

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ALTIN NANOPARTİKÜL-BİLAYER TİYOL
MODİFİYE DİAMİN OKSİDAZ-PEROKSİDAZ
ÇİFTLİ ENZİM SİSTEMİNE DAYALI YENİ BİR
BİYOSENSÖR SİSTEMİ**

Cansu GÜVENÇ

Tez Danışmanı :Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 405.05.01

Sunuş Tarihi: 28.05.2015

Bornova – İZMİR

2015

Cansu GÜVENÇ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Altın Nanopartikül-Bilayer Tiyoil Modifiye Diamin Oksidaz-Peroksidaz Çiftli Enzim Sistemine Dayalı Yeni Bir Biyosensör Sistemi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’ nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 28.05.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Raportör Üye : Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

Üye : Doç. Dr. Şenol ALPAT

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Altın Nanopartikül-Bilayer Tiyo Modifiye Diamin Oksidaz-Peroksidaz Çiftli Enzim Sistemine Dayalı Yeni Bir Biyosensör Sistemi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

28/ 05/2015

Cansu GÜVENÇ

ÖZET

**ALTIN NANOPARTİKÜL-BİLAYER TİYOL MODİFİYE DİAMİN
OKSİDAZ-PEROKSİDAZ ÇİFTLİ ENZİM SİSTEMİNE DAYALI YENİ
BİR BİYOSENSÖR SİSTEMİ**

GÜVENÇ, Cansu

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Mayıs 2015, 61 sayfa

Bu tez çalışmasında biyosensör teknolojisine yeni ve orijinal bir bakış açısı getiren serotonin tayinine yönelik, altın nanopartikül-bilayer tiyol modifiye diamin oksidaz-peroksidaz çiftli enzim sistemine dayalı biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen biyosensör sisteminde öncelikle altın elektrod (Au) yüzeyine fonksiyonel tiyol grubu içeren 1,6-hekzanditiyolün bağlanması ve kendiliğinden oluşan tek tabakaların (SAM) oluşumu gerçekleştirildi. Ditiyolün elektrod yüzeyine bağlanması sonrası diğer reaktif (-SH) ucuna altın nanopartikül bağlanması sağlandı. Ardından altın nanopartikül (AuNP) 3- merkaptopropiyonik asit ile etkileşime sokuldu. Modifiye elektrot yüzeyine diamin oksidaz ve peroksidaz ilavesi sonrası üzerine glutaraldehit damlatılarak kovalent immobilizasyonu sağlandı.

Tasarlanan biyosensör sistemiyle serotonin ölçümleri 0,2 V'ta amperometrik metod kullanılarak yapılmıştır. Serotonin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artan akım değerlerinden çıkılarak tayin yapılmıştır.

Hazırlanan biyosensörün biyoaktif tabakasının optimizasyonu çalışmalarında öncelikle tek tabaka oluşum süresi, diamin oksidaz-peroksidaz aktiviteleri, glutaraldehit konsantrasyonu gibi parametreler çalışıldı. Çalışma koşullarının optimizasyonunda pH optimizasyonu gerçekleştirildi. Biyosensörün karakterizasyon çalışmalarında serotonin için doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, substrat spesifikliğı, girişim etkisi, depo kararlılığı ve örnek analizi gibi parametreler araştırılmıştır.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda serotonin biyosensörü için en uygun tek tabaka oluşum süresi, enzim aktivitesi (diamin oksidaz- peroksidaz) ve glutaraldehit konsantrasyonu sırasıyla 20 saat, 0,11 Unit/ml – 113 Unit/ml ve % 2,5 olarak bulunmuştur. Çalışma koşullarının optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde serotonin biyosensörü için çalışma tamponu olarak 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu ve çalışma sıcaklığı olarak 30 °C bulunmuştur. Geliştirilen biyosensör için yapılan karakterizasyon çalışmalarında ise serotonin için 1 – 10 μ M aralığında doğrusal sonuçların alındığı belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik denemelerinde (n=6) 5 μ M serotonin konsantrasyonunda ortalama değer ($\bar{x}$) , standart sapma (S.S) ve % varyasyon katsayısı (%V.K) sırasıyla 4,97 μ M, $\pm$ 0,241 ve % 4,84 olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler : 1,6-hekzanditiyol, altın nanopartikül, diamin oksidaz, peroksidaz, serotonin, biyosensör

ABSTRACT

**A NOVEL BIOSENSOR SYSTEM BASED ON GOLD
NANOPARTICLES-BILAYER THIOL MODIFIED DIAMINE OXIDASE-
PEROXIDASE COUPLED ENZYME SYSTEM**

GÜVENÇ, Cansu

MSC Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

May 2015, 61 pages

In this thesis, a biosensor system based on a gold nanoparticles(AuNP)-bilayer thiol modified diamine oxidase-peroxidase coupled enzyme system was intended to be developed to determine serotonin which brings a new and original perspective to biosensor technology. Primarily, in this developed biosensor system, binding of 1,6-hexanedithiol, having functional thiol group, were performed to the gold electrode (Au) surface and self assembled monolayers (SAM) formation was carried out. After the binding of dithiol to the electrode surface, the gold nanoparticles were allowed to bind to the other reagent (-SH) terminal. After that, the gold nanoparticles (AuNP) were reacted with 3-mercaptopropionic acid. After the addition of diamine oxidase-peroxidase on to the modified electrode surface, covalent immobilization was provided by dropping of glutaraldehyde on to the electrode surface.

The serotonin measurements were made using 0,2 V amperometric method with the designed biosensor system. The determination was made on the basis of increasing current values in direct proportion with serotonin concentration.

In the optimization studies of the biosensor firstly bioactive layer components such as SAM formation time, diamine oxidase-peroxidase activity and glutaraldehyde concentration were carried out. In the optimization of working conditions; optimum pH was also investigated. Afterwards, in the characterization studies of the biosensor some parameters such as linearity, reproducibility, storage stability were determined.

From the result of the optimization studies optimum 1,6-hexanedithiol amount, optimum diamine oxidase – peroxidase activity and optimum glutaraldehyde concentration were determined to be 20 hour, 0.11 Units/ml- 113 Units/ml and 2.5 % respectively. From the experiments the phosphate buffer (50 mM, pH 7.0) and 30 °C were chosen to be optimum working conditions for the biosensor. It was determined from the characterization studies of the biosensor that linear curves were obtained serotonin concentration between the ranges of 1 μ M to 10 μ M. At the repeatability experiments (n=6), the average value ($\bar{x}$), standard deviation, (SD) and coefficient of variation (CV %) were calculated to be 4.97 μ M mM, $\pm$ 0.241 and 4.84 % for 5 μ M serotonin concentration, respectively.

Keywords : 1,6- hexanedithiol, gold nanoparticles, diamine oxidase, peroxidase, serotonin, biosensor

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca maddi manevi her anlamda desteğini esirgemeyen, yol gösteren sorumluluk vererek gelişmemi sağlayan saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Erol AKYILMAZ’a, kıymetli görüşlerinden faydalandığım Doktora öğrencisi araştırma görevlisi Sayın Çağrı ALTUĞ’a, ve bu aşamaya gelmemde önemli katkıları olan tüm Hocalarıma teşekkürü borç bilirim. Ayrıca lisansüstü eğitimime başlamamdaki en büyük desteğim olan ve bana her zaman inanan bana verdikleri destek göstermiş oldukları sabır ve fedakârlıklar için başta AİLEM olmak üzere Erol GÜVENÇ’e, Neslihan GÜVENÇ’e, Anıl GÜVENÇ’e, laboratuvar çalışmalarımda engin bilgilerini benimle paylaşan Doktora Öğrencisi Erhan CANBAY’a, Belgin SERT SERDAR’a ve nihayetinde her zaman yanımda olan Cem YILMAZCAN’a teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 13 FEN 027 no’lu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Biyosensörler	1
1.2. Biyoresöptör moleküller	2
1.3. Biyosensörlerin sınıflandırılması	3
1.3.1. Analizlenecek madde-biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması	3
1.3.2. Biyoaktif tabaka-iletim ve ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması	3
1.3.3. Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması	3
1.4. Enzim temelli biyosensörlerde immobilizasyon yöntemleri	4

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.4.1. Adsorbsiyon	5
1.4.2. Tutuklama	5
1.4.3. Çapraz bağlama.....	5
1.4.4. Kovalent bağ	5
1.5. Elektrokimyasal esaslı enzim biyosensörleri	8
1.5.1. Amperometrik elektrokimyasal sensörler	9
1.6. Voltammetri	12
1.6.1. Döngüsel voltammetri (CV).....	13
1.6.2. Kronoamperometri	15
1.6.3.Diferansiyel puls ve kare dalga voltammetri	15
1.7. Biyoaktif tabaka bileşenleri	16
1.7.1. İmmobilizasyonda kullanılan enzim diamin oksidaz.....	16
1.7.2. İmmobilizasyonda kullanılan enzim peroksidaz.....	17
1.7.3. Nanopartiküller	17
1.7.4. Glutaraldehit.....	20
1.7.5. Hidrokinon	21
1.7.6. Serotonin	22

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2. MATERYAL VE METOD	24
2.1. Materyal.....	24
2.1.1. Cihaz ve diğer ekipmanlar	24
2.1.2. Kimyasallar.....	24
2.2. Yöntem	26
2.2.1. Biyosensörün hazırlanması.....	26
2.2.2. Biyosensörün çalışma ilkesi	29
2.3. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar	30
2.3.1. Tek tabakanın oluşma süresinin biyosensör cevabına etkisi	30
2.3.2. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.	30
2.3.3. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.	31
2.4. Çalışma Koşullarının Optimizasyonu.....	31
2.4.1. Optimum pH'nın belirlenmesi.....	31
2.4.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	31

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.5. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün karakterizasyonuna ilişkin çalışmalar	32
2.5.1. Serotonin için doğrusal tayin aralığı	32
2.5.2. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliği	32
2.5.3. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün substrat spesifikliği	32
2.5.4. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensör cevabı üzerine girişimcilerin etkisi	33
2.5.5. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensör ile örneklerde serotonin analizi.....	33
2.5.6. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığı.....	33
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.	34
3.1. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit Modifiye Biyosensörün Optimizasyon ve Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular	34
3.1.1. Tek tabaka oluşum süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisine yönelik bulgular	36
3.1.2. Enzim miktarlarının biyosensör cevabı üzerine etkisi.	38
3.1.3. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi.	39
3.2. Çalışma koşullarının optimizasyonuna yönelik bulgular.....	41

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.1. pH optimizasyonu	41
3.2.2. Sıcaklık optimizasyonu	42
3.3. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün karakterizasyonuna ilişkin bulgular	43
3.3.1 Serotonin için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi	43
3.3.2. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliğine ilişkin bulgular	45
3.3.3. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün substrat spesifikliğine ilişkin bulgular	45
3.3.4. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün cevabı üzerine girişimcilerin etkisine yönelik bulgular	46
3.3.5. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensör ile örneklerde serotonin analizine yönelik bulgular	48
3.3.6. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığına yönelik bulgular	49
4. GENEL DEĞERLENDİRME	50
KAYNAKLAR DİZİNİ	54
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1.Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi	1
1.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.....	4
1.3. Kendiliğinden oluşan tek tabakanın (SAM) şematik gösterimi	6
1.4. Değişik yüzeylerdeki SAM yapıları (A) Altın yüzeye alkan tiyollerin oluşturduğu ve (B) hidroksillenmiş yüzeyde alkil siloksan ile elde edilen SAM yapısının modellenmesi.....	7
1.5 Enzim biyosensörünün genel çalışma ilkesi	8
1.6. Amperometrik biyosensör yapımında kullanılan yöntemler.....	10
1.7. Amperometrik biyosensörün çalışma prensibi.....	11
1.8. İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel	13
1.9. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram	14
1.10. Kronoamperometride elektroda uygulanan potansiyelin zamanla değişimi	15
1.11. a) Kare dalga voltammetri dalgaformu	16
1.11. b) Diferansiyel voltammetri dalgaformu.....	16
1.12. Diamin oksidaz enziminin reaksiyonu	17
1.13. Peroksidaz enziminin reaksiyonu.....	17
1.14. Glutaraldehitin yapısı.....	20
1.15. Hidrokinon yapısı.....	21

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.16. a) Serotonin yapısı, b) Serotonin metaboliti 5-HIAA, c) Serotonin oksidasyon ürünü	22
2.1. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye elektroda ait immobilizasyon şeması.....	28
2.2. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörünün çalışma ilkesi	29
3.1. İmmobilizasyon öncesi ve sonrası alınan voltammogramlar.....	35
3.2. 5µM serotonin ile 0,2 V potansiyelinde alınan biyosensör cevabı.....	36
3.3. 1,6-hekzanditiyol bekletme süresinin biyosensör cevabına etkisine ait kalibrasyon grafiği.	37
3.4. 1,6-hekzanditiyol 20 saat bekletme süresinin biyosensör cevabına etkisi.....	37
3.5. Enzim miktarlarının biyosensör cevabına etkisi.....	38
3.6. 0,11 Unit/ml DAO-113 Unit/ml HRP enzim miktarlarının biyosensör cevabına etkisi.	39
3.7. Glutaraldehit miktarlarının biyosensör cevabına etkisi.	40
3.8. % 2,5 Glutaraldehit miktarlarının biyosensör cevabına etkisi.	40
3.9. Biyosensör cevabına pH'nın etkisi.	42
3.10. Biyosensör cevabına sıcaklık etkisi.	43
3.11. Tayin aralığı belirlenmesi.	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.12. Tayin aralığı için elde edilen amperometrik ölçümlere ilişkin standart grafiği.....	44
3.13. Serotonin biyosensörü için substrat spesifikliğine ilişkin grafik.	46
3.14. Serotonin biyosensörü için depo kararlılığı..	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İmmobilizasyon prosedürü	27
3.1. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik bulguları	45
3.2. Farklı maddelerin varlığının serotonin cevabına etkisi	47
3.3. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörle örnek analizi	48
4.1. Serotonin tayininde kullanılan biosensörlerin karşılaştırılması.....	52

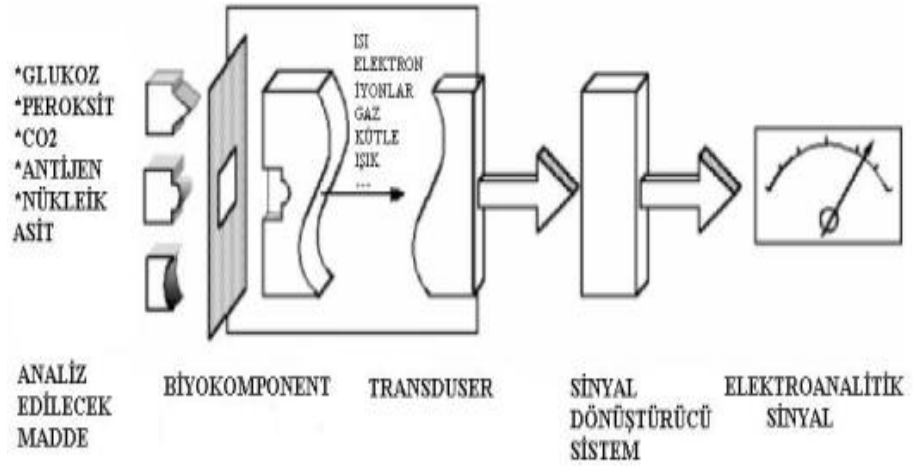
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Au	Altın elektrod
AuNP	Altın nanopartikül
CV	Döngüsel voltammogram
DAO	Diamin oksidaz
GA	Glutaraldehit
HRP	Peroksidaz
3-MPA	3-Merkaptopropiyonik asit

1.GİRİŞ

1.1. Biyosensörler

Canlıların çevrelerindeki değişiklikleri algılama ve yanıt verme mekanizmaları, biyosensörlerin geliştirilmesinde temel oluşturmıştır (Arshak et al.,2008). Biyosensörler; sıklıkla biyolojik analizler için kullanılan bir çeşit özel sensörlerdir ve " International Union of Pure and Applied Chemistry " (IUPAC) tarafından, " kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar " olarak tanımlanmaktadır (Rasooly, 2005).



Şekil 1.1. Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi (Newman et al., 2001).

Biyosensörlerin çoğu basit olarak; biyoreseptör olarak adlandırılan, hedef molekülün yakalandığı biyolojik bağlanma bölgesi bu bağlanma sonucu oluşan değişimi ileten iletici(transduser) ve sinyal dönüştürücü kısımlardan oluşur. Biyoreseptör olarak birçok biyomolekül (enzimler, antikorlar, mikroorganizmalar) kullanılabilir. Biyoreseptör ve dönüştürücünün tipi biyosensörün sınıfını belirlemektedir.

1.2. Biyoreseptör Moleküller

Biyoreseptör moleküller olarak, antikor, enzim, protein, nükleik asitler gibi biyolojik moleküller ya da hücre, doku ve mikroorganizmalar gibi canlı biyolojik sistemler kullanılabilir. Biyoreseptör olarak kullanılacak moleküllerin en önemli özelliği tespit edilmesi istenen hedef moleküle karşı yüksek afinite ve seçicilik göstermeleridir (Rasooly, 2005). Biyomolekül olarak en çok kullanılan enzimler hedef moleküle karşı oldukça özgül olmasından dolayı tercih edilir (Chambers et al., 2008).

Enzimler kimyasal tepkimelere katıldıklarında proton, elektron, ışık ve ısı gibi birçok ölçülebilir reaksiyon ürünü meydana getirdiklerinden, biyoreseptör olarak sıklıkla kullanılan biyomoleküllerdir (Chambers et al., 2008). Özellikle birden fazla alt üniteye sahip olan allosterik enzimler, doğaları gereği biyoreseptör olarak yüksek potansiyele sahiptirler. Bu tip enzimlerin substratlarına olan ilgileri, aktif bölgeleri dışına bağlanacak efektör (modülatör) moleküller tarafından değiştirilebilir (O'Connell and Guilbault, 2001).

Antikorlar 1950'li yıllardan itibaren tanıda kullanılmaya başlanmış, yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip biyoreseptör moleküllerdir. Antikorlar tüm bir mikroorganizmayı tanıyabilecekleri gibi onlara ait toksinleri, pilileri, sporları, enzimleri hatta peptid parçalarını tanıyabilirler (Proske et al., 2005). Antikorlar ile tasarlanmış biyosensörlerin en önemli avantajı immunojen olmalarıdır. Bunun en önemli faydası, hedef molekülün saptama öncesinde saflaştırılmasına ihtiyaç duyulmamasıdır. (Chambers et al., 2008).

Biyoreseptör olarak kullanılan birçok biyolojik molekülün çıkış noktası mikroorganizmalardır. Mikroorganizmaların kendileri de biyoreseptör olarak kullanılabilirler. Çoğunlukla inorganik veya organik toksik kimyasal maddelerin tespitinde kullanılırlar ve diğer biyoreseptör moleküllere göre daha çok çeşitlilikte kimyasal yapı saptayabilirler. Genetik modifikasyonlara uyumlu olmaları, farklı pH ve farklı

sıcaklıklarda işlev görebilmeleri mikroorganizmaları ideal biyoreseptörlerden yapmaktadır (D'Souza, 2001; Lei et al., 2006).

1.3. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

1.3.1. Analizlenecek madde biyoaktif bileşen ilişkisine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler farklı bir bakış açısıyla analizlenecek madde- biyoaktif bileşen ilişkisine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilirler:

- a) Biyokatalitik esaslı biyosensörler (mikroorganizma ve enzimlerin kullanıldığı biyosensörler)
- b) Biyoafinite esaslı biyosensörler (antikor-antijen ve reseptör-ligand gibi etkileşimlerin kullanıldığı biyosensörlerdir.)

1.3.2. Biyoaktif tabaka-iletim ve ölçüm sistemi içeriğine göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler ölçüm prensiplerine ve transduser türüne göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

- a) Elektrokimyasal esaslı biyosensörler (Amperometri, Potansiyometri)
- b) Optik esaslı biyosensörler (Fotometri, Fluorometri, Biyoluminesans)
- c) Piezoelektrik esaslı biyosensörler (Kuartz kristal mikrobals, Mikrokantileverlar)
- d) Kalorimetri esaslı biyosensörler (termistörler)

1.3.3. Biyoaktif tabakada kullanılan biyokomponent türüne göre biyosensörlerin sınıflandırılması

Biyosensörler biyoaktif tabakalarında görev alan biyokomponentin türüne göre:

1. Enzim temelli biyosensörler

2. Hücre temelli biyosensörler
3. DNA temelli biyosensörler
4. Antikor/Antijen temelli biyosensörler (immünobiyosensörler)

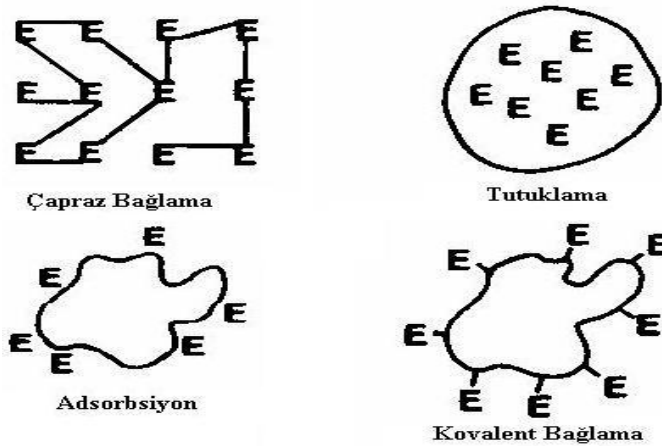
1.4. Enzim Temelli Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Analizlenmesi hedeflenen örneğe uygun biyokomponent ve transduser seçildikten sonra bu iki eleman birbirine bağlanmalı yani biyokomponent transduser yüzeyine immobilize edilmelidir.

İmmobilizasyon için kullanılan temel yöntemler şöyledir:

- I. Adsorpsiyon (kovalent olmayan bağlama)
- II. Kovalent Bağlama
- III. Tutuklama
- IV. Çapraz Bağlama

Bu immobilizasyon yöntemleri şematik olarak Şekil 1.2’de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi.

(www.engr.usask.ca/classes/CHE/461/notes/lecture%2016/lecture%20notes-enzyme-immobilization%20of%20enzyme.ppt)

Biyosensörün ömrü immobilizasyon işlemiyle biyokomponentin transduser yüzeyinde ne kadar süre tutulabildiğine bağlı olduğundan, biyokomponentin uzun süre yüzeyden ayrılmasını engellemelidir. Enzimlerin immobilizasyonunda enzim aktif merkezi immobilizasyon esnasında zarar görmemeli ya da enzim aktivitesinde sterik engel nedeniyle düşüş olmamasına dikkat edilmelidir.

1.4.1. Adsorbsiyon

İmmobilizasyon için kullanılan en basit yöntemlerden biridir. Biyokomponentin transduser yüzeyine non-kovalent etkileşimler (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, elektron geçiş kompleksleri ve Van der Waals kuvvetleri) ile tutturulması prensibine dayanır. Adsorbsiyonda kullanılan başlıca adsorbanlar; selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit, kollajen, kil, polimerik aromatik reçinelerdir.

1.4.2. Tutuklama

Yüksek molekül kütleli biyomoleküller sentetik veya doğal jel matrikslerde, yarı geçirgen membranlarda, misellerde ve mikro kapsüllerde tutuklanarak etkin bir şekilde immobilize edilebilirler. Jel matriste tutuklamada kullanılan başlıca malzemeler akrilamit polimerleri, jelâtin tabakaları, nişasta, kalsiyum aljinat jelleri, silikon lastiği, polivinil klorür, polivinil alkoldür.

1.4.3. Çapraz Bağlama

Çapraz bağlama; küçük moleküllü bi ya da multi-fonksiyonel gruplar içeren kimyasal reaktifler kullanarak biyokomponent ile adsorban arasında çözünmeyen kompleksler oluşturma prensibine dayanır. En çok kullanılan çapraz bağlama ajanı glutaraldehit'tir. Glutaraldehit dışında heksametilen diizosiyanat, 2-izosiyanato-4-izotiyasiyanato-toluen, 1,5-difloro-2,4-dinitrobenzen, bisdiazobenzidin-2,2- disülfonik asit gibi kimyasallarda çapraz bağlamada kullanılabilir.

1.4.4. Kovalent Bağ

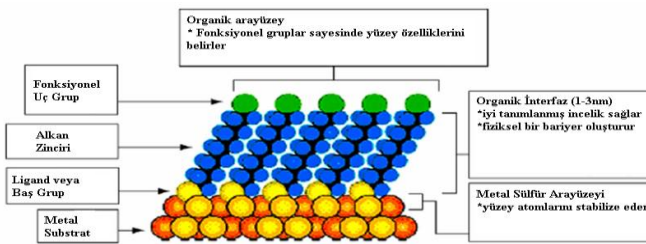
Kovalent bağlamanın gerçekleşmesi için bağlanma yüzeyinde ve/veya biyomolekül üzerinde tiyol (-SH), hidroksil (-OH), amin (-NH₂), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi reaktif grupların olması gerekmektedir. Bu reaktif gruplar olmadığı takdirde çeşitli manipülasyonlarla (kendiliğinden oluşan tek tabakalar,

SAM vb. gibi) reaktif gruplar oluşturulabilir. Biyomolekül aktive edilmiş transduser yüzeyine bağlanabileceği gibi önceden uygun bir materyale kovalent bağlanıp immobilize biyokomponenti içeren tabaka ile transduser yüzeyinde film oluşturulabilir.

Biyokomponentlerin kovalent bağlama ile immobilizasyonu pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlere karşı direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü uzatır ancak biyoaktif tabakada bir miktar aktivite kaybına sebep olabilir.

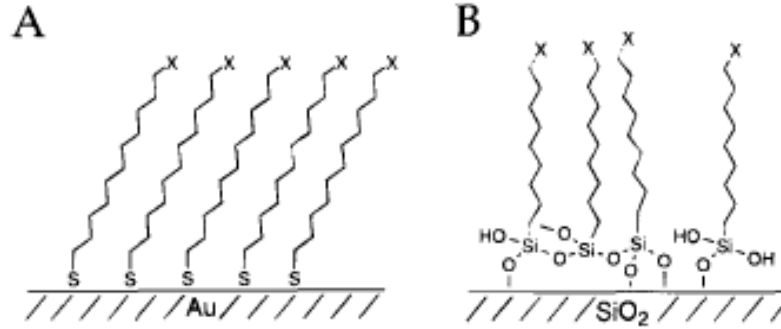
1.4.4.1. Enzimlerin Kendiliğinden Oluşan Tek Tabaka (SAM) Yöntemiyle İmmobilizasyonu

Kendiliğinden oluşan tek tabaka (self-assembled monolayers, SAM) oluşumu metal yüzey ve seçilen organik molekülün baş grubu arasında meydana gelen güçlü kemisorbsiyon ile oluşmaktadır (Ulman, 1991; Bain ve Whitesides 1989). Alkil zincirler arasındaki hidrofobik ve van der Waals etkileşimleri sonucunda çok iyi organize olmuş ve elektrot yüzeyine çok sıkı paketlenmiş bir tek tabaka elde edilir. Elektrot yüzeyindeki SAM, çözelti içindeki elektro aktif türler ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferi için kinetik bir bariyer olarak tanımlanır. SAM yönteminin diğer metotlara göre avantajlarının başında uygun moleküllerin seçilerek tabaka kalınlığının kolaylıkla kontrol edilebilmesidir (Wink et al., 1997). Kendiliğinden oluşan tek tabakalar ve bu tabakaların bazı özellikleri Şekil 1.3' te şematik olarak gösterilmiştir. Tek tabakanın oluşumunu ve paketlenme yoğunluğunu; substratın doğası, pürüzsüzlüğü, çözgen, adsorbatın (tutunan) doğası, adsorbatın tutunma süresi, sıcaklık ve adsorbat konsantrasyonu gibi pek çok parametre etkiler (Vijayamohanan et al., 2002).



Şekil 1.3. Kendiliğinden oluşan tek tabakanın (SAM) şematik gösterimi (Chen and Jinghong, 2006)

SAM oluşumunda nispeten pürüzsüz metal yüzeylerinde (altın, gümüş, bakır, platin ve nikel) tiyolat veya sülfür molekülleri; metal oksit yüzeylerinde ($\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3$, SiO_2 , PtO , TiO_2 ve ZrO_2) alkan silan molekülleri kullanılır (Chen ve Jinghong, 2006). Şekil 1.4’ te farklı yüzeylerdeki tek tabaka oluşumları gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Değişik yüzeylerdeki SAM yapıları (A) Altın yüzeye alkan tiyollerin oluşturduğu ve (B) hidroksillenmiş yüzeyde alkan siloksan ile elde edilen SAM yapısının modellenmesi (Mrksich and Whitesides, 1996).

SAM kullanımının çok önemli avantajları vardır: elektrot yüzeyine biyomoleküllerin bağlanması için ya direkt kimyasal bağlar kullanılır veya polimerik destekler kullanılarak enkapsülasyon yapılır.

1. Düzenli yapının, iğne deliği boşlukların ve stabil tek tabakanın oluşması kolaydır.
2. SAM yüzey ile sağlanan mikro çevre benzeri membran biyomolekül immobilizasyonu için uygundur.
3. Çeşitli fonksiyonel gruplar ile SAM’da ki baş grupların dizaynının esnekliği isteğe göre hidrofobik ve hidrofilik yüzeylerin elde edilmesini sağlar.
4. SAM üzerinde immobilizasyon için çok az miktarda biyomolekül (tek tabaka oluşturmak için gerekli) gereklidir.
5. Çok olağanüstü durumlarda moleküler düzeyde bilgi edinmek örneğin protein adsorpsiyonu, DNA hibridizasyonu, antijen-antikor ilişkisi vs. için AFM gibi yüzey duyarlı teknikler kullanılır.

6. +0.8V ile -1.4V arasında SCE' ye karşı uygulanan potansiyelde stabil olduğunu göstermektedir ki bu durum onu pek çok elektrokimyasal enzim elektrotu uygulaması için uyumlu hale getirir (Chaki and Vijayamohanan, 2002).

Bu avantajlarının yanı sıra SAM oluşturmaya sınırlayan önemli etmenler de vardır. Bunlar:

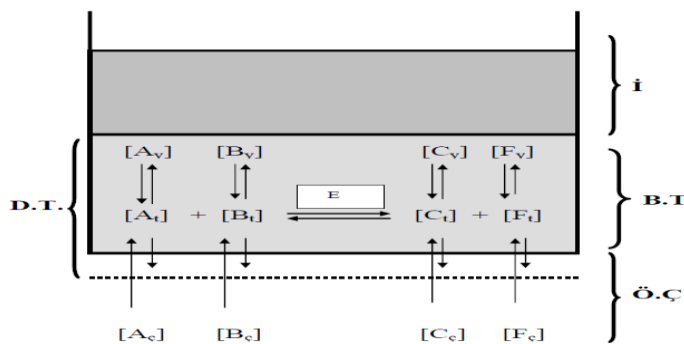
1. Bazı SAM tabakaların kimyasal stabiliteleri çok iyi olmadığından tabakanın deneme esnasında izlenen yoldan etkilenecek kimyasal oksitlenmeye uğraması

2. Tek tabakanın elektriksel alanının etkisi ve termal desorpsiyonu

3. Hidrofobik SAM yüzeyi yüksek yüzey enerjisiyle çok sayıda kontaminantı yüzeyde biriktirdiğinden istenmeyen safsızlıkların adsorplanmasıdır (Wink et al., 1997).

1.5. Elektrokimyasal Esaslı Enzim Biyosensörleri

Enzim temelli biyosensörlerin pek çoğunda elektrokimyasal esaslı transduserler kullanılır. Bu transduserler ile amperometri ve/veya potansiyometri ilkelerine göre ölçümler alınabildiğinden genellikle oksidoredüktaz (elektron açığa çıkaran enzimler) sınıfı enzimler kullanılır (Bartlett, 1990). Bir enzim biyosensörü şekil 1.5' te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.5. Enzim biyosensörünün genel çalışma ilkesi (Dinçkaya, 1999)

(A: Substrat, B: Kosubstrat veya Koenzim, C ve F: Ürünler, ϕ : Ölçüm çözeltisi içindeki, t: biyoaktif tabakadaki ve y: elektrot yüzeyindeki konsantrasyonlar. D.T: Difüzyon tabakası, Ö.Ç.: Ölçüm çözeltisi, B.T.: Biyoaktif tabaka, İ: İletici)

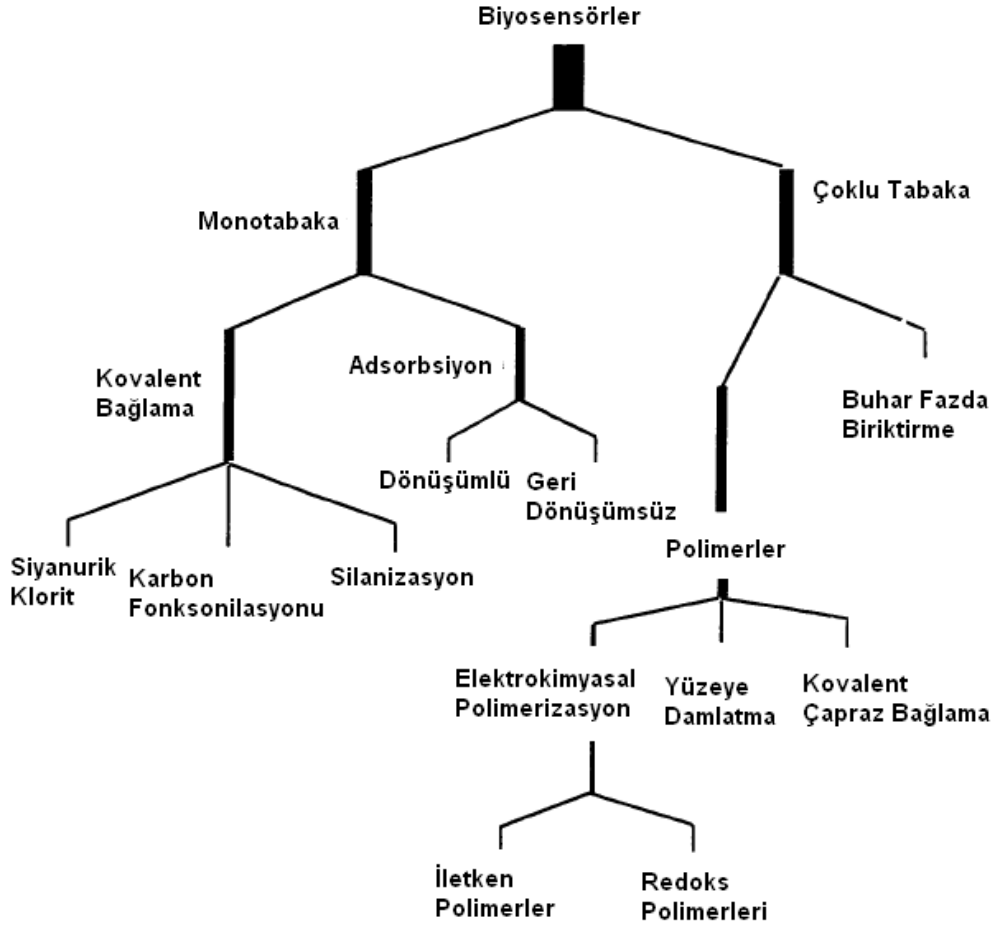
Şekil 1.5 te görüldüğü gibi A substratı elektrot yüzeyine immobilize olmuş enzim tarafından B koenziminin yardımıyla C ve F'ye dönüştürülür. Bu dönüşüm sonrasında elektrot yüzeyindeki madde konsantrasyonlarındaki farklanma iletici tarafından sinyal olarak yansıtılır.

1.5.1. Amperometrik Elektrokimyasal Sensörler

Elektrokimyasal biyosensörler içinde en yaygın kullanılan biyosensör tipidir. Amperometrik biyosensörlerde ölçüm yapılacak türün belli bir potansiyel altında yükseltgenmesi ve indirgenmesi sağlanır. Biyokimyasal reaksiyon sonucu oluşan akım analit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

1.5.1.1. Amperometrik Biyosensörlerin Hazırlanması

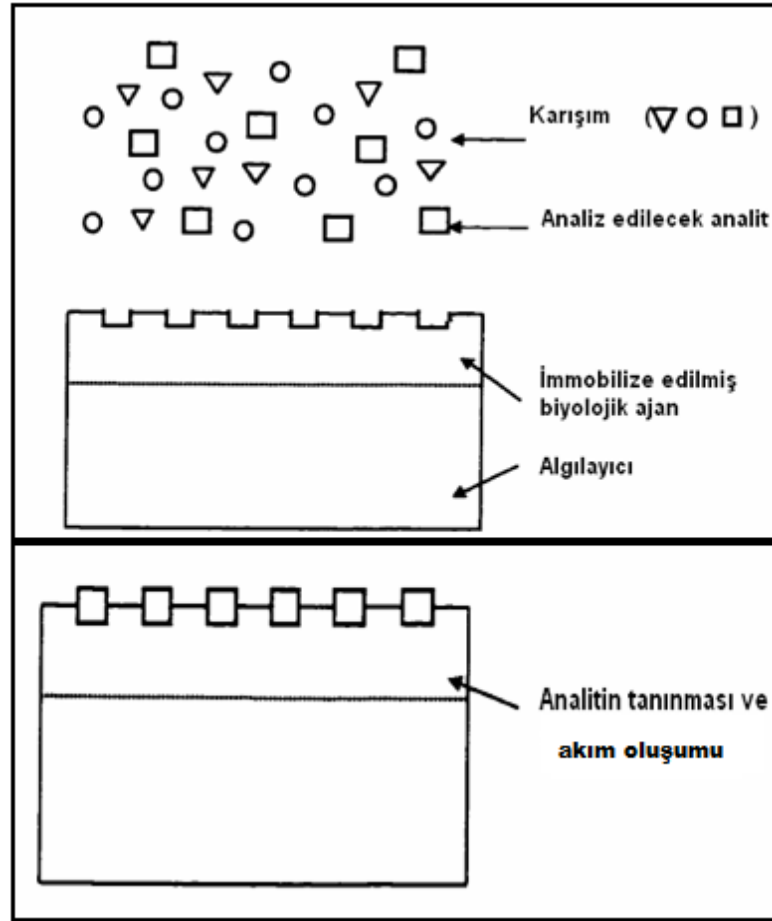
Biyosensör teknolojisindeki gelişmeler biyosensör yapımında çok farklı yaklaşımların ortaya çıkmasına sebep olmuştur (Connolly et al., 1995, Vadgama and Crumpl, 1992, Griffiths et al., 1993, Wring and Hart, 1992). Elektrot yüzeyinin moleküler yapısının kontrolü biyosensör yapımında büyük önem taşımaktadır. Amperometrik biyosensör çalışmalarında yüzey modifikasyonu için çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin listesi Şekil 1.3'de verilmiştir.



Şekil 1.6. Amperometrik biyosensör yapımında kullanılan yöntemler.

1.5.1.2 Amperometrik Biyosensörlerin Çalışma Prensibi

Amperometrik biyosensörler biyolojik bir materyal ve elektrokimyasal bir algılayıcıdan oluşur. Biyolojik materyal analit ile birleşerek onun tanınmasına olanak sağlar. Algılayıcı ise biyolojik materyal ile analit arasında belli bir potansiyel altında reaksiyon sonucu sinyali ölçer. Amperometrik biyosensörün çalışma prensibi Şekil 1.7’ de verilmiştir.



Şekil 1.7. Amperometrik biyosensörün çalışma prensibi

Amperometrik biyosensörler için gerekli olan üç temel öge şunlardır:

- Substrat ile etkileşimi sonucunda uygun bir elektrot yüzeyinde yükseltgenebilecek veya indirgenebilecek bir tür oluşturan enzim
- Enzimin aktivitesini yitirmeden elektrot yüzeyinde immobilize olmasını sağlayacak immobilizasyon metodu
- Yükseltgenme veya indirgenme sırasında oluşacak akımın ölçülmesi ve potansiyelin kontrolünü sağlayacak bir elektronik sistem.

1.5.1.3. Amperometrik Enzim Biyosensörleri

Enzim ile modifiye edilmiş elektrotlar amperometrik biyosensörlerin ve biyoyakıt hücrelerinin temel parçalarındandır. Enzim elektrotları elektrokimyasal prosesi immobilize enzimin aktivitesi ile kombine eden minyatür kimyasal iletici

sistemlerdir (Dzyadevych et al., 2008). Bu sistemler enzimin biyolojik fonksiyonu sayesinde biyolojik orijinli olan substrat moleküllerine karşı genellikle yüksek seçicilik gösterir. Bu nedenle, enzimlerin sahip olduğu bu özellik enzim sensörleri oluşturulmasında avantaj sağlar. Tipik olarak, enzim reaksiyonunun kinetiği ürün oluşumunun ya da reaktantın eksilmesinin hızı olarak izlenir. Eğer ürün ya da reaktant elektroaktif ise reaksiyon direkt olarak amperometri ile izlenebilir. Böylece bu tip elektrokimyasal reaksiyonlar amperometrik biyosensörlerin oluşturulmasında kullanılabilir. Elektrokimyasal biyosensörlerin büyük bir kısmı katalitik reaksiyon sırasında elektronlar kullanan ya da üreten oksidoredüktaz sınıfı enzimleri içerir. Bu elektrokimyasal reaksiyonlar elektrot yüzeyinde gerçekleşir ve akım oluşturmak için kullanılır. Enzimatik oksidasyon sonucu açığa çıkan elektronlar anoda transfer edilir. Burada, oksijen gibi yüksek bir elektron alıcısına taşınır. Enzim elektrotlarının değişmez parçaları enzimler ve elektrot materyalidir. Elektrot materyalinin seçiminde önemli olan parametreler elektriksel iletkenlik ve materyalin sertliğidir. Bu nedenle, altın (folyo ya da çubuk), platin (folyo ya da çubuk) ya da karbon (kâğıt, çubuk, pasta, metallenmiş karbon, camımsı karbon, karbon fiber, nanotüp film) gibi katı destek elektrotlar kullanılır. Enzim elektrotlarını oluşturmak amacıyla kullanılan enzimler analizlemek istediğimiz analitin reaksiyon tipine bağlı olarak seçilir. Redoks enzimleri (oksidoredüktazlar) en çok kullanılan enzimlerdir. Ayrıca lipazlar ve esterazlar gibi hidrolaz sınıfı enzimler de redoks enzimleri ile beraber kullanılabilir. Tüm bu enzimlerin içinde glukoz oksidaz kan glukoz tayininin öneminden dolayı en çok kullanılan enzimdir. Enzim elektrotlarının en önemli problemi ko-substrat olarak oksijene ihtiyaç duymaları ve reaksiyonun amperometrik yöntemlerle izlenmesinin hidrojen peroksit dayalı olmasıdır. Bu problem mediyatörler kullanılarak aşılıma çalışılmaktadır (Sarma et al., 2009).

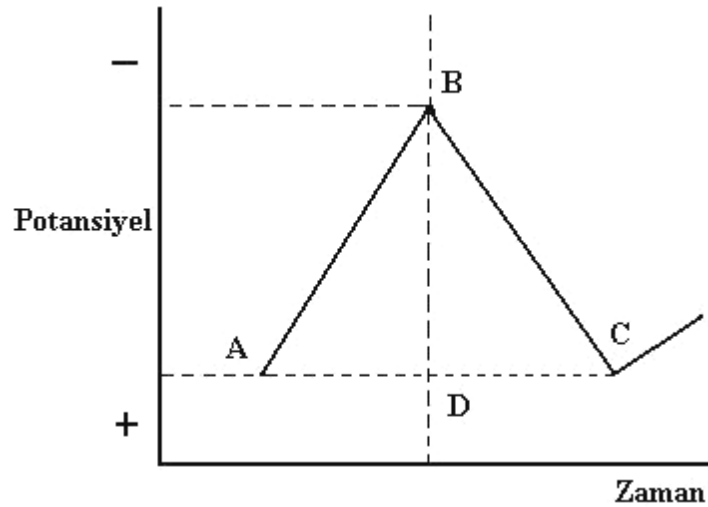
1.6. Voltammetri

Voltammetri, elektrokimyasal bir hücre içinde bulunan çalışma elektrotu üzerindeki akım-gerilim ilişkilerinin çalışmasıdır. Voltammetri bize ilgili tepkimenin mekanizması hakkında detaylı bilgi sağlayabilir. Çalışma elektrodu atımlı, doğrusal dalga formları kullanılarak potansiyostatik olarak kutuplanabilir. Barker ve Jenkin (Barker and Jenkin, 1952), tarafından bulunan atımlı

voltammetrik teknikler çalışma elektrodunun E1 potansiyelinden E2 potansiyeline anlık kutuplaşmasını içerir. Diğer taraftan doğrusal taramalı voltammetride kutuplaşma sabit bir potansiyel tarama hızında, v , E1 potansiyelinden E2 potansiyeline uygulanır. Dönüşümlü voltammetri, doğrusal taramalı voltammetrinin bir uzantısı olarak E2 den E1 e geri tarama yapmadan önce E1 den E2 ye tarama yapar. Adsorptif sıyırma voltammetrisi, polorografi gibi elektrokimyasal analizlerin birçoğu doğrusal tarama ya da dönüşümlü voltammetri temeline dayanır. Ancak akış analizi gibi teknikler sabit potansiyel temeline dayanır ve amperometriklerdir.

1.6.1. Döngüsel voltammetri (CV)

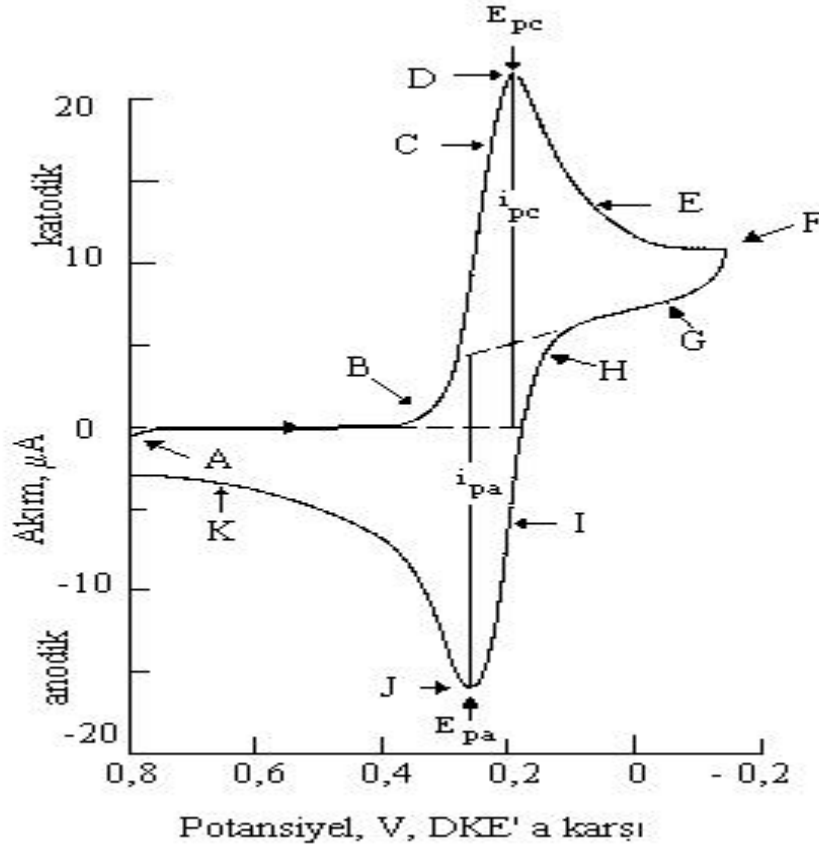
Döngüsel voltammetride (CV), karıştırılmayan bir çözeltide küçük durgun bir elektrodun akım cevabı bir üçgen dalga şekilli potansiyel ile uyarılır (Skoog et al., 1997).



Şekil 1.8. İkizkenar üçgen dalgası şeklinde uygulanan potansiyel.

Döngüsel voltammetride belli bir potansiyel aralığında doğrusal olarak tarama yapılır sonra tarama yönü ters çevrilir ve potansiyel orijinal değerine getirilir. Her iki yöndeki tarama hızı aynıdır. Bu uyarma çevrimi birkaç kez tekrarlanır. Ters yöndeki potansiyellere döndürme potansiyelleri denir. Döndürme potansiyellerin aralığı, bir veya daha fazla analitin difüzyon kontrollü bir yükseltgenme veya indirgenmenin meydana geldiği potansiyeldir. Başlangıç

taramasının yönü negatif veya pozitif olabilir. Bu da numunenin bileşimine bağlıdır. Daha negatif potansiyeller yönünde bir tarama ileri tarama, zıt yöndeki tarama da ters tarama olarak adlandırılır. Üçgen dalga uygulandığında Şekil 1.9'deki gibi bir voltammogram elde edilir.



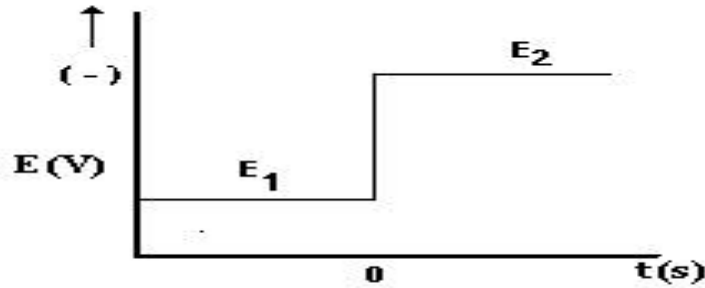
Şekil 1.9. Üçgen dalga potansiyel uygulandığında elde edilen voltammogram. (Skoog et. al., 1997).

Bu eğri şöyle yorumlanır; gittikçe artan bir katodik gerilim uygulandığında eğrinin ABDF dalı elde edilir. İndirgenme sebebiyle bir katodik akım gözlenir (B noktası). B'den D'ye kadar ki bölgede indirgenebilen maddenin yüzey derişimi gittikçe küçülürken, akımda hızlı bir artış olur. Pik akımı iki bileşenden meydana gelir. Biri, analitin yüzey derişimini Nernst eşitliği ile verilen denge derişimine eşitlemek için gerekli kapasitif akım artışıdır. İkincisi ise normal difüzyon kontrollü akımdır. Sonra ilk akım, difüzyon tabakası elektrot yüzeyinden uzaklaştıkça hızla azalır (D noktasından F noktasına). F'de uygulanan katodik gerilim azalmaya başlar. FH bölgesinde indirgenebilen maddenin indirgenmesi

devam eder. Ancak indirgenmiş madde konsantrasyonu azalmış olduğundan akım da azdır. Potansiyel yeteri kadar pozitif olduğunda indirgenme daha fazla devam etmez, akım sıfıra gider ve sonra da anodik olur. Anodik akım, ileri yöndeki tarama sırasında yüzey yakınlarında biriken indirgenmiş maddenin yeniden yükseltgenmesi sonucu oluşur. Bu anodik akım pik yapar ve sonra biriken indirgenmiş maddenin anodik reaksiyon yoluyla kullanılmasıyla azalır (Skoog et al., 1997).

1.6.2. Kronoamperometri

Kronoamperometride çalışma elektrodunun potansiyeli aniden değiştirilir ve durgun ortamda akım–zaman ilişkisi gözlenir. Kronoamperometride çözeltiye daldırılan çalışma elektroduna uygulanan potansiyel–zaman grafiği Şekil 1.10’de gösterildiği gibidir. Önce çalışma elektroduna herhangi bir indirgenmenin olmadığı E_1 potansiyeli uygulanır. Sonra potansiyel ani olarak E_2 ’ye değiştirilir. E_2 potansiyeli, indirgenme difüzyon kontrollü olacak şekilde seçilir.



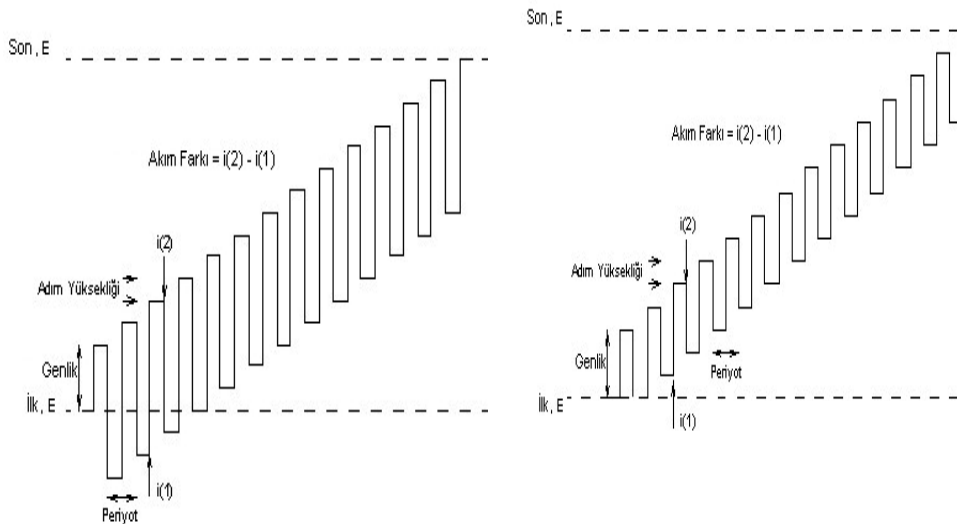
Şekil 1.10. Kronoamperometride elektroda uygulanan potansiyelin zamanla değişimi. (Skoog et al., 1997).

1.6.3. Diferansiyel Puls ve Kare Dalga Voltammetri

1960’lardan sonra doğrusal taramalı voltammetri metotları önemli bir metot olmaktan çıkmış, yerine puls metotları gelişmeye başlamıştır. Doğrusal taramalı voltammetrinin yavaş olması, dedeksiyon limitinin düşük olması ve pahalı

parçalar gerektirmesi gibi özellikleri nedeniyle diferansiyel puls ve kare dalga voltammetri gibi önemli metotlar gelişmiştir (Skoog and Leary, 1992).

SWV ve DPV hem nitel hem de nicel analiz için kullanılır. Bu yöntemlerde elektrota uygulanan gerilim sinyalinin zamanına bağlı olarak iki noktada akım sinyalleri ölçülür. İki akım değeri arasındaki fark uygulanan DC potansiyelin fonksiyonu olarak grafiğe geçirilir. Oluşan pikler elektrokimyasal hücredeki türlerin elektroaktifliğini gösterir. Bu akım farkının ana bileşeni elektrot yüzeyindeki indirgenme ve yükseltgenmeye bağlı olarak oluşan akımdır. Bu metotlarda sinyal/gürültü oranı DC metotlara oranla daha yüksektir. İki teknik arasındaki fark uygulanan potansiyel puls dalgaformudur (Bard and Faulkner, 2001). Şekil 1.11a. ve 1.11b.'de kare dalga voltametri ve diferansiyel puls voltametri dalgaformları gösterilmektedir.



Şekil 1.11.a. Kare dalga voltametri dalgaformu Şekil 1.11.b. Diferansiyel voltametri dalgaformu

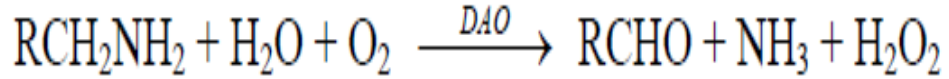
1.7. Biyoaktif Tabaka Bileşenleri

1.7.1. İmmobilizasyonda kullanılan enzim diamin oksidaz

Diamin oksidaz (DAO, EC 1.4.3.6) [amin: O₂ oksidoredüktaz (deaminasyon)] bir bakır içerikli amin oksidaz sınıfının bir üyesi olup histamin ile diğer biojenik aminlerin oksidatif deaminasyonunu katalize eder. Diamin oksidaz; diamino oksihidraz, histaminaz, histamin deaminaz, histamin oksidaz,

amin oksidaz, amin oksijen oksidoredüktaz, Cu-amin oksidaz, monoamin oksidaz vb. gibi isimlerle de adlandırılır.

Mitokondride yer alan bu enzim, bir çok monoaminin oksidatif deaminasyonu sonucu aldehid, amonyak ve H_2O_2 dönüşümünü katalizler (Wilflingseder et al., 2000)

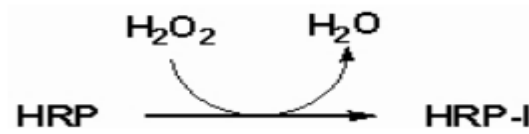


Şekil 1.12. Diamin oksidaz enziminin reaksiyonu

Enzim aktivitesi genelde oksijenin harcanması ya da oluşacak olan hidrojen peroksit üretimine bağlı olarak ölçülmektedir (Wimmerova et al., 1999).

1.7.2. İmmobilizasyonda kullanılan enzim peroksidaz

Peroksidazlar (E.C 1.11.1.7), hidrojen peroksit veya türevlerini kullanarak çok sayıda organik veya inorganik maddenin indirgenmesini katalizleyen, demir(III) porfirinler sınıfında yer alan, oksidoredüktazlardır.



Şekil 1.13. Peroksidaz enziminin reaksiyonu

1.7.3. Nanopartiküller

Teknolojide yaşanan hızlı gelişmeler, nano teknolojinin doğmasına yol açtı ve çağımızın en öncelikli konularından biri oldu. Nano parçacıklar, ince filmler ve nanotüpler olarak elde edilen malzemeler, gösterdikleri çok ilginç fiziksel

özellikler ve çok küçük boyutları nedeniyle teknolojide önemli bir kullanım alanına sahiptir. Nanoteknolojinin hayatımızda kullanımının artmasıyla birlikte nanomalzemeler üzerine çalışmalar artmıştır. Nanometre boyutundaki farklı nanopartiküllerin kontrol edilebilir elektronik ve katalitik özellikleri bu partiküllerin elektrot fabrikasyonunda ve modifikasyonunda kullanılabilmesine olanak sağlamıştır. Çok tabakalı iletken nanopartiküllerle (Altın (Au) gibi metalik nanopartiküller) modifiye edilen elektrotlar gözenekli ve yüzey alanı geniş yapıya kavuşurlar. Ayrıca metalik nanopartiküller analitiksel öneme sahip bazı elektrokimyasal tepkimelerin aşırı potansiyelini düşürerek metalik elektrotlarda tersinmez olan redoks tepkimelerine de tersinirlik sağlamaktadır.

Nanopartiküllerin kendi özel nitelikleri nedeniyle boyutu büyük ölçekli farklı uygulamaları mümkündür. Nanopartiküller altın, demir ve protein gibi çeşitli metallerin albümin ve jelâtin ile kullanımı gibi medikal amaçlar için kullanımı mevcuttur.

Nanopartiküller sinyal iletiminde lokalizasyon değiştirerek ölçümünün biyolojik bileşeninde düzensizlik meydana getirirler ve ölçülebilen sinyalde bir değişiklik yaparlar. Sinyal iletici olarak görev yapan nanopartiküller biyolojik örneklerin işaretlenmesini elimine ederler ve tanı yöntemlerinde kullanılabilirler.

Metal olmayan nanopartiküller arasında, albümin nanopartikülleri anti-tümör ilaçların bölgesel yönlendirilmesi için kullanılır. Tümörün olduğu bölgeye doğru göç gerçekleşir. Benzer şekilde jelatin nanopartiküller antijene karşı hücrel immün yanıt olarak hem hücrel hem de humoral andjuvant olarak kullanılmıştır.

Metaller arasında altın ve demir nanopartiküller geleneksel ayurvedik (ayurveda: Eski Hindu hekimlik ve uzun yaşam sanatı) ilaç ve modern medikal müdahalelerde kullanılır. Kolloidal altın tavşanlarda ramatoid arterite karşı başarılı bir terapi olarak kullanılmıştır. Altın nanopartiküllerin proteinlerle etkileşimini içeren çeşitli çalışmalar devam etmektedir.

1.7.3.1. Altın Nanopartiküller (AuNP)

Son yıllarda nanopartiküllerin önemli özellikleri hakkındaki gelişmeler biyoduyarlık alanlarında bu materyallerin uygulanabilirliği ve elektrokimyasal davranışları hakkındaki ilgiyi arttırmıştır. Altın nanopartikül (Au-np) proteinlerin adsorpsiyon üzerinden biyolojik aktivitelerini muhafaza etmelerine yardım eden bir çeşit nanomateriyaldir. Büyük yüzey alanı, iyi elektronik özellikler ve redoks proteinlerinin doğru elektron transferinin çalışması için kullanımı biyosensör yapımındaki kullanışlılığını arttırmıştır.

Altın nanopartikül ile elektrot yüzeyinin modifikasyonu yerel sistemlerdeki redoks proteinlerine benzer bir mikroçevre sağlar ve altın nanokristallerin iletim tüneli içinden doğru elektron transferi için protein kabuklarının yalıtma etkisinin indirgenmesi yoluyla oryantasyonda protein moleküllerine daha bir serbestlik sağlar.

Altın nanopartiküllerin yüzey morfolojisi, nanopartiküller arasındaki uzaklık ve elektrot yüzeyi, elektrot materyali ve redoks proteini arasındaki elektriksel bağlantının meydana getirilmesinde rol oynayan önemli faktörlerdir.

Altın nanopartiküller agregatlaşabildikleri için sistemde bir sinyal değişimine yol açarlar. Örneğin antijen kaplandığı zaman altın nanopartiküllerin agregasyonu ile antikor konsantrasyonu tayin edilebilir. İmmünoglobulin ölçümü için agregasyon metoduyla nanoshell'ler kullanılabilir.

Yakın IR bölgede güçlü absorban özellikte olduklarından aşırı hücre ısınması ve hücre hasarına sebep olabildiklerinden, nanokabuklara kanser hücrelerinin sıcaklıkla yok edilmesinde kullanılabilir.

Altın nanopartiküllerin nanometrik sınırları, elektron transferi için biyomolekül redoks kısmı ve elektrot arasındaki uzaklığı azaltması yoluyla hafifçe protein içine girer (Mena, 2005). Altın nanopartiküller kendilerine has optik, elektronik ve moleküler tanıma özellikleri yüzünden çeşitli alanların uygulamaları ile birlikte elektronik, nanoteknoloji ve önemli özellikteki yeni materyallerin sentezini içeren araştırmaların da konusu olmuştur. Yeni çalışmalara

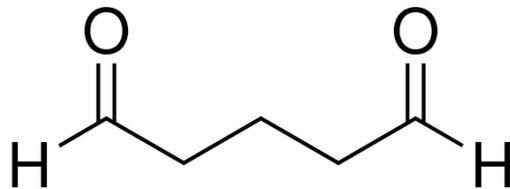
göre altın nanopartiküller potansiyel olarak biomedikal uygulamalarda kullanılabilen ufak, kesin ve güçlü ısıtıcılar olarak davranabilmektedirler.

1.7.4. Glutaraldehit

Glutaraldehit tıpta özellikle sistoskop, bronkoskop, endoskop gibi lensli aletlerin sterilizasyonunda sıkça kullanılan renksiz, sıvı bir dezenfektan ve sterilizasyon kimyasalıdır. Aynı zamanda elektron mikroskoplarında sabitleyici olarak da kullanılmaktadır (HSDB., 1996; Thomas et al., 1974).

Glutaraldehit özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılan homo bifonksiyonel bir kimyasaldır. Homo bifonksiyonel maddeler, proteindeki lizin kalıntısının amino grupları gibi primer aminlerle seçici olarak etkileşime girerler. Suda ve benzen, alkol gibi susuz ortamlarda kararlı ve çözünebilir olması nedeniyle kullanımları çok yaygındır (Kapoor, 1996).

Glutaraldehit, içerdiği iki aktif aldehit grubu ile biyosensör geliştirilmesinde kullanılan enzim, mikroorganizma ve doku kesitleri gibi biyolojik bileşenlerin, kitosan, kolajen, jelatin ve karragenan gibi biyolojik matriks moleküllerinin polimerleri üzerindeki $-NH_2$ gibi gruplarla H_2O çıkarak birleşir ve iki polimer zincirini birbirine çapraz bağlar. Bu esasa dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça sık kullanılmaktadır (Sezgintürk vd., 2004a ; Akyılmaz vd., 2000). Yöntem kolay uygulanabilir olup genellikle sistemin termal, işlem ve depo kararlılıklarını da arttırmaktadır.



Şekil 1.14. Glutaraldehitin yapısı

1.7.5. Hidrokinon

Hidrokinon, benzene 1,4-diol olarak bağlanmış fenolik türevli bir bileşiktir. Enzim ile elektrot arasında elektron transferini hızlandıran mediyatör görevi görmektedir.

Hidrokinonun Özellikleri

Kimyasal formül: $C_6H_6O_2$

Molar kütle: $110,11 \text{ g/mol}^{-1}$

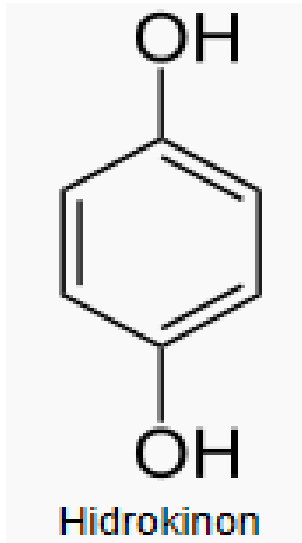
Görünüm: Beyaz katı

Yoğunluk: $1,3 \text{ g/cm}^3$

Erime noktası: $172 \text{ }^\circ\text{C}$

Kaynama noktası: $287 \text{ }^\circ\text{C}$

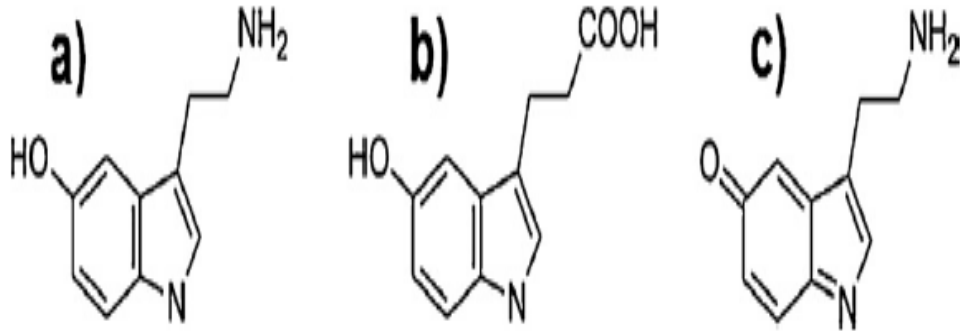
Çözünürlük (su) : $5,9 \text{ g/100 mL (15}^\circ\text{C)}$



Şekil 1.15. Hidrokinon yapısı

1.7.6. Serotonin

Serotonin temel amino asit L-triptofanın bir metabolitidir ve düz kas kasılmasındaki rolü 1951 yılında bildirilmiştir [Esparmer and Boretti, 1951]. Serotonin yapısı, doğal metaboliti 5-hidroksiindoleasetik asit (5-HIAA) ve serotonin oksidasyon ürünü Şekil 1.16 'da gösterilmektedir [Kema et al., 2000].



Şekil 1.16. a) Serotonin yapısı, b) Serotonin metaboliti 5-HIAA, c) Serotonin oksidasyon ürünü

Serotonin kimyasal formülü $C_{10}H_{12}N_2O$ dir. Molekül ağırlığı 176,22 g/mol' dür.

Esansiyel bir amino asit olan L-triptofandan triptofan hidroksilaz enzimi ile sentezlenmekte, etkilerini kendisine özgü serotonerjik reseptör (5-HTR) aileleriyle göstermektedir. Vücudumuzdaki temel serotonin sentezi gastrointestinal sistemdeki enterokromaffin hücrelerinde ve beyinde serotonerjik nöron gövdelerinin yoğun olduğu “*raphe nuclei*”de gerçekleşir.

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) merkezi sinir sistemi aracılığıyla yayılan bir nörotransmitter olup; duygu, uyku ve açlık

hislerinde hayati rol oynayan fizyolojik sistemdeki önemli bir biyomoleküldür [Ressler and Nemeroff, 2000; Perry and Fuller, 1992]. Bu nedenle; 5-HT seviyesinin ölçümünün, serotoninin depresyon ve diğer sinirsel bozukluklardaki rolünü anlamamızda büyük değeri vardır. Bu analizin yapılması için fluorimetri [Panholzer et al., 1999], enzim immunoassay [Chauveau et al., 1991], radio immunoassay [Jeon et al., 1992], kemiluminesans [Tsunoda et al., 1999] ve kütle spektrometri [Middelkoop et al., 1993] gibi çeşitli analitik metodlar kullanılır. Bu teknikler hem çok zaman harcar hem de örneğin önceden hazırlığının yapılmış olması gerekir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1. Cihaz ve diğer ekipmanlar

Denemelerde Palm Sens Ins. (Hollanda) marka potansiyostat; CHI 104 model Altın (Au) çalışma elektrodu, CHI 111 model Ag/AgCl doygun referans elektrodu, CHI 115 model Pt yardımcı elektrodu; Gibson P1000 otomatik pipetleri, Nuve (TR) marka termostat, Yellow line manyetik karıştırıcı kullanıldı.

2.1.2. Kimyasallar

Deneysel çalışmalar için temin edilen kimyasallar:

- Glutaraldehit (Sigma)
- Peroksidaz (Sigma)
- Diamin Oksidaz (Sigma)
- Serotonin (Sigma)
- 1,6- hekzanditiyol (Aldrich)
- 3-merkaptopropiyonik (Sigma)
- Dopamin (Sigma)
- Epinefrin (Sigma)
- Norepinefrin (Sigma)
- Dopa (Sigma)
- Glukoz (Sigma)
- Askorbik asit (Sigma)
- Sitrik asit (Sigma)
- Ürik asit (Riedel-de-Haen)
- Potasyum fosfat monobazik (Sigma)
- Glisin (Sigma)
- Sülfürik asit
- Gamma alumina (0,1-0,05 micron)

Deneyisel çalışmalarda aşağıdaki çözeltiler kullanıldı:

- 50 mM fosfat tamponları (pH: 6,0 - 6,5 –7,0 – 7,5- 8,0)
- 50 mM Sitrat Tamponu (pH: 4,5 - 5,0 - 5,5)
- 50 mM Glisin Tamponu (pH: 8,5 - 9,0)
- Peroksidaz (113 U/mL - 226 U/mL)
- Diamin oksidaz (0,11 U/mL- 0,22 U/mL)
- 10 mM 1,6-hekzanditiyol
- 25 mM 3- merkaptopropiyonik asit
- % 1,25'lik, %2,5'luk ve %5 'lik glutaraldehit
- 5 µM serotonin, dopamin, epinefrin, norepinefrin, D- glukoz, L- askorbik asit, sitrik asit, ürik asit, (Fosfat tamponu içinde)
- Sentetik fizyolojik serum (pH 7,4 % 0,09 NaCl)

2.1.2.1. Altın Nanopartikül Sentezi :

Altın nanopartikül hazırlamada sodyum sitrat kullanıldı. %10'luk kloro aurik asit çözeltisinden 10 mL alınarak 100 mL ultrasaf su çözeltisine eklenerek manyetik bar ile karıştırıldı. Çözelti kaynama noktasına gelince karışıma yeni hazırlanmış %1'lik sulu trisoydum sitrat çözeltisinin 4 mL'si hızlı bir şekilde eklendi. Karıştırma ve kaynama devam ederken rengin maviye ve ardından yaklaşık 6 dk sonra kırmızıya döndüğü gözlemlendi ve 2-3 dk daha karıştırılarak kırmızı-turuncu renk gözlemlendiğinde çözeltinin hazır olduğu anlaşıldı. 5 dk daha kaynatıldıktan sonra soğutularak kullanıma hazır hale getirildi [Preparation of Colloidal Gold, Methods in Molecular Biology, Vol. 115: Immunocytochemical Methods and Protocols (Edited by: L. C. Javois © Humana Press Inc., Totowa, NJ)]

2.2. Yöntem

2.2.1. Biyosensörün hazırlanması

Öncelikle Au elektrot fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlenir. Temizlik aşamaları aşağıdaki gibidir:

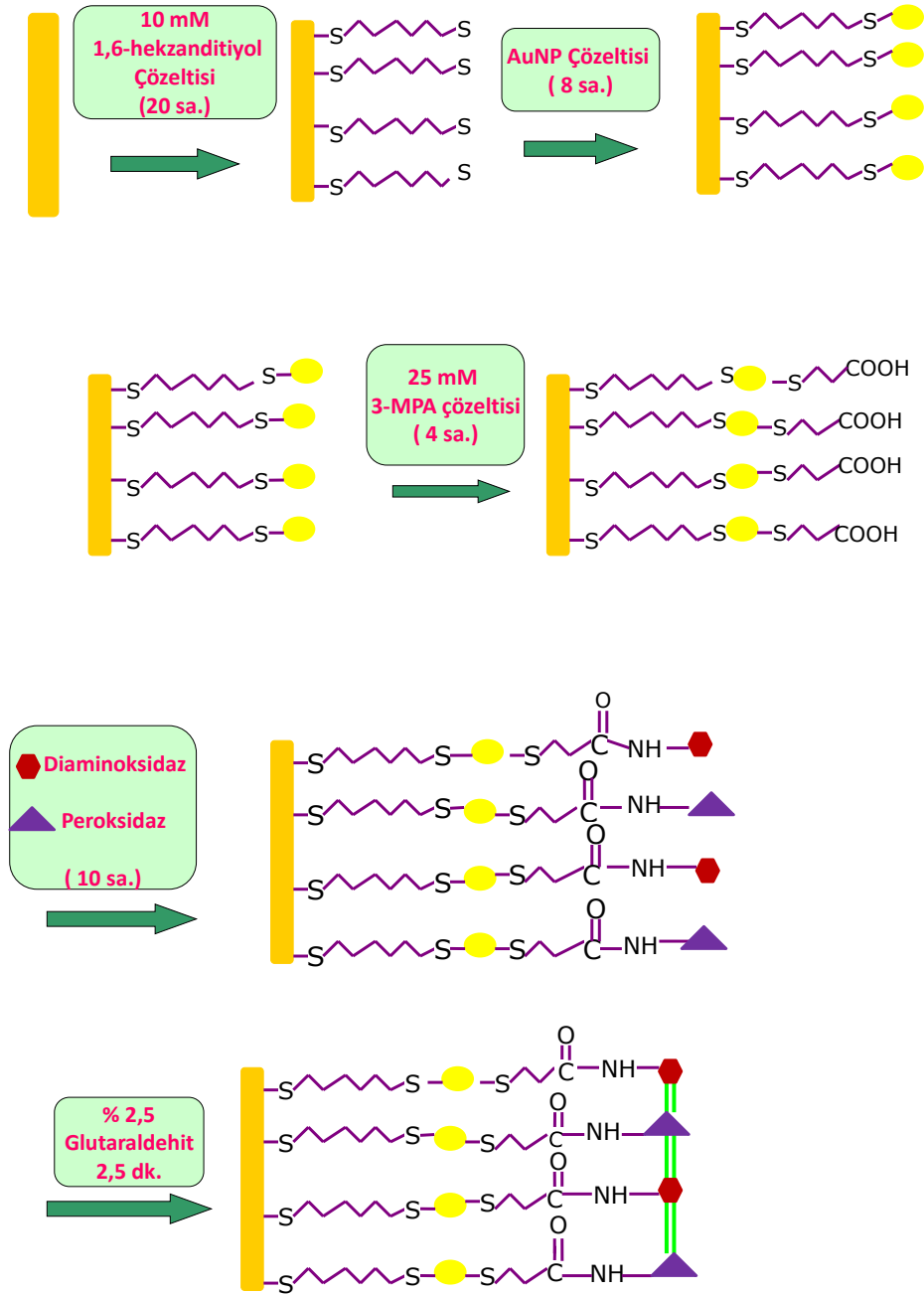
- Altın elektrot (-0,2) – (1,2) V potansiyelleri arasında tarama hızı 50mv/s olacak şekilde KOH çözeltisi içerisinde on beş tane lineer sweep voltammogramı alınır.
- Bir miktar bulamaç halindeki Gamma alumina kadife bir yüzey üzerine belli bir miktar damlatılır. Altın elektrot önce 0,05 mikronluk gamma alüminada sekiz çizerek yavaşça gezdirilir. Bu şekilde elektrot yüzeyindeki kirlilikler mekanik olarak temizlenmiş olur.
- Au elektrot bidistile suyla durulandıktan sonra adsorblanmış partikülleri uzaklaştırmak için on dakika etanol (%96) içerisinde sonikatörde bekletilir. Tekrardan bidistile suyla durulandıktan sonra on dakika da bidistile su içerisinde sonikatörde bekletilir.
- Au elektrodun yüzeyinin elektrokimyasal olarak temizlenmesi için 0,1 N H₂SO₄ çözeltisi içerisinde (-0,3) – (1,5) V potansiyelleri arasında 100mv/s tarama hızında otuz tane döngüsel voltammogram alınır.

Temiz Au elektrot SAM oluşturmak için fonksiyonel tiyol grubu içeren 1,6-hekzanditiyol çözeltisine daldırılır. Bu bileşiğin fonksiyonel uç grubu (-SH) doğrudan altın elektrot yüzeyine bağlanarak yüzey modifikasyonu gerçekleştirilir. 1,6- Hekzanditiyolün altın elektrot yüzeyine bağlanması ile diğer reaktif (-SH) ucuna altın nanopartikül bağlanması sağlanır. Altın nanopartikül modifiye elektrot 3-merkaptopropiyonik asit ile etkileşime sokularak bilayer tabaka elde edilir. Modifiye elektrot yüzeyine diamin oksidaz ve peroksidaz ilavesi sonrası glutaraldehit ile kovalant immobilizasyon gerçekleştirilir. Immobilizasyon prosedürüne ilişkin aşamalar Çizelde 2.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. İmmobilizasyon prosedürü

İşlem sırası	Yöntem
1	Altın elektrot 10 mM 1,6 hekzanditiyol çözeltisi içinde bekletilir. 20 saatin sonunda çıkarılıp önce etanol çözeltisi ardından saf su ile yıkanır.
2	Altın elektrot AuNP çözeltisine daldırılarak 8 saat beklenir. Daha sonra çıkartılıp saf su ile yıkanır.
3	Altın elektrot pH:7 50 mM monobazik potasyum fosfat tamponunda hazırlanmış 25 mM 3-MPA çözeltisi içerisine daldırılır ve 4 saat süresince bu çözeltide bekletilir. Dört saat sonunda bağlanmamış 3-MPA' yı uzaklaştırmak için elektrot yüzeyi bidistile suyla durulanır.
4	Daha sonra elektrot 1 mg/ml (0,11 Unit/ml) DAO ve 1 mg/ml (113 Unit/ml) HRP enzim çözeltisinde 10 saat bekletilir ve saf su ile yıkanır.
5	Son olarak altın elektrot (pH 7,5 50 mM fosfat tamponunda hazırlanan) % 2,5'lik glutaraldehit çözeltisi içerisinde 2,5 dakika bekletilir. Süre sonunda elektrot çıkartılıp saf su ile yıkanır.

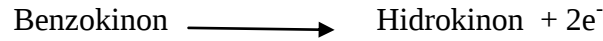
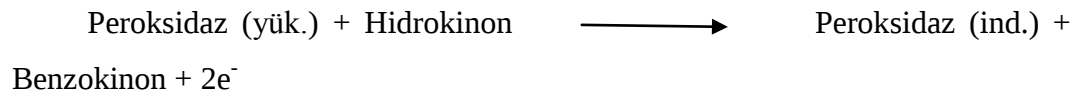
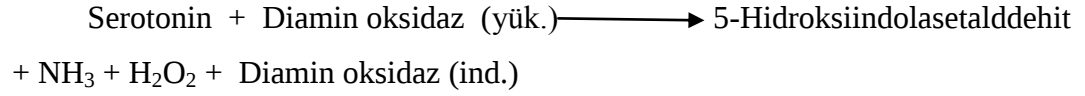
Hazırlanan biyosensör kullanıldıktan sonra +4 °C'de buzdolabında saklanır. Şekil 2.1. 'de tasarlanan modifiye elektrodun şematik gösterimi mevcuttur.



Şekil 2.1. Au/1,6-heksanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye elektroda ait immobilizasyon şeması. (Lu et al., 2002)

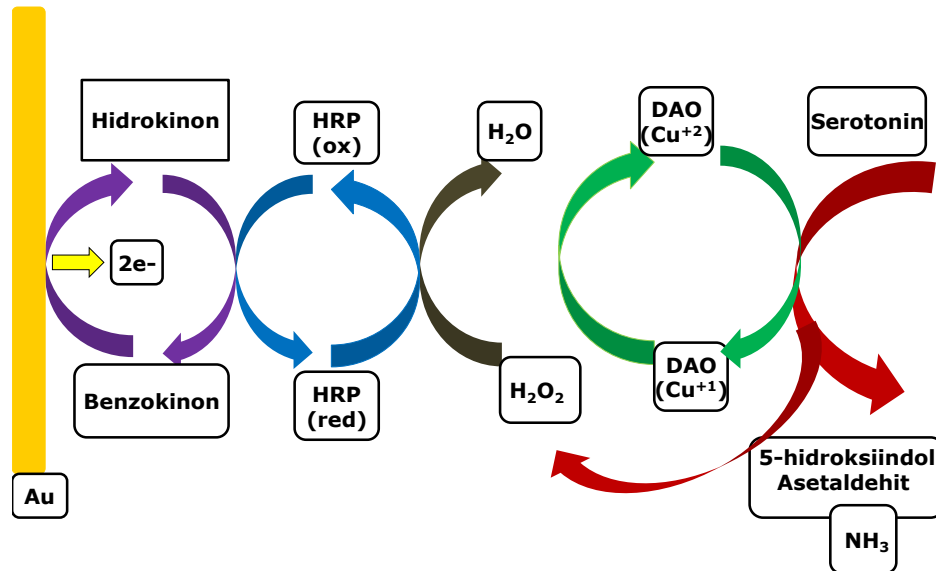
2.2.2. Biyosensörün çalışma ilkesi

Hazırlanan biyosensörün çalışma ilkesi amperometrik ölçümler için aşağıdaki eşitliği temel alarak 0,2 V'ta gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.2.' de tasarlanan biyosensörün çalışma ilkesi şematik olarak gösterilmektedir.

Reaksiyon Mekanizması



Şekil 2.2. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörünün çalışma ilkesi

2.3. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO-HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar

Bu kısımda, serotonin tayini amacı ile Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye elektrotlar kullanılarak hazırlanan biyosensörler ile serotonine yönelik olarak yapılan çalışmalara ilişkin sonuçlar verilmiştir. Öncelikle biyosensörlerin hazırlanmasına ilişkin parametrelere yönelik olarak 1,6-hekzanditiyolde bekletme süresi optimizasyonu, enzim miktarının ve glutaraldehit miktarının biyosensör cevabına etkisi, çalışma koşullarının optimizasyonu amacı ile optimum pH ve sıcaklık etkisine yönelik sonuçlar verilmiştir. Son kısımda analitik karakterizasyon ve hazırlanan biyosensörün örneklerde serotonin tayini amacıyla kullanımına ilişkin olarak elde edilen veriler sunulmuştur.

2.3.1. Tek tabakanın oluşma süresinin biyosensör cevabına etkisi

Denemeler 30° C’de potasyum fosfat tamponunda (pH:7,0 50 mM) gerçekleştirildi. 1,6-hekzanditiyol konsantrasyonu (10 mM), AuNP çözeltisinde 8 saat bekletme süresi, 3-MPA miktarı (25 mM) 4 saat bekletme, enzim konsantrasyonları (1mg/ml) ve % 2,5’ luk glutaraldehit çözeltisinde bekletme süresi 2,5 dakika olacak şekilde sabit tutularak gerçekleştirilen tek tabaka oluşum süresi 5; 10; 20 ve 30 saat olarak değiştirildi. Yapılan denemeler amperometrik metotla 0,2 V’ta serotoninin amperometrik ölçüm yoluyla gerçekleştirilmiştir.

2.3.2. Enzim miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Denemeler 30° C’de potasyum fosfat tamponunda (pH:7,0 50 mM) gerçekleştirildi. 1,6-hekzanditiyol konsantrasyonu (25 mM), tek tabaka oluşum süresi 20 saat, AuNP çözeltisinde 8 saat bekletme süresi, 3-MPA miktarı (25 mM) 4 saat bekletme, % 2,5 glutaraldehit çözeltisinde bekletme süresi 2,5 dakika

olacak şekilde sabit tutularak gerçekleştirilen enzim miktarı optimizasyonu 1 mg/ml DAO- 1mg/ml HRP; 2 mg/ml DAO- 1 mg/ml HRP ve 1 mg/ml DAO- 2 mg/ml HRP olarak değiştirildi. Yapılan denemeler amperometrik metotla 0,2 V'ta serotoninin amperometrik ölçümü yoluyla gerçekleştirilmiştir.

2.3.3. Glutaraldehit miktarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Denemeler 30° C'de potasyum fosfat tamponunda (pH:7,0 50 mM) gerçekleştirildi. 1,6-hekzanditiyol konsantrasyonu (25 mM), tek tabaka oluşum süresi 20 saat, AuNP çözeltisinde 8 saat bekletme süresi, 3-MPA miktarı (25 mM) 4 saat bekletme, enzim konsantrasyonları (1mg/ml) sabit tutularak gerçekleştirilen glutaraldehit miktarı optimizasyonu % 1,25; %2,5 ve % 5 olacak şekilde değiştirildi. Yapılan denemeler amperometrik metotla 0,2 V'ta serotoninin amperometrik ölçümü ile gerçekleştirilmiştir.

2.4. Çalışma koşullarının optimizasyonu

2.4.1. Optimum pH'nın belirlenmesi

Denemelerde 50 mM derişiminde pH: 4,5-5,0-5,5 sitrat; pH: 6,0-6,5-7,0-7,5-8,0 fosfat; pH: 8,5-9,0 glisin tamponları kullanılarak tasarlanan biyosensör için en iyi pH belirlenmeye çalışıldı. Ölçümler 30 ° C'de, mediyatör 1mM hidrokinon varlığında ve 5 µM serotonin konsantrasyonu kullanılarak 0,2 V'ta amperometrik metotla gerçekleştirilmiştir.

2.4.2. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Denemeler 10° C; 15° C; 20° C; 25° C; 30° C ve 35° C sıcaklıklarda soğuktan sığa doğru geçiş yapılarak ölçümler gerçekleştirilmiş ve en uygun sıcaklık belirlenmeye çalışılmıştır. Ölçümler pH: 7,0 'de ve 5 µM serotonin konsantrasyonu kullanılarak 0,2 V'ta amperometrik metotla gerçekleştirilmiştir.

2.5. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO-HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensörün karakterizasyonuna ilişkin bulgular

Bu amaç dahilinde hazırlanan ve optimizasyonu gerçekleştirilen modifiye biyosensör ile serotonin için doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, substrat spesifikliğı, girişimci etkileri, depo kararlılığı ve sentetik serum örneklerinde serotonin tayini gerçekleştirilmiştir.

2.5.1. Serotonin için doğrusal tayin aralığı

Yapılan denemelerde 1; 2,5; 5; 7,5; 10 μM serotonin derişimleri için ölçümler alındı. Yapılan değerlendirmeler sonucu serotonin için doğrusal tayin aralığı 1-10 μM arasında bulunmuştur.

2.5.2. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliğı

Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye elektrodu ile 0,2 V'ta amperometrik ölçüm yoluyla 5 μM serotonin için 6 tane ölçüm alındı. Elde edilen verilerden faydalanarak ortalama değeri ($\bar{x}$), standart sapma (S.S.), varyasyon katsayısı (% V.K.) hesaplandı.

2.5.3. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO-HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensörün substrat spesifikliğı

Serotonin tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacı ile 5 μM epinefrin, norepinefrin, dopamin, dopa, ürik asit, glukoz, askorbik asit reaktifleri kullanıldı. Serotonin cevabı % 100 kabul edilerek diğeri reaktifler için bulunan biyosensör cevapları ile kıyaslandı ve % biyosensör cevabı substrat çeşiti olarak grafiğeri geçirildi.

2.5.4. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO-HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensöre girişimcilerin etkisi

Serotonin biyosenörüne ilişkin girişimcilerin etkisi denemesinde 5 μ M epinefrin, norepinefrin, dopamin, dopa, ürik asit, glukoz, askorbik asit reaktifleri 5 μ M serotonin ile birlikte kullanılmıştır. Tek başına serotonin cevabı % 100 kabul edilerek diğer reaktiflerin serotonin ile birarada iken verdikleri cevaplar serotonin cevabı ile kıyaslandı ve % biyosensör cevabı - girişimci grafiği çizildi.

2.5.5. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO-HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensör ile örneklerde serotonin analizi

Serotonin tayinine yönelik tasarlanan biyosensörle sentetik serum örneklerinde serotonin tayini yapılmıştır. 100 μ M serotonin içerecek şekilde sentetik serum örnekleri (pH 7,4; % 0,09 NaCl) olarak hazırlandı.

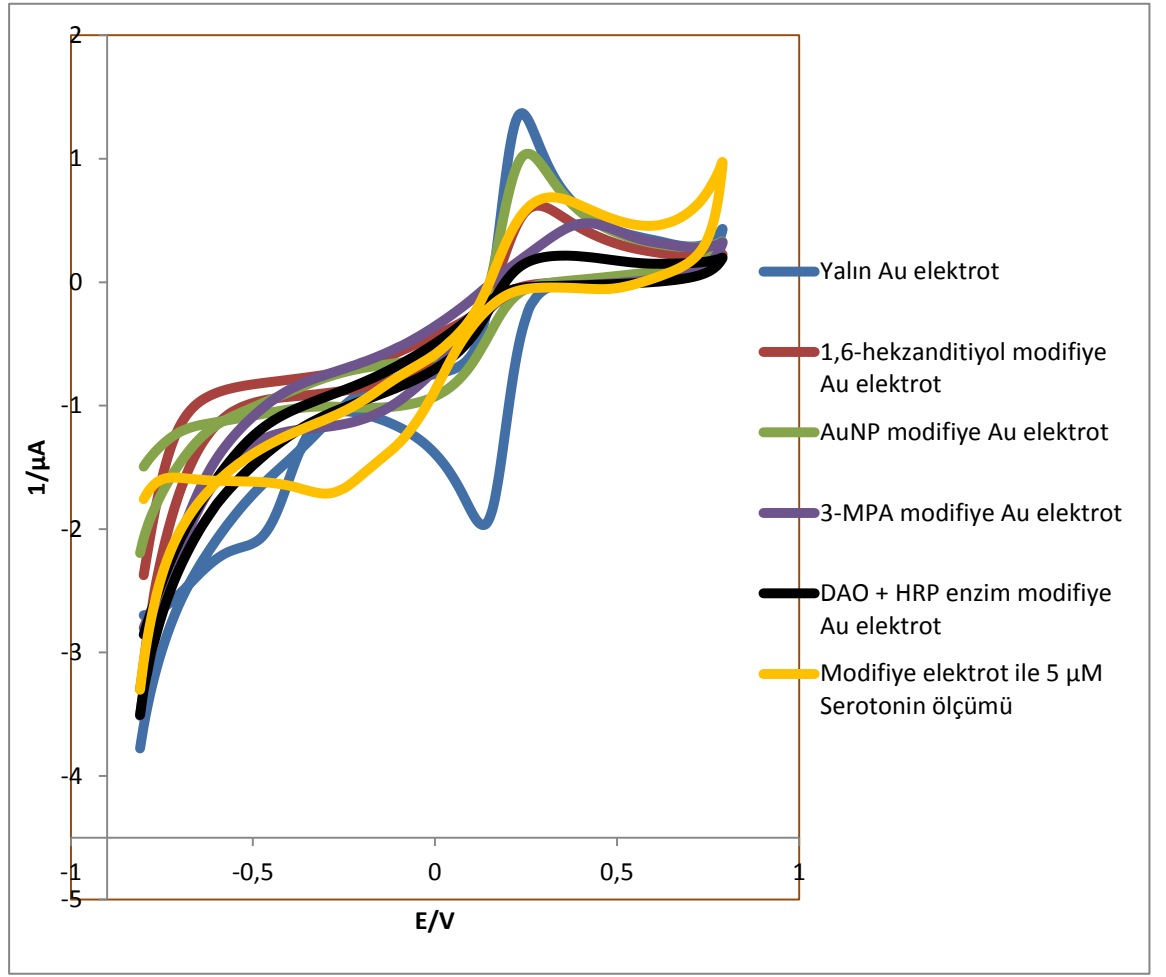
2.5.6. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO-HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensörün depo kararlılığı

Bu amaç dahilinde Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensör ile hazırlandığı günden itibaren 21 gün boyunca 2 günde bir 5 μ M serotonin derişimleri için ölçümler alındı. Bu süre zarfında ölçüm alınmadığı zamanlar biyosensör +4 °C’ de tutuldu. Denemeler 30 °C’de ve potasyum fosfat tamponunda (pH:7,0; 50mM) gerçekleştirildi.

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

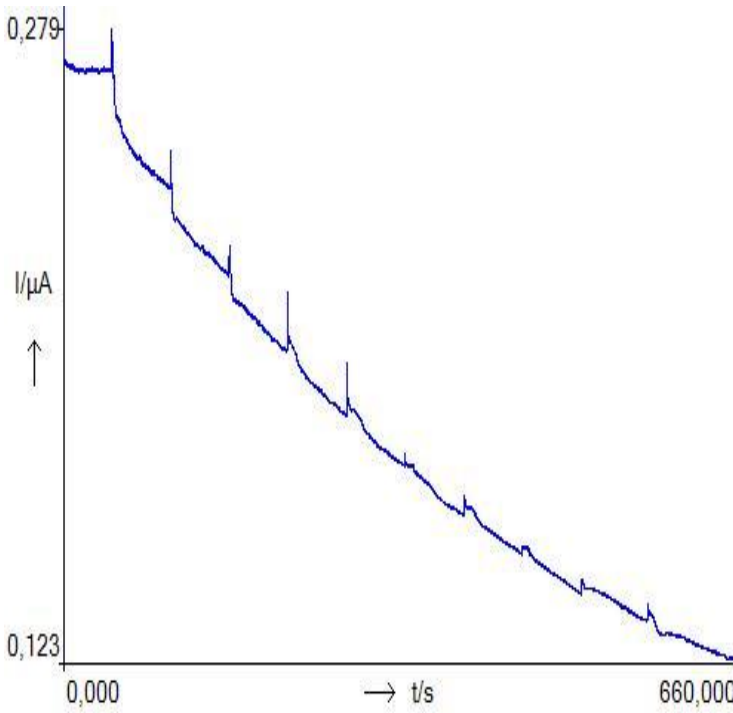
3.1. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO-HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensörün optimizasyon ve karakterizasyonuna ilişkin bulgular

Öncelikle hazırlanan biyosensörle 1 mM potasyum ferrisiyanür içeren 50 mM fosfat tamponunda -1,0 & 1,0 V potansiyel aralığında immobilizasyon adımlarına dair CVler alınarak farklanmalar yorumlanmıştır. Şekil 3.1.' de immobilizasyon öncesi altın elektrotla alınan CV' nin akım değerlerinin altın elektrot 1,6-hekzanditiyol ile muamele edildikten sonra düştüğü ve anodik – katodik pik potansiyelinin uzaklığının arttığı gözlenmiştir. Söz konusu farklanma altın elektrot yüzeyinde oluşan tek tabakaların iletkenliği azaltmasından kaynaklanmaktadır. Au/1,6-hekzanditiyol elektroduna AuNP eklendikten sonra ise akım Au/1,6-hekzanditiyol elektroduna göre gözle görülür bir şekilde artmış, anodik – katodik pik potansiyeli uzaklığı azalmış ve pikler daha keskin bir görünüm almıştır. Daha sonra 3-MPA ile muamele edilmesi ile oluşan tek tabaka ile iletkenliğin azaldığından dolayı akım değerinde tekrardan bir düşüş elde edilmiştir. Elektrot enzimler ile immobilize edilerek CV ölçümü alınarak daha sonra modifiye elektrot ile 5 μ M serotonin ölçümü alınmıştır.



Şekil 3.1. İmmobilizasyon öncesi ve sonrası alınan voltammogramlar. 1 mM ferrisiyanür içeren 50 mM ve pH:7 fosfat tamponunda alınan döngüsel voltammogramlar (Mavi: Au elektrod baseline; Kırmızı: Au/1,6-hekzanditiyol; Yeşil: Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP; Mor: Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA; Siyah: Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glu; Sarı: Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glu modifiye elektroda 5 μM serotonin eklemeli)

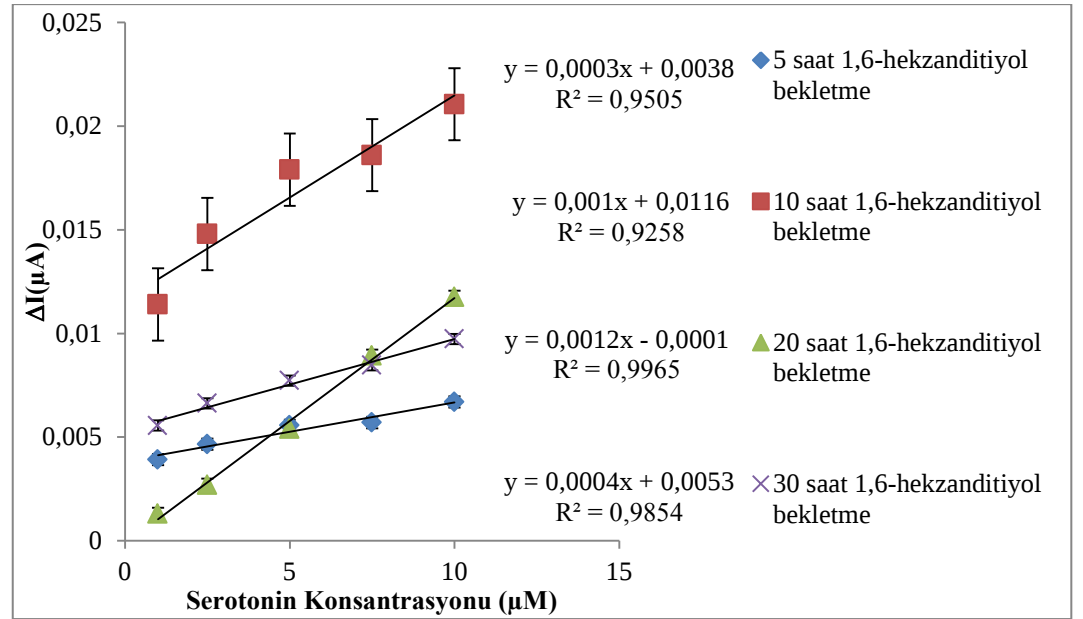
Au/1,6hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glu modifiye elektrodu ile CV karakterizasyonu sonrası 0,1-0,2-0,3-0,4-0,5 ve 0,6 V' larında 5 μ M serotonin konsantrasyonunda sıralı katım yoluyla elde edilen amperometrik ölçümler alınmıştır. En iyi biyosensör cevabı 0,2 V potansiyelinde elde edilmiştir. Diğer potansiyellerde düzgün standart grafiği elde edilememiştir. Bunun sonucunda 0,2 V potansiyelinde amperometrik ölçümler alınmış ve Şekil 3.2'de bu potansiyelde elde edilen biyosensör cevabı gösterilmiştir.



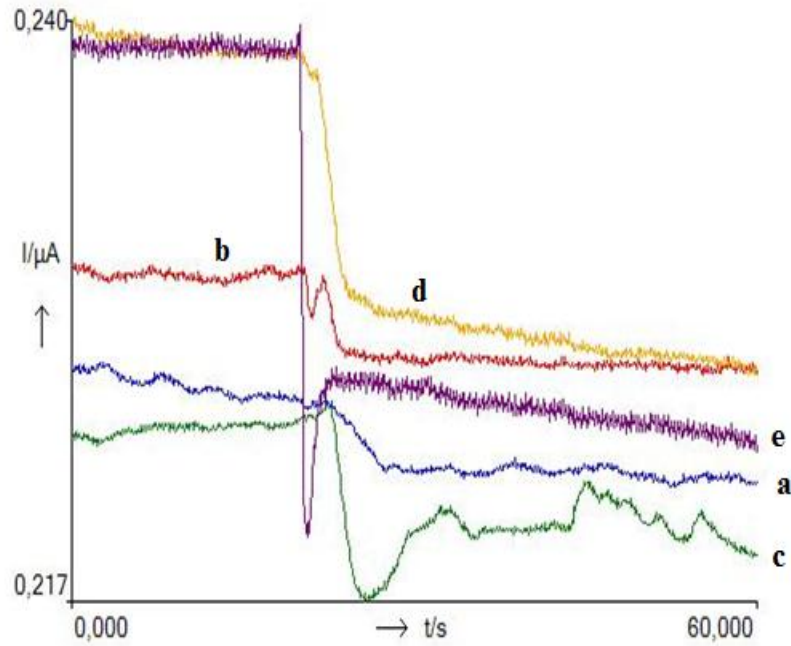
Şekil 3.2. 5 μ M serotonin ile 0,2 V potansiyelinde alınan biyosensör cevabı. (Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 30° C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirilmiştir.)

3.1.1. Tek tabaka oluşum süresinin biyosensör cevabı üzerine etkisine yönelik bulgular

1,6-hekzanditiyol (10 mM)' da bekleme süresinin biyosensör cevabına etkisi belirlendi. 5, 10, 20 ve 30 saatlik bekleme süreleri sonunda serotonin için standart grafikler çizilerek en uygun bekletme süresi belirlendi. Denemeler sonucunda serotonine verilen cevaplara ilişkin grafikler ve amperometrik ölçümler Şekil 3.3 ve 3.4' te verilmiştir.



Şekil 3.3. 1,6-hekzanditiyol bekletme süresinin biyosensör cevabına etkisine ait kalibrasyon grafiği. (Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 30° C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirilmiştir.)

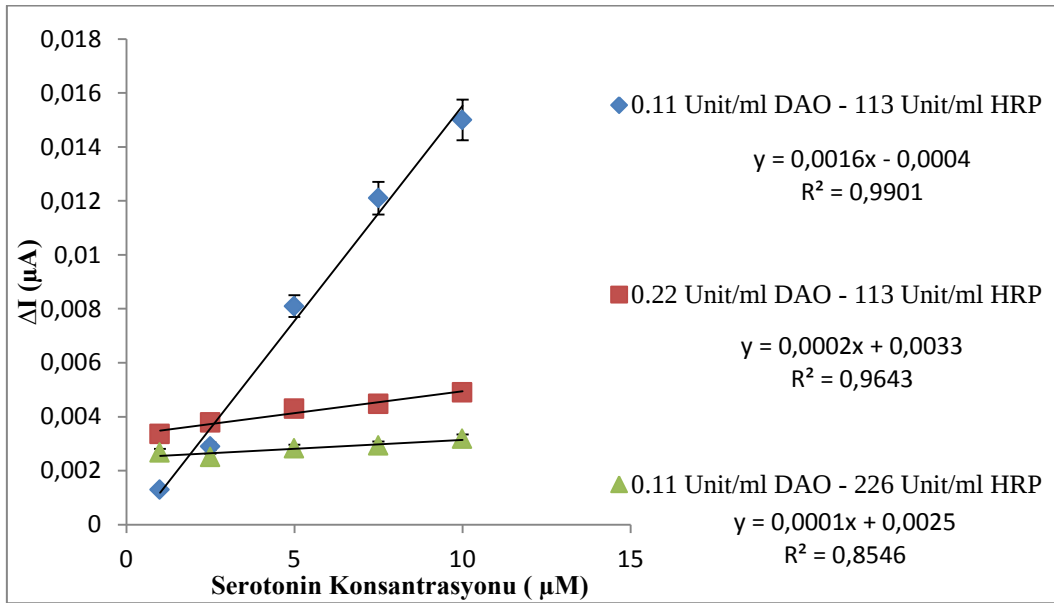


Şekil 3.4. 1,6-hekzanditiyol 20 saat bekletme süresinin biyosensör cevabı üzerine olan etkisi. a) 1 μM ; b) 2,5 μM ; c) 5 μM ; d) 7,5 μM ; e) 10 μM serotonin konsantrasyonu. (Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 30° C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirilmiştir.)

Tek tabaka oluşum süresinin artması, 1,6-hekzanditiyol çözeltisinin elektrod yüzeyine bağlanması artırdığı gözlenmiştir. Şekil 3.3' te görüldüğü üzere her dört oluşum süresine bakıldığında yüksek akım farklanması ve en iyi doğrusallık 20 saat bekletme süresi olarak belirlenmiştir.

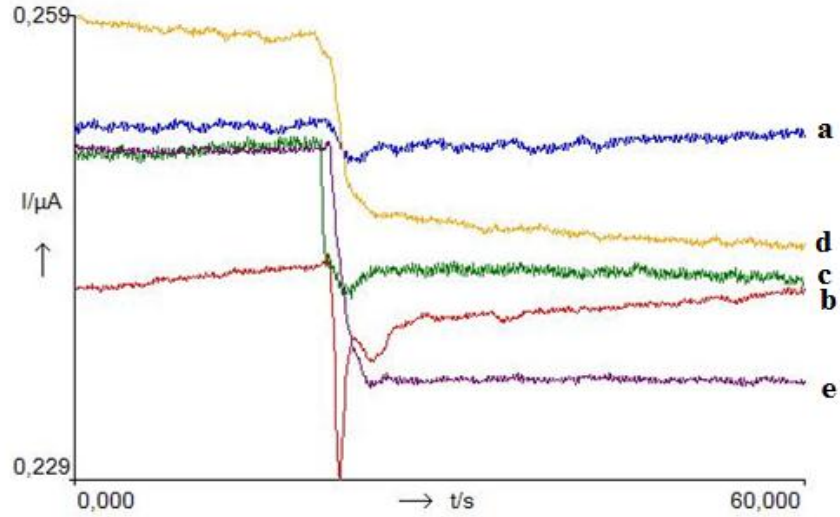
3.1.2. Enzim miktarlarının biyosensör cevabı üzerine etkisi

Biyosensör hazırlanmasında kullanılan diamin oksidaz ve peroksidaz enzim oranının biyosensör cevabı üzerine olan etkisi belirlendi. Şekil 3.5 ve 3.6 'da serotonine verilen cevaplara ilişkin grafikler ve ölçümler verilmiştir.



Şekil 3.5. Enzim miktarlarının biyosensör cevabına etkisi.

(Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 30° C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirilmiştir.)

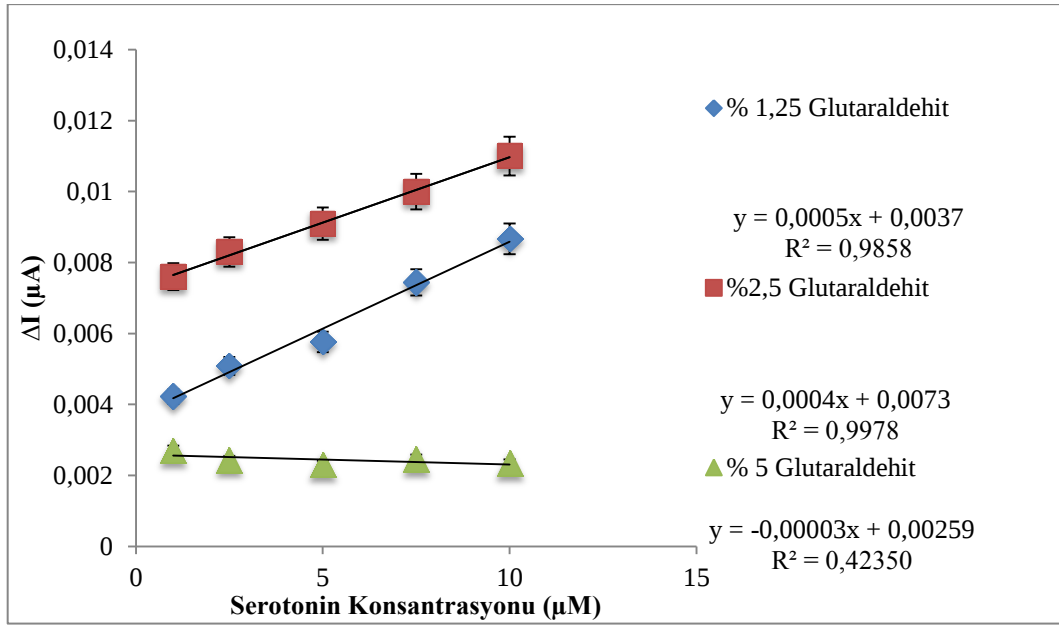


Şekil 3.6. 0,11 Unit/ml DAO - 113 Unit/ml HRP enzim miktarlarının biyosensör cevabına etkisi. a) 1 μ M; b) 2,5 μ M; c) 5 μ M; d) 7,5 μ M; e) 10 μ M serotonin konsantrasyonu. (Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 30° C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirilmiştir.)

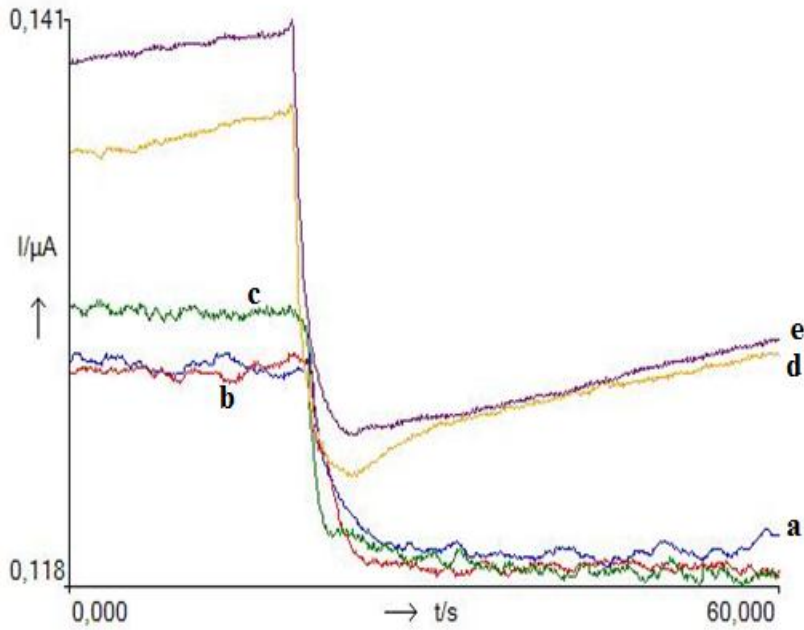
Grafikte görüldüğü üzere en ideal biyosensör cevapları enzim miktarı 0,11 Unit/ml DAO-113 Unit/ml HRP kullanıldığında alındığı ve bu aktivitelerde akım farkının ve doğrusallığın en yüksek olduğu gözlenmiştir. DAO enzim aktivitesinin artmasının enzim-substrat etkileşimi için difüzyon bariyeri oluşturduğu gözlenmiştir. En yüksek biyosensör cevaplarının alındığı 0,11 Unit/ml DAO aktivitesi sabit tutulup HRP aktivitesi 2 katına çıkarıldığında da bu difüzyon bariyerinin biyosensör cevaplarını etkilediği görülmüştür. Sonuç olarak biyosensör hazırlanmasında akım farklanmasının ve doğrusallığın en iyi olduğu 0,11 Unit/ml DAO- 113 Unit/ml HRP seçilmiştir.

3.1.3. Glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine etkisi

Bu çalışmada çapraz bağlamada kullanılan glutaraldehit konsantrasyonunun biyosensör cevabı üzerine olan etkisi belirlendi. Şekil 3.7 ve 3.8 ' de serotonine verilen cevaplara ilişkin grafikleri ve amperometrik ölçüm verilmiştir.



Şekil 3.7. Glutaraldehit miktarlarının biyosensör cevabına etkisi. (Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 30° C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirilmiştir.)



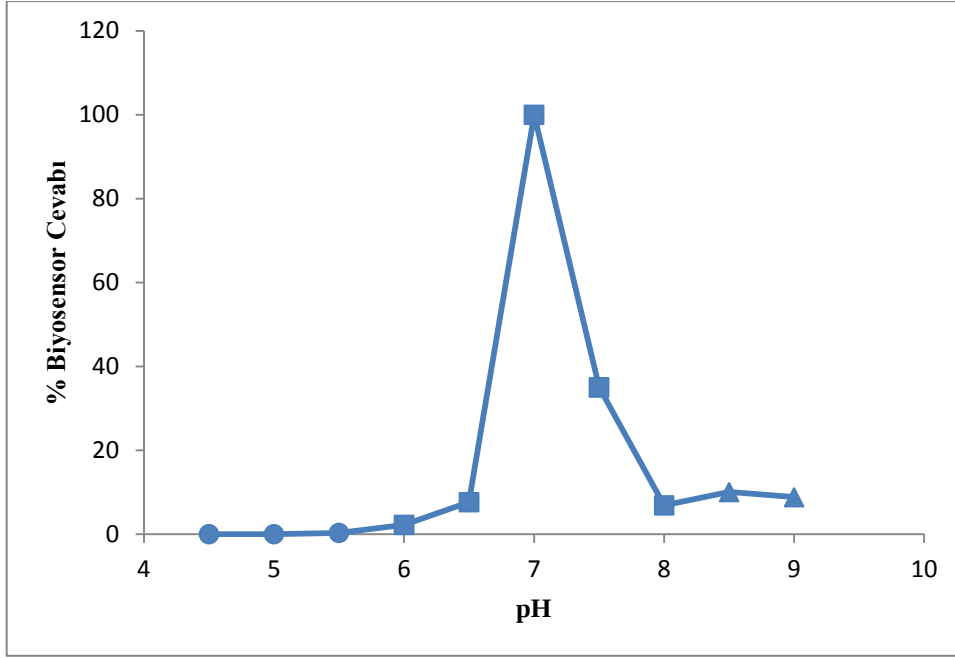
Şekil 3.8. % 2,5 Glutaraldehit miktarlarının biyosensör cevabına etkisi. a) 1 μM ; b) 2,5 μM ; c) 5 μM ; d) 7,5 μM ; e) 10 μM serotonin konsantrasyonu. (Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 30° C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirilmiştir.)

Şekildeki 3.7.' deki grafikte de görüldüğü üzere % 1,25' lik ve %5' lik glutaraldehit çözeltisi ile hazırlanan biyosensörler düşük akım farklanmalarıyla cevap vermişlerdir. % 1.25' lik glutaraldehit çözeltisiyle hazırlanan biyosensörde çapraz bağlanmanın güçlü olmaması ve elektrod yüzeyinden enzim kaçması ile oluşan erken bozulma nedeniyle yeterince iyi cevap alınamamış olup %5'lik glutaraldehit çözeltisiyle hazırlanan biyosensörde çok sıkı çapraz bağlanma sonucu substratın enzimine ulaşması güç olacağından enzimin substratına verdiği cevap çok düşük çıkmış ve doğrusallıktan yüksek miktarda sapma olduğu görülmüştür. Bu veriler ışığında glutaraldehit için % 2,5 glutaraldehit konsantrasyonu hem akım hemde doğrusallığın daha yüksek olmasından dolayı seçilmiştir.

3.2. Çalışma Koşullarının Optimizasyonuna Yönelik Bulgular

3.2.1. pH optimizasyonu

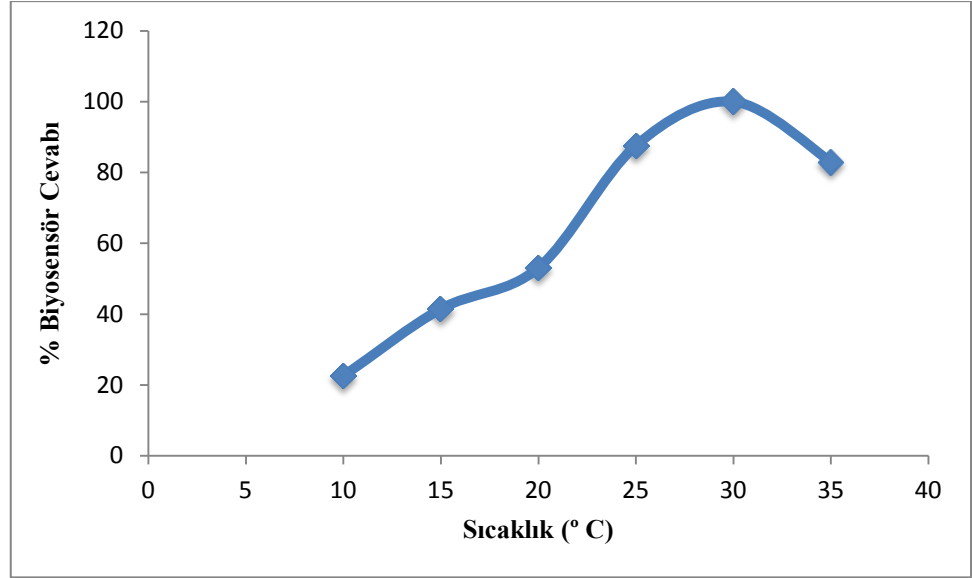
Enzimler protein yapısındaki moleküller oldukları için katalitik aktiviteleri çevre koşullarından önemli oranda etkilenmektedir. Bunlardan birisi de ortamın pH değeridir. Bu nedenle immobilizasyonun neden olduğu pH-aktivite davranışlarındaki değişimler hakkında elde edilen bilgiler, enzim proteinin yapı-fonksiyon ilişkisini anlamak ve biyosensörün optimum çalışma koşullarını belirlemek açısından faydalı olacaktır. Serotonin biyosensörünün optimum pH'ını belirlemek amacıyla yapılan denemelerde elde edilen pH ve % biyosensör cevabı arasında verilen optimum pH grafiği Şekil 3.9' da verilmiştir. Görüldüğü gibi biyosensör için optimum pH 7,0 olarak bulunmuştur. Bu pH değerinin altında ve üstünde biyosensör cevaplarında keskin düşüşler gözlemlenmiştir.



Şekil 3.9. Biyosensör cevabına pH'nın etkisi. Ölçümler 0,2 V potansiyelinde amperometrik yöntem kullanılarak 30 °C'de gerçekleştirildi. ● pH: 4,5-5,0-5,5 Sitrat Tamponu, ■ pH:6,0-6,5-7,0-7,5-8,0 Fosfat Tamponu, ▲ pH:8,5-9,0 Glisin Tamponu.

3.2.2. Sıcaklık optimizasyonu

Serotonin biyosensörlerinin optimum sıcaklığının belirlenmesine yönelik çalışmalarda 15-35 ° C' de düşük sıcaklıktan yüksek sıcaklığa doğru Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO/HRP/Glutaraldehit biyosensörü ile ölçümler yapılarak akım farkı değerleri izlenmiştir. Şekil 10' da görüldüğü üzere yapılan denemeler sonucunda sıcaklık ve % biyosensör cevabı arasında oluşturulan grafikten optimum sıcaklık 30 ° C olarak bulunmuştur. Sıcaklık değeri 35 ° C' nin üzerine çıkarıldığında mediyatör olarak kullanılan hidrokinonun bozulmasından dolayı ortamda hem renk değiştirdiği hem de yüksek akım değerlerine neden olduğu gözlenmiştir.

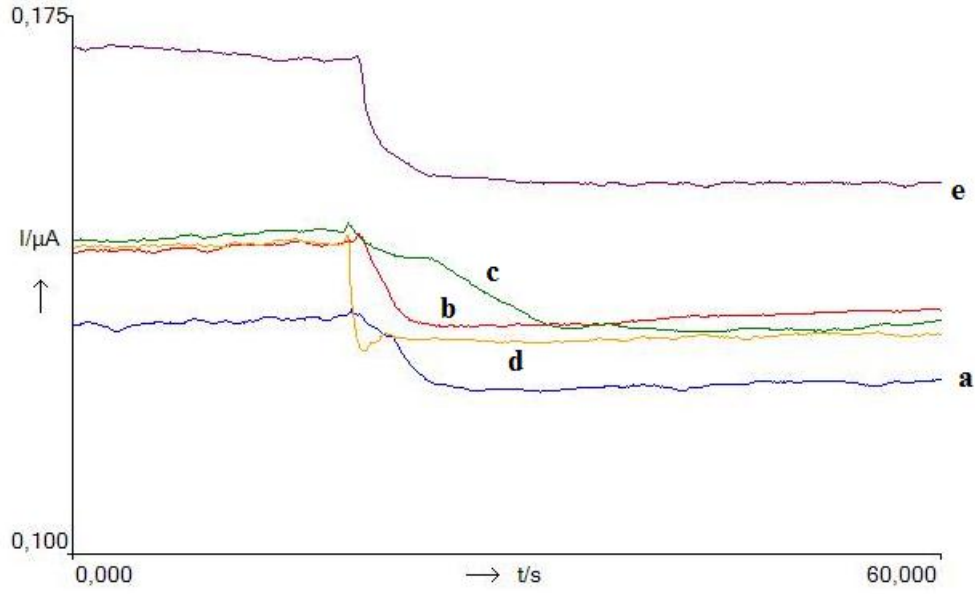


Şekil 3.10. Biyosensör cevabına sıcaklığın etkisi. Ölçümler 0,2 V potansiyelinde amperometrik yöntem kullanılarak pH 7, 50 mM fosfat tamponunda gerçekleştirildi.

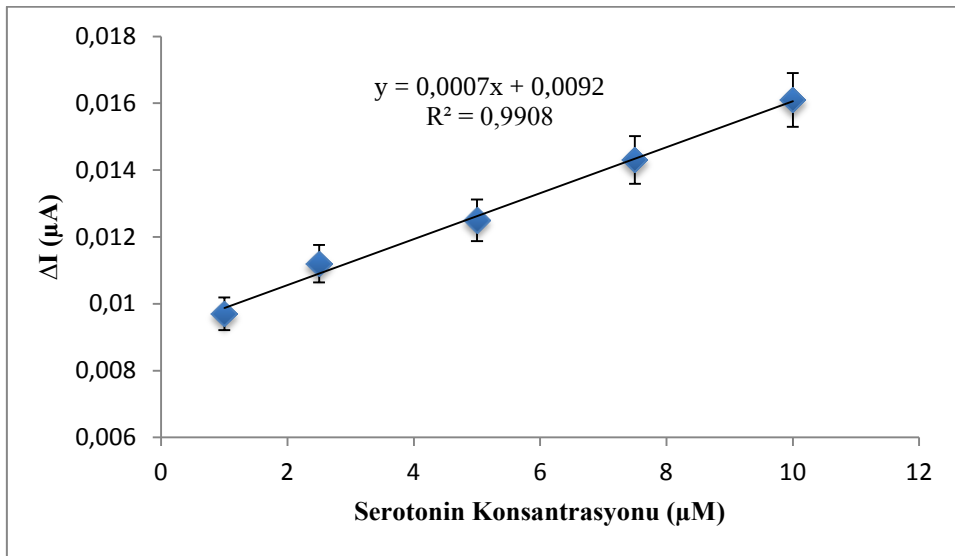
3.3. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün karakterizasyonuna ilişkin bulgular

3.3.1. Serotonin için doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Geliştirilen Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO/HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrasında, karakterizasyonu amacıyla serotonin için ölçüm aralığı belirlenmiştir. Şekil 3.11’ de 1-10 μM arası serotonin konsantrasyonuna karşılık gelen tek katım yoluyla elde edilen amperometrik ölçümler, Şekil 3.12’ de ise bu ölçümlere ait kalibrasyon grafiği verilmiştir.



Şekil 3.11. Tayin aralığının belirlenmesi 0,2 V' ta a) 1 μM ; b) 2,5 μM ; c) 5 μM ; d) 7,5 μM ; e) 10 μM serotonin ilavesi ile elde edilen amperometrik ölçümler. (Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 30 °C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirilmiştir.)



Şekil 3.12. Tayin aralığı için elde edilen amperometrik ölçümlere ilişkin standart grafiği (Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 30 °C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirilmiştir.)

Grafiklerden anlaşılacağı üzere amperometrik ölçüm sonucu biyosensörün serotonin için tayin aralığı 1-10 μM olarak bulunmuştur.

3.3.2. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO-HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliğine ilişkin bulgular

Bu çalışmada geliştirilen modifiye biyosensörün tekrarlanabilirliği incelenmiştir. Çözelti içerisinde 5 μM serotonin olacak şekilde 6 kez tekrar edilen ölçümler ve çizilen standart grafik yardımıyla örnek derişimleri saptanmış ve çizelge 3.1 'de verilmiştir. Ölçümlere ilişkin ortalama değer ($\bar{x}$), standart sapma ($\pm$ S.S) ve % varyasyon katsayısı (% V.K) belirlenmiştir. Elde edilen veriler kabul edilebilir sınırdadır.

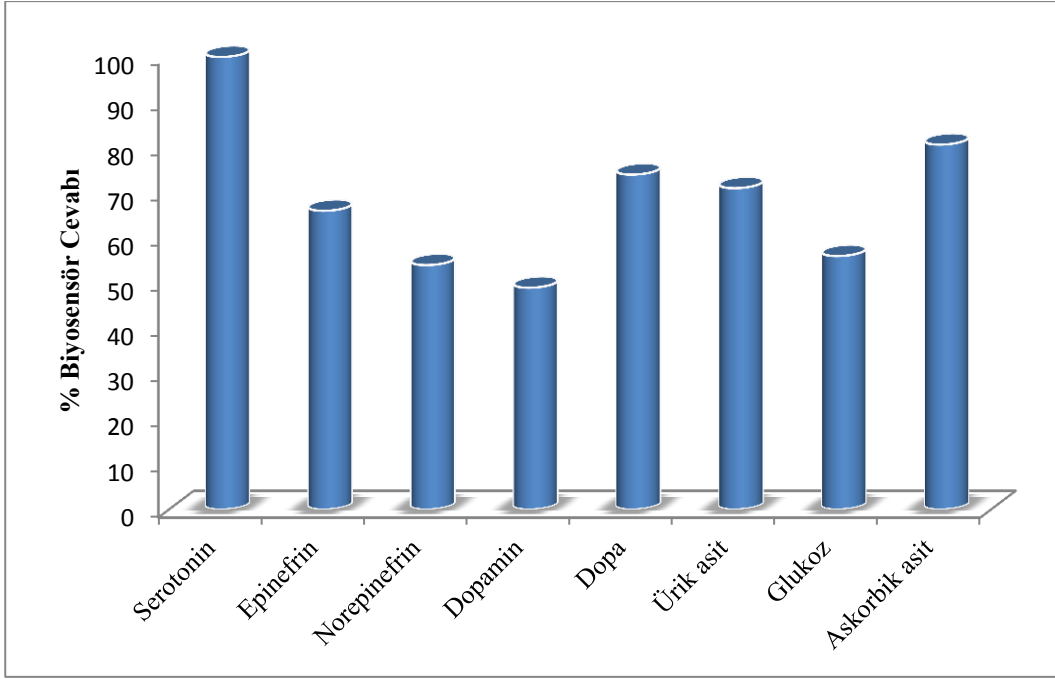
Çizelge 3.1. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik bulguları.

Ortalama Değer ($\bar{x}$)	Standart Sapma ($\pm$ S.S)	Varyasyon Katsayısı (%)
4,97 μM	$\pm$ 0,241 μM	4,84

3.3.3. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO-HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensörün substrat spesifikliğine ilişkin bulgular

Metabolizmada serotoninin büyük miktarı monoamin oksidaz enziminin metabolize olur. Mitokondride yer alan bu enzim, birçok monoaminin oksidatif deaminasyonu sonucu aldehid, amonyak ve H_2O_2 dönüşümünü katalizler.

Modifiye biyosensörün substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla dopamin, dopa, epinefrin, norepinefrin ve fenolik olmayan glukoz ile elektroaktif anyonik bileşikler olan askorbik asit ve ürik asit kullanılarak ölçümler yapılmıştır. İlgili bileşiklere yönelik biyosensör cevabı Şekil 3.13'te verilmiştir.



Şekil 3.13. Serotonin biyosensörü için substrat spesifikliğine ilişkin grafik. Ölçümler 0,2 V 'ta amperometrik ölçüm yoluyla 5 μ M substrat derişimi için 50 mM fosfat tamponu pH: 7,0 ve 30 ° C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirildi).

Şekil 3.13' te göre; tasarlanan biyosensör dopamin, dopa, epinefrin ve norepinefrinin hepsine birden farklı oranlarda cevap vermekle beraber 5 μ M derişim için en yüksek cevabı serotonine vermiştir. Evrensel girişimciler olan askorbik asit, ürik asitede cevaplar alınmıştır.

3.3.4. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensörün cevabı üzerine girişimcilerin etkisine yönelik bulgular

Tasarlanan biyosensör ile serotonin varlığında bazı katekolaminlerin, glukozun, askorbik asitin ve ürik asitin biyosensör cevabı üzerine etkisi belirlendi. Çizelge 3.2' de bu maddelerin serotonin tayinine yönelik olarak elde edilen girişim etkileri verilmiştir.

Çizelge 3.2 Farklı maddelerin varlığının serotonin cevabına etkisi.

Substrat	% Biyosensör Cevabı
Serotonin	100
Serotonin + Dopa	148.8
Serotonin +Epinefrin	142
Serotonin + Norepinefrin	111.7
Serotonin + Dopamin	102
Serotonin + Askorbik asit	185.1
Serotonin + Ürik asit	169
Serotonin + Glukoz	130.2

Çizelge 3.2’ de serotonin cevabına çeşitli substratların etkisi incelenmiştir. Aynı konsantrasyondaki dopa, epinefrin, norepinefrin ve dopamin varlığının biyosensör cevabının arttırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte bu moleküller serotonin varlığında biyosensör cevabı üzerine tek başlarına iken verdiklerinden çok daha az etki göstermişlerdir. Söz konusu bileşikler diamin oksidaz enziminin substratıdır ve diamin oksidazın bu bileşikleri yükseltgemesi sonucu açığa çıkan elektronlar akım artışına neden olarak cevabı arttırmıştır. Ürik asit, glukoz ve askorbik asit varlığının biyosensör cevabını yüzdesel oranda arttırdığı gözlenmiştir. Askorbik asit ve ürik asit yükseltgenmeye çok elverişli bir girişimcidir. Bu anlamda açığa çıkan elektronların sinyale neden olması beklenen bir durumdur.

3.3.5. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO- HRP / Glutaraldehit modifiye biyosensör ile örneklerde serotonin analizine yönelik bulgular

Çalışmanın bu bölümünde hazırlanan Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensör ile sentetik serum örneklerinde serotonin analizi yapılarak uygulanabilirliği araştırıldı.

Sentetik serum örneklerinde 100 μM serotonin olacak şekilde standart katma yöntemi kullanılarak örnek analizi yapıldı. 100 μM serotonin içerecek şekilde sentetik serum örnekleri (pH 7,4; % 0,09 NaCl) hazırlandı. Ölçümler 0,2 V'ta amperometrik yöntem kullanılarak 50 mM; pH 7,0 fosfat tamponu; 30 °C'de gerçekleştirildi. Ölçüm hücresine sentetik serum eklendiğinde ortamda 5 μM serotonin içerecek şekilde eklemeler yapıldı. Alınan ölçüm cevapları standart grafiği cevapları ile kıyaslanmıştır ve Çizelge 3.3' de gösterilmiştir.

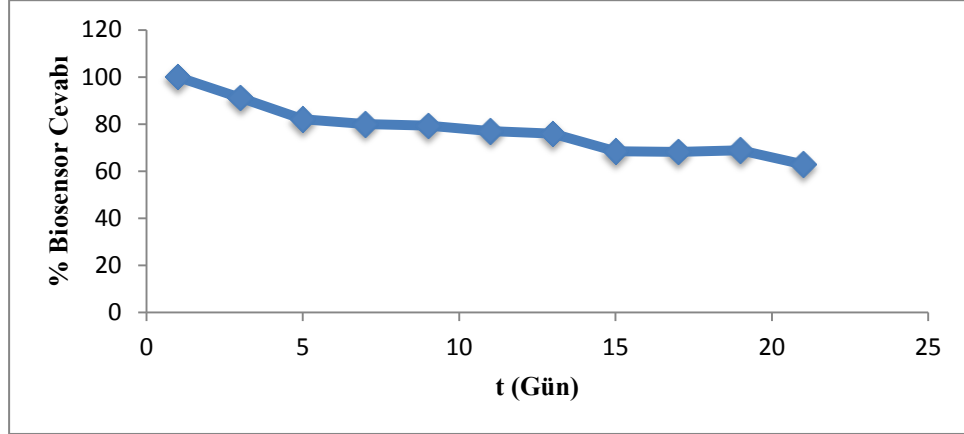
Çizelge 3.3. Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit modifiye biyosensörle örnek analizi. (Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 30 °C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirilmiştir.)

Örnek- Serum Serotonin (μM) (n=3)	Biyosensör ile bulunan değer Serotonin (μM)	% Fark	Gerikazanım (%)
5 μM	4,86 $\pm$ 0,0058 μM	% 2,8	% 97,2

Sentetik serum örneklerinde yapılan çalışmalar 3' er kez çalışılıp ortalama değer elde edildi.

3.3.6. Au / 1,6-hekzanditiyol / AuNP / 3-MPA / DAO-HRP / Glutaraldehyt modifiye biyosensörün depo kararlılığına yönelik bulgular

Denemelerde elde edilen bulgular Şekil 3.14.' te verilmiştir.



Şekil 3.14. Serotonin biyosensörü için depo kararlılığı. (Ölçümler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda, 30 °C sıcaklıkta ve 1 mM hidrokinon varlığında gerçekleştirilmiştir.)

Grafik 21 gün boyunca iki günde bir olacak şekilde 5 μ M serotonin standardı için alınan ölçümler yoluyla elde edilmiştir. Biyosensör kullanılmadığı zaman + 4 °C' de buzdolabında bekletilmiştir. Şekil 3.14'ten anlaşıldığı gibi ilk yedi günde biyosensör cevabında % 20'lik, ikinci haftada % 31,6 'lık, 21 günün sonunda ise % 37' lik bir kaybın olduğu gözlenmiştir.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Serotonin, esansiyel aminoasit olan triptofandan sentezlenir. Diyet yoluyla alınan triptofanın yaklaşık %2 ' si serotonine (10 mg) geriye kalan kısmı kinurenin ve 3-hidroksi antranilik aside dönüşür. Serotonin, oksidatif deaminasyon (monoamin oksidaz) , sülfirik ve glukuronik asitle konjugasyon, N-asetilasyon, 5-o-metilasyon reaksiyonları sonucunda metabolize olur. Bu reaksiyonları katalizleyen enzimler organlara göre farklıdır. Serotonin büyük miktarı Monoamin oksidaz enziminin metabolize olur. Mitokondride yer alan bu enzim, bir çok monoaminin oksidatif deaminasyonu sonucunda aldehid, amonyak ve H₂O₂ dönüşümünü katalizler.

Serotonin ve biyolojik amin tayinlerine yönelik olarak enzim immobilizasyonu ile gerçekleştirilen birçok biyosensör sistemi bulunmaktadır. Bu biyosensörler, CNT, karbon pasta gibi çeşitli kompozit elektrot sistemlerinden oluşturulan biyosensör sistemleridir. Bununla birlikte kullanacağımız immobilizasyon tekniğinin (altın-nanopartikül- bilayer tiyol modifiyeli çift enzim sistemi) daha önce kullanılmadığından; yapacağımız uygulamalar biyosensör alanındaki immobilizasyon tekniklerine yeni bir bakış açısı getirecektir (Telsnig et al., 2012).

Nano partiküller sadece yapısal özellikleri ile değil fonksiyonel özellikleri ile de üstün malzemelerdir. Çeşitli yöntemler kullanılarak yığın özelliklerinin yanında fonksiyonel özelliklerinin değiştirilmesi sağlanabilir. Nano partiküllerin elektronik), optik ve katalitik özellikleri, onların seviyesindeki boyutlarından kaynaklanmaktadır. Nano boyutlu partiküller, yüksek yüzey alanları, farklı optik ve elektronik özelliklere sahip olduklarından dolayı modern teknolojik sistemlerde kullanılabilirliklerinin araştırılması önem kazanmıştır. Nano partiküller yüksek biyoaktivite sağlar (Feng et al.,2009).

Çalışmada altın elektrot yüzeyine kendiliğinden oluşan tek tabakalar oluşturmak için öncelikle fonksiyonel tiyol grubu içeren 1,6- Hegzanditiyol bileşiği kullanılarak bu bileşiğin fonksiyonel uç grubu (-SH) doğrudan altın elektrot yüzeyine bağlanarak yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. 1,6- Hegzanditiyol, altın-kükürt etkileşimlerinden dolayı altın elektrot yüzeyinde

Çalışılan moleküllerden biridir. Bu tür bir yüzey modifikasyonu altın nanopartikülün altın y zeeye bağlanabilmesini sağlar. Ditiyol n elektrot yüzeyine bağlanması sonrası diğer reaktif (-SH) ucuna altın nanopartikül bağlanması sonrası altın nanopartiküle 3- merkaptopropiyonik asit ile etkileşime sokularak altın nano partikül içeren bilayer tabaka elde edilmiştir. Modifiye elektrot yüzeyine diamin oksidaz ve peroksidaz ilavesi sonrası glutaraldehit ile kovalent immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Bunu sonucunda; genel anlamda biyomateryal olarak diamin oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin altın nanopartikül bilayer tiyol modifiye elektrot yüzeyine immobilize edilmesi ile serotonin tayinine yönelik yeni bir biyosensör geliştirilmesi sağlanmıştır.

Çalışmanın temel yöntemi, geliştiren biyosensör sistemi ile serotonin tayinine yönelik olmak üzere çiftli enzimlerin katalizlediği reaksiyon neticesinde mediyatör (hidrokinon) vasıtası ile 0,2 V'ta amperometrik yöntem ile değerlendirilmiştir.

Biyosensör yüzeyi ve çalışma koşullarının optimizasyonu sağlandıktan sonra tekrarlanabilirlik, substrat spesifikliği ve girişim etkisi ve depo kararlılığı denemesi yapılmış, biyosensör ile örnek analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.1' de serotonin biyosensörleri ve tasarladığımız biyosensörle karşılaştırılması verilmiştir.

Çizelge 4.1. Serotonin tayininde kullanılan biyosensörlerin karşılaştırılması

Sensör	Ölçüm metodu	Tayin aralığı	Tayin limiti	Cevap süresi
MWNT/IE	CV DPV	1,0-1,5 μ M	0,2 μ M	<5 dak.
Acetylcholine/GCE	CV DPV	1,0-30 μ M	0,5 μ M	<5 dak.
Edge plane pyrolytic	CV DPV	0,1-20 μ M	0,06 μ M	<5 dak.
5-HTP/GCEa	CV DPV	5-35 μ M	1,7 μ M	<5 dak.
MWCNTs-CHT/GCEb	CV DPV Amperometrik	0,5-130 μ M	0,08 μ M	<5 dak.
Karbon nanofibers	DPV	0,1-100 μ M	0,25 μ M	<3 dak.
G-g-PLA-Pd/GCE	Amperometrik	0,1-100 μ M	0,08 μ M	<10s
Au/1,6-hekzanditiyol/AuNP/3-MPA/DAO-HRP/Glutaraldehit (Bu çalışmada)	Amperometrik	1-10 μ M	0,723 μ M	<3s

[Han ve ark., 2013]

Tablo 4.1’den de anlaşılacağı üzere tasarladığımız biyosensör yüksek seçimliliğe, düşük tayin limitine ve hızlı cevap süresine sahiptir ve bu özelliği ile diğer serotonin biyosensörlerinden ayrılmaktadır. Ayrıca bu çalışmada

biyosensörün tekrarlanabilirliği yüksek ve epinefrin, norepinefrin gibi diğer katekolaminlerin tayinine de olanak sağlayabileceği ortaya konmuştur.

Sonuç olarak bu yüksek lisans tezi kapsamında serotonin tayinine yönelik enzim sistemine dayalı bir biyosensör tasarlanması literatürde önemli bir yenilik kazandıracak niteliktedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akyılmaz, E. ve Dinçkaya, E.**, 2000, A mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate based alcohol oxidase electrode for alcohol determination in serum, *Talanta*, 53, 505-509 pp.
- Arshak, K., Mohamed, Z., Souna, E. and Anthony, T.**, 2008, Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems, Springer Science and Business Media, New York.
- Bard, A.J. and Faulkner, L.R.**, 2001, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd Edition, Wiley, New York.
- Barker, G.C. and Jenkin, I.L.**, 1952, Square-wave polarography, *Analyst*, 77, 685 pp.
- Bartlett, P.N.**, 1990, Biosensors, (Cass, A.E.G. ed.), *Oxford University Press*, Oxford, 42. pp.
- Chaki, N.K. and Vijayamohanan, K.**, 2002, Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications *Physical & Biosens. & Bioelec.* 17: 1-12 pp.
- Chauveau, J., Fert V., Morel, A.M. and Delaage, M.A.**, Rapid and specific enzyme immunoassay of serotonin, *Clinical Chemistry* 37 (1991) 1178.
- Chambers, J.P., Arulanandam, B.P., Matta, L.L., Weis A and Valdes, J.J.**, 2008, Biosensor recognition elements. *Curr Issues Mol Biol*; 10(1-2): 1-12 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, D. and Jinghong, L.**, 2006, Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers, *Surface Science Reports* 61: 445–446 pp.
- Connolly, P.**, 1995, Clinical Diagnostics Opportunities for Biosensors and Bioelectronics, *Biosensors and Bioelectronics*, 10, 1-6 pp.
- Dinçkaya, E.**, 1999, *Biyosensörler*, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Baskı Atölyesi, İzmir, 81 –142 s.
- D'Souza, S. F.**, 2001, Microbial biosensors, *Biosens Bioelectron*;16(6), 337-353 pp.
- Dzyadevych, S. V., Arkhypova, V. N., Soldatkin, A. P., El'skaya, A. V., Martelet, C. and Jaffrezic-Renault, N.**, 2008, Amperometric Enzyme Biosensors: Past, Present and Future, *ITBM-RBM*, 29, 171–180 pp.
- Esparmer, V. and Boretti, G.**, Identification and characterization by paper chromatography of enteramine, octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior salivary glands of octopoda and in other tissue abstracts of vertebrates and invertebrates, *Archives of International Pharmacodynamics* 88 (1951) 296–332 pp.
- Feng Duan, Wang Fang and Chen Zilin.**, (2009) “Electrochemical glucose sensor based on one-step construction of gold nanoparticle-chitosan composite film”, *Sensors and Actuators B* 138 (2009) 539-544 pp.
- Griffiths, D. and Hall, G.**, 1993, Biosensors-What Real Progress is Being Made, *Tibtech*, 11, 122-128 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Han, H. S., You J., Jeons, H. and Jeon, S., Synthetic of graphane oxide grafted poly(lactic acid) with palladium nanoparticles and its application to serotonin sensing, 2013, 500-757 pp.

HSDB., Hazardous Substances Data Bank, National Library of Medicine, Bethesda, Md (Tomes cd-rom Version), Denver, CO: Micromedex, Inc., 1996.

Jeon, H.-K., Nohta, H. and Ohkura, Y., High-performance liquid chromatographic determination of catecholamines and their precursor and metabolites in human urine and plasma by postcolumn derivatization involving chemical oxidation followed by fluorescence reaction, *Analytical Biochemistry* 200 (1992) 332.

Kapoor, M., 1996, How to cross-link proteins, Cellular, Molecular and Microbial Biology Division, University of Calgary, Calgary, Canada, T2N 1N4.

Kema, I.P., De Vries, E.G.E. and Muskiet, F., Clinical chemistry of serotonin and metabolites, *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 747 (2000) 33–48 pp.

Lu, M., Li, X. H., Yu B. Z. And Li, H. L, Electrochemical Behavior of Au Colloidal Electrode through Layer-by-Layer Self- Assembly, *Journal of Colloid and Interface Science* 248 (2002), 376-382 pp.

Middelkoop, C.M., Dekker, G.A., Kraayenbrink, A.A. and Poppsnijders, C., Platelet-poor plasma serotonin in normal and preeclamptic pregnancy, *Clinical Chemistry* 39 (1993) 1675.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mrksich, M. and Whitesides, M.G.,** 1996, Using self-assembled monolayers to understand the made surfaces with proteins and cells interactions of man, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2555-2578 pp.
- Newman, J.D., Tigwell, L.J., Warner, P.J. and Turner, A.P.F.,** 2001, Biosensors: boldly going into the new millennium, *Sensor Review*, 21, 268 – 271 pp.
- O’Connell, P. and Guilbault G.,** 2001, Future Trends in Biosensor Research, *Analytical Letters* 34(7), 1063–1078 pp.
- Panholzer T.J., Beyer, J. and Lichtwald, K.,** Coupled-column liquid chromatographic analysis of catecholamines, serotonin, and metabolites in human urine, *Clinical Chemistry* 45 (1999) 262.
- Perry K.W. and Fuller R.W.,** Effect of fluoxetine on serotonin and dopamine concentration in microdialysis fluid from rat striatum, *Life Sciences* 50 (1992) 1683.
- Proske, D., Blank M., Buhmann, R. and Resch, A.,** 2005, Aptamers--basic research, drug development, and clinical applications, *Appl Microbiol Biotechnol.*;69(4):367-74 pp.
- Rasooly, A.,** 2005, *Biosensor Technologies Methods*, 1-3 pp.
- Ressler, K.J. and Nemeroff, C.B.,** Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders, *Depression and Anxiety* 12 (2000) 2 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sarma, K., Vatsyayan, P., Goswami, P. and Minter, S. D.,** 2009, Recent Advances in Material Science for Developing Enzyme Electrodes, Biosens. Bioelectron., 24, 2313-2322 pp.
- Sezgintürk, M.K. ve Dinçkaya, E.,** 2004, Direct determination of sulfite in food samples by a biosensor based on plant tissue homogenate, Talanta 65, 998-1002 s.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A.,** 1997, Principles of Instrumental Analysis, Brooks/Cole, 325 pp.
- Ulman, A.,** 1991. An Introduction to Ultrathin Organic Films: From Langmuir-Blogett to Self-Assembly. Academic Press Inc, New York
- Telsnig Dietling, Terzic Amela, Krenn Tanja, Kassarnig Verena, Kalcher Kurt and Ortner Astrid,** (2012), “ Development of a Voltammetric Amine Oxidase-Modified Biosensor for the Determination of Biogenic Amines in Food”, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7 (2012) 6893-6903 pp.
- Thomas, S. and Russell, A.D.,** 1974, Temperature-induced changes in the sporocidal activity and chemical properties of glutaraldehyde, Applied Microbiology, 28(3), 331-335 pp.
- Tsunoda, M., Takezawa, K., Santa, T. and Imai, K.,** Simultaneous automatic determination of catecholamines and their 3-o-methyl metabolites in rat plasma by high-performance liquid chromatography using peroxyoxalate chemiluminescence reaction, Analytical Biochemistry 269 (1999) 386 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wilflingseder, D. and Schwelberger, G.** (2000). High Efficient Purification of Porcine Diamine Oxidase. *Journal of Chromatography*. 737. 161-166 pp.
- Wimmerova, M. and Macholan, L.** (1999) Sensitive Amperometric Biosensor for the Determination of Biogenic and Synthetic Amines Using Pea Seedlings Amine Oxidase: A Novel Approach for Enzyme Immobilization. *Biosensor and Bioelectronics*. 14. 695-702 pp.
- Wink, T., van Zuilen, S. J., Bult, A. and Bennekom, W. P.,** 1997, Self-assembled Monolayers for Biosensors, *Analyst*, 122:43-50 pp.
- Wring, S. A. and Hart, J. P.,** 1992, Chemically Modified, Carbon-based Electrodes and Their Application as Electrochemical Sensors for the Analysis of Biologically Important Compounds, *Analyst*, 117, 1215-1229 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Cansu GÜVENÇ

Doğum tarihi, yeri : 08.07.1989- Mersin

Medeni hali : Bekâr

Uyruğu : T.C

Adres : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü 35100
Bornova/İZMİR

Tel : 0 539 563 53 43

e-mail: cnsuguvenc@hotmail.com, cnsuguvenc@gmail.com

Eğitim Durumu:

OKUL	DERECE	YIL
Bahçelievler İ.Ö.O.	İlköğretim	1996-2003
Mehmet Adnan Özçelik Anadolu Lisesi	Lise	2003-2007
Ege Üniversitesi	Yabancı Dil	2007-2008
Ege Üniversitesi	Lisans, Biyokimya	2008-2012
Ege Üniversitesi	Yüksek Lisans, Biyokimya	2013-Halen devam ediyor.

Görev aldığı Projeler

Tübitak 2209 programı- *C.Tropicalis* Maya Hücreleri Kullanılarak L-Askorbik Asit Tayinine Yönelik Yeni Bir Mikrobiyal Biyosensör Tasarımı – Proje yürütücüsü (2011-2012)

Tübitak programı- Nanoteknolojik İmmobilizasyon Yöntemlerine Dayalı Yeni Mikrobiyal Biyosensör Sistemleri Geliştirilmesi ve Katekolaminlerin Tayinine Adaptasyonu (2013-2015)

BAP - 2013 FEN 027 - Altın Nanopartikül-Bilayer Tiyo Modifiye Diamin Oksidaz-Peroksidaz Çiftli Enzim Sistemine Dayalı Yeni Bir Biyosensör Sistemi (2013-2015)