

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**ELEKTROKİMYASAL İMPEDANS
SPEKTROSKOPİSİ İLE AFİNİTE TEMELLİ İNSÜLİN
VE İNSÜLİN ANTİKORU TAYİNİNE YÖNELİK
BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

Çağrı ALTUĞ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 405.05.01

Sunuş Tarihi: 26.03.2015

Bornova-İZMİR

2015

Çağrı ALTUĞ tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi İle Afinite Temelli İnsülin ve İnsülin Antikoru Tayinine Yönelik Biyosensörlerin Geliştirilmesi**” 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 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Erhan Dinçkaya
Raportör Üye	: Prof. Dr. Erol Akyılmaz
Üye	: Doç. Dr. Şenol Alpat
Üye	: Doç. Dr. Sibel Kılınç Alpat
Üye	: Doç. Dr. Dilek Odacı Demirkol

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi İle Afinite Temelli İnsülin ve İnsülin Antikoru Tayinine Yönelik Biyosensörlerin Geliştirilmesi” 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.

.... / /20..

Çağrı Altuğ

ÖZET**ELEKTROKİMYASAL İMPEDANS SPEKTROSKOPİSİ İLE AFİNİTE
TEMELLİ İNSÜLİN VE İNSÜLİN ANTİKORU TAYİNİNE YÖNELİK
BİYONSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

ALTUĞ, Çağrı

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

Mart, 2015, 170 sayfa

İnsülinin kandaki seviyelerinin belirlenmesi klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. Çünkü diyabet ve bazı durumlarda insülinomanın belirticidir. Diabetes mellitus, tüm dünyada en sık rastlanan endokrin hastalıktır. Diabetes mellitus karbohidrat, protein ve yağ metabolizmalarında anormalliklerle ve bunlara eşlik eden klinik ve biyokimyasal bulgularla karakterize kronik bir rahatsızlıktır.

İnsülin antikorları (IA) insülin tedavisi gören hastalarda sıklıkla görülür. Bu antikorlar hiperglisemi veya hipoglisemiye neden olmaz. Bu antikorlar neredeyse hiç insüline bağlanmazlar (düşük kapasite) eğer bağlanırsa asla ayrılmazlar (yüksek afinite). İkinci bahsedilen tipi insülin direncini tetikler fakat hipoglisemiye neden olmaz. Öte yandan, bilinen diğer bir hastalık olan insülin otoümmün sendromu (IAS) endojen insülin için organizma tarafından insülin antikoru üreterek hipoglisemiyi teşvik eder. Bu hastalığın ekzojen insülin almış kişilerde görüldüğü bilinmemektedir. Bu hastalıkta görünen antikorlar insülinde non-IAS antikorlarından daha zor ayrılır.

Bu tezde, insülin ve insülin antikoru miktarının belirlenebilmesi için 2 farklı biyosensör geliştirildi. Bu amaçla insülin ve insülin antikoru gibi katalitik reaksiyon özelliği olmayan moleküllerin tayini için gelecek vaat eden Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisinden (EIS) yararlanıldı. Biyosensörler için ayrıntılı optimizasyon çalışmaları yapıldı. Optimizasyon çalışmalarından sonra biyosensörlerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

Anahtar sözcükler: İnsülin, insülin antikorı, diyabet, insülin direnci, biyosensör, elektrokimyasal impedans spektroskopisi

ABSTRACT**DEVELOPMENT OF AFFINITY BIOSENSORS BASED ON
ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY FOR
DETERMINATION OF INSULIN AND INSULIN ANTIBODIES**

ALTUĞ, Çağrı

PhD in Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA

March, 2014, 170 pages

The detection of insulin level in blood is of great importance for clinical diagnostics, because it serves as a predictor of diabetes and insulinoma. Diabetes mellitus is the most common endocrine diseases in worldwide. It is a chronic disease in abnormalities of carbohydrates, protein and fat metabolism, and characterized by their associated clinical and biochemical findings.

Insulin antibodies (IA) are often seen in patients undergoing insulin treatment. These antibodies, however, do not cause hyperglycemia or hypoglycemia. These antibodies almost never bind to insulin (low capacity), or, if they do bind to insulin, they never separate (high affinity). The latter type may trigger increased insulin resistance, but they never induce hypoglycemia. On the other hand, a disease that is known to induce hypoglycemia by producing insulin antibodies to endogenous insulin, despite never having received insulin injections, is insulin autoimmune syndrome (IAS). The antibodies seen in this disease have lower affinity and higher capacity than non-IAS antibodies. These antibodies readily bind to insulin, and are difficult to separate from it.

In this thesis, two different biosensors were developed for the determination of insulin and insulin antibodies amount. For this purpose it was used the biosensors utilizing Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) for analyzing of the compounds that hasn't a catalytic reaction activity such as insulin and insulin antibodies. For biosensors, several optimization studies were carried out. After optimization studies, characterization studies of biosensors were realized.

Keywords: Insulin, insulin antibodies, diabetes, insulin resistance, biosensor, electrochemical impedance spectroscopy

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince değerli görüş ve deneyimlerinden yararlandığım başta hocam Sayın Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA olmak üzere tüm Biyokimya Bölümü öğretim elemanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Tez İzleme Toplantılarında kıymetli görüşlerinden yararlandığım Doç. Dr. Şenol ALPAT' a ve Prof. Dr. Erol AKYILMAZ' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca bana vermiş oldukları destek, göstermiş oldukları sabır ve fedakârlıklar için ANNEME ve BABAMA ve hep yanımda olan DOSTLARIMA, çalışma arkadaşlarıma minnettarım.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2010 FEN 02 no' lu proje ile desteklenmiştir. Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonuna teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxix
1. GİRİŞ	1
1.1 İnsülin	1
1.1.2 İnsülinin üç boyutlu yapısı	2
1.1.3 İnsülinin metabolizmaya etkileri	3
1.1.4 İnsülinin sentez ve salınım mekanizması	6
1.1.5 İnsülinin etki ve yıkım mekanizması	10
1.1.6 İnsülin direnci	11
1.2 İnsülin Antikoru	11
1.3 Elektrokimyasal Biyosensörler	12
1.3.1 Biyosensör teriminin kullanılmasıdaki sınırlamalar	15
1.4 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler	16
1.4.1 İmpedans kavramı	16
1.4.2 İmpedans spektroskopisi	17
1.4.3 İmpedans spektroskopisi temelli immünosensörler	20
2. MATERYAL VE METOD	23
2.1 Materyal	23
2.2 Metod	24
2.2.1 Cihaz ve sistemler	24
2.2.2 Elektrot temizleme	25
2.2.3 İmmobilizasyon parametrelerinin optimizasyonu	26
2.2.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarına ilişkin optimizasyon çalışmaları	28
2.2.5 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün karakterizasyonu	31

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

2.2.6 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoruna tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarına ilişkin optimizasyon çalışmaları	33
2.2.7 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoruna tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün ölçüm parametrelerinin karakterizasyonu	36
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	38
3.1 İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	38
3.1.1 Merkaptoundekanoik asit immobilizasyonu parametrelerinin Optimizasyonu.....	38
3.1.2 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) <i>n</i> -hidroksisüksinimid (NHS) immobilizasyonu parametrelerinin optimizasyonu.....	42
3.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile Afinite Temelli İnsülin Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensör Üzerine Çalışmalar.....	48
3.2.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarına ilişkin optimizasyon çalışmaları	48
3.2.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine geliştirilen yönelik biyosensörün ölçüm parametrelerinin karakterizasyonu	64
3.3 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi (EİS) ile Afinite Temelli İnsülin Antikoru Tayinine Yönelik Geliştirilen Biyosensör Üzerine Çalışmalar	102
3.3.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarına ilişkin optimizasyon çalışmaları	102
3.3.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün ölçüm parametrelerinin karakterizasyonu	117

4. GENEL DEĞERLENDİRME	152
KAYNAKLAR DİZİNİ	156
ÖZGEÇMİŞ	164

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 6 İnsülin molekülünün Zn^{+2} iyonu ile etkileşimi.....	2
1.2 İnsan ve fare langerhans adacıklarının hücresel dağılım ve sentezlediği hormonlar.....	7
1.3 İnsülinin sentez ve salınım mekanizması.....	8
1.4 Sağlıklı bir insanın gün içinde kan glukoz ve insülin düzeylerinin değişimi.....	10
1.5 Biyosensörlerin çalışma prensibinin genel şeması.....	13
1.6 Kompleks impedans grafiği	17
1.7 Randles ve Ershler impedans modeli	18
1.8 Paralel direnç ve kapasitans - Nyquist diyagramı	19
1.9 Randels hücresi - Nyquist diyagram	19
1.10 Randles hücre warburg impedansı - Nyquist diyagramı	19
1.11 Karakteristik faradaik impedans eğrisinin şematik anlatımı	20
1.12 Etiketli ve etiketsiz problemlerin karşılaştırılması.....	21
2.1 Ölçüm cihaz ve sistemleri	25
2.2 İmmobilizasyon aşamaları	27
3.1 MUA konsantrasyon optimizasyonu denemesi 1.....	38
3.2 MUA konsantrasyon optimizasyonu denemesi 2.....	39
3.3 MUA konsantrasyon optimizasyonu denemesi 3.....	39
3.4 MUA konsantrasyona bağlı devre direnci değişimi grafiği	40
3.5 MUA süre optimizasyonu denemesi	41
3.6 MUA inkübasyon süresi ile devre direnci değişimi grafiği	41
3.7 Altın elektrot yüzeyine MUA immobilizasyonu 20 mM MUA konsantrasyonu 60 dakika bekleme süresi.....	42
3.8 EDC-NHS konsantrasyonlarının optimizasyonu denemesi	43
3.9 EDC-NHS konsantrasyonu ile devre direnci değişim grafiği.....	43
3.10 Altın elektrot yüzeyine MUA immobilizasyonu 20 mM MUA konsantrasyonu 60 dakika bekleme süresi.....	44
3.11 EDC-NHS immobilizasyonunda pH'nın etkisi	45
3.12 EDC-NHS immobilizasyonunda pH ile devre direnci değişim grafiği.....	45
3.13 Altın elektrot yüzeyine MUA immobilizasyonu 20 mM MUA konsantrasyonu 60 dakika bekleme süresi.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil

Sayfa

3.14 EDC-NHS inkübasyon süresinin optimizasyonu denemesi	47
3.15 EDC-NHS immobilizasyonunda inkübasyon süresi ile ilgili devre direnci.değişim grafiği.....	47
3.16 Immobilizasyon parametreleri Nyquist diyagramları.....	49
3.17 Immobilizasyon parametreleri CV sonuçları.....	49
3.18 Immobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 1	50
3.19 Immobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 2	51
3.20 Immobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 3	51
3.21 Immobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 4	52
3.22 Immobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi ile ilgili devre direnci değişim grafiği.....	52
3.23 Inkübasyon süresi optimizasyonu: 15 dakika	54
3.24 Inkübasyon süresi optimizasyonu: 30 dakika	54
3.25 Inkübasyon süresi optimizasyonu: 45 dakika	55
3.26 Inkübasyon süresi optimizasyonu denemesi ile ilgili devre direnci değişim grafiği.....	55
3.27 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 6,8 HEPES için inkübasyon tamponu	56
3.28 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,0 HEPES için inkübasyon tamponu	57
3.29 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,2 HEPES için inkübasyon tamponu	57
3.30 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,4 HEPES için inkübasyon tamponu	58
3.31 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,6 HEPES için inkübasyon tamponu	58
3.32 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,8 HEPES için inkübasyon tamponu	59
3.33 Inkübasyon tamponu pH optimizasyonu ile ilgili devre direnci değişim grafiği	59
3.34 Inkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 1 a	60
3.35 Inkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 2 a..	61
3.36 Inkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 3 a..	61

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sekil

Sayfa

3.37 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu	
1 b.....	62
3.38 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu	
2 b.....	62
3.39 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu	
3 b.....	63
3.40 İnsülin bağlanması üzerine inkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonlarının etkisi	63
3.41 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü.....	64
3.42 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü.....	65
3.43 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü.....	65
3.44 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü.....	66
3.45 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 40 pM insülin varlığında impedans ölçümü.....	66
3.46 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 50 pM insülin varlığında impedans ölçümü.....	67
3.47 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi denemelerinden elde edilen standart grafiği (5-50 pM insülin konsantrasyon aralığı).....	67
3.48 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü	68
3.49 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü	68
3.50 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü.....	69
3.51 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü.....	69

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil

Sayfa

3.52 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü.....	70
3.53 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 35 pM insülin varlığında impedans ölçümü.....	70
3.54 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi denemelerinden elde edilen standart grafiği (2,5-35pM insülin konsantrasyon aralığı)	71
3.55 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1.	72
3.56 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2.	72
3.57 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3.	73
3.58 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4.	73
3.59 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1.	74
3.60 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2.	74
3.61 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3.	75
3.62 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4.	75
3.63 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1.	76
3.64 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2.	76
3.65 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3.	77
3.66 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4.	77

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sekil

Sayfa

3.67 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1.	79
3.68 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1.	79
3.69 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1.	80
3.70 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 15 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1.	80
3.71 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1.	81
3.72 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1.	81
3.73 1. Seri tekrar üretilebilirlik denemelerinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı).....	82
3.74 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2.	82
3.75 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2.	83
3.76 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2.	83
3.77 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 15 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2.	84
3.78 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2.	84
3.79 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2.	85
3.80 2. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direncideğişim standart grafiği (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı).....	85
3.81 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3.	86

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.82 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3.	86
3.83 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3.	87
3.84 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 15 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3.	87
3.85 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3.	88
3.86 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3.	88
3.87 3. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı)	89
3.88 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4.	89
3.89 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4.	90
3.90 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4.	90
3.91 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 15 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4.	91
3.92 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4.	91
3.93 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4.	92
3.94 4. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı)	92
3.95 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5.	93
3.96 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5.	93

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sekil

Sayfa

3.97 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5.	94
3.98 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 15 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5.	94
3.99 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5.	95
3.100 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5.	95
3.101 5. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı).....	96
3.102 Tekrarlanabilirlik denemesinden elde edilmiş devre direnci değişim standart grafiği toplu sonuçları (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı).....	97
3.103 Depo kararlılığı denemesi; 1 gün, 15 pM insülin	98
3.104 Depo kararlılığı denemesi; 2 gün, 15 pM insülin	99
3.105 Depo kararlılığı denemesi; 3 gün, 15 pM insülin	99
3.106 Depo kararlılığı denemesi; 4 gün, 15 pM insülin	100
3.107 Depo kararlılığı denemesi; 5 gün, 15 pM insülin	100
3.108 Depo kararlılığı denemesi; 6 gün, 15 pM insülin	101
3.109 Depo kararlılığı denemesi zamana karşı % rölatif direnç grafiği	101
3.110 İmmobilize edilen insülin optimizasyonu denemesi 1.	103
3.111 İmmobilize edilen insülin optimizasyonu denemesi 2.	103
3.112 İmmobilize edilen insülin optimizasyonu denemesi 3.	104
3.113 İmmobilize edilen insülin optimizasyonu denemesi 4.	104
3.114 İmmobilize edilen insülin optimizasyonu denemesi 5.	105
3.115 İmmobilize edilen insülin optimizasyonu denemesi 6.	105
3.116 İmmobilize edilen insülin optimizasyonu denemesi ile ilgili devre direnci değişim grafiği	106
3.117 İnkübasyon süresi optimizasyonu: 15 dakika	107
3.118 İnkübasyon süresi optimizasyonu: 30 dakika	108
3.119 İnkübasyon süresi optimizasyonu: 45 dakika	108

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil

Sayfa

3.120 İnkübasyon süresi optimizasyonu denemesi ile ilgili devre direnci değişim grafiği.....	109
3.121 50 mM pH: 6,8 HEPES inkübasyon tamponu pH optimizasyonu	110
3.122 50 mM pH: 7,0 HEPES inkübasyon tamponu pH optimizasyonu	110
3.123 50 mM pH: 7,2 HEPES inkübasyon tamponu pH optimizasyonu	111
3.124 50 mM pH: 7,4 HEPES inkübasyon tamponu pH optimizasyonu	111
3.125 50 mM pH: 7,6 HEPES inkübasyon tamponu pH optimizasyonu	112
3.126 50 mM pH: 7,8 HEPES inkübasyon tamponu pH optimizasyonu	112
3.127 İnkübasyon tamponu pH optimizasyonu ile ilgili devre direnci değişim grafiği.....	113
3.128 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 1 a	114
3.129 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 2 a.....	114
3.130 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 3 a	115
3.131 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 1 b	115
3.132 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 2 b	116
3.133 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 3 b	116
3.134 İnsülin bağlanması üzerine inkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonlarının etkisi	117
3.135 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	118
3.136 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	118
3.137 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	119

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sekil

Sayfa

3.138 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 800 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	119
3.139 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	120
3.140 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1200 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	120
3.141 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi denemelerinden elde edilen standart grafiği (100-1200 ng/mL arası	121
3.142 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	121
3.143 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	122
3.144 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	122
3.145 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	123
3.146 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	123
3.147 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü	124
3.148 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi denemelerinden elde edilen standart grafiği (50-1000 ng/mL arası	124
3.149 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi 20 ng/mL insülin antikoru	125
3.150 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi 20 ng/mL insülin antikoru	125
3.151 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi 40 ng/mL insülin antikoru	126
3.152 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi 40 ng/mL insülin antikoru	126
3.153 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi 50 ng/mL insülin antikoru	127
3.154 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi 50 ng/mL insülin antikoru	127
3.155 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 1.	129

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil

Sayfa

3.156 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 1.	129
3.157 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 1.	130
3.158 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 1.	130
3.159 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 1.	131
3.160 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 1.	131
3.161 1. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (50-1000 ng/mL insülin antikor konsantrasyon aralığı).....	132
3.162 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 2	132
3.163 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 2	133
3.164 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 2	133
3.165 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 2	134
3.166 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 2	134
3.167 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 2	135
3.168 2. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (50-1000 ng/mL insülin antikor konsantrasyon aralığı)	135
3.169 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 3	136

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Sekil

Sayfa

3.170 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 3.....	136
3.171 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 3.....	137
3.172 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 3.....	137
3.173 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 3.....	138
3.174 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 3.....	138
3.175 3. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (50-1000 ng/mL insülin antikor konsantrasyon aralığı)	139
3.176 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 4.....	139
3.177 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 4.....	140
3.178 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 4.....	140
3.179 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 4.....	141
3.180 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 4.....	141
3.181 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 4.	142
3.182 4. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (50-1000 ng/mL insülin antikor konsantrasyon aralığı).....	142
3.183 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 5.....	143

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil

Sayfa

3.184 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 5	143
3.185 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 5	144
3.186 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 5	144
3.187 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 5	145
3.188 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikor varlığında impedans ölçümü 5	145
3.189 5. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (50-1000 ng/mL insülin antikor konsantrasyon aralığı).....	146
3.190 Tekrarlanabilirlik denemesinden elde edilmiş devre direnci değişim standart grafiği toplu sonuçları 50-1000 ng/mL insülin antikor konsantrasyon aralığı.....	147
3.191 Depo kararlılığı denemesi 1. gün 200 ng/mL insülin antikor.....	148
3.192 Depo kararlılığı denemesi 2. gün 200 ng/mL insülin antikor.....	149
3.193 Depo kararlılığı denemesi 3. gün 200 ng/mL insülin antikor.....	149
3.194 Depo kararlılığı denemesi 4. gün 200 ng/mL insülin antikor.....	150
3.195 Depo kararlılığı denemesi 5. gün 200 ng/mL insülin antikor.....	150
3.196 Depo kararlılığı denemesi 6. gün 200 ng/mL insülin antikor.....	151
3.197 Depo kararlılığı denemesi zamana karşı % rölatif direnç grafiği	151

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Analit ve tanıma sistemlerine göre seçilebilecek ölçüm teknikleri ve iletim modelleri.....	14
1.2 Etiketsiz impedimetrik biyosensörler.....	22
2.1 Elektrot yüzeyi temizlik yöntemi.....	26
3.1 İnsülin konsantrasyonlarının oluşturdukları ortalama direnç.....	78
3.2 İnsülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirlik özelliğinin belirlenmesi için yapılan denemelerin devre direnci değişim standart grafiklerinden elde edilen denklemler, doğruluk ve (R^2) değerleri	96
3.3 Depo kararlılığı denemesi için yapılan denemelerin devre direnci değişiminden elde edilen sonuçların günlere göre değişiminin rölatif değerleri	101
3.4 İnsülin antikoru konsantrasyonlarının oluşturdukları ortalama direnç	127
3.5 İnsülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirlik özelliğinin belirlenmesi için yapılan denemelerin devre direnci değişim standart grafiklerinden elde edilen denklemler, doğruluk ve (R^2) değerleri	146
3.6 Depo kararlılığı denemesi için yapılan denemelerin devre direnci değişiminden elde edilen sonuçların günlere göre değişiminin rölatif değerleri	151
4.1 İnsülin analizine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün bütün denemelerine ilişkin toplu sonuçlar	153
4.2 İnsülin antikoru analizine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün bütün denemelerine ilişkin toplu sonuçlar	155

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
ω	Açısal frekans
μL	Mikrolitre
AC	Alternatif akım
C_{dl}	Çift tabaka kapasitansı
CV	Döngüsel voltammetri
DC	Doğru akım
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid
EİS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
FIA	Akış enjeksiyon analizi
gER	Granüllü endoplazmik retikulum
GH	Ghrelin
GLU	Glukagon
GLUT	Glukoz transporter
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
Hz	Hertz
$I(j\omega)$	Akım fazörü
IA	İnsülin antikoru
IAS	İnsülin otoümmün sendromu
INS	İnsülin
IP3	İnositol 1,4,5-trifosfat
IU	Uluslararası ünite aktivite birimi
mM	Milimolar
MUA	Merkaptoundekanoik Asit
NHS	N-Hidroksisüksinimid
pM	Pikomolar
PP	Pankreatik peptit
R	Resistif direnç
R_{ct}	Elektron transfer direnci
R_{el}	Elektrolit çözeltisinin ohmik direnci

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
SAM	Kendiliğinden oluşan tek tabaka
SST	Somatostatin
$U(j\omega)$	İmpedans sistem voltaj fazörü
Z	Öz Direnç
Z'	Direnç (AC de)
Z''	Reaktans(sanal impedans)
Z_w	Warburg impedası

1. GİRİŞ

Bu tez çalışmasında biyosensör teknolojisine yeni ve orijinal bir bakış açısı getiren elektrokimyasal impedans spektroskopisi ile insülin tayinine yönelik affinite temelli insülin biyosensörü ve insülin antikoru tayinine yönelik insülin antikoru biyosensörü olmak üzere iki ayrı tür biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) materyallerin hem kapasitif hemde rezistif analizinin birleşimidir. EİS nin potansiyeli sistemin impedansının alternatif akım (AC) frekanslarının geniş spektrumlu taranabilmesine imkan sağlamasıdır. Eşdeğer devre modelleri impedans spektrumunun yorumlanması için yararlıdır. Karakterizasyon, analiz ve tabaka çalışmaları, piller, yakıt hücreleri ve aşınma fenomeni için değerli bir tekniktir. Bu teknikte elektrot, EİS kinetiğini, iletken polimerleri, yarıiletkenleri, sensörleri, hayvan ve bitki dokularını ve genel materyalleri incelemek üzere bir sistem olarak kullanır (Bott, 2001).

Biyosensörler elektrot yüzeyinde bir biyolojik reaksiyonu veya etkileşimi izlemek üzere tasarlanır. AC impedimetrik sensörlerle çeşitli biyomateriyaller kullanılarak başarılı biyosensörler tasarlanmıştır. Elektrot yüzeyine immobilize edilen biyomateriyaller; çoğunlukla enzimler, antikorlar, nükleik asitler, hücreler ve mikroorganizmalardır. (Guan et al., 2004)

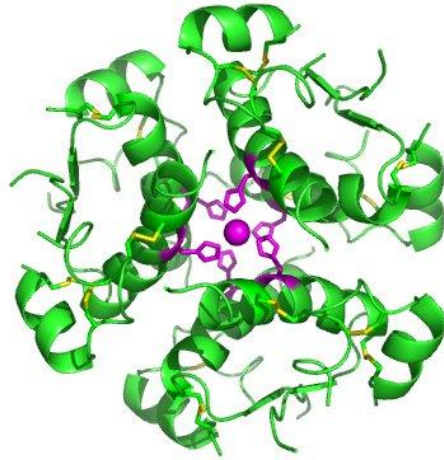
1.1 İnsülin

1869 yılında Berlin'de bir tıp öğrencisi olan Paul Langerhans, mikroskopla pankreasın yapısını incelerken, pankreasın dış salgı (ekzokrin) dokusunun içinde yayılmış ve daha önce belirlenememiş hücre kümelerine rastlamıştır. Bir süre sonra Eduard Laguesse, daha sonraları "Langerhans adacıkları" diye adlandırılacak olan ve o dönemde işlevleri bilinmeyen bu hücreler için, sindirimde rolü olan bir salgı üretiyor olabilecekleri fikrini öne sürmüştür (Sakula, A., 1988) . 1889'da Polonya asıllı Alman tıp doktoru Oscar Minkowski, Joseph von Mehring ile birlikte yürüttükleri bir çalışmada, pankreasın sindirim üzerindeki bu öngörölmüş rolünü gösterebilmek için sağlıklı bir köpeğin pankreasını çıkarmıştır.

Bundan birkaç gün sonra, Minkowski'nin hayvan bakıcısı tarafından köpeğin idrarının üzerinde sineklerin uçtuğunu farkedilmiş ve köpeğin idrarı test edildiğinde de içinde şeker olduğu ortaya çıkmıştır. (Mering, 1889). Ondan sonraki 20 yıl boyunca, adacıkların salgılarını toplayıp, ilaç olarak kullanmak için birçok çalışma yapılmıştır. 1906 yılında, George Ludwig Zuelzer köpeklerin pankreas özütüyle iyileştirilmesinde kısmen başarı sağlamış, fakat çalışmalarını sürdürememiştir. 1911'le 1912 yılları arasında, Şikago Üniversitesi'nden E. L. Scott sulandırılmış pankreas özütlerini kullanmış ve glukozüride hafif bir azalma gözlediğini not etmiştir. 1919'da ise Rockefeller Üniversitesi'nden Israel Kleiner benzer etkileri göstermiştir. Birinci Dünya Savaşı nedeni ile kesilen çalışmalarına bir daha dönememiştir (Kleiner,1919).

1.1.2 İnsülinin üç boyutlu

Yapılan bir çok çalışmanın ardından insülin iki disülfid bağıyla birleşen A ve B polipeptit zincirlerinden oluşan (Mr 5700) bir molekül olduğu, 1953 yılında Frederick Sanger tarafından dünyada ilk kez amino asit dizisi aydınlatılmış olan polipeptit yapıdır (Metzler, 2003). Sentezi ve saklanması Zn^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının büyük etkisi vardır. Zn^{+2} iyonu ile 6 insülin molekülünün yapılarında bulunan histidin amino asidi kalıntıları ile hegzamer yapı oluşturarak paketlenbildiği gösterilmiştir. Bu hegzamer yapı Şekil 1.1 de gösterilmiştir (Dunn, 2005).



Şekil 1.1: 6 İnsülin molekülünün Zn^{+2} iyonu ile etkileşimi

1.1.3 İnsülinin metabolizmaya etkileri

İnsülinin en çok üzerinde durulan özelliği organizmanın tek hipoglisemik etkili hormonu olmasıdır. Karbohidrat metabolizması üzerine olan etkileri ağırlıklı olarak ön plana çıkan insülin, organizmada karbohidrat metabolizmasının yanı sıra bağımsız diğer bazı metabolik olayları da etkilemektedir. İnsülin, organizmada bazı anabolik olayları uyaran bir hormondur. Karbohidrat ve lipidlerin depolanması yanı sıra protein sentezinde katkıda bulunmaktadır (Onat et al., 2002).

İnsülinin etkili olduğu temel hedef hücreler kas, karaciğer ve adipoz hücrelerdir. Fibroblastlar ve lenfositler üzerine de etkili olan insüline, böbreklerin yanıtı daha az olmaktadır. Eritrositler ve beyin ise insüline hiç yanıt vermemektedir (Onat et al., 2002).

1.1.3.1 İnsülinin karbohidrat metabolizmasına olan etkileri

İnsülinin karbohidrat metabolizmasına etkilerinin net sonucu olarak kan glukoz düzeyi azalmaktadır. İnsülin salgılanmasının yetersiz olduğu koşullarda görünen hiperglisemi ve glukozüri, bunun en önemli kanıtıdır. Hormonun hipoglisemik etkisi, antagonist etki gösteren hormonlara karşı tek başına gösterilmektedir (Onat et al., 2002).

Başta glukoz olmak üzere bazı şekerlerin fosforilenmesi için hücre içine kolaylaştırılmış difüzyon ile taşınmasını insülin sağlamaktadır. Kas ve adipoz dokuda belirgin olan ve hızla gelişen bu etki, glukoz taşıyıcılarının hücre membranına translokasyonları sonucunda görülmektedir. Glukozun hepatositlere taşınmasını kolaylaştırmada insülinin doğrudan bir etkisi bulunmadığı için karaciğer bir ayrıcalık oluşturmaktadır. Ancak karaciğer glukokinazının uyarıcı etkisinden ötürü insülin, glukoz-6-fosfata dönüşümünü hızlandırarak dolaylı yoldan hücre içine glukoz girişini arttırmaktadır. Hızlı fosforilasyon nedeni ile hepatositlerde çok düşük düzeylerde serbest glukoz bulunmaktadır. Bu durum bir konsantrasyon gradienti oluşturduğundan insülin glukozun hücre içine akımını kolaylaştırmaktadır. İnsülinin bu etkileri sonucu kan glukoz düzeyi azalmakta ve

hücre içinde fosforillenmiş şekerler ile bunlardan meydana gelen glikoliz ürünleri ve glikojen artmaktadır (Onat et al., 2002).

Taşıma olaylarındaki etkisinden bağımsız olarak insülin, hücre içinde glukozun kullanımını da etkilemektedir. Karaciğerde insülin glukokinaz, fosfofruktokinaz ve piruvat kinaz gibi anahtar enzimlerin miktarını ve aktivitesini artırarak glikolizi hızlandırmaktadır. Glikolizin hızlanması ile glukoz kullanımı artmakta ve plazmaya glukoz geçişi ise dolaylı olarak yavaşlamaktadır. İnsülin karaciğere özgü olan ve kasta bulunmayan glukoz-6-fosfatazın aktivitesini azaltmaktadır. Plazma membranından geçemeyen glukoz-6-fosfatın karaciğerde birikmesi, plazma glukoz düzeyinin düşük tutulmasına katkıda bulunmaktadır.

Kas ve karaciğerde insülinin glikojen yapımını uyarıcı anabolik etkisi bulunmaktadır. İnsülinin uyarıcı etkisi ile glukoz, glukoz-6-fosfata dönüştükten sonra glukoz-1-fosfata izomerize olmakta ve daha sonra aktivitesi insülin tarafından uyarılan glikojen sentazın katalitik etkisi ile glikojene dönüşmektedir. İnsülin tarafından glikojen sentazın aktiflenmesi için inaktif sentazın aktif şekline, insülin tarafından aktiflenen bir fosfataz tarafından defosforile edilmesi gerekmektedir. cAMP bağımlı fosforilasyonla glikojen sentazın inaktive edilmesi ile hücre cAMP düzeyi düşük tutularak fosfodiesteraz enziminin aktivasyonu sağlanmaktadır. Glukoz 6-fosfat ile glikojen sentazın artması ve fosforilaz aktivitelerinin azalması, glikojenden glukoz açığa çıkışının azalmasına neden olmaktadır.

İnsülin, karbohidrat dışı kaynaklardan glukoz elde edilmesine cAMP üzerinden etkili olan glukagon ve glukokortikoidler gibi hormonların uyarıcı etkisini engelleyerek glukoneogenezi inhibe etmektedir. Glukoz-6-fosfataz, fruktoz-1,6-bisfosfataz, fosfoenolpirüvat karboksikinaz ve pirüvat karboksilaz gibi glukoneogenezde anahtar görevi bulunan enzimlerin sentezleri, insülin tarafından baskılanmaktadır (Onat et al., 2002).

1.1.3.2 İnsülinin lipid metabolizmasına olan etkileri

Lipogenik bir hormon olan insülin, karaciğer ve adipoz dokuda epinefrin ve glukagon gibi lipolitik hormonların etkisi ile artan cAMP düzeylerini baskılayarak ve hormona duyarlı lipaz aktivitesini azaltarak lipolizi engellemektedir. İnsülin etkisi ile defosforilasyona uğrayan hormona duyarlı lipaz inaktive olmakta ve ayrıca insülin karaciğer ile adipoz dokuda glukagon gibi hormonların etkisi sonucu uyarılan cAMP bağımlı protein kinaz aktivitesini baskılamaktadır. cAMP bağımlı protein kinaz, hormona duyarlı lipazı fosforile ederek aktiflemektedir. İnsülinin etkisi ile bir çeşit cAMP spesifik fosfodiesterazın aktivitesi artmakta, hormonla uyarılan adenilat siklaz aktivitesi ile engellenmektedir (Onat et al., 2002).

Lipolizin engellenmesine bağlı olarak dolaşıma salıverilen serbest yağ asitleri ve gliserol miktarı azalmaktadır. Bu şekilde insülin dolaşımında glikolizi baskılayan, buna karşın glukoneogenezi uyaran maddeler olan serbest yağ asitlerini azaltarak karbohidrat metabolizmasına katkıda bulunmaktadır. Karaciğerde lipolizi engelleyen ve lipogenezi uyaran insülin, uzun zincirli yağ asitlerinin sentezini kolaylaştırmaktadır. Uzun zincirli yağ asitleri, çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin yapısına katılarak genel dolaşıma salınmaktadır. İnsülin adipoz dokuda da gliserol ve yağ asitlerinin triaçilgliserollere dönüşümünü sağlayarak lipid depolarının artmasına yol açmakta, lipogenezi uyarmaktadır.

İnsülin yetmezliğinde lipaz aktivitesi baskılanmadığı için lipoliz hızlanmakta, plazma ve karaciğer serbest yağ asitlerinin miktarı artmaktadır. Glukagon düzeylerinin artması ile daha fazla yükselen serbest yağ asitlerinden oluşan asetil-CoA, sitrat döngüsüne katılarak CO₂ ve suya metabolize olmaktadır. Diyabetli hastalarda kapasitesi hızla aşılacak bu döngüde asetil-CoA, asetoasetil-CoA ve daha sonra asetoasetik asit ile β-hidroksibütirik asite dönüşmektedir. Kontrolsüz diyabetiklerde insülinin çok düşük ve düşük dansiteli lipoproteinlerin oluşum ve klirenslerinin düzenleyici etkisinin ortadan kalkması sonucu, kolesterol düzeyi artmaktadır. İnsülin yokluğunda bunların ve sonuç olarak kolesterolün düzeylerinin artması doğaldır (Onat et al., 2002).

1.1.3.3 İnsülinin protein ve nükleik asit metabolizması ile büyüme üzerine olan etkileri

Protein metabolizması üzerine anabolik etkili olan insülin, protein sentezini uyarmakta ve protein yıkımını baskılamaktadır. İnsülinin etkisi ile amino asitlerin hücre için taşınmaları kolaylaşmakta ve taşıma olayları ile ilgili membran proteinlerinin sentezi hızlanmaktadır. Karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda insülin uygulaması, amino asitlerin protein yapısına katılmalarını arttırmaktadır. Protein sentezi inhibitörleri, insülinin bu etkilerini engellemektedir.

RNA ve DNA sentezini de arttıran insülin, mRNA çevirisini etkiliyerek karaciğer, iskelet ve kalp kasında protein sentezini düzenlemektedir. Nükleik asitler üzerine bu tip etkileri olan insülin, hücre çoğalması ile büyüme ve farklılaşmanın uyarılmasına yol açmaktadır.

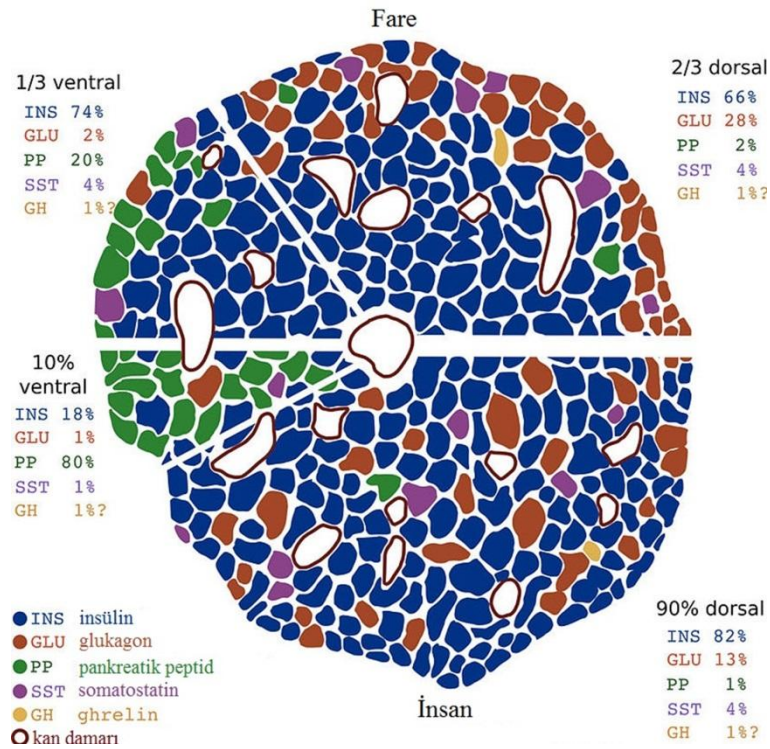
İn vitro hücre kültürlerinde insülinin büyüme uyarıcı bir rol oynadığı gösterilmiştir. Fibroblast kültürlerinde epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü trombosit kaynaklı büyüme faktörü, gibi bazı büyüme faktörlerini etkileyen insülinin in vivo olarak benzer etkileri olabileceği düşünülmektedir.

Kas ve karaciğer tarafından K^+ alımını uyararak insülin, hücre dışına Na^+ çıkışını artırmaktadır. Bazı durumlarda hormonun $Na^+ - K^+$ ATPaz pompasını uyardığı gösterilmiştir (Onat et al., 2002).

1.1.4 İnsülinin sentez ve salınım mekanizması

Memelilerde, insülin pankreasın Langerhans adacıklarının β hücrelerinde sentezlenir. Pankreasın endokrin bölgesi bir ila üç milyon Langerhans adacığından oluşan bir ekzokrin bezdir. (Elayat et al., 1995) Pankreasın endokrin kısmı pankreasın % 2 lik kısmını oluşturur. β hücrelerinin bir langerhans adacığındaki oranı ise % 65- 80 arasındadır (Brissova et al., 2005). Geri kalan hücreler % 15-20 alfa hücreleri glukagon sentezinde, % 3-10 delta hücreleri somatostatin sentezinde, % 3-5 PP hücreleri pankreatik polipeptit sentezinde ve <1% epsilon hücreleride ghrelin sentezinde görev alırlar (Ichii et al., 2005) .

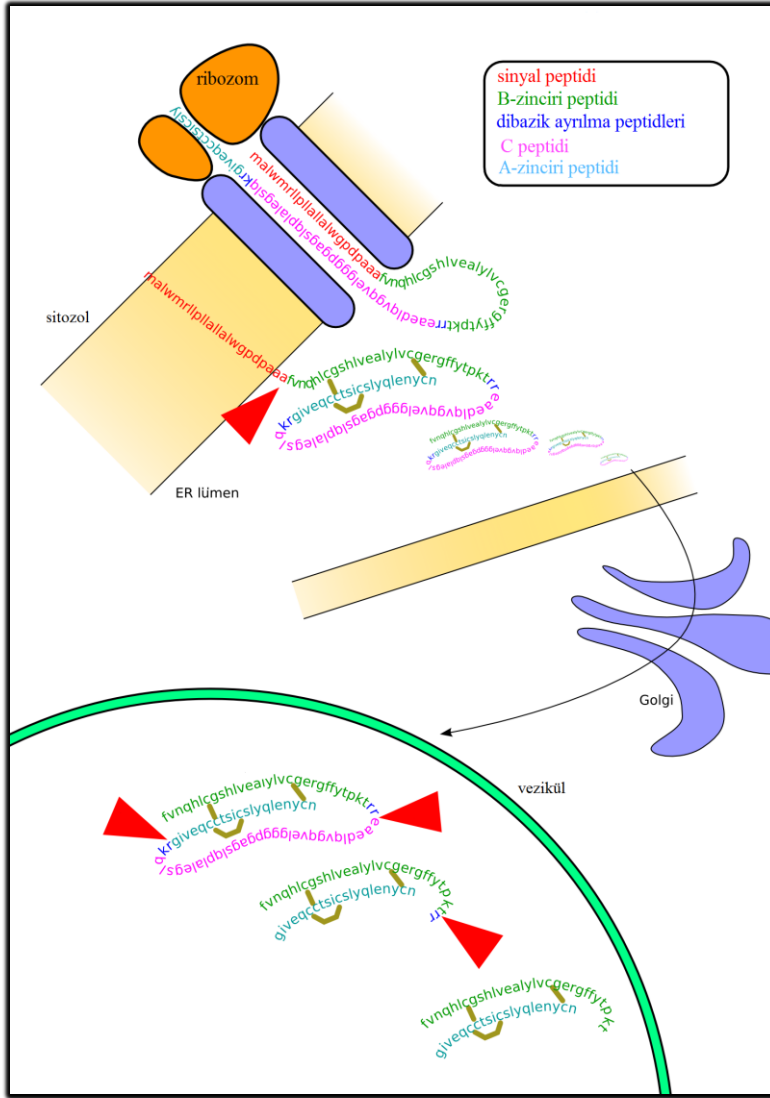
Şekil 1.2 de insan ve fare Langerhans adacıklarında hücrelerin dağılımı ve sentezlenen hormonların yüzdeleri verilmiştir.



Şekil 1.2 İnsan (Stefan et al., 1982) ve fare Langerhans adacıklarının hücresel dağılım ve sentezlediği hormonlar (Baetens et al., 1979)

İnsülin birbirlerine disülfid bağları ile bağlı A ve B olarak adlandırılan iki polipeptit zincirden oluşur. Ancak bu iki polipeptit zincir pankreasın β hücrelerinde preproinsülin adında tek bir polipeptit olarak sentezlenir. Preproinsülin oluşmaya başlayan polipeptit zincirin granüllü endoplazmik retikulumda (gER) girmesi için N-terminalinde 24 AA lik sinyal peptidi içerir. Sinyal peptidi gER un lümeninde bölgeleşmiş polipeptit ile kesilir preproinsülini proinsüline dönüştürür. (Joslin and Kahn., 2005) gER da doğru konformasyonda katlanır ve 3 tane disülfid bağı oluşur. Proinsülin gER dan golgi kompleksine taşınır, orada proteazların etkisiyle C-peptit segmentini kaybederek insüline dönüşür. Dönüşüm golgi aparatından kopma sonucu oluşan insülin depo veziküllerinde devam eder. İnsülin parsiyel ekzositozla salgılanırken onunla

birlikte C-peptidi de salgılanır (Champe et al., 2005) . İnsülinin sentez aşaması Şekil 1.3 de şematize edilmiştir.



Şekil 1.3 İnsülinin sentez ve salınım mekanizması

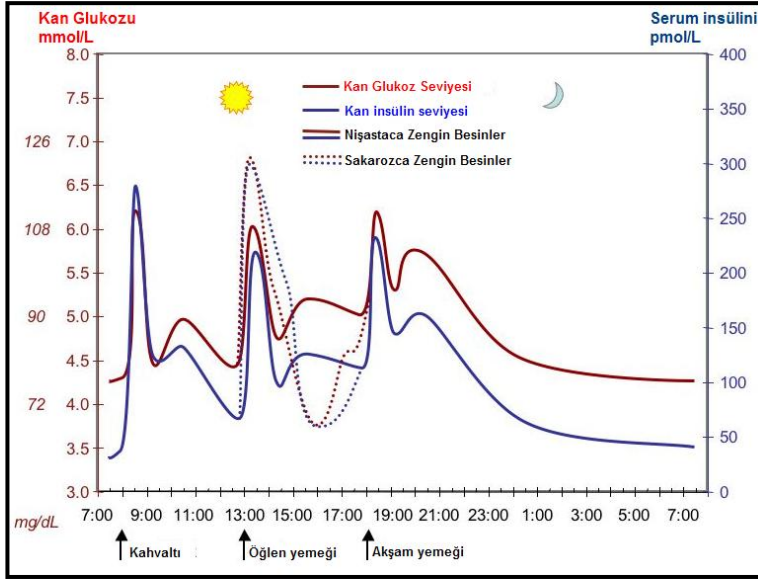
Langerhans adacıklarındaki insülinin iki farklı şekilde salınır. Birinci salınım türü, hızlı bir şekilde artmış kan glukoz seviyelerine karşı yanıt olarak tetiklenir. İkinci salınım türü sürekli salınımdır. Bu yeni tür oluşan veziküllerin yavaş salınımdır şekerden bağımsız tetiklenir.

Birinci salınım türünde ilk olarak glukoz, glukoz transporter (GLUT2) ile β hücrelerine girer. β hücrelerine giren glukoz degradasyonu sırasında oluşan ATP ler ATP:ADP oranını hücre içinde arttırır. Artan bu oran ATP-duyarlı

SUR1/Kir6.2 potasyum kanallarını kapatır. Bu durum potasyum iyonlarının kolaylaştırılmış difüzyonla dışarı çıkmasını engeller. Sonuç olarak hücre içerisi dışarısına nazaran daha pozitif olur. Bu fark hücre yüzeyi membran depolarizasyona yol açar. Depolarizasyon, kalsiyum iyonlarının hücre içerisine kolaylaştırılmış difüzyon ile girmesine neden olacak kalsiyum iyonu voltaj kapılarını açar. Artan kalsiyum iyonu konsantrasyonu fosfolipaz C nin aktivasyonuna neden olur. Fosfolipaz C membran fosfolipit fosfatidil inozitol 4,5-bisfosfatını, inositol 1,4,5-trifosfat ve diacilgliserole parçalar. İnositol 1,4,5-trifosfat (IP3) endoplazmik retikulumun plazma membranında reseptör proteinlere bağlanır. Bu, endoplazmik retikulumun IP3-gated kanallarından Ca^{2+} iyonlarının serbest bırakılmasına izin verir ve Ca^{2+} iyonlarının intraselüler konsantrasyonunun yükselmesini kolaylaştırır. Hücre içerisindeki Ca^{2+} iyonlarının konsantrasyonunun anlamlı yükselişi salgı veziküllerinde saklanmış, daha önceden sentezlenmiş insülinin serbest bırakılmasına neden olur (Gembal et al., 1993).

Sindirim sırasında genel olarak yemeklerden sonra bir ila iki saat arasında pankreas sürekli olmayacak bir şekilde insülin salgılar. İnsülinin salgılanma şekli 3 ila 6 dakika aralıklarla salınım şeklindedir. Bu sırada kan insülin seviyesi 800 pM dan az 100 pM dan fazladır. (Hellman et al., 2007)

Açlık kan insülin seviyesinin normal değerleri ise uluslararası ünit olarak 8–11 μ IU/mL belirlenmiştir. SI birim sistemine göre 1 μ IU/mL 6,945 pmol/L insüline karşılık gelmektedir. Bu durumda SI birim sistemine göre insülinin normal değerleri 57–79 pmol/L (pM) dır (Iwase et al., 2001). İnsülin değerlerinin gün içindeki değişimi Şekil 1.4’ de verilmiştir.



Şekil 1.4 Sağlıklı bir insanın gün içinde kan glukoz ve insülin düzeylerinin değişimi

1.1.5 İnsülinin etki ve yıkım mekanizması

İnsülin aktivitesinin bir kısmının, hedef insülin reseptörlerinin serin veya treonin birimlerinin fosforilasyonu veya defosforilasyonu ile olduğu bilinmektedir. (Ward and Lawrence ., 2009) Bu nedenle reseptör tirozin kinaz aktivitesiyle insülin reseptör substratı (IRS-1,IRS-2) adı verilen bir peptidin tirozinlerinin fosforile edildiği düşünülmektedir. IRS-1 geni silinmiş farelerde glukoz homeostazının bozulduğu, glukoz toleransın geliştiği bulunmuştur. Belirgin diyabet oluşmaması, kaybolan IRS-1 yerine, kısmen IRS-2 tarafından tutulmasıyla açıklanmıştır. Birçok dokuda insülin varlığında glukoz taşınımı artmaktadır. (Murat, 2004) İnsülin, glukoz taşıyıcılarının(glukoz transport molekülleri, GLUT) hücre içi vezikül havuzundan hücre yüzeyine devamlı hareketini sağlamaktadır. Çizgili kas ve yağ dokusunda insülin GLUT-4 yardımıyla yer değiştirir. İnsülin bağlandıktan sonra, hormon reseptör kompleksi hücre içine alınır. Hücre içinde, insülin lizozomlarda yıkılır. Reseptörler de yıkılabilir, fakat çoğu hücre yüzeyine geri döner. (Pedersen et al., 1990)

Hücre yüzeyine geri dönen insülin molekülleri karaciğer, böbreklerde ve çizgili kaslar olmak üzere yağ dokusu, monosit, eritrosit, granülosit, plasentada yıkılır, insüline spesifik proteaz ve glutatyon-insülin transhidrogenaz

enzimleri tarafından parçalanarak metabolize edilir. Bu yüzden kan dolaşımında insülinin yarı ömrü 4-6 dakikadır. (Duckworth et al., 1998)

1.1.6 İnsülin direnci

İnsülin direnci, kas ve yağ dokusuna glukoz alımını bozar ve karaciğerin glukoz üretimini artırır. Bu durum artmış insülin salgısı ile kısmen telafi edilir. İnsülin direnci tüm insüline duyarlı dokularda eşit oranda olmayabilir hatta bazı dokularda insülin etkisinde bir miktar artış olabilir. Örneğin: böbrekte insülin renal tubuler tuz ve su absorpsiyonunu kolaylaştırdığı bilinir ve bu nedenle hipertansiyon gelişimine katkıda bulunabilir. Karaciğerde hiperinsülinemi trigliserit sentezinde artmaya ve sonuçta hipertriglisidemiye yol açar. Damar düz kasında insülin veya insülin-like growth faktör-1 reseptörü ile etkileşerek endotel proliferasyonunu arttırabilir ve ateroskleroz gelişimi ile ilişkili olabilir. (Caro, 1991)

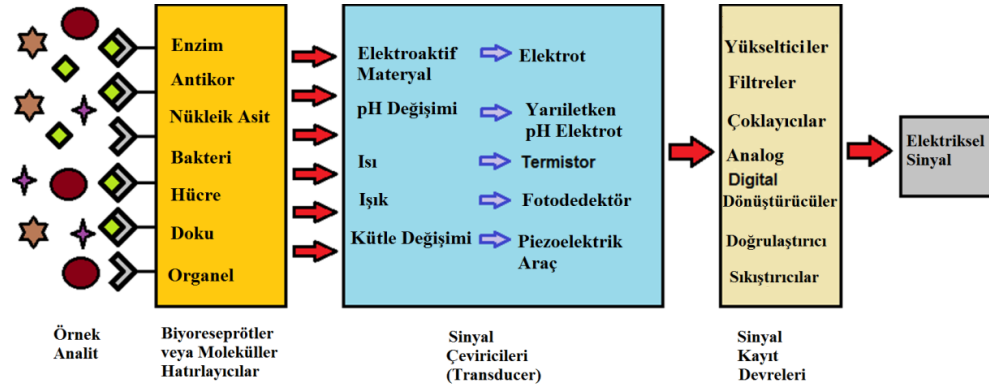
1.2 İnsülin Antikoru

İnsülin antikorları (IA) insülin tedavisi gören hastalarda sıklıkla görülür. Bu antikorlar hiçbir şekilde hiperglisemi veya hipoglisemiye neden olmaz. Bu antikorların neredeyse bir türü hiç insülin bağlamaz (düşük kapasite) veya diğer bir türü ise insülin ile bağlanır ve asla ayrılmaz (yüksek afinite) ikinci bahsedilen tipi insülin direncini tetikler fakat asla hipoglisemiye neden olmaz. Öte yandan, bilinen diğer bir hastalık olan insülin otoümmün sendromu (IAS) endojen insülin için organizma tarafından insülin antikoru üreterek hipoglisemiyi teşvik eder. Bu hastalığın ekzojen insülin almış kişilerde görüldüğü bilinmemektedir. Bu hastalıkta görünen antikorlar non-IAS antikorlarından düşük afiniteye ve yüksek kapasiteye sahiptir. Bu antikorlar kolayca insüline bağlanır (yüksek kapasite) ve ayrılır (düşük afinite) (Ishizuka et al., 2009) .

1.3 Elektrokimyasal Biyosensörler

Bir kimyasal sensör, spesifik bir örneğin konsantrasyonu, yapılan analizin toplam bileşimi gibi, oldukça geniş bir yelpazedeki kimyasal bilgiyi, analitik açıdan kullanışlı bir sinyale dönüştüren bir alettir. Kimyasal sensörler genellikle birbirine seri bağlı iki temel bileşenden oluşurlar; bir kimyasal(moleküler) tanıma sistemi ve bir fizikokimyasal iletici. Biyosensörler ise biyokimyasal bir mekanizmayı temel almış bir tanıma sistemi içeren kimyasal sensörlerdir (Turner et al., 1987).

Biyolojik tanıma sistemi, biyokimyasal reaksiyon sonucu elde edilen bilgiyi, belirli hassasiyette kimyasal yada fiziksel çıkış sinyaline dönüştürür. Tanıma sisteminin başlıca görevi, tayini yapılacak analiti yüksek düzeyde seçimlilikle tayin edebilecek bir sensör meydana çıkarmaktır. Biyolojik tanıma sistemleri çok farklı düzeylerde seçimli olabilmektedirler. Bu, doğal olarak kullanılan biyolojik materyalin seçimliliğiyle doğrudan alakalıdır. Örneğin bazı grup spesifik enzimler ile (polifenol oksidazlar gibi) daha düşük düzeyde seçimlilikle biyosensörler geliştirilebilirken, avidin-biyotin gibi çiftlerin kullanımıyla da çok yüksek düzeyde seçimlilik gösteren biyosensörler geliştirilebilmektedir. Sensörün iletici kısmı ise tanıma sisteminden elde edilen çıkış sinyalinin, çok sıklıkla bir elektriksel sinyale dönüştürülmesinden sorumludur. Bir transduser iki yönlü sinyal dönüşümü sağlamaktadır. Sensörün transduser kısmı dedektör, sensör yada elektrot olarak adlandırılabilir ancak iletici terimi anlam kargaşasını önlemek açısından tercih edilmelidir. Şekil 1.5’de biyosensörlere ilişkin genel bir şema bulunmaktadır.



Şekil 1.5 Biyosensörlerin çalışma prensibinin genel şeması

Şekil 1.5’de görüldüğü gibi biyosensörlerin tanıma materyallerine bağlı olarak çok farklı kullanılabilir transduser olanakları mevcuttur. Ancak tez kapsamında konunun kapsamı gereği sadece elektrokimyasal biyosensörler üzerinde yoğunlaşılacaktır. Elektrokimyasal biyosensörler sahip oldukları çok farklı parametreler açısından açıklanacak ve değerlendirilecektir.

Transduserler, tanıma sisteminin tipine göre (Çizelge 1.1) yada elektrokimyasal transduser modeline göre sınıflandırılırlar. Bir elektrokimyasal biyosensör, elektrokimyasal bir transduserden oluşmaktadır. Bir biyosensör entegre bir reseptör-transduser aygıtıdır ve biyolojik tanıma sistemi sayesinde kantitatif yada yarı-kantitatif analitik bilgi sağlamaktadır.

Çizelge 1.1 Analit ve tanıma sistemlerine göre seçilebilecek ölçüm teknikleri ve iletim modelleri

Analitler	Reseptör/ Kimyasal tanıma sistemi	Ölçüm tekniği/transdüksiyon modu
İyonlar	Karışık valens metal oksitleri seçimli iyon iletken inorganik kristaller, sentetik veya biyolojik iyonoforlar, enzimler, iyon değişim camları	Potansiyometrik, voltammetrik
Çözünmüş gazlar, buharlar kokular	Çift lipit tabakası veya hidrofobik membran , inert metal elektrot, enzimler, antikor, reseptör	Potansiyometrik, voltammetrik amperometrik, impedans, piezoelektrik, optik
Substratlar	Enzimler, hücreler, membranlar, bitki veya hayvan dokuları	Amperometrik, potansiyometrik, kondüktometrik, piezo elektrik, optik, kalorimetrik
Antikor/antijen	Antijen/antikor, oligonükleotid çift zincir, enzim işaretli aptamerler, kemilüminesans veya floresans işaretleme	Potansiyometrik, amperometrik veya impedimetrik, piezoelektrik optik, yüzey plazmon resonans
Proteinler, düşük molekül kütleli substratlar, iyonlar	Spesifik ligandlar, enzim işaretli protein reseptör ve kanalları, floresans işaretleme	Potansiyometrik, amperometrik veya impedimetrik, piezoelektrik optik, yüzey plazmon resonans

Biyosensörler hem biyolojik hem de biyolojik olmayan örneklerin incelenmesinde kullanılabilir. Biyolojik olmayan bir spesifisite ile birleştirilmiş kimyasal sensörler, biyolojik proseslerin izlenmesinde kullanılırlarsa (in vivo pH yada O₂ sensörleri) biyosensör olarak nitelendirilemezler. Bununla birlikte, in vivo basınç yada kan akış sensörleri de biyosensör sınıfına dahil değildirler (Sezgintürk, 2007) .

1.3.1 Biyosensör teriminin kullanılmasındaki sınırlamalar

Biyosensör kendi içinde entegre bir sistem olduğundan, HPLC gibi ilave ayırma adımları içeren yada bazı örnek işleme adımlarına ihtiyaç duyan FIA gibi analitik sistemlerden çok kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Bu yüzden bir biyosensör, bazı enzimler için gerekli olabilecek kosubstratlar dışında başka herhangi bir belirtiye gereksinim duymayan bir analitik sistemdir. Diğer yandan, entegre bir sistemin bir parçası olarak, iç veya dış membranlar veya reaktif tabakalar vasıtasıyla, bazı ayırma ve amplifikasyon adımları da sağlamalıdır. Sonuç olarak, bir HPLC veya FIA sistemi, tayin aracı olarak, bir biyosensör ile birleştirilebilir ve bu amaç için FIA sistemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, bir reaktif rezervuarı, bir enzimatik yada immunolojik reaktör veya bir elektrokimyasal sensör içeren bir FIA sistemi biyosensör değildir.

Tekrarlanabilir kalibrasyona uygun olan ve reaktör veya akış hücrelerinde bir analitin azalan yada artan konsantrasyonlarının belirlenebilmesine imkan tanıyan biyosensör sistemlerine “çok kullanımlık biyosensörler” terimi uygun bir isimlendirme olacaktır. Bunun yanında çok çabuk ve tekrarlanabilir bir şekilde rejenere edilemeyen sistemlere de “tek kullanımlık biyosensörler” denilmektedir. Bu tür tek kullanımlık ve rejenere edilemeyen sistemler için, biyoprobalar, biyoindikatörler gibi farklı isimler kullanılmıştır. Ancak bugün, bu isimlerin hiçbirisi bilimsel literatürde kabul edilmemekte ve “tek kullanımlık biyosensörler” terimi bu tür sistemler için önerilmektedir.

Sonuç olarak, moleküler tanıma sistemlerinin ve elektrokimyasal transduserlerin entegrasyonu ile oluşturulabilecek biyosensör sistemlerinin sayı ve çeşidi son derece fazladır. Ancak yine de bu sistemlerin fonksiyonlarıyla alakalı bazı ortak özellikler çok önemlidir. Bu ortak özellikler, onların transduser ve moleküler reseptör türüne bağlıdır. İşlem prensibinden dolayı amperometrik sensörler, biyokatalitik amperometrik sensörlerde dahil olmak üzere, kendi çevresine yakın bir çevredeki analit konsantrasyonunu değiştirirler ve bu sensörler bir durgun-hal durumuna ulaşabilirler ancak asla dengeye ulaşamazlar. Bu sistemlerin cevabının oluşmasındaki hız-sınırlayıcı adım, operasyonel karakteristiklerin anlaşılabilmesi açısından çok önemlidir.

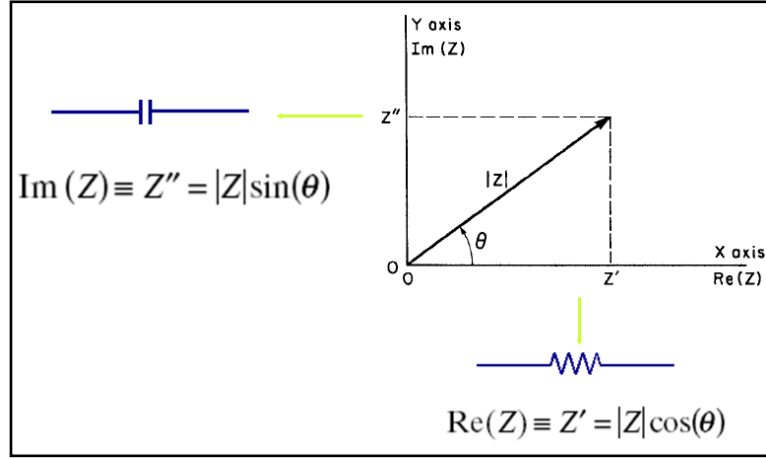
Potansiyometrik sensörler genellikle ya dengede yada dengeye yakın bir durumda çalışırlar ve çözelti içi taşınım sınırlamalarından etkilenmezler. Diğer yandan bu sistemlerin, deneysel koşullardaki denge sabiti ve kinetikleri, sensör cevabının sürekliliğini belirleyecektir. Bu tür sensörler ayrıca bir reaktif ilavesi olmaksızın çalıştırıldığında ve hızlı ve tekrarlanabilir rejenerasyona imkan tanıyabildiğinde “çok kullanımlık biyosensörler” olarak nitelendirilebilirler (Sezgintürk, 2007).

1.4 Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensörler

1.4.1 İmpedans kavramı

Özdirenç, maddenin kimyasal özelliğinden dolayı direncinin artması ya da azalmasına neden olan her maddeye özgü ayırt edici bir özelliktir. Farklı maddelerin impedansları aynı olabilir ama özdirençleri aynı olamaz. Bu nedenle özdirenç impedans olarak adlandırılmaz $R = Lq/Q$ dur. (Resistif Direnç= Uzunluk*özdirenç/kesit, (impedans ya da elektriksel impedans olarak da adlandırılır) Alternatif akım'a (AC) karşı koyan zorluk olarak adlandırılır. İçinde kondansatör ve endüktans gibi zamanla değişen değerlere sahip olan elemanlar olan devrelerde direnç yerine öz direnç kullanılmaktadır. Özdirenç gerilim ve akımın sadece görünür genliğini açıklamakla kalmaz, ayrıca görünür fazını da açıklar. DA (DC) devrelerinde özdirenç ile direnç arasında hiçbir fark yoktur. Direnç sıfır faz açısına sahip özdirenç olarak adlandırılabilir.

Özdirencin genellikle Şekil 1.6 daki gibi Z sembolü ile gösterilir ve hem genliğini hem de fazını ifade eden gösterim $|Z| < \theta$ 'dir. Bununla beraber karmaşık sayı ifadesi devre analizi uygulamalarında daha sık kullanılır. İmpedans (özdirenç) ifadesi ilk olarak Temmuz 1886'da Oliver Heaviside tarafından kullanılmıştır. 1893'de Arthur Kennelly de öz direnci karmaşık sayılarla ilk kullanandı.



Şekil 1.6 Kompleks impedans grafiği [Z'' : reaktans(sanal impedans), Z' : direnç, $|Z|$: İmpedans θ sığasal açı]

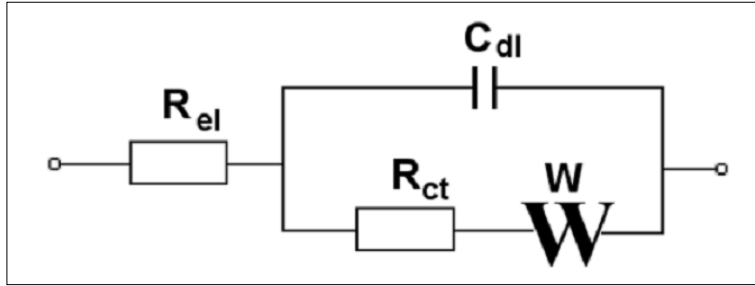
1.4.2 İmpedans spektroskopisi

İmpedans spektroskopisi elektrotların yüzey modifikasyonlarının araştırmak için etkili bir yoldur. (Bard and Faulkner., 1980) Elektrokimyasal hücreye küçük genlikte rahatsız edici sinuzoidal voltaj sinyali uygulanır ve elde edilen akım cevabı ölçülür. İmpedans sistem voltaj fazörü $U(j\omega)$ ile akım fazörü arasındaki $I(j\omega)$ orandır. Aynı zamanda impedans reel impedansla imajinel impedansın $j = \sqrt{-1}$ çarpımının toplamıdır ki açısal frekansın (ω) bu ikisi için hesaplanması gerekmektedir. Eşitlik 1 de görüldüğü gibi birimi Hertz (1/saniye) dir.

$$Z(j\omega) = \frac{U(j\omega)}{I(j\omega)} = Z_{re}(\omega) + jZ_{im}(\omega); \quad \text{where } \omega = 2\pi f \quad (1)$$

Elektrot/elektrolit arayüzeyinde meydana gelen elektrokimyasal transformasyonlar deneysel impedans spektrumlarına karşılık gelen elektronik eşdeğer devrelerin bileşenlerini ayıklanması ile modellendirilebilir. Eğer mevcut redoks probu elektrolit çözeltisinde ise Şekil 1.7 daki genel elektronik eşdeğer devre (Randles ve Ershler modeli (Stoynev et al., 1991)) kullanılır. Bu devrede elektrolit çözeltisinin ohmik direnci (R_{el}), elektrot ara yüzeyindeki yığın elektrolit

iyonlarının difüzyonu sonucunda Warburg impedansı (Z_W), çift tabaka kapasitansı (C_{dl}) ve elektron transfer direnci (R_{ct}) vardır.



Şekil 1.7 Randles ve Erschler impedans modeli

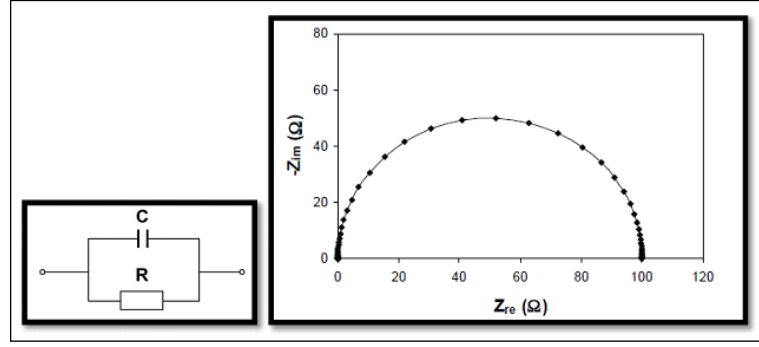
Çalışma arayüzü ile toplam akım faradayik süreç (I_F) ve çift tabaka yükün (I_C) den farklı katkıların toplamı eşdeğer devrenin paralel öğelerini (C_{dl} ve $Z_W + R_{ct}$) ortaya koyar. Akımların tamamı dengesiz elektrolit çözeltisinin direncinden (R_{el}) geçtiği için R_s devre öğelerine seri bağlanmalıdır. Çözeltide elektronik Şekil 1.7' nin iki bileşeni R_{el} ve Z_W elektrolit çözeltisinin kütle özelliklerini ve redoks probunun difüzyon özellikleri gösterir. Bu yüzden elektrot yüzeyinde bu parametreler meydana gelen kimyasal dönüşümler tarafından etkilenmez. Şekil 1.7 deki diğer iki bileşende C_{dl} ve R_{ct} , elektrot elektrolit ara yüzeyinde dielektrik ve yalıtıcı özelliklere bağlıdır (Stoynov et al., 1991) .

Elektrokimyasal impedans spektroskopisinde arayüz özelliklerinin incelenmesi için Randles hücresi olarak tabir edilen elektrokimyasal hücrenin devre üzerine oturtulması gerekmektedir. Buna göre impedans kendi için de iki alt gruba ayrılmaktadır. (Yuan et al., 2010).

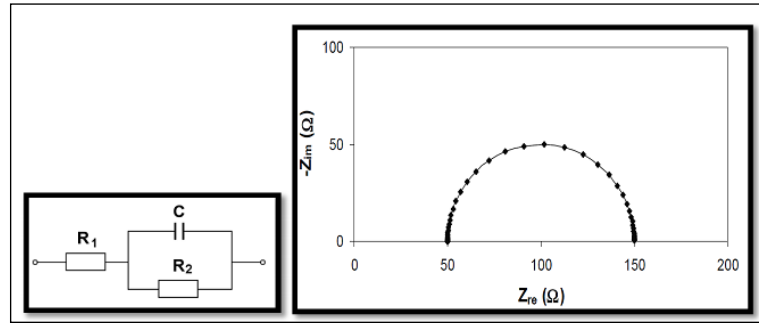
1) Direnç ve kapasitans ile doğrudan aktarılan alternatif akım ile ölçülen impedans

2) Ortamda redoks probu bulunması ile yük transfer direnci(R_{et}) ve kütle transferini(Z_w) alternatif akımın etkisi ile ölçülen impedans.

Elektriksel hücrenin tasarımıyla elde edilen diyagram ve buna bağlı olarak en çok çizilen devre elemanları Şekil 1.8 - Şekil 1.11 de gösterilmiştir.

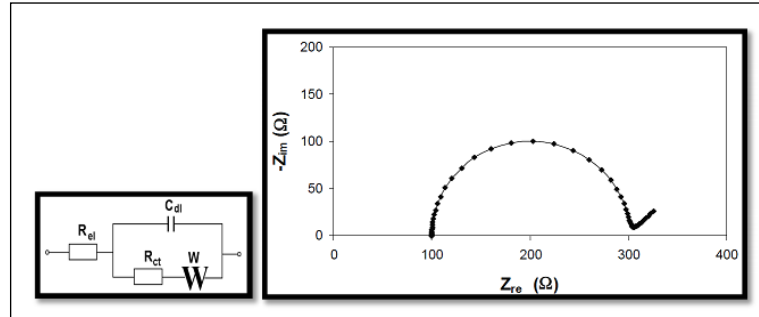


Şekil 1.8 Paralel direnç ve kapasitans - Nyquist diyagramı



Şekil 1.9 Randels hücresi - Nyquist diyagram

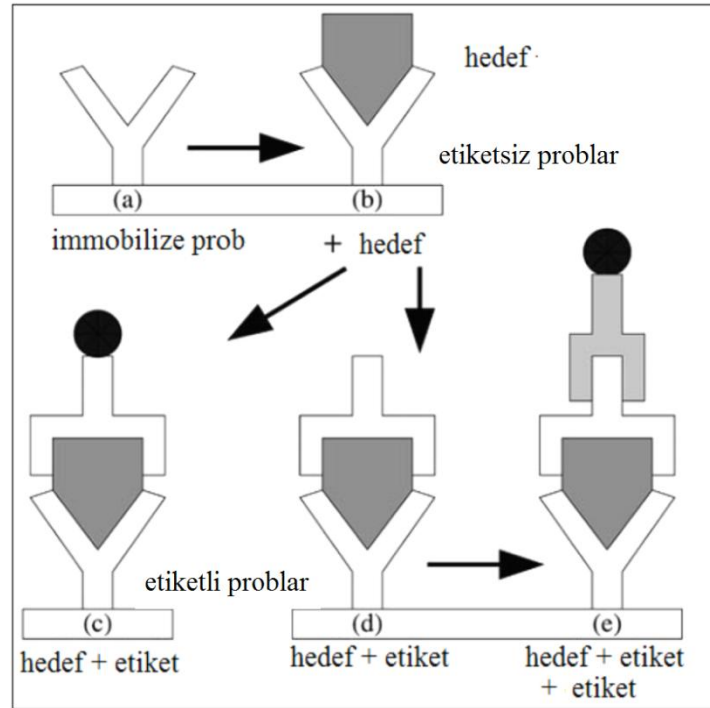
R_1 ile gösterilen direnç, çözeltinin oluşturduğu direnci göstermektedir. Bu sebeple Nyquist diyagramı sıfır noktasından başlamaz (Yuan et al., 2010).



Şekil 1.10 Randles hücre warburg impedansı - Nyquist diyagramı

olabilirler. Bununla birlikte biyomolekölü etiketlemek biyomolekölün bağlayıcı özelliklerini değiştirebilir ve hedef-etiket çifti bağlanma reaksiyonunun verimi oldukça değişkendir (Haab, 2003). Bu sorunlar DNA sensörleri için nispeten küçük sorunlardır ancak asıl problem protein hedeflemeleri içindir.

Şekil 1.12 de görüldüğü üzere indirekt etiketleme yani sandwich yöntemi genellikle spesifik bir proteinin tayini için kullanılır (Bilitewski, 2006). Bu, gelişmiş bir seçicilik ve hedef bölgelere bağlanan iki prob gerektirir ancak geliştirme maliyetlerinin fazla olması ve sınırlı kullanım zorluğu vardır. Elektrokimyasal impedans spektroskopisine yönelik biyosensörlerde hedef maddenini analizi için etikete ihtiyaç duyulmaz. İmmobilize materyal ile (DNA, protein, aptamer vb) etkileşime giren hedef molekül yüzeyin yapısını değiştirir ve bir sinyal oluşturur (Daniels and Pourmand., 2007).



Şekil 1.12 Etiketli ve etiketsiz problemlerin karşılaştırılması: [Etiketsiz prob: a: immobilize (ölçüme hazır prob), b: hedefle etkileşime girmiş prob. Etiketli problemler c: etiketle etkileşime girmiş prob, d ve e: sonuç verilebilmesi için ikili etiket sistemine ihtiyaç duyan prob

Çizelge 1.2 impedimetrik biyosensörlerle ilgili yapılan bazı çalışmalara değinilmiştir.

Çizelge 1.2 Etiketsiz impedimetrik biyosensörler

Prob	Hedef	Tayin Limiti	Ölçüm	Yüzey Kimyası	Referans
antikor	hlgG	50ng/mL	ID-elektrot non faradayik	polimer/probe karışımı	(Taylor et al., 1991)
antikor	IgG, anti-IgG	1 ng/mL	2-elektrot non faradayik	silan, bağlayıcı	(Gebbert et al., 1992)
antikor	a-fetoprotein	50ng/mL	2-elektrot non faradayik	silan, bağlayıcı	(Maupas et al.,1997)
antikor	HSA	1000 ng/mL	2-elektrot non faradayik	Karşılaştırmalı yüzeyler	(Mirsky et al., 1997)
antikor	IL-2	0.05 ng/mL	3-elektrot non faradayik	SAM, linker, C12 diluent	(Berggren et al., 1998)
antikor	interferon- γ	0.00000002 ng/mL	3-elektrot non faradayik	SAM, bağlayıcı	(Dijksma et al., 2001)
antikor	Schistosoma japonicum	0.1 ng/mL	3-elektrot non faradayik	PrA linker, tiyol diluent	(Zhou et al., 2002)
antikor	IgG	100 ng/mL	3-elektrot non faradayik	İletken polimer, tutuklama	(Sadik et al., 2002)
antikor	vitellogenin 420ng/mL	420ng/mL	3-elektrot non faradayik	İletken polimer, bağlayıcı	(Darain et al., 2004)
antikor	HSA	1.6 ng/mL	3-elektrot non faradayik	polimer, bağlayıcı	(Wu et al., 2005)
antikor	transferrin	0.08 ng/mL	3-elektrot non faradayik	Au nanopartikül, iletken polimer	(Hu et al., 2005)
antikor	α -fetoprotein	10000 ng/mL	3-elektrot non faradayik	Karşılaştırmalı yüzeyler	(Limbut et al., 2006)
antikor	Afla-toxin B1	1 ng/mL	3-elektrot non faradayik	Uv polimerizasyon	(Dinckaya et al., 2012)
antijen	anti-HRP	0.024 ng/mL	3-elektrot non faradayik	SAM, bağlayıcı	(Pyun et al., 2005)
antijen	anti-Der 12	2000 ng/mL	3-elektrot non faradayik	MPTS, Au nanopartikül	(Huang et al., 2006)
aptamer	lysozyme	1000 ng/mL	3-elektrot non faradayik	ITO, SA, biyotin-aptamer	(Rodriguez et al., 2005)
aptamer	IgE	19 ng/mL	3-elektrot non faradayik	SAM, bağlayıcı	(Xu et al., 2005)
aptamer	thrombin	3.6 ng/mL	3-elektrot non faradayik	tiyol-probe, C6 diluent	(Cai et al., 2006)
ssDNA	ssDNA	0.0000000002 nM	3-elektrot non faradayik	tiyol-DNA, C2 diluent	(Berggren et al., 1999)
ssDNA	ssDNA	100 nM	3-elektrot non faradayik	polimer	(Tlili et al., 2005)
HSssDNA	Afla-toxin M1	1 ng/mL	3-elektrot non faradayik	HSssDNA bağlayıcı	(Dinckaya et al., 2011)

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

EİS ile afinite temelli insülin ve insülin antikoru tayinine yönelik biyosensörün hazırlanmasında; Metrohm marka 6.1204.320 seri no.lu altın elektrotlar kullanıldı. Elektrotların temizliği, immobilizasyon parametrelerinin takibi, ölçüm ve sonuçların analizi için Autolab Potansiyostat/Galvanostat/PGSTAT 302 (FRA 2-220, ECD-220 modülleri ve bilgisayar kontrol sistemi ile GPES ve FRA programlarını içeren komple sistem) ile gerçekleştirildi. Ölçüm sırasında sıcaklığın sabit tutulması için Metrohm marka 6.1418.220 seri no.lu çift çeperli reaksiyon hücresi ve Lauda marka RE 120 model termostat kullanıldı. Tamponların ve çözeltilerin pH ayarlamalarında HANNA Instruments HI 221 marka ve model pH metre ve İka KMO2 marka ve model manyetik karıştırıcı kullanıldı. Altın elektrot temizliği için 0,05 µm boyutlu alümina çözeltisi kullanıldı. Altın elektrot temizliği için Hans Schmidbauer GmbH & Co, Elmasonic E 120 H marka ve model sonikatör kullanıldı. Tasarlanan biyosensörlerlede ölçüm sisteminde klasik üç elektrotlu elektrokimyasal ölçüm düzeneği kullanıldı. Bu düzenekte, referans elektrot olarak Ag/AgCl, (3 M KCl, (Metrohm, Switzerland) yardımcı elektrot olarak da Pt elektrot kullanıldı(Metrohm, Switzerland).

Denemelerde kullanılan biyolojik materyaller;

İnsülin antikoru (tavuktan izole, Sigma), maya hücresine exprese edilmiş rekombinant insan insülini (Sigma) Sığır Serum Albümini (Sigma)

Denemelerde kullanılan temel kimyasal maddeler;

Potasyum dihidrojenfosfat, dipotasyum hidrojenfosfat, sodyum hidroksit, potasyum hidroksit, hidroklorik asit, 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit (HEPES), potasyum ferrisiyanür, etanol, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) ve potasyum ferrisiyanür, Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Potasyum klorür ve sülfürik asit, Merck firmasından temin edildi.

potasyum ferrosiyanür ve *N*-Hidroksisüksinimid (NHS), Fluka firmasından temin edildi. 0,05 μ M φ apında alümina çözeltisi Buehler firmasından temin edildi. Naylon parlatma kumaşı BASi firmasından sağlandı.

2.2 Metod

2.2.1 Cihaz ve sistemler

Elektrokimyasal impedans spektroskopisi bir elektrokimyasal hücreye bir sinusoidal sinyal uyarılması uygulamasını ve üretilen akımın ölçümü temel alır. İmpedans yada değişen bir akıma hücre direnci, elektrokimyasal hücredeki akım ve voltaj arasındaki ilişkiyi tanımlamak için kullanılan bir parametredir. İmpedans ölçümlerinin bir sonucu olarak, impedansın sanal ve gerçek bölümleri, elektrot-elektrolit ara yüzeyinin karakteristik kapasitans ve rezistans elementlerinin tanımlayıcısı olarak ortaya çıkarlar. Bir elektrot yüzeyindeki antijen-antikor (ya da diğer affinite kompleksleri) komplekslerinin oluşumundan dolayı yüzey tabakasının direnci ve elektriksel çift tabakadaki yük dağılımının her ikisi de değişecektir. Dolayısıyla impedans, antikor (veya diğer bir affinite kompleks bileşeni) ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyindeki biyolojik komplekslerin asosiyasyon-disosiyasyon kinetiği hakkında bilgi verecektir.

Tez kapsamında temel sensör olarak altın elektrotları kullanıldı. İmmobilizasyon yöntemi olarak SAM' den (self assembled monolayer), yararlanıldı. Yöntemlerin membran oluşturma kademelerinde, her aşamada elektrokimyasal impedans ölçümleri yapılarak her aşamanın ve sonuçta immobilizasyon başarısının belirlenmesi gerçekleştirildi. Sonraki aşamada ise insülin ve insülin antikorunun hazırlanan biyosensörlerin membranlarında oluşturacağı affinite komplekslerinin elektrot cevabına etkileri incelendi.

Biyosensör biyoaktif tabakası hazırlanması ve analit ölçüm aşamalarının her kademesinde döngüsel voltammetri ve AC-impedans ölçümlerini bir arada yürütebilecek bir FRA modülü içeren Autolab Potansiyostat/Galvanostat/PGSTAT 302 (FRA 2-220, ECD-220 modülleri, RDE ve bilgisayar kontrol sistemi ile GPES ve FRA programlarını içeren komple sistem) ile gerçekleştirildi.

Ölçümler üç elektrot (karşıt, referans ve çalışma elektrotları) sistemi içeren bir konvansiyonel elektrokimyasal hücre içinde gerçekleştirildi. Yukarıda bahsedilen sistem Şekil 2.1 de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Ölçüm Sistemi [A: Güç kaynağı, B: Bilgisayar, C: Yazıcı, D: Autolab Potansiyostat/Galvanostat/PGSTAT 302 (FRA 2-220, ECD-220 modülleri), E: Monitör, F,G,H: Üçlü elektrot sistemi sırasıyla Ag/AgCl çift cidarlı referans elektrot; Çalışma elektrotu; Yardımcı elektrot, I: Çift cidarlı reaksiyon hücresi, J: Termostat]

2.2.2 Elektrot temizleme yöntemi

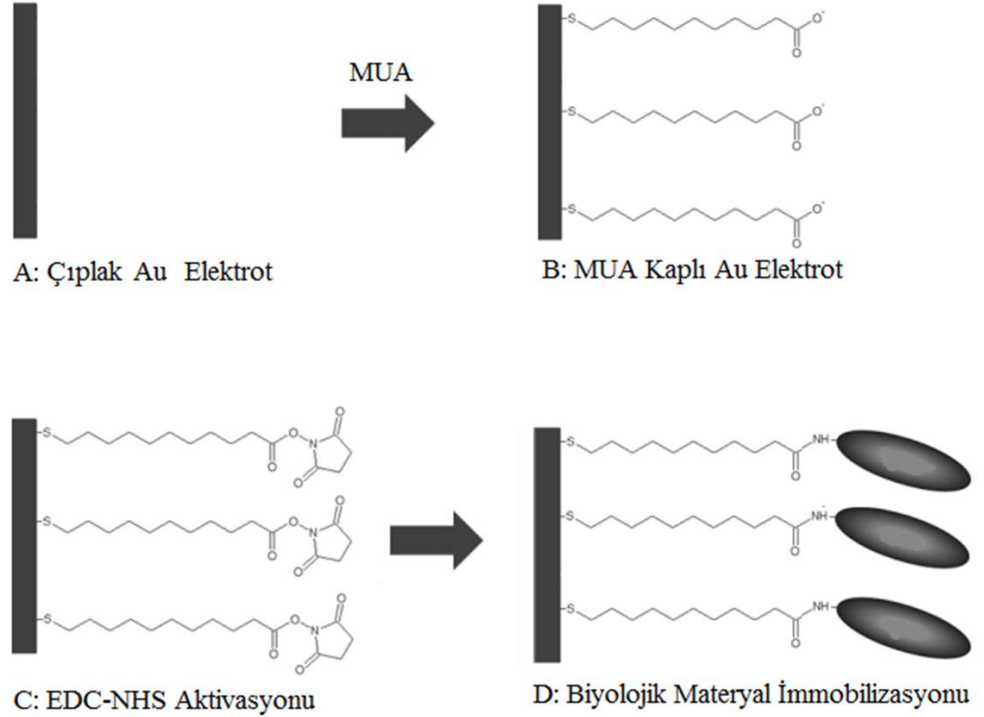
Yapılan bu tez çalışmasında çalışma elektrotlarının immobilizasyon öncesi yüzeylerinin eşit seviyede temiz olması sonuçların tutarlılığı, tekrar üretilebilirliği ve tekrarlanabilirliği açısından oldukça önemlidir. Uygulanan temizlik prosedürü Çizelge 2.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Elektrot yüzeyi temizlik yöntemi

Adım	Temizlik Uygulamalar
1	50 mM KOH çözeltisinde -200 -1200mV 50mV/s 15 kere Lineer SWEEP tarama yapılır. (Fischer et al., 2009)
2	Alüminada parlatma: Naylon parlatma kumaşı 0,05 mikrometre çapında □ 0,5mL alümina damlatılır. Elektrotun altın yüzeyi alüminaya bastırılır. ∞ şekli sürtme ile saniyede 1 döngü olacak hızda 100 defa hafif baskı uygulanarak parlatılır.
3	%95 lik Etanol sonikasyonu 5 dakika
4	Su sonikasyonu 5 dakika
5	%25 H ₂ O ₂ 50 mM KOH 30 dakika bekletme (Fischer et al., 2009)
6	0,5M H ₂ SO ₄ 1500mV-0mV arası 100mV/s hız 30 Döngü (Akin et al., 2010)

2.2.3 İmmobilizasyon parametrelerinin optimizasyonu

EİS ile afinite temelli insülin tayinine yönelik biyosensör ve afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik biyosensörler geliştirilmesine yönelik çalışmalarda birçok immobilizasyon yöntemi denendi. Yapılan çalışmalarda söz konusu yöntemlerden en olumlu sonuç veren ve 6 elektrotlarda aynı impedimetrik sinyalin elde edildiği yöntemle denemelere devam edildi. Bu yöntemde altın yüzeye merkaptoundekanoik asit immobilizasyonunun ardından açıkta kalan karboksilik asit ucu 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) ve *N*-hidroksisüksinimid (NHS) ile aktive edildi (Tlili et al., 2006). Daha sonra, aktive edilmiş olan bu grupların biyolojik materyalin (insülin tayinine yönelik biyosensörde insülin antikorumun, insülin antikoru tayinine yönelik biyosensörde insülinin) üzerindeki amino grupları ile kovalent bağ yapması sağlanarak immobilizasyon tamamlandı (Hermanson, 2008). Yapılan immobilizasyon işlemlerinin şematik gösterimi Şekil 2.2 de verilmiştir.



Şekil 2.2 İmmobilizasyon aşamaları

2.2.3.1 Merkaptoundekanoik asit (MUA) immobilizasyonu parametrelerinin optimizasyonu

Yapılan bu denemede merkaptoundekanoik asidin elektrot yüzeyine en verimli bir şekilde bağlanması için konsantrasyon ve süre optimizasyonu yapıldı. MUA konsantrasyon optimizasyonu yüksek saflıkta etanol (HPLC grade) içinde 12,5 - 25 - 50 - 100 - 200 - 400 - 500 μM ve 1 - 2 - 4 - 5 - 6 - 8 - 10 - 20 - 30 - 40 - 50 mM konsantrasyonlarındaki MUA çözeltilerinde 120 dakika boyunca bekletildi. Optimumu MUA konsantrasyonu belirlendikten sonra belirlenen konsantrasyonda optimum süre denemesi 20, 40, 60, 80, 100, 120 dakika olacak şekilde inkübasyona bırakılarak yapıldı. Yapılan denemelerin impedans ölçümleri $+25^\circ\text{C}$ de 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirildi. 0,1-10000 Hz frekans aralığı, 10 mV sinyal büyüklüğü, 60 frekans sayısı ve 180 mV bias potansiyelinde impedans ölçümleri alındı. Alınan tüm sonuçlar R(C+R) devre direnci sistemine göre değerlendirildi.

2.2.3.2 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) - n-hidroksisüksinimid (NHS) immobilizasyonu parametrelerinin optimizasyonu

Tezin bu aşamasında MUA ile immobilize edilen elektrotun yüzeyindeki MUA'nın karboksilik asit uçlarını aktive etmek ve aktivasyon sonrası, yapısında amino grubu bulunan biyolojik moleküllerle etkileşim seviyesini en yüksek seviyede tutmak için EDC-NHS konsantrasyonlarının, pH'ının ve inkübasyon süresinin optimizasyonları gerçekleştirildi. Konsantrasyon optimizasyonunda elektrotlara 1:4 oranında (Tlili et al., 2006) EDC/NHS 8/2 mM, 16/4 mM, 24/6 mM, 32/8 mM, 40/10 mM, 48/12 mM konsantrasyonlarında bekletildi. pH optimizasyonunda inkübasyon pH'ları +25 °C'de 50 mM HEPES pH:6,8-7,0-7,2-7,4-7,6-7,8 tamponlarında 60 dakika bekletildi. Süre optimizasyonunda elektrotlar 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakikalarda EDC-NHS çözeltisinde bekletildi. Yapılan denemelerin impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirildi. 0,1-10000 Hz frekans aralığı, 10 mV sinyal büyüklüğü, 60 frekans sayısı ve 180 mV bias potansiyelinde impedans ölçümleri alındı. Alınan tüm sonuçlar R(C+R) devre direnci sistemine göre değerlendirildi (Tlili et al., 2006).

2.2.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarına ilişkin optimizasyon çalışmaları

EİS ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarına ilişkin optimizasyon denemeleri kapsamında immobilize edilecek insülin antikoru miktarının optimizasyonu, insülin bağlanmasına ilişkin tayin edilmesi hedeflenen inkübasyon süresinin optimizasyonu, inkübasyon tamponu pH optimizasyonu ve inkübasyon tampon sistemi ve konsantrasyonu optimizasyonuna yönelik denemeler gerçekleştirildi.

2.2.4.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörde immobilize edilen insülin antikoru miktarının optimizasyonu

EİS ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün immobilize edilen insülin antikoru miktar optimizasyonu denemelerinde immobilizasyon işleminde EDC-NHS aktivasyonuna kadar aynı koşullarda ve bileşimde hazırlanan elektrotlara farklı konsantrasyonlarda (15,63 µg/mL, 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL ve 125 µg/mL) olacak şekilde insülin antikoru 60 dakika süresince 50 mM pH: 7,4 HEPES tamponunda immobilizasyon için bekletildi. Ardından 50 mM pH: 7,4 HEPES tamponu ile inkübasyonda 45 dakika kadar bekletildikten sonra 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansları ölçüldü. Bu boş ölçümlerin ardından içerisinde 30 pM insülin içeren 50 mM pH: 7,4 HEPES tamponu ile inkübasyonda 45 dakika kadar bekletildikten sonra tekrar ölçüm impedansları alındı.

2.2.4.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün en yüksek düzeyde insülin bağlanmasına ilişkin inkübasyon süresinin optimizasyonu

Bu denemede tam olarak hazırlanmış insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensör ortamdaki analit olan insülinin en yüksek düzeyde bağlanmasının gerçekleştiği süre belirlendi. Denemede elektrotlar 15, 30 ve 45 dakika, +25 °C de 50 mM pH: 7,4 HEPES tamponunda bekletildi. Ardından +25 °C de 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansı alındı. İçerisinde 30 pM insülin içeren inkübasyon tamponlarında da ayrılan ikişerli guruplar değişmemek suretiyle tekrar 15, 30 ve 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu

denemede yapılan her immobilizasyon ve bağlanma için bekletme süresinin ardından 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) impedansı alındı. Yapılan bu denemede inkübasyon süresinin sonuçlara etkisi incelendi. Alınan ölçümlerin devre dirençleri arasındaki farklar değerlendirildi.

2.2.4.3 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün inkübasyon tampon pH sınır optimizasyonu

Bu denemede tam olarak hazırlanmış insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün ortamdaki analit olan insülinin bağlanması üzerine tampon pH' sınırın bağlanma verimine etkisi incelendi. Denemede elektrotlar pH : 6,8 ile 7,8 arasında hazırlanan inkübasyon tamponlarında bekletildi. Ardından 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansları alındı. İçerisinde 30 pM insülin içeren pH: 6,8 ile 7,8 arasında hazırlanan inkübasyon tamponlarında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) impedansları alındı. Yapılan bu denemede inkübasyon pH sınırın denemeye etkisi incelendi. Alınan ölçümlerin devre dirençleri arasındaki farklar değerlendirildi.

2.2.4.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün inkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonun optimizasyonu

Bu denemede insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensöre ortamdaki analit olan insülinin bağlanması üzerine kullanılan tamponun türü ve konsantrasyonunun etkisi incelendi. Bir önceki denemede optimum pH' sı belirlenen ölçüm tamponunun pH' sında üç farklı konsantrasyonda iki farklı tampon türünde toplamda 6 farklı tampon hazırladı ve hazırlanan her tampon çözeltisine insülin tayinine yönelik biyosensöre ait elektrotlar daldırılarak 30 dakika bekletildi. Ardından 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansı alındı. İçerisinde 30 pM insülin içeren üç farklı konsantrasyonda iki farklı tampon türünde toplamda 6 farklı tampon sisteminde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) impedansı alındı. Alınan ölçümlerin devre dirençleri arasındaki farklar değerlendirildi.

2.2.5 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün karakterizasyonu

EİS ile afinite temelli insülin tayinine yönelik biyosensörün karakterizasyonu denemeleri kapsamında doğrusal tayin aralığının belirlenmesi, tekrar üretilebilirlik denemeleri, tekrarlanabilirlik denemesi ve depo kararlılığı denemesi gerçekleştirildi.

2.2.5.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimizasyon denemeleri sonucunda elde edilen veriler dahilinde karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. 6 standart değer için 6 elektrot kullanılarak doğrusal tayin aralığı belirlendi. İlk olarak hazırlanan biyosensörler içerisinde standart bulunmayan inkübasyon tamponlarında 30 dakika inkübe edildi. Ardından 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansları alındı. Bir sonraki adımda her bir elektrot farklı standartlar içeren inkübasyon tamponunda bekletildi. 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansları alındı. Alınan 2. impedans ölçümünün devre direnci ile 1. impedans ölçümünün devre direnci arasındaki fark standart uygulamasına ilişkin net sonuçlar verildi.

2.2.5.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirlik denemeleri

Yapılan bu karakterizasyon denemesinde aynı standart konsantrasyonlar kullanılarak 5 tane 2.2.5.1 deki gibi hazırlanan standart grafiği oluşturuldu. Her bir grafiğin eğimi ve R^2 değeri karşılaştırıldı.

2.2.5.3 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirlik denemesi

Yapılan tekrar üretilebilirlik denemelerinin sonuçlarından yararlanarak elde edilen standart değerlerin ortalaması alınarak yeni bir standart grafiği çizildi. Bu

grafikten faydalanarak her bir değer için ortalama değer ($\bar{X}$), standart sapma (S.S.) ve varyasyon katsayıları (V.K.) belirlendi.

2.2.5.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün depo kararlılığı denemesi

Yapılan bu denemede immobilizasyon sonrası elektrotlar +4 °C de nemli bir ortamda saklandı. Her gün bir elektrot kullanılarak sabit insülin konsantrasyonu ile inkübe edildi. Yapılan ilk denemede elde edilen sonuç % 100 olarak kabul edildi. Deneme sonundaki elektrot yanıtı incelendi.

2.2.6 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarına ilişkin optimizasyon çalışmaları

EİS ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarına ilişkin optimizasyon denemeleri kapsamında immobilize edilecek insülin miktarı optimizasyonu, tayin edilmesi hedeflenen insülin antikorunun bağlanmasına ilişkin inkübasyon süresinin optimizasyonu, inkübasyon tamponu pH optimizasyonu ve inkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu denemeleri gerçekleştirildi.

2.2.6.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik gerçekleştirilen biyosensörde immobilize edilen insülin miktarının optimizasyonu

EİS ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik gerçekleştirilen biyosensörün immobilize edilen insülin miktarının optimizasyonu denemesinde immobilizasyon prosedüründe EDC-NHS aktivasyonuna kadar aynı hazırlanan

elektrotlar farklı konsantrasyonlarda 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL ve 1000 µg/mL, insülin ile muamele edildi.

Elektrotlar yukarıda belirtilen insülin konsantrasyonlarında 60 dakika boyunca immobilizasyon için bekletildi. Ardından 50 mM pH: 7,4 HEPES tamponu ile inkübasyonda 45 dakika kadar bekletildikten sonra 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansları alındı. Bu boş ölçümün ardından içerisinde 250 ng/mL insülin antikoru içeren 50 mM pH: 7,4 HEPES tamponu ile inkübasyonda 45 dakika kadar bekletildikten sonra tekrar impedans çözeltisinde ölçümler alındı.

2.2.6.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik biyosensörün en yüksek düzeyde insülin antikoru bağlanmasına ilişkin inkübasyon süresinin optimizasyonu

Bu denemede insülin antikoru tayinine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün ortamdaki analit olan insülin antikorunun en yüksek düzeyle bağlanmasının gerçekleştiği süre belirlendi. Denemede elektrotlar 15, 30 ve 45 dakika 50 mM pH: 7,4 HEPES tamponunda bekletildi. Ardından 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansları alındı. İçerisinde 250 ng/mL insülin antikoru içeren inkübasyon tamponlarında 15, 30 ve 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu denemede yapılan her immobilizasyon ve bağlanma için bekletme süresinin ardından 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) impedansı alındı. Yapılan bu denemede inkübasyon süresinin denemeye etkisi incelendi. Alınan ölçümlerin devre dirençleri arasındaki farklar değerlendirildi.

2.2.6.3 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörünün inkübasyon tamponu pH'sının optimizasyonu

Bu denemede insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensöre insülin antikorunun bağlanması sırasında çözelti pH'ının bağlanma verimine etkisi incelendi. Denemede elektrotlar pH: 6,8 ile 7,8 arasında hazırlanan inkübasyon tamponlarında bekletildi. Ardından 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansları alındı. İçerisinde 250 ng/mL insülin antikoru içeren pH: 6,8 ile 7,8 arasında hazırlanan inkübasyon tamponlarında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) impedansları alındı. Yapılan bu denemede inkübasyon pH'sının denemeye etkisi incelendi. Alınan ölçümlerin devre dirençleri arasındaki farklar değerlendirildi.

2.2.6.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik gerçekleştirilen biyosensörünün inkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonunun optimizasyonu

Bu denemede insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensör ortamdaki analit olan insülin antikorunun bağlanması sırasındaki tampon çözeltisinin türü ve konsantrasyonu incelendi. Bir önceki denemede pH'sı belirlenen ölçüm tamponunun pH'ında üç farklı konsantrasyonda iki farklı tampon türünde toplamda 6 farklı tampon hazırladı ve hazırlanan her tampon çözeltisine insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensöre ait elektrotlar daldırılarak 30 dakika bekletildi. Ardından 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M

$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansları alındı. İçerisinde 250 ng/mL insülin antikoru içeren üç farklı konsantrasyonda iki farklı tampon türünde toplamda 6 farklı tampon sisteminde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. +25 °C de 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) impedansları alındı. Alınan ölçümlerin devre dirençleri arasındaki farklar değerlendirildi.

2.2.7 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün ölçüm parametrelerinin karakterizasyonu

EİS ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün ölçüm parametrelerinin karakterizasyonu denemeleri kapsamında doğrusal tayin aralığının belirlenmesi, tekrar üretilebilirlik denemeleri, tekrarlanabilirlik denemesi ve depo kararlılığı denemesi gerçekleştirildi.

2.2.7.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimizasyon denemeleri sonucunda elde edilen veriler dahilinde karakterizasyon çalışmalarına başlandı. 6 standart değer için 6 elektrot kullanılarak doğrusal tayin aralığı belirlendi. İlk olarak hazırlanan biyosensörler, içerisinde standart bulunmayan inkübasyon tamponlarında 30 dakika inkübe edildi. Ardından 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansları alındı. Bir sonraki adımda her bir elektrot farklı standartlar içeren inkübasyon tamponunda bekletildi. 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl

referans elektrot) la impedansları alındı. Alınan 2. impedans ölçümünün devre dirençleri ile 1. impedans ölçümünün devre dirençleri arasındaki farklar standart uygulaması sonrası ölçümleri elde etmek üzere kullanıldı.

2.2.7.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine geliştirilen yönelik biyosensörün tekrar üretilebilirlik denemeleri

Yapılan bu karakterizasyon denemesinde aynı standart konsantrasyonlar kullanılarak 5 tane 2.2.7.2 deki gibi hazırlanan standart grafiği oluşturuldu. Her bir grafiğin eğimi ve R^2 değeri karşılaştırıldı.

2.2.7.3 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine geliştirilen yönelik biyosensörün tekrarlanabilirlik denemesi

Yapılan tekrar üretilebilirlik denemelerinin sonuçlarından yararlanarak elde edilen standart değerlerin ortalaması alınarak yeni bir standart grafiği çizildi. Bu grafikten faydalanarak her bir değer için ortalama değer ($\bar{X}$), standart sapma (S.S.) ve varyasyon katsayıları (V.K.) belirlendi.

2.2.7.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine geliştirilen yönelik biyosensörün depo kararlılığı denemesi

Yapılan bu denemede immobilizasyon sonrası elektrotlar $+4^{\circ}\text{C}$ de nemli bir ortamda saklandı. Her gün yeni bir elektrot kullanılarak sabit insülin konsantrasyonu ile inkübe edildi. Yapılan ilk denemede elde edilen sonuç % 100 olarak kabul edildi. Deneme sonundaki elektrot yanıtı incelendi.

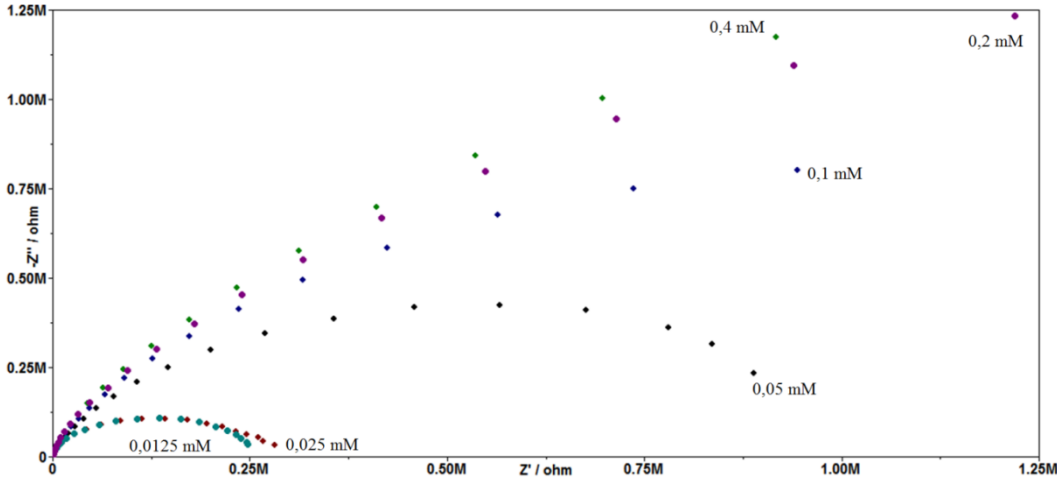
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

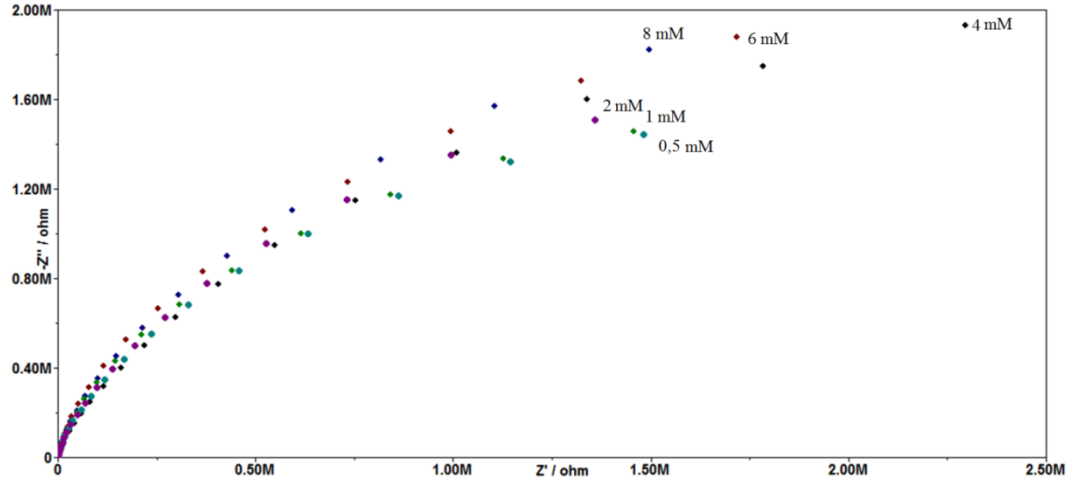
3.1.1 Merkaptoundekanoik asit immobilizasyonu parametrelerinin optimizasyonu

3.1.1.1 Merkaptoundekanoik asit immobilizasyonu konsantrasyon optimizasyonu

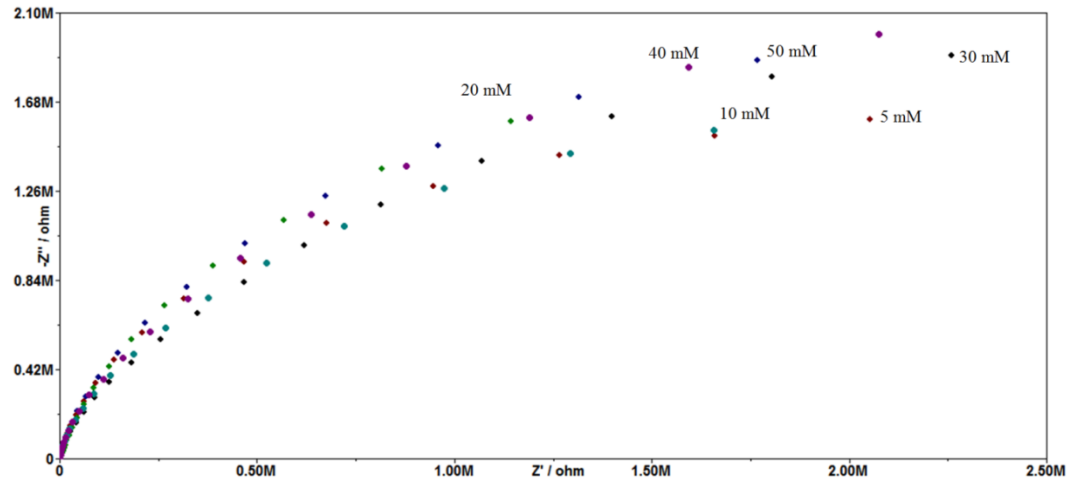
Bu uygulamada elektrot yüzeyine uygulanan farklı MUA konsantrasyonlarının etkisi incelendi. Bu uygulamada yüksek saflıkta etanol (HPLC grade) içinde 0,0125-0,025-0,05-0,1-0,2-0,4- 0,5-1-2-4-5-6-8-10-20-30-40-50 mM konsantrasyonlarındaki MUA çözeltilerinde 120 dakika boyunca temizleme prosedürü uygulanmış elektrotlar bekletildi. Merkaptoundekanoik asit immobilizasyonu konsantrasyon optimizasyonu ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği Şekil 3.1 - 3.2 - 3.3 ve 3.4 de verilmiştir.



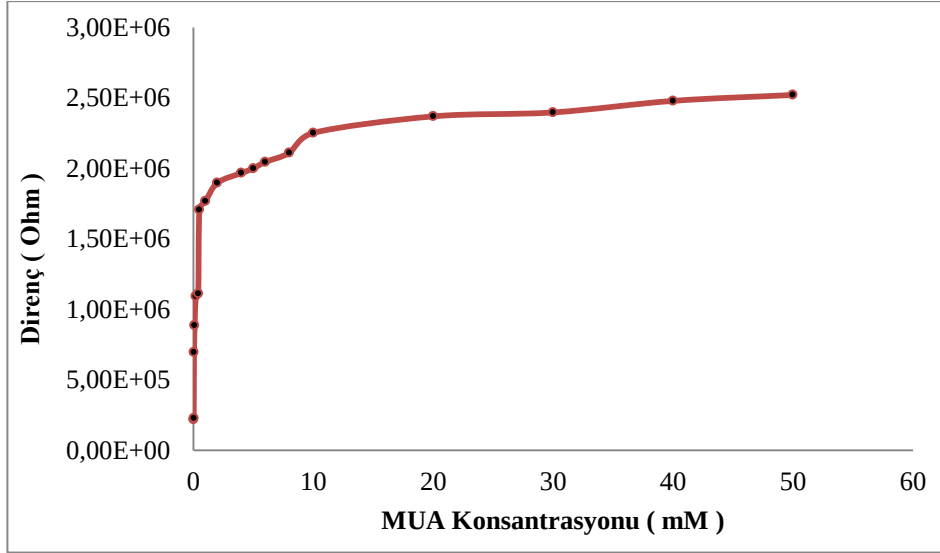
Şekil 3.1 MUA konsantrasyon optimizasyonu denemesi 1: MUA konsantrasyonları ■ 0,0125 mM- ■ 0,025 mM- ■ 0,05 mM- ■ 0,1 mM- ■ 0,2 mM- ■ 0,4 mM. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.2 MUA konsantrasyon optimizasyonu denemesi 2: MUA konsantrasyonları 0,5 mM - 1 mM - 2 mM - 4 mM - 6 mM - 8 mM. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.3 MUA konsantrasyon optimizasyonu denemesi 3: MUA konsantrasyonları 5 mM - 10 mM - 20 mM - 30 mM - 40 mM - 50 mM. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

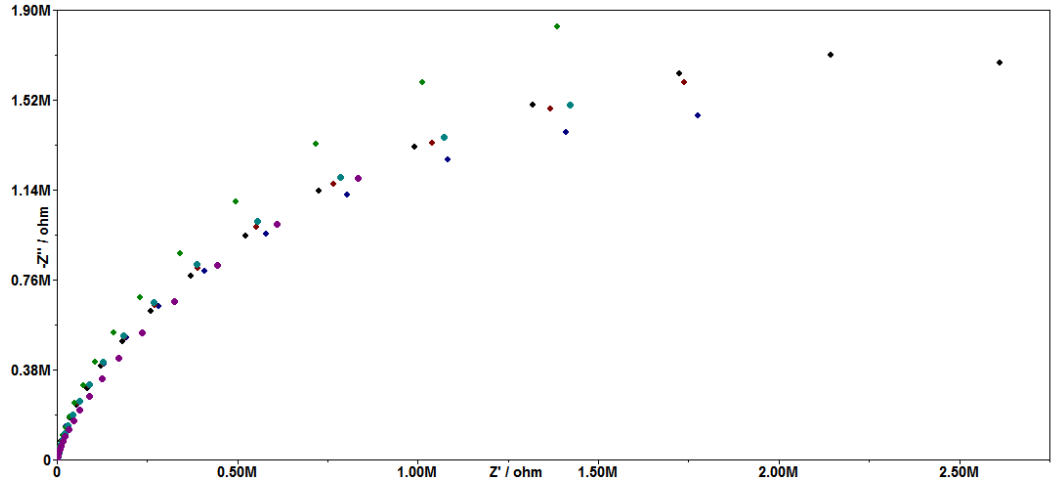


Şekil 3.4 MUA konsantrasyonuna bağlı devre direnci değişimi grafiği

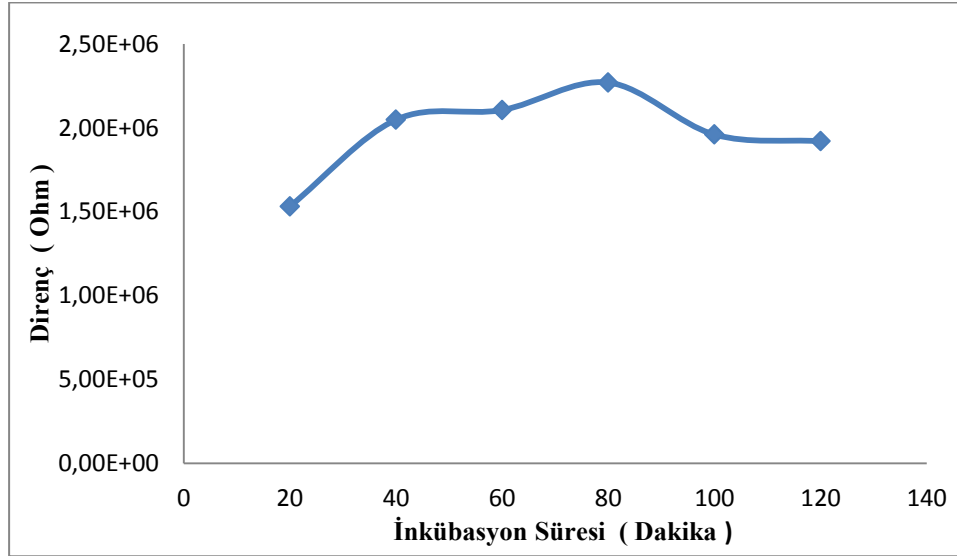
Nyquist diyagramlarından elde edilen direnç değerlerine ait grafik (Şekil 3.4) sonucunda belirli bir konsantrasyondan sonra grafikte bir plato bölgesi oluşmaktadır. Optimum MUA konsantrasyonunun bu plato bölgesinin ortasında bir değer olan 20 mM olarak seçildi. Bunun sebebi MUA konsantrasyonlarında meydana gelebilecek küçük farklanmaların büyük direnç farklarına neden olmasını engellemektir

3.1.1.2 Merkaptoundekanik asit immobilizasyonu inkübasyon süresinin optimizasyonu

Yapılan bu denemede 20 mM olan MUA konsantrasyonu 20, 40, 60, 80, 100, 120 dakika olacak şekilde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonlar sonunda 40 dakikalık inkübasyon süresinden sonra bir plato bölgesi oluştu bu bilgiler ışığı altında inkübasyon süresi olarak 60 dakikalık sürenin uygun olacağına karar verildi. 80 dakikadaki artış 60 dakikaya nazaran bağlanma derecesinde %5 lik bir artış gerçekleşti. Ancak bağlanma zamanı ve bağlanma derecesi arasındaki bu performans artışını immobilizasyon süresinin kısaltılması amacıyla süre yönünde kullanılmıştır. Merkaptoundekanik asit immobilizasyonu inkübasyon süresinin optimizasyonu ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği Şekil 3.5de verilmiştir.



Şekil 3.5 MUA süre optimizasyonu denemesi: 20 mM MUA konsantrasyonu ■ 20 dakika - ■ 40 dakika - ■ 60 dakika - ■ 80 dakika - ■ 100 dakika - ■ 120 dakika bekleme süresi. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

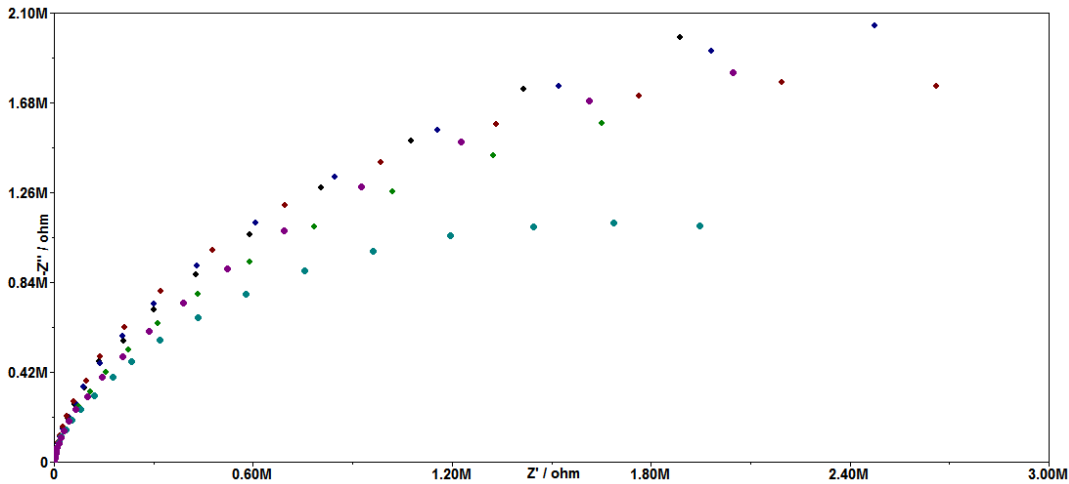


Şekil 3.6 MUA inkübasyon süresi ile devre direnci değişimi grafiği

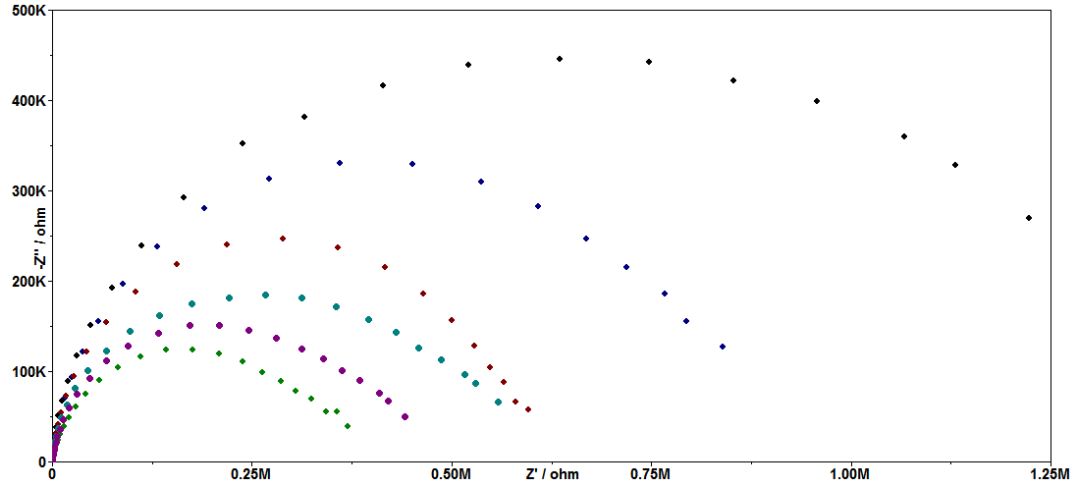
3.1.2 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC)- n-hidroksisüksinimid (NHS) immobilizasyonu parametrelerinin optimizasyonu

3.1.2.1 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC)- n-hidroksisüksinimid (NHS) immobilizasyonunda konsantrasyonun etkisi

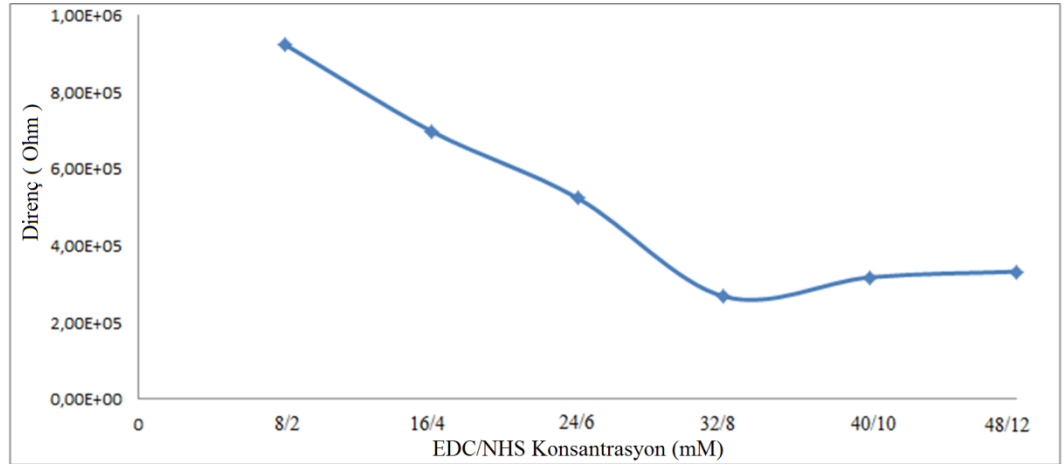
Bu denemede elektrotlar 20 mM MUA çözeltisi içinde 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından 6 elektrotun her biri EDC/NHS 8/2mM, 16/4mM, 24/6mM, 32/8mM, 40/10mM, 48/12mM konsantrasyonlarında bekletildi. Yöntemde NHS elektrot yüzeyine –SH grupları üzerinden immobilize edilen MUA moleküllerin –COO⁻ gruplarına bağlanarak devrenin direncinin düşmesini sağlar. Bu yolla bağlanmanın varlığı tesbit edilebilir. EDC-NHS immobilizasyonu parametrelerinden konsantrasyon optimizasyonu ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği Şekil 3.7 - 3.8 ve 3.9 da verilmiştir.



Şekil 3.7 Altın elektrot yüzeyine MUA immobilizasyonu 20 mM MUA konsantrasyonu 60 dakika bekleme süresi. Bir sonraki adım için elektrotlar ■ 8/2 mM - ■ 16/4 mM- ■ 24/6 mM- ■ 32/8 mM - ■ 40/10 mM - ■ 48/12 mM EDC/NHS çözeltilerinde bekletilecek [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M Fe(CN)₆^{3-/4-} + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.8 EDC-NHS konsantrasyonlarının optimizasyonu denemesi. Elektrotlar ■ 8/2 mM - ■ 16/4 mM- ■ 24/6 mM- ■ 32/8 mM - ■ 40/10mM - ■ 48/12mM EDC/NHS çözeltilerinde 60 dakika inkübasyonda bırakıldı. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltilisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



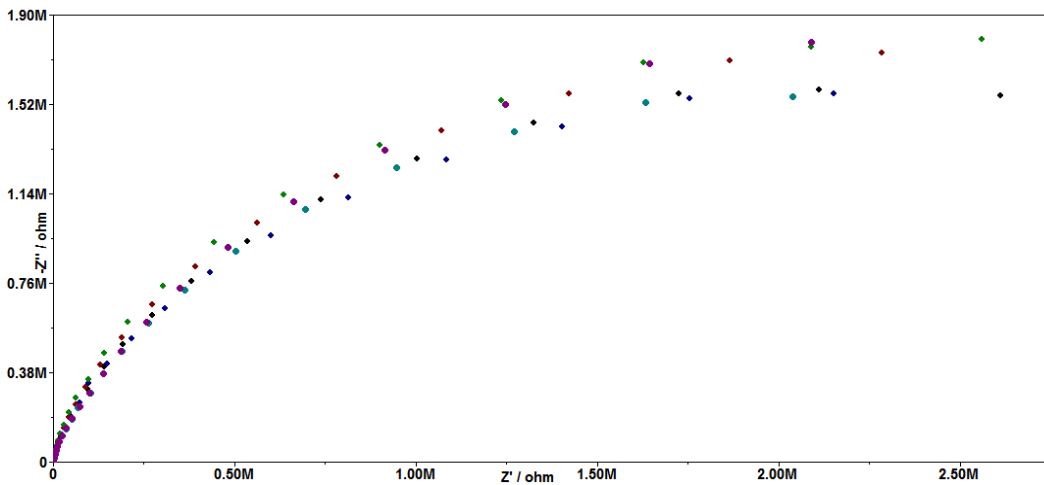
Şekil 3.9 EDC-NHS konsantrasyonu ile devre direnci değişim grafiği

Şekil 3.7 de 6 elektrot yüzeyine MUA kaplama sonrası Nyquist diyagramları verilmiştir. Şekil 3.8 da ise bu elektrotların EDC/NHS ile etkileşimleri sonucunda elde edilen Nyquist diyagramları verilmiştir. Şekil 3.9, Şekil 3.8 deki Nyquist diyagramlarının devre direnci sonuçlarından Şekil 3.7 deki Nyquist diyagramlarının devre direnci sonuçlarının çıkarılması ile elde edilen farklarla oluşmuştur. Şekil 3.9 a bakıldığında 32/8 mM EDC/NHS değerinden sonra bir plato bölgesi elde edildiği görülmektedir. Ancak Şekil 3.8 a bakıldığında konsantrasyon arttıkça sürekli bir azalma gözlenmektedir. Bunun

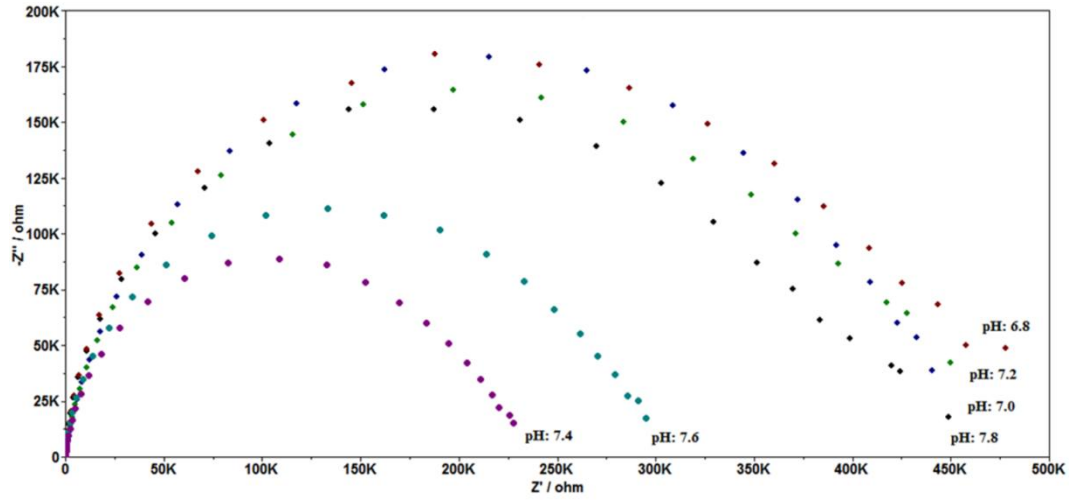
nedeni ilk immobilizasyon basamağı sırasında MUA kaplamasının standartlarındaki küçük değişikliklerdir.

3.1.2.2 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC)- n-hidroksisüksinimid (NHS) immobilizasyonunda pH' nın etkisi

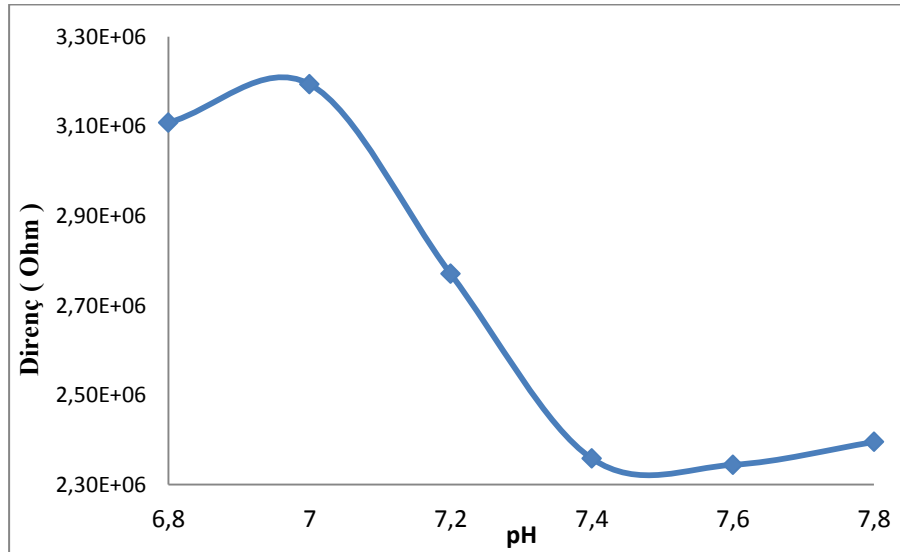
Bu denemede elektrotlar 20 mM MUA 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından 6 elektrotun her biri EDC/NHS 32/8mM, konsantrasyonunda 50 mM HEPES pH:6,8-7,0-7,2-7,4-7,6-7,8 tamponlarında 60 dakika bekletildi. Yöntemde NHS elektrot yüzeyine -SH grupları üzerinden immobilize edilen MUA moleküllerin -COO⁻ gruplarına bağlanarak devrenin direncinin düşmesini sağlar. Bu yolla bağlanmanın varlığı tesbit edilebilir. EDC-NHS immobilizasyonu parametrelerinden pH optimizasyonu ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği Şekil 3.10 -3.11 ve 3.12 de verilmiştir.



Şekil 3.10 Altın elektrot yüzeyine MUA immobilizasyonu 20 mM konsantrasyonu MUA 60 dakika bekleme süresi. Bir sonraki adım için elektrotlar ■ pH:6,8 - ■ pH:7,0 - ■ pH:7,2 - ■ pH: 7,4 - ■ pH: 7,6 - ■ pH:7,8 hidrojen iyonu derişimli 32/8mM EDC/NHS çözeltisinde bekletildi. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M Fe(CN)₆^{3-/4-} + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.11 EDC-NHS immobilizasyonunda pH'nın etkisi: Elektrotlar ■ pH:6,8 - ■ pH:7,0 - ■ pH:7,2 - ■ pH: 7,4 - ■ pH: 7,6 - ■ pH:7,8 50 mM HEPES tamponlarında 32/8 mM EDC/NHS bekletildi. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirildi. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



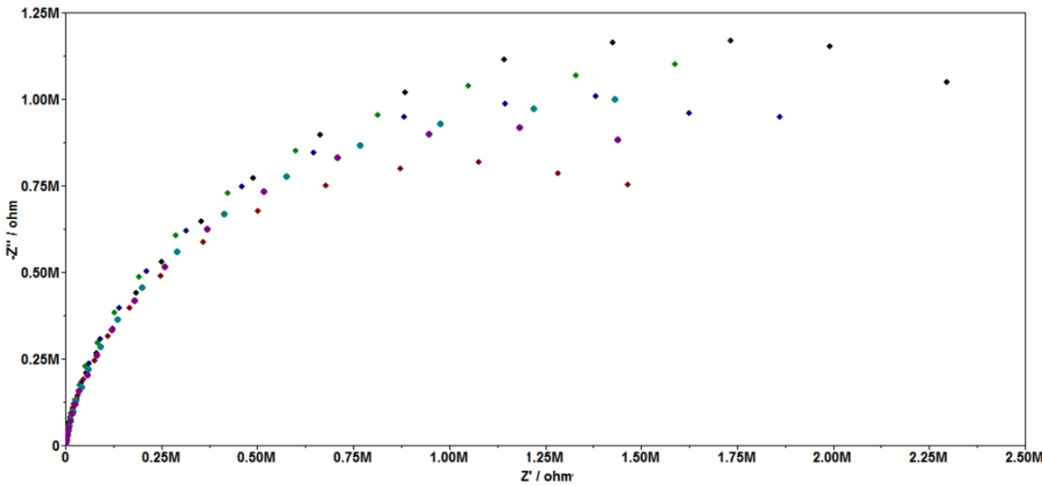
Şekil 3.12 EDC-NHS immobilizasyonunda pH ile devre direnci değişim grafiği

Denemeler sırasında çıplak altın elektrotun yüzeyine MUA kaplandıktan sonra impedans değerleri artmaktadır. Ardından EDC-NHS uygulanıp impedans ölçümleri alındıktan sonra impedansın azaldığı başka bir deyişle elektrot yüzeyindeki direncin azaldığı görülmektedir. İyi bir EDC-NHS immobilizasyonunda MUA kaplamasından sonra oluşan impedans ile EDC-NHS

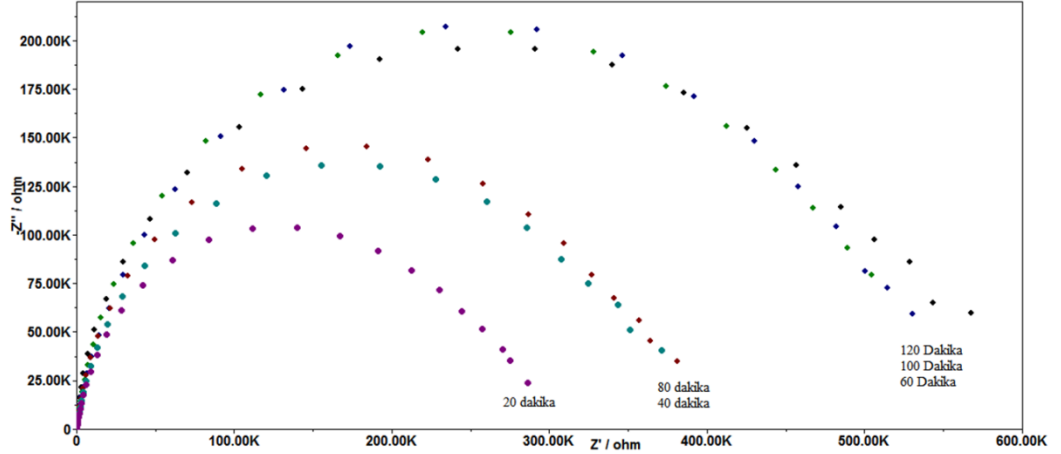
sonrasındaki impedansın farkının büyük olması gerekir. Yukardaki grafikte pH: 7,0 de EDC-NHS immobilizasyonun en yüksek olduğu görülmektedir.

3.1.2.3 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC)- n-hidroksisüksinimid (NHS) immobilizasyonunda inkübasyon süresinin etkisi

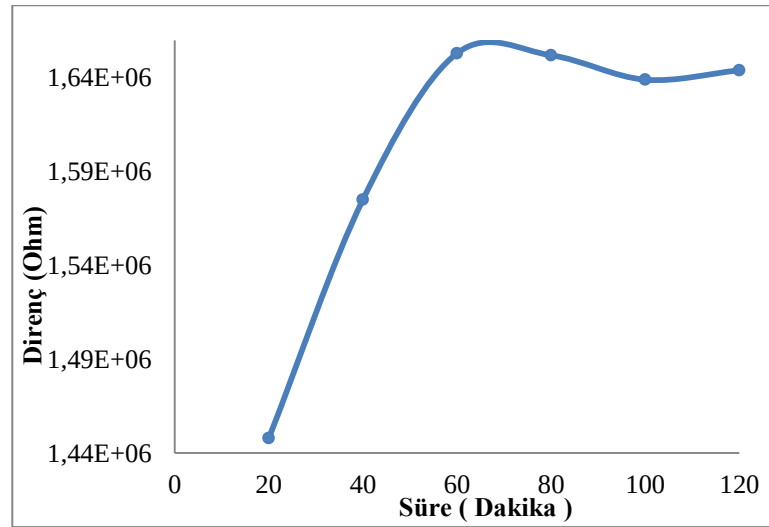
Denemede elektrotlar 20 mM MUA çözeltisinde 60 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Ardından 6 elektrotun her biri 32/8 mM, EDC/NHS konsantrasyonunda 50 mM pH:7.0 HEPES tamponunda 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 dakika bekletildi. Yöntemde yukarda sözü edilen nedenlerden dolayı devrenin direncinde azalma meydana gelmektedir. Bu yolla bağlanmanın varlığı tesbit edildi ve aynı zamanda EDC-NHS immobilizasyonu için en uygun inkübasyon süresi belirlendi. EDC-NHS immobilizasyonu parametrelerinden süre optimizasyonu ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği Şekil 3.13 - 3.14 ve 3.15 'de verilmiştir.



Şekil 3.13 Altın elektrot yüzeyine MUA immobilizasyonu 20 mM MUA konsantrasyonu 60 dakika bekleme süresi: ■ 20 dakika- ■ 40 dakika- ■ 60 dakika- ■ 80 dakika- ■ 100 dakika- ■ 120 dakika boyunca EDC/NHS çözeltisinde bekletildi. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.14 EDC-NHS inkübasyon süresinin optimizasyonu denemesi: Elektrotlar 20 dakika- 40 dakika- 60 dakika- 80 dakika- 100 dakika- 120 dakika boyunca 50 mM pH:7,0 HEPES tamponundaki 32/8 mM EDC/NHS de bekletildi. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.15 EDC-NHS immobilizasyonunda inkübasyon süresi ile ilgili devre direnci değişim grafiği

Denemeler sırasında çıplak altın elektrotun yüzeyine MUA kaplandıktan sonra impedans değerleri artmaktadır. Ardından EDC-NHS uygulanıp impedans ölçümleri alındıktan sonra impedansın azaldığı yani elektrot yüzeyindeki direncin azaldığı görülmektedir. İyi bir EDC-NHS immobilizasyonunda MUA

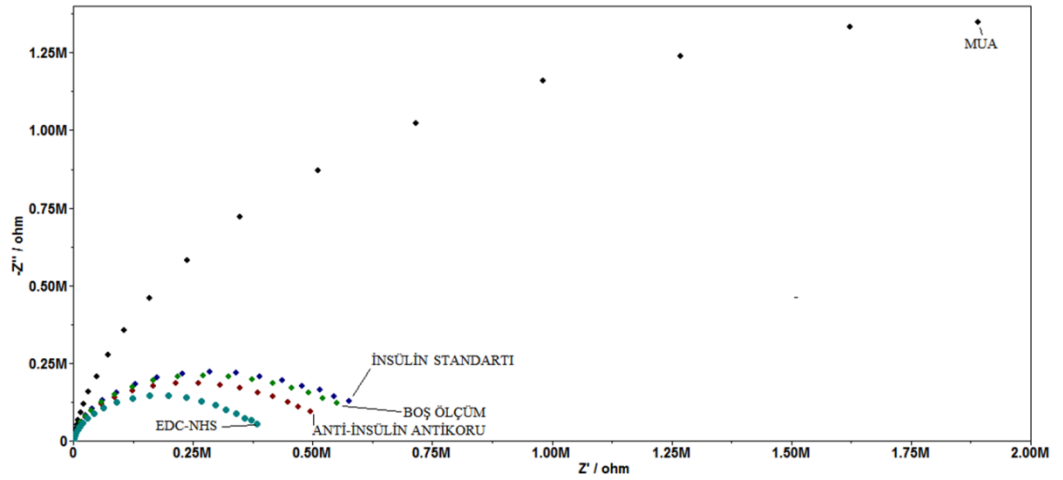
kaplamasından sonra oluşan impedans ile EDC-NHS sonrasındaki impedansın farkının büyük olması gerekir. Yukardaki grafikte EDC-NHS inkübasyon süresinin 60 dakika ve üzeri sürelerde verimin en yüksek olduğu görülmektedir.

3.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensör üzerine çalışmalar

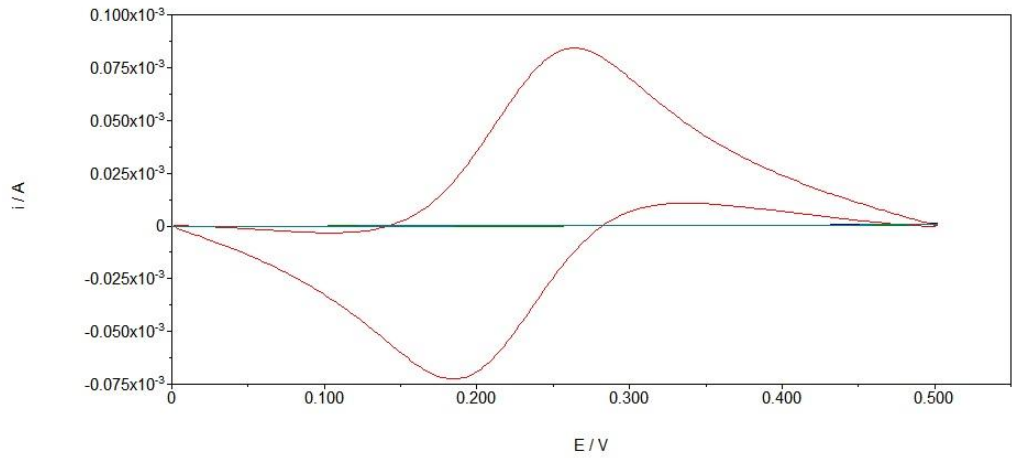
3.2.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarına ilişkin optimizasyon çalışmaları

3.2.1.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörde immobilize edilen insülin antikoru miktarı optimizasyonu

İmmobilizasyon parametrelerinin sayınının fazla oluşu ve bu parametrelerin tek bir grafikte gösterilmesi durumunda analizi planlanan insülin konsantrasyonlarının görsel olarak boş ölçümle aralarındaki farkın anlaşılamiyacağı için her bir elektrotun sadece boş ölçümleri ve insülin konsantrasyonları ölçümleri tezde gösterilmiştir. İmmobilizasyon parametreleri ile ilgili grafikler ise Şekil 3.16 ve 3.17 de gösterilmiştir. İnsan kan insülin konsantrasyonunun normal değerleri 57-79 pM arasındadır. Kullanılan insülin standardının 30 pM seçilmesinin nedeni bu konsantrasyon aralığının altında olduğu içindir. Bu sayede bu değer civarında sonuç alınabilirliğin gösterilmesi geliştirilen biyosensörün duyarlık açısından kullanılabilirliğini de göstermesi açısından önemlidir.



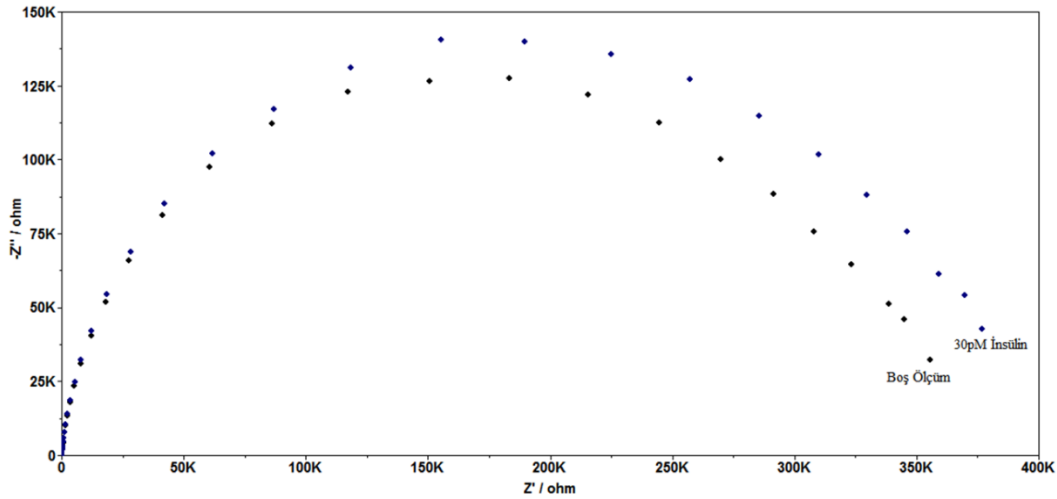
Şekil 3.16 İmmobilizasyon parametreleri Nyquist diyagramları: ■ MUA immobilizasyonu- ■ EDC/NHS immobilizasyonu- ■ insülin antikoru immobilizasyonu - ■ boş ölçüm- ■ insülin standartı [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



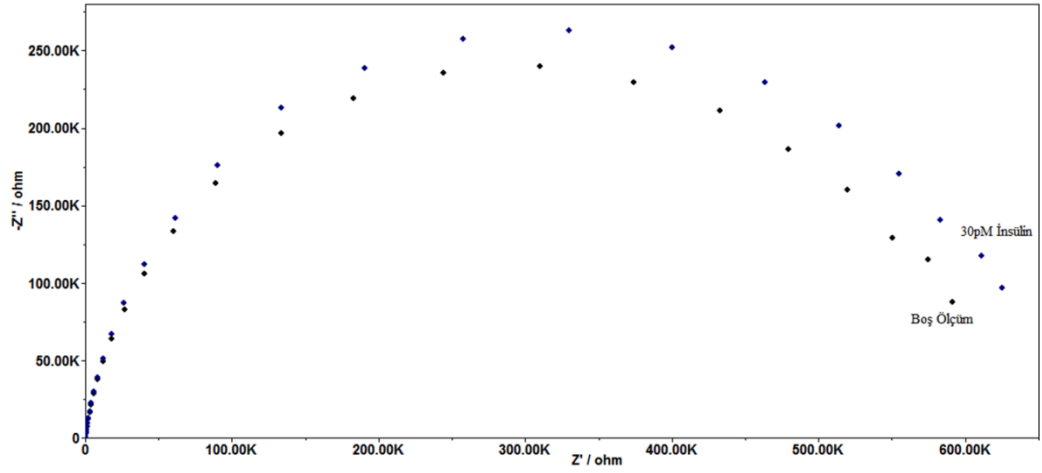
Şekil 3.17 İmmobilizasyon parametreleri döngüsel voltametri sonuçları ■ Çıplak altın elektrot - ■ insülin antikoru immobilizasyonu [Çalışma koşulları: Tüm döngüsel voltametri ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Başlangıç potansiyeli: 0 mV, birinci tepe potansiyeli: 500 mV, ikinci tepe potansiyeli 0 mV, adım potansiyeli: 2 mV, tarama hızı: 50 mV/s (Ag/AgCl referans elektrot)]

Bu denemede elektrot yüzeyinde MUA ve EDC-NHS kaplaması gerçekleştirildikten sonra 15, 63 $\mu\text{g/mL}$, 31, 25 $\mu\text{g/mL}$, 62, 5 $\mu\text{g/mL}$ ve 125

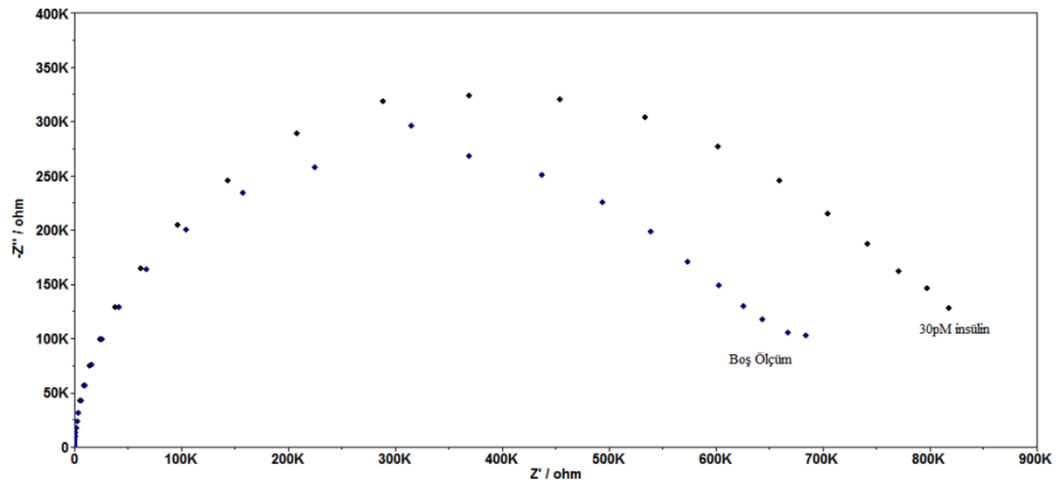
$\mu\text{g/mL}$ insülin antikorları 60 dakika boyunca immobilizasyon için elektrot yüzeyinde bekletildi. Ardından 50 mM pH: 7,4 HEPES tamponu ile inkübasyonda 45 dakika kadar bekletildikten sonra 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansı alındı. Bu boş ölçümün ardından içerisinde 30 pM insülin içeren 50 mM pH: 7,4 HEPES tamponu ile inkübasyonda 45 dakika bekletildikten sonra tekrar impedans çözeltisinde ölçüm alınmıştır. Bu yolla yüzeye bağlanan insülin antikorumun optimum değeri belirlendi. Bu iki ölçüm arasındaki devre direnç değerlerindeki fark insülin konsantrasyonu ile ilişkilidir. İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği Şekil 3.18 – 3.19 – 3.20 – 3.21 ve 3.22’ de verilmiştir.



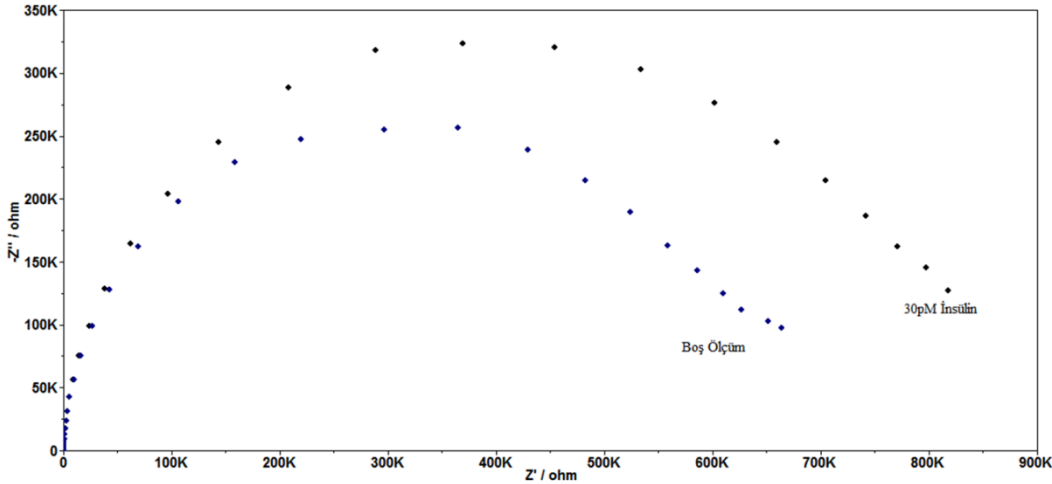
Şekil 3.18 İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 1: 15,625 $\mu\text{g/mL}$ insülin antikoru : [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



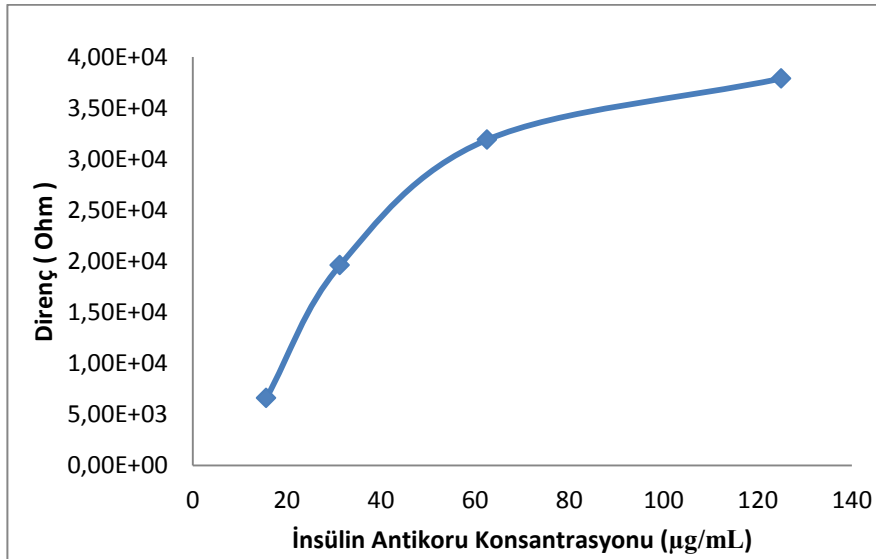
Şekil 3.19 İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 2: 31,25 µg/mL insülin antikoru [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.20 İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 3: 62,5 µg/mL insülin antikoru [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.21 İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 4: 125 µg/mL insülin antikoru [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



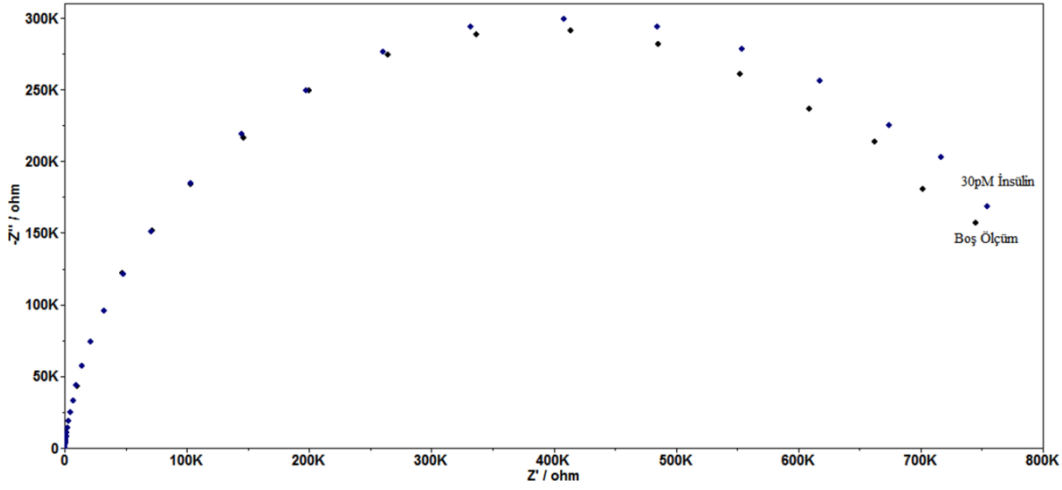
Şekil 3.22 İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi ile ilgili devre direnci değişim grafiği : (insülin konsantrasyonu 30 pM)

Yapılan denemelerde anlaşılaçağı üzere 15,625 ; 31,25 ; 62,5 ve 125 µg/mL konsantrasyonlarında insülin antikorkları elektrot yüzeylerine immobilize edildi. İnsülin antikoru immobilize edilen elektrotlar daha sonra inkübasyon tamponunda 45 dakika bekletilip boş ölçüm alındı. Bu ölçümlerin ardından kan insülin seviyesinin en düşük konsantrasyonunun onda biri (5,7 pM) ile bu deneme tekrar

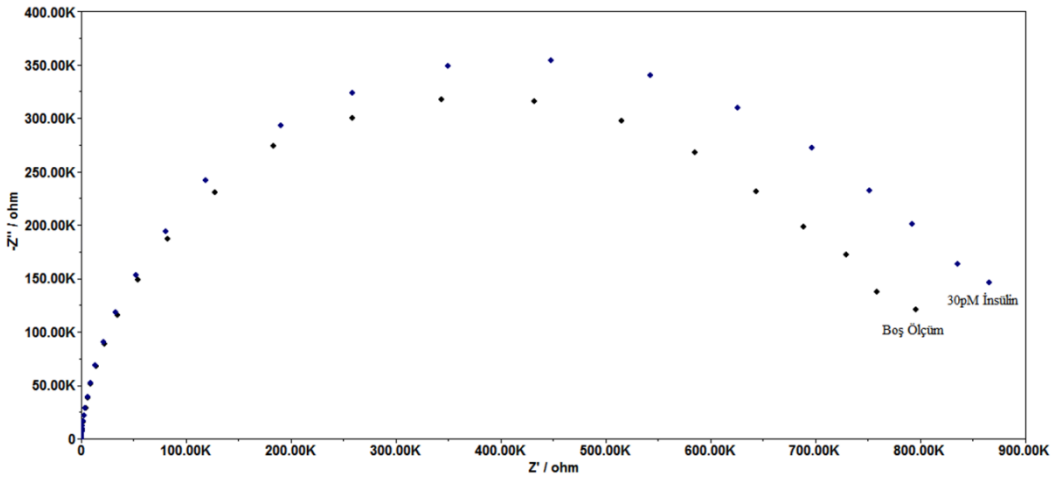
edildi. Elde edilen veriler ışığı altında en yüksek cevap 125 µg/mL insülin antikoru ile immobilizasyon gerçekleştirilen biyosensörde elde edildi. Ancak 62,5 µg/mL insülin antikoru ile immobilizasyonun gerçekleştirildiği biyosensör ile elde edilen cevap ve harcanan insülin antikoru miktarına kıyaslandığında biyosensör hazırlanışında kullanılacak insülin antikoru konsantrasyonu 62,5 µg/mL seçilmesinin tam yeterlilik hemde ekonomiklik açısından daha uygun olacağına karar verildi.

3.2.1.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün insülin inkübasyon süresinin optimizasyonu

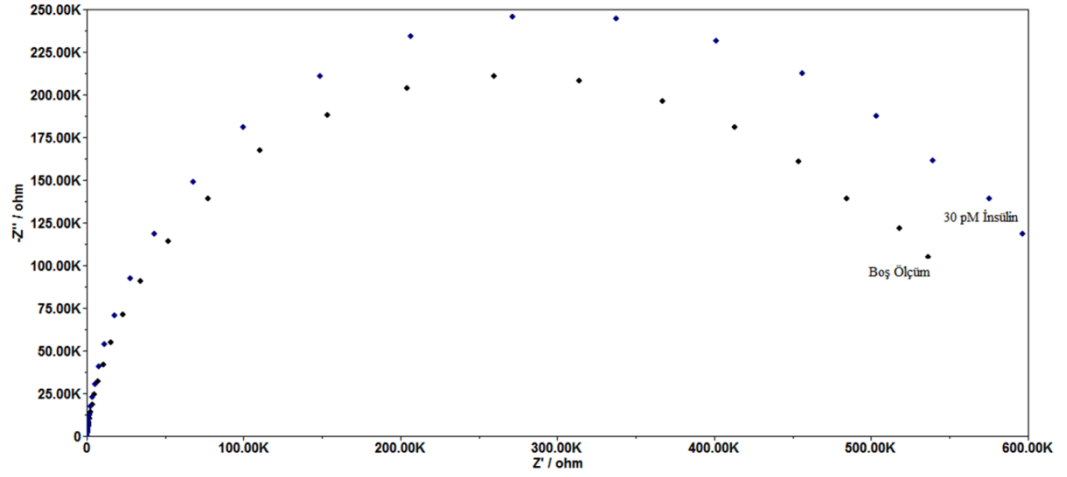
Bu denemede elektrotların yüzeyinde 20 mM MUA 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından 50 mM pH:7,0 HEPES tamponunda hazırlanan EDC-NHS 32/8 mM çözeltisi 60 dakika bekledildi. Bir sondaki adımda 62,5µg/mL insülin antikoru 60 dakika süreyle elektrotlar altın yüzeyinde bekletilerek immobilize edildi. Ardından 6 elektrot ikiyeşerli gruplara ayrılarak inkübasyon tamponunda 15, 30 ve 45 dakika bekletilip boş ölçümler alındı. İçerisinde 30 pM insülin antikoru içeren inkübasyon tamponlarında da ayrılan ikiyeşerli guruplar değişmemek suretiyle tekrar 15, 30 ve 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu denemede yapılan her immobilizasyon ve bağlanma için bekletme süresinin ardından 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansı alındı. Yapılan bu denemede inkübasyon süresinin elektrot cevabına etkisi incelendi. İnsülin inkübasyon süresinin optimizasyonu ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği Şekil 3.23 – 3.24 – 3.25 ve 3.26’da verilmiştir.



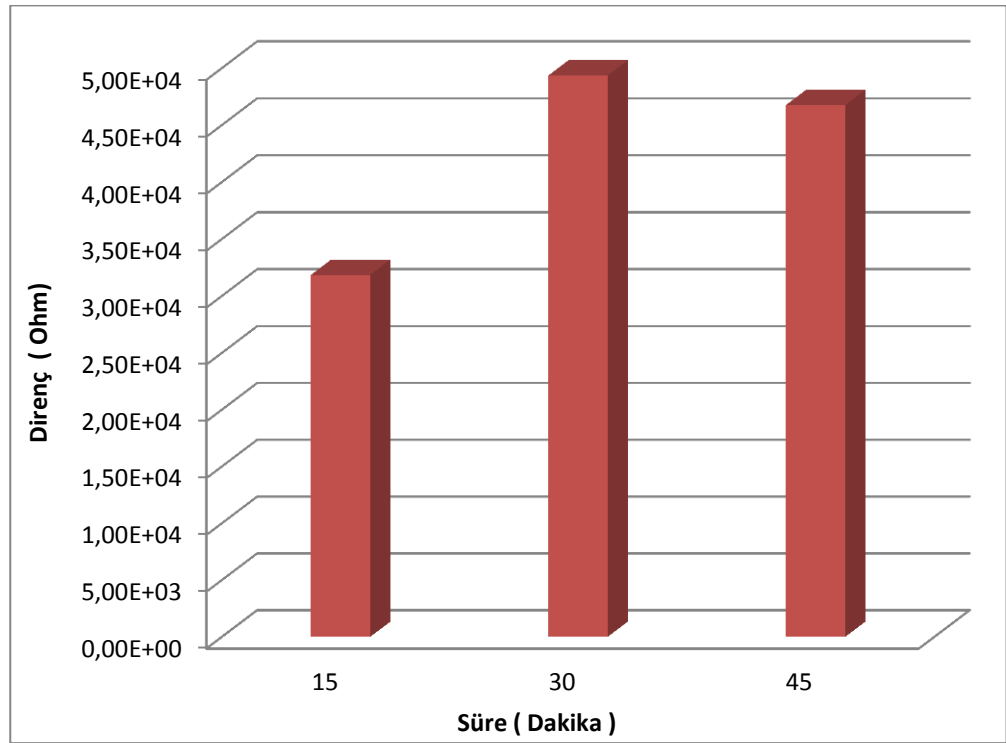
Şekil 3.23 İnkübasyon süresi optimizasyonu: 15 dakika [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.24 İnkübasyon süresi optimizasyonu: 30 dakika [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.25 İnkübasyon süresi optimizasyonu: 45 dakika [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

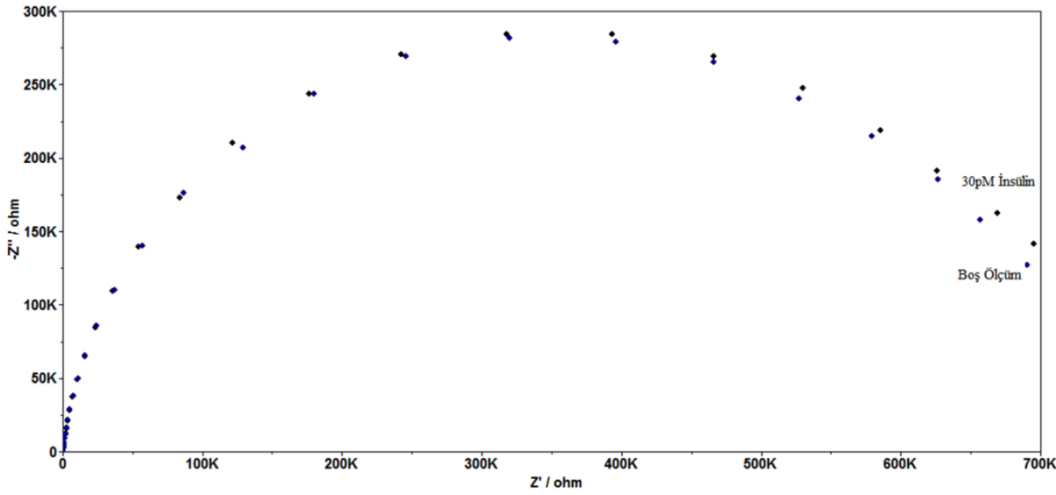


Şekil 3.26 İnkübasyon süresi optimizasyonu denemesi ile ilgili devre direnci değişim grafiği

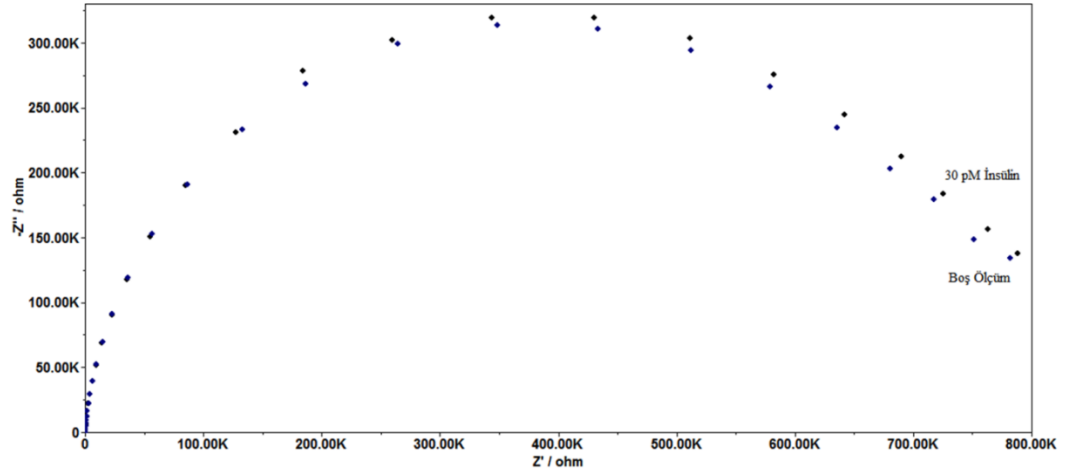
Elde edilen impedans verileri değerlendirildiğinde insülin bağlanması için en uygun bağlanma inkübasyon süresinin 30 dakika olmasına karar verildi. 30 dakika inkübasyon süresi ile kıyaslandığında 45 dakikalık ölçümlerde %5 lik bir azalma olduğu belirlendi.

3.2.1.3 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik biyosensörün inkübasyon tamponu pH optimizasyonu

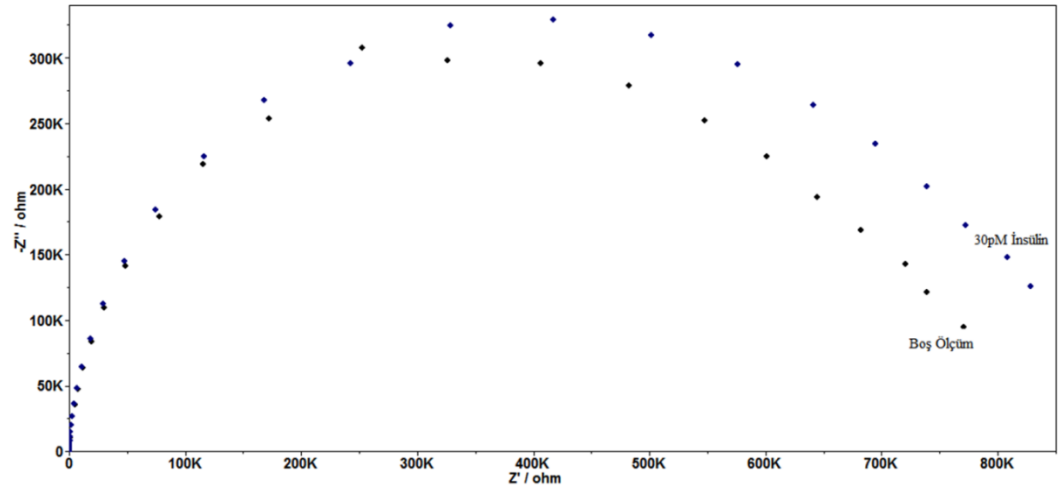
İnkübasyon tamponu pH optimizasyonu denemesinde immobilizasyon parametreleri yukarıda bulunan optimum sonuçlarla gerçekleştirildi. Bu denemede 6 elektrot kullanılarak 50mM pH: 6,8 ile 7,8 arasında HEPES tamponunda pH taraması gerçekleştirildi. Deneme ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafikleri Şekil 3.27 – 3.28 – 3.29 – 3.30 – 3.31 – 3.32 ve 3.33’de verilmiştir.



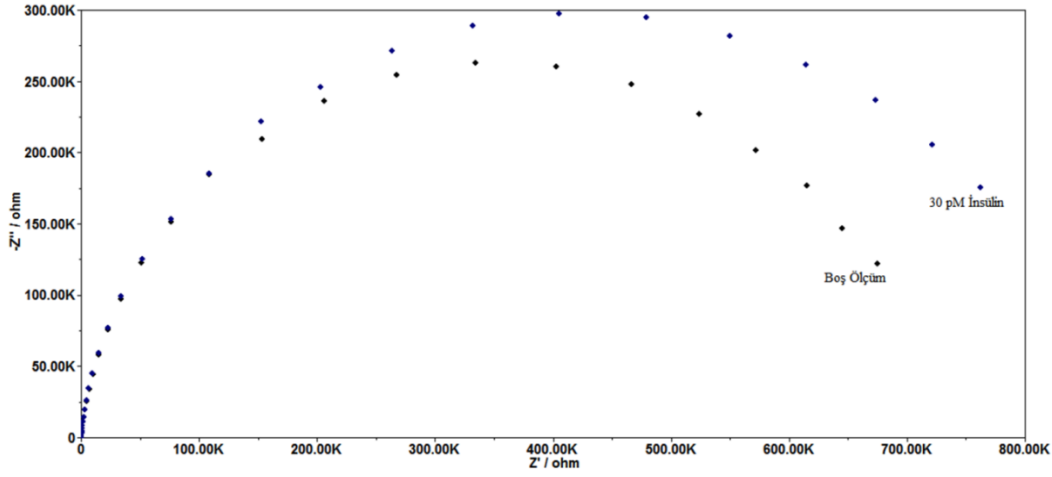
Şekil 3.27 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 6,8 HEPES için inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



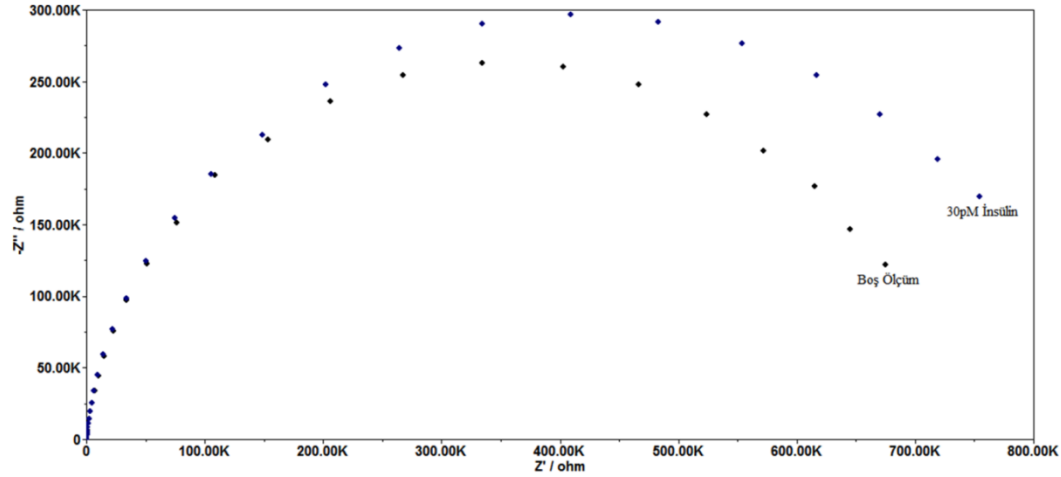
Şekil 3.28 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,0 HEPES için inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



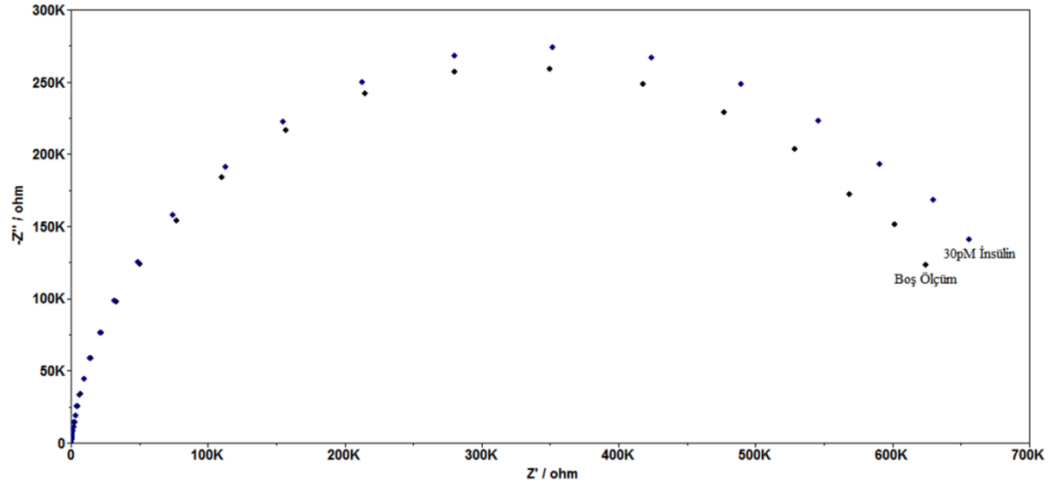
Şekil 3.29 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,2 HEPES için inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



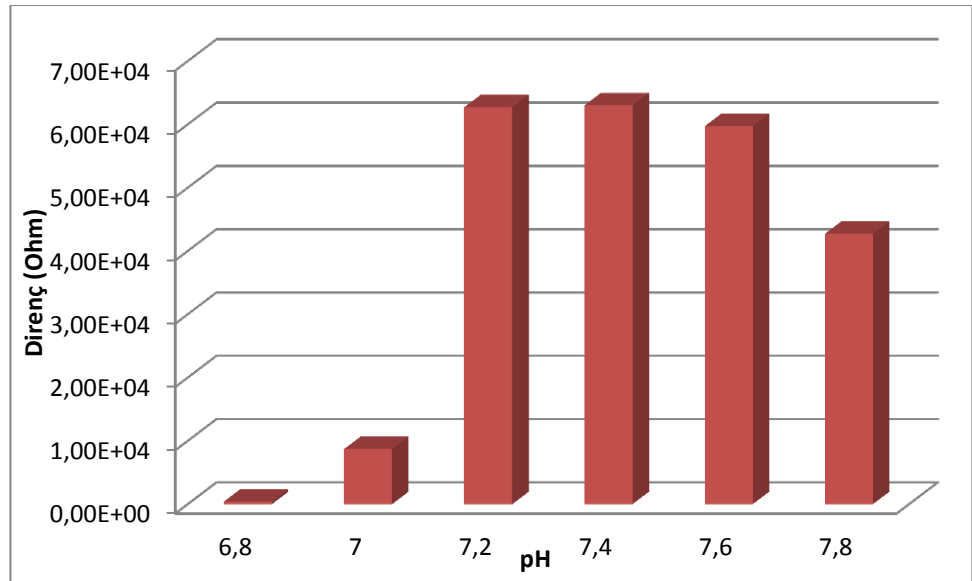
Şekil 3.30 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,4 HEPES için inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.31 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,6 HEPES için inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.32 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,8 HEPES için inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

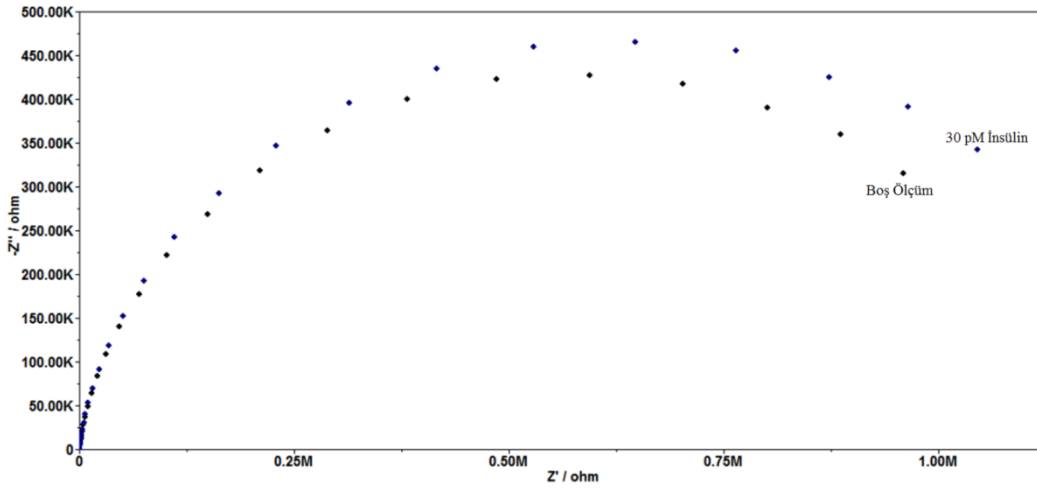


Şekil 3.33 İnkübasyon tamponu pH optimizasyonu ile ilgili devre direnci değişim grafiği

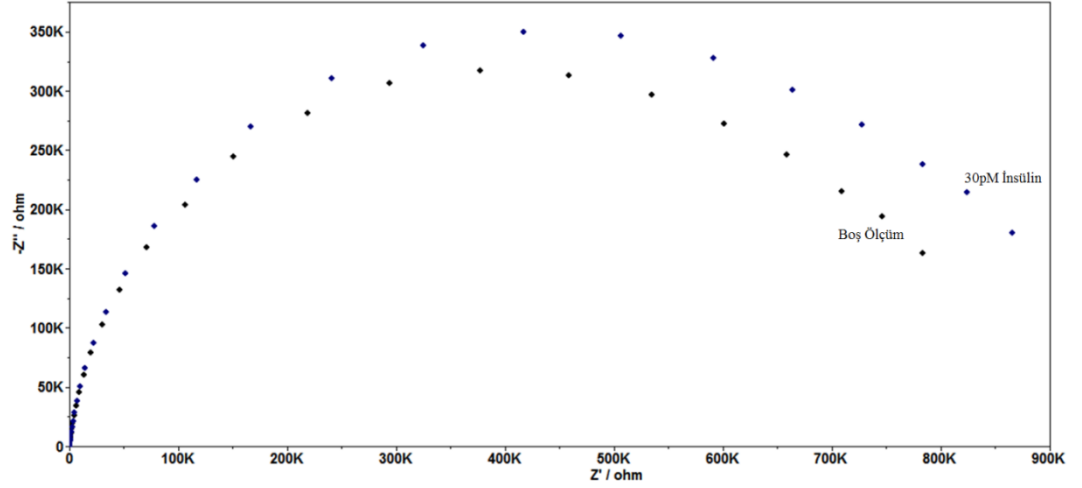
İmpedans sonuçları analizine göre en iyi inkübasyon tamponu pH sı 7,4 bulundu. Ancak sonuçlar değerlendirildiğinde göreceli olarak pH 7,4 ü %100 kabul edersek pH 7,2 için %99,5 pH 7,6 ise %94,8 olarak belirlendi. Bu durum etkileşim için uygun pH aralığının doğal ortam olan kan pH sı ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

3.2.1.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörde inkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonunun optimizasyonu

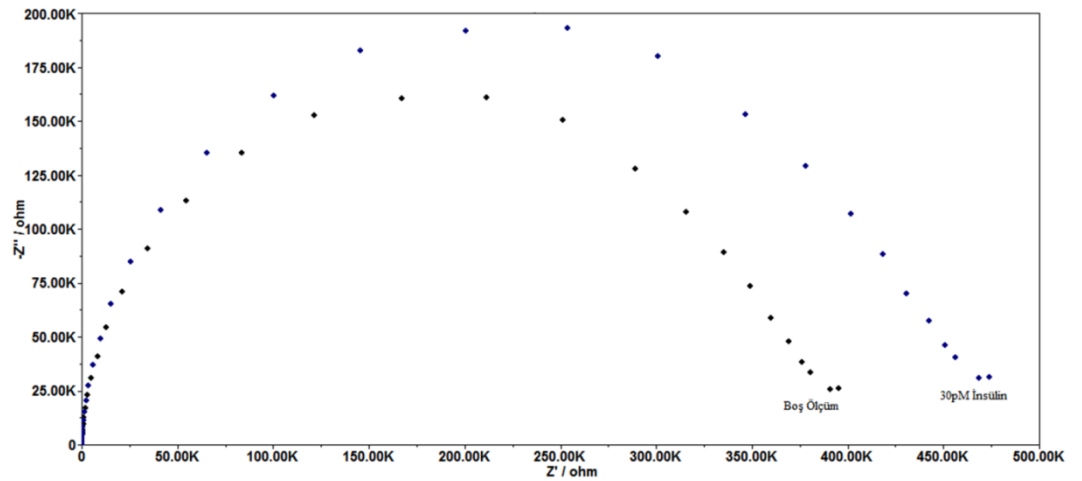
İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu denemesinde HEPES ve fosfat tampon sistemlerinin 10-25-50 mM şeklinde değişen konsantrasyonlarının 30 pM insülinin insülin antikoru ile etkileşimi incelendi. İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafikleri Şekil 3.34 – 3.35 – 3.36 – 3.37 – 3.38 – 3.39 ve 3.40’da verilmiştir.



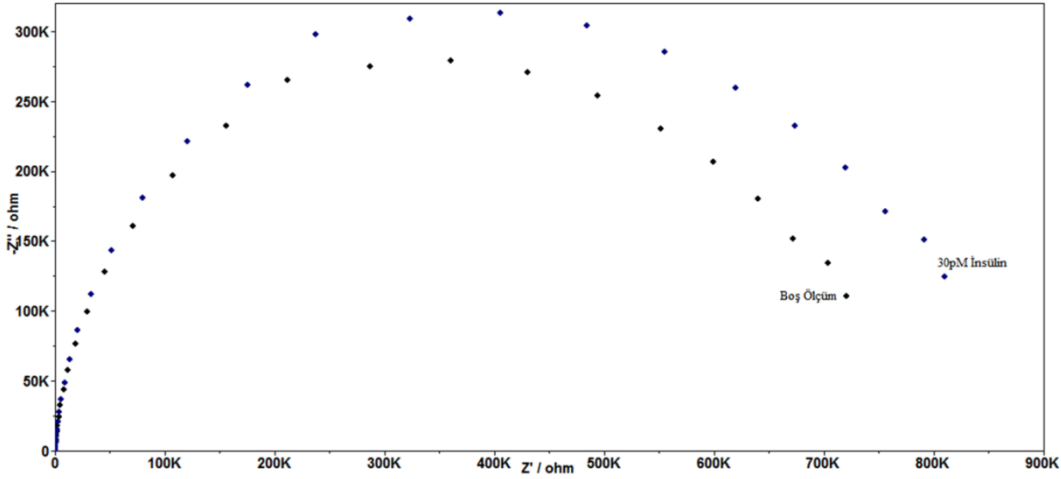
Şekil 3.34 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 1 a: 10 mM pH: 7,4 HEPES tamponu, [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



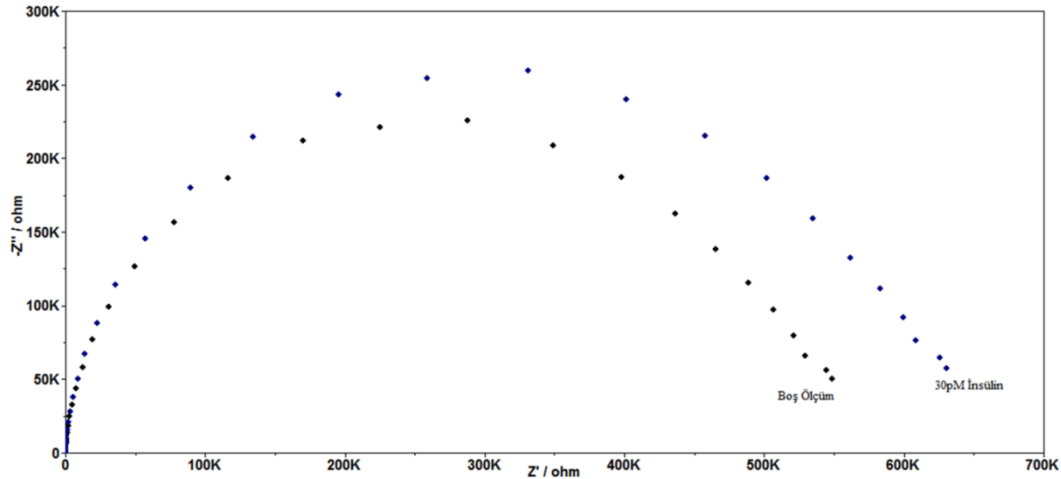
Şekil 3.35 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 2 a: 25 mM pH: 7,4 HEPES tamponu, [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



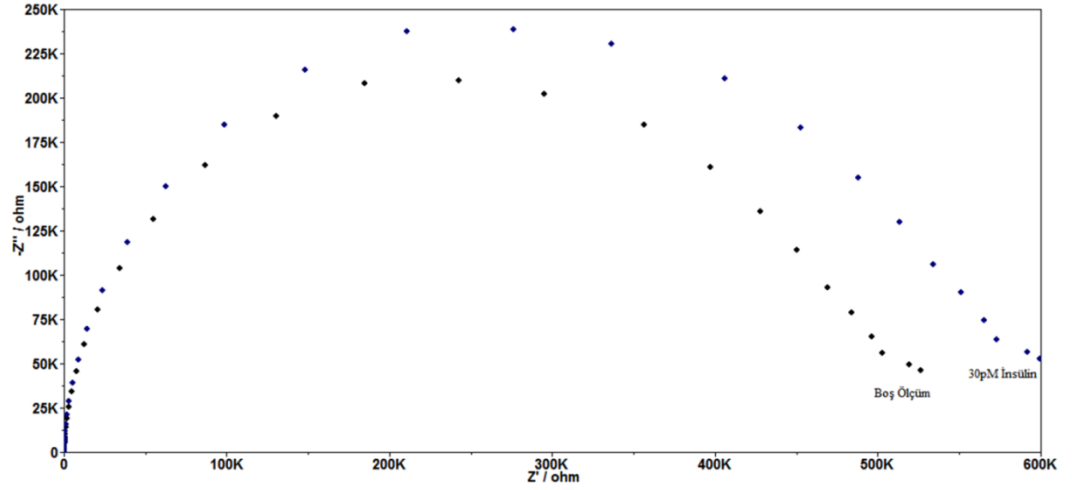
Şekil 3.36 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 3 a: 50 mM pH: 7,4 HEPES tamponu, [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



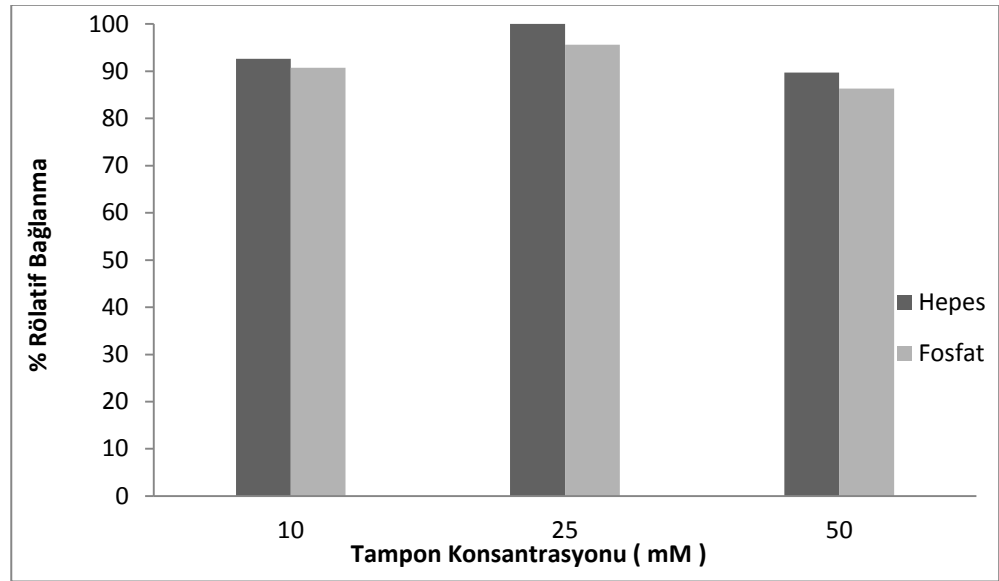
Şekil 3.37 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 1 b: 10 mM pH: 7,4 Fosfat tamponu, [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.38 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 2 b: 25 mM pH: 7,4 Fosfat tamponu, [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.39 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 3 b: 50 mM pH: 7,4 Fosfat tamponu, [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.40 İnsülin bağlanması üzerine inkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonlarının etkisi

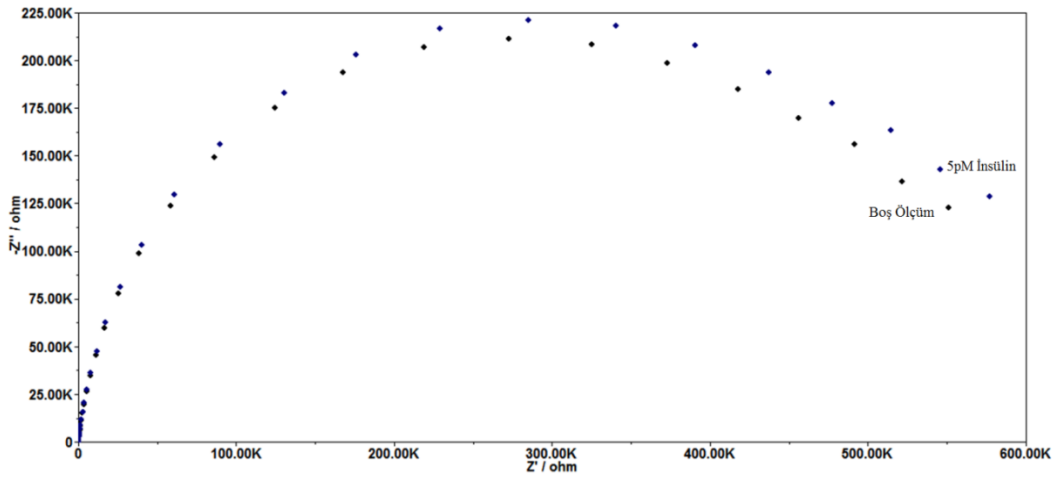
Şekil 3.40 dan da anlaşıldığı üzere en iyi sonuçlar 25 mM lık tampon konsantrasyonunda elde edilmiştir. Tampon sistemleri açısından değerlendirildiğinde HEPES tampon sistemi fosfat tampon sistemine nazaran göreceli olarak % 4,4 daha yüksek performans göstermektedir. Elde edilen

deneysel veriler doğrultusunda inkübasyon tampon sistemi ve konsantrasyonu sırasıyla HEPES pH:7,4 25 mM olarak belirlenmiştir.

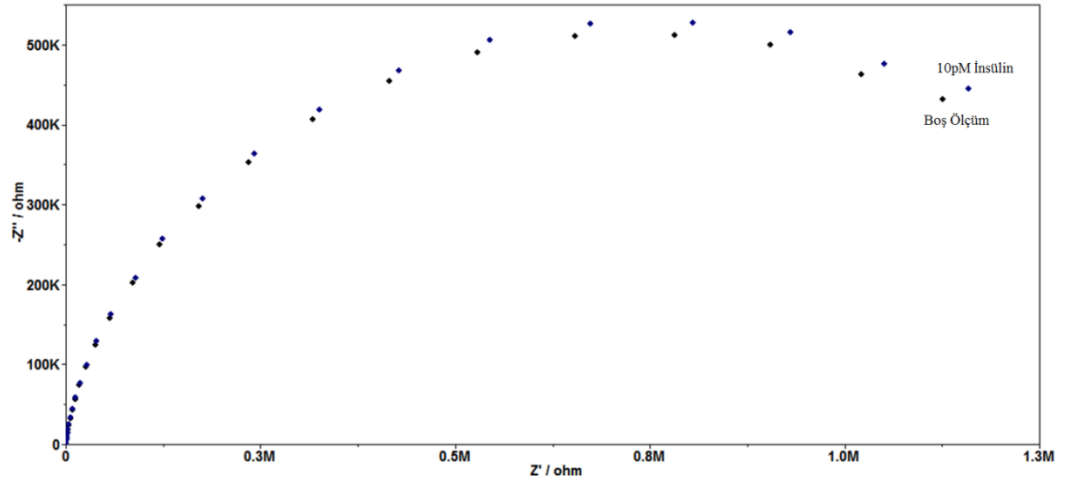
3.2.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine geliştirilen yönelik biyosensörün ölçüm parametrelerinin karakterizasyonu

3.2.2.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

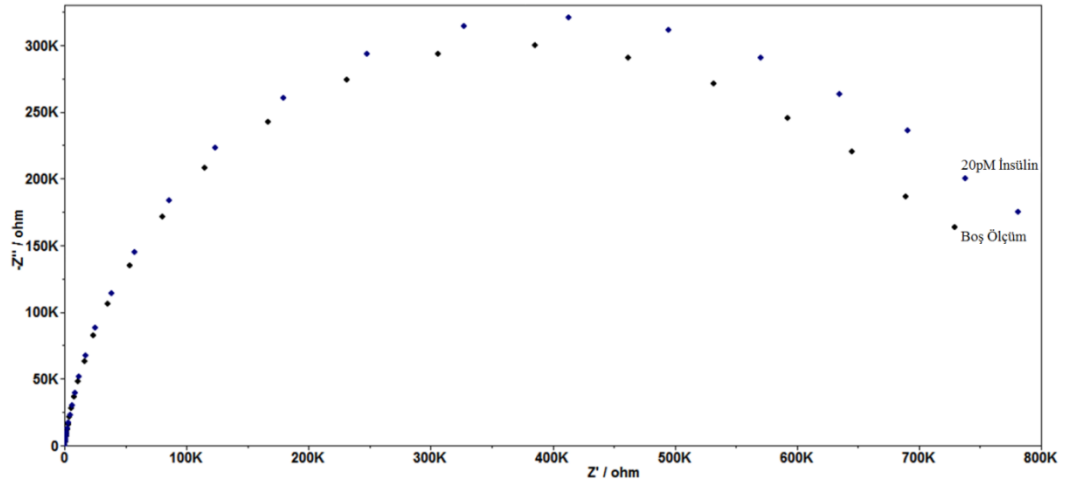
Optimizasyon denemeleri sonucunda elde edilen veriler dahilinde karakterizasyon çalışmalarına gerçekleştirildi. Bu çalışmada 5-50 pM ve 2,5-35 pM aralığında olmak üzere iki ayrı standart grafik oluşturuldu. Deneme ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği Şekil 3.41 ile Şekil 3.54 arasındaki şekillerde verilmiştir.



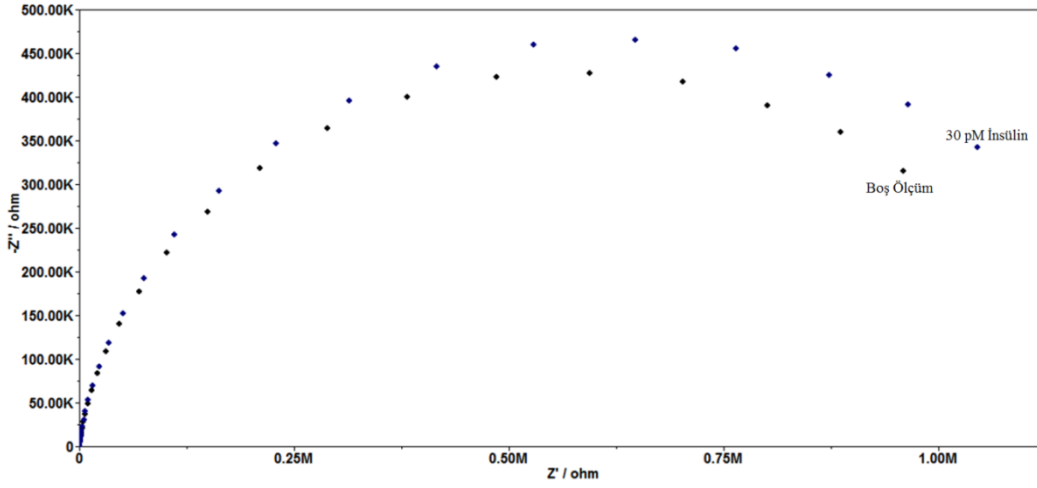
Şekil 3.41: Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



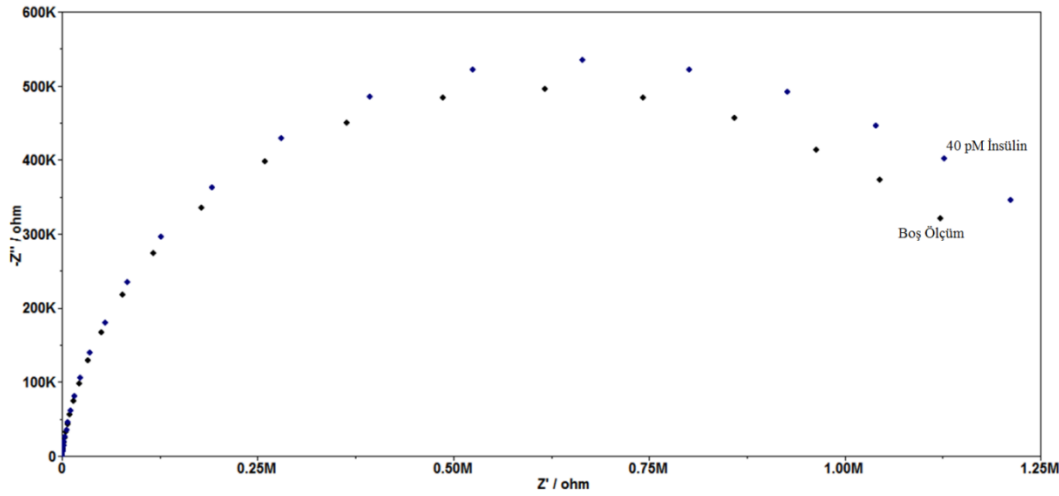
Şekil 3.42 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



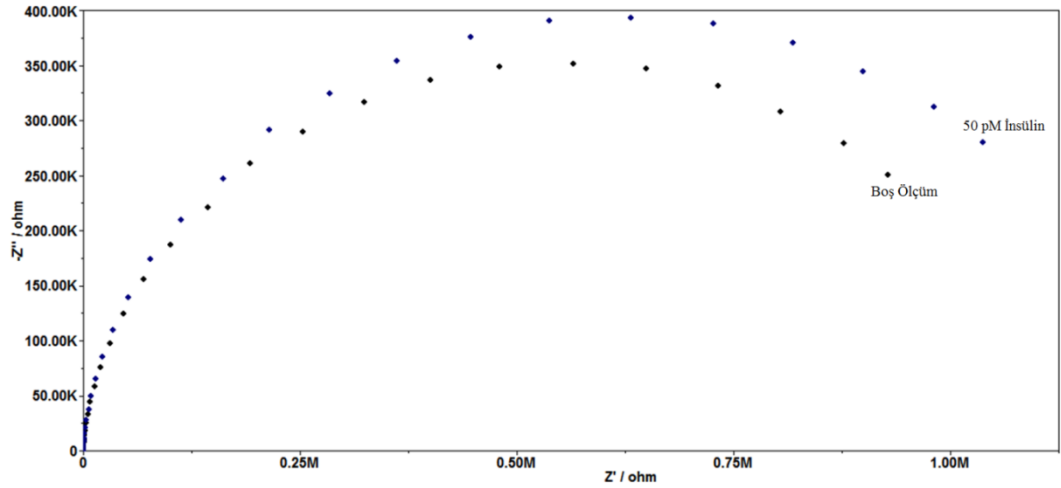
Şekil 3.43 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



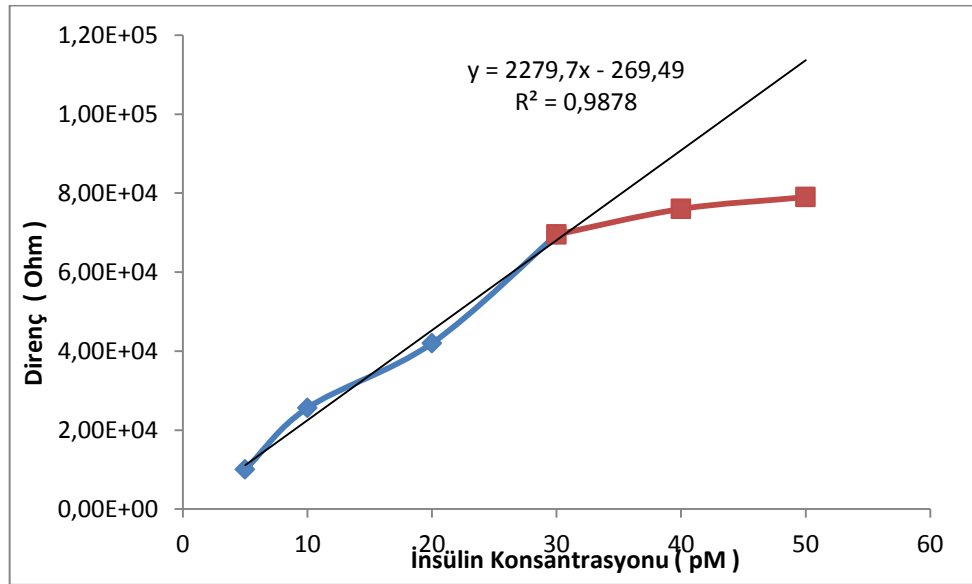
Şekil 3.44 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.45 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 40 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



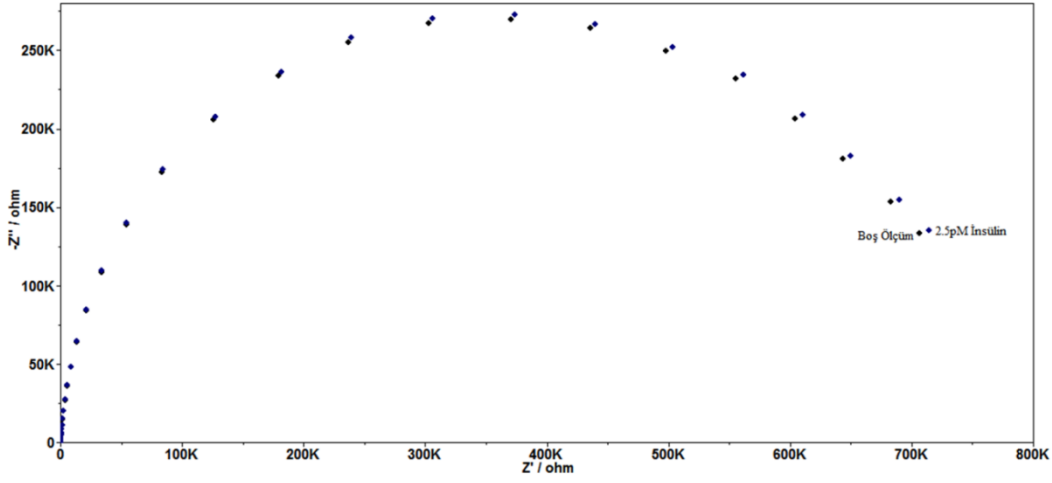
Şekil 3.46 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 50 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



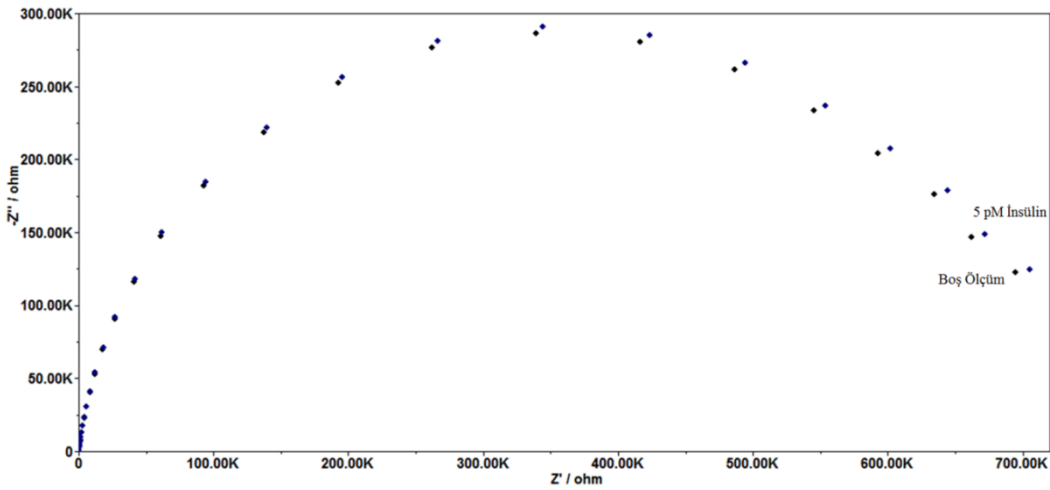
Şekil 3.47 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi denemelerinden elde edilen standart grafiği (5-50 pM insülin konsantrasyon aralığı)

Doğrusal tayin aralığı çalışmasından elde edilen bulgular çerçevesinde 30 pM insülin konsantrasyonu sonrasında doğrusallıktan sapma olduğu belirlendi. Alt ve üst tayin aralığını daha kesin belirlemek için 2,5 pM- 35 pM arasındaki insülin konsantrasyonlarında impedans ölçümleri gerçekleştirildi. Söz konusu

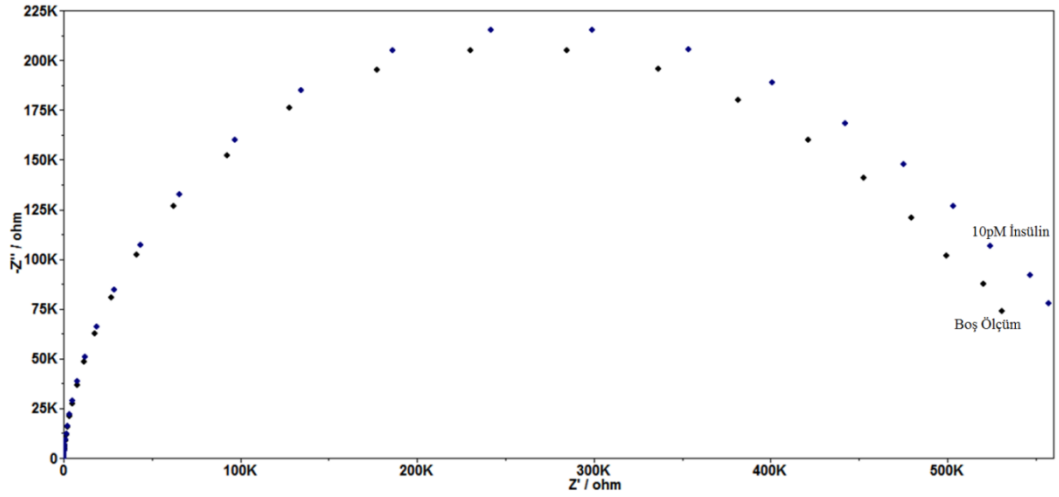
çalışmalara ilişkin sonuçlar Şekil 3.48 – Şekil 3.54 arasındaki grafiklerde verilmiştir.



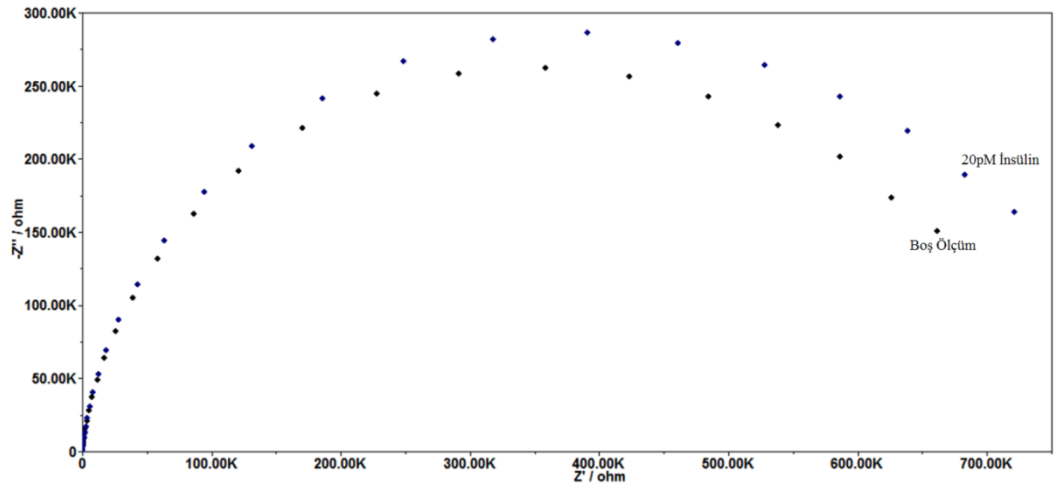
Şekil 3.48 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



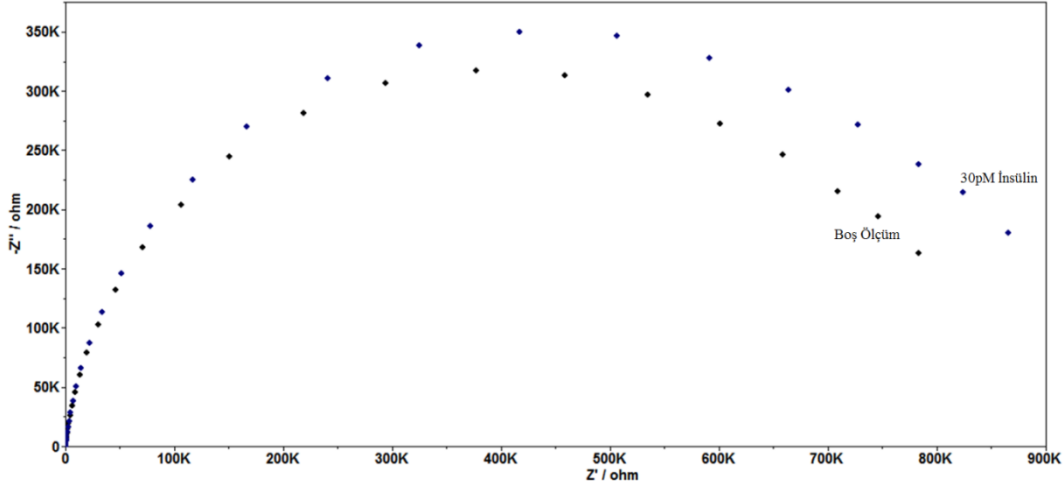
Şekil 3.49 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



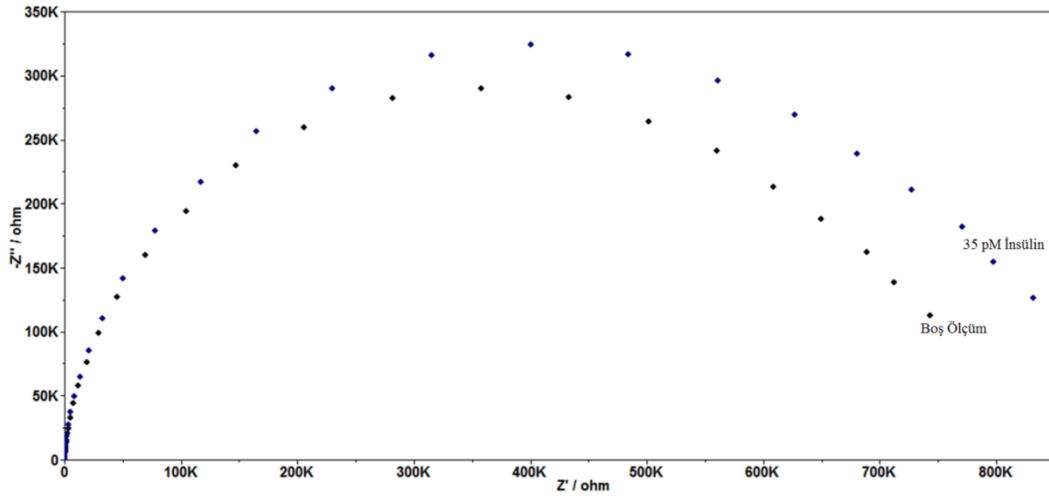
Şekil 3.50 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



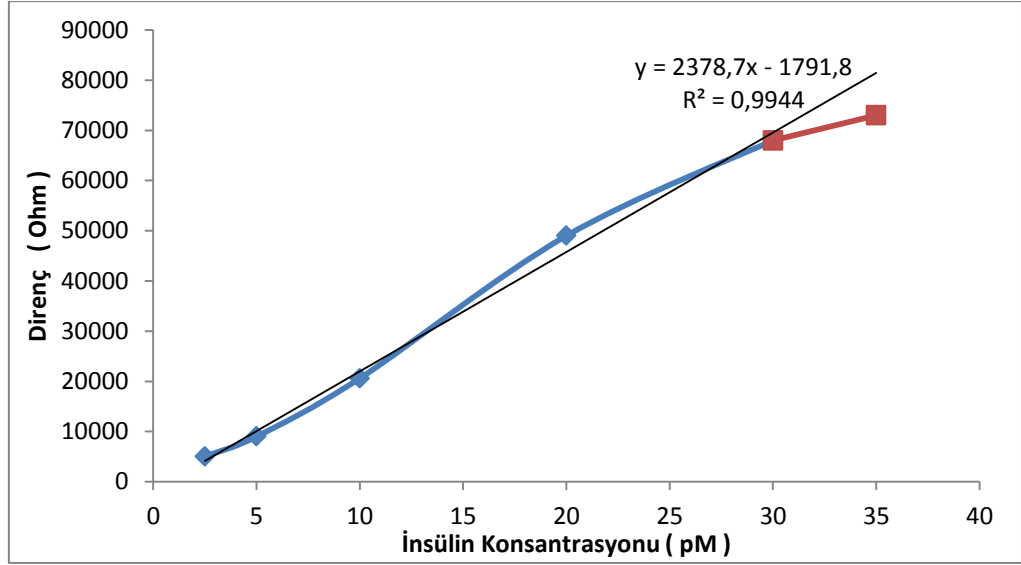
Şekil 3.51 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.52 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



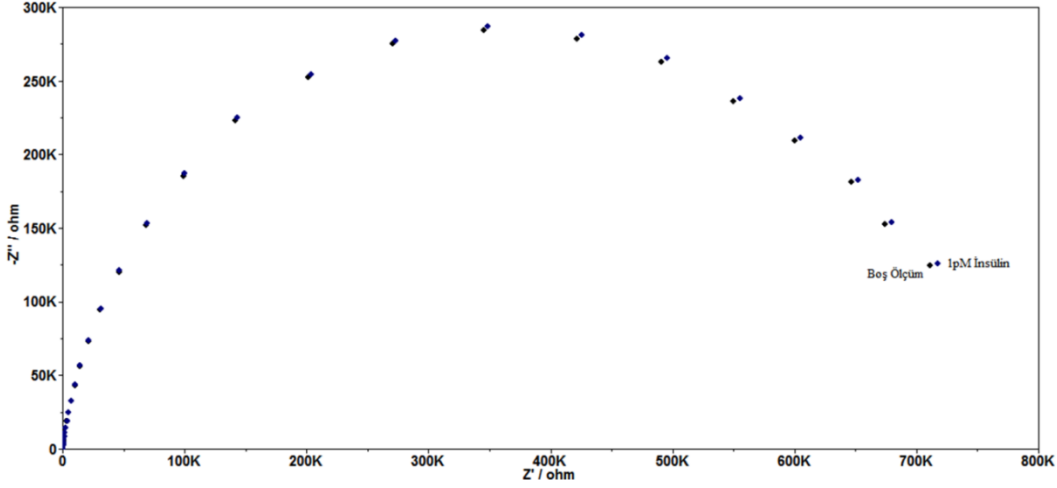
Şekil 3.53 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 35 pM insülin varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



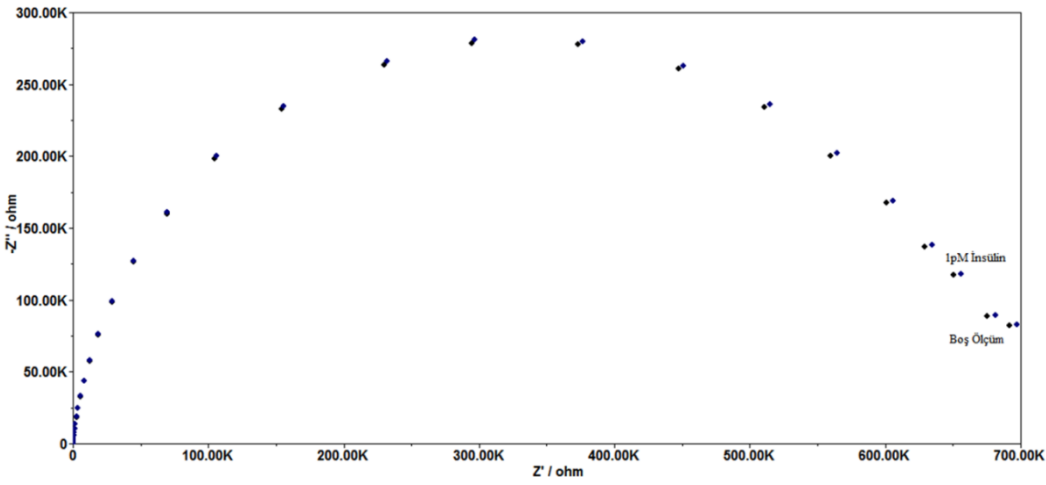
Şekil 3.54 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi denemelerinden elde edilen standart grafiği
(2,5-35pM insülin konsantrasyon aralığı)

Grafiklerden de anlaşılacağı gibi sensörün ölçüm aralığının 2,5-30 pM olduğu ve 35 pM insülin değerinde doğrusallıktan sapma başladığı gözlemlendi.

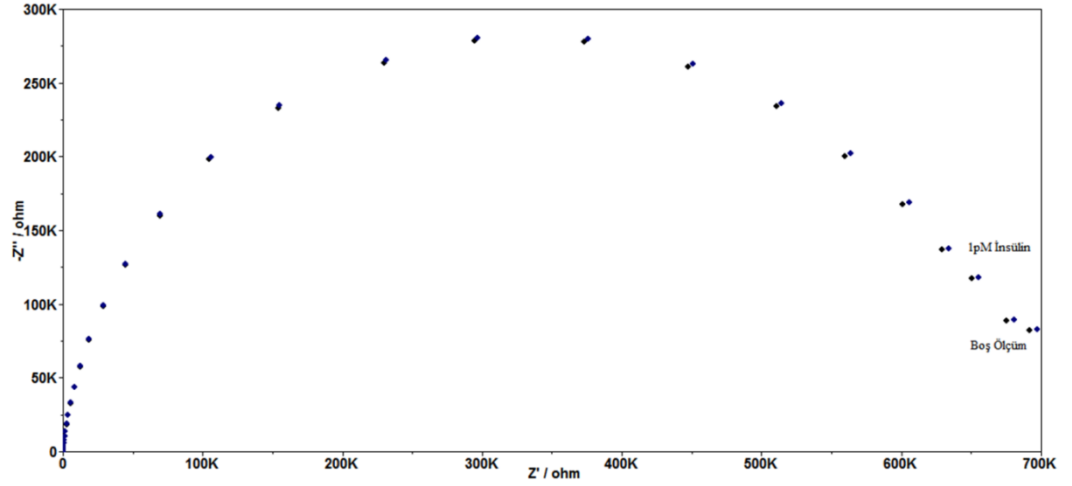
Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi denemelerinde üst sınır 30 pM insülin konsantrasyonu olarak belirlendi. Bu denemede ise alt tayin sınırının daha kesin bir şekilde belirlenmesi için 1- 2.5 ve 5 pM insülin konsantrasyonları kullanılarak 4 er deneme yapıldı. Deneme ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları grafikleri Şekil 3.55 ila Şekil 3.66 arasında ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci çizelge 3.1 de verilmiştir.



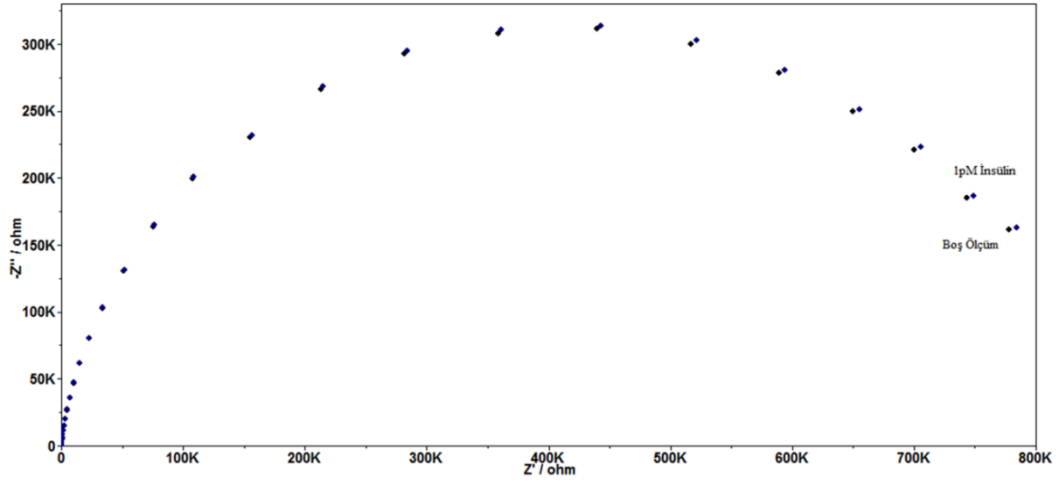
Şekil 3.55 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



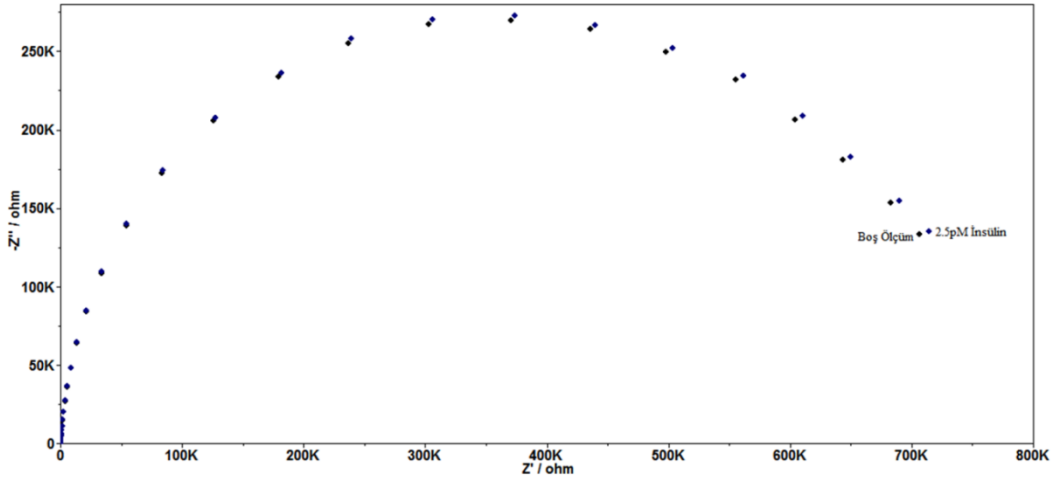
Şekil 3.56 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



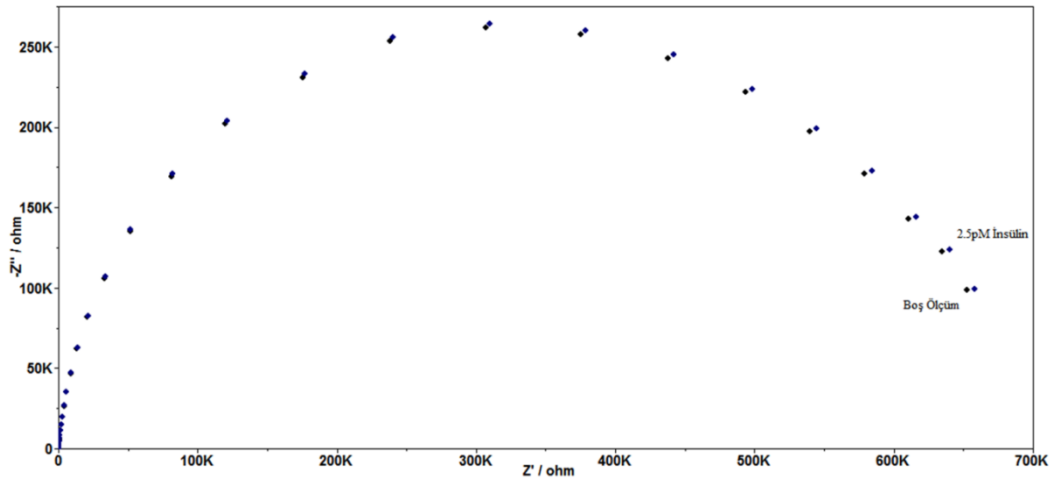
Şekil 3.57 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



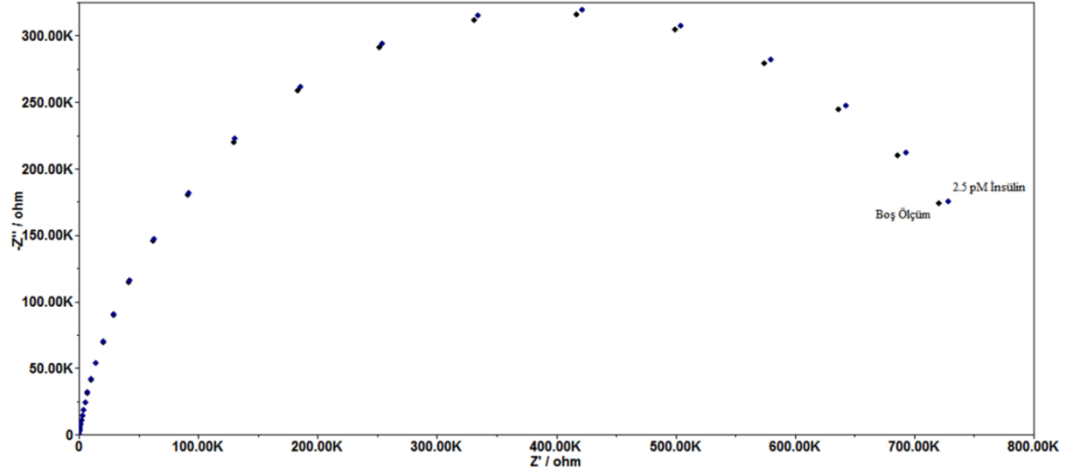
Şekil 3.58 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



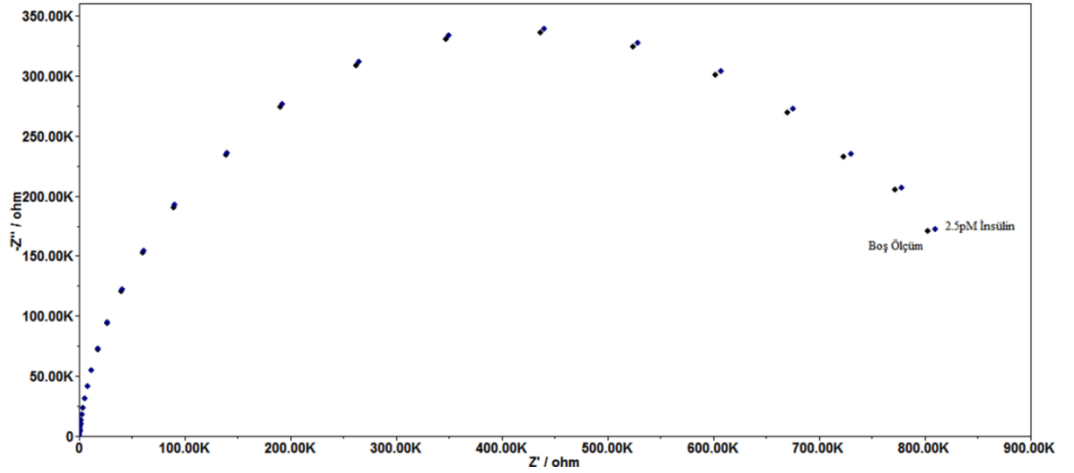
Şekil 3.59 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



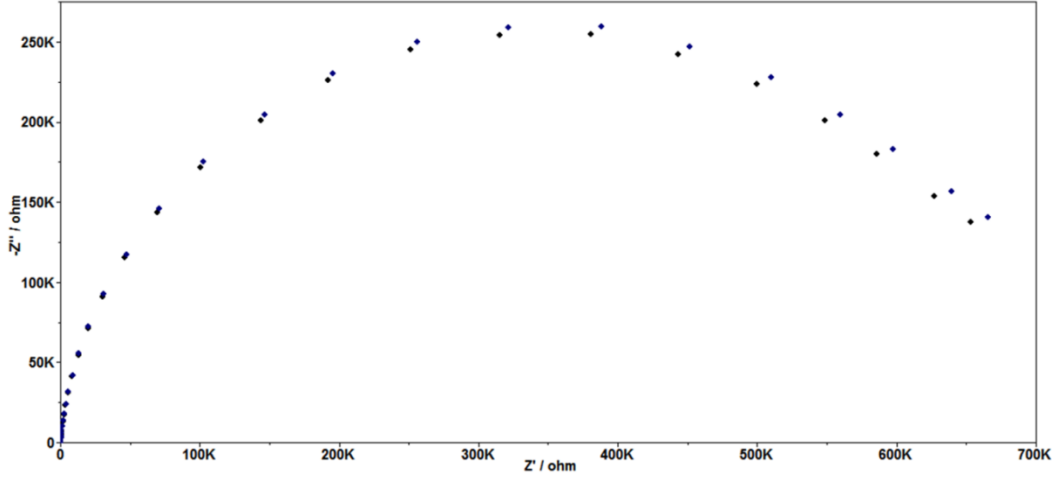
Şekil 3.60 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



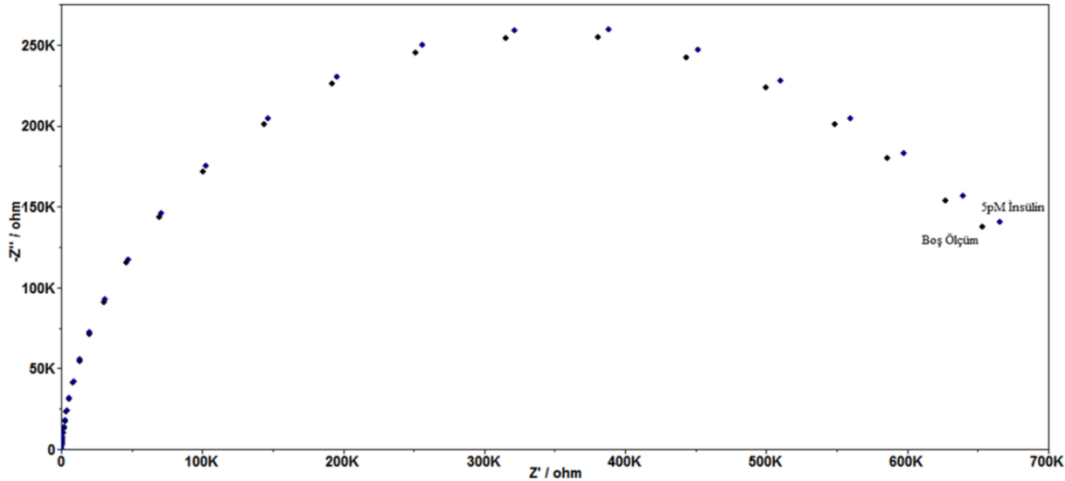
Şekil 3.61 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



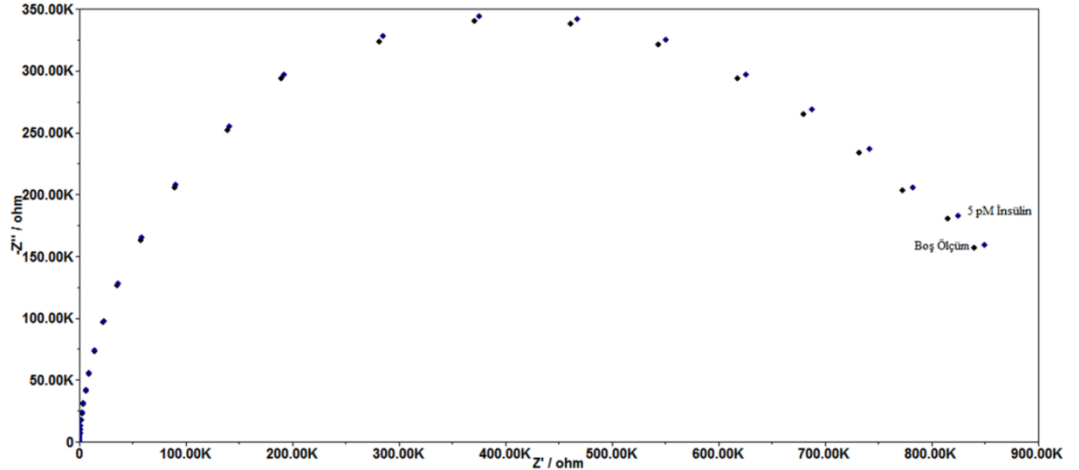
Şekil 3.62 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



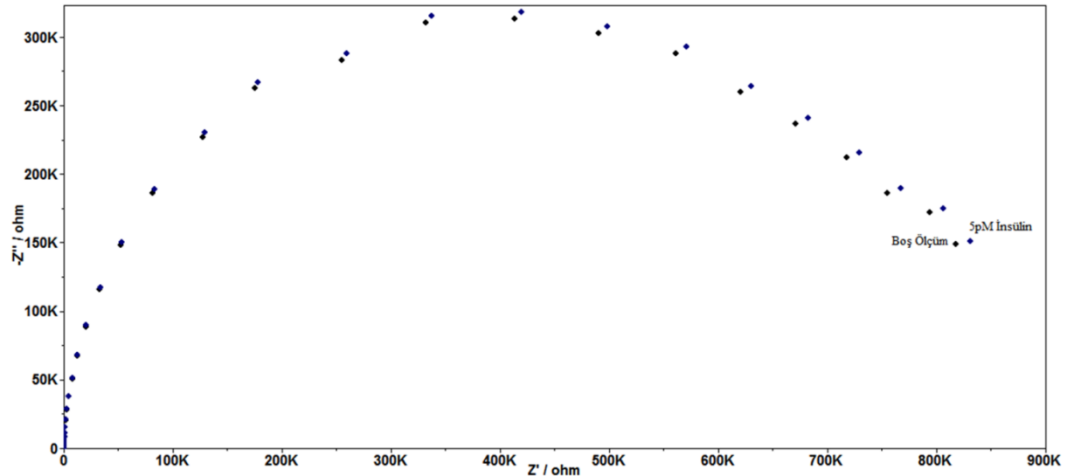
Şekil 3.63 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.64 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.65 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.66 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

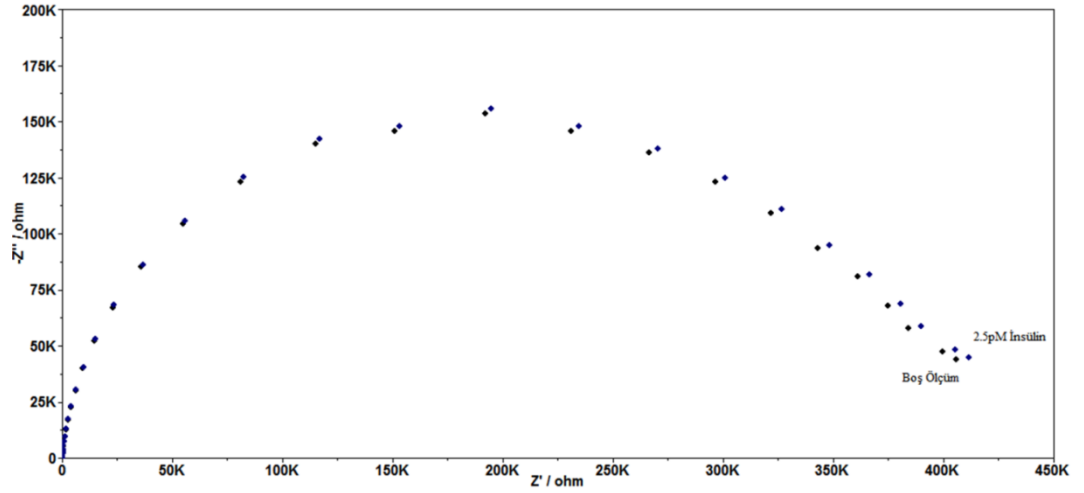
Çizelge 3.1 İnsülin konsantrasyonlarının oluşturdukları ortalama direnç

pM İnsülin	Ortalama Direnç Ohm
1	4850
2.5	5750
5	9750

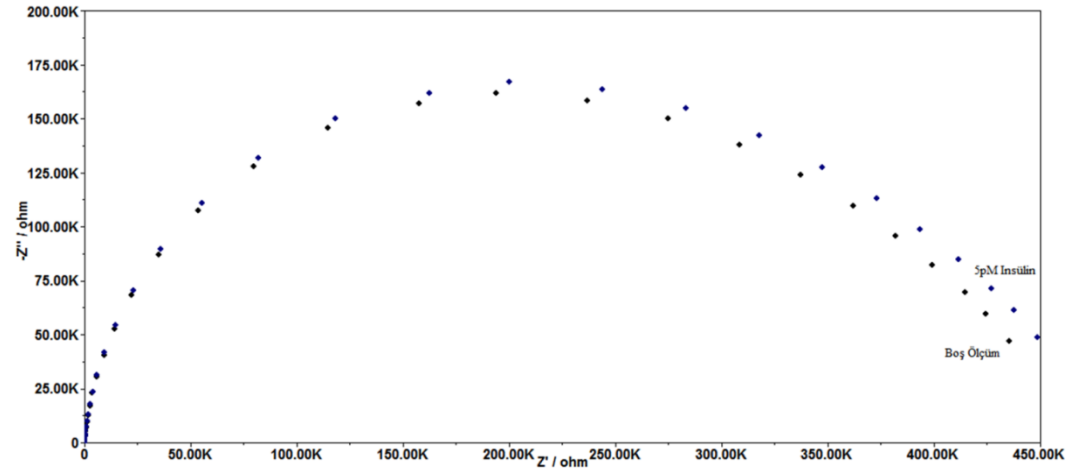
Yapılan denemeler sonucunda 1 pM insülin konsantrasyonu 2,5 pM insülin konsantrasyonuna göre daha düşük olmasına rağmen doğrusallıktan sapma göstermektedir. Bu bilgiler ışığı altında tayin edilebilir insülin konsantrasyonu için alt sınır 2,5 pM olarak belirlendi.

3.2.2.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik biyosensörün tekrar üretilebilirlik denemeleri

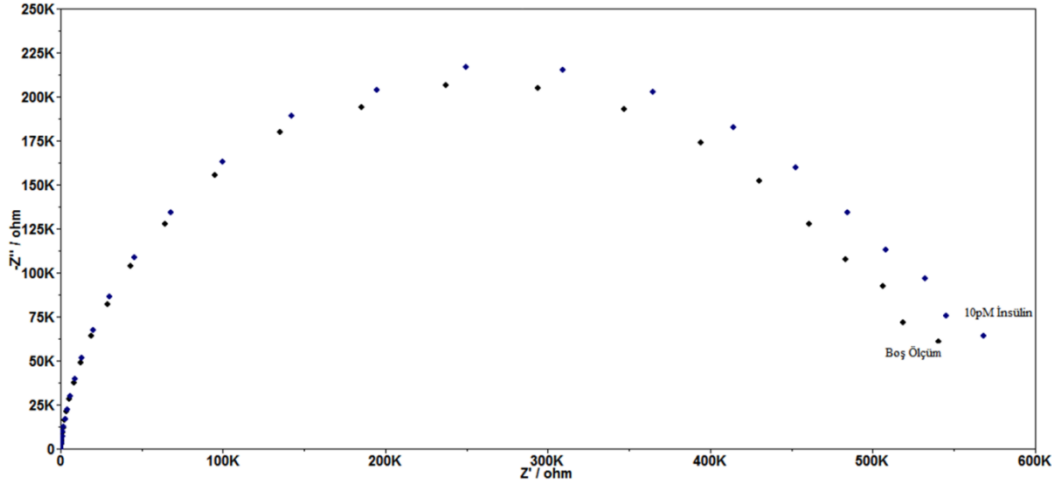
Tekrar üretilebilirlik denemesi ile insülin antikorunun immobilize edilmesiyle hazırlanan her yeni biyosensörde elektrot için benzer sonuçlar gösterip göstermediği araştırıldı. Bu çalışma için 2,5 – 30 pM arası 5 standart grafiği hesaplandı. Çizilen standart grafikleri için eğim ve R^2 değerleri hesaplandı. Yapılan her çalışmanın Nyquist diyagramları Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci ile çizilen standart grafikleri ve tüm standart grafiklerinin denklemi, Şekil 3.67 ile şekil 3.101 lerde gösterildi. Elde edilen standart grafikleri nin doğru denklemleri ve R^2 değerleri Çizelge 3.2 de verilmiştir.



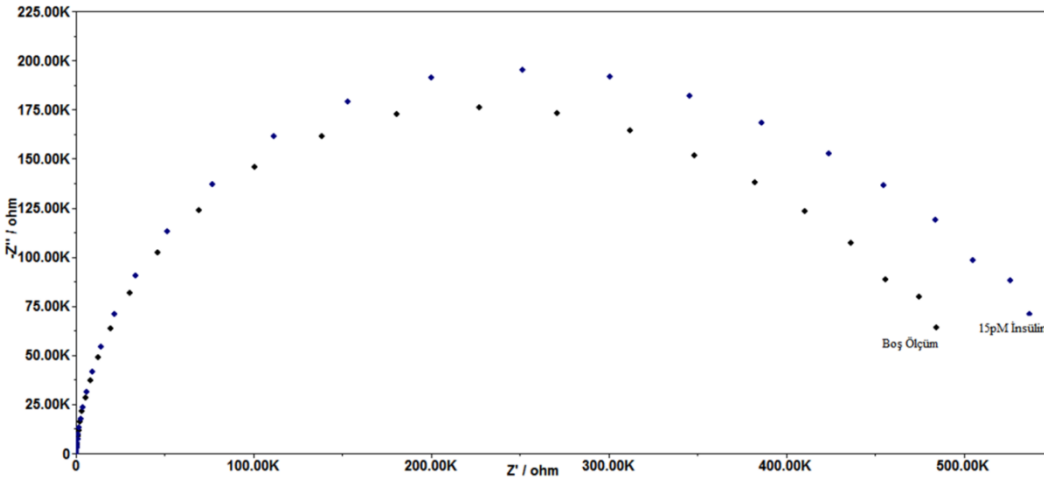
Şekil 3.67 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



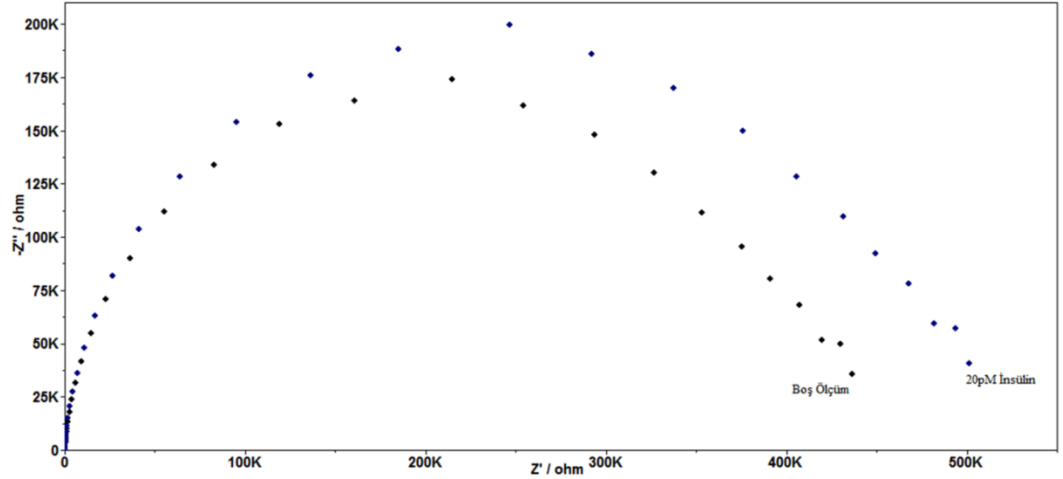
Şekil 3.68 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



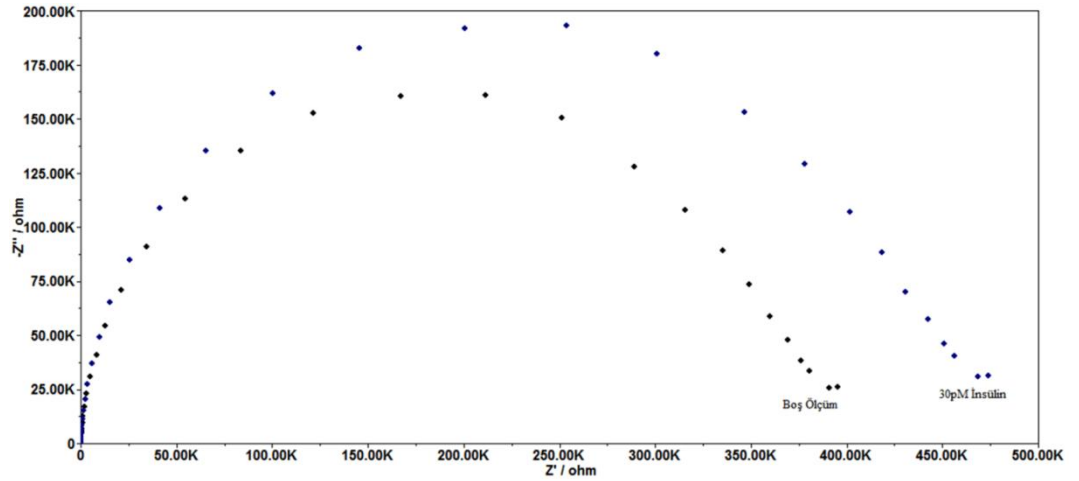
Şekil 3.69 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



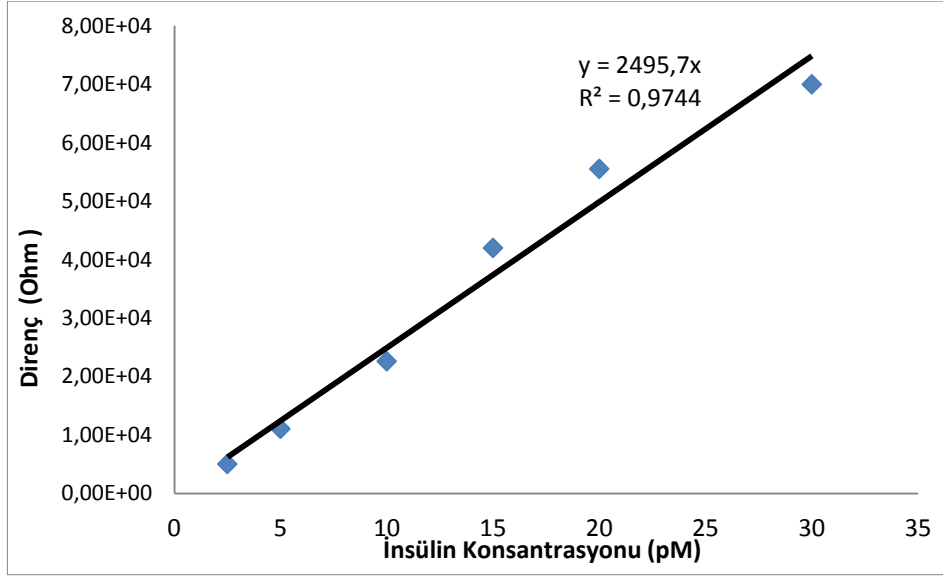
Şekil 3.70 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 15 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



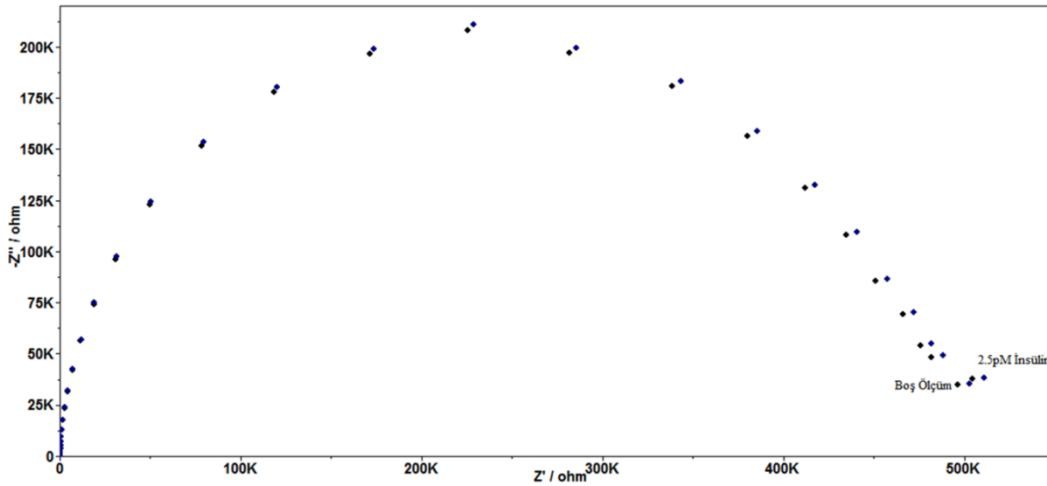
Şekil 3.71 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



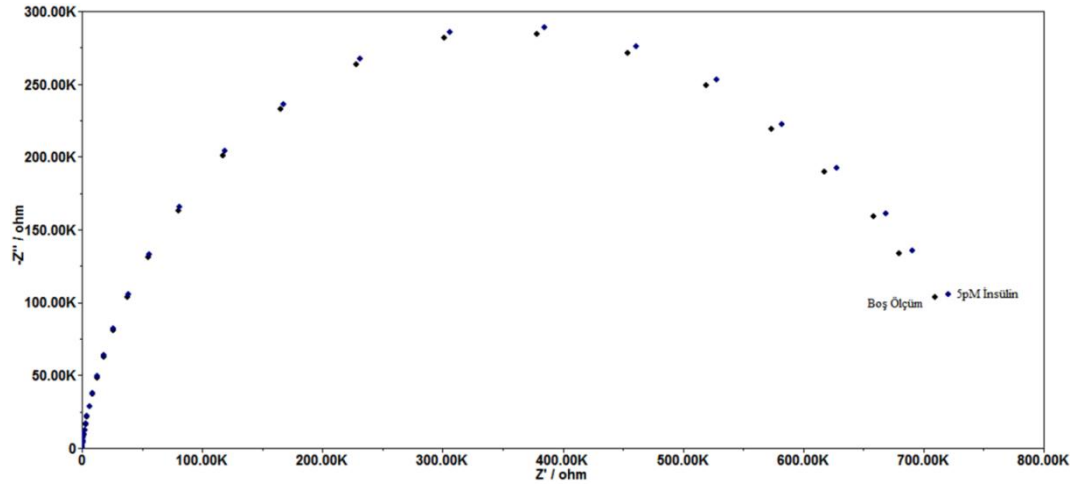
Şekil 3.72 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.73 1. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı)

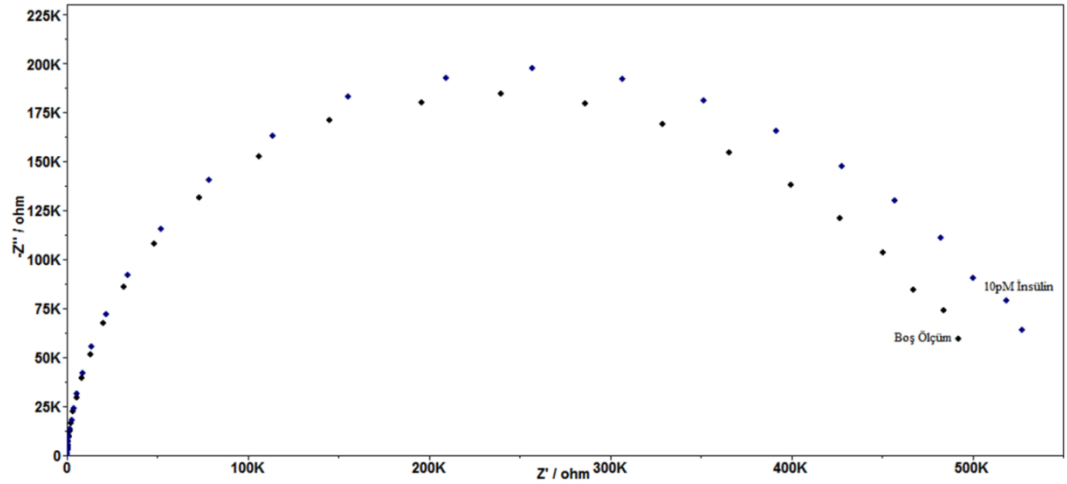


Şekil 3.74 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



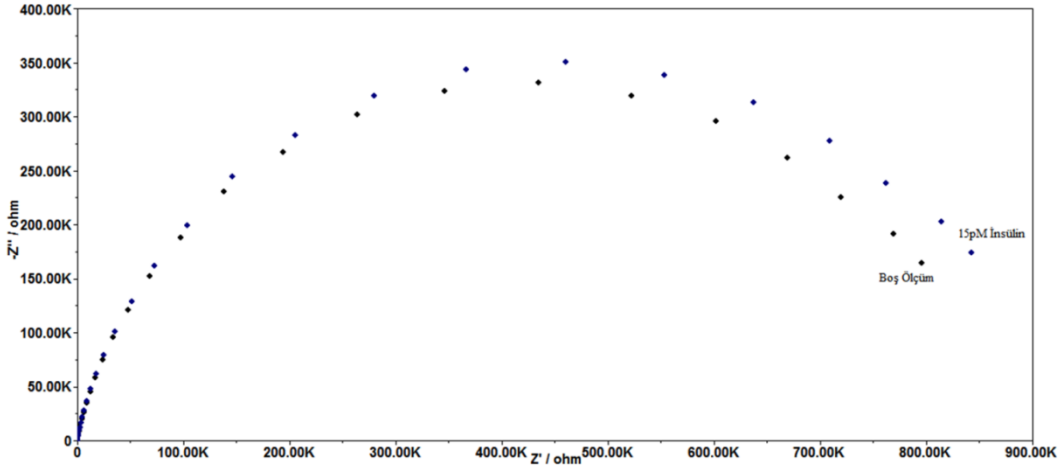
Şekil 3.75 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü

2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

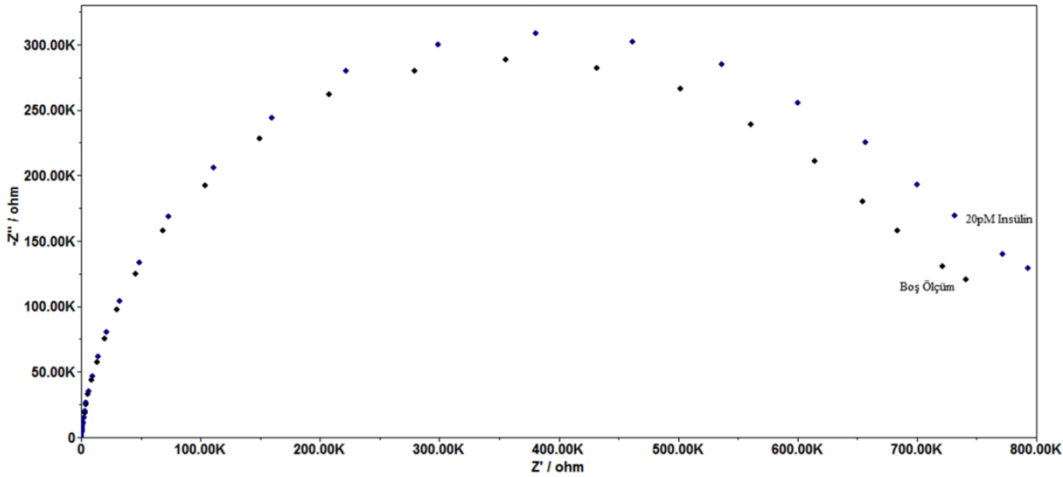


Şekil 3.76 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans

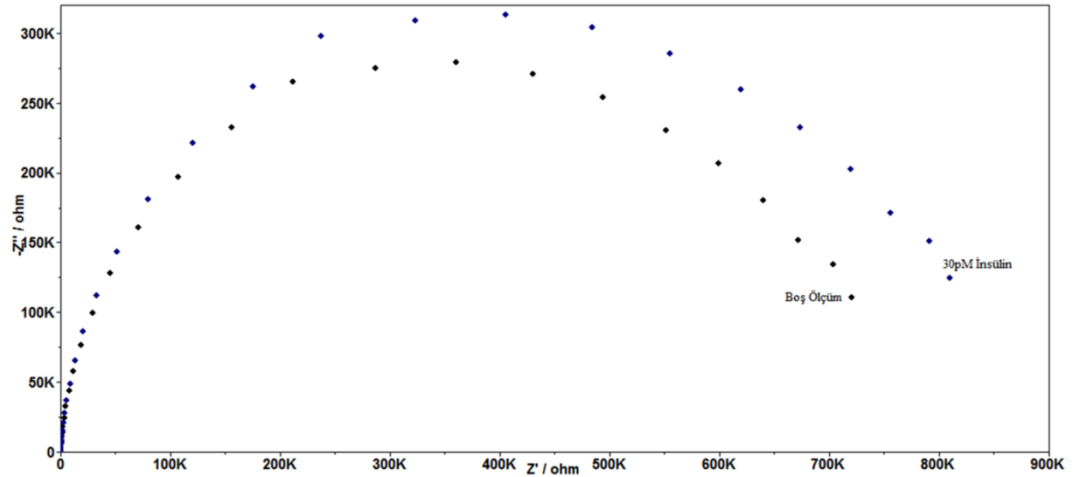
ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



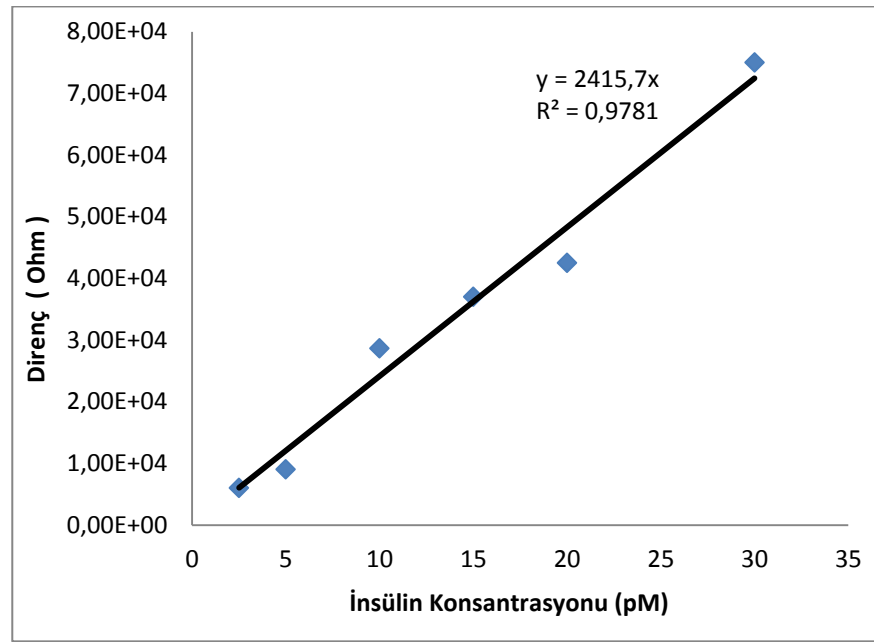
Şekil 3.77 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 15 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



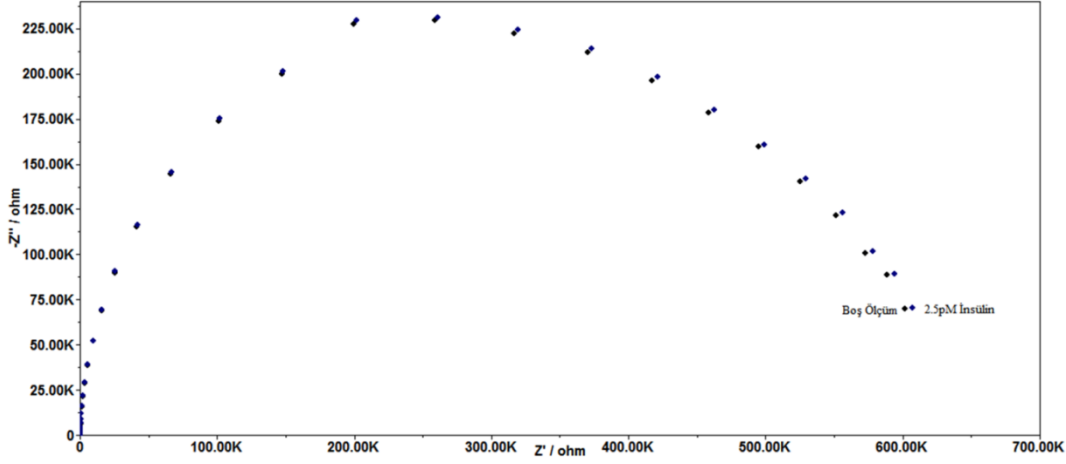
Şekil 3.78 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



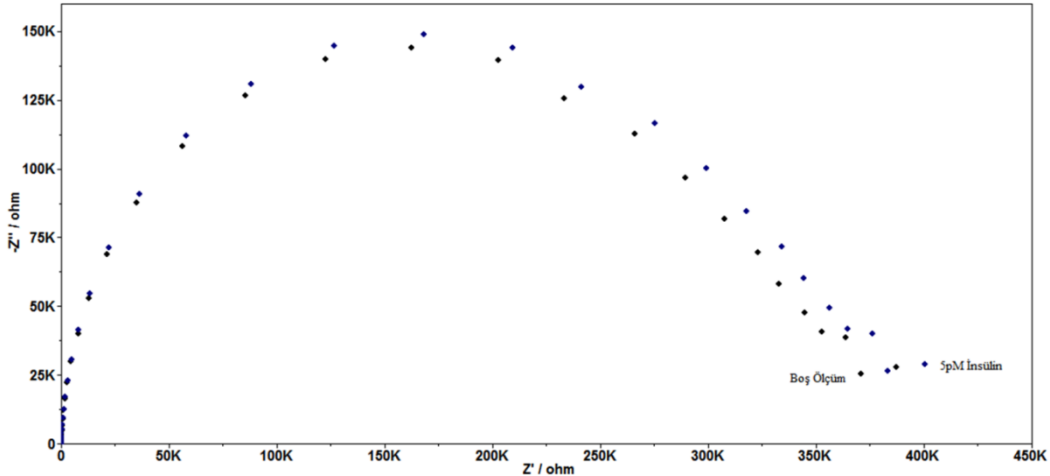
Şekil 3.79 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



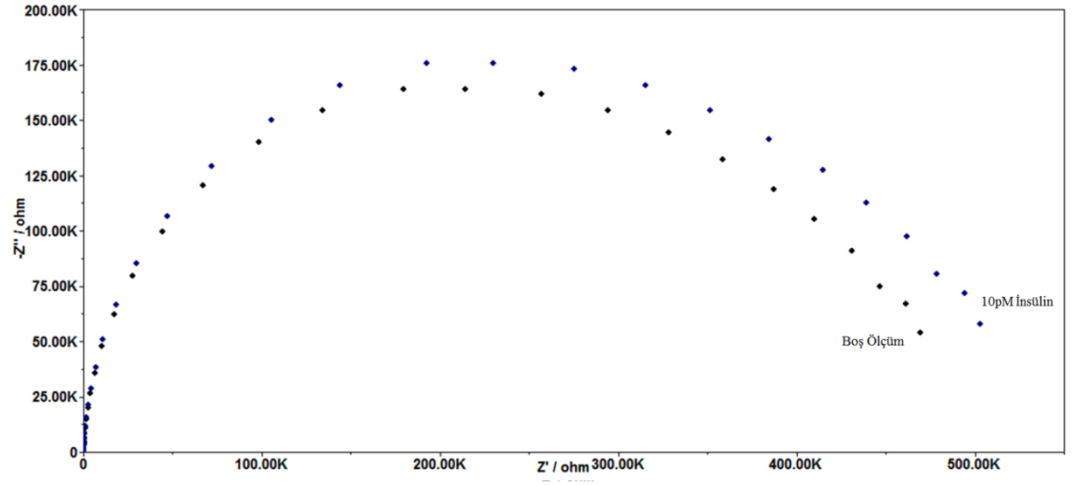
Şekil 3.80 2. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı)



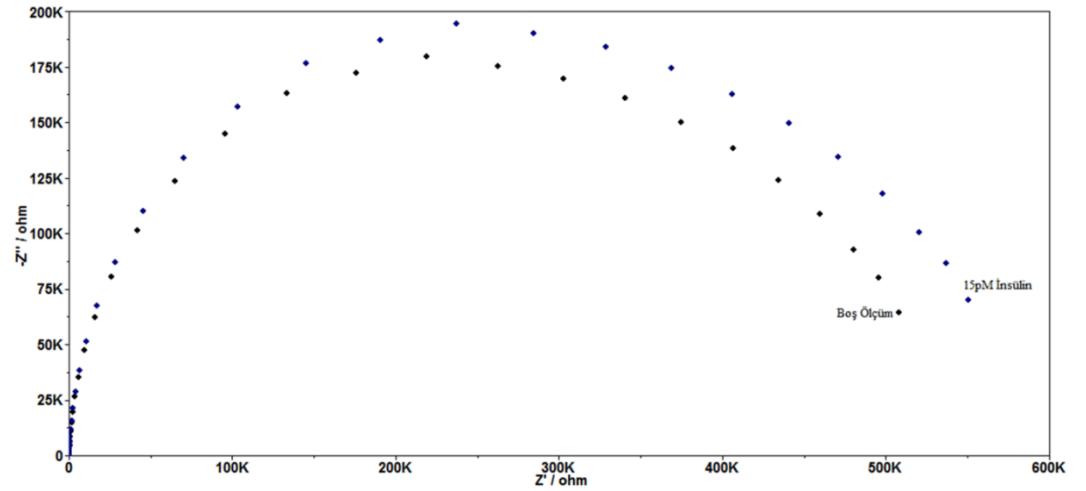
Şekil 3.81 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



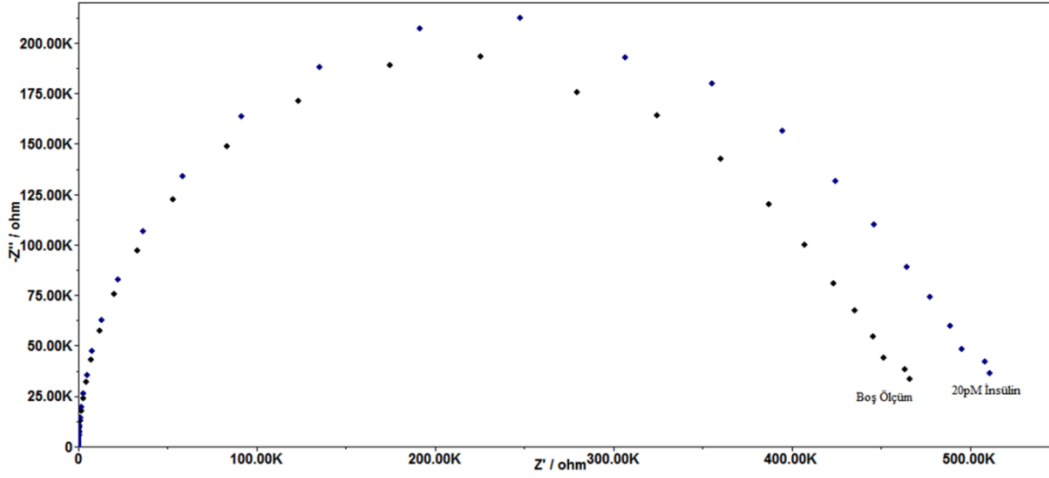
Şekil 3.82 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



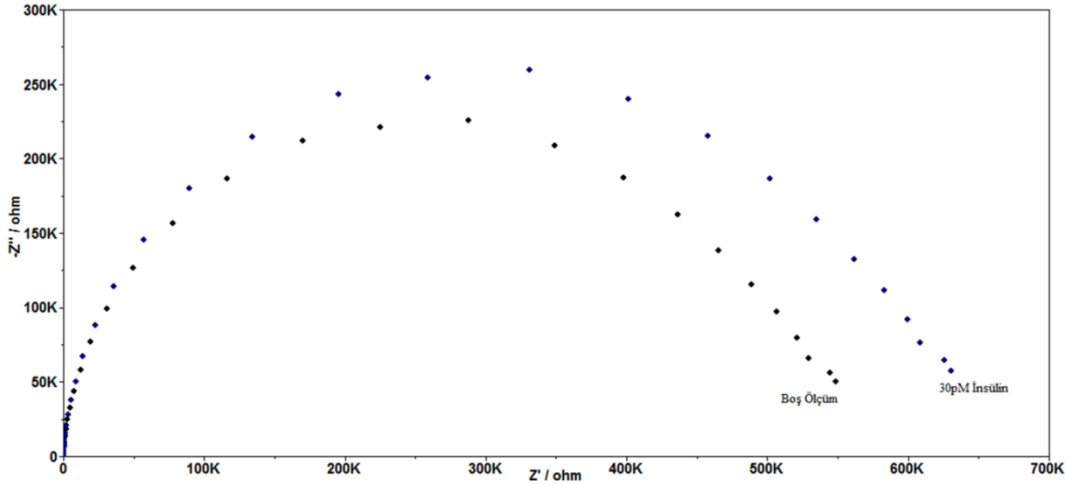
Şekil 3.83 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



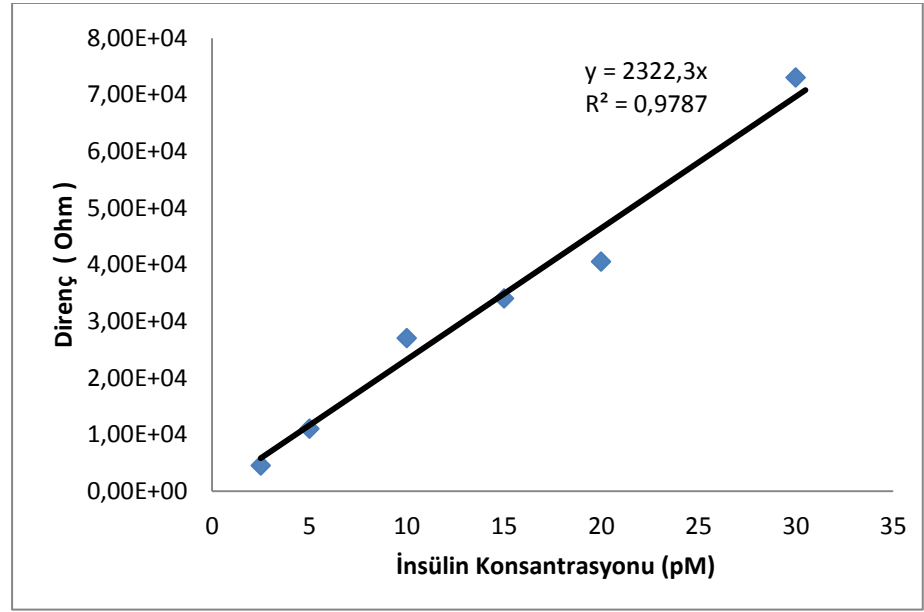
Şekil 3.84 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 15 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



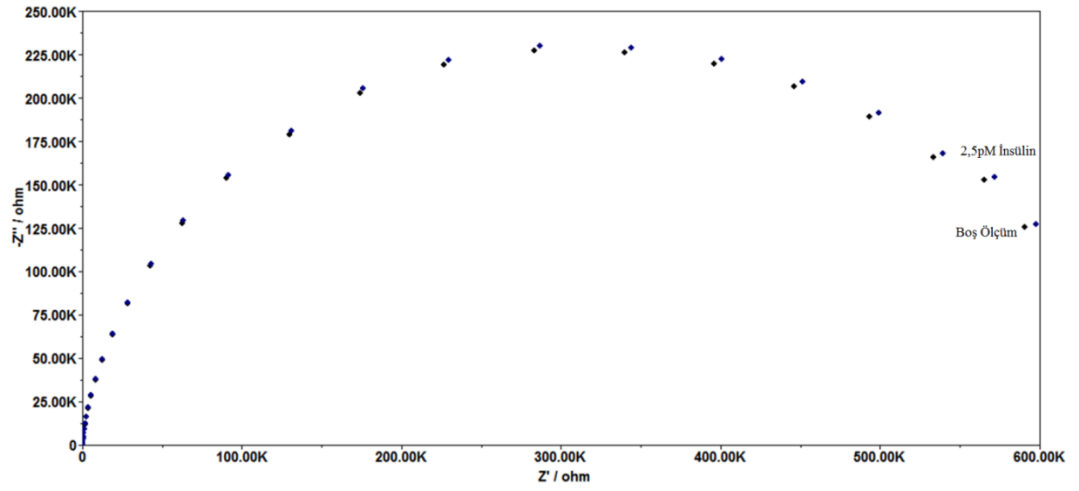
Şekil 3.85 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



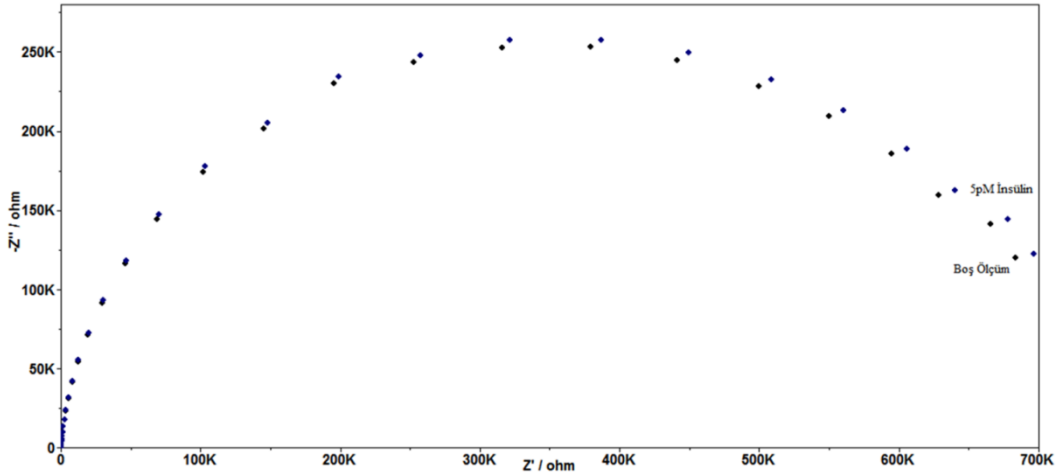
Şekil 3.86 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.87 3. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı)

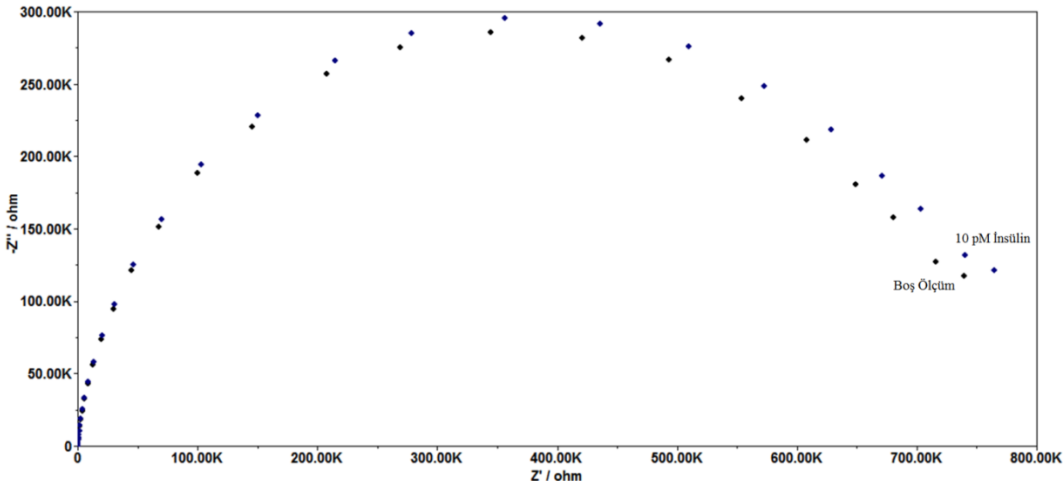


Şekil 3.88 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



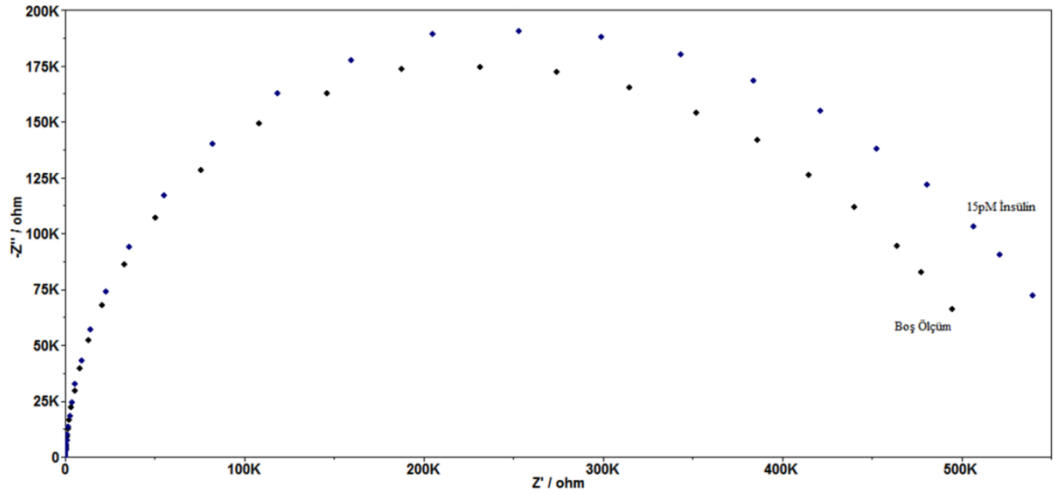
Şekil 3.89 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü

4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

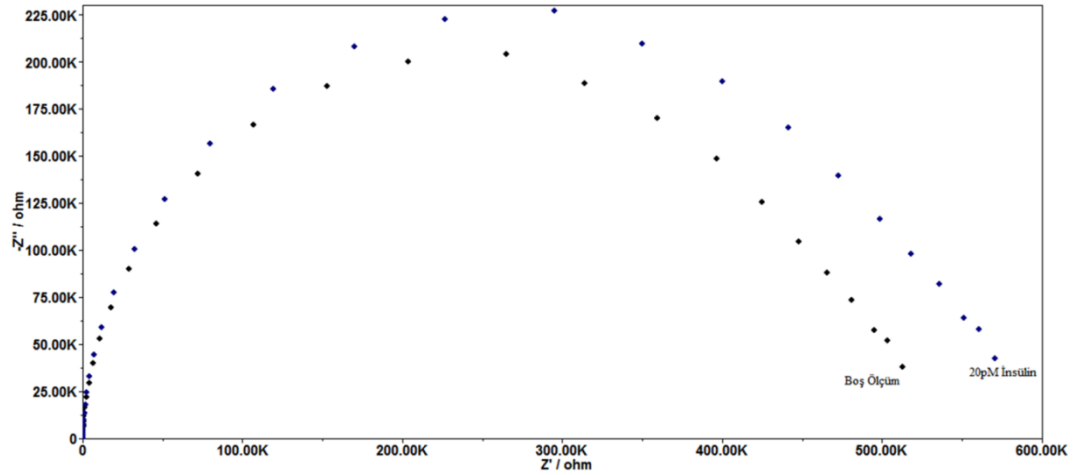


Şekil 3.90 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü

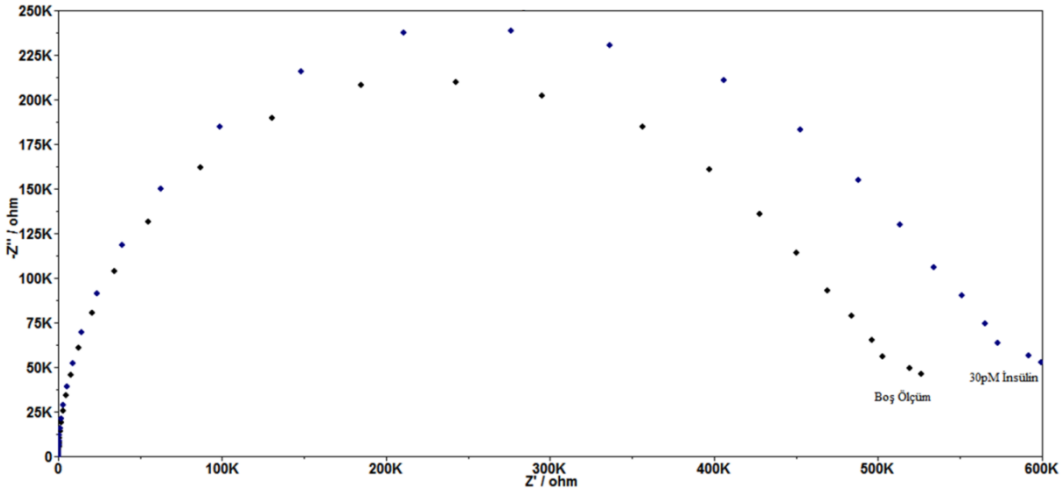
4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



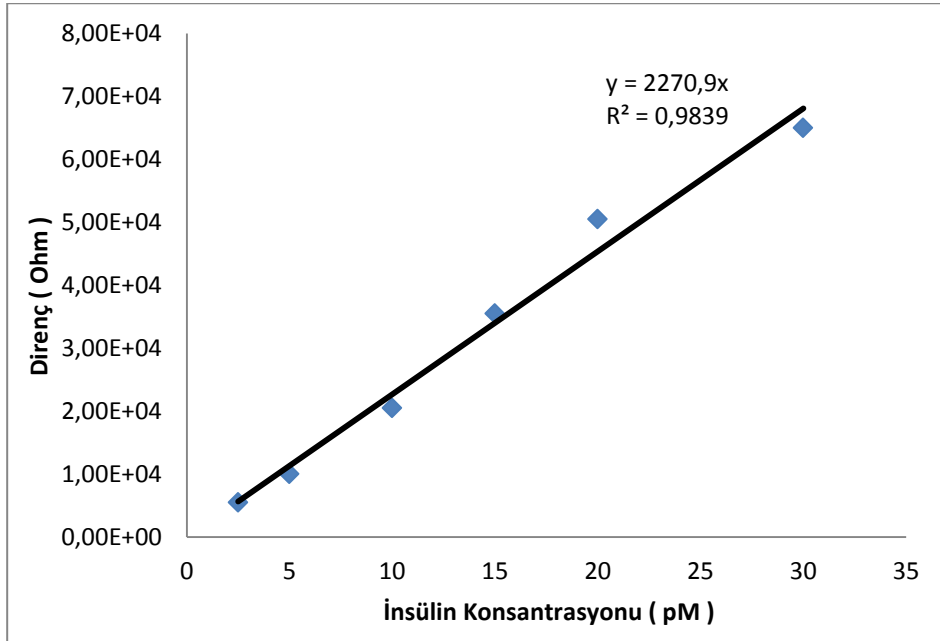
Şekil 3.91 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 15 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



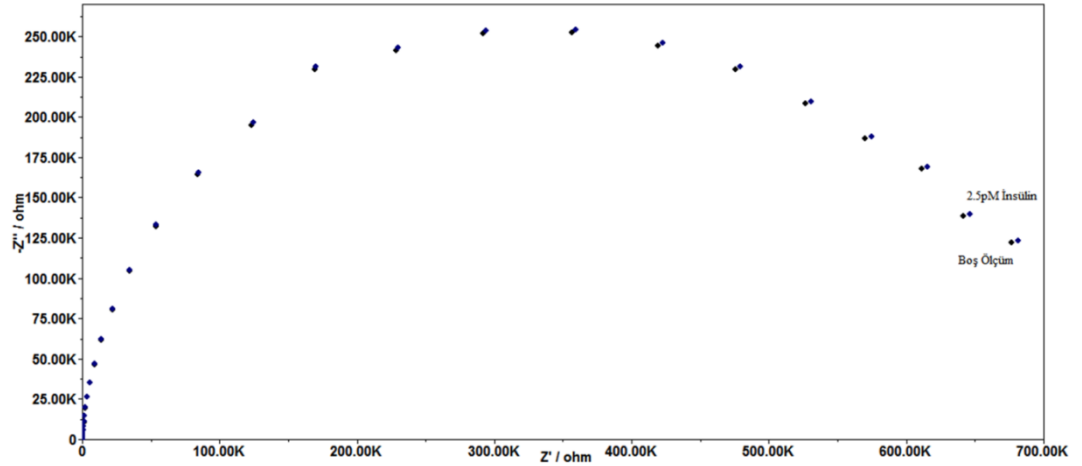
Şekil 3.92 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



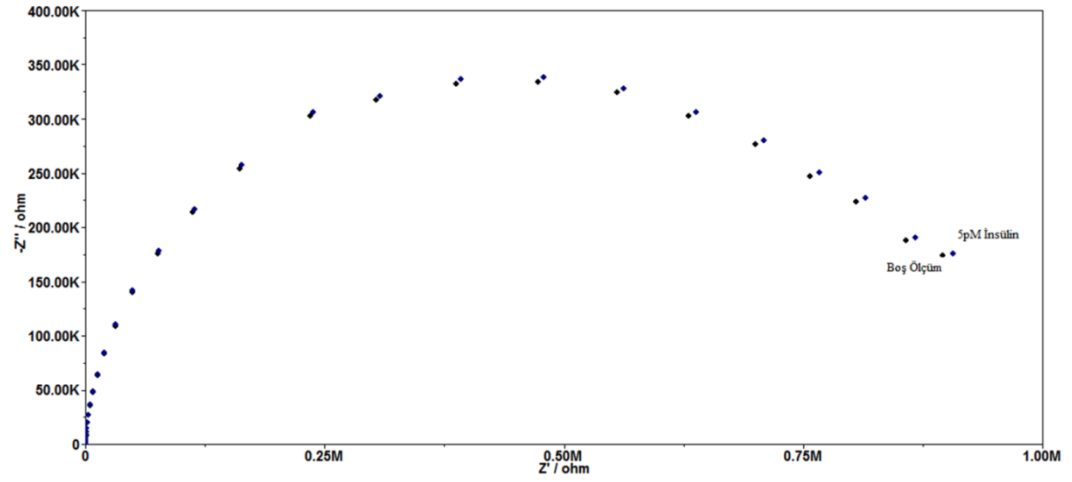
Şekil 3.93 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



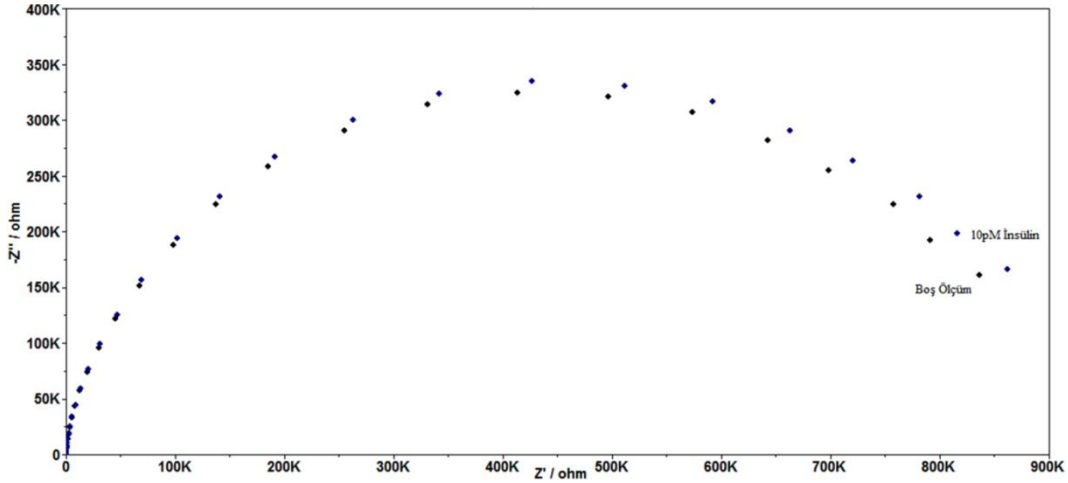
Şekil 3.94 4. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı)



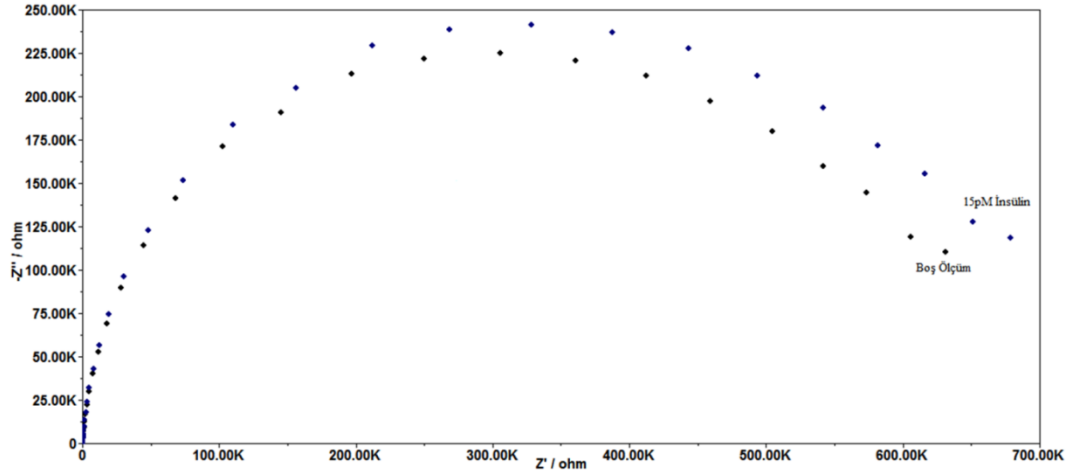
Şekil 3.95 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 2,5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



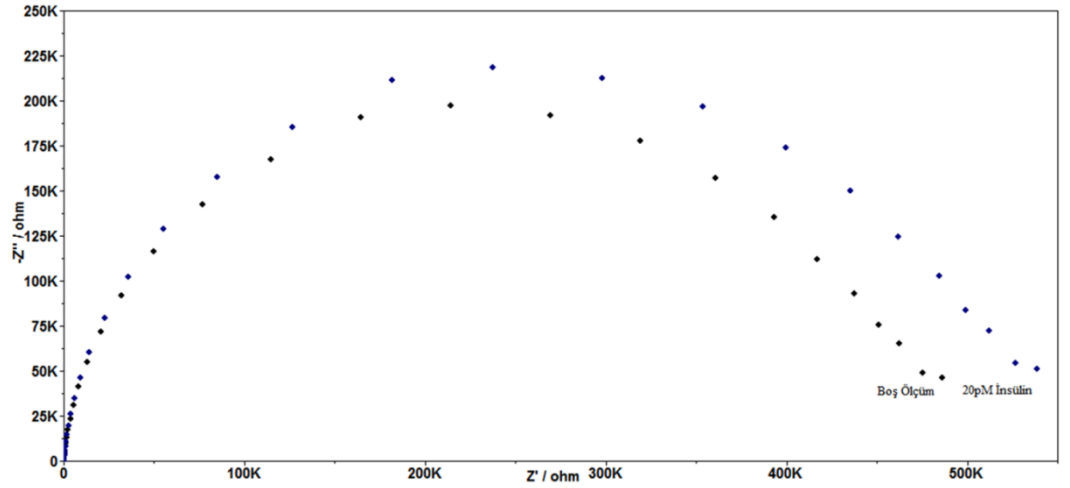
Şekil 3.96 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 5 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



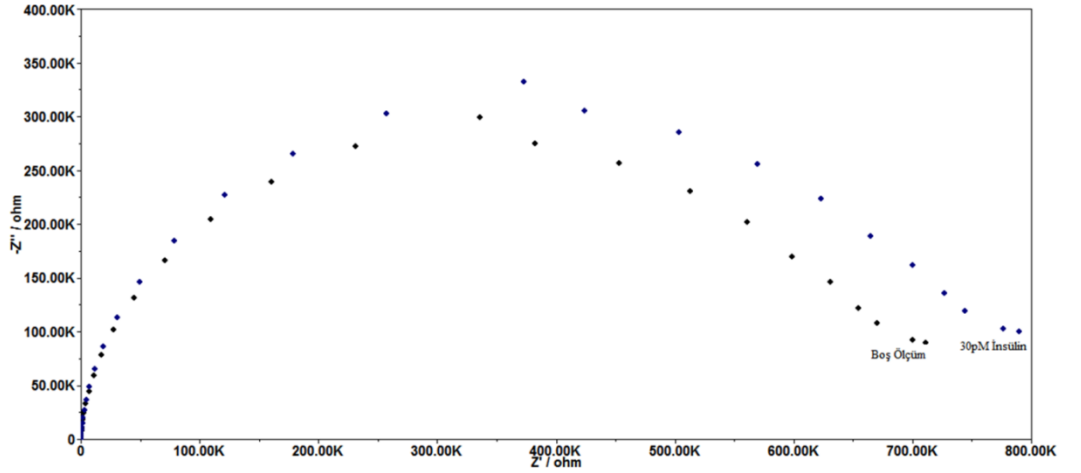
Şekil 3.97 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 10 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



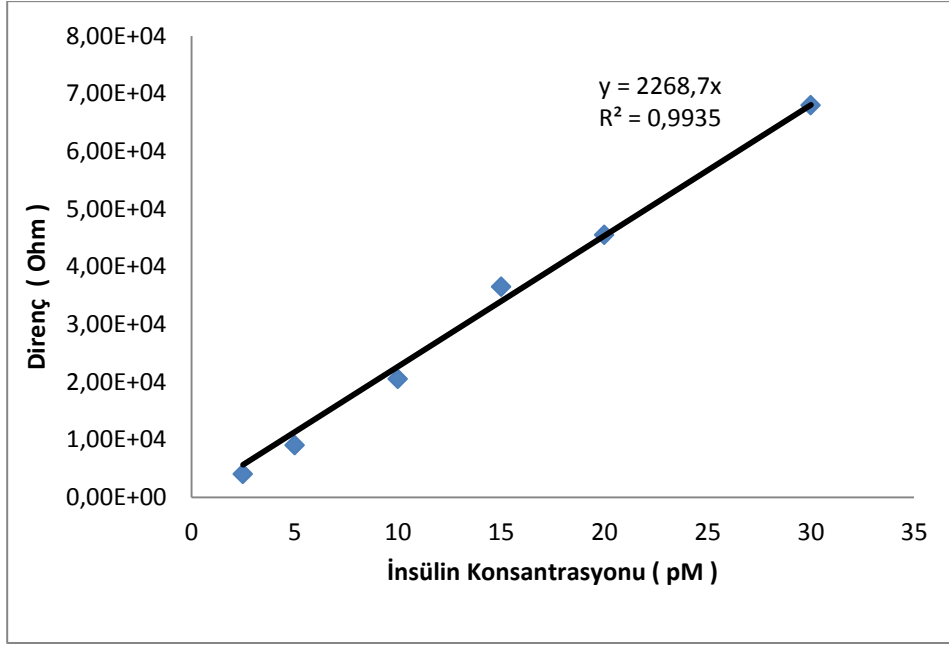
Şekil 3.98 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 15 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.99 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 20 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.100 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 30 pM insülin varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.101 5. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı)

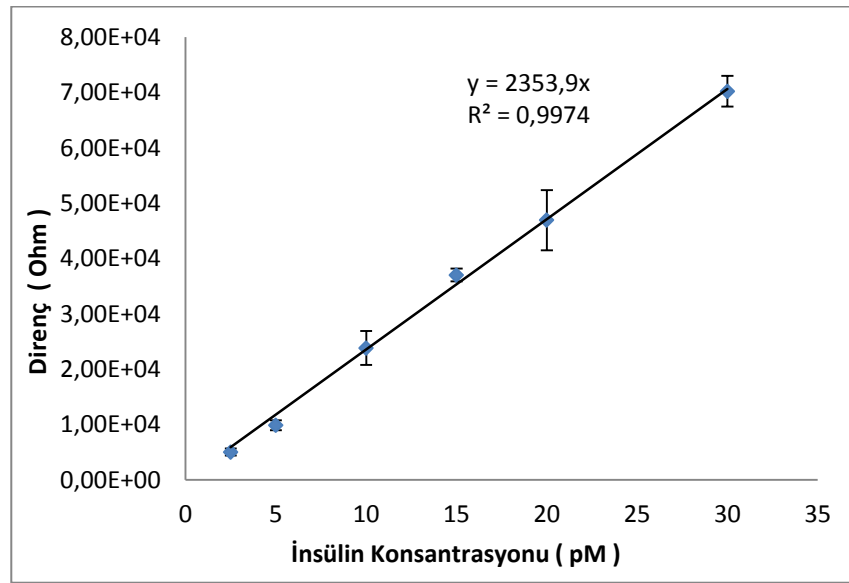
Çizelge 3.2 İnsülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirlik özelliğinin belirlenmesi için yapılan denemelerin devre direnci değişim standart grafiklerinden elde edilen denklemler, doğruluk değerleri (R^2) ve eğim açıları

Deney No	Denklem	R^2
1	$y = 2495.7x$	$R^2 = 0.9744$
2	$y = 2415.7x$	$R^2 = 0.9781$
3	$y = 2322.3x$	$R^2 = 0.9787$
4	$y = 2270.9x$	$R^2 = 0.9839$
5	$y = 2268.7x$	$R^2 = 0.9935$

Yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar ışığı altında insülin antikoruna insülin bağlanması aşamasında elde edilen sonuçlar birbirlerine çok yakın bulunmuştur. Oluşturulan biyosensörün tekrar üretilebilirlik niteliğinin yüksekliği yapılan denemelerle oluşan doğru denklemlerinin eğimlerinin birbirlerine çok yakın olmasından anlaşılmaktadır.

3.2.2.3 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrarlanabilirlik denemesi

Yapılan tekrar üretilebilirlik denemelerinin sonuçlarından yararlanarak elde edilen standart değerlerin ortalaması alınarak yeni bir standart grafiği çizildi. Bu grafikten faydalanarak her bir değer için standart sapma ve varyasyon katsayıları belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.102 te gösterilmiştir.

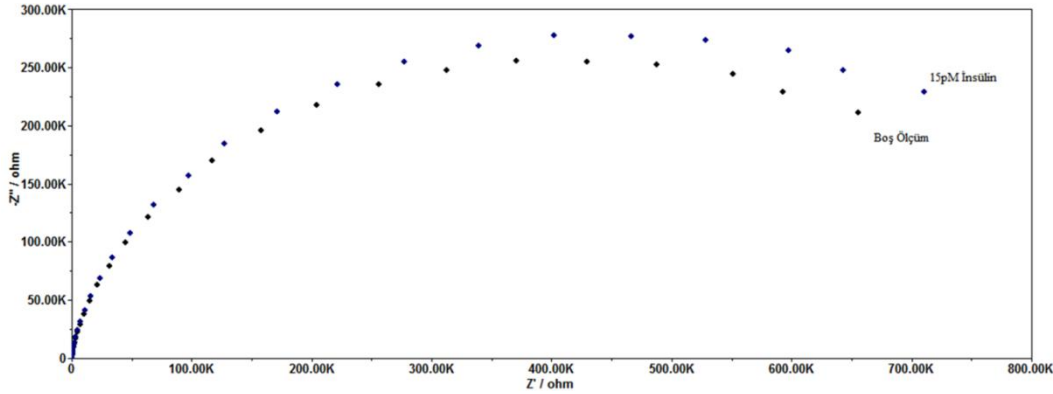


Şekil 3.102 Tekrarlanabilirlik denemesinden elde edilmiş devre direnci değişim standart grafiği toplu sonuçları (2,5-30 pM insülin konsantrasyon aralığı)

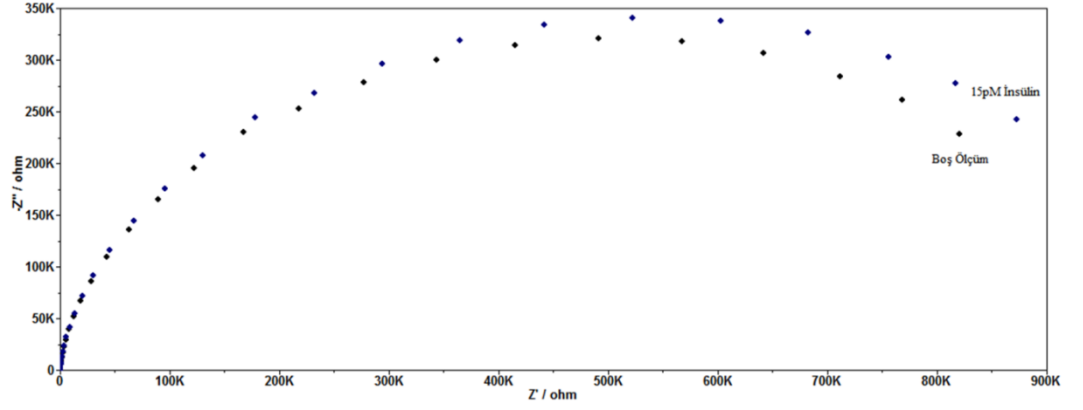
Geliştirilen biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik değerlerinin belirlenmesi için 15 pM lık insülin ile 5 elektrot için ölçümler gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen (N)= 5 ölçüm sonucunda; ortalama değer ($\bar{X}$)= 15,3 pM, standart sapma (S.S.)= $\pm 0,48$ pM, varyasyon katsayı (V.K.) ise % 3,13 ve tayin limiti 2,03 pM olarak bulundu. Bu değerlerden görüleceği üzere geliştirilen insülin biyosensörünün insülin tayininde oldukça iyi tekrarlanabilir sonuçlarla kullanılabileceği belirlenmiştir.

3.2.2.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün depo kararlılığı denemesi

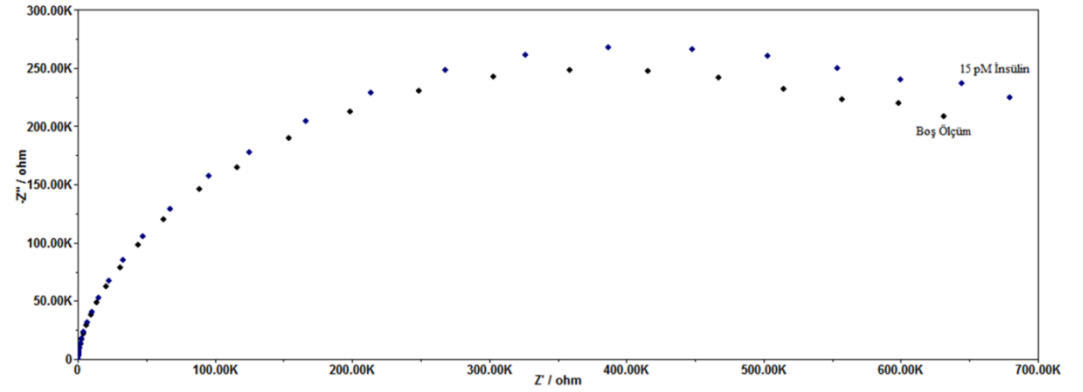
Geliştirilen bir biyosensörün en önemli performans kriterlerinden bir tanesi onun depolama süresine bağlı olarak ne ölçüde aktivite kaybettiğidir. Bir başka bakış açısıyla depolama süresince aktivitesini ne kadar koruduğudur. Çalışmaların bu kısmında insülin biyosensörünün depolama kararlılığı incelenmiştir. Depo kararlılığı denemesi ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği Şekil 3.103 ile 3.109 arasında verilmiştir. Depo kararlılığı denemesi için yapılan denemelerin devre direnci değişiminden elde edilen sonuçların günlere göre değişiminin rölatif değerleri Çizelge 3.3 verilmiştir.



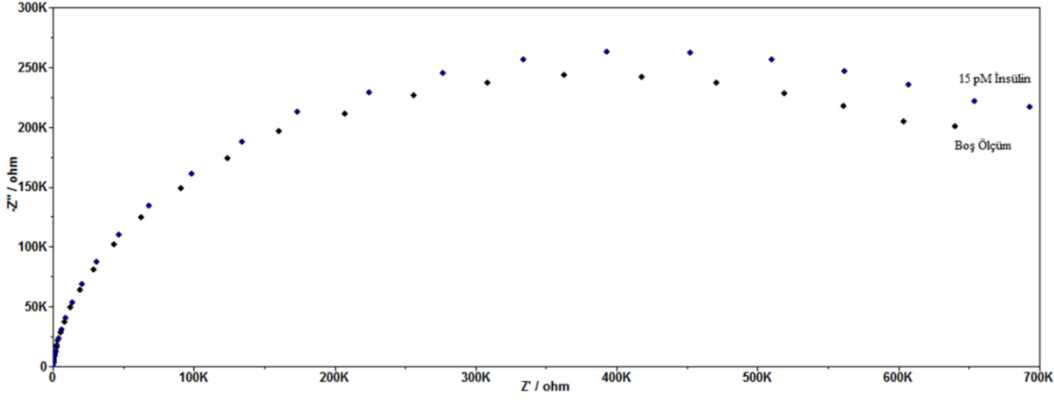
Şekil 3.103 Depo kararlılığı denemesi; 1 gün, 15 pM insülin [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



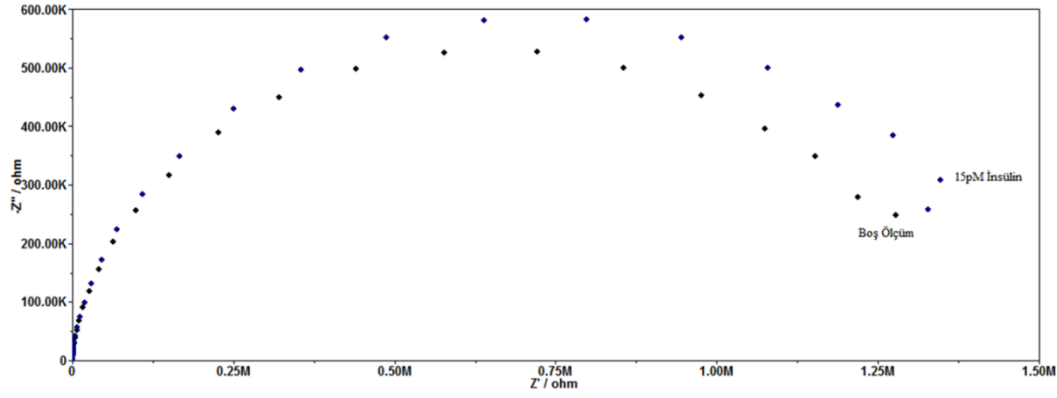
Şekil 3.104 Depo kararlılığı denemesi; 2 gün, 15 pM insülin [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



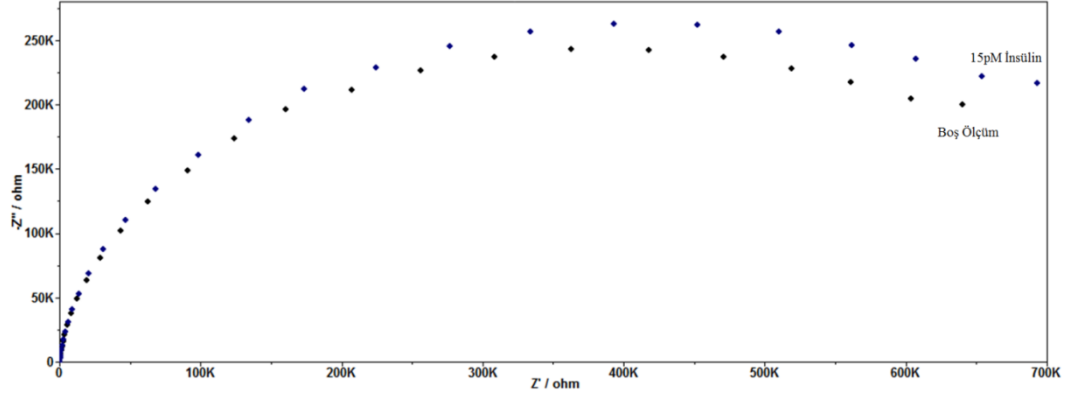
Şekil 3.105 Depo kararlılığı denemesi; 3 gün, 15 pM insülin [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



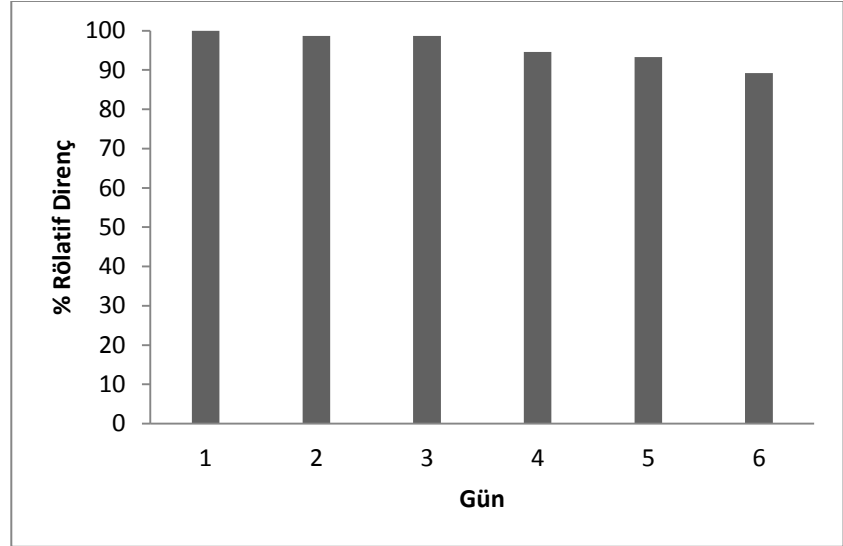
Şekil 3.106 Depo kararlılığı denemesi; 4 gün, 15 pM insülin [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.107 Depo kararlılığı denemesi; 5 gün, 15 pM insülin [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.108 Depo kararlılığı denemesi; 6 gün, 15 pM insülin [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.109 Depo kararlılığı denemesi zamana karşı % rölatif direnç grafiği

Çizelge 3.3 Depo kararlılığı denemesi için yapılan denemelerin devre direnci değişiminden elde edilen sonuçların günlere göre değişiminin rölatif değerleri

Gün	% Rölatif Direnç
1	100
2	99
3	99
4	95
5	93
6	89

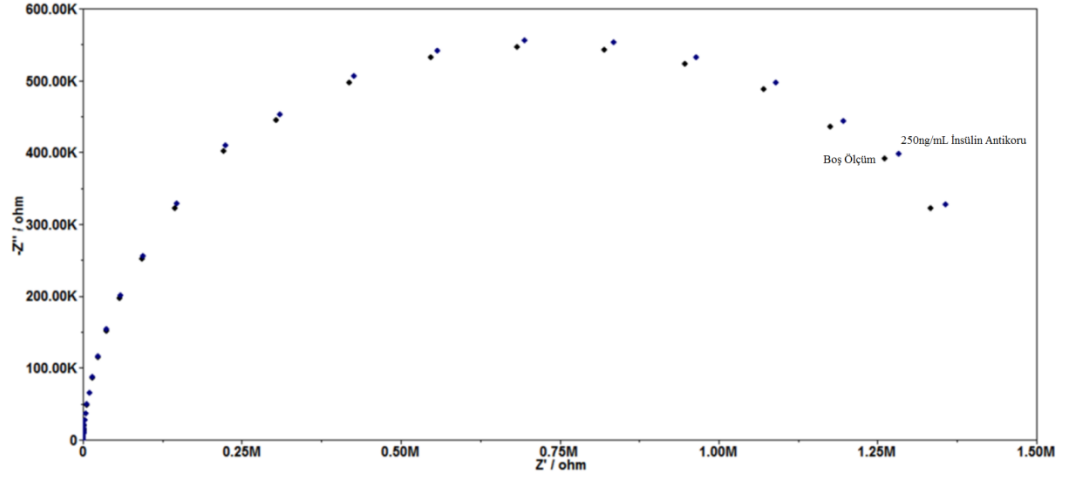
Yapılan depo kararlılığı denemesi ise bize ilk 5 günlük bekleme süresi sırasında afinite kaybı %7 civarındadır. 6 günlük bir depolama işlemi sonrasında yaklaşık % 11 lik afinite kaybı gerçekleşmiştir.

3.3 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensör üzerine çalışmalar

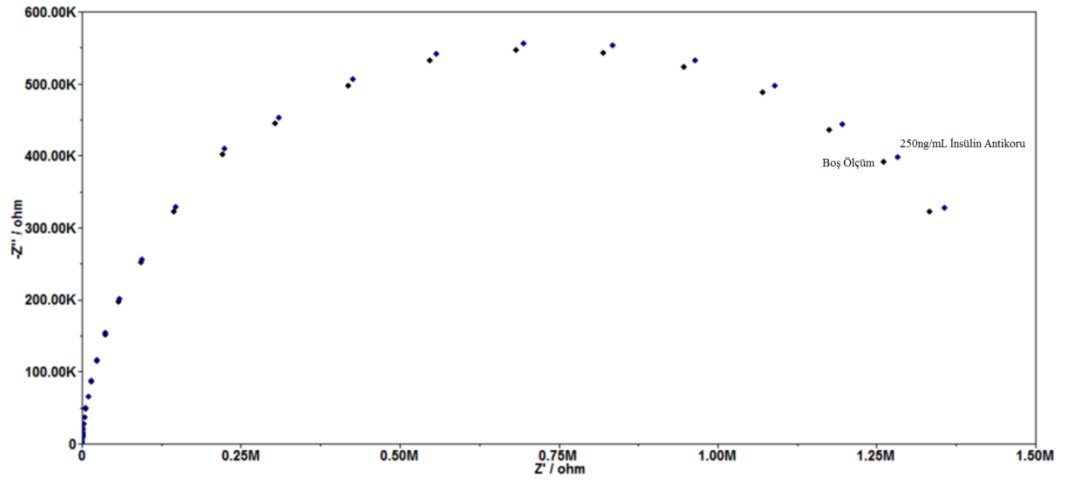
3.3.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün hazırlama ve çalışma koşullarına ilişkin optimizasyon çalışmaları

3.3.1.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörde immobilize edilen insülin miktarı optimizasyonu

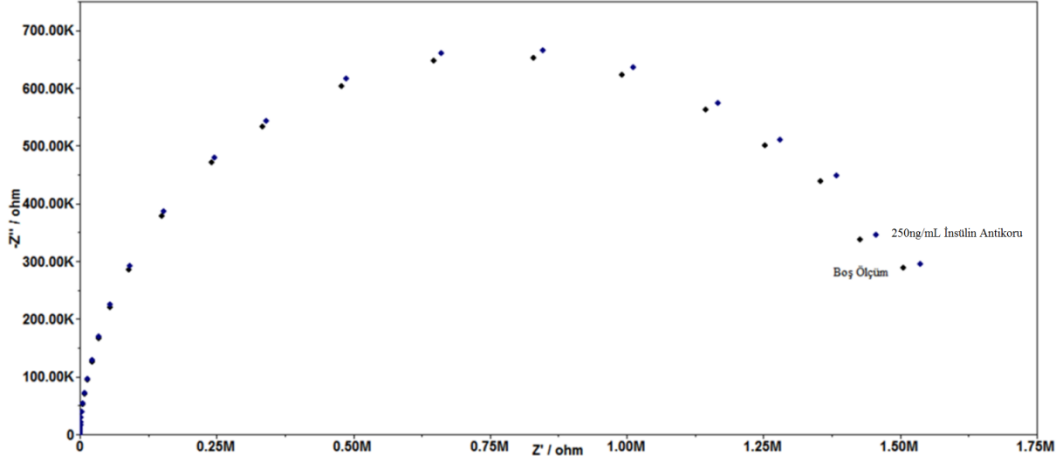
Çalışmaların bu kısmında elektrotların yüzeyine immobilize edilen insülin konsantrasyonlarına karşılık insülin antikorunun verdiği sinyal incelendi. Bu deneme yapılmadan önce bir seri deneme yapıldı ve bir standart grafiği oluşturuldu. Oluşturulan bu standart grafiğinin yaklaşık orta noktasından insülin antikoru konsantrasyonu 250ng/ml olarak bulundu. Yukardaki veri ışığı altında immobilize edilen insülin optimizasyonu denemesi ve diğer optimizasyon denemelerinde standart olarak 250 ng/mL insülin antikoru kullanıldı. İmmobilize edilen insülin optimizasyonu denemesi ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği şekil 3.110 ile şekil 3.116 arasında verilmiştir.



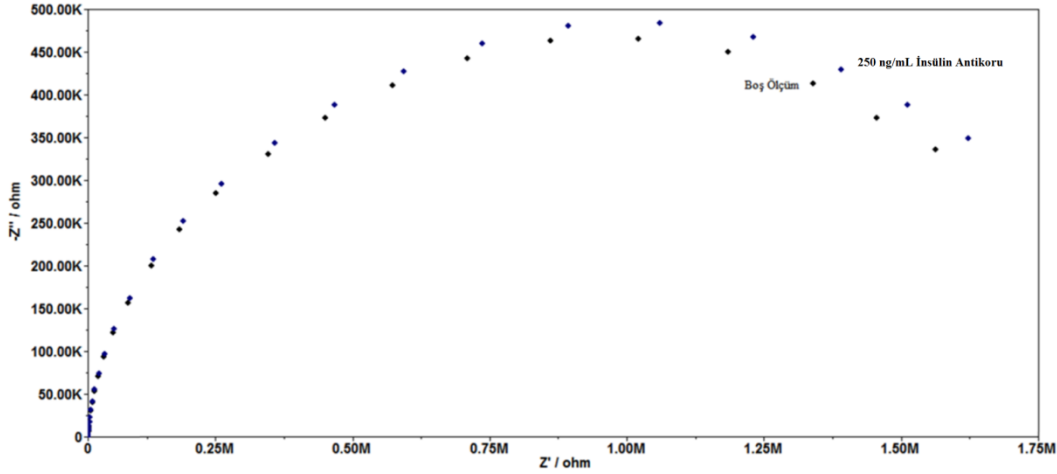
Şekil 3.110 İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 1: 31,25 $\mu\text{g/mL}$ insülin konsantrasyonu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



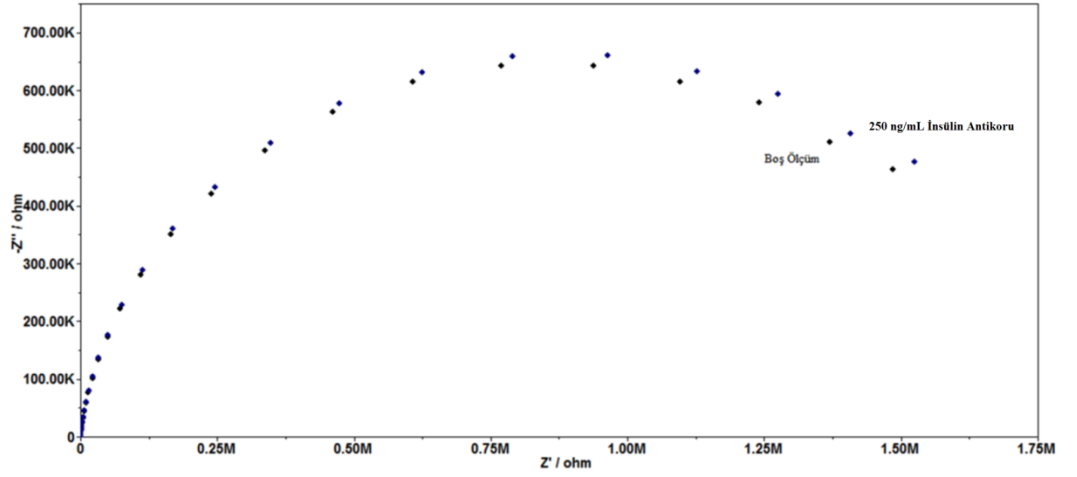
Şekil 3.111 İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 2: 62,5 $\mu\text{g/mL}$ insülin konsantrasyonu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



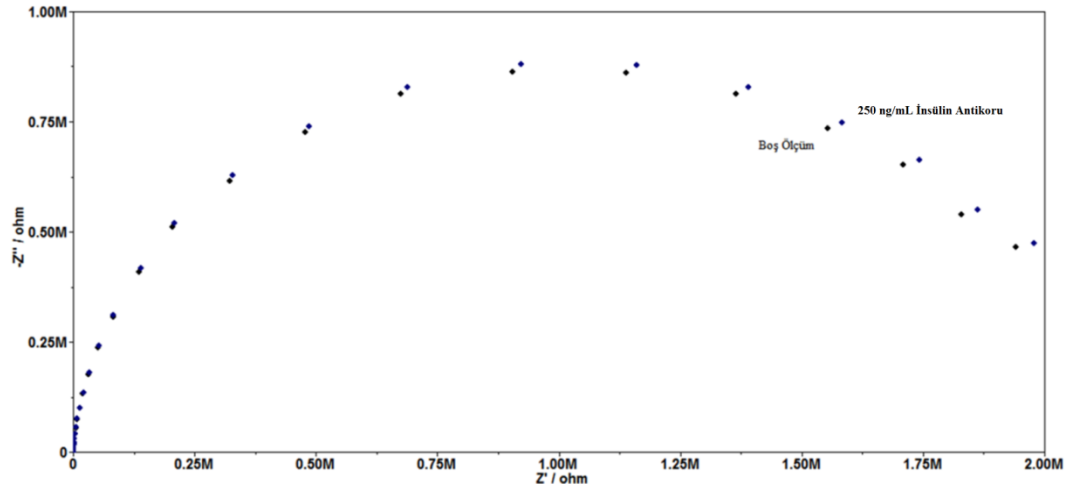
Şekil 3.112 İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 3: 125 µg/mL insülin konsantrasyonu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



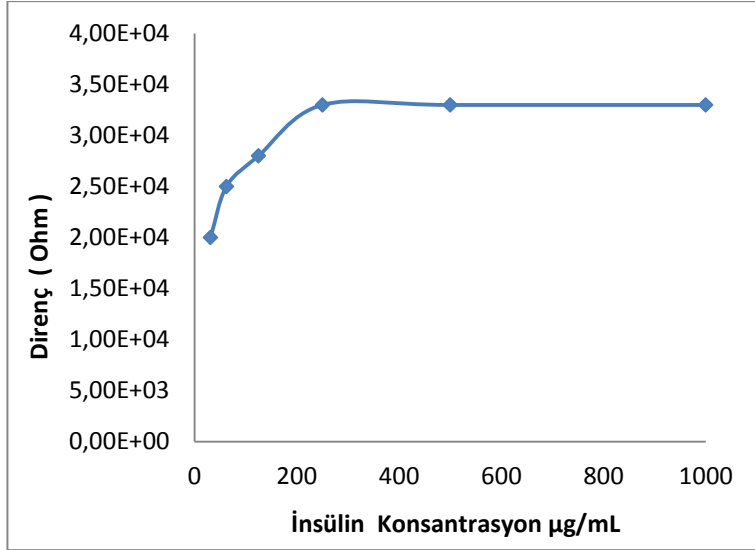
Şekil 3.113 İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 4: 250 µg/mL insülin konsantrasyonu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.114 İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 5: 500 $\mu\text{g/mL}$ insülin konsantrasyonu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.115 İmmobilize edilen insülin antikoru optimizasyonu denemesi 6: 1000 $\mu\text{g/mL}$ insülin konsantrasyonu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



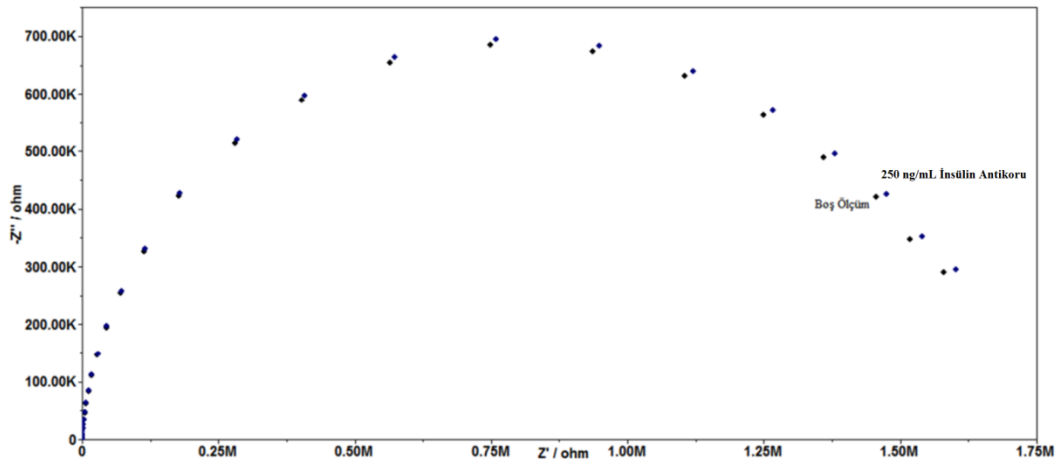
Şekil 3.116 İmmobilize edilen insülin optimizasyonu denemesi ile ilgili devre direnci değişim grafiği : (insülin antikoru konsantrasyonu 250 ng/mL)

Yapılan bu denemede her bir elektrota farklı konsantrasyonlarda insülin immobilize edildi. Deneme sırasında insülin konsantrasyonunun artması yüzeydeki impedans değişimini arttırdı. 250 $\mu\text{g/mL}$ ve daha yüksek insülin immobilizasyonunda insülin antikoruна ait devre direnci yanıtı aynıdır. İnsülin konsantrasyonu artışının 250 $\mu\text{g/mL}$ dan sonra impedansta bir artışa neden olmamasına rağmen 1 mg/mL insülin konsantrasyonu kullanılmasına karar verildi. Bu tercihin nedeni olarak zamana bağlı olarak azalabilecek afinitenin 250 $\mu\text{g/mL}$ gibi kritik bir değer olarak seçilmesi durumunda biyosensörün depo kararlılığı olumsuz etkiliyebilecek olmasıdır. İnsülin konsantrasyonu 1 mg/mL olarak seçildiğinde bu açıdan daha güvenilir bir aralık temin edilebilir. 1 mg/mL üzerindeki insülin konsantrasyonlarında ise insülinin çözünürlüğünde problemler yaşandığı için pratik kullanım olanağı bulunmamaktadır.

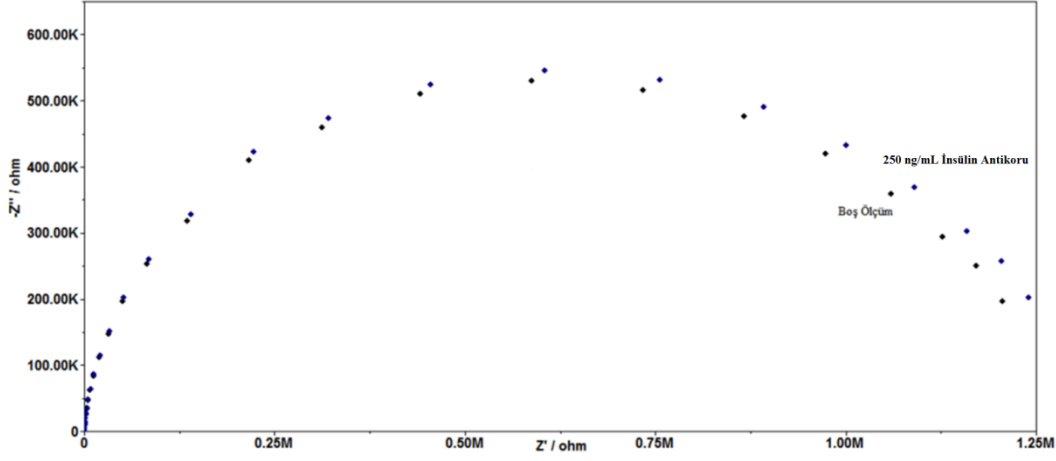
3.3.1.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün insülin inkübasyon süresinin optimizasyonu

Bu denemede elektrotların yüzeyinde 20 mM MUA çözeltisinin içinde 60 dakika, 50 mM pH:7,0 HEPES tamponunda hazırlanan EDC/NHS 32/8mM çözeltisinin içinde 60 dakika bekletilmesinin ardından 1mg/mL insülin 60 dakika

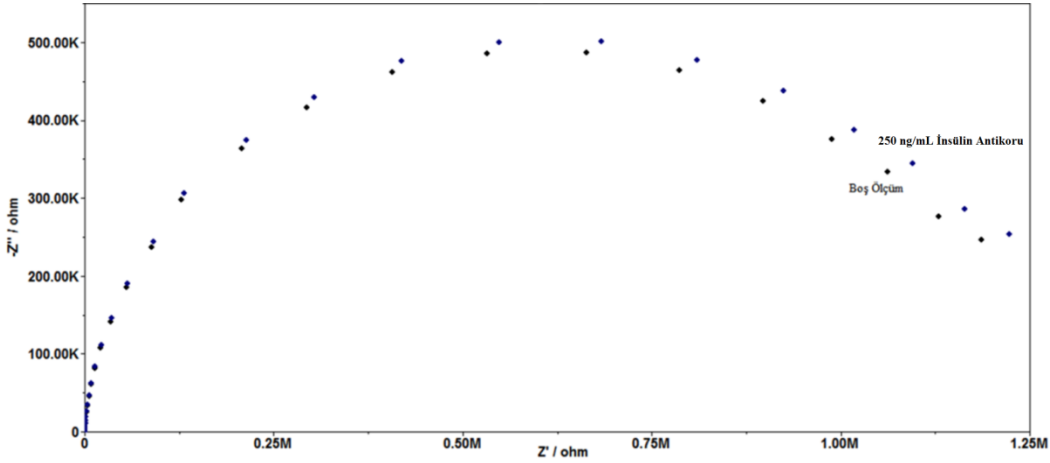
elektrotların yüzeyinde bekletilerek immobilize edildi. Ardından 6 elektrot ikiyeşerli gruplara ayrılarak inkübasyon tamponunda 15, 30 ve 45 dakika bekletilip boş ölçüm alındı. İçerisinde 250 ng/mL insülin antikoru içeren inkübasyon tamponlarında da ayrılan ikiyeşerli gruplar değişmemek suretiyle tekrar 15, 30 ve 45 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu denemede yapılan her immobilizasyon ve bağlanma için bekletme süresinin ardından 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot) la impedansı alındı. Yapılan bu denemede inkübasyon süresinin denemeye etkisi incelendi. Inkübasyon süresi optimizasyonu ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği şekil 3.117 ile şekil 3.123 arasında verilmiştir.



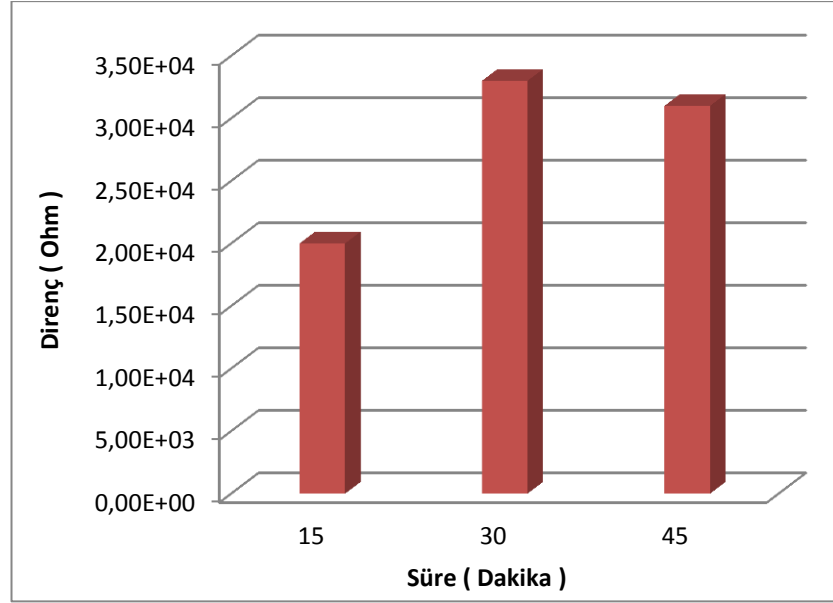
Şekil 3.117 Inkübasyon süresi optimizasyonu: 15 dakika [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.118 İnkübasyon süresi optimizasyonu: 30 dakika [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.119 İnkübasyon süresi optimizasyonu: 45 dakika [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

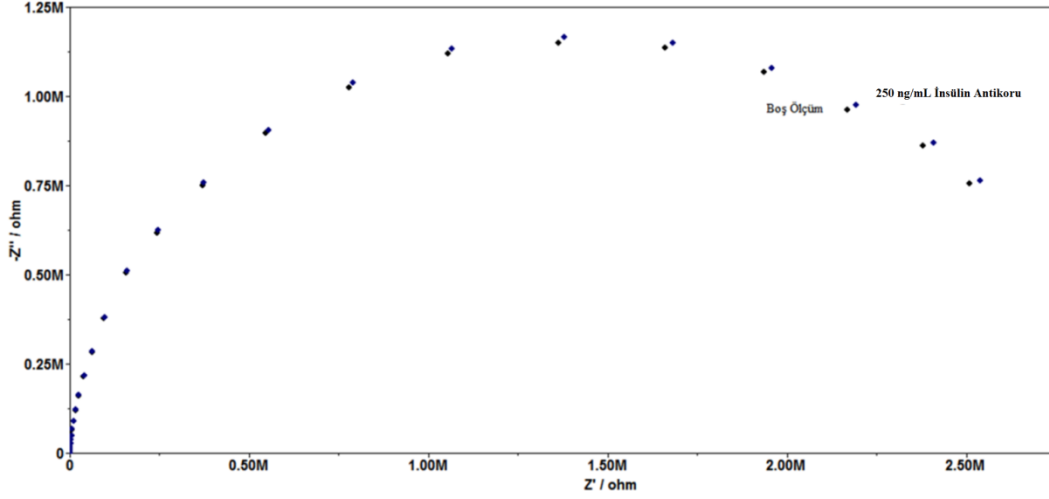


Şekil 3.120 İnkübasyon süresi optimizasyonu denemesi ile ilgili devre direnci değişim grafiği

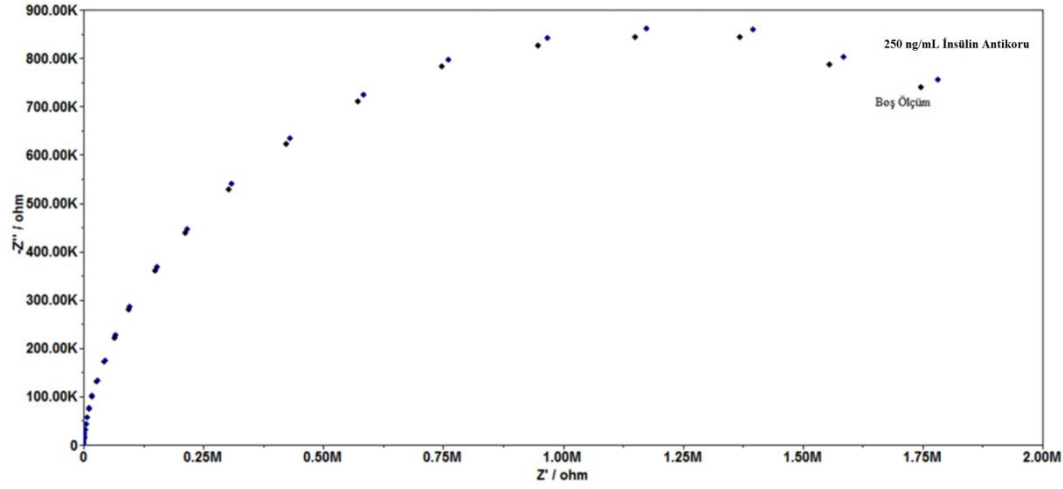
Elde edilen impedans verileri değerlendirildiğinde en uygun insülin antikoru bağlanma inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlendi. 45 dakikalık ölçümde 30 dakikalığa göre daha düşük sonuçlar elde edildi. 45 dakikalık ölçümde sonuçların 30 dakikalığa göre daha düşük çıkmasının çözelti ortamında insülin antikorlarının bir kısmının insülin ile bağlandıktan sonra süreye bağlı olarak altın yüzeye bağlı MUA ile aralarındaki kovalent bağların kopmasına yol açmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir.

3.3.1.3 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörde inkübasyon tampon pH sınır optimizasyonu

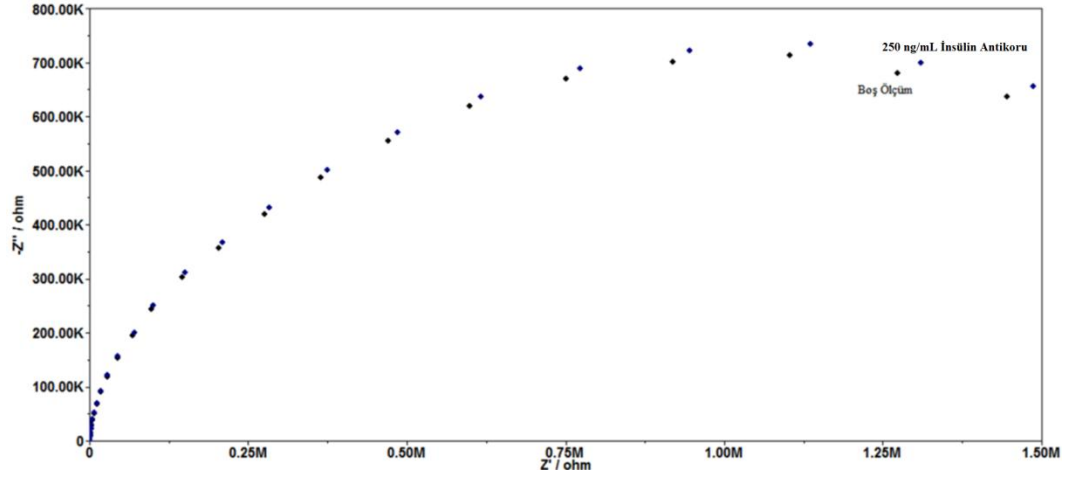
İnkübasyon tamponunun pH sınır optimizasyonuna ilişkin denemede immobilizasyon parametreleri yukarıda bulunan optimum sonuçlarla gerçekleştirildi. Bu denemede 6 elektrot kullanılarak 50mM pH: 6,8 ile 7,8 arasında HEPES tamponunda pH taraması gerçekleştirildi. İnkübasyon tamponu pH optimizasyonu ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği Şekil 3.121 ile Şekil 3.127 arasında verilmiştir.



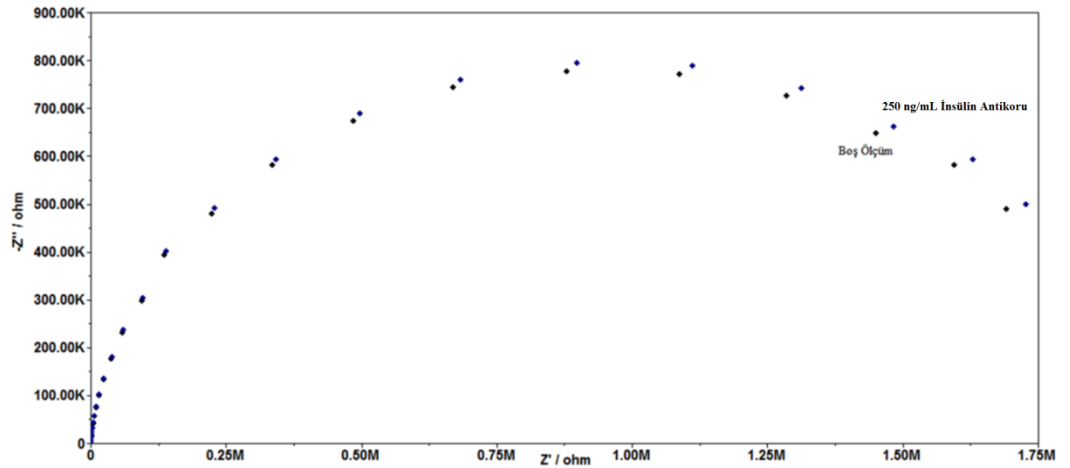
Şekil 3.121 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 6,8 HEPES inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



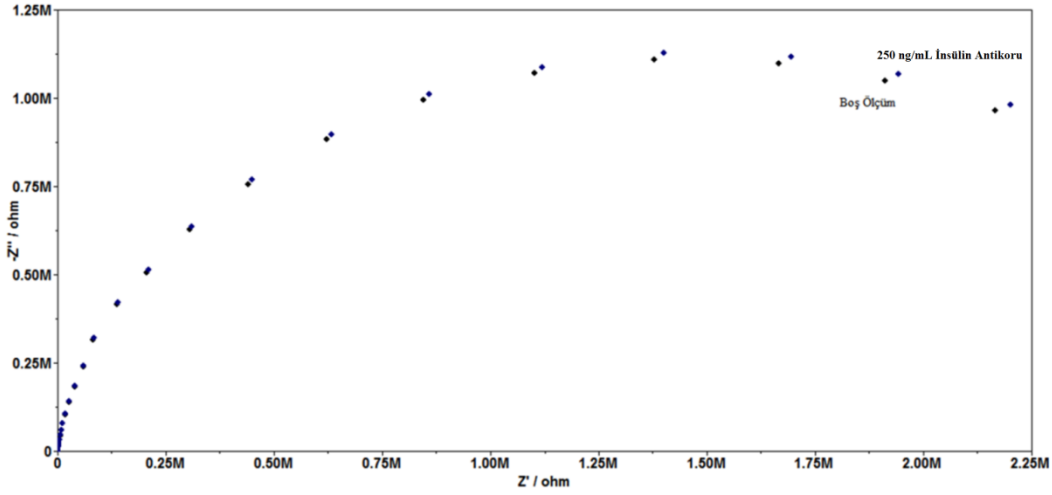
Şekil 3.122 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,0 HEPES inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



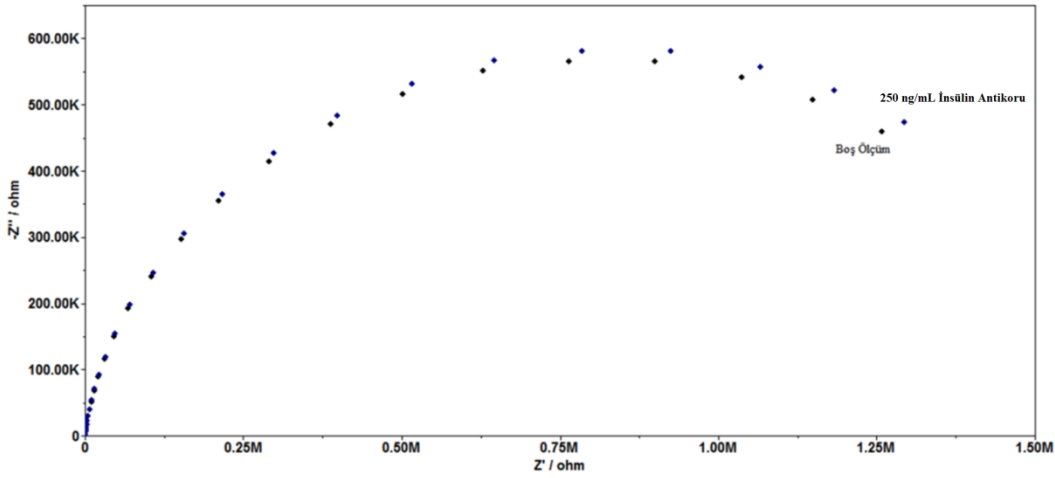
Şekil 3.123 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,2 HEPES inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



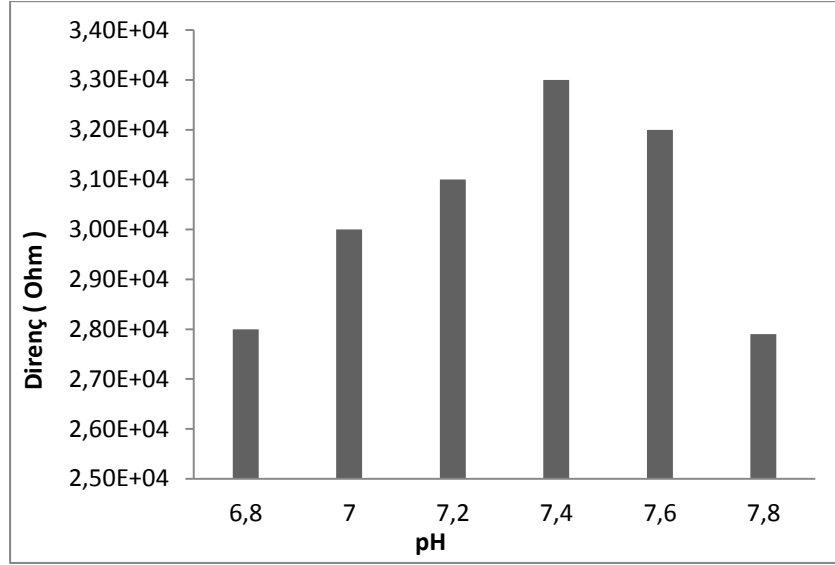
Şekil 3.124 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,4 HEPES inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.125 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,6 HEPES inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.126 pH optimizasyonu: 50 mM pH: 7,8 HEPES inkübasyon tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

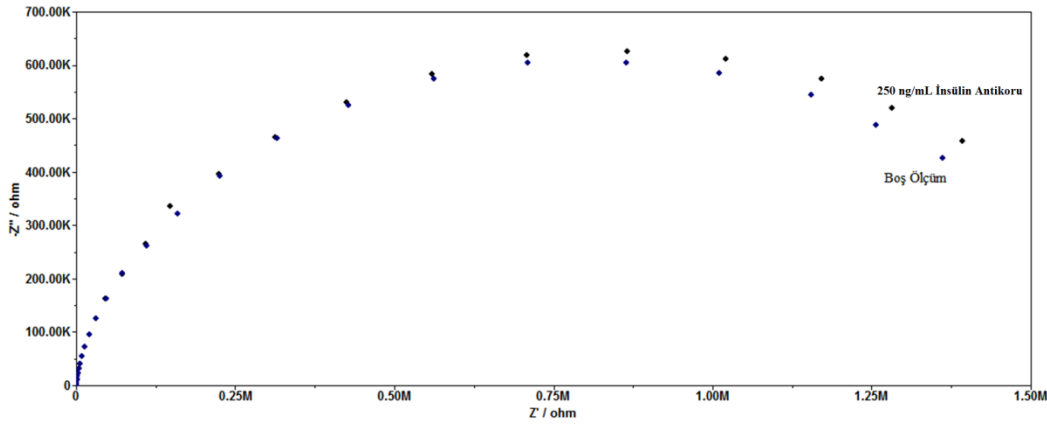


Şekil 3.127 İnkübasyon tamponu pH optimizasyonu ile ilgili devre direnci değişim grafiği

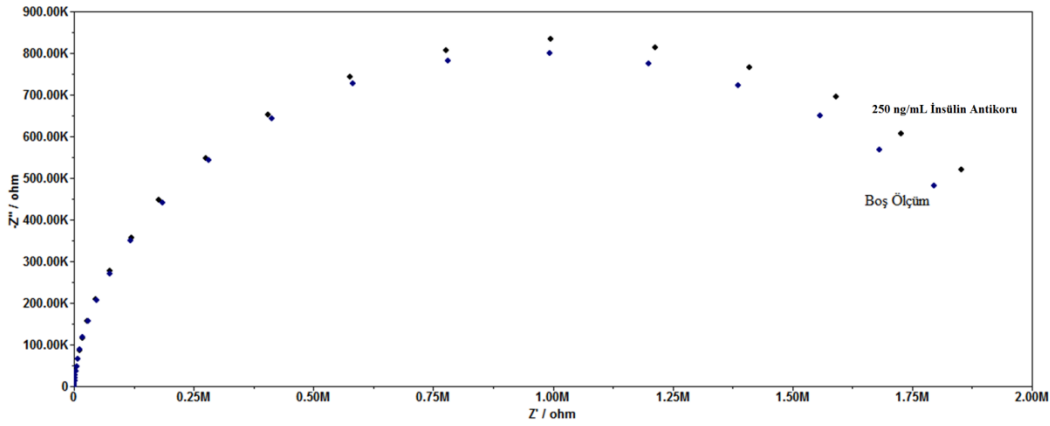
İmpedans sonuçları analizine göre en iyi inkübasyon tamponu pH sı 7,4 bulundu. Ancak sonuçlar değerlendirildiğinde rölatif olarak pH 7,4 ü %100 kabul edersek pH 7,2 için %94 pH 7,6 ise %97,8 olarak belirlendi. Bu durum etkileşim için uygun pH aralığının doğal ortam olan kan pH sı ile uygun olduğunu göstermektedir.

3.3.1.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörünün inkübasyon tampon sistemi ve konsantrasyonu optimizasyonu

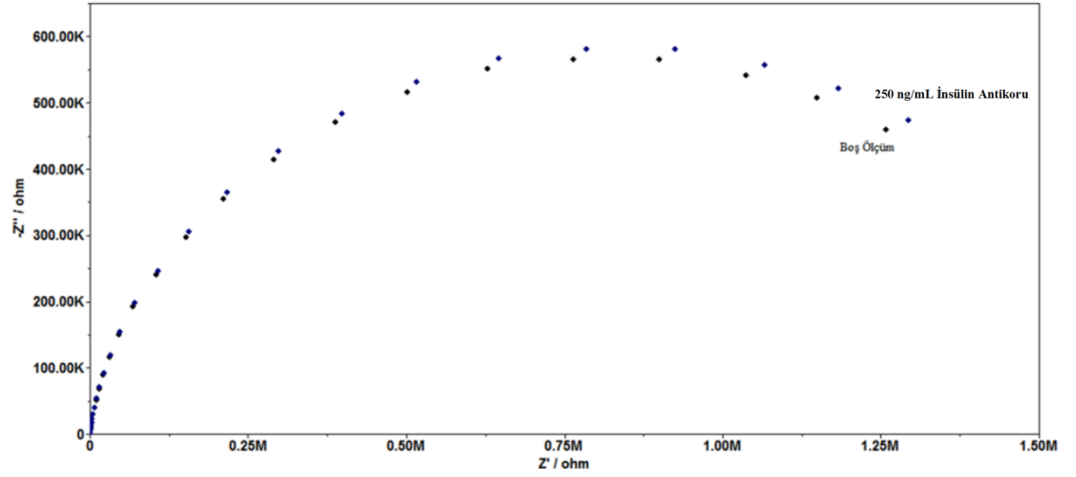
İnkübasyon tampon sistemi ve konsantrasyonu optimizasyonu denemesinde HEPES ve fosfat tampon sistemlerinin 10-25-50 mM konsantrasyonlarının 250 ng/mL insülin antikorumun insülin ile etkileşimi incelendi. İnkübasyon tamponu pH optimizasyonu ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci değerlerinin % rölatif grafiği Şekil 3.128 ile 3.133 arasında verilmiştir.



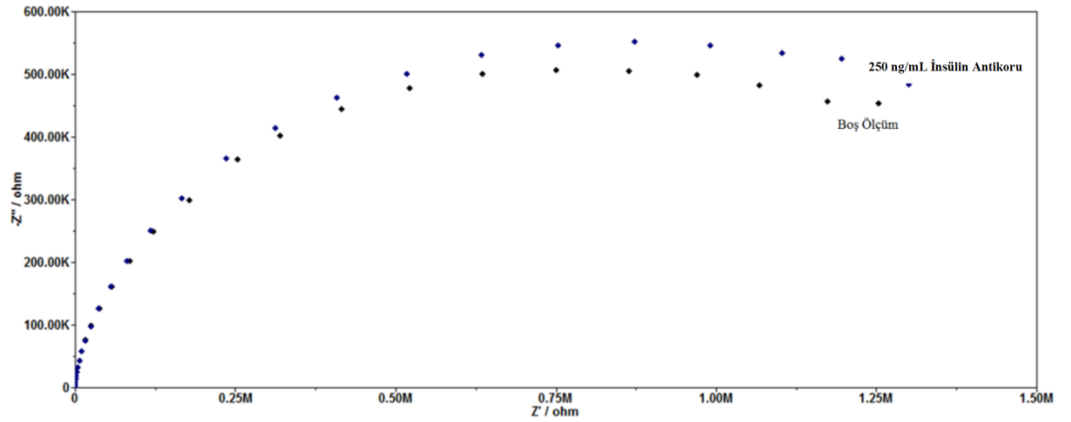
Şekil 3.128 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 1 a: 10 mM pH: 7,4 HEPES tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



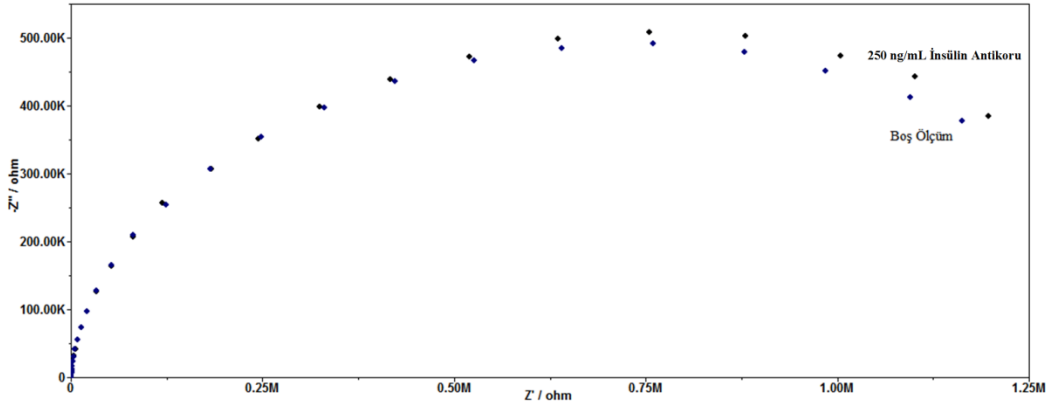
Şekil 3.129 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 2 a: 25 mM pH: 7,4 HEPES tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.130 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 3 a: 50 mM pH: 7,4 HEPES tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

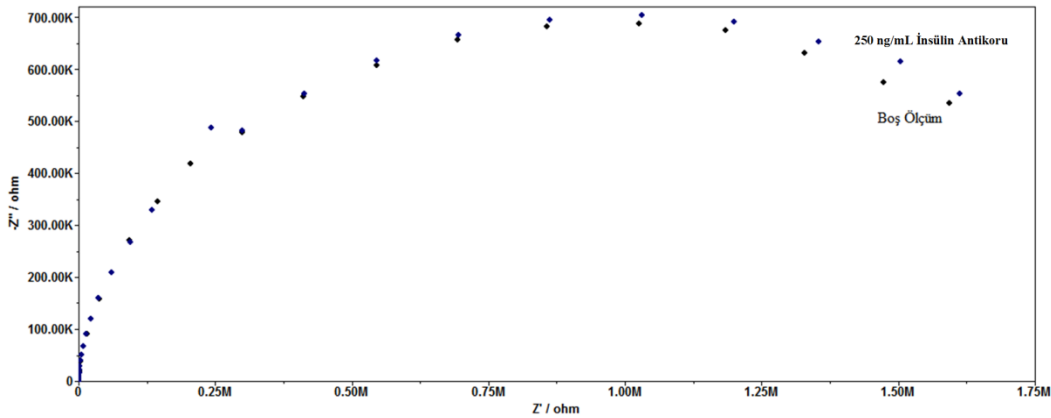


Şekil 3.131 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 1 b: 10 mM pH: 7,4 Fosfat tamponu [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



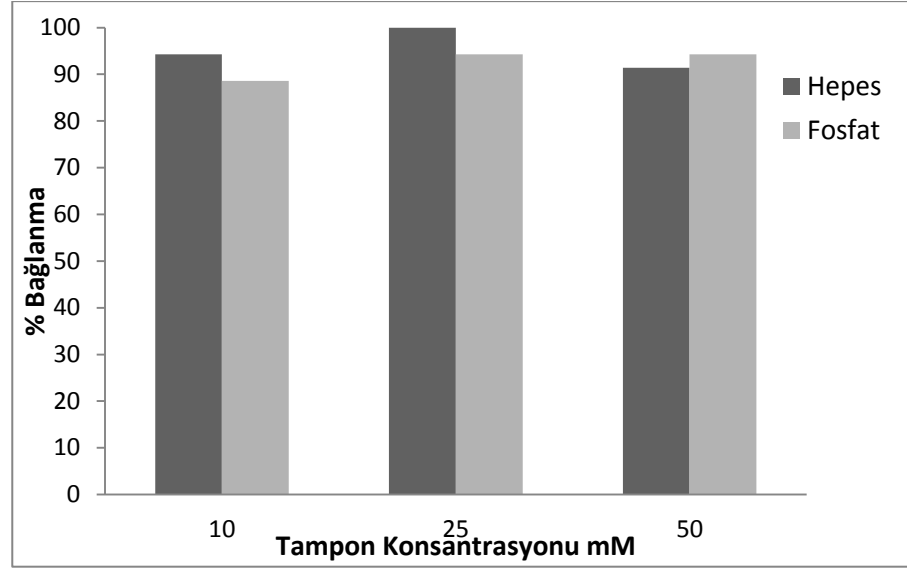
Şekil 3.132 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 2 b: 25 mM pH:

7,4 Fosfat tamponu, inkübasyon tampon sistemi ve konsantrasyonu optimizasyonu
 [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.133 İnkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonu optimizasyonu 3 b: 50 mM pH:

7,4 Fosfat tamponu, inkübasyon tampon sistemi ve konsantrasyonu optimizasyonu
 [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-} + 0,1 \text{ M KCl}$ çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.134 İnsülin bağlanması üzerine inkübasyon tampon sistemi ve tampon konsantrasyonlarının etkisi

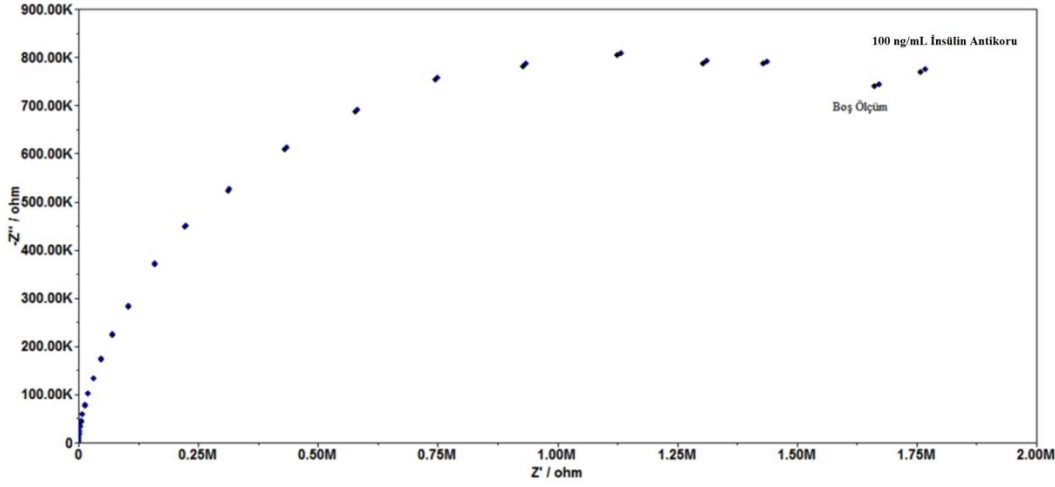
Şekil 3.134 den de anlaşıldığı üzere en iyi sonuçlar 25 mM lık tampon konsantrasyonunda elde edildi. Tampon sistemleri açısından değerlendirildiğinde HEPES tampon sistemi fosfat tampon sistemine nazaran rölatif olarak % 5,7 daha yüksek performans göstermektedir. Deneysel veriler göz önüne alınarak konsantrasyonu ve inkübasyon tampon sistemi pH:7,4 25 mM HEPES tamponu olarak belirlendi

3.3.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün ölçüm parametrelerinin karakterizasyonu

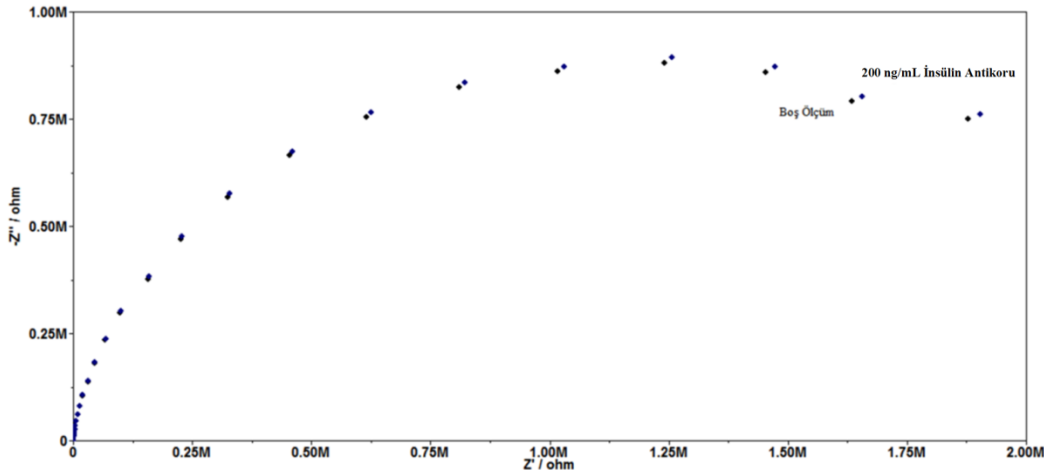
3.3.2.1 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün doğrusal tayin aralığının belirlenmesi

Optimizasyon denemeleri sonucunda elde edilen veriler dahilinde karakterizasyon çalışmalarına gerçekleştirildi. Bu çalışmada 100-1200 ng/mL 50-1000 ng/mL insülin antikoru konsantrasyon aralığı olmak üzere iki ayrı standart grafik oluşturuldu. Elde edilen grafiklerle doğrusal tayin aralığının üst sınırı belirlenmesi ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist

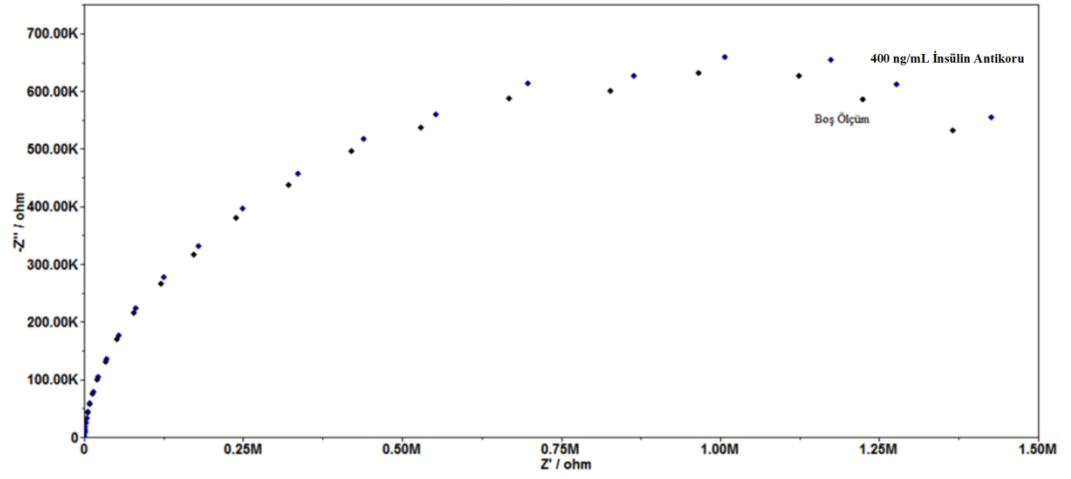
diyagramlarından elde edilen devre direnci grafiği Şekil 3.135 - Şekil 3.148 da verilmiştir.



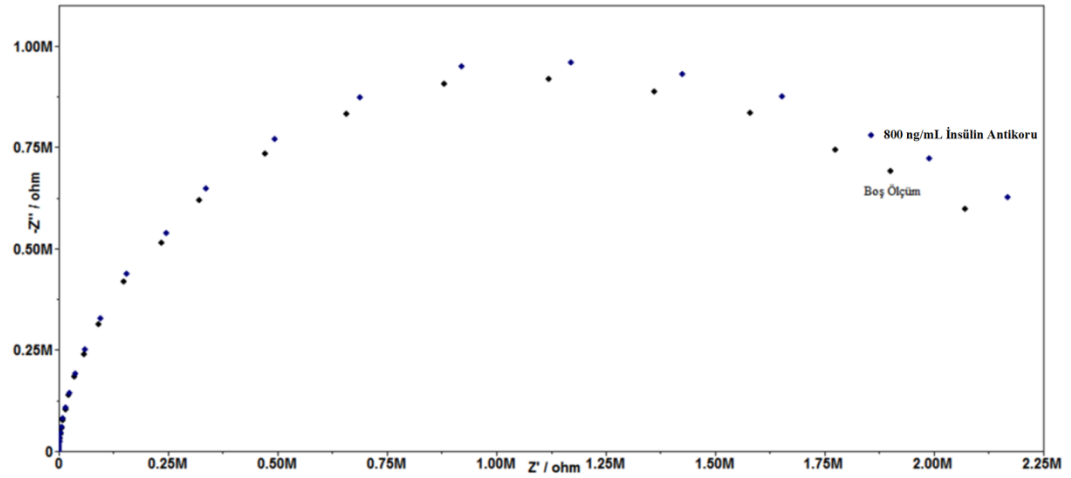
Şekil 3.135 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



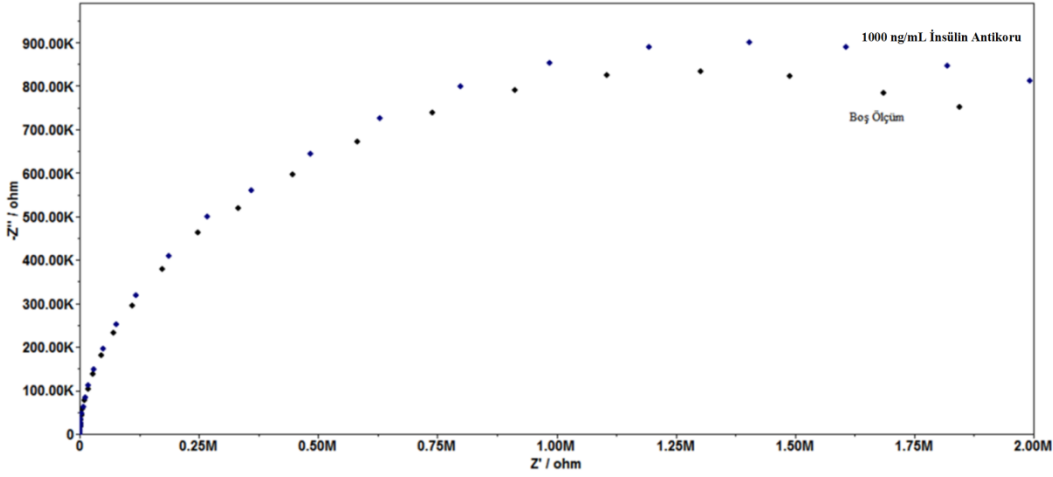
Şekil 3.136 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



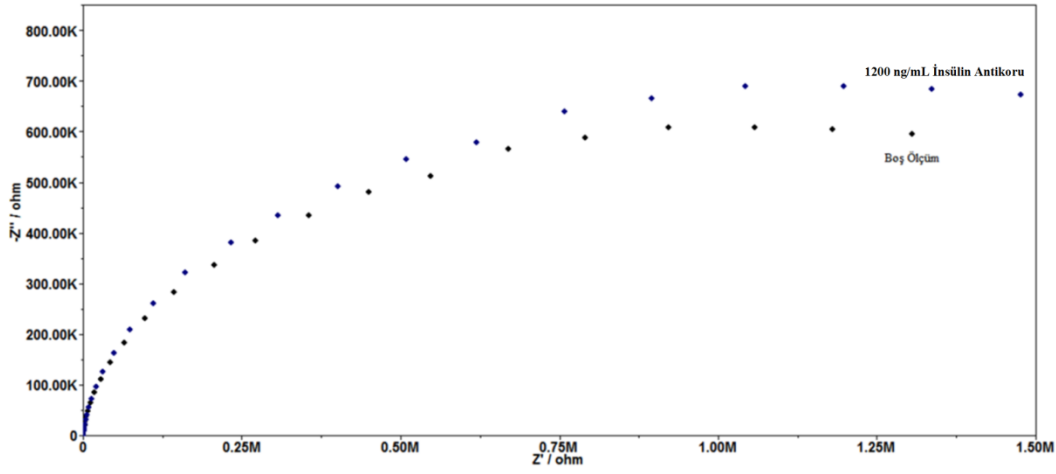
Şekil 3.137 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



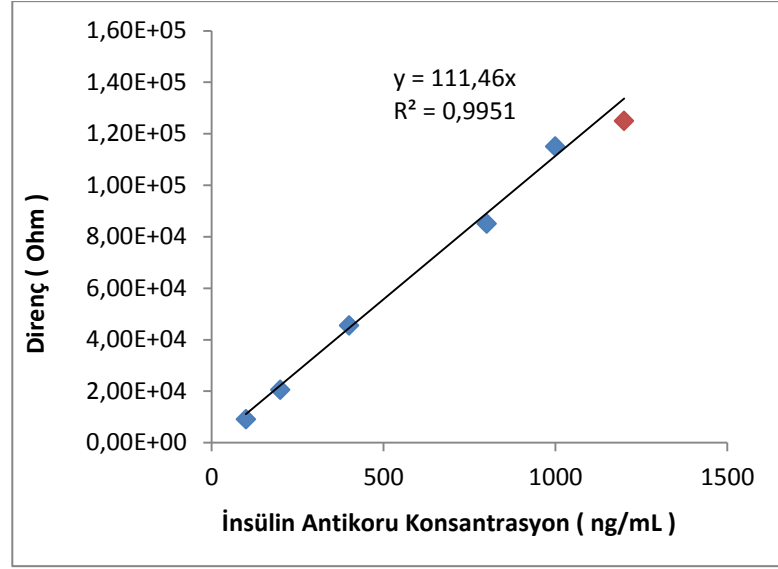
Şekil 3.138 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 800 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.139 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

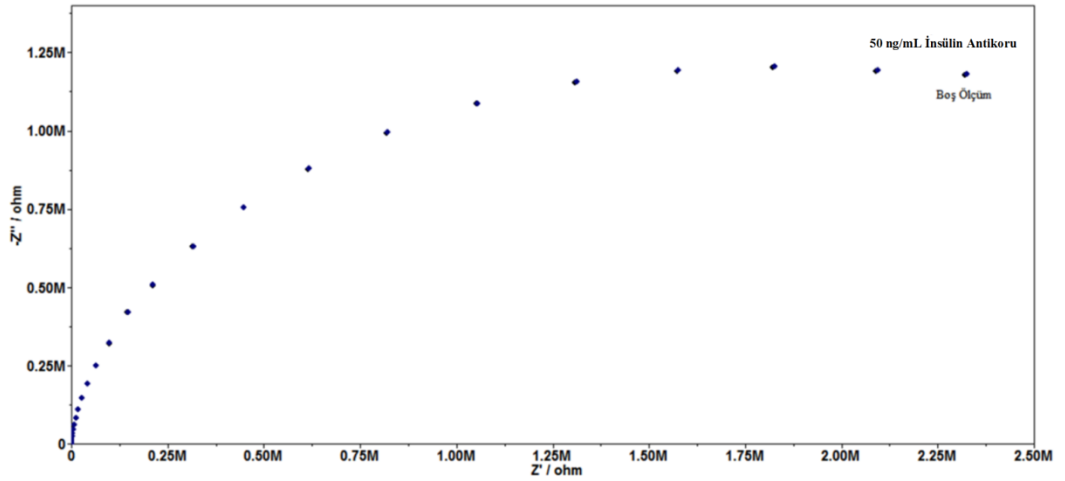


Şekil 3.140 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1200 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

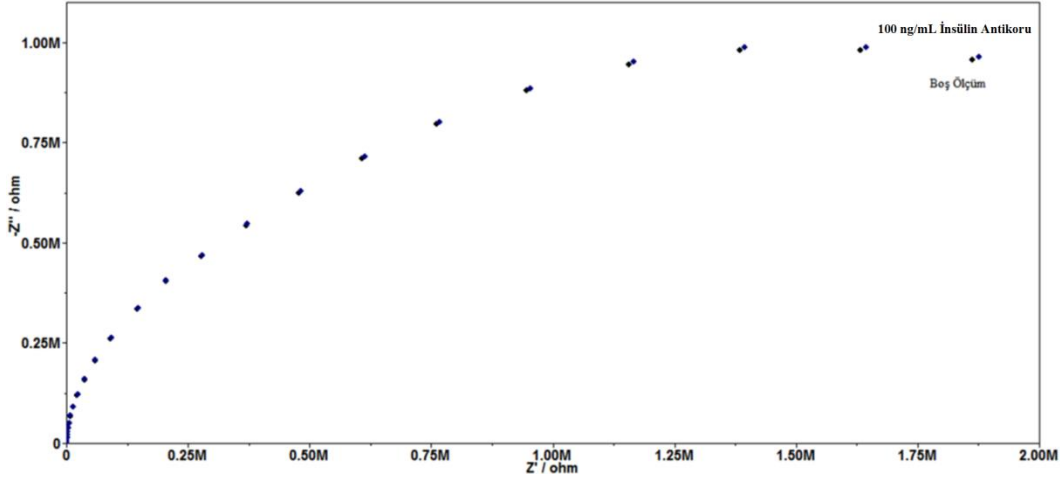


Şekil 3.141 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi denemelerinden elde edilen standart grafiği (100-1200 ng/mL insülin antikoru konsantrasyon aralığı arası)

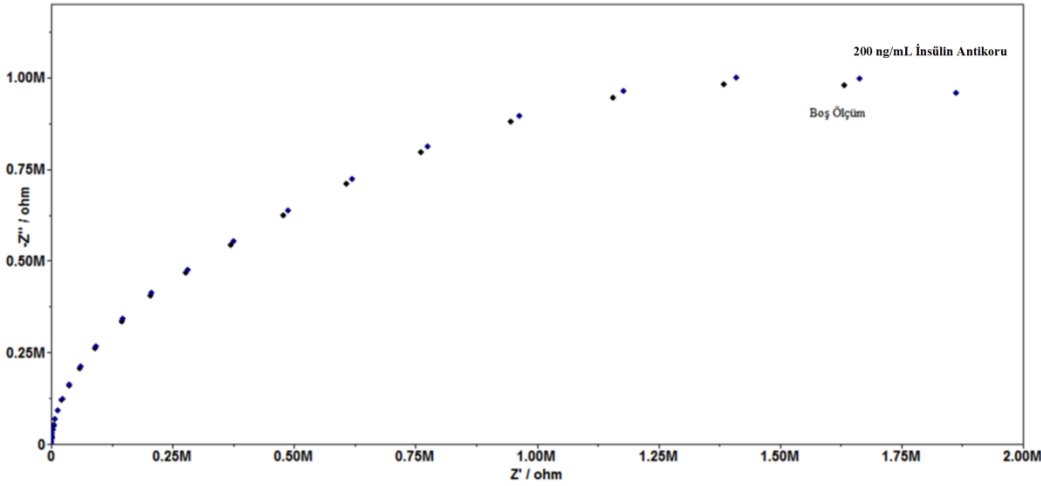
Gerçekleştirilen bu denemede 1200 ng/mL lik insülin antikoru konsantrasyonu doğrusallıktan sapma göstermiştir.



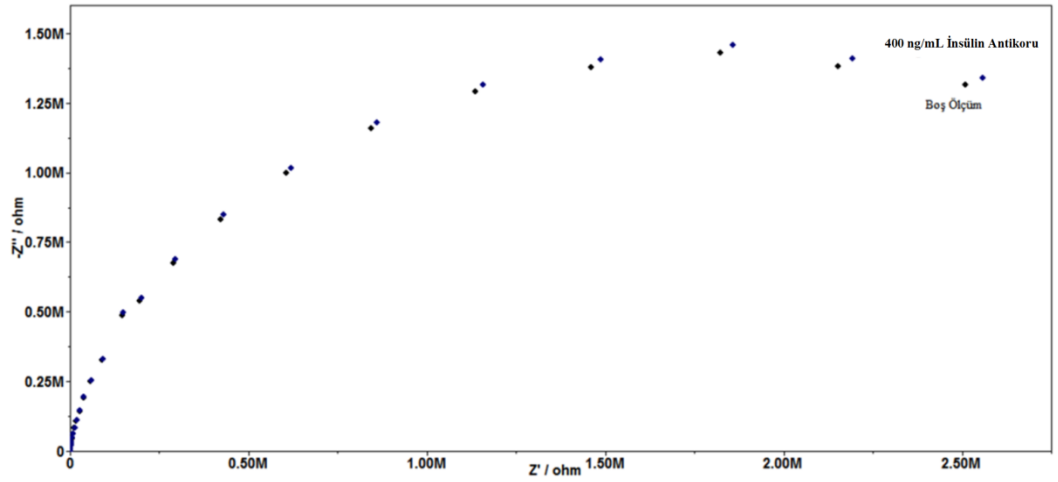
Şekil 3.142 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



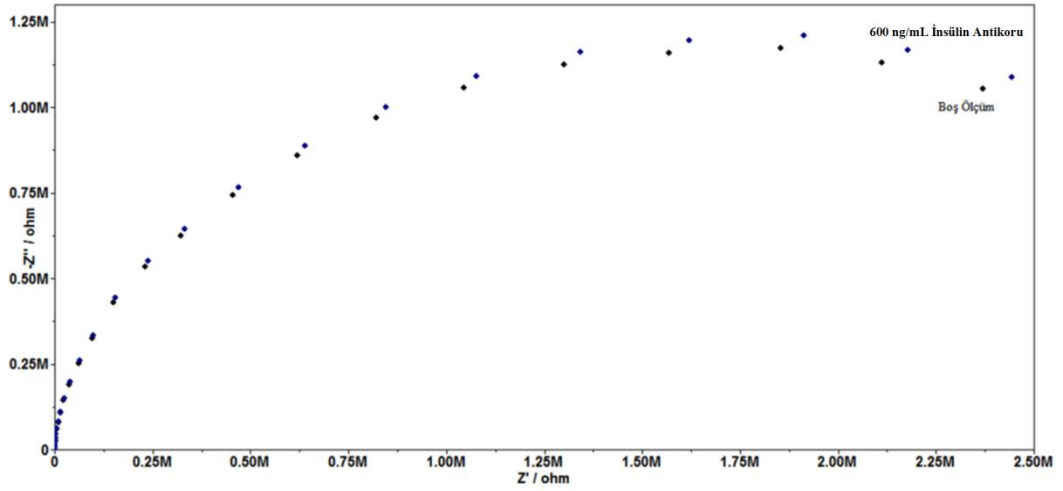
Şekil 3.143 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



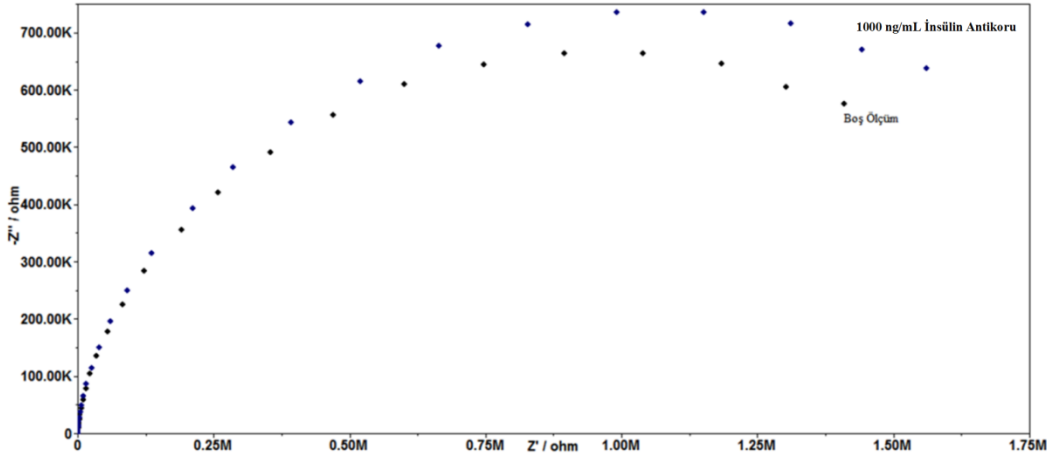
Şekil 3.144 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



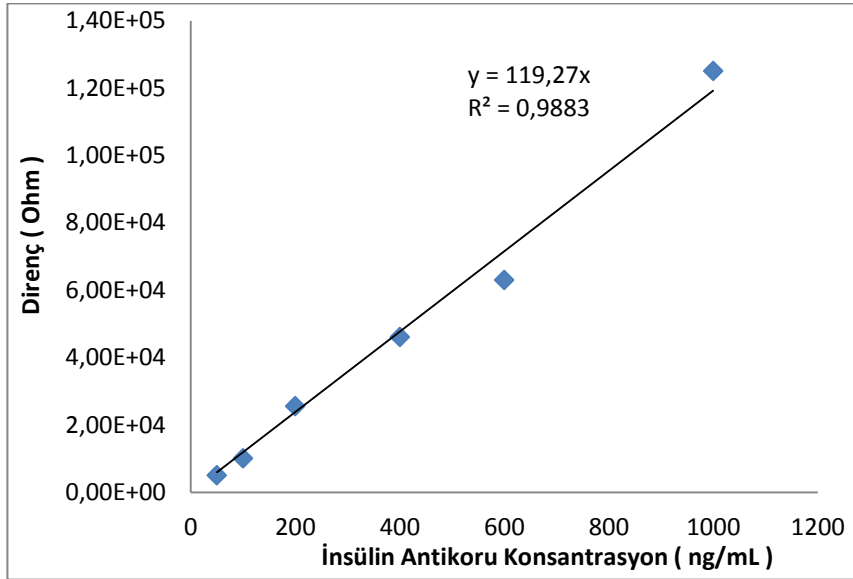
Şekil 3.145 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.146 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, 0,005 M + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.147 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,0 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

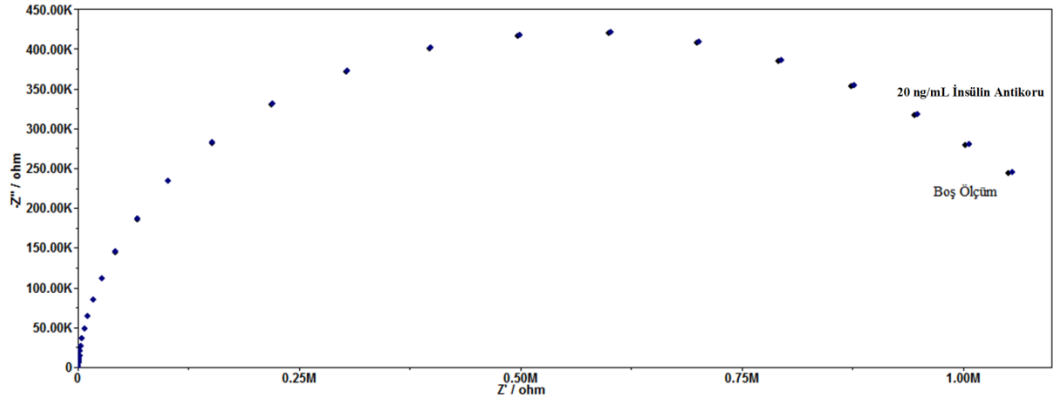


Şekil 3.148 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi denemelerinden elde edilen standart grafiği (50-1000 ng/mL insülin antikoru konsantrasyon aralığı)

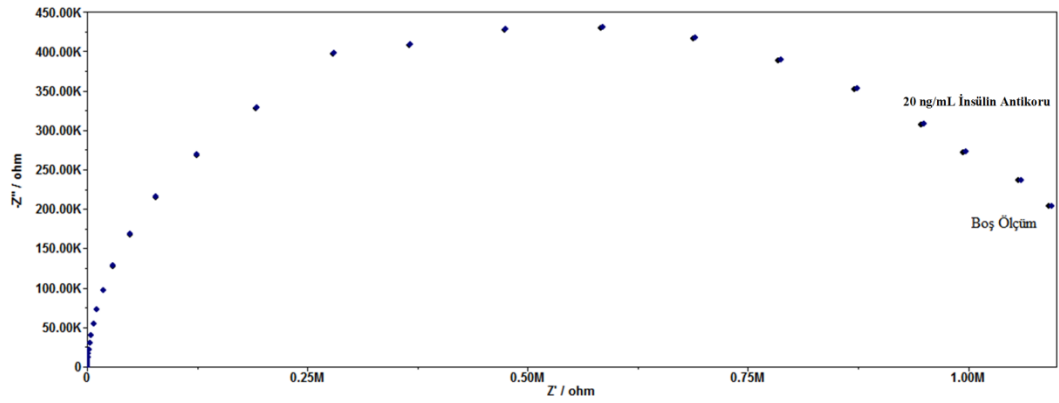
Gerçekleştirilen bu denemede 1000 ng/mL lik insülin antikoru konsantrasyonu doğrusal tayin aralığının en yüksek değeri olarak belirlendi.

Bu çalışmadan sonra alt tayin sınırının daha kesin bir şekilde belirlemek için 20, 40 ve 50 ng/mL lik insülin antikoru konsantrasyonları kullanılarak 2 şer

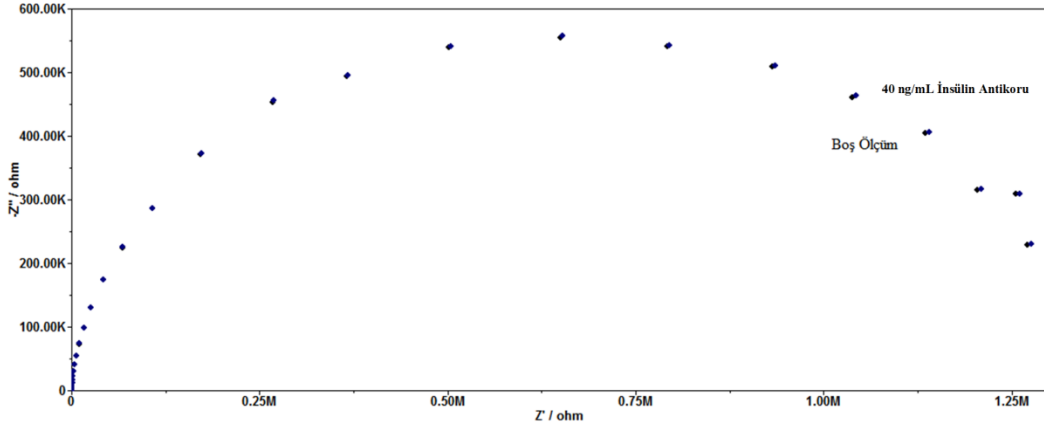
deneme yapıldı. Deneme ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları Şekil 3.152 ile Şekil 3.157 arasında, Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci sonuçları Çizelge 3.4 de verilmiştir.



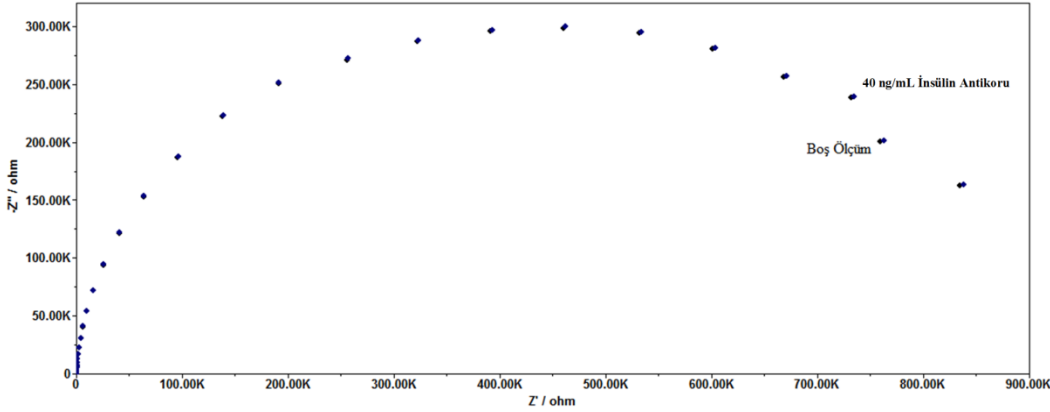
Şekil 3.149 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 20 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



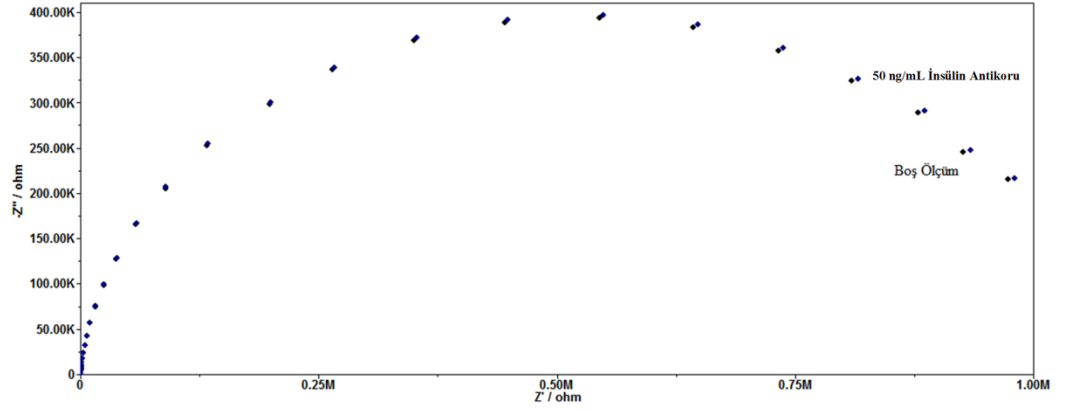
Şekil 3.150 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 20 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



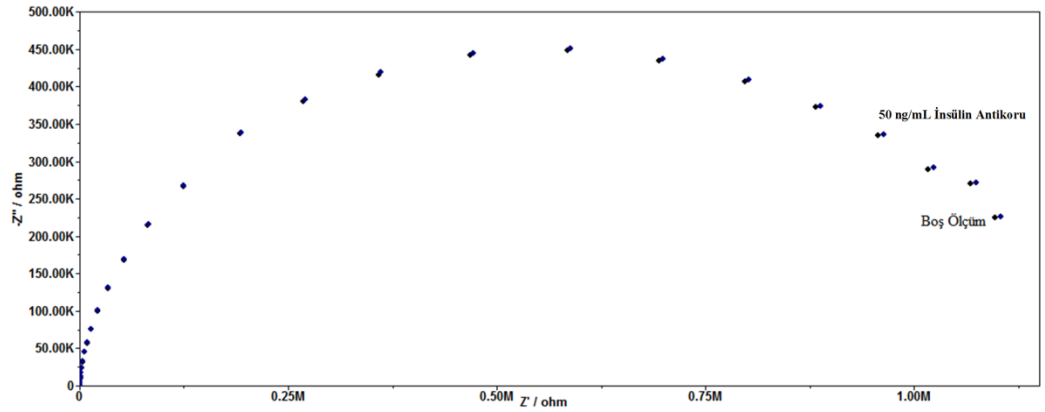
Şekil 3.151 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 40 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.152 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 40 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.153 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.154 Doğrusal tayin aralığının belirlenmesi; boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 6. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]

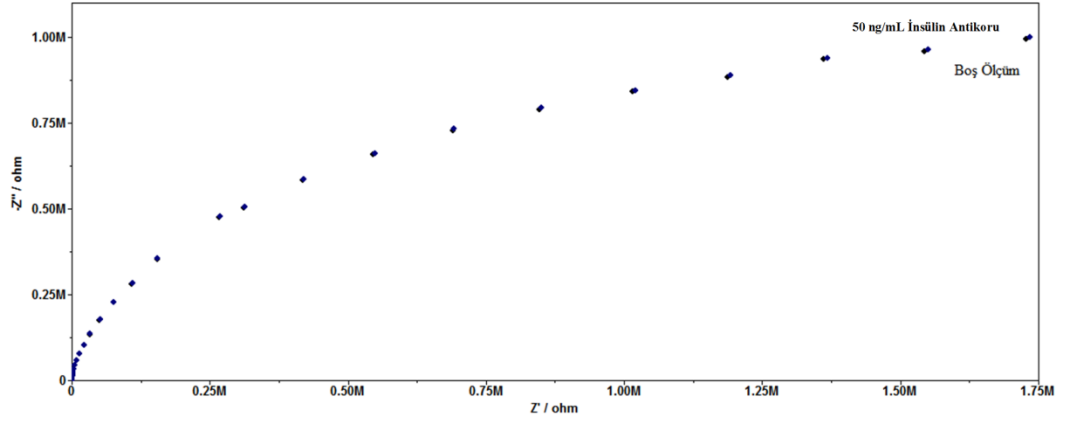
Çizelge 3.4 İnsülin antikoru konsantrasyonlarının oluşturdukları ortalama direnç

İnsülin Antikoru (ng/mL)	Ortalama Direnç (Ohm)
20	3000
40	2250
50	6000

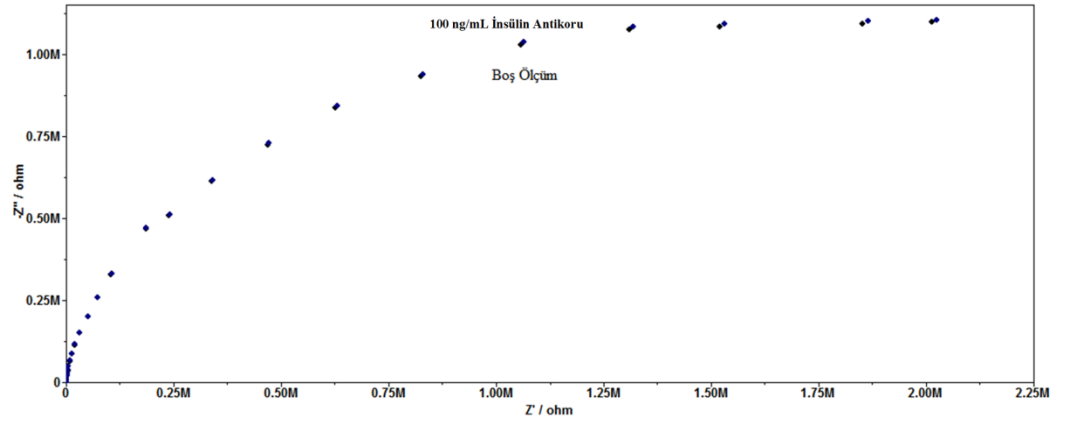
Yapılan denemeler sonucunda 20 ve 40 ng/mL insülin antikoru konsantrasyonlarından elde edilen sonuçlar salınım göstermektedir. 40 ng/mL insülin antikoru denemesi ile arasında 10 ng/mL insülin antikoru fark bulunan 50 ng/mL insülin antikoru denemesinde elde edilen devre direnci 40 ng/mL insülin antikoru denemesinin iki katından fazladır. Bu durum sensörün alt tayin sınırının 50 ng/mL insülin antikoru konsantrasyonu olarak belirtilmesine karar verilmesine zemin oluşturmuştur.

3.3.2.2 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EIS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirlik denemeleri

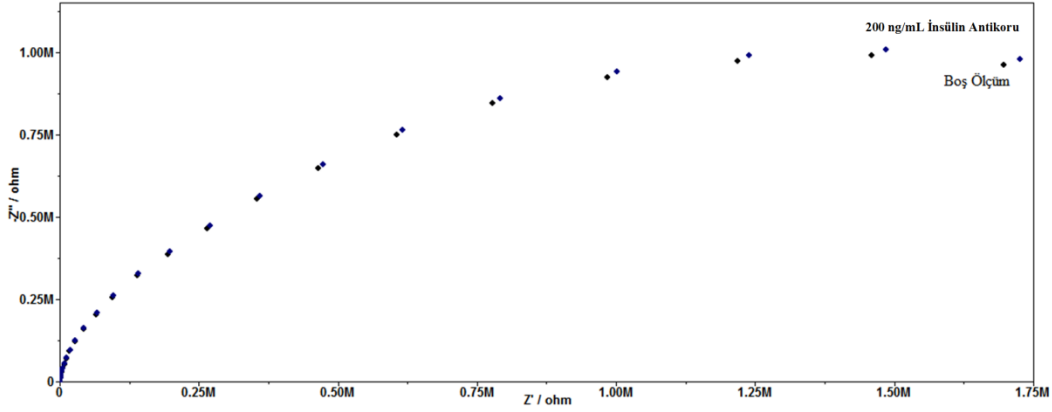
Tekrar üretilebilirlik denemesi ile immobilize edilen insülin antikorunun elektrot için benzer sonuçlar gösterip göstermediği araştırıldı. Bu çalışma için 50-1000 ng/mL arası 5 standart grafiği çizildi. Çizilen standart grafikleri için eğim ve R^2 değerleri hesaplandı. Yapılan her çalışmanın Nyquist diyagramı ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci ile çizilen standart grafikleri Şekil 3.155 ile Şekil 3.189 arasında gösterildi. Elde edilen devre direnci değişim standart grafiklerinin denklemleri, doğruluk değerleri (R^2) ve eğim açıları Çizelge 3.5 de sunuldu.



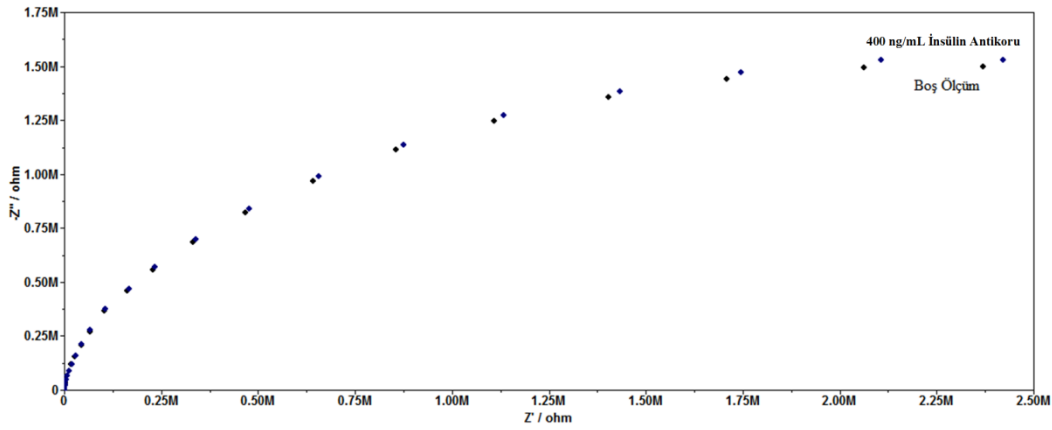
Şekil 3.155 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



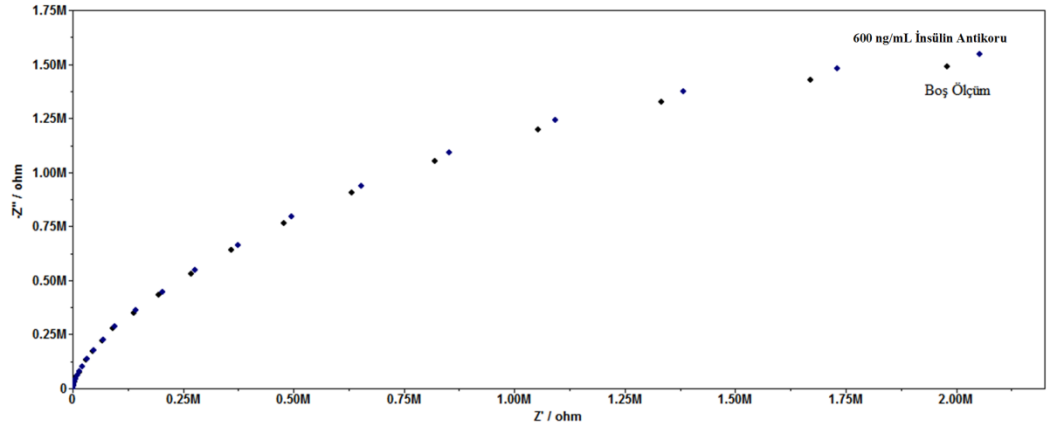
Şekil 3.156 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



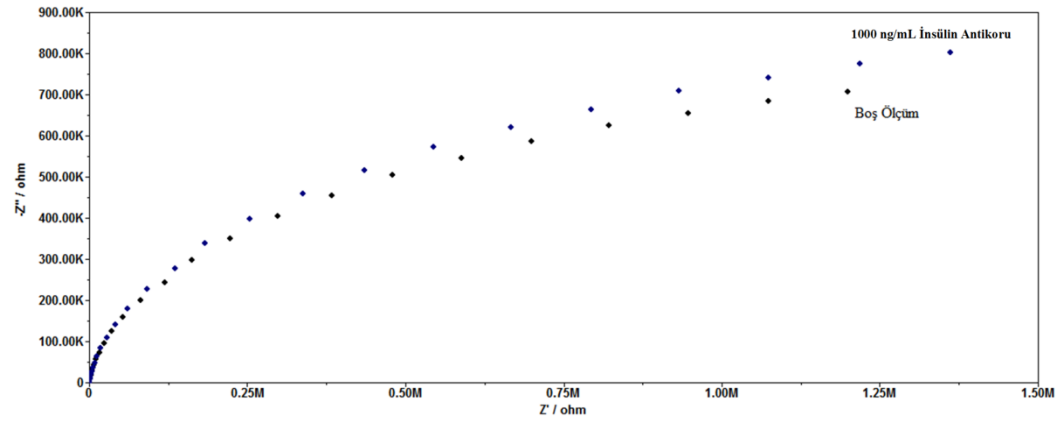
Şekil 3.157 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



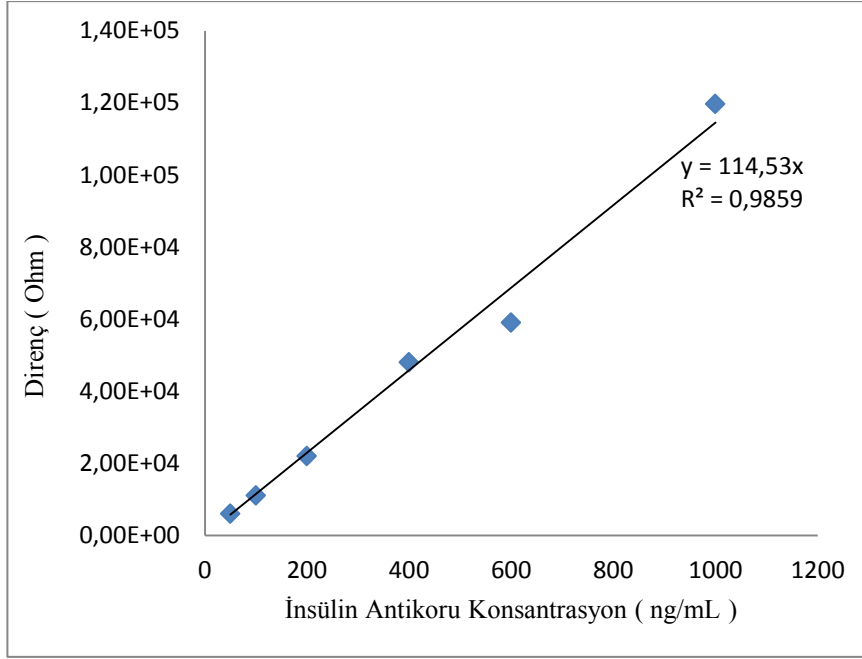
Şekil 3.158 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



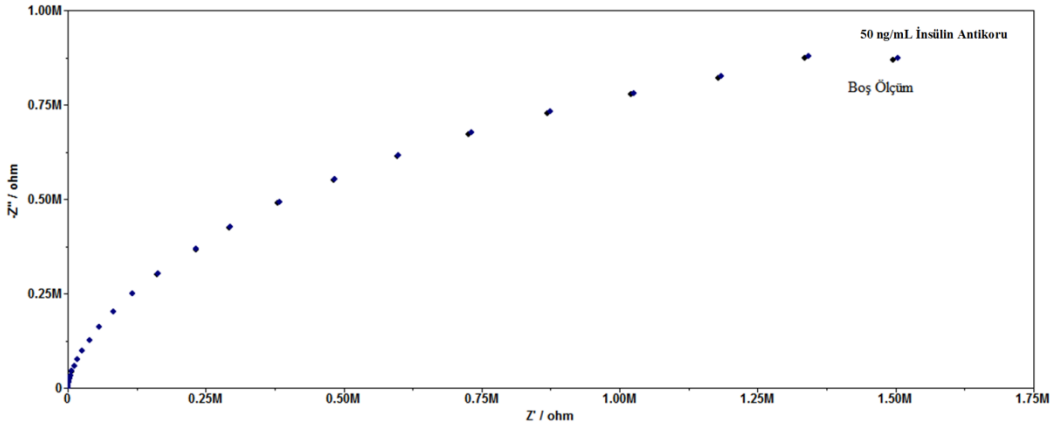
Şekil 3.159 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



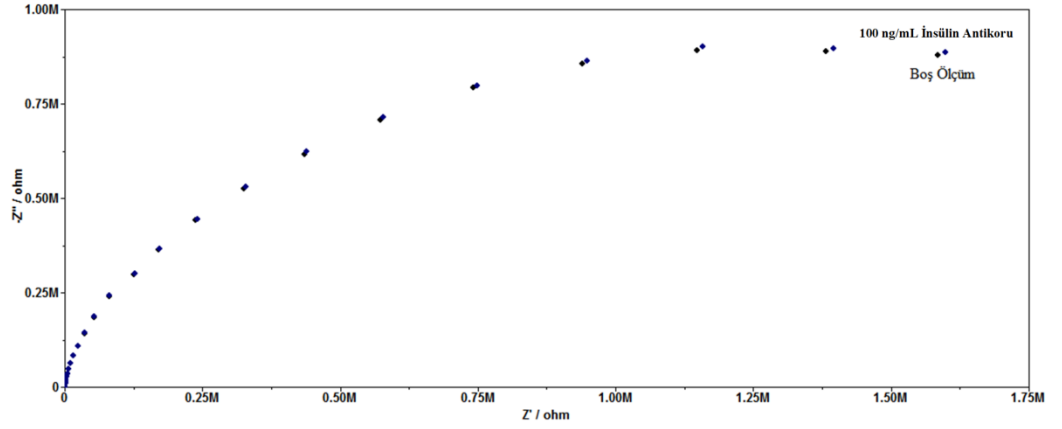
Şekil 3.160 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 1. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



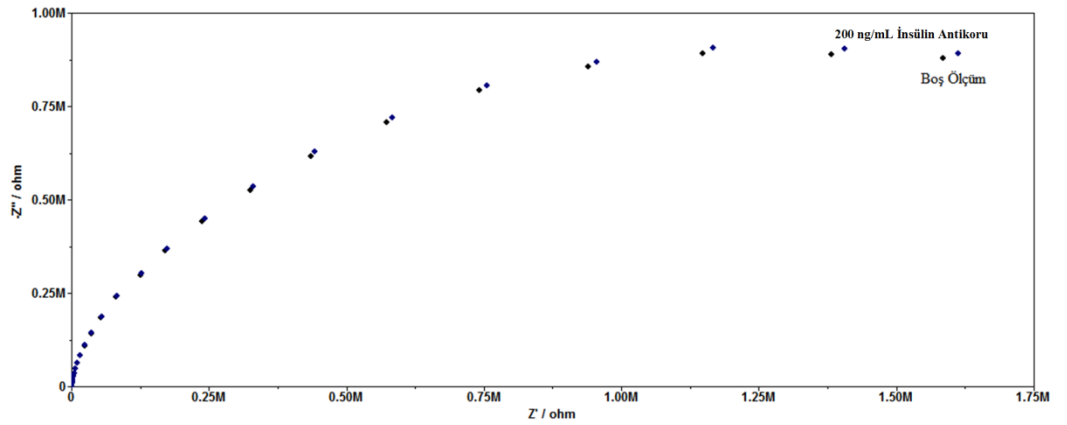
Şekil 3.161 1. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (50-1000 ng/mL insülin antikoru konstrasyon aralığı)



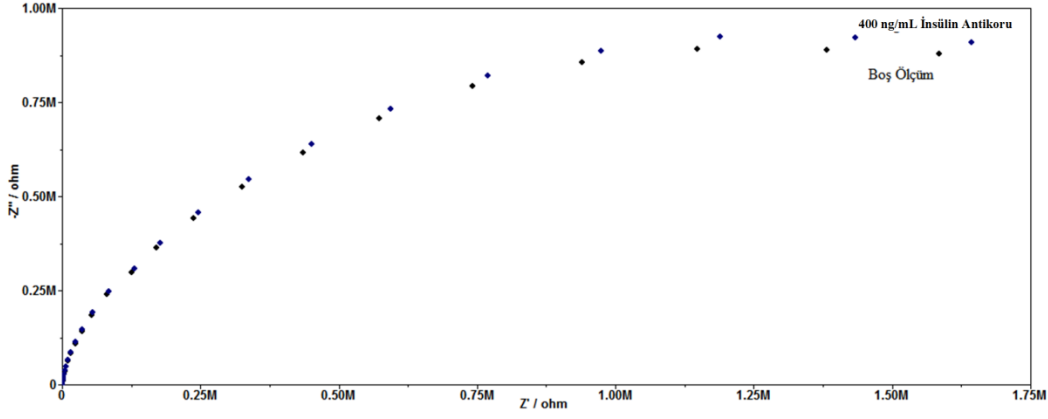
Şekil 3.162 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



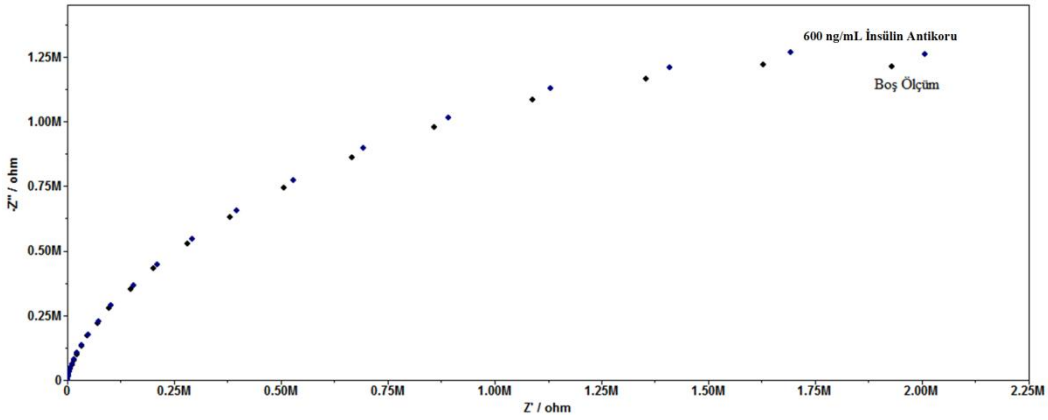
Şekil 3.163 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



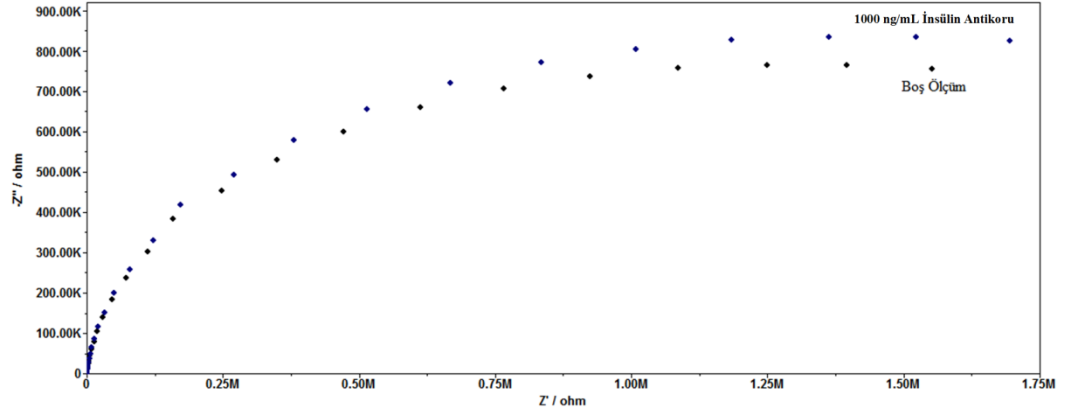
Şekil 3.164 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



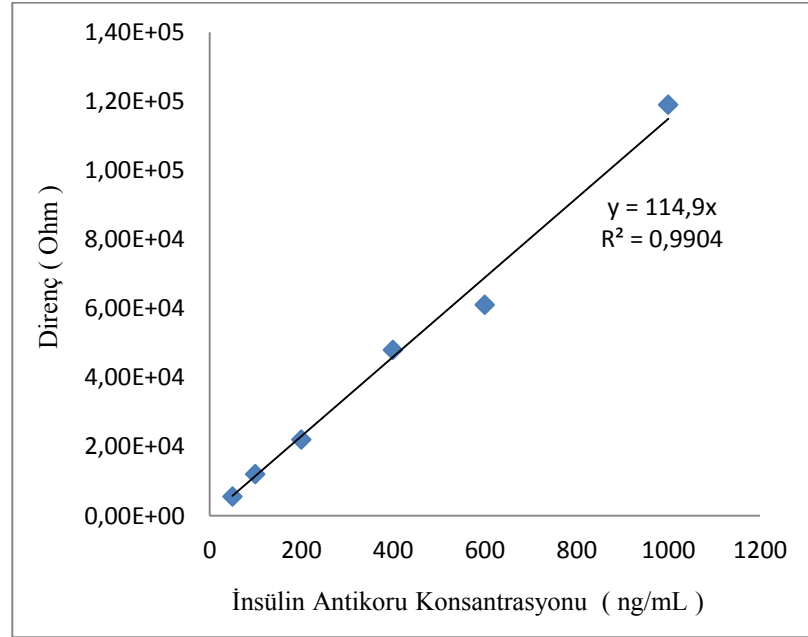
Şekil 3.165 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



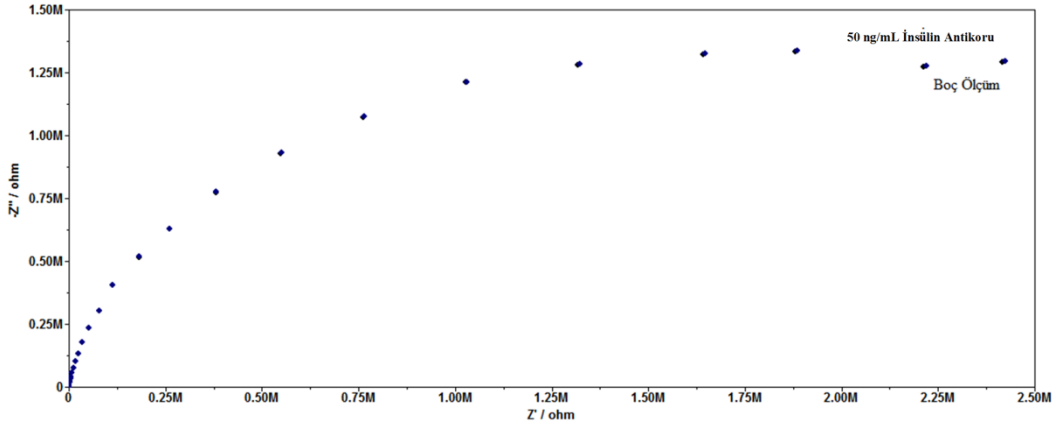
Şekil 3.166 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



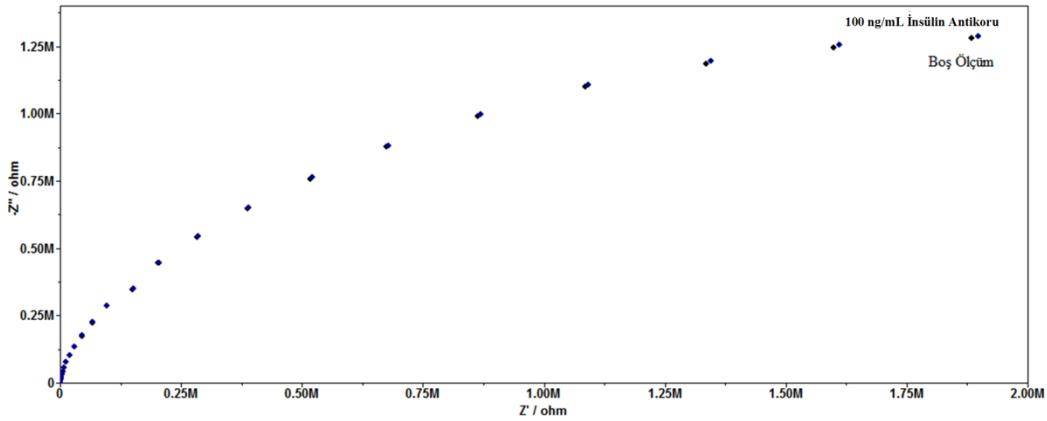
Şekil 3.167 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 2. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



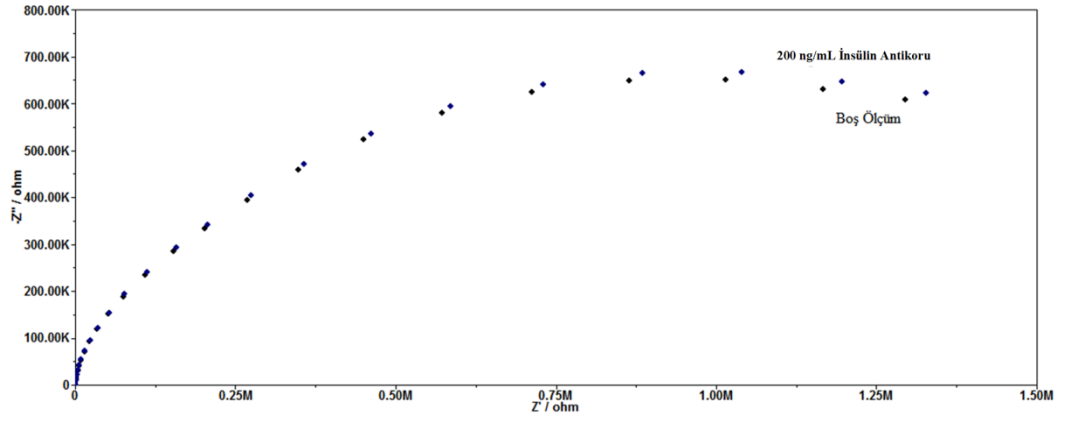
Şekil 3.168 2. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (50-1000 ng/mL insülin antikoru konsantrasyon aralığı)



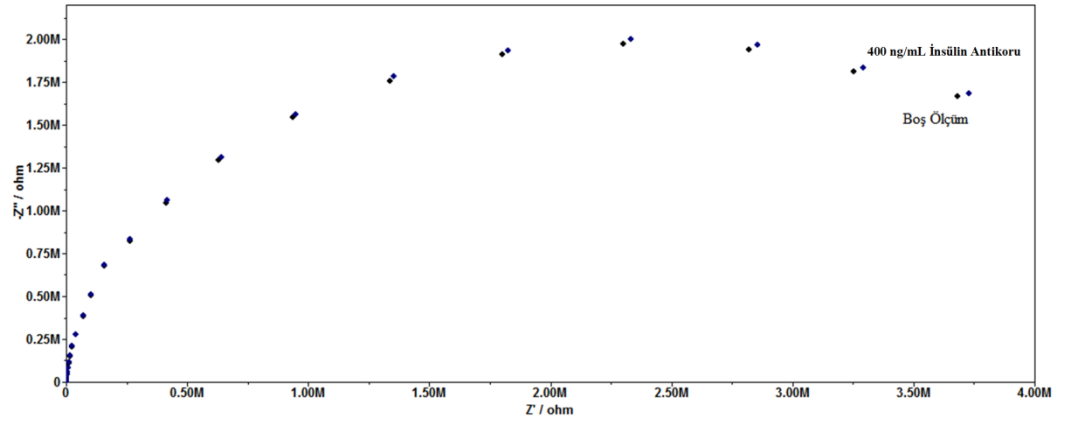
Şekil 3.169 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



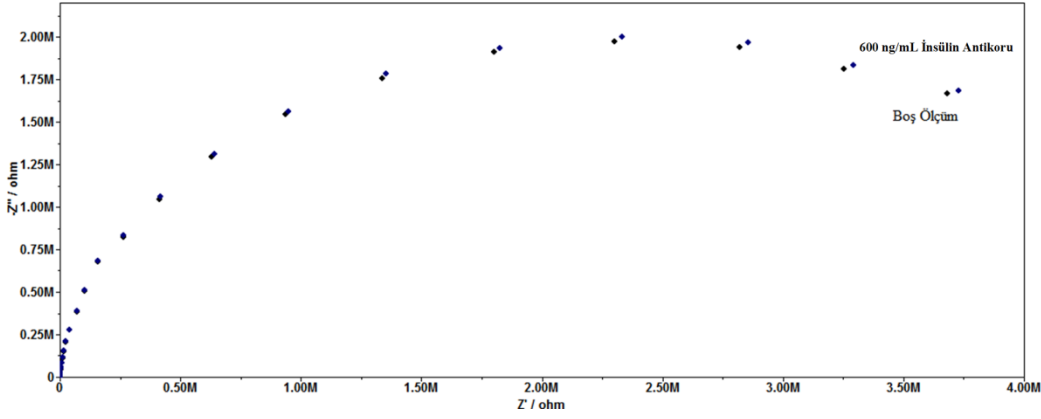
Şekil 3.170 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



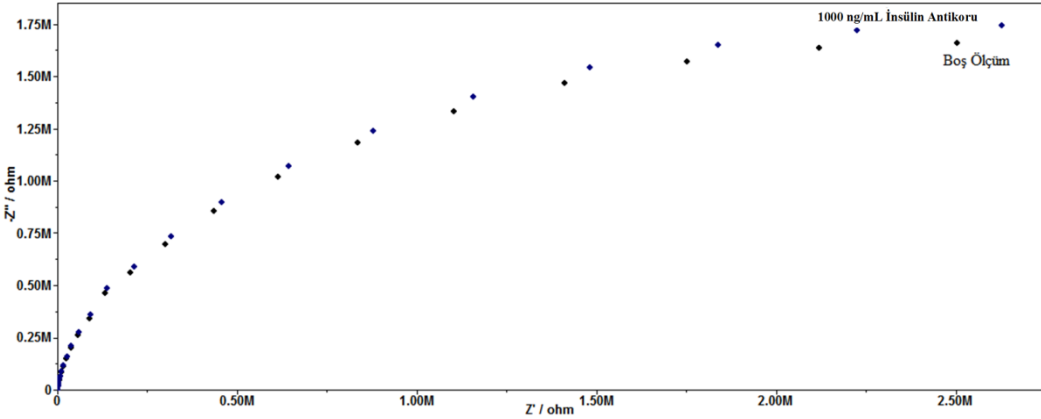
Şekil 3.171 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



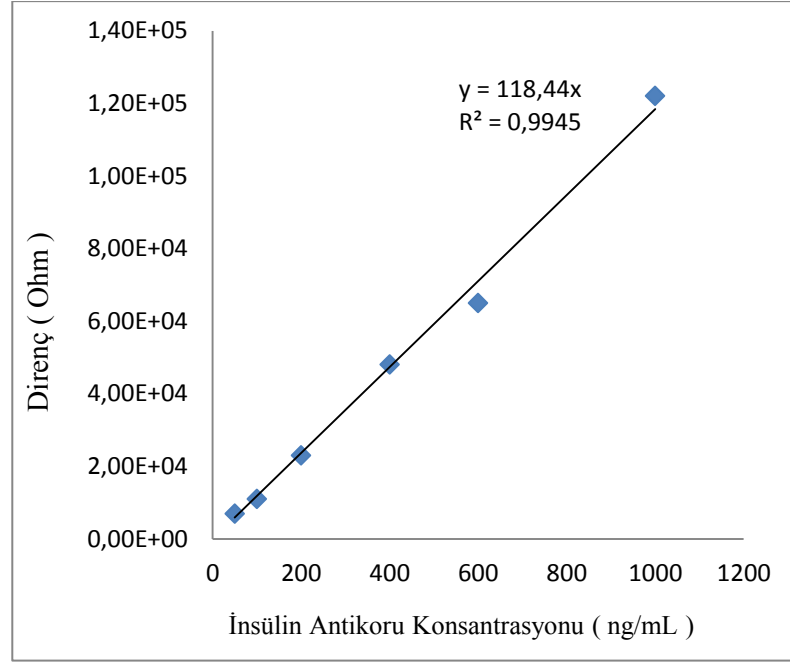
Şekil 3.172 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



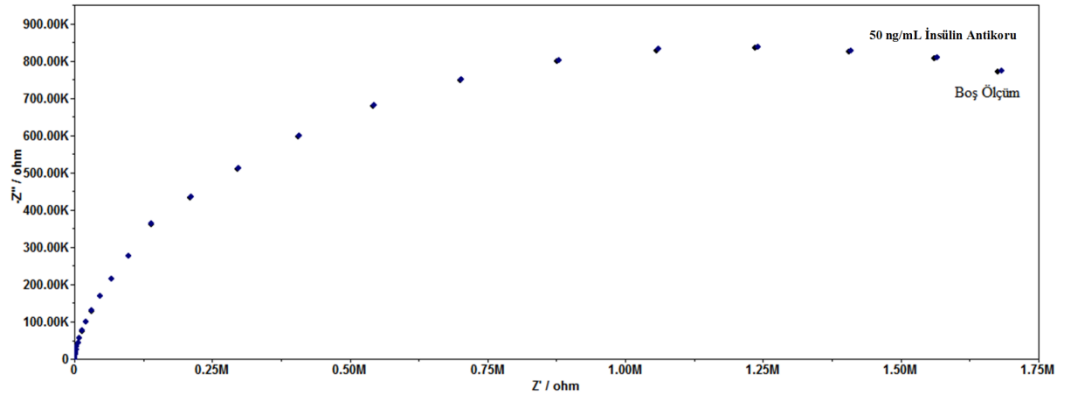
Şekil 3.173 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



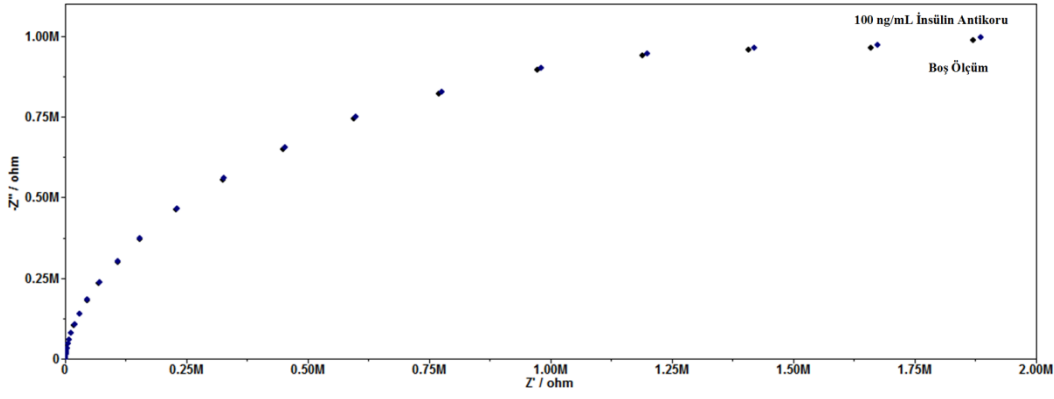
Şekil 3.174 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 3. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



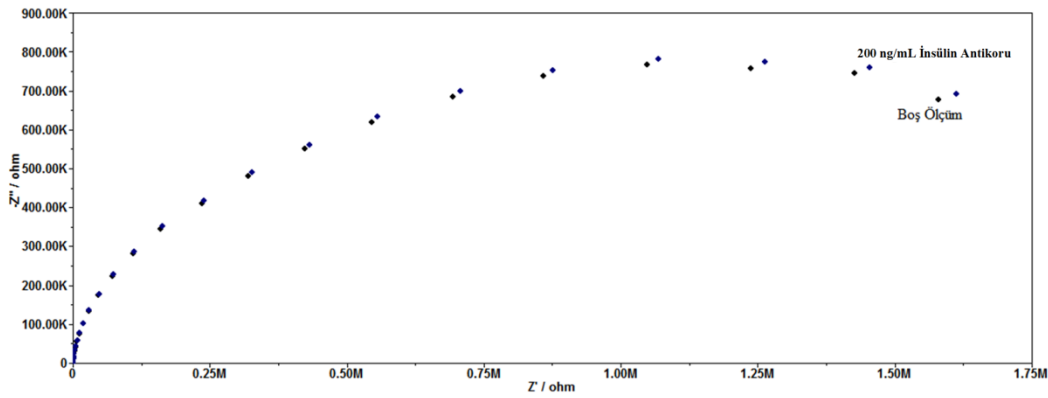
Şekil 3.175 3. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değışim standart grafiğı (50-1000 ng/mL insülin antikoru konantrasyon aralığı)



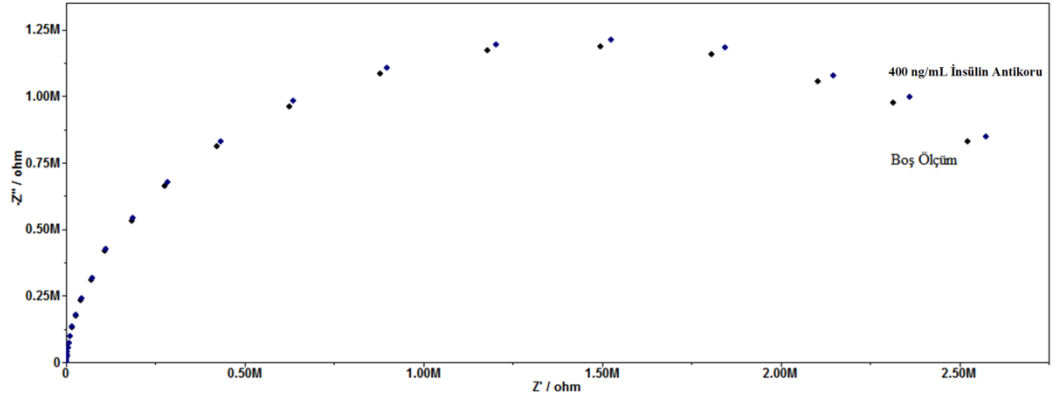
Şekil 3.176 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



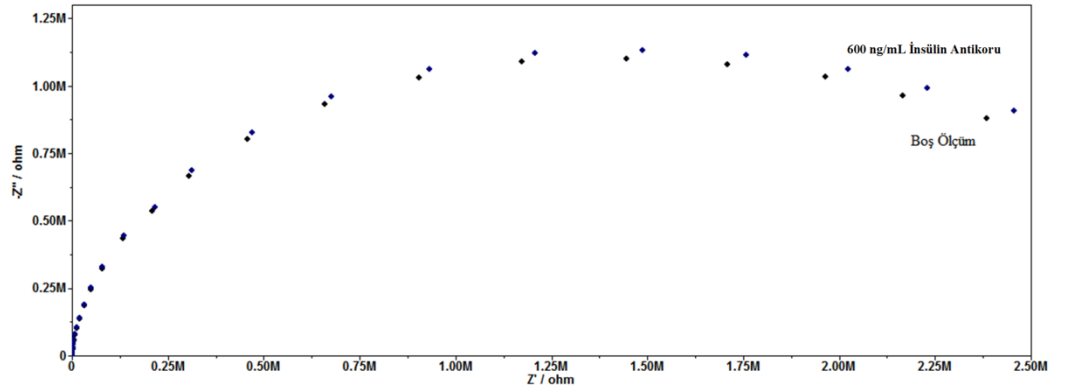
Şekil 3.177 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



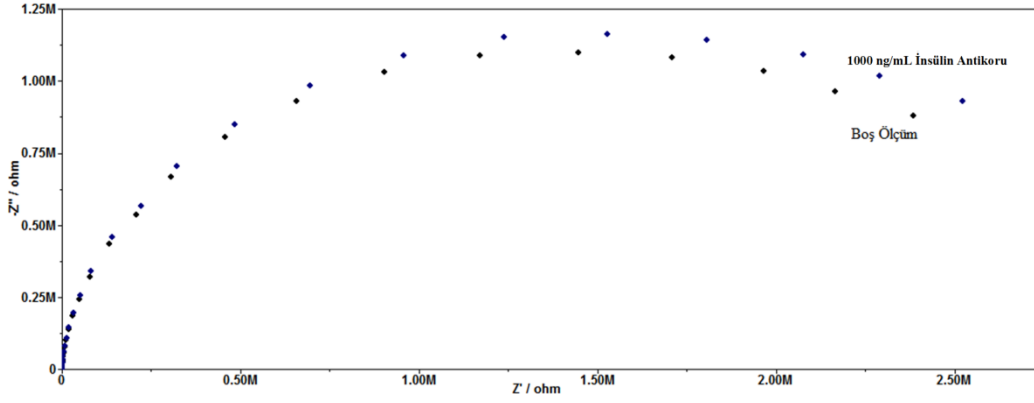
Şekil 3.178 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



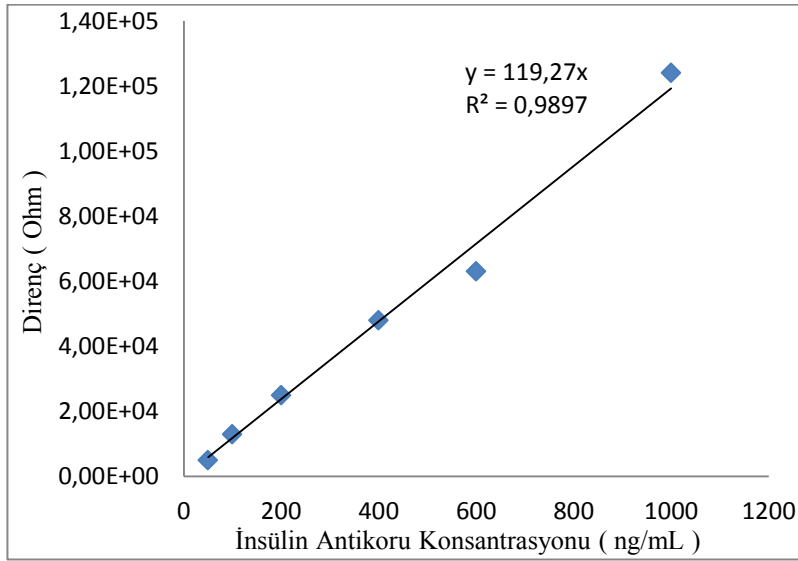
Şekil 3.179 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



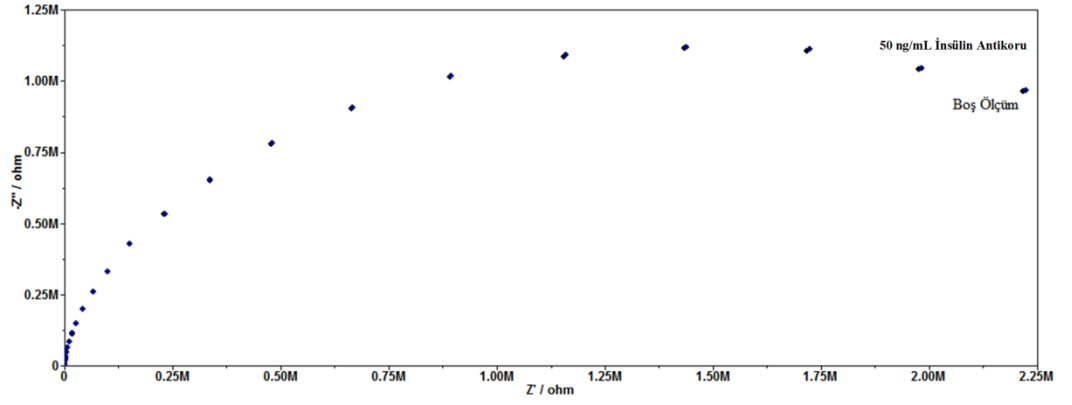
Şekil 3.180 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



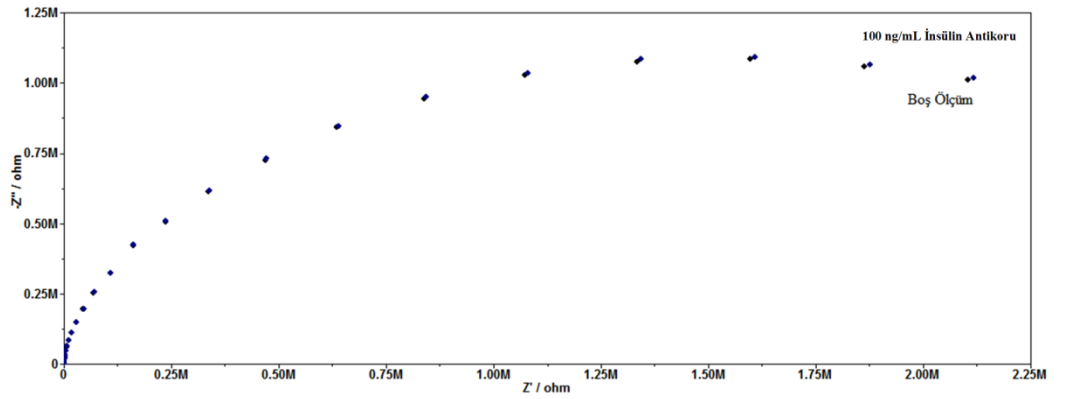
Şekil 3.181 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 4. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



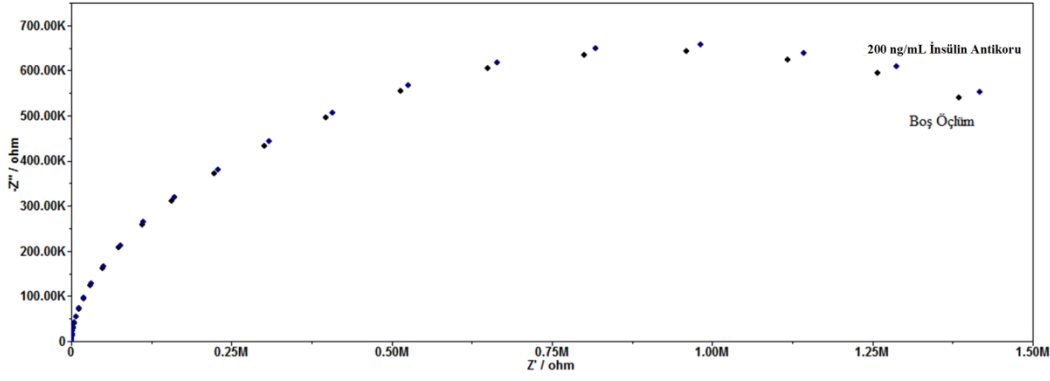
Şekil 3.182 4. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (50-1000 ng/mL insülin antikoru konsantrasyon aralığı)



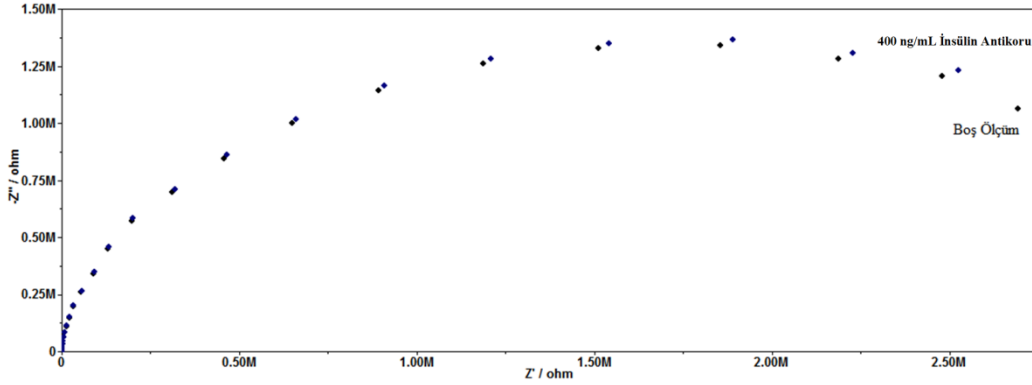
Şekil 3.183 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 50 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



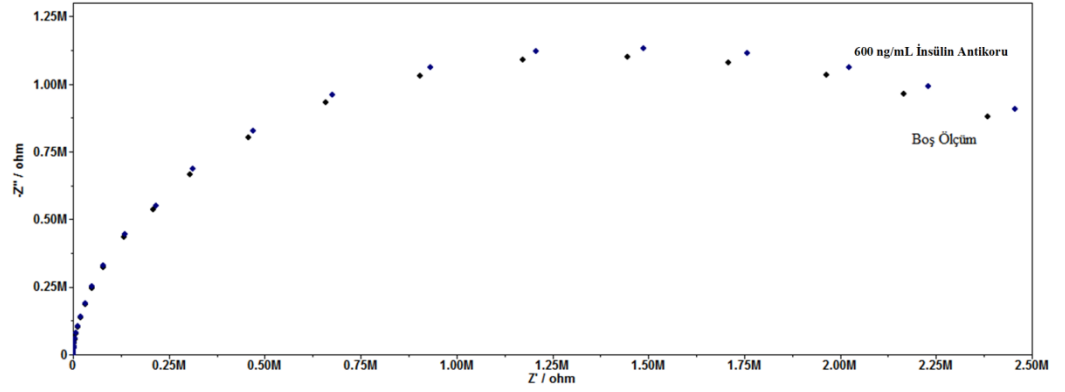
Şekil 3.184 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 100 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



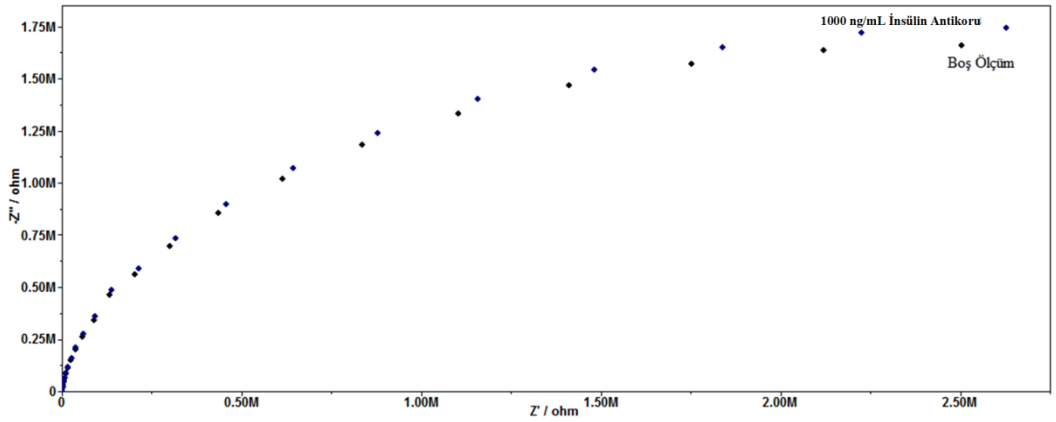
Şekil 3.185 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 200 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



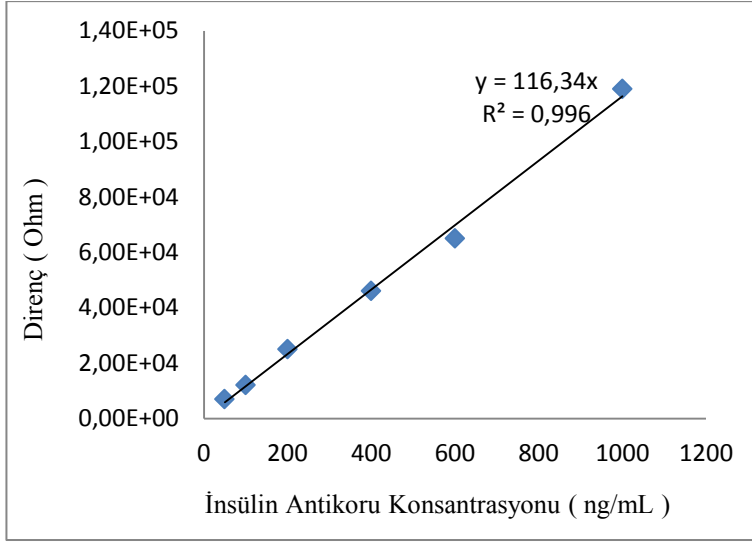
Şekil 3.186 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 400 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.187 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 600 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.188 Tekrar üretilebilirlik denemesi: boş ölçüm ve 1000 ng/mL insülin antikoru varlığında impedans ölçümü 5. [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde $0,005 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.189 5. Seri tekrar üretilebilirlik denemesinden elde edilen devre direnci değişim standart grafiği (50-1000 ng/mL insülin antikoru konsantrasyon aralığı)

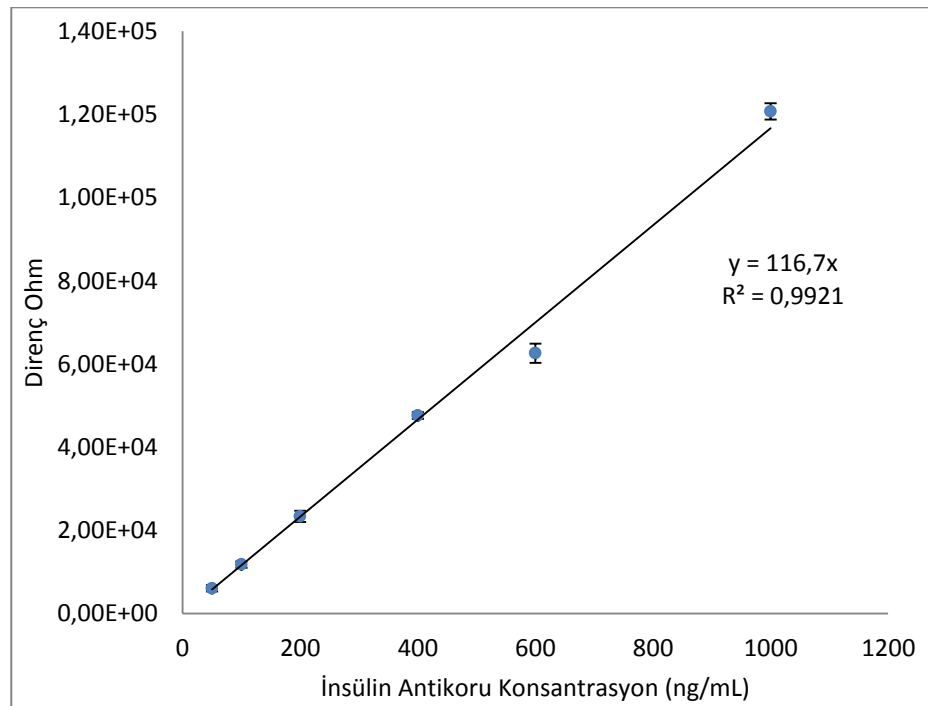
Çizelge 3.5 İnsülin antikoru tayinine yönelik geliştirilen biyosensörün tekrar üretilebilirlik özelliğinin belirlenmesi için yapılan denemelerin devre direnci değişim standart grafiklerinden elde edilen denklemler, doğruluk değerleri (R^2) ve eğim açıları

Deney No	Denklem	R^2
1	$y = 114.53x$	$R^2 = 0.9859$
2	$y = 114.9x$	$R^2 = 0.9904$
3	$y = 118.44x$	$R^2 = 0.9945$
4	$y = 119.27x$	$R^2 = 0.9897$
5	$y = 116.34x$	$R^2 = 0.996$

Yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar ışığı altında insülin antikoru insülin bağlanması aşamasında elde edilen sonuçlar birbirlerine çok benzer çıkmaktadır. Oluşturulan biyosensörün tekrar üretilebilirlik seviyesinin yüksekliği yapılan denemelerle oluşan doğru denklemlerinin eğimlerinin birbirlerine çok yakın olmasından anlaşılmaktadır.

3.3.2.3 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik biyosensörün tekrarlanabilirlik denemesi

Yapılan tekrar üretilebilirlik denemelerinin sonuçlarından yararlanarak elde edilen standart değerlerin ortalaması alınarak yeni bir standart grafiği çizildi. Bu grafikten faydalanarak her bir değer için standart sapma ve varyasyon katsayıları belirlendi. Elde edilen sonuçlar şekil 3.190 te gösterilmiştir.

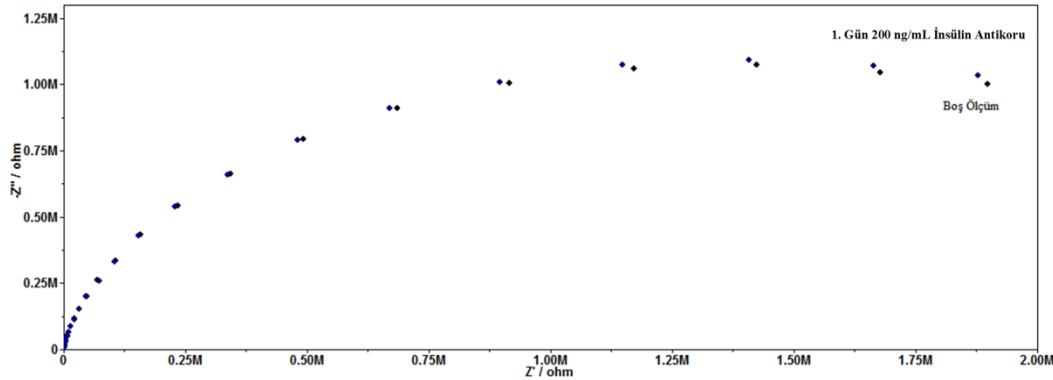


Şekil 3.190 Tekrarlanabilirlik denemesinden elde edilmiş devre direnci değişim standart grafiği toplu sonuçları (50-1000 ng/mL insülin antikoru konsantrasyon aralığı)

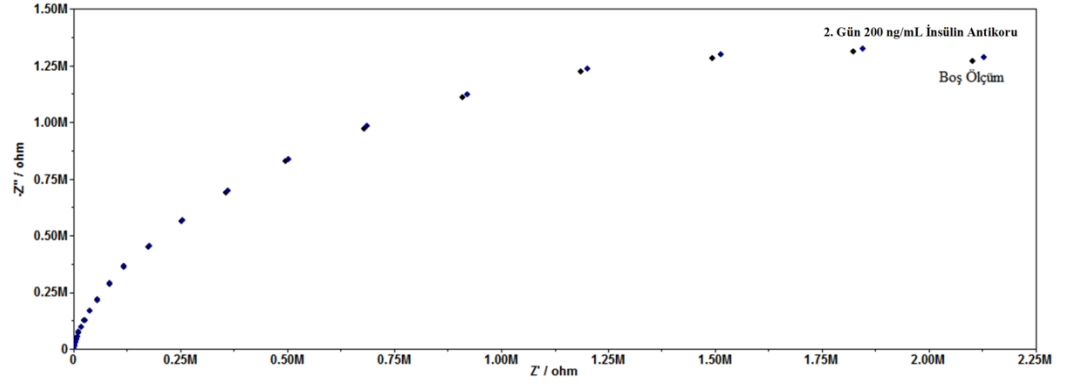
Geliştirilen biyosensöre ilişkin tekrarlanabilirlik değerlerinin belirlenmesi için 400 ng/mL lik insülin antikoru ile 5 elektrot için ölçümler gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen (N)= 5 ölçüm sonucunda; ortalama değer ($\bar{X}$)= 407 ng/mL, standart sapma (S.S.)= $\pm 6,8$ ng/mL, varyasyon katsayısı (V.K.) = % 1,68 ve tayin limiti 21,44 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerden görüleceği üzere geliştirilen insülin antikoru biyosensörünün insülin antikoru tayininde oldukça iyi tekrarlanabilir sonuçlarla kullanılabilece belirlendi.

3.3.2.4 Elektrokimyasal impedans spektroskopisi (EİS) ile afinite temelli insülin antikoru tayinine yönelik biyosensörün depo kararlılığı denemesi

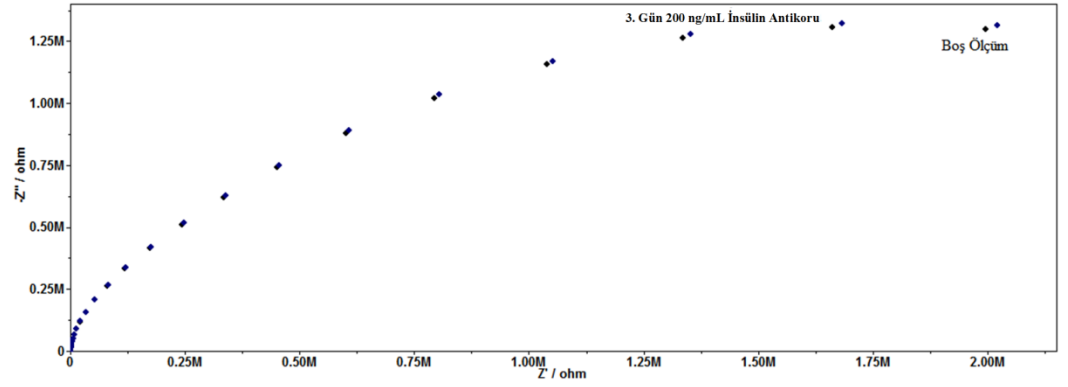
Geliştirilen bir biyosensörün en önemli performans kriterlerinden bir tanesi onun depolama süresine bağlı olarak ne kadar biyolojik aktivite kaybettiğidir. Bir başka bakış açısıyla depolama süresince aktivitesini ne kadar koruduğudur. Çalışmaların bu kısmında insülin biyosensörünün depolama kararlılığı incelenmiştir. Depo kararlılığı denemesi ile ilgili sonuçların Nyquist diyagramları ve Nyquist diyagramlarından elde edilen devre direnci rölatif değerleri Şekil 3.191 ila Şekil 3.197 arasında verilmiştir. Depo kararlılığı denemesi için her gün biyosensör cevabındaki değişime ilişkin alınan ölçümlere göre % rölatif azalma Çizelge 3.6 de verilmiştir.



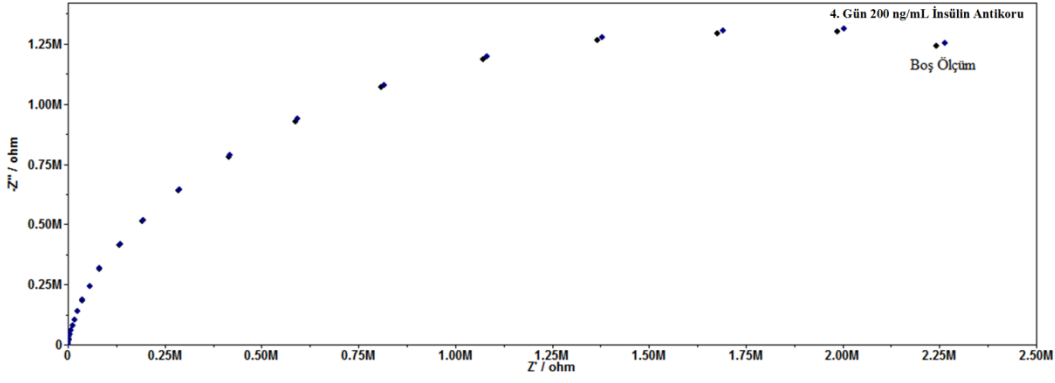
Şekil 3.191 Depo kararlılığı denemesi; 1 gün, 200 ng/mL insülin antikoru [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



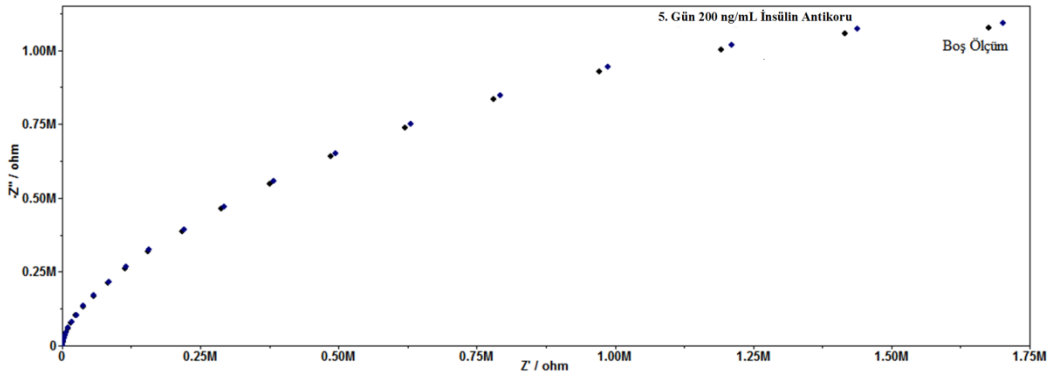
Şekil 3.192 Depo kararlılığı denemesi; 2 gün, 200 ng/mL insülin antikoru [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



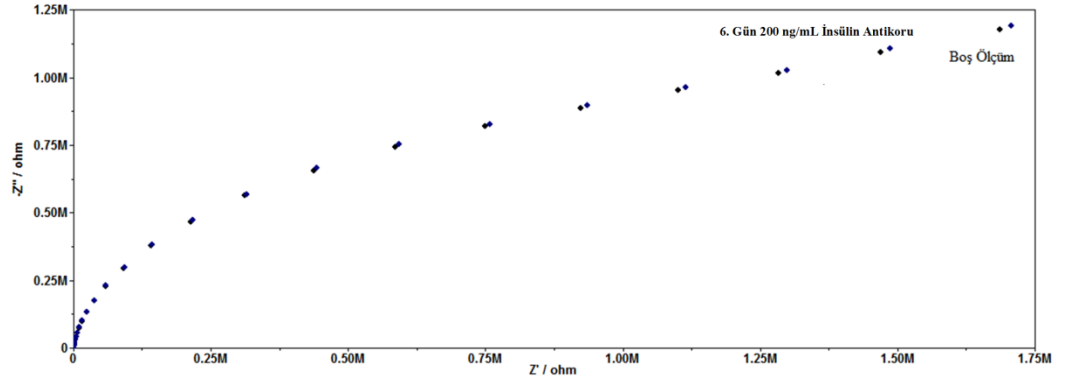
Şekil 3.193 Depo kararlılığı denemesi; 3 gün, 200 ng/mL insülin antikoru [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



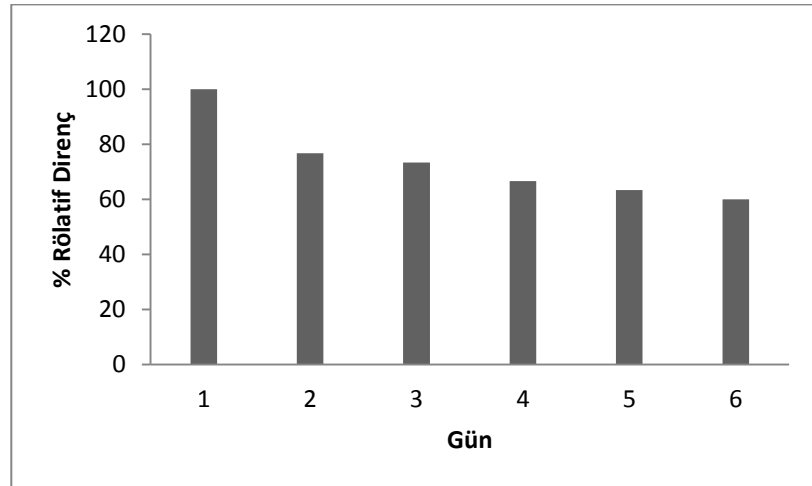
Şekil 3.194 Depo kararlılığı denemesi; 4 gün, 200 ng/mL insülin antikoru [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.195 Depo kararlılığı denemesi; 5 gün, 200 ng/mL insülin antikoru [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü:10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.196 Depo kararlılığı denemesi; 6 gün, 200 ng/mL insülin antikoru [Çalışma koşulları: Tüm impedans ölçümleri 25 mM pH 7,4 fosfat tamponu sisteminde 0,005 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ + 0,1 M KCl çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Frekans aralığı: 0,1-10000 Hz, sinyal büyüklüğü: 10 mV, Frekans sayısı: 60, Bias potansiyeli: 180 mV (Ag/AgCl referans elektrot)]



Şekil 3.197 Depo kararlılığı denemesi zamana karşı % rölatif direnç grafiği

Çizelge 3.6 Depo kararlılığı denemesi için yapılan denemelerin devre direnci değişiminden elde edilen sonuçların günlere göre değişiminin rölatif değerleri

Gün	% Rölatif Direnç
1	100
2	77
3	73
4	67
5	63
6	60

Yapılan depo kararlılığı denemesi ilk 5 günlük depolama süresi sırasında afinite kaybının %37, 6 günlük depolama süresi sonrasında ise % 40 lik afinite kaybı gösterdi.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Yapılan bu tez çalışmasında iki biyosensör geliştirildi. Bunlardan birincisinde; insülin analizine yönelik olan biyosensörde; elektrot yüzeyine immobilize edilen insülin antikorunun insülinle etkileşimi sonrasında elektrot yüzeyi ile çözelti arasındaki elektriksel direncin artması ile oluşan sinyal EİS ile incelendi. EİS aynı zamanda 0,1-10000 Hz arasında 60 noktanın spektral taramasını yaptığı ve yapılan bu spektral tarama yüzeydeki değişimleri karakteristik olarak belirlediği için immobilizasyon parametrelerinin takibi için de kullanıldı. İnsülin analizine yönelik olan bu biyosensörde immobilizasyon optimizasyonları, ölçüm optimizasyonları ve ölçüm karakterizasyonları denemeleri gerçekleştirildi. İnsülin analizine yönelik olan söz konusu biyosensör için gerçekleştirilen tüm denemelerin toplu sonuçları Çizelge 4.1 da verilmiştir.

Çizelge 4.1 İnsülin analizine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün bütün denemelerine ilişkin toplu sonuçlar

İNCELENEN PARAMETRELER	SONUÇLAR														
İMOBİLİZASYON PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU															
OPTİMUM MUA KONSANTRASYONU	20mM														
OPTİMUM MUA İNKÜBASYON SÜRESİ	60 dakika														
OPTİMUM EDC/NHS KONSANTRASYONU	32/8 mM														
OPTİMUM EDC/NHS pH sı	pH: 7,0														
OPTİMUM EDC/NHS İNKÜBASYON SÜRESİ	60 dakika														
ÖLÇÜM PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU															
İMMOBİLİZE EDİLEN ANTİ İNSÜLİN ANTİKORU OPTİMİZASYONU	62,5µg/mL İnsülin antikoru														
İNSÜLİN İNKÜBASYON SÜRESİNİN OPTİMİZASYONU	30 dakika														
İNKÜBASYON TAMPONU pH OPTİMİZASYONU	pH: 7,4														
İNKÜBASYON TAMPON SİSTEMİ VE KONSANTRASYONU OPTİMİZASYONU	25 mM HEPES														
ÖLÇÜM PARAMETRELERİNİN KARAKTERİZASYONU															
DOĞRUSAL TAYİN ARALIĞININ BELİRLENMESİ	2.5-30 pM İnsülin														
TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİK	$y=(2268,7-2495,7)x$														
TEKRARLANABİLİRLİK	15,3 pM ($\bar{X}$)= 15 pM (S.S.)= $\pm 0,48$ pM (V.K.)ise %3,08 tayin limiti= 2,03 pM														
DEPO KARARLILIĞI	<table> <tr> <th>Gün</th><th>% Rölatif Direnç</th></tr> <tr> <td>1</td><td>100</td></tr> <tr> <td>2</td><td>99</td></tr> <tr> <td>3</td><td>99</td></tr> <tr> <td>4</td><td>95</td></tr> <tr> <td>5</td><td>93</td></tr> <tr> <td>6</td><td>89</td></tr> </table>	Gün	% Rölatif Direnç	1	100	2	99	3	99	4	95	5	93	6	89
Gün	% Rölatif Direnç														
1	100														
2	99														
3	99														
4	95														
5	93														
6	89														

Hazırlanılan insülin analizine yönelik bu biyosensör kan insülin seviyesini ölçmek için uygun bir biosensördür. Kan insülin seviyelerinin normal değerleri 57–79 pM arasındadır. Hazırladığımız biyosensörümüz 2,5-30 pM arası insülin konsantrasyonlarını ölçebilir. Aynı zamanda EİS sinin yüzeyine immobilize

edilen insülin antikorumun sinyal oluşturabilmesi için sinyal güçlendirici herhangi bir proteine (ELİSA yöntemi: peroksidaz cinsi enzimler(Lequin, R. M., 2005)) ihtiyaç duymaz bu açıdanda ek bir masraf çıkarmaz. Xu ve arkadaşlarının 2013 yılında insülin tayini için geliştirdiği afinite temelli impedimetrik biyosensör (Xu et al., 2013) 5 pM ile 50 nM arasında insülin analizi gerçekleştirmektedir. Bizim geliştirdiğimiz biyosensörün doğrusal aralığı 2,5 pM ile 30 pM arasındadır.

İkinci olarak geliştirdiğimiz insülin antikoru analizine yönelik biyosensör yukarıda bahsettiğimiz ölçüm sistemi ile analizleri gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon parametreleri aynıdır. Bu biyosensörde elektrot yüzeyine immobilize edilen insülin çözelti ortamındaki insülin antikoru ile etkileşim göstererek sinyal oluşturur. Literatürde insülin antikoru analizine yönelik afinite temelli impedimetrik biyosensöre rastlanmamıştır. İnsülin antikoru analizine yönelik olan biyosensörün için gerçekleştirilen tüm denemelerin sonuçları Çizelge 4.2 de verilmiştir.

Çizelge 4.2 İnsülin antikoru analizine yönelik olarak geliştirilen biyosensörün bütün denemelerine ilişkin toplu sonuçlar

İNCELENEN PARAMETRELER	SONUÇLAR
İMOBİLİZASYON PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU	
OPTİMUM MUA KONSANTRASYONU	20mM
OPTİMUM MUA İNKÜBASYON SÜRESİ	60 dakika
OPTİMUM EDC/NHS KONSANTRASYONU	32/8 mM
OPTİMUM EDC/NHS pH sı	pH: 7,0
OPTİMUM EDC/NHS İNKÜBASYON SÜRESİ	60 dakika
ÖLÇÜM PARAMETRELERİNİN OPTİMİZASYONU	
İMMOBİLİZE EDİLEN ANTİ İNSÜLİN ANTİKORU OPTİMİZASYONU	1mg/mL insülin
İNSÜLİN İNKÜBASYON SÜRESİNİN OPTİMİZASYONU	30 dakika
İNKÜBASYON TAMPONU pH OPTİMİZASYONU	pH: 7,4
İNKÜBASYON TAMPON SİSTEMİ VE KONSANTRASYONU OPTİMİZASYONU	25 mM HEPES
ÖLÇÜM PARAMETRELERİNİN KARAKTERİZASYONU	
DOĞRUSAL TAYİN ARALIĞININ BELİRLENMESİ	50-1000 ng/mL insülin antikoru
TEKRAR ÜRETİLEBİLİRLİK	$y=(119,27-114,53)x$
TEKRARLANABİLİRLİK	400ng/mL ($\bar{X}$)=407 ng/mL (S.S.)= $\pm 6,8$ ng/mL (V.K.)ise %1,68 tayin limiti 21,44 ng/mL
DEPO KARARLILIĞI	Gün
	% Rölatif Direnç
	1
	100
	2
	77
	3
	73
	4
	67
	5
	63
	6
	60

KAYNAKLAR DİZİNİ

Akin, M., Yuksel, M., Geyik, C., Odaci, D., Bluma, A., Höpfner, T., ... and Timur, S., 2010, Alcohol biosensing by polyamidoamine (PAMAM)/cysteamine/alcohol oxidase-modified gold electrode, *Biotechnology progress*, 26(3): 896-906 pp.

Baetens, D., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., and Orci, L., 1979, Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of Langerhans. *Science*, 206(4424): 1323-1325 pp.

Bard, A. J., and Faulkner, L. R., 1980, *Electrochemical methods: fundamentals and applications* (Vol. 2), New York, Wiley.

Berggren, C., Bjarnason, B., and Johansson, G., 1998, An immunological Interleukine-6 capacitive biosensor using perturbation with a potentiostatic step, *Biosensors and Bioelectronics*, 13(10): 1061-1068 pp.

Berggren, C., Stålhandske, P., Brundell, J., and Johansson, G., 1999, A feasibility study of a capacitive biosensor for direct detection of DNA hybridization, *Electroanalysis*, 11(3): 156-160 pp.

Bilitewski, U., 2006, Protein-sensing assay formats and devices, *Analytica chimica acta*, 568(1): 232-247pp.

Bott, A. W., 2001, Electrochemical techniques for the characterization of redox polymers, *Current Separations*, 19(3): 71-75 pp.

Brissova, M., Fowler, M. J., Nicholson, W. E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D. M., and Powers, A. C., 2005, Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 53(9): 1087-1097 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Cai, H., Lee, T. M. H., and Hsing, I., 2006, Label-free protein recognition using an aptamer-based impedance measurement assay, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(1): 433-437 pp.

Caro, J. F., 1991, CLINICAL REVIEW 26 Insulin Resistance in Obese and Nonobese Man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 73(4): 691-695 pp.

Champe, P. C., Harvey, R. A., and Ferrier, D. R., 2005, *Biochemistry*. Lippincott Williams and Wilkins.

Daniels, J. S., and Pourmand, N., 2007, Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges, *Electroanalysis*, 19(12): 1239-1257 pp.

Darain, F., Park, D. S., Park, J. S., and Shim, Y. B., 2004, Development of an immunosensor for the detection of vitellogenin using impedance spectroscopy, *Biosensors and Bioelectronics*, 19(10): 1245-1252 pp.

Dijksma, M., Kamp, B., Hoogvliet, J. C., and Van Bennekom, W. P., 2001, Development of an electrochemical immunosensor for direct detection of interferon- γ at the attomolar level, *Analytical chemistry*, 73(5): 901-907 pp.

Dinckaya, E., Kınık, Ö., Sezgintürk, M. K., Altuğ, Ç., and Akkoca, A., 2011, Development of an impedimetric Aflatoxin M1 biosensor based on a DNA probe and gold nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 26(9): 3806-3811 pp.

Dinçkaya, E., Kınık, Ö., Sezgintürk, M. K., Altuğ, Ç., and Akkoca, A., 2012, Immobilization of anti-aflatoxin B1 antibody by UV polymerization of aniline and aflatoxin B1 detection via electrochemical impedance spectroscopy, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 40(6), 385-390 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Duckworth, W. C., Bennett, R. G., and Hamel, F. G., 1998, Insulin Degradation: Progress and Potential 1. Endocrine reviews, 19(5): 608-624 pp.

Dunn, M. F., 2005, Zinc–ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer—a review, Biometals, 18(4): 295-303 pp.

Elayat, A. A., el-Naggar, M. M., and Tahir, M. O. H. A. M. M. A. D., 1995., An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets, Journal of anatomy, 186(Pt 3): 629.

Fischer, L. M., Tenje, M., Heiskanen, A. R., Masuda, N., Castillo, J., Bontien, A., Émneus, J., Jakobsen, M. H., Boisen, A., 2009, Gold cleaning methods for electrochemical detection applications, Microelectronic engineering, 86(4): 1282-1285 pp.

Gebbert, A., Alvarez-Icaza, M., Stoecklein, W., and Schmid, R. D., 1992, Real-time monitoring of immunochemical interactions with a tantalum capacitance flow-through cell, Analytical Chemistry, 64(9): 997-1003 pp.

Gembal, M., Detimary, P., Gilon, P., Gao, Z. Y., and Henquin, J. C., 1993, Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. Journal of clinical investigation, 91(3): 871 pp.

Guan, J. G., Miao, Y. Q., Zhang, Q. J., 2004, Impedimetric biosensors. Journal of bioscience and bioengineering, 97(4): 219-226 pp.

Haab, B. B., 2003, Methods and applications of antibody microarrays in cancer research, Proteomics, 3(11): 2116-2122 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hellman, B., Gylfe, E., Grapengiesser, E., Dansk, H., and Salehi, A., 2007, Insulin oscillations--clinically important rhythm. Antidiabetics should increase the pulsative component of the insulin release. *Läkartidningen*, 104(32-33): 2236 pp.

Hermanson, G. T., 2008, Bioconjugate techniques, Academic press.

Hu, S. Q., Xie, Z. M., Lei, C. X., Shen, G. L., and Yu, R. Q., 2005, The integration of gold nanoparticles with semi-conductive oligomer layer for development of capacitive immunosensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 106(2): 641-647 pp.

Huang, H., Liu, Z., and Yang, X., 2006, Application of electrochemical impedance spectroscopy for monitoring allergen-antibody reactions using gold nanoparticle-based biomolecular immobilization method, *Analytical biochemistry*, 356(2): 208-214 pp.

Ichii, H., Inverardi, L., Pileggi, A., Molano, R. D., Cabrera, O., Caicedo, A., ... and Ricordi, C., 2005, A Novel Method for the Assessment of Cellular Composition and Beta-Cell Viability in Human Islet Preparations, *American journal of transplantation*, 5(7): 1635-1645 pp.

Ishizuka, T., Ogawa, S., Mori, T., Nako, K., Nakamichi, T., Oka, Y., and Ito, S., 2009, Characteristics of the antibodies of two patients who developed daytime hyperglycemia and morning hypoglycemia because of insulin antibodies, *Diabetes research and clinical practice*, 84(2): e21-e23 pp.

Iwase, H., Kobayashi, M., Nakajima, M., and Takatori, T., 2001, The ratio of insulin to C-peptide can be used to make a forensic diagnosis of exogenous insulin overdose. *Forensic science international*, 115(1): 123-127 pp.

Joslin, E. P., and Kahn, C. R. (Eds.), 2005, *Joslin's Diabetes Mellitus*, Edited by C. Ronald Kahn...[et Al.]. Lippincott Williams and Wilkins.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Katz, E., and Willner, I., 2003, Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors, *Electroanalysis*, 15(11): 913-947 pp.

Kleiner, I. S.,1919, The action of intravenous injections of pancreas emulsions in experimental diabetes, *Journal of Biological Chemistry*, 40(1): 153-170 pp.

Lequin, R. M., 2005, Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Clinical chemistry*, 51(12): 2415-2418 pp.

Limbut, W., Kanatharana, P., Mattiasson, B., Asawatreratanakul, P., and Thavarungkul, P., 2006, A comparative study of capacitive immunosensors based on self-assembled monolayers formed from thiourea, thioctic acid, and 3-mercaptopropionic acid, *Biosensors and Bioelectronics*, 22(2): 233-240 pp.

Maupas, H., Soldatkin, A. P., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., and Mandrand, B., 1997, Direct immunosensing using differential electrochemical measurements of impedimetric variations, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 421(1): 165-171 pp.

Mering, V. J., 1889, Oskar Minkowski: Diabetes mellitus nach Pankreasextirpation. *Centralblatt für klinische Medizin*, 10(23): 393-394 pp.

Metzler, D. E., 2003, *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*, (Vol. 2), Academic Press.

Mirsky, V. M., Riepl, M., and Wolfbeis, O. S., 1997, Capacitive monitoring of protein immobilization and antigen–antibody reactions on monomolecular alkylthiol films on gold electrodes, *Biosensors and Bioelectronics*, 12(9), 977-989 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Mullett, W. M., Lai, E. P., and Yeung, J. M., 2000, Surface plasmon resonance-based immunoassays. *Methods*, 22(1): 77-91 pp.

Murat, B., 2004, Pre-Diyaliz, Hemodiyaliz Ve Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi Hastalarında İnsülin Direncinin Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, T.C. Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi 2. Dahiliye Kliniği, İstanbul

Onat, T., Emerk, K., and Sözmen, E., 2002, İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık.

Pedersen, O., Bak, J. F., Andersen, P. H., Lund, S., Moller, D. E., Flier, J. S., and Kahn, B. B., 1990, Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM, *Diabetes*, 39(7): 865-870 pp.

Pravda, M., O'Halloran, M. P., Kreuzer, M. P., and Guilbault, G. G. 2002, Composite glucose biosensor based on screen-printed electrodes bulk modified with Prussian blue and glucose oxidase. *Analytical letters*, 35(6): 959-970 pp.

Pyun, J. C., Kim, S. D., and Chung, J. W., 2005, New immobilization method for immunoaffinity biosensors by using thiolated proteins, *Analytical biochemistry*, 347(2): 227-233 pp.

Rodriguez, M. C., Kawde, A. N., and Wang, J., 2005, Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of proteins based on recognition-induced switching of the surface charge, *Chemical communications*, (34): 4267-4269 pp.

Sadik, O. A., Xu, H., Gheorghiu, E., Andreescu, D., Balut, C., Gheorghiu, M., and Bratu, D., 2002, Differential impedance spectroscopy for monitoring protein immobilization and antibody-antigen reactions, *Analytical chemistry*, 74(13): 3142-3150 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sakula, A., 1988, Paul Langerhans (1847-1888): a centenary tribute, Journal of the Royal Society of Medicine, 81(7): 414 pp.

Sezgintürk, M. K., 2007, β -galaktozidaz Aktivitesinin Belirlenmesinde Biyosensör Temelli Ölçüm Sistemlerinin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

Stefan, Y., Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., Patel, Y., and Unger, R. H., 1982, Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans, Diabetes, 31(8): 694-700 pp.

Stoynov, Z. B., Grafov, B. M., Savova-Stoynova, B., Elkin, V., Budevski, E. B., and Kazarinov, B. E., 1991, Electrochemical Impedance, Publishing House “Nauka”, Moscow.

Taylor, R. F., Marenchic, I. G., and Spencer, R. H., 1991, Antibody-and receptor-based biosensors for detection and process control, Analytica chimica acta, 249(1): 67-70 pp.

Tlili, C., Korri-Yousoufi, H., Ponsonnet, L., Martelet, C., and Jaffrezic-Renault, N., 2005, Label-free detection of DNA hybridization with EIS measurements. In Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Digest of Technical Papers. TRANSDUCERS'05. The 13th International Conference on (2):1600-1603 pp.

Tlili, A., Abdelghani, A., Ameer, S., & Jaffrezic-Renault, N., 2006, Impedance spectroscopy and affinity measurement of specific antibody-antigen interaction, Materials Science and Engineering: C, 26(2), 546-550 pp.

Uygun, Z. O., 2012, Organofosfat Türü Pestisitlerin Tayinine Yönelik Elektrokimyasal İmpedans Temelli Sensör Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Çanakkale

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ward, C. W., and Lawrence, M. C., 2009, Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *Bioessays*, 31(4): 422-434 pp.

Wu, Z. S., Li, J. S., Deng, T., Luo, M. H., Shen, G. L., and Yu, R. Q., 2005, A sensitive immunoassay based on electropolymerized films by capacitance measurements for direct detection of immunospecies, *Analytical biochemistry*, 337(2): 308-315 pp.

Xu, D., Xu, D., Yu, X., Liu, Z., He, W., and Ma, Z., 2005, Label-free electrochemical detection for aptamer-based array electrodes, *Analytical Chemistry*, 77(16), 5107-5113 pp.

Xu, M., Luo, X., and Davis, J. J., 2013, The label free picomolar detection of insulin in blood serum, *Biosensors and Bioelectronics*, 39(1), 21-25 pp.

Yuan, X. Z. R., Song, C., Wang, H., and Zhang, J., 2009, *Electrochemical impedance spectroscopy in PEM fuel cells: fundamentals and applications*, Springer Science & Business Media.

Zhou, Y. M., Hu, S. Q., Cao, Z. X., Shen, G. L., and Yu, R. Q., 2002, Capacitive immunosensor for the determination of *Schistosoma japonicum* antigen, *Analytical letters*, 35(12): 1919-1930 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : Çağrı ALTUĞ

Doğum Tarihi : 23/ 06/ 1978

Doğum Yeri : Bornova / İZMİR

Cinsiyeti : ERKEK

Uyruğu : T.C

Medeni Hali : BEKAR

Ev Adresi : Manavkuyu mahallesi 279 sokak No:23
Başarı sitesi kat:5 daire:9 Bayraklı/İZMİR

Cep Tel : 0533 521 70 14

e-mail : cagri.altug@ege.edu.tr

Eğitim Durumu

Okul	Derece	Yıl
İzmir Atatürk Lisesi, İzmir	Diploma	1991–1994
Ege Üniversitesi, İzmir	B. Sc. (Biyokimya Bölümü)	1997–2003
Ege Üniversitesi, İzmir	M. Sc. (Biyokimya Bölümü)	2004–2007
Ege Üniversitesi, İzmir	Ph. D. (Biyokimya Bölümü)	2008-

İş Durumu

Görev Yeri	Görev	Yıl
Ege Üniversitesi, İzmir	Araş. Gör.	2005-Devam Ediyor

Yabancı Diller : İngilizce

Staj : İzmir Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsü (Temmuz-Eylül 2001)

Uzmanlık Alanları : Biyokimya Biyosensör Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi

Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

Protein Modifikasyonu: Katalaz Örneğinde Kalitatif Denemeler (Danışman : Prof. Dr. Arif H. USLAN), 2002.

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

Kreatin Ve Kreatinin Tayinlerine Yönelik Enzim Temelli Hibrit Biyosensörlerin Geliştirilmesi (Danışman: Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA), 2007.

Doktora Tez Başlığı ve Danışmanı:

Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi İle Afinite Temelli İnsülin ve İnsülin Antikoru Tayinine Yönelik Biyosensörlerin Geliştirilmesi (Danışman: Prof. Dr. Erhan DİNÇKAYA), 2014.

Projeler:

1. “Kreatin ve Kreatinin Tayinlerine Yönelik Enzim Temelli Hibrit Biyosensörlerin Geliştirilmesi”.

Altuğ, Ç., Dinçkaya, E., Araştırma Fonu Projesi, 2005 Fen 001, Proje Yürütücüsü, 2005.

2. “Gıda Güvenliğinde Büyük Önem Taşıyan Aflatoksin Analizleri İçin Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Esaslı Biyosensör Teknolojilerinin Geliştirilmesi”

Dinçkaya, E., Kınık, Ö., Sezgintürk M. K., Altuğ Ç., Akkoca A., TÜBİTAK Projesi, 106T367, Proje Araştırmacısı, 2006- 2009

3. “Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi ile Afinite Temelli İnsülin ve İnsülin Antikoru Tayinine Yönelik Biyosensörlerin Geliştirilmesi ”

Dinçkaya, E., Altuğ Ç., Araştırma Fonu Projesi, 2010 FEN 002, Proje Araştırmacısı, 2010 -2014

Seminerler:

1. “Kreatinin ve Kreatin Biyosensörleri”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 2005.

2. “Biyosensör Tasarımında İnce Film Teknikleri”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 2006.

3. “İmpedans Spektroskopisi”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü”, 2007.

4. “Gıda Sektöründe Aflatoksinler”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü”, 2009.

5. “Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi İle Afinite Temelli İnsülin Ve İnsülin Antikoru Tayinine Yönelik Biyosensörlerin Geliştirilmesi”, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü”, 2014.

ESERLER

A. SCI Tarafından Taranan Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Akkaya, A., **Altuğ, Ç.**, Pazarlıoğlu, K. N., Dinçkaya, E., 2009, Determination of 5-Aminosalicylic Acid by Catalase-Peroxidase Based Biosensor, *Electroanalysis*, . 16: 1805 – 1810

2. Dinçkaya, E., Kınık, Ö., Sezgintürk, M. K., **Altuğ, Ç.**, Akkoca, A., 2011 2010, Development Of An İmpedimetric Aflatoxin M1 Biosensor Based On A DNA Probe And Gold Nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 9: 3806-3811.

3. Dinçkaya, E., Kınık, Ö., Sezgintürk, M. K., **Altuğ, Ç.**, Akkoca, A., 2012, Immobilization of anti-aflatoxin B1 antibody by UV polymerization of aniline and aflatoxin B1 detection via electrochemical impedance spectroscopy, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 6: 385-390.

4. **Altuğ, Ç.**, Mengülluoğlu, U., Kurt, E., Kaya, Secil., Dinçkaya, E., 2011, A Novel Biosensor Based on Glucose Oxidase for Activity Determination of α - Amylase, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 5: 298–303

5. Mengülluoğlu, U., **Altuğ, Ç.**, Ertuğrul, H. D., Yıldız, A., Ekici E. M., Dinçkaya, E., 2012, A Novel Biosensor Based on Glucose Oxidase for Activity Determination of α -Amylase, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 40: 97–102

6. Sezgintürk, M. K., Alaçam, S., Altuğ, Ç., Akbayırlı, P., Dinçkaya, E., 2012, A Hybrid Enzyme Biosensor Based On Sulfite Oxidase And Glucose Oxidase For The Analyzing Of Sulfite And Glucose, *Analytical & Bioanalytical Electrochemistry*, 2 :153 – 162

B. Bildiriler

B1. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında (Proceedings) Basılan Bildiriler

1. Altuğ, Ç., Akkaya, A., Pazarlıoğlu, N., Dinçkaya, E., “Cytochrome C Based Biosensor For H₂O₂ Measurements” 31st FEBS Congress Molecules in Health &, İstanbul 24-29 Haziran 2006

2. Akkaya, A., Altuğ, Ç., Pazarlıoğlu, N., Dinçkaya, E., “A Novel Biosensor Based On Ligninolytic Peroxidases From *Trametes Versicolor*” The 7th Workshop on Biosensors and Bioanalytical μ -Techniques in Environmental and Clinical Analysis, Kuşadası-Aydın, 10 -14 Eylül 2006

3. Altuğ, Ç., Akkaya, A., Pazarlıoğlu, N., Dinçkaya, E., “Optimization Studies of Catalase-Peroxidase Based Biosensor for 5-Asa Measurement”, International Enzyme Engineering Symposium IEES’2008, Kuşadası-Aydın, 1-5 October 2008.

4. Akkaya, A., Altuğ, Ç., Pazarlıoğlu, N., Dinçkaya, E., “Characterization Studies Of Catalase-Peroxidase Based Biosensor For 5-Asa Measurement”, International Enzyme Engineering Symposium IEES’2008, Kuşadası-Aydın, 1-5 October 2008.

5. Altuğ, Ç., Kurt, E., Kaya, S., Mengüllüoğlu, U., Dinçkaya, E., “Development and Optimization of a Novel Glucose Oxidase Biosensor for α -Amylase Activity Determination”, 8th International Electrochemistry Meeting 8-11, 2009, Ekim Antalya

6. Mengüllüoğlu, U., Kurt, E., Kaya, S., Altuğ, Ç., Dinçkaya, E., “Characterization of a Novel Biosensor Based on Glucose Oxidase for Activity Determination of α – Amylase”, 8th International Electrochemistry Meeting 8-11, 2009, Ekim Antalya

7. Mengüllüoğlu, U., **Altuğ, Ç.**, Akgöl, S., Dinçkaya, E., Denizli, A., “A Novel Electrochemical Impedance Biosensor Based on Cysteine Containing Nano-sized Polymeric Material for Detection of Fe^{3+} Values in Blood Samples”, Vth International Bioengineering Congress, İzmir, 16-19 Haziran 2010.

8. Dinçkaya, E., Kınık, Ö., Sezgintürk, M. K., **Altuğ, Ç.**, Akkoca, A., “Electrochemical Impedance Spectroscopy Based On A Novel Biosensor For Aflatoxin M1 Analysis”, Vth International Bioengineering Congress, İzmir, 16-19 Haziran 2010.

9. Mengüllüoğlu, U., **Altuğ, Ç.**, Sakallı, A., Genç, N., Dinçkaya, E., “A Novel Polypyrrole-Based Amperometric Biosensor for Uric Acid Determination”, 10. Workshop on biosensors and bioanalytical microtechniques in environmental and clinical analysis (10. bbmec), Weimar- Germany, 19.-22. June 2011

10. Kahraman, H., Özbek, A. G., Altuğ, Ç., Mengüllüoğlu, U., Dinçkaya, E., “Electrochemical Impedance Spectroscopy Based On Biosensor For The Development Of Cytochrome C”, 19th Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED2013), 12-15 Kasım 2013.

B2. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1. **Altuğ, Ç.**, Alaçam, S., Akbayırlı, P., Sezgintürk, M. K., Dinçkaya, E., “Glukoz ve Sülfite Tayini için Glukoz Oksidaz ve Sülfite Oksidaz Temelli Hibrit Bir Biyosensör”, 19. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül-4 Ekim 2005, Kuşadası-Aydın.

2. **Altuğ, Ç.**, Dinçkaya, E., “Kreatinin Tayinine Yönelik Enzim Temelli Hibrit Biyosensörlerin Geliştirilmesi”, XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 27 - 30 Ekim 2010, Eskişehir.

3. Mengüllüoğlu, U., **Altuğ, Ç.**, Ural, C., Barış, İ. C., Ertekin, İ., Dinçkaya, E., “ α -Amilaz Aktivitesi Tayinine Yönelik Yüzey Korozyonunu Esas Alan Yeni Bir Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Temelli Biyosensör Sistemi”, XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 27 - 30 Ekim 2010, Eskişehir.

4. **Altuğ, Ç.**, Mengüllüoğlu, U., Yıldız, A., Ekici E. M., Ertuğrul, H. D., Dinçkaya, E., “Amperometrik Glukoz Biyosensörü ile α -Amilaz Aktivitesi Tayinine Yönelik Yeni Bir Ölçüm Yöntemi”, 24. Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran–02 Temmuz 2010 Zonguldak

5. **Altuğ, Ç.**, Dinçkaya, E., “Kreatin Tayinine Yönelik Enzim Temelli Hibrit Biyosensör”, 24. Ulusal Kimya Kongresi, 29 Haziran–02 Temmuz 2010 Zonguldak

6. Dinçkaya, E., Kınık, Ö., Sezgintürk, M. K., **Altuğ, Ç.**, Akkoca, A., “Anilinin Uv Polimerizasyonu Yoluyla Anti-Aflatoksin B1 in İmmobilizasyonu ve Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi Üzerinden Aflatoksin B1 in Tayini”, 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, 29 Kasım - 2 Aralık 2011, Adana.