

# Homosistein-BSA-afinite temelli biyosensor tasarımı

## [Homocysteine-BSA – affinity based biosensor design]

Fatma Ayhan,  
Gizem Kaya,  
Hakan Ayhan

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi,  
Fen Fakültesi, Kimya Bölümü,  
Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya ve  
Biyomalzemeler Araştırma Laboratuvarı,  
Muğla

**Yazışma Adresi**  
[Correspondence Address]

**Dr. Hakan Ayhan**

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Kimya Bölümü,  
Biyokimya ve Biyomalzemeler Araştırma Laboratuvarı,  
48000 Muğla, Türkiye  
Telefon: +90 252 2111506  
E-posta: hayhan48@gmail.com

Kayıt Tarihi: 02 Ocak 2014; Kabul Tarihi: 07 Mayıs 2014  
[Registered: 02 January 2014; Accepted: 07 May 2014]

### ÖZET

**Amaç:** Çalışmada, Kuartz Kristal Mikrodenge (QCM) sistemi kullanılarak piezoelektrik esası Homosistein biyoafinite sensörü ile Homosisteinin tayini ve tekrar kullanılabilirliğinin tespiti amaçlanmıştır.

**Metod:** Gümüş sensör yüzeyi bir dizi ön işlemle geçirilmiştir. Yüze aktivasyonu işlemi sırası ile NaOH, aseton ve metanol çözeltileri ile belli sürelerde gümüş kristallerin etkileştirilmesi ile yapılmıştır. Sonraki aşamada yüze sırası ile sisteamin, glutaraldehit bağlanması ve BSA immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. BSA derişimi belli bir aralıkta denenmiş ve en uygun derişim olarak en çok BSA bağlanmasının tayin edildiği 0,1 mg/mL değeri seçilmiştir.

**Bulgular:** Yüze modifikasyon aşamalarından sonra BSA-homosistein afinitesi kapsamında çalışma aralığının belirlenmesi amacıyla Homosistein kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve 0,5-2 µmol aralığının en yüksek uyumu verdiği belirlenmiştir. Kuartz kristallerin ekar kullanılabilirlik çalışmalarında bazik ve asidik ortamlarda BSA-Homosistein afinitesinin kırılması incelenmiştir. Bazik ortamda yapılan deneylerde 10-6, 10-3, 10-1, 1, 10 ve 100 mM NaOH çözeltileri (pH 8-9) ile afinitenin kırılması denenmiş ve hiçbir bazik ortam denemesinde tekrar kullanım imkânı gözlenmemiştir. Asidik ortamda yapılan BSA-Homosistein afinitesini koparma deneylerinde 0,01, 1, 10, 100 mM Glisin-HCl çözeltileri ile pH 2,5, 3,5, 5,5 ve 6,5 değerlerinde deneyler yapılmıştır. 0,01 mM Glisin-HCl çözeltisi ile pH 5,5'ta kristalin 12 kez tekrar kullanım mümkün olmuştur.

**Sonuç:** En yüksek tekrar kullanım sayısına Glisin-HCl derişimi 1mM olduğunda yine pH 5,5'ta yapılan BSA-Homosistein afinitesini koparma deneylerinde 30 tekrar sayısı ile ulaşılmıştır. Asidik ortam derişimi 10 mM Glisin-HCl ile yapılan deneylerde en fazla dört kez kullanım imkânı olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Piezoelektrik sensörler, Biyosensör, Biyoafinite, Homosistein, Bovin serum albümin, Kuartz Kristal Mikrodenge (QCM), Nanobiyosensör, Tekrar kullanılabilirlik.

**Çıkar Çatışması:** Yazarların çıkar çatışması yoktur.

### ABSTRACT

**Objective:** In this research, the detection and Reusability of Homocysteine by piezoelectric based Homocysteine Bioaffinity sensor using Quartz Crystal Microbalance (QCM) was aimed.

**Methods:** The surface of silver sensor was subjected to a series of pretreatments. Surface activation process was done with the interaction of silver crystals with NaOH, acetone and methanol, respectively at definite times. Then, systeamine, glutaraldehyde attachments and BSA immobilization were performed to surfaces. BSA concentration was assayed within a range and the highest coupling BSA amount of 0.1 mg/mL was chosen as the most convenient concentration.

**Results:** In the scope of BSA-Homocysteine affinity, the calibration graph of Homocysteine was formed after surface modification steps and the range of 0.5-2 µmol was estimated to give the best determination coefficient. Reusability of quartz crystals were tested by the cleavage of BSA-Homocysteine affinity in acidic and basic conditions. The NaOH solutions of 10-6, 10-3, 10-1, 1, 10 ve 100 mM (pH 8-9) were used to cleave the affinity and it was observed that no basic medium trials were convenient to reuse. Assays performed to break BSA-Homocysteine affinity in acidic condition were done with 0.01, 1, 10, 100 mM Glisin-HCl solutions of pH 2.5, 3.5, 5.5 and 6.5. The crystal reusability of 12 was reached with Glisin-HCl solution of 0.01, mM in pH 5.5.

**Conclusion:** The highest reusability value of 30 repeat was reached when Glisin-HCl concentration is 1mM with pH 5.5 achieved to cleave BSA-Homocysteine affinity experiments. The experiments carried out in 10 mM Glisin-HCl acidic medium concentration gave opportunity to four reuse of silver crystal.

**Key Words:** Piezoelectric sensors, Biosensor, Bioaffinity, Homocysteine, Bovine serum albumine, Quartz Crystal Microbalance (QCM), Nanobiosensor, Reusability.

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Giriş

Homosistein kanda bulunan, metabolizmada metiyoninin demetilasyonu sonucu açığa çıkan endojen bir amino asittir. Albümine bağlı olarak kanda dolaşmaktadır. Homosistein miktarının kanda fazla olması birçok hastalığa yol açmaktadır. Kandaki homosistein miktarı  $15 \mu\text{m}'ı$  geçtiğinde oluşan hastalığa hiperhomosisteinemi denilmektedir [1-4]. Homosistein düzeyleri ile kalp damar hastalıkları dolayısıyla kalp krizi geçirme riskinin birbiriyle ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda kalp damar hastalığı olan kişilerde homosistein düzeylerinin normalden yüksek olduğu bulunmuştur [5,6]. Hiperhomosisteinemi; kalp damar hastalıklarına dolayısıyla kalp krizine, B6 ve B12 vitamini, folik asit eksikliğine dolayısıyla hamile bayanlarda düşüklere sebep olmaktadır [7,8].

Homosistein değeri genetik faktörlerin yanında, fiziksel faktörlerden de etkilenmektedir. Yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımı, beslenme şekli, yaşanan ortam ve çevre şartları gibi faktörler kandaki homosistein miktarını etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada B6 ve B12 vitamini ile folik asidin, kandaki homosistein değeriyle bağlantılı olup olmadığı araştırılmıştır. Yapılan deneyler doğrultusunda; kandaki homosistein değerinin artmasıyla birlikte, B6 ve B12 vitamini ile folik asit değerlerinin düştüğü, homosistein değeri normal düzeye geldiğinde ise B6 ve B12 vitamini ile folik asit değerlerinin de normal düzeyde olduğu gözlenmiştir. Homosistein miktarının fazla olması, B6 ve B12 vitamini ile folik asit değerlerini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır [9,10].

Biyosensörler; biyolojik algılayıcılarıdır. Kristal yüzeyine bağlanan maddenin cinsine göre ortamdaki molekülün varlığını algırlar. Yüzeye immobilize edilen maddeye özgü algılama yetenekleri vardır. Biyosensörler; tanıyıcı bölüm, çevirici (transducer), elektronik bölüm olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır. Biyosensörün tanıyıcı bölümündeki ligand (tanıyan) ile analit (tanınan) arasında, sensör yüzeyinde bir etkileşme oluşur. Bu etkileşme, çok seçicidir. Etkileşmenin sonucunda oluşan değişiklik, elektriksel potansiyel veya akım değişimine neden olur. Cihazdaki çevirici birimi bu değişimi algılar ve tanıyan ile tanınan arasındaki etkileşmeyi elektrik sinyaline çevirir. Bu da elektronik bölüm tarafından değerlendirilir ve sayısal okunabilir verilere dönüştürülür [11]. Biyosensörlerde; seçicilik, kullanım ömrü, kalibrasyon gereksinmesi, yüksek duyarlılık, tekrarlanabilirlik gibi özellikler önemlidir. Biyosensör algılayacağı maddeye özgü yani seçici olmalıdır ki diğer maddeleri tanımasını istenilen maddeyi tanımasını, kullanım ömrü uzun olmalı hemen bozulmamalı, sürekli kalibrasyon etmeye ihtiyaç duyulması sonuçların doğruluğunu azaltacağından kalibrasyon gereksinmesi az olmalı, tekrarlanabilirliği fazla olmalı aynı yöntemi tekrar tekrar uygulayabilmeli ve hassas ölçüm yapabilmesi için yüksek duyarlılıkta olmalıdır [12-15].

Günümüzde homosistein tayini oldukça önem kazan-

mıştır. Birçok yöntemle homosistein tayini mümkündür. HPLC, GC, spektrofotometrik yöntem ve Eliza testiyle homosistein tayini yapılabilmektedir. Fakat uzun süren, tekrarlanamayan, maliyetli yöntemler olduğu için çok zor olmaktadır [9,10].

QCM sisteminde kuartz kristaller kullanılmaktadır. Kristalin yüzeyine bağlanan madde miktarına göre qcm sisteminde sinyal üretilir. Yüzeye bağlanan madde miktarının artmasıyla titreşim azalacağından frekans düşmesi kaydedilir [16-22].

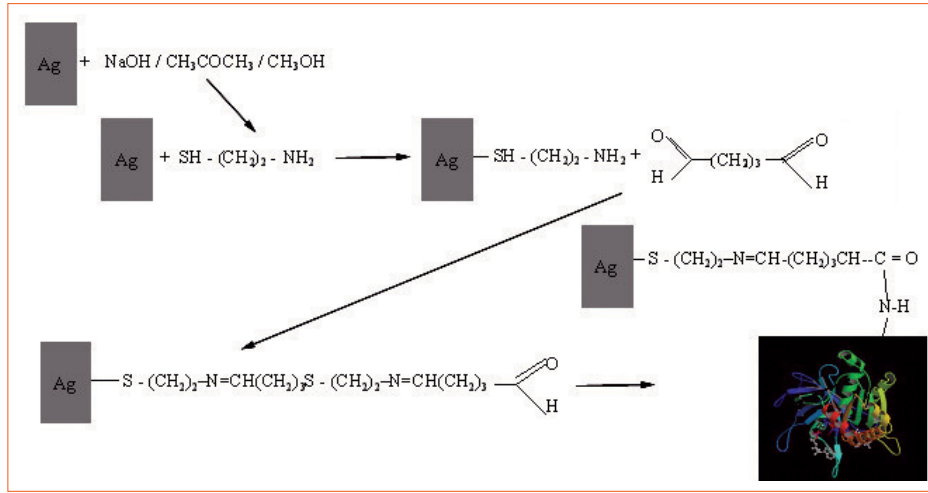
Moleküler etkileşimlere dayalı algılayıcı sistemlerin (QCM, FET, SPR gibi) önemi ve uygulama alanları gün geçtikçe artmaktadır. Klasik analitik tayin yöntemlerine nazaran biyosensörlerin daha avantajlı olması bu uygulamalara ilgiyi arttırmaktadır. Cevap verme süresi, hassasiyet, düşük maliyeti, tasarım kolaylığı gibi beklentileri karşılayabilmek amacıyla tanıyıcı yüzey ve çevirici bütünlüğünün sağlandığı biyosensörler tasarlanmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden birisi de QCM'dir. QCM'de de bir çevirici (transducer) sistem ile bir biyolojik molekül beraber kullanılmaktadır. Bu amaçla sensörlerde çevirici sistem olarak piezoelektrik kristallerin kullanılması önem kazanmaktadır, uygulamalara ilgiyi arttırmaktadır. Cevap verme süresi, hassasiyet, düşük maliyeti, tasarım kolaylığı gibi beklentileri karşılayabilmek amacıyla tanıyıcı yüzey ve çevirici bütünlüğünün sağlandığı biyosensörler tasarlanmaktadır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden birisi de QCM'dir. QCM'de de bir çevirici (transducer) sistem ile bir biyolojik molekül beraber kullanılmaktadır. Bu amaçla sensörlerde çevirici sistem olarak piezoelektrik kristallerin kullanılması önem kazanmaktadır [23,24].

Nicel kütle ölçümleri için piezoelektrik kuartz rezonatörlerinin uygulanması için, bağlı boşluk ve rezonans frekans ile eklenen kütle boşluğu arasındaki nicel ilişkinin geliştirilmesi gereklidir. 1959'dan önce, frekans boşluğunu kapsayan bu kütle anlaşılmaması sadece nitel bir bazda olmuştur. Ama Sauerbrey kuartz kristal bir rezonatörün frekans boşluğunun eklenen kütle ile direkt orantılı olduğunu göstermiştir. Sauerbrey'in çalışması genel olarak bilimde büyük bir buluş ve çok küçük kütlelerin ölçülmesinde yeni bir nicel araç olarak kabul edilebilir. Kuartz plaka kütledeki bir artış, rezonans frekansında bir düşüşe neden olmaktadır [25].

Sauerbrey eşitliği sadece tam olarak uniform, dayanıklı, ince film katmanlarında uygulanabilmektedir. Bundan dolayı QCM uzun yıllar sadece gaz faz kütle dedektörü idi. 1980'lerin başında bilim adamları tarafından sıvının içerisine tamamen daldırıldığında sabit osilasyon verdiğini tanımladılar. Sıvı fazdaki QCM ölçümlerinin çoğu QCM'nin havadan sıvıya daldırıldığında rezonant sıklığında değişiklik gösterdiğini bildiren Kanazawa ve Gordon tarafından yapılmıştır.

QCM ile ilgili ticari cihazlar bulunmaktadır. SRS QCM cihazında altın kristallerin frekans değeri ölçülmektedir.





Şekil 2. Yüzey temizliği ve modifikasyon aşamalarının şematik görünümü.

**1) Osilatör:** Asıl frekans ölçme bölümüdür. Bu bölüm 12V'luk bir bilgisayar güç kaynağıyla beslenmektedir. Güç kaynağının özellikle bilgisayar güç kaynağının olmasının nedeni, düzenli sabit bir elektrik akımı sağlamasıdır. Devre bu kısımda BF255 nolu tranzistörden; 1N40148 nolu diyottan ve 10K'luk primer konduktanstan yararlanmaktadır. Osilatör bölümünün uç kısmında bulunan kristaller birazdan anlatılacak olan sabit sıcaklık bölmesinin içinde bulunmaktadırlar. Ölçülmek istenen kristalin hangisi olduğunu belirlemek için bir 12V'luk minyatür röle ve bir Switch'ten yararlanılmaktadır. Şekil 1'de RF Output adıyla gösterilen kısım osilatör devresinde ölçülmüş olan kristallerin frekansının çıkış noktasıdır. Aynı zamanda Şekilde şemaları çizilen elektronik malzemelerin isimleri aşağıda verilmektedir:

**2) Sabit sıcaklık bölümü:** Cihazın bu kısmı kristaller içinde olmak üzere kapaklı bir metal kutudan oluşmaktadır. Bu bölme 15V'luk bir trafo tarafından beslenmektedir. Aynı trafo sıcaklık kontrol birimini de beslemektedir. Bölme içinde sıcaklığı sağlamak için iki tane 5 Watt'lık dirençten yararlanılmıştır.

**3) Sıcaklık kontrol birimi:** Bu bölüm tasarlanan osilatör devresinin en önemli birimidir. Bu birimin amacı ise 2. birimde yani sıcaklık üretilen kısımdaki sıcaklığı istenilen derecede ayarlayıp o sıcaklıkta sabit tutmaktır. Aynı zamanda hem ayarlanan sıcaklık ve hem de her an sabit sıcaklık kutusunun sıcaklık değerini görmek mümkündür. Burada sıcaklık göstergesi için dijital bir voltmetreden yararlanılmaktadır. Bu voltmetre sıcaklık biriminden ayrı olan bir 6 Volt'luk trafo tarafından beslenmektedir. Voltmetreden ayarlanan sıcaklık veya o andaki sabit sıcaklık kutusunun sıcaklığını seçmek için, bir Switch kullanılmaktadır. Kutunun içindeki sıcaklığı algılamak için LM35 sıcaklık sensöründen ve kutunun duvarlarına yapışan BDX tranzistörlerinden faydalanılmıştır. Devreyi istenilen sıcaklığa ayarlamak için çok turlu bir Trimpot kullanılmıştır ve asıl sıcaklık kontrolü için kullanılan malzeme LM358 adlı bir opampdır. Burada sıcaklık gösterge has-

sasiyeti 0,1°C ve kutu ve stabilize duruma geldikten sonra sıcaklık toleransı 1°C'dir. Deneylerde kullanılan frekans sayıcı Protek Universal Counter U2000AQ0355'tir.

#### Osilatör devresinin çalıştırılması

Deneylerde kristal yüzeyinde herhangi bir kütle yüklediği ve/veya kütle yüklenmediği durumlar, tasarlanan osilatör devresi yardımıyla ölçülmüştür. Kuartz kristallerin yüzey temizlenmesi, yıkanma işlemlerinin, yüzeye bağlanmalarının ve immobilizasyonların olup olmadığını tespiti için frekans farklarının ölçümleri ile takip edilmiştir. Bu cihazın avantajları: A) Tüm ölçümlerin sabit bir sıcaklıkta yapılabilmesi, B) İki kristalin aynı zamanda ve aynı koşullarda incelenebilmesi, C) Osilatörlerin şehir elektriğindeki herhangi bir frekans değişiminden etkilenmemesi, D) Çift yüzü bir devreden yararlanmakla, etrafta oluşup yayılan frekans etkisinden kurtulmak, şeklinde özetlenebilir. Kristal osilatöre yerleştirilir. Kristale bağlanan kütle miktarına göre osilatör cihazı sinyal üretir ve kayıt cihazından sayısal değeri okunur [22, 30, 31].

#### Gümüş kristaller

Çalışmada satın alma ile temin edilen TIC 10.000MF marka 10 MEGA HERTZ'lik gümüş piezo kristaller kullanılmıştır. Piezo kristaller metal kılıflı şekilde ticari olarak sunulmaktadır. Metal kılıflar elektrikli minik el testeresi ile kesilip çıkarıldıktan sonra ilk frekans değerleri hemen ölçülmüştür. Kristaller kılıflarından çıktıktan sonra çok daha hassas hale geldiklerinden dikkat edilmesi gerekmektedir. Piezo kristalin yuvarlak kısmı olan kuartz alana ve ayak kısmı olan metal kısımlarına ve özellikle de kuartz kısmın üzerinde görülmekte olan gümüş elektrod kısımlara dokunulmamalı ve ortamın tozsuz olması gerekmektedir. Kafa kısmıyla ayak kısmının birleştiği metal bölgeden pens yardımıyla tutularak çalışılmıştır. Zira ayak kısımlarından tutulduğunda ayak kısımlarının cihaza yerleştirilirken deforme olması söz konusudur.

#### Ön işlemler

İlk frekansları ölçülen kristaller küçük camdan özel imal

ettirilmiş 10 ml'lik beherlerde manyetik karıştırıcıda 30 dakika süreyle, 3'er ml 0,1 M NaOH, aseton ve metanolle ile etkileştirilmiştir. Kristallere aralarda 35°C'de kurutma işlemi yapılmış ve her türlü kirliliğe karşı özenle korunarak frekansları ölçülmüştür. İlk ölçülen frekans değerleri ile yüzey temizleme sonrası frekans değerleri karşılaştırılmıştır.

Sisteamin (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NS) bağlanması aşamasında kristaller, manyetik karıştırıcıda 3 ml 18 mM sisteamin ile karanlık ortamda 2 saat nötral Ph:7 de (PB) sodyum tetraborat/HCl tamponunda etkileştirilmiştir. Etkileşim sonrası etüvde temiz koşullarda 35°C'de kurutulduktan sonra kristallerin frekansları ölçülmüştür. Sisteamin molekülü bir tiyol (SH) ve bir de amin (NH<sub>2</sub>) olmak üzere iki fonksiyonel uca sahiptir (H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH, M.A: 77,15). Yumuşak bir baz olan sisteamin molekülünün bu özelliğinden yararlanılarak tiyol ucundan, gene yumuşak bir asit olan Ag kristal yüzeyinden tutturulmuş ve diğer amin ucu fonksiyonel olarak başka bağ için hazır tutulmuştur. Sisteaminle etkileştirilen kristaller manyetik karıştırıcıda 3 ml 0,66 M glüteraldehit (GA) (COH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COH M.A: 100,12) ile 2 saat pH: 8.2'de sodyum tetraborat/HCl tamponunda karanlıkta etkileştirilip kurutulduktan sonra frekans değerleri ölçülmüştür. Burada amaç sisteaminin serbest olan amin ucu ile glüteraldehitin aldehit uçlarının reaksiyona girmesi ve şift bazı reaksiyonu ile bağlanmalarının sağlanmasıdır.

Yüzey temizlenmesi sonrası frekans değerleri ile sisteamin bağlanması sonrası frekans değerleri karşılaştırılmıştır. Şekil 2'de yüzey temizlenmesi ve bağlanma ve immobilizasyon aşamaları toplu olarak şematize edilmiştir.

Sensör üzerinde tiyol ve aldehit oluşumu sağlandıktan sonra kristal oda sıcaklığında 3 ml 0,4 mg/ml BSA ile 1 saat etkileştirilip kurutulduktan sonra frekans değerleri ölçülmüştür. Çalışmada BSA çözeltisi için pH: 7 sodyum tetraborat/HCl tamponunda kullanılmıştır. Yüzeve BSA'nın bağlanma miktarı bulunmuştur.

Sisteamin, GA bağlanması ve BSA immobilizasyonu sonrası kristaller, önce ilgili maddenin çözündüğü pH tamponuyla, sonra da ultra saf suyla iki kez yıkanarak kurutulmuş ve frekans değerleri okunmuştur. Bağlanan kütle miktarları aşağıda verilen Sauerbrey denklemi kullanılarak hesaplanmıştır [25].

$$\Delta f = -2.26 \times 10^{-6} f^2 \Delta m / A$$

Burada; ( $\Delta m$ ): kristal üzerine ilave edilen kütle, ( $\Delta f$ ): kristalin frekansındaki değişim, (f): Boş kristalin frekansı, (A): piezo kristaldeki metal yüzeyin alanı.

### 2.3.2. Homosistein immobilizasyonu

BSA ile etkileştirilerek immobilizasyonu sağlanan kristaller farklı derişimlerde (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu$ M) homosistein çözeltileri ile pH: 7 sodyum tetraborat/HCl tamponunda etkileştirilerek BSA-HSİS afinitesi incelenmiştir. Bu amaçla oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 3 ml homosistein çözeltileri ile farklı kristaller ayrı ayrı 2 saat etkileştirilmiştir. Etüvde 35°C'de kurutulduktan sonra frekans değerleri ölçülmüştür. BSA

sonrası ölçülen frekans değerleri ile homosistein sonrası ölçülen frekans değerleri karşılaştırılmıştır. Kristalin yüzeyine ne kadar homosistein bağlandığı frekans farkı ve yukarıda verilen Sauerbrey denkleminin kullanılması ile hesaplanarak bulunmuştur.

### Tekrar kullanılabilirlik deneyleri

Çalışma kapsamında oluşturulan BSA-HSİS kovalent bağlandığı bölgeden bağın kırılması ve sonradan aynı piezo kristalde, aynı ve/veya benzer miktarda Homosisteinin tekrar bağlanması deneyleri bu aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla literatürdeki benzer çalışmalar incelenmiş söz konusu benzer kovalent bağların kırılması için bazik ve asidik ortamların kullanılması ile deneyler gerçekleştirildiği rapor edilmiştir [32-35]. Bu kapsamda BSA-HSİS afinitesinin yıkılması amacıyla bazik ve asidik çözeltiler ile deneyler yapılmıştır. Böylece yapılacak ardışık deneyler ile sensörün tekrar kullanılabilirlik sayısının belirlenmesi hedeflenmiştir.

### Bazik ortam deneyleri

Literatürde yapılan inceleme ve araştırmalarda BSA-Homosistein kovalent bağları gibi benzer bağların koparılması ve/veya kırılması bazik ortamlarda gerçekleştiği bilgisinden hareketle ilk aşamada bazik ortam deneyleri gerçekleştirilmiştir. Farklı derişimlerde NaOH çözeltileri hazırlanıp BSA-Homosistein bağının kırılması çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Derişimleri 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-1</sup>, 1, 10, ve 10<sup>2</sup> mM (pH 7; 8; 10; 11; 12; 13) olan NaOH çözeltileri hazırlanıp kristallerle etkileştirilmiştir. Elde edilen bu çözeltiler ile etkileştirilen piezo kristallerden BSA-Homosistein bağı bazik ortamda koparılmıştır. Koparılan bu bağın tekrar oluşturulabilmesi için de Homosistein bağlama işlemi tekrar aynı kristale uygulanmıştır. Bu şekilde kristalin bozunma noktasına kadar tekrar deneyleri gerçekleştirilmiş ve kullanılabilirliği araştırılmıştır.

### Asidik ortam deneyleri

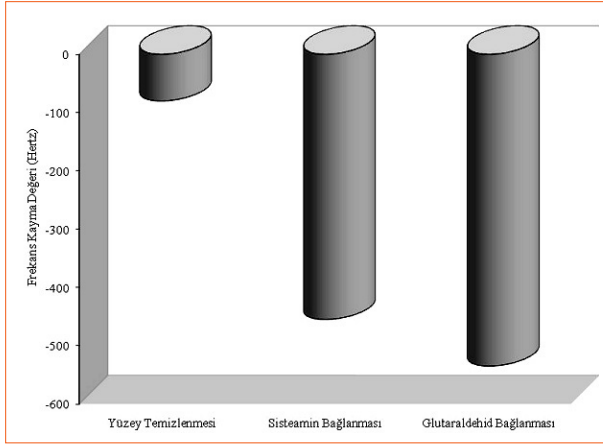
Asidik ortam olarak sık kullanılan kovalent bağ yıkımı ortamı için Glisin-HCl kullanılmaktadır [33-36]. Bu amaçla Glisin amino asit çözeltilerinin derişimleri 0,01; 1; 10 ve 100 mM çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan glisin çözeltileri aynı molaritelerdeki HCl çözeltilerinin ilavesi ile farklı pH değerlerine (2,5; 3,5; 5,5 ve 6,5) ayarlanmış ve asidik ortamda BSA-HSİS afinitesinin yıkım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Asidik ortamda koparılan bu bağın tekrar oluşturulabilmesi için Homosistein bağlama işlemi tekrar aynı kristale uygulanmıştır. Bu şekilde kristalin bozunma noktasına kadar tekrar-tekrar deneyler gerçekleştirilmiş ve kullanılabilirliği araştırılmıştır.

## Bulgular ve Tartışılması

### Yüzey temizlenmesi

Çalışma kapsamında gümüş iletken yüzeylere sahip kuartz piezo kristallerin homosistein sensörü olarak kullanılabilmesi için çeşitli yüzey işlemlerine gereksinim vardır.





Şekil 3. YüzeY temizliği ve modifikasyon aşamaları frekansları.

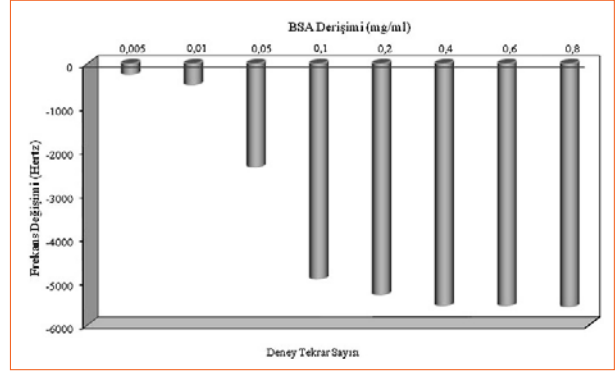
Gümüş yüzeylere homosistein immobilizasyonu için hem sterik engellemelerden hem de gümüş yüzeyin kararlılığının sürelı olması gereğinden dolayı direk olarak kristalin gümüş yüzeyine bağlanma gerçekleştirilmemiştir. Piezo kristal üzerinde bulunan gümüş elektrod yüzeylerin temizliği amacıyla NaOH, aseton ve en son metanolle kristaller etkileştirilmiştir. Bu sayede gümüş elektrod yüzeyler öncelikle kirden ve safsızlıklardan arındırılmıştır. Temizlik sonrası yaklaşık 100 Hz bir frekans düşüşü saptanmıştır. Benzer yöntemler literatürde de mevcuttur. Erdamar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada piezoelektrik gümüş kristaller kullanmışlar ve üzerine üreaz immobilize etmişlerdir. Bu çalışmada üreaz immobilizasyonu öncesi gümüş kristalin yüzey temizliği NaOH, aseton ve metanol kullanılarak sağlanmıştır. İşlem sonrası elde edilen frekans kayma değerleri benzerdir [37]. Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise QCM-FIA sistemini kullanarak kristal yüzeyine heparin ve antitrombin immobilize etmişlerdir. Kristal yüzeyini immobilizasyon öncesi temizlemek için piranha çözeltisi ve ardından aseton ve metil alkol kullanmışlardır [41].

### Sisteamin bağlanması

YüzeY temizliği sonrası sisteamin bileşiminin -SH uçlarından gümüş yüzeye bağlanmasında elde edilen anlamlı frekans kayma değeri gözlenmiştir. YüzeY temizlenmesi sonrası ölçülen değerle sisteamin bağlanması sonrası ölçülen frekans değerı arasındaki farkların 450 Hz bulunmuştur. Bu fark kristale sisteaminin bağlandığını göstermektedir. Literatürde de altın veya gümüş kristal yüzeylerine sisteamin immobilizasyonu çalışılmıştır. Liu ve ark. QCM-FIA kullanarak altın kristallerle çalışmışlardır. Kristale 20 µM sisteamin immobilize etmişlerdir. Frekans kayması olarak 80 Hz'lik bir düşüş elde etmişlerdir [38]. Erdamar ve ark. gümüş kristal üzerine sisteamin immobilize etmiş ve frekans kaymasınının 420 Hz olduğunu rapor etmişlerdir [37].

### Glutaraldehit bağlanması

Sisteamin bağlı piezo kristallerin yüzeyine bifonksiyonel GA molekölü bağlanmıştır. Böylelikle GA'in var olan bir



Şekil 4. Farklı başlangıç BSA derişimlerinde immobilizasyon işlemi frekansları.

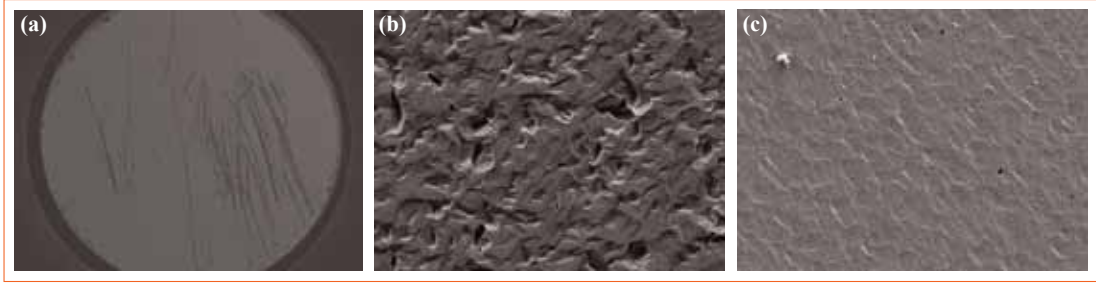
aldehid ucundan sisteamin molekölüne bağlanması sağlanırken diğer aldehid ucundan da epsilon pozisyonunda amin fonksiyonel uç içeren BSA molekölünün immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. GA bağlanması sonucu ölçülen frekans kayma değerı ortalama 550 Hz olarak hesaplanmış ve sisteamin bağlanması karşılaştırılmıştır. Bu son aşama ile piezo kristal yüzeyi BSA bağlanması için elverişli hale getirilmiştir. Buna benzer uzatma kolu (*spacer arm*) kullanımı literatürde de vardır.

Liu ve ark. QCM-FIA kullanarak altın kristallerle çalışmışlardır. Kristale uzatma kolu olarak 0.01 M pH 7.4 PBS'te hazırlanan uzatma kolu olarak GA bağlamışlardır. Çalışmanın sonucunda farklı proteinleri ayrı ayrı kullanarak sensör sistemine immobilize etmeyi başarmışlardır [42].

Çalışmalardan birinde gümüş kristallerin yüzeyine üreaz immobilize edilmiştir. YüzeY aktivasyonu için NaOH, aseton ve metanol kullanılmıştır. YüzeY temizliği sonrası 18 mM sisteamin, %2'lik GA yüzeye sırasıyla bağlanmıştır. En son olarak da üreaz bağlanmıştır. 0.0025 mg/

Tablo 1. Birim yüzey alanı başına immobilize olan madde miktarları.

Kristal modifikasyon aşamaları	SAUERBREY denklemine göre birim yüzey alanı başına immobilize madde miktarı (µg/cm <sup>2</sup> )
Sisteamin immobilizasyonu	0.77
GA immobilizasyonu	0.91
BSA immobilizasyonu	
0.005 mg/ml	0.455
0.01 mg/ml	0.883
0.05 mg/ml	4.32
0.1 mg/ml	8.99
0.2 mg/ml	9.65
0.4 mg/ml	10.10
0.6 mg/ml	10.10
0.8 mg/ml	10.15



**Şekil 5.** SEM görüntüleri. (a) Boş kristal x25; (b) Boş kristal x1000; (c) Yüzey temizliği ve modifikasyon aşamaları sonrası x1000 büyütme.

ml ile 0.02 mg/ml üreaz derişim aralığında kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve en iyi bağlanma 0.02 mg/ml üreaz derişiminde sağlanmıştır. Diğer bir çalışmada altın kristaller kullanılarak mikrogravimetrik DNA tespiti yapılmıştır. Yüzey temizliği için yine NaOH, aseton ve metanol kullanılmıştır. Diğer bir çalışmada gümüş kristaller yüzeyine altın nanopartiküller immobilize edilmiştir. Yüzey temizliği için NaOH, aseton ve metanol kullanılmıştır. Sonrasında sisteamin, GA ve tekrar ikinci kez sisteamin yüzeye sırasıyla bağlanmıştır. En son olarak altın nanopartiküller immobilize edilerek özellikle DNA biyosensör amaçlı altın nanopartikül kaplı yüzey elde edilmiştir [22-36,39].

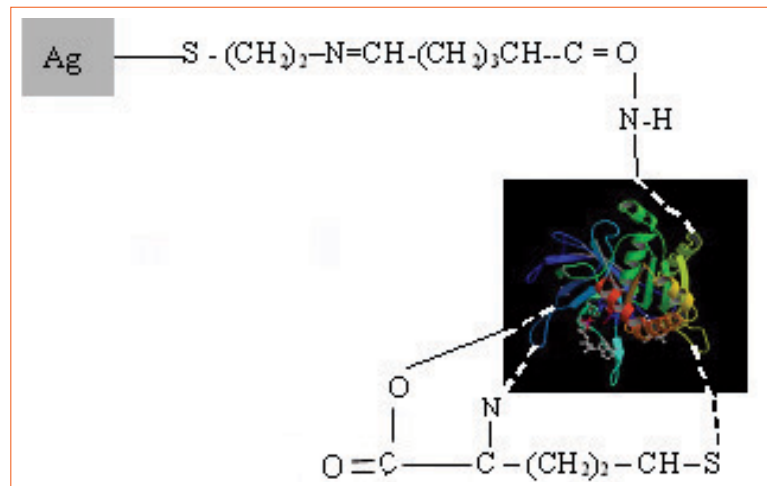
Grubumuz tarafından yapılan bu çalışmalarda, yüzey temizliği, sisteamin ve glutaraldehyd bağlanması aşamalarında elde edilen frekans kayma değerleri, elde edilen değerler ile uyum gösterdiğinden söz konusu aşamalar için optimize edildiğinden aynı koşullar kullanılmıştır. Bu üç aşamanın kristal üzerine etkileri Şekil 3’de toplu olarak sunulmuştur.

### **BSA İmmobilizasyonu**

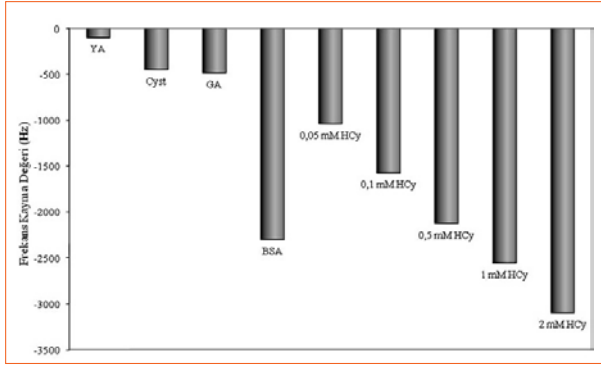
Araştırmalarda homosisteinin kanda %70-80 oranında İnsan Serum Albuminine (human serum albumin, (HSA)) bağlı olarak bulunduğu ve aynı zamanda albümine yüksek afinitesi olduğu rapor edilmektedir [4]. Bu yüksek afinite nedeniyle bu çalışma kapsamında sığır serum

albumin (bovin serum albumin, (BSA)) homosistein ile etkileştirilerek kullanılmıştır. Homosistein BSA’ne bağlanma kapasitesinin bulunması ve optimize edilebilmesi için farklı başlangıç derişimlerinde BSA ile çalışılmış ve piezo kristal yüzeylerine immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde BSA’nın piezo kristal yüzeylerine immobilizasyonu sonucu oluşan frekans kayma değerleri Şekil 4’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi en fazla BSA bağlanması 0,1 mg/ml BSA başlangıç derişiminde gözlenmiştir. BSA bağlandıktan sonra frekans kayma değeri ortalama olarak 5000 Hz olarak bulunmuştur. 0,1 mg/ml’den daha fazla derişimlerde yüzeyin doymuş hale geldiğinden kristalde daha fazla BSA birikimi gözlenmemiştir. Tablo 1’de sunulan değerler deneylerin her aşamasında birim yüzey alanı başına immobilize olan madde miktarlarını göstermektedir.

Tablo 1’de sunulan cm<sup>2</sup> başına bağlanan BSA miktarları incelendiğinde 0.005 ve 0.01 mg/ml başlangıç derişimleri için ve 0.05 ve 0.1 mg/ml başlangıç derişimleri için doğrusal bir artıştan söz edilebilir. Zira birinci aralıkta derişim beş kat artarken bağlanan madde miktarı da yaklaşık beş kat, diğer aralıkta da derişim iki kat artarken bağlanan madde miktarı da benzer olarak gerçekleşmiştir. Ancak bu aşamadan sonra yüzey doymuş, immobilizasyon miktarı sabit kalmıştır. Farklı BSA derişimlerinde kristal yüzeyine



**Şekil 6.** Homosistein-BSA olası bağlanma yollarının şematik gösterimi.



Şekil 7. Farklı başlangıç Homosistein derişimlerinde BSA-Homosistein etkileşim frekansları.

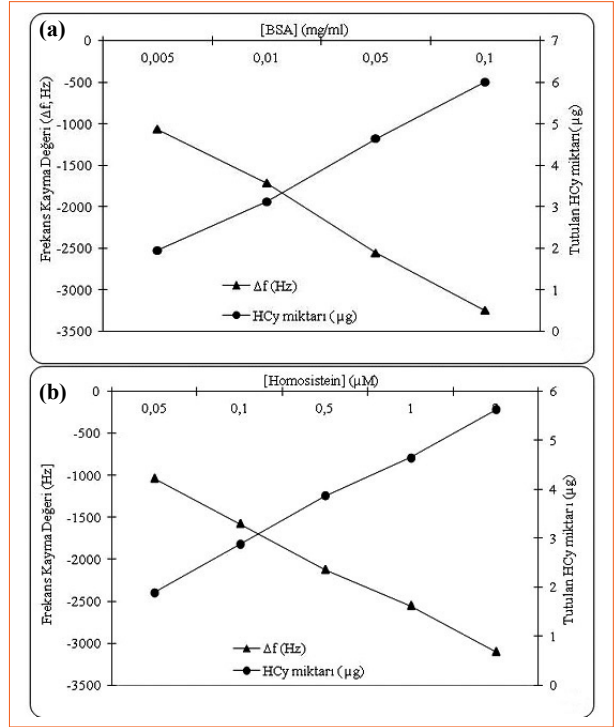
gerçekleştirilen immobilizasyonlar için elde edilen sonuçlar doğrusallaştırılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ve elde edilen  $R^2$  değeri 0,9924 olup yüksek uyum göstermiştir (Şekil 5).

### Homosistein afinitesi

Gümüş piezo kristallerin yüzeylerine BSA'nın immobilizasyonu sonrası homosistein afinitesini deneyleri ile BSA-Homosistein afinitesi incelenmiştir. Homosistein molekülünün BSA molekülünün çeşitli bölgelerinden olası bağlanma yolları Şekil 6'da [-----] çizgileri ile şematize edilmiştir. Şekilde, homosistein molekülü yapısında olan -OH; -SH; ve/veya -NH uçlarından birinden, ikisinden veya daha fazla uçtan bağlanma gerçekleştirebilir. Tamponlardan gelen iyonların ortamı etilememesi için tüm deney setlerinde tuz içermeyen soyum tetraborat/HCl ve/veya sodyum tetraborat/NaOH tamponları kullanılmıştır.

Aynı zamanda meydana gelebilecek elektrostatik etkileşimlerin de etkili olacağı düşüncesiyle mümkün olan en az enerjili olan tek bir bağdan bağlanmasını tercih edilmektedir. Zira elde edilen sensörün tekrar kullanılabilmesi için bağlanan homosistein bağının koparılması işlemi yapılacaktır. Bu koparılma işleminin mümkün olan en yumuşak koşullarda olması gerekmektedir ki yüzeye bağlı diğer moleküllerin kopması engellenmelidir. Literatürde de homosisteinin %70-80 oranında insan serum albuminine (HSA) kovalent bağ yaparak bağlandığı rapor edilmiştir [4].

Çalışmada BSA-Homosistein immobilizasyonu için, başlangıç homosistein derişim aralığı da önemlidir. 0,1 mg/mL BSA ile etkileşen kristal yüzeyler kullanılarak 1  $\mu$ M homosistein başlangıç derişiminde bir grup deney gerçekleştirilmiştir. Kristal yüzeylerinin; yüzey temizliği, sisteamin, GA bağlanması, BSA ve homosistein immobilizasyonu sonucu elde edilen tüm frekans kayma değerleri Şekil 6'da toplu olarak gösterilmektedir. 1  $\mu$ M başlangıç homosistein derişimi ile gerçekleştirilen deneylerde kristalde görülen frekans kayma değeri ortalama 2900 Hz olarak ölçülmüştür. Yüzey temizliği, sisteamin, GA bağlanması ve BSA immobilizasyonu işlemleri aynı şekilde uygulanmıştır ve farklı kristallere farklı 0,05, 0,1, 0,5, 1 ve



Şekil 8. Farklı derişimlerinde frekans ve tutunma değerleri. (a) BSA; (b) Homosistein.

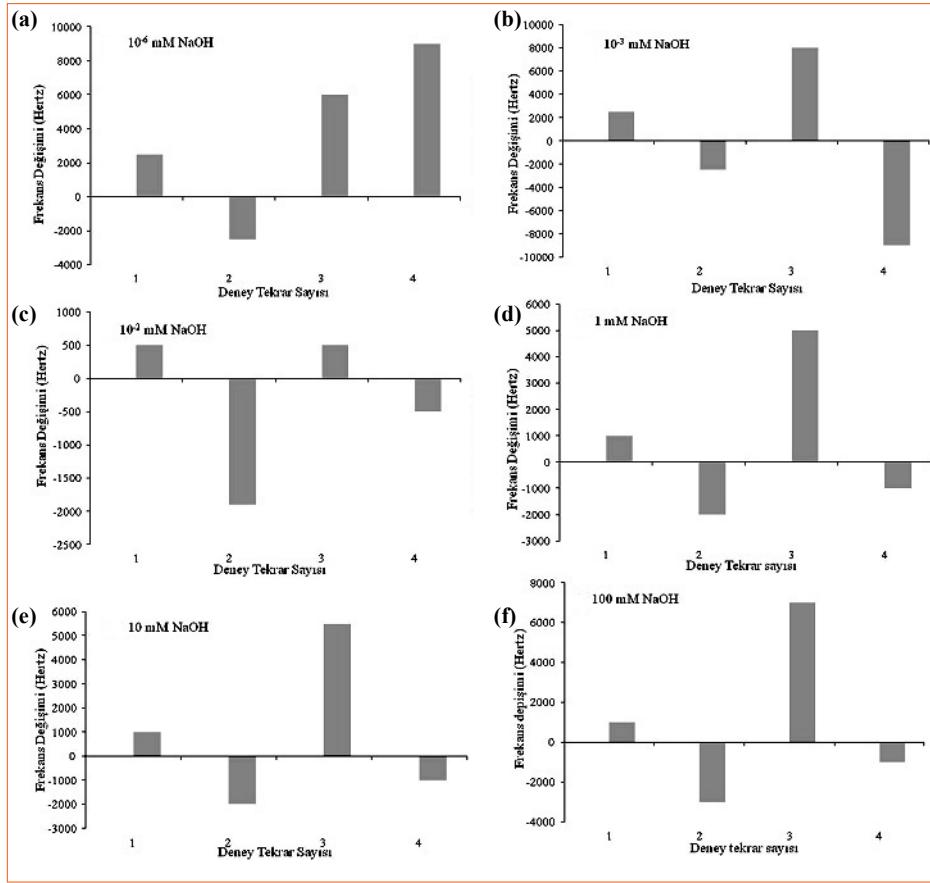
2  $\mu$ M başlangıç derişimlerinde homosistein bağlanmış (Şekil 7).

Deneylerde elde edilen frekans fark değerleri sırasıyla 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3300 Hz olarak ölçülmüştür. En yüksek homosistein bağlanma miktarı 2  $\mu$ M homosistein başlangıç derişiminde gerçekleşmiş ve bağlanma miktarları da orantılı olarak artış göstermiştir. Homosistein kalibrasyon grafiği oluşturularak doğrusal davranış gösteren homosistein derişim aralığı belirlenmeye çalışılmıştır. 0,05, 0,1, 0,5, 1 ve 2  $\mu$ M aralığı için kalibrasyon grafiğinin doğrusallaştırılması ile elde edilen  $R^2$  belirlilik (determinasyon) değeri 0,7264 olarak bulunmuştur. Aynı kalibrasyon grafiği bu kez 0,5, 1,0 ve 2  $\mu$ M aralıkları için çizilmiş ve 0,985 olarak hesaplanan belirlilik (determinasyon,  $R^2$ ) değeri ile bu derişim aralığı homosistein için çalışma aralığı olarak seçilmiştir.

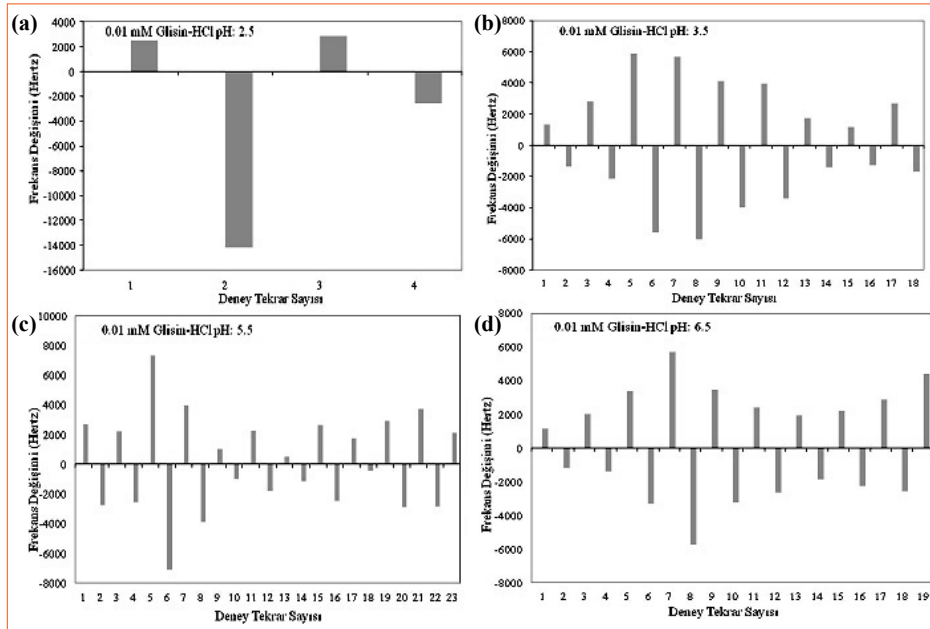
Şekil 8'de BSA ve Homosistein derişimlerine karşı elde edilen frekans kayma değerleri ve Sauerbrey denkleminde göre hesaplanan bağlanan homosistein miktarları verilmektedir. Frekans kayma değeri arttıkça bağlanan madde miktarının da arttığı görülmüştür. BSA için başlangıç derişimi 0,1 mg/mL olduğunda farklı homosistein derişimleri için frekans düşüşü de tutulan miktar da artmıştır.

Diğer taraftan Homosistein tayini için mevcut HPLC, GC-MS, immunoanaliz ve immunoenzimatik yöntemleri de zaman alıcı, pahalı ve eğitimli elemana ihtiyaç duymaktadır. Geliştirilen yöntemler serum veya plazmada toplam homosistein tayinine yönelik kullanılmıştır (44-46). Bu nedenle günlük klinik kimya laboratuvarları için





Şekil 9. NaOH ortamındaki deneyler. (a)  $10^{-6}$ ; (b)  $10^{-3}$ ; (c)  $10^{-1}$ ; (d) 1; (e) 10; (f) 100 mM.

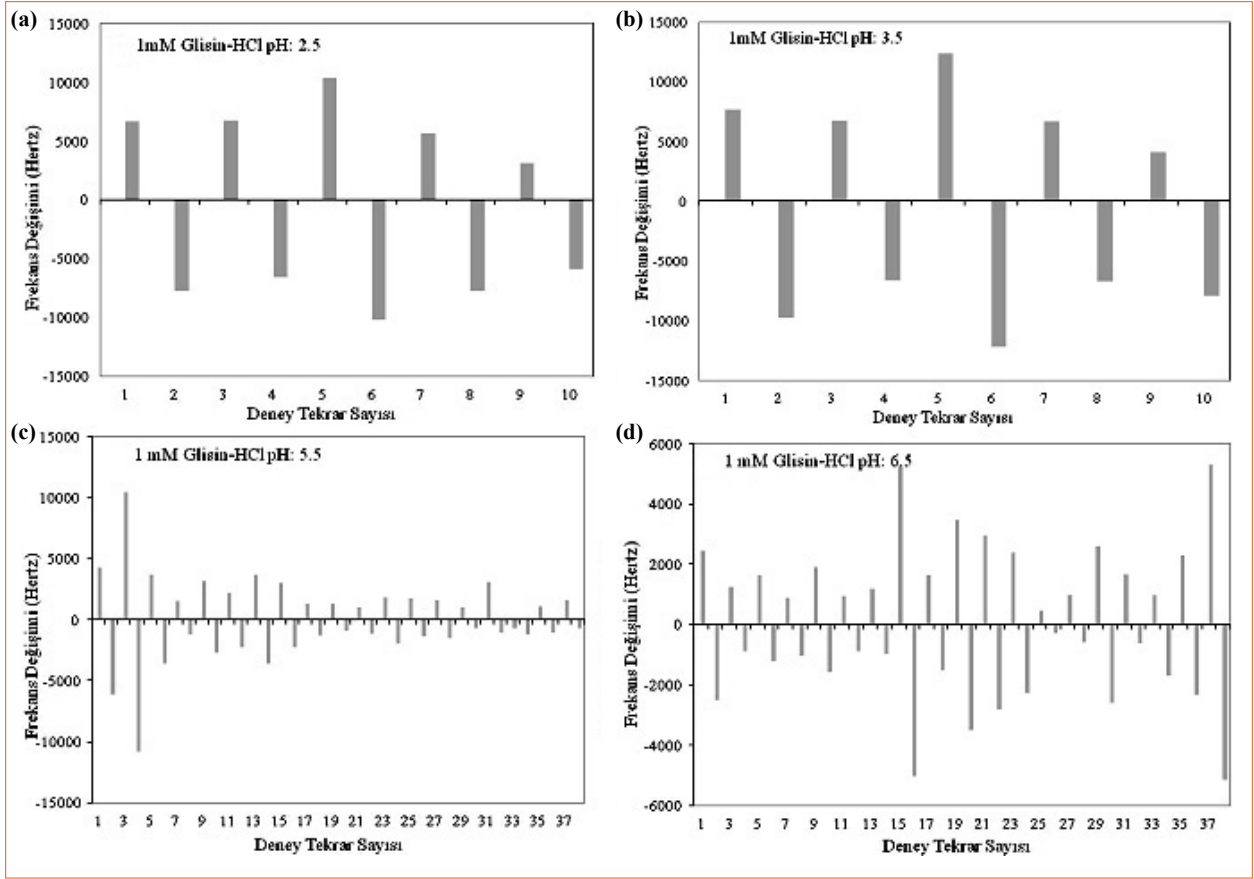


Şekil 10. Glisin-HCl tamponundaki deneyler (0,01mM). pH (a) 2,5; (b) 3,5; (c) 5,5; (d) 6,5.

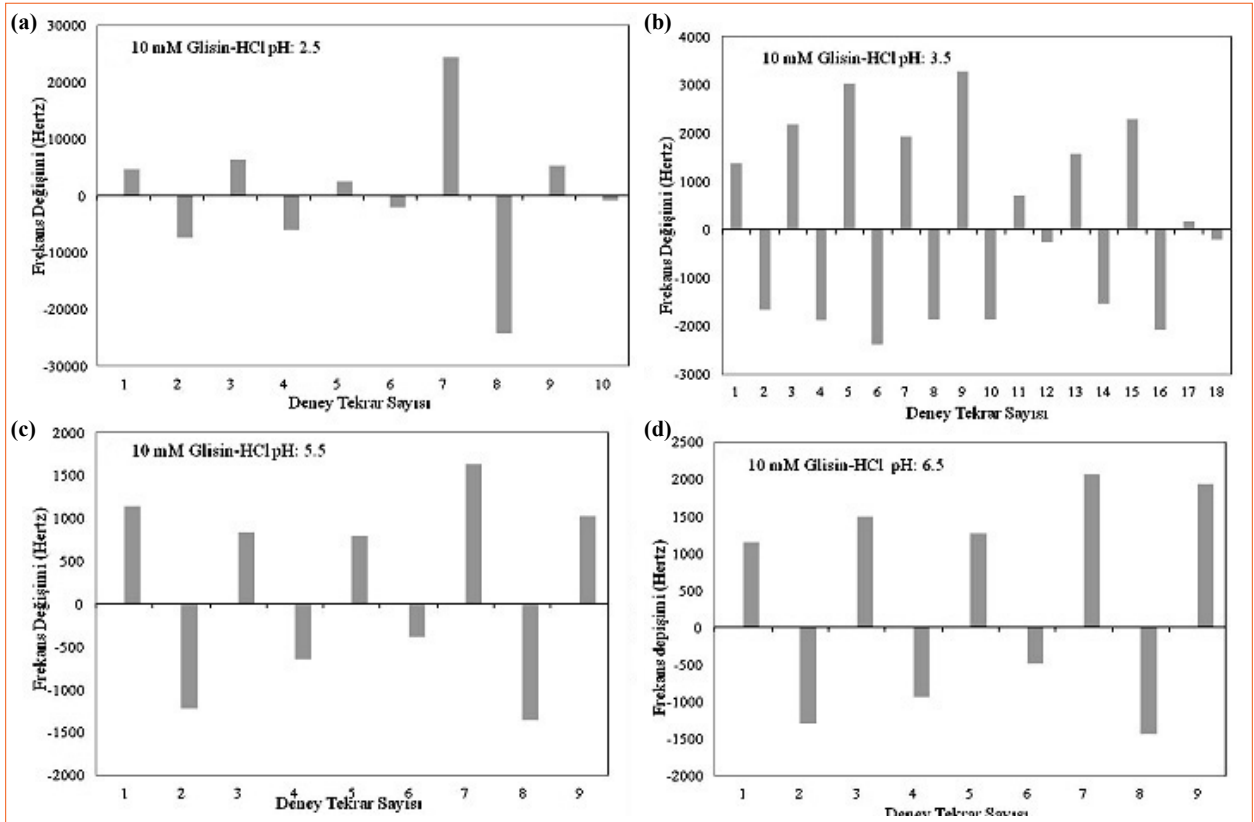
tercih edilmeleri zordur. Çalışma kapsamında yapılan çalışma gerek yukarıda bahsedilen etkileşimleri incelemek üzere gerekse karşılaşılan zorlukları büyük oranda aşma potansiyeline sahiptir.

#### Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları

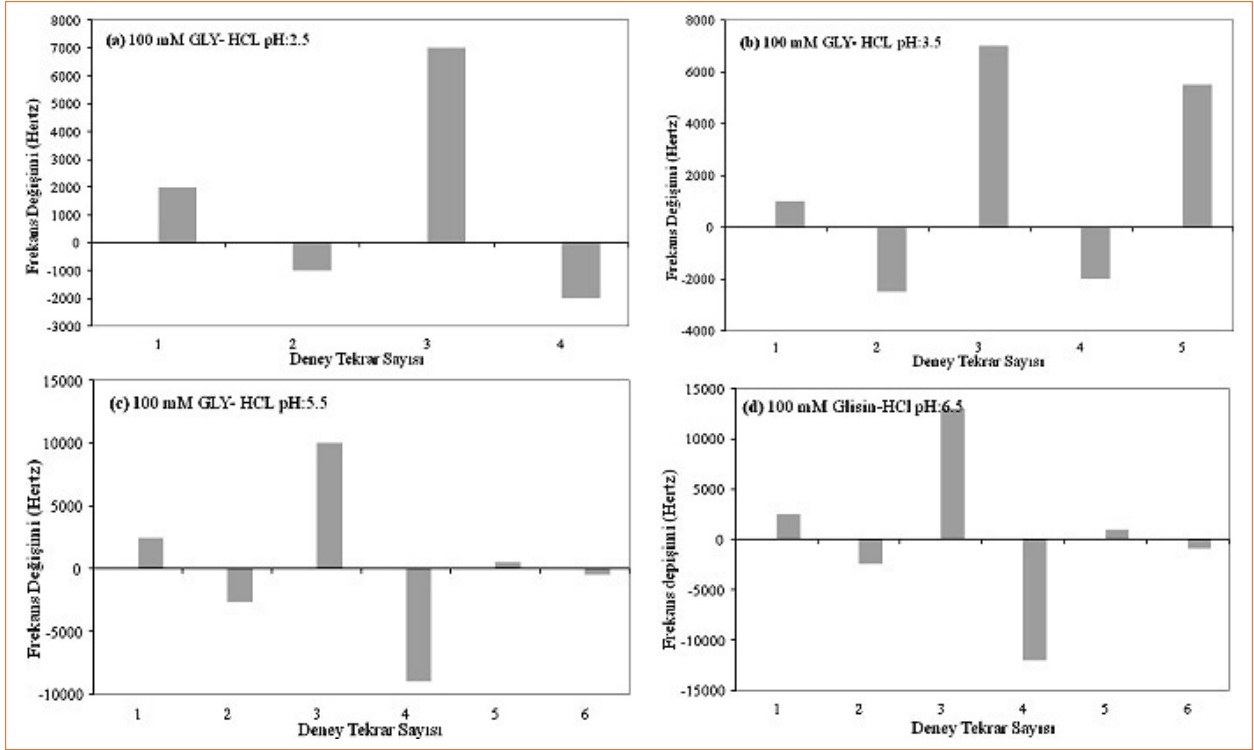
Çalışmada oluşturulan BSA-Homosistein bağının koparılması amacıyla farklı derişimlerde NaOH çözeltileri ve farklı derişim ve pH değerlerinde Glisin-HCl tampon



Şekil 11. Glisin-HCl tamponundaki deneyler (1 mM). pH (a) 2,5; (b) 3,5; (c) 5,5; (d) 6,5.



Şekil 12. Glisin-HCl tamponundaki deneyler (10 mM). pH (a) 2,5; (b) 3,5; (c) 5,5; (d) 6,5.



Şekil 13. Glisin-HCl tamponundaki deneyler (100 mM). pH (a) 2,5; (b) 3,5; (c) 5,5; (d) 6,5.

çözeltileri hazırlanmış ve kullanılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında bağlanan homosistein miktarının tamamının koparılması ve yine homosisteinin bağlanması hedeflenmiştir. Bu işlem, aynı piezo kristal için deformasyonuna kadar devam edilmiştir. Homosistein derişimi hem bazik hem de asidik desorpsiyonda 1  $\mu$ M olarak sabit tutulmuştur.

#### Bazik desorpsiyon

Farklı derişimlerde NaOH kullanarak BSA-homosistein afinitesi sonucu oluşan kovalent bağın koparılması işlemleri yapılmıştır. NaOH derişimleri  $10^{-6}$  mM ile 100 mM aralığında değiştirilerek homosistein-BSA bağının koparılması sağlanmıştır. Her bir NaOH derişim değeri için sonuçlar toplu olarak Şekil 9'da topluca sunulmuştur.  $10^{-6}$  mM NaOH için ikinci homosistein bağlanmasından sonraki kopma işleminde kristal deforme olmuş ve yanlış frekans değışimi tespit edilmiştir.  $10^{-3}$  mM NaOH derişiminde yalnızca iki kez koparılma ve bağlanma işlemi yapılabilmektedir. NaOH derişiminin  $10^{-1}$  mM olduğunda piezo kristalde bozunma hemen ilk tekrarda oluşmuştur. Bağlanan homosistein miktarından fazla bağ kırılması gerçekleşmiştir. Bazik ortamda bağ koparılması deneylerinde 1, 10 ve 100 mM derişim değerlerinde, bağlanandan fazla homosistein bağ kırılması gerçekleşmiştir. Bu durum kristal yüzeyine bağlanan BSA'dan da bir miktar kopma gerçekleştiği, belki de yüzeydeki diğer modifikasyon işlemlerini etkisiz hale getirdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Sonuç olarak bazik ortamda gerçekleştirilen tekrarlanan

birlik deneylerinden olumlu sonuç alınamamıştır. Bu durum ortam pH değerinin bu bağ kırılması için uygun olmadığı ile açıklanabilir, çünkü BSA'nın izoelektrik noktasının pH 5 olduğu düşünüldüğünde bazik koşullarda gerçekleştirilen deney ortamlarının BSA'nın izoelektrik noktasının üzerinde olması nedeniyle en düşük derişimli NaOH'ın bile bağlanan albuminin ve yapısındaki bağlarının da kopması sonucunu meydana getirdiği düşünülmüştür. Ayrıca farklı NaOH değerlerinde gözlenen yüksek frekans değerleri göz önüne alındığında yüzeydeki diğer modifikasyon basamaklarını da etkileme ihtimali ortaya çıkmıştır.

#### Asidik desorpsiyon

Bu aşamada BSA-Homosistein bağının koparılması amacıyla farklı derişimlerde ve pH'larda Glisin-HCl tampon çözeltileri hazırlanmış ve kullanılmıştır. Hazırlanan Glisin çözeltilerinin derişimleri 0,01, 1, 10, 100 mM olarak seçilmiştir. Seçilen bu değerler ile aynı molaritelerdeki HCl çözeltilerinin ilavesi ile tampon çözeltiler sırasıyla 2,5; 3,5; 5,5 ve 6,5 pH değerlerine ayarlanmıştır. pH değerleri ayarlanan bu tampon çözeltiler ile piezo kristaller etkileştirilmiş ve BSA-Homosistein bağının koparılma işlemi gerçekleştirilmiştir. Koparılan bu bağın tekrar oluşturulabilmesi için homosistein bağlanma işlemi aynı kristale tekrar uygulanmıştır. Bu şekilde kristalin bozunma noktasına kadar tekrar deneyleri gerçekleştirilmiş ve tasarımı gerçekleştirilen homosistein sensörün tekrar kullanılabilirliği asidik ortamda yenileme deneyleri ile araştırılmıştır.

Glisin derişimlerinin ve pH değerlerinin farklılanmasının nedeni kuartz kristal yüzeylerine uygulanmış olan çoklu modifikasyon işlemidir. Zira buradaki amaç modifikasyonun son aşaması olan homosistein bağının koparılmasıdır, ancak bu aşamadan önceki bağların da zarar görmemesi önemlidir. Yapılan işlemler kimyasal modifikasyonlar olarak görünse de protein yapısındaki BSA'nın kristal yüzeyine olan GA-BSA bağının ve BSA molekülünün üç boyutlu yapısının da bu koşullardan etkilenmemesi temel amaçtır.

### **0,01 mM Glisin-HCL deneyleri**

Bu bölümde 0,01 mM Glisin-HCl tamponuyla pH: 5; 3,5; 5,5 ve 6,5'da çalışılmıştır. Sonuçlar toplu olarak Şekil 10'da sunulmuştur. Bu grafiklerden elde edilen sonuçlara göre 0,01 mM glisin derişiminde tüm pH değerlerinde önemli miktarda tekrar sayısına ulaşılmamıştır. Sadece pH 5,5 değerinde 13 kez tekrar edilebilmiştir.

### **1 mM Glisin-HCL deneyleri**

Çalışmanın bu bölümünde 1 mM Glisin-HCl tamponuyla pH 2,5; 3,5; 5,5 ve 6,5'da çalışılmıştır. Her bir pH değeri için sonuçlar toplu olarak Şekil 11'de sunulmuştur. pH 2,5 tamponunda gerçekleştirilen deneylerde piezo kristallerdeki BSA-Homosistein bağının koparılması ve tekrar homosistein bağlanması ile ilgili yapılan bağ koparılma-oluşturma işleminde 8. tekrardaki bağlanmada kopan miktardan daha fazla homosistein bağlanması gerçekleşmiştir. pH 3,5 te elde edilen sonuçlarda 10. aşamadaki etkileşim sonrası bağlanan Homosisteinden daha çok kopma olduğu gözlenmiştir. pH 5,5 tamponunda gerçekleştirilen çalışmada piezo kristallerdeki BSA-Homosistein bağının koparılması ve tekrar homosistein bağlanması ile ilgili yapılan bağ koparılma-oluşturma işleminde 31. tekrar sayısına kadar deney başarıyla gerçekleştirilmiştir. pH 6.5 tamponunda gerçekleştirilen çalışmada ise piezo kristallerdeki BSA-Homosistein bağının koparılması ve tekrar homosistein bağlanması ile ilgili yapılan deneylerin sonuçları sunulmuştur. Bu koşullarda yapılan bağ koparılma-oluşturma işleminde 27. denemeye kadar deney başarıyla gerçekleştirilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi 27. bağlanma aşamasından sonraki 28 inci işlem adımında bağlanan miktardan daha fazla kopma meydana gelmiştir. Bu da kristal yüzeyindeki BSA'nın da bir kısmının kopması anlamına gelmektedir. Bu aşamadan sonra deney 39 tekrara kadar devam ettirilmiştir. 29. ile 39. bağlanma-kopma denemeleri de orantılı sonuçlar vermekle birlikte deney sonlandırılmıştır.

### **10 mM Glisin-HCL deneyleri**

Araştırmanın bu bölümünde ise 1 mM Glisin-HCl tamponuyla pH 2,5; 3,5; 5,5 ve 6,5'da çalışılmıştır. Her bir pH değeri için sonuçlar toplu olarak Şekil 12'de verilmektedir. pH 2,5 tamponunda gerçekleştirilen deneylerde piezo kristallerdeki BSA-Homosistein bağının koparılması ve tekrar homosistein bağlanması ile ilgili yapılan deneylerin bağ koparma-oluşturma işleminde ikinci, pH: 3,5 tamponunda yapılan onuncu tekrar bağlanma deneyinde

koparılan miktardan daha az homosistein bağlanması gerçekleşmiştir. pH 5,5 tamponunda gerçekleştirilen deneylerde ise piezo kristallerdeki BSA-Homosistein bağının koparılması ve tekrar homosistein bağlanması ile ilgili yapılan bağ koparılma-oluşturma işleminde beşinci, pH: 6,5 tamponunda yapılan ikinci tekrar bağlanma deneyinde koparılan miktardan daha az homosistein bağlanması gerçekleşmiştir. Tüm şekillerden de görüleceği gibi bu noktadan sonra da bir kaç tekrar deney daha yapılmış ancak kristal deforme olduğundan deneylere devam edilmemiştir.

### **100 mM Glisin-HCL deneyleri**

Araştırmanın bu bölümünde de 100 mM Glisin-HCl tamponuyla pH 2,5; 3,5; 5,5 ve 6,5'da çalışılmıştır. Sonuçlar toplu olarak Şekil 13'de sunulmuştur. pH 2,5 tamponunda gerçekleştirilen bağ koparılma-oluşturma işleminde ikinci tekrar bağlanma deneyinde koparılan miktardan daha az, pH: 3,5 tamponunda yapılan yine ikinci tekrar bağlanma deneyinde koparılan miktardan daha fazla homosistein bağlanması gerçekleşmiştir. pH 5,5 ve 6,5 Glisin-HCl tamponunda yapılan deneylerde ise piezo kristallerdeki BSA-Homosistein bağının koparılması ve tekrar homosistein bağlanması ile ilgili yapılan deneylerde her iki pH değeri için bağ koparılma-oluşturma işleminde üçüncü tekrar bağlanma deneyinde koparılan miktardan daha fazla homosistein bağlanması gerçekleşmiştir. Bir kaç tekrar deney daha yapılmış ancak kristal deforme olduğundan deneylere devam edilmemiştir.

## **Sonuçlar**

QCM sisteminde gümüş kristaller kullanılarak BSA-Homosistein bağının oluşturulması - koparılması ve tekrar kullanılabilirliğinin incelendiği Homosistein Biyosensörüne ilişkin yapılan çalışmaların sonuçları aşağıda sunulmuştur. İlk olarak kristalin gümüş yüzeyinde ardışık olarak sodyum hidroksit, aseton ve metanol çözeltileriyle temizleme işlemi başarıyla gerçekleştirilmiştir. İkinci olarak gümüş yüzeye bağlanma işlemleri yapılmış, kristale sistemin sonrası serbest amin uçlarından uzatma kolu olarak bifonksiyonel glutaraldehid bağlanması gerçekleştirilmiştir. Kristal yüzeyine Bovin Serum Albumin'nin kovalent immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Piezo kristallere farklı derişimlerde BSA immobilize edilerek kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Piezo kristal yüzeyine bağlanan madde miktarı Sauerbrey denkleminde göre hesaplanmıştır. BSA bağlanan gümüş kristal yüzeyine homosistein immobilizasyonu gerçekleştirilmiş ve homosistein için kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Homosistein için tespit edilen 0,5-2 µM çalışma aralığı ile mikro düzeyde tayarinin mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır. Son olarak tekrar kullanılabilirlik denemeleri kapsamında kristale bağlanan homosisteini koparmak için farklı derişimlerde ve pH'larda asidik çözeltiler hazırlanmış ve tekrar kullanılabilirlik denemeleri ile 30 tekrar sayısına ulaşılmıştır.

Sunulan bu araştırma ile mevcut yöntemlere göre kolay,

ucuz, tekrarlanabilen bir homosistein biyosensörü geliştirilmiştir. Tasarlanan homosistein biyosensörü için yaklaşık 30 ardışık deneme önemli bir sayı olarak kabul edilmiştir. Mikromolar seviyesinde kantitatif ölçüm yapabilen bir biyosensörün aynı test için 30 kez kullanılabilir olması maliyet açısından da önemli bir avantaj sağlayacağı düşünülmüştür.

## Kaynaklar

- [1] Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I, Nygård O, Schneede J, et al. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (> or = 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study. *J Clin Invest* 1996; 98(9):2174-83.
- [2] Petri M, Roubenoff R, Dallal GE, Nadeau MR, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1996; 348(9035):1120-4.
- [3] Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA. Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* 1997; 95(5):1119-21.
- [4] Krijt J, Vacková M, Kozich V. Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using tris(2-carboxyethyl)phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine. *Clin Chem* 2001; 47(10):1821-8.
- [5] Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, et al. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98(1):24-9.
- [6] van den Berg M, Stehouwer CD, Bierdrager E, Rauwerda JA. Plasma homocysteine and severity of atherosclerosis in young patients with lower-limb atherosclerotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16(1):165-71.
- [7] Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274(13):1049-57.
- [8] Konecky N, Malinow MR, Tunick PA, Freedberg RS, Rosenzweig BP, et al. Correlation between plasma homocyst(e)ine and aortic atherosclerosis. *Am Heart J* 1997; 133(5):534-40.
- [9] de Lorgeril M, Salen P, Paillard F, Lacan P, Richard G. Lipid-lowering drugs and homocysteine. *Lancet* 1999; 353(9148):209-10.
- [10] Desouza C, Keebler M, McNamara DB, Fonseca V. Drugs affecting homocysteine metabolism: impact on cardiovascular risk. *Drugs* 2002; 62(4):605-16.
- [11] Eren AA. Ufuk Üniversitesi Dr. Rıdvan Ege Hastanesi Polikliniklerine başvuran hastalarda serum Vitamin B12 ve Folik Asit, Homosistein değerleri ile Nöropsikiyatrik şikâyetlerin ilişkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ufuk Üniversitesi, Ankara, 2011.
- [12] Kavuk S. Sigara içen ve içmeyen gebelerde 3. trimester ve kordon kanlarının vitamin b12, folik asit ve homosistein seviyeleri açısından karşılaştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, GATA Üniversitesi, Ankara 2011.
- [13] Ünlü A. Kardiyak cerrahi geçiren hastalarda, preoperatif serum homosistein düzeylerinin, akut böbrek yetmezliği, serebrovasküler olay, mezenterik iskemi ve derin ven trombozu ile ilişkisinin değerlendirilmesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2011.
- [14] Uzman A. Metilentetrahidrofolat (MTHFR) gen polimorfizminin, implant uygulanan hastalarda homosistein seviyeleri üzerine olan etkisinin incelenip değerlendirilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2012.
- [15] Ducros V, Demuth K, Sauvant MP, Quillard M, Caussé E, et al. Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 781(1-2):207-26.
- [16] Gu F, Lux R, Du-Thumm L, Stokes I, Kretz J, Anderson MH, et al. In situ and non-invasive detection of specific bacterial species in oral biofilms using fluorescently labeled monoclonal antibodies. *J Microbiol Methods* 2005; 62(2):145-60.
- [17] Berdat D, Marin A, Herrera F, Martin AM. DNA biosensor using fluorescence microscopy and impedance spectroscopy, *Sensors and Actuators B* 2006; 118:53-9.
- [18] Vivian, C., Wu, H., Sz-Hau. Chenb, Chih-Sheng. Lin., Real-time detection of Escherichia coli O157: H7 sequences using a circulating-flow system of quartz crystal microbalance, *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22:2967-2975.
- [19] Pastorino L, Caneva Soumetz F, Giacomini M, Ruggiero C. Development of a piezoelectric immunosensor for the measurement of paclitaxel. *J Immunol Methods* 2006; 313(1-2):191-8.
- [20] Makower A. and Scheller, F.W., A set of piezoelectric biosensors using cholinesterases, *Methods in Molecular Biology*, 2008, vol. 504, s.3-22.
- [21] Mutlu S, Çökeler D, Shard A, Goktas H, Ozansoy B, et al. Preparation and characterization of ethylenediamine and cysteamine plasma polymerized films on piezoelectric quartz crystal surfaces for a biosensor, *Thin Solid Films* 2008; 516:1249-55.
- [22] Sözmen N. Biyomedikal Uygulamalarında Akıllı Polimer Kullanılması ve Karakterizasyon Yönteminin Kuartz Kristal Mikro Dengeleyici Sistemler ile Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Başkent Üniversitesi, Ankara, 2008.
- [23] Escuderos ME, Sánchez S, Jiménez A Virgin olive oil sensory evaluation by an artificial olfactory system, based on Quartz Crystal Microbalance (QCM) sensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010; 147:159-64.
- [24] Fogel R, Limson JL. Probing fundamental film parameters of immobilized enzymes-towards enhanced biosensor performance. Part I--QCM-D mass and rheological measurements. *Enzyme Microb Technol* 2011; 49(2):146-52.
- [25] Ayhan F, Tabrizi A, Ayhan H. Microgravimetric DNA Detection with Gold Nanoparticle Immobilized Piezo Crystal by Quartz Crystal Microbalance, *Sensor letteres* 2011; 9:1-7.
- [26] Lee CF, Yan TR, Wang TH. Long-term monitoring of Caco-2 cell growth process using a QCM-cell system, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012; 166-7:165-71.
- [27] Akgül EÖ. HPLC Yöntemiyle Plazma Homosistein Ölçüm Yöntemlerinin Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, GATA Üniversitesi, Ankara, 2003, 61s.
- [28] Sağdıç D. Spektrofotometrik Homosisteinin Tayini, Yüksek Lisans Tezi İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2004, 63s.
- [29] Özen P. QCM tabanlı sıvı ortam algılama sistemi tasarımı, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya, 2012, 61s.
- [30] Updike SJ, Hicks GP. The enzyme electrode. *Nature* 1967; 214(5092):986-8.
- [31] Guilbault GG, Luong JH. Gas phase biosensors, *Journal of Biotechnology*. 1988; 9:1-29.
- [32] Kanazawa KK and J. Gordon II, Impedance analysis of thickness-shear mode quartz crystal resonators in contact with linear viscoelastic media. *Anal Chem* 1985; 57:1770.
- [33] Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. *JAMA* 1993; 270(22):2693-8.
- [34] Shons A, Dorman F, Najarian J. The piezoelectric Quartz immuno-sensor. *J Biomed Monit Res* 1972, 570-6.
- [35] Ayhan F, Gülsu A, Ayhan H. Quartz crystal piezo electrode surface modification for gold nano-particles immobilization. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* 2007; 3:203-8.
- [36] Koçum C, Erdamar A, Ayhan H. Design of temperature control-



- led Quartz Crystal Microbalance System. *Instrumentation Science and Technology* 2010; 38:39-51.
- [37] Erdamar A, Ayhan F, Koçum İC, Ayhan H. Urease immobilized piezoelectric quartz crystal for urea conversion. *Hacettepe J of Biology&Chemistry* 2008; 2:173-80.
- [38] Liu YC, Wang CM, Hsiung KP. Comparison of different protein immobilization methods on quartz crystal microbalance surface in flow injection immunoassay. *Anal Biochem* 2001; 299(2):130-5.
- [39] Sauerbrey GA. Use a quartz vibrator form weight thin films on a microbalance. *Z Phys* 1959; 155:206-10.
- [40] Liu Y, Yu X, Zhao R, Shangguan DH, Bo Z, Liu G. Real time kinetic analysis of the interaction between immunoglobulin G and histidine using quartz crystal microbalance biosensor in solution. *Biosens Bioelectron* 2003; 18(11):1419-27.
- [41] Zhang H, Zhao R, Chen Z, Shangguan DH, Liu G. QCM-FIA with PGMA coating for dynamic interaction study of heparin and antithrombin III. *Biosens Bioelectron* 2005; 21(1):121-7.
- [42] Liu Y, Yu X, Zhao R, Shangguan DH, Bo Z, Liu G. Quartz crystal biosensor for real-time monitoring of molecular recognition between protein and small molecular medicinal agents. *Biosens Bioelectron* 2003; 19(1):9-19.
- [43] Tabrizi APF. Altın nanopartikül üretimi ve kuartz kristal mikrobalsans sisteminde kullanımı. [Yüksek Lisans Tezi] Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2006.
- [44] Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985; 31(4):624-8.
- [45] Refsum H, Ueland PM, Svardal AM. Fully automated fluorescence assay for determining total homocysteine in plasma. *Clin Chem* 1989; 35(9):1921-7.
- [46] Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, et al. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39(9):1764-79.