

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMÜNOBİYOSENSÖRLERDE BİYOMOLEKÜLLERİN DEDEKSİYONU İÇİN
İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

SEVECEN TUĞLU GÜRPINAR

DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ZEYNEP AKDESTE
EŞ DANIŞMAN
DOÇ. DR. SELMA ÖZTÜRK

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İMMÜNOBİYOSENSÖRLERDE BİYOMOLEKÜLLERİN DEDEKSİYONU İÇİN
İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Sevecen TUĞLU GÜRPINAR tarafından hazırlanan tez çalışması 25.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü'nde **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep AKDESTE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK
TÜBİTAK MAM GMBE

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep AKDESTE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sevil YÜCEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Zafer Ziya ÖZTÜRK
Gebze Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ
İstanbul Medipol Üniversitesi



Bu çalışma, TÜBİTAK 110G139 (5123101) ve 5133101 numaralı projeleri ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın oluşumunda, planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, değerli zamanlarını esirgemeyerek her fırsatta çalışmamla yakından ilgilenen, yol gösteren, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli tez hocalarım sayın Dr. Öğr. Üyesi Zeynep AKDESTE'ye ve sayın Doç. Dr. Selma ÖTÜRK'e teşekkür ve minnetimi özellikle belirtmek isterim.

Tez çalışmam boyunca yapmış oldukları değerlendirmeler ile sağladıkları bilimsel destekten ötürü doktora tez izleme jüri üyesi hocalarım sayın Prof. Dr. Ziya ÖZTÜRK'e, Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'e ve Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ'ye, çalışmalarımın yerine getirilmesinde maddi ve manevi imkân sağlayan TÜBİTAK MAM GMBE Yönetimi ve çalışma arkadaşlarıma, yıllardır öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Yıldız Teknik Üniversitesi'ne, Biyomühendislik Bölümüne, Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Sevil YÜCEL'e ve değerli hocalarıma çok teşekkür ederim.

TÜBİTAK MAM GMBE Tanı Teknolojileri Laboratuvarlarında bilgi birikimlerini bizlere her zaman aktaran sayın hocalarım Doç.Dr. Fatıma YÜCEL'e ve Dr. Esin Akçel'e çok teşekkür ederim. Çalışmalarımındaki katkılarından dolayı İlke SÜDER'e, Şerife Şeyda PİRİNÇCİ'ye, tez yazarken sabırla bana destek olan sevgili arkadaşım Dr. Ahsen MORVA YILMAZ'a, teknik destek sağlayan Harun KOCAAĞA'ya ve Şakir SEKMEN'e, manevi desteği ile yanımda olan İlham BAHAR ve Meryem IŞIK'a, arkadaşlıkları ve destekleri için diğer tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Sevgisi ile hayatımı anlamlandıran, sabrı ile beni her zaman destekleyerek gücüme güç katan eşim Doğan Serdar GÜRPINAR'a, anne ve babam Nur ve Osman TUĞLU'ya, tüm yardımları ve sevgileri ile her zaman yanımda olan ikinci anne ve babam Şükran ve Kadir GÜRPINAR'a, geceler boyu süren çalışmalarımda beni uyumadan bekleyen, bu tezi armağan ettiğim, hayatımın en güzel varlığı olan sevgili ve biricik kızım Yağmur GÜRPINAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2018

Sevecen TUĞLU GÜRPINAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTIMA LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xvi
ÖZET	xviii
ABSTRACT.....	xx
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	4
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİ	7
2.1 Biyosensörler	6
2.1.1 Biyosensörün Tanımı	7
2.1.2 Biyosensörlerin Bileşenleri ve Sınıflandırılması	8
2.1.3 Biyolojik Algılayıcı Türüne Göre Biyosensörler	9
2.1.4 İmmünoensörler	9
2.1.5 Transdüser Türüne Göre İmmünoensörler	10
2.1.6 Kuars Kristal Mikrobalans (QCM) Sensörleri	11
2.1.7 Biyosensörlerin Performans Parametreleri	14
2.1.8 QCM’de İmmobilizasyon	16
2.1.8.1 Kendiliğinden Oluşan Tek Katman (SAM)	18
2.1.8.2 Dendronlar	19
2.1.8.3 QCM’de Kompetitif Algılamaya Dayalı Tanıma	21
2.2 Mikotoksinler ve Mikotoksin Sensörleri	22

BÖLÜM 3

MATERYAL METHOD.....	33
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	32
3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler.....	33
3.1.2.1 Protein A Kolonunda Saflaştırma İşleminde Kullanılan Tamponlar	35
3.1.2.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri	36
3.1.2.3 Diğer Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	37
3.2 İmmünojen Hazırlama.....	37
3.2.1 Protein Katyonizasyonu ve FUM Konjugatlarının Elde Edilmesi	38
3.2.1.1 Proteinlerin Katyonizasyon Basamakları.....	38
3.2.1.2 FUM-Protein Konjugasyonları	39
3.2.1.3 FUM-Polimer Konjugasyonları	41
3.2.2 Konjugat Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler ve Cihazlar	42
3.2.2.1 FUM-cOVA Konjugatının HPLC ile Karakterizasyonu	42
3.2.2.2 FUM-Polimer Konjugatlarının HPLC ile Karakterizasyonu	43
3.2.2.3 FTIR ile FUM-cOVA Konjugatının Karakterizasyonu.....	44
3.2.2.4 FUM-Polimer Konjugatlarının Karakterizasyonunda Nano Boyut Ölçümü	44
3.2.2.5 FUM-Polimer Konjugatlarının UV-VIS Spektrofotometre ile Karakterizasyonu	45
3.3 İmmünizasyon ve Serumda Antikor Titresinin Takibi	46
3.3.1 İmmünizasyon	46
3.3.2 Serumda Antikor Titresinin Takibi	46
3.4 Hibridoma Teknolojisi ile FUM Spesifik Monoklonal Antikor Elde Edilmesi	48
3.4.1 Besleyici Hücrelerin Hazırlanması	49
3.4.2 Bağışıklanmış Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi	49
3.4.3 Myeloma (FO Hattı) Hücrelerinin Hazırlanması	50
3.4.4 Hücrelerin Sayımı.....	50
3.4.5 Füzyon İşlemi	50
3.4.6 Anti FUM 8F4 Monoklonal Antikorumun Karakterizasyonu ve Saflaştırılması.....	51
3.4.6.1 Anti FUM 8F4 Monoklonal Antikorida Çapraz Reaksiyon ve Özgünlük Belirlenmesi	51
3.4.6.2 Anti FUM 8F4 Monoklonal Antikorumun Afinitesinin ve İso tipinin Belirlenmesi	52
3.4.6.3 Anti FUM 8F4 Monoklonal Antikorumun Saflaştırılması	52
3.5 Fumonisin İmmüno sensörünün Geliştirilmesi	53
3.5.1 QCM cihazı ve LOD hesaplama	54
3.5.2 FUM İmmüno sensörünün Geliştirilmesine Ait Ön Çalışmalar.....	55
3.5.2.1 Altın Yüzeylerde SAM Oluşturulması	56
3.5.2.2 SAM FUM İmmobilizasyonu için Aktivatör Oranlarının Tayini.....	56
3.5.2.3 FUM Kaplı Sensör Yüzeyinde Rejenerasyon Şartlarının Tayini	57

3.5.2.4	Anti FUM 8F4 Uygulama Koşullarının İncelenmesi.....	58
3.5.2.5	MUA ile SAM Modifiye Yüzeyde İmmobilize FUM Konsantrasyonunun Optimizasyonu	60
3.5.3	İmmobilizasyon Etkinliklerinin Arttırılmasına Yönelik Alternatif Lineer Moleküller ile SAM Oluşturulması.....	61
3.5.3.1	MUD ile SAM Yapılmış Yüzeyde İmmobilize FUM Konsantrasyonunun Optimizasyonu	61
3.5.3.2	MUO ile SAM Yapılmış Yüzeyde İmmobilize FUM Konsantrasyonunun Optimizasyonu	62
3.5.3.3	MUA, MUD ve MUO Kullanılarak SAM Yapılmış Yüzeylerde FUM Algılanması	63
3.5.4	Fumonisin İmmünoşensöründe İmmobilizasyon Etkinliklerinin Arttırılmasına Yönelik Dendronlar ile SAM Çalışmaları	65
3.5.4.1	G3 DND, G4 DND ve G5 DND ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM Kaplama Optimizasyonu.....	65
3.5.4.2	İki Katmanlı SAM Yapılmış Yüzeylerde FUM Kaplama Optimizasyonu.....	67
3.5.4.3	Dendronlar ile Tek Katmanlı ve MUD ile İki Katmanlı SAM Yapılmış Yüzeylerde FUM Algılanması	70
BÖLÜM 4		
SONUÇLAR		
4.1	Antikor Geliştirme.....	71
4.1.1.	İmmünojen Hazırlama	71
4.1.2.	FTIR ile cOVA ve FUM-cOVA Konjugatlarının Karakterizasyonu	72
4.1.3.	HPLC ile Katyonize OVA'nın ve FUM Konjugatlarının Karakterizasyonu 76	
4.1.4.	FUM-PAA Konjugatlarının UV-VIS Spektrofotometresi ve HPLC ile Karakterizasyonu	85
4.1.5.	FUM – PAA ve FUM-PAA-OVA Konjugatlarının Zetasizer ile Çap Ölçümü	90
4.2.	FUM Konjugatları ile İmmünizasyonlar.....	93
4.2.1.	FUM-Polimer Konjugatları ile Farelerin İmmünizasyonu ve FUM Spesifik İmmün Yanıtın (Pab) Belirlenmesi.....	94
4.2.2.	FUM-cProtein Konjugatları ile İmmünizasyon ve FUM Spesifik İmmün Yanıtın (pAb) Belirlenmesi	95
4.2.3.	Hibrit hücre Geliştirme	98
4.2.3.1.	Anti FUM 8F4 Antikorumun Karakterizasyonu	100
4.2.3.2.	Anti FUM 8F4 İzotipinin Belirlenmesi	100
4.2.3.3.	Anti FUM 8F4'ün Afinitesinin Belirlenmesi	101
4.3.	FUM Dedeksiyonu İçin QCM İmmünoşensörü Geliştirilmesi.....	102
4.3.1.	Aktivatör Oranlarının Tayini	103
4.3.2.	SAM Modifiye Yüzeyde FUM Kaplama Optimizasyonu.....	104
4.3.3.	Anti FUM 8F4 Uygulama Koşullarının Belirlenmesi.....	106
4.3.4.	MUA ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM Algılanması.....	107

4.3.5. İmmobilizasyon Etkinliklerinin Arttırılmasında Alternatif Lineer Moleküller ile SAM Oluşturulması.....	115
4.3.5.1. MUD ve MUO ile SAM Yüzeyde FUM Kaplama Optimizasyonu	116
4.3.6. FUM İmmünoşensörü Geliştirilmesinde İmmobilizasyon Etkinliklerinin Dendronlar ile Arttırılması.....	123
4.3.6.1. Dendronlar ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM Kaplama Optimizasyonu.....	124
4.3.6.2. Dendronlar ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM Algılanması.....	125
4.3.7. İmmobilizasyon Etkinliklerinin Arttırılmasında Lineer ve Dendron Yapıların Bir Arada Kullanımı.....	131
4.3.7.1. MUD ve Dendronların Birlikte Kullanımı ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM Kaplama Optimizasyonu.....	132
4.3.7.2. MUD ve Dendronların Birlikte Kullanımı ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM Algılanması.....	133
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	139
KAYNAKLAR.....	153
EK-A	
HPLC SONUÇLARI.....	159
ÖZGEÇMİŞ.....	173

SİMGE LİSTESİ

—	
\bar{x}	Ölçüm setinin istatistiksel ortalama değeri
\$	Dolar
%	Yüzde
Δf	Frekans Farkı
°C	Santigrad Derece
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
Au	Altın
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare
Da	Dalton
Dk	Dakika
Hz	Hertz
kDa	Kilo Dalton
L	Litre
m	Kalibrasyon eğrisinin eğimi
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
Mw	Moleküler Ağırlık
ng	Nanogram
nm	Nanometre
p	Yoğunluk
pg	Pikogram
ppm	Milyonda bir (mg/L) kısım
rpm	Dakikadaki devir sayısı
Sd	Körün (referans eğrinin) standart sapması
Sn	Saniye
Tl	Türk Lirası
V	Hacim
x	Her bir frekans değişiminin değeri

KISALTMA LİSTESİ

Ab	Antikor
ABD	Amerika Birleşik Devletleri'nde
AC	Alternatif Akım
AFL	Aflatoksinler
Ag	Antijen
Anti FUM 8F4	Fumonisine Özgü Geliştirilen Monoklonal Antikor
Anti FUM pAb	Fumonisine Özgü Geliştirilen Poliklonal Antikor
AP	Alkalen Fosfataz
AS	Amonyum Sülfat
BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri
BSA	Bovine Serum Albumin
cBSA	Katyonize Bovine Serum Albumin
CDI	1,1'-Carbonil-diimidazol
cOVA	Katyonize Ovalbumin
cPRT	Katyonize Protein
CS	Süpernatant
cTF	Katyonize Apo-Transferrin
d.H2O	Distile Su
DAS	Doymuş Amonyum Sülfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's (Medium- high glucose) Medyum
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DPT	Devlet planlama Teşkilatı
E.C.	Avrupa Komisyonu
EC	Elektrokimyasal
EDA	Etilen Diamin
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMIT	Enzim Aktivitesine Bağlı İmmunoteknik
Fab	Antijen Bağlama
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FPIA	Flouresans Polarization İmmunoassay

FRET	Fluoresans Rezonans Enerji Transferi
FTIR	Fourier Transform Infrared
FUM	Fumonisin B1
G3 DND	Polyester bis-MPA dendron, 8 hidroksil, 1 thiol, G3
G4 DND	Polyester bis-MPA dendron, 32 hidroksil, 1 thiol, G4
G5 DND	Polyester bis-MPA dendron, 16 hidroksil, 1 thiol, G5
GC/MS	Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi
Gly	Glisin
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
HAT	Hypoxanthine, Aminopterin ve Thymidine
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HRP	Horseradış Peroksidaz (bayır turpu peroksidazı)
IAK	İmmünafinite Kolonu
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Birliği
IgG	İmmünoglobulin G
IR	Kızılötesi
KAS	Kristalize Amonyum Sülfat
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrofotometresi
LOD	Tespit sınırı (limit of detection)
LOQ	Kantitatif Ölçüm Sınırı (Limit of Quantitative Measurement)
mAb	Monoklonal antikor
MAM	Marmara Araştırma Merkezi
MES	2-(N-Morfolin) ethansülfonik asit hidrat
MUA	11-Merkaptoundekanoik asid
MUD	11-Merkaptoundekanamide
MUO	11-Merkapto-1-undekanol
NHS	N-Hydroxysuccinimide
OD	Optik Yoğunluk
OTA	Okratoksin A
OVA	Ovalbumin
PAA	Poliakrilik asid
PBS	Phosphate buffered saline (fosfat tamponu)
PE	Polielektrolit
PEG	Polyetilen glikol 4000
pH	Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması (asidite ölçüsü)
PNPP	4-nitrophenyl phosphate
PRT	Protein
QCM	Kuvars Kristal Mikrobalans
RP	Ters Faz
RT	Alıkonma Zamanı
SAM	Self Assambled Monolayer (kendiliğinden oluşan tabaka)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SPDP	3-(2-Pyridyldithio) propionic acid N-hydroxysuccinimide ester
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
TF	Apo-Transferrin
TFA	Trifloro Asetik Asid

THF	Tetrahidroforan
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UV	Ultraviyole
ZEA	Zearalenonun



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Biyosensör şeması..... 7
Şekil 2. 2	Biyosensörlerin bileşenlerinin genel gösterimi..... 8
Şekil 2. 3	MUA ile yapılmış SAM'lerin altın (Au) yüzeyde istiflenmesinin gösterimi ... 19
Şekil 2. 4	Dendronlar ile yapılmış SAM'lerin altın (Au) yüzeyde sembolik gösterimi .. 20
Şekil 2. 5	Toksin immobilize sistemlerde toksin algılanmasının şematik gösterimi..... 22
Şekil 2. 6	Fumonisin (B1)'in moleküler yapısı..... 29
Şekil 3. 1	Ovalbumin katyonizasyon reaksiyonu (cOVA) 39
Şekil 3. 2	FUM'in EDC çapraz bağlayıcı ile cOVAproteninine konjugasyonu..... 40
Şekil 3. 3	QCM 200 cihazı ve 5 MHz'lik AT kesim altın kaplı kuvars kristal elektrotlar 54
Şekil 3. 4	MUA SAM oluşturulmuş altın yüzeyde FUM immobilizasyon basamakları.. 61
Şekil 3. 5	MUD SAM oluşturulmuş altın yüzeyde FUM immobilizasyon basamakları . 62
Şekil 3. 6	MUO SAM oluşturulmuş altın yüzeyde FUM immobilizasyon basamakları . 63
Şekil 3. 7	G3 DND ile SAM oluşturulmuş altın yüzeyde FUM immobilizasyon basamakları..... 67
Şekil 3. 8	MUD ve G4 DND ile SAM oluşturulmuş altın yüzeyde FUM immobilizasyon basamakları..... 69
Şekil 4. 1	cOVA ve OVA molekülüne ait FTIR spektrumu 73
Şekil 4. 2	FT-IR ile cOVA ve cOVA-FUM (nFUM/ncOVA: 10, 20, 30, 40) molekülünün kıyaslamalı gösterimi 75
Şekil 4. 3	FUM'nin moleküler yapısı 75
Şekil 4. 4	cOVA ve OVA proteinlerine ait HPLC (UV detektör) kromatogramı 77
Şekil 4. 5	cOVA ve OVA proteinlerine ait HPLC (FLD detektör) kromatogramı 79
Şekil 4. 6	Artan mol oranlarında hazırlanmış FUM-cOVA konjugatlarına ait HPLC (FLD detektör) kromatogramları..... 80
Şekil 4. 7	Artan konjugat oranları ile pik şiddetleri grafiği (FLD detektör)..... 81
Şekil 4. 8	Artan mol oranlarında hazırlanmış FUM-cOVA konjugatlarına ait HPLC (UV detektör) kromatogramları..... 82
Şekil 4. 9	Artan konjugat oranları ile pik şiddetleri grafiği (UV:280; RT 1,7 dk 5,6 dk)83
Şekil 4. 10	PAA, FUM, OVA, FUM-PAA ve FUM-PAA-OVA örneklerine ait UV-VIS spektroskopik absorbands ölçümleri grafiği..... 85
Şekil 4. 11	FUM, OVA, PAA, FUM-PAA, FUM-PAA-OVA 'ya ait UV detektör ile belirlenen HPLC kromatogramları 86
Şekil 4. 12	FUM, OVA, PAA, FUM-PAA, FUM-PAA-OVA 'ya ait FLD detektör ile belirlenen HPLC kromatogramları 88

Şekil 4. 13	Apolar bir çözücü içerisinde a) OVA ve b) PAA-FUM-OVA konjugatı	89
Şekil 4. 14	PAA-FUM-OVA, FUM-OVA ve FUM-PAA konjugatlarının PBS tamponunda moleküler sayıca miktara bağlı çap boyutlarının ölçümü A) PBS B) MES tamponunda yapıldı.....	91
Şekil 4. 15	OVA ve cOVA 'nın PBS ve MES tamponunda a) sayıca miktara bağlı moleküler çap ölçümleri	92
Şekil 4. 16	FUM-PAA ve FUM-PAA-OVA ile immünize edilen hayvanlarda oluşan FUM antikor titresinin ELISA ile belirlenmesi.....	95
Şekil 4. 17	A) FUM-cBSA ve B) FUM-cOVA konjugatları ile alınan antikor yanıtlarının ELISA ile takibinde plak kaplama optimizasyonu.....	96
Şekil 4. 18	A)FUM-cBSA ve B) FUM-cOVA konjugatları ile immünize fare serumlarında yapılan ELISA sonuçları (1/1000 dilüsyonlarında)	97
Şekil 4. 19	A) cBSA-FUM ve B) FUM-cOVA immünize farelerde FUM'e spesifik yanıtının yarışimli ELISA ile belirlenmesi (Grafikler logaritmik olarak verilmiştir) ...	98
Şekil 4. 20	Elde edilen FUM spesifik antikorun (8F4) diğer mikotoksinler, mikotoksinlerin çözüldüğü solventler ve proteinler ile yarışimli ELISA sonuçları	100
Şekil 4. 21	Anti FUM 8F4 antikorunda izotip belirlenmesi.....	101
Şekil 4. 22	8F4 anikorunun afinitesinin yarışimli ELISA ile belirlenmesi	102
Şekil 4. 23	3 farklı konsantrasyonda FUM immobilizasyonunda kullanılan aktivatör oranları	103
Şekil 4. 24	FUM kaplama optimizasyonunda elde edilen sensör cevapları	105
Şekil 4. 25	Anti FUM 8F4 uygulaması ile elde edilen sensör cevapları	106
Şekil 4. 26	1,75 mM FUM immobilize yüzeyde A) 0,1 mg/ml B) 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ve 2 mM FUM immobilize yüzeyde C) 0,05 mg/ml D) 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 ile FUM konsantrasyonlarına bağlı sensör cevapları	109
Şekil 4. 27	1,75 mM ve 2 mM FUM immobilize yüzeyde 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri (1,75 mM FUM immobilize yüzeyde a) 0,1 mg/ml b) 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ile ve; 2 mM FUM immobilize yüzeyde c) 0,05 mg/ml d) 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 ile hazırlandı)	110
Şekil 4. 28	0-0,5 ppm FUM konsantrasyonlarının inkübasyonu ile oluşan frekans farklarından elde edilen kalibrasyon eğrileri. 1,75 mM FUM immobilize yüzeyde a) 0,1 mg/ml b) 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ve 2 mM FUM immobilize yüzeyde c) 0,05 mg/ml d) 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 ile hazırlandı	112
Şekil 4. 29	MUD ve MUO ile SAM oluşturulmuş yüzeylerde FUM kaplama optimizasyonu	116
Şekil 4. 30	A) MUA ve B) MUD ile SAM yapılmış yüzeylerde; artan FUM konsantrasyonlarına bağlı sensör cevapları	118
Şekil 4. 31	A) MUD, B) MUO ile SAM oluşturulmuş yüzeylerde 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri	119
Şekil 4. 32	A) MUD ve B) MUO ile SAM oluşturulmuş yüzeylerde 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri.....	120
Şekil 4. 33	MUA, MUD ve MUO ile SAM yapılan yüzeylerde anti FUM 8F4 ve %5 FBS bloklaması ile elde edilen frekans farkları	122

Şekil 4. 34	Dendron yüzeylerde FUM kaplama optimizasyonuna ait ortalama frekans farkları.....	124
Şekil 4. 35	A) G3 DND, B) G4 DND ve C) G5 DND ile SAM yapılmış yüzeyde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ile FUM konsantrasyonlarının miktarına bağlı sensör cevapları.....	126
Şekil 4. 36	A) G3 DND, B) G4 DND ve c) G5 DND ile SAM yapılmış yüzeyde anti FUM 8F4'ün 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile elde edilen frekans farkları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri	127
Şekil 4. 37	A) G3 DND, B) G4 DND ve c) G5 DND ile SAM yapılmış yüzeyde antiFUM 8F4'ün 0-0,5 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile elde edilen frekans farkları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri	129
Şekil 4. 38	MUD lineer SAM üzerinde oluşturulan G3 DND, G4 DND ve G5 DND dendronik SAM yüzeylerde FUM kaplama optimizasyonuna ait ortalama frekans farkları.....	132
Şekil 4. 39	A) MUD/G4 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu, B) MUD/G4 DND yüzeyde 2mM FUM immobilizasyonu, C) MUD/G5 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu ve D) MUD/G5 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu yapılmış yüzeylerde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ile FUM konsantrasyonlarının miktarına bağlı sensör cevapları	134
Şekil 4. 40	A) MUD/G4 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu, B) MUD/G4 DND yüzeyde 2mM FUM immobilizasyonu, C) MUD/G5 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu ve D) MUD/G5 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu yapılmış yüzeylerde anti FUM 8F4'ün 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile elde edilen frekans farkları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri	135
Şekil 4. 41	A) MUD/G4 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu, B) MUD/G4 DND yüzeyde 2mM FUM immobilizasyonu, C) MUD/G5 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu ve D) MUD/G5 DND yüzeyde 2 mM FUM immobilizasyonu yapılmış yüzeylerde anti FUM 8F4'ün 0-0,5 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile elde edilen frekans farkları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri	137

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1 Son yıllarda ZEA dedeksiyonuna yönelik geliştirilen, algılamaelemanı olarak antikor kullanılan immünosensörler çeşitleri	25
Çizelge 2. 2 Son yıllarda DON dedeksiyonuna yönelik geliştirilen antikor temelli immünosensör çeşitleri	26
Çizelge 2. 3 AFL, DON, ZEA ve FUM analizlerinin bir arada yapıldığı antikor temelli biyosensörler üzerine son yıllarda yapılan çalışmalar	27
Çizelge 2. 4 Fumonisin tayinine yönelik geliştirilen antikor temelli biyosensörler	30
Çizelge 3. 1 Deneylerde kullanılan kimyasallar ve biyolojik maddeler	32
Çizelge 3. 2 Kullanılan FUM Konjugatları	38
Çizelge 3. 3 Konjugasyonda kullanılan protein, FUM ve EDC miktarları	40
Çizelge 3. 4 HPLC Mobil faz gradyan değişime ait solvent hacmi ve akış hızı	43
Çizelge 3. 5 Uygulanan anti FUM 8F4 koşulları, bloklama elemanları, kullanılan kristal sayıları ile kristallerdeki immobilize FUM konsantrasyonları	59
Çizelge 4. 1 Organik grupların karakteristik IR absorpsiyon frekansları	74
Çizelge 4. 2 UV ve FLD detektörler ile elde edilen pik alanları ve FUM-cOVA konjugasyon oranları	84
Çizelge 4. 3 HPO denklemlerinden elde edilen PAA-FUM konjugasyon oranları	89
Çizelge 4. 4 PAA-FUM-OVA, FUM-OVA ve FUM-PAA konjugatlarının MES ve PBS tamponlarında çap ölçümüne dair sonuçlar	91
Çizelge 4. 5 OVA ve cOVA 'nın PBS ve MES tamponunda yarıçapları	93
Çizelge 4. 6 Füzyon işlemlerine ait bilgiler	99
Çizelge 4. 7 Farklı aktivatör oranları ile yapılan FUM immobilizasyonları ile elde edilen frekans farkları	104
Çizelge 4. 8 FUM kaplama miktarına bağlı ölçülen frekans farkları	105
Çizelge 4. 9 Antikor uygulama şartlarına bağlı elde edilen frekans farkları	107
Çizelge 4. 10 1,75 mM ve 2 mM FUM immobilize yüzeylerde (0,1 ve 0,05 mg/ml anti FUM 8F4) artan FUM inkübasyonu ile oluşan frekans farkları ve sinyal azalma oranları	111
Çizelge 4. 11 1,75 mM ve 2 mM FUM immobilize yüzeyde 0,05 mg/ml ve 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılması ile elde edilen LOD ve LOQ değerleri	113
Çizelge 4. 12 MUD ve MUO ile SAM oluşturulmuş kristallerde FUM kaplama optimizasyonuna ait frekans farkları	117

Çizelge 4. 13 MUD ve MUO ile SAM oluşturulmuş yüzeylerde artan FUM inkübasyonu ile oluşan frekans farkları ve sinyal azalma oranları.....	119
Çizelge 4. 14 MUD ve MUO ile SAM oluşturulmuş olan yüzeylerde hesaplanan LOD ve LOQ değerleri (0-0,5 ppm aralığında FUM inkübasyonu).....	121
Çizelge 4. 15 Dendron yüzeylerde FUM kaplama miktarına bağlı ölçülen frekans farkları	125
Çizelge 4. 16 G3 DND,G4 DND ve G5 DND ile SAM yapılmış yüzeyde inkübe edilen FUM konsantrasyonlarının miktarına bağlı frekans farkları ve sinyal azalma oranları	128
Çizelge 4. 17 G3 DND, G4 DND ve G5 DND ile SAM oluşturulmuş olan yüzeylerde hesaplanan LOD ve LOQ değerleri.....	130
Çizelge 4. 18 MUD ve Dendron kaplı yüzeylerde FUM kaplama miktarına bağlı ölçülen frekans farkları.....	133
Çizelge 4. 19 MUD G5 DND ve MUD G4 DND yüzeylerde 1,75 mM ve 2 mM FUM immobilizasyonu sonrası inkübe edilen FUM konsantrasyonlarının miktarına bağlı frekans farkları ve sinyal azalma oranları.....	136
Çizelge 4. 20 MUD/G4 DND ile SAM sonrası 1,75 mM ve 2 mM FUM, MUD/G4 DND ile SAM sonrası 1,75 mM ve 2mM FUM immobilizasyonu yapılan yüzeylerde hesaplanan LOD ve LOQ değerleri (FUM miktarı -0-0,5 ppm)	138
Çizelge 5. 1 QCM immünoensöründe FUM deteksiyonuna yönelik geliştirilen immobilizasyon yüzeylerinden elde edilen LOD, LOQ, korelasyon katsayısı, SD, Frekans farkları	150

İMMÜNOBİYOSENSÖRLERDE BİYOMOLEKÜLLERİN DEDEKSİYONU İÇİN İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Sevecen TUĞLU GÜRPINAR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Zeynep AKDESTE

Eş Danışman: Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK

Biyosensörler, bir biyolojik algılayıcı ile hedef analitin arasındaki etkileşimin yarattığı değişiklikten sinyal üreten bir transdüserin kombinasyonundan oluşan cihazlardır. Biyosensörlerin performans parametreleri; hızlı geriye dönme zamanı, dinamik cevap, tekrarlanabilirlik, seçicilik, kantitatif ölçüm sınırı, tespit sınırı, geniş ölçüm aralığı, doğrusallık ve hassasiyettir. Biyosensörlerin hassasiyetine büyük ölçüde etki eden immobilizasyon etkinlikleri biyoalgılayıcı yüzeyde farklı methodlar ile gerçekleştirilmektedir. Tez kapsamında yapılan çalışmada elektrod yüzeyinde kendiliğinden oluşan tek tabakalar (self assembled monolayer (SAM)) oluşturularak analit immobilizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında geliştirilen kuvars kristal mikrobals (QCM) immünosensöründe immobilizasyon etkinliğinin belirlenmesi çalışmaları için Fumonisin (FUM) biyomolekülü model olarak kullanılmıştır. FUM, *Fusarium Moniliforme* ve *Fusarium Proliferatum* isimli küf mikroorganizmaları tarafından üretilen bir mikotoksin türüdür ve diğer mikotoksinler gibi ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) , Avrupa Komisyonu (E.C.) ve ülkemizde Türk Gıda Kodeksi tarafından getirilen regülasyonlar (düzenlemeler) ile izlenmektedir. FUM kontaminasyonunda laboratuvar odaklı enstrümantal analitik sistemler ile tayinlerin yanısıra yerinde tespit imkanları sunmasına bağlı olarak biyosensörler ile tayin metodları üzerine çalışmalar da geliştirilmektedir. Tez kapsamında FUM'ne karşı üretilen Monoklonal Antikorlar (Mab) kullanılarak FUM

dedeksiyonu yapabilen QCM immünosensörü ilk kez geliştirilmiştir. Çalışmada immobilizasyon etkinliğinin önemini ortaya koyan stratejiler sayesinde regülasyonların belirlediği aralıklarda FUM tayini yapılabilen bir sensör geliştirildi. FUM'nin yüzeye immobilizasyonunda SAM ajanı olarak en sık kullanılan 11-merkaptoundekanoik asit'in yanısıra yine lineer ajanlardan 11-merkaptoundekanamid (MUD) ve 11-merkaptoundekanol (MUO) kullanılarak yüzey modifikasyonları yapıldı. Immobilizasyon etkinliğinin arttırılmasında lineer ajanlara alternatif olarak; kendiliğinden SAM oluşturmaları, farklı topografik yapıları ile analiti sunma/yakalama kabiliyetleri ve yüksek derecede ıslanabilme özelliklerinden dolayı dendronlar kullanıldı. Immobilize olan analitin elektrodla ve birbirlerine olan uzaklıklarının ölçümlerdeki hassasiyet üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 3 farklı nesilden (jenerasyon) dendronlar kullanıldı. Bu amaçla bis-MPA dendron-8-hidroksil-1thiol (G3 DND), bis-MPA dendron-16 hidroksil-1 thiol (G4 DND) ve bis-MPA dendron-32 hidroksil-1 thiol (G5 DND) dendronları ile FUM immobilizasyonları gerçekleştirildi. Yüzeyde dendronların kullanılması ile yüksek sensör yanıtlarının elde edilmesine karşın verilerde güven sınırlamasından dolayı iki katmanlı sensör yüzeyleri oluşturuldu ve MUD ile SAM oluşturulduktan sonra yüzeyde ikinci bir katman olarak dendronlar kullanıldı. Geliştirilen tüm elektrod yüzeyleri ölçümlerde algılama, hassasiyet, doğruluk ve tekrarlanabilirlik parametreleri açısından irdelendi. Biyosensörlerde immobilizasyon etkinliğini ortaya koyan bu çalışmalar sayesinde, 0.008 ppm algılama limitine sahip, güvenilir, tekrarlanabilir, yüksek hassasiyette FUM ölçümü yapabilen QCM immünosensörü geliştirildi.

Anahtar Kelimeler: Immünosensör, dedeksiyon limiti, fumonisin, kuvars kristal mikrobaleans (QCM), dendron

**DEVELOPMENT OF IMMOBILIZATION METHODS FOR DETECTION OF
BIOMOLECULES IN IMMUNOBIOSENSORS**

Sevecen TUĞLU GÜRPINAR

Department of Bioengineering

PhD. Thesis

Adviser: Asst. Prof. Dr. Zeynep AKDESTE

Co-Adviser: Assoc. Prof. Dr. Selma ÖZTÜRK

Biosensors are devices that consist of a combination of a transducer that generates a signal from the change caused by the interaction between a biological sensor and the target analyte. Performance parameters of biosensors are fast response time, dynamic response, reproducibility, selectivity, quantitative measurement limit, detection limit, wide measurement range, linearity and precision. The immobilization activities, which affect sensitivity of the biosensors, are achieved by different methods on the biosensor surface. In this thesis, analyte immobilization was performed by forming single layers (self assembled monolayer (SAM)) on the surface of the electrode. Fumonisin (FUM) biomolecule was used as a model to determine immobilization activity in developed quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor in thesis study.

FUM is a mycotoxin species produced by the fungus microorganisms named *Fusarium Moniliforme* and *Fusarium Proliferatum* and it is followed by the US Food and Drug Administration (FDA), European Commission (E.C.), Turkish Food Codex(T.F.C) regulations as other mycotoxins. In addition to laboratory-focused instrumental analytical systems in FUM contamination, biosensors and identification methods have also been developed depending on the availability of on-site detection facilities. In the thesis, for the first time, QCM immunosensor capable of FUM detection was

developed by using Monoclonal Antibodies (Mab) produced against FUM. In this study FUM immunosensors were developed that can be identified at intervals determined by the regulation because of strategies that demonstrate the importance of immobilization effectiveness. Surface immobilization was performed by using 11-mercaptoundecanamide (MUD) and 11-mercaptoundecanol (MUO) from linear agents as well as 11-mercaptoundecanoic acid, which is the most commonly used SAM agent in surface immobilization of FUM. Dendrons were used as an alternative to linear agents for enhancing immobilization efficiency due to spontaneous SAM formation, the ability to present / capture analytes with different topographic features, high degree of wettability and conductivity. Three different generations of dendrons were used to determine the effect of the immobilized analyte on the sensitivities of the electrodes and their distances to each other. For this purpose, FUM immobilization was performed with dendrons of bis-MPA dendron-8-hydroxyl-1 thiol (G3 DND), bis-MPA dendron-16 hydroxyl-1 thiol (G4 DND) and bis-MPA dendron-32 hydroxyl-1 thiol (G5 DND). High sensor responses were obtained by using the dendrons on the surface but due to the confidence constraint in the data, two layer sensor surfaces were created and dendrons were used as a second layer on the surface after MUD and SAM were created. All developed electrode surfaces were investigated in terms of perception, precision, accuracy and repeatability parameters in measurements. Through the studies the effect of immobilization on biosensors, QCM immunosensor has been developed for FUM detection, which have 0.008 ppm detection limit, reliable, reproducible, capable of high precision measurement.

Keywords: Immunosensor, limit of detection, fumonisin, quartz crystal microbalance (QCM), dendrons

1.1 Literatür Özeti

Biyosensörler, analit ile biyolojik aktif maddenin etkileşimi sonucu meydana gelen değişimleri ölçülebilir sinyale çeviren cihazlardır. Son yıllarda kullanım alanları ve piyasa ihtiyacı giderek artan biyosensörlerin tüketicinin kullanımına göre geliştirilmesi için hedefe yönelik tasarımlar yapılmalıdır. Analite yüksek spesifiklikte tanıma sağlayan biyolojik algılayıcının geliştirilmesi, uygulamaya yönelik kolay kullanımlı bir biyosensör ve transdüserin dizayn edilmesi, etkin metodolojinin belirlenmesi ve yüksek hassasiyette ölçümler için immobilizasyonların geliştirilmesi gereklidir [1].

Piezoelektrik temelli gravimetrik bir yöntem olan kuvars kristal mikrobalsans (QCM) sistemi, kolay kullanım teknikleri, kısa süreli analiz imkânı sağlaması, hassas analiz kabiliyeti, taşınabilir olması sayesinde yerinde tespitte olanak sağlaması, işaretleyici ajana gerek duymaması, düşük masraflı ve kullanıcı dostu olmasından dolayı mikotoksin analizlerinde kullanılmaya başlanmıştır [2], [3]. QCM immünosensöründe altın elektrodlar kendiliğinden oluşan tek tabakalar (SAM) oluşturularak antijen ya da antikorun immobilizasyonuna olanak sağlayacak şekilde hazırlanırlar [4], [5]. Immobilizasyonda kovalent bağlama, adsorpsiyon, çapraz bağlama ve tutuklama yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak immobilizasyon yöntemleri arasında antijen-antikor bağlanmasına ve ayrılmasına imkân sağlayan en etkin yöntem kovalent bağ ile immobilizasyondur [6].

İmmobilizasyonda yeni yöntemler geliştirilerek biosensör etkinlikleri duyarlılık, seçicilik, hassasiyet, tutarlılık, dedeksiyon limit değerleri açısından

iyileştirilebilmektedir. Biyosensörlerin immobilizasyonunda ve yüzey modifikasyonlarında dendrimerler kullanılarak biyosensörlerde hassasiyet artırılması üstüne çalışmalar mevcuttur [7]. Dendrimerler bir çekirdek, çekirdek etrafındaki dallanma birimleri (dendronlar) ve fonksiyonel yüzey gruplarından oluşurlar. Dendrimerler ilaç taşıma sistemleri, görüntüleme sistemleri ve malzeme biliminin yanı sıra küçük kimyasal yapıli moleküllerin dedeksitonu için geliştirilen immünosensörlerde de kullanılmaktadır [8], [9], [10]. Sensör elektrodlarında kullanılan dendrimerler kendiliğinden tek katmanli tabaka (SAM) oluşturma eğilimindedirler. Altın yüzeylerin modifikasyonunda, kendiliğinden SAM oluşturmaları ve farklı ıslanabilme özellikleri, sterik engeli azaltmaları, yüksek iletkenlik özelliklerinden dolayı tez çalışması kapsamında immobilizasyon etkinliğinin arttırılması çalışmalarında ilk kez dendronlar tercih edildi [10].

Biyosensörlerde immobilizasyon etkinliklerinin geliştirilmesi çalışmasında model olarak fumonisin (FUM) biyomolekülü kullanıldı. *Fusarium* cinsi mantarların sekonder metabolitleri olan fumonisinler çeşitli türlerdeki farklı hastalıkların etiyopatojenezinden sorumlu bir mikotoksindir [11], [12]. Avrupa Komisyonu (E.C.), Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Türk Gıda Kodeksi yayınladıkları tebliğler ile halk sağlığını korumak için kirliliğın mümkün olduğunca engellenmesi ve azaltılması için önlemler alınmasını sağlamaktadırlar. FUM'nin analitik tayininde ince tabaka kromatografisi (ITK), yüksek basınçli sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisi-kütle spektrofotometresi (LC-MS) ve enzim işaretli immünosorbent testi (ELISA) ile yapılabilmektedir. Ancak ITK ile kantitatif analizler yapılabilmektedir. Öte yandan kalitatif tayine de olanak sağlayan ELISA, hatalı pozitif değer riski taşımaktadır ve uzun süreli bir protokole sahiptir. LC-MS ile tayinler ise yüksek maliyetlidir [11], [13]. Halen FUM tayininde HPLC en çok tercih edilen yöntem olsa da analiz sırasında kullanılan orto-fitaldehit (OPA) hatalı pozitif sonuç verebilmektedir. Son yıllarda biyosensörler sahip oldukları yüksek hassasiyet, kalitatif ölçüm yeteneği, taşınabilirlik ve kullanıcıya sundukları kolay kullanım avantajlarından dolayı sıklıkla tercih edilmektedirler. FUM tayini için de geliştirilen ve üzerinde çalışılan farklı biyosensör çeşitleri mevcuttur. Sahip olduğu yüksek seçicilik ve özgünlük sayesinde antikörlerin sensörlerde kullanımı ile oluşan immünosensörler, FUM tayininde 1996'dan bu yana üzerine en çok çalışılan biyosensör çeşidi olmuştur.

FUM immünosensörlerinden amperometrik ve impedimetrik tekniklerin kullanıldığı elektrokimyasal biyosensörler ile yüzey plasmon rezonansı (SPR), elektrokemilüminisans, floresans ve flouresans polarization immunoassay (FPIA) temelli optik biyosensörler önceki araştırmalarda en çok kullanılan sensör çeşitleri olmuştur [14], [15]. Optik ve elektrokimyasal sensörler dışında mikotoksin tayininde kullanılabilecek bir diğer immünosensör çeşidi QCM'dir.

1.2 Tezin Amacı

Tez çalışması kapsamında QCM temelli model bir immünosensör geliştirilmesi ve geliştirilen immünosensörde ölçümlerin yüksek hassasiyet ve doğrulukta yapılabilmesinde kritik bulunan analit immobilizasyonunun etkinliğinin arttırılması hedeflenmiştir. Daha etkin bir immobilizasyon ile sensörün algılama limitlerinin azaltılabileceği, analit immobilize edilen yüzeylerde ölçümler arası yüksek tutarlılık elde edilebileceği ve bu sayede tez çalışması kapsamında geliştirilen model immünosensör dışında genel kullanıma uygun bir immobilizasyon metodunun geliştirilebileceği düşünülmüştür.

İmmobilizasyonda etkinliğin incelenmesi için model olarak öncelikle QCM'de FUM dedeksiyonuna yönelik immünosensör geliştirilmesi hedeflendi. İmmünosensör geliştirilmesinde biyolojik algılayıcı olarak hibridoma teknolojisi ile laboratuvarımızda geliştirilen Mab kullanıldı. Mikotoksinler gibi küçük moleküllerin algılanmasına yönelik geliştirilen gravimetrik immünosensörlerde yüzeyde genellikle analit immobilizasyonu yapılarak yarışımlı sistemlerde ölçümler gerçekleştirilmektedir. Antikorların immobilize analit ile etkileşimine dayalı bu sistemlerde analitin güçlü bağlar ile yüzeye tutundurulması, analite özgün olmayan bağlanmalara izin vermeyecek yoğunlukta immobilizasyonların gerçekleşmesi, antikorun sterik engellere uğramasını önleyecek miktarda analitin immobilize olması ve gerekli durumlarda yönlendirme yapılması gerekmektedir. Bu amaçla altın elektrod yüzeyinde immobilizasyon için kendiliğinden oluşan tek katmanlı tabakalar (SAM) kullanılması öngörüldü ancak modifikasyonlar ve alternatif ajanlar ile geliştirilmesi hedeflendi. Tez kapsamında SAM ajanı olarak farklı fonksiyonel gruplara sahip lineer ajanlar ile immobilizasyonlar sağlanarak kimyasal modifikasyonların immobilizasyona etkisinin immünosensör hassasiyetindeki değişim

ile incelenmesi amaçlandı. Ayrıca alternatif olarak farklı morfolojiye sahip, çoklu dal yapılı ve hiper hidrofilik dendronların sulu ortamlarda yüzeylerindeki analiteri farklı açılar ile ortama sunma kabiliyetlerinden dolayı ilk kez tez çalışması kapsamında immobilizasyon aracı olarak kullanılması öngörüldü.

1.3 Hipotez

Bu çalışmanın hipotezi; geliştirilecek olan model bir immüno sensörde farklı ve yenilikçi immobilizasyon teknikleri uygulanarak, biyosensörün hassasiyeti, duyarlılığı, tekrarlanabilirliği, tutarlılığı, güvenilirliği ve analit algılama limitleri gibi parametrelerde iyileştirmelerin yapılmasıdır.

Kuvarzt kristalin mikrobals (QCM) temelli biyosensörler gravimetrik olarak analitin algılanmasına dayalı sistemlerdir. Mikotoksinler gibi küçük molekül ağırlıklı maddelerin algılanmasında QCM temelli immüno sensörler kullanılabilir. Tez kapsamında model olarak geliştirilen QCM temelli FUM immüno sensöründe biyolojik algılayıcının hibridoma teknolojisi kullanılarak elde edilmesi sayesinde antikorların büyük miktarlarda üretilebilmesi ve kolaylıkla saflaştırılabilmesi öngörülmektedir. QCM temelli FUM spesifik antikorun kullanıldığı immüno sensör, gravimetrik yöntemde algılama yaptığı için küçük molekül ağırlıklı FUM'nin doğrudan tayini yerine antikorun moleküler ağırlığından yararlanılarak ölçüm sistemi oluşturulmuştur. QCM kristallerinde altın yüzeyde analit immobilizasyonu yapılarak antikorun analit ile yarışımına dayalı kalibrasyon eğrileri elde edilerek miktar tayini gerçekleştirilebilmektedir.

Antikorun FUM' i algılaması için immünojen hazırlanmasında reaksiyona giren fonksiyonel grubundan immobilize edilmesi gerekmektedir. QCM' de en sık kullanılan immobilizasyon ajanı MUA' dır. SAM oluşturmak için kullanılan MUA' nın bu amaçla modifikasyonu gerçekleştirilmelidir. Ancak modifikasyonlar FUM immobilizasyonu için verim kaybına neden olabilmekte, bu durum sensör yanıtlarında tutarsızlığa ve düşük hassasiyette ölçüme neden olabilmektedir. Alternatif SAM ajanı olarak MUD kullanılması ile bu durumun önüne geçilmesi hedeflenmektedir.

Biyosensörlerde immobilizasyon etkinliği üzerine yapılan bazı çalışmalarda dendrimerlerin yüzey özelliklerinden yararlandığı bilinmektedir. Dendrimerler altın yüzeyde adsorbe edilerek tutundurulmakta; yüzey miktarını arttırma, ıslanabilme, impirit modelleme gibi özelliklerinden yararlanılmaktadır. Tez çalışmasında dendrimerler yerine dendronların kullanılması ile yüzey modifikasyonunda yenilikçi bir yaklaşıma ulaşılması hedeflenmektedir. Çünkü dendronlar dendrimerlerden farklı olarak çekirdeklerinde bulunan thiol kimyasal gruplarını açıkta taşırlar. Thiol grubu içeren dendronların altın yüzeyde kendiliğinden tek tabaka oluşturması ile hazırlanacak olan dendron SAM'ler sayesinde yüzeyde adsorpsiyondan daha kuvvetli immobilizasyonların sağlanması hedeflenmektedir. Farklı nesillerden dendronların kullanılmasıyla analitin birbirine ve yüzeye mesafesinin, sensör cevaplarında hassasiyet ve ölçümler arası güvenilirlik açısından değerlendirilebilmesi; antikorun sterik engele maruziyetinin en az olacağı morfolojik yapının seçilmesi öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasında ilk kez geliştirilecek olan FUM dedeksiyonuna yönelik QCM immünosensöründe MUD ve MUO ile alternatif lineer ajanlar ile immobilizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyonda dendronlar ilk kez kullanılmış olup elde edilen veriler sayesinde yüksek hassasiyette algılama yapılması gereken biyosensörlerde immobilizasyon ve yüzey modifikasyon ajanı olarak dendronların kullanımına dair önemli bilgiler edinilmiştir.

2.1 Biyosensörler

Genel olarak biyosensör; biyolojik, kimyasal veya biyokimyasal sinyali ölçülebilir ve işlenebilir elektriksel sinyale dönüştürebilen, kimyasal veya fiziksel transdüser ile birleştirilmiş biyolojik algılama materyali içeren bir cihaz veya enstrümandır [1], [2]. Biyosensörler, biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlardır [3].

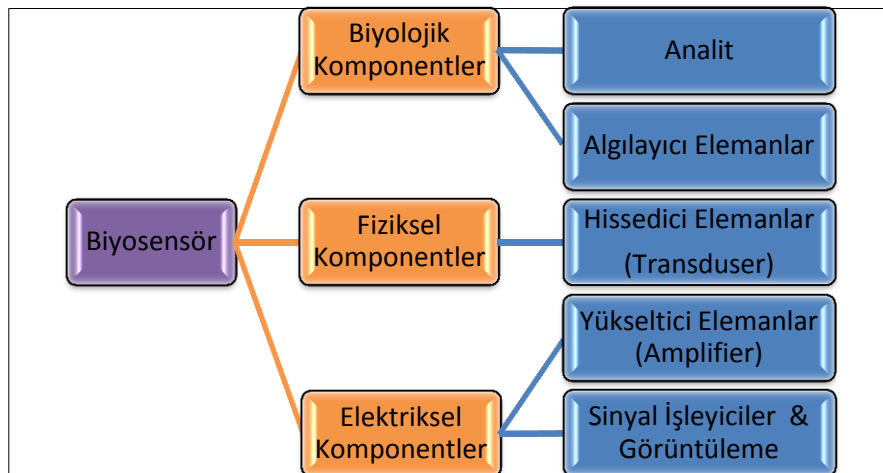
Biyosensör, bünyesinde bir moleküler tanıma elemanı ve/veya bir fizikokimyasal dönüştürücü ile entegre edilmiş olan biyoanalitik cihaz olarak tanımlanır. Moleküler biyoloji, mikro-akışkanlar, akıllı polimerler ve nanomateryaller gibi yeni teknolojilerle bir araya gelerek zararlı mikroorganizmaları, toksinleri, pestisitleri, antibiyotikleri, patojenleri, proteinleri, nutriliteri, gazları ve daha fazlasını hızlı, spesifik, hassas ve düşük maliyetli olarak tespit etmek için biyosensörler sıklıkla kullanılmaktadır. Sağlık, tarım, gıda işleme, çevresel izleme gibi pek çok alanda kullanılan biyosensörler sayesinde hedef analitler bitkilerde, hayvanlarda, gıdalarda, toprakta, havada veya suda güvenilir ve pratik şekilde izlenebilmektedir [16], [17], [18].

Biyosensörler, temel olarak bir biyoalgılama materyali ile kombine çalışabilen bir güç çevirici (transdüser) içeren, biyolojik veya kimyasal etken maddelerin tespitinde kullanılan cihazlardır [19]. Son yıllarda kullanım alanları ve piyasa ihtiyacı giderek artan

biyosensörlerin tüketiciye yönelik geliştirilmesinde, ilk olarak hedefe yönelik tasarımlar için biyosensör tanımlarının doğru yapılması gerekmektedir. Bunun için biyosensör uygulama alanlarının ve hedef analite uygun metodolojinin iyi belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca biyoalgılayıcı ve transdüserin analiz metoduna ve analite uygun olarak seçilmesi gerekir. Ölçümler arası tutarlığın yüksek olması ve hata payının minimize edilebilmesi için algılama elemanlarının ölçüm yüzeyinde etkin değerlerde dedeksiyon sağlayacak şekilde sabitlenmesi gereklidir [20]. Analit miktarının tayininde sinyal güçlendirme gibi performans artırıcı yöntemler de geliştirilmesi gerekebilmektedir [21]. Genel olarak protitipi geliştirilecek biyosensörün ve tayin metodunun öncü çalışmaları ve ticari biyosensör ürünlerinin mevcut durumu iyi belirlenmelidir.

2.1.1 Biyosensörün Tanımı

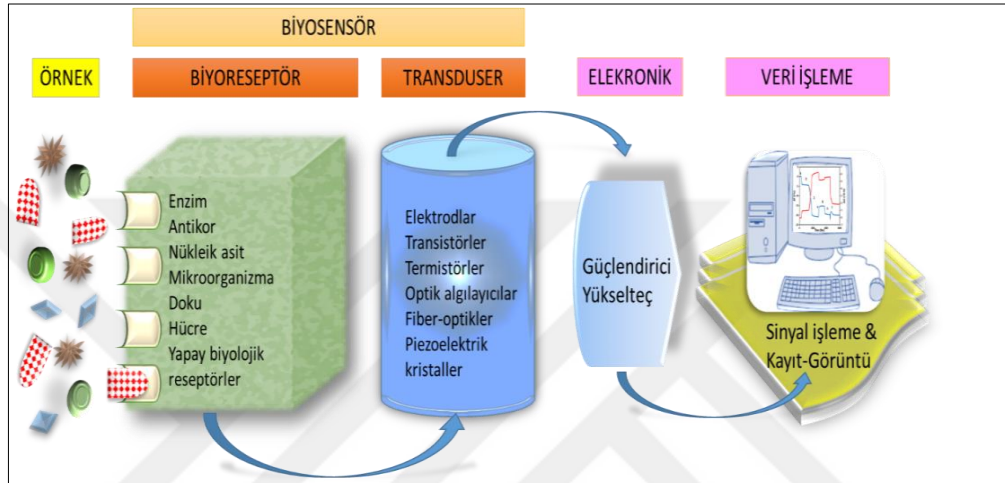
Biyosensörler, biyolojik algılayıcı molekül ile bu molekülün ve hedef analitin arasındaki etkileşimin yarattığı değişiklikten sinyal üreten bir transdüserin kombinasyonundan oluşan cihazlardır. Tanıma aşamasında biyolojik komponent olan reseptörler, çözültideki veya atmosferdeki biyolojik veya kimyasal analitleri uygun bir algılayıcı eleman sayesinde tanımlarlar. Fiziksel komponent olan hissedici elemanlar sayesinde, tanımlanan analitlerden gelen veriler ölçülebilir bir sinyale dönüştürülürler. Daha sonra biyosensör yapısına entegre edilen elektriksel komponentler sayesinde sinyalde güçlendirme, işleme ve görüntüleme gerçekleştirilir [22], [23].



Şekil 2. 1 Biyosensör şeması

2.1.2 Biyosensörlerin Bileşenleri ve Sınıflandırılması

Biyosensörlerin çalışma prensibi, biyolojik bir algılama elemanının analiz edilecek madde ile etkileşime girmesine dayanmaktadır. Bu etkileşim sonucu oluşan fiziksel veya kimyasal değişiklikler, uygun bir çevirici sistem ile doğrudan veya dolaylı olarak ölçülebilir elektronik sinyale çevrilmektedir.



Şekil 2. 2 Biyosensörlerin bileşenlerinin genel gösterimi

Antikor, enzim, nükleik asit, mikroorganizma, doku, yapay biyolojik reseptörler, hücre gibi biyolojik algılayıcı elemanlar sayesinde bu moleküllerin spesifik olduğu hedef analiti tanıyarak etkileşime girer. Algılama elemanlarının analitleri tanıması sırasında kütle değişimi, proton konsantrasyonunda değişim, gaz salınımı, yükseltgenme-indirgenme, ışık emisyonu ya da absorpsiyonu, veya reflektansı gibi değişimler meydana gelmektedir.

Bu değişimlerden oluşan verileri transdüseler algılayıp daha kolay ölçülebilen başka bir sinyale niceliksel olarak değiştirirler. Transdüsere gelen bu birincil sinyaller; akım, potansiyel fark, sıcaklık değişimi, elektrokimyasal değişim, termal fark, optik bir olay ya da piezoelektrik anlamda kütle artışıyla ölçülebilir ikincil bir sinyale dönüştürülürler. Transdüsere çeşitleri olan elektrodlar, transistörler, termistörler, optik algılayıcılar, fiber-optikler, piezoelektrik kristaller farklı biyosensör çeşitlerinde kullanılmaktadır. Her reaksiyon için kullanılacak evrensel kavramda bir çevirici vardır. Örneğin; antikorun kullanıldığı bir elektrotta, antijen-antikor (Ag-Ab) kompleks yapısı toplam kütle artışı

dışında kimyasal ya da optik ölçülebilir bir fark yaratmadığı için kütleli farkın izlenebildiği bir transdüser kullanımı doğru olmaktadır. Son bileşen ise, analitik sistem, ön güçlendirici, empedans dönüştürücü, multiplexer, analog-dijital dönüştürücü vb. elektronik kısımlardan oluşmaktadır [19], [20], [24].

2.1.3 Biyolojik Algılayıcı Türüne Göre Biyosensörler

Algılama elemanlarının yapısına göre biyosensörler, etkileşim mekanizması göz önünde tutularak katalitik biyosensörler ve affinite biyosensörleri olarak iki ana kategoriye ayrılırlar. Katalitik biyosensörler, asıl biyolojik çevresinde bulunan, izole edilen veya üretilen, enzim veya hücre gibi makromoleküllerin reaksiyonuna dayanırlar. Biyolojik bileşenlerinin yapısına bağlı olarak katalitik biyosensörler; enzimatik sensörler, supramoleküler hücre sensörleri, mikrobiyal sensörler olarak gruplandırılabilirler [25].

Affinite biyosensörleri ise antikor-antijen kompleksi veya aptamer gibi biyolojik affiniteye sahip elementlerin etkileşimlerine dayanırlar. Affinite biyosensörleri, DNA sensörleri ve immüno-sensörler olarak da sınıflandırılmaktadırlar. DNA sensörlerinin biyokimyasal bileşenleri nükleik asitlerdir. Çoğu zaman, DNA problemleri veya DNA primerleri olarak adlandırılan fragmanlar şeklinde kullanılırlar. Aptamerler ise antikorlara yakın özgünlükte biyolojik bileşenlerdir ve sensör sistemlerinde kullanıldıklarında aptamer-tabanlı DNA sensörleri olarak isimlendirilirler. Bir diğer affinite temelli biyosensör çeşidi de immünoaffinite sensörleridir. Genel olarak antijen-antikor etkileşimine dayanan sistemlere immüno-sensör denilmektedir. Bu tez kapsamında geliştirilen immüno-sensörde, bir mikotoksin çeşidi olan fumonisine (FUM) spesifik monoklonal antikor elde edilerek biyolojik algılayıcı olarak kullanılmıştır [26].

2.1.4 İmmüno-sensörler

İmmüno-sensörler, immünoaktif bir materyal olan antikorların algılayıcı eleman olarak kullanıldığı sistemlerdir. Antijen-antikor bağlanmasının yüksek seçicilik, affinite ve hassasiyetinden dolayı immüno-sensörlerde biyolojik algılayıcı olarak antikorlar kullanılmaktadır. Günümüz teknolojisinde tanı ve analiz sistemleri için kısa sürede sonuç verebilen, kullanımı kolay, laboratuvar odağı dışında da kullanılabilen, yüksek

hassasiyette ve düşük maliyette olması hedeflenen immünosensörler önem kazanmaktadır. İmmünosensörler transdüser türlerine göre kategorize edilmektedir [18], [26], [27].

2.1.5 Transdüser Türüne Göre İmmünosensörler

Elektrokimyasal transdüserlere sahip immünosensörler genel olarak potansiyometrik, voltametrik, kondüktometrik, impedimetrik transdüserli immünosensörler olarak sınıflandırılabilirler.

Potansiyometrik transdüser kullanılan immünosensörler, çalışma elektrodu ile referans elektrod arasındaki potansiyel farkın çevrilmesi prensibine dayanan sensörlerdir. Voltametrik transdüser kullanılan immünosensörler, elektroaktif maddelerde meydana getirilen oksidasyon veya indirgeme akımının ölçülmesi prensibine dayanan sensörlerdir [28].

Kondüktometrik transdüser kullanılan immünosensörler; bir biyokimyasal reaksiyon sırasında çözeltinin total elektriksel iletkenliğini ölçen transdüserlerin kullanıldığı sensörlerdir. Özellikle biyolojik algılama elemanı enzim veya antikor olan afinite etkilişimine dayalı sensör sistemlerinde indirgemelerin meydana gelmesinden dolayı daha az tercih edilmektedirler. İmpedimetrik transdüser kullanılan immünosensörler; bir elektrokimyasal hücrenin empedansını ve bu empedansın alternatif akım (AC) frekansı ile değişimini ölçen çeviricilere sahip sensör sistemleridir [28], [29]. Optik transdüserlere sahip immünosensörler, biyolojik reaksiyon sonucunda oluşan absorpsiyon, flüoresan, lüminesans, iç yansıma, yüzey plasmon rezonansı (SPR) veya ışık saçılım spektroskopisine dayanan optik değişimin algılanıp farklı sinyallere çevrilmesi prensibinin kullanıldığı sensörlerdir [30]. Analitin bulunduğu ortamın ısı miktarının hassas bir termistörle ölçülmesi sonucu analit konsantrasyonunun belirlenmesini sağlayan transdüser sistemlerine sahip termal biyosensörler, biyolojik komponentler için oldukça nadir kullanım alanına sahiptir [2], [31].

Mikroterazi özelliği ile elektrotta artan toplam kütle nin ölçümü prensibine dayanan piezoelektrik transdüserler ise kolay kullanımı ve hassas ölçüm yeteneği sayesinde immünosensörler için iyi bir biyosensör sistemi oluşturmaktadırlar. Bu tez çalışması

kapsamında piezoelektrik transdüser sistemine sahip bir mikro terazi olan “Kuvars Kristal Mikrobals (QCM)” sensörü kullanılmıştır [2],[3].

2.1.6 Kuvars Kristal Mikrobals (QCM) Sensörleri

Piezoelektrik sensörler, en genel anlamda örneğin piezoelektrik kristal yüzeyinde toplanan kütlesinin artması nedeniyle oluşan karakteristik rezonans frekansındaki farkın ölçülmesi esasına göre çalışan gravimetrik aygıtlardır. Sensör cevabı, kristal yüzeyindeki madde ile spesifik bir etkileşime girerek biriken analitin miktarıyla ilişkilidir [3].

Kütle algılayıcı sensör olan QCM, piezoelektrik özelliktedir. Piezoelektrik, kuvvet uygulandığında elektrik, elektrik uygulandığında ise fiziksel boyutlarda değişim (burkulma) oluşturabilme özelliğidir. Piezoelektrik özelliğe sahip malzemelere uygulanan mekanik basınç sonucunda, malzemenin elektrik alan ya da potansiyel değiştirme yeteneğidir ve malzeme bir voltaj meydana getirir [32].

QCM ve piezoelektrik kristallerin keşfi 1880 yılında, ilk kez Jaques ve Pierre Curie tarafından gözlenmiştir. Jaques ve Pierre Curie kimi kristal materyallere dışarıdan bir mekanik etki uygulandığında kristal yüzeyler arasında bu mekanik etkinin büyüklüğü ile orantılı bir potansiyel fark oluştuğunu ileri sürmüşlerdir. Ancak ilerleyen yıllarda anlaşılmıştır ki, bu potansiyel fark yüzeye uygulanan mekanik etkinin doğrudan sonucu değil; mekanik etkiye bağlı oluşan gerilimden dolayı kristal yapıda meydana gelen boyut değişimi ile ilgilidir [3],[32]. Çünkü uygulanan bu mekanik etki sayesinde kristal materyallerde bir titreşim oluşmaktadır. Kristalli katılarda atomların birbirlerine göre konumları tekrarlı bir düzen içerir ve bu düzen sayesinde kristal materyallerde titreşim sırasında atomlar orijinal konumlarından deforme olmuş konuma geçip tekrar orijinal konuma geri dönerler. Birim zamanda tekrarlanan bu atomik konum değişimi ve geri dönüşümü salınım (osilasyon) frekansı olarak tanımlanmaktadır [33]. QCM sensörler, elektrot yüzeyinde meydana gelen kütle değişimleri ile oluşan mekanik etkiye -hassas olmaları nedeniyle- kütle değişime dayalı algılama sistemlerinde kullanılmaktadırlar. Sensör yüzeylerine tutunan her bir birim analit kütlesi, QCM salınım frekansında bir değişimine neden olmaktadır. Salınım frekansındaki bu değişimler “frekans farkı (Δf)” olarak tanımlanmaktadır.

Piezoelektrik özelliğinin sağlanması için kuvars kristaller belirlenen bir kristal düzleminde ve dedektör özelliğinin kazanılması için de belirli bir açı ile kesilerek üretilirler. AT açısı, sensörlerde önemli bir parametre olan sıcaklıktan ve nemden kaynaklı frekans farkında etkilenmenin en az gözlemlendiği kristal kesim şeklidir. Ayrıca, AT kesim QCM'ler, yüzeylerindeki kütle değişimlerine daha duyarlıdır. Bu çalışma kapsamında AT kesim, 5 MHz, dairesel, simetrik, metal (Altın (Au)) elektrotlar bulunan kuvars kristaller kullanılmıştır [34], [35].

1959'da Sauerbrey, bir piezoelektrik malzeme olan kuvartsın salınım frekansının, kristal üzerindeki kütle değişimden etkilendiği gerçeğinden yola çıkarak, QCM sensör tarafından algılanan kütle değişimleri (Δm) ile frekans değişimleri (Δf) arasındaki bağlantıyı "Sauerbrey Eşitliği" ile göstermiştir [36].

1959'da Sauerbrey, bir piezoelektrik malzeme olan kuvartsın salınım frekansının, kristal üzerindeki kütle değişimden etkilendiği gerçeğinden yola çıkarak, QCM sensör tarafından algılanan kütle değişimleri (Δm) ile frekans değişimleri (Δf) arasındaki bağlantıyı "Sauerbrey Eşitliği" ile göstermiştir [36].

$$\Delta f = - \frac{2 \cdot \Delta m \cdot f_0^2}{A \cdot \sqrt{\rho_q \mu_q}} = - \frac{2 \cdot f_0^2}{A \cdot \sqrt{\rho_q \mu_q}} \cdot \Delta m \quad (2.1)$$

Δf (Hz): Ölçülen frekans farkı

f_0 (Hz) : Kristalin temel salınım frekansı

Δm (g/cm^3) : Birim alandaki kütle değişimi

ρ_q ($2.648 \text{ g}/\text{cm}^3$) : Kristalin yoğunluğu

μ_q ($2,947 \times 10^{11} \text{ g}/\text{cm} \cdot \text{s}^2$) : AT- kesim kristal için kuvarsın kesim katsayısı

Başlangıçta, QCM ölçümleri katı faz ölçümler için kullanılmıştır. Fakat uygun salınım devrelerinin (osilatör) geliştirilmesiyle sıvı fazda da ölçümler yapmak mümkün hale gelmiştir. Sıvının yoğunluğu (ρ_1), viskozitesi (η) ve kuvarts kristal rezonatörün frekansı arasındaki ilişkiyi açıklayan eşitlik Kanazawa ve Gordon tarafından 1997 yılında türetilmiştir [36], [37], [38].

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\rho_1 \eta_1}{\pi P_q \mu q}} \quad (2.2)$$

İki tabakalı bir sistemde frekans değişimi, tüm değişimlerin toplanması ile hesaplanır.

$$\Delta f = \Delta f_m + \Delta f_1 = -f_0^2 \left(\frac{\Delta m_s}{F_q \cdot P_q \cdot A_{el}} + \sqrt{\frac{\rho_1 \cdot \eta_1}{f_0 \cdot \pi \cdot P_q \cdot \mu q}} \right) \quad (2.3)$$

f_0 (Hz) : rezonans frekansı

F_q (Hz.cm²/ng): kristalin frekans sabiti ($F_q = \frac{1}{4} f_0 \cdot d_q$)

d_q (mm) : kristal kalınlığı

P_q (g/cm³) : kristalin yoğunluğu

A_{el} (mm²) : kristal rezonatörün elektrot boyutu

ρ_1 (g/cm³) : sıvının yoğunluğu

η_1 (kg/m/s) : sıvının viskozitesi

Genellikle sıvı ortamda gerçekleştirilen QCM sensör uygulamalarında, analiz edilecek sıvının yoğunluğu ve viskozitesi, titreşen kristalin rezonans davranışını etkiler ve böylelikle sensör tarafından ölçüm gerçekleştirilmiş olur.

Algılamayı ölçebilmek için de kararlı osilatör devreleri kullanılmaktadır. Bu yöntemle QCM sensör dizilerine mikroterazi özelliği kazandırılmıştır. Kurulan elektronik sistemlerden frekans değişim bilgileri alınarak da algılama ile ilgili olarak nicel ve nitel yöntemler ile birikimi izleme, tür belirleme (tespiti), immunoserolojik yöntem, sıvıların sıvı karışımları ayırma ve bileşenlerini tanımlama yöntemiyle (kromatografik) tespiti, korozyon görüntüleme ve elektrokimyasal analizler gibi birtakım çözelti ölçümlerini yapabilmektedirler [39], [40], [41].

QCM sensörlerinin benzersiz en önemli avantajı, etiketleme ajanlarına ihtiyaç duyulmadan ölçümlerin yapılabilmesi sensör cihazları olmalarıdır. QCM sensörlerinin kullanımının oldukça kolay olması ve temel ekipmanlarının pahalı olmaması, diğer avantajları arasındadır. Sensör çipleri defalarca kullanılabilen, eş zamanlı ölçümlerin de yapılabilmesi sistemlerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar da halen sürdürülmektedir

2.1.7 Biyosensörlerin Performans Parametreleri

Bir biyosensör genel olarak hızlı ve sürekli ölçüm yapabilmeli, yüksek özgüllüğe sahip olmalı, kolay kalibre edilebilmeli ve tekrar kullanılabilirdir. Ayrıca, hızlı tepki süresi, düşük maliyet, kolay üretim, sahaya uygulanabilirlik gibi avantajları da her zaman sunabilmelidir. Biyosensörlerde en iyi ölçüm sistemini belirlemek için kullanılan sisteme ve ölçüm metoduna ait bu parametrelerin iyi bilinmesi gerekir. Bu özelliklerden en önemlileri ve ideal biyosensörün karakteristik davranışları şunlardır [24],[42],[43]:

Hassasiyet: Bir sensör diyagramı için ideal hassasiyet, biyosensörün çıkış sinyali ile son durağan halindeki frekans farkının, analitin derişimindeki değışime oranı olarak tanımlanır. Sensör yüzeyinin büyüklüğü, analitin kütleli değışim farkının büyüklüğü, ölçüm ortamına doğru analitin kütle aktarım hızı, analit derişiminin yüzdesel aralığının ölçülebilirliğı gibi faktörler hassasiyete etki etmektedir. İmmüno-sensörlerde antikorun seçiciliğı ve afinitesi de biyosensörün hassasiyeti üzerine etkisi vardır. Biyolojik algılayıcı olarak kullanılan antikorlar analite özgün olarak yüksek afinite de bağlanma yapmalıdır. Analitin içinde bulunduğı ortamda diğ er komponentler ile etkileşime girmemeli, hatalı pozitif yanıt vererek sensörün hassasiyetini azaltmalıdır.

Biyosensörlerde hassasiyetin artırılması için genellikle sinyal güçlendirme ve alternatif immobilizasyon ajanlarının kullanımı ile sensör yüzey alanının artırılması üzerine çalışılmaktadır. Piezoelektrik alan başına düş en kütleli farkın artışı sensör yanıtlarının geniş aralıkta olmasını sağlamaktadır. Piezoelektrik alanın artırılması sayesinde sensör alanının antikor bağlama kapasitesi yükseltilebilmekte böylece hem sensör hassasiyeti arttırılmakta hem de ölçüm aralığı genişletilmektedir. Sensör alanının artırılması için üç boyutlu topografik yüzeyler (dendrimerler ve nanotariküller gibi), hidrojeller (dekstran gibi) içerisinde analitin tutturulması ve polimerik yüzeyler kullanılmaktadır.

Doğrusallık: Sisteme eklenen her analit derişimi ile ölçülen sinyal arasındaki ilişki, belirli bir analit derişimine kadar doğrusal olmalıdır.

Geniş Ölçüm Aralığı: Biyosensör uygulamalarında ölçüm aralığı olarak adlandırılan bölge, biyosensörlerden alınan eğrilerin lineer olduğı derişim aralığıdır. Yani cihazın ölçebildiğı analit konsantrasyonunun aralığıdır.

Tespit sınırı (limit of detection-LOD): Bir elektrotta ölçülebilecek olan en düşük analit derişimi olarak tanımlanmaktadır. Ölçüm sınırı, kullanılan elektronik cihazın ayırma gücünü belirler. Biyosensör sistemlerde oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin LOD değeri, o cihazın ve geliştirilen analiz metodunun en az hata ile ölçebileceği en düşük analit miktarıdır. Bu açıdan uygulanacak ve geliştirilecek analiz yöntemlerinin saptanmasında ortaya konulması gereken önemli bir ölçüm birimidir [44].

Kantitatif Ölçüm Sınırı (Limit of Quantitative Measurement, LOQ): Uygulanan test koşulları altında, kabul edilebilir hassasiyet ve doğrulukla tayin edilebilen en düşük analit konsantrasyonudur [45].

Seçicilik: Biyosensörler sadece analit derişimine duyarlı olmalı, diğer kimyasal türlerden etkilenmemelidir. Aksi durumda girişim yapan durumların takip edilen gerçek sinyali örtmesi nedeniyle hatalı ölçüm alınabilir, dolayısıyla bu durumların önüne geçilmesi gerekmektedir. Afinitiyeye dayalı sistem olan antijen-antikor etkileşimi gibi spesifik bağlanmaların kullanıldığı sistemlerde, seçicilik performansında herhangi bir sorun yaşanmamaktadır.

Tekrarlanabilirlik: Aynı miktar analitin aynı koşullar altında ve aynı akış hızında sisteme ardışık olarak tekrar uygulanması sonucu, sensörün oluşturduğu sinyal değişim farklarının tekrarlanabilmesi ve standart sapma miktarlarının kabul edilebilir ölçülerde olması gerekir.

Dinamik cevap: Bir biyosensörün dinamik cevabı, ölçülen hedef analitin derişimindeki değişikliğe ne kadar hızlı cevap verdiğini belirler.

Hızlı Geriye Dönme Zamanı: Geriye dönme zamanı, ilk örnekten ne kadar süre sonra ikinci örneğin ölçülebileceğini belirler. Yani ilk örneğin ilavesinden sonra, sabit akım değerleri (baseline) kısa sürede gözlenebiliyorsa ikinci örnek ancak bu süre sonunda tekrar ölçülebilecektir.

Bu parametreler dışında, biyosensör ömrü, yapılan toplam ölçüm sayısına ya da ölçülen analit derişiminin büyüklüğüne göre tanımlanmaktadır [46], [47]. Bu nedenle, biyosensörü sıcaklıktan etkilenmeyecek bir ortamda korumak ya da biyolojik maddenin biyoaktivitesini koruyacak özel bir çevrede bulundurmak gerekebilir. Bu açıdan biyosensörün stabilitesi de aranan önemli özellikler arasındadır. Biyosensörlerde

stabilite genellikle kullanılan biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığına bağlıdır ve biyosensörler pH, ısı, nem, ortam, O₂ derişimi gibi parametrelerden en az düzeyde etkilenmelidir. Bunun dışında ideal bir biyosensörün elektrodları, basit bir işlem sonrası tekrar ölçüme hazır hale getirilebilmelidir (rejenerasyon). Ayrıca biyosensörlerde aranan bir diğer parametre ise tasarımının basit ve ucuz, kullanımının rahat olmasıdır. Bu nedenle ilk biyosensörlerdeki karmaşık ve de pahalı olan yapılar, daha sonra basitleştirilmiş ve mümkün olduğunca da maliyeti düşürülmüştür. Buna ilave olarak biyosensör tasarımında gerek duyulduğunda, elektrotların sterilize edilebilmesi ve boyutların küçültülmesi günümüzde aranan diğer ideal özelliklerdir [44], [45], [47].

İmmünosensörlerde performans arttırmaya yönelik yapılan çalışmalar kapsamında yüksek özgünlükte biyolojik algılayıcı geliştirilmesinden sonra, serolojik method geliştirme, sinyal güçlendirme, yüzey kimyasında yenilikler, immobilizasyon etkinliklerini arttırma üzerinde çalışılan en önemli parametrelerdir.

2.1.8 QCM'de Immobilizasyon

Gravimetrik bir ölçüm tekniğine dayalı olan QCM sensörlerinde ölçümler sırasında elde edile frekans farklılıkları yüzeyde bağlanan analit miktarı ile doğrudan ilişkilidir. Algılanan analit şayet makromoleküler yapıda ise bağlanan molekülün yüksek ağırlığından dolayı oluşacak frekans farkları kayda değer ölçülerde meydana gelmektedir. Ancak küçük moleküler yapıya sahip analitlerin algılanmasında yüzeye bağlanan alan yoğunluğunda (kütlesel fark / piezoelektrik alan) oluşan değişimlerde ölçülebilir sinyaller oluşmamaktadır. Bu sebeple immünosensörlerde gravimetrik yöntemler kullanıldığında analitin algılanması için antikor ile yarışımına dayalı deney protokolleri hazırlanmaktadır. Yarışımlı sistemlerde elektroda analit immobilizasyonları yapılmakta, antikor ile artan miktarlarda yarışıtırlan analitten elde edilen sinyal azalmaları sayesinde kalibrasyon eğrileri çizilmektedir.

Analit immobilizasyonunda analitin ilgili yüzeye kimyasal veya fiziksel yöntemlerle tutturulması gerekmektedir. Adsorpsiyon, spacer ismi verilen reaktif ajanlar vasıtasıyla ilgili yüzeye doğrudan kovalent bağlama, gluteraldehid gibi homofonksiyonel ajanlar vasıtasıyla intramoleküler çapraz bağlama, jel veya membran içine fiziksel olarak hapsetme (entrapment) gibi çeşitli yöntemler kullanılarak

immobilizasyonlar gerçekleştirilmektedir. Birçok uygulamada bu dört yöntemden biri tek başına ya da yöntemlerin kombinasyonları şeklinde yararlanılmaktadır [6].

Yüzeye tutunma (adsorpsiyon), biyoalgılama materyalleri üzerinde daha az bozunmaya yol açan en basit sabitleme metodudur. Ancak bağlanma zayıftır ve kullanım ömrü kısadır. Yüzeye tutundurulan analit ya da antikor ısıdaki, pH'daki, iyonik güçteki, akış oranı ve substratlardaki değişimlere karşı hassastır. Yüzeysel immobilizasyon yönteminde kullanılan kovalent kimyasal bağları ile analit ve transdüser yüzeyi arasında kuvvetli bir bağ oluşumu sağlanmaktadır. Yüzeysel tutundurma (adsorpsiyon), tuzağa düşürme ve çapraz bağlama metotlarıyla kıyaslandığında, kovalent bağlanma yöntemi; yüksek stabilite, yüzeyden istenmeyen sökölümünün daha az olması, yüzeye homojen bağlanması, antikor ile doğrudan etkileşim imkânı sunabilmesi, antijen-antikor ilişkisinden daha yüksek enerjili bağ ile yüzeye bağlanmış olması sayesinde defalarca rejenerasyonun sağlanabilmesi gibi avantajlarından dolayı daha çok tercih edilmektedir [6], [48].

İmmünosenör geliştirilmesinde analitin yüksek hassasiyette algılanması için kullanılan immobilizasyon tekniği ve immobilizasyonda etkinlik oldukça önemlidir. İmmobilize edilecek olan analit, antikorun bağlanmasında sterik engelin oluşturmayacak yoğunlukta olmalıdır. İmmobilize edilecek olan analit miktarı çok düşük olduğunda ise yüksek frekans farkı oluşturacak kadar antikorun bağlanamayacağı için ölçüm aralığında sınırlandırma meydana gelebilmektedir. Etkin bir immobilizasyon yöntemi ile yüksek miktarda antikor sterik engele uğramadan yüzeye bağlanabilmelidir. Ayrıca antikor yüzeye bağlandıktan sonra uygun solventler ile yüzeyden uzaklaştırılarak bir sonraki ölçüm için yüzey defaten rejenerasyon edilebilmelidir. Etkin bir immobilizasyon sayesinde çok sayıda tekrarlanabilen ölçümler yapılabilir. Tekrarlar arası tutarlılığın yüksek olması için rejenerasyon metodunun immobilize olan analiti yüzeyden sökmemesi gerekir. Uygulaması kolay, kristaller arası ölçümlerde yüksek tutarlılık sağlayan, farklı analitlerin testinde de kullanılacak evrensel metodlar geliştirilmelidir. Ayrıca geliştirilebilecek etkin immobilizasyonlar sayesinde yüzeyde tutundurulan analit ya da antikorların raf ömürleri arttırılmakta, toksisiteleri azaltılmakta, ısı, ışık, nem ve pH değişimlerine karşı direnci arttırılabilmektedir.

2.1.8.1 Kendiliğinden Oluşan Tek Katman (SAM)

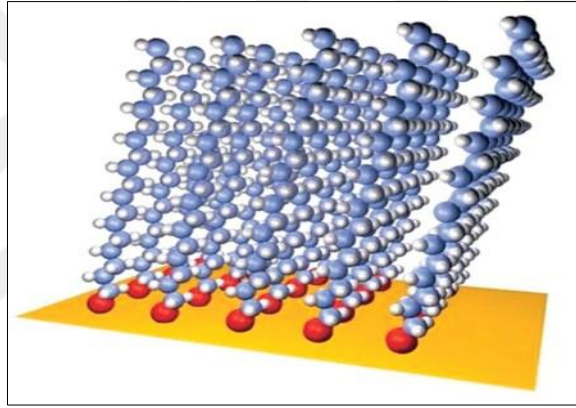
QCM'de metal elektrod olarak Bakır(Cu), Nikel (Ni), Platin (Pt), Altın (Au) kullanılabilir. Platin veya iridyum gibi daha az asal metaller yüzlerce nanometre derinliğe kadar oksitlenebilirken altın çok daha kararlı bir asal (soy) metaldir. Au, alüminyum, bakır ve hatta gümüşten çok daha iyi bir elektron iletkenliği sağlamaktadır [4]. QCM'de kullanılan Au elektrotlar, biyomedikal uygulamalar için algılama elektrotları olarak geniş ölçüde kullanılmaktadır ve genellikle biyolojik olarak uyumlu olduğu düşünülmektedir. Bu yüksek iletkenlikteki Au yüzey, bakteriyel büyüme izleme, virüs algılama ve DNA algılama da dahil olmak üzere birçok biyolojik algılama uygulamaları için ideal olabilmektedir. Üstelik eşsiz yüzey kimyası sayesinde Au, kükürt atomları yoluyla organik moleküllerin kendinden oluşan tek tabaka (self assembled monolayer (SAM)) yapmasına izin verir. SAM, Au algılama elektrotları ile tanıma tabakası arasında bir bağlayıcı olarak kullanılmaktadır ve özellikle yüzeye kuvvetli adsorbe olabilmeye ve biyolojik algılayıcı ile kovalent bağ yapma yeteneklerinden yararlanılmaktadır [4], [5].

Kükürt atomu ile elektrottaki Au atomları arasında oluşan kuvvetli kimyasal bağ nedeniyle, tiol grubu Au yüzeylerin modifikasyonunda sıklıkla tercih edilmektedir. SAM için kullanılan moleküllerin sahip olduğu alifatik veya aromatik karaktere sahip olan kuyruk kısımlar, toplam yüzey yapılarından bağımsız olarak tiol molekülleri sayesinde Au atomları üzerinde tiyolat-Au bağı ($40-50 \text{ kcal mol}^{-1}$) oluşturarak adsorbe edilirler. Bununla beraber sadece tiyollerin değil, aynı zamanda Au yüzey üzerinde disülfürlerin (R-S-S-R) ve sülfidlerin (R-S-R) de benzer bir prensip ile adsorbe edildikleri bilinmektedir.

Kükürt içeren moleküllerin immobilizasyonunda öncü olan Nuzzo ve Allara [49] , dialkan sülfidlerin metal yüzeylerde yüksek derecede SAM oluşturduğunu fark ettiler. Elde ettikleri veriler neticesinde kükürt atomlarının, Au bir substrat üzerinde güçlü bir şekilde koordine olduklarını belirttiler. Porter ve arkadaşları, metilen gruplarının sayısının 10 karbon atomundan fazla olduğu uzun zincirli durumlarda, alkan tiyollerin kristal yapıya benzer şekilde bir araya geldiğini gösterdiler. SAM oluşumu sırasında öncelikle altın atomları ile tiol grupları arasında tiyolat bağı oluşur, daha sonra uzun

alkan zincirleri arasında Van Der Waals etkileşimleri meydana gelir ve polar uç gruplar arasında dipol etkileşimler meydana gelir. Tüm bu elektronik etkileşim ve bağlanmalar sonucunda, kendiliğinden oluşan düzenli istiflenmiş SAM yapılar meydana gelmektedir [49], [50].

Au yüzeyde SAM oluşturmak için en sık kullanılan ajan 11-merkaptoundekanoik asittir (MUA). MUA yüzeyde yapılan modifikasyonlar ve farklı polar uç gruba sahip yapıların kullanılması ile yüzeye immobilizasyonda etkinliklerin incelenmesi tez çalışmasında tartışılan konulardan bir tanesidir. Ayrıca sensör yüzeyinde doğrusal yapılara alternatif olarak farklı yüzey polimerizasyonları, hidrojeller, çok katmanlı dekstran yapılar ve dendronlar ile yüzey modifikasyonları son yıllarda üzerine çalışılan önemli gelişmelerdir [8].

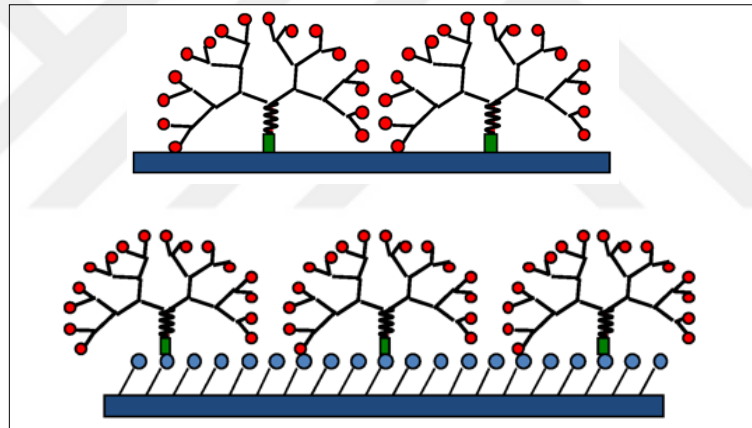


Şekil 2. 3 MUA ile yapılmış SAM'lerin altın (Au) yüzeyde istiflenmesinin gösterimi

2.1.8.2 Dendronlar

Dendrimerler ve dendronlar, bir kök segment olan çekirdek yapısı veya omurga zinciri üstüne aşılan (grafting) çok sayıda dal polimer yapılar ile katmanlı olarak (nesil/generation/G) büyüeyebilen ağaç modelinde (tree-like) makromoleküllerdir. Dendrimerlerin polimerizasyon derecesi, gerçekleştirilen tekrarlama döngüsünü sayısını ifade eden jenerasyon sayısı (G) kavramıyla belirtilir. Jenerasyon sayısı çekirdekten dış yüzeye doğru ilerleyen dallanma noktaları sayısının hesaplanması ile kolayca tespit edilebilir. Dallanma noktası dendrimer büyümesi ile orantısız bir artış göstermektedir. Örneğin bağlanma noktası olmayan bir dendrimer sıfırıncı jenerasyon (G-0) olarak adlandırılmaktadır. Lineer analogların aksine, fonksiyonel gruplarının

dağılımı tutarlıdır ve monodispersitesi yüksek olan polimerlerdir [8], [9]. Çekirdeğin, kabukların ve özellikle de yüzey tabakalarının kimyasal özelliklerinin değiştirilmesiyle, dendrimer özellikleri belirli bir uygulamaya yönelik olacak şekilde değiştirilebilir. Dendritik materyaller; akıllı yüzey geliştirme, diagnostik görüntüleme, hidrojel hazırlama, optik yapılar elde etme, tekstil boya işlemlerinde, ilaç salınım sistemleri ve nanotıp konularında geniş bir uygulama alanına sahiptir. Yüksek derecelerde aşılınmış polimer zincirlerine sahip dendronlar, lateral olarak tek katmanlı tabakalar oluşturma eğilimine sahiptirler. Bu özellik sayesinde dendronlar, nanotüplerin, grafit yapıların, yüzey modifikasyonları için SAM tabakaların hazırlanmasında iyi birer alternatif olarak kullanılabilirliği yönünde karşımıza çıkmaktadır. Au yüzeylerin modifikasyonunda, kendiliğinden SAM oluşturmaları, farklı topografik, ıslanabilme ve iletkenlik özelliklerinden dolayı tez çalışması kapsamında yüzey modifikasyonlarının geliştirilmesi amacıyla dendronlar kullanıldı [10].



Şekil 2. 4 Dendronlar ile yapılmış SAM'lerin altın (Au) yüzeyde sembolik gösterimi

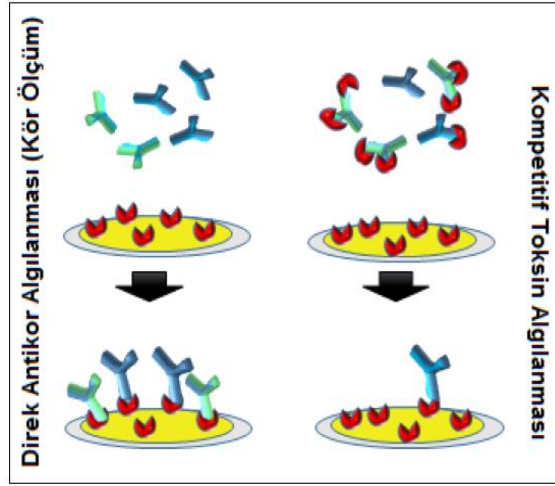
Yatuka ve arkadaşlarının [51], 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada SPR sensör yüzeylerinde poly(amidoamine) dendron tabanlı SAM yüzeyler hazırlanarak yüksek duyarlılıklı 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) sensörü oluşturulmuştur. Hazırlanan dendron kaplı Au yüzeylerde, TNT antikörlerinin 3 boyutlu yüzeyde immobilizasyonlarının çok daha kolay ve yüksek miktarda olabildiğini göstermişlerdir. Elde ettikleri TNT biyosensörünün dedeksiyon limitinin (LOD), kullanılan dendron yüzey modifikasyonu sayesinde daha hassas değerlere ulaştırıldığını (15 pg/ml) belirlemişlerdir.

2009 yılında Rainer Haag ve Monika Wyszogrodzka [52], alkentiyol modifiye polygliserol dendrimerler sentezleyerek SPR'da protein miktarlarının tespitinde adsorpsiyon etkinliğinin arttırılması üstüne yaptıkları bir çalışmada, fibrinojen (Fib), lysozyme (Lys), albumin (Alb) ve pepsin (Pep) proteinlerini kullanmışlardır. X-ray fotoelektron spektroskopisi ile dendrimerlerin SAM oluşturma özelliklerini incelemişlerdir ve kullandıkları dendrimer yapıların polyetilenglikol (PEG) yüzey modifikatörlerine iyi birer alternatif yapı olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir.

2011 yılında Advincula [53] ve ekibinin yaptığı bir çalışmada ise bis-tertiofen dendrimer tabanlı moleküler imprint polimer filmler (MIP), QCM'de folik asit tespitine yönelik kullanılmıştır. Bu sonuçlara dayalı olarak, tez çalışması kapsamında farklı nesilden (jenerasyon, G) katmanlara sahip dendronik yapılar ile altın yüzeyde katmanlar oluşturularak elde edilecek tabakanın kalınlığına bağlı oluşabilecek osilasyon frekans farklılıklarından yararlanarak immünosensörde sinyal arttırılması ve ölçüm hassasiyetinin geliştirilmesine yönelik sonuçlar irdelendi.

2.1.8.3 QCM'de Kompetitif Algılamaya Dayalı Tanıma

Kompetitif algılama, yüzeye immobilize edilen analit ile artan konsantrasyonlarda analit içindeki antikorun etkileşiminin ölçülmesidir. İnhibisyona dayalı kompetitif immünosensörler, mikotoksinler gibi düşük molekül ağırlıklı yapıların analizi için daha çok kullanılmaktadır. Bu yöntemde, doğrudan algılamaya dayalı tanıma yönteminin aksine analit konsantrasyonu arttırıldığında cevap sinyali azalmaktadır. Bu yöntemde küçük molekül ağırlıklı toksin molekülleri sensörün elektroduna doğrudan immobilize edilmektedir ve biyolojik algılayıcının (antikor) tek başına sensör yüzeyinde oluşturduğu frekans farkı belirlenir. Daha sonra sabit antikor miktarı ile toksinin değişen konsantrasyonları, ön inkübasyona tabi tutulur ve toksin immobilize sensör yüzeyine sırasıyla uygulanarak bir kalibrasyon eğrisi elde edilir [54].



Şekil 2. 5 Toksin immobilize sistemlerde toksin algılanmasının şematik gösterimi

Bu tez çalışması kapsamında gıda ve yemlerde önemli bir kontaminasyon kaynağı olan mikotoksinlerden FUM'nin tespitini yapabilen QCM temelli immünosensör geliştirildi. Canlı sağlığında büyük tahribatlara neden olduğu bilinen FUM'nin tespiti için sensör algılama yüzeyinde, küçük molekül ağırlığından dolayı (721,83 g/mol) FUM immobilize edilerek antikor ile kompetitif immünoassay sistemi geliştirildi. Biyosensörlerde önemli bir parametre olan hassasiyetin geliştirilmesine yönelik gerçekleştirilen immobilizasyon etkinliğinin artırılması çalışmalarında FUM immünosensörü model olarak kullanılmıştır. FUM'in EU Kodex'e, FDA'e ve Türk Kodex'ine göre uygun algılama sınırlarında ölçümünün yüksek hassasiyette yapılabilmesi için analit/algılayıcı etkileşiminde kritik olan immobilizasyon etkinliğine odaklanılmıştır.

2.2 Mikotoksinler ve Mikotoksin Sensörleri

Mikotoksinler, bitki patojeni olarak bilinen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* ve *Claviceps spp.* küfleri tarafından üretilen ikincil metabolizma ürünleridir. Günümüze kadar 400'den fazla mikotoksin tanımlanmıştır ve bunların içinde 20 mikotoksinin insan ve hayvanlar için yüksek toksiklikte olduğu açıklanmıştır [54]. Mikotoksinlerin tüketimi sonucu insan ve hayvan gibi yüksek yapılı canlılarda görülen toksik sendromlara "mikotoksikozis" adı verilmektedir (EC Report, 1999). Önem derecesine göre sıralama, ülkelere ve bölgelere göre farklılık göstermekle birlikte aflatoksinler (AFL), okratoksin A (OTA), fumonisinler (FUM), trikotesenler ve zearalenonun (ZEA) birinci derecede önemli mikotoksinler olduğu konusunda

araştırmacılar görüş birliğine varmışlardır [55], [56], [57]. Örneğin; Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD), mısırdaki FUM birinci derecede önemli mikotoksinler arasında değerlendirilirken, Avustralya'da mısır, beslenmede fazla kullanılmadığından FUM varlığı önemli bir tehlike olarak görülmemektedir. Dolayısıyla ölkelere göre regölasyonlar ve mikotoksin tespitinde getirilen yöntem uygulamaları düzenlemelerle sınırlandırılmıştır.

Mikotoksin kontamine ürünlerin kontrolünde getirilen düzenlemeler ve izin verilen limit değerler iyi tarım, balıkçılık ve üretim uygulamalarının izlenebilmesi ve gıda tüketimiyle ilgili risklerin dikkate alınması ile makul bir ölçüde belirlenmiştir. Resmi kontrollerde mikotoksin analizlerinin karşılması gereken yöntem performans kriterleri, AB'nin 401/2006 sayılı Yönetmeliği (EC, 2006) ile belirlenmiş ve ölkemizde de Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından yayınlanan 2007/21 no.lu tebliğ ile tamamen benimsenmiştir. Ayrıca, "Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğ" ve "Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum Limitleri Hakkında Tebliğe Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ" ile gıdalarda bulunabilecek mikotoksin limitleri belirlenmiştir [12], [58], [59]. Fumonisin analizlerinin bu limitleri karşılayabilecek "tespit (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ)" değerlerine sahip olması gerekmektedir.

Mikotoksinler ile kontamine gıdalarda genel olarak uygulanan analiz yöntemleri: ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS), ELISA ve enzim aktivitesine bağlı immunoteknik (enzyme multiplied immunotechnique/EMIT) uzun zamandır kullanılmaktadır [11]. Ancak bunların dışında floresans polarization immunoassay (FPIA) yöntemi de mikotoksinlerin ölçümünde deneme aşamasındadır ve kullanılabileceği yönünde olumlu sonuçlar alınmıştır [13]. Ayrıca mikotoksinlerin kütle dedektörüne sahip sıvı kromatografileri ile (LC-MS veya LC-MS/MS) [12] analizleri yapılmaktadır, ancak kütle dedektörleri diğer dedektörlerden çok daha pahalıdır. Mikotoksin analizinde, temelde C-18 kolonları ve mikotoksinlerin ekstraksiyon aşamasında toksinlerin daha konsantre ve saf olarak elde edilebilmesi için immüno affinite kolonları (IAK) kullanılmaktadır. Son zamanlarda kolay kullanım teknikleri, kısa süreli analiz imkânı sağlaması, yüksek hassasiyette analiz kabiliyetleri, taşınabilir

olmaları, yerinde tespit yapabilmeleri, düşük masraflı ve kullanıcı dostu olmalarından dolayı biyosensörler, mikotoksin analizlerinde de kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca mikotoksin analizinde son yıllarda biyosensör çalışmaları üzerine gelişmeler kaydedilmekte ve sahada kullanımına yönelik çalışmalar devam etmektedir.

Gaag ve ark. [58] HPLC ve ELISA yöntemleriyle karşılaştırmalı olarak çalıştıkları biyosensör kullandıkları çalışmada biyosensörlerin tekrarlanabilirliği, üretilebilirliği gibi özelliklerinden dolayı birçok çoklu mikotoksin aranmasının tek bir ölçümle yapılmaya çalışıldığı ELISA ve HPLC tekniklerine göre daha iyi bulunmuştur. Dünyada en yaygın olarak bulunabilen ve sağlı üzerine etkileri kapsamlı şekildi araştırmalar sonucunda ortaya konulan bir mikotoksin türü olan aflatoksin (AFL) için yapılan birçok biyosensör çeşidi üzerine çalışmalar mevcuttur. Bunlar arasında AFL tespitinde empedans ve impedimetric transdüserler ile belirleyen immünosensör sisteminde iyi bir elektrokimyasal yanıt alınarak deteksiyon limitinin 0,0003 ng/ml olarak 5 dakikalık bir süre içerisinde ölçülebildiği görülmüştür.

Yapılan bir strip-biyosensör kompleksinde ise 30 dakikalık bir sürede aptamer tabanlı strip test kullanılarak 4,17 pg/ml LOD değerinde tespit yapılabildiği ortaya konulmuştur. Field effect transistör (FET) kullanılan bir AFL sensöründe ise immünoassay geliştirilerek 0,1 fg/ml LOD değerinde analiz yapıldığı belirtilmiştir. İşatersiz FRET immünosensörünün uygulandığı bir çalışmada ise 280 nm de sönmü (quenched) spesifik ligandlar ile çalışma yapılmış olup 12 dakikalık bir sürede 0,16 ug/kg LOD değerine ulaşılabildiği tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada ise DNA problemleri ile yapılan bir immünoassay sisteminde gold nanoyapılar kullanılarak 0,36 ng/ml LOD değerinde tespiti olanak sağlandığı belirtilmiştir.

AFL'den sonra araştırmacıların ve dünya sağlık örgütlerinin kabul ettiği en yüksek toksisitede olan ve toplum sağlığını tehdit eden mikotoksinler ZEA, OTA, DON ve FUM'dir. Zearalenone (ZEA), *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium roseum* ve *Fusarium crookwellense* tarafından ikincil metabolit olarak üretilmekte hak sağlığını tehdit etmektedir. ZEA kontaminasyonu daha çok üzüm, mısır ve saman yığınlarında görülmektedir. WHO, ZEA mikotoksinini önemli karsinojenikler arasında görmekte ve tüketiminde kontrollerin yapılması gerektiğine dair bildirilerde

bulunmaktadır. ZEA ile kontamine ürünlerin izlenmesinde diğer mikotoksinlerde olduğu gibi ülkelere göre değişen yönetmelikler mevcuttur. Enstürmantel analizlere dayalı analitik yöntemlerle ZEA takibi yapılabilirliği gibi son yıllarda ZEA takibi için strip testler geliştirilmiş olup sensör sistemleri üzerine çalışmalar devam etmektedir. ZEA için geliştirilen biyosensörler incelendiğinde; fotoluminesans semikondüktör quantum dot (QD) kullanılarak geliştirilen fluoresan-işaretli immunosorbent testi (FLISA) sayesinde 0.03 ng/mL LOD değerinde tespiti olanak sağlanabilmiştir. Ayrıca ZEA tayinine yönelik başka çalışmalar kapsamında Mesoforus karbon ve Au-Ag-Pt nano yapılar vasıtasıyla geliştirilmiş siklik voltametri ve square wave voltametri transduserlerin kullanıldığı label-free amperometrik immunosensör geliştirilmiştir. Son yıllarda ZEA'nın algılanmasına yönelik geliştirilen biyosensör çeşitlerine bakıldığında pek çok immünosensör temelli biyosensör geliştirildiği görülmektedir (Çizelge 2. 1). E.C. regülasyonlarına göre gıdalarda ZEA kontaminasyonu için getirilen limit değerler 0,02-0,4 ppm aralığındadır ve bu değerler arasında dedeksiyon yapabilen yöntemler kabul görmektedir.

Çizelge 2. 1 Son yıllarda ZEA dedeksiyonuna yönelik geliştirilen, algılama elemanı olarak antikor kullanılan immünosensörler çeşitleri [14]

Yıl	Teknik	Örnek	LOD
2011	Optik: FPIA	Mısır (60%Me-OH)	77 ng/g
2011	Optik: toplam iç yansıma elipsometrisi (TIRE)	Suda	0,1 ng/mL
2011	EK: amperometrik	Yem (70%Me-OH)	0,41 ng/g
2012	Optik: FPIA	Tahıl (60% metanol)	3 ng/mL
2013	Optik: QD	-	0,02–0,6 ng/g
2013	EK: amperometrik	Yem (70% Me-OH)	2,1 pg/mL
2014	EK: amperometrik	-	1,7 pg/mL
2015	EK: voltametrik	Siğir serumu	16 pg/mL

Deoksinivalenol (DON), aynı zamanda vomitoksin olarak da anılmaktadır ve özellikle tahıl ürünlerinde bulunan fusarium küflerinin ürettiği bir mikotoksin türüdür. DON ve alt türleri insanlarda deri rahatsızlıkları ve kusmalara neden olmakta, daha önemlisi bağışıklık sistemine zarar vermektedir. DON dedeksiyonuna yönelik bilinen enstürmantel analitik tayin metodlarının yanısıra geliştirilmesi devam eden biyosensör sistemleri de mevcuttur. DON dedeksiyonunda geliştirilmiş olan strip testler ile sensörlerin bir arada kullanıma yönelik piyasaya sürülmüş olan ürünler mevcuttur. Örneğin 10 dakikalık süreçte ölçüm gerçekleştirilebilen strip-sensör kompleks sistemi sayesinde 0,3 mg/ml LOD değerinde DON tespitine olanak sağlanabilmektedir. Ayrıca literatürde DON tanıma için elektrokimyasal immünosensörlerin, rekombinant anti DON Fab fragmanlar ve immünomagnetik boncuklar kullanarak geliştirilebileceği yönünde çalışmalar mevcuttur. Bu sayede enzim işaretli immünomagnetik elektrokimyasal (ELIME) methodlarının gıda analizlerinde DON deteksiyonu için kullanılabilirliği yönünde gösterilmiştir. DON dedeksiyonuna yönelik son yıllarda geliştirilen antikor temelli biyosensör çalışmaları Çizelge 2. 2'de mevcuttur. E.C. regülasyonları DON kontaminasyon takibinde ürün çeşidine göre sınır limitler belirlemiştir ve bu limitler 0,002-1,75 ppm aralığındadır. Geliştirilen immünosensörlerin LOD değerinin bu aralıkta olması gerekmekte, aksi halde sensör sadece belirli ürünlerin kullanımına uygun olacak şekilde arz edilmektedir.

Çizelge 2. 2 Son yıllarda DON dedeksiyonuna yönelik geliştirilen antikor temelli immünosensör çeşitleri [14]

Yıl	Teknik	Örnek	LOD
2011	Elektrokimyasal (EK): impedimetrik	Gıda örnekleri (suda)	0.3 pg/mL
2011	EK: potensiyometrik	PBS	, ppm
2012	Optik: kemilüninisans (CL)	-	, ng/mL
2014	Optik: fluoresans polarizasyon immunoassay (FPIA)	Buğday kepeği (PBS)	120 ng/g
2014	EK: amperometrik	Buğday (suda)	6.25 ng/mL
2015	Optik: Elektrokemilüminisans (ECL)	Buğday unu	1 pg/mL

Çizelge 2. 3 Son yıllarda DON dedeksiyonuna yönelik geliştirilen antikor temelli immünoensör çeşitleri [14] (Devamı)

Yıl	Teknik	Örnek	LOD
2015	EK: impedimetrik	Buğday, kurukahve ve mısır (suda)	0,3 ng/mL
2015	Optical: Q-body	Buğday (dstile suda)	6 ng/mL

İmmünoensör geliştirilmesinde immobilizasyon etkinlikleri üzerine çalışmalar son yıllarda artmaktadır. Örneğin Hu ve arkadaşları AFL, OTA ve ZEA'nın saptanması için fırça modelli polimer ile immobilizasyon etkinliklerini incelediği bir çalışmada kompetitif immünoassay sistemi kullanarak yüksek verimli bir flüoresan immünoensörün geliştirilebileceğini göstermiştir. Polimerik yapının, spesifik olmayan protein absorpsiyonunun düşük olduğunu ve bu sayede elde edilem immünoensörlerin AFL, OTA ve ZEA için LOD değerlerinin sırasıyla 4, 4 ve 3 pg / mL olduğu ve bu sayede hassasiyetin 2 kat arttırıldığını saptanmıştır.

Son yıllarda ZEA, DON, AFL ve FUM üzerine yapılan çalışmalar ve geliştirilen pek çok biyosensör çeşidi mevcuttur. Çoklu mikotoksin analizlerinin yapılabilmesi için immünoensör geliştirilmesi üzerine çalışmalar da yapılmıştır. ZEA, DON, AFL ve FUM'nin dedeksiyonu için total analizlerin yapılabildiği biyosensör sistemleri geliştirilmiş olup antikor temelli olanlar Çizelge 2. 4'de gösterilmektedir.

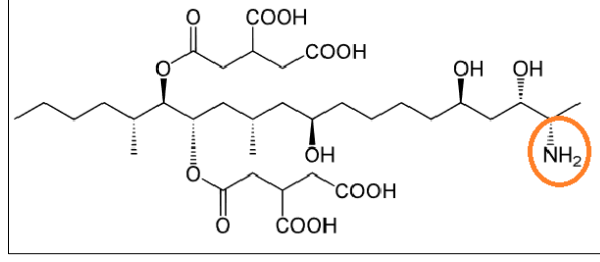
Çizelge 2. 4 AFL, DON, ZEA ve FUM analizlerinin bir arada yapıldığı antikor temelli biyosensörler üzerine son yıllarda yapılan çalışmalar[15]

Yıl	Teknik	Analit	Örnek	Çalışma aralığı
2003	Optik: SPR	AFL B1, ZEA, FUM B1, DON	-	0,01–50 ng/g
2003	Optik: fluoresans	FUM B1, ricin, cholera toksini	-	FB: 250ng/mL
2006	Optik: fluoresans	OTA, DON	Arpa, mısır unu, buğday ve mısır (75% Me-OH)	DON: 1–180; OTA: 1–85. (ng/g)
2006	Optik: fluoresans	OTA, DON, AFL B1, FUM	-	AFB1: 0.3 ng/mL

Çizelge 2. 5 AFL, DON, ZEA ve FUM analizlerinin bir arada yapıldığı antikor temelli biyosensörler üzerine son yıllarda yapılan çalışmalar[15] (Devamı)

Yıl	Teknik	Analit	Örnek	Çalışma aralığı
2010	Magnetoresistiv	AFL B1, ZEN, HT-2	-	50 pg/mL
2011	Optik: SPR	DON, ZEN	Buğday ve mısır (Actrnl–su–formik asit (84:16:1))	(ng/g) DON: 68–84; ZEN: 40–64
2014	Optik: QD	DON, ZEN, AFLB1, T-2, FUM B1	Buğday ve mısır (80% Me-OH)	(ng/g) SAM FISA: DON: 3,2, ZEN: 0,6, AFB1: 0,2, T-2: 10, FB1: 0,4; DAM FISA: ZEN: 1,8, AFB1: 1,
2015	Optik: CL	FUM, AFL B1	Buğday unu (PBS)	(ng/mL) FB1:0,6 (0,6–1500); AFB1: 0,15 (0,15–50)
2016	Optik	ZEA, DON, T-2 toxinleri, AFL, FUM	Tahıl gevreği	(ng/g) ZEA: 0,04–0,17, DON: 0,06–49, T-2 toxin: 0,15–0,22, AFL: 0,056–0,49, FUM: 0,53–1,05

Fumonisin ise *Fusarium Moniliforme* ve *Fusarium Proliferatum* isimli küf mikroorganizmaları tarafından üretilen bir mikotoksin çeşididir [57]. Mısır tanesi, sapı ve köklerinde bulunmasının yanı sıra buğday ve pirinç gibi tahıllarda, yerfıstığı, üzüm ve incir gibi meyvelerde de bulunabilen bir mikotoksin çeşididir. FUM toksinleri, küf mikroorganizmaları tarafından üretilen toksin maddeleri sınıfında en son keşfedilen mikotoksinlerdendir [12]. FUM dünyada ilk defa 1988 yılında keşfedilmiştir ve 1993 yılında da Uluslararası Kanser Araştırmaları Birliği (IARC) tarafından muhtemel kanserojenler (Grup2B) arasına dahil edilmiştir [60]. Bezuidenhout ve arkadaşları, 1988'de FUM'nin ve ana alt gruplarının kimyasal yapısını tamamiyle açıklamışlardır. Kimyasal yapıları, 2-amino-12,16-dimetil polihidroksieikosan iskeletinin C14 ve C15 konumlarından propan-1,2,3-trikarboksilik asit ile esterleşmesiyle oluşmuştur [61].



Şekil 2. 6 Fumonisin (B1)'in moleküler yapısı

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, 28 FUM analogu tespit edilerek A, B, C ve P olarak dört ana sınıfa ayrılmış ve bunlardan toksikolojik olarak B analogları, özellikle de B1 ön plana çıkmıştır. Bunlardan fumonisin B1 (FUM B1) ve fumonisin B2 (FUM B2) major toksinler olup FB3, FB4, FA1, FA2 ve FC1 minör olanlarıdır. FUM B1 ve FUM B2 yapısal olarak birbirine benzemekle birlikte, doğada en sık FUM B1'e rastlanmaktadır. Dolayısıyla tespitine yönelik çalışmalar daha çok total FUM ya da FUM B1 üzerine odaklanmıştır [62]. Total FUM içerisinde B1'in % 70-80, B2'nin % 15-25 arasında yer aldığı saptanmıştır. FUM' nin 6 tip minör alt grubu içerisinde FUM B1'in toksisitesinin en etkili olduğu bilinmektedir. FUM, özellikle insan ve hayvan gıdası olarak kullanılan doğal veya işlenmiş mısır çeşitlerinde bulunmaktadır. Gıdaların işlenmesinde kullanılan yöntemlere karşı FUM yapısı dayanıklıdır ve kansorejen etkisini korumaktadır. Avrupa ülkeleri içinde İsviçre mısır ve mısır içeren ürünlerde $1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ FUM sınırlaması getirmiştir. FAO / WHO uzman komitesi tarafından hazırlanan gıda katkı maddeleri ve kontaminantlar hakkındaki ortak bildirmede toplam FUM için geçici maksimum tolere edilebilir günlük alım miktarı $2 \mu\text{g. kg}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa Komisyonu (E.C.) düzenlemelerinde insan tüketimi için önerdiği maksimum düzey $0.2-4 \text{ mg L}^{-1}$ olarak bildirilmiştir [59], [63].

FUM kirleticilerinin bu düşük limitlerde tespit edilmesini sağlamak için son yıllarda birçok biyosensör tipi geliştirilmektedir. Dalga esaslı fiberoptik immünosensörler ile yapılan ilk çalışmalarda 3.2 mg.L^{-1} LOD değerine sahip bir sistem geliştirilmiştir. Mısırdaki ölçüm yapan Thompson ve Maragos (1996), o zamana kadar ki en düşük LOD değerine sahip sensör sistemini-FITC işaretli FUM B1'in işaretsiz FUM B1 ile yarışımına dayalı fiberoptik immünosensörler üzerinde geliştirmiş olup, LOD değerlerinin $0,01 - 0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ arasında olduğunu ilan etmişlerdir [64]. Ancak işaretli sistemlerin yarattığı zorlukları göz önünde bulunduran Mullett ve arkadaşları, 1998 yılında üzerine

çalıştıkları SPR ile işaretli sistemlerde çalışmışlar ancak $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ LOD değerinde ölçüm yapabilen immüno-sensör geliştirebilmişlerdir [65]. Bir başka SPR bazlı çalışmada ise matris ortamından PBS'e alınmış olan FUM miktarının tespiti için Gaag ve arkadaşları (2003) LOD değerini $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ olarak bildirmişlerdir [58]. Benzer şekilde PBS ortamında FUM miktarının tespiti için yine SPR ile çalışmış olan Sapsford ve arkadaşları ise daha hassas bir çalışma geliştirdikleri sensörün LOD değerinin $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ olduğunu açıklamışlardır [66]. TMB/H₂O₂ substratı ile dizayn edilmiş HRP işaretli amperometrik bir elektrokimyasal sensörde ise LOD değeri $0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ olarak Ibtisam E. Tohill tarafından 2010 yılında belirlenmiştir [67]. Ancak diğer işaretlemelerin kullanıldığı çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da HRP'den kaynaklı hatalı pozitif kontrollerin ve standart hataların yüksek olduğu bildirilmiştir. Son yıllarda ise gerçek örnekler üzerine yapılan çalışmalar ile belirlenen ve $0,014 \text{ ug.L}^{-1}$ LOD değerine sahip florometrik dizi immüno-sensörleri Emmanuel I. Iwuoha tarafından 2015 yılında ortaya konulmuştur [68]. FUM dedeksiyonuna yönelik geliştirilen sensör çalışmaları son yıllarda hız kazanmıştır ve değişen LOD değerlerine sahip sistemlerin geliştirildiğini bilinmektedir (Çizelge 2. 5).

Çizelge 2. 5 FUM tayinine yönelik geliştirilen antikor temelli biyosensörler [14], [15]

Yıl	Teknik	Analit	Örnek	LOD
1996	Optik: fiber-optik	FUMB1	Mısır (80% Me-OH)	10 ng/mL
1998	Optik: SPR	FUMB1	-	50 ng/mL
1999	Optik: fiber-optik	FUMB1	Mısır (75% Me-OH)	0.4–3.2 µg/g
2001	Optik: FPIA	FUMB1,B2, B3	Darı (PBS)	0,5 µg/g
2010	EC: Amperometrik	FUMB1, B2	Mısır (70% Me-OH)	5 ng/mL
2012	Kemiluminesans	FUMB1, B2	Darı Tozu (PBS)	2.5 ng/mL
2015	Optik: FPIA	FUMB1, B2	Darı (40% Me-OH)	53.6–290.6 ng/g
2015	Optik: FPIA	FUMB1, B2	Darı (40% Me-OH)	53.6–290.6 ng/g
2015	EC: amperometrik	FUMB1,B2, B3	Mısır (%50 ACN)	0.33 ng/mL

Çizelge 2. 6 FUM tayinine yönelik geliştirilen antikor temelli biyosensörler [14], [15]
(Devamı)

Yıl	Teknik	Analit	Örnek	LOD
2015	EC: impedimetrik	FUMB1,B2, B3	Mısır (70% Me-OH)	0.46 pg/L
2015	EC: amperometrik	FUMB1	Mısır (50%Actnl)	2 pg/mL
2016	EC: AuNPs	FUMB1	-	4,2 mg/L
2016	Optik: SPR	FUMB1	-	2 µg/kg
2017	Optik: FLD	FUMB1	%60 PBS/ Me-OH	11,1 ng/ml

Tüm bu gelişmelere karşın, E.C. komisyonunca belirlenmiş aralıkta FUM'i tespit etmek için geliştirilmiş olan diğer mikotoksinlere kıyasla total FUM için FDA'nın yayınladığı regülasyonlarda sınır değerinin en fazla 4 ppm olmasından dolayı hassasiyetin yanı sıra sensör sisteminde aranan diğer özellikler ön plana çıkmaktadır. Taşınabilirlik, düşük maliyetli cihaz, tekrarlanabilirlik, kullanım kolaylığı gibi QCM özelliklerinin, FUM immünosensör geliştirilmesi açısından önemi artmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında QCM'de FUM B1 algılanması için immünosensör geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapıldı. Geliştirilen immünosensörde hassasiyetin artırılması ve deteksiyon limitlerinin düşürülmesi için alternatif immobilizasyon yöntemleri üzerine çalışmalar gerçekleştirildi.

MATERYAL ve METOD**3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler****3.1.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal ve biyolojik maddeler listesi temin edilen firma ismi ve katalog numarası ile birlikte Çizelge 3. 1’de sunulmaktadır.

Çizelge 3. 1 Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve biyolojik maddeler

Kimyasal ve Biyolojik Maddeler	Katalog No	Firma Adı
Konjugasyonda Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler		
Apo-Transferrin human (TF)	T-1147-500mg	Sigma Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA)	A-9647	Sigma Aldrich
Asetik asid (glacial) 100%	1000632511	Emsure
Magnezyum klorür anhidrid	M8266-100G	Sigma Aldrich
MES (4-Morpholineethanesulfonic acid)	M2933	Sigma Aldrich
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)	22980	Thermo
Ovalbumin (OVA)	A5503	Sigma Aldrich
Trizma base	T-6066-1KG	Sigma Aldrich

Çizelge 3. 1 Deneyleerde kullanılan kimyasallar ve biyolojik maddeler (Devamı)

İmmüniasyonda Kullanılan Kimyasal Maddeler		
Freund's Adjuvant Complete	F5881-10ml	Sigma Aldrich
Freund's Adjuvant, Incomplete	F5506-10ml	Sigma Aldrich
ELISA'da kullanılan Kimyasal Maddeler		
Kimyasal ve Biyolojik Maddeler	Katelog No	Firma Adı
Anti Mouse Polyvalent Immunoglobulins (G, A, M) - Alkaline phosphatase monoklonal antikor (keçide üretim)	A0162-1ml	Sigma Aldrich
Anti Rabbit IgG (Whole molecule) - Alkaline phosphatase, antibody produced in goat, affinity isolated antibody	A3812-5ml	Sigma Aldrich
Çinko klorür (ZnCl ₂)	Z0152-100G	Sigma Aldrich
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	M8266	Sigma Aldrich
Sodyum hydroxide (NaOH)	1064621000	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	31434-1KG-R	Sigma Aldrich
Sodyum phosphate dibasic	04273-1KG	Sigma Aldrich
p-Nitrophenyl Phosphate (PNPP)	20-106	EMP-Milipore
Potassium dihidrojen fosfat	1048731000	Merck
Potasyum hidroksit	105021100	Merck
Skim Milk Powder (Süt tozu)	70166-500G	Fluka Anayt.
Sodyum dihydrogen phosphate dihydrate	1063451000	Merck
Tween 20	8221840050	Merck

Çizelge 3. 1 Deneyleerde kullanılan kimyasallar ve biyolojik maddeler (Devamı)

Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasal Maddeler		
Dimetil Sülfoksid (DMSO)	34943	Sigma Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	D5648-10L	Sigma Aldrich
Gentamicin reagent Solution	15750-060	Gibco
HAT Supplement (50x)	21060-017 100ml	Gibco
HT Supplement (100X)	11067030	Gibco
Polyetilen glikol 4000 (PEG4000)	8074901000	Merck
Antikor Safılaştırma ve Karakterizasyonda Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler		
Amonyum Sülfat	BP212R-1	Fischer Sci.
HiTrap™ Protein A HP	17-0402-01	GE Healthcare
Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit	550487	BD. Biosci.
İmmünosensör Geliştirmede Kullanılan Kimyasal Maddeler		
11-Merkapto-1-undekanol (MUO)	447528	Sigma Aldrich
11-Merkaptoundekanamide (MUD)	745766	Sigma Aldrich
11-Merkaptoundekanoik asid (MUA)	450561	Sigma Aldrich
Aseton	1.000.202.500	Merck
Bromoasetik asid	17000-256	Fluka
Ethanol	1.009.832.511	Merck
Ethanolamine	110167-1L	Sigma Aldrich
Ethylenediamine 99% Extra Pure	11842001	Acros Organics
Fetal Bovine Serum (FBS)	95110	Multicell
N-Hydroxysuccinimide (NHS)	56480-100G	Fluka
Polyester bis-MPA dendron,16 hidrosil,1 thiol (G5DND)	767123	Sigma Aldrich

Çizelge 3. 1 Deneyleerde kullanılan kimyasallar ve biyolojik maddeler (Devamı)

Polyester bis-MPA dendron, 32 hidroksil, 1 thiol, (G4 DND)	767115	Sigma Aldrich
Polyester bis-MPA dendron, 8 hidroksil, 1 thiol, g 3 (G3 DND)	767131	Sigma Aldrich
Sodyum asetate trihidrate	1.062.671.000	Merck
Sodyum borohidrür	S-9125	Sigma Aldrich
Sulfosuccinimidyl 6-[3'-(2-pyridyldithio) propionamido]hexanoate)(S-LC-SPDP)	21650	Thermo
Genel Amaçlı Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Maddeler		
Fumonisin B1 (FUM)	1147	Sigma Aldrich
Ultra Distile Su	34877	Sigma Aldrich

3.1.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

Tez çalışması kapsamında kullanılan çözeltiler 3 ana grup altında hazırlanarak kullanıldı.

- Protein A Kolonunda Safılaştırma İşleminde Kullanılan Tamponlar
- Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri
- Diğer Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

3.1.2.1 Protein A Kolonunda Safılaştırma İşleminde Kullanılan Tamponlar

- **Yükleme Tamponu:** (20 mM sodyum fosfat tamponu) 3.561 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2,76 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1L d. H_2O içinde çözüldü ve tampon pH 7'ye ayarlandı.
- **Bağlama Tamponu:** 3M NaCl (175,6 g) ve 1,5 M glisin/NaOH (11,25 g glisin/60 gNaOH) 1 L içerisinde çözümlenerek tampon hazırlandı ve pH'sı 8'e ayarlandı.
- **Elüsyon Tamponu:** 0,1M Glisin-HCl tamponu hazırlamak için 7,5 g glisin çözeltisinin 25 ml'sine 12 ml hidroklorik asit (HCl) eklenerek hazırlandı (pH 2,7).

- **Denge tamponu:** 121,14 g TRIS baz ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) 800 ml dH_2O içinde çözüldü, pH 9'a ayarlanıp (konsantre HCl ile) son hacim 1 L'ye tamamlandı.

3.1.2.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler ve Besiyerleri

- **DMEM Besiyeri (Dulbecco's modified eagle's medium):** 13.4 gr DMEM, 2 gr sodyum bikarbonat (NaHCO_3) 5.96 gr 4-(2-Hidroksietil)piperazin-1-ethansülfonik asit (HEPES, $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), %1 sodyum piruvat ($\text{CH}_3\text{COCOONa}$), 1 L otoklavlanmış $\text{d.H}_2\text{O}$ 'da çözüldü, pH'sı 7.2 olacak şekilde ayarlandı, steril kabin içinde 0.2 μM ' lik filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı.
- **Normal Besiyeri:** % 80 DMEM, % 20 fetal sığır serumu (FBS), %0,1 gentamisin (antibiyotik) kullanılarak hazırlandı.
- **HAT (Hypoxanthine aminopterin-thymidine) İçeren Besiyeri:** Normal besi yerine litrede 20 ml olacak şekilde HAT içeren (50X HAT) çözelti eklenerek hazırlandı.
- **HT (Hipoksantin-Timidin) İçeren Besiyeri:** Normal besiyerine litre'de 20 ml olacak şekilde HT (50X HT) içeren çözeltinin eklenmesi ile hazırlandı.
- **PEG (Polietilen Glikol) hazırlanması:** 10 gr PEG 4000 (M_w 3600-4400 Da), 10 ml PBS içine eklendikten sonra otoklav edilerek çözdürüldü ve sterilize edildi. Füzyon sırasında kullanılmak üzere açılmadan etüvde saklandı.
- **Dondurma Medyumu:** %60 DMEM, %30 FBS ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlandı

3.1.2.3 Diğer Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

- **10 mM PBS tamponu:** 10 mM dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) (0,7 g) , 10mM potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (0,272 g), 0,15 M sodyum klorür (NaCl) (8,75 g) 1 L distile su (d.H₂O) ile çözüldü ve ortam pH'sı 7,2 olarak ayarlandı.
- **0,1 M MES tamponu:** 19,52 g 2-(N-Morfolin) ethansülfonik asit hidrat (MES) 1 L d.H₂O içinde çözüldü ve ortam pH'sı 10 M sodyum hidroksit (NaOH) ile 4,8'e ayarlandı.
- **20 mM Sodyum Borat tamponu:** 4,77 g sodyum tetraborat ($Na_2B_4O_7$) ve 183 ml 0,1 M NaOH 1 L d.H₂O içinde hazırlandı, pH 10 olarak 10 M NaOH ile ayarlandı.
- **0,1 M Sitrat tamponu:** 2,3 gr sodyum sitrat, 0,8 gr sitrik asit, 2,2 gr glikoz 100 ml dH₂O içinde çözüldü.
- **Yıkama Tamponu:** 0,05 % tween-20 1 L PBS içinde karıştırıldı.
- **1 M EDA solüsyonu:** 1,337 ml etilendiamin (EDA, $C_2H_8N_2$) 20 ml d.H₂O içerisinde çözüldü, pH'sı asetik asit ile 8,3'e ayarlandı.
- **Substrat Tamponu:** 0,027 g çinko klorür ($ZnCl_2$), 0,04 g magnezyum klorür ($MgCl_2$), 1,5 g glisin (NH_2CH_2COOH) 200 ml d.H₂O içinde çözüldü, potasyum hidroksit (KOH) ile tampon pH'sı 10.4'e ayarlandı.
- **60 mM Sodyum Asetat Tamponu:** 163 mg sodyum asetat trihidrat (CH_3COONa) ve 36 µl asetik asit (CH_3COOH) 20 ml d.H₂O'da çözüldü ve pH asetik asit ile 4,8'e ayarlandı.

3.2 İmmünojen Hazırlama

Fumonisin (FUM) tayinine yönelik immünosensör geliştirilmesinde biyolojik algılayıcı olarak kullanılan anti FUM mAb hibridoma teknoloji ile üretildi. Bu kapsamda öncelikle hedef molekül olan FUM' e karşı antikor üreten B lenfositlerin gelişiminin sağlanması için fareler FUM ile immünize edildi. FUM gibi mikotoksinler, haptan yapılı

moleküller olduğu için büyük molekül ağırlıklı ve antikor yanıtı oluşturma yeteneği olan moleküllere kovalent veya iyonik bağlarla bağlanmaları gerekmektedir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, taşıyıcı immunojen molekül olarak proteinler ve polimer konjugatları hazırlanarak kullanıldı. Tüm konjugatlar protein/analit oranları ve saflıkları açısından karakterize edildikten sonra immünizasyonlarda, immünizasyon sonuçlarının (ELISA testleri ile serumda antikor yanıtı) izlenmesinde ve elde edilen antikorların kontrolünde (ELISA testleri ile füzyon sonrası elde edilen hibritlerin) kullanıldı.

Çizelge 3. 2 Kullanılan FUM Konjugatları

İmmünizasyon	cBSA-FUM	cOVA-FUM	PAA-FUM-cOVA	PAA-FUM
İmmün yanıt kontrolünde	cOVA-FUM	cTF-FUM	BSA-FUM	BSA-FUM
Hibrit hücre seçiminde	cTF-FUM	cBSA-FUM	-	-

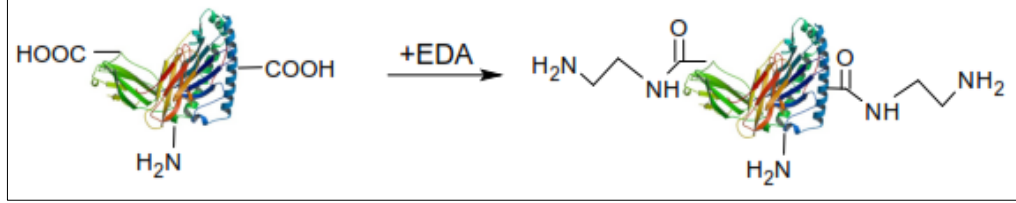
3.2.1 Protein Katyonizasyonu ve FUM Konjugatlarının Elde Edilmesi

Katyonizasyon reaksiyonlarında proteinin yapısında bulunan asidik aminoasitlerdeki negatif yüklü karboksil grupları diamin yapıda olan etilendiamin (EDA) ve çapraz bağlayıcı olan N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) ajanı kullanılarak amine (-H₂) edildi. Bu sayede proteinlerin toplam net pozitif yükleri arttırıldı. Tez çalışmasında kullanılmak üzere BSA, OVA ve Tf proteinleri katyonize edildi. Katyonizasyonu takiben FUM molekülü cBSA, cTF ve cOVA'ya 10, 20, 30 ve 40 mol oranlarında konjuge edildi. Konjugasyon basamakları aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

3.2.1.1 Proteinlerin Katyonizasyon Basamakları

- 670 µL EDA 5 mL MES tamponu ile soğukta karıştırılıp çözeltinin pH'sı konsantre HCl ile 4,8'e ayarlandı. Toplam hacim MES ile 10 ml'ye tamamlandı.
- 50 mg olarak tartılmış native proteinlerin herbiri (BSA, OVA ve TF) ayrı ayrı 10 mL EDA solüsyonunda çözdürüldü ve katyonizasyon reaksiyonu 18 mg EDC eklenmesi ile başlatıldı.

- Katyonizasyon reaksiyonu oda sıcaklığında karıştırılarak 1 saat sürdürüldü.
- 300 µL sodyum asetat tamponu ile reaksiyon durduruldu ve katyonize proteinler ultra saf suya karşı dializ edilerek saflaştırıldı. Uzun süre muhafaza için liyofilize edilerek -20 °C'de saklandı.



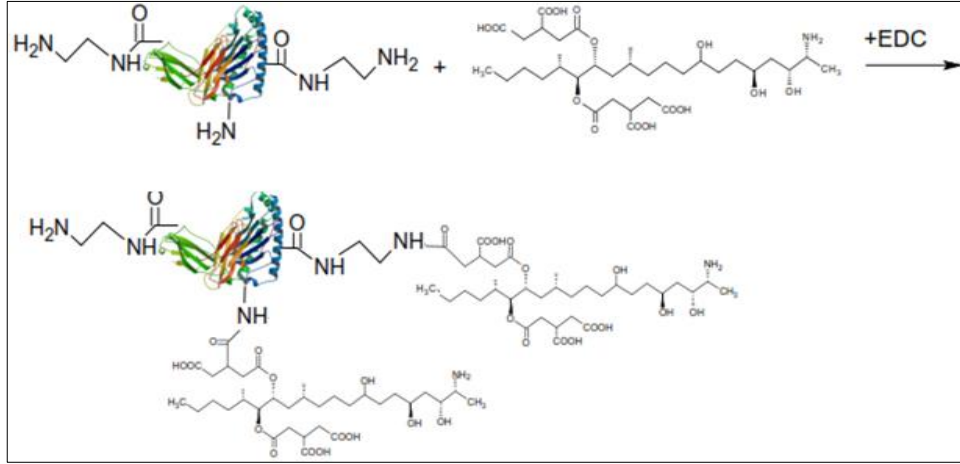
Şekil 3. 1 Ovalbumin katyonizasyon reaksiyonu (cOVA)

3.2.1.2 FUM-Protein Konjugasyonları

cOVA-FUM konjugasyon reaksiyonunda;

- 0,64 mg FUM, 0,1 M MES tamponunda çözülerek
- 0,85 mg EDC ve 1 mg cOVA eklendi.
- Reaksiyona girmeden önce cOVA proteininin 280 nm'deki UV spektrum değeri 0,861 OD olarak ölçüldü ve FUM'nin mol sayısının cOVA'nın mol sayısına oranı (nFUM/ncOVA) 40 kat olacak miktarda reaksiyona girdiği belirlendi.
- 16 saat +4 C°'de karıştırılarak konjugasyon reaksiyonu devam ettirildi.
- 10 kDa'luk membranlı filtreler (10 K Mwco) ile santrifüj edilerek (10.000g X 5 dk. / 5 kez) safsızlıklardan arındırıldı. Santrifüjler sırasında PBS tamponu kullanıldı.
- Kullanılan proteinler ile diğer reaktanlar arası mol oranları sabit olmak üzere cOVA için verilen yukarıdaki protokol aynı şekilde OVA, BSA, TF, cBSA, cTF için de

kullanıldı.



Şekil 3. 2 FUM'in EDC çapraz bağlayıcı ile cOVAproteninine konjugasyonu

Farklı mol oranlarındaki FUM-cOVA konjugatlarında kullanılan FUM, cOVA ve EDC miktarları

Çizelge 3. 'de verilmektedir. Tüm reaksiyonlar 500 µl hacimde ve 0,1 M MES içerisinde 2 saat oda sıcaklığında karıştırılarak tamamlandı. Safılaştırma işlemleri 10 kDa'luk membranlı santrifüj tüpleri ile (10.000g X 5 dk. / 5 kez) yapıldı.

Çizelge 3. 3 Konjugasyonda kullanılan protein, FUM ve EDC miktarları

nFUM/nProtein	cOVA	FUM (mg)	EDC (mg)
10	0,25	0,04	0,032
20	0,25	0,08	0,064
30	0,25	0,12	0,096
40	0,25	0,16	0,128

Hem immünizasyonda kullanmak, hem de FUM-cOVA konjugatının immünize edildiği farelerdeki antikor titresinin belirlendiği ELISA testlerinde kullanmak ve füzyon öncesi deney hayvanına rapel immünizasyonunda kullanmak amacıyla yukarıda verilen yöntemle FUM-cBSA ve FUM cTF konjugatları hazırlandı.

cBSA -FUM (mol oranı 40) konjugasyonunda ;

- 500 µl, 0,1M MES tamponu içinde 1mg cBSA çözüldü
- 0,44 mg FUM ve 0,58 mg EDC eklendi,
- 16 saat +4 C°'de karıştırılarak reaksiyonu devam ettirildi.

- 10.000 Da ayırımında membrana sahip filtreler ile 5 defa santrifüj edilerek safsızlıklardan arındırıldı.

cTf-FUM (mol oranı 40) konjugasyonunda ;

- 500 µl 0,1 M MES tamponu içinde 1 mg cTF çözüldü.
- 0,38 mg FUM ve 0,5 mg EDC eklendi.
- 16 saat +4 C°'de karıştırılarak reaksiyon devam ettirildi.
- 10.000 Da ayırım gücün sahip membranlı filtreler kullanılarak 0,1 M PBS tamponu ile 5 defa santrifüj edilerek safsızlıklarından arındırıldı. Tüm FUM-cProtein konjugasyonlarında EDC miktarı FUM'nin 5 katı molü değerinde kullanıldı.

3.2.1.3 FUM-Polimer Konjugasyonları

Hapten ya da Sentetik peptidlerin düşük çözünürlüğü, kararsızlığı, küçük molekül boyutlarından dolayı antijenik özelliklerinin düşük olması, biyouyumlu olmaması ya da sistematik toksisitesi gibi istenmeyen özellikleri onların etki yeteneklerini azaltmaktadır. Lineer polimerler ile hazırlanan hapten-polimer ikili konjugatları ya da hapten-protein-polimer üçlü konjugatları sayesinde haptenin hidrofobitesini azaltılabilmekte, immünojenik özellikleri artırılabilenekte, canlı organizmada daha uzun süre dağılmadan kompleks halinde kalabilmeleri sağlanabilmektedir. Konjugatlara kazandırdıkları bu özelliklerden dolayı klasik adjuvanlara iyi bir alternatif olarak pozitif ya da negatif yüklü immünojenik olmayan sentetik polielektrolit polimerler olabileceği düşünülmektedir. Lineer sentetik polielektrolitler arasında prototip ürün oluşturmak için yaygın olarak tercih edilen polimer poliakrilik asiddir (PAA) [69],[70],[71]. Alternatif taşıyıcılardan poliakrilik asid polimerinin (PAA) adjuvan olarak kullanılması için PAA-FUM konjugatları sentezlendi. Kendisine karşı immün yanıt oluşturmadığı bilinen PAA polimeri, adjuvan niteliği göstermesi açısından konjugasyon çalışmalarında tercih edilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında "PAA-FUM (ikili konjugat)", "PAA-FUM (üçlü konjugat)" ve kontrol olarak "OVA-FUM" konjugatları hazırlandı.

- FUM mikotoksinin polimer ile konjugasyon reaksiyonunda molekül ağırlığı 100,000 olan %335'lik PAA çözeltisi kullanıldı.
- 80µl (3.2 µg) PAA, 1ml PBS tamponunda çözüldü.
- Çözelti pH'sı 20µl 5M NaOH kullanılarak 4.2'ye ayarlandı.

- nFUM/nPAA oranı 1000 olacak şekilde 0.3mg FUM ve 0.4mg EDC eklendi, manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldı.
- Konjugat, hacimce 2'ye ayrıldı.
- 500 µl'lik 1.grup; "FUM-PAA (2'li konjugat)" olarak isimlendirilip gece boyu +4°C'de karıştırılmaya devam etti.
- 24 saat sonra 30 K MWCO membranlı tüp kullanılarak safsızlıklarından arındırıldı.
- 500 µl'lik 2. gruba 0.39 mg OVA eklendi ve "FUM-PAA-OVA (3'lü konjugat)" olarak isimlendirildi ve gece boyu +4°C'de karıştırıldı.
- 24 saat sonra 30 K MWCO membranlı tüp kullanılarak safsızlıklarından arındırıldı.
- Her iki deney grubu da karakterize edildikten sonra immünizasyon için kullanıldı.
- Konjugatların yapısal özelliklerinin karakterizasyonu, HPLC analizlerinin yanı sıra çap büyüklükleri açısından Nano-Zetasizer cihazı ile hacimsel ve hacim içindeki molekülün sayısal verisine dayalı olarak belirlendi.

3.2.2 Konjugat Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler ve Cihazlar

Protein içerikli konjugatların karakterizasyonunda Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography (HPLC)), Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi kullanıldı. PAA içerikli konjugatların karakterizasyonunda ise HPLC, Ultraviyole-Görünür Işık (UV-VIS) absorpsiyon spektrofotometresi ve Zeta-Nano sizer cihazları kullanıldı.

3.2.2.1 FUM-cOVA Konjugatının HPLC ile Karakterizasyonu

HPLC, analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Özellikle peptit ve proteinlerin karakterizasyonunda merkezi bir teknik olmanın yanı sıra biyolojik ve biyomedikal bilimlerde son yıllarda sağlanan hızlı ilerlemede kritik roller üstlenmiştir. Peptit ve proteinlerin kromatografik yüzeye özgül davranışlar göstermesinden dolayı, özellikle gecikme süresi (RT) özgül bağlanma alanlarının yoğunluğuyla belirlenmektedir. Yaygın kullanılma sebepleri; 1) duyarlılığı, 2) kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, 3) uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. Proteinlerin yapısında bulunan aromatik

aminoasidler (triptofan, tirozin ve fenilalanin) 280nm'de kuvvetli absorbans yaptığı için konjugatların UV bölgede deteksiyonu bu dalga boyunda gerçekleştirildi. Bir diğer yandan, flüoresans özellik gösteren tirozin ve fenilalaninden en yüksek fluorensansa sahip olan triptofandır. OVA yapısında bulunan triptofan (W148, W184, W267) 280 nm 'de uyarıldığında, diğer floresans özelliği olan amino asitler ile quenching yapmaması için emisyonlar 350 nm FLD detektör ile gerçekleştirildi.

Ters faz kromatografisi (RPC) proteinlerin kromatografik analizi ve saflaştırılmasında en yaygın sıvı kromatografilerinden birisidir. RPC'de genel olarak sabit faz apolar gruplara sahip bir kolon destek materyali, hareketli faz ise polar yapıda bir solventtir. Analitlerin içinde bulunan proteinler yüzeye apolar fonksiyon gösteren gruplarıyla bağlanırlar. Bu çalışmada katyonize protein yapıların karakterizasyonunda, yüzeye geri gönüşümsüz bağlanmaların engellenmesi için RPC kullanıldı. Solvent değişimi farklı polaritelerdeki 2 mobil fazın gradyan olarak değişimi ile sağlandı. Tüm tamponlar degaze edilerek kullanıldı, örnek 0,45 µm'lik filtreden geçirildi. HPLC'de uygulama şartları aşağıdaki şekildedir:

- Mobil faz : (A) 75:25, (0,1% TFA dH2O içinde):(0,1% TFA CH₃CN içinde)
(B) 25:75, (0,1% TFA dH2O içinde):(0,1% TFA CH₃CN içinde)
- Kolon: c18 (25cm / 4,6mm, 5µm)
- Akış hızı: 0,8 ml/dk (gradyan)
- Örnek hacmi: 20 µl
- Deteksiyon: UV= 280 nm; FLD = ex:280nm / em: 350nm

Çizelge 3. 4 HPLC Mobil faz gradyan değişime ait solvent hacmi ve akış hızı

Süre	Solvent A	Solvent B	Akış Hızı
0-2 dk	80	20	0,8 ml
2-20 dk	20	80	0,8 ml

3.2.2.2 FUM-Polimer Konjugatlarının HPLC ile Karakterizasyonu

FUM miktarları ile orantılı artan absorpsiyon şiddetine ve alıkonma zamanına dayalı karakterizasyon analizi HPLC ile yapıldı. Tampon degaze edilerek kullanıldı, örnek 0,45

um'lik filtreden geçirildi. SEC kolonda yapılan kromatografik incelemede tek mobil faz sabit akışta uygulandı.

- Mobil faz: PBS
- Kolon: 300A I-5um SEC kolon (25cm / 4.6mm, 5µm)
- Akış hızı: 1 ml/dk – sabit akış
- Örnek hacmi: 20 µl
- Deteksiyon: UV= 280 nm

3.2.2.3 FTIR ile FUM-cOVA Konjugatının Karakterizasyonu

FTIR spektroskopisi katı, sıvı, gaz ve çözelti halindeki organik bileşiklerin analizinde kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir ve kızıl ötesi (IR) radyasyonun absorpsiyonu ile kimyasal bağların titreşiminin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Optik izomerler dışında bütün bileşiklerin IR spektrumu birbirinden farklıdır. IR bölgesi elektromanyetik spektrumun görünür bölgesi ile mikro dalga bölgesi arasında yer alır. FTIR, bir kimyasal reaksiyon sonucunda oluşan bağ yapılarının sahip olduğu titreşim (gerilme, eğilme, makaslama, sallanma, salınma ve burkulma) ve dönme frekansları ile absorplanan enerji frekansının eşit olması prensibine dayanarak absorpsiyon enerjisini ölçmektedir. Konjugasyon ve katyonizasyon sonucu oluşan yeni bağların (amid bağı başta olmak üzere) enstrümantel bağ analizi, FTIR (Perkinelmer Spectrum 100) cihazı ile sıvı fazda tuz diskleri kullanılarak yapılmıştır. Bu sebeple örneklerin ölçümünden önce mobil faz (PBS) ile kör (referans) ölçüm alındı. Analiz sonuçları online portallar¹ kullanılarak belirlendi.

3.2.2.4 FUM-Polimer Konjugatlarının Karakterizasyonunda Nano Boyut Ölçümü

Lineer elektrolit yapıdaki polimerlerin çözündüğü ortamdaki tuz varlığına göre konformasyonel yapıları değişmektedir. Sulu ortamda Na⁺ and Cl⁻ iyonlarına ayrılan NaCl tuzu, poliakrilik asit (PAA) gibi negatif yüklü polielektrolitlerle etkileşime girer. Na⁺

¹ Kullanılan farklı portallar bir arada değerlendirildi. Kullanılan portallardan bazıları şunlardır: <http://www.science-and-fun.de/tools/> , <http://webbook.nist.gov/chemistry/vib-ser.html> , http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

iyonları, polimer zinciri üzerindeki negatif yüklerle etkileşir ve bu durum konformasyonunda ve viskozitesinde bazı değişimlere neden olur. Tuz varlığında lineer polimerler sarmallaşarak globüler bir yapı oluşturmaktadırlar. Bu yapının moleküler çapının büyüklüğü, içinde bulunduğu ortamın tuz konsantrasyonuna, pH'sına ve viskozitesine bağlıdır. Polimer konjugatlarının zeta potansiyellerinin ölçülmesi bulunduğu ortamdaki moleküler çaplarına ulaşmamızı sağlamaktadır. Bu sebeple PAA-FUM ikili konjugatı ile PAA-cOVA-FUM üçlü konjugatlarının zeta potansiyelleri ile moleküler çapları belirlendi. Ölçümler, hem pH 7,2 PBS içerisinde hem de pH 4,8 MES tamponu içerisinde tekrarlandı. Böylece moleküllerin değişen moleküler çapları farklı pH ve tuz konsantrasyonunda zeta potansiyellerinin belirlenmesi sayesinde ölçüldü. Elde edilen yapının kopmaktığı ile immünojenitesinin değişimi irdelendi.

3.2.2.5 FUM-Polimer Konjugatlarının UV-VIS Spektrofotometre ile Karakterizasyonu

Önemli birçok biyolojik molekül UV ışığını absorplamaktadır. Proteinlerin UV absorplama özellikleri; çözeltilerindeki konsantrasyonunun ve saflığının tayininde kullanılmaktadır. Proteinler UV bölgede iki absorpsiyon pikine sahiptirler. Bunlardan bir tanesi 215-230 nm'de (peptid bağının absorpsiyonundan kaynaklanan), diğeri de 280 nm'de (triptofan, tirozin ve fenilalanin gibi aromatik aminoasitlerin absorpsiyonundan kaynaklanan) gözlenmektedir. Proteinlerin UV ışığı absorplaması özelliğinden yola çıkılarak protein çözeltilerinin konsantrasyonlarının saptanmasında, UV-VIS spektroskopisi kullanıldı. Bu kapsamda;

- Polimer konjugasyonu sırasında kullanılan 80 µl (32µg) PAA / 500 µl PBS, 0,3mg FUM / 500 µl PBS, 0,39 mg OVA / 500 µl PBS, tek başlarına UV absorpsiyon ölçümleri yapıldı.
- Elde edilen PAA-FUM ve PAA-OVA-FUM konjugatları saflaştırıldıktan sonra PBS ile 500 µl hacime tamamladı ve UV spektrofotometresi ile ölçümleri yapıldı.
- UV taraması 190-400 nm arasındaki dalga boylarında tarama yapıldı.

3.3 İmmünizasyon ve Serumda Antikor Titresinin Takibi

3.3.1 İmmünizasyon

Balb/c tipi albino deney fareleri kullanılan bu çalışmada erkek farelerden her kafeste 4 hayvanlık gruplar oluşturuldu. İlk immünizasyon fareler 5 haftalık iken başlandı ve ağırlıkları ortalama 21 gram olarak hesaplandı. Toplam immünize edilen fare sayısı 20'dir. FUM-cProtein konjugatlarının 1mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış ve saflaştırılmış örneklerinden FUM-cBSA ve FUM-cOVA'dan 100'er µg ile her bir fareye immünizasyonlar yapıldı. İlk immünizasyonlar 100 µl complete Freund's adjuvan ile karıştırılarak intraperitoneal olarak yapıldı. Takip eden immünizasyonlar, 14 günlük rejimler uygulanarak 100 ul incomplete Freund's adjuvan ile karıştırılarak yine intraperitoneal yoldan yapıldı. FUM-PAA konjugatı 3 BALB/c'nin immünizasyonunda ilave adjuvant kullanılmadı. Tüm immünizasyonlarda her bir fareye 4 µg FUM-PAA konjugatı intraperitoneal olarak immunize edildi. Takip eden immünizasyonlar, 14 günlük rejimler ile intraperitoneal olarak adjuvansız yapıldı. Her immünizasyonu takiben 10. günde kuyruktan kan alındı. Serumda farklı dilüsyonlar yapılarak (1/100, 1/1000, 1/5000 ve 1/10000) ELISA ile test edildi. Yüksek ve spesifik antikor titrelerine ulaşan farelerin dalakları ile füzyon yapılmadan önce son rapel denilen hatırlatma immünizasyonu yapıldı (Çizelge 3.). İmmünizasyonlar, kuyruk veninden intravenöz olarak yapıldı Fareler 5 gün sonra füzyona işlemine alındı.

3.3.2 Serumda Antikor Titresinin Takibi

İmmünizasyonlarda FUM spesifik poliklonal antikor yanıtlarının takibi indirekt ELISA ile 405 nm'de optik yoğunlukların şiddeti (OD) ölçülerek belirlendi. Hazırlanan FUM-protein konjugatlarının immünizasyonu sonucu hem FUM'e hem de protein yapılaraya karşı immün yanıt oluşmaktadır. ELISA ile sadece FUM'e karşı oluşan poliklonal antikorların takibinin yapılabilmesi için, immünizasyonda kullanılmayan FUM konjugatı ile plak kaplamaları yapıldı (Çizelge 3.).

cBSA-FUM konjugatı ile immünize farelerden alınan serumlar ile yapılan ELISA'larda plağa kaplama için cOVA-FUM konjugatı kullanılırken, cOVA-FUM konjugatlarının

ELISA'sında ise plağa kaplamada FUM-cTF konjugatı kullanıldı. Uygulanan indirekt ELISA protokolü şu şekildedir;

- 96 kuyulu ELISA plaklarının her bir kuyusu 100 ng/kuyu FUM-cPRT konjugatı (50 µl PBS tamponu içinde) ile kaplandı ve 4°C'de ağzı kapalı olarak 1 gece bekletildi. Kontrol kuyularına hiç antijen konulmadı.
- Ertesi gün yıkama tamponu ile 3 kez yıkanan kuyular % 5'lik 350 µl süt tozu (w/v, PBS içinde) ile 1 saat kadar 37°C'de bloklandı.
- Kuyular tekrar yıkama tamponu ile 3 kez yıkandıktan sonra farelerden alınan ve 1/100, 1/1000, 1/5000 oranlarında PBS ile seyreltilen serumlar kuyulara eklendi (100 µl/kuyu), 1 saat 37°C'de bekletildi.
- Kuyular, yıkama tamponu ile 3 kez yıkandıktan sonra fare antikorlarına karşı geliştirilmiş alkalen fosfataz (AP) konjuge ikincil antikor 1/2000 seyreltilerek kuyulara eklendi (100 µl /kuyu), 1 saat kadar 37°C'de bekletildi.
- 5 kez yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra kuyulara AP'nin substratı olan 4-nitrophenyl phosphate (PNPP) (1mg/ml), substrat tamponunda hazırlandı ve kuyu başına 100 µl eklendi.
- 30 dakika ve 60 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra 405 nm'de ELISA okuyucu yardımıyla absorbanslar (OD) belirlendi.

Yarışimli elisalardan önce kaplama optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla FUM-cBSA immünize farelerde ELISA plağında kaplama için kullanılan cOVA-FUM konjugatı 1,6 ug/100 ul PBS'te hazırlandı ve ½ dilüsyon ile 8 kuyuda kaplama yapıldı. Ardından 3. İmmünizasyon sonucu alınan serumlarda ELISA yapıldı ve optimal değer kaplama konsantrasyonu olarak belirlendi. Yarışimli ELISA'da optimal değer altında kaplamalar yapıldı. İmmünizasyon sonrası alınan serumlarda FUM spesifik antikorların varlığı yarışimli ELISA ile doğrulandı. Bu amaçla yarışimli ELISA test sisteminde, serumdaki poliklonal antikorlar ile 4 ug'a kadar (2 kat artan) miktarlarda FUM ön inkübasyona tabii tutuldu.

3.4 Hibridoma Teknolojisi ile FUM Spesifik Monoklonal Antikor Elde Edilmesi

İmmünreaktif tanı testlerinde ve immünosensörlerde analite spesifik geliştirilmiş olan antikorların büyük bir bölümü, hibridoma teknolojisi ile üretilmektedir. Hibridoma teknolojisinde iki somatik hücrenin sitoplazma ve çekirdeklerinin tamamen birbirine kaynaşması sağlanmakta, her iki hücrenin de sahip olduğu özelliklerinin hibrid hücreye aktarılması hedeflenmektedir [72], [73]. Bu çalışmada da kullanılan hibridoma teknolojisi ile antikor üretimi kapsamında öncelikle balb/c tipi fareler, FUM ile immunize edildi. İmmünizasyon için seçilen farelerin genetik soyu ile füzyona girecek olan myeloma hücrelerinin aynı soydan gelmesi önemlidir. Genellikle deney hayvanlarına intradermal, subkutan, intramasküler, patiler ve intraperitoneal olarak immünizasyon yapılmaktadır [74]. Antikor üretme kabiliyetindeki B lenfositlerin fareden alınabilmesi için fare servikal dislokasyon ile öldürülür ve B hücrelerinin bulunduğu dalak ve lenf düğüm hücreleri toplanır. Toplanan dalak hücreleri süspanse edildikten sonra polietilen glikol ile (PEG) myeloma hücreleri ile birleştirilirler ve hibrid hücreleri elde edilir. Hibrid hücrelerini myeloma hücrelerinden ayırt edebilmek için myeloma hücre hatlarının seleksiyon sağlanabilecek bir mutasyona sahip olması gerekmektedir. En yaygın kullanılan mutasyon türü pürin biyosentezinde görevli hipoksantin fosforiboziltransferaz (HGPRT) enziminin mutasyonudur. Füzyon sonrası seçici medyum ortamına eklenen "hypoxanthine, aminopterin ve thymidine" (HAT) içinde bulunan aminopterin, hücrelerin pürin ve pirimidin üretimini sağlayan "de novo" (temel sentetik yol) sentez yolunu inhibe eder. Ancak füzyon sonrası hibrid hücrelerinin pürin ve primidin sentezlerinin devamlılığı istenmektedir. Füzyona girmemiş HGPRT pozitif B lenfositleri ise kültür şartlarında 4-5 gün içerisinde öldükleri için doğal seleksiyona uğramış olurlar. Oluşan klonlar arasında antijen spesifik klonun bulunması için ELISA ile tüm klonlar test edilir. Pozitif yanıt alınan kuyularda tek hücreden klon elde edebilmek için seri dilüsyon ile tek düşürme işlemleri ardı ardına uygulanır. Böylece antijen spesifik monoklonal antikor salgısı yaptığı bilinen hibrid hücre hattı elde edilmiş olur [75].

3.4.1 Besleyici Hücrelerin Hazırlanması

Hibrit hücreler ilk üretildiklerinde polistrenden yapılmış olan hücre kültürü plaklarında yaşamakta güçlük çekmektedirler. Makrofaj hücreleri, salgıladıkları sitokinler ile ortamdaki hücrelerin aktivitesini artırır. Ayrıca ortamdaki artıkları fagosite ederek ortamı hibrid hücreleri için daha uygun hale getirirler. Bu amaçla immünize edilmemiş sağlıklı bir farenin öldürüldükten sonra periton içinden 5 ml DMEM (serumsuz) ile besleyici hücreler alındı. Çalışılacak hücre kültür plağı sayısına göre her kuyuya normal besi yeri (%20 FBS ve %0,1 antibiyotik) ile karıştırılarak 100 µl olacak şekilde dağıtıldı ve CO₂ inkübatöründe (%5 CO₂, %96 nem ve 37°C) ortam şartları 1 gün boyu önden sitokinlerini salgılaması için bekletildi.

3.4.2 Bağışıklanmış Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi

FUM'e karşı antikor yanıtlarının yüksek olduğu ELISA ile belirlenen farelerden, FUM-cBSA ile immünize edilen (n=2) ve FUM-cOVA ile immünize fareler (n=3) füzyon işlemi için seçildi.

Laminar akımlı kabin içerisinde, bağışıklanmış farenin karın bölgesi açılarak ELISA'da pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere farenin kalbinden 0,15 ml kan alınarak 1:1 oranında sodyum sitrat ile karıştırıldı, santrifüjle serum kısmı ayrıldı, alıquotlanarak -20 °C 'de saklandı. B hücrelerinin elde edilmesi için;

- Bağışık farelerin yüzey lenf düğümleri ve dalakları toplandı.
- 10 ml DMEM bulunan petri kabındaki strainer (süzgeç) içine alındı
- Mekanik ezme işlemi ile hücreler açığa çıkarıldı.
- Pipet yardımıyla süspanse edildi.
- DMEM içerisinde 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkandı.
- Çöken hücreler 25 ml DMEM içerisine alınarak hücre sayımları 2 şer kez yapıldı.

3.4.3 Myeloma (F0 Hattı) Hücrelerinin Hazırlanması

Füzyondan 15 gün önce, azot tankı içerisinde (-196 °C'de) dondurma medyumunda saklanmış F0 myeloma hücre hattı dondurma işleminin tersine hızlı şekilde çözündürüldü. DMSO'dan uzaklaştırmak için;

- %20 FBS'li DMEM içine alınan hücreler santrifüj ile (1250 rpm, 5 dk) çöktürüldü.
- Üst sıvıda kalan DMSO hemen uzaklaştırıldı,
- Hücreler tekrar 1 ml DMEM içinde süspanse edildi,
- Kültürde normal besi yeri içerisinde çoğaltılması için alındı.
- Füzyon gününe kadar yeterli sayıda ($100-500 \times 10^6$) F0 hücresi elde edilmesi için hücreler %10 FBS içeren medyumla pasajlanarak çoğaltıldı.

3.4.4 Hücrelerin Sayımı

- Hücre sayısı, $1-2 \times 10^5$ hücre/mL konsantrasyonu geçmeyen hücre süspanسیونundan 10 µL örnek alındı
- Hücre süspanسیونu üzerine 10 µL %0.4'lük trypan blue solüsyonu eklendi
- 3 dakika beklendi.
- Örnek Thoma lamına yerleştirilip ışık mikroskopunda sayım yapıldı
- Canlı hücreler yüzdesi aşağıdaki gibi hesaplanır

Toplam Hücre Sayısı =

Hücrelerin içinde bulunduğu medyum hacmi (ml) X Sayılan hücre miktarı X 10^4 (sabit katsayı)

3.4.5 Füzyon İşlemi

- Hücre sayımı yapılan F0 myeloma hücreleri ve dalak hücreleri birleştirildi ve 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst kesim atılarak çöken hücre karışımına yaklaşık 37°C'de 1 ml PEG 4000, 1 dakika içerisinde eklendi.
- 1 dakika süresince hücre karıştırılarak avuç içinde ufak hareketlerle bekletildi.
- 4 ml serumsuz DMEM, 4 dakika içerisinde yavaş yavaş ilave edildi.
- 10 ml DMEM yavaşça karıştırılan hücrelere 4 dakikada içinde ilave edildi.

- 30 dakika CO₂ etüvde (% 5 CO₂, % 96 nem ve 37°C) bekletildikten sonra santrifüj edildi.
- Çöken hücrelere HAT içeren besiyeri ilave edilerek süspanse edildikten sonra, bir önceki gün makrofaj ekilmiş hücre kültür plaklarına 150 µl/kuyu olacak şekilde dağıtıldı.
- 10 gün sonra HAT besiyeri, 12-14. gün arasında hücrelerin oluşturduğu klon büyüklüğüne göre seçici HT ortamı eklendi, hücrelerin gelişme periyoduna bağlı olarak (15. gün civarı) normal besiyerine geçildi.
- Klon kontrolleri ışık mikroskopunda yapıldı, ELISA ile pozitif yanıt veren kuyular blirlendi, alt klonla ve seri dilüsyon uygulanarak (2 kez) hibridoma seleksiyonu ve alt klonlama işlemleri yapılmış oldu.

3.4.6 Anti FUM 8F4 Monoklonal Antikorunun Karakterizasyonu ve Saflaştırılması

Anti FUM 8F4 monoklonal antikorunun karakterizasyonu, diğer mikotoksinlere yanıt verip vermediğinin belirlendiği çapraz reaksiyon ve özgünlük belirleme testleri, izotipleme/alt izotipleme testleri, afinite belirleme testleri ile gerçekleştirildi.

3.4.6.1 Anti FUM 8F4 Monoklonal Antikorida Çapraz Reaksiyon ve Özgünlük Belirlenmesi

Monoklonal antikorun, FUM'nin tahıllarda bir arada bulanabileceği diğer mikotoksinler ile hatalı pozitif yanıt vermesi durumunda FUM'nin tanı sisteminde kullanımı uygun olmayacaktır. Anti FUM 8F4 diğer mikotoksinler ve mikotoksinlerin içinde bulunduğu solventler ile test edilmesi gereklidir. Bu amaçla elde edilen 8F4 antikorunun, aflatoksin (AFM1, AFG1, AFG2, AFB2), zeralenon (ZEA), okratoksin (OTA) gibi diğer mikotoksinlere karşı yanıtları yarışımlı ELISA ile test edildi. AFM1, AFG1, AFG2, AFB2, ZEA mikotoksinleri DMF içerisinde, OTA mikotoksini EtOH içerisinde ve FUM, BSA, OVA, TF proteinleri ise d.H₂O'da çözündürülerek kullanıldığı için çözücü etkisini gözlemlemek ve non-spesifik bağlanma kontrolünü yapabilmek için organik solventlerle de test edildi. Yarışımlı ELISA için serbest mikotoksin veya proteinlerin her birinin 1 µg'ı, 8F4 kültür üst sıvıyla bir ependorf tüp içinde ön inkübasyona bırakıldı, yarım saat sonra 100

µl'deki her bir örnek FUM-Tf kaplı plağa koyularak çapraz cevapları kontrol edildi. Deney kapsamında, antijen bulunmayan süt tozu kaplı kuyucuktaki antikor yanıtı negatif kontrol olarak test edildi.

3.4.6.2 Anti FUM 8F4 Monoklonal Antikorumun Afinitesinin ve İso tipinin Belirlenmesi

İmmunoglobulin (Ig) izotipinin hızlıca belirlenmesi amacıyla BD Pharmingen™ fare Ig izotip belirleme ELISA kiti kullanıldı. Anti FUM 8F4 antikorumun afinitesinin belirlenmesi çalışmasında ilk olarak kullanılacak optimum anti FUM 8F4 miktarı, sabit miktarda immobilize FUM ile artan miktarda anti FUM 8F4 etkileştirilerek indirekt ELISA'da belirlendi.

Anti FUM 8F4'ün afinitesinin belirlenmesi için; ELISA plağı 50 ng/kuyu olacak şekilde FUM -TF konjugatı ile kaplandı. 0,01-2 µg arasında 2 kat artan miktarda serbest FUM üzerine 100 ng anti FUM 8F4 supernatant eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında çalkalandı. Ön inkübasyon sonrasında her bir kesim FUM-TF kaplı kuyulara eklendi. Anti FUM 8F4'ün FUM'e afinitesini belirlemeye yönelik antikorun farklı düzeylerde serbest toksinle etkileşimi incelendi. Deney 2 kez tekrarlandı ve elde edilen verilerden, EC50 değeri (ED50 plus 0v1 programı ile) hesaplandı.

3.4.6.3 Anti FUM 8F4 Monoklonal Antikorumun Saflaştırılması

Anti FUM 8F4 monoklonal antikorumun saflaştırılması 3 adımda gerçekleştirildi. İlk adımda toplanan supernatant amonyum sülfat ile çöktürüldü, daha sonra oluşan pellet geri çözülerek diyaliz edildi ve en son olarak protein A kolonu (sefroz kolon/GE Healthcare 17-0402-01) ile saflaştırıldı.

- AS ile çöktürme sırasında presipitasyon konsantrasyonunu etkileyen en önemli faktörlerden biri antikora ait polar grupların sayısı, bu grupların pozisyonu, $(NH_4)^+$ ve $(SO_4)^{2-}$ iyonları ile etkileşim hızı, iyon konsantrasyonu ve ortam pH'sıdır. Bu sebeple kristalize AS (KAS) ve doyurulmuş AS (DAS) çözeltisi anti FUM 8F4'ün kısmi saflaştırılması kapsamında kıyaslamalı olarak incelendi ve antikor aktivitesinin korunmasına yönelik optimizasyon gerçekleştirildi. DAS çöktürme için 1 l anti FUM 8F4 supernatantı manyetik karıştırıcı ile karıştırılırken, üzerine 1.2 l

DAS (1.417 ml'de 767,92 g AS) yavaşça eklendi, KAS çöktürme için +4°C'de 380 g KAS eklenerek karıştırıldı.

Çökeltinin meydana geldiği her iki medyumda

- Proteinler, 10.000 rpm'de 40 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.
- Elde edilen peletlere 12,5 ml PBS eklenerek +4°C'de çözünmesi için bekletildi.
- Ortamdaki tuzun uzaklaştırılması için PBS'e karşı 2 gün süresince diyaliz edilen antikor çözeltilerinin kısmi saflaştırılması gerçekleştirildi ve antikor kolon kromatografisi için konsantre edildi.
- KAS ve DAS çöktürmeler ile yapılan anti FUM 8F4 antikorlarının kısmi saflaştırılmış kısımları 1/500 dilüsyonunda, tüm AS'lerin santrifüjlenmesi sonrası ayrılan üst sıvıları ise 1/50 dilüsyonda kullanılarak FUM-CTF konjugatı kaplı ELISA testine uygulandı.
- Böylece çökeltilerin içerdiği ve süzüntüde kalan anti FUM 8F4 antikor miktarı belirlendi.
- DAS ile 40 kat konsantre elde edilen proteinler, protein A'ya dayalı immüno afinite kromatografisi ile saflaştırılmaya devam edildi ve aktif antikor miktarı ELISA yöntemi kullanılarak tespit edildi.

3.5 Fumonisin İmmünosensörünün Geliştirilmesi

FUM deteksiyonu için FUM immobilize yüzeyde anti FUM 8F4 monoklonal antikorunun algılayıcı eleman olarak kullanıldığı immünoassay geliştirildi. FUM deteksiyonuna yönelik yöntem geliştirilebilmesi için ilk olarak kristal yüzeyinde kendinden oluşan tek tabaka (self assembled monolayer (SAM)) yüzeyler oluşturuldu ve FUM immobilizasyonları gerçekleştirildi. FUM immobilizasyonunu takiben yüzeyde rejenerasyonun sağlanabileceği şartlar belirlendi. İmmobilizasyon etkinliğinin sistemde algılanan FUM limit değerine etkisinin incelenmesi için alternatif lineer ve dendronik moleküller ile tek ve çok katlı SAM tabakalar oluşturuldu.

3.5.1 QCM cihazı ve LOD hesaplama

FUM tayini yapabilen immüno-sensör geliştirilmesi ve etkinliğin artırılmasına yönelik yüzey immobilizasyonu çalışmaları sırasında QCM 200 cihazı kullanıldı. 5MHz AT kesim, her iki yüzeyinde de altın kaplı elektrodları bulunan kristaller ve QCM 200 cihazı, KVG Quartz Crystal Technology GmbH (Neckarbischofsheim/ Germany) firmasından temin edilmiştir.



Şekil 3. 3 QCM 200 cihazı ve 5 MHz'lik AT kesim altın kaplı kuvars kristal elektrotlar

Tespit sınırı, bir analitin biyolojik sensörlerin analitik prosedürleri ile güvenilir şekilde ölçülebilen en küçük konsantrasyonunu tanımlamak için kullanılan bir terimdir ve hesaplamak için çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu tez çalışması kapsamında LOD değerinin tespiti için, kalibrasyon eğrisinden elde edilen veriler ve kör örneğin (referans ölçüm) tekrarlı ölçümünden elde edilen standart hata (sd) kullanıldı.

Kalibrasyon eğrisinin belirlenmesi için, uygun FUM konsantrasyon aralığı seçilerek, FUM konsantrasyonuna karşı (x) cihaz cevabı (y) grafiğe geçirilir. Bu sayede, belli bir konsantrasyon aralığı için doğrusallık gösteren bir eğri elde edilmektedir. Çünkü doğrusallık gösteren eğrilerin hata payları kabul edilebilir değerlerdedir. Tez kapsamında; kalibrasyon eğrisi üzerinde gösterilen doğrusal ilişkiyi bulmanın en yaygın yolu olan “en küçük kareler yöntemi” kullanıldı. Doğrunun denklemi ($y=mx+b$) sayesinde doğrunun eğimi (m) bulundu. Kalibrasyon eğrilerinde iki değişkenin birbirine bağımlılığını gösteren m değeri, analitik yöntemde oransal hata ölçüsünü belirttiği için LOD değerinin hesaplanmasında kullanıldı. Tez çalışması kapsamında LOD değeri;

$$LOD = (k * sd)/m \quad (3.1)$$

LOD: Tespit Sınırı

Sd : Körün standart sapması

m : Kalibrasyon eğrisinin eğimi (oransal hata ölçüsü)

k : Gürültüden kaynaklı hatayı minimize etmek adına %92,1 güven aralığında hesap yapılabilmesi için kullanılan sabit değer 2 olarak kullanıldı.

Körün standart deviasyonu ise aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\text{Sample Standard Deviation} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (3.2)$$

x : Her bir frekans değişiminin değeri (ΔF , Hz)

\bar{x} : Ölçüm setinin istatistiksel ortalama değeri

n : Tekrar edilen ölçüm sayısı

LOQ değerinin hesaplanmasında şu formül kullanıldı;

$$LOQ = (k * sd)/m \quad (k=6) \quad (3.3)$$

3.5.2 FUM İmmünoensörünün Geliştirilmesine Ait Ön Çalışmalar

FUM immünoensörünün geliştirilmesi için tez kapsamında kullanılacak immünoassay metot; FUM immobilize yüzeye uygulanan sabit anti-FUM 8F4 miktarının, 0-10 ppm aralığında artan FUM miktarı ile bloke edilmesi ile ölçülen frekans farklarında azalmaların belirlenmesidir. Altın yüzeyde FUM immobilizasyonu için alternatif SAM oluşturma metotları hazırlandı. Elde edilen lineer ve dendronik SAM yüzeylere FUM molekülleri kovalent olarak bağlandı ve anti FUM 8F4 algılanması tayin edildi. Anti FUM 8F4'ün hangi koşullarda uygulanması gerektiğinin tayini için poliklonal anti FUM 8F4 antikoru (anti FUM 8F4 pAb), süpernatant içindeki monoklonal anti FUM 8F4 antikoru (anti FUM 8F4 CS) , AS sonrası kesimi (anti FUM 8F4 AS) ve tam saf kesimi (anti FUM 8F4) ile algılama yapıldı. FUM immobilize yüzeyde tekrar ölçüm yapılabilmesi için rejenerasyon koşulları incelendi.

3.5.2.1 Altın Yüzeylerde SAM Oluşturulması

Kristallerin temizlik işlemi için;

- Kristaller, 75 °C'lik bir sıcaklığa kadar ısıtılan hidrojen peroksit (% 30), amonyak (% 25) ve deiyonize sudan oluşan (v/v/v 1: 1: 5) temizleme solüsyonunda 3 dakika boyunca daldırılarak bekletildi.
- Bu sürenin sonunda, hemen deiyonize suyla durulanan kristaller azot gazı altında kurutuldu.
- Daha sonra, altın yüzeyi üzerindeki kalıntıları gidermek için kristaller plazma temizleme ünitesinde 60 watt'ta 5 dakika süreyle inert argon gazı ile yakma işleminden geçirildi.

Temizlendikten sonra, kristallerde FUM immobilizasyonu öncesinde;

- 11-merkaptoundekanoik asittir (MUA) ajanı kullanılarak karboksil grupları oluşturuldu.
- Kristallerin altın yüzeyi, etanol içerisinde 2mM MUA çözeltisinin + 4 ° C'de gece boyu inkübasyonu ile kaplandı.
- Oluşturulan MUA-SAM'ın modifikasyonundan önce yüzeyler en az 5 kez saf su ile yıkandı ve steril kabinde kurutuldu.

3.5.2.2 SAM FUM Immobilizasyonu için Aktivatör Oranlarının Tayini

MUA ile modifiye edilmiş altın yüzeye FUM immobilizasyonunu optimize etmeden önce, immobilizasyon sırasında kullanılacak aktivatörlerin miktarları optimize edildi. MUA'nın fonksiyonel karboksil grupları N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC)/ N-Hydroxysuccinimide (NHS) ile aktive edildi ve etilen diamin (EDA) solüsyonu ile amin fonksiyonel gruplarına dönüştürüldü. Değişen miktar ve oranlardaki aktivatör kullanımının, SAM yüzeyinde gerçekleştirilen diamin modifikasyonu üzerine etkisi araştırıldı. Çalışma kapsamında, farklı aktivatör konsantrasyonları, diğer tüm şartlar sabit tutulmak üzere 6 kristallik 3 grupta incelendi.

- Birinci grupta 400 mM EDC ve 100 mM NHS,
- ikinci grupta 100 mM EDC ve 400 mM NHS,

- üçüncü grupta 400 mg EDC ve 400 mM NHS 1: 1 oranında 10 dakika inkübe edilerek farklı aktivasyon seviyelerinin oluşması sağlandı.
- Tüm kristaller 7 dakika boyunca EDA solüsyonu ile inkübe edildi.
- SAM yüzeyinde kalan karboksil gruplarını bloke etmek için 2 dakika boyunca 1 M etanolamin (pH 8,3) uygulandı.
- 5 kez saf distile su ile temizlenerek steril kabin içinde kurutuldu.
- Antikor bağlanma aktivitelerini karşılaştırmak için, her gruptan 2 kristal olmak üzere 6 kristalde 1 mM FUM, 6 kristalde 2 mM FUM ve 6 kristalde 3 mM FUM oda sıcaklığında 2 saat süreyle (pH 4,8'de 0,1 M MES içinde) 8 mM EDC ile birlikte inkübe edildi.
- FUM'nin immobilizasyonu sonrasında, yüzey spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için oda sıcaklığında 10 dakika 60 mM pH 4,8 sodyum asetat / asetik asit ile bloke (kimyasal bloklama) edildi.
- Kristali QCM kristal haznesine yerleştirmeden önce, yüzeyler 5 kez saf su ile yıkandı ve steril kabinde kurutuldu.
- Tüm çözeltiler degaze edilerek kullanıldı ve antikorlarda agregatlardan kaçınmak için 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- QCM haznesi PBS ile dolduruldu ve dengeli bir sinyal (baseline) elde edilmesi beklendi.
- Yüzeyler % 5 FBS ile bloke edildi ve daha sonra yüzeylerin antikor bağlama kapasitesi Anti FUM 8F4 antikorunu kullanılarak belirlendi.
- Optimizasyon işlemi için Anti FUM 8F4'ün kısmen saflaştırılmış amonyum sülfat fraksiyonu (8F4 AS), 1/50 oranında PBS ile seyreltilerek (yaklaşık 0,1 mg/ml antikor içeren) kullanıldı.

3.5.2.3 FUM Kaplı Sensör Yüzeyinde Rejenerasyon Şartlarının Tayini

Sensör yüzeylerinde immobilize FUM'nin yüzeyden sökülmeden, sadece anti FUM 8F4 uzaklaştırılması ile kristallerin tekrar kullanılması istenmektedir. Bu durum, FUM'nin yüzeye yaptığı bağın, FUM ile anti FUM 8F4 arasındaki afiniteden daha kuvvetli olduğu durumda sağlanabilir. Bu sebeple, yüzeyde yapılan FUM immobilizasyonu kovalent

bağlanma ile yapıldı. Çünkü antijen antikor arasındaki ikincil bağlar kovalent bağlardan daha düşük enerjiye sahiptir ve uygulanacak bir rejenerasyon metodu ile bu bağın kopartılması sağlanabilmektedir. Bu nedenle, rejenerasyon protokolü ampirik olarak değerlendirilmelidir. Çünkü antijen-antikor bağlanmasının fiziksel kuvvetlerinin kombinasyonu belirsizdir.

Ayrıca rejenerasyon koşulları FUM kaplı yüzeyde geri döndürülemez hasarlar oluşturmamalıdır. FUM kaplı yüzeylerin rejenerasyonu sayesinde QCM cihazı ile daha hızlı, daha kolay ve tekrarlanabilir ölçümler sağlanmaktadır. Rejenerasyon için;

- HPLC grade distile su 50 ul/dk akış hızında, 10 dakika süresince,
- 0,1 M HCl 50 ul/dk akış hızında, 5 dakika süresince,
- 0,1 M Glisin tamponu (pH 2,7) 50 ul/dk akış hızında, 5 dakika süresince,
- 0,1 M Glisin tamponu (pH 2,7) 0,5 ml/dk akış hızında, 2 dakika süresince,
- % 1 v/v SDS içeren 50 mM NaOH tamponu 50 ul/dk akış hızında, 5 dakika süresince,
- HPLC grade distile su 0,5 ml/dk akış hızında 3 dakika ardından 0,1 M Glisin tamponu (pH 2,7) 0,5 ml/dk akış hızında, 1 dakika süresince uygulandı.

3.5.2.4 Anti FUM 8F4 Uygulama Koşullarının İncelenmesi

SAM yapılan yüzeylerde FUM kaplama optimizasyonu için;

- Ethanol içinde hazırlanan 2 mM MUA, 24 saat süreyle +4°C'de inkübasyon ile 25 adet kristal yüzeyine uygulandı.
- Kristallerden 19 tanesi üzerinde 1,75 mM FUM immobilizasyonu daha önce bahsedildiği gibi gerçekleştirildi.
- FUM miktarına dayanan yüzey kaplama etkilerinin de belirlenmesi için 6 kristalde 2 mM FUM immobilize edildi.
- FUM'nin immobilizasyonu sonrasında, yüzeyde spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için kimyasal bloklama daha önce bahsedildiği gibi yapıldı.
- Yüzeyler en az 5 kez saf su ile yıkandı ve steril kabinde kurutuldu, QCM haznesine yerleştirildi, PBS ile denge elde edildi.

Bloklama işlemi, kullanılacak olan antikor şartlarına göre şu şekilde yapıldı;

- Anti FUM pAb ve anti FUM 8F4 AS için bloklama işleminde immünize edilmemiş fare serumu 1/250 oranında seyreltilerek 250 µl'şer uygulandı.
- Anti FUM 8F4CS için bloklama işleminde F0 myeloma hücre kültürü süpernatanı uygulandı.
- Anti FUM 8F4 uygulaması öncesinde ise 2,5 / 50 oranında seyreltilmiş FBS ile bloklama yapıldı.
- Uygulanan antikor koşulları ve yaklaşık içerdikleri saf antikor miktarları, bloklamada kullanılan elemanlar ve dilüsyonları, uygulamaların yapıldığı FUM kaplı kristal sayıları ile immobilize edilen FUM konsantrasyonları Çizelge 3. 'te verilmektedir.
- 1,75 mM ve 2 mM FUM immobilize yüzeylerin aynı şartlarda incelenmesi sadece en iyi sonuçların elde edildiği anti FUM 8F4 uygulamasında tekrarlandı.

Çizelge 3. 5 Uygulanan anti FUM 8F4 koşulları, bloklama elemanları, kullanılan kristal sayıları ile kristallerdeki immobilize FUM konsantrasyonları

Anti FUM 8F4 Uygulama Koşulları	Yaklaşık Antikor İçeriği (250 µl) ve Dilüsyon Koşulları	Bloklama	İmmobilize FUM miktarı
Anti FUM 8F4 pAb	1/250 seyreltik immünize fare serumu	1/250 seyreltik immünize edilmemiş fare serumu	1,7 mM FUM
Anti FUM 8F4 CS	250 µl 8F4 süpernatant (0,1 mg/ml)	F0 myeloma hücre kültür süpernatantı	1,7 mM FUM
Anti FUM 8F4 AS	1/50 seyreltik KAS çöktürme anti FUM 8F4 (0,1 mg/ml)	1/250 seyreltik immünize edilmemiş fare serumu	1,7 mM FUM
Anti FUM 8F4 mAb-1	0,1 mg/ml saf Anti FUM 8F4 mAb	2,5/50 seyreltik FBS	1,7 mM FUM
Anti FUM 8F4 mAb-2	0,1 mg/ml saf Anti FUM 8F4 mAb	2,5/50 seyreltik FBS	2 mM FUM

Biyolojik algılayıcı olan anti FUM 8F4'ün kullanım şartlarının belirlenmesinde;

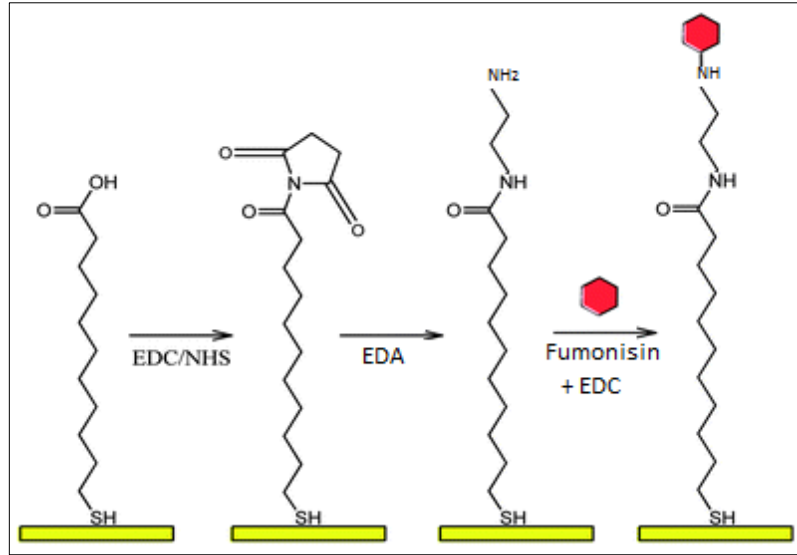
- İmmünize farelerin serumdan elde edilen anti FUM poliklonal antikorları (anti FUM 8F4 pAb),
- 8F4 hücre kültür süpernatantı (anti FUM 8F4CS),

- 8F4 kültür süpernatantının kısmen saflaştırılmış amonyum sülfat fraksiyonu (anti FUM 8F4AS),
- Protein A kolonu kullanılarak saflaştırılmış monoklonal antikor (anti FUM 8F4) Çizelge 3. 'da belirtilen miktarlarda, 50 µl / dakika hızıyla uygulandı.

3.5.2.5 MUA ile SAM Modifiye Yüzeyde İmmobilize FUM Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Bu çalışma kapsamında 2 mM MUA ile SAM oluşturulmuş olan yüzeyde FUM kaplama optimizasyonu yapıldı. Bu amaçla,

- 12 adet kristal yukarıda bahsedildiği şekilde 2 mM MUA ile SAM oluşturuldu
- 100 mM EDC ve 400 mM NHS aktive edilip yüzeyin EDA ile aminasyonu gerçekleştirildi
- 2'şer kristal yüzeyinde, MES içerisinde 0,85 mM, 1 mM, 1,75 mM, 2 mM, 3 mM ve 3,5 mM konsantrasyonlarında hazırlanan FUM'nin 8 mM EDC eklenerek oda sıcaklığında 2 saat inkübasyonla immobilizasyonları sağlandı
- Kimyasal bloklama işlemi daha önce bahsedildiği şekilde yapıldı ve distile su ile temizlenmeleri sağlanarak kurutuldu.
- Antikor bağlanmasına dayalı frekans farkının belirlenmesi için 250 µl anti FUM 8F4 AS, 1/25 seyreltilmiş olarak (yaklaşık 1 mg/ml anti FUM 8F4) kullanıldı.
- Kristaller rejenere edilerek 5'er kez anti FUM 8F4 uygulanarak frekans değişimi ölçüldü.



Şekil 3. 4 MUA SAM oluşturulmuş altın yüzeyde FUM immobilizasyon basamakları

3.5.3 İmmobilizasyon Etkinliklerinin Arttırılmasına Yönelik Alternatif Lineer Moleküller ile SAM Oluşturulması

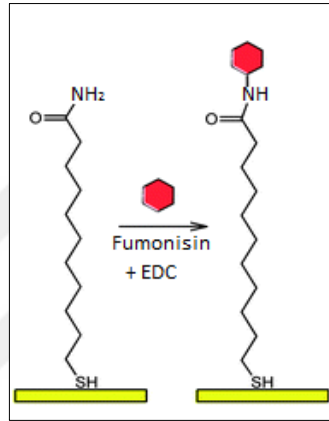
Altın yüzeylerde, MUA kullanılarak SAM oluşturulmasıyla yüzeye karboksil grupları kazandırılırken, 11-Mercaptoundecanamide (MUD) kullanılmasıyla amin grupları ve 11-Mercapto-1-undecanol (MUO) kullanılmasıyla ise hidroksi grupları kazandırılmaktadır. Ethanolde çözülen 2 mM MUD ve 2 mM MUO + 4 ° C'de gece boyunca kristal yüzeyinde inkübasyonu yapılarak SAM oluşturuldu. Yüzeye eklenen SAM ajanlarının sahip olduğu fonksiyonel gruplara göre aktivasyonları sağlanarak FUM immobilizasyonları gerçekleştirildi.

3.5.3.1 MUD ile SAM Yapılmış Yüzeyde İmmobilize FUM Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Altın kaplı kristal yüzeyde yapılmış MUD ile oluşturulmuş SAM'in FUM immobilizasyonu öncesinde amin modifikasyonuna ihtiyacı bulunmamaktadır. FUM immobilizasyon yöntemi olarak;

- MUD ile SAM yapılmış olan 4'er adet kristalde 1 mM, 2 mM, 3 mM konsantrasyonlardaki FUM, 8 mM EDC ile 0,1 M MES içinde 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

- Ardından FUM immobilize yüzeylerde FUM bağlanmamış aktif amin gruplarının kimyasal bloklama işlemi 10 dk süreyle daha önce belirtildiği şekilde oda sıcaklığında yapıldı.
- Kristaller 5 kez distile su ile yıkandı ve steril kabin altında kurutuldu.
- Anti FUM 8F4 ile yapılan ölçümler arasında rejenerasyon yöntemi olarak; HPLC grade distile su 0,5 ml/dk akış hızında 3 dakika süresince uygulandı ve ardından 0,1 M Glisin tamponu (pH 2,7) 0,5 ml/dk akış hızında, 1 dakika süresince uygulandı.
- 5'er kez frekans farkı ölçümleri tekrarlandı.



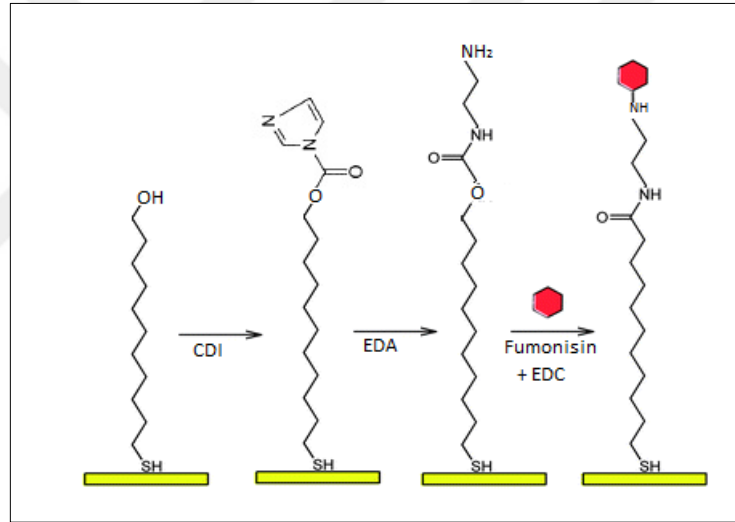
Şekil 3. 5 MUD SAM oluşturulmuş altın yüzeyde FUM immobilizasyon basamakları

3.5.3.2 MUO ile SAM Yapılmış Yüzeyde İmmobilize FUM Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Yüzeyde gerçekleştirilen MUO-SAM'in sahip olduğu hidroksi gruplarından dolayı, FUM immobilizasyonu öncesinde amin modifikasyonuna ihtiyacı bulunmaktadır. MUO ile SAM yapılmış olan yüzeylere aktivatör olarak 1,1'-Carbonyl-diimidazole (CDI) kullanıldı. FUM immobilizasyon yöntemi olarak;

- 4'er adet altın yüzeye (toplam 12 kristal), etanol içinde çözülmüş 2mM MUO'nun gece boyu + 4 ° C'de inkübasyonu ile SAM oluşturuldu.
- Aseton : borat tamponu (pH 10) (v/v, 5:2) içinde 400 mM konsantrasyonda CDI aktivatörü çözüldü ve 10 dk süreyle MUO ile SAM yapılmış olan yüzeyde aktivasyon gerçekleştirildi.
- Temizlenen yüzeye 1 M EDA (pH 10), 20 dakika süre boyunca oda sıcaklığında uygulandı.

- Yüzeyler distile su ve aseton (5:1) ile yıkanarak steril kabinde kurutuldu.
- FUM immobilizasyonu için 0,1 M MES (pH 4,8) içinde 8 mM EDC ve 1 mM, 2 mM, 3 mM konsantrasyonlarında FUM karıştırılarak uygulandı, 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kimyasal bloklama işlemi yapılmadan kristaller 5 kez distile su ile yıkandı ve kurutuldu.
- Anti FUM 8F4 ile yapılan ölçümler arasında rejenerasyon yöntemi olarak; HPLC grade distile su 0,5 ml/dk akış hızında 3 dakika süresince uygulandı ve ardından 0,1M Glisin tamponu (pH 2,7) 0,5 ml/dk akış hızında, 1 dakika süresince uygulandı. Tampon değişimleri arasında kristalleşmeleri engellemek için 1 ml d.H₂O uygulaması yapıldı.



Şekil 3. 6 MUO SAM oluşturulmuş altın yüzeyde FUM immobilizasyon basamakları

3.5.3.3 MUA, MUD ve MUO Kullanılarak SAM Yapılmış Yüzeylerde FUM Algılanması

Tez çalışması kapsamında, FUM konsantrasyonunun yarışımlı sistem içerisinde algılanması üzerine immünosensörde method geliştirilmesi yapıldı. Bu yöntemde, FUM molekülleri sensör yüzeyine doğrudan immobilize edildi ve anti FUM 8F4'ün tek başına sensör yüzeyinde oluşturduğu frekans farkı belirlendi. Daha sonra anti FUM 8F4'ün sabit konsantrasyonu ile FUM'nin değişen konsantrasyonları, ön inkübasyona tabi tutuldu ve FUM immobilize sensör yüzeyine uygulanarak elde edilen frekans değişimlerinden kalibrasyon eğrileri elde edildi.

- 2mM MUA ile SAM yapılmış yüzeylerde (8 kristal) 1,75 mM ve 2 mM konsantrasyonda FUM immobilizasyonu daha önce bahsedildiği şekilde yapıldı.
- Ardından her iki yüzeyde de 0,05 mg/ml ve 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılarak oluşan sinyal farkları belirlendi.
- 1,75 mM FUM immobilize 2 farklı kristalde uygulamak üzere; 0,1 mg/ml anti FUM 8F4'nin 250 µl'si ile 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm ve 10 ppm FUM karıştırılarak 20 dk inkübe edildi.
- Yine 1,75 mM FUM immobilize kristaller (2 adet) için; 0,05 mg/ml anti FUM 8F4'nin 250 µl'si ile 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm ve 10 ppm FUM inkübe edildi ve yüzeye sırası ile uygulandı.
- 2 mM FUM immobilize 2 kristalde uygulamak üzere; 0,05 mg/ml anti FUM 8F4'nin 250 µl'si ile 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm ve 10 ppm FUM inkübe edildi.
- Yine 2 mM FUM immobilize yüzeyde 0,1 mg/ml anti FUM 8F4'nin 250 µl'si ile 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm ve 10 ppm FUM inkübe edilerek uygulandı.
- Rejenerasyon yöntemi olarak; HPLC grade distile su 0,5 ml/dk akış hızında 3 dakika süresince uygulandı ve ardından 0,1M Glisin tamponu (pH 2,7) 0,5 ml/dk akış hızında, 1 dakika süresince uygulandı. Tampon değişimleri arasında kristalleşmeleri engellemek için 1 ml d.H₂O uygulaması yapıldı.
- Elde edilen frekans farkları kullanılarak kalibrasyon eğrileri hazırlandı, LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

MUD ve MUO ile SAM yapılan yüzeylerde FUM tayinine yönelik çalışmalar kapsamında;

- 4 adet yüzeye 2 mM MUD ve 2 mM MUO daha önce bahsedildiği şekilde kaplandı.
- SAM gerçekleştirildikten sonra, FUM immobilizasyonları için tüm yüzeylere 2 mM FUM daha önce bahsedildiği şekilde uygulandı.
- 0,05 mg/ml anti FUM 8F4'nin 250 µl'si ile 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm ve 10 ppm FUM inkübe edildi.
- Tüm yüzeylere sırası ile uygulandı.
- Rejenerasyon yöntemi olarak; HPLC grade distile su 0,5 ml/dk akış hızında 3 dakika süresince uygulandı ve ardından 0,1M Glisin tamponu (pH 2,7) 0,5 ml/dk akış

hızında, 1 dakika süresince uygulandı. Tampon değişimleri arasında kristalleşmeleri engellemek için 1 ml d.H₂O uygulaması yapıldı.

- Elde edilen frekans farkları kullanılarak kalibrasyon eğrileri hazırlandı, LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.
- Her 3 inkübasyonlu ölçüm arasında sadece anti FUM 8F4 ölçümleri de yapılarak yüzeyin antikoru algılaması kontrol edildi. Ara ölçümler standart deviasyonların hesap edilmesinde toplam tekrar sayılarına eklendi.

3.5.4 Fumonisin İmmünoensöründe İmmobilizasyon Etkinliklerinin Arttırılmasına Yönelik Dendronlar ile SAM Çalışmaları

3 farklı jenerasyondan dendronik yapılar ile SAM oluşturmak için 4 er kristale 2 mM konsantrasyonda çözülen;

- Bis-MPA dendron-8-hidroksil-1thiol (G3 DND)
- Bis-MPA dendron-16 hidroksil-1 thiol (G4 DND)
- Bis-MPA dendron-32 hidroksil-1 thiol (G5 DND)

dendronları uygulandı. SAM oluşumları için +4 °C'de gece boyunca inkübasyon yapıldı. Aktivasyon öncesi tüm yüzeyler 1 kez etanol ile yıkandıktan sonra 5 kez distile su ile yıkandı ve steril kabin altında kurutuldu.

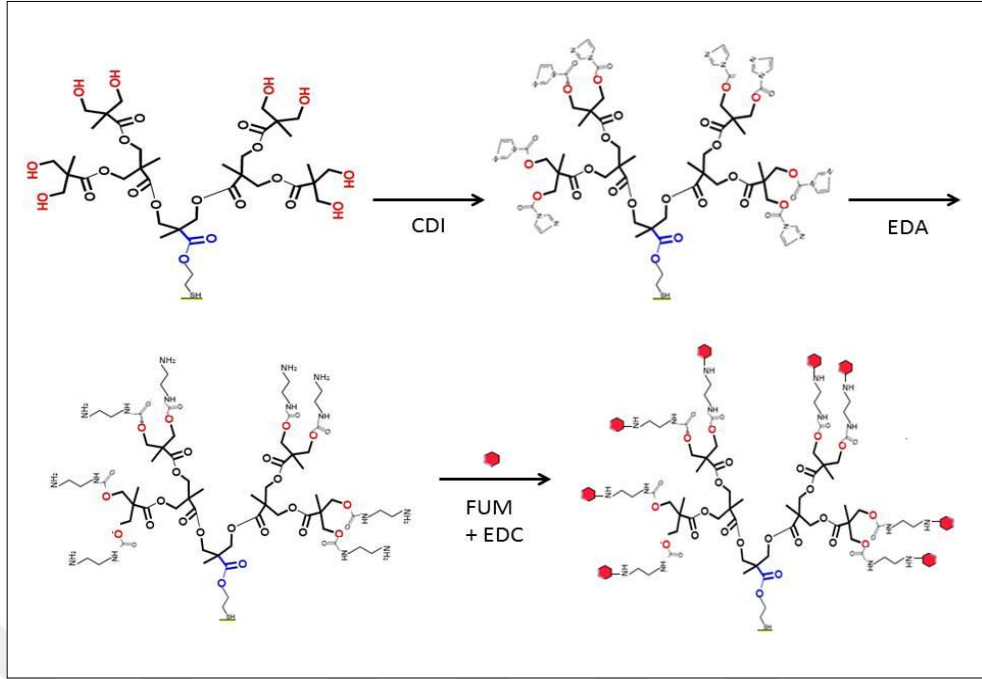
3.5.4.1 G3 DND, G4 DND ve G5 DND ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM Kaplama Optimizasyonu

Yüze eklenen dendron yapıda SAM ajanlarının sahip olduğu fonksiyonel hidroksi grubu için fazla miktarda kullanılan CDI ile aktivasyonlar yapıldıktan sonra EDA ile aminasyonlar gerçekleştirilip FUM immobilizasyonları yapıldı. Bu amaçla;

- Aktivasyon için CDI aktivatörü 400 mM konsantrasyonda aseton:borat tamponu (pH 10) (1:1) içinde yüzeylere 10 dk süresince inkübasyon yapılarak uygulandı.
- Daha sonra aktive edilmiş yüzeye doğrudan pH 10,5'a ayarlanmış 1M EDA eklendi
- İnkübasyon sırasında da 100 mM CDI ilave edildi.
- 20 dakikalık inkübasyon süresi sonunda 60 mM pH 4,8 sodyum asetat / asetik asit tamponu ile 10 dk oda sıcaklığında yapıldı.

30 adet kristal yukarıda belirtilen şekilde dendron kaplamaları yapıldıktan sonra FUM kaplama optimizasyonu için ;

- 10'ar adet yüzeyde G3 DND, G4 DND, ve G5 DND dendronlar ile SAM yapıldı.
- G3 DND ile SAM yapılmış 2'şer kristal yüzeyine 1 mM, 1,75 mM, 2 mM, 2,75 mM, 3,5mM konsantrasyonlarında FUM uygulandı.
- FUM immobilizasyonu için tüm konsantrasyonlara 0,1 M MES (pH 4,8) içinde 8 mM EDC eklendi ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Kimyasal bloklama işlemi daha önce bahsedildiği şekilde 10 dk süre ile oda sıcaklığında yapıldı, kristaller 5 kez distile su ile yıkandı ve kurutuldu.
- Hazneye yerleştirilen kristallerde anti FUM 8F4 uygulaması öncesinde %5 FBS ile bloklama işlemleri yapıldı.
- Anti FUM 8F4 ile yapılan ölçümler arasında rejenerasyon yöntemi olarak; HPLC grade distile su 0,5 ml/dk akış hızında 3 dakika süresince uygulandı ve ardından 0,1M Glisin tamponu (pH 2,7) 0,5 ml/dk akış hızında, 1 dakika süresince uygulandı. Tampon değişimleri arasında kristalleşmeleri engellemek için 1 ml d.H₂O uygulaması yapıldı.
- Antikor bağlanmasına dayalı frekans bağlanmasının belirlenmesi için 250 µl anti FUM 8F4 0,05 ml/ml konsantrasyonda kullanıldı.
- Tekrarlanabilirliği gözlemleyebilmek için kristaller rejenere edilerek 8 kez anti FUM 8F4 bağlanmasından kaynaklı frekans değişimi ölçüldü ve SD değeri hesaplandı.

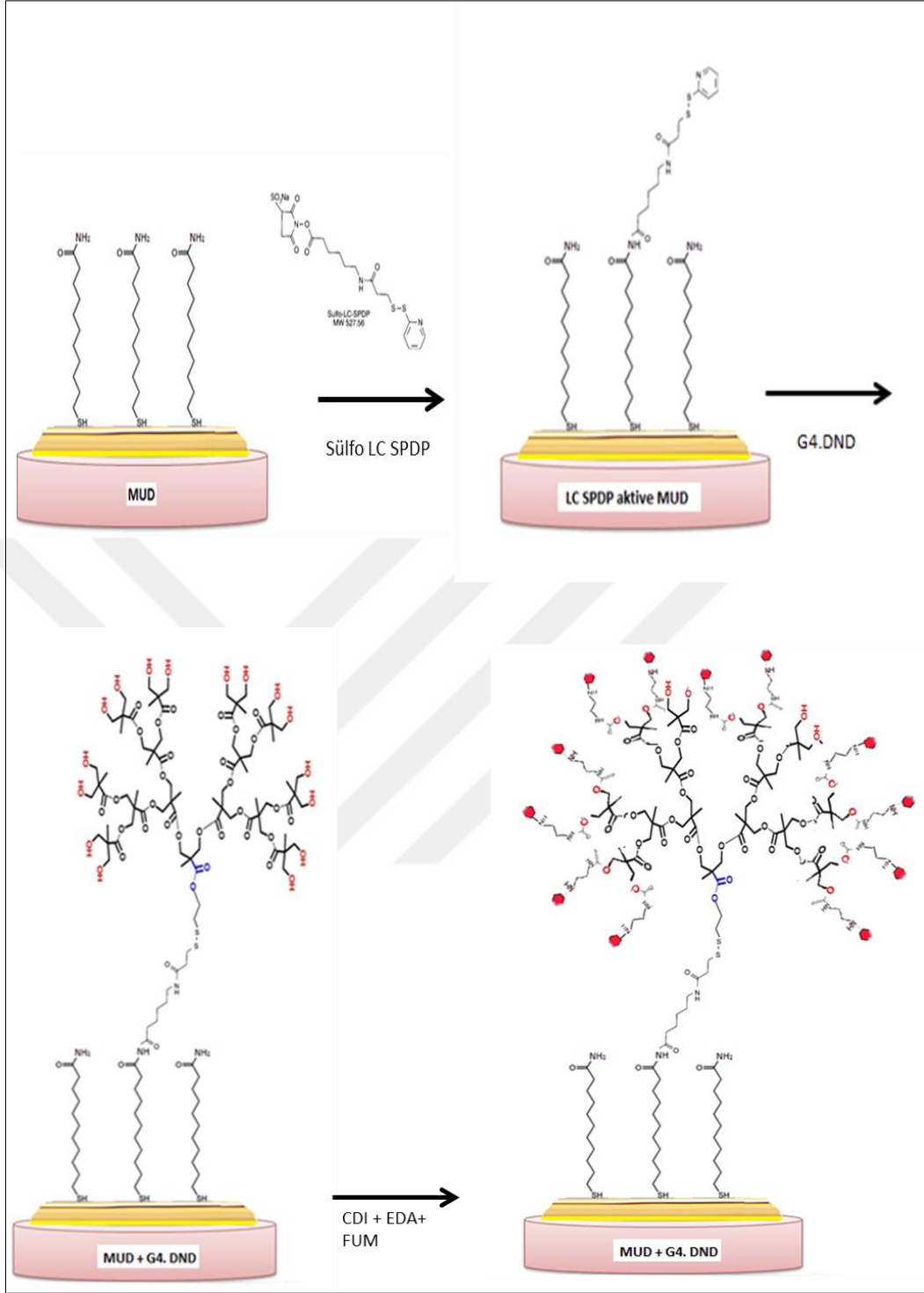


Şekil 3. 7 G3 DND ile SAM oluşturulmuş altın yüzeyde FUM immobilizasyon basamakları

3.5.4.2 İki Katmanlı SAM Yapılmış Yüzeylerde FUM Kaplama Optimizasyonu

- Kristal yüzeylere ilk olarak 2 mM MUD ile SAM oluşturmak için etanol içinde çözülen 2mM MUD + 4 ° C'de gece boyu uygulandı.
 - Kristaller 5 kez distile su ile yıkandıktan sonra kurutuldu.
 - Yüzeydeki amin gruplarının dendronlardaki thiol (-SH) gruplarına bağlanması için 0,1 M asetat tamponunda çözülmüş 400 mM Sulfo-LC-SPDP 10 dk bekletilerek aktivasyonları sağlandı.
 - Oluşturulan MUD ile SAM üzerinde G2.DND ile ikinci SAM katmanı oluşturmak için, saf ultra püre distile suda çözülen 2mM G4 DND ve 100 mM supho-LC-SPDP karıştırılarak hemen 6 kristal yüzeyine dikkatlice yayılarak gece boyu oda sıcaklığında bekletildi.
 - Başka 6 kristalde de yine MUD oluşturulduktan sonra aynı metotla G4 DND ve G5 DND ile ikincil katmanlar hazırlandı.
 - Tüm kristaller daha sonra 3 kez saf su ile yıkanarak steril kabin altında kurutuldu.
- G3 DND, G4 DND ve G5 DND yüzeylerindeki hidroksi (-OH) gruplarının, FUM 'nin üzerindeki karboksil (-COOH) gruplarına bağlanabilmesi için CDI aktivasyonu yapıldı ve ardından EDA kullanılarak bu gruplar amine dönüştürüldü. Bunun işlem için;

- Asetonda çözülmüş CDI 400 mM konsantrasyonda aseton:borat tamponu (pH 10) (1:1) içinde 10 dk inkübasyon ile uygulandı.
- Ardından 1 M EDA (pH 10,5) ile 20 dakika inkübe edildi.
- G3 DND, G4 DND ve G5 DND kaplı kurutulan yüzeylerde antijen kaplaması için 2'şer kristale 1,75 mM, 2 mM, 2,75 mM ve 3,5 mM FUM 0,1 M pH 4,8 MES içinde 8 mM EDC ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- FUM immobilizasyonunun ardından kimyasal bloklama yapıldı ve en az 5 defa saf su ile yıkanarak steril kabin içinde kurutuldu.
- Hazneye yerleştirilen yüzeylere bloklama için %5 FBS kullanıldı ve anti FUM 8F4 antikoru 0,05 mg/ml konsantrasyonda 250 µl kullanılarak yüzeye antikor bağlanma miktarı tespit edildi.
- 4'er kez 0,05mg/ml konsantrasyonda 250 µl anti FUM 8F4 yüzeyde etkileştirilerek frekans farkları kaydedildi.
- Rejenerasyonda 2 dk maksimum hızda 0,1 M glisin (pH 2,7) ve 550 µl/dk hızla PBS uygulaması aralarında 0,5 ml/dk hızda 1 ml distile su uygulaması ile gerçekleştirildi.



Şekil 3. 8 MUD ve G4 DND ile SAM oluşturulmuş altın yüzeyde FUM immobilizasyon basamakları

3.5.4.3 Dendronlar ile Tek Katmanlı ve MUD ile İki Katmanlı SAM Yapılmış Yüzeylerde FUM Algılanması

Elde edilen yüksek frekans farklarından dolayı 2 katmanlı yüzeylerde FUM tayini çalışmaları için FUM yarışımlı methodu uygulandı. Bu amaçla;

- Her bir ölçümden 20 dakika önce 250 µl 0,05 mg/ml konsantrasyondaki anti FUM 8F4; 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm FUM ile karıştırılarak oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Ölçümler arası rejenerasyon için 2 dk 0,1 M glisin (pH 2,7) ve PBS uygulanarak bir sonraki ölçüme geçildi.
- Her 3 inkübasyonlu ölçüm arasında sadece anti FUM 8F4 ölçümleri de yapılarak yüzeyin antikoru algılanması kontrol edildi.
- Ara ölçümler standart deviasyonların hesap edilmesinde toplam tekrar sayılarına eklendi.
- Elde edilen frekans farkları kullanılarak kalibrasyon eğrileri hazırlandı, LOD ve LOQ değerleri hesaplandı.

4.1 Antikor Geliştirme

Antikor geliştirme bölümü; immünojen hazırlama, immünizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi, monoklonal antikor geliştirme, elde edilen monoklonal antikorun karakterizasyonu ve saflaştırılmasına ait deney sonuçlarını kapsamaktadır.

4.1.1. İmmünojen Hazırlama

Tez kapsamında konjugasyon kimyası hem immünojen hazırlanmasında hem de analitin sensör yüzeyine immobilizasyonunda kullanılmıştır. İmmünojen hazırlanmasında Fumonisin (FUM) molekülü polimere ve proteinlere konjuge edilirken sensör geliştirilmesi aşamasında QCM elektrodlarında dendrimerlere konjugasyon kimyası ile immobilize edilmiştir. FUM molekülünün makromoleküler yapılar ile konjugasyonun irdelenmesi, elde edilen yapıların karakterizasyonu ve konjugasyonda farklı fonksiyonel grupların reaksiyona girme eğilimlerinin incelenmesi her iki çalışma için de çok önemlidir. Bu sebeple tez çalışması kapsamında FUM molekülünün konjugasyonu sırasındaki davranışları ve elde edilen konjugatların karakterizasyonu üzerinde fazlaca çalışmaya yer verilmiştir. Yapılan analizler konjugatların karakterizasyonunda birbirini tamamlar niteliktedir.

FTIR ile karakterize edilen örnekler;

- OVA ve cOVA

- cOVA-FUM (FUM/cOVA mol oranı 10, 20, 30 ve 40) konjugatları

HPLC ile karakterize edilen örnekler;

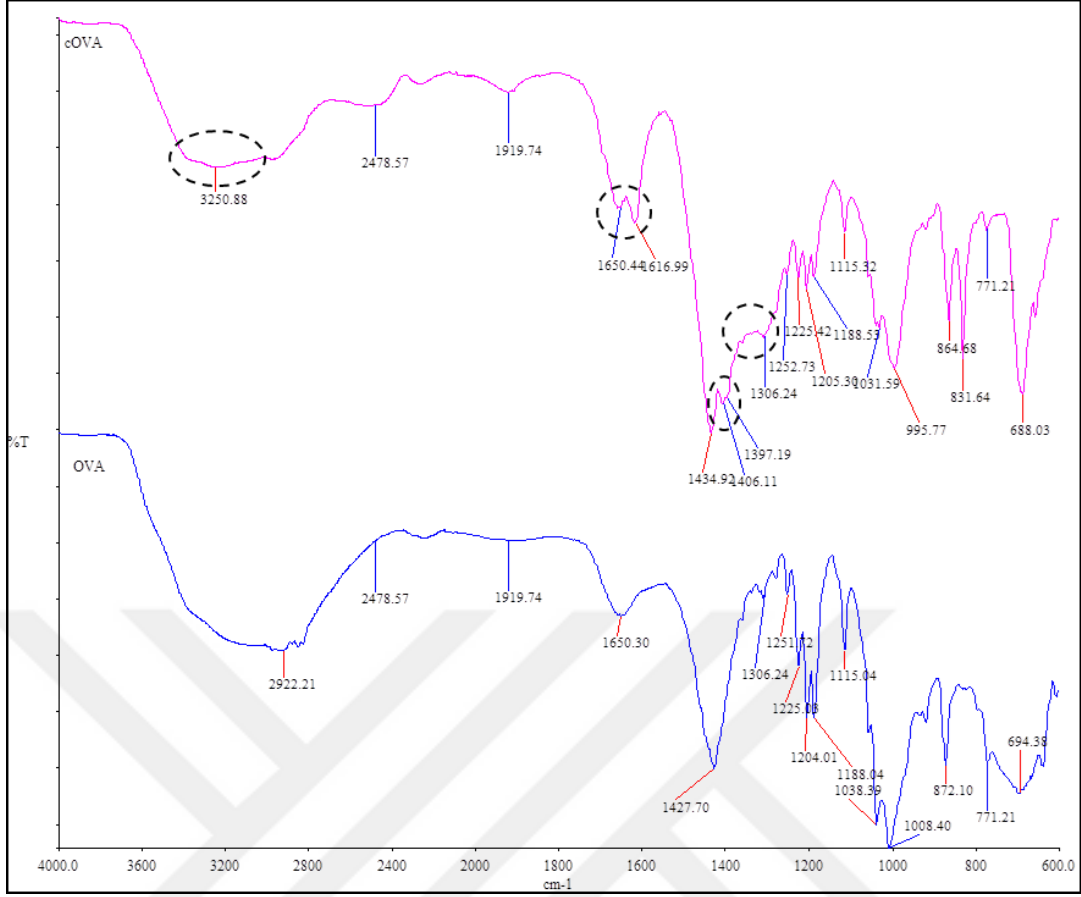
- OVA ve cOVA
- cOVA-FUM (FUM/cOVA mol oranı 10, 20, 30 ve 40) konjugatları
- FUM, OVA, PAA,
- FUM-PAA, FUM-PAA-OVA konjugatları

Zetasizer ile karakterize edilen örnekler;

- OVA ve cOVA
- FUM-OVA, FUM-PAA, FUM-PAA-OVA konjugatları (PBS ve MES tamponlarında)

4.1.2. FTIR ile cOVA ve FUM-cOVA Konjugatlarının Karakterizasyonu

FTIR spektrum cihazı organik bileşiklerin tanımlanmasında kullanılır. Bir reaksiyonun durumu veya bir kromatografik ayrımın gidişi belirli zaman aralıklarında yapılan deneylerle ve FTIR spektrumu alınmasıyla takip edilebilir. Preparatif çalışmalarda IR spektrumu kullanımı bağların ispatı için önem taşır. Çünkü bir reaksiyonda istenen maddenin oluşup oluşmadığına, yan ürünlerin çıkıp çıkmadığına ve oluşan ürünlerin neler olduğuna FTIR spektrumu yanıt verir. Katyonizasyon işleminde, OVA'ya eklenen diamin grupları ve oluşan amid bağları FTIR cihazı sayesinde ispatlanabilmektedir. Bu bölümde, hazırlanmış olan cOVA'nın FTIR ile analizi gerçekleştirildi. Ayrıca değişen oranlarda FUM ve cOVA ile hazırlanan konjugatların (n:10, 20, 30, 40) FTIR spektrumları karşılaştırıldı. cOVA'nın ve OVA'nın FTIR spektrumları bir arada Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Gerçekleşen kondenzasyon reaksiyonu sonucu 1 mol H₂O molekülü çıkışı ile 1 amid bağı oluşmaktadır. Bu sırada karbonil grubundan hidroksil grubu eksilmektedir. Hidroksil grubunun çıkışı, cOVA'ya ait olan 3250,88 cm⁻¹ 'deki pikin, OVA'ya ait olan 2922,21 cm⁻¹ 'deki pike göre yüzde transmitansının (geçirgenlik) azalmasından anlaşılmaktadır.



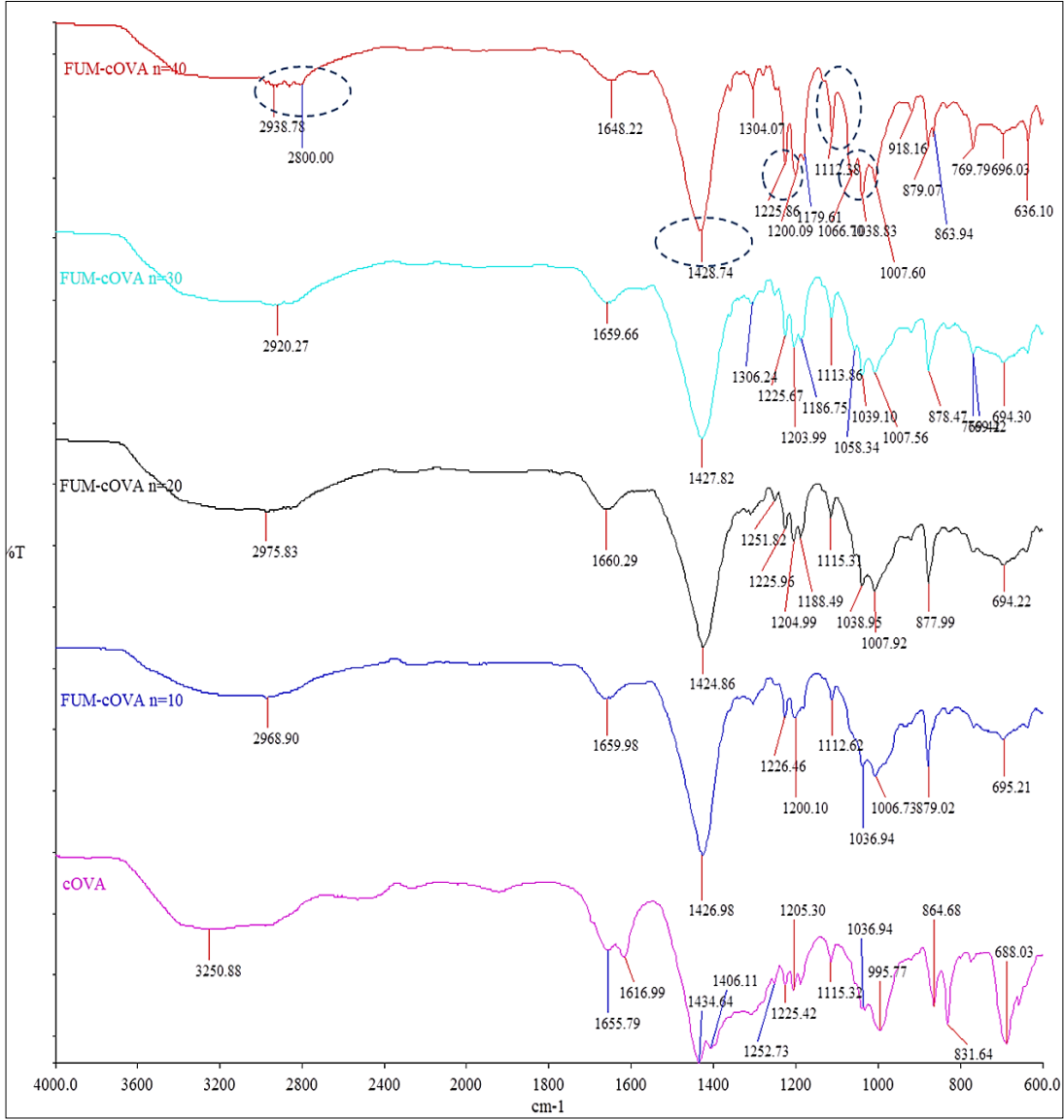
Şekil 4. 1 cOVA ve OVA molekülüne ait FTIR spektrumu

Katyonizasyon sırasında EDA ile OVA arasında amid bağı oluşmaktadır. Oluşan amid bağının bükülme titreşimi ile karakteristik N-H piki meydana gelmektedir. cOVA'nın IR spektrumunda $1616,99 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısında yarık 2 pik olarak bu bağ oluşumu gözükmemektedir. EDA molekülünün OVA ile bağ yapmayan diğer uçtaki amin grubunun C-N gerilim titreşimi cOVA'nın IR spektrumunda $1397,14 \text{ cm}^{-1}$ de dalga sayısında yarık 2 pik olarak görülmektedir. OVA spektrumuna bakıldığında sadece $1427,70 \text{ cm}^{-1}$ 'de tek pik görülmektedir. EDA'nın yapısında bulunan alkan grubundaki -C-H bağının bükülme titreşimi ise cOVA'nın IR spektrumunda $1306,24 \text{ cm}^{-1}$ de görülmektedir. Bu pik OVA'nın IR spektrumunda mevcut değildir ve cOVA'da katyonizasyon ile oluşan -C-H bağını göstermektedir. Oluşması beklenen bağlara ait karakteristik IR absorpsiyon frekanslarının aralığını gösteren liste aşağıdaki Çizelge 4. 1'de gösterilmektedir. OVA'nın katyonizasyonunda oluşması beklenen bağların oluşumu FTIR analizi sayesinde görüldü. Böylece OVA proteini üzerinde yeni oluşan bağlar saptanarak elde edilen cOVA FTIR ile karakterize edildi.

Cizelge 4. 1 Organik grupların karakteristik IR absorpsiyon frekansları

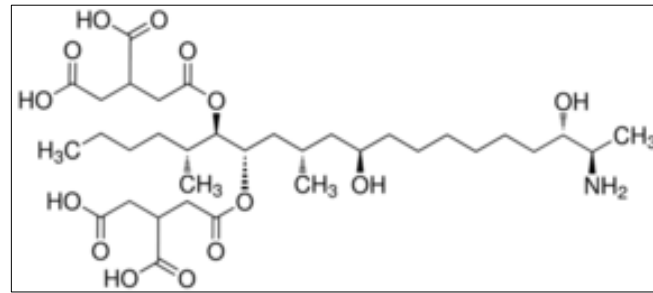
Fonksiyonel Grup	Titreşim Şekli	Karakteristik Absorpsiyon (cm ⁻¹)	Şiddet
Amid			
C=O	gerilim	1640-1690	Kuvvetli
N-H	gerilim	3100-3500	Birleşik iki band
N-H	bükülme	1550-1640	
Amin			
N-H	gerilim	3300-3500	Orta (primer aminler çift band;sekonder aminler tek band, genellikle oldukça zayıf)
C-N	gerilim	1080-1360	Orta-zayıf
N-H	bükülme	1600	Orta
Alkan			
C-H	gerilim	2850-3000	Kuvvetli
-C-H	bükülme	1350-1480	Değişken

FTIR analizi ile aynı zamanda FUM konjugasyonunun takibi de yapıldı. FUM konjugasyonu tıpkı katyonizasyon gibi bir kondenzasyon reaksiyonudur ve H₂O molekülü çıkışı ile amid bağları oluşmaktadır. Artan mol oranlarındaki FUM'nin reaksiyona giren miktarı arttıkça yeni oluşan bağ sayısının artması beklenmektedir. FTIR analizi ile bağ artışları, spektral şiddet olarak takip edildi.



Şekil 4. 2 FT-IR ile cOVA ve cOVA-FUM (nFUM/ncOVA: 10, 20, 30, 40) molekülünün kıyaslamalı gösterimi

FUM molekülünün cOVA'ya eklenmesi ile temel olarak amid bağının spektral olarak izlenebilmesi beklenmektedir.

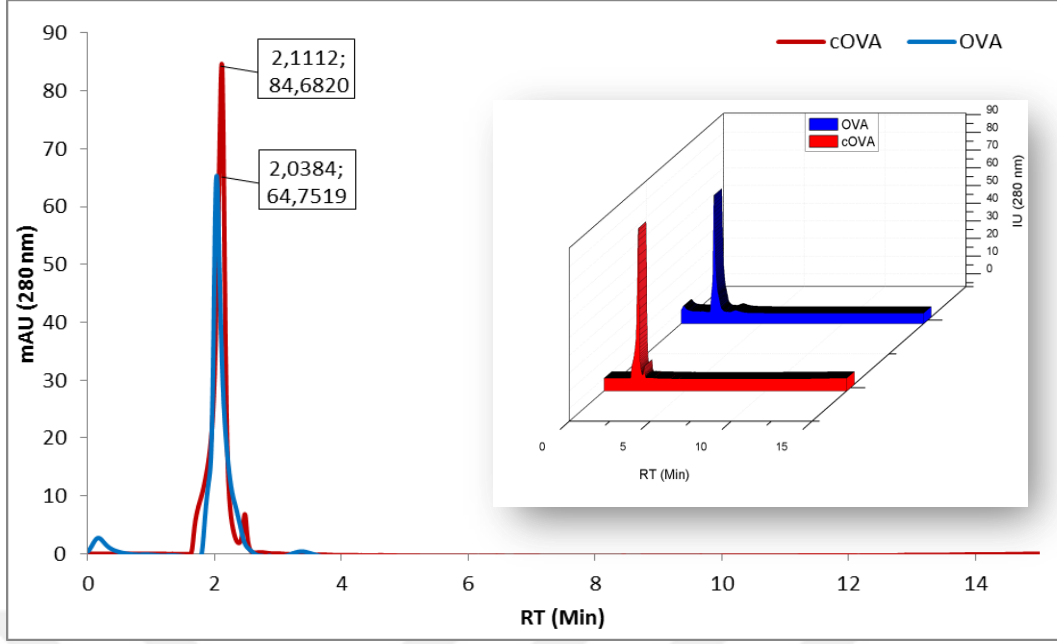


Şekil 4. 3 FUM'nin moleküler yapısı

Proteinlerin amid (A, I ve II) bağı spektrumlarına ait hassas spektral bölge olan 3400-3300 cm^{-1} , 1700-1600 cm^{-1} ve 1575-1480 cm^{-1} 'de OVA'nın kuvvetli emilimi vardır. Dolayısıyla FUM-OVA'nın karakteristik absorpsiyon pikleri 3400-3300 cm^{-1} , 1700-1600 cm^{-1} ve 1575-1480 cm^{-1} bölgelerinde bulunabilir. cOVA'ya konjuge olan FUM moleküllerinin konjugattaki FUM oranları arttıkça spektral sonuçlarda % transmitansın şiddetinde artış meydana gelmektedir. Özellikle en belirgin farkın 40 oranında olduğu Şekil 4. 2'de görülmektedir. 40 oranına ait spektrumda 2938,78 cm^{-1} - 2800 cm^{-1} arasındaki piklerin FUM molekülüne ait alkan kısmının C-H bağının gerilim titreşiminden kaynaklı pikler olduğu görüldü. 1225,86 - 1200 cm^{-1} bölgesindeki piklerinin ise FUM molekülünün ester grubundaki C-O bağının gerilim titreşiminden meydana gelmektedir. 1112,38 cm^{-1} 'de FUM yapısında bulunan 3 adet sekonder alkol grubundaki O-H bağının gerilim titreşiminden meydana gelmektedir. Ayrıca yine konjugasyon sonucu artan amid bağının oluşumu, bağı titreşimine ait 1428 cm^{-1} 'deki transmitans şiddetinin artışı ile görülmektedir. Konjuge olan FUM miktarının artışı ile orantılı olan pik şiddetleri, konjugasyon işleminin başarılı olduğu sonucunu göstermektedir. Bu sebeple cOVA-FUM konjugatı ile yapılan immünizasyonlarda nFUM/ncOVA 40 oranı tercih edildi.

4.1.3. HPLC ile Katyonize OVA'nın ve FUM Konjugatlarının Karakterizasyonu

Tez çalışmasının bu bölümünde hem cOVA, hem de değişen mol oranlarındaki FUM-cOVA konjugatları RPC ile karakterize edildi.



Şekil 4. 4 cOVA ve OVA proteinlerine ait HPLC (UV detektör, 280 nm) kromatogramı

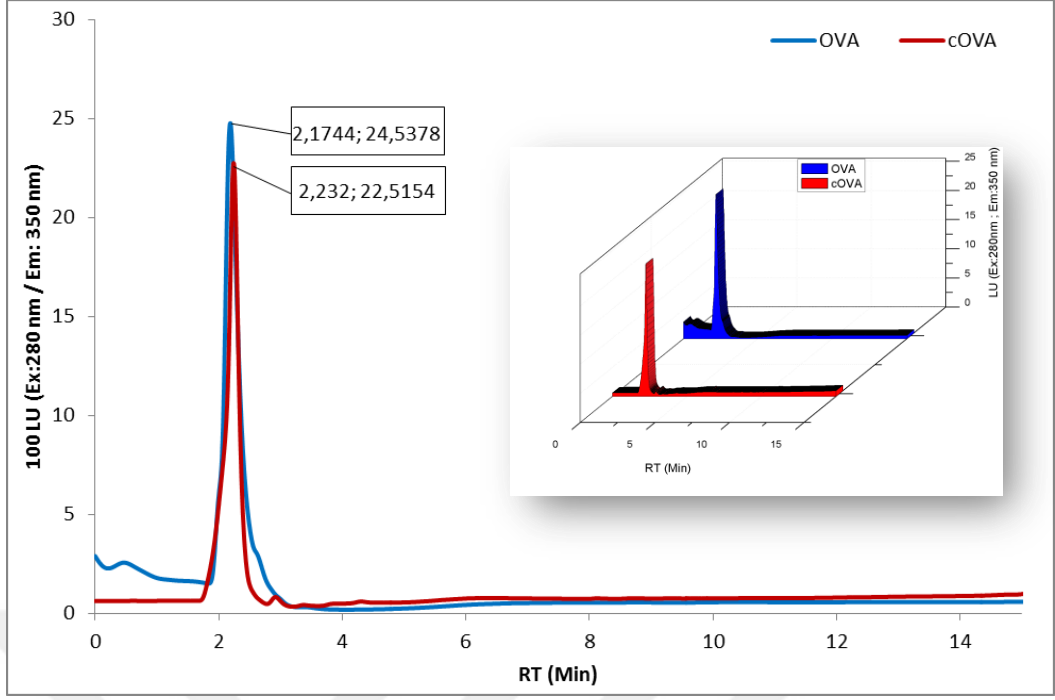
cOVA ve OVA proteinlerine ait HPLC (UV detektör, 280 nm) kromatogramında görüldüğü üzere Şekil 4. 4'de native OVA'ya ait spesifik pikin alıkonma zamanı (RT) 2,0384.dk'da 64,7519 IU şiddetinde gerçekleşmiştir. Ancak katyonizasyon ile OVA'nın değişen net yükü ve protein yapının daha yüksek polariteye sahip olması nedeniyle cOVA'ya ait spesifik pikin alıkonma zamanında pikin şiddeti ve toplam pik alanı değişmektedir. cOVA'nın en yüksek (58,6820 IU) pik şiddetinin olduğu RT 2,11. dk'da sola omuzlu kromatogram Şekil 4. 5'de görülmektedir. Pik alanı katyonizasyon sonucunda artmaktadır. UV detektör ile belirlenmiş kromatogramlarda, pik alanları toplamı OVA için 917,328 mAU*s iken, cOVA için 1042,75 mAU*s olarak belirlendi (EK1). Bu değerler ile katyonizasyon işlemi sonrası oran aşağıdaki formül (4.1) kullanılarak hesaplandı. RP-HPLC için kullanılan konjugasyon oranlarının belirlenmesinde hapten-protein oranlarının (HPO) denklemi (4.1) ile hesaplandı.

$$HPO (of_{uv}) = 1 \times \frac{\text{Konjuge Proteinin Pik Alanı}}{\text{Konjuge Proteinin Pik Alanı} + \text{Konjuge Olmamış Proteinin Pik Alanı}} \quad (4.1)$$

$$HPO (of_{uv}) = 1 \times \frac{1042,75}{1042,75 + 917,328} = 0,532 \quad (4.2)$$

OVA'nin yapısal floresans özelliğine sahip olan üç çeşit aminoasidinin bulunmasından dolayı katyonize OVA ve OVA-FUM konjugatlarının RP-HPLC ile analizinde floresans dedektör (FLD) kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Bu aminoasitler; fenilalanin (Phe), triptofan (Trp) ve tirozindir (Tyr). Kuantum verimlilikleri yüksek floresans sinyali verebildiği için Trp ve Tyr deneysel çalışmalarda daha çok üstünde durulan amino asitlerdir. 280 nm'lik bir uyarım dalgaboyu ile hem Trp hem de Tyr uyarılabilir. FLD dedektörde uyarılma dalga boyu 280 nm olarak tercih edilerek Trp ve Tyr amino asidlerinin uyarılması sağlandı ve bu sayede yapısal değişiklikler analiz edildi.

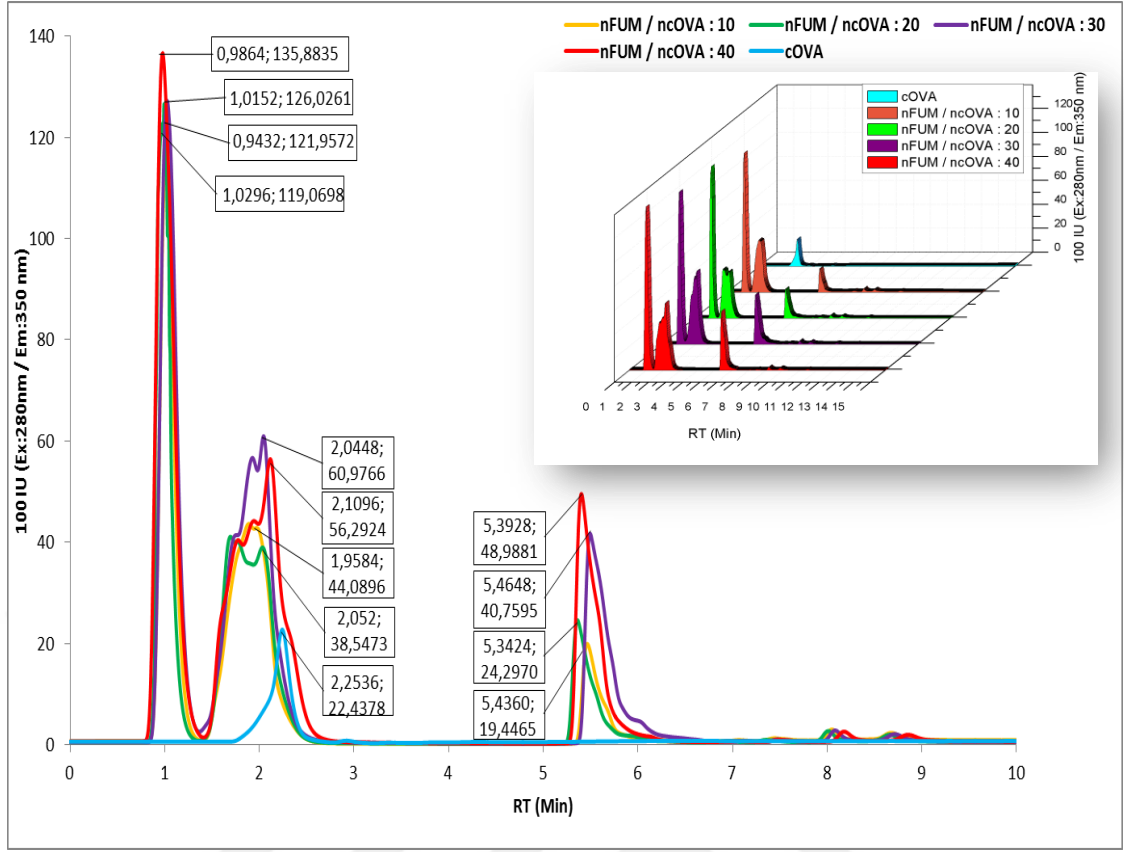
Protein katlanmasını takip edebilmek için kullanılan bu rezidüler/kök yapılar konjugat yapısının tayininde de kullanılabilir yapılardır. Çünkü proteinin floresan özellikleri proteinlerin katlanıp açılmasına göre değişir (kuantum verimlilikleri) ve bu durum proteine kazandırılan yapısal değişikliklere ve çevresel koşullara oldukça hassastır. Tyr ve Trp doğal durumunda katlanmış proteinin çekirdeğinde yer alırken kısmen katlanmış ya da açılmış durumda bu aminoasitler proteinin içinde bulunduğu çözücüye maruz kalırlar. Trp ve Tyr amino asitleri, proteinin çekirdeğine gömülü olduğu hidrofobik ortamda yüksek floresan şiddetine sahiptir. Ancak hidrofilik ortamda ise floresans şiddetleri düşer. Katyonizasyon sonucu OVA'nın izoelektrik noktası (PI) değerinin artması ve polar çözücülerdeki çözünürlüğünün azalması nedeniyle gradyan değişen polaritedeki mobil faz kullanılarak RP-HPLC ile analiz yapıldı. Ortamın hidrofobisitesi değiştirilerek OVA'nın katyonizasyon sonucu değişen floresans özelliklerinden yararlanılarak FLD detektörde analiz gerçekleştirildi. Katyonizasyon işlemi sonucunda polar fazda çözünürlük arttığı için floresans ışımının azalması gerekmektedir.



Şekil 4. 5 cOVA ve OVA proteinlerine ait HPLC (FLD detektör, ex:280 nm; em: 350nm) kromatogramı

FLD detektörü ile elde edilen kromatograma ait (Şekil 4. 5’de) pik şiddetinde görülen değişim floresans ışımının azalmasını doğrular niteliktedir. Nativ OVA’ya ait pik 2,1744.dkda 24,5378 100 LU şiddetinde ve alanı ise 423,619 LU*s olarak hesaplandı. Katyonizasyon işlemi sonrasında bu pikin alıkonma zamanı 2,232.dk., şiddeti 22,5154 LU ve alanı ise 337,56 LU*s olarak hesaplandı. Katyonizasyon sonucunda OVA’nın moleküler ağırlı artışını HPLC-UV dedektör ile elde edilen sonuçları gösterirken, FLD dedektör polar fazda floresans şiddetinde azalma meydana geldiğini göstermektedir.

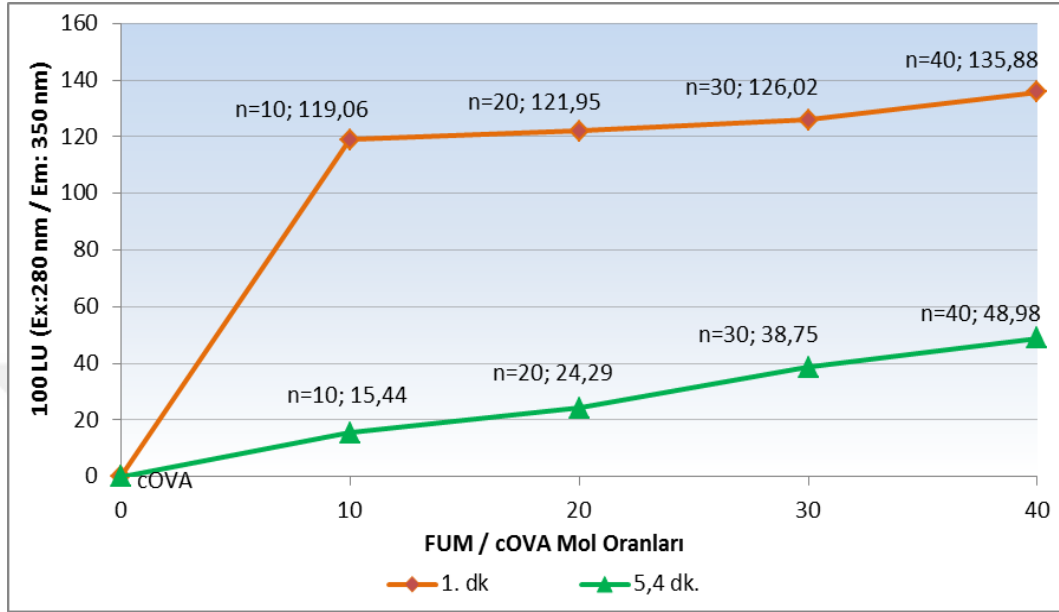
FUM konjugasyonu sayesinde cOVA’nın PI değeri tekrar azalır. Çünkü FUM molekülü yapısında olan serbest karboksil grupları eklendikçe apolar fazda çözünme artışı meydana gelmektedir. RP-HPLC çalışma şartlarında, konjugatın ihtiva ettiği FUM miktarı arttıkça konjugatın polar fazda çözünürlüğü azaltmaktadır. Çözünürlüğün azalması kuvantum verimliliğini, dolayısıyla floresans ışım şiddetini arttırmaktadır.



Şekil 4. 6 Artan mol oranlarında hazırlanmış FUM-cOVA konjugatlarına ait RP-HPLC (FLD detektör ex:280nm; em:350nm) kromatogramları

Floresans dedektörler, belli bir dalga boyunda ışığı absorpladıktan sonra başka bir dalga boyunda ışın yayan yani floresans özellik gösteren maddelerin yaydığı ışık şiddetini ölçerler. nFUM/ncOVA mol oranı 10 olan konjugatın kromatogramında 1,0296dk.da 119,0698 LU şiddetinde, 1,9584.dk'da 44,0896 LU şiddetinde, 5,4360 dk'da 19,4465 LU şiddetinde pikler oluştuğu görüldü ve toplam alan 2531,097 LU*s olarak hesaplandı. nFUM/ncOVA mol oranı 20 olan konjugatın kromatogramında ise 0,9438 dk'da 121,9572 LU şiddetinde, 2,052 dk'da 38,5473 LU şiddetinde, 5,3424 dk'da 24,2970 LU şiddetinde pikler oluştuğu görüldü ve toplam alan 2877,31 LU*s olarak hesaplandı. nFUM/ncOVA mol oranı 30 olan konjugatın kromatogramında 1,0153 dk'da 126,0261 LU şiddetinde, 2,0448 dk'da 60,9766 LU şiddetinde, 5,4648 dk.da 40,7595LU şiddetinde pikler oluştuğu görüldü ve toplam alan 4280,579 LU*s olarak hesaplandı. nFUM/ncOVA mol oranı 40 oran konjugatın kromatogramında ise 0,9864 dk'da 135,8835 LU şiddetinde, 2,1096 dk'da 56,2924 LU şiddetinde, 5,3928 dk'da 48,9881 LU şiddetinde pikler oluştuğu görüldü ve toplam alan 4101,6165 LU*s olarak hesaplandı.

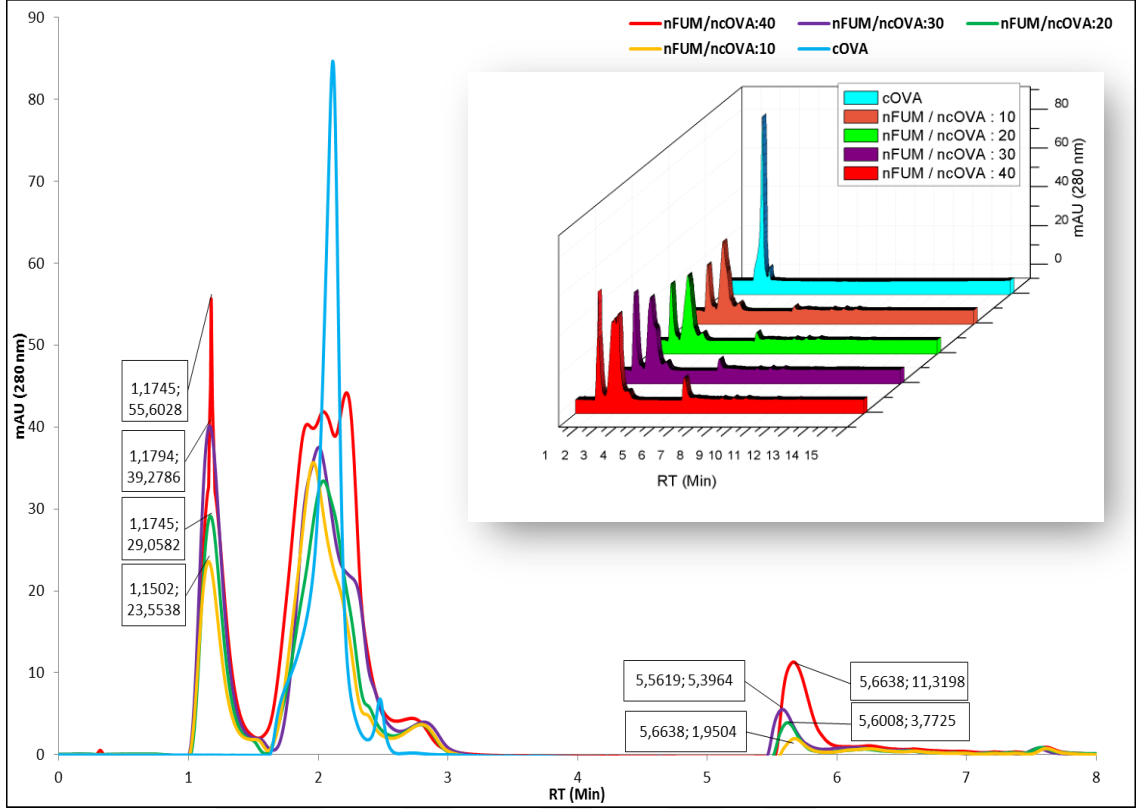
Kromatogramda net görünemediği için piklerin belirli bir sürede maksimum şiddetleri grafiğe geçirildi. Oluşan konjugat piklerinin en yüksek olduğu noktalara yakın sabit seçilen RT'da (1. ve 5,4. dk) oluşmuş pik şiddetlerinin, konjugattaki fum/cOVA mol oranı ile doğru orantılı arttığı Şekil 4. 7'de görülmektedir.



Şekil 4. 7 Artan konjugat oranları ile pik şiddetleri grafiği (FLD detektör ex: 280nm em: 350nm)

1.dk'da oluşan konjugatların n40/n10 konjugatlarının pik şiddetlerinin oranı 1,14 oranındadır. Bu oran 5,4 dk'da ise 3,17 oranındadır. Tamponda apolar faz azaldıkça konjugatın çözünürlüğü azalmaktadır, dolayısıyla 5,4 dk'da FUM molekülü eklendikçe pik şiddetleri daha fazla artmaktadır.

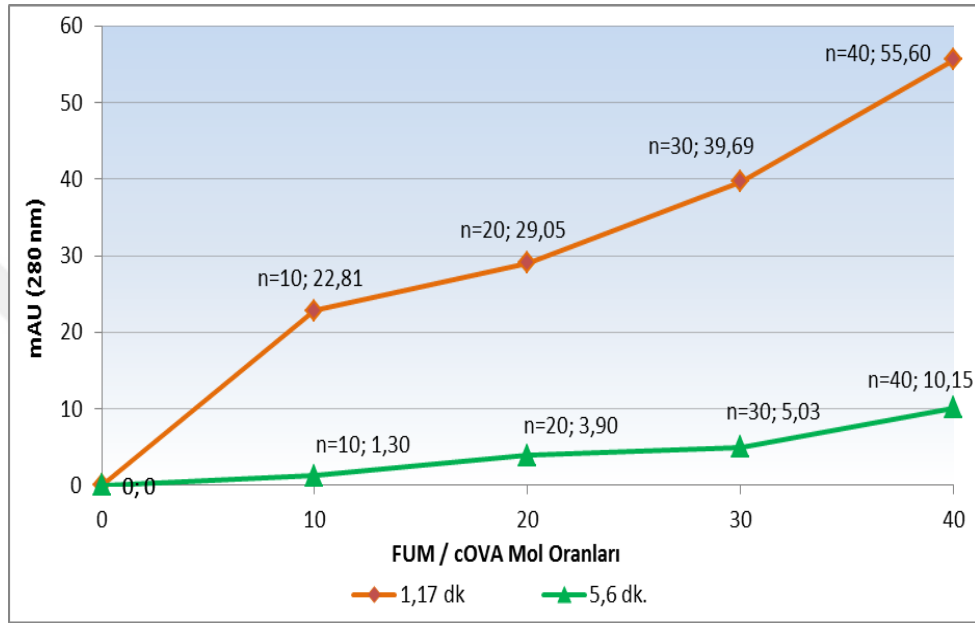
FLD detektör, floresans özellikteki moleküllerin analizinde hassas ölçüm yapılmasına izin vermektedir. Ancak FUM'nin cOVA'ya oranının hesaplanmasında gerekli bilgileri edinebilmek için HPLC'de UV detektör kullanılması gerekmektedir. RPC-HPLC'de UV detektör ile FUM konjugatlarının analizi yapılarak ve FUM/cOVA oranları hesaplandı.



Şekil 4. 8 Artan mol oranlarında hazırlanmış FUM-cOVA konjugatlarına ait RP-HPLC (UV detektör 280 nm) kromatogramları

FUM'nin cOVA'ya 10, 20, 30 ve 40 mol oranıyla hazırlanmış FUM-cOVA konjugatlarına ait RP-HPLC (UV detektör) kromatogramları Şekil 4. 8'de gösterilmektedir. Konjugat içindeki FUM miktarı arttıkça konjugata ait pik şiddetlerinde ve toplam pik alanında artış meydana gelmektedir. cOVA'nın kromatogramında 2,0384. dk'da 64,7519 mAU şiddetinde tek pik oluşurken katyonizasyon sonucunda değişen polariteler sebebiyle farklı dakikalarda ve farklı şiddetlerde pik alanları oluştuğu görülmektedir. nFUM/ncOVA mol oranı 10 olan konjugatın kromatogramında 1,1502 dk'da 23,5538 mAU şiddetinde, 2. Dk'da 32,4988 mAU şiddetinde, 5,6638. dk'da 1,9504 mAU şiddetinde pikler oluştuğu görüldü ve toplam alan 1310,736 mAU*s olarak hesaplandı. nFUM/ncOVA mol oranı 20 olan konjugatın kromatogramında ise 1,1745. dk'da 29,0582 mAU şiddetinde, 1,956. dk'da 35,6228 mAU şiddetinde, 5,60. dk'da 3,7725 mAU şiddetinde pikler oluştuğu görüldü ve toplam alan 1355,367 mAU*s olarak hesaplandı. nFUM/ncOVA mol oranı 30 konjugatına ait kromatogramda 1,1794. dk'da 39,2786 mAU şiddetinde, 2,0189. dk'da 38,3152 mAU şiddetinde, 5,5619. dk'da 5,3964 mAU şiddetinde pikler oluştuğu görüldü ve toplam alan 1715,023 mAU*s olarak

hesaplandı. nFUM/ncOVA mol oranı 40 olan konjugatın kromatogramında ise 1,1745. Dk'da 55,6028 mAU şiddetinde, 2,0286. dk'da 42,813 mAU şiddetinde, 5,6638. dk'da 11,3198 mAU şiddetinde pikler oluştuğu görüldü ve toplam alan 2118,779 mAU*s olarak hesaplandı. Şekil 4. 8'te gösterilen kromatogramların daha net anlaşılabilmesi için grafiğin konjugatların 1,7. dk ve 5,6. dk'larında gösterdikleri pik şiddetleri ile Şekil 4. 9'da gösterilen grafikler çizildi.



Şekil 4. 9 Artan konjugat oranları ile pik şiddetleri grafiği (UV:280; RT 1,7 dk ve 5,6 dk) RPC kolonda yapılan HPLC kromatografisinde FUM-cOVA'nın 10, 20, 30 ve 40 oranlarında konjugatlara ait ilk pik 1,17 dk.da detekte edildi. Kromatograma göre 2. dk'da var olan pikler FUM konjuge olmamış cOVA pikleridir. Çünkü cOVA'nın tek başına kromatogramı, bu bölgedeki pikler ile benzerlik göstermektedir. 3.dk'da görülen pikler cOVA'nın dimerik yapısına aittir. 1,17. dk'da ve 5,6. dk'da ise konjugata ait pikler elde edilmektedir. Gradyan tampon değişimi yapılan HPLC kromatografisinin 5,6. dk'sında elde edilen konjugat piklerinde (Şekil 4. 9) n 10 oranında 1,3 mAU, n 40 oranında ise 10,15 mAU şiddetinde pikler elde edildi. İki konjugatın bu dakikadaki pik şiddetlerinin oranı (n_{40}/n_{10} (mAU)) hesaplandığında yaklaşık 7,8 kat şiddet artışı olduğu görüldü. 1,17. dk'da elde edilen konjugat pikleri sırası ile n 10 oranındaki konjugat için 22,81 mAU, n 40 oranındaki konjugat için 55,60 mAU'dir. Yine iki konjugatı bu dakika (1,17) için oranlandığında, pik şiddetinde 2,44 kat artış olduğu hesaplandı. Bu sonuçlara göre; FUM molekülü n 40 oranındaki konjugatta n10 oranına göre daha fazla miktarda

konjuge oldu. 1,7. dk ve 5,6. dk'da iki pik elde edilen kromatogram sonucuna göre iki farklı polariteye sahip konjugatlar elde edildi. Ayrıca 5,6. dk'da detekte edilen konjugatın 1,7. dk'ya kıyasla daha fazla miktarda FUM içerdiği görüldü.

Konjugasyon oranları, denklem 4.1'de belirtildiği gibi haptten-konjuge protein pik alanları kullanılarak hesaplandı (Çizelge 4. 2). Konjugasyon oranları hesaplanırken toplan pik alanları (1,17. dk ve 5,6. dk) kullanıldı. Tüm oranlardaki konjugatların bağlanma oranları denklem 4.1'de belirtildiği gibi "haptten-konjuge protein" pik alanları (HBO) kullanılarak hesaplandı (Çizelge 4. 2).

Çizelge 4. 2 UV ve FLD detektörler ile elde edilen pik alanları ve FUM-cOVA konjugasyon oranları

	UV Detektör ile Pik Alanları (mUA*s)	FLD Detektör ile Pik Alanları (LU*s)	UV Detektör ile Konjugasyon Oranları	FLD Detektör ile Konjugasyon Oranları
OVA	917,328	423,619		
cOVA	1042,750	337,560	0,532	
nFUM/ncOVA : 10	1310,736	2531,097	0,557	0,882
nFUM/ncOVA : 20	1355,367	2877,310	0,565	0,895
nFUM/ncOVA : 30	1715,023	4280,579	0,622	0,927
nFUM/ncOVA : 40	2118,779	4101,616	0,670	0,924

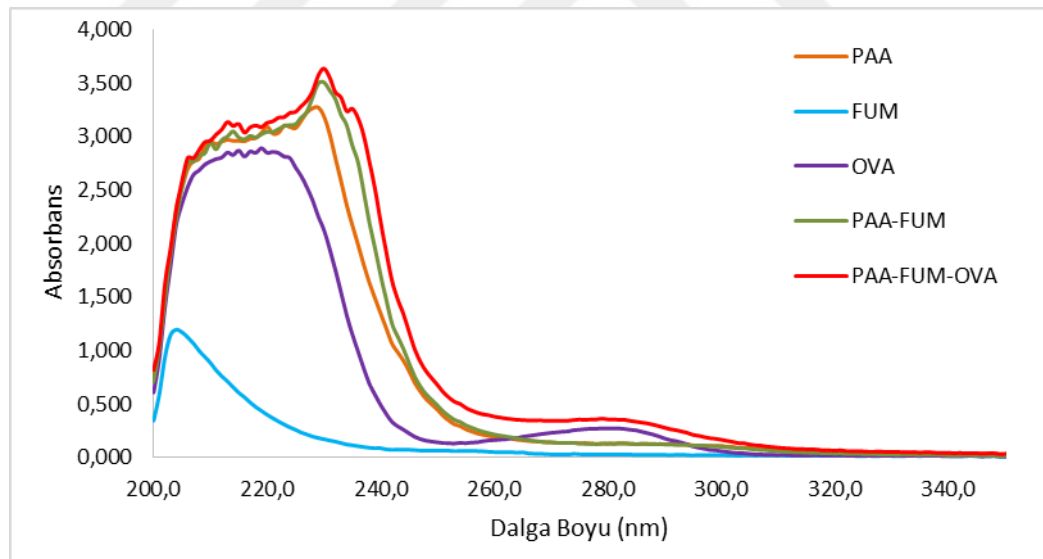
Elde edilen pik alanlarının oranlaması ile veriler değerlendirildiğinde; UV detektöre göre OVA'nın katyonizasyon oranı %53,2 oranında gerçekleştirildi. nFUM/ncOVA:40 konjugatında FUM'nin konjugasyon oranı ise %67 oranında gerçekleştirildi (Çizelge 4. 2). FLD detektör ile elde edilen pik alanlarından yararlanarak hesaplanan sonuçlara göre nFUM/ncOVA:40 konjugatında FUM konjugasyon başarısı % 92,4 olarak hesaplandı. HBO oranlarından elde edilen değerler 0-1 aralığında ve sonuç 1'e yakın olduğu oranda haptten konjugasyonu başarılı olarak kabul görmektedir. nFUM/ncOVA pik alanı değerlerinde FLD detektör ile elde edilen sonuçlarda (n30: 0,927 ve n40: 0,924) artış meydana gelmemekte, UV detektörde ise sadece %4'lük fark oluşmaktadır. Konjugasyon oranında artış olmadığı için daha yüksek oranlarda konjugasyon reaksiyonu gerçekleştirilmedi. Elde edilen 4 farklı orandaki konjugat diğer methodlarla

da analiz edildikten sonra nFUM/ncOVA 40 oranındaki konjugat immünojen olarak kullanıldı.

4.1.4. FUM-PAA Konjugatlarının UV-VIS Spektrofotometresi ve HPLC ile Karakterizasyonu

Protein-FUM konjugatlarının HPLC ile analizinde doğal amino asitlerin 280 nm dalga boyunda absorptans yapmalarından yararlanarak karakterizasyonlar gerçekleştirildi. Ancak deneyde kullanılan PAA'nın ve FUM'nin bilinen bir absorptans değeri yoktur. Bu sebeple öncelikle PAA, FUM ve tüm konjugatların absorpsiyon aralığı UV-VIS spektrofotometre ile belirlendi.

HPLC ile polimer konjugatlarının karakterizasyonundan önce UV-VIS spektrofotometre cihazı ile 200 nm - 450 nm dalga boyları arasında absorpsiyon spektrumu tarandı. FUM-PAA konjugatlarının Şekil 4. 10'daki grafikte sunulduğu gibi spesifik absorptans değerleri incelendi.

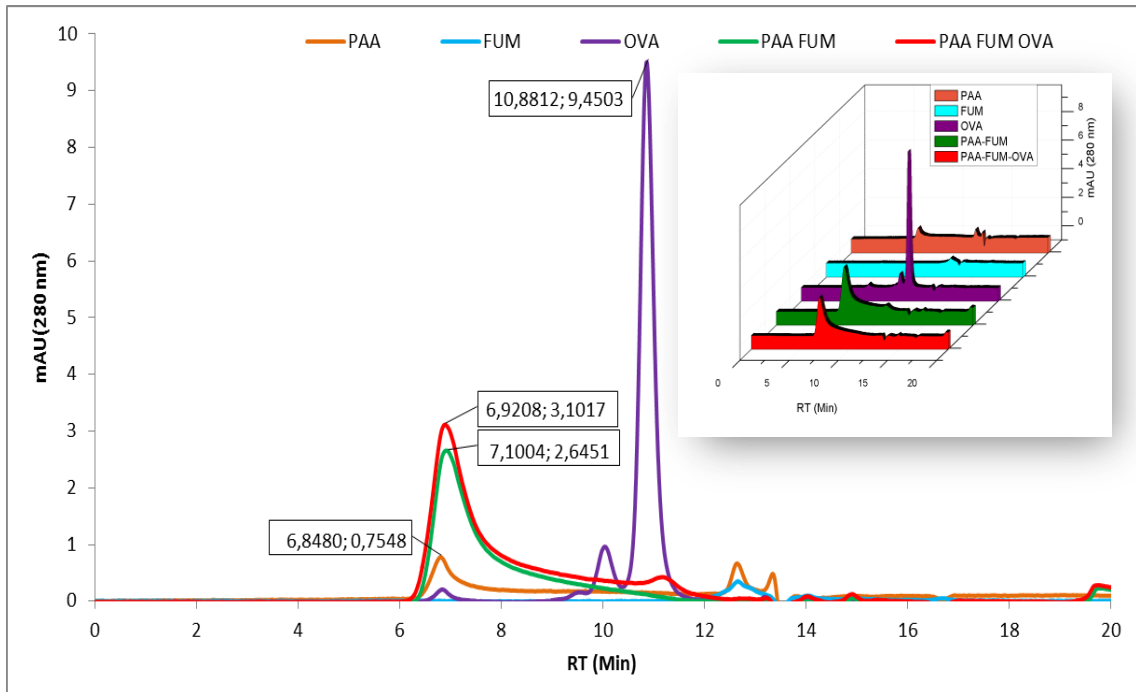


Şekil 4. 10 PAA, FUM, OVA, FUM-PAA ve FUM-PAA-OVA örneklerine ait UV-VIS spektroskopik absorptans ölçümleri grafiği

280 nm dalga boyunda FUM molekülünün absorpsiyonu 0,029, PAA'nın ise 0,130 olarak ölçüldü. FUM-PAA konjugatının da yine bu dalga boyunda yaptığı absorptans 0,132 olarak belirlendi. Ancak OVA'nın 280 nm dalga boyunda 0,271 absorptans yaptığı belirlendi. PAA-FUM-OVA konjugatının bu dalga boyunda 0,365 değerinde absorptans

yaptığı sonucuna ulaşıldı. Bu çalışmanın sonucunda OVA'nın protein yapısından dolayı, 280 nm'de absorbands yaptığı, aynı miktardaki FUM-PAA-OVA konjugatının 280 nm absorbandsının, moleküler büyüklüğün artışından dolayı kuvvetlendiği görüldü. Ayrıca, 280 nm dalga boyunda PAA'nın ve FUM'nin tek başına fazla absorbands yapmıyor olması, konjugasyon sonrası değişikliği izlemek için HPLC'de UV detektöründe 280 nm dalga boyunda çalışılabileceğini ortaya koymaktadır.

PAA, FUM, OVA, FUM-PAA ve FUM-PAA-OVA örnekleri ile HPLC analizleri 300A-5µm SEC kolonda, 1 ml/dk akış hızında, 25°C'de 280 nm dalga boyunda UV detektör kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 4. 11 FUM, OVA, PAA, FUM-PAA, FUM-PAA-OVA 'ya ait UV detektör ile belirlenen HPLC kromatogramları

Kromatogramda FUM ve PAA'ya ait belirgin pikler oluşmadığı görüldü. OVA'nın kendi başına yaklaşık 10,88. dk'da 9,45 mAU şiddetinde monomerik, 10. dk'da ise dimerik pikinin oluştuğu görüldü. 6-7. dk'lar arası PAA'nın zayıf bir (0,75 mAU şiddetinde, 29,188 mAU*s alanında) piki olduğu görülmektedir. PAA-FUM konjugatının ise artan moleküler büyüklüğünden dolayı 6-7. dk'lar arası maksimum 2,645 mAU şiddetinde piki görüldü ve bu pikin alanı 202,63 mAU*s olarak hesaplandı. 3'lü konjugat olan PAA-FUM-OVA konjugatına ait kromatogramda 6-7. dk'lar arasında 3,102 mAU şiddetinde

bir pik olduğu görüldü ve 267,867 mAU*s toplam alanı hesaplandı. Böylece OVA'nın eklenmesiyle moleküler boyutun daha da arttığı görüldü. PAA'nin polidispersitesinden dolayı pikler yaygın şekilde oluşmakta ancak PAA-FUM-OVA'ya ait kromatogramda 10-12. dk'lar arasında belirgin bir OVA piki kalmaması başarılı bir konjugasyon reaksiyonu olduğunu göstermektedir. Konjugasyon oranı denklem (4.4) kullanılarak aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$$HPO(pf_{UV}) = \frac{(\text{Polimer-Hapten Konj.nın Pik Alanı})}{(\text{Polimer Pik Alanı})+(\text{Polimer-Hapten Konj.nın Pik Alanı})} \quad (4.3)$$

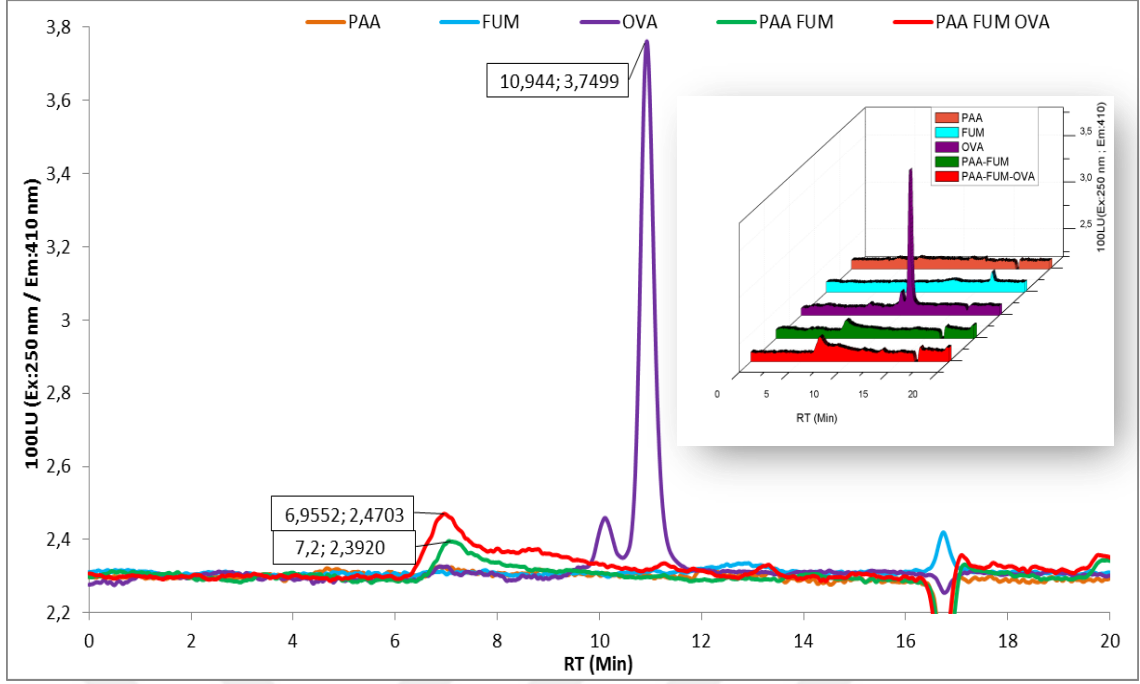
$$HPO(pf_{UV}) = 1x \frac{202,63}{29,188+202,63} = 0,874 \quad (4.4)$$

$$HPO(pf_{O_{UV}}) = \frac{(\text{Polimer-Protein-Hapten Konj.nın Pik Alanı})}{(\text{Polimer Pik Alanı})+(\text{Polimer-Protein-Hapten Konj.nın Pik Alanı})} \quad (4.5)$$

$$HPO(pf_{O_{UV}}) = 1x \frac{267,867}{29,188+267,867} = 0,902 \quad (4.6)$$

FUM-cOVA konjugatlarının HPLC ile karakterizasyonunda olduğu gibi PAA-FUM ve PAA-FUM-OVA konjugatlarında da Trp ve Tyr aminoasidlerinin konjugatta kuantum verimlilikleri açısından irdelenmek adına FLD detektör kullanılarak analizler gerçekleştirildi.

FUM, FUM-PAA, FUM-PAA-OVA, OVA ve PAA örnekleri tamamlayıcı teknik olarak HPLC'de 300A-5µm SEC kolon ile (1 ml/dk akış hızı ve 25°C'de), FLD detektör (Ex:250 nm; em:410 nm) kullanılarak karakterize edildi.



Şekil 4. 12 FUM, OVA, PAA, FUM-PAA, FUM-PAA-OVA 'ya ait FLD detektör ile belirlenen HPLC kromatogramları

Kromatogramda görüldüğü üzere OVA doğal halde kullanıldığı için şiddetli bir floresans piki vermektedir (3,7499 LU). Şekil 4. 12'de görüldüğü gibi FUM ve PAA yapılarında floresans özellik olmadığı için belirgin bir pik oluşmamaktadır. Ancak PAA'ya FUM molekülü konjuge edildiğinde yaklaşık 7. dk'da, pik şiddetinin 2,392 LU olduğu (9,343 LU*s) görülmektedir. Bu pikin tuz içeren PBS ortamında polielektrolitlerin konjugasyon sonrasında daha kompakt yapıda globülerleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Tek başına OVA'nın kromatogramında 10-12. dk'lar arasında 3,75 LU şiddetinde monomerik bir pik, hemen öncesinde ise karakteristik bir dimerik yapısına ait pik görülmektedir. Yine aynı kromatogramda FUM-PAA-OVA konjugatı analiz edildiğinde; 7. dk'da artan pik şiddeti (2,470 LU) ve alanına (19,925 LU*s) göre konjugasyonun gerçekleştiği sonucu elde edildi. FLD detektör ile elde edilen kromatogramlardaki pik alanlarından yararlanarak FUM ve OVA bağlanma oranları aşağıdaki şekilde hesaplandı (

Çizelge 4. 3).

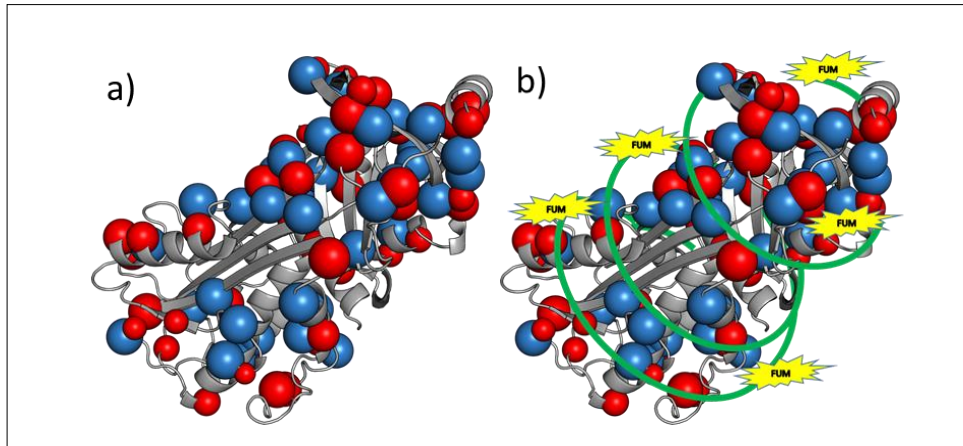
$$HPO(pf_{FLD}) = 1x \frac{9,343}{1,594+9,343} = 0,854 \quad (4.7)$$

$$HPO(pf_{o_{FLD}}) = 1x \frac{19,925}{1,594+19,925} = 0,926 \quad (4.8)$$

Çizelge 4. 3 HPO denklemlerinden elde edilen PAA-FUM konjugasyon oranları

	UV Pik Alanı (mUA*s)	FLD Pik Alanı (LU*s)	UV'ye göre % Pik Alanları	FLD'ye göre % Pik Alanları
PAA	29,188	1,594		
FUM	14,302	1,777		
OVA	209,547	33,105		
PAA-FUM	202,63	9,343	0,874	0,854
PAA-FUM-OVA	267,867	19,925	0,902	0,926

Elde edilen pik alanlarının oranlaması ile veriler değerlendirildiğinde; FLD detektöre göre PAA-FUM konjugasyon başarısı % 85,4 oranında, UV detektöre göre ise %87,4 oranında gerçekleştirildi. PAA-FUM-OVA konjugatında; FLD detektörü ile elde edilen pik alanlarına göre %92,6, UV detektörü ile elde edilen pik alana göre %90,2 başarılı olundu. PRC-HPLC kromatogramlarında FUM-cOVA'ya ait UV ve FLD detektörlerine ait pik alanlarının hesaplanması ile elde edilen konjugasyon oranları değerlendirildiğinde PAA-FUM-OVA ile elde edilen değerlerden daha fazla fark olduğu sonucuna ulaşıldı. FUM-cOVA konjugatlarının UV ve FLD detektörleri ile analizlerde oluşan bu farkın sebebi protein yapının Tyr ve Trp aminoasidlerinin polimer olmadan çözücü ile doğrudan etkileşime girmesidir. FUM miktarına göre etkileşim artmaktadır ve elde edilen pik oranları arasında farklar oluşmaktadır. Polimer kullanıldığında ise OVA proteinini polimer sarmalamakta dolayısıyla Tyr ve Trp aminoasidleri çözücünden daha az etkilenmektedir.



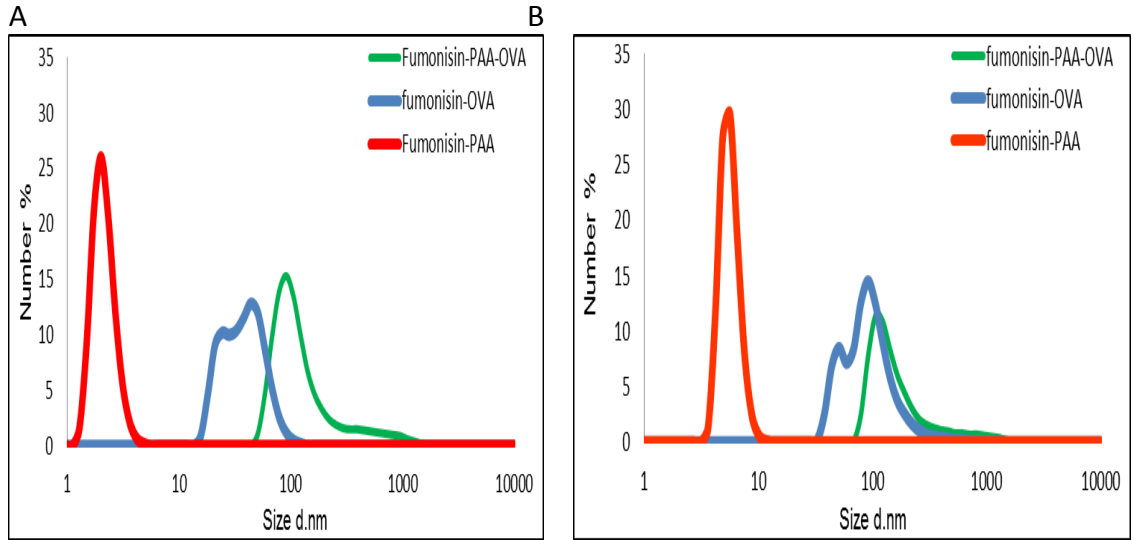
Şekil 4. 13 Apolar bir çözücü içerisinde a) OVA ve b) PAA-FUM-OVA konjugatı

4.1.5. FUM – PAA ve FUM-PAA-OVA Konjugatlarının Zetasizer ile Çap Ölçümü

Proteinlerin sentetik polielektrolitlerle (PE) olan etkileşimleri genel olarak elektrostatik kuvvetlerle olup, bunun sonucunda şu üç durum oluşabilir: çözünür kompleks, konjugatlar ve amorf çökeltiler. Protein içeren polielektrolit komplekslerin oluşturulmasındaki olası bütün bu durumlar; makromoleküler bileşenlerin çeşidine, iyonik şiddetine, pH'ya ve proteinlerle PE'lerin konsantrasyonlarına yani protein/polielektrolit oranına bağlı olarak sağlanabilir.

PAA-FUM-OVA ve PAA-FUM konjugatlarının RP-HPLC FLD dedektörü ve UV detektörü ile elde edilen sonuçların birbirlerine yakın oranda FUM bağlanma oranı vermesinden dolayı yapıların Zetasizer ile aydınlatılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Yarıçaplarının büyüklüklerine göre farklı tamponlarda OVA ve cOVA yapıları değerlendirildi. PAA ile konjugasyon sonrası molekül yarıçapının artışının kompakt bir yapı oluşturması ile ilişkisi irdelendi.

Tez çalışması kapsamında FUM molekülü PAA'ya, protein yapıda olan OVA'ya ve PAA-OVA kompleksine konjuge edildi. Zetasizer ile yarıçapı ölçülen örnekler tek oranda konjuge edildi. Bileşen çeşidine (PAA-FUM, PAA-FUM-OVA ve FUM-OVA), iyonik şiddetine ve pH'ya (PBS ve MES tamponlarında) göre moleküler çapları 3'er kez ölçüldü. PBS içerisinde yapılan ölçümler Şekil 4. 14-A'da, MES tamponu içerisinde yapılan ölçümler Şekil 4. 14-B'de verilmektedir. Örnek hacmi içerisinde konjugatların sayıca miktara bağlı moleküler çap ölçümleri yapıldı.



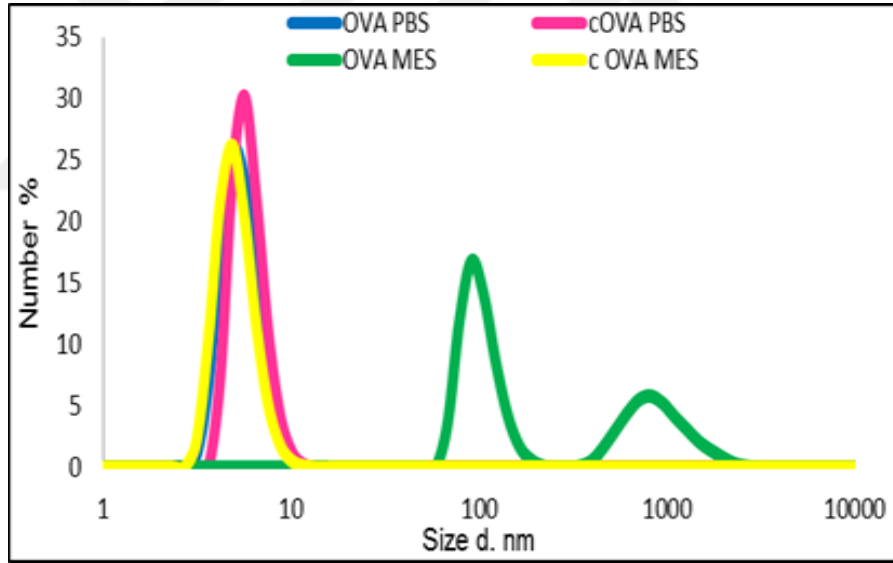
Şekil 4. 14 PAA-FUM-OVA, FUM-OVA ve FUM-PAA konjugatlarının PBS tamponunda moleküler sayıca miktara bağlı çap boyutlarının ölçümü A) PBS B) MES tamponunda yapıldı.

Çizelge 4. 4 PAA-FUM-OVA, FUM-OVA ve FUM-PAA konjugatlarının MES ve PBS tamponlarında çap ölçümüne dair sonuçlar

Tampon	Konjugat	1.%	Yarıçap (d.nm)	2. %	Yarıçap (d.nm)
PBS (PH7,2)	FUM-PAA-OVA	96,3	116,8	3,7	39,8
	FUM-OVA	76,7	103,1	23,3	78,6
	FUM-PAA	100	5,63	-	-
MES (PH 4,5)	FUM-PAA-OVA	100	102,7	-	-
	FUM-OVA	56,8	88,5	43,1	47,6
	FUM-PAA	100	2,16	-	-

PBS tamponu içerisinde FUM-PAA konjugatının mono disperse yakın moleküler çapta (5,63 nm) olduğu görüldü. FUM-OVA konjugatı 2 farklı yarıçapa sahip yapı oluşturmaktadır. Bu moleküllerin örnek hacmi içerisinde sayıca ortalamaları alındığında %76,7 oranında 103,1nm ve %23,3 oranında 78,6 nm'lik makromoleküler yapıların olduğu bulundu. PAA-FUM-OVA konjugatı %96,3 oranında 116,8 nm moleküler çapındadır. PAA-FUM-OVA konjugatının FUM-OVA'ya kıyasla daha monodispers yapıda bulunduğu içerisinde tek tip yarıçapa sahip moleküllerin %96,3 oranda var olduğundan anlaşılmaktadır. Bu sonuca göre RP-HPLC kromatogramlarında FUM-OVA yapısının 2 pikinin oluşunu ve PAA-FUM-OVA konjugatının ise tek pike sahip oluşunu

açıklamaktadır. Konjugatların içinde buldukları çözücünden etkilenmesinin irdelenebilmesi için tampon değişikliği yapılarak ölçümler tekrarlandı. pH 4.5 olan MES tamponu içerisinde yapılan ölçümlerde ortamda bulunan proton yüklerinden dolayı polielektrolitler daha kompakt hale gelirler. PAA-FUM konjugatının yarıçapı MES tamponunda 2,16 nm, PAA-FUM-OVA konjugatınıninkisi ise 102,7 nm'ye düşmektedir. Ayrıca PAA-FUM-OVA'nın daha monodispers yapıda olduğu görülmektedir. FUM-OVA konjugatına bakıldığında iki farklı yarıçapa sahip yapının varlığı daha net şekilde görülmektedir. %56,8 oranında 88,5nm yarıçaplı ve %43,1 oranında 47,6 nm yarıçaplı iki konjugat yapısının olduğu görülmektedir. Bu durumda PAA'nın OVA üzerinde pH'a duyarlı sıklıkta bir kompleks yapı oluşturduğu sonucunu göstermektedir. Bir diğer yandan cOVA'nın kullanıldığı konjugatların farklı pH'larda davranışlarının gözlemlenebilmesi için OVA ve cOVA'nın PBS ve MES tamponu içerisinde çap ölçümleri yapıldı.



Şekil 4. 15 OVA ve cOVA 'nın PBS ve MES tamponunda a) sayıca miktara bağlı moleküler çap ölçümleri

Çizelge 4. 5 OVA ve cOVA 'nın PBS ve MES tamponunda yarıçapları

Konjugat	1.Pik Alanı %	Yarıçap(d.nm)	2.Pik Alanı %	Yarıçap(d.nm)
OVA (MES)	62	102	38	925
OVA (PBS)	100	5,34	-	-
cOVA (PBS)	100	5,93	-	-
cOVA (MES)	100	5,12	-	-

OVA'nın düşük pH'ta (MES pH 4,5) iki farklı çapta yapılar oluşturduğu sonucuna ulaşıldı. Ancak cOVA aynı tampon içerisinde monodispers bir yapı sergilemektedir. OVA'nın düşük pH'larda çözünürlüğünün azalarak agregasyon oluşturmaktadır. Ancak kationizasyon işlemi sonunda düşük pH'da makromoleküler yapılar meydana getirmedeği görülmektedir. Bu bilgiler sayesinde MES içerisinde yapılan konjugasyon reaksiyonunda cOVA'nın monodispers yapısını koruduğu sonucuna ulaşılmıştır. Hazırlanan tüm FUM-taşıyıcı molekül konjugatlarının karakterizasyonu sonucunda elde edilen veriler sayesinde immünizasyonda kullanılacak konjugasyon oranları ve kullanılacak miktarlar belirlendi.

4.2. FUM Konjugatları ile İmmünizasyonlar

İmmünoensörlerde biyolojik algılayıcı olarak kullanılacak FUM spesifik antikorun elde edilebilmesi için FUM immünojenlerinin hazırlanması ve karakterize edilmesinin ardından immünizasyonlara başlandı. İmmünizasyonda 4 grup fare kullanıldı ve immünojen olarak n:40 oranında FUM-cBSA konjugatı ve FUM-cOVA konjugatı ile FUM-PAA ve FUM-PAA-OVA konjugatı kullanıldı. Protein konjugatlarının yanısıra 2'li ve 3'lü PAA konjugatlarının immünizasyonu ile FUM spesifik antikor elde edilmesinin yanısıra PAA'nın adjuvanlara alternatif olabilmesi hedeflenmiştir. 4'er farelik 2 gruptan oluşan deneklere 14 günlük rejimler halinde interperitoneal olarak immünizasyonlar gerçekleştirildi.

İmmünojen olarak hazırlanan FUM-cOVA'nın yanısıra fareden alınacak immün yanıtın karşılaştırılması için alternatif olarak başka bir FUM-cProtein konjugatıyla da immünizasyonlar gerçekleştirildi. Bu amaçla FUM-cBSA konjugatları hazırlanarak

immünizasyonlar yapıldı. ELISA plağının yüzeyi protein bağlama özellikte olduğu için polimer konjugatlarının plağa kaplanmasında da protein konjugatları kullanıldı.

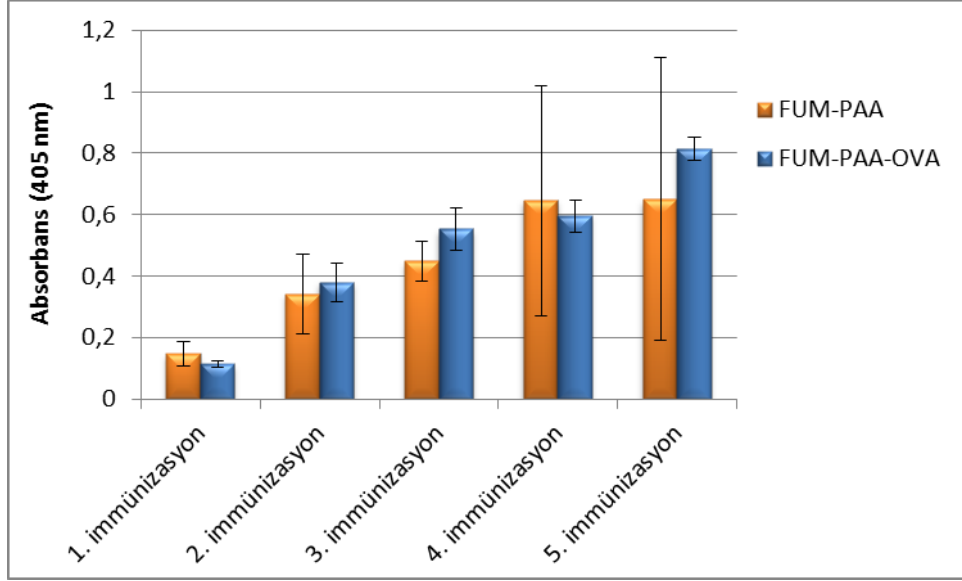
Bu amaçla;

- FUM-PAA ve FUM-PAA-cOVA konjugatları ile immünize farelerde antikor titrelerini belirlemek için ELISA plağına FUM-cBSA ile kaplandı.
- FUM-cOVA immünize edilmiş olan farelerin serumlarında FUM spesifik antikor titrelerinin belirlenmesinde plağa FUM-cTf kaplandı.
- FUM-cBSA immünize farelerin serumlarında FUM spesifik antikor titreleri ELISA ile takip edilirken plağa FUM-cOVA kaplandı.

İmmünize edilmiş farelerden 14 gün arayla alınan kanların serumunda poliklonal antikor titresinin takibi indirek ELISA ile yapıldı. Ardından kaplama optimizasyonları ve yarışmalı ELISA ile spesifite kontrolleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre yüksek antikor titreleri olan fareler ile monoklonal antikor elde edebilmek için füzyon işlemi gerçekleştirildi.

4.2.1. FUM-Polimer Konjugatları ile Farelerin İmmünizasyonu ve FUM Spesifik İmmün Yanıtın (Pab) Belirlenmesi

Alternatif taşıyıcı sistemler olarak adjuvan özelliği olduğu bilinen FUM mikotoksinin PAA ile konjugatıyla (2'li konjugat) ve PAA-FUM-OVA konjugatıyla (3'lü konjugat) 4'er adet BALB/c farenin immünizasyonları, her bir konjugattan 4 ug konjugat kullanılarak gerçekleştirildi. İmmünizasyonlar sonucunda farelerde oluşan antikor yanıtları ELISA ile belirlendi. Bu amaçla yapılan ELISA'larda tabana 100 ng/kuyu FUM-BSA konjugatı kaplanarak elde edilen fare serumu 1/100 oranında seyreltilerek test edildi. İmmünizasyonlar sonucunda elde edilen antikor yanıtları Şekil 4. 16' de gösterilmektedir. PAA-FUM immünize farelerden alınan kanla yapılan deney sonucunda 1/100 dilüsyonda kullanılan serum pAb'sinde antikor titresi 405 nm'de en yüksek 0,646 OD değeri elde edildi.



Şekil 4. 16 FUM-PAA ve FUM-PAA-OVA ile immünize edilen hayvanlarda oluşan FUM antikor titresinin ELISA ile belirlenmesi

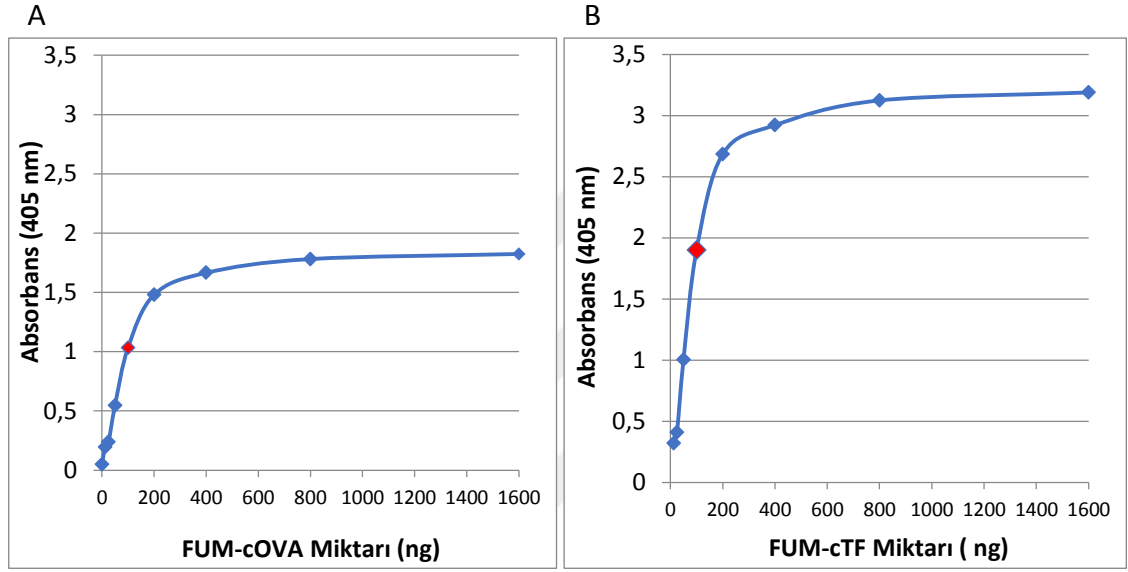
PAA-FUM-OVA immünize farelerden alınan kanla yapılan deney sonucunda 1/100 dilüsyonda kullanılan serum pAb'sinde antikor titresi 405nm'de en yüksek 0,815 OD değeri elde edildi.

Her grup 4 er farelik gruplardan oluşmaktadır ve grafikte hata barları elde edilen OD'lerin standart hatalarını göstermektedir. FUM-PAA yüksek toksik etkisinden dolayı deney hayvanları ile immünizasyonların takibinde ölen fare sayısı daha fazla olduğu için hata barları daha yüksektir. FUM-PAA-OVA ile gerçekleştirilmiş olan immünizasyon sonuçlarında elde edilen titreler PAA-FUM ile immünize edilen farelerden daha yüksek OD değerlerindedir. FUM-PAA ve FUM-PAA-OVA immünize farelerden en yüksek pAb yanıtı olan farelerin serumları, 0 ile 4µg arasında değişen miktarlarda serbest FUM ile kompetitif ELISA sistemi kullanılarak özgünlük testi yapıldı. Test sonucu, FUM'e spesifikliğin yeterli düzeyde olmadığı sonucuna varılarak kalan fareler için deneyin sonlandırılmasına karar verildi.

4.2.2. FUM-cProtein Konjugatları ile İmmünizasyon ve FUM Spesifik İmmün Yanıtın (pAb) Belirlenmesi

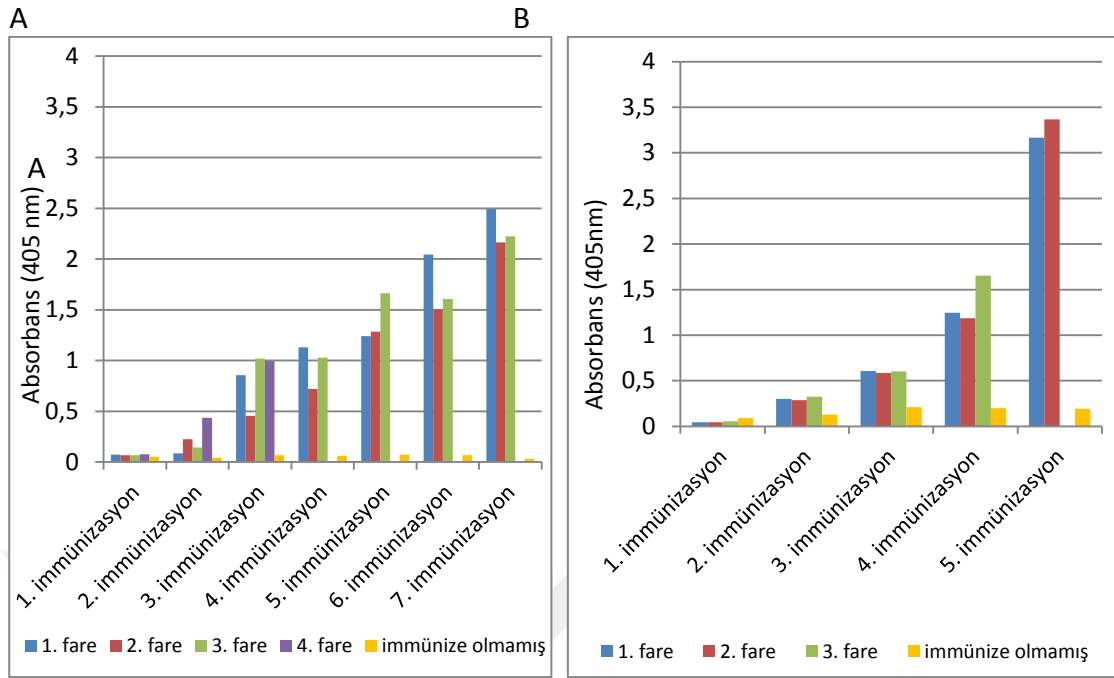
Farelerde oluşan antikor yanıtları ELISA ile belirlendi. Bu amaçla plak tabanına 100 ng/kuyu FUM-cOVA konjugatı kaplandı ve pAb'lar 1/100, 1/1000 ve 1/5000 oranlarında

seyreltilerek test edildi. Kaplama optimizasyonu yapılması amacıyla FUM-cBSA ile 4. immünizasyon sonucunda, FUM-cOVA ile 3. immünizasyon sonunda 1 numaralı farelerden alınan pAb ile (1/100 dilüsyonda) ELISA testi yapıldı (Şekil 4. 17). Kaplama için kullanılan FUM-cOVA ve cTF-FUM konjugatı 1,6 ug/100 ul PBS'te hazırlandı ve ½ dilüsyon ile 8 kuyuda kaplama yapıldı. Elde edilen eğrilerin yaklaşık ortalama değerindeki FUM miktarları Şekil 4. 7'de kırmızı renk ile gösterilmektedir. 405 nm'de okunan absorbans sonuçlarına göre ortalama 100 ng konjugatlar ile kaplamalara devam edildi.



Şekil 4. 17 A) FUM-cBSA ve B) FUM-cOVA konjugatları ile alınan antikor yanıtlarının ELISA ile takibinde plak kaplama optimizasyonu

100 ng kaplama yapılan plaklarda FUM-cBSA ve FUM-cOVA immünizasyonları sonunda farede yükselen antikor titreleri Şekil 4. 18'da sunulmaktadır.



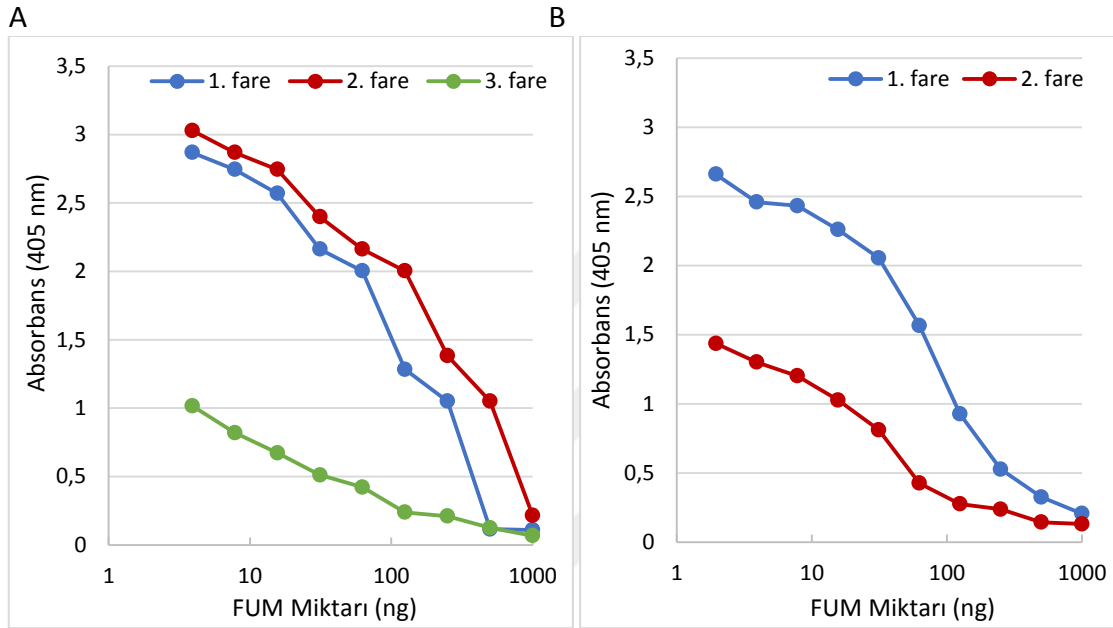
Şekil 4. 18 A)FUM-cBSA ve B) FUM-cOVA konjugatları ile immünize fare serumlarında yapılan ELISA sonuçları (1/1000 dilüsyonlarında)

FUM-cBSA immünize farelerden 4. İmmünizasyon sonucunda 3 no'lu farenin serumunda yüksek pAb titresi elde edildi (1/100 dilüsyonda 1,893 OD, 1/1000 dilüsyonda 1,654 OD ve 1/5000 dilüsyonda ise 0,901 OD) ve füzyon işlemine alındı. 5. İmmünizasyon sonucunda ise 1 ve 2 no'lu farelerin serumunda yapılan indirek ELISA sonuçlarında yüksek pAb titreleri elde edildiği için sıralı olarak füzyon işlemine alındılar. (1 nolu fare;1/100 dilüsyonda 3,578 OD, 1/1000 dilüsyonda 3,165 OD ve 1/5000 dilüsyonda 2,204 OD: 2 nolu fare;1/100 dilüsyonda 3,897 OD, 1/1000 dilüsyonda 3,366 OD ve 1/5000 dilüsyonda 2,203 OD)

Farelerin serumları 1/1000 oranda seyreltildi ve 0-4 ug arasında ½ oranında azalan serbest FUM ile 30 dk. ön etkileşimi gerçekleştirildi (Şekil 4. 19). Yüksek spesifiklikte pAb olduğu belirlenen fareler füzyon işlemine alındı.

FUM-cOVA immünize farelerden 4. Fare 3. İmmünizasyon sonunda öldü. Füzyon işlemi öncesinde yüksek antikor yanıtı veren 1, 2 ve 3 no'lu farelerden alınan serumlarda yapılan yarışımlı ELISA sonucu elde edilen antikor cevabının FUM spesifik olduğu görüldü (6. immünizasyon sonu). 1 ve 2 nolu farelerden alınarak 1/1000 oranında seyreltilmiş fare serumuna eklenen 0-1 ug arasında FUM ile yapılan yarışımlı ELISA

sonucunda 1ug FUM seviyesinde 1. Fare için 0,207 OD ve 2. fare için 0,130 OD değerleri ölçüldü. Böylece 1 ve 2 no'lu farenin serumunda yüksek spesifiklikte pAb olduğu sonucuna ulaşılarak sırası ile füzyona alındı (Şekil 4. 19). Ancak 3 no'lu fare ile yapılan yarışımlı ELISA testinde 4 ug FUM ile inkübasyon yapıldığı halde antikor yanıtının 2,834 OD'den 1,473 OD'ye indiği görüldüğü için bu fare füzyon işlemine alınmadı.



Şekil 4. 19 A) cBSA-FUM ve B) FUM-cOVA immünize farelerde FUM'e spesifik yanıtının yarışımlı ELISA ile belirlenmesi (Grafikler logaritmik olarak verilmiştir)

4.2.3. Hibrit Hücre Geliştirme

cBSA – FUM ve cOVA –FUM konjugatlarının immünizasyonları ile elde edilen pAb'lerin ELISA ile yüksek titrasyonda ve FUM spesifik yanıtlarının belirlenmesinin ardından bu fareler sırayla hibridoma çalışmalarında kullanıldı. Hibridoma teknolojisi kullanılarak FUM'ne karşı monoklonal antikor elde etmek amacıyla FUM konjugatları ile immünize edilmiş olan farelerden izole edilen immün hücreler ile aynı kökenden myeloma hücrelerinin hibridizasyonu sağlandı. Füzyon öncesinde seçilmiş olan farelere yapılan toplam immünizasyon sayısı, son hatırlatma rapellerinin içeriği, füzyonda kullanılan B hücrelerinin sayıları, myelom hücre sayıları ve lenfosit/myeloma hücre sayısı oranları

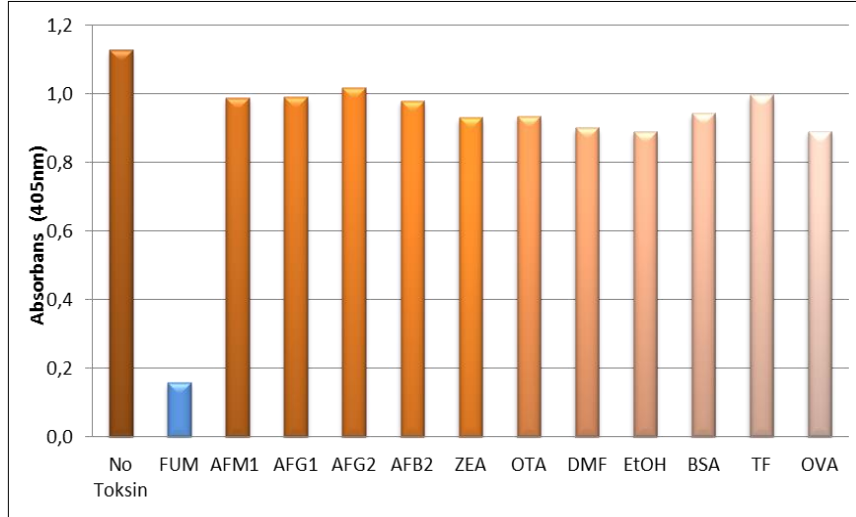
Çizelge 4. 6'da belirtilmektedir.

Çizelge 4. 6 Füzyon işlemlerine ait bilgiler

	Füzyon 1	Füzyon 2	Füzyon 3	Füzyon 4	Füzyon 5
İmmunize fare	3 No'lu	2 No'lu	1 No'lu	1 No'lu	2 No'lu
İmmunizasyon sayısı	5	5	5	7	7
İmmunojen içeriği	FUM-cBSA	FUM-cBSA	FUM-cBSA	FUM-cOVA	FUM-cOVA
Son rapel	FUM-cTF	FUM-cTF	FUM-cTF	FUM-cBSA	FUM-cBSA
Füzyonda kullanılan lenfosit sayıları	Dalak + Lenf Hücre sayısı	Dalak Hücre sayısı	Dalak + Lenf Hücre sayısı	Dalak Hücre sayısı	Dalak + Lenf Hücre sayısı
	435 x10 ⁶	290 x10 ⁶	850 x10 ⁶	200 x10 ⁶	600 x10 ⁶
Füzyonda kullanılan myeloma sayısı	116 x 10 ⁶	134 x 10 ⁶	220 x 10 ⁶	100 x 10 ⁶	340 x 10 ⁶
Plak sayısı	11	11	15	12	14
Lenfosit / myeloma hücre oranı	3,75	2,23	3,8	2	1,76
Toplam hibrid klon sayısı	0	184	150	66	125
Seçilen klon sayısı	0	5	0	0	6
Mevcut son durum (elde edilen klon sayısı)	0	0	0	0	1 (8F4)

8F4 numaralı kuyuda var olan klonda ilk olarak FUM kaplı olmayan kuyuda özgünlük testi yapıldı ve FUM spesifik olabileceği belirlendi. Test sonucunda 8F4 kuyusundaki hibrid klonunun FUM spesifik olduğu belirlendi ve hücre sayısının artmasını takiben 96 kuyulu plakta yedekleme yapıldı.

Anti FUM 8F4 kültür üst sıvıları kullanılarak, elde edilen antikorun diğer mikotoksinler (AFL M1, AFL B1, AFL B2, AFL G1, AFL G2, OTA, ZEA), proteinler (BSA, TF, OVA) ve diğer mikotoksinlerin çöündüğü organik solventlerle (DMF, EtOH) çapraz reaksiyon verip vermediği yarışmalı ELISA ile test edildi. Şekil 4. 20'de görüldüğü gibi anti FUM 8F4 antikorunun öninkübasyon sonucunda sadece FUM ile inkübe olduğu ve diğer mikotoksinler ile çapraz reaksiyon vermediği için tüm mikotoksinler arasında sadece FUM spesifik olduğu sonucuna ulaşıldı.



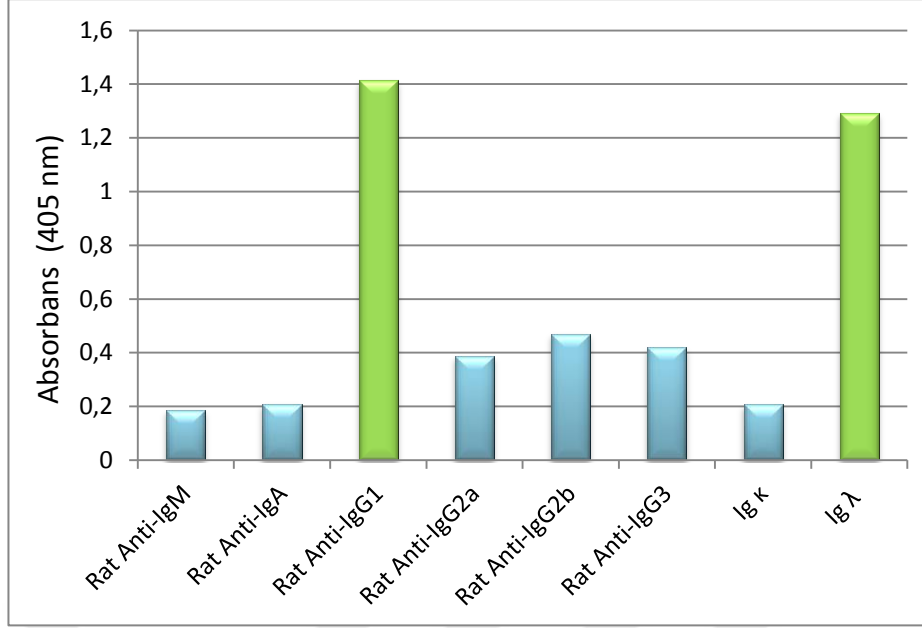
Şekil 4. 20 Elde edilen FUM spesifik antikorun (8F4) diğer mikotoksinler, mikotoksinlerin çözündüğü solventler ve proteinler ile yarışmalı ELISA sonuçları

4.2.3.1. Anti FUM 8F4 Antikorunun Karakterizasyonu

Elde edilen monoklonal antikorların amaca yönelik kullanılabilmesi için öncelikle karakterize edilmeleri gereklidir. FUM sensör geliştirilmesinde kullanılacak olan anti FUM 8F4 antikorunun karakterize edilmesi, sensörde kullanım için uygunluğunun belirlenmesinde önemli bir adımdır. Anti FUM 8F4 antikorunun karakterizasyonunda ilk olarak antikorun ELISA testi ile afinitesi belirlendi. Daha sonra antikorun izotipi ve alt izotipi belirlenerek karakterizasyon işlemi tamamlandı.

4.2.3.2. Anti FUM 8F4 İzotipinin Belirlenmesi

Monoklonal antikorlar hibridoma teknolojisi ile geliştirilirken, kullanılan immünizasyon etkinliğine bağlı olarak farklı sınıflarda üretilirler. Genellikle saflaştırma ve test sistemlerinde kullanılacakları yöntemin seçimi için ağır ve hafif zincir tiplerinin bilinmesi önem taşımaktadır. Bu nedenle, saflaştırmaya geçilmeden önce kültür üst sıvısından alınan ve saflaştırma sonrası elde edilen örneklerde izotip belirleme testi yapıldı.

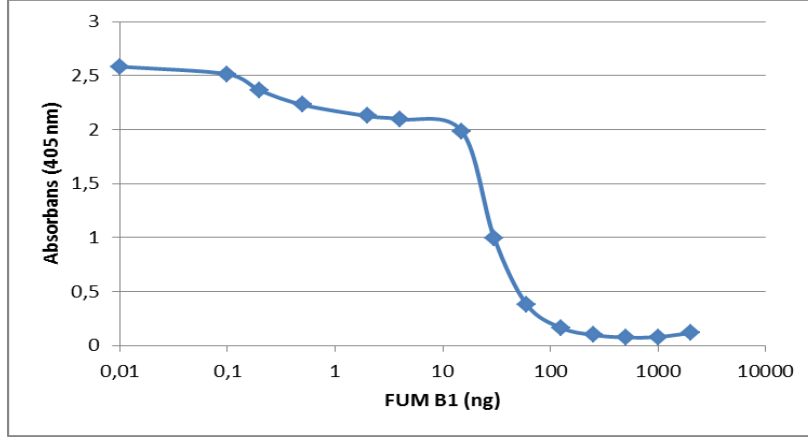


Şekil 4. 21 Anti FUM 8F4 antikorunda izotip belirlenmesi

ELISA sonucuna göre, 8F4 hücre hattının ürettiği Anti FUM 8F4 antikorunun ağır zincirinin IgG1, hafif zincirinin ise lambda olduğu belirlendi.

4.2.3.3. Anti FUM 8F4'ün Afinitesinin Belirlenmesi

Tez kapsamında geliştirilen FUM spesifik antikor olan anti FUM 8F4'ün FUM'e karşı olan afinitesinin belirlenmesi önemli bir kriterdir. Geliştirilecek olan FUM tespit methodunda afinitenin önemi çok büyüktür. Antikoron afinitesinin bir göstergesi olarak reaksiyona giren antikorumların toplam bağlama noktalarının yarısının serbest antijenle bloklandığı antijen konsantrasyonu yarı-maksimal inhibisyon konsantrasyonu (IC50) değeri hazır bir program kullanılarak (ed50v10.xls) hesaplandı. Test iki kez kontrol edildi ve ELISA sonuçları 100 ng antikorum serbest ortamda 15 ng FUM ile etkileştiği sonucunu verdi. Grafiğin IC50 değerinin yaklaşık 30 ng serbest toksine karşılık geldiği ve yaklaşık 80 ng serbest toksin mevcudiyetinde antikorum tamamının bloke olduğu sonucuna ulaşıldı. Yüksek afiniteli bir antikorumun ideal bağlanma koşullarında, 100 ng antikorum (iki bağlanma bölgesine sahip) 1 ng toksin ile tamamen bloklanmış olması beklenmektedir. Sonuçlar anti FUM 8F4'ün çok yüksek afiniteli olmadığını göstermiş olup immüno-biyosensör çalışmalarında kullanılmak üzere üretim ve saflaştırılmasına devam edilmesine karar verildi.



Şekil 4. 22 8F4 antikorunun afinitesinin yarışımlı ELISA ile belirlenmesi

4.3. FUM Dedeksiyonu İçin QCM İmmünosensörü Geliştirilmesi

FUM deteksiyonuna yönelik immünosensör çalışmaları, analite uygun immünoassayın belirlenmesi ile başlamaktadır. İmmünoserojik yöntemler, antijen ve antikor arasındaki reaksiyonu temel alan tekniklerdir ve çözeltideki her iki maddenin de konsantrasyonunu ölçmek için kullanılabilirler. Sensörlerde kullanılan immünoassaylar, antikorların spesifik olduğu antijen ile olan etkileşiminden yararlanılarak analitin kantitatif veya kalitatif olarak belirlenebildiği metodların tümüdür.

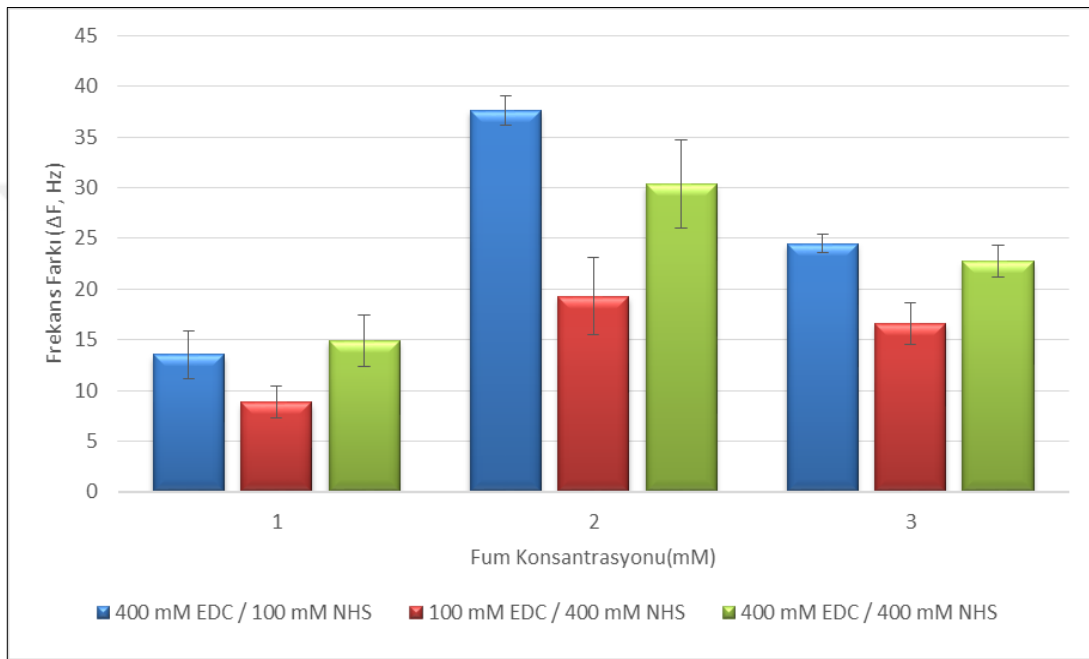
İmmünosensör geliştirmelerinde uygulanacak immünoassayın belirlenmesinin ardından yüzeye immobilize edilecek olan analit ya da antikorun optimizasyonu yapılmalıdır. Bu amaçla immobilize edilen FUM konsantrasyon optimizasyonu ve kullanılan aktivatörlerin optimizasyonu gerçekleştirildi. Kuşkusuz rejenerasyon metodunun geliştirilmesi ve hazırlanacak protokol ile yüksek tutarlıkta defalarca dedeksiyon yapılabilmesi, immünosensör geliştirmede en önemli unsurlardan birisi olduğu için tez tez çalışmasında kendi antikorumuza özgü rejenerasyon metodu geliştirildi. Geliştirilen rejenerasyon metodu ile ölçüm süresi ve aynı kristalde defalarca ölçüm yapılabilmektedir.

Kullanılan biyolojik algılayıcının uygulama koşullarının ve miktarın belirlenmesi de immünosensör geliştirilmesinde bir diğer önemli adımdır. Hibridoma teknolojisi kullanılarak elde edilen anti FUM 8F4'ün üretimi sırasında içinde bulunduğu tüm koşullar denenerek en tutarlı sonuçların elde edildiği koşul saptandı. MAb'den önce diğer koşulların incelenmesinin sebebi, tam saflaştırılması yapılan antikorlarda

maliyetin çok yükselmesi ve saflaştırma protokolleri sırasında kimi zaman aktivasyon kaybının yaşanmasından dolayıdır.

4.3.1. Aktivatör Oranlarının Tayini

QCM yüzeyde MUA ile SAM hazırlandıktan sonra farklı konsantrasyonlardaki FUM'nin immobilizasyonunda kullanılacak olan EDC/NHS oranlarının optimizasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 4. 23 3 farklı konsantrasyonda FUM immobilizasyonunda kullanılan aktivatör oranları

Algılayıcı olarak 250 µl 0.11 mg/ml konsantrasyonda amonyum sülfat çöktürme anti FUM 8F4 (AS) kullanıldı. FUM immobilizasyonunda 1 mM, 2 mM ve 3 mM konsantrasyonda FUM ile kaplamalar yapıldı. Aktivatör olarak kullanılan EDC: NHS için 4:1, 1:4, 4:4 oranları kullanıldı. 1mM FUM kaplama için ΔF 13,53Hz. 2 mM FUM kaplama için ΔF 37,67 Hz. 3 mM FUM kaplama için ΔF 24,46 Hz elde edildi. Şekil 4. 23'de görüldüğü üzere en yüksek frekans farkı 2 mM FUM kaplı sensör yüzeylerinde gerçekleşti.

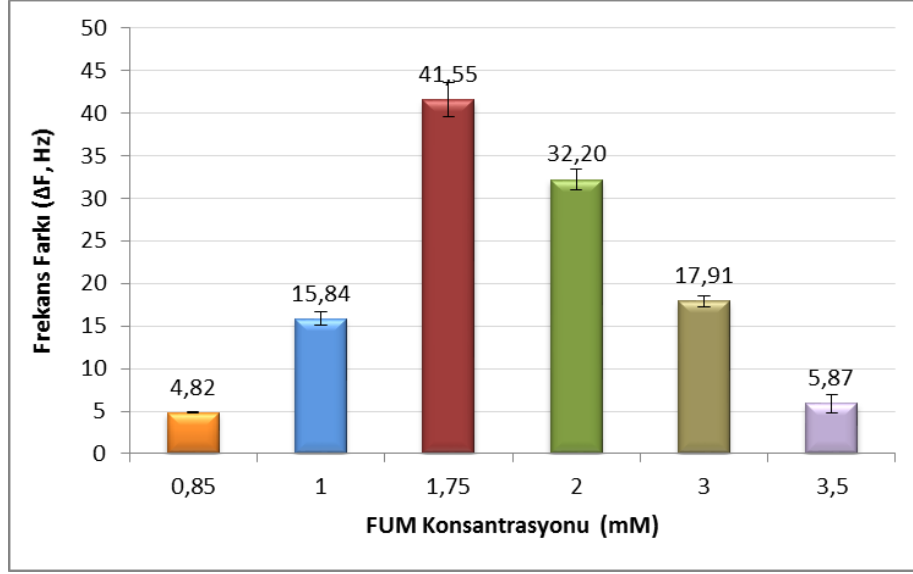
Çizelge 4. 7 Farklı aktivatör oranları ile yapılan FUM immobilizasyonları ile elde edilen frekans farkları

Aktivatör Oranları (EDC/NHS)	FUM KAPLAMA MİKTARI (mM)	FREKANS FARKI (ΔF)	STANDART HATA
400/100	1	13,53	2,3561
	2	37,67	1,4530
	3	24,47	0,9025
100/400	1	8,83	1,5899
	2	19,31	3,8375
	3	16,63	2,0664
400/400	1	14,90	2,5160
	2	30,35	4,3683
	3	22,75	1,5922

Her 3 konsantrasyonda değişen aktivatör denemeleri sonucunda en fazla frekans farkı EDC : NHS aktivatör oranının 4 : 1 olarak kullanılmasıyla elde edildi. Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm FUM immobilizasyonlarında EDC : NHS aktivatör oranı 4 : 1 olarak kullanılmaya devam edildi.

4.3.2. SAM Modifiye Yüzeyde FUM Kaplama Optimizasyonu

2 mM MUA kullanılarak elde edilmiş SAM yüzeyde immobilize edilecek FUM miktarının tayini için optimizasyon yapıldı. Bu amaçla yüzeyde 0,85mM, 1mM, 1,75mM, 2mM, 3 mM ve 3,5 mM FUM immobilizasyonları yapıldı. Elde edilen frekans farkları Şekil 4. 24'te gösterilmektedir.



Şekil 4. 24 FUM kaplama optimizasyonunda elde edilen sensör cevapları

Optimizasyonda artan miktarlarda FUM immobilize yüzeylere eşit şartlarda ve miktarda antikor uygulaması yapıldı. Saf anti FUM 8F4 (mAb) 0,1 mg/ml konsantrasyonunda kullanıldı. Elde edilen ortalama frekans farkları en fazla 1,75 mM FUM (ΔF 41,55 Hz) kaplama ile ve 2 mM (ΔF 32,20 Hz) FUM immobilize yüzeyden elde edildi. Sonuçlar, elde edilen frekans farklarının büyüklüğü, ölçümler arası tutarlık ve tekrarlanabilirlik açısından değerlendirildi. Tüm ölçümler 2'şer kristalde ve 5'er kez tekrarlandı.

Çizelge 4. 8 FUM kaplama miktarına bağlı ölçülen frekans farkları

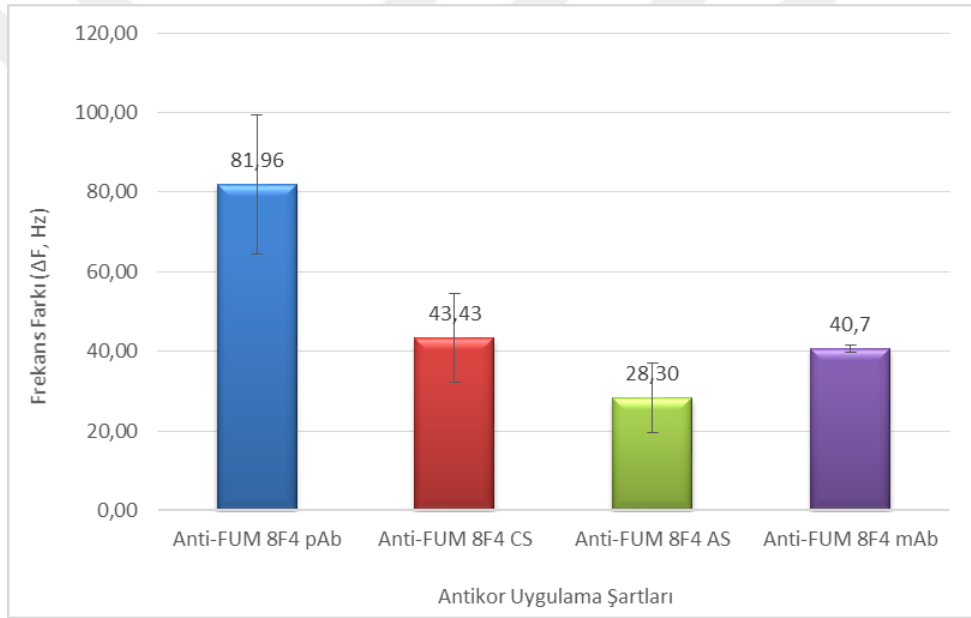
FUM KAPLAMA MİKTARI (mM)	FREKANS FARKI (ΔF ,HZ)	STANDART SAPMA	STANDART HATA
0,85	4,82	0,1947	0,0974
1	15,84	1,5833	0,7917
1,75	41,55	2,8823	2,0381
2	32,20	1,7320	1,2247
3	17,91	1,3056	0,6528
3,5	5,87	2,0314	1,0157

Tekrarlar arası tutarlığın 1,75 mM FUM kaplanmış yüzeyde daha az hata ile gerçekleştiği görüldü. Algılayıcı eleman olan anti FUM 8F4 antikorunun elde edilmesi sırasında içinde bulunduğu diğer koşullarda kullanılmasının ölçümler sırasındaki tekrarlanırlığa ve tutarlığa etkisi 1,75 mM FUM kaplı yüzeyde belirlendi. FUM algılanmasına yönelik çizilecek kalibrasyon eğrileri için yüksek frekans farkı ve yüksek

tutarlılıkta ölçümler yapılabildiği için 1,75 mM FUM ve 2 mM FUM immobilize yüzey kullanıldı.

4.3.3. Anti FUM 8F4 Uygulama Koşullarının Belirlenmesi

QCM yüzeyinde FUM kaplamalarının optimize edilmesinden sonra. Biyolojik algılayıcı olarak kullanılan anti FUM 8F4'ün sensör yüzeyine uygulama koşulları incelendi. Bu bağlamda, anti FUM 8F4 pAb, anti FUM 8F4 CS, anti FUM 8F4 AS ve anti FUM 8F4 mAb algılayıcı olarak kullanıldı ve 1,75 mM FUM immobilize yüzeye uygulandı. Anti FUM pAb 1/250 dilüsyonda kullanılırken anti FUM 8F4 CS. Anti FUM 8F4 AS ve anti FUM 8F4 mAb yaklaşık olarak 0,1 mg/ml konsantrasyonda kullanıldı.



Şekil 4. 25 Anti FUM 8F4 uygulaması ile elde edilen sensör cevapları

Anti FUM pAb ile yapılan ölçüm sonuçlarında 81,96 Hz ortalama frekans farkı elde edilmesine rağmen tekrarlanırlığın düşük olması nedeniyle uygulamada optimal şart olamayacağına karar verildi. Anti FUM 8F4 CS'nin biyolojik algılayıcı olarak kullanıldığı denemelerde ise ortalama frekans farkının 43,43 Hz'dir ancak tekrarlanırlıkta tutarsızlıklar yaşanmasından dolayı antikor kullanımında CS'nin uygun şartları sağlayamayacağına karar verildi. Anti FUM 8F4 AS ile yapılan ölçümlerde ortalama 28,30 Hz frekans farkı elde edildi ve diğer antikor şartları ile kıyaslandığında düşük miktarda frekans farkı yarattığı görüldü. Anti FUM 8F4 mAb ile yapılan ölçümlerde 40,7

Hz frekans farkı elde edildi ve yapılan ölçümler arası 0,96 standart hata elde edildi. Diğer antikor şartlarının kullanımında yaşanan tekrarlanırlık sorunu Anti FUM 8F4 mAb kullanılması ile bertaraf edildi.

Çizelge 4. 9 Antikor uygulama şartlarına bağlı elde edilen frekans farkları

Antikor Uygulama Şartları	Frekans Farkı (ΔF ,Hz)	Standart Sapma	Standart Hata
Anti FUM 8F4 pAb	81,96	46,2191	17,4692
Anti FUM 8F4 CS	43,43	19,3105	11,1489
Anti FUM 8F4 AS	28,30	17,6235	8,8117
Anti FUM 8F4 mAb	40,7	2,8823	0,9607

Benzer değerlerde frekans farkı elde edilen antikor kullanım şartları arasında, tutarlığın ve tekrarlanabilirliğin diğerlerinden daha fazla olmasından dolayı anti FUM 8F4 mAb'ın algılayıcı eleman olarak kullanılmasına karar verildi. İmmobilize FUM miktarının kalibrasyon eğrisine LOD değerlerine etkisi açısından irdelenmesi çalışmalarında 1,75 mM FUM immobilize ve yüksek tutarlıkta ölçümler elde edildiği için (32,20 Hz ve 1,2247 standart hata) 2 mM FUM immobilize yüzey de kullanıldı.

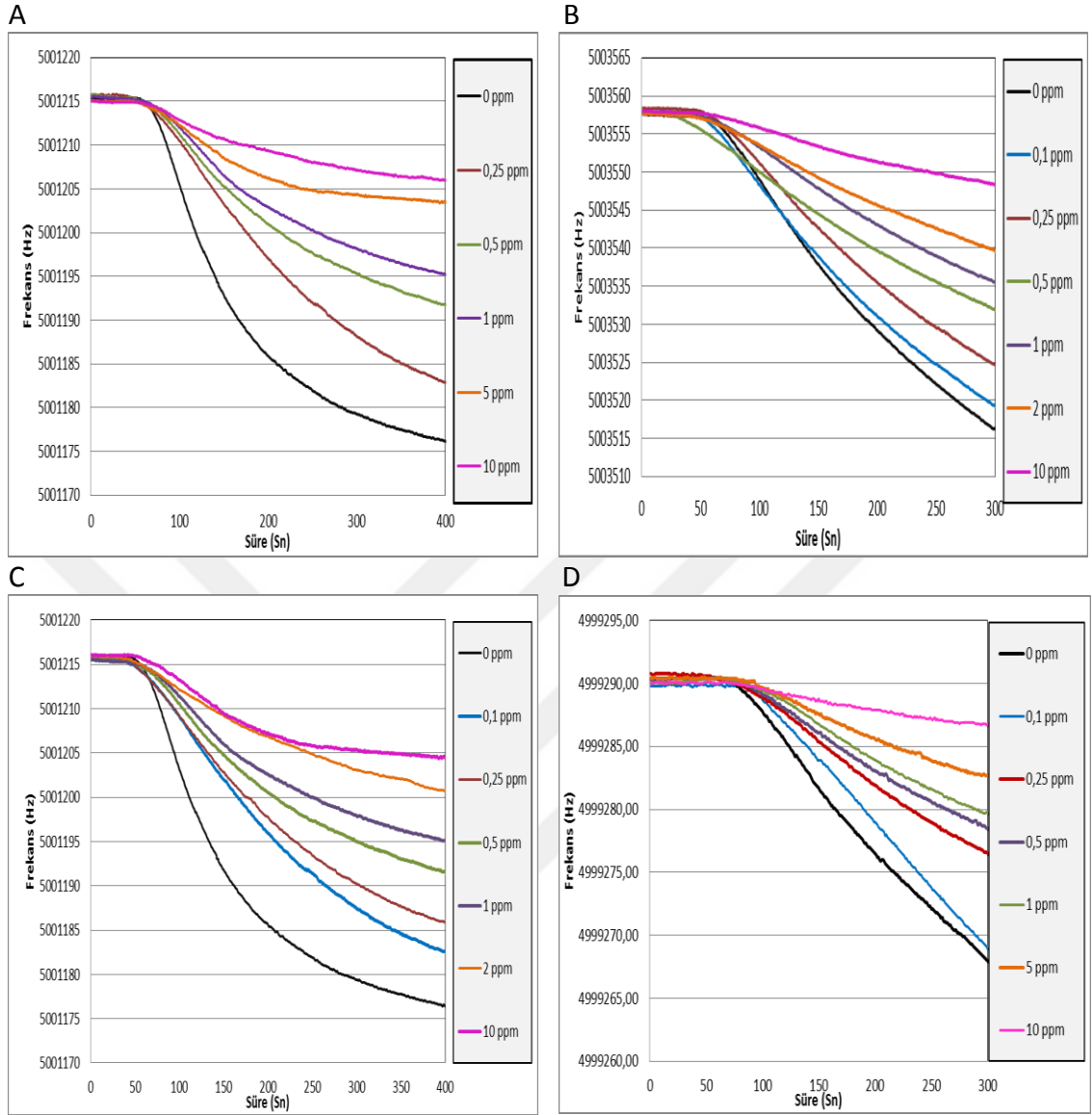
4.3.4. MUA ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM Algılanması

QCM ile FUM dedeksiyonuna yönelik immünosensör geliştirilmesi için inhibisyona dayalı kompetitif immünosensörler sistemi geliştirildi. FUM gibi moleküler ağırlığı küçük olan moleküllerin analizi için bu metot tercih edilmektedir. Doğrudan algılamaya dayalı tanıma yönteminin aksine, bu yöntemde analit konsantrasyonu artırıldığında cevap sinyali azalmaktadır.

Bu yöntemde küçük molekül ağırlıklı FUM molekülleri, sensörün elektroduna doğrudan immobilize edilmektedir ve biyolojik algılayıcı anti FUM 8F4'ün tek başına sensör yüzeyinde oluşturduğu frekans farkı belirlenmektedir. Daha sonra sabit anti FUM 8F4 miktarı ile toksinin değişen konsantrasyonları, ön inkübasyona tabi tutulur ve toksin immobilize sensör yüzeyine sırasıyla uygulanarak bir kalibrasyon eğrisi elde edilir. Böylece kalibrasyon eğrileri kullanılarak FUM içeriği bilinmeyen bir örnekte aynı analizin uygulanması ile içeriğindeki FUM miktarı tespit edilebilir.

Öncelikle yüksek frekans farkı elde edilmiş olan 1,75 mM ve 2 mM FUM immobilize yüzeylerde 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 mAb algılaması tekrarlandı. 1,75 mM FUM immobilize edilmiş MUA ile SAM kaplı yüzeyde 5 tekrarlı gerçekleştirilen ölçümlerin frekans farkı ortalamasının 44,33 Hz olduğu bir önceki bölümde gösterildi (Şekil 4. 26). Daha sonra 1,75 mM FUM immobilize yüzeyde 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 mAb ile 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm ve 10 ppm serbest FUM ile ön muamele edildi. FUM inkübasyonlu ölçümler arasında ön inkübasyonsuz ölçümler yapılarak sensörün anti FUM 8F4 mAb algılanmasının kontrolü ortalama 2 – 3 ölçüm arasında tekrarlandı. Toplamda 7 ölçüm gerçekleştirilmesinin ardından ortalama frekans farkının 40,7 Hz olduğu saptandı.

Biyolojik algılayıcı konsantrasyonunun MUA ile SAM yapılmış FUM immobilize yüzeyde hassasiyete etkisinin belirlenmesi için 0,05 mg/ml konsantrasyonda anti FUM 8F4 mAb ile ölçümler yapıldı. Bu amaçla 1,75 mM FUM immobilize yüzeylerde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 mAb algılaması tekrarlandı. Kontrol ölçümleri ile birlikte toplam 7 kez tekrarlanan ölçüm sonucunda sensör cevabı ortalama 41,55 Hz frekans farkında elde edildi. 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm ve 10 ppm serbest FUM ile ön muamele edilen anti FUM 8F4 mAb ile frekans farklarındaki değişimlerden kalibrasyon eğrileri çizildi. MUA ile SAM yapılmış yüzeyde 2 mM FUM immobilizasyonun hassasiyete etkisinin belirlenmesi için biyolojik algılayıcı olarak 0,05 mg/ml ve 0,1 mg/ml konsantrasyonda anti FUM 8F4 mAb kullanıldı. 2'şer kristalde yapılan ölçümler ara tekrarlar ile birlikte 7 kez tekrarlandı. 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 mAb kullanılması ile 41,8 Hz, 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 mAb kullanılması ile 32,32 Hz frekans farkı elde edildi. Her iki konsantrasyondaki anti FUM 8F4 mAb 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm ve 10 ppm serbest FUM ile ön muamele edilerek sensör yüzeyine uygulandı. Elde edilen frekans farkı azalmalarından kalibrasyon eğrileri elde edildi.

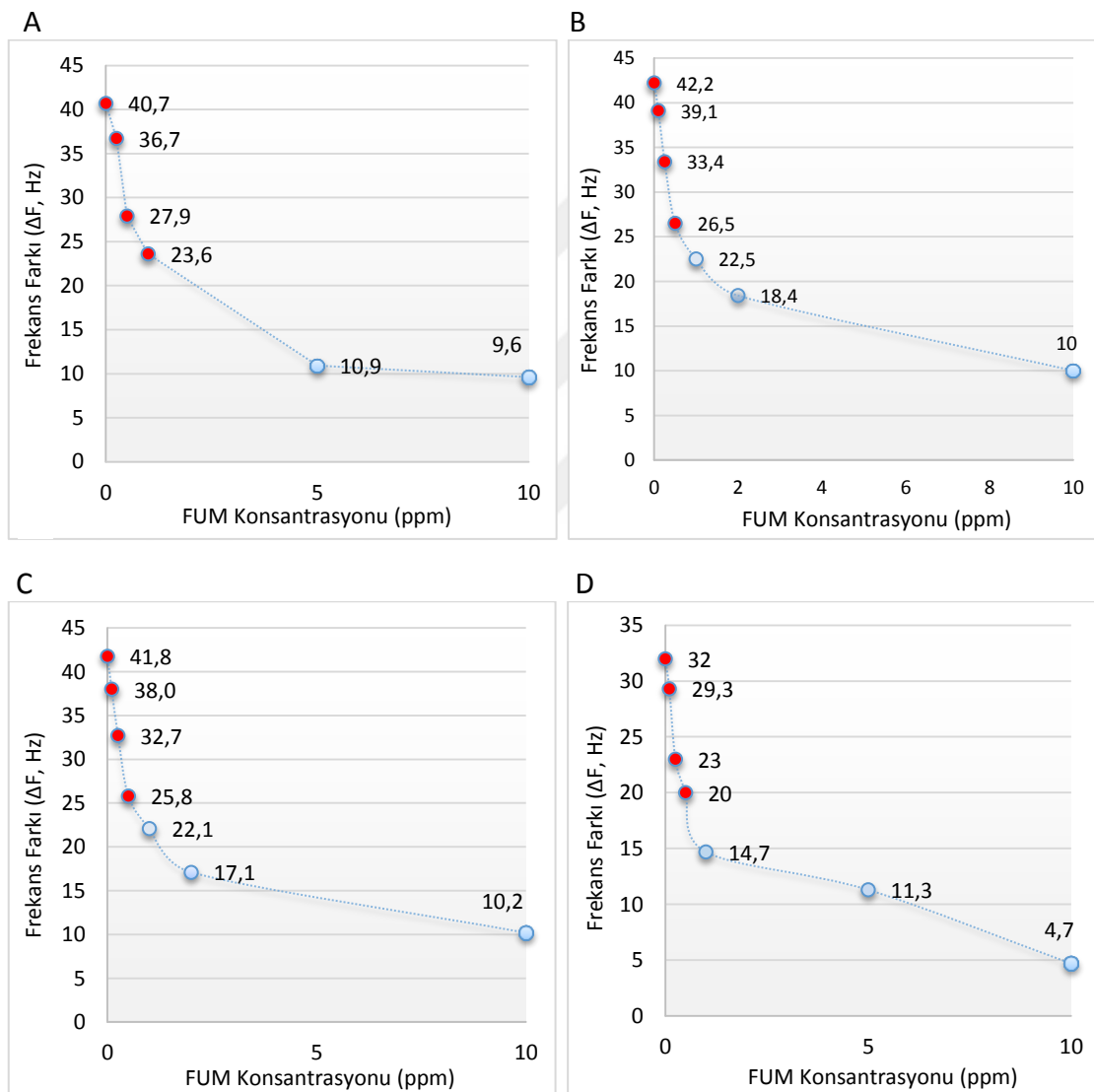


Şekil 4. 26 1,75 mM FUM immobilize yüzeyde A) 0,1 mg/ml B) 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ve 2 mM FUM immobilize yüzeyde C) 0,05 mg/ml D) 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 ile FUM konsantrasyonlarına bağlı sensör cevapları

İnkübasyonlar sensöre uygulanmadan 20 dakika önce gerçekleştirildi. 50 µl/dk akış hızında gerçekleştirilen analizlerde okuma süreleri toplam 5 dk sürmektedir. Rejenerasyon metodunun pratik olması toplam süresinin 5 dk sürmesinden dolayı bir analizin ortalama 10 dk'da tamamlandığı hesaplandı. Ölçümler arası uygulanan rejenerasyon metodu olarak; HPLC grade distile su 3 dakika süresince ve ardından 0,1 M Glisin tamponu (pH 2,7) 0,5 ml/dk akış hızında 1 dakika süresince uygulandı. Tampon değişimleri arasında kristalleşmeleri engellemek için 1 ml d.H₂O uygulaması yapıldı. Bu

metodla 28 kez kullanılabilirdi hesaplandı. Elde edilen frekans farklarının inkübe edilen FUM miktarına göre azalma yüzdeleri Çizelge 4. 10'de gösterilmektedir.

Bilinmeyen örnekte FUM miktarının tespitine olanak sağlamak için QCM sensörde yapılan ölçümlerden kalibrasyon eğrilerinin hazırlamak gereklidir. Bu amaçla, 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile yapılan bu deneyler 2'şer kristalde 2 defa tekrarlanarak frekans farkı değişimleri ile kalibrasyon eğrileri hazırlandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4. 27'da mevcuttur.



Şekil 4. 27 1,75 mM ve 2 mM FUM immobilize yüzeyde 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri (1,75 mM FUM immobilize yüzeyde a) 0,1 mg/ml b) 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ile ve; 2 mM FUM immobilize yüzeyde c) 0,05 mg/ml d) 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 ile hazırlandı

1,75 mM FUM kaplı yüzeyde 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 ile 10 ppm FUM inkübasyonunda 9,6 Hz frekans farkı elde edilerek toplam %23,1 oranında sinyal azalması oluşturmaktadır. Aynı yüzeyde 0,5 ppm inkübasyonla ise 27,9 Hz frekans farkı elde edilmektedir ve toplamda %68,55 oranında sinyal azalması oluşturmaktadır. 1,75 mM FUM kaplı yüzeyde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ile 10 ppm FUM inkübasyonunda 9,99 Hz frekans farkı elde edilerek toplam %24,04 oranında sinyal azalması oluşturmaktadır. Aynı yüzeyde 0,5 ppm inkübasyonla ise 26,5 Hz frekans farkı elde edilmektedir ve toplamda %63,77 oranında sinyal azalması oluşturmaktadır.

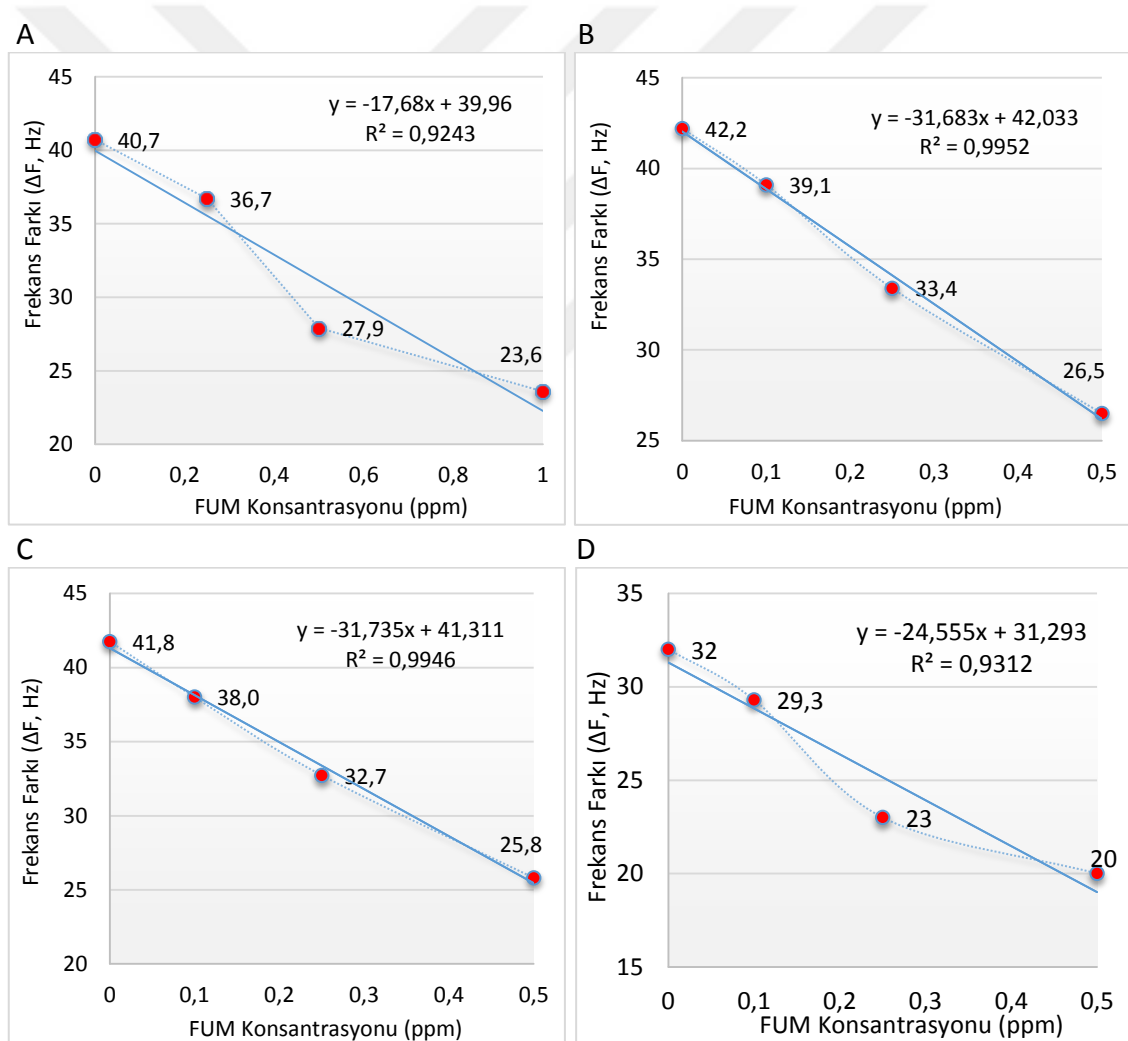
2mM FUM kaplı yüzeyde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ile 10 ppm FUM inkübasyonunda 10,2 Hz frekans farkı elde edilerek toplam %24,42 oranında sinyal azalması oluşturmakta, aynı yüzeyde 0,5 ppm inkübasyonla 25,8 Hz frekans farkı elde edildiği için %61,8 oranında sinyal azalması oluşturmaktadır. Aynı yüzeyde 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 ile 10 ppm FUM inkübasyonunda 4,7 Hz frekans farkı elde edilerek toplam %14,54 oranında sinyal azalması oluşturmaktadır. 0,5 ppm FUM inkübasyonu ile 20,1 Hz frekans farkı ve %61,88 oranında sinyalde azalma oluşmaktadır. Yüzde sinyal azalmalarında 20 kat FUM miktarının artışına rağmen aynı oranda sensörde sinyal azalması meydana gelmediği için 0,5-10 ppm FUM aralığında lineer bir bölge elde edilememektedir (Çizelge 4. 10).

Çizelge 4. 10 1,75 mM ve 2 mM FUM immobilize yüzeylerde artan FUM inkübasyonu ile oluşan frekans farkları ve sinyal azalma oranları

İmmobilize FUM Miktarı (mM)		1,75		1,75		2		2	
Anti FUM 8F4 (mg/ml)		0,1		0,05		0,05		0,1	
İnkübe FUM miktarı (ppm)	ΔF (Hz)	% Sinyal Azalması	ΔF (Hz)	% Sinyal Azalması	ΔF (Hz)	% Sinyal Azalması	ΔF (Hz)	% Sinyal Azalması	
0	40,7	100	41,55	100	41,8	100	32,32	100	
0,5	27,9	68,55	26,5	63,77	25,8	61,8	20,1	61,88	
10	9,6	23,1	9,99	24,04	10,2	24,43	4,7	14,54	

Bu veriler Şekil 4. 27'deki kalibrasyon eğrileri birlikte değerlendirildi. FUM konsantrasyonuna bağlı kalibrasyon eğrisinin alt sınırlarında daha az sensör algısı olduğu için frekans değişiminin fazla olmadığı sonucuna ulaşıldı. Yüksek FUM miktarında doygunluk meydana geldiği için anti FUM 8F4'ün bağlanma miktarı azalmaktadır ve kalibrasyon eğrisi doğrusallıktan uzaklaşmaktadır. Kalibrasyon eğrisinin 0-10 ppm aralığında hazırlanması regresyon katsayısını (R^2) düşüreceği için bu aralıkta ölçümlerde doğruluk azalacak, sensogramlar güvenilirlik sınırından çıkacaktır.

Kalibrasyon eğrilerinde tüm yüzeyler için lineer bölge 0-0,5 ppm FUM aralığında kalmaktadır. 0-0,5 ppm FUM inkübasyonu ile gerçekleştirilen ölçümlerden elde edilen frekans farkları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri Şekil 4. 28'de sunulmaktadır.



Şekil 4. 28 0-0,5 ppm FUM konsantrasyonlarının inkübasyonu ile oluşan frekans farklarından elde edilen kalibrasyon eğrileri. 1,75 mM FUM immobilize yüzeyde a) 0,1 mg/ml b) 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ve 2 mM FUM immobilize yüzeyde c) 0,05 mg/ml d) 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 ile hazırlandı.

0-0,5 ppm FUM inkübe sistemde doğrusal eğim çizgisinin eğimi ve korelasyon katsayıları hesaplandı. 1,75 mM FUM immobilize yüzeyde 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılmasıyla 0,9243 R², 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılmasıyla 0,9017 R² elde edildi. Ayrıca 2 mM FUM immobilize yüzeyde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılmasıyla 0,9946 R², 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılmasıyla 0,9099 R² değeri elde edildi. Evans'ın regresyon sayılar kılavuzu ve Pearson'nın korelasyon katsayıları ile güvenilirlik üzerine geliştirdiği kuramında, 0,9 değeri üzerindeki regresyon sayılarına sahip eğrilerde bağıntının çok kuvvetli olduğunu, bu sayının 1 değerine yaklaşması ile mutlak doğruya ulaşıldığını bildirmektedir. 2 mM MUA ile SAM yapılmış olan yüzeylerde gerçekleştirilen 4 farklı kombinasyonu uygulamanın hepsinde 0-0,5 ppm aralığında elde edilen kalibrasyon eğrilerinin hepsinde kuvvetli bağıntı mevcuttur. Regresyon katsayılarının birbirlerine yakındır ancak aralarında 1 değerine en yakın olan 1,75 mM FUM immobilize yüzeyde 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılması ile elde edildi.

Kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemden yararlanarak en düşük limit değerleri (LOD) hesaplandı. LOD hesaplamak için "standart hata x sabit değer / eğim" formülü kullanıldı (sabit değer 2). Çizelge 4. 11'de her bir deney koşulunda ölçülen anti FUM 8F4 algılamalarının ortalama frekans farkı ve hesaplanan standart hatalar belirtilmektedir. Ölçümler her bir koşulda ortalama 7 kez 2 farklı kristalde gerçekleştirildi. Eğim değerleri 0- 0,5 ppm FUM inkübasyonu ile oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin denkleminde elde edildi. Kantitatif ölçüm sınır (Limit of Quantitative Measurement, LOQ) değerinin hesaplanması için aynı formülde sabit değer 6 olarak kullanıldı.

Çizelge 4. 11 1,75 mM ve 2 mM FUM immobilize yüzeyde 0,05 mg/ml ve 0,1 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılması ile elde edilen LOD ve LOQ değerleri

İmmobilize FUM Miktarı (mM)	Anti FUM 8F4 (mg/ml)	Standart Sapma (SD)	Eğim	Korelasyon Katsayısı	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
1,75	0,1	5,1945	17,68	0,9243	0,588	1,764
1,75	0,05	2,8823	31,683	0,9952	0,182	0,546
2	0,05	1,7320	31,735	0,9946	0,109	0,327
2	0,1	2,1312	24,555	0,9312	0,174	0,522

2 mM MUA ile SAM oluşturulmuş olan yüzeyde 1,75 mM FUM ve 2 mM FUM immobilize yüzeylerde gerçekleştirilen kalibrasyon eğrilerinden deteksiyon limiti en hassas olan 2 mM FUM immobilize yüzeyde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4'ün kullanılması ile elde edildi. Korelasyon katsayıları göz önünde bulundurulduğunda, mutlak doğruya en yakın değerler 1,75 mM ve 2 mM FUM immobilize yüzeyde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılması ile elde edildi. Bu sonuçlara göre FUM immünoensörünü geliştirilmesi çalışmalarında kullanılan anti FUM 8F4 miktarının 0,05 mg/ml kullanılması ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin güvenilirliği daha fazladır. Bu sonuçlar değerlendirilerek, immobilizasyon etkinliğini arttırmaya yönelik yapılan çalışmalarda 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılmasının daha uygun olduğu görüldü.

LOD değeri bir sensörün hassasiyetinin en önemli göstergesi olarak kabul edilmektedir. Sensör en düşük olarak LOD değerinde analit tanıma kapasitesindedir. Ancak Analitin miktarının belirlenmesi için LOQ değerlerinin de bilinmesi gereklidir. LOQ değeri altında analiti tanıyamayan sensörlerde kalitatif analiz gerçekleştirilemez. Dolayısıyla bir sensörün analiti tanıyabileceği miktarın saptanması için sensörün mutlaka LOQ değeri belirlenmiş olmalıdır.

Yapılan çalışmada LOD değerleri arasında fazla fark olmamasına rağmen analiz edilecek FUM'nin kalibrasyon eğrisinden miktar analizinin gerçekleştirilmesinde seçilecek yöntem için LOQ değerinin de incelenmesi gerekmektedir. LOQ değerleri kalibrasyon eğrisinde içinde kalan tek sonuç 2 mM FUM immobilize yüzeyde anti FUM 8F4 miktarının 0,05 mg/ml kullanılması ile elde edildi (0,327 ppm). Sonuç olarak 2 mM MUA ile SAM oluşturulan yüzeyde FUM analizi için kullanılabilir method olarak bu yöntem belirlendi.

SAM oluşturan diğer lineer ajanların kullanılması ile FUM immobilizasyon etkinlikleri tekrar irdelendi. MUA ile SAM oluşturulduğunda yapılan aminleme reaksiyonundan reaksiyon veriminden gelebilecek hataları ve bu hatalardan kaynaklı hesaplanacak LOD değerlerinin hassasiyetinin arttırılabilmesi için alternatif olarak 11-Mercaptoundecanamide (MUD) kullanıldı. Bir diğer yandan hidroksi gruplarının yüzey immobilizasyonunda etkilerini de görebilmek için 11-Mercapto-1-undecanol (MUO) kullanıldı.

4.3.5. İmmobilizasyon Etkinliklerinin Arttırılmasında Alternatif Lineer Moleküller ile SAM Oluşturulması

Analit immobilizasyonunda SAM oluşturmak için kullanılan MUA ajanının modifikasyonunda EDA kullanılmaktadır. Ancak, FUM immobilizasyonu bu modifikasyon basamağının veriminden etkilenmektedir.

İnkübasyon ile gerçekleştirildiği için modifikasyonda gerçekleştirilen aminasyon yüzeyin her bölgesinde eşit olmama riski taşımaktadır. Çünkü MUA ile SAM oluşurken uzun alkan zincirleri arasında Van Der Waals etkileşimleri meydana gelerek kristal yapıya benzer bir yapı oluştururlar. Bu sırada polar uç gruplar (-COOH) arasında da dipol etkileşimler meydana gelmektedir. Ancak bu yapının modifikasyon sırasında etkileşimlerinin bozulmaması ve modifikasyon veriminin yüksek olması gerekmektedir. Tez çalışması kapsamında altın yüzeylerde SAM oluşturmak için 11-Mercaptoundecanamide (MUD) kullanılmasıyla SAM yapının amin grupları ihtiva etmesi sağlandı. MUD sahip olduğu amin gruplarında azot ve hidrojen arasındaki elektronegativite farkından ($3,0 - 2,1 = 0,9$) dolayı polar kısımlardır ve SAM oluşturma eğilimi gösterirler.

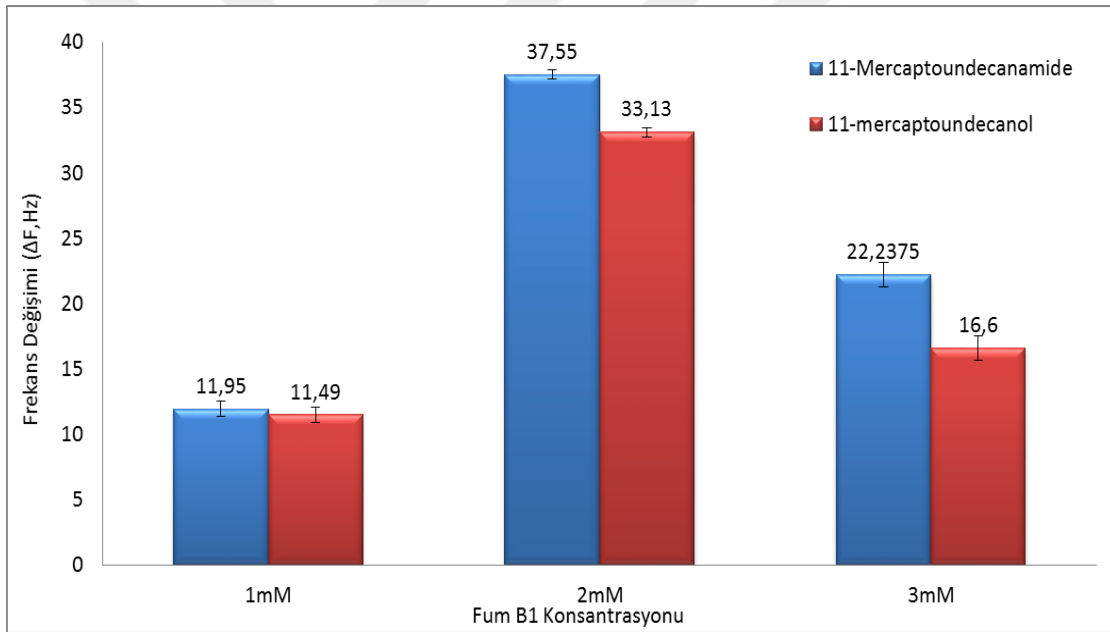
MUA ile SAM oluşturulmasında kristaller arası tutarsızlıklar yaşanabilmektedir. MUD kullanılması ile modifikasyon basamağının azaltılması sağlanarak tutarsızlıkların azaltılması üzerine çalışmalar tez kapsamında yapıldı. Böylece ölçümlerde standart hata ve standart sapmalar azaltılarak, sensör hassasiyetinin arttırılması üzerine çalışmalar yapıldı.

Bir diğer yandan sensör yüzeyinde MUA ile sam oluşturulduğunda aktif amin ve karboksil gruplarının kapatılması için kimyasal bloklama işlemleri yapılmaktadır. Ancak bu kimyasal bloklama işlemi analit kaplama protokolünü uzakmaktadır. 11-Mercaptoundecanol (MUO) kullanılmasıyla yüzeyde hidroksi (-OH) grupları oluşturuldu ve bloklama işlemlerine gerek olmadan immobilizasyonların gerçekleştirildi. Bu kapsamda gerçekleştirilen MUA ve MUO ile sam oluşturulmasında MUA ile yüksek etkinliğin elde edildiği 2 mM kaplamaların kullanılmasına devam edildi. Daha sonra EDC: NHS (4:1) oranında aktivatör kullanılarak FUM immobilizasyonunda optimizasyon

çalışması yapıldı. 2 mM SAM oluşturulmuş olan kristal yüzeylerinde 1 mM, 2 mM ve 3 mM FUM immobilizasyonları MUA ve MUD için gerçekleştirildi. Algılayıcının 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılarak frekans farkları belirlendi ve böylece FUM kaplama koşulları optimize edildi.

4.3.5.1. MUD ve MUO ile SAM Yüzeyde FUM Kaplama Optimizasyonu

2 mM MUD ve 2 mM MUO kullanılarak elde edilmiş SAM yüzeylerde immobilize edilecek FUM miktarının tayini için optimizasyon işlemi yapıldı. Bu amaçla yüzeyde 1mM, 2mM ve 3 mM FUM immobilizasyonları yapıldı. İmmobilizasyon sonrası 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 uygulaması 2 şer kristalde 5'er tekrarlandı. Elde edilmiş olan frekans farklarının değişimi bir arada Şekil 4. 29'de grafikte sunulmaktadır.



Şekil 4. 29 MUD ve MUO ile SAM oluşturulmuş yüzeylerde FUM kaplama optimizasyonu

Optimizasyonda 1 mM , 2 mM ve 3 mM FUM immobilize yüzeylere eşit şartlarda ve 0,05 mg/ml konsantrasyonda antikor uygulaması yapıldı. MUD ile SAM oluşturulmuş yüzeyde elde edilen ortalama frekans farkları en fazla 2mM FUM (ΔF 37,55 Hz) kaplama ile elde edildi. Benzer şekilde MUO ile SAM oluşturulmuş olan yüzeyde de en fazla ortalama frekans farkları en fazla 2mM FUM (ΔF 33,13 Hz) kaplama ile elde edildi.

Elde edilen frekans farkları, ölçümler arası standart hata ve standart sapmalar Çizelge 4. 12’de sunulmaktadır.

Çizelge 4. 12 MUD ve MUO ile SAM oluşturulmuş kristallerde FUM kaplama optimizasyonuna ait frekans farkları

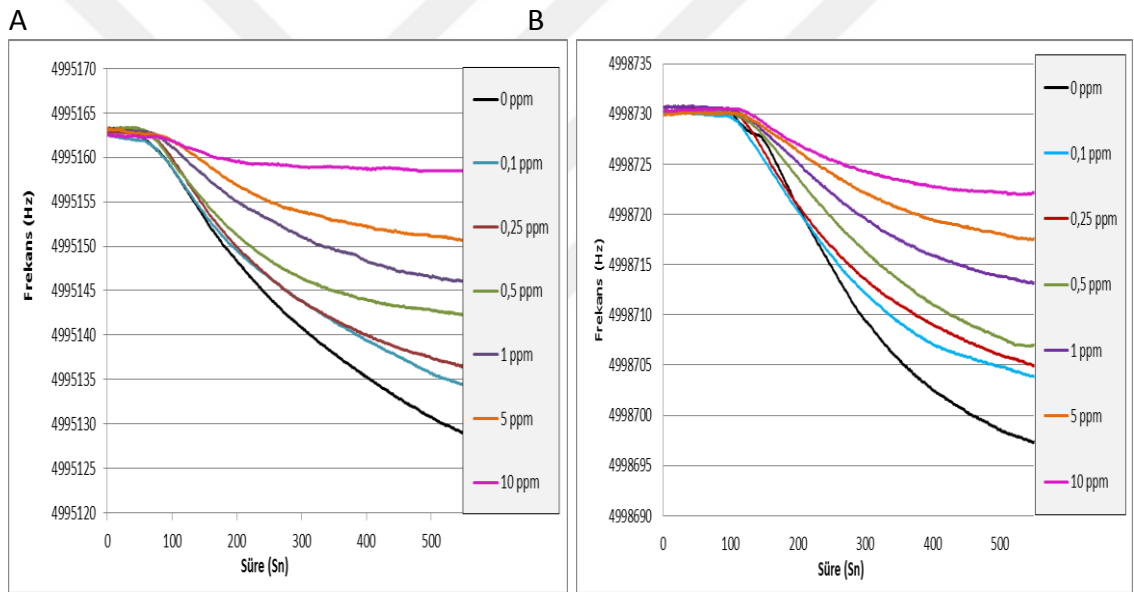
SAM Ajanı	FUM Kaplama Miktarı (mM)	Frekans Farkı (ΔF ,Hz)	Standart Sapma	Standart Hata
MUD	1	15,84	1,763992	0,55782
	2	37,55	1,023998	0,36204
	3	17,91	2,656495	0,93921
MUO	1	9,51	1,285485	0,37109
	2	33,13	1,276994	0,57352
	3	22,1	2,603843	0,82341

Sonuçlar, elde edilen frekans farklarının büyüklüğü, ölçümler arası tutarlık ve tekrarlanabilirlik açısından değerlendirildi, Standart hatanın az olması kristal içi ve kristaller arası ölçümlerde tutarlığın daha yüksek olduğunun bir göstergesidir. Dolayısıyla standart hataların az olmasından dolayı MUD ve MUO ile SAM oluşturulmuş olan yüzeylerde 2 mM anti FUM 8F4 ile kaplama yapılarak yarışimli sistemlerde kullanıldı. Aynı zamanda standart sapma değeri kalibrasyon eğrilerinden sistemin LOD değerinin hesaplanmasında kullanılacak önemli bir veridir. Bir kristalde yapılan ölçümler arası standart sapmanın düşük olması tutarlılığın yüksek olduğunu göstermekte aynı zamanda hassasiyetin önemli bir unsuru olmaktadır.

Hem MUD hem de MUO ile SAM yapılmış olan yüzeylerde tekrarlar arası tutarlığın 2 mM FUM kaplanmış yüzeyde ölçümlerin daha az sapma ile gerçekleştiği görüldü, FUM algılanmasına yönelik çizilecek kalibrasyon eğrileri için yüksek frekans farkı ve yüksek tutarlılıkta ölçümler yapılabilirdi için 2 mM FUM immobilize yüzeyler her iki immobilizasyon yönteminde de tercih edildi.

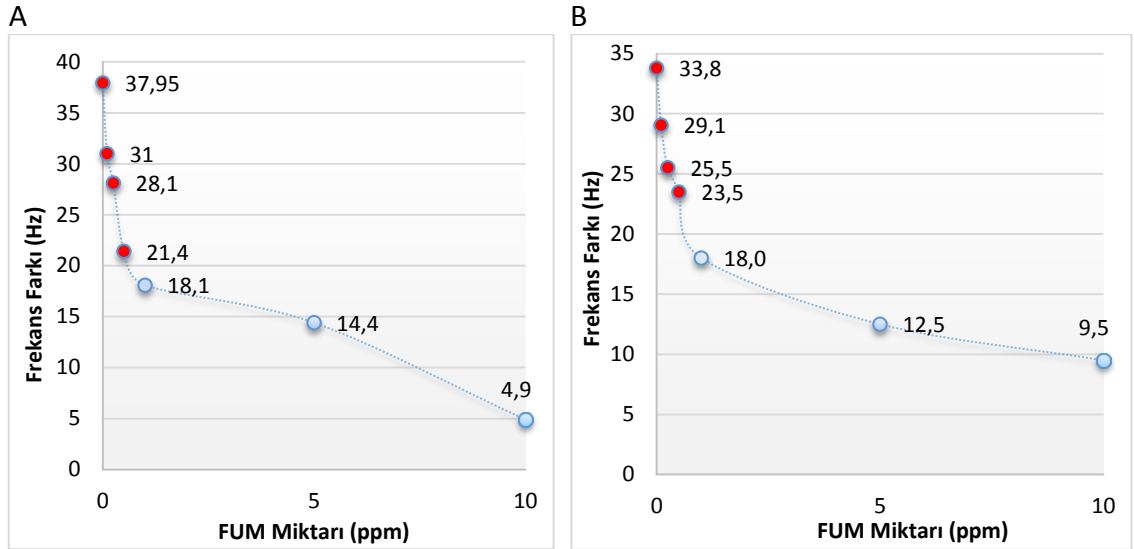
QCM ile FUM dedeksiyonuna yönelik immünosensörlerde farklı immobilizasyon teknikleri için de inhibisyona dayalı kompetitif sistem dizayn edildi. Sensörün en önemli ölçüm parametresi olan LOD değerlerinin immobilizasyon tekniklerinin değiştirilmesi ile daha hassas değerlerde elde edilmesi amaçlandı. Sonuçların karşılaştırmalı olarak değerlendirilebilmesi için inhibisyon testlerinde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4

konsantrasyonda biyolojik algılayıcı 250 µl içinde 50 µl/dk akış hızı ile uygulandı. Böylece immobilizasyon yönteminde SAM ajanı olarak MUD ve MUO kullanılması ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon sayıları ve frekans farkları arası korelasyonlar değerlendirildi. MUD ile SAM yapılmış yüzeyde 2 mM FUM immobilizasyonun ardından biyolojik algılayıcı olan 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 mAb'nin toplam 5 kez uygulanması ile 37,55 Hz frekans farkı elde edildi. MUO ile SAM yapılmış yüzeyde ise aynı şartlarda yapılan ölçümlerin ortalaması 33,18 Hz olarak hesaplandı. Her iki yüzey kaplaması için de 0,05 mg/ml konsantrasyondaki anti FUM 8F4 mAb içinde 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm ve 10 ppm FUM ön muamele edilerek sensör yüzeyine uygulandı. Elde edilen frekans farkı azalmalarından kalibrasyon eğrileri elde edildi. Cihaz tepkilerinin verileri Şekil 4. 30'da sunulmaktadır.



Şekil 4. 30 A) MUA ve B) MUD ile SAM yapılmış yüzeylerde; artan FUM konsantrasyonlarına bağlı sensör cevapları

Ölçümler arası uygulanan rejenerasyon metodu olarak; HPLC grade distile su 3 dakika süresince ve ardından 0,1 M Glisin tamponu (pH 2,7) 0,5 ml/dk akış hızında 1 dakika süresince uygulandı. Tampon değişimleri arasında kristalleşmeleri engellemek için 1 ml d₂O uygulaması yapıldı. Bu metod ile kristalin 26 kez kullanılabilirdiği hesaplandı. Sensör cevaplarından elde edilen frekans farkları ortalaması ile FUM konsantrasyonları arasında kalibrasyon eğrileri hazırlandı.



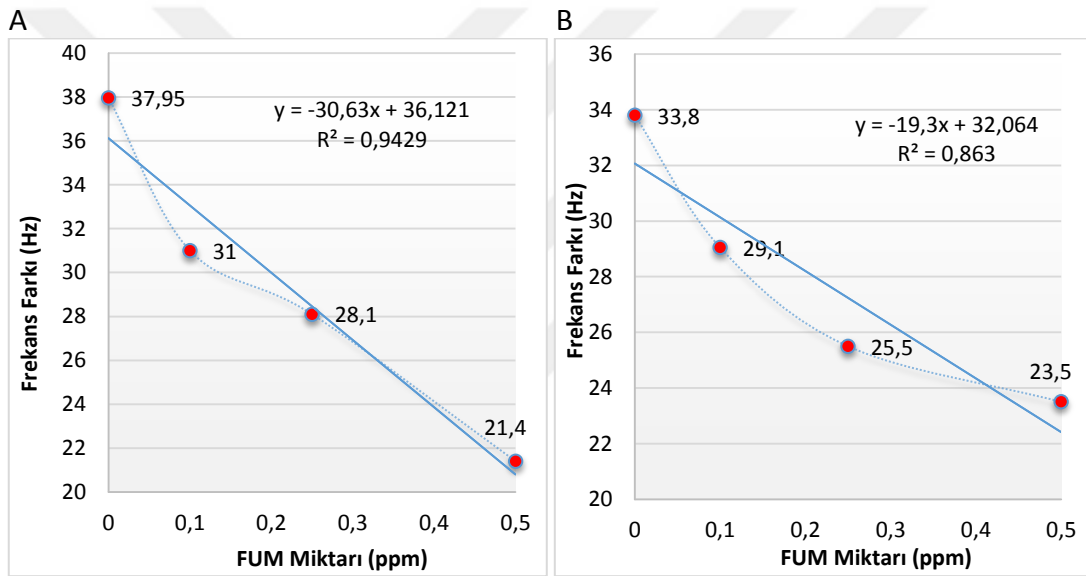
Şekil 4. 31 A) MUD, B) MUO ile SAM oluşturulmuş yüzeylerde 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri

MUD ile SAM yapılmış olan yüzeyde 10 ppm FUM inkübasyonu ile 4,9 Hz frekans farkı elde edilerek toplam %13,07 oranında sinyal azalması oluşturmaktadır. Aynı yüzeyde 0,5 ppm inkübasyonla ise 21,4 Hz frekans farkı elde edilmektedir ve toplamda %57,07 oranında sinyal azalması oluşturmaktadır. MUA ile SAM yapılmış olan yüzeyde ise 10 ppm FUM inkübasyonu ile 9,5 Hz frekans farkı elde edilerek toplam %25,3 oranında sinyal azalması oluşturmaktadır. Aynı yüzeyde 0,5 ppm inkübasyonla ise 23,5 Hz frekans farkı elde edilerek toplam % 62,7 oranında sinyal azalması oluşturmaktadır. İki SAM ajanı kıyaslandığında MUD ile oluşturulan yüzeyde elde edilen frekans farkları daha yüksektir.

Çizelge 4. 13 MUD ve MUO ile SAM oluşturulmuş yüzeylerde artan FUM inkübasyonu ile oluşan frekans farkları ve sinyal azalma oranları

FUM miktarı (ppm)	MUD		MUO	
	ΔF (Hz)	% Sinyal Azalması	ΔF (Hz)	% Sinyal Azalması
0	37,95	100	33,8	100
0,5	21,4	57,07	23,5	62,7
10	4,9	13,07	9,5	25,3

Çizelge 4. 13'e göre FUM konsantrasyonuna bağlı kalibrasyon eğrisinin alt sınırlarında daha az sensör algısı olduğu için frekans farklarının değişimi az olmaktadır. 0,5 ppm'den daha yüksek FUM miktarında yavaş yavaş doygunluk meydana gelmektedir. Bu sebeple anti FUM 8F4'ün bağlanma miktarı azalmakta ve kalibrasyon eğrisi doğrusallıktan uzaklaşmaktadır. Doğrusallıktan uzaklaşma sonucu grafiği bu aralıkta regresyon katsayısını (R^2) düşüreceği için ölçümlerde doğruluk azalacak, sensogramlar güvenilirlik sınırından çıkacaktır. Kalibrasyon eğrilerinde tüm yüzeyler için lineer bölge MUA ile SAM oluşturulduğundaki gibi 0-0,5 ppm FUM aralığında kalmaktadır. 0-0,5 ppm FUM inkübasyonu ile gerçekleştirilen ölçümlerden elde edilen frekans farkları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri Şekil 4. 32'de sunulmaktadır.



Şekil 4. 32 A) MUD ve B) MUO ile SAM oluşturulmuş yüzeylerde 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri

0-0,5 ppm FUM inkübe sistemde doğrusal denklemden eğim ve korelasyon katsayıları hesaplandı. MUD ile SAM hazırlanan yüzeyde 0,9429 R^2 , MUO ile SAM hazırlanan yüzeyde 0,863 R^2 elde edildi. Evans'ın regresyon sayıları ve korelasyonlar hakkındaki kılavuzuna göre, 0,9429 değeri ile MUD ile SAM yapılan yüzeydeki ölçümler arasında bağıntının çok kuvvetli olduğu ve mutlak doğruya yakın kalibrasyon eğrisi elde edilebildiği söylenebilmektedir. Ancak MUO ile SAM yapılmış olan yüzeyde regresyon katsayısı 0,9'un altına düşmektedir. Evans'ın kılavuzu, 0,9'un altındaki regresyon değerini 0,7'ye kadar "kuvvetli bağıntılı" olarak tanımlasa da biyosensörlerde güvenilirlik açısından yeterli aralıkta kabul edilememektedir.

Kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklem vasıtasıyla LOD ve LOQ değerleri MUD ve MUO ile SAM yapılmış yüzeyler için hesaplandı. LOD ve LOQ değerlerini hesaplamak için “standart hata x sabit değer / eğim” formülü kullanıldı. Sabit değerler gürültüden kaynaklı hata paylarını minimize etmek için LOD değerini hesaplarken 2, LOQ değerini hesaplarken 6 olarak kullanıldı. Çizelge 4. 14’de her bir deney koşulunda ölçülen anti FUM 8F4 algılamalarının ortalama frekans farkı ve hesaplanan standart hatalar belirtilmektedir. Ölçümler her bir koşulda ortalama 5 kez 2 farklı kristalde gerçekleştirildi. Eğim değerleri 0- 0,5 ppm FUM inkübasyonu ile oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin denkleminde elde edildi.

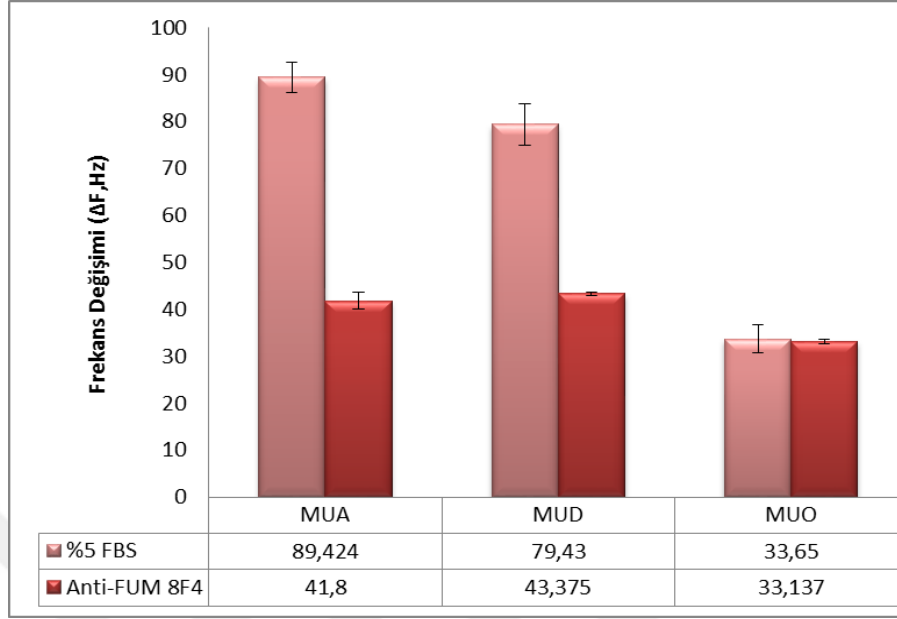
Çizelge 4. 14 MUD ve MUO ile SAM oluşturulmuş olan yüzeylerde hesaplanan LOD ve LOQ değerleri (0-0,5 ppm aralığında FUM inkübasyonu)

SAM Ajanı	ΔF (Hz)	Standart Sapma (SD)	Eğim	Korelasyon Katsayısı	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
MUD	37,95	1,023998	30,63	0,9429	0,0669	0,2007
MUO	33,8	1,276994	19,3	0,863	0,1323	0,3969

MUD ve MUO ile SAM yapılmış yüzeylerde FUM kaplaması sonrasında gerçekleştirilen FUM dedeksiyonlarında elde edilen frekans farklarından yararlanılarak kalibrasyon eğrileri çizildi. Bu kalibrasyon eğrileri vasıtasıyla hesaplanan LOD değerleri MUD ile SAM yapılmış yüzeyde 0,132 ppm elde edilirken MUO ile SAM yapılmış olan yüzeyde 0,067 ppm elde edildi. Bu değerlere göre MUD ile SAM oluşturulduğunda daha hassas bir dedeksiyon limitine ulaşıldı. Her iki yüzey kıyaslandığında MUD ile SAM yapılan yüzey ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin güvenilirliği daha fazladır. Aynı şartların kullanıldığı MUA ile SAM yapılan yüzey ile karşılaştırıldığında ise MUA ile SAM yapılan yüzeyde LOD değeri 0,109 ppm elde edilmişti. 3 farklı SAM ajanı arasında da MUD ile SAM oluşturularak en hassas dedeksiyon limitine ulaşıldığı görüldü.

FUM miktarının geliştirilen immüno-sensörde kalitatif olarak saptanmasında önemli bir dedeksiyon limiti olan LOQ değerleri de MUD ve MUO ile SAM yapılmış yüzeylerde değerlendirildi. Her iki yüzeyde de LOQ değerleri kalibrasyon eğrisi içindedir. Ancak daha hassas olan değer (0,201 ppm) MUD ile SAM oluşturulan yüzeyde elde edildi.

Yapılan çalışmalarda MUO ile SAM oluşturulmasından kazanılan fayda ise işlemler sırasında FBS bloklamaya ihtiyacın ortadan kalkması yönünde oldu.



Şekil 4. 33 MUA, MUD ve MUO ile SAM yapılan yüzeylerde anti FUM 8F4 ve %5 FBS bloklaması ile elde edilen frekans farkları

MUA ile SAM yapılan yüzeyde ölçümlerden önce yapılan FBS bloklama ile alınan sonuçların frekans farkı ortalaması 89,4 Hz oldu. MUD ile yapılan SAM yüzeyde ise bloklama sinyalleri ortalaması 79,43 Hz olarak hesaplandı. Ancak MUO ile SAM yapıldığında FBS bloklamasında frekans farkları 33,65 Hz olarak hesaplandı ve bu sonuçlara göre MUO ile SAM yapılan yüzeylerde bloklama işlemine gerek duyulmadığı sonucuna ulaşıldı (Şekil 4. 33). Bu sonuçlara göre FBS bloklama yapılmadan MUO yüzeyde ölçümler tekrarlandı ve frekans farklarında herhangi bir sapma olmadığı görüldü. Ancak MUD ve MUA ile yapılan ölçümlerde FBS uygulaması yapılmadığında anti FUM 8F4 uygulamasında spesifik olmayan bağlanmaların yaşandığı gözlemlendi.

MUO ile SAM oluşturulan yüzeylerden elde edilen veriler dendron çalışmaları için de önemli kazanımlar sağladı. Hidroksi gruplarının aktivasyonunda izlenecek protokol MUO ile SAM oluşturma sırasında belirlendi. Dendronların kullanılması için karbonil diimidazol (CDI) aktivasyonları için de önemli kazanımlar sağlandı.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, lineer SAM ajanları ve dendronların ortak kullanılmasıyla gerçekleştirilen 2 katlı SAM sistemlerinde lineer ajan olarak MUD kullanılmasının daha hassas deteksiyon limitlerinin elde edileceği sonucuna ulaşıldı.

4.3.6. FUM İmmünoensörü Geliştirilmesinde İmmobilizasyon Etkinliklerinin Dendronlar ile Arttırılması

Yüzeyde kullanılan dendrimer veya dendron bağlayıcı sistemlerin yüksek immobilizasyon etkinliğine ve tekrarlanan rejenerasyon döngüleri sırasında kayda değer yüksek stabiliteye yol açtığı bilinmektedir. Kimyasal olarak hazırlanmış dendrimerler veya dendronlar kullanılarak altın filmler üzerinde proteinlerin ve DNA'nın çok adımlı immobilizasyonu sağlanarak protein bağlama kapasitesinin arttırıldığı da bilinmektedir.

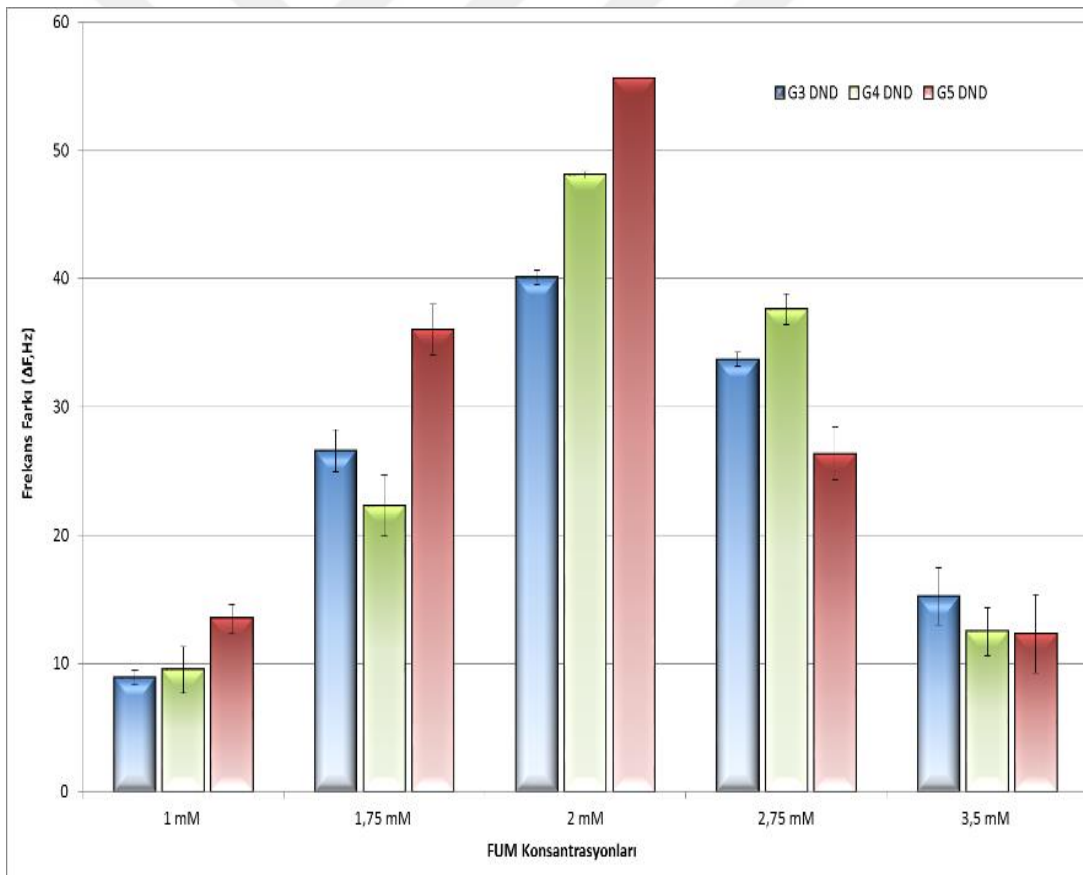
Dendronlar ve dendrimerler kendilerine has geometrileri, stabiliteleri ve yüksek yüzey işlevsellikleri sayesinde immobilize moleküllerin yoğunluğu, moleküller arası boşlukları ve genel reseptör tabakasının kalınlığı üzerinde daha iyi kontrol sağlamaktadır. Tez çalışmasında, dendron yüzey tabakaları oluşturarak yüzeyin zenginleştirilmesi üzerine çalışmalar geliştirildi. Kullanılan dendronların dendrimerlere göre avantajı, yapısında bulunan tiyol (-SH) grubu sayesinde altın yüzeyde kuvvetli bağlanma yapmasıdır. Böylece immobilizasyon etkinlikleri değerlendirilerek verimli ve oldukça hassas FUM dedeksiyonu yapabilen QCM immünoensörü geliştirildi. Tez çalışmasında lineer moleküllerde elde edilen ölçüm hassasiyetlerinin geliştirilebilmesi için yüzeyde immobilizasyonlar için dendron yapılar kullanıldı.

Bu amaçla, Polyester-8-hidroksi-1-asetilen bis-MPA dendron (3, jenerasyon dendron (G3 DND)), Polyester-16-hidroksi-1-asetilen bis-MPA dendron (4, jenerasyon dendron (G4 DND)), Polyester-32-hidroksi-1-asetilen bis-MPA dendron (5, jenerasyon dendron (G5 DND)) ile QCM altın yüzeyde kendiliğinden oluşan tabakalar hazırlandı. Daha sonra FUM immobilizasyonunda optimizasyonlar gerçekleştirildi. Belirlenen konsantrasyondaki FUM immobilizasyonları sonrasında FUM inhibisyonlu immünoassay ile algılama yapıldı. Böylece G3 DND, G4 DND ve G5 DND dendronlarının sensör yüzeylerinin antikor bağlama kapasiteleri belirlendi. Dendronların kullanımı ile

yüze immobilizasyonunda standardizasyonun artışı, ölçümler arası tutarlık ve kristaller arası ölçüm tutarlığı standart hata ve standart sapma değerleri kullanılarak irdelendi.

4.3.6.1. Dendronlar ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM Kaplama Optimizasyonu

2 mM MUA kullanılarak elde edilmiş SAM yüzeyde immobilize edilecek FUM miktarının tayini için optimizasyon yapıldı. Bu amaçla yüzeyde 1mM, 1,75mM, 2mM, 2,75 mM ve 3,5 mM FUM immobilizasyonları yapıldı. Sonuçlar, elde edilen frekans farklarının büyüklüğü, ölçümler arası tutarlık ve tekrarlanabilirlik açısından değerlendirildi. Tüm ölçümler 2'şer kristalde ve 5'er kez tekrarlandı. Elde edilen frekans farkları Şekil 4. 34'de gösterilmektedir. Optimizasyonda artan miktarlarda FUM immobilize yüzeylere eşit şartlarda ve miktarda antikor uygulaması yapıldı. Saf anti FUM 8F4 (mAb) 0,1 mg/ml konsantrasyonda kullanıldı.



Şekil 4. 34 Dendron yüzeylerde FUM kaplama optimizasyonuna ait ortalama frekans farkları

Çizelge 4. 15 Dendron yüzeylerde FUM kaplama miktarına bağlı ölçülen frekans farkları

FUM Kaplama Miktarı(mM)	DENDRONLAR			Standart Hata		
	G3 DND	G4 DND	G5 DND	G3 DND	G4 DND	G5 DND
1	8,90	9,50	13,50	0,556	1,784	1,095
1,75	26,59	22,30	36,03	1,618	2,402	1,977
2	40,07	48,06	55,65	0,968	0,750	0,690
2,75	33,70	37,62	26,35	1,539	1,193	2,052
3,5	15,25	12,50	12,30	2,220	1,871	3,051

Elde edilen frekans farkları Çizelge 4. 15’da görüldüğü üzere en yüksek değerde 2 mM FUM immobilizasyonu ile sağlanmaktadır (G3 DND ile 40,07Hz, G4 DND ile 48,06Hz, G5 DND ile 55,65Hz). Ölçümler arası tutarlılık, dendronlar ile immobilizasyonda (2 mM FUM kaplamasıyla) daha az hata ile gerçekleşmektedir (SE: 0,568, 0,250, 0,069). Dendron kaplanmış yüzeylerde FUM algılanması çalışmalarında, bu sayede immobilize edilmesi gereken FUM miktarı 2 mM olarak belirlendi.

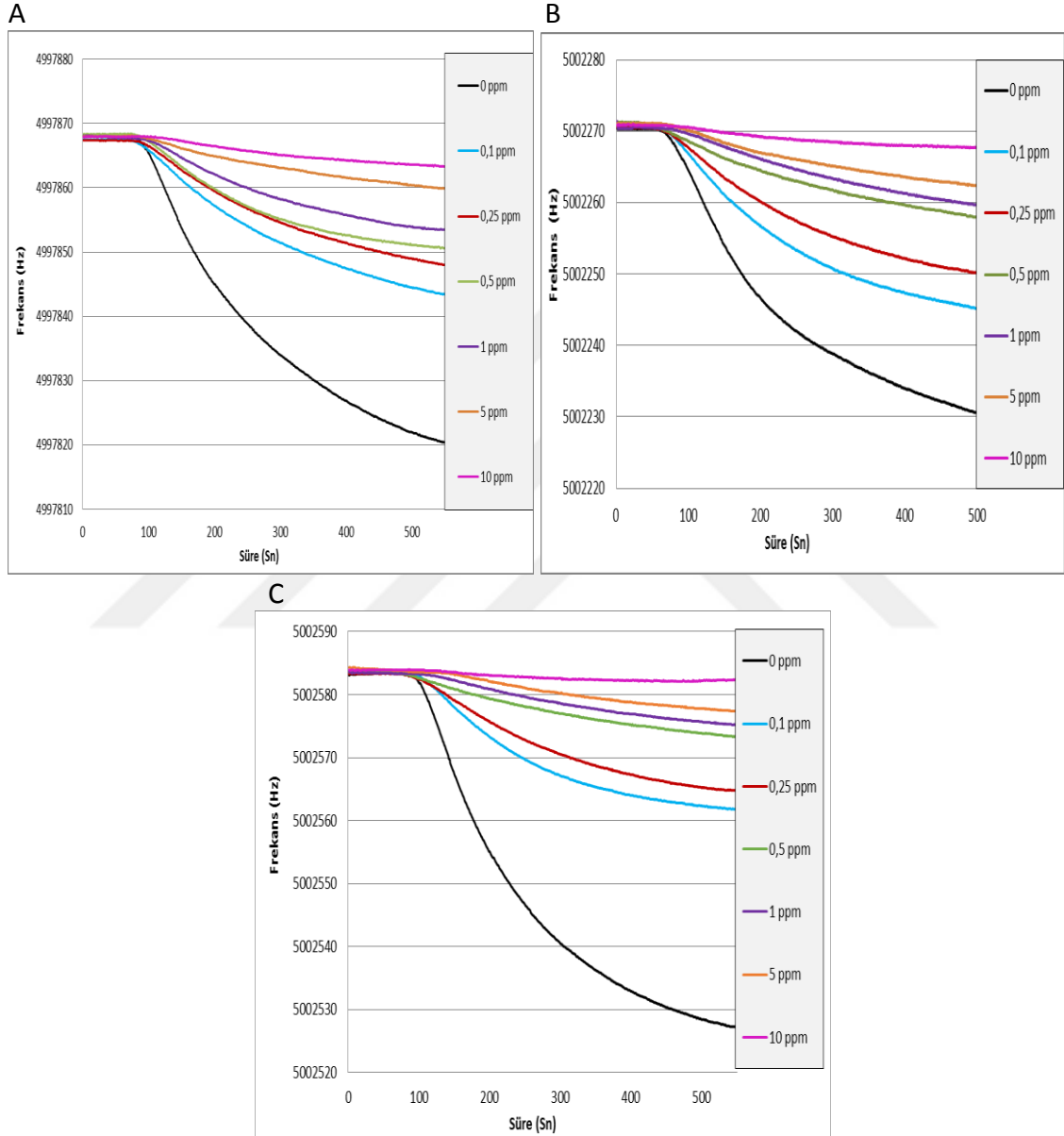
4.3.6.2. Dendronlar ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM Algılanması

QCM ile FUM dedeksiyonunda immobilizasyon etkinliğinin artırılması çalışmasında G3 DND, G4 DND ve G5 DND kullanıldı. Her bir yüzeyde FUM immobilizasyonu için optimize edilmiş olan 2 mM konsantrasyon kullanıldı. FUM deteksiyon için yine inhibisyona dayalı kompetitif immünosensörler sistemi geliştirildi.

Dendronların FUM deteksiyonunda tercih edilme nedeni, çok dallı ve geniş yüzey alanına sahip makromoleküler yapıların uzaysal farklı konumlarda FUM immobilizasyonuna olanak sağlamasıdır. Bu sayede FUM molekülüne biyolojik algılayıcı (anti FUM 8F4) intramoleküler sterik engelleme olmadan bağlanabilecek ve daha fazla frekans farkı elde edilecektir.

G3 DND, G4 DND ve G5 DND ile SAM yapılmış yüzeyde 2 mM FUM immobilize edildikten sonra algılayıcı olarak 0,05 mg/ml konsantrasyonda anti FUM 8F4 mAb kullanıldı. 2’şer kristalde yapılan ölçümler ara tekrarlar ile birlikte 5 kez tekrarlandı. 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 mAb kullanılması ile G3 DND yüzeyde 41,0375 Hz, G4 DND

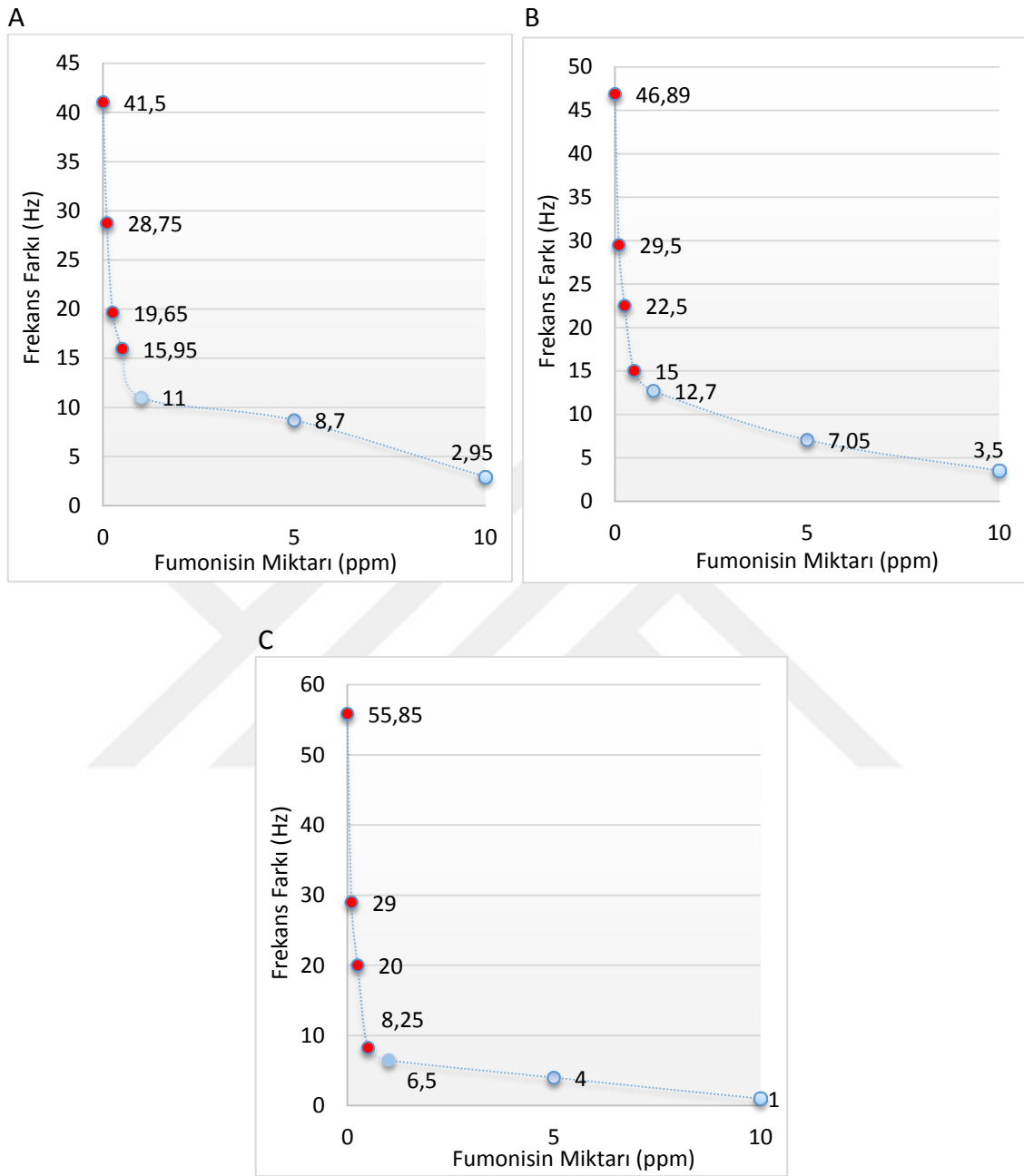
yüzeyde 46,89Hz ve G5 DND yüzeyde 55,85Hz frekans farkları ortalaması elde edildi. Daha sonra aynı miktar anti FUM 8F4 ile 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm ve 10 ppm serbest FUM ön muamele edilerek sensör yüzeyine uygulandı. Elde edilen frekans farkı azalmalarından kalibrasyon eğrileri elde edildi. Cihaz tepkilerinin verileri Şekil 4. 35’de sunulmaktadır.



Şekil 4. 35 A) G3 DND, B) G4 DND ve C) G5 DND ile SAM yapılmış yüzeyde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ile FUM konsantrasyonlarının miktarına bağlı sensör cevapları

Kalibrasyon eğrileri Şekil 4. 35’de ki sensör cevaplarında elde edilen frekans farklarından yararlanılarak elde edildi. Bu amaçla, 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile yapılan bu deneyler 2’şer kristalde 2 defa tekrarlanarak frekans farkı

değişimleri ile kalibrasyon eğrileri hazırlandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4. 36'te mevcuttur.



Şekil 4. 36 A) G3 DND, B) G4 DND ve c) G5 DND ile SAM yapılmış yüzeyde anti FUM 8F4'ün 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile elde edilen frekans farkları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri

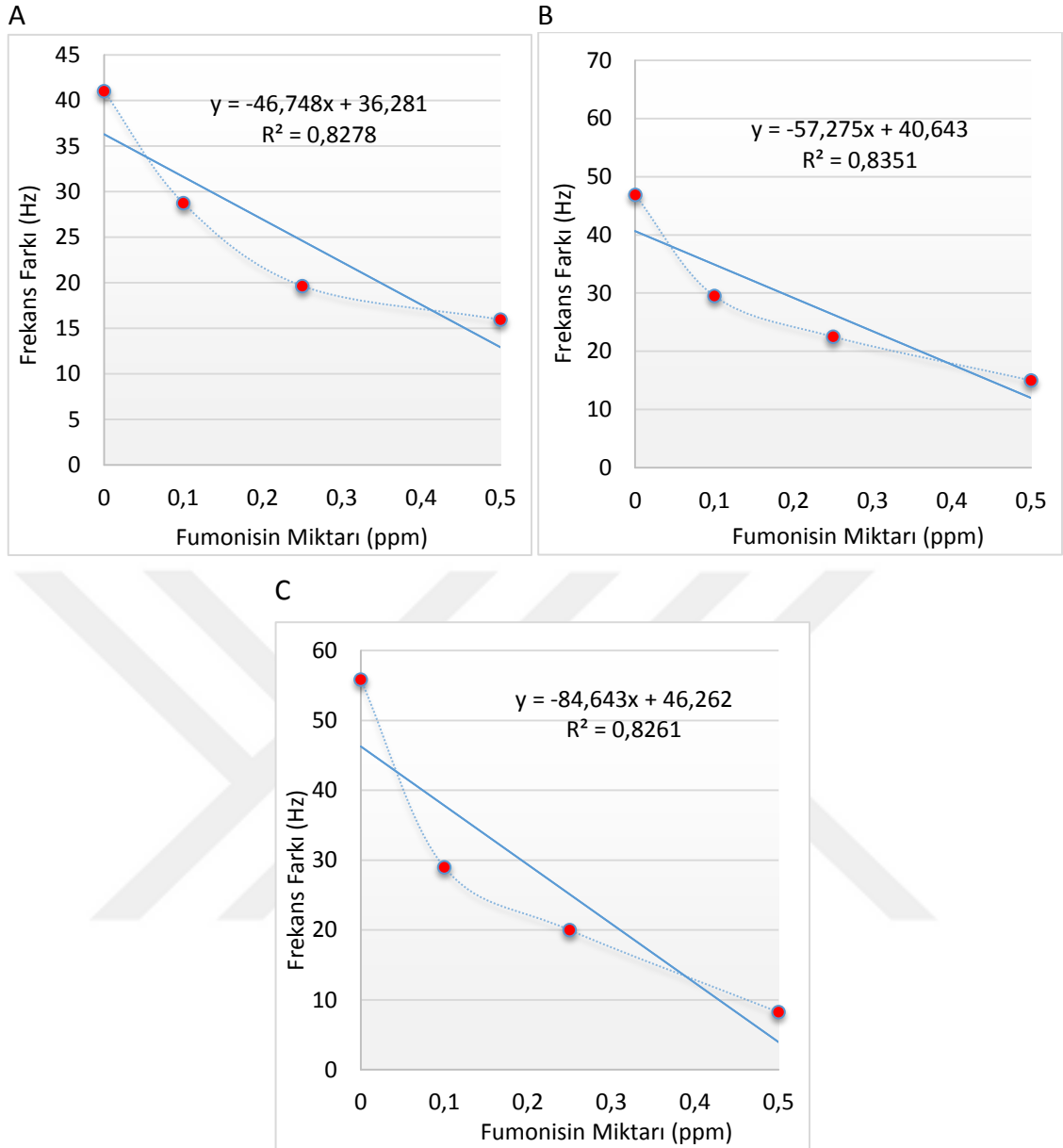
2 mM FUM immobilize edilmiş dendron yapıları yüzeylerde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ile FUM inkübasyonunda FUM konsantrasyonu arttıkça elde edilen frekans farkları ortalaması azalmaktadır. Ancak bu azalma oranları dendron yapıya immobilize edilen FUM miktarı ve FUM'e bağlanan antikor miktarı ile orantılı olarak değişiklik

göstermektedir. G3 DND yüzeyde Şekil 4. 36-A'da anti FUM 8F4 ile 10 ppm FUM inkübasyonu yapıldığında ortalama 2,95 Hz frekans farkı elde edildi ve bu sinyal azalmasında % 7,16 farka neden olmaktadır. 0,5 ppm FUM ile inkübasyonda ise 15,95 Hz frekans farkı elde edilmekte, % 38,71 sinyalde azalmaya neden olmaktadır. G4 DND ve G5 DND ile elde edilen frekans farklarına dayalı sinyal azalması oranları aşağıdaki tabloda sunulmaktadır (Çizelge 4. 16).

Çizelge 4. 16 G3 DND,G4 DND ve G5 DND ile SAM yapılmış yüzeyde inkübe edilen FUM konsantrasyonlarının miktarına bağlı frekans farkları ve sinyal azalma oranları

İnkübe FUM miktarı (ppm)	G3 DND		G4 DND		G4 DND	
	ΔF	% sinyal	ΔF	%sinyal	ΔF	%sinyal
0	41,04	100	46,89	100	55,85	100
0,1	28,75	69,78	29,50	62,92	29,00	52,62
0,25	19,65	47,69	22,50	47,99	20,00	36,29
0,5	15,95	38,71	15,00	31,99	8,25	14,97
1	11,00	26,70	12,70	27,09	6,50	11,79
5	8,70	21,12	7,05	15,04	4,00	7,26
10	2,95	7,16	3,50	7,46	1,00	1,81

FUM konsantrasyonuna bağlı kalibrasyon eğrisinin yüksek FUM konsantrasyonlarında daha az sensör algısı olduğu için frekans değişiminin fazla olmadığı sonucuna ulaşıldı. Yüksek FUM miktarında doygunluk meydana geldiği için anti FUM 8F4'ün bağlanma miktarı azalmaktadır ve kalibrasyon eğrisi doğrusallıktan uzaklaşmaktadır. Kalibrasyon eğrisinin 0-10 ppm aralığında hazırlanması regresyon katsayısını yükselteceği için bu aralıkta ölçümlerde doğruluk azalarak güvenilirlik sınırından çıkmaktadır. Bu sebeple kalibrasyon aralığı lineer bölgenin elde edildiği 0-0,5 ppm FUM konsantrasyon aralığında hazırlandı (Şekil 4. 37).



Şekil 4. 37 A) G3 DND, B) G4 DND ve c) G5 DND ile SAM yapılmış yüzeyde anti FUM 8F4'ün 0-0,5 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile elde edilen frekans farkları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri

Sensörün FUM algılama hassasiyetinin belirlenmesi için LOD değerleri hesaplandı. LOD değerlerinin hesaplanmasında kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemden yararlanıldı. LOD hesaplamak için formül olarak “standart hata x sabit değer / eğim” kullanıldı (sabit değer 2). Çizelge 4. 17’de her bir deney koşulunda ölçülen anti FUM 8F4 algılamalarının ortalama frekans farkı ve hesaplanan standart hatalar belirtilmektedir. Ölçümler her bir koşulda ortalama 5 kez 2 farklı kristalde gerçekleştirildi. Eğim değerleri 0- 0,5 ppm FUM inkübasyonu ile oluşturulan kalibrasyon

eğrilerinin denkleminde elde edildi. Kantitatif ölçüm sınırı (Limit of Quantitative Measurement, LOQ) değerinin hesaplanması için aynı formülde sabit değer 6 olarak kullanıldı.

Çizelge 4. 17 G3 DND, G4 DND ve G5 DND ile SAM oluşturulmuş olan yüzeylerde hesaplanan LOD ve LOQ değerleri

0-0,5 ppm FUM						
	ΔF (Hz)	Standart Sapma (SD)	Eğim	Korelasyon Katsayısı	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
G3 DND	41,04	1,961465	46,748	0,8278	0,0849	0,2517
G4 DND	46,89	1,779995	57,275	0,8351	0,0622	0,1865
G5 DND	55,85	1,929471	84,643	0,8261	0,0456	0,1368

Kalibrasyon eğrileri vasıtasıyla hesaplanan LOD değerleri her 3 dendron ile SAM yapılmış yüzeyde de hesaplandı. G3 DND ile SAM oluşturulmuş olan yüzeyde 0,0849 ppm değerinde LOD, G4 DND ile SAM oluşturulmuş olan yüzeyde 0,0622 ppm ve G5 DND ile SAM oluşturulmuş olan yüzeyde ise 0,0456 ppm değerinde LOD değerleri hesaplandı.

3 farklı dendron yapı ile SAM oluşturulan yüzeyler arasında en düşük LOD değerleri G4 DND ve G5 DND ile elde edildi. LOQ değerleri açısından tüm dendronik yüzeyler immüno-sensörün ölçüm yapacağı FUM miktarının kalitatif olarak tespitine olanak sağlamaktadır.

0-0,5 ppm FUM inkübe sistemde doğrusal eğim çizgisinin eğimi ve korelasyon katsayıları hesaplandı. G3 DND ile SAM oluşturulan yüzeyde 0,8278 R^2 değeri elde edildi. Regresyon katsayısı G4 DND kullanılması ile 0,8351, G4 DND kullanılması ile 0,8261 değerinde elde edildi. Elde edilen regresyon katsayıları 0,7'nin üstünde olduğu için "kuvvetli bağıntılı" olarak kabul edilmektedir. Ancak 1 değerinden uzaklaşan değerlerde korelasyon katsayıları mutlak doğru olarak kabul edilememektedir. Biyosensörlerde genel olarak güvenilirlik sınırları açısından çok kuvvetli bağıntıların olduğu korelasyon katsayıları tercih edilmektedir.

Bir önceki bölümde lineer ajanlardan yararlanılarak oluşturulan SAM yüzeylerin kullanılması ile daha yüksek regresyon katsayısı elde edilmişti. Ancak yüzeye doğrudan

dendronların kullanılması ile elde edilen regresyon katsayılarının azaldığı görüldü, Dendronların kullanılması ile elde edilen hassasiyetin daha yüksek güven sınırları içerisinde ölçüm yapabilmesi için farklı immobilizasyon teknikleri uygulandı.

4.3.7. Immobilizasyon Etkinliklerinin Arttırılmasında Lineer ve Dendron Yapıların Bir Arada Kullanımı

İmmobilizasyon etkinliğinin arttırılması çalışması kapsamında dendronların kullanılması ile yüksek hassasiyette FUM algılayabilen immünosensör yüzeyleri geliştirildi. Ancak elde edilen kalibrasyon eğrilerinin regresyon katsayıları kuvvetli bağıntılı olmadığı için doğruluğun arttırılması yönünde iyileştirilmeler yapılması gereklidir.

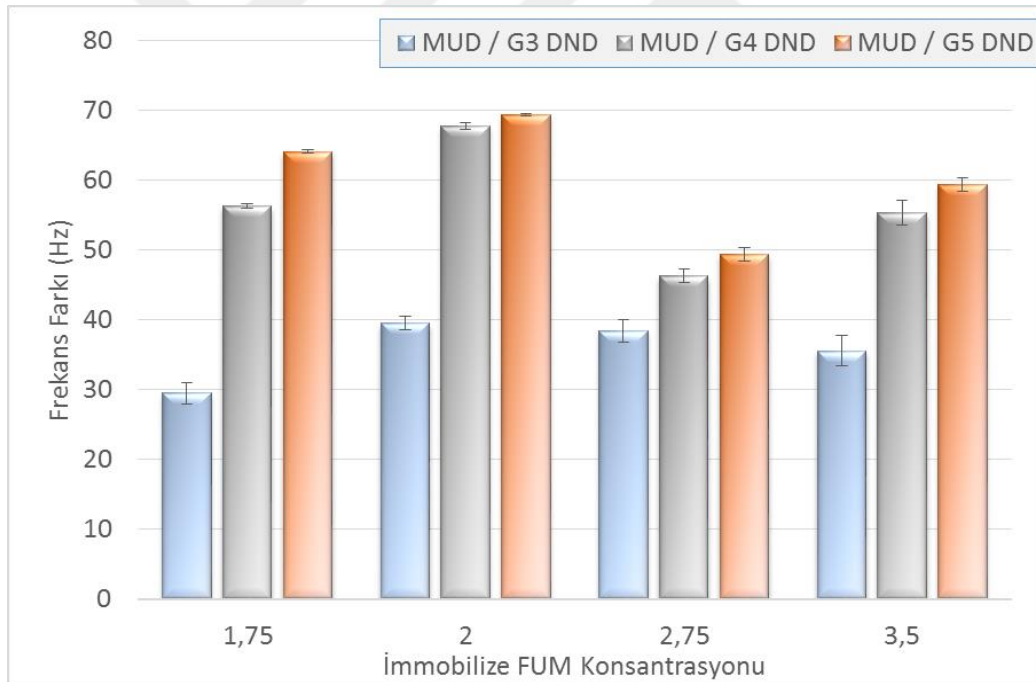
Dendronların kullanılması ile elde edilen ölçüm hassasiyetinden faydalanmak için sensör kristallerinin altın yüzeyine ilk olarak lineer ajanlar ile SAM oluşturuldu. Kullanılan lineer ajanlardan (MUA, MUD ve MUO) hangisinin kullanılacağına karar verilirken FUM algılama hassasiyetleri (LOD değerleri), kalibrasyon eğrilerinin regresyon katsayıları ve kristaller arası ölçüm tutarlılıkları değerlendirildi. Bu açıdan MUD ve MUA ajanlarının kullanımının uygun olabileceği görüldü. MUA ile SAM oluşturulmuş olan yüzeyde 2 mM FUM immobilizasyonu sonrası 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılması ile 0,109 ppm değerinde LOD değeri elde edilmişti (Çizelge 4. 11). MUD ile SAM oluşturulmuş olan yüzeyde ise aynı konsantrasyonda FUM immobilizasyonu ve anti FUM 8F4 kullanılması ile 0,0669 ppm değerinde LOD değeri elde edilmişti (Çizelge 4. 14). MUD ile SAM oluşturulan yüzeyde standart sapma değerinin (1,023998) MUA ile SAM oluşturulan yüzeyden daha düşük değerde (1,732009) olmasından dolayı kristaller arası ve kristal içi ölçüm değerleri daha tutarlıdır. Bu sebepler ile MUD ile SAM oluşturulmuş olan yüzey üzerine dendronlar ile ikinci katmanlar hazırlandı.

Dendronların kullanılması ile elde edilen LOD değerleri incelendiğinde G3 DND kullanılması ile 0,0849 ppm değerinde FUM deteksiyon limiti, G4 DND kullanılması ile 0,0622 ppm değerinde FUM deteksiyon limiti, incelendiğinde G5 DND kullanılması ile 0,0456 ppm değerinde FUM deteksiyon limiti elde edildiği için her üç dendron yapının da kullanılmasına karar verildi.

Bunun için öncelikle 2 mM MUD ile yüzeyde SAM tabaka hazırlandı, Daha sonra G3 DND, G4 DND ve G5 DND ile dendronik SAM tabakaları hazırlandı. İki katmanlı SAM yüzeyde FUM immobilizasyon etkinliğinin belirlenmesi için miktar optimizasyonu yapıldı. Ardından belirlenen en yüksek frekans farklarına göre seçilen yüzeylerde FUM deteksiyonuna yönelik inhibisyona dayalı sensör sistemleri geliştirildi.

4.3.7.1. MUD ve Dendronların Birlikte Kullanımı ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM Kaplama Optimizasyonu

2 mM MUA kullanılarak elde edilmiş SAM yüzeyin üzerinde 2 mM G3 DND, 2mM G4 DND ve 2 mM G5 DND kullanılarak ikincil SAM yapılar hazırlandı. İmmobilize edilecek FUM miktarının tayini için optimizasyonlar bu iki katmanlı SAM'ler üzerinde yapıldı. Bu amaçla yüzeyde 1,75mM, 2mM, 2,75 mM ve 3,75 mM FUM immobilizasyonları yapıldı. Elde edilen frekans farkları Şekil 4. 38'de gösterilmektedir.



Şekil 4. 38 MUD lineer SAM üzerinde oluşturulan G3 DND, G4 DND ve G5 DND dendronik SAM yüzeylerde FUM kaplama optimizasyonuna ait ortalama frekans farkları

Elde edilen frekans farkları ve standart hatalar değerlendirilerek MUD / Dendron kaplama optimizasyonu belirlendi.

Çizelge 4. 18 MUD ve Dendron kaplı yüzeylerde FUM kaplama miktarına bağlı ölçülen frekans farkları

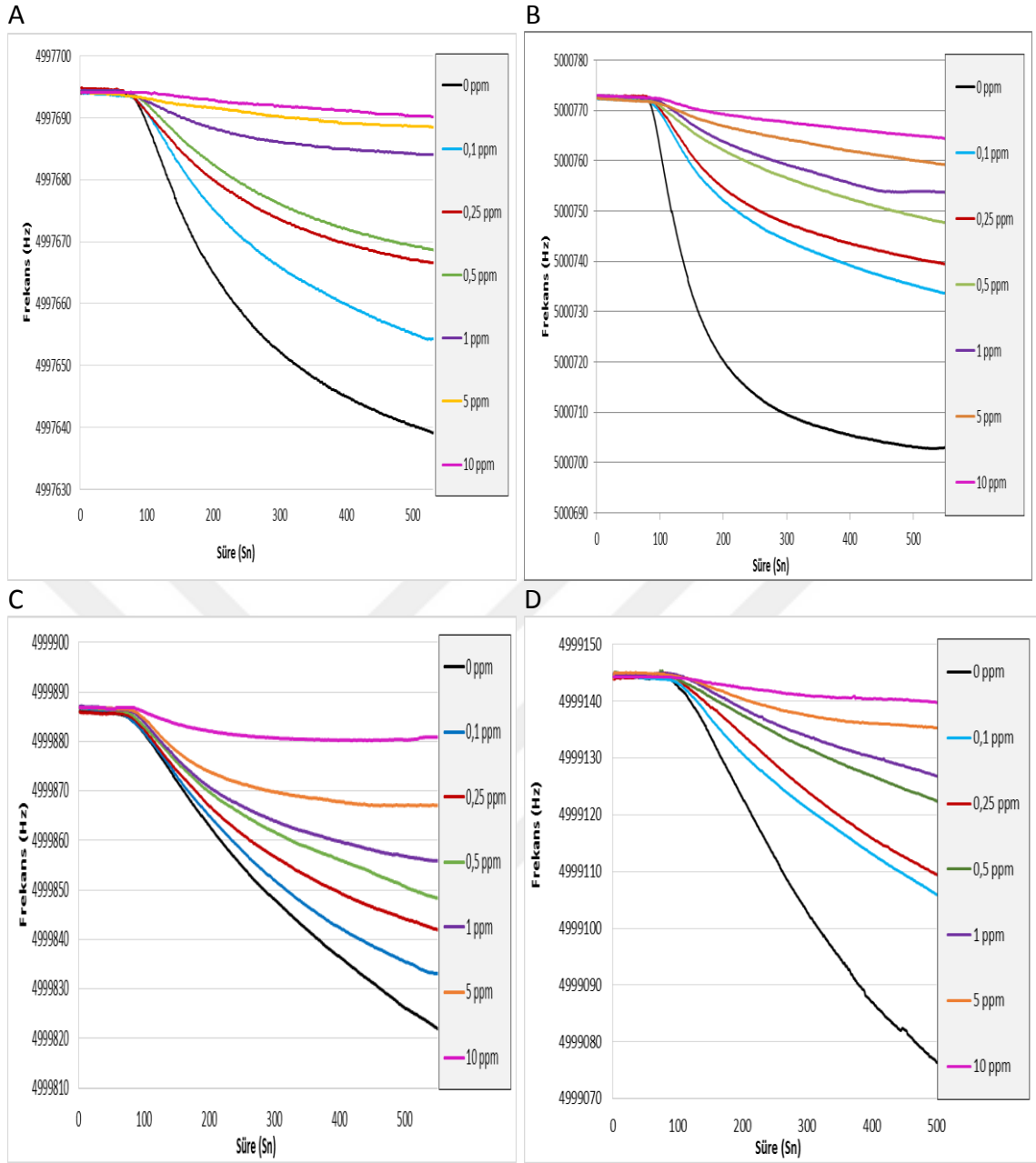
Frekans Farkı (ΔF , Hz)			
FUM Kaplama Miktarı (mM)	MUD / G3 DND	MUD / G4 DND	MUD / G5 DND
1,75	29,50	56,33	64,14
2	39,55	67,80	69,41
2,75	38,50	46,40	49,70
3,50	35,60	55,50	59,50

Elde edilen frekans farklarında görüldüğü üzere en yüksek değerlerde 1,75 mM ve 2 mM FUM immobilizasyonu ile sağlanmaktadır (sırası ile G5 DND ile 64,14 Hz ve 69,41 Hz, G4 DND ile 56,33 Hz ve 67,80 Hz, G3 DND ile 29,50 Hz ve 39,55 Hz). Dendronlar arasında G3 DND ile SAM yapılan yüzeyde diğerlerinden daha az frekans farkı elde edildi. Ölçümler arası tutarlılıklar açısından G4 DND yüzeyde 1,75 mM FUM kaplama ile 0,3189 Hz, 2 mM FUM kaplama ile 0,4498 Hz değerinde standart hata hesaplandı. G5 DND yüzeyde frekans farkları arasında standart hata 1,75 mM FUM kaplama ile 0,1954 Hz, 2 mM FUM kaplama ile 0,1445 Hz olarak hesaplandı. Ancak G4 DND ile yapılan SAM yüzeylerde FUM immobilizasyonunda standart hatalar daha yüksek değerlerde elde edildi. G3 DND yüzeyde 1,75 mM FUM kaplama ile 1,5354 Hz, 2 mM FUM kaplama ile 1,0264 Hz değerinde standart hata hesaplandı. G3 DND ile kaplamalarda daha yüksek hata payları elde edildiği için G4 DND ve G5 DND kullanılmasına karar verildi.

4.3.7.2. MUD ve Dendronların Birlikte Kullanımı ile SAM Yapılmış Yüzeyde FUM

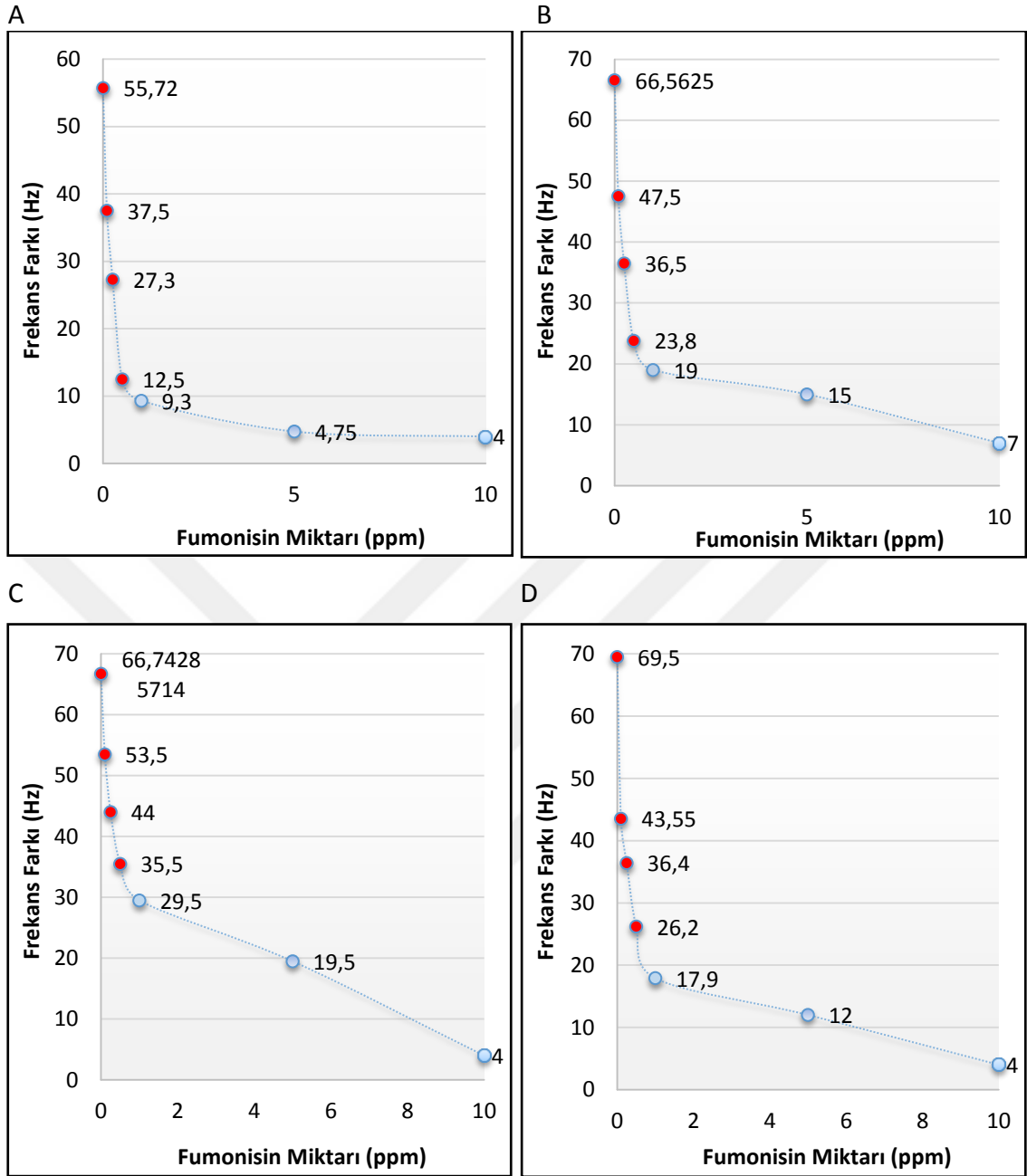
Algılanması

İki katmanlı SAM yapılan yüzeylerde FUM deteksiyonu için FUM immobilize yüzeyde serbest FUM ile 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 inhibisyonuna dayalı algılama yapıldı. FUM konsantrasyonu 0,1 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm ve 10 ppm miktarlarında kullanıldı. Tekrarlı yapılan ölçümlerden örgen cihaz sensogramları Şekil 4. 39'de sunulmaktadır.



Şekil 4. 39 A) MUD/G4 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu, B) MUD/G4 DND yüzeyde 2mM FUM immobilizasyonu, C) MUD/G5 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu ve D) MUD/G5 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu yapılmış yüzeylerde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ile FUM konsantrasyonlarının miktarına bağlı sensör cevapları

Ortalama frekans farklarının kullanılması ile elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4. 40'da sunulmaktadır.



Şekil 4. 40 A) MUD/G4 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu, B) MUD/G4 DND yüzeyde 2mM FUM immobilizasyonu, C) MUD/G5 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu ve D) MUD/G5 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu yapılmış yüzeylerde anti FUM 8F4'ün 0-10 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile elde edilen frekans farkları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri

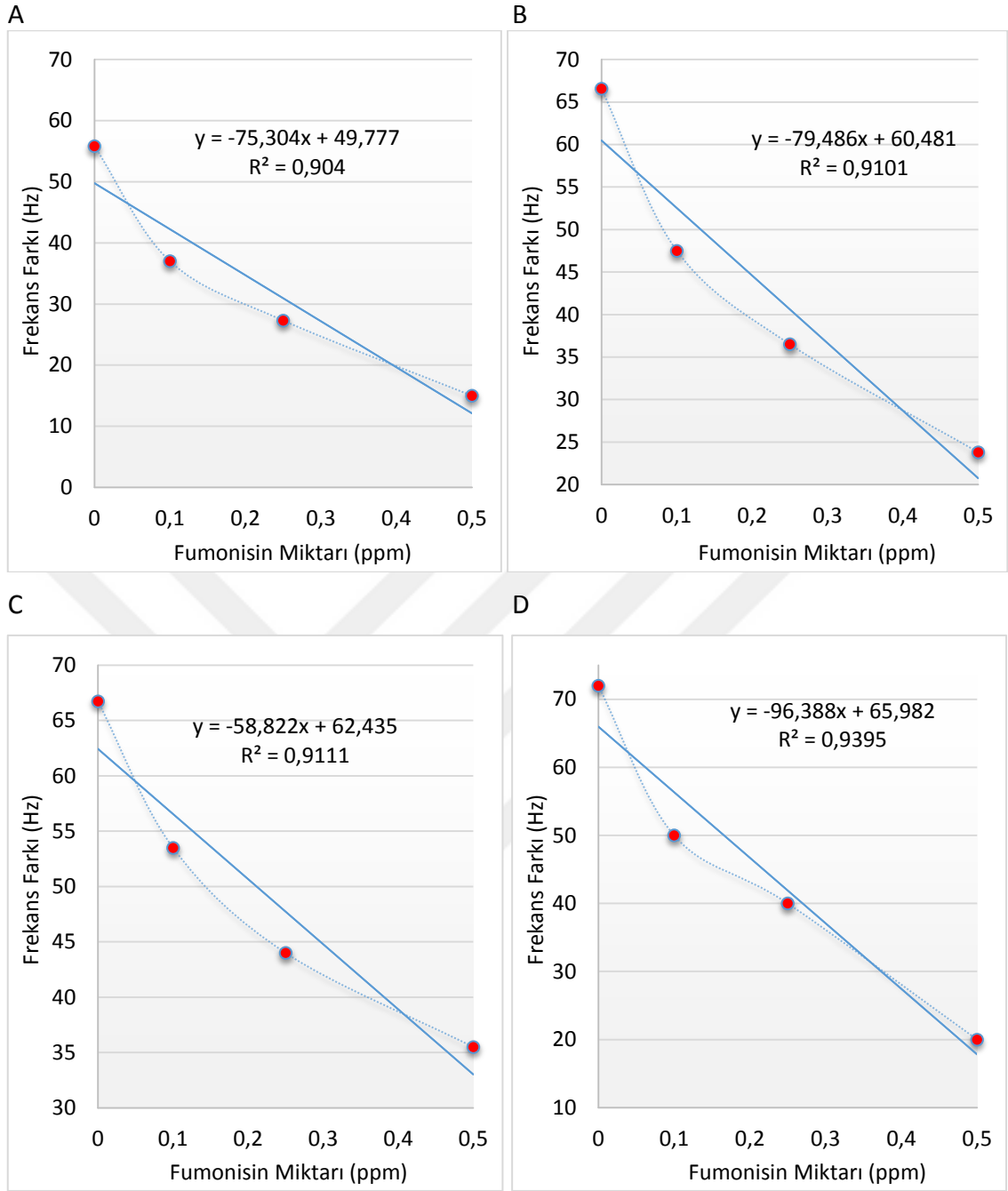
Şekil 4. 40-B'de görüldüğü gibi 2 mM FUM immobilize edilmiş dendron yapıları yüzeylerde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 ile FUM inkübasyonunda. FUM konsantrasyonu arttıkça elde edilen frekans farkları ortalaması azalmaktadır. Ancak bu azalma oranları dendron yapıya immobilize edilen FUM miktarı ve FUM'e bağlanan antikör miktarı ile orantılı olarak değişiklik göstermektedir. MUD/G4 DND ile SAM yapılmış 1,75 mM FUM

immobilize yüzeyde anti FUM 8F4 ile 10 ppm FUM inkübasyonu yapıldığında ortalama 6 Hz frekans farkı elde edildi ve bu sinyal azalmasında % 8,96 farka neden olmaktadır. Aynı dendronik yüzeyde 2 mM FUM immobilizasyonu yapıldığında ortalama 4 Hz frekans farkı ve %5,97 sinyal azalmasına neden olduğu görüldü. MUD/G5 DND ile SAM yapılmış yüzeyde 1,75 mM FUM immobilize edildiğinde yine 4 Hz frekans farkı elde edildi ve bu azalma toplamda % 7,16 sinyal azalmasına tekabül etmektedir. Aynı yüzeyde 2 mM FUM immobilizasyonu yapıldığında 7 Hz frekans farkı, %10,45 sinyal azalması elde edildi (Çizelge 4. 19). Elde edilen değerlere bakıldığında 10 ppm FUM inhibisyonunun toplam sinyal azalması açısından oldukça az farka neden olduğu görülmektedir. Benzer şekilde Çizelge 4. 19 incelendiğinde 1 ppm ve 5 ppm ile inhibisyonlarda da % sinyal farklarının az olduğu görülmektedir.

Çizelge 4. 19 MUD G5 DND ve MUD G4 DND yüzeylerde 1,75 mM ve 2 mM FUM immobilizasyonu sonrası inkübe edilen FUM konsantrasyonlarının miktarına bağlı frekans farkları ve sinyal azalma oranları

İnkübe FUM miktarı (ppm)	MUD/G5 DND 1,75 mM FUM		MUD/G5 DND 2 mM FUM		MUD/G4 DND 1,75 mM FUM		MUD/G4 DND 2 mM FUM	
	ΔF	% sinyal	ΔF	% sinyal	ΔF	% sinyal	ΔF	% sinyal
0	64,14	100	69,5	100	56,06	100	66,7	100
0,1	55	82,09	43,55	65	37,5	67,14	48	71,64
0,25	44	65,67	36,4	54,33	27,3	48,88	37	55,22
0,5	37	55,22	24,2	36,12	12,5	22,38	25,75	38,43
1	29,5	44,03	17,9	26,72	9,3	16,65	19	28,36
5	19,5	29,10	12	17,91	4,75	8,50	15	22,39
10	6	8,96	4	5,97	4	7,16	7	10,45

Kalibrasyon eğrilerinin yüksek FUM konsantrasyonlarında doygunluk meydana geldiği için sensör algısı azalmaktadır ve bu sebeple frekans farkı azalmaktadır. Kalibrasyon eğrisinin 0-10 ppm aralığında eğri doğrusallıktan uzaklaşmaktadır ve regresyon katsayıları yükseldiği için 0-10 ppm aralığında ölçümler güvenilirlik sınırından çıkmaktadır. Lineer bölgenin elde edildiği 0-0,5 ppm FUM konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrileri hazırlandı (Şekil 4. 41).



Şekil 4. 41 A) MUD/G4 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu, B) MUD/G4 DND yüzeyde 2mM FUM immobilizasyonu, C) MUD/G5 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu ve D) MUD/G5 DND yüzeyde 2 mM FUM immobilizasyonu yapılmış yüzeylerde anti FUM 8F4'ün 0-0,5 ppm aralığında FUM inkübasyonu ile elde edilen frekans farkları ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri

0-0,5 ppm FUM inkübe sistemde doğrusal eğim çizgisinden m değeri ve korelasyon katsayıları hesaplandı. MUD/G4 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilize edildiğinde 0,904 R² değeri, 2 mM FUM immobilize edildiğinde 0,910 904 R² değeri elde edildi.

Regrasyon katsayısı MUD/G5 DND yüzeyde 1,75 mM FUM immobilize edildiğinde 0,911, 2 mM FUM immobilize edildiğinde 0,940 değerinde elde edildi.

Elde edilen regresyon katsayılarının hepsi 0,9'dan yüksek değerlerde olduğu için "çok kuvvetli bağıntılı" olarak kabul edilmektedir. Ancak aralarında en yüksek regresyon sayısı (0,940) MUD/G5 DND yüzeyde 2 mM FUM immobilize edildiğinde elde edildi. Güvenilirlik sınırları içerisinde olan bu yüzeyde yapılan ölçümlerin tekrarları ve kristaller arası ölçüm değerleri incelendiğinde en iyi sonuç veren yüzey olduğu görüldü (standart sapma 0,407 ppm, standart hata 0,145 ppm).

Sensör yüzeylerinin FUM algılama hassasiyetlerinin belirlenmesi için LOD değerleri hesaplandı. LOD değerlerinin hesaplanmasında kalibrasyon eğrilerinden elde edilen denklemden yararlanıldı. LOD hesaplamak için daha önce belirtilen formül kullanıldı. Eğim değerleri 0- 0,5 ppm FUM inkübasyonu ile oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin denkleminde elde edildi (Çizelge 4. 20).

Çizelge 4. 20 MUD/G4 DND ile SAM sonrası 1,75 mM ve 2 mM FUM, MUD/G4 DND ile SAM sonrası 1,75 mM ve 2mM FUM immobilizasyonu yapılan yüzeylerde hesaplanan LOD ve LOQ değerleri (FUM miktarı -0-0,5 ppm)

	ΔF (Hz)	Standart Sapma (SD)	Eğim	Korelasyon Katsayısı	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
MUD/ G4 DND 1,75mM FUM	56,060	1,883	75,304	0,904	0,050	0,150
MUD/ G4 DND 2 mM FUM	66,700	1,591	79,486	0,910	0,040	0,120
MUD/ G5 DND 1,75mM FUM	64,140	0,757	58,822	0,911	0,026	0,077
MUD/ G5 DND 2 mM FUM	69,500	0,407	96,388	0,940	0,008	0,025

Kalibrasyon eğrileri vasıtasıyla hesaplanan LOD değerleri MUD/G4 DND ile SAM yapılan ve MUD/G5 DND ile SAM yapılan (1,75 mM ve 2 mM FUM immobilize) yüzeylerde hesaplandı. MUD/G4 DND ile SAM oluşturulmuş olan yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu ile 0,050 ppm, 2 mM FUM immobilizasyonu ile 0,040 ppm LOD değerleri hesaplandı. MUD/G5 DND ile SAM oluşturulmuş olan yüzeyde 1,75 mM FUM immobilizasyonu ile 0,026 ppm, 2 mM FUM immobilizasyonu ile 0,008 ppm LOD

değerleri hesaplandı. Böylece SAM oluşturulan yüzeyler arasında en düşük LOD değerleri MUD/G5 DND ile SAM oluşturulmuş olan yüzeyde 2 mM FUM immobilizasyonu ile elde edildi.

Daha önce dendronik yüzeylerde LOQ değerlerinin hesaplanmasında elde edilen değerler gibi, 2 katlı SAM ile geliştirilen yüzeylerin kullanıldığı immünoensörler de ölçüm yapılacak FUM miktarlarının kalitatif olarak tespitine olanak sağlamaktadır.

Yüzeye doğrudan dendronların immobilizasyonu ile elde edilen SAM'lerde yapılan FUM miktarına bağlı kalibrasyon eğrilerinde regresyon sayıları güven aralığı içerisinde olmasına rağmen çok kuvvetli bağıntılı değildi. Dendronların doğrudan yüzeye immobilizasyonu yerine önce MUD ile SAM oluşturulması ardından dendronlar ile ikinci SAM tabakanın hazırlanması ile regresyon sayıları mutlak doğru değerine daha fazla yaklaştı. Bu sayede daha yüksek doğrulukta ölçüm değerlerinin elde edilmesi sağlandı.

İki katlı dendronik yapıların kullanılması ile LOD değerleri azaldı (0,008 ppm), regresyon sayıları 1'e yaklaştı (0,940) ve ölçümler arası istenmeyen farklar oldukça azaldı (standart sapma 0,407 ppm, standart hata 0,145 ppm).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında algılama hassasiyetinin geliştirilmesi için immobilizasyon etkinliğinin arttırılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirildi ve model olarak FUM dedeksiyonu yapabilen QCM immünosensörü geliştirildi. Biyosensörlerle mikotoksin tespitinin geleneksel analitik tekniklere göre birçok üstünlüğü mevcuttur. Taşınabilir olmaları, örnek hazırlama işleminin basit olması, örnek kullanımının az olması, kompleks karışımlardan analizin yapılabilir olması, küçük olması, hızlı olması en önde gelen üstünlükleridir.

İmmünosensörlerde biyolojik algılayıcı olarak antikorlar, aptamerler ve moleküler baskınmış polimerler (MIP) kullanılmaktadır. Antijen-antikor bağlanmasının yüksek seçicilik, afinite ve hassasiyetinden dolayı immünosensörlerde algılayıcı olarak antikorlar sıklıkla tercih edilmektedir. Düşük derişimdeki analitlerin kantitatif olarak belirlenmesinde, antikorların kullanıldığı tanı teknikleri ve immünosensörler önemli avantajlar sağlar. Bu avantajlarından dolayı biyolojik algılayıcı olan FUM spesifik antikor tez kapsamındaki çalışmalarda hibridoma teknolojisi kullanılarak üretilmiştir. FUM deteksiyonuna yönelik fiber optik, SPR, FPIA, kemiluminesans-floresans temelli optik teknikler ve elektrokimyasal yöntemler kullanılarak antikor temelli immünosensörlerin geliştirildiği literatürde yer almasına rağmen QCM temelli sadece FUM'nin algılandığı immünosensör üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. Tez kapsamında QCM sensörlerinin mevcut pek çok avantajından dolayı QCM tercih edilmiştir. İşaretçi etiketlerin kullanılması, hatalı pozitif yanıtlara sebep olduğu için sensörün

güvenilirliğini azaltmaktadır. QCM sensörleri ile çalışırken işaretleme ajanına ihtiyaç duyulmaması en önde gelen avantajlardan birisidir. QCM sensörlerinin diğer avantajları. kolay kullanımlı olması. laboratuvar şartları dışında kullanıma uygun hale getirilebilir olması ve özel operasyon personeline ihtiyaç duymayan cihazlar olmasıdır. QCM cihazının temel ekipmanları ucuzdur. Kullanılan sensör çiplerinin maliyetleri de defalarca kullanılabilir olmalarından dolayı azaltılabilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen sensör yüzeylerinin uygun rejenerasyon tamponlarının kullanılması ile 30-38 kez tekrar kullanılabilir olduğu görüldü. Böylece çipin 1 kez kullanılmasında maliyete yansıyan masraf yaklaşık 1 TL civarındadır.

QCM immünoensörleri ile çok sayıda immobilizasyon yöntemi denenmiştir; ancak pek çok uygulama için yüksek immobilizasyon verimi, iyi stabilitede ve ortak ideal bir yöntem henüz sunulmamıştır. Bu nedenle, geliştirilecek uygulamalarda, antikor veya antijenin immobilizasyonu için uygun yöntemin bulunması gereklidir.

Elektrod yüzeyinde analit ya da antikor immobilizasyonu için kendinden oluşan tek tabaka (SAM) tekniği dâhil, pek çok yöntem literatürde önerilmektedir. SAM tekniğinin, biyolojik moleküllerin immobilizasyonu için güçlü bir yüzeye tutunma sağladığı bilinmektedir. SAM ile immobilizasyonun sağladığı avantajlarından dolayı FUM immünoensörünün geliştirilmesinde tercih edildi. SAM oluşturmak için lineer moleküller ve dendronik yapıların kullanılması sonucu FUM dedeksiyon hassasiyeti ve dedeksiyon limitleri incelendi.

Altın yüzeylerde SAM oluşturmak için en sık kullanılan SAM ajanı 11-merkaptoundekonoik asittir (MUA). Yüzeye immobilizasyonda ihtiyaca göre kimyasal modifikasyonlar gerçekleştirilmektedir. Aktivatör oranlarının yüzeyde FUM immobilizasyonu için verimi incelendi ve bu çalışma için EDC: NHS (4:1) en iyi oran olduğu bulundu. Elde edilen sonuçlar literatürde önerilen oranlarda aktivatör kullanımının FUM immünoensörünün geliştirilmesi için uygun oranlar olduğu sonucunu doğrulamıştır.

MUA ile SAM ajanı oluşturulmasının ardından kullanılacak FUM spesifik antikorunun (anti FUM 8F4) kullanım şartları ve konsantrasyonu üzerine çalışmalar yapıldı. Genel olarak monoklonal antikorların mutlak saflaştırılmasında protein A veya G kolonları

kullanılmaktadır. Ancak bu kolonların kullanımı bazı antikorların etkinliğini azaltmakta ve saflaştırma maliyetlerini çok arttırmaktadır. Bu sebeplerden dolayı tez kapsamında geliştirilen anti FUM 8F4 antikorunun süpernatant (CS) içinde, amonyum sülfat (AS) ile kısmi saflaştırma halinde ve protein A kolonu ile tam saf haliyle kullanımları kıyaslandı. Süpernatant ortamında bulunan antikor dışındaki diğer protein yapılar, hücre parçaları, vs. den dolayı daha az sayıdaki antikor yüzeydeki FUM'e bağlanmaktadır. Benzer şekilde AS çöktürme halinde kullanılan antikorun da yüzeye bağlanmasında tekrarlanırlıkta büyük sorunlar olduğu görüldü. Yüzeylerin hazırlanmasından sonra antikor öncesinde FBS ile bloklama işlemlerinde yüzeylerde FUM spesifik olmayan bağlanmaların olduğu görüldü. Bu bağlanmalar, rejenerasyon işlemi ile yüzeyden uzaklaşabilmekte, sonraki ölçümlerde tekrar yüzeye bağlanabilmektedir. AS ve CS halindeki antikorların yüzey uygulamasında da benzer şekilde içinde bulunan antikor dışı diğer protein yapıların yüzeye non-spesifik bağlandığı görülmektedir. Bu sebeple her iki ortamda da yüksek frekans farkı ortalaması elde edilse de ölçümler arası tutarsızlıklar fazla olduğu için standart hata payı yüksektir. Devam eden çalışmalarda antikorun tam saf halinin kullanılmasına karar verildi.

Tez kapsamında FUM deteksiyonuna yönelik geliştirilen QCM sensöründe, FUM molekülünün küçük moleküler ağırlığından dolayı inhibisyonlu immünoassay geliştirildi. Bu metotlarda, QCM altın yüzeylerine FUM molekülleri immobilize edildi. Biyolojik algılayıcı olarak geliştirilen FUM spesifik anti FUM 8F4 antikoru ile FUM inhibisyonu yapılarak sensör cevapları tayin edildi. FUM miktarına bağlı olarak azalan frekans farklarından yararlanılarak kalibrasyon eğrileri elde edildi. Böylece FUM kontaminasyon miktarı bilinmeyen bir örnekte, kalibrasyon eğrileri kullanılarak içeriğindeki FUM miktarı tespit edilmesi amaçlanmaktadır. FUM immünosensöründe yüzey modifikasyonlarının etkinliği, sensör yüzeyinde yapılan ölçümler arası tutarlılık, ölçüm hassasiyeti ve analitik tayinde güvenilirlik değerleri açısından irdelendi.

Analitik tayinlerde güvenilirlik üzerine Evans'ın (1996) geliştirdiği regresyon sayıları kılavuzu ve Pearson'ın korelasyon katsayıları ile istatistiksel kuramı tutarlılık göstermektedir. Korelasyon sayısı doğruluk üstünde önemli bir etki büyüklüğüdür ve bu nedenle Evans'ın mutlak değer için önerdiği kılavuzu kullanarak korelasyonun gücü tarif edilmektedir. Evans'ın regresyon sayıları ve korelasyonlar hakkındaki kılavuzuna

göre; 0-0,29 aralığında regresyon sayıları zayıf bağıntılı, 0,3-0,49 regresyon sayıları düşük bağıntılı, 0,5-0,69 arası regresyon sayıları orta kuvvetli bağıntılı, 0,7-0,89 arası regresyon sayıları kuvvetli bağıntılı ve 0,9-1 arası regresyon değerleri çok kuvvetli bağıntılı olarak kabul edilmektedir. Kuvvetli bağıntı, klasik analitik metodların bazıları için geçerliliğini korusa da, biyolojik bilimlerde sürdürülen sensör çalışmalarında değerlendirilen kalibrasyon eğrilerinde çok kuvvetli bağıntılı eğriler geçerlidir. Bu sebeple, kalibrasyon eğrilerinin regresyon sayıları ve frekans farkları arası korelasyonlar değerlendirildi. Tez kapsamında immobilizasyon etkinlikleri irdelenirken anti FUM 8F4 antikoru ile elde edilen ortalama frekans farkları, ölçümler arası standart sapma ve hatalar, elde edilen kalibrasyon eğrilerinin ölçüm aralığı, ölçüm hassasiyeti, korelasyon katsayısı bir arada değerlendirildi.

Sensör hassasiyeti açısından kullanılan antikor miktarının ölçümler üzerinde etkinliğin belirlenmesi çok önemlidir. Yüksek miktarda kullanılan biyolojik algılayıcı hassasiyeti, az miktarda kullanılan algılayıcı ise ölçüm aralığını azaltacaktır. Bu sebeple, ilk denemelerde kullanılan miktar yarı yarıya azaltıldı (0,05 mg/ml); sensörde algılama hassasiyeti üzerine etkinliği değerlendirildi. Benzer şekilde sensör yüzeyinde kaplanan analit miktarı da inhibisyonlu sistemde önemli bir parametredir. Yüzeğe kaplanacak FUM miktarı hem spesifik olmayan bağlanmalara izin vermeyecek miktarda olmalı, hem de anti FUM 8F4 ile yüksek frekans farkında sensör cevabı oluşturmalıdır. Tez kapsamında FUM immobilizasyonun kullanılması gereken ideal miktar optimizasyon çalışmaları ile belirlendi. SAM yüzeyde FUM immobilizasyonu için FUM kaplama optimizasyonunda 1,75 mM ve 2 mM FUM ile kaplamaların yapılmasında yüksek frekans farkları elde edildi (sırası ile 41,55 Hz ve 41,8 Hz). Her iki yüzeyde de anti FUM 8F4'ün kullanım miktarı tekrar denendi, 2 mM FUM immobilize yüzeyde standart sapma 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılması ile azaldı (1,732009 Hz). Ayrıca korelasyon katsayıları yükseldiği için 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılması ile sensör güvenilirliğini arttırdığı görüldü. Öte yandan 0,05 mg/ml anti FUM 8F4'ün uygulandığı FUM yüzeyde optimizasyon işlemi sonucunda 2 mM FUM kullanılması ile standart sapmaların azaltıldığı görüldü. Kaplamada kullanılan FUM miktarı azaltıldığında yüzeydeki boş alanlar arttığı için spesifik olmayan bağlanmaların da gerçekleşmesinden dolayı standart sapmaların arttığı görüldü. 2 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda

FUM kaplama yapıldığında antikor yanıtının tekrar düşmesinin nedeninin sterik engelden dolayı olduğu sonucuna ulaşıldı.

Anti FUM 8F4'ün artan miktarlarda FUM inkübasyonu ile gerçekleştirilen inhibisyonlu ölçümlerden elde edilen frekans farkı ortalamaları ile kalibrasyon eğrileri elde edildi. 0-10 ppm aralığında yapılan inhibisyonlardan elde edilen kalibrasyon eğrileri incelendiğinde 0-0,5 ppm FUM aralığında (0, 0,1, 0,25 ve 0,5 ppm) elde edilen eğrilerin doğrusallık göstermektedir. Ancak 0,5 ppm'den daha yüksek FUM konsantrasyonlarında ise (1, 5 ve 10 ppm) eğrilerin doğrusallıktan çıktığı görülmektedir. Yüksek FUM konsantrasyonlarında anti FUM 8F4 antikorunu FUM ile doymakta, yüzeye bağlanan antikor miktarı azaldığı için sensör yanıtları düşmektedir. Sensör yanıtlarının düşük olduğu kalibrasyon bölgesinde ölçümlerin yapılması doğruluktan çıkmaya neden olmaktadır. Kalibrasyon eğrisinin 0-10 ppm aralığında hazırlanması regresyon katsayısını (R^2) düşüreceği için bu aralıkta ölçümlerde sensogramlar güvenilirlik sınırından çıkmaktadır. Kalibrasyon eğrilerinde tüm FUM immobilize edilen SAM yüzeylerinde doğrusal bölge 0-0,5 ppm FUM aralığında kalmaktadır.

Kalibrasyon eğrisi, MUA ile SAM yapılan yüzeylerin hepsinde 0-0,5 ppm FUM konsantrasyon aralığı için irdelendi ve en yüksek sensör hassasiyeti 2 mM FUM immobilize yüzeyde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 kullanılması ile elde edildi (deteksiyon limiti **0,109 ppm** FUM). Bu sonuçlar doğrultusunda, tüm yüzeylerde regresyon katsayıları birbirlerine yakın değerlerde ve kuvvetli bağıntılı olarak değerlendirilmektedir.

MUA, literatürde en sık kullanılan SAM ajanıdır ancak analit immobilizasyonu için yüzeydeki karboksil grubunda modifikasyonlar gerçekleştirilmektedir. FUM immobilizasyonunda antikorun amin grubuna spesifik olmasından dolayı molekülün yapısında bulunan karboksil gruplarının yüzeyde immobilizasyon için kullanılması gerekmekte, bu sebeple yüzey amine edilmektedir. Ancak denge reaksiyonlarında reaktantların hepsi ürüne dönüşmez. Dolayısıyla modifikasyon verimi % 100'den düşük olacaktır. Immobilizasyonda aminleme reaksiyonunun veriminden kaynaklanabilecek hatalar sistemin hassasiyetini azaltabilir. Bu sebeple lineer ajanın karboksil grubu

yerine amin grubu içeren alternatifi olan 11-Mercaptoundecanamide (MUD) tez kapsamında kullanıldı.

SAM yüzeyin MUD ajanı kullanılarak yapılması sonucu elde edilen ortalama frekans farkları, standart hatalar, regresyon sayısı ve hassasiyet hesaplandı. MUA ile SAM oluşturulmasından elde edilen değerler ile karşılaştırılabilmesi için çalışmada FUM immobilizasyon konsantrasyonu optimize edildi ve elde edilen frekans farkı (ΔF : 37,95 Hz) ve standart sapma (1,023998 Hz) değerlendirilerek 2 mM konsantrasyonda FUM ile immobilizasyon yapılmasına karar verildi. Ayrıca biyolojik algılayıcı olarak anti FUM 8F4 miktarı da SAM ajanın kullanılması ile elde edilen en yüksek hassasiyetteki yüzey ile kıyaslanması açısından 0,05 mg/ml olarak kullanıldı (37,95 Hz). Ortalama frekans farkı MUA ile SAM yapılan yüzeyle kıyaslandığında daha düşük frekans farkı oluşturduğu belirlendi. FUM inhibisyonu yapılarak gerçekleştirilen yarışimli sistemde elde edilen frekans farkları ile kalibrasyon eğrisi elde edildi. Kalibrasyon eğrisinde doğrusallık 0-0,5 ppm aralığında elde edildiği için deteksiyon limiti bu aralıkta hesaplandı ve **0,0669 ppm** değeri elde edildi. Sistemin güvenilirliğinin irdelenmesi açısından ise regresyon katsayısı hesaplandı (0,9429) ve kuvvetli bağıntılı olduğu sonucuna ulaşıldı. MUA ile SAM yapılan yüzeyle kıyaslandığında (0,9946), MUD ile SAM oluşturulan yüzeyde mutlak doğruluğun nispeten azaldığı görüldü. Ancak FUM dedeksiyonu için QCM immünosensöründe immobilizasyon etkinliklerinin geliştirilmesi çalışmasında, regresyon katsayısı kuvvetli bağıntılı değerlerde olduğu sürece en önemli kriter olarak deteksiyon limitleri değerlendirildi. Dolayısıyla MUA ve MUD ile SAM oluşturulan yüzeyler kıyaslandığında MUD ile hazırlanan yüzeyin FUM deteksiyonunu daha hassas miktarda ölçebildiği sonucuna ulaşıldı.

SAM için kullanılan farklı polaritede uç gruba sahip yapıların kullanılması ile immobilizasyonda etkinliklerin incelenmesi açısından hidroksil gruplarının modifikasyonu da irdelendi. Bu amaçla 11-merkaptoundekanol (MUO) ajanı kullanılarak hidroksi grubu ihtiva eden SAM yüzey hazırlandı. Hidroksi gruplarının aminlendirilmesi için karbonildiimidazol (CDI) gibi bir çapraz bağlayıcı ajanın kullanılması, tiyonil klorür (SOCl_2) ile halojenlendirme, enzimatik veya periyodat ile oksidasyon yöntemleri kullanılabilir. Ancak oksidasyon, sekonder alkoller için uygundur, SOCl_2 gibi kuvvetli halojenlendirme reaksiyonu için altın uygun bir yüzey

değildir, CDI ile ise polimer kimyasında, nano tüp yüzeylerde, membran ve boncukların yüzeylerinin aktifleştirilmesinde sıklıkla kullanılan bir ajandır. Tez çalışmasında içerisinde CDI'nın kullanılması sayesinde EDA ile yüzeydeki hidroksi grupları arasında karbamat yapı oluşturularak immobilizasyonlar yapıldı. MUA ile SAM oluşturulmasına alternatif olarak MUO ile SAM yapılan yüzeylerin etkinlikleri değerlendirildi.

MUA ve MUD ile SAM oluşturulmasından elde edilen değerler ile karşılaştırılabilmesi için MUO ile SAM oluşturulan yüzeyde de FUM kaplama optimizasyonu yapıldı ve 2 mM FUM immobilizasyonunun tüm yüzeylerde ideal kaplama miktarı olduğu sonucuna ulaşıldı. MUO ile SAM oluşturulan yüzeyde anti FUM 8F4'ün uygulanması ile MUA ve MUD yüzeylerle elde edilen ortalama frekans farkına kıyasla daha düşük değerde (Δf : 33,13 Hz) sinyal azalması olduğu görüldü. MUA ve MUD ile SAM oluşturulan yüzeyler ile ortalama frekans farklarının, standart sapma değerinin, FUM deteksiyon limitinin kıyaslanabilmesi için anti FUM 8F4 antikoru 0,05 mg/ml olarak kullanıldı. FUM inhibisyonu yapılarak gerçekleştirilen yarışmalı sistemde elde edilen frekans farkları ile kalibrasyon eğrisi elde edildi ve 0-0,5 ppm aralığında deteksiyon limiti **0,1323 ppm** değerinde elde edildi. Lineer SAM ajanları arasında FUM tespitinde en hassas deteksiyona olanak sağlayan en düşük LOD değeri MUD yüzeyin kullanılması ile elde edilmiş oldu.

MUO ile SAM yüzey çalışmaları ile FUM deteksiyonunda hassasiyet arttırılamamış olsa da başka kazanımlar elde edilebildiği görüldü. MUO ile SAM oluşturulan yüzeyde, işlemler sırasında FBS bloklamaya ihtiyacın ortadan kaldırıldığı sonucuna ulaşıldı. Böylece proste işlem sayısı ve süresi kısaltılmış oldu. Diğer yandan yüzey immobilizasyonunda dendrimer yapıların kullanılmasında da yararlanılacak olan "altın yüzeyde hidroksi gruplarının aktivasyonu" metodu MUO ile SAM oluşturulması sırasında geliştirildi.

Nanoparçacık yapılardan olan dendrimer ve dendronlar sağladığı pek çok avantajı ile beraber eşsiz polimerik yapılardır. Nanoteknoloji dışında dendron/dendrimer yapılar farklı birçok alanda kullanılırlar çünkü dendrimer ve dendronlar sentezlendikleri yöntem ve materyallere bağlı olarak pekçok özelliğe sahip olabilirler. Bazı majör uygulamalarda; biyo-konjügasyonda çok değerlikli iskele olarak, hedefli terapötik

yapılar geliştirilmesinde taşıyıcı olarak, analitik tayinler için sinyallerin arttırılmasında, konjugasyon için yüzeylerin ve partiküllerin işlevsel hale getirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Sensör sistemlerinde kullanımı ise ilk kez Svobodova ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışma ile anlamlı hale gelmiştir. Bu çalışmada, glikoz tespiti için amperometrik tabanlı bir cihazda doğrudan altın substratlar üzerine adsorbe edilen amin sonlu 4. jenerasyon PAMAM dendrimerleri ile SAM oluşturduklarına dair bir rapor sunmuşlardır. İlerleyen yıllarda TNT analizinde “köpek burun” adı verilen gaz sensörlerinin geliştirilmesinde yine yüzey modifikatörü olarak PAMAM dendrimerler kullanıldı [76], [77].

Dendrimerlerin sensör yüzeyinde iyi bir yüzey modifikatörü olarak kullanılmasında en önemli sebeplerden bir tanesi de yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların diğer makromoleküllerde mevcut oldukları zaman aktivitelerine kıyasla daha yüksek kimyasal reaktivite gösterme eğiliminde olmalarından dolayıdır. Böylece analit immobilizasyonunda daha yüksek verimde konjugasyon sağlanabilmektedir. Sensörlerde kullanımının bir diğer avantajı immobilize moleküllerin yoğunluğu, moleküller arası boşlukları ve genel reseptör tabakasının kalınlığı üzerinde yüksek kontrol sağlanabilmesidir. Bu sebeplerle tez çalışmasında lineer SAM ajanlarının yanısıra dendron yapıda makromoleküller ile yüzey modifikasyonları gerçekleştirilerek FUM deteksiyonunda etkinlikleri belirlendi.

Dendrimerler birçok dendron yapının tek çekirdekte birleşmesi ile oluşan küresel yapılardır. Dendronlar ise çekirdek üzerinde büyüyen polimerik zincirlerin yelpaze şeklinde yer almış halidir. Literatürde dendrimerler ile SAM oluşturularak yapılan çalışmalar mevcut olmasına rağmen dendronlar ile SAM çalışmalarına henüz yer verilmemiştir. Dendronlar, yapılarında bulunan tiyol (-SH) grubu sayesinde altın yüzeyde dendrimerlere göre daha kuvvetli bağlanma yapabilmektedirler. Tez çalışmasında, dendronlar ile SAM oluşturularak yüzeyin zenginleştirilmesi üzerine çalışmalar gerçekleştirildi. Dendrimerler/dendronlar farklı jenerasyonlarda üretilmektedir ve her bir jenerasyonun yüzeyde kullanım etkisi birbirinden farklılıklar göstermektedir. Bu sebeple tez kapsamında 3 farklı jenerasyondan dendronlar kullanılarak immobilizasyonda etkinlikleri kıyaslanmıştır.

Polyester-8-hidroksi-1-asetilen bis-MPA dendron (G3 DND), Polyester-16-hidroksi-1-asetilen bis-MPA dendron (G4 DND), Polyester-32-hidroksi-1-asetilen bis-MPA dendron (G5 DND) ile QCM altın yüzeyde SAM hazırlandı. İnovatif bir yaklaşım ile QCM yüzeyde dendronlar kullanılarak oldukça hassas FUM dedeksiyonu yapabilen QCM immünosensörü geliştirildi.

Dendronlar ile SAM yapılan yüzeylerde 0,05 mg/ml anti FUM 8F4'ün kullanılması ile en yüksek frekans farkı G5 DND yüzey ile elde edildi (ΔF : 55,85 Hz). 0-10 ppm konsantrasyon aralığında FUM inhibisyonu ile yapılan yarışımlı sisteme dair elde edilen frekans farkları ile kalibrasyon eğrileri dendron yüzeyler için de çizildi. Lineer yüzeylerde olduğu gibi 0,05 ppm FUM konsantrasyonundan daha yüksek miktardaki FUM inhibisyonu ile sensör cevaplarının azaldığı görüldü. Kalibrasyon eğrisinin doğrusal olduğu aralıkta (0-0,5 ppm FUM) elde edilen korelasyon katsayıları incelendiğinde, lineer ajanlar ile elde edilenlerden daha düşük değerde olduğu görüldü (G3 DND ile 0,8278, G4 DND ile 0,8351 ve G5 DND ile 0,8261) (Çizelge 5. 1). Yüzeyde doğrudan dendronların kullanılması ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin Evans'ın regresyon sayıları kılavuzuna göre kuvvetli bağıntılı skalada olduğu sonucuna ulaşıldı. Sistemler FUM algılama hassasiyetleri açısından, G3 DND ile **0,0849 ppm**, G4 DND ile **0,0622 ppm** ve G5 DND ile **0,0456 ppm** LOD değerinde elde edildi. Lineer ajanlardan MUD ile gerçekleştirilen SAM yüzeyde en yüksek hassasiyete ulaşıldığı için dendron ile SAM oluşturulan yüzeyler MUD ile SAM oluşturulmuş olan yüzeydeki LOD değerleri ile kıyaslanması uygun olmaktadır. Bu açıdan G3 DND ile elde edilen LOD değeri MUD ile elde edilenden daha yüksek, G5 DND ile elde edilen LOD değeri ise daha düşüktür (Çizelge 5. 1). Sonuç olarak, dendron yüzey (G5 DND) kullanılması ile oluşturulan SAM yüzeyde anti FUM 8F4 uygulamasında elde edilen toplam frekans farkı lineer ajanlar ile elde edilen değerlerden daha yüksek değerde elde edildi. Ancak altın yüzeye doğrudan dendronların immobilizasyonunda, yüzeyde oluşan boşluklara antikörlerin adsorbe olmasından dolayı ölçümler arası tutarsızlıklar olduğu ve bu sebeple standart hataların arttığı görüldü.

Dendronların kullanılması sayesinde daha düşük değerlerde FUM dedekte edilebildiği ancak standart sapmaların azaltılması gerektiği sonucuna ulaşıldı. Bu sebeple lineer

ajanlar ile birlikte dendronların kullanılması sayesinde hem algılama limitlerinde hassasiyetin artırılması hem de standart hatanın azaltılması sağlandı.

İki katmanlı SAM uygulamasında ilk katmanda seçilecek lineer ajan için iki önemli kistas değerlendirildi. Brinci önemli kistas düşük standart hata ile yüksek hassasiyette FUM deteksiyonunun yapılabilmesi olarak belirlendi. İkinci kistas ise dendronların tiyol grupları ile kolaylıkla, ama seçici olarak reaksiyona girebilecek bir fonksiyonel gruba sahip olmasıdır. Bu kriterlere göre ilk katmanda kullanılan en ideal ajan MUD'tur, Bu molekülün kullanmanın bir başka avantajı, kovalent bağ oluşturmak için kullanılan fonksiyonel grupların kimyasal reaktivitesinin diğer makromoleküllerden daha yüksek olmasıdır. MUD ajanının yüzeyde sahip olduğu amin grubu sülfosüksinimidil 6-(3'-(2- pridilditiyo)propionamido)heksanoat (Sülfo-LC-SPDP) heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ile dendronun tiyol grubuna kolaylıkla bağlanabilmektedir.

Bu amaçla ilk katmanda MUD ajanları oluşturulduktan sonra G3 DND, G4 DND ve G5 DND ile SAM katmanlar oluşturularak FUM kaplama optimizasyonları yapıldı. 1,75 mM ve 2 mM kaplamalarda G4 DND ve G5 DND ile düşük standart sapma ve yüksek frekans farkları elde edildi (MUD G4 DND ile 1,75 mM FUM kaplamada 56,33 Hz; 2 mM FUM kaplamada 67,80 Hz; MUD G5 DND ile 1,75 mM FUM kaplamada 64,14 Hz; 2 mM FUM kaplamada 69,41 Hz) (Çizelge 5. 1). Bu yüzeylerde elde edilen yüksek frekans farkları sadece dendronların kullanılarak oluşturulduğu yüzeyler ile elde edilenlerden daha yüksek değerlerde olduğu görüldü. İki katmanlı SAM oluşturma sayesinde antikorun sensör yüzeyine daha fazla bağlanmasından kaynaklanan frekans farkları artışının temelde pek çok nedenle olabileceği düşünülebilir. İlk düşünülen, dendronların SPDP ajanı ile aktive edilerek immobilizasyonunda etkinliğin inkübasyonla serbest şekilde altın yüzeyde bağlanmasından daha etkin olabileceğidir. İkincisi ise iki katmanlı SAM oluşturulduğunda, immobilize FUM moleküllerinin yüzeyden uzaklaşması ile daha fazla solventle etkileşime geçmesinden dolayı antikor bağlama kapasitesinde artış olabileceğidir.

Çizelge 5. 1 QCM immünoensöründe FUM deteksiyonuna yönelik geliştirilen immobilizasyon yüzeylerinden elde edilen LOD, LOQ, korelasyon katsayısı, SD, Frekans farkları

SAM Ajanı	FUM Kaplama Miktarı (mM)	Anti FUM 8F4 Miktarı (mg/ml)	ΔF (Hz)	Standart Sapma (SD)	Eğim	Korelasyon Katsayısı	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
MUA	1,75	0,1	40,34	5,1945	17,68	0,924	0,588	1,764
		0,05	41,55	2,8823	31,683	0,995	0,182	0,546
	2	0,1	32,33	2,1312	24,555	0,931	0,174	0,522
		0,05	41,8	1,732	31,735	0,995	0,109	0,327
MUD	2	0,05	37,95	1,277	19,3	0,924	0,132	0,397
MUO	2	0,05	33,8	1,024	29,956	0,995	0,067	0,201
G3 DND	2	0,05	41,04	1,9615	46,748	0,828	0,085	0,252
G4 DND	2	0,05	46,89	1,78	57,275	0,835	0,062	0,187
G5 DND	2	0,05	55,85	1,9295	84,643	0,826	0,046	0,137
MUD/ G4 DND	1,75	0,05	56,06	1,883	75,304	0,904	0,05	0,15
MUD/ G4 DND	2	0,05	66,7	1,591	79,486	0,91	0,04	0,12
MUD/ G5 DND	1,75	0,05	64,14	0,757	58,822	0,911	0,026	0,077
MUD/ G5 DND	2	0,05	69,5	0,407	96,388	0,94	0,008	0,025

0-10 ppm FUM ile inkübasyona dayalı sistemler ile elde edilen veriler değerlendirildiğinde bu yüzeylerde de öncekiler gibi 0,5 ppm FUM miktarından daha yüksek konsantrasyonlarda sensör sinyalinin azalmasında fazla fark oluşmadığı görüldü. MUD G4 DND ve MUD G5 DND ile 1,75 mM ve 2 mM FUM kaplama yapılmış yüzeyde 0-0,5 aralığında kalibrasyon eğrileri hazırlanarak regresyon katsayıları ve FUM deteksiyon limitleri belirlendi. Sırası ile regresyon katsayıları 0,904, 0,910, 0,911 ve 0,940 olarak elde edildi (Çizelge 5. 1). G4 DND ve G5 DND'nin tek başına yüzeyde uygulanması ile elde edilen regresyon katsayılarına göre (sırası ile 0,8278, 0,8261), MUD kullanılması ile elde edilen değerlerin azaldığı, dolayısıyla güvenilirliğin arttığı sonucuna ulaşıldı. Bu sayede doğruluğun artırılması için MUD kullanılarak 2 katlı SAM oluşturulması ile güvenilirlik açısından istenilen sonuçların elde edildiği görüldü. İki katlı

SAM yüzeylerde dendronların kullanılması hedeflenen bir diğer unsur ise yüksek güvenilirlik içinde hassasiyetin artırılmasıdır. Elde edilen regresyon sayıları (sırası ile 0,050, 0,040, 0,026 ve **0,008** LOD) dendronların tek başına kullanılmasıyla elde edilenler (G4 DND ile 0,0622 ppm ve G5 DND ile 0,0456 ppm LOD) ile kıyaslandığında arttığı görüldü.

Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm yüzey modifikasyonları bir arada değerlendirildiğinde Çizelge 5. 1'de görüldüğü gibi en düşük FUM deteksiyon limiti MUD lineer ajan ile G5 DND dendronunun kullanıldığı SAM yüzeyde 2 mM FUM immobilizasyonu ile elde edildi. MUD ve G5 DND'nin birlikte kullanılması ile elde edilen LOD değeri 0,008 ppm FUM kontaminasyonunu detekte edebilme özelliğindedir. FUM için Avrupa Birliği'nin regresyonunda genel beslenmede en üst limit 4 ppm, bebek gıdasında ise bu limit 2 ppm değerindedir, FUM ekstrasyonunda kontamine olduğu şüphelenilen mısır veya diğer (buğday, pirinç, darı gibi) besin maddelerinin içeriğindeki kontaminasyonun belirlenebilmesi için ilk olarak örnekte ekstraksiyon işlemi uygulanmaktadır. Ekstraksiyon methodunda parçalama işlemini takiben %70 metanol ile ekstrakte etme basamağı uygulanmaktadır. Böylece FUM ile kontamine örnekteki FUM içinde yüksek oranda metanolün de bulunduğu matris ortamına geçmekte, analizler bu ortamda gerçekleştirilmektedir. Matris ortamında çok düşük değerlerde bulunan FUM miktarını HPLC, LC-MSMS gibi enstrümantel analiz yöntemleri ile tayin edebilmek için genellikle ilk olarak matris ortamından uzaklaştırmak ve örnek zenginleştirmek için immünafinite kolonlar ile saflaştırma yapılmaktadır. Çünkü matris ortamı analizin hassasiyetini etkilemektedir.

Tez çalışmasında geliştirilen metot ile ulaşılan LOD değeri sayesinde matris etkisi minimize edilebilecektir. En hassas ölçüm gerekliliği olan bebek mamalarında dahi, ekstrakta 2 ppm (2 mg/L) FUM miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Tez kapsamında geliştirilen QCM ile 2 ppm FUM kontaminasyonunu analiz edebilmek için 1 ul örnek, 0,05 mg/ml anti FUM 8F4 içeren 250 ml PBS'e alınarak uygulama yapılabilmektedir. 1/250 dilüsyon faktörü ile matris etkisinin azaltılabilecektir.

Tez çalışmaları kapsamında henüz ticari olarak temin edilemeyen amid modifiye dendronlar son zamanlarda piyasaya arz edilmiş durumdadır. Bu dendronların özellikle

kuarterner amonyum tuzlarının MUD yüzeylerde kullanımı ile regresyon katsayılarının daha da yükseltilebileceği böylece ölçümlerde mutlak doğruluk paylarının arttırılabileceği öngörülebilir.

FUM deteksiyonu için QCM immünosensöründe yüzey modifikasyonlarında dekstran, alginik asit, pektin, karboksimetil selüloz, karboksimetil dekstran, poligliserol, polietilen glikol, poli-L-lisin veya poliakrilik asit gibi hidrofilik polimer malzemeler ile etkinlik çalışmaları türevlendirilebilir [78].

Tez kapsamında geliştirilmiş olan QCM immünosensörü ile FUM kontaminasyonunda sınır değerlerde miktar tayini yapılabilmektedir. Ancak FUM'nin çok daha az miktarları ile sürekli maruziyet halinde otoimmün bir rahatsızlık olan çölyak hastalığı, fetüste nöral tüp bozuklukları, damar fonksiyon yapısında bozukluk, safra kanallarında hiperplazi, karaciğer ve özefagus kanseri gibi pek çok etkisinin olduğu saptanmıştır [79]. Düşük miktarlarda beslenmenin de kontrol altına alınabilmesi için gıdaların üretimi, depolanması ve işlenmesi sırasında eş zamanlı sürekli kontrollerin yerinde yapılması gereklidir. Düşük kontaminasyon değerlerinin de belirlenebileceği kolay kullanımlı, taşınabilir, hassas sensör sistemlerinin geliştirilmesi gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Tez kapsamında geliştirilen QCM immünosensörü sayesinde bu gereksinimler için önemli veriler elde edilerek gelecekte ilerletilebilecek teknolojiler ile entegrasyonlar sağlanarak daha geniş alanda çok sayıda kullanıcıya bu sistemlerin ulaştırılması gereklidir.

KAYNAKLAR

-
- [1] Souza, D.F., (2001). "Immobilization and stabilization of biomaterials for biosensor applications", *Appl Biochem Biotechnol*, (1-3):225-38.
- [2] Janshoff, A., Galla, H. ve Steinem, C., (2000). Piezoelectric mass-sensing devices as biosensors - An alternative to optical biosensors, *Angewandte Chemie - International Edition*. 39, Argentina.
- [3] Sözmen, N.N., (2008). Biyomedikal Uygulamalarında Akıllı Polimer Kullanılması ve Karakterizasyon Yönteminin Kuart Kristal Mikro Dengeleyici Sistemler ile Geliştirilmesi, Başkent Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [4] Leckband, D. ve Langer, R., (1991). "An approach for the stable immobilization of proteins", *Biotech and Bioeng*, 37: 227-237.
- [5] Chaki, K.N. ve Vijayamohanan, K., (2002). "Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications", *Biosensors and Bioelectronics*, 17(1-2) :1-12.
- [6] Bhardwaj, T., (2014). "A Review on Immobilization Techniques of Biosensors", *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, 3(5):294-298.
- [7] Sonny, S.M., Neelakantapillai S., Changcheng Z., Campagnolo, C. ve Batt, C., (2004). "Dendrimer-Functionalized Self-Assembled Monolayers as a Surface Plasmon Resonance Sensor Surface", *Langmuir*, 20(16):6808-6817.
- [8] Satija, J., Sai, R.V., Mukherji, S. ve Mater, J., (2011). "Chem. Dendrimers in biosensors: Concept and applications", *J Mater Chem.*, 21(14):367-386.
- [9] Wang, B. ve Eric, V., (2011). *Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications*, Wiley Series in Drug Discovery and Development, 15,1, John Wiley & Sons, New Jersey.
- [10] Trinchi, A. ve Muster, T.H., (2007). "A Review of Surface Functionalized Amine Terminated Dendrimers for Application in Biological and Molecular Sensing", *Supramolecular Chemistry*, 19(7): 431-445.
- [11] Zhang, H., Zhang, L., Diao, X., Li, N. ve Liu, C., (2017). "Toxicity Of The Mycotoxin Fumonisin B1 On The Insect Sf9 Cell Line" *Toxicon*, 129: 20-27.

- [12] Soriano, A.J.M. ve Dragacci, S.B., (2004). "Food Research International", Occurrence Of Fumonisin in Foods, 37: 985–1000.
- [13] Gelderblom, W.C. ve Jaskiewicz, K., Marasas, W.F., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vlegaar, R., (1988). "Fumonisin–Novel Mycotoxins With Cancer-Promoting Activity Produced By Fusarium Moniliforme", Applied And Environmental Microbiology, 54: 1806–1811.
- [14] Lin, X. ve Guo, X., (2016). "Advances in Biosensors, Chemosensors and Assays for the Determination of Fusarium Mycotoxins" Toxins, 8(6): 161-170.
- [15] Man, Y., Liang, G., Li, A. ve Pan, L., (2017). "Recent Advances in Mycotoxin Determination for Food Monitoring via Microchip", Toxins, 9: 324-330.
- [16] Parikha M., (2016). "Biosensors and Their Applications – A Review" Journal of Oral Biology and Craniofacial Research 6(2): 153-159.
- [17] Tüylek Z., (2017). "Biyosensörler ve Nanoteknolojik Etkileşim", BEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 6(2):71-80.
- [18] Bulut Y., (2011). "Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış", 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11), 16-18 Mayıs 2011, Elazığ, Türkiye.
- [19] Blum, L.J. ve Coulet P.R., (1991). Biosensor Principles and Applications, CRC Press, Boca Raton.
- [20] Patel, P.D., (2002). "(Bio)sensors for Measurement of Analytes Implicated in Food Safety: A review", TrAC Trends Anal. Chem., 21: 96-115.
- [21] Lei, J. ve Ju, H.,(2012). "Signal amplification using functional nanomaterials for biosensing", Chem. Soc. Rev., Chemical Society Reviews, 41(6):2122-2134.
- [22] Kökbaş, U., Kayrın, L. ve Tuli, A.,(2013). "Biyosensörler ve Tıpta Kullanım Alanları Biosensors and their Medical Applications", Archives Medical Review Journal, 22(4):499-513.
- [23] Fanlan, X., Siyka, M.W., Hongying, I.S., Suter, D.Z. ve Sun, Y., (2008). "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review" , Analytica Chimica Acta, 620 (1):8-26.
- [24] Vo-Dinh, T. ve Cullum, D., (2000). "Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnosis", Fresenius J Analytical Chemistry, 366:540-551.
- [25] Schultz, J.S., (1987). "Sensitivity and dynamics of bioreceptor-based biosensors", Ann N Y Acad Sci., 506:406-14.
- [26] Preda, G.,(2011). Sol-Gel Technology in Enzymatic Electrochemical Biosensors for Clinical Analysis, Otilia Spiridon Bizerea and Beatrice Vlad-Oros., Biosensors for Health, Environment and Biosecurity., 17:365-403, Timișoara.
- [27] Ricci, F., Volpe, G., Micheli, L. ve Palleschi, G., (2007). "A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis", Analytica Chimica Acta, 605:111–129.

- [28] Moina, C. ve Ybarra, G., (2012). Fundamentals and Applications of Immunosensors, Advances in Immunoassay Technology, Arjantin.
- [29] Burg, T.P., Godin, M., Knudsen, S.M., Shen, W., Carlson, G., Foster, J.S., Babcock, K. ve Manalis, S.R., (2007). "Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid", Nature. 446:1066-1069.
- [30] Hoa, X.D., Kirk, A.G. ve Tabrizian, M., (2007). "Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress", Biosensors and Bioelectronics, 23:151-160.
- [31] Moraes, A.C.M. ve Kubota, T.L., (2016). Recent Trends in Field-Effect Transistors-Based Immunosensors, Chemosensors, 4:20, Brazil.
- [32] Özoğlu Ö., Ünal A. ve Altuntaş E., (2017). "Biyosensörler: Gıda ve Sağlık Alanında Laktat Biyosensörleri", Turk J Life Sci., 2(2):180-193.
- [33] Konash, P.L. ve Bastiaans, G.J., (1980). "Piezoelectric Crystals as Detectors in Liquid Chromatography", Anal. Chem., 52:1929-1931.
- [34] Erbahar, D., (2012). Kuartz Kristal Mikrobaleans (QCM) Sensörlerin Sıvılardaki Zehirli Organik Kirleticilerin Tespitinde Kullanımı, Doktora Tezi, Fizik Anabilim Dalı, GTÜ, GEBZE
- [35] Arnau, A.A., (2008). "Review of Interface Electronic Systems for AT-cut Quartz Crystal Microbalance Applications in Liquids", Sensors, 8(1):370-411.
- [36] Sauerbrey, G., (1959). "Use of vibrating quartz for thin weighing and microweighing", Z. Phys., 155:260-262.
- [37] Schumacher, R., (1990). "The Quartz Microbalance: A Novel Approach to the In-Situ Investigation of Interfacial Phenomena at the Solid/Liquid Junction", Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 29(4):329-343.
- [38] Deakin, M.R. ve Byrd, H., (1989). "Prussian blue coated quartz crystal microbalance as a detector for electroinactive cations in aqueous solution", Anal. Chem., 61:290-295.
- [39] Thompson, M., Arthur, C. L. ve Dhaliwal, G. K., (1986). "Liquid-Phase Piezoelectric and Acoustic Transmission Studies on Interfacial Immuno Chemistry", Anal. Chem., 58:1206-1209.
- [40] Seo, M., Sawamura, I. ve Sata, N., (1990). "Extended Abstracts, The Electrochemical Society Fall Meeting", WA, 272, Seattle.
- [41] Bruckenstein, S., (1985). "An In Situ Weighing Study of the Mechanism for the Formation of the Adsorbed Oxygen Monolayer at a Gold Electrode", J. Electroanal. Chem., 188:131-136.
- [42] Anthony T., (1987). Biosensors: Fundamentals and Applications (Biosensors and Bioelectronics), Cranfield University, 770, Oxford
- [43] Mathew B.B., (2014). "Biosensors: A Modern Day Achievement Shruthi GS, Amitha CV", Journal of Instrumentation Technology, 2(1):26-39.

- [44] Guidera, R., Gandolfia, D., Chalyana, T., Pasquardinib, L., Samusenko, A., Pederzoli, C., Pucker, G. ve Avesia, L., (2015). "Sensitivity and Limit of Detection of biosensors based on ring resonators", *Sensing and Bio-Sensing Research*, 6:99-102.
- [45] Rathee, K., Dhull, V., Dhull, R. ve Singh S., (2016). "Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review", *Biochemistry and Biophysics Reports*, 5:35-54.
- [46] Ajami, S. ve Teimouri, F., (2015). "Features and application of wearable biosensors in medical care", *Journal of Research in Medical Sciences*, 20(12):1208-1215.
- [47] Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. ve Estrela, P., (2016). "Introduction to biosensors", *Essays in Biochemistry*, 60(1):1-8.
- [48] William, P. ve Ronkainen, J.N., (2013). "Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review", *Sensors*, 13(4):4811-4840.
- [49] Nuzzo, R.G., Dubois, L.H. ve Allara, D.L., (1990), "Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces, 1, Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers", *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (2): 558–569.
- [50] Arya, K.S., Solanki, P.R., Datta, M. ve Malhotra, M.D., (2009). "Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices", *Biosensors and Bioelectronics*, 24(9):2810-2817.
- [51] Singhad, P., Onodera, T., Mizuta, Y., Matsumoto, K., Miura, N. ve Toko, K., (2009). "Dendrimer modified biochip for detection of 2,4,6 trinitrotoluene on SPR immunosensor: Fabrication and advantages", *Sensors and Actuators B: Chemical.*, 137(2):403-409.
- [52] Wyszogrodzka, M. ve Haag, R., (2009). "Synthesis and Characterization of Glycerol Dendrons, Self-Assembled Monolayers on Gold: A Detailed Study of Their Protein Resistance", *Biomacromolecules*, 10 (5):1043–1054.
- [53] Taranekar, P., Baba, A., Park, J.Y., Fulghum, T.M. ve Advincula, R., (2006). "Dendrimer Precursors for Nanomolar and Picomolar Real-Time Surface Plasmon Resonance/Potentiometric Chemical Nerve Agent Sensing Using Electrochemically Crosslinked Ultrathin Films", *Advanced Func. Materials*, 16 (15): 2000-2007.
- [54] Shankaran, K.R.D. ve Miura, V.G.N., (2007). "Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 121(1): 158-177.
- [55] Stoia M., (2008). "Mycotoxins: A Review Of Toxicology, Analytical Methods And Health Risks- Review", *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology* 12(1):21-40.

- [56] Bennett J.W. ve Klich M., (2003). "Mycotoxins Clinical Microbiology Reviews", 497–516.
- [57] Tsitsigiannis, D.I., Dimakopoulou, M., Antoniou, P. ve Tjamos, C.E., (2012). "Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops", *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1): 158-174.
- [58] Gaag, B.V.D., Spath, S., Dietrich, H., Stigter, E., Boonzaaijer, G., Osenbruggen, T.V. ve Koopal, K., (2003). "Biosensors And Multiple Mycotoxin Analysis", *Food Control*, 14:251–254.
- [59] Commission Regulation (EC) No 1881, (2006). Setting Maximum Levels For Certain Contaminants in Foodstuffs(Text With EEA Relevance), OJ L 364, 5., Europe.
- [60] Domijan, A.M. ve Rada, A.H., (2012). "Fumonisin B(1): a neurotoxic mycotoxin", *Toksikol*, 63(4):531-44.
- [61] Yıldız, H. ve Selahattin S., (2004). "Mısır ve Mısır Kaynaklı Gıdalarda Fumonisinler", *Atatürk Üniv.Ziraat Fak. Derg.*,35 (1-2), 111-116.
- [62] Smithi, J.S. ve Thakur, R.A., (1996). "Occurrence and fate of fumonisins in beef" *Adv Exp Med Biol.*, 392:39-55.
- [63] Rensburg, B.J.V., Flett, B.C., Mc Laren, N.W. ve Mc Donald, A.H., (2011). "Sampling Variation In The Quantification Of Fumonisin In Maize Samples South African Journal Of Plant And Soil", *S. Afr. J. Plant & Soil*, 28(2).
- [64] Maragos, C.M. ve Thompson, V.S., (1999). "Fiber-optic immunosensor for mycotoxins", *Nat. Toxins*, 7(6):371-6.
- [65] Mullett, W., Lai, E.P. ve Yeung, J.M., (1998). "Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor", *Anal Biochem*, 258(2):161-7.
- [66] Mutlu, M., (2011). *Biosensors in Food Processing, Safety and Quality Control*, CRC Press, 65, USA.
- [67] Kadir, M.K.A. ve Tohill, I.E., (2010). "Development of an Electrochemical Immunosensor for Fumonisin Detection in Foods", *Toxins* 2(4): 382–398.
- [68] Milua, M., (2015). "A Fumonisin Immunosensor Based on Polyaniline-Carbon Nanotubes Doped with Palladium Telluride Quantum Dots.", *Sensors*, 15(1): 529–546.
- [69] Topuzogullari, M., Cakir, K.R., Isoglu, D.S., Bagirova, M., Akdeste, Z., Elcicek, S., Oztel, O.N., Baydar S.Y., Ates, S.C. ve Allahverdiyev, A.M., (2013). "Conjugation, characterization and toxicity of lipophosphoglycan-polyacrylic acid conjugate for vaccination against leishmaniasis" , *Journal of Biomedical Science*, 20(1):35.
- [70] Basalp, A., Mustafaeva, Z. ve Mustafaev, M., (2002). "Immunogenic Cu²⁺ -induced biopolymer systems comprising a steroid hormone, protein antigen, and synthetic polyelectrolytes", *Hybridoma*, 21: 45-51.

- [71] Kabanov, V.A., (2004). " From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines", Pure Appl Chem, 76:1659-1678.
- [72] Freysd'ottir J., (2000). "Production of monoclonal antibodies", Methods Mol Med., 40:267-79.
- [73] Nobel Ödülleri Resmi İnternet Sitesi, https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/, 20.03.2018
- [74] Kuçuk, M., Çevik, A. ve Kalaycı, R., (2005). "Deney Hayvanlarında Temel Uygulamalar", Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Der., 2(4):39-47.
- [75] Dündar, M. ve Bağış, H., (2010). Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları, Hibridoma Teknolojileri, Erciyes Üniversitesi Yayınları, 1.Edition., 1(7): 163-193, Kayseri.
- [76] Svobodova , L., Synejdarkova, M. ve Hianik, T. (2002). Anal. Bioanal. Chem. 373: 735-741.
- [77] Mizuta, Y., Onodera, T., Singh, P., Matsumoto, K., Miura, N. ve Toko, K., (2010). "Highly Sensitive Detection of TNT Using a Poly(amidoamine) Dendron-Based SPR Immunosensor", Sensors and Materials, 22(4):193–200.
- [78] AOAC Official Method 49.5.02., (2001). Determination of Fumonisin B1 and B2 in Corn and Corn Flakes, Liquid Chromatography with Immunoaffinity Column Cleanup, AOAC International.
- [79] Doğan, A. ve Tuzcu, M., (2001)., "Fumonisinler", Kafkas Üni. Vet. Fak. Derg.,7(2): 237-244.

HPLC SONUÇLARI

HPLC ile çalışma şartları ve Agilent marka HPLC cihazına ait CHEM 32 programı ile elde edilen sonuçlardır,

Data File : C:\Chem32\,,TA\22_15_2015_SVCN_FUMcOVA_ORANLAR_LC 20125-01-22 14-37-21\001-0101,D

Acq, Method: C18 PROTEIN ANALYSIS_22_01_15,M

The Acq, Method's Instrument Parameters for the Run were :

=====

Agilent 1100/1200 Quaternary Pump 1

=====

Control

Column Flow : 0,800 ml/min
Stoptime : 20,00 min
Posttime : Off

Solvents

Solvent A : 20,0 % (Solvent A)
Solvent B : Off
Solvent C : 80,0 % (Solvent B)
Solvent D : Off

PressureLimits

Minimum Pressure : 0 bar
Maximum Pressure : 400 bar

Auxiliary

Maximal Flow Ramp : 100,00 ml/min^2
Primary Channel : Auto
Compressibility : 100*10^-6/bar
Minimal Stroke : Auto

Store Parameters

Store Ratio A : Yes
Store Ratio B : Yes
Store Ratio C : Yes
Store Ratio D : Yes

Store Flow : Yes
Store Pressure : Yes

Timetable

Time	Solv,B	Solv,C	Solv,D	Flow	Pressure
0,00	0,0	80,0	0,0	0,500	
2,00	0,0	80,0	0,0	0,500	
2,01	0,0	20,0	0,0	0,500	
20,00	0,0	20,0	0,0	0,500	

=====

Agilent 1100/1200 Fluorescence Detector 1

=====

Signal

Excitation : 280 nm
Emission : 350 nm

Time

Stoptime : As pump
Posttime : Off
Peakwidth : > 0,2 min
PMT-Gain : 10

Analog Outputs

Zero offset output 1 : 5 %
Zero offset output 2 : 5 %
Attenuation output 1 : 100 LU
Attenuation output 2 : 100 LU

Phosphorescence Detection : Off

Fluorescence Scan :

Excitation Range : 220 to 380 nm, Step 5 nm
Emission Range : 300 to 500 nm, Step 5 nm

Lamp

Only On During Run : Yes
Economy Mode : No
Lamp Energy Reference : On
Enable analysis
when lamp is off : No

Special Setpoints

Baseline Behavior : Append
Signal Polarity : Positive
Fit Spectral Range : Yes

=====

Agilent 1200 Variable Wavelength Detector 1

=====

Signal

Wavelength : 280 nm
Peakwidth : > 0,1 min

Time

Stoptime : As pump

Posttime : Off
Analog Output
Zero offset analog out,: 5 %
Attenuation analog out,: 1000 mAU

Store Additionally
Signal w/o Reference : No
Reference : No

Autobalance
Prerun balancing : Yes
Postrun balancing : No

Special Parameters
Margin for negative Absorbance: 100 mAU
Signal Polarity : Positive
Enable analysis when lamp is off: No
Scan from : 190 nm
Scan to : 400 nm
Scan step : 2 nm

Timetable is empty

=====

Agilent 1100 Autosampler 1

=====

Injection
Injection Mode : Standard
Injector volume : 20,00 µl
Optimization : none

Auxiliary
Drawspeed : 100 µl/min
Ejectspeed : 100 µl/min
Draw position : 0,0 mm

Time
Stoptime : As Pump
Posttime : Off

=====

Agilent 1100/1200 Column Thermostat 1

=====

Temperature settings
Left temperature : 37,0°C
Right temperature : Same as left
Enable analysis : When Temp, is within setpoint +/- 0,8°C
Store left temperature : Yes
Store right temperature: No

Time
Stoptime : As pump
Posttime : Off

Column Switching Valve : Column 1

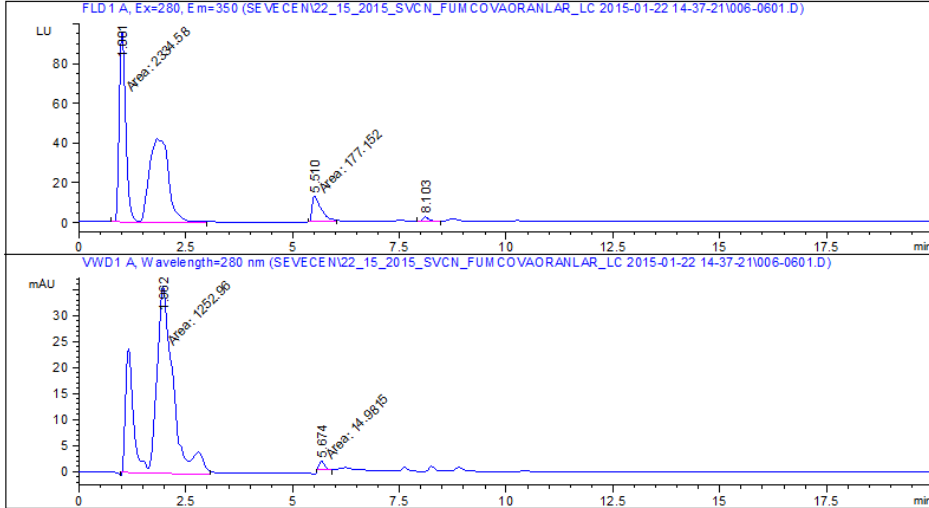
Timetable is empty

Data File C:\CHEM32\...EN\22_15_2015_SVCN_FUMCOVAORANLAR_LC 2015-01-22 14-37-21\003-0301.D
 Sample Name: FUM cOVA 10

```

=====
Acq. Operator   : OE                               Seq. Line :    3
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 3
Injection Date  : 1/22/2015 3:23:28 PM           Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20.0 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\22_15_2015_SVCN_FUMCOVAORANLAR_LC 2015-01-22 14-37-21\
                C18 PROTEIN ANALYSIS_22_01_15.M
Last changed   : 1/22/2015 2:37:09 PM by OE
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\23032017INJECTORYIKAMA.M
Last changed   : 3/31/2017 5:54:57 PM by BENGU_PRO_G
Sample Info    : FUM cOVA 10
  
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=280, Em=350

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Height [LU]	Area %
1	1.001	MM	0.4077	2334.57764	95.43328	92.2358
2	5.510	MM	0.2383	177.15242	12.39207	6.9990
3	8.103	BB	0.1383	19.36666	2.13368	0.7651

Totals : 2531.09671 109.95904

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=280 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	1.154	BV	0.2004	323.65979	24.31560	24.6930
2	1.962	VV	0.3256	876.92883	36.29098	66.9035
3	2.795	VB	0.3028	85.37978	4.17305	6.5139
4	5.674	BB	0.1769	24.76779	2.26804	1.8896

Totals : 1310.73619 67.04767

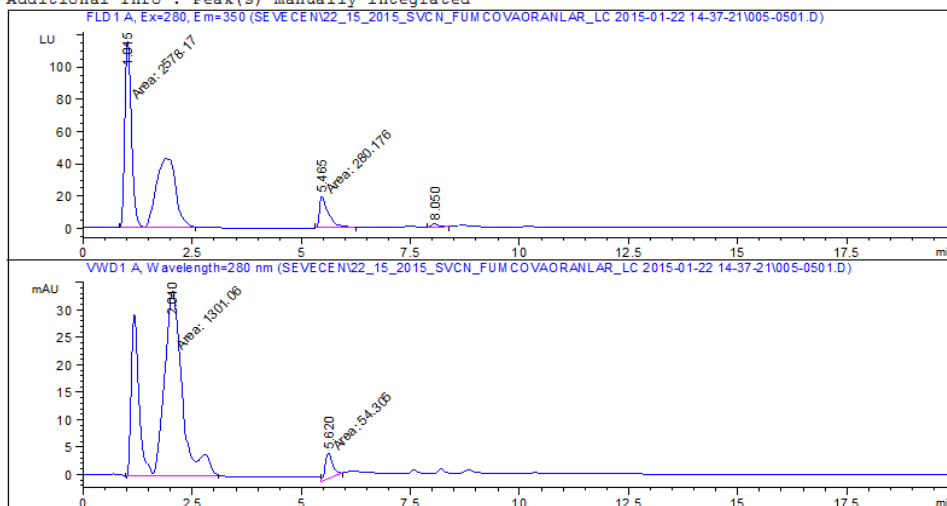
=====
 *** End of Report ***

Data File C:\CHEM32\...\EN\22_15_2015_SVCN_FUMCOVAORANLAR_LC 2015-01-22 14-37-21\004-0401.D
 Sample Name: FUM COVA 20

```

=====
Acq. Operator   : OE                               Seq. Line :    4
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 4
Injection Date  : 1/22/2015 3:45:35 PM           Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20.0 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\22_15_2015_SVCN_FUMCOVAORANLAR_LC 2015-01-22 14-37-21\
                C18 PROTEIN ANALYSIS_22_01_15.M
Last changed   : 1/22/2015 2:37:09 PM by OE
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\23032017INJECTORYIKAMA.M
Last changed   : 3/31/2017 5:54:57 PM by BENGU_PRO_G
Sample Info    : FUM COVA 20
  
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=280, Em=350

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Area *s	Height [LU]	Area %
1	1.015	MM	0.3708	2578.17188	115.89082	89.6035	
2	5.465	MM	0.2381	280.17636	19.60968	9.7374	
3	8.050	BB	0.1385	18.96261	2.08516	0.6590	

Totals : 2877.31085 137.58566

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=280 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.040	MM	0.6448	1301.06177	33.62980	95.9933	
2	5.620	MM	0.1948	54.30504	4.64517	4.0067	

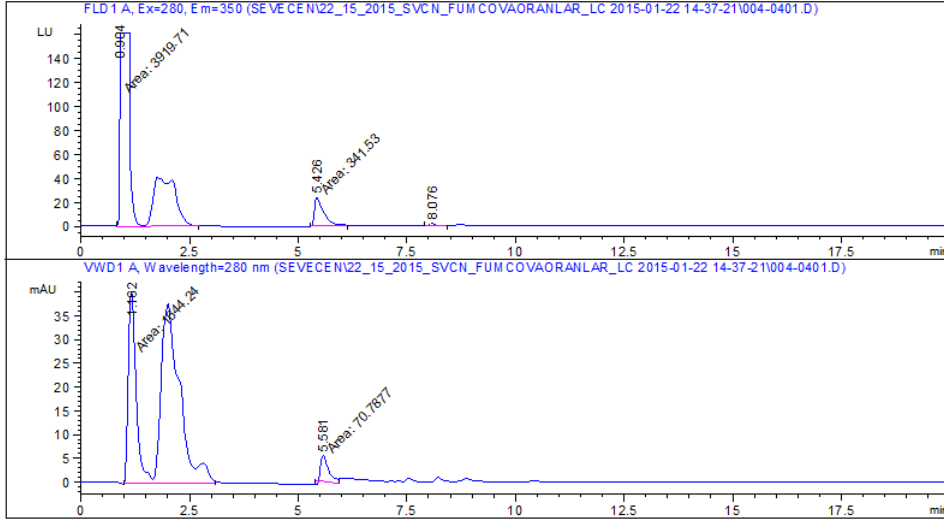
Totals : 1355.36681 38.27496

=====
 *** End of Report ***


```

=====
Acq. Operator   : OE                               Seq. Line :    5
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 5
Injection Date  : 1/22/2015 4:07:39 PM           Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 20.0 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\22_15_2015_SVCN_FUMCOVAORANLAR_LC 2015-01-22 14-37-21\
                C18 PROTEIN ANALYSIS_22_01_15.M
Last changed   : 1/22/2015 2:37:09 PM by OE
Analysis Method: C:\CHEM32\1\METHODS\23032017INJECTORYIKAMA.M
Last changed   : 3/31/2017 5:54:57 PM by BENGU_PRO_G
Sample Info    : FUM COVA 30
  
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=280, Em=350

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU *s	Height [LU]	Area %
1	0.904	MM	0.3540	3919.71436	184.56494	91.5697
2	5.426	MM	0.2365	341.52982	24.06729	7.9786
3	8.076	BB	0.1372	19.33472	2.10928	0.4517

Totals : 4280.57890 210.74151

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=280 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.162	MM	0.6772	1644.23535	40.46756	95.8725
2	5.581	MM	0.2204	70.78773	5.35187	4.1275

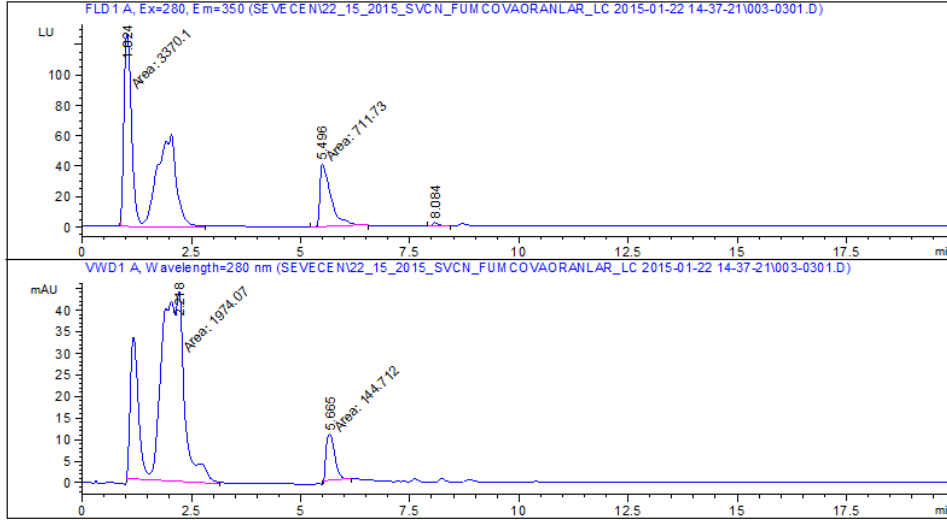
Totals : 1715.02309 45.81943

=====
 *** End of Report ***

```

=====
Acq. Operator   : OE                      Seq. Line :    6
Acq. Instrument : Instrument 1             Location  : Vial 6
Injection Date  : 1/22/2015 4:29:43 PM   Inj       :    1
                                           Inj Volume: 20.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\22_15_2015_SVCN_FUMCOVAORANLAR_LC 2015-01-22 14-37-21\
                  C18 PROTEIN ANALYSIS_22_01_15.M
Last changed    : 1/22/2015 2:37:09 PM by OE
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\23032017INJECTORYIKAMA.M
Last changed    : 3/31/2017 5:54:57 PM by BENGU_PRO_G
Sample Info     : FUM cOVA 40
  
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=280, Em=350

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Area *s	Height [LU]	Area %
1	1.024	MM	0.4424	3370.10303	126.95750	82.1652	
2	5.496	MM	0.2856	711.72986	41.53977	17.3524	
3	8.084	BB	0.1386	19.78361	2.17268	0.4823	

Totals : 4101.61650 170.66996

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=280 nm

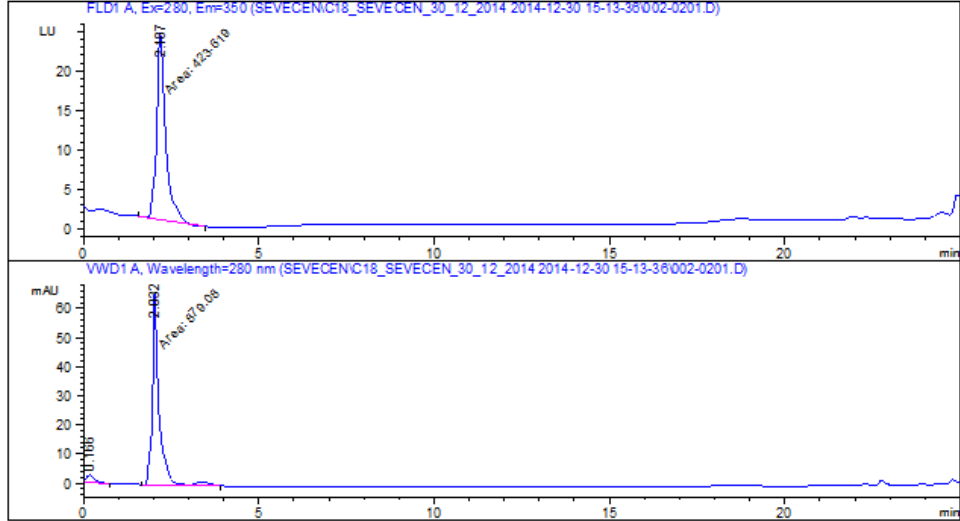
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.218	MM	0.7504	1974.06738	43.84694	93.1700	
2	5.665	MM	0.2244	144.71178	10.74623	6.8300	

Totals : 2118.77916 54.59317

*** End of Report ***

Data File C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\C18_SEVECEN_30_12_2014 2014-12-30 15-13-36\002-0201.D
 Sample Name: ova c18

```
=====
Acq. Operator   : OE                               Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 2
Injection Date  : 12/30/2014 3:41:30 PM          Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 10.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\C18_SEVECEN_30_12_2014 2014-12-30 15-13-36\C18 PROTEIN
                  ANALYSIS.M
Last changed    : 12/30/2014 3:13:35 PM by OE
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\23032017\INJECTORYIKAMA.M
Last changed    : 3/31/2017 5:54:57 PM by BENGU_PRO_G
Additional Info : Peak(s) manually integrated
=====
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=280, Em=350

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Area %s	Height [LU]	Area %
1	2.187	MM	0.2990	423.61938	100.0000	23.61138	100.0000
Totals :				423.61938		23.61138	

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=280 nm

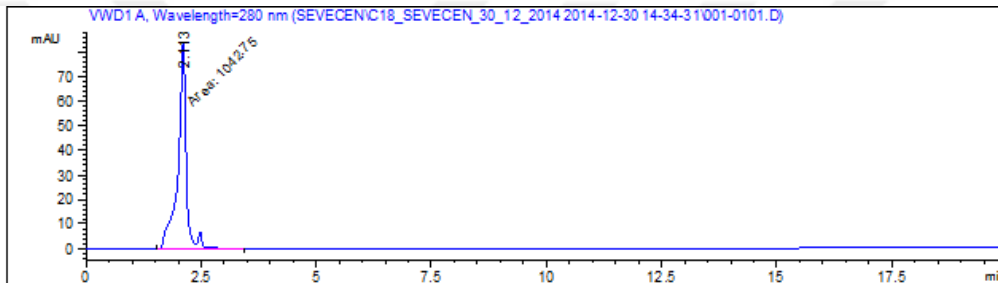
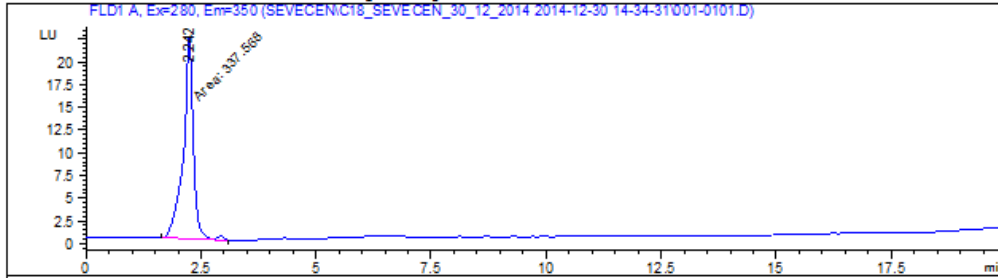
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %s	Height [mAU]	Area %
1	0.166	BB	0.2319	38.24793	4.1695	2.46660	4.1695
2	2.032	MM	0.2222	879.07996	95.8305	65.93462	95.8305
Totals :				917.32789		68.40123	

=====
 *** End of Report ***

Data File C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\C18_SEVECEN_30_12_2014 2014-12-30 14-34-31\001-0101.D
 Sample Name: bsa ova c18

```

=====
Acq. Operator   : OE                               Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 1
Injection Date  : 12/30/2014 2:35:33 PM          Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 10.0 µl
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\C18_SEVECEN_30_12_2014 2014-12-30 14-34-31\C18 PROTEIN
                  ANALYSIS.M
Last changed   : 12/30/2014 2:34:29 PM by OE
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\23032017\INJECTORYIKAMA.M
Last changed   : 3/31/2017 5:54:57 PM by BENGU_PRO_G
Additional Info : Peak(s) manually integrated
  
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=280, Em=350

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Area *s	Height [LU]	Area %
1	2.242	MM	0.2529	337.56805		22.25009	100.0000

Totals : 337.56805 22.25009

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=280 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	2.113	MM	0.2050	1042.75085		84.77798	100.0000

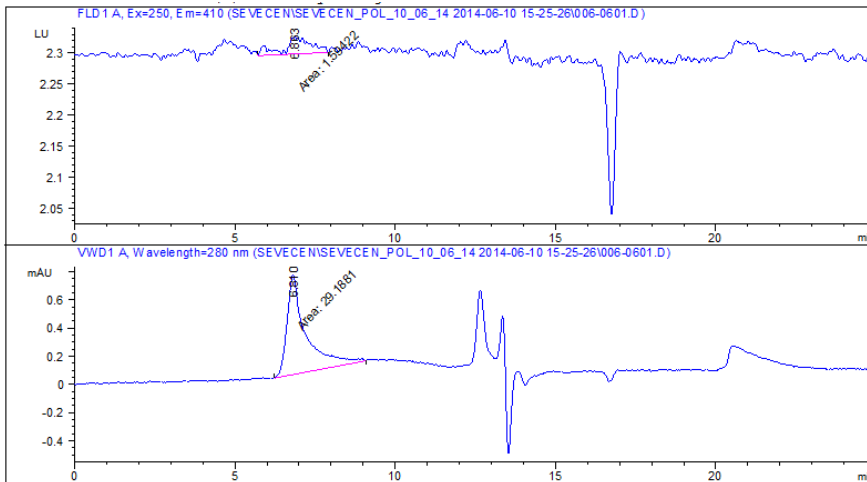
Totals : 1042.75085 84.77798

=====
 *** End of Report ***

Data File C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\SEVECEN_POL_10_06_14 2014-06-10 15-25-26\006-0601.D
 Sample Name: PAA2

```

=====
Acq. Operator   : OE                               Seq. Line :    6
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 6
Injection Date  : 6/10/2014 5:41:33 PM           Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 5.0 µl
Different Inj Volume from Sequence !      Actual Inj Volume : 17.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\SEVECEN_POL_10_06_14 2014-06-10 15-25-26\
                SEVECEN POLIMER LC.M
Last changed    : 6/10/2014 3:26:57 PM by OE
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\23032017INJECTORYIKAMA.M
Last changed    : 3/31/2017 5:54:57 PM by BENGU_PRO_G
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
  
```



=====
 Area Percent Report
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FLD1 A, Ex=250, Em=410

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU *s	Height [LU]	Area %
1	6.863	MM	0.9364	1.59422	2.83742e-2	100.0000

Totals : 1.59422 2.83742e-2

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=280 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	6.810	MM	0.6879	29.18810	7.07225e-1	100.0000

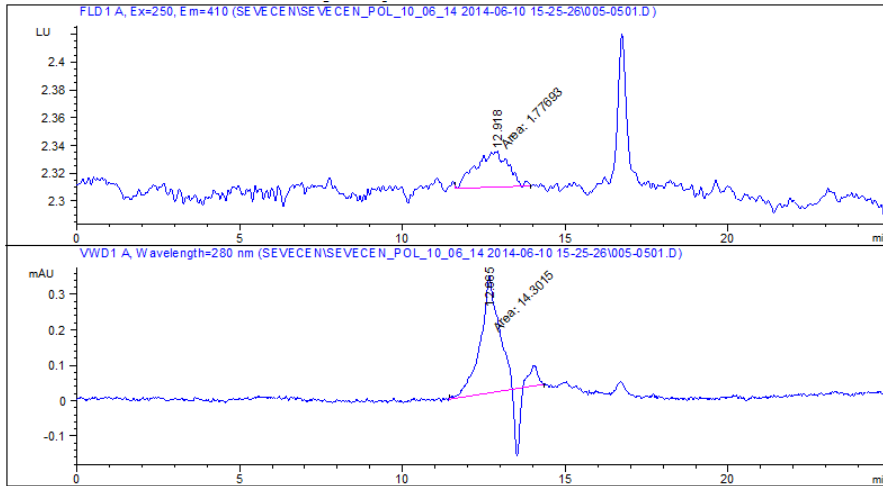
Totals : 29.18810 7.07225e-1

=====
 *** End of Report ***

Data File C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\SEVECEN_POL_10_06_14 2014-06-10 15-25-26\005-0501.D
 Sample Name: FUM

```

=====
Acq. Operator   : OE                               Seq. Line :    5
Acq. Instrument : Instrument 1                     Location  : Vial 5
Injection Date  : 6/10/2014 5:14:31 PM           Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 5.0 µl
Different Inj Volume from Sequence !      Actual Inj Volume : 17.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\SEVECEN_POL_10_06_14 2014-06-10 15-25-26\
                SEVECEN POLIMER LC.M
Last changed    : 6/10/2014 3:26:57 PM by OE
                (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\23032017INJECTORYIKAMA.M
Last changed    : 3/31/2017 5:54:57 PM by BENGU_PRO_G
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
=====
  
```



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=250, Em=410

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Height [LU]	Area %
1	12.918	MM	1.1492	1.77693	2.57697e-2	100.0000

Totals : 1.77693 2.57697e-2

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=280 nm

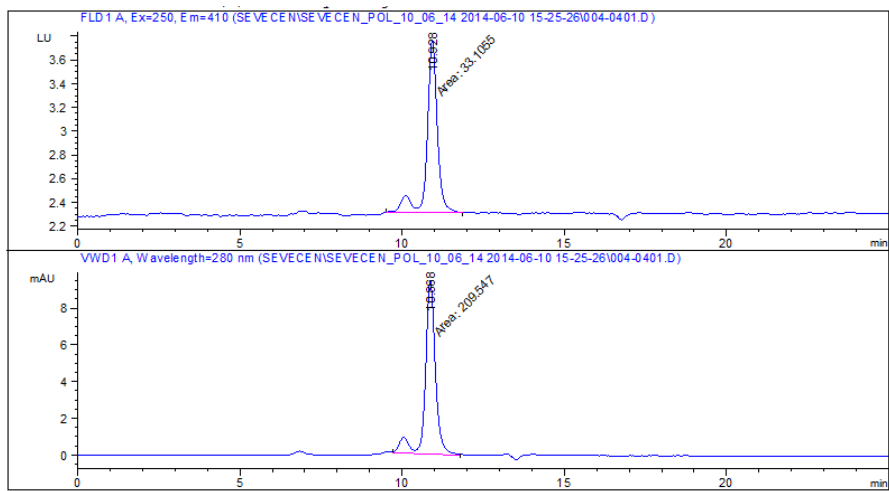
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	12.665	MM	0.7200	14.30149	3.31062e-1	100.0000

Totals : 14.30149 3.31062e-1

=====
 *** End of Report ***

Data File C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\SEVECEN_POL_10_06_14 2014-06-10 15-25-26\004-0401.D
 Sample Name: OVA

=====
 Acq. Operator : OE Seq. Line : 4
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 4
 Injection Date : 6/10/2014 4:47:28 PM Inj : 1
 Inj Volume : 5.0 µl
 Different Inj Volume from Sequence ! Actual Inj Volume : 17.0 µl
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\SEVECEN_POL_10_06_14 2014-06-10 15-25-26\
 SEVECEN POLIMER_LC.M
 Last changed : 6/10/2014 3:26:57 PM by OE
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\23032017\INJECTORYIKAMA.M
 Last changed : 3/31/2017 5:54:57 PM by BENGU_PRO_G
 Additional Info : Peak(s) manually integrated



```

=====
                        Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FLD1 A, Ex=250, Em=410

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Height [LU]	Area %
1	10.928	MM	0.3807	33.10548	1.44943	100.0000
Totals :				33.10548	1.44943	

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=280 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	10.868	MM	0.3692	209.54710	9.45922	100.0000
Totals :				209.54710	9.45922	

```

=====
                        *** End of Report ***

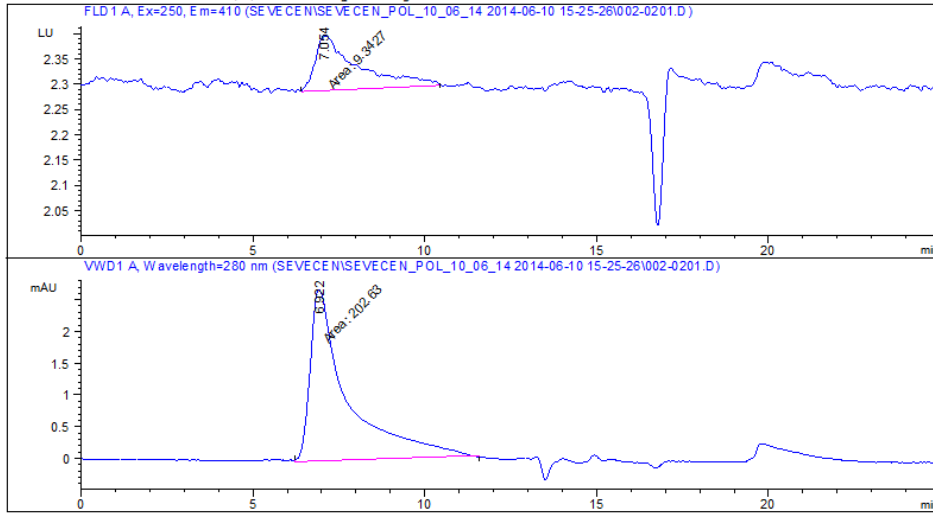
```

Data File C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\SEVECEN_POL_10_06_14_2014-06-10_15-25-26\002-0201.D
Sample Name: PAA-FUM

```

=====
Acq. Operator   : OE                               Seq. Line : 2
Acq. Instrument : Instrument 1                       Location  : Vial 2
Injection Date  : 6/10/2014 3:53:31 PM             Inj       : 1
                                                    Inj Volume: 5.0 µl
Different Inj Volume from Sequence ! Actual Inj Volume : 17.0 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\SEVECEN_POL_10_06_14_2014-06-10_15-25-26\
SEVECEN POLIMER LC.M
Last changed    : 6/10/2014 3:26:57 PM by OE
                  (modified after loading)
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\23032017\INJECTORYIKAMA.M
Last changed    : 3/31/2017 5:54:57 PM by BENGU_PRO_G
Additional Info  : Peak(s) manually integrated

```



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=250, Em=410

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Height [LU]	Area %
1	7.054	MM	1.4326	9.34270	1.08691e-1	100.0000

Totals : 9.34270 1.08691e-1

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=280 nm

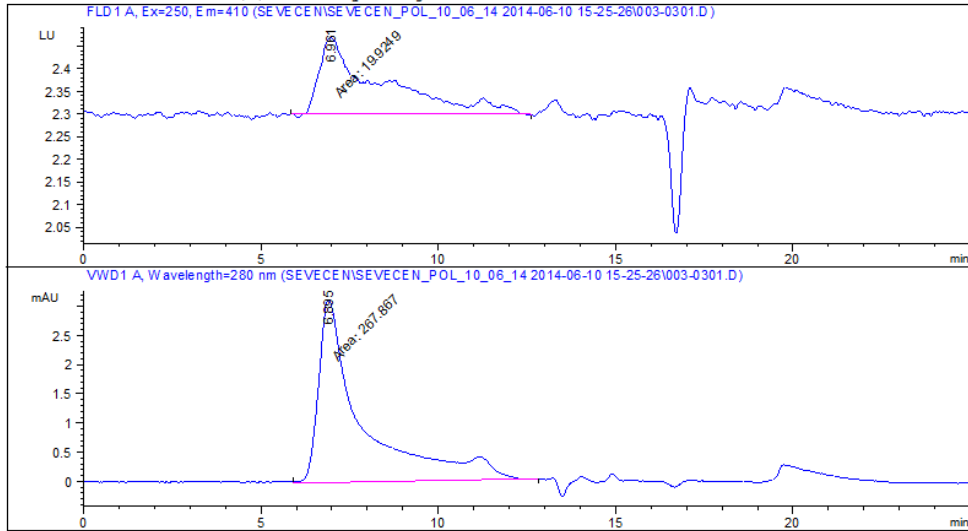
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	6.922	MM	1.2528	202.62993	2.69564	100.0000

Totals : 202.62993 2.69564

=====
 *** End of Report ***

Data File C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\SEVECEN_POL_10_06_14 2014-06-10 15-25-26\003-0301.D
 Sample Name: PAA-FUM-OVA

=====
 Acq. Operator : OE Seq. Line : 3
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 3
 Injection Date : 6/10/2014 4:20:28 PM Inj : 1
 Inj Volume : 5.0 µl
 Different Inj Volume from Sequence ! Actual Inj Volume : 17.0 µl
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\DATA\SEVECEN\SEVECEN_POL_10_06_14 2014-06-10 15-25-26\
 SEVECEN POLIMER_LC.M
 Last changed : 6/10/2014 3:26:57 PM by OE
 (modified after loading)
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\23032017INJECTORYIKAMA.M
 Last changed : 12/4/2017 10:36:18 AM by BENGU_PRO_G
 (modified after loading)
 Additional Info : Peak(s) manually integrated



=====
 Area Percent Report
 =====

Sorted By : Signal
 Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FLD1 A, Ex=250, Em=410

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area LU	Height [LU]	Area %
1	6.961	MM	1.9465	19.92489	1.70606e-1	100.0000

Totals : 19.92489 1.70606e-1

Signal 2: VWD1 A, Wavelength=280 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Height [mAU]	Area %
1	6.895	MM	1.4257	267.86682	3.13151	100.0000

Totals : 267.86682 3.13151

=====
 *** End of Report ***

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sevecen TUĞLU GÜRPINAR
Doğum Tarihi ve Yeri : 07.10.1984 / İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : tuglusevecen@gmail.com, sevecen.tuglu@tubitak.gov.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2008
Lise	Fen Lisesi	Tekirdağ Fen Lisesi	2002

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2013-Devam Ediyor	Tübitak MAM GMBE	Araştırmacı

YAYINLARI

Makale

1. Karahan M., Tuğlu S. ve Mustafaeva Z. (2012). Synthesis of microwave assisted poly methyl vinyl ether co maleic anhydride bovine serum albümin bioconjugates, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40 (6).
2. Karahan M., Tuğlu S. ve Mustafaeva Z. (2013). "Polielektrolitler Ve Biyolojik Özellikleri", *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences*, 31, 85-106.

Bildiri

1. Gürpınar, S.T., Ertekin, Ö., Akdeste, Z., Öztürk, S., (2014). "Fumonisin Specific Immune Response Stimulation with Polymeric Conjugates" NanoTR10, Yeditepe Üniversitesi, 17-21 Haziran 2014, İstanbul.
2. Piriñçi, Ş.Ş., Ertekin, Ö., Gürpınar, S.T., Akçael, E.A., Öztürk, Z.Z., (2015). "Label Free QCM Based Immunobiosensor for On-Site Detection of Fumonisin B1", 4th International Symposium on Sensor Science, Temmuz 2015, Basel.
3. Piriñçi, Ş.Ş., Ertekin, Ö., Gürpınar, S.T., Öztürk, S., (2014). "Development Of Qcm immuno Biosensor For Detection of Small Molecules", 1st National Biosensor Congress, Haziran 2014 Tekirdağ.
4. Ertekin, O., Guloglu, F.B., Piriñçi, Ş.Ş., Tuğlu, S., Akçael, E., Ercan, D., Hatipođlu, İ., Göksel, M., Ozturk, S.,(2013). "Immunological Studies For The Determining Of Mycotoxins In Food And Feed" Eurobiotech 16-18 Mayıs 2013, Slovakia.
5. Ertekin, O., Guloglu, F.B., Piriñçi, Ş.Ş., Tuğlu, S., Kaymak, T., Öztürk, S., (2013) "Modification of small molecule chemical contaminants for immunochemical detection", 44 IUPAC World Chemistry Congress 11-16 Ağustos 2013, İstanbul.
6. Ertekin, O., Guloglu, F.B., Piriñçi, Ş.Ş., Tuğlu, S., Akçael, E., Ercan, D., Hatipođlu, İ., Göksel, M., Ozturk, S., Ahsen, V., Ozturk, S., (2013). "Antibody based systems for the determination of mycotoxins in food and feed", *Current Opinion in biotechnology*, Eurobiotech, Bratislava.
7. Piriñçi, S., Ertekin, Ö., Tuğlu Gürpınar, S., Öztürk, S., (2014). "Development Of Qcm Immunobiosensor For Detection Of Small Molecules", 1. Ulusal Biyosensör Kongresi, Namik Kemal Üniversitesi, 22-26/06/2014, Tekirdağ.
8. Tuğlu, S.T., Karahan, M., Mustafaeva, Z., (2011). "Sentetik Polimerik Aşı Model Sistemlerinin Geliştirilmesinde Yeni Yaklaşımlar", 25. Ulusal Kimya Kongresi, Mayıs 2011, Erzurum.
9. Tuğlu, S., Karahan, M., Mustafaeva, Z., (2011). "Synthesis and structure analysis of Water-soluble polyelectrolyte - protein complexes and conjugates", *Conference on Materials and Technologies for Green*

Chemistry (SustainChem2011), 5-9 Eylül, 2011, Tallinn-Estonia.

10. Kılınç, Y.B., Karahan, M., Tuğlu, S., Mustafaeva, Z., (2011). "Papain Enziminin İkili ve Üçlü Komplekslerinin Spektroskopik İncelemesi", Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 18-22 Mayıs 2011, Side-Antalya.

Proje

1. MAM'da Biyosensör Geliştirme Çalışmaları (Gıdalarda Çoklu Toksin Tespit Platformu Geliştirilmesi) / TÜBİTAK
2. Geleneksel Gıdalarda Mikotoksin Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi / TÜBİTAK (1007 Programı)
3. Aflatoksin Tespiti İçin İmmunoafinite Kolonlarının Geliştirilmesi / TÜBİTAK (1003 Programı)
4. Tavşan Serumunu / TÜBİTAK (1009 Programı)
5. BKTM Projesi / DPT
6. Polielektrolitlerin Proteinlerle Çapraz Bağlayıcı Ajanlar Varlığında Konjugatlarının Oluşturulması / Yıldız Teknik Üniversitesi (BAP Projesi)
7. Metal İçeren Fonksiyonel Biyopolimer Sistemlerin Geliştirilmesi / Yıldız Teknik Üniversitesi (BAP Projesi)

ÖDÜLLERİ

1. En Başarılı Araştırma Ekibi, TÜBİTAK MAM, 2013
2. Teknoloji Ödülü, Elginkan Vakfı, 2016
3. Teknoloji Geliştirme Ödülü, TÜBİTAK MAM, 2016