

**Meme Kanseri Biyomarkerleri
İçin Elektrokimyasal
Biyosensör Sistemleri**

Çiğdem SAYIKLI ŞİMŞEK

**Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Mustafa
Kemal SEZGİNTÜRK**

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MEME KANSERİ BİYOMARKERLERİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL
BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ**

Çiğdem SAYIKLI ŞİMŞEK

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

TEKİRDAĞ-2012

Her hakkı saklıdır

Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK danışmanlığında, Çiğdem SAYIKLI ŞİMŞEK tarafından hazırlanan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. İbrahim İsmet ÖZTÜRK

İmza :

Üye : Doç. Dr. Rıfat BİRCAN

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MEME KANSERİ BİYOMARKERLERİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖR SİSTEMLERİ

Çiğdem SAYIKLI ŞİMŞEK

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

Bu tezde, erken kanser teşhisi için hedeflenen anti-HER3 bazlı ve HER3 tayini yapabilen yeni bir biyosensör tasarlandı. Bunun için altın elektrot yüzeyine sisteamin ile kendinden oluşan monotabaka (SAM) oluşturuldu ve böylece anti-HER3' ün yüzeye kovalent olarak bağlanması sağlandı. Döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile immobilizasyon adımları ve HER3' ün elektrot yüzeyine bağlanması incelendi. Biyosensörün başarılı sonuçlar vermesi için tüm adımlar optimize edildi. Deneysel impedans dataları üzerinde Kramers-Kronig dönüşümü uygulandı.

Anahtar kelimeler: Anti-HER3, HER3, kanser biyomarkerleri, elektrokimyasal impedans spektroskopisi, biyosensör

2012 , 52 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR SYSTEMS FOR BREAST CANCER BIOMARKERS

Çiğdem SAYIKLI ŞİMŞEK

Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK

For early cancer diagnosis, a new impedimetric biosensor, based on the use of anti-HER3 was developed for the determination of HER3. Anti-HER3 was immobilized through covalent coupling with cysteamine which formed a self-assembled monolayer on gold electrodes. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy techniques were employed to characterize the immobilization process and to detect HER3. To successfully construct the biosensor current experimental parameters were optimized. Kramers–Kronig Transform was performed on the experimental impedance data.

Keywords: Anti-HER3, HER3, cancer biomarkers, Electrochemical impedance spectroscopy, biosensör

2012, 52 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım ve tez hazırlama sırasında bilgi ve tecrübeleriyle bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Doç. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e,

Varlıkları ile yaşama sevincim olan, maddi manevi her türlü desteği hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili aileme,

Laboratuar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşım Çetin CANBAZ' a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1 Hücre Döngüsü.....	1
1.2 Hücre Döngüsünün Kontrolü.....	3
1.2.1 İçsel Kontrol Mekanizmaları.....	5
1.2.2 Dışsal Kontrol Mekanizmaları.....	5
1.3 Kanserin Moleküler Özellikleri.....	7
1.4 Biyosensörler.....	9
1.5 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisine Giriş.....	11
1.6 İmpedans Spektroskopisinin Temel İlkeleri.....	11
1.7 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler.....	17
1.7.1 Enzim Temelli İmpedimetrik Biyosensörler.....	15
1.7.2 İmmünokimya Temelli İmpedimetrik Biyosensörler.....	18
1.7.3 Nükleik Asit Temelli İmpedimetrik Biyosensörler.....	26
1.7.4 Hücre ve Mikroorganizma Temelli İmpedimetrik Biyosensörler.....	29
1.8 Kansere Teşhisi İçin Biyomarkerler.....	32
2. MATERYAL ve YÖNTEM	35
2.1 Materyal	35
2.1.1 Hekzanditiyol SAM'in Hazırlanması.....	35

2.1.2 Altın Nanopartikül Hazırlanması.....	35
2.1.3 Anti-HER3' ün Hekzanditiyol/AuNanopartikül/Sisteamin Üzerine Kovalent Bağlanması.....	36
2.2 Elektrokimyasal Ölçümler.....	36
2.3 Ölçüm Prosedürleri.....	36
3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	37
3.1 İmobilizasyon Basamakları.....	37
3.2 Optimizasyon Basamakları.....	39
4. SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	53

TABLO LİSTESİ

1.1 Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamakta çok sıklıkla kullanılan impedanselemanlarının tanımlanmaları, frekans bağımlılıkları ve faz kaymaları.....	13
1.2 Kanser tayinindeki biyomarkerler: Farklı yaklaşımların kullanımı.....	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1 Ökaryotik bir hücredeki tipik hücre döngüsü.....	2
1.2 M fazının sitolojik özellikleri.....	2
1.3 G1 fazından S fazına ilerlemesinin retinoblastoma proteininin (pRb) fosforillenmesi ile düzenlenmesi.....	3
1.3 Hücre döngüsündeki kontrol noktaları: içsel ve dışsal kontrol mekanizmaları.....	4
1.4 Hücre döngüsünün kontrolündeki mitojenik ve antimitojenik sinyaller.....	6
1.5 Kanser kutusu.....	9
1.6 Kanser teşhis biyosensörü tasarlamak için gerekli olan bileşenler.....	10
1.7 İmpedans'ın potansiyel(zaman) ve akım(zaman) büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi.....	12
1.8 Bir elektrolitle kontakt halindeki elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli.....	14
1.9 Sitokrom c oksidaz'ın lipid tektabaka içinde yerleşimi.....	18
1.10 Bir antikor ile modifiye edilmiş elektrodun, antijensiz ve antijen ilave edildikten sonra elde edilen kompleks Nyquist diyagramları.....	21
1.11 Çok tabakalı biyolojik reseptör immobilizasyon adımlarının şematize edilmiş hali.....	22
1.12 Artan VEGF konsantrasyonlarına karşı elde edilen kompleks impedans pektrumlarının gösterilmesi.....	23
1.13 IDE'nin SEM görüntüsü ve IDE'nin hesaplanan akım kapasitesi.....	24
1.14 Ultraince platin film immunosensörün şematik gösterimi.....	25
1.15 İki elektrot arasındaki elektriksel devre modeli.....	30
1.16 IDE temelli biyoçip'in kanallarının SEM görüntüsü ve bir mikro akışkanlı biyoçip'in resmi.....	32
3.1 Anti-HER3 imobilizasyon basamaklarının elektrokimyasal impedans eğrileri ve döngüsel voltametri.....	37
3.2 Altın elektrot yüzeyinde gerçekleşen imobilizasyon basamakları.....	38
3.3 Farklı konsantrasyonlarda denenen sisteminin elektrokimyasal impedans eğrileri ve döngüsel voltametri.....	40
3.4 Farklı konsantrasyonlarda denenen sisteminin standart eğrileri.....	41
3.5 Farklı yüzdelerdeki glutaraldehite elektrokimyasal impedans eğrileri ve döngüsel voltametri değerleri.....	42
3.6 Farklı konsantrasyonlardaki anti-HER3' e ait elektrokimyasal impedans eğrileri ve döngüsel voltametri değerleri.....	42

3.7 Farklı konsantrasyonlarda denenen anti-HER3' e ait standart eğrileri.....	43
4.1 Tezde gerçekleştirilen deneyin modellendiği eşdeğer devre.....	46

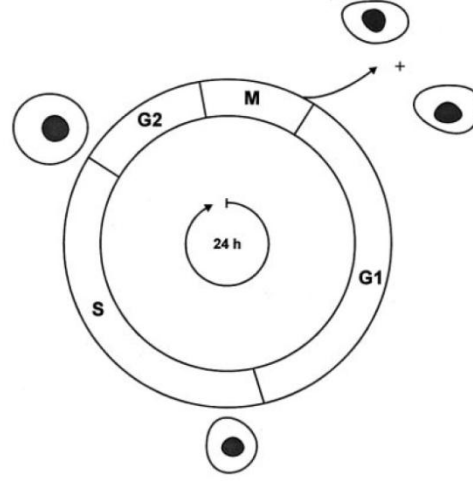
GİRİŞ

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Genel kullanımda insan kanseri olarak adlandırılmasına rağmen aslında 200 farklı çeşidi bulunmakta ve batı dünyasında ölümlerin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra dünya nüfusunun 3te 1i hayatının bir bölümünde kanser tedavisi görmektedir. Almanya gibi tipik bir batı endüstri ülkesinde her yıl 400.000'den fazla kişi kansere yakalanmakta, yaklaşık 200.000 civarı kişi de bu sebepten ölmektedir (**Schulz 2005**). Küresel kanser yükü geçtiğimiz 30 yıl zarfında iki kattan daha fazla artmıştır. 2008'de 12 milyon yeni kanser vakasının teşhis edildiği, kanserden kaynaklanan 7 milyon ölümün gerçekleştiği ve kanserli 25 milyon kişinin halen hayatta olduğu tahmin edilmektedir. Dünya nüfusunun süregelen artışı ve yaşlanması kanser yükü üzerinde de büyük değişikliklere yol açacaktır. 2030'a gelindiğinde 27 milyon kanser vakası, kanserden kaynaklanan yıllık 17 milyon ölüm ve son beş yıl içinde kanser tanısı konmuş 75 milyon kişi rakamlarına ulaşılması beklenebilir.

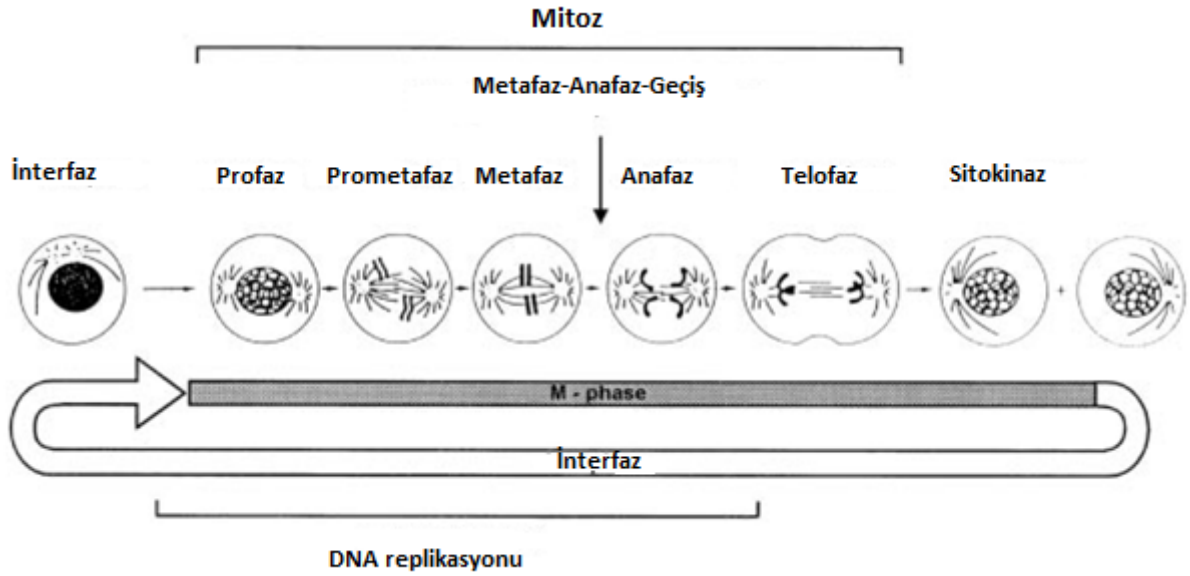
1.1 Hücre Döngüsü

Ökaryotik bir hücrede yaşam, döngüsel bir süreçte ilerler. Bu süreç, *S fazı* ve *M fazı* olmak üzere iki ana faz altında incelenmektedir. S fazında (sentez fazı), DNA çekirdekteki DNA'nın replikasyonu ve kendini eşlemesi görülür. Böylece DNA genetik kodunu eşlemiş olmaktadır. M fazında ise (mitoz faz), kromozomların yavru hücrelere ayrılması işlemi gerçekleşmektedir.

Birçok hücre türünde, bu iki fazdan başka iki faz daha anlamlandırılmaktadır: G1 ve G2 fazları. G1 fazı, M ve S fazları arasındaki süreci kapsarken, G2 fazı ise S fazı ve M fazı arasındaki süreci kapsamaktadır. G1 fazındayken hücre durgun bir sürece girebilir ki bu faz G₀ olarak adlandırılmaktadır. Hücre bu fazda iken uygun sinyaller geldiğinde G1 fazına geçiş olmaktadır. Şekil 1.1' de hücrenin normal döngüdeki fazları görülmektedir (G1-S-G2-M) (**Krauss 2001**).

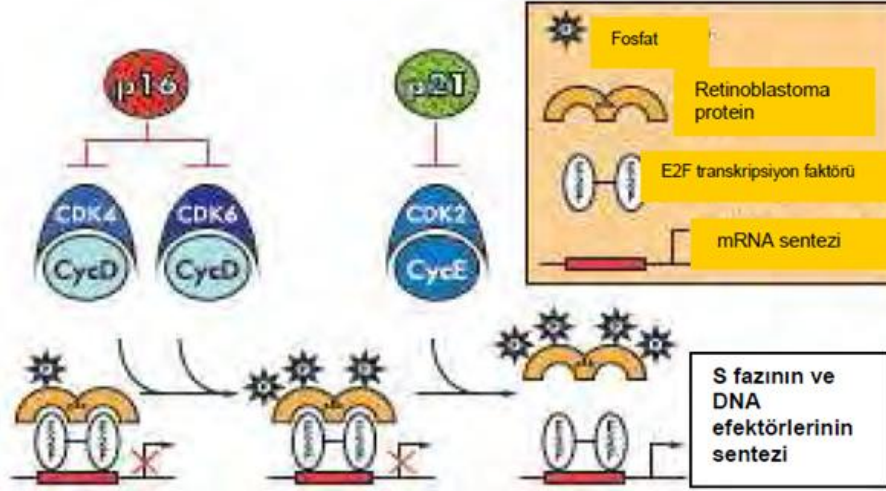


Şekil 1.1. Ökaryotik bir hücredeki tipik hücre döngüsü. G1, S ve G2 fazları interfazı oluşturmaktadır ve hücre sürekli olarak büyür. Hücre bölünmesi M fazında gerçekleşir ve yeni DNA sentezlenmesi S fazında sınırlanır. G1 fazı, M ve S fazları arasındaki periyodu içerirken G2 fazı S ve M fazları arasındaki periyodu kapsar. Şekilde bu sürecin 24 saat olarak gösterilmesi yaklaşık bir değerdir. Bu süreç daha uzayabilir, ya da kısalabilir (**Krauss 2001**)



Şekil 1.2. M fazının sitolojik özellikleri. M fazı gösterildiği gibi mitotik fazlara bölünmüştür. Metafazdan anafaza geçiş, önemli bir kontrol noktasıdır. Hücre u kontrol noktasına gelmeden önce işlemi durdurabilir, ya da işleme ara verebilir. Eğer işlem kontrol noktasından geçerse, hücre bölünmesi işlemi tamamlanır (**Krauss 2001**)

Bazı hücre tiplerinde S ve M fazı arasındaki süreç okadar kısaldır ki G1 ve G2 fazları görülemez (örneğin embriyo hücreleri). Bu tip hücrelerin döngüsü 8 ila 60 dakika arasında tamamlanır.



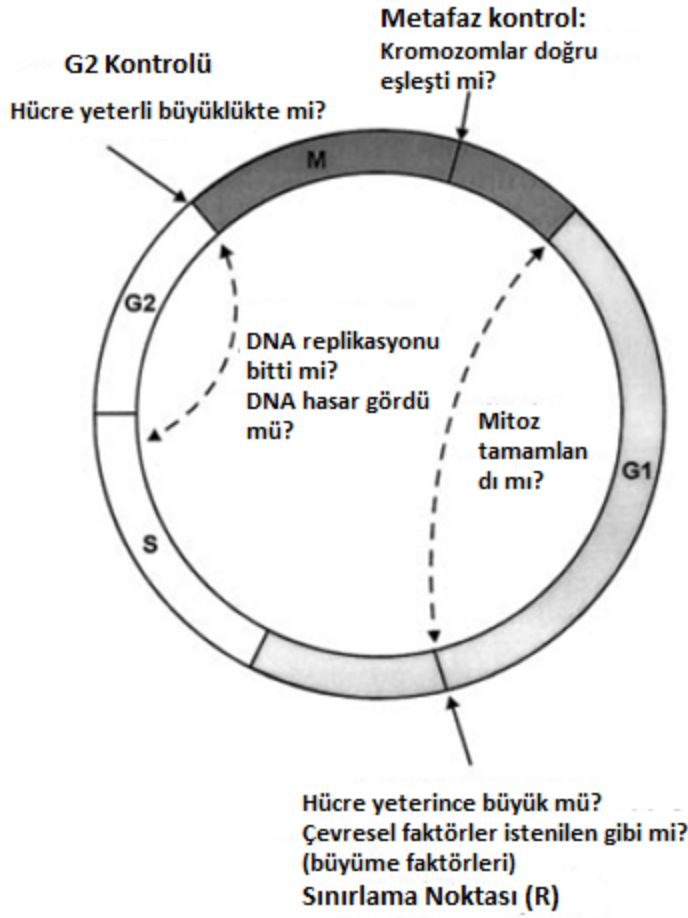
Şekil 1.3. G1 fazından S fazına ilerleme, retinoblastoma proteininin (pRb) fosforillenmesi ile düzenlenir, bu proteinin yokluğunda DNA replikasyonu ilerleyemez (Boyle ve Levin 2008)

1.2 Hücre Döngüsünün Kontrolü

Hücre döngüsündeki çeşitli fazlar, hücre bölünmesini sağlayan yüksek düzene sahip süreçler içermektedirler. Çeşitli hücre döngüsü olayları olağanüstü bir kontrol mekanizması sayesinde tam zamanlama ile gerçekleşmektedirler.

Hücre döngüsü sekansları değişik kontrol bölgeleri tarafından incelenmektedir ve bu bölgeler süreci baskılayıcı ya da tetikleyici olabilmektedirler. Bunlar, hücre döngüsünün tamamlanmasını kontrol eden ve bir sonraki adıma geçiş izni veren görüntüleme sistemleridir.

Hücre döngüsünün kontrol sistemleri söz konusu fazın tam anlamıyla başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol eder. Yeni bir faza geçiş, ancak bir önceki fazın başarılı bir şekilde tamamlanmasıyla gerçekleşebilir.



Şekil 1.4. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları: içsel ve dışsal kontrol mekanizmaları. Önemli kontrol noktaları G2 fazının sonunda bulunur (G2/M geçişi), mitoz(metafaz/anafaz geçişi) ve G1 fazı (kısıltma noktası). Kesikli çizgiler içsel kontrolü, düz çizgiler ise dışsal kontrolü göstermektedir (**Krauss 2001**)

Hücre döngüsü kontrol sistemlerinin birçoğu içsel mekanizmayla oluşturulmaktadır, aslidirler, kullanıma hazırdırlar. Buna karşılık diğer kontrol mekanizmalarının bir kısmı hücre döngüsünde görev almazlar. *Kontrol noktaları* olarak adlandırılan bu mekanizmalar, sadece merkezi hücre döngüsünde bir sorun olduğunda devreye girerler.

Yapı aşamasını kontrol ve koruma sistemine ek olarak hücre bölünmesinin tüm organizma ile uyumunu kontrol eden bir dışsal kontrol mekanizması bulunmaktadır.

En önemli elemanları Ser/Thr-özgü protein kinaz ve bunlarla alakalı düzenleyici proteinler olan ve hücre döngüsünün merkezinde bulunan bir biyokimyasal sistem bulunmaktadır. Bu sistem, belirlenen düzenin hücre döngüsünün faz-spesifik hücre döngüsünün biyokimyasının düzenlenmesinde etkili rol oynamaktadır (**Krauss 2001**).

1.2.1 İçsel Kontrol Mekanizmaları

Bu mekanizmanın görevi, döngünün hedeflenen şekilde gerçekleşmesi ve hücre bölünmesi sonucunda yavru hücrelere genetik bilginin tam olarak aktarılıp aktarılmadığının kontrol edilmesidir (**Krauss 2001**).

Tamamlanmış S Fazı ile Mitozun Eşleşmesi

Mitoz fazı, S fazında DNA kendini tamamen eşlediğinde gerçekleşmeye başlar. Mekanizma tamamlanmış S fazının mitoz fazına geçişi ile sonlanır (**Krauss 2001**).

S fazı ve Mitozun Eşleşmesi

Diğer bir kontrol sisteminde ise S fazına geçiş, sadece tamamlanmış mitoz ile gerçekleşebilir. Eğer hücre G2 fazı boyunca mitozsuz S fazına geçebilmişse, bu durum çok kromozomluluğa neden olur (**Krauss 2001**).

G1 Fazındaki Hücre Boyutu ve Gelişiminin Eşleşmesi

Bu mekanizma sayesinde hücrenin bölünebilmesi için yeterli boyuta ulaşmış ulaşmadığı kontrol edilir. S fazı başlamadan önce G1 fazında hücrenin yavru hücreye bölünebilmesi için gerekli boyuta ulaşması gerekmektedir (**Krauss 2001**).

DNA Hasarı ve Hücre Döngüsünde İzlenen Yol

Hücrenel ya da dışsal yollarla hücrenel genom hasara uğrayabilir. DNA hasarları tamir enzimleri tarafından tamir edilmelidir. Enzimlerin tamir edemediği kısımlar ise DNA eşleşmesi sırasında yanlış kodlamaya ve dolayısı ile mutasyona neden olmaktadır. Bu sebepten dolayı hücre, hasarı kayıt eder ve hücre döngüsünü durdurabilir. Ayrıca hücre bazı durumlarda hücre döngüsünü duraklamaya alır ve hücreyi programlı hücre ölümüne yönlendirebilir (**Krauss 2001**).

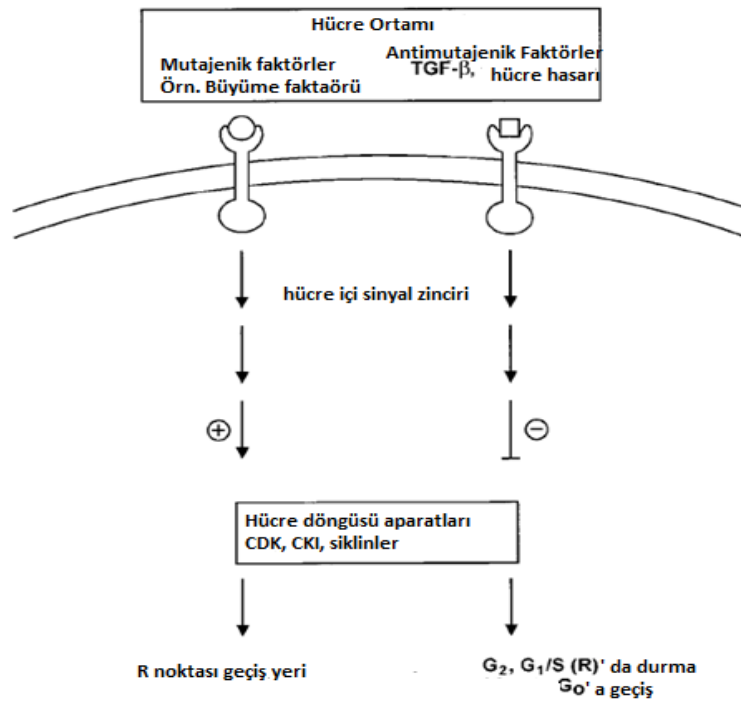
1.2.2 Dışsal Kontrol Mekanizmaları

Büyüme Durumları

Hücre büyümesi, yüksek derecede kontrol altında tutulmakta ve büyümesi besin kaynağı gibi dışsal faktörlerle kontrol edilmektedir. Hücre bölünmesi fiziksel koşullar uygun durumda olmadığında durabilir (**Krauss 2001**).

Hücre-Hücre İletişiminde Mutajenik Sinyaller

Hücrelerarası etkileşimde organizma tarafından üretilen ve büyüme faktörü formundaki mutajenik sinyaller etkilidir. Bu sinyaller hedef hücredeki spesifik reseptöre bağlanırlar ve hücre döngüsü sürecini etkileyen sinyal zinciri başlatılmış olur (şekil 1.5) (Krauss 2001).



Şekil 1.5. Hücre döngüsünün kontrolündeki mutajenik ve antimutajenik sinyaller. Hüresel çevre mutajenik ya da antimutajenik sinyalleri belirleyebilirler. Mutajenik sinyaller (örn. Büyüme faktörü) hücre döngüsü boyunca geçişi destekler. Antimutajenik sinyaller (örn. TGFg) hücre döngüsünde bir engelleme meydana getirirler. Her iki durumda da hücre dışı sinyal transmembran reseptörler tarafından alınır, daha sonrasında hücre içi sinyal zinciri ile hücre döngüsüne katılırlar. TGFg: transforming growth factor g: CDK:cyclin-dependent protein kinase, CKI: inhibitor of CDK, R: restriction point (Krauss 2001)

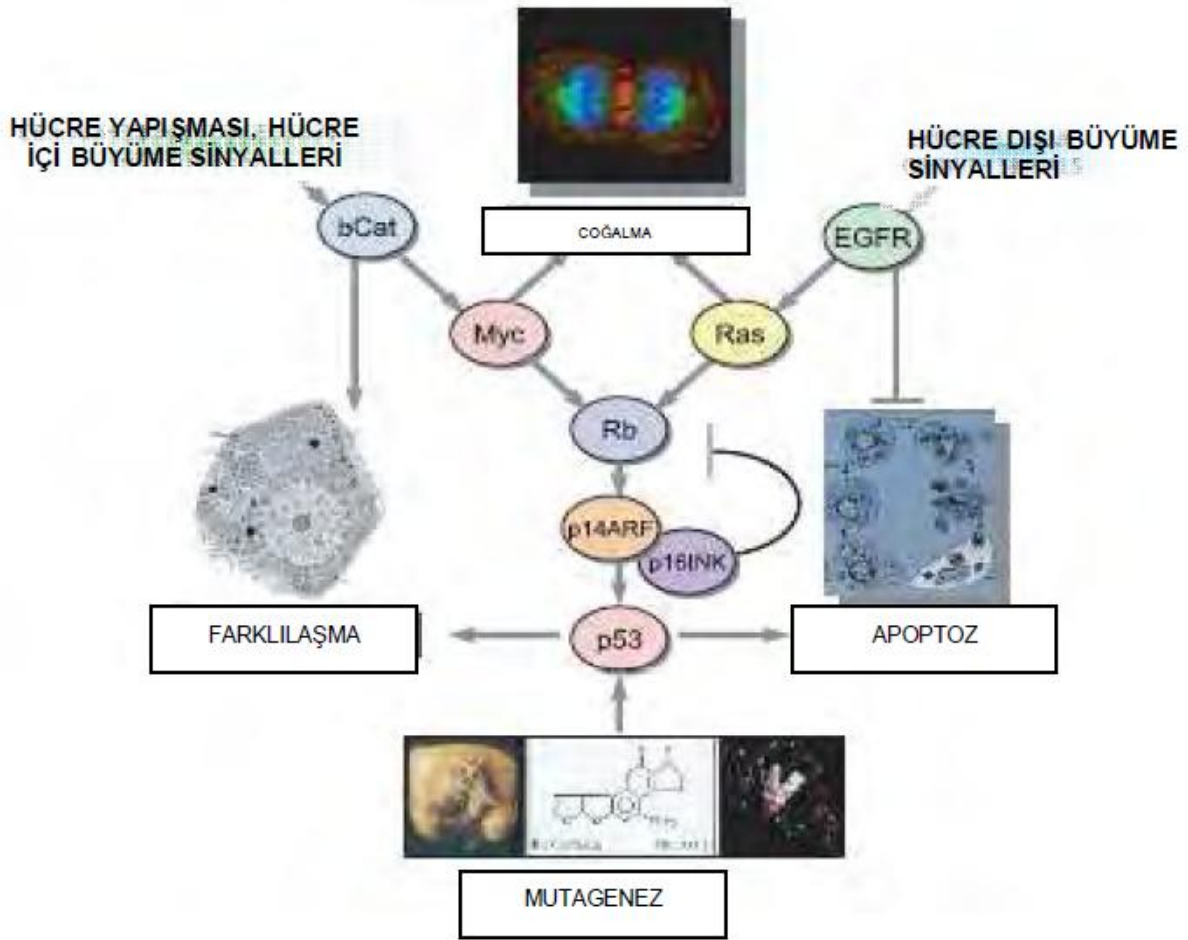
Büyüme hızlandıran sinyallerin yanı sıra büyüme baskılayan antimutajenik sinyaller de organizmayı etkilemektedirler. Bu durumda hücre döngüsü durur ve G₀ fazına geri döner (**Krauss 2001**).

1.3 Kanser Moleküler Özellikleri

Kanser, hücrelerin aşırı ve zamansız çoğalmalarına, immün sistemin gözetiminden kaçmalarına ve nihai olarak da uzaktaki dokuları da istila ederek metastazlar oluşturmalarına yol açan metabolik ve davranışsal değişiklikler geçirdikleri, çok basamaklı bir süreçtir (**Merlo 2006**). Bu değişiklikler hücre çoğalmasını ve ömrünü, komşu hücrelerle ilişkileri ve immün sistemden kaçma kapasitesini kontrol eden genetik programlardaki modifikasyonların birikmesiyle ortaya çıkar. Bu süreç, regülasyonu bozulmuş, normal hücre büyümesini ve davranışını denetleyen kurallara uymadıkları için “asi” olarak nitelendirilebilecek hücrelerden oluşan bir kitlenin oluşumuna neden olur. Böylesi bir kitle uzun bir süre asemptomatik olabilir. Bununla birlikte, sonunda büyüyerek, fizyolojik işlevleri altüst edecek, kitlenin yerine ve büyüklüğüne bağlı olarak çok sayıda semptoma ve kanser hücrelerinin organizma içinde yayılmasına yol açacaktır (**Boyle ve Levin 2008**). Kanser hedeflediği genetik programlar insan genomuna dağılmış genlerde yazılıdır. İnsan DNA’sının 23 000 kadar gen içerdiği düşünülmektedir. Bu genlerin birkaç bin kadarı (3000–5000) kanserde regülasyonu bozulan genetik programlarda rol alan proteinleri kodlamaktadır. İşlevini kaybeden bir gen, kritik bir proteinin anormal düzeylerde üretimine (çok az ya da çok fazla), anormal bir protein üretimine (işlev kazanmış ya da kaybetmiş), ya da bir proteinin hiç olmamasına sebep olabilir (**Boyle ve Levin 2008**). Çoğu kanser sadece tek bir hücreden (ya da az sayıda hücreden) doğar (**Nowell 1976**). Bu hücre kanserli olmak için onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde hücrenin normal sınırının çok ötesinde çoğalmasını sağlayacak birkaç değişiklik geçirmelidir. Bu süreç “asi” hücrelerden oluşan bir klonun oluşumuna yol açar. Eğer organizma bu klonu tolere ederse ve rahatsız edilmeden kalırsa, çoğalmaya devam edebilir ve bu süreç içinde içerdiği hücreler gittikçe artan sayıda modifikasyon biriktirir. Böylesi bozulmuş bir süreçte, sadece en uygun ve en saldırgan hücreler hayatta kalacak ve daha örgütsüz olan hücrelerin yerini alacaktır. Tümörler bu şekilde malign hale gelirler. Bu aynı zamanda kanserin tedavisinin bu denli zor olmasının da nedenidir: hastalara kanser hücrelerini etkin olarak öldüren bir ilaç verildiğinde, hayatta kalan az sayıdaki hücre, kendilerini ilaca karşı dirençli kılan değişiklikler geçirmiş olanlardır. Geride kalan bu ufak hücre grubu

kanserin başlangıçtaki biçiminden daha kötü bir biçimde dönmesi için yeterli olabilir (**Boyle ve Levin 2008**). Tümörün yayılması çoğu zaman kanser hücrelerinin anjiyogenezi, yani tümör vaskülarizasyonuna yönelik yeni, küçük kan hücrelerinin sentezini artırması ve tümöre oksijen ve besin sağlaması sonucu kolaylaşır (**Boyle ve Levin 2008**). DNA diziliminde mutasyon meydana geldiğinde kanser başlayabilir (**Herceg 2007**). Bu mutasyonlar tek bir baz değişikliği olabilir ve bu durumda bir kodonu tanımlayan 3 bazdan biri değişmiş olur ve bir proteine farklı bir proteinin eklenmesine yol açar. Bazı durumlarda, bu, söz konusu proteinin aktivitesini değiştirmek için yeterlidir. Başka DNA mutasyonları ise, çok sayıda bazı etkileyebilir ve genomdan birkaç gen içeren bir DNA parçası kopar; ya da bu DNA parçası genomda başka bir yere yerleşerek bitişik olmayan DNA parçalarının birleşmesiyle oluşan yeni genler oluşarak yeni, anormal proteinlerin sentezine yol açar. Büyüklükleri ne olursa olsun böylesi değişiklikler “genetik değişimler” ya da “mutasyonlar” olarak adlandırılır. Bu değişiklikler kanserli hücrelerin DNA diziliminin saptanmasıyla belirlenebilir. “Kapalı” olan DNA alanları (bunlar düzeltmeye ve kopyalanmaya kapalıdır) ve açık DNA alanları (hücre bunları kopyalayabilir, okuyabilir ve RNA ile proteinleri üretmek için kullanabilir) vardır. Dolayısıyla, hücrelerin program değiştirmenin DNA mutasyonu dışındaki bir yolu, açık alanlardaki genleri kapatmak, ya da kapalı alanlardakileri açmak için genel paketlemeyi değiştirmektir. Bu gibi değişiklikler sadece DNA diziliminin saptanması ile belirlenmez. DNA’ nın okunabilirliğini ve DNA’ ya erişilebilirliği düzenleyen kimyasal modifikasyonların da analizi gerekmektedir. Bunlar *epigenetik değişiklikler* olarak adlandırılmaktadır.

Hücreler, içsel farklılıklarına karşın, hücre çoğalmasını ve ölümünü kontrol eden temel süreçlerin gerçekleştirilmesinde ortak planlar doğrultusunda hareket ederler. Bunun bir sonucu olarak, birçok kanserde, organın yeri ya da hastalığın nedenine bağlı olmaksızın, bazı onkogenler ve tümör baskılayıcılar değiştiği sıklıkla görülür. Bu genlerin ürünleri, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını kontrol etmek üzere birlikte çalışan bir öğeler ağının bir parçasıdır. Şekil 1.6, tüm kanserli hücrelerde değiştirilmesi gereken gen ve süreç ağının çekirdeği olarak tanımlanabilecek “kansere kutusunu” göstermektedir. Bu kanser kutusu, başlıca üç sinyal verme süreci içerir. Bunların ikisi büyümeyi artıran süreçlerdir; biri ise büyümeyi baskılayan bir mekanizmadır (**Boyle ve Levin 2008**).



Şekil 1.6. Kanser kutusu. Bu şekil kanser gelişiminde birkaç genin nasıl işbirliği yaptığını göstermektedir. Üç resim bir hücrenin yaşamının 3 aşamasını göstermektedir: bölünme (üstte), farklılaşma (solda) ve programlanmış hücre ölümü (sağda). Önemli genler ve bunların işbirliği oklarla gösterilmiştir. Hücre yapışma sinyalleri betaKatenin yoluyla hücre bölünme sisteminin bileşenlerine aktarılır ve RB1 geninde toplanır (hücre çevriminin bir düzenleyicisi). Büyüme sinyalleri de genlerden geçerek aynı kontrol noktalarına yakınsar, örneğin tirozin kinaz aktivitesi (RTK) olan hücre yüzeyi reseptörleri ve bunların hücre dışı transmittörleri (RAS). Seklin altında, hücre bölünmesi kontrolünün evrensel “fren”i gösterilmiştir: p53 proteini. P53’ü kodlayan gen olan TP53, çoğu kez çevresel mutajenlerin hedefi olur, örneğin DNA’da baz değişiklikleri oluşturan ve bir yiyecek bulaşanı olan aflatoksin. Bu mutasyon fren etkisini ortadan kaldırır ve kontrolsüz çoğalmaya neden olur. Kaynak: Pierre Hainaut, yayınlanmamıştır. **(Boyle ve Levin 2008)**

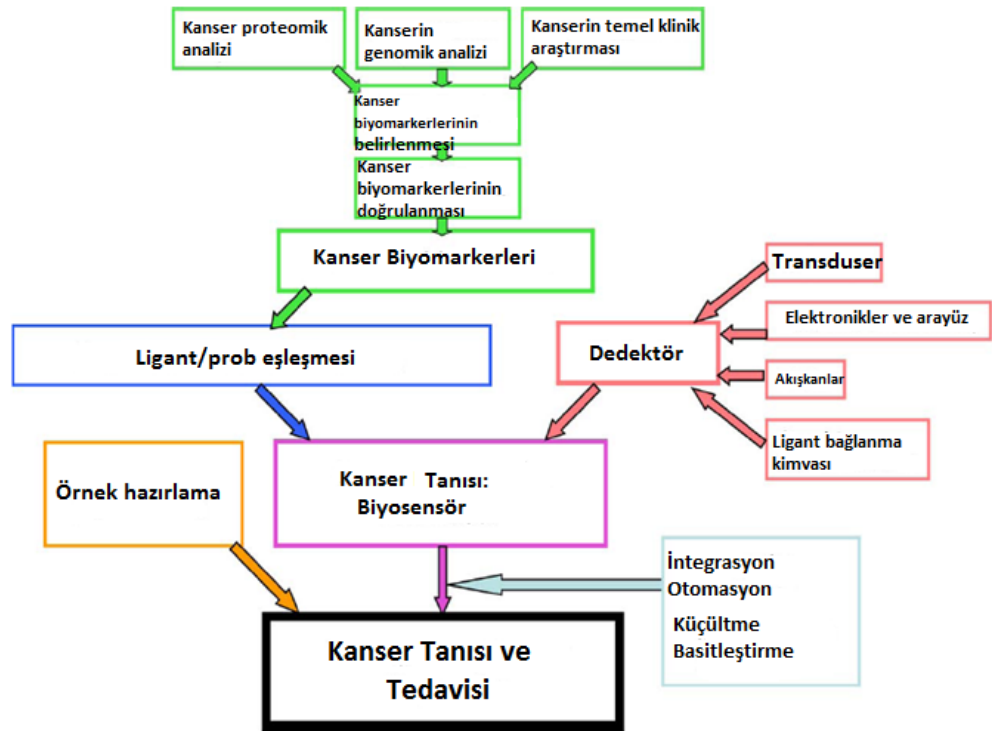
1.4 Biyosensörler

Biyosensörler, biyokimyasal tanımlama/bağlanma elementi ile (ligant) sinyal değiştirme ünitesini (transduser) kombine eden cihazlardır. Biyosensörler, kandaki glikoz miktarını ölçmek gibi birçok klinik tanımlar için kullanılmaktadırlar **(Rasooly ve ark. 2006)**.

Kanserin 200 farklı çeşidinin 60 farklı organı etkilemesinden dolayı kanserin klinik testi oldukça karmaşık bir işittir. Kanser teşhisi için bir biyosensör tasarlanmaya başlandığında, bu karmaşıklığın göz önünde bulundurulması oldukça önemlidir. Kanserin klinik teşhisinin biyosensörler ile yapılması, esneklik ve hızın artması, çoklu hedef analiz kabiliyeti, düşük

maliyet toplum sağlık sistemlerine moleküler tanı geliştirme faaliyetlerinin yaygınlaşması gibi birçok avantajı da beraberinde getirmektedir. Biyosensörlerin kullanım alanlarının çok fazla olmasına karşın kanser teşhisi için geliştirilen biyosensör sayısı oldukça azdır. Bunun sebeplerinin en önemlisi kanserin oldukça karmaşık dizilerden oluşan bir hastalık olması söylenebilir. Tümörün hücre karakterizasyonu hala tam olarak aydınlatılamamıştır ve çok az sayıda biyomarker klinik olarak fayda sağlayabilmektedir (**Rasooly ve ark. 2006**).

Son birkaç yıldır, artan uyum ve küçültülmüş sistemlerle yüksek verimde ve moleküler seviyede ölçüm almak oldukça popüler olmaktadır. Bu durum birçok avantajı da beraberinde getirmektedir. Örneğin yüksek kapasitede cihazlar üretme eğilimi, kullanımı daha basit sistemler, daha ucuz maliyetler ve daha hızlı yanıt zamanları bu avantajlar arasındadır. Kanserın klinik olarak teşhisi için hazırlanması gereken bir biyosensörün temel bileşenleri şekil 7’de görülmektedir. Bu yeni teknoloji için verilebilecek örneklerden bir tanesi katı bir yüzeyin üzerine iki boyutlu olarak yerleştirilmiş antibadilerin bulunduğu antibadi dizileridir. Bu diziler, çeşitli antijenlerin kendilerine uygun antikora bağlanması ile tanımlanmalarında kullanılabilirler (**Taitt ve ark. 2005; Ligler ve ark. 2003**).



Şekil 1.7. Kanser teşhis biyosensörü tasarlamak için gerekli olan bileşenler. Kanser biyomarkerleri, temel ve klinik araştırmalar; genomik analizler ve proteomik analizlerden türetilmiştir. Bu markerler için ligantlar ve incelemeler biyosensör oluşturmak için dedektör ile harmanlanır. Kanserden korunma noktası ise uygun örnek hazırlama metotları geliştirmek için gerekli otomasyon ve teknolojik olanakları harmanlar (**Taitt ve ark. 2005; Ligler ve ark. 2003**)

1.5 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisine Giriş

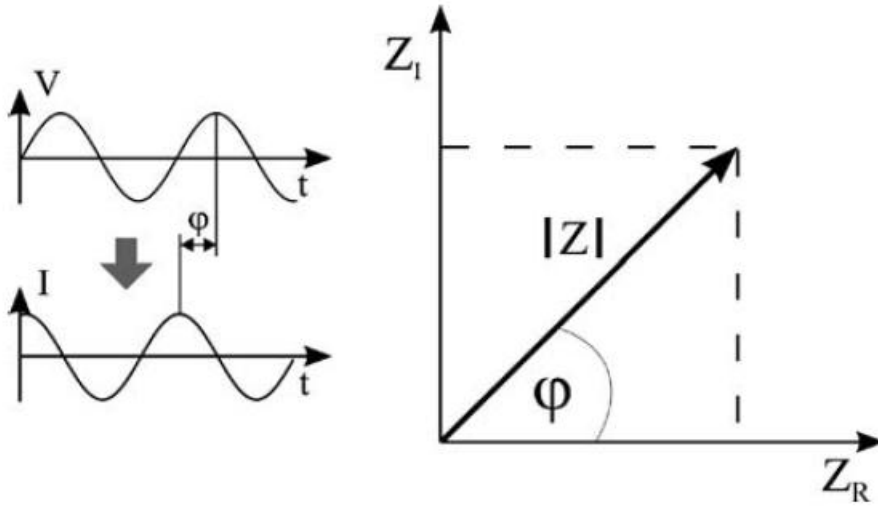
Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmede kullanılan çok etkili ve kullanışlı bir metottur. Metal korozyon mekanizmalarının aydınlatılmasında, membranlar boyunca yük aktarımı ve membran/çözelti ara yüzeylerinin karakterizasyonunda ve optimizasyonunda çok sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda ise biyosensörlerin hem hazırlanma aşamalarının, hem de biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinin izlenmesi ve kantitatif analizlerinde çok yoğun bir şekilde tercih edilmeye başlanmıştır. EIS'nin kullanımı ile ilgili ilk örnekler 1980'lerin sonunda rapor edilmiş olmasına rağmen metodun uygulamaları, enstrümantasyondaki ilerlemelere bağlı olarak son yıllarda çok fazla artış göstermiştir. Çünkü elektrokimyasal impedans spektroskopisinin kompleks parametreleri enstrümanların her türlü donanımından çok fazla etkilenebilmektedir. İmpedans teknikleri ile biyoreseptör ve onun analiti arasındaki etkileşimin belirlenmesinin yanı sıra, transduserde biyomoleküllerin immobilizasyonu boyunca meydana gelen olaylarda olduğu gibi, yüzey modifikasyonun karakterizasyonları da başarıyla gerçekleştirilebilir. Bu özellikleri ile impedans aynı zamanda, yüzey morfolojisinin görüntüleme teknikleriyle aydınlatılmasında yardımcı ve çok önemli bir araçtır.

1.6 İmpedans Spektroskopisinin Temel İlkeleri

Bir sistemin impedansı genellikle küçük bir genlikli potansiyel uygulanması ve akım cevabının belirlenmesiyle tayin edilir. Bu tanımdan yola çıkarak impedans; potansiyel-zaman fonksiyonun $V(t)$ akım-zaman $I(t)$ fonksiyonuna bölümüdür. V_0 ve I_0 maksimum değere ulaştıklarında, f ; frekans, t ; zaman, ϕ potansiyel-zaman ve akım-zaman arasındaki faz kaymasıdır. Y ise kompleks iletkenlik veya admittanstır.

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \sin(2\pi f t)}{I_0 \sin(2\pi f t + \phi)} = \frac{1}{Y}$$

İmpedans kompleks bir değerdir; çünkü akım sadece genlik açısından farklılık göstermekle kalmaz, potansiyel-zaman fonksiyonuyla kıyaslandığında faz kayması da gösterir. Bu yüzden değer ya $|Z|$ ve faz kayması ϕ ya da reel Z_R ve imgesel Z_I olarak tanımlanabilir.



Şekil 1.8. İmpedans'ın potansiyel(zaman) ve akım(zaman) büyüklüklerine bağımlı matematiksel gösterimi

Bu durum, şekil 1.8.'de gösterilmiştir. Dolayısıyla impedans ölçümlerinin sonuçları iki şekilde gösterilebilir: Bode grafiği ($\log f$ 'nin fonksiyonu olarak $\log Z$ ve ϕ) veya Z_R ve Z_I 'nin olduğu Nyquist grafiği şeklindedir.

İmpedans "spektroskopisi" adı, impedansın tek bir frekanstan ziyade farklı frekansları tayin edebilme gerçeğinden türemiştir. Bu sayede bir impedans spektrumundan yüzeylerin, tabakaların veya membranların değişim ve difüzyon prosesleri ve karakterizasyonu hakkında bilgi sağlanır. Bu bilgilere ulaşmak için, impedans spektrumu genellikle eşdeğer devre kullanılarak analiz edilir. Genellikle direnç ve kapasitanstan oluşan bu devre incelenen sistemin farklı fizikokimyasal özelliklerini açıklar. Ayrıca sistem; elektrokinetik, difüzyon, partiyon gibi temel yasalardan türeyen transfer fonksiyonları temelinde de tanımlanabilir. Bu durumda bir impedans elementinin -direnç veya kapasitan- değişimi çözeltinin

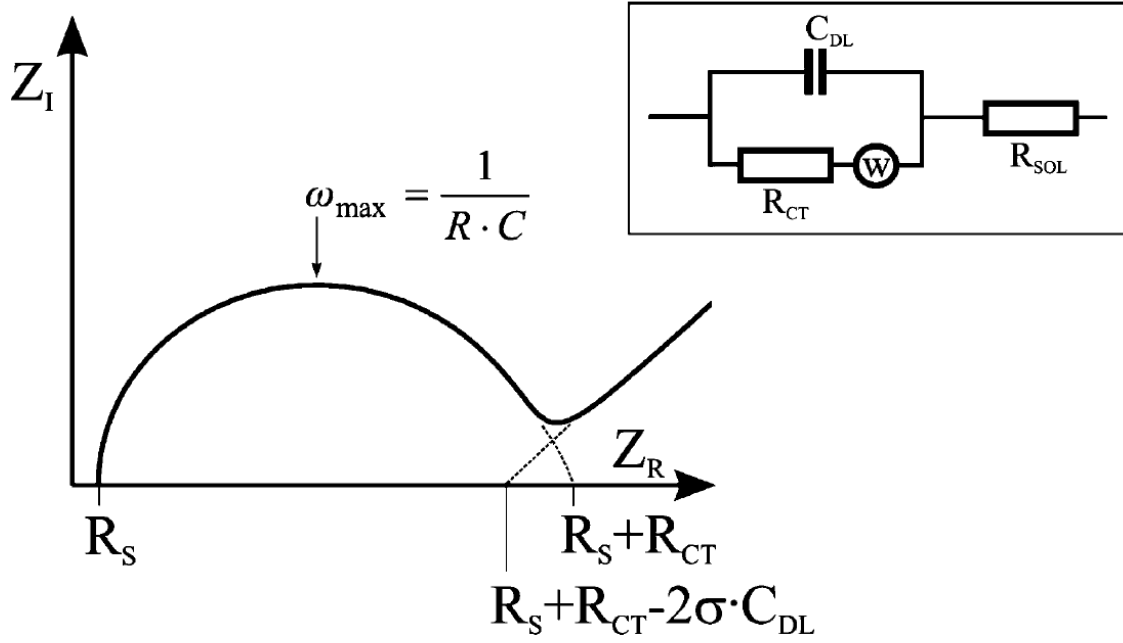
bileşiminin bir fonksiyonu olarak değerlendirilir. Bazı durumlarda, tüm impedansla konsantrasyondaki değişim arasında ilişki kurmak mümkündür (Macdonald 1997, Rubinstein 1995, Krause 2007).

Elektrokimyasal impedans spektroskopisinde, elektrolit çözeltisi sistemin tek bileşeni olarak incelendiğinde, impedans davranışı açıklamak için 4 unsur kullanılır: ohmik direnç, kapasitans, sabit faz ögesi ve Warburg impedans. Bu unsurlar ve tanımlamalarının özeti tablo 1.1’ de verilmiştir.

Tablo 1.1. Biyoelektrokimyasal sistemleri tanımlamakta çok sıklıkla kullanılan impedans elemanlarının tanımlanmaları, frekans bağımlılıkları ve faz kaymaları

İmpedans elemanı	Tanımlama	Faz açısı	Frekans bağımlılığı
R	$Z=R$	0°	Hayır
C	$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$	90°	Evet
CPE	$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^\alpha}$	$0-90^\circ$	Evet
W (infinite) ^a	$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}}(1-j)$ $\sigma = \frac{RT}{n^2 F^2 \sqrt{2}} \left(\frac{1}{\sqrt{D_0 c_0}} + \frac{1}{\sqrt{D_R c_R}} \right)$	45°	Evet

Eşdeğer devreler, deneysel impedans verilerini seri ve/veya paralel düzenlenmiş ideal impedans unsurlarla yaklaşık olarak belirlemek için kullanılır. Çoğu elektrokimyasal sistem bu prosedüre göre analiz edilir. Bir elektrolitle bir elektrodun temasta olduğu bir sistem – Randles devresi- çözelti direnci, R_s , yük transfer direnci, R_{ct} , çift tabaka kapasitans C_{dl} ve Warburg impedans, W . Şekil 1.9’ da gösterilen Nyquist grafiğinde R_s ve R_{ct} değerleri kolaylıkla belirlenebilir. Çift tabaka kapasitansı ise yarım dairenin maksimum yaptığı noktadaki frekanstan hesaplanabilir.



Şekil 1.9 Bir elektrolitle kontakt halindeki elektroda ilişkin Randles eşdeğer devre modeli

Biyolojik bir materyali karakterize etmek için (antikor gibi) elektrotlar sisteme uygulanmalı böylece elektrokimyasal hücre elde edilmelidir. Ac potansiyel uygulanması ile birlikte, akım tüm sistem elemanlarını –çalışma elektrodu, biyolojik materyal, çözeltili ve karşıt elektrot-dolaşmaya başlayacaktır. Ölçülen impedans, esasen bu elemanların bireysel katkılarının bir özetidir.

a) Biyolojik bir materyalin impedansı ya belirli bir analitin konsantrasyonunun fonksiyonu ya da zamanın bir fonksiyonudur. Her iki durumda da her iki elektrodun impedansı, ölçülecek impedansa kıyasla küçük olmalıdır. Bu da geniş yüzey alanları kullanılarak sağlanabilir. Ayrıca, çözeltiden kaynaklanabilecek biyolojik materyalin nonspesifik bağlanmalarından kaçınılmalıdır, çünkü bu durum ara yüzey impedansı artırır.

b) Çalışma elektroduna biyolojik bileşen immobilize edilir ve analitle ilişkisi tayin edilir. Bu, tipik bir biyosensör uygulamasıdır. Burada duyar elektrotun impedansı (yani biyolojik materyalle modifiye edilmiş çalışma elektrodu) aslında tüm impedansı kontrol eder. Bu yüzden, karşıt elektrodun impedansı belirgin şekilde küçük olmalıdır. Bu da duyar elektroda göre en az 10 kat daha büyük (alan) elektrot kullanılarak sağlanabilir (Moritz 1992, Friebe ve ark. 1993).

1.7 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler

Bütün elektrokimyasal biyosensörlerde olduğu gibi, impedimetrik biyosensörler biyomoleküllerin kondüktif bir (veya yarı kondüktif) transduser yüzeyiyle etkileşimini kullanan biyoelektronik cihazlardır. Ölçüm prosesleri, reseptör biyomolekül ile analit arasında oluşan algılama yüzeyinin, elektronik transduserin elektriksel özelliklerini direkt veya indirekt şekilde değiştirmesine dayanır. Antijen-antikor veya DNA-DNA etkileşimleri gibi sınırlı katalitik aktiviteye sahip bileşiklerin analizi için geliştirilen elektrokimyasal impedans spektroskopisi(EIS) temelli biyosensörlerin sayısı literatürde her geçen gün daha da artmaktadır. Son yıllarda, EIS, birçok kimyasal ve fiziksel proseslerin çalışılmasında da kullanılan çok etkili bir yöntem haline gelmiştir. EIS, birçok proses için analitik çözümler sunmaktadır. Bunun yanı sıra membran özelliklerinin belirlenmesi, biyosensör karakterizasyon ve fabrikasyonu gibi bilimsel araştırmalar için de etkili bir teknik olan EIS ile gerçekleştirilebilmektedir. Enzim-substrat etkileşimlerinin tersine, bağlanmadan sonra herhangi bir reaksiyonun meydana gelmediği antijen-antikor veya DNA-DNA, protein-protein gibi afinite etkileşimlerinden sonra yük transfer değişimleri meydana gelir ve bu değişimler EIS ile çok etkili bir şekilde izlenebilir. Çeşitli spesifik ve hassas ölçümler , elektrot materyaline (metaller, metal oksitler, camsı karbonlar, yarı iletkenler) elektrot geometrisine (klasik elektrot düzenlenmesi veya interdijite-birbirine geçmiş- elektrotlar), analite (proteinler, antikorlar, nükleik asitler vs) veya kullanılan amplifikasyon protokolüne (label-free –tabakasız-, enzim labeller enzim tabakalar-, iletken polimer filmler nanopartiküller vs..) göre sınıflandırılabilir (Katz ve ark. 2003, Guan ve ark. 2004, Daniels ve ark. 2007, Berggren ve ark. 2001, Saby ve ark. 1993).

1.7.1 Enzim Temelli İmpedimetrik Biyosensörler

İmpedans spektroskopisi, yüzeyi modifiye edilmiş elektrotların elektriksel özelliklerinin ölçülmesi için etkin bir yöntemdir. Ancak geniş bir frekans aralığında bütün impedans spektrumunun taranması zaman alıcıdır. Bundan dolayı impedimetrik teknikler, enzim temelli bir biyosensörün karakterizasyonu için kullanılmaktadır.

Enzim sensörleri içerisinde amperometrik elektrotlar en çok ilgi çeken transdüserlerdir. Bununla birlikte, bir enzimin dönüşümünden (turnover) dolayı redoks-aktif bileşiğinde meydana gelen değişim, yük aktarım direnciyle belirlenebilir. Bu durum, glukoz oksidazın ve mediatör olarak benzokininonun kullanıldığı glukoz tayini çalışmalarında gösterilmiştir (Shervedani ve ark. 2006).

İmpedans spektroskopisiyle, substrat ve enzim inhibitörlerinin tayini yapılmakla birlikte enzimin kendi aktivitesi de analiz edilebilmektedir. Bu duruma ilginç bir yaklaşım, parçalanabilir polimer filmlerin kullanılmasıdır. Bu polimerler elektrot üzerine kaplanırlar ve biyokatalitik reaksiyon vasıtasıyla polimer parçalanma ya polimer zinciri üzerinde enzimin direkt etkisiyle ya da enzimatik dönüşüm sonucu oluşan ürünün indirekt etkisiyle oluşur. Parçalanmaya başlayan filmin kalınlığı impedans ölçümleriyle kolaylıkla takip edilir. Bu yöntem; üre, glukoz, kimotripsin veya lipaz gibi enzimlerin tayininde gösterilmiştir. İmpedansın kullanıldığı bir diğer yol, elektrot yüzeyindeki lipit tabakasına “sinyalizasyon” proteinin katılması ve spesifik analitle etkileşimi sonucu konformasyonel değişiminin değerlendirilmesine dayanır (McNeil ve ark. 1995, Cortina ve ark. 2006, Gooding ve ark. 1996, Sumner ve ark. 2001, Cornell ve ark. 1997).

Substrat ve inhibitör sensörlerinin kullanımına dair bir çalışma Naumann ve ark.’larına aittir. Bu çalışmada, sitokrom oksidaz destekli altın yüzeyde peptit bağlı lipit membran kullanılmış ve membran boyunca proton taşınımını çalışılmıştır. İmpedans spektrumları, inhibitör ve enzim substratların konsantrasyonlarıyla ilişkili olabilmektedir. Paraokson, kinakrin veya bakteriyal toksin streptolizinin tayini verilebilecek bir diğer örneklerdir (Naumann ve ark. 1999, Schasfoort ve ark. 1994, Tong ve ark. 2003, Wilkop ve ark. 2007).

Neticede, algılama molekülünün konformasyonel değişiminin impedans ölçümlerle belirlenmesi analitik tayinde uygulanabilir bir yöntemdir. Örneğin, galaktoz/glukoz reseptör protein kullanılarak glukozun belirlenmesi çalışmasında efektif protein tabakasının kalınlığı nanogözenek formunda dizayn edilen uygun elektrotlar kullanılarak impedans analiziyle takip edilmiştir.

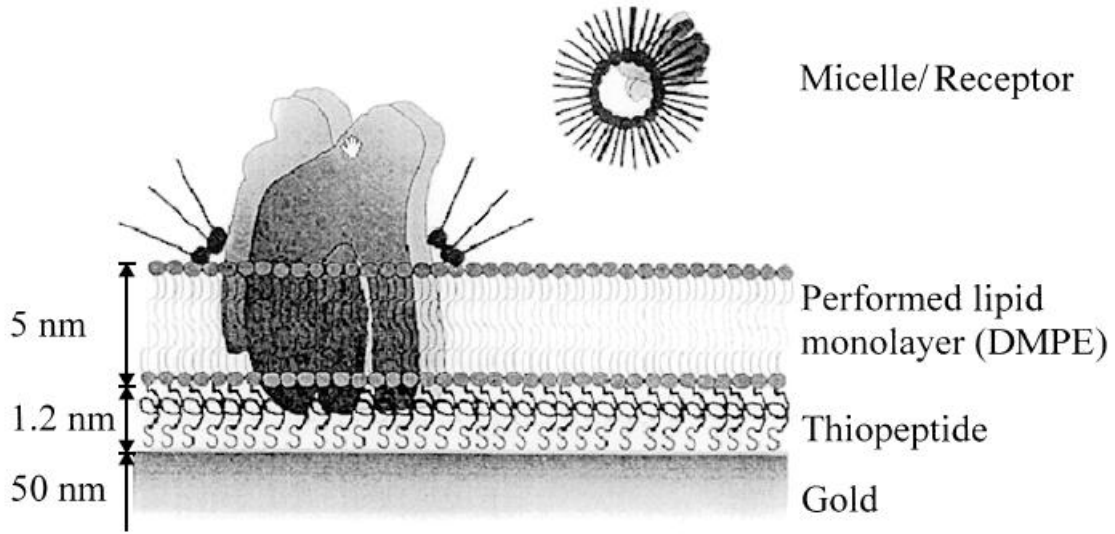
Aşağıda EIS temelli bazı enzim biyosensör örnekleri açıklanmıştır.

Jelatin kaplanmış altın elektrot yüzeyindeki proteolitik aktivite değişiminin sebep olduğu impedans farklanmalarının ölçüldüğü, kollegenaz tayini için bir biyosensör geliştirilmiştir (Saum ve ark. 1998). Bu sistemde, tabaka kritik bir kalınlığa ulaştığında, tabakanın enzim tarafından degradasyonu ile oluşan impedans hızla artar. Protein yıkımı ile impedansta oluşan farklanma, elektrot yüzeyinden jelatin tabakasının ayrılma hızı ile orantılıdır. Potansiyostatın cevap süresi çözeltinin karıştırılması ile düşürülebilmektedir ve bu biyosensör sisteminin kollagenaz aktivitesinin belirlenmesi için kullanışlı bir yöntem olduğu gözlenmektedir. Ancak sensör yüzeyine kaplanmış jelatinin biyosensör tarafından saptanma yeteneği elektrolitlerin varlığında ciddi bir şekilde azalmaktadır. Bu bulgular Saum ve ark (1998) tarafından başka bir biyosensör çalışmasında da ortaya atılarak tartışılmıştır.

Birçok enzim temelli biyosensörde, LB filmlerin karakterizasyonu için uygun olduğundan, elektrotların Lagmuir-Blodgett (LB) yöntemleri ile modifikasyonlarında da impedimetrik teknikler kullanılmışlardır (**Abdelmalek ve ark. 2001**).

Örneğin; sudaki organofosfor pestisitlerinin saptanması için iyon seçimli bir alan-etkin transistör (ISFET) kullanılarak Bütirilkolinesteraz (BuChE) içeren LB filmler oluşturulmuştur. Enzim/stearilamin karışımı LB filmleri, filmlerin kararlılığını arttırmak için glüteraldehit buharı uygulamasından sonra ISFET boşlukları üzerine immobilize edilir. Önerilen eşdeğer modeli Si/SiO₂/LB film-elektrolit ara yüzeyi ile uyumludur. LB filmin kalınlığı, elipsometri sonuçları ile uyumlu olan bir ayarlama programı tarafından yaklaşık 60 nm olarak belirlenmiştir. Geliştirilen biyosensör Triklorofonun saptanması için kullanılabilir. **Yea ve ark.(2003)**, desteklenmiş bir çift tabakalı lipid membran (s-BLM) platinyum nanopartiküller ile birleştirerek bir biyosensör geliştirmişlerdir. Çıplak camı karbon (GC) elektrodun ve s-BLM ile (hem Pt nanopartikülsüz hem de nanopartiküllü) modifiye edilmiş elektrodun [Fe(CN)₆]^{3-/4-} varlığındaki impedans spektrumları, çıplak GC elektrot elektrokimyasal prosesin difüzyon kontrollü adımı için karakteristik olan neredeyse doğrusal bir çizgi şeklinde çıktığını göstermektedir. Modifiye elektrotlar da ise Pt nanopartikül eklenmiş ve eklenmemiş s-BLM'lerin Nyquist kompleks düzlem eğrileri, yüksek frekans alt birimindeki tek bir yarı devre ile karakterize edilir. Bu, s-BLM'leri Pt nanopartiküller ile birleştirmenin membran kapasitansında bir artmaya, membran direncinde de azalmaya sebep olduğu anlamına gelir. S-BLM'ler içerisindeki Pt nanopartikül arrayleri, glukoz biyosensörü yapımında, ortamda bulunan oksijenin indirgenmesi ile elektrokatalize olurlar.

Altın destek üzerindeki peptid bağlı lipid membranlar (t-BLMs) integral membran proteinlerinin araştırılması için bir biyomimetik sistem olarak dizayn edilmiştir (**Şekil2**) (**Naumann ve ark. 1999**). Örneğin, sığır kalbinden elde edilmiş sitokrom C oksidaz (COX) önceden oluşturulmuş peptid t-BLM içerisine immobilize edilmiştir. İmpedans spektroskopisi hem lipid filmlerin kalitesini hem de iyonların filmlerden geçişini izlemek için kullanılmıştır. Spektrumlar, elektrot kısmen (% 70) çift tabakalı ve yaklaşık %30 bozulmuş tek tabaka peptid veya, peptid-lipid altbirimleri ile kaplandığı zaman, düşük kaliteli peptid destekli lipid tek- ve çift- tabakaları olduğunu göstermiştir.



Şekil 1.10. Sitokrom c oksidaz'ın lipid tektabaka içinde yerleşimi (Naumann ve ark. 2002)

İmpedans spektrumları, inhibitör ve substrat konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bundan dolayı bu sistem, biyosensör uygulamaları için ümit 18onar18n yaklaşımdır. Aynı çalışma grubu tarafından yapılan benzer bir çalışmada, kloroplasttan elde edilen H^+ -ATP sentaz t-BLM içerisine yerleştirilmiştir (Naumann ve ark. 2002). Proteinin aktivitesi impedans spektroskopisi ile gösterilmiştir. ATP hidrolizi sonucunda gerçekleşen lipid tabakadan proton transferinden dolayı direnç azalır. ATP eklenmesinden dolayı oluşan impedans değişimleri tamamen geri dönüşlüdür.

1.7.2 İmmunokimya Temelli İmpedimetrik Biyosensörler

İmpidimetrik immünosensörlerin geliştirilmesinde itici güç, basit ekipmanların kullanıldığı tanı sistemlerine (*point of care diagnostics*) olan talep ve potansiyel moleküler etiketsiz analizler (*label free*)dir. İmmünsensörler için iki immobilizasyon stratejisi çok sıklıkla kullanılır; Sensör, ya ilgili antijeni bağlayan antikorlarla modifiye edilebilir ya da antijenin kendisi immobilize edilebilir –ki daha sonra bu antijen bütünleyici antikorunu bağlar-. Her iki durumda da, bağlanma olayı elektriksel yüzey özelliklerinin değişimiyle sonuçlanacak olmasına rağmen, ikinci durumda (antijen immobilizasyonunda) antikorların yüksek molekül ağırlıkları ve düşük dielektrik katsayılarından ötürü daha büyük değişimler

açığa çıkarabilir ki bu impedimetrik olarak çok daha etkili bir şekilde izlenebilir.

Kapasitif sensörler tercihen immün reaksiyonların belirlenmesinde oldukça sık bir şekilde kullanılmışlardır. Örneğin yük transferi, uzun zincirli SAM tabakaları kullanılarak azaltılabilmektedir. Daha sonra şu da gösterilmiştir ki, bağlanma davranışlarının matematiksel tanımlanması devamlı surette bir bağlanma analizini mümkün kılar (**Taira ve ark. 1993, Berggren ve ark. 1998, Bataillard ve ark. 1998**).

Nonspesifik bağlanmaların etkisinin önüne geçmek için (spesifik etkileşimlere benzer yollarla kapasitansı etkilerler), ölçümlere diferensiyel bir mod önerilmiştir. Antikorlar bağlanma özellikleri korunarak Langmuir-Blodgett filmlerine birleştirilebilir ve oldukça düzenli algılama yapıları elde edilebilir. İnterleukin-6 için, epoksisilan işlevselleştirilmesi kullanılarak veya interferon γ için SAM modifikasyonu ile antikor immobilizasyonunda oldukça hassas kapasitif ölçümler gerçekleştirilmiştir (**Berggren ve ark. 1997, Hedstrom ve ark. 2005**).

Bunun yanı sıra, direnç temelli sensörler de geliştirilmiştir. Örneğin, insan meme tümörü ilişkili glikoprotein, spesifik antikorların altın yüzeye kendiliğinden immobilizasyonu ile belirlenmiştir. Bütünleyici antijenin bağlanması yük transfer direncinin (R_{ct}) nin değişimiyle neticelenir. Direnç temelli ölçüm yöntemleri, reseptör-ligand etkileşimleri ve kokulu moleküllerin belirlenmesinde de kullanılır. İmmün analizler için bir diğer sistem, çok ince platin tabakaların kullanıldığı ve impedans model analizlerinin temel alınıp iletkenlik değişimlerinin değerlendirildiği sistemlerdir. Polipirol gibi iletken polimerler kullanılarak algılama biriminin immobilizasyonunda özel yaklaşımlar sergilenmesi, söz konusu immunosensörlerin hassasiyetini iyileştirilebilir. Polimerik ağın iletkenliği, bağlanma olaylarının tetiklediği konformasyonel değişikliklerden güçlü bir şekilde etkilendiği için alınan cevap da o derece yükselir. Biotinli polipirol filmler, biyotinli antikorların avidin ile immobilizasyonunda kullanılmıştır (**Hleli ve ark. 2006, Jie ve ark. 1999, Pak ve ark. 2001, Hou ve ark. 2007**).

Aşağıda EIS temelli bazı immunosensör örnekleri açıklanmıştır.

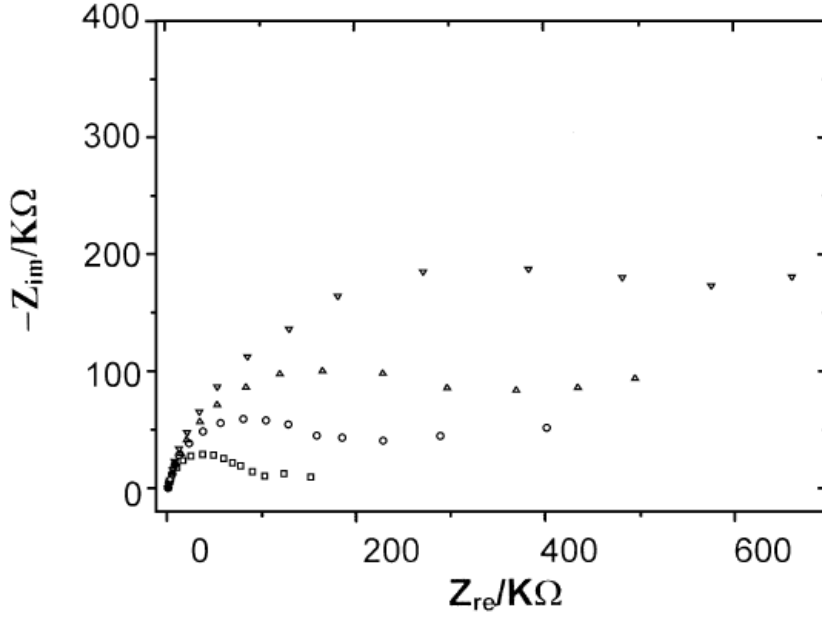
Direkt olarak ölçüme olanak tanıdıklarından, işaretleme yapılmadığından, hızlı olduklarından ve çoklu analiz sistemlerine olanak sağladığından dolayı, affinite bağlama esaslı immunosensörler ile her geçen gün daha çok çalışılmaktadır. Son yıllarda, birçok yeni immün temelli impedimetrik biyosensör tasarımına ilişkin çalışma yayınlanmıştır.

Ma ve ark.(1999) insan meme kanserine ilişkin glikoproteininin tayinine yönelik bir impedans immunosensörü çalışması yayınlamışlardır. Antikor, altın elektrot yüzeyine kendiliğinden adsorbsiyon yöntemi ile immobilize edilmiştir. Elektrokimyasal

karakteristiklerdeki değişim, spesifik antijen bağlandığı sürece gerçeklemiştir. Nyquist eğrisindeki yarım daireden hesaplanan yük transfer direnci, kararlı bir antijen-antikör kompleksi oluştuğundan dolayı artmıştır.

İletken polimerler de biyomoleküllerin immobilizasyonu için iyi birer matrikstir. **Sargent ve Sadık (1999)**, iletken polipirol (PPy) film üzerindeki antikör-antijen (Ab-Ag) etkileşimlerinin mekanizmasını araştırmışlardır Heterojen polimerik arayüzey içerisindeki yük oluşumunun ve taşınımının teorisi, Ab-Ag bağlanması sırasında oluşan akım akışını açıklamak için öne sürülmüştür. Bu mekanizmaya göre, antikör immobilize edilmiş iletken polimer temelli elektrotlarda elde edilen akım, dört adımda ortaya çıkar: (1) iyonların elektroda difüzyonu (2) porlu PPy/membran arayüzeyinde yük transferi, (3) polimer PPy membran boyunca göç (4) Antijenin PPy arayüzeyinde adsorpsiyonu veya desorpsiyonu. Dördüncü adımdaki adsorpsiyon ve dezorpsiyon süreci, hız sınırlayıcı adımdır. Bu adım uygun elektriksel potansiyel seçimi ile kontrol edilebilir. Bu da Ab-Ag etkileşiminin, uygulanan potansiyelden büyük ölçüde etkilendiğini göstermektedir.

Elektrobiriktirme ile oluşturulmuş biyotinli polipirol film, impedimetrik immunosensörler için bir immobilizasyon matriksi olarak tanımlanmıştır (**Ouerghi ve ark. 2002**). Biyotinlenmiş antikör (anti Human IgG) iletken polimer üzerindeki serbest biyotin gruplarına avidin vasıtasıyla bağlanır. Aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi, Nyquist eğrilerindeki ikinci yarım daire çapı, özellikle de konsantrasyon bağımlı impedans ölçümlerinde tercih edilen düşük frekanslarda, artan antijen konsantrasyonu ile artmıştır. Bu immobilizasyon yöntemi tekrarlanabilir ve kararlı bir sisteme olanak sağlamaktadır. Biyosensörün doğrusal aralığı 10-80 ng/mL antijen ve dedeksiyon limiti 10 pg/mL'dir.

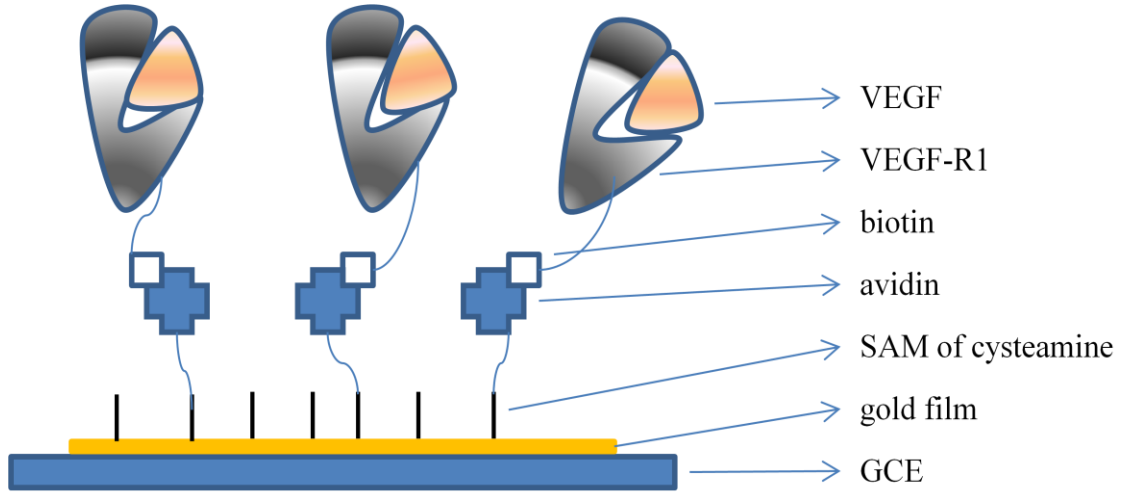


Şekil 1.11. Bir antikor ile modifiye edilmiş elektrodun, antijensiz ve antijen ilave edildikten sonra elde edilen kompleks Nyquist diyagramları (**Ouerghi ve ark. 2002**)

Başka bir polipirol immobilizasyon matriksi kullanılan çalışma da, Geoffrey ve ark.(2001) tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada impedans temelli reaktifsiz biyoaffinite biyosensörü geliştirmiştir. Antikor-yüklenmiş polipirol filmlerde, düşük frekanslarda polaronik iletim ve yüksek frekanslarda elektriksel iletim olmak üzere iki tane yük transfer prosesi gözlenmiştir. Affinite reaksiyonu Bode eğrisinde hiçbir farklılaşmaya sebep olmamıştır. Ancak, Redoks döngüsü (-0,1'den -0,9'a ve -0,9'dan -0,1'e) olduğunda, pik polaronik faz açısı olarak gözlenen muhtemel bir bağlanmaya bağlı cevap oluşur. Bu sonuç, bağlanma sonrasında protein etrafındaki polimer zincirin tekrardan sıralanmasına dayandırılmaktadır. Bu nispeten karmaşık bir prosestir.

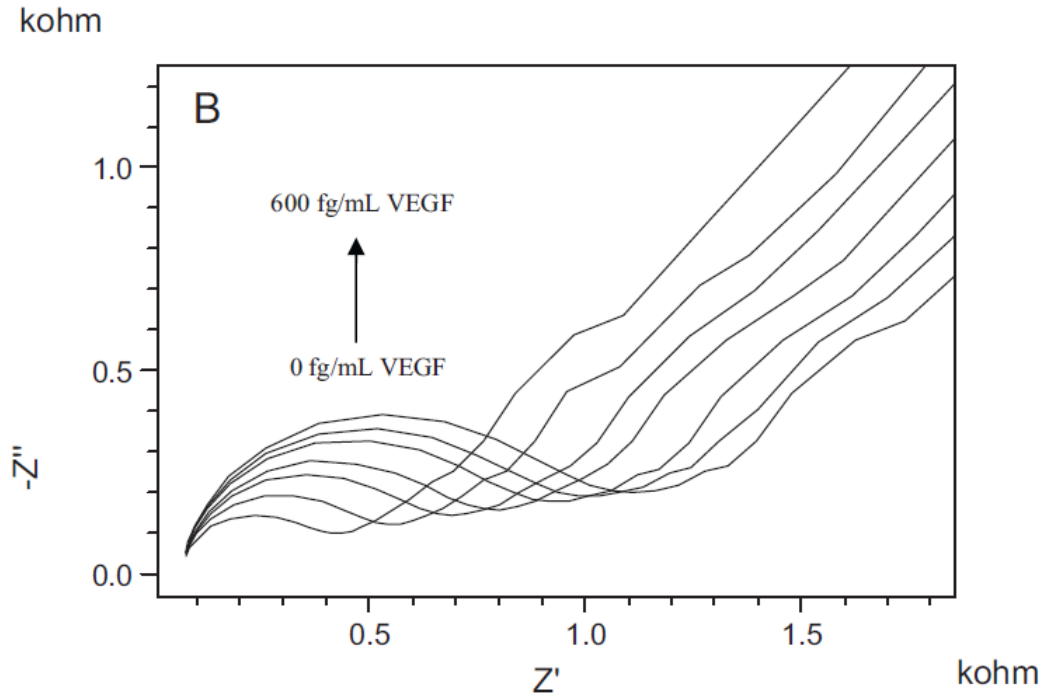
Protein çoklu tabakalar da, redoks probu varlığında impedans spektroskopisi ile araştırılmışlardır (şekil 1.12). Bu prensibin kullanıldığı bir çalışmada, özellikle meme kanseri biyomarkeri olarak değerlendirilebilen, vaskular endotelial büyüme faktörü (VEGF) tayini gerçekleştirilmiştir (**Uygun ve ark. 2011**). Tabaka-tabaka oluşturma yöntemiyle hazırlanmış çoklu tabaka film, bir altın tabaka üzerinde biyotin-işaretli antikor (bio-Ab) ile avidinden oluşmuştur. Multitabakaların adım adım oluşumu sırasında impedans spektrumundaki belirgin bir farklanma gözlenmiştir. Sensör yüzeyine ilave edilen her tabaka, kendi elektriksel

özelliklerine bağlı olarak elektron transfer rezistansını değiştirmektedir. Bu adımların sonunda biyo-reseptörün ve onun ligandının (VEGF) bağlanması R_{ct} değerini artırmıştır.



Şekil 1.12. Çok tabakalı biyolojik reseptör immobilizasyon adımlarının şematize edilmiş hali (Uygun ve ark. 2011)

Böyle bir sistemde artan VEGF derişimlerine karşı elde edilen biyosensör yanıtları (Nyquist diyagramında) aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

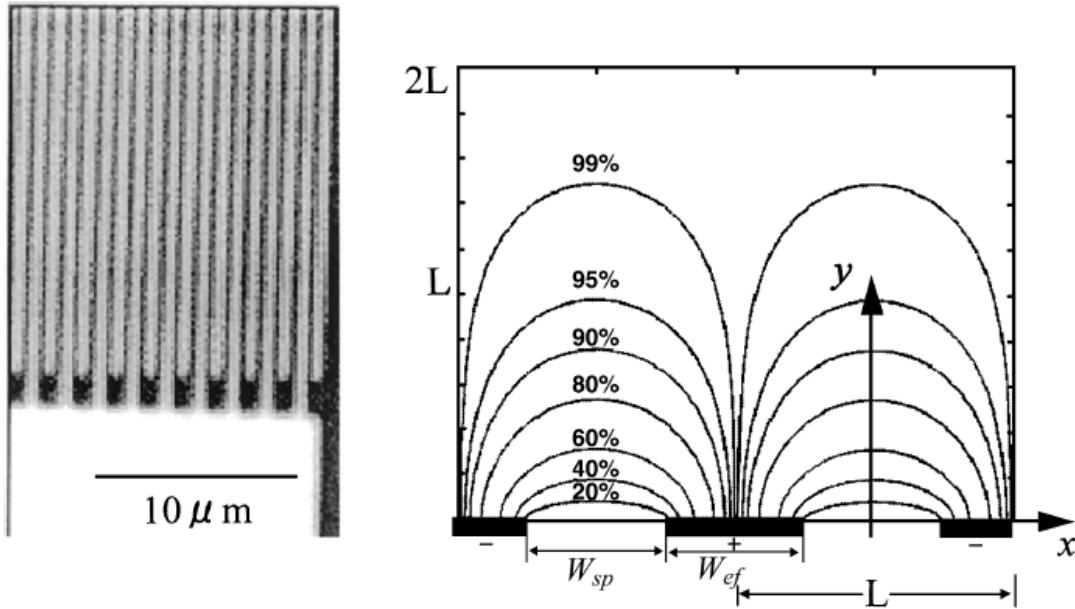


Şekil 1.13. Artan VEGF konsantrasyonlarına karşı elde edilen kompleks impedans spektrumlarının gösterilmesi(Uygun ve ark. 2011)

İmpedans spektroskopisi, ISFET cihazlarının gözenekli yüzeyleri üzerindeki biyomateryal tabakalarının yapısını karakterize etmek ve oyuk ara yüzeyindeki antijen-antikor etkileşimlerini açıklamak için de kullanılır (Kharitonov ve ark. 2001). ISFET cihazlarının oyuk ara yüzeyleri üzerindeki protein tabakalarının kalınlığını karakterize edebilme yeteneği impedans spektroskopisinin sadece yapısal karakterizasyonlara olanak sağlamadığını, aynı zamanda ISFET oyukları üzerinde gerçekleşen biyo algılama olaylarını ölçen ve saptayan bir analitik yöntem olduğunu göstermektedir.

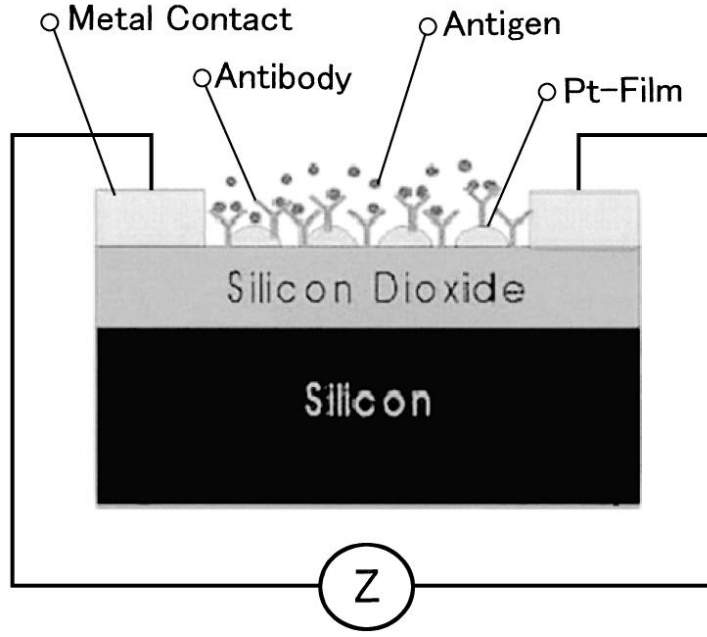
Nano boyutlarda sensör geliştirmek, impedimetrik biyosensörlerin cevap performansını arttırabilir. Van Gerwen ve ark (1998). Nano boyutta kenetlenmiş (interdigitated) elektrot arrayleri ile impedimetrik biyosensörler geliştirmişlerdir (Şekil 1.14) Bu sistemde 500 den 250 nm ye kadar değişen elektrot genişliği ve boşlukları elde edilmiştir. Nano boyutlardaki elektrotlar, yüzeyden sadece 100 nm yukarıdaki bir alanı tararlar. Bundan dolayı diğer elektrotlara kıyasla duyarlılıkları daha fazladır. Bu etki teorikte, interdigitated elektrotlar arasındaki elektriksel alanın hesaplanması ile değerlendirilebilir. Örneğin genişliği ve aralıkları 250 nm olan elektrotlar için akımın %80'i yüzeyden 250 nm daha yüksek olmayan

bir tabakaya yayılır. Farklı KCl çözeltilerindeki model ve karakterizasyon çalışmaları, impedansın nerdeyse tamamının yüzeye yakın bir süreçte hesaplandığını ve çözelti karakteristiklerinin sinyalde gözükmediğini göstermiştir. Biyomoleküler yapıların, affinite bağlanmalarının impedans ile saptanması için, glukoz oksidaz silanlanmış bir yüzeye bağlanmıştır.



Şekil 1.14. IDE'nin SEM görüntüsü ve IDE'nin hesaplanan akım kapasitesi (Van Gerwen ve ark. 1998)

Silanlama sonrasında, sensörün çift tabakalı impedansı, bir sabit faz elemanı ile gösterilir. Bu parametrenin ölçümü GOD immobilizasyonunun in situ izlenmesini kolaylaştırmaktadır. Nano boyuttaki platin tabaka temeline dayanan yeni bir immüno-biyosensör Pak ve ark. (2001) tarafından geliştirilmiştir.



Şekil 1.15. Ultrince platin film immunosensörün şematik gösterimi (Pak ve ark. 2001)

Film 25 Å kalınlığında tabakalardan oluşmuş ve 20-30 Å kalınlığında aralıklı kanallar içermektedir. Monoklonal antikorlar sensör yüzeyine, silanizasyon yardımıyla immobilize edilmişlerdir. Bu çalışmada, film boyunca sabit frekansta ölçülen impedans değerleri, modifikasyon ve yüzeye bağlanmayı ölçmek için kullanılmıştır. 20 Hz'deki impedans, yüzeyin anti-alkalen fosfataz ile (anti-AP) aktivasyonu süresince % 55 artmıştır. Devamında Alkale fosfatazın bağlanması da %12'lik bir artışa sebep olmuştur.

Katz ve ark (2001) tarafından dedeksiyon için yeni konsept bir impedimetrik biyosensör geliştirilmiştir. Çözünmeyen bir maddenin, elektrot yüzeyinde biyokataliz ile çöktürülmesi, immünosensörler için önemli bir prensiptir. Çöktürme prosesini takiben, faradaik impedans spektroskopisi ve kronopotansiyometri yöntemleri kullanılır. Bu çalışmada, elektrot yüzeyine, dinitrofenil antikorunun tayinine için, spesifik bir antijen immobilize edilmiştir. Enzim reaksiyonu sonucu oluşan çözünmeyen ürünü oluşturmak için, Antikor-HRP konjugatı biyokatalist olarak kullanılmış ve uygulanmıştır. İmpedans analizleri, çözünmeyen maddenin elektrot yüzeyinde çöktüğünü ve elektron transferine engel olan yalıtkan bir tabaka oluşturduğunu, bunun da elektron transfer direncini arttırdığını çok net bir şekilde göstermektedir.

Biyolojik reseptörlerin biyosensörlerde kullanımının, biyolojik maddelerin düşük kararlılığı, küçük antijenlerin immünizasyonunun zorlukları ve düşük kimyasal-termal kararlılıklar gibi iyi bilinen sınırlayıcı faktörleri vardır. Bundan dolayı doğal reseptörleri taklit edebilen, yapay resptörlerin geliştirilmesine yönelik yeni eğilimler ortaya çıkmaya başlamıştır. Moleküler baskılanmış polimerler (MIPs) kararlı ve dirençli, ekstrem basınç, sıcaklık, pH altında veya organik solventler içerisinde kolaylıkla uygulanabilen materyallerdir. MIP ler analitin “negatif”i yönünde davranan bir yüzey sağlarlar ve böylelikle karışımın içindeki analit belirlenir. Kimyasal yapılarından ötürü, farklı formatlarda tekrar üretilebilirler ve farklı çevresel koşullarda uzun zaman stabil kalabilirler. Kromatografik ayırmalarda kullanılmalarının yanı sıra, sensör uygulamalarına dair de ilginç çalışmalar mevcuttur. İnce yüzey filmleri özellikle bağlanma olayının impedimetrik transdüksiyonuna çok uygundur. Bu sayede, hücre ve virüslerde olduğu gibi organik moleküller için de kapasitif sensörler geliştirilmiştir. Ayrıca ucuzdurlar ve katı (kuru) halde saklanabilirler. MIPs sadece pestisit, aminoasit, steroid ve şekerler gibi organik moleküller için değil; hücre ve proteinler için de sentezlenebilirler (**Andersson ve ark. 2000**). **Panasyuk-Delanet ve arkadaşları 2001** yılında. MIP temelli bir biyosensör geliştirmişlerdir. Bu çalışmada bir herbisit olan desimetrin kalıp olarak kullanılmıştır. UV ışığa maruz kalan Benzofenonun ışığı adsorblamış tabakası, yüzeye yakın bölgede radikal polimerizasyonunu başlatır. Elektrotların, desimetrini spesifik bir şekilde tanıyan ve bağlayan MIP ile kaplanması, elektrodun kapasitansında düşmelere sebep olur. Terbumeton veya atrazin eklendiğinde kapasitansta küçük bir düşme varken, metribuzin eklendiğinde desimetrininkine benzer bir düşüş gözlenir. Moleküler baskılama (kalıp polimerizasyonu) ümit vadeden ve pahalı olmayan bir alternatif yöntemdir. Ancak analitlerin ince MIP içerisine yavaş difüzyonu, yavaş reaksiyon kinetiğinin oluşmasına sebep olur.

1.7.3 Nükleik Asit Temelli İmpedimetrik Biyosensörler

Nükleik asitlerin impedimetrik yolla belirlenmesi de bu alanda gerçekleştirilen araştırmalar arasındadır. ssDNA ve dsDNA ayrımı damlayan civa elektrot ile belirlenmiştir (**Hason ve ark. 2002, Strasak ve ark. 2002**). Hibridizasyonun voltammetrik analizi için pek çok sayıda çalışma mevcuttur.

Elektrot yüzeyinde ss- veya ds-DNA'nın bulunması durumunda, farklı moleküler yapılar, farklı spektroskopik ve mikroskopik yöntemlerle tayin edilmiştir. Bu durum, oligonükleotit konsantrasyonunun ve baz çifti uyumsuzluklarının impedimetrik yöntemle belirlenmesinin temelini oluşturmaktadır. Özellikle DNA tayininde, hibridizasyon boyunca meydana gelen

yük birikimi, redoks aktif bir maddenin dönüşümünü gerçekleştirmek için kullanılmıştır. Bu tür biyosensörlerde hassasiyeti modifiye etmek için interkalasyon kullanılabilir. Prob DNA'nın yüzey konsantrasyonu, sensör performansında önemli bir etkiye sahiptir. Performans, dendrimerlerin kullanılmasıyla da kuvvetli bir şekilde artırılabilir. Polielektrolit ile modifiye edilen Screen-printed elektrotların da bu çalışmalar için bir alternatif olduğu ve tanıyıcı moleküller olarak ss-PCR ürünleri ile birlikte kullanıldığı da gösterilmiştir. Bu alanda, kapasitif ölçümlerin, direnç temelli metotlara göre daha düşük hassasiyette olduğu bulunmuştur (**Xu ve ark. 2006, Li ve ark. 2007, Davis ve ark. 2007**).

DNA analizinde önemli bir nokta, tek baz çifti yanlış eşleşmelerin belirlenmesidir. İmpedans spektroskopisi bu alanda da kullanılmaktadır (**Cho ve ark 2006**). Transdüksiyon yöntemleri, ligasyon(bağlanma) gibi spesifik biyokimyasal protokollerle kombine edilebilir. Yani, sensör yüzeyindeki farklı DNA yapılarını (B- veya M-DNA konformasyonları gibi) impedimetrik olarak analiz etmek mümkündür ki bu oldukça ilginç bir uygulama alanını da ortaya çıkaracaktır (**Long ve ark. 2003**).

Benzer şekilde, iletken polimerler kullanılan sensörlerde, prob DNA , hedef DNA bağlanması sonrasında ara yüzeydeki değişikliklerin belirlenebilmesi için bu tip polimer filmlere bağlanabilir. Bu durumda, dirençte bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca doymamış yan zincirleri olan fonksiyonel polipirol türevlerinin sensör uygulamalarında üstün olduğu gösterilmiştir (**Li ve ark. 2005, Wang ve ark. 1999**).

Elektropolimerizasyon yöntemi, DNA'nın mikroelektrotlara immobilizasyonunda ve bu sayede *array* üretiminde çok uygun bir metottur. Polipirole alternatif olarak, kinon içeren polimerler de geliştirilmiştir (**Li ve ark. 2005**).

DNA-DNA bağlanmasının belirlenmesinin yanı sıra impedans tekniği DNA-analit etkileşimlerinin analizinde de kullanılmaktadır. Pek çok küçük organik molekül ve büyük proteinler DNA ile spesifik etkileşim meydana getirirler. Bu sayede bu maddelerin analitik tayini mümkün olmaktadır. Cisplatin ve mitramisin'in protein bağlanması, spesifik DNA-protein bağlanmasına örnek olarak verilebilir. Aptamerler, algılama moleküllerinin yeni bir sınıfı olarak karşımıza çıkmakta ve impedimetrik transdüksiyon ile kombinasyonu, çok sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (**Radi ve ark. 2006, Cai ve ark. 2006, Rodriguez ve ark. 2005, Zayats ve ark. 2006**).

Aşağıda EIS temelli bazı nükleik asit biyosensör örnekleri açıklanmıştır.

Damlayan civa elektrot, nükleik asitlerin ve sentetik polinükleotidlerin tek iplikli ve çift iplikli konformasyonları arasındaki konformasyon farkını algılamak için kullanılmıştır (**Strašák ve ark. 2002**). Elektrot çift tabakasının impedansının, frekans bağımlılığı kompleks

bir impedans eğrisi göstermesinden dolayı, DNA kaplı elektrodun elektrik eşdeğer devre modeli belirlenebilir. Denatüre ss-DNA'nın desorbsiyonu, ds-DNA'nın desorbsiyonuna nazaran daha yüksek bir dielektrik kayıba neden olur. Bu ss-DNA'nın, ds-DNA'dan daha esnek olması ile açıklanır. Çift iplikli ve tek iplikli DNA'yı AC impedans spektroskopisi ile karakterize etmek için sıklıkla elektroaktif indikatörler kullanılır.

Zhao ve ark.(1999) çıplak altın elektrodun, ds-DNA/Au ve ss-DNA/Au elektrotlarının $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ çözeltisi içerisindeki impedans spektrumlarını araştırmışlardır. Sonuçlar $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ 'nın, dsDNA ve ssDNA ile olan etkileşimlerinden dolayı, DNA modifiye elektrotlarda biriktiğini ve DNA'nın altın yüzeylere adsorpsiyonla bağlanabildiğini göstermektedir. Ferrrosen hekzafloro fosfat (FcPF6) da başka bir çalışmada elektroaktif indikatör olarak kullanılmıştır (**Ye ve ark. 2003**). Tek iplikli hepatit B virüsü (HBV) DNA'sı, tiyoglikolik asit (TGA) kendiliğinden oluşan tek tabakasının karboksil grubu ile ester bağı yapılması yoluyla altın elektrot yüzeyine immobilize edilmişlerdir. Yüzeydeki Fc^+ 'nın, ss-DNA ve ds-DNA etkileşiminin ispatı olan immobilizasyon ve hibridizasyon reaksiyonları, AC impedans spektroskopisi ile izlenmiştir. FcPF6 ile HBV'nin elektrot yüzeyine immobilize edilen ss-DNA veya ds-DNA'ları arasındaki etkileşim mekanizmasının, tahmin edileceği üzere elektrostatik olduğu bulunmuştur.

Brett ve ark (1999) elektrot yüzeyindeki DNA üçlü heliks oluşumunu, bir impedimetrik teknik ile karakterize ederek tanımlamışlardır. Immobilize ds-DNA içeren camı karbon elektrot, ss-DNA içeren bir çözeltiliye daldırılıp 0,0 veya +1,4 V potansiyel uygulandığında, ss-DNA göçü meydana gelir. Ds-DNA ve ss-DNA arasındaki etkileşim, DNA konformasyonunda modifikasyonlara sebep olur. Çözeltideki ss-DNA ile yüzeye bağlı ds-DNA arasındaki etkileşimin, elektrot yüzeyinde üçlü heliks DNA yapılarının oluşmasını sağlaması muhtemeldir. Bu durum, impedans ve voltammetrik veriler ile desteklenmiştir.

Yüzey-aktif (surfaktan) moleküllerden oluşmuş çift tabakalı lipid tabakalar (BLMs) doğal hücre membranları ile biyouyumludurlar. Altın elektrot yüzeyinde kendiliğinden oluşan yüksüz surfaktan Brij-52 membranları çok kararludur ve affinite etkileşimlerinin saptanmasında impedimetrik transduser olarak kullanılabilirler (**Vagin ve ark. 2002**). Yüzey aktif çift tabakanın hidrofobik bölgesine, oligonükleotid pentadecatimidilat (dT15) bağlı bir hidrokarbon zincirinin girişi veya çift tabaka yüzeye antikor adsorbsiyonu ile antikor veya oligonükleotidlerin immobilizasyonları gerçekleştirilir. Spesifik DNA eşlenmesi impedansın reel bölümünde bir düşüşe ve antikor-antijen etkileşimleri de yine real kısımda bir yükselmeye sebep olur. Bundan dolayı, modifiye oligonükleotidlerin, hidrokarbon zincirlerinin iç kısımlarında sebep olduğu lokal bozulmalar, membran direncinde azalmaya

neden olur. Aynı zamanda, elektrot yüzeyindeki, yüzeyler arası tabakanın kalınlığını arttıran antijen bağlanması, iyon geçişini engeller. Bu etki impedansın reel kısmını artırır. Sonuçlar klinik analizler veya çeşitli çevresel kirliliklerin saptanması için tasarlanmış impedimetrik affinite biyosensörlerinin geliştirilmesini kolaylaştırabilir.

Hipoksantin ve inosin-5-fosfat üzerine elektrokimyasal çalışmalar, elektrot yüzeyindeki pürin bazlarının ve pürin nükleozidlerinin oksidasyon mekanizmasının ve adsorpsiyonunun anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Bu alanda artan bilgiler DNA biyosensörlerinin geliştirilmesine ve zehirli bileşiklerin, DNA'ya nasıl hasar verdiğinin anlaşılmasına yardım etmiştir. Hipoksantin için gerçekleştirilmiş bir impedans spektroskopisi çalışmasında, hipoksantin oksidasyonuna karşılık gelen potansiyelde, düzgün, karakteristik yarım daireler elde edilmiştir (**Oliveira-Brett ve ark. 2003**). Oksidasyon bölgesinde bir potansiyel uygulandığında, R_{ct} başlangıç değerine göre üç kat artmıştır. Ancak açık devrede R_{ct} de küçük bir artış olur. Bu durum, adsorpsiyonun spontane olmadığını ve adsorpsiyon için bir potansiyel uygulamasının da gerekli olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı buradaki adsorpsiyon, oksidatif proses ile ilişkilendirilebilmektedir. Adsorblanan türler, oksidasyon sonucu oluşan elektroaktif oligomer ürünlerdir ve bunlar elektrot yüzeyini bloke etmişlerdir. Bu çalışmada oksidasyon mekanizmasının aydınlatılması, sulu ortamda bu maddelerin tayin edilmesine olanak sağladığı gibi, impedans spektroskopisinin elektrot proseslerinin aydınlatılmasında da kullanılabilceğini ortaya koymuştur.

1.7.4 Hücre ve Mikroorganizma Temelli İmpedimetrik Biyosensörler

Maddelerin biyolojik etkilerini geniş bir alanda gözlemlemek ve spesifik analitlerin tayini için hücre temelli analizlerde son zamanlarda hızlı bir artış vardır. Herhangi bir hücre ya da mikroorganizma durumunda, tüm biyolojik sistemin cevabını rapor edebilecek parametrelere ihtiyaç duyulur. İmpedans bu parametrelerden biridir; çünkü metabolik aktivite, yüzeydeki hücre adezyonu, potansiyel ilaçlardan alınan yanıt ve sitotoksitite testlerinin indirekt analizinde kullanılabilir (Hug ve ark. 2003, Yotter ve ark. 2004). Hücre kültüründe veya tek bir hücreye ait çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin, insan kolon kanseri HT-29 hücre şeklinin apoptosiz indüklü değişiklikleri bu şekilde araştırılmıştır (Yin ve ark. 1996).

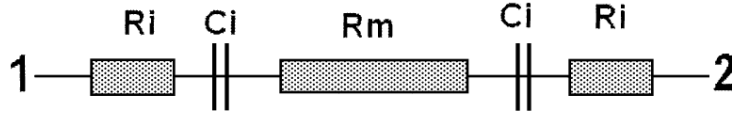
İmpedans, sadece yüzeyde sabit hücreler hakkında bilgi edinmek için değil aynı zamanda çözeltideki hücrelerin sayısını belirlemek için de kullanılır. Bu yöntemin yoğun bir şekilde, mikrobiyolojide bakterilerin tanımlanmasında, sayımında ve belirlenmesinde kullanıldığı gösterilmiştir. İmpedans ayrıca, spesifik bakteriyal hücreler, antikorlar ve bakteriyofajlar için

de kullanılabilir. İmpedimetrik analiz lösemi hücrelerin belirlenmesinde de kullanılmıştır (Jonsson ve ark. 2006, Yang ve ark. 2006, Maalouf ve ark. 2007, Silley ve ark. 1997).

Aşağıda EIS'nin kullanıldığı, bazı hücre ve mikroorganizma temelli biyosensör örnekleri açıklanmıştır.

Elektrokimyasal impedansın mikrobiyoloji alanında genel uygulaması mikroorganizmaların tayin edilmesi ve tanımlanmasıdır (Felice ve ark. 1999). Mikrobiyal büyümeler sonucu elde edilen impedans ölçümleri, mikrobiyal büyümenin hızlı ve düzenli takibine olanak sağlamaktadır. Aşağı yukarı $1 \times 10^3 - 3 \times 10^7$ hücre/mL, impedans eğrilerinde saptanabilir bir değişim üretebilir (Madrid ve ark. 1999).

Bakteriyel büyüme süresince elektrot-elektrolit ara yüzeyinin teorik analizi, birçok bilim adamı tarafından çalışılmıştır. İmpedans mikrobiyolojisinin temel prensibi şekil 1.16 da gösterilmiştir. Burada iki elektrot arasındaki impedans bir seri devre ile modellenir. Devre modeli; ortam iletkenliğini (G_m), ara yüzey iletkenliğini (G_i), her elektrodun kapasitansı (C_i) ve toplam iletkenlik (G) yi kapsar. Genel anlamda C_i elektrot-elektrolit arayüzeyinin çift tabaka kapasitesini göstermektedir.



$$|Z_{1,2}| = \sqrt{(R_m + 2R_i)^2 + (1 / \pi \cdot f \cdot C_i)^2} \quad R = R_m + 2R_i$$

Şekil 1.16. İki elektrot arasındaki elektriksel devre modeli (Madrid ve ark. 1999)

Mikroorganizma büyümesi boyunca oluşan metabolik ürünler, ortamın bileşimini değiştirir, bununla birlikte iyonik içeriğin de farklılaşması, kültür ortamının iletkenliğinin değişmesine sebep olur (Cady ve ark. 1978). Ayrıca değişimler elektrot-elektrolit arayüzeyinde de

gerçekleşir. İmpedimetrik tekniklerle izlenebilen bunun gibi modifikasyonlar canlı mikroorganizma konsantrasyonu ile orantılıdır.

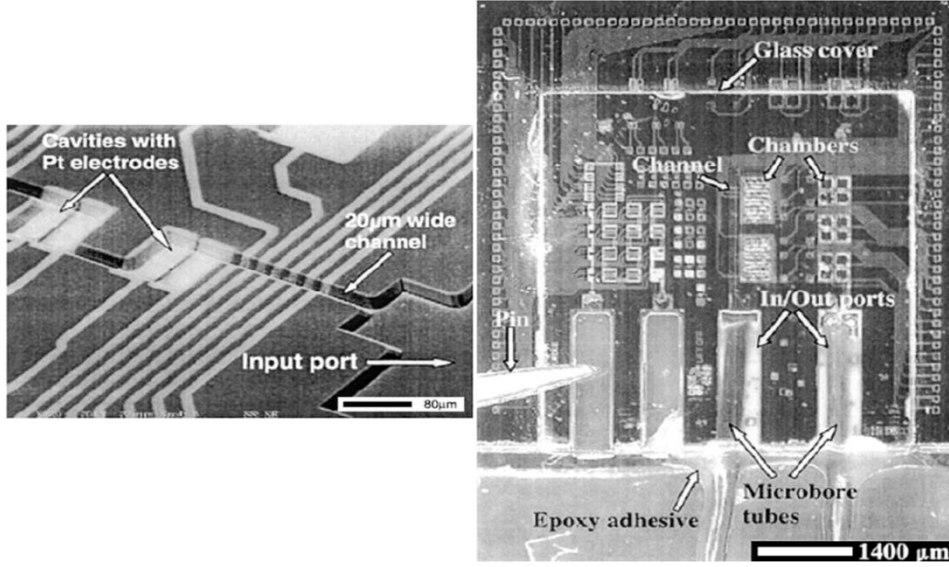
Mikroorganizma temelli impedimetrik biyosensörler, mikroorganizmaların günlük ürünler ve süt içerisinde saptanması ve tayin edilmesinde kullanılmaktadır. **Cady (1978), Gnan ve ark. (1982)** sütün mikrobiyal içeriğinin hızlı izlenmesi için petri'deki m/o saymasına alternatif bir impedimetrik yöntem geliştirmiştir. Bundan sonra, günlük ürünler için, Bactomer, Malthus System ve BacTrac gibi birçok ticari sistem geliştirilmiştir. Ayrıca balıkta, ette, şarapta, meyve suyunda ve içilebilir sudaki toplam mikroorganizma sayısını izlemeye yönelik impedimetrik teknikler de geliştirilmiştir (**Pirovano ve ark. 1995, Neaves ve ark. 1988, Flint ve ark. 2001, Van Sprecken ve ark. 1986, Russell ve ark. 1994, Henschke ve ark. 1988, Deak ve ark. 1993, Colquhoun ve ark. 1995, Depaola ve ark. 2001**).

Endotelial tek tabakaların elektriksel impedansları, dinamik akış şartları altında Depaola ve ark. Tarafından araştırılmıştır (**Wegener ve ark. 2000**). Tek tabakaların impedanslarındaki farklılıklar, endotelial hücre morfolojisi ve fonksiyonundaki değişimlerle doğru orantılıdır. Bu sonuçlar endotelial tek tabakaların impedansının, hücre tabakasındaki işlevsel ve/veya morfolojik değişimlerle dinamik olarak değiştiğini göstermektedir.

İmpedansın yeni bir uygulaması da memeli hücresi ile yapay yüzeyler arasındaki etkileşimlerin incelendiği, hem bilimsel hem de medikal açıdan çok önemli bir çalışmadır. ECIS olarak bilinen yöntem, petri kabı üzerine biriktirilmiş küçük bir altın elektrodun AC impedansındaki değişmelerin ölçülmesi esasına dayanır ve bir büyüme substratı olarak kullanılır. Bu yöntem memeli hücrelerinin gerçekte yayılmasının ve yapışmasının sayısal olarak izlenmesinde kullanılır. Epitelial MDCK hücrelerinin farklı protein kaplamaları üzerindeki yapışması ve yayılması Wegener ve ark. Tarafından bulunmuştur (**Gómez ve ark. 2001**).

Biyochip veya lab-on-a-chip, biyolojik türlerin işlenmesi için kullanılan mikro ölçüde üretilmiş cihazlardır. Bunlar biyosensörler için en cazip araştırma alanı haline gelmiştir.

Gomez ve ark.(1992), mikroorganizmaların impedans spektroskopisi için mikroelektronik bir biyochip fabrikasyon ve karakterizasyonu geliştirmişlerdir



Şekil 1.17. IDE temelli biyoçip'in kanallarının SEM görüntüsü ve bir mikro akışkanlı biyoçip'in resmi (Bresler ve ark. 1992)

Geliştirilen cihaz akışkan kanallar, düzlemsel akışkan arayüzey portlar, entegre metal elektrotlar ve cam bir kapaktan ibarettir. Toplam akışkan yol hacmi yaklaşık 30 nanolitredir. Biyoçip içerisine enjekte edilen canlı bir mikroorganizma (*Listeria innocua*) süspansiyonu için alınan elektriksel impedans ölçümleri, bakteri hücrelerinin canlılığının saptanması için kolay bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriyel metabolizmanın sebep olduğu iyonik şiddetteki değişim, düşük iletkenlikteki süspansiyon ortamının elektriksel karakteristiklerini çok ciddi bir şekilde farklılaştırmaktadır.

1.8 Kanser Teşhisi İçin Biyomarkerler

Biyomarkerler, normal, normal olmayan ya da basit biyolojik proseslerle gerçekleşen hücresel, biyokimyasal ya da moleküler değişikliklerdir. Bunlar, tedavi sonucu biyolojik prosesleri, patolojik prosesleri ya da farmakolojik yanıtları ölçme ve değerlendirmede kullanılmaktadırlar. Kanser araştırması ve tayininde bir biyomarker kanserin vücutta olduğunu belirtir. Biyomarker miktarları biyolojik dokuda, hücrede ya da sıvıda tayin edilebilir. Görüntüleme ücretini en aza indirebilmek ve faydayı en yüksek miktarda tutabilmek için biyomarkerler serum, üre ve tükürükte de ölçülebilmektedirler. (a) genomik, proteomik ve epigenomik biyomarker örnekleri tablo 1.2' de verilmektedir.

Tablo1.2. Kanser tayinindeki biyomarkerler: Farklı yaklaşımların kullanımı

Types of biomarker	Approach	Reference
Genomic		
ERBB2, IGF2BP2 (synovial sarcoma)	Microarray analysis	4
Microsatellite instability (bladder, head and neck cancer)	Nucleotide sequencing, SNP array	5,6
Long DNA (colon cancer)	Gel electrophoresis	7
Mitochondrial DNA mutation (bladder, head and neck, kidney, lung)	Nucleotide sequencing	3
Proteomic		
Protein profile (prostate cancer)	SELDI	8
Protein profile (ovarian cancer)	SELDI	9
Haptoglobin-alpha subunit (ovarian cancer)	SELDI and protein electrophoresis	10
pGP9.5 (lung cancer)	Two-dimensional gel electrophoresis	11
Mammaglobin (breast cancer)	Two-dimensional gel electrophoresis	12
CA125, Osteopontin, Prostatin (ovarian cancer)	Gel electrophoresis, Immunoprecipitation	17
Galectin-3 (colon cancer)	Protein electrophoresis	17
Des-gamma carboxy-prothrombin (liver cancer)	Protein electrophoresis	13
Epigenomic		
APC, CDH1, DAPK, TIMP-3, GSTP1, MGMT, p16, RAR (breast, esophageal, cervical, colon, head and neck, kidney, lung, prostate cancer)	Methylation analysis	14–16

Kanser biyomarker teknolojisi, oldukça üretken, yeniliğe açık, kullanım alanları yeniliğe açık teknolojiler içeren bir alandır. Buna karşın biyomarkerlerin keşfinden kullanılabilirliğine kadar geçen süre oldukça yavaş ve dolayısıyla bir biyomarkerin kanser teşhisinde kullanılabilirliğine kadar geçen süre oldukça uzundur. Bunun yanı sıra sınırlı sayıda biyomarker kanser tayininde kullanılabilir. Bir biyomarkerin laboratuvar ortamında belirlenip klinik ortamda kanser tayininde kullanılmasına kadar geçen süre beş farklı adımdan oluşmaktadır.

Bunlardan “keşif adımı” olarak da geçen ilki, potansiyel olarak uygun biyomarkerlerin belirlenmesi aşamasıdır. Bu aşamada normal hücre ile tümörlü hücrelerin protein

ekspresyonları karşılaştırılarak baskılanmış ya da yok edilmiş oldukları tespit edilir. İkinci aşama “doğrulama” aşamasıdır. Bu aşamada ilk basamakta elde edilen çıplak protein alınarak diğer bir örnekten elde edilmeye çalışılır. Üçüncü aşamada dokulardan elde edilen biyomarkerlerin kanser teşhis etme kapasiteleri ölçülür. Dördüncü aşamaya gelindiğinde biyomarkerin kanseri erken teşhis edip edemediği ölçülür. Bu ölçümlerin spesifikliğı ve tekrar edilebilirliğı oldukça önemlidir. Ve son aşama olarak biyomarkerin insanlar üzerinde işe yarayıp yaramadığı test edilir.

Bir biyomarker için en önemli iki özellik seçiciliğı ve hassaslığıdır. Hassaslık, kanser hastalarının tümünü içeren bir parametredir. Seçicilik parametresi ise kanserli hastayı sağlıklı hastadan ayıran ve tüm insanları içeren bir parametredir. İdeal bir biyomarker, %100 hassaslığa ve seçiciliğe sahip olmalıdır. Bu çalışmada HER3 (Human Epidermal Growth Factor) biyomarkeri kullanılarak biyosensör tasarlanmıştır.

HER ailesi, hücre yaşamında, hücre çoğalmasında, birleşme ve ayrılmasında önemli rol oynamaktadır. Tirozin reseptör kinaz HER ailesi, dört alt transmembran reseptöründen oluşurlar. Bunlar HER1 (EGFR ya da *c-erbB1*), HER2 (HER2neu ya da *c-erbB2*), HER3 (*c-erbB3*), ve HER4 (*c-erbB4*) (**Arteaga ve ark. 2002; Berchuck ve ark. 1990, Tovey ve ark. 2004, Witton ve ark. 2003, Woodburn ve ark. 1999**). Ailenin bu üyelerinin hepsi hücre dışı ligand bağlanma domaini, transmembran domaini ve sitoplazmik tirozin kinaz domaini içerirken HER3 bunları içermez (**Arteaga ve ark. 2002, Woodburn ve ark. 1999**).

HER3 proteini erişkin bir insanda ve hasta dokularda bulunur ve birincil tümör materyali ve tümörlü hücre dizilerinde mRNA ve protein düzeyinde yer alır (**Lemoine ve ark. 1992, Rajkumar ve ark. 1993**).

HER3 tayin yöntemlerinin arasında ELİSA (enzyme linked immuno assay) testi (**Hsieh ve ark. 2011**), imminohistokimyasal testler (**Hilbe ve ark. 2003**), ve Western Blot (**Göstring ve ark. 2012**) gösterilebilir. Son zamanlarda elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), döngüsel voltametrinin (CV) yardımı ile tanımlama, biyosensör geliştirme ve üretiminde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, yüzeyi SAM (self assembled monolayer) ile modifiye edilmiş altın elektrot yüzeyini daha da genişletebilmek için altın nanopartiküller kullanılmıştır. Anti-HER3 immobilizasyonu için ise glutraldehit kullanılarak çapraz bağ oluşumu sağlanmıştır. İmmobilizasyon adımları ise CV ve EIS ile izlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal:

Deneyde kullanılan tüm cihazlar ve HER3 ile anti-HER3 Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA)' den alınmıştır. Tüm seyreltme işlemleri pH7' de 0.01M olarak hazırlanan fosfat tampon ile yapılmıştır. Anti-HER3 ve HER3 belli konsantrasyonlarda porsiyonlanarak -20°C' de saklanmıştır. Çalışma elektrodu olarak 2.01mm² yüzey alanına sahip altın elektrot, referans elektrot olarak KCl ile doyunlaşmış Ag/AgCl elektrot ve yardımcı elektrot olarak ise 10 mm uzunluğunda platin tel kullanılmıştır. Tüm elektrotlar iBAS, Warwickshire, UK firmasından getirtilmiştir. Ölçümler ise akım voltametri ve electrokimyasal impedans spektroskopisi yazılımı olan Echem Analyst içeren (Gamry Instruments, Warminster, USA) bir bilgisayara bağlı Gamry Potentiostat/Galvanostat, Reference 600 (Gamry Instruments, Warminster, USA) cihazında alınmıştır.

2.1.1 Hekzanditiyol SAM'in Hazırlanması:

İlk olarak altın elektrotların temizlenmesi aşamasında elektrotlar 0.05µm alumina ile temizlenerek yüzeyde kalan alüminanın giderilmesi için 5 dakika ultrasonik banyoda etanolde bekletilmiştir. Sonrasında H₂O₂/H₂SO₄, 1/3, v/v oranında hazırlanan pirana çözeltisi içerisinde 2 dakika bekletilerek temiz elektrotların CV ve EIS ölçümleri alınmıştır. Temiz elektrotlara ait pikler ve eğriler elde edilene kadar bu işlem tekrar edilmiştir. Temiz elektrotlar, saf etanol içinde hazırlanmış 0.01M hekzanditiyol içinde gece boyu karanlık ortamda bekletilerek SAM oluşması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra elektrotlar saf etanol ve ultra saf su ile yıkanarak argon gazı ile kurutulmuş ve CV-EIS ölçümleri alınmıştır.

2.1.2 Altın Nanopartiküllerinin Hazırlanması

2.4 mL 40 mM sodyum bor hidrür (NaBH₄) çözeltisi 50 mL 200 ppm altın çözeltisi (HAuCl₄) içine eklenerek şarabi renkte çözelti elde edilmiş, bu çözeltinin 2 mL si reaksiyon şişelerine konarak elektrotlar içine daldırılarak 24 saat karanlık ortamda bekletilerek elektrot yüzeyinde altın nanopartiküller oluşması sağlanmıştır. Bu aşamanın sonunda elektrotlar ultra saf su ile yıkanarak argon gazı ile kurutulmuş, daha sonrasında CV-EIS ölçümleri alınmıştır.

2.1.3 Anti-HER3' ün Hekzanditiyol/AuNanopartikül/Sisteamin Üzerine Kovalent Bağlanması

Yukarıda anlatılan aşamalardan sonra altın elektrotlar etanol ile hazırlanmış 0.5 M sisteamin çözeltisi içinde yukarıda belirtilen şartlarda 24 saat bekletilmiş, bu süre sonunda elektrotlar saf etanol ve ultra saf su ile yıkanıp saf argon gazı ile kurutulup CV-EIS ölçümleri alınmıştır. Bu işlemlerden sonra elektrotların yüzeyine 5 μ L %5 lik glutaraldehit ve 5 μ L anti-HER3 (5 μ g/ μ L) karışımı mikro pipet yardımı ile eklenerek nemli ve karanlık ortamda 1 saat beklenmiştir. 1 saat sonunda elektrotlar ultra saf su ile yıkanarak fiziksel olarak absorbe edilmiş anti-HER3 uzaklaştırılmış, argon gazı ile kurutulup CV-EIS ölçümleri alınmıştır. Daha sonrasında ise aktif uçları bloke etmek için %1 lik 10 μ L BSA yine elektrot yüzeyine eklenip karanlık ve nemli ortamda 1 saat beklenerek CV-EIS ölçümleri alınmıştır.

2.2 Elektrokimyasal Ölçümler

Çıplak elektroda uygulanan SAM oluşumunu ve karakterizasyonunu ölçmek için döngüsel voltametriden yararlanılmıştır. Potansiyel aralığı 0 ila 500 mV arasında seçilmiş olup (adım büyüklüğü: 20 mV, tarama hızı: 50 mV/s) ölçümler 0.1 M KCl içeren ve ölçüm için redoks probu sunan 5mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) çözeltisi içinde gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal impedans ölçümleri ise 10 mV alternative akımda gerçekleştirilmiştir. Ölçümde kullanılan redoks çifti, döngüsel voltametredeki ile aynıdır. Impedans spektrumları 10.000 ila 0.05 Hz aralığındadır.

2.3 Ölçüm Prosedürleri

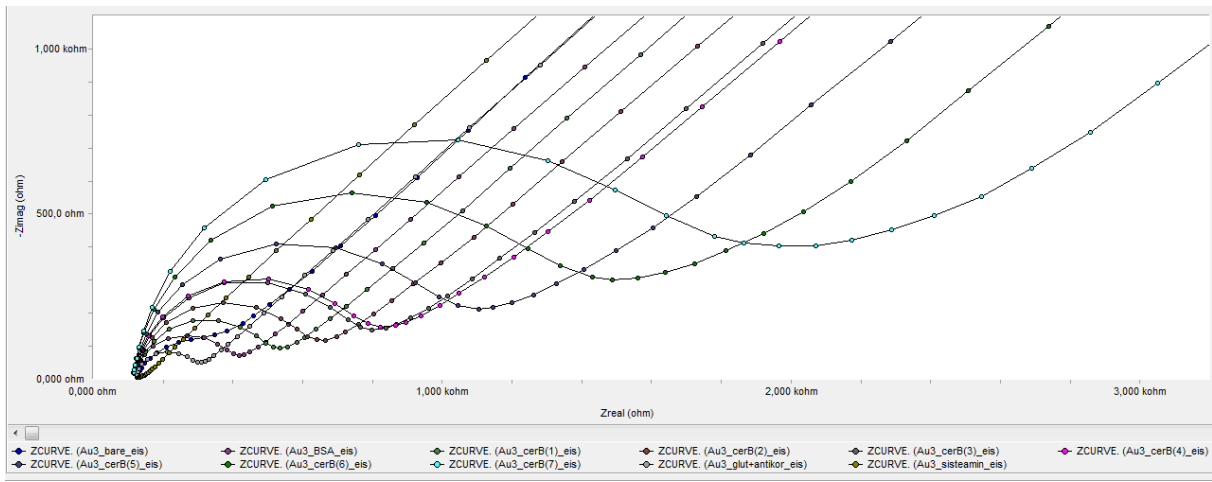
Anti-HER3' ün elektrot yüzeyine bağlanması gerçekleştirildikten sonraki aşama HER3' ün elektrot yüzeyine ağlanması sağlamaktır. Standart HER3 konsantrasyonu 0.2 pg/ μ L olarak alınarak elektrot yüzeyine yapılan her bir ekleme mikropipet ile gerçekleştirilmiştir. Her bir ekleme için belirlenen hacim 5 μ L' dir. İnkübasyon süresi nemli ve karanlık ortamda 1 saattir. Her inkübasyon periyodundan sonra elektrot yüzeyinde fiziksel olarak absorblanmış HER3' ü uzaklaştırmak için ultra saf su ile yıkanarak ve $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ redoks probu içeren çözeltinin bulunduğu hücrede CV ve EIS alınmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

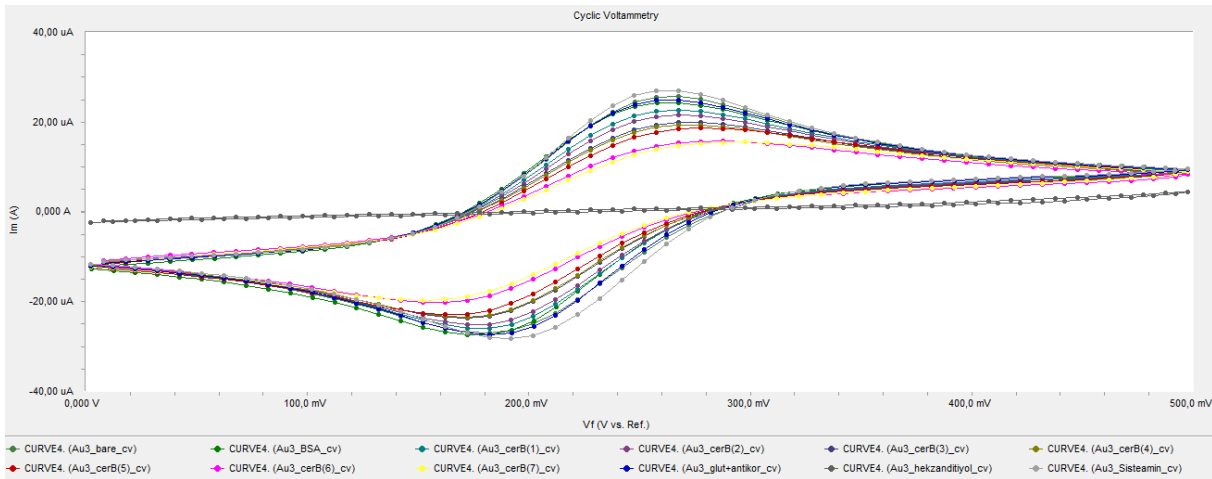
3.1 İmmobilizasyon Basamakları:

İlk olarak çıplak elektrot ölçümü alındığında $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ ' nin karakteristik pikleri gözlemlendi.

(A)



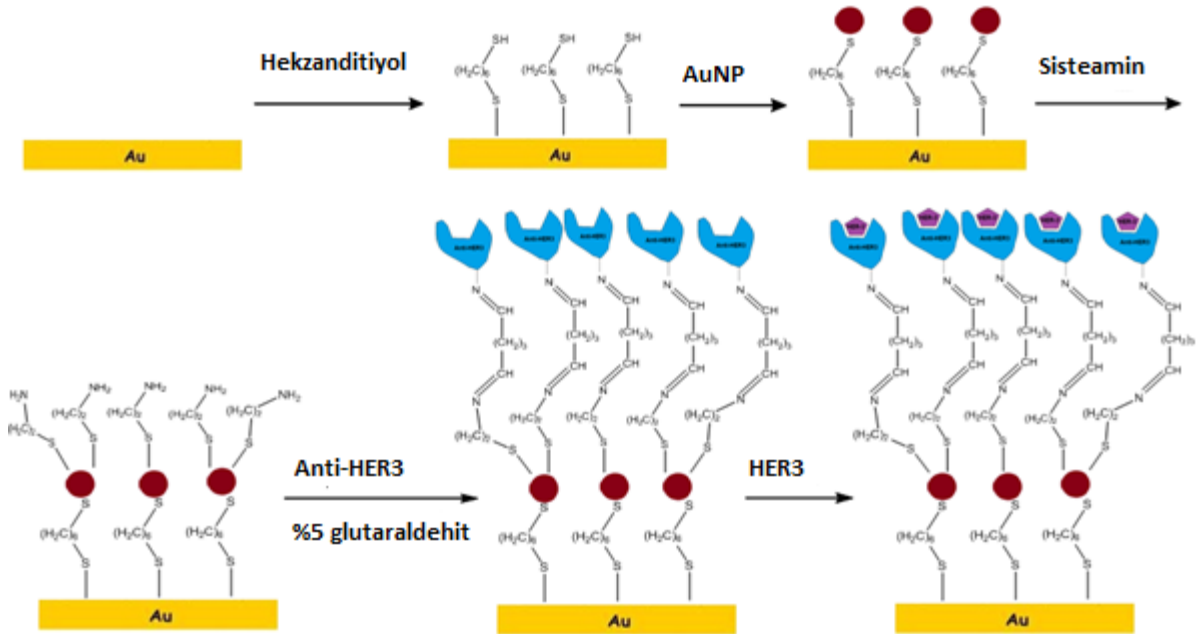
(B)



Şekil 3.1. (A)Anti-HER3 immobilizasyon basamaklarının elektrokimyasal impedans eğrileri (B)Anti-HER3 immobilizasyon basamaklarının döngüsel voltametri

Hekzanditiyol elektrot yüzeyinde sağlam bir yalıtkan tabaka oluşturdu ve redoks probun yüzeye geçişi bu tabaka yüzünden engellendi. Bunun yanı sıra hekzanditiyol molekülü uzun

zincirli bir molekül olduğundan hidrofobik etkileşimler engellenmekte, sıkı bir paketlenme gerçekleşmektedir. Bu sebeplerden dolayı elektron transfer rezistansı yüksek gözlemlendi. İkinci basamak olarak elektrot yüzeyine bağlanan altın nanopartiküller sayesinde elektrot yüzeyindeki iletkenlik arttığından dolayı EIS ölçümlerindeki sinyalde bariz bir düşüş gözlemlendi. İmobilizasyonun üçüncü basamağında elektrot yüzeyine bağlanan sisteamin yüzeyi daha da iletken hale getirdi. Bu aşamada sisteamin, yüzeydeki altın partiküllerine SH-bağları ile bağlanmaktadır. Esasen amino grubu ile bağ yapması da mümkün olmakta, fakat bunun için gerekli pH 9 olduğundan dolayı SH- bağı yapmayı tercih etmektedir. Bu aşamada elektrot yüzeyinde iletkenliğin artma sebebi; redoks probu ile arada elektrostatik çekim olmasıdır. Bir sonraki aşamada elektrot yüzeyine bağlanan antikor ile yüzeydeki yalıtkanlık arttı, bu nedenle elde edilen EIS sinyali de artmış oldu. Son aşamada aktif sisteamin uçlarını kapatmak için elektrot yüzeyine bağlanan BSA ile fazladan bir yalıtkan tabaka daha oluşturuldu ve yük transfer direncinin daha artması sağlandı.



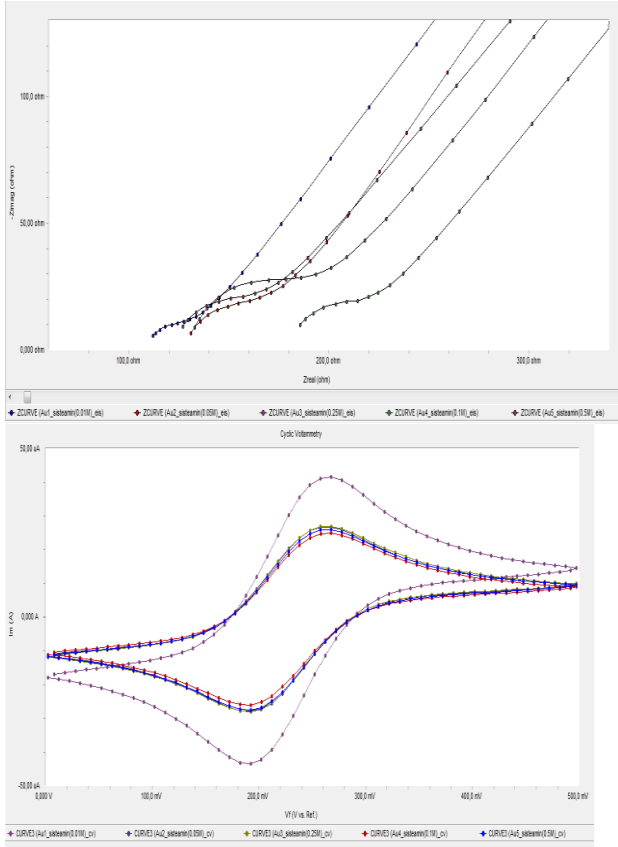
Şekil 3.2. Altın elektrot yüzeyinde gerçekleşen immobilizasyon basamakları

3.2 Optimizasyon Basamakları:

Anti-HER3 bazlı biyosensörün üretimi için inkübasyon aşamaları hekzanditiyol ile SAM (kendiliğinden oluşan tabaka) oluşturma, sisteamin ile modifikasyon ve anti-HER3 ve HER3 bağlanmasıdır. Bu aşamalarla ilgili ayrıntılar aşağıda verilmiştir.

Hekzanditiyolün inkübasyon zamanı alınan sinyalleri oldukça etkilemektedir. Bu etkinin gözlemlenmesi için elektrotların hekzanditiyol ile bekleme süreleri 5 saat ve 24 saat olarak denendi. Ölçümler sonucunda bekleme süresi arttıkça hekzanditiyolün bağlanmasının daha sağlam olduğu gözlemlenmiş, bu sebeple hekzanditiyolün inkübasyon süresini 24 saat olarak belirlenmiştir.

Deneyler göstermiştir ki sisteamin konsantrasyonu arttıkça biyosensörün verdiği yanıt daha iyi olmaktadır. Bunu kanıtlamak için farklı konsantrasyonlarda denemeler yapıldı (0.01M, 0.05M, 0.1M, 0.25M, 0.5M ve 1.0M), ve konsantrasyon etkisi elektron transfer rezistansında net bir şekilde görüldü. Bunun nedeni şöyle açıklanabilmektedir: sisteamin konsantrasyonu arttığında ara ürün etkisi azalmakta ve ana ürün etkisi çok net bir şekilde görülmektedir. 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.25M ve 0.5 M konsantrasyonlar için R_p değerleri ise sırası ile 34.89, 67.96, 191.2 ve 49.78' dir. Denemelerde 1.0M sisteamin de denenmiş, fakat saf etanol içinde çözünme gerçekleşmediği için değerlendirmeye alınmamıştır. Hangi sisteamin konsantrasyonu ile çalışılacağı belirlenirken birçok etkene bakılabilir. Bunlardan ilki, hangi konsantrasyona ait EIS eğrisinin en yüksek çıktığıdır. Diğer bir yol standart eğrileri çizildiğinde hangi konsantrasyona ait noktalarla çizilen eğrinin sapma göstermediği, son yol ise R_p^2 değerinin hangi konsantrasyonda 1'e daha yakın olduğudur.

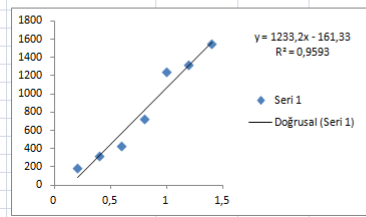


(A)

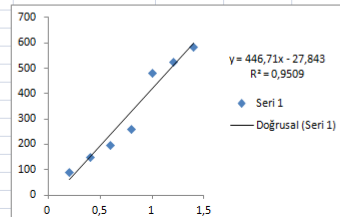
(B)

Şekil 3.3.. (A)Farklı konsantrasyonlarda denenen sisteminin elektrokimyasal impedans eğrileri (B)Farklı konsantrasyonlarda denenen sisteminin döngüsel voltametrileri

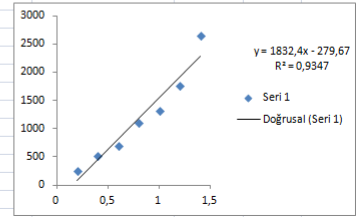
Au2 (0.01 M)	Rp(ohm)	C (pg/µL)	ΔRp(ohm)
Au2_bare	116,6	-	-
Au2_heksenditiol	-	-	-
Au2_AuNP	-	-	-
Au2_Sisteamin	24,7	-	-
Au2_Glut&AntiCerbB-3	185,5	-	-
Au2_BSA	214	-	-
Au2_CerbB(1)	404,4	0,2	190,4
Au2_CerbB(2)	539,5	0,4	319,5
Au2_CerbB(3)	641,1	0,6	427,1
Au2_CerbB(4)	939,4	0,8	725,4
Au2_CerbB(5)	1453	1	1239
Au2_CerbB(6)	1,54E+03	1,2	1,32E+03
Au2_CerbB(7)	1,77E+03	1,4	1,55E+03



Au2 (0.05 M)	Rp(ohm)	C (pg/µL)	ΔRp(ohm)
Au2_bare	245,8	-	-
Au2_heksenditiol	-	-	-
Au2_AuNP	-	-	-
Au2_Sisteamin	94,89	-	-
Au2_Glut&AntiCerbB-3	241,2	-	-
Au2_BSA	222,8	-	-
Au2_CerbB(1)	317,5	0,2	94,7
Au2_CerbB(2)	376,9	0,4	154,1
Au2_CerbB(3)	422,2	0,6	189,4
Au2_CerbB(4)	486,7	0,8	263,9
Au2_CerbB(5)	705,1	1	482,3
Au2_CerbB(6)	7,49E+02	1,2	5,26E+02
Au2_CerbB(7)	8,09E+02	1,4	5,86E+02

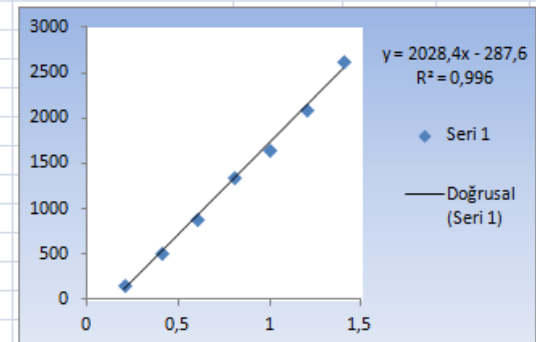
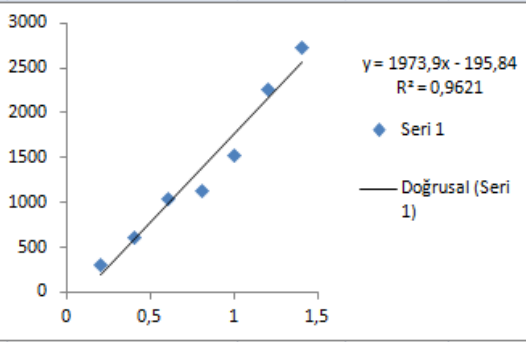


Au3 (0.25 M)	Rp(ohm)	C (pg/µL)	ΔRp(ohm)
Au3_bare	387,2	-	-
Au3_heksenditiol	-	-	-
Au3_AuNP	-	-	-
Au3_Sisteamin	67,86	-	-
Au3_Glut&AntiCerbB-3	454,1	-	-
Au3_BSA	579,3	-	-
Au3_CerbB(1)	8,28E+02	0,2	248,8
Au3_CerbB(2)	1,11E+03	0,4	526,7
Au3_CerbB(3)	1,28E+03	0,6	700,7
Au3_CerbB(4)	1,69E+03	0,8	1112,7
Au3_CerbB(5)	1,89E+03	1	1311,7
Au3_CerbB(6)	2,34E+03	1,2	1,76E+03
Au3_CerbB(7)	3,22E+03	1,4	2,64E+03



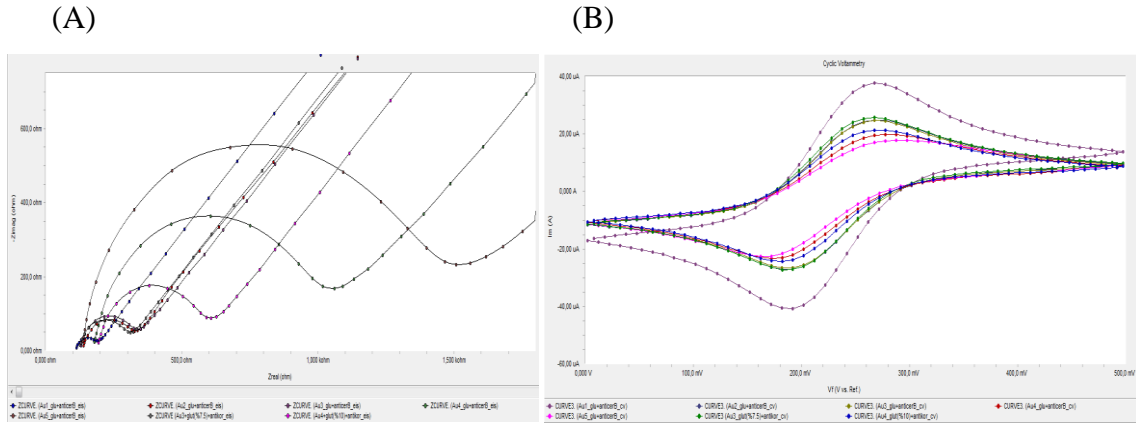
Au4 (0.1 M)	Rp(ohm)	C (pg/ μ L)	Δ Rp(ohm)
Au4_bare	180,7	-	-
Au4_heksenditiol	-	-	-
Au4_AuNP	-	-	-
Au4_Sisteamin	191,2	-	-
Au4_Glut&AntiCerbB-3	3,04E+02	-	-
Au4_BSA	6,85E+02	-	-
Au4_CerbB(1)	1,00E+03	0,2	316,3
Au4_CerbB(2)	1,31E+03	0,4	628,3
Au4_CerbB(3)	1,73E+03	0,6	1042,3
Au4_CerbB(4)	1,83E+03	0,8	1147,3
Au4_CerbB(5)	2,22E+03	1	1536,3
Au4_CerbB(6)	2,96E+03	1,2	2,27E+03
Au4_CerbB(7)	3,43E+03	1,4	2,74E+03

Au5 (0.5 M)	Rp(ohm)	C (pg/ μ L)	Δ Rp(ohm)
Au5_bare	143	-	-
Au5_heksenditiol	-	-	-
Au5_AuNP	-	-	-
Au5_Sisteamin	49,78	-	-
Au5_Glut&AntiCerbB-3	3,58E+02	-	-
Au5_BSA	6,13E+02	-	-
Au5_CerbB(1)	7,77E+02	0,2	163,5
Au5_CerbB(2)	1,14E+03	0,4	524,6
Au5_CerbB(3)	1,51E+03	0,6	898,6
Au5_CerbB(4)	1,96E+03	0,8	1348,6
Au5_CerbB(5)	2,28E+03	1	1665,6
Au5_CerbB(6)	2,72E+03	1,2	2,10E+03
Au5_CerbB(7)	3,26E+03	1,4	2,64E+03



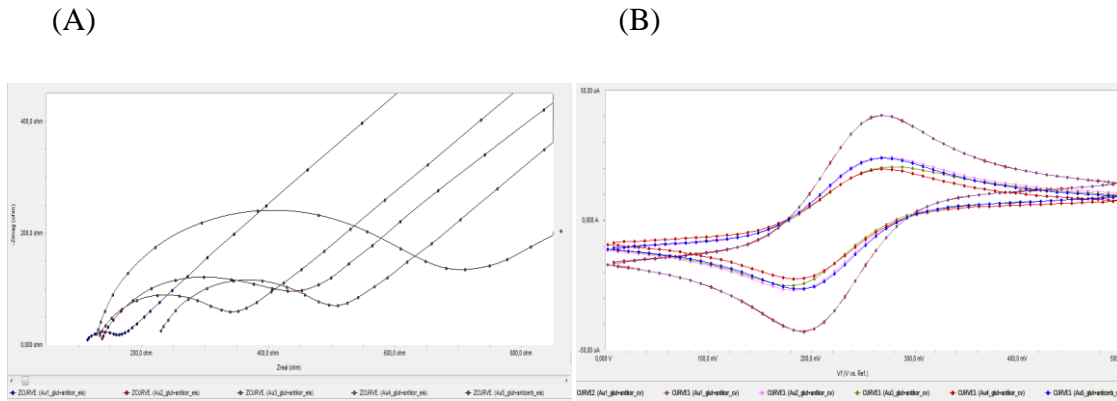
Şekil 3.4. Farklı konsantrasyonlarda denenen sisteaminin (0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5) standart eğrileri

Çalışılacak glutaraldehit konsantrasyonunu belirlemek için farklı konsantrasyonlarda glutaraldehit çözeltileri hazırlandı (%1, %1.5, %2.5, %3.5, %5, %7.5 ve %10). %1 konsantrasyon ile alınan ölçümlerde sinyallerin çok düşük olduğu gözlemlendi. %7.5 ve %10luk çözeltilerde ise yüksek oranda çapraz bağlanma olduğundan protein denatüre edilmiş ve istenen sonuçlar elde edilememiştir. Bu sebeplerle %1.5, %2.5, %3.5 ve %5'lik konsantrasyonların sinyallerine bakıldığında en yüksek EIS sinyal eğrisi %5'lik çözeltiliye ait olduğundan bu konsantrasyonda çalışılmaya karar verildi.



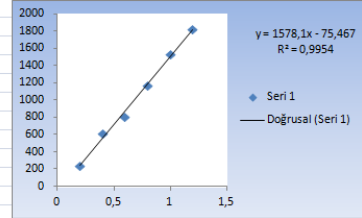
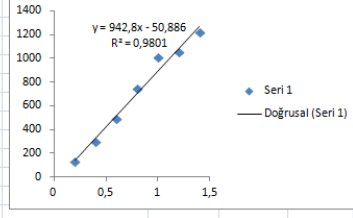
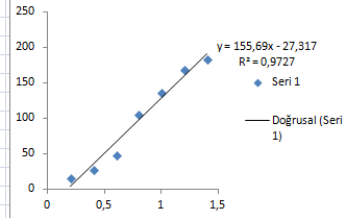
Şekil 3.5. (A)Farklı yüzdelerdeki glutaraldehite ait (%1, %1.5, %2.5, %3.5, %5, %7.5 ve %10) elektrokimyasal impedans eğrileri (B) Farklı yüzdelerdeki glutaraldehite ait (%1, %1.5, %2.5, %3.5, %5, %7.5 ve %10) döngüsel voltametri değerleri

Bundan sonraki aşama, anti-HER3 konsantrasyonunun belirlenmesi idi. 1, 2, 5, 10 ve 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ konsantrasyonlarda anti-HER3 elektrotların yüzeylerine eklenerek ölçümler alındı. Antikor ekleme noktasında çok yüksek konsantrasyonlar istenmemektedir çünkü bağlanma yapılabilecek uç sayısı sınırlıdır. Buna karşın çok az konsantrasyonda antikor ile çalışıldığında ise düşük sinyaller alınmaktadır. Bu nedenle 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ anti-HER3'ün verdiği sinyaller çok fazla fark yaratmadığından ve R_p^2 değerleri birbirine çok yakın olduğundan (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, için 0.9954, ve 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ için 0.9946) 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ seçilmiştir.



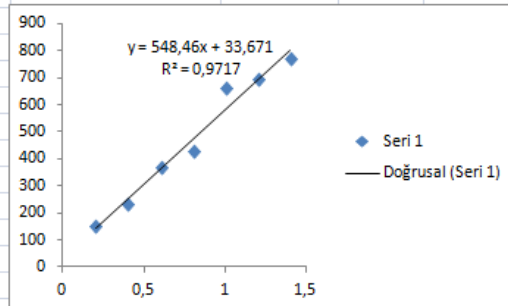
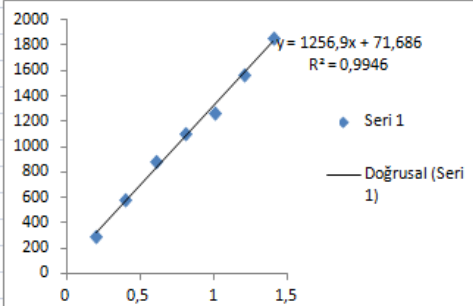
Şekil 3.6. Farklı konsantrasyonlardaki anti-HER3' e ait (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) elektrokimyasal impedans eğrileri (B) Farklı konsantrasyonlardaki anti-HER3' e ait (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) döngüsel voltametri değerleri

Au1 (1 µg/mL)	Rp(ohm)	C (pg/µL)	ΔRp(ohm)	Au2 (2 µg/mL)	Rp(ohm)	C (pg/µL)	ΔRp(ohm)	Au3 (5 µg/mL)	Rp(ohm)	C (pg/µL)	ΔRp(ohm)
Au1_bare	67,3	-	-	Au2_bare	177	-	-	Au3_bare	462,8	-	-
Au1_heksenditiol	-	-	-	Au2_heksenditiol	-	-	-	Au3_heksenditiol	-	-	-
Au1_AuNP	-	-	-	Au2_AuNP	-	-	-	Au3_AuNP	-	-	-
Au1_Sisteamin	6,189	-	-	Au2_Sisteamin	62,44	-	-	Au3_Sisteamin	140,5	-	-
Au1_Glut&AntiCerbB-3	59,91	-	-	Au2_Glut&AntiCerbB-3	295	-	-	Au3_Glut&AntiCerbB-3	575,6	-	-
Au1_BSA	102	-	-	Au2_BSA	413,7	-	-	Au3_BSA	675	-	-
Au1_CerbB(1)	117,07	0,2	15,07	Au2_CerbB(1)	545,2	0,2	131,5	Au3_CerbB(1)	9,11E+02	0,2	236,1
Au1_CerbB(2)	129,3	0,4	27,9	Au2_CerbB(2)	708,5	0,4	294,8	Au3_CerbB(2)	1,29E+03	0,4	610
Au1_CerbB(3)	149,8	0,6	47,8	Au2_CerbB(3)	898,7	0,6	485	Au3_CerbB(3)	1,49E+03	0,6	811
Au1_CerbB(4)	206,4	0,8	104,4	Au2_CerbB(4)	1,16E+03	0,8	742,3	Au3_CerbB(4)	1,84E+03	0,8	1164
Au1_CerbB(5)	237,2	1	135,2	Au2_CerbB(5)	1,42E+03	1	1005,3	Au3_CerbB(5)	2,21E+03	1	1533
Au1_CerbB(6)	2,70E+02	1,2	1,68E+02	Au2_CerbB(6)	1,46E+03	1,2	1,05E+03	Au3_CerbB(6)	2,50E+03	1,2	1,82E+03
Au1_CerbB(7)	2,85E+02	1,4	1,83E+02	Au2_CerbB(7)	1,63E+03	1,4	1,21E+03	Au3_CerbB(7)	2,50E+03	1,4	1,83E+03



Au4 (10 µg/mL)	Rp(ohm)	C (pg/µL)	ΔRp(ohm)
Au4_bare	-	-	-
Au4_heksenditiol	-	-	-
Au4_AuNP	-	-	-
Au4_Sisteamin	103,4	-	-
Au4_Glut&AntiCerbB-3	2,69E+02	-	-
Au4_BSA	4,25E+02	-	-
Au4_CerbB(1)	7,14E+02	0,2	289
Au4_CerbB(2)	1,01E+03	0,4	583,6
Au4_CerbB(3)	1,31E+03	0,6	884,6
Au4_CerbB(4)	1,52E+03	0,8	1097,6
Au4_CerbB(5)	1,69E+03	1	1266,6
Au4_CerbB(6)	1,99E+03	1,2	1,57E+03
Au4_CerbB(7)	2,28E+03	1,4	1,85E+03

Au5 (20 µg/mL)	Rp(ohm)	C (pg/µL)	ΔRp(ohm)
Au5_bare	157,3	-	-
Au5_heksenditiol	-	-	-
Au5_AuNP	-	-	-
Au5_Sisteamin	47,49	-	-
Au5_Glut&AntiCerbB-3	2,03E+02	-	-
Au5_BSA	2,79E+02	-	-
Au5_CerbB(1)	4,30E+02	0,2	151,4
Au5_CerbB(2)	5,11E+02	0,4	231,7
Au5_CerbB(3)	6,49E+02	0,6	369,8
Au5_CerbB(4)	7,08E+02	0,8	428,7
Au5_CerbB(5)	9,40E+02	1	661,3
Au5_CerbB(6)	9,74E+02	1,2	6,95E+02
Au5_CerbB(7)	1,05E+03	1,4	7,69E+02



Şekil 3.7. Farklı konsantrasyonlarda denenen anti-HER3' e ait standart eğrileri

SONUÇ

Bu tezde, anti-HER3 bazlı ve HER3 tayini yapabilen yeni bir biyosensör tasarlandı. Küresel kanser yükü geçtiğimiz 30 yıl zarfında iki kattan daha fazla artmıştır. 2008’de 12 milyon yeni kanser vakasının teşhis edildiği, kanserden kaynaklanan 7 milyon ölümün gerçekleştiği ve kanserli 25 milyon kişinin halen hayatta olduğu tahmin edilmektedir. Dünya nüfusunun süregelen artışı ve yaşlanması kanser yükü üzerinde de büyük değişikliklere yol açacaktır. 2030’a gelindiğinde 27 milyon kanser vakası, kanserden kaynaklanan yıllık 17 milyon ölüm ve son beş yıl içinde kanser tanısı konmuş 75 milyon kişi rakamlarına ulaşılması beklenebilir (**Boyle ve Levin 2008**). Kanser, insanlığı bu kadar tehdit eden bir hastalık olmuşken onun daha kolay teşhis edilebileceği yeni yöntemler bulmak gerekmektedir.

Kanserde erken teşhis, uygulanacak tedavinin başarısı ve yaşama şansının artması bakımından hayati önem taşımaktadır. Bu sebeple hassas ve spesifik teşhis yöntemleri geliştirilmektedir (**Tothill 2009**). Biyomarkerlerin kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında analizi ile geliştirilen yöntemler, kanser teşhisi için alternatif yöntemler sunmaktadırlar. Bu çeşit analizler, sağlık çalışanlarına hasta ile ilgili gerekli bilgileri zamanında sunmakta, böylece kısa sürede tedavi yöntemi belirlenebilmekte ve hastanın yaşam süresi uzamaktadır.

Günümüzde kanser teşhisi için hücre boyayarak mikroskopta incelemek suretiyle gerçekleştirilen ve teşhisi oldukça güçleştiren geleneksel yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemler, biyopsi ile alınan dokudaki hücrenin fiske edilmesi ve morfolojik yaklaşımlarla incelenmesine dayanmaktadır. Bu gibi analizlerin doğruluğu şüphelidir. Eğer hastalık başlangıç aşamasında ise biyopsi için doku alımı sırasında kanserli hücre zarar görebilir ve teşhis edilemeyebilir. Daha gelişmiş araştırmalar immunoassay kullanarak (örn. ELİSA) kanser biyomarkerlerini hastane laboratuvarlarında teşhis edebilmektedirler. Fakat bazen bu hastalık için sadece bir tek marker indikatör olarak kullanılmaktadır. İmmunoassayler oldukça hassas ve seçicidirler. Fakat yanıt süreleri uzundur ve pahalıdırlar. Bunun yanı sıra ELİSA testleri düşük konsantrasyondaki marker teşhisi için uygun değildir. Hastalığın ilk aşamalarında vücuttaki marker konsantrasyonu düşük olduğundan erken teşhis için ELİSA testleri uygun değildir. Son zamanlarda ayrıca moleküler işaretler oluşturabilmek için moleküler aparatlar (genomik ve proteomik, örn. PCR, Southern blotting) işleve konmuştur. Bu yöntem hastalığı teşhis için oldukça kullanışlıdır fakat hastanın bilgileri gibi bazı bilgiler ile bağlantı oluşturulması gereken karmaşık bir yapısı vardır (**Tothill 2009**).

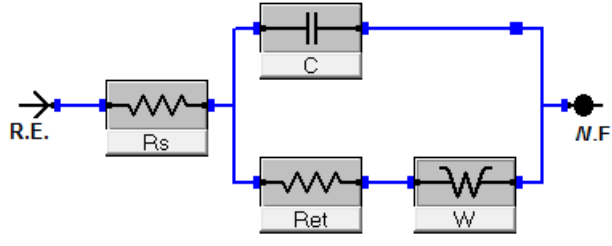
Biyosensörler, fizikokimyasal transduser ile bütünleştirilmiş ya da alakalandırılmış moleküler tanımlama cihazıdır. Bu cihazlar point-of-care olarak sınıflandırılabilirler ve bu

şekilde evde ya da klinikte kullanılabilme imkânına sahiptirler. Uygun bir biyosensör tasarlarken cihazın spesifikliğini belli bir markere olan hassaslığı belirlemektedir. Biyosensörler, kolay kullanım, ucuzluk ve çabuk sonuç verme gibi avantajlar sağlamaktadırlar (Tothill 2009).

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS), sistemlerin kompleks elektriksel dirençlerini, yüzey hassasiyetlerini ve miktarlarındaki değişimleri analiz etmede kullanılan çok etkili ve kullanışlı bir metottur. Son yıllarda biyosensörlerin hem hazırlanma aşamalarının, hem de biyomoleküllerin spesifik etkileşimlerinin izlenmesi ve kantitatif analizlerinde çok yoğun bir şekilde tercih edilmeye başlanmıştır. EIS'nin kullanımı ile ilgili ilk örnekler 1980'lerin sonunda rapor edilmiş olmasına rağmen metodun uygulamaları, enstrümantasyondaki ilerlemelere bağlı olarak son yıllarda çok fazla artış göstermiştir. Çünkü elektrokimyasal impedans spektroskopisinin kompleks parametreleri enstrümanların her türlü donanımından çok fazla etkilenebilmektedir. İmpedans teknikleri ile biyoreseptör ve onun analiti arasındaki etkileşimin belirlenmesinin yanı sıra, transducerde biyomoleküllerin immobilizasyonu boyunca meydana gelen olaylarda olduğu gibi, yüzey modifikasyonun karakterizasyonları da başarıyla gerçekleştirilebilir. Bu özellikleri ile impedans aynı zamanda, yüzey morfolojisinin görüntüleme teknikleriyle aydınlatılmasında yardımcı ve çok önemli bir araçtır.

Bu çalışmada, anti-HER3 bazlı ve HER3 tayini yapabilen yeni bir biyosensör tasarlandı. Bunun için öncelikle hekzanditiyol ve sisteamin ile altın elektrot yüzeyine kendinden oluşan monotabaka (SAM) oluşturuldu. Yüzey alanını daha da arttırabilmek için altın nanopartiküller yüzeye eklenerek sisteaminin bağlanabileceği bölgeler arttırıldı. Elektrot yüzeyinde oluşturulan SAM tabakası sayesinde anti-HER3' ün yüzeye kovalent olarak bağlanması sağlandı. Döngüsel voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile immobilizasyon adımları ve HER3' ün elektrot yüzeyine bağlanması incelendi. Biyosensörün başarılı sonuçlar vermesi için tüm adımlar optimize edildi. Deneysel impedans dataları üzerinde Kramers-Kronig dönüşümü uygulandı.

Deneyde elde edilen elektrokimyasal impedans verileri şekil 4.1' deki eşdeğer devreye uyarlandı. Bu eşdeğer devre resistif ve kapasitif elementlerin yanı sıra Warburg elementinden meydana gelmektedir. Bu devrede bulunan R_s çözelti direncini simgelemektedir. CPE (sabit faz elementi) kompleks biyoaktif tabakanın kapasitansı ile bağlantılıdır. R_{et} , elektrot yüzeyinde elektron transfer resistansı ile alakalıdır. Z_w ile gösterilen Warburg impedansı elektrot yüzeyindeki normal difüzyonu simgeler.



Şekil 4.1 Bu tezde gerçekleştirilen deneyin modellendiği eşdeğer devre

KAYNAKLAR

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 1725, Milton Park, UK.
- Abdelmalek F, Shadaram M, Boushriha H (2001). Ellipsometry measurements and impedance spectroscopy on Langmuir-Blodgett membranes on Si/SiO₂ for ion sensitive sensor. *Sensors and Actuators B: Chemicals*, 72:208–213..
- Andersson L.I (2000). Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field. *Journal of Chromatography B*, 745:3–13.
- Bataillard P, Gardies F, Jaffrezicrenault N, Martelet C, Colin B, Mandrand B (1988). Direct detection of immunospecies by capacitance measurements. *Analytical Chemistry*, 60:2374-2379.
- Berggren C, Bjarnason B, Johansson G (1998). An immunological Interleukine-6 capacitive biosensor using perturbation with a potentiostatic step. *Biosensors and Bioelectronics*, 13:1061-1068.
- Berggren C, Bjarnason B, Johansson G (2001). Capacitive biosensors. *Electroanalysis*, 13:173-180.
- Berggren C, Johansson G (1997). Capacitance measurements of antibody-antigen interactions in a flow system. *Analytical Chemistry*, 69:3651-3657.
- Boyle P, Levin B (2008) “Dünya Sağlık Örgütü Uluslar arası Kanser Araştırma Kurumu Dünya Kanser Raporu” 11-494, Lyon.
- Brett C.M.A, Brett A.M.O, Serrano S.H.P (1999). An EIS study of DNA-modified electrodes. *Electrochimica Acta*, 44:4233–4239.
- Cady P, Charles C (1978). *Electrical impedance measurements: rapid method for detecting and monitoring microorganisms*. Thomas Publisher, 7:199–239.
- Cai H, Lee T.M.H, Hsing I.M (2006). A DNA biochip for on-the-spot multiplexed pathogen identification. *Sensors and Actuators B*, 114:433-437.
- Cho M, Lee S, Han S.Y, Park J.Y, Rahman M.A, Shim Y.B, Ban C (2006). Electrochemical detection of mismatched DNA using a MutS probe. *Nucleic Acids Research*, 34:75-85.
- Colquhoun K.O, Timms S, Fricker C. R (1995). Detection of *Escherichia coli* in potable water using direct impedance technology. *Journal of Applied Bacteriology*, 79:635–639.
- Cornell B.A, Braach-Maksvytis V.L.B, King L.G, Osman P.D.J, Raguse B, Wiczorek L, Pace R.J (1997). A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature*, 387, 580-583.
- Cortina M, Esplandiú M.J, Alegret S, del Valle M (2006). Urea impedimetric biosensor based on polymer degradation onto interdigitated electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemicals* 118:84-89.
- Daniels J.S, Pourmand N (2007). Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges. *Electroanalysis*, 19:1239- 1257.

- Davis F, Hughes M.A, Cossins A.R, Higson S.P.J (2007). Single gene differentiation by DNA-modified carbon electrodes using an AC impedimetric approach. *Analytical Chemistry*, 79:1153-1157.
- Deak T, Beuchat L.R (1993). Identification of foodborne yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 75:546–550.
- Depaola N, Phelps J.E, Florez L, Keese C. R, Minnear F. L, Giaever I, Vincent P (2001). Electrical impedance of cultured endothelium under fluid flow. *Annals of Biomedical Engineering*, 29:648–656.
- Felice C.J, Valentinuzzi M.E. (1999). Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 46:1483–1491.
- Flint S.H, Brooks J.D (2001). Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of Microbiological Methods*, 44:205–208.
- Friebe A, Lisdat F, Moritz W (1993). Polymer Membranes on Chemical Semiconductor Devices-Their Electrical Influence on Sensor Characterization. *Sens Mater*, 5:65-82,
- Geoffrey L, Peter P, Panka, V (2001). *Sensors and Actuators B: Chemicals*, 78:249–256.
- Gnan S, Luedecke L.O (1982). Impedance measurements in raw milk as an alternative to the standard plate count.. *Journal of Food Protection*, 45:4–7.
- Gómez R, Bashir R, Sarikaya A, Ladisch M.R, Sturgis J, Robinson J. P, Geng T, Bhunia A. K, Apple H. L, Wereley S (2001). *Biomedical Microdevices*, 3:201–209.
- Gooding J.J, Hall E.A (1996). Practical and theoretical evaluation of an alternative geometry enzyme electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 11:1031-1040.
- Guan J.G, Miao Y.Q, Zhang Q.J.J (2004). *Bioscience and Bioengineering*, 97: 219-225.
- Hason S, Dvorak J, Jelen F, Vetterl V (2002). Interaction of DNA with echinomycin at the mercury electrode surface as detected by impedance and chronopotentiometric measurements. *Talanta*, 56:905-913.
- Hedstrom M, Galaev I.Y, Mattiasson B (2005). Continuous measurements of a binding reaction using a capacitive biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 21:41-48.
- Henschke P. A, Thomas D.S (1988). Detection of wine-spoiling yeasts by electronic methods. *Journal of Microbiological Methods*, 53:123–133.
- Hleli S, Martelet C, Abdelghani A, Burais N, Jaffrezic-Renault N (2006). Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer. *Sensors and Actuators B: Chemicals*, 113:711-717.
- Hou Y.X, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Zhang A.D, Minic-Vidic J, Gorojankina T, Persuy M.A, Pajot-Augy E, Salesse R, Akimov V, Reggiani L, Penetta C, Alfinito E, Ruiz O, Gomilla G, Samitier J, Errachid A (2007). Gold surface functionalization and patterning for specific immobilization of olfactory receptors carried by nanosomes. *Biosensors and Bioelectronics*, 22:1550-1555.

- Hug T.S (2003). Biophysical methods for monitoring cell-substrate interactions in drug discovery. *Assay and Drug Development Technologies*, 1:479-488.
- Jie M, Ming C.Y, Jing D, Cheng L.S, Na L.H, Jun F, Xiang C.Y (1999). *Electrochemistry Communications*, 1:425-429.
- Jonsson M, Welch K, Hamp S, Stromme M(2006). Bacteria counting with impedance spectroscopy in a micro probe station. *The Journal of Physical Chemistry*, 110:10165-1169.
- Katz E, Alfonta L, Willner I (2001). Probing of bioaffinity interactions at interfaces using impedance spectroscopy and chronopotentiometry. *Sensors and Actuators B, Chemicals*, 76:134–141.
- Katz E, Willner I (2003). Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications. *Electroanalysis*, 15:913-947.
- Kharitonov A.B, Wasserman J, Katz E, Willner I (2001). The use of impedance spectroscopy for the characterization of protein-modified ISFET devices: application of the method for the analysis of biorecognition processes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105:4205–4213.
- Krause S (2007). *Encyclopedia of electrochemistry*, 10.1002/9783527610426.bard030206, Wiley VCH, Weinheim.
- Krauss G (2001). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Wiley VCH, 526, Germany.
- Li A.X, Yang F, Ma Y, Yang X.R (2007). *Biosensors and Bioelectronics*, 22:1716-1720.
- Li C.M, Sun C.Q, Song S, Choong V.E, Maracas G, Zhang X.J (2005). Impedance labelless detection-based polypyrrole DNA biosensor. *Frontiers in Bioscience*, 10:180-186.
- Li C.M, Sun C.Q, Song S, Choong V.E, Maracas G, Zhang X.J (2005). Impedance labelless detection-based polypyrrole DNA biosensor. *Frontiers in Bioscience*, 10:180-186.
- Long Y.T, Li C.Z, Kraatz H.B, Lee J.S (2003). AC impedance spectroscopy of native DNA and M-DNA. *Biophysical Journal*, 84:3218-3225.
- Maalouf R, Fournier-Wirth C, Coste J, Chebib H, Saikali Y, Vittori O, Errachid A, Cloarec J.P, Martelet C, Jaffrezic-Renault N (2007). Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry*, 79:4879-4886.
- Madrid R.E, Felice C.J, Valentinuzzi M.E (1999). Impedance microbiology: quantification of bacterial content in milk by means of capacitance growth curves. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 37:789–793.
- Macdonald J.R (1987). Impedance spectroscopy and its use in analyzing the steady-state AC response of solid and liquid electrolytes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 223: 25-50.
- Ma J, Chu Y.M, Di J, Liu S.C, Li H.N, Feng J, Ci Y.X (1999). *Electrochemistry Communications*, 1:425–428.

- McNeil C.J, Athey D, Ball M, Ho W.O, Krause S, Armstrong R.D, Wright J.D, Rawson K (1995). Electrochemical sensor for measurement of urea and creatinine in serum based on ac impedance measurement of enzyme-catalyzed polymer transformation. *Analytical Chemistry*, 67:3928-3935.
- Moritz W, Szeponik J, Lisdat F, Friebe A, Krause S, Hintsche R, Scheller F (2001). Diversiform applications of LaF₃ for chemical semiconductor sensors. *Sens Actuators B* 7:497.
- Naumann R, Baumgart T, Gräber P, Jonczyk A, Offenhäusser A, Knoll W (2002). *Biosensors and Bioelectronics*, 17:25–34.
- Nauman, R, Schmidt E.K, Jonczyk A, Fendler K, Kadenbach B, Liebermann T, Offenhäusser A, Knoll W (1999). *Biosensors and Bioelectronics*, 14:651–662.
- Naumann R, Schmidt E.K, Jonczyk A, Fendler K, Kadenbach B, Liebermann T, Offenhäusser A, Knoll W (1999). The peptide-tethered lipid membrane as a biomimetic system to incorporate cytochrome c oxidase in a functionally active form. *Biosensors and Bioelectronics*, 14:651-662.
- Neaves P, Waddell M.J, Prentice G.A (1988). A medium for the detection of Lancefield Group D cocci in skimmed milk powder by measurement of conductivity changes. *Journal of Applied Bacteriology*, 65:437–448.
- Oliveira-Brett A.M, Silva L.A, Farace G, Vадgama P, Brett C.M.A (2003). Voltammetric and impedance studies of inosine-5'-monophosphate and hypoxanthine. *Bioelectrochemistry*, 59:49–56.
- Ouerghi O, Touhami A, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Ben Ouada H, Cosnier S (2002). Impedimetric immunosensor using avidin-biotin for antibody immobilization. *Bioelectrochemistry*, 56:131–133.
- Pak S.C, Penrose W, Hesketh P.J (2001). An ultrathin platinum film sensor to measure biomolecular binding. *Biosensors and Bioelectronics*, 16:371-379.
- Pak S.C, Penrose W, Hesketh P.J (2001). An ultrathin platinum film sensor to measure biomolecular binding. *Biosensors and Bioelectronics*, 16:371–379.
- Panasyuk-Delaney T, Mirsky V. M, Ulbricht M, Wolfbeis O. S (2001). Impedometric herbicide chemosensors based on molecularly imprinted polymers. *Analytical Chimica Acta*, 435:157–162.
- Pirovano F, Piazza I, Brambilla F, Sozzi T (1995). Impedimetric method for selective enumeration of specific yoghurt bacteria with milk-based culture media. *Lait*, 75:285–293.
- Radi A.E, Sanchez J.L.A, Baldrich E, O'Sullivan C.K (2006). Reagentless, reusable, ultrasensitive electrochemical molecular beacon aptasensor. *Journal of the American Chemical Society*, 128(1):117–124.
- Rodriguez M.C, Kawde A.N, Wang J (2005). Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge. *Chemical Communications*, 34:4267-4269.

- Rubinstein I (1995) *Physical electrochemistry Methods and Principles*. Marcel Dekker, New York.
- Russell S.M, Fletcher D.L, Cox N.A. (1995). Spoilage bacteria of fresh broiler chicken carcasses. *Poultry Science*, 73:1144–1148.
- Saby C, Jaffrezicrenault N, Martelet C, Colin B, Charles M.H, Delair T, Mandrand B (1993). Immobilization of antibodies onto a capacitance silicon-based transducer. *Sensors and Actuators B:Chemicals*, 16:458-462.
- Sargent A, Sadik O.A (1999). The electrochemistry of antibody-modified conducting polymer electrodes. *Electrochimica Acta*, 44:4667–4675.
- Saum A.G.E, Cumming R.H, Rowell F.J (1998). Use of substrate coated electrodes and AC impedance spectroscopy for the detection of enzyme activity. *Biosensors and Bioelectronics*, 13:511–518.
- Schasfoort R.B.M, Niedziela T (1994). Detection of inhibitory compounds of acetylcholine esterase with a novel ion responding impedance sensor (IRIS). *Sensors and Actuators* 18:175-177.
- Shervedani R.K, Mehrjardi A.H, Zamiri N (2006). A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor *Bioelectrochemistry*, 69:201-208.
- Silley P, Forsythe S (1996). Impedance microbiology-a rapid change for microbiologists. *Journal of Applied Bacteriology*, 80:233-243.
- Silley P, Forsythe S (1996). Impedance microbiology-a rapid change for microbiologists. *Journal of Applied Bacteriology*, 80:233–243.
- Strasak L, Dvorak J, Hason S, Vetterl V (2002). Electrochemical impedance spectroscopy of polynucleotide adsorption. *Bioelectrochemistry*, 56:37-41..
- Strašák L, Dvůrák J, Hason S, Vetterl V (2002). Electrochemical impedance spectroscopy of polynucleotide adsorption. *Bioelectrochemistry*, 56:37–41.
- Sumner C, Krause S, Sabot A, Turner K, McNeil C.J (2001). Biosensor based on enzyme-catalysed degradation of thin polymer films. *Biosensors and Bioelectronics*, 16:709-714.
- Taira H, Nakano K, Maeda M, Takagi M (1993). Electrode modification by long-chain, dialkyl disulfide reagent having terminal dinitrophenyl group and its application to impedimetric immunosensors. *Analytical Sciences*, 9:199-206.
- Tong Y.H, Han X.J, Song Y.H, Jian, J.G, Wang E.K (2003). *Biophysical Chemistry*, 105:1-5.
- Tothill I E (2009). Biosensors for Cancer Marker Diagnosis. *Seminars in Cell&Biology*, 20:55-62.
- Uygun Z.O, Sezgintürk M.K (2011). A novel, ultra sensible biosensor built by layer-by-layer covalent attachment of a receptor for diagnosis of tumor growth. *Analytica Chimica Acta*, 706:343-349.

- Vagin M.Y, Karyakin A.A, Hianik T (2002). Electrochemical transducers based on surfactant bilayers for the direct detection of affinity interactions. *Bioelectrochemistry*, 56:91–93.
- Van Gerwen P, Laureyn W, Laureys W (1998). Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors. *Sensors and Actuators B, Chemicals*, 49:73–80.
- Van Spreken K.J.A, Stekelenburg F.K (1986). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24:95–96.
- Wang J, Jiang M, Fortes A, Mukherjee B (1999). New label-free DNA recognition based on doping nucleic-acid probes within conducting polymer films. *Analytica Chimica Acta*, 402:7-12.
- Wegener J, Keese C. R, Giaever I (2000). Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Experimental Cell Research*, 259:158–166.
- Wilkop T, Xu D.K, Cheng Q (2007). Surface plasmon resonance imaging for affinity analysis of aptamer–protein interactions with PDMS microfluidic chips. *Langmuir*, 23:1403-1409.
- Xu Y, Yang L, Ye X.Y, He P.G, Fang Y.Z (2006). Impedance DNA biosensor using electropolymerized polypyrrole/multiwalled carbon nanotubes modified electrode. *Electroanalysis*, 18:873-881..
- Yang L.J, Li Y.B (2006). Protective role of supplement with foreign Bifidobacterium and Lactobacillus in experimental hepatic ischemia-reperfusion injury. *Journal of Microbiological Methods*, 64:9-16.
- Ye Y.K, Zhao J.H, Yan F, Zhu Y.L, Ju H.X (2003). Electrochemical behavior and detection of hepatitis B virus DNA PCR production at gold electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 18:1–8.
- Yea J-S, Ottovab A, Tienb H.T, Sheu F-S (2003). Impedimetric biosensors. *Bioelectrochemistry*, 59:65–72.
- Yin H.Y, Wang F.L, Wang A.L, Cheng J, Zhou Y.X (1996). High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. *Analytical Letters*, 40:85-94.
- Yotter R.A, Wilson D.M (2004). A review of photodetectors for sensing light-emitting reporters in biological systems. *IEEE Sensors Journal*, 4:412-429.
- Zayats M, Huang Y, Gill R, Ma C, Willner I (2006). Label-free and reagentless aptamer-based sensors for small molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 128:13666-13667.
- Zhao Y, Pang D, Hua S (1999). DNA-modified electrodes Part 3.: spectroscopic characterization of DNA-modified gold electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 388:93–101.

ÖZGEÇMİŞ

Çiğdem SAYIKLI ŞİMŞEK, 1984 yılında Tekirdağ' da dünyaya gelmiştir. Lise öğrenimini Tekirdağ Anadolu Lisesi' nde tamamlayarak İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Bölümünden 2007 yılında mezun olmuştur. 2010 yılında Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamış, 2012 yılında Kimya Anabilim Dalı'na yatay geçiş yapmıştır.