T.C.
ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELEKTROKİMYASAL ALFA FETOPROTEİN İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

KİMYA ANABİLİM DALI

KADİR ERDEM

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Kadir ERDEM tarafından hazırlanan "ELEKTROKİMYASAL ALFA-FETOPROTEİN İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ" adlı tez çalışması 24/07/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ

Jüri Üyeleri

Başkan: Dr. Öğr. Üyesi Burcu ÖZCAN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'ne göre hazırlamış olduğum ''ELEKTROKİMYASAL ALFA-FETOPROTEİN İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ '' konulu tezin, bana ait özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve ünvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı'yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (24.07.2020).

Kadir ERDEM

(imza)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ELEKTROKİMYASAL ALFA-FETOPROTEİN İMMÜNOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

KADİR ERDEM

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ

Bu araştırmada, bir kanser biyobelirteci olan alfa-fetoproteinin (AFP) elektrokimyasal tayini için yeni bir immünosensör geliştirilmiş ve kan serumu (insan kanı) numunelerinde uygulaması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) ilk olarak indirgenmiş grafen oksit (RGO) ile modifiye edilmiş ardından elektropolimerizasyon tekniği uygulanarak elektrot yüzeyi polinötral kırmızı ile kaplanmış, son olarak elektrodepozisyon ile altın nanoparçacıklar (AuNP) yüzeyde oluşturulmuştur. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun elektrokimyasal karakterizasyonu dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve kare dalga voltametri (SWV) metotları kullanılarak yapılmıştır. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotların yüzeyine Anti-AFP'nin immobilizasyonu 3-merkaptopropiyonik asit (3-MPA) ve 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) karbodiimid/N-hidroksisüksinimid (EDC/NHS) kullanılarak kovalent bağlama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan AFP immünosensörünün optimum çalışma parametreleri DPV ve SWV metotları ile belirlenmiş ve optimum anti-AFP konsantrasyonu 50,0 µg/mL, optimum anti-AFP inkübasyon süresi 60 dk ve optimum AFP inkübasyon süresi 15 dk olarak bulunmuştur. Optimum şartlarda elektrokimyasal AFP immünosensörünün analitiksel karakterizasyonu yapılmıştır. DPV ve SWV metotları ile belirlenen doğrusal tayin aralıkları 1-500 ng.mL^{-1}, tespit limitleri sırasıyla 6,51 ng.mL^{-1} ve 9,68 ng.mL^{-1} olarak belirlenmiştir. AFP immünosensörünün tekrarlanabilirliği 50 ng.mL^{-1} AFP konsantrasyonu için test edilmiş ve bağıl standart sapma (R.S.D.) değerleri DPV ve SWV metotları için sırasıyla %4,06 (n=10) ve %3,68 (n=10) olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen AFP immünosensörünün uygulama kararlığı 60 gün boyunca, depolama kararlığı ise 12 hafta depolama süresince voltametrik metotlarla incelenmiştir. AFP immünosensörünün seçiciliği 9 farklı antijen karışımı varlığında AFP analizinin yapılmasıyla test edilmiş ve antijen karışımının %4,02'lik bir girişim yaptığı bulunmuştur. Hazırlanan AFP immünosensörleri yapay kan serumu (insan kanı) örneklerine bilinen miktarda ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki AFP'nin analizi için kullanılmış ve %95'in üstünde geri kazanımlar elde edilmiştir.

2020, 56 sayfa

Anahtar Kelimeler: Elektrokimyasal AFP immünosensörü, kanser biyobelirteci, indirgenmiş grafen oksit, polinötral kırmızı, altın nanopartikül, yüzey baskılı karbon elektrotlar.

ABSTRACT

MASTER THESIS

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL ALPHA-FETOPROTEIN IMMUNOSENSOR

KADİR ERDEM

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Melike BİLGİ KAMAÇ

In this study, a new immunosensor was developed for the electrochemical determination of alpha-fetoprotein (AFP) that is a cancer biomarker and its application was performed on human blood serum samples. In the work, firstly the screen printed carbon electrodes (SPCE) were modified with reduced graphene oxide (RGO), then the electrode surface was coated with polyneutral red by applying the electropolymerization technique, and finally, gold nanoparticles (AuNP) were created by electrodeposition on the surface. Electrochemical characterizations of the SPCE/RGO/PNR/AuNP electrode were performed using cyclic voltammetry (CV), differential pulse voltammetry (DPV) and square wave voltammetry (SWV) methods. Immobilization of Anti-AFP to the surface of SPCE/RGO/PNR/AuNP electrodes were carried out by covalent binding method using 3-mercaptopropionic acid (3-MPA) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide/N-hydroxy succinimide (EDC/NHS). The optimum working parameters of the prepared AFP immunosensor were determined by DPV and SWV methods. The optimum anti-AFP concentration, incubation time of Anti-AFP and incubation time of AFP were found to be 50.0 µg/mL, 60 min and 15 min, respectively. The analytical characterization of electrochemical AFP immunosensors were performed under the optimum working parameters. It was calculated that the linear ranges were 1-500 $ng.mL^{-1}$, limit of detections (LOD) were 6.51 $ng.mL^{-1}$ and 9.68 $ng.mL^{-1}$, respectively. The reproducibility of the AFP immunosensor was tested for 50 $ng.mL^{-1}$ AFP concentration and relative standard deviation (R.S.D.) values were calculated as 4.06% (n = 10) and 3.68% (n = 10) for DPV and SWV methods, respectively. The operation stability of the developed AFP immunosensor was examined by voltammetric methods for 60 days, and the storage stability for 12 weeks. The selectivity of the AFP immunosensor was tested by performing AFP analysis in the presence of 9 different antigen mixes and it was found that the antigen mixture made a 4.02% interference. The prepared AFP immunosensors were used for the analysis of different concentrations of AFP added to the human blood serum samples in a known amount and over 95% recoveries were obtained.

2020, 56 pages

KEYWORDS: electrochemical alpha-fetoprotein immunosensor, cancer biomarker, reduced graphene oxide, polyneutral red, gold nanoparticles, screen printed electrodes.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde değerli bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Melike BİLGİ KAMAÇ'a,

İlk günden bu yana engin bilgi ve tecrübesiyle bu çalışmada desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Kemal SEZGİNTÜRK'e,

Tez çalışmalarımı yürütmemde yardım eden ve manevi desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN'a, laboratuvar çalışmalarında yardım ve desteklerini esirgemeyen Merve YILMAZ'a,

Bölümümüzün her türlü imkanından faydalanmamı sağlayan Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne,

Her anımda yanımda olup bana destek olan eşim Aysun ERDEM'e ve kızım İrem ERDEM'e, her an desteğini yanımda hissettiğim Y. Lisans arkadaşlarım Soner AKTAN ve Ayla YILMAZ AKTAN'a, büyük bir inanç ve sevgiyle benden desteğini eksik etmeyen anneme,

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma, Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FF61218209 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Çalışmamı maddi açıdan destekledikleri için Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Kadir ERDEM
Çankırı, Temmuz 2020

İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ i
ÖZET ii
ABSTRACT iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iv
SİMGELER DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xi
1. GİRİŞ 1
1.1. Alfa-feto Protein 1
1.2. İmmünosensörler 2
1.2.1. Etiketli İmmünosensörler 3
1.2.2. Etiketsiz İmmünosensörler 4
1.2.3. İmmünosensörlerde Antikor İmmobilizasyon Yöntemleri 4
1.3. Yüzey Baskılı Elektrotlar (SPE) 6
1.4. Grafen Oksit ve İndirgenmiş Grafen Oksit 7
1.5. Polinötral Kırmızı 8
1.6. Altın Nanopartiküller (AuNP) 10
2. KAYNAK TARAMALARI 12
3. MATERYAL VE METOT 15
3.1. Materyal 15
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar 15
3.1.2. Kullanılan Cihazlar 15
3.1.3. Elektrokimyasal Ölçüm Sistemi 15
3.1.4. Kullanılan Elektrotlar ve Konnektörler 16
3.2. Metot 18
3.2.1. Elektrot Yüzeyinin Temizlenmesi 18
3.2.2. Destek Elektrolit Tampon Çözeltisinin Hazırlanması 18
3.2.3. SPCE'lerin RGO ile Modifikasyonu 18
3.2.4. SPCE/RGO Yüzeyinde Nötral Kırmızının Elektropolimerizasyonu 18
3.2.5. SPCE/RGO/PNR'lerin AuNP ile Modifikasyonu 19
3.2.6. Kovalent Bağlanma ile AFP İmmünosensörünün Hazırlanması 19
3.2.6.1. SPCE/RGO/PNR/AuNP'lerin 3-MPA ve EDC-NHS ile Aktivasyonu 19
3.2.6.2. Anti-AFP'nin SPCE/RGO/PNR/AuNP Üzerine İmmobilizasyonu 19
3.2.6.3. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP'nin BSA Bloklama Ajanı ile Modifikasyonu 20

3.2.6.4. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA İmmünosensörü ile AFP'nin Tutuklanması **20**
3.2.6.5. Elektrokimyasal Ölçümler **20**
4. BULGULAR **21**
4.1. SPCE 'lerin İndirgenmiş Grafen Oksit ile Modifikasyonu **21**
4.2. SPCE/RGO/PNR/AuNP Elektrodunun Elektrokimyasal Karakterizasyonu **21**
4.3. AFP İmmünosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu **25**
4.4. AFP İmmünosensörünün Optimum Çalışma Parametrelerinin Belirlenmesi **28**
4.4.1. Anti-AFP Antikor Konsantrasyonunun Optimizasyonu **28**
4.4.2. Anti-AFP'nin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu **30**
4.4.3. AFP'nin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu **32**
4.5. Analitiksel Karakterizasyon **35**
4.6. Seçicilik Testi **43**
4.7. Gerçek Numune Analizi **44**
5. TARTIŞMA VE SONUÇ **46**
KAYNAKLAR **52**
ÖZGEÇMİŞ **56**

SİMGELER DİZİNİ

Abs	Antikor
AFP	Alfa-fetoprotein
Ag	Antijen
AgCl	Gümüş klorür
Au	Altın
AuNP	Altın nanopartikül
BSA	Sığır serum albümin
CA 125	Kanser Antijen 125
CNT	Karbon nanotüpler
CV	Döngüsel voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametri
DMF	Dimetil formamid
EDC	Etil,3[3-dimetilaminopropil] karbodiimid
ELISA	Enzime bağlı immünosorban analizi,
GCE	Camsı karbon elektrot
GO	Grafen oksit
$HAuCl_4$	Kloroaurik asit
HCC	Hepetocellüler kanser
HCl	Hidroklorik asit
HE4	İnsan Epididimis Protein-4
HSP70	70 kilodaltonluk ısı şoku proteini
H_2O_2	Hidrojen peroksit
IL-rGO	Likit formdaki indirgenmiş grafen oksit
In	İndiyum
IrOx	İridyum oksit
ITO	İndiyum kalay oksit
MAGE1	Melanom ile ilişkili antijen
NaOH	Sodyum hidroksit
NHS	N-Hidroksisüksinimid
NR	Nötral kırmızı
pAb	Poliklonal antikorlar
PAMAM	Poliamidoamin
PAK2	Serin/treonin-protein kinaz2
PB	Prusya mavisi
PDA	Polidopamin
PDDA	Poli dialildimetilamonyum klorit
Pb	Kurşun
PNR	Polinötral kırmızı
PTH	Politiyonin
PtNP	Platinyum nanopartiküller
RGO	İndirgenmiş grafen oksit
S	Kükürt
SAMs	Organosülfür bileşik tabakaları
SPCE	Yüzey baskılı karbon elektrot
SPE	Yüzey baskılı elektrot
SOX2	Transkripsiyon proteini
SWV	Kare dalga voltametri
Th	Tiyonin

TRAP1	Mitokondriyal ısı şoku proteini
3-MPA	3-Merkaptopropiyonik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Etiketlenmiş ikinci Abs ile sandwich – tip immünoanaliz şematik gösterimi 4

Şekil 1.2. 3 – Merkaptopropiyonik asitin molekül formülü. 6
Şekil 1.3. SPE çeşitleri 7
Şekil 1.4. Polinotral kırmızının molekül formülü 9

Şekil 1.5. pH'a bağlı PNR'nin polimerizasyonunun şematik gösterimi 9

Şekil 3.1. Dropsens μStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat 16

Şekil 3.2. SPCE 16

Şekil 3.3. a) SPCE'lerde damlatmalı analizler için kutu şeklindeki konnektör b) SPCE'lerde kesikli analizler için konnektör 17

Şekil 3.4. SPCE için elektrokimyasal hücre 17

Şekil 4.1. SPCE/RGO (A) ve yalın SPCE (B) elektrotlarının SEM görüntüleri 21

Şekil 4.2.A. SPCE, SPCE/RGO, SPCE/PNR, SPCE/AuNP, SPCE/RGO/PNR, SPCE/RGO/AuNP, SPCE/PNR/AuNP ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde -0,4 V ile +0,7 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları 22
Şekil 4.2.B. SPCE, SPCE/RGO, SPCE/PNR, SPCE/AuNP, SPCE/RGO/PNR, SPCE/RGO/AuNP, SPCE/PNR/AuNP ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde -0,4 V ile +0,5 V potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları 22
Şekil 4.2.C. SPCE, SPCE/RGO, SPCE/PNR, SPCE/AuNP, SPCE/RGO/PNR, SPCE/RGO/AuNP, SPCE/PNR/AuNP ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) -0,3 V ile +0,6 V potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları. 23
Şekil 4.3.A. AFP immünosensörünün hazırlanma basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde ve -0,4 V ile +0,8 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları 25
Şekil 4.3.B. AFP immünosensörünün hazırlanma basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde ve -0,4 V ile +0,5 V potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları 26
Şekil 4.3.C. AFP immünosensörünün hazırlanma basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde ve -0,3 V ile +0,6 V potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları 26
Şekil 4.4.A. Farklı konsantrasyonlardaki anti-AFP ile hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı DPV cevabına etkileri 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) 28
Şekil 4.4.B. Farklı konsantrasyonlardaki anti-AFP ile hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı SWV cevabına etkileri 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) 29

Şekil 4.5.A. Farklı anti-AFP inkübasyon sürelerinde hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV cevabına etkileri 31
Şekil 4.5.B. Farklı anti-AFP inkübasyon sürelerinde hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde SWV cevabına etkileri 31
Şekil 4.6.A. AFP'nin inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/ BSA immünosensörünün farklı AFP antijenine karşı 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV cevabına etkileri 33
Şekil 4.6.B. AFP'nin inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/ BSA immünosensörünün farklı AFP antijenine karşı 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde SWV cevabına etkileri 34
Şekil 4.7.A. AFP immünosensörü ile 0,01 ile 10 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği 35
Şekil 4.7.B. AFP immünosensörü ile 0,05 ile 10 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği 36
Şekil 4.7.C. AFP immünosensörü ile 1 ile 50 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akım grafiği 36
Şekil 4.7.D. AFP immünosensörü ile 1 ile 50 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği 37
Şekil 4.7.E. AFP immünosensörü ile 1 ile 500 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği 37
Şekil 4.7.F. AFP immünosensörü ile 1 ile 500 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği 38
Şekil 4.8. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün 50 ng/mL AFP derişiminde ortalama % bağıl akım değerlerine karşı gün sayısı grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) 40
Şekil 4.9. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün 50 ng/mL AFP derişiminde % ortalama bağıl akım değerlerine karşı hafta sayısı grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) 41
Şekil 4.10. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün AFP ve farklı antijenlerin karışımına karşı elde edilen % ortalama bağıl akım grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) 43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. CV, DPV ve SWV metotları ölçüm parametreleri 20
Çizelge 4.1. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun hazırlanma basamaklarında CV, DPV ve SWV'lerden elde edilen pik akımı yükseklikleri 23
Çizelge 4.2. AFP immünosensörünün hazırlanma basamaklarında CV, DPV ve SWV'lerden elde edilen pik akımı yükseklikleri 27
Çizelge 4.3. Farklı anti-AFP konsantrasyonlarında hazırlanan AFP immünosensörlerinin farklı AFP konsantrasyonlarında DPV ve SWV ile ölçümleri sonucu 4.4.A. ve 4.4.B. grafiklerinden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri 29
Çizelge 4.4. Farklı anti-AFP inkübasyon sürelerinde hazırlanan AFP immünosensörlerinin farklı AFP konsantrasyonunda DPV ve SWV ile ölçümleri sonucu 4.4.A. ve 4.4.B. grafiklerinden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri 32
Çizelge 4.5. AFP inkübasyon süresinin DPV ve SWV ile ölçümlerinden elde edilen grafiklerdeki µA değerlerine karşı duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri 34
Çizelge 4.6. AFP'nin tayini için SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörü ile elde edilen analitiksel parametreler 38
Çizelge 4.7. AFP immünosensörünün tekrarlanabilirlik testi sonuçları (RSD) 39
Çizelge 4.8. Çeşitli materyallerle modifiye edilerek AFP'nin tayini için geliştirilmiş immünosensörler ile bu çalışmada geliştirilmiş olan AFP immünosensörünün analitiksel karakterizasyon verilerinin karşılaştırılması 42
Çizelge 4.9. Yapay kan serumu (insan kanı) örneklerinde AFP analizi 44

1. GİRİŞ

Her yıl, kanser nedeniyle yaklaşık yarım milyon ölüm gerçekleşir ve bir milyondan fazla hastaya bu hastalık teşhisi konur. Kanser, 14 yaşın altındaki çocuklarda ölüm nedeninin en sık görüldüğü ikinci nedendir ve kanser etki hızları 1975'ten bu yana yılda %0,6 artmıştır. Belirlenemeyen başlangıç, kolay metastaz, zayıf tahminler, yüksek ölüm oranı ve tekrar etme oranları nedeniyle kanser önemli bir halk sağlığı endişesi ve ölüm oranlarının ikinci önde gelen nedenidir. Erken teşhis ve tıbbi tedavinin, kanserin ilerlemesini ve yayılmasını önlemek, kanser hastalarının sayısını azaltmak ve sağ kalma oranlarını artırmak için en etkili yol olduğu kanıtlanmıştır. Serum, plazma, tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarında göstergeler olarak görev yapan tümör belirteçlerinin erken tespit ile belirlenmesi, daha etkili teşhis stratejilerinin yolunu açmıştır. Şimdiye kadar taranan birçok tümör belirteci, prostat, karaciğer, akciğer ve kolon kanserleri dahil birçok kanser çeşidi için yüksek özgünlük sergilemiştir. Tümör belirteçlerinin konsantrasyonunun ufak bir değişimi kanser oluşumu, gelişimi ve terapötik etkiye sıkı sıkıya bağlıdır. Bu durumda, tümör belirteçlerinin konsantrasyonundaki hafif değişikliği duyarlı bir şekilde tespit etmek için etkili yöntemlerin geliştirilmesi, klinik tanı açısından acil önem teşkil etmektedir (Tang and Ma, 2017).

Günümüzde kanser teşhisi için; meme scan, tomografi, mammografi ve patalojik testler gibi birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde teknik eleman ihtiyacı, uzun ve sıkıcı analiz süreleri, yetersiz bilgi ve maliyet yüksekliği gibi dezavantajlar bulunmaktadır. Bu nedenle klinik olarak maliyeti düşük, hızlı, basit ve pratik kullanıma olanak sağlayan analiz yöntemleri gereklidir (Jia et al., 2014).

1.1. Alfa-feto Protein

Kanser biyobelirteçlerinin arasında önemli bir yere sahip olan alfa-fetoprotein (AFP), onkofetal glukoproteindir. Molekül ağırlığı yaklaşık 70 kDa olan AFP, 590 çeşit aminoasit içerir ve yaklaşık %3,4 karbonhidrattan oluşur (Zhou et al., 2018). AFP karaciğer kanserinin teşhisi ve tedavisi için her zaman hayati ve çok özel bir biyobelirteç olarak kabul edilir. Sağlıklı insan serumunda, AFP konsantrasyonu genellikle 20 ng/mL’den düşüktür. Bunun yanında karaciğer kanseri olan bir hastanın

kan serumundaki AFP konsantrasyonu 20 ng/mL'den önemli ölçüde daha fazladır. Karaciğer ve testis kanserlerinde rastlanmasının yanı sıra ağırlıklı olarak hepatosellüler kanserinde (HCC), vitellus kesesi ve diğer kötü huylu tümörlerde de bulunur. AFP miktarı, insan vücudunda 20 ng/mL değerini aştığı zaman HCC için de şüphe oluşturan bir durum olarak kabul edilir. HCC hastalarının kanında %75-80 oranında AFP bulunduğu bilinmektedir. Bu hastalıkların yanında endoderm kanser, teratoma, yumurtalık kanseri ve mide kanserinden karaciğer kanserine geçiş aşamalarında da görülür (Tang and Ma, 2017; Wu et al., 2019).

AFP, anne karnında bebek tarafından da üretilen bir proteindir, gebelik boyunca fetal karaciğer ve yolk kesesinden salgılanmaktadır. Kanser hastalıklarında, kandaki AFP miktarındaki artışın yanı sıra gebelik döneminde yaşanan düşük, down sendromu ve nöral tüp defekti gibi olumsuz vakalarda da AFP miktarının değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda gebelik döneminde anne kan serumundaki AFP, konjuge olmayan östriol ve koryonik gonadotropin miktarlarının takibi yaşanabilecek olumsuzlukların erken tespitinde alternatif bir metot olarak kabul edilmiştir. Annenin kan serumundaki AFP miktarı günümüzde tarama testlerinin bir bileşeni olmakla birlikte, tek başına nöral tüp defekti taramasında da kullanılabilmektedir. (Yuana et al., 2019; Babu et al., 2020).

Tüm bu bilgiler ışığında AFP'nin erken tespiti ve izlenilmesi, hastaların zamanında tedavi edilebilmesi ve hayat kurtarılması için büyük önem taşımaktadır (Jia et al., 2014).

1.2. İmmünosensörler

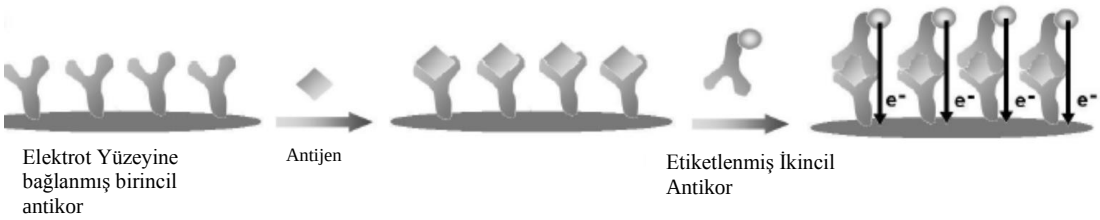
Bir biyosensör, genel olarak biyoreseptör ve dönüştürücü olmak üzere iki bileşenden oluşur. Biyoreseptör, hedef analiti tanıyan bir biyomoleküldür. Dönüştürücü, biyoreseptör ile analit arasında oluşan tanıma olayını ölçülebilir bir sinyale dönüştüren materyaldir. İmmünosensörler ise antijen ve antikor arasındaki etkileşimi ölçmeye dayanan bir biyosensördür. İmmünosensörlerde antijen hedef analit; antikor ise antijen ile özel, seçici bağ yapan biyomoleküldür (Bahadır ve Sezgintürk, 2014).

Genel olarak immünosensörler, antijen (Ag) ve antikor (Abs) arasında oluşan bağın tespitini, ayırma ve yıkama aşamalarına gerek duymadan yapabilen en önemli araçlardır. Ayrıca, çeşitli fiziksel dönüştürücülerin kolaylığı ve yüksek seçicilikleriyle immunoreaksiyonların doğal seçiciliğini birleştirirler. Dört ana tip immunosensör çeşidi mevcuttur. Bunlar; elektrokimyasal (potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik ve impedimetrik), optik, mikrogravimetrik ve termometrik olarak belirtebiliriz (Vestergaard et al., 2007).

Son yıllarda, elektrokimyasal immünosensörlerin klinik analizlerdeki rolü oldukça artmıştır. İmmünosensörlerin dizaynında kullanılan membran tiplerinin, dönüştürücülerin, immobilizasyon tekniklerinin seçiminde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Her immunosensör türü, etiketsiz (doğrudan) veya etiketli (dolaylı) olarak çalıştırılabilir (Vestergaard et al., 2007).

1.2.1. Etiketli İmmünosensörler

Etiketli immünosensörler için kullanılabilen çok çeşitli farklı etiketler vardır. En değerli etiketler arasında, peroksidaz, glikoz oksidaz, alkalin fosfataz, katalaz veya lusiferaz gibi enzimler; ferrosen veya In^{+2} tuzları gibi elektroaktif bileşikler ve rodamin, floresin, rutenyum diimin kompleksleri, fosforlu porfirin boyaları, vb. gibi bir dizi floresan etiketi mevcuttur (Diaconu et al., 2013). Şekil 1.1.'de etiketli bir immünosensör şematik olarak gösterilmiştir. Poliklonal ve monoklonal olmak üzere iki tür antikor vardır. Poliklonal antikorlar (pAb), hedef antijen için bir ilgiye sahiptir ve farklı bağlanma ilgileri ile farklı bağlanma bölgelerine yönlendirilirler. Monoklonal Abs ise Ag için özdeştir, çünkü immün hücrenin bir türünden üretilir. Monoklonal Abs'ler pAb'lerden daha hassas ve seçici oldukları için tercih edilirler. Antikor bağlanma bölgeleri, Y-şeklindeki proteinin iki kolunun uçlarında bulunur. Y'nin kuyruk ucu, türlere özgü yapılar içerir ve genellikle türüne özgü seçici oldukları için daha çok tercih edilirler. (Vestergaard et al., 2007).



Şekil 1.1. Etiketlenmiş ikinci Abs ile sandwich – tip immünoanaliz şematik gösterimi (Vestergaard et al., 2007).

1.2.2. Etiketsiz İmmünosensörler

Etiketsiz immünosensörler, immünokompleks oluşumu sırasında fiziksel değişiklikleri algılayabilir, daha hassas ve çok yönlü tespit modlarına izin verir. Etiketli immünosensörler, uygulanan etiketin analitik özellikleri nedeniyle son derece hassastır. Etiketsiz immünosensörler, potansiyel basitliği ve ekonomikliği ile immüno analiz sistemlerine iyi bir alternatiftir (Diaconu et al., 2013).

Etiketli immünosensör yöntemlerinde; kalifiye personel ihtiyacı, uzun ve sıkıcı analiz zamanı, spesifik enstrümental cihaz ihtiyaçları ortaya çıkar. Ayrıca bu yöntemlerde, çözelti içerisinde medyatörlere ihtiyaç duyulması, daha kompleks analiz sistemlerinin oluşmasına ve analiz zamanının daha da artmasına sebebiyet verir. Bu nedenle, medyatör moleküllerin elektrot yüzeyine immobilizasyonunun temel alındığı etiketsiz immünosensörlerin daha uygun olacağı düşünülmüştür (Peng et al., 2014).

İmmünosensörleri geliştirirken antikorun immobilizasyonu, antikor-antijen reaksiyonu için önemli bir adımdır. Uygun antikor yüzeyi ile antijen tespiti ve antijen bağ kapasitesi arttırılabilir. Bu bize immünosensör geliştirilmesinde, antikor immobilizasyon metodunun son derece önemli olduğunu gösterir (Bahadır ve Sezgintürk, 2014).

1.2.3. İmmünosensörlerde Antikor İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmünosensörler, immobilize antikorlar ve ilgili analit arasındaki bağlanma etkileşimlerine ve daha sonra bu bağlanmanın uygun detektörle saptanmasına dayanır. İmmobilizasyon, immünosensörlerin önemli bir parçasıdır. Antikorun elektrot

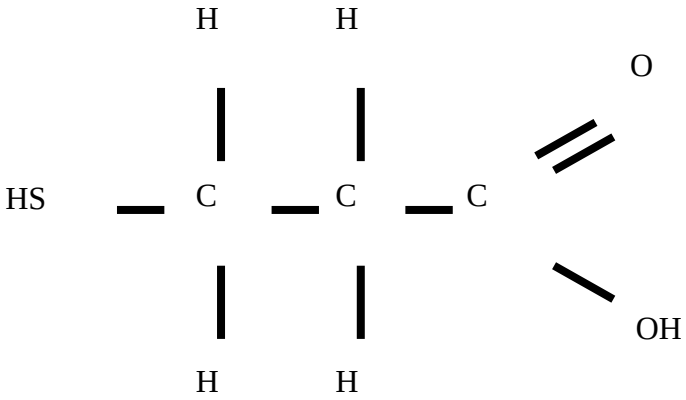
yüzeyine immobilizasyonunda birçok metot mevcuttur. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı fiziksel adsorpsiyon ve kovalent bağlanma yöntemleridir (Limbut et al., 2006).

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi, sensör yüzeyine antikorların immobilizasyonunda kullanılan en basit yöntemdir. Bu yöntemde karışık materyallerin kullanılmasına gerek duyulmaz. Fakat antikorun rastgele adsorpsiyonu sonrası oluşacak kompleks reaksiyonların birçok dezavantajı vardır. Protein denatürasyonu, düşük kararlılık ve rastgele antikor yönelimleri bunların başlıcalarıdır (Kausaite et al.,2010).

Kovalent bağlanma yönteminde en çok kullanılan yöntem, kendiliğinden elektrot yüzeyine modifiye olan organosülfür bileşik (SAMs) tabakalarıdır. SAMs, proteinler için özellikle uygun bir immobilizasyon tekniğidir. Elektrotun yüzeyinin elektrokimyasal yalıtımını sağlar, proteinleri katı yüzeyle doğrudan temastan korur, algılama elemanının denatürasyon riskini azaltır (Limbut et al., 2006). Yüksek pH ve sıcaklıklarda kararlıdır. Antikor yönelimleri kontrol edilebilir (Kausaite et al.,2010).

Elektrot yüzeyine modifiye edilen organik moleküller pratik oluşları sebebiyle büyük ilgi çekmektedir (Ulman, 1996). Organik moleküllerin içerisinde de en iyi bilineni organosülfür bileşikleridir. Elektrot yüzeyine eklenen organosülfür moleküllerinin sonunda yer alan kükürt (S), elektrot yüzeyinde yer alan Altın (Au) ile güçlü S-Au bağı oluşturarak altına bağlanırken, diğer uçlardaki fonksiyonel grup ya da gruplar, çeşitli uygulamalar için tasarım imkânı sunar (Giz et al., 1999).

Organosülfür bileşiklerinin CH_3- ile sonlanan alkantiyolatları ($CH_3(CH_2)_nS^-$), CH_3- fonksiyonel grubu ile elektron transferi için uygun zemin oluşturur. Bazı uygulamalar için de -COOH ve $-NH_2$ gibi fonksiyonel gruplar, CH_3- fonksiyonel grubundan daha çok önem taşır (Giz et al., 1999).



Şekil 1.2. 3 – Merkaptopropiyonik asitin molekül formülü.

Örneğin, Şekil 1.2'de molekül formülü verilmiş olan 3-merkaptopropiyonik asit (3-MPA) ($COOH(CH_2)_2S^-$), EDC (Etil,3[3-dimetilaminopropil] karbodiimid), NHS (N-Hidroksisüksinimid) çözeltileri ile aktive edilen COOH fonksiyonel grubu ile bazı proteinlerin elektrokimyasal tespitinde yaygın olarak kullanılan uygun bir organik bileşiktir (Giz et al., 1999).

1.3. Yüzey Baskılı Elektrotlar (SPE)

Yüzey baskılı elektrotların elektrokimyasal immünosensörlerde kullanımı yüksek seçicilik ve hassasiyet sunar. Kullanım alanı sert yüzeylerden, kâğıt, stres topu hatta kıyafetler gibi esnek yüzeylere kadar genişletilmiştir. SPE sadece üretim maliyetini düşürmekle kalmayıp, aynı zamanda yüksek tekrarlanabilirlik özelliğiyle birçok çalışmanın da önünü açmıştır (Thiyagarajan et al., 2013).

SPE'lerin baskı işlemi sırasında, yaygın olarak gümüş, karbon ya da altın çeşitleri kullanılır. Gümüş yüzey, iletkenliği sağlaması ve iletkenliği arttırıcı olması, karbon yüzey ise düşük maliyeti ve kararlı olması nedeniyle yaygın olarak tercih edilir. Bazı elektrolarda ise gümüş yerine altın kullanılabilir (Li et al., 2018).



a) Yüzey baskılı altın elektrot b) Yüzey baskılı karbon elektrot c) Yüzey baskılı gümüş elektrot

Şekil 1.3. SPE çeşitleri (http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html, 2020)

Şekil 1.3'te baskı materyaline göre değişen karbon, altın ve gümüş elektrot çeşitleri gösterilmiştir.

1.4. Grafen Oksit ve İndirgenmiş Grafen Oksit

Elektrokimyasal immünosensörlerin üretiminde, özellikle etiketsiz immünosensörlerin üretiminde, biyomoleküllerin elektrot yüzeyine etkili ve verimli bir şekilde immobilizasyonu önemli rol oynar. Etkili ve verimli bir immobilizasyon elde edebilmek için ise; immünosensör üretiminde kullanılan materyaller, iyi bir biyouyumluluk ve stabilite sunarak daha çok antikor immobilizasyonu için geniş yüzey alanı sağlamalıdır. İstenen elektron transferini kolaylaştırmak ve hızlandırmak için iletkenliği arttırmalıdır. Metal ve grafen bazlı materyaller, iyi iletkenlikleri, sundukları geniş yüzey alanı ve biyouyumluluklarının fazla olması nedeniyle elektrokimyasal AFP immünosensörlerde yaygın olarak kullanılmıştır (Li et al., 2018).

Birçok çalışmada elektrokimyasal immünosensör yapımında polimerik film ile modifiye edilmiş elektrotlar kullanılmıştır. Polimerik filmlerin elektrot yüzeyine polimerizasyonu için de birçok metot mevcuttur. Bu metotlardan elektropolimerizasyon metodu, polimerlerin immobilizasyonu açısından en uygun yöntemlerden birisidir. Çünkü elektrokimyasal parametreler ayarlanarak film kalınlığı, yüzeye nüfuz etme oranı ve iyon geçirgenliği kontrol edilebilir. Ayrıca,

elektropolimerizasyon yöntemi ile polimerin -NH_2 ve -COOH grupları analitin çeşidinden kaynaklı ihtiyaca göre ayarlanabilir (Li et al., 2012).

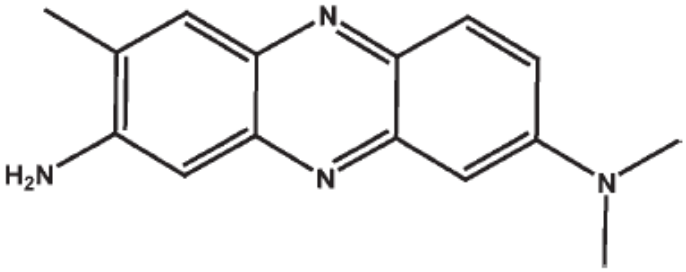
Grafenin benzersiz özellikleri, alan etkili transistörler, ultra hassas sensörler ve elektrokimyasal rezonatörler gibi çok yönlü cihazların tasarımında ön plana çıkar. Bunun yanında grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksit (RGO), biyosensör üretiminde, hücre görüntülemede, ilaç dağıtım sistemlerinde yaygın olarak kullanım alanı bulur. Son yıllardaki araştırmalar, elektroaktif biyomoleküllerin bazı ajanlar varlığında tespiti sırasında RGO ile kaplanmış elektrotların elektrokimyasal biyo-algılama performansının, yalın elektrotların hatta karbon nanotüplerle modifiye elektrotların performansından daha üstün olduğunu göstermiştir. GO'nun indirgenmesi için geliştirilmiş birçok metot mevcuttur. Bu yöntemler arasında yer alan kimyasal ve termal indirgenme metodu ile elektrot yüzeyleri üzerine önceden yerleştirilmiş GO tabakalarının elektrokimyasal indirgenmesi metotları, RGO ile modifiye edilmiş elektrot yüzeyleri elde etmek için daha uygundur. Çünkü basit, hızlı ve düşük maliyetli olmaları ile diğer yöntemlerden daha etkilidirler (Li et al., 2018).

Elektrokimyasal biyosensörlerde grafen, GO veya RGO, elektrokatalitik nanopartiküllerin elektrot yüzeyinde depolanması için iletken bir destek olarak ve/veya katalitik nanopartiküllerin grafen tabakasına çökeltilerek immünosensör formülasyonunda yer alabilmesi için kullanılır. Aynı zamanda yüzey alanını arttırması ve biyouyumluluğu gibi avantajları da beraberinde getirir. Elektrokimyasal algılama ve tespit için katalizör nanopartiküller ile modifiye edilmiş grafenin çok sayıda örnekleri bulunmaktadır (Pumera et al., 2010).

1.5. Polinötral Kırmızı

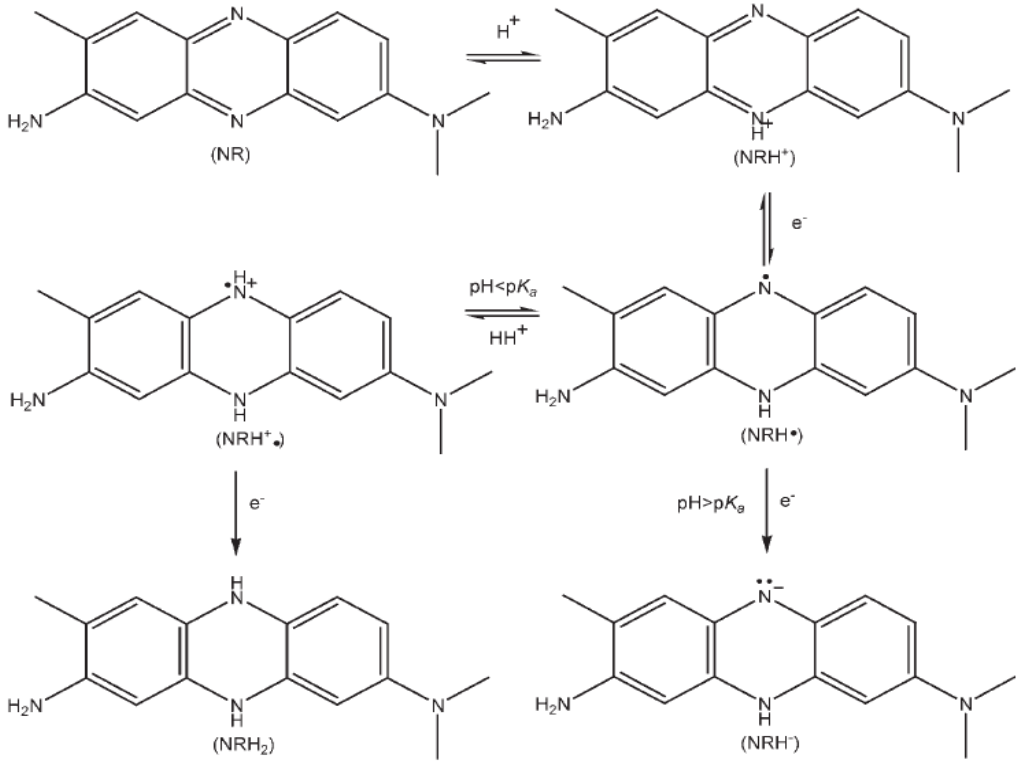
Günümüzde elektrot yüzeyinde analitine uygun fonksiyonel gruplara sahip polimerize filmlerin kullanımı büyük ilgi çekmektedir. Bu tür filmler, sensör araştırma ve geliştirme alanı dahil olmak üzere kimyanın birçok farklı dallarında uygulamalara sahiptir. Bu polimerler, sahip oldukları fonksiyonel grupları ile çeşitli analitleri seçici olarak algılamaya olanak sağlar. Son yıllarda, asit baz tespitinde yaygın olarak kullanılan bazı indikatörlerin de elektrot yüzeyine polimerizasyonu ile

elektrokimyasal immünosensörlerde çok uygun bir redoks ajanı olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir (Broncova et al., 2004)



Şekil 1.4. Polinotral kırmızının molekül formülü (Pauliukaite et al., 2007).

Elektron transfer özeliği ile Şekil 1.4'te molekül formülü verilmiş olan PNR mükemmel bir redoks medyatörüdür. Bu özelliğinin yanında kolay hazırlanması ve düşük maliyeti ile elektrokimyasal immünosensörlerde yaygın olarak kullanılır. PNR'nin elektrokimyasal polimerizasyonu, pH'ın, elektrolit tuzunun ve uygulanan potansiyel aralığının değiştirilmesi ile kolaylıkla kontrol edilebilir (Pauliukaite et al., 2007).



Şekil 1.5. pH'a bağlı PNR'nin polimerizasyonunun şematik gösterimi (Pauliukaite et al., 2007).

Şekil 1.5'te gösterildiği gibi PNR'nin polimerizasyon mekanizması, monomerlerin dimerizasyonu, tetramerizasyonu ve bu radikallerin oluşumunu içerir. Daha sonra polimer vermek üzere bu radikallerin birleşimi gerçekleşir (Pauliukaite et al., 2007).

1.6. Altın Nanopartiküller (AuNP)

Altın nanopartiküller olarak da bilinen altın kolloidler, 21. Yüzyılın en iyi kararlı nano parçacıkları ve birçok avantajı bakımından elektrokimyasal immünosensörler için önemli bir materyalidir. Faraday'ın 1857' de $AuCl_4^-$ iyonunun sudaki iletkenliğini açıklamasından günümüze kadar altın kolloidler birçok elektrokimyasal çalışmada kullanılmıştır (Sun et al., 2005).

Kolloidler, küçük boyutlarından dolayı çözelti içinde toplanma eğilimindedir. Bu eğilimleri kolloidlerin elektrokimyasal ölçümlerde kullanımında sorun teşkil eder. Fakat kararlı kolloidler elde etmek için birçok strateji geliştirilmiştir. Bunların içerisinde en çok kullanılanı, kolloidlerin partikül boyutunu kontrol edebilen, toparlanmalarını önleyebilen ve işlevsellik kazandırabilen tiyoller, yüzey aktif maddeler ve polimerler gibi koruyucu maddelerle kolloidleri korumaktır. Polielektrolitler de kolloidler için mükemmel koruyucu maddelerdir, çünkü sterik ve elektrostatik stabilizasyon özelliklerini birleştirirler (Sun et al., 2005).

Altın kolloidlerin kullanılmasında sorun teşkil eden bir başka konu; destek yüzeyleri üzerinde dağılmış $HAuCl_4$ kristalitlerinin kalsinasyonu sırasında, klorür iyonunun altın parçacıklarının pıhtılaşmasını belirgin bir şekilde arttırmasıdır. Çapı 10 nm'nin altında olan altın parçacıklarının hazırlanabilmesi için metal oksitler, karbon materyaller veya tekli kristal yapılar gibi destek materyalinin ne çeşit olacağını seçmek son derece önemlidir (Haruta, 2004).

AuNP'lerin elektrokimyasal immünosensörlerde kullanımı birçok avantaj sunar. Altının elektriksel iletkenliğinin çok iyi oluşuyla AuNP'ler elektrot yüzeyi ile antikor arasında doğrudan elektron alış-verişi sağlayabilirler. Bir diğer taraftan altın kararlı bir metaldir fakat son çalışmalar Au'nun yüksek yüzey / hacim oranında yüzeye ve yüzey

özelliklerine sahip olduğunu göstermiştir. Bu avantajı, yüksek potansiyellerde çalışma ihtiyacını ortadan kaldırır ve biyouyumluluk sunar (Putzbach and Ronkainen, 2013).

2. KAYNAK TARAMALARI

Canlı serumunda AFP tayini için birçok immünosensör geliştirilmiştir. Bunlar, amperometrik immünosensörler, elektrokemilümunesans analiz yöntemleri, elektrokimyasal ve floresans sensörler, optik sensörlerdir (Chen ve Zhao 2017; Wei, 2010). Günümüzde optik ve elektrokimyasal immünosensörler, klinik araştırmalarda antijenin erken tespiti için sıkça kullanılmaktadır. Optik immünosensörler, radyoaktif tutucuların kısa ömürlü olması, daha az seçicilik gibi birçok istenmeyen problemleri içerir. Buna karşın elektrokimyasal immünosensörler, daha hızlı, basit ve ekonomik oluşlarıyla ön plana çıkarlar (Bahadır ve Sezgintürk, 2014).

AFP tayini için 2010 yılında geliştirilen etiketsiz elektrokimyasal bir immünosensör; 0,05 - 2 ng/mL tespit aralığında çalışmaktadır. RGO ve tiyonin kompozitininin camsı karbon elektroda (GCE) modifiyesi sonrasında glutaraldehit ve Anti-AFP ile immobilize edilerek AFP immünosensörü hazırlanmıştır (Wei et al., 2010). Bu çalışmada AuNP kullanılmadan, kısa ve basit elektrot hazırlık aşamaları ile geniş bir tayin aralığına ulaşılmıştır.

Başka bir etiketsiz elektrokimyasal AFP immünosensörü çalışmasında AuNP/PDA/Tiyonin (THI)/GO nanokompoziti, elektrot üzerinde elektro polimerizasyon metodu ile sentezlenmiştir. Bu basit ve çok yönlü metot, diğer biyomolekül immobilizasyonları için de yeni bir biyosensör platformudur. AFP tayini 15 dk süre içerisinde gerçekleştirilmiştir. Anti-AFP/AuNP/PDA/THI/GO elektrotunun tayin aralığı 0,1–150 ng/mL olarak tespit edilmiştir (Peng et al., 2013).

Ag-GO nanokompozitinin redoks ajanı olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise; altın elektrot yüzeyine, Ag-GO ve nafyon nanokompoziti modifiye edilir. Modifiye elektrotun yüzeyi AuNP'ler ile kaplanarak AFP tayini için etiketsiz elektrokimyasal immünosensör hazırlanmıştır. Altın elektrodun kullanıldığı bu çalışmada AFP tayini 12 dk içerisinde gerçekleştirilmiş ve tayin aralığı 0,01 ng/mL – 100 ng/mL olarak belirtilmiştir (Wu et al., 2013).

2014 yılında Gao ve çalışma arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada ise; iyonik sıvı ile indirgenmiş grafen oksit kullanarak, 0,01-100 ng/mL aralığında çalışabilen AFP tespiti için etiketli elektrokimyasal immünosensör geliştirmişlerdir. İmmünosensör probunun üretimi için camsı karbon elektrot, likit formdaki indirgenmiş grafen oksit (IL-RGO), gluteraldehit (GA), birincil AFP antikoru (anti-AFP_1) ve BSA kullanılmıştır. AFP'nin elektrokimyasal tespiti için daha önce hazırlanan IL/RGO/altın (Au)/ poli dialildimetilamonyum klorit (PDDA)/ kurşun (PB)/ikincil AFP antikoru (anti-AFP_2) çözeltisi elektrot yüzeyine damlatılmıştır. Toplamda 100 dk inkübasyon süresinin ardından, hidrojen peroksit (H_2O_2) içeren pH 6,5 tampon çözeltisinde SWV metodu ile ölçümleri yapılmıştır (Gao et al., 2014). Bu metotta, H_2O_2 ve IL-RGO-Au-PDDA-Pb nanokompoziti arasında meydana gelen katalitik reaksiyon, sinyal kalitesini arttırmıştır.

Jia ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı bir başka çalışmada, GCE yüzeyine modifiye edilen grafenin iki ana rol oynadığı belirtilmiştir. İlk olarak, sunduğu yüksek yüzey alanı ile redoks moleküllerinin ve AuNP'lerin elektrot yüzeyine immobilizasyonunu arttırmış ikinci olarak ise elektronik özellikleri ile elektron transferini desteklemiştir. GCE, Grafen oksit (GO), prusya mavisi, AuNP, platinyum nanopartiküller (PtNP), glikoz oksidaz ve peroksidazlar kullanılarak AFP ve CEA125 tespiti için etiketli elektrokimyasal immünosensör geliştirilmiştir. Tayin aralığı 0,001-300 ng/mL, AFP inkübasyon zamanı 45 dk ve sıcaklık 37 ^{0}C olarak belirtilmiştir (Jia et al., 2014).

Altın elektrot, Au-poliamidoamin (PAMAM) nanokompoziti kullanılarak yapılan bir başka çalışma ile etiketsiz elektrokimyasal AFP immünosensörünün çalışma aralığı 0,001 ng/mL – 0,45 ng/mL olarak bulunmuştur. Bu çalışmada Au-PAMAM nanokompozitinin sadece elektrot yüzeyini arttırma etkisi olmadığı aynı zamanda antijen antikor bağlanmasını da arttırdığı belirtilmiştir AFP tayini 5 dk içerisinde gerçekleştirilmiştir. (Kavosi et al., 2014). Bu çalışma, AFP tayininin kısa bir süre içerisinde gerçekleştirilmesi ile ön plana çıkmaktadır.

500 °C sıcaklıkta elde edilen iridyum oksit (IrOx) nanofiberlerin benzersiz yapısı ve özellikleri, elektrot yüzey alanının artmasını ve elektron transfer kinetiğinin hızlandırılmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda kimyasal ve termal stabilitesi ile son

yıllarda IrOx nanofiberleri elektrokimyasal immünosensörlerde tercih sebebidir. IrOx nanofiberleri kullanılarak yapılan bu çalışmada; AFP/BSA/anti-AFP/IrOx-CS/GCE materyalleri kullanılarak etiketsiz elektrokimyasal AFP immünosensörü geliştirilmiştir. AFP tayini 1 saat içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan bu immünosensörün tayin aralığı 0,05 – 150 ng/mL olarak belirtilmiştir (Li et al., 2015).

2017 yılında yapılan bir çalışmada ise; prusya mavisi-karbon nanotüpler (PB-CNT) (CNTS)/Polidopamin (PDA)-AuNP ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrot (GCE) PDA'nın mükemmel redoks özelliği ile bir başka redoks ajanına ihtiyaç duymadan 0,005 ng/mL – 80 ng/mL aralığında çalışma imkânı sunmuştur. AFP'nin elektrokimyasal tayini 20 dk sürede yapılmıştır (Gao et al., 2017). GCE ve AuNP kullanılarak AFP tayini için geliştirilmiş olan bu etiketsiz elektrokimyasal immünosensör, çalışma aralığının genişliği, ekonomikliği ve basit oluşuyla ön plana çıkmaktadır.

Bu çalışmada ise, SPCE, RGO, PNR ve AuNP materyalleri kullanılarak insan kan serumunda AFP tespiti için etiketsiz elektrokimyasal AFP immünosensörünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun yanında, kullanılan materyaller ve immünosensörün hazırlanma basamaklarında uygulanan metotların sunduğu avantajlar ile düşük maliyetli, hızlı sonuç verebilen, seçiciliği ve hassasiyeti yüksek ölçümler yapılması hedeflenmiştir. Bu amaç ve hedefler doğrultusunda geliştirilen AFP immünosensörünün gebelik döneminde oluşabilecek olumsuzlukları önceden tespit etmede, kandaki AFP miktarının artış gösterdiği kanser hastalıklarının erken teşhislerinde ve bu hastalıkların tedavi süreçlerinde kandaki AFP miktarının izlenebilmesinde kullanılabilecek bir yöntem olacağı öngörülmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Anti-AFP ve AFP Novus Biologicals USA firmasından, NaOH (sodyum hidroksit), 3-merkaptopropiyonik asit (3-MPA), KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat), K_2HPO_4 (dipotasyum hidrojen fosfat), KCl (potasyum klorür), HCl hidroklorik asit (% 37'lik), Merck firmasından, yapay kan serumu (insan kanı, H6914), indirgenmiş grafen oksit (RGO), nötral kırmızı (NR), EDC (Etil,3[3-dimetilaminopropil] karbodiimid), NHS (N-Hidroksisüksinimid), kloroaurik asit ($HAuCl_4$), $K_3Fe(CN)_6$ (potasyum hekzasiyanoferrat), $K_4Fe(CN)_6$ (potasyum hekzasiyanoferrit), sığır serum albümin (BSA), DMF (dimetil formamid) Sigma-Aldrich firmasından, etanol, Carlo Erba Reagents firmasından tedarik edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar yüksek analitik saflıktadır.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Elektrokimyasal ölçümler Dropsens μStat 400 Bipotentiyostat/Galvanostat ile gerçekleştirilmiştir. İstenilen pH'da tampon çözelti hazırlamak için, standart tampon çözeltilerle kalibre edilmiş Mettler Toledo pH-metre kullanılmıştır. Katı kimyasalların tartımı için Precia XR 2055M-DR 0,01 mg duyarlı elektronik terazi kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan ultra saf su Millipore Milli-Q Direct Q-3 ultra saf su cihazından elde edilmiştir.

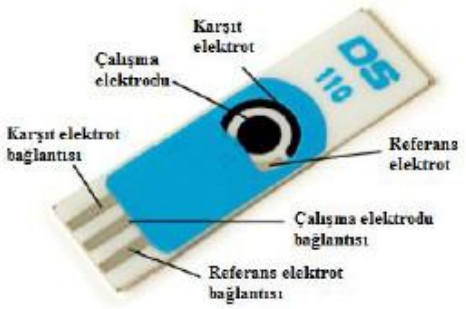
3.1.3. Elektrokimyasal Ölçüm Sistemi

Deneylerde voltametri, kronoamperometri gibi çeşitli elektrokimyasal metotların çalışılabildiği Dropsens μStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat elektrokimyasal ölçüm sistemi (Şekil 3.1.) kullanılmıştır. Bilgisayar kontrollü olan Dropsens μStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat cihazının sinyalleri DropView 8400 yazılımı ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Dropsens µStat 400 Bipotentiostat / Galvanostat (http://www.dropsens.com/en/potentiostats_pag.html, 2020).

3.1.4. Kullanılan Elektrotlar ve Konnektörler



Şekil 3.2. SPCE (http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html, 2020)

Deneylerde DropSens firmasından temin edilmiş tek kullanımlık yüzey baskılı karbon elektrotlar (SPCE) (Şekil 3.2.) kullanılmıştır. SPCE çalışma elektrodu (4 mm) ve yardımcı elektrotu karbondan, referans elektrotu ise pseudo Ag/AgCl (0,1 M KCl)'dan oluşmaktadır. Elektrotların Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostata bağlantısı DropSens'ten temin edilmiş konnektörler ile sağlanmıştır.

Elektrotlar, Dropsens µStat 400 Bipotentiostat/Galvanostat cihazına, yine DropSens'ten alınan konnektörler ile bağlanmıştır (Şekil 3.3.a ve b)

a) **b)**



Şekil 3.3. a) SPCE'lerde damlatmalı analizler için kutu şeklindeki konnektör **b)** SPCE'lerde kesikli analizler için konnektör (http://www.dropsens.com/en/faqs_dropsens.html, 2020).

Elektrotlar için, metil metakrilat malzemesinden imal edilmiş olan elektrokimyasal hücreler kullanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. SPCE'ler için elektrokimyasal hücre (http://www.dropsens.com/en/faqs_dropsens.html, 2020).

3.2. Metot

3.2.1. Elektrot Yüzeyinin Temizlenmesi

SPCE elektrotlarının yüzeylerinin temizlenebilmesi için; 50 mM pH 7,5 fosfat tamponu (0,1 M KCl) içerisinde, -1,0 V ve + 1,0 V potansiyel aralığında 3 döngü CV (döngüsel voltametri) uygulanmıştır.

3.2.2. Destek Elektrolit Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

Deneylerde 0,1 M KCl içinde hazırlanan 50 mM KH_2PO_4 ve 50 mM K_2HPO_4 fosfat tamponu çözeltileri destek elektrolit olarak kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm çözeltiler 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Tampon çözeltilerinin pH ayarlaması ise 1 M NaOH ve 1 M HCl çözeltileri ile yapılmıştır.

3.2.3. SPCE'lerin RGO ile Modifikasyonu

0,5 mg RGO ve 1 mL DMF:H_2O (1:1) karışımına 3 saatlik sonikatör uygulamasıyla kararlı ve homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Disperse edilmiş RGO'dan SPCE'lerin çalışma elektrodunun (WE) yüzeyine 2 µL damlatılmış ve karanlıkta kapalı ortamda oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır (Bilgi ve Ayrancı 2016, Şahin 2013, Şahin ve Ayrancı 2015). Daha sonra ultra saf su ile elektrotların yüzeyi temizlenmiş ve yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. RGO ile modifiye edilen SPCE'ler SPCE/RGO şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.4. SPCE/RGO Yüzeyinde Nötral Kırmızının Elektropolimerizasyonu

0,1 M KNO_3 içeren 0,025 M pH 5,5 fosfat tamponu içerisinde 1,0 mM monomer nötral kırmızı çözeltisi hazırlanmıştır. Döngüsel voltametri uygulanarak SPCE/RGO üzerinde nötral kırmızının elektropolimerizasyonu, dolayısıyla da PNR oluşumu sağlanmıştır. Döngüsel voltametri, -1,0 V ile + 0,9 V potansiyel aralığında 15 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ultra saf su ile elektrotların yüzeyi

temizlenmiş ve yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. PNR ile modifikasyonu yapılan elektrot SPCE/RGO/PNR şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.5. SPCE/RGO/PNR'lerin AuNP ile Modifikasyonu

SPCE/RGO/PNR'lerin çalışma elektrodunun yüzeyine 0,1 M KCl'li 50 mM pH 7 fosfat tamponu içinde hazırlanan 4 mM kloroaurik asit çözeltisinden 50 µL damlatılmıştır. Ardından döngüsel voltametri -1,3 V ile -0,2 V potansiyel aralığında 10 döngü uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Karaboğa ve Sezgintürk, 2019). Daha sonra elektrotların yüzeyi, ultra saf su ile temizlenmiş ve yüksek saflıktaki Ar gazı ile kurutulmuştur. AuNP ile modifikasyonu yapılan elektrot SPCE/RGO/PNR/AuNP şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.6. Kovalent Bağlanma ile AFP İmmünosensörünün Hazırlanması

3.2.6.1. SPCE/RGO/PNR/AuNP'lerin 3-MPA ve EDC-NHS ile Aktivasyonu

SPCE/RGO/PNR/AuNP'lerin WE yüzeyine etanol içinde hazırlanmış olan 50 mM 3-MPA çözeltisinden 3 µL damlatılıp karanlıkta ve oda sıcaklığında 1 gece bekletilmiştir. Hazırlanan elektrotlara yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır. SPCE'lerin WE yüzeyine 50 mM pH 7 fosfat tamponunda (0,1 M KCl içinde) hazırlanmış olan 0,6 mM EDC / 0,1 mM NHS çözeltisinden 2 µL damlatılıp 60 dk oda sıcaklığında ve sabit nem ortamında bekletilmiştir. Daha sonra elektrotların yüzeyi ultra saf suyla temizlenmiş ve kurutulmuştur.

3.2.6.2. Anti-AFP'nin SPCE/RGO/PNR/AuNP Üzerine İmmobilizasyonu

3-MPA ve EDC/NHS ile aktive edilmiş SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun WE yüzeyine 50 µg/mL anti-AFP çözeltisinden 2 µL damlatılıp oda sıcaklığında ve sabit nem ortamında 60 dk bekletilmiştir. Daha sonra elektrotlara yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır. Hazırlanan elektrotlar SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP olarak kısaltılmıştır.

3.2.6.3. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP'nin BSA Bloklama Ajanı ile Modifikasyonu

SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP elektrodunun WE yüzeyine %1'lik BSA çözeltisinden 2 µL damlatılmıştır. 30 dk sabit nem ortamında ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra elektrotların yüzeyi yıkanıp kurutulmuştur. Elektrotlar SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA şeklinde kısaltılmıştır.

3.2.6.4. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA İmmünosensörü ile AFP'nin Tutuklanması

SPCE'lerin WE yüzeyine 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu (0,1 M KCl) içerisinde hazırlanan farklı derişimlerdeki AFP çözeltilerinden 2 µL damlatılmıştır. 15 dk sabit nem ortamında ve oda sıcaklığında bekleme süresinin ardından yıkama ve kurutma işlemi yapılmıştır.

3.2.6.5. Elektrokimyasal Ölçümler

Elektrokimyasal ölçümler elektrot yüzeyine 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinden 100 µL damlatılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Döngüsel voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV) ve kare dalga voltametri (SWV) ölçümleri DropSens mikrostat 400 Bipotansiyostat/Galvanostat ile gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.1'de CV, DPV ve SWV metotlarında kullanılan ölçüm parametreleri verilmiştir.

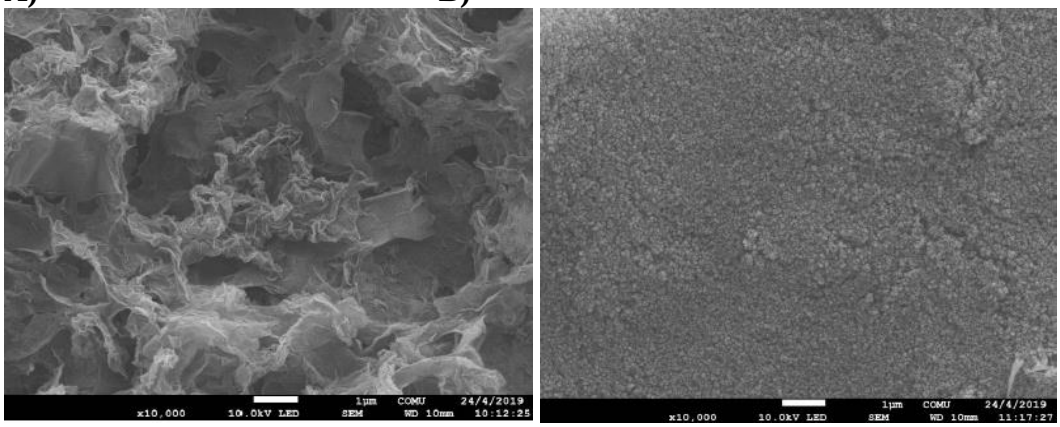
Çizelge 3.1. CV, DPV ve SWV metotları ölçüm parametreleri.

Metot	Parametreler
CV (Dönüşümlü Voltametri)	Tarama hızı (srate): 50 $mV.s^{-1}$
DPV (Diferansiyel puls Voltametri)	Vurum potansiyeli (E_{puls}): 70 mV, vurum zamanı (t_{puls}): 0,1 s basamak potansiyeli (E_{step}): 5 mV tarama hızı (srate): 10 $mV.s^{-1}$
SWV (Kare dalga Voltametri)	Basamak potansiyeli (E_{step}): 5 mV, genlik potansiyeli (E_{amp}): 25 mV, kare dalga frekansı (Freq): 5 Hz

4. BULGULAR

4.1. SPCE 'lerin İndirgenmiş Grafen Oksit ile Modifikasyonu

A) **B)**

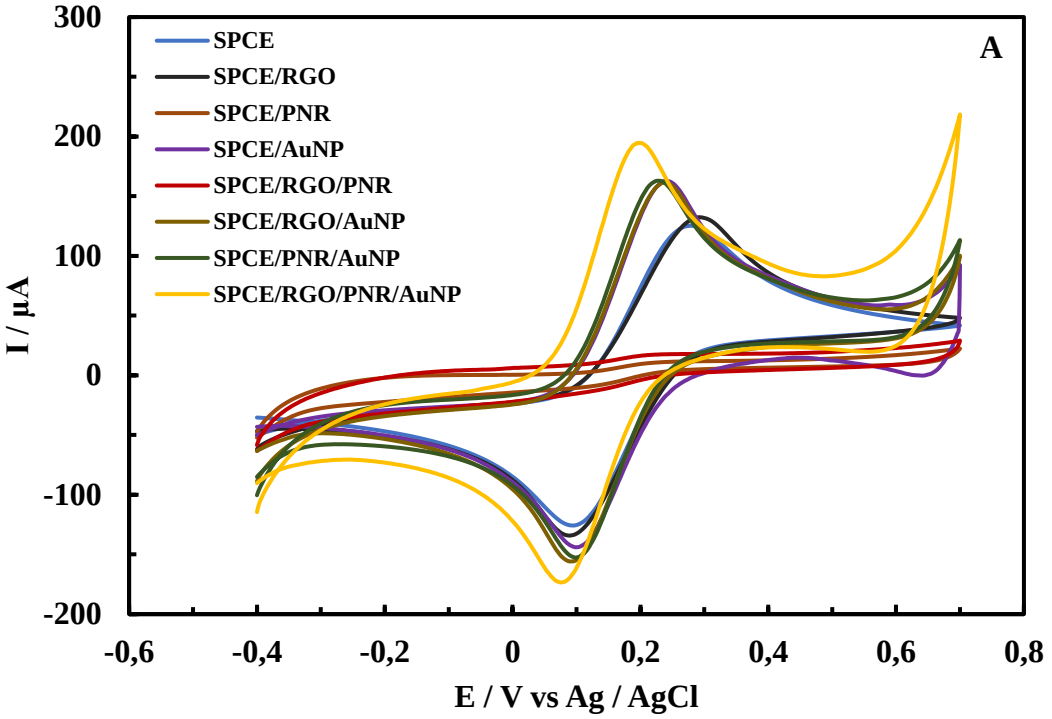


Şekil 4.1. SPCE/RGO (A) ve yalın SPCE (B) elektrotlarının SEM görüntüleri

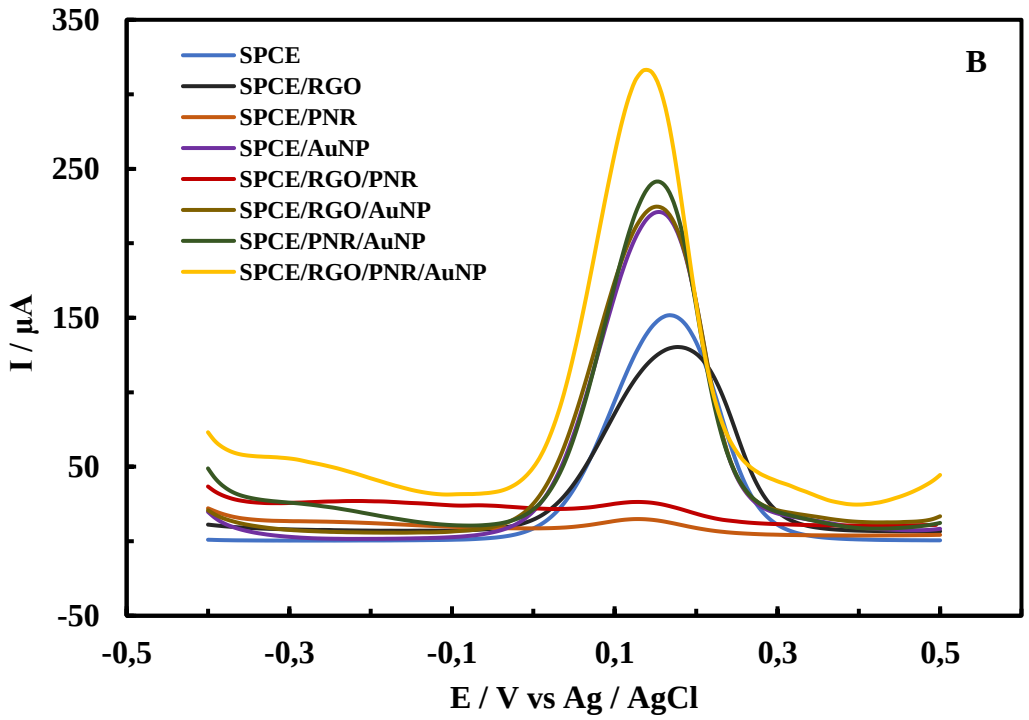
Şekil 4.1. A'da RGO'nun katmanlı, buruşuk yüzeyli ve birbirine benzer, rasgele dağılmış ince katmanlar ve dağınık halde üst üste binmiş yapısı gözlenmiştir. Görüntüdeki bu yapı literatürle uyumludur (Shalaby et al., 2015, Tiyek et al., 2016). Bu sonuçlar, SPCE yüzeyine RGO'nun başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermektedir.

4.2. SPCE/RGO/PNR/AuNP Elektrodunun Elektrokimyasal Karakterizasyonu

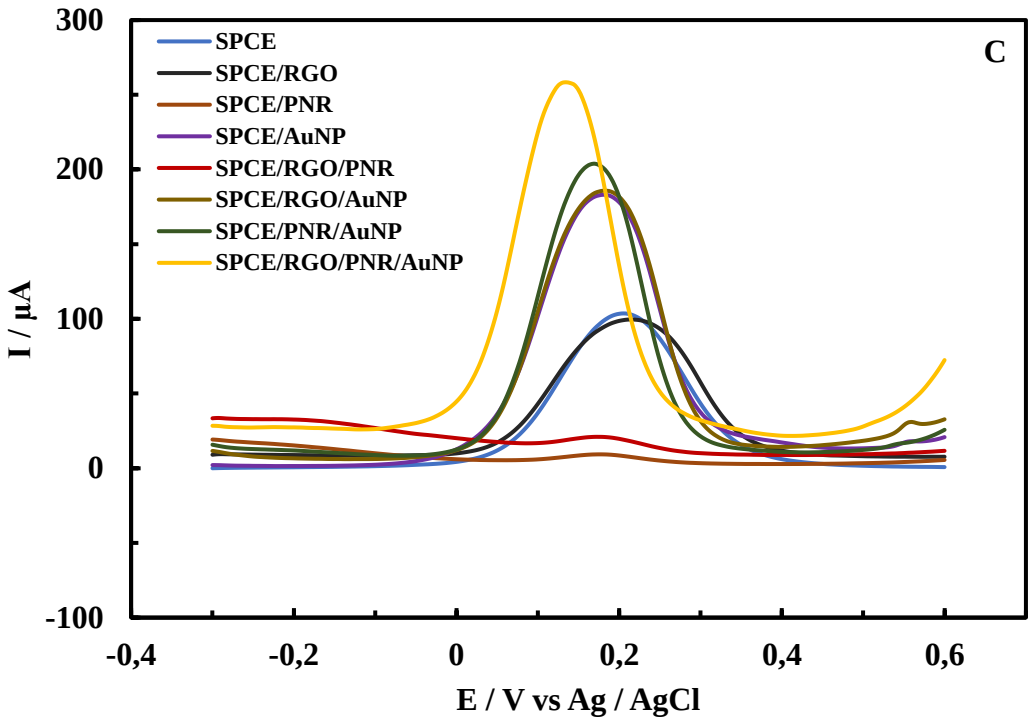
SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun formülasyonunda yer alan nanomateryaller ve iletken redoks polimerlerinin etkisini incelemek için, SPCE, SPCE/RGO, SPCE/PNR, SPCE/AuNP, SPCE/RGO/PNR, SPCE/RGO/AuNP, SPCE/PNR/AuNP ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarına 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde CV, DPV ve SWV metotları uygulanmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.2.A, 4.2.B ve 4.2.C'de verilmiştir.



Şekil 4.2.A. SPCE, SPCE/RGO, SPCE/PNR, SPCE/AuNP, SPCE/RGO/PNR, SPCE/RGO/AuNP, SPCE/PNR/AuNP ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde -0,4 V ile +0,7 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları.



Şekil 4.2.B. SPCE, SPCE/RGO, SPCE/PNR, SPCE/AuNP, SPCE/RGO/PNR, SPCE/RGO/AuNP, SPCE/PNR/AuNP ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde -0,4 V ile +0,5 V potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları.



Şekil 4.2.C. SPCE, SPCE/RGO, SPCE/PNR, SPCE/AuNP, SPCE/RGO/PNR, SPCE/RGO/AuNP, SPCE/PNR/AuNP ve SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrotlarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) -0,3 V ile +0,6 V potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları.

Şekil 4.2.A, 4.2.B ve 4.2.C'de yer alan CV, DPV ve SWV'lardan elde edilen pik akım değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun hazırlanma basamaklarında CV, DPV ve SWV'lerden elde edilen pik akımı yükseklikleri.

Elektrot türü	CV (µA)	DPV (µA)	SWV (µA)
SPCE	122,57	151,1	102,9
SPCE/RGO	125,8	186,9	147,8
SPCE/PNR	4,97	8,3	5,0
SPCE/AuNP	153,30	216,4	175,3
SPCE/RGO/PNR	5,1	9,0	7,3
SPCE/RGO/AuNP	154,05	215,1	175,0
SPCE/PNR/AuNP	148,1	231,7	194,4
SPCE/RGO/PNR/AuNP	170	288,2	234

Çizelge 4.1'de verilen CV, DPV ve SWV sonuçları incelendiğinde, SPCE üzerine AuNP modifikasyonu sonrasında her üç metotta da pik akım değerlerinin arttığı dolayısıyla iletkenliğin de arttığı görülmüştür. SPCE üzerine RGO'nun modifikasyonu ile SPCE/AuNP'de olduğu gibi SPCE elektroduna göre pik akım değerlerinin arttığı görülmüştür. AuNP modifikasyonu ile beklendiği gibi elektronik iletkenliğin arttırmasının yanında RGO modifikasyonu da elektronik iletkenliği artırmıştır. SPCE yüzeyine sadece NR'nin elektropolimerizasyonu sonrasında ise SPCE/PNR elektrodunun CV, DPV ve SWV pik akım değerlerinin azaldığı dolayısıyla elektrodun elektronik iletkenliğinin oldukça az olduğu görülmektedir. Aynı şekilde SPCE/RGO elektrodu yüzeyine PNR'nin elektropolimerizasyonu sonrasında her üç metotta da pik akım değerlerinin azaldığı görülmüştür. Diğer taraftan SPCE/RGO/PNR elektrodunun pik akım değerlerinin SPCE/PNR elektrodunun pik akım değerlerine göre arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2.B ve Şekil 4.2.C). Bu durumun NR'nin elektropolimerizasyonu sonrasında PNR'nin dallanması ve elektrot yüzeyinin yapısının değişmesiyle ilgili olabileceği savunulmaktadır (Pauliukaite et al., 2007).

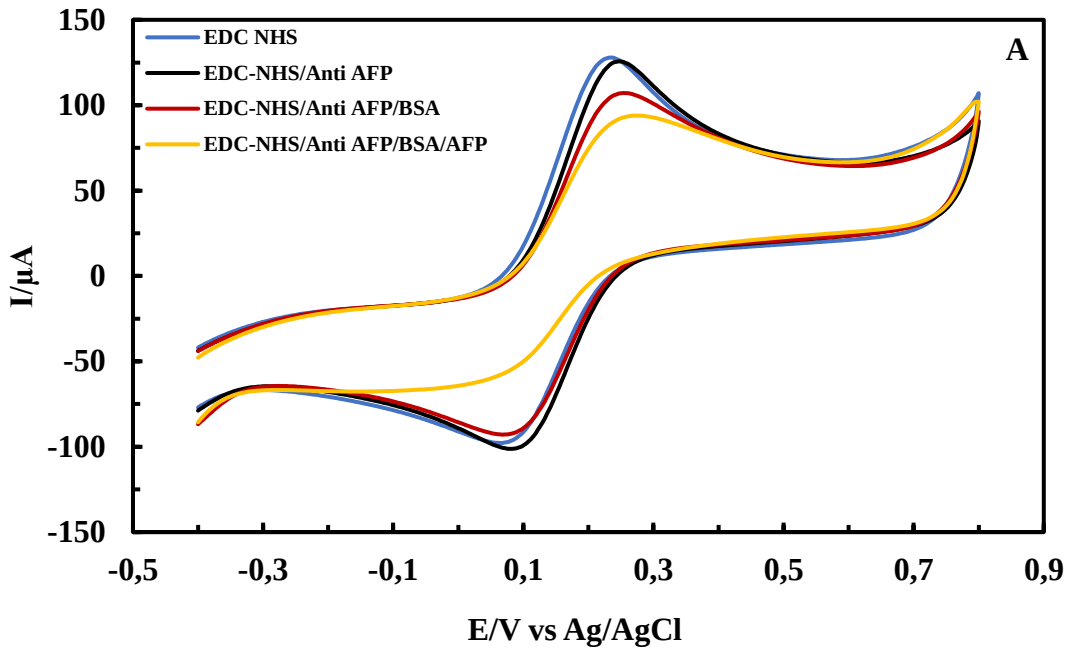
AuNP modifikasyonu sonrasında SPCE/RGO/AuNP elektrodunda pik akım değerleri CV, SWV ve DPV metotlarının her üçünden elde edilen sonuçlara göre tekrar yükselmiştir, dolayısıyla iletkenlik artmıştır. Aynı şekilde AuNP modifikasyonu ile SPCE/PNR/AuNP elektrodunda elektronik iletkenliğin artışı ve pik akım değerlerindeki artış genel olarak sonuçlara tekrar yansımıştır. Burada dikkat çeken nokta; AuNP modifikasyonu sonrasında SPCE/PNR/AuNP elektrodundaki pik akım değerlerinin SPCE/RGO/AuNP elektrodundaki pik akım değerlerinden daha yüksek değerlere ulaşmış olmasıdır.

RGO, PNR ve AuNP materyallerinin üçünün de aynı anda elektrot formülasyonunda yer aldığı SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunda ise CV, DPV ve SWV metotlarından elde edilen sonuçlara göre pik akım değerlerinde artış görülmektedir ve elde edilen pik akım değerlerinin en yüksek değerlere ulaştığı dolayısıyla elektronik iletkenliğin de arttığı tespit edilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak; RGO'nun formülasyonda bulunması elektroaktif yüzey alanını ve bunun sonucu olarak da elektrodun elektronik iletkenliğini arttırdığını söyleyebiliriz. Ayrıca, RGO'nun sp^2 karbonlarından oluşan hidrofobik yan duvarlarına ve π-konjuge yapılarına sahip olması, PNR'nin aromatik

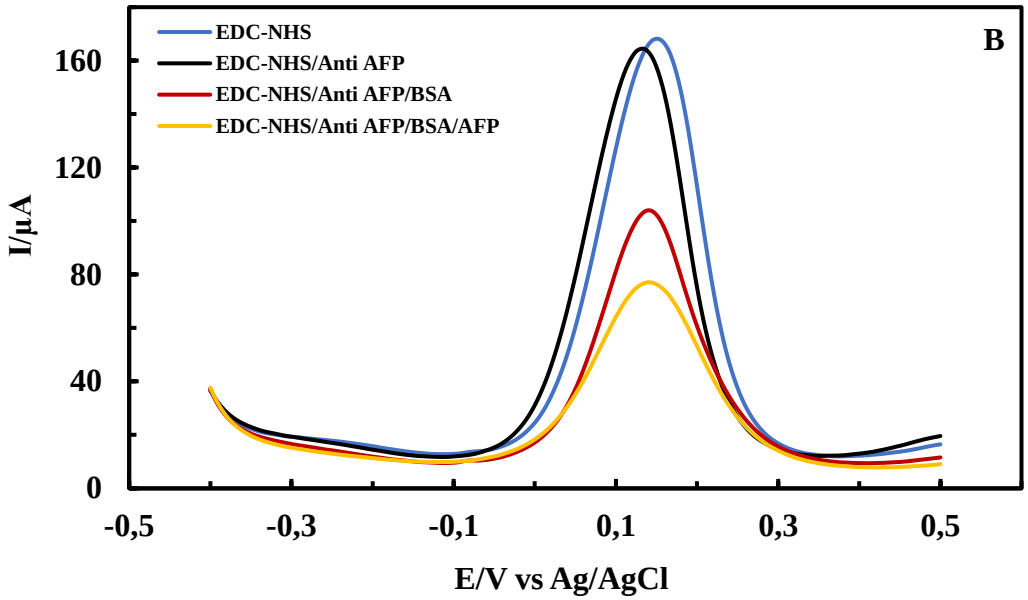
halkasında bulunan π-π konjuge yapıları ile, π-π elektronik ve hidrofobik etkileşim yapmasına neden olmuştur. PNR ve RGO arasındaki bu etkileşim sonucu elektronik iletkenlik, sinerjik bir etkiyle artmıştır. Elektronik iletkenliğin artışı da elektron transfer hızını ve faradik cevabı artırmıştır. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur (Pauliukaite et al., 2007; Şahin, 2013; Şahin ve Ayrancı, 2015; Altun vd., 2020; Kamaç vd., 2019; Kamaç vd., 2020).

4.3. AFP İmmünosensörünün Elektrokimyasal Karakterizasyonu

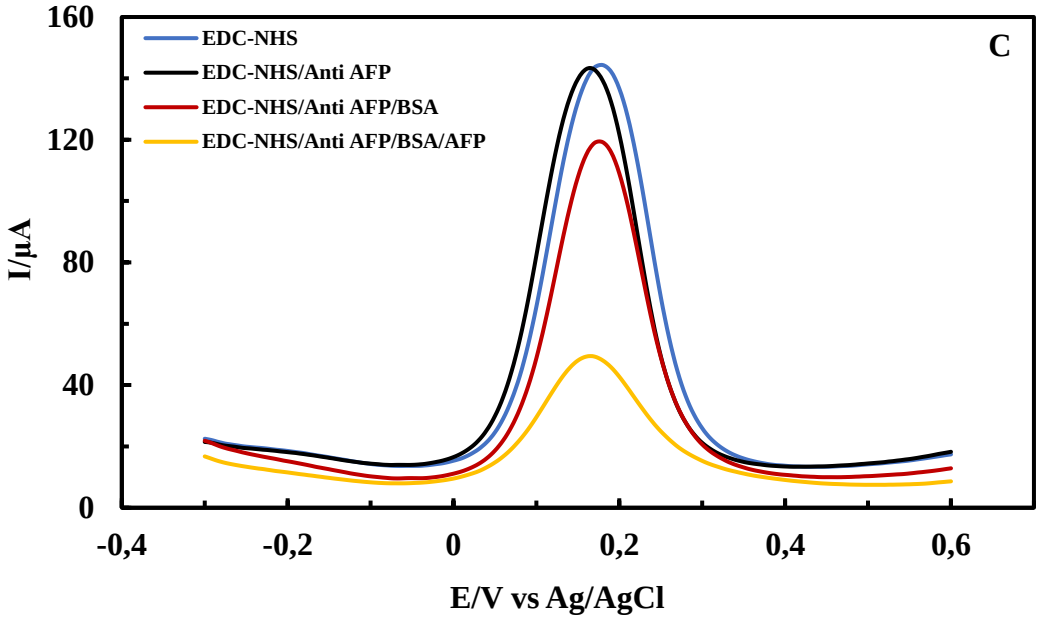
AFP immünosensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu için, EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-AFP, EDC-NHS/Anti-AFP/BSA ve EDC-NHS/Anti-AFP/BSA/AFP basamaklarında 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde CV, DPV ve SWV sonuçları alınmış ve Şekil 4.3.A, 4.3.B ve 4.3.C'de verilmiştir.



Şekil 4.3.A. AFP immünosensörünün hazırlanma basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde ve -0,4 V ile +0,8 V potansiyel aralığında elde edilen döngüsel voltamogramları.



Şekil 4.3.B. AFP immünosensörünün hazırlanma basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde ve -0,4 V ile +0,5 V potansiyel aralığında elde edilen diferansiyel puls voltamogramları.



Şekil 4.3.C. AFP immünosensörünün hazırlanma basamaklarının 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde ve -0,3 V ile +0,6 V potansiyel aralığında elde edilen kare dalga voltamogramları.

Şekil 4.3.A, B ve C'deki grafiklerden elde edilen pik akım değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. AFP immünosensörünün hazırlanma basamaklarında CV, DPV ve SWV'lerden elde edilen pik akımı yükseklikleri.

Elektrot türü	CV (µA)	DPV (µA)	SWV (µA)
EDC-NHS	110,4	155,6	130,8
EDC-NHS/Anti-AFP	108,4	152,4	129,7
EDC-NHS/Anti-AFP/BSA	90,1	94,2	109,4
EDC-NHS/Anti-AFP/BSA/AFP	72,6	68,1	41,7

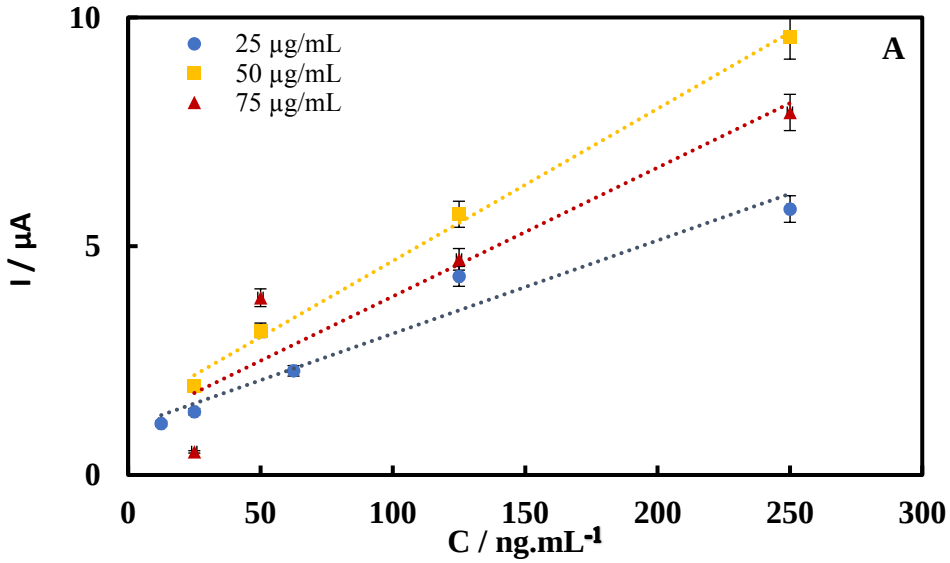
AFP immünosensörünün elektrokimyasal karakterizasyonunda Çizelge 4.2'de verilen CV, DPV ve SWV değerleri incelendiğinde, anti-AFP'nin elektrot yüzeyine tutuklanması sonrasında EDC-NHS/Anti-AFP elektrodunun pik akım değerleri üç metotta da azalmıştır. Bu azalışın nedeni, antikorun elektrodun yüzeyini EDC-NHS basamağına göre daha yalıtkan hale getirmesi ve sonrasında elektronların elektrot yüzeyine difüzyonunu azaltmasıdır. Bu sonuç, anti-AFP'nin elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde kovalent bağlandığını göstermektedir. BSA bloklama ajanının modifikasyonu sonrasında ise her üç metottan elde edilen değerlere göre, EDC-NHS/Anti-AFP/BSA immünosensörünün yüzeyinde EDC-NHS/Anti-AFP elektroduna göre daha yalıtkan bir tabaka oluşmuş ve bunun sonucu olarak da elektronların elektrot yüzeyine difüzyonu azalmıştır. Elektron difüzyonunun azalması ile pik akım değerleri de azalmıştır (Aydın ve Sezgintürk, 2017; Demirbakan ve Sezgintürk, 2020). Son olarak AFP'nin immünosensör yüzeyine eklenmesi ile AFP immünosensörünün yalıtkanlığı artmış, iletkenliği azalmış ve pik akım değerleri de azalma göstermiştir. Pik akım değerlerindeki bu azalma bize AFP'nin anti-AFP ile etkileşerek yüzeye tutuklandığını göstermektedir (Aydın ve Sezgintürk, 2017; Demirbakan ve Sezgintürk, 2020).

4.4. AFP İmmünosensörünün Optimum Çalışma Parametrelerinin Belirlenmesi

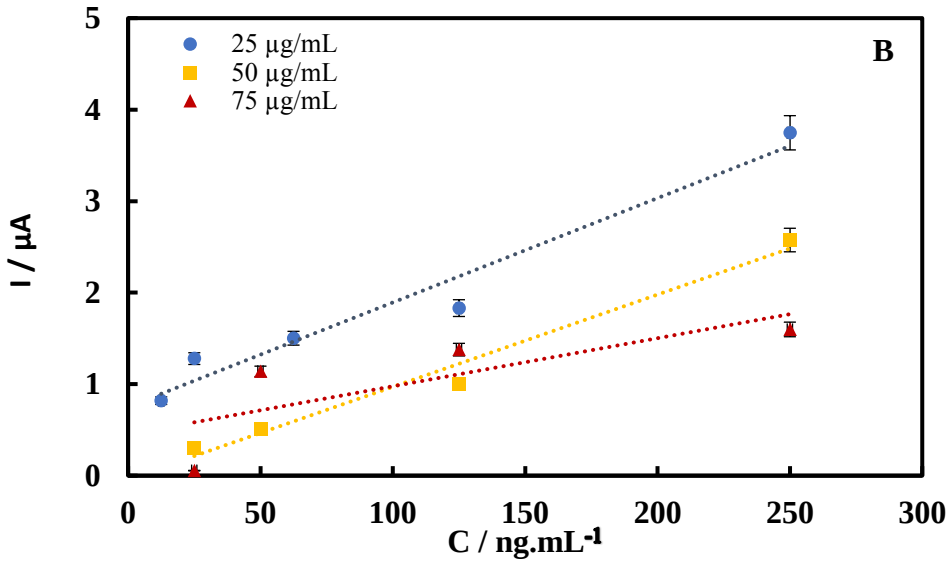
4.4.1. Anti-AFP Antikor Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Antikor konsantrasyonunun optimizasyonunda, 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 75µg/mL olmak üzere üç farklı anti-AFP konsantrasyonuna sahip AFP immünosensörleri hazırlanmıştır. Bunun için; karakterizasyonu yapılan elektrotların yüzeylerine farklı konsantrasyonda hazırlanan anti-AFP çözeltilerinden damlatılarak 60 dk boyunca sabit nem ortamında ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hazırlanan AFP immünosensörleri, farklı konsantrasyonlardaki AFP'nin analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla farklı AFP immünosensörlerinin, 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı ölçümleri alınmıştır.

DPV ölçümlerinden elde edilen akım farkı değerlerinin farklı AFP konsantrasyon değerlerine karşı grafiği çizilmiş ve grafik, Şekil 4.4.A'da verilmiştir. Grafik incelendiğinde, elde edilen doğruların lineerliğinin iyi olduğu gözlemlenmiştir. SWV ölçümlerinden elde edilen akım farkı değerlerinin farklı AFP konsantrasyon değerlerine karşı grafiği çizilmiş ve grafik, Şekil 4.4.B'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde, elde edilen doğruların lineerliğinin iyi olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4.A. Farklı konsantrasyonlardaki anti-AFP ile hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP/ Anti-AFP/BSA immünosensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı DPV cevabına etkileri 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl).



Şekil 4.4.B. Farklı konsantrasyonlardaki anti-AFP ile hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP/ Anti-AFP/BSA immünosensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı SWV cevabına etkileri 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl).

Şekil 4.4.A ve Şekil 4.4.B'de verilmiş olan grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Farklı anti-AFP konsantrasyonlarında hazırlanan AFP immünosensörlerinin farklı AFP konsantrasyonlarında DPV ve SWV ile ölçümleri sonucu 4.4.A. ve 4.4.B. grafiklerinden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri.

Metot	**Anti-AFP Konsantrasyonu (µg/mL)**	**Duyarlık (µA.mL/ng)**	**Korelasyon Katsayısı (r)**
DPV	25	0,0204	0,9774
	50	0,0333	0,9981
	75	0,0281	0,9330
SWV	25	0,0114	0,9796
	50	0,0101	0,9898
	75	0,0053	0,7755

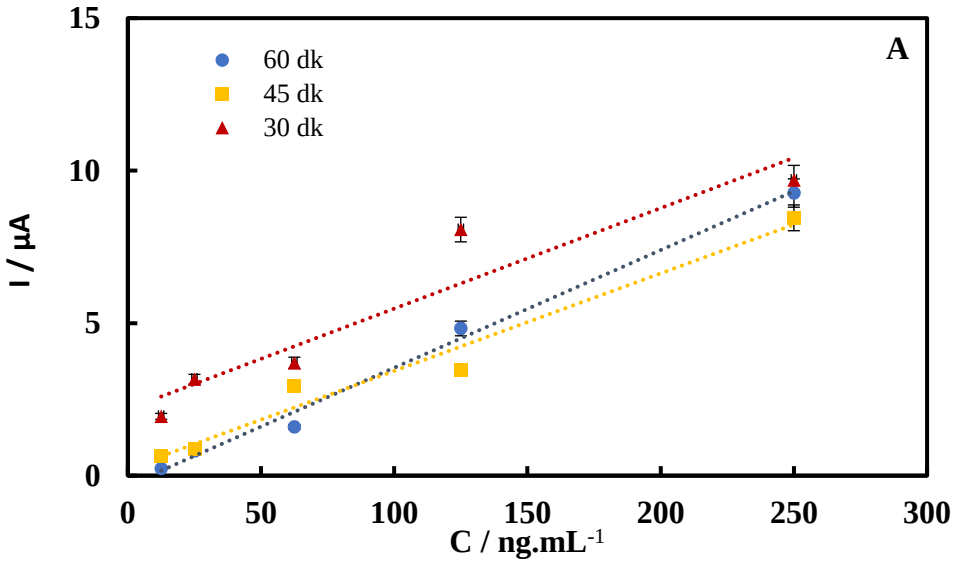
Çizelge 4.3'de verilen değerler incelendiğinde, DPV metodu sonuçlarına göre duyarlık 50 µg/mL anti-AFP konsantrasyonunda (0,0333 µA.mL/ng) en yüksek değerine, SWV

metodu sonuçlarına göre de 25 µg/mL ve 50 µg/mL anti-AFP konsantrasyonlarında (sırasıyla; 0,0114 µA.mL/ng ve 0,0101) en yüksek değerlere ulaştığı ve bu iki değerin de birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Korelasyon katsayısı değerlerine baktığımızda, DPV ve SWV metotlarının her ikisinde de 50 µg/mL anti-AFP konsantrasyonunda 1'e en yakın değerine (sırasıyla 0,9981 r, 0,9898 r) ulaştığı görülmektedir. Duyarlık ve korelasyon katsayısı değerlerinin her ikisi de göz önünde bulundurulduğunda optimum anti-AFP konsantrasyonu 50 µg/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısımlarında AFP immünosensörleri 50 µg/mL anti-AFP konsantrasyonunda hazırlanmıştır.

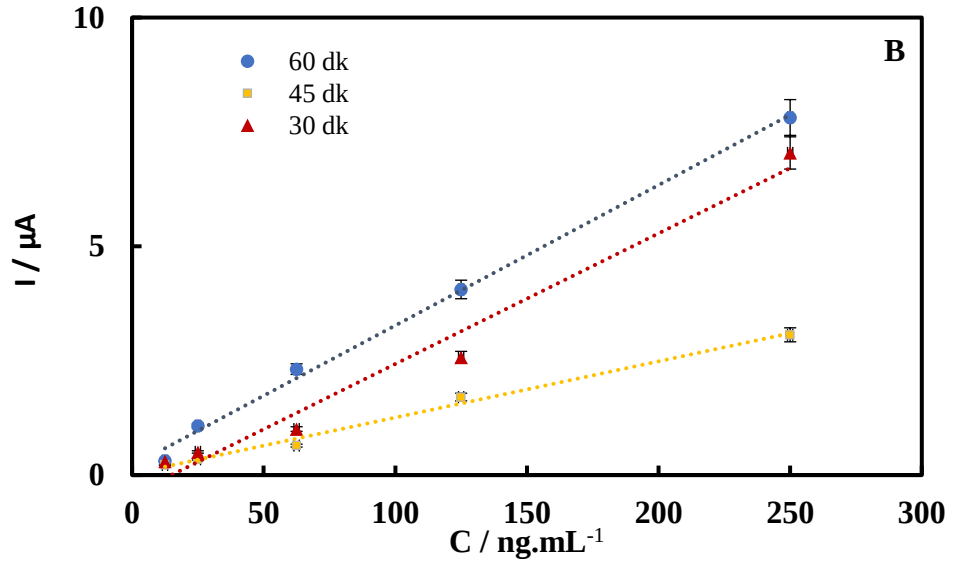
4.4.2. Anti-AFP'nin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

Optimum anti-AFP konsantrasyonunu belirledikten sonra, anti-AFP inkübasyon süresinin optimizasyonu basamağına geçildi. Burada amaç; anti-AFP'nin hangi inkübasyon süresinde en verimli şekilde yüzeye bağlanabileceğini tespit etmektir. Bunun için elektrotların her birinin yüzeyine 50 µg/mL anti-AFP çözeltisi damlatılarak 30, 45 ve 60 dakika olarak üç farklı sürede inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan AFP immünosensörleri, farklı konsantrasyonlardaki AFP'nin analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla farklı AFP immünosensörlerinin, 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı ölçümleri alınmıştır.

DPV ölçümlerinden elde edilen akım farkı değerlerinin farklı AFP konsantrasyon değerlerine karşı grafiği çizilmiş ve grafik Şekil 4.5.A'da verilmiştir. Grafik incelendiğinde, elde edilen doğruların lineerliğinin iyi olduğu gözlemlenmiştir. SWV ölçümlerinden elde edilen akım farkı değerlerinin farklı AFP konsantrasyon değerlerine karşı grafiği çizilmiş ve grafik Şekil 4.5.B'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde, elde edilen doğruların lineerliğinin iyi olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5.A. Farklı anti-AFP inkübasyon sürelerinde hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV cevabına etkileri.



Şekil 4.5.B. Farklı anti-AFP inkübasyon sürelerinde hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörlerinin farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde SWV cevabına etkileri.

Şekil 4.5.A ve B'de yer alan grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı anti-AFP inkübasyon sürelerinde hazırlanan AFP immünosensörlerinin farklı AFP konsantrasyonunda DPV ve SWV ile ölçümleri sonucu 4.4.A. ve 4.4.B. grafiklerinden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri.

Metot	Anti-AFP inkübasyon süresi (dk)	Duyarlık (µA.mL/ng)	Korelasyon katsayısı (r)
DPV	30	0,0329	0,950
	45	0,0320	0,986
	60	0,0386	0,997
SWV	30	0,0285	0,988
	45	0,0123	0,996
	60	0,0307	0,998

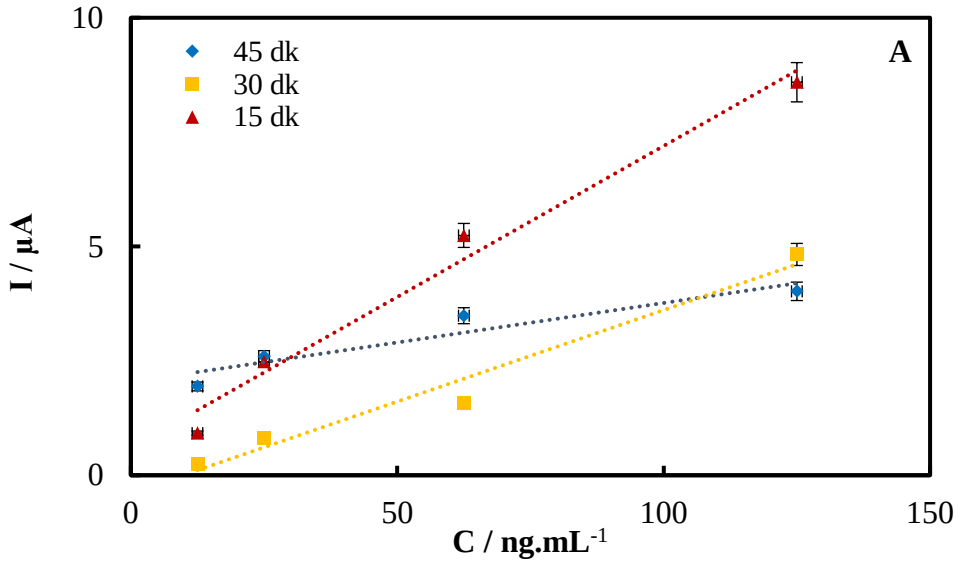
Çizelge 4.4'te verilmiş olan DPV ve SWV metotlarından elde edilen değerler incelendiğinde, her iki metotta da 60 dk anti-AFP inkübasyon süresinde en yüksek eğim (duyarlık) değerlerine (sırasıyla 0,0386 µA.mL/ng, 0,0307 µA.mL/ng) ulaşıldığı görülmektedir. Korelasyon katsayısı ise; her iki metodun verilerine göre 60 dk Anti-AFP inkübasyon süresinde 1'e en yakın değerindedir (DPV = 0,997 r; SWV 0,998 r). Her iki değer de göz önüne alındığında optimum anti-AFP inkübasyon süresi 60 dk olarak belirlenmiştir. Literatürde de antikorların yüzeye immobilizasyonu genellikle 30 ile 60 dk arasındadır (Aydın ve Sezgintürk, 2017; Aydın vd., 2017). Bulduğumuz sonuçlar literatür ile de uyumludur. Çalışmanın bundan sonraki kısmında, 50 µg/mL konsantrasyonundaki anti-AFP'ler 60 dk inkübe edilerek AFP immünosensörleri hazırlanmıştır.

4.4.3. AFP'nin İnkübasyon Süresinin Optimizasyonu

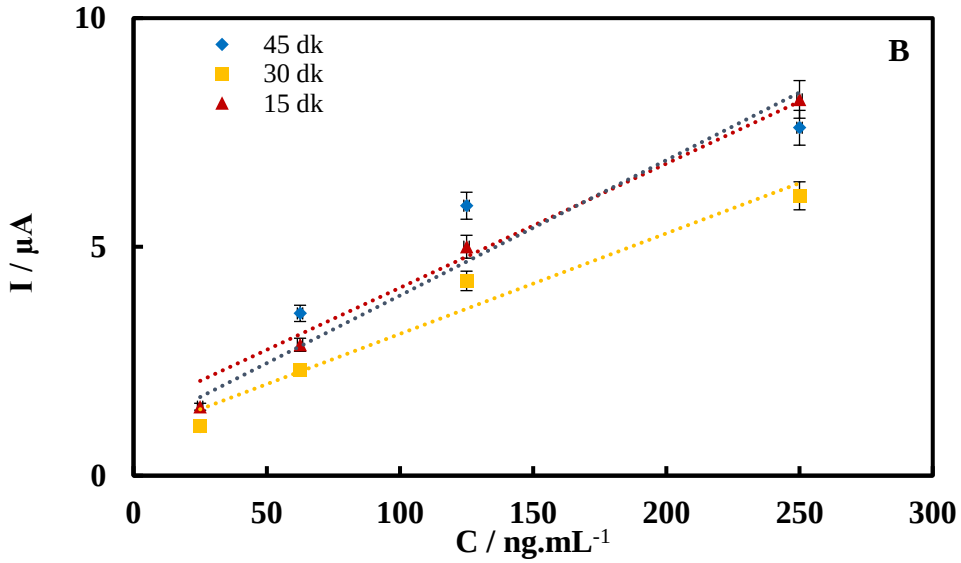
Tezin bu aşamasında, diğer optimum koşullar sağlandıktan sonra son olarak elektrot yüzeyine AFP'nin maksimum verimde bağlanabileceği inkübasyon süresi belirlenmiştir. Bu amaçla diğer optimum şartlar olan 50 µg/mL ve 60 dk Anti-AFP immobilizasyon süresince sabit tutularak hazırlanan elektrotlara AFP çözeltisi damlatılmıştır. Daha sonra elektrotlar sırasıyla farklı sürelerde (15, 30 ve 45 dk)

inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan AFP immünosensörleri, farklı konsantrasyonlardaki AFP'nin analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla farklı AFP immünosensörlerinin, 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı ölçümleri alınmıştır.

DPV ölçümlerinden elde edilen akım farkı değerlerinin farklı AFP konsantrasyon değerlerine karşı grafiği çizilmiş ve grafik Şekil 4.6.A'da verilmiştir. Grafik incelendiğinde, elde edilen doğruların lineerliğinin iyi olduğu gözlemlenmiştir. SWV ölçümlerinden elde edilen akım farkı değerlerinin farklı AFP konsantrasyon değerlerine karşı grafiği çizilmiş ve grafik Şekil 4.6.B'de verilmiştir. Grafik incelendiğinde, elde edilen doğruların lineerliğinin iyi olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.6.A. AFP'nin inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün farklı AFP antijenine karşı 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV cevabına etkileri.



Şekil 4.6.B. AFP'nin inkübasyon sürelerinin SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/ BSA immünosensörünün farklı AFP antijenine karşı 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde SWV cevabına etkileri.

Şekil 4.6.A ve B'de yer alan grafiklerden elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. AFP inkübasyon süresinin DPV ve SWV ile ölçümlerinden elde edilen grafiklerdeki µA değerlerine karşı duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri.

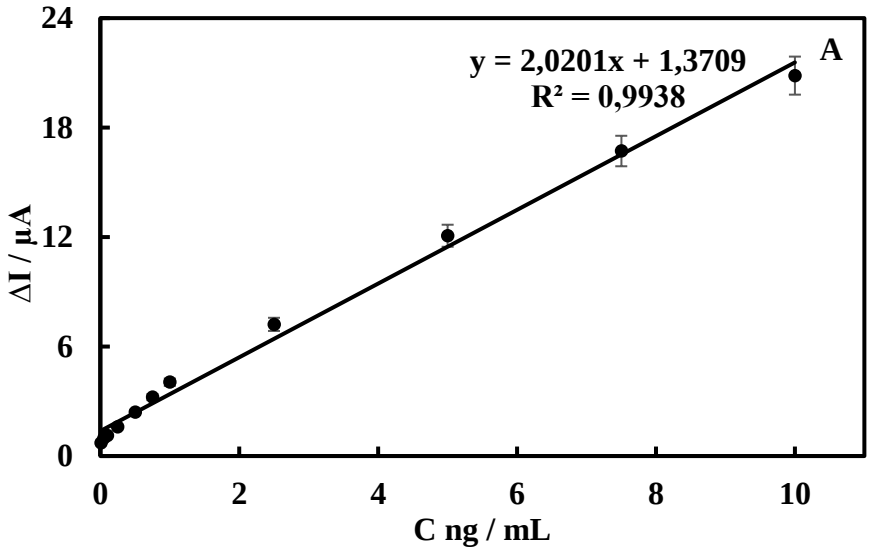
Metot	**AFP'nin inkübasyon süresi (dk)**	**Duyarlık (µA.mL/ng)**	**Korelasyon katsayısı (r)**
DPV	15	0,0660	0,803
	30	0,0400	0,996
	45	0,0173	0,936
SWV	15	0,0296	0,997
	30	0,0220	0,980
	45	0,0271	0,941

Çizelge 4.5'te verilmiş olan DPV ve SWV metotlarından elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri incelendiğinde, 15 dk AFP inkübasyon süresinde en yüksek duyarlık değerlerinin (sırasıyla 0,0660 µA.mL/ng, 0,0296 µA.mL/ng) olduğu görülmektedir. Korelasyon katsayısı değeri ise DPV metodu sonuçlarına göre 30 dk

AFP inkübasyon süresinde 1'e en yakın değerine (0,996 r), SWV metodu sonuçlarına göre ise 15 dk AFP inkübasyon süresinde 1'e en yakın değerine (0,997) ulaşmıştır. DPV ve SWV metotları sonuçlarına göre her iki değer de göz önüne alındığında, AFP'nin tespiti için 15 dk inkübasyon süresinde, immünosensörden çok daha yüksek performans elde edileceği sonucuna varılmıştır (Aydın ve Sezgintürk, 2017). Sonuç olarak optimum AFP inkübasyon süresi 15 dk olarak belirlenmiştir.

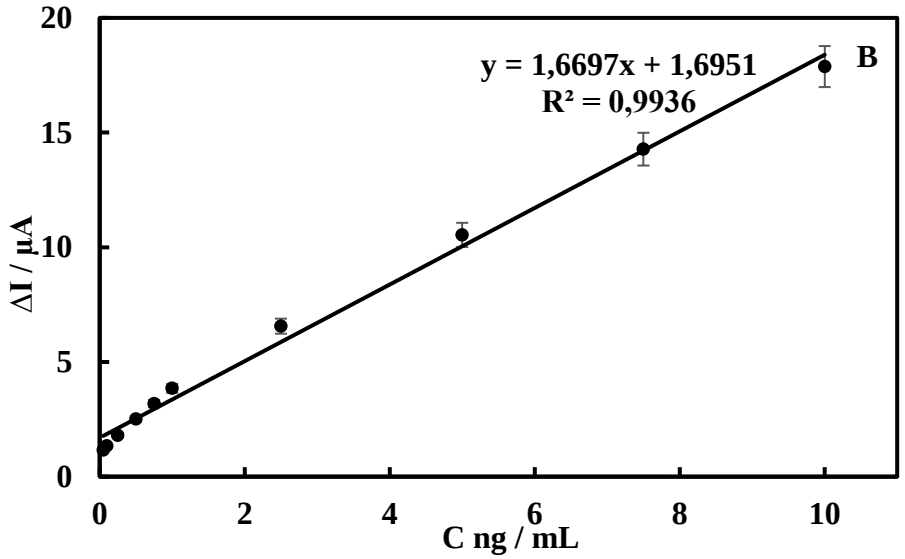
4.5. Analitiksel Karakterizasyon

Hazırlanan AFP immünosensörünün analitiksel karakterizasyonu, belirlenen AFP konsantrasyon artışına karşılık 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile ölçümleri sonucu elde edilen pik akım değerlerinden tespit edilmiştir. 0,01 ile 10 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği Şekil 4.7.A'da verilmiştir. AFP derişimi artışı ile pik akım değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır.



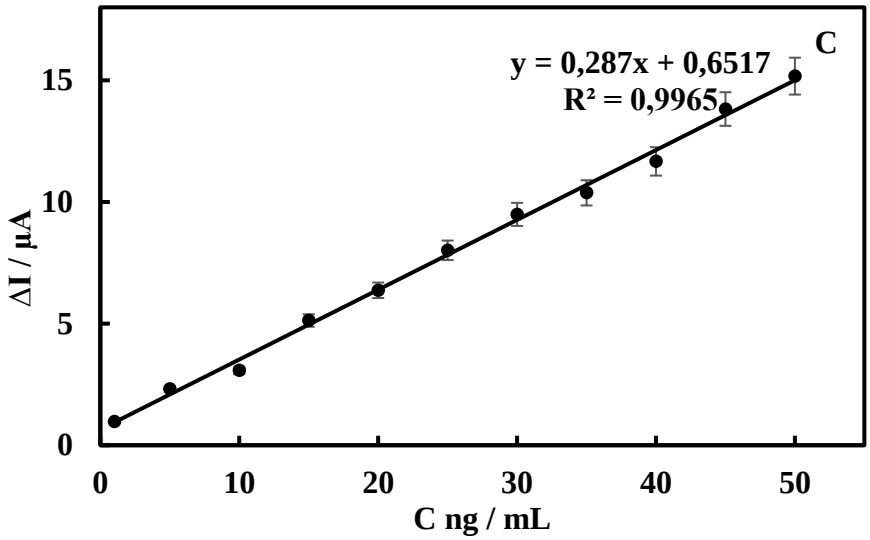
Şekil 4.7.A. AFP immünosensörü ile 0,01 ile 10 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği.

AFP immünosensörü ile 0,05 ile 10 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği Şekil 4.7.B'de verilmiştir. SWV sonuçlarına göre, AFP konsantrasyonu artışı ile pik akım değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır.



Şekil 4.7.B. AFP immünosensörü ile 0,05 ile 10 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği.

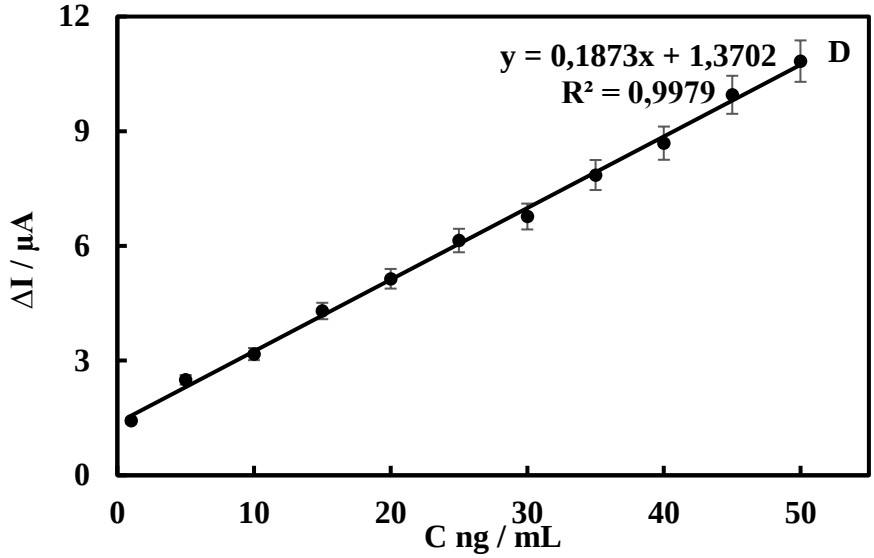
AFP immünosensörü ile 1 ile 50 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri Şekil 4.7.C'de verilmiştir. DPV sonuçlarına göre, AFP konsantrasyonu artışı ile pik akım değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır.



Şekil 4.7.C. AFP immünosensörü ile 1 ile 50 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği.

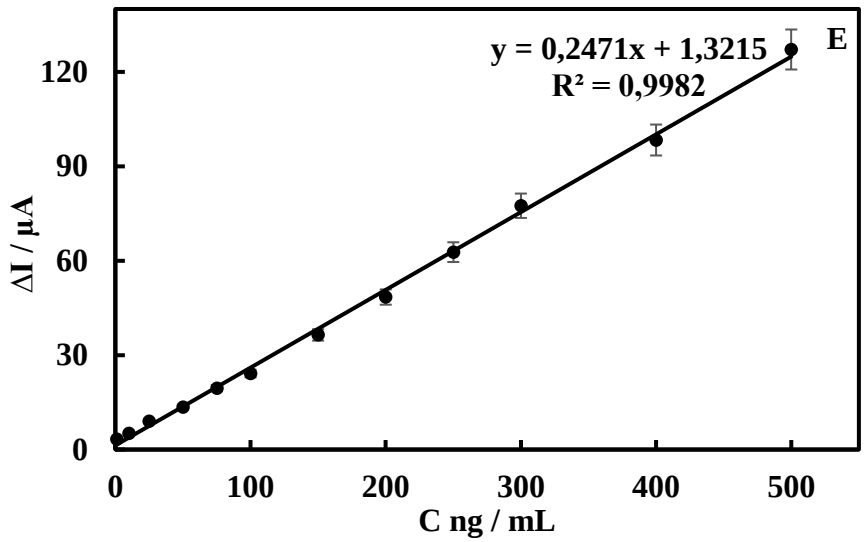
AFP immünosensörü ile 1 ile 50 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği Şekil 4.7.D'de verilmiştir. SWV

sonuçlarına göre, AFP konsantrasyonu artışı ile pik akım değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır.



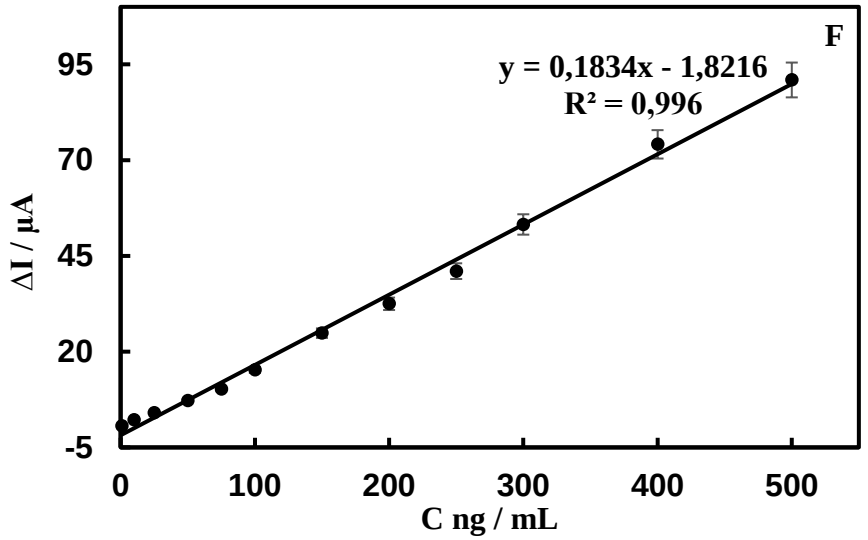
Şekil 4.7.D. AFP immünosensörü ile 1 ile 50 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği.

AFP immünosensörü ile 1 ile 500 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği Şekil 4.7.E'de verilmiştir. DPV sonuçlarına göre, AFP konsantrasyonu artışı ile pik akım değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır.



Şekil 4.7.E. AFP immünosensörü ile 1 ile 500 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı DPV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği.

AFP immünosensörü ile 1 ile 500 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği Şekil 4.7.F'de verilmiştir. SWV sonuçlarına göre, AFP konsantrasyonu artışı ile pik akım değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır.



Şekil 4.7.F. AFP immünosensörü ile 1 ile 500 ng/mL aralığında artan AFP derişimine karşı SWV'den elde edilen pik akım değerleri grafiği.

AFP'nin voltametrik tayininde kullanılan SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün analitiksel karakterizasyonu için duyarlık, bağıl standart sapma, tayin ve gözlemlenebilme sınırı ve tekrarlanabilirlik gibi parametreler belirlenmiş ve Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. AFP'nin tayini için SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörü ile elde edilen analitiksel parametreler.

Metot	AFP tayin aralığı (ng/mL)	Duyarlık (μA.mL/ng)	Tespit Limiti (ng/mL)	Tayin Sınırı (ng/mL)	Korelasyon katsayısı (r)
DPV	0,01 – 10	2,02	0,218	0,726	0,9971
	1 – 50	0,287	1,16	3,88	0,9983
	1 – 500	0,247	6,51	21,69	0,9991
SWV	0,05 – 10	1,669	0,234	0,781	0,9968
	1 – 50	0,187	0,89	2,98	0,9990
	1 – 500	0,183	9,68	32,26	0,9980

Çizelge 4.6'da verilen parametreler incelendiğinde, DPV metodundan elde edilen pik akım değerlerine göre 0,01-10 ng/mL AFP tayin aralığında AFP immünosensörünün duyarlığı (2,02 μA.mL/ng) en yüksek değerindedir. Devamında tespit limiti ve tayin sınırı değerleri sırasıyla 0,218 ve 0,726 ng/mL olarak belirlenmiştir. Tayin aralığı 1-50 ng/mL için duyarlık 0,287 μA.mL/ng, tespit limiti 1,16 ng/mL ve tayin sınırı da 3,88 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Tayin aralığı 1 – 500 ng/mL için duyarlık 0,247 μA.mL/ng, tespit limiti 6,51 ng/mL, tayin sınırı 21,69 ng/mL olarak belirlenmiştir. Korelasyon katsayısı değerleri, her üç tayin aralığı için de 1'e yakın değerlerdedir.

SWV metodu ile yapılan ölçümlerden elde edilen pik akım değerlerine bakıldığında, duyarlık değeri 0,05-10 ng/mL AFP tayin aralığında en yüksek değerine (1,669 μA.mL/ng) ulaşmıştır. Bu aralıkta tespit limiti 0,234 ng/mL, tayin sınırı 0,781 ng/mL olarak tespit edilmiştir. 1-50 ng/mL AFP tayin aralığında duyarlık değeri 0,187 μA.mL/ng, tespit limiti 0,89 ng/mL ve tayin sınırı 2,98 ng/mL olarak, 1-500 ng/mL AFP tayin aralığında duyarlık değeri 0,183 μA.mL/ng, tespit limiti 9,68 ng/mL ve tayin sınırı 32,26 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Korelasyon katsayısı değerleri, her üç tayin aralığı için de 1'e yakın değerlerdedir. DPV ve SWV metotları ile yapılan ölçümlerde düşük konsantrasyonlardaki AFP tayin aralığında duyarlık değerinin yüksek olduğu görülmüştür.

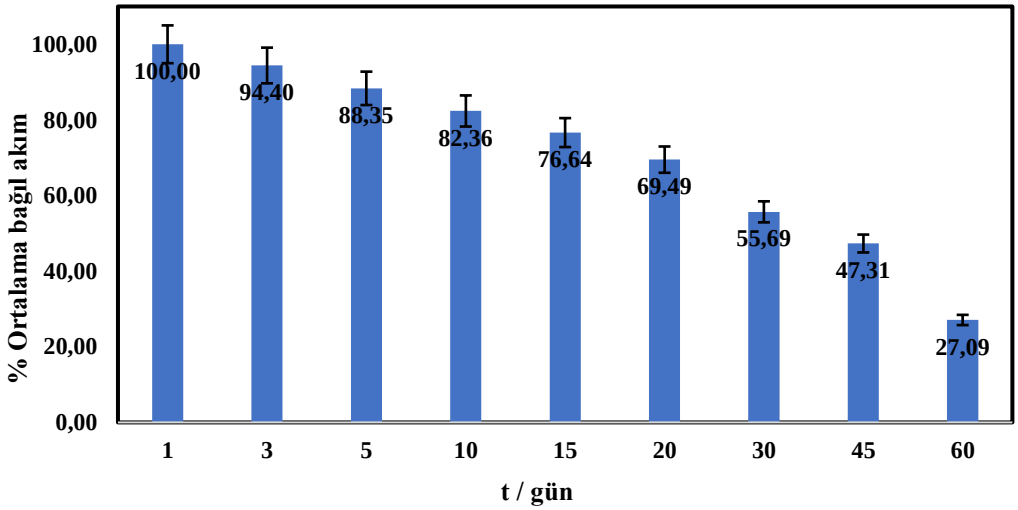
AFP immünosensörünün tekrarlanabilirliği 50 ng/mL AFP derişiminde DPV ve SWV metotları ile test edilmiş ve bağıl standart sapma (R.S.D.) değeri hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. AFP immünosensörünün tekrarlanabilirlik testi sonuçları (RSD).

Metot	**RSD**
DPV	%4,06 (n=10), 50 ng/mL
SWV	%3,68 (n=10), 50 ng/mL

Çizelge 4.7'de yer alan verileri incelediğimizde, her iki metot verilerine göre tekrarlanabilirlik için hesaplanan RSD değerleri, 10 tekrara kadar AFP tayininin iyi olduğunu göstermektedir.

SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün uygulama kararlılığının tespiti için, 50 ng/mL AFP'nin 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde 60 gün boyunca belirli aralıklarla DPV ve SWV metotları ile ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler 4'er tekrar olarak alınmıştır. 60 gün boyunca immünosensör +4 ^{0}C sıcaklıkta bekletilmiştir. DPV ve SWV metotları ile yapılan 4'er tekrarlı ölçümlerden elde edilen AFP'ye karşı immünosensör cevabının ilk günkü akıma göre yüzde bağıl akım değerlerinin ortalaması Şekil 4.8'de verilmiştir.

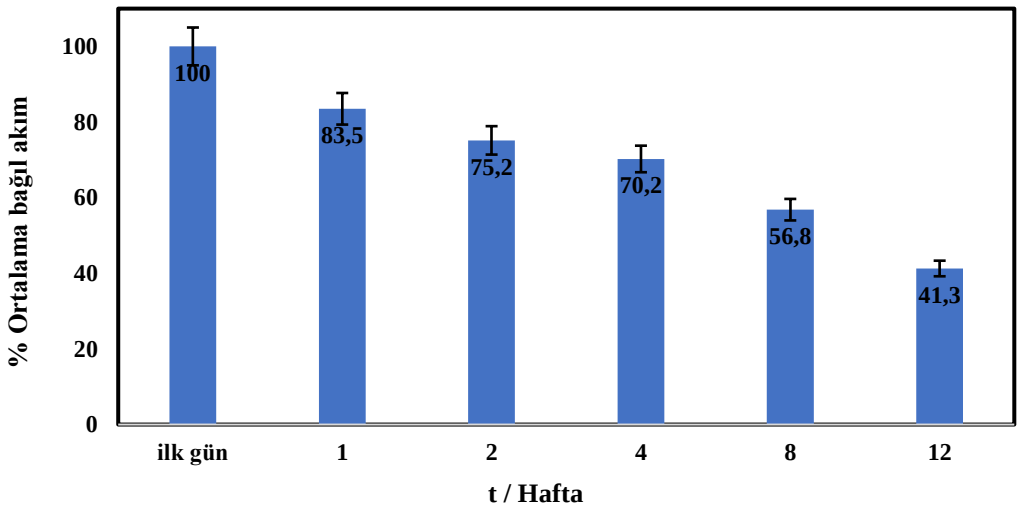


Şekil 4.8. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün 50 ng/mL AFP derişiminde ortalama % bağıl akım değerlerine karşı gün sayısı grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

Şekil 4.8'de verilen grafik incelendiğinde, AFP için immünosensörün ortalama % bağıl akım değeri 3. günün sonunda %5,6, 10. günün sonunda %17,64, 30. günün sonunda %44,31, 45. günün sonunda %52,69 ve 60. gün sonunda %72,91 oranında azalmıştır. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün uygulama kararlılığı ilk kullanımdan sonra azalmış olsa da 60. güne kadar AFP için yanıt vermiştir. Bu sonuçlardan, tek kullanımlık olarak hazırlanan bir immünosensör için, 60 gün uygulama kararlılığının iyi olduğu ve immünosensör formülasyonunda bulunan RGO, PNR ve AuNP'nin uygulama kararlılığını arttırdığı sonucuna varılabilir.

Çalışma şartlarında geliştirilen SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün depolama kararlığını belirlemek için, hazırlanan immünosensörler -20 ^{o}C'de bekletilmiştir. Daha sonra bu immünosensörlerin 12 hafta boyunca belirli

aralıklarla 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile ölçümleri yapılmıştır. DPV ve SWV ölçümleri sonucu elde edilen akım değerlerine karşı hafta sayısı grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün 50 ng/mL AFP derişiminde % ortalama bağıl akım değerlerine karşı hafta sayısı grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

Şekil 4.9'da verilen grafikte % ortalama bağıl akım verileri incelendiğinde, SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün 1. hafta sonunda % ortalama bağıl akım değerinin ilk güne göre %16,5 ve 2. hafta sonunda %24,8 azaldığı görülmektedir. Devamında 4. haftada %29,8 ve 8. hafta sonunda ise %43,2 azalma gösterdiği tespit edilmiştir. 12. haftada yapılan ölçümler sonucunda ise ilk güne göre %58,7 azalma göstermiştir. Bu veriler, SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün 12. haftaya kadar AFP'ye karşı yanıt verdiğini göstermektedir.

Literatürde çeşitli materyallerle modifiye edilerek AFP'nin tayini için geliştirilmiş immünosensörler ile bu çalışmada geliştirilmiş olan SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA AFP immünosensörünün analitiksel karakterizasyon verileri Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Çeşitli materyallerle modifiye edilerek AFP' nin tayini için geliştirilmiş immünosensörler ile bu çalışmada geliştirilmiş olan AFP immünosensörünün analitiksel karakterizasyon verilerinin karşılaştırılması.

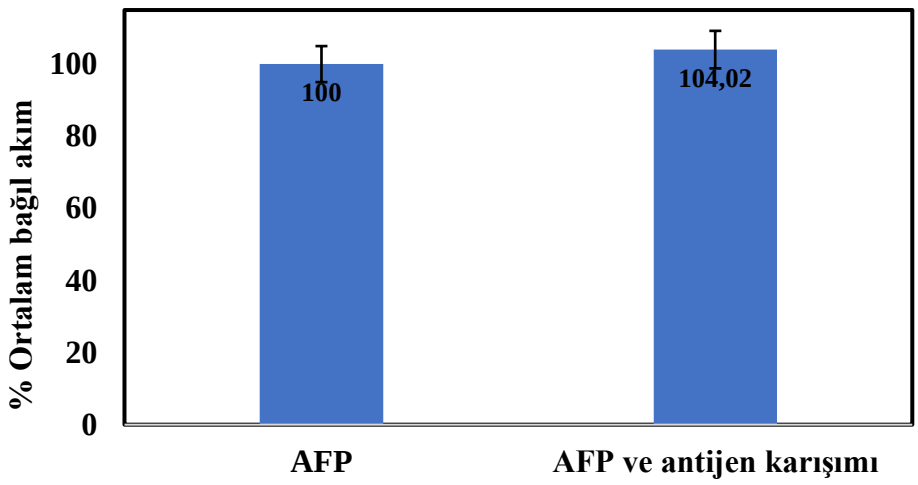
İmmünosensör	Tayin aralığı (ng/mL)	Tespit limiti (ng/mL)	Metot	Stabilite (gün)	AFP inkübasyon süresi (dk)	Referans
GCE/CNT/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP	0,005–1000	0,0019	SWV	-	40	Idris et al., 2018
GCE/PHEMA/RGO/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP	0,0025–25	0,00403	SWV	15	30	Liang et al., 2019
GCE/Cu_3Pt NF-RGO/Anti-AFP/BSA/ AFP	0,0001–10	0,000033	DPV	5	-	Wang et al., 2019
GCE/AuNP-PEDOT/PB-RGO/Anti-AFP/BSA/AFP	0,01-50	0,0033	DPV	14	90	Yang et al., 2017
SPCE/RGO/THI/AuNP/ Anti-AFP/BSA/AFP	100-10000	50	DPV	-	60	Li et al., 2018
GCE/AuNP-Dex-RGO/Anti-AFP/BSA /AFP	0,01-20.0	0,0005	DPV	28	30	Zhou et al. 2018
SPCE/RGO-TEPA/ AuNP/Anti-AFP/BSA /AFP	0,01-100	0,005	SWV	30	20	Caoa et al., 2017
GCE/PB-CNT-PDA/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP	0,005-80	0,001	CV	20	20	Gao et al., 2017
GCE/RGO/THI/GA/Anti-AFP/BSA/AFP	0.05-2.00	0,006	CV	21	-	Wei et al., 2010
Au/AuNP-PAMAM/Anti-AFP/BSA/AFP	0,001-45	0,5	DPV	-	5	Kavosi et al., 2014
SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP	0,01 – 10	0,218	DPV	60	15	Bu çalışma
SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP	1 – 50	1,16	DPV	60	15	Bu çalışma
SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP	1 – 500	6,51	DPV	60	15	Bu çalışma
SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP	0,05 – 10	0,234	SWV	60	15	Bu çalışma
SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP	1 – 50	0,89	SWV	60	15	Bu çalışma
SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP	1 – 500	9,68	SWV	60	15	Bu çalışma

SPCE: yüzey baskılı karbon elektrot, GCE: camsı karbon elektrot, PHEMA: 2- hidroksietil metakrilat, Cu_3Pt NF: Cu_3Pt kare çerçeveler, PEDOT: poly(3,4-ethylenedioxythiophene), DEX: dekstran, TEPA: tetraetilen pentamin, PB: prusya mavisi, PDA: poli dopaminamin , CNT: karbon nanotüp, PAMAM: Poliamidoamin.

Çizelge 4.8'de yer alan AFP immünosensörlerinin analitiksel karakterizasyon verilerini incelediğimizde GCE ve Au elektrotlar kullanılarak hazırlanmış immünosensörlerin oldukça düşük limit aralığında AFP tayini yapabildiği görülmektedir. Diğer taraftan stabilite sonuçlarına göre değerlendirdiğimizde SPCE ile hazırlanmış olan immünosensörlerde en uzun satabilite sürelerine ulaşıldığını söyleyebiliriz. AFP inkübasyon sürelerinde ise genel olarak en kısa süreye bu çalışmada ulaşıldığı görülmektedir.

4.6. Seçicilik Testi

Çalışma şartlarında geliştirilen SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün seçiciliğini belirlemek için her biri 20 ng/mL konsantrasyonuna sahip on farklı antijen karışımı ile AFP immünosensörü hazırlanmıştır. Karışımda yer alan antijenlerin [HE4, CA125, AFP, MAGE1 (Melanom ile ilişkili antijen), Haptoglobin, HSP70 (70 kilodaltonluk ısı şoku proteini), PAK2 (Serin/treonin-protein kinaz2), SOX2 (transkripsiyon proteini), Leptin, TRAP1 (mitokondriyal ısı şoku proteini)] hazırlanan immünosensörler ile 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları kullanılarak üç tekrarlı ölçümleri yapılmıştır. DPV ve SWV ölçümleri sonucu elde edilen % ortalama bağıl akım değerlerine karşı AFP ve antijen karışımı grafiği Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün AFP ve farklı antijenlerin karışımına karşı elde edilen % ortalama bağıl akım grafiği (5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$, 1 M KCl).

Şekil 4.10'da verilen değerler incelendiğinde sadece AFP varlığında DPV ve SWV metotları ile yapılan ölçümlerden elde edilen % ortalama bağıl akım değeri ile antijen karışımı varlığında DPV ve SWV metotları ile yapılan ölçümlerden elde edilen % ortalama bağıl akım değeri %4,02 artmıştır. Antijen karışımı varlığında ortalama bağıl akım değerindeki bu artış SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün seçiciliğinin antijen karışımı varlığında yeterli olduğunu göstermektedir.

4.7. Gerçek Numune Analizi

Geliştirdiğimiz AFP immünosensörleri gerçek numune analizinde kullanılmıştır. Merck firmasından satın alınan insan kan serumu numunesi 1:100 oranında pH 7,4 tampon çözeltisi ile seyreltilmiştir. Kan serumu numunesine bilinen konsantrasyonda AFP ilave edilerek AFP içeren yapay kan serumu (insan kanı) numuneleri hazırlanmıştır. Bilinen miktarda AFP içeren kan serumu numunelerindeki AFP'nin elektrokimyasal tayini 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP immünosensörleri kullanılarak DPV ve SWV metotları ile yapılmıştır.

Çizelge 4.9'da yapay kan serumu (insan kanı) numunelerin analiz sonuçları yer almaktadır.

Çizelge 4.9. Yapay kan serumu (insan kanı) örneklerinde AFP analizi.

Metot	Eklenen AFP	Hesaplanan AFP	% Geri Kazanım	% Hata
DPV	5,0 ng/mL	4,86 ng/mL	97,2	2,8
	25,0 ng/mL	24,15 ng/mL	96,6	3,4
	250,0 ng/mL	245,18 ng/mL	98,07	1,93
SWV	5,0 ng/mL	4,79 ng/mL	95,8	4,2
	25,0 ng/mL	24,32 ng/mL	97,28	2,72
	250,0 ng/mL	244,31 ng/mL	97,72	2,28

Çizelge 4.9’da yapay kan serumu (insan kanı) örneklerinde elde edilen AFP analiz verileri incelendiğinde eklenen AFP konsantrasyonu ile hesaplanan AFP konsantrasyonu arasındaki % hatanın DPV ve SWV metotlarının her ikisinde de %5’ten az olduğu görülmektedir. Her iki metodun verilerine göre geri kazanımlar %95’in üstündedir. Yapay kan serumu (insan kanı) örneklerinde AFP analizinde yüksek % geri kazanım ve düşük % hata değerleri elde edilmesiyle başarılı bir şekilde AFP analizi yapıldığını söylenebilir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

SPCE'lerin yüzeyleri CV ile temizlendikten sonra elektrot yüzeyi ile RGO modifiye edilmiş ve SEM ile karakterize edilmiştir. RGO'nun katmanlı, rasgele dağılmış birbirine benzer ince katmanlar halinde buruşuk yüzeyli ve dağınık halde üst üste binmiş yapısı gözlemlenmiştir. Bu gözlemde elde edilen görüntüler literatürle uyum göstermektedir (Shalaby et al., 2015, Tiyek et al., 2016). Elde edilen sonuçlara göre RGO, SPCE elektrodunun yüzeyine başarılı bir şekilde modifiye edilmiştir.

SPCE/RGO'lar üzerinde önce NR'nin elektrokimyasal polimerizasyonu yapılmış ve sonrasında AuNP ile modifiye edilerek SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodu elde edilmiştir. Elde edilen SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunun CV, DPV ve SWV metotları ile elektrokimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. RGO, PNR ve AuNP materyallerinin üçünün de aynı anda elektrot formülasyonunda yer aldığı SPCE/RGO/PNR/AuNP elektrodunda CV, DPV ve SWV metotlarından elde edilen sonuçlara göre pik akım değerlerindeki artış ve dolayısıyla elektronik iletkenliğinde yükselme olduğu tespit edilmiştir. RGO'nun formülasyonda bulunması elektroaktif yüzey alanını ve bunun sonucu olarak da elektrodun elektronik iletkenliğini arttırdığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca, RGO'nun sp^2 karbonlarından oluşan hidrofobik yan duvarlarına ve π-konjuge yapılarına sahip olması, PNR'nin aromatik halkasında bulunan π-π konjuge yapıları ile, π-π elektronik ve hidrofobik etkileşim yapmasına neden olduğu tespit edilmiştir. PNR ve RGO arasındaki bu etkileşim sonucu elektronik iletkenliğin sinerjik bir etkiyle artması ve elektronik iletkenliğin artışı da immünosensörün elektron transfer hızını ve faradik cevabını arttırdığı da tespitlerimiz arasında yer almıştır. Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur (Pauliukaite et al., 2007; Şahin, 2013; Şahin ve Ayrancı, 2015; Altun vd., 2020; Kamaç vd., 2019; Kamaç vd., 2020).

Daha sonra elektrot üzerine 3-MPA çözeltisi damlatılıp 1 gece bekletilmesinin ardından EDC-NHS çözeltisi damlatılarak anti-AFP'nin kovalent bağlanması için yüzey aktif hale getirilmiştir. Anti-AFP antikoru ilavesi sonrasında kovalent bağlanma gerçekleştirilmiş ve sonrasında BSA bloklama ajanı ile SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörü AFP tayini için hazır hale getirilmiştir.

AFP immünosensörünün elektrokimyasal karakterizasyonu için, EDC-NHS, EDC-NHS/Anti-AFP, EDC-NHS/Anti-AFP/BSA ve EDC-NHS/Anti-AFP/BSA/AFP basamaklarında 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde CV, DPV ve SWV sonuçları alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre anti-AFP'nin elektrot yüzeyine tutuklanması sonrasında EDC-NHS/Anti-AFP elektrodunun pik akım değerleri üç metotta da azalmıştır. Bu azalışın nedeni, antikorun elektrodun yüzeyini EDC-NHS basamağına göre daha yalıtkan hale getirmesi ve sonrasında elektronların elektrot yüzeyine difüzyonunu azaltmasıdır. Bu sonuç, anti-AFP'nin elektrot yüzeyine başarılı bir şekilde kovalent bağlandığını göstermiştir. BSA bloklama ajanının modifikasyonu sonrasında ise her üç metottan elde edilen değerlere göre, EDC-NHS/Anti-AFP/BSA immünosensörünün yüzeyinde EDC-NHS/Anti-AFP elektroduna göre daha yalıtkan bir tabaka oluşmuş ve bunun sonucu olarak da elektronların elektrot yüzeyine difüzyonu azalmıştır. Elektron difüzyonunun azalması ile pik akım değerleri de azalmıştır (Aydın ve Sezgintürk, 2017; Demirbakan ve Sezgintürk, 2020). Son olarak AFP'nin immünosensör yüzeyine eklenmesi ile AFP immünosensörünün yalıtkanlığı artmış, iletkenliği azalmış ve pik akım değerleri de azalma göstermiştir. Pik akım değerlerindeki bu azalma bize AFP'nin anti-AFP ile etkileşerek yüzeye tutuklandığını göstermiştir (Aydın ve Sezgintürk, 2017; Demirbakan ve Sezgintürk, 2020).

Sonraki aşamada antikor konsantrasyonunun optimizasyonu için 25 µg/mL, 50 µg/mL ve 75µg/mL olmak üzere üç farklı anti-AFP konsantrasyonuna sahip AFP immünosensörleri hazırlanmıştır. Karakterizasyonu yapılan elektrotların yüzeylerine farklı konsantrasyonlarda hazırlanan anti-AFP çözeltilerinden damlatılarak 60 dk boyunca sabit nem ortamında ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Hazırlanan AFP immünosensörleri, farklı konsantrasyonlardaki AFP'nin analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla farklı AFP immünosensörlerinin, 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı ölçümleri alınmıştır. DPV metodu sonuçlarına göre duyarlılık 50 µg/mL anti-AFP konsantrasyonunda (0,0333 µA.mL/ng) en yüksek değerine, SWV metodu sonuçlarına göre de 25 µg/mL anti-AFP konsantrasyonunda (0,0114 µA.mL/ng) en yüksek değere ulaştığı görülmüştür. Korelasyon katsayısı değerlerine baktığımızda, DPV ve SWV metotlarının her ikisinde de 50 µg/mL anti-AFP konsantrasyonunda 1'e en yakın değerine (sırasıyla 0,9981 r, 0,9898 r) ulaştığı tespit edilmiştir. Duyarlık ve korelasyon

katsayısı değerlerinin her ikisi de göz önünde bulundurulduğunda optimum anti-AFP konsantrasyonu 50 µg/mL olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki kısımlarında AFP immünosensörleri 50 µg/mL anti-AFP konsantrasyonunda hazırlanmıştır.

Optimum anti-AFP konsantrasyonunu belirlenmesinden sonra, anti-AFP inkübasyon süresinin optimizasyonu basamağına geçilmiştir. Burada amaç; anti-AFP'nin hangi inkübasyon süresinde en verimli şekilde yüzeye bağlanabileceğini tespit etmektir. Bunun için elektrotların her birinin yüzeyine 50 µg/mL anti-AFP çözeltisi damlatılarak 30, 45 ve 60 dakika olarak üç farklı sürede inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan AFP immünosensörleri, farklı konsantrasyonlardaki AFP'nin analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla farklı AFP immünosensörlerinin, 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı ölçümleri alınmıştır. Elde edilen değerler incelendiğinde, her iki metotta da 60 dk anti-AFP inkübasyon süresinde en yüksek eğim (duyarlık) değerlerine (sırasıyla 0,0386 µA.mL/ng, 0,0307 µA.mL/ng) ulaşıldığı görülmüştür. Korelasyon katsayısı ise; her iki metodun verilerine göre 60 dk Anti-AFP inkübasyon süresinde 1'e en yakın değerindedir (DPV = 0,997 r; SWV 0,998 r). Her iki değer de göz önüne alındığında optimum anti-AFP inkübasyon süresi 60 dk olarak belirlenmiştir. Literatürde de antikorların yüzeye immobilizasyonu genellikle 30 ile 60 dk arasındadır (Aydın ve Sezgintürk, 2017; Aydın vd., 2017). Bulduğumuz sonuçlar literatür ile de uyumludur. Çalışmanın bundan sonraki kısmında, 50 µg/mL konsantrasyonundaki anti-AFP'ler 60 dk inkübe edilerek AFP immünosensörleri hazırlanmıştır.

Diğer optimum koşullar sağlandıktan sonra olarak elektrot yüzeyine AFP'nin maksimum verimde bağlanabileceği inkübasyon süresi belirlenmiştir. Bu amaçla diğer optimum şartlar olan 50 µg/mL ve 60 dk anti-AFP immobilizasyon süresince sabit tutularak hazırlanan elektrotlara AFP çözeltisi damlatılmıştır. Daha sonra elektrotlar sırasıyla farklı sürelerde (15, 30 ve 45 dk) inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan AFP immünosensörleri, farklı konsantrasyonlardaki AFP'nin analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla farklı AFP immünosensörlerinin, 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile farklı konsantrasyonlardaki AFP antijenine karşı ölçümleri alınmıştır. Elde edilen duyarlık ve korelasyon katsayısı değerleri incelendiğinde, 15

dk AFP inkübasyon süresinde en yüksek duyarlık değerlerinin (sırasıyla 0,0660 μA.mL/ng, 0,0296 μA.mL/ng) olduğu görülmektedir. Korelasyon katsayısı değeri ise DPV metodu sonuçlarına göre 30 dk AFP inkübasyon süresinde 1'e en yakın değerine (0,996 r), SWV metodu sonuçlarına göre ise 15 dk AFP inkübasyon süresinde 1'e en yakın değerine (0,997) ulaşmıştır. DPV ve SWV metotları sonuçlarına göre her iki değer de göz önüne alındığında, AFP'nin tespiti için 15 dk inkübasyon süresinde, immünosensörden çok daha yüksek performans elde edileceği sonucuna varılmıştır (Aydın ve Sezgintürk, 2017). Sonuç olarak optimum AFP inkübasyon süresi 15 dk olarak belirlenmiştir.

Optimum koşulların sağlanmasından sonra, SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörü ile AFP tayini yapılmış ve bu tayin sonunda DPV ve SWV metotları kullanılarak analitiksel parametreler belirlenmiştir. DPV metodu ile yapılan ölçümlerde; tayin aralığı 0,01 – 10 ng/mL'de tespit limiti 0,218 ng/mL, tayin sınırı 0,726 ng/mL; tayin aralığı 1 – 50 ng/mL'de tespit limiti 1,16 ng/mL, tayin sınırı 3,88 ng/mL; tayin aralığı 1 – 500 ng/mL'de tespit limiti 6,51 ng/mL, tayin sınırı 21,69 ng/mL, RSD %4,06 olarak tespit edilmiştir. SWV metodu ile yapılan ölçümlerde; tayin aralığı 0,05-10 ng/mL'de, tespit limiti 0,89 ng/mL, tayin sınırı 2,98 ng/mL; tayin aralığı 1-50 ng/mL'de tespit limiti 1,16 ng/mL, tayin sınırı 21,69 ng/mL; tayin aralığı 1-500 ng/mL'de tespit limiti 9,68 ng/mL, tayin sınırı 32,26 ng/mL ve RSD %3,68 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7)

Sağlıklı insan kan serumunda, AFP konsantrasyonu genellikle 20 ng/mL'den daha düşüktür. Bunun yanında, örneğin karaciğer kanseri olan bir hastanın kan serumundaki AFP miktarı 20 ng/mL'den oldukça fazladır (Wu et al., 2019). Literatürde yer alan bu bilgiler ışığında, bu çalışmada geliştirdiğimiz AFP immünosensörünün tayin limit aralığının ve diğer analitiksel parametrelerinin klinik açıdan AFP tespit uygulamalarında yeterli olduğu söylenebilir.

SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün uygulama kararlılığı, 50 ng/mL AFP'nin 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde 60 gün boyunca belirli aralıklarla DPV ve SWV metotları ile ölçümleri yapılarak tespit edilmiştir. % Ortalama bağıl akım değeri 3. günün sonunda %1,6, 10. günün sonunda %13,3, 30. günün

sonunda %38,2 ve 45. günün sonunda ise %60,0 oranında azalmıştır. % Ortalama bağıl akım değeri ilk kullanımdan sonra azalmış olsa da 60. güne kadar AFP için yanıt vermiştir. Bu sonuçlardan, tek kullanımlık olarak hazırlanan bir immünosensör için, 60 gün uygulama kararlılığının iyi olduğu ve immünosensör formülasyonunda bulunan RGO, PNR ve AuNP'nin uygulama kararlılığını arttırdığı sonucuna varılmıştır.

Çalışma şartlarında geliştirilen SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün depolama kararlığını belirlemek için, hazırlanan immünosensörler -20 ^{o}C'de bekletilmiştir. Daha sonra bu immünosensörlerin 12 hafta boyunca belirli aralıklarla 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları ile ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen verilere göre SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün 1. hafta sonunda % ortalama bağıl akım değerinin ilk güne göre %16,5 ve 2. hafta sonunda %24,8 azaldığı görülmüştür. Devamında 4. haftada %29,8 ve 8. hafta sonunda ise %43,2 azalma gösterdiği tespit edilmiştir. 12. haftada yapılan ölçümler sonucunda ise ilk güne göre %58,7 azalma göstermiştir. Bu veriler, SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün 12. haftaya kadar AFP'ye karşı yanıt verdiği tespit edilmiştir.

Çalışma şartlarında geliştirilen SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün seçiciliğini belirlemek için her biri 20 ng/mL konsantrasyonuna sahip on farklı antijen karışımı ile AFP immünosensörü hazırlanmıştır. Karışımda yer alan antijenlerin [HE4, CA125, AFP, MAGE1 (Melanom ile ilişkili antijen), Haptoglobin, HSP70 (70 kilodaltonluk ısı şoku proteini), PAK2 (Serin/treonin-protein kinaz2), SOX2 (transkripsiyon proteini), Leptin, TRAP1 (mitokondriyal ısı şoku proteini)] hazırlanan immünosensörler ile 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde DPV ve SWV metotları kullanılarak üç tekrarlı ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen veriler incelendiğinde sadece AFP varlığında DPV ve SWV metotları ile yapılan ölçümlerden elde edilen % ortalama bağıl akım değeri ile antijen karışımı varlığında DPV ve SWV metotları ile yapılan ölümlerden elde edilen % ortalama bağıl akım değeri %4,02 artmıştır. Antijen karışımı varlığında % ortalama bağıl akım değerindeki bu artış SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün antijen karışımı varlığında seçiciliğinin yeterli olduğunu göstermiştir.

Geliştirdiğimiz AFP immünosensörleri gerçek numune analizinde kullanılmıştır. Merck firmasında satın alınan yapay kan serumu (insan kanı) numunesi 1:100 oranında pH 7,4 tampon çözelti ile seyreltilmiştir. Kan serumu numunesine bilinen konsantrasyonda AFP ilave edilerek AFP içeren yapay kan serumu (insan kanı) numuneleri hazırlanmıştır. Bilinen miktarda AFP içeren kan serumu numunelerindeki AFP'nin elektrokimyasal tayini 5 mM $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ (1 M KCl) çözeltisinde SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA/AFP immünosensörleri kullanılarak DPV ve SWV metotları ile yapılmıştır.

Elde edilen AFP analiz verileri incelendiğinde eklenen AFP konsantrasyonu ile hesaplanan AFP konsantrasyonu arasındaki % hatanın DPV ve SWV metotlarının her ikisinde de %5'ten az olduğu görülmüştür. Eklenen AFP analiz sonuçlarına göre her iki metottan elde edilen verilerde de geri kazanımların %95'in üstünde olduğu tespit edilmiştir. Bu tespitlerden yola çıkarak yüksek oranda % geri kazanım ve düşük oranda % hata değerleri elde edilmesiyle başarılı bir şekilde AFP analizi yapılabildiği sonucuna varılmıştır.

Çalışma sonunda hazırlanan SPCE/RGO/PNR/AuNP/Anti-AFP/BSA immünosensörünün AFP tayininde göstermiş olduğu yüksek elektronik iletkenlik, yüksek duyarlık ve başarılı gerçek numune analizleri sonuçları, bu immünosensörün AFP tayininde kullanımının uygun olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda, üretim aşamasında kullanılan materyallerin ekonomik oluşu bunun yanında basit ve kolay uygulanabilir olması da AFP tayininde avantaj teşkil etmektedir. Bu avantajlarının yanında 15 dk süre içerisinde AFP tayininin yapılabilmesi de bu immünosensörü öne çıkartan bir diğer özelliğidir. Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada geliştirilmiş olan etiketsiz elektrokimyasal AFP immünosensörünün klinik açıdan AFP'nin tayin ve takibi için yeni bir metot olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

Altun, M., Melike Bilgi Kamaç, Alper Bilgi, Merve Yılmaz. 2020. Dopamine biosensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polyneutral red and gold nanoparticle. International Journal of Environmental Analytical Chemistry,100:4, 451-467.

Aydın E. B., Sezgintürk M. K., 2017. A sensitive and disposable electrochemical immunosensor for detection of SOX2, a biomarker of cancer. Talanta 172: 162-170.

Aydın M., Aydın E. B., Sezgintürk M. K., 2017. A highly sensitive immunosensor based on ITO thin films covered by a new semi-conductive conjugated polymer for the determination of TNFα in human saliva and serum samples. Biosensors and Bioelectronic 97:169-176.

Babu, T. E. G., S.A. Mastan, M. Sai Sowjanya, G. Rajesh, K. Harshitha. A. Madhavi, U. Haritha, B. Sindhulekha, P. Sivanarendra Babu. 2020. Identification of High-Risk Pregnancies by Maternal Serum Alfa Fetoprotein. Int. J. Appl. Sci. Biotechnol. Vol 8(2): 231-234.

Bahadır, E. Burcu, M.Kemal Sezgintürk. 2015. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. Namık Kemal University, Scientific andTechnological Research Center, Talanta162–174.

Bilgi, M., Ayrancı, E. 2016. "Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase" Sensors and Actuators B: Chemical, 237, 849-855.

Broncova, G., Tatiana V. Shishkanova, Pavel Matejka, Radko Volf, Vladimir Kral. 2004. 'Citrate selectivity of poly(neutral red) electropolymerized films' Analytica Chimica Acta 511 197–205.

Caoa, L., Cheng Fangb, Ruosheng Zengb, Xiongjie Zhaoa, Feijun Zhaob, Yuren Jianga, Zhencheng Chenb. 2017. A disposable paper-based microfluidic immunosensor based onreduced graphene oxide-tetraethylene pentamine/Au nanocompositedecorated carbon screen-printed electrodes. Sensors and Actuators B 252 (2017) 44–54.

Chen, J. and G. C. Zhao. 2017. 'A novel signal-on photoelectrochemical immunosensor for detection of alpha-fetoprotein by in situ releasing electron donor', Biosens Bioelectron, 98: 155-60.

Demirbakan, B., & Sezgintürk, M. K., 2020. A novel ultrasensitive immunosensor based on disposable graphite paper electrodes for troponin T detection in cardiovascular disease. Talanta, 213: 120779.

Diaconu, I., C. Cristea, V. Harceaga, G. Marrazza, I. Berindan-Neagoe, and R. Sandulescu. 2013. 'Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer', Clin Chim Acta, 425: 128-38.

Gao, Q., Na Liu, Zhanfang Ma. 2014. 'Prussian blue–gold nanoparticles-ionic liquid functionalized reduced graphene oxide nanocomposite as label for ultrasensitive electrochemical immunoassay of alpha-fetoprotein' Analytica Chimica Acta 829 15–21.

Gao, K., Zhao Sun, Bo Guang Pan, Xiuwen Qiao, Chenglin Hong. 2017. Electrochemical immunosensor for alpha-fetoprotein based on prussian blue-carbon nanotube@polydopamine. Micro & Nano Letters, 2018, Vol. 13, Iss. 1, pp. 58–62.

Giz, M. J., B. Duong, N.J. Tao. 1999. 'In situ STM study of self-assembled mercaptopropionic acid monolayers for electrochemical detection of dopamine' Journal of Electroanalytical Chemistry 465 72–79.

Haruta, M. 2004. 'Gold as a Novel Catalyst in the 21st Century: Preparation, Working Mechanism and Applications' Research Institute for Green Technology. Tsukuba 305-8569.

Idris, Azeez O., Nonhlangabezo Mabubaab and Omotayo A. Arotiba. 2018. 'An alpha-fetoprotein electrochemical immunosensor based on a carbon/gold bi-nanoparticle platform' Anal. Methods, 2018, 10, 5649.

Jia, X., Xia Chen, Jingman Han, Jie Ma, Zhanfang Ma. 2014. 'Triplesignalamplification usinggoldnanoparticles, bienzyme and platinum nanoparticles functionalized graphene as enhancers for simultaneous multiple electrochemical immunoassay' Biosensors and Bioelectronics 53 65–70.

Kamaç M.B., Eda Kıymaz Onat, Merve Yılmaz. 2019. A new disposable amperometric NADH sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide/polyneutral red/gold nanoparticle. International Journal of Environmental Analytical Chemistry.

Kamaç M.B., Eda Kiymaz Onat, Merve Yilmaz. 2020. A novel non-enzymatic amperometric H_2O_2 sensor based on screen-printed electrode modified with reduced graphene oxide, polyneutralred and gold nanoparticles. International Journal of Environmental Analytical Chemistry.

Karaboğa Sonuç M. N., Sezgintürk M. K., 2019. Cerebrospinal fluid levels of alpha-synuclein measured using a poly-glutamic acid-modified gold nanoparticle-doped disposable neurobiosensor system. Analyst 144: 611-621.

Kausaite, A -Minkstimiene, A. Ramanaviciene, J. Kirlyte,and A. Ramanavicius. 2010. 'Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization Techniques on the Binding Capacity of Immunosensor' Anal. Chem. 82, 6401–6408.

Kavosi, B., Rahman Hallaj, Hazhir Teymourian, Abdollah Salimi. 2014. 'Au nanoparticles/PAMAM dendrimer functionalized wired ethyleneamine–viologenas highly efficient interface for ultra-sensitive α-fetoprotein electrochemical immunosensor' Biosensors and Bioelectronics 59 389–396.

Li, Q., D. Liu, L. Xu, R. Xing, W. Liu, K. Sheng, and H. Song. 2015. 'Wire-in-Tube IrOx Architectures: Alternative Label-Free Immunosensor for Amperometric Immunoassay toward alpha-Fetoprotein', ACS Appl Mater Interfaces, 7: 22719-26.

Li, M., Yuan-Ting Li., Da-Wei Li, Yi-Tao Long. 2012. 'Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review. Analytica Chimica Acta 734 31– 44.

Li, G. Shanshan Li, Zhihong Wang, Yewei Xue, Chenyang Dong, Junxiang Zeng, Yong Huang, Jintao Liang, Zhide Zhou. 2018. Label-free electrochemical aptasensor for detection of alpha-fetoprotein based on AFP-aptamer and thionin/reduced graphene oxide/gold nanoparticles. Analytical Biochemistry (2018).

Liang, Y. Xiaoqing Zhao, Na Wang, Jing Wang, Hou Chen, Liangjiu Bai and Wenxiang Wang. 2019. A label-free immunosensor based on PHEMA/ graphene oxide nanocomposite for simultaneous electrochemical determination of alpha fetoprotein. School of Chemistry and Materials Science. 2019, 9, 17187/17193/17193.

Limbut, W. Proespichaya Kanatharana, Bo Mattiasson, Punnee Asawatreratanakul, Panote Thavarungkul. 2006. 'A comparative study of capacitive immunosensors based on self-assembled monolayers formed from thiourea, thioctic acid, and 3-mercaptopropionic acid' Biosensors and Bioelectronics 22 233–240.

Pauliukaite, R., Ghica, M. E., Barsan, M. and Brett, C. M. 2007. Characterisation of poly (neutral red) modified carbon film electrodes; application as a redox mediator for biosensors. Journal of Solid State Electrochemistry, 11(7), 899-908.

Putzbach, W. and Niina J. Ronkainen. 2013. 'Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review' Sensors 13, 4811-4840.

Peng, Hua-Ping, Yan Hu, Ai-Lin Liu, Wei Chen, Xin-Hua Lin, and Xiang-Bin Yu. 2013. 'Label-free electrochemical immunosensor based on multi-functional gold nanoparticles–polydopamine–thionine–graphene oxide nanocomposites film for determination of alpha-fetoprotein', Journal of Electroanalytical Chemistry, 712: 89-95.

Pumera, Martin, Adriano Ambrosi, Alessandra Bonanni, Elaine Lay Khim Chng, and Hwee Ling Poh. 2010. 'Graphene for electrochemical sensing and biosensing', TrAC Trends in Analytical Chemistry, 29: 954-65.

Shalaby, A., D. Nihtianova, P. Markov, A. D. Staneva, R. S. Iordanova, Y. B. Dimitriev, 2015. Structural analysis of reduced graphene oxide by transmission electron microscopy, Institute of Mineralogy and Crystallography, Bulgarian Academy of Sciences, Acad. G. Bonchev Str., bl. 107, 1113

Sun, X., Shaojun Dong, Erkang Wang. 2005. 'One-step preparation of highly concentrated well-stable gold colloids by direct mix of polyelectrolyte and $HAuCl_4$ aqueous solutions at room temperature' Journal of Colloid and Interface Science 288 301–303.

Şahin M., 2013, Etanol-Metanol Karışımının Tayini İçin Yüzey Baskılı Elektrotların Modifiye Edilmesiyle Amperometrik Alkol Biyosensörünün Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 191s., Antalya.

Şahin, M. and Ayrancı, E. 2015. Electrooxidation of NADH on modified screen-printed electrodes: effects of conducting polymer and nanomaterials. Electrochimica Acta, 166, 261-270.

Tiyek, İ, U. Dönmez , B. Yıldırım, M.Hakkı Alma, M Sabri Ersoy , Şükrü Karataş , M. Yazıcı. 2016. Synthesis of reduced graphene oxide by chemical method and its characterization. Sakarya University Journal of Science, Sakarya 2016

Tang, Z., and Z. Ma. 2017. 'Multiple functional strategies for amplifying sensitivity of amperometric immunoassay for tumor markers: A review', Biosens Bioelectron, 98: 100-12.

Thiyagarajan N., Jen-Lin Chang, Krishnan Senthilkumar, Jyh-Myng Zen. 2013. 'Disposable electrochemical sensors: A mini review' Electrochemistry Communications 38 86–90.

Ulman Abraham. 1996. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. Department of Chemical Engineering, Chemistry and Materials Science, and the Herman F. Mark Polymer Research Institute, Polytechnic University, Six MetroTech Center, Brooklyn, New York 11201

Vestergaard, M., Kagan Kerman and Eiichi Tamiya. 2007. 'An Overview of Label-free Electrochemical Protein Sensors' Sensors, 7, 3442-3458.

Wanga, Ai-Jun. Xiao-Yan Zhua, Yao Chena, Pei-Xin Yuana, Xiliang Luob, Jiu-Ju Feng. 2019. A label-free electrochemical immunosensor based on rhombic dodecahedral Cu_3Pt nanoframes with advanced oxygen reduction performance for highly sensitive alpha-fetoprotein detection. Sensors & Actuators: B. Chemical 288 (2019) 721–727.

Wei, Qin, Kexia Mao, Dan Wu, Yuxue Dai, Jian Yang, Bin Du, Minghui Yang, and He Li. 2010. 'A novel label-free electrochemical immunosensor based on graphene and thionine nanocomposite', Sensors and Actuators B: Chemical, 149: 314-18.

Wei Q., Kexia Mao, Dan Wu, Yuxue Dai, Jian Yang, Bin Du, Minghui Yang, He Li. 2010. 'A novel label-free electrochemical immunosensor based on graphene and thionine nanocomposite' Sensors and Actuators B 149 314–318.

Wu Y., Yanying Wangy, Xing Wang, Chen Wang, Chunya Li, and Zhengguo Wang. 2019. 'Electrochemical Sensing of -Fetoprotein Based on Molecularly Imprinted Polymerized Ionic Liquid Film on a Gold Nanoparticle Modified Electrode Surface.' Sensors, 19, 3218.

Wu, Y., Wenju Xu, Yan Wang, Yali Yuan, Ruo Yuan. 2013. Silver–graphene oxide nanocomposites as redox probes for electrochemical determination of -1-fetoprotein. Electrochimica Acta 88 (2013) 135– 140.

Yang, T., Haiyan Jia, Zhen Liu, Xinlan Qiu, Yansha Gao, Jingkun Xu, Limin Lu, Yongfang Yu. 2017. The assemble of prussian blue-reduced graphene oxide and gold nanoparticles-poly(3,4-ethylenedioxythiophene) as a stable signal transduction for label-free electrochemical immunosensor. Journal of Electroanalytical Chemistry (2017).

Yuana X., Wei Longa, Jianbing Liua, Bin Zhanga, Wenbai Zhoua, Jian Jiangb, Bin Yua, Huiyan Wangb.2019. 'Associations of serum markers screening for Down's syndrome with pregnancy outcomes: A Chinese retrospective cohort study.' Clinica Chimica Acta 489 130–135.

Zhou, J. Cong Zhang, Yuan Chen, Zihua Wang, Lintao Lan, Yingying Wang, Bingkai Han, Meixin Pan, Jun Jiao, Qiang Chen. 2019. A simple immunosensor for alpha-fetoprotein determination based on gold nanoparticles-dextran-reduced graphene oxide. Journal of Electroanalytical Chemistry. S1572-6657(18)30786-0.

Zhou J., Cong Zhang, Yuan Chen, Zihua Wang, Lintao Lan, Yingying Wang, Bingkai Han, Meixin Pan, Jun Jiao, Qiang Chen. 2018. A simple immunosensor for alpha-fetoprotein determination based on gold nanoparticles-dextran-reduced graphene oxide. Journal of Electroanalytical Chemistry. S1572-6657(18)30786-0.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: KADİR ERDEM
Doğum yeri	: SEYDİŞEHİR / KONYA
Doğum tarihi	: 07.07.1983
Medeni hali	: EVLİ
Yabancı Dili	: İNGİLİZCE
E-posta	: chemist026@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve yıl)

Lise	: Enis Şanlıoğlu Süper Lisesi-2001
Lisans	: Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü. 2001-2006
Tezli Yüksek Lisans	: Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü.

Uluslararası Kongreler:

1. M. Bilgi Kamaç, K. Erdem, M. Yılmaz, Preparation and Electrochemical Characterization of Label-Free AFP Immunosensor on Screen-Printed Electrode Modified with Nanoparticles and Conducting Polymers, 4 th International Congress on Biosensors, Çanakkale 8-11 Temmuz 2019 (Poster Sunum).