



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CEA TESPİTİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL İMMÜNOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

ŞULE NUR ALEŞ

BİYOTEKNOLOJİ

**Şanlıurfa
2025**



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CEA TESPİTİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL İMMÜNOSENSÖR
GELİŞTİRİLMESİ**

ŞULE NUR ALEŞ

**BİYOTEKNOLOJİ
Tez Danışmanı: Doç. Dr. ABDURRAHMAN AKDAĞ**

**Şanlıurfa
2025**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim ve tez dönemim boyunca bana her konuda yardımcı olan, bilgisini, tecrübesini ve hoşgörüsünü esirgemeyen, süreç boyunca sabırla bana destek olan danışman hocam Doç. Dr. Abdurrahman AKDAĞ'a,

Lisans ve yüksek lisans sürecim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Mustafa DURGUN'a,

Yüksek lisans sürecimde bilgisinden, sevgisinden ve pozitif enerjisinden faydalandığım Prof. Dr. Ayşegül KUTLUAY BAYTAK'a,

Tüm eğitim hayatım boyunca yanımda olan, beni her koşulda maddi ve manevi olarak destekleyen sevgili anneme, kardeşlerime ve eşime,

Sürekli desteklerini ve ilgilerini hissettiğim sevgili dostum Harran Üniversitesi Arş. Gör. Dr. İlknur Yeşim DİNÇEL KIRATOĞLU'na ve değerli eşi Dr. Öğr. Üyesi Emrah KIRATOĞLU'na

Gönülden teşekkür eder ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
SİMGELER	iv
KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ	1
1.1. CEA	2
1.2. Biyosensörler	3
1.2.1. Biyoreseptörler	4
1.2.2. Dönüştürücüler	4
1.3. İmmünosensörler	5
1.3.1. Optik İmmünosensörler	6
1.3.2. Piezoelektrik İmmünosensörler	6
1.3.3. Termometrik İmmünosensörler	7
1.3.4. Elektrokimyasal İmmünosensörler	7
1.3.4.1. Amperometrik İmmünosensörler	8
1.3.4.2. Potansiyometrik immünosensörler	8
1.3.4.3. Kondüktometrik İmmünosensörler	9
1.3.4.4. İmpedimetrik İmmünosensörler	9
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Gereç	16
3.2. Yöntem	16
3.2.1. Elektrot modifikasyonu	16
3.2.2. Optimizasyon çalışmaları	17
4. BULGULAR	18
4.1. Karakterizasyon	18
4.2. Optimizasyon	18
4.2.1. MPA/MUA oranı	18
4.2.2. MPA/MUA süresi	19
4.2.3. EDC/NHS süresi	20
4.2.4. Antikor süresi	21
4.2.5. Antijen süresi	22
4.3. Kalibrasyon	23
4.4. Tekrarlanabilirlik, seçicilik ve stabilite	24
5. TARTIŞMA	25
6. SONUÇLAR	27
7. ÖNERİLER	28
KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	34

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEA TESPİTİ İÇİN ELEKTROKİMYASAL İMMÜNOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

ŞULE NUR ALEŞ

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ

Tez Danışman: Doç. Dr. ABDURRAHMAN AKDAĞ

Yıl: 2025, Sayfa : 33

Bu çalışmada, karsinoembriyonik antijenin (CEA) tespiti amacıyla elektrokimyasal bir immünosensör geliştirilmiştir. Bunun için öncelikle altın elektrot yüzeyinde 3-merkaptopropiyonik asit (MPA) ve 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) karışımı ile tek tabaka oluşturulmuştur. Daha sonra elektrot yüzeyi sırasıyla 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid/N-hidroksisüksinimid (EDC/NHS), anti-CEA ve sıgır serum albumini (BSA) ile modifiye edilerek immünosensör hazırlanmıştır. Hazırlanan immünosensör için MPA/MUA oranı ile, MPA/MUA, EDC/NHS, BSA, anti-CEA ve CEA süreleri optimize edilmiştir. Elektrokimyasal ölçümler için diferansiyel puls voltametri kullanılmıştır. İmmünosensörün doğrusal aralığının 0.05-50 ng/mL, tespit limitinin ise 0.03 ng/mL olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Kanser, İmmünosensör, CEA, Diferansiyel Puls Voltametri, Tümör Belirteci

ABSTRACT

MASTER THESIS

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL IMMUNOSENSOR FOR CEA DETECTION

ŞULE NUR ALEŞ

**HARRAN UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE EDUCATION
BIOTECHNOLOGY**

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. ABDURRAHMAN AKDAĞ

Year: 2025, Page : 33

In this study, an electrochemical immunosensor was developed for the detection of carcinoembryonic antigen (CEA). For this purpose, a monolayer consisting of a mixture of 3-mercaptopropionic acid (MPA) and 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) was initially formed on the gold electrode surface. Subsequently, the electrode surface was sequentially modified with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS), anti-CEA, and bovine serum albumin (BSA) for the preparation of the immunosensor. For the prepared immunosensor, the MPA/MUA ratio and the times of MPA/MUA, EDC/NHS, BSA, anti-CEA, and CEA were optimized. Differential pulse voltammetry was used for electrochemical measurements. The linear range of the immunosensor was determined to be 0.05-50 ng/mL, and the limit of detection was 0.03 ng/mL.

KEYWORDS: Cancer, Immunosensor, CEA, Differential Pulse Voltammetry, Tumor Marker

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Biyosensörlerin genel yapısı ve çalışma mekanizması (Garcia ve Mottram, 2003)	4
Şekil 1.2. Algılayıcı türleri (Keskin ve Arslan, 2020).	5
Şekil 1.3. Elektrokimyasal immünosensörlerin şematik gösterimi (Bahadır ve Sezgintürk, 2015).	8
Şekil 4.1. Au, Au/MPA-MUA, Au/MPA-MUA/EDC-NHS, Au/MPA-MUA/EDC-NHS/Anti-CEA, Au/MPA-MUA/EDC-NHS/Anti-CEA/BSA ve Au/MPA-MUA/EDC-NHS/Anti-CEA/BSA/CEA elektrotların 0.1 M KCl ve 3 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ içeren PBS çözeltisindeki Nyquist eğrileri	18
Şekil 4.2. MPA/MUA oranı (v/v)	19
Şekil 4.3. MPA/MUA süresi	20
Şekil 4.4. EDC/NHS süresi	21
Şekil 4.5. Antikor süresi	22
Şekil 4.6. Antijen süresi	22
Şekil 4.7. Au/MPA-MUA/EDC-NHS/Anti-CEA/BSA immünosensörün 0.05 (a), 0.2 (b), 0.5 (c), 1 (d), 10 (e) ve 50 (f) ng/mL derişimlerdeki CEA ile inkübasyonundan sonra elde edilen DPV eğrileri ve kalibrasyon grafiğı	23

SİMGELER

Au	Altın
Co	Kobalt
Cu	Bakır
Fe(CN)₆	Hekzasiyanoferrat
fg	Femtogram
H₂O₂	Hidrojen peroksit
K	Potasyum
mM	Milimolar
ng	Nanogram
Ni	Nikel
pg	Pikogram
TiO₂	Titanyum dioksit
V	Volt
μA	Mikroamper
μg	Mikrogram

KISALTMALAR

AFP	Alfa-fetoprotein
AuNP	Altın nanopartikül
BSA	Sığır serum albümini
CA 125	Kanser antijeni 125
CA 19-9	Kanser antijeni 19-9
CEA	Karsinoembriyonik antijen
CV	Dönüşümlü Voltametri
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
ECL	Elektrokemilüminesans
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
EIS	Elektrokimyasal empedans spektroskopisi
GOD	Glikoz oksidaz
IARC	Uluslararası kanser araştırmaları ajansı
LOD	Tespit limiti
MPA	3-merkaptopropiyonik asit
MUA	11-merkaptoundekanoik asit
NHS	N-hidroksisüksinimid
PBS	Fosfat tamponlu salin
PEDOT	Poli(3,4-etilendioksitiyofen)
PSA	Prostat spesifik antijen
QCM	Kuvars kristal mikro terazisi
rGO	İndirgenmiş grafen oksit
RSD	Bağıl standart sapma
SPR	Yüzey plazmon rezonans
SWV	Kare dalga voltametrisi

1. GİRİŞ

Kanser, vücuttaki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüyerek çoğalmasıyla oluşan bir hastalık grubudur. Kanser, dünya genelinde toplum sağlığını tehdit eden önemli bir unsurdur ve 1990'dan beri birçok ülkede vaka oranları artış göstermiştir. Bu artış, gelişmekte olan ülkelerde karmaşık ve maliyetli kanser tedavileriyle mücadele etmekte zorlanan sağlık sistemleri için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Fitzmaurice ve ark., 2015).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), 2012 ile 2022 yılları arasında yeni kanser vakalarının dünya genelinde %50 oranında artış gösterdiğini ve kansere bağlı kayıpların yaklaşık olarak %18 oranında yükseldiğini bildirmiştir. Ayrıca IARC, küresel kanser yükünün önümüzdeki 30 yıl boyunca artış göstermeye devam edeceği ve 2050 yılına kadar da yeni kanser vakalarının %77 oranında artış göstereceği yönünde tahminde bulunmuştur. Dünya Sağlık Örgütü'nün hazırlamış olduğu raporda akciğer, meme, kolorektal, karaciğer ve mide kanserinin 2022'de Dünya genelinde yeni kanser vakalarının ve kayıplarının yaklaşık %50'sini oluşturduğu belirtilmiştir. Akciğer kanseri, yaklaşık olarak 2.5 milyon yeni kanser vakasıyla Dünya genelindeki toplam kanser vakalarının %12.4'ünü oluşturarak en yaygın kanser türü olmuştur. Meme kanseri de 2.3 milyon vaka sayısı ile en yakın ikinci sırada yer almıştır ve toplam yeni vakaların %11.6'sını meydana getirmiştir. Üçüncü sırada ise Dünya genelindeki toplam yeni kanser vakalarının %9.6'sını oluşturan 1.9 milyon vaka ile kolorektal kanser yer almıştır. Kanserle ilgili yaşam kayıpları incelendiğinde, 1.8 milyon ölüm ile en fazla yaşam kaybına neden olan kanser türü akciğer kanseri olmuştur. Bu, kansere bağlı toplam yaşam kayıplarının %18.7'sini temsil etmektedir. Akciğer kanserini sırasıyla; 900.000 ölümle kolorektal kanser (%9.3), 760.000 ölümle karaciğer kanseri (%7.8), 670.000 ölümle meme kanseri (%6.9) ve 660.000 ölümle mide kanseri (%6.8) takip etmektedir.

Halk sağlığını önemli ölçüde tehdit eden bir hastalık olan kanserle mücadelede erken teşhis çok önemlidir. Kanserlin erken evrelerde teşhisi tedavi sürecinde büyük kolaylıklar sağlar. Hücrelere müdahale, mutasyonun erken safhalarında gerçekleştirilebilirse kanserlin gelişimi önlenelir (Auyang, 2006). Gelişen teknolojilerle birlikte son yıllarda biyosensörler, kanserlin teşhis aşamasına önemli bir yenilik getirerek daha hızlı, hassas ve invaziv olmayan (zarar vermeyen) tanı yöntemleri sunmaktadır (Şenel, 2013).

Biyosensörler; yüksek hassasiyet, kararlılık ve hızlı yanıt gibi avantajlı

özelliklerinden dolayı bilimsel çalışmalarda önemli bir yere sahiptirler. Günümüzde hastalıkların teşhisi, gıda analizi ve atık su analizi gibi çeşitli alanlarda biyosensör cihazlarından faydalanılmaktadır. Ayrıca kanser, diyabet, hepatit, tüberküloz ve birçok hastalığın tanı sürecinde biyosensör teknolojisinden yararlanılmaktadır (Bulut, 2011; Boz ve ark., 2017).

İmmünosensörler, biyolojik tanıma elemanı olarak antijen-antikor etkileşimini temel alan biyosensörlerdir. Temel prensibi, belirli bir biyomolekülün (örneğin CEA gibi bir tümör belirteci) varlığını ve miktarını hızlı, hassas ve seçici bir şekilde tayin etmektir (Parkinson ve Pejicic, 2005). İmmünosensörler, bu avantajlı özellikleri sayesinde tıbbi ve biyoanaliz alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. İmmünosensörler sinyal türüne bağlı olarak elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve termal (kalorimetrik) olmak üzere 4 ana grupta sınıflandırılmaktadır. Bu gruplar arasında elektrokimyasal immünosensörler; yüksek hassasiyet, hızlı ölçüm imkânı ve taşınabilirlik gibi üstünlükleriyle öne çıkmaktadır (Hao ve ark., 2019).

1.1. CEA

Karsinoembriyonik antijen (CEA) ilk kez 1965 yılında Gold ve Freedman tarafından tanımlanmıştır (Hao ve ark., 2019). CEA, kolorektal, akciğer, göğüs ve yumurtalık gibi kanser türlerinde önem arz eden bir tümör belirteçidir. Karsinoembriyonik antijenler, embriyonik dönemde gastrointestinal sisteme ait hücreler tarafından oluşturulur ve doğum sonrası baskılanırlar (Chen ve ark., 2018). Sağlıklı bir yetişkinin kan serumundaki CEA miktarının minimum seviyede olması beklenir. Anormal CEA seviyesi pankreas, karaciğer kanseri gibi bazı kanserlerin belirtisi olabilir (Hasanzadeh ve ark., 2017; Ballesta ve ark., 1995).

CEA genellikle kanserin teşhisi ve izlenmesinde kullanılan bir biyobelirteçtir. Özellikle yumurtalık kanseri, kolorektal, akciğer ve göğüs kanseri gibi bazı kanser türlerinin takibinde önemli bir rol oynar. CEA testi, kanser tedavisinin etkinliğini izlemek, tedavi sonrası nüksü erken saptamak ve hastalığın ilerlemesini değerlendirmek için kullanılır. Ancak CEA düzeyleri aynı zamanda bazı benign (iyi huylu) hastalıklar ve iltihaplı durumlarla da yükselir. CEA tek başına kesin tanı koymak için yeterli değildir ve genellikle diğer testlerle birlikte değerlendirilmesi gerekir. CEA düzeylerinin yükselmesi, kanserin varlığına işaret edebileceği gibi, bazı enfeksiyonlar, sigara içimi ve karaciğer hastalıkları gibi durumlarla da ilişkilidir. Bu

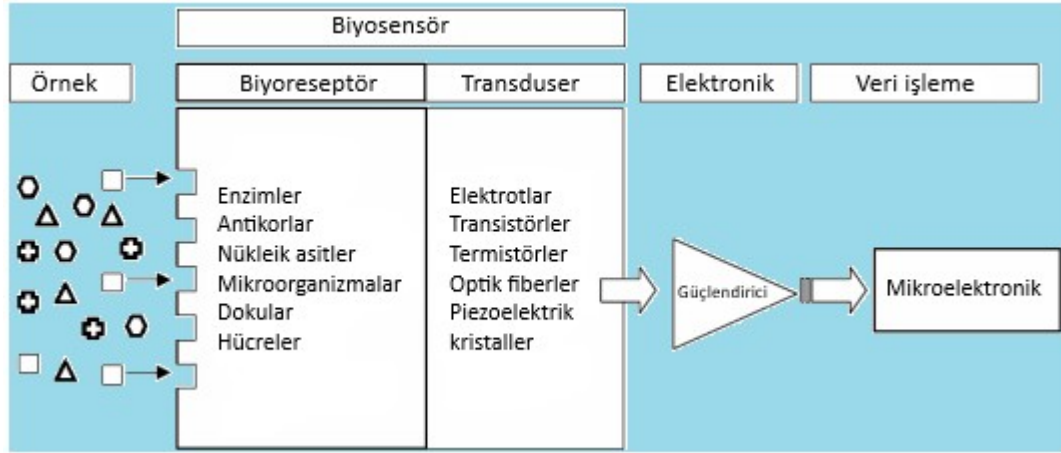
nedenle CEA testi, doktorların hastanın genel durumu hakkında daha fazla bilgi edinmelerine yardımcı olan önemli bir araçtır (Hatipoğlu ve ark., 2002).

CEA, pankreatik, gastrik ve servikal kanserlerin klinik teşhisi için de önemli bir biyobelirteçtir. Genellikle düşük serum düzeylerine sahiptir (Shen ve ark., 2005). CEA tayin yöntemleri geliştirilirken yüksek hassasiyet, hızlı ve güvenilir sonuç elde etme ile düşük maliyet gibi kriterler göz önünde bulundurulmaktadır. Bu kapsamda birçok CEA tayin yöntemi geliştirilmiştir. Optik analiz yöntemleri, elektrokimyasal tayin yöntemleri, immünoassay yöntemi (ELISA) (Crulhas ve ark., 2021; Tang ve ark., 2008), radyometrik yöntem (Nicholson ve ark., 2015; Szturmowicz ve ark., 1995), florometrik yöntem (Qiu ve ark., 2017), piezoelektrik yöntem (Shen ve ark., 2005), yüzey plazmon rezonans yöntemi (Wu ve ark., 2020), yüzey akustik dalga yöntemi ile CEA tayini yapılmaktadır (Jandas ve ark., 2020).

1.2. Biyosensörler

Biyosensörler, biyolojik bir materyaldeki analitleri algılayan ve bu algılama sonuçlarını elektriksel sinyallere dönüştüren analitik cihazlardır. Biyosensörler kararlılık, yüksek hassasiyet, hızlı yanıt süresi ve düşük maliyet gibi avantajlı özelliklere sahiptir. Yaygın olarak tıp alanında kullanılmakla birlikte mühendislik, tarım, gıda ve savunma gibi alanlarda da biyosensörlerden faydalanılmaktadır. Biyosensörler; biyoreseptör ve transducer (dönüştürücü) olmak üzere 2 temel kısımdan meydana gelirler. Biyosensörlerde kullanılan biyoreseptörlere enzimler, antikorlar, nükleik asitler ile bitkisel ve hayvansal dokular örnek verilebilir (Campanella ve ark., 2019; Coulet ve ark., 2019). Şekil 1.1'de biyosensörün sistematik yapısı gösterilmiştir.

Biyosensörler, biyoreseptörün yapısına göre biyokatalitik ve biyoafinite esaslı olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Biyokatalitik temelli biyosensörlerde, bir biyokatalizör kullanılarak ortamda bulunan substrat katalize edilir. Bu kataliz tepkimesi, biyosensör aracılığıyla ölçülür. Biyoafinite temelli biyosensörlerde ise biyolojik materyal (antikor, DNA gibi) belirli bir analit ile güçlü ve özgül etkileşimler kurarak denge durumuna ulaşır (Özoğlu ve ark., 2017).



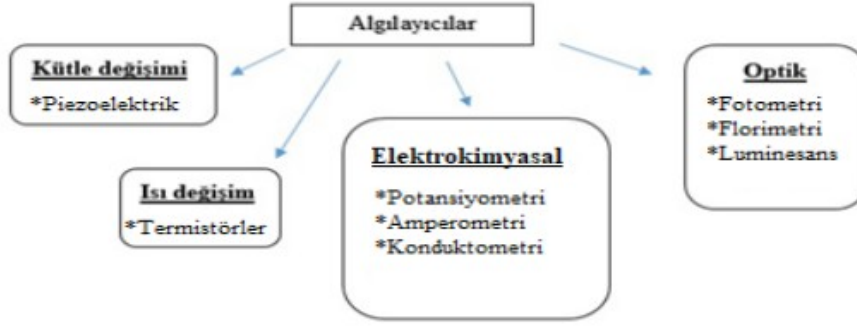
Şekil 1.1. Bioyosensörlerin genel yapısı ve çalışma mekanizması (Garcia ve Mottram, 2003)

1.2.1. Biyoreseptörler

Biyoreseptörler analiti algılayıp, dönüştürücüye saptanabilir sinyaller gönderen biyomoleküllerdir. Özgüllük ve ilgili analite duyarlı olma biyoreseptörlerden beklenen temel özelliklerdendir. Biyoreseptör olarak enzim, nükleik asit, mikroorganizma, doku kesitleri, antikor gibi biyomoleküller örnek verilebilir. Enzimler ve antikorlar yüksek özgüllük sebebiyle yaygın olarak kullanılan biyoreseptörlerdir (Boz ve ark., 2017; Özoğlu ve ark., 2017).

1.2.2. Dönüştürücüler

Dönüştürücüler (transducer), biyoreseptör ve analitin etkileşimi sonucu ortaya çıkan değişimleri ölçülebilir bir elektriksel sinyale dönüştürürler. Biyokimyasal tepkimenin özelliği dikkate alınarak uygun dönüştürücü seçilir. Elektrotlar, optik fiberler, termistörler ve piezoelektrik kristaller yaygın olarak tercih edilen dönüştürücülerdir (Boz ve ark., 2017). Şekil 1.2'de algılayıcı (dönüştürücü) türleri verilmiştir.



Şekil 1.2. Algılayıcı türleri (Keskin ve Arslan, 2020).

1.3. İmmünosensörler

İmmünosensörler, biyoreseptör olarak immün materyallerin kullanıldığı bir biyosensör çeşididir (Li, 2006). İmmünosensörlerin temel prensibi antikorların antijenleri özgün bir şekilde tanıyarak kararlı bir kompleks oluşturmaya dayanır.

Antijen ve antikor reaksiyonu oldukça seçicidir. Bu seçicilik, immünosensörlere özgüllük kazandırır (Kaman, 2021). İmmünosensörler, kullanılan dönüştürücü türüne göre elektrokimyasal, optik, mikrogravimetrik ve kalorimetrik prensiplere dayanmaktadır. Elektrokimyasal ve optik dönüştürücüler, immünosensör uygulamalarında en çok tercih edilen sistemlerdir. İmmünosensörler, etiketsiz (doğrudan) veya etiketli (dolaylı) immünosensörler olarak da sınıflandırılabilir.

Doğrudan immünosensörlerde, antijen-antikor kompleksinin oluşumu fiziksel değişikliklerin izlenmesiyle tespit edilir. Dolaylı immünosensörlerde ise, kullanılan etiketin yanıtı izlenerek antijenin tayini gerçekleştirilir (Luppa ve ark., 2001; Kaman, 2021). Antikor-antijen arasındaki özgül etkileşime dayanan immünosensörler, geniş bir kullanım alanına sahip olmuştur (Lim ve Ahmed, 2019; Kaman, 2021).

Elektrokimyasal immünosensör, optik immünosensör, piezoelektrik immünosensör ve termometrik immünosensör olmak üzere dört tip immünosensör sistemi mevcuttur (Luppa ve ark., 2001).

1.3.1. Optik İmmünosensörler

Optik immünosensörler, immünoaktanların etkileşimi sonucu ışığın soğurulması ve saçılımının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Optik immünosensörlerin algılama yüzeylerinde gerçekleşen adsorpsiyon, floresan, saçılma vb. gibi optik olayların neredeyse tamamının biyokimyasal algılama işleminde kullanılabilmesi klinik ve çevresel analizler için önemli bir avantajdır. Optik immünosensörler doğrudan optik immünosensörler ve dolaylı optik immünosensörler olmak üzere iki grupta ele alınabilir. Doğrudan optik dönüştürücü olan yüzey plazmon rezonans (SPR) immünosensör, yaygın olarak kullanılan bir optik immünosensör cihazıdır. Yüzey plazmon rezonans immünosensörü, immobilize bir antikor tabakası ile modifiye edilmiş bir cihazdır. Antijen immobilize antikor tabakasına bağlandığında, yüzey plazmon rezonans cihazı antikorların bulunduğu metal tabaka üzerine düşen ışığın absorpsiyon açısındaki bir sapma olarak kırılma indeksindeki değişimleri tespit eder (Marty ve ark., 1998; Wang ve ark., 2008).

1.3.2. Piezoelektrik İmmünosensörler

Piezoelektrik immünosensörler, piezoelektrik kuvars kristalinin kütle duyarlılığından yararlanarak karakteristik antikor-antijen etkileşimine yanıt oluştururlar. Piezoelektrik immünosensörler, yüksek hassasiyet, özgüllük, etiketsiz olma ve kararlılık gibi avantajlı özelliklerinden dolayı klinik tanı ve birçok alanda kullanılmaktadır. Piezoelektrik immünosensörün temel prensibi, analitin antikorun bağlanma bölgelerine bağlanması esnasında kütledeki değişime dayanmaktadır. Kütledeki bu değişim, piezoelektrik immünosensörün ana bileşeni olan kuvars kristali ile gözlemlenir. Ayrıca bu tip sensörler birinci derece kinetiğine uyum sağlayan analitleri eş zamanlı olarak tespit yeteneğine sahiptirler. Kuvars kristal yüzeyindeki antikor veya antijen için kullanılan immobilizasyon tekniği tespit hassasiyeti ve spesifikliğı açısından önem taşır. Günümüzde farklı immobilizasyon teknikleri uygulanmaktadır, en yaygın kullanılan yöntemler polietilenimin-glutaraldehit (PEI-GA), protein A tekniğı ve kendiliğinden birleşen tek tabaka (SAM) teknolojisidir. Toplu dalga veya kuvars kristal mikro terazisi (QCM) ve yüzey akustik dalgası (SAW) ise immün algılama uygulamasında kullanılan tekniklerdir (Lim ve Ahmed, 2019).

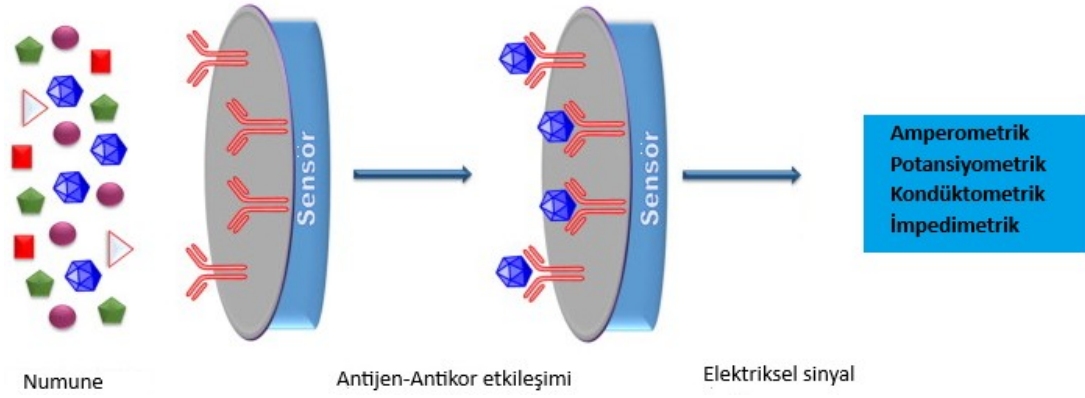
1.3.3. Termometrik İmmünosensörler

Termometrik immünosensörler, antikor-antijen tepkimesi sonucu oluşan veya absorbe edilen ısıdan kaynaklı oluşan sıcaklık farkını ölçme amacıyla kullanılır. Termometrik immünosensörler, ortaya çıkan sıcaklık farkını doğrudan bir elektriksel sinyaline çevirilebilir. Yayılan veya emilen ısı, biyokimyasal reaksiyon sonucunda oluşan molar entalpi ve ürünlerin toplamı dikkate alınarak ölçülebilir. Termometrik immünosensörlerde yaygın olarak tercih edilen dönüştürücü, yüksek negatif sıcaklık katsayısına sahip bir termistördür. Termometrik immünosensörler uzun vadede kararlılık, düşük maliyet ve birçok algılama durumuna uygulanabilirlik gibi avantajlara sahiptir. Bunun yanı sıra algılamasında spesifik olmayışı ise doğal bir dezavantajdır (Lim ve Ahmed, 2019).

1.3.4. Elektrokimyasal İmmünosensörler

Elektrokimyasal immünosensörler; düşük maliyet, basit kullanım, yüksek hassasiyet ve hızlı analitik yanıt gibi avantajları sayesinde günümüzde en çok tercih edilen immünosensörler arasında yer almaktadır. İmmünosensörlerde biyoreseptör olarak immüno materyaller (antikor vb.) kullanılır (Kaman, 2021). Küçük boyutlarda tasarlanabilme özellikleri sayesinde elektrokimyasal immünosensörler, in vivo analizlerde kullanılabilir (Stefan ve ark., 2000).

Şekil 1.3'de elektrokimyasal bir immünosensörün çalışma prensibi verilmiştir. Elektrokimyasal immünosensörler, uygun antikor-antijen kompleks oluşumu esasına dayanır. Elektrokimyasal immünosensör sisteminde antikorların üstünde immobilize olduğu bir biyoreseptör tabaka bulunur. Analizi gerçekleştirilecek örneğin içerisinde antikora özgü maddeler yer alır. Bunun yanı sıra antikora özgü olmayan farklı maddeler de yer alabilir. Özgül antikor-antijenin bağlanması sonucu kompleks reaksiyonu oluşur. Bağlanma öncesi ve sonrasında oluşan elektriksel fark elektrokimyasal dönüştürücü aracılığıyla ölçülebilir sinyallere çevrilir. Elde edilen sonuca göre değerlendirme yapılır. Elektrokimyasal immünosensörler; potansiyometrik, amperometrik, kondüktometrik ve impedimetrik olmak üzere dört farklı başlık altında incelenebilir (Özbek, 2014).



Şekil 1.3. Elektrokimyasal immünosensörlerin şematik gösterimi (Bahadır ve Sezgintürk, 2015).

1.3.4.1. Amperometrik İmmünosensörler

Amperometrik immünosensörlerde ölçüm, elektroaktif türlerin reaksiyonu sonucu oluşan akımın sabit potansiyelde ölçülmesi esasına dayanır (Marty ve ark., 1998). Dönüşümlü voltametri (CV), diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ve kare dalga voltametrisi (SWV) gibi yöntemlerin kullanıldığı voltametrik immünosensörler ise potansiyel değiştirilirken akımın ölçülmesine dayanan immünosensörlerdir. Literatür incelendiğinde sadece az sayıda etiketsiz amperometrik immünosensörün rapor edildiği görülür. Bunun nedeni çoğu antikor ve antijenin elektroaktif olmamaları ve bu yüzden de amperometrik yanıt verememeleridir. Bu yüzden, amperometrik immünosensörlerin genelinde, biyobelirteçlerden yanıt elde etmek için elektroaktif etiket veya araçlara ihtiyaç duyulur. Amperometrik immünosensörlerin en büyük dezavantajları dolaylı tespit sistemine sahip olmalarıdır. Ancak bu durum yüksek hassasiyetle telafi edilir (Mollarasouli ve ark., 2019).

1.3.4.2. Potansiyometrik immünosensörler

Potansiyometrik immünosensörler, antikor-antijen kompleksinin ortaya çıkardığı potansiyel değişimin ölçülmesi esasına dayanır. Potansiyometrik immünosensörler, diğer elektrokimyasal immünosensörlere kıyasla daha düşük hassasiyete sahiptir. Bu durum antijen ve antikor kompleksi oluşumundan kaynaklanan potansiyel farkın küçük olması ve girişimlerin etkisi ile ilişkilidir. (Mollarasouli ve ark., 2019).

1.3.4.3. Kondüktometrik İmmünosensörler

Kondüktometrik immünosensörler, iletkenlik ile biyotanıma süreci arasındaki ilişkiyi ele alır. Biyotanıma unsuru ile antijen arasında gerçekleşen reaksiyon iyonik tür değişiminin değişmesine yol açar. Bu durum çözeltinin iletkenliğinin değişmesine sebep olur. Kondüktometrik sensörde bulunan metal elektrotlara (genellikle platin veya gümüş) alternatif bir akım voltajı uygulanır. Metal elektrotlar arasında gerçekleşen iletkenlik değişimini ölçmek için bir ohmmetre veya multimetre kullanılır. Kondüktometrik immünosensörler düşük voltajda çalışma, ışığa karşı duyarsız olma ve referans elektrot kullanılmadan minyatürleştirme gibi avantajlı özelliklere sahiptirler (Mollarasouli ve ark., 2019).

1.3.4.4. İmpedimetrik İmmünosensörler

Düşük genlikli akım uygulanmasıyla elektrot yüzeyindeki antijen-antikor etkileşiminden kaynaklanan empedans değişimlerinin elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile ölçülmesine dayanan immünosensörlerdir.

Bu tez çalışmasında, dünya genelinde sık görülen ve yüksek ölüm oranlarına yol açan kolon, rektum, pankreas, meme, akciğer ve yumurtalık kanserlerinin erken tanısı, kanser tedavisinin etkinliğinin izlenmesi, tedavi sonrası nüksün erken saptanması ve hastalığın ilerlemesinin değerlendirilmesinde önemli bir belirteç olan CEA'nın diferansiyel puls voltametri ile (DPV) düşük konsantrasyonlarda tespitine yönelik elektrokimyasal bir immünosensör geliştirilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Biyosensörler, biyolojik bir algılayıcı, fiziksel bir dönüştürücü ve elektronik kısımdan oluşan, analitlerin yoğunluğu ile orantılı ölçülebilir bir sinyal elde edebilmek amacıyla kullanılan analitik cihazlardır. Biyosensörün tarihi 1950'li yıllarda L.C. Clark'ın bir ameliyat sırasında kandaki O₂ miktarını bir elektrot ile izlemesine dayanır. L.C. Clark glikoz oksidaz (GOD) enzimi ile O₂ elektrodu sistemini birleştirip kandaki glikoz miktarını ölçmüştür. Bu sayede birçok maddenin tayininin gerçekleştirilebilme olanağı ortaya çıkmıştır. Biyosensör terimi ilk kez 1962'de Clark ve Lyons tarafından kullanılmıştır (Boz ve ark., 2017). Bu tarihlerden günümüze kadar biyosensör alanında önemli gelişmeler ortaya çıkmıştır.

İlk adımları 1959'lu yıllarda Yalow ve Berson tarafından atılan immünosensörler, insan kanındaki insülin bağlayıcı antikorların tespiti için radyoimmünoassay geliştirilmesine imkân sağlamıştır. Bu dönem sonrası çeşitli immünolojik hastalıkların tanısına yönelik birçok immünosensör geliştirilmiştir. İmmünosensör odaklı çalışmalar 1980'li yılların başlarında yoğunluk kazanmıştır. Haga ve ark. (1980), spin membran immünoassay ve enzim immünosensörünün faydalı yönlerini bir araya getirerek bir lipozom immünosensörü geliştirmişlerdir. Bu sensör bir oksijen elektrodu ve duyarlılaştırılmış lipozomlardan oluşur. Antijen-antikor tepkimesinin amplifikasyonu için lipozomlar kullanılmıştır. Bu yöntemle 4×10^{-9} M (0,7 ng/mL) düzeyine kadar teofilinin tayini yapılabilmektedir.

2000'li yılların başlarında nanoteknolojinin hızla gelişmesiyle birlikte, çeşitli fonksiyonel nanoyapılar geliştirilmiş; bu yapılar farklı malzemelere uyarlanarak nanomalzemeler elde edilmiştir. Bu nanomalzemelerin biyoteknolojik uygulamalarda kullanımı giderek yaygınlaşmış, özellikle biyosensör teknolojisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Nanoyapıların biyosensör platformlarına uyarlanması, analizlerde tayin limitlerinin düşürülmesini, seçicilik ve duyarlılığın artırılmasını mümkün kılmış; böylece daha ekonomik, hızlı ve yüksek performanslı biyosensör sistemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır.

Karsinoembriyonik antijen (CEA), kolorektal kanser gibi birçok kanser türünün teşhisinde önemli bir biyomarker olarak kullanılmaktadır. CEA'nın tespiti, kanserin erken teşhisi ve tedavi sürecinin izlenmesi için kritik bir rol oynamaktadır. Geleneksel analiz yöntemleri, yüksek doğruluk sağlasa da genellikle zaman alıcı ve pahalıdır. Bu sebeple, son yıllarda elektrokimyasal immünosensörler hızlı, düşük maliyetli ve taşınabilir çözümler olarak öne çıkmaktadır. Bu sensörler,

antijen–antikor etkileşmesinin elektrokimyasal sinyale dönüştürülmesi prensibiyle çalışmakta ve böylece CEA tespiti yapılabilmektedir.

Liu ve Jiang (2006), karsinoembriyonik antikor (anti-CEA) altın elektrot yüzeyine sabitlemek için yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde 3-merkaptopropiyonik asit (3-MPA), silika nanoparçacıkları ve titanya sol-jel yapısı bir arada kullanılmıştır. İlk olarak karboksil ($-\text{COO}$) grubu taşıyan 3-MPA, zıt yüklerin çekiminden faydalanılarak anti-CEA antikorunun amonyum ($-\text{NH}_3^+$) grubunu tutacak şekilde altın elektrot yüzeyine yerleştirilmiştir. Aynı zamanda, anti-CEA molekülleri de silika nanoparçacıklarının yüzeyine adsorbe edilmiştir. Daha sonra hem anti-CEA hem de silika nanoparçacıkları, titanya esaslı sol-jel matrisine kimyasal buhar biriktirme yöntemiyle hapsedilmiştir. Geliştirilen bu sensör sistemi, antijen ve antikor arasındaki etkileşim sonrası oluşan potansiyel değişikliklerine dayanarak ölçüm gerçekleştirmektedir. Geliştirilen immünosensör, yüksek hassasiyet, hızlı yanıt süresi, iyi tekrarlanabilirlik ve uygun stabilite gibi olumlu performans özellikleri göstermiştir.

Shi ve arkadaşları (2007), hidrofilik, toksik olmayan ve iletken TiO_2 -altın nanoparçacık çift katmanını immobilizasyon matriksi olarak hazırlamışlardır. Daha sonra, pozitif yüklü HRP'yi çift katmanlı elektrot yüzeyine monte etmişlerdir. CEA analitinin doğrusal aralığını 0.3-10 ng/mL ve 10-80 ng/mL, tespit limitini ise 0.2 ng/mL olarak ölçmüşlerdir.

Zhu ve ark. (2015), dört farklı tümör belirtecinin (AFP, CEA, CA125 ve PSA) aynı anda ultra hassas tespiti için redoks prob etiketleme teknolojisine dayalı sandviç tipi bir elektrokimyasal immünosensör geliştirilmişlerdir. Elektrot yüzeyinde, yakalama antikorlarının (Ab1) immobilizasyonu için grafen/altın hibrit filmi kullanılmıştır. Sinyal etiketlerinin miktarını artırmak amacıyla hibridizasyon zincir reaksiyonu ve biotin/streptavidin stratejileri, altın manyetik nanopartiküller ile birleştirilerek tespit antikor (Ab2) biyokonjugatları oluşturulmuştur. Geliştirilen sensör, diferansiyel puls voltametri yöntemi ile dört antijeni eşzamanlı olarak başarıyla tespit edebilmiş ve yüksek hassasiyet göstermiştir. Tespit aralıkları AFP için 0,2–800 pg/mL, CEA için 0,2–600 pg/mL, CA125 için 0,2–1000 pg/mL ve PSA için 0,2–800 pg/mL olarak belirlenmiş; sırasıyla 62, 48, 77 ve 60 fg/mL tespit limitleri elde edilmiştir.

Cheng ve ark. (2015), CEA'nın hassas tespiti için enzimatik altın biriktirme ve elektrokimyasal sıyırma analizini birleştiren yenilikçi bir çip tabanlı immünosensör

geliştirilmiştir. Sensör, karbon nanotüp (CNT) modifiye ekran baskılı karbon elektrot yüzeyine yakalama antikorunun immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. Altın nanoprob, sinyal antikoru ve yüksek içerikli glikoz oksidaz (GOD) yüklenmiş altın nanoçubuklar ile oluşturulmuştur. Sandviç bağlanmadan sonra, enzimatik kataliz ile AuNR'lar aracılığıyla elektrot yüzeyinde altın nanopartikülleri (AuNP) birikmiştir. Hem bu birikim hem de CNT yüzeyindeki elektrokimyasal sıyırma analizi sinyalin büyük ölçüde güçlenmesini sağlamıştır. Geliştirilen sistem, 0,01–100 ng/mL aralığında doğrusal yanıt ve 4,2 pg/mL tespit sınırı ile yüksek performans göstermiştir. Ayrıca yüksek özgüllük, tekrarlanabilirlik ve kararlılık sunmuştur. Pozitif tespit potansiyeli sayesinde oksijen kaynaklı girişimlerin de önüne geçilmiştir.

Ji ve ark. (2016), CEA tespiti için Au/PDA/Fe₃O₄@C@PGC nanokompozitlerine dayanan yüksek oranda etiketsiz hassas bir manyetik immünosensör geliştirilmişlerdir. Manyetik camsı karbon elektrot, Au/PDA/Fe₃O₄@C@PGC nanokompozitlerini manyetik kuvvet yardımıyla sabitlemek için kullanılmıştır. Geliştirilen sensör, optimum koşullar altında geniş bir doğrusal aralık (0.001 ng/mL-20.0 ng/mL), düşük bir tespit limiti (0.33 pg/mL), iyi bir tekrarlanabilirlik, seçicilik ve kabul edilebilir bir stabilite sergilemiştir.

Li ve ark. (2017), CEA tespiti için sandviç tipi bir elektrokemilüminesans (ECL) immünosensör geliştirmişlerdir. Polidopamin ve gümüş nanopartiküllerinden oluşan nanokompozit, hem birincil antikoru immobilizasyonu için uygun bir ortam sağlamış hem de elektrotun iletkenliğini artırmıştır. İkincil antikor, karbon kuantum noktaları (CQDs), poli(etilenimin) fonksiyonelleştirilmiş grafen oksit (PEI-GO) ve altın nanopartiküllerinden oluşan AuNPs/CQDs-PEI-GO matrisi üzerine bağlanmıştır. Bu yapının sinerjik etkisi sayesinde CQD'lerin ECL sinyali önemli ölçüde güçlendirilmiştir. Geliştirilen sensör, 5 pg/mL – 500 ng/mL aralığında doğrusal yanıt vermiş ve 1,67 pg/mL tespit sınırına ulaşmıştır. Gerçek örneklerde başarılı şekilde CEA tespiti yapılmış; sensör, yüksek hassasiyet, özgüllük, tekrarlanabilirlik ve kararlılık sergileyerek klinik uygulamalar için umut taşımaktadır.

Chen ve ark. (2018), CEA tayini için AuNPs-TiO₂-grafen nanokompozitleri kullanılarak sandviç tipi bir amperometrik immünosensör geliştirilmişlerdir. İlk önce dopamin fonksiyonlu grafen π -yığılma etkileşimiyle hazırlanmış, ardından TiO₂, dopaminin enediol grupları aracılığıyla yüzeye bağlanmıştır. Au nanoparçacıkları ise ultraviyole ışınlama altında foto-indirgeme yöntemiyle sentezlenmiştir. Elde edilen

nanokompozitlerin morfolojisi ve elektrokimyasal özellikleri çeşitli karakterizasyon teknikleriyle analiz edilmiştir. Geniş yüzey alanı ve biyouyumluluğu sayesinde AuNP'ler, HRP etiketli ikincil antikor ile kovalent bağ yaparak sandviç immünosensör yapısının oluşturulmasına olanak sağlamıştır. Geliştirilen sensör, 0.005–200 ng/mL arasında geniş bir doğrusal aralık sergilemiş ve 3.33 pg/mL tespit sınırı ile yüksek hassasiyet göstermiştir.

Zhang ve ark. (2020), tek duvarlı karbon nanotüpler (CNTs-COOH), indirgenmiş grafen oksit (rGO), sıgır serum albümini-Ag hibrid (Ag@BSA) ve poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT)'den oluşan bir nanokompoziti, CEA tespiti için elektrokimyasal bir platform geliştirmek amacıyla üretmişlerdir. İlk aşamada Ag@BSA nanoflowers, CNTs-COOH ve rGO ile sentezlenmiş, ardından PEDOT adsorpsiyonu ile son halini almıştır. Hazırlanan bu nanokompozitler, CEA antikorunun (anti-CEA) immobilizasyonu ile bir Au elektrot yüzeyinde biriktirilmiş ve elektrokimyasal immünosensör olarak kullanılmıştır. Geliştirilen sensör, CEA konsantrasyonlarıyla elektrokimyasal yanıtlar arasında doğrusal bir ilişki göstermiş ve 0,002 ila 50 ng/mL arasında CEA tespitine olanak vermiştir. Tespit limiti 1×10^{-4} ng/mL olarak belirlenmiştir.

Liao ve ark (2021), CEA tespiti için elektrokimyasal-kimyasal-kimyasal (ECC) redoks döngüsü gelişmiş (RCA) sinyal amplifikasyon stratejisine dayalı bir elektrokimyasal immünosensör geliştirmişlerdir. CeO_2/Au NPs@ SiO_2 redoks indikatörü olarak ferrosen ile bağlanmıştır. CeO_2/Au NPs@ SiO_2 hidrokinon (HQ) ve tris(2-karboksietil) fosfinden (TCEP) oluşmuştur. İlk aşamada ferrosenkarboksilik asit (FcA) elektrot yüzeyinde FcA^+ 'ya oksitlenir. Daha sonra HQ, iç halkanın döngüsel reaksiyonunu tetiklemek için FcA^+ 'yı FcA 'ya indirger. İkinci aşamada TCEP, HQ'nun oksidasyon ürününü katalizler. Ürün, dış halkanın döngüsel reaksiyonunu tamamlamak için tekrar HQ'ya indirgenir, bu şekilde bütün döngüsel reaksiyon kapalı bir döngü oluşturur. Bu süreç, sinyal amplifikasyonunu sağlayarak son derece düşük CEA konsantrasyonlarını tespit etmeye olanak tanır. Yapılan bu çalışmadaki sensör, 0,01 pg/mL ila 80 pg/mL arasında iyi bir performans sergileyerek 0,0037 pg/mL tespit sınırına ulaşmıştır.

Domínguez-Aragón ve arkadaşları (2022), CEA'nın kantitatif tespiti için sandviç tipi elektrokimyasal bir immünosensör geliştirilmişlerdir. Sensörde, yakalama antikorları altın elektrot üzerine, tespit antikorları ise redoks etiketli tek duvarlı karbon nanohornlar/thionine/AuNPs (SWCNH/Thi/AuNPs) yapısına immobilize edilmiştir. Her iki antikor immobilizasyonu, Au-S bağları aracılığıyla

fotokimyasal teknikle gerçekleştirilmiştir. Bu nanokompozit yapı hem CEA tanıma hem de sinyal amplifikasyonu görevini üstlenmiştir. Tespit, diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ile yapılmış ve tiyoinin sinyali üzerinden antijen konsantrasyonuna duyarlılık gösterilmiştir. Geliştirilen sensör, 0,001–200 ng/mL arasında geniş bir doğrusal tespit aralığına ve 0,1385 pg/mL gibi düşük bir tespit sınırına ulaşmıştır. Sonuçlar, karbon nanohornların iletkenlik, bağlanabilirlik ve fonksiyonel modifikasyon kapasitesi sayesinde CEA başta olmak üzere diğer biyobelirteçlerin klinik tanısında etkili sinyal artırıcı materyaller olarak kullanılabileceği göstermiştir.

Zheng ve ark. (2023), CEA tespiti için N katkılı içi boş mezogözenekli nanokarbon küreler/altın (NHMN/Au) ve altın/ferrosen (Au/Fc) hibritlerinden oluşan sandviç tipi bir elektrokimyasal immünosensör geliştirmişlerdir. Bu sensörün tasarımında, NHMN/Au kompozit yapısının sunduğu geniş yüzey alanı, yüksek iletkenlik ve iyi biyouyumluluk gibi avantajlardan yararlanılmıştır. Bu yapı, hem birincil hem de ikincil antikorların etkili bir şekilde immobilize edilmesini sağlamıştır. Ayrıca Fc-SH'nin sinyal probu olarak kullanılmasıyla, CEA'nın özgül tanınmasından sonra elde edilen sinyal artışı sayesinde hedef biyobelirteç başarıyla tespit edilmiştir.

Cotchim ve ark. (2024), kolanjiyokarsinom biyobelirteçleri olan CA19-9 ve CEA tespiti için etiketsiz bir elektrokimyasal immünosensör geliştirmişlerdir. Altın nanopartiküller, molibden trioksit ve kitosandan (Au-MoO₃-Chi) oluşan nanokompozit, kendi kendine birleştirme (self-assembly) tekniğiyle gözenekli grafen (PG) ile modifiye edilmiş çift ekran baskılı bir elektrot üzerine katmanlar halinde monte edilmiştir. Geliştirilen immünosensör, CA19-9 için 0.0025–0.1 U/mL ve 0.1–1.0 U/mL, CEA için ise 0.001–0.01 ng/mL ve 0.01–1.0 ng/mL arasında geniş bir doğrusal tespit aralığı sunmuştur. Sensörün tespit limiti (LOD), CA19-9 için 1.0 mU/mL ve CEA için 0.5 pg/mL olarak belirlenmiştir. Kantitatif tayin limiti ise CA19-9 için 3.3 mU/mL ve CEA için 1.6 pg/mL olarak raporlanmıştır. Sensörün seçiciliği, farklı antijen karışımları ile test edilmiş ve yüksek özgüllük sergilediği görülmüştür. Ayrıca bu immünosensör, insan serum örneklerinde CA19-9 ve CEA'nın tespiti için başarıyla uygulanmış ve elde edilen sonuçlar klinik yöntemlerle uyumlu bulunmuştur.

Li ve ark. (2024), kanserin teşhis, tedavi değerlendirmesi ve hastaların sağkalım oranlarını ve hayat kalitelerini iyileştirmesi için büyük önem taşıyan elektrokemilüminesans (ECL) bir immünosensör geliştirmişlerdir. Bu sensörde

tümör biyobelirteci olan CEA'nın duyarlı bir şekilde tespit edilmesini sağlamak için, nano kanal içinde hapsolmuş altın (Au) nanomateryali ile güçlendirilmiş ECL sinyali kullanılmıştır. Geliştirilen bu sensör düşük algılama limiti (LOD, 0.37 pg/mL) ile 1 pg/mL⁻¹ ile 100 ng/mL arasında değişen CEA'yı hassas bir şekilde tespit edebilmiştir. Geliştirilen sensör yüksek seçicilik ve iyi stabilite sergilemiştir.

Wang ve ark. (2024), ohm yasasına dayanan yenilikçi bir paylaşılan katot bipolar elektrot çipi tasarlamış ve çift modlu çift sinyalli biyosensör platformunu (DD-cBPE) başarıyla oluşturmuşlardır. Cihaz, ELISA ve ECL tekniklerini birleştirerek CEA'nın yüksek hassasiyetle tespitini ve görsel olarak görüntülenmesini sağlamıştır. BPE'nin seri ve paralel bağlantısı ile sistemin direnci azaltılmış ve akım artırılmıştır. Ayrıca, Au@NiCo₂O₄@MnO₂ nanozim aktivite probu ile iletkenlik artırılmıştır. NiCo₂O₄@MnO₂ 'nin peroksidaz aktivitesi, H₂O₂'nin ayrışmasını hızlandırarak ECL sinyalini güçlendirmiştir. Cihaz, TPrA konsantrasyonunu düzenleyerek akımı ve direnci etkilemiş, harici direnç düzenlemesine gerek duymadan yüksek hassasiyetle tespit sağlamıştır. Bu yeni yaklaşım, biyosensörlerin klinik tespit ve çevresel izleme gibi alanlarda geniş bir uygulama potansiyeli sunmaktadır.

Cheng ve ark. (2025), CEA tespiti için Au@CuS kompozit nanomalzeme ile bir sandviç immünosensör tasarlamışlardır. Au@CuS kompozit nanomalzeme CuS ile modifiye edilmiş Au nanopartiküllerinden oluşur. Au@CuS kompozit nanomalzeme H₂O₂ ile etkileşime girerek akım yanıtı üretmesi için ikincil antikor ile birleştirilmiştir. Birincil anti-CEA antikor, Au@MXene ile modifiye edilmiş camsı karbon elektrot üzerine sabitlenmiştir. Geliştirilen sensör, CEA'nın hızlı ve yüksek hassasiyetli tespitini gerçekleştirmiştir. Optimum koşullar altında, sensör 0,01 pg/mL ile 0,5 ng/mL arasında doğrusal bir yanıt vermiş ve algılama limiti 3,8 fg/mL'ye kadar düşmüştür. Bu strateji yüksek tekrar edilebilirlik, kararlılık ve seçicilik sergileyerek diğer tümör belirteçlerinin tespiti için de potansiyel taşımaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmada kullanılan kimyasallardan 3-merkaptopropiyonik asit (MPA), 11-merkaptoundekanoik asit (MUA), fosfat tamponlu salin (PBS), 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC), N-Hidroksisüksinimid (NHS), sığır serum albümini (BSA), CEA, anti-CEA , potasyum hekzasiyanoferrat (III) $K_3[Fe(CN)_6]$ ve potasyum hekzasiyanoferrat (II) ($K_4[Fe(CN)_6]$) Sigma-Aldrich şirketinden temin edilmiştir. Etil alkol, sülfürik asit ve potasyum klorür Merck firmasından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

Modifiye edilmiş altın elektrotların elektrokimyasal ölçümleri CHI660E cihazında gerçekleştirilmiştir. Elektrokimyasal hücre sisteminde, karşıt elektrot olarak platin, çalışma elektrotu olarak altın ve referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrotu kullanılmıştır. Elektrotların temizliği için ilk olarak çıplak altın elektrotlar, 0.05 µm alümina ile temizlenip distile su ile yıkandıktan sonra, 10 mL etilalkol çözeltisinde 5 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletilip distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra pirana çözeltisinde 4 dakika bekletilip distile su ile yıkanmıştır. Ayrıca 0.5 M H_2SO_4 çözeltisinde 50 mV/s tarama hızında 10 döngü dönüşümlü voltametri (CV) uygulanarak elektrotlar kullanıma hazır hale getirilmiştir. Yüzeyleri modifiye edilen elektrotların karakterizasyonu elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile, optimizasyon ve kalibrasyonu ise diferansiyel puls voltametrisi (DPV) ile 0.1 M KCl ve 3 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ içeren PBS çözeltisinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Elektrot modifikasyonu

Elektrokimyasal immünoensörün hazırlanmasında ilk adım olarak, altın elektrot yüzeylerinin modifikasyonu için karboksil fonksiyonlu 3-merkaptopropiyonik asit (MPA) ve 11-merkaptoundekanoik (MUA) ile SAM oluşturulmuştur. Bunun için elektrotlar etanolde hazırlanmış 5 mM MPA ve 5 mM MUA çözelti karışımında karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir.

SAM tabakası oluşturulan altın elektrot yüzeyindeki karboksil gruplarını aktive etmek amacıyla EDC/NHS kimyasal aktivasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu işlem için, SAM ile kaplanmış elektrotlar, 0.4 M EDC ve 0.1 M NHS karışımı içeren tüplere daldırılmış ve karanlık ortamda bekletilmiştir.

Aktivasyon işleminden sonra, her bir elektrot yüzeyine 0.5 µg/mL anti-CEA antikor eklenmiş ve optimum süre beklendikten sonra elektrot yüzeyleri distile su ile yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır.

Spesifik olmayan bölgelerin bloke edilmesi amacıyla, elektrot yüzeyine %1 BSA (Bovine Serum Albumin) çözeltisinden 10 µL damlatılmış ve optimum süreyle bekletilmiştir. İşlemin ardından elektrot yüzeyleri distile su ile yıkanmıştır.

Yüzey bloklama işlemi tamamlanan elektrotların her birine, farklı derişimlerde 10 µL CEA antijeni damlatılmış ve antijen–antikor etkileşiminin gerçekleşmesi için optimum süre beklendikten sonra elektrokimyasal ölçümler alınmıştır.

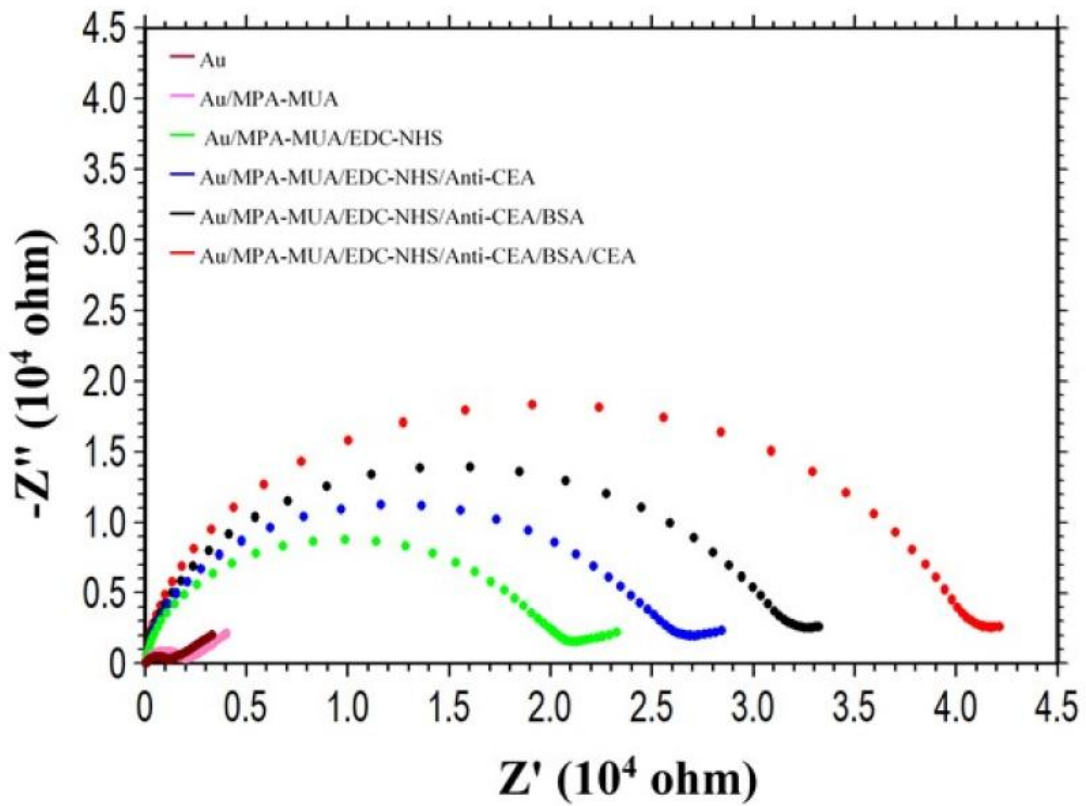
3.2.2. Optimizasyon çalışmaları

Sensör performansını artırmak amacıyla çeşitli optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. İlk olarak, MPA/MUA'nın süresi ile derişimi optimize edilerek yüzey modifikasyonu için en uygun koşullar belirlendi. Ardından, EDC/NHS aktivasyon süresi ile antikor immobilizasyon ve antijen-antikor inkübasyon süreleri optimize edildi.

4. BULGULAR

4.1. Karakterizasyon

Au çalışma elektrot yüzeyinin modifikasyon aşamaları elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile incelenmiştir. Yüzey modifikasyon aşamalarından sonra elde edilen Nyquist eğrileri Şekil 4.1'de verilmiştir. Bu eğriler incelendiğinde elektrot yüzeyindeki her bir işlemten sonra direnç değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu durum elektrot yüzeyindeki her işlemten sonra yüzey yalıtkanlığının biraz daha arttığını göstermektedir. Yüzey yalıtkanlığının artması ise yüzeyde yapılan işlemlerin gerçekleştirildiğine işaret etmektedir.



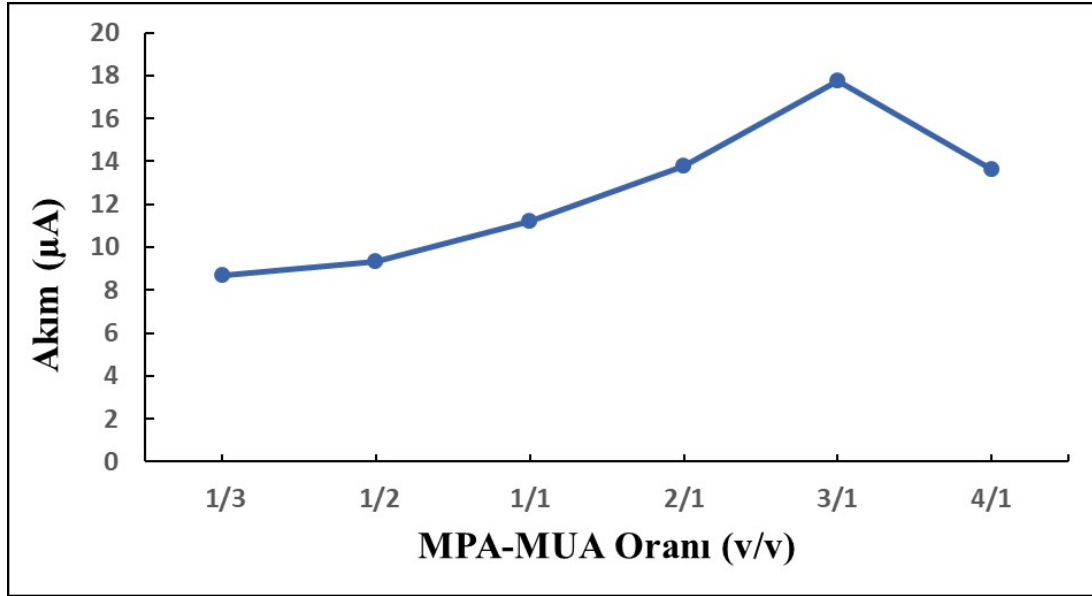
Şekil 4.1. Au, Au/MPA-MUA, Au/MPA-MUA/EDC-NHS, Au/MPA-MUA/EDC-NHS/Anti-CEA, Au/MPA-MUA/EDC-NHS/Anti-CEA/BSA ve Au/MPA-MUA/EDC-NHS/Anti-CEA/BSA/CEA elektrotların 0.1 M KCl ve 3 mM $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ içeren PBS çözeltisindeki Nyquist eğrileri

4.2. Optimizasyon

4.2.1. MPA/MUA oranı

Elektrot yüzeyinde SAM oluşturmak amacıyla farklı oranlarda hazırlanan MPA/MUA çözeltileri oda sıcaklığındaki karanlık bir ortamda bekletilmiştir.

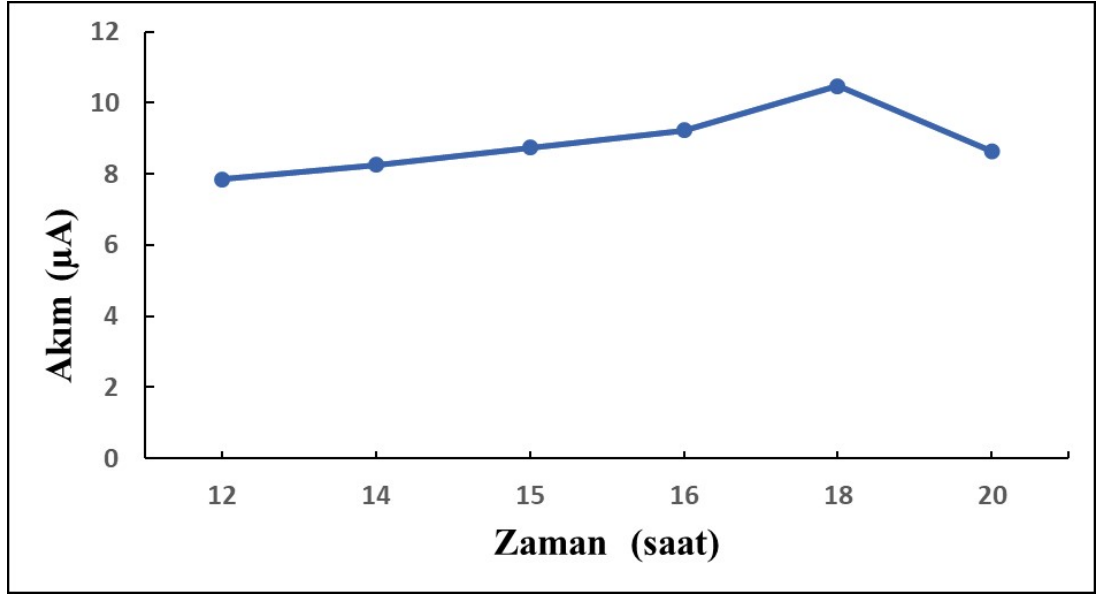
Çalışmada kullanılan MPA/MUA (v/v) oranları 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 ve 4:1 şeklindedir. MPA ve MUA oranlarındaki değişikliklerin, elektrot yüzeyinde oluşan SAM tabakasını etkilediği gözlemlenmiştir. Şekil 4.2'de verilen bu farklı oranlarda elde edilen immünosensörler için akım yanıtları incelendiğinde en yüksek akımın 3:1 oranında elde edildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.2. MPA/MUA oranı (v/v)

4.2.2. MPA/MUA süresi

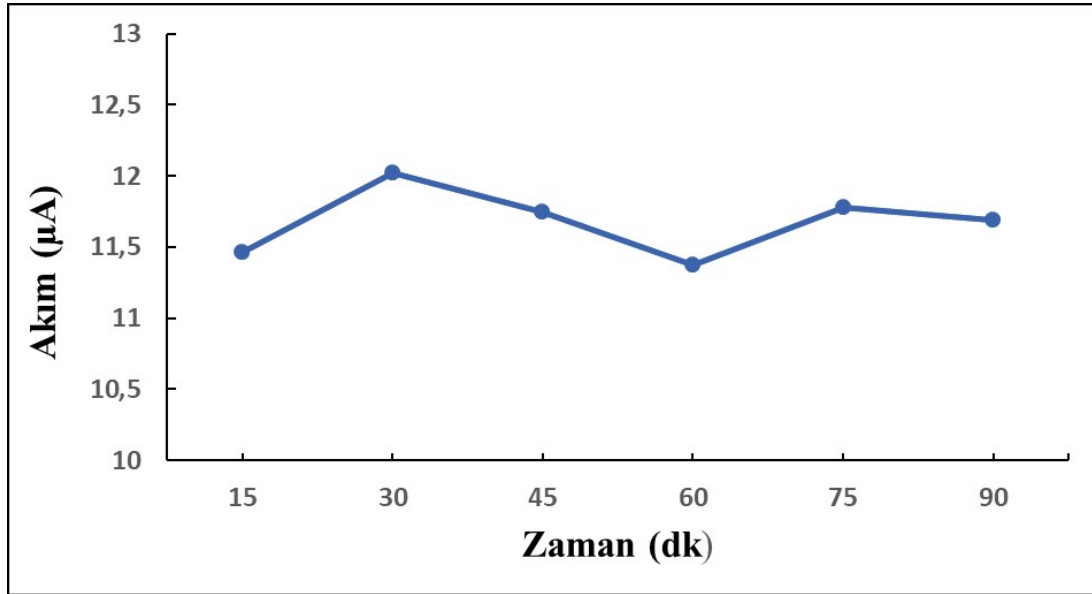
3:1 oranındaki MPA ve MUA karışımından oluşan çözeltilerde bekleme sürelerinin etkisi incelenmiştir. 12, 14, 15, 16, 18 ve 20 saat süreyle oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda bekletilmiş immünosensörler için elde edilen akımlar Şekil 4.3'te verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi en yüksek akım sinyali 18 saatlik bekleme süresinde elde edilmiştir.



Şekil 4.3. MPA/MUA süresi

4.2.3. EDC/NHS süresi

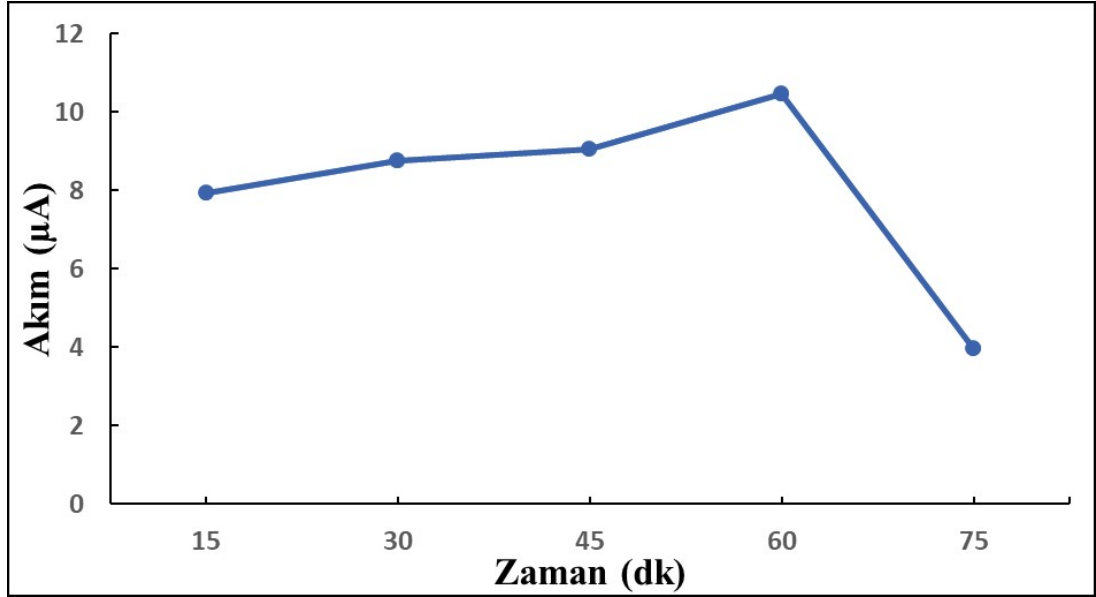
Bu aşamada 1:1 oranında 0.4 M EDC ve 0.1 M NHS karışımında bekleme sürelerinin etkisi incelenmiştir. İmmünosensörler 15, 30, 45, 60, 75 ve 90 dakika süreyle oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Deney sonucundaki en yüksek sinyal değeri Şekil 4.4'te görüldüğü gibi 30 dakika bekleme süresinde elde edilmiştir.



Şekil 4.4. EDC/NHS süresi

4.2.4. Antikor süresi

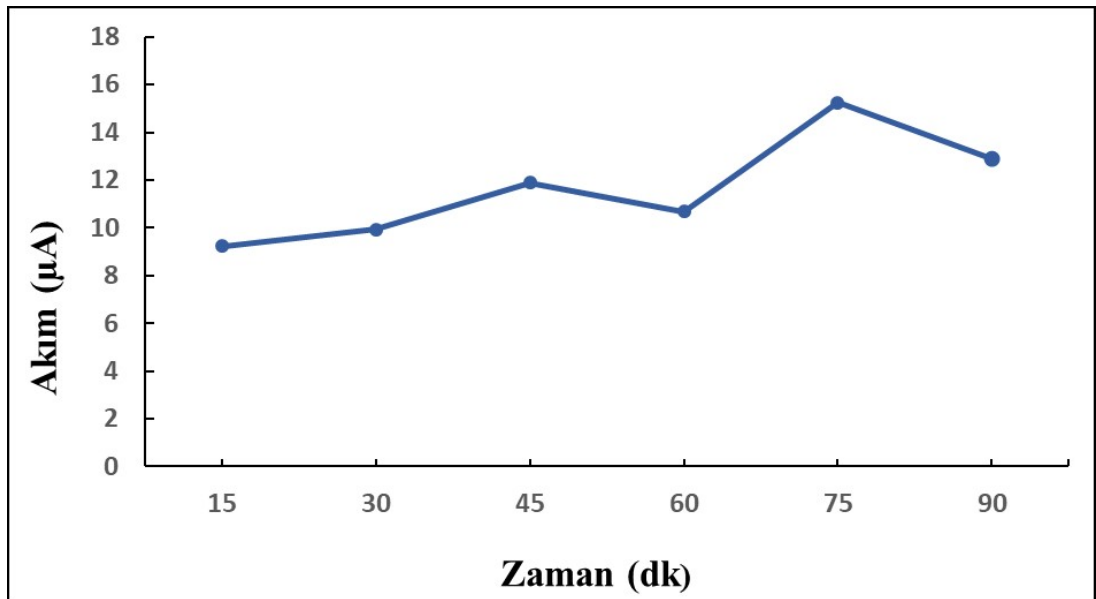
Altın elektrot yüzeyine MPA/MUA ve EDC/NHS çözeltileri ile yapılan yüzey modifikasyonunun ardından yüzeye anti-CEA antikorlarının immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada elektrot yüzeyine 0.5 µg/mL konsantrasyonunda anti-CEA damlatılarak, farklı sürelerde bekletilmiştir. Test edilen süreler 15, 30, 45, 60 ve 75 dakika olup elde edilen akım değerleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Antikorum elektrot yüzeyiyle etkileşim süresinin sensörün sinyal şiddeti üzerindeki etkisi incelendiğinde 60 dakikaya kadar olan sürelerde süre arttıkça akım değerlerinin arttığı görülmüş olup 60 dakikalık bekleme süresinde maksimum sinyal elde edilmiştir. 60 dakikadan sonra ise akım değerinde düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlar, anti-CEA antikorlarının yüzeye etkili bir şekilde bağlanabilmesi için 60 dakikalık bir bekleme süresinin yeterli ve ideal olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.5. Antikor süresi

4.2.5. Antijen süresi

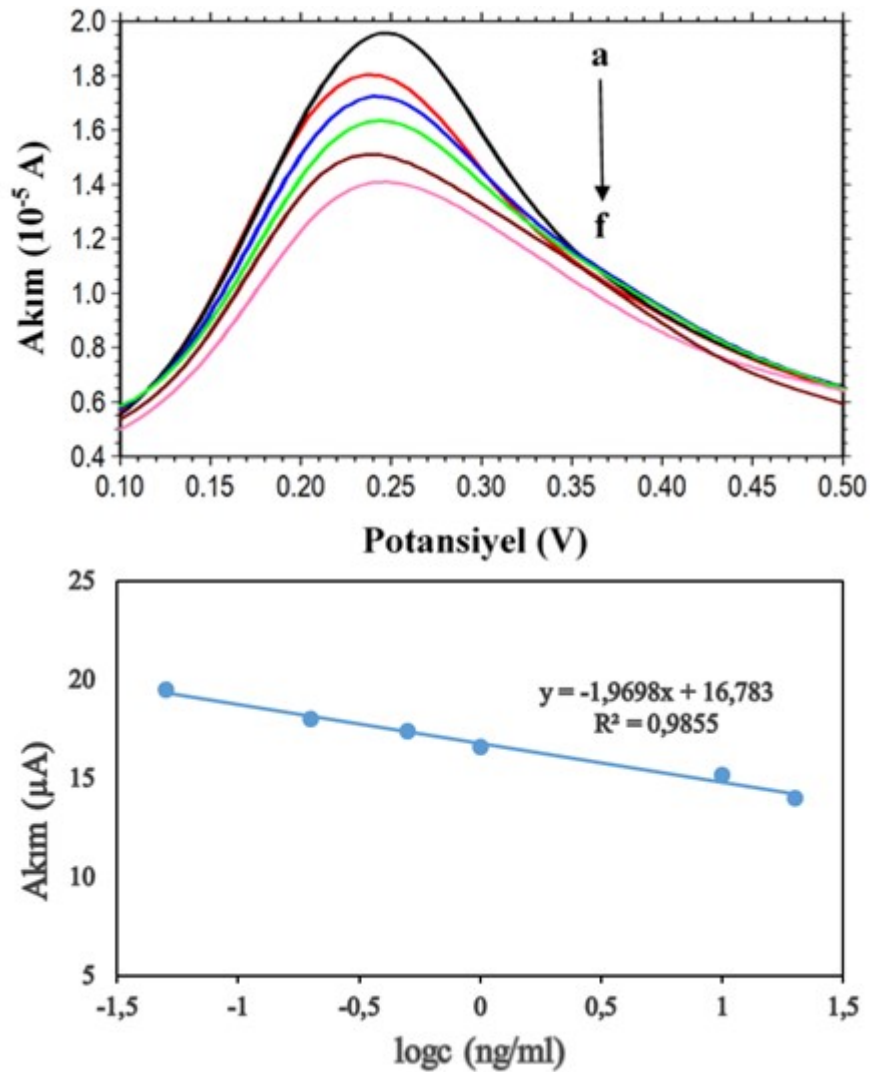
10 ng/mL konsantrasyonunda CEA antijeni kullanılarak, farklı bekletme sürelerinde antijenin antikorla etkileşimi incelenmiş ve elde edilen yanıtlar Şekil 4.6'da verilmiştir. 15, 30, 45, 60, 75 ve 90 dakika boyunca gerçekleştirilen antijen-antikor etkileşimi sonunda en yüksek sinyalin 75 dakikalık bekleme süresinde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Antijen süresi

4.3. Kalibrasyon

Şekil 4.7'de Au/MPA-MUA/EDC-NHS/Anti-CEA/BSA immünosensörün 0.05, 0.2, 0.5, 1, 10 ve 50 ng/mL derişimlerdeki CEA ile inkübasyonundan sonra elde edilen DPV eğrileri ve kalibrasyon grafiğini göstermektedir. CEA'nın artan konsantrasyonuna karşılık akım değerlerinde düşme gözlenmiştir. Elde edilen kalibrasyon denklemi $I (\mu A) = -1.9698 \log C (\text{ng/mL}) + 16.783$ ($R^2 = 0.9855$)'dir. İmmünosensörün 0.05 ile 50 ng/mL aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. LOD değerinin ($3S_b/m$) 0.03 ng/mL olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Au/MPA-MUA/EDC-NHS/Anti-CEA/BSA immünosensörün 0.05 (a), 0.2 (b), 0.5 (c), 1 (d), 10 (e) ve 50 (f) ng/mL derişimlerdeki CEA ile inkübasyonundan sonra elde edilen DPV eğrileri ve kalibrasyon grafiği

4.4. Tekrarlanabilirlik, seçicilik ve stabilite

Tekrarlanabilirlik testi için aynı koşullarda beş adet immünosensör hazırlanmış ve DPV yöntemi ile akım değerleri ölçülmüştür. Bağıl standart sapmanın %4,3 olduğu belirlenmiş olup, bu değer immünosensörün iyi tekrarlanabilirliğe sahip olduğunu göstermektedir.

İmmünosensörün seçiciliği çeşitli protein kombinasyonları içeren ortamlarda incelenmiştir. Bunun için CEA + BSA, CEA + PSA ve CEA + BSA + PSA karışımları kullanılmıştır. Sadece CEA ile olan etkileşime göre elde edilen sinyallerde CEA + BSA, CEA + PSA ve CEA + BSA + PSA için sırasıyla %6.1, %3.7 ve %4.2'lik fark oluşmuştur.

Stabilite kapsamında immünosensör +4 °C'de bir ay boyunca bekletilmiştir. Belirli aralıklarla DPV ölçümleri alınarak elde edilen akım değerlerinden immünosensörün etkinliği değerlendirilmiştir. Bir aylık süre sonunda akım değerlerinden immünosensörün etkinliğini %62 oranında koruduğu tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada geliştirilen elektrokimyasal immünosensör, karsinoembriyonik antijenin (CEA) düşük konsantrasyonlarda hassas bir şekilde tespit edilmesine olanak sağlamıştır. Sensörün elektrokimyasal yanıtları diferansiyel puls voltametri (DPV) yöntemiyle incelenmiş ve CEA konsantrasyonundaki artışa paralel olarak akım şiddetinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Bu durum, antijen–antikor etkileşiminin sensör yüzeyinde etkin bir engelleme mekanizması oluşturduğunu ve elektron transferini kısıtladığını göstermektedir. Ayrıca, elde edilen kalibrasyon eğrisinin yüksek korelasyon katsayısı ($R^2 = 0.9855$), sensörün belirli konsantrasyon aralığında tutarlı ve güvenilir sonuçlar verdiğini doğrulamaktadır.

İmmünosensör için elde edilen saptama limiti (LOD) yaklaşık 0.03 ng/mL olarak bulunmuş, bu değer literatürde bildirilen bazı benzer çalışmalara kıyasla düşük seviyededir. Örneğin, Wang ve ark. (2020), altın nanoparçacık destekli bir elektrokimyasal CEA sensöründe LOD değerini 0.05 ng/mL olarak bildirirken; Shen ve ark. (2018), grafen oksit destekli bir sensörde bu değeri 0.04 ng/mL olarak sunmuşlardır. Literatürde bazı çalışmalarda 0.03 ng/mL'den daha düşük LOD değerlerine sahip çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, Li ve ark. (2010), altın nanopartiküller kullanarak gerçekleştirdikleri bir immünosensör çalışmasında 0.001 ng/mL LOD değerine ulaşmışlardır.

Sensörün belirlenen doğrusal aralığı 0.05–50 ng/mL olup, hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlardaki CEA seviyelerinin güvenilir şekilde ölçülebileceğini göstermektedir. CEA düzeylerinin 5 ng/mL üzerine çıkması çoğunlukla malignite şüphesiyle ilişkilendirilirken, metastatik veya ileri evre durumlarda bu değer 30–40 ng/mL'ye kadar ulaşabilmektedir. Bu nedenle, 50 ng/mL'ye kadar uzanan doğrusal aralık sensörün klinik senaryolarda etkin bir şekilde kullanılabilmesini mümkün kılmaktadır.

Örneğin, Yuan ve ark. (2009), CEA tespiti için geliştirdikleri elektrokimyasal immünosensörün 0.5–10 ve 10–160 ng/mL aralıklarında doğrusal olduğunu belirtmişlerdir. Zhang ve ark. (2021), tarafından bildirilen bir immünosensörde doğrusal aralık 0.1–50 ng/mL olarak verilmiştir. Çalışmamızda daha düşük başlangıç noktası (0.05 ng/mL) ile sağlanan bu geniş aralık, özellikle erken tanıda daha avantajlı bir performans sergilemektedir. Bununla beraber, literatürde daha geniş doğrusal aralığa sahip çalışmalar da rapor edilmiştir. Xu ve ark. (2016), yaptıkları altın mikro elektrot yüzeyinde kitosan-çok duvarlı karbon nanotüp-tiyonin hibrit

yapısını kullanarak 1 pg/mL ile 100 ng/mL arasında doğrusallık gösteren bir immünosensör geliştirmişlerdir.

Tekrarlanabilirlik, %4,3'lük bir bağıl standart sapma (RSD) değeri göstermiştir. Elektrokimyasal sensörler için %5'in altındaki RSD değerleri genellikle iyi tekrarlanabilirlik olarak kabul edilmektedir. Bu bulgu, geliştirilen sensörün farklı denemelerde benzer sonuçlar verdiğini ve deneysel tutarlılığın sağlandığını göstermektedir. Böylece sensörün laboratuvar içi uygulamalar için güvenilir bir seçenek olduğu söylenebilir.

Sensörün stabilite performansı da ayrı bir önem taşımaktadır. Bir aylık süre boyunca haftalık yapılan ölçümler sonucunda, sensör sinyalinin %62'sinin korunması elde edilmiştir. Chen ve ark. (2020), tarafından yürütülen bir çalışmada benzer sensörlerde 4 hafta sonunda biyolojik aktivitenin %50'nin altına düştüğü rapor edilmiştir. Lin ve ark. (2020), prusya mavisini ve altın nanopartiküllerle modifiye ettikleri bir CEA immünosensöründe bir aylık bekleme sonundaki stabilitenin % 93 olduğunu belirtmişlerdir. Ramadan ve Hassan (2025), CoMoO₄@PANI-PPy ile modifiye ettikleri CEA immünosensöründe bir ay sonundaki stabilitenin % 82.5 olduğunu söylemişlerdir. Bu bağlamda, çalışmamızda elde edilen %62'lik stabilite, bazı çalışmalara göre yüksek olmasına rağmen bazı çalışmalara göre ise düşük kalmıştır.

Ancak bu oran, kısa vadeli analizlerde sensörün işlevselliğini koruduğunu göstermesine rağmen, uzun vadeli klinik uygulamalarda kullanılabilirliği için bazı iyileştirmelerin gerekliliğine işaret etmektedir. Stabilite kaybı, antikorun denatürasyonu, yüzeyden desorpsiyonu veya yapısal bozulmalar gibi nedenlerle meydana gelebilmektedir. Stabilitenin artırılması amacıyla bazı polimerik kaplamalar ve alternatif immobilizasyon teknikleri gibi yöntemler uygulanabilir.

6. SONUÇLAR

İmmünoşensörün elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ile yapılan karakterizasyonunda, yüzey modifikasyon basamaklarının başarıyla gerçekleştiği belirlenmiştir. Au elektrotların yüzeyinde kendi kendine monte olan monolayer (SAM) oluşturmak için farklı MPA/MUA karışımlarındaki en uygun oran 3:1 olarak tespit edilmiştir. Elektrotların MPA/MUA karışımındaki farklı bekleme süreleri test edilmiş ve optimum süre 18 saat olarak belirlenmiştir.

Yüzeylerinde SAM tabakası oluşturulan elektrotlar, EDC/NHS ile muamele edilmiş ve bu işlem için en uygun bekleme süresinin 30 dakika olduğu saptanmıştır. EDC/NHS ile muamele edilen elektrotlarda, yüzeye Anti-CEA antikorunun immobilizasyonu için optimum zaman 60 dakika olarak tespit edilmiştir.

Antikor immobilizasyonunu takiben elektrotlar BSA ile muamele edilmiş ve bu işlem için en uygun bekleme süresi 45 dakika olarak belirlenmiştir. BSA ile muameleden sonra antijen–antikor etkileşimi için yüzeye eklenen CEA antijeninin optimum bekleme süresi ise 75 dakika olarak saptanmıştır.

İmmünoşensörün doğrusal aralığı 0.05–50 ng/mL ve tespit limiti (LOD) 0.03 ng/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca, immünoşensörün farklı girişim yapabilen ortamlardaki seçiciliğinin iyi olduğu ve tekrarlanabilirlik için bağıl standart sapmanın %5'in altında olduğu anlaşılmıştır.

+4 °C'de bir aylık bekleme süresi sonunda immünoşensörün stabilitesinin %62 olduğu belirlenmiştir.

7. ÖNERİLER

Farlı kanser hastalarının teşhis ve tedavi süreçlerinde rol oynayan AFP, CA-125 ve PSA gibi tümör belirteçleri için hassas immünosensörler geliştirilebilir.

CEA ile beraber farklı biyobelirteçleri aynı anda ölçebilen çoklu immünosensör platformları geliştirilebilir.

İmmünosensör stabilitesinin artırılmasına yönelik yüzey modifikasyonunda değişiklikler gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Auyang, Y. S. (2006). Cancer causes and cancer research on many levels of complexity. *Creat. Technol*, 1-15.
- Bahadır, E. B., & Sezgintürk, M. K. (2015). Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. *Talanta*, 132, 162-174.
- Ballesta, A. M., Molina, R., Filella, X., Jo, J., & Giménez, N. (1995). Carcinoembryonic antigen in staging and follow-up of patients with solid tumors. *Tumor biology*, 16(1), 32-41.
- Boz, B., Paylan, İ. C., Kızmaz, M. Z., & Erkan, S. (2017). Biyosensörler ve tarım alanında kullanımı. *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 13(3), 141-148.
- Burak, D. Anti-Miyelin Temelli Protein tayini için impedimetrik immünosensör geliştirilmesi.
- Bulut, Y. (2011, May). Biyosensörlerin Tanımı ve Biyosensörlere Genel Bakış. In 6th International Advanced Technologies Symposium (IATS'11) (pp. 16-18).
- Campanella, L., & Tomassetti, M. (2019). İlaç, gıda ve nutrasötiklerin araştırılmasında sensörlerin ve biyosensörlerin uygulamaları. *Sensörler*, 19(15), 3395. <https://doi.org/10.3390/s19153395>
- Chen, H., Zhang, Y., Li, M., & Wang, J. (2020). Evaluation of storage stability of antibody-based biosensors. *Talanta*, 216, 120980.
- Chen, Y., Li, Y., Deng, D., He, H., Yan, X., Wang, Z., ... & Luo, L. (2018). Effective immobilization of Au nanoparticles on TiO₂ loaded graphene for a novel sandwich-type immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 301-306.
- Cheng, C., Han, F., Zhou, H., Wang, H., Zhao, J., Zhao, G., ... & Wei, Q. (2025). Construction of electrochemical immunosensors based on Au@ MXene and Au@ CuS nanocomposites for sensitive detection of carcinoembryonic antigen. *Talanta*, 283, 127147.
- Cheng, H., Lai, G., Fu, L., Zhang, H., & Yu, A. (2015). Enzymatically catalytic deposition of gold nanoparticles by glucose oxidase-functionalized gold nanoprobe for ultrasensitive electrochemical immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics*, 71, 353-358.
- Cotchim, S., Kongkaew, S., Thavarungkul, P., Kanatharana, P., & Limbut, W. (2024). A dual-electrode label-free immunosensor based on in situ prepared Au-MoO₃-Chi/porous graphene nanoparticles for point-of-care detection of cholangiocarcinoma. *Talanta*, 272, 125755.
- Coulet, P. R. (2019). *Biosensor principles and applications*. CRC Press.
- Crulhas, B. P., Basso, C. R., Castro, G. R., & Pedrosa, V. A. (2021). Kanser biyobelirteci tespiti için bir sensöre dayalı son gelişmeler. *ECS Katı Hal Bilimi ve Teknolojisi Dergisi*, 10(4), 047004.
- Domínguez-Aragón, A., Zaragoza-Contreras, E. A., Figueroa-Miranda, G.,

- Offenhäusser, A., & Mayer, D. (2022). Electrochemical immunosensor using electroactive carbon nanohorns for signal amplification for the rapid detection of carcinoembryonic antigen. *Biosensors*, 13(1), 63.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., ... & NAGHAVI, M. (2015). The global burden of cancer 2013 global burden of disease cancer collaboration.
- Garcia, M. N. V., & Mottram, T. (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems engineering*, 84(1), 1-12.
- Haga, M., Itagaki, H., Sugawara, S., & Okano, T. (1980). Liposome immunosensor for theophylline. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 95(1), 187-192.
- Hao, C., Zhang, G., & Zhang, L. (2019). Serum CEA levels in 49 different types of cancer and noncancer diseases. *Progress in molecular biology and translational science*, 162, 213-227.
- Hasanzadeh, M., Shadjou, N., Lin, Y., & de la Guardia, M. (2017). Nanomaterials for use in immunosensing of carcinoembryonic antigen (CEA): Recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 86, 185-205.
- Hatipoğlu, O. N., Topal, T., & Çağlar, T. (2002). Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde serum ve bronş lavajı karsinoembriyonik antijen ölçümlerinin tanısal değerleri. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 50(1), 38-43.
- Jandas, P. J., Luo, J., Quan, A., Li, C., Fu, C., & Fu, Y. Q. (2020). Graphene oxide-Au nano particle coated quartz crystal microbalance biosensor for the real time analysis of carcinoembryonic antigen. *RSC advances*, 10(7), 4118-4128.
- Ji, L., Yan, T., Li, Y., Gao, J., Wang, Q., Hu, L., ... & Du, B. (2016). Preparation of Au-polydopamine functionalized carbon encapsulated Fe₃O₄ magnetic nanocomposites and their application for ultrasensitive detection of carcinoembryonic antigen. *Scientific Reports*, 6(1), 21017.
- Kaman, G., (2021). Leptin tainine yönelik etiketsiz elektrokimyasal immünosensör geliştirilmesi (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Keskin, M., & Arslan, F. (2020). Biyosensörler. *Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 1(1-2), 51-60.
- Li, W., Yu, R., & Xi, F. (2024). Enhanced electrochemiluminescence of luminol and-dissolved oxygen by nanochannel-confined Au nanomaterials for sensitive immunoassay of carcinoembryonic antigen. *Molecules*, 29(20), 4880.
- Liao, X., Wang, X., Zhang, M., Mei, L., Chen, S., Qi, Y., & Hong, C. (2021). An immunosensor based on an electrochemical-chemical-chemical advanced redox cycle amplification strategy for the ultrasensitive determination of CEA. *Analytica Chimica Acta*, 1170, 338647.
- Li, J., Gao, H., Chen, Z., Wei, X., & Yang, C. F. (2010). An electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen enhanced by self-assembled

- nanogold coatings on magnetic particles. *Analytica chimica acta*, 665(1), 98-104.
- Li, N. L., Jia, L. P., Ma, R. N., Jia, W. L., Lu, Y. Y., Shi, S. S., & Wang, H. S. (2017). A novel sandwiched electrochemiluminescence immunosensor for the detection of carcinoembryonic antigen based on carbon quantum dots and signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 89, 453-460.
- Li, Y. Li, Yanbin. 2006. Section 2.3 Biosensors, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in *CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology*. Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering; Volume Editor, Axel Munack. St. Joseph, Michigan, USA: ASABE. Copyright American Society of Agricultural Engineers. Çevirmenler: Pınar DEMİRCİOĞLU ve İsmail BÖĞREKÇİ.
- Lim, S. A., & Ahmed, M. U. (2019). Immunosensors.
- Lin, J., Li, K., Wang, M., Chen, X., Liu, J., & Tang, H. (2020). Reagentless and sensitive determination of carcinoembryonic antigen based on a stable Prussian blue modified electrode. *RSC advances*, 10(63), 38316-38322.
- Liu, Y., & Jiang, H. (2006). Electroanalytical Determination of Carcinoembryonic Antigen at a Silica Nanoparticles/Titania Sol–Gel Composite Membrane-Modified Gold Electrode. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 18(10), 1007-1013.
- Luppa, P. B., Sokoll, L. J., & Chan, D. W. (2001). Immunosenors—principles and applications to clinical chemistry. *Clinica chimica acta*, 314(1-2), 1-26.
- Marty, J. L., Leca, B., & Noguer, T. (1998). Biosensors for the detection of pesticides. *Analisis*, 26(6), 144-148.
- Mollarasouli, F., Kurbanoglu, S., & Ozkan, S. A. (2019). The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. *Biosensors*, 9(3), 86.
- Nicholson, B. D., Shinkins, B., Pathiraja, I., Roberts, N. W., James, T. J., Mallett, S., ... & Mant, D. (2015). Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (12).
- Özbek, G. (2014). Jelatin ve kitosan biyopolimerlerinin kullanılmasıyla immünoglobülin g tayini için protein a immünosensörü geliştirilmesi ve elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi (Master's thesis, Ankara Üniversitesi (Turkey)).
- Özoğlu, Ö., Ünal, M. A., & Altuntaş, E. G. (2017). Biyosensörler: gıda ve sağlık alanında laktat biyosensörleri. *Türk Yaşam Bilimleri Dergisi*, 2(2), 180-193.
- Parkinson, G., & Pejicic, B. (2005). Using biosensors to detect emerging infectious diseases. Prepared for The Australian Biosecurity Cooperative Research Centre, 1-80.
- Qiu, Z., Shu, J., & Tang, D. (2017). Bioresponsive release system for visual

fluorescence detection of carcinoembryonic antigen from mesoporous silica nanocontainers mediated optical color on quantum dot-enzyme-impregnated paper. *Analytical chemistry*, 89(9), 5152-5160.

- Ramadan, O., & Hassan, R. Y. (2025). Nanostructured immunosensing system for label-free impedimetric detection of multiple breast cancer biomarkers (CEA and HER2) using CoMoO₄@ PANI-PPy Nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics: X*, 23, 100596.
- Shen, G. Y., Wang, H., Deng, T., Shen, G. L., & Yu, R. Q. (2005). A novel piezoelectric immunosensor for detection of carcinoembryonic antigen. *Talanta*, 67(1), 217–220.
- Shen, L., Wang, J., Chen, J., & Liu, G. (2018). Graphene oxide–gold nanocomposite-based electrochemical immunosensor for sensitive detection of CEA. *Analytical Biochemistry*, 556, 85–91.
- Shi, Y. T., Yuan, R., Chai, Y. Q., & He, X. L. (2007). Development of an amperometric immunosensor based on TiO₂ nanoparticles and gold nanoparticles. *Electrochimica acta*, 52(11), 3518-3524.
- Stefan, R. I., Van Staden, J. F., & Aboul-Enein, H. Y. (2000). Immunosensors in clinical analysis. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 366(6), 659-668.
- Szturmowicz, M., Tomkowski, W., Fijalkowska, A., Sakowicz, A., & Filipecki, S. (1995). 1268 Is an increased carcinoembryonic antigen (CEA) concentration in pericardial fluid an indication of malignant pericarditis?. *European Journal of Cancer*, 31, S264.
- Şenel, F. (2013). Biyosensörler. *Bilim ve Teknik Dergisi*, 553, 44-45.
- Tang, D., Yuan, R., & Chai, Y. (2008). Ultrasensitive electrochemical immunosensor for clinical immunoassay using thionine-doped magnetic gold nanospheres as labels and horseradish peroxidase as enhancer. *Analytical chemistry*, 80(5), 1582-1588.
- Wang, H., Shen, G., & Yu, R. (2008). Aspects of recent development of immunosensors. *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*, 237–260. <https://doi.org/10.1016/B978-012373738-0.50011-8>
- Wang, J., Li, Y., Zhao, X., & Xu, D. (2020). An ultrasensitive electrochemical immunosensor for CEA detection using nanocomposite-modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 168, 112524.
- Wang, S., Wang, T., Wang, Z., Liu, G., Ji, R., Zang, Y., ... & Wang, Q. (2024). An integrated bipolar electrode with shared cathode for dual-mode detection and imaging of CEA. *Biosensors and Bioelectronics*, 265, 116704.
- Wu, Q., Li, N., Wang, Y., Xu, Y., Wu, J., Jia, G., ... & Cui, X. (2020). Ultrasensitive and selective determination of carcinoembryonic antigen using multifunctional ultrathin amino-functionalized Ti₃C₂-MXene nanosheets. *Analytical chemistry*, 92(4), 3354-3360.

- Xu, H., Wang, Y., Wang, L., Song, Y., Luo, J., & Cai, X. (2016). A label-free microelectrode array based on one-step synthesis of chitosan–multi-walled carbon nanotube–thionine for ultrasensitive detection of carcinoembryonic antigen. *Nanomaterials*, 6(7), 132.
- Yıldırım, S., & Bulut, G. (2022). Metastatik mide kanserinde karsinoembriyonik antijen (cea) prediktif midir?. *Ege Tıp Dergisi*, 61(1), 99-104.
- Yuan, Y. R., Yuan, R., Chai, Y. Q., Zhuo, Y., & Miao, X. M. (2009). Electrochemical amperometric immunoassay for carcinoembryonic antigen based on bi-layer nano-Au and nickel hexacyanoferrates nanoparticles modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 626(1-2), 6-13.
- Zhang, X., Yu, Y., Shen, J., Qi, W., & Wang, H. (2020). Design of organic/inorganic nanocomposites for ultrasensitive electrochemical detection of a cancer biomarker protein. *Talanta*, 212, 120794.
- Zhang, Y., Gao, W., Liu, T., & Ma, H. (2021). Label-free electrochemical immunosensor for CEA based on AuNPs-decorated graphene. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 329, 129241.
- Zheng, C., Chen, J., Zhang, Y., Zhou, S., Wang, L., Zhou, J., ... & Hong, Y. (2023). Sandwich-type electrochemical immunosensing of hypopharyngeal carcinoma biomarker carcinoembryonic antigen based on N-doped hollow mesoporous nanocarbon spheres/gold hybrids as sensing platform and gold/ferrocene as signal amplifier. *Analytical Sciences*, 39(1), 5-11.
- Zhu, Q., Chai, Y., Zhuo, Y., & Yuan, R. (2015). Ultrasensitive simultaneous detection of four biomarkers based on hybridization chain reaction and biotin–streptavidin signal amplification strategy. *Biosensors and Bioelectronics*, 68, 42-48.