

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALTIN NANOPARTİKÜL TEMELLİ TİROZİNAZ
BİYOSENSÖRÜ İLE FENOLİK
BİLEŞİKLERİN TAYİNİ

Kazım ÖZDEMİR

Mayıs, 2015
İZMİR

**ALTIN NANOPARTİKÜL TEMELLİ TİROZİNAZ
BİYOSENSÖRÜ İLE FENOLİK
BİLEŞİKLERİN TAYİNİ**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

Kazım ÖZDEMİR

**Mayıs, 2015
İZMİR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

KAZIM ÖZDEMİR, tarafından DOÇ. DR. ŞENOL ALPAT yönetiminde hazırlanan “ALTIN NANOPARTİKÜL TEMELLİ TİROZİNAZ BİYOSENSÖRÜ İLE FENOLİK BİLEŞİKLERİN TAYİNİ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



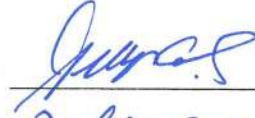
Doç. Dr. Şenol ALPAT

Yönetici



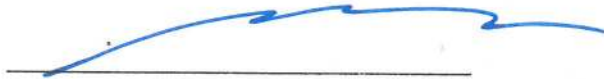
Prof. Dr. Hülya AÇAR KAYALI

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Erol AKYILMAZ

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Ayşe OKUR

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı bana öneren, tez çalışması boyunca danışmanlığımı yürüten, bana her konuda destek olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Şenol ALPAT' a ve Sayın Doç. Dr. Sibel KILINÇ ALPAT' a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ege Üniversitesi' nde laboratuarda ki deneysel çalışma sürecinde, yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Erol AKYILMAZ' a teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarımda bana yardımcı olan arkadaşım Erhan CANBAY' a, Efe Deniz ÖZTÜRK' e ve Özlem ALASAĞ' a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan maddi ve manevi olarak her zaman desteğini gördüğüm annem Liber BAĞCI ÖZDEMİR' e teşekkür ederim.

Kazım ÖZDEMİR

ALTIN NANOPARTİKÜL TEMELLİ TİROZİNAZ BİYOSENSÖRÜ İLE FENOLİK BİLEŞİKLERİN TAYİNİ

ÖZ

Bu tez çalışmasında biyosensör çalışmalarına yeni ve orijinal bir bakış açısı getiren epinefrin (EP) tayinine yönelik, altın nanopartikül (AuNP) –nafyon modifiye tirozinaz, biyosensörü geliştirilmesi amaçlanmıştır. AuNP Turkevich metodu kullanılarak sentezlendi ve zeta potansiyel sayacı kullanılarak karakterize edildi. Bu biyosensör sisteminde, altın nanopartikül ve grafit karıştırılarak karbon pasta hazırlandı. Tirozinaz enzimi elektrot yüzeyine damlatıldı ve kuruyan elektrot yüzeyine Nafyon çözeltisi eklenip kurutularak KP/AuNP/tirozinaz/Nafyon modifiye elektrot oluşturuldu. Tasarlanan biyosensör sistemi ile EP ölçümleri katodik bölgede (+0,8)-(-0,8) potansiyel aralığında diferansiyel puls (DP) metodu kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan biyosensörün optimizasyon çalışmasında öncelikle optimum AuNP miktarı, tirozinaz enzim aktivitesi gibi parametreler çalışıldı. Çalışma koşullarının optimizasyonunda pH ve oksijen gazı geçirme süresi optimizasyonu gerçekleştirildi. Biyosensörün karakterizasyonu çalışmalarında EP için doğrusal tayin aralığı, tekrarlanabilirlik, girişim etkisi ve depo kararlılığı gibi parametreler araştırıldı. Optimizasyon çalışmaları sonucunda EP biyosensörü için AuNP miktarı, enzim aktivitesi sırasıyla, 40 μ L ve 313,087 U/mL olarak bulundu. Çalışma koşulları optimizasyonu amacıyla yapılan denemelerde, çalışma tamponu 50 mM pH:7,0 fosfat tamponu ve oksijen gazı geçirme süresi ise 10 dk olarak bulundu. Geliştirilen biyosensörün karakterizasyon çalışmalarında ise 5-500 μ M aralığında EP için doğrusal sonuçların alındığı belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik denemelerinde (n=7) 200 μ M EP konsantrasyonunda ortalama değer, standart sapma (S.S), yüzde varyasyon katsayısı (V.K) sırasıyla 218,56, 3,53 ve yüzde 1,61 olarak bulunmuştur. Ayrıca geliştirilen biyosensörle adrenalin ampul örneklerinde EP tayini de yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Altın nanopartikül, tirozinaz, epinefrin, Nafyon, biyosensör

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS WITH TYROSINASE BIOSENSOR BASED GOLD NANOPARTICLE

ABSTRACT

In this thesis, development of a gold nanoparticle (AuNP) modified tyrosinase biosensor which brings a new and original perspective to biosensor technology indeed for epinephrine determination. AuNP was synthesized by Turkevich method and it was characterized with zeta potential counter. In this biosensor system, carbon paste was prepared with AuNP and graphite mixed. KP/AuNP/Tyrosinase/Nafion modified system formed by dropping a Tyrosinase enzyme and dried then dropping a Nafion solution again dried on surface of carbon paste. Epinephrine measurement were done cathodic region with using differential pulse method between from (+0.8) to (-0.8) potentials by developed biosensor system. In the optimization studies of the biosensor firstly such as optimum tyrosinase enzyme activity and gold nanoparticles amount, were carried out. In the optimization working condition; optimum pH and oxygen gas time were also investigated. Afterwards in characterization studies of the biosensor some parameters such as linearity, storage stability were determined. From the results of the optimization studies optimum gold nanoparticles amount and optimum tyrosinase enzyme activity were determined 40 μL and 313.087 U/mL respectively. From the experiments the phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) were chosen to be optimum working conditions for the tyrosinase biosensor. It was determined at the characterization studies on the biosensor that linear curves were obtained between the ranges of 5-500 μM epinephrine concentrations. At the repeability experiments ($n= 7$), the average value, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV) were calculated to be 218.56, 3.53 and 1.61 percent for 200 μM EP concentration. Also determination of epinephrine were carried out in real adrenalin ampule samples by developed biosensor.

Keywords: Gold nanoparticle, tyrosinase, epinephrine, nafion, biosensor

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZ.....	iv
ABSTRACT.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
BÖLÜM BİR-GİRİŞ.....	1
1.1 Biyosensörler.....	1
1.1.1 Biyosensörlerin Yapısı.....	1
1.1.2 Biyosensör Uygulamaları.....	2
1.1.3 Amperometrik Biyosensörler.....	4
1.1.4 Potansiyometrik Sensörler.....	4
1.2 Metal Nanopartiküller.....	5
1.2.1 AuNP'lerin Küçük Biyo Moleküllerin Tayininde Kullanımı.....	5
1.2.2 AuNP'lerin DNA Tayininde Kullanımı.....	6
1.2.3 AuNP'lerin Glukoz Tayininde Kullanımı.....	6
1.2.4 AuNP'lerin H ₂ O ₂ Tayininde Kullanımı.....	7
1.2.5 Diğer Metal Nanopartiküllerin Voltametrinde Kullanımı.....	7
1.3 Katekolaminler.....	9
1.3.1 Epinefrin.....	9
1.3.2 Katekolaminlerin Biyosentezi.....	10
1.3.3 Katekolaminlerin Salgılanması.....	11
1.4 Tirozinaz.....	13
1.4.1 Tirozinazın Biyokimyasal Karakteri.....	14
1.4.2 Aktif Merkezin Yapısı.....	14

BÖLÜM İKİ-MATERYAL VE YÖNTEM.....17

2.1 Materyal.....	17
2.1.1 Cihaz ve Diğer Ekipmanlar.....	17
2.1.2 Kimyasal Maddeler.....	17
2.2 Yöntem.....	17
2.2.1 Altın Nanopartikül Sentezi.....	17
2.2.2 Altın Nanopartikül ve Tirozinaz Modifiyeli Altın Nanopartikül İçeren Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması.....	18
2.2.3 Biyosensörün Elektrokimyasal Davranışı.....	18
2.2.4 Tarama Hızının Etkisi.....	18
2.2.5 Altın Nanopartikül Miktarı Optimizasyonu.....	18
2.2.6 Enzim Aktivitesinin Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi.....	19
2.2.7 Optimum pH ve Oksijen Süresinin Belirlenmesi.....	19
2.2.8 Epinefrin İçin Doğrusal Tayin Aralığı.....	19
2.2.9 Depo Kararlılığı ve Tekrarlanabilirlik.....	19
2.2.10 Substrat Spesifikliği.....	20
2.2.11 Gerçek Örnek Analizi.....	20

BÖLÜM ÜÇ-DENEYSEL VERİLER.....21

3.1 Altın Nanopartikül Karakterizasyonu.....	21
3.2 Çıplak Karbon Pasta, Altın Nanopartikül Modifiyeli ve Tirozinaz Modifiyeli Altın Nanopartikül, Elektrotların Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi.....	22
3.2.1 Döngüsel Voltametri ile Çıplak Karbon Pasta Elektrodun Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi.....	22
3.2.2 Döngüsel Voltametri ile Altın Nanopartikül Modifiye Karbon Pasta Elektrodun Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi.....	23
3.2.3 Tirozinaz Modifiye Altın Nanopartikül Karbon Pasta Elektrodun Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi.....	24

3.2.4 KP/Nafyon, KP/AuNP/Nafyon ve KP/AuNP/Tyr/Nafyon Elektrotların Elektrokimyasal Davranışının Karşılaştırılması.....	25
3.2.5 Tarama Hızının Etkisi.....	26
3.3 Altın Nanopartikül Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi.....	27
3.4 Enzim Aktivitesinin Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi.....	29
3.5 pH ve Oksijen Geçirme Süresinin Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi.....	32
3.6 Epinefrin İçin Doğrusal Tayin Aralığı.....	36
3.7 Biyosensörün Depo Kararlılığı ve Tekrarlanabilirliği.....	38
3.8 Biyosensörün Substrat Spesifikliği.....	40
3.9 Gerçek Örnek Analizi.....	40
BÖLÜM DÖRT-TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
KAYNAKLAR.....	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Biyosensörün çalışma düzeninin basitçe gösterilmesi.....	1
Şekil 1.2 L-tirozin epinefrine reaksiyonu ve bu reaksiyonda kullanılan enzimler.....	10
Şekil 1.3 Monofenol ve difenollerin o-kinonlara yükseltgenme döngüsünde tirozina- zın aktif merkezi.....	12
Şekil 1.4 Melanin biyosentezinde tirozinin dopakroma dönüşme reaksiyonu.....	14
Şekil 3.1 AuNP yüzde yoğunluğa karşı nanometre boyutu grafiği.....	21
Şekil 3.2 a) 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda ve b) bu tamponda hazırlanmış 200 µM EP çözeltisinde KP/Nafyon elektrodun döngüsel voltamogramları ...	22
Şekil 3.3 a) 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda ve b) bu tamponda hazırlanmış 200 µM EP çözeltisinde KP/AuNP/Nafyon elektrodun döngüsel voltamogramları.....	23
Şekil 3.4 a) 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda ve b) bu tamponda hazırlanmış 200 µM EP çözeltisinde KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun döngüsel voltamogramları	24
Şekil 3.5 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 200 µM EP çözeltisinde a) KP/Nafyon b) KP/AuNP/Nafyon ve c) KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrotların döngüsel voltamogramları.....	25
Şekil 3.6 50 mM pH:7,0'de hazırlanmış 200 µM EP çözeltisinde a)5 b)20 c)50 d)100 e)200 f)500 ve g)1000 mV/s tarama hızlarında KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun döngüsel voltamogramları.....	26
Şekil 3.7 Tarama hızlarının kareköküne karşılık çizilen pik akım değerleri.....	27
Şekil 3.8 a)10, b)20, c)30, d)40 e)50 µL AuNP içeren KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun 200 µM EP çözeltisindeki diferansiyel puls voltamogramları.....	28
Şekil 3.9 200 µM EP için AuNP miktarının etkisi	28
Şekil 3.10 A) 156,54, B) 313,087 ve C) 626,174 U/mL tirozinaz enzim aktivitesi içeren KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun a) 10, b) 30, c) 50, d) 80 ve e) 100 µM EP çözeltilerindeki diferansiyel puls voltamogramları	30
Şekil 3.11 Tirozinaz aktivitesinin biyosensör cevabına etkisi.....	32

Şekil 3.12 A) a)6,0, b)6,5, c) 7,0, d)7,5 ve B) a)8,0, b)8,5, c)9,0 pH'lardaki 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmış 200 μ M EP çözeltisindeki diferansiyel puls voltamogramları.....	33
Şekil 3.13 pH değerlerine karşılık akım değerleri grafiği.....	34
Şekil 3.14 KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun a) 5, b) 10, c) 15 ve d) 20 dk oksijen gazı geçirilmiş EP çözeltilerindeki diferansiyel puls voltamogramları.....	35
Şekil 3.15 Oksijen gazı geçirme süresine karşılık akımları grafiği.....	36
Şekil 3.16 KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun 5 ile 500 μ M derişimlerdeki EP çözeltisindeki diferansiyel puls voltamogramları	37
Şekil 3.17 KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun 5 ile 500 μ M EP derişimlerine karşı pik akım değerleri grafiği (Elektrodun çalışma aralığı).....	37
Şekil 3.18 Depo karalılığı grafiği.....	39
Şekil 3.19 (-340) mV'da biyosensöre uygulanan substrat spesifikliğinin incelenmesi. 100. s. de 200 μ M EP, 150. s. de 200 μ M AA, 200. s. de 200 μ M EP 250. s. de 200 μ M UA ve 300. s. de tekrar 200 μ M EP ilave edilmiştir.....	40

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1 Enzim biyosensörlerin kullanımı.....	3
Tablo 3.1 AuNP boyutları ve bunların yoğunluk pikleri.....	21
Tablo 3.2 Elektrotların pik potansiyel ve akım değerleri.....	26
Tablo 3.3 KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun 200 µM EP çözeltisindeki pik potansiyelleri ve pik akım değerleri.....	27
Tablo 3.4 AuNP miktarlarına bağlı olarak pik potansiyelleri ve pik akım değerleri..	29
Tablo 3.5 Tirozinaz miktarlarına bağlı olarak elde edilen akım değerleri.....	31
Tablo 3.6 KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun farklı pH'lardaki pik potansiyelleri ve akım değerleri.....	34
Tablo 3.7 Oksijen gazı geçirme süresine bağlı olarak pik potansiyel pozisyonları ve pik akım değerleri.....	35
Tablo 3.8 EP derişimlerinin potansiyel pozisyonları ve akım yüksekliğı değerleri...	38
Tablo 3.9 Biyosensörün 14 gün sonunda elde edilen % biyosensör cevabı ve pik akım değerleri.....	38
Tablo 3.10 Özdeş elektrotların 200 µM EP çözeltisindeki potansiyel pozisyonları ve pik akımı değerleri.....	39
Tablo 4.1 Geliştirilen biyosensörün diğeri biyosensörle karşılaştırılması.....	43

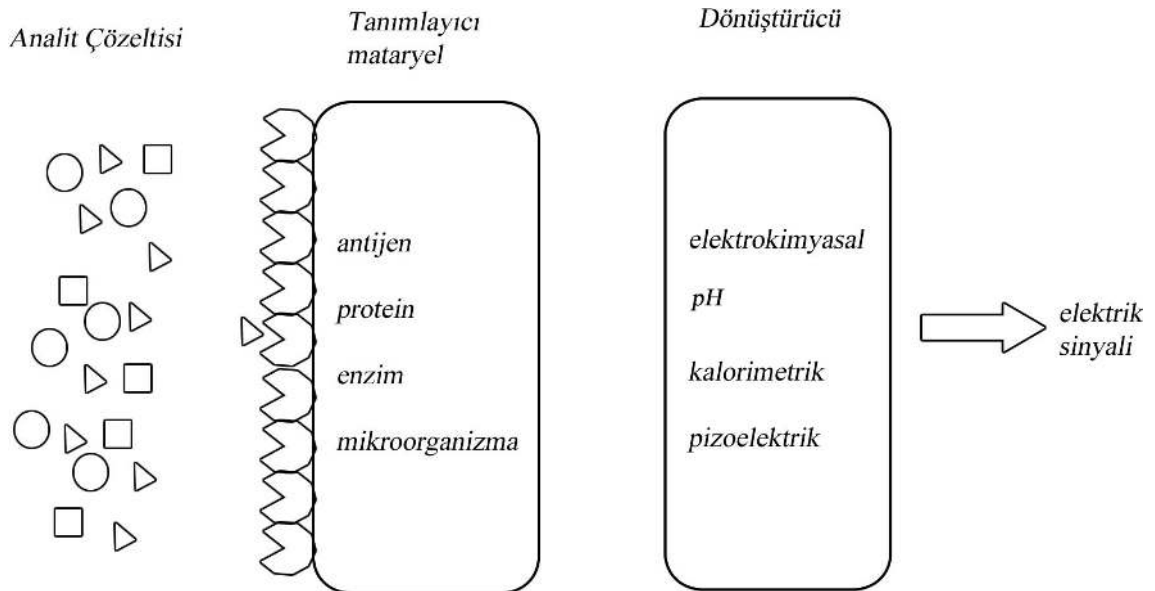
BÖLÜM BİR

GİRİŞ

1.1 Biyosensörler

1.1.1 Biyosensörlerin Yapısı

Biyosensörler, yapısında biyolojik yapı ve molekülleri (enzimler, mikroorganizmalar, hücreler, antikorlar, dokular vs.) içeren ve bunların reaksiyonlarını veya biyokatalitik etkilerini uygun bir çevirici ile ölçülebilir elektronik sinyale dönüştüren algılama aygıtları olarak tanımlanır (Şekil 1.1). Bir biyosensör hedef analitin derişimi hakkında bilgi verebilmektedir. Bu bilginin niteliği yüksek oranda; analit çözeltisinin karışımına, biyolojik tanımlama reaksiyonunun spesifikliğine, sensörün dizaynına ve fiziksel dönüştürücünün özelliklerine bağlıdır. Hedef analit, içerisinde birçok madde içeren bir karışım örneğinde bulunabilir. Biyosensör bu analitteki tayini yapılmak istenen maddeye özgü ve diğerlerine karşı kör olmalıdır (Sieve ve ark., 2010).



Şekil 1.1 Biyosensörün çalışma düzeninin basitçe gösterilmesi

Biyolojik tanıma elamanları genelde bir enzim içeren elektrotlardır ve içeriği bilinmeyen analit enzimin aktif bölgesi tarafından katalitik olarak ürüne

dönüştürülür. Oluşan ürün serbest bırakılır ve bu sayede enzim rejenere olur. Enzimin kendinde var olan bu özellik enzim temelli biyosensörlere büyük fayda sağlamaktadır. Bu katalitik reaksiyon ile analitin derişimi, analit türü ve reaksiyonu gerçekleştiren kofaktörlerin değışmesi sağlanmış olur. Bu derişim değışimleri, redoks türlerinin, potansiyelin ve pH değeri gibi değışimler sayesinde fiziksel bir dönüştürücüde değerlendirilmesine olanak sağlar.

İkinci tip biyosensör ise enzimin aktif bölgesine direk bağlanan analitin oluşturduğu afinite biyosensörleridir. Bu tip biyosensörlerde spesifik bağlanma sonucunda enzim kendisini rejenere edemez ve ikinci ölçüme olanak sağlamaz. Biyosensörlerin doğrusal tayin aralığı biyolojik tanılama sürecine ve bileşiklerin içeriğine oldukça bağlıdır. Enzimler için doğrusal aralık enzimin turnover oranına ve bunun afinite sabitine bağlıdır (Tevenot ve ark., 2001).

1.1.2 Biyosensör Uygulamaları

Biyosensörlerin analitik uygulamaları giderek önem kazanmaktadır. Ancak geleneksel analitik metotların yerine geçebilmiş olmamalarına rağmen hızlı görüntüleme, yerinde tayin veya bileşiğe özgü miktar analizi gibi geleneksel yöntemlere hizmet eden araçlar olarak entegre olabilmışlerdir. Biyosensörlerin en temel avantajı içeriğinde bulunan biyotanımlama elemanları sayesinde kendilerine özgü seçicilikleridir. Bu sayede hedef analitin tayininde kompleks matrislerde hiçbir ayırma işlemi uygulanmadan tayin gerçekleştirilebilir.

Biyosensörlerin daha önemli bir avantajı ise minyatürleştirilebilen ve mikro sistemlere kolaylıkla uyum sağlayabilen yapıda olmalarıdır. Bu küçük hacimlerdeki örneklerde kolaylıkla çalışma imkanı ve taşınabilir olması sayesinde kolay kullanım sağlamaktadır. Bir diğer önemli özelliği ise biyosensörlerin yüzeylerine farklı biyotanıma maddelerin immobilizasyonu ile sensör yüzeyinde birçok analitin eşzamanlı tayini gerçekleştirilebilmektedir. En belirgin dezavantajları ise uzun zaman stabilitelerini koruyamamaları ve bazen de sensörün zor kalibre olması olarak açıklanabilir (Schuhmam ve ark., 2001).

Biyosensörler; çevre, klinik ve gıda analizleri gibi bir çok yerde kullanılmaktadır (Antiochia ve ark., 2013). Bunlardan bazıları fenoller (Karim ve ark., 2013), fosfatlar

(d'Urso ve ark., 1990), siyanür (Ghavanati ve ark., 2014), nitrit ve metan (Maghsoodi ve ark., 2009), çeşitli pestisitler (Liu ve ark., 2014), gibi bileşiklerin tayini gerçekleştirilmiştir. Biyosensörlerin en yaygın uygulama alanları enzim elektrotlardır (Kotanen ve ark., 2012). Bunların bazı örnekleri tablo 1.1'de verilmiştir. Bunlara ek olarak immunosensörler (Marco ve ark., 1995) ve bütün hücre temelli sensörler (Bahadır ve ark., 2015) ve bitki dokusu (Li ve ark., 2002) sensörleri de araştırılmaktadır.

Tablo 1.1 Enzim biyosensörlerin kullanımı (Leihnenger ve ark., 2007)

Enzim sınıfı	Enzim alt sınıfı	Örnek	Hedef analit	Tayin edilen tür
Oksido-redüktazlar	Oksidaz	Glukoz oksidaz	β -D-glukoz	H ₂ O ₂ veya O ₂
	Dehidrogenaz	Glukoz dehidrogenaz	β -D-glukoz	NADH
	peroksidaz	Horseraddish peroksidaz	H ₂ O ₂	Redoks Medyatör
Hidrolazlar	Amidohidrolaz	Üreaz	Üre	NH ₃ , CO ₂ veya H ⁺
	Esteraz	Asetil kolin esteraz	Asetil kolin	H ⁺
Liyazlar	Dekarboksilaz	Amino asit dekarboksilaz	Amino asit	CO ₂

Temel olarak elektrokimyasal (amperometrik, potansiyometrik, impedimetrik veya kondüktometrik) ve optik (IR, Raman, floresans, absorpsiyon, yansıma veya yüzey plazma direnci) dönüştürücüler biyosensörlerde kullanılır. Bunların yanı sıra daha az kullanılan sensörler temelde pizoelektrik etki, yüzey akustik dalgaları veya enzim sonucu oluşan sıcaklık yoluyla yapılan tayinlerdir.

1.1.3 Amperometrik Biyosensörler

Bir amperometrik tayin bir çalışma elektrodunun (genelde biyosensörün kendisidir) referans ve düşük dirençli karşıt elektrot ile aynı elektrolit ortamına daldırılmasıyla gerçekleşir. Burada belirlenen bir akım değerinde potansiyotat kullanılarak referans elektroda bağlı olarak çalışma elektroduna bir akım uygulanır. Akım karşıt ve çalışma elektrodu arasında akar, elektrot ve elektrolit ara yüzeyinde oluşan tepkime ile heterojen elektron transferi gerçekleşir.

Amperometride sabit potansiyeldeki akım zamana karşı ölçülür, buna karşın voltametrde akım çalışma elektrot potansiyeline karşı ölçülür. Elektrot alanına göre gözlenen akım; redoks reaksiyonlarına, yüzeye difüze olmuş elektroaktif türlere ve derişimlerine bağlıdır.

Referans elektrot olarak en yaygın Ag/AgCl veya doygun kalomel elektrot (DKE) kullanılırken, karşıt elektrot olarak ise platin veya karbon şeritler kullanılır. Çalışma elektrodu olarak ise soy metaller (Au, Pt) veya karbon materyaller (camsı karbon, karbon pasta veya yüzey baskılı karbon) genelde tercih edilir (Kotanen ve ark., 2012).

1.1.4 Potansiyometrik Sensörler

Birbiri arasında elektriksel köprü ile bağlı olan iki yarım hücrenin potansiyel farkı yüksek empedans dijital voltametre kullanılarak ölçülür. Her bir yarım hücre için elektrot potansiyeli E ise, Nernst eşitliğine göre yükseltgenen ve indirgenen türler arasındaki derişim oranı standart bir E° potansiyeline sahiptir. Yarım hücrelerden biri referans elektrotsa, potansiyel ikincisinin analitik bilgisinden ortaya çıkmaktadır.

İyon seçici elektrotlar; cam membran (pH elektrodu), katı membranlar (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- veya S^{2-} gibi iyonlar için), sıvı iyon değıştirici membranlar (NO_3^- , Cl^- , BF_4^- , veya K^+ gibi iyonlar için) veya pH elektrot temelli gaz duyarlı elektrotlar (NH_3 or CO_2 gibi asidik ve bazik gazlar için) gibi çeşitli iyon seçici materyaller kullanılarak tasarlanabilir (Yin ve ark., 2013).

1.2 Metal Nanopartiküller

Günümüzde, nanopartiküllerin değişik bileşimleri ve ölçüleri; birçok amaç doğrultusunda ve hassas tayin yöntemleri olarak kullanılır hale gelmiştir. Nanopartiküllerin sensör uygulamalarına getirdiği avantajlar; geliştirilmiş hassasiyet, artan yüzey alanları, güçlendirilmiş etkileri ve küçük boyutları olarak sıralanabilir (Wang, 2005). Elektrokimyasal metotlarla modifiye edilen nanopartiküller oldukça geniş uygulama alanı bulabilmiştir. Bu uygulamalar son yıllarda hızla artmaktadır. Metal nanopartikül temelli elektrokimyasal biyoanaliz dalında kullanımının merkezde olmasının sebeplerinin başında, hastalıkların tayininde ve önlenmesinin öneminden kaynaklanmaktadır (Siangproh ve ark., 2011).

Metal nanopartiküllerin değişik boyutlarının ve bileşimlerinin birçok çeşidi şu an, hem kimyasal sensör hem de biyosensör olarak kullanımları kolaylaştırılmıştır. Yüksek hassasiyete sahip altın nanopartiküller (AuNP) geniş yüzey alanları sayesinde biyolojik moleküllerin tayinine öncülük ederler. Bazı hastalıkların erken safhada teşhis edilebilmesi için düşük seviyelerde ölçüm yapmaya gereksinim vardır. Mekanik dayanımları, çok hafif oluşları, zengin elektronik özellikleri ve oldukça yüksek kimyasal ve termal kararlılıkları mevcuttur (Katz ve ark., 2003).

Au, Pt, Pd ve Ag gibi metaller yükseltgenme reaksiyonuna karşı direnç gösterirler ve biyosensörlerde elektrot materyali olarak kullanılabilirler. Au ve AuNP'ler çoğu kez sentezlerinin kolay olması ve diğerlerine oranla daha düşük maliyetlerinden dolayı elektrokimyasal sistemlerde tercih edilir. AuNP'lerin yüzeyleri tiyol grubu taşıyan moleküller tarafından kolaylıkla modifiye edilebilmektedir (Hardy ve ark., 2008).

1.2.1 AuNP'lerin Küçük Biyo Moleküllerin Tayininde Kullanımı

AuNP'lerin çeşitli elektrot yüzeylerine kaplanarak hazırlanan elektrokimyasal sensörler ile bir çok küçük biyo molekülün tayini gerçekleştirilmiştir. Bunlardan bazıları; AuNP ile modifiye edilmiş camı karbon elektrot (GCE) ile dopamin (DA) ve ürik asit(UA) tayini μM düzeyinde gerçekleşmiştir. AuNP'ler eş zamanlı tayine olanak sağlamaktadır (Rosi ve ark., 2005). Bunlara ek olarak, altın nanoçubuk, altın

nanosalkım gibi çeşitli şekilleri, fenolik bileşiklerin nM düzeyinde tayini için kullanılmıştır (Einarsson ve ark., 2005).

1.2.2 AuNP'lerin DNA Tayininde Kullanımı

AuNP'ler DNA tayinine yönelik çalışmalarda önemli rol oynayan materyallerdir. Bu nanopartiküller, çalışmalarda DNA için substrat olarak ve sinyal yükseltici olarak kullanılmıştır.

Örnek vermek gerekirse; altın elektrot yüzeyinde 1,6-hekzanditol'ün AuNP ile modifikasyonu ile nM düzeyinde DNA tayini gerçekleştirilmiştir (Huang, X., ve ark., 2008). GCE elektrot yüzeyinde poli propilenimin (PPI) dendrimerlerin varlığında AuNP modifikasyonu ile 10 pM ve 5 nM aralığında yüksek hassasiyete sahip DNA biyosensörleri geliştirilmiştir (Arotiba ve ark., 2008).

Daha duyarlı bir çalışma da ise AuNP'ler Sandviç tipi elektrokimyasal sensörde, hızlı katalitik reaksiyonlar yoluyla ultra duyarlı 1 fM düzeyinde DNA tayinine olanak sağlamıştır (Selvaraju ve ark., 2008).

1.2.3 AuNP'lerin Glukoz Tayininde Kullanımı

Glukoz tayininde enzimatik olamayan elektrokimyasal sensörler düşük fiyatları, yüksek kararlılıkları ve tekrar üretilebilirlikleri bakımından alternatif nanosensörler olarak kullanılabilirler. AuNP ve polianilin (PANI) polimerleriyle modifiye edilen elektrot glukoz tayininde kullanılmıştır. Glukoza duyarlı AuNPs-PANI-AgCl/jelatin modifiye elektrot yüzeyine piranoz oksidaz enzimi, jelatin ile immobilize edilerek elektrot dizayn edilmiştir (Ozdemir ve ark., 2010).

Bir glukoz oksidaz enzim temelli biyosensörde ise AuNP'ün parçacık boyutunun H_2O_2 'in hem indirgenme hem de yükseltgenme yönünde katalitik etki gösterdiği ispatlanmıştır. Camsı karbon elektrot yüzeyine AgCl ve polianilin hibrit materyali ve

5 nm çapındaki AuNP nano kompoziti hazırlanarak geliştirilmiş biyosensörde düşük pM seviyesinde glukoz tayini gerçekleşmiştir (Yan ve ark., 2008).

1.2.4 AuNP’lerin H_2O_2 Tayininde Kullanımı

H_2O_2 metabolizmada oldukça önemli redoks reaksiyonlarını gerçekleştirmektedir. H_2O_2 biyolojik olaylarda ve hücreler arası geçiş yollarında, birkaç hastalıkta ve buna ek olarak yiyeceklerden bazı maddelerin uzaklaştırılmasında, eczacılıkta, klinik olarak, endüstride ve evre analizinde görevde alır.

H_2O_2 ’in güvenilir, kesin ve hızlı tayini pratikte oldukça büyük önem taşır. Son dönemlerde H_2O_2 tayinine yönelik farklı metotların uygulandığı çalışmaların sayısı artmaktadır.

Miyoglobin yardımıyla ITO elektrota tutturulan AuNP ile gerçekleştirilen H_2O_2 tayini gerçekleştirilmiştir. Bu alışma H_2O_2 ’in direk tayini yöntemine iyi bir örnektir. Dizayn edilen sensör iyi bir yeniden üretilebilirliğe ve nM düzeyinde tayin limitine sahiptir (Zhang ve ark., 2005).

1.2.5 Diğer Metal Nanopartiküllerin Voltametrinde Kullanımı

Metal NP’ların benzersiz özelliklerinden dolayı çeşitli tipleri hedef analitin tayin hassasiyetini arttırmada sensör bileşeni olarak kullanmak için sentezlenmektedirler. Anodik akım ölçümü için en temel metal NP, Platin NP’lerdir (PtNPs). Çünkü güçlü katalitik yükseltgenme özelliğine sahiptirler (Wang ve ark., 2004).

PtNP kullanılması glukozun yükseltgenmesine oldukça pozitif elektro katalitik etki yapmıştır. Buna ek olarak etilen glikolün PtNP’ü sarmalayarak koruması sayesinde, hidrodinamik voltametri yöntemi kullanılarak glukozun enzimatik olmayan tayinleri de gerçekleştirilmiştir (Rathod ve ark., 2010).

Gümüş NP'ler (AgNP'ler), bazı biyolojik moleküllerin ömrünü uzattığı için (enzimlerin aktivitelerini daha uzun süre göstermeleri gibi) ve elektronların transfer miktarını artırma yetenekleri olduğundan sensör dizaynlarında oldukça sık kullanılan materyallerdir (Cao ve ark., 2010).

Bakır NP'ler (CuNPs), mükemmel seçicilik, geniş doğrusal tarama aralığı (50 μ M-12 mM), hızlı tepki zamanı (4 saniyeden daha az), özelliklerinden dolayı glukoz tayininde kullanılmıştır (Wang ve ark., 2008). İlaveten, CuNP'ler PPoyx modifiyeli GCE elektrotta eş zamanlı olarak DA ve UA'in pM seviyesinde tayini gerçekleştirilmiştir. (Ulubay ve ark., 2010).

Son yıllarda metal nanopartiküllerin biyo analitik uygulamalarındaki yüksek potansiyeli bu alanda yapılan çalışmaları giderek artmasına neden olmaktadır. Çeşitli biyo uygulamalar için farklı nano materyaller başarıyla kullanılmıştır. Metal nanopartiküllerin biyo uygulamalarda bu derece önemli yer tutmasının başlıca nedenleri biyo moleküllerin yüzeye kolay immobilize edilmesi, biyo moleküllerin aktivitelerini ve nano partiküllerin elektro katalitik yeteneklerini korumaları ve iletken bir ara yüz oluşturmaları ile özetlenebilir.

Metal nanopartiküllerin bir çok biyo molekülün oldukça düşük sınırlarda tayin edilmesini sağlaması, hassasiyeti ve duyarlılığı geliştirmesi de diğer önemli özellikleridir.

1.3 Katekolaminler

Katekolaminler, merkezi sinir sisteminde görev yapan nörotransmitterlerdir. Bunlar dopamin, norepinefrin ve epinefrindir. Norepinefrin beyinde bulunan sempatik nöronudur. Dopamin çeperlerde aktivite gösteren, özellikle böbreklerde bulunan ve merkezi sinir sistemindeki çevrimlere hizmet eden norepinefrinin öncül maddesidir. Norepinefrinin metillenmiş formu olan epinefrin, böbrek üstü bezler tarafından hormon olarak salgılanan ve çeşitli organlardaki katekolamin reseptörlerini uyaran maddedir (Shiman ve ark., 1971).

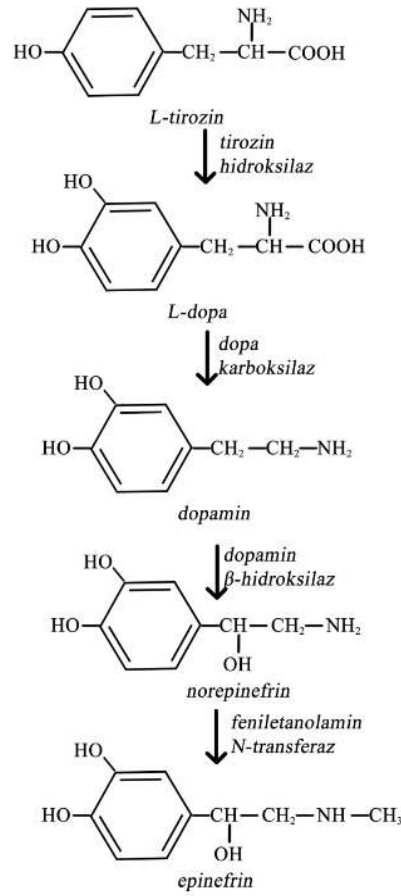
1.3.1 Epinefrin

Diğer bir adı adrenalın olan Epinefrin (EP) sinir sisteminin önemli nörotransmitterlerinden biridir. Epinefrin özellikle vücudun stres mekanizmasına, damarlardaki kan basıncının değişmesi, terleme ve titreme gibi durumlarda rol oynar. Epinefrin stres durumunda vucuda böbrek üstü bezlerinin merkez bölgesinden (medulla) salgılanır. Epinefrin beş büyük protein reseptörü ile etkileşime girerek biyolojik reaksiyonları tetikler (Bannister ve ark., 2011).

Büyük reseptör etkileşimlerinde kan basıncı artar ve ter bezleri aktif olur ve diğer norepinefrin gibi kateşol aminlerin salgılanması azalır. Kalp hızı ve renin salgılanması artar. Düz kaslardaki reseptörler özellikle nefes almayı kolaylaştırmak için ve çizgili kasları duyarlı hale getirmek için titremeyle sonuçlanan uyarılar salgılar. Bu reseptörlerin harekete geçmesiyle glikojenolis aktivasyonu gerçekleşir ve enerji depoları harekete geçer (Feinberg ve ark., 2007).

Norepinefrinden sentezlenen bir kateşol amin olan epinefrin, metabolik çevrimlerde tirozinin dihidroksifenilalanine (DOPA) dönüşmesinde bunun sonucunda DOPA'nın dopamine ve dopaminin norepinefrine ve son olarak norepinefrinde epinefrine dönüşmesiyle meydana gelir (Şekil 1.2). Bu metabolik çevrimde yer alan enzimler ise; tirozin hidroksilaz, DOPA dekarboksilaz, dopamin hidroksilaz ve feniletanolamin N-metil tranferaz şeklindedir (Jaenisch ve ark., 2003).

Tirozin hidroksilaz katekolaminlerin biyosentezinde hız belirleyici enzimdir. Bütün hücrelerde tirozini moleküler oksijen kullanarak katekolaminlere dönüştürür. Dopa karboksilaz enzimi, dopanın dopamine dönüşmesinde karboksil grubunun ayrılmasını ve sonraki adımda ise dopamin β -hidroksilaz enzimi dopamini epinefrin veya norepinefrine dönüşümünü katalizler.



Şekil 1.2 L-tirozin epinefrine reaksiyonu ve bu reaksiyonda kullanılan enzimler

Böbrek üstü bezlerin yanı sıra, bazı dokularda sentezi de mevcuttur. Bunlar: beyin, retina ve kalbin sol kulakçığıdır. Epinefrinin, taşikardi, vazokonstriksiyon, hipertansiyon, terleme, titreme, ve glukoz ve yağ asitleri gibi enerji depolarının yıkımı gibi stres tepkilerinde arabuluculuk yapar. Epinefrinin beyinde düşük seviyede bulunması ise alzheimer hastalığının göstergesidir.

Epinefrin insan hafıza artışının bir göstergesidir ancak beyine nüfuz etmeyen bu etkiye epinefrinin periperal hareketleri sebep olmaktadır. Bunlar merkezi beyin etkileri değildir. Bu intraserebral etkiler hayvanlarda da uyarım ve depresyon olarak görülmektedir (Richards ve ark., 2006).

1.3.2 Katekolaminlerin Biyosentezi

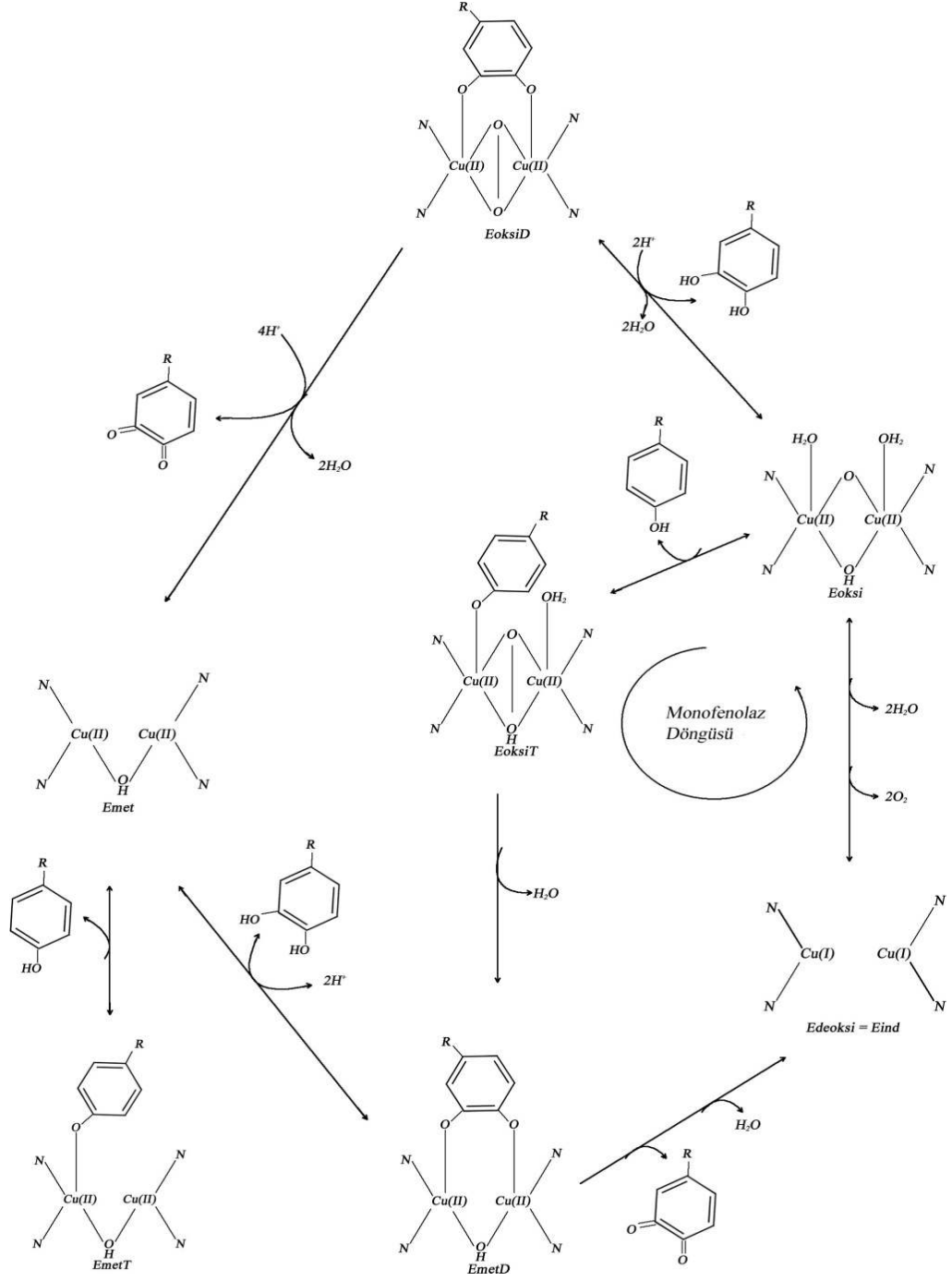
Katekolaminlerin biyosentezi enzimatik prosesle gerçekleşir. Çevrimdeki enzimlerin kinetiği, substrat spesifikliğı, kofaktör gereksinimi gibi veriler ayrıntılı bir biçimde incelendiğinde katekolaminlerin çevrimleri şekil 1.3'deki gibidir.

Hücrelerde feniletanolamin N-transferaz ile epinefrin sentezi bu çevrimin son basamağıdır. 284 amino asit içeren bu enzim beyinde küçük gruplar halinde bulunan nöronlarda bulunur ve norepinefrinden azotu uzaklaştırıp yerine metil transferi gerçekleştirir. Bu sayede sekonder amin sentezi gerçekleşmiş olur (Lamaouroux ve ark., 1987).

1.3.3 Katekolaminlerin Salgılanması

Düzenli olarak düşük derişimdeki katekolaminler, mono amin oksidaz (tirozinaz) tarafından sitozolde serbest halde metabolizmaya verilir. Bu sayede tirozinin l-dopaya, l-dopanında dopamine dönüşümü sitozolde gerçekleşir. Dopamin daha sonra tekrar depo keseciklere iletilir. Norepinefrin içeren sinir hücrelerinde hidroksilasyon gerçekleşir. Böbrek üstü bezlerde metilleme işlemi de tamamlandıktan sonra epinefrin kromafin granüllerine taşınır ve depo edilir.

Monoamin oksidaz (tirozinaz) ve katekol-O-metil transferaz katekolaminlerin birinci dereceden inaktivasyonundan sorumludur. Bu enzimler vucuda yaygın bir şekilde dağılmıştır. Hücreler arası yerleşiminden dolayı tirozinaz sinir depolarındaki serbest katekolaminlerin inaktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu sayede veziküler depoları engelleyen ilaçlar rezepin gibi veya dolaylı yoldan etkileyen sempotamimetik ilaçlar amfetaminler gibi deamin metabolitlerinde belirgin bir artışa sebep olur. Monoamin oksidazların izoenzimleri farklı substrat spesifikliklerine sahiptirler. Monoamin oksidaz-A norepinefrin ve seratoninin deaminasyonunda ve klorjin tarafından inhibe olur. Mono amin oksidaz B ise feniletilaminlerin geniş spektrumunda rol alır. Mono amin oksidaz-B deprenil (parkinson hastalığının erken tanısında ilaç olarak kullanılır.) tarafından inhibe olur (Kuhar ve ark., 2006).

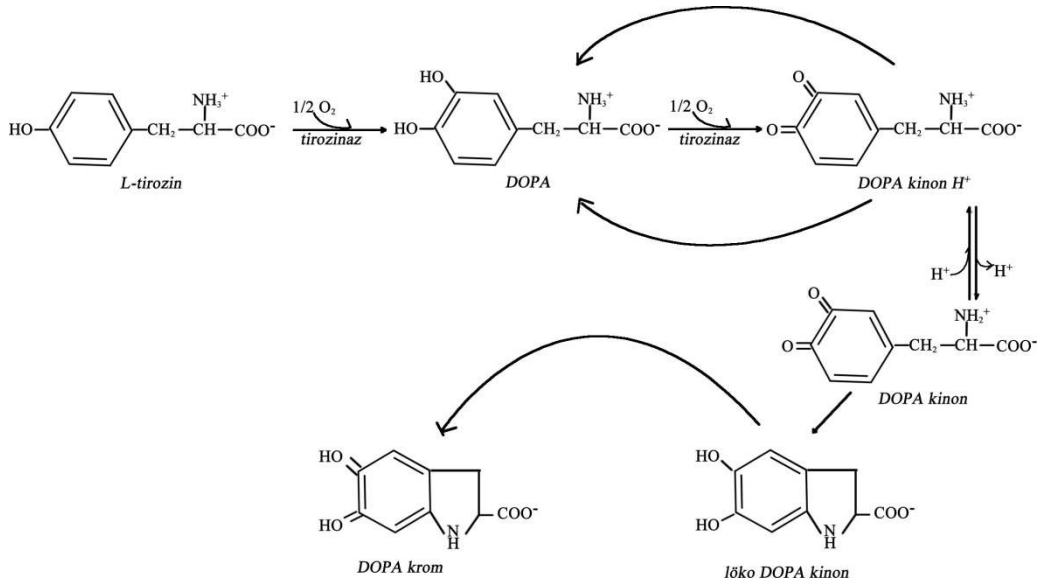


Şekil 1.3 Monofenol ve difenollerin o-kinonlara yükseltgenme döngüsünde tirozinazın aktif merkezi

1.4 Tirozinaz

Tirozinaz melanin üretimini kontrol eden enzimdir. Melanin pigmenti doğada bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda olmak üzere geniş bir dağılım göstermektedir. Melaninler sarıdan siyaha bir çok renk türünde heterojen polifenol benzeri kompleks yapıdaki bipolimerlerdir. Bunların biyosentezi kesilen elma, patates veya muzun havayla maruz kaldıktan sonra kararmasından anlaşılabilir (Pawalek ve ark., 1982).

Memelilerde temel olarak iki tip melanin bulunmaktadır, eumelaninler ve femelaninler. Bunlardan ilki kahverengi siyah ve ikincisi sarıdan kırmızı kahverengine kadar değişen aralıktadır. Her ikisinde kimyasal reaksiyonları ve enzimatik katalizlenme kombinasyonları ilk defa Raper tarafından ortaya konulmuş ve daha sonra Mason tarafından onaylanmıştır. Raper-Mason çevrimi olarak bilinen melanojenesis, proksimal (iç) ve distal (dış) olmak üzere iki fazdan oluşur. Proksimal faz monofenolün (tirozinin) veya o-difenolün (L-DOPA) enzimatik o-kinon türlerine yükseltgenmesiyle başlar. Bu kataliz işlemi bakır içeren tirozinaz (EC 1.14.18.1) enzimi ile gerçekleşir. Oluşan o-kinon türü iki tip tepkime gerçekleştirebilir : benzen halkasının 1,4 pozisyonuna bağlanabilir veya bir su tepkimesine eklenebilir. o-dopa kinon yan zincirinden benzen halkasına 1,4 pozisyonunda bağlanarak döngüdeki lökoDOPA kromu oluşturur. Oluşan bu ürün L-DOPA tarafından indirgenmiş o-DOPA kinon-H⁺ tarafından DOPA kroma indirgenir. Aminoasitler gibi (serin, prolin vb.) nükleofillerin varlığında redoks reaksiyonları gerçekleşir ve o-kinon türler oluşur (Ferrer ve ark., 1995).



Şekil 1.4 Melanin biyosentezinde tirozinin dopakroma dönüşme reaksiyonu

1.4.1 Tirozinazın Biyokimyasal Karakteri

Bakır içeren tirozinaz (monofenol, dihidroksi-L-fenilalanin: oksijen oksidoredüktaz, EC 1.14.18.1) melenizasyon için esansiyel bir enzimdir. İlk biyokimyasal havaya maruz kaldığında siyah olan *Russula nigricans* mantarında 1895 yılında gerçekleşmiştir. Keşfedildiği günden bugüne bakterilerden memelilere kadar bir çok yerde değişik karakteristik özelliklerde varlığı tayin edilmiştir. Yüksek bitkilerin farklı organlarında örneğin köklerinde farklı, yapraklarında farklı görevleri vardır. Ancak endojen inhibitörlerin olduğu yerlerde varlığına rastlanmamaktadır.

Tirozinazın başlıca iki tip reaksiyonu katalizlediği bilinmektedir. Bunlar; monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonu (monofenolaz aktivite) ve o-difenollerin o-kinonlara yükseltgenmesi (difenolaz aktivite) dir. Her iki tepkime için de oksijen gereklidir. İşaretli oksijen-18 çalışmaları monofenol tepkimesinde hidraksilasyondan gelen moleküler oksijenin kullanıldığını göstermiştir.

1.4.2 Aktif Merkezin Yapısı

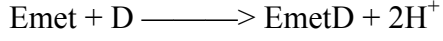
Kimyasal ve spektroskopik çalışmalar, tirozinazın aktif merkezinin hemosiyanine benzer biçimde bir çift bakır atomu içerdiğini göstermektedir. Bu çift bakır çeşitli biçimlerde bulunabilir. Sistematik çalışmalar bu bakır çiftinin bulunuş biçimine göre enzimin geometrik ve elektronik yapısını anlamamızda önemli olmuştur.

Yükseltgenmiş biçimi (oksitirozinaz, Eoxy) iki tane tetragonal Cu(II) atomu içermektedir. Her biri iki güçlü ekvatoryal ve bir zayıf eksensel His ligandlarıyla kordine olmuş durumdadır. Dış taraftaki oksijen molekülü peroksit olarak bağ yapar ve iki bakır atomuna köprü oluşturur.

Mettirozinaz (Emet), yükseltgenmiş biçimi gibi iki tane tetragonal Cu(II) iyonu içerir. Antiferro manyetik çift bir endojen köprü aracılığıyla çift haline gelir. Diğer peroksit den gelen egzojen ligandlara rağmen merkezdeki bakıra bağlanır. Bu türevi peroksit katılmasıyla oksitirozinaza ve peroksitin kaybolduğu kısımlarında mettirozinaza geri dönüşümü gerçekleşir. Saflaştırma işleminden sonraki tirozinazın son halinde % 85 met ve % 15 oksi formu karışım halinde bulunur. Ayrıca yarı met türevin karışımında eşit değerde [Cu (I)— Cu (II)] bulunduğu elektro paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi ile tespit edilmiştir.

Deoksitirozinaz (Edeoksi), yapısında [Cu (I)— Cu (II)] içeren deoksihemosistein yapısına benzemektedir. Bu yapı 1938 yılında Kubowitz firması tarafından enzim katekol ile indirgendiğinden sonra her bir Cu atomuna birer CO bağlı olarak açıklanmıştır (Himmelwright ve ark., 1980).

Bu üç halde de tirozinazın aktif merkezi monofenollerin o-hidroksilasyonuna ve oluşan difenollerin yükseltgenmesine öncülük eder. Monofenolik substrat başlangıçta oksitirozinazın bakırlarından birini eksensel pozisyona getirir. Trigonal bipiramit yapısına doğru yeniden düzenlenen yapı peroksit bağı tarafından monofenolün hidroksilasyonunu başlatır, su kaybeder ve EmetD kompleks formuna dönüşür. Bu yapılar EPR ve X-ray çalışmaları ile desteklenmiştir. Bu EmetD serbest difenol hali oluşturmak üzere;



reaksiyonu ile difenolaz döngüsünün ilk adımı gerçekleşir veya tekrar aktif merkezindeki bağ ile difenolat yükseltgenmesi olur ve binükleer bakır enzimi oluşturarak serbest bir kinon açığa çıkar (Edeoksi). Oksitirozinaz daha sonra moleküler oksijeni kullanarak Edeoksi ye tekrar geri döner. Eğer sadece difenol varsa Eoksi hali difenolden o-kinona yükseltgenerek antiferromanyetik ürünler oluşturan EoksiD haline dönüşür. Son halinde o-difenol o-kinona dönüşür ve Edoksi halindeki enzimin bakır çifti indirgenir (Solomon ve ark., 1981).

BÖLÜM İKİ

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Cihaz ve Diğer Ekipmanlar

Denemelerde Nova 1.9 yazılımı içeren Metroohm Autolab Tip 3 potansiyostat ile üç elektrot sistemi kullanılmıştır. Çalışma elektrodu olarak karbon pasta (cam tüp; 5 cm uzunluğunda ve 4 mm çapında), referans elektrot Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak ise Pt elektrot kullanılmıştır. Gilson P100 ve P1000 (Fransa) ve Yellow-Line manyetik karıştırıcı (Almanya) ve ultra saf için USF-ELGA cihazı kullanıldı.

2.1.2 Kimyasal Maddeler

Nujol (Sigma) mineral yağ, Nafyon 117 (% 5'lik çözeltisi) (Fluka Kimya), Epinefrin hiroklorür ($C_9H_{13}NO_3 \cdot HCl$) (Sigma) ($M_a = 183,204 \text{ g/mol}$), $HAuCl_4$ (Sigma), Sodyum sitrat tribazik ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) (Sigma) (Tirozinaz mantardan) (Sigma) (3130,87 UI/mg), KH_2PO_4 (Carlo Erba), NaOH (Merck) ve diğer bütün kimyasallar Sigma Chemical Co. (ABD)'dan alınmıştır. Bütün çözeltiler çalışmadan önce hazırlanmış, ultra distile saf su kullanılmış ve analitik saflıktadır.

2.2 Yöntem

2.2.1 Altın Nanopartikül Sentezi

Altın nanopartiküller Turkevich metoduna göre sentezlenmiştir (Cui R., ve ark. 2008). Bu yönteme göre 100 mL % 1'lik tetrakloraurik asit ($HAuCl_4$) çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti 350 rpm'de 90°C'ye kadar ısıtıldı. Daha sonra 5 mL % 1'lik trisodyum sitrat çözeltisi indirgeyici olarak bu karışıma eklendi. 4 dk sonra renk önce mavi mora ve daha sonra şarap kırmızısına döndü. 30 dk daha 350 rpm'de

karıştırılarak soğutuldu. Nanopartikül boyut ölçümü zeta potansiyel sayacı ile gerçekleştirildi.

2.2.2 Altın Nanopartikül ve Tirozinaz Modifiyeli Altın Nanopartikül İçeren Karbon Pasta Elektrotların Hazırlanması

Karbon pasta (KP) elektrot doğrudan grafit tozu (0,7 g) ve mineral yağın (0,3 g) homojen olarak karıştırılıp pasta haline getirilerek hazırlandı. Hazırlanan pasta kıvamındaki grafit cam borulara dikkatli bir şekilde dolduruldu. Daha sonra zımparalanmış bakır tel yarıya kadar elektrodun ucuna takıldı ve yüzey yağlı kağıt ile düzleştirildi. AuNP modifiyeli elektrot (KP/AuNP) hazırlanmasında ise 0,7 g grafit tozu ile 40 µL AuNP karıştırılarak aynı işlemler uygulandı. Hazırlanan elektrot yüzeyine 10 µL Tirozinaz enzim çözeltisi (50 mM fosfat tamponunda pH: 7,0) damlatıldı ve desikatörde 1 saat kurutuldu. Son olarak kuruyan yüzeye 5 µL Nafyon çözeltisi damlatıldı ve desikatörde 45 dk kurutulması ile KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodu hazırlandı.

2.2.3 Biyosensörün Elektrokimyasal Davranışı

Biyosensörün elektrokimyasal davranışını anlamak için; KP/Nafyon, KP/AuNP/Nafyon ve KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon olmak üzere üç adet elektrot hazırlandı. Hazırlanan bu elektrotlar 10 dk oksijen gazı geçirilmiş ve pH: 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 200 µM Epinefrin (EP) çözeltisi içerisinde (+0,8)'den (-0,8) V'a doğru 50 mV tarama hızı ile döngüsel voltamogramları alındı.

2.2.4 Tarama Hızının Etkisi

50 mM pH:7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış ve 10 dk oksijen gazı geçirilmiş 0,2 µM EP çözeltisinin KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrot döngüsel voltamogramları alındı. Döngüsel voltamogramlar (+0,8) - (-0,8) V aralığında tarama hızları 5, 20, 50, 100, 200, 500 ve 1000 mV/s olacak şekilde alındı.

2.2.5 Altın Nanopartikül Miktarı Optimizasyonu

Denemelerde 4 adet KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrot hazırlandı ve sırayla grafit tozuna 10-20-30-40 ve 50 μL AuNP ilave edildi. Her bir elektrot için pH:7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış ve oksijen gazı ile doyurulmuş 200 μM EP çözeltisinin katodik bölgede (+0,8) - (-0,8) V aralığında 50 mV tarama hızı ile diferansiyel pulsları alındı.

2.2.6 Enzim Aktivitesinin Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

Elektrot hazırlanırken enzim aktiviteleri sırayla 156,543, 313,080 ve 626,174 U/mL olacak şekilde elektrotlar hazırlandı. Her bir enzim aktivitesi için hazırlanmış elektrotlar ile sırasıyla 1-3-5-8 ve 10 μM EP çözeltisinde Diferansiyel pulsları alındı. Her bir aktivite için EP konsantrasyonlarına karşı pik akımları ile grafikleri çizildi.

2.2.7 Optimum pH ve Oksijen Süresinin Belirlenmesi

Optimum pH'nın belirlenmesi amacıyla 50 mM fosfat tamponunda pH; 6, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 ve 9,0'da hazırlanmış ve 10 dk oksijen gazı geçirilmiş 200 μM EP çözeltilerinin KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrotla diferansiyel pulsları alındı. Oksijen geçirme süresinin belirlenmesi amacıyla da 200 μM EP içeren pH: 7,0 fosfat tamponundan sırayla 5, 10, 15 ve 20 dk. Oksijen gazı geçirilerek gaz geçirme süresinin biyosensörün cevabına etkisi incelendi. Elde edilen pik akımlarına karşı pH ve oksijen geçirme sürelerine karşılık grafikler çizildi.

2.2.8 Epinefrin İçin Doğrusal Tayin Aralığı

Yapılan denemelerde 0,05-500 μM aralığındaki EP derişimleri için katodik yönde (+0,8) - (-0,8) V aralığında diferansiyel puls voltametresi ile ölçümler alındı. EP derişimlerine karşı pik akımları ile çizilen kalibrasyon grafiğı yardımıyla biyosensörün doğrusal tayin aralığı ve tayin limiti belirlendi.

2.2.9 Depo Kararlılığı ve Tekrarlanabilirlik

Biyosensörün depo kararlılığının belirlenmesi amacıyla, KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun hazırlandığı günden itibaren 14 gün boyunca biyosensör cevabı izlendi. Biyosensörle hazırlandığı gün ve 2 gün aralıklarla 200 μ M EP derişim için ölçümler alındı. Bu süre zarfında ölçüm alındığı zamanlar dışında biyosensör +4 $^{\circ}$ C de bekletildi. Denemeler oda sıcaklığında ve fosfat tamponunda (pH 7,0 ; 50 mM) gerçekleştirildi.

Tekrarlanabilirlik denemelerinde, KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodu ile katodik yönde (aralık yaz) diferansiyel puls voltametri yöntemiyle 7 ölçüm alındı. Elde edilen verilerden yararlanılarak ortalama değer (x), standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı (%V.K) hesaplandı.

2.2.10 Substrat Spesifikliği

Askorbik asit (AA) ve ürik asit (UA)'ın hazırlanan elektrotta herhangi bir girişim yapıp yapmadığı amperometrik olarak incelendi. 350 s. süresince elektroda 100. s. de 200 μ M EP, 150. s. de 200 μ M AA, 200. s. de 200 μ M EP 250. s. de 200 μ M UA ve 300. s. de tekrar 200 μ M EP ilave edilerek substrat spesifikliği belirlendi.

2.2.11 Gerçek Örnek Analizi

Gerçek örnek analizinde eczaneden alınan adrenalin ampüller kullanılmıştır. Her bir ampul içeriği; 8,38 mg sodyum klorür, 0,1 mg sodyum metabisülfid, 1 mL enjeksiyonluk su ve 1mg adrenalin içermektedir. 30 mL hücrede 200 μ M EP olacak şekilde seyreltildi ve hazırlanan KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrotlar ile diferansiyel puls voltamogramları alındı.

BÖLÜM ÜÇ

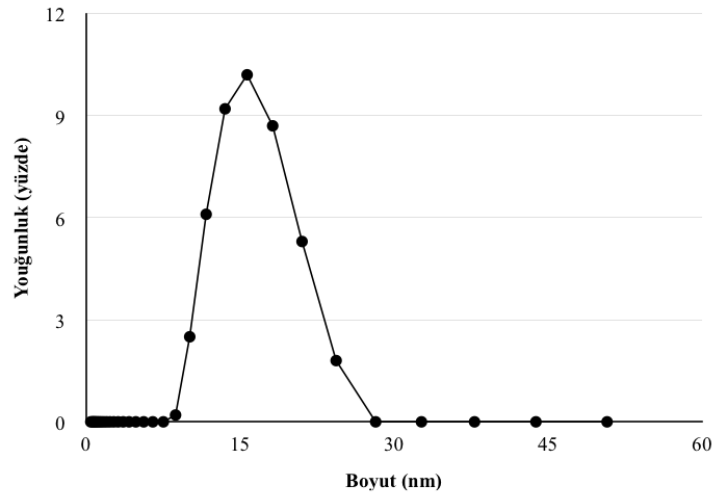
DENEYSEL VERİLER

3.1 Altın Nanopartikül Karakterizasyonu

Tek kullanımlık küvette, 25 °C de 319,2 kcps ile yapılan ölçümde sonuçlar tablo 3.1 dedir. Sentezlenen AuNP'nin oldukça homojen bir dağılım gösterdiği ve ortalama 15,82 nm çapında olduğu şekil 3.1'de gözükmemektedir.

Tablo 3.1 AuNP boyutları ve bunların yoğunluk pikleri

	Boyut (nm)	Yoğunluk (%)
pik 1	15,82	44

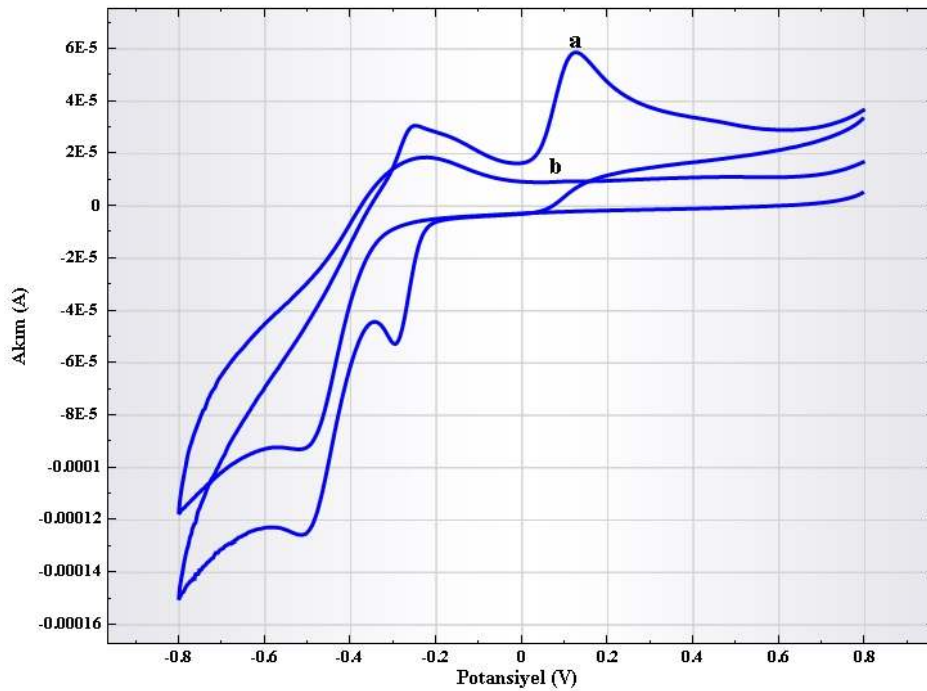


Şekil 3.1 AuNP yüzde yoğunluğa karşı nanometre boyutu grafiği

3.2 Çıplak Karbon Pasta, Altın Nanopartikül Modifiyeli ve Tirozinaz Modifiyeli Altın Nanopartikül, Elektrotların Elektrokimyasal Davranışlarının İncelenmesi

3.2.1 Döngüsel Voltametri ile Çıplak Karbon Pasta Elektrodun Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

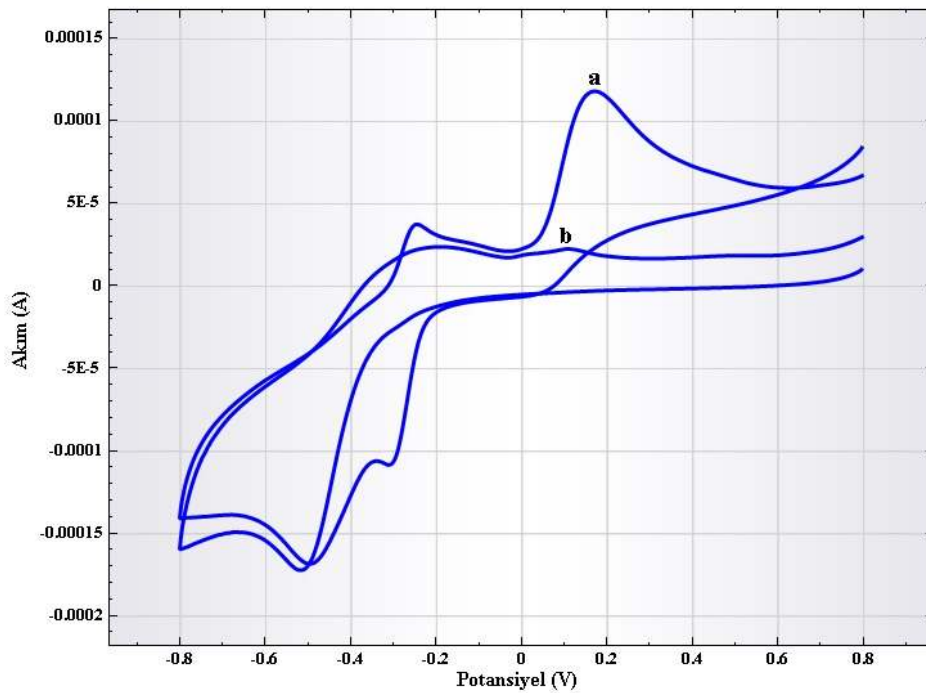
KP/Nafyon elektrotun 200 μM EP varlığında ve 50 mM pH:7,0 fosfat tampon ortamında alınan döngüsel voltamogramları şekil 3.2 de verilmiştir. Şekil 3.2 de b ile gösterilen tampon ortamında katodik ve anodik yönde herhangi bir pik gözlenmedi. Buna karşılık EP varlığında -0,291V ve -0,492V da katodik yönde iki pik, anodik yönde de -0,257V ve 0,124V da iki adet redoks çifti piki gözlemlendi. Katodik yöndeki -0,291V ve -0,492V de ki piklerin akım değerleri sırasıyla 25,71 μA ve 48,57 μA , anodik yöndeki -0,257V ve 0,124V deki piklerinde akım değerleri sırasıyla 24,28 μA ve 34,28 μA olarak bulundu.



Şekil 3.2 a) 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda ve b) bu tamponda hazırlanmış 200 μM EP çözeltisinde KP/Nafyon elektrodun döngüsel voltamogramları

3.2.2 Döngüsel Voltametri ile Altın Nanopartikül Modifiye Karbon Pasta Elektrodun Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

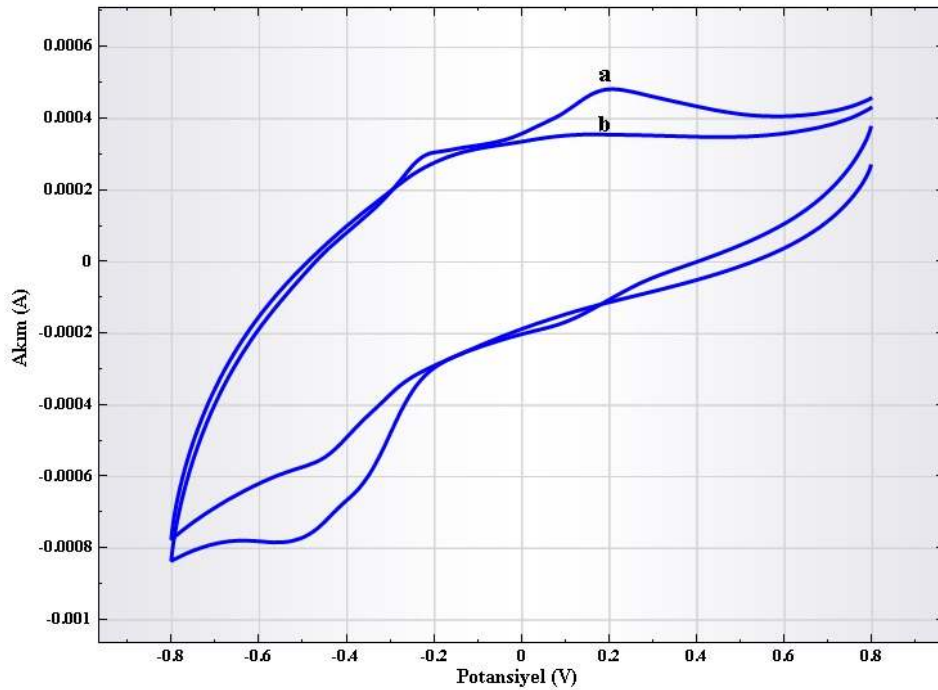
AuNP'nin EP nin elektrokimyasal reaksiyonuna etkisini incelemek için KP/AuNP/Nafyon elektrot hazırlandı. KP/AuNP/Nafyon elektrotun 200 μ M EP varlığında ve 50 mM pH:7,0 fosfat tampon ortamında alınan döngüsel voltamogramları şekil 3.3 de verilmiştir. AuNP modifiyeli karbon pasta elektrotun EP çözeltisinde alınan voltamogramında, KP/Nafyon elektrotun döngüsel voltamogramına benzer şekilde -0,308V ve -0,500V da katodik yönde iki pik, anodik yönde de -0,250V ve 0,163V'da iki adet redoks çifti piki gözlemlendi. Katodik yöndeki -0,308V ve -0,500V da ki piklerin akım değerleri sırasıyla 36,30 μ A ve 46,70 μ A, anodik yöndeki -0,250V ve 0,163V da ki piklerinde akım değerleri sırasıyla 34,09 μ A ve 77,27 μ A olarak bulundu. AuNP lerin indirgenme yönündeki katalitik etkisinin bir sonucu olarak katodik yöndeki -0,3V daki pik akımında artış gözlemlendi. Elektrot yüzeyinde indirgenen EP türü artışına bağlı olarak anodik yönde 0,163V daki pik akımında da artış gözlemlenmiştir.



Şekil 3.3 a) 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda ve b) bu tamponda hazırlanmış 200 μ M EP çözeltisinde KP/AuNP/Nafyon elektrodun döngüsel voltamogramları

3.2.3 Tirozinaz Modifiye Altın Nanopartikül Karbon Pasta Elektrodun Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

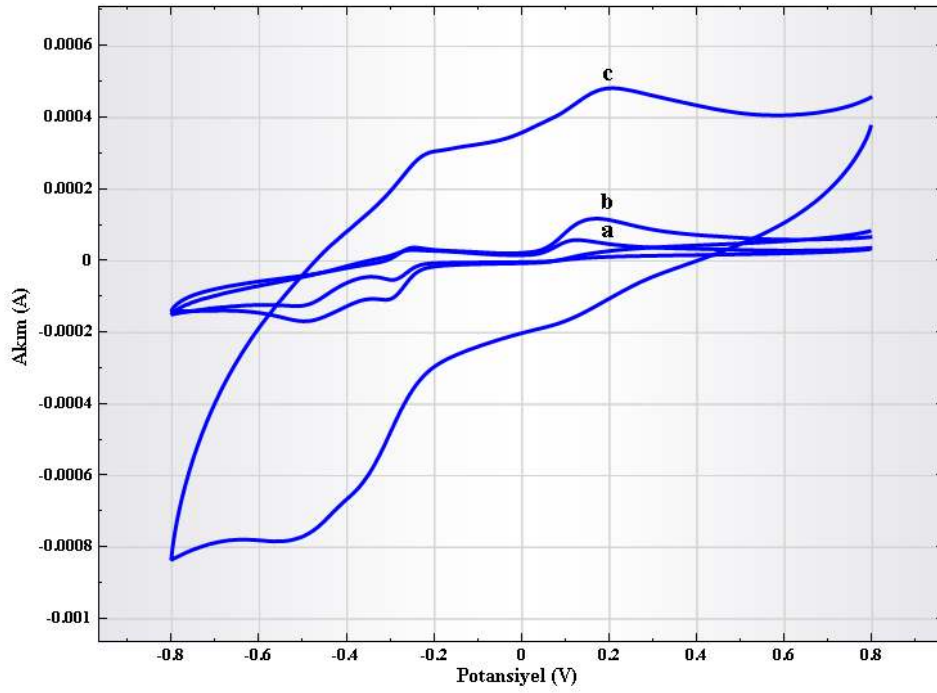
Tirozinaz enziminin EP nin elektrokimyasal reaksiyonuna etkisi KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrot ile döngüsel voltametriyle incelendi. 200 μ M EP varlığında ve 50 mM pH:7,0 fosfat tampon ortamında alınan döngüsel voltamogramları şekil 3.4 de verilmiştir. Tirozinazın EP ile enzimatik reaksiyonu sonucu yapıdaki difenoller kinon yapısına yükseltgendi. Enzimatik reaksiyon sonucu artan yükseltgenmiş EP tür konsantrasyonuna bağlı olarak katodik yöndeki -0,469V daki pik potansiyelinde de artış gözlemlendi. Katodik yöndeki -0,469V daki pik akım değeri 181,8 μ A, anodik yöndeki -0,223V ve 0,195V daki pik potansiyellerinin akım değerleri sırasıyla 84 μ A ve 105 μ A olarak bulundu. Anodik yöneki pik akım değerlerinin yükselmesi de yükseltgenen EP türlerinin katodik yönde indirgenmesine bağlı olarak anodik yöndeki taramada artış göstermiştir.



Şekil 3.4 a) 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda ve b) bu tamponda hazırlanmış 200 μ M EP çözeltisinde KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun döngüsel voltamogramları

3.2.4 KP/Nafyon, KP/AuNP/Nafyon ve KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon Elektrotların Elektrokimyasal Davranışının Karşılaştırılması

200 μM EP çözeltisinde **KP/Nafyon**, **KP/AuNP/Nafyon**, ve **KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon** elektrotların döngüsel voltamogramları şekil 3.5 verildi. EP'nin indirgenme yönündeki pik potansiyelleri ve pik akımları karşılaştırıldığında (Tablo 3.2) altın nanopartikülün katodik yöndeki pik akım değerlerini arttırdığı, Tirozinazın EP ile enzimatik reaksiyonu sonucu yükseltgeniş EP türünün derişimin artmasıyla katodik yöndeki pik akım değerlerinde artma gözlemlendi.



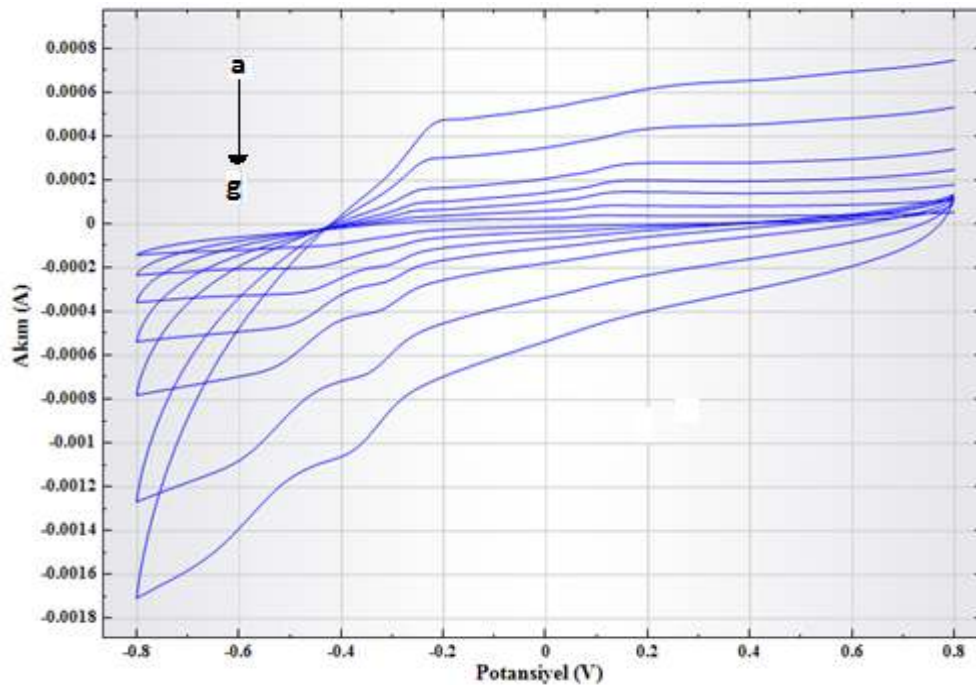
Şekil 3.5 50 mM pH: 7,0 fosfat tamponunda hazırlanmış 200 μM EP çözeltisinde a) KP/Nafyon b) KP/AuNP/Nafyon ve c) KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrotların döngüsel voltamogramları

Tablo 3.2 Elektrotların pik potansiyel ve akım değerleri

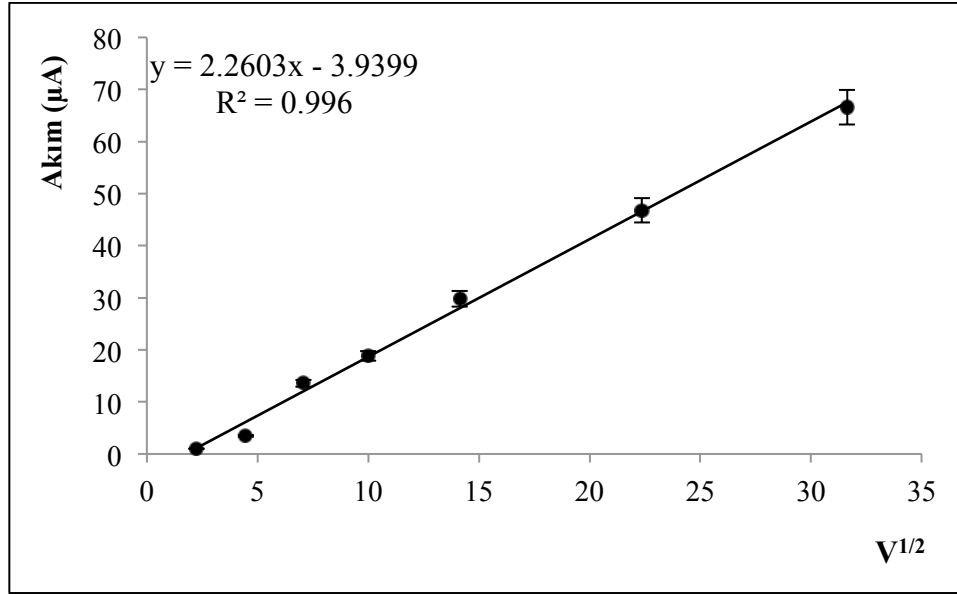
	KATODİK				ANODİK			
	Pik Pot. (mV)	Pik Akım (μA)	Pik Pot. (mV)	Pik Akım (μA)	Pik Pot. (mV)	Pik Akım (μA)	Pik Pot. (mV)	Pik Akım (μA)
KP/Nafyon	-0,291	25,71	-0,492	48,57	-0,257	24,28	0,124	34,28
KP/AuNP/Nafyon	-0,308	36,30	-0,500	46,70	-0,250	34,09	0,163	77,27
KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon	-0,469	181,8	-	-	-0,223	84,00	0,195	105,00

3.2.5 Tarama Hızının Etkisi

KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon modifiye elektrotun 200 μM EP çözeltisinde döngüsel voltamogramları alınarak (şekil 3.6) I_p ' ye karşı $v^{1/2}$ eğrileri oluşturularak (şekil 3.7) reaksiyonun elektrokimyasal analizi yapıldı ve tarama hızı 50 mV olarak belirlendi. Bunun sonucunda biyosensör için 5-1000 mV/s arası tarama hızında akımın doğrusal olarak değiştiği gözlemlendi. Buna bağlı olarak akımın yarı-sonsuz lineer difüzyon kontrollü olduğu bulundu.



Şekil 3.6 50 mM pH:7,0'de hazırlanmış 200 μM EP çözeltisinde a)5 b)20 c)50 d)100 e)200 f)500 ve g)1000 mV/s tarama hızlarında KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun döngüsel voltamogramları



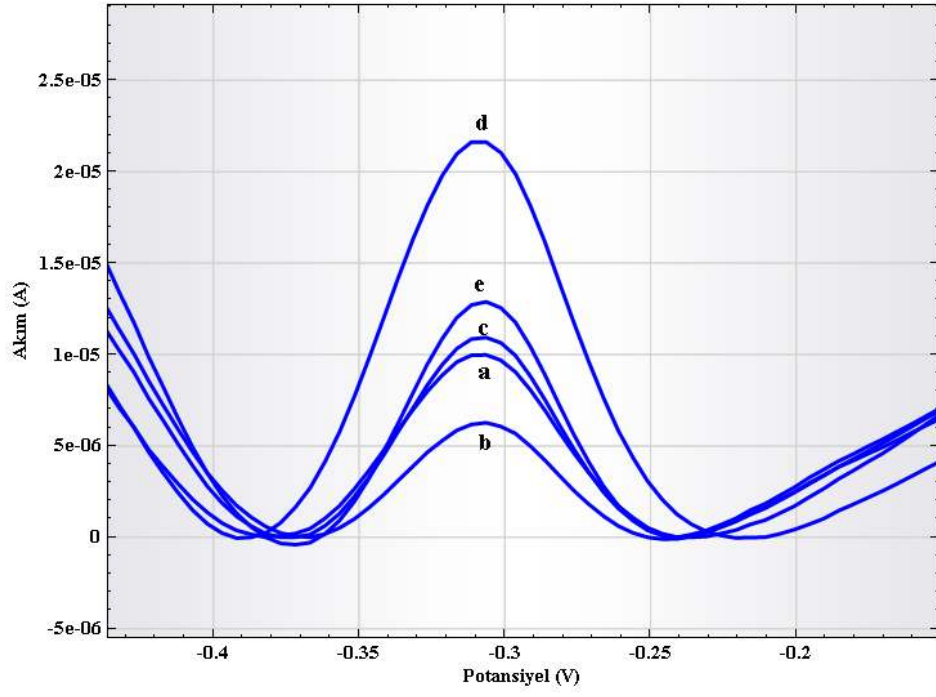
Şekil 3.7 Tarama hızlarının kareköküne karşılık çizilen pik akım değerleri

Tablo 3.3 KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun 200 μM EP çözeltisindeki pik potansiyelleri ve pik akım değerleri

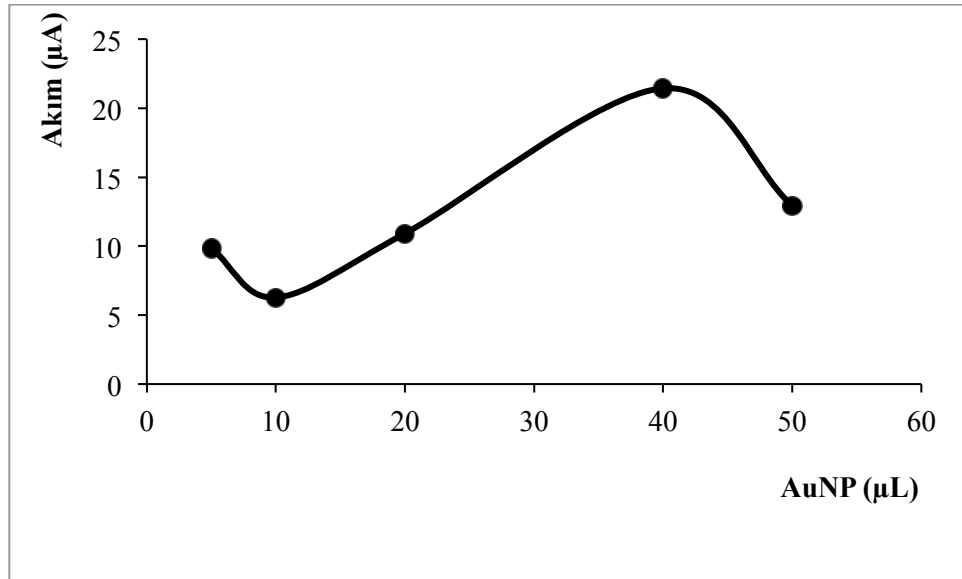
Tarama Hızı (mV)	Tarama Hızının Karekökü ($v^{1/2}$)	Pik Potansiyeli (V)	Akım (μA)
5	2,2361	0,2937	1,0193
20	4,4721	0,2937	3,4952
50	7,0711	0,3035	13,601
100	10	0,3132	18,867
200	14,1421	0,323	29,794
500	22,3606	0,3474	46,797
1000	31,6227	0,3743	66,581

3.3 Altın Nanopartikül Miktarının Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

Şekil 3.8 ve 3.9 de AuNP miktarının (5, 10, 20, 40 ve 50 μL) 200 μM EP'nin akım cevabına etkisi gösterildi. En yüksek akım değeri 40 μL AuNP içeren elektrotla alındı. Bundan sonraki denemelerde AuNP miktarı olarak 40 μL kullanıldı. Yapılan çalışmalarda AuNP miktarındaki artışa bağlı olarak akım değerinde görülen azalma dirençteki artmaya, grafitin aktif oranının azalmasına ve elektrotun çift tabakasında meydana gelen kapasitif akıma bağlanabilir. (Liu S., ve ark. 2002)



Şekil 3.8 a)5, b)10, c)20, d)40 ve e)50 μL AuNP içeren KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun 200 μM EP çözeltisindeki diferansiyel puls voltamogramları



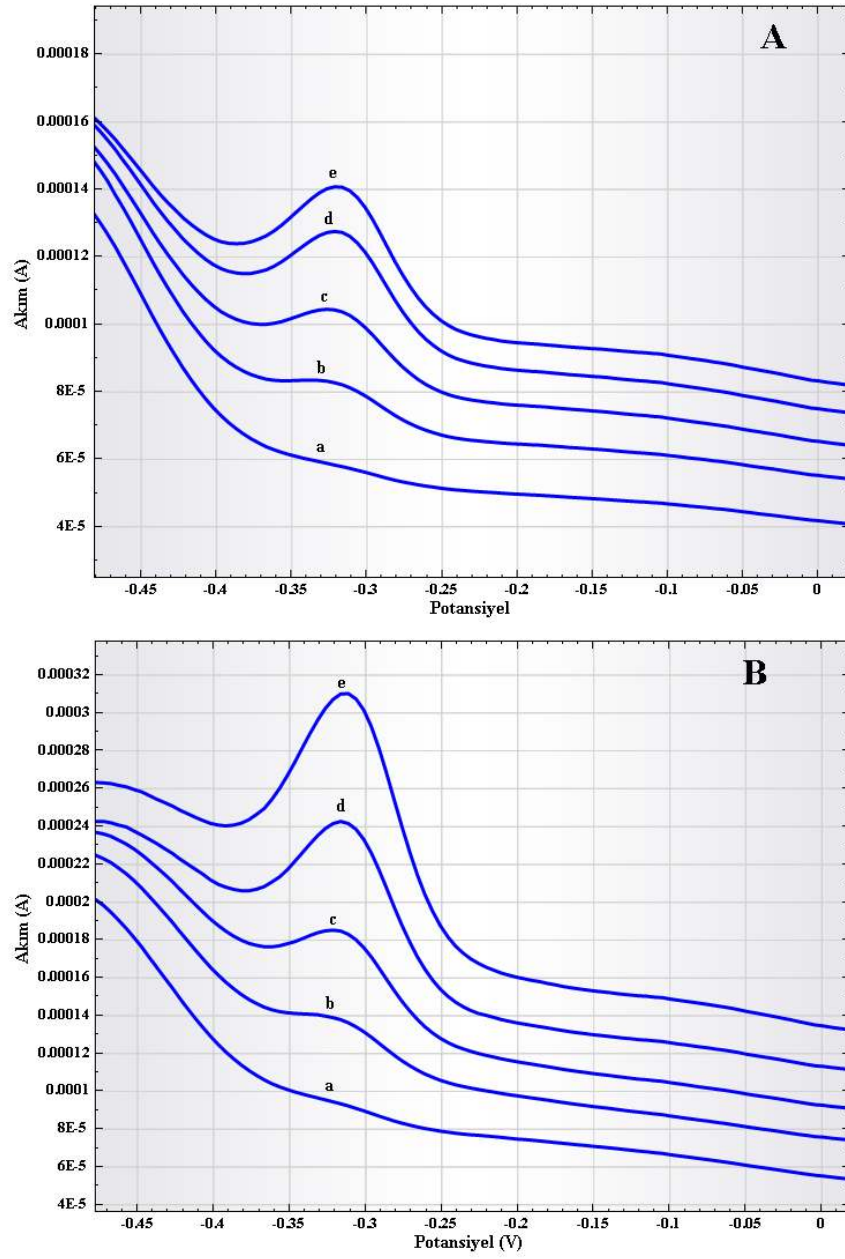
Şekil 3.9 200 μM EP için AuNP miktarının etkisi

Tablo 3.4 AuNP miktarlarına bağı olarak pik potansiyelleri ve pik akım değerleri

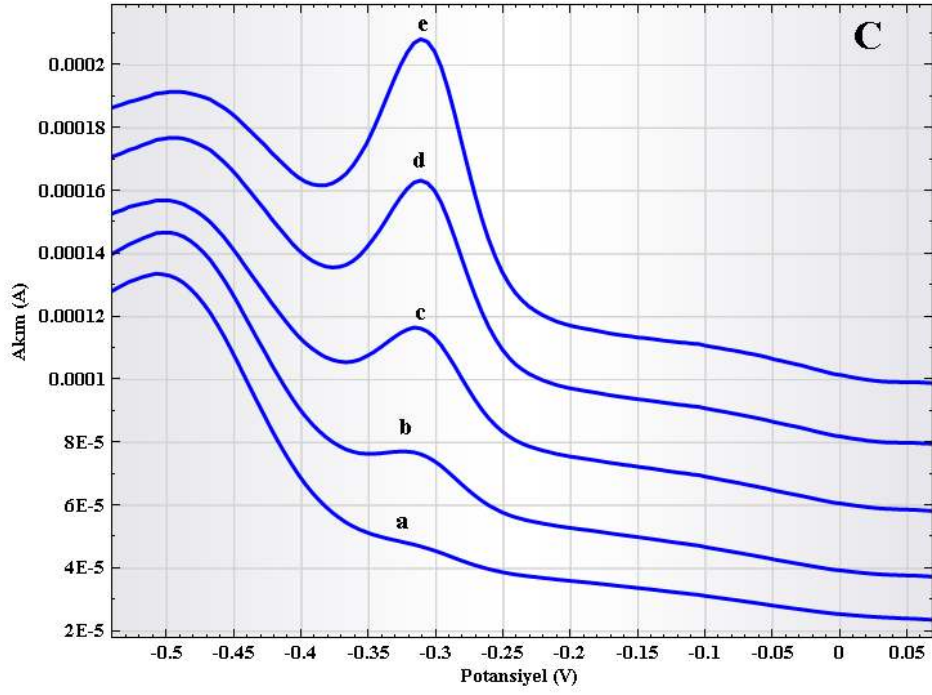
AuNP (μL)	Pik Potansiyeli (V)	Akım (μA)
5	-0,3064	9,845
10	-0,3065	6,2775
20	-0,3071	10,92
40	-0,3114	21,44
50	-0,3064	12,92

3.4 Enzim Aktivitesinin Biyosensör Cevabı Üzerine etkisi

Kullanılan Tirozinaz miktarlarının biyosensör cevabına etkisi şekil 3.10 da gösterildi. Şekil 3.11 de görüldüğü gibi enzim aktivitesi 156,54 U/mL den 313,087 U/mL ye çıktığında akım değerlerinde ve doğrusallıkta artış gözlemlendi. 626,174 U/mL enzim kullanılarak hazırlanan biyosensörde ise akım farkının ve doğrusallığın 313,087 U/mL enzim kullanılarak hazırlanan biyosensöre oranla düştüğü görülmüştür. Bunun nedeni enzim konsantrasyonunun artmasının AuNP'ün dağılımını azaltması ve dolayısıyla iletkenliği azaltması olarak açıklanabilir. 313,087 U/ml en iyi enzim miktarı seçilmiş ve bundan sonraki çalışmalar bu parametre dikkate alınarak yapılmıştır.



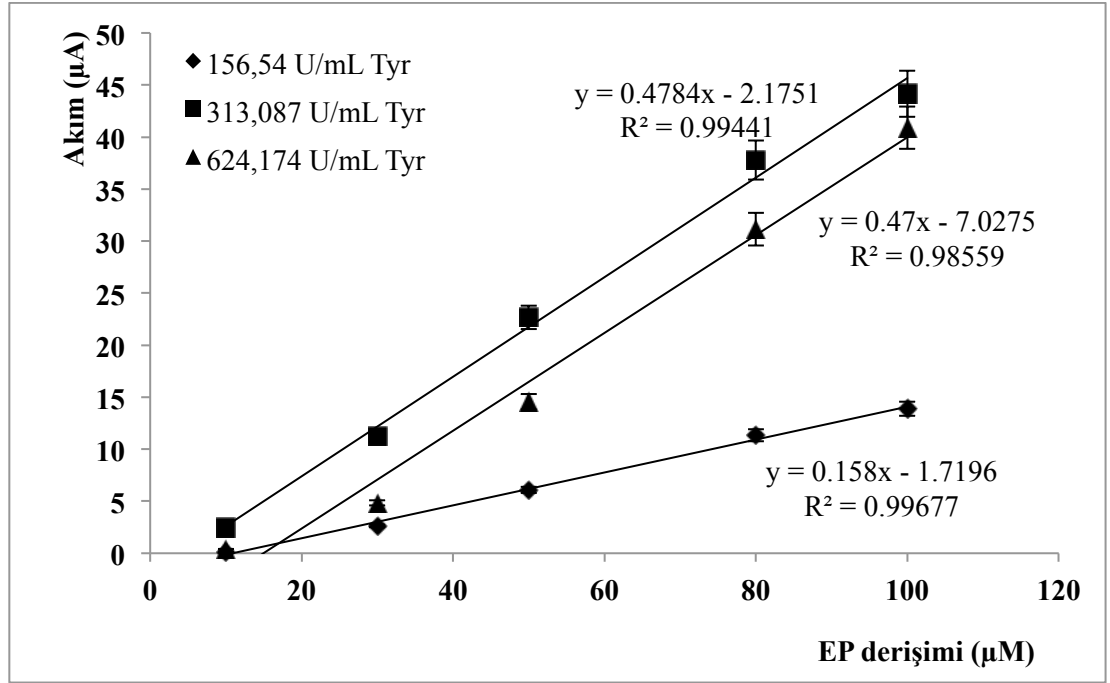
Şekil 3.10 A) 156,54, B) 313,087 ve C) 626,174 U/mL tirozinaz enzim aktivitesi içeren KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun a) 10, b) 30, c) 50, d) 80 ve e) 100 μM EP çözeltilerindeki diferansiyel puls voltamogramları



Şekil 3.10 A) 156,54, B) 313,087 ve C) 626,174 U/mL tirozinaz enzim aktivitesi içeren KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun a) 10, b) 30, c) 50, d) 80 ve e) 100 μM EP çözeltilerindeki diferansiyel puls voltamogramları (devamı)

Tablo 3.5 Tirozinaz miktarlarına bağlı olarak elde edilen akım değerleri

EP derişimi (μM)	Tirozinaz aktivitesinin akımları (μA)		
	156,54 U/mL	313,087 U/mL	624,174 U/mL
10	0,12	2,43	0,367
30	2,63	11,26	4,82
50	6,1	22,68	14,55
80	11,33	37,77	31,13
100	13,89	44,15	40,89

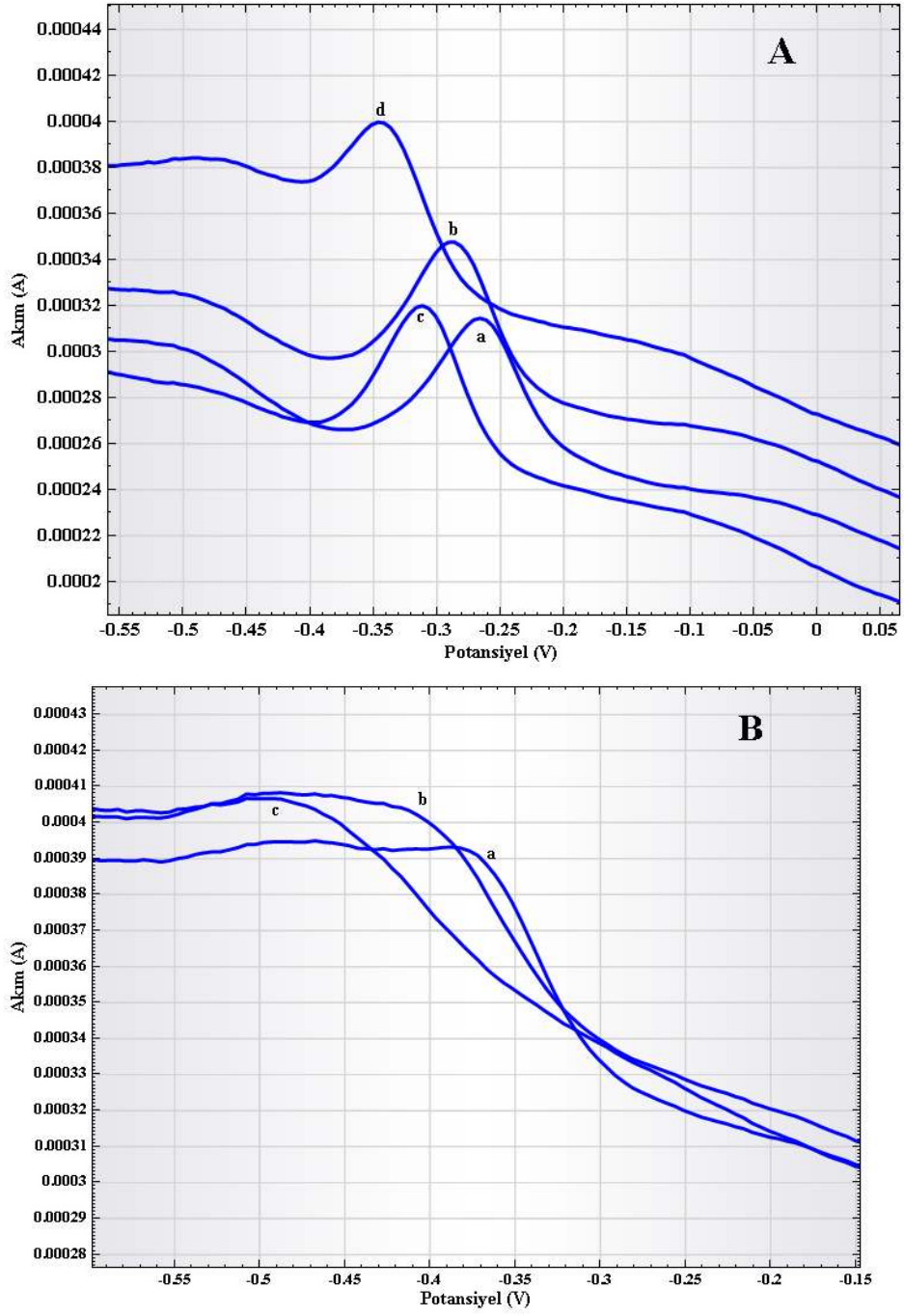


Şekil 3.11 Tirozinaz aktivitesinin biyosensör cevabına etkisi

3.5 pH ve Oksijen Geçirme Süresinin Biyosensör Cevabı Üzerine Etkisi

Protein yapısındaki enzim moleküllerin katalitik aktivitesi pH a bağımlı olarak etkilenebilir. pH-aktivite değişimi hakkındaki bilgiler biyosensörün çalışma koşullarının belirlenmesi açısından önemlidir. Epinefrin biyosensörünün optimum pH sınını belirlemek amacıyla yapılan denemelerde elde edilen pH ve pik akım değerleri arasında çizilen grafik ve diferansiyel puls voltamogramları şekil 3.12 ve 3.13 de verilmiştir. Optimum pH değeri 7,0 olarak bulundu. Bulunan pH değeri serbest enzimin pH değeri ile uyumludur.

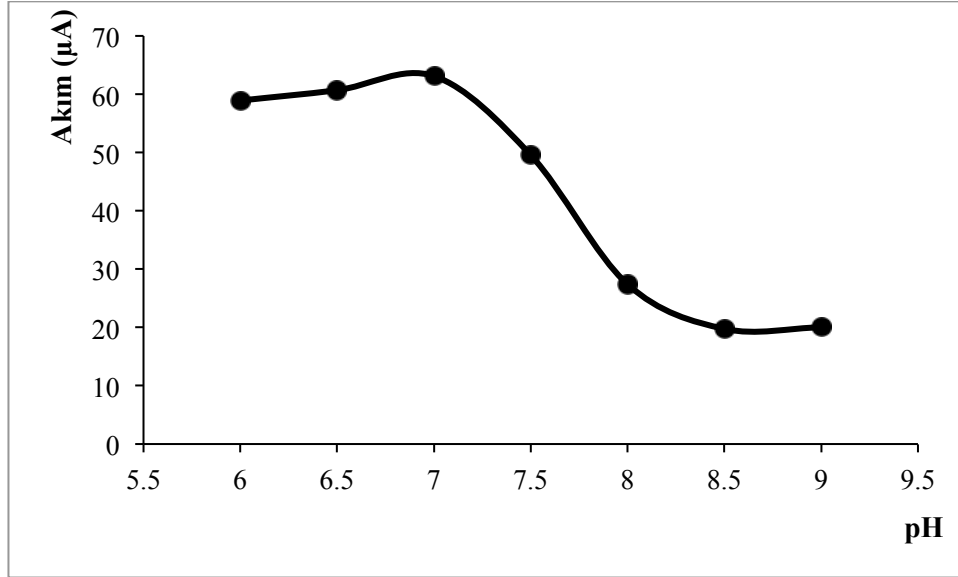
Aktif merkezinde Cu^{2+} atomları bulunan tirozinaz enzimin rejenere olması bakımından ortamdaki geçirilen oksijen süresi önemlidir. EP ile enzimatik reaksiyon sonucunda EP yükseltgenerek kinon yapısı oluşurken tirozinaz enzimi indirgen forma dönüşür. Bu durumda aktif merkezdeki indirgenen Cu^{2+} atomlarının yükseltgenmesi gerekir. Bu amaçla reaksiyon ortamından ölçüm öncesi 5, 10, 15 ve 20 dk oksijen gazı geçirilerek biyosensör cevabına etkisi incelendi. Şekil 3.14 ve 15 den görüldüğü gibi optimum oksijen gazı geçirme süresi 10 dk olarak bulunmuştur.



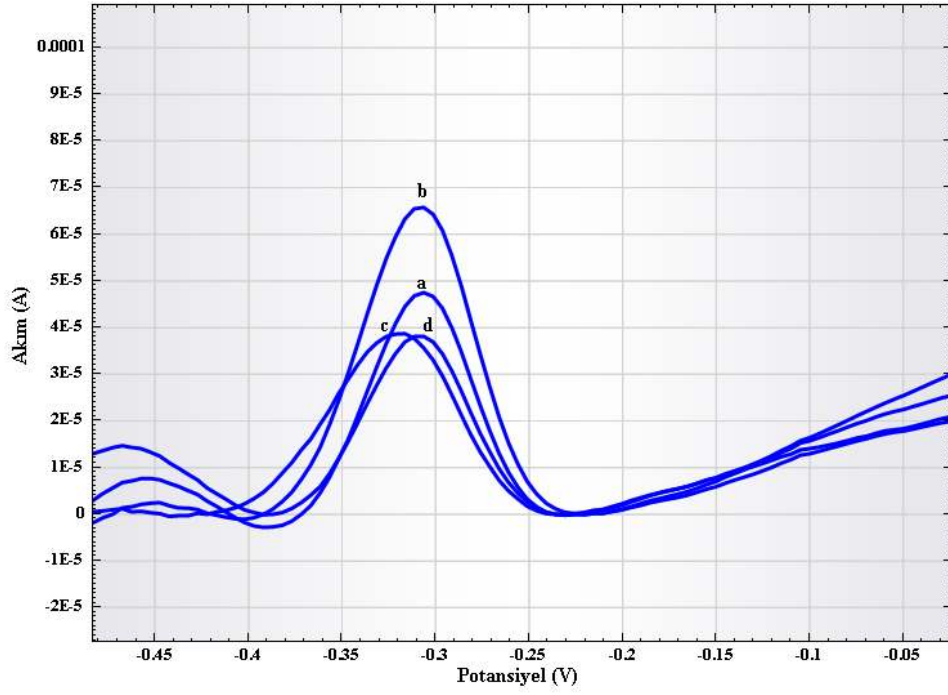
Şekil 3.12 A) pH a)6,0, b)6,5, c) 7,0, d)7,5 ve B) pH a)8,0, b)8,5, c)9,0 için 50 mM fosfat tamponunda hazırlanmış 200 μ M EP için elde edilen DP'ler

Tablo 3.6 KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun farklı pH'lardaki pik potansiyel pozisyonları ve akım değerleri

pH	Pik Potansiyeli (V)	Akım (μ A)
6	-0,2661	58,95
6,5	-0,2862	60,7
7	-0,3114	63,12
7,5	-0,3464	49,57
8	-0,3719	27,41
8,5	-0,397	19,76
9	-0,4575	20,03



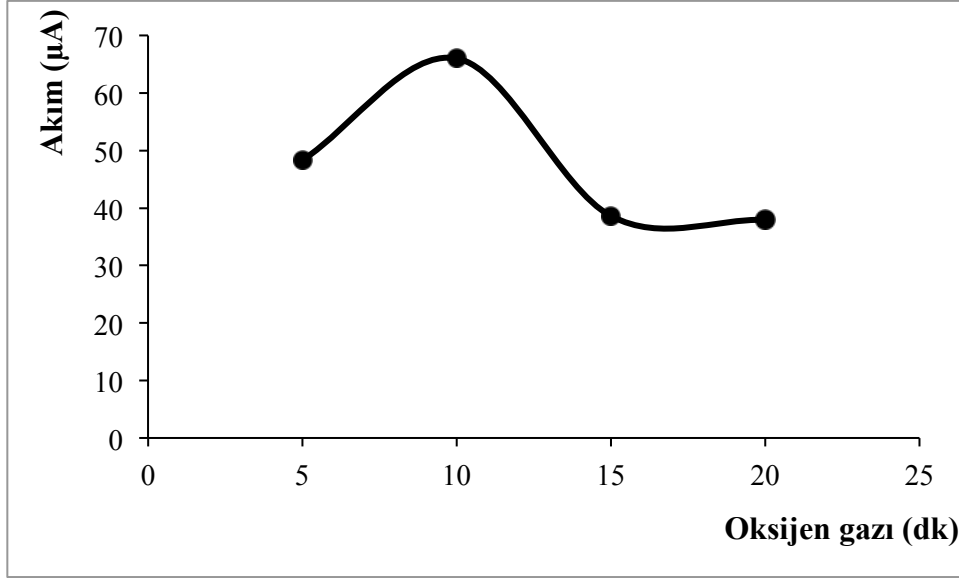
Şekil 3.13 pH değerlerine karşılık pik akım değerleri grafiği



Şekil 3.14 KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun a) 5, b) 10, c) 15 ve d) 20 dk oksijen gazı geçirilmiş EP çözeltilerindeki DP'leri

Tablo 3.7 Oksijen gazı geçirme süresine bağlı olarak pik potansiyel pozisyonları ve pik akım değerleri

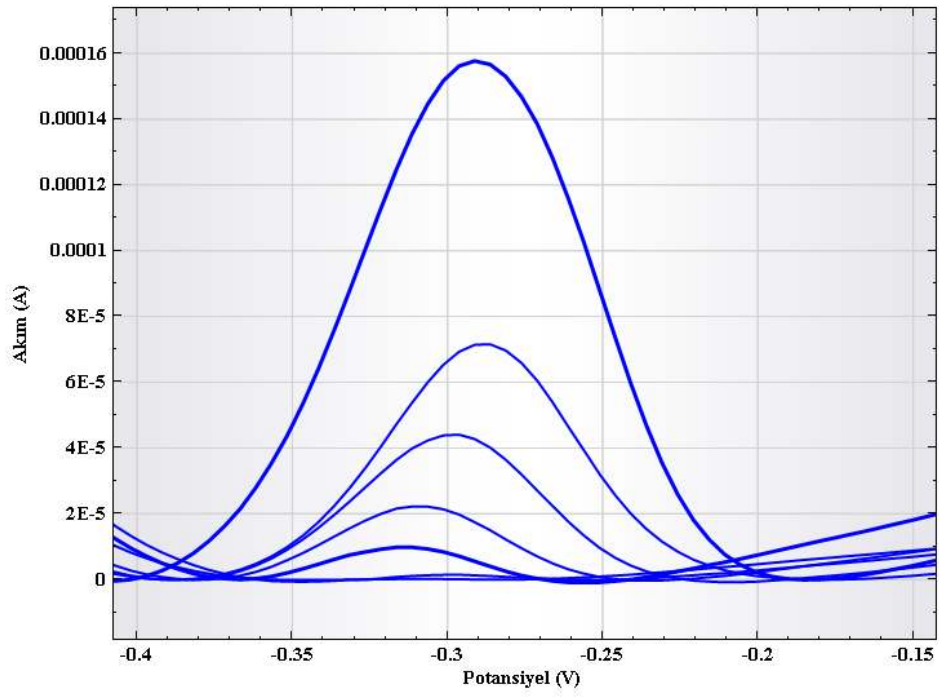
Oksijen Gazı (dk)	Pik Potansiyeli (V)	Akım (μA)
5	-0,3064	48,26
10	-0,3064	66,02
15	-0,3165	38,62
20	-0,3086	37,95



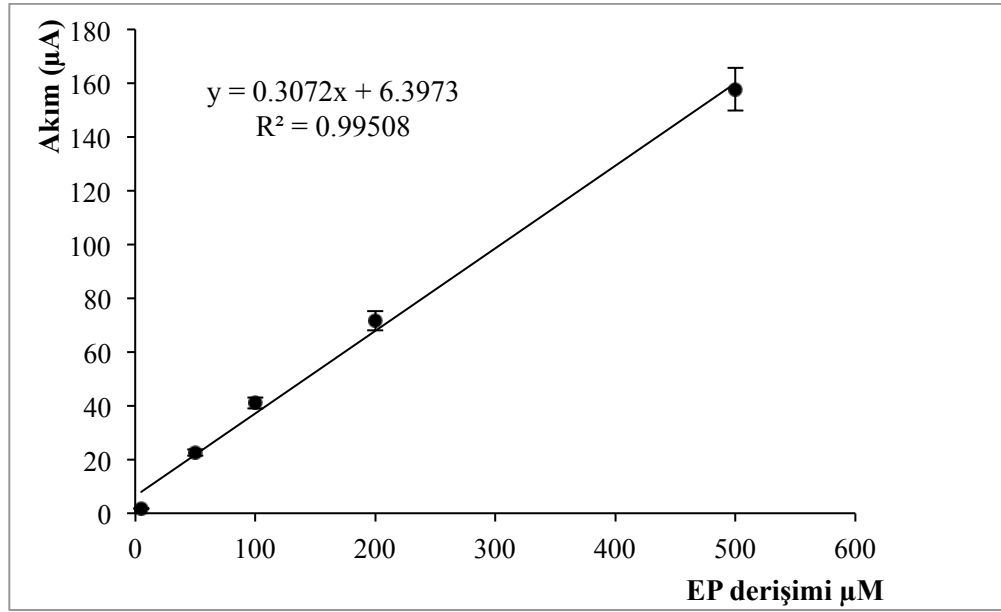
Şekil 3.15 Oksijen gazı geçirme süresine karşılık pik akımları grafiği

3.6 Epinefrin İçin Doğrusal Tayin Aralığı

Geliştirilen KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon modifiye biyosensörünün hazırlama ve çalışma koşullarının optimizasyonu sonrasında, karakterizasyonu amacıyla Epinefrin için ölçüm aralığı belirlenmiştir. Şekil 3.16 gösterilen diferansiyel puls voltamogramları ile elde edilen sonuçlarla Şekil 3.17 de EP konsantrasyonlarına karşılık akım değerleri arasında çizilen grafik verilmiştir. Şekil 3.17 de görüldüğü gibi EP nin 5 ile 500 μM arasındaki derişim aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur ($r^2 = 0,9951$). 500 μM üzerindeki EP derişimlerinde grafik doğrusallıktan sapmaktadır.



Şekil 3.16 KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun 5 ile 500 µM derişimlerindeki EP çözeltisindeki diferansiyel puls voltamogramları



Şekil 3.17 KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodun 5 ile 500 µM EP derişimlerine karşı pik akım değerleri grafiğı (Elektrodun çalışma aralığı)

Tablo 3.8 EP derişimlerinin pik potansiyel pozisyonları ve pik akım değerleri

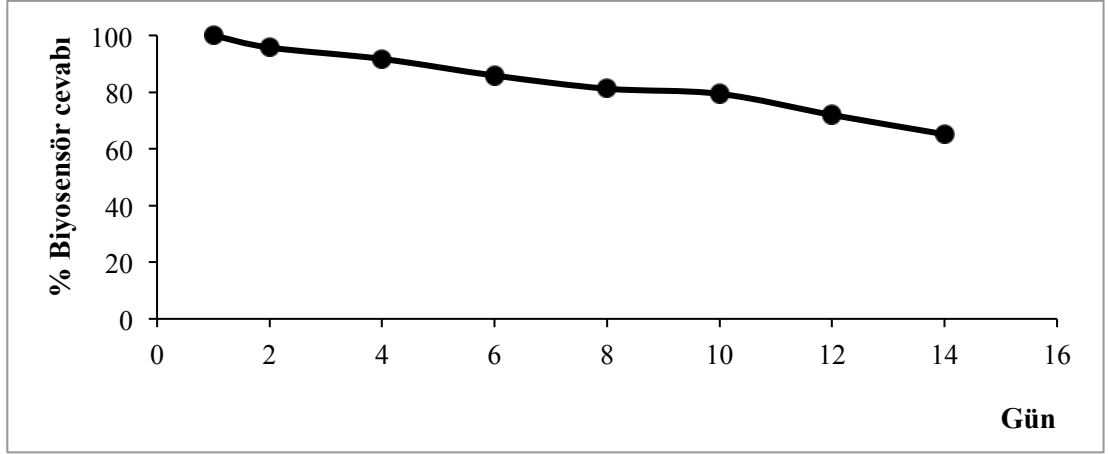
EP derişimi (μM)	Pik Potansiyeli (V)	Akım (μA)
5	-0,29633	1,79
50	-0,29633	22,54
100	-0,29633	41,05
200	-0,28625	71,55
500	-0,29129	157,7

3.7 Biyosensörün Depo Kararlılığı ve Tekrarlanabilirliği

Hazırlanan biyosensör her iki günde bir olacak şekilde 200 μM EP çözeltisinde 14 gün boyunca takip edilmiştir (Şekil 3.18). Biyosensörün bekledikçe pik akımı değerlerinde düşme ve potansiyel pozisyonlarında kayma olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.9). 14 gün sonunda elektrodun hala % 65 oranında cevap verdiği görülmüştür.

Tablo 3.9 Biyosensörün 14 gün sonunda elde edilen % biyosensör cevabı ve pik akım değerleri

Gün	Akım (μA)	Biyosensör Cevabı (%)
1	77,08	100
2	73,81	95,75
4	70,71	91,73
6	66,19	85,87
8	62,62	81,24
10	61,22	79,42
12	55,47	71,96
14	50,22	65,15



Şekil 3.18 Depo karallığı grafiği

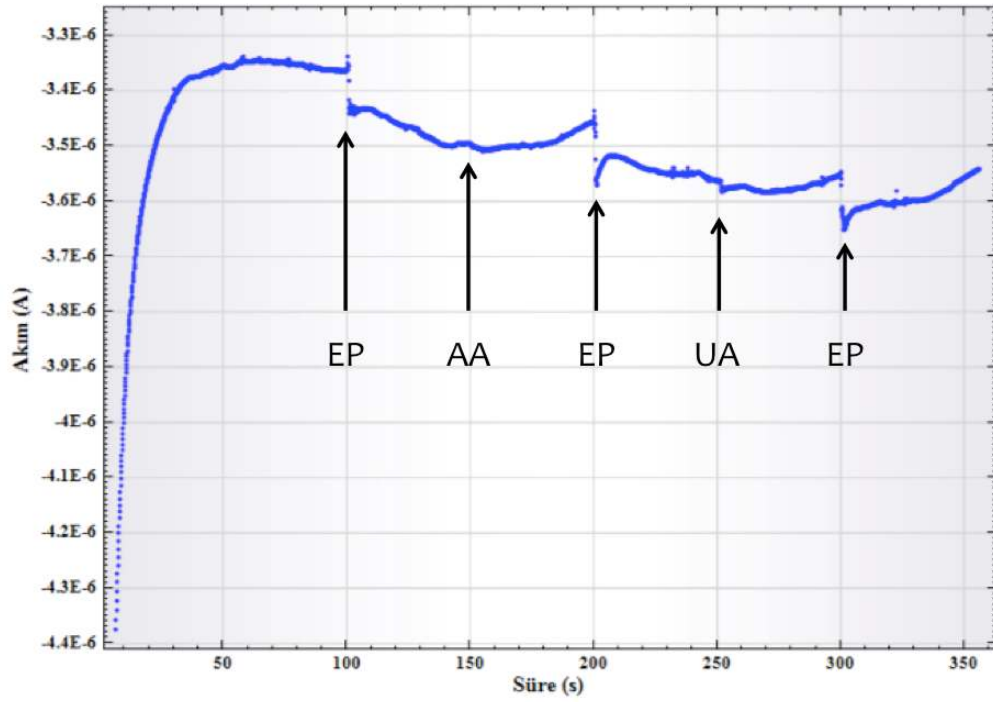
Bu çalışmada hazırlanan Epinefrin biyosensörünün tekrar kullanılabilirliği incelendi. Çözelti içerisinde 200 μM Epinefrin olacak şekilde 7 kez tekrar edilen ölçümler ve çizilen standart grafik yardımıyla örnek derişimleri saptanmış ve ortalama değeri ($\bar{x}$), standart sapma (S.S) ve varyasyon katsayısı (V.K.) sırasıyla; $218,56 \pm 3,53 \mu\text{M}$ ve % 1,615'dir.

Tablo 3.10 Özdeş elektrotların 200 μM EP çözeltisindeki pik potansiyelleri ve pik akımı değerleri

Hazırlanan elektrot numarası	Pik Potansiyelleri (V)	Akım (μA)	Konsantrasyon (μM)
1	-0,3114	72,47	215,08
2	-0,3014	74,88	222,92
3	-0,3014	74,54	221,81
4	-0,3014	73,70	219,08
5	-0,3014	73,57	218,66
6	-0,3014	74,08	220,32
7	-0,28625	71,55	212,08

3.8 Biyosensörün Substrat Spesifikliği

Biyosensörün AA ve UA'e olan cevabını incelemek için yapılan amperometrik çalışmada EP ilave edilen 100., 200. ve 300. s'de akım farklanması görülürken AA'ın ilave edildiği 150. s ve UA'ın ilave edildiği 250. s'de akım değerlerinde farklanma görülmemiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 (-340) mV'da biyosensöre uygulanan substrat spesifikliğinin incelenmesi. 100. s. de 200 μ M EP, 150. s. de 200 μ M AA, 200. s. de 200 μ M EP 250. s. de 200 μ M UA ve 300. s. de tekrar 200 μ M EP ilave edilmiştir.

3.9 Gerçek Örnek Analizi

İçerisinde 200 μ M EP olacak şekilde seyreltilen adrenalin ampüllerin KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrodu ile (+0,8) ile (-0,8) V aralığında 50 mV tarama hızı ile alınan DP voltogramı ortalama değer, standart sapma $193,3 \pm 2.89$ ve varyasyon katsayısı % 1,49 olarak bulundu (n=3).

BÖLÜM DÖRT

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada karbon pasta elektrot, altın nanopartikül ile modifiye edilerek Tirozinaz biyosensörü hazırlandı ve hazırlanan bu biyosensör ile Epinefrin tayini gerçekleştirildi. İlk aşama olarak AuNP sentezlendi ve karakterize edildi. Ortalama 15,82 nm çapında homojen nanopartikül elde edildi. Yapılan denemelerde ilk olarak AuNP'nin ve Tirozinaz'ın etkisi olup olmadığı araştırıldı. Döngüsel voltamogramlar tayin edilecek pik potansiyellerinde AuNP'ün ve Tirozinaz'ın katalitik etkinliklerinin varlığını kanıtlamaktadır.

Tarama hızının etkisi incelendiğinde; tarama hızlarına karşılık akımlar çizildiğinde eğimin 0,5'e yaklaşması (grafik 3.7) ve tarama hızlarının karekökleri alınarak akım değerlerine karşılık çizilen grafikte okunan korelasyon katsayısının değerinin 0,9960 (grafik 3.7) olması bize reaksiyonun difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir.

KP/AuNP/Tirozinaz/Nafyon elektrotlarda 40 µL AuNP'ye kadar pik akımlarında artış olmaktadır. Bu artış nanopartikülün elektrokatalitik olarak etkinliğini göstermektedir. Nanopartiküller elektrot yüzeyindeki elektron transferini arttırmıştır. 40 µL'den daha fazla AuNP ilave edildiğinde hazırlanan karbon pastanın aktif grafit oranının azalması ve direnç de bir artışa meydana gelmesi ile pik akımda bir azalma gözlenmiştir. Bu durum elektrodun çift tabakasında meydana gelen kapasitif akıma bağlanabilir.

Enzim aktivitesinin optimizasyonunda enzimin aktivitesi arttıkça o-kinon türlerin indirgenmesinin artmasıyla pik akımlarında artış meydana gelmiştir. Denemelerde enzim korelasyon katsayısı iyi olan ($r^2 = 0,9944$) ve akım değerlerini en yüksek veren 313,087 U/mL lik enzim aktivitesi kullanıldı.

Oksijen gazı geçirme süresi optimize edilerek 10 dk değeri bulundu. Oksijen Enzimin aktif merkezinde bulunan Cu atomlarının rejenerasyonunu sağlamaktadır. Çalışmalar, ortamdan 10 dk süreyle oksijen gazı geçirilerek yapıldı. Serbest Tirozinaz enziminin optimum pH aktivitesi 6,5-7,0 aralığındadır. Aktif merkezinde bulunan Cu^{2+} iyonlarının elektrokimyasal reaksiyonları, His aminoasidinin yükü ve enzimin üç boyutlu yapısı enzimin optimum pH sını belirler. Denemelerde optimum pH 7,0 olarak bulundu ve çalışmalarda bu pH kullanıldı.

Biyosensörün optimizasyon koşulları tamamlandıktan sonra, belirlenen değerlerler altında doğrusal tayin aralığı belirlendi. 5 ile 500 μM arasındaki EP konsantrasyona karşılık akımlar alındı. Bu çalışma aralığında biyosensörün korelasyon katsayısı 0,9951 olarak bulundu. 500 μM EP derişimin üzerinde ki DP akımlarında çalışma elektrodunun artık EP için doygunluğa ulaştığı görülmüştür.

Biyosensörün tekrarlanabilirliği için standart sapma (S.S) : 3,53 (n=7) ve varyasyon katsayısı (% V.K) : % 1,62 olarak bulundu. Tayin alt sınırı hesabı; 5 μM EP için okunan akım değerlerinin (n=3) standart sapmasının hesaplanması ($\pm 0,24 \mu\text{M}$) ve bunun $(3 \times \text{S.S})/m$ formülünde yerine konması ile 2,29 μM olarak hesaplandı. EP tayinine yönelik yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, tasarlanan karbon pasta elektrodun iyi bir çalışma aralığına ve tayin alt sınırına sahip olduğu söylenebilir.

Biyosensörün depo kararlılığına bakıldığında 14. günde sensör hala % 65 oranında cevap vermektedir. Biyosensörün yüzeyinde bulunan flor yüklü iyonlar içeren Nafyon çözeltisi sayesinde AA ve UA herhangi bir girişimde bulunmamıştır. Bu çalışmada geliştirilen biyosensörün diğer elektrotlarla karşılaştırılması tablo 4.1'de verilmiştir.

Sonuç olarak tez kapsamında hazırlanan altın nanopartikül modifiyeli Tirozinaz biyosensörü kolay hazırlanması, ucuz olması, ekstra saflaştırma basamakları gerektirmemesi gibi avantajları sayesinde Epinefrin tayini için elektrokimyasal sistemlerde kullanılma avantajına sahiptir.

Tablo 4.1 Geliştirilen biyosensörün diğer biyosensörle karşılaştırılması

Elektrot türü	Method	Çalışma aralığı (μM)	Tayin alt sınırı (μM)	Kaynaklar
Au/MPA/CA/AuNP/AuE	DV ve DP	0,1-700	0,042	Luczak, 2009
Nano-Au/CA/GC	DV ve DP	0,1-500	0,040	Yang ve ark., 2007
TDPA/CA/AuNP/AuE	DV	0,1-0,75	0,082	Luczak, 2009
Au-NPs/AuE	DV	0,1-1 ve 10-200	0,060	Wang ve ark., 2006
PPy/AuNP/SWCNT- AuE	DV ve DP	0,04-0,1	0,020	Lu ve ark., 2011
Aktiflendirilmiş/GC	DP	0,1-500	0,089	Qiao ve ark., 2008
Poli (kafeik asit)/GC	DV	2-80	0,200	Ren ve ark., 2006
PXSP/GC	DV ve DP	0,1-560	0,080	Enfasi ve ark., 2010
AuNP/PAn-LB/GC	DV ve EİS	0,4-100	0,080	Zou ve ark., 2013
KP/AuNP/Tirozinaz /Nafyon	DV ve DP	5-500	2,290	Bu çalışma

Kısaltmalar: DV: döngüsel voltametri, DP: diferansiyel pulse volatmetri, EİS: elektrokimyasal impedans spektroskopisi, MPA: merkaptopropiyonik asit PPy: polipirrol, SWCNT: tek duvarlı karbon nanotüp, AuE: altın elektrot, TDPA: tiyodipropiyonik asit, CA: sisteamin, GC: camı karbon elektrot, PXSP: poli (p-kilenosülfitelein), PAn: polianalin, LB: Langmuir-Blodgett teknolojisi

KAYNAKLAR

- Antiochia, R., Vinci, G. ve Gorton, L. (2013). Rapid and direct determination of fructose in food: A new Osmium-Polymer mediated biosensor. *Food Chemistry*, 140(4), 742–747.
- Arotiba, O., Owino, J., Songa, E., Hendricks, N., Waryo, T., Jahed, N. ve diğeri. (2008). An electrochemical DNA biosensor developed on a nanocomposite platform of gold and poly(propyleneimine) dendrimer. *Sensors*, 8, 6791–6809.
- Bannister, A. J. ve Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395.
- Canbay, E. ve Akyilmaz E. (2014). Design of a multiwalled carbon nanotube-Nafion-cysteamine modified tyrosinase biosensor and its adaptation of dopamine determination. *Analytical Biochemistry* 444(2014), 8-15
- Cao, Y., Wang, J., Xu, Y. ve Li, G. (2010). Sensing purine nucleoside phosphorylase activity by using silver nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 25, 1032–1036.
- Cui, R., Huang, H., Yin, Z., Gao, D. ve Zhu, J. J. (2008). Horseradish peroxidase-functionalized gold nanoparticle label for amplified immunoanalysis based on gold nanoparticles/carbon nanotubes hybrids modified biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 1666–1673.
- Ensafi, A., Taei, M., ve Khayamian, T. (2010). Simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly(p-xylenolsulfonephthalein) modified glassy carbon electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2), 480–487.

- Feinberg, A. P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, 447(7143), 433–440.
- Ghanavati, M., Azad, R. R. ve Mousavi, S. A. (2014). Amperometric inhibition biosensor for the determination of cyanide. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 190, 858–864.
- Qiao, J. X., Luo, H. Q., ve Li, N. B. (2008). Electrochemical behavior of uric acid and epinephrine at an electrochemically activated glassy carbon electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62(1), 31–35.
- Hardy, N. J. ve Richardson, T. H. (2008). Temperature effects on the optical properties of thiol encapsulated gold nanoparticle thin films. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 321, 285–291.
- Himmelwright, R. ve Eickman, N. (1980). Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of Neurospora tyrosinase: comparison to hemocyanins. *Journal of the American Chemical Society*, 102(c), 7339–7344.
- Huang, X., Li, Y., Wang, P. ve Wang, L. (2008). Sensitive determination of dopamine and uric acid by the use of a glassy carbon electrode modified with poly(3-methylthiophene)/gold nanoparticle composites. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 1563–1568.
- Jaenisch, R. ve Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33(Suppl), 245–254.
- Katz E, W. I. ve Wang, J. (2004). Electroanalytical and bioelectroanalytical systems based on metal and semiconductor nanoparticles. *Electroanalysis*, 16, 19–44.

- Kaufman, S., Shiman, R. ve Akino M. (1971). Solubilization and partial purification Of Tyrosine Hydroxylase from bovin adrenal medulla. *The Journal of biological chemistry*, 246 (5), 1330-1340.
- Kotanen, C. N., Moussy, F. G., Carrara, S., ve Guiseppi-Elie, A. (2012). Implantable enzyme amperometric biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 35(1), 14–26.
- Lamouroux, A., Vigny, A., Faucon Biguet, N., Darmon, M. C., Franck, R., Henry, J. P. ve Mallet, J. (1987). The primary structure of human dopamine-beta-hydroxylase: insights into the relationship between the soluble and the membrane-bound forms of the enzyme. *The EMBO Journal*, 6(13), 3931–3937.
- Li, B., Zhang, Z. ve Jin, Y. (2002). Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for determination of unbound dopamine in rabbit blood with on-line microdialysis sampling. *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 585–589.
- Liu, Y. ve Wei, M. (2014). Development of acetylcholinesterase biosensor based on platinum-carbon aerogels composite for determination of organophosphorus pesticides. *Food Control*, 36(1), 49–54.
- Lu, X., Li, Y., Du, J., Zhou, X., Xue, Z., Liu, X., ve Wang, Z. (2011). A novel nanocomposites sensor for epinephrine detection in the presence of uric acids and ascorbic acids. *Electrochimica Acta*, 56(21), 7261–7266.
- Luczak, T. (2009). Epinephrine oxidation in the presence of interfering molecules on gold and gold electrodes modified with gold nanoparticles and thiodipropionic acid in aqueous solution. A comparative study. *Electroanalysis*, 21(23), 2557–2562.

- Luczak, T. (2009). Comparison of electrochemical oxidation of epinephrine in the presence of interfering ascorbic and uric acids on gold electrodes modified with S-functionalized compounds and gold nanoparticles. *Electrochimica Acta*, 54(24), 5863–5870.
- Maghssoodi, S., Gholami, Z., Chourchian, H., Mortazavi, Y. ve Khodadadi, A. A. (2009). A novel biosensor using entangled carbon nanotubes layer grown on an alumina substrate by CCVD of methane on FeOx-MgO. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 141, 526–531.
- Mann, J. J., Currier, D., Quiroz, J. A. ve Manji, H. K. (2012). *Neurobiology of Severe Mood and Anxiety Disorders. Basic Neurochemistry*, 1021–1036
- Nurul Karim, M. ve Lee, H. J. (2013). Amperometric phenol biosensor based on covalent immobilization of tyrosinase on Au nanoparticle modified screen printed carbon electrodes. *Talanta*, 116, 991–996.
- Ozdemir, C., Yeni, F., Odaci, D. ve Timur, S. (2010). Electrochemical glucose biosensing by pyranose oxidase immobilized in gold nanoparticle-polyaniline/AgCl/gelatin nanocomposite matrix. *Food Chemistry*, 119(1), 380–385.
- Pawelek, J.M. ve Korner, A.M. (1982). The biosynthesis of mammalian melanin. *American Scientist*, 70(2), 136-145
- Rathod, D., Dickinson, C., Egan, D. ve Dempsey, E. (2010). Platinum nanoparticle decoration of carbon materials with applications in non-enzymatic glucose sensing. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 143, 547–554.
- Ren, W., Luo, H. Q., ve Li, N. B. (2006). Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid, epinephrine and uric acid at a glassy carbon electrode modified with caffeic acid. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(7), 1086–1092.

- Richards, E. J. (2006). Inherited epigenetic variation revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 7(5), 395–401.
- Rosi N.L. ve Mirkin, C. A. (2005). Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews*, 105, 1547–1562.
- Selvaraju, T., Das, J., Jo, K., Huh, C., Kim, T. K., Yang, H. ve Kwon, K. (2008). Nanocatalyst-based assay using DNA-conjugated Au Nanoparticles for electrochemical DNA detection. *Langmuir* 2008 (20), 9883–9888.
- Sfinchez-ferrer, A., Rodriguez-lpez, J. N., Garcla-cfinovas, F. ve Garcia-carmona, F. (1995). *Biochimica et. Biophysica Acta*, 1247, 1–11.
- Siangproh, W., Dungchai, W., Rattanarat, P. ve Chailapakul, O. (2011). Nanoparticle-based electrochemical detection in conventional and miniaturized systems and their bioanalytical applications: A review. *Analytica Chimica Acta*, 690(1), 10–25.
- Solomon, E.I. (1981) Binuclear copper active site: hemo-cyanin, tyrosinase and type 3 copper oxidases, in Copper proteins. *New York: Wiley*, 43-108.
- Thévenot, K. ve Toth, R. A. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification *Pure Applied Chemistry*, 71, 2333–2348.
- Ulubay, Ş. ve Dursun, Z. (2010). Cu nanoparticles incorporated polypyrrole modified GCE for sensitive simultaneous determination of dopamine and uric acid. *Talanta*, 80, 1461–1466.
- Wang, J., Einarsson, C., Murphy, C., Parini, P., Björkhem, I., Gafvels, M. ve Eggertsen, G. (2006). Studies on LXR- and FXR-mediated effects on cholesterol

- homeostasis in normal and cholic acid-depleted mice. *Journal of Lipid Research*, 47, 421–430.
- Wang, L., Bai, J., Huang, P., Wang, H., Zhang, L., ve Zhao, Y. (2006). Self-assembly of gold nanoparticles for the voltammetric sensing of epinephrine. *Electrochemistry Communications*, 8(6), 1035–1040.
- Wang, S., Lu, L. Ve Lin, X. (2004). A selective voltammetric method for uric acid detection at a glassy carbon electrode modified with electrodeposited film containing DNA and Pt-Fe(III) nanocomposites. *Electroanalysis*, 16(III), 1734–1738.
- Wang, Y., Wei, W., Zeng, J., Liu, X. ve Zeng, X. (2008). Fabrication of a copper nanoparticle/chitosan/carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose. *Microchimica Acta*, 160, 253–260.
- Yan, W., Feng, X., Chen, X., Hou, W. Ve Zhu, J. J. (2008). A super highly sensitive glucose biosensor based on Au nanoparticles-AgCl@polyaniline hybrid material. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 925–931.
- Yang, Z., Hu, G., Chen, X., Zhao, J., ve Zhao, G. (2007). The nano-Au self-assembled glassy carbon electrode for selective determination of epinephrine in the presence of ascorbic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54(2), 230–235.
- Yin, T. ve Qin, W. (2013). Applications of nanomaterials in potentiometric sensors. *Trends in Analytical Chemistry*, 51, 79–86.

Zhang, J. ve Oyama, M. (2005). Gold nanoparticle-attached ITO as a biocompatible matrix for myoglobin immobilization: Direct electrochemistry and catalysis to hydrogen peroxide. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 577, 273–279.

Zou, L., Li, Y., Cao, S., ve Ye, B. (2013). Gold nanoparticles/polyaniline Langmuir-Blodgett Film modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for detection of epinephrine and uric acid. *Talanta*, 117, 333–337.