



Yüzüncü Yıl Üniversitesi  
Tarım Bilimleri Dergisi  
(YYU Journal of Agricultural Science)



<http://dergipark.gov.tr/yyutbd>

Araştırma Makalesi (Research Article)

**Elektrokimyasal Sensörlerde, Antikorun Sensör Yüzeydeki İnkübasyon Süresinin, Ölçüm Kalitesine Etkisi**

**Sümevra SAVAŞ<sup>\*1</sup>**

<sup>1</sup>Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilişim ve Bilgi Güvenliği İleri Teknolojiler Araştırma Merkezi, 41470, Kocaeli, Türkiye

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0001-5057-9178>

\*Sorumlu yazar e-posta: [sumeyra.savas@tubitak.gov.tr](mailto:sumeyra.savas@tubitak.gov.tr)

**Makale Bilgileri**

Geliş: 08.08.2020  
Kabul: 02.09.2020  
Online Yayınlanma: 10.10.2020  
DOI: 10.29133/yyutbd.778217

**Anahtar Kelimeler**

Biyosensör  
İnkübasyon süresi,  
Patojen tespiti

**Öz:** Tarım ve gıda teknolojisinde sıklıkla karşılaşılan problemlerden biri olan patojenlerin tespitinde biyosensör teknolojisi son yıllarda üzerinde çalışılan bir konudur. Bu çalışmada, daha önceki çalışmalarımız da geliştirdiğimiz antikor temelli assayin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Antijenin (patojenin) tespitinde antijen-antikor eşleşmesi kadar birincil antikorun sensör yüzeye tutunma süreside önem taşımaktadır. Bu çalışma da antikor, farklı sürelerde, sensör yüzeye temas ettirilmiş ve aynı konsantrasyondaki antijenin, bu inkübasyon süreleri sonunda antikor ile olan etkileşimi sonrası elde edilen elektrokimyasal sensör seviyeleri incelenmiştir. 15 dakikalık ve yarım saatlik inkübasyon sürelerinin ideal sonuçlar alınmasını sağladığı, 1.5 saatlik inkübasyonun sinyal seviyesinde düşmeye sebep olduğu ve 2 saatlik inkübasyonda antikorun etkisini yitirdiği gözlenmiştir. Gerçek zamanlı gerçekleştirilen reaksiyonlarda ideal süre 4 dakika olarak belirlenmiş ancak bu süre de 15 dakika- 1 saat aralığında elde edilen maksimum sinyal gözlenmemiştir. Bu çalışmanın antikorun sensör yüzey modifikasyonunda ki uygulamaları için deneysel bir temel oluşturacağı düşünülmektedir.

**The Effect of the Incubation Time of the Antibody on the Sensor Surface on the Measurement Quality in Electrochemical Sensors**

**Article Info**

Recieved: 08.08.2020  
Accepted: 02.09.2020  
Online Published: 10.10.2020  
DOI: 10.29133/yyutbd.778217

**Keywords**

Biosensor  
Incubation time  
Pathogen

**Abstract:** Biosensor technology has been studied in recent years in the detection of pathogens, which is one of the frequently encountered problems in agricultural and food technology. In this study, it is aimed to develop the antibody-based assay that we developed in our previous studies. Adhesion time of the primary antibody to the sensor surface is as important as the antigen-antibody match in the detection of the antigen (pathogen). In this study, the antibody was contacted with the sensor surface for different times and the electrochemical sensor levels obtained after the interaction of the antigen at the same concentration with the antibody at the end of these incubation periods were examined. It was observed that 15- minute and half-hour incubation times provided ideal results, 1.5 hour incubation caused a decrease in the signal level and the antibody lost its effect in 2 hours of incubation. In real-time reactions, the ideal time was determined as 4 minutes, but the maximum signal obtained in the range of 15 minutes to 1 hour could not be observed. It is thought that this study will form an experimental basis for the applications of the antibody in sensor surface modification.

## 1. Giriş

Elektrokimyasal biyosensörler; biyoreseptör, dönüştürücü ve sensör okuyucu olmak üzere temel üç bileşenden oluşan, biyolojik veya kimyasal sinyali, bünyesinde bulunan dönüştürücü ile ölçülebilir bir elektrik sinyale dönüştürerek, biyolojik ve kimyasal analitin tespitinde kullanılan cihazlardır (Boz ve ark., 2017; Tüylek, 2017). Günümüzde tıptan tarıma, eczacılıktan savunma sektörüne, kadar pek çok alanda kullanımı mevcuttur (Bagde ve Borkar, 2013). Özellikle tarım ve veterinerlik alanında, bitki patojenlerinin hızlı tanısı oldukça önemli olup, bu patojenler tarımsal üretimi düşürdükleri için dünya çapında sorun teşkil etmektedirler (Khater ve ark., 2017). Günümüzde, tarımsal sektör bu patojenlerin tespitinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve enzim bağlı immünotestler (ELISA) yaygın olarak kullanılıyor olup, her ikisinde tecrübe ve ekipman gerektirir. Beraberinde zaman alıcı olan bu yöntemlere, hızlı tanı ile zamandan tasarruf sağlanması, yüksek tecrübe ve ekipmana gereksinim duyulmaması sebebi ile biyosensörler alternatif olmaya adaydır (Tüylek, 2017).

Proteinler, çevreden korunmadan, hücre sel bilgi alışverişine kadar pek çok yaşam sürecinde ciddi rol oynayan önemli makromoleküllerdir (Gauci ve ark., 2011). Antikorlar, bedene giren yabancı hücrelere karşı oluşturulan protein yapıları güçlü koruyuculardır. Protein biyobelirteçlerinin aynı kökenli antikorlar tarafından özel olarak tanınmasında kullanılan immünojenik testler ile hastalık tespiti günümüzde büyük ilgi görmektedir. ELISA yöntemi yani proteinlerin enzim araçlı veya kolorimetrik tespiti, standart bir immünojenik test tekniği olup, bu teknik, mikrofluidik biyosensör uygulamalarında, protein ve enzimlerin analizinde, sensör yüzeye de uygulanmaktadır ve güçlü bir teknolojik araç olarak tanımlanmaktadır (Bange ve ark., 2005; Kim ve Henn., 2013; Ng ve ark., 2010). Sensör uygulamalarında, mikro ölçekli akışkan ağlar içerisinde sıvının geçişi, makro ölçekli cihazlara nazaran kullanılan reagenlerin, reaktiflerin tüketim miktarının azalmasını sağlar. Yarı iletken endüstrisi sayesinde, analit-antikor veya enzim- substrat arasında hızlı reaksiyona fırsat veren mikrofluidik sistem, sensör yüzeydeki kolay reaksiyona izin verir ve test süresinin azalmasını sağlar (Bange ve ark., 2005; Henares ve ark., 2008; Ng ve ark., 2010).

Biyosensör uygulamalarında antikorun sensör yüzeye immobilizasyonunda kullanılan çeşitli yöntemler mevcut olup, bu yöntemlerden birisi de kolavent bağlanmadır. Bu yöntem mikrofluidik sistemlerde sıklıkla kullanılan bir immobilizasyon tekniğidir. Antikorun yüzeye bağlanma aşamasından sonra, reaksiyona girmeyen aktif gruplar bloke edilir. Kovalent bağlanmanın en büyük dezavantajı, proteinin aktif bölgelerinde oluşacak kovalent bağın, proteinin aktivitesinde azalmaya sebep olabilmesidir. Kovalent bağlanma reaksiyonu yavaş olmalıdır ancak, inkübasyon süresi aktivasyonu açısından büyük önem taşımaktadır (Liu ve ark., 2011; Peterson ve ark., 2002; Rusmini ve ark., 2007). Sensör yüzeyde immobilizasyon kalitesini ve buna bağlı olarak ölçüm limitini etkileyen çeşitli faktörler mevcuttur. pH, kullanılan tampon, antijen konsantrasyonu ve süspansiyonda kullanılan medium bunlar arasındadır.

Bu çalışma, geçmişte yaptığımız çalışmaların (Savas ve ark., 2018; Savas ve Altintas, 2019; Savas, 2020) bir devamı niteliğinde olup, bu çalışmada kovalent bağla immobilizasyon yöntemlerinden biri olan, carboxylate-EDC+NHS-amine bağlanması sırasında önemli olan ve optimize edilen parametreler dikkate alınarak ve sabit tutularak, antikorun sensör yüzey üzerinde ki bağlanma amaçlı inkübasyon süresinin optimizasyonu ve inkübasyon süresine bağlı meydana gelen aktivasyon kaybı araştırılmıştır. Patojenlerin elektrokimyasal sensör ile tespitinde antikorun altın kaplı sensör yüzeyde ki inkübasyon süresinin, neticeye etkisi ile ilgili mevcut çalışma bulunmuyor olup, immobilizasyon da en önemli aşama antikorun yüzeye tutunma aşamasıdır. Bu çalışma, antikorun sensör yüzey modifikasyonunda ki uygulamaları için deneysel bir temel oluşturmaktadır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal ve reagenler

Monoklonal anti-Salmonella antikor BIO-RAD'dan temin edilmiştir (Puchheim, Germany). Peroksidaz işaretli keçi anti-Salmonella ikincil antikor (BacTrace® Anti-Salmonella CSA-1 Antikor) SeraCare Life Sciences firmasından temin edilmiştir (Gaithersburg, MD, USA). 11-Mercaptoundecanoic asit (MUDA), phosphate-buffered saline tabletler (PBS), 0.01 M fosfat tampon,

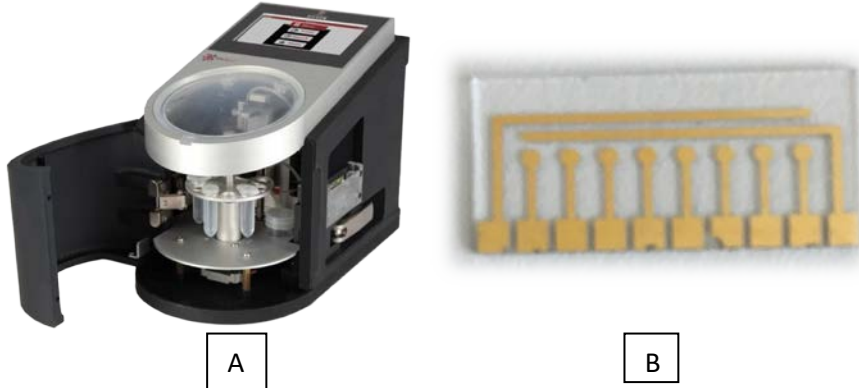
0.0027 M potasyum klorid ve 0.137 M sodyum klorid, (pH 7.4), Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), moleküler kullanıma uygun etanol, horseradish peroksidaz (HRP), etanolamin ve 3,3,5,5 -tetramethylbenzidine (TMB) reijenleri Sigma Aldrich'den temin edilmiştir (Poole, UK), Ultrasaf su temini için (18 MΩ cm<sup>-1</sup>) Milli-Q water system kullanılmıştır (Millipore Corp., Tokyo, Japan).

## 2.2. Ön çalışmalar

Çalışmada TÜBİTAK, BİLGEM tarafından tasarlanmış ve yine TÜBİTAK' da üretilmiş olan 8 kanallı sensör çipler kullanılmıştır. Sensör çipin yüzeyinin temizliği, SAM (self-assamble monolayer) kaplama, deneyde ki HRP konsantrasyonunun optimizasyonu ve yine deneyde kullanılan reijenlerin yoğunluğu ve pH' sı bir önceki çalışmalarımızda optimize edilmiştir (Altintas ve ark., 2018; Savas ve ark., 2018; Savas, 2020).

## 2.3. Tam-Otomatik Mikrofluidik Temelli Elektrokimyasal Sensör ve Yeni Dizayn Çip

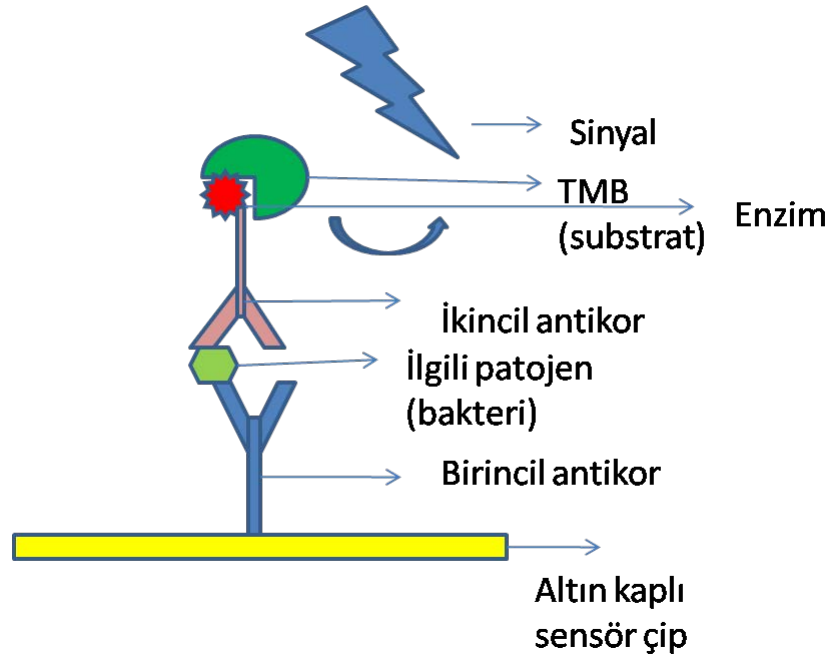
Bu çalışmada elektrokimyasal ölçüm için özel olarak tasarlanmış tam otomatik, mikrofluidik kanallı bir elektrokimyasal sensör cihazı kullanılmıştır (TÜBİTAK, Bilgem, Kocaeli, Türkiye) (Şekil 1-A). Kullanılan yeni dizayn sensör çip ve elektrokimyasal ölçüm cihazının detayları bir önceki çalışmada detaylı verilmiş olup, kullanılan çipin tasarımında, elektrotlar cam slayt üzerine lazer kesimli çelik maske sayesinde işlenmiştir. (Şekil 1-B). Altın, E- beam sistemi (Nanovak NVEB-600, Ankara) kullanılarak 200 nm ve altına 40 nm titanyum tabakası şeklinde uygulanmıştır. Ölçümde PC Trace Emstat (PalmSens, Hollanda) programı kullanılmıştır (Altintas ve ark., 2018; Savas ve ark., 2018; Savas, 2020).



Şekil 1. A) Mikrofluidik temelli elektrokimyasal sensör cihazı B) Altın Kaplı Sensör Çip (Savas ve ark., 2018).

## 2.4. Sensör yüzeye uygulanan Antikor Temelli Sandwich Assay

Antikor temelli sensör mekanizması farklı patojenler için daha önceki çalışma da optimize ettiğimiz reijen konsantrasyonları, tampon pH'ları, ikincil antikor konsantrasyonu, kullanılan optimum enzim konsantrasyonu dikkate alınarak birebir uygulanmıştır (Altintas ve ark., 2018; Savas ve ark., 2018). Bu çalışmada bir önceki çalışmadan farklı olarak primer antikor konsantrasyonu 10<sup>5</sup> cfu/mlt olacak şekilde sabitlendi ve tek değişken parametre, antikorun sensör yüzeyde bekleme süresi olacak şekilde deney dizayn edilmiştir. Sensör yüzey üzerine uygulanan sandwich assay prensibi Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Antikor temelli sensör prensibi.

### 2.5. Antikoru yüzeyde bekleme süresi ve optimizasyonu

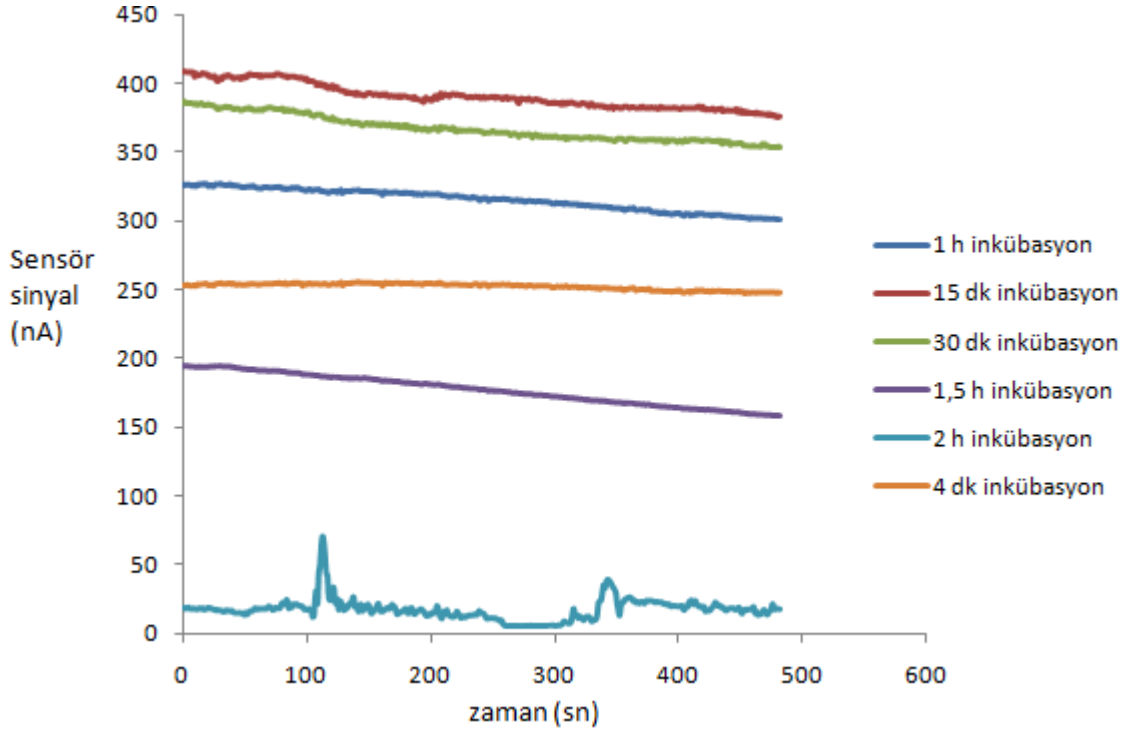
Sensör yüzey 1:1 hacimde EDC – NHS karışımı ile aktifleştirildikten sonra, birincil antikor farklı sensör çiplerde 1. Çipte 4 dakika, 2. Çipte 15 dakika, 3. Çipte 30 dakika, 4. Çipte 1 saat, 5. Çipte 1.5 saat ve 6. Çipte 2 saat inkübe edildikten sonra, PBS tampon içerisinde hazırlanan BSA tamponu ile sensör yüzeydeki boşluklar kapatılmıştır. Etanolamin uygulamasından sonra HRP işaretli ikincil antikor her çipe ayrı ayrı uygulanmıştır. Amperometrik ölçümler, TMB reaktifi kullanılarak 0,1 V’da gerçekleştirildi. Proseste kullanılan tüm reagen ve tampon konsantrasyonları, pH değerleri ve diğer tüm parametreler, bir önceki çalışmada optimize edildiği gibi birebir uygulanmıştır (Savas ve ark., 2018).

### 3. Bulgular

Antijen konsantrasyonu  $10^5$  cfu/mlt olacak şekilde sabit tutularak, Sensör Çip yüzeyinde antikor, 4, 15, 30, 90 ve 120 dakika inkübe edildi ve enzimatik gerçekleşen reaksiyon sonunda elde edilen amperometrik ölçüm sonuçları şekil 3’ de gösterildi.

Antikor 4 dakika sensör yüzeyde bekletildiğinde alınan amperometrik ölçüm sonucunun 251 nA olduğu görüldü. Aynı proses birebir uygulanmak koşulu ile antikoru 15, 30 ve 60 dakika inkübasyonları sonrasında, sırası ile 402, 394 ve 327 nA sinyal elde edilmiştir. Bulunan değerler birbirine oldukça yakın olup, 15 dakikalık inkübasyon sonucunda maksimum değere ulaşıldığı saptanmıştır. İlk 15 dakikadan sonrasında antikoru ve antijen-antikor bağlanmasının etkisinin de bir düşüş gözlenmemiştir. Benzer uygulama inkübasyon süreleri 1.5 ve 2h olacak şekilde farklı sensör çiplere tekrar uygulanmıştır. 1,5 saat lik inkübasyon sonunda sinyal 191 nA, 2 saatlik inkübasyon sonunda ise 50 nA’ın altına düşmüştür.

Sonuçlar değerlendirildiğinde 4 dakikalık bekleme süresi, zamandan kazandırdığı için değerlendirilebileceği ancak maksimum verim elde edebilmek için inkübasyon süresinin en az 15 olmasının faydalı olabileceği sonucu çıkmıştır. Vakumlamaksızın sensör çip yüzeyinde 1 saatden fazla antikoru bekletilmesi deney sonucunun verimini düşürmüştür ve 2 saat sonunda ise antikoru aktivitesini yitirdiği gözlenmiştir.



Şekil 3. İlgili antikorun yüzeyde bekletilme zamanına bağlı olarak, elde edilen amperometrik ölçüm sensogramı.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Her metotta olduğu gibi biyosensör çalışmalarında uygulanan proseslerin tekrarlanabilirliğinin sağlanabilmesi için optimum koşulların belirlenmesi ve tekrarlı uygulanabilir olması önemlidir. İmmobilizasyonun yoğunluğu, kullanılan proteinin yoğunluğu, inkübasyon süresinde aktif bölgelerin bloke olmasına sebep olabilmektedir (Rusmini ve ark., 2007). Bu çalışmada, elektrokimyasal sinyal olarak rakamsal hale getirilen antijen-antikor bağlanma seviyesini etkileyen bir parametre olan, immobilizasyonda ilgili proteinin sensör yüzeyde bekleme süresi optimize edilmeye çalışılmıştır. Antijen olarak patojenler esas alınmış olup, yaptığımız çalışmaya en yakın çalışma 2019 yılında Yuan ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.

Altın kaplı sensör yüzeye dopamin immobilize edilmiş ve bekleme süreleri diğer parametreler sabit tutularak değiştirilmiştir. 2 saatlik inkübasyon sonrasında sinyal seviyesinde keskin bir düşüş yaşandığını gözlemişlerdir. Çalışmalarda sensör yüzeye immobilize edilen etkenler ve büyüklükleri farklı olsa da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yuan ve arkadaşları, yüzeye immobilize edilen dopaminin kalınlığı inkübasyon süresine bağlı olarak arttığını ve kritik bir değere ulaştığında reaksiyonda düşüş olduğu sonucuna varmışlardır (Yuan ve ark., 2019). Açıkça protein immobilizasyon stratejileri biyolojik sistemlerin ve süreçlerin ölçülmesinde kritik bir rol oynar.

#### Teşekkür

Çalışma da kullanılan sensör çip ve elektrokimyasal sensör cihazı TÜBİTAK/Bilgem Biyoelektronik ve Biyosensör Grubu tarafından geliştirilmiş olup, grupta bulunan tüm araştırmacılara teşekkür ederim.

#### Kaynakça

- Altintas, Z., Akgun, M., Kokturk, G., & Uludag, Y. (2018). A fully automated microfluidic-based electrochemical sensor for real-time bacteria detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 100, 541-548. doi: 10.1016/j.bios.2017.09.046
- Bagde, V.L., & Borkar, D.B. (2013). Biosensor: Use in agriculture. *International Journal of Scientific Research*, 2(10), 2277-8179.

- Bange, A., Halsall, H. B., & Heineman, W. R., (2005). Microfluidic immunosensor system. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), 2488-503.
- Boz, B., Paylan, İ. C., Kızmaz, M. Z., & Erkan, S. (2017). Biyosensörler ve tarım alanında kullanımı. *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 13(3), 141-148.
- Gauci, V., Wright, E., & Coorsen, J., (2011). Quantitative proteomics: Assessing the spectrum of in-gel protein detection methods. *Journal of Chemical Biology*, 4 (1), 3-29.
- Henares, T. G., Mizutani, F., & Hisamoto, H., (2008). Current development in microfluidic immunosensing chip. *Analitica Chimica Acta*, 611(1), 17-30.
- Kim, D., & Hen, A.E. (2013). Protein immobilization techniques for microfluidic assay. *Microfluidics*, 7, 041501. doi.org/10.1063/1.4816934.
- Khater, M., Escosura-Muniz, A., & Merkoçi A. (2017). Biosensors for Plant Pathogen Detection. *Science Direct Biosensors and Bioelectronics*, 93, 72-86.
- Liu, P., Li, X., Greenspoon, S. A., Scherer, J. R., & Mathies, R. A. (2011). Integrated DNA purification, PCR, sample cleanup, and capillary electrophoresis microchip for forensic human identification. *Lab on a Chip*, 11, 1041-1048.
- Ng, A. H., Uddayasankar, U., & Wheeler, A.R., (2010). Immunoassays in microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 991-1007.
- Peterson, D. S., Rohr, T., Svec, F., & Frechet, J. M. J. (2002). Enzymatic microreactor-on-a-chip: Protein mapping using trypsin immobilized on porous polymer monoliths molded in channels of microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 74, 4081-4088.
- Rusmini, F., Zhong, Z., & Feijen, J. (2007). Protein immobilization strategies for protein biochips. *Biomacromolecules*, 8(6), 1775-89.
- Savas, S., Ersoy, A., Gulmez, Y., Kılıc, S., Levent, B., & Altıntas, Z. (2018). Nanoparticle Enhanced Antibody and DNA Biosensors for Sensitive Detection of Salmonella, *Materials.*, 11, 154.
- Savas, S., Altıntas, Z. (2019). Graphene Quantum Dots as Nanozymes for Electrochemical Sensing of *Y. enterocolitica* in milk and Human Serum, *Materials.*, 12, 2189.
- Savas, S. (2020). Yersinia enterocolitica'nın Tespiti için Altın-nanoparçacık ile Güçlendirilmiş Biyosensör Uygulamalarının Geliştirilmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 15(1), 158-166.
- Tüylek, Z. (2017). Biyosensörler ve nanoteknolojik etkileşim. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2), 71-80.
- Yuan, Y.J., Xu, Z., & Chen, Y. (2019). Investigation of dopamine immobilized on gold by surface plasmon resonance. *AIP Advances*. 9, 035028.