenin TEM görüntüsü c) grafenin SEM görüntüsü

Şekilde b ve c deki grafen, grafen oksitin kimyasal indirgenmesinden üretilmiştir.

2.1.4. Grafenin özellikleri

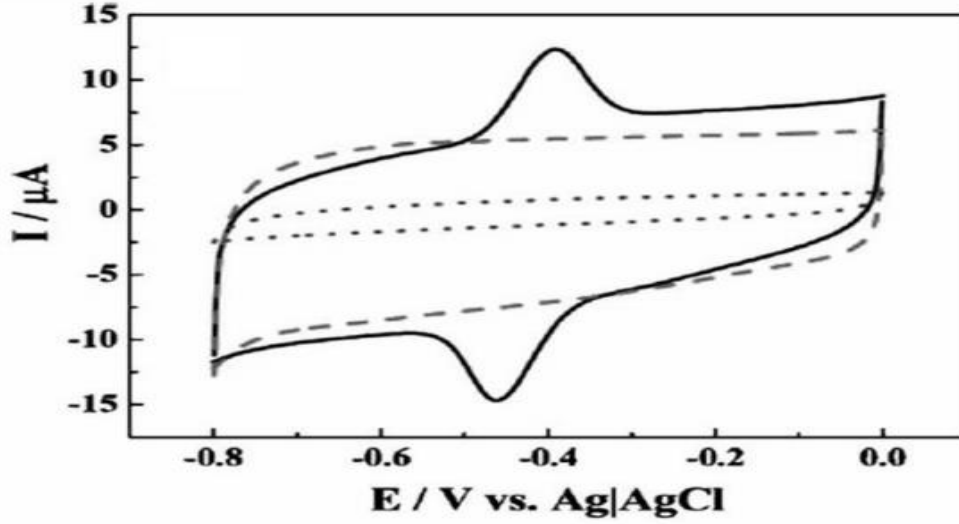
- **Elektrokimyasal özellikleri**

Yüksek derecede yönlendirilmiş pirolitik grafitin (HOPG) yapısı, bir kısmı bozulmuş çok tabakalı grafendir. Grafen levhanın kenar yüzeyi, 0,01 cm/s elektron transfer hız sabitine (k_e) sahip olmasına rağmen, ana yüzey elektrokimyasal olarak ($k_b \approx 10^{-9}$ cm/s in altındadır.) inerttir. Grafen levhanın ana yüzeyi bazı kusurlar içerebilir ancak genelde kusurların, hızlı elektron transfer kinetiklerinden dolayı kenar yüzey bölgelerinde olduğu öngörülür. Kusursuz yapıdaki grafen levhalar sıfıra yakın k_b değerine sahiptir (**Davis ve ark. 2005**).

Grafen levhaların elektrokimyası, grafenin heterojen elektron transferinin hızlı olduğu kenarları tarafından yönlendirildiği için, CNT ve grafenin yapısına bakıldığında grafen levhalarda gözlenen heterojen elektron transferinin daha yüksek olması beklenmektedir. Çünkü grafenin kütle başına düşen kenar sayısı daha fazladır yani yüzeyi daha geniştir.

Bütün bu özelliklerin yanısıra grafen kimyasal kararlılığı ve özellikle elektrokataliz çalışmaları için metalik ve metal oksidi parçacıklarını tutma kabiliyeti özellikleriyle elektrokimya çalışmaları için bulunmaz fırsatlar sunmaktadır.

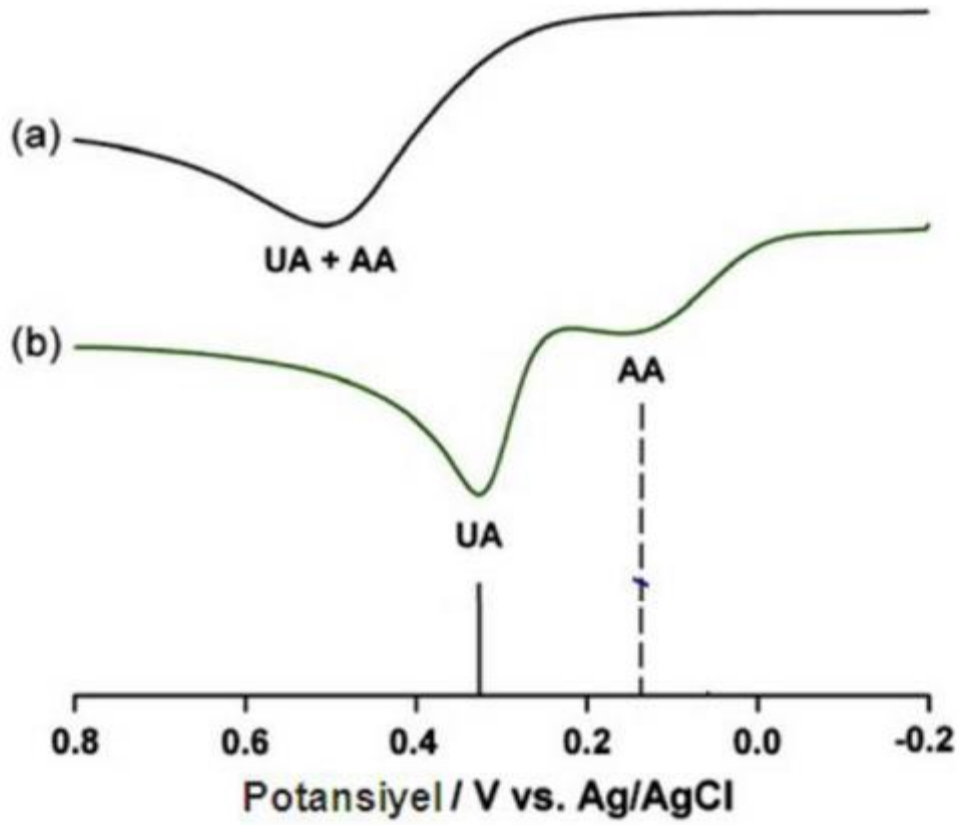
Yüzeye grafen tutturulmuş karbon elektrot için tipik bir elektrokimyasal davranış Şekil 2.4.'te gösterilmektedir (**Shan 2009**).



Şekil 2.4. Grafen kaplı elektrodun ferrisiyanür çözeltisindeki tersinir elektrokimyasal davranışı gösteren (düz çizgi) ve destek elektrolit için verdiği (kesikli çizgi) voltammogramlar. Noktalı eğri ise camsı karbon elektrodun destek elektrolit içinde verdiği voltamogramı göstermektedir.

Şekil 2.4.'e bakıldığında grafenin, elektroaktif bir madde olan ferrisiyanüre karşı verdiği cevap görülmektedir. Camsı karbondan farklı olarak çok yüksek bir kapasitif akım, artık akımın büyümesine sebep olmuştur. Bu grafen için karakteristik bir özellik olup süper kapasitörlerin üretilmesinde ve grafenin hibrit otomobiller için elektrik enerjisinin depolanmasında kullanılmasına imkân vermektedir (**Stoller 2008**).

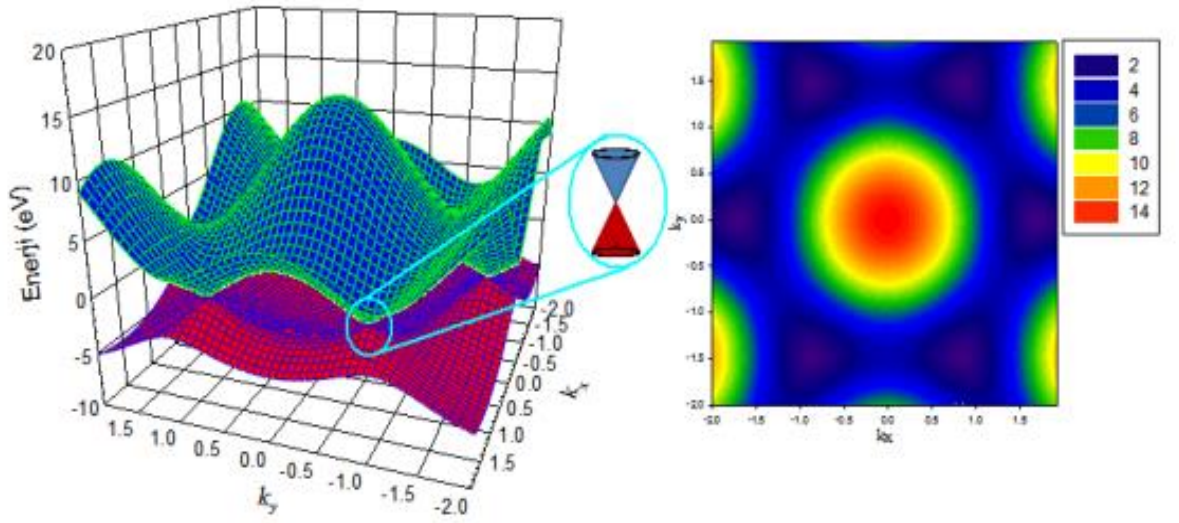
Grafen, elektrot yüzeyinin modifikasyonunda doğrudan kullanılmaktadır. Grafenle modifiye edilen elektrot, edilmemiş elektrot ile aynı potansiyelde pik veren ve analizi yapılamayan karışımların analizinin yapılmasına imkân sağlar. Şekil 2.5'de ürik asit ve askorbik asit karışımının camsı karbon ve grafen-modifiye camsı karbon elektrot üzerinde verdiği voltammogramlar verilmiştir (**Chang 2010**).



Şekil 2. 5. Ürik asit ve askorbik asit karışımının camsı karbon (a) ve grafen modifiye camsı karbon elektrot (b) üzerinde verdiği voltamogramlar.

- **Grafenin elektronik özellikleri**

Grafen, sıfır band aralığı nedeniyle, teorik ve deneysel açıdan mükemmel yakın bir elektronik iletken malzemedir (Avouris 2010). Elektronların enerjisi, Brillouin bölgesi kenarlarındaki elektronların momentumu ile doğrusal olarak ilişkilidir (elektronlar kütesiz Dirac fermiyonları gibi davranır). Ayrıca, grafen düzlüklerde balistik iletim gözlenir. Grafenin band yapısı ilk kez 1947 yılında sıkı-bağ modeli kullanılarak elde edilmiştir (Wallace 1947).



Şekil 2.6. Bir grafen düzlüğün band yapısı. Solda; bir grafen düzlüğün band yapısı. İletim ve valans bandı bir huni biçimindedir. Sağda; band yapısının üstten görünüşü.

- **Mekanik özellikleri**

Grafende C-C bağları arasında kuvvetli kovalent bağlar olduğu için bir grafen düzlük olağanüstü mekanik özelliklere sahiptir. Grafiti oluşturan grafen düzlüklerin arasında ise zayıf Van der Waals bağları olduğu için grafen düzlükler çok az bir kuvvet uygulandığında birbirlerinin üstünden kayarak grafit yapısını bozabilir (**Rozploch ve ark. 2007**).

2.1.5. Grafenin avantajları

Grafen;

- Yüksek elektrik iletkenliğine ve termal iletkenliğe sahiptir.
- Kuantum Hall 3 etkisine sahiptir.
- Yarı metal veya sıfır bant enerjili yarı iletkenidir.
- Transparan, esnek, hafif ve çok kuvvetlidir.

Bu özelliklerinden dolayı, oldukça fazla kullanım alanına sahip gelecek için umut verici bir malzeme olarak değerlendirilmektedir (**Rao ve ark. 2009**). Hatta grafen tabakasının genişliği ve hazırlanış biçimi (zig-zag veya sandalye) ayarlanabilmektedir ve bu şekilde ona farklı fiziksel özellikler kazandırmak mümkündür. Ayrıca grafenden oluşturulan malzemelerin elektronik özelliklerinin malzemeyi oluşturan tabaka sayısına da bağlı olması, onun tabaka sayısı kontrol edilerek özelliklerin kontrol edilebileceğini göstermektedir. Örneğin, çok tabakalı grafen bir metalik iletken olmasına karşın tek tabakalı grafen bir yarı iletkenidir.

Grafen ile çalışmaların, karbon materyallerine yeni bir bakış açısı sağlayacağı düşünülmektedir. Karbon nanotüplerle kıyaslandığında grafen; düşük maliyet, geniş yüzey alanı, üretim kolaylığı ve güvenilirlik gibi avantajlara sahiptir. Grafen, yüksek saflık göstermesinden dolayı, karbon materyallerin elektrokatalitik etkilerinin araştırılması için iyi bir malzemedir. (Alwarappan ve ark. 2012).

2.1.6. Grafenin kullanıldığı yerler

Grafitin tek atomik tabakasından oluşan grafen; mekanik ve termal dayanıklılık, yüksek elektron mobilitesi, optiksel geçirgenlik gibi yeni elektronik ve mekanik özelliklerinden dolayı oldukça fazla dikkat çekmiştir. İki boyutlu hekzagonal karbon yapısından oluşan grafenin bu mükemmel özellikleri sayesinde nanoelektronikte, sensör uygulamalarında, enerji depolayıcılar ve dönüştürücüler için en uygun malzemelerden birisi olacağı düşünülmekte ve bilim çevreleri tarafından araştırılmaktadır. Farklı grafen elde etme yöntemlerine bağlı olarak oluşan grafenin özellikleri ve kullanım alanları değişmektedir. Günümüzdeki silisyum tabanlı elektronik teknolojisi gün geçtikçe sınırlarına yaklaşmaktadır. Çünkü silisyumun çok küçük ölçeklerde boyutlandırma problemi olmaktadır. Yarıiletken endüstrisinin elektronik bileşenlerin küçültülmesi konusunda gelecek yirmi yıl içinde karşı karşıya kalması beklenen en büyük sorunlardan biri olan alt sınıra ulaşılması grafen sayesinde aşılabilecek gibi durmaktadır.

Grafen son zamanlarda bilgisayar teknolojisinde dokunmatik ekranlarda da kullanılmaya başlanmıştır. Şimdiye kadar üretilen ekran yalnızca bir piksel çözünürlüğünde ve metrenin milyonda biri ölçülerindedir. Şu an için dokunmatik ekranların yüzeyinde indiyum kalay oksit kullanılmaktadır. İndiyum, doğada az bulunan bir element olduğu için, dokunmatik ekranların geleceği bu elementin yerine kullanılacak başka maddelerin bulunmasına bağlıdır ve bu konudaki araştırmalar devam etmektedir. Ayrıca grafenin sergilemiş olduğu elastiklik özelliği onun esnek teknolojik malzemeler oluşturmasını sağlamıştır. Günümüzde grafen temelli esnek ekranlı cep telefonları üretilmiştir. Ayrıca, tek katmanlı grafen yüzeyler güneş hücreleri için elektrotlar oluşturma, lityum pillerde anot ve elektrot malzemesi ve yarıiletken olarak da kullanılma özelliğine sahiptirler. Bunların dışında grafeni esas çekici kılan şey ise grafenin içinde elektronların fotonlar gibi davranabilmeleridir. Amerika'da bulunan Teksas Üniversitesi'nin araştırmacıları, normal pillerden daha kapasiteli elektrik depoları olan ultrakapasitörleri grafen tabanlı olarak imal etmeyi başarmışlardır. Sonuç, normalin iki katı kapasiteye sahip olan ultrakapasitörler olmuştur. Bu gelişme hayata geçirilirse, şarjlı pille çalışan cihazlar yanında, rüzgârsız veya

güneşsiz günler için büyük miktarda enerji depolama yöntemleri arayan yenilenebilir enerji endüstrisi için de çok faydalı olacaktır.

Pil teknolojisinde olduğu gibi hidrojen depolamada da grafen malzemesi oldukça önemli roller üstlenmektedir. Artan küresel ısınma ve fosil yakıtların gün geçtikçe azalması araştırmacıları yeni arayışlara itmektedir. Hidrojenin verimli bir şekilde depolanıp elektrik enerjisi gereken yerlerde kullanılması için oldukça yoğun araştırmalar yürütülmektedir.

Spintronik teknolojisi de günümüzde oldukça önem kazanmaya başlamıştır. Elektronların yüküne ek olarak sahip oldukları spinlerini de kullanmaya çalışan bu teknoloji günümüz bilgi depolama sistemlerinde hayati öneme sahip bulunmaktadır. Grafen nanoşeritlerin de sahip oldukları manyetik özellikler sayesinde spintronikte kullanım alanları doğmaktadır.

Grafen vücut içerisinde bulunan iyonik sıvılarda yapısı bozulmadan kalabildiğinden dolayı biyolojik uygulamalar için de umut vaat eden bir malzeme niteliğindedir. Biyonik kulaklar, biyonik gözler grafen teknolojilerinin geliştirilmesi ile mümkün olabilecek gibi görünmektedir. Henüz biyoelektronik ve biyomalzeme olarak kullanımı için yapılan araştırmalar çok başlarda olsa da araştırmacılar gelecek için oldukça umut verici olduğunu düşünmektedirler (**Anonim 2014**).

- **Grafenin biyosensörlerde kullanımı**

Grafen sahip olduğu hızlı elektron taşınımı, biyoyumluluk gibi eşsiz özellikleri sayesinde elektrokimyasal, impedimetik, floresans biyosensörler ve immunosensörler gibi tüm biyosensörlerde uygulanabilirliğini sağlamaktadır.

Yang ve arkadaşları (2011) yapmış oldukları çalışmada, camsı karbon elektrot yüzeyinde GO'in elektrokimyasal indirgenmesini gerçekleştirdikten sonra Au-Pd nanopartikülleri ile yüzeyi modifiye etmişler ve biyosensör olarak kullanımını incelemişlerdir. GO'in elektrokimyasal indirgenmesini pH'sı 5 olan fosfat tampon çözeltisinde 0 V ile -1,5 V arası tarama yaparak başarmışlardır. Au kaynağı olarak H₂AuCl₄, Pd kaynağı olarak ise PdCl₂ seçilmiştir. Au-Pd nanopartiküllerinin sentezi bu metal iyonlarının bulunduğu çözeltiden -0,2 V sabit potansiyelde depozisyon yöntemiyle elektrokimyasal indirgenmiş GO yüzeyinde gerçekleştirilmiştir. Grafen modifiye elektrotların sensör olarak kullanımına diğer bir örnek ise Sang ve arkadaşları (2008) tarafından yapılmıştır. Yapmış oldukları bu çalışmada, kardiyovasküler, böbrek, hormonal ve merkezi sinir sisteminde önemli rolü olan biyomolekül dopamin (DA), askorbik asit (AA) ve ürik asit gibi moleküllerin yanında seçici olarak tayin edilmiştir. Özellikle biyolojik örneklerde DA ile birlikte bulunan AA, dopaminin

elektrokimyasal belirlenmesi için büyük bir problemdir. Çünkü Au, Pt ve camısı karbon elektrot gibi geleneksel elektrotlar üzerinde DA ve AA'in oksidasyon potansiyellerinin birbirine çok yakın olmasından kaynaklanan bir girişim söz konusudur. Dolayısıyla, AA'in varlığında DA'nın seçici belirlenmesi bu araştırma alanında büyük bir amaçtır. Bu amaç için, organik redoks araçları, nanoparçacıklar, polimerler, kendi kendine biriken tek tabakalar ve karbon nanotüpler gibi çeşitli materyaller elektrotların modifikasyonunda kullanılmıştır.

Grafenin elektrokimyasal davranışı ile grafen temelli elektrokimyasal sensör çalışmalarının son birkaç yılda bir hayli artması, grafenin elektrokimyasal analizlerde önemli bir elektrot malzemesi olacağını göstermektedir.

Birçok uzman, grafeni hızlı, ince ve esnek elektronik cihazların yapımında silikona rakip olarak düşünmektedirler. Ancak grafenin silikonun yerini alabilmesi için özelliklerinin kontrol edilebilmesi gerekir. Örneğin silikon gibi yarı iletkenlerin aksine, saf grafen sıfır bant enerji aralığına sahiptir dolayısıyla üzerindeki akım geçişini kontrol etmek zordur. Bu nedenle, araştırmalar son birkaç yılda daha fonksiyonel, özellikleri sentez metodu ile kontrol edilebilen yüksek kalitede grafen, GO ve grafen temelli kompozit malzemelerin sentezine ait yeni metodların geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Özellikle elektrokimyasal ve elektronik uygulamalarda kullanılan strateji grafitin, grafen oksite dönüştürülmesi ve daha sonra istenen derecede ve istenen katkı maddeleri ile birlikte indirgenmesidir.

2.1.7. Grafenle İlgili Yapılan Çalışmalar

Papakonstantinou ve ark. grafen bazlı nanomateryalleri elektrokimyasal algılama için kullanan ilk araştırmacılarıdır.

Zheng ve ark. (2015), pestisit tayini için iyonik sıvı fonksiyonlu grafen temelli bir asetilkolin esteraz biyosensörü geliştirmişlerdir. Çalışmalarında, iyonik sıvı fonksiyonlu grafeni epoksit halka açma reaksiyonuyla sentezlemişlerdir. Daha sonra iyonik sıvı fonksiyonlu grafen ve jelatin modifiyeli elektrot başarıyla hazırlanmıştır. Asetilkolin esterazın iyonik sıvı fonksiyonlu grafen ve jelatin modifiyeli camısı karbon elektrota immobilizasyonunda çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılmıştır. Asetilkolin esterazın biyoyoumlu bir matriks üzerinde adsorbe olmasından sonra modifiye elektrot karbaril ve monokrotofosun elektrokimyasal tayini için kullanılmıştır. Optimum koşulların belirlenmesiyle biyosensörün geniş bir lineer aralığı tayin edebildiği gözlenmiştir. Hazırlanan biyosensörün yüksek hassasiyetli , düşük maliyetli olması enzim inhibitörlerinin analizi için umut vaat eden bir sonuç doğurmuştur.

Huang ve ark. (2015), insan papillom virüsü (HPV) tayini için elektrokimyasal DNA biyosensörü geliştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada bir yakalama probunu grafen/Au nanoçubuk/ politiyonin modifiyeli camı karbon elektrot üzerine immobilize etmişlerdir. DNA biyosensörü oldukça geniş bir aralıkta HPV tayinini gerçekleştirebilmiştir. Önerilen bu metot ayrıca gerçek kan örneklerinde uygulanabilir. Bu durum da DNA biyosensörünün klinik uygulamalarda kullanımı için umut vaat etmektedir.

Guo ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada suda çözünür elektroaktif boya azofleksin fonksiyonlu grafen temelli ultra hassas ve etiketsiz elektrokimyasal bir DNA biyosensörü geliştirmişlerdir. Optimum koşullar altında bu biyosensör düşük tayin sınırı ve geniş bir tayin aralığı sağlamaktadır. Ayrıca bu biyosensör tek nükleotitli polimorfizm denemeleri için olağanüstü bir kabiliyet göstermiştir. Bu sonuçların ışığında, bu biyosensörün hassas DNA tayini için potansiyel bir uygulama olduğu sonucuna varılmıştır.

Niu ve ark. grafeni kullanarak grafen/AuNP/kitosan nanokompoziti biyosensörü geliştirdiler. Bu biyosensör H_2O_2 ve O_2 ye karşı yüksek elektrokimyasal aktivite gösterdi. Yapılan çalışmada yüksek hassasiyet ve iyi satabilitesinden dolayı iyi bir glukoz biyosensörü olarak kullanılabilceği bulundu.

Shan (2009), grafen yüzeyinde glukoz oksidazın elektrokimyasal davranışını incelemişler ve bu malzemenin glukoz biyosensörü olarak kullanılabilceğini öne sürmüşlerdir. Grafit ile alınan voltamogramda herhangi bir pik gözlenmez iken grafen elektrot kullanıldığı zaman glukoz oksidazın pik verdiği tespit edilmiştir. Bu sebeple grafen elektrodun glukozu duyarlı olmasından dolayı biyosensör olarak kullanılabilceğini önermişlerdir.

2.2.Kanser Biyomarkerları

Kanser, ölüme en sık yol açan hastalıkların başında gelmektedir. Bazı kanser tiplerinin tanı ve tedavisindeki ilerlemelere karşın, kanserin erken tanı ve tedavisi halen büyük bir sorun olmaya devam etmektedir. Zira kanser hastalarının birçoğunda kanser tanısı hastalığın ileri safhalarında veya metastaz yapmasından sonra gerçekleşmektedir. Bu aşamada cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi bugünkü tedavi seçeneklerinin de ancak sınırlı etki gösterebildiği bilinmektedir. Bu da mortalitenin yüksek olmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, hastalığın erken belirlenmesine olanak sağlayacak yeni gelişmeler ve teknikler kanser mortalitesini etkileyecektir.

Serumda bulunan ve kanserin belli tiplerine spesifik olan proteinlerin eser miktarlarının saptanması, karsinoembriyonik antijen ve alfa-fetoprotein gibi tümör belirleyicilerin geliştirilmesiyle başlamıştır. İmmündefüzyon ve daha sonra RIA ve ELISA tekniklerinin kullanılması pek çok serum tümör belirleyicinin bulunmasına yol açmış, bunların bir çoğu rutin kullanıma girmiştir. Ancak bu tür belirleyicilerin dezavantajı sınırlı spesifisite ve sensitiviteye sahip olmalarıdır. Son yıllarda kanser hastalarının serum veya plazmalarında tümöre özgü moleküler değişikliklerin bulunduğu anlaşılması ile kanser tanısında yeni bir dönem başlamaktadır. Moleküler biyomarkerların, özellikle de kanser inisiyasyon ve progresyonu ile ilişkili olanların bulunması kanserin erken belirlenmesi için geliştirilecek stratejiler için yararlı olacaktır.

Biyomarker, patojenik, biyoteknolojik veya tedavi amaçlı farmakolojik işlemlerde kullanılan, kesin olarak ölçülebilir indikatörlerdir. Biyomarkerların aşırı konsantrasyonları vücut içersinde kanser indikatörleri olarak kullanılır. Biyomarkerlar aynı zamanda metabolizmanın kanser varlığına verdiği spesifik bir karşılık olan bir molekül de olabilir. Biyomarkerlar kanser çeşitleri için elverişli indikatörler olduğu gibi bunun yanı sıra hastalığın teşhisi, seyri ve akıbeti için de kullanışlı olabilir. Antikor ve antijenin oldukça karakteristik moleküler seçiciliklerinden ötürü, immunosensörlerde özellikle biyomarkerların kantitatif tayininde, kullanılan antikor-antijen etkileşiminden yararlanılır. Biyomarkerların belirlenmesi için geliştirilen analitik teknikler, antikor ve antijenin bir immün oluşturmak üzere oldukça spesifik bir şekilde birbirini tanıması esasına dayanır.

2.3. HSP (Isı Şok Proteini)

Biyolojide temel metot genetik bilginin fonksiyonel proteinlere dönüşmesidir. Ancak bunun için yeni sentezlenmiş proteinlerin uygun konumda katlanması gereklidir. Isı şok proteinleri olarak bilinen proteinler olgunlaşmanın bu basamağında önemlidirler ve polipeptitlerin ribozomal çıkış tüneline çıkmasına yardım ederek katlanmalarını sağlarlar. Parkinson hastalığı gibi birçok hastalıkta proteinlerin hücre içinde katlanmasının engellenmesi durumlarıyla karşılaşılır. Bu tehlikelerden dolayı hücreler katlanan özel bir moleküler şaperon sistemi geliştirmiştir. HSP ve şaperon isimleri genelde aynı anlamda kullanılırsa da şaperon aktivitesi göstermeyen bazı HSP'ler ve tam tersi olarak HSP ailesi üyesi olmayan bazı şaperonlar vardır.

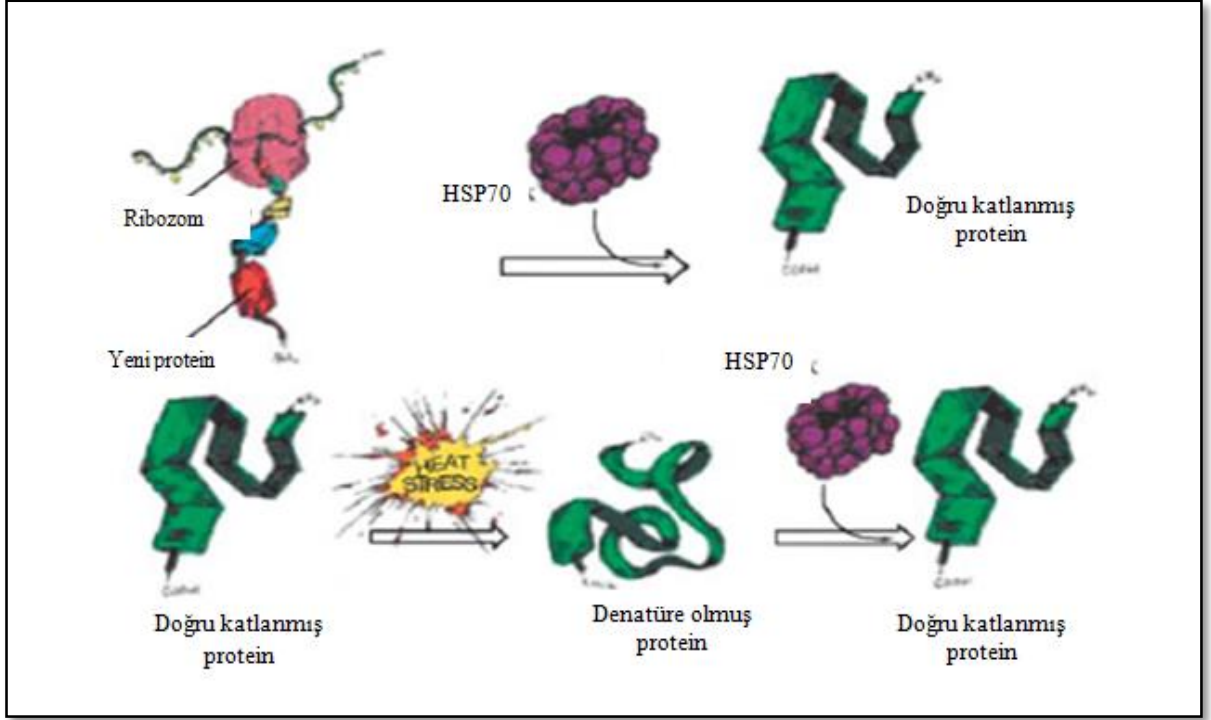
HSP'lerin ilk kez *Drosophila melanogaster*'da uygulanan ısı şokuyla sentezinin arttığı belirlenmiştir (**Ritossa 1962**). Bazı HSP'ler hücre döngüsünün devamlılığı gibi normal hücresel işlevlerde çok önemlidir. HSP'ler apoptozun baskılanmasını da sağlar, ama bunu

nasıl sağladığı hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Şaperon fonksiyonu olan belirli HSP'ler: HSP104, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 ve küçük HSP'ler (HSP27)'dir. HSP lerin yerleşim yerleri ve işlevleri Tablo 2.1. de gösterilmektedir (**Thomas 2005**).

Tablo 2.1. Bazı Hsp'ler yerleşim yerleri ve işlevleri

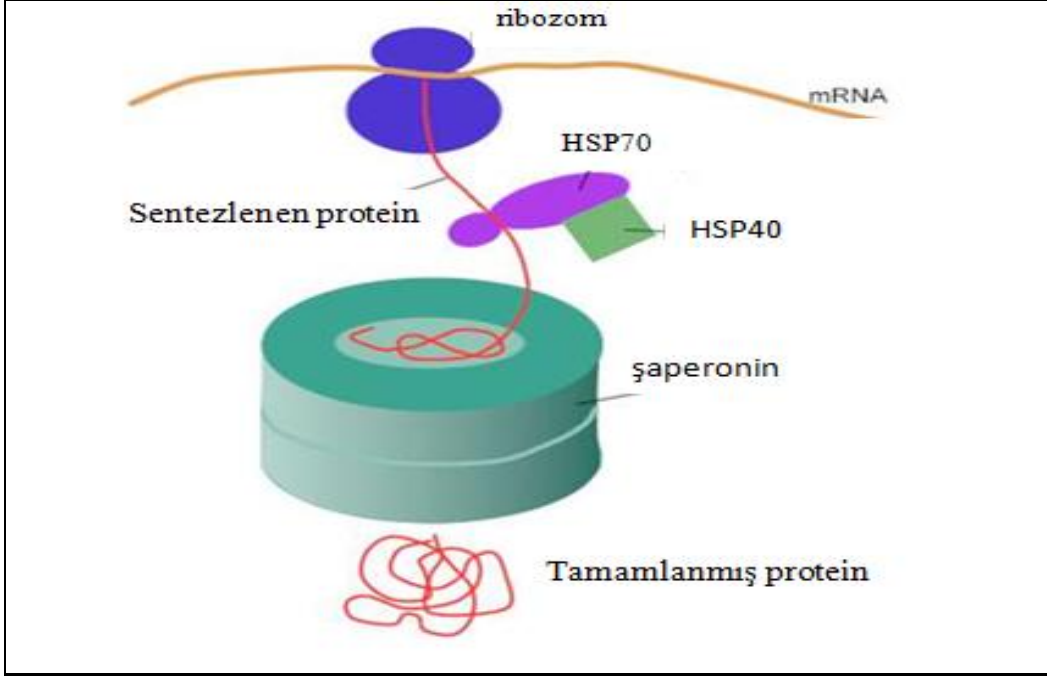
HSP	Lokalizasyon	İşlev
HSP27	Sitoplazma	Protein agregasyonunun engellenmesi, hücre büyümesi, farklılaşması
HSP40	Sitoplazma	HSP70 in koşaperonu
HSP60	Sitoplazma,mitokondri	Protein egregasyonunun engellenmesi, protein katlanması
Grp78	Endoplazmik retikulum	Protein taşınımı ve katlanması
HSP70	Sitoplazma	Protein agregasyonunun engellenmesi,protein katlanması
HSP75	Mitokondri	Bilinmiyor
Grp 94	Endoplazmik retikulum	Protein kalite kontrolü
HSP90	Sitoplazma	Protein agregasyonunun engellenmesi, protein stabilizasyonu, transferi
HSP104	Sitoplazma	Proteinlerin agregatlardan serbestleştirilmesi

Ribozomun dar yapısından dolayı protein zincirini oluşturan polipeptit zinciri ribozomun içinde katlanamaz. Ancak 50-300 aminoasitlik zincir ribozomdan tamamen çıktıktan sonra katlanabilir hale gelir. Oluşan protein zincirine bağlanan HSP'ler (trigger faktör, HSP70, prefoldin) ribozomdan uzayarak sentezlenen zincirleri düzgünce stabilize ederler.



Şekil 2. 7. HSP70 in sentezlenen zincirleri stabilize etmesi

Sitozol içindeki katlanma ya zincirlerin salınımı sırasında bu faktörlerle ya da sentezlenen proteinlerin şaperonin gibi down-stream şaperonlara transfer edilmesiyle meydana gelir. Şaperonların bir alt bölümü olan şaperoninler büyük silindirik kompleks yapıdadırlar. İçinde zincirin düzgünce katlanması için merkezi bir kompartman bulunur ve metabolik bir enerjiye gereksinim duyarlar (Thomas 2005).



Şekil 2. 8. Protein katlanmasında HSP' ler

HSP ler stres proteinleri olarak da adlandırılmaktadır. Radyasyon, manyetik alan, basınç, pH değişikliği gibi fiziksel ve kimyasal etkenler strese sebep olurlar. Ayrıca soğuk algınlığı, enfeksiyon, kanser ve nörodejeneratif bozukluklar gibi hastalıklara da neden olurlar. Hüresel stres antikanser ilaçları ve antibiyotiklerin kullanımıyla da tetiklenebilir (**Ciocca ve ark. 2005**).

2.3.1. HSP60

HSP60 protein ailesi çoklu altbirime sahiptir, şaperonin olarak da adlandırılır. HSP60, merkezi boşluklarında, denatüre olmuş proteini yakalar ve ATP kullanarak protein katlanma reaksiyonlarını yavaşlatır.

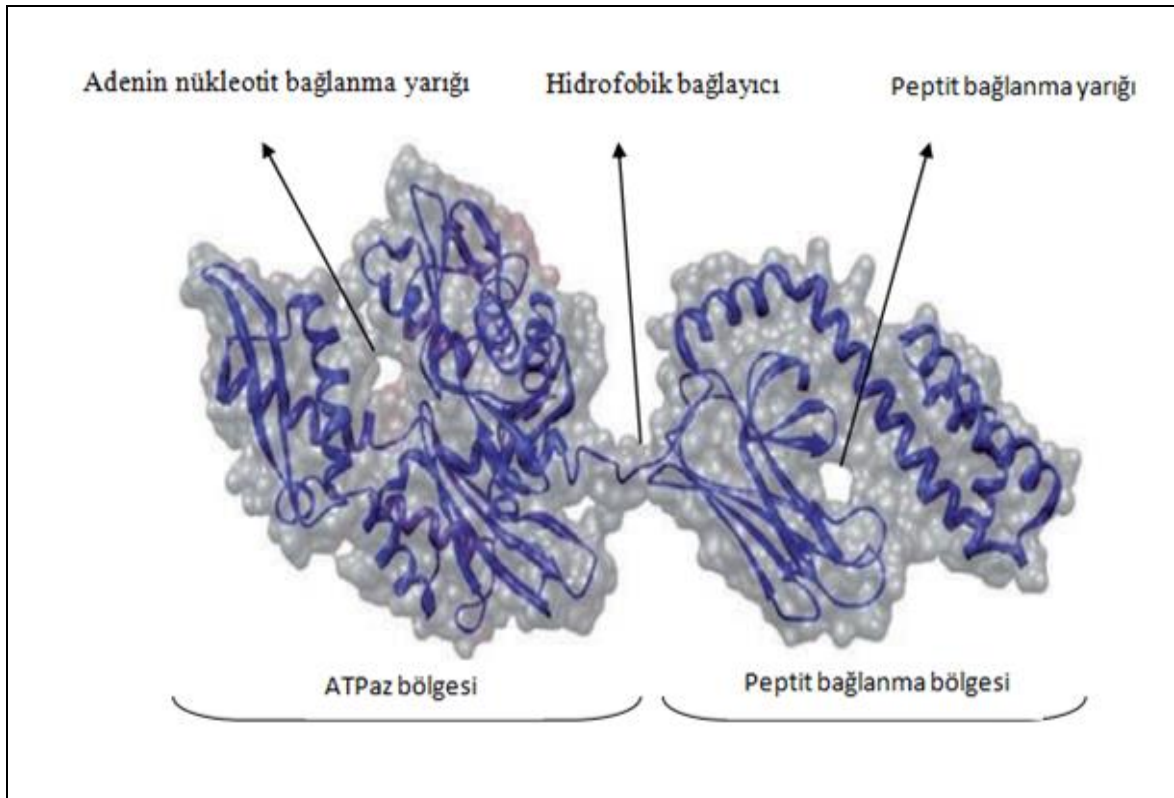
2.3.2. HSP90

HSP90 proteinler diğer hüresel proteinlerin katlanmasında rol oynar. Diğer proteinlere yardım eder ama onlarla bir kompleks oluşturmaz. Nerdeyse tüm hücrelerde, stressiz koşullarda hücre içi transportta görev almak üzere HSP90 proteinlerine rastlanabilir. Stresli koşullar altında ise, bu proteinlerin sentezinin artması stresi azaltmak içindir (**Linqvist ve Craig 1988**).

2.3.3.HSP70

HSP70 ailesi, en az sekiz üyeden oluşmaktadır. HSP70 proteinlerin doğru katlanması ve protein homeostasizinde görev alır. Bu proteinler ayrıca pH değişikliği, sıcaklık değişikliği, kanda oksijen değişikliği gibi stres durumlarında hücrenin hayatta kalabilmesinde de rol alır. Bu hayati rol, HSP70 in stres anında denatüre olmuş ve katlanamamış proteinlerin düzeltilmesinde üstlendiği roldür.(**Daugaard 2007**)

HSP70 iki fonksiyonel altbirimden oluşmaktadır. İlki yüksek afiniteli ATP bağlanma bölgesi içeren N- terminal bölgedir. Diğer substrat proteinlerin ve polipeptitlerin bağlanmasından sorumlu C- terminal bölgedir. Bu yapı Şekil 2.9. da gösterilmektedir.



Şekil 2. 9. HSP70 (ADP bağlı yapı).

Esnek hidrofobik bağlayıcı, ATPaz bölgesi ve peptit- bağlayıcı bölge arasında köprü görevi görür. (**Kampinga ve Craig 2010**)

HSP70 polipeptitlerin açılmış hidrofobik alanlarına bağlanır. HSP70 aktivitesi ATP bağlama, ATP hidrolizi, nükleotit değiştirme döngüleriyle kontrol edilir (**Qiu ve ark. 2006**).

- **HSP70 ve kanser**

HSP70'in fazla miktarda üretilmesi hücrede tümör oluşumuna yardımcı olur. İnsanda meme kanseri MCF-7 hücrelerinde fazla üretilmiş HSP70 G0/ G1 fazını kısaltarak hücre büyümesini hızlandırır. Bu HSP70 in siklinD1'in stabilize etmesiyle ilgili olabileceği kabul edilmektedir. HSP70 in azalışı ağız kanser hücreleri gibi bazı tümör hücrelerini apoptoza sürükler. Normal hücreler ise HSP70 in azalışıyla yaşama yeteneklerini yitirmezler. HSP70-2'nin tümör ilerletici aktivitelerde p53 baskılanmasında rolü vardır. Kanser ilerlemesinde HSP70 ler kofaktörlerle beraber çalışabilirler (**Sherman ve ark. 2007**).

HSP70 birçok kanser türünde serumda artış gösterdiğinden dolayı biyomarker olarak kullanılabilir. Ancak bu çalışmalar çok yüzeyseldir. Genelde HSP70, stres azaltıcı olarak bilinmektedir (**Suzuki 2006**).

2.3.4. HSP70 ile yapılan biyosensör çalışmaları

Manoj Garg ve ark. HSP70 proteinini idrar kesesi üroteliyal kanser tayini için kullanmışlardır. İdrar kesesi kanseri hızla artan bir kanserdir. Kanserın tekrarlama oranı yüksek olmasından dolayı ve tedavisi uzun bir süreç gerektirdiğinden dolayı, idrar kesesi kanseri tedavisi en pahalı olan kanser türüdür. Bu yüzden, erken teşhisi çok önemlidir. Bu yapılan çalışmada da HSP70 in oranının artmış olduğu gözlenmiş ve bu kanser türüyle bu şekilde ilişkilendirilmiştir.

E.Pyza ve ark. HSP70 proteininin ekotoksikolojik çalışmalarda biyomarker olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır. Ancak HSP70 in bu amaçla kullanımının bazı zorlukları vardır. Örneğin, normal koşullar altında hsc hücrelerde hsp ile aynı fonksiyona sahiptir ve DNA dizisinde genler tarafından benzer kodlanır. Hsc miktarı bilinmez ve farklı organizma gruplarında farklılık gösterir. Monoklonal antikor testlerine dayanan HSP tayini için bir çok metot hsp ve hsc yi birbirinden ayıramaz. Bu çalışmada iki omurgasızda deterjanlar,pestisitler ve ağır metallere kaynaklanan stres halinde HSP70 proteininin tayin edilip edilmeyeceği araştırılmıştır. Bu iki tür *Lithobius mutabilis* ve *Musca domestica* dır. Ancak çalışma sonuçları HSP70 proteininin, çevresel risk değerlendirmesi için çok pratik olmadığını göstermiştir.

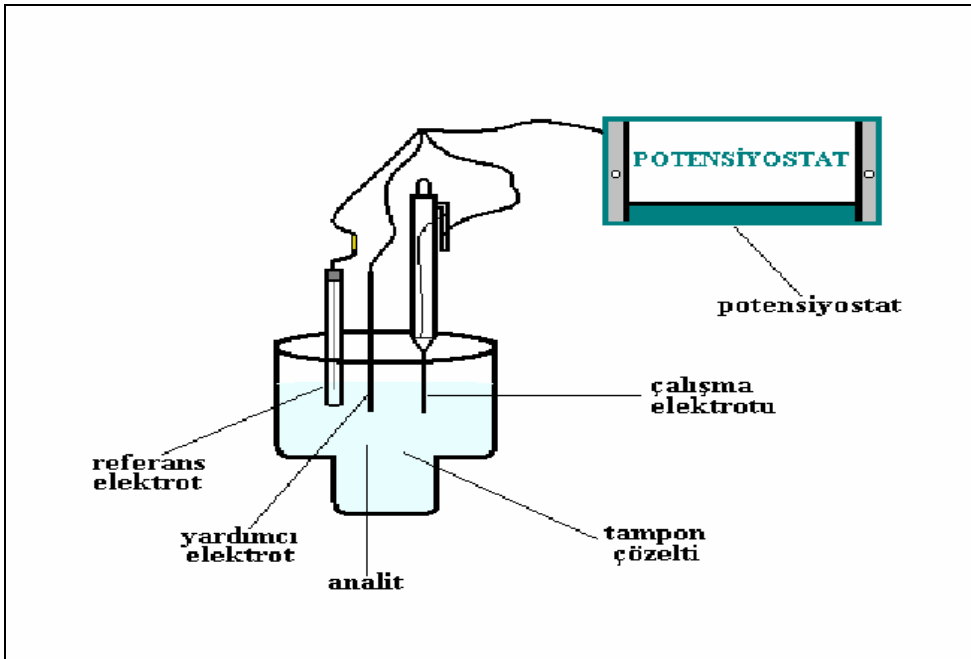
Mathias Gehrman ve ark. baş ve boyunda skuamöz hücreli kanser hastalarında tümör tayini için HSP70 in biyomarker olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır ve sonuçta HSP70 seviyesinin referans doku ile kıyaslandığında kanserli dokularda arttığını görmüşlerdir. HSP70, hastalarda klinik radyoterapi sonuçlarının gözlenmesi için ve tümörlerin belirlenmesi için potansiyel bir biyomarker olarak kullanılabilir.

Sudhir K. Dutta ve ark. serum HSP70 in pankreas kanserinin erken tayini için biyomarker olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır. Sonuçlarda pankreas kanserli hastalarda serum HSP70 seviyesinin arttığı görülmüştür ve biyomarker olarak kullanılabilceği bulunmuştur.

2.4. Elektrokimya

Elektrokimya; maddenin elektrik enerjisi ile etkileşmesini, bunun sonucunda oluşan kimyasal dönüşümleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine, elektrik enerjisinin de kimyasal enerjiye dönüşümünü inceleyen bilim dalıdır. Elektrokimya redoks olayıyla ilgilendir, yani bu tip tepkimeler yükseltgenme-indirgenme türü tepkimelerdir. Bu tepkimeler, elektron transferinin gerçekleştiği ve elektrokimyasal hücre adı verilen bir kap içerisinde yürütülen tepkimelerdir. Bir elektrokimyasal tepkimenin oluşabilmesi;

1. Analiz edilecek maddeyi içeren bir çözeltiyi (İletkenlik tampon çözelti kullanımıyla sağlanır)
2. Maddenin kimyasal dönüşüme uğradığı genellikle üçlü olan bir elektrot sistemini
3. Elektrotları birbirine bağlayan bir çevrim sistemini gerektirir.



Şekil 2. 10. Genel Elektrokimyasal Hücre Seması

Analiz işlemlerinde, maddenin elektrokimyasal özelliklerinin kullanıldığı yöntemlere elektroanalitik yöntemler denir. Çeşitli elektroanalitik yöntemleri kullanılarak, Doğru akım (DC), Diferansiyel Puls (DPV), Dönüşümlü Voltametri (CV) vb. uygulamalarla belirli potansiyel aralığında tarama yapılır ve meydana gelen akım şiddeti ölçülür. Difüzyona bağlı olarak oluşan bir akım söz konusu olduğundan, burada ölçülen difüzyon akımıdır. Akım, difüzyon hızı ile doğru orantılıdır. Difüzyon, elektrot yüzeyinin yakınında yer alan difüzyon tabakasında oluşur (**Brett ve ark. 1992**).

2.4.1.Voltametri

Çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçüldüğü ve buna bağlı olarak analit hakkında bilgi edinildiği elektrokimyasal yöntem voltametri, uygulanan gerilimin ölçülen akım değerlerine karşı çizilen grafiğine de voltamogram denir. Voltametri çalışılacak gerilim aralığının sınırları, kullanılacak çalışma elektroduna, kullanılan çözücüye ve elektrolit türlerine bağlıdır.

Voltametri, çeşitli ortamlarda oluşan yükseltgenme ve indirgenme işlemlerinin incelenmesi, yüzeydeki adsorpsiyon işlemlerinin araştırılması ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerinde gerçekleşen elektron aktarım mekanizmalarının aydınlatılması gibi analitik olmayan amaçlarla da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

- **Voltametrik cihazlar**

Bir voltametrik analizde kullanılacak cihazlar; elektrokimyasal hücre, analit ve destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış üç elektrottan meydana gelir. Bu elektrotlar;

a) **Çalışma elektrodu;** Yüzeyinde, analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur. Zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişir. Yapımında iletken malzemeler kullanılmaktadır. Bu iletken malzemeler örnek olarak; platin veya altın gibi inert bir metal, karbon, pirolitik grafit ya da camsı karbon; kalay oksit ya da indiyum oksit gibi yarı iletken veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metal olabilmektedir. Kullanılacak elektrotlar, farklı şekil ve büyüklüklerde hazırlanarak, tasarımı yapılacak olan biyosensör sistemine en uygun şekilde geliştirilebilmektedirler.

- ✓ **Karbon elektrotlar ve çeşitleri**

Bu tip elektrotlar, çok ucuz olmaları ve geniş potansiyel aralığında çalışılmasına olanak sağlamaları açısından, elektrokimyasal analizlerde sıklıkla tercih edilmektedirler.

Karbon elektrot çeşitleri;

- Karbon Pastası Elektrodu

- Camsı Karbon Elektrot
- Kalem Grafit Elektrot
- Perde Baskılı Karbon Elektrotlar

Camsı karbon elektrot: Camsı karbon fenol / formaldehit polimerlerinin veya poliakrilonitrilin, 1000-3000 °C arasında, basınç altında, karbonizasyona uğratarak, inert malzemeden yapılmış elektrot gövdesi içerisine sıkıştırılmasıyla elde edilir. Elde edilen yüzeyin çok daha pürüzsüz ve düzgün olmasından ötürü bu tip elektrotlarla elde edilen elektrokimyasal yanıt, karbon pastası elektrotlarına göre daha iyi ve tekrarlanabilir. Hem yüksek fiziksel dayanıklılığa sahiptir hem de kimyasal tepkimelere katılmaz. Ayrıca geniş bir potansiyel aralığında çalışmasına olanak sağlamaktadır.

b. Referans elektrot; Deney süresince potansiyeli sabit kalan bir elektrottur. Çalışmalarda özellikle Ag / AgCl referans elektrotlar sıklıkla kullanılmaktadır.

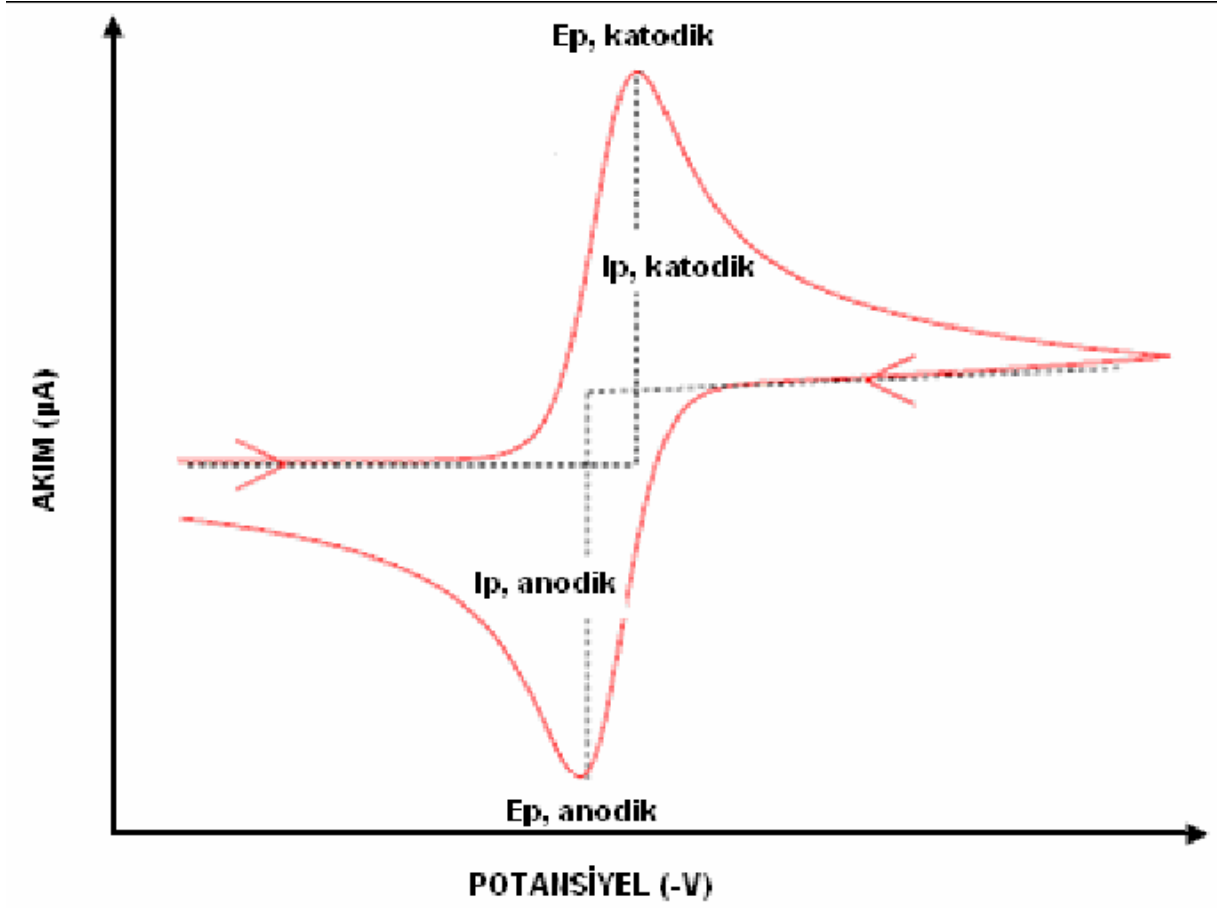
c. Yardımcı elektrot; Elektriğin çözelti içinden çalışma elektrotuna aktarılmasını sağlayan karşıt elektrottur. Bu elektrot, çalışma elektrotu ile bir çift oluşturmakta ancak ölçülen potansiyelin büyüklüğünün tayininde rol oynamamaktadır.

- **Voltametrik yöntemler**

Dönüşümlü voltametri tekniği ile gerilimin bir fonksiyonuna karşı akım ölçülmektedir. Bu teknikte öncelikle başlangıç ve bitiş potansiyellerini içeren bir aralık belirlenir. Sonrasında başlangıç potansiyelinden bitiş potansiyeline doğru sabit bir hızda gerilim uygulanır. Gerilim yükseltgenme veya indirgenme yönünde olabilir. Uygulanan bu uyarma sinyali üçgen şekilli dalga hareketiyle bir maksimuma kadar doğrusal olarak artar ardından aynı eğimle orijinal değerine doğrusal olarak azalır. Başlangıç taramasının yönü, analiz edilecek örneğe bağlı olarak negatif veya pozitif olabilir. Negatif potansiyel yönündeki taramalar ileri tarama, zıt yöndeki taramalar ise ters tarama olarak adlandırılır. Uygulanan gerilim aynı sabit hızda bitiş potansiyelinden başlangıç potansiyeline doğru tekrarlanır. Sürekli değişen potansiyel değerlerine karşı belirli aralıkta, akımda meydana gelen değişim grafiğe geçirilerek “Dönüşümlü Voltamogram” elde edilir (Yıldız 1993).

Dönüşümlü voltametri ile durgun sistemde, üçlü elektrot sistemi ile çalışılır. Burada hız difüzyon tarafından tayin edilir. Analite ait yükseltgenme ve indirgenme elde edilen voltamogramdan gözlenebilmektedir. Bu teknik çoğunlukla elektrokimyasal bir analizde kullanılacak olan maddelerin elektriksel davranışlarını saptamak için tercih edilir. Böylece elektroaktif türlerin yükseltgenme–indirgenme tepkimelerine ait mekanizmalar kolaylıkla

aydınlatılabilir. Dönüşümlü voltametri miktar tayinine dayalı analizlerde tercih edilmemektedir (Yıldız 1993).



Şekil 2. 11. Pik potansiyellerini ve akımlarını gösteren klasik bir dönüşümlü voltamogram

Diğer voltametrik teknikler;

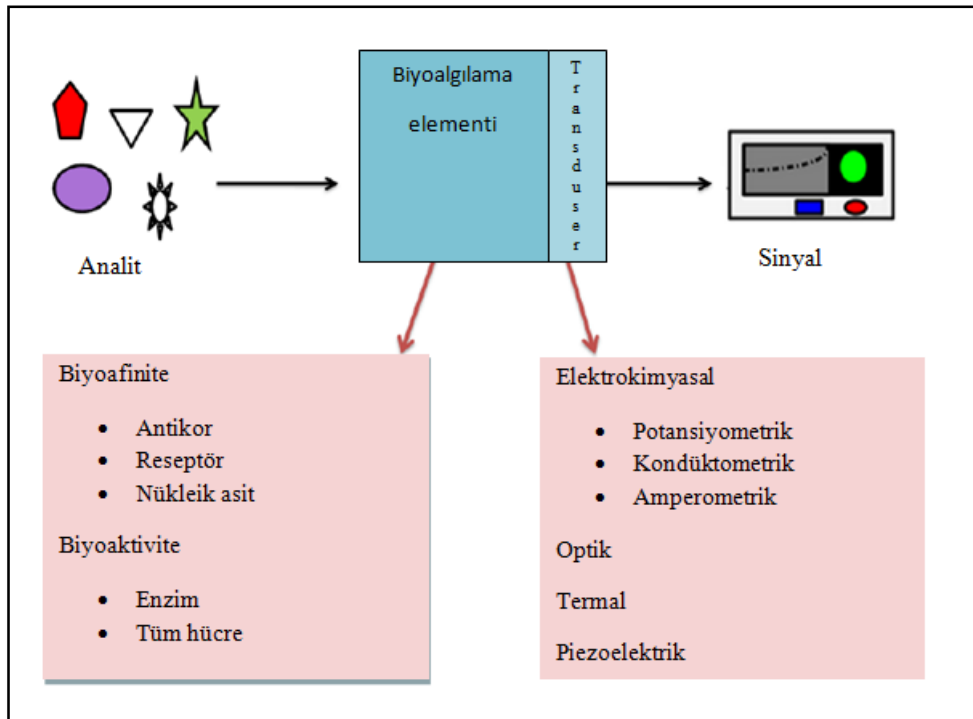
- Diferansiyel Puls Voltametrisi (DPV)
- Kare Dalga Voltametrisi (SWV)
- Doğrusal Taramalı Voltametri

2.5. Biyosensörler

Kimyasal bilgiyi analitik sinyale çeviren aygıt kimyasal sensör olarak bilinmektedir. Biyokimyasal mekanizmanın kullanıldığı kimyasal sensörlere de biyosensör denilmektedir (Thevenot ve ark. 2001).

Biyosensörler; spesifikklik, üretim kolaylığı, tekrarlanabilirlik, yüksek duyarlılık, kararlılık gibi özelliklere sahiptir (Gerard ve ark. 2002). Bu yüzden tanılama, gıda teknolojisi, biyoteknoloji, genetik mühendisliği, çevresel gözlem gibi uygulama alanları mevcuttur (Ahuja ve ark. 2007). Bir biyosensör temel olarak iki kısımdan oluşur: biyolojik tayin elementi ve bir transduser. Biyolojik bileşen katalitik veya katalitik olmayan olabilir. Katalitik gruplar enzimler, dokular ve mikroorganizmaları içerir. Katalitik olmayan gruplar antikorlar, nükleik asitler veya reseptörler olabilir. İkinci kısım, transduser, biyolojik sinyali anlaşılabilir sinyale çevirmek için kullanılır. Elektrokimyasal (kondüktometrik, potansiyometrik ve amperometrik), optik, kolorimetrik biyosensörleri üretebilmek için bir çok transduser kullanılır (Sharma ve ark. 2003).

Biyosensörler, transduser ve biyolojik tayin elementi çeşidine göre sınıflandırılır. Biyosensörlerin sınıflandırılması Şekil 2.13. te gösterilmektedir.



Şekil 2. 12. Biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensör oluşturabilmek için elektrot yüzeyindeki biyolojik materyaller çok iyi immobilize edilmelidir. İmmobilizasyon, biyoalgılama sisteminin oluşturulmasında, biyomoleküllerin biyoaktivitelerini kaybetmeden fiziksel lokalizasyonunu ifade eder. Biyolojik materyallerin kullanım ömrü çok kısadır. Bu yüzden biyomoleküller uygun bir matriks içerisinde korunmalıdırlar.

İmmobilizasyon işleminde çok değişik yöntemler kullanılabilir. Hangi yöntemin kullanılacağı seçilen dönüştürücü ve biyoreseptöre göre belirlenir. İmmobilizasyon biyoreseptörün kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. Biyosensör immobilizasyonunda başlıca beş yöntem kullanılmaktadır (**Telefoncu 1999**).

✓ **Kovalent bağlama**

Enzimler doğrudan dönüştürücü veya önceden uygun bir film veya tabaka ile kaplanmış dönüştürücüye kovalent olarak bağlanabilirler. Enzimler aktifleştirilmiş dönüştürücü yüzeylerine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanarak immobilize edilen enzim preparatının dönüştürücü yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturmasıyla da biyosensörler hazırlanabilir.

Enzimlerin kovalent bağlanmasında dikkat edilecek önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için aktif merkezdeki amino asitler üzerinden gerçekleşmemesi ve bu grupların sterik olarak rahatsız edilmemesidir. Kovalent bağlanma enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleşir (**Telefoncu 1999**).

✓ **Tutuklama**

Biyoreseptörün bir membran veya tabaka içerisinde hapsedilmesidir. Enzimler makromoleküler yapıları proteinler olup polimer jel tabakalarda ve daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanabilirler. Bu yöntem enzimler yanında organeller, hücreler ve antikolar için de uygulanabilir. Elektrokimyasal polimerizasyon diğer bir tutuklama yöntemidir.

✓ **Çapraz bağlama**

Bu yöntem biyosensör hazırlanmasında daha çok tutuklama ve kovalent bağlama yöntemlerinin kombinasyonu şeklinde uygulanır. Çapraz bağlayıcı reaktif olarak glutaraldehit, hegzametilen diizosiyanat, diflorodinitrobenzen, bismaleimidohegzan, disüksinilsüberat sık kullanılır. İki fonksiyonlu reaktifler enzimler yanında organeller, hücreler ve antijenlerin immobilizasyonunda da uygulanır.

✓ **Adsorpsiyon**

Bu yöntemde biyobileşenin film veya tabakaya adsorbe olması sağlanır. Biyobileşenlerin kimyasal yapısı ve fiziksel durumuna göre immobilizasyon yöntemi belirlenir. Enzimler için uygulanan tüm immobilizasyon yöntemleri protein yapısındaki diğer biyoreseptörler için de uygulanabilir. Örneğin; hayvan ve bitki dokuları zar yapısında olduklarından farklı immobilizasyon yöntemleri uygulamak gerekir (**Telefoncu 1999**).

2.5.1. Elektrokimyasal biyosensörler

Etkileşim sonucu ortaya çıkan değişim elektrokimyasal bir değişim ise (elektriksel potansiyel, akım veya empedans değişimi gibi), çevirici bölümün bu elektrokimyasal değişimleri algıladığı biyosensörlere elektrokimyasal biyosensörler adı verilir. Elektrokimyasal sensörler, bir elektrotun transdüksiyon elementi olarak kullanıldığı kimyasal sensörlerin alt sınıfını oluşturmaktadır (**Thevenot ve ark. 2002**). Elektrokimyasal tekniklerin analitik gücü ve biyolojik tayinin spesifikliğı, seçiciliğı elektrokimyasal biyosensörlerde de bulunur. Bu yüzden elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik olaylarda hızlı, basit ve düşük maliyetli tayin imkanı sağlarlar. (**Wang 2006, Cosnier 1999**).

Elektrokimyasal teknikler, transduser tipine göre üç alt sınıfa ayrılmaktadır: kondüktometrik, potansiyometrik ve amperometrik biyosensörler.

✓ **Kondüktometrik biyosensörler**

Kondüktometrik biyosensörler, biyokimyasal reaksiyon nedeniyle örnek çözeltilerde veya ortamda oluşan elektriksel iletkenlikteki değişimleri tespit eder. Tayin, yönetimin moduna göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler (**Skoog ve ark. 2007**).

✓ **Potansiyometrik biyosensörler**

Potansiyometrik biyosensörler ihmal edilebilir akım altında, elektrokimyasal hücredeki potansiyelin ölçülmesi prensibine dayanır. Elektrot yüzeyindeki seçici bağlanma ile oluşan iyon konsantrasyonuna ait elektrik potansiyelini tayin ederler (**Pohanka ve ark. 2008**).

✓ **Amperometrik Biyosensörler**

Amperometrik elektrokimyasal biyosensörler diğerleriyle kıyaslandığında çok daha fazla ilgi çekmektedir. Seçicilik, hassasiyet, hızlı yanıt, üretim kolaylığı ve tekrar üretilebilirliğinden dolayı substrat analizi için kullanışlı bir tekniktir (**Yang ve ark. 2014**).

Amperometrik biyosensörler, elektrokimyasal reaksiyon sırasında, türlerin indirgenme veya yükseltgenmesiyle oluşan akım değişikliklerini ölçerler. Ölçüm sırasında çalışma elektrotuna (referans elektrotuna göre) sabit bir potansiyel uygulanır (**Chaubey ve ark. 2002**).

Amperometrik tayin, genellikle biyokatalitik veya afinite sensörlerinde kullanılır (**Ronkainen ve ark. 2010**).

2.5.2. Elektrokimyasal Empedans Spektroskopisi (EIS)

Elektrokimyasal empedans spektroskopisi farklı araştırma alanlarında geniş ölçüde kullanılan değerli bir tekniktir. Metot potansiyel ya da akımın küçük bir sarsımının uygulanmasını içerir. Bu sarsım tekli bir sinüs dalgası veya üst üste eklenmiş farklı frekanslardaki çok sayıda sinüs dalgasıdır. Uygulanan sarsımdan ve bunun ölçülmüş yanıtından, empedansın büyüklüğü ve faz kayması belirlenir. Bu teknik spektroskopi olarak adlandırıldığından, parametreler uygulanan sarsımın frekansının bir fonksiyonu olarak ölçülür (**AUTOLAB 2005**). Elektriksel rezistans; bir devre elemanın, elektriksel akım devaranına karşı direnme yeteneğidir. Rezistans, potansiyel (E) ve akım (I) arasındaki orantıya dayanarak Ohm kuralları tarafından belirlenir. Buradan yola çıkılarak oldukça iyi bilinen şu bağıntı yazılabilir (**2.1**).

$$R (\text{Ohm})=E (\text{Volt}) / I (\text{Amper}) \quad (2.1)$$

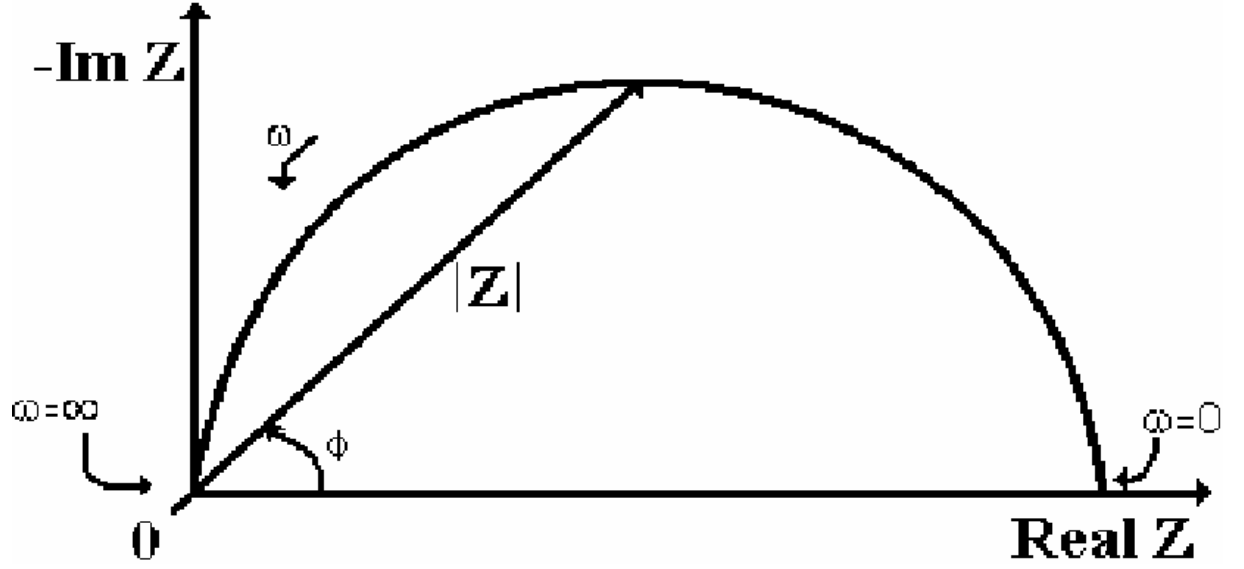
Ohm kanuna paralel olan bir ifade sistem empedansının şu şekilde hesaplanmasına olanak sağlar (**2.2**).

$$Z= E(t) / I(t) \quad (2.2)$$

Burada; Z empedans değeri, E(t) küçük uyarma sinyali (zamanın bir fonksiyonu olarak), I(t) yanıt sinyali (zamanın bir fonksiyonu olarak) olarak ifade edilmektedir.

Çalışmalarda kullanılan empedans diyagramı bir gerçek bir de hayali kısımdan oluşmaktadır. X ekseninde gerçek, y ekseninde ise hayali kısmın yer aldığı ve sinyal yanıtlarının bu şekilde çizildiği diyagramlardan bir Nyquist eğrisi elde edilmektedir. Bu diyagramda y ekseninin negatif olduğu ve Nyquist eğrisindeki her bir noktanın farklı bir frekanstaki empedans değeri olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Nyquist eğrisinde empedans mesafenin (uzunluğun) bir vektörü olarak sunulabilir IZI. Bu vektör ile x eksen

arasındaki açı frekansı (f-Hertz) verir. Nyquist eğrilerinde diyagram üzerindeki veri noktalarına bakıldığında, o noktayı kaydetmek için hangi frekans değerinin kullanıldığı konusunda bir şey söylemek mümkün değildir. Ölçüm sonucunda elde edilen sinyale ait sayısal analiz uydurma ve simülasyon seçeneği kullanılarak okunabilir değerler elde edilir.



Şekil 2. 13. Empedans vektörünün belirtildiği Nyquist Eğrisi

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Deneyde kullanılan tüm reaktifler, grafen ve HSP70 Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)' den alındı. Tüm seyreltme işlemleri pH 7' de 50 mM olarak hazırlanan fosfat tamponu ile yapıldı. HSP70 belli konsantrasyonlarda porsiyonlama yapılarak -20°C' de muhafaza edildi. Çalışma elektrotu olarak camsı karbon elektrot (GCE), referans elektrot olarak KCl ile doygunlaşmış 3 M Ag/AgCl elektrot ve yardımcı elektrot olarak ise 10 mm uzunluğunda platin tel kullanıldı. Tüm elektrotlar iBAS, Warwickshire, UK firmasından getirildi. Ölçümler ise döngüsel voltametri, kronoamperometri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi yazılımı olan Echem Analyst içeren (Gamry Instruments, Warminster, USA) bir bilgisayara bağlı Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 1000 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazında alındı.

3.2 Elektrokimyasal Ölçümler

GCE elektrota uygulanan bütün immobilizasyon işlemlerinin karakterizasyonunu ölçmek için elektrokimyasal impedans spektroskopisinden (EIS), döngüsel voltametriden (CV), kronoamperometriden yararlandı. CV için potansiyel aralığı -0,5 – 1 V arasında seçilmiş olup (adım büyüklüğü: 20 mV, tarama hızı: 50 mV/s) ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirildi. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternatif akımda gerçekleştirildi. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametredeki ile aynıdır. İmpedans spektrumları 10.000 – 0.05 Hz aralığındadır. Kronoamperometri ölçümlerinde potansiyeli 0,01 V, frekansı 20 Hz (3600 saniye) seçilmiş olup ölçümler pH 7' de 50 mM olarak hazırlanan fosfat tamponu içerisinde gerçekleştirildi.

3.3. Ölçüm Prosedürleri

Anti-HSP70 temelli biyosensörün hazırlanması için kullanılan çalışma elektrodu camsı karbon elektrottur. HSP70 konsantrasyonu sabit potansiyelde sistemden geçen akım miktarındaki değişimle doğru orantılıdır ve camsı karbon çalışma elektrodu ile akım değişimlerini belirlemek mümkündür. Bu bilgilerin doğrultusunda, ilk aşama olarak camsı karbon elektrodun temizlenmesi yer almaktadır. Temizlik prosedüründe, elektrot 0,05µm alümina ile temizlendikten sonra ultra saf su ile yıkanıp 1 mL %65 lik HNO_3 ve 1 mL saf aseton karışımında 180 sn boyunca ultrasonik banyoda bekletildi. Tekrar ultra saf su ile yıkandıktan sonra elektrodun CV ve EIS ölçümleri alındı. Temiz elektrot yüzeyine, hazırlanan

grafen çözeltisi damlatılarak inkübasyona bırakıldı. Ölçüm prosedürlerinin diğer basamakları sırasıyla; elektrotun EDC/NHS çözeltisi damlatılarak inkübasyona bırakılması, antiHSP70 çözeltisi damlatılarak inkübasyona bırakılması, %1 lik BSA çözeltisi damlatılarak inkübasyona bırakılması ve HSP70 biyomarkerının damlatılarak inkübasyona bırakılmasıdır. Ölçümlerde kullanılan sistem Şekil 3.1.de verilmiştir.



Şekil 3. 1. Ölçüm sistemi

Grafen çözeltisinin hazırlanması;

- 0,2 mg grafen oksit tartıldı.
- Üzerine 100 μ L ultra saf su konuldu.
- 1 saat ultrasonik banyoda bekletildi.
- Daha sonra üzerine 0,024 g NaOH, 0,02 g trikloroasetik asit eklendi.
- Tekrar 1 saat sonikasyon yapıldı. 1 mL ultra saf su eklendi.
- pH ölçümü yapıldı. (pH 12.8 oldu.)

- Daha sonra pH ı 8 e ayarlanmaya çalışıldı. Bu işlem için 1 mL seyreltilmiş HCl, 0.5 ml 2 M lık NaOH kullanıldı.

HCl seyreltmesi %37 lik HCl den 10 μ L alıp 1000 μ L ye ultra saf su ile tamamlanarak yapıldı.

Grafen temelli biyosensörün hazırlanmasında izlenen yol Tablo 3.1’de ayrıntılı olarak verilmektedir. Tablolarda belirtilen değerler; çok sayıdaki ön denemeler ve optimizasyon çalışmaları sonrasında belirlenen en uygun değerlerdir. Hazırlanan sensörler önce destile su ile yıkandı ve ölçümler arasında karanlık ortamda bekletildi.

Tablo 3.1. HSP70 tayinine yönelik grafen temelli biyosensör sisteminin hazırlanma prosedürü

İşlem Sırası	İşlem
1	Herbir temiz elektrot yüzeyine, hazırlanan grafen çözeltisinden 5µL damlatılarak, elektrotlar 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
2	İnkübasyon sonrasında, ultra saf su ile yıkanan her bir elektrodun CV ve EIS ölçümleri alındı.
3	Grafenle kaplanmış camsı karbon elektrotlar 0,4 mM EDC ve 0,1 mM NHS içeren 2 mL çözeltime daldırılarak 1 saat boyunca nemli ve karanlık ortamda bekletildi.
4	1 saat sonunda her bir elektrot tekrar ultra saf su ile yıkanarak saf argon gazı ile kurutuldu. EIS ve CV ölçümleri alındı.
5	Bu işlemlerden sonra her bir elektrotun yüzeyine 5 µL anti-HSP70 (40 µg/mL) damlatıldı. Nemli ve karanlık ortamda 1 saat boyunca bekletildi.
6	1 saat sonunda elektrotlar ultra saf su ile yıkanarak fiziksel olarak yüzeye absorbe olmuş anti-HSP70 uzaklaştırıldı. Elektrotlar argon gazı ile kurutulurken EIS ve CV ölçümleri alındı.
7	Daha sonrasında ise aktif uçları bloke etmek için %1 lik 10µL BSA çözeltisi yine her bir elektrot yüzeyine eklenip karanlık ve nemli ortamda 30 dakika bekletildi. Bekleme sonrası elektrotlar ultra saf su ile yıkandı ve argon gazı ile kurutuldu. CV-EIS ölçümleri alındı.
8	Anti-HSP70' in elektrot yüzeyine bağlanması gerçekleştirildikten sonraki aşama HSP70' in elektrot yüzeyine bağlanmasını sağlamaktır. Lineer aralığı genişletebilmek adına elektrota uygulanacak olan HSP70 derişimleri her bir eklemede farklı olacak şekilde belirlendi.
9	İlk eklemede 12 fg/mL HSP70 elektrot yüzeyine damlatıldı. Son ekleme işleminden sonra toplam konsantrasyon 144 fg/mL olacak şekilde konsantrasyonlar belirlendi.
10	Her bir ekleme hacmi 5 µL olarak belirlendi. İnkübasyon süresi nemli ve karanlık ortamda 1 saattir.
11	Her inkübasyon periyodundan sonra elektrotlar, yüzeyinde fiziksel olarak absorblanmış HSP70' i uzaklaştırmak için ultra saf su ile yıkandı. Daha sonra argon gazı ile kurutuldu. CV ve EIS ölçümleri alındı.
12	Bütün bu işlemler $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ redoks probu içeren çözeltinin bulunduğu hücrede yapıldı.

3.4. Optimizasyon Basamakları

HSP70 tayinine yönelik geliştirilen grafen temelli biyosensörün, en üst düzeyde performansla çalışmasını sağlamak amacıyla öncelikle bütün bileşenlerin optimizasyonları gerçekleştirildi. Bu amaca yönelik olarak, sırasıyla grafen miktarı, EDC/NHS konsantrasyonu, antiHSP70 konsantrasyonu ve inkübasyon süresi, HSP70 inkübasyon süresi en uygun biyosensör yanıtlarını verecek şekilde optimize edildi. Bu çalışmalar daha ayrıntılı bir şekilde alt başlıklarda anlatılmıştır.

3.4.1. Grafen miktarı optimizasyonu

Grafenin elektrot yüzeyine kaplanabilmesi antiHSP70 in yüzeye maksimum verimde bağlanabilmesi için en önemli adımdır. Bu amaçla, HSP70 tayinine yönelik grafen temelli biyosensör için en uygun grafen miktarının belirlenmesine yönelik bu optimizasyon gerçekleştirildi. 0,1 mg, 0,2 mg, 0,4 mg, ve 0,8 mg olmak üzere dört farklı grafen miktarları kullanılarak biyosensörler hazırlandı. Hazırlanan biyosensörlerle her aşamada CV ve EIS ölçümleri alındı. Ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirildi. Her aşamanın inkübasyon sürelerinde elektrotlar oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildi. Bu işlemlerin neticesinde, HSP70 tayinine yönelik standart grafikler oluşturuldu.

3.4.2. EDC/NHS konsantrasyonunun belirlenmesi

HSP70 tayinine yönelik olarak geliştirilen grafen temelli biyosensörün geliştirilmesinde EDC/NHS çözeltisinin konsantrasyonu da optimize edilen parametrelerden biridir. EDC/NHS çözeltisi kullanılan grafen çözeltisindeki karboksil uçlarını aktifleştirmek için kullanılır. Aktifleşen karboksil uçları ile antiHSP70 çözeltisinde bulunan amin uçları etkileşerek antiHSP70 in kovalent olarak yüzeye immobilizasyonu sağlanmış olur. Bu sebeplerden dolayı EDC/NHS konsantrasyonunun doğru bir şekilde belirlenmesi de biyosensörün doğruluğu açısından çok önemlidir. Bu amaca yönelik olarak, 0,04 mM olan EDC ve 0,01 mM olan NHS konsantrasyonları 0,4 mM EDC ve 0,1 mM NHS olarak değiştirilerek optimize edildi. EDC/NHS çözeltisinin hazırlanma basamağında 2,4 μ L EDC+1,2 μ L NHS alınarak 50 mM pH 7 fosfat tamponuyla 2 mL ye tamamlanmıştı. Elektrot bu çözeltiliye daldırılıp inkübasyona bırakılmıştı. Ancak bu optimizasyon basamağında 24 μ L EDC+12 μ L NHS alınarak fosfat tamponuyla 2 mL ye tamamlandı ve elektrot bu çözeltiliye inkübasyona bırakıldı. Elde edilen EIS ve CV spektrumları incelendi.

3.4.3. AntiHSP70 konsantrasyonu optimizasyonu

Tekrar üretilebilirlik ve yüksek tekrarlanabilirlik özelliklerine sahip hassas bir biyosensör hazırlanması için antiHSP70 konsantrasyonun optimizasyonu çok önemli bir adımdır. Bu amaca yönelik olarak, hazırlanan elektrotlar, yüzeylerine sırasıyla 20µg/mL, 40µg/mL, 60µg/mL ve 80µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan antiHSP70 çözeltisi damlatılarak 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda CV ve EIS ölçümleri alındı. EIS ölçümlerinden elde edilen Rct değerleri, HSP70 konsantrasyonuna karşılık grafiğe geçirildi.

3.4.4. Anti-HSP70 inkübasyon süresinin optimizasyonu

Optimum anti-HSP70 konsantrasyonu belirlendikten sonra bir diğer önemli adım anti-HSP70 inkübasyon süresinin optimizasyonudur. Anti-HSP70 in en verimli şekilde yüzeye bağlanabileceği inkübasyon süresinin tayin edilmesi amacıyla elektrotlar, yüzeylerine 40µg/mL antiHSP70 çözeltisi damlatılarak 30, 45, 60, 75 dakika sürelerinde inkübasyona bırakıldı. Yapılan ölçümler sonunda standart grafikler çizildi.

3.4.5. HSP70 inkübasyon süresinin optimizasyonu

Tezin bu aşamasında, diğer optimum koşullar sağlandıktan sonra son olarak elektrot yüzeyine HSP70 in maksimum verimde bağlanabileceği inkübasyon süresi belirlendi. Bu amaçla diğer optimum koşullar sabit tutularak, hazırlanan elektrotlara HSP70 çözeltisi damlatıldı ve elektrotlar sırasıyla 30,45, 60 ve 75 dakika inkübasyona bırakıldı. Elde edilen Rct değerleri HSP70 konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirildi.

3.5. Biyosensörün Analitik Çalışmaları

3.5.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik ideal bir biyosensör için olması gereken en önemli özelliklerden biridir. Karakteristik özellikleri bilinen bir biyomarker kullanılması durumunda bile biyosensörün hazırlanmasında çalışma ortam ve koşulları açısından beklenen niteliklerde büyük farklanmalar gözlenebilir. Bu sebeple, tekrarlanabilirlik çalışmalarının gerçekleştirilmesi bir zorunluluktur. Bu aşamada da hazırlanan biyosensörlerin tekrarlanabilirlik denemeleri yapıldı. Elde edilen değerlerden standart sapma ve korelasyon katsayısı hesaplandı.

3.5.2. Tekrar üretilebilirlik

Geliştirilen biyosensörün farklı hazırlanma aşamalarında, elde edilen yanıtların birbirinden ne kadar saptığının belirlenmesi için biyosensörün tekrar üretilebilirlik denemeleri

gerçekleştirildi. Bu amaca yönelik olarak, aynı optimum koşullarda 10 biyosensör hazırlandı ve herbirinden ayrı ayrı standart grafikler elde edildi. Bu standart grafiklere ait doğrusal tayin aralıkları ve R^2 değerleri kıyaslanarak biyosensörün tekrar üretilebilirliği yorumlandı.

3.5.3. Sabit frekansta impedans ölçümleri

Bu çalışmada, elektrokimyasal impedans spektroskopisi biyosensörün immobilizasyonu ve karakterizasyonu için kullanıldı. Ayrıca modifiyeli yüzeyin yük transfer direncini analiz etmek için kullanıldı. EIS nin yanısıra farklı bir impedimetrik yöntem olan sabit frekansta impedans tekniği de bu çalışmada kullanılan bir yöntemdir. Single frequency zamana karşı sabit frekansta impedansı ölçer. Bu impedimetrik teknik ile sabit bir frekansta zamana bağlı olarak anti-HSP70 ve HSP70 arasındaki etkileşim tayin edilmeye çalışıldı. İlk olarak reaksiyon hücresine 5 ml pH 7' de 50 mM olarak hazırlanan fosfat tamponu kondu. İçerisine konsantrasyonu 7,2 pg/mL olan HSP70 çözeltisinden 5 µL damlatıldı ve bir karıştırıcı yardımıyla 1 saat boyunca karıştırılarak 20 Hz sabit frekansta impedans ölçümü zamanın ve faz açısının bir fonksiyonu olarak ölçüldü.

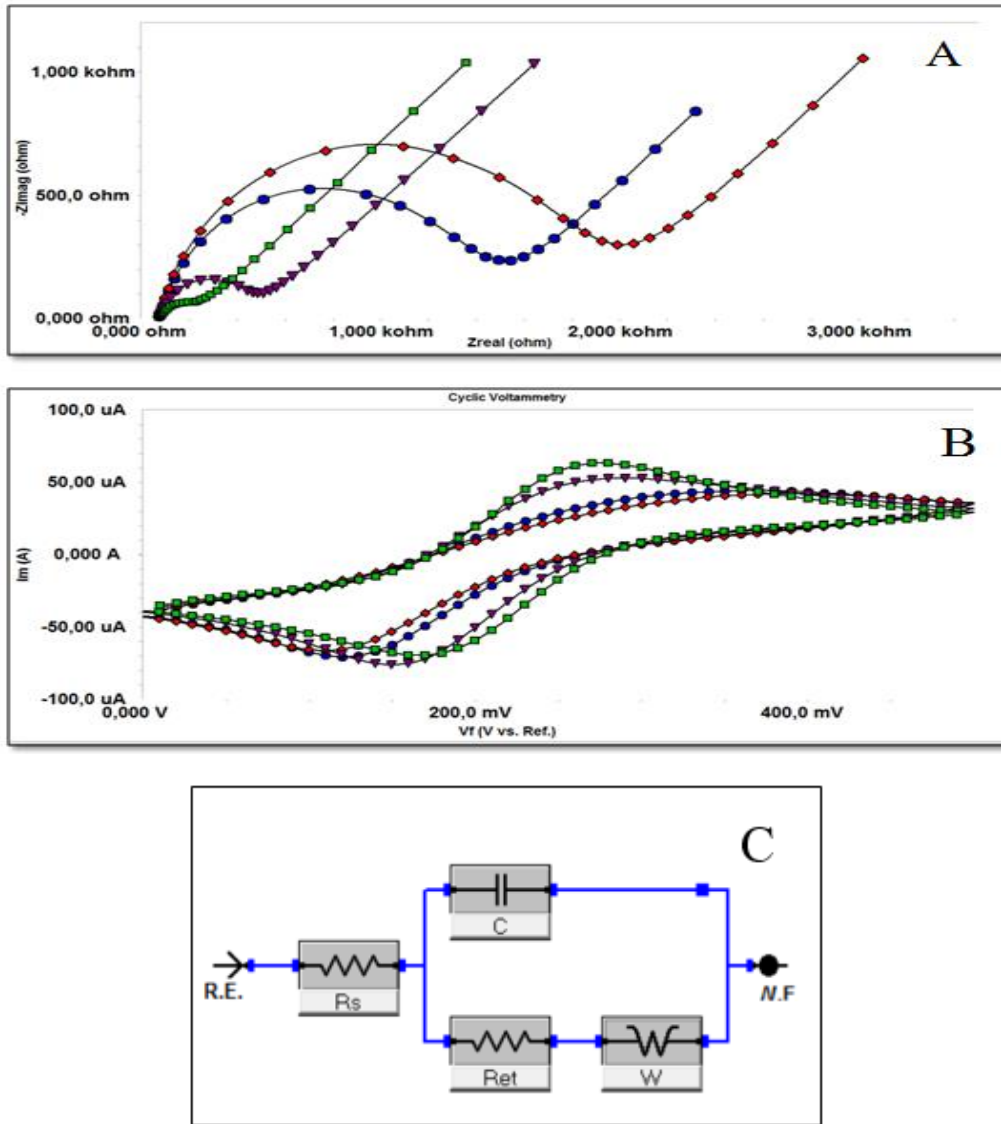
3.5.4. Biyosensörün gerçek örneklerle uygulanabilirliğinin incelenmesi

Tez çalışmasının son aşamasında, geliştirilen biyosensörle, gerçek serum örneklerinde yapay serum örneklerinde HSP70 tayini amaçlandı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildi.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Biyosensörlerin İmmobilizasyon Basamakları

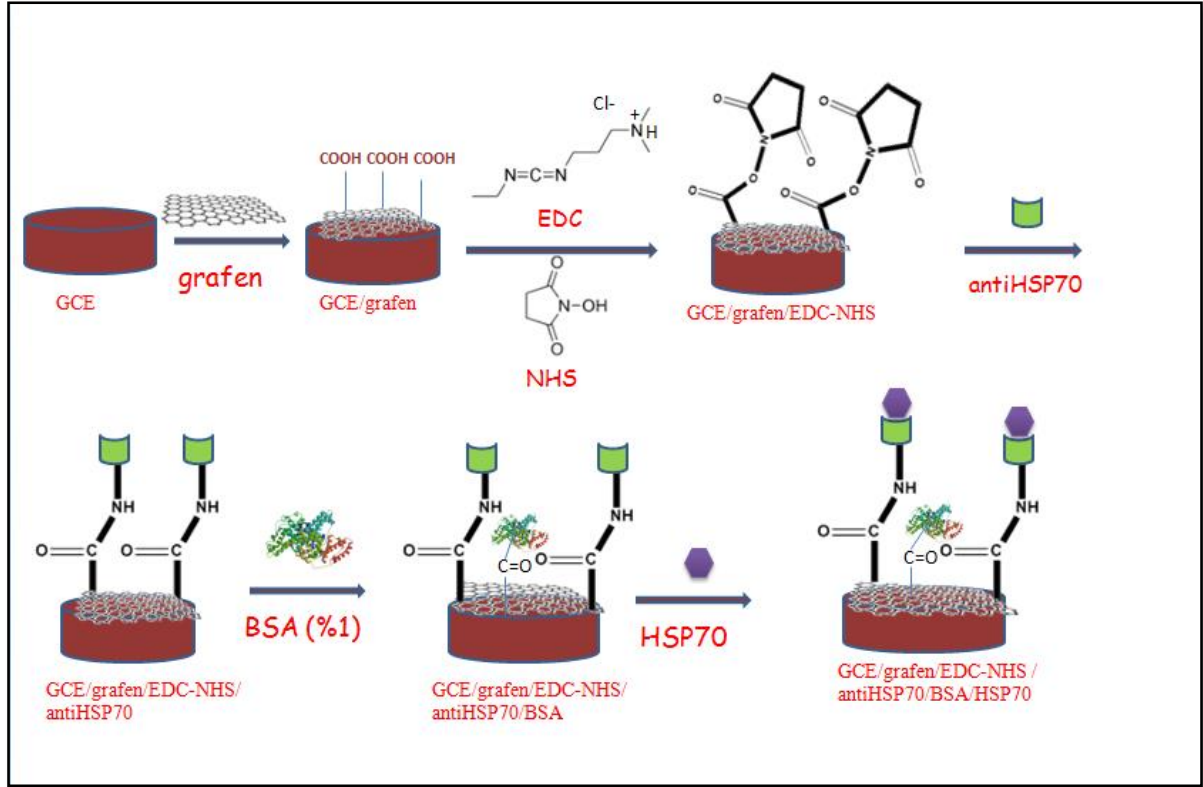
Bu çalışmada, HSP70 (ısı şok proteini) tayinine yönelik bir biyosensör tasarlanması hedeflendi. Bunun için camı karbon elektrot yüzeyi grafen ile kaplandı. Grafen kullanılması sayesinde anti-HSP70 in yüzeye kovalent olarak bağlanması sağlandı. Döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile immobilizasyon adımları ve HSP70' in elektrot yüzeyine bağlanması incelendi. Hazırlanan biyosensör için geliştirilen eşdeğer devre modeli ve tüm immobilizasyon adımlarının $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ ' de alınan EIS ve CV spektrumları Şekil 4.1. de gösterildi.



Şekil 4.1. İmmobilizasyon adımlarına ait A) EIS eğrileri ve B) CV voltamogramları. yeşil (-■-■-): GCE/Grafen, mor (-▼-▼): GCE/Grafen/EDC- NHS, mavi (-●-●-): GCE/Grafen/EDC-NHS/AntiHSP70, kırmızı (-◆-◆-): GCE/ Grafen/EDC-NHS/Anti HSP70/BSA C) Hazırlanan biyosensör için geliştirilen eşdeğer devre modeli

Bu tezde ilk olarak GCE yüzeyi grafen ile kaplandı. Grafende bulunan açık uçlardaki COO⁻ fonksiyonel grupları çalışılan pH da negatif yüklendiklerinden ötürü redoks probunun bu aşamada yüzeye difüze olması güçleşmiştir. Bu da sonuçlara elektron transfer direncinin artması olarak yansımıştır. Grafen ile elektrot yüzeyi modifiye edildikten sonra, grafende bulunan karboksil uçlarını aktifleştirmek için 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) ve N-hidroksisüksinimid (NHS) çifti kullanıldı. Daha sonra elektrot yüzeyine anti-HSP70 immobilize edildi. Anti-HSP70 in immobilize edilmesiyle protein tabakası yüzeyde bir nevi bariyer etkisi oluşturarak yalıtkan bir tabaka meydana getirdi. Bu yalıtkan tabaka EIS sinyalinde de oldukça belirgin artış olarak gözlemlendi. BSA immünosensörlerde biyolojik bileşenlerin yüzeye tam immobilize olamadığı durumlarda, sinyal verilerini tehlikeye atmamak adına bloklama ajanı olarak sıklıkla kullanılır. Bu çalışmada da yüzeyde açıkta kalmış aktif uçları bloke etmek için BSA damlatıldı ve Şekil 4.1.A 'da görüldüğü gibi yük transfer direncinin daha da artması sağlandı.

Şekil 4.1.B incelendiğinde döngüsel voltametri sonuçlarının impedans spektrumlarıyla uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Elektrot yüzeyi grafenle uygun koşullarda kaplandığında katodik ve anodik pik akım farklarının oluşan yalıtkan tabakadan ötürü azaldığı tespit edildi. Bu durum impedans spektrumlarında olduğu gibi redoks probunun yüzeye difüze olmasının zorluğuyla açıklanabilir. EDC/NHS çiftinin grafen yüzeyindeki karboksil gruplarını aktive etmesiyle yüzeye elektron transferi daha da güçleşmiş ve bu durum CV voltomogramına pik akım farklarının azalması olarak yansımıştır. İmmobilizasyonun son adımı olan BSA muamelesiyle birlikte oluşan yalıtkan protein tabakası anodik katodik pik akımlarını daha da azaltmıştır. Bu aşamayla beraber tasarlanan biyosensör HSP70 in tayini için hazır hale gelmiştir.



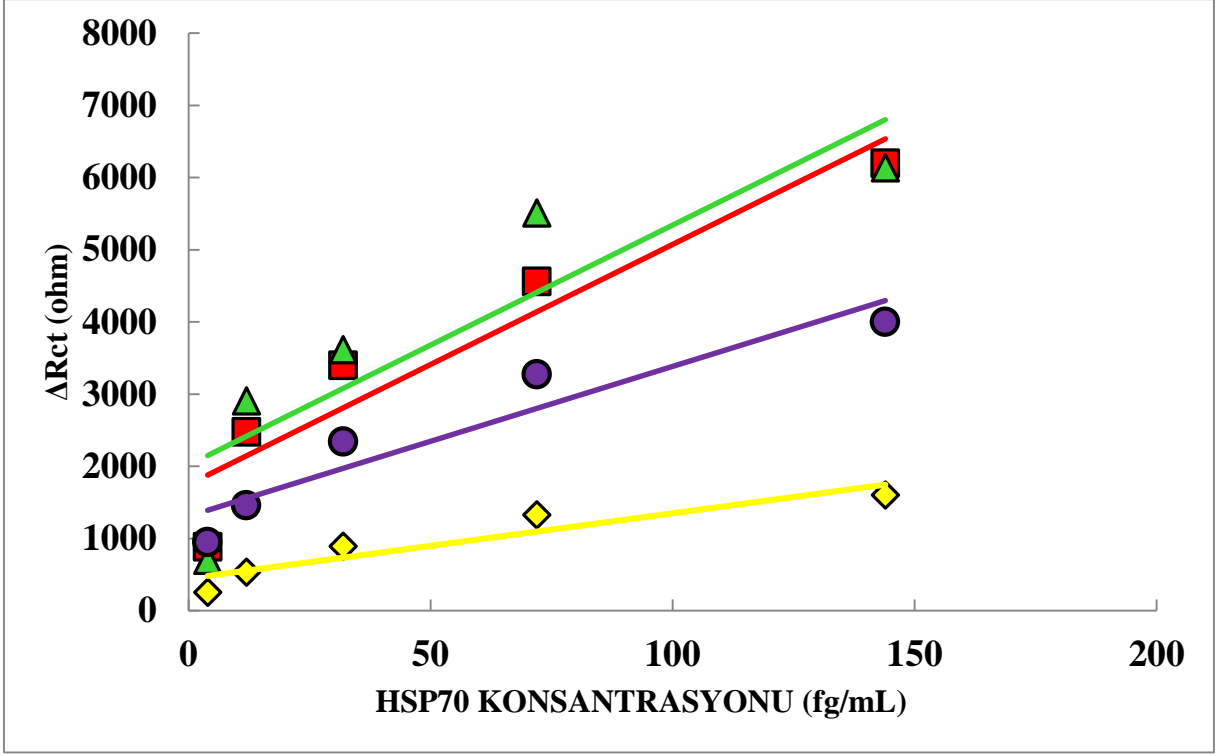
Şekil 4.2. İmmobilizasyon adımlarına ait sistematik diyagram

4.2 Biyosensörlerin Hazırlanma Koşullarının Optimizasyonuna Ait Bulgular

4.2.1 Grafen konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi

Tezin bu aşamasında grafen miktarının hazırlanan biyosensör cevapları üzerine etkisi incelendi. Farklı miktarlarda grafen kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle HSP70 tayinine ilişkin standart grafikler çizildi ve birbiriyle kıyaslandı. Buna ait standart grafikler şekil 4.3. te gösterildi.

Yapılan çalışmalarda, EIS spektrumlarından elde edilen R_{ct} değerleri, HSP70 konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirildiğinde; grafen miktarı artışının, sinyalde artışa sebep olduğu görüldü. Ancak 0,8 mg gibi daha fazla grafen miktarı artık düzenli bir kaplanmaya imkan vermemekte ve bu da oluşan sinyalleri etkilemektedir. 0,4 mg grafen ve 0,2 mg grafen kullanılarak hazırlanan biyosensörlerde sinyaller birbirine yakın olarak gözlemlendi. Buna karşın elde edilen R^2 değerlerine bakıldığında ve harcanan grafenin miktarı da göz önüne alındığında, en uygun grafen miktarının 0,2 mg olmasına karar verildi.



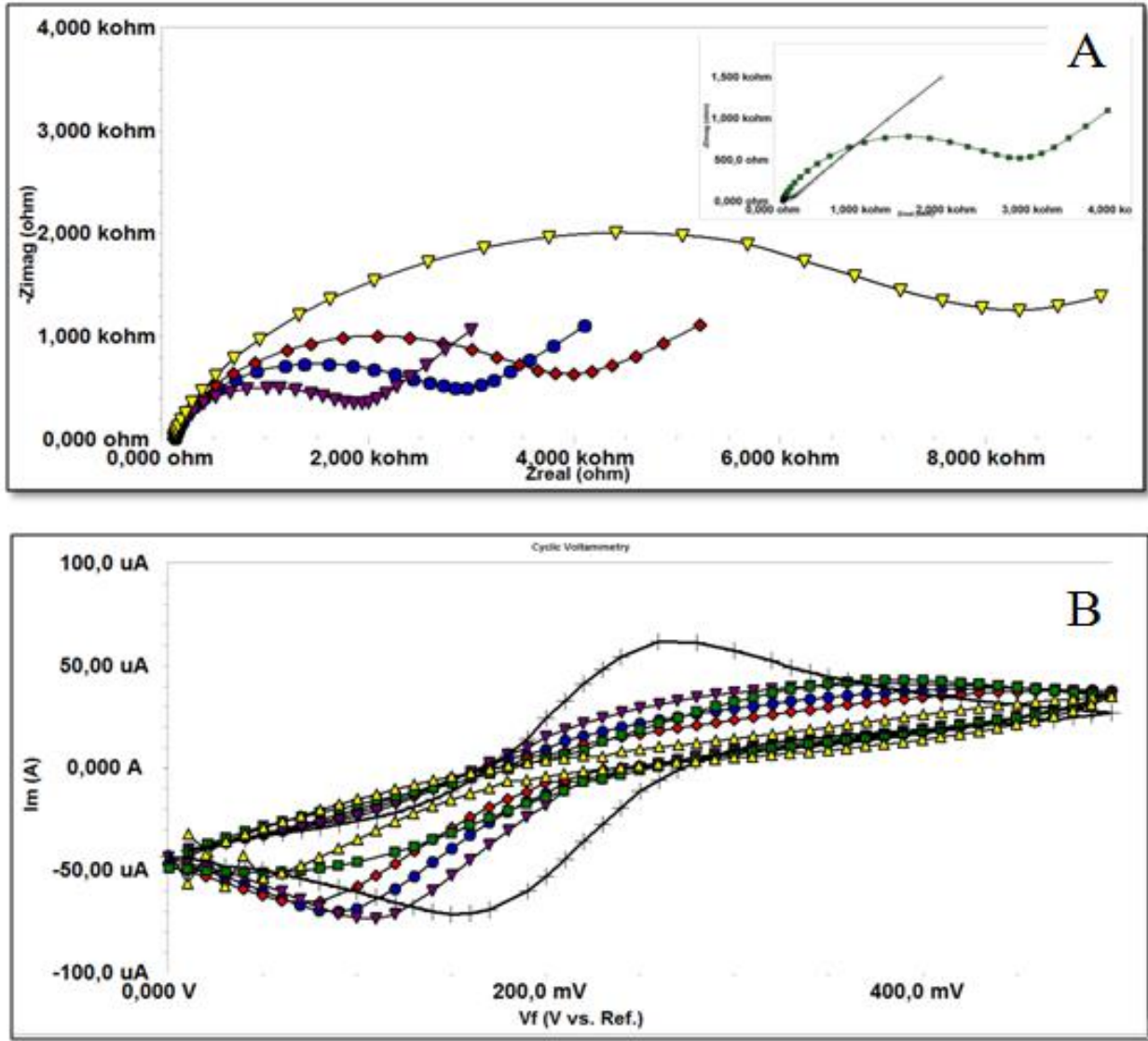
Şekil 4.3. Grafen miktarının biyosensör cevabının üzerine etkisi. mor (-●-●-): 0,8 mg grafen, yeşil(-▲-▲-): 0,4 mg grafen, kırmızı (-■-■-) : 0,2 mg grafen, sarı (-◆-◆-): 0,1mg grafen

Grafen miktarı optimizasyon grafiklerinin R^2 değerleri ve denklemleri Tablo 4.1 de gösterilmektedir.

Tablo 4. 1. Grafen miktarı optimizasyon grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

Grafen miktarı	R^2	Denklem
0,1 mg	0,8771	$y = 9,0316x + 444,33$
0,2 mg	0,8937	$y = 33,253x + 1746,8$
0,4 mg	0,7721	$y = 33,221x + 2016,9$
0,8 mg	0,8962	$y = 20,731x + 1308$

Optimizasyon basamağının bu kısmında belirlenen 0,2 mg grafen kullanılarak hazırlanan biyosensörün EIS ve CV eğrileri Şekil 4.4. te gösterilmektedir.



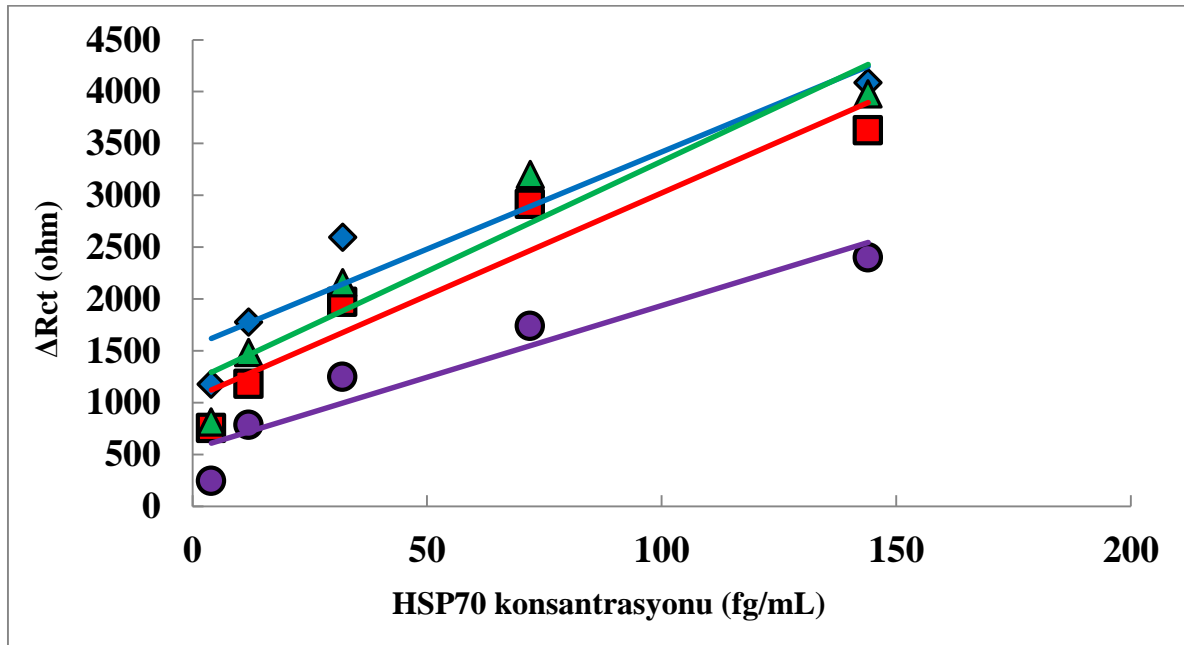
Şekil 4.4. Optimizasyon sonucu belirlenen 0,2 mg grafenle hazırlanan biyosensörün A) EIS spektrumları ve B) CV voltammogramları. gri (-+--+): GCE, yeşil (-■-■-): GCE/Grafen, mor (-▼-▼-):GCE/Grafen/EDC-NHS, mavi (-●-●-): GCE/Grafen/EDC-NHS/AntiHSP70, kırmızı (-◆-◆-): GCE/Grafen/EDC-NHS/AntiHSP70/BSA , sarı(-▲-▲-): GCE/Grafen/EDC-NHS/AntiHSP70/BSA/HSP70

4.2.2 Anti HSP70 konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi

Tezin bu aşamasında geliştirilen biyosensörün optimum grafen miktarı belirlendikten sonra uygun antiHSP70 konsantrasyonu tayin edildi. Anti-HSP70 konsantrasyonunun tayini biyosensörün performansı açısından son derece önemlidir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda anti-HSP70 kullanılarak hazırlanan biyosensörlerle HSP70 tayinine ilişkin

standart grafikler çizildi ve birbiriyle kıyaslandı. Buna ait standart grafikler Şekil 4.5. te gösterilmektedir.

Kalibrasyon eğrileri kıyaslandığında, 40 µg/mL antiHSP70 konsantrasyonu kullanıldığında elde edilen sinyalin, 20 µg/mL anti-HSP70 kullanıldığında elde edilene göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Yani konsantrasyon artışı sinyalde artışa neden oldu. Ancak daha fazla konsantrasyon artışı sinyali ya çok etkilemedi ya da düşürmedi. Bu nedenle, çalışma için anti-HSP70 konsantrasyonu 40µg/mL olarak optimize edildi. Buna ait EIS ve CV eğrileri Şekil 4.6. da gösterilmektedir.

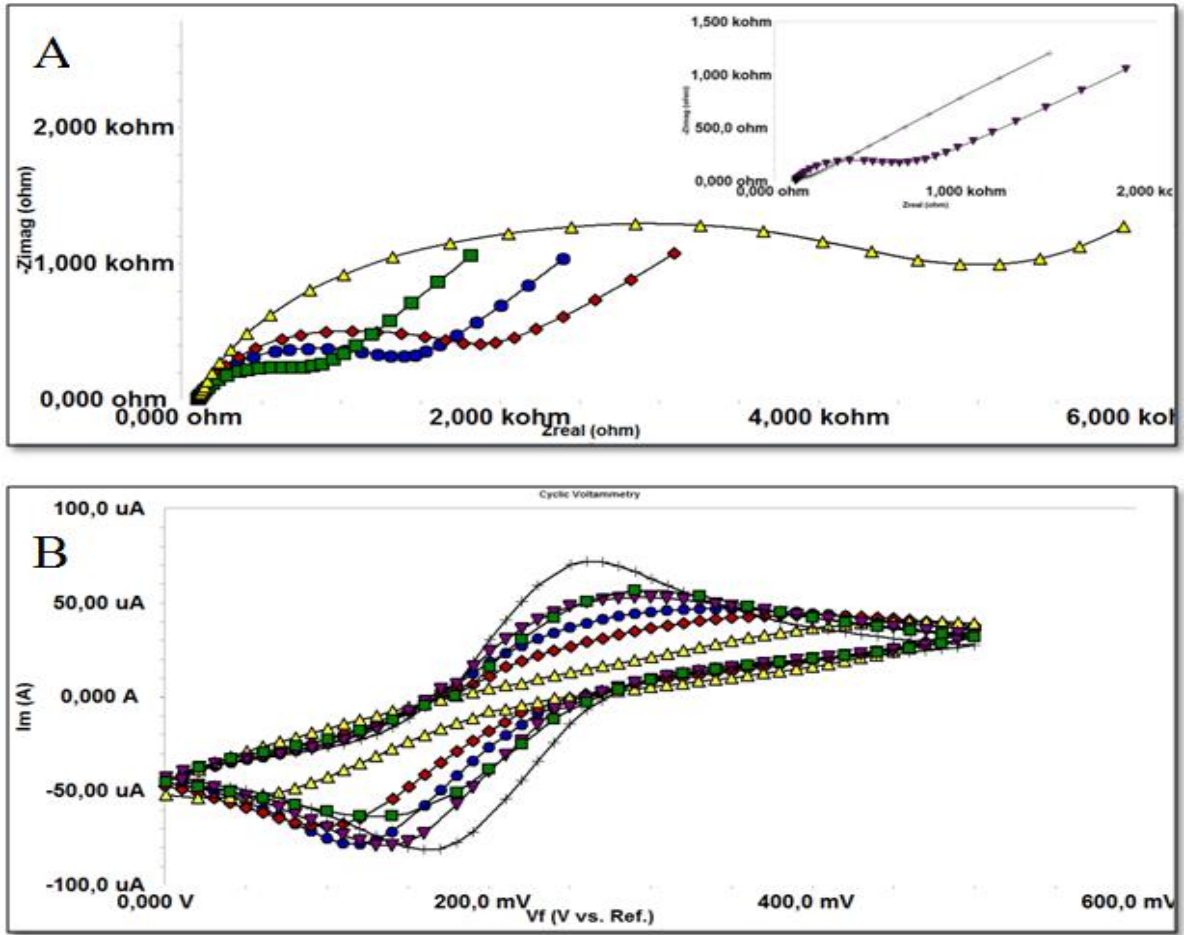


Şekil 4.5. Anti HSP70 konsantrasyonunun biyosensör cevabının üzerine etkisi. mor (●-●-●): 20µg/mL anti HSP70, mavi (◆-◆-◆): 40µg/mL anti -HSP70, kırmızı (■-■-■) : 60µg/mL anti- HSP70, yeşil (▲-▲-▲): 80µg/mL anti -HSP70

Farklı konsantrasyonlarda anti-HSP70 ile hazırlanan biyosensörlere ait grafiklerin R² değerleri ve denklemleri Tablo 4.2. de gösterilmektedir.

Tablo 4.2. Anti HSP70 konsantrasyonu optimizasyon grafiklerinin R² leri ve denklemleri

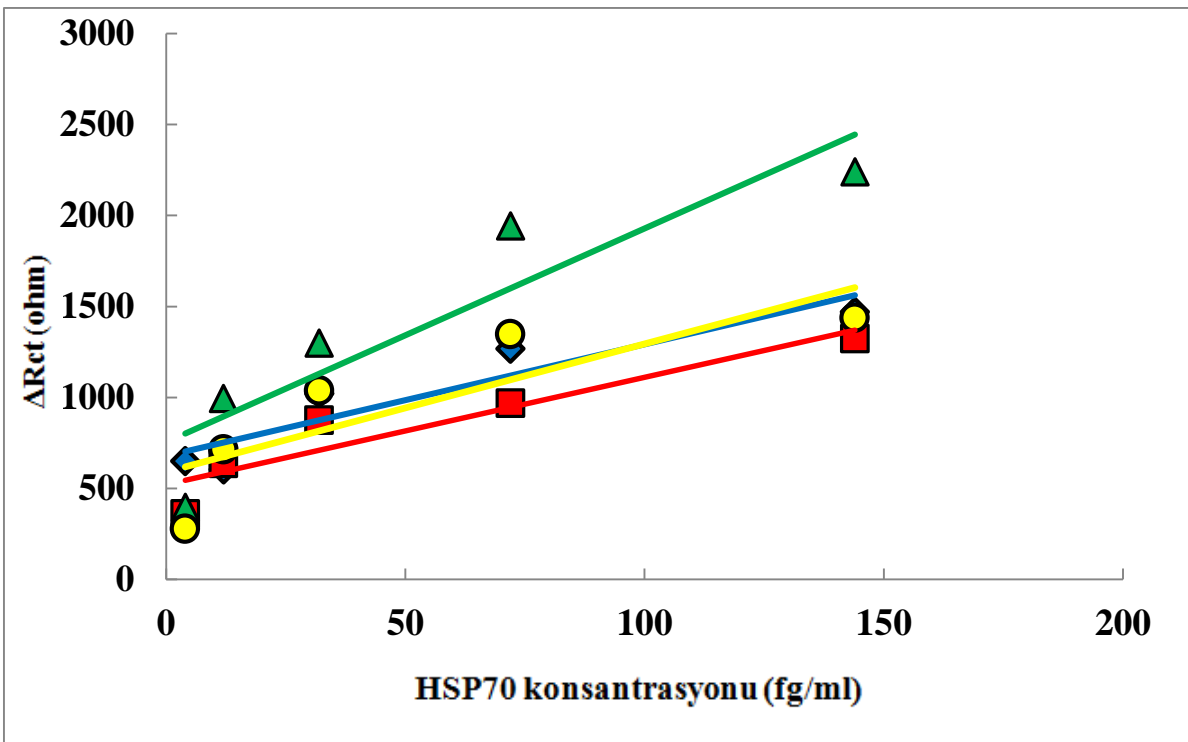
Anti HSP70 Konsantrasyonu	R ²	Denklem
20 µg/mL	0,9068	$y = 13,848x + 552,8$
40 µg/mL	0,9135	$y = 18,759x + 1542,9$
60 µg/mL	0,9108	$y = 19,803x + 1043,6$
80 µg/mL	0,9077	$y = 21,211x + 1208,3$



Şekil 4.6. Optimizasyon sonucu belirlenen 40µg/mL antiHSP70 ile hazırlanan biyosensörün A) EIS eğrileri ve B) CV voltamogramları. siyah (-+-+):GCE, yeşil (-■-■-): GCE/Grafen, mor(-▼-▼-):GCE/Grafen/EDC-NHS, mavi(-●-●-):GCE/Grafen/EDC-NHS/AntiHSP70, kırmızı (-◆-◆-):GCE/Grafen/EDC-NHS/AntiHSP70/BSA, sarı (-▲-▲-):GCE/Grafen/EDC NHS/AntiHSP70/BSA/HSP70

4.2.3 Anti HSP70 inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi

Çalışmanın bu aşamasında, antiHSP70 konsantrasyonu optimize edildikten sonra, antikorun maksimum verimde bağlanacağı inkübasyon süresi tayin edilmeye çalışıldı. Farklı sürelerde inkübe edilen antiHSP70 ile hazırlanan biyosensörün verdiği cevap araştırıldı ve sonucunda kalibrasyon grafiği çizildi. Buna ait standart grafikler Şekil 4.7. de gösterilmektedir. Kalibrasyon grafiği yorumlandığında antiHSP70 in düşük sürede inkübasyona bırakılmasının sonucunda antiHSP70 in yeterince yüzeye bağlanamadığı gözlemlendi. Çok yüksek sürelerde ise yüzeyde bozulmalar başladığı için bu durumun marker ölçüm sinyallerine de yansıdığı görüldü. Bu gözlemlenen sinyallerin doğrultusunda, konsantrasyonu optimize edilmiş olan antiHSP70 60 dakika inkübasyona bırakıldığında biyosensörden çok daha yüksek performans elde edileceği açık bir şekilde anlaşılmaktadır. Bu nedenle optimizasyon sonucu anti-HSP70 in inkübasyon süresi olarak 60 dakika uygun görülmüştür. Buna ait EIS ve CV eğrileri Şekil 4.8. de gösterilmektedir.

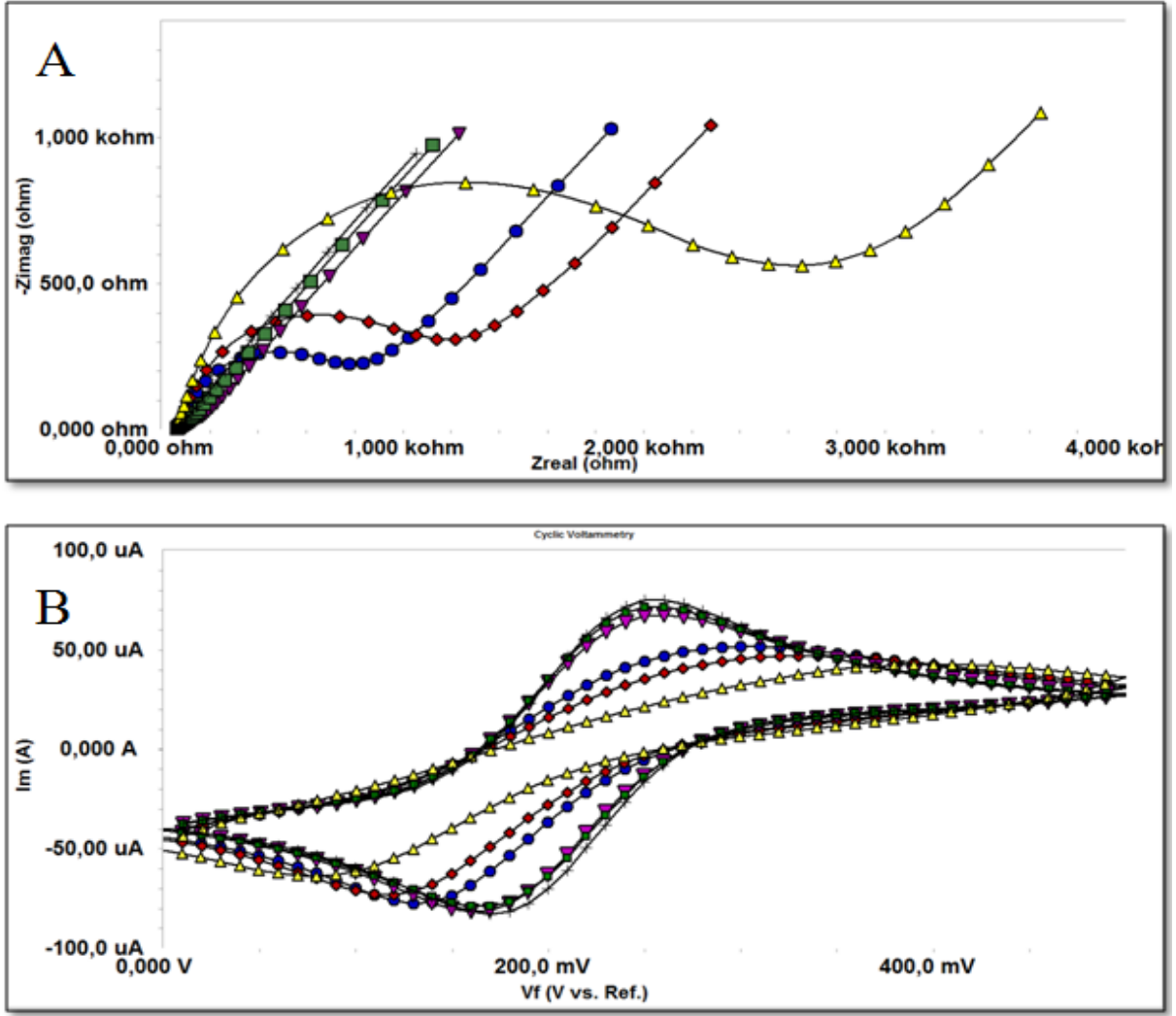


Şekil 4.7. Anti HSP70 inkübasyon süresinin biyosensör cevabının üzerine etkisi. mavi (-◆-◆-): 30 dakika anti HSP70, kırmızı (-■-■-): 45 dakika anti HSP70, yeşil (-▲-▲-): 60 dakika anti HSP70, sarı (-●-●-): 75 dakika anti HSP70

Anti-HSP70 in farklı sürelerde inkübasyona bırakılmasıyla hazırlanan biyosensörlerin grafiklerinin R² leri ve denklemleri Tablo 4.3. te gösterilmektedir.

Tablo 4.3. Anti HSP70 inkübasyon süresinin optimizasyon grafiklerinin R² leri ve denklemleri

Anti HSP70 İnkübasyon süresi	R ²	Denklem
30 dakika	0,866	$y = 6,1367x + 678,78$
45 dakika	0,8732	$y = 5,8965x + 521,27$
60 dakika	0,8342	$y = 11,744x + 754,32$
75 dakika	0,7174	$y = 7,0445x + 590,25$

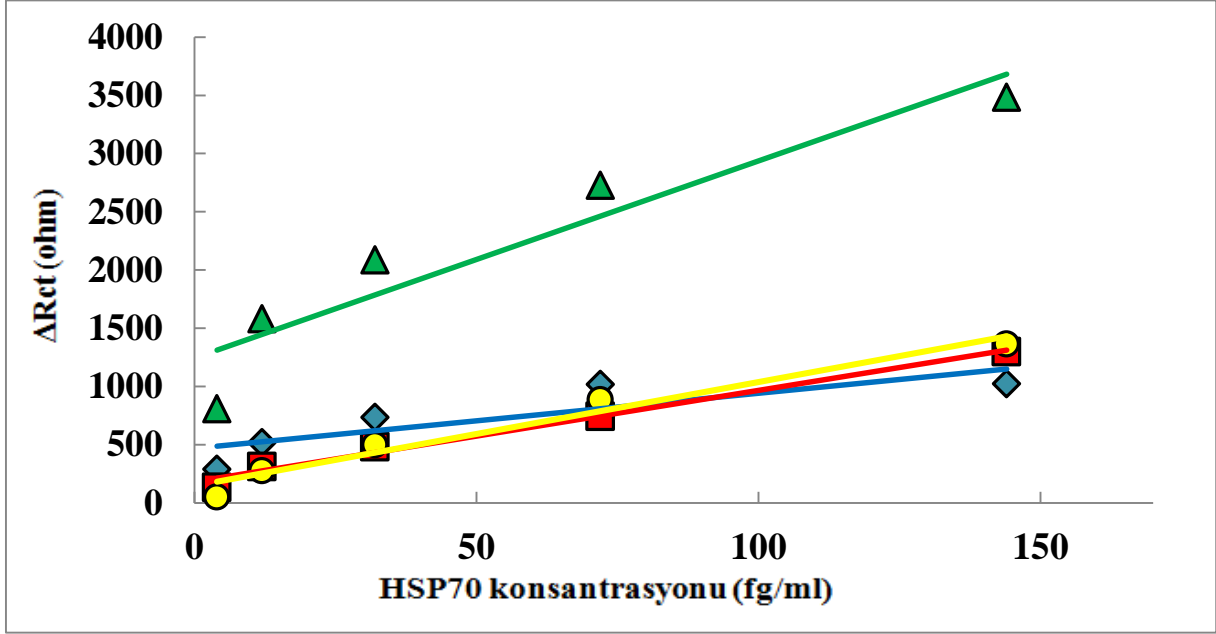


Şekil 4.8. Optimizasyon sonucu belirlenen 60 dakikalık inkübasyon süresi antiHSP70 ile hazırlanan biyosensörün A) EIS eğrileri ve B) CV voltamogramları. siyah (-+--+): GCE, yeşil (-■-■-): GCE/Grafen, mor (-▼-▼-): GCE/Grafen/EDC-NHS , mavi (-●-●-): GCE/Grafen/EDC-NHS/AntiHSP70, kırmızı (-◆-◆-):GCE/Grafen/EDC-NHS/AntiHSP70/BSA, sarı (-▲-▲-): GCE/Grafen/EDC-NHS/AntiHSP70/BSA/HSP70

4.2.4 HSP70 inkübasyon süresinin biyosensör cevapları üzerine etkisi

Son olarak bütün optimizasyon basamaklarından sonra belirlenen antiHSP70 konsantrasyonuna karşılık HSP70 in yüzeye bağlanabilme süresi incelendi. Elde edilen impedans eğrilerinden elde edilen Rct değerleri ile çizilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.9. da gösterildi. Kalibrasyon grafiğine bakıldığında, HSP70 in inkübasyon süresi arttıkça, gözlenen sinyalde artış olduğu görüldü. 30 dakika ve 45 dakika inkübasyon sürelerinde sinyaller birbirine çok yakın elde edilmiştir. Ancak 60 dakika inkübasyon süresinde sinyalde oldukça iyi bir artış gözlemlendi. Bu durum 30 dakika ve 45 dakika inkübasyon sürelerinin HSP70 in

yüzeyle bağlanmasında yetersiz olduğunu gösterdi. Daha yüksek inkübasyon sürelerinde ise HSP70 in büyük olasılıkla yüzeydeki bozulmalardan dolayı yüzeye bağlanabilme kapasitesinin düştüğü gözlemlendi. Bunun sonucunda HSP70 in inkübasyon süresi olarak en uygun 60 dakika olarak belirlendi. Buna ait EIS ve CV eğrileri şekil 4.10. da gösterilmektedir.

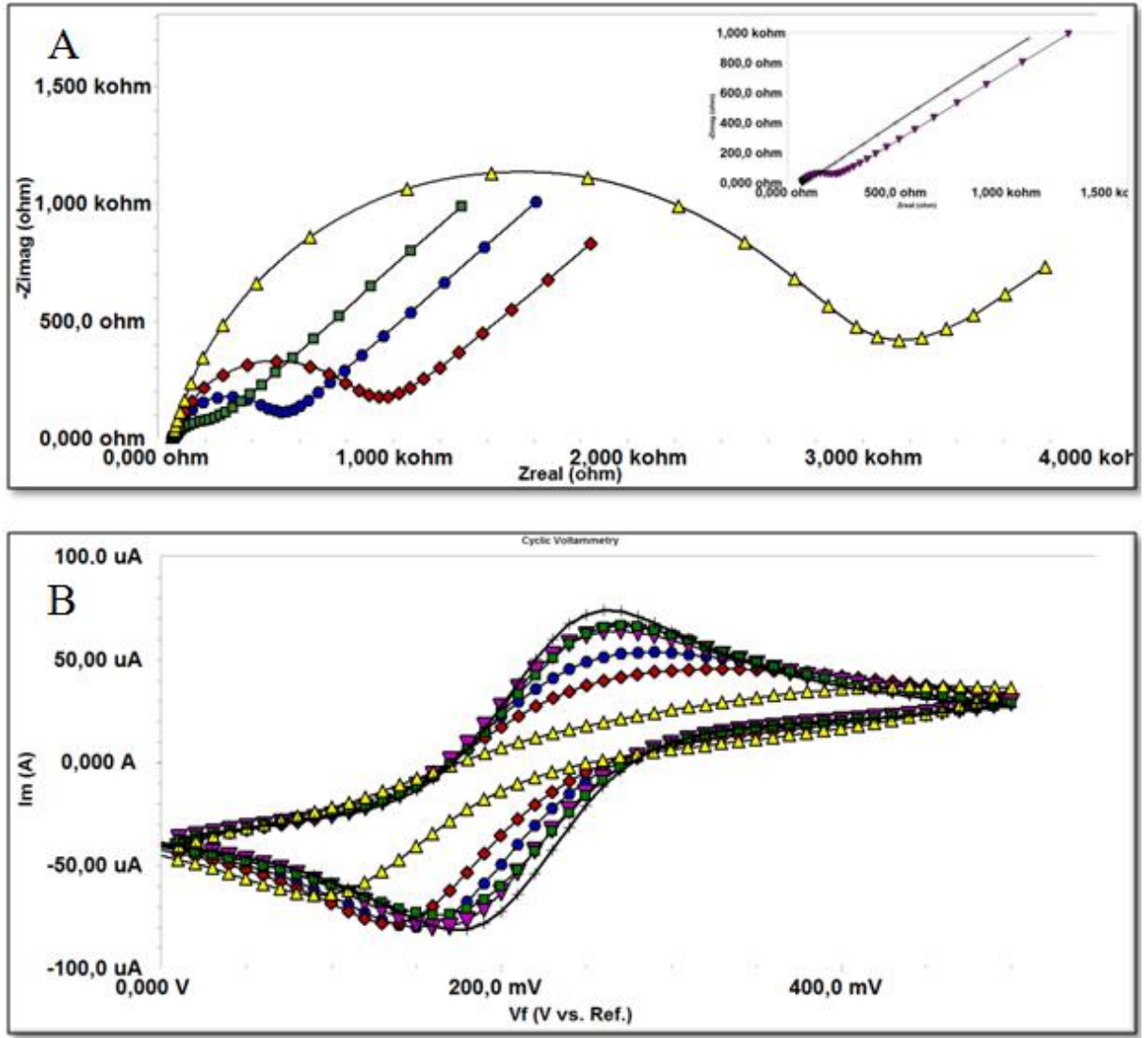


Şekil 4.9. HSP70 inkübasyon süresinin biyosensör cevabının üzerine etkisi. mavi (-♦-♦-): 30 dakika HSP70, kırmızı (-■-■-): 45 dakika HSP70, yeşil (-▲-▲-): 60 dakika HSP70, sarı (-●-●-): 75 dakika HSP70

HSP70 inkübasyon süresinin optimizasyon grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri Tablo 4.4. te gösterilmektedir.

Tablo 4.4. HSP70 inkübasyon süresinin optimizasyon grafiklerinin R^2 leri ve denklemleri

HSP70 İnkübasyon Süresi	R^2	Denklem
30 dakika	0,7247	$y = 4,739x + 467,78$
45 dakika	0,9879	$y = 7,862x + 179,49$
60 dakika	0,889	$y = 16,922x + 1245,5$
75 dakika	0,9664	$y = 8,9123x + 145,53$



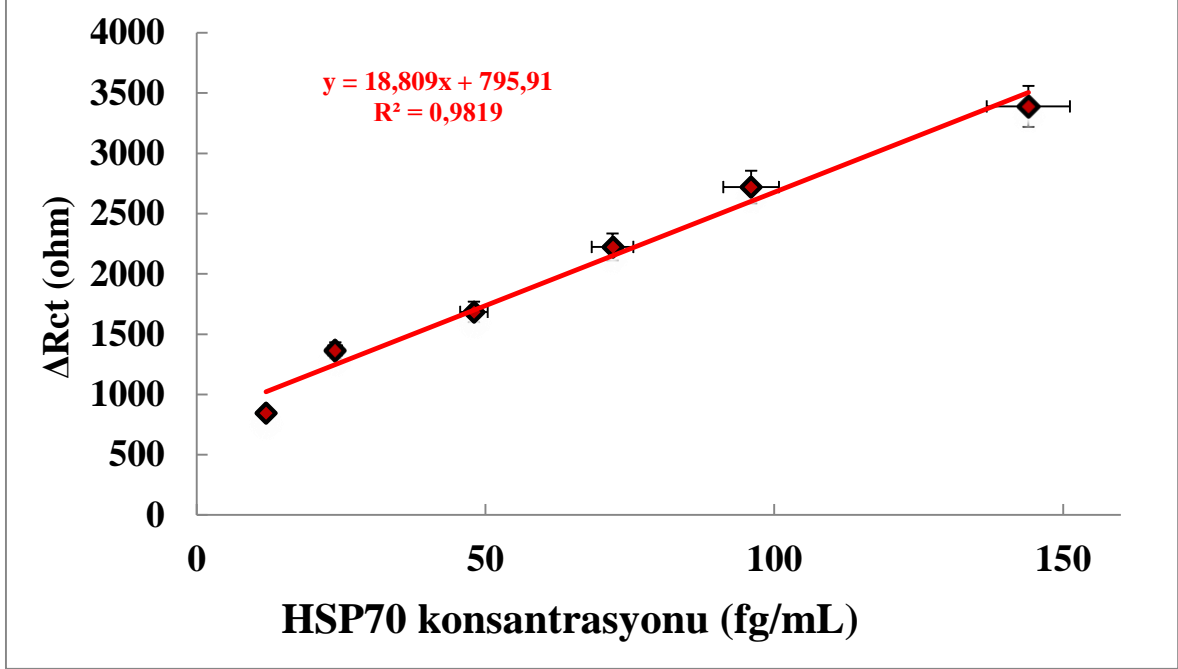
Şekil 4.10. Optimizasyon sonucu belirlenen 60 dakikalık inkübasyon süresi HSP70 ile hazırlanan biyosensörün A) EIS eğrileri ve B) CV voltamogramları. siyah (-+-+): GCE, yeşil (-■-■-): GCE/Grafen, mor (-▼-▼-): GCE/Grafen/EDC-NHS , mavi (-●-●-): GCE/Grafen/ EDC-NHS/AntiHSP70, kırmızı (-◆-◆-): GCE/Grafen/EDC-NHS/AntiHSP70/BSA, sarı (-▲-▲-): GCE/Grafen/EDC-NHS/AntiHSP70/BSA/HSP70

4.3. Biyosensörün Analitik Çalışmaları

4.3.1. Standart Grafik

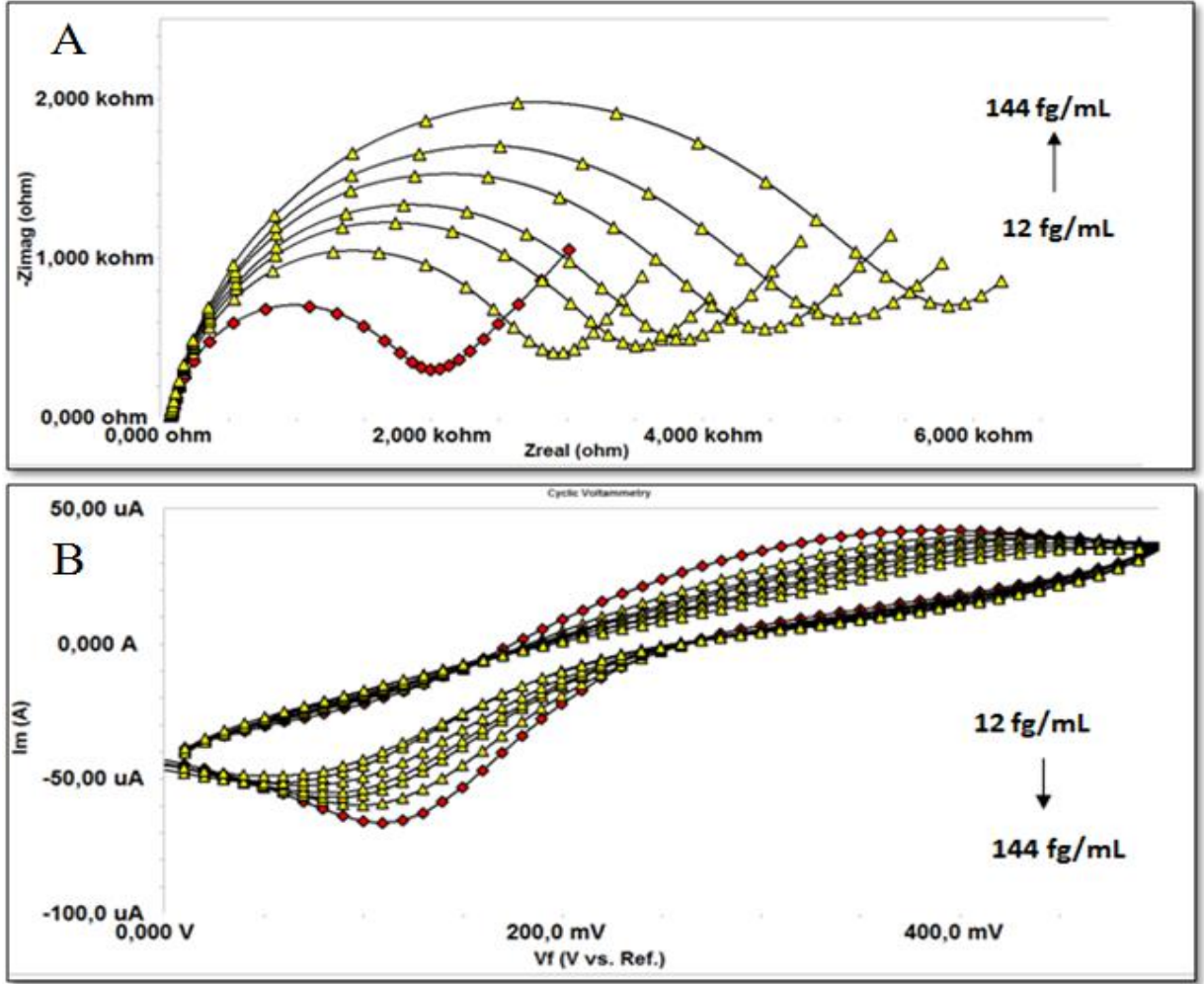
Optimize edilen immobilizasyon parametrelerine göre hazırlanan biyosensörlerle farklı HSP70 konsantrasyonlarında ölçümler yapılarak, HSP70 in lineer tayin aralığı belirlendi. Ölçümler optimum koşullarda gerçekleştirildi. Ölçüm sonuçlarının tutarlılığına ve R^2 değerine bakıldığında HSP70 in tayin aralığı 12 fg/mL – 144 fg/mL konsantrasyonu

aralığında belirlendi. Bu grafik Şekil 4.11 de gösterilmektedir. Ayrıca yapılan hesaplamalar sonucu LOD değeri 0,765 fg/mL, LOQ değeri 2,55 fg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.11. Kalibrasyon eğrisi

Tasarlanan biyosensörün artan HSP70 konsantrasyonu ile elde edilen EIS spektrumu ve CV voltamogramı Şekil 4.12. de gösterilmektedir.



Şekil 4.12. Tasarlanan biyosensörün artan HSP-70 konsantrasyonu ile elde edilen A) EIS spektrumu ve B) CV voltamogramı. kırmızı (-◆-◆-): GCE/ Grafen / EDC-NHS/ AntiHSP70/ BSA, sarı (-▲-▲-): GCE/ Grafen/EDC-NHS/ AntiHSP70/BSA/ HSP70

4.3.2. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, aynı koşullarda, aynı cihazla ve aynı örneklerle yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlardaki farklılığın bir ifadesidir. Geliştirilen biyosensör ile aynı örnek için tekrarlanabilir sonuçlar almak bu açıdan çok önemli bir noktadır. Dolayısıyla HSP70 tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirliğinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmalar, onun karakterizasyonu aşmasında çok önemli bir rol oynamıştır. Bu amaç doğrultusunda 72 fg/mL'lik HSP70 standart çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen 10 ölçümün sonuçları değerlendirilerek istatistiksel parametreler hesaplanmıştır. Buna göre ortalama değer, standart sapma ve varyasyon katsayısı sırasıyla, 72,6 fg/mL, $\pm 4,8$ fg/mL ve % 6,6 olarak belirlenmiştir.

4.3.3. Tekrar üretilebilirlik

Biyosensörlerde sahip olması istenen özelliklerden en önemlisi tekrar aynı şartlarda ve özelliklerde hazırlanabiliyor olmasıdır. Biyosensörlerin rutin analizlerde kullanılabilmesi için güvenilir olması ve tekrar tekrar üretilmesi çok önemli bir parametredir. Bu amaca yönelik, optimizasyon aşamasında belirlenen optimum koşullarla 10 tane biyosensör hazırlandı. Bu biyosensörlerde, EIS spektrumlarından elde edilen R_{ct} değerleri, HSP70 konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirildi ve birbirleriyle kıyaslandı. Bu grafiklere ilişkin R^2 değerleri ve doğru denklemleri Tablo 4.5 ' te gösterilmiştir. Grafiklerin herbirinin R^2 değerleri yüksek ve birbirine yakındır. Ayrıca doğru denklemlerindeki intercept ve eğim değerlerine ilişkin bağlı standart sapma (RSD) verileri de sırasıyla % 0,96 ve % 1,2 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin iyi olduğu sonucunu göstermektedir.

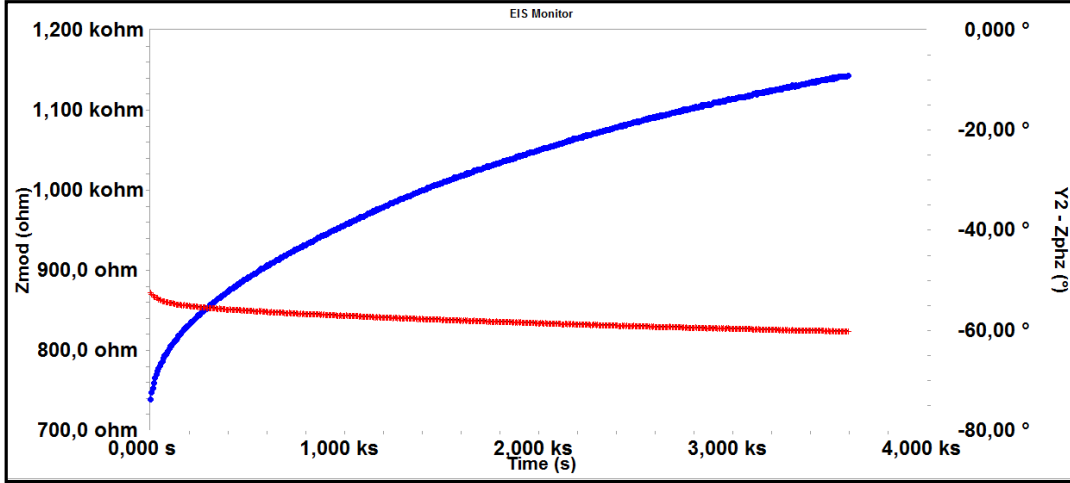
Tablo 4.5. Tekrar Üretilebilirlik

Biyosensör	R^2	Y	Aralık(fg/mL)
1	0,9456	$23,948x + 690,96$	12-144
2	0,9094	$20,164x + 731,53$	12-144
3	0,9565	$19,79x + 458,7$	12-144
4	0,8762	$21,444x + 994,36$	12-144
5	0,9819	$18,809x + 795,91$	12-144
6	0,9354	$11,364x + 735,96$	12-144
7	0,9187	$20,664x + 813$	12-144
8	0,9474	$18,256x + 1610,9$	12-144
9	0,9601	$19,686x + 846,75$	12-144
10	0,8663	$21,171x + 885,2$	12-144

4.3.4. Sabit frekansta impedans ölçümleri sonuçları

Bu çalışmada grafen modifiyeli camı karbon elektrot üzerine immobilize olan antiHSP70 ve HSP70 arasındaki etkileşimin karakterizasyonu için single frequency impedans

tekniki kullanıldı. Single frequency tekniği ile zamana karşı sabit bir frekansta impedans ölçümü gerçekleştirilir. Dolayısıyla tekrarlayan zamanda ve toplam zamanda impedans değişimleri kontrol edilebilmektedir. Bu amaçla potansiyostat 20 Hz sabit frekansında ayarlandı. 60 dakika boyunca bu sabit frekansta impedans ölçümü zamanın ve faz açısının bir fonksiyonu olarak ölçüldü. Şekil 4.13 sabit frekansta ölçüm sonuçlarını göstermektedir.

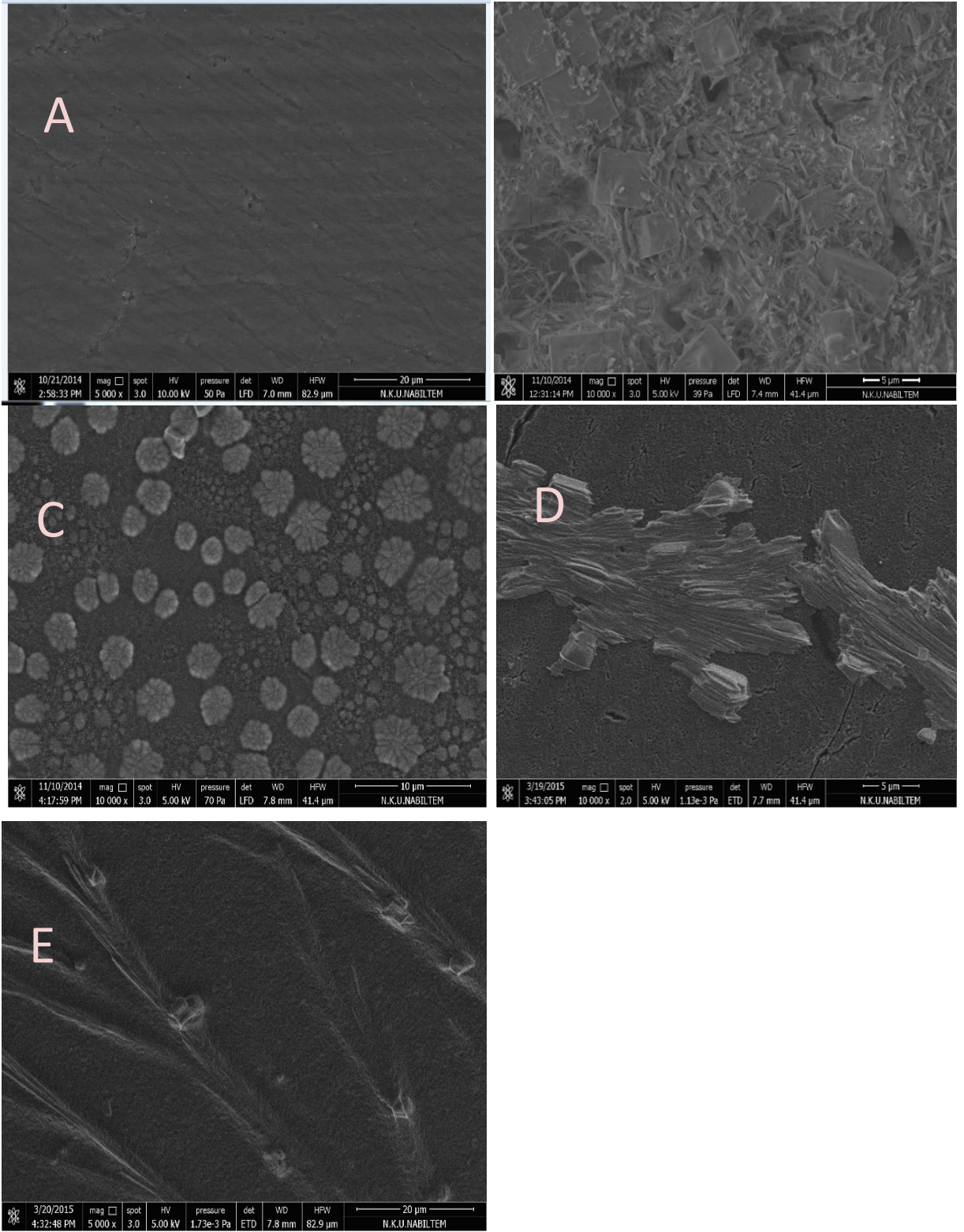


Şekil 4.13. Sabit frekansta impedans ölçümü

Şekil 4.13. te görüldüğü gibi, sabit frekansta impedans ölçümleri HSP70 ve antiHSP70 bağlanması hakkında önemli bilgi sunmaktadır. Mavi eğri zamanın bir fonksiyonu olarak impedanstaki değişimi, kırmızı eğri yine zamanın bir fonksiyonu olarak faz açısındaki değişimi göstermektedir. Yük transfer direnci ve faz açısındaki değişimler HSP70 ve antiHSP70 arasındaki etkileşimden kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak sabit frekansta impedans, biyosensör ölçümü veya biyosensör yüzeyinde zamana bağlı değişimleri ölçmek için kullanılabilir.

4.3.5. Grafen temelli antiHSP70 biyosensörün Taramalı Elektron Mikroskopuyla (SEM) yüzey morfolojisi analizi

Çalışmanın bu aşamasında, Namık Kemal Üniversitesi NABİLTEM de bulunan SEM cihazı (FEI-Quanta FEG 250 model) ile biyosensörün optimum koşullarda hazırlanırken her bir aşamasında yüzeyinde meydana gelen değişikliklerin morfolojik olarak incelenmesi amaçlandı. Biyosensör yüzeyine ait SEM görüntüleri Şekil 4.14.' te gösterilmektedir. A'da elektrot yüzeyinin grafen ile kaplanması görülmektedir. B'de yüzeye immobilize olan anti-HSP70 molekülleri görülmektedir. C'de bloklama ajanı olarak kullanılan BSA moleküllerinin yüzeye bağlanması görülmektedir. Son olarak D' de ise elektrot yüzeyinde anti-HSP70 molekülleri ile etkileşime giren HSP70 molekülleri net olarak görülmektedir.



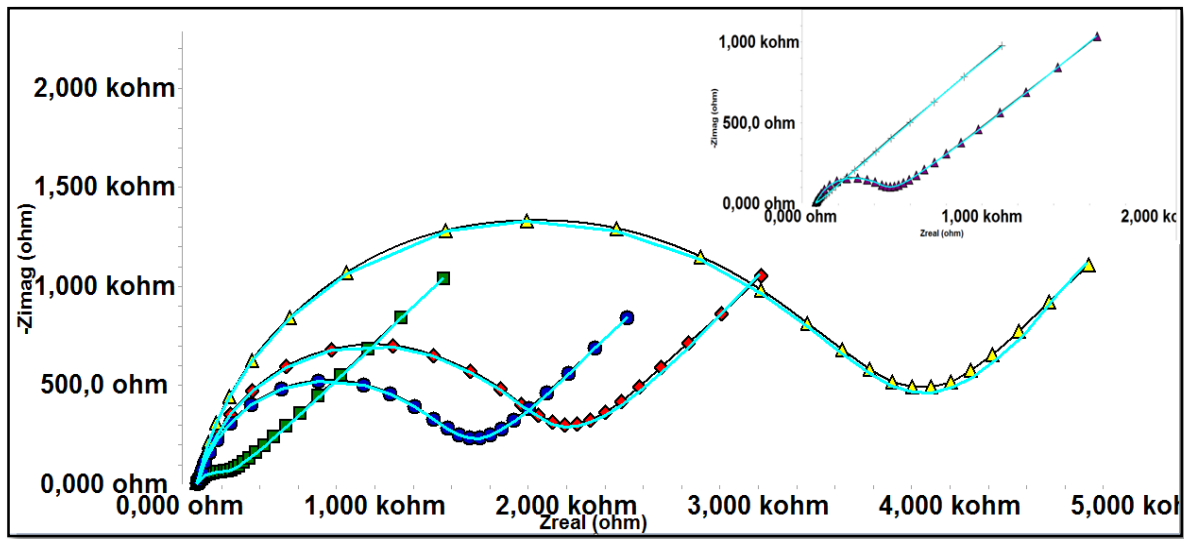
Şekil 4.14. Hazırlanan biyosensöre ait SEM görüntüleri A)GCE B)GCE/Grafen C)GCE/Grafen/antiHSP70 D) GCE/Grafen/antiHSP70/BSA E) GCE/Grafen/antiHSP70/BSA/HSP70

SEM tekniğiyle elde edilen sonuçlar, impedans karakterizasyon çalışmaları ile elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Sonuç olarak SEM tekniği hem morfolojik açıdan yüzeyin incelenebilmesine hem de yapılan ölçümlerin doğruluğunun kanıtlanabilmesine olanak sağlamıştır.

4.3.6. Kramers Kronig

Kramers Kronig transformu, geliştirilen biyosensör sisteminin impedans spektrumunun dış etkenlerden dolayı meydana gelen sapmalardan etkilenip etkilenmediğini belirlemek için kullanılır. Bu yöntem elektrokimyasal impedans spektroskopisinin yorumlanması ve analizi için son derece önemlidir (Orazem ve ark. 2008). Kramers-Kronig ilişkileri elektrokimyasal sistemlere, denklemlerin doğrudan entegrasyonu, kararlılık ve lineerliğin deneysel gözlemlenmesi, spesifik elektrik devre modellerinin regresyonu ve oluşan ölçüm modellerinin regresyonuyla uygulanmaktadır. Kramers Kronig ilişkisinin doğrudan entegrasyonu, impedansın bir bileşeninden diğerinin hesaplanmasını kapsar (Huang ve ark. 2007). Ölçülen impedansın sanal bileşeninden gerçek bileşeninin hesaplanması buna örnek olarak gösterilebilir. Sonrasında sonuçlar elde edilen verilerle kıyaslanır (Orazem ve ark. 2008).

Bu tez çalışmasında da antiHSP70 temelli biyosensörün Kramers Kronig transformu Şekil 4.15 te gösterilmektedir.



Şekil 4. 15. Hazırlanan biyosensörün Kramers Kronig transformu

Şekil 4.15. teki impedans spektrumlarından elde edilen Kramers Kronig transformunun fit değerleri Tablo 4.6. da verilmiştir.

Tablo 4.6. AntiHSP70 temelli biyosensörün farklı aşamalarında Kramers-Kronig transformu

Biyosensör Yüzeği	Fit değerleri
GCE	1,448
GCE/grafen	6,402
GCE/grafen/EDC-NHS	2,699
GCE/grafen/anti-HSP70	2,700
GCE/grafen/anti-HSP70/BSA	13,94
GCE/grafen/anti-HSP70/BSA/HSP70	20,29

4.3.7. Biyosensörün Gerçek Örneklerle Uygulanabilirliğinin İncelenmesi

Tez çalışmasının son aşamasında, geliştirilen biyosensörle, gerçek serum örneklerinde yapay serum örneklerinde HSP70 tayini amaçlandı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildi. Sonuçlar Tablo 4.7. de gösterilmektedir.

Tablo 4.7. Serum örneklerinde HSP70 analizi
Yapay serum örneklerinde HSP70 analizi (fg/mL HSP70)

<i>İlave edilen</i>	<i>Bulunan</i>	<i>% Geri kazanım</i>	<i>% Hata</i>
48	46,5	96,9	3,1

Gerçek insan serum örneklerinin analizi (fg/mL HSP70)					
<i>Örnek</i>	<i>Biyosensörle bulunan</i>	<i>İlave edilen HSP70</i>	<i>Total bulunan</i>	<i>% Hata</i>	<i>% Bağıl hata</i>
1	40,4	48	90,6	102,5	2,5

5) SONUÇ

Günümüzde oldukça artmakta olan kanser hastalığının erken teşhisi hayati bir rol oynamaktadır. Bu amaca yönelik yapılan tez kapsamında kanser hastalığında vücutta aktif olarak arttıkları bilenen biyomarkerların tayinine yönelik bir biyosensör tasarlanması hedeflenmektedir. Moleküler biyomarkerların, özellikle de kanser inisiyasyon ve progresyonu ile ilişkili olanların bulunması, kanserin erken belirlenmesi için geliştirilecek stratejiler için yararlı olacaktır.

Bu çalışmada, HSP70 biyomarker olarak kullanılmıştır. HSP70 proteini hücrel stres cevaplarının moleküler işaretleyicileridir ve protein katlanması, agregasyon, taşınma ve stabilizasyonda önemli görevleri mevcuttur. Literatürlere bakıldığında, HSP70 proteini idrar kesesi ürotelyal kanseri, prostat kanseri, pankreas kanseri, meme kanseri, endometriyal kanser ve karaciğer kanseri gibi kanser türlerinde biyomarker olarak da kullanılmıştır. HSP70 in erken teşhis için umut vaat eden bir biyomarker olmasından dolayı, bu tez HSP70 in çok düşük konsantrasyonlarda ve tekrarlanabilir şekilde tayinine olanak sağlamıştır.

Hassas bir biyosensör hazırlamanın en önemli adımı tüm immobilizasyon adımlarının dikkatli bir şekilde optimize edilebilmesidir. Yapılan optimizasyon basamaklarında seçilen değerler Tablo 5.1 de verilmiştir.

Tablo 5. 1. Optimizasyon basamakları ve seçilen değerler

Optimizasyonlar	Seçilen değer
Grafen miktarı	0,2 mg
Anti-HSP70 konsantrasyonu	40µg/mL
Anti-HSP70 inkübasyon süresi	60 dakika
HSP70 inkübasyon süresi	60 dakika
Lineer aralık	12-144 fg/mL

Optimizasyon basamağından sonra yapılan tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik adımlarıyla da biyosensörün tekrar üretilebilirlikte oldukça başarılı olduğu görülmüştür. Biyosensörün gerçek kan serumunda da denenmiş olmasıyla tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Bu sayede geleceğe yönelik umut vaat edici sonuçlar elde edilmiştir.

6.KAYNAKLAR

- Ahuja T, Mir I.A, Kumar D, Rajesh (2007). Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials*, 28: 791-805.
- Alwarappan S, Boyapalle S, Kumar A, Li C, Mohapatra S (2012). Comparative study of single-, few-, and multilayered graphene toward enzyme conjugation and electrochemical response. *J. Phys. Chem. C*, 116: 6556–6559.
- Anonim(2014). Grafen Nedir?<http://ntvbilim.wordpress.com/category/ntv-bilim/teknoloji/> (erişim tarihi, 04.06.2009).
- Avouris P (2010). Graphene: Electronic and Photonic Properties and Devices. *Nano Letters*, 10: 4285–4294.
- Aykut U, Temiz H, (2006). Biyosensörler ve Gıdalarda Kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3: 51-59.
- Chang J, Chang K, Hu C, Cheng W, Zen J (2010). Improved Voltammetric Peak Separation and Sensitivity of Uric Acid and Ascorbic Acid at Nanoplatelets of Graphitic Oxide. *Electrochemistry Communications*, 12: 596-599.
- Chaubey A, Malhotra B.D (2002). Mediated biosensors. *Biosens. Bioelectronics*, 17: 441-456.
- Ciocca D. R, Calderwood S. K (2005). Heat Shock Proteins in Cancer: Diagnostic, Prognostic, Predictive, and Treatment Implications. *Cell Stress Chaperones*, 10: 86–103.
- Cosnier S (1999). Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films, *Biosensors and Bioelectronics*, 14: 443-456.
- Daugaard M, Rohde M, Jäättelä M (2007). The Heat Shock Protein 70 Family: Highly Homologous Proteins with Overlapping and Distinct Functions. *FEBS Lett.*, 581: 3702–3710.
- Davis T.J, Hyde M.E, Compton R.G (2005). Nanotrench arrays reveal insight into graphite electrochemistry. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 44: 5121-5126.
- Geim A. K (2009). Graphene: Status and Prospects. *Science*, 324: 1530-1534.
- Gerard M, Chaubey A, Malhotra B.D (2002). Application of conducting polymers to biosensors. *Biosens. Bioelectronics*, 17: 345-359.
- Hamdi N, Wang J.J, Walker E, Maidment N.T, Monbouquette H.G (2006). An electroenzymatic L-glutamate microbiosensor selective against dopamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 591: 33.
- Hernandez Y, Nicolosi V, Lotya M, Blighe F. M, Sun Z. Y, De S, McGovern I. T, Holland B, Byrne M, Gun_ko Y. K, Boland J. J, Niraj P, Duesberg G, Krishnamurthy S, Goodhue R, Hutchison J, Scardaci V, Ferrari A. C, Coleman J. N (2008). High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite. *Nat. Nanotechnol*, 3: 563-568.
- Huang Q.A, Hu R, Wang B, Zhang J (2007). ‘‘ Electrochim. Acta.’’, 52: 8144-8164.

- Kampinga H, Craig E (2010). The HSP70 chaperone machinery: J Proteins as Drivers of Functional Specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11: 579-592.
- Kim K. S, Zhao Y, Jang H, Lee S. Y, Kim J. M, Ahn J. H, Kim P, Choi J. Y, Hong B. H (2009). Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. *Nature*, 457: 706-710.
- Li X. S, Cai W.W, An J. H, Kim S, Nah J, Yang D. X, Piner R, Velamakanni A, Jung I, Tutuc E, Banerjee S. K, Colombo L, Ruoff R. S (2009). Large-area synthesis of high-quality and uniform graphene films on copper foils. *Science*, 324: 1312-1314.
- Lindquist S, and Craig E (1988). The Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet.*, 22:631-77.
- Novoselov K. S, Geim A. K, Morozov S. V, Jiang D, Zhang Y, Dubonos S. V, Grigorieva I.V, Firsov A. A (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* 306 (5696), 666-669.
- Orazem M.E, Tribollet B. (2008). *Electrochemical Impedance Spectroscopy*. New Jersey.
- Otlu B, (2010). *Biyosensörler (Biyolojik Sensörler)*. XXXIV Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 54-55.
- Pohanka M, Skládal P (2008). Electrochemical biosensors—principles and applications. *J. Appl. Biomed.*, 6: 57-64.
- Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L (2006). The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci*, 63(22): 2560-2570.
- Rao C.N.R, Sood A.K, Subrahmanyam K.S, Govindaraj A (2009). Graphene: The new two-dimensional nanomaterial. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 48: 7752-7777.
- Rozploch F, Patyk J, Stankowski J (2007). Graphenes Bonding Forces in Graphite. *Acta Physica Polonica A*, 112: 557-563.
- Ronkainen N.J, Halsall H.B, Heineman W.R (2010). Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.*, 39: 1747-1763.
- Shan C.S, Yang H.F, Song J.F, Han D.X, Ivaska A, Niu L (2009). Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene. *Anal. Chem.*, 81: 2378-2382.
- Sharma S. K, Sehgal N, Kumar A (2003). Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Curr. Appl. Phys.*, 3: 307-316.
- Sherman M, Multhoff G (2007). Heat shock proteins in cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 1113:192-201.
- Shioyama H (2001). Cleavage of Graphite to Graphene. *J Mater Sci Letters*, 20: 499-500.
- Stankovich S, Dikin D.A, Dommett G.H.B, Kohlhaas K.M, Zimney E.J, Stach E.A (2006). Graphene-based composite materials. *Nature*, 442: 282–286.

- Skoog D.A, Holler F.J, Crouch S.R (2007). Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition. Thomson Brooks/Cole Publishing, 1039p, Belmont.
- Stoller M.D, Park S, Zhu Y, An J, Ruoff R.S (2008). Graphene-Based Ultracapacitors. Nano Lett., 8: 3498–3502.
- Sutter P.W, Flege J. I, Sutter E. A (2008). Epitaxial Graphene on Ruthenium. Nat. Mater., 7: 406-411.
- Suzuki K, Ito Y, Wakai K, Kawado M, Hashimoto S, Seki N, Ando M, Nishino Y, Kondo T, Watanabe Y, Ozasa K, Inoue T, Tamakoshi A (2006). Serum Heat Shock Protein70 Level and Lung Cancer Risk: a Case-control Study nested in a Large Cohort Study. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 15: 1733–1737.
- Thevenot D, Toth K, Durst R.A, Wilson G.S (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. Biosens. Bioelectron., 16:121-131.
- Thomas X, Campos L, Le Q.H (2005). Heat shock proteins and acute leukemias. Taylor & Francis Group Ltd, 10(3): 225-235.
- Yang P, Wang L, Wu Q, Chen Z, Lin X (2014). A method for determination of glucose by an amperometric bienzyme biosensor based on silver nanocubes modified Au electrode. Sensor Actuat B-Chem., 194: 71-78.
- Wallace P. R (1947). The Band Theory of Graphite, Physical Review, 71: 622–634.

ÖZGEÇMİŞ

Burcu ÖZCAN, 04 Eylül 1989 Bakırköy/İSTANBUL doğumludur. İlköğrenimini Alaattin Keykubat İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Kadriye Morođlu Lisesi'nde 2007 yılında, lisans öğrenimini ise Namık Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde 2012 yılında tamamlamıştır.