

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK MOLEKÜL YAPILI ANALİTLERİN PİEZOELEKTRİK
İMMUNOBİYOSENSÖRLER İLE TESPİTİNDE DUYARLIK
GELİŞTİRİLMESİ**

Şerife Şeyda PİRİNÇCİ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2018

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK MOLEKÜL YAPILI ANALİTLERİN PİEZOELEKTRİK
İMMUNOBİYOSENSÖRLER İLE TESPİTİNDE DUYARLIK
GELİŞTİRİLMESİ**

Şerife Şeyda PİRİNÇCİ

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK

TÜBİTAK MAM Tarafından

**“Çoklu Toksin Deteksiyonu Sağlayan Biyosensör Geliştirilmesi (MAMBİYOSENS
5133101) Projesi” ile desteklenmiştir**

KOCAELİ

2018

KABUL VE ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE


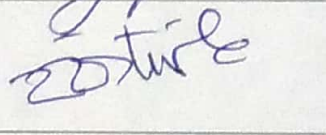
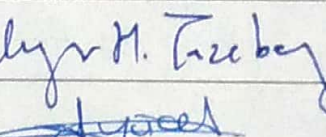
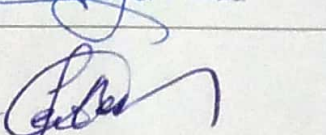
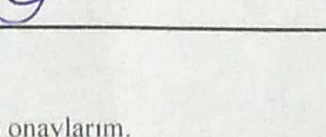
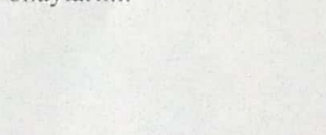
Tez Adı: Küçük Molekül Yapılı Analitlerin Piezoelektrik İmmunobiyosensörler ile Tespitinde Duyarlık Geliştirilmesi

Tez yazarı: Şerife Şeyda Pirinçci

Tez savunma tarihi: 25.05.2018

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	Doç. Dr. Naci ÇİNE	
ÜYE (DANIŞMAN)	Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK	
ÜYE	Prof. Dr. Zafer Ziya ÖZTÜRK	
ÜYE	Prof. Dr. Uygur TAZEBAZ	
ÜYE	Doç. Dr. Fatıma YÜCEL	
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Seda EREN KESKİN	

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2018

Prof.Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Küçük Molekül Yapılı Analitlerin Piezoelektrik İmmunobiyosensörler ile Tespitinde Duyarlık Geliştirilmesi

Amaç: Toksinler, pesitistler, organik toksik kimyasallar ve farmasötikler olarak günlük hayatta sıkça karşımıza çıkmakta olan küçük moleküllerin (analit), sağlık ve çevre üzerindeki zararlı etkileri nedeniyle izlenmelerine yönelik düzenlemeler yapılmıştır. Bu tür moleküllerin insan ve hayvan sağlığı ve çevre üzerine olumsuz etkilerinin önüne geçilmesi için etkin bir şekilde izlenmelerinde kullanılan rutin analitik sistemlere kıyasla, biyosensörler alanda hassas, kolay ve hızlı tarama imkânları sunabilmektedirler. Biyosensörlerin sağlayacakları olumlu sonuçlara bağlı olarak yaygınlaştırılmaları amacıyla analitik yöntemlerle karşılaştırıldıklarında, özellikle küçük moleküllerin tespitinde duyarlık açısından sınırlılıkları olduğu görülmektedir. Bu nedenle küçük moleküler yapıya sahip analitlerin, laboratuvar odaklı analitik cihazlara bağımlılığın azalarak yerinde hızlı bir şekilde tespitine yönelik biyosensör geliştirme çalışmaları analizlerin sıklaşması ve izlemenin yaygınlaşması açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada, önemli gıda kirleticileri olan küçük kimyasal yapılı mikotoksinlerin, gıda ve yem örnekleri laboratuvara taşınmadan yerinde tespitine yönelik piezoelektrik immünobiyosensörlerle duyarlılığı artırabilecek yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Yöntem: Yöntem geliştirme çalışmaları kapsamında antikor immobilizasyonu, analit-protein konjugatı immobilizasyonu ve analitin kovalent olarak immobilizasyonu stratejileri değerlendirilmiştir. Ardından duyarlık geliştirilmesi amacıyla antikorun PBM321 dendronuna konjugasyonu ile ağırlaştırılması ve valensisinin artırılması ile 5 MHz QCM'e göre daha yüksek frekansta ölçüm yapabilen 120 MHz Love wave ölçüm platformu kullanılması stratejileri değerlendirilmiştir. Çalışmada, mikotoksinler içinde en yüksek toksisiteye sahip AFB1 ve OTA küçük analit modeli olarak seçilmiş ve Anti-AFB1 ve Anti-OTA antikorumları kullanılarak tespit edilmelerine yönelik yöntem geliştirilmiştir.

Bulgular: Ölçüm platformu olarak 5 MHz QCM kullanılarak 17,2 ppb hassasiyetle OTA immünosensörü geliştirilmiştir. Küçük analitlerin tespitinde duyarlılığın

artırılmasına yönelik gerçekleştirilen diğer çalışmada ise, Ertekin ve diğerleri (2016) tarafından 5 MHz QCM ile 1,25 ppb olarak geliştirilen AFB1 belirleme duyarlılığı, 120 Mhz Love wave ölçüm platformu kullanılarak 0,25 ppb'ye, PBM321 konjugasyonu ile 0,0002 ppb'ye kadar düşürülmüştür.

Sonuç: AFB1 gibi küçük bir kimyasalın piezoelektrik biyosensörlerle tespitinde 6250 kat daha yüksek duyarlığa ulaşılmıştır.

Bu çalışma TÜBİTAK MAM Tarafından “Çoklu Toksin Deteksiyonu Sağlayan Biyosensör Geliştirilmesi (MAMBİYOSENS 5133101) Projesi” ile desteklenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Küçük molekül, biyosensör, AFB1, OTA, piezoelektrik



ABSTRACT

Enhancement of Sensitivity in Detection of Small Molecules With Piezoelectric Immunobiosensors

Objective: Small molecules are widely encountered analytes in daily life and divided into four main classes such as toxins, pesticides, organic toxic chemicals and pharmaceuticals. Although there are regulations for monitoring of many small molecules due to their impact on health and environment; sensitive, easy and fast on-site detection devices such as biosensors need to be developed and generalised for effective monitoring and prevention of these molecules. However many biosensor studies have limitations in detection of small molecules when compared to analytical methods. Thus studies focusing on enhancement of sensitivity in detection of small molecules with biosensors provide the advantage of lower dependency to laboratory based analytical devices and generalisation of monitoring.

Method: This study consists of two parts as method development and enhancement of sensitivity for detection of small molecules with piezoelectric immunobiosensors. Within the context of method development immobilization of antibody, analyte-protein conjugate and analyte was evaluated. Then mass and valency of the antibody was increased by conjugation to PBM321 and measurements were made by using 120 MHz Love Wave that can make measurements at higher frequencies when compared to 5MHz QCM in order to enhance the sensitivity. 5 MHz QCM was used in the studies carried for detection of selected model mycotoxins AFB1 and OTA by using Anti-AFB1 and Anti-OTA.

Results: In this study OTA immunobiosensor was developed and limit of detection for this biosensor was calculated as 17.2 ppb. Ertekin et. al. (2016) developed a biosensor for detection of AFB1 by using 5 MHz QCM and the limit of detection for this biosensor was found as 1.25 ppb. Within the scope of this study, this value was lowered to 0.25 ppb by use of 120 Mhz Love wave platform and to 0,0002 ppb by conjugation of antibody to PBM 321.

Conclusions: As aimed and motivated, 6250 times more sensitive piezoelectric biosensor was developed for detection of small molecules.

This study is supported by TUBITAK MRC by the project “Development of Biosensor for Multiplex Toxin Detection (MAMBIYOSENS 5133101).

Keywords: Small molecules, biosensor, AFB1, OTA, piezoelectric



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yapıldığı beş yıllık süreç, beni destekleyen ve bana eşlik eden kişilerle birlikte tamamlandı. Bu kişilere teşekkür etme şansına eriştiğim için mutluyum.

Tez danışmanım ve tezimin desteklediği projelerin yürütücüsü Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK'e hiçbir zaman esirgemediği destek, teşvik ve rehberliği için şükranlarımı sunmak isterim. Bilimsel bakış açısı ve tecrübesi ile destek olan Prof. Dr. Zafer Ziya ÖZTÜRK'e ve doktora sürecim boyunca desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Naci ÇİNE'ye teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'ndeki laboratuvarımda bana bu mutlu ve huzurlu çalışma ortamını sağlayan, yardımsever ve samimi insanlarla beraber çalışıyor olmaktan mutluluk duyuyorum. Tecrübelerini ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemediği ve her zaman cesaretlendirdiği için Doç. Fatma Yücel'e teşekkürü borç bilirim. Teknik desteği ve sabrıyla yoluma çıkan her zorluğa aşmamda yardımcı olan Harun Kocaağa'ya içten teşekkürlerimi sunuyorum. Tez çalışmasında kullanılan antikorlardan birini sağlamanın yanı sıra en zor anlarımda desteklerini hissettiğim Dr. Esin Akçael'e minnettarım. Tüm çalışma süresince benimle sırt sırta çalışan ve gece gündüz demeden her anlamda destek olan Dr. Özlem Ertekin'e teşekkürü borç bilirim. İlke Süder ve Beren Üstünkaya'ya dostlukları, destekleri ve sağladıkları neşe ve huzur dolu yuva için teşekkür ediyorum. Bilim ve yaşamda bana farklı bakış açıları göstererek vizyonumu geliştiren Dr. Fatma Betül Güloğlu'na teşekkür ediyorum. Çalışmada kullanılan 10F4 antikorunda büyük emeği olan Fehime Şeyma Özen ve Duygu Ercan Laguna'ya teşekkür ederim. Tanı Teknolojileri Laboratuvarı'nda çalışan tüm TTL ekibine arkadaşlıkları, keyifli çalışma ortamı için teşekkür ederim.

Ayrıca tez yazım sürecinde bana büyük destek veren Gökhan Göktürk'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, ailem Filiz Pirinççi, Hayrettin Pirinççi, Müberra Genç, Deniz Genç ve Buğra Genç'e bana olan güvenleri ve sonsuz destekleri için minnettarım.

Bu çalışma TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi 5133101 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

..... / / 2018

Şerife Şeyda PİRİNÇCİ

İmza

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET	vi
TEŞEKKÜR	viii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	ix
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÇİZİMLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1 GİRİŞ	1
1.1. Küçük Moleküller	1
1.1.1. Mikotoksinler	3
1.1.1.1. <i>Aflatoksin B1</i>	5
1.1.1.2. <i>Okratoksin A</i>	7
1.1.2. Küçük Moleküllerin İzlemede Kullanılan Yöntemler	7
1.2. Biyosensörler	8
1.2.1. Algılama Birimleri	11
1.2.1.1. <i>Biyosensörlerde algılayıcı molekül olarak antikorlar</i>	12
1.2.1.2. Dendronlar	17
1.2.2. Transdüserler	18
1.2.3. Piezoelektrik Biyosensörler	19
1.2.3.1. <i>Kuartz kristal mikroterazi (QCM)</i>	20
1.2.3.2. Love wave sensörler	21
2. AMAÇ	23
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	25
3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Sensör Yüzeyine OTA Bağlanması	26
3.2.2. Katyonize BSA Hazırlanması	26
3.2.3. OTA-cBSA Konjugatlarının Hazırlanması	27
3.2.4. 5 MHz QCM Kristallerine OTA-cBSA Bağlanması	28
3.2.5. Kovalent OTA İmmobilizasyonu	28
3.2.6. Yarışmalı ELISA ile 10F4 Konsantrasyon Optimizasyonu	30
3.2.7. OTA Ölçümü	30
3.2.8. Kristallere Anti-AFB1 8G8 Bağlanması	31
3.2.8.1. <i>8G8 antikorlarının yüzeye direkt adsorpsiyonu</i>	31

3.2.8.2. 8G8 antikorlarının Protein A ile yönlendirilerek yüzeye bağlanması	31
3.2.8.3. Dithiothreitol (DTT) ile kesilen 8G8 antikorlarının yüzeye bağlanması	31
3.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrophorez	31
3.2.10. AFB1-cBSA Konjugasyonu	32
3.2.11. Anti-AFB1 8G8 Kaplı Yüzeyde AFB1 Ölçümü	33
3.2.12. Kristallere AFB1 Bağlanması	33
3.2.13. D12E2-Dendron Konjugasyonu	34
3.2.14. AFB1 Ölçümü	34
3.2.15. Yüzey Rejenerasyonu	34
4.BULGULAR	36
4.1. Konjugasyon Çalışmaları	36
4.1.1. AFB1-cBSA Konjugasyonu	36
4.1.2. OTA-cTF Konjugasyonu	36
4.2. İmmobilizasyon Çalışmaları	37
4.2.1. Antikor Yönlendirme ve İmmobilizasyon Çalışmaları	37
4.2.2. Antijen İmmobilizasyon Çalışmaları	39
4.2.2.1. Yüzeye antijen-protein konjugat immobilizasyon çalışmaları	40
4.2.2.2. Yüzeye doğrudan toksin immobilizasyonu ile sinyal geliştirme	42
4.2.2.3. Kovalent OTA immobilizasyonu ile yöntem geliştirme ve OTA tespiti	42
4.3. Antikor-Dendron Konjugasyonu ile Hassasiyet Geliştirme	48
4.3.1. D12E2-PBM321 Konjugasyonunun Karakterizasyonu	48
4.3.2. D12E2-PBM321 Konjugatı ve D12E2 ile Yapılan AFB1 Ölçüm Çalışmaları	49
5 TARTIŞMA	52
5.1. İmmobilizasyon Çalışmaları	52
5.1.1. Antikor Yönlendirme Çalışmaları	52
5.1.2. Antijen İmmobilizasyon Çalışmaları	53
5.1.2.1. Yüzeye antijen-protein konjugat immobilizasyon çalışmaları	53
5.1.2.2. Yüzeye OTA immobilizasyonu ile yöntem geliştirme ve OTA tespiti	54
5.2. Antikor-Dendron Konjugasyonu ile Hassasiyet Geliştirme	56
5.3. Sınırlılıklar	58
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ρ_q : Yoğunluk

μ_q : Kesim katsayısı

A: piezoelektriksel aktif alan

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AFB1: Aflatoksin B1

AFB2: Aflatoksin B2

AFG1: Aflatoksin G1

AFG2: Aflatoksin G2

AFM1: Aflatoksin M1

APS: Amonyum Persülfat

BAW: Bulk Acoustic Wave (Bulk akustik dalga)

BEN: Balkan Endemik Nefropati

BSA: Bovin Serum Albumin

CH₃COONa: Sodyum asetat

CIN: Kronik İnterstisyel Nefropati

Da: Dalton

DNA: Deoksiribonükleik asit

DON: Deoksinivalenol

DTT: Dithiothreitol

EC: European Commission (Avrupa Komisyonu)

EDA: Etilendiamin

EDC: 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EIA: Enzyme Immunoassay (Enzim İmmünoassay)

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzim Bağlı İn Assay)

EOA: Ethanolamine

EtOH: Ethanol

F: Frekans

FUMB1: Fumonisin B1

GC: Gas chromatography (Gaz kromatografi)

HCl: Hidroklorik asit

HPLC: High pressure liquid chromatography (Yüksek basınçlı

kromatografi)

Hz: Hertz

IDT: İnterdijital transdüser

Ig: İmmünglobulin

KDa: Kilo Dalton

LC/MS: Liquid chromatography/Mass spectrophotometry

LNA: Locked nükleik asit

LOD: Limit of detection (Belirleme limiti)

LOQ: Limit of quantification (Kantifikasyon limiti)

LW: Love wave (Love dalga)

m: Ağırlık

MEA: Mercaptoethylamine

MUA: Merkaptoundekanoik asit

MUD: 11-Merkapto-1-undekanol

MW: Molecular weight, moleküler ağırlık

NaCl: Sodyum klorür

NaOH: Sodyum hidroksid

NHS: N-hydroxysuccinimide

OTA: Okratoksin A

PAGE: Poliakrilamid Jel Elektroforez

PBM321: Polyester bis-MPA dendron 32 hydroxyl 1 amine generation 5

PBS: Fosfat buffered salin

PNA: Peptid nükleik asit

Ppb: part per billion

Ppm: part per million

Ppt: part per trillion

Q Factor: Quality Factor (Kalite faktörü)

QCM: Quartz Crystal Microbalance (Kuartz Kristal Mikroterazi)

RIA: Radioimmunoassay

RNA: Ribonükleik asit

SAM: Self Assembled Monolayer (Kendiliğinden düzenlenen tek katman)

SAW: Surface Acoustic Wave,(Yüzey akustik dalga)

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

TEMED: Tetrametiletildiamin

t_q : Kalınlık

ZEA: Zearalenon



ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1. 1. Transdüser ve biyoalgılayıcı elemanlara göre biyosensör çeşitleri	10
Çizim 1. 2. Biyosensörlerin temel birimleri	11
Çizim 1. 3. Tipik bir antikorun yapısı	12
Çizim 1. 4. Katı yüzeye immobilizasyonda Fc bölgesi aracılığıyla yüzeye immobilize edilen antikorların antijen bağlama bölgesi kapanmayacağından bu yolla yüzeye immobilize edilen antikorların antijen bağlama etkinliği daha yüksek olmaktadır	14
Çizim 1. 5. QCM sisteminde yarışımlı immunoassaylerin kullanılması	16
Çizim 1. 6. Dendrimer ve dendronların şematik gösterimi	17
Çizim 1. 7. AT kesim bir QCM kristalinin önden ve arkadan görünüşleri	21
Çizim 1. 8. Bir Love Wave sensörün temel yapısı	22
Çizim 3. 1. MUA aracılığıyla aminlenen altın yüzeye OTA bağlanması	26
Çizim 3. 2. BSA'nın kationizasyon reaksiyonu.	27
Çizim 3. 3. OTA-cBSA konjugasyon reaksiyonu	27
Çizim 3. 4. AFB antikorunu (8G8) kullanılarak yapılan antikor yönlendirme çalışmaları	31
Çizim 3. 5. AFB1 – cP konjugat oluşturma stratejisi	32
Çizim 3. 6. Sensör yüzeyine MUD aracılığıyla AFB1 immobilizasyonu	34
Çizim 4. 1. AFM1-cBSA konjugatının UV spektrumu	37
Çizim 4. 2. Katyonize hTf proteini (cTf), OTA ve OTA-cTf konjugatın 260-400nm arasındaki OD (absorbance) değerleri	38
Çizim 4. 3. DTT ile 8G8'in indirgenme çalışması sonucunda elde edilen %10 SDS-PAGE görüntüsü.	39
Çizim 4. 4. OTA-cBSA'nın akış halinde immobilize edildiği yüzeylerde anti-OTA 10F4 antikorunu ile etkileşimden sağlanan frekans değişimleri	42
Çizim 4. 5. OTA-cBSA'nın adsorpsiyon yoluyla immobilizasyonunun ardından rejenerasyon yapıldığında elde edilen frekans değişimleri	42
Çizim 4. 6. Farklı immobilizasyon koşullarında anti-OTA 10F4 antikorunu ile elde edilen frekans değişimleri ve kristaller arası standart sapmalar	44
Çizim 4. 7. SAM-OTA kaplı yüzeyde 10F4 antikorunun bağlanma etkinliği rejenerasyonlar sonrasında değişiklik göstermemiştir	45
Çizim 4. 8. 0,025, 0,05 ve 0,1 mg/ml 10F4 ile artan konsantrasyonlarda (0, 10, 20, 50, 100 veya 200 ppb) toksin etkileşimine bağlı ELISA sinyali	47
Çizim 4. 9. OTA kaplı yüzeye 0,025 mg/ml 10F4 uygulaması sonucunda elde edilen frekans değişiminin farklı miktarlarda serbest OTA ile etkileşimi	48
Çizim 4. 10. Farklı OTA konsantrasyonları varlığında elde edilen sensör ölçüm eğrileri	49
Çizim 4. 11. 100 MHz QCM ile yapılan ölçümlerde D12E2 ve D12E2-PBM321 bağlanması sonucunda elde edilen frekans farkları	50
Çizim 4. 12. 0,05 mg/ml D12E2 antikorunu kullanılarak yapılan ölçümler Love wave tabanlı AFB1 biyosensörünün en düşük belirleme sınırının 250 ppt olduğunu göstermektedir	51
Çizim 4. 13. 0,05 mg/ml D12E2-PBM321 konjugatı kullanılarak yapılan ölçümler Love wave tabanlı AFB1 biyosensörünün en düşük belirleme sınırının 0,2 ppt olduğunu göstermektedir.	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. Yaygın mikotoksinler ve bu mikotoksinlerle ilgili genel bilgiler	26
Çizelge 3. 1. OTA'nın yüzey immobilizasyon optimizasyonunda kullanılan reaksiyon koşulları	41
Çizelge 4. 1. Antikor immobilizasyonunun etkinliğini geliştirmek üzere denenen direkt adsorpsiyon, Protein A ile yönlendirme ve DTT ile indirgeyerek yönlendirme çalışmalarında antikor ve AFB1-BSA konjugatı bağlanması sonucunda elde edilen frekans düşüşleri	51
Çizelge 4. 2. Farklı OTA-cBSA immobilizasyon stratejilerinde yüzeye bağlanan 10F4'ün meydana getirdiği frekans değişimleri ve yüzeyin rejenerasyon sonrası tekrar bağlama kapasitesi	53
Çizelge 4. 3. OTA kaplı sensör yüzeyinin rejenerasyon değerleri	56
Çizelge 4. 4. Zamana bağlı yapılan ölçümler sonucunda hesaplanan R2, LOD ve LOQ değerleri	58

1. GİRİŞ

Hızlı nüfus artışı tüm dünyada sağlık, beslenme, güvenlik, çevre sorunlarını ön plana çıkarmakta, insan sağlığı için risk oluşturan tehdit unsuru bakteri, virüs, toksin ve diğer mikrokirleticiler gibi dış etkenlerin yanı sıra vücutta hastalık belirteci olarak kullanılan enzim, protein gibi maddelerin kan, serum, idrar gibi örneklerde tespitine yönelik analizler yapılmaktadır. Gıda üretiminde verimi artırmak, daha besleyici ve sağlıklı gıda üretmek amacıyla, biyoteknolojik gelişmelerle gıdalar yeniden tasarlanmakta, insan ve hayvan besin kaynaklarında, üretildikleri andan tüketiciye ulaşmaya kadarki zincirde insan sağlığını olumsuz etkileyebilecek analitlerin kontrolüne yönelik bilgi ve teknolojiler ilerledikçe mevzuatlar geliştirilmektedir. Sağlık sorunları oluşturmalarına bağlı olarak, gıdalarda ve besin kaynağı olarak kullanılan hayvanların et, süt, yumurta vb. ürünlerinden yararlanıldığı için gıda zincirinde bulunan hayvan yemlerinde bulunabilecek mikrobiyolojik kirleticiler, tarımsal ilaç kalıntıları ve katkı maddeleri bu mevzuatlara bağlı yöntemlerle izlenmektedir (Brancato ve diğ. 2017). Katkı, kalıntı veya mikorganizmalar tarafından üretilen mikotoksin gibi küçük moleküler yapılara sahip birçok ikincil metabolit oluşturdukları sağlık riskleri nedeniyle karmaşık gıda komponentlerinde analiz edilmektedir (EC 2006; The Commission of European Communities 2006). Bunlara ek olarak, canlılara zarar vermek amacıyla kullanılan hastalık yapıcı organizmalar ve bazı organizmaların metabolik aktiviteleri ile üretilen kimyasal maddeler ve toksinler biyolojik silah ajanı olarak kullanılarak insanlık için tehdit yaratmaktadır (Anderson 2012; Zilinskas 1997). Milli ve sivil savunma amacı ile tehdidin önceden belirlenip, tedbir alınması amacıyla bu ajanların da tespit ve teşhislerinin yapılarak izlenmesi ve risk oluşturmadan istihbari bilgi sağlanması önem arz etmektedir.

Sağlıktan gıdaya, çevreden savunmaya kadar sağlık sorunları yaratan istenmeyen maddelerin hızlı, güvenilir, hassas ve yerinde tespitleri tanı teknolojilerinin etkinlikleri açısından değer ifade etmektedir. Biyosensörler bu kriterlerin birçoğunu sağlamakta veya sağlamaya yönelik yüksek potansiyelleri ile biyosensörlere yönelik alt teknolojilerle birlikte hızla gelişmektedir.

1.1. Küçük Moleküller

Küçük moleküller genel olarak 3500 Da'dan daha küçük moleküller olarak tanımlanmakta olup sentetik olarak veya doğal yollarla üretilebilmektedir. Bu moleküller arasında ilaç etken maddeleri gibi faydalı moleküller yer aldığı gibi birçoğu çevre ve sağlık

açısından zararlı olan mikotoksinler, nörotoksinler, pestisitler ve polimer parçacıkları da bulunmaktadır. Bu tür zararlıların kanser, hormonal bozukluklar, üreme bozuklukları ve hatta ölüm gibi etkileri olduğu bilinmektedir (Brito ve Guthrie n.d.). Küçük moleküller yüz yıldan fazla süredir toksikoloji, farmakoloji ve klinik biyokimya alanlarında öne çıkmakta ve bir çok hastalığın sebebi (toksinler), tedavisi (ilaçlar) ve belirlenmesi (markerlar) açısından bu moleküllerin tespiti büyük önem taşımaktadır (Wishart 2012).

Küçük moleküllerde zaman zaman yaşanan artışlar nedeniyle günlük yaşamın önemli ölçüde etkilendiği, hatta ölümlerin olduğu durumlar meydana gelmektedir. Örneğin 2014 yılında, ABD'nin Ohio eyaletinde yaşanan siyanobakteri patlaması sonucunda içme suyu ve diğer su kaynakları karaciğere verdiği büyük zararlarla ve karsinojenik etkileriyle bilinen ve oldukça yüksek toksisiteye sahip mikrosistin gibi küçük molekül sınıfına giren çeşitli toksinlerle kontamine olmuş ve günlük yaşamı ciddi derecede etkilemiştir (Funari ve Testai, 2008). Otoriteler iklim değişikliği ile birlikte bu tarz olayların sıklaşma ihtimalinin üstünde durmakta, bu ve daha birçok küçük kirleticinin izlenmesinin önemini altını çizmektedirler (Battilani ve diğ. 2016; Brito ve Guthrie n.d.).

Küçük moleküller sınıfına giren bir diğer toksin olan saksitoksin, protein yapıda olmayan bilinen en toksik maddelerden biri olup deniz yosunları ve kontamine yumuşakçalar tarafından üretilmektedir. Nörotoksik etkilere, gastrointestinal sorunlara ve hafıza kaybına neden olmaktadır (Wang ve Wang 2008). Yine deniz canlıları yoluyla bulaşan tetrodotoksin, kas ve sinirlerdeki voltaj kapılı sodyum kanallarına bağlanarak solunumun ve kalbin durmasına, buna bağlı olarak da hızlı ve acılı bir ölüme sebep olur (Kondo ve Matsumoto 1996). Önceki yıllarda yalnızca Asya ülkeleri ve Japonya için tehdit oluşturmakta olan bu toksin, yükselen su sıcaklıkları nedeniyle tüm dünyaya yayılma potansiyeli taşımaktadır (Danovaro ve diğ. 2009).

Nadiren karşılaşılma ihtimali bulunan bu tip küçük molekül kontaminasyonlarının yanı sıra yiyecekler aracılığıyla günlük hayatımızın parçası haline gelen ve karşılaşılma ihtimali oldukça yüksek olan pestisit mikotoksin kontaminasyonları daha da korkutucudur. Pestisitler, vücutta metabolize edilebilir, idrarla dışarı atılabilir veya yağ dokuda birikim gösterebilir (Alewu ve Nosiri C 2011). Birçok dermatolojik, gastrointestinal, nörolojik, kanserojenik, solunum, üreme ve endokrin bozuklukları pestisit maruziyeti ile ilişkilendirilmektedir (Sanborn ve diğ. 2007; Mnif ve diğ. 2011; Semchuk ve diğ. 1992).

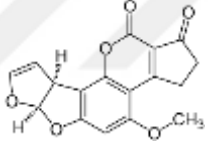
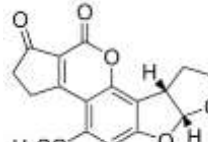
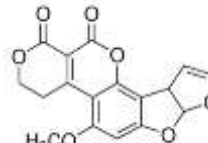
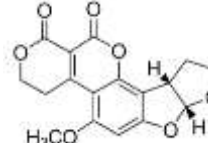
Yaygın bir şekilde karşımıza çıkan ve sağlığımızı ciddi şekilde tehdit eden bir diğer küçük molekül sınıfı mikotoksinlerdir. Çalışmalar, yiyecek ve yem olarak kullanılan tahılların %30-

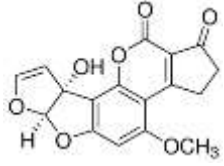
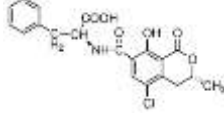
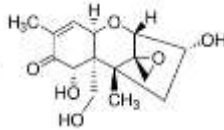
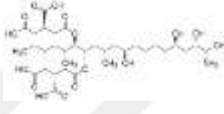
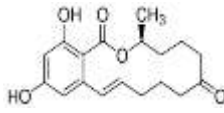
%100'unun birden çok mikototoksin ile kontamine olduğunu göstermektedir (Pinotti ve diğ. 2016; Cheli ve diğ. 2013; Zhang ve Caupert 2012). Mikotoksinlerin hayvan ve insan sağlığı üzerindeki karsinojenik, mutajenik, teratojenik, genotoksik, nefrotoksik ve immün baskılayıcı etkileri göz önünde bulundurulduğunda bu sahnenin vahameti ve bu moleküllerin etkin bir şekilde izlenerek kontamine ürünlerin tüketilmesinin önüne geçilmesinin önemi daha net bir şekilde anlaşılacaktır.

1.1.1. Mikotoksinler

Mikotoksinler, funguslar tarafından üretilen ikincil metabolitlerdir. En sık rastlanan mikotoksinler olan Aflatoksin, Okratoksin, Deoksinivalenol, Fumonisin B1 ve Zearalenon'un kimyasal yapıları, zararları ve Avrupa Komisyonu (EC) ve Türk Gıda Kodeksi tarafından belirlenen ve bu mikotoksinlerin bulunmasına izin verilen limitler Çizelge 1. 1'de gösterilmektedir.

Çizelge 1. 1. Yaygın mikotoksinler ve bu mikotoksinlerle ilgili genel bilgiler

	Yapısı	Üreten Suşlar	Zararları	Gıdalarda İzin Verilen Limitler
Aflatoksin B1 (AFB1)		<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Genotoksik, hepatoksik, karsinojenik, teratojenik,	0,1-15 ppb (EC 2006)
Aflatoksin B2 (AFB2)		<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	mutajen (Hamid ve diğ. 2013)	0,1-15 ppb (EC 2006)
Aflatoksin G1 (AFG1)		<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus flavus</i>		
Aflatoksin G2 (AFG2)		<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus flavus</i>		

Aflatoksin M1 (AFM1)		<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Genotoksik (Kumar ve diğ. 2016)	0,025-0,05 ppb (EC 2006)
Okratoksin A (OTA)		<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , ve <i>Penicillium verrucosum</i> (Bui-Klimke ve Wu 2015)	Nefrotoksik, karsinojenik (Reddy ve Bhoola 2010)	0,5-10 ppb (EC 2006)
Deoksinivalenol (DON)		<i>Fusarium graminearum</i>	İmmün baskılayıcı, genotoksik, sitotoksik (Sobrova ve diğ. 2010)	200-1750 ppb (EC 2006)
Fumonisin B1 (FUMB1)		<i>Fusarium moniliforme</i>	Karsinojenik, sitotoksik (Cortinovis ve diğ. 2014)	200-4000 (EC 2006)
Zearalenon (ZEA)		<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium roseum</i>	Hiperöstrojenik (Hueza ve diğ. 2014), hepatotoksik, hematotoksik, immunotoksik ve genotoksik (Zinedine ve diğ. 2007)	20-400 ppb (EC 2006)

Mikotoksinlerin zararlı etkileri keşfedilmeye başlandıktan sonra, 1960'ların sonlarına doğru dünya genelinde birçok ülke gıdalarda ve yemlerde bulunmasına izin verilen mikotoksin seviyelerine sınırlama getirmeye başlamış ve Çizelge 1. 1'de gösterildiği gibi, gıdalar ve yemlerde bulunmasına izin verilen üst limitler otoritelerce belirlenmiştir. Türkiye için izin verilen değerler 29 Aralık 2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde belirtilmektedir.

Yapılan tüm düzenlemelere ve izlemelere rağmen, yapılan çalışmalar piyasadaki gıda ve yemlerin birçoğunun mikotoksin pozitif olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalardan en vurucu olanlarından biri 2012 yılında Rodrigues ve Naehrer tarafından 3 yıllık survey sonucunda yayınlanan çalışmadır. Bu çalışmada 3 yıl boyunca Asya, Avrupa ve Amerika'dan toplanan 7049 yem örneğinin Aflatoksin, Okratoksin, Deoksinivalenol, Fumonisin ve Zearalenon analizleri yapılmış ve bu analizler sonucunda örneklerin %81'inin en az bir mikotoksin açısından pozitif olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmada test edilen örneklerin %48'lik kısmının birden fazla mikotoksin barındırdığı belirlenmiştir (Rodrigues ve Naehrer 2012). Bu kontaminasyonların ne kadarının izin verilen limitlerin üzerinde olduğu bilinmemektedir. Bunun yanı sıra, birden fazla mikotoksin kontaminasyonunun sağlık üzerindeki etkileri de henüz net bir şekilde belirlenmemiştir. Bu nedenle belirlenen limitlerin eş-kontaminasyon durumundaki geçerliliğine dair şu an için yeterli bilgiye sahip değiliz.

Mikotoksin miktarları ve izlemesi ile ilgili bir diğer önemli husus; mikotoksin kontaminasyonlarının gıdaların üretiminden önce, depolanması, işlenmesi, taşınması ve hatta pazarlanması sırasında oluşabileceği gerçeğidir (Darwish ve diğ. 2014). Yüksek sıcaklık ve nem gibi koşullar yiyeceklerde mikotoksin oluşumunu hızlandıran faktörlerdir. Yukarıda sayılan aşamalardan bir veya birden fazlasında bu koşullara dikkat edilmediği takdirde mikotoksin kontaminasyonunun oluşması ve/veya artması olasıdır (Bhat 1988). Bu bilgiyle birleştirdiğimizde otoritelerce belirlenen limitlerin altında mikotoksin içeren ve "güvenli" sınıfına aldığımız ürünlerin aslında bizim için risk grubundan çıkmamış olabileceğini görüyoruz. Bu ürünlerin bizim için risk grubundan çıkabilmesinin tek yolu, mikotoksin testleri ve izlemesinin olabildiğince sık ve yaygın yapılmasıdır. Bunun içinse kolay, ucuz, hassas mikotoksin analiz sistemlerinin yaygınlaşması elzemdir (Anukul ve diğ. 2013).

1.1.1.1.Aflatoksin B1

Aflatoksinler (AF), *Aspergillus* spp. tarafından üretilen ve tüketildiğinde insanlarda ve hayvanlarda akut ve kronik toksisiteye sebep olabilen ikincil metabolitlerdir (Do, Jin Hwan 2007; Quadri ve diğ. 2012). Yaklaşık 20 farklı çeşidi olan AF'lerin 5 ana çeşidi vardır. Bunlar; AF B1, B2, G1, G2 ve M1 olup AFB1'ler IARC tarafından sınıf 1 karsinojenler sınıfına alınmıştır (IARC 2012). Fındık, mısır, buğday, susam, ayçiçek, pirinç ve sorgum gibi bir çok yiyeckte bulunmakta olan AFB1'e yüksek miktarda maruziyet akut toksisiteye

sebepler olarak ölüme yol açabilmekte; kronik maruziyet ise genellikle karaciğer kanseri, kronik hepatit, hepatomegali ve siroza neden olabilmektedir (Kensler ve diğ. 2011; Robens ve Richard 1992; Shephard 2009). AFB1'in en çok çalışılan ve bilinen hepatotoksik etkisinin yanı sıra böbrek, kalp, epididimis, testis, yumurtalık ve beyin gibi bir çok organ üzerinde zararlı etkileri raporlanmıştır (Abdel-Hamid ve Firgany 2015; Abdulmajeed 2011; Agnes ve Akbarsha 2001; Ibeh ve diğ. 2000; Bahey ve diğ. 2015).

Gerek hasat aşamasında gerek sonrasında koşullara dikkat edilmemesi ve izlemenin yetersiz olması nedeniyle özellikle gelişmekte olan ülkeler için ciddi bir problemdir. Bu ülkelerde 5 milyardan fazla kişinin kontamine gıdalar nedeniyle kronik AFB1 maruziyeti olduğu tahmin edilmektedir (Lizárraga-Paulín ve diğ. 2011). Az gelişmiş ülkelerde ise kronik maruziyetin ötesinde akut maruziyet sebebiyle ölümler görülmektedir. 2004 yılında Kenya'da yaşanan AF zehirlenmesi sonucunda 125 kişinin yaşamını yitirdiği, Nepal ve Bangladeşte ise 2014 yılında 2004'te Kenya'da belirtilen miktarlarda Aflatoksin'e maruziyet vakalarıyla karşılaşıldığı bildirilmiştir (Probst ve diğ. 2007; Singh 2014).

Uluslararası kanser araştırmaları enstitüsü (International Agency for Research on Cancer, IARC) tarafından grup I insan kanserojeni olarak tanımlanan bu mikotoksin karaciğerde bulunan p450 enzimleri tarafından metabolize edilerek en zararlı metaboliti olan aflatoksin-8,9-ekso-epoksid formuna dönüştürülür (Asim ve diğ. 2011; Kamdem ve diğ. 2006; IARC 2012). Oldukça reaktif olan bu metabolit protein, RNA ve DNA'lara bağlanır. Aflatoksin-8,9-ekso-epoksidin DNA'ya bağlanmasıyla promutajenik 8,9 dihidro-8-(N7) guanil-9 hidroksi AFB1 eklentisi oluşur (Wild ve Turner 2002). Ardından, AFB1-N7-Gua AFB1-formamidopirimidin eklentisine çevrilir ve guanin>timin dönüşümüne sebep olur (Hussain ve diğ. 2007). AFB1'in bu şekilde p53 tümör baskılayıcı genine bağlanıp, üretilen proteinin 249. pozisyonunda arjinin>serin mutasyonuna sebep olarak karaciğer kanserini tetiklediği bilinmektedir (Chan ve diğ. 2003; Macé ve diğ. 1997).

Mevcut teknoloji ile günümüzde AFB1 tayini genelde laboratuvar ortamında yüksek teknoloji ürünü analitik sistemlerde (HPLC, GC vb.) kromatografik yöntemler kullanılarak yapılmaktadır.

Biyosensörlerin kullanımının yaygınlaşması; bu zahmetli sürecin kısaltılması, kullanım kolaylığı sağlaması, maliyetin düşürülmesi ve yerinde tespitin yapılabilmesi açısından yüksek avantaj potansiyeli taşımaktadır. Fakat esas olarak, tespit sistemlerinde

yaygınlaşmanın izlemeyi daha etkin hale getirerek kontaminasyonlu ürünlerin tüketimini azaltması beklenmektedir (Brito ve Guthrie n.d.).

1.1.1.2. Okratoksin A

Okratoksin A (OTA), *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* ve *P. verrucosum* tarafından üretilen bir ikincil metabolit olup tahıl, kuru meyve, şarap ve kahve gibi çok çeşitli gıda ürünlerinde bulunabilmektedir (Bui-Klimke ve Wu 2015). OTA kontaminasyonu genellikle kötü koşullarda depolama ve yanlış kurutma nedeniyle oluşmaktadır (Moss 1996). OTA'nın gıda tüketimiyle bulaşan diğer mikotoksinlerden farklı yanı proteinlere karşı yüksek afinitesi olması ve hayvanların organlarında birikmesi nedeniyle hayvan ürünlerinin tüketilmesi sonucunda da kontaminasyonun bulaşabilmesidir (Duarte ve diğ. 2012). Bu nedenle bitkisel gıdaların yanı sıra hayvansal ürünlerin de izlenmesi önemlidir. Fakat dünya genelinde bu yönde bir düzenleme bulunmamaktadır.

Hedef organı böbrek olan OTA'nın bir çok hayvanda böbrek kanserine yol açtığı bilinmektedir (Duarte ve diğ. 2011; Hagelberg ve diğ. 1989; Anon 2002). OTA'nın diğer yan etkileri içinde immünotoksisite, makromolekül sentezi inhibisyonu, lipid peroksidasyonunda artış ve mitokondriyal solunum inhibisyonu sayılabilmektedir (Genevieve S. Bondy, James J. Pestka ve Pestka 2000; Kuiper-Goodman ve Scott 1989; Marquardt ve Frohlich 1992). Ayrıca OTA, 1970'lerden beri Balkan Endemik Nefropati (BEN) ve kronik interstisyel nefropati (CIN)'in muhtemel sebeplerinden biri olarak görülmektedir (Barnes ve diğ. 1977; Sattler ve diğ. 1977; Castegnaro ve diğ. 2006; Abid ve diğ. 2003). IARC tarafından Grup 2B muhtemel insan karsinojenleri listesine alınmıştır (IARC 1993).

OTA'nın tespitinde yaygın olarak tıpkı AF'lerde olduğu gibi HPLC, LC/MS ve LC/MS-MS yöntemleri kullanılmaktadır. OTA tespit yöntemlerinin kolaylaşması ve yaygınlaşması ile şu an regülasyonlarla takip edilmeyen hayvansal gıdalarda OTA kontaminasyonunun da takip edilebileceği ve OTA maruziyetinin azaltılabileceği düşünülmektedir.

1.1.2. Küçük Moleküllerin İzleminde Kullanılan Yöntemler

Küçük moleküllerin hassas ve kantitatif tespiti özellikle biyomedikal, gıda ve çevre alanları için önemli bir hedeftir. Biyomedikal analizlerde steroid, tiroid hormonları hastalığa özgü peptidler diagnostik markerler olarak kullanılmaktadır. Öte yandan,

özellikle gelişmekte olan ülkelerde pestisitlerin bilinçsiz kullanımı, çevre kirliliği ve gıdaların mikotoksinlerin oluşumuna meydan veren koşullarda üretilmesi ve saklanması nedeniyle küçük moleküllerin izlenmesi hayati önem taşımaktadır(Dong ve diğ. 2012).

Küçük moleküllerin tespitinde uzun yıllardır kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler oldukça hassas tespit sağladığı için rutin analizlerde sıkça kullanılıyor olmasına rağmen kullanımları sırasında aşağıda belirtilen sorunlarla karşılaşmaktadır:

1. Ekstraksiyon ve ön temizleme işlemleri nedeniyle oldukça zaman alıcıdır,
2. Maliyeti yüksektir,
3. Eğitilmiş kullanıcı gerektirmektedir (Dong ve diğ. 2012).

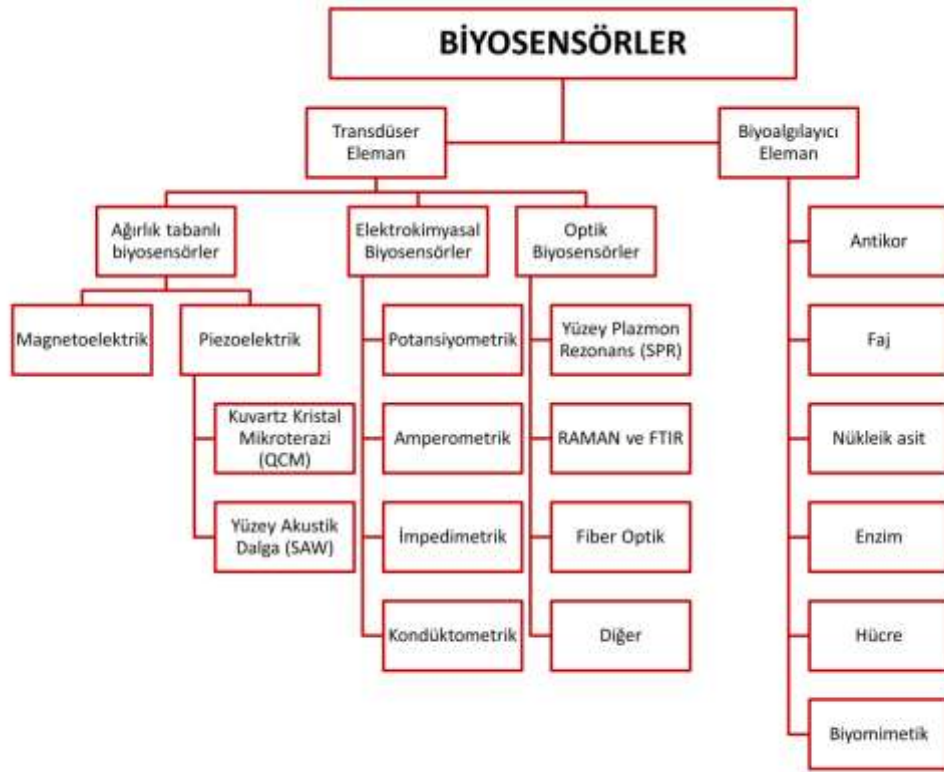
Bu dezavantajların yanı sıra HPLC, LC/MS, LC/MS-MS, GC gibi kromatografi cihazları oldukça büyük ve laboratuvara bağımlı cihazlar olduklarından bu yöntemlerin alanda tarama için kullanılması imkansızdır. Bu nedenle bir örneğin analizinin yapılabilmesi için gereken toplam süre uzamakta ve mikotoksin izleme süreci hantallaşmaktadır. Bu durum özellikle küçük üretici ile başlayan gıda tedarik zincirlerinde kontrolü imkansız hale getirmekte ve parça parça tedarik edilen gıda porsiyonlarının tüm stoğu kontamine etmesi riskini artırmaktadır. Alanda kullanılacak tanı testleri ise ürün tedarigi esnasında küçük porsiyonların anında taramasının yapılmasını mümkün kılarak gıda tedariginde stok kontaminasyonu riskini elimine etme potansiyeline sahiptir.

Küçük moleküllerin tespitinde kromatografik yöntemler dışında ELISA, EIA ve RIA gibi immunoassayler de kullanılmaktadır. Bu tür immunolojik analizler kromatografik yöntemlere göre daha ucuz ve kolay olmasına rağmen akışsız ortamda düşük konsantrasyonlardaki analitlerin yüksek hassasiyetle belirlenebilmesi için uzun inkübasyon sürelerine ihtiyaç duyulması ve bu yöntemlerin birçok adım içermesi nedeniyle alanda taramada rahatlıkla kullanılamamaktadır. Bu nedenle yüksek hassasiyet ve doğruluk ile kısa sürede alanda taramaya olanak sağlayabilecek tanı sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyacı karşılamak adına son 50 yıldır biyosensörler alanında çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan biyosensör çalışmalarında yüksek hassasiyet ve özgünlükleri nedeniyle immünosensörler öne çıkmaktadır. İmmünosensörler ve temel immünoassay yöntemlerinden “1.2.1.1. Biyosensörlerde Algılayıcı Molekül Olarak Antikorlar” bölümünde detaylı biçimde bahsedilecektir.

1.2. Biyosensörler

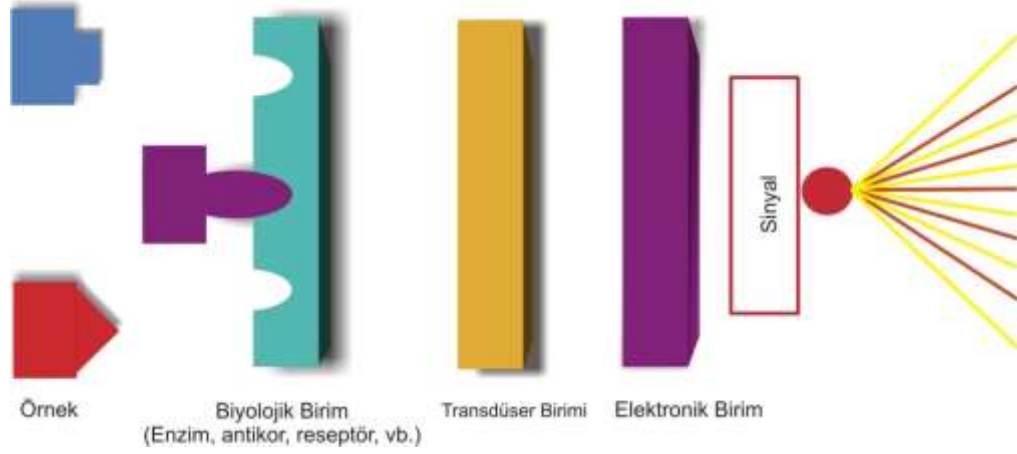
Son 50 yıldır biyosensör kavramı hayatımızda yer almasına rağmen geliştirilen birçok biyosensör hala zararlıların rutin tespitinde kullanılamamaktadır (Bhalla ve diğ. 2016; Heineman ve Jensen 2006). Biyosensörlerin tespit hassasiyetlerinin yerleşik donanımlar ile rekabet edememesi, bu cihazların aynı kesinlik ve doğruluğu sağlayamaması olarak gösterilmektedir. Gerçekte doğruluk, hassasiyet, yerinde ve kolay kullanımı, geniş alanlara uygulanabilirlik, düşük maliyet ve çoklu tanı imkânları ile yüksek potansiyel vadeden biyosensör teknolojilerinin multidisipliner olması ve alt teknolojilerin de gelişime açık olması bu alanda gelişiminin sürmesine neden olmaktadır. Özellikle “label free” (işaretsiz analiz) imkanlarına dair yüksek potansiyele sahip biyosensör teknolojileri kapsamında bilimsel ve teknolojik araştırmaların sürmesine neden olmaktadır (Kim ve diğ. 2017). Bu tez çalışmasının da içinde bulunduğu biyosensörlerde hassasiyet geliştirme çalışmaları ile, laboratuvar bazlı yerleşik donanımların yerini biyosensörlerin almasına ve biyosensörlerin yaygınlaşarak zararlıların daha yaygın bir şekilde izlenmesine katkıda bulunulması hedeflenmektedir.

Biyosensörler; izole enzim, antikor, doku, organel, nükleik asit ve hatta tüm hücre gibi biyolojik materyaller aracılığıyla meydana gelen biyolojik süreçler sonucunda oluşan fiziksel ya da kimyasal değişikliklerin fizikokimyasal bir transdüser ile tespitinde kullanılan analitik cihazlardır (Mehrotra 2016). Transdüser ve biyoalgılayıcı elemanların çeşitliliği ele alındığında birçok farklı biyosensör çeşidi bulunmaktadır (Çizim 1. 1) (Malhotra ve diğ. 2017).



Çizim 1. 1. Transdüser ve biyoalgılayıcı elemanlara göre biyosensör çeşitleri Malhotra, Verma, Tyagi, ve Kumar, (2017)'den uyarlanmıştır.

Biyosensörler Algılama Birimi (Biyolojik Birim), Transdüser (algılama sonucu ortaya çıkan etkiyi sinyale çevirici) Birimi ve Elektronik Birim olmak üzere temelde 3 birimden oluşmaktadır (Çizim 1. 2) (Malhotra ve diğ. 2017). Seçici ve kararlı olması son derece önemli olan algılama birimi, ortamda bulunan ve algılanmak istenilen madde ile etkileşerek gerekli sinyalin oluşmasına neden olan birim olarak tanımlanır. Kullanılan bu algılama birimleri arasında antikorlar sağladıkları yüksek özgünlük, hassasiyet, ölçülebilirlik potansiyeller ile tanı sistemlerinde en çok tercih edilen algılayıcı moleküllerdir (Byrne ve diğ. 2009). Spesifik antijen-antikor etkileşiminden faydalanılarak oluşan değişikliklerin izlendiği biyosensörler immunosensörler olarak adlandırılırlar (Luppa ve diğ. 2001).



Çizim 1. 2. Biyosensörlerin temel birimleri

1.2.1. Algılama Birimleri

Biyosensörler kullanılan spesifik algılayıcı molekülüne göre enzimlerin kullanıldığı enzim biyosensörleri, antikorların kullanıldığı immünosensörler, hücrelerin kullanıldığı hücresel sensörler ve aptamerler, DNA, RNA veya PNA'ların kullanıldığı genosensörler olarak sınıflandırılabilir.

Enzim biyosensörleri: Enzimlerin hedef moleküllerine karşı afinite, seçicilik ve katalitik aktivitelerinden faydalanılarak, enzim-substrat/inhibitör/koenzim/kofaktör ilişkisindeki değişimlerin transdüser tarafından ölçüldüğü biyosensörlerdir (Rocchitta ve diğ. 2016).

Hücresel biyosensörler: Ölçülmesi hedeflenen örneğin, algılayıcı olarak kullanılan hücrenin morfolojik yapısında veya hücresel aktivitesinde yarattığı değişimlerin transdüser aracılığıyla sinyale çevrilerek ölçüldüğü biyosensörlerdir (Bousse 1996; Liu ve diğ. 2014; Gui ve diğ. 2017).

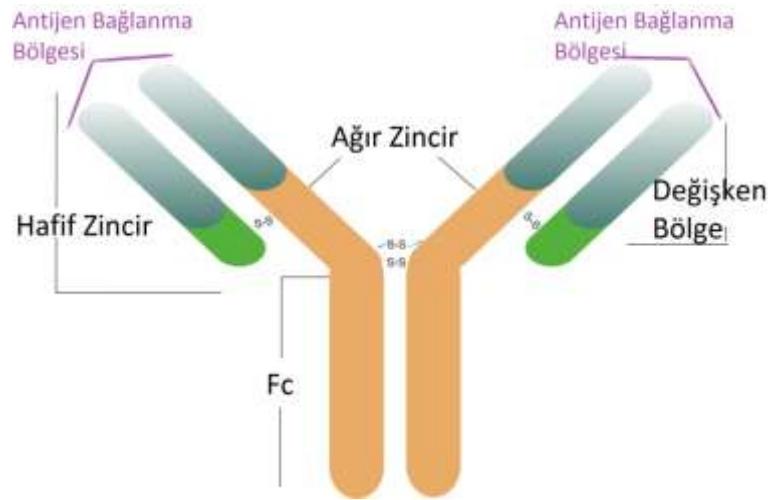
Genosensörler: Nükleik asitlerin sabitlendiği transdüserlerde, biyolojik moleküllerin eşleşen, uygun dizilerinin varlığının saptandığı biyosensörlerdir. Algılayıcı element olarak DNA, RNA, PNA veya LNA kullanılabilir (Manzanares-Palenzuela ve diğ. 2015; Aoki ve Tao 2005).

İmmüno-biyosensörler: Antikorların örnekte aranan antijene bağlanması sonucunda oluşan sinyal değişiminin transdüser aracılığıyla ölçüldüğü biosensörlerdir (Luppa ve diğ. 2001). Bu tez çalışması kapsamında anti-Aflatoksin ve anti-Okratoksin A antikorları kullanılarak immüno-biyosensörler geliştirilmiştir.

1.2.1.1. Biyosensörlerde algılayıcı molekül olarak antikorlar

Biyosensörlerde Antijen-antikor, enzim-substrat, reseptör-ligand gibi afiniteye bağlı tasarımlar sıklıkla kullanılmaktadır. Diğer afinite temelli biyokomplekslere göre antijen-antikor kompleksleri yüksek özgünlük, afinite, stabilite ve seçicilikleri nedeniyle avantajlıdır (Sharma ve diğ. 2016). İmmün test sistemleri bu özelliklerinden dolayı tıp, tarım, çevresel analiz ve biyokimyasal çalışmalarda yaygın biçimde kullanılmaktadır. 2016 yılı itibariyle antikorların kullanıldığı immunoassaylerin küresel pazarı 17,2 milyar \$, biyosensörlerin küresel pazarı 15,6 milyar \$ olarak belirtilmektedir. 2021 itibariyle bu pazarın immunoassayler için 25,2 milyar \$'a, biyosensörler için 27,2 milyar \$'a ulaşması beklenmektedir (Markets and Markets 2016).

Antijene maruz kalan organizmaların B ve plazma hücreleri tarafından doğal tepki olarak üretilen antikorlar (İmmüoglobulin-Ig), özel bir antijene özgün olarak bağlanır. Tipik bir Ig (IgG; MW: 150 kD), ağır (H) ve hafif (L) olmak üzere 2 çift polipeptit zincirden oluşmaktadır. Farklı antijenler için değişken olabilen iki Fab (antigen bağlama bölgesi) ve immün sistemin efektör moleküllerinin bağlanmasını sağlayan bir Fc (kristalize olan sabit bölge)'den oluşur. Fab kısmı değişken ağır (V_H) ve hafif (V_L) zincir içerir ve Fc'ye bağlıdır (Çizim 1. 3) (Schroeder ve diğ. 2010).



Çizim 1. 3. Tipik bir antikorun yapısı.

In vitro koşullarda da üretilen antikorlar, antijenlerine yapılarını bozmadan bağlanarak *in vitro* ve *in vivo* tanı sistemlerinde, korunma ve tedavide başarılı bir şekilde kullanılabilirler.

150 -900 kDa arasında molekül ağırlığına sahip antikorlar çözünür yapıda protein molekülleridir. Antijenler ile elektrostatik güçler aracılığıyla bağ kurarak immün-kompleks

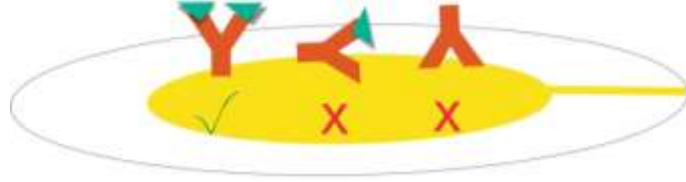
yapılar oluştururlar. Antijen (epitop) ve antikor arasındaki kompleks oluşumunu birkaç tip çekici kuvvet yönetir. Bunlar; Hidrojen bağları, iyon-dipol bağları ve Van der Waals bağlarıdır. Hidrojen bağları ve iyon-dipol bağları zıt yüklenmiş atomların varlığını gerektirir (Reverberi ve Reverberi 2007). Van der Waals bağları bu bağlar arasında en zayıfı olmakla birlikte her tür molekülü çekebilmektedir. Stabil bir antijen-antikor bağlanması için birden fazla gücün aynı anda etkin olması gerekmektedir.

*Antikor afinitesi:*Antikorum antijene bağlanma afinitesi çekici ve itici kuvvetler arasındaki denge tarafından belirlenir (Reverberi ve Reverberi 2007). Yüksek afiniteli antikorlar yüksek uygunluğu ve yüksek bağlanma gücünü, düşük afiniteli antikorlar ise düşük uygunluğu ve düşük bağlanma gücünü tanımlar. Antijen-antikor reaksiyonları tersinirdir ve denge sabiti K olarak ifade edilir (K_a : Afinite sabiti). K_a oranı, 10^4 - 10^{12} litre/mol arasında olan antikorlar yüksek afiniteli, $K_a < 10^4$ litre/mol olanlar ise düşük afiniteli antikorlar olarak kabul edilir.

*Antikor Aviditesi:*Avidite, epitop ile antikor moleküllerinin yaklaşma bölgeleri arasındaki bağlanma gücüdür. Antijen ve antikor arasındaki çoklu bağlanma (avidite veya işlevsel afinite, basit monovalent bağlanmaya karşılık stabilitede önemli düzeyde artış sağlamaktadır. IgM tipi antikorlara 5 antijen bağlanabilir ve yüksek avidite sağlarlar. Ayrıca yapılan çalışmalar, rekombinant yollarla antikorların üzerindeki antijen tanıma bölgelerinin çoklanarak aviditenin artırılmasının mümkün olduğunu göstermiştir (Ito ve Kurosawas 1993; a. Goel ve diğ. 2000).

Antikorların algılayıcı molekül olarak kullanıldığı immünobiyosensörlerden etkin bir sonucun alınabilmesi için, sensor yüzeyine antikor veya antijen immobilizasyonunun yüksek verimlilikle yapılabilmesi gerekmektedir.

Analitlerin biyosensörler ile tespitinde kullanılan antikorların IgG tipi olması halinde sadece iki tanıma bölgesi olan IgG'lerin yüzeye bağlanırken yönlendirilmeleri çok önemlidir (Trilling ve diğ. 2013). Bunun nedeni, antijen bağlama bölgeleri yüzeye gelecek şekilde yapılan immobilizasyonlarda aktif bağlanma bölgelerin kapanması ve antikorum yüzeyde yer işgal ettiği halde işlevsiz hale gelmesidir (Çizim 1. 4). İşlevsiz antikorların yüzeyde bulunması tanıma yüzeyinin etkin olmayan bir şekilde kullanılması sonucunu doğuracak ve sensör hassasiyetini düşürecektir. Bu nedenle antikorum antijen tanıma bölgeleri açıkta kalacak şekilde immobilize edilmesi, yani antikorum yönlendirilerek immobilizasyonu önemlidir.



Çizim 1. 4. Katı yüzeye immobilizasyonda Fc bölgesi aracılığıyla yüzeye immobilize edilen antikorların antijen bağlama bölgesi kapanmayacağından bu yolla yüzeye immobilize edilen antikorların antijen bağlama etkinliği daha yüksektir.

İmmobilizasyonda kovalent olmayan, semi-kovalent ve kovalent bağlama yöntemleri kullanılabilir. Kovalent olmayan yönlendirme çalışmaları arasında Protein A/G ile immobilizasyon en sık ve en etkin kullanılanıdır ve Staphylococcus aureus tarafından üretilen Protein A ve Streptococcus tarafından üretilen Protein G'nin antikorun Fc bölgesine bağlanarak antikorun aktif bağlama bölgelerinin açıkta bırakılması prensibine dayanmaktadır (Y. Yuan ve diğ. 2009; Podlaski ve Stern 2000).

Semi-kovalent bağlanma, bağlanma enerjisinin kovalent ve kovalent olmayan bağlanma arasında olduğu görece güçlü ve stabil bağlanmalar olarak tanımlanmaktadır (Thangaraj ve diğ. 2017). Semi-kovalent bağlama yöntemleri arasında altın-thiol bağlanması gösterilebilir. Bu şekilde altın yüzeye kendiliğinden oluşan tek katman (SAM, ing. Self Assembled Monolayer) bağlanmasını sağlamak mümkündür. Böylelikle altın sensör yüzeyleri kovalent bağlanmalar için fonksiyonelleştirilebilmektedir (Welch ve diğ. 2017; Le ve diğ. 2011). Altın-thiol bağlanması ile antikorların yönlendirilerek immobilizasyonu da mümkündür. Bunun için antikorlar öncelikle düşük konsantrasyonda DTT (dithiothreitol) veya MEA (mercaptoethylamine) ile indirgenerek -SH grupları açığa çıkarılır ve açığa çıkan -SH grupları aracılığıyla altın yüzeye yönlendirilmiş antikor immobilizasyonu sağlanır (Wang, Mei, Wang, ve Tang, 2017; Öztürk ve Pirinççi, 2017).

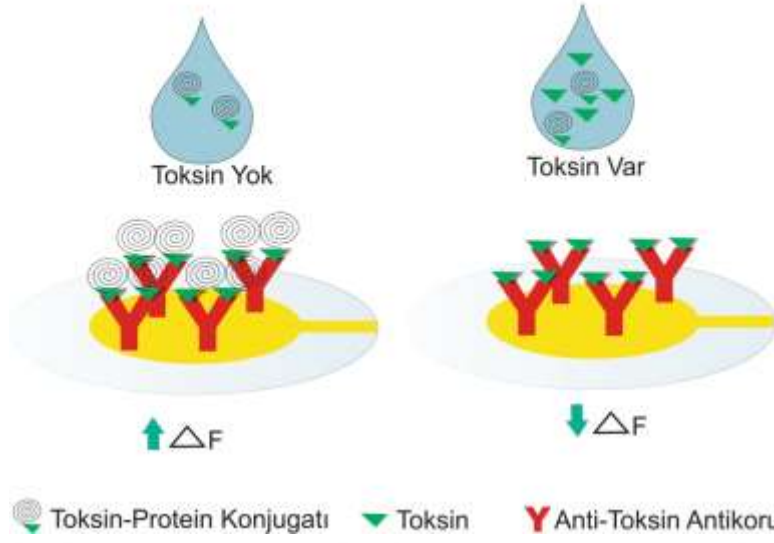
Antikorların sensör yüzeylerine kovalent bağlanması amin, karboksil veya karbonhidrat grupları aracılığıyla yapılabilmektedir. Amin ve karboksil grupları antikorun her yerinde olduğundan bu gruplar aracılığıyla yapılan kovalent immobilizasyonlarda antikorun yönlendirilmesi söz konusu değildir. Fakat karbonhidrat grupları antikorun Fc bölgesinde yoğun bir şekilde bulunduğundan bu grupların periodat oksidasyonu ile yapılan immobilizasyonlarla antikorun yönlendirilmesi mümkündür (Welch ve diğ. 2017).

İmmünoensörlerin dayandığı temel immunoassay yöntemlerinden direkt ve sandviç immunoassayler küçük analitlerin tespitinde kullanılamamaktadır. Direkt immunoassaylerin biyosensörlerde kullanımı genelde biyosensörün tipine göre tespit

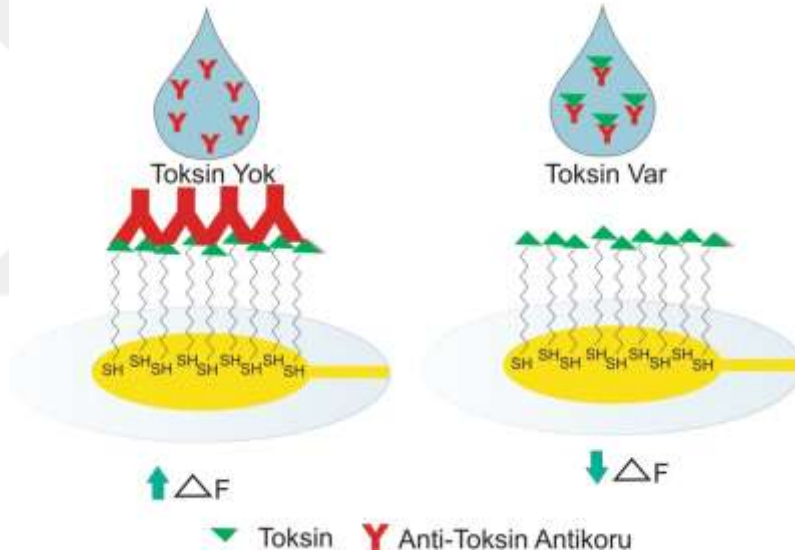
edilmek istenen değişikliği doğrudan yaratabilecek bir analitin, tabana immobilize edilmiş antikorla etkileşerek ölçülmesi şeklindedir. Örneğin Quartz Crystal Microbalance (QCM) gibi ağırlık ölçümüne dayalı bir sensör sisteminde protein, hücre gibi yüksek molekül ağırlıklı bir analitin doğrudan tabana bağlı antikor ile etkileşmesi tespit edilebilir bir ağırlık değişimi sağlayacaktır. Sandviç tipi immunoassayler ise en az iki epitopu bulunan ve aynı anda iki antikora birden bağlanabilen moleküllerin tespitinde kullanılabilir (Cox 2012).

Küçük moleküllerin tespiti için en uygun immunoassay yöntemi yarışmalı immunoassaylerdir. Yarışmalı immunoassayler, antijenin tabana immobilize edildiği durumlarda antikor veya işaretli antikor ile örnek içindeki serbest analitin yarışımı prensibine dayanmaktadır. Örnek içinde analit yoksa antikor tabandaki antijene bağlanarak sinyal alınabilmekte, örnek içinde analit varsa antikora bağlanarak, analit miktarı oranında antikoru bloke edeceği için tabana daha az antikorun bağlanmasını sağlayarak sinyalde düşüşe neden olmaktadır. Tabana antikor immobilize edildiği durumlarda ise işaretli antijen ve işaretli antijenin bulunduğu karışım sensör yüzeyine uygulanarak elde edilen sinyal belirlenmektedir (Cox 2012). Örnekte aranan analit yoksa işaretli analit tabandaki antikora bağlanarak sinyal vermektedir. Örnekte aranan analitin olduğu durumda tabandaki antikora bağlanarak işaretli antijenin bağlanmasını engellemekte ve elde edilen sinyalde düşüş gözlemlenmektedir (Çizim 1. 5). Bu tez çalışmasında, tespit edilecek analitlerin ağırlığının düşük olması sebebiyle yarışmalı immunoassay formatı kullanılmıştır.

A. ANTİKOR İMMOBİLİZE YARIŞIMLI SİSTEM



B. ANTİJEN İMMOBİLİZE YARIŞIMLI SİSTEM



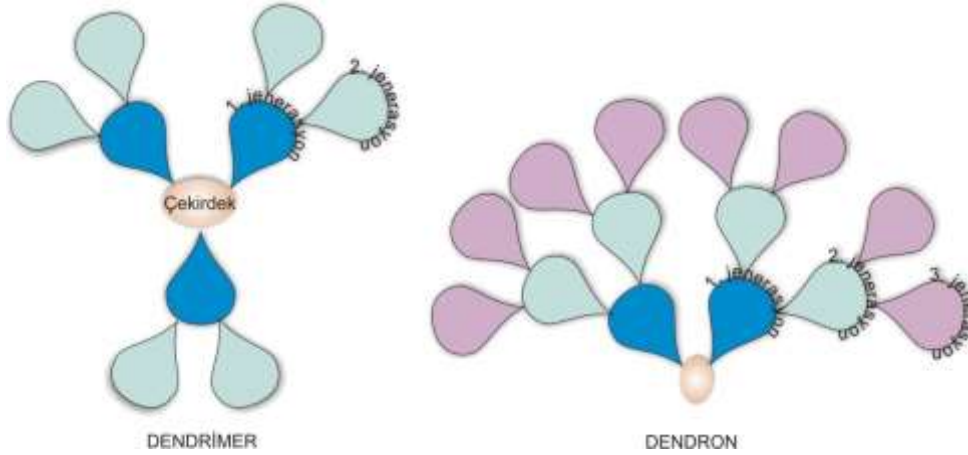
Çizim 1. 5. QCM sisteminde yarışimli immunoassaylerin kullanılması. A. Antikör immobilize yarışimli sistem, B. Antijen immobilize yarışimli sistem

Küçük moleküllerin immunoassaylerle tespitinde kullanılan yarışimli immunoassay sistemleri ölçüm hassasiyetinin düşmesine neden olmaktadır (Giraudi ve diğ. 1999). Bu nedenle araştırmacılar küçük moleküllerin immunoassaylerle tespitine yönelik hassasiyet geliştirmek amacıyla farklı stratejiler geliştirmektedir. Bu stratejiler kapsamında yarışimsız immunoassay sistemleri geliştirilmesi (Giraudi ve diğ. 1999; Self ve diğ. 1994; Eremenko ve diğ. 1998; Pradelles ve diğ. 1994; Omi ve diğ. 2015) çalışmaları yapılmış olmasına rağmen sadece belirli kimyasal yapıdaki antijenler için kullanılabilmesi, çok fazla adım içermesi veya antimetatip antikörlarının geliştirilmesi gerekliliği oluşturması nedeniyle verimli bir şekilde uygulamaya aktarılamamıştır. Yarışimli immunoassay sistemlerin

uygulandığı moleküler büyüklüğe dayalı yöntemler kapsamında hassasiyet geliştirmeye yönelik çalışmalar antikorun veya antijenin nanopartiküllerle ağırlaştırılması çerçevesinde yoğunlaşmaktadır (Mitchell 2010; Cao ve diğ. 2017; Ding ve diğ. 2014; Lyu ve diğ. 2008; Xia ve diğ. 2008). Fakat kullanılan nanopartiküllerin yapılarının dinamik olmaması sebebi ile kullanılan nanopartiküllerin hassasiyet geliştirmeye katkısı ağırlık artışıyla orantılı ve sınırlı kalmaktadır. Yapılan çalışmada dinamik olmayan nanopartiküller yerine dinamik bir konjugasyon platformu olan dendronlar kullanılmıştır. Bu sayede birden fazla antikorun konjugasyonu sağlanmış ve bu yolla ağırlık artışı sağlayabilecek bir platform oluşturulmuş, oluşan dinamik yapı sayesinde aynı zamanda antikorun valensisi artırılarak K_D değeri düşürülmüş ve bağlanma kuvveti artırılmıştır.

1.2.1.2. Dendronlar

Yunanca'da "ağaç" anlamına gelen dendron kelimesi; kimyada nanoboyutlarda, üç boyutlu, dallı, makromoleküler polimerik yapıları tanımlar (Love ve diğ. 2006). Bu dallı yapılar, dendrimerlerle benzerlik göstermesine rağmen çekirdek fonksiyonel grubun sabit kalarak uç fonksiyonel grupların her bir jenerasyonda 2^n 'nin kuvvetleri şeklinde artması yönüyle farklıdır. Örneğin 5. jenerasyon bir dendronun $2^5=32$ tane uç fonksiyonel grubu olacaktır. Dendrimerlerde ise bu sayı değişiklik gösterebilmektedir. Dendrimerler ve dendronlar arasındaki farklar Çizim 1. 6'da gösterilmektedir.



Çizim 1. 6. Dendrimer ve dendronların şematik gösterimi

Günümüzde dendrimer ve dendromerlerin birçok medikal ve pratik uygulaması bulunmaktadır. İlaç taşınması, gen taşınması, sensör uygulamaları, manyetik rezonans görüntüleme, çözünürlüğün artırılması, kaplama, fotodinamik terapi ve yanık tedavisi için başarıyla kullanılmaktadır (Abbasi ve diğ. 2014).

Dendronların sensör uygulamalarında kullanımı daha çok immobilizasyon yüzey alanının artırılması ve fonksiyonelleştirilmesi yönündedir (Montañez ve diğ. 2011; Soler ve diğ. 2015; Satija ve diğ. 2011).

Bu çalışmada, zararlı küçük moleküllerin en tehlikelilerinden olan Aflatoksin B1 ve OTA'nın tespiti ve Aflatoksin B1'in biyosensörlerle tespitinde hassasiyet geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Böylelikle zararlı küçük moleküllerin izlemesinin daha etkin yapılabilmesi ve belki de bizim için risk grubundan çıkarılmasına katkıda bulunulması hedeflenmektedir.

1.2.2. Transdüserler

Algılayıcı birim ve ölçülmesi hedeflenen analitin etkileşimi sonucunda ortaya çıkan değişimin ölçülmesi ve fiziksel bir veriye dönüştürülmesi gerekmektedir. Analit ve algılayıcı arasındaki etkileşimin doğasına göre, bu değişimi fiziksel sinyale çeviren aygıtlara transdüser denmektedir. Sensör tasarımında kullanılan transdüser, algılayıcı molekül ve analitin doğasına göre değişiklik göstermektedir. Transdüserin dönüştürdüğü cevap, kalorimetrik, potansiyometrik, amperometrik, optik veya piezoelektrik gibi sistemler ile ölçülür (Rasooly ve Herold 2006; Lowe 1989). Bu sistemler;

1. Reaksiyon sonucunda oluşan ısı değişimini ölçen Kalorimetrik biyosensörler,
2. Yük dağılımındaki değişimlerin sebep olduğu elektriksel potansiyeli ölçen Potansiyometrik biyosensörler,
3. Reaksiyon sonucunda elektronların hareketinde oluşan değişimi ölçen Amperometrik biyosensörler,
4. Reaksiyon sonucunda oluşan renk veya optik özelliklerin değişimini ölçen Optik biyosensörler,
5. Reaksiyon sonucunda oluşan kütle değişimini ölçen Piezoelektrik biyosensörler olarak sınıflandırılabilirler.

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan piezoelektrik biyosensörlerin diğer sensör cihazlarına üstünlükleri arasında;

1. Gerçek zamanlı takip yapılabilmesi,
2. Materyallerin optik özelliklerinden faydalanılmadığı için çok çeşitli yüzeyler ve temizlenmemiş örneklerle çalışılabilmesi,

3. Düşük maliyetli olması,
4. Reseptörün yakınlığından ziyade gerçek bağlanmanın ölçülmesi ve
5. Elde edilen sinyalin kolayca işlenebilmesi sayılabilir.

Anlatılan avantajlarından ötürü bu tez çalışması kapsamında birer piezoelektrik biyosensör olan Kuartz Kristal Mikroterazi (QCM) ve Love-dalga sensör cihazları kullanılmıştır.

1.2.3. Piezoelektrik Biyosensörler

Anizotropik materyaller mekanik olarak sıkıştırıldıklarında elektrik dipolü oluştururlar. Bu elektrik dipolü piezoelektrisite, bu etkinin görülebildiği materyaller ise piezoelektrik materyaller olarak da adlandırılır. Piezoelektrik etkinin gözlemlendiği anizotropik materyaller arasında alüminyum fosfat, alüminyum nitrit, kuartz, çinko oksid, galyum ortofosfat gibi inorganik materyaller ve Rochelle tuzu, Poliviniliden florür, poliamid ve polilaktik asit gibi organik moleküllerin yanı sıra bazı protein yapıda iyon kanalları, kolajen ve selüloz gibi biyomoleküller de bulunmaktadır (Zu ve diğ. 2016; Hees ve diğ. 2013; Bagriantsev ve diğ. 2014; Fukada ve diğ. 1976). Ucuz ve yaygın olması, 5-300 MHz arasında farklı frekanslarda çalışma olanağı sağlaması, elektriksel, mekanik, kimyasal özellikleri ve stabil olmaları nedeniyle inorganik piezoelektrik materyallerden olan kuartz kristaller piezoelektrik biyosensörlerde en çok tercih edilen kristallerden biridir (Bunde ve diğ. 1998; Kurosawa ve diğ. 2003).

Piezoelektrik materyallere uygulanan mekanik kuvvetin elektrik dipolü oluşturması durumunun tersi de geçerlidir. Bu kristallere gerilim uygulandığında ters piezoelektrik etki ile belirli bir frekansta rezonans oluştururlar. Sensör yüzeyine bağlanan analitler, ağırlıkları nedeniyle kuartz kristalin rezonans frekansını değiştirdikleri için kristale bağlı frekans okuyucu tarafından algılanabilirler (Hauck ve diğ. 2002; Kurosawa ve diğ. 2003). Kuartz kristal yüzeyinde oluşan ağırlık değişiminin frekansa etkisi Sauerbrey denklemi ile gösterilmektedir.

Denklem 1. Sauerbrey Denklemi

$$\Delta F = \frac{-2F_o^2 \Delta m}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} = -2.3 \times 10^6 F_o^2 \frac{\Delta m}{A}$$

Denklemden yer alan parametrelerden F_o frekansı (Hertz), A piezoelektriksel aktif alanı (cm^2), ρ_q yoğunluğu (0.648 g/cm^3), μ_q kesim katsayısını ($2.947 \times 10^{11} \text{ g/cm} \times \text{s}^2$), m ise

ağırlığı (g) göstermektedir. Denklem 1’de de görüldüğü üzere, frekans değişimi ile ağırlık değişimi birbirleri ile doğru orantılıdır.

Piezoelektrik biyosensörlerde osilasyonun gerçekleştiği kristallerde akustik dalgalar oluşur. Akustik ölçüm elementlerinde faydalanan akustik dalgalar bulk akustik dalga (BAW) ve yüzey akustik dalga (SAW) olarak ikiye ayrılabilir (Voinova 2015; Bunde ve diğ. 1998). Bu tez çalışması kapsamında BAW’ı kullanarak ölçüm yapan QCM ve SAW’ı kullanarak ölçüm yapan Love-wave sensör cihazları kullanılmıştır.

1.2.3.1. Kuartz kristal mikroterazi (QCM)

QCM, kuartz kristalinin karşılıklı yüzlerinde bulunan elektrodlar aracılığıyla uygulanan voltaj sonucunda elde edilen osilasyona bağlı oluşan Bulk akustik dalganın (BAW) kullanılarak ağırlığa bağlı değişimlerin gözlemlendiği biyosensör cihazlarıdır. Transdüser olarak kullanılan kuartz kristallerin çok farklı kesim çeşitleri olmakla birlikte (BT, CT, DT, ET, FT, GT, IT, SC, XY ...) genellikle AT kesim kristaller kullanılmaktadır (Bunde ve diğ. 1998) (Çizim 1. 7). AT kesim kristallerin kullanılmasının ana nedeni zamana, sıcaklığa ve çevresel faktörlere göre frekans stabilitesinin görece yüksek olması ve yüksek kalite (Q) faktörüdür (Goyal 2006). Q faktörü, sistemin rezonanstaki kayıpları olarak tanımlanmakta olup depolanan enerji ve dağılan enerji arasındaki orandır. Q faktörü sıvılarda genelde 1000-3000 aralığında olup bu değer havada 100.000’e kadar çıkabilmektedir (Kasper ve diğ. 2016). Sıvılarda Q faktöründeki büyük kayıp nedeniyle QCM’in sıvılarda kullanımı gazlarda kullanımına kıyasla daha zordur (García-Martinez ve diğ. 2011).

0,5 ile 300 MHz arasında çalışma olanağı sağlayan QCM kristalleri ile yapılan ölçümlerde, daha yüksek frekanslarda çalışıldığında ölçüm hassasiyetinin arttığı görülmektedir (Kurosawa ve diğ. 2003). Fakat daha yüksek çalışma frekansı her zaman daha yüksek hassasiyet anlamına gelmemektedir. QCM’ler ile yüksek frekanslarda çalışmanın temel sınırlayıcısı frekans gürültüsüdür. Bunun nedeni, frekans gürültüsünün ölçüm çözünürlüğünü azaltarak hassasiyette beklenen artışa ulaşmanın önüne geçmesidir (Rodríguez-Pardo ve diğ. 2005; Montagut ve diğ. 2011).

QCM’lerde çalışma frekansını kullanılan kristalin inceliği belirler. Kristalin kalınlığı ve rezonans frekansı arasındaki ilişki denklem Denklem 2’de görülmektedir.

Denklem 2. Bir kuartz kristale AC alanı uygulandığında kristalin rezonans frekansı kuartz kristalin ρ_q ile gösterilen yoğunluğu (0.648 g/cm^3), μ_q ile gösterilen kesim katsayısı ($2.947 \times 10^{11} \text{ g/cm} \times \text{s}^2$) ve t_q ile gösterilen kalınlığına bağlıdır.

$$F_0 = \frac{\sqrt{\mu_q / \rho_q}}{2t_q}$$

Yüksek frekanslarda ve daha ince kristallerle çalışmanın zorluklarından biri, çok ince kristallerin işlem sırasında kırılma riskinin yüksek olmasıdır. Bazı kristal üreticileri bu sorunu aşmak için kristali koruyucu bir polimerin içine yerleştirmiş ve ölçüm hücrelerini koruyucu içine yerleştirilmiş kristaller ile ölçüm yapacak şekilde dizayn etmişlerdir. Bu yolla ince kristallerle çalışmanın zorluklarını aşabilmişlerdir.

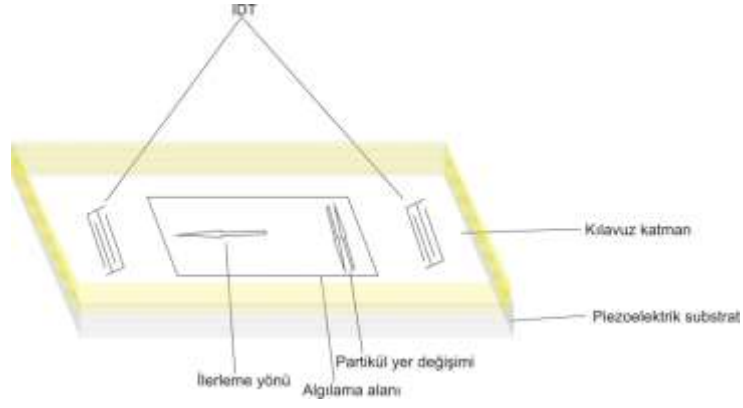


Çizim 1. 7. AT kesim bir QCM kristalinin önden ve arkadan görünüşleri (<http://products.inficon.com/en-us/product/detail/p-researchcrystals/>'den alıntılanmıştır).

1.2.3.2. Love wave sensörler

Love Wave (LW) sensörlerin de mensubu olduğu yüzey akustik dalga (SAW, surface acoustic wave) cihazları, mekanik akustik dalganın piezoelektrik kristalin yüzeyinde ilerlemesi ve yüzeyde oluşan değişikliklerin bu dalganın hızı ve şiddetine etkisinin ölçülmesi prensibine göre çalışmaktadır (Gronewold 2007). Bir Love Wave sensörünün temel yapısı Çizim 1. 8'de gösterilmektedir.

Bir LW ölçümünde, inter dijital transdüserlerde (IDT) çevrilen elektrik sinyali sonucunda oluşan polarize enine dalga, substratın piezoelektrik özelliklerinden dolayı sensör yüzeyinde ilerler (Martin ve diğ. 2004). Dalganın ilerlemesi bağımsız bir kılavuz katmana kısıtlı olduğundan akustik enerji piezoelektrik kristalin dağılmak yerine kılavuz katmanda yoğunlaşmış olur. Bu nedenle, sensörün hassasiyeti kılavuz katmanın özellikleri ve tasarımına önemli ölçüde bağlıdır (Länge ve diğ. 2008).



Çizim 1. 8. Bir Love Wave sensörün temel yapısı

Enerjinin kılavuz katmana yoğunlaştırılması, diğer sistemlerin sıvılarda kullanımında önemli bir kısıtlayıcı olan ve hassasiyeti düşüren sönüm etkisini azaltmaktadır. Sönüm etkisi, büyük miktarda enerjinin sıvı tarafından emilmesi ve bu nedenle enerji kaybı olarak tanımlanmaktadır (Li ve diğ. 2017). Kılavuz katman sayesinde sönüm etkisinin azaltılması ve gürültünün azaltılması, sıvılarda kullanım açısından LW sensörlere avantaj sağlamaktadır (Kovacs ve diğ. 1994; Harding ve diğ. 1997; Puiu ve diğ. 2015). Bunun yanı sıra, LW sensörlerin daha düşük gürültü seviyesi, bu sensörlerle daha yüksek frekanslarda yüksek hassasiyetle çalışma olanağı sunmaktadır (Montagut ve diğ. 2011).

2. AMAÇ

Günlük yaşamda gıda ve su tüketimi ile veya çevresel yollarla pek çok zararlı maddeye maruz kalınabilmektedir. Bu zararlı maddeler, ilk akla gelen mikrobiyal etkenlerin yanı sıra bu organizmalar tarafından üretilen metabolik maddeler, gıda katkı ve/veya zirai mücadele ilaç kalıntıları (pestisit gibi) gibi küçük moleküller olabilmektedir. Bu küçük moleküller, akut zehirlenmelere yol açabildiği gibi uzun vadede kanser, alerji, doğum defektleri ve immün sistem bozuklukları gibi sorunlara da sebep olabilmektedir (Wishart 2012). Yüksek toksisiteye sahip düşük ağırlıklı biyolojik toksinler, doğal örneklerde de belli bir miktar bulunması ve kolaylıkla üretilmesi nedeniyle biyolojik silah ajanı olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Hali hazırda bu moleküllerin etkin bir şekilde tespitinde HPLC, LC-MS/MS ve LC-MS gibi yöntemler kullanılmaktadır. Fakat bu sistemler taşınabilir olmaması, zaman alıcı olması ve eğitimli operatör gerektirmesi nedeniyle kısıtlı sayıda ortam ve örnek zararlı moleküllerin varlığı açısından test edilebilmektedir. Alanda ve hızlı tarama ile daha çok örnek ve ortam izlenerek bu zararlıların ve etkilerinin meydana çıkmasının engellenmesi ve/veya azaltılması mümkündür (Brito ve Guthrie n.d.). Ancak düşük molekül ağırlığına sahip olan ve genellikle düşük miktarlarda bulunan toksik maddelerin tespiti için geliştirilen yöntemlerde duyarlık sorunu yaşanmaktadır. Bunun nedeni, küçük moleküllerin üzerinde genellikle bir epitop bulunması ve/veya ikinci bir antikorun bağlanamaması nedeniyle direkt veya sandwich formatta assayler geliştirilememesi ve dolayısıyla küçük moleküllerin tespitinde genellikle yarışmalı assay formatının kullanılmasıdır (Gorton 2005). Bu nedenle küçük molekül ağırlığına sahip analitlerin yüksek hassasiyet ve doğrulukla tespit edilmelerine yönelik çalışmalar analiz yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında piezoelektrik immünobiyosensörler kullanılarak küçük moleküllerin daha yüksek hassasiyet ile daha düşük miktarlarda tespit edilmesine yönelik bir yaklaşım geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda; antikor immobilizasyonu, analit-protein konjugatı immobilizasyonu, analitin kovalent olarak immobilizasyonu, antikorun dendron ile ağırlaştırılması ve daha yüksek frekansta ölçüm yapabilen bir ölçüm platformu kullanılması stratejileri değerlendirilmiştir. Çalışmalar, seçilen iki model mikotoksin olan AFB1 ve OTA ile bu toksinleri tanıyan Anti-AFB1 (8G8 ve D12E2) ve Anti-OTA (10F4) antikorları ile yapılmıştır. Çalışmanın ilk kısmı olarak ayırabileceğimiz ve immobilizasyon yöntemlerinin ele alındığı “İmmobilizasyon çalışmaları” bölümünde ölçüm yöntemi

geliştirilmesine yönelik tabana antikor immobilizasyonu, tabana analit-protein konjugatı immobilizasyonu ve tabana kovalent analit immobilizasyonu stratejileri ele alınarak değerlendirilmiştir. Kullanılan tüm ölçüm yöntemlerinde yarışmalı immunoassayler kullanılmıştır. Yarışmalı immunoassaylerde tabana antikor immobilize edildiği ve tabana toksin-protein konjugatlarının immobilize edildiği deney düzeneklerinde toksin-protein konjugatları hazırlanmıştır. Ayrıca antikor immobilizasyonuna yönelik çalışmalar kapsamında antikorun fonksiyonel bölgelerinin ulaşılabilir olmaması ve bu nedenle etkinlik kaybı ihtimalini ortadan kaldırmak amacıyla antikorların indirgenerek ve Protein A ile yönlendirilerek immobilizasyonları üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ölçüm yöntemi geliştirilmesine yönelik bir diğer çalışma, antijenin kovalent olarak ve adsorpsiyon ile yüzeye immobilizasyonunu içermektedir.

Çalışmanın ikinci kısmı olan “Antikor-Dendron Konjugasyonu ile Hassasiyet Geliştirme” bölümünde ise hassasiyet geliştirmeye yönelik antikorun dendron ile ağırlaştırılması ve daha etkin bir ölçüm platformu kullanılması stratejileri üzerine çalışılmıştır. Antikorların dendronlar ile ağırlaştırılması çalışmaları Jenerasyon 5 Polyester bis-MPA dendron 32 hidroksil 1 amin ile konjugasyonu içermektedir. Bunun yanı sıra ölçümler 5 MHz QCM ve 120 MHz Love wave ölçüm platformları ile yapılmış ve bu ölçüm platformlarının etkinlikleri karşılaştırılmıştır.

3. YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Sensör çalışmalarında kullanılan D12E2, 8G8 ve 10F4 antikorları TÜBİTAK MAM GMBE tarafından geliştirilmiştir.

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (Thermo Scientific, 22980), AFB1 (Sigma Aldrich, A6636), OTA (Sigma Adrich, O1877), 5 MHz AT kesim kuartz kristaller (KVG Quartz Crystal Technology GmbH), dithiothreitol (DTT) (Fermentas, RV862), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Sigma Aldrich, E5134), Polyester bis-MPA dendron 32 hydroxyl 1 amine generation 5 (Sigma Aldrich,767239), sodyum hidroksid (Merck, 1064621000), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma Aldrich, 71725), Glisin (Sigma Aldrich, G8898), Protein A (Sigma Aldrich, P6031), Potassium phosphate monobasic (Sigma Aldrich, P0662), potassium phosphate dibasic (Sigma Aldrich, P3786) kullanılmıştır.

Kristallerin temizlenerek bağlamaya hazır hale getirilmesi için Diener Femto düşük basınçlı plazma sistemi, Almanya; QCM-5 MHz ölçümleri için QCM200 (Stanford Araştırma Sistemleri, ABD) Quartz Crystal Microbalance; Love wave-120 MHz ölçümleri için AWS A20-F20 (AWSensors, İspanya) sensör platformu kullanılmıştır.

Stanford araştırma sistemleri tarafından geliştirilmiş olan QCM 200 5 MHz sistemi ağırlık ve vizkosite değişimlerini ölçebilmekte olup bir kontrolör, kristal osilatörü ve kristal yuvası içermektedir. Cihaz 5 MHz AT kesimli kristalin direncini ve kristal üzerindeki ağırlıkla ters orantılı olarak değişen rezonans frekansını ölçer. Ölçülen direnç ise kristal yüzeyi ile temasta olan materyalin (sıvı/film) vizkosite/elastisisine bağlı olarak değişir. Mikrogram-nanogram arasındaki ağırlık değişimlerini ölçebilme kapasitesine sahiptir. Cihaz sadece ölçüm modülünü içeriyor olup harici pompa ile akış sağlanması gerekmektedir. Sıcaklık kontrolü mevcut değildir.

AWSensors şirketi tarafından üretilmiş olan AWS A20-F20 biyouygulamalar için tasarlanmış bir yüzey akustik dalga ölçüm platformudur. Platform ile 10 MHz QCM, 100 MHz QCM ve 120 MHz Love wave ölçümleri yapılabilmekte olup sıcaklık kontrolü sağlanabilmektedir. 5 MHz-160 MHz frekans aralığına sahiptir. Saniyede 12 frekans ölçümü yapılabilmektedir. Yüksek frekans, tarama (sweep) ve izleme (tracking) olmak

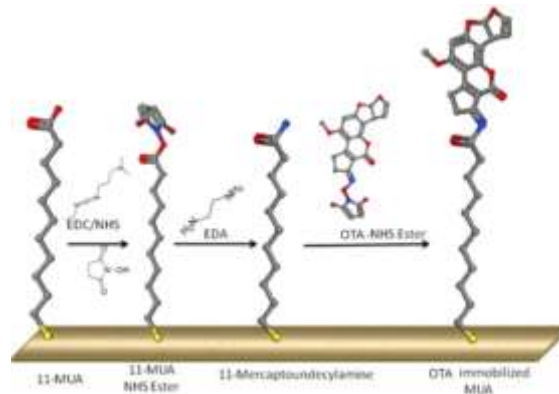
üzere üç operasyon modu bulunmaktadır. Ayrıca dört akış modülü bulunmakta olup bu dört akış modülüne eş zamanlı akış sağlanabilmektedir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Sensör Yüzeyine OTA Bağlanması

Altın kaplı 5 MHz QCM kristalleri Diener Femto plazma temizleyici ile 40 mV'de 3 dk temizlendi ve yüzey bağlanma için hazırlandı.

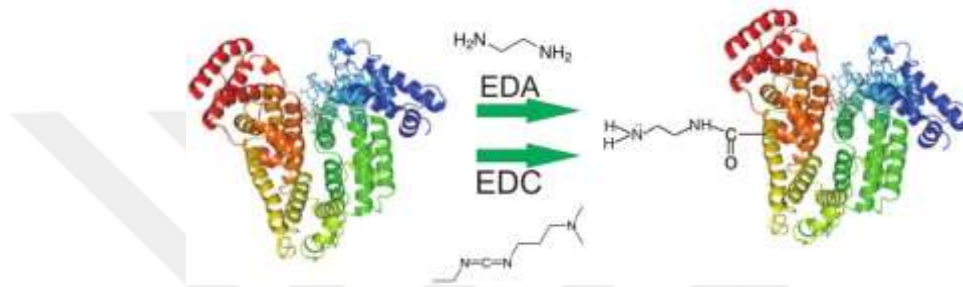
Temizlenen ve ethanol içinde hazırlanmış olan 2 mM 11-mercapto-undekanoik asit (MUA) içinde gece boyu oda sıcaklığında bekletilerek yüzey SAM kaplandı. Ertesi gün 3 defa ethanol, 3 defa ultrasaf dH₂O ile yıkanarak yüzeye bağlanmayan MUA uzaklaştırıldı. 400 mM EDC ve 100 mM N-hydroxysuccinimide (NHS) 1:1 oranında karıştırılarak aktivatör solüsyon hazırlandı ve MUA kaplı yüzey bu aktivatör solüsyonla 10 dakika boyunca aktive edildi. Ardından yüzey 7 dakika 1 M ethylenediamine (EDA), pH: 8.5 ile muamele edilerek yüzeydeki karboksilik asit grupları amin gruplarına çevrildi. Amine dönüşmeyen karboksilik asit gruplarını kapatmak için yüzey 2 dakika 1 M ethanolamine (EOA) pH:8.5 ile muamele edildi. Bağlama öncesinde OTA, 400 mM EDC ve 100 mM NHS'in 1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan aktivatör solüsyon ile 2:1 oranında karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Aktive edilen ve bağlanmaya hazır hale getirilen OTA, amin aktive yüzeye yayılarak 40 dk oda sıcaklığında bekletildi. MUA aracılığıyla OTA'nın sensor yüzeyine bağlanması Çizim 3. 1'de şematik olarak gösterilmektedir. Bağlama sonrasında yüzey 3 defa ethanol, 3 defa da ultra saf dH₂O ile yıkandı. Hemen kullanılmayacak olan kristaller kurutularak +4°C'de bekletildi.



Çizim 3. 1. MUA aracılığıyla aminlenen altın yüzeye OTA bağlanması. (Ertekin ve diğ. 2016)

3.2.2. Katyonize BSA Hazırlanması

Katyonizasyon reaksiyonları Domen ve arkadaşlarının 1992 yılında yayınlanan patent çalışmalarında uyguladıkları yöntemin modifikasyonu ile gerçekleştirildi (Patricia L. Domen 1992). Katyonizasyon reaksiyonlarında proteinin yapısında bulunan asidik aminoasitlerdeki pozitif yüklü karboksil grupları ethylene diamine (EDA) ve 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride (EDC) molekülleri kullanılarak amine edildi. Sığır serum albumin (BSA)'nın katyonizasyon reaksiyonu Çizim 3. 2'de belirtilmektedir.



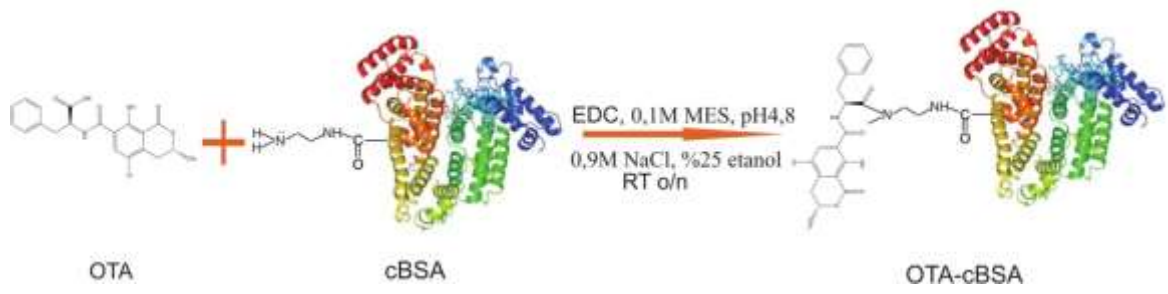
Çizim 3. 2. BSA'nın katyonizasyon reaksiyonu

3.2.3. OTA-cBSA Konjugatlarının Hazırlanması

Yu ve diğ. tarafından 2005'te raporlanan OTA-protein konjugasyon reaksiyonu modifiye edilerek oluşturulan reaksiyon aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı (Çizim 3. 3)(Yu ve diğ. 2005);

- Toplam reaksiyon 500-600µl'ye tamamlanacak şekilde bir eppendorf tüp içine MES tamponu (0,1M MES, pH4,8, 0,9M NaCl, %25 etanol), 1,2 mg cBSA, 0,1 mg OTA ve 0,1 mg EDC konuldu.
- Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında gece boyu çalkalanarak inkübe edildi. Konjugatlar Vivaspin 500 (10kDa MW limit) filtreli tüplerde MES tamponu ile en az 5 kere yıkanarak saflaştırıldı.

En son aşamada filtrenin üstünde kalan konjugatlar PBS, pH 7,2 içerisinde çözüldü.



Çizim 3. 3. OTA-cBSA konjugasyon reaksiyonu

3.2.4. 5 MHz QCM Kristallerine OTA-cBSA Bağlanması

5 MHz QCM Kristallerine OTA-cBSA kaplanması SAM ile kaplı yüzeye akış altında OTA-cBSA immobilizasyonu ve OTA-cBSA'nın adsorpsiyon ile immobilizasyonu olmak üzere iki şekilde gerçekleştirildi:

1. SAM ile kaplı yüzeye akış altında OTA-cBSA immobilizasyonu;

Diener Femto oksijen plazma ile (60 watt, 3 dk) temizlenen QCM 5 MHz kristalleri 2mM 11-MUA içinde gece boyu oda sıcaklığında bekletilerek SAM kaplaması yapıldı. Kristaller ethanol ve saf su ile yıkanıp kurutulduktan sonra cihaza yerleştirildi.

Daha sonra 1:1 oranda karıştırılan 400 µl 0,4 M EDC/0,1 M NHS 25 µl/dk hızda sisteme verildi ve 15 dk boyunca geçirildi.

Ardından 0,2 mg/ml OTA-cBSA konjugatı sisteme verilerek 45 dk boyunca konjugatın kristal yüzeyinden geçişi sağlandı.

Kaplamanın ardından yüzey PBS ile yıkanarak sinyalin dengeye ulaşması sağlandı.

2. OTA-cBSA'nın adsorpsiyon ile immobilizasyonu;

Oksijen plazma ile temizlenen (60 W, 3dk) altın yüzeye OTA-cProtein'in adsorpsiyon ile immobilizasyonunu içermektedir.

- Adsorpsiyon işlemi 50 µl/dk hızda akış altında 0,1 mg/ml OTA-cProtein uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Burada cProtein, OTA-cBSA ve OTA-cTF karışımını ifade etmektedir.

- Immobilizasyonun ardından kristal PBS ile dengelendi.

3.2.5. Kovalent OTA İmmobilizasyonu

Altın kaplı QCM kristalleri Diener Femto plazma temizleyici ile 40 mV'de 3 dk temizlendi ve yüzey bağlanma için hazırlandı. Temizlenen ve aktive edilen kristaller, etanol içinde hazırlanmış olan 1mM 11-mercapto-1-undecanol (MUD) içinde gece boyu oda sıcaklığında bekletilerek OTA bağlanmasına hazır hale getirildi. Ertesi gün 3 defa etanol, 3 defa ultrasaf dH₂O ile yıkandı. Bağlama öncesinde OTA, 400 mM EDC ve 100 mM NHS'in 1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan aktivatör solüsyon ile Çizelge 3.1'de gösterilen oranlarda karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Çizelge 3. 1. OTA'nın yüzey immobilizasyon optimizasyonunda kullanılan reaksiyon koşulları

	OTA	Seyreltme	1:1 EDC:NHS	EDC:OTA Oranı	% Çözücü	Son OTA Konsantrasyonu	Bekleme süreleri
1	EtOH, 10 mM, 30 uL	-	15 uL	20	%66	6,6 mM	10' aktivasyon, 30' inkubasyon
2	EtOH, 10 mM, 30 uL	-	30 uL	40	%50	5 mM	10' aktivasyon, 30' inkubasyon
3	EtOH, 10 mM, 30 uL	-	30 uL	40	%50	5 mM	10' aktivasyon, 60' inkubasyon
4	EtOH, 10 mM, 20 uL	40 uL, dH ₂ O	20 uL	40	%25	2,5 mM	10' aktivasyon, 30' inkubasyon
5	EtOH, 20 mM, 10 uL	20 uL PBS	20 uL	40	%20	4 mM	10' aktivasyon, 30' inkubasyon
6	EtOH, 20 mM, 5 uL	5 uL PBS	10 uL	40	%25	5 mM	10' aktivasyon, 40' inkubasyon
7	EtOH, 10 mM, 30 uL	-	30 uL	40	%50	5mM	10' aktivasyon, 40' inkubasyon

Aktive edilen ve bağlanmaya hazır hale getirilen OTA, amin aktive yüzeye yayılarak 40 dk oda sıcaklığında bekletildi. Bağlama sonrasında yüzey 3 defa ethanol, 3 defa da ultra saf dH₂O ile yıkandı. Hemen kullanılmayacak olan kristaller kurutularak +4°C'de bekletildi.

3.2.6. Yarışımli ELISA ile 10F4 Konsantrasyon Optimizasyonu

ELISA plağının tabanına 400ng/kuyu olacak şekilde OTA-cBSA konjugatı konarak gece boyu +4°C'de antijenin tabana immobilizasyonu sağlandı. Ertesi gün plak 3'er kez % 0,2 Tween-PBS yıkanarak %1'lik (w/v) süt tozu kuyulara eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Böylece serbest alanların bloklanması sağlandı. Bloklamanın ardından plak 3'er kez % 0,2 Tween-PBS yıkandı. Diğer yandan tüp içinde 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml veya 0,02 mg/ml 10F4 antikoru 0, 10, 20, 50, 100 ve 200 ppb serbest OTA ile yarıştırdı. Yarışımın olduğu antikor-toksin karışımları kuyulara bekletilmeden eklenerek 1 saat 37°C'de inkübe edildi.

1 saatin sonunda plak 3'er kez % 0,2 Tween-PBS yıkanarak 1:2000 oranında alkalin fosfataz işaretli ikincil antikor eklenerek 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Kuyular 5'er kez % 0,2 Tween-PBS ile yıkandıktan sonra substrat (4-nitrophenyl phosphate) 1mg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde (substrat tamponunu: 1mM ZnCl₂, 1mM MgCl₂, 0.1M glycine ddH₂O içerisinde çözüldü ve pH 10.4'e ayarlandı, toplam hacim 200ml) hazırlandı ve kuyu başına 100 µl eklendi. 30-60 dakika sonra 405 nm'de absorbance (OD) okundu.

3.2.7. OTA Ölçümü

OTA immobilize edilerek hazırlanan kristaller ölçüm yuvasına yerleştirildi. Yüzey PBS ile yıkanarak sinyalin dengeye gelmesi beklendi. Sinyal dengeye geldikten sonra yüzey 10 dk boyunca 0,1 mg/ml BSA ile spesifik olmayan bağlanmaların ölçüme etki etmemesi için bloklandı. BSA muamelesinin ardından yüzey PBS ile yıkanarak sinyalin dengeye gelmesi beklendi. Ardından, 10F4 50 µl/dk hızda yüzeye gönderilerek sinyal ölçüldü.

3.2.8. Kristallere Anti-AFB1 8G8 Bağlanması

Tüm bağlama yöntemleri için öncelikle Diener Femto oksijen plasma temizleyici ile 40 watt'ta 3 dk temizlenen QCM 5MHz kristalleri QCM 200 cihazına takılarak PBS akışı

altında sinyalin dengeye ulaşması beklendi. Ardından 8G8 antikoru yüzeye üç farklı şekilde bağlandı. Kullanılan Anti-AFB1 8G8 immobilizasyon yöntemleri Çizim 3. 4'te özetlenmektedir.



Çizim 3. 4. AFB1 antikoru (8G8) kullanılarak yapılan antikor yönlendirme çalışmaları. Böylelikle antijen bağlama kapasitesine sahip kısımların fiziksel olarak ulaşılamaz olarak etkinlik kaybına uğramasının engellenmesi hedeflenmiştir.

3.2.8.1. 8G8 antikollarının yüzeye direkt adsorpsiyonu

0,1 mg/ml 8G8 50 µl/dk hızda yüzeye gönderilerek frekansta azalış sonlanana kadar akış sürdürüldü.

3.2.8.2. 8G8 antikollarının Protein A ile yönlendirilerek yüzeye bağlanması

0,1 mg/ml Protein A 50 µl/dk hızda yüzeye gönderilerek frekansta azalış sonlanana kadar akış sürdürüldü. Ardından, 0,1 mg/ml 8G8 50 µl/dk hızda yüzeye gönderilerek yüzeye bağlanması sağlandı.

3.2.8.3. Dithiothreitol (DTT) ile kesilen 8G8 antikollarının yüzeye bağlanması

Antikordaki thiol gruplarını kullanarak kristal yüzeyine yönlendirilmiş bağlama yapılabilmesi için 8G8 antikolları 1:4, 1:8, 1:16, 1:64, 1:128 ve 1:256 8G8:DTT oranında DTT ve 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) varlığında PBS içinde 20 dk 37°C'de bekletilerek indirgenmiştir. Reaksiyon 5mM EDTA içeren PBS'e karşı diyaliz edilerek DTT ortamdan uzaklaştırıldı. Ardından, 0,1 mg/ml indirgenmiş 8G8 50 µl/dk hızda yüzeye gönderilerek yüzeye bağlanması sağlandı.

3.2.9. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroferez

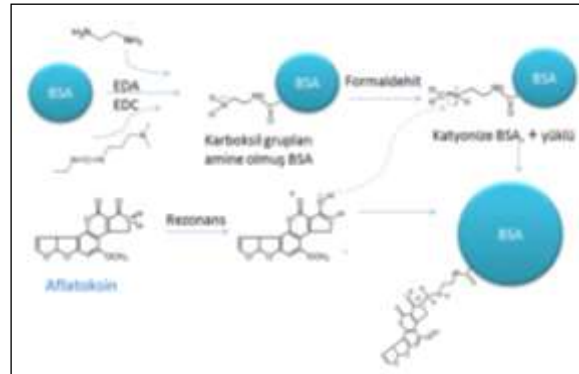
DTT kullanılarak indirgenen 8G8 antikollarının indirgenme durumu Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroferez (SDS-PAGE) ile gözlemlendi. Çalışmada, Bio-Rad Mini protean tetra jel aparatı kullanıldı. 10 ml %10'luk ayrıştırma jeli; 3,8 ml dH₂O, 3,4 ml %30 akrilamid/bis-akrilamid, 2,6 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 0,1 ml %10 SDS, 0,1 ml %20 amonyum persülfat (APS) ve 0,01 ml Tetrametiletildiamin (TEMED)

karıştırılarak hazırlandı ve iki cam arasına döküldü. Butanol ile jelin hava ile teması kesilerek polimerizasyonu sağlandı. Ayırıştırma jelinin donmasının ardından 2ml %5'lik toplama jeli; 0,34 ml %30 akrilamid/bis-akrilamid, 0,25 ml 1M Tris pH 6,8, 0,02 ml %20 APS, 0,02 ml %10 SDS, 0,002 ml TEMED ve 1,36 ml dH₂O konarak hazırlandı ve ayırıştırma jelinin üzerine eklenerek donması beklendi.

Jelin hazırlanmasının ardından 12 µl örnek 4 µl Laemmli Örnek Tamponuyla (BioRad, #1610747) karıştırılarak kuyulara yüklendi ve 120 V'ta proteinler yürütüldü. Jelde proteinler ayırıştırıldıktan sonra gümüş boyama ile boyandı (Chevallet ve diğ. 2006).

3.2.10. AFB1-cBSA Konjugasyonu

AFB1 moleküllerinin cBSA, Mannich tip reaksiyon ile gerçekleştirildi (Zhou ve diğ. 2007). Katyonize proteinlerde bulunan amin grupları formaldehit ile aktive edildi ve AFB1 molekülüne bağlandı. Bu işlem sırasında reaksiyon 600 µl'ye tamamlanacak şekilde, bir eppendorf tüp içine MES tamponu (0,1M pH 4,8), katyonize BSA, DMF içerisinde 2 mg/mL AFB1 ve formaldehit (50µl) kondu. Reaksiyonda 100 µg AFB1 ve buna karşılık olarak molar olarak 1/40 oranında katyonize protein kullanıldı. Böylece başlangıç cBSA:AFB1 oranı 1:40 olarak reaksiyon başlatıldı. 24 saat 37°C'de çalkalanarak reaksiyon gerçekleştirildi. AFB1-protein konjugasyon reaksiyonları Çizim 3. 5'te özetlenmektedir.



Çizim 3. 5. AFB1 – cP konjugat oluşturma stratejisi.

Yapılan konjugasyon reaksiyonunun ardından karışım 0,1 M MES, pH 4,8'e karşı diyaliz edildi ve ortamdaki AFB1'ler ve formaldehit uzaklaştırıldı. Diyalizle temizlenen konjugatın OD280 ve OD360 değerleri ölçüldü.

3.2.11. Anti-AFB1 8G8 Kaplı Yüzeyde AFB1 Ölçümü

Antikor bağlı QCM 5MHz kristalleri hazneye yerleştirilerek PBS uygulandı. Sinyalin dengeye gelmesi beklendi ve 10 dk boyunca 50 µl/dk hızda 2 mg/ml OVA (ovalbumin)

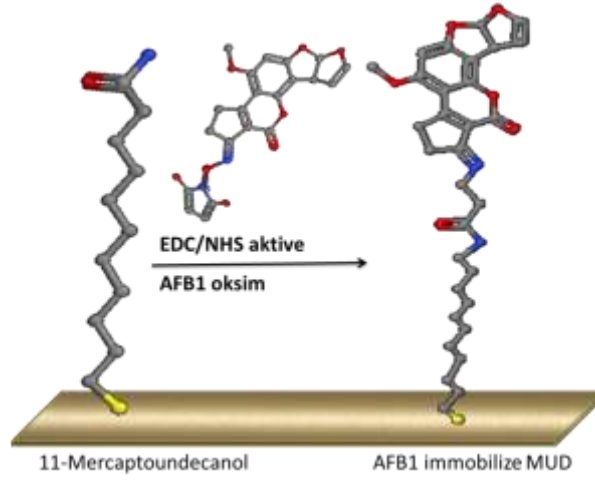
akışı ile bloklandı. Bloklamanın ardından 0,1 mg/ml Aflatoksin B1-BSA (AFB1-BSA) konjugatı sisteme gönderilerek bağlanmaya bağlı frekans düşüşü ölçüldü. Tüm uygulamaların arasında sabit frekans ölçümü alınana kadar PBS yıkaması yapıldı.

3.2.12. Kristallere AFB1 Bağlanması

AFB1'in altın yüzeye bağlanabilmesi için öncelikle O-carboxymethyloxime ile reaksiyona sokularak AFB1-oxim oluşturuldu. Bunun için; 400 µl methanol içinde 1 mg AFB1, 100 µl dH₂O içinde 2 mg carboxymethyl hydroxylamine HCl ve 100 µL piridin karıştırıldı. 3 saat boyunca tabanı 100 °C'de tutulan tüplerin üstüne buz konarak inkübe edildi. Ardından, reaksiyon 24 saat boyunca oda sıcaklığında sürdürüldü. Çözücüler azot altında uçuruldu ve oluşan AFB1-oxime son hacim 320 µl olacak şekilde PBS'te çözüldü.

Altın kaplı Love Wave kristalleri ise plazma temizleyiciye konmadan önce 3 dakika asetonla muamele edilerek üstündeki koruyucu tabaka uzaklaştırıldı. Ardından, altın kaplı QCM kristalleri ve love wave kristalleri Diener Femto plazma temizleyici ile 40 mV'de 10 dk temizlendi ve yüzey bağlanma için hazırlandı.

Temizlenen ve aktive edilen kristaller, ethanol içinde hazırlanmış olan 1mM MUD içinde gece boyu oda sıcaklığında bekletilerek AFB1-oxim bağlanmasına hazır hale getirildi. Ertesi gün 3 defa ethanol, 3 defa ultrasaf dH₂O ile yıkandı. Bağlama öncesinde AFB1-oxim, 400 mM EDC ve 100 mM NHS'in 1:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan aktivatör solüsyon ile 2:1 oranında karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Aktive edilen ve bağlanmaya hazır hale getirilen AFB1-oxim, amin aktive yüzeye yayılarak 40 dk oda sıcaklığında bekletildi. Kullanılan yöntem Çizim 3. 6'da şematize edilmiştir. Bağlama sonrasında yüzey 3 defa ethanol, 3 defa da ultra saf dH₂O ile yıkandı. Hemen kullanılmayacak olan kristaller kurutularak +4°C'de bekletildi.



Çizim 3. 6. Sensör yüzeyine MUD aracılığıyla AFB1 immobilizasyonu. Ertekin ve diğ. (2016)'dan alınmıştır

3.2.13. Anti-AFB1 Antikoru D12E2-Dendron Konjugasyonu

1 mg BPM321 20 mg CDI ile 100 µl kuru asetonunda karıştırılarak 10 dk oda sıcaklığında aktive edildi. Aktivasyonun ardından 20 µl dH₂O yavaşça eklendi. 0,5 mg D12E2 250 µl 0,1M sodyum bikarbonat pH 8,5 tamponu içinde ortama konarak gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Reaksiyonun ardından karışım PBS'e karşı diyaliz edilerek temizlendi.

3.2.14. AFB1 Ölçümü

AFB1 immobilize edilerek hazırlanan kristaller ölçüm yuvasına yerleştirildi. AFB1'in bağlanmadığı aktive gruplar, akış altında 10 dk boyunca 1 M CH₃COONa, pH 4.5 ile muamele edilerek bloklandı ve ardından yüzey PBS ile yıkanarak sinyalin dengeye gelmesi beklendi. Sinyal dengeye geldikten sonra yüzey 10 dk boyunca 0,1 mg/ml BSA ile spesifik olmayan bağlanmaların ölçüme etki etmemesi için bloklandı. BSA muamelesinin ardından yüzey PBS ile yıkanarak sinyalin dengeye gelmesi beklendi. Ardından, 0,05 mg/ml D12E2-AFB1 karışımı 20 µl/dk hızda yüzeye gönderilerek sinyal ölçüldü.

3.2.15. Yüzey Rejenerasyonu

AFB1 Yüzey Rejenerasyonu: Ölçümün tamamlanmasının ardından sırasıyla 500 µl ultrasaf su, 1 ml 75 mM NaOH %1 SDS, 750 µl ultrasaf su ve 750 µl PBS 200 µl/dk hızda yüzeye gönderilerek yüzeyde bağlı olan D12E2 uzaklaştırıldı ve yüzey tekrar D12E2 bağlanmasına uygun hale getirildi.

OTA Yüzey Rejenerasyonu: Ölçümün tamamlanmasının ardından sırasıyla yüksek hızda 1 dk ultrasaf su, 2 dk 50 mM NaOH %1 SDS, 1 dk ultrasaf su ve 1 dk PBS yüzeye gönderilerek yüzeyde bağlı olan 10F4 uzaklaştırıldı ve yüzey tekrar 10F4 bağlanmasına uygun hale getirildi.

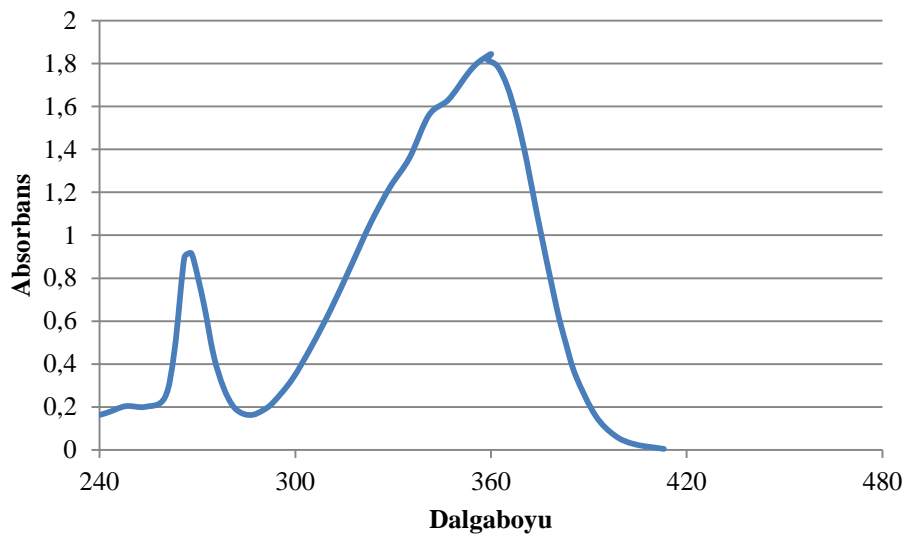


4. BULGULAR

4.1. Konjugasyon Çalışmaları

4.1.1. AFB1-cBSA Konjugasyonu

Elde edilen AFB1-cBSA konjugatının konjugasyon oranı ve etkinliğinin hesaplanabilmesi için 220-400 nm arasında dalga taraması yapıldı (Çizim 4. 1). Bu dalga taramasının sonuçlarında görülen 360 nm absorbands değeri proteinin üzerine konjuge olan AFB1'i göstermektedir.



Çizim 4. 1. AFB1-cBSA konjugatının UV spektrumu

AFB1-cBSA konjugasyon oranı, AFB1'in 360 nm'de gösterdiği absorbands sayesinde Beer-Lambert kanunundan çıkarılan Denklem 3 kullanılarak hesaplandı.

Denklem 3.

$$C_{(AF)}/C_{(Protein)} = A_{360} \times \epsilon_{Protein\ 280} / (A_{280} \times \epsilon_{AF360} - \epsilon_{AF280} \times A_{360})$$

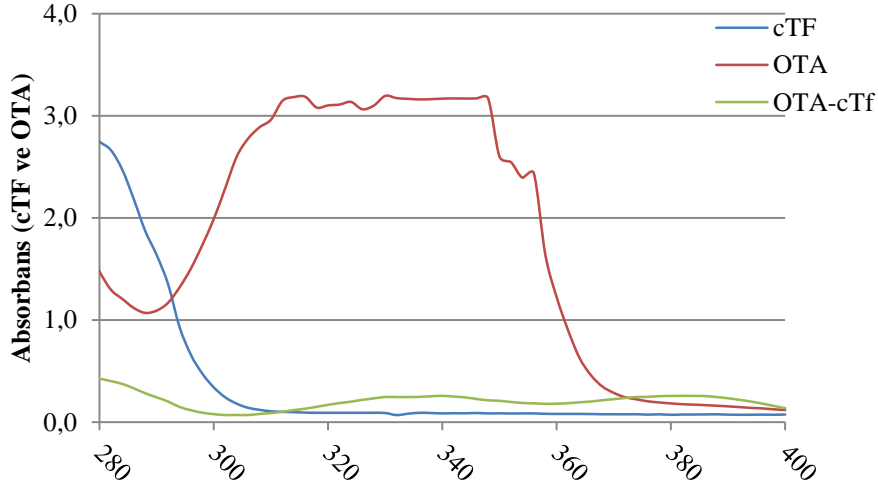
A: absorbands, ϵ : molar ekstinksiyon katsayısı, C: konsantrasyon.

Hesaplamalar sonucunda 0,72:1 oranında AFB1-cBSA konjugasyonunun başarıyla gerçekleştiği belirlendi.

4.1.2. OTA-cTF Konjugasyonu

OTA-cTF konjugasyonunun başarısını belirlemede spektrofotometrik ölçüm kullanıldı. Spektrofotometrik ölçümlerde cTF-OTA konjugatındaki spektral kaymadan dolayı konjuge olan cTF:OTA oranı kesin olarak belirlenememekle beraber,

konjugasyonun başarısı 334 ve 380nm dalga boylarında Absorbans değeri doruğa ulaşan proteine bağlı OTA miktarının ölçülmesi ile belirlendi (Çizim 4. 2). Proteinler 280nm maksimum absorbans (Abs_{max}) verirken OTA'nın Abs_{max} 'ı 334nm'de olup konjugasyondan sonra 380nm'de de okuma vermektedir.



Çizim 4. 2. Katyonize hTf proteini (cTf), OTA ve OTA-cTf konjugatın 260-400nm arasındaki OD (absorbance) değerleri

4.2. İmmobilizasyon Çalışmaları

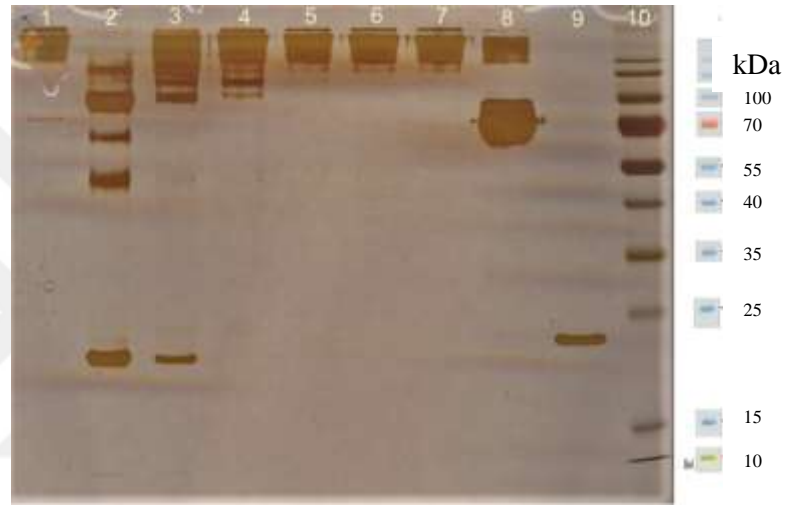
Yüze immobilizasyonu, geliştirilen biyosensörün performansını belirleyen temel faktörlerden biridir. Bu nedenle tez çalışması kapsamında küçük moleküllerin tespiti için uygun immobilizasyon yönteminin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu doğrultuda yüze antikor ve antijenler immobilize edilmiş ve immobilizasyon sonucunda ölçümler yapılarak hazırlanan sensör yüzeyinin verimliliği değerlendirilmiştir. Sensör yüzeyinin verimliliğinin değerlendirilmesinde yüzeyin rejenere edilebilme durumu, tutarlılığı ve elde edilen sinyal seviyesi göz önünde bulundurulmuştur.

4.2.1. Antikor Yönlendirme ve İmmobilizasyon Çalışmaları

Biyosensörlerde yüksek hassasiyetin yakalanması için önemli unsurlardan biri yüze immobilize edilen algılayıcı miktarı olarak görülmektedir. Söz konusu antikorların algılayıcı olarak kullanımı olduğunda, immobilize edilen algılayıcının miktarı kadar önemli bir diğer unsur antikorun tanıma bölgelerinin ulaşılabilirliğidir. Bu çalışmada yüzeyde algılayıcı olarak antikor bulunduğu durumda antikorun tanıma bölgelerinin ulaşılabilirliğinin artırılarak algılama kapasitesinin yükseltilmesine yönelik çalışmalar ve yaklaşımlar sunulmaktadır. Çalışmanın bu bölümünde model molekül olarak AFB1

seçilmiş ve IgG tipi bir antikor olan 8G8'in yönlendirilerek biyosensörün algılayıcı kapasitesinin artırılması hedeflenmiştir. Bu çalışmalar kapsamında antikorların direkt adsorpsiyonu, Protein A yönlendirme çalışmaları ve antikorun disülfid bağlarının DTT ile kesilerek -SH gruplarının açığa çıkarılması yoluyla yönlendirme çalışmaları yapıldı.

DTT ile indirgeme çalışmasında 8G8 antikorunun indirgendiği DTT konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 1:4, 1:8, 1:16, 1:64, 1:128 ve 1:256 8G8: DTT oranında kesim çalışması yapıldı ve elde edilen antikorların indirgenme durumu %10 SDS-PAGE ile gözlemlendi (Çizim 4.3). Elde edilen jel görüntüsü 1:256 oranında DTT'nin ortamdaki 8G8 antikorlarını etkin bir şekilde indirgediğini göstermektedir.



Çizim 4. 3. DTT ile 8G8'in indirgenme çalışması sonucunda elde edilen %10 SDS-PAGE görüntüsü. 1. 8G8, 0 DTT, 2. 8G8, 1:256 DTT, 3. 8G8, 1:128 DTT, 4. 8G8, 1:64 DTT, 5. 8G8, 1:16 DTT, 6. 8G8, 1:8 DTT, 7. 8G8, 1:4 DTT, 8. 0,5 µg hTF, 9. 0,5 µg CA, 10. Marker (Thermo #26616).

Çizim 4. 3'te gösterildiği gibi indirgenen 8G8 antikorları, daha sonra yüzeye immobilize edildi.

Diğer yandan antikorun Fc bölgesine bağlandığı bilinen Protein A yüzeye bağlanarak antikorların Fc bölgeleri aracılığıyla yüzey immobilizasyonu ve yönlendirilmesi sağlandı.

Ardından, QCM'in ağırlık tabanlı bir sistem olması ve AFB1'in oldukça küçük bir molekül olması nedeniyle AFB1'in bu sistemde doğrudan tespiti mümkün olmayacağından; biyosensör tabanındaki algılayıcı kapasitesi, cBSA bağlanarak ağırlaştırılmış AFB1 kullanılarak yarışımlı immünoassay ile ölçüldü.

Bu çalışmada immobilizasyon ve antijen bağlama etkinliğinin değerlendirilebilmesi için tabana bağlanan antikor miktarı ve tabana bağlanan antikorun yakaladığı AFB1-cBSA

miktarı olmak üzere iki parametre incelendi. İncelenen parametreler ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 1’de gösterilmektedir.

Çizelge 4. 1. Antikor immobilizasyonunun etkinliğini geliştirmek üzere denenilen direkt adsorpsiyon, Protein A ile yönlendirme ve DTT ile indirgeyerek yönlendirme çalışmalarında antikor ve AFB1-BSA konjugatı bağlanması sonucunda elde edilen frekans düşüşleri

	DİREKT ADSORPSİYON	DTT İLE İNDİRGEYEREK YÖNLENDİRME	PROTEİN A İLE YÖNLENDİRME
ΔF ANTİKOR (Hz)	18	43	21
ΔF KONJUGAT (Hz)	1,5	3	65

Rejenerasyon çalışmalarında kullanılan 50 mM NaOH %1 SDS uygulaması sonucunda yüzey etkinliğini yitirdiğinden aynı kristal üzerinde ölçüm yapılmaya devam edilemedi. Bu durum, sert rejenerasyon koşullarının kullanımını gerektiren durumlarda antikor kaplı yüzeylerin etkin biçimde sensör geliştirilmesinde kullanılamayacağını göstermektedir.

4.2.2. Antijen İmmobilizasyon Çalışmaları

Yarışımlı sistemlerde, yüzeye antijen immobilize edilerek örnek içerisindeki antijenin antikora bağlanmak için yüzeydeki antijenle yarışırılması ve örnekte bulunan antijen miktarının belirlenmesi mümkün olabilmektedir. Bu tür sistemlerde yüzeye immobilizasyon etkinliğinin yüksek olması, ölçüm hassasiyetini ve deteksiyon aralığını doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle yüksek hassasiyetli ölçüm sistemlerinin elde edilmesinde antijen immobilizasyonunun etkinliği önemli rol oynamaktadır.

Bunun yanı sıra, özellikle proteinlerden daha stabil olan hapten gibi analitlerin yüzey immobilizasyonu daha yüksek tekrarlanabilirlik ve rejenerasyonlara dayanıklı stabil yüzeyler oluşturulması anlamında avantaj sağlamaktadır. Fakat küçük molekül çapına sahip olan moleküllerin yüzeye yüksek konsantrasyonda immobilizasyonunun moleküller arası boşlukları azaltarak sterik etkilerle antikor gibi büyük moleküllerin antijene bağlanmasının önüne geçmesi değerlendirilen ihtimaller dahilindedir. Bu nedenle bu çalışma kapsamında yüzeye antijen-protein konjugatlarının immobilizasyonu ve doğrudan hapten moleküllerin immobilizasyonu stratejileri değerlendirilmiştir.

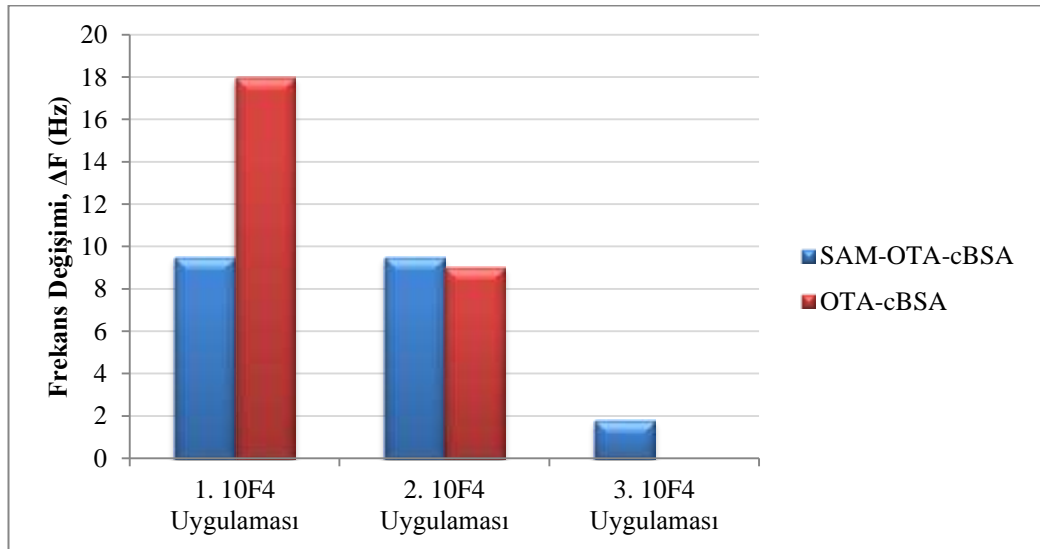
4.2.2.1. Yüzeğe antijen-protein konjugat immobilizasyon çalışmaları

Bu çalışmada yüzeğe daha seyrek antijen bağlanması sağlanarak antikorların sterik engellenmeden etkilenmeden yüzeğe rahatça bağlanmasının sağlanması hedeflenmiştir. Bu çalışmada model toksin olarak OTA kullanılmıştır.

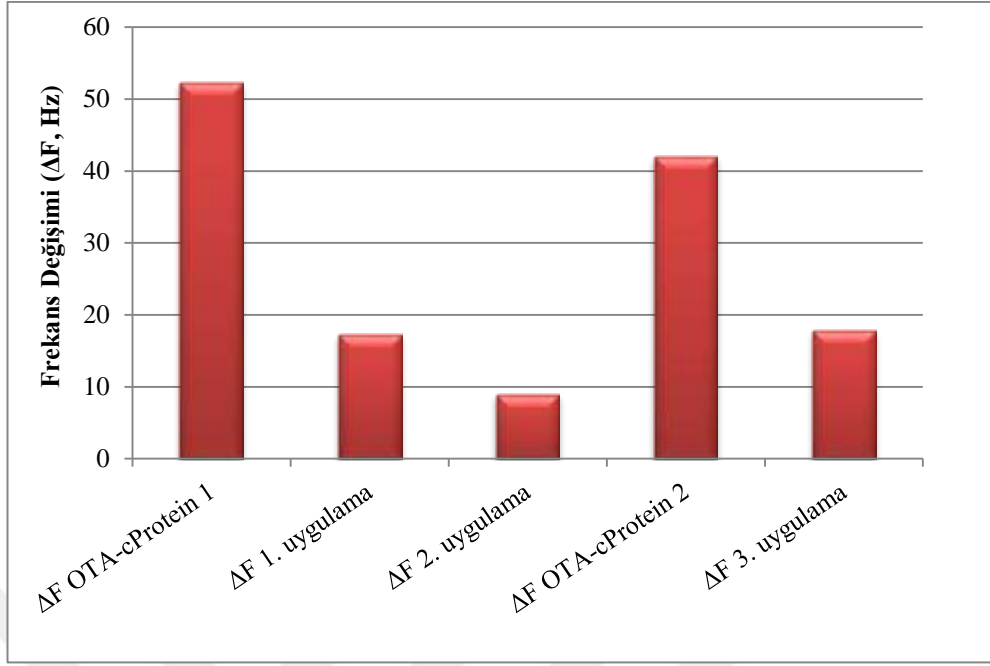
Bu bölümde, daha önce hazırlanmış olan OTA-cBSA konjugatı yüzeğe kovalent ve non-kovalent olmak üzere iki şekilde bağlanmıştır:

- SAM ile kaplı yüzeğe akış altında OTA-cBSA immobilizasyonu
- OTA-cBSA'nın adsorpsiyon ile immobilizasyonu

Bu immobilizasyonlar sonucunda yüzeğe 0,025 mg/ml 10 F4 antikorı gönderilmiş ve frekans değişimleri ölçülmüştür. Bunun yanı sıra, antikor uygulamasının ardından 50mM NaOH+%1 SDS uygulaması yapılarak yüzeğ rejenere edilmiş ve yüzeğin tekrar antikor bağlama kapasitesi ölçülmüştür. Yapılan bu çalışmada SAM kaplı yüzeğe akış altında OTA-cBSA kaplanması durumunda elde edilen antikor bağlanması ve rejenerasyon sonrası yüzeğin bağlama kapasitesi Çizim 4. 4'te, adsorpsiyon yoluyla OTA-cBSA kaplanması durumunda elde edilen antikor bağlanması ve rejenerasyon sonrası yüzeğin bağlama kapasitesi Çizim 4. 5'te gösterilmektedir. Yüzeğe bağlanan antikorların yarattığı frekans değişimleri Çizelge 4. 2'de karşılaştırılmıştır.



Çizim 4. 4. OTA-cBSA'nın akış halinde immobilize edildiği yüzeğlerde anti-OTA 10F4 antikorı ile etkileşimden sağlanan frekans değişimleri. 1. Uygulama, kaplamanın ardından yapılan ilk ölçümü, 2. Uygulama ilk rejenerasyondan sonra yapılan ilk ölçümü, 3. Uygulama ise 2. rejenerasyon sonrasında yapılan ölçümü ifade etmektedir.



Çizim 4. 5. OTA-cBSA'nın adsorpsiyon yoluyla immobilizasyonunun ardından 10F4 antikoru uygulaması sonucunda elde edilen frekans değişimleri. Rejenerasyonun ardından yapılan 10F4 uygulamalarında frekans değişiminde düşüş olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4. 2. Farklı OTA-cBSA immobilizasyon stratejilerinde yüzeye bağlanan 10F4'ün meydana getirdiği frekans değişimleri ve yüzeyin rejenerasyon sonrası tekrar bağlama kapasitesi

	SAM-OTA-cBSA (Akış altında)	OTA-cBSA Adsorpsiyon
1. Uygulama ΔF (Hz)	9,5	18
2. Uygulama ΔF (Hz)	9,5	9
3. Uygulama ΔF (Hz)	1,8	-

4.2.2.2. Yüzeye doğrudan toksin immobilizasyonu ile sinyal geliştirme

Yüzeye OTA toksinlerinin doğrudan kovalent olarak bağlanabilmesi için öncelikle yüzey SAM (MUD) ile muamele edilerek yüzeyde $-\text{COOH}$ veya $-\text{NH}_2$ fonksiyonel grupları oluşturulmuştur. Ardından detayları yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde OTA toksinleri yüzeye immobilize edilmiştir.

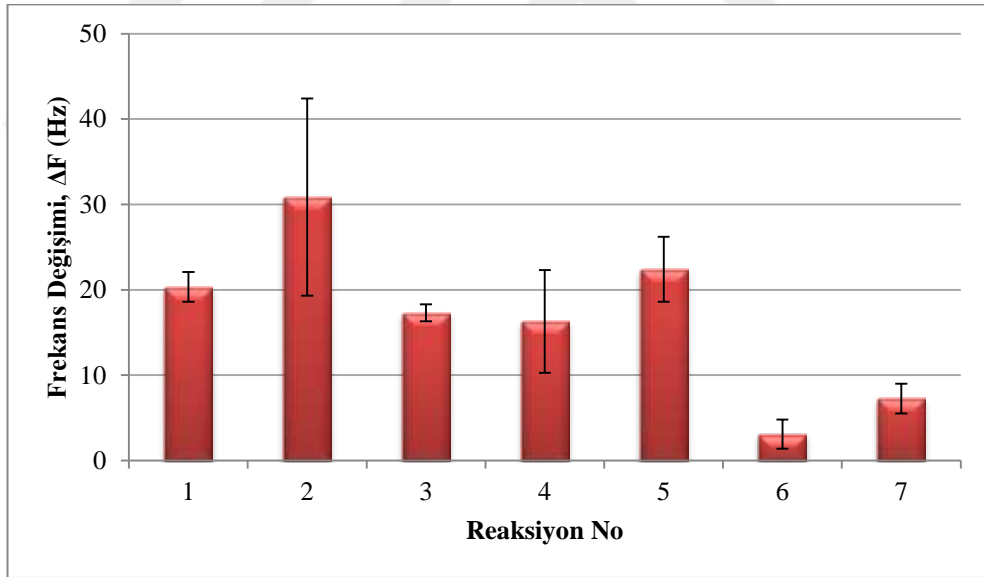
4.2.2.3. Kovalent OTA immobilizasyonu ile yöntem geliştirme ve OTA tespiti

Yapılan çalışmada, yüzeye doğrudan toksinin immobilize edilerek serbest toksin ile yarışırılması stratejisi ile sinyal geliştirilmesi hedeflendi. Bu stratejinin tercih edilmesinin sebebi;

- i. Yüzey rejenerasyonu sırasında kullanılan solüsyonlara antikorun daha dayanıksız olması ve dolayısıyla yüzeye antikor immobilize edildiğinde yüzeyin daha kısa ömürlü olacak olması,
- ii. Ağırlık temelli ölçüm yapılması sebebiyle 150 kDa büyüklüğündeki antikorun ölçüm sırasında yüzeye bağlanmasının daha büyük bir frekans değişimine yol açacak olması,
- iii. Immobilizasyon sırasında yönlendirme yapılması ihtiyacının olmamasıdır.

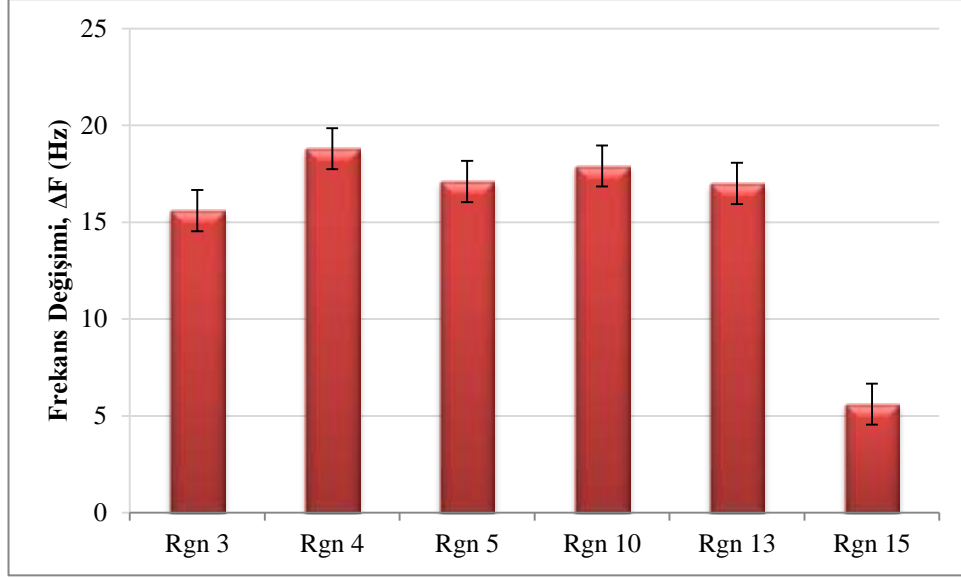
Detayları yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde uygulanan protokolde süre, çözücü ve toksin konsantrasyonlarında yapılan değişikliklerle optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

Farklı immobilizasyon koşullarıyla hazırlanan kristallere 10F4 antikoru verilerek elde edilen frekans değişimleri ve kristaller arası standart sapmalar Çizim 4. 6'da gösterilmektedir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda %66 çözücü oranında 6,6 mM OTA ile yapılan immobilizasyonların (1 numaralı reaksiyon koşulu) en tutarlı ölçümleri verdiği ve tutarlı reaksiyonlar arasında en yüksek antikor bağlanmasını sağladığı görüldü ve immobilizasyonlarda bu reaksiyon koşullarının kullanılmasına karar verildi. 2, 4 ve 5 numaralı reaksiyon koşullarında kristaller arası tutarlılık düşük olduğu için bu kristallerle deneylere devam edilmedi. 6 ve 7 numaralı reaksiyon koşullarında hazırlanan kristallerden elde edilen antikor sinyali ise çok düşük olduğu için kullanılmadı. Düşük antikor yanıtı (algılayıcı kısıtı), toksin içermeyen ortam ve zayıf miktarda toksin içeren ortam arasındaki farkın algılanması için yeterli hassasiyet sağlayamacağı için, belirlenecek toksin aralığını kısıtladığı için bu kristallerle çalışmalara devam edilmedi.



Çizim 4. 6. Farklı immobilizasyon koşullarında anti-OTA 10F4 antikoru ile elde edilen frekans değişimleri ve kristaller arası standart sapmalar

Yüzeye doğrudan OTA immobilizasyonunun ardından 0,025 mg/ml 10F4 yüzeje gönderilerek frekans değişimi ölçüldü. Bunun yanı sıra yüzeje 13 defa 50mM NaOH+%1 SDS ile muamele edilerek rejenere edildi ve rejenerasyonlar sonrasında yüzejin etkin kalma durumu değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar Çizim 4. 7'de gösterilmektedir.



Çizim 4. 7. SAM-OTA kaplı yüzeyde 10F4 antikorunun bağlanma etkinliği rejenerasyonlar sonrasında değişiklik göstermemiştir.

SAM kaplı yüzeye OTA bağlanarak elde edilen verilerle OTA-cBSA immobilize yüzey kullanılarak elde edilen veriler karşılaştırıldığında SAM kaplı yüzeye OTA bağlanarak elde edilen sinyalin geliştirildiği görüldü. Fakat çok kısıtlı olan bu sinyal geliştirmeden ziyade verilerin rejenerasyon sonrasında birbiriyle uyumluluk göstermesi üzerine bu yöntem üzerinden OTA tespiti için yöntem geliştirme çalışmaları yapıldı. Yöntem geliştirme çalışmaları; rejenerasyon optimizasyonu ve kullanılan 10F4 miktarının optimizasyon çalışmalarını içermektedir.

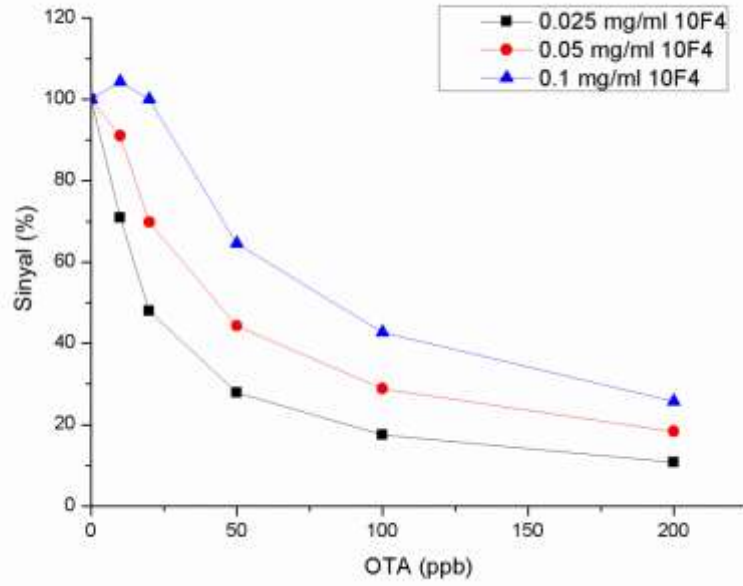
Daha önce immobilizasyonu detaylı bir biçimde anlatılan Okratoksin A kaplı yüzeylerin anti-OTA 10F4 antikor uygulaması sonrasında rejenerasyonu ve tekrar kullanılabilmesine yönelik çalışmalar yapıldı. Bu şekilde daha hızlı, standart ve kolay ölçüm yapılabilmesi sağlandı. Rejenerasyon için farklı stratejiler denenerek etkinlikleri karşılaştırıldı. Bu yöntemler ve etkinlikleri Çizelge 4. 3'te karşılaştırılmıştır;

Çizelge 4. 3. OTA kaplı sensör yüzeyinin rejenerasyon değerleri

Rejenerasyon solüsyonları	Uygulanan antikor	Antikor uygulaması (ΔF)	Rejenerasyon sonrası antikor uygulaması (ΔF)	% Etkinlik
0,1 M HCl uygulaması	0,025 mg/ml 10F4	10	5,1	51
50mM NaOH+% 1 SDS uygulaması	0,025 mg/ml 10F4	3,8	3,8	100
0,1 M pH 2,7 Glisin uygulaması	0,05 mg/ml 10F4	17,8	14,3	80,34
50 mM NaOH	0,025 mg/ml 10F4	16,7	12,4	74,25
0,1 M NaOH+0,5 M NaCl	0,025 mg/ml 10F4	12,4	8,4	67,74
50 mM NaOH+35 mM EDTA	0,025 mg/ml 10F4	8,4	4,8	57,14
100 mM NaOH + 70 mM EDTA	0,025 mg/ml 10F4	4,8	3,8	79,17
%50 Methanol	0,025 mg/ml 10F4	3,8	3,3	86,84
6M Guanidine hidroklorür	0,025 mg/ml 10F4	8,2	4,6	56,10

Algılama yöntemi geliştirilirken, kullanılan antikorun hangi konsantrasyonda serbest toksinle en verimli şekilde yarışım verdiğini belirlemek amacıyla ELISA testi yapıldı. Yarışımlı ELISA'nın prensibi tıpkı sensör çalışmalarımızda olduğu gibi ortamda serbest toksinin varlığında antikorun tabana immobilize antijenlere daha az bağlanarak ölçülen sinyalde bir düşüş gözlenmesine dayanmaktadır. Aralarındaki tek fark immobilizasyon yöntemleri ve tespit şeklidir. Sensör çalışmalarımızda kütle temelli bir tespit yapılırken ELISA'da alkale fosfataz enzimi ile işaretli ikincil bir antikor tabandaki antijenle

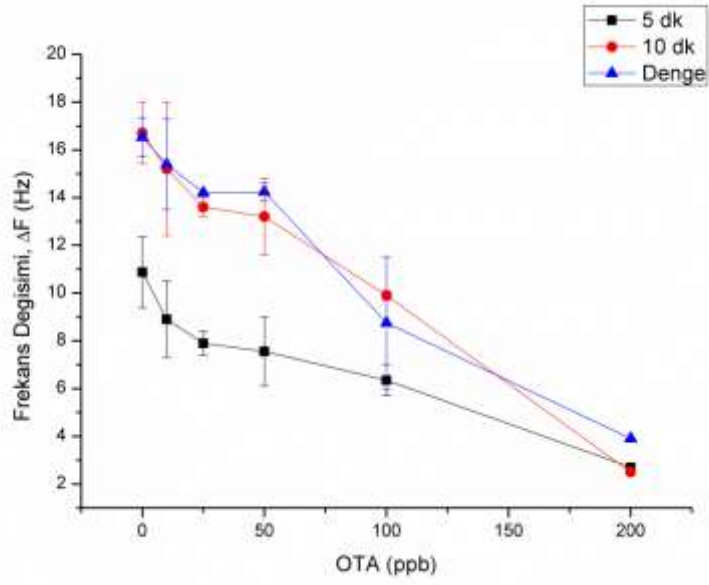
etkileşime giren antijene özgü antikorumuza bağlanarak kolorimetrik ölçüme imkan sağlamaktadır. Bu çalışmada elde edilen sinyal eğrileri Çizim 4. 8’de gösterilmektedir. Bu verilerle antikor miktarı azaltıldığında yarışım kapasitesinin artırıldığı gösterildi. Sensör uygulamasında 0,02 mg/ml’nin altındaki konsantrasyonlarda hızlı ve etkin sonuç alınamaması sebebiyle bu konsantrasyonun altında denemeler yapılmaya gerek görülmedi. Bu verilerden yola çıkılarak çalışmalar 0,025 mg/ml anti-OTA 10F4 antikorunu kullanılarak sürdürüldü.



Çizim 4. 8. 0,025, 0,05 ve 0,1 mg/ml 10F4 ile artan konsantrasyonlarda (0, 10, 20, 50, 100 veya 200 ppb) toksin etkileşimine bağlı ELISA sinyali.

0,025 mg/ml 10F4 antikorunu uygulaması ile elde edilen eğri Çizim 4. 9’da gösterilmiştir. Elde edilen eğri, 0,025 mg/ml 10F4 antikorunu kullanıldığında OTA tespitinin 50 ile 200 ppb arasında güvenle yapılabileceğini göstermektedir.

Ölçüm sistemlerinin istenen özelliklerinden bir diğeri, analiz süresinin kısa olmasıdır. Bu nedenle sensör yüzeyine antikor ve örnek karışımının uygulanmasının ardından geçen sürenin belirleme limiti (LOD, limit of detection) ve kantifikasyon limitine (LOQ, limit of quantification) etkisinin belirlenmesi amacıyla 5 dk, 10 dk ve sinyal dengeye ulaştıktan sonra ölçümler yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen eğriler Çizim 4. 9’da, bu ölçümlere bağlı yapılan R^2 , LOD ve LOQ hesaplamaları Çizelge 4. 4’te gösterilmektedir.

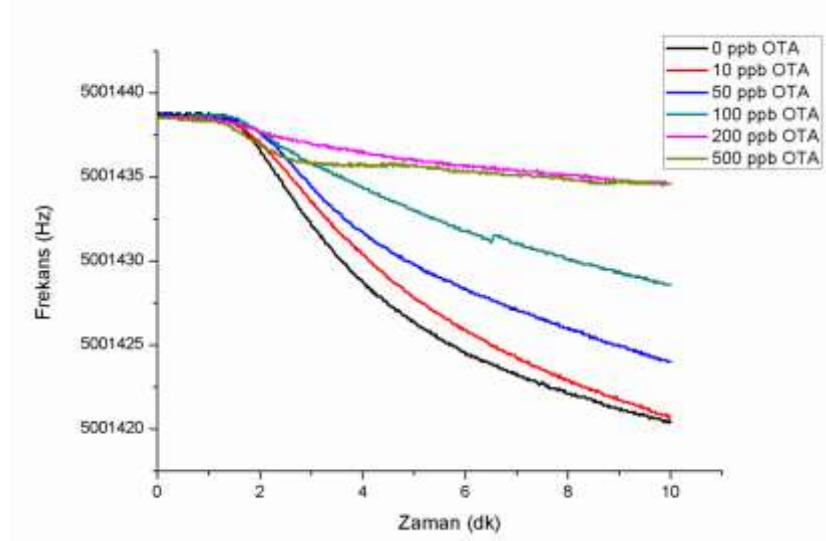


Çizim 4. 9. OTA kaplı yüzeye 0,025 mg/ml 10F4 uygulaması sonucunda elde edilen frekans değişiminin farklı miktarlarda serbest OTA ile etkileşimi.

Çizelge 4. 4. Zamana bağlı yapılan ölçümler sonucunda hesaplanan R^2 , LOD ve LOQ değerleri

	R^2	LOD	LOQ
5 dk	0,997	19,3 ppb	58,5 ppb
10 dk	0,998	17,2 ppb	52,0 ppb
Denge	0,995	26,5 ppb	80,2 ppb

Yarışımlı OTA tespit çalışmalarında farklı toksin konsantrasyonları varlığında elde edilen sensör ölçüm eğrileri Çizim 4. 10'da gösterilmektedir.



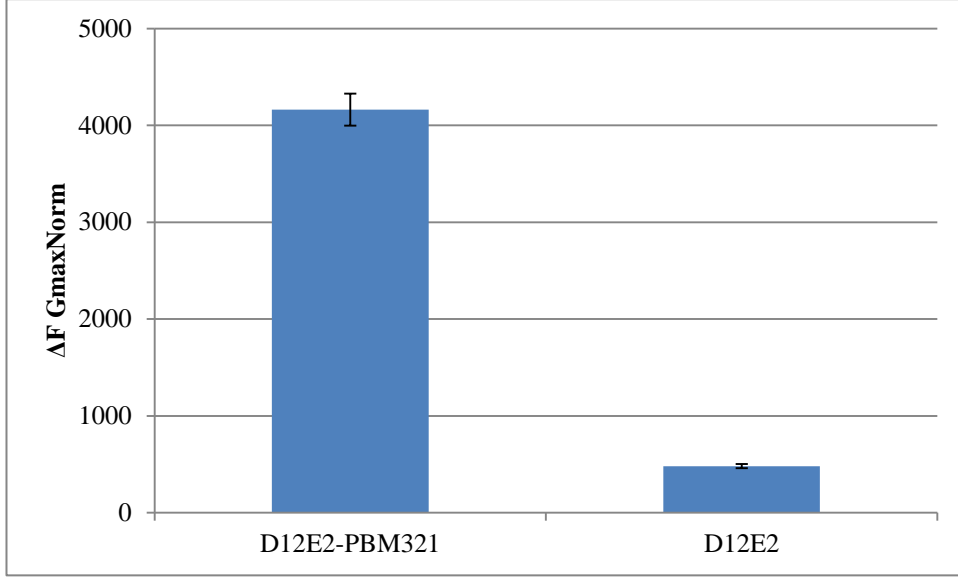
Çizim 4. 10. Farklı OTA konsantrasyonları varlığında elde edilen sensör ölçüm eğrileri

4.3. Antikor-Dendron Konjugasyonu ile Hassasiyet Geliştirme

4.3.1. Anti-AFB1 Antikoru D12E2-PBM321 Konjugasyonunun Karakterizasyonu

3.2.12 D12E2-Dendron Konjugasyonu bölümünde anlatıldığı gibi hazırlanan D12E2-PBM 321 konjugatı boyutunun çok büyük olması nedeni ile SDS-PAGE ile analiz edilemedi. Bu nedenle konjugat boyutu ve ağırlığı dolaylı olarak QCM 100 MHz ile test edilerek konjuge edilmeyen D12E2 ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma çalışmasında yüzeye AFB1 immobilize edildi. İmmobilizasyon işleminin detayları yöntemler bölümünde anlatılmıştır.

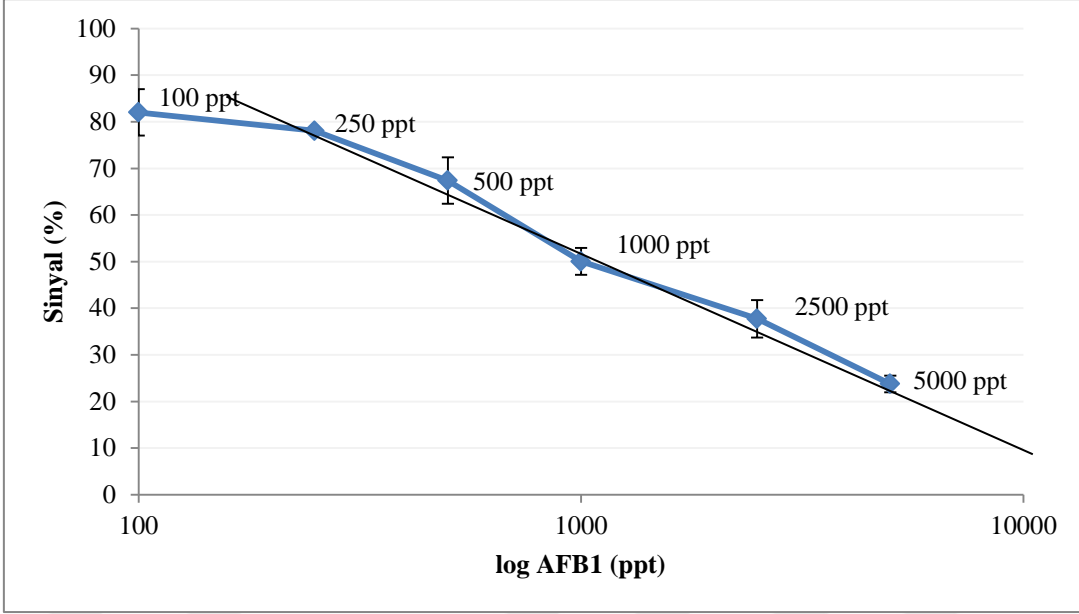
Ölçüm ve karşılaştırma çalışmalarında 0,05 mg/ml D12E2 ve D12E2-PBM321 antikorları yüzeye gönderilmiş ve oluşan frekans farkları ölçülmüştür. Çalışmalar üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş olup elde edilen frekans farkı Çizim 4. 11’de gösterilmektedir. Yapılan çalışma sonucunda D12E2-PBM321’nin D12E2’ye göre 8,6 kat daha fazla frekans düşüşüne sebep olduğu görülmüştür.



Çizim 4. 11. 100 MHz QCM ile yapılan ölçümlerde D12E2 ve D12E2-PBM321 bağlanması sonucunda elde edilen frekans farkları

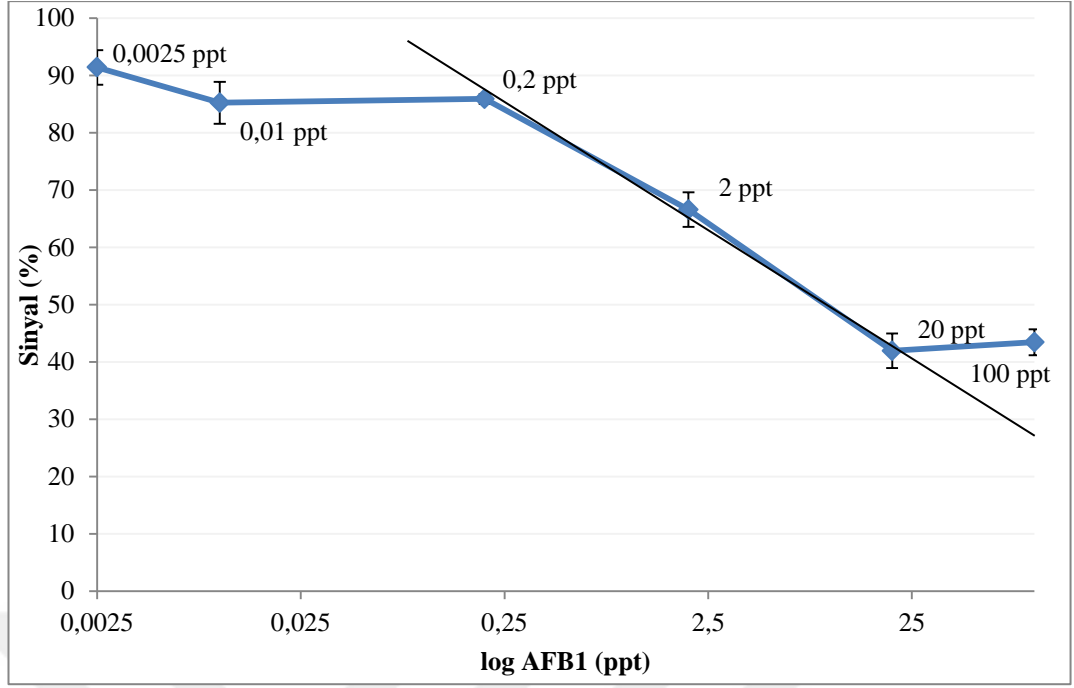
4.3.2. D12E2-PBM321 Konjugatı ve D12E2 ile Yapılan AFB1 Ölçüm Çalışmaları

Yöntemler bölümünde detaylı bir şekilde anlatıldığı gibi Yüzeğe AFB1 İmmobilizasyonu ile Yöntem Geliştirme ve AFB1 Tespiti çalışmalarında öncelikle tabana SAM kaplandı, ardından oluşan SAM tabakasına AFB1-oxim molekülleri kovalent biçimde bağlandı. Yüzey bu şekilde hazırlandıktan sonra farklı konsantrasyonlarda AFB1 ile 0,05 mg/ml D12E2 karıştırılarak Love Wave ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonucunda oluşan Phase Shift değerleri analiz edildi. Verilerin değerlendirilmesinde 0 AFB1 konsantrasyonunda elde edilen phase shift değeri %100 kabul edildi ve diğer konsantrasyonlarda elde edilen phase shift değerleri 0 AFB1 konsantrasyonunda elde edilen phase shift değerine oranlanarak % değerleri hesaplandı. Yapılan bu çalışmalar sonucunda Çizim 4. 12'de de gösterildiği üzere geliştirilen AFB1 sensörünün en düşük belirlene sınırnın 250 ppt olduğu görüldü.



Çizim 4. 12. 0,05 mg/ml D12E2 antikorunu kullanılarak yapılan ölçümler Love wave tabanlı AFB1 biyosensörünün en düşük belirleme sınırının 250 ppt olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada D12E2 antikorları 5. Jenerasyon Polyester bis-mpa 32-karboksil-1-amin (PBM321) isimli dendron konjuge edilerek, geliştirilen biyosensörün AFB1 hassasiyeti değerlendirildi. D12E2'nin PBM321'e konjugasyonu ile antikorun valensi değeri ve ağırlığı artırılmak istendi. Yapılan ölçümler sonucunda elde edilen değerler D12E2 yerine D12E2-PBM321 konjugatı kullanımının en düşük AFB1 belirleme sınırını 250 ppt'den 0,2 ppt'ye düşürdüğü görüldü. Elde edilen sonuçlar Çizim 4. 13'te gösterilmektedir.



Çizim 4. 13. 0,05 mg/ml D12E2-PBM321 konjugatı kullanılarak yapılan ölçümler Love wave tabanlı AFB1 biyosensörünün en düşük belirleme sınırının 0,2 ppt olduğunu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada antijen ve antikor immobilizasyonuna yönelik farklı yöntemler karşılaştırılarak ölçüm yöntemi geliştirilmiş, bunun yanı sıra yüksek hassasiyete sahip ölçüm platformu kullanılmış ve antikorların dendronlar ile konjugasyonu yapılarak optimizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu yolla piezoelektrik immünobiyosensörler kullanılarak küçük moleküllerin tespitine yönelik duyarlık geliştirmesi sağlanmış olup bu sonuca katkı sağlayan unsurlar aşağıda tartışılmıştır.

5.1. İmmobilizasyon Çalışmaları

5.1.1. Antikor Yönlendirme Çalışmaları

Antikorum immobilize edildiği tanı sistemlerinde en büyük problem, bağlanma sırasında antikorum edindiği konformasyon nedeniyle antijen tanıma bölgelerinin ulaşılamaz olmasıdır. Bu çalışmada, iki farklı antikor yönlendirme stratejisi denenerek antikorum tanıma bölgelerinin ulaşılabilir olması hedeflenmiştir. Bu iki stratejiden ilki, antikorum iki ağır zinciri arasındaki disülfit bağlarının koparılarak altın yüzeyine S-S bağları ile yüksek afiniteli bağlanmanın gerçekleşmesi ve antikorum antijen tanıma bölgelerinden tabana bağlanmasının engellenmesidir.

Literatürde yer alan çalışmalar, DTT ile yönlendirmenin ölçüm kapasitesini yaklaşık 2 kat artırdığını göstermektedir (Sharma ve diğ. 2010; Baniukevic ve diğ. 2013). Çalışmamızda, yönlendirme olmadan direkt adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon yapıldığında tabana bağlanan antikorlar 18 Hz'lik frekans değişimine yol açtı. Öte yandan DTT ile indirgenen antikorlar çok daha verimli bir şekilde yüzeye bağlanarak 43 Hz'lik frekans değişimine yol açtı. Buna karşılık, yönlendirilmemiş antikora bağlanan AFB1-cBSA 1,5 Hz'lik kaymaya sebep olurken, DTT ile yönlendirme yapıldığında bağlanan AFB1-cBSA'nın 3 Hz'lik bir kaymaya sebep olduğu görüldü. Bu artış, literatürde yer alan çalışmalarla uyumlu olarak 2 kattır. Fakat her ne kadar elde edilen bağlanma iki katına ulaşmış olsa da, frekanstaki bu kayma bir standart eğri elde edilebilmesi için yeterli değildir.

Antikorum yönlendirilmesinde kullanılan bir diğer strateji Protein A'nın antikorum Fc bölgesine olan afinitesine dayanmaktadır. Böylelikle tabana bağlanan Protein A, antikorum kuyruk bölgesine bağlanarak antijen bağlama bölgelerini açıkta bırakacak ve antijenlerin bu bölgeye ulaşımı kolaylaşacaktır. Bu çalışmada, Protein A yüzeye direkt adsorpsiyonla bağlanmış ve ardından yüzeye 0,1 mg/ml 8G8 uygulanmıştır. Bu yolla bağlanan antikor 21

Hz'lik bir frekans farkı oluşturmasına ve bu miktar direkt adsorpsiyonla bağlanan antikor miktarıyla birbirine çok yakın olmasına rağmen çok daha fazla AFB1-BSA konjugatı bağlanabilmiş ve 65 Hz'lik frekans farkına yol açmıştır. Sinyaldeki bu artış, serbest ortamdaki AFB1'in yüksek hassasiyetle belirlenebileceği konusunda heyecan uyandırır da Protein A ve antikor arasındaki ilişki oldukça hassas bir ilişki olduğundan Protein A'ya bağlanan antikorlar ve tabana bağlanan Protein A sert rejenerasyon koşullarına dayanamamış ve ortamdaki uzaklaşmıştır.

Buna ek olarak çalışılan sistem ağırlık tabanlı bir sistem olduğundan tabana antikor immobilize edildiğinde AFB1'in ağırlaştırılması gerekmiş ve antijenler cBSA ile konjuge edilerek ağırlaştırılmıştır. Fakat protein ile konjugasyon işlemi bir miktar agregasyona sebep olmuş, bu da ölçümlerde tutarsızlıklara yol açmıştır.

Bunun da ötesinde, çalışmakta olduğumuz antikor olan 8G8'in antijenimize çok yüksek afiniteyle bağlanması ve AFB1'in hidrofobik bir molekül olması sebebiyle antijen-antikor arasındaki ilişkinin koparılması ve yüzeyin rejenere edilip tekrar kullanılabilmesi için oldukça sert bir tampon olan 50 mM NaOH %1 SDS kullanılmıştır. Bu tampon, protein yapıdaki antikora zarar verdiği için yüzeyde antikor immobilizasyonu stratejisinin uygulanması bu çalışma için mümkün olamamıştır.

5.1.2. Antijen İmmobilizasyon alışmaları

5.1.2.1. Yüzeye antijen-protein konjugat immobilizasyon alışmaları

Gerçekleşen bir algılayıcı-analit bağlanması bir diğer etkileşime engel olması durumu, sterik engelleme olarak açıklanmakta olup immobilizasyon temelli tanı sistemlerinde göz önünde bulundurulması gereken bir parametredir (Edwards 2007; Zhao ve diğ. 2013). Antikorlar oldukça büyük moleküller olduklarından, sensör yüzeyine bağlandıklarında bir diğer antikorun bağlanmasını engellememesi için yapılan bu çalışmada antijenlerin bir protein üzerine immobilize halde daha seyrek bağlanması hedeflendi. Bu çalışmada model toksin olarak OTA kullanılmıştır.

Bu bölümde, daha önce hazırlanmış olan OTA-cBSA konjugatı yüzeye kovalent ve non-kovalent olmak üzere iki şekilde bağlanmıştır. Yüzeye kovalent bağlama stratejisinin rejenerasyonlar sonrasında antijenin yüzeyden sklmesini engelleyerek yüzeyin fonksiyonelliğini kaybetmesini engellemesi açısından faydalı olacağı dşnlmştir.

Bu çalışmada adsorpsiyon yoluyla bağlanan OTA-cBSA'nın ilk aşamada kovalent bağlamaya göre 2 kat daha fazla antikor bağladığı fakat ilk rejenerasyonda etkinliğinin yarısını kaybettiği görülmüştür. Bu durumun yüzeydeki antijenlerin kaybindan oluştuğunu göstermek amacıyla yüzeye tekrar OTA-cBSA gönderildikten sonra antikor bağlama kapasitesinin tekrar aynı seviyeye ulaşması kapasite kaybının antijenlerin yüzeyden uzaklaşması nedeniyle gerçekleştiğini kanıtlamaktadır. Öte yandan SAM kaplı yüzeye OTA-cBSA kovalent olarak bağlandığında yüzeyin antikor bağlama kapasitesi düşmüş olmasına rağmen akış altında yapılan immobilizasyonda 1. rejenerasyon sonucunda aktivite kaybı görülmemiş, fakat 2. Rejenerasyon sonucunda aktivite kaybı gerçekleşmiştir. Bu durumun kovalent bağlanan antijenlerin yüzeyden uzaklaşması sonucunda gerçekleşmesi beklenmedik bir durum olduğundan yüzeye tekrar OTA-cBSA verilerek yüzeye OTA-cBSA bağlanması olup olmadığı test edildi. Yapılan çalışmada yüzeye tekrar OTA-cBSA bağlanmaması; uygulanan rejenerasyon işlemi sonucunda yüzeyden antijen uzaklaşması sonucunda değil, yüzeydeki protein-toksin konjugatlarının konformasyonel yapısındaki değişiklik sonucunda toksinlerin maskelenmesi nedeniyle olabileceği veya etkin rejenerasyonun yapılamadığı şeklinde yorumlanabilir. Fakat yüzeye kaplanan SAM üzerine doğrudan toksin immobilize edildiğinde böyle bir rejenerasyon sorunuyla karşılaşılma olmaması, sert rejenerasyon koşullarında tabandaki protein varlığının aktivitesi önemli olmasa bile yüzeyin tekrar kullanılabilirliğini etkilediğini ifade etmektedir. Literatürde yer alan çalışmalarda tabanda OTA-BSA konjugatı kullanıldığında önemli aktivite kaybı yaşanmadan etkin rejenerasyon döngüleri uygulanabildiği görülmektedir (Adányi ve diğ. 2007; J. Yuan ve diğ. 2009). Benzer çalışmalar farklı mikotoksinler için de uygulanmış ve 500 defa rejenere edilebilen yüzeyler bu yolla geliştirilebilmiştir (Tüdös ve diğ. 2003). Rejenerasyon işlemi, kullanılan antikor ve antijen arasındaki ilişkinin doğasıyla doğrudan alakalı olduğundan farklı antikorlar kullanılarak aynı rejenerasyon başarısına ulaşmak mümkün olmayabilmektedir. Yukarıda işaret edilen yayınlarda kullanılan antikoru Guanidine HCl ile tabandaki kaplamaya zarar vermeden etkin bir şekilde uzaklaştırmak mümkünken bizim antikorumuz ile antijenimiz arasındaki ilişkinin doğası nedeniyle bu solüsyon kullanıldığında ancak %56'lık bir rejenerasyon sağlanabilmiştir.

5.1.2.2. Yüzeğe OTA immobilizasyonu ile yöntem geliştirme ve OTA tespiti

Yüzeğe doğrudan toksin immobilizasyonu üzerine yapılan çalışmalarda Ertekin ve ark.'ın 2016'da yaptığı çalışma iz alınmıştır. Bu çalışma, 5 MHz QCM kristallerine önce SAM, ardından doğrudan AFB1 kaplanarak yüksek afiniteli bir antikor olan D12E2 ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada, bizim de rejenerasyon için kullanmak durumunda kaldığımız 50 mM NaOH %1 SDS solüsyonuna dirençli sensör yüzeylerinin AFB1 tespiti için kullanımını içermektedir.

Yüzeğe doğrudan OTA immobilizasyonu ile, bu çalışmada daha önce antikor ve antijen-protein konjugatları immobilizasyonu sonucunda elde edilen sensör sinyallerinden daha tutarlı ve yüksek sonuçlar elde edilmesi ve sert rejenerasyon koşullarına dayanıklı bir yüzey ile örnek içinde bulunan farklı konsantrasyonlardaki OTA'nın yarışımlı sistem ile tespitinin yapılabilmesi hedeflenmiştir.

Bu çalışmada karşılaşılan ilk sorun, OTA'nın çözünür olduğu bilinen ethanol konsantrasyonunda, çapraz bağlama için kullanılan EDC ve NHS'in çözünür olmaması olmuştur. Bunun üzerine bir dizi farklı reaksiyon koşulu denenerek immobilizasyon optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Literatürde şimdiye kadar bu şekilde uygulanmış bir OTA immobilizasyon stratejisi bulunmamakta olup bu çalışma biyosensörlerde OTA immobilizasyon çalışmaları açısından yenilik taşımaktadır. Hazırlanan bu kristaller aynı zamanda rejenerasyon etkinliği açısından da değerlendirilmiş ve hazırlanan yüzeylerin en az 13 defa etkinlik kaybı yaşanmadan kullanılabilceği görülmüştür. Toksinin doğrudan yüzeğe immobilizasyonu ile küçük moleküllerin tespitinde çok defa rejenerasyon yapılabildiği ve spesifik olmayan sinyallerin azaltılabileceği raporlanmıştır (Ertekin ve diğ., 2016; Taylor ve diğ., 2008; Llamas ve diğ., 2007; Mitchell, 2010) Taylor ve ark.'ın 2008'de küçük molekül yapıda bir toksin olan tetrodotoksinin (TTX) SPR ile tespiti üzerine yaptığı çalışmada, TTX yüzeğe SAM aracılığıyla konjuge edilmiş ve 50 mM NaOH ile rejenere edilmiştir. Bu çalışmada etkinlik kaybı olmadan yüzeyin 7 defa rejenere edilebildiği görülmüştür. Bu çalışmada kullanılan rejenerasyon tamponu bizim çalışmamızda ancak %74'lük rejenerasyon sağlayabilmiştir. Ertekin ve ark., (2016)'ın çalışması, bizim kullandığımız rejenerasyon solüsyonu olan 50 mM NaOH %1 SDS kullanıldığında aktivite kaybı yaşanmadan 9 ardışık rejenerasyon yapılabildiğini göstermiştir. Bu bilgiler ışığında sert rejenerasyon koşullarının uygulandığı çalışmalarda

karşılaştırıldığında, elde edilen 13 rejenerasyon döngüsünün oldukça başarılı bir sonuç olduğu görülmektedir.

Yüzeye doğrudan toksin immobilizasyonu sonucunda bağlanan antikorun yol açtığı frekans kayması ile OTA-cBSA immobilize yüzeyle bağlanan antikorun yol açtığı frekans kayması karşılaştırıldığında bağlama etkinliği açısından büyük bir sinyal geliştirme elde edilememiştir, bu durumun sterik etkilerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde doğrudan toksin immobilizasyonu yapıldığında sterik etkilenmeden dolayı toksin-protein konjugatı immobilize edildiğindekiyle benzer sonuçlar görülmesi durumuna rastlanmıştır (Prieto-Simón ve diğ. 2010; Llamas ve diğ. 2007). Bu yolla sinyal geliştirme elde edilememiş olmasına rağmen bu sonuç, rejenerasyonlara dayanıklı yüzeyler ve tutarlı sonuçlar elde edilebilmesi nedeniyle yöntem geliştirme penceresinden ele alındığında kıymetlidir.

Yarışımli sistemlerde yöntem geliştirilirken ele alınması gereken bir diğ er unsur kullanılan antikorun konsantrasyonudur. Ortamda çok fazla antikor olması durumunda ölçülmesi hedeflenen analitin bağlanarak blokladığı antikorlar dışında serbest kalan antikorlar yüzeyde immobilize edilmiş antijenlere aynı şekilde bağlanabilir. Bu nedenle yüksek miktarda antikor kullanımı düşük hassasiyete ve yüksek tespit limitlerine yol açar (Wild 2005). Bu durumdan kaçınmak için bu çalışmada tabana antijen kaplanarak yarışımli ELISA ile ölçülebilen sinyal ve OTA tespit limitleri gözetilerek en uygun antikor konsantrasyonu 0,025 mg/ml olarak belirlendi. Bu konsantrasyon biyosensör çalışmalarında 0,006 ile 0,5 mg/ml arasında değişmekte olup bu konsantrasyonun belirlenmesinde kullanılan antikorun afinitesi belirleyici olmaktadır.

Anlatıldığı şekilde geliştirilen yöntem kullanılarak solüsyon içindeki serbest OTA ölçümleri yapılmış ve bir standart eğri elde edilmiştir. Elde edilen standart eğri incelendiğinde geliştirilen biyosensörün 50 ile 200 ppb arasında OTA tespit edebileceği ve bu değ erin literatürde yer alan ve tespit aralığı 50-1000 ppb olan diğ er OTA immünobiyosensörle uyumluluk gösterdiği görülmüştür (Tsai ve Hsieh 2007).

5.2. Antikor-Dendron Konjugasyonu ile Hassasiyet Geliştirme

Bu çalışmada, daha önceden kullandığımız 5 MHz QCM ile elde edilen sinyallerin artırılması ve hassasiyetin geliştirilmesi amacıyla daha yüksek frekansta çalışılması planlandı. Fakat daha yüksek frekansta çalışıyor olmanın daha yüksek gürültüye sebep olacağı bilinmektedir (Isabel ve diğ. 2013). Bu nedenle, sıvı sistemlerde kullanılmak üzere

optimize edilen ve yüksek frekanslarda QCM'lerle karşılaştırıldığında daha düşük gürültü sorunu yaşanan bir diğer piezoelektrik sistem olan Love Wave sensörünün kullanılmasına karar verildi ve ölçümler 120 MHz frekansta yapıldı.

Love wave sensörü ile yapılan çalışmalar Ertekin ve ark.'ın 2016'da raporladığı QCM tabanlı AFB1 biyosensör çalışmaları ışığında ilerletilmiştir. Yöntem bölümünde detaylı şekilde anlatıldığı gibi altın yüzeye önce SAM kaplanmış, ardından D12E2-AFB1 karışımları sisteme gönderilerek faz kayması (phase shift) değerleri ölçülmüştür.

Yapılan çalışma sonucunda en düşük AFB1 belirleme limitinin 250 ppt olduğu ve 250 ppt ile 5000 ppt arasında lineer eğriye sahip olduğu görülmüştür. Ertekin ve ark., (2016), aynı şekilde immobilizasyon yapılarak ve aynı antikora QCM 5 MHz ile çalışıldığında bu aralığı 1250-10000 ppt olarak belirlemiştir. Elde edilen bu sonuçlar 120 MHz frekansta Love wave sensörlerle çalışıldığında tespit hassasiyetinin 5 kat artırıldığını göstermektedir. Love wave sensörler kullanılarak örnek içindeki serbest AFB1'in tanınmasına yönelik henüz literatürde çalışma bulunmadığından elde edilen değerlerin literatürdeki AFB1 Love wave sensörleri ile karşılaştırması mümkün olmamaktadır.

Bu tez çalışmasında ölçüm platformunun ve çalışma frekansının değiştirilmesinin yanı sıra kullanılan D12E2 antikorunun 5. Jenerasyon polyester bis mpa 32 karboksil 1 amin (PBM321) ile konjugasyonu ile ağırlığının ve valensisinin artırılması hedeflenmiştir. D12E2-PBM321 ile love wave platformunda yapılan ölçümler sonucunda elde edilen standart eğri, 0,2-20 ppt aralığında AFB1 ölçümü yapılabileceğini göstermektedir. Bu strateji ile AFB1 ölçüm hassasiyeti yaklaşık 1250 kat geliştirilmiştir.

Piezoelektrik biyosensörlerde antikorun ağırlaştırılarak AFB1 ölçüm hassasiyetinin geliştirilmesine yönelik çalışmaların benzerleri bulunmaktadır. Fakat bu çalışmalarda genellikle altın nanopartikül gibi esnek olmayan yapılar kullanılmış ve belirleme limiti 10 ppt'ye, ölçüm limiti ise ancak 100 ppt'ye kadar düşürülebilmıştır (Jin ve diğ. 2009). Bu çalışmada kullanılan PBM321'in farkı, oldukça esnek bir yapı olması nedeniyle üzerinde bulunan birden fazla D12E2'ye yapısal engellemeye neden olmadan tabana bağlanabilme şansı sunmasıdır.

Dendrimerlerle yapılan AFB1 biyosensör çalışmalarının tamamında dendronlar immobilizasyon için kullanılmış olup yapılan çalışmanın benzeri literatürde yer almamaktadır (Castillo, Poturnayova, ve diğ. 2015; Castillo, Spinella, ve diğ. 2015; Satija ve diğ. 2011). Dendronların düşük molekül ağırlığı (≈ 3 kDa) nedeniyle yeterince ağırlık

sağlayamayacağı için daha çok immobilizasyon için kullanılmaktadır. Bu çalışmada dendronlar hali hazırda yüksek molekül ağırlığına sahip IgA tipi antikorların birden fazlasını bir araya getirebilecek esnek bir platform olarak kullanılmıştır. Bunun sonucunda oluşan yapının valensisi artmıştır. Antikorların valensisinin rekombinant olarak artırıldığı bir çalışmada, aviditenin yükselmesi nedeniyle ayrılma katsayısının 3,5 kat düştüğü (k_{off}), dolayısıyla antijene daha kuvvetli bağlanmanın gerçekleştiği deneysel olarak gösterilmiştir (Ito ve Kurosawas 1993). Pankarsinomaya karşı terapötik antikorların kullanıldığı bir diğer çalışmada ise bivalent $[ScFv_2]$ yapısı rekombinant olarak $[ScFv_2]_2$ 'ye dönüştürüldüğünde bağlanma afinitesi sabitinin (k_{on}) 4 kat arttığı tespit edilmiştir (A. Goel ve diğ. 2000). Bu bilgiler ele alınarak k_{off}/k_{on} olarak ifade edilen denge ayrılma sabiti (K_D) yeniden yorumlandığında, k_{off} 'taki düşüş ve k_{on} 'daki artış nedeniyle K_D 'nin önemli oranda düşmesi ve buna bağlı olarak bağlanmanın önemli oranda kuvvetlenmesi beklenmektedir.

Bu çalışma kapsamında elde edilen 1250 katlık sinyal geliştirmenin, D12E2-PBM321 konjugatının hem K_D 'sinin düşmesi nedeniyle bağlanmasının kuvvetlenmiş olması hem de ağırlık artışı nedeniyle oluşturduğu sinyalde artış olması sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir.

5.3. Sınırlılıklar

Çalışma süresince karşılaşılan en temel sınırlılığın zaman olduğu değerlendirilmektedir. Çalışmanın genelleme anlamında daha kuvvetli olması açısından PBM321 konjugasyonunun farklı küçük analit antikorları için de denenerak hassasiyet artırma etkinliğinin gösterilmesinin anlamlı olacağı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra tartışma bölümünde PBM321 ile elde edilen duyarlık geliştirme etkinliği bağlanma kuvvetinin artışı ve antikorun ağırlığının artması ile açıklanmıştır. Antikor ağırlığındaki artış deneysel olarak gösterilmiştir. Fakat bağlanma kuvvetindeki artışın da deneysel olarak gösterilmesi çalışmayı güçlendirecektir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışması kapsamında küçük moleküllerin piezoelektrik immünobiyosensörler kullanılarak tespitine yönelik yöntem ve duyarlık geliştirilmesi hedeflenmiştir. Yöntem geliştirilmesi kapsamında ele alınması öngörülen immobilizasyon karşılaştırmaları yapılmış ve yapılan karşılaştırmalar sonucunda tabana kovalent antijen bağlanmasının rejenerasyonlara dayanıklı yüzey oluşturulması açısından verimli olduğu sonucuna varılmıştır.

Yöntem geliştirilmesinin ardından duyarlık geliştirmek amacıyla yüksek frekanslarda daha düşük gürültü ile ölçüm yapabilen 120 MHz Love wave platformu ile ölçümler gerçekleştirilmiş ve 5 MHz QCM ile yapılan ölçümlere göre 5 kat daha hassas sonuçlar elde edilmiştir. Buna ek olarak antikora PBM321 dendronu konjuge edilerek antikorun ağırlığı ve bağlanma kuvveti artırılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda bu stratejinin 1250 kat daha düşük konsantrasyonda AFB1 ölçümüne izin verdiği belirlenmiştir.

Sınırlılıklar bölümünde de ele alındığı üzere etkinliği belirlenen PBM321 dendron konjugasyonu stratejisinin farklı küçük analitlerin tespiti için de uygulanarak sonuçların doğrulanması stratejinin genellenebilmesi açısından önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra sadece ağırlık artışı ile açıklanamayacak olan yüksek hassasiyet artışının teorik olarak ilişkilendirdiği K_D düşüşü ve bağlanma kuvvetinin artışı deneysel olarak da gösterilmelidir.

KAYNAKLAR

Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, ve diğ. Dendrimers: Synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res Lett.* 2014;9(1):1–10. doi:10.1186/1556-276X-9-247.

Abdel-Hamid AAM, Firgany AE-DL. Vitamin E supplementation ameliorates aflatoxin B1-induced nephrotoxicity in rats. *Acta Histochem.* 2015;117(8):767–779. doi:10.1016/j.acthis.2015.08.002.

Abdulmajeed NA. Therapeutic ability of some plant extracts on aflatoxin B1 induced renal and cardiac damage. *Arab J Chem.* 2011;4(1):1–10. doi:10.1016/J.ARABJC.2010.06.005.

Abid S, Hassen W, Achour A, ve diğ. Ochratoxin a and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic? *Hum Exp Toxicol.* 2003;22(2):77–84. doi:10.1191/0960327103ht3280a.

Adányi N, Levkovets I a. I, Rodriguez-Gil S, Ronald a., Váradi M, Szendro I. Development of immunosensor based on OWLS technique for determining Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. *Biosens Bioelectron.* 2007;22(6):797–802. doi:10.1016/j.bios.2006.02.015.

Agnes VF, Akbarsha MA. Pale vacuolated epithelial cells in epididymis of aflatoxin-treated mice. *Reproduction.* 2001;122(4):629–641. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11570970>. Erişim Ekim 10, 2017.

Alewu B, Nosiri C. Pesticides and Human Health. İçinde: Pesticides in the Modern World - Effects of Pesticides Exposure. *InTech;* 2011. doi:10.5772/18734.

Anderson PD. Bioterrorism: Toxins as Weapons. *J Pharm Pract.* 2012;25(2):121–129. doi:10.1177/0897190012442351.

Anukul N, Vangnai K, Mahakarnchanakul W. Significance of regulation limits in mycotoxin contamination in Asia and risk management programs at the national level. *J Food Drug Anal.* 2013;21(3):227–241. doi:10.1016/J.JFDA.2013.07.009.

Aoki H, Tao H. Gene sensors based on peptide nucleic acid (PNA) probes: Relationship between sensor sensitivity and probe/target duplex stability. *Analyst.* 2005;130(11):1478. doi:10.1039/b507121f.

Asim M, Sarma MP, Thayumanavan L, Kar P. Role of Aflatoxin B1 as a risk for primary liver cancer in north Indian population. *Clin Biochem.* 2011;44(14–15):1235–1240. doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.07.017.

Bagriantsev SN, Gracheva EO, Gallagher PG. Piezo proteins: Regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Biol Chem.* 2014;289(46):31673–31681. doi:10.1074/jbc.R114.612697.

Bahey NG, Elaziz HOA, Gadalla KKES. Toxic effect of aflatoxin B1 and the role of recovery on the rat cerebral cortex and hippocampus. *Tissue Cell.* 2015;47(6):559–566. doi:10.1016/J.TICE.2015.09.001.

Baniukeyvic J, Kirlyte J, Ramanavicius A, Ramanaviciene A. Application of oriented and random antibody immobilization methods in immunosensor design. *Sensors Actuators B Chem.* 2013;189:217–223. doi:10.1016/j.snb.2013.03.126.

Barnes JM, Austwick PK, Carter RL, Flynn F V, Peristianis GC, Aldridge WN. Balkan (endemic) nephropathy and a toxin-producing strain of *Penicillium verrucosum* var *cyclopium*: An experimental model in rats. *Lancet (London, England).* 1977;1(8013):671–675. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/66474>. Erişim Ekim 18, 2017.

Battilani P, Toscano P, Van der Fels-Klerx HJ, ve diğ. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci Rep.* 2016;6:24328. doi:10.1038/srep24328.

Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* 2016;60:1–8. doi:10.1042/EBC20150001.

Bhat R V. Mould deterioration of agricultural commodities during transit: problems faced by developing countries. *Int J Food Microbiol.* 1988;7(3):219–225. doi:10.1016/0168-1605(88)90041-4.

Bousse L. Whole cell biosensors. *Sensors Actuators B Chem.* 1996;34(1–3):270–275. doi:10.1016/S0925-4005(96)01906-5.

Brancato A, Brocca D, Erdos Z, ve diğ.. Reporting data on pesticide residues in food and feed according to Regulation (EC) No 396/2005 (2016 data collection). *EFSA J.* 2017;15(5). doi:10.2903/j.efsa.2017.4792.

Brito MC, Guthrie J. Development of Biosensors for Small Environmental Target Molecules Using Ce-Selex. *McNair Sch Res J.* 9(1). <http://commons.emich.edu/mcnair/vol9/iss1/4>. Erişim Ekim 6, 2017.

Bui-Klimke TR, Wu F. Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;55(13):1860–1869. doi:10.1080/10408398.2012.724480.

Bunde RL, Jarvi EJ, Rosentreter JJ. Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta.* 1998;46(6):1223–1236. doi:10.1016/S0039-9140(97)00392-5.

Byrne B, Stack E, Gilmartin N, O’Kennedy R. Antibody-based sensors: Principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors (Switzerland).* 2009;9(6):4407–4445. doi:10.3390/s90604407.

Cao Y, Griffith B, Bhomkar P, Wishart DS, McDermott MT. Functionalized gold nanoparticle-enhanced competitive assay for sensitive small-molecule metabolite detection using surface plasmon resonance. *Analyst.* 2017;143(1):289–296. doi:10.1039/c7an01680h.

Castegnaro M, Canadas D, Vrabcheva T, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Pfohl-Leszkowicz A. Balkan endemic nephropathy: Role of ochratoxins A through biomarkers. *Mol Nutr Food Res.* 2006;50(6):519–529. doi:10.1002/mnfr.200500182.

Castillo G, Poturnayova A, Snejdarkova M, Hianik T, Spinella K, Mosiello L. Development of electrochemical aptasensor using dendrimers as an immobilization platform for detection of Aflatoxin B1 in food samples. *Içinde: 2015 XVIII AISEM Annual Conference. IEEE;* 2015:1–4. doi:10.1109/AISEM.2015.7066764.

Castillo G, Spinella K, Poturnayova A, Snejdarkova M, Mosiello L, Hianik T. Detection of aflatoxin B1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform. *Food Control.* 2015;52:9–18. doi:10.1016/J.FOODCONT.2014.12.008.

Chan K-T, Hsieh DPH, Lung ML. In vitro aflatoxin B1-induced p53 mutations. *Cancer Lett.* 2003;199(1):1–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963117>. Erişim Ekim 10, 2017.

Cheli F, Pinotti L, Rossi L, Dell’Orto V. Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: A review. *LWT - Food Sci Technol.* 2013;54(2):307–314. doi:10.1016/J.LWT.2013.05.040.

Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc.* 2006;1(4):1852–1858. doi:10.1038/nprot.2006.288.

Cortinovis C, Caloni F, Schreiber NB, Spicer LJ. Effects of fumonisin B 1 alone and combined with deoxynivalenol or zearalenone on porcine granulosa cell proliferation and steroid production. *Theriogenology.* 2014;81:1042–1049. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.01.027.

Cox KL. Immunoassay Methods. *Assay Guid Man.* 2012:26–28.

Danovaro R, Umani SF, Pusceddu A. Climate Change and the Potential Spreading of Marine Mucilage and Microbial Pathogens in the Mediterranean Sea. *PLoS One*. 2009;4(9):e7006. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0007006.

Darwish WS, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Ishizuka M. An overview on mycotoxin contamination of foods in Africa. *J Vet Med Sci*. 2014;76(6):789–797. doi:10.1292/JVMS.13-0563.

Ding J, Lu Z, Wang R, Shen G, Xiao L. Piezoelectric immunosensor with gold nanoparticles enhanced competitive immunoreaction technique for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid quantification. *Sensors Actuators, B Chem*. 2014;193:568–573. doi:10.1016/j.snb.2013.11.079.

Do, Jin Hwan D-KC. Aflatoxins : Detection , Toxicity , and Biosynthesis. *Biotechnol bioprocess Eng*. 2007;12:585–593.

Dong J, Hasan S, Fujioka Y, Ueda H. Detection of small molecule diagnostic markers with phage-based open-sandwich immuno-PCR. *J Immunol Methods*. 2012;377(1–2):1–7. doi:10.1016/j.jim.2012.01.005.

Duarte SC, Lino CM, Pena A. Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. *Vet J*. 2012;192(3):286–292. doi:10.1016/J.TVJL.2011.11.002.

Duarte SC, Pena A, Lino CM. Human ochratoxin A biomarkers—From exposure to effect. *Crit Rev Toxicol*. 2011;41(3):187–212. doi:10.3109/10408444.2010.529103.

EC. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Oj*. 2006;L364(1881):5–24.

Edwards DA. Steric hindrance effects on surface reactions: applications to BIAcore. *J Math Biol*. 2007;55(4):517–539. doi:10.1007/s00285-007-0093-7.

Eremenko A V, G. Bauer C, Makower A, Kanne B, Baumgarten H, Scheller FW. The development of a non-competitive immunoenzymometric assay of cocaine. *Anal Chim Acta*. 1998;358(1):5–13. doi:10.1016/S0003-2670(97)00590-4.

Ertekin Ö, Öztürk S, Öztürk ZZ. Label Free QCM Immunobiosensor for AFLB1 Detection Using Monoclonal IgA Antibody as Recognition Element. *Sensors (Basel)*. 2016;16:1274.

Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2002;906:i–viii, 1–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11969182>. Erişim Ekim 18, 2017.

Fukada E, Ueda H, Rinaldi R. Piezoelectric and related properties of hydrated collagen. *Biophys J*. 1976;16(8):911–918. doi:10.1016/S0006-3495(76)85741-4.

Funari E, Testai E. Human Health Risk Assessment Related to Cyanotoxins Exposure. *Crit Rev Toxicol*. 2008;38(2):97–125. doi:10.1080/10408440701749454.

García-Martínez G, Bustabad EA, Perrot H, ve diğ.. Development of a mass sensitive quartz crystal microbalance (QCM)-based DNA biosensor using a 50 MHz electronic oscillator circuit. *Sensors*. 2011;11(8):7656–7664. doi:10.3390/s110807656.

Genevieve S. Bondy, James J. Pestka GS, Pestka JJ. IMMUNOMODULATION BY FUNGAL TOXINS. *J Toxicol Environ Heal Part B*. 2000;3(2):109–143. doi:10.1080/109374000281113.

Giraudi G, Anfossi L, Rosso I, Baggiani C, Giovannoli C, Tozzi C. A General Method To Perform a Noncompetitive Immunoassay for Small Molecules. *Anal Chem*. 1999;71(20):4697–4700. doi:10.1021/ac981282c.

Goel a., Colcher D, Baranowska-Kortylewicz J, ve diğ.. Genetically engineered tetravalent single-chain Fv of the pancarcinoma monoclonal antibody CC49: Improved biodistribution and potential for therapeutic application. *Cancer Res.* 2000;60(24):6964–6971.

Goel A, Colcher D, Baranowska-Kortylewicz J, ve diğ.. Genetically Engineered Tetravalent Single-Chain Fv of the Pancarcinoma Monoclonal Antibody CC49: Improved Biodistribution and Potential for Therapeutic Application 1. *CANCER Res.* 2000;60:6964–6971.
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/60/24/6964.full.pdf>. Erişim Ekim 18, 2017.

Gorton L (Lo). Biosensors and modern biospecific analytical techniques. *Elsevier*; 2005.
[https://books.google.com.tr/books?id=Xjw3B8pg0KYC&pg=PA334&lpg=PA334&dq=competitive+biosensor+or+antibody+concentration&source=bl&ots=iE9-luS9SZ&sig=NOFNIZ6AIfJVkhHk09MfDjNGrGq&hl=tr&sa=X&ved=0ahUKEwjzJHm2PfWAhVMZIAKHV9IBNoQ6AEIQjAD#v=onepage&q=competitive biosensor antibody concentration&f=false](https://books.google.com.tr/books?id=Xjw3B8pg0KYC&pg=PA334&lpg=PA334&dq=competitive+biosensor+or+antibody+concentration&source=bl&ots=iE9-luS9SZ&sig=NOFNIZ6AIfJVkhHk09MfDjNGrGq&hl=tr&sa=X&ved=0ahUKEwjzJHm2PfWAhVMZIAKHV9IBNoQ6AEIQjAD#v=onepage&q=competitive%20biosensor%20antibody%20concentration&f=false). Erişim Ekim 17, 2017.

Goyal A. Ultrasensitive quartz crystal microbalance integrated with carbon nanotubes. *ProQuest Diss Theses.*2006;(August):324.

Gronewold TMA. Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: Recent trends and challenges. *Anal Chim Acta.* 2007;603(2):119–128. doi:10.1016/j.aca.2007.09.056.

Gui Q, Lawson T, Shan S, Yan L, Liu Y. The Application of Whole Cell-Based Biosensors for Use in Environmental Analysis and in Medical Diagnostics. *Sensors (Basel).* 2017;17(7). doi:10.3390/s17071623.

Hagelberg S, Hult K, Fuchs R. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J Appl Toxicol.* 1989;9(2):91–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2715571>. Erişim Ekim 18, 2017.

Hamid AS, Tesfamariam IG, Zhang Y, Zhang ZG. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. *Oncol Lett.* 2013;5(4):1087–1092. doi:10.3892/ol.2013.1169.

Harding GL, Du J, Dencher PR, Barnett D, Howe E. Love wave acoustic immunosensor operating in liquid. *Sensors Actuators A Phys.* 1997;61(1–3):279–286. doi:10.1016/S0924-4247(97)80275-0.

Hauck S, Drost S, Prohaska E, Wolf H, Dübel S. Analysis of Protein Interactions Using a Quartz Crystal Microbalance Biosensor. *İçinde: Protein–Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 2002. http://pro.proteinsandproteomics.org/content/free/protocols_2/273-284-PI-Ch15.pdf. Erişim Ekim 19, 2017.

Hees J, Heidrich N, Pletschen W, ve diğ.. Piezoelectric actuated micro-resonators based on the growth of diamond on aluminum nitride thin films. *Nanotechnology.* 2013;24(2). doi:10.1088/0957-4484/24/2/025601.

Heineman WR, Jensen WB, Leland C, Clark Jr. (1918–2005). *Biosens Bioelectron.* 2006;21(8):1403–1404. doi:10.1016/J.BIOS.2005.12.005.

Hueza IM, Raspantini PCF, Raspantini LER, Latorre AO, Górnica SL. Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. *Toxins (Basel).* 2014;6(3):1080–1095. doi:10.3390/toxins6031080.

Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene.* 2007;26(15):2166–2176. doi:10.1038/sj.onc.1210279.

IARC. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins VOLUME 56 IARe MONOGRAHS. *International Agency Res Cancer.* 1993. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf>. Erişim Ekim 18, 2017.

IARC. International Agency for Research on Cancer Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks To Humans. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks To Humans*. 2012;100F:225–248. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/>.

Ibeh IN, Saxena DK, Uraih N. Toxicity of aflatoxin: effects on spermatozoa, oocytes, and in vitro fertilization. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2000;19(4):357–361. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11213017>. Erişim Ekim 10, 2017.

Isabel M, Gaso R, Jiménez Y, Francis LA, Arnau A. Love Wave Biosensors: A Review. *InTech Open*. 2013. doi:10.5772/53077.

Ito W, Kurosawas Y. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Development of an Artificial Antibody System with Multiple Valency Using an Fv Fragment Fused to a Fragment of Protein A*. 1993;268(27):20668–20675. <http://www.jbc.org/content/268/27/20668.full.pdf>. Erişim Ekim 18, 2017.

Jin X, Jin X, Chen L, Jiang J, Shen G, Yu R. Piezoelectric immunosensor with gold nanoparticles enhanced competitive immunoreaction technique for quantification of aflatoxin B1. *Biosens Bioelectron*. 2009;24(8):2580–2585. doi:10.1016/j.bios.2009.01.014.

Kamdem LK, Meineke I, Gödtel-Armbrust U, Brockmöller J, Wojnowski L. Dominant Contribution of P450 3A4 to the Hepatic Carcinogenic Activation of Aflatoxin B. *Chem Res Toxicol*. 2006;19(4):577–586. doi:10.1021/tx050358e.

Kasper M, Traxler L, Salopek J, Grabmayr H, Ebner A, Kienberger F. Broadband 120 MHz impedance quartz crystal microbalance (QCM) with calibrated resistance and quantitative dissipation for biosensing measurements at higher harmonic frequencies. *Biosensors*. 2016;6(2):1–13. doi:10.3390/bios6020023.

Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, Groopman JD. Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicol Sci*. 2011;120 Suppl(suppl_1):S28-48. doi:10.1093/toxsci/kfq283.

Kim E, Baaske MD, Vollmer F. Towards next-generation label-free biosensors: recent advances in whispering gallery mode sensors. *Lab Chip*. 2017;17(7):1190–1205. doi:10.1039/C6LC01595F.

Kondo F, Matsumoto H. Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. *Chem Res toxicol*. 1996;9(8):1355–1359. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx960085a>. Erişim Eylül 28, 2015.

Kovacs G, Vellekoop MJ, Haueis R, Lubking GW, Venema A. A love wave sensor for (bio)chemical sensing in liquids. *Sensors Actuators A Phys*. 1994;43(1–3):38–43. doi:10.1016/0924-4247(93)00660-V.

Kuiper-Goodman T, Scott PM. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed Environ Sci*. 1989;2(3):179–248. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2692617>. Erişim Ekim 18, 2017.

Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK, Kang SG. Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Front Microbiol*. 2016;7:2170. doi:10.3389/fmicb.2016.02170.

Kurosawa S, Aizawa H, Tozuka M, Nakamura M, Park J-W. Immunosensors using a quartz crystal microbalance. *Meas Sci Technol*. 2003;14(11):1882–1887. doi:10.1088/0957-0233/14/11/005.

Länge K, Rapp BE, Rapp M. Surface acoustic wave biosensors: A review. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391(5):1509–1519. doi:10.1007/s00216-008-1911-5.

Le TT, Wilde CP, Grossman N, Cass AEG. A simple method for controlled immobilization of proteins on modified SAMs. *Phys Chem Chem Phys*. 2011;13(12):5271. doi:10.1039/c0cp02531c.

Li S, Wan Y, Fan C, Su Y. Theoretical study of monolayer and double-layer waveguide love wave sensors for achieving high sensitivity. *Sensors (Switzerland)*. 2017;17(3). doi:10.3390/s17030653.

Liu Q, Wu C, Cai H, Hu N, Zhou J, Wang P. Cell-Based Biosensors and Their Application in Biomedicine. *Chem Rev.* 2014;114(12):6423–6461. doi:10.1021/cr2003129.

Lizárraga-Paulín EG, Moreno-Martínez E, Miranda-Castro SP. Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology-3 Aflatoxins and Their Impact on Human and Animal Health: An Emerging Problem. (Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez, ed.). *InTech*; 2011. <http://cdn.intechweb.org/pdfs/20394.pdf>. Erişim Ekim 11, 2017.

Llamas NM, Stewart L, Fodey T, ve diğ.. Development of a novel immunobiosensor method for the rapid detection of okadaic acid contamination in shellfish extracts. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389(2):581–587. doi:10.1007/s00216-007-1444-3.

Love CS, Ashworth I, Brennan C, Chechik V, Smith DK. Dendron-protected Au nanoparticles-Effect of dendritic structure on chemical stability. *J Colloid Interface Sci.* 2006;302(1):178–186. doi:10.1016/j.jcis.2006.05.064.

Lowe CR. Biosensors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1989;324:487–496. doi:10.2307/2396945.

Luppa PB, Sokoll LJ, Chan DW. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. *Clin Chim Acta.* 2001;314(1–2):1–26. doi:10.1016/S0009-8981(01)00629-5.

Lyu Y-K, Lim K-R, Lee BY, Kim KS, Lee W-Y. Microgravimetric lectin biosensor based on signal amplification using carbohydrate-stabilized gold nanoparticles. *Chem Commun.* 2008;0(39):4771. doi:10.1039/b807438k.

Macé K, Aguilar F, Wang JS, ve diğ.. Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis.* 1997;18(7):1291–1297. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230270>. Erişim Ekim 10, 2017.

Malhotra S, Verma A, Tyagi N, Kumar V. *BIOSENSORS: PRINCIPLE, TYPES AND APPLICATIONS.* 2017;(2):2395–4396. http://ijariie.com/AdminUploadPdf/BIOSENSORS__PRINCIPLE__TYPES_AND_APPLICATIONS_ijariie4676.pdf. Erişim Mart 31, 2018.

Manzanares-Palenzuela CL, Martín-Fernández B, Sánchez-Paniagua López M, López-Ruiz B. Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms. *TrAC Trends Anal Chem.* 2015;66:19–31. doi:10.1016/j.trac.2014.10.006.

Markets and Markets. Immunoassay Market by Technology, Application & End User – 2021 | Marketsandmarkets. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/immunoassay-market-436.html>. Published 2016. Erişim Mart 31, 2018.

Marquardt RR, Frohlich AA. A review of recent advances in understanding ochratoxigenesis. *J Anim Sci.* 1992;70(12):3968–3988. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1474034>. Erişim Ekim 18, 2017.

Martin F, Newton MI, McHale G, Melzak KA, Gizeli E. Pulse mode shear horizontal-surface acoustic wave (SH-SAW) system for liquid based sensing applications. *Biosens Bioelectron.* 2004;19(6):627–632. doi:10.1016/S0956-5663(03)00257-4.

Mitchell J. Small molecule immunosensing using surface plasmon resonance. *Sensors (Basel).* 2010;10(8):7323–7346. doi:10.3390/s100807323.

Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2011;8(6):2265–2303. doi:10.3390/ijerph8062265.

Montagut Y, Garcia JV, Jimenez Y, March C, Montoya Á, Arnau A. QCM Technology in Biosensors. *İçinde: Serra PA, ed. Emerging Materials and Applications.* ; 2011.

Montañez MI, Hed Y, Utsel S, ve diğ.. Bifunctional dendronized cellulose surfaces as biosensors. *Biomacromolecules.* 2011;12(6):2114–2125. doi:10.1021/bm200201y.

Moss MO. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit Contam.* 1996;13 Suppl:5–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8972339>. Erişim Ekim 18, 2017.

Omi K, Ando T, Sakyu T, ve diğ.. Noncompetitive immunoassay detection system for haptens on the basis of antimetatype antibodies. *Clin Chem.* 2015;61(4):627–635. doi:10.1373/clinchem.2014.232728.

Patricia L. Domen GH. *Cationized carriers for immunogen production.* Ağustos 1992. <http://www.google.com/patents/US5142027>. Erişim Nisan 4, 2015.

Pinotti L, Ottoboni M, Giromini C, Dell'Orto V, Cheli F. Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts. *Toxins (Basel).* 2016;8(2):45. doi:10.3390/toxins8020045.

Podlaski FJ, Stern AS. Site-Specific Immobilization of Antibodies to Protein G-Derivatized Solid Supports. *İçinde: Humana Press*; 2000:41–48. doi:10.1007/978-1-60327-261-2_4.

Pradelles P, Grassi J, Creminon C, Boutten B, Mamas S. Immunometric assay of low molecular weight haptens containing primary amino groups. *Anal Chem.* 1994;66(1):16–22. doi:10.1021/ac00073a005.

Prieto-Simón B, Miyachi H, Karube I, Saiki H. High-sensitive flow-based kinetic exclusion assay for okadaic acid assessment in shellfish samples. *Biosens Bioelectron.* 2010;25(6):1395–1401. doi:10.1016/j.bios.2009.10.039.

Probst C, Njapau H, Cotty PJ. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(8):2762–2764. doi:10.1128/AEM.02370-06.

Puiu M, Gurban A-M, Rotariu L, Brajnicov S, Viespe C, Bala C. Enhanced sensitive love wave surface acoustic wave sensor designed for immunoassay formats. *Sensors (Basel).* 2015;15(5):10511–10525. doi:10.3390/s150510511.

Quadri SH, Ms N, Kc C, Shantaram U, Hs E. An Overview on Chemistry , Toxicity , Analysis and Control of Aflatoxins. *Int J Chem Life Sci.* 2012;2(1):1071–1078.

Rasooly A, Herold KE. Biosensors for the analysis of food- and waterborne pathogens and their toxins. *J AOAC Int.* 2006;89(3):873–883. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16792089>. Erişim Ekim 18, 2017.

Reddy L, Bhoola K. Ochratoxins-food contaminants: impact on human health. *Toxins (Basel).* 2010;2(4):771–779. doi:10.3390/toxins2040771.

Reverberi R, Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus.* 2007;5(4):227–240. doi:10.2450/2007.0047-07.

Robens JF, Richard JL. Aflatoxins in animal and human health. *Rev Environ Contam Toxicol.* 1992;127:69–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1631352>. Erişim Mayıs 25, 2015.

Rocchitta G, Spanu A, Babudieri S, ve diğ.. Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. *Sensors (Basel).* 2016;16(6). doi:10.3390/s16060780.

Rodrigues I, Naehrer K. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins (Basel).* 2012;4(9):663–675. doi:10.3390/toxins4090663.

Rodríguez-Pardo L, Rodríguez JF, Gabrielli C, Perrot H, Brendel R. Sensitivity, noise, and Resolution in QCM sensors in liquid media. *IEEE Sens J.* 2005;5(6):1251–1256. doi:10.1109/JSEN.2005.859257.

Sanborn M, Kerr KJ, Sanin LH, Cole DC, Bassil KL, Vakil C. Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors. *Can Fam Physician.* 2007;53(10):1712–1720. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934035>. Erişim Mart 31, 2018.

Satija J, Sai VVR, Mukherji S. Dendrimers in biosensors: Concept and applications. *J Mater Chem.* 2011;21(38):14367. doi:10.1039/c1jm10527b.

Sattler TA, Dimitrov T, Hall PW. Relation between endemic (Balkan) nephropathy and urinary-tract tumours. *Lancet (London, England).* 1977;1(8006):278–280. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/64805>. Erişim Ekim 18, 2017.

Schroeder HW, Cavacini L, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2 Suppl 2):S41-52. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.046.

Self CH, Dessi JL, Winger LA. High-Performance Assays of Small Molecules: Enhanced Sensitivity, Rapidity, and Convenience Demonstrated with a Noncompetitive Immunometric Anti-Immune Complex Assay System for Digoxin. *Autom Anal Tech Clin Chem.* 1994;4011(11):2035–2041. <http://clinchem.aaccjnls.org/content/clinchem/40/11/2035.full.pdf>. Erişim Nisan 1, 2018.

Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology.* 1992;42(7):1328–1335. doi:10.1212/WNL.42.7.1328.

Sharma A, Matharu Z, Sumana G, Solanki PR, Kim CGG, Malhotra BDD. Antibody immobilized cysteamine functionalized-gold nanoparticles for aflatoxin detection. *Thin Solid Films.* 2010;519(3):1213–1218. doi:10.1016/j.tsf.2010.08.071.

Sharma S, Byrne H, O'Kennedy RJ. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays Biochem.* 2016;60(1):9–18. doi:10.1042/EBC20150002.

Shephard GS. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Anal Bioanal Chem.* 2009;395(5):1215–1224. doi:10.1007/s00216-009-2857-y.

Singh S. Aflatoxin threat in Nepal, Bangladesh - SciDev.Net South Asia. SciDevNet. <http://www.scidev.net/south-asia/health/news/aflatoxin-threat-in-nepal-bangladesh.html>. Published 2014. Erişim Ekim 16, 2017.

Sobrova P, Adam V, Vasatkova A, Beklova M, Zeman L, Kizek R. Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdiscip Toxicol.* 2010;3(3):94–99. doi:10.2478/v10102-010-0019-x.

Soler M, Mesa-Antunez P, Estevez MC, ve diğ.. Highly sensitive dendrimer-based nanoplasmonic biosensor for drug allergy diagnosis. *Biosens Bioelectron.* 2015;66:115–123. doi:10.1016/j.bios.2014.10.081.

Taylor A, Ladd J, Etheridge S, Deeds J, Hall S, Jiang S. Quantitative detection of tetrodotoxin (TTX) by a surface plasmon resonance (SPR) sensor. *Sensors Actuators B Chem.* 2008;130(1):120–128. doi:10.1016/j.snb.2007.07.136.

Thangaraj SE, Antony EJ, Yousuf S, Selvakumar PM, Dhanaraj P, Enoch IVMV. Binding interaction of a fluoranthene–thiol on gold nanoparticles with β -cyclodextrin and DNA. *J Exp Nanosci.* 2017;12(1):62–71. doi:10.1080/17458080.2016.1258496.

The Commission of European Communities. Commission Recommendation on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off J Eur Union.* 2006;(2006/576/EC). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:229:0007:0009:EN:PDF>. Erişim Aralık 23, 2017.

Trilling AK, Beekwilder J, Zuilhof H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyst.* 2013;138(6):1619–1627. doi:10.1039/c2an36787d.

Tsai W, Hsieh C. QCM- Based Immunosensor for the Determination of Ochratoxin A. *Anal Lett.* 2007;40(10):1979–1991. doi:10.1080/00032710701484509.

Tüdös AJ, Lucas-van den Bos ER, Stigter ECA. Rapid Surface Plasmon Resonance-Based Inhibition Assay of Deoxynivalenol. *J Agric Food Chem.* 2003;51(20):5843–5848. doi:10.1021/jf030244d.

Voinova M V. Modelling of the response of acoustic piezoelectric resonators in biosensor applications – Part 1: The general theoretical analysis. *J Sens Sens Syst.* 2015;4:137–142. doi:10.5194/jsss-4-137-2015.

Wang X, Mei Z, Wang Y, Tang L. Comparison of four methods for the biofunctionalization of gold nanorods by the introduction of sulfhydryl groups to antibodies. *Beilstein J Nanotechnol.* 2017;8:372–380. doi:10.3762/bjnano.8.39.

Wang X-H, Wang S. Sensors and Biosensors for the Determination of Small Molecule Biological Toxins. *Sensors.* 2008;8(9):6045–6054. doi:10.3390/s8096045.

Welch NG, Scoble JA, Muir BW, Pigram PJ. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). *Biointerphases.* 2017;12(2):02D301. doi:10.1116/1.4978435.

Wild CP, Turner PC. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis.* 2002;17(6):471–481. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12435844>. Erişim Ekim 10, 2017.

Wild D. The immunoassay handbook. Elsevier; 2005. https://books.google.com.tr/books?id=_9kEeTjyJdMC&pg=PA51&lpg=PA51&dq=competitive+antibody+concentration&source=bl&ots=2PMK6JjaEk&sig=0gC4mKyyWw8YwRdYBkvF7OjsHRk&hl=tr&sa=X&ved=0ahUKEwjn3YeG1vfWAhUiJJ0KHVfPBMQQ6AEIbDAI#v=onepage&q=competitive+antibody+concentration&f=false. Erişim Ekim 17, 2017.

Wishart DS. Chapter 3: Small Molecules and Disease. *PLoS Comput Biol.* 2012. doi:10.1371/journal.pcbi.1002805.

Xia H, Wang F, Huang Q, ve diğ.. Detection of Staphylococcus epidermidis by a Quartz Crystal Microbalance Nucleic Acid Biosensor Array Using Au Nanoparticle Signal Amplification. *Sensors.* 2008;8(10):6453–6470. doi:10.3390/s8106453.

Yu F, Chi T, Liu B, Su C. Development of a Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Ochratoxin A. *J Agric Food Chem.* 2005;53(17):6947–6953. doi:10.1021/jf0513922.

Yuan J, Deng D, Lauren DR, Aguilar M-I, Wu Y. Surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in cereals and beverages. *Anal Chim Acta.* 2009;656(1–2):63–71. doi:10.1016/j.aca.2009.10.003.

Yuan Y, He H, Lee LJ. Protein A-based antibody immobilization onto polymeric microdevices for enhanced sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay. *Biotechnol Bioeng.* 2009;102(3):891–901. doi:10.1002/bit.22136.

Zhang Y, Caupert J. Survey of Mycotoxins in U.S. Distiller's Dried Grains with Solubles from 2009 to 2011. *J Agric Food Chem.* 2012;60(2):539–543. doi:10.1021/jf203429f.

Zhao H, Gorshkova II, Fu GL, Schuck P. A comparison of binding surfaces for SPR biosensing using an antibody-antigen system and affinity distribution analysis. *Methods.* 2013;59(3):328–335. doi:10.1016/j.ymeth.2012.12.007.

Zhou Y, Wu J, Yu W, ve diğ.. Preparation for aflatoxin B1-cationized bovine serum albumin based on Mannich-type reaction. *J Immunol Methods.* 2007;328(1–2):79–88. doi:10.1016/j.jim.2007.08.009.

Zilinskas RA. Iraq's biological weapons. The past as future? *JAMA.* 1997;278(5):418–424. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9244334>. Erişim Mart 31, 2018.

Zinedine A, Soriano JM, Molto JC, Manes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(1):1–18. doi:10.1016/J.FCT.2006.07.030.

Zu H, Wu H, Wang QM. High-Temperature Piezoelectric Crystals for Acoustic Wave Sensor Applications. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2016;63(3):486–505. doi:10.1109/TUFFC.2016.2527599.



ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Şerife Şeyda Pirinççi

Doğum Yeri ve Tarihi: Tosya 23.04.1987

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Bekar

Çalıştığı Kurum: TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi

İletişim Adresi ve Telefonu: TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Yerleşkesi

Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Dr. Zeki

Acar Cad. Barış Mah. Gebze KOCAELİ

+90 262 677 33 85

2. Eğitimi

Doktora, Kocaeli Üniversitesi, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji ABD., 2013-
Devam ediyor.

Yüksek Lisans, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoloji, 2010-2013.

Lisans, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, 2005-2010.

Yabancı dili: İngilizce

3. Ünvanları: Moleküler Biyolog, MSc

4. Mesleki Deneyimi

GÖREV DÖNEMİ	UNVAN	ÜNİVERSİTE / DİĞER SEKTÖR BÖLÜM
2013- Halen	Araştırmacı	TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü
2013-2015	Genel Müdür	GENERA Biyoteknoloji Araştırma Geliştirme Sanayi Ticaret Ltd.Şti,

5. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

-

6. Bilimsel Etkinlikler

• Seçilmiş Yayınlar:

SCI kapsamlı yayınlar

Pirinççi Ş.Ş., Ertekin Ö., Laguna Ercan D., Özen F.S., Öztürk Z.Z., Öztürk S. (2018)
Label Free QCM Immunosensor for the Detection of Ochratoxin A, Sensors, 18(4),
1161; doi:[10.3390/s18041161](https://doi.org/10.3390/s18041161)

Ertekin Ö., Pirincci S.S., Öztürk S. (2016) Monoclonal IgA Antibodies for Aflatoxin Immunoassays, *Toxins*, 8(5), 148.

Diğer Yayınlar

Ertekin Ö., Pirincci S.S., Öztürk S. (2016) Monoclonal Antibodies MAM-D3E4, MAM-D3C6, MAM-D12E2, and MAM-D4D6 Against Aflatoxins, *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 35(2), 117-118

Patent

Öztürk S., Ertekin Ö., Pirincci S. S., Kocaağa H., Monoclonal IgA antibody for mycotoxins, a hybridoma cell line Producing said antibody, and specific use thereof in immunoassay, International patent application number: PCT/IB2015/052150

Kitaplar ve Kitap Bölümleri

Esin Akçael, Şeyda Pirinççi, Sevecen Tuğlu, Harun Kocaağa, Selma Öztürk, Fatıma Yücel; “Hibridoma Teknolojisi ve Antikora Dayalı Tanı Sistemlerinin Geliştirilmesi”, Kurs kitabı, 24-28 Ekim 2016, TÜBİTAK- MAM-GMBE, Gebze, Kocaeli

Selma Öztürk, S.Şeyda Pirinççi; *Biyosensörler; Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları*, Basım: 2, Bölüm: 16, Yayıncı: Erciyes Üniversitesi Yayınları, Editörler: Prof.Dr.Munis DÜNDAR; Prof.Dr. Haydar BAĞIŞ, 2017.

Bildiriler

1. Ertekin O., Guloglu F.B., Pirincci S., Tuglu S., Akcael E., Ercan D., Hatipoglu I., Goksel M., Ahsen V., Ozturk S., Antibody based systems for the determination of mycotoxins in food and feed, European Biotechnology Congress 2013, Current Opinion in Biotechnology, Volume 24, Suppl 1, July 2013, Pages S23.
2. İlke Süder, Ş. Şeyda Pirinççi, Özlem Ertekin, Sevecen Tuğlu Gürpınar, Esin Akçael, Selma Öztürk, Design of Fumonisin Clean-up Systems by ELISA and biosensors, BEC 2015/ VII. Bioengineering Conference, 2015
3. Seyda Serife Pirincci, Özlem Ertekin, Sevecen Tuğlu Gürpınar, Esin Akcael, Selma Ozturk, Zafer Ziya Özturk, Label Free QCM Based Immunobiosensor for On-Site Detection of Fumonisin B1, 4th International Symposium on Sensor Science, 2015.
4. Cost reduction in the development of aflatoxin immunoaffinity columns, Ertekin Ö., Aslankaraoglu Akcael E., Tuglu Gurpınar S., Pirincci S.S. and Ozturk S, 11th World Congress on Biotechnology and Biotech Industries Meet, July 28-29, 2016 Berlin, Germany.

5. S.S.Pirincci, E.Akcael, T.Kaymak, S.Ozturk, Development of immunoaffinity column and HPLC analysis method for simultaneous detection of aflatoxin B1, B2, G1, G2 and M1 , 11th World Congress on Biotechnology and Biotech Industries Meet, 2016, Berlin, Germany.
6. Pirincci Ş.Ş, Ertekin Ö., Laguna Ercan D., Özen F.S., Öztürk Z.Z, Öztürk S. (2018) Label Free QCM Immunosensor for the Detection of Ochratoxin A, 5th International Symposium on Sensor Science, 27-29 Eylül 2017, Barcelona, İspanya
7. Bengü Ergenoğlu , İlham Bahhar, Tuğçe Nur Eralp, Şeyda Pirinççi, Özlem Ertekin, Esin Akçael, Fatıma Yücel , “Development of Monoclonal Antibodies for the detection of Immunoreactive Trypsin for Use in Diagnosis of Cystic Fibrosis” ; 42. FEBS Kongresi" 10-14/09/2017;Jerusalem/İsrail.
8. Esin Akcael, Serife Seyda Pirincci (co Author), İlham Bahhar, Mustafa Divyapicigil, Fatıma Yucel; “Development of Immunoaffinity Column for Purification of Pancreatitis Associated Protein” "European Biotechnology Congress; 256S, S51; 25-27/05/2017 Dubrovnik/Hırvatistan .
9. İ. Bahhar,Ö. Ertekin, Ş. Pirinççi, B. Ergenoğlu, S. Ara, F. Yücel, E. Akçael, ” Monoclonal Antibody Development for Quantitative Analysis of Pancreatitis-Associated Protein. "European Biotechnology Congress; [pp-27-ab-029] 256S, S51; 25-27/05/2017 Dubrovnik/Hırvatistan.
10. Ş. Şeyda PİRİNÇCİ, Esin AKÇAEL, A. İhsan MANAV, Bengü ERGENOĞLU, İlham BAHHAR, Erdal ATAÇ, Fatıma YÜCEL; “Development of Immunoreactive Trypsinogen (IRT) and Pancreatitis Associated Protein (PAP) ELISA Kits for Detection Of Cystic Fibrosis” 2. Orta Doğu Kistik Fibroz kongresi,İzmir, 22-24 Mart 2018.
11. Mustafa Divyapicigil, S. Seyda Pirincci, Tamer Yagci, Fatıma Yucel, Esin Akcael “Development of Inactive Immunoreactive Trypsinogen (IRT) for Immunoassay Studies” 2. Orta Doğu Kistik Fibroz kongresi, İzmir, 22-24 Mart 2018.

- **Aldığı Burslar**

TÜBİTAK BİDEB Yüksek Lisans Bursu, 2010-2012

TÜBİTAK BİDEB Lisans Bursu, 2005-2010

- **Ödüller**

2016 Elginkan Teknoloji Ödülü, Selma Öztürk ve Proje Ekibi olarak Esin Akçael, Özlem Ertekin, Şeyda Pirinççi, Harun Kocaaga, Sevecen Tuğlu Gürpınar.

TÜBİTAK MAM Teknoloji Geliştirme Ödülü, TÜBİTAK MAM, Mayıs 2017, Gebze, KOCAELİ

TÜBİTAK MAM En Başarılı Araştırma Ekibi Ödülü, “Aflatoksin Geliştirilmesi için İmmunoafinite Kolonlarının Geliştirilmesi” ve “Geleneksel Gıdalarda Mikotoksin Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi” projelerinin Ekibi, TÜBİTAK MAM, Aralık 2013, Gebze, KOCAELİ.

- **Projeler**

TÜBİTAK 1009 Projesi, 2017, Araştırmacı.

TUBİTAK TARAL-1003 Programı (115S124), Yenidoğan Taramalarında Kistik Fibrozisin Erken Tanısı İçin İmmunreaktif Tripsinojen (IRT) ve Pankreatitle İlişkili Protein (PAP) ELISA Kitlerinin Geliştirilmesi”, 10/2015-10/2018. Araştırmacı.

MAM İç Destekli Proje, Proje YBS No: 5133101, MAM’da Biyosensör Geliştirme Çalışmaları- Gıdalarda Çoklu Toksin Tespit Platformu Geliştirilmesi (2013-2015), Araştırmacı.

TUBİTAK TARAL-1007 Programı, Proje No: 110G126, Geleneksel Gıdalarda Mikotoksin Analiz Yöntemlerinin Geliştirilmesi, 2012 Eylül-2016 Eylül , Araştırmacı.

TAGEM Projesi, T.C.Tarım ve Köyişleri Bak. (Proje No:TAGEM/ 10 / AR-GE / 10), Aflatoksin Tespiti İçin İmmunoafinite Kolonlarının Geliştirilmesi, 2010-2013, Araştırmacı.

EU Marie Curie Actions, Interactions Between GProtein Coupled Receptors and Ligand Gated Ion Channels,2010-2013, Araştırmacı

Bilim Sanayii ve Teknoloji Bakanlığı, TGSD Programı, Cerrahi Operasyonlar için Tümör ve Sinir Hücrelerinin Floresan Markörlerle Boyanması, 2013 Nisan- 2014 Nisan, Yürütücü

- **Verdiği Konferans ya da Seminerler**

Nadir Hastalıklar Sempozyumu, 6 Nisan 2018, Sözlü Sunu, Altınbaş Üniversitesi, İstanbul.