

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**TAŞINABİLİR VE DÜŞÜK MALİYETLİ KUVARS AKORT ÇATAL
SÜRÜCÜ TABANLI PROTOTİP ÜRETİMİ VE İMMUNOSENSÖR
OLARAK YAPILANDIRILMASI**

HAZIRLAYAN

KÜBRA KIRALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA-2020

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

**TAŞINABİLİR VE DÜŞÜK MALİYETLİ KUVARS AKORT ÇATAL
SÜRÜCÜ TABANLI PROTOTİP ÜRETİMİ VE İMMUNOSENSÖR
OLARAK YAPILANDIRILMASI**

**HAZIRLAYAN
KÜBRA KIRALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. DİLEK ÇÖKELİLER SERDAROĞLU**

ANKARA-2020

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Kübra Kırall tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25 / 08 / 2020

Tez Adı: Taşınabilir Ve Düşük Maliyetli Kuvars Akort Çatal Sürücü Tabanlı Prototip Üretimi Ve İmmunosensör Olarak Yapılandırılması

Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı-Soyadı,Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Dilek Çökeliler Serdaroğlu
Başkent Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Adil Denizli
Hacettepe Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Sedat Nazlıbilek
Başkent Üniversitesi

.....

ONAY

Prof. Dr. Faruk ELALDI
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih:....../....../.....

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 25 / 08 / 2020

Öğrencinin Adı, Soyadı : Kübra KIRALI

Öğrencinin Numarası : 21720461

Anabilim Dalı : Biyomedikal Mühendisliği

Programı : Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı : Prof. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

Tez Başlığı : Taşınabilir Ve Düşük Maliyetli Kuvars Akort Çatal Sürücü Tabanlı Prototip Üretimi Ve İmmunosensör Olarak Yapılandırılması

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans/Doktora tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 54 sayfalık kısmına ilişkin, 25 / 08 / 2020 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezinin benzerlik oranı % 2'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esasları” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:.....

ONAY

Tarih: ... / ... / 20...

Öğrenci Danışmanı Unvan, Adı, Soyadı, İmza:
Prof. Dr. Dilek ÇÖKELİLER SERDAROĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışma sürecimde kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve her zaman destek olan değerli danışman hocam Sayın, PROF. DR. DİLEK ÇÖKELİLER SERDAROĞLU'na

Bu zorlu süreçte desteklerini ve anlayışlarını her zaman hissettiğim sevgili araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve tüm değerli hocalarıma,

Hayatım boyunca daima desteklerini hissettiğim, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve hep yol göstericim olan sevgili babam Ali Osman Kırallı'ya, annem Bahar Kırallı'ya ve kardeşim Berkay Kırallı'ya,

Zorlandığım, yorulduğum ve en stresli zamanlarımda büyük sabır ve özveriyle yanımda olup güvenini bir an olsun kaybetmeden daima destek olan Serdar Öner'e

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Kübra KIRALI

**TAŞINABİLİR VE DÜŞÜK MALİYETLİ KUVARS AKORT ÇATAL SÜRÜCÜ
TABANLI PROTOTİP ÜRETİMİ VE İMMUNOSENSÖR OLARAK
YAPILANDIRILMASI**

Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

2020

Canlılar, çevrede meydana gelen değişiklikleri duyu organları yoluyla algılayarak hayatlarını bu değişimlere göre şekillendirmektedir. Doğayı taklit ederek çeşitli hastalıkların teşhisinde biyosensör yapılandırılma stratejilerinin kullanımı, tıpkı duyu organları gibi ortamdaki değişiklikleri anlamlandırma yaklaşımıdır. Bu tez çalışmasında öncelikle, birinci nesil olarak adlandırılan bununla birlikte patent değeri olan kuvars akort çatalı (QTF) sürücüsünü tanımlamak ve 118S614 numaralı TÜBİTAK destekli proje kapsamında ise bu cihazın geliştirilmesiyle ikinci nesil olarak adlandırılan cihazı tanıtmaktır. Tezin ana kapsamı ise, seçilen iki farklı analitin (transferrin ve kanda serbest dolaşan tümör hücresi) yeni bir yaklaşım olan kuvars akort çatalı temelli kütle hassas immünoensör yapılandırılması ile teşhis edilebilir olup olmadığını araştırmaktır. Bu iki analit özel olarak seçilmiştir. Bu seçimin nedeni ise, iki analitten ilki olan transferrin, hastalık öyküsünün sıkça grip nezle ile karıştırıldığı ve görüntüleme yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda beyin omurilik sıvı kaçaklarına tanı koymada önemli bir biyoışaret molekülü olmasıdır. Öte yandan seçilen diğer analit olan kanda serbest dolaşan tümör hücresi ise kanserin erken evrede teşhis edilebilmesini sağlayan oldukça önemli bir biyoışaret molekülüdür. Bahsedilen amaçlar doğrultusunda QTF kütle hassas immünoensörü yapılandırılmış ve önemli veriler elde edilmiştir ($R^2=0,9686$).

ANAHTAR KELİMELE: Kuvars Akort Çatalı, İmmünoensör yapılandırılması, Transferrin, Kanda Serbest Dolaşan Tümör Hücresi, Kuvars Akort Çatal Sürücü Tasarımı.

ABSTRACT

Kübra KIRALI

**PRODUCTION OF PORTABLE AND LOW COST QUARTZ TUNING FORK
DRIVE BASED PROTOTYPE AND CONSTRUCTION AS IMMUNOSENSOR**

Başkent University Institute of Science and Engineering

The Department of Biomedical Engineering

2020

Living things perceive changes in the environment through their sensory organs and shape their lives according to these changes. The use of biosensor structuring strategies in the diagnosis of various diseases by imitating nature is an approach to make sense of changes in the environment, just like the sense organs. In this thesis, first of all, it is to define the quartz tuning fork (QTF) driver, which is called the first generation and has a patent value, and to introduce the device called the second generation with the development of this device within the scope of the TÜBİTAK supported project numbered 118S614. The main scope of the thesis is to investigate whether two selected analytes (transferrin and circulating tumor cell in blood) can be diagnosed with a new approach, a quartz tuning fork-based mass-sensitive immunosensor configuration. These two analytes are specially selected. The reason for this choice is that transferrin, the first of the two analytes, is an important biomarker molecule in diagnosing cerebrospinal fluid leaks in cases where the history of the disease is frequently confused with influenza and imaging methods are insufficient. On the other hand, the other analyte selected, the circulating tumor cell in the blood, is a very important biomarker molecule that enables cancer to be diagnosed at an early stage. QTF mass sensitive immunosensor was configured for the aforementioned purposes and important data were obtained ($R^2=0,9686$).

KEYWORDS: Quartz Tuning Fork, Immunosensor configuration, Transferrin, Circulating Tumor Cell in Blood, Quartz Tuning Fork Drive Design.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kavramsal Açıdan İmmünoşensörler	2
2.2. İmmünoşensörlerin Sınıflandırılması	3
2.2.1. Elektrokimyasal çeviricili immünoşensör	4
2.2.2. Optik çeviricili immünoşensör	4
2.2.3. Piezoelektrik çeviricili immünoşensör	5
2.3. Kuvars Akort Çatalı ve Uygulama Alanları	5
2.3.1. Kuvars akort çatal çeviricisi	5
2.3.2. Kuvars akort çatalı uygulamaları	7
2.4. Transferrin Önem i ve Yapılan Çalış malar	8
2.5. Kanda Serbest Dolaş an Tümör Hücrelerinin Önem i ve Teş hisi için Geliştirilen Yöntemler	9

3. MATERYAL VE METOT.....	12
3.1. Ön Çalışmalar	12
3.1.1. QTF kristallerin mekanik ve elektriksel incelemesi.....	12
3.1.2. QTF frekans ölçüm sistem tasarımı.....	14
3.2. Materyal.....	17
3.3. Metot	18
3.3.1. QTF immünosensör olarak yapılandırma: Transferrin.....	18
3.3.1.1. QTF yüzey aktivasyonu	19
3.3.1.2. Aktive edilmiş QTF çevirici yüzeylerine antikor (anti-TRC2) tutuklanması	20
3.3.1.3. Antijen (Transferrin) cevabı	21
3.3.2. QTF immünosensör olarak yapılandırma: CTC.....	21
3.3.2.1 QTF yüzey aktivasyonu	21
3.3.2.2 Aktive edilmiş QTF çevirici yüzeylerine antikor (anti- EpCAM) tutuklanması	23
3.3.2.3. Antijen (Rekombinant h-EpCAM) cevabı	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. QTF İmmünosensör Olarak Yapılandırma: Transferrin	26
4.1.1. QTF yüzey aktivasyonu.....	26
4.1.2. Aktive edilmiş QTF çevirici yüzeylerine antikor (anti-TRC2) tutuklanması	28
4.1.3. Antijen (Transferrin) cevabı.....	28

4.2. QTF İmmünoşensör Olarak Yapılandırma: CTC	30
4.2.1. QTF yüzey aktivasyonu	30
4.2.2. QTF çeviricilerin modifikasyonu aşamasında, karakterizasyon testleri	33
4.2.3. Aktive edilmiş QTF çevirici yüzeylerine antikor (anti-EpCAM) tutuklanması	37
4.2.4. Antijen (Rekombinant h-EpCAM) cevabı	43
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	55
EKLER	
EK 1: QTF Veri Sayfası	
EK 2:Anti-EpCAM Veri Sayfası	
EK 3: EpCAM Veri Sayfası	

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Kuvars akort çatallarının uygulama alanları	7
Tablo 2.2. Transferrin teşhisinde biyosensör uygulamaları.....	8
Tablo 2.3. CTC teşhisi için yapılan çalışmalar ve performansları	11
Tablo 3.1. QTF rezonans frekansının mekanik ifadesinde kullanılan değişkenler ve değerleri.....	13
Tablo 3.2. Birinci ve ikinci nesil cihazların performans karşılaştırılması.....	17
Tablo 3.3. Tez materyali.....	18
Tablo 4.1. Referans analit üzerinden immünosensör yapılandırılma sonuçları.....	29
Tablo 4.2. QTF'lerin yüzey modifikasyon aşamalarında elde edilen frekans ve frekans kayması değerleri	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Biyosensör sistemi şematik gösterimi	3
Şekil 2.2. Kuvars akort çatalı ve boyutsal karşılaştırma.....	6
Şekil 3.1. QTF şematik gösterimi	12
Şekil 3.2. QTF sensörün Butterworth-Van Dyke modeline göre eşdeğer devresi [59]	13
Şekil 3.3. Birinci nesil QTF frekans ölçüm cihazı blok şeması.....	15
Şekil 3.4. İkinci nesil QTF frekans ölçüm cihazı	16
Şekil 3.5. Birinci nesil (a) ve ikinci nesil (b) QTF frekans ölçüm cihazlarının ara yüzleri.	16
Şekil 3.6. İkinci nesil cihazın mobil ara yüzü.....	17
Şekil 3.7. Kimyasal aktivasyon ajanı: T3BA (a) iki boyutlu (b) ve üç boyutlu görüntüsü (c)	19
Şekil 3.8. QTF bacaklarının lehim aşaması.....	19
Şekil 3.9. Farklı konsantrasyonlarda T3BA hazırlanışı.....	22
Şekil 3.10. Anti-EpCAM antikorunun hazırlanması	24
Şekil 3.11. EpCAM antijeni.....	25
Şekil 4.1. QTF yüzeyinin 50 mM derişimdeki T3BA ile aktivasyonu- ham veriler	26
Şekil 4.2. QTF yüzeyinin 1 mM derişimdeki T3BA ile aktivasyonu- ham veriler	27
Şekil 4.3. QTF çevirici kimyasal aktivasyonu, 1 mM, T3BA- en az üç tekrarlı örnek	27
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda antikorun (TRC2) etkisiyle frekans kaymalarının karşılaştırılması	28
Şekil 4.5. QTF immünosensör yapılandırılma basamaklarındaki pik frekans değışimleri ve referans analite (Transferrin) cevap	29
Şekil 4.6. QTF çevirici kimyasal aktivasyonu, 0.5 mM, T3BA	30
Şekil 4.7. Değişen T3BA konsantrasyonlarında QTF çevirici kimyasal aktivasyonu	31
Şekil 4.8. Değişen T3BA konsantrasyonlarında QTF çevirici kimyasal aktivasyonu sonrası frekans kayma değeri, Δf_{akt}	31
Şekil 4.9. QTF'lerin aktivasyon ajanıyla muamele süresinin değışimine bağı frekans değeri.....	32

Şekil 4.10. Farklı ortam pH değerlerinde aktive edilen QTF'lerin frekans kayması	33
Şekil 4.11. Değişen aktivasyon ajanı konsantrasyonlarında QTF çevirici yüzey özellikleri a.) İşlem görmemiş QTF b.) T3BA, 0.5mM c.) T3BA, 1.5 mM	34
Şekil 4.12. Kimyasal aktivasyon ajanı T3BA yönelimi	35
Şekil 4.13. Değişen aktivasyon ajanı konsantrasyonlarında QTF çevirici yüzey özellikleri karşılaştırmaları (Turuncu ok: işlem görmemiş QTF; Mavi ok: Farklı derişimde T3BA aktivasyonları.....	36
Şekil 4.14. Distile su (dH2O) hazırlanmış anti-EpCAM ile etkileştirilmiş QTF immunosensörün cevabı	37
Şekil 4.15. Fosfat tamponu etkisi (pH:7.4): eş zamanlı ham veriler	38
Şekil 4.16. Fosfat tamponu etkisi: pik frekans değerleri	39
Şekil 4.17. Fosfat tamponu etkisi; frekans kayma değerleri.....	39
Şekil 4.18. Tampon ortamındaki ham veri	40
Şekil 4.19. Farklı konsantrasyon değerindeki anti-EPCAM ile etkileştirilmiş QTF'lerin frekans cevapları.....	41
Şekil 4.20. İşlem görmemiş QTF frekansı ile aktivasyon işlemi sonrası frekans kayması (mavi), aktivasyon sonrası frekans ile farklı konsantrasyona sahip anti-EPCAM tutuklanma sonrası QTF frekans kayması (kırmızı)	42
Şekil 4.21. Farklı konsantrasyonlardaki antikoron (anti-EPCAM) etkisiyle, frekanstaki kaymaların karşılaştırılması, $\Delta f_{\text{anti-EPCAM}}$	43
Şekil 4.22. QTF yüzey modifikasyon aşamaları ve EpCAM cevabı (target); frekans kaymaları, ham veriler	44
Şekil 4.23 . QTF yüzey modifikasyon aşamaları ve frekans değerleri.....	45
Şekil 4.24. QTF yüzey modifikasyon aşamaları ve frekans kayma değerleri, $\Delta f_{\text{aktivasyon}}$, $\Delta f_{\text{anti-EPCAM}}$ ve Δf_{EPCAM}	45
Şekil 4.25. 0,75 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonuna sahip antijen (EpCAM) cevabı. a.) İşlem görmemiş QTF frekans cevabı, b.) Normalize edilmiş İşlem görmemiş QTF frekans cevabı, c.) 1mM T3BA ile modifiye edilmiş QTF frekans cevabı, d.) Normalize edilmiş 1mM T3BA ile modifiye, , e.) 1 $\mu\text{g/mL}$ anti-EpCAM ile etkileştirilmiş QTF frekans cevabı, f.) Normalize edilmiş 1 $\mu\text{g/mL}$ anti- EpCAM ile etkileştirilmiş QTF frekans cevabı, g.) 0,75 $\mu\text{g/mL}$ EpCAM ile etkileştirilmiş QTF cevabı, h.) Normalize edilmiş 0,75 $\mu\text{g/mL}$ EpCAM ile etkileştirilmiş QTF cevabı	48
Şekil 4.26. 1,25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonuna sahip antijen (EpCAM) cevabı. A.) İşlem görmemiş QTF frekans cevabı, b.) Normalize edilmiş İşlem görmemiş QTF frekans cevabı, c.) 1mM T3BA ile modifiye edilmiş QTF frekans cevabı, d.)	

Normalize edilmiş 1mM T3BA ile modifiye edilmiş QTF frekans cevabı, e.) 1 $\mu\text{g/mL}$ anti-EpCAM ile etkileştirilmiş QTF frekans cevabı, f.) Normalize edilmiş 1 $\mu\text{g/mL}$ anti-EpCAM ile etkileştirilmiş QTF frekans cevabı, g.) 1,25 $\mu\text{g/mL}$ EpCAM ile etkileştirilmiş QTF cevabı, h.) Normalize edilmiş 1,25 $\mu\text{g/mL}$ EpCAM ile etkileştirilmiş QTF cevabı..... 51

Şekil 4.27. Farklı konsantrasyon değerindeki anti-EPCAM ile etkileştirilmiş QTF’lerin frekans cevapları..... 51

Şekil 4.28.Farklı konsantrasyonlardaki antijenin (EPCAM) etkisiyle, frekanstaki kaymaların karşılaştırılması, Δf_{EPCAM} 53



SİMGELER VE KISALTMALAR

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği)
µg	Kütle birimi, Mikrogram
ADC	Analog-sayısal dönüştürücü ,
AFM	Atomic Force Microscopy (Atomik Kuvvet Mikroskobu),
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
BAW	Bulk Acoustic Wave (Yığın akustik dalgalar)
BOS	Beyin omurilik sıvısı,
C1	Kapasitans değeri,
CK	Sitokeratin,
cm	Uzunluk birimi, santimetre
CTC	Circulating tumor cell
DC	Doğru akım
ddH ₂ O	Distile su
dk	Zaman birimi, dakika
dL	Hacim birimi, desilitre
EpCAM	Epitel hücre yapışma molekülü
EQ	Kuvars Young Modülü
F ve f	Frekans
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
FTIR-ATR	Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi
g	Kütle birimi, gram
h	Yükseklik
h-EpCAM	Rekombinant insan epitel hücre yapışma molekülü
Hz	Frekans birimi, Hertz
I	Eylemsizlik momenti
IgG	İmünoglobulin G
IgM	İmünoglobulin M
K	Elastik Katsayısı

l	Boy
L	İndüktans değeri
m	Kütle
M	Molarite birimi, Molar
mg	Kütle birimi, Miligram
mL	Hacim birimi, mililitre
mM	Molarite birimi, milimolar
ng	Kütle birimi, nanogram
PBS	Fosfat tampon çözelti
pg	Kütle birimi, Pikogram
pH	Asitlik derecesi, Hidrojen konsantrasyonunun 10 tabanında negatif logaritması
Q faktörü	Rezonans devresinde kalite faktörü
Q	Yük indirgenmesi
QCM	Quartz crystal microbalance (Kuvars kristal mikrodenge)
QTF	Quartz tuning fork (Kuvars akort çatalı)
R	Direnç değeri
RLC devresi)	Resistor inductor capacitor (Direnç indüktans kapasitör devresi)
SAW	Surface acoustic wave (Yüzey akustik dalgalanma)
T3BA	Tiofen 3 boronik asit
Tor	Basınç birimi
TRC-2	Anti-transferrin antikor
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
V	Elektrik potansiyel birimi, Volt
w	Kalınlık
Δf	Frekans değişimi, kayması
μL	Hacim birimi, mikrolitre
ρ	Kuvars Yoğunluğu

1. GİRİŞ

Kuvars akort çatalları (QTF) geçmişte saat alanında kullanılmış ve asıl kullanımları elektroniğin farklı alanlarıdır. İmmunosensör olarak QTF çeviricisinin kullanımına yaygın olmamakla birlikte yeni başlanmıştır. Burada QTF sürmek konusunda günümüzde oldukça pahalı ve hantal cihazlar kullanılmaktadır. Tezin motivasyonu olarak öncelikle taşınabilir ve düşük maliyetli kütle hassas yeni bir cihaz prototipi tanımlanmıştır. Ana tema ise tanımlanan bu cihazın immünosensör olarak kullanılıp kullanılmayacağının hedef olarak seçilen analitlere göre değerlendirilmesidir.

Patente sahip olan cihaz 1. nesil olarak ifade edilebilir. Bu cihaz “Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Kuvars Akort Çatalı Tabanlı İmmunosensörle Tayini” başlıklı 118S614 numaralı TÜBİTAK destekli proje kapsamında geliştirilmiş ve bu yeni cihaz 2. nesil olarak adlandırılmıştır. İkinci nesil olarak bahsedilen bu yeni cihaz, kolay kullanımı, kullanıcı dostu, tek bir seferde 5 adet QTF frekansını art arda ölçebilme yeteneği ve ortamdaki fiziksel değişimler nedeniyle QTF frekansının sapmasını minimum düzeye indirmek adına tasarlanan sıcaklık kontrol hücresi ile QTF frekans ölçümü için oldukça üstün niteliklere sahiptir.

QTF immünosensör yapılandırılması için iki farklı analit belirlenmiştir. Bunlardan ilki, travmaya bağlı gelişen beyin omurilik sıvısı kaçaklarına tanı koymada kullanılan önemli bir biyobelirteç olan transferrindir. Belirlenen diğer bir analit ise kanserin erken evre tespitinde önemli bir rol oynayan, birincil tümör bölgesinden koparak kanda serbest dolaşan tümör hücreleridir (CTC). Özellikle kolon, rahim, yumurtalık, meme, mide, ince bağırsak, deri ve gırtlak gibi belirli kanser tiplerine spesifik epitel hücre yapışma molekülü (EpCAM), CTC’lerin tespitinde kullanım potansiyeli yüksek olan bir biyobelirteçtir.

Bu tez çalışmasında ilk olarak QTF yüzeyine anti-transferrin antikorunun tutuklanması ve arkasından transferrin antijeni ile etkileşimi incelenirken eş zamanlı olarak QTF yüzeyine anti-EpCAM tutuklanması ve EpCAM antijeni ile etkileşimleri de irdelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez çalışmasının temellerinin oluşumu açısından kavramsal olarak bazı konulara değinilmiştir. CTC'ler kanserin erken teşhisi için oldukça önemli bir rol oynamaktadır. CTC'lerin kanda nadir düzeyde bulunması onların tespit edilmesini oldukça zor bir hale getirmektedir. Fakat gelişen teknoloji sayesinde biyosensörler gün geçtikçe daha hassas tespit yapabilir duruma getirilmektedir. Tez kapsamında kullanılan QTF çevirici, pikogram düzeyinde tespit yapabilmektedir. Oldukça hassas olan bu yeni çeviriciye ve CTC tespitine yönelik yapılan çalışmalara değinilmiştir.

2.1. Kavramsal Açıdan İmmünosensörler

İmmünosensör kavramı, sensör ve biyosensör arasındaki ilişkiyi ve farklılıkları ortaya koyarak daha doğru bir biçimde açıklanabilmektedir.

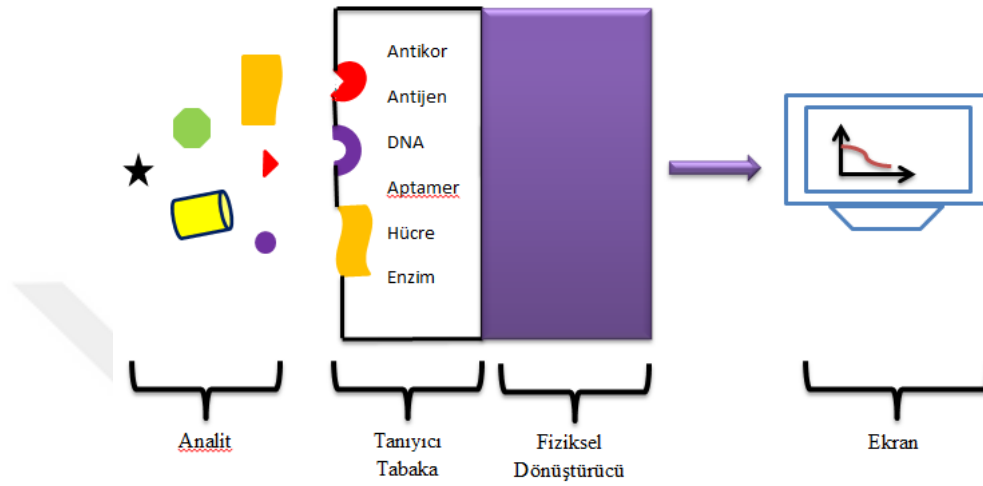
Sensör, Latince ‘‘sensus’’ kelimesinden kök almış ve ‘‘algılayıcı’’ anlamında kullanılmaktadır. Çevrede meydana gelen fiziksel ve kimyasal farklılıklar (sıcaklık, ışık, basınç, koku vb.) hem insanlarda hem de hayvanlarda bulunan duyu organları (el, göz, burun vb.) aracılığıyla algılanmaktadır. Bu gibi fiziksel ve kimyasal değişikliklerin kullanıcılar tarafından okunabildiği elektriksel veya optik sinyallere dönüştürebilen cihazlara ise sensör denilmektedir. Sensör sistemi temelde algılanacak olan madde (analit), algılayıcı tabaka ve fiziksel çeviriciden oluşmaktadır [1].

Biyosensör ifadesi, ilk olarak 1962’de Clark ve Lyson tarafından glikoz konsantrasyonunu ölçmek için tasarladıkları cihaz sayesinde kullanılmıştır. Tasarladıkları bu cihaza sensör ifadesi yerine biyosensör ifadesinin kullanılmasının tercih edilmesindeki en büyük neden tanıyıcı tabakada veya yüzeyde bulunan biyolojik tanıyıcı elemanı içermesidir. Biyosensör teriminin önerilen IUPAC tanımı ise fiziksel bir çevirici (transdüser) ile bir biyolojik tanıma elemanının kullanılarak özgün bir şekilde nicel ya da yarı niceliksel sinyal üretebilen analizör bir sistemi şeklindedir. Bir biyosensör (Şekil 2.1.), fiziksel çeviricisi ile ilişkili biyolojik tanıma elemanı içeren tanıyıcı bir tabaka veya yüzeyi ile kompakt analiz sistemidir [2]. Biyosensörde sinyalin anlamlı bir şekilde okunabilmesi için gerçekleşen işlemler sırasıyla şunlardır:

-Hedef analit biyolojik algılama tabakası ile etkileşir.

-Algılama tabakasına entegre olan fiziksel çevirici sayesinde anlamlı elektriksel sinyaller elde edilir.

-Daha sonra bu sinyaller sinyal işleme prosedüründen geçirilerek ekrana yansıtılır [3].



Şekil 2.1. Biyosensör sistemi şematik gösterimi

İmmünosensör, spesifik antijeni tespit edebilmek için biyolojik algılayıcı tabakasında antikorların kullanıldığı bir çeşit biyosensördür. Kısacası antikor-antijen etkileşimlerini incelemeye izin veren biyosensördür. İmmünosensörlerin en spesifik analitik teknik olması, bu sistemlerin son derece hassas ve oldukça düşük değerlerde saptama sınırlarına ulaşmasını sağlamaktadır. İmmünosensör biyolojik tanıyıcı tabakasında bulunan antikor , antijeni oldukça yüksek afinite ile bağlar ve bu sayede ortamda başka biyomoleküllerin varlığında bile analiti tespit edebilmektedir. Biyoteknolojik gelişmeler sayesinde immünosensörlerin biyolojik algılama tabakalarında çeşitli yöntemlerle üretilmiş farklı tiplerde antikorlar kullanılabilmektedir. Bu antikor tipleri, poliklonal ve monoklonal olarak adlandırılmaktadır. Monoklonal antikorlar poliklonal antikorlara göre daha spesifiktir. Uygulanacak olan stratejiye göre kullanım alanları farklılık göstermektedir [4].

2.2. İmmünosensörlerin Sınıflandırılması

İmmünosensörler, kullanılan çevirici tipine göre sınıflandırılmaktadır. Fiziksel çeviricilerinin temel alındığı sınıflandırmada elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik çeviricili immünosensörler yer almaktadır [3].

2.2.1. Elektrokimyasal çeviricili immünosensör

Elektrokimyasal immünosensörlerde anlamlı bir sinyal oluşumu, immünosensör yüzeyine tutuklanmış biyolojik tanıyıcı elemanlar ile çözeltinin elektriksel potansiyeli veya akımı gibi özelliklerini etkileyen hedef analit arasındaki reaksiyona bağlıdır. Elektrokimyasal immünosensörlerde algılama için temelde üç elektrot (prob) gereklidir. Bunlar; çalışma elektrodu, karşı elektrot ve referans elektrodudur. Çalışma elektrodu, çözelti ortamı içerisindeki değişimleri algılamak için reaksiyonun gerçekleştiği bölgede konumlandırılırken, referans elektrodu reaksiyon bölgesinden uzak tutulmalıdır. Bunun amacı ise kararlı bir potansiyel sağlamaktır. Genel olarak referans elektrodu Ag/AgCl yapısından meydana getirilmiştir. Buna ek olarak çalışma elektrodu ve karşı elektrot iletken olmaları ve kimyasal açıdan kararlı olmaları sebebiyle altın, platin ve silikon bileşenlerinden oluşmaktadır [2].

2.2.2. Optik çeviricili immünosensör

Optik bir çevirici ve biyolojik tanıyıcı tabakada antikor veya antijen içeren analiz sistemlerine optik çeviricili immünosensör denilmektedir. Biyolojik bir değişikliği algılamak için ışık kaynağıyla entegre olabilen optik çeviricinin asıl işlevi, algılanan sinyali elektronik bir sinyale dönüştürülmesini sağlamaktır. Optik çeviricili immünosensörlerde sinyal oluşumu, analit ile biyolojik tanıyıcı tabakanın etkileşimi sonucunda meydana gelen fiziksel veya kimyasal farklılığa bir cevap niteliğinde ışığın yansımaları, soğurulması, kırılması veya iletimi gibi özelliklerinde değişikliklere yol açması şeklinde gerçekleşmektedir [5].

Optik olarak biyolojik olayları tespit edebilmek için iki farklı yöntem uygulanmaktadır. Bunlardan floresan bazlı tespit teknikleri oldukça dikkat çekicidir. Bu yöntemi dikkat çekici kılan en önemli yanı çok düşük biyoanalit konsantrasyonlarında bile tespit olanağı sağlamasıdır. Bu yöntemde ister biyolojik tanıyıcı tabaka ister hedef biyomolekül floresan etkiye sahip maddeler ile etiketlenmektedir. Ardından hedef biyomolekülün ortamdaki varlığı ile biyolojik tanıyıcı tabaka arasındaki etkileşim sonucunda floresanın yoğunluğunun artmasıyla biyomolekül varlığının tespit edilmesi sağlanmaktadır. Floresan, harici bir ışık kaynağı varlığında moleküllerde veya atomlardaki elektron geçişlerini başlatmaktadır. Harici ışık kaynağı ile başlatılan elektron geçişi sayesinde ışıltama (daha uzun dalga boyu ışığı) sağlanmaktadır. Optik çeviriciye sahip biyosensörlerde ışık üretimini sağlamak adına florokrom molekülleri kullanılmaktadır [4].

2.2.3. Piezoelektrik çeviricili immünosensör

Piezoelektrik etkinin 1880’li yıllarda Jaques ve Pierre Curie tarafından keşfi ile kristallerin mekaniksel ve elektriksel durumlarını anlamak için yoğun çalışmalar başlatılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda kuvars ve rochelle tuzunun mekanik etki altında kristal yüzeyinde bir elektriksel potansiyelin meydana geldiği gözlemlenmiştir. Öte yandan elektriksel etki altındaki kristal yüzeyinde ise mekanik bazı değişiklerin meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu durumda kristalin mekanik etki (basınç) altında kalmasıyla mekanik enerjiyi elektrik enerjisine dönüştürebilen etki piezoelektrik etki olarak tanımlanmaktadır. Bu durumda bu tip çeviriciye sahip olan immünosensörlere kütle hassas veya gravimetrik immünosensörler de denilmektedir [6].

Piezoelektrik çeviricilerin yaygın olarak kullanılanları, kuvars kristal mikrodenge (Quartz Crystal Microbalance, QCM), yüzey akustik dalgaları (Surface Acoustic Wave, SAW), yığın akustik dalgaları (Bulk Acoustic Wave, BAW) ve bütün bunlara ek olarak son yıllarda immünosensör çalışmaları içerisinde yer bulan kuvars akort çatalıdır (Quartz Tuning Fork, QTF).

2.3. Kuvars Akort Çatalı ve Uygulama Alanları

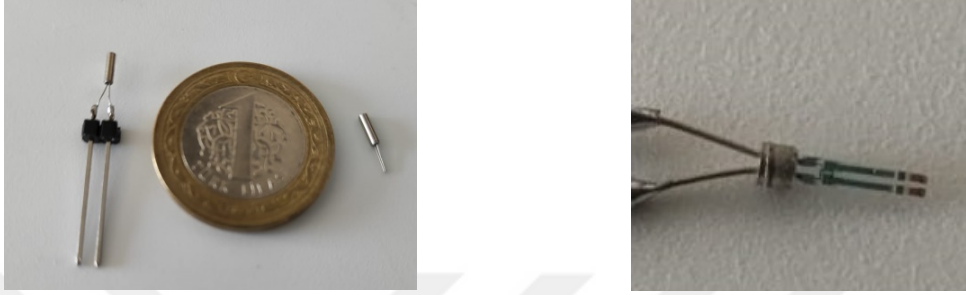
Bu bölümde kuvars akort çatalının tarihçesi, özellikleri ve çalışma prensiplerine yer verilmiştir. Bunlarla birlikte kuvars akort çatal uygulama alanlarına yer verilmiştir.

2.3.1. Kuvars akort çatal çeviricisi

İngilizce bir terim olan tuning fork, Türkçede akort çatalı anlamına gelmektedir. Akort çatalı ilk olarak 1711 yılında İngiliz bir müzisyen olan John Shore tarafından icat edilmiştir. Bu yapı ‘U’ şeklinde iki uçlu bir çatal görünümündedir. Akort çatalının en nadide özelliği ise bir yere vurulduğunda tek frekansta ses dalgalarını yaymasıdır. Bu özelliği sayesinde geçmişte müzik aletlerinin ayarlanması (akort edilmesi) için kullanılmıştır.

Akort çatalının yapımında kullanılan malzemeler, elastik metal, çelik çubuğu ve kuvars şeklindedir. Kuvars ile üretilen akort çatalı literatürde kuvars akort çatalı (QTF) olarak bilinmektedir (Şekil 2.2). Ayrıca QTF’ler küçük boyutları, ucuz maliyetleri, kolay ulaşılabilirliği ve kararlı bir şekilde tek frekansta titreşim özellikleri nedeniyle elektronik uygulamalarda kullanılmaktadır. Kuvars akort çatalı literatürde, 1969 yılında Forrer’in elektronik kol saati çalışması ile yer almıştır [7]. Yapısında kuvars bulunan akort çatalı piezoelektrik etki göstermektedir. Bu etki, mekanik enerjinin elektriksel enerji ile

yer değiştirmesine olanak sağlamaktadır. Piezoelektrik etki kısaca, kristal matris yüzeyine uygulanan mekanik uyarının kristal kafes yapısında deformasyona neden olmasıyla elektriksel yük üretme kabiliyeti olarak tanımlanabilmektedir [8]. Bu etki sayesinde kuvars akort çatallı üzerine adsorbe edilen kütle nedeniyle frekansında değişiklikler meydana gelmektedir. Bu nedenle QTF'ler sensör ve biyosensör geliştirilmesinde kullanılmaktadır [9].



şekil 2.2. Kuvars akort çatallı ve boyutsal karşılaştırma

Zhang et. al. yaptıkları çalışmada, QCM ile QTF arasında kalite faktör özellikleri karşılaştırılmış ve QTF'in sahip olduğu kalite faktörünün çok daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle QTF'in daha hassas ve güvenilir bir yöntem olduğu anlaşılmıştır [10]. Bir rezonatör olarak QTF'lerin yüksek kalite faktörü (Q faktörü) nedeniyle elektronik uygulamalarda örneğin, osilatör devrelerinde ve frekans ölçüm sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kalite faktörü (Q) parametresi, akort çatallarının üretildiği malzeme özelliklerinin yanı sıra çatalların boy ve kalınlık gibi özelliklere de bağlıdır. Q faktörü, ortam direnci ile rezonatörün sahip olduğu kinetik ve potansiyel enerjilerinin oranlarıyla ilişkilidir. Kalite faktörü (Q) şu denklem ile hesaplanmaktadır:

$$Q = \frac{1}{R_1} \sqrt{\frac{L_1}{C_1}} \quad (2.1)$$

Q= Kalite Faktörü

R₁= Ortam Direnci

L₁= İndüktans Değer

C₁= Kapasitans Değer

Denklemden de anlaşılacağı üzere Q faktörü, enerji kaybı azaldıkça artmaktadır. Kalite faktörünün yüksek olması bant genişliğinin dar olmasına ve bu durum seçiciliğin yüksek olması anlamına gelmektedir. Bu elektriksel modelden yola çıkarak mekaniksel bir modele evirilmeye çalışıldığında R₁ ile ifade edilen direnç sürtünme kuvveti ile ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle ticari ürün olarak satılan QTF'ler yüksek vakum altında sıkıştırılmış ($\cong 10^{-5}$ Tor) bir başlık ile üretilmektedir [11].

2.3.2. Kuvars akort çatalı uygulamaları

QTF'ler, yüksek Q faktörü, ucuz ve kolay bulunabilmesi gibi eşsiz özellikleri sebebiyle birçok alanda kullanılmışlardır. Bu uygulamalar, immüno sensör, mikrobiyal sensör öncül ve immüno sensör çalışmalarıdır. Bu çalışmalar tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1.Kuvars akort çatalarının uygulama alanları

	QTF Kullanım Amacı	Teşhis Limiti	Yıl	Referans
a. İmmüno sensör Dışı Çalışmalar	Işık Yoğunluk Sensörü	-	2019	[12]
	Nem Sensörü	-	2007	[13]
			2018	[14]
	Ortamdaki Sıvı Viskozite Değişimini Ölçmek	16cP	2011	[15]
		-	2020	[16]
	Ortamdaki Gaz Yoğunluğunu Ölçmek	-	2011	[17]
	Gaz sensörü	29ppbv	2018	[18]
		% 0.025	2019	[19]
		6,1 ppbv	2020	[20]
b. Mikrobiyal Sensör Öncül Çalışmalar	Bakteriyel Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi	-	2012	[21]
		-	2012	[22]
		-	2014	[23]
	Koli Basil Tespiti	-	2014	[24]
c. İmmüno sensör Çalışmaları	İmmüno globulin G (IgG) Tespiti	5 µg/mL	2002	[25]
	IgG ve IgM Tespiti	-	2012	[26]

Tablo 2.1.'de özetlenen çalışmaların yanı sıra yüksek Q faktörü nedeniyle AFM çalışmalarında da kullanılmıştır [27], [28]. Buna ek olarak 2002 yılında Su et. al. yapmış oldukları çalışma ile QTF'ler ilk kez literatürde immüno sensör olarak yer almıştır. Bu çalışmada immunoglobulin G'nin (IgG) teşhis edilmesi amaçlanmıştır [25]. Bahsedilen ilk

çalışmanın başarılı sonuçlanmasının ardından birçok çalışma grubu tarafından mikrobiyal sensör bazında çalışmalar yapılmıştır. Fakat Tablo 2.1.'den de anlaşılacağı üzere immüno sensör çalışmaları oldukça sınırlıdır.

2.4. Transferrin Önemi ve Yapılan Çalışmalar

Tez çalışmasında algılanmak istenen ilk analit transferrin olarak seçilmiştir. Bu seçimin nedeni travmaya bağlı olarak gelişen beyin omurilik sıvı (BOS) kaçaklarına tanı koymada önemli bir biyo işaret olmasıdır. Doğum, kafa travmaları gibi zorlanma durumlarının ardından ortaya çıkabilen bu akıntı çoğu zaman nezle grip gibi hastalıklarla karıştırılmaktadır. Bu karışıklık insan hayatına mal olabilmektedir. Çünkü BOS, beyni hem fiziksel hem de immünolojik açıdan korumakla birlikte kafa tası içerisindeki beyin ağırlığının hissedilmemesi gibi fonksiyonları da sağlamaktadır.

Günümüzde BOS kaçaklarına tanı koymada birçok yöntem uygulanmaktadır. Bunlar görüntüleme yöntemleri ve protein analizleridir. Görüntüleme yöntemleri ile fark edilemeyen ufak boyutlu çatlaklar olabilmektedir. Bu tür durumlarda BOS'a spesifik olan proteinlerin tayin edilmesi gerekmektedir. Bu durumda ise klinikte elektroforetik yöntemlerin kullanıldığı görülmektedir [29]. Ayrıca transferrin biyomolekülünü tespit etmenin tek yolu elektroforetik yöntemler değildir. Bunlarla birlikte biyosensör sistemleri kullanarak da teşhis yapılabilmektedir. Biyosensör çalışmaların özeti tablo 2.2'de sunulmuştur.

Tablo 2.2. Transferrin teşhisinde biyosensör uygulamaları

Sensör Tipi	Teşhis Limiti	Yıl	Referans
Piezoelektrik İmmüno sensör	$10^{-4} - 10^{-2}$ mg/mL	1990	[30]
Elektrokimyasal İmmüno sensör	1,9- 78,8 mg/mL	2004	[31]
Optik İmmüno sensör	0,05- 20 µg/mL	2006	[32]
Kapasitif İmmüno sensör	0,05- 75 ng/mL	2006	[33]
Optik İmmüno sensör (Yüzey Plazmon Rezonans)	0,0375- 40000 µg/mL	2012	[34]
Optik İmmüno sensör (Yüzey Plazmon Rezonans)	0,5-5,228 µM	2016	[35]

Tablo 2.2. devam ediyor

Voltametri İmmünoşensör	12,0-29,2 ng/dL	2017	[36]
Optik İmmünoşensör (Yüzey Plazmon Rezonans)	0,34 µg/mL	2017	[37]

Tablo 2.2.'de transferrin tayini için biyosensör yapılandırılmaları gösterilmiştir. Fakat görüldüğü üzere literatür taraması sonucunda transferrin için herhangi bir kütle hassas QTF biyosensör çalışmasına rastlanılmamıştır.

2.5. Kanda Serbest Dolaşan Tümör Hücrelerinin Önemi ve Teşhisi için Geliştirilen Yöntemler

Dünya çapında kanser hastalığı nedeniyle yaşanan kayıplar bir hayli artış göstermekte ve bu nedenle ölüm sebepleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Ölümünün hatırı sayılır bir oranının, tümörün metastaz yapması sonucunda gerçekleştiği bilinmektedir [38]. Tümör metastazında (yayılmasında) büyük bir önemle rol oynayan dolaşım sisteminde serbest dolaşan tümör hücreleri (CTC), 1869 yılında kanser hastalarında tespit edilmiştir [39]. CTC, birincil veya metastatik bozuk dokulardan (lezyon) dolaşım sistemi içerisine geçebilen oldukça düşük miktarlardaki (1-10 hücre / ml) tümör hücresini ifade etmektedir. CTC'lerin bu denli serbest bir şekilde dolaşımında bulunması uzak metastaza yol açabilmekte ve ölümleri de beraberinde getirmektedir [38],[40]. Uzak metastaz süreci birincil bozuk dokudan tümörün salınması ile başlayarak sırasıyla; kan dolaşımına giriş, dolaşımdaki damarlar aracılığıyla uzak bölgedeki dokulara sızma ve uzak bölgedeki dokular içerisinde tohumlanma şeklinde ifade edilebilmektedir [41]. Bunlara ek olarak, bazı CTC'ler birincil bozuk dokudan ayrılarak kan dolaşımına katılıp kılcal damarları büyük boyutları nedeniyle tıkayabilmekte ayrıca kılcal damarların duvarlarına yapışabilmektedirler [42]. Bu nedenle kanserin erken evrede tespit edilmesi zamanında tedaviye başlanmasını sağlayacağından oldukça önem arz etmektedir. Kanserinin erken tespiti için dolaşımdaki CTC'lerin yakalanmasının hedef alınması çok çalışılan konular içerisinde. Bunlara ek olarak CTC'lerin yakalanmasına katkı sağlayacak zenginleştirme protokolleri de oldukça önemli bir konudur. CTC'lerin zenginleştirilmesi iki ana başlık altında incelenebilmektedir. Bunlar fiziksel ve biyolojik özelliklerindeki farklılıkların temel alındığı zenginleştirme yöntemleridir. Boyutsal filtrasyon, yoğunluğa dayalı santrifüj ve elektriksel özellikler, fiziksel farklılıkların temel alındığı zenginleştirme

yöntemlerindendir. Biyolojik farklılıkların temel alındığı zenginleştirme yöntemleri ise CTC'lerde eksprese (ifade) edilen yüzey işaretleyicilerinin hedef alındığı pozitif bir seçim veya negatif seçim şeklindedir [41].

CTC'lerin dolaşım sistemi ortamında oldukça nadir bulunması yüksek seçici ve yüksek hassasiyet ile yakalanmaları açısından güçlüğe neden olmaktadır. Bu sorunlara çözüm bulmak amacıyla teknolojik olarak birçok yöntem denenmiştir [39]. Bu yöntemlerden birisi, klinik uygulamalarda CTC tespitine yönelik Veridex tarafından üretilmiş, Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onayı alınmış tek ticari ürün CellSearch, kullanıma sunulmuştur [43]. Bu yöntemin çalışma prensibi, epitel hücre yapışma molekülünü (EpCAM) yüksek düzeyde eksprese (ifade) eden hücreleri zenginleştirmek için manyetik boncukların yüzeyinin antikorla kaplanarak harici bir manyetik alan etkisiyle tespit etmektir [39]. Bu yöntemin avantajları hücre sayımı yapması ve bununla birlikte CTC'lere karşı yüksek duyarlılık göstermesi şeklinde ifade edilmesine karşın yüksek maliyetli aletler olmaları ve uzun süren ön işlemleri nedeniyle dezavantajlara da sahip olmalarıdır [44]. Bu gibi sınırlandırılmaların olması CTC tespiti için yeni yöntemlerin araştırılmasına neden olmuştur. Yapılan çalışmaların büyük oranı biyosensörlerin kullanılarak CTC'lerin tespit edilmesine yönelik olanlardır. Biyosensörler aracılığıyla CTC'lerin tespitinde kullanılan evrensel bir biyobelirteç belirlemek zor bir durumdur. Fakat yaygın olarak EpCAM ve sitokeratin (CK) maddeleri kandaki kanser hücrelerini belirlemek adına kullanılan biyobelirteçlerdir [40].

Tez çalışmasında algılanmak istenen ikinci analit yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı CTC olarak seçilmiştir. Günümüzde CTC'lerin teşhis edilmesi için farklı birçok teknik kullanılmaktadır. Bunların başında çeşitli çeviricilerin kullanıldığı biyosensör sistemleri yer almaktadır. Bu sistemlerin bazıları, çözelti içerisinde bulunan CTC'lerin çeşitli ön zenginleştirme prosedürlerinden geçirilerek tespit edilmesini sağlayıcı niteliktedir. Nano/mikro kanal yönteminin kullanıldığı bu sistemlerde CTC izolasyonu gerek fiziksel gerek kimyasal yollar ile sağlanmaktadır. Bunun yanı sıra bu yöntem ile ön zenginleştirme yapılarak CTC tespitine de olanak sağlanmaktadır. Nano/mikro kanal yöntemi ile CTC tespiti için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bunlar; yaygın olarak afiniteye dayalı (antikor/aptamer) metodların kullanılarak ön zenginleştirmenin ardından floresans, raman, elektrokimyasal yöntemler şeklinde sıralanabilmektedir. Bu sistem bazı kaynaklarda ise mikroakışkan immunosensörler olarak geçmektedir [40]. CTC teşhisine yönelik yapılan çalışmalar tablo 2.3.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.3. CTC teşhisi için yapılan çalışmalar ve performansları

	Çevirici Tipi	Teşhis Limiti	Yıl	Referans
a. İmmünoşensör Çalışmaları	İmpedimetrik İmmünoşensör	10 hücre/mL	2011	[45]
	Optik İmmünoşensör	1000 hücre/mL	2012	[46]
	Piezoelektrik İmmünoşensör	32 hücre/mL	2014	[47]
	Optik İmmünoşensör	10 hücre/mL	2015	[48]
	Elektrokimyasal İmmünoşensör	3 hücre/mL	2018	[49]
	Elektrokemilüminesans İmmünoşensör	40 hücre/mL	2018	[50]
	Elektrokimyasal İmmünoşensör	1 hücre/mL	2019	[51]
	Elektrokimyasal İmmünoşensör	7 hücre/mL	2019	[52]
	Yüzey Plazmon Rezonans	1 hücre/mL	2020	[43]
	Optik İmmünoşensör	% 97 performans	2020	[38]
	Optik İmmünoşensör	25 hücre/mL	2020	[53]
b. İmmünoşensör Dışı Çalışmalar	Elektrokimyasal Sensör	% 90,9 verim ile	2019	[54]
	Elektrokimyasal Sensör	0,43 hücre/mL	2019	[55]

Tablo 2.3.'de görüldüğü üzere QTF kristalinin CTC tespitine yönelik herhangi bir immünoşensör yapılandırılmasına rastlanmamıştır. Burada dikkat çekici olan diğer bir nokta ise aynı tip çeviricinin kullanıldığı diğer uygulamalarda farklı teşhis değerleri elde edilmesidir. Bu durum çevirici yüzeyine antikor tutuklama stratejilerine göre değişiklik gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Ayrıca yapılan çalışmalara bakıldığında ise uzun tespit süreleri, pahalı cihaz kullanımı, ön işlemler ve işaretleme tekniklerinin kullanılması sonuçların elde edilmesinde zaman ve maddi güç kayıplarına yol açmaktadır.

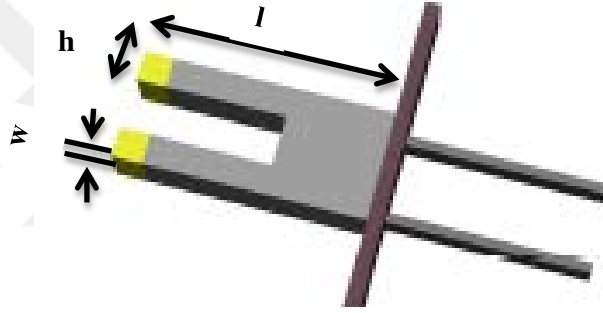
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Ön Çalışmalar

Bu bölümde, materyal ve metot bölümüne geçmeden önce yapılacak olan deneyler için QTF ölçüm cihazının çalışma prensipleri, tanımlamalar ve geliştirilen ikinci jenerasyon cihaz anlatımları yapılmıştır.

3.1.1. QTF kristallerin mekanik ve elektriksel incelemesi

QTF sensörü, iki dişli bir çeşit çatal görünümüne sahiptir (Şekil 3.1). QTF sensörlerin yapısındaki kuvars nedeniyle piezoelektrik özellik gösterdiği bilinmektedir. Bu özellik sayesinde elektriksel bir sinyal ile uyarıldığında mekanik olarak titreşim yapmaktadır. Bu sebeplerle QTF'in salınımı hem elektriksel hem de mekanik olarak incelenmektedir.



Şekil 3.1. QTF şematik gösterimi

QTF sensörün rezonans frekansının (f_0) mekanik olarak aşağıdaki gibi ifade edilmektedir;

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{m}} \quad (3.1)$$

$$K = \frac{3IE_Q}{l^3} \quad (3.2)$$

$$I = \frac{wh^3}{12} \quad (3.3)$$

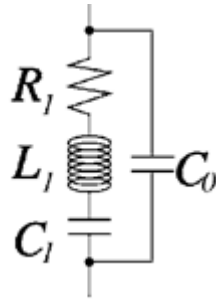
$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{3IE_Q}{ml^3}} \quad (3.4)$$

Verilen eşitliklerde kullanılan l , h , w şekil 3.1.'de görüldüğü üzere sırasıyla boy, en ve yüksektir. Eşitliklerde yer alan diğer değişkenler değerleri ile tablo 3.1.'de verilmiştir

Tablo 3.1. QTF rezonans frekansının mekanik ifadesinde kullanılan değişkenler ve değerleri

Değişkenler	Değerler
Elastik Katsayısı (K)	
Kütle (m)	02429 $\rho w t l$
Kuvars Yoğunluğu (ρ)	$2.65 \times 10^3 \text{ kgm}^{-3}$
Kuvars Young Modülü (E_Q)	$7.87 \times 10^{10} \text{ Nm}^{-2}$
Eylemsizlik momenti (I)	-

Rezonatör kristallerin elektriksel tavrı genel kabul görmüş Butterworth- Van Dyke modeli ile incelenmektedir [56]. Buna istinaden QTF sensörünün davranışını incelemek için en uygun model Butterworth- Van Dyke modeli olmuştur [57]. Bu modelde birbirine seri bir biçimde bağlı direnç (R_1), indüktans (L_1) ve kapasitörden (C_1) oluşmaktadır. Ayrıca bu seri bağlı elemanlara paralel bir şekilde bağlı olan kapasitör (C_0) de bulunmaktadır. Şekil 3.2.'deki RLC devresinde R_1 direnci enerjide meydana gelen kaybı, L_1 kinetik enerjiyi dolayısıyla rezonansı, C_1 potansiyel enerjiyi ve C_0 kaçak sinyalleri simgelemektedir [58].



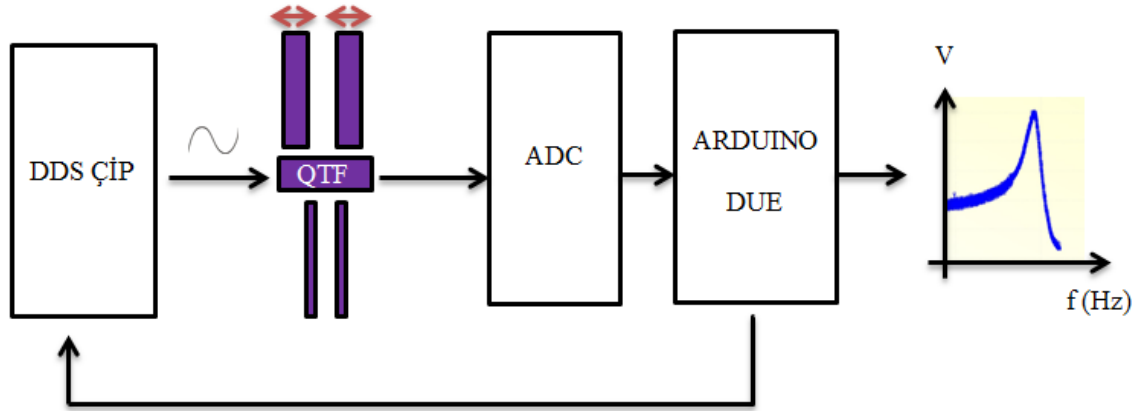
Şekil 3.2. QTF sensörün Butterworth-Van Dyke modeline göre eşdeğer devresi [59]

RLC devresi rezonans frekansına yakın bir değerdeki sinyal ile uyarıldığında meydana gelen titreşim genliği ve o genliğe ait olan bant genişliği devredeki R direncinin değerine bağlıdır. Kısacası bu model ile ifade edildiği gibi QTF kristali bir bant geçiren filtre gibi davranmaktadır. Buradan yola çıkılarak rezonans frekansı ve bant genişliği arasındaki ilişki kalite faktörünü (Q faktör) simgelemektedir. Ayrıca denklem 2.1.'de verilen eşitlik incelendiğinde devredeki enerji kaybının azaldıkça (R değeri) Q faktörünün değeri artmaktadır. QTF'in diğer kütle hassas sensörlerden farklı olarak geometrik çatal yapısı sayesinde enerji kaybı oldukça düşük sayılmaktadır. Bu ifade, birbirine doğru

yakınlaşıp uzaklaşarak simetrik bir biçimde çatalların titreşme mekanizmasıyla açıklanmaktadır. QTF çatalları birbirlerine yaklaştıklarında ortamda bulunan hava moleküllerini sıkıştırır böylece çatallar arasında bir potansiyel enerji birikimi oluşturmaktadır. Ardından çatallar birbirlerinden uzaklaşırken biriken bu potansiyel enerjiye sahip hava molekülleri tarafından itici bir kuvvet oluşturmaktadır. Böylece havanın çatallar üzerindeki direnci dolayısıyla kaybedilen enerjinin bir miktarı itici kuvvet sayesinde geri kazanılmaktadır. Bu mekanizmasının yanı sıra QTF'in yüzey alanının çok küçük olması sebebiyle hava direncinden daha az etkilenmektedir. Buda yine QTF sensörünün Q faktörünün (≈ 60000) diğer kütle hassas sensörlerden bu denli yüksek olmasını kanıtlar niteliktedir [59], [60].

3.1.2. QTF frekans ölçüm sistem tasarımı

Kuvars kristale sahip akort çatallının (QTF) frekansını ölçmeye yarayan 1.nesil sistem Mehmet Altay Ünal'ın 2016'da yayınlanan doktora tezi kapsamında geliştirilmiş ve bir patente sahiptir. Böyle bir sisteme ihtiyaç doğmasının nedeni günümüzde kullanılan sistemlerin oldukça pahalı ve hantal olmalarıdır. Bu dezavantajların ortadan kaldırılarak taşınması kolay ve ucuz maliyete sahip bir cihaz üretilmiştir. Sistem tasarımının ilk aşaması yüksek çözünürlüğe sahip bir sinüs sinyali oluşturmaktır. Bu kriteri sağlamak adına AD9850 kodlu bir doğrudan dijital sentezleme çekirdeği (DDS) kullanılmıştır. DDS çipi 0,0291Hz (hertz) çıkış çözünürlüğüne sahip 32 bit frekans ayarlama kelimesi sağlayan yenilikçi bir çeşit sinyal jeneratörü gibi davranmaktadır. QTF, DDS çipinden gelen sinüs sinyalleri ile uyarılmaktadır. Bu sinyal uyarımını yapabilmek için tasarımda Arduino Due kartı programlanmıştır. Arduino Due kartının içerisine yazılan program sayesinde başlangıç ve bitiş frekans değerleri manuel bir şekilde ayarlanabilmektedir. Ayrıca bu frekans bilgilerini DDS çipine aktarmak için özel bir formata dönüştürmektedir. Ardunino Due kartından DDS çipine aktarılan bu frekans verisine göre QTF uyarılmakta ve çıkışındaki sinyaller Analog-sayısal dönüştürücü (ADC) hücresine gönderilmektedir. Bu hücre içinde toplanan çıkış sinyali DC voltaj, frekans gibi diğer biçimlere dönüştürmek yerine sinyalin doğrudan örnekleme stratejisi kullanılarak tepe değerlerinin matrise yazılması şeklinde çalışmaktadır. Tasarımın bu aşaması patent için ana noktayı oluşturmaktadır. Kısacası bu sistem, DDS çipi tarafından sinüs sinyalleri ile QTF'lerin uyarılması ve çıkışında voltaj değerlerinin okunması şeklinde çalışmaktadır [9]. Üretilen cihazın blok diyagramı şekil 3.3'de verilmektedir.



Şekil 3.3. Birinci nesil QTF frekans ölçüm cihazı blok şeması

Bu sistemde DDS çipine frekans bilgilerinin aktarımı bir döngüsel işlem ile sağlanmaktadır. Bu döngüsel işlem basamakları Arduino Due kartının programlanması ile sağlanmaktadır. Program temelde rezonans frekansını saptamak için belirlenen frekans değerlerinde taranması şeklinde açıklanabilmektedir. Burada manuel olarak başlangıçta başlangıç ve bitiş frekans değerleri yazılmaktadır. Başlangıç frekans değeri DDS çipine özel bir formatta gönderilip oradan QTF uyarılmaktadır. Çıkış sinyallerinden alınan veriler değerlendirilip matrise yazılır ve bitiş frekansına eşit olup olmadığına bakılmaktadır. Eğer eşit değilse DDS'in çıkış çözünürlüğüne yakın bir değer olan 0,03 Hz yeni frekans değeri üzerine ekleyerek bu döngü devam ettirilir. Bitiş frekansına ulaşıldığı zaman ise bu işlem durdurulmaktadır. Programın çalışma algoritma detaylarına Ünal 2016'dan ulaşılabilir [60].

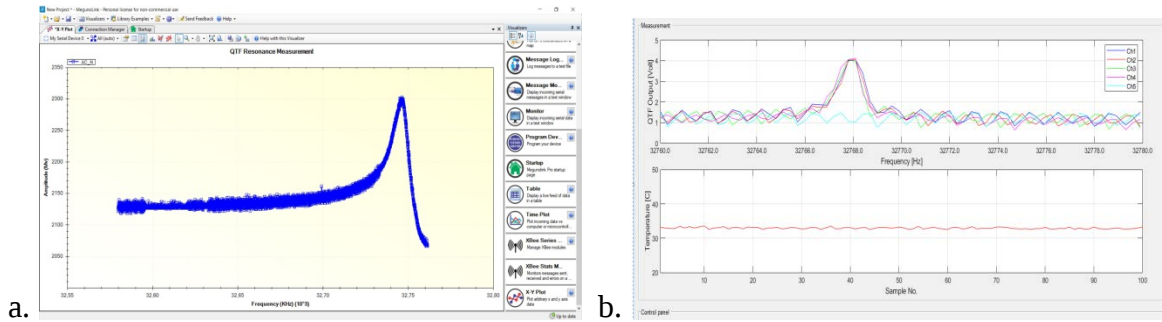
Bu çalışmaların ardından üretilen sistem TÜBİTAK tarafından desteklenen 118S614 nolu "Kanda Dolaşan Tümör Hücrelerinin Kuvars Akort Çatalı Tabanlı İmmünoşansörle Tayini " başlıklı proje kapsamında geliştirilmiş ve 2. nesil cihaz olarak adlandırılmıştır (Şekil 3.4) .



Şekil 3.4. İkinci nesil QTF frekans ölçüm cihazı

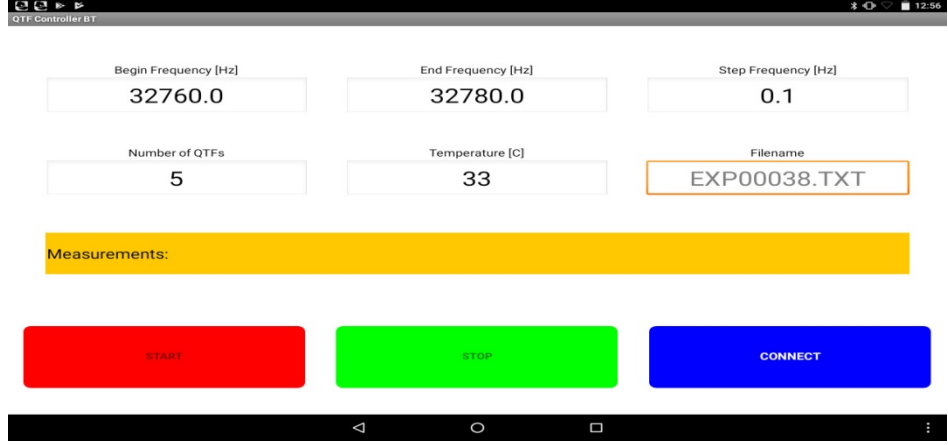
Şekil 3.4’te gösterilen ikinci nesil cihaz prototipi üzerindeki zif soket sayesinde tek seferde 5 adet QTF’in art arda frekans ölçümlerini almak için cihaz üzerine tutturulabilmektedir. Ayrıca QTF frekansının ortam sıcaklığının aniden değişmesi gibi durumlar nedeniyle yanlış sonuçlar vermesini engellemek için üzerinde sıcaklık kontrol hücresi bulunmaktadır.

Eki prototip ‘MegunoLink’ , yeni prototip ise ‘MATLAB’ kullanarak programlanmıştır. Eski prototip ara yüzü ile yeni prototip ara yüzü farklılık göstermektedir (Şekil 3.5). Ayrıca yeni prototip ara yüzünde görülen düşük genlikli piklerin normalize edilerek görülmesini sağlayan bir buton ilavesi yapılmıştır.



Şekil 3.5. Birinci nesil (a) ve ikinci nesil (b) QTF frekans ölçüm cihazlarının ara yüzleri

Bütün bunlara ilaveten ikinci nesil prototip Bluetooth aracılığıyla tablet, akıllı telefon gibi cihazlara kablosuz bir şekilde bağlanabilmekte, verileri aktarılabilen ve kontrol edilebilmektedir. Şekil 3.6 ‘da mobil ara yüzü gösterilmektedir. Birinci ve ikinci nesil cihazların performanslarına yönelik kıyaslama tablo 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.6. İkinci nesil cihazın mobil ara yüzü

Tablo 3.2. Birinci ve ikinci nesil cihazların performans karşılaştırılması

Özellikler	Birinci Nesil Cihaz Prototipi	İkinci Nesil Cihaz Prototipi
Taşınabilir Nitelik	+	+
Uygun Maliyet	+	+
Kolay Kullanım	+	+
Başlangıç-Bitiş Frekans Ayarlama	+	+
Birden Fazla QTF Frekans Ölçümü	X	+
Akıllı Cihazlara Bluetooth ile Bağlanabilme	X	+
Alınan Veri Normalizasyonu	X	+
Sıcaklık Kontrol Hücresi	X	+
Step Frekans Ayarı	X	+

İkinci nesil olarak ifade edilen cihaz prototipi birden fazla sonucu tek seferde almayı ve düşük genlikli sinyallerin normalize edilerek net bir şekilde anlaşılmasını sağlamasıyla metot bölümü oluşturulan deney setlerinde kullanılmıştır.

3.2. Materyal

Tez kapsamında kullanılan gerek satın alınan gerekse de üretilen bütün materyal bilgileri tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3. Tez materyali

Malzeme Adı	Model	Özellikler	Satın Alınan Yer
Kuvars Akort Çatalı (Altın Yüzeyli)	CFS-14532768DZFB	Vakum altında kapatılmış silindir başlıklar içerisinde gelmiştir. Silindir başlığın çapı 1,50 mm, yüksekliği ise 5,10 mm'dir (Ek:1).	Citizen Finedevice Co Ltd. şirketi
Tiofen-3-Boronik Asit	BGBB8189V	-	Sigma Aldrich şirketi
Methanol	SZBA300S	-	Sigma Aldrich şirketi
Fosfat Tampon Çözeltisi	-	7,4 pH	Sigma Aldrich şirketi
Anti-TRC2 (anti-transferrin)	-	Poliklonal antikor	İş birlikleri ile alınmıştır
Transferrin	-	-	
Anti-EpCAM Antikoru (AUA1)	ab20160	Sıvı halde temin edilmiştir (Ek:2).	ABCAM şirketi
Rekombinant İnsan EpCAM Proteini	ab155637	Liyofilize olarak temin edilmiştir (Ek:3).	ABCAM şirketi
QTF Frekans Ölçüm Cihazı	-	Ünal 2016	Çalışma grubumuz tarafından üretilmiştir.

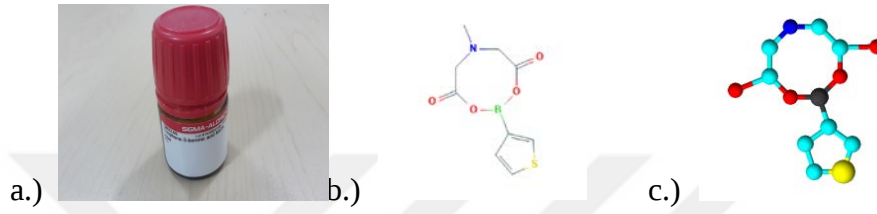
3.3. Metot

3.3.1. QTF immünosensör olarak yapılandırma: Transferrin

Bu bölümde ilk antijen olarak seçilen tranferrini algılamak için QTF'in yüzeyinde meydana getirilen kimyasal değişiklikler ve protokolleri verilmiştir.

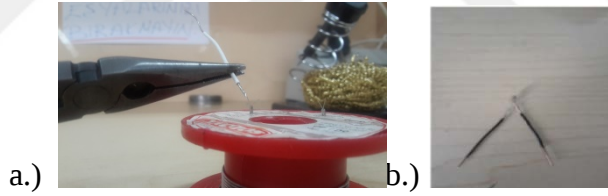
3.3.1.1 QTF yüzey aktivasyonu

Burada ilk defa tiofen- 3 boronik asit- (T3BA) kimyasal aktivasyon ajanı (Şekil 3.7) QTF çevirici yüzeyler üzerinde denenmiştir. Burada amaç boronat gruplarının şeker gruplarına olan afinitesinden yararlanarak, antikorların ağır uçlarının (aktif) yüzeye bakar şekilde konumlanmasını sağlamaktır. Bu aşamada ilk defa altın kaplı QTF çevirici temin edilerek çalışmalara başlanmıştır (CFS, 145327680ZFB). Böylece de sülfür gruplarının da çevirici yüzey üzerinde yönlenmesi düşünülmüştür.



Şekil 3.7. Kimyasal aktivasyon ajanı: T3BA (a) iki boyutlu (b) ve üç boyutlu görüntüsü (c)

Yüzey modifikasyonundan önce QTF'lerin bacakları ependorf tüpüne rahat bir şekilde daldırmak için lehimlenmiştir (Şekil 3.8). Böylece, yapılan bütün deneylerde QTF'lerin yalnızca çatal kısmı aktivasyon çözeltisine daldırılmıştır.



Şekil 3.8. QTF bacaklarının lehim aşaması

Kimyasal modifikasyonun başlangıcında T3BA hazırlanarak (50 mM) modifikasyon denemesi yapılmıştır. Hazırlık basamakları aşağıda verilmiştir (Protokol 1).

Protokol-1: QTF yüzey aktivasyonu

- 1.) Öncelikle QTF'lerin vakumlu kapakları çıkartılmıştır. QTF çevirici yüzeyleri koruyucu metal kaplar içinde gelmektedir. (Sonuçta immunosensör yapılandırılması için değil, farklı sistemlerde donanım elemanı olarak satılmaktadır).
- 2.) Vakumlu kapakları çıkartılmış olan QTF'lerin frekans ölçümleri alınarak kaydedilmiştir.
- 3.) Bu aşamadan sonra T3BA aktivasyon ajanından 11,953g tartılıp 1L methanolde (%99 v/v) çözündürülerek 50mM'lık T3BA+methanol çözeltisi hazırlanmıştır.

- 4.) Hazırlanan aktivasyon çözeltisinden 2ml'lik ependorf tüplerinin içerisine 20µl olacak şekilde mikropipet yardımıyla konulmuştur.
- 5.) QTF'ler 20µl T3BA+metanol çözeltisinin içerisine daldırılmış ve 3 saat boyunca çözeltinin içerisinde bekletilmiştir.
- 6.) Ependorf tüplerinden çıkarılan QTF'ler desikatör içerisinde 30 dk boyunca kurutulmaya bırakılmıştır.
- 7.) Son olarak kurutma süreleri dolan QTF'lerin frekans ölçümleri alınmış, kaydedilmiş ve incelenmiştir.

3.3.1.2 Aktive edilmiş QTF çevirici yüzeylerine antikor (anti-TRC2)

tutuklanması

Optimizasyon çalışmaları öncesinde, QTF immünoşansör yapılandırılabilirdiğinin kanıtlanması hedeflenmiştir. Kimyasalla (1mM, T3BA) modifiye edilmiş QTF çevirici yüzey üzerinde, antikor tutuklanabildiği ve hatta sonrasında ise, hedef analit (antijen) varlığında sinyal oluşturulup oluşturulamadığı test edilmiştir. Ayrıca, bu ön test, optimizasyon aşamasına geçildiğinde, her basamakta hangi aralıkta çalışma derişimlerinin değıştirilmesi gerektiğini hususunda ön fikir verecektir. Aktive edilmiş QTF çeviricileri yüzeyine antikor tutuklanmasında aşğıdaki basamaklar uygulanmıştır (Protokol 2).

Protokol 2:

QTF yüzeyine antikor (anti-TRC2) tutuklama

- 1.) 1mg/ml konsantrasyon değıerine sahip olan stok-1 antikor çözeltisinden 10 µl alınarak 990 µl ddH₂O (distile su) içerisinde çözdüürölerek stok-2 çözeltisi hazırlanmıştır.
- 2.) 1,25µg/µl antikor konsantrasyonu hazırlamak için stok-2 çözeltisinden 2,5µl alınarak üzerine 17,5µl ddH₂O ilave edilmektedir. Böylece ependorf tüpünde 20 µl'lik 1,25µg/µl konsantrasyonunda antikor hazırlanmıştır.
- 3.) Yüzeyi 1mM'lık T3BA+metanol ile aktive edilen QTF'ler, antikor tutuklaması için tüplere daldırılıp 10 dk boyunca bekletilmiştir.
- 4.) Ölçüm almadan önce, yıkanıp, 30 dk boyunca desikatörde bekletilmiştir ve daha sonra frekans ölçümleri alınıp kaydedilmiştir.

3.3.1.3 Antijen (Transferrin) cevabı

Antijen hazırlama basamakları antikor hazırlama aşamalarıyla aynıdır. Burada yüzeyinde antikor bulunan QTF'ler zaman kaybetmeden antijen ile etkileştirilmelidir (Protokol 3).

Protokol 3: Antijen (Transferrin) cevabı

- 1.) 1mg/ml konsantrasyon değerine sahip olan stok-1 antikor çözeltisinden 10 µl alınarak 990 µl ddH₂O (distile su) içerisinde çözündürülerek stok-2 çözeltisi hazırlanmıştır.
- 2.) 1,25µg/µl antikor konsantrasyonu hazırlamak için stok-2 çözeltisinden 2,5µl alınarak üzerine 17,5µl ddH₂O ilave edilmektedir. Böylece ependorf tüpünde 20 µl'lik 1,25µg/µl konsantrasyonunda antikor hazırlanmıştır.
- 3.) Yüzeyi 1mM'lık T3BA+metanol ile aktive edilen QTF'ler, antikor tutuklaması için tüplere daldırılıp 10 dk boyunca bekletilmiştir.
- 4.) Ölçüm almadan önce, yıkanıp, 30 dk boyunca desikatörde bekletilmiştir ve daha sonra frekans ölçümleri alınıp kaydedilmiştir.

3.3.2. QTF immünosensör olarak yapılandırma: CTC

Bu bölümde ikinci antijen olarak seçilen CTC'yi algılamak için QTF'in yüzeyinde meydana getirilen kimyasal değişiklikler ve protokolleri verilmiştir.

3.3.2.1 QTF yüzey aktivasyonu

T3BA aktivasyon ajanı 0,75-1-1,25-1,5 ve 2 mM konsantrasyonunda hazırlanmıştır. 1 mM T3BA aktivasyon ajanının hazırlanma ve QTF üzerine uygulaması örnek oluşturması adına detaylandırılmıştır. Bu örnek uygulama tezin diğer bölümlerinde protokol-1 olarak geçmektedir.

Protokol.1: Aktivasyon Ajanı Hazırlama

- 1.) Moleküler ağırlığı 239,06 g olan T3BA 1mM konsantrasyonda ve 100 mL'lik balon jode hazırlamak için hassas terazide 0,023906 g tartılmıştır.
- 2.) Tartılan T3BA, temiz ve boş 100 mL'lik balon jodeye alınmıştır.
- 3.) Üzeri 100 mL olana kadar metanol eklenmiştir.

Bu şekilde diğer konsantrasyonlarda hazırlanmış ve şekil 3.9'da sunulmuştur.



Şekil 3.9. Farklı konsantrasyonlarda T3BA hazırlanışı

Hazırlanan bu konsantrasyon değerlerine sahip T3BA, 20 μ L hacminde ependorf tüpüne mikro pipet yardımıyla eklenmiştir. Vakumlu başlıkları çıkarılmış ve işlem görmeden frekans ölçümleri alınmış QTF'ler T3BA'nın bulunduğu tüpe daldırılmış tüp içerisinde 3 saat boyunca bekletilmiştir. Ardından tüpten çıkarılan QTF'ler 30 dk boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulan QTF'lerin frekans ölçümleri alınmış ve kaydedilmiştir. Bu aşamada süre ve pH değerleri sabit tutulmuş ve değişen konsantrasyonlarda aktivasyon ajanının etkileri incelenmiştir. Ardından QTF'lerin aktivasyon ajanı içerisinde bekletme süreleri 3 ve 5 saat olarak belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır (Protokol-2). T3BA'nın metanol yerine farklı pH'da çözülmesi (6,8 ve 7,2) durumunda QTF çevirici yüzey üzerinde birikimlerinde anlamlı bir değişiklik olup olmadığı incelenmiştir. Farklı pH'da aktivasyon ajanı hazırlama protokolü uygulanmıştır (Protokol-3).

Protokol-3: Farklı pH'larda Aktivasyon Ajanı Hazırlama

- 1.) pH etkisinin araştırılması için QTF'lerin işlemden önceki frekans ölçümü alınması adına vakumlu kapakları çıkartılmıştır.
- 2.) Fosfat tamponu hazırlamak için öncelikle potasyum fosfatın iki ayrı formlarından hazırlık yapmak gereklidir. (Dibazik potasyum fosfat (K_2HPO_4) 1M molekül ağırlığı : 174.18 gr, Monobazik potasyum fosfat (KH_2PO_4) 1M molekül ağırlığı : 136.09 gr).

- 3.) 0,5l her iki formundan stok hazırlamanız gerekmektedir. Öncelikle 87.09gr Dibazik potasyum fostat (K_2HPO_4) (174.18 gr olan) tartılmış ve 450 ml distile suya eklenilerek iyice çözündürülmüştür. Daha sonra 500ml olacak şekilde üzerine ddH₂O ilave edilmiştir.
- 4.) 68.045 gr Monobazik potasyum fosfat (KH_2PO_4) (136.09gr olan) tartılmış ve 450 ml distile suya ekleyerek iyice çözündürülmüştür. Tamamen çözündükten sonra oda şartlarında üstüne 500 ml olacak şekilde distile su ilave edilmiştir.
- 5.) İstenilen pH seviyesinde hazırlamak adına listelerden faydalanılmıştır.
- 6.) Örnek olarak 6,8 pH değeri için 50 ml balon joje içerisinde, 26,5ml monobazik ve 23,5ml dibazik potasyum fosfat karıştırılarak elde edilebilmektedir.
- 7.) pH etkisini görebilmek adına T3BA derişimi sabit olarak 1mM tutulmuştur.
- 8.) İşlemden önce frekans ölçümleri alınan QTF'ler hazırlanan karışıma 3 saat boyunca daldırılmıştır.
- 9.) Kurutulmak üzere 30 dk bekletilen QTF'ler kuruduktan sonra frekans ölçümleri alınmıştır.

3.3.2.2 Aktive edilmiş QTF çevirici yüzeylerine antikor (anti-EpCAM) tutuklanması

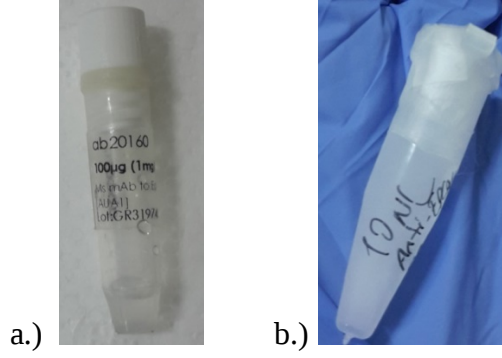
Anti-EPCAM ile stok hazırlığı için distile su (dH_2O) da denenmiş fakat anlamlı veriler oluşmamıştır. Araştırmalar sonucunda anti-EpCAM hazırlamak için fosfat tampon çözeltisi (PBS) kullanımları yaygın görülmüştür. Bu nedenle PBS içerisinde anti-EPCAM seyreltilerek stok hazırlanmış ardından QTF'ler etkileştirilmiştir. Aşağıda antikor tutuklanması için hazırlık ve uygulama protokolleri verilmiştir (Protokol-4).

Protokol-4:Anti-EpCAM Tutuklama

- 1.) QTF'lerin bacakları lehimlenip vakumlu kapakları çıkartıldıktan sonra frekans ölçümleri alınmıştır (İşlem görmemiş QTF).
- 2.) Sonrasında QTF'lerin yüzeyleri 1Mm'lık T3BA+methanol ile 3 saat bekletilerek aktive edilmiştir (QTF'lerin yüzeyleri için uygulanacak olan aktivasyon ajanının konsantrasyonu optimizasyon sonrasında 1mM T3BA+methanol olarak belirlenmiştir). Bekletmenin ardından 30 dk boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur ve frekans ölçümü alınmıştır.

Antikor hazırlama işlemi;

- 1.) Satın alınan anti-EPCAM antikorumun konsantrasyonu 1mg/ml (stok-1) şeklindedir.
- 2.) Stok-1 çözeltisinden 10µl alınarak ependorf tüpüne konulmuştur. Ardından üzerine 990µl fosfat tampon çözeltisi (PBS) eklenmiştir ve böylece stok-2 elde edilmiştir.



Şekil 3.10. Anti-EpCAM antikorunun hazırlanması

- 3.) Satın alınan anti-EPCAM (stok-1) -80°C de saklanırken elde ettiğimiz stok-2 çözeltisi -20°C de saklanmaktadır.
- 4.) Optimizasyon için dört farklı konsantrasyonda antikor (Anti-EPCAM) hazırlanmıştır.
- 5.) Bu konsantrasyonlar sırasıyla; 0,75/ 1/ 1,25 ve 1,5 $\mu\text{g/mL}$ şeklindedir.
- 6.) 0,75 $\mu\text{g/mL}$ 'lik anti-EPCAM hazırlamak için; stok-2 çözeltisinden 1,5 μl alınır ve 20 μl 'ye tamamlamak için üzerine 18,5 μl PBS eklenir. Benzer olarak hazırlanan 20 μl 'lik antikor çözeltileri için miktarlar şu şekilde ifade edilmiştir; 1 $\mu\text{g/mL}$ için 2 μl stok-2 +18 μl PBS; 1,25 $\mu\text{g/mL}$ için 2,5 μl stok-2 + 17,5 μl PBS; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ için 3 μl stok-2 + 17 μl PBS.
- 7.) QTF'ler hazırlanan antikor derişimlerinin bulunduğu ependorf tüplerine 10 dk boyunca daldırılmış ve 30 dk kurutulmuştur. Ardından QTF'lerin frekans ölçümleri alınmış ve kaydedilmiştir.

QTF çevirici yüzeyine tutuklanmak istenen anti-EPCAM'in etkin konsantrasyonunu tespit edebilmek adına dört deney seti hazırlanmış ve ilk iki aşamaları ortak bir şekilde yürütülmüştür. Bu aşamalar;

- 1.) Dört farklı QTF'in vakumlu kapakları çıkartılarak işlem görmemiş hali için frekans ölçümleri alınmıştır.
- 2.) Ardından 1mM'lık T3BA ile yüzey aktivasyonları sağlanıp kurutulmuş ve frekans değerleri kaydedilmiştir. Belirtilen ilk iki aşama bu noktada son bulmuştur.
- 3.) Bundan sonra deney setleri numaralandırılmış ve antikor hazırlama basamaklarının son maddesi uygulanmıştır (Dört farklı anti-EPCAM konsantrasyonuna sahip (0,75/ 1/ 1,25 ve 1,5 $\mu\text{g/mL}$) olan çözeltiler içerisinde yüzeyi aktive (1mM,T3BA) edilmiş olan QTF (antikor tutuklamak için) 10 dk bekletilip 30 dk kurutulduktan sonra frekans ölçümleri alınmış ve kaydedilmiştir).

3.3.2.3 Antijen (Rekombinant h-EpCAM) cevabı

Liyofilize şekilde satın alınan h-EPCAM (Şekil 3.11) veri sayfası (datasheet) dikkate alınarak hazırlanmış ve muhafaza edilmiştir. Aşağıda h-EPCAM hazırlık aşamalarına yer verilmiştir (Protokol-5).

Protokol-5:Antijen (rekombinant h-EPCAM protein ab155637) hazırlık aşamaları

- 1.) Satın alınan 100 µg'lık h-EPCAM (Stok-1), datasheet'te belirtildiği üzere ilk önce 0,1 mL steril distile su (ddH₂O) ile sulandırılmıştır.
- 2.) Ardından son konsantrasyonu 1000 µg/mL olacak şekilde üzerine PBS (Fosfat tampon çözeltisi) ilave edilmiş ve karıştırılarak homojen hale gelmesi sağlanmıştır (Stok-2).
- 3.) Bütün bu aşamaların sonunda hazır hale getirilen h-EPCAM -20⁰'de saklanmaktadır.



Şekil 3.11. EpCAM antijeni

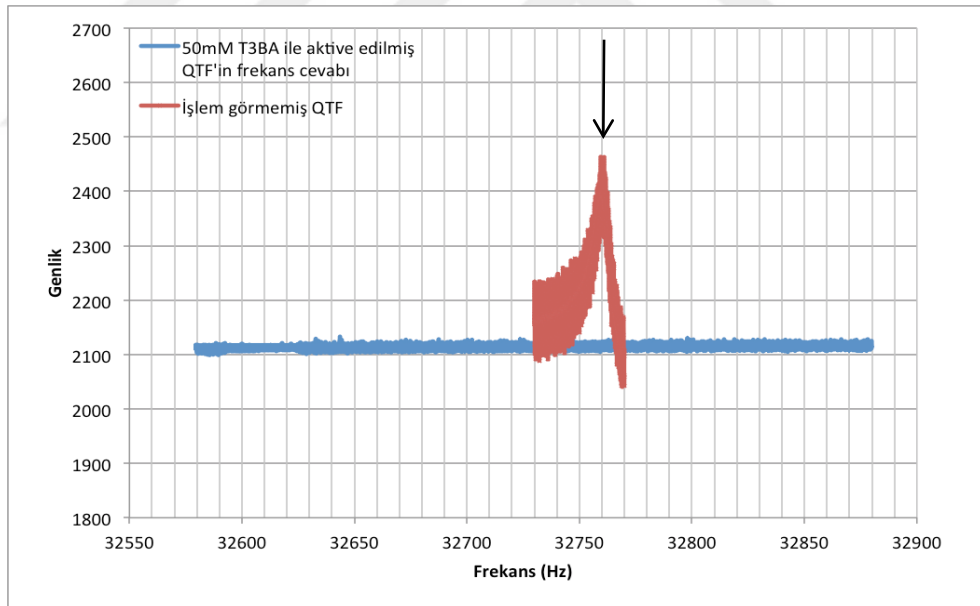
- 4.) Optimizasyon için üç farklı konsantrasyonda antikor (Anti-EPCAM) hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar sırasıyla; 0,75/ 1 ve 1,25 µg/mL şeklindedir.
 - 5.) 0,75 µg/mL'lik anti-EPCAM hazırlamak için; stok-2 çözeltisinden 1,5 µl alınır ve 20 µl'ye tamamlamak için üzerine 18,5 µl PBS eklenir. Benzer olarak hazırlanan 20 µl'lik antikor çözeltileri için miktarlar şu şekilde ifade edilmiştir; 1 µg/mL için 2 µl stok-2 +18 µl PBS; 1,25 µg/mL için 2,5 µl stok-2 + 17,5 µl PBS.
 - 6.) QTF'ler hazırlanan antikor derişimlerinin bulunduğu ependorf tüplerine 10 dk boyunca daldırılmış ve 30 dk kurutulmuştur.
 - 7.) Ardından QTF'lerin frekans ölçümleri alınmış ve kaydedilmiştir.
- Metot bölümünde elde edilen ve kaydedilen bütün veriler sonuç bölümünde incelenmiştir.

4. BULGULAR

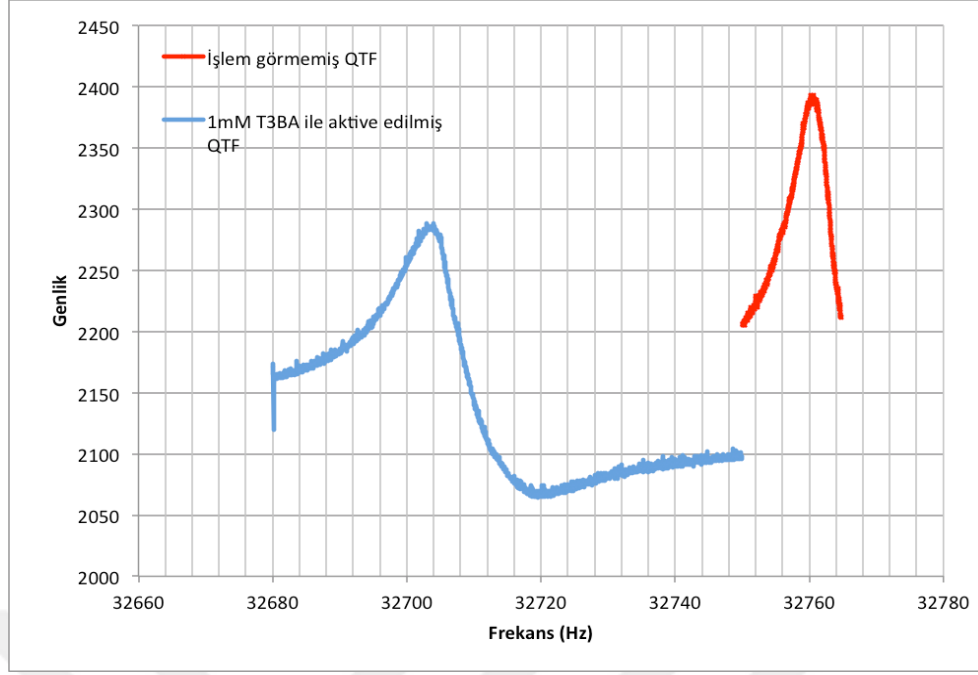
4.1. QTF İmmünoensör Olarak Yapılandırma: Transferrin

4.1.1. QTF yüzey aktivasyonu

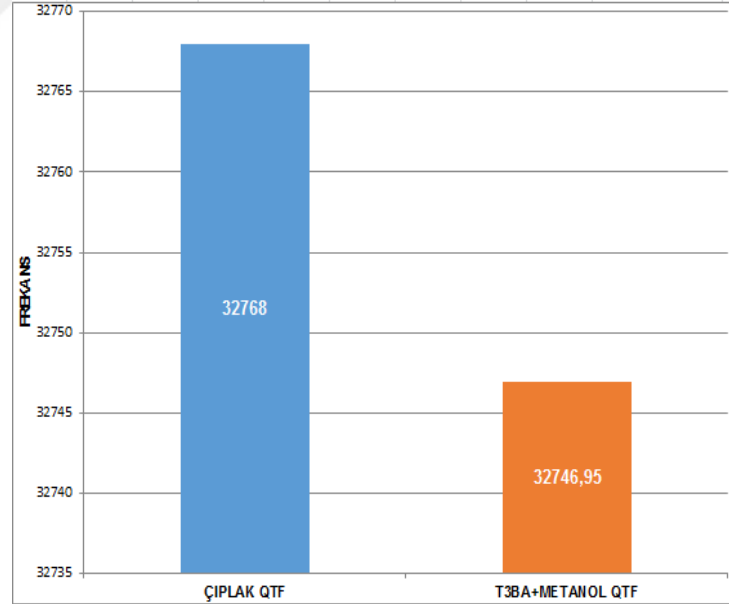
Transferrini algılamak için öncelikle protokol 1 uygulandığında (T3BA, 50mM), kimyasal modifikasyon sonrası herhangi bir sinyal alınamamıştır örnek sinyal verisi Şekil 4.1’de sunulmuştur. Görüldüğü üzere, işlem görmemiş QTF belli bir frekans değerinde pik verirken (siyah okla işaret edilmiştir), kimyasal modifikasyon sonrasında QTF çeviriciden herhangi bir pik verisi elde edilememiştir. Bunun, QTF üzerinde fazlaca kütle binmesinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Bu öngörüye göre, T3BA konsantrasyonu seyreltilerek 10 mM’da deneme yapılmıştır. Fakat benzer şekilde, yine bir pik gözlenememiştir. Bunun üzerine T3BA, 1mM derişimde hazırlanarak yukarıdaki çalışma protokolü tekrar uygulanmıştır (Şekil 4.2). Bu defa hem sinyal alınmış hem de işlem görmemiş QTF’e göre, azalan yönde frekans pik değeri kayması, yani kütle birikimi gözlenebilmiştir.



Şekil 4.1. QTF yüzeyinin 50 mM derişimdeki T3BA ile aktivasyonu- ham veriler



Şekil 4.2. QTF yüzeyinin 1mM derişimdeki T3BA ile aktivasyonu- ham veriler
Bu sonuç üzerine, 1mM’lık derişimde T3BA kimyasal modifikasyonları üç paralel örnekte çalışılmış ve ortalama frekans kayma değeri Şekil 4.3’te sunulmuştur.

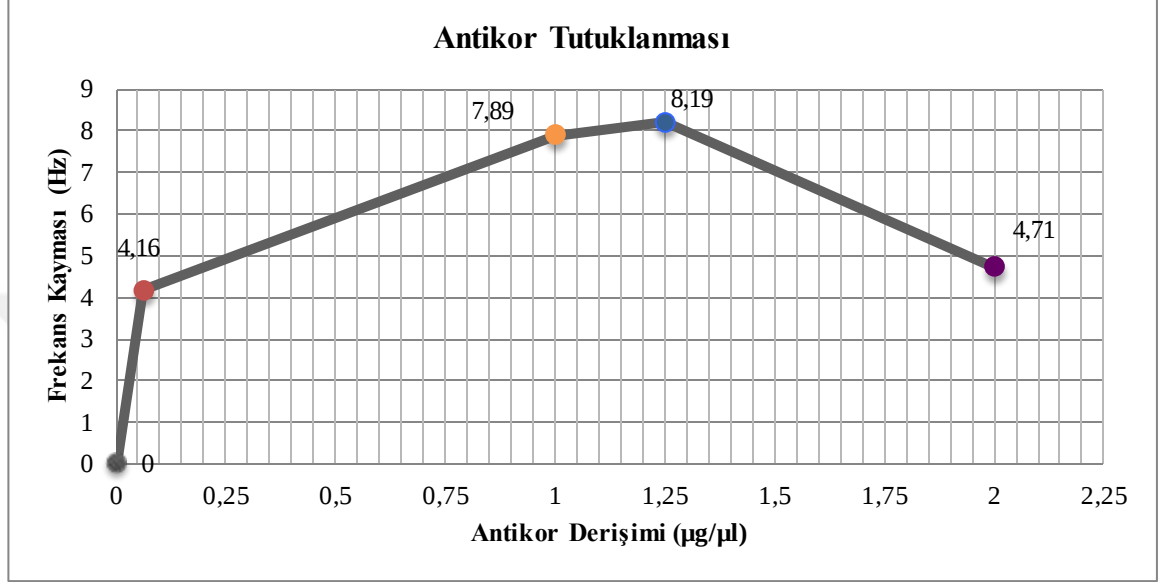


Şekil 4.3. QTF çevirici kimyasal aktivasyonu, 1 mM, T3BA- en az üç tekrarlı örnek

Şekil 4.3’te görüldüğü üzere, ortalama 32768 ± 5 Hz olan işlem görmemiş QTF pik frekansları, 32746 ± 9 Hz değerine düşmüştür. Kimyasal aktivasyon sonrasında, 1mM, T3BA konsantrasyonunda, ortalama, $\Delta f_{akt,1mM} = 22$ Hz’lik negatif yönde frekans kayması, bize çevirici yüzey üzerinde kütle birikimini göstermiştir.

4.1.2. Aktive edilmiş QTF çevirici yüzeylerine antikor (anti-TRC2) tutuklanması

Hazırlama protokolüne (Protokol 2) uygun nitelikte farklı derişimde antikorlarla (0,0625 - 1 -1,25 - 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) , QTF'ler etkileştirilmiş ve her biri için pik frekans kayma değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4.Farklı konsantrasyonlarda antikorum (TRC2) etkisiyle frekans kaymalarının karşılaştırılması

Burada, denenen her farklı antikor çözelti konsantrasyonunda, negatif yönde bir frekans kayması gözlenmiştir. Bu durum, QTF çevirici yüzeylerinde antikorların tutuklanabildiğini göstermektedir. Şekil 4.4'ten anlaşılacağı üzere en fazla frekans kaymasının gözleendiği antikor çözelti konsantrasyonu 1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olmuştur. Ayrıca, QTF çeviricilerin etkileştirildiği antikor çözeltisi konsantrasyonu arttıkça önce bir artış, sonrasında ise azalma gözlenmiştir.

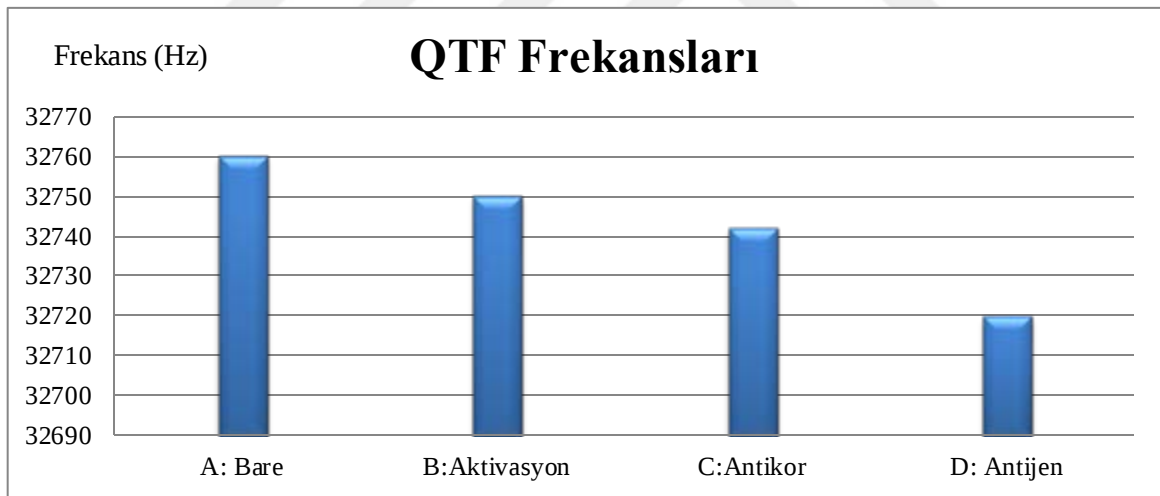
4.1.3. Antijen (Transferrin) cevabı

Devam eden seride, 1mM T3BA ile etkileştirilmiş, sonrasında 1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ referans antikor çözeltisinde (en fazla frekans kayması olan ve bu yüzden yüzeye antikorum en fazla tutuklandığı düşünölen) bekletilmiş örneğin, transferin antijenine (antikorla aynı derişimdeki) karşı cevap sinyali elde edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Referans analit üzerinden immünosensör yapılandırılma sonuçları

Örnek Niteliği	Pik frekans değeri	Frekans Kayması
İşlem görmemiş QTF (Bare: Çıplak)	32760	
T3BA ile aktivasyon	32750	$\Delta f_{akt,1mM} : 10$
Antikor Tutuklama	32742,11	$\Delta f_{akt,1mM} / anti,1.25 \mu g/\mu l : 7,89$
Antijen (referans analit) cevabı	32720	$\Delta f_{akt,1mM} / anti,1.25 \mu g/\mu l / antijen : 22,11$

Burada her basamakta, negative yönde pik frekans değerinde kayma gözlenmiştir (Tablo 4.1). Bu husus, yapılandırılan QTF immünosensörün, referans analiti ölçebildiğini göstermektedir. Şekil 4.5'te her basamaktaki pik frekans değerinin düşüşleri daha net ortaya konmuştur.



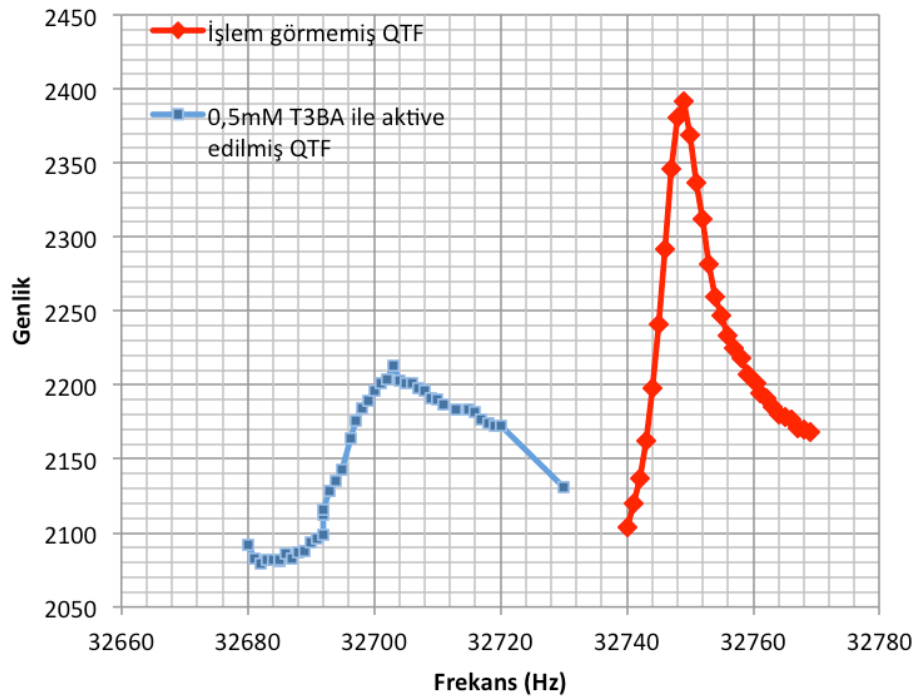
Şekil 4.5. QTF immünosensör yapılandırılma basamaklarındaki pik frekans değişimleri ve referans analite (Transferrin) cevap

Sonuç olarak, antikorlar ağır ve hafif uçları ile benzerlik gösteren immünoglobulinlerdir. Burada kritik nokta, antikorların inorganik yüzeylere (kuvars, silika ve altın bazlı QTF çevirici yüzeyi) tutuklanabilmesidir.

4.2. QTF İmmünosensör Olarak Yapılandırma: CTC

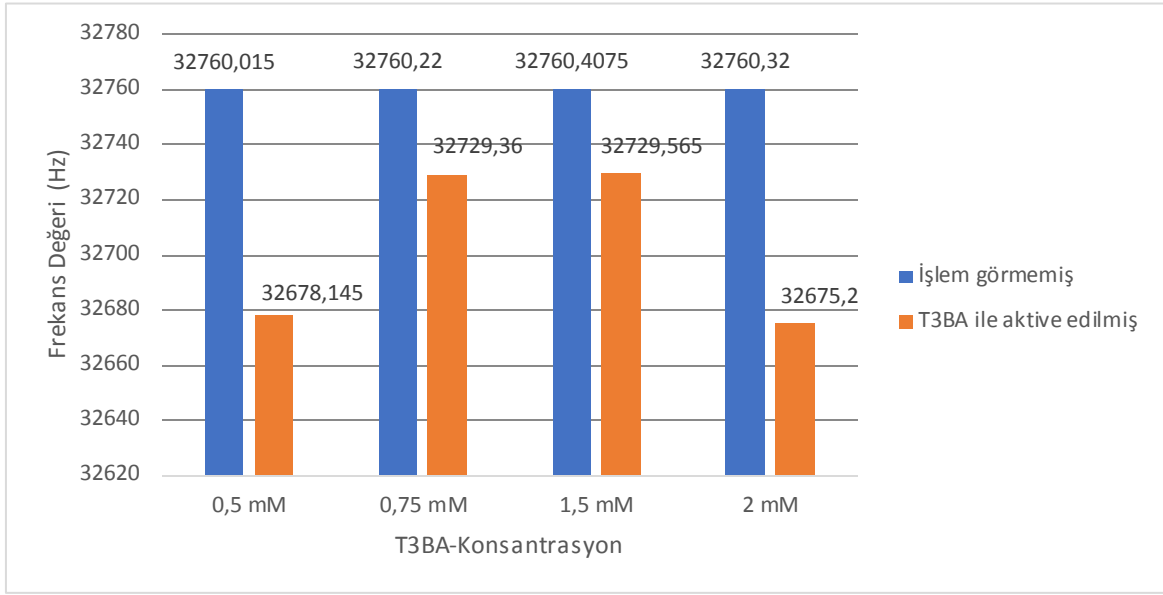
4.2.1. QTF yüzey aktivasyonu

İşlem görmemiş QTF pik frekansı not edildikten sonra, protokol-1 uygulanmıştır. Sadece başlangıç miktarları değiştirilen setlerde (Aktivasyon süresi: 3 saat ve %99'lık metanol çözeltisi) , kimyasal modifikasyon sonrasındaki ölçümlerde frekans pik değerleri elde edilebilmiştir (Şekil 4.6).



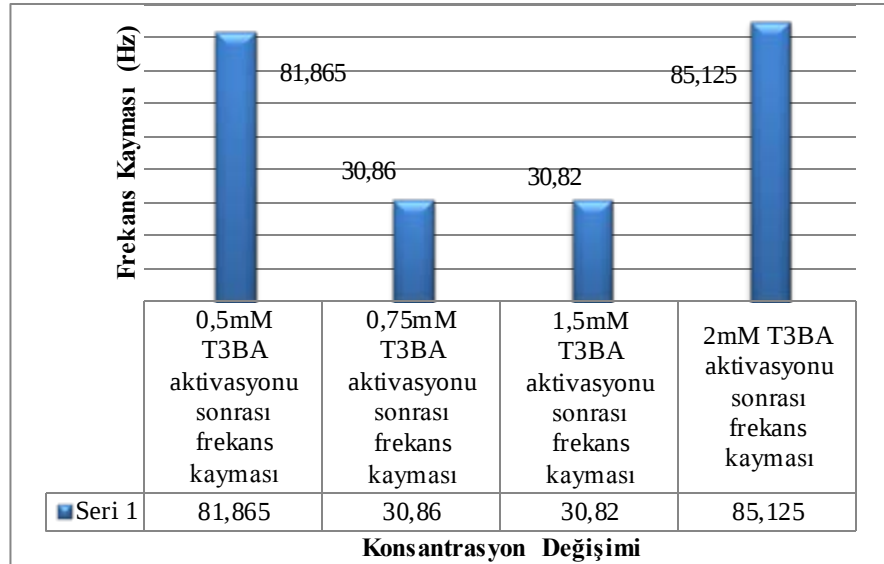
Şekil 4.6. QTF çevirici kimyasal aktivasyonu, 0.5 mM, T3BA

Burada da istenilen nitelikte negatif yönde pik frekans kayması, yani QTF üzerinde kütle birikimi, her derişim için gözlenebilmiştir (Örnek bir data: Şekil 4.6). Tüm setler için, işlem görmeden önceki pik frekans değeri ve kimyasal modifikasyon sonrasındaki değerler Şekil 4.7'de sunulmuştur.



Şekil 4.7. Değişen T3BA konsantrasyonlarında QTF çevirici kimyasal aktivasyonu

Farklı konsantrasyonlarda aktivasyon ajanına maruz kalan QTF'lerin frekansındaki kayma miktarının en fazla 2mM konsantrasyon değerinde olduğu görülmüştür ($\Delta f_{akt, 2mM} = 85,125$ Hz) (Şekil 4.8). İkinci olarak en fazla kaymanın görüldüğü nokta ise 0,5mM konsantrasyonudur ($\Delta f_{akt, 0.5mM} = 81,865$ Hz kayma miktarı). 0,75 mM ile 1,5 mM konsantrasyonlarının gerçekleştirdiği kayma miktarları ise birbirlerine oldukça yakın değerlerdedir (30,82-30,86Hz).

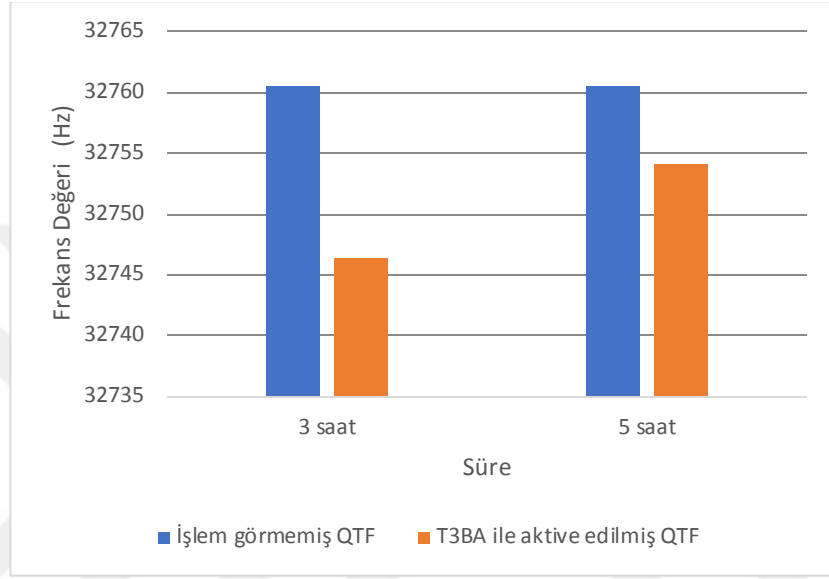


Şekil 4.8. Değişen T3BA konsantrasyonlarında QTF çevirici kimyasal aktivasyonu sonrası frekans kayma değerleri, Δf_{akt}

Sonuç olarak, aktivasyon ajanının derişimindeki artış ya da azalmanın, çevirici yüzeyde kütle birikimi olarak belli bir eğilim yarattığı söylenemez. Fakat Diğer taraftan,

antijen yani analiz edilecek hedef yapı ölçümüne kadarki toplam kütle birikimlerinin takip edilmesinin daha önemli bir veri olduğu düşünülmüştür.

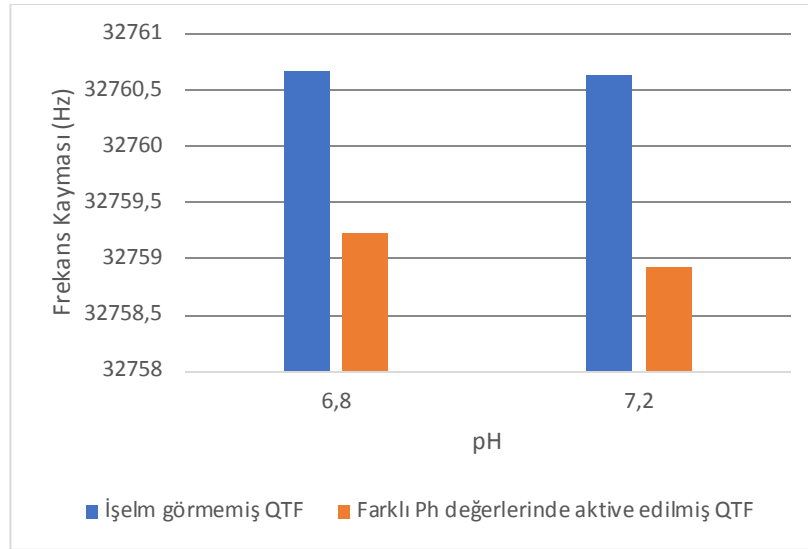
Bu protokolden sonra süre değişimine bağlı frekans kayması gözlemek adına (Protokol 2) QTF'leri aktivasyon ajanı sabit konsantrasyonda tutulmuş (1mM), fakat çözelti içerisinde bekletme süresi rutin olan 3 saatten, 5 saat değerine çıkarılmıştır. Diğer bütün kurutma ve koşullar sabit bırakılmıştır. Pik frekanstaki değişimler Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. QTF'lerin aktivasyon ajanıyla muamele süresinin değişimine bağlı frekans değerleri

Şekil 4.9'dan anlaşılaacağı üzere aktivasyon süredeki artış, QTF yüzeyinde T3BA nedeniyle oluşan kütle birikimlerinde azalmaya neden olmuştur. Bu durumda, 3 saatten daha az bekletme süresi denenebilir. Diğer tarafta kimyasal bağlanma için de beklenilmesi gereken sürenin altına inilmemesine dikkat edilmelidir. 5 saatlik aktivasyon sonrasında, yaklaşık 6 Hz'lik frekans düşüşü gözlenirken, 3 saatlik aktivasyon sonrasında, önceki denemelere paralel nitelikte yaklaşık 14 Hz'lik bir frekans kayması elde edilmiştir.

Protokol-3 kapsamında hazırlanan farklı pH değerlerine sahip aktivasyon ajanı T3BA ile QTF 'in etkileştirilmesi sonucunda elde edilen değerler şekil 4.10'da sunulmuştur.

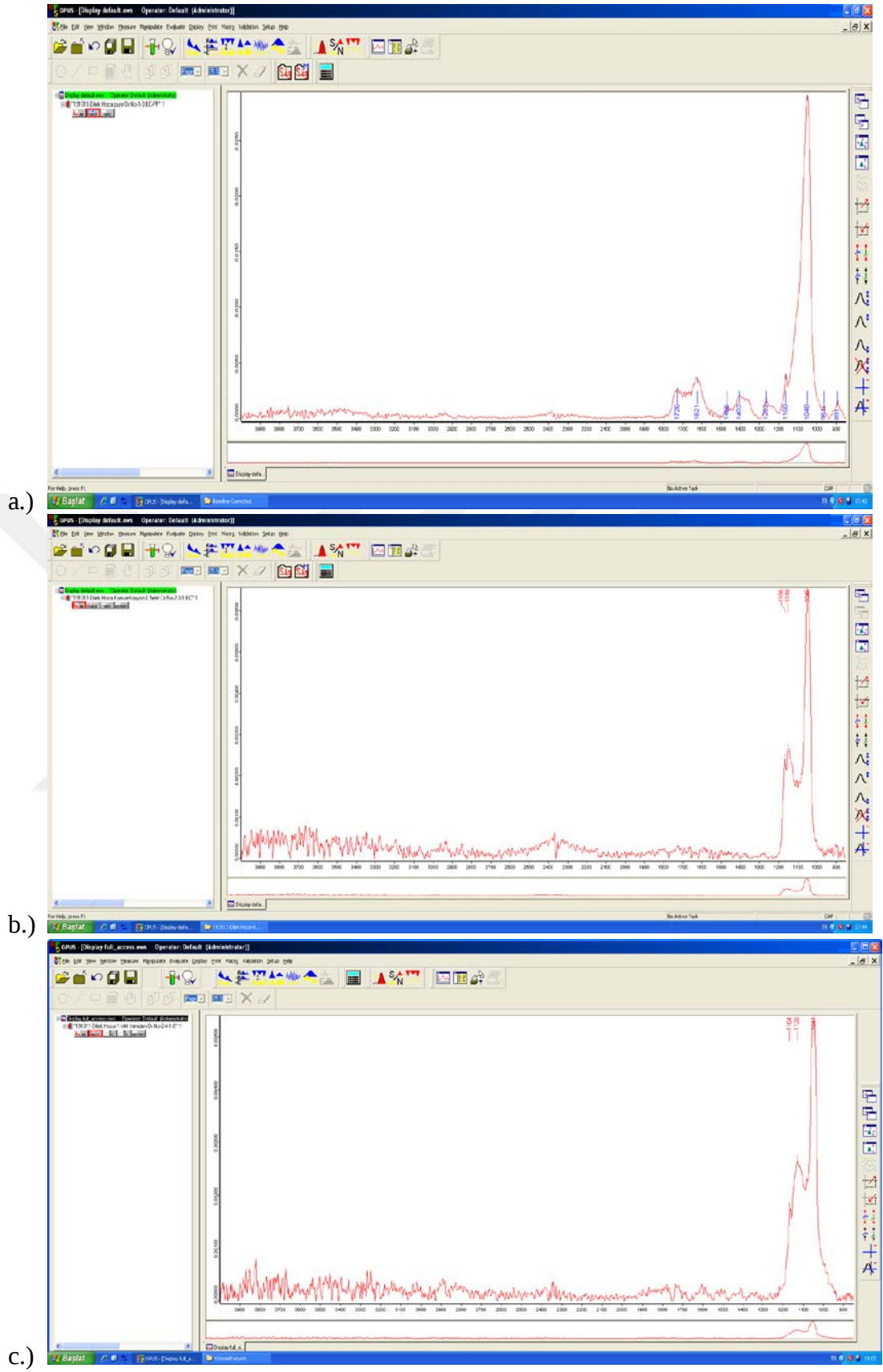


Şekil 4.10. Farklı ortam pH değerlerinde aktive edilen QTF'lerin frekans kayması

Ortam pH değeri 6,8 iken frekansta meydana gelen kayma (düşüş) 1,43 Hz iken pH değeri 7,2 ye çıkarıldığında ise frekanstaki kayma miktarının 1.72 Hz olduğu görülmüştür. Bu düşüş değerleri oldukça küçüktür. Sonuç olarak, %99 methanolde aktivasyon ajanı hazırlanması durumunda, daha belirgin kütle birikimleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar bize, aktivasyon aşamasında pH ve tamponlama yapılmaması gerektiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, %99 methanol çözütüsü ile çalışılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu değerlendirmelerin yanı sıra, QTF çevirici yüzeylerinin kimyasal karakterizasyonlarına da başlanmıştır.

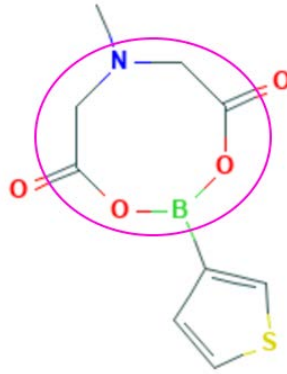
4.2.2. QTF çeviricilerin modifikasyonu aşamasında, karakterizasyon testleri

Bu aşamada, işlem görmemiş QTF ve farklı derişimlerde, farklı süre ve pH'da kimyasal yolla modifiye edilmiş QTF çeviriciler, yüzey kimyası incelemesi için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisinde (FTIR-ATR) (Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü) test edilmiştir. Burada, örneklerin çok ince olması ve ilk defa FTIR-ATR'de çalışılması nedeniyle bazılarında kayıplar olmuştur. Sonuç olarak, ilk aşamada farklı derişimde kimyasal olarak aktive edilmiş örneklerin spektrumları Şekil 4.11'de sunulmuştur.



İşlem görmemiş, çıplak (bare) QTFde varolan kimyasal bağlar, 1726 cm^{-1} , 1621 cm^{-1} , 1466 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} , 1262 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 1048 cm^{-1} , 961 cm^{-1} , 891 cm^{-1} dalga sayılarında gözlemlenmiştir (Şekil 4.11.a). Hem 0.5 mM 'lık hem de 1 mM 'lık T3BA ile aktivasyon sonrasında, $1726\text{--}1060\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki bu bantların tümüyle kaybolması, aktivasyon sonrasında kütle birikimi olduğunu kanıtlamaktadır. QTF çevirici yüzeyindeki kimyasal yapı, kimyasal modifikasyonda oluşan kaplama tabakası sonucu alt katmanlarda kalmış ve QTF çeviricide tespit edilen bu bağlar, tümüyle kaybolmuştur.

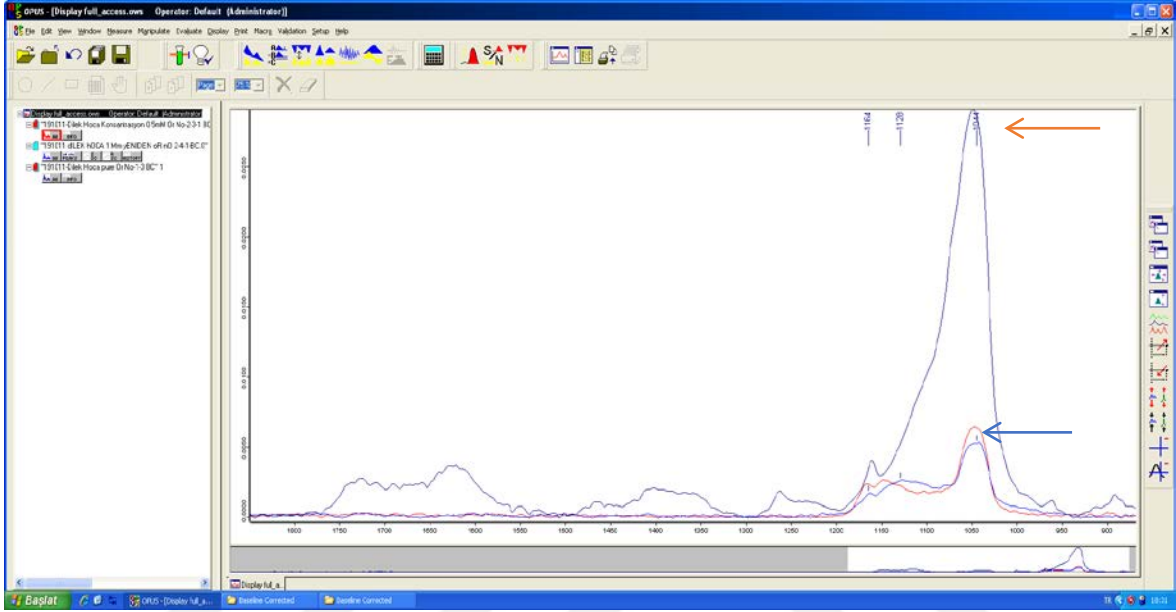
Diğer taraftan, her iki farklı derişim denemesi için T3BA ile aktivasyon sonrasında yüzeyde görülebilen bağların dalga sayıları 1166 cm^{-1} , 1148 cm^{-1} , 1046 cm^{-1} olarak belirmiştir (Şekil 4.11.b ve Şekil 4.11.c). Bu dalga sayıları, C-C, C-N, B-O, C-O, B-C, B-O-H bağlarının olası olduğu bölgelerdir. Burada, kimyasal aktivasyon ajanımızın beklediğimiz nitelikte yönlenerak QTF çevirici yüzeyinde modifikasyon yapabildiğine dair önemli bir kanıt mevcuttur. Diğer taraftan, Şekil 4.12'de gözüktüğü üzere, -S içeren kısım çeviriciye doğru yöneldiğinden, aktivasyon sonrasında S-H bağı ($2500\text{--}2600\text{ cm}^{-1}$ bandında çıkmaktadır) görülmemiştir. Bu tespiti, C=C bağlarının da ortaya çıkmaması desteklemektedir. Bu iki bağ, alt kısmında (Şekil 4.12 pembe halkaya alınmış bölge üst kısım/ işaretli olmayan bölge alt kısım) bulunmaktadır. Dolayısıyla, S-H ve C=C bantları altta kalarak, istenilen nitelikte altın kaplı QTF üzerine yönlendirilmiştir.



Şekil 4.12. Kimyasal aktivasyon ajanı T3BA yönelimi

Diğer taraftan, farklı derişimde kimyasal modifikasyon sonrasındaki örneklere ait spektrumlarda, bantlar $1200\text{--}1000$ arasına dağılmış durumdadır. Bu aralık böyle bir molekül için küçük bir aralıktır. Bu durum, molekülün (T3BA) vibrasyonel modlarının ya çok az olduğunu ya da molekülün kıvrılmış olduğuna işaret etmektedir. Diğer taraftan halkalı tiofen yapısı ve altta kalma teorimiz, vibrasyonel modlarının görülmemesini

destekler niteliktedir. Sonuç olarak buraya kadar elde edilen spektrum sonuçları, öncelikle istenildiğimiz yönlenmede bir kimyasal modifikasyon yapabildiğimizi kanıtlar niteliktedir. Diğer taraftan aktivasyon derişimine bağı olarak farklı gördüğümüz frekans kaymalarını açıklamak adına Şekil 4.13'te sunulduğu üzere, işlem görmemiş ve modifiye örnekler karşılaştırmalı olarak incelenmeye çalışılmıştır.

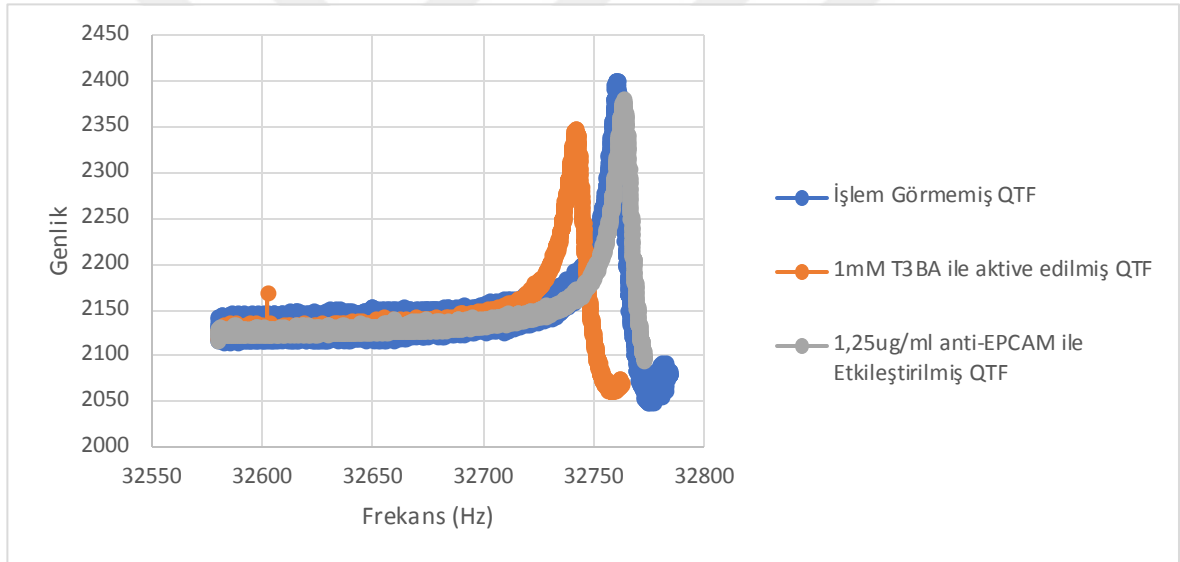


Şekil 4.13. Değişen aktivasyon ajanı konsantrasyonlarında QTF çevirici yüzey özellikleri karşılaştırmaları (Turuncu ok: işlem görmemiş QTF; Mavi ok: Farklı derişimde T3BA aktivasyonları)

Burada, farklı derişimde etkileştirilen örnekler arasında az bir farklılık olmasına rağmen (Şekil 4.13-mavi ok), yine vibration modellerının az olmasına ya da kıvrılmaya bağı olarak gözlenemesine neden olmuştur. Aynı durum pH ve süre değişiklikleri için de ortaya çıkmıştır. QTF sensor sisteminin geliştirilmesi ve yapılandırma tamamlanmıştır. QTF çevirici yüzeylerinin modifikasyonu aşamalarında, kimyasal aktivasyon ajanının, immünosensör yapılandırması için kullanılabileceği kanıtlanmıştır. Ayrıca bu aktivasyon ajanının uygun yönelimle QTF çevirici yüzeyine konumlandığına dair kimyasal değerlendirmeler, FTIR-ATR analizleri ile elde edilmiştir. Aktivasyon ajanı çalışma konsantrasyonu şu aşamada 1mM olarak belirlenmiştir. Bu çalışma koşulunda, immünosensör yapılandırabileceği kanıtlamıştır. Diğer taraftan, aktivasyon hazırlama çözücüsü olarak metanol bundan sonraki deneylerde her zaman kullanılacaktır (pH değiştirilmeyecektir).

4.2.3. Aktive edilmiş QTF çevirici yüzeylerine antikor (anti-EpCAM) tutuklanması

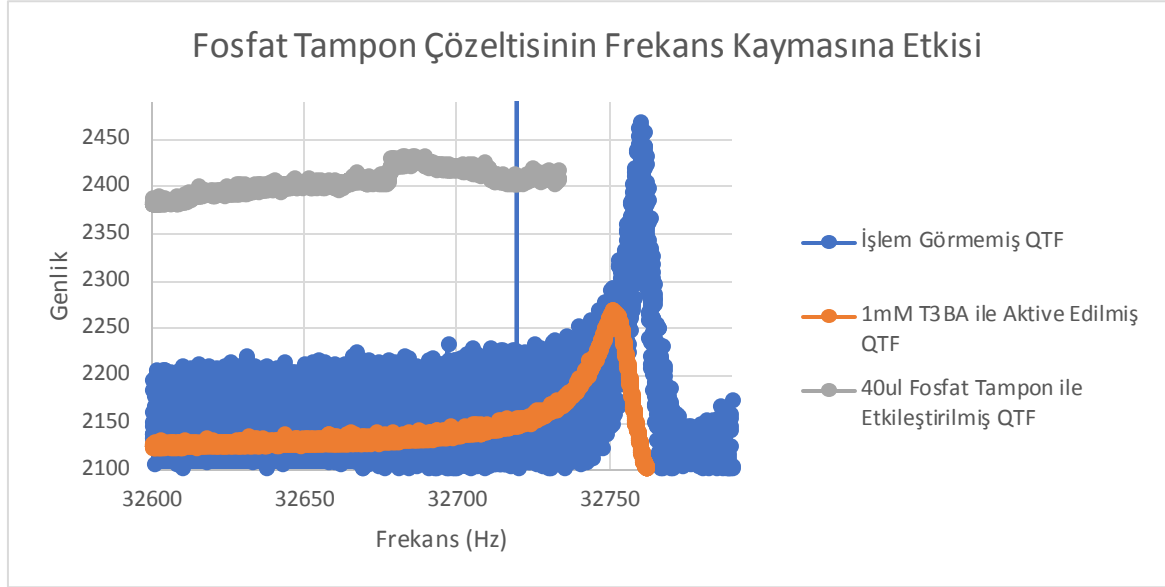
Distile su içinde anti-EpCAM hazırlanarak aktivasyon ve tutuklama çalışmalarına başlanmıştır. T3BA aktivasyon ajanı 1mM konsantrasyonunda sabit tutulup antikor derişimi önceki verilere dayanarak 1,25 µg/ml olarak seçilmiştir. Anti-EPCAM ile stok hazırlığı için distile su (dH₂O) da denenmiş fakat anlamlı veriler oluşmamıştır. Frekans kaymasını ters yönde etkileyerek aktivasyon sonrasında ki frekans antikor etkileşimi sonrasında işlem görmemiş QTF'in frekans değerlerine yakın bir frekans tepkisi göstermiştir (Şekil 4.14). Bu sonuç ile birlikte aktivasyon da herhangi bir olumsuz etki oluşmamış fakat antikor etkileşimi sonrasında yüzeyde tutuklu olan diğer moleküllerinde sıyrıldığı kanaatine varılmıştır. Bu nedenle sonuç anlamlı olarak değerlendirmeye alınmamıştır.



Şekil 4.14. Distile su (dH₂O) hazırlanmış anti-EpCAM ile etkileştirilmiş QTF immunosensörün cevabı

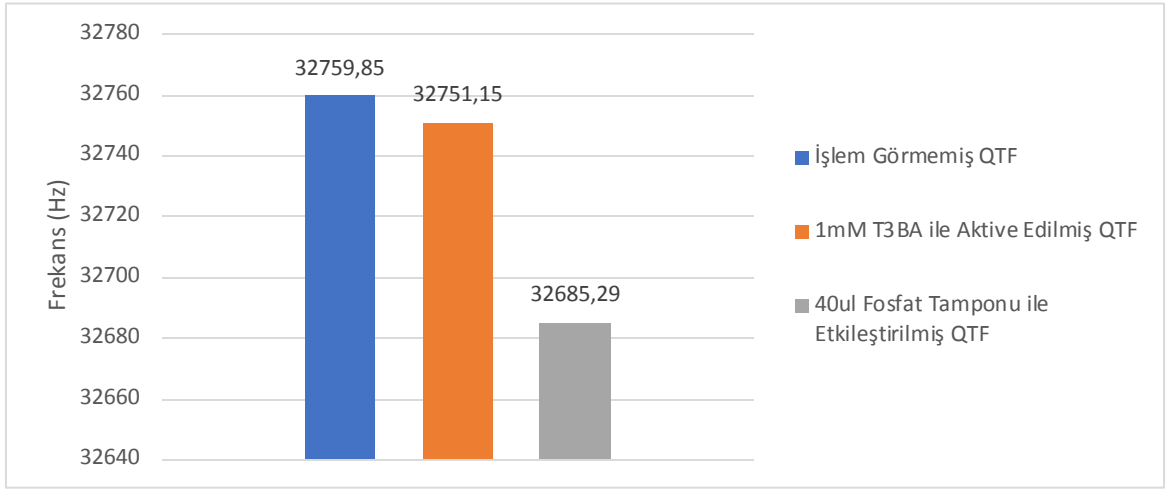
Bu sonuç sonrasında, anti-EpCAM ana üretici firmaya ulaşarak ve literatürden teknik özellikleri detaylı araştırılarak, fosfat tamponu içerisinde (pH:7.4) stok çözeltisi hazırlanmasına karar verilmiştir. Tutuklama işlemine geçmeden önce, sadece fosfat tamponunun, tek başına, QTF üzerinde herhangi bir cevap sinyal etkisi oluşturup oluşturulmadığı kontrol edilmiştir. Aktivasyon protokolü (1mM,T3BA+metanol,3 saat bekletme ve 30 dk kurutma) aynı şekilde uygulanmış ve frekans ölçümü alındıktan sonra, QTF çeviricisi fosfat tamponu ile etkileştirilmiştir. 40µl'lik fosfat tampon çözeltisi (pH:7,4) ependorf tüpüne konulmuştur. Yüzeyi aktif QTF'ler 40µl'lik fosfat tampon

çözeltisi içerisine daldırılmıştır. Bu etkileşim 10 dk sürmüş ardından 30 dk kurutmaya bırakılmıştır. Sırasıyla İşlem görmemiş QTF, aktive edilmiş QTF ve fosfat tampon ile etkileştirilmiş QTF frekans değerleri ölçülmüştür (Şekil 4.15).



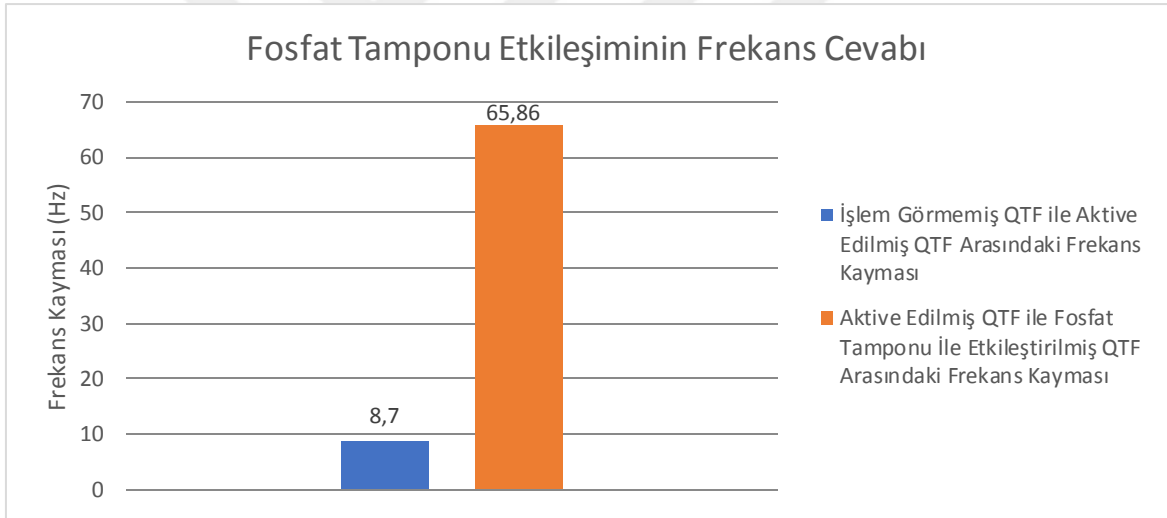
Şekil 4.15. Fosfat tamponu etkisi (pH:7.4): eş zamanlı ham veriler

İşlem görmemiş QTF frekans değeri 32759,85 Hz iken aktive edildikten sonra bu ölçülen frekans değeri 32751,15 Hz şeklinde düştüğü gözlemlenmiştir. Aktivasyon sonrasında fosfat tampon etkileşimi gerçekleştirilmiş ve frekans değeri 32685,29 Hz olarak ölçülmüştür (Şekil 4.16).



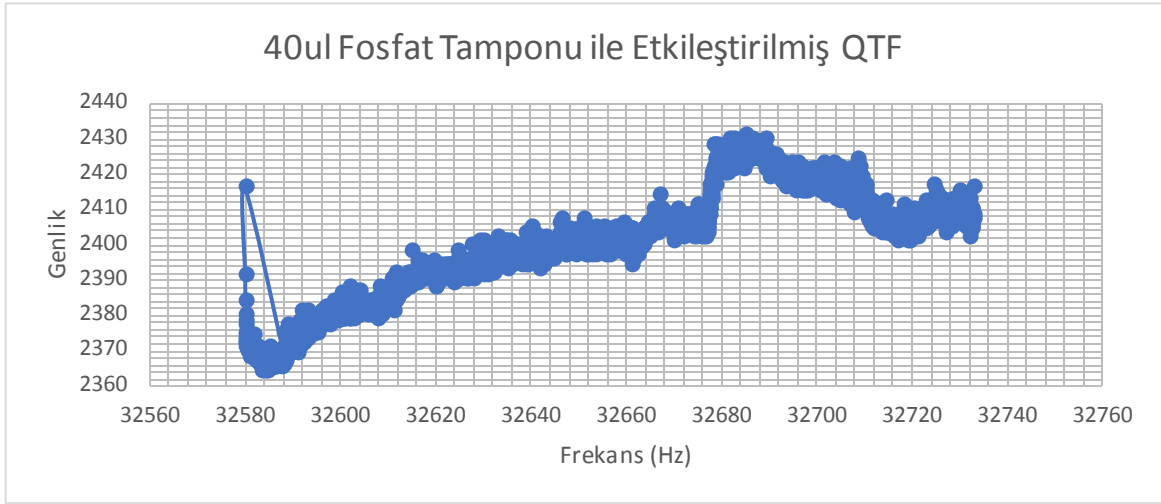
Şekil 4.16. Fosfat tamponu etkisi: pik frekans değerleri

Yapılan ölçümlerde, işlem görmemiş QTF ile aktive edilmiş QTF arasında 8,7 Hz'lik, aktive edilmiş QTF ile fosfat tamponu ile etkileştirilmiş QTF arasında ise 65,86 Hz'lik frekans kaymaları gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Fosfat tamponu etkisi; frekans kayma değerleri

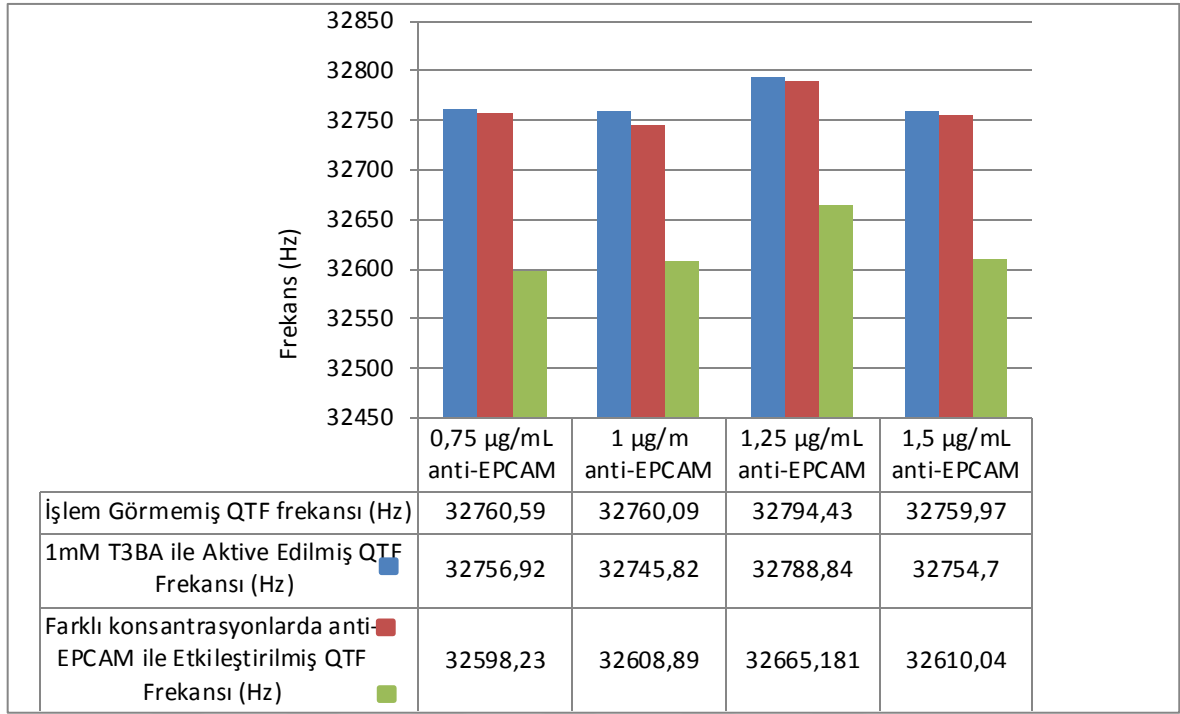
Her ne kadar bir frekans kayması var gibi gözlenmiş olsa da burada önemli husus, tam bir pik oluşumunun gözlenmemiş olmasıdır. Bu durum, Tampon ortamındaki ham veri detaylı olarak incelendiğinde ortaya çıkmaktadır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Tampon ortamındaki ham veri

Şekil 4.18'den anlaşılabacağı üzere, fosfat tampon çözeltisi ile etkileştirilmiş QTF frekans cevabı alışık olduğumuz dar bir bantta pik göstermemiştir. Bunun nedeni ise PBS varlığında QTF yüzeyinde fiziksel bağlanmaların olmasıdır. Böylece kimyasal olarak (kovalent bağlanma ile) yüzeye tutunma olmadığını kanıtlar nitelikte veriler elde edilmiştir.

Bu sonuçların devamında, PBS içinde anti-EPCAM seyreltilerek stok hazırlanmış ardından QTF'ler etkileştirilmiştir ve anlamlı veriler elde edilmiştir. Burada kritik husus, bir başlangıç antikor stok derişimini kestirebilmektir. QTF çevirici yüzeyler üzerinde antikor tutuklama çalışması literatürde de yer almadığı için, bu başlangıç derişimi, ancak bahsettiğimiz, anti-transferrinle yapılan ilk çalışmanın doğrultusunda seçilebilmiştir. Burada literatürde yer alan herhangi bir başka çeviricili sensör çalışmasını (QCM ya da SPE vs.) temel almak da çok doğru değildir. Çünkü QTF çeviriciler tel benzeri oldukça küçük yüzey alanına sahiptir ve yüzey elementer yapısı da oldukça farklıdır. Sonuç olarak, anti-transferrinle (TRC2) yapılan ön denemelerdeki antikor derişim konsantrasyonu temel alınmış ve anti-EpCAM tutuklanması için protokol-4 uygulanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda protokol-4' e uygun olarak hazırlanan antikorlar ile yüzeyi modifiye edilmiş QTF ile etkileştirildiğinde elde edilen veriler şekil 4.19'da gösterilmiştir.



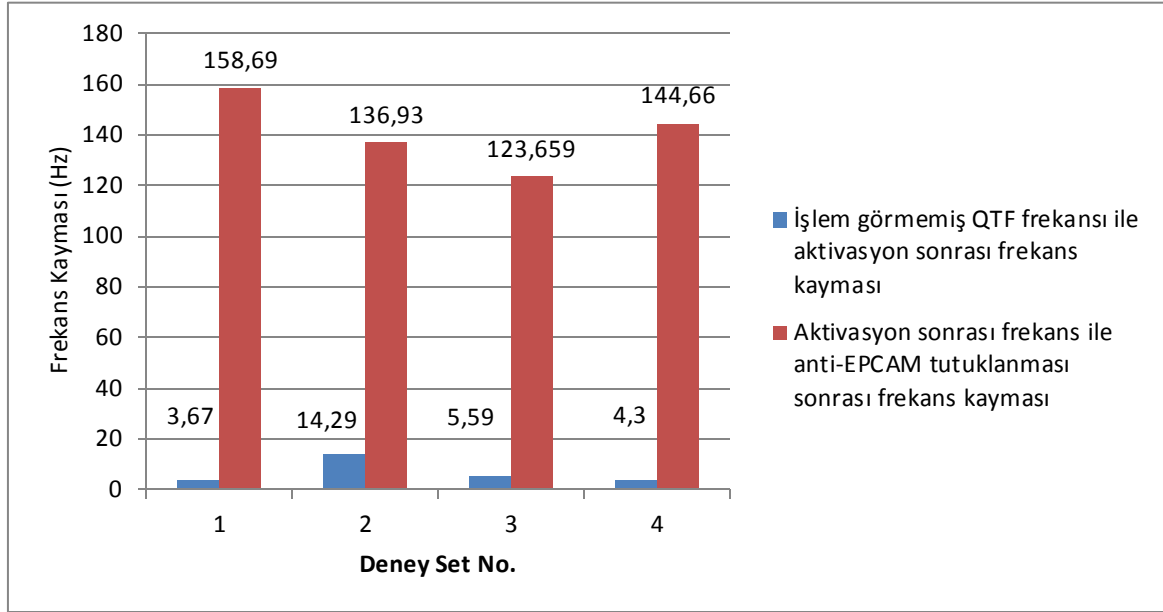
Şekil 4.19. Farklı konsantrasyon değerindeki anti-EPCAM ile etkileştirilmiş QTF’lerin frekans cevapları

Elde edilen bu frekans değerlerinin (Şekil 4.19) yorumlanabilmesi adına işlem görmemiş QTF ile yüzeyi aktive (1mM,T3BA) edilmiş QTF frekansı arasındaki farkın, aktivasyonu yapılmış QTF ile farklı konsantrasyonlarda anti-EPCAM ile etkileştirilmiş QTF’in frekans kaymaları dikkate alınmalıdır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. QTF’lerin yüzey modifikasyon aşamalarında elde edilen frekans ve frekans kayması değerleri

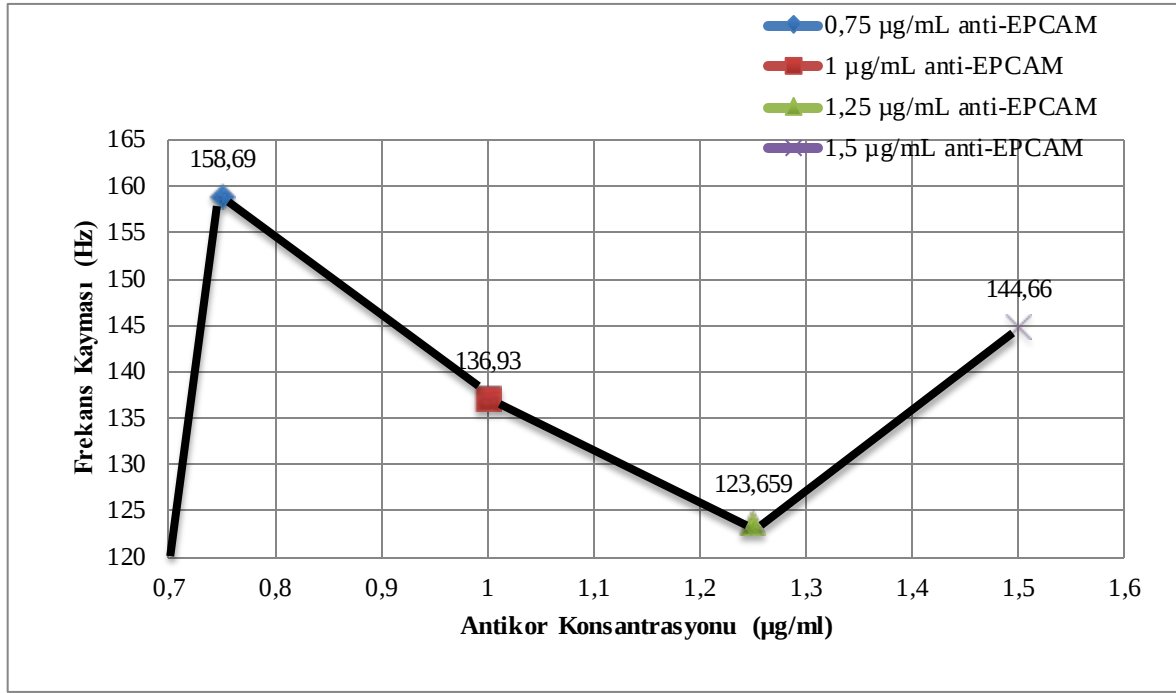
Deney Set No.	İşlem Görmemiş QTF Frekansı (Hz)	1mM T3BA ile Aktive Edilmiş QTF Frekansı (Hz)	Δf (Hz)	Anti-EPCAM Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Anti-EPCAM ile Etkileştirilmiş QTF Frekansı (Hz)	Δf (Hz)
1	32760,59	32756,92	3,67	0,75	32598,23	158,69
2	32760,09	32745,82	14,29	1	32608,89	136,93
3	32794,43	32788,84	5,59	1,25	32665,181	123,659
4	32759,97	32754,7	4,3	1,5	32610,04	144,66

Tablo 4.2’de, QTF frekanslarını etkileyen işlemler ile sonrasında ölçülen frekans değerleri ve kayma miktarları gösterilmiştir. Her aşamadaki frekans kayması negatif (-) yöne doğru olmuştur (Şekil 4.20). Bu durum olumlu bir şekilde QTF çeviricisinin yüzeyinde kütle birikimini kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4.20. İşlem görmemiş QTF frekansı ile aktivasyon işlemi sonrası frekans kayması (mavi), aktivasyon sonrası frekans ile farklı konsantrasyona sahip anti-EPCAM tutuklanma sonrası QTF frekans kayması (kırmızı)

Optimum antikor (anti-EPCAM) konsantrasyonunun belirlenebilmesi adına sırasıyla; 0,75/ 1/ 1,25 ve 1,5 $\mu\text{g/mL}$ 'lik çözeltilere maruz bırakılan yüzey aktif QTF'lerde meydana gelen frekanstaki kaymaların karşılaştırılması gerekmektedir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Farklı konsantrasyonlardaki antikorun (anti-EPCAM) etkisiyle, frekanstaki kaymaların karşılaştırılması, $\Delta f_{\text{anti-EPCAM}}$

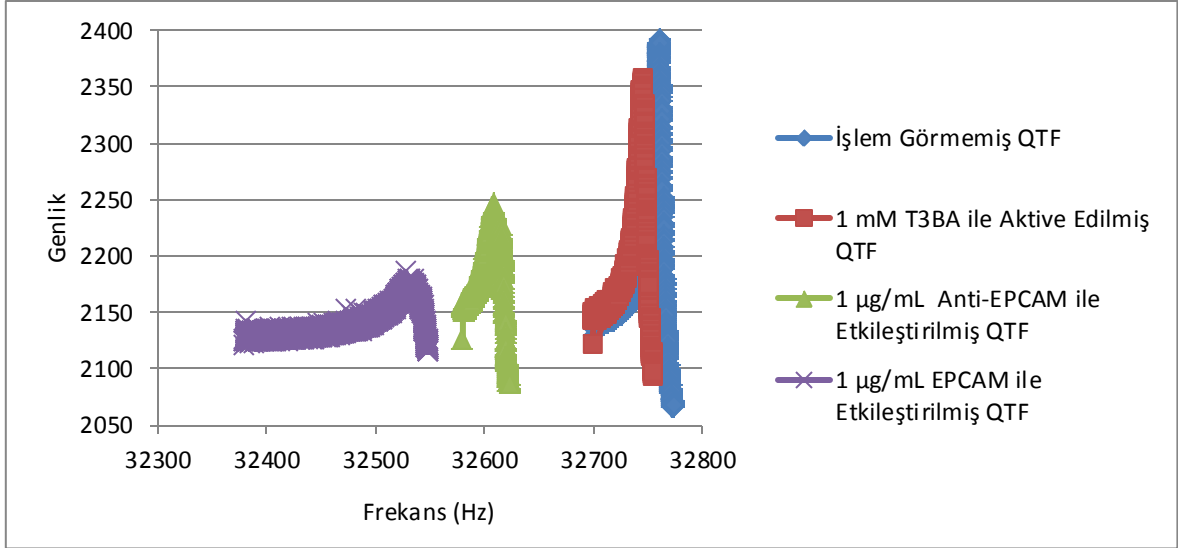
Yukarıda gösterilen Şekil 4.21’de 0,75/ 1/ 1,25 ve 1,5 $\mu\text{g/mL}$ ’lik anti-EPCAM çözeltilerine maruz bırakılan yüzeyi aktif QTF’lerde meydana gelen frekanstaki kaymaları sırasıyla 158,69/ 136,93/ 123,659 ve 144,66 Hz şeklindedir. Bu durumda en fazla frekans kayması etkisini sağlayan antikor konsantrasyonu 0,75 $\mu\text{g/mL}$ iken en düşük frekans farkını sağlayan antikor konsantrasyonu 1,25 $\mu\text{g/mL}$ olmuştur. Antikor konsantrasyonunda ki artış frekans kaymasıyla ters oranlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Ardından 1,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon değerine sahip olan antikor ile yüzeyi aktif QTF etkileşiminde frekans kaymasının miktarının artması dikkat çekici olmuştur.

Bu bölümde yapılan optimizasyon çalışmaları anti-EPCAM ile yaptığımız çalışmalarda optimum konsantrasyon değerinin en yüksek frekans kayması değerini sağladığı noktadan ziyade ortalama olarak bir frekans kaymasına neden olan konsantrasyon değerinin seçilmesi, QTF yüzeyinde hem aşırı kütle birikiminden hem de antijen yakalayıp anlamlı bir sonuç üretemeyen çok az kütle (antikor) birikimlerinden kaçınmaya yönelik strateji ile belirlenmiştir.

4.2.4. Antijen (Rekombinant h-EpCAM) cevabı

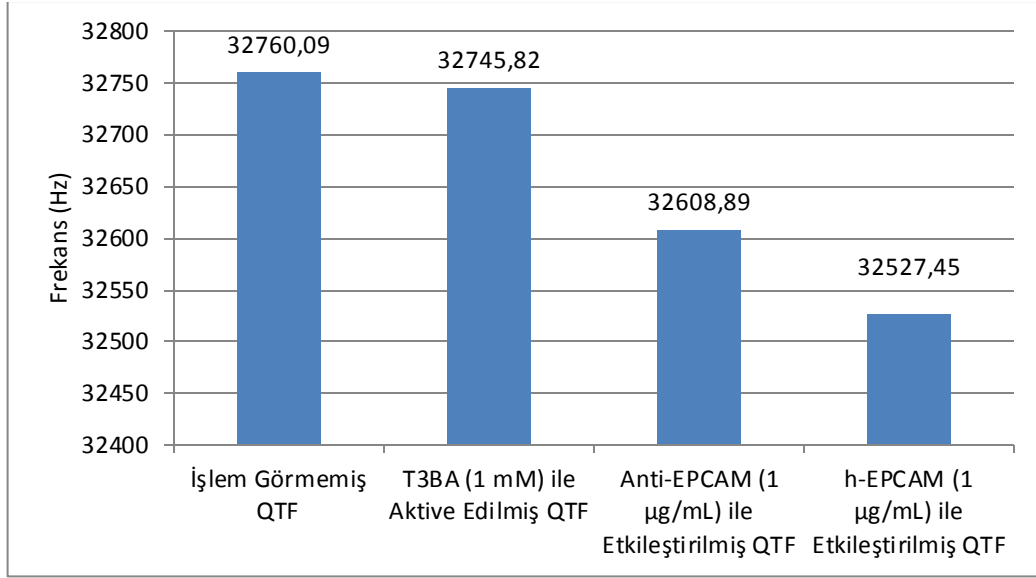
Literatürde QTF ile h-EPCAM etkileşiminin bir örneği olmadığından ön veri oluşturmak adına antijen konsantrasyonu, antikor konsantrasyonu ile aynı seçilerek (1 $\mu\text{g/mL}$ ’lik h-EPCAM) frekans cevaplarına bakılmıştır. Bu işlem için sırasıyla, işlem

görmemiş QTF, T3BA (1mM) ile aktive edilmiş QTF, antikor (1 $\mu\text{g/mL}$, anti-EPCAM) tutuklanmış QTF ve antijen (1 $\mu\text{g/mL}$, h-EPCAM) ile etkileştirilmiş QTF'in ham verileri Şekil 4.22'de sunulmuştur.



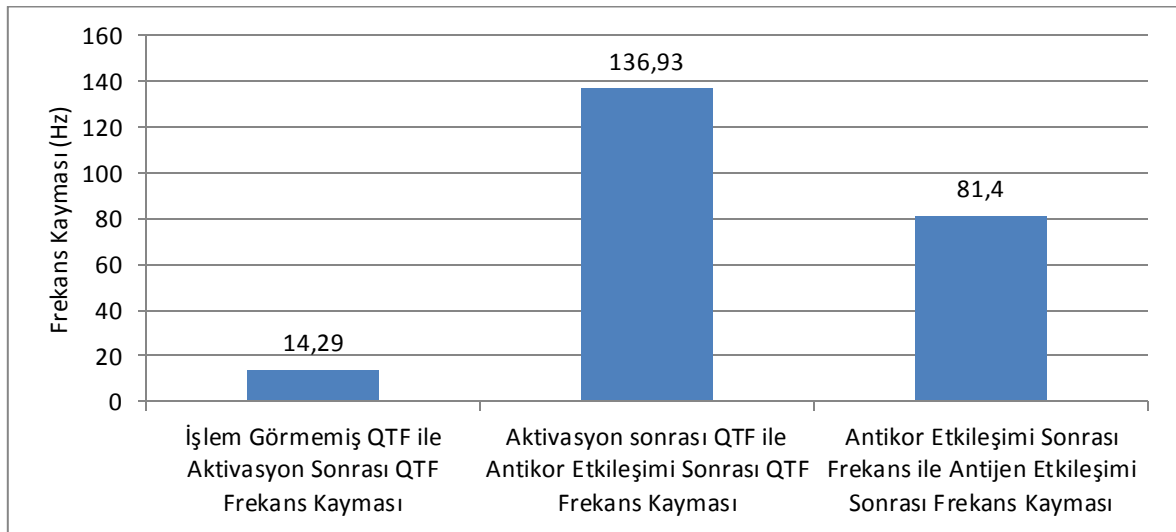
Şekil 4.22. QTF yüzey modifikasyon aşamaları ve EpCAM cevabı (target); frekans kaymaları, ham veriler

Şekil 4.22' de görüldüğü üzere her aşamadan sonra alınan frekans ölçümlerine dayanarak frekanstaki kayma yönü daima negatif yöne doğru olmuştur. Bu durum QTF çevirici yüzeyine yapılan işlemlerin tümünün çevirici üzerine bir kütle birikimi oluşturduğunu kanıtlamaktadır. Özgün aktivasyon ajanı sayesinde antikorun yüzeye, antijen yakalayabilecek konformasyonda (ağır zincirlerinden) tutuklanması, çalışmamız için kilit noktayı oluşturmuştur. Elde edilen ham veriler ışığında frekans değerleri (Şekil 4.23) ve frekans kaymalarının daha net ve anlaşılır biçimde gösterilmiş hali sunulmuştur (Şekil 4.24).



Şekil 4.23 . QTF yüzey modifikasyon aşamaları ve frekans değerleri

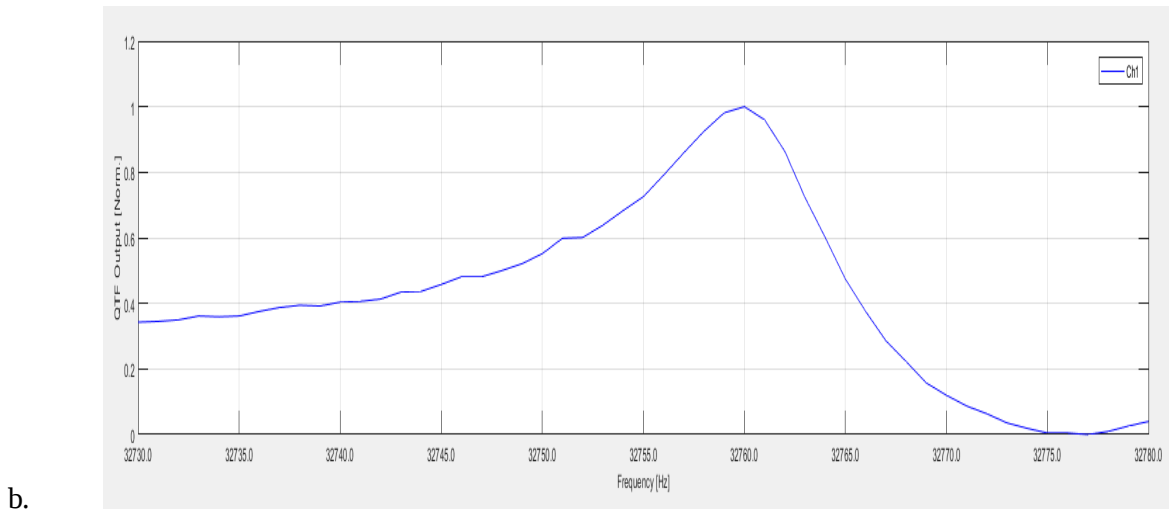
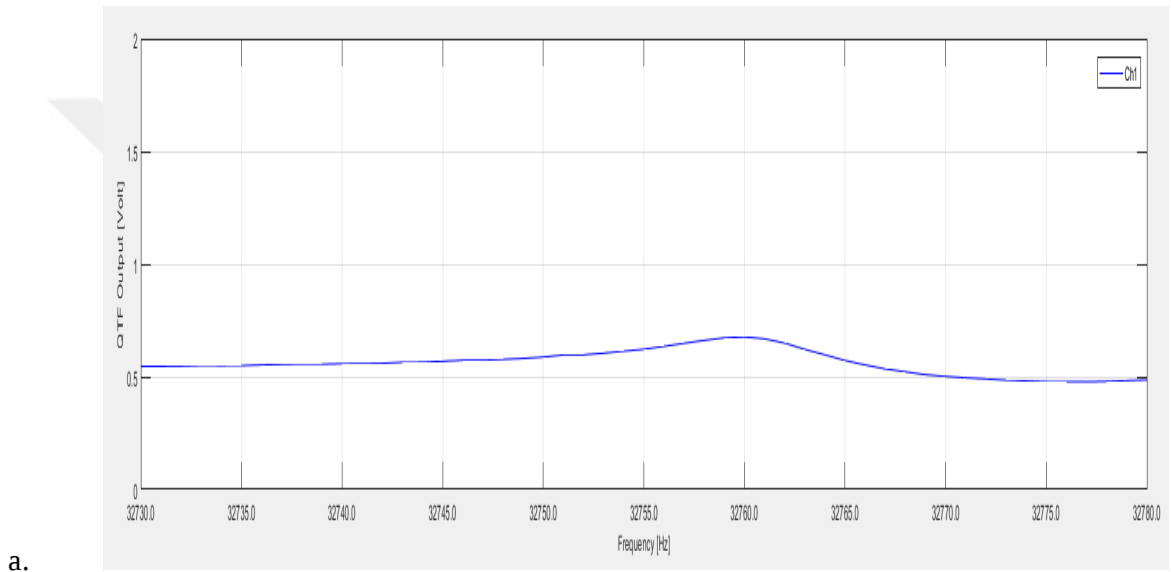
Antijen yakalama basamağına kadar geline süreçte ham verilerden elde edilen sonuçlara göre; herhangi bir işlem uygulamadan önceki QTF frekansı 32760,09 Hz ,ardından 1mM'lık T3BA özgün aktivasyon ajanı ile aktive edilmiş QTF frekansı 32745,82 Hz olarak ölçülmüştür. Ortalama bir frekans kaymasına sebep olabilen 1 µg/mL konsantrasyonuna sahip antikor tutuklama işleminden sonra ki QTF frekansı 32608,89 Hz olmuştur. Son olarak ise 1 µg/mL konsantrasyonuna sahip h-EPCAM antijeninin bulunduğu ependorf tüpüne daldırılarak etkileştirilen QTF frekansı 32527,45 Hz şeklinde olmuştur.



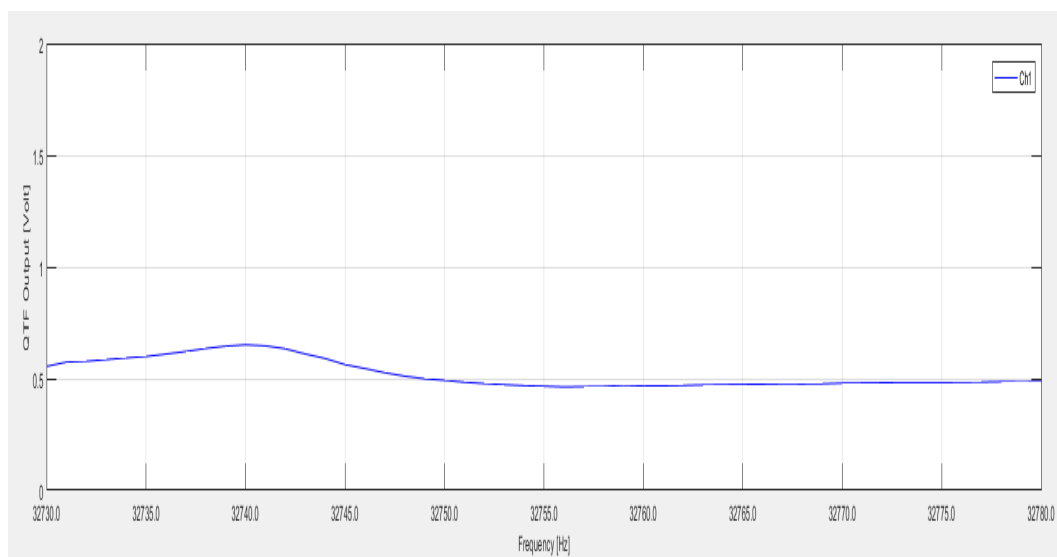
Şekil 4.24.QTF yüzey modifikasyon aşamaları ve frekans kayma değerleri, $\Delta f_{\text{aktivasyon}}$, $\Delta f_{\text{anti-EPCAM}}$ ve Δf_{EPCAM}

Burada görüldüğü üzere, anti-EpCAM yüzeye tutuklanarak immünosensör hazırlanabilmiştir (136,93 Hz'lik frekans kayma eşdeğeri anti-EPCAM brikimi). Hazırlanan bu immünosensörün ön veri oluşturulması için bir konsantrasyondaki h-EPCAM ile etkileşimi incelenmiş ve antijen yakalama-algılama işlemi gerçekleştirilmiştir.

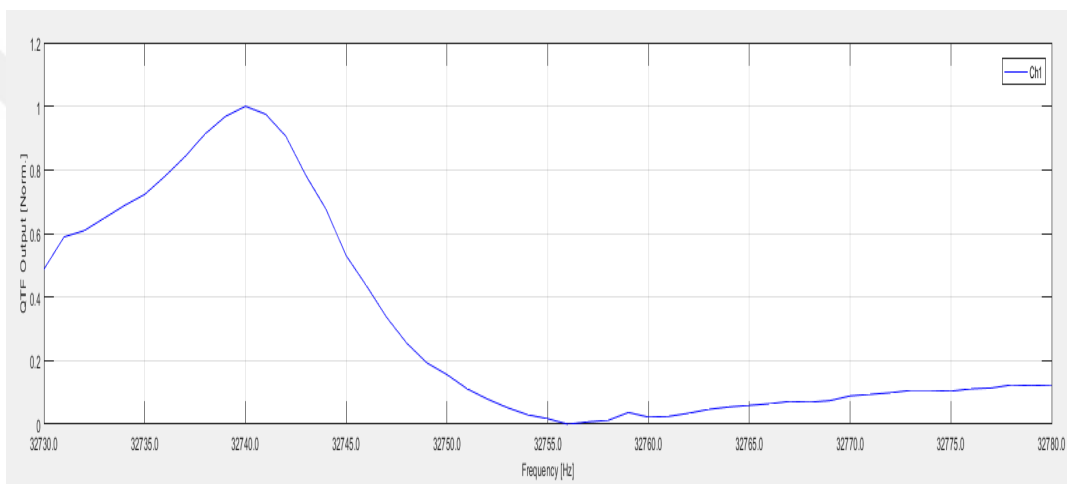
Protokol-5 işlem adımlarını uygulayarak yapılan ön çalışmadan elde edilen veriler ışığında optimizasyon çalışmaları için 1 µg/mL konsantrasyonu etrafında 0,75 (Şekil 4.25) ve 1,25 µg/mL (Şekil 4.26) konsantrasyonları ile çalışmalar yapılmıştır. Yeni ölçüm sisteminin kullanıldığı bu bölümde elde edilen ham veriler ve normalize edilmiş veriler gösterilmiştir.



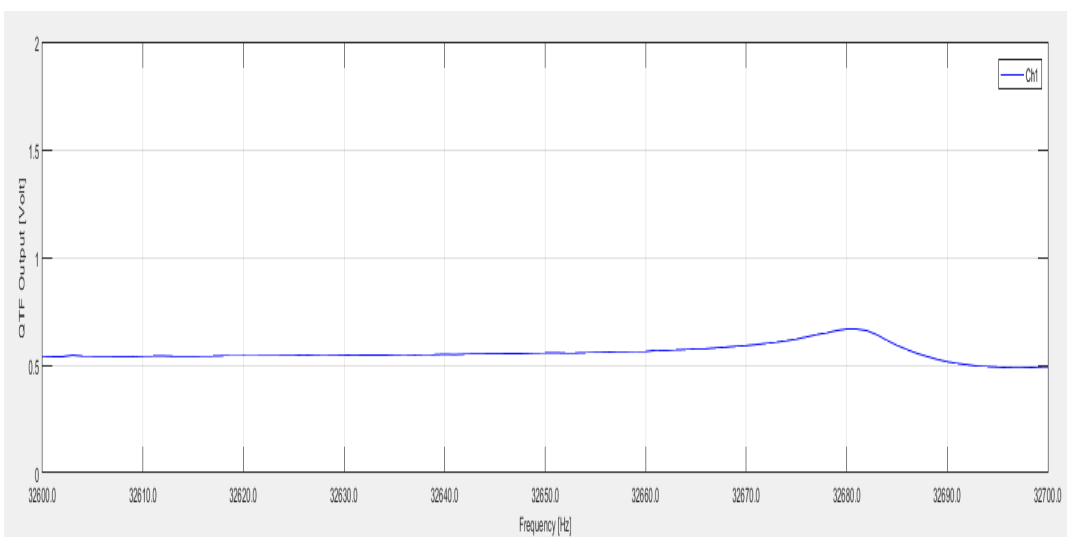
c.



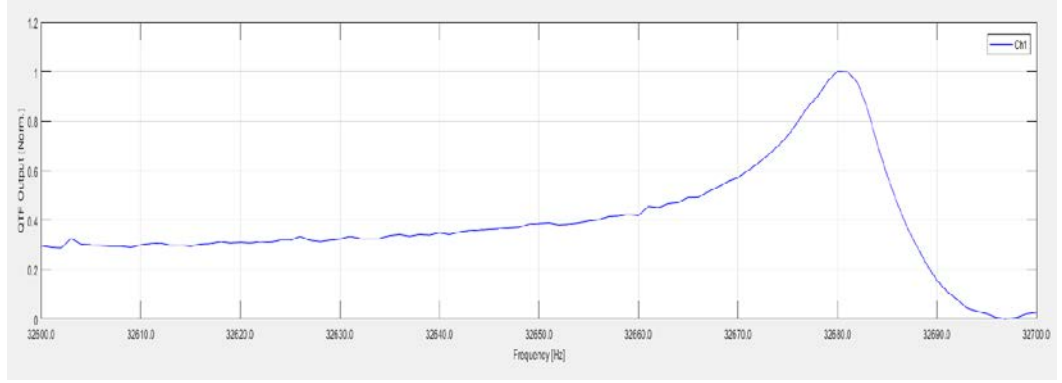
d.



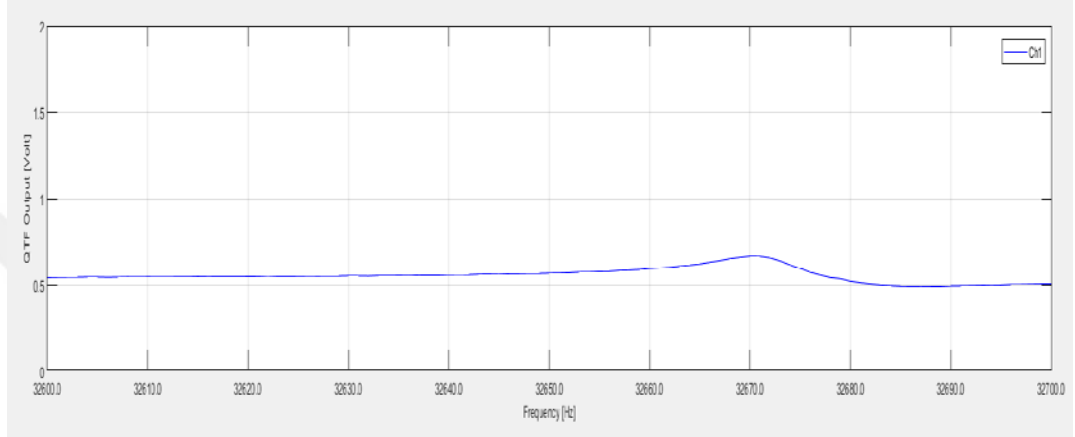
e.



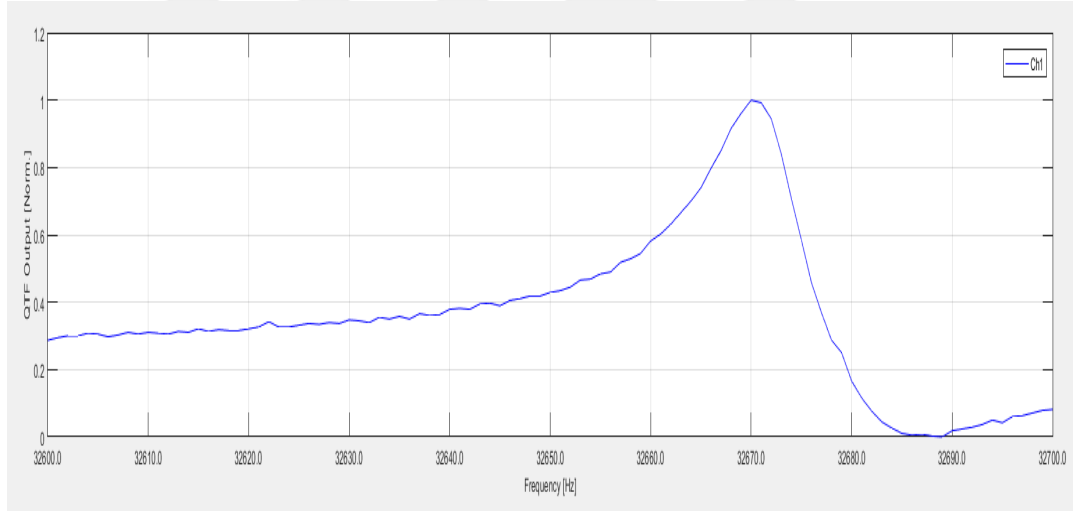
f.



g.

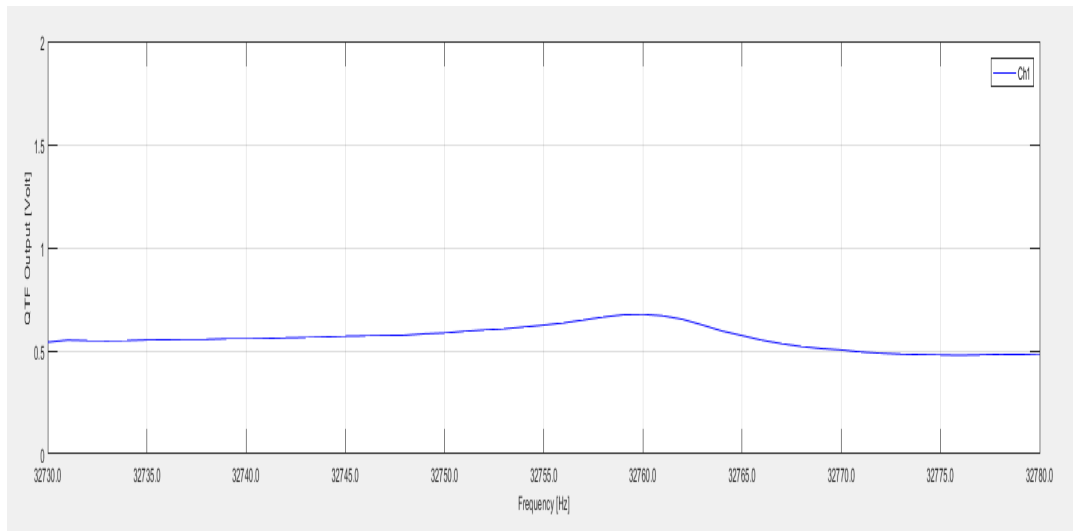


h.

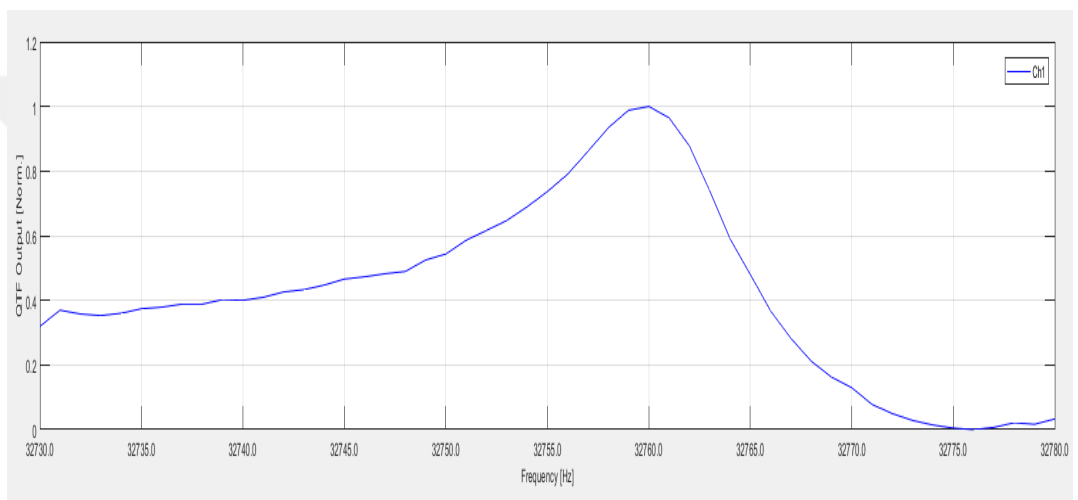


Şekil 4.25. 0,75 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonuna sahip antijen (EpCAM) cevabı. a.) İşlem görmemiş QTF frekans cevabı, b.) Normalize edilmiş İşlem görmemiş QTF frekans cevabı, c.) 1mM T3BA ile modifiye edilmiş QTF frekans cevabı, d.) Normalize edilmiş 1mM T3BA ile modifiye, , e.) 1 $\mu\text{g/mL}$ anti-EpCAM ile etkileştirilmiş QTF frekans cevabı, f.) Normalize edilmiş 1 $\mu\text{g/mL}$ anti-EpCAM ile etkileştirilmiş QTF frekans cevabı, g.) 0,75 $\mu\text{g/mL}$ EpCAM ile etkileştirilmiş QTF cevabı, h.) Normalize edilmiş 0,75 $\mu\text{g/mL}$ EpCAM ile etkileştirilmiş QTF cevabı

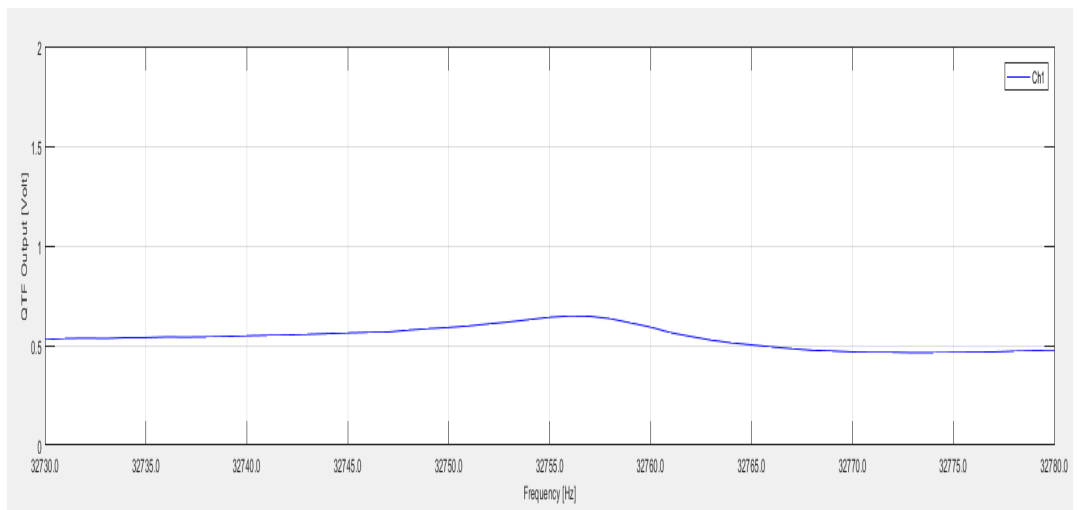
a.



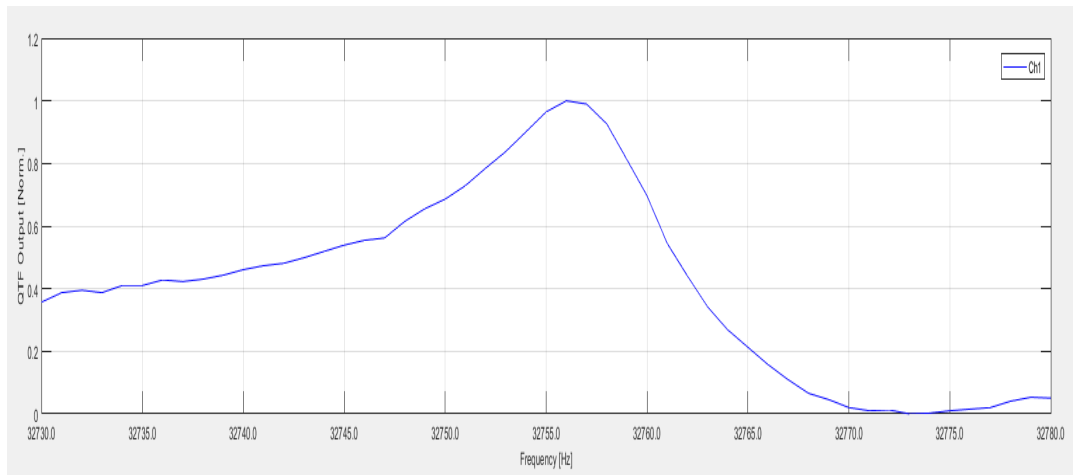
b.



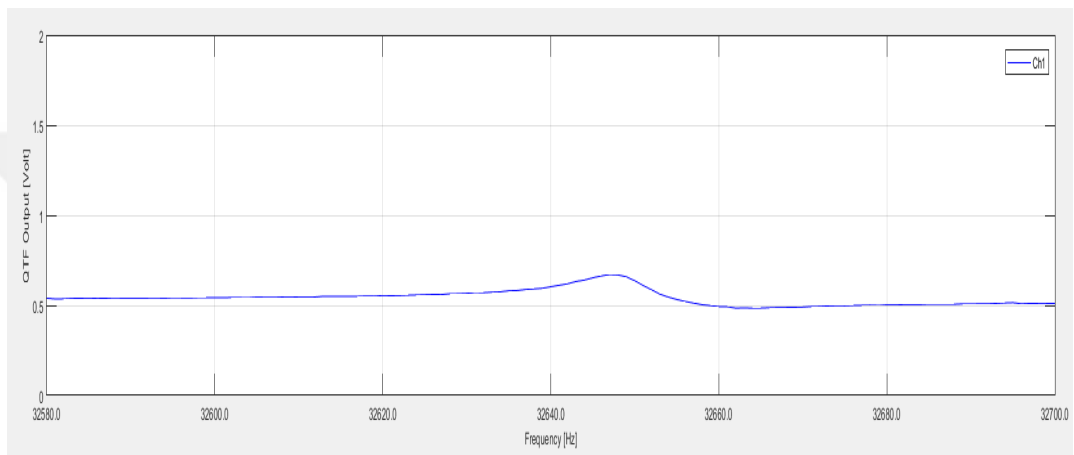
c.



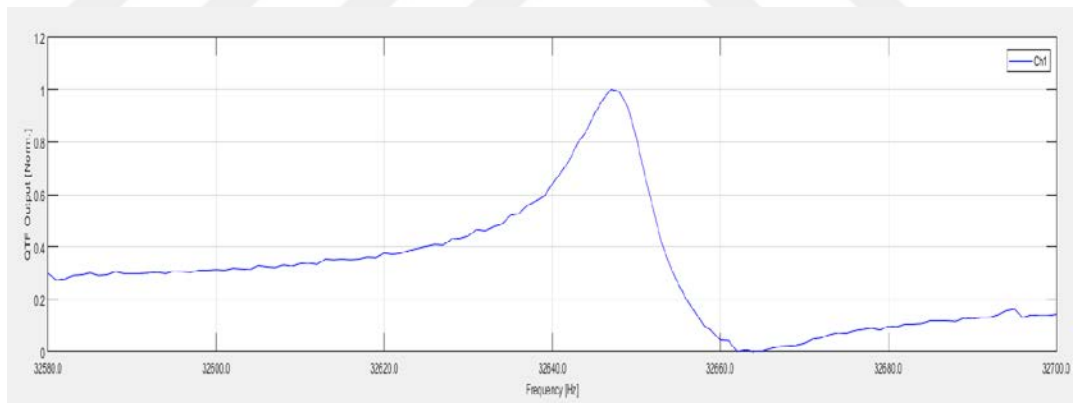
d.



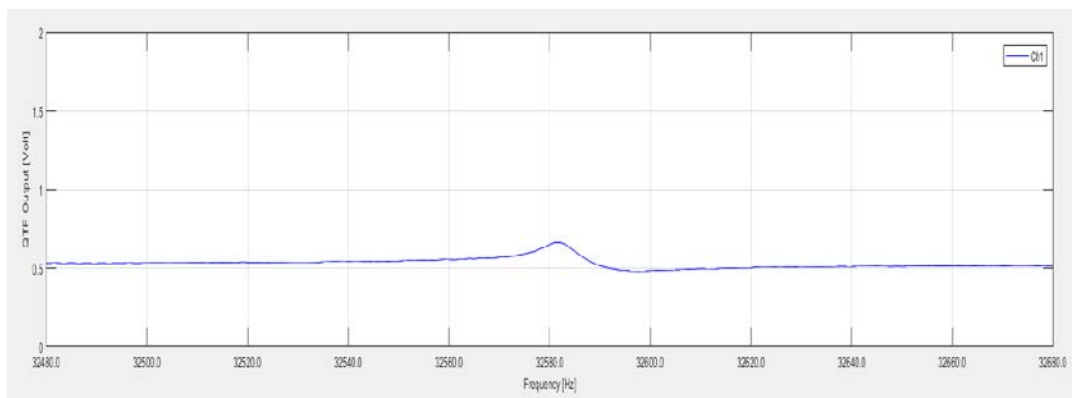
e.

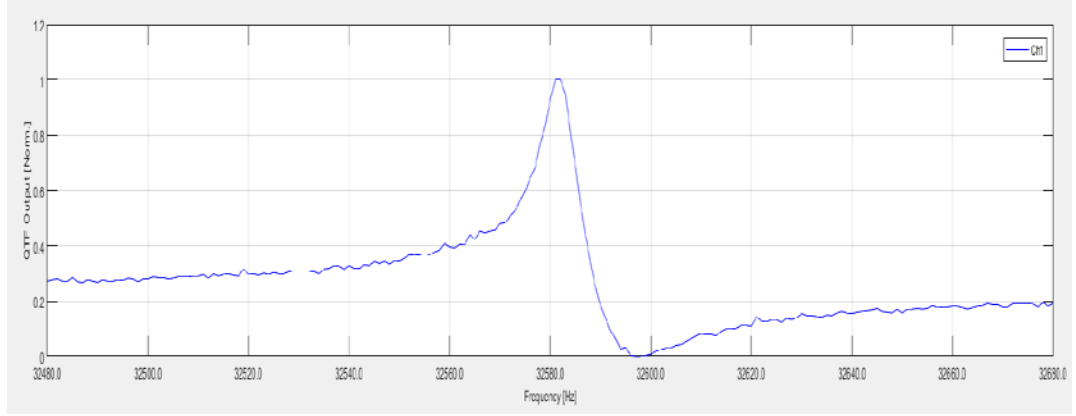


f.



g.

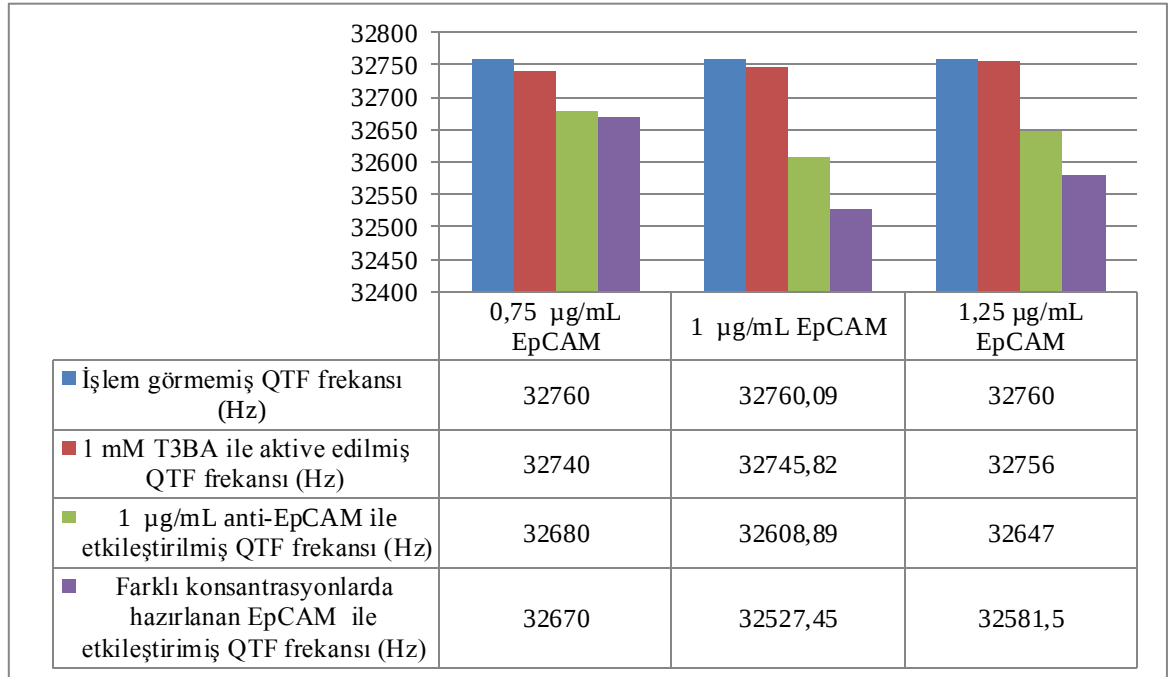




h.

Şekil 4.26.1,25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonuna sahip antijen (EpCAM) cevabı. A.) İşlem görmemiş QTF frekans cevabı, b.) Normalize edilmiş İşlem görmemiş QTF frekans cevabı, c.) 1mM T3BA ile modifiye edilmiş QTF frekans cevabı, d.) Normalize edilmiş 1mM T3BA ile modifiye edilmiş QTF frekans cevabı, e.) 1 $\mu\text{g/mL}$ anti-EpCAM ile etkileştirilmiş QTF frekans cevabı, f.) Normalize edilmiş 1 $\mu\text{g/mL}$ anti-EpCAM ile etkileştirilmiş QTF frekans cevabı, g.) 1,25 $\mu\text{g/mL}$ EpCAM ile etkileştirilmiş QTF cevabı, h.) Normalize edilmiş 1,25 $\mu\text{g/mL}$ EpCAM ile etkileştirilmiş QTF cevabı

QTF yüzeyine uygulanan bütün kimyasal işlemler sonucunda elde edilen ham veriler sonucunda frekans kayması beklenildiği üzere negatif yönde olmuştur. Yeni frekans ölçüm cihazı sayesinde düşük genlikli QTF frekansları normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi ile frekans cevabı daha net ve anlaşılır olmuştur. Yapılan bütün kimyasal işlem sonuçlarının daha net anlaşılması adına bütün işlem basamakları (antijen cevabı için ön çalışma verilerini de kapsamaktadır) ve frekans cevapları şekil 4.27’de verilmiştir.

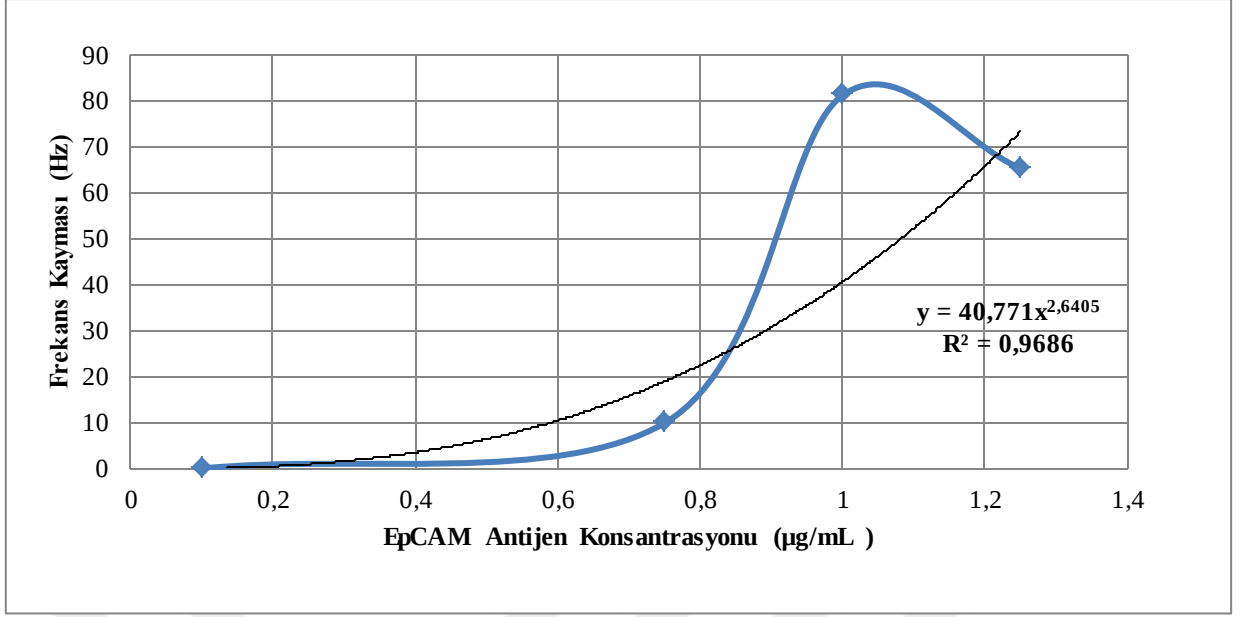


Şekil 4.27. Farklı konsantrasyon değerindeki anti-EPCAM ile etkileştirilmiş QTF’lerin frekans cevapları

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan EpCAM antijeni ile QTF etkileştirilmiştir. Bütün basamaklarda ölçülüp kaydedilen frekans değerleri farklı konsantrasyonlar için hazırlanan deney setleri için farklılıklar göstermektedir. 0,75 µg/mL EpCAM ile etkileştirmek hazırlanan deney setinde, herhangi bir işlem uygulamadan önceki QTF frekansı 32760 Hz, 1mM'lık T3BA özgün aktivasyon ajanı ile aktive edilmiş QTF frekansı 32740 Hz olarak ölçülmüştür. Ortalama bir frekans kaymasına sebep olabilen 1 µg/mL konsantrasyonuna sahip antikor tutuklama işleminden sonra ki QTF frekansı 32680 Hz olmuştur. 0,75 µg/mL konsantrasyonuna sahip h-EPCAM antijeninin bulunduğu ependorf tüpüne daldırılarak etkileştirilen QTF frekansı 32670 Hz şeklinde olmuştur.

1 µg/mL EpCAM ile etkileştirmek hazırlanan deney setinde, herhangi bir işlem uygulamadan önceki QTF frekansı 32760,09 Hz ,ardından 1mM'lık T3BA özgün aktivasyon ajanı ile aktive edilmiş QTF frekansı 32745,82 Hz olarak ölçülmüştür. 1 µg/mL konsantrasyonuna sahip antikor tutuklama işleminden sonra ki QTF frekansı 32608,89 Hz olmuştur. Son olarak ise 1 µg/mL konsantrasyonuna sahip h-EPCAM antijeninin bulunduğu ependorf tüpüne daldırılarak etkileştirilen QTF frekansı 32527,45 Hz şeklinde olmuştur.

Son konsantrasyon olan 1,25 µg/mL EpCAM ile etkileştirmek hazırlanan deney setinde, herhangi bir işlem uygulamadan önceki QTF frekansı 32760 Hz, 1mM'lık T3BA özgün aktivasyon ajanı ile aktive edilmiş QTF frekansı 32756 Hz olarak ölçülmüştür. Ortalama bir frekans kaymasına sebep olabilen 1 µg/mL konsantrasyonuna sahip antikor tutuklama işleminden sonra ki QTF frekansı 32647 Hz olmuştur. 1,25 µg/mL konsantrasyonuna sahip h-EPCAM antijeninin bulunduğu ependorf tüpüne daldırılarak etkileştirilen QTF frekansı 32581,5 Hz şeklinde olmuştur.



Şekil 4.28.Farklı konsantrasyonlardaki antijenin (EPCAM) etkisiyle, frekanstaki kaymaların karşılaştırılması, Δf_{EPCAM}

Değişen konsantrasyon değerlerinde bulunan EpCAM ortamına, yüzeyine sabit konsantrasyonda (1µg/mL) tutuklanmış antikor bulunan QTF kristalleri daldırılmıştır. Elde edilen deneysel veriler şekil 4.28’de sunulmuştur. Bu veriler ışığında $R^2 = 0,9686$ olarak hesaplanmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışması birçok özgün nokta barındırmaktadır. Bunlar, patent değeri ve analit teşhisinde frekans ölçümü için kullanılmış olan taşınabilir ve uygun maliyetli birinci nesil cihaz temel prensip tanımlamaları, QTF kristalini elektronik uygulamalarının yanı sıra tez kapsamında seçilen analitlerin teşhisinde kütle hassas immünosensör olarak yapılandırılması, antikor tutuklama stratejisi olan tiol gruplarının ilk defa QTF üzerinde uygulanması ve karakterizasyon testleri ile aktivasyonunun kanıtlanması gibi niteliklerdir. Tez çalışmasında ilk analit, BOS kaçaklarını tespit etmek için kullanılan biyoışaret molekülü olan transferrindir. Transferrini teşhis etme amacıyla yapılan deneylerde belirli bir tespit seviyesine inilmiş ancak tekrarlanan deneylerin yapılarak tayin sınırının daha doğru değerlere ulaşması sağlanmalıdır. Ayrıca deneylerde poliklonal olarak üretilen anti-transferrinin kullanılması bir handikap olarak düşünülebilir. Bu durumun etkisi ileriki dönemlerde incelenebilir. Bir diğer husus CTC tespitine yönelik yapılan deneysel çalışmalardır. CTC tespiti için QTF yüzeyi yine tiol grupları ile aktive edilmiştir. Ardından kolon, meme gibi kanser türlerine spesifik olan anti-EpCAM antikoru yüzeye tutturulmuş ve EpCAM dolayısıyla CTC algılanması amaçlanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda yüzeyinde antikor bulunan QTF'ler EpCAM ortamına daldırılmış ve etkileştirilmiştir. Antikor konsantrasyonu 1µg/mL değerinde sabit tutulmuş ve farklı konsantrasyonlarda antijen ile etkileşimi incelenmiştir. Elde edilen bulgulardan yola çıkılarak R^2 ve korelasyon değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen R^2 değeri 0,9686 olup korelasyon katsayısı 0,082'dir.

Antijen etkileşim verileriyle elde edilen grafiğin lineer bölgesini net bir şekilde ifade edilebilmek için tekrar sayılarının artırılarak deneylerin sürdürülmesi gerekmektedir. Elde edilen bu sonuçlar ışığında gerek örnek toplamının zor olduğu BOS kaçaklarında kullanılabilecek kompakt bir sistem (ev tipi) gerekse de kanser teşhisi için önemli bir biyobelirteç olan ve kanda oldukça nadir (1-10 hücre/mL) bulunan CTC'lerin tespit edilmesindeki zorlukların aşılması için QTF kütle hassas immünosensörlerin kullanılması, oldukça iddialı bir alternatif yöntem olarak görülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] A. A. Ensafi, *An introduction to sensors and biosensors*. Elsevier Inc., 2019.
- [2] T. Lakshmipriya and S. C. B. Gopinath, *An introduction to biosensors and biomolecules*. Elsevier Inc., 2018.
- [3] M. Farré and D. Barceló, “Sensor, biosensors and MIP based sensors,” *Food Toxicants Anal.*, pp. 599–636, 2007.
- [4] C. Karunakaran, R. Rajkumar, and K. Bhargava, *Introduction to Biosensors*. Elsevier Inc., 2015.
- [5] B. D. Malhotra and M. A. Ali, *Nanomaterials in Biosensors*. 2018.
- [6] S. Tombelli, *Piezoelectric biosensors for medical applications*. Elsevier Masson SAS., 2012.
- [7] A. N. E. Wrist-watch, “Flexure-mode quartz for.”
- [8] K. Cali, E. Tuccori, and K. C. Persaud, *Gravimetric biosensors*, 1st ed. Elsevier Inc., 2020.
- [9] M. A. Ünal, İ. C. Koçum, and D. Çökeli, “Design of a portable and low-cost mass-sensitive sensor with the capability of measurements on various frequency quartz tuning forks,” *Turkish J. Electr. Eng. Comput. Sci.*, vol. 27, no. 3, pp. 1871–1884, 2019.
- [10] J. Zhang and S. O’Shea, “Tuning forks as micromechanical mass sensitive sensors for bio- or liquid detection,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 94, no. 1, pp. 65–72, 2003.
- [11] J. Zhang, C. Dai, X. Su, and S. J. O’Shea, “Determination of liquid density with a low frequency mechanical sensor based on quartz tuning fork,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 84, no. 2–3, pp. 123–128, 2002.
- [12] S. Zhou, N. Liu, L. Zhang, T. He, B. Yu, and J. Li, “Realization of a infrared detector free of bandwidth limit based on quartz crystal tuning fork,” *Opt. Laser Technol.*, vol. 113, no. July 2018, pp. 261–265, 2019.
- [13] X. Zhou, T. Jiang, J. Zhang, X. Wang, and Z. Zhu, “Humidity sensor based on quartz tuning fork coated with sol-gel-derived nanocrystalline zinc oxide thin film,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 123, no. 1, pp. 299–305, 2007.
- [14] J. Ko, Y. Yoon, and J. Lee, “Quartz tuning forks with hydrogel patterned by dynamic mask lithography for humidity sensing,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 273, pp. 821–825,

2018.

- [15] K. Waszczuk, T. Piasecki, K. Nitsch, and T. Gotszalk, "Application of piezoelectric tuning forks in liquid viscosity and density measurements," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 160, no. 1, pp. 517–523, 2011.
- [16] A. Alodhayb, "Quartz tuning fork, a low-cost orthogonal measurement tool for the characterization of low-volume liquid reagents," *Meas. J. Int. Meas. Confed.*, vol. 152, p. 107313, 2020.
- [17] J. K. Sell, A. O. Niedermayer, and B. Jakoby, "Simultaneous measurement of density and viscosity in gases with a quartz tuning fork resonator by tracking of the series resonance frequency," *Procedia Eng.*, vol. 25, pp. 1297–1300, 2011.
- [18] Q. Wang, Z. Wang, W. Ren, P. Patimisco, A. Sampaolo, and V. Spagnolo, "Fiber-ring laser intracavity QEPAS gas sensor using a 7.2 kHz quartz tuning fork," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 268, pp. 512–518, 2018.
- [19] X. Chen, X. Feng, X. Liu, X. Zeng, and Y. Xu, "Low-cost quartz tuning fork based methane sensor for coal mine safety applications," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 295, no. May, pp. 7–11, 2019.
- [20] Q. Zhang, J. Chang, Z. Cong, and Z. Wang, "Long-path quartz tuning fork enhanced photothermal spectroscopy gas sensor using a high power Q-switched fiber laser," *Meas. J. Int. Meas. Confed.*, vol. 156, p. 107601, 2020.
- [21] T. Piasecki, G. Guła, K. Nitsch, K. Waszczuk, Z. Drulis-Kawa, and T. Gotszalk, "Evaluation of pseudomonas aeruginosa biofilm formation using quartz tuning forks as impedance sensors," *Procedia Eng.*, vol. 47, no. Figure 1, pp. 631–634, 2012.
- [22] G. Gula *et al.*, "Piezoelectric tuning fork based mass measurement method as a novel tool for determination of antibiotic activity on bacterial biofilm," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 175, pp. 34–39, 2012.
- [23] T. Piasecki, G. Guła, K. Waszczuk, Z. Drulis-Kawa, and T. Gotszalk, "Quartz tuning fork as in-situ sensor of bacterial biofilm," *Procedia Eng.*, vol. 87, pp. 369–372, 2014.
- [24] A. Chałupniak, K. Waszczuk, K. Hałubek-Głuchowska, T. Piasecki, T. Gotszalk, and J. Rybka, "Application of quartz tuning forks for detection of endotoxins and Gram-negative bacterial cells by monitoring of Limulus Amebocyte Lysate coagulation," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 58, pp. 132–137, 2014.
- [25] X. Su, C. Dai, J. Zhang, and S. J. O'Shea, "Quartz tuning fork biosensor," *Biosens.*

- Bioelectron.*, vol. 17, no. 1–2, pp. 111–117, 2002.
- [26] A. Makky, T. Berthelot, C. Feraudet-Tarisse, H. Volland, P. Viel, and J. Polesel-Maris, “Substructures high resolution imaging of individual IgG and IgM antibodies with piezoelectric tuning fork atomic force microscopy,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 162, no. 1, pp. 269–277, 2012.
 - [27] J. Kim, D. Won, B. Sung, S. An, and W. Jhe, “Effective stiffness of qPlus sensor and quartz tuning fork,” *Ultramicroscopy*, vol. 141, pp. 56–62, 2014.
 - [28] H. Hida *et al.*, “Fabrication of a quartz tuning-fork probe with a sharp tip for AFM systems,” *Sensors Actuators, A Phys.*, vol. 148, no. 1, pp. 311–318, 2008.
 - [29] G. Bathla and T. Moritani, “Imaging of Cerebrospinal Fluid Leak,” *Semin. Ultrasound, CT MRI*, vol. 37, no. 2, pp. 143–149, 2016.
 - [30] E. P. Prusak-Sochaczewski and J. H. T. Luang, “Detection of human transferrin by the piezoelectric crystal,” *Anal. Lett.*, vol. 23, no. 2, pp. 183–194, 1990.
 - [31] C. X. Lei, J. Wu, H. Wang, G. L. Shen, and R. Q. Yu, “A new electrochemical immunoassay strategy for detection of transferrin based on electrostatic interaction of natural polymers,” *Talanta*, vol. 63, no. 2, pp. 469–474, 2004.
 - [32] X. Liu, Y. Sun, D. Song, Q. Zhang, Y. Tian, and H. Zhang, “Enhanced optical immuosensor based on surface plasmon resonance for determination of transferrin,” *Talanta*, vol. 68, no. 3, pp. 1026–1031, 2006.
 - [33] T. Yin, W. Wei, L. Yang, X. Gao, and Y. Gao, “A novel capacitive immunosensor for transferrin detection based on ultrathin alumina sol-gel-derived films and gold nanoparticles,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 117, no. 1, pp. 286–294, 2006.
 - [34] J. Zhang *et al.*, “A novel surface plasmon resonance biosensor based on graphene oxide decorated with gold nanorod-antibody conjugates for determination of transferrin,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 45, no. 1, pp. 230–236, 2013.
 - [35] S. Chen, Y. Liu, Z. Liu, S. Chu, and W. Peng, “Micro-capillary-based self-referencing surface plasmon resonance biosensor for determination of transferrin,” *Appl. Opt.*, vol. 55, no. 30, p. 8571, 2016.
 - [36] E. Matysiak-Brynda, M. Bystrzejewski, A. Wieckowska, I. P. Grudzinski, and A. M. Nowicka, “Novel ultrasensitive immunosensor based on magnetic particles for direct detection of transferrin in blood,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 249, pp. 105–113, 2017.
 - [37] Y. Mayang, X. He, L. Chen, and Y. Zhang, “Detection of transferrin by using a surface

- plasmon resonance sensor functionalized with a boronic acid monolayer,” *Microchim. Acta*, vol. 184, no. 8, pp. 2749–2757, 2017.
- [38] D. Barcel, B. Zonja, and A. Ginebreda, “Ur Na of,” *Biochem. Pharmacol.*, p. 104262, 2020.
- [39] R. Tang, R. Hu, X. Jiang, and F. Lu, “LHRH-targeting surface-enhanced Raman scattering tags for the rapid detection of circulating tumor cells,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 284, no. December 2018, pp. 468–474, 2019.
- [40] W. Q. Yue, Z. Tan, X. P. Li, F. F. Liu, and C. Wang, “Micro/nanofluidic technologies for efficient isolation and detection of circulating tumor cells,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 117, pp. 101–115, 2019.
- [41] L. Chen, A. M. Bode, and Z. Dong, “Circulating tumor cells: Moving biological insights into detection,” *Theranostics*, vol. 7, no. 10, pp. 2606–2619, 2017.
- [42] P. Potdar and N. Lotey, “Role of circulating tumor cells in future diagnosis and therapy of cancer,” *J. Cancer Metastasis Treat.*, vol. 1, no. 2, p. 44, 2015.
- [43] X. Huang *et al.*, “Triple-enhanced surface plasmon resonance spectroscopy based on cell membrane and folic acid functionalized gold nanoparticles for dual-selective circulating tumor cell sensing,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 305, no. December 2019, 2020.
- [44] P. Paterlini-Brechot and N. L. Benali, “Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions,” *Cancer Lett.*, vol. 253, no. 2, pp. 180–204, 2007.
- [45] Y. K. Chung *et al.*, “An electrical biosensor for the detection of circulating tumor cells,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 5, pp. 2520–2526, 2011.
- [46] T. Kumeria, M. D. Kurkuri, K. R. Diener, L. Parkinson, and D. Losic, “Label-free reflectometric interference microchip biosensor based on nanoporous alumina for detection of circulating tumour cells,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 35, no. 1, pp. 167–173, 2012.
- [47] K. Chang *et al.*, “Label-free and high-sensitive detection of human breast cancer cells by aptamer-based leaky surface acoustic wave biosensor array,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 60, pp. 318–324, 2014.
- [48] Y. Gu *et al.*, “Detection of circulating tumor cells in prostate cancer based on carboxylated graphene oxide modified light addressable potentiometric sensor,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 66, pp. 24–31, 2015.
- [49] S. Tang, “Biosensors and Bioelectronics A novel cytosensor based on Pt @ Ag nano flowers and AuNPs / Acetylene black for ultrasensitive and highly specific detection of Circulating Tumor,” vol. 104, no. 1, pp. 72–78, 2018.

- [50] Q. Kun *et al.*, “A ‘signal-on’ switch electrochemiluminescence biosensor for the detection of tumor cells,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 808, no. November 2017, pp. 101–106, 2018.
- [51] M. U. Anu Prathap, E. Castro-Pérez, J. A. Jiménez-Torres, V. Setaluri, and S. Gunasekaran, “A flow-through microfluidic system for the detection of circulating melanoma cells,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 142, no. July, 2019.
- [52] J. Yang, X. Huang, C. Gan, R. Yuan, and Y. Xiang, “Highly specific and sensitive point-of-care detection of rare circulating tumor cells in whole blood via a dual recognition strategy,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 143, no. August, 2019.
- [53] L. Zhao *et al.*, “Janus micromotors for motion-capture-ratiometric fluorescence detection of circulating tumor cells,” *Chem. Eng. J.*, vol. 382, no. July 2019, p. 123041, 2020.
- [54] N. G. Gurudatt *et al.*, “Separation detection of different circulating tumor cells in the blood using an electrochemical microfluidic channel modified with a lipid-bonded conducting polymer,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 146, p. 111746, 2019.
- [55] Y. Chen, J. Peng, Y. Lai, B. Wu, L. Sun, and J. Weng, “Ultrasensitive label-free detection of circulating tumor cells using conductivity matching of two-dimensional semiconductor with cancer cell,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 142, no. July, 2019.
- [56] R. J. Matthys, *Design of Crystal Oscillator Circuits*. Elsevier, 1991.
- [57] J. X. J. Zhang and K. Hoshino, *Mechanical transducers: Cantilevers, acoustic wave sensors, and thermal sensors*. 2019.
- [58] M. Lee, B. Kim, S. An, and W. Jhe, “Dynamic responses of electrically driven quartz tuning fork and qPlus sensor: A comprehensive electromechanical model for quartz tuning fork,” *Sensors (Switzerland)*, vol. 19, no. 12, 2019.
- [59] J.-M. Friedt and É. Carry, “Introduction to the quartz tuning fork,” *Am. J. Phys.*, vol. 75, no. 5, pp. 415–422, 2007.
- [60] M. A. Ünal, “Farklı Tasarımlarda QTF (Quartz Tuning Fork) Sensör Üretimi,” 2015.

EKLER

EK 1: QTF Veri Sayfası

EK 2:Anti-EpCAM Veri Sayfası

EK 3: EpCAM Veri Sayfası

