

**RACK-1 ANALİZİ İÇİN İMMUNOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

Hakan TÖRER

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK
2016**

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**RACK-1 ANALİZİ İÇİN İMMUNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Hakan TÖRER

KİMYA ANABİLİM DALI

**DANIŞMAN: : Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK
TEKİRDAĞ-2016**

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında, Hakan TÖRER tarafından hazırlanan” RACK-1 Analizi İçin İmmunosensör Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu” 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 : Yrd. Doç. Dr. Funda ÖZTÜRK

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Özgür ÖZAY

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RACK-1 ANALİZİ İÇİN İMMUNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Hakan TÖRER

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Bu tez çalışmasında meme kanserinin önemli bir biyomarkerı olan ve RACK-1 geninin aşırı ekspresyonu sonucu oluşan RACK-1 konsantrasyonunu belirleyen yeni bir immunosensör geliştirildi. Bunun için tek kullanımlık İndiyum Tin Oksit Polietilen Teraftalat (ITO- PET) elektrot yüzeyine 11-siyanoundesiltrimetoksisilan ile kendi kendine oluşan mono tabaka (SAM) oluşturuldu. 11-CUTMS modifiyeli yüzey üzerine Anti-RACK-1 'in kovalent bağlanması sağlandı. Döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile immobilizasyon adımları ve RACK-1' in elektrot yüzeyine bağlanması incelendi. Tekrarlanabilir ve tekrar üretilebilir bir biyosensör elde etmek için tüm immobilizasyon parametreleri optimize edildi.

Anahtar kelimeler: Anti-RACK-1, RACK-1, immunosensör, kanser biyomarkerları, ITO- PET elektrot

2016, 35 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF AN IMMUNOSENSOR FOR ANALYSIS OF RACK-1

Hakan TÖRER

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

In this study, an immunosensor was developed to detect RACK-1 antigen that is a significant biomarker of breast cancer and forms by high expression of RACK1 gene. For this purpose, a self assembled monolayer (SAM) was generated on the disposable indium thin oxide polyethylene terephthalate (ITO-PET) electrode surface with 11-cyanoundecyltrimethoxysilane. AntiRACK-1 was covalently immobilized onto the 11-CUTMS modified surface. The immobilization steps and the binding of RACK-1 onto the surface were examined by using cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. All immobilization parameters were optimized to obtain a good, repeatable and reproducible biosensor.

Keywords: Anti-RACK-1, Rack-1, immunosensor, cancer biomarkers, ITO-PET electrode

2016, 35 Page

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER.....	2
2.1.Biyosensör	2
2.2.Rack-1 Geni ve Proteini	5
2.3.Silan Bağlanma Ajanları ve Substrat Yüzeyine Bağlanması.....	6
2.4.İmpedans Spektroskopisi ve Döngüsel Voltametrinin Biyosensör Sistemlerinde Uygulamaları	9
2.4.1.İmpedans spektroskopisinin biyosensör sistemlerindeki uygulamaları.....	10
2.4.2. Döngüsel voltametrinin biyosensör sistemlerinde uygulamaları	10
3.MATERYAL ve YÖNTEM.....	12
3.1.Materyal.....	12
3.1.1. ITO-PET Elektrotların hazırlanması	12
3.1.2. OH tabakası için karışım hazırlanması.....	12
3.1.3 Kendi kendine oluşan (SAM) için 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) çözeltisinin hazırlanması	13
3.2. Elektrokimyasal Ölçümler.....	13
3.4 Yöntem	14
3.4.1 İmmobilizasyon basamakları.....	14
3.4.2. Optimizasyon basamakları	15
3.4.2.1.11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) ile kendi kendine oluşan tek tabakalar (SAM) için konsantrasyon optimizasyonu	15

3.4.2.2. Anti-RACK-1 konsantrasyon optimizasyonu.....	16
3.4.2.3. Anti-RACK-1'in inkübasyon süresi optimizasyonu	16
3.4.2.4. RACK-1 biyomarkerinin inkübasyon süresi optimizasyonu	16
3.4.2.5. Geliştirilen biyosensör için ideal tayin aralığı belirlenmesi	16
3.4.2.6. Tekrarlanabilirlik	17
3.4.2.7. Geliştirilen biyosensörün depo ömrü.....	17
3.4.2.8. Tekrar üretilebilirlik	17
3.4.2.9. Rejenerasyon	18
3.4.2.10. Gerçek serum örneklerinde RACK-1 tayini	18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	19
4.1. İmmobilizasyon Basamaklarının Bulguları	19
4.2. Optimizasyon Basamaklarının Bulguları.....	21
4.2.1. 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) ile kendi kendine oluşan tek tabakalar (SAM) için konsantrasyon optimizasyonu bulguları.....	21
4.2.2. AntiRACK-1 miktar optimizasyon bulguları	22
4.2.3. AntiRACK-1 süre optimizasyon bulguları	23
4.3.4. RACK-1 inkübasyon süre optimizasyon bulguları.....	24
4.4. Tayin Aralığı Bulguları	25
4.5 Tekrarlanabilirlik Bulguları	26
4.6 Geliştirilen Biyosensörün Depo Ömrü Bulguları	26
4.7 Tekrar Üretilirlik Bulguları	27
4.8 Rejenerasyon Bulguları	28
4.9 İmmobilizasyon basamaklarının ve bağlanmış RACK-1'in SEM Görüntüleri	29
4.10 Gerçek Serum Örnekleri ile Çalışmaların Bulguları	30
5. SONUÇ	32
6. KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	35

KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	: Bovine albümin serum
CV	: Döngüsel voltametri
EIS	: İmpedans spektroskopisi
WHO	: Dünya sağlık örgütü
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$: Ferri-ferrosiyandır çözeltisi
11-CUTMS	: 11-siyanoundesiltrimetoksisilan
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SAM	: Kendiliğinden oluşan monotabaka
ITO-PET	: İndiyum tin oksit polietilen elektrot
NH_4OH	: Amonyum hidroksit
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
RACK-1	: Aktive edilmiş C-kinaz reseptörü

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Biyosensör Bileşenlerinin İçeriği	2
Çizelge 3. 1. İmmobilizasyon Basamakları	15
Çizelge 4. 1. Farklı 11-CUTMS miktarı ile hazırlanmış biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları	22
Çizelge 4. 2.Farklı Anti-RACK-1 konsantrasyonları ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları	23
Çizelge 4. 3.Farklı Anti-RACK-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları	24
Çizelge 4. 4. Farklı RACK-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri sonuçları	25

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2. 1. Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması.....	3
Şekil 2. 2. Transduser çeşitleri	4
Şekil 2. 3. RACK-1 proteini yapısı:	6
Şekil 2. 4. 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) yapısı.....	8
Şekil 2. 5. R= (CH ₂) ₁₁ CN, organo silan ajanların substrat yüzeyine bağlanma şeması	9
Şekil 3. 1. Ölçüm sistemi.....	14
Şekil 4. 1. Şematik olarak ITO-Pet elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen işlemler.....	19
Şekil 4. 2. İmmobilizasyon adımlarına ait EIS ve CV eğrileri.	20
Şekil 4. 3. SAM konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi.....	21
Şekil 4. 4. Anti-RACK-1 konsantrasyon optimizasyonu	22
Şekil 4. 5. Anti-RACK1 inkübasyon süresi optimizasyonu.	23
Şekil 4. 6. RACK1 inkübasyon süresi optimizasyonu.....	24
Şekil 4. 7. Optimal şartlarda kalibrasyon grafiği.....	26
Şekil 4. 8. Haftalık depo ömrü sonuçları.....	28
Şekil 4.9. Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının standart eğrileri.....	29
Şekil 4.10 Rejenerasyon çalışmasının grafik görünümü.....	30
Şekil 4.11 Biyosensör yüzeyinin SEM görüntüleri.....	31

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin başlangıcından mezuniyetime kadar desteğini esirgemeyen değerli hocam ve saygı değer büyüğüm Prof. Dr. Şefik KURULTAY'a,

Yüksek lisans eğitimimde ve tez hazırlama sürecimde sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesiyle her konuda yol gösterici olarak yardımcı olan çok değerli danışman hocam Prof.Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan, deneyimlerini, yardımseverliklerini ve dostluklarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Burçak DEMİRBAKAN'a ve Burcu ÖZCAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma kapsamında kullanılan tüm kimyasal, cihaz ve donanım, **113Z678** numaralı **TÜBİTAK** projesi tarafından sağlanmıştır. Katkılarından dolayı **TÜBİTAK**'a, Teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

2015 yılı Şubat ayı, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) resmi internet sitesinde yayımlanan verilere göre, dünyada toplam 8 milyon 200 bin kişi kanser yüzünden hayatını kaybediyor. WHO'den alınan verilere göre 2012 yılında da en büyük hastalık ve ölüm nedenleri arasında kanser vakaları yer aldı. Yeni kanser vakalarının yüzde 60'ından fazlası Afrika, Asya, Orta ve Güney Amerika'da görüldü. Bu bölgelerde kanserden ölüm oranı ise yüzde 70. Kanser vakalarının 20 yıl içinde 22 milyona yükseleceği tahmin ediliyor. Dünyada 14 milyon yeni kanser vakasına rastlandığı ifade edilirken, erkekler arasında en sık rastalanan kanser türü akciğer kanseri. Akciğer kanserini prostat, kalın bağırsak, mide, karaciğer türleri sırasıyla takip etmekte. Kadınlarda ise en sık rastlanan kanser türü meme kanseri olduğu ifade edilirken, meme kanserini sırasıyla kalın bağırsak, akciğer, rahim ağzı ve mide kanser türleri takip etmektedir (WHO 2014).

Biyomarkerlar ile bir organın işlevi, bir organizmanın gelişiminin takibi veya bir hastalığın oluşumundan gelişimine kadar farklı aşamaları tespit edilebilmektedir. Özellikle günümüzde en yaygın uygulamaları kanser tanısı, gelişimi ve takibinde önemli rol oynamaktadır. Medüler troid kanserinde calsitonin, pankreas ve mide kanserinde CA19-9, meme kanseri için CA 15-3 tümör markerlarına örnek olarak verilebilir. Bu biyomarkerların tespit edilmesi, ölçülmesi, vücut sıvılarındaki miktarlarının belirlenebilmesi için immunosensör yapılarının bu belirteçlerin reseptörleri ile dizayn edilmesi gerekmektedir.

RACK-1 geni özellikle meme kanserinde aşırı ekspresyona uğrar ve RACK-1 proteini miktarında aşırı bir artış gözlenmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında; RACK-1'in önemli bir kanser biyomarkeri olma potansiyelinden dolayı, hassas, ekonomik ve doğru tayini için bir immunosensör tasarımı amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER

2.1. Biyosensör

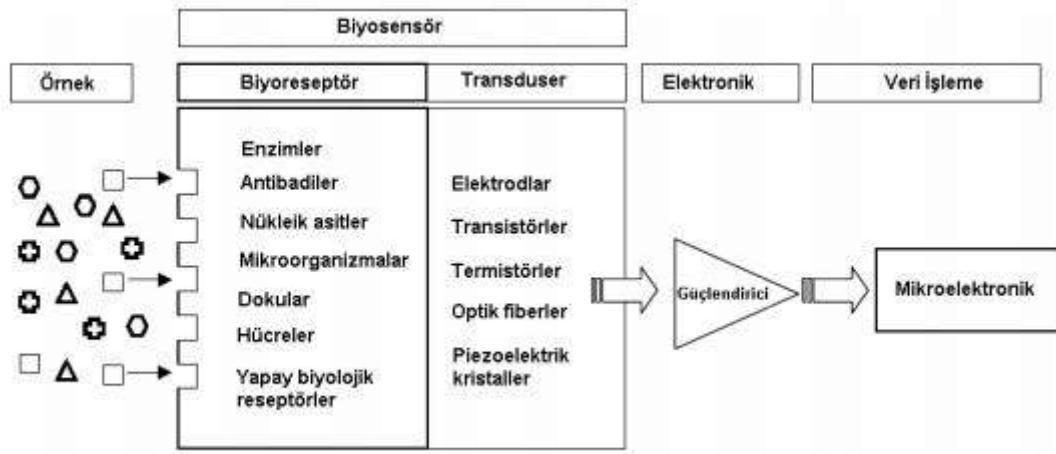
Biyosensörler fizikokimyasal analiz sistemleri ile biyolojik materyallerin birleştirilmesi ile oluşan analitik sistemlerdir. Biyosensörlerde biyolojik sistemin yüksek özgüllüğü ile fiziksel analiz sisteminin tayin duyarlılığı birleştirilmiştir.

Biyosensörler temel olarak; analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyobileşen (biyolojik tanıma bölgesi) ile etkileşime girmesi sonucu transduser (dönüştürücü) yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanır. Biyosensörlerde biyobileşen olarak enzimler, mikroorganizmalar, bitkisel ve hayvansal dokular, reseptörler, antikorlar ve nükleik asitler kullanılabilir. Analiz edilecek moleküle uygun olarak bir biyobileşen ve analitin dönüşümü sonucunda oluşan elektrokimyasal, optik ya da gravimetrik sinyali elektriksel sinyale çeviren uygun bir transduser seçilmelidir. Transduser ve biyobileşen birbirine uygun fiziksel ya da kimyasal yöntemle bağlanabilir (Kökbaş ve ark. 2013).

Tablo.1'de bir biyosensör sisteminin birimleri şematik olarak gösterilmiştir. Günümüzde biyosensörler; biyobileşen ve transduser olarak pek çok farklı maddeyi ve sistemi içermektedir. Bunların en önemli olanları Çizelge 2. 1.'de verilmiştir (Kökbaş ve ark. 2013).

Çizelge 2. 1. Biyosensör Bileşenlerinin İçeriği

Analit	Biyobileşen	Sinyal iletici sistem
Hormonlar	Enzimler	Elektrokimya Esaslı
Enzim	Antikorlar	Yarı İletken Esaslı
Koenzim	Hücre	Optik Esaslı
Substrat	Doku Kesitleri	Fotometri Esaslı
Aktivatör	Reseptörler	Flüometri Esaslı
İnhibitörler	Mikroorganizmalar	Flüometri Esaslı
Antikor-Antijen	Nükleik Asitler	Piezoelektrik Esaslı
Nükleik Asit	Lipidler	Kuartz Kristal Mikrobalans
Mikroorganizmalar	Hücre Organelleri	Mikrokantileverlar



Şekil 2. 1. Biyosensörlerin genel çalışma mekanizması

Biyoreseptör bir analitin tanınmasında biyosensörün biyolojik hassasiyete sahip kısmıdır. Biyosensörün hassasiyeti ve seçiciliğinde etkilidir. Bu reseptörler tek bir partiküler substratı bağlayacak ve diğer substratlara bağlanmayacak özellikte olmalıdır (Kökbaş ve ark. 2013).

Biyoreseptörler temel olarak 3 ana grup (biyokatalitik, biyoafinite ve hibrit reseptörleri) olarak sınıflandırılır. Biyokatalitik reseptörler, analiti belirlenmeyen formdan belirlenebilir forma dönüştürerek transduserle kaydedilebilir ve belirlenebilir kılar (Demirbakan 2015). Biyokatalitik tanıma elementleri enzim (mono veya multi enzim) içeren sistemler, hücreler (mikroorganizmalar, örn; bakteriler, mantarlar, ökaryotik hücreler, mayalar), hücre organelleri ve bitki, hayvan doku parçalarından oluşur (Özcan 2015). Enzimler biyosensörlerde kullanılan ilk biyokomponentlerdir. Antiadiler, nükleik asitler, lektinler, boyalar, hücre membran reseptörleri ve diğer spesifik bağlayıcı ajanlar gibi biyolojik komponentler biyoafinite reseptörlerine örnektir. Hormonlar, ilaçlar, virüsler, tümör antijenleri, bakteri antijenleri ve diğer birçok protein gibi maddelerin belirlenmesi ve ölçümü, immünolojik teknikler vasıtasıyla düşük konsantrasyonlarda bile başarılabilmektedir (Canbaz 2013). Affinite bazlı biyosensörler belirli bir ligantı termodinamik olarak stabil kompleks formuna dönüştüren seçici etkileşimler oluştururlar (Özcan 2015).

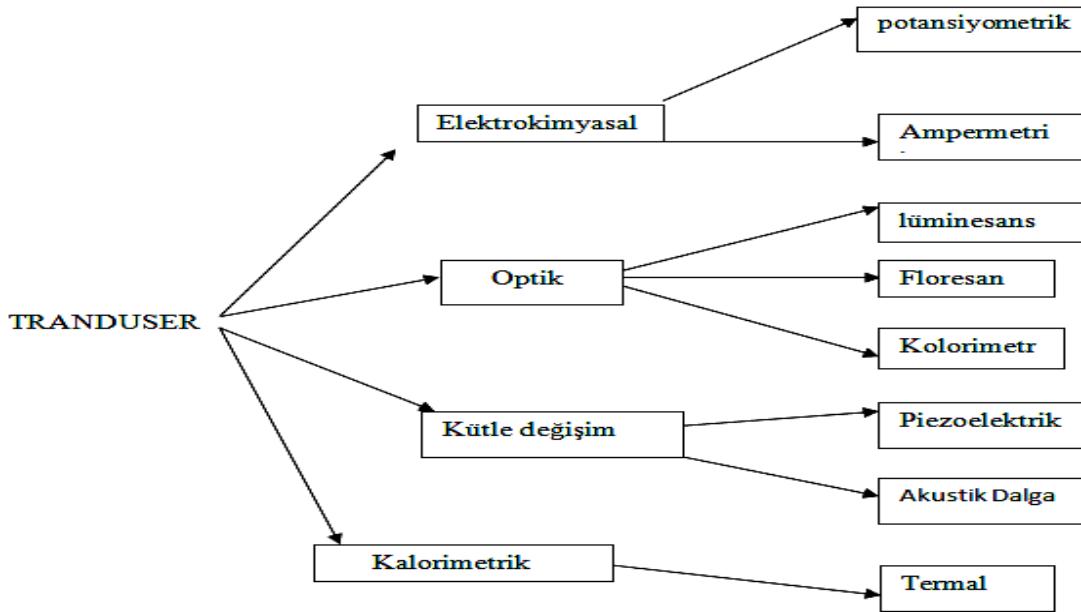
Hibrit reseptörlerin biyosensör uygulamalarında nükleik asitlerden yararlanılmaktadır. Karakteristik özelliklerinden dolayı nükleik asitler seçici olarak davranmaktadır.. Bu sensörlerin kullanım alanları, DNA’da meydana gelen hasarları kimyasal olarak tespit etme ve DNA’nın türe özgü dizilişinin hibridizasyonu ile mikroorganizmaların belirlenmesidir (Canbaz 2013).

Transduserler yani dönüştürücüler, biyoreseptörün analiti tanıdıktan sonra ortamda oluşan fiziksel veya kimyasal değişimi algılayıp bu değişikliği ölçülebilir anlamlı sinyallere dönüştürerek detektöre aktaran yapılardır.

Genel olarak biyolojik komponent uygun bir şekilde immobilizasyonla transdusere bağlanır. İmmobilizasyon metodu immobilize edilecek biyokomponentin yapısına göre belirlenir. Kullanılan transdüksiyon elementi ve analitin fiziksel durumu da seçilecek metod için önemli faktörlerdir. Genel olarak 5 yaygın metot bulunmaktadır. Bunlar;

- 1-Adsorbsiyon
- 2-Mikroenkapsülasyon
- 3-Tutuklama
- 4-Çapraz bağlama
- 5-Kovalent bağlama'dır.

Transduserlar, algıladıkları değişimleri algıladıkları sinyallere göre farklı türlere ayrılmaktadırlar. Transduser çeşitleri şekil 2.2'de gösterilmiştir (Gündoğdu 2015).



Şekil 2. 2.Transduser çeşitleri

Geleneksel dönüştürücüler 2 çeşittir: H₂O₂ veya O₂ ölçümlerine odaklanan ampermetre, pH veya iyon ölçümleri yapan potansiyometridir. Biyotanıma reaksiyonları genel olarak kimyasal ürünler üretir ve bu ürünler elektrokimyasal metotlar ile kolayca tespit edilebilmektedirler (Gündoğdu 2015).

Nitelikli bir biyosensörde olması gereken özellikler aşağıdaki gibidir.

Duyarlılık: Sistemin analitteki değişimlere birebir cevap vermesidir.

Seçimlilik: Sistemin sadece analite özgü olduğunu belirtir. Sistem başka reaktiflere ilgi göstermez ve hatalı sonuç vermez.

Ölçüm aralığı: Sistemin tayin edebildiği analit konsantrasyonu aralığıdır.

Ölçüm süresi: Sistemin analiz işlemini tamamlama süresidir.

Tutarlılık: Sistemin sonuçlarındaki tutarlılığı ifade eder.

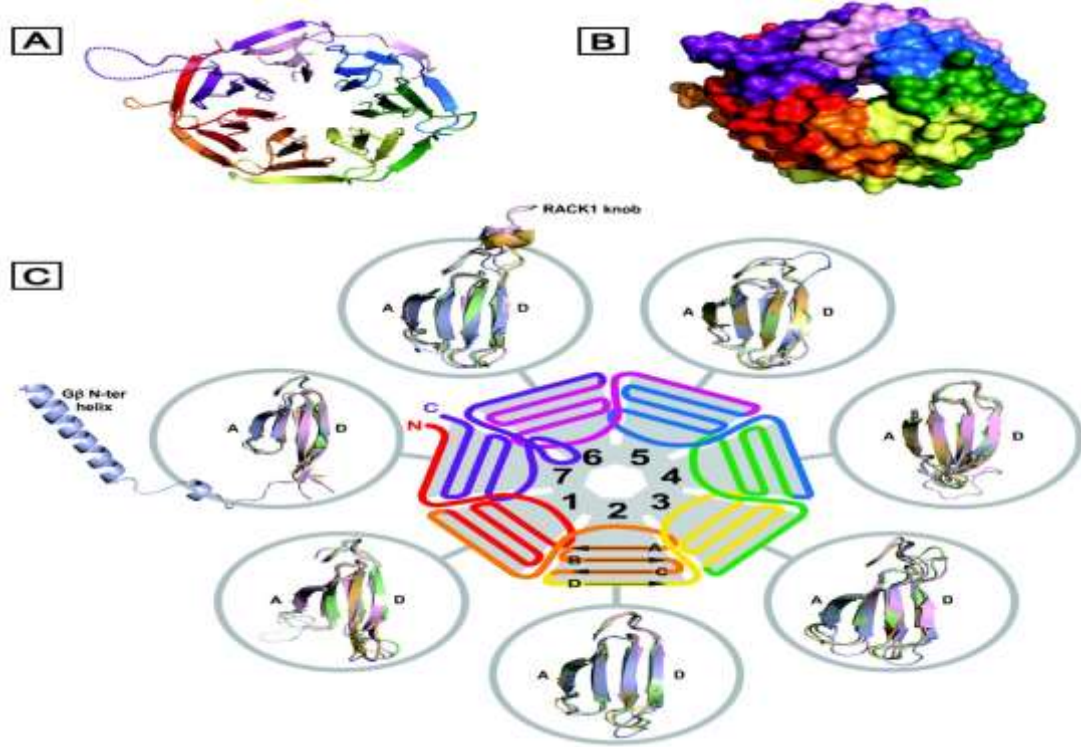
Ölçüm sınırı: Sistemin analiz yapabileceği en düşük analit konsantrasyonunu belirtir.

Ömrü: Sistemin, optimum olan tüm özelliklerini kaybetmeden analiz yapabilme süresidir.

Kararlılık: Belirli bir süre içinde cihazın duyarlılığındaki değişimleri dikkate alan bir kalite ölçüm değeridir (Kökbaş ve ark. 2013).

2.2.Rack-1 Geni ve Proteini

RACK-1 yapısal olarak bir proteindir, 158kDa moleküler ağırlığa sahiptir ve serin/treonin kinazı olarak görev yapmaktadır. Aynı zamanda bu proteini kodlayan genin adı da RACK-1 olarak adlandırılmıştır. İnsan RACK-1 geni 18. Kromozom üzerinde yer almakta ve 1354 aminoasit içermektedir. RACK-1 özellikle tümör invazyonu ve aktin hücre iskeleti organizasyonunda önemli bir modülatördür. Aktin-miyozin daralması, hücre polaritesi ve hücre kararlılığında düzenleyici göreve sahiptir. Ayrıca gen transkripsiyonu, proliferasyon, apoptoz ve onkogenik transformasyon düzenlenmesinde rol oynar. Sahip olduğu bu özellikler ve görevlerinden dolayı kanser ile yakından ilişkili olan bu protein özellikle meme kanserinde aşırı ekspresyona uğrar ve RACK-1 miktarında aşırı bir artış gözlenmektedir.



Şekil 2. 3. RACK-1 proteini yapısı:

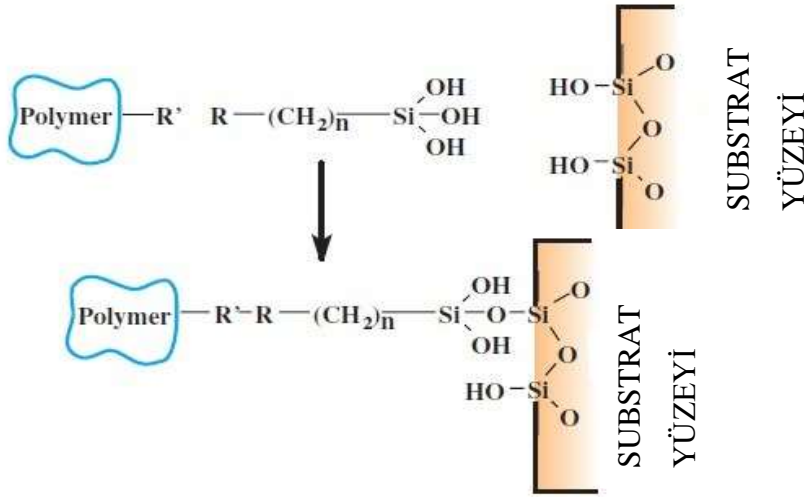
(A) RACK-1 proteini yedi kanatlı β formundaki kristal yapısı

(B) RACK-1 proteini yüzey görünümü, (C) WD tekrar yapılarının yapısal ve şematik görünümü, 7 kanatlı yapının her bir kanadının yapısal ve şematik görünümü (<https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-811X-9-22>).

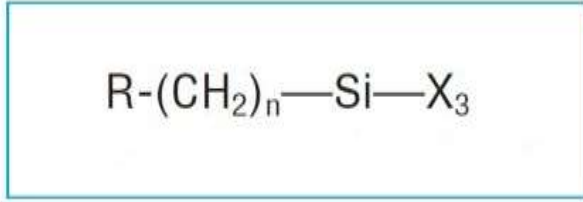
2.3.Silan Bağlanma Ajanları ve Substrat Yüzeyine Bağlanması

2.3.1.Silan bağlanma ajanları genel özellikleri

Silan bağlanma ajanları organik ve inorganik maddeler arasında kuvvetli bağlama yeteneğine sahiptirler. Farklı fazları düzenli bir kompozit haline getirmek için ve heterojen yapıları oluşturmak ve arayüzleri birleştirmek için etkili yapılardır.



Silan bağlama ajanı genel formülü aşağıdaki şekildedir.



X grubu hidroliz olabilen ve genellikle alkol, halojen veya amino gruplarıdır. Hidroliz sonrası reaktif silanol grupları siloksan bağı oluşturmak üzere dolgu maddeleri yüzeyinde yoğunlaşabilir. Alüminyum, zirkonyum, kalay, titanyum ve nikel oksitleri ile kararlı yapılar oluştururlar. Bor, demir ve karbon oksitleri ile daha az kararlı bağlar oluştururlar. Alkali metal oksitler ve karbonatlar Si-O- ile istikrarlı bağlar oluşturmazlar. R grubu ise istenilen özellikleri kazandırabilen, hidrolize edilemeyen organik radikal bir grup olabilir. Organik ve inorganik yapılar arasında kovalent bağ gerçekleştirebilirler.

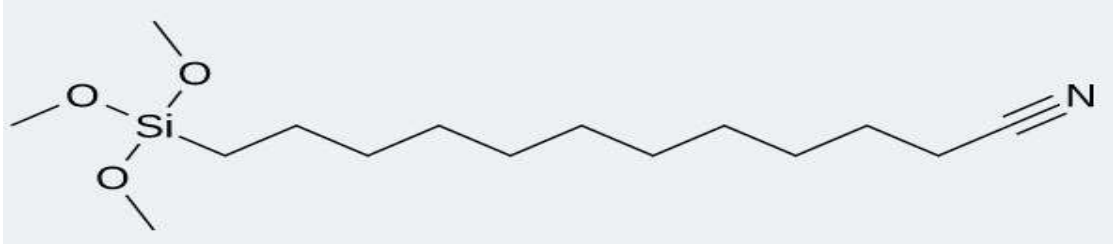
2.3.2. Silan ajanların substrat yüzeyine bağlanması ve kendi kendine oluşan (SAM) 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) tabakasının oluşumu

Yaygın olarak kullanılan organosilan ajanlar 1 organik yapı ve 3 hidroliz olabilen yapıya sahiptir. Trialkoksi silanlar ve alkoksi grupları silan içeren maddeler oluşturmak için hidrolize edilir. Bu silanların reaksiyon aşamaları dört adımdan oluşur. İlk üç aşamada değişken grupların hidrolizi gerçekleşir ve sonrasında oligomerleşme adımı takip edilir. Oligomerler alt-tabaka OH grupları ile hidrojen bağı oluştururlar. Son olarak kurutma yada ısıtma gibi ısı işlem uygulanarak suyun kaybedilmesi ile birlikte alt tabaka OH grupları ile

kovalent bağlanma gerçekleşir. Ardışık olarak tarif edilmiş olmasına rağmen, bu reaksiyonlar ilk hidroliz adımından sonra eş zamanlı olarak ortaya çıkabilir (<http://www.gelest.com/wp-content/uploads/Goods-PDF-brochures-couplingagents.pdf>).

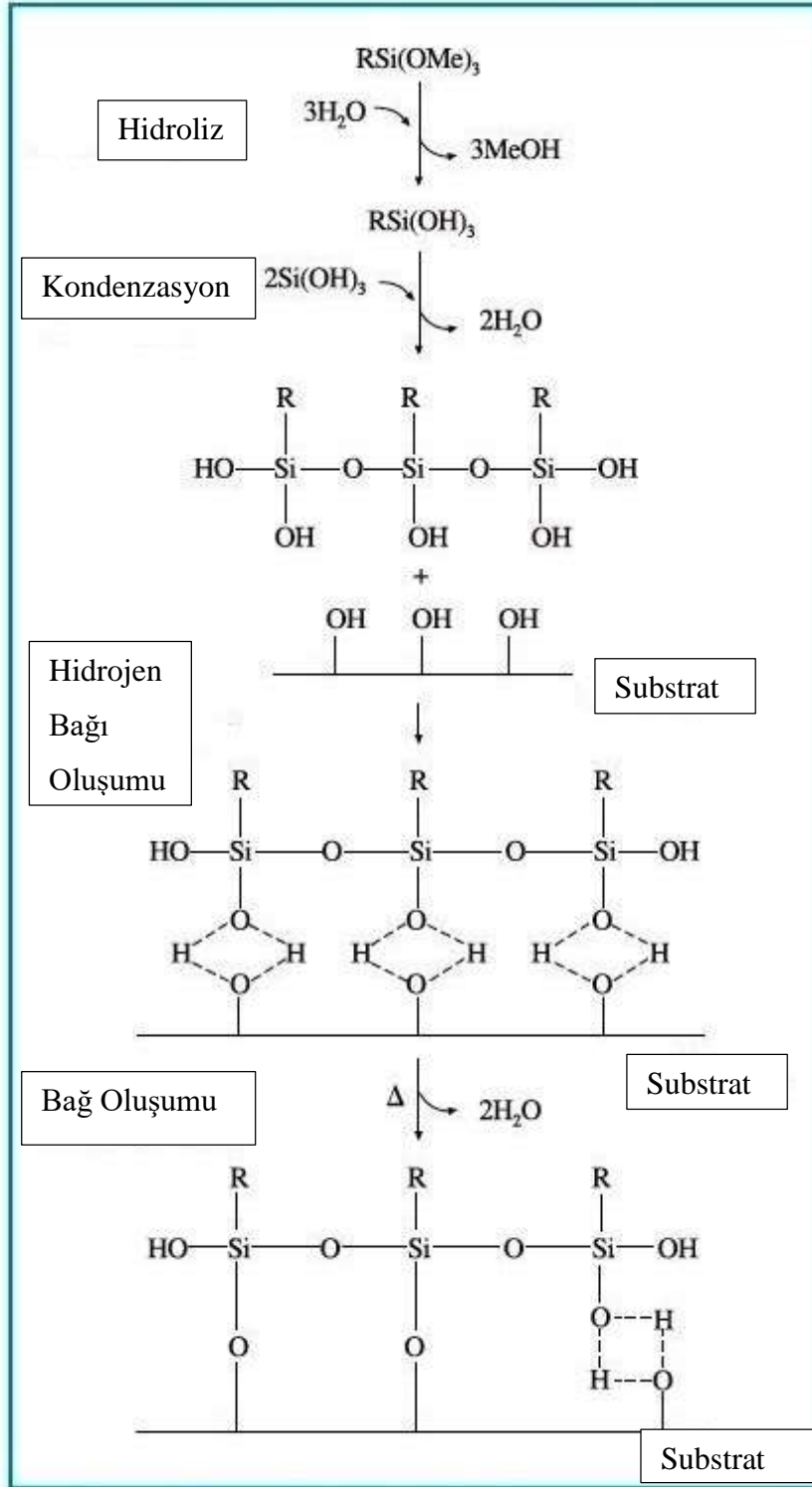
11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS), organosilan ajanlardan biridir.

Kapalı formülü= $C_{15}H_{31}NO_3Si$, moleküler ağırlığı= 301,50 g/mol, yoğunluğu=0,930 g/ml (<http://www.abcr.de/shop/en/11-Cyanoundecyltrimethoxysilane-97-63709.html/>).



Şekil 2. 4. 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) yapısı

(<http://www.abcr.de/shop/en/11-Cyanoundecyltrimethoxysilane-97-63709.html/>).



Kaynak: <http://www.abcr.de/shop/en/11-Cyanoundecyltrimethoxysilane-97-63709.html/>.

Şekil 2. 5. R= (CH₂)₁₁CN, organo silan ajanların substrat yüzeyine bağlanma şeması

2.4. İmpedans Spektroskopisi ve Döngüsel Voltametrinin Biyosensör Sistemlerinde Uygulamaları

2.4.1. İmpedans spektroskopisinin biyosensör sistemlerindeki uygulamaları

İmpedans, bir devredeki toplam dirençtir. İmpedans spektroskopisi, elektrokimyasal sistemleri ve yöntemleri araştırmak için etkili bir tekniktir. Elektrokimyasal impedans spektroskopisi elektrokimyasal tekniklerden farklı olarak, hacim araştırmalarında ve dakikalardan mikrosaniyelere uzanan geniş zaman aralığı ile bağlantılı ara yüzey işlemlerinde kullanılabilir. Ayrıca impedans metodu denge veya sabit halde küçük boyutta bir dalga sinyali ölçülen elektrokimyasal hücrenin değişimine dayanmaktadır. Değişim uygulanan potansiyel, uygulanan akım veya hidrodinamik elektrotlarda konveksiyon hızı gibi parametrelerin geniş bir aralığı olabilir. Bu tekniğin avantajı değişimler çok küçük seviyede olsa bile cevap yaklaşık olarak doğrusaldır (Bard ve Faulkner 2001).

Elektriksel direnç, devrede bulunan bir elemanın elektrik akıma karşı gösterdiği dirençtir. İmpedans ile direnç arasındaki en temel benzerlik; impedansın da direnç gibi elektriksel akıma karşı devrenin direnç göstermesiyle ölçülmüş bir değer olmasıdır. İmpedansın dirençten en önemli farkı ise; ideal direncin sahip olduğu basit özellikler ile sınırlandırılmamasıdır. İmpedans spektroskopisi, yapıların kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmekte sıkça kullanılan bir yöntemdir (Gündoğdu 2015). İmpedans spektroskopisi biyosensörlerde ise transduser yüzeyindeki bağlanma olaylarının gözlenmesinde kullanılmaktadır. Biyomoleküllerin gözlemlenmesi ve tanımlanması açısından etkili bir yöntemdir. Biyomoleküllerin transduser üzerine immobilizasyon adımları ve yüzey modifikasyonu ve karakterizasyonunun incelenmesinde kullanılan önemli bir yöntemdir.

2.4.2. Döngüsel voltametrinin biyosensör sistemlerinde uygulamaları

İletken bir maddeyi içeren durgun bir çözeltide bir çalışma elektroduna zamanla doğrusal olarak artan bir potansiyel programı uygulandığında akım-potansiyel eğrisinin bir pik şeklinde çıktığı görülür. Bu uygulamada potansiyel taraması ileri yönde belli bir potansiyel değerine ulaştıktan sonra yine doğrusal olarak azalacak biçimde ters çevrilirse, bu tekniğin adı döngüsel voltametri olur. Döngüsel voltametrinde ileri ve geri yöndeki potansiyel tarama hızları aynı tutulabildiği gibi, istenildiğinde farklı tarama hızları da kullanılabilir. Ayrıca ileri ve geri yöndeki tarama bir kez yapılabildiği gibi, birçok kez de yapılabilir (Şimşek 2012).

Döngüsel voltametri tekniğinde, tarama hızı değiştirilerek pik yüksekliklerinin tarama hızı ile değişiminden adsorpsiyon, difüzyon ve elektron aktarım sayısına eşlik eden kimyasal

reaksiyon olaylarının var olup olmadığı ve varsa büyüklüğü belirlenebilir. Ayrıca ileri ve geri tarama piklerinden reaksiyon mekanizması hakkında fikir edinilip, kinetik veriler elde edilebilir (Tekin 2008).

CV yöntemi birçok alanda kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları: kantitatif analizler, yüzey modifikasyonu, elektrot reaksiyonlarının kinetiklerinin incelenmesi, çeşitli fizikokimyasal sabitlerin bulunması (D , n , i , K , E , α ...), adsorpsiyon olaylarının incelenmesi, elektrot reaksiyonlarının mekanizmalarının incelenmesi, kompleks yapıların belirlenmesi, biyosensörlerde immobilizasyon basamaklarının incelenmesi gibi kullanım alanlarına sahiptir (Gündoğdu 2015).

Döngüsel voltametri biyosensör alanında, immobilizasyon aşamalarının gözlenmesi ve biyoanalitin bağlanmasını takip etmek amacıyla kullanılır. Döngüsel voltametri yöntemi ile yapılan ölçümler sonucunda oluşan anodik ve katodik pikler her aşamada farklılık göstermektedir. Oluşan bu piklerin artış ve azalmaları elektrot yüzeyinde gerçekleşen durum ve gelişimi hakkında bizlere bilgi verir.

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Materyal

Deneyle esnasında kullanılan tüm kimyasallar ve RACK-1 antijeni ile anti-RACK-1 Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)' den alınmıştır. RACK-1 ve anti-RACK-1'in tüm seyreltme işlemleri 0,01M pH=7,4 fosfat tamponu ile gerçekleştirilmiştir ve porsiyonlama işleminden sonra -20°C' de saklanmıştır. Çalışma elektrodu olarak ITO-Pet elektrotlardan, 1 cm² (eni 0,5 cm, boyu 2 cm) yüzey alanına sahip elektrotlar kesilerek, kullanılmıştır. Referans elektrot olarak, KCl ile doygunlaşmış Ag/AgCl elektrot kullanılmıştır. Yardımcı elektrot olarak 5 cm uzunluğunda platin tel kullanılmıştır. Referans ve yardımcı elektrotlar iBAS, Warwickshire, UK firmasından getirilmiştir. ITO-Pet çalışma elektrodu Sigma–Aldrich' den getirilmiştir. Ölçümler için, akım voltmetresi ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi yazılımı olan Echem Analyst içeren (Gamry Instruments, Warminster, USA) bir bilgisayara bağlı Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 600 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazı kullanılmıştır.

3.1.1. ITO-PET Elektrotların hazırlanması

İndiyum tin oksit (ITO-PET) elektrotlara immobilizasyon aşamasından önce ultrasonik banyoda 10'ar dakika süre ile sırasıyla aseton-sabun çözeltisi ve saf su uygulanarak elektrotların temizliği sağlandı. Sonrasında çıplak elektrotların CV-EIS ölçümleri alındı. Elektrotların iletkenliğini arttırmak, yüzeyde aktif -OH uçları oluşturmak suretiyle bir sonraki adımda immobilizasyonların başarıyla gerçekleştirilmesi için çıplak ITO-PET elektrotlar 1:1:5 oranında sırasıyla NH₄OH, H₂O₂, H₂O içeren çözeltinin içerisine daldırıldı ve oda sıcaklığında 90 dakika inkübasyona bırakıldı.

3.1.2. OH tabakası için karışım hazırlanması

Her bir ITO-PET elektrot 1cm² yüzey alanına sahip olacak şekilde kesildikten sonra temizleme işlemi yapılmıştır. Yüzeyde aktif -OH uçları elde etme amacıyla 90 dakika oda sıcaklığında OH karışımı ile inkübe edilmiştir. Her elektrot için ayrı ayrı hazırlanan OH

karışımı için % 94'lük NH_4OH (amonyum hidroksit), %99'luk H_2O_2 (hidrojen peroksit) ve ultra saf su kullanılmıştır.

Her bir elektrot için ayrı hazırlanan OH karışımı formülü: $80\mu\text{L NH}_4\text{OH}$, $80\mu\text{L H}_2\text{O}_2$, $400\mu\text{L}$ ultra saf su olmak üzere toplam $560\mu\text{L}$ 'lik bir karışım elde edilir. OH tabakası için kullanılan tüm kimyasallar Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)' den alınmıştır.

3.1.3 Kendi kendine oluşan (SAM) için 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) çözeltisinin hazırlanması

Aktif -OH uçları oluşturulmuş elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan tek tabakalar meydana getirmek için, elektrotlar etanol ve toluenle hazırlanmış %0,5'lik 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) çözeltine daldırılarak SAMs tabakaları oluşması için gece boyu inkübasyona bırakılır. Hazırlanan %0,5'lik 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) SAM çözeltisi için, $25\mu\text{L}$ % 97'lik 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS), $2487\mu\text{L}$ etanol ve $2487\mu\text{L}$ toluen kullanılmıştır. Her bir elektrot için $500\mu\text{L}$ SAM çözeltisi kullanılmıştır. % 97'lik 11-siyanoundesiltrimetoksisilan, abcr GmbH & Co.KG (Almanya)'den temin edilmiştir.

3.2. Elektrokimyasal Ölçümler

ITO elektrota uygulanan bütün immobilizasyon işlemleri ve optimizasyon adımlarının takibi için döngüsel voltametriden (CV) ve elektrokimyasal impedans spektroskopisinden (EIS) yararlanılmıştır. CV için potansiyel aralığı -0,5 - 1 V arasında seçilmiş olup (adım büyüklüğü: 10 mV, tarama hızı: 100 mV/s) ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternatif akımda gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametredeki ile aynıdır. İmpedans spektrumları 10.000 – 0.05 Hz aralığındadır.

3.3. Ölçüm Prosedürleri

Anti-RACK-1' in elektrot yüzeyine bağlanması gerçekleştirildikten sonra, elektrot yüzeyinde anti-RACK-1' in bağlanmadığı kısımlara BSA (bovine serum albümin) ajanının bağlanmasıyla biyosensör sistemi tamamlanmıştır. Son işlem olarak RACK-1'in elektrot yüzeyine bağlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bağlanma işlemi 30 dakika, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Her elektrot, farklı $100\mu\text{L}$ 'lik RACK-1

konsantrasyonuna daldırılarak inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Her elektrotun, fiziksel olarak absorblanmış RACK-1' i uzaklaştırmak için ultra saf su ile yıkanarak, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ redoks probu içeren çözeltinin bulunduğu hücre içerisinde CV ve EIS ölçümleri alınmıştır.

Ölçümlerde kullanılan sistem Şekil 3.1.de verilmiştir



Şekil 3. 1. Ölçüm sistemi

3.4 Yöntem

3.4.1 İmmobilizasyon basamakları

Elektrotlara ilk olarak temizleme işlemi uygulanmıştır. Elektrotları temizlemek için her elektrot ayrı ayrı işlem ultrasonik banyoda 10'ar dakika işlem görür. Sırayla: saf aseton, sabun çözeltisi, ultra saf su içerisinde işlem görmüştür. Temizleme işleminden sonra her bir elektrot immobilizasyon işlemleri için hazır hale gelmiştir.

İmmobilizasyon basamakları ayrıntılarıyla birlikte Çizelge 3. 1.'de gösterilmiştir. Elde edilen immobilizasyon koşulları optimizasyon çalışmalarından sonra belirlenmiştir.

Çizelge 3. 1. İmmobilizasyon Basamakları

İŞLEM SIRASI	İŞLEM
1	OH tabakası oluşturma. Hazırlanan OH çözeltisi ile her elektrot oda sıcaklığında 90 dakika boyunca elektrot yüzeyinde -OH uçları oluşturmak amacıyla inkübasyona bırakılmıştır.
2	SAM tabakası oluşturma. Elektrot yüzeyinde kendi kendine oluşan tek tabaka oluşturmak için hazırlanan %0,5 'lik 11-CUTMS ile her elektrot gece boyunca (15-16 saat) oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır.
3	Anti-RACK-1'in bağlanması. Elektron yüzeyine Anti-RACK-1 'in kovalent bağlanması için elektrotlar pH=7,4 0,01M Fosfat tamponu ile seyreltilmiş 0,4062pg/mL Anti-RACK-1 ile oda sıcaklığında 45 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
4	BSA ajanının bağlanması. Elektrot yüzeyindeki açık uçları bloklama ajanı olarak, pH=7 0,01M fosfat tamponuyla hazırlanmış %0,5'lik BSA proteini kullanılarak elektrotlar oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Her işlem sonrasında elektrotlar ultra saf su ile yıkanarak argon gazı ile kurutulmuştur. İmmobilizasyon basamaklarının her bir aşaması EIS ve CV ölçümleri alınarak kontrol edilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda 7 farklı ITO-PET elektrotla çalışılıp, her bir elektrot aynı koşullar altında immobilizasyon sürecine tabii tutulmuştur.

3.4.2. Optimizasyon basamakları

3.4.2.1.11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) ile kendi kendine oluşan tek tabakalar (SAM) için konsantrasyon optimizasyonu

Yüzeyde düzgün bir SAM tabakasının oluşabilmesi ve bu tabakanın her çalışmada tekrarlanabilmesi, ileri aşamalar için oldukça önemlidir. Bu sebeple, SAM oluşumu için 3 farklı konsantrasyonda (%0,1, %0,5, %1) denemeler yapıldı. Her bir konsantrasyonda etanol

ve toluenle hazırlanan çözeltilere ITO elektrotlar daldırılarak gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon neticesinden yıkanıp kurutulan elektrotların CV-EIS ölçümleri alındı.

3.4.2.2. Anti-RACK-1 konsantrasyon optimizasyonu

Yüksek tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirliğe sahip bir biyosensör için optimize edilmesi gereken bir diğer önemli adım antikor konsantrasyonudur. Bunun için 3 farklı konsantrasyonda (0,4062pg/mL, 0,8125pg/mL, 1,625pg/mL) denemeler yapıldı. Belirtilen konsantrasyonlarda anti-RACK-1 ile 1 saat inkübe edilen elektrotlar yıkanıp kurutulduktan sonra CV-EIS ölçümleri alındı.

3.4.2.3. Anti-RACK-1'in inkübasyon süresi optimizasyonu

Optimize edilen anti-RACK1 konsantrasyonunun inkübasyon süre optimizasyonu için 45 dakika ve 60 dakikalarda denemeler yapıldı. Hazırlanan elektrotlar iki ayrı sürede 0,4062pg/mL anti-RACK1 konsantrasyonu ile inkübe edildikten sonra CV-EIS ölçümleri alındı.

3.4.2.4. RACK-1 biyomarkerinin inkübasyon süresi optimizasyonu

Son optimizasyon adımı RACK-1 biyomarkerinin anti-RACK-1 e maksimum verimle bağlanabileceği inkübasyon süresinin belirlenmesidir. Bu amaçla elektrotlar, 30 dakika, 45 dakika ve 60 dakika olmak üzere 3 farklı süre ile RACK-1 biyomarkeri ile inkübe edilip CV-EIS ölçümleri alındı.

3.4.2.5. Geliştirilen biyosensör için ideal tayin aralığı belirlenmesi

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu geliştirilen biyosensör için ideal şartlar belirlenmiştir. Son aşama olarak, biyosensörün belirlenen şartlar altında hangi tayin aralığında RACK-1'i bağlayabildiği gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmaların sonunda en uygun tayin aralığı EIS ve CV ölçümleri ile teyit edilmiştir. Bu çalışmada 7 elektrot ile çalışılmıştır.

3.4.2.6.Tekrarlanabilirlik

Lineer tayin aralığı belirlenen biyosensör sisteminin tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirildi. Optimum şartlarda hazırlanan 20 biyosensör sistemi 0,5696pg/mL konsantrasyonundaki RACK-1 biyomarkeri ile belirlenen optimum süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda CV-EIS ölçümleri alındı. Yani 20 adet aynı biyosensör sistemi geliştirilmiş ve EIS ölçümleri sonucunda gerekli hesaplamalar yapılarak çalışmanın doğruluğu teyit edilmiş, standart sapması hesaplanmıştır.

3.4.2.7.Geliştirilen biyosensörün depo ömrü

Bu çalışmada ideal bir biyosensörün önemli bir özelliği olan depolama ömrü incelenmiştir. 8 adet ITO-PET elektrot hazırlanıp, 7 hafta boyunca +4 °C saklama koşulları altındaki ömrü incelenmiştir. Hazırlanan 8 elektrota belirlenen ideal koşullardaki immobilizasyon basamakları uygulanmış ve her aşamada EIS,CV ölçümleri kaydedilmiştir. İlk elektrot 0,59pg/mL konsantrasyona sahip RACK-1 ile muamele edilere ölçüm sonucu kaydedilmiştir. Her hafta hazırlanmış olan elektrotlar aynı konsantrasyona sahip RACK-1 ile muamele edilip ölçümler kaydedilmiş, EIS Rct sonuçları esas alınarak biyosensörün depo ömrü hesaplanmıştır. Bu çalışmada, tayin aralığında çizilen grafik esas alınmıştır.

3.4.2.8.Tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik çalışmasında üretilmiş olan aynı biyosensörlerin aynı tayin aralığını ölçmedeki kararlılığı tesbit edilmiştir. Bu çalışmada belirlenmiş optimum şartlarda üretilmiş olan 7 adet biyosensör sistemi ile tayin aralığımızda bulunan konsantrasyonu bilinin RACK-1 ile muamele edilerek EIS ve CV ölçümleri alınmıştır. Tayin aralığında çizilen lineer grafik esas alınarak bu çalışmanın doğruluğu için bu grafiğe en yakın değerler bulunması amaçlanmıştır. Tekrar üretilebilirlik çalışması için 7 farklı çalışma gerçekleştirilmiş ve gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

3.4.2.9.Rejenerasyon

Bu çalışmada immobilizasyon basamakları tamamlanmış tek biyosensör üzerinde gerçekleştirilmiştir. Optimum şartlarda hazırlanan biyosensör 0,5696 pg/mL RACK-1 ile 30 dakika muamele edilmiş ve EIS ölçümleri alınmıştır. Daha sonrasında 10 mM HCl ile 5 dakika boyuca muamele edildikten sonra 30 dakika 0,5696 pg/mL RACK-1 ile inkübe edilmiştir. Bu işlem 4 defa tekrar edilmiştir.

Rejenerasyon işleminin amacı, biyosensörün bağlamış olduğu RACK-1 proteininin yüzeyden koparılarak tekrar tekrar RACK-1 proteinini bağlayabildiğini gözlemlemektir.

3.4.2.10.Gerçek serum örneklerinde RACK-1 tayini

Bu çalışmada, RACK-1 biyomarkerının gerçek insan serum örneklerinde tayini amaçlanmıştır. Optimum şartlarını belirleyerek dizayn ettiğimiz biyosensör ile 10 adet gerçek insan serum örneğinde RACK-1 tayini gerçekleştirilmiştir.

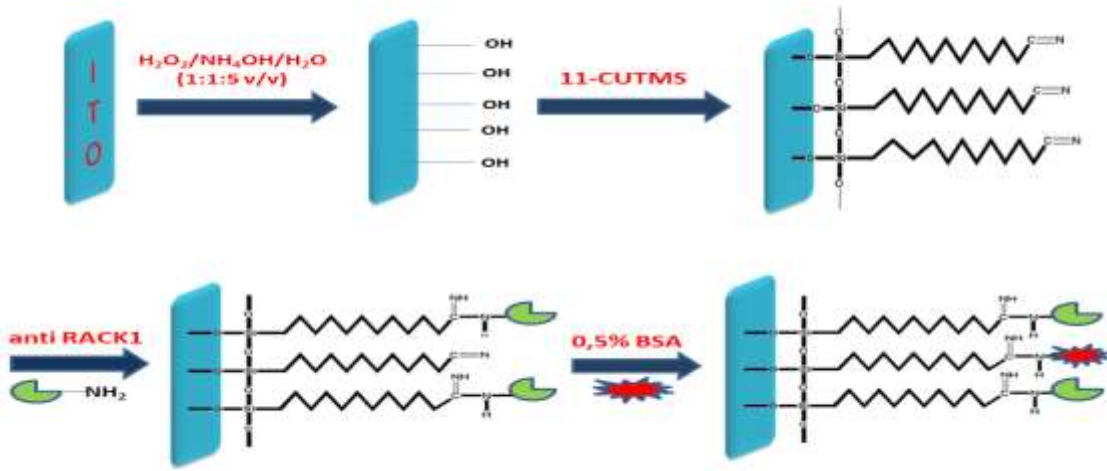
Bu tayinde standart ekleme yönteminden faydalanılmıştır. Konsantrasyonu belirli olan 0,5696 pg/mL RACK-1 markerı üzerine, lineer grafik esas alınarak konsantrasyonları hesaplanan gerçek insan serum örnekleri ilave edilip EIS ölçümleri alınıp hesaplamalar yapılmıştır. Gerçek insan serum örnekleri pH=7,4 fosfat tamponu ile 100000 kat seyreltilip optimum şartlarda hazırlanan biyosensör ile 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. İmmobilizasyon Basamaklarının Bulguları

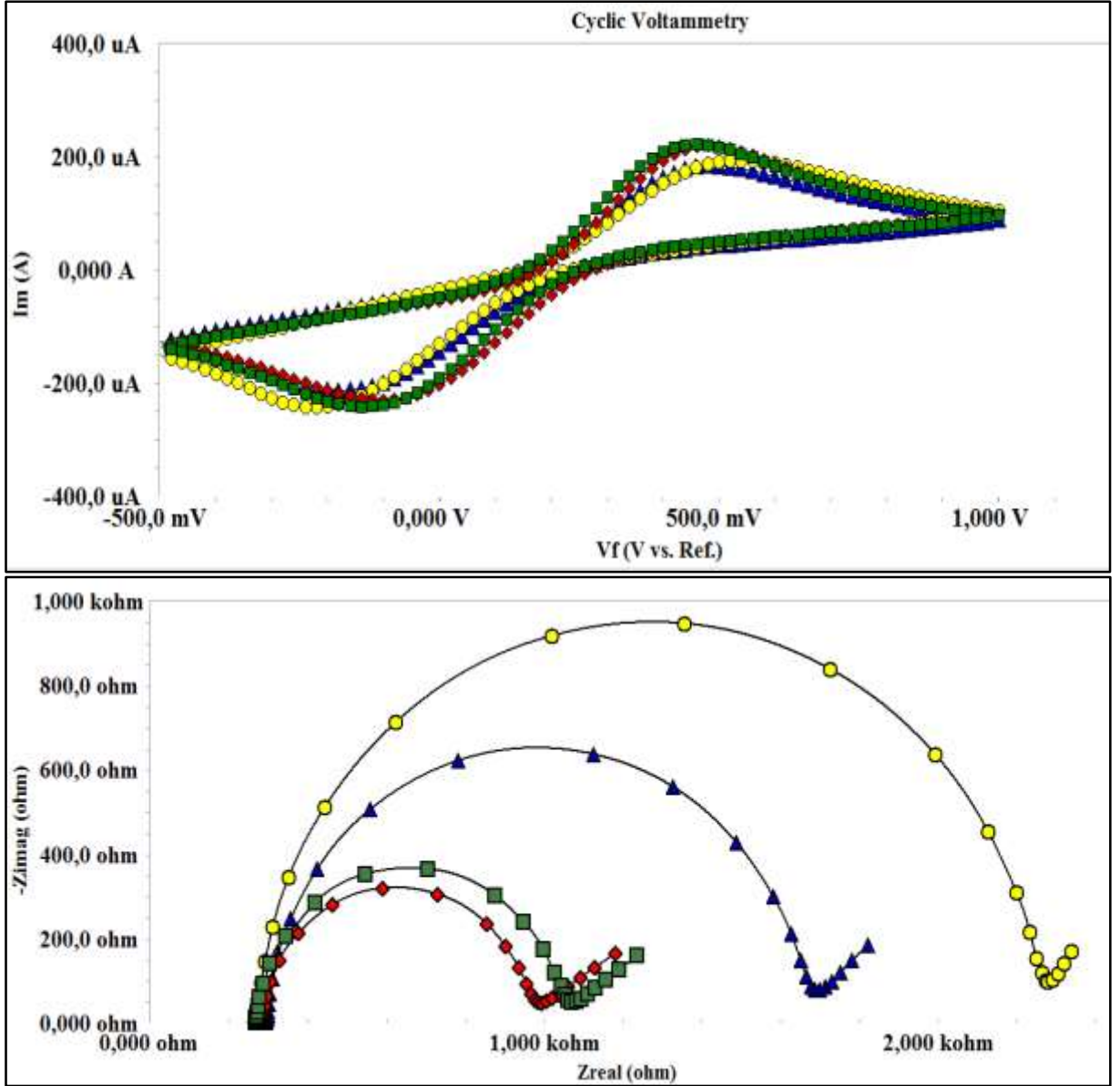
İmmobilizasyon basamakları, bir dizi optimizasyon aşamalarından geçerek belirlenmiş ve ideal bir elektrokimyasal biyosensör sistemi geliştirilmiştir.

Elektrot yüzeyinde gerçekleşen tüm immobilizasyon basamakları ve RACK-1 kanser antijeninin biyosensöre bağlanması temsili olarak şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. Şematik olarak ITO-PET elektrot yüzeyinde gerçekleştirilen işlemler

İmmobilizasyon basamaklarının hepsinden sonra EIS ve CV ölçümleri alınmış ve işlemin doğruluğu kontrol edilmiştir. Bir elektrot için immobilizasyon basamaklarının CV ve EIS ölçüm sonuçları şekil 4.2’de gösterilmektedir. Her bir immobilizasyon basamağından sonra EIS ölçüm sinyallerinde artış gözlenmiştir. Sinyallerdeki bu artış bize, OH tabakası oluşturarak iletken hale getirdiğimiz ITO-PET elektrodun yüzeyine diğer tabakaların en uygun şekilde bağlanarak daha yalıtkan bir yüzeyin oluştuğunu göstermektedir. CV ölçümlerin anodik ve katodik piklerin küçülmesi, yüzeye moleküllerin bağlandığını bize göstermektedir.



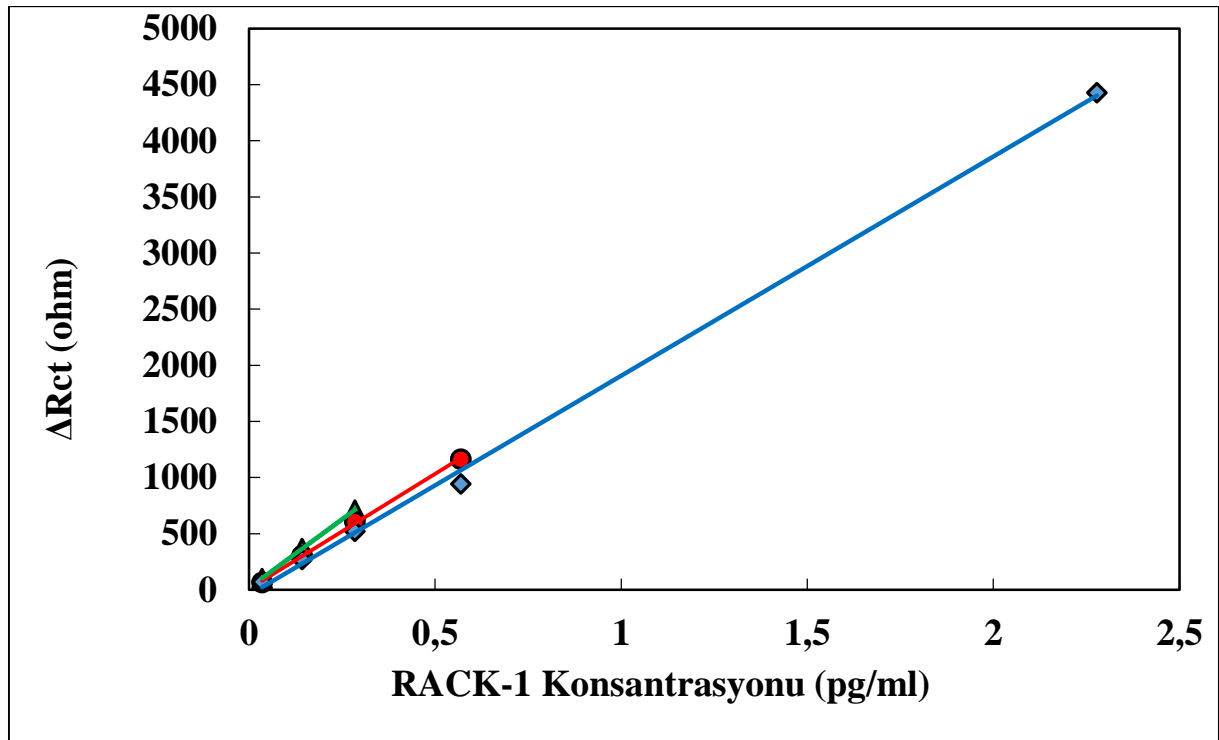
Şekil 4. 2. İmmobilizasyon adımlarına ait EIS ve CV eğrileri.

kırmızı (-♦-♦-): ITO/OH, yeşil (-■-■-): ITO/OH/11-CUTMS, mavi (-▲-▲-): ITO/OH/11-CUTMS/anti-RACK-1, sarı (-●-●-): ITO/OH/11-CUTMS/anti-RACK-1/BSA

4.2.Optimizasyon Basamaklarının Bulguları

4.2.1.11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) ile kendi kendine oluşan tek tabakalar (SAM) için konsantrasyon optimizasyonu bulguları

SAMs tabakasının düzenli olması için gerçekleştirilen etoanl-toluen ile hazırlanan 11-siyanoundesiltrimetoksisilan konsantrasyonunun optimizasyon adımına ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.3. de gösterilmiştir.



Şekil 4. 3. SAM konsantrasyonunun biyosensör cevapları üzerine etkisi.

kırmızı (-●-●-): %0,1 11-CUMTS, yeşil (-▲-▲-): %1 11-CUMTS,mavi (-◆-◆-): %0,5 11-CUTMS

EIS spekturumlarından elde edilen ΔR_{ct} değerleri kullanılan RACK-1 konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirildiğinde, %0,5 lik 11-CUTMS ile oluşturulan SAM tabakalarının daha düzenli olduğu ve immobilizasyonun bu konsantrasyonda daha başarılı olduğu görülmüştür. %0,1 lik 11-CUTMS kullanıldığında sinyallerde bozulma gözlemlenmiştir. Bunun sebebi kullanılan 11-CUTMS konsantrasyonunun düzgün bir SAM tabakası oluşturulması için yetersiz kalmasıdır. %1 lik 11-CUTMS ile oluşturulan SAM tabakaları ise yüzeyde meydana gelen bozulmalardan dolayı düzgün sinyaller alınamamıştır.Bu sonuçların doğrultusunda en uygun sinyallerin alındığı ve elektrot

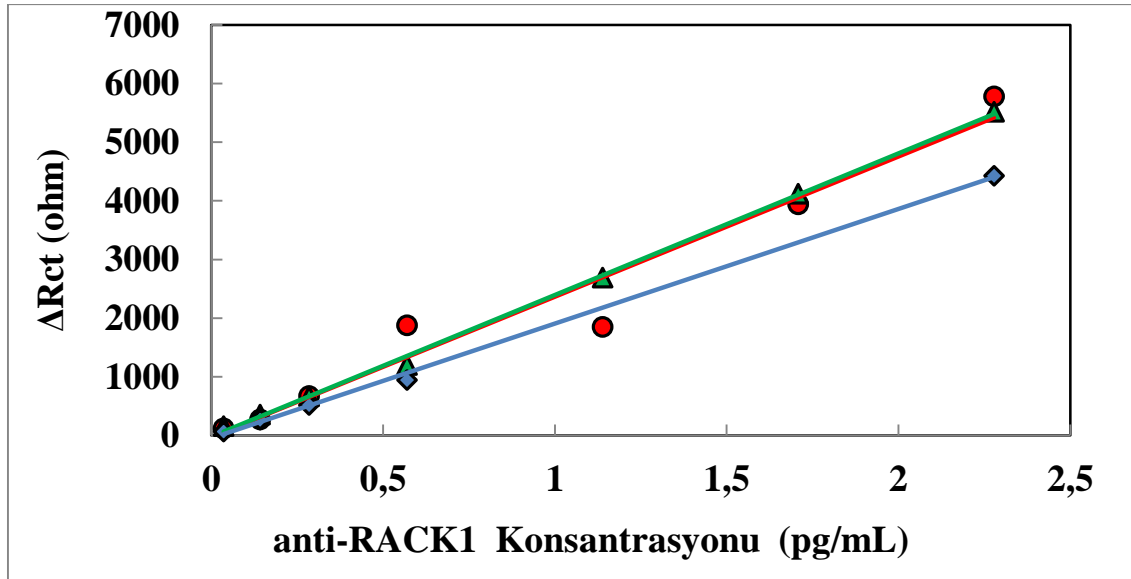
yüzeyinde bozulmalar oluşmayan SAM konsantrasyonu olarak %0,5 lik 11-CUTMS seçilmiştir.

Çizelge 4. 1. Farklı 11-CUTMS miktarı ile hazırlanmış biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları

11-CUTMS Miktarı	Grafik Denklemi	Eğim Çizgisi R ² Değeri
% 1'lik 11-CUTMS	$y = 2445,7x + 15,041$	R ² = 0,999
% 0,5 'lik 11-CUTMS	$y = 1953,1x - 45,888$	R ² = 0,998
% 0,1 'lik 11-CUTMS	$y = 2047,8x + 7,215$	R ² = 0,999

4.2.2. AntiRACK-1 miktar optimizasyon bulguları

3 farklı AntiRack-1 konsantrasyonu ile 7 farklı elektrot sistemi geliştirilmiş ve immobilizasyon basamakları izlenmiştir.



Şekil 4. 4. Anti-RACK-1 konsantrasyon optimizasyonu

yeşil (▲-▲-): 0,4062pg/ml anti-RACK1, kırmızı (-●-●-): 0,8125pg/ml anti-RACK1,
mavi (-◆-◆-): 1,625pg/ml anti-RACK1

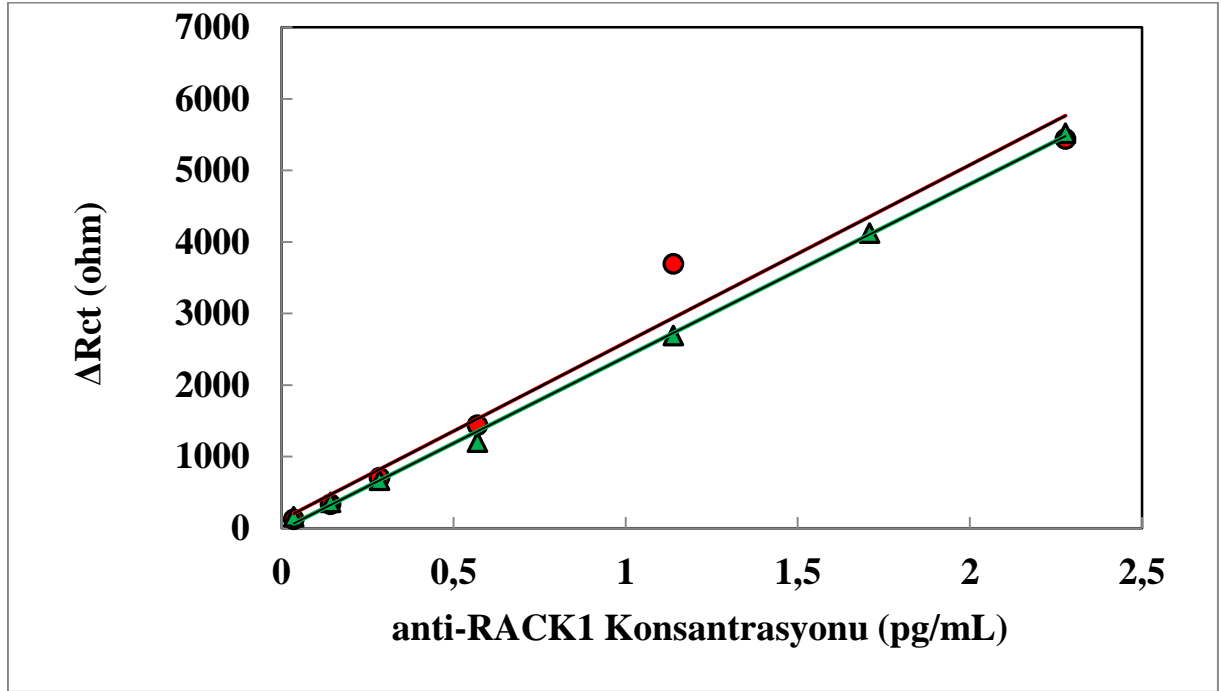
Şekil 4.4. deki anti-RACK1 konsantrasyon optimizasyonu çalışması sonucunda impedans spektrumları ve döngüsel voltogramlar ile elde ettiğimiz sonuçlarla çizilen grafikte görüldüğü üzere yüksek sinyal seviyesi ve doğruluk oranıyla 0,4062 pg/ml konsantrasyonu optimum değer olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4. 2.Farklı Anti-RACK-1 konsantrasyonları ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları

Anti-RACK-1 Konsantrasyonu	Grafik Denklemi	Eğim Çizgisi R ² Değeri
1,625 pg/mL Anti-RACK-1	$y = 1953,1x - 45,888$	R ² = 0,9985
0,8125 pg/mL Anti-RACK-1	$y = 2387,4x - 25,508$	R ² = 0,9559
0,4062 pg/mL Anti-RACK-1	$y = 2414,6x - 20,465$	R ² = 0,9986

4.2.3. AntiRACK-1 süre optimizasyon bulguları

Anti-RACK-1 inkübasyon süresi optimizasyonuna ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 5.Anti-RACK1 inkübasyon süresi optimizasyonu.

kırmızı (-●-●-): 45 dakika anti-RACK1, yeşil (-▲-▲-):60 dakika anti-RACK1

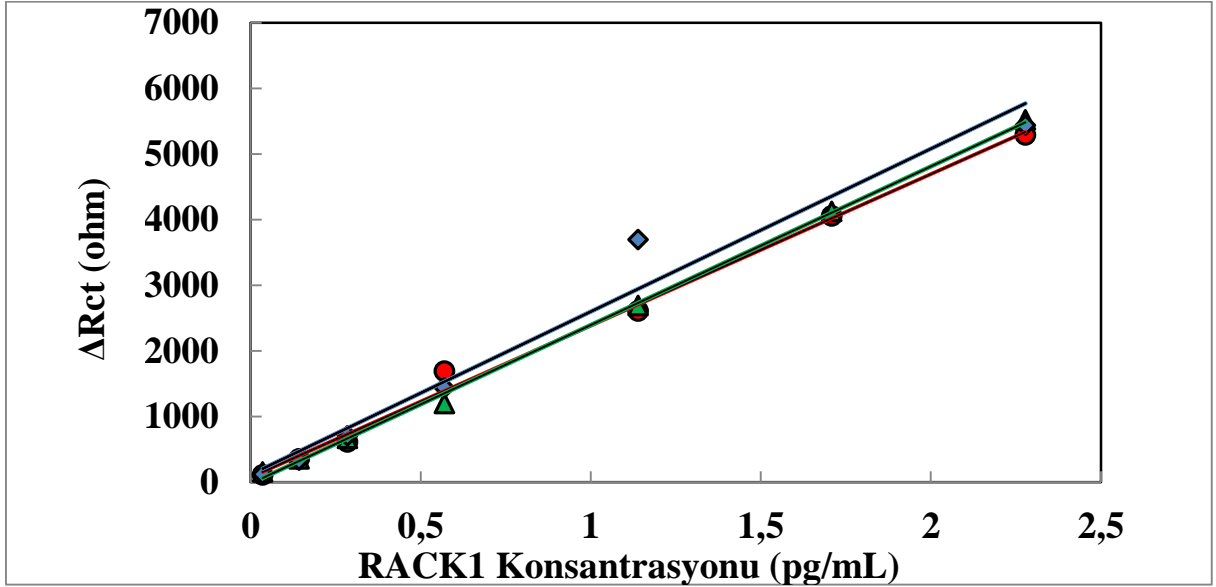
Şekil 4.5. da 45 dakika ve 60 dakika olmak üzere 2 farklı inkübasyon süresi çalışılmıştır. Elde ettiğimiz impedans spektrumları sonucunda çizmiş olduğumuz grafikte görüldüğü üzere 45 dakikalık inkübasyon süresi sonucunda daha yüksek sinyaller elde edilmiştir. Anti-RACK1 inkübasyon süresi 45 dakika olarak optimize edilmiştir.

Çizelge 4. 3.Farklı Anti-RACK-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrilerinin sonuçları

Anti-RACK-1 İnkübasyon süresi	Grafik Denklemi	Eğim Çizgisi R ² Değeri
45 Dakika	$y= 2480x + 117,12$	$R^2 = 0,9685$
60 Dakika	$y= 2414,6x - 20,465$	$R^2 = 0, 9986$

4.3.4. RACK-1 inkübasyon süre optimizasyonu bulguları

Bu optimizasyon adımına ait kalibrasyon grafiği Şekil 4.6.' da gösterilmiştir.



Şekil 4. 6.RACK1 inkübasyon süresi optimizasyonu,

yeşil (-▲-▲-):30 dakika RACK1, kırmızı (-●-●-):45 dakika RACK1,mavi (-◆-◆-): 60 dakika RACK1

RACK-1 biyomarkerının 30, 45 ve 60 dakikalık inkübasyonu sonucunda, impedans spektrumlarından elde edilen Rct değerleri RACK-1 konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirildiğinde, sinyallerin birbirine çok yakın çıktığı görülmüştür. 30 dakikalık inkübasyon süresi hem sinyallerin en düzgün olmasından dolayı hem de süre tasarrufu göz önüne alındığında en uygun süre olarak seçilmiştir.

Çizelge 4. 4. Farklı RACK-1 inkübasyon süreleri ile hazırlanan biyosensör sistemlerinin standart eğrileri sonuçları

RACK-1 İnkübasyon Süresi	Grafik Denklemi	Eğim Çizgisi R ² Değeri
30 Dakika	y= 2414,6x – 20,465	R ² = 0,9986
45 Dakika	y= 2308,3x – 74,278	R ² = 0,9949
60 Dakika	y= 2480x – 117,12	R ² = 0,9685

4.4. Tayin Aralığı Bulguları

Biyosensör sistemi için optimum şartlar belirledikten sonra en uygun tayin aralığını belirlemek için 3 farklı konsantrasyon aralığında çalışma gerçekleştirilmiş ancak bir konsantrasyon aralığında olumlu sonuçlar elde edilmiş ve çalışmanın kalan kısımları için bu aralık kullanılmıştır.

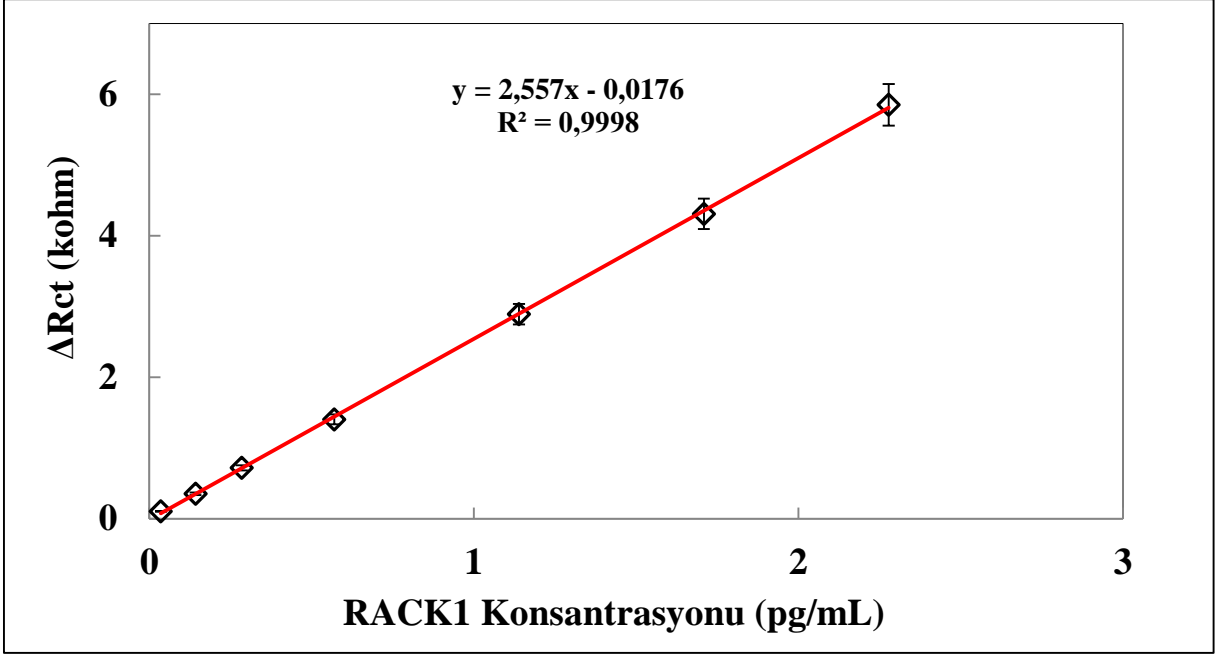
Yapılan bu çalışmanın amacı, kan serumundaki RACK-1 tayini olmasından dolayı, tayin aralığı oldukça geniş tutulmak istenilmiş fakat çalışmalarda en sağlıklı sonuç veren tayin aralığı seçilmiştir.

0,0356 pg/mL - 9,1136 pg/mL RACK-1 konsantrasyonu aralığında yedi sensör denenmiş, olumlu bir yanıt alınamamıştır.

0,0356 pg/mL - 4,5568 pg/mL RACK-1 konsantrasyonu aralığında yedi sensör denenmiş, sağlıklı sonuçlar alınamamıştır.

Son olarak 0,0356 pg/mL - 2,2784 pg/mL RACK-1 konsantrasyonu aralığında yedi sensör denenmiş ve en iyi yanıtlar alınmıştır. Bu tayin aralığı için tayin limiti (LOD) ($3\sigma(s/m)$) değeri $3,05 \times 10^{-2}$ ve ölçüm limiti (LOQ) ($10\sigma(s/m)$) değeri $1,02 \times 10^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

Tüm adımlardaki optimizasyon çalışmaları başarıyla tamamlanan biyosensörün kalibrasyon grafiği Şekil 4.7. de gösterildiği gibidir. Tasarlanan bu biyosensörün RACK-1 biyomarkeri için lineer tayin aralığı 0,0356 pg/mL – 2.2784 pg/mL olarak belirlendi.



Şekil 4. 7. Optimal şartlarda kalibrasyon grafiği

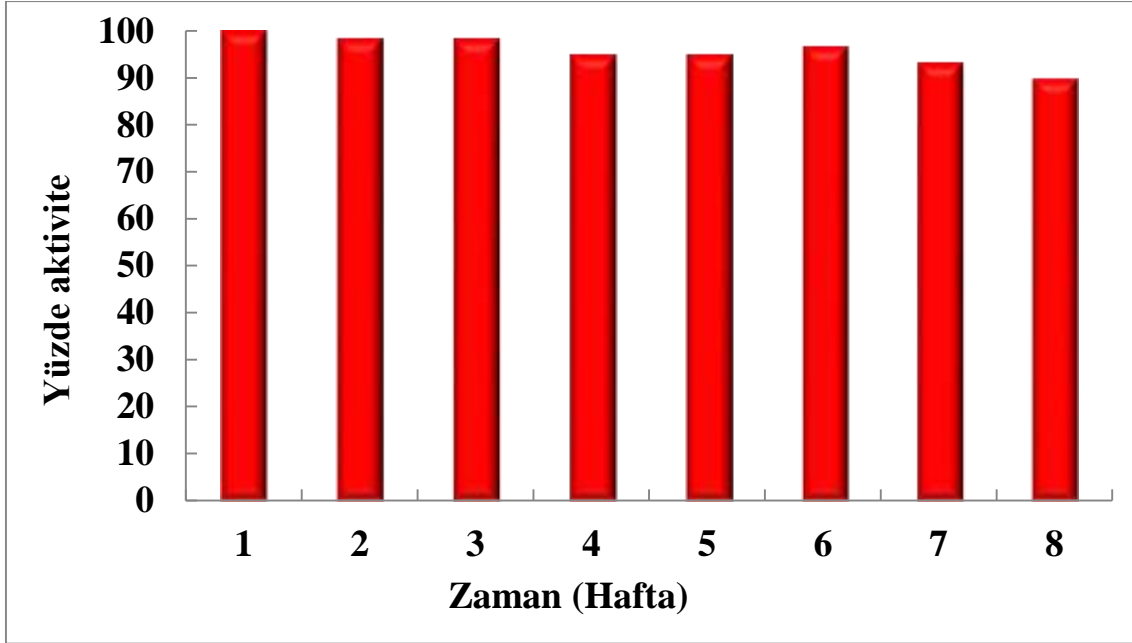
4.5 Tekrarlanabilirlik Bulguları

Lineer tayin aralığı belirlenen biyosensör sisteminin tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirildi. Optimum şartlarda hazırlanan 20 biyosensör sistemi 0,5696 pg/mL konsantrasyonundaki RACK-1 biyomarkeri ile belirlenen optimum süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda CV-EIS ölçümleri alındı. Alınan ölçümler sonucunda varyasyon katsayısı % 4,52, standart sapma 0,026049 pg/mL, ortalama değer 0,5754 pg/mL olarak hesaplandı. Standart RACK-1 çözeltisi konsantrasyonu için tekrarlanabilir sonuçlar gözlemlendi.

4.6 Geliştirilen Biyosensörün Depo Ömrü Bulguları

İdeal bir biyosensörün depo ömrünün uzun süreli olması istenir. Bu çalışmada 8 adet optimum şartlarda hazırlanan biyosensörün 7 haftalık depo ömrü incelenmiştir. Optimum şartlardaki immobilizasyon aşamaları tamamlanan biyosensörler +4°C'de kapalı ve karanlık ortamda saklanıp depolama günü başlangıcından itibaren her hafta 1 adet elektrot 0,59pg/mL RACK-1 ile inkübe edilerek sonuçlar kaydedilmiştir. 1.haftadan itibaren (başlangıçtan

itibaren) ölçülen EIS ölçümleri $y=2557x - 17,635$ denklemine göre hesaplanmıştır. Gerekli hesaplamalar sonucu 7 haftalık depolama sonucunda RACK-1 ölçümleri sonucunda ilk haftada %1,7, son haftada max. %10,2 kaybın olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Hesaplamalarda çizilen depo ömrü grafiği Şekil 4.8’de gösterilmiştir.

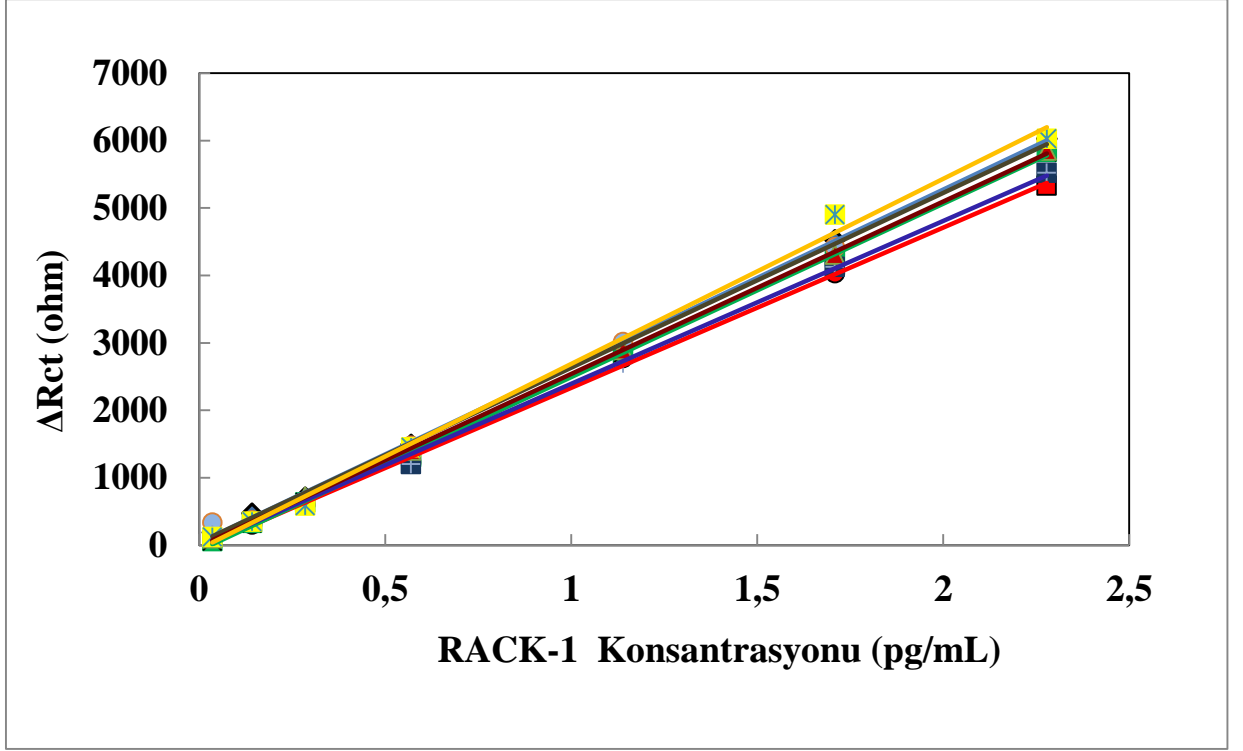


Şekil 4.8. Depo ömrü sonuçları

4.7 Tekrar Üretilbilirlik Bulguları

İdeal bir biyosensörün önemli bir özelliği de tekrar üretilebilir olmasıdır. Bu çalışmada optimum şartları belirlenmiş olan biyosensör sistemleri oluşturulup 7 farklı çalışma gerçekleştirilmiştir. Her çalışmada 7 şer elektrot kullanılmış olup belirli tayin aralığında gerekli ölçümler ve hesaplamalar yapılmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda çizilen standart eğri grafikleri Şekil 4.9. da, bu eğrilerin denklemleri ve R^2 değerleri Çizelge 4.5 de gösterilmiştir.

Elde etmiş olduğumuz standart eğri değerlerinin hem birbirlerine olan yakınlığı hem de optimizasyon aşamalarında belirlemiş olduğumuz ideal şartlarda çizmiş olduğumuz lineer grafiğimize yakınlığı biyosensör sistemimizin tekrar üretilebilirliğinin başarı oranının yüksekliğini göstermektedir.



Şekil 4. 9. Tekrar üretilebilirlik çalışması standart eğrileri

Çizelge 4. 5. Tekrar üretilebilirlik çalışmalarının standart eğri değerleri

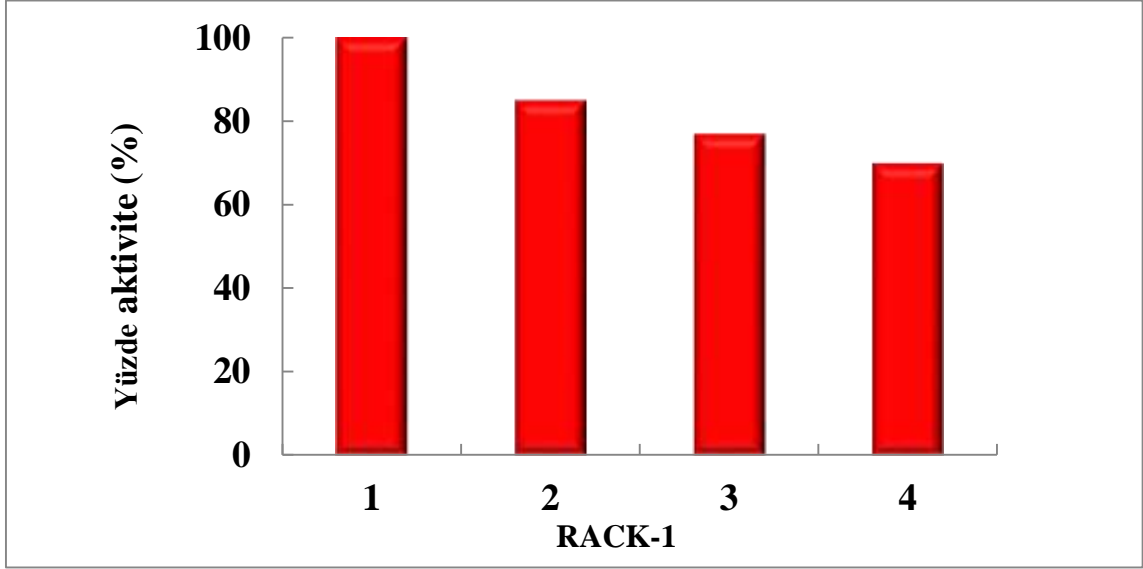
STANDART EĞRİ TÜRÜ	GRAFİK DENKLEMİ	GRAFIĞIN R ² DEĞERİ	TAYİN ARALIĞI
Tekrar üretilebilirlik 1	$y=2376,3x-42,321$	0,9991	0,0356-2,2784 pg/MI
Tekrar üretilebilirlik 2	$y=2557x-17,635$	0,9998	0,0356-2,2784 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 3	$y=2617,8x+38,603$	0,9994	0,0356-2,2784 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 4	$y=2572,5x-81,091$	0,9995	0,0356-2,2784 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 5	$y=2746x-58,493$	0,9961	0,0356-2,2784 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 6	$y=2592,4x+39,817$	0,9976	0,0356-2,2784 pg/mL
Tekrar üretilebilirlik 7	$y=2414,6x-20,465$	0,9986	0,0356-2,2784 pg/mL

4.8 Rejenerasyon Bulguları

Bu çalışmada hazırlanmış olan biyosensör sistemi yüzeyine RACK-1 bağlandıktan sonra 4 kez 10mM HCl ile muamele edilip rejenerasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

4 kez rejenerasyon işlemi gerçekleştirilmiş olup 5.kez rejenerasyon işlemi denemesi sonucunda elektrotta bozulmalar meydana gelmiştir.

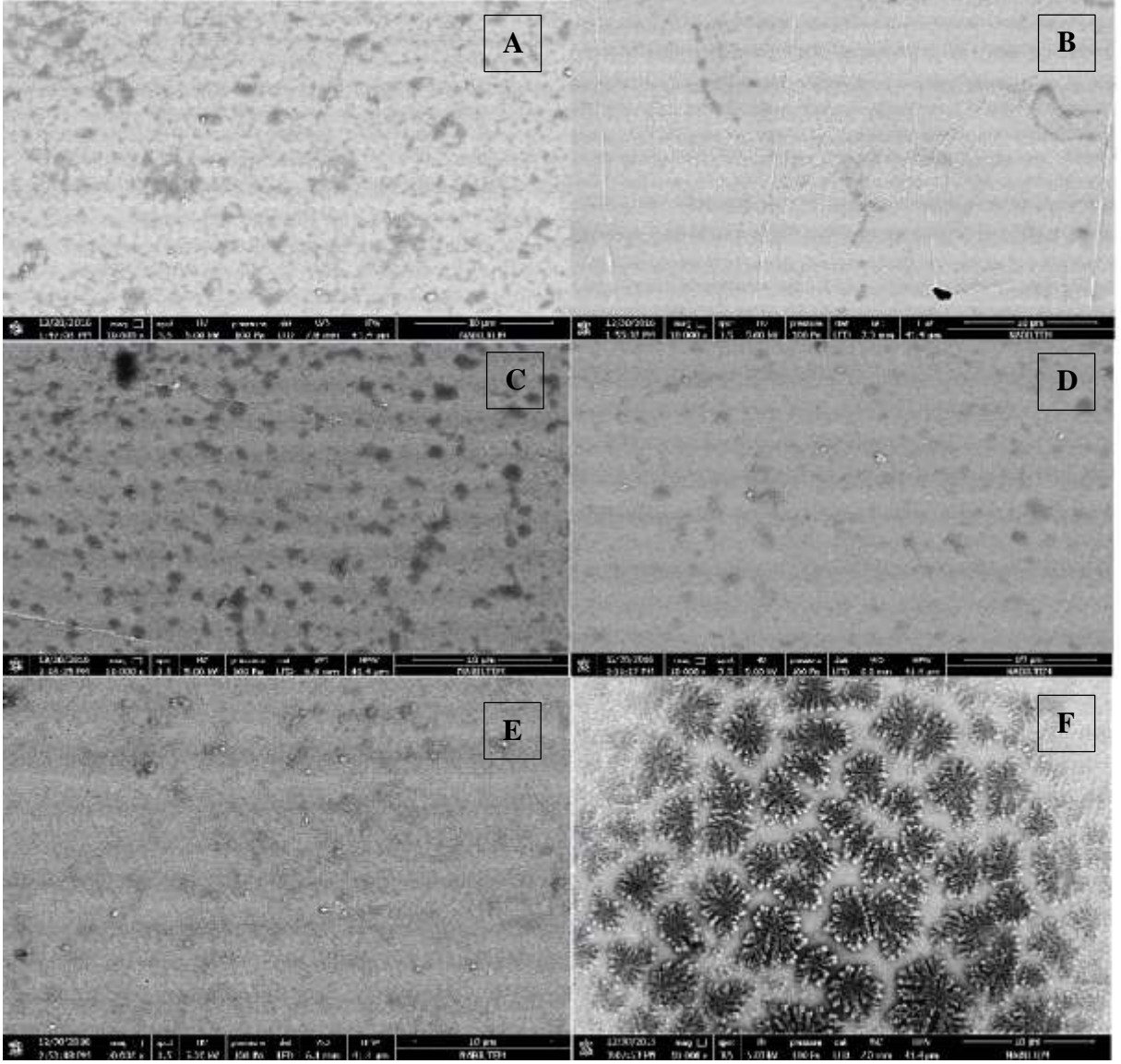
Geliştirilen biyosensör sistemi tek kullanımlık olmasına rağmen bu çalışmada aynı biyosensörün tekrar tekrar kullanılabilirliği gözlemlenmiştir. Yapılan ölçüm ve hesaplamalar sonucunda aynı biyosensörün 4.kez kullanımında %70 verim gözlemlenmiştir.



Şekil 4.10. Rejenerasyon çalışmasının grafik görünümü

4.9 İmmobilizasyon basamaklarının ve bağlanmış RACK-1'in SEM Görüntüleri

SEM görüntüleme tekniği ile biyosensör sistemimizin immobilizasyon basamaklarını morfolojik açıdan inceledik. SEM cihazı ile biyosensör yüzeyindeki 11-CUTMS, anti-RACK-1, BSA ve RACK-1 görüntüleri şekil 4.11' de görülmektedir.



Şekil 4.11. SEM cihazı ile biyosensörün yüzeyinin görüntüleri

A:ITO-Pet, B:ITO/OH, C:ITO/OH/11-CUTMS, D:ITO/OH/11-CUTMS/antiRACK-1,
E: ITO/OH/11-CUTMS/antiRACK-1/BSA, F: ITO/OH/11-CUTMS/antiRACK-1/BSA/RACK-1

4.10 Gerçek Serum Örnekleri ile Çalışmaların Bulguları

Bu çalışmada standart ekleme yöntemi ile çalışma gerçekleştirilmiştir.10 adet gerçek insan serum örneği pH=7,4 fosfat tamponu ile 100000 seyreltilip EIS ölçümleri alındı ve konsantrasyonları belirlendi. Çalışmanın ikinci aşamasında 0,5696 pg/mL RACK-1 markerları üzerine konsantrasyonları belirlenen seyreltilmiş gerçek insan serum örnekleri

eklenip EIS ölçümleri alındı. Yapılan analizler sonucu elde edilen veriler çizelge 4.6 da gösterilmiştir.

Çizelge 4. 6. Gerçek insan serum örneklerinde RACK-1 tayini

Örnek	Bulunan (pg/mL)	İlave edilen (pg/mL)	Total Bulunan	% Geri kazanım	% Hata
1	0,05	0,5696	0,5806	6,29	6,72
2	0,06	0,5696	0,5978	4,92	5,31
3	0,065	0,5696	0,64	0,85	0,84
4	0,058	0,5696	0,6044	3,69	3,84
5	0,054	0,5696	0,5919	5,08	5,35
6	0,057	0,5696	0,6244	0,35	0,35
7	0,065	0,5696	0,6267	1,24	1,26
8	0,06	0,5696	0,6044	4	4,17
9	0,054	0,5696	0,615	1,38	1,39
10	0,054	0,5696	0,6064	2,75	2,84

Sonuçlarda görüldüğü üzere standart ekleme yönteminden faydalanarak geliştirmiş olduğumuz biyosensör ile gerçek insan serum örneklerinde RACK-1 tayini çok düşük % hata oranları ile gerçekleştirilmiştir.

5. SONUÇ

Günümüzde en yaygın hastalık türlerinden biri olan kanserin erken teşhisi, tedavisi, aşamalarının tespiti ve hastalık sürecinin takip edilmesi insan hayatında çok büyük önem taşımaktadır. Dünya sağlık örgütünün verilerine göre kadınlarda en sık rastlanan meme kanserinin teşhisinde RACK-1 proteini tespiti hayati öneme sahiptir. Geliştirmiş olduğumuz anti-RACK-1 temelli biyosensör sistemi ile RACK-1 proteini tespiti için başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında immobilizasyon basamakları, bir dizi optimizasyon aşamalarından geçerek belirlenmiş ve ideal bir elektrokimyasal biyosensör sistemi geliştirilmiştir. ITO-PET elektrot yüzeyinde hidroksil uçları oluşturulduktan sonra gece boyunca karanlık ortamda %0,5'lik 11-siyanoundesiltrimetoksisilan (11-CUTMS) ile kendinden oluşan mono tabaka (SAM) oluşumu için bekletildikten sonra optimizasyon aşamalarında tesbit edilmiş optimum miktar ve sürelerde sırasıyla 0,4062ng/ml konsantrasyonunda 45 dakika boyunca Anti-RACK-1 ile ve %0,5'lik BSA 60dakika boyunca inkübe edildi. Optimum konsantrasyon ve süreler sonucunda RACK-1 tayini için 0,0356 pg/mL - 2,2784 pg/mL tayin aralığında, tekrarlanabilirlik varyasyon katsayısı % 4,52, standart sapma 0,026049 pg/mL, ortalama değer 0,5754 pg/mL olan, 7 haftalık depo ömrü sonucuna %10,2 'lik kaybın olduğu bir biyosensör üretildi.

Üretmiş olduğumuz bu biyosensör ile gerçek insan serumunda yapmış olduğumuz çalışma ile de dizayn etmiş olduğumuz biyosensörün max % 6,72 hata oranı ile RACK-1 proteinini tesbit edilebildiği görülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Bard, A.J. and Faulkner, L.R. (2001). Electrochemical Methods, 2nd Ed, John Wiley and Sons, Inc. New York.

Canbaz, Ç. (2013). Bir Meme Kanseri Biyomarkeri Olan HER3 Analizi İçin Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi Mehmet Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

Demirbakan, B. (2015). Hsp70'in Hassas Ve Ekonomik Analizi İçin Fulleren C60 Temelli Bir Biyosensör, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

Gündoğdu. A. (2015). Melanoma Antjen-1'in Hassas Ve Ekonomik Tayini İçin Elektrokimyasal Bir Biyosensör , Yüksek Lisans Tezi , Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ,

<http://www.abcr.de/shop/en/11-Cyanoundecyltrimethoxysilane-97-63709.html>, Erişim Tarihi: 01/11/2016.

<http://www.gelest.com/wp-content/uploads/Goods-PDF-brochures-couplingagents.pdf>, Erişim Tarihi: 01/11/2016

<https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-811X-9-22>, Erişim Tarihi: 01/11/2016.

Özcan, B. (2015). Bazı Hastalıkların Erken Teşhisi İçin Yeni Biyoalgılama Sistemlerinin Geliştirilmesi Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

Şimşek, Ç. (2012). Meme Kanseri Biyomarkerleri İçin Elektrokimyasal Biyosensör Sistemleri Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

TEKİN, S. (2008). Platin Elektrot Yüzeylerine Tutturulmuş Organik Moleküllerin Elektrokimyasal Tekniklerle pKa Değerlerinin Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Kökbaşı, U., Kayrın, L., Tuli, A., (2013). Biyosensörler ve Tıpta Kullanım Alanları, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, Archives Medical Review Journal, Biosensors and their Medical Applications, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD, Adana, Turkey, 499-513.

WHO, world cancer report, 2014.

ÖZGEÇMİŞ

Hakan TÖRER, 1982 Tekirdağ doğumludur. İnönü İlköğretim Okulunda ilköğrenimini, orta ve lise öğrenimini Namık Kemal Lisesinde 1999 yılında tamamlamıştır. Lisans eğitimini 2007 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde tamamlamıştır.