ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASETİLKOLİN TAYİNİ İÇİN NANOMATERYAL TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Ecem Özlem BOLAT

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2018

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ecem Özlem Bolat tarafından hazırlanan "**Asetilkolin Tayini İçin Nanomateryal Temelli Elektrokimyasal Biyosensörlerin Geliştirilmesi**" adlı tez çalışması 10/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Fatma ARSLAN
Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Emel EMREGÜL
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI
Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

10.01.2018



Ecem Özlem BOLAT

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ASETİLKOLİN TAYİNİ İÇİN NANOMETARYEL TEMELLİ ELEKTROKİMYASAL BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Ecem Özlem BOLAT

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

Bu çalışmada Alzeheimer, parkinson ve şizofreni hastalıklarının teşhisinde önemli bir belirteç olan asetilkolini tespit etmek için hızlı ve güvenilir bir biyosensör geliştirilmiştir. Farklı nanoyapılar ile modifiye edilen camsı karbon elektrotlar ile hazırlanan biyosensörler asetilkolin tayini için kullanılmıştır. Geliştirilen bu biyosensör ile asetilkolin tayini enzim-substrat ilişkisine dayanarak yapılmıştır. Günümüzde yaygın olarak asetilkolin tayininde LC (sıvı kromatografisi) ve MS (kütle spektroskopisi) kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin maliyetinin yüksek olması, uzmanlık gerektirmesi, çeşitli ön işlem ve yıkama aşamalarının zaman alması ve aynı anda çoklu analiz yapamaması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu sebepleri göz önünde bulundurarak maliyeti düşük, uygulama basamakları daha az, hızlı ve güvenilir sonuç verebilecek bir nanomateryal temelli elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Nanopartiküllerin hızlı elektron transferi, etkin geniş yüzey alanı, yüksek yüzey enerjisi, protein-metal partikülleri yaklaştırma özelliği bulunmaktadır. Ayrıca elektroanalitik işlemler için hassas, kolay modifiye edilebilir, kararlı bir elektrot yüzeyi oluştururlar. Asetilkolin tayini için hazırlanan bu amperometrik biyosensörde çalışma elektrodu olarak camsı karbon elektrot ve modifiye edici olarak kitosan, çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) ve Fe_3O_4 nanopartiküller kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensör serum örneklerinde asetilkolin seviyelerini ölçmek için kullanılmıştır.

Ocak 2018, 47 sayfa

Anahtar Kelimeler: Asetilkolin, Asetilkolinesteraz, Kolinoksidaz, Biyosensör, Elektrokimya, Camsı Karbon Elektrot.

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT OF NANOMATERIALS BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS FOR ACETHYLCHOLINE DETERMINATION

Ecem Özlem BOLAT

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

In this study, a fast and reliable biosensor was developed to detect acetylcholine which is an important marker in the diagnosis of Alzeheimer, Parkinson's and schizophrenia diseases. Biosensors prepared with glassy carbon electrodes modified with different nanostructures were used for the determination of acetylcholine. This biosensor was developed based on the enzyme-substrate relationship with acetylcholine. LC (liquid chromatography) and MS (mass spectroscopy) are widely used for the determination of acetylcholine. These methods have some disadvantages such as high cost, expertise requirement, various pre-treatment and washing stages take time, and multiple analysis can not be performed at the same time. Considering these reasons, a nanomaterial-based electrochemical biosensor has been developed which can provide low cost, low application steps, fast and reliable results. Nanoparticles have fast electron transfer, effective large surface area, high surface energy, ability to approximate protein-metal particles. They also form a precise, easily modifiable, stable electrode surface for electroanalytical processes. The glassy carbon electrodes were used as working electrode and the chitosan, multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) and Fe_3O_4 nanoparticles were selected as modifiers for the preparation of acetylcholine biosensor. The fabricated biosensor was used to determine acetyhlcholine levels in serum samples.

January 2018, 47 pages

Key Words: Acetyhlcholine, Acetyhcholine Esterase, Cholinoxidase, Biosensor, Electrochemistry, Glassy Carbon Electrode.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI'ya, (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı)

Yüksek lisans çalışmalaım sırasında ilgisini ve desteğini göstermekten kaçınmayan değerli hocam Dr. Gözde AYDOĞDU TIĞ'a ve çalışmalarım sırasında yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen değerli ekip arkadaşlarım Mustafa Barış KOÇER'e,

Çalışmalarım boyunca maddi ve manevi destkeleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme de sonsuz teşekkür ederim.

Ecem Özlem BOLAT
Ankara, Ocak 2018

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ..... **i**
ÖZET ..... **ii**
ABSTRACT ..... **iii**
TEŞEKKÜR ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1.GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ **3**
2.1 Biyosensörler **3**
2.1.1 Biyosensörlerin temel bileşenleri **4**
2.1.2 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler **5**
2.1.3 Biyosensörlerde kullanılan immobilizasyon teknikleri **7**
2.2 Asetilkolin Tayininin Önemi **8**
2.3 Asetilkolinesteraz ve Kolinoksidaz Enzimlerinin Özellikleri **9**
2.4 Kaynak Özetleri **12**
3. MATERYAL ve YÖNTEM **15**
3.1 Kullanılan Cihazlar, Hücre ve Elektrotlar **15**
3.2 Kullanılan Kimyasallar **16**
3.2.1 Oksijen gazı **16**
3.2.2 Kullanılan diğer kimyasallar **16**
3.3 Kullanılan Çözeltiler **18**
3.3.1 Fosfat tamponu **18**
3.3.2 Hidrojen peroksit çözeltisi **18**
3.3.3 Kitosan Çözeltisi **18**
3.3.4 EDC-NHS Çözeltisi **18**
3.3.5 Enzim Çözeltileri **18**
3.3.6 Asetilkolin çözeltisi **19**
3.3.7 Nafyon çözeltisi **19**
3.4 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun hazırlanması **19**

3.5 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun karakterizasyonu 20
3.6 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun asetilkoline duyarlılığının belirlenmesi 20
3.7 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun çalışma potansiyelinin belirlenmesi 21
3.8 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun çalışma koşulları 21
3.8.1 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun cevabına enzim miktarlarının etkisi 21
3.8.2 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun cevabına pH'nin etkisi 21
3.8.3 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun cevabına sıcaklığın etkisi 22
3.8.4 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun cevabına substrat miktarının etkisi 22
3.8.5 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun tekrarlanabilirliğinin ve tekrar üretilebilirliğinin belirlenmesi 23
3.8.6 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun kararlanabilirliğinin belirlenmesi 23
3.8.7 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun raf ömrünün belirlenmesi 23
3.9 Biyosensör üzerine girişim yapan maddeler 24
3.10 Serumda Asetilkolin Tayini 24
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 25
4.1 Hazırlanan Elektrotların Karakterizasyonu 25
4.2 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun asetilkoline duyarlılığının belirlenmesi 30
4.3 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektrodunun çalışma potansiyelinin belirlenmesi 31
4.4 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun çalışma koşulları 32
4.4.1 AChE ve ChOx miktarının etkisi 32
4.4.2 pH'nin etkisi 33
4.4.3 Sıcaklığın etkisi 34
4.4.4 Asetilkolin miktarının etkisi 35
4.4.5 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik 36
4.4.6 Kararlılık 37

4.4.3 Raf ömrü 38
4.5 Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler 38
4.9 Geliştirilen Biyosensör ile Serumda Asetilkolin Tayini 39
5. SONUÇLAR 42
KAYNAKLAR 44
ÖZGEÇMİŞ 47

SİMGELER DİZİNİ

M	Molar
i_{pa}	Anodik pik akımı
i_{pk}	Katodik pik akımı

Kısaltmalar

µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ACh	Asetilkolin
BSS	Bağıl standart sapma
CV	Dönüşümlü voltametri
EIS	Elektrokimyasal impedans spektroskopisi
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Alt tayin sınırı
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
R_{et}	Elektron transfer direnci
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
GCE	Camsı karbon karbon elektrot
XPS	X-ışınları fotoelektron spektroskopisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyosensörlerin çalışma prensibi 5

Şekil 2.2 Enzim immobilizasyon yöntemleri 7

Şekil 2.3 Asetilkolinesteraz enziminin üç boyutlu yapısı 10

Şekil 2.4 Kolin oksidazın üç boyutlu yapısı 11

Şekil 3.1 AUTOLAB PGSTAT204 elektrokimyasal analiz cihazı ve BASi C3 hücre standı 15

Şekil 4.1 (A) BGCE a. GCE/CS-Fe_3O_4NPs, b. GCE/CS-MWCNTs, c, GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs, d. ve GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx, e. elektrotlarının 0,1 M KCl içeren 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözeltisinde, 50 mV/s tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları, (B) 0,1 M KCl içeren 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözeltisinde elde edilen Nyquist eğrileri 26

Şekil 4.2.a. Yalın GCE, b. GCE/CS-MWCNTs-Fe3O4NPs, c.d. GCE/CS-MWCNTs-Fe3O4NPs/AChE-ChOx (c,d) elektrotlarının SEM görüntüleri 28

Şekil 4.3.a. GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs, b. GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/ AChE-ChOx elektrotlarına ait genel tarama XPS spektrumları. b. GCE/ CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektroduna, c. GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/ AChE-ChOx elektroduna ait kısmi tarama N1s spektrumu 29

Şekil 4.4 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs ve GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs-ACh-ChOx elektrotlarının 1,0 mM asetilkolin yokluğunda ve varlığında elde edilen dönüşümlü voltamogramları (0,05 M fosfat tamponu, pH 7,5, tarama hızı: 50 mV/s) 31

Şekil 4.5 Çalışma potansiyelinin GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektrodunun amperometrik cevabına etkisi (0,05 M PBS, pH 7,5) 32

Şekil 4.6 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodun cevabına a. ChOx, b. AChE miktarının etkisi (1,0 µM asetilkolin, +0.4 V, 0,1 M fosfat tamponu, pH 7,5, n = 3) 33

Şekil 4.7 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodun cevabına pH'nin etkisi (1,0 µM asetilkolin, +0,4 V, 0,1 M fosfat tamponu, pH 7,5, n = 3) 34

Şekil 4.8 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodun cevabına sıcaklığın etkisi (1,0 µM asetilkolin, +0,4 V, 0,1 M fosfat tamponu, pH 7,5, n = 3) 35

Şekil 4.9 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodun cevabına asetilkolin derişiminin etkisi, (a) ve (b) GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/ AChE-ChOx elektrodu ile farklı derişim aralığında elde edilen kalibrasyon grafikleri (0,05 M pH 7,5 fosfat tamponu, +0,4 V) 36

Şekil 4.10 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs-AChE-ChOx elektroduna ait ardışık çok döngülü voltamogramlar (0,05 M fosfat tamponu, pH 7.5) 37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edilen firmalar 17
Çizelge 4.1 BGCE, GCE/CS-Fe_3O_4NPs, GCE/CS-MWCNTs, GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs ve GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrotlarının 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki elektrokimyasal karakteristiklerinin karşılaştırılması (tarama hızı 50 mVs^{-1}) 27
Çizelge 4.2 Asetilkolin tayini için geliştirilen biyosensöre diğer türlerin girişim etkisi 39
Çizelge 4.3 Serum numunelerinde asetilkolin tayini 39
Çizelge 4.4 Farklı amperometrik ACh biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması 41

1. GİRİŞ

Biyosensör, biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçimlilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlardır. Biyosensörler reseptör ve dönüştürücü (transducer) olmak üzere iki ana yapıdan oluşur. Eğer reseptör biyomoleküler bir yapıda ise buna biyoreseptör adı verilir. Biyoreseptörler, analiti fark edebilen biyomoleküllerdir. Dönüştürücüler ise biyoreseptörün analiti fark ettiği esnada ürettiği kimyasal veya fiziksel sinyali elektrik sinyallerine dönüştüren yapılardır (Ravi vd. 2010)

Biyosensörlerin elektrokimyasal, optik, kalorimetrik ve piezoelektrik esaslı olmak üzere dört çeşidi vardır. Amperometrik esaslı biyosensörler elektrokimyasal sınıfa girmektedir. Biyosensörler kullanılan kaynaklara göre; enzim, doku, DNA, antikor/antijen ve mikrobiyal kaynaklı olmak üzere çeşitli sınıflara ayrılırlar (Qin vd. 2010, Aynacı vd. 2014). Biyomoleküllerden en çok kullanılanı enzimlerdir. Enzim biyosensörlerinin önemini arttıran en büyük etmen canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılabilecek binlerce enzimin varlığıdır. Enzimler hiçbir değişikliğe uğramadan, kimyasal reaksiyonları katalizleyen ve aynı zamanda biyokimyasal olayların uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan biyomoleküllerdir. Enzimlerin substratlarına karşı yüksek bir afinitesi vardır. Binlerce kimyasal arasından ilgili oldukları substratı seçer ve reaksiyonu katalizlerler. Birçok analit içinden hedef analiti seçip reaksiyon oluşturabilen bu biyokatalizatörlerin dönüştürücülere immobilizasyonları biyosensörlerin hazırlanmasında en önemli aşamasını oluşturur (Ravi vd. 2010, Qin vd. 2010, Aynacı vd. 2014).

Bir alkaloid olan asetilkolin tanımlanan ilk nörotransmitterdir. Merkezi sinir sisteminde yer alan bir kimyasal transmiter (iletici) olmasının yanı sıra birçok organizmanın parasempatik sinir sisteminde yer alır. Formülü $CH_3COOCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$ olan asetilkolin, çizgili kas liflerindeki nikotinik reseptöre bağlanarak kas hücresine Na^+ iyonunun taşınmasını ve voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının açılması ile depolarize olan kas hücresinin kasılmasını sağlar. Asetilkolinin öğrenme ve hafıza ile de ilişkisi

vardır ve beyinde asetilkolin içeren nöronlar bulunmaktadır. Asetilkolin belli nöronlarda kolin asetil transferaz enzimi tarafından, kolin ve asetil-CoA'dan sentezlenir. Sinaptik boşluğa salınarak görevini tamamladıktan sonra, asetilkolinesteraz enzimiyle kolin ve asetata çevrilerek yıkılır (Aynacı vd. 2014, Zhang vd. 2014).

Nikotin ve muskarin, asetilkolin reseptörlerini güçlü bir şekilde uyarırlar. Bazı insektisitler (böcek öldürücüler) ise asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederler. Bu inhibisyon sonucu merkezi sinir sistemi, kaslar ve bezler sürekli olarak uyarılırlar. Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların asetilkolin eksikliği ile önemli bir bağlantısı olduğu için asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden bazı ilaçlar Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Bir nöromusküler hastalık olan Miyasteni Gravis'de ise, vücut asetilkolin reseptörlerine karşı antikor üreterek düzgün bir asetilkolin sinyal transferini önler. Bu bozukluğun tedavisinde de asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlar kullanılmaktadır. Asetilkolin ayrıca, katarakt ameliyatlarında göz bebeğinin hızlı bir şekilde konstriksiyonu (küçülmesi) için de kullanılır (Şen vd. 2004, Aynacı vd. 2014, Zhang vd. 2014).

Bu çalışmada Alzeheimer, parkinson ve şizofreni hastalıklarının teşhisinde önemli bir belirteç olan asetilkolini tespit etmek için hızlı ve güvenilir tayin amacıyla nanometaryal temelli biyosensör geliştirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Biyosensörler

Tüm canlılar yaşadıkları ortamdaki değişimleri derhal algılayıp yaşamlarını sürdürebilmek için değişimlere uymaya çalışırlar. İşte bu algılama mekanizması biyosensörlerin *in vitro* kullanımı için temel oluşturmuştur. Canlılara bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensör teknolojisinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Biyosensör, biyolojik moleküllerin veya sistemlerin seçimlilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen biyoanalitik cihazlardır. Biyosensörler reseptör ve dönüştürücü (transducer) olmak üzere iki ana yapıdan oluşur. Eğer reseptör biyomoleküler bir yapıda ise buna biyoreseptör adı verilir. Biyoreseptörler, analiti fark edebilen biyomoleküllerdir. Dönüştürücüler ise biyoreseptörün analiti fark ettiği esnada ürettiği kimyasal veya fiziksel sinyali elektrik sinyallerine dönüştüren yapılardır (Zhang vd. 2014). Biyosensörlerin elektrokimyasal, optik, kalorimetrik ve piezoelektrik esaslı olmak üzere dört çeşidi vardır. Amperometrik esaslı biyosensörler elektrokimyasal sınıfa girmektedir. Biyosensörler kullanılan kaynaklara göre; enzim, doku, DNA, antikor/antijen ve mikrobiyal kaynaklı olmak üzere çeşitli sınıflara ayrılırlar (Wang 1999). Biyomoleküllerden en çok kullanılanı enzimlerdir. Enzim biyosensörlerinin önemini arttıran en büyük etmen canlı sistemlerle ilgili hemen hemen her türlü maddenin doğrudan veya dolaylı olarak analizinde kullanılabilecek binlerce enzimin varlığıdır. Enzimler hiçbir değişikliğe uğramadan, kimyasal reaksiyonları katalizleyen ve aynı zamanda biyokimyasal olayların uyumlu bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan biyomoleküllerdir. Enzimlerin substratlarına karşı yüksek bir afinitesi vardır. Binlerce kimyasal arasından ilgili oldukları substratı seçer ve reaksiyonu katalizlerler (Orak 2011). Birçok analit içinden hedef analiti seçip reaksiyon oluşturabilen bu biyokatalizatörlerin dönüştürücülere immobilizasyonları biyosensörlerin hazırlanmasında en önemli aşamasını oluşturur.

Bir alkaloid olan asetilkolin tanımlanan ilk nörotransmitterdir. Merkezi sinir sisteminde yer alan bir kimyasal transmiter (iletici) olmasının yanı sıra birçok organizmanın

parasempatik sinir sisteminde yer alır. Formülü $CH_3COOCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$ olan asetilkolin, çizgili kas liflerindeki nikotinik reseptöre bağlanarak kas hücresine Na^+ iyonunun taşınmasını ve voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının açılması ile depolarize olan kas hücresinin kasılmasını sağlar. Asetilkolinin öğrenme ve hafıza ile de ilişkisi vardır ve beyinde asetilkolin içeren nöronlar bulunmaktadır. Asetilkolin belli nöronlarda kolin asetil transferaz enzimi tarafından, kolin ve asetil-CoA'dan sentezlenir. Sinaptik boşluğa salınarak görevini tamamladıktan sonra, asetilkolinesteraz enzimiyle kolin ve asetata çevrilerek yıkılır (Zhang vd. 2014).

Nikotin ve muskarin, asetilkolin reseptörlerini güçlü bir şekilde uyarırlar. Bazı insektisitler (böcek öldürücüler) ise asetilkolinesteraz enzimini inhibe ederler. Bu inhibisyon sonucu merkezi sinir sistemi, kaslar ve bezler sürekli olarak uyarılırlar. Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların asetilkolin eksikliği ile önemli bir bağlantısı olduğu için asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden bazı ilaçlar Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Bir nöromusküler hastalık olan miyasteni gravis de ise, vücut asetilkolin reseptörlerine karşı antikor üreterek düzgün bir asetilkolin sinyal transferini önler. Bu bozukluğun tedavisinde de asetilkolinesteraz enzimini inhibe eden ilaçlar kullanılmaktadır. Asetilkolin ayrıca, katarakt ameliyatlarında göz bebeğinin hızlı bir şekilde konstriksiyonu (küçülmesi) için de kullanılır (Wang 1999).

2.1.1 Biyosensörlerin temel bileşenleri

Biyosensörler, biyomolekül, sinyal iletici sistem ve sinyal okuyucu olmak üzere üç ana bileşenden meydana gelmektedir. Bir biyosensörü oluşturan ana parametreler; seçici tanıma mekanizmasına sahip bir biyoajan, bu biyoajanın incelenecek olan madde ile etkileşmesiyle meydana gelen fizikokimyasal sinyalleri elektronik sinyallere dönüştürebilen bir çevirici ve sinyalleri ölçen kaydedicidir (Wang. 1999).



Şekil 2.1 Biyosensörlerin çalışma prensibi

Analit ile seçici olarak tepkimeye girecek olan biyolobileşenler, biyoaktif tabakayı meydana getirirler. Biyoajanlar, tek bir substratı bağlayacak özelliğe sahip olmalıdır.

Dönüştürücüler; analit ile biyoajanın reaksiyonu sonucu oluşan biyokimyasal sinyali, elektronik sinyale çevirirler.

Kaydedici; elektornik kısımdır. Dönüştürücü aracılığıyla oluşan sinyallerin kaydedilmesini sağlar.

2.1.2 İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler

İdeal bir biyosensörün sahip olması gereken özellikler aşağıda özetlenmiştir (Hall 1990, Buerk 1993).

Seçicilik: bu özellik ideal biyosensörin sahip olması gereken önemli parametredir. Hedef analit haricinde ortamdaki diğer türlerden biyosensör cevabı etkilenmemelidir**.** Biyosensör, kararlı ve yalnızca analite karşı duyarlı olmalıdır. Biyosensörün spesifik olabilmesi amacıyla ortamdaki girişim yapabilecek maddeler önceden belirlenmelidir ve engellenmelidir.

Duyarlılık: İdeal bir biyosensörün analiz edilecek maddeye karşı yani enzimin substratına karşı yüksek duyarlık göstermesi beklenir.

Kararlılık: oluşturulan biyosensörün ne kadar süre performansını koruduğunun ölçüsüdür. Hazırlanan biyosensör ile yapılan ard arda ölçümler sonucunda biyomolekülün aktivitesindeki değişime bakılarak kararlılık parametresi belirlenmektedir. Elektrot kararlılığının yüksek olması ideal bir biyosensör için aranan özelliktir.

Doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı: ideal biyosensörde tayin sınırı belirli bir derişimin altında olmalıdır. Tayin sınırı olarak adlandırılan parametre; elektrot yüzeyinin genişliği, enzimin analite karşı ilgisi, immobilize edilen enzimin miktarı gibi parametrelerden etkilenmektedir. Tayin sınırı biyosensörden alınan akım-derişim eğrisinin doğrusal olduğu geniş bir aralıktır.

Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik: biyosensörün aynı özelliğe sahip analite karşı ile art arda yapılan ölçümlerde, aynı sonuçların elde edilmesi biyosensörün tekrarlanabilir olduğunu, aynı koşullarda hazırlanan farklı biyosensörlerin aynı cevpalrı vermesi biyosensörün tekrar üretilebilir olduğunu ifade eder.

Hızlı cevap süresi: analitin hücreye eklendiği andan itibaren akımın sabit kalması beklenir. Akım sabit olduğunda tayini istenilen analit eklenir ve akım değeri ölçülür. Ekleme yapıldıktan sonra akımın sabitlenmesine kadar geçen süre cevap süresi olarak adlandırılmaktadır. İdeal bir biyosensörde bu sürenin kısa olması istenir.

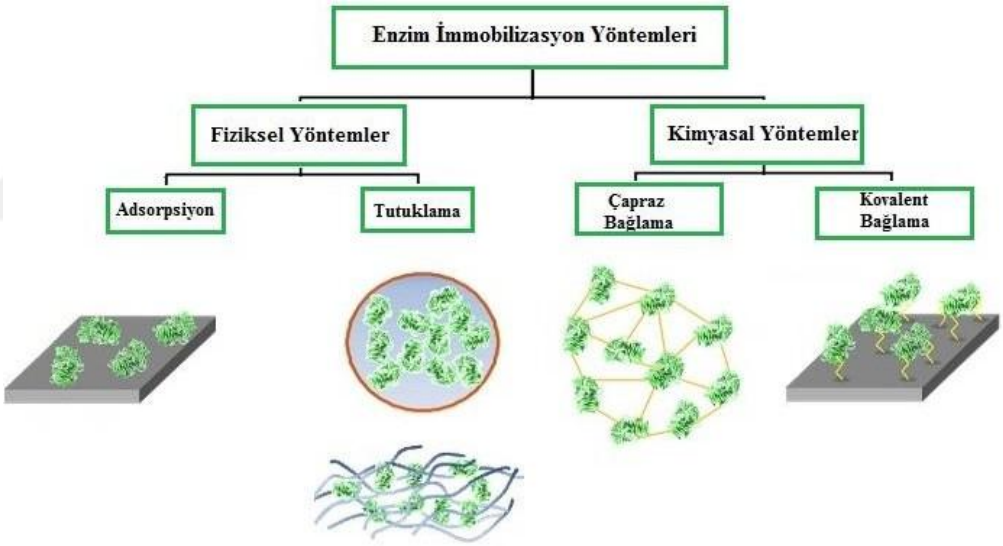
Raf Ömrü: biyosensörün duyarlılığını koruduğu zaman olarak adlandırılmaktadır. İdeal bir biyosensörün uzun ömürlü olması istenir.

2.1.3 Biyosensörlerde kullanılan immobilizasyon teknikleri

Biyosensörlerde, analizi yapılması istenilen analitin dönüştürücü birimine uygun bir immobilizasyon yöntemiyle bağlanmasıdır.

Biyosensörlerde immobilizasyon için kullanılan yöntemler;

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



Şekil 2.2 Enzim immobilizasyon yöntemleri

Adsorpsiyon: İmmobilizasyon için kullanılan en basit yöntemdir. Biyobileşenin dönüştürücü yüzeyine non-kovalent etkileşimler aracılığıyla (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, elektron geçiş kompleksleri ve Van der Walls kuvvetleri) ile tutturulmasıyla meydana gelir. Yöntemin tercih sebepleri; enzimin immobilizasyon işleminin basit ve kolay olmasıdır. Yöntemin dezavantajı immobilizasyon işlemi kolay sağlanmasına karşı optimum koşulların sağlanmasının zor olmasıdır. Eğer enzimle yüzey arasında kuvvetli

bir bağlanma yoksa bu durumda desorpsiyon meydana gelir ve enzim serbest halde tepkime ortamına geçer (Wang 1999).

Kovalent Bağlama: Tayin edilecek analitin dönüşütürücü yüzeyine doğrudan ya da önceden tabaka ile kaplanmış bileşene kimyasal bir reaksiyon aracılığıyla bağlanmasına dayanan immobilizasyon yöntemidir. Kovalent bağlamanın oluşabilmesi için bağlanma yüzeyinde tiyol (-SH), hidroksil (-OH), amin ($-NH_2$), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi reaktif grupların olması gerekmektedir. Kovalent bağlama ile immobilizasyon sonucunda pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi değişkenlere karşı biyosensör direnç sağlar ve biyosensörün ömrünü ve kararlığını uzatır. Kovalent bağlanmada dikkat edilecek en önemli nokta; enzim aktivitesinin sağlandığı amino asit gruplarından bağlanmanın olmaması ve streik olarak engellenmemesidir (Yücel 2013).

Tutuklama: Yüksek molekül kütleli biyomoleküllerin matrikslere, membranlara immobilize edilmesidir. Başka bir deyişlei enzim molekülünü bir alanda kalmasını sağlamaktır. Yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Tutuklamada kullanılan başlıca malzemeler akrilamit polimerleri, jelâtin tabakaları, nişasta, kalsiyum aljinat jelleri, silikon lastiği, polivinil klorür, polivinil alkoldür. Bu yöntemin kovalent ve çapraz bağlama ile immobilizasyonundan en önemli farkı, enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir desteğe ihtiyaç duymamasıdır (Wang 1999).

Çapraz Bağlama: Küçük moleküllü kimyasal reaktifler aracılığıyla çözünmeyen kompleksler oluşturarak sağlanan immobilizasyon yöntemidir. Çapraz bağlayıcı ajan olarak; glutaraldehit, kloroformat ve karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bioksiranlar, divinilsülfonlar, benzokinon, transizyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir kullanılmaktadır (Wang 1999).

2.2 Asetilkolin Tayininin Önemi

Asetilkolin en önemli nörotransmitter maddelerden biri olmasının yanı sıra, önemli bir biyolojik görevi olan esterdir. Ayrıca keşfedilen ilk nörotransmitter olarak literatüre

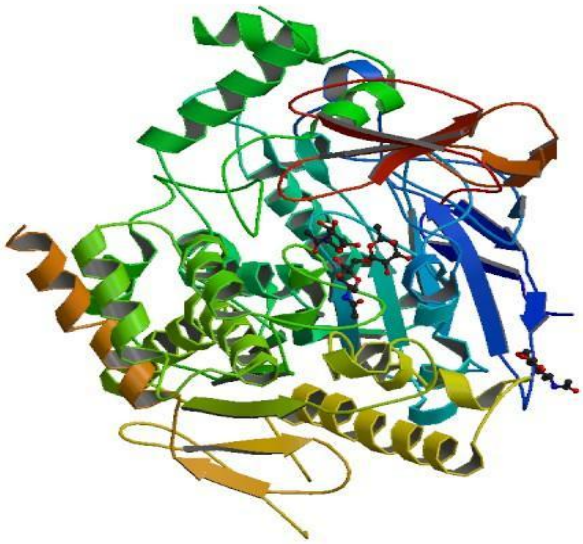
geçmiştir. Asetilkolinin ilk görevi; sinir uçlarından etkilendiği organa ya da sinir ucundan bir diğer sinir ucuna implus taşıma görevi vardır. İkinci bir önemli görevi ise; sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasın da görevli olduğu belirlenmiştir (Wilson vd. 1954). Omurgalılarda ve diğer hayvanlarda birbirine yakın sinir hücreleri arasındaki dar aralıklardan sinirsel iletilerin atlatılarak taşınmasından sorumludur. Bu uyarı sayesinde kas hücrelerinin kasılması başlar.

Sinirsel uyarıların taşınması ve kas hücrelerinin kasılması elektrokimyasal olaydır. Elektrikçe yüklü iyonlar sinir ve kas hücrelerini kaplayan membranlar boyunca ilerler ve sinir uyarılmasıyla uzun sinir lifleri boyunca bir iyon akışı sinapsa ulaşıncaya kadar devam eder. Böylece, sinir hücresi içerisinde depo edilmiş asetilkolinin serbest kalması sağlanır. Asetilkolin sinaps boyunca difüzlenir ve en yakınındaki sinir lif membranına bağlanır. Bu bağlanmayla birlikte hücre membranı boyunca sodyum ve potasyum iyonları yer değiştirir. Böylece bir diğer sinir hücresinde sinirsel uyarım başlamış olur. (Noyan 1996). Sinir uçları tarafından salgılanan asetilkolin, görevini yerine getirdikten sonra asetilkolin enzimi katalizörlüğünde hidroliz yoluyla kolin ve asetata ayrılır.

Asetilkolin seviyesi Alzheimer hastalığı, ileri demans, Parkinson hastalığı ve şizofreni ile ilişkilidir. Asetilkolin kalp atışının yavaşlaması, tükürük salgısının artması, mesane hareketlerinin artması gibi fizyolojik olayların gerçekleşmesine neden olmaktadır.

2.3 Asetilkolinesteraz ve Kolinoksidaz Enzimlerinin Özellikleri

Sistematik adı asetilkolin asetilhidrolaz, Uluslararası Enzim Komisyonu'na göre EC 3.1.1.7 ve asetilkolinesteraz (AChE) olarak bilinen enzim, hidrolazlar sınıfındandır (Orak, N. 2011).



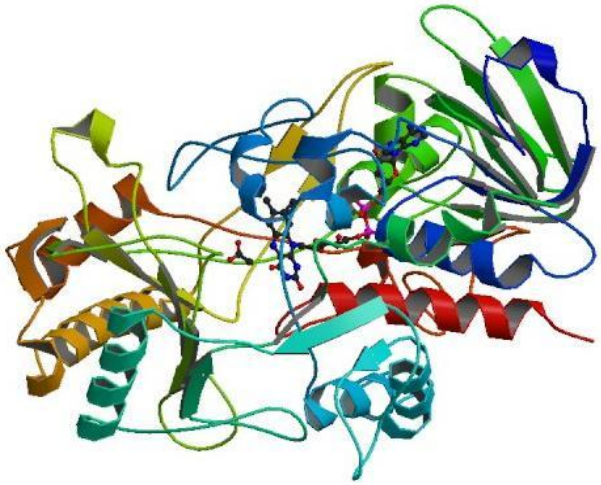
Şekil 2.3 Asetilkolinesteraz enziminin üç boyutlu yapısı (https://tr.wikipedia.org)

AChE, sinaptik boşluklarda bulunan asetilkolini aşağıdaki reaksiyona göre koline ve asetata dönüştürerek hidroliz eder ve yıkılmasına sebep olur.

AChE'ın ortamda bulunması hem asetilkolin sentezi için gereken hücre içi kolinin azalmasına hem de sinaptik aralıktaki asetilkolinin etkisinin uzamasına yol açar (Şahin 2002, Budak Kaya 2012)

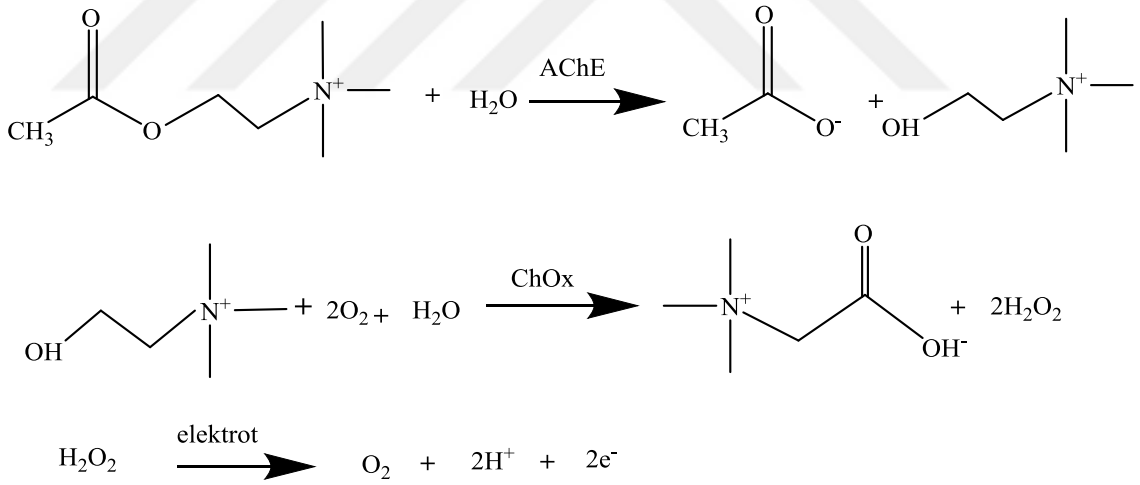
Asetilkolinesteraz, membrana bağlı bir enzimdir. Beyinde, sinir hücrelerinde, kasta, akciğerlerde, dalakta, eritrositlerde, lökositlerde, kemik iliğinde, trombositlerde ve plasentada bulunmaktadır.

Kolin oksidaz (ChOx) enizmi ise Uluslararası Enzim Komisyonu'na göre EC 1.1.3.17 olarak adlandırılır.



Şekil 2.4 Kolin oksidazın üç boyutlu yapısı (https://tr.wikipedia.org)

ChOx kolinin oksidasyonunu katalizler, bu reaksiyon sonucunda betain ve H_2O_2 oluşur. Kofaktör olarak FAD kullanılır ve tepkime, iki yarı tepkime olarak aşağıdaki şekilde gerçekleşir;



Asetilkolinesteraz ve kolin oksidaz enzimleri, yüksek duyarlılık, doğrusal sınır ve düşük tayin limitlerini tespit etmesinden yararlanılarak tayin edilmek istenen analitlerin analizinde kullanılır (Rozwadowski vd. 1997).

2.4 Kaynak Özetleri

Burada, asetilkolin esteraz ve kolin esteraz enzimleriyle farklı modifiye elektrotların hazırlanması ve asetilkolin maddesinin tayini için analitik uygulamalarıyla ilgili SCI kapsamındaki dergilerde çeşitli yıllar içerisinde yayımlanan bazı çalışmalar özetlenmiştir.

Chauhan vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, AChE enzimi demir oksit nanopartikülleri modifiye çok duvarlı karbon nanotüplere kovalent olarak immobilize edilmiş ve çalışma elektrodu olarak indiyum kalay oksit (İTO) kullanılmıştır. Malathion, chlorpyrifos, monocrotophos ve endosulfan pestisislerinin tayini için yüksek duyarlıklı biyosensör geliştirmiştir. Modifiye elektrot atomik kuvvet mikroskobu (AFM), dönüşümlü voltametri (CV), fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve elektrokimyasal empedans spektroskopi (EIS) yöntemleriyle karakterize edilmiştir. Asetilkolin için doğrusal çalışma aralığı 0,1–700 μM olarak elde edilmiş ve duyarlılık 0,402 mA/μM olarak bulunmuştur. Optimum pH 7,0 ve optimum sıcaklık 300 °C olarak belirlenmiştir.

Sinha vd. (2010) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise AChE'ın immobilizasyonu için çinko oksit sol jel modifiye perde baskılı karon elektrotlar kullanılmış ve pestisit paraoxonun tayini gerçekleştirilmiştir. İmmobilize enzim, fosfat tamponunda (pH 7,4) 4 °C'de saklandığında 3 aya kadar enzimatik aktivitesini korumuştur. Paraoxonun tayini dönüşümlü voltametri ve amperometrik yöntemle belirlenmiş ve paraoxon için çalışma aralığı 0,035–1,38 ppm olarak bulunmuş ve diğer AChE orgonafosfat pestitlerin belirlenmesi için de kullanılabilmiştir. Enzimle çinko oksit matriksinin birbirine bağlandığı pH 7,4 olarak belirlenmiştir. 235 mV çalışma potansiyelinde AChE biyosensörü iyi tekrarlanabilirlik ve kararlılık göstermiştir.

Aynacı vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada polipirol ve polivinilsulfonat üzerine immobilize edilmiş asetilkolinesteraz ve kolin oksidaz ile asetilkolinin tayini amperometrik olarak yapılmıştır. Asetilkolinesteraz ve kolin oksidaz enzimleri sığır serum albumin ve glutaraldehitin çapraz bağlanması ile polipirol ve polivinilsulfonat

üzerine immobilize edilmiştir. Asetilkolin tayini 300 mV çalışma potansiyelinde enzimatik olarak oluşan H_2O_2'in yükseltgenmesi ile yapılmıştır. pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmış ve en ideal ölçüm pH 9,0 ve sıcaklık 65 °C'de alınmıştır. $1{,}0\times10^{-8}$–$1{,}0\times10^{-7}$ M ve $1{,}0\times10^{-7}$–$1{,}0\times10^{-6}$ M olmak üzere iki doğrusal çalışma aralığı elde edilmiştir. Biyosensörün alt tayin sınırı $5{,}0\times10^{-9}$ M ve cevap süresi 200 s olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca, depolama kararlılığı ve çalışma kararlılığı da incelenmiştir. Asetilkolin biyosensörünün 4 °C'deki 0,1 M glisin tampon çözeltisinde 35 gün boyunca ilk aktivitesinin % 31'ini koruduğu gözlemlenmiştir.

Shimomura vd. (2009) yaptığı bir başka çalışmada asetilkolin tayini için AChE ve COx immobilize enzimleri temelli bir biyosensör geliştirilmiştir. İki enzim katalizi sonucu üretilen hidrojen peroksitin tayini ardışık enzim reaksiyonlarına dayalıdır. Doğrusal çalışma aralığı 6,0–800 μM ve cevap süresi yaklaşık 3 dakika olarak ölçülmüştür. 80 günlük depolama süresinden sonra bile, serbest enzimlerle karşılaştırıldığında sensörün kararlı olduğu ve ilk yanıtın % 80'nin korunduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar iki enzim de başarı ile immobilize edildiğini ve kararlılıklarını koruduklarını göstermiştir. Organofosfor pestisitlerin tayini asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonu açısından da çalışılmıştır. Pestisisin tayini için yapılan sonuçlarda 1,2 nM'a kadar alt tayin sınırı gözlenmiştir.

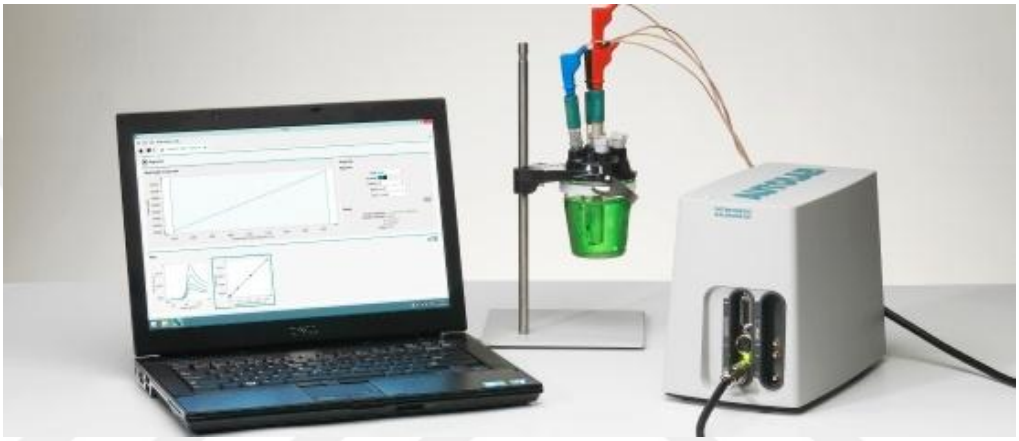
Heli vd. (2009) yaptığı çalışmada ise asetilkolinin elektrokatalitik oksidasyonu m tipi bakır mikroparçacıklar ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot (m-CPE) ve n tipi bakır nanoparçacıklar ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot (n-CPE) ile araştırılmıştır. Elde edilen voltogramlarda, m-CPE kullanıldığında tek anodik oksidasyon piki, n-CPE kullanıldığında ise iki çakışan anodik pik olduğu belirlenmiştir. Reaksiyon kinetiği formülüze edilmiş ve sistemin yük transfer direnci hem teorik hem de deneysel olarak hesaplanmıştır. Asetilkolin için elektrokataliktik yükseltgenme transfer katsayısı, difüzyon katsayısı ve katalitik oran sabiti kronoamperometri, kararlı hal polarizasyon ölçümü ve elektrokimyasal empedans spektroskopisi yöntemleriyle incelenmiştir. Elektrot yüzeyinde kirlenme olmadığı asetilkolinin bakır nanoparçacıklar ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrotta (n-CPE) gözlenmiştir.

Qin vd. (2010) yaptığı çalışmada, kolinin tayini için poli(dialildimetil amonyum klorat) (PDDA), altın nanoparçacıklar (GNp) ve çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNs) ile nanokompozit film hazırlanmış ve bu film üzerine kolin oksidaz immobilize edilerek bir biyosensör geliştirilmiştir. Çok duvarlı karbon nanotüplerle modifiye edilmiş altın nanoparçacıklar klasik kimyasal yollarla sentezlenmiş ve tiyol gruplar ile altın arasındaki spesifik etkileşim sayesinde altın nanoparçacıklar çok duvarlı karbon nanatüplere bağlanmıştır. Kolin oksidaz enzimi MWCNs-GNp matriksine bağlanmış ve ayrıca bağlayıcı materyal olarak kullanılabilen PDDA'ya elektrostatik olarak adsorplanmıştır. Sentezlenen MWCNs-GNp'nin mikroskopik yapısı ve kompozisyonu sırasıyla TEM ve EDX ile karakterize edilmiştir. Kolin tayini 0,35 V'da Ag/AgCl'ye karşı yapılmıştır. Elde edilen biyosensör için geniş bir çalışma aralığı (0,01-0,5 mM), yüksek duyarlılık (12,97 μA/mM) ve oldukça düşük gözlenebilme sınırı (0,3 μM) elde edilmiştir. Ayrıca hazırlanan biyosensör iyi tekrar üretilebilirlik ve uzun süreli kararlılık sunmuştur.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar, Hücre ve Elektrotlar

Amperometrik ölçümler bilgisayar bağlantılı olarak kullanılan şekil 3.1'de gösterilen AUTOLAB PGSTAT 204 elektrokimyasal analiz cihazı ve BASi marka elektrokimyasal hücre standı kullanılarak yapıldı.



Şekil 3.1 AUTOLAB PGSTAT204 elektrokimyasal analiz cihazı ve BASi C3 hücre standı

Çalışmada kullanılan çözeltilerinin pH'ları ORION cihazı ile ayarlandı. Cihazı kalibresi pH'sı 4,13 olan potasyum hidrojen ftalat ve pH'sı 8,20 olan sodyum bikarbonat çözeltileri ile yapıldı.

Amperometrik çalışmalarda çalışma elektrodu olarak BASi firmasından temin edilen camsı karbon elektrot (GCE) gövdesi (MW 2070), karşıt elektrot olarak platin tel elektrot (MW 1034) ve referans elektrot olarak da Ag/AgCl, 3M KCl (MF 2052) kullanıldı.

Isıtma, soğutma ve sabit sıcaklık yapılması gereken çalışmalarda Grant LTD GGG sistemli termostat, dolaşımlı su banyosu kullanıldı.

Çözeltilerin hazırlanması sırasında kullanılan saf su için ELGA Purelab Optimum-Q marka ultra saf su cihazı ile elde edildi.

Hücre ortamına çözelti ilaveleri için ve çözeltilerin hazırlanmasında Ependorf Research plus ±0.05 µL hassasiyete sahip olan mikropipetler kullanıldı.

3.2 Kullanılan Kimyasallar

3.2.1 Oksijen gazı

Asetilkolin tayini için geliştirilen amperometrik biyosensörlerde enzimatik reaksiyonlar oksijenli ortamda gerçekleştiğinden, enzim elektrotla yapılan çalışmalarda yüksek saflıktaki oksijen gazı Oksan firmasından temin edilerek kullanıldı.

3.2.2 Kullanılan diğer kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan diğer kimyasal maddelerin adları ve özellikleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddelerin adları, saflık dereceleri ve temin edilen firmalar

Kimyasal Madde	**Saflık Dereceleri**	**Temin Edildiği Firma**
Asetilkolin klorür	% 98	Acros Organics
Asetilkolinesteraz	-	Sigma
Kolinoksidaz	-	Sigma
Demir oksit nanopartikül (Fe_3O_4NPs)	50 – 100 nm	Sigma
Askorbik asit	-	-
Ürik asit	-	-
Glukoz	-	-
Karboksilik asit fonksiyonlaştırılmış çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNTs)	-	Dropsens
Kitosan (CS)	Ma 100.000 – 300.000	Across Organics
N-hidroksisüksinimid (NHS)	-	Sigma
1-etil-3-(-3-dimetilaminopropil)karboimid hidroklorid (EDC)	-	Sigma
Nafyon 117	% 99	Sigma
Sodyum monohidrojen fosfat	-	Sigma
Sodyum dihidrojen fosfat	-	Sigma-Aldrich
Hidrojen peroksit	-	Sigma-Aldrich

3.3 Kullanılan Çözeltiler

3.3.1 Fosfat tamponu

Monosodyum dihidrojenfosfat ve disodyum monohidrojenfosfattan belirli miktarlarda tartılarak derişimi 0,05 M olacak şekilde pH 7,5 fosfat tampon çözeltisi hazırlandı. Farklı pH ve derişimlerdeki tampon çözeltileri hazırlamak için hesaplamalar yapılarak aynı yol izlendi. Tampon çözelti +4 °C'de saklandı.

3.3.2 Hidrojen peroksit çözeltisi

Yoğunluğu 1,13 kg/L olan % 35'lik hidrojen peroksitten uygun miktarda alınarak derişimi 1.0×10^{-2} M olacak şekilde 50,0 ml stok çözeltiler her gün taze olarak hazırlandı.

3.3.3 Kitosan çözeltisi

Belirli miktarda kitosan maddesi alındı ve % 1,0'lık asetik asitle çözüldü.

3.3.4 EDC-NHS çözeltisi

50 mM EDC ve 200 mM NHS çözeltileri 0,5 M pH 7,5 fosfat tamponunda hazırlandı.

3.3.5 Enzim çözeltileri

Kolinoksidaz enzimi stok çözeltisi 100,5 U/ml olacak şekilde yeterli miktarda katısından alınarak 0,05 M pH 7,5 fosfat tamponunda çözüldü ve stok kolinoksidaz çözeltisi hazırlandı. Asetilkolinesteraz enzimi de tok çözeltisi 50 U/ml olacak şekilde yeterli miktarda katısından alınarak 0,05 M pH 7,5 fosfat tamponunda çözüldü ve stok asetilkolinesteraz çözeltisi hazırlandı. Stok enzim çözeltileri kullanılmadığı zamanlarda –20 $^{\circ C}$'de saklandı.

3.3.6 Asetilkolin çözeltisi

Katı asetilkolin klorürden belirli miktarda tartılarak derişimi 0,05 M olan pH 7,5 fosfat tamponunda 0,1 M stok asetilkolin klorür çözeltisi hazırlandı. Farklı derişimlerdeki asetilkolin klorür çözeltileri, belirli hacimlerde stok çözeltiden alınarak fosfat tamponuyla seyreltilerek taze hazırlandı.

3.3.7 Nafyon çözeltisi

Belirli miktarda alınan nafion etanol-su (% 50'lik) karışımında çözüldü. Saklanan kabın ağzı, çözeltinin uçucu olması sebebiyle parafilmle kapatılıp, buzdolabında saklandı.

3.3.8 Girişim yapan çözeltilerin türleri

Kan serumunda bulunabilecek elektroaktif bazı türlerin enzim elektrot cevabına etkisinin araştırılmasında kullanılan L-askorbik asit, parasetamol (asetaminofen), ürik asit, L-sistein, D-glukoz çözeltiler derişimleri $1x10^{-2}$ M olacak şekilde hazırlandı.

3.4 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun hazırlanması

Elektrot yüzeyinin temizlenmesi: Kaplama işleminden önce camsı karbon elektrodunun yüzeyi ilk olarak 0,3 μM ve 0,05 μM alümina çözeltisi (Al_2O_3) ile temizlendi. Daha sonra sırasıyla etanol ve saf su çözeltilerinde 5 dakika boyunca sonike edildi. Yüzeyindeki suyun uzaklaştırılması için kurutuldu. Her çalışma işleminden önce yüzey bu şekilde temizlendi.

2 mg kitosan, 4 ml % 0,1'lik asetik asitte çözülerek % 0,05'lik kitosan çözeltisi hazırlandı. 1 mg Fe_3O_4 ve 3 mg MWCNTs % 0,05'lik kitosan çözeltisine ilave edildi ve homojen-siyah bir süspansiyon elde edilene kadar 3 saat bounca ultrasonik banyoda karıştırıldı.

Yukarıda belirtilen CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs karışımından GCE yüzeyine 10 µL damlatıldı ve 50 $^{\circ}C$'de etüvde kurutuldu. Hazırlanan modifiye elektrot GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs olarak adlandırıldı. Enzim elektrodunun hazırlanmasında çapraz bağlama yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, hazırlanan bu modifiye elektrot yüzeyine EDC-NHS çözeltisinden 10 µl ve oda sıcaklığında kurutuldu. Hazırlanan GCE/CS-MWCNTs elektrodunun yüzeyi saf su ile yıkandıktan sonra belirli miktarlarda asetilkolinesteraz ve kolin oksidaz enzimleri elektrodun yüzeyine ilave edildi ve kuruyana kadar açık havada bekletildi. Bağlanmayan enzimlerin yüzeyden uzaklaştırılması amacıyla enzim elektrot fosfat tamponuyla yıkandı. Hazırlanan enzim elektrot GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx olarak adlandırıldı. Kullanılmadığı zamanlarda +4 °C'de saklandı.

3.5 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx Elektrodunun Karakterizasyonu

Yalın GCE, GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs ve GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrotlarının karakterizasyonları 5 mM ferri-ferrosiyanür ($Fe(CN)_6^{3-/4-}$) (1:1) içeren 0,1 M KCl çözeltisinde yapıldı. CV ve EIS ölçümleriyle elektrotlar için pik-pik ayrımı değerleri (ΔE_p) ve R_{et} değerleri hesaplanarak sonuçlar değerlendirildi. Hazırlanan bu elektrotların yüzey karakterizasyonları Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelendi. Elektrotların yüzeylerinin incelenmesi ve yorumlanabilmesi için kullanılan X-ışınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) ile ölçümler alındı.

3.6 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx Elektrodunun Asetilkoline Duyarlılığının Belirlenmesi

Bölüm 3.4.1'de belirtildiği şekilde temizlenen ve hazırlanan çalışma elektrodunun asetilkoline duyarlılığını belirlemek için üç elektrot sistemli elektrokimyasal hücre kullanıldı. Elektrodun asetilkoline duyarlılığının belirlenebilmesi için –0,2 V ile +0,8 V arasında 50 mV/s tarama hızında 0,05 M fosfat tamponunda 1,0 mM asetilkolin içeren ortamda dönüşümlü voltamogramları alındı.

3.7 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx Elektrodunun Çalışma Potansiyelinin Belirlenmesi

Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı şekilde temizlenen ve hazırlanan çalışma elektrodunun çalışma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla çalışma potansiyeli +0,2 V ve +0,6 V arasında değiştirilerek ölçümler alındı. Elektrodun çalışma potansiyelinin belirlenebilmesi için +0,2 V sabit potansiyel değerinde elektrot dengeye getirildi ve akım kaydedildi. Denge akımına ulaşan elektrot ile hücre içi 0,1 mM arasında hidrojen peroksit derişimindeki akım değişimleri incelendi. Her ilave sonunda hücre içerisi 4 dk karıştırılıp, hem de O_2 (g) geçirildi, karıştırmanın bitiminden itibaren 40 s'daki akımı ölçüldü. Okunan akımlar ile denge akımı arasındaki farklar alınarak her bir derişim için akım farkı (Δi) değerleri hesaplanıp grafiğe geçirildi.

3.8 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx Elektrodunun Çalışma Koşulları

Enzim elektrodunun en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi için pH'nın etkisi, sıcaklığın etkisi, substrat derişiminin etkisi, enzim elektrodunun tekrar kullanılabilirliği ve raf ömrünün belirlenmesi çalışmaları yapıldı.

3.8.1 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun cevabına enzim miktarlarının etkisi

Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı şekilde temizlenen ve hazırlanan çalışma elektrodunun enzim miktarlarının belirlenmesi amacıyla her iki enzimin de miktarları 0,5 U, 1,0 U, 1,5 U, 2,0 U, 2,5 U ve 3,0 U şeklinde değiştirilerek +0,4 V'da ölçümler alındı. Enzim miktarlarındaki değişikliğin, cevap akımına etkisi değerlendirildi.

3.8.2 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun cevabına pH'nin etkisi

Bölüm 3.4.1'de belirtildiği şekilde temizlenen ve hazırlanan çalışma elektrodunun amperometrik cevap akımı üzerine pH'nın etkisi incelenmesi için 0,05 M pH'sı 5,0,

5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 ve 8,5 fosfat tamponları hazırlandı. Bir hücre içerisine pH değeri belli olan tampon çözeltisinden ilave edildi. Enzim elektrot, bu çözelti içerisinde +0,4 V'da dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Sonrasında asetilkolin klorür çözeltisinden ilave edildi. Çözelti, 4 dk karıştırıldı ve aynı zamanda O_2 (g) geçirildi ve 40 s sonra okunan akım kaydedildi. Okunan akım ile denge akımı arasındaki fark alınarak pH değeri için Δi değeri hesaplandı. Aynı işlemler, tüm tamponlar için tekrarlandı. Her bir pH'ya karşı Δi değeri hesaplandı ve grafiğe geçirilerek enzim elektrodun en iyi aktivite gösterdiği pH değeri belirlendi.

3.8.3 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun cevabına sıcaklığın etkisi

Kararlı hale gelen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerinde sıcaklığın etkisini incelemek için on farklı sıcaklık değerinde biyosensörün amperometrik cevabı ölçüldü. Hücre içerisine 0,05 M pH'sı 7,5 olan fosfat tampon çözeltisi eklendi ve enzim elektrot hücreye daldırıldı. Termostatlı dolaşımlı su banyosu kullanılarak hücre içindeki çözeltinin sıcaklığı 20 °C olacak şekilde ayarlandı. +0,4 V sabit potansiyelde dengeye getirildi ve denge akımı kaydedildi. Daha sonra hüce içi derişimi 0,01 M olacak şekilde asetilkolin klorür çözeltisi ilave edildi. Çözelti 4 dk karıştırıldı ve aynı zamanda O_2 (g) geçirilerek ve 40 s sonunda akım değerleri okunup denge akımı ile farkı alınarak 20 °C için bir Δi değeri hesaplandı. Aynı işlemler sırasıyla 25 °C, 30 °C, 37,5 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C ve 75 °C sıcaklıkları için tekrarlanarak her bir sıcaklık için Δi değeri hesaplandı. Sıcaklığa karşı Δi grafiği çizilerek enzim elektrodun en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değeri belirlendi.

3.8.4 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun cevabına substrat miktarının etkisi

Kararlı hale gelen biyosensörün amperometrik cevap akımı üzerinde substrat miktarının incelenmesi için 0,1 mM, 1 mM ve 10 mM asetilkolin standart çözeltileri hazırlandı ve geliştirilen biyosensörün analite cevabıyla birlikte, artan asetilkolin

derişiminden yararlanılarak kalibrasyon grafiği çizildi ve bu grafik yardımıyla doğrusal çalışma aralığı tespit edildi.

3.8.5 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun tekrarlanabilirliğinin ve tekrar üretilebilirliğinin belirlenmesi

Bölüm 3.4.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan ve her ölçümde +0,4 V sabit potansiyelde dengeye getirilen enzim elektrodun optimum şartlarda tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için $1{,}0x10^{-2}$ M derişiminde asetilkolin klorür çözeltileri eklenerek arka arkaya 10 kez ölçüm alındı. Her ölçüm için denge akımı ile okunan akım arasındaki farklar alınarak Δi değerleri belirlendi. Bu değerlerin % bağıl standart sapması (% BSS) hesaplandı. Ayrıca, enzim elektrodunun tekrar üretebilirliğini belirlemek amacıyla birbirinden bağımsız olarak hazırlanmış 10 enzim elektrodun yukarıda belirtildiği gibi Δi değerleri hesaplanarak % BSS sonuçları elde edildi.

3.8.6 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun kararlılığının belirlenmesi

Enzim elektordunun kararlılığının belirlenmesi amacıyla dönüşümlü voltametri kullanılarak 0,05 M pH'sı 7,5 olan fosfat tamponunda +0,2 V ile +0,8 V arasında 50 mV/s tarama hızında ardışık döngüler alındı. Enzim elektrodun cevabında değişikliklik olup olmadığı incelendi.

3.8.7 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun raf ömrünün belirlenmesi

Bölüm 3.4.1'de anlatılan şekilde hazırlanan enzim elektrodunun raf ömrünün belirlenebilmesi için 30 gün boyunca belirli günlerde +0,4 V sabit potansiyelde dengeye getirildi. Ardından elektrodun bulunduğu hücreye 1,0 mM derişiminde asetilkolin klorür çözeltisi eklenerek çözelti 4 dk karıştırıldı ve aynı zamanda O_2 (g) geçirilerek 40 s sonunda akım değerleri okunup karıştırıldı ölçüm alındı. Ölçüm işlemi tamamlanan enzim elektrot, bir sonraki ölçüm yapılıncaya kadar +4 $^{\circ}C$'de saklandı. Bu

şekilde enzim elektrodun ilk gün ve son gün verdiği cevap karşılaştırıldı. Elde edilen amperometrik cevap akımları, ölçüm yapılan gün sayısına karşı grafiğe geçirildi.

3.9 Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler

Hazırlanan biyosensörün biyolojik ortamında bulunabilecek maddelerin enzim elektroduna yapabileceği etkiler üzerine inceleme yapıldı. Bölüm 3.4'de anlatılan şekilde hazırlanan enzim elektrodu, içinde +0,4 V sabit potansiyelde dengeye getirilerek denge akımı kaydedildi. Daha sonra hücre içi derişimi 0,1 mM olacak şekilde asetilkolin klorür ilavesi yapıldı. Çözelti 4 dk karıştırıldı ve aynı zamanda O_2 (g) geçirilerek sonrasındaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak asetilkolin klorürden meydana gelen cevap akımı kaydedildi. Aynı çözelti üzerine hücre içi derişimi 0,1 mM olacak şekilde askorbik asit çözeltisi ilave edildi. Çözelti 4 dk karıştırıldı ve aynı zamanda O_2 (g) geçirilerek 40 s sonunda akım değerleri okunup karıştırıldı ölçüm alındı. Ölçüm sonundaki akım okundu ve denge akımı ile arasındaki fark alınarak asetilkolin klorür ve askorbik asitten meydana gelen toplam okunan akım kaydedildi. Bu okunan akımdan asetilkolinden meydana gelen akım çıkarılarak askorbik asitten meydana gelen cevap akımı hesaplandı. Hesaplanan bu akım, toplam cevap akımına oranlanarak askorbik asitin yüzde girişimi bulundu. Aynı işlemler 0,1 mM parasetamol, L-sistein, ürik asit, kreatinin, üre ve D-glukoz içinde tekrarlanarak yüzde girişimleri hesaplandı.

3.10 Serumda Asetilkolin Tayini

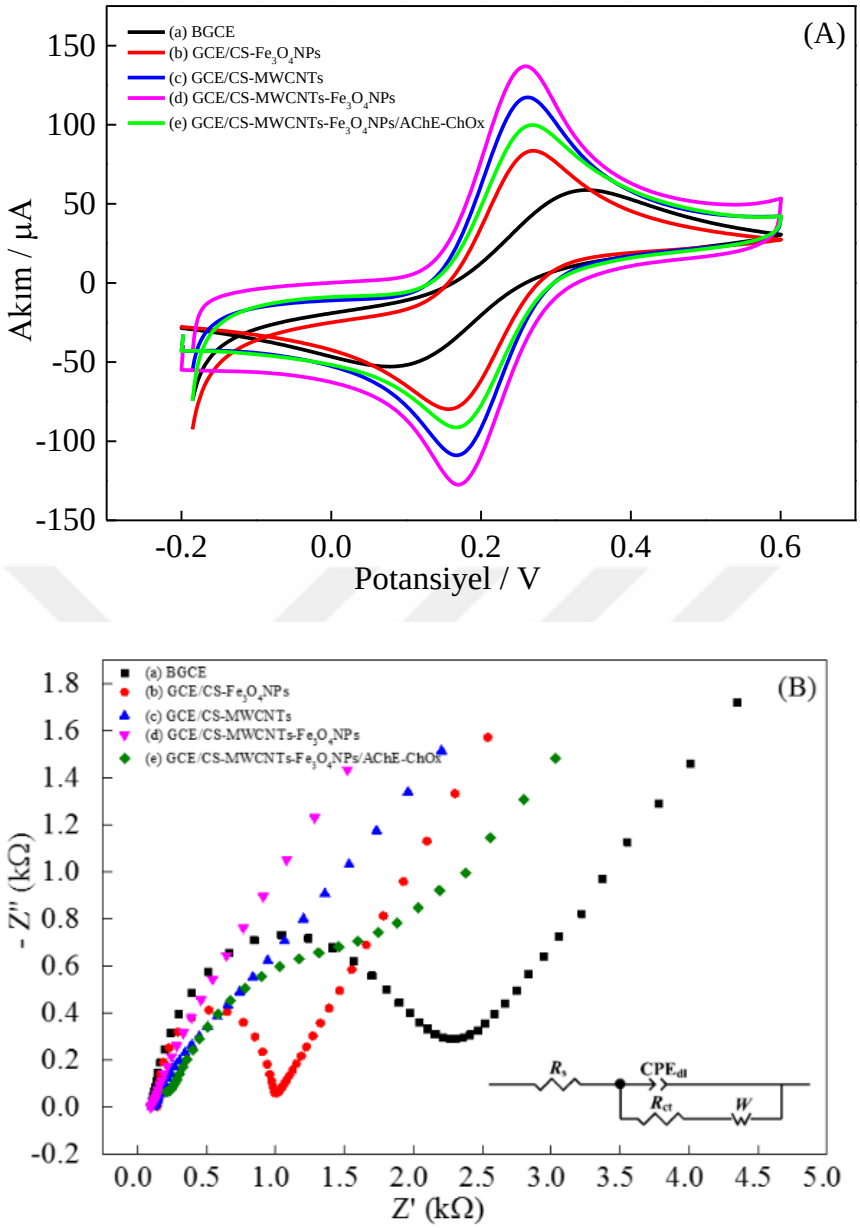
Bölüm 3.4.1'de anlatılan şekilde hazırlanan enzim elektrodunun serumda asetilkolin tayini yapılabilmesi için standart ekleme yöntemiyle, her bir numune için 3 ölçüm alınarak % geri kazanım değerleri hesaplandı.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Hazırlanan Elektrotların Karakterizasyonu

GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektrodun elektrokimyasal karakterizasyonunu yapmak ve modifiye edilmemiş elektrotla karşılaştırmak için dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi çalışmaları yapılmıştır.

MWCNTs ve Fe_3O_4NPs elektrot performansı üzerine olan etkilerini açıklayabilmek için dönüşümlü voltametri çalışması yapılmıştır. Şekil 4.1 (A)'da yalın ve modifiye elektrodun $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözeltisi içerisindeki dönüşümlü voltamogamları incelenmiştir. Yalın elektrotta açıkça görülen indirgenme-yükseltgenme pikleri vardır. GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs modifiye elektrodu, yalın elektrot ile karşılaştırıldığında anodik ve katodik pik akımlarının daha yüksek olduğu ve pik-pik ayırımı (ΔE_p) değerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun MWCNTs-Fe_3O_4NPs'ün elektrodun yüzey alanını genişletmesi, yüksek katalitik aktivite sağlaması ve iletkenliği arttırmasından kaynaklanabileceği söylenebilir (Chen vd. 2015). GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunda ise redoks piklerinin azaldığı görülmüştür. Bu durumun immobilize enzimlerin elektrot yüzeyine kütle ve elektron transferini için iletken olmayan bir bariyer oluşturmasından kaynaklandığı söylenebilir (Bolat vd. 2017). Buradan her iki enzimin de yüzeye başarılı bir şekilde immobilize edildiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca BGCE, GCE/CS-Fe_3O_4NPs, GCE/CS-MWCNTs, GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs ve GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrotlarının 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki elektrokimyasal karakteristiklerinin karşılaştırılması çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 (A) BGCE a. GCE/CS-Fe_3O_4NPs, b. GCE/CS-MWCNTs, c, GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs, d. ve GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx e. elektrotlarının 0,1 M KCl içeren 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözeltisinde, 50 mV/s tarama hızında elde edilen dönüşümlü voltamogramları, (B) 0,1 M KCl içeren 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ çözeltisinde elde edilen Nyquist eğrileri

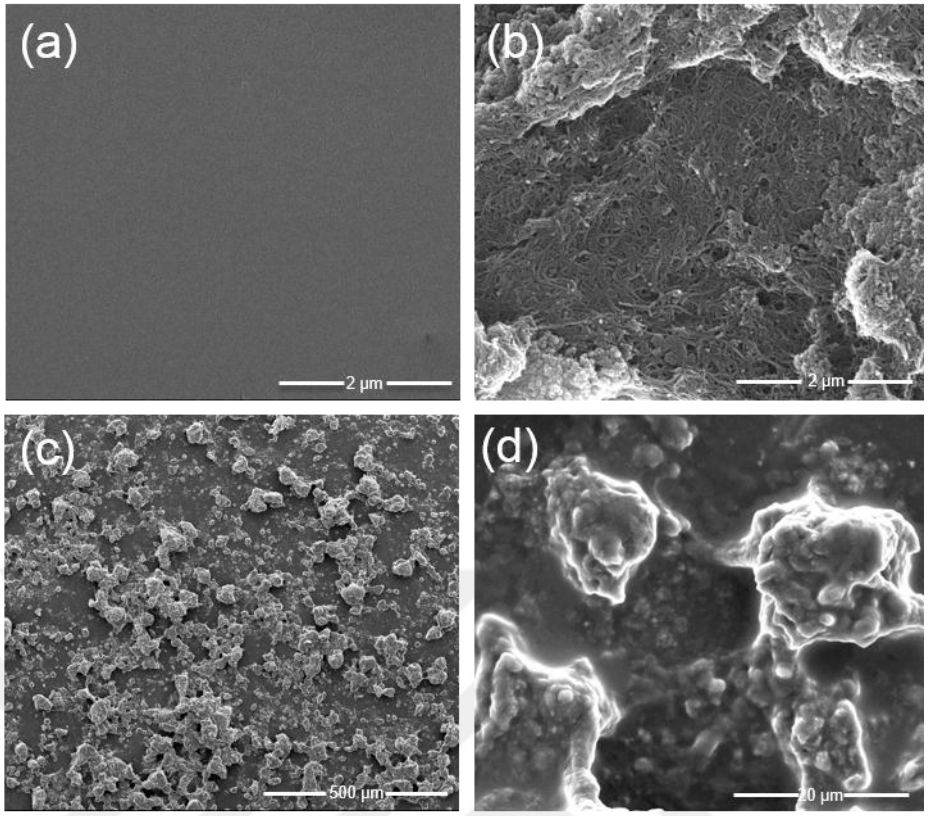
Çizelge 4.1 BGCE, GCE/CS-Fe_3O_4NPs, GCE/CS-MWCNTs, GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs ve GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrotlarının 5,0 mM $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ içeren 0,1 M KCl çözeltisindeki elektrokimyasal karakteristiklerinin karşılaştırılması (tarama hızı 50 mVs^{-1})

Elektrot	E_{pa} / V	E_{pc} / V	ΔE_p / V	I_{pa} / μA	I_{pc} / μA
BGCE	0,327	0,098	0,229	50,48	–46,20
GCE/CS-Fe_3O_4NPs	0,266	0,161	0,105	85.51	–80,92
GCE/CS-MWCNTs	0,259	0,168	0,091	108,60	–102,95
GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs	0,256	0,171	0,085	118,79	–113,22
GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx	0,264	0,169	0,095	90,05	–84,41

GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektrodun elektron transferinin özellikleri EIS yöntemiyle de incelendi ve elde edilen verilerle ortaya çıkan Nyquist eğrileri şekil 4.1 (B)'de verildi. Nyquist eğrisi olarak adlandırılan EIS spektrumunda yüksek frekanslarda yarım daire ve düşük frekanslarda doğrusal bir kısmı içerir. Yarım dairenin çapı yük transfer direncini (R_{et}) ifade etmektedir (Aydoğdu vd. 2014). BGCE için R_{et} değeri 2085 Ω olarak hesaplanırken, GCE/CS-Fe_3O_4NPs (b) ve GCE/CS-MWCNT (c) ve GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs (d) elektrotları için R_{et} değerleri sırasıyla 727, 125 ve 80 Ω olarak bulunmuştur. AChE ve ChOx enzimleri GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektrodunun yüzeyine immobilize edildiğinde, R_{et} değerinin makromoleküllerin elektron transferindeki inhibisyon etkisi nedeniyle arttığı gözlenmiştir (172 Ω) (Zha, vd. 2013)

CV ve EIS sonuçları, CS-MWCNTs-Fe_3O_4 kompozitinin, modifiye edilmiş elektrodun iletkenliğini geliştirdiğini ve elektrot/çözelti arayüzünde elektron transfer reaksiyonunu hızlandırdığını göstermektedir.

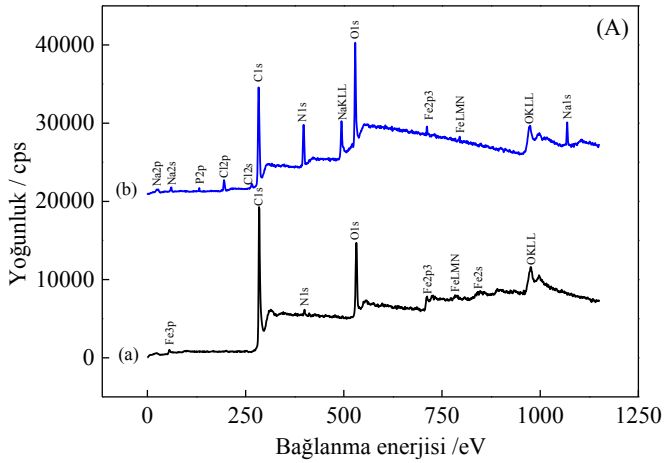
Biyosensörün geliştirilmesi sırasında, her bir aşama SEM karakterizasyonuyla ile görüntülenerek yüzeylerin morfolojik karşılaştırılmaları yapılmıştır. Elde edilen verileri şekil 4.2'de gösterildi.

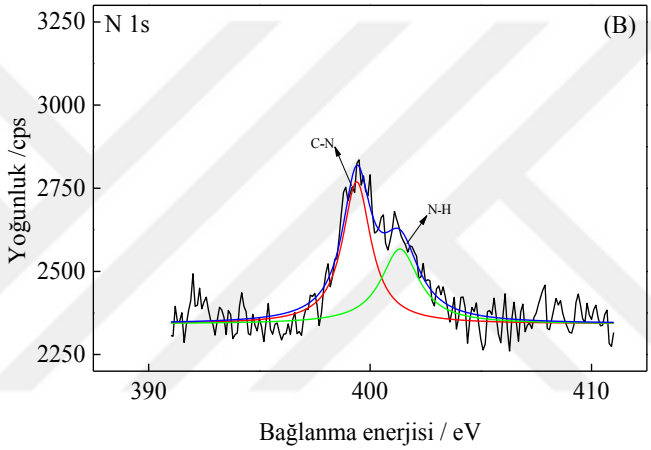


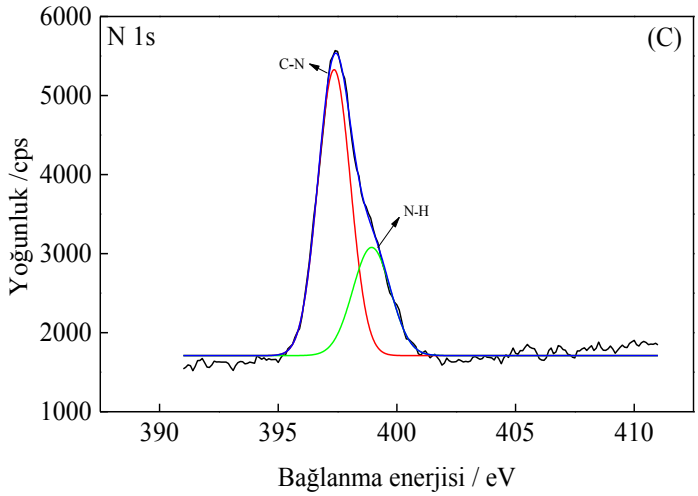
Şekil 4.2.a. Yalın GCE, b. GCE/CS-MWCNTs-Fe3O4NPs, c.d. GCE/CS-MWCNTs-Fe3O4NPs/AChE-ChOx (c,d) elektrotlarının SEM görüntüleri

Şekil 4.2.a incelendiğinde yalın elektrodun pürüzsüz bir yapıda olduğu görülmektedir. MWCNTs-Fe_3O_4NPs ise elektron yüzeyine homojen bir şekilde dağıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.2.b). AChE-ChOx enzimlerinin GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektrodu yüzeyine immobilizasyonundan sonra yüzey morfolojisinin tamamen değiştiği ve enzimlerin yüzeyde ikinci bir tabaka olarak kaplandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2.c.d).

AChE ve ChOx enzimlerinin GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektrodu yüzeye immobilize olup olmadığını belirlemek amacıyla X-ışını fotoelektron spektroskopisi yöntemi kullanıldı. Şekil 4.3.a.'da GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs ve GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx (Şekil 4.3.b) elektrotlarına ait genel tarama XPS spektrumları görülmektedir.







Şekil 4.3.a. GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs, b. GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrotlarına ait genel tarama XPS spektrumları. b. GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektroduna, c. GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektroduna ait kısmi tarama N1s spektrumu

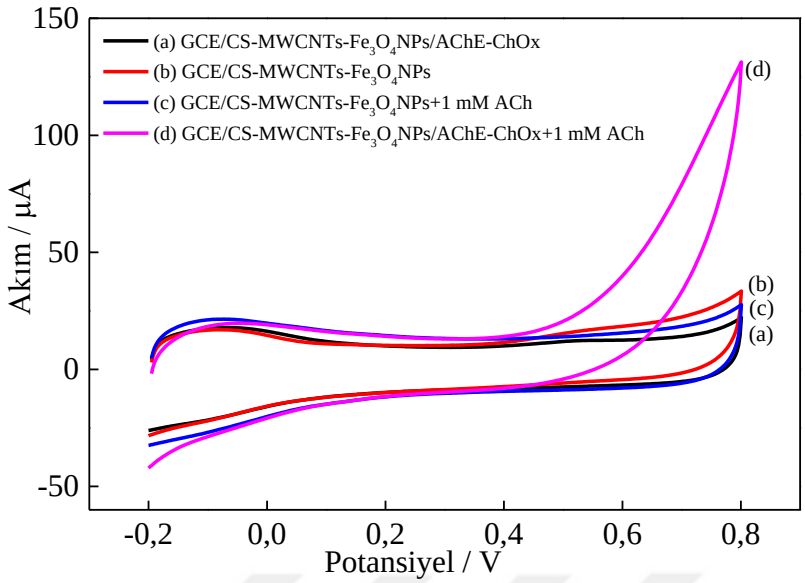
Şekil 4.3 a.b. incelendiğinde GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektroduna ait XPS spektrumunda C1s (285 eV), N1s (400 eV), O1s (532 eV), Fe2s (847 eV), Fe3p (56.06 eV), Fe2p3 (712 eV) ve FeLMN (787 eV) piklerinin olduğunu gözlenmiştir.

Enzimlerin immobilizasyonundan sonra, GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektroduna ait XPS spektrumunda yeni Na2p, Na2s, P2p Cl2p, Cl2s, NaKLL, ve Na1s sinyalleri gözlendi (Şekil 4.3 a.b.). Na, Cl ve P piklerinin ortaya çıkmasının nedeni, enzim çözeltilerinin fosfat tamponu içerisinde hazırlanmasıdır.

GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs için elde edilen N1s kısmi tarama spektrumunda C–N ve N–H bağlanmalarına karşılık gelen pikler sırasıyla 399,4 eV ve 401,3 eV'da gözlenmiştir (Şekil 4.3 b.). Şekil 4.3 c.'de ise enzimlerin immobilizasyonundan sonra 399,4 eV'daki C–N pikinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Bu durum enzimlerin GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs yüzeyine kovalent bağlama yoluyla enzimlerin immobilize olduğunu göstermektedir (Bolat vd. 2017).

4.2 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun asetilkoline duyarlılığının belirlenmesi

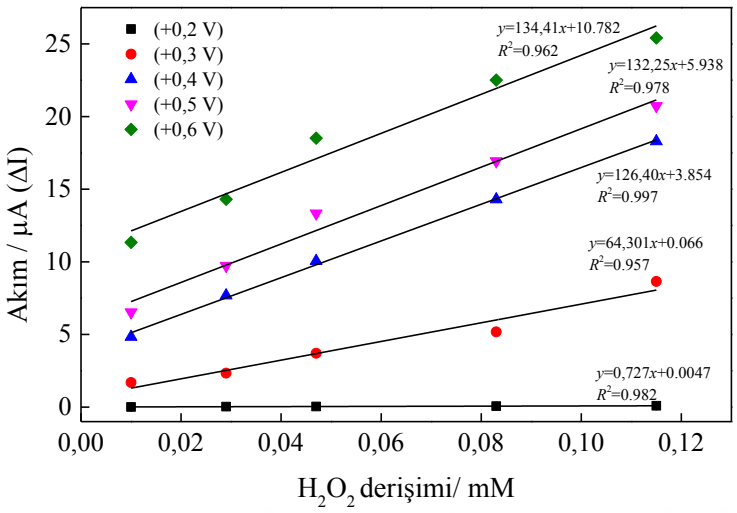
Asetilkolin, asetilkolinesteraz enzimi tarafından koline dönüşür. Oluşan kolin ise kolin oksidaz enzimi ile betaine dönüşerek hidrojen peroksit açığa çıkarır. Bu çalışmada hazırlanan enzim biyosensörün çalışma prensibi de yukarıda anlatılan tepkimeyle açığa çıkan H_2O_2'nin elektrot yüzeyinde yükseltgenmesine dayanmaktadır. Bu nedenle Bölüm 3.4.1'de anlatılan şekilde hazırlanan GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs ve GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrotlarının voltametrik cevapları 1,0 mM asetilkolin içeren 0,05 M fosfat tamponunda incelendi. Şekil 4.4'de görülebileceği gibi tampon çözeltiye asetilkolin eklenmesiyle GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektrodunda herhangi bir yükseltgenme sinyali görülmezken, enzim modifiye elektrotta +0,4 V civarında başlayan bir yükseltgenme sinyali elde edildi. Elde edilen bu sinyalin enzimatik olarak üretilen H_2O_2'in yükseltgenmesinden kaynaklandığı söylenebilir. Buradan hazırlanan GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodun asetilkoline karşı duyarlı olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 4.4 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs ve GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs-ACh-ChOx elektrotlarının 1,0 mM asetilkolin yokluğunda ve varlığında elde edilen dönüşümlü voltamogramları (0,05 M fosfat tamponu, pH 7,5, tarama hızı: 50 mV/s)

4.3 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektrodunun çalışma potansiyelinin belirlenmesi

Bölüm 3.4.1'de anlatılan şekilde hazırlanan GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektrodunun farklı çalışma potansiyellerinde hidrojen perokside duyarlılığını belirlemek amacıyla +0,20 V; +0,30 V; +0,40 V; +0,50 V ve +0,60 V sabit potansiyellerde elektrotlar dengeye getirildi ve elde edilen veriler sonucunda hidrojen peroksit derişimine karşı akım farkları grafiğe geçirildi. Grafik incelendiğinde çalışma potansiyeli +0,20 V'dan +0,60 V'a doğru arttıkça akım değerlerinin arttığı gözlendi. Fakat biyolojik sıvılarda bulunan dopamin, askorbik asit ve ürik asit gibi maddeler yüksek çalışma potansiyellerinde kolaylıkla yükseltgenip girişim etkisi yapabilir (Y.Zhang vd. 2007). Bu nedenle çalışmada doğrusallığın yüksek olduğu ve girişim etkilerini en az olabileceği +0,4 V çalışma potansiyeli olarak seçildi.

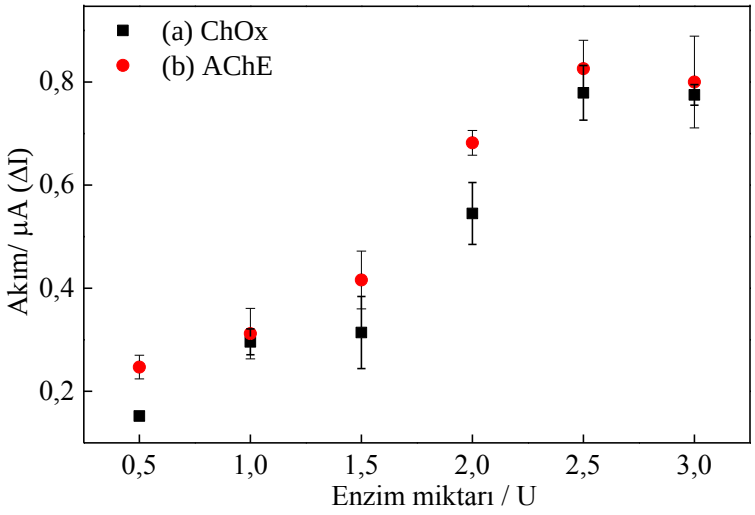


Şekil 4.5 Çalışma potansiyelinin GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs elektrodunun amperometrik cevabına etkisi (0,05 M PBS, pH 7,5)

4.4 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodunun çalışma koşulları

4.4.1 AChE ve ChOx miktarının etkisi

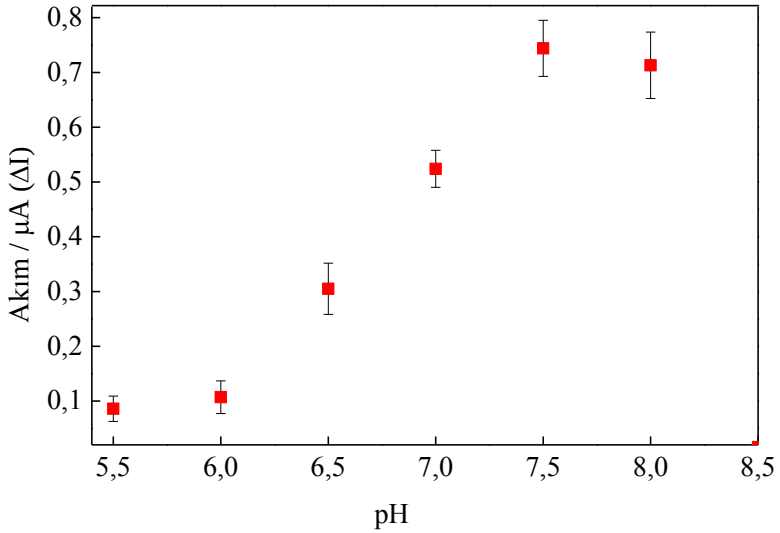
Hazırlanan GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodu cevabına enzim miktarının etkisi 3.8.1'de anlatıldığı gibi incelendi. Buna göre 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 ünite AChE ve ChOx enzimleri içeren elektrotların 0,1 M pH 7,5 fosfat tamponunda +0,4 V'da asetilkoline karşı cevapları incelendi. Elde edilen duyarlılık değerleri enzim miktarına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.5). Öncelikle 2,5 U AChE miktarı sabit tutularak ChOx miktarı optimize edildi. Grafik incelendiğinde enzim miktarının 0,5 U'den 2,5 U'ye artması ile elektrodun duyarlılığının arttığı ve 2,5 U'den sonra ise sabit kaldığı görüldü. Ardından 2,5 U ChOx miktarı sabit tutularak AChE miktarı optimize edildi ve AChE miktarı 0,5 U'den 2,5 U'ye kadar arttıkça elektrodun cevabının arttığı ve 2,5 U'den sonra ise değişmediği belirlendi. Enzim miktarının artmasıyla duyarlılıktaki bu artış, enzimin aktif merkeziyle reaksiyona giren substrat miktarı dolayısıyla oluşan ürün miktarının artması şeklinde yorumlanabilir. AChE ve ChOx için 2,5 U en uygun enzim miktarı olarak seçildi. Enzimler için seçilen bu oran (1:1) literatürdeki çalışmalarla da uyumludur (Şen vd. 2004, Aynacı vd. 2014).



Şekil 4.6 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodun cevabına a. ChOx, b. AChE miktarının etkisi (1,0 µM asetilkolin, +0.4 V, 0,1 M fosfat tamponu, pH 7,5, n = 3)

4.4.2 pH'nin etkisi

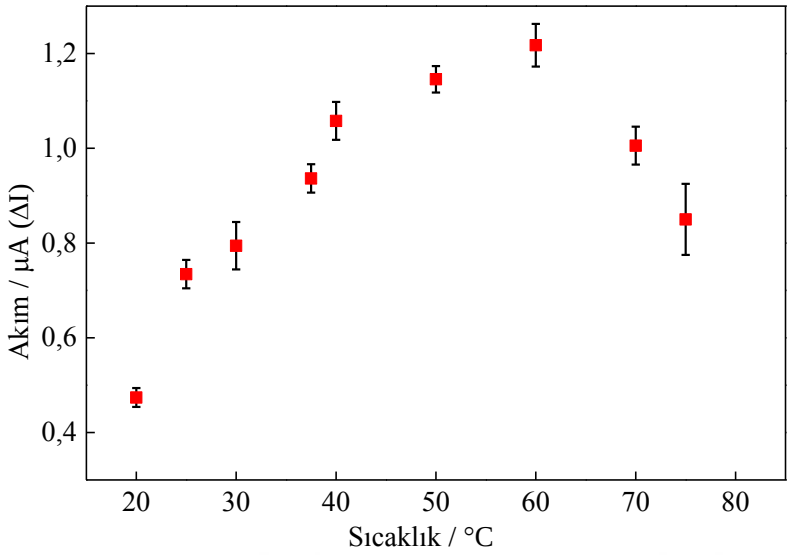
Enzimlerin aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri pH değeridir. Her enzim için optimum pH değeri bulunmaktadır. Asetilkolin için 5,5 – 8,0 pH aralığında elde edilen akım farklarına karşı pH değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.6 incelendiğinde, pH değeri arttıkça cevap akımlarının pH 7,5'e kadar arttığı, bu değerden sonra ise azaldığı görülmektedir. Bu nedenle, optimum pH değeri 7,5 (fosfat tamponu) olarak seçilmiştir. Literatürde, asetilkolinesteraz ve kolin oksidaz enzimleri ile yapılan çalışmalarda çalışılan pH değerlerinin 7,5; 8,0; 8,3 ve 9,0 olduğu rapor edilmiştir (Ravi vd. 2010, Qin vd. 2010, Aynacı vd. 2014).



Şekil 4.7 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodun cevabına pH'nin etkisi (1,0 µM asetilkolin, +0,4 V, 0,1 M fosfat tamponu, pH 7,5, n = 3)

4.4.3 Sıcaklığın etkisi

Sıcaklık, enzimlerin aktivitesini etkileyen bir diğer en önemli faktördür. Her enzimin optimum bir sıcaklık değeri vardır. Asetilkolin için 20–75 °C aralığında elde edilen akım farklarına karşı sıcaklık değerleri grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde, sıcaklık değeri arttıkça cevap akımlarının 60º C'ye kadar arttığı, bu değerden sonra ise azaldığı görülmektedir. Cevap akımlarındaki azalma AChE ve ChOx enzimlerinin üç-boyutlu yapılarının değişmesi ve denatüre olması sonucu aktivitelerini kaybetmelerinden kaynaklanmaktadır. Literatürde bu enzimlerin optimum sıcaklık değerinin 50–60 °C olduğu belirtilmektedir (Şenvd. 2004, Aynacı vd. 2014, Zhang vd 2014). Hazırlanan elektrot için optimum sıcaklık değeri 60 °C olarak belirlenmesine rağmen, uzun süreli çalışma durumlarında daha stabil çalışma şartları oluşturulabilmesi için bundan sonraki çalışmalara oda sıcaklığında devam edilmiştir. Ayrıca, asetilkolin tayini için geliştirilen pek çok biyosensörde sıcaklık faktörü çalışılmıştır, ancak uygulama kolaylığı nedeniyle oda sıcaklığında çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 4.8 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodun cevabına sıcaklığın etkisi (1,0 µM asetilkolin, +0,4 V, 0,1 M fosfat tamponu, pH 7,5, n = 3)

4.4.4 Asetilkolin miktarının etkisi

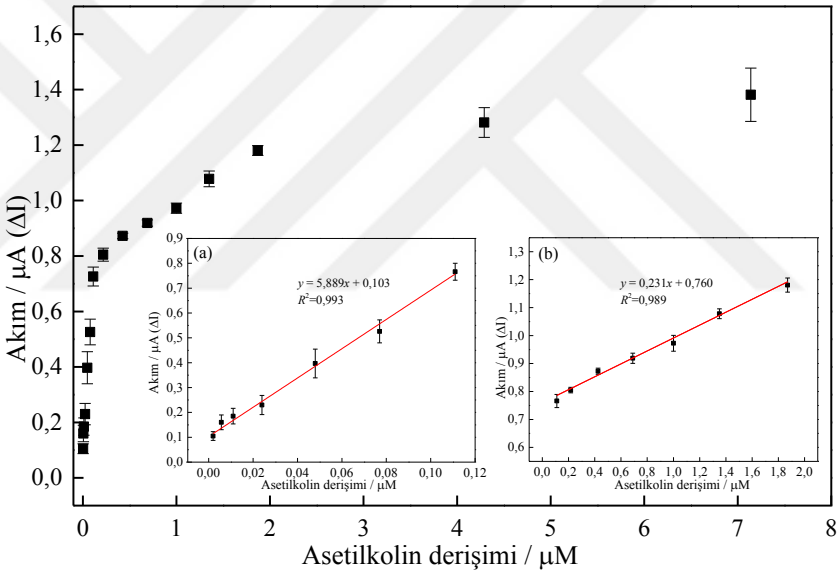
GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodun çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.8.4'te anlatıldığı şekilde, farklı derişimdeki asetilkolin çözeltilerinden çalışma ortamına belli miktarlarda eklemeler yaparak kalibrasyon grafiği çizildi. (Şekil 4.8). Grafik incelendiğinde iki farklı doğrusal çalışma aralığının olduğu görüldü (Şekil 4.8.a,b).

Asetilkolin için 0.02 µM - 0.111 µM ve 0.111 µM - 1.87 µM aralığında doğrusal çalışma aralıkları elde edildi. Bu aralıklar için hesaplanan eşitlikler sırasıyla y (µA) = 5.889 *x* (µM) + 0.103 (R^2=0.993) ve y (µA) = 0.231 *x* (µM) + 0.760 (R^2=0.989) olarak bulunmuştur. 2,0 µM'dan sonra ise asetilkolinin yükseltgenme sinyallerinin sabit kaldığı görüldü. Asetilkolin için gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) eşitlik 4.1 deki formüllere göre hesaplandı (Tığ vd. 2016, Aydoğdu vd. 2014).

$$\mathrm{LOD} = 3s / m,\ \ \mathrm{LOQ} = 10s / m \qquad (4.1)$$

s en düşük asetilkolin derişiminde üç ölçüm için elde edilen akım değerlerinin standart sapması ve *m* ise ilgili kalibrasyon eğrisinin eğimidir. Asetilkolin için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.61 nM ve 0.002 µM olarak bulundu.

Geliştirilen biyosensör ile elde edilen doğrusal çalışma aralığının literatürdeki benzer çalışmalarda elde edilenler ile karşılaştırılınca oldukça geniş olduğu söylenebilir. (Şen S. vd. 2004, Aynacı E. vd. 2014. Ayrıca, asetilkolin için hesaplanan gözlenebilme sınırının da diğer biyosensörler ile elde edilenlerden oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. (Shimomura T. vd 2009, Doretti L. vd 2000, Chen J.vd 2001, Doretti L. vd 2000, Zhang L. vd 2014)



Şekil 4.9 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodun cevabına asetilkolin derişiminin etkisi, (a) ve (b) GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodu ile farklı derişim aralığında elde edilen kalibrasyon grafikleri (0,05 M pH 7,5 fosfat tamponu, +0,4 V)

4.4.5 Tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik

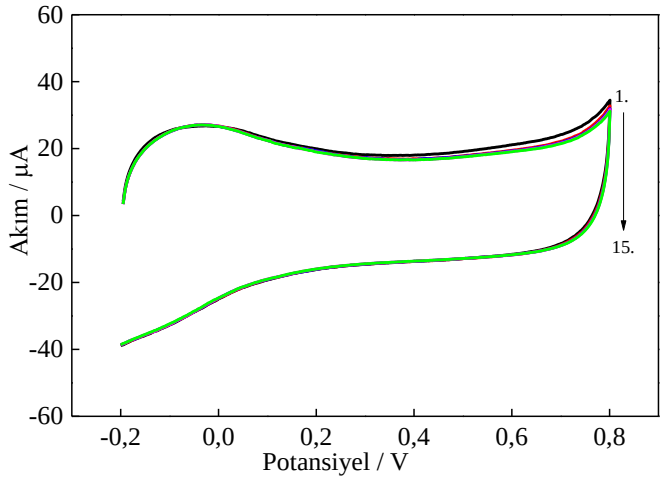
Asetilkolin biyosensörün tekrarlanabilirliğini, Bölüm 3.8.5'de belirtildiği şekilde, 1,0 µM asetilkolin içeren ortamda aynı enzim elektrot kullanılarak ard arda on kez ölçüm alınarak incelendi. Elde edilen cevap akımlarının standart sapması (s) ve bağıl standart

sapması (BSS) sırasıyla ±0.03 ve % 3.65 olarak hesaplandı. Bu da geliştirilen aynı biyosensör ile çok sayıda analizin yapılmasının mümkün olduğunu göstermektedir.

Biyosensörün tekrar üretilebilirliğini araştırmak amacıyla birbirinden bağımsız olarak hazırlanan on elektrot hazırlandı ve 1,0 µM asetilkolin içeren ortamda amperometrik ölçüm alındı. Elde edilen sonuçlardan yararlanarak % BSS değeri % 3,93 olarak hesaplandı. Bulunan bu % BSS değerinin oldukça düşük olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlara dayanarak, düşük % BSS değerine sahip olan bu biyosensörün tekrar üretilebilirliğinin oldukça iyi olduğuna ve asetilkolinin hızlı ve duyarlı bir şekilde tayinine olanak sağladığı söylenebilir.

4.4.6 Kararlılık

Hazırlanan biyosensörün kararlılığı Bölüm 3.8.6'da belirtildiği şekilde ardışık dönüşümlü voltamogramlar alınarak yapıldı. Şekil 4.9'da 1,0 µM asetilkolin içeren ortamda -0,2 V ile +0,8 V arasında 50 mv/s tarama hızında GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs-AChE-ChOx elektroduna ait ard arda alınan dönüşümlü voltamogramları göstermektedir. Şekil incelendiğinde, enzim elektrodun 15. döngüden sonra bile kararlılığını koruduğu görüldü.



Şekil 4.10 GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs-AChE-ChOx elektroduna ait ardışık çok döngülü voltamogramlar (0,05 M fosfat tamponu, pH 7.5)

4.4.3 Raf ömrü

Enzim temelli biyosensörlerin raf ömrünün incelenmesi özellikle ticari kullanım potansiyellerinin araştırılması için önemli bir faktördür. Hazırlanan GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs-AChE-ChOx enzim elektrodun raf ömrü, Bölüm 3.8.7'de anlatıldığı şekilde, 30 gün boyunca farklı günlerde 1,0 μM asetilkoline cevabın ölçülmesi ve akım farklarının güne karşı grafiğe geçirilmesiyle değerlendirildi. GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs-AChE-ChOx elektrodunun 30 gün sonunda başlangıç cevabının yaklaşık % 60'ını koruduğu görüldü. Biyosensörün kararlılığın iyi olması elektrot modifikasyonunda kullanılan MWCNTs, Fe_3O_4NPs ve CS'ın AChE ve ChOx'ın enzimatik aktivitelerini koruması için uygun bir mikroçevre oluşturması ile ilişkilendirilebilir. Literatürde asetilkolin biyosensörleri ile ilgili çalışmalar incelendiğinde farklı raf ömrüne sahip elektrotlar bulunduğu görüldü (Doretti vd. 2000, Chen vd. 2001, Hou vd. 2012, Shimomura 2009). Geliştirilen biyosensörlerin ömürlerinin birbirinden farklılık göstermesinin immobilizasyon yöntemi ve matriks seçimi ile ilgili olduğu söylenebilir.

4.5 Biyosensör Üzerine Girişim Yapan Maddeler

Hazırlanan GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrot ile biyolojik sıvılarda girişim etkisi yapabilecek bazı maddelerin girişim etkileri araştırıldı. Askorbik asit, asetoaminofen, L-sistein, ürik asit ve D-glukoz'un girişim etkileri incelendi. İncelenen bu maddelerin kanda bulunabilecek olası derişim değerlerinde, sabit derişimde asetilkolin içeren çalışma ortamına ilave edildi. Ve bu maddelerin girişim yapıp yapmadıkları ve girişim varsa bu etkinin nasıl giderildiği incelendi. Her bir tür için % girişim değeri hesaplandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de gösterildi. Çizelge 4.2 incelendiğinde, askorbik asit ve ürik asidin serumda bulunabilecek derişim değerlerinde girişim etkisinin % 6'dan az olduğu, asetoaminofenin ve L-sisteinin ise % 10'dan az girişim etkisi yaptığı sonucu gözlendi.

Çizelge 4.2 Asetilkolin tayini için geliştirilen biyosensöre diğer türlerin girişim etkisi

Girişim yapan tür	Derişim[a] (mM)	% Girişim[b]
L-Askorbik asit	0,1	3,70
Ürik asit	0,1	0,56
Asetoaminofen	0,1	9,50
L-Sistein	0,1	6,48
D-Glukoz	0,1	-2,27

[a] Girişim yapan türlerin elektrokimyasal hücre derişimleri
[b] % girişim = $(I_x\text{-}I_0)/I_0 \times$ % 100; I_0: 0,1 mM asetilkolin çözeltisinin amperometrik cevabı, I_x: 0,1 mM asetilkolin çözeltisi içinde bulunan girişim yapan türün amperometrik cevabı

4.9 Geliştirilen Biyosensör ile Serumda Asetilkolin Tayini

Hazırlanan asetilkolin biyosensörünün hassasiyetini ve uygulanabilirliğini test etmek amacıyla GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrotla serum numuneleri üzerinde çalışıldı. Bu amaçla, serum örneği hücreye ilave edildi ve 10 kat seyreltildi. Biyosensörün amperometrik cevabı +0,4 V'da elde edildi. Serum örneklerindeki asetilkolin miktarları standart ekleme yöntemi kullanılarak belirlendi. Çizelge 4.3'de görülebileceği gibi serum örneklerinin % geri kazanım değeri % 96,67 ile % 103,07 arasında değişmektedir. Elde edilen yüksek geri kazanım değerleri hazırlanan GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodu temelli amperometrik asetilkolin biyosensörünün serum örneklerinde asetilkolin düzeylerini belirlemede uygulanabilirliğinin oldukça iyi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.3 Serum numunelerinde asetilkolin tayini

Numune	Eklenen asetilkolin miktarı (µM)	Bulunan asetilkolin miktarı (µM)	Geri kazanım (%)	RSD* (%)
1	0.10	0.102	100.20	3.85
2	0.30	0.29	96.67	5.35
3	0.65	0.67	103.07	1.51

*Her sonuç üç ölçümün ortalaması olarak verilmiştir.

Asetilkolin tayini için hazırlanan GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrodun performans faktörlerinin literatürdeki diğer biyosensörle elde edilenler ile karşılaştırılması çizelge 4.4'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.4 Farklı amperometrik ACh biyosensörlerinin analitik özelliklerinin karşılaştırılması

İmmobilizasyon tabakası	Çalışma potansiyeli	Doğrusallık	LOD	Optimum pH	Optimum Sıcaklık	Tekrarlanabilirlik	Raf Ömrü	Kaynaklar
Hibrit mezopor membran	+0,6 V	6,0-800 µM	5.2 µM	8-9	nr	BSS: 5,7% (n=10)	80 gün sonraki amprometrik cevap % 80	Shimomura, T. vd 2009
Pol(vinil alkol) kriyojel membran	+0,65 V	5,0-100 µM	2,0 µM	9,5	35 °C	BSS: 4% (n=5)	30 days	Doretti L. vd 2000
Pt/$PVF^{+}ClO_4^{-}$/AChE-ChOx	+0,7 V	0-12,0 mM	1,0 µM	7,4	55 °C	nr	Cevap akımı 30 gün sonar% 30 azaldı	Şen S, vd 2004
Pt/PPy-PVS	+0,3 V	0,01-1,0 µM	5,2 nM	9,0	65 °C	BSS: 4,4% (n=18)	35, gündeki cevap, başlangıç değerinin% 31'i	Aynacı E. vd 2014
GCE/Pt-black/AChEt-ChOx	+0,5 V	29-1200 µM	8,7 µM	7,0	nr	BSS: 3,8% (tekrarüretilebilirlik) (n=8)	Yanıt, 1 aydan sonra, yalnızca % 5 oranında azaldı.	Chen J. vd 2001
Pt/MWCNT-AuNP-PDDA-AChE	+0,35 V	0,005-0,4 mM	1 µM	8,0	nr	BSS: 5% (tekrarüretilebilirlik) (n=5)	2 ay sonunda, elektordun ilk akım cevabından % 0 I kaldı.	Hou S. vd 2012
PG/MWCNT/ ZnO/ChOx-AChE/PDDA	+0,6 V	1,0 µM - 0,8 mM ve 0,8 -1,0 mM	0,3 µM	7,8	50 °C	nr	Yanıtta, 90 gün sonunda % 5,4 oranında azalma oldu	Zhang L. vd 2014
GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx	+0,4 V	0,02–0,111 µM ve 0,111–1,87 µM	0,61 µM	7,5	60 °C	BSS: 3,51% (n=5)	30 gün sonra, modifiye elektrotun başlangıç değerinin % 60'ı	Bu çalışma

platin (Pt), polivinilferrosen perklorat ($PVF^{+}ClO_4^{-}$), camsı karbon elektrot (GCE), polipirol-polivinilsülfat (PPy-PVS), asetilkolinesteraz (AChE), kolin oksidaz (ChOx), çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNTs), altın nanoparçacıkla (AuNP), poli (diallildimetilammonyum klorit) (PDDA), pirolitik grafit (PG), çinko oksit (ZnO), demir oksit (Fe_3O_4), bağıl standart sapma (RSD), rapor edilmedi (nr)

5. SONUÇLAR

İlk olarak camsı karbon elektrot kitosan, MWCNTs ve Fe_3O_4NPs ile modifiye edilmiştir. Hazırlanan modifiye camsı karbon elektrotların elektrokimyasal karakterizasyonu dönüşümlü voltametri ve elektrokimyasal impedans spektroskopisi yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen bulgular yalın camsı karbon elektrodun sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Bir sonraki aşamada modifiye elektroda asetilkolin esteraz ve kolin oksidaz enzimleri immobilize edilmiş ve bu hazırlanan enzim elektrotta enzim ünitesi, pH ve sıcaklık gibi parametreler optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışması sonucu;

- Çalışma potansiyeli +0,4 V olarak belirlenmiştir.
- Enzimler literatürde de belirtildiği gibi bire bir (1:1) oranında kullanılmıştır (Aynacı vd. 2014).
- GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4/AChE-ChOx/Naf enzim elektrodun optimum çalışma koşullarının belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalar sonunda; pH 7,5 (fosfat tamponu) optimum pH olduğu gözlenmiştir.
- Optimum sıcaklık 60 °C olarak bulunmuştur, fakat daha rahat çalışma koşulu sağlanması için çalışmalara oda sıcaklığında devam edilmiştir.
- GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4/AChE-ChOx enzim elektrodu, asetilkolin için 0,02–0,111 μM ve 0,111–1.87 μM üzere iki farklı doğrusal çalışma aralığı elde edilmiştir ve gözlenebilme sınırı (LOD) 0,61 nM olarak hesaplandı.
- Biyolojik sıvılarda girişim etkisi yapabilecek bazı maddelerin girişim etkileri araştırılmış, askorbik asit ve ürik asidin serumda bulunabilecek derişim değerlerinde girişim etkisinin % 6'dan az olduğu, asetoaminofenin ve L-sisteinin ise % 10'dan az girişim etkisi yaptığı sonucuna varılmştır.

- Hazırlanan asetilkolin biyosensörünün hassasiyetini ve uygulanabilirliğini test etmek amacıyla GCE/CS-MWCNTs-Fe_3O_4NPs/AChE-ChOx elektrotla serum numuneleri üzerinde çalışılmıştır. Serum örneklerinin % geri kazanım değeri % 96,67 ile % 103,07 arasında değiştiği saptanmıştır.

.

KAYNAKLAR

Aydoğdu G., Günendi G., Zeybek D.K., Zeybek B. and Pekyardımcı Ş. 2014. ‘’A novel electrochemical DNA biosensor based on poly-(5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole) modified glassy carbon electrode for the determination of nitrofurantoin’’ Sensors Actuators B Chem. 197 211–219.

Aydoğdu, G., Koyuncu Zeybek, D., Zeybek, B. and Pekyardımcı, Ş. 2013. “Electrochemical sensing of NADH on NiO nanoparticles-modified carbon paste electrode and fabrication of ethanol dehydrogenase-based biosensor.’’, Journal of Applied Electrochemistry, 43 523-531.

Aynacı, E., Yas, A. and Arslan, F. 2014. “An amperometric biosensor for acetylcholine determination prepared from acetylcholinesterase-choline oxidase immobilized in polypyrrole-polyvinylsulpfonate film’’, Sensors and Actuators B, 202, 1028–1036.

Bolat E. Ö., Aydoğdu G. and Pekyardımcı Ş. 2017. ‘’ Fabrication of an amperometric biosensor based on MWCNTs-Fe3O4NPs-CS nanocomposite for determination of acetylcholine’’, Journal of Electroanalytical Chemistry, 785, 241-248

Budak Kaya, H. 2012. ‘ ’Asetilkolinestereaz Enziminin İnsan Eritrositlerinden Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması’’, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 1-18.

Chauhan, N. and Pundir, C.S. 2012. “An amperometric acetylcholinesterase sensor based on Fe3O4 nanoparticle/multi-walled carbon nanotube-modified ITO-coated glass plate for the detection of pesticides ‘’, Electrochimica Acta, 67 79– 86.

Chen J., Lin X.Q., Chen Z.-H., Wu S.G. and Wang S.Q. 2001. ‘’Amperometric micro-biosensor array for choline and acetylcholine based on a glassy carbon electrode modified by platinum-black particles and a co-crosslinked enzyme system’’ Anal. Lett. 34 (4) 491–50,

Chen, D., Sun, X., Qiao, Y. and Wang, X. 2015. ‘’Acetylcholinesterase biosensor based on multi-walled carbon nanotubes-SnO2-chitosan nanocomposite’ ’Bioprocess Biosyst Eng 38:315–321

Davies, P. and Maloney, A.J.F. 1976. ‘’ Selective Loss Of Central Cholinergic Neurons In Alzheimer's Disease’’, The Lancet, Volume 308, Issue 8000, Page 1403.

Davis, K. and Berger, P.A.P. 1979. ‘’Brain Acetylcholine and Neuropsychiatric Disease. ‘’Plenum Press, New York.

Doretti L., Ferrara D., Lora S., Schiavon F. and Veronese F.M. 2000. ‘’Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly(ethylene glycol)-modified choline oxidase in a poly(vinyl alcohol) cryogel membrane’’ Enzym.Microb. Technol. 27 (3–5) 279–285.

Doretti L., Ferrara D., Lora S., Schiavon F. and Veronese F.M. 2000. ‘’Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly(ethylene

glycol)-modified choline oxidase in a poly(vinyl alcohol) cryogel membrane'' Enzym.Microb. Technol. 27 (3–5) 279–285.

Doretti L., Gattolin P., Burla A., Ferrara D., Lora S. and Palma G. 1998. ''Covalently immobilized choline oxidase and cholinesterases on a methacrylate copolymer for disposable membrane biosensors'' Appl. Biochem. Biotechnol. 74 (1) 1–12.

Hall. E.A.H. 1990. Biosensors, Ch. 1: Biosensors in context, Open University Press, 3-30, London

Helia, H., Hajjizadeh, M., Jabbari, A. and Moosavi-Movahedi, A.A. 2009. Biosensors and Bioelectronics 24 2328–2333.

Hou, S., Ou, Z., Chen, Q. and Wu, B. 2012. ''Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of gold nanoparticles and acetylcholinesterase on the sol–gel/multi-walled carbon nanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode'' Biosensors and Bioelectronics 33 44– 49.

Nirogi, R., Mudigonda, K., Kandikere, V. and Ponnamaneni R. 2010. Quantification of acetylcholine, an essential neurotransmitter, in brain microdialysis samples by liquid chromatography mass spectrometry Biomed. Chromatogr. 24: 39–48.

Noyan, A. 1996. Yaşama ve hekimlikte fizyoloji. Metaksan anonim şirketi 240-242.

Orak, N. 2011. ''Asetilkolinesterazın Bazı Tıbbi Bitkiler Tarafından İnhibisyonu'', Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2-15.

Pingarron, J.M., Yanez-Sedeno, P. and Gonzalez-Cortes, A. 2008. "Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors'', Electrochimica Acta, 53 5848–5866.

Qin, X., Wang,H., Wang, X., Miao, Z., Chen, L., Zhao, W., Shan, M. and Chen, Q. 2010. ''Amperometric biosensors based on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes-poly(diallyldimethylammonium chloride) biocomposite for the determination of choline'', Sensors and Actuators, B: Chemical 147, 593–598.

Ravi, S., Ganesana, M., Andreescu, S. and Stanciu, L. 2010. "AChE biosensor based on zinc oxide sol–gel for the detection of pesticides'', Analytica Chimica, Acta661, 195–199.

Rozwadowski, K.L., Khachatourians, G.G. and Selvaraj, G. 1991, Choline oxidase, a catabolic enzyme in Arthobacter pascens, facilitates adaption to osmotic stress in Escherichia coli. Journal of Bacteriology, 173 (2), 472-478.

Shimomura, T., Itoh, T., Sumiya, T., Mizukami, F. and Ono, M. 2009. "Amperometric biosensor based on enzymes immobilized in hybrid mesoporous membranes for the determination of acetylcholine'', Enzyme and Microbial Technology, 45, 443–448.

Şahin, A.H. 2002.''Asetilkolin, Kolinesterazlar ve Alzheimer Hastalığı''. Demans Dergisi, 2, 69-73.

Şen S., Gülce A. and Gülce H. 2004. ''Polyvinylferrocenium modified Pt electrode for the design of amperometric choline and acetylcholine enzyme electrodes''

Biosens. Bioelectron. 19 (10) 1261–1268.

Tandon, R. 1999.'' Cholinergic aspects of schizophrenia.'', British Journal of Psychiatry, 174 (suppl. 37), 7 -11.

Tığ G.A., Zeybek B., Pekyardımcı Ş. 2016. ''Electrochemical DNA biosensor based on poly(2,6-pyridinedicarboxylic acid) modified glassy carbon electrode for the determination of anticancer drug gemcitabine'' Talanta 154 312–321.

Wang, J. 1999. ''Amperometric Biosensors For Clinical and Therapeutic Drug Monitoring'', A Review. Journal of Biomedical Analysis,. 19, 47-53.

Wilson, IB. and Nachmansohn. D 1954. '' Ion transport across membranes'' (HT Clarke Ed), Academic Press, New York,

Yücel, A. 2013. ''Çoklu Enzim Esaslı Biyosensör Geliştirilmesi'', Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 3-22

Zhai, C., Sun, X., Zhao, W., Gong, Z. and Wang, X. 2013. ''Acetylcholinesterase biosensor based on chitosan/prussian blue/multiwall carbon nanotubes/hollow gold nanospheres nanocomposite film by one-step electro deposition'' Biosensors and Bioelectronics 42 124–130.

Zhai, C., Sun, X., Zhao, W., Gong, Z. and Wang. X. 2013. ''Acetylcholinesterase biosensor basedonchitosan/prussian blue/multiwall carbon nanotubes/hollow gold nanospheres nanocomposite film by one-stepelectrodeposition'' Biosens. Bioelectron. 42 124–130.).

Zhang L., Chen J., Wang Y., Yu L., Wang J., Peng H. and Zhu J. 2014. ''Improved enzyme immobilization for enhanced bioelectrocatalytic activity of choline sensor and acetylcholine sensor'' Sensors Actuators B Chem. 193 904–910.).

Zhang Y., Wen G., Zhou Y., Shuang S., Dong C. and Choi M.M.F. 2007. ''Development and analytical application of an uric acid biosensor using an uricase-immobilized eggshell membrane'' Biosens. Bioelectron. 22 (8) 1791–1797).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ecem Özlem BOLAT

Doğum Yeri : Silvan

Doğum Tarihi: 16.04.1990

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Öğretmen Necla Kızılbağ Anadolu Lisesi (2008)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2014)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (Ocak 2018)

Çalıştığı Kurum ve Yıl

ARGİS İLAÇ San. ve Tic. Ltd. Şti. (Ekim 2016-Haziran 2017)

Vilsan Veteriner İlaçları Tic. San. A.Ş. (Temmuz 2017-halen)

Yayın

Bolat E. Ö., Aydoğdu G. Ve Pekyardımcı Ş. (2017) ‘’ Fabrication of an amperometric biosensor based on MWCNTs-Fe3O4NPs-CS nanocomposite for determination of acetylcholine’’, Journal of Electroanalytical Chemistry, 785, 241-248