BİYOLOJİK MOLEKÜLLERİN TAYİNİNE YÖNELİK KANTİLEVER BAZLI BİYOSENSÖR SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

DEVELOPMENT OF CANTILEVER BASED BIOSENSOR SYSTEM FOR DETECTION OF BIOLOGICAL MOLECULES

TAMER ÇIRAK

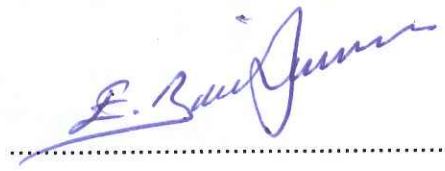
PROF. DR. EMİR BAKİ DENKBAŞ
Tez Danışmanı

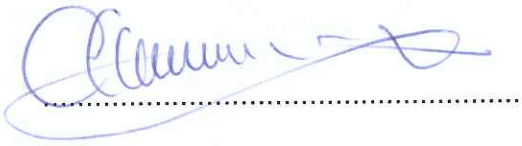
Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

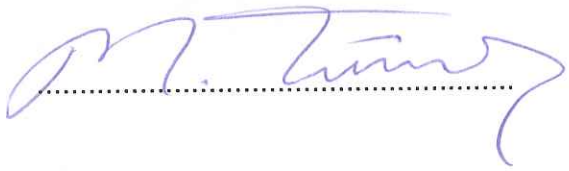
2014

TAMER ÇIRAK'ın hazırladığı "**Biyolojik Moleküllerin Tayinine Yönelik Kantilever Bazlı Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ
Başkan .....

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ
Danışman ..... 

Doç. Dr. Y. Çetin KOCAEFE
Üye ..... 

Doç. Dr. Mustafa TÜRK
Üye ..... 

Yrd. Doç. Dr. Memed DUMAN
Üye .....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sevgili Eşime...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan bu verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede ve başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

21 / 07 / 2014

TAMER ÇIRAK

ÖZET

BİYOLOJİK MOLEKÜLLERİN TAYİNİNE YÖNELİK KANTİLEVER BAZLI BİYOSENSÖR SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Tamer ÇIRAK

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Temmuz 2014, 184 Sayfa

Günümüz koşullarında teknolojik gelişmelerle birlikte insanların bilgiye ulaşma istekleri ve ihtiyaçları da artmıştır. Hastalıkların tedavisinde erken teşhis tedavinin etkisi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle hastalığın ilk evresinde oluşan öncül belirteç moleküller veya hastalığa sebep olan virüs gibi organizmaların oldukça düşük derişimlerde teşhisi insanlar için önem taşımaktadır. Devletler savunma sistemlerinin bir parçası olarak biyolojik savaş aracı olarak kullanılabilecek her türlü organizmayı ve biyomolekülü çok hızlı teşhis edebilecek sistemlere ihtiyaç duymaktadırlar. İlaç geliştirme çalışmaları, çevre kirliliği kontrolü, uzay araştırmaları, savunma ve tıp gibi uygulama alanlarında ortak ihtiyaç incelenmek istenilen molekülün varlığının ve miktarının saptanması olarak özetlenebilir. Bu ihtiyacı karşılamak için biyolojik incelemeler açısından kandaki glukoz miktarının belirlenmesi ile başlayan araştırmalar tek molekül veya virüs tespitine kadar ilerlemiş bulunmaktadır. Halen farklı biyolojik ajanların farklı ölçüm ve analiz yöntemlerine ihtiyaç duyması sebebiyle yeni yöntemler geliştirilmek üzere birçok çalışma sürdürülmektedir.

Sunulan tez çalışması kapsamında biyolojik moleküllerin saptanması amacıyla kütle değişimi ölçümüne dayanan kantilever bazlı biyosensör sisteminin hazırlanması ve spesifik olmayan bağlanmalardan kaynaklanan sanal etkilerin giderilmesi amacıyla bir sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Bu amaç doğrultusunda Atomik Kuvvet Mikroskopi temeline dayanan kapalı sıvı hücre içerisinde biyolojik ortamda ölçüm alabilen bir sistem oluşturulmuştur. Bu sistemde kantileverlerin mekanik özelliklerindeki değişimler kantilever yüzeyinden yansıyan lazer aracılığıyla fotodetektörde ölçülerek kantileverin rezonans frekans değerleri takip edilmiştir. Kantileverin rezonans frekansındaki değişimler ile yüzeyde biriken analit molekülleri arasındaki ilişki teorik hesaplamalarla incelenmiş, farklı geometrik yapılarda kantileverler tasarlanarak sinyal/gürültü oranını arttıracak yapılar belirlenmeye çalışılmıştır. Geometrik modifikasyonların hava ve sıvı ortamındaki etkilerinin incelenmesi amacıyla odaklamalı iyon demeti yöntemiyle aşındırılarak kantileverler hazırlanmıştır.

İlk olarak modifiye edilmiş kantileverlerin yüzeylerinde biyotin reseptörleri oluşturularak streptavidin ile etkileşimleri incelenmiştir. Sonrasında kantilever yüzeyinde anti-Hepatit B antikoru ile reseptör tabakası oluşturularak ortamda bulunan Hepatit B yüzey antijeni tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışmaların son aşamasında kantileverlerin analit molekülüne karşı verdikleri cevap sinyallerinin arttırılması amacıyla kantilever yüzeyleri biyotinlenmiş HSA nanopartiküllerle fonksiyonelleştirilerek yüzey alanı ve serbest fonksiyonel grup sayısı arttırılmaya çalışılmıştır. Bu kantileverler kullanılarak biyotin - streptavidin etkileşimleri incelenmiştir. Sonrasında anti-HBs antikoru ile kaplanan kantileverler ile Hepatit B yüzey antijeni etkileşimleri incelenerek gerçekleştirilen yüzey modifikasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Kantilever yüzeyinde yapılan modifikasyon işlemlerinin etkinliği temas açısı ölçümü, FT-IR, XPS, SEM, AFM gibi karakterizasyon teknikleri ile analiz edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: kantilever, biyosensör, atomik kuvvet mikroskobu, streptavidin, biyotin.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF CANTILEVER BASED BIOSENSOR SYSTEM FOR DETECTION OF BIOLOGICAL MOLECULES

Tamer ÇIRAK

Doctor of Philosophy, Division of Nanotechnology and Nanomedicine

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

July 2014, 184 Pages

Nowadays, demand and necessity of obtaining information is increased depending on technological developments. Early diagnosis is very important on therapeutic efficiency of diseases. So, detection of precursor molecules, which are formed during initial steps of diseases or detection of viruses in very low concentrations, is very important for patients. Governments are looking for very fast and accurate detection systems, which are able to detect any kind of organism or biomolecule that could be used as a biological war agent. Common need of drug development researches, environmental pollution controls, space, defense and medicinal researches is identifying existence of analyte molecule and detection of concentration. Current researches on biosensors are reached detection levels down to single molecule or virus detection levels, which started with studies of detection of glucose level in blood. There are many studies are going on for he development of novel sensor systems because still there is need of different type of measurement and analysis methods for different type of analytes.

In this thesis, cantilever based biosensor system is prepared for detection of biological molecules in their physiological environment. Main goal was enhance the biosensor system in order to avoid the virtual mass effect arises from the nonspecific bindings on cantilever. For this purpose an atomic force microscope based system with closed liquid cell, which is able to collect data in biological mediums, is configured.

Changes in mechanical properties of cantilever are measured in photo-detector, which collects laser beams reflected from cantilever surface and resonance frequency data are obtained. Relation of change in the resonance frequency of cantilever and analyte molecules deposited on surface is investigated by theoretical calculations and experimental measurements. Different geometric modifications are studied by modeling their resonance behaviors in air and liquid. Then experimental resonance frequencies are measured on cantilevers that are prepared by milling using Focused Ion Beam method.

Biotin streptavidin interactions are investigated by preparation of biotin receptor layer on modified cantilever surfaces. Following, detection of Hepatitis B surface antigen by using cantilevers modified with anti-HBs surface antigen specific receptor layer. In the last section of the studies, in order to increase the response signal of analyte molecules, cantilever surfaces are modified by using biotinylated Human Serum albumin (HSA) nanoparticles and therefore cantilevers surface area and numbers of active functional groups on surface are increased. To understand effects of surface modifications, cantilever responses are investigated for biotin – streptavidin and anti-HBs – HbsAg interactions. Modification processes are characterized by using contact angle, FT-IR, XPS, SEM and AFM analyses.

Keywords : cantilever, biosensor, atomic force microscope, streptavidin, biotin.

TEŞEKKÜR

Akademik hayatıma başladığım ilk günden itibaren yanımda olarak, gerek bilgi birikimini ve tecrübelerini aktarma konusunda gerekse laboratuvar, akademik ve sosyal her türlü imkanlarını paylaşma konusunda her zaman cömert davranarak desteğini eksik etmeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş ve her zaman yanımızda olarak birlik olmanın verdiği gücü hissettiren sevgili ailesine,

Birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım ve daha önce hiç bilmediğim birçok konuda sınırlarımı zorlamamı sağlayarak, desteğini esirgemeden bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sayın hocam Doç. Dr. Çetin Kocaefe'ye,

Tez çalışmalarım süresince sahip olduğu bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, zamanını ve desteğini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Hüseyin Avni Öktem, Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz ve Doç. Dr. Mustafa Türk'e,

Özellikle AKM ve biyolojik uygulamaları konusundaki bilgi ve engin deneyimlerini benimle paylaşan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Memed Duman'a,

Tez süresince AKM sisteminin geliştirilmesi ve Nanomanyetik Bilimsel Cihazlar ekibi ile ortak çalışmaların yürütülmesi konularındaki sonsuz desteği için Dr. Demet Çatçat Kayım'a,

Tezin laboratuvar çalışmalarında benden yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım Tayfun Vural, Ebru Erdal, Öznur Akbal, Salih Akbudak, Betül Bozdoğan Pala, Uğur Aydın, Soheil Malekghasame, Zeynep Karahaliloğlu, Göknur Kara, Ekin Çelik, Dr. Cem Bayram, Dr. Doğa Kavaz, Dr. Erkut Yılmaz, Dr. Murat Demirbilek ve buraya ismini sığdıramadığım diğer değerli arkadaşlarıma,

Gerek bilimsel bilgi birikimiyle, gerek dostluğuyla hem tezimde hem de hayatımda birçok desteğini gördüğüm Koray Ekinci ve sevgili eşi Tuba Ekinci'ye

Beni büyütüp yetiştirerek bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımın her anında bana inanarak ve her zaman destek olarak, beni ben yapan sevgili anneme – babama ve biricik kardeşime,

Hayatıma girdiği günden itibaren hayatımı renklendiren, anlamlandıran ve her gün yeni değerler kazandıran, beni hep daha yukarılara taşıyan sevgili eşim Funda'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Ayrıca tezde kullanılan sistemin temini ve deneylerin gerçekleştirilebilmesinde önemli katkısı bulunan 010BİYP09604001 numaralı destek projesi için Hacettepe Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT iii
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
ÇİZELGELER x
ŞEKİLLER xii
SİMGELER VE KISALTMALAR xx
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Biyosensörler 4
2.1.1. Moleküler Tanıma 6
2.1.2. Moleküler Tanıyıcı Ajanlar 9
2.1.3. Biyosensör Türleri 12
2.1.4. Sensör Karakteristikleri 15
2.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu 16
2.2.1. Atomik Kuvvet Mikroskobunun Temel Bileşenleri 18
2.2.2. Görüntüleme 19
2.2.3. Kuvvet Spektroskopisi 20
2.3. Kantilever Bazlı Biyosensörler 21
2.3.1. Kantilever Modifikasyonları 27
2.3.2. Kantilever Bazlı Biyosensör Sistemlerinde Ölçüm Yaklaşımları 28
2.3.3. Kantilever Mekanikleri 35
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 41
3.1. Materyal ve Yöntemler 41
3.2. Kantilever Bazlı Biyosensör Sistemi 42
3.2.1. Kantilever Bazlı Biyosensör Sisteminin Temel Kurulumu 43
3.2.2. Atomik Kuvvet Mikroskopu Elektronik Ünitesi 43
3.2.3. AKM Kafa Ünitesi 44
3.2.4. Kapalı Sıvı Hücre Ünitesi 44

3.2.5. Peristaltik Pompa ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Sisteminin Kantilever Bazlı Biyosensör Sistemine Entegrasyonu 46
3.2.6. Çalışmalarda Kullanılan Standart Kantileverlerin Temel Özellikleri 48
3.3. Kantilever Frekans Değişimlerinin Matematiksel Modellemeleri 49
3.3.1. Kantilever Uzunluğunun ve Biriken Kütlenin Miktar ve Yerinin Frekansa Etkilerinin Hesaplanması 49
3.3.2. Kantilever Üzerine Biriken Kütlenin Konumunun Etkisinin Modellenmesi .53
3.3.3. Kantileverlerin Geometrik Modifikasyonunun Rezonans Frekansına Etkisinin Modellenmesi 54
3.4. Kantileverlerin Geometrik Modifikasyonu 58
3.5. Kantileverlerin Hava ve Sıvı Ortamındaki Davranışlarının incelenmesi 64
3.6. Sisteme Örnek Verilmesi ve Sıvı Akışının Sinyallere Etkisi 65
3.7. Biyotin ile Fonksiyonelleştirilmiş Kantilever Yüzeylerine Streptavidin Bağlanmasının İncelenmesi.....66
3.7.1. Altın Kaplı Kantilever Yüzeylerinin Hazırlaması ve Temizlenmesi 67
3.7.2. Altın Kaplı Kantilever Yüzeyinin 11-merkapto-undekanoik asit ile Fonksiyonelleştirilmesi.....67
3.7.3. Karboksil Gruplarına Biyotin Bağlanması.....68
3.7.4. Biyotin – Streptavidin Etkileşimlerinin İncelenmesi 69
3.8. Anti Hepatit B Yüzey Antijeni Antikoru ile Hepatit B Yüzey Antijeninin Tayin Edilmesi Çalışmaları 70
3.8.1. Anti-HBs Reseptörlerin Yüzeye Adsorpsiyonu.....71
3.8.2. Streptavidin Bağlanmış Kantilever Yüzeylere Anti-HBs Reseptörlerin Bağlanması.....71
3.8.3. Anti-HBs – HbsAg Etkileşimlerinin İncelenmesi 71
3.9. İnsan Serum Albümin (HSA – Human Serum Albumin) Nanopartiküller Kullanılarak Sistemin Hassasiyetinin Arttırılması.....72
3.9.1. HSA Nanopartiküllerin Hazırlanması.....72
3.9.2. HSA Nanopartiküllerin Biyotinlenmesi.....73
3.9.3. HSA Nanopartiküllerin Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri 74
3.9.4. Yüzeye Bağlanan Biyotin Miktarının Tayini.....75
3.9.5. Biyotinlenmiş HSA Nanopartiküllerle Dekore Edilmiş Kantilever Yüzeylerin Hazırlanması.....76

3.9.6. Biyotinlenmiş HSA nanopartiküller ile Streptavidin Etkileşimlerinin İncelenmesi....77
3.9.7. HSA Nanopartiküller Üzerinden Streptavidin Bağlanmış Kantilever Yüzeylere Anti-HBs Reseptörlerin Bağlanması....78
3.9.8. Anti-HBs – HbsAg Etkileşimlerinin İncelenmesi....78
3.9.9. Sensörün Hassasiyetinin ve Doğrusallığının Belirlenmesi....79
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA....80
4.1. Sıvı Akışının ve Örnek Enjeksiyonunun Optimizasyonu Çalışmaları....80
4.1.1. Peristaltik Pompa ve HPLC Pompasının Fotodedektörde Ölçülen Sinyallere Etkisinin İncelenmesi....80
4.1.2. HPLC Enjeksiyon Portu Üzerinden Örnek Enjeksiyonunun Kalibrasyonu 84
4.2. Kantilever Frekans Değişimlerinin Teorik Modellemeleri....85
4.2.1. Kantilever Uzunluğunun ve Biriken Kütlenin Miktar ve Yerinin Frekansa Etkilerinin Hesaplanması....85
4.2.2. Kantileverlerin Geometrik Modifikasyonunun Rezonans Frekansına Etkisinin Modellenmesi....91
4.2.3. Kantilever Üzerine Biriken Kütlenin Konumunun Etkisinin Modellenmesi.95
4.3. Kantileverlerin Hava ve Sıvı Ortamındaki Davranışlarının incelenmesi....97
4.3.1. Kantileverlerin Hava ve Sıvı Ortamındaki Yay Sabitlerinin (k) Hesaplanması....100
4.4. Biyotin ile Fonksiyonelleştirilmiş Kantilever Yüzeylerine Streptavidin Bağlanmasının İncelenmesi....104
4.4.1. Biyotinlenmiş Yüzeyin Morfolojik ve Kimyasal Karakterizasyonu....105
4.4.2. Biyotin – Streptavidin Etkileşimlerinin İncelenmesi....113
4.5. Anti Hepatit B Yüzey Antijeni Antibadisi ile Hepatit B Yüzey Antijeninin Tayin Edilmesi Çalışmaları....120
4.5.1. Adsorpsiyon Yöntemi ile Oluşturulmuş Anti-HBs Reseptörlerin HBsAg ile Etkileşimlerinin İncelenmesi....120
4.5.2. Kantilever Yüzeylere Streptavidin Üzerinden Bağlanan Anti-HBs Reseptörlerin HbsAg ile Etkileşimlerinin İncelenmesi....127
4.6. İnsan Serum Albümin Nanopartiküller Kullanılarak Sistemin Hassasiyetinin Arttırılması....135
4.6.1. HSA Nanopartiküllerin Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri....135
4.6.2. Nanopartikül Yüzeyine Bağlanan Biyotin Miktarının Tayini....138

4.6.3. Biyotinlenmiş HSA Nanopartiküllerle Dekore Edilmiş Kantilever Bazlı Streptavidin Sensörünün Karakterizasyonu.....140
4.6.4. Biyotinlenmiş HSA nanopartiküller ile Streptavidin Etkileşimlerinin İncelenmesi.....146
4.6.5. HSA Nanopartiküller İle Dekore Edilmiş Kantileverlerde Anti-HBs – HbsAg Etkileşimlerinin İncelenmesi.....151
4.6.6. Sensörün Hassasiyetinin ve Doğrusallığının Belirlenmesi.....156
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....162
KAYNAKLAR.....169
ÖZGEÇMİŞ.....183

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2.1 Biyotinin temel kimyasal özellikleri....8
Çizelge 3.1 Standart kantileverlerin teknik özellikleri....49
Çizelge 3.2. Standart Kantileverlerin Model Görüntüleri ve Kütle, Hacim Özellikleri 56
Çizelge 3.3. Modifiye Edilmiş Kantileverlerin Model Görüntüleri ve Kütle, Hacim Özellikleri....57
Çizelge 3.4. Hazırlanan kantileverler üzerindeki altın tabakalarının yüzey alanları 64
Çizelge 4.1. Standart Kantileverlerin Bükülme Özelliklerinin Karşılaştırılması 91
Çizelge 4.2 Modifiye Kantileverlerin Bükülme Özelliklerinin Karşılaştırılması 92
Çizelge 4.3. Kantileverlerin Üzerine Biriken Kütlenin Uç Noktasından Uzaklığının Bükülme Özelliklerine Etkisi....96
Çizelge 4.4 Standart kantilever yapılarının hava ve su ortamındaki özellikleri....97
Çizelge 4.5 Modifiye kantilever yapılarının hava ve su ortamındaki özellikleri....98
Çizelge 4.6 Standart ve modifiye kantileverlerin yay sabitleri ve rezonans frekanslarındaki 100Hz'lik değişime karşılık eklenen kütleler....103
Çizelge 4.7. Yüzey Fonksiyonelleştirme İşlemleri Sonrası Temas Açısı Değerleri 107
Çizelge 4.8. 11-Merkaptoundekanoik asidin yüzdece atomik bileşenleri....112
Çizelge 4.9. 11-Merkaptoundekanoik asit için karbon, oksijen ve kükürt elementleri yüzdece kütle bileşenleri....112
Çizelge 4.10. Streptavidin bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri....119
Çizelge 4.11. HBsAg bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri....126
Çizelge 4.12. HBsAg bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri....133
Çizelge 4.13. İnsan Serum Albumin'in (HSA) FT-IR spektrumlarında görülen karakteristik pikleri....137
Çizelge 4.14. Streptavidin bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri....149

Çizelge 4.15. Streptavidin bağlanmasına karşılık elde edilen sinyal/gürültü oranları 150
Çizelge 4.16. HBsAg bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri 154
Çizelge 4.17. HBsAg bağlanmasına karşılık elde edilen sinyal/gürültü oranları. 155
Çizelge 4.18. HBsAg bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri 159
Çizelge 4.19. HBsAg bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri 160

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Biyosensör bileşenleri ve temel çalışma prensipleri 5
Şekil 2.2. Streptavidinin 3 boyutlu moleküler yapısı 7
Şekil 2.3. Biyotin molekülünün kimyasal yapısı 7
Şekil 2.4. AKM'nin temel bileşenlerinin gösterimi 17
Şekil 2.5. Tipik kuvvet – mesafe ölçüm döngüsünün şematik gösterimi.....21
Şekil 2.6. Kantilever yüzeyinde gerçekleşen etkileşimler sonucu kantileverde oluşan değişimlerin şematik gösterimi 23
Şekil 2.7. Kantilever bazlı biyosensör sistemlerde optik okuma yöntemi ile sinyal elde edilmesi. 26
Şekil 2.8. Sıvı hücre sistemi şematik gösterimi.....27
Şekil 2.9. Klorimuron etil ve anti-klorimuron etil mAb spesifik bağlanmasının yüzey immobilizasyon yöntemleri açısından karşılaştırılması 30
Şekil 2.10. Aptamer bazlı kanamisin kantilever sensörün A) derişime bağlı zamana karşılık bükülme grafikleri B) sensörün seçiciliğini gösteren bükülme grafikleri.....31
Şekil 2.11. Farklı *S. typhimurium* derişimleri için zamana karşı PZT/altın kaplı cam kantileverlerin rezonans frekansındaki değişim [119]. 32
Şekil 2.12. Tümör belirteç proteinlerinin kantilever sensörler ile algılanması [125]. 33
Şekil 3.1. Atomik Kuvvet Mikroskopu Elektronik Ünitesi.....43
Şekil 3.2. Atomik Kuvvet Mikroskopu Kafa Ünitesi 44
Şekil 3.3. Kapalı sıvı hücre tasarımı 45
Şekil 3.4. Atomik Kuvvet Mikroskopu kapalı sıvı hücre ünitesi.....46
Şekil 3.5. Masterflex L/S model 7519 kartuş sürücülü peristaltik pompa.....47
Şekil 3.6. AKM ve HPLC sistemlerinin seri bağlanması 48
Şekil 3.7. P680 model HPLC pompasının görünümü (Dionex, ABD) 48
Şekil 3.8. Dikdörtgen bir kantilever için (A) kesit alan görüntüsünün (B) uygulanan N kuvvetine karşılık Δz uzaklığında bükülme davranışının (C) uygulanan T torkuna karşılık Δϕ açısıyla büzülme davranışının şematik gösterimi.....50

Şekil 3.9. Kantilever üzerine biriken kütlenin konumunun model üzerinde gösterimi 53
Şekil 3.10. Çalışmalarda kullanılan kantileverlerin boyutları ve geometrik yapıları55
Şekil 3.11. Odaklı İyon Demeti yönteminin çalışma prensibi 59
Şekil 3.12. Kantileverlerin iyon demeti aşındırma yöntemi ile geometrik modifiye edilmesinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri 61
Şekil 3.13. Odaklanmış İyon Demeti yöntemi ile farklı geometrik yapılarda hazırlanmış kantilever örneklerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri (M1-M4).....62
Şekil 3.14. Odaklanmış İyon Demeti yöntemi ile farklı geometrik yapılarda hazırlanmış kantilever örneklerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri 63
Şekil 3.15. Modifiye edilmiş kantileverlerin altın kaplı ve aşındırılmış yüzeylerinin karşılaştırılması 64
Şekil 3.16. Kantilever üzerinde oluşturulan 11-merkaptoundekanoik asit uzatıcı kolları için şematik gösterim (A) ve kimyasal yapı (B).....67
Şekil 3.17. Kantilever yüzeyinin biyotinlenmesi 69
Şekil 3.18. Biyotin - streptavidin bağlanmasının şematik gösterimi ve rezonans frekansına etkisi 70
Şekil 3.19. HSA nanopartiküllerin Sülfo-NHS-LC-biyotin ile reaksiyonuyla biyotinlenmesi [152] 74
Şekil 3.20. HABA (4-hidroksiazobenzene-2-karboksilik asit) molekülünün kimyasal yapısı.....75
Şekil 3.21. NHS varlığında EDC kullanılarak gerçekleştirilen karbodiimid aktivasyonunun kimyasal gösterimi.....77
Şekil 4.1. Peristaltik pompa akışının kantilever üzerindeki etkisi.....81
Şekil 4.2. Peristaltik pompa akışı kapandıktan sonra kantilever üzerindeki etki....82
Şekil 4.3. HPLC pompa akışı ve kapandıktan sonra kantilever üzerindeki etkisi ..83
Şekil 4.4. Sıvı hücredeki akış hızının fotodedektörde ölçülen toplam sinyal üzerindeki etkisi.....84
Şekil 4.5. HPLC örnek enjeksiyonu ve akış sonlandırma kalibrasyonu 85
Şekil 4.6. Kantileverin uç kısmına eklenen kütlenin kantilever frekansına etkisinin şematik gösterimi 86
Şekil 4.7. Kantilever uzunluğunun rezonans frekansı ile ilişkisi.....88

Şekil 4.8. Kantilever üzerine eklenen kütlenin rezonans frekansı ile ilişkisi.....89
Şekil 4.9. Kantilever üzerinde biriken kütlenin uç noktasına uzaklığının rezonans frekansı ile ilişkisi 90
Şekil 4.10. Tap 300Al ve modifiye edilmiş kantileverlerin maksimum bükülme davranışlarının karşılaştırılması 93
Şekil 4.11. ContAl , ElectriMulti ve CLR standart kantileverleri ve modifiye edilmiş kantileverlerin maksimum bükülme davranışlarının karşılaştırılması 94
Şekil 4.12. Kantileverlerin Üzerine Biriken Kütlenin Uç Noktasından Uzaklığının Bükülme Özelliklerine Etkisi 96
Şekil 4.13. Tap300Al ve FIB yöntemi ile aşındırılarak modifiye edilmiş kantileverlerin hava ve su ortamında rezonans frekanslarının karşılaştırılması 99
Şekil 4.14. Cont Al, ElectriMulti ve CLR kantileverleri ve bunlardan FIB yöntemi ile aşındırılarak modifiye edilmiş kantileverlerin hava ve su ortamında rezonans frekanslarının karşılaştırılması 99
Şekil 4.15. Tap300Al ve FIB yöntemi ile aşındırılarak modifiye edilmiş kantileverlerin hava ve su ortamında kalite faktörlerinin karşılaştırılması 100
Şekil 4.16. Cont Al, ElectriMulti ve CLR kantileverleri ve bunlardan FIB yöntemi ile aşındırılarak modifiye edilmiş kantileverlerin hava ve su ortamında kalite faktörlerinin karşılaştırılması 100
Şekil 4.17. Kantileverler için su ortamında 100 Hz frekans kaymasına karşılık hesaplanan biriken kütle miktarlarının karşılaştırmalı gösterim 104
Şekil 4.18. (a) Altın kaplanmış, (b) MUA oluşturulmuş, (c) EDC aktivasyonu uygulanmış, (d) biyotin bağlanmış, (e) streptavidin bağlanmış yüzeylerin su ile durağan damla temas açısı fotoğrafları 107
Şekil 4.19. Altın kaplanmış mika disklerin 3D, kesit, pürüzlülük ve 2D topografik AKM incelemeleri 108
Şekil 4.20. MUA ile fonksiyonelleştirilmiş disklerin 3D, kesit, pürüzlülük ve 2D topografik AKM incelemeleri 109
Şekil 4.21. Biyotinlenmiş disklerin 3D, kesit, pürüzlülük ve 2D topografik AKM incelemeleri 109
Şekil 4.22. Altın kaplı mika disklerin X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi ile elde edilmiş survey analiz grafiği 110

Şekil 4.23. Modifiye edilmiş yüzeylerin Au4f (a), S2p (b), C1s (c), N1s (d), O1s (e) piklerinin grafikleri ve yüzde atomik bileşen karşılaştırması (f) 111
Şekil 4.24. Snow ve arkadaşları tarafından altın yüzey üzerinde oluşturulan 11-merkaptoundekanoik asit moleküllerinin XPS *survey* spektrası [156].... 112
Şekil 4.25. M1 kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri..... 115
Şekil 4.26. M5 kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri..... 115
Şekil 4.27. M6 kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri..... 116
Şekil 4.28. M7 kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri..... 116
Şekil 4.29. M8 kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri..... 117
Şekil 4.30. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M6* kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 117
Şekil 4.31. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M7* kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 118
Şekil 4.32. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6*,M7* kantileverleri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansındaki değişim..... 118
Şekil 4.33. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6,7 kantileverleri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı ($\Delta f / f_0$) grafiği 120
Şekil 4.34. M1 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 121
Şekil 4.35. M5 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 122
Şekil 4.36. M6 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 122
Şekil 4.37. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M6* kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri..... 123

Şekil 4.38. M7 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 123
Şekil 4.39. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M7* kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 124
Şekil 4.40. M8 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 124
Şekil 4.41. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6*,7* kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansındaki değişim 125
Şekil 4.42. Anti-Hepatit-B yüzey antikorunun adsorpsiyon yöntemi ile yüzeye immobilizasyonu ve Hepatit B yüzey antijeni ile bağlanması 125
Şekil 4.43. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6*,70 kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı ($\Delta f / f_0$) grafiği..... 127
Şekil 4.44. M1 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 128
Şekil 4.45. M5 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 129
Şekil 4.46. M6 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 129
Şekil 4.47. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M6* kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 130
Şekil 4.48. M7 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 130
Şekil 4.49. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M7* kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 131
Şekil 4.50. M8 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 131
Şekil 4.51. Biyotinlenmiş anti-Hepatit-B yüzey antikorunun streptavidin ile bağlanarak yüzeye immobilizasyonu ve Hepatit B yüzey antijeni ile etkileşimi 132

Şekil 4.52. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6*,7* kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansındaki değişim 133
Şekil 4.53. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6*,7* kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı ($\Delta f / f_0$) grafiği 134
Şekil 4.54. HSA nanopartiküllerin a) 20000 X, b) 100000 X büyütme ile elde edilmiş SEM görüntüleri 136
Şekil 4.55. HSA nanopartiküllerin a) 2D b) 3D topografik AKM görüntüleri 136
Şekil 4.56. HSA nanopartiküllerin zeta-sizer boyut ve potansiyel ölçüm grafikleri 137
Şekil 4.57. HSA ve HSA nanopartikül yapıları için FT-IR spektrumları 138
Şekil 4.58. HABA-Avidin kompleksi ile biyotinlenmiş HSA nanopartiküllerin reaksiyonunun şematik gösterimi 139
Şekil 4.59. Biyotinlenmiş HSA nanopartiküller ile dekore edilmiş M8 kodlu kantilever yüzeylerinin a) 1000X, b) 18000X, c) 11000X ve d) 55000X büyütme ile elde edilmiş SEM görüntüleri 141
Şekil 4.60. Biyotinlenmiş HSA nanopartiküller ile dekore edilmiş tamamı altın kaplanmış Tap300Al kodlu kantilever yüzeylerinin a) 43000X, b) 6000X ve d) 2000X büyütme ile elde edilmiş SEM görüntüleri 142
Şekil 4.61. HSA nanopartiküllerin zeta-sizer boyut ve potansiyel ölçüm grafikleri 143
Şekil 4.62. Biyotinlenmiş HSA nanopartikül yapıları için FT-IR spektrumları 143
Şekil 4.63. Modifiye edilmiş yüzeylerin Au4f (a), S2p (b), C1s (c), N1s (d), O1s (e) piklerinin grafikleri ve yüzde atomik bileşen karşılaştırması (f) 144
Şekil 4.64. Modifiye edilmiş yüzeylerin Au4f (a), S2p (b), C1s (c), N1s (d), O1s (e) piklerinin grafikleri ve yüzde atomik bileşen karşılaştırması (f) 145
Şekil 4.65. M1 kantileveri için BSA ve streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 147
Şekil 4.66. M5 kantileveri için BSA ve streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 147

Şekil 4.67. M7 kantileveri için BSA ve streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri.....148
Şekil 4.68. M8 kantileveri için BSA ve streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri.....148
Şekil 4.69. M1, M5, M7 ve M8 kantileverleri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansındaki değişim grafikleri 149
Şekil 4.70. M1, M5, M7 ve M8 kantileverleri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı ($\Delta f / f_0$) grafiği.....151
Şekil 4.71. M1 kantileveri için HBsAg-negatif ve HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri.....151
Şekil 4.72. M5 kantileveri için HBsAg-negatif ve HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 152
Şekil 4.73. M7 kantileveri için HBsAg-negatif ve HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 152
Şekil 4.74. M8 kantileveri için HBsAg-negatif ve HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 153
Şekil 4.75. M1, M5, M7 ve M8 kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri.....154
Şekil 4.76. M1, M5, M7 ve M8 kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu enjeksiyonu sonrası zamana karşı ($\Delta f / f_0$) grafiği.....156
Şekil 4.77. M8 kantileveri için HBsAg-negatif ve 0.1 ng/mL HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri.....157
Şekil 4.78. M8 kantileveri için HBsAg-negatif ve 1.0 ng/mL HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri.....157

Şekil 4.79. M8 kantileveri için HBsAg-negatif ve 5.0 ng/mL HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 158
Şekil 4.80. M8 kantileveri için HBsAg-negatif ve 20 ng/mL HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri 158
Şekil 4.81. M8 kantileveri için 0.1-200 ng/mL aralığında HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansındaki değişim grafiği 159
Şekil 4.82. M8 kantileveri için derişime karşılık rezonans frekansındaki değişim grafikleri a) lineer skala b) logaritmik skala 160
Şekil 4.83. M8 kantileverleri için derişime karşılık hesaplanan kütle değişimi grafiği 161

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Kd	Ayrışma sabiti (*ing.dissociation constant*)
E	Young modülü
F_T	Fotodedektörde ölçülen toplam kuvvet
F_N	Fotodedektörde ölçülen normal (dikey) kuvvet
F_L	Fotodedektörde ölçülen lateral (yatay) kuvvet
Hz	Hertz

Kısaltmalar

AKM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
DB-FIB	Çift Işın Demetli – Odaklı İyon Demeti (*ing. Dual Beam – Focused Ion Beam*)
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FET	Alan Etki Transistörü (Field Effect Transistors)
GFP	Yeşil Floresan Protein
HABA	4-hidroksiazobenzene-2-karboksilik asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (*ing. High Performance Liquid Chromatography*)
ISFET	(*ing. ion-sensitive field-effect transistor*)
JFET	(*ing. Junction gate field-effect transistor*)
MAC-AFM	Manyetik mod AKM
MES	2-(N-morfolino)etansülfonik asit
MOSFET	(*ing. metal–oxide–semiconductor field-effect transistor*),
MUA	11-merkaptoundekanoik asit
NHS	N-hidroksisüksinimid
PDB	Protein veri tabanı (*ing. Protein database*)
PFM-AFM	Salınımlı kuvvet mod AKM (*ing. Pulsed-Force Mode AFM*)
PSA	Prostat spesifik antijen
QCM	Kuvars Kristal Mikrobalans (*ing. Quartz Crystal Microbalance*)

SAM	Kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (*ing. Self assembled monolayer*)
SAW	Yüzey Akustik Dalga (*ing. Surface Acoustic Wave*)
SELEX	Ligandların Üstel Zenginleştirilmesi ile Sistematik Gelişimi (*ing. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SMRFM	Tek molekül tanıma kuvvet mikroskopisi (*ing: Single Molecular Force Recognition Microscopy*)
SPR	Yüzey plazmon Rezonans (*ing. Surface Plasmon Resonance*)
TTM	Taramalı Tünelleme Mikroskobu

1. GİRİŞ

Varlığı veya miktarı saptanmak istenilen bir analit için tanıyıcı element olarak biyolojik bir reseptör kullanılarak analit-reseptör etkileşimini ölçülebilir bir sinyale dönüştüren ve bu sinyali analiz eden sistemler biyosensör olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde tıp alanından çevre bilimlerine, savunma sanayisinden uzay bilimlerine kadar birçok kullanım alanı olan biyosensörler üzerindeki çalışmalar gün geçtikçe daha da artmaktadır. Birbirinden oldukça farklı alanlara yönelmiş bu çalışmalar sonucu çeşitli çalışma prensiplerine sahip ve farklı avantajları bulunan yöntemler geliştirilmiştir. Farklı yöntemler ile hazırlanmış biyosensör yüzeyi ile saptanmak istenen analit arasındaki etkileşimi ölçmek için akım-voltaj değişimlerinden yararlanılan elektrokimyasal yöntemler, ısıl değişimleri temel alan kalorimetrik yöntemler, ışık değişimlerinin ölçülmesine dayanan optik yöntemler yada kütle değişimini ölçen kuvarz mikrobalans veya kantilever bazlı sensörler gibi daha birçok sensör çeşidi kullanılabilmektedir.

Tüm bu çalışmaların ortak hedefi biyosensör sistemlerinde ihtiyaç duyulan birtakım özellikleri iyileştirmektir. Günümüzde kullanılan geleneksel pahalı ve karmaşık analiz yöntemleri yerine aynı işlevi görebilecek ve bunun da ötesinde daha basit, hızlı ve ucuz sistemler geliştirmek en önemli amaçtır. Bunun yanında sensör sistemlerinin ideal olmasını sağlayan bir takım özellikler bulunmaktadır. Doğrusallık, spesifiklik, analiz zamanı, maliyet, ölçüm kolaylığı, taşınabilirlik gibi özellikler bir biyosensörün başarılı olmasını sağlayan önemli faktörlerdir. Özellikle son yıllardaki çalışmalar daha çok sensör sistemlerinin minyatürize edilerek taşınabilir kılınması üzerinedir.

Sensör algılama mekanizmasında fonksiyon gösteren etkileşim biyolojik moleküller arası etkileşim ise, özellikle ligand-reseptör ilişkilerindeki spesifiklik sensörün analite olan özgüllüğünü oldukça arttırmaktadır. Bunun yanında biyolojik moleküller için özellikle fizyolojik ortamlarda çalışma gereksinimi nedeniyle bazı durumlarda kararlılığı yüksek sistemler elde etmek oldukça zordur.

Son yıllarda üzerinde çokça çalışılan sensör türlerinden birisi olan kantilever temelli sensörlerin en önemli avantajlarından birisi çok düşük miktarlardaki analiti saptayabilmeleridir. Bu tür biyosensörler tek bir molekülü dahi saptayabilecek kadar hassas olabilmektedir. Kütle değişiminin ölçümüne dayanan bu tip sensörlerde kantilever üzerine bağlanan molekülden kaynaklanan kütle değişimi kantileverde bükülmeye veya rezonans frekansında kaymaya neden olmaktadır. Kantileverdeki bu değişimler elektronik sistem aracılığıyla veriye dönüştürülmektedir. Bu bağlamda kantilever yüzeyinin ölçülmek istenen analite olan spesifikliği önem arz etmektedir. Kantilever üzerinde istenmeyen bağlanmalar oluşması pozitif hata kaynağı olabilmektedir.

Sunulan tez çalışması kapsamında öncelikle kantilever bazlı biyosensör geliştirilmesi için bir sistem yapılandırılmıştır. Bunun için Atomik Kuvvet Mikroskop prensibi ile çalışan ve kapalı sıvı hücre içerisinde analiz yapılabilecek şekilde bir sistem tasarlanarak, satın alınmıştır. Kantilever yüzeyinde spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçmek amacıyla geometrik modifikasyonlar ile yüzey modifikasyon tekniklerinin birlikte kullanımı sonucu spesifik etkileşimlerin sadece sınırlandırılan bölgelerde gerçekleşmesi tez çalışmasının temel hedefleridir. Bu amaçla öncelikle bu sistem ile sıvı ortamda kantileverin analite olan cevabını incelemek üzere farklı geometrik yapıda kantileverler tasarlanmış, gerçekleştirilen modelleme ve hesaplamalarla bu kantileverlerin davranışları öngörülmüştür. Daha sonra “odaklamalı iyon demeti” yöntemi ile kantileverler aşındırılarak geometrik olarak modifiye edilmiş kantileverler hazırlanmıştır. Farklı yapıdaki bu kantileverlerin hava ve sıvı ortamında deneysel olarak verdikleri tepkilerin de birbiri ile karşılaştırılması sonucu en iyi kantilever belirlenmiştir.

Kantilever yüzeyinin kimyasal yöntemler kullanılarak biyotin ile fonsiyonelleştirilmesiyle streptavidin biyomolekülü saptanmıştır. Streptavidin molekülünün bağlanması kantileverin frekansında belirli bir kayma gerçekleştirmiştir. Ayrıca streptavidin bağlı yüzeyler, hepatit-B yüzey antijeninin tayin edilmesi amacıyla anti-HBs ile modifiye edilmiş ve antijenler tespit edilmiştir. Sistemin hassasiyetinin arttırılması amacıyla reaktif yüzey alanı arttırılması düşünülmüş ve bu amaçla ortalama 80nm çapında küresel formda İnsan Serum Albümin (HSA) nanopartiküller sentezlenmiş ve bu partiküller ile yüzey modifiye

edilmiştir. Ayrıca yapılan modifikasyon işlemlerinin FT-IR, XPS, SEM, AFM gibi analiz teknikleri ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

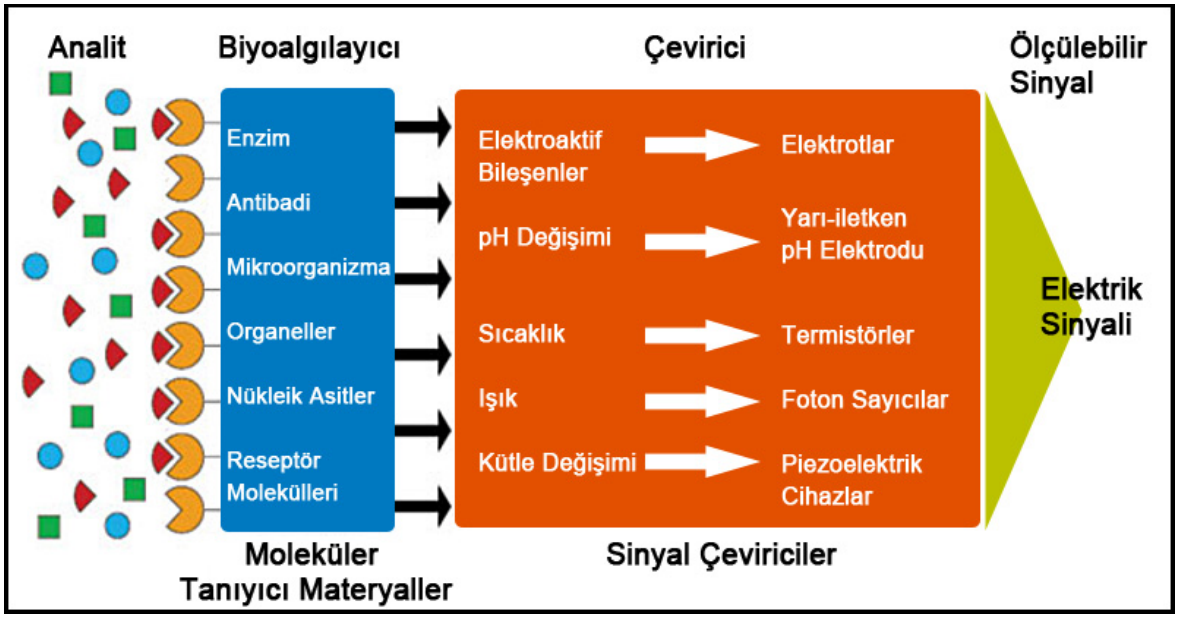
2. GENEL BİLGİLER

Biyosensör araştırmaları hayati önem taşıyan ve hızla gelişmekte olan bir araştırma alanıdır. Günümüz koşullarında nanoteknolojik yaklaşımlar sayesinde oldukça küçük boyutlarda cihaz üretiminin mümkün olmasına paralel olarak aynı anda birden fazla molekülün tayin edilebildiği, yüksek seçiciliğe sahip, çok daha düşük derişimlerde ve hacimde sıvılarla ölçüm gerçekleştirilebilen, daha hızlı sonuç alınabilen yeni biyosensör sistemleri üzerine artan ilginin uzun bir süre daha devam edeceği bir gerçektir [1]. Biyosensör uygulamalarının odaklandığı temel alanlar yaşam bilimlerinde temel araştırmalar, tıbbi diyagnostik, ekolojik incelemeler, ilaç araştırmaları ve askeri uygulamalarda kullanılan bileşiklerin tespiti olarak kısaca sıralanabilir. İdeal bir biyosensör; moleküler bileşikleri tek bir molekülden yüksek derişimlere kadar saptama ve moleküler bileşenlerini gerçek zamanlı olarak tanımlama yeteneğine sahip bir sistem olarak ifade edilebilir. Tüm bunların yanında ticari bir ürün olarak bir biyosensör sistemi güvenilir, ucuz, küçük, taşınabilir olmalı ve eğitimsiz bir personelin kullanabileceği şekilde tasarlanmalıdır. Biyosensör araştırmaları, sensör donanımlarının geliştirilmesi, sensör yüzeylerinin kimyasal modifikasyonu ve spesifik biyolojik uygulamaları gibi işlemleri içeren disiplinler arası bir çalışma gerektirmektedir.

2.1. Biyosensörler

Biyosensörler moleküllerin varlığını yada aktivitesini biyolojik moleküllerin yardımıyla saptayan cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Bir biyosensör, tanımlama elemanı olarak fonksiyon gösteren ve analit moleküllerine bağlanan veya etkileşen bir biyomolekül tabakasından ve bir fiziksel dönüştürücü olan, analit molekülleriyle biyomoleküller arasındaki etkileşimi saptayabilen bir katı-hal aygıtından oluşmaktadır. Biyosensörün özgüllüğünü belirleyen algılama tabakasıdır [2]. Biyomoleküllerle analit molekülleri arasındaki etkileşim işlenmek üzere uygun elektronik sinyale dönüştürülmektedir. Boyaların floresan sinyalleri, moleküler yüklerin elektriksel alanları, sensör yüzeyine moleküllerin adsorplanması veya bağlanması sonucu oluşan kütle değişimleri veya kırınım indeksi değişimleri moleküllerin varlığını belirten fiziksel sinyallere örnek olarak verilebilir. Genel

biyosensör bileşenleri ve temel çalışma prensipleri şematik olarak Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Biyosensör bileşenleri ve temel çalışma prensipleri

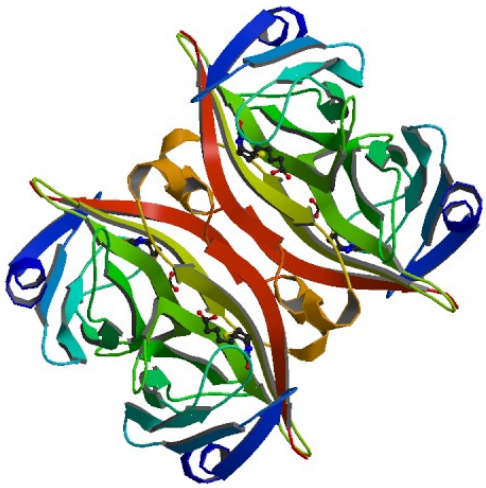
Algılama prensiplerine göre biyosensörler ikiye ayrılabilir: etiket gerektirmeyen ve etiketlenmiş. Etiket gerektirmeyen sensörler herhangi bir işaretleyici ajan bağlanmamış hedef molekülleri algılayabilirler ve bu sayede devamlı anlık gözlem yapılabilmekte ya da hızlı ve direkt saptama gerçekleştirilebilmektedirler. Genellikle moleküllerin etiketlenmesi algılanmalarını kolaylaştırsa da inceleme öncesi kimyasal modifikasyona gerek duyulduğu için tanı süresi çok uzamakta, ayrıca bu işlem ekstra maliyet getirmektedir. Bu nedenlerle etiket gerektirmeyen biyosensör uygulamaları tercih edilmektedir.

Clark ve Lyons'un 1962 yılında ortaya koydukları kandaki glikoz seviyesini tayin eden amperometrik sensör temelli ilk klasik biyosensör uygulamasından günümüze kadar birçok farklı biyosensör geliştirilmiştir [3]. Temeli sensör yüzeyine moleküler bağlanmalar sonucu oluşan mekanik strese dayanan kantilever bazlı biyosensörler ise yüksek hassasiyetleri ve mikro cihaz uygulamaları ile dikkat çekmektedir.

2.1.1. **Moleküler Tanıma**

Bir çözeltideki moleküller saniyede milyarlarca kez çarpışırlar. Çoğu durumda, bu çarpışmalar sonucu oluşan kompleks yapılar zayıftır, kısa ömürlüdür ve spesifik değildir. Fakat bir molekülün yüzey özellikleri karşı molekülünkine uygun ise etkileşimler sonucu oluşan çekici kuvvetler, itici kuvvetlere baskın gelir ve daha güçlü, uzun ömürlü ve spesifik etkileşimler kurulur. İki veya daha fazla molekülün hidrojen bağı, metal koordinasyon bağı, hidrofobik kuvvetler, elektrostatik kuvvetler, van der waals kuvvetleri gibi kovalent olmayan bağlar ile oluşturduğu bu spesifik etkileşime moleküler tanıma denilmektedir [4]. Moleküler tanıma özellikle antijen-antikor, enzim-substrat, DNA-protein, RNA-ribozom gibi biyolojik sistemlerdeki reseptör-ligand ilişkisinde önemli bir role sahiptir.

Sadece istenilen biyomoleküllerin immobilize edilmesi için fonksiyonel yüzeylerin hazırlanması biyosensörlerin üretiminde ilk aşamadır. Bu tür yüzeyler elde etmek için kovalent bağlanma, avidin-biotin yada DNA hibritleşmesi gibi spesifik etkileşimler, yada elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler gibi fiziksel adsorpsiyonlardan yararlanılabilir [5-7]. Özellikle biyomoleküllerin moleküler tanıma ve spesifik etkileşimler ile yüzeylere immobilize edilmesi, immobilize edilen biyomoleküllerin uygun yönelmesini ve kararlılığını sağlamaktadır. Fonksiyonel biyomoleküllerin yüzeylere istenilen bölgelerden ve düzgün doğrultuda bağlanması için, moleküler tanıma ve spesifik etkileşimler çok uygun bir yoldur. Nanoboyuttaki spesifik etkileşimler ve moleküler tanıma ile yüzey özelliklerinin kontrolü, biyosensörlerin yüksek duyarlılık ve spesifiklik ile nanofabrikasyonu için çok önemlidir [8].

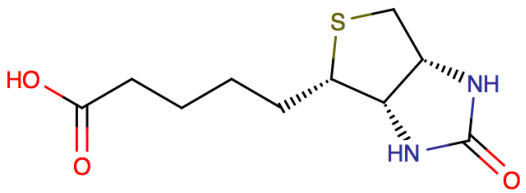


Şekil 2.2. Streptavidinin 3 boyutlu moleküler yapısı

(Resim ilgili protein veri tabanından alınmıştır.

RCSB PDB (www.rcsb.org) PDB ID: 1STP [9].)

Günümüzde biyosensör çalışmalarında sıklıkla streptavidin-biyotin ya da avidin-biyotin etkileşiminden yararlanmaktır. Streptavidinin (Şekil 2.2) ve avidinin biyotin'e olan ilgisi bilinen en güçlü kovalent olmayan etkileşimlerdendir ($K_{d,str.}$~ 10^{-14} mol/L, $K_{d,avi.}$~ 10^{-15} mol/L). Bu güçlü ve spesifik etkileşimden yararlanılarak düzgün yönlendirilmiş, homojen, spesifik biyosensör yüzeyleri hazırlanabilmektedir. Ayrıca streptavidinin biyotine olan ilgisinin pH, sıcaklık, organik çözücüler, yüzey aktif madde gibi koşullardan etkilenmemesi de biyosensör araştırmalarında kullanılmasında büyük avantaj sağlamaktadır [8]. Şekil 2.3'de biyotin molekülünün kimyasal yapısı ve Çizelge 2.1'de temel kimyasal özellikleri verilmiştir.



Şekil 2.3. Biyotin molekülünün kimyasal yapısı

Çizelge 2.1 Biyotinin temel kimyasal özellikleri

Formülü	:	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$
Bileşenleri	:	C (49.16%), H (6.6%), N (11.47%), O (19.65%), S (13.12%)
Molekül Kütlesi	:	244.311 g/mol

Fonksiyonel biyomoleküllerin moleküler tanıma ve spesifik etkileşimler ile nano-desenlenmiş yüzeyler veya nanomalzemeler üzerine kontrollü immobilizasyonu biyosensörlerin üretiminde daha yüksek duyarlılık ve spesifiklik sağlayabilmektedir. Yüzeye uygulanan biyomoleküler nanodesenleme, moleküler kendiliğinden-düzenlenme yöntemi ve çoğunlukla litografik teknikler ile birlikte yapılmaktadır [10, 11].

Biyosensörün analiti tanıması için geliştirilecek olan yüzeyin biyomoleküller ile kontrollü etkileşimini sağlayacak şekilde tasarımı, biyosensör üretimi ve manipülasyonu için en önemli faktörlerden biridir. Teşhis olayının gerçekleşeceği sensör yüzeyinin fonksiyonelleştirilmesi, biyomoleküllerin yüzeye fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlanma ya da biyokimyasal etkileşimler ile bağlanması ile gerçekleştirilir. Ayrıca hedef biyomolekülü tespit etmek için sadece istenilen biyomoleküllerin sensör yüzeyine immobilizasyonu için spesifik olmayan moleküllerin biyosensör ile istenmeyen etkileşimleri önlenmelidir. Bu yüzden yüzey ile konjuge biyomoleküller arasındaki yüzey kimyası biyosensörlerin pratik uygulamaları için çok önemlidir [12]. Yüzey kimyası kullanılarak, yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip yeni nesil biyosensörler geliştirmek amacıyla nanometre boyutunda, seçici ve verimli yüzeyler elde edilir.

Kendiliğinden Düzenlenme (Self-Assembly)

Yüzeyler kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (SAMs) ile fonksiyonelleştirilebilir [13]. SAM'ler organik moleküllerin çözelti ya da gaz fazından katı bir yüzey üzerine adsorpsiyonu veya bağlanması sonucu kendi kendine oluşur. Kendiliğinden

düzenlenme işlemi spesifik olmayan adsorpsiyon, elektrostatik etkileşimler, kovalent bağlanma ya da spesifik etkileşimler ile oluşabilir. Bu yöntem sonucunda yüzeyde 1-3 nm kalınlığında organik ince film oluşturulmuş olunur [14, 15]. Bazı organik bileşiklerin baş grupları bazı metallere, metal oksitlere ve yarıiletkenlere bağlanabilmektedir. Örneğin altın metalinin yüzeyine organik tiyol bileşikleri kolayca bağlanarak kendiliğinden-düzenlenen tek tabaka oluşturabilmektedir [16]. Kullanılan organik molekülün baş grupları yüzeye tutunurken uç gruplar fonksiyonelleştirilen yüzeyin özelliklerini belirlemektedir.

2.1.2. **Moleküler Tanıyıcı Ajanlar**

Biyosensörün moleküler biyotanıyıcı kısmı genellikle antikor, enzim, nükleik asit gibi doğal biyomoleküllerden oluşmaktadır. Bunlar dışında hücre membranlarındaki reseptörler hatta hücrenin kendisi bile tanıyıcı ajan olarak kullanılabilmektedir. Biyotanıyıcı kısım, saptanmak istenen analitin seçiciliğini belirlemektedir [17]. Bu bakımdan biyosensörün performansını doğrudan etkilediğinden biyotanıyıcı kısmın önemi büyüktür.

Antikorlar

Antikorlar immün sistem tarafından oluşturulan ve antijene kovalent olmayan etkileşimler ve yüksek afinite ile bağlanması için antijen tanıyıcı bölgeleri bulunan proteinlerdir. Antikorlar muhtemelen biyosensör çalışmalarında en sık kullanılan biyotanıyıcı ajandır. Antikorlar biyosensörün tasarımına göre sandviç yapıda da kullanılabilirler [18]. Bu tip biyosensörlerde antikorlar analiti yakaladıktan sonra etiketlenmiş diğer bir antikor analite bağlanır ve sinyal yaratır. Bu yöntem aynı zamanda daha güçlü bir sinyal elde etmek amacıyla ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) yönteminde de kullanılır. Klasik ELISA yönteminde biyolojik örneklerdeki proteinler için tayin limiti 1-10 pg/mL kadardır [19]. Yöntemde yüzeyleri birincil-antikor içeren 96 veya daha fazla kuyucuktan oluşan plaklar kullanılır. Bu yüzeyler ile örnekten istenilen analit proteinleri ayrılabilmektedir. Örnekteki antijenler yüzeydeki bu antikorlara bağlandıktan sonra spesifik olmayan bağlanmaları uzaklaştırmak için çeşitli deterjan çözeltileri kullanılır. Daha sonra etiketlenmiş ikincil-antikor, birincil-antikorun antijene bağlanmadığı farklı bir epitopa bağlanır. Yöntemde duyarlılığı arttırmak için enzimler, nanopartiküller,

manyetik partiküller gibi farklı etiketler kullanılabilmektedir [20-22]. Klasik ELISA yönteminde enzimler kullanılmakta olup, enzimin ortaya çıkardığı renkli tepkime ürünü optik yöntemler ile saptanır. Son zamanlarda üzerinde sıklıkla çalışılan diğer bir yöntem ise elektrokimyasal analizdir. Etiket olarak kullanılan HRP (horse radish peroxidase) enzimi redoks tepkimesi ile hidrojen peroksiti indirgemekte ve amperometrik, voltametrik ya da impedans yöntemleri ile analit saptanmaktadır [23].

Enzimler

Katalitik enzim temeline dayanan tanıyıcı ajanlar, katalitik tepkime sonucu birçok ölçülebilen tepkime ürünü oluştuğundan dolayı biyosensör uygulamaları için çok kullanılmaktadır. Bu tür tepkimeler sonucu açığa çıkan elektron, proton, ısı veya ışığın ölçümü ile analitin saptanması mümkün olmaktadır.

Yeşil Floresan Protein (green fluorescent protein, GFP) birçok sensör uygulamasında kullanılan bir biyomoleküldür [24]. GFP polipeptit zincirinin florofor bölgesi sayesinde proteinin kovalent modifikasyonuna gerek kalmamaktadır. Literatürde GFP'nin kullanıldığı sayısız biyosensör uygulaması bulunmaktadır. Tak ve ark. GFP kullanarak hedef gen ekspresyonundaki yanlış negatif-hata düzeltmesine yönelik yöntem geliştirmişlerdir [25]. Diğer bir çalışmada okside olmuş silikon alt-taşlar üzerindeki GFP'nin saptanmasına yönelik yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar optik girişim etkisini kullanarak GFP'nin floresan şiddetini 20 kat arttırmayı başarmışlardır [26].

Enzim tanıyıcı ajanlar içeren biyosensörlerden en bilineni hiç kuşkusuz ki glikoz biyosensörleridir. Diyabet hastaları için hayati önemi olan ve yaygın kullanıma sahip olan glikoz ölçüm cihazı ile hastaların kendisi kendi kan şekerini hızlı ve basit bir şekilde ölçebilmektedir. Ülkemizde yaklaşık 7 milyon, dünyada ise 285 milyon diyabetli bulunduğu ve bu sayının hızla artığı göz önünde bulundurulursa [27] taşınabilir glikoz biyosensörlerinin insanlık için ne kadar önemli olduğu daha iyi anlaşılabilir. En bilinen glikoz sensörlerinde tanıyıcı ajan olarak glikoz oksidaz enzimi kullanılmakta olup ölçüm amperometrik yöntem ile yapılmaktadır [28, 29].

Aptamerler

Nükleik asit ya da peptitlerden oluşan tek sarmallı kısa zincir şeklindeki yapılar aptamer olarak adlandırılmaktadırlar. Aptamer temelli sensörler için elektrokimyasal, optik ya da kütle duyarlı analitik tekniklerin kullanımı mümkündür. Günümüzde özellikle nükleik asit aptamerleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Nükleik asit aptamerlerinin biyosensör uygulamaları için tanıyıcı ajan olarak antikorlara göre birçok avantajı bulunmaktadır. Küçük boyutta olmaları, kimyasal olarak kararlı olmaları, yüksek bağlanma ilgisi ve spesifikliği, kolay modifiye edilebilmeleri ve uygun maliyetli olmaları bunlardan bazılarıdır [30]. Ayrıca diğer tanıyıcı ajanlarla karşılaştırıldığında oldukça seçici özelliğe sahiptirler. Özellikle nanomalzemeler ile oluşturulmuş aptamer biyosensörler diğer yöntemlerde olduğu gibi daha yüksek performans göstermektedir.

Çoğu aptamer, Ligandların Üstel Zenginleştirilmesi ile Sistematik Gelişimi olarak isimlendirilen SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) tümleşik seçim işlemi ile elde edilmektedir [31]. Selex sonucu üretilen aptamerler metal iyonları, çeşitli yüzeyler, vitaminler, aminoasitler, antibiyotikler, peptit ya da proteinler, hatta daha karmaşık yapılara, hücreler ve mikroorganizmalara bağlanabilir.

Moleküler Baskılanmış Polimerler (Molecularly imprinted polymers)

Biyosensör tasarımlarında tanıyıcı ajan olarak enzim, antikor ya da diğer biyolojik reseptörler sıkça kullanılmaktadır. Biyolojik tanıyıcı ajanlar yerine yapay polimerik malzemelerin kullanılması ile de biyosensörler geliştirilebilmektedir. Bu tür biyosensörler için yapay polimerlerin üzerine moleküler düzeyde baskılanmış kalıplar oluşturularak analit molekülünü tanıyıcı bölgeler oluşturulmaktadır. Polimerik malzemelerin kullanılmasının biyolojik ajanlara göre daha düşük maliyet, daha fazla fiziksel ve kimyasal kararlılık ve daha kolay hazırlanma yöntemi gibi avantajları bulunmaktadır [32, 33]. Moleküler baskılama teknolojisinde polimerik bir matriks içerisinde, spesifik tanıyıcı bölgeler baskılanacak kalıp moleküller tarafından kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimler ile düzenlenebilir. Çapraz bağlanma ko-polimerizasyonundan sonra çapraz bağlanmış matriksten baskılanmış moleküllerin uzaklaştırılması ile boyut, şekil ve fonksiyonellik olarak, baskılanmış molekülün kimyasal ve sterik bilgisini içeren analit molekülünü tanıyıcı

kavitelere sahip bölgeler elde edilmiş olunur. Bu yöntem biyosensörler dışında farmasötik, çevre bilimleri ve yaşam bilimleri gibi alanlarda da birçok uygulama bulmuştur [34-37].

2.1.3. **Biyosensör Türleri**

Biyosensörler analitin saptanmasında kullanılan dönüştürücülere göre dörde ayrılabilir. Kütle, sıcaklık, elektriksel ve optik değişimlerin ölçümüne dayanan bu yöntemler için geliştirilen birçok biyosensör türü bulunmaktadır.

Kütle Sensörleri

Kütle değişimini ölçmek üzere tasarlanan bu tip sensörlerde galyum fosfat, kuvars, kurşun magnezyum niyobat – kurşun titanat gibi piezoelektrik malzemeler kullanılmaktadır. Tanıyıcı ajan ile analitin etkileşimi sonucu oluşan mekanik stres kullanılan piezoelektrik malzeme ile elektrik yüküne ve en son sinyale dönüştürülerek veriler elde edilmektedir [38].

Kuvars Kristal Mikrobalans (Quartz Crystal Microbalance, QCM)

QCM sensörler en yaygın kullanılan kütle sensörleridir. Kuvars disk ve elektrotlardan meydana gelen sistemde oluşan elektrik alanın osilasyon frekansı kütledeki değişim ile birlikte farklılaşmaktadır. Frekanstaki bu değişim analiti saptamak üzere veriye dönüştürülmektedir [39-41].

Yüzey Akustik Dalga (Surface Acoustic Wave, SAW)

Bu tip biyosensörler, biyoreseptör ile hedef analitin etkileşimi sonucu oluşan toplam kütle değişimini yine piezoelektrik dönüştürücü kullanarak ölçmektedir. SAW sensörler elektrik sinyalini mekanik dalgaya dönüştürdükten sonra bu dalgayı tekrar elektrik sinyaline dönüştürerek veri elde ederler. Reseptör ile analit etkileşimi, giren ve çıkan elektrik sinyalleri arasındaki genlik, frekans, faz ya da zaman gecikmesi ölçümleri ile elde edilmektedir [42, 43]. SAW sensörler, QCM sensörlerden daha duyarlı olmasına rağmen biyolojik çözeltilerde akustik dalgalar sönümlenebildiği için çalışmasında bazı sınırlamalar bulunmaktadır.

Mikro-nanomekanik kantileverler (Micro- and nanomechanical cantilevers)

Mikro-nanomekanik kantileverler günümüz elektronik endüstrisinin silikon üretim teknolojisi kullanılarak üretilebilmektedir. Bu kantileverler normal koşullarda belli frekansta titreşim hareketi yapmakta iken yüzeydeki biyoreseptörler ile analit molekülleri bağlandığında meydana gelen kütle artışı kantileverin titreşim frekansını değiştirmektedir. Daha sonra bu frekans değişimi bilgisayar ile veriye dönüştürülmektedir [44, 45].

Kalorimetrik Sensörler

Kalorimetrik sensörler egzotermik (ısı yayan) tepkimeler sonucu açığa çıkan ısıyı hassas bir şekilde saptayan sensörlerdir. Enzimatik tepkimeler gibi birçok tepkime egzotermiktir ve açığa çıkan ısı ölçülerek analit miktarı bulunabilir. Fakat bu sistemlerde çevre ile ısı yalıtımının iyi yapılması gerekmektedir [46, 47].

Optik Sensörler

Optik sensörler birçok avantajı olmasından dolayı üzerinde çokça çalışılan alanlardan biridir. Optik dönüştürücüler diğer yöntemlere göre oldukça hızlı çalışmaktadır. Ayrıca diğer yöntemlerde bulunan voltaj dalgalanmaları, harmonik indüksiyon, elektrotların korozyonu, radyo frekans girişimleri gibi dezavantajlar optik dönüştürücülerde bulunmamaktadır. Analitin saptanması kırılma indisi, kemilüminesans tepkime oluşumu, floresan ışıma, enerji transferi, optik emisyon özellikleri ve saçılım gibi özelliklerdeki değişimler ölçülebilmektedir [48].

Yüzey plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance, SPR)

SPR olayı bir metal ile dielektrik malzeme ara yüzeyinde oluşmaktadır. Yüzeye gönderilen ışığın ve yüzey elektronlarının salınım frekanslarının eşleşmesi ile birlikte yansıyan ışığın miktarındaki azalma ölçülür. Metal yüzeyine analitin tutunması ile rezonans açısı değişmekte ve bu durum derişim arttıkça artmaktadır. Bu olaydan yararlanılarak SPR rezonans açısını takip eden kantitatif biyosensörler geliştirilmiştir [49, 50].

Floresans (fluorescence)

Floresans, yüksek duyarlılığından dolayı optik dönüştürücüler arasında en çok kullanılanıdır. Ayrıca floresans temelli metotlarda SPR ya da kırınım indeksi temelli

metotlardaki gibi girişim problemleri bulunmamaktadır. Ancak çoğu durumda analiz için floresans yeterli olmayıp etiketleme için florojenik raporlayıcılar kullanılmaktadır. Florojenik raporlayıcıların şiddetine bakılarak analitin derişimini saptamak mümkündür. Floresans ile analitin saptanması farklı yöntemler ile birleştirilebilir. Örneğin akış sitometresi (flow cytometry) veya mikroakışkan sistemler ile birlikte ya da biyoçip sistemlerinde kullanılabilir [51].

Kemiluminesans (chemiluminescence)

Kemiluminesans optik sensör teknolojisinin bir türüdür. Çeşitli kimyasal tepkimeler sonucunda ürün belli dalga boyunda karakteristik bir ışık yayar. Bu ışık şiddeti ile analit miktarı arasındaki ilişkiden analitin kantitatif tayini yapılabilmektedir. Kemiluminesans teknolojisinde en çok kullanılan kimyasallardan birisi luminoldur. Luminol kimyasal bir tepkime ile yükseltgendiği zaman 428 nm dalgaboyunda karakteristik mavi ışık yaymaktadır. Kemiluminesans dönüştürücünün avantajı arkaplan gürültüsünün kuramsal olarak neredeyse sıfır olması, sinyal/gürültü oranının yüksek olmasıdır. Fakat pratikte spesifik olmayan bağlanmalardan dolayı az miktarda gürültü oluşmaktadır. Çoklu yıkama ve etiketleme adımları ile bu problemin üstesinden gelinebilmektedir [52, 53].

Elektrokimyasal Sensörler

Elektrokimyasal dönüştürücüler biosensör uygulamalarında kullanılan en popüler dönüştürücülerden birisidir. Elektrokimyasal yöntemler ile hareketli kompleks ortamlarda analiz yapılabilmektedir. Ayrıca maliyeti oldukça düşüktür ve minyatürize edilebilmektedir. Elektrokimyasal yöntemler genel olarak Potansiyometrik, amperometrik ve impedans yöntemleri olmak üzere üç alt kategoriye ayrılabilir. Potansiyometrik yöntemlerde, genellikle enzimler tarafından üretilen elektroaktif türlerin potansiyelde yarattığı değişiklikler ölçülmektedir. Amperometrik yöntemlerde, tepkimelerin akımda yarattığı değişiklik direkt olarak ölçülmektedir. İmpedans spektroskopisi de denilen impedans yöntemlerinde, uygulanan kontrollü alternatif akım (AC) sinyali ile birlikte akım ölçülmektedir. Böylece arayüzeydeki yük transferi, kapasitans gibi yüzey özellikleri ölçülebilmektedir [54, 55].

Elektrokimyasal yöntemlerin farklı bir türü de Alan Etki Transistörleridir (Field Effect Transistors, FETs). Yarıiletken malzemedeki iki elektrot (source ve drain) arasındaki iletkenliği üçüncü bir elektrot (gain) ile elektrik alanı kullanarak kontrol eden bu sistemlerin gürültü oranı oldukça düşüktür. MOSFET (*metal–oxide–semiconductor field-effect transistor*), ISFET (ion-sensitive field-effect transistor), JFET (Junction gate field-effect transistor) gibi türleri bulunmaktadır [56].

2.1.4. **Sensör Karakteristikleri**

Farklı tür biyosensörler farklı karakteristik özelliklere, avantaj ve dezavantajlara sahip olabilmektedir. İdeal bir biyosensörden beklenen özellikler aşağıda sıralanmıştır [57].

Analiz Zamanı: Analiz süresinin mümkün olduğunca kısa olması tercih edilmektedir, gerçek-zamanlı cevap verebilen sensörler çok daha avantajlıdır.

Duyarlılık (Sensitivity): Duyarlılığı yüksek bir analiz, hedef analitin daha düşük derişimlerde tespit edilebilmesine imkan vermekte, negatif hatayı azaltmaktadır.

Spesifiklik (specificity): Spesifikliği yüksek bir analiz, hedef analit ile analite benzer diğer türler arasındaki ayırma gücü yüksek olan bir analizdir ve pozitif hata oranı azdır.

Tekrar üretilebilirlik (Reproducibility): Biyosensörün kolay kalibre edilebilmesi, güvenilir analiz yapabilmesi için tekrar üretilebilir olması gerekmektedir.

Doğruluk (Accuracy): Bir biyosensör pozitif ve negatif hataları minimum olacak şekilde doğru ölçüm yapmalıdır.

Dayanıklılık (Robustness): Bir biyosensör sıcaklık, nem, pH, elektronik girişimler gibi çevresel faktörlerden etkilenmemelidir.

Maliyet (Unit and operational costs): Düşük maliyetli kimyasallar ve yöntemler kullanılarak üretilen biyosensörler, daha geniş çaplı uygulama alanı bularak yaygınlaşmasını sağlayacaktır.

Boyut ve Ağırlık: Biyosensörlerin minyatürize edilmesi tercih edilmektedir. Taşınabilir olması alan uygulamaları açısından önem arz etmekte olup ayrıca başka sistemler ile birleştirilebilme olanağı olmaktadır.

Yenilenebilirlik (Regeneration): Tek kullanımlık sistemler genellikle yeterli olmakla birlikte, bağlanma yüzeyinin yenilenerek aynı sensör ile çoklu ölçümler alınabilmesi tercih edilmektedir.

Çoklu tespit (Multianalyte detection): Bir biyosensörün eş zamanlı olarak birden fazla analiti saptaması tercih edilmekte ve birçok avantajı bulunmaktadır. Maliyetin düşürülmesi, zaman, boyut ve ağırlıktan tasarruf etme bunlardan bazılarıdır.

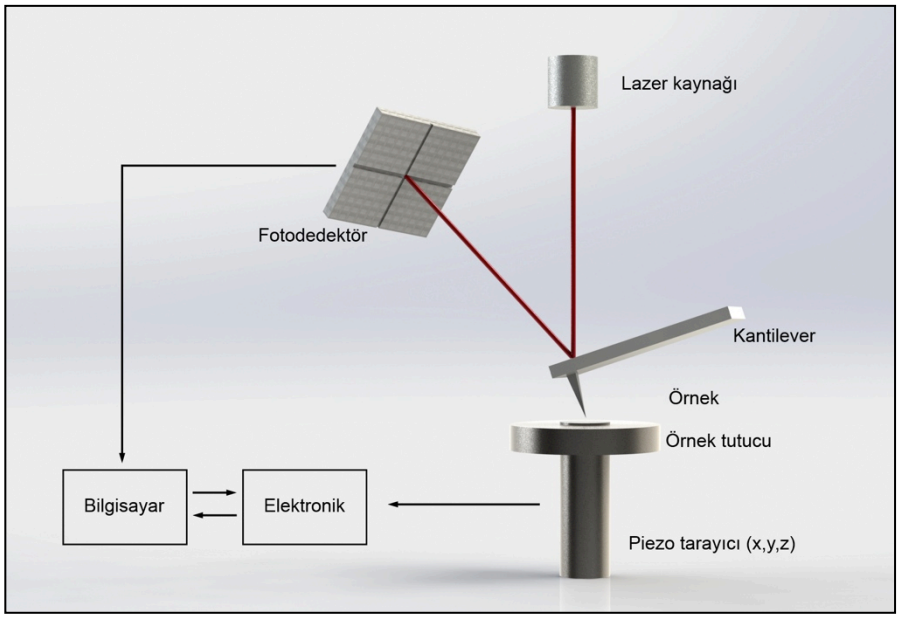
Kullanım kolaylığı (User interface): İdeal olarak tam otomatik olan sistemler tercih edilmektedir. Ya da kullanıcı becerisinin en düşük düzeyde yeterli olacağı şekilde üretilen sistemler tercih edilir.

2.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu

Atomik kuvvet mikroskobu (AKM) 1986 yılında Binning, Quate ve Gerber tarafından bulunmuş bir taramalı mikroskop çeşididir ve geliştirilmesini takiben oldukça ilgi görmüş ve kullanımı hızla artmıştır. Atomik kuvvet mikroskobuna olan ilgi sadece yüzey görüntülemekle sınırlı kalmamış ayrıca mekanik kuvvetler ve moleküler etkileşimlerin incelenmesi de oldukça ilgi görmüştür [58].

AKM'de kantileverin uç kısmına yerleştirilmiş çok sivri bir uç bulunmaktadır. Standart bir kantilever kısaca mikrometre boyutlarında, bir tarafı sabitlenmiş ve diğer tarafı ise askıda serbest duran bir kiriş olarak tanımlanabilir. Kantileverin ucu ise nanometre boyutlarında çapa sahiptir ve örnek yüzeyinde hareket ettirilen uç ile örnek arasında atomlar arası kuvvetler oluşmaktadır. Uç örnek yüzeyinde belirli koordinatlarda hareket ettirilerek tarama işlemi gerçekleştirilmekte ve tarama sırasında oluşan atomlar arası kuvvetler kaydedilerek örnek yüzeyinin

topografyası çıkarılmaktadır. Kantilever yüzeyine bir lazer kaynağından ışın demeti gönderilmekte ve bu lazer ışını kantilever yüzeyinden yansıyarak bir foto-dedektöre ulaşmaktadır. Uç ile örnek arasında oluşan atomlar arası kuvvetler kantileverde bükülmeye veya kantileverin rezonans frekansında kaymaya neden olmaktadır. Kantileverde gerçekleşen bükülme ve frekans kaymaları foto-dedektör üzerine düşen lazerin yerinin değişiminden saptanabilmektedir [59, 60]. Şekil.2.4'de atomik kuvvet mikroskobunun temel bileşenleri ve çalışma prensibi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.4. AKM'nin temel bileşenlerinin gösterimi

Diğer tekniklerden farklı olarak AKM, yüzey ve uç arasındaki etkileşimlerle ilgilendiği için örneğin iletken olup olmamasından bağımsız olarak görüntü almak mümkündür. Ayrıca AKM'nin nano boyuttaki tarama ucu sayesinde yüzey topografyasının görüntülenmesinde sistemin üç boyutlu çözünürlüğü nanometre altı çözünürlüklere çıkmaktadır [59].

AKM sadece katı yüzeylerin yüksek çözünürlükte topoğrafik görüntüsünün elde edildiği bir yöntem değil, aynı zamanda kuvvete karşılık mesafe eğrileri sayesinde malzemelerin sertlik, elastikiyet, adezyon ve yüzey yük yoğunlukları gibi birçok özelliği hakkında bilgi elde edilebilen bir yöntemdir [61].

Sulu ve fizyolojik koşullar altında çalışabilmesi ve yüksek yanal nanometre altı çözünürlüğü gibi üstün özellikleri sayesinde AKM biyolojik süreçlerin incelenmesi [62] ve tek molekül deneylerinin gerçekleştirilmesi için hızla gelişmiştir [63]. Son yıllarda kimyasal olarak modifiye edilmiş AKM uçları kullanılarak gerçekleştirilen tek molekül tanıma çalışmalarına artan bir ilgi gözlenmektedir. Genellikle bu tip çalışmaların önündeki en büyük engel AKM ucunun modifikasyonudur. Genellikle problemler modifikasyon basamaklarının kontrol edilmesindeki güçlüklerden kaynaklanmaktadır. Bu da tek molekül etkileşimlerinin ölçümlerini etkilemektedir [58].

2.2.1. **Atomik Kuvvet Mikroskobunun Temel Bileşenleri**

Genel bir AKM sisteminin temel bileşenleri çok sivri bir uç probu bulunan yumuşak bir mikro-kantilever yay (genellikle silisyum veya silisyum nitrür'den üretilmektedir), örneği tutacak katı substrat yüzeyi, x-y-z eksenlerinde örneğin hareketlerini nanometre boyutunda kontrol eden bir piezoelektrik tarayıcı, bir lazer kaynağı, mikro-kantileverin bükülmesini ve frekans cevabını ölçen konum duyarlı bir foto-dedektör, örneğin z – konumunu kontrol eden bir geri besleme elektroniği ve elektroniği kontrol eden, verileri kaydeden görüntüleyen ve analiz eden bir bilgisayardan oluşmaktadır [59].

AKM'de örneğin yüzeyi, ucun yüzey üzerinde taratılması ile incelenir. Uç ve yüzey etkileşimlerini ifade eden ucun pozisyonu, kantilever üzerinde lazer demetinin yansımasındaki sapmanın ölçülmesi ile izlenmektedir. Bu yansıyan ışın demetleri pozisyon duyarlı kuadrant fotodiyot ile ölçülmektedir. Taranan yüzey üzerindeki her nokta için (x,y), kantileverin pozisyonu (z) bilgisayar ve elektronik sistem tarafından kaydedilir.

Substrat yüzeyini incelemede genellikle AKM'nin iki temel modu kullanılmaktadır. Temaslı modda uç, örnek ile sürekli temas halindedir ve yüzeydeki en küçük değişime oldukça hassas durumdadır. Diğer taraftan, dinamik modda ise rezonans frekansında salınım yapan uç ile yüzey taranmaktadır. Tarama sırasında tıklama hareketini yapan uç ile örnek arasındaki temas lazerdeki sapmadan gözlenen kantileverin titreşim genliğinde bir azalmaya yol açar. Bu temel AKM modlarının

yanında farklı fiziksel etkileşimlerden yararlanan ve birkaç modu bir arada kullanan çalışma prensipleri de geliştirilmiştir. Örneğin manyetik modda (MAC), kantilever direkt olarak alternatif bir manyetik alan ile sürülmektedir [64-66]. Salınımlı kuvvet mod AKM (PFM-AFM, Pulsed-Force Mode AFM)'de ise kantileverin ve tarayıcının rezonans frekanslarından çok daha düşük bir frekansta periyodik olarak AKM ucunun ve örneğin temas ettirilerek ve ayrılması ile tıklama gerçekleştirilir [67, 68].

2.2.2. **Görüntüleme**

AKM'nin ilk uygulamaları yüzeylerin genellikle atmosferik basınç, vakum veya gaz halindeki koşullarda görüntülenmesi olmuştur. AKM'nin sulu koşullarda görüntü alabilme yeteneği kazanması çok çeşitli biyolojik sistemlerin araştırılmasına olanak sağlamıştır [69]. Biyomoleküler görüntüleme çalışmaları için temaslı ve dinamik modlar kullanılmıştır. Temaslı modun daha yüksek çözünürlüklü görüntüler sağlamasına rağmen substratta bozulmaya yol açmaması için taranan örneklerin yüzeye çok düzgün bir biçimde immobilize edilmiş olmaları gerekmektedir. Alternatif olarak tıklamalı mod moleküler hareketleri ve deformasyonu azaltmakta ve bu nedenle fizyolojik koşullar altında izole edilmiş biyolojik moleküllerin daha yüksek doğrulukla incelenmesine olanak sağlamaktadır [58].

AKM ile gerçekleştirilen yüksek çözünürlüklü biyomoleküler görüntülemelerde DNA ve RNA gibi tek moleküllerden biyolojik membran, membran proteinleri, hücre yüzeyleri, antikorlar, virüsler ve bakteriler gibi biyolojik yapılanmalara, dokulara ve organlara kadar birçok çalışma gerçekleştirilmiştir [70-75]. Bu çalışmaların bir çoğunda yanal çözünürlük için 100nm ve dikey çözünürlük için ise 10nm'lik sonuçlar alınmıştır.

Tüm bunların yanında biyomoleküllerin kendi doğal çevrelerinde görüntülenebilmeleri RNA transkripsiyonu veya membran proteinlerinin konformasyonal değişimleri gibi bazı biyokimyasal süreçlerin görselleştirilmesini mümkün kılmıştır [76, 77].

2.2.3. **Kuvvet Spektroskopisi**

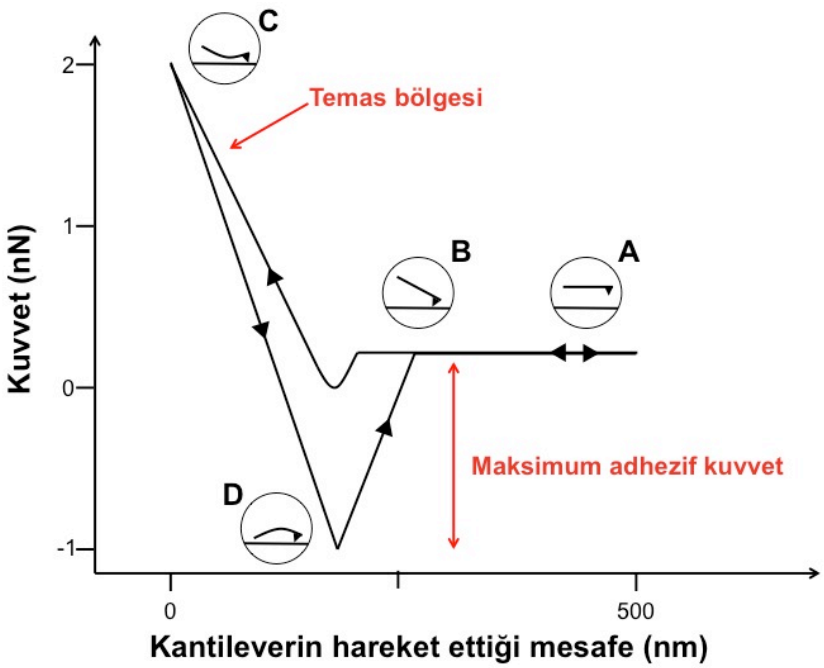
Kuvvet spektroskopisinde uçlar kimyasal olarak modifiye edilerek spesifik moleküler etkileşimlere duyarlı hale getirilir. Bu şekilde uç ve örnek arasında oluşan kuvvetleri ölçmek ve kimyasal duyarlı görüntüleri incelemek mümkün olmaktadır.

Kimyasal Kuvvet Spektroskopisi

Kimyasal kuvvet spektroskopisinde [78] AKM uçları spesifik kimyasal fonksiyonel gruplar kullanılarak ve genellikle kendinden oluşan tek tabakalı (SAM) yüzeyler oluşturularak [79-81] modifiye edilir. Kimyasal kuvvet mikroskopisi prob ucundaki fonksiyonel gruplarla yüzeydeki ilgilenilen grupların arasında oluşan hidrofobik-hidrofilik etkileşimler, hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri, kolombik etkileşimler, π-istiflenmeleri gibi etkileşimler sonucu oluşan adhezyon veya sürtünme kuvvetlerinin ölçümüne dayanmaktadır. Bu şekilde modifiye uç farklı kimyasal fonksiyonelliğe sahip bölgelerde bir kontrast oluşturmakta ve yüzeydeki konumsal dağılımlar haritalanabilmektedir.

Tek Molekül Tanıma Kuvvet Spektroskopisi

AKM kuvvet algılama hassasiyeti olan bir teknik olduğundan tek molekül seviyesinde de spesifik etkileşim kuvvetlerini algılayabilmektedir. Tek molekül tanıma kuvvet mikroskopisi (SMRFM, ing: Single Molecular Force Recognition Microscopy) adı verilen bu teknikte uçlar yüzeydeki spesifik türde hedef molekülü tanıyabilmesi amacıyla bir veya birkaç tanıyıcı molekül ile fonksiyonelleştirilir.



Şekil 2.5. Tipik kuvvet – mesafe ölçüm döngüsünün şematik gösterimi

Şekil 2.5'te verilen daireler içerisinde gösterilen kantilever davranışları sırasıyla şöyledir:

A) Uç yüzeye doğru yaklaşıyor
B) Uç yüzeyle temas ediyor
C) Yaklaşma hareketi sonunda uç örnek yüzeyine bastırılıyor (maksimum yük noktası)
D) Örnek ile uç arasında maksimum adezyon kuvvetlerinin oluştuğu noktaya kadar uç yüzeyden uzaklaşıyor.

2.3. Kantilever Bazlı Biyosensörler

Kantilever bazlı biyosensör sistemlerinin ortaya çıkmasında ve sonrasındaki gelişim sürecinde birbirinden bağımsız iki farklı teknolojinin geliştirilmesi ön plana çıkmaktadır. Bunlardan ilki sensör sisteminin temelini oluşturan AKM'dir. Binning ve Quate ultra küçük bir kütleye sahip kantilever kirişinin hareketini ölçmek için bir taramalı tünelleme mikroskobu (TTM) kullanmışlardır. Bu çalışmalarında, kantileverin üzerine yerleştirilmiş sivri uç ile örnek yüzeyi arasında yaklaştıkça oluşan kuvvetleri ölçerek, örnek yüzeyi üzerinde bir alan taraması yapmışlardır. Bu şekilde yüzeyin görüntüsünü elde ettikleri AKM sistemini geliştirmişlerdir [82]. Bu buluşlarını takiben gerçekleştirdikleri çalışmalarda elde ettikleri ölçülebilir en düşük kuvvet değerlerini arttırabilmek adına daha düşük kütleli ve rezonans frekansı 2 kHz'den daha yüksek kantileverlerin üretilmesi gerekliliğini tartışmışlardır.

Bu noktada önem kazanan diğer bir anahtar teknoloji ise mikrofabrikasyon teknikleridir. AKM ölçümleri için hazırlanmış entegre uca sahip SiO_2 ve Si_3N_4 bazlı mikroişlenmiş kantileverlerin üretimi için birkaç yöntem 1990 yılında Stanford Üniversitesi'nde Albrecht ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur [83]. Daha sonrasında tek kristal silikondan yapılmış mikroişlenmiş kantileverler için ıslak ve kuru aşındırma tekniklerini içeren bir seri üretim yöntemi Woller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [84].

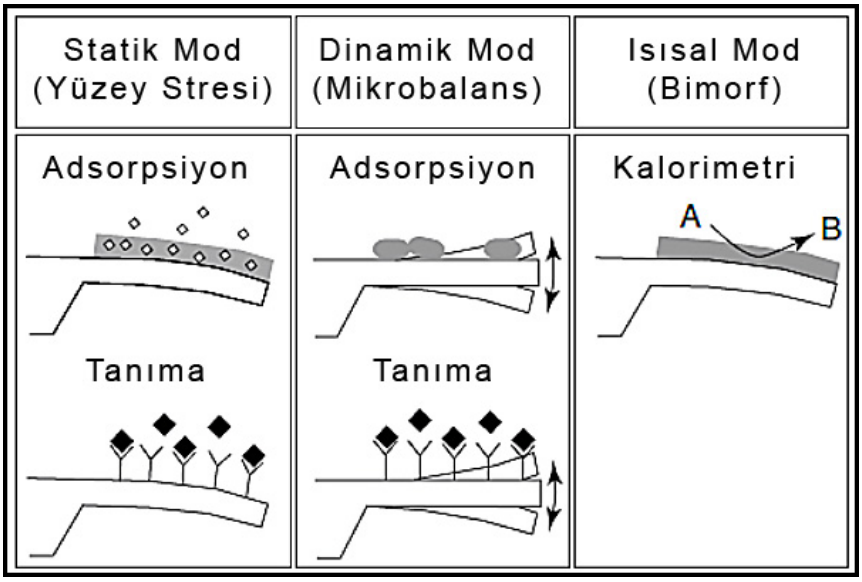
Böylece AKM ve mikrofabrikasyon teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte moleküler algılama için mikrokantilever çalışmaları başlamış ve yıllar geçtikçe ilgili araştırma alanları da genişleyerek artmıştır. Özellikle son yıllarda medikal teşhis, ulusal güvenlik ve çevresel analiz alanlarında çok çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Mekanik sensörler, sensörlerin mekanik özelliklerdeki değişimlere duyarlı bir alt sınıfıdır. Kantileverler ise moleküler etkileşimleri mekanik harekete çeviren sinyal dönüştürücülerdir. Kantileverler gibi mekanik sensörler mikro-işleme teknolojileri ile birleştiklerinde moleküler algılama uygulamalarında önemli roller üstlenmektedirler. Geçtiğimiz yıllarda kantilever sensörler biyosensör uygulamaları alanında ilgi çekici ve umut vaat eden bir teknoloji olarak yerini almıştır [85]. Piezoelektrik ve piezodirenç prensipleri ise bükülme ve kütle değişimlerine oldukça hassas tepkiler sağlayan regülasyon sistemlerinde kullanılmışlardır. Optik ve diğer elektriksel ölçümler de ayrıca özel uygulamalar için oldukça önemlidirler [86].

Kantileverler tek molekül seviyelerinde kuvvetlerin ölçümlerini mümkün kılmıştır [87]. Tek bir antikor-antijen tanıma olayı için ayrışma kuvveti 244 ± 22 pN olarak ölçülmüştür. Sırasıyla 20, 16 ve 12 baz çiftinin etkileşim kuvvetleri 1.52, 1.11, 0.83 nN olarak ölçülmüştür [88]. Birkaç avidin-biyotin bağı için ayrılma kuvveti 160 ± 20 pN'un katları olarak saptanmıştır [89]. Ayrıca iyonik ve van der Waals etkileşimlerinin de ölçülebilir kuvvet sınırları içerisinde oldukları teorik olarak hesaplanmıştır [90].

Mikroyapılar kullanılarak biyomoleküllerin algılanması ölçülebilir mekanik değişimlere yol açan moleküler adsorpsiyona dayanmaktadır. Minyatür boyutları,

hızlı tepki vermeleri, yüksek hassasiyetleri ve etiket gerektirmemeleri sayesinde mikro kantileverlerin moleküler algılama yetenekleri gerektiren çip üzerinde laboratuvar (*ing: lab on a chip*) veya hasta başı test (*ing: point of care*) tasarımlarıyla entegrasyonu mümkün olmuştur. Yapılan çalışmalarda; sıcaklık ve pH değişimlerini, iyonları, nükleik asitleri, proteinleri, bakterileri ve virüsleri algılayabilen birçok farklı kantilever bazlı biyosensör sistemi geliştirilmiştir [91, 92]. Kantilever bazlı sensör sistemlerinde analit molekülü kantilever yüzeyinde tutuklanmış reseptörlere bağlandığında sistemin kütlesinde bir artışa sebep olmakta ve iki değişim oluşmaktadır. Bu değişimlerin her ikisi de ölçülebilmekte ve istenilen molekülün veya molekül grubunun varlığının saptanması için kullanılabilmektedir. Statik mod olarak adlandırılan yöntemde kantileverin yüzey stresine bağlı kantilever bükülmesi ölçülmekte ve dinamik mod olarak adlandırılan sistemde ise kütle değişimine bağlı olarak kantileverin rezonans frekansında oluşan değişim veya kayma ölçülmektedir [85].



Şekil 2.6. Kantilever yüzeyinde gerçekleşen etkileşimler sonucu kantileverde oluşan değişimlerin şematik gösterimi

Şekil 2.6'da şematik olarak gösterilmiş olan kantileverlerde görüldüğü üzere, statik modda kantileverin bir yüzeyine tutuklanmış tanıma (algılama) moleküllerine analit moleküllerinin bağlanması kantilever yüzey stresinde değişime ve kantileverin bükülmesine sebep olmaktadır [93]. Statik mod algılaması gaz ve sıvı ortamda

biyomoleküler etkileşimlerin gerçek zamanlı olarak saptanabileceği etiket gerektirmeyen bir yöntem oluşturmaktadır.

Dinamik modda ise analit ve reseptör moleküllerinin bağlanması salınım yapan kantilevere ilave bir kütle eklenmesine ve böylece rezonans frekansında bir azalmaya sebep olur. Dinamik mod gaz fazında efektif bir şekilde çalışmaktadır, bununla birlikte daha çok vakum ve nemlendirilmiş gaz ortamında tek bir bakteri ve virüsün varlığının saptanabileceği ve mikroorganizmaların kantilever yüzeyinde büyümesinin izlenebileceği uygulamalar için bir yöntem sağlamaktadır. Bununla birlikte reseptörlere biyolojik ligandların bağlanmasının dinamik algılama ile izlenmesi işlemi sıvı fizyolojik ortam içerisinde gerçekleşmesi nedeniyle daha güçtür. Sıvı ortamda salınım viskoz sönümleme tarafından engellenmektedir [94]. Sıvı ortamda algılama ve etkileşimin sinyale dönüştürülmesi işlemlerindeki güçlüklerin giderilmesi amacıyla sensörün boyutlarının küçültülmesi, sıvı hacminin düşürülmesi ve rezonans frekansının düzenlenmesi gibi farklı modifikasyonlar üzerinde çalışılmıştır [95, 96].

Kantilever sensörlerde algılama prensipleri nedeniyle etiketleme gibi ön işlemlere ve bununla birlikte pahalı kimyasalların kullanımına gerek duyulmamaktadır. Bazı biyolojik moleküller için kimyasal yapıları veya örnek alma ve teşhis edilme işlemleri sırasındaki koşulları nedeniyle özellikle işaretlenmeden direkt olarak saptanma ihtiyacı bulunmaktadır. Kantilever sensörler kullanılarak çeşitli moleküller için etiket gerektirmeyen tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Cyanovirin gibi proteinler [97], prostat spesifik antijen [98], oxytetracycline gibi antibiyotikler [99], atrazine [100], trimetilamin [101] ve mikotoksin [102] çalışmaları buna örnek olarak verilebilir. Bunun yanında küçük boyutları ve yüksek yüzey/hacim oranları sayesinde bu teknoloji yüksek bir hassasiyete sahiptir. Mikrokantilever sensörler erken dönem kanserlerin teşhisinde, virüslerin varlığının saptanması ve en düşük uyarıcıya bile tepki vermesi gereken benzer birçok uygulamada kullanılabilmektedir. Kantilever bazlı sensörler DNA hibridizasyonu gibi devam eden süreçleri algılama [103] ve tek nükleotid uyumsuzluğunun saptanması gibi bir çok moleküler biyoloji uygulamasında da kullanılmışlardır [72, 104]. Piezo-dirençli kantilever çipleri kullanılarak streptavidin - biyotin etkileşimi üzerinden kendi algılamasını gerçekleştiren biyosensör çalışması Chen ve arkadaşları tarafından

çalışılmıştır [105]. Bu çalışma kantilever üzerine bağlanan moleküllerin yüzeyde yaratmış olduğu gerilime bağlı olarak kantileverin bükülme özelliklerinde farklılıklar oluşturduğunu göstermiştir. Birbirini çeken grupların yüzeyde etkileşimi kantileveri negatif (🡻) yönde bükerken birbirini iten grupların kantilever üzerinde pozitif (🡹) yönde bükülme eğilimi oluşturduğu gözlenmiştir. Bu elde edilen sonuçların yorumlanmasını zorlaştırmaktadır.

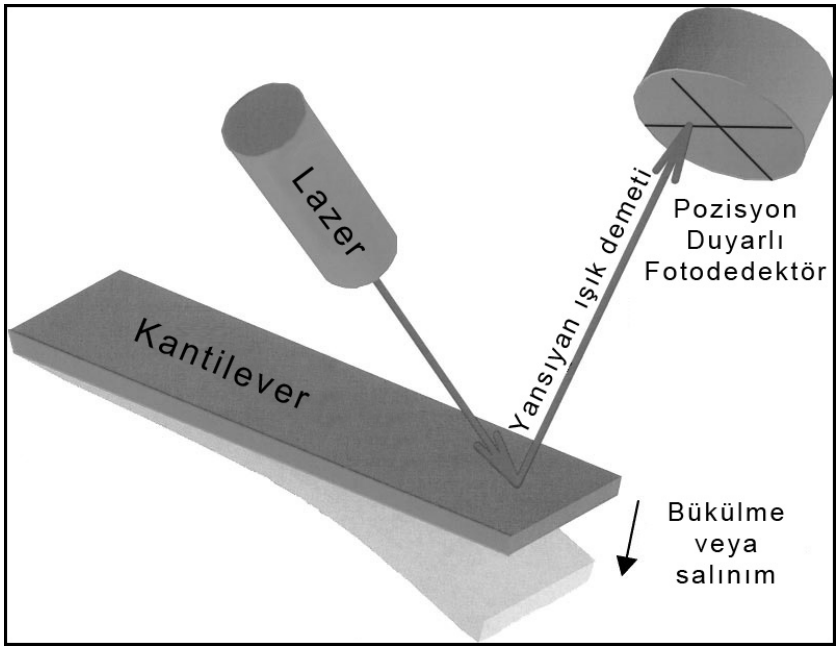
Ayrıca kantileverler diziler halinde üretilebilirler ve böylece kendi iç referans sensörleri sayesinde spesifik olmayan sinyalleri engelleyerek aynı anda çoklu örnek tayininde kullanılabilirler [106].

Konvansiyonel analitik tekniklerle karşılaştırıldığında, kantilever sensörlerin basit prosedür, hızlı tepki süresi, yüksek hassasiyet, düşük örnek tüketimi ve çoklu türlerin aynı anda izlenebilme potansiyeli gibi birçok avantajı bulunmaktadır.

Sıra dışı bir örnek olarak karbon nanotüp bazlı kütle sensörü 1.7×10^{-24} g gibi düşük değerlere ulaşarak bir ksenon atomunun bağlanma enerjisini ölçülebilir kılmıştır [86]. Çok daha büyük moleküler ağırlığa sahip olan proteinler (örneğin IgG antikorunun molekül kütlesi yaklaşık olarak 2.5×10^{-19} g/moleküldür) ile karşılaştırıldığında tek molekül algılamasının biyomoleküllerin çoğu için mümkün olacağını söylemek mümkündür. Fakat bunun yanında her analit için farklı ölçüm ihtiyaçları bulunmaktadır. Örneğin protein derişimleri tipik olarak sıvı içerisinde ölçülmektedir ve bir nanotüp sensörü sıvının yüksek viskozitesi nedeniyle çalışmayacaktır. Bu nedenle hassasiyet limitleri öncelikle algılama şemasının konfigürasyonuna göre belirlenmektedir [86].

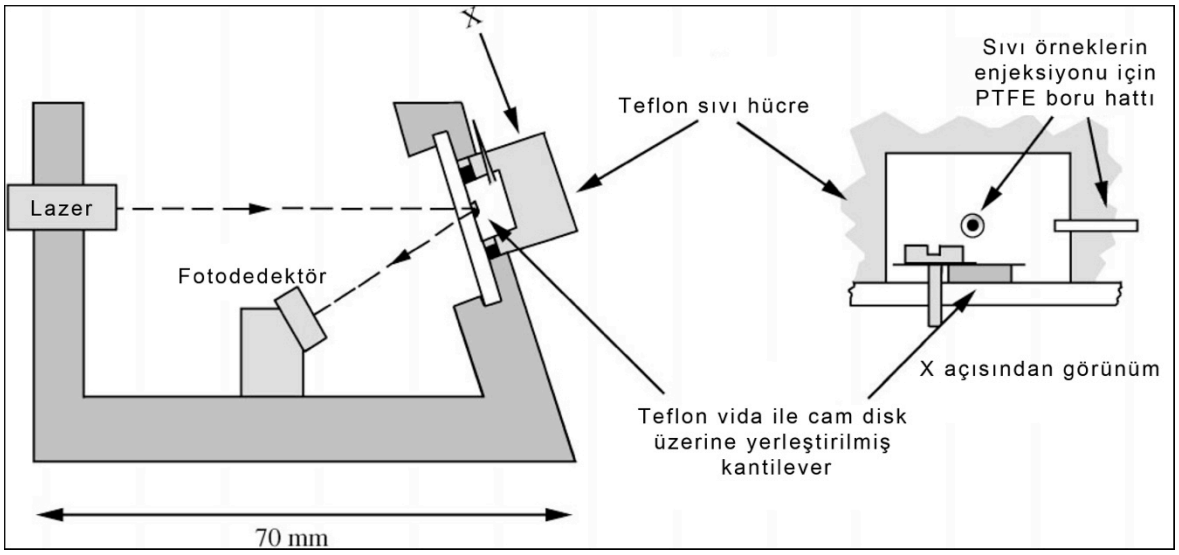
Kantilever bazlı biyosensör sistemlerinde oluşan mekanik değişimleri sinyale dönüştürmek amacıyla optik, piezoelektrik, piezodirenç, interferometri, kapasitans ve elektron tünelleme yöntemleri kullanılmaktadır [94, 107]. Bu yöntemlerin her biri diğerine sistemin içinde bulunduğu ortama, bükülmenin kaynağına ve uygulama alanına bağlı olarak farklı üstünlükler sağlamaktadır. Buna rağmen genel olarak tüm bu yöntemlerin gerekli olan sinyali üretme bakımından yeterli oldukları gösterilmiştir. Şekil 2.7'de gösterilen optik okuma yöntemi en temel ve standart kabul edilen yöntem olmakla birlikte temel prensibi kantilever üzerine düşürülen

lazer ışın demetinin yüzeyden yansıdıktan sonra pozisyon duyarlı foto-dedektörde (PSD) algılanması ve kantileverde bükülme veya salınım gerçekleştiğinde foto-dedektördeki sapmaların dijital sinyale dönüştürülmesi ilkesine dayanmaktadır.



Şekil 2.7. Kantilever bazlı biyosensör sistemlerde optik okuma yöntemi ile sinyal elde edilmesi.

Kantilever bazlı biyosensör sistemleri, biyolojik numunelerin analiz edilebilmeleri için uygun fizyolojik ortamda bulunması gereksinimi nedeni ile sıvı hücreye ihtiyaç duymaktadırlar. Sıvı hücrenin doğru çalışabilmesi kantilever yüzeyinden yansıyan lazer ışın demetinin fotodedektöre ulaşmasını engellemeyecek bir yapıda, sıvı sızdırmazlığı sağlanmış, biyolojik örneklerle etkileşime girmeyen bir malzemeden yapılmış olmasına bağlıdır. Literatürde çok çeşitli sıvı hücre tasarımları bulunmaktadır bununla birlikte en genel sıvı hücre konumlandırılması ve yapısı Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Sıvı hücre sistemi şematik gösterimi.

Şekilde görülen sıvı hücre sisteminde bir cam disk üzerine yerleştirilmiş kantilever tamamen sıvı içerisinde kalacak şekilde konumlandırılmıştır. Kantileverin sabitlenmesinde ve sızdırmazlığın sağlanması amacıyla sistemin izolasyonunda biyolojik ve kimyasal olarak inert oluşu nedeni ile teflon kullanılmıştır. Sisteme örnek enjeksiyonu ve sıvıların uzaklaştırılması için PTFE borular kullanılmıştır [108].

2.3.1. **Kantilever Modifikasyonları**

Silikon veya silikon nitrürden yapılmış ve ticari olarak satılan AKM uçları kantilever bazlı sensör araştırmalarında geniş ölçüde kullanılmıştır [109-116]. Sensör uygulamalarında kullanılacak kantileverlerin yapısal ve geometrik özellikleri AKM'de kullanılanlarla oldukça benzerdir. Kalınlıkları 0.5 - 5 μm, uzunlukları 100 – 500 μm ve yay sabitleri de 10 – 0.01 Nm^{-1} aralıklarında bulunan kantileverler her iki sistem için de kullanılmaktadır.

Kullanılan kantileverlerdeki en temel farklılık; biyosensör uygulamalarında kullanılan kantileverlerde uç bulunmasına ihtiyaç olmamasıdır. Bunun yanında özelleşmiş uygulamalar ve hassasiyeti arttırmak amacıyla birçok geometrik modifikasyon ve yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. En çarpıcı uygulamalar özellikle mikro fabrikasyon tekniklerinin gelişmesiyle ortaya çıkmıştır.

Yüzey fonksiyonelleştirme tekniklerinin geniş bir kısmı mikrokantilever yüzeyine uygulanabilmektedir. Bir kimyasalın varlığını saptayabilmek için mikrokantilever yüzeyi istenilen molekülün yüzeye adsorpsiyonunu kolaylaştıracak bir malzeme ile yüklenmelidir [117]. Yüzey kaplamaları yalnızca çok kısıtlı bir molekül grubuna cevap verecek şekilde düzenlenebilmekte ve böylece yüksek derişimlerde bile ilgilenilmeyen moleküllere tepki vermeyen yüksek seçiciliğe sahip sensörler elde edilebilmektedir.

2.3.2. **Kantilever Bazlı Biyosensör Sistemlerinde Ölçüm Yaklaşımları**

Dinamik mod kantilever ölçümlerinde temel yaklaşım kantileverin rezonans frekansındaki değişimlerin belirlenmesidir. Rezonans frekansındaki değişim temel olarak iki farklı yol ile belirlenebilmektedir. Bunlardan ilki rezonans frekansının birbirine komplementer iki biyomolekülün bir araya gelmesinden hemen önce ve moleküllerin bir araya gelerek bağlanmalarının tamamlanmasından sonra ölçülmesine dayanmaktadır. Diğer yöntem ise rezonans frekansının biyomoleküllerin bir araya gelerek bağlanma olayının gerçekleştiği tüm süreçte sürekli olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Genellikle hangi yöntemin kullanılacağını araştırmacılar değil kullanılan sensörün tasarımı belirlemektedir. Eğer ölçümün kalitesini bozmayacak şekilde kontaminasyondan, termal gürültüden ve girişim yapacak moleküllerden uzak bir ortam ve sistem tasarımı bulunuyorsa ikinci yöntemi kullanmak algılama prensiplerini ve algılama kinetiklerini incelemek açısından daha önemli bilgiler sağlayacaktır.

Daldırma – Kurutma – Ölçme (Dip & Dry) Yöntemi

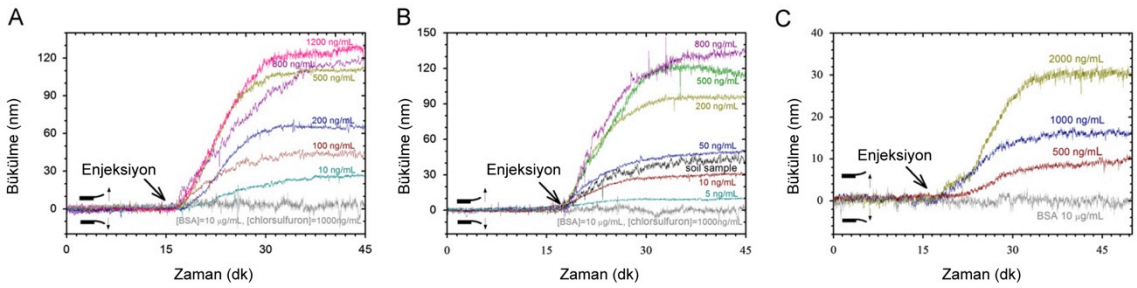
Bu yöntem en eski ve en basit biyosensör ölçüm yöntemidir. Temel olarak 3 adımdan oluşmaktadır. İlk olarak hazırlanan sensör reaksiyonun gerçekleşmesi için uygun süre boyunca örnek çözeltisine daldırılarak bekletilir. Sonrasında sensör çözeltiden alınarak yıkanır ve kurutulur. En son olarak ise sensörün rezonans frekansı ölçülür. Bu yöntemde önemli olan kantileverin rezonans frekansındaki değişimin sadece reseptör moleküllere bağlanan analit molekülünden kaynaklandığına emin olabilmektir. Bu nedenle bu tekniği kullanan biyosensör araştırmalarında aynı transfer, yıkama ve kurutma koşullarının uygulandığı kontrol örneklerinin çalışılması gerekmektedir. Bu yöntem içerisinde

sürekli ölçüm yapmanın mümkün olamadığı biyolojik ortamlarda ve özellikle biyolojik bağlanma kinetiklerinin önemli olmadığı uygulamalarda oldukça önemli sonuçlar sağlamaktadır.

Sürekli Ölçüm (Continous) Yöntemi

Birçok biyolojik etkileşim sıvı ortam içerisinde gerçekleştiğinden rezonans frekansının sıvı içerisinde ve etkileşim süresince sürekli olarak ölçüldüğü bu yöntem sensör uygulamasına önemli ölçüde ek bilgi ve anlam katmaktadır. Genellikle bu yöntemde sensör sürekli olarak sıvı akışı içerisinde olacak şekilde uygulanmaktadır. Bu tarz uygulamalarda tersinir olarak bağlanan moleküllerin birbirinden ayrılması veya ikincil hedef moleküllerin biyolojik komplekse bağlanarak sandviç yapıyı oluşturması gibi hassasiyeti arttıran ve daha çok bilgi sağlayan çalışmalar gerçekleştirilebilmektedir. Bu tarz ikincil bağlanmalar veya hedef sinyalini yükseltme uygulamaları hedef analite ilgisi olan antikorların, proteinlerin, oligonükleotidlerin ve nanopartikül benzeri yapıların kullanılması ile gerçekleştirilebilmektedir [60].

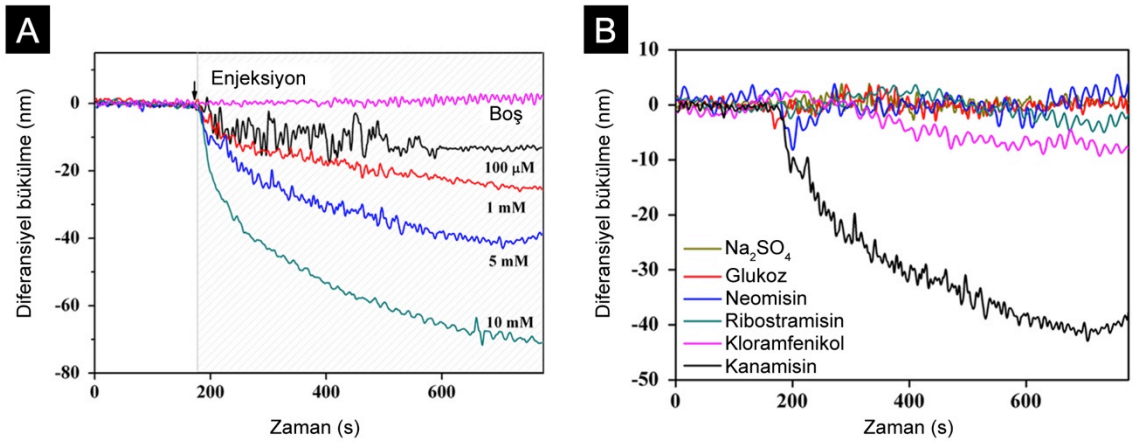
Wu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada biyomakromoleküllerin antijen – antikor bağlanmalarının yüzey gerilimi oluşturmalarına karşın küçük molekül yapısına sahip antijen ve antikor bağlanmalarının yüzeyde çekme kuvvetleri oluşturduklarına dair bir görüş sunmuşlardır. Araştırmacılar bu hipotezlerini antikorun konformasyonel değişimine bağlamaktadırlar. Bu nedenle çalışmalarında reseptör ve analit moleküller olarak klorimuron etil (CE) ve anti-klorimuron etil monoklonal antikor (anti-CE mAb) kullandıkları mikrokantilever immünosensörler geliştirmiştirler. İlk olarak altın yüzey üzerine 2-iminotiyolan hidroklorit ile hedef antikor bağlanmış kantileverler (A) hazırlamışlardır. İkinci grup olarak yine 2-iminotiyolan hidroklorit ile ara bir antikor bağlanmış ve sonrasında doğru konformasyonda olduğundan emin olmak için bu antikor üzerine hedef antikor bağlanmış kantileverler (B) hazırlamışlardır. Son olarak ise alkentiyol ile uzatıcı uçlar üzerinden antikor immobilize edilmiş kantileverler (C) hazırlamışlardır.



Şekil 2.9. Klorimuron etil ve anti-klorimuron etil mAb spesifik bağlanmasının yüzey immobilizasyon yöntemleri açısından karşılaştırılması

Hazırlanan kantileverlerin performansları karşılaştırıldığında aracı antikor kullanılarak antijenin antikor bağlanma noktası immobilizasyon sürecinde korunduğunda en iyi sonuçların alındığı görülmektedir (Şekil 2.9). Ayrıca elde edilen sonuçlardan sensörün hem hassasiyetinin hem de doğrusallığının artmış olduğu görülmektedir. Uzatıcı kolların oluşturulması doğrusallığı arttırmış fakat bununla birlikte bağlanan molekül sayısını sınırlandırdığı için sensörün tayin limit değerlerini yaklaşık 100 kat düşürmüştür. Kullanılan uzatıcı kolların karbon atomu uzunluklarına göre gerçekleştirdikleri karşılaştırmada ise karbon zincir uzunluğu arttıkça aynı derişim için kantileverin bükülme miktarının azaldığını buna karşılık hedef molekülün saptanma aralığının genişlediği görülmüştür. Sonuç olarak rastgele immobilize edilen antikorlara göre yönlendirilerek immobilize edilen antikorlarda daha yüksek yüzey gerilimi gözlemlemişlerdir [118].

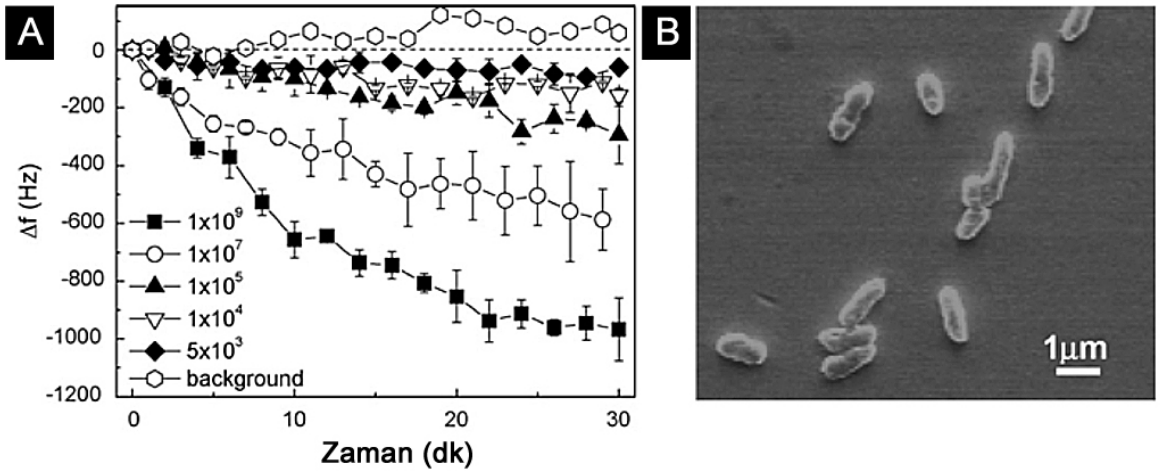
Bai ve arkadaşları aptamer bazlı kantilever dizi sensörlerini kullanarak kanamisin tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. Gerçekleştirdikleri çalışmada hem algılayıcı hem de referans kantileverleri bir arada bulunduran bir dizi sensörü hazırlamış ve bu sensörlerin algıladıkları bükülme değerlerinin farkından diferansiyel bükülme değerlerini elde etmişlerdir. Algılayıcı kantileverleri reseptör molekül olarak kanamisin aptamerleri ile fonksiyonelleştirmişler ve buna karşılık istenmeyen moleküllerin bağlanmasını engellemek için referans kantileverleri 6-merkapto-1-heksanol ile bloklayarak modifiye etmişlerdir.



Şekil 2.10. Aptamer bazlı kanamisin kantilever sensörün A) derişime bağlı zamana karşılık bükülme grafikleri B) sensörün seçiciliğini gösteren bükülme grafikleri

Şekil 2.10'da görüldüğü gibi araştırmacılar bu çalışmada 100 µM–10 mM kanamisin derişimi aralığında doğrusal olarak yüzey gerilimi ölçmeyi başarmışlardır. Hazırlanan kanamisin sensörü glukoz, neomisin, ribostamisin, kloramfenikol gibi moleküllere kanamisine oranla ihmal edilecek derecede az tepki vermektedir [85].

Zhu ve arkadaşları Salmonella typhimurium için kurşun zirkonat titanat (PZT) altın kaplı cam kantileverler ile gerçek zamanlı işaret gerektirmeyen bir biyosensör çalışması gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan kantileverler 0.8mm uzunluğunda ve 2.0mm genişliğinde PZT ve 3.0 mm uzunluğunda altın kaplanmış cam uç çift katmanından oluşmaktadır. Çalışmada kantileverler 5Mhz QCM ile karşılaştırmalı olarak yüzeye antikor immobilizasyonuna karşılık S. Typhimurium bağlanması incelendiğinde kantileverler ile 10 kat daha hassas ölçümler gerçekleştirilebildiği gözlenmiştir. Hazırlanan bu kantileverler için kütle saptama hassasiyeti $\Delta m/\Delta f = -5 \times 10^{-11}$ g/Hz olarak saptanmıştır (Şekil 2.11) [119].



Şekil 2.11. Farklı *S. typhimurium* derişimleri için zamana karşı PZT/altın kaplı cam kantileverlerin rezonans frekansındaki değişim [119].

Kantilever Bazlı Biyosensörlerin Spesifik Olmayan Adsorpsiyon Uygulamaları

Kantilever bazlı biyosensör araştırmalarının önemli alanlarından birisi proteinlerin ve hücrelerin spesifik olmayan adsorpsiyonlarıdır. Antonik ve arkadaşları kantilever yüzeyinde harici bir kimyasal uyarıyla doğrudan canlı hücre büyümesini sorgulamışlardır [120]. BSA gibi proteinlerin spesifik olmayan adsorpsiyonları kantileverin bir yüzeyinde strese neden olmakta ve bu nedenle kantileverde statik bükülme gerçekleşmektedir. Moulin ve arkadaşları düşük yoğunluklu lipoprotein ve onun heparinde oksitlenmiş formunun adsorpsiyonları arasındaki farklılaşmaları ve aynı zamanda proteinlerin yavaş konformasyonal değişimlerinin indüklediği yüzey stresini de incelemişlerdir [108].

Kantilever Bazlı Biyosensörlerin Spesifik Adsorpsiyon Uygulamaları

Spesifik olmayan adsorpsiyon alanının dışında spesifik bağlanma olaylarını inceleyen alanlar da oldukça dikkat çekici uygulamalar içermektedir. Thundat ve arkadaşları [113] ile Grogan ve arkadaşları [121] antikor kaplanmış mikro-kantilever bükülmelerinin antijenlerle etkileşimlerinin zamana bağlı bir fonksiyonu olduğunu farklı uygulamalarla göstermişlerdir. Prostat spesifik antijen (PSA)'nın iki formunun geniş derişim aralığında diğer protein türlerinin varlığında spesifik saptanması Wu ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır [122].

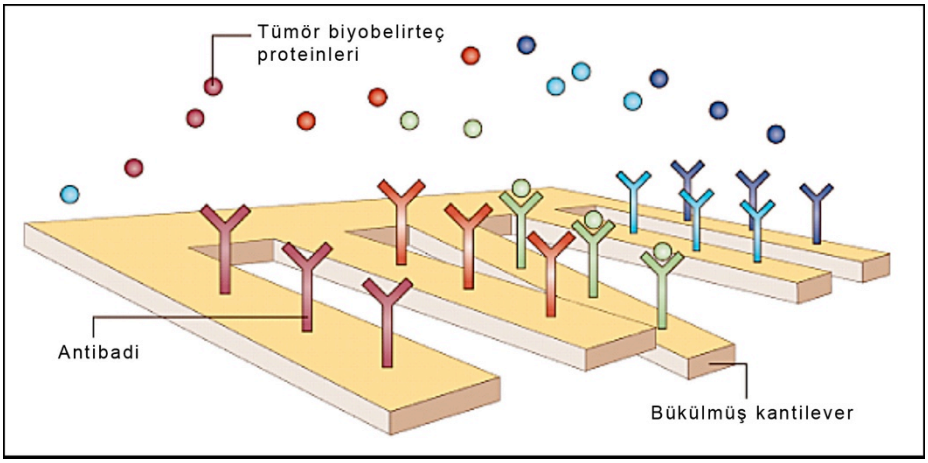
Biyotin ve streptavidinin antijen – antikor etkileşimi veya bir herbisitin monoklonal antikoruna bağlanması sonucu kantileverin bükülmesinin sinyal çevirici (transduser) olarak kullanımı Raiteri ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır [123].

Diğer bir çalışmada L-cystein ve Cu^{2+} ile çift tabakalı olarak kaplanmış bir mikro-kantileverin fosfonil grupları ve Cu^{2+} iyonu arasında oluşan güçlü bağ sayesinde sinir ajanları olan organofosfor bileşenlerini tayin edebildiği gösterilmiştir [124].

Kanser Teşhisinde Kantilever Bazlı Biyosensörlerin Kullanılması

Kanser hücrelerin kontrolsüz üremesi sonucu komşu dokulara invazyonu veya kaynağını aldığı organdan daha uzak dokulara metastazı ile oluşan bir hastalıktır. Hücreler DNA eşlenmesi sırasında meydana gelen bozulmalar nedeniyle yapılarını değiştirirler.

Arun Majumdar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kanser teşhisi için mikro-kantilever bazlı analiz yöntemi tanımlamışlardır. Prostat spesifik antijene (PSA) spesifik antikorlar mikro-kantilever yüzeyine kaplanarak prostat kanserli hastaların kanlarındaki prostat kanser tümör işaretleyicileri (*ing.: marker*) saptanmıştır. Anti-PSA kaplanmış mikro-kantilever prostat kanseri olan hastanın kan örneği ile etkileştirildiğinde antijen-antikor kompleksi oluşmuş ve bağlanan antijen moleküllerinin kütlesine bağlı olarak kantileverde bükülme gerçekleşmiştir.



Şekil 2.12. Tümör belirteç proteinlerinin kantilever sensörler ile algılanması [125].

Kantileverdeki nanometre boyutlarındaki bükülme nanometre altında hassasiyette düşük güç lazer ışınlarıyla bir foto-dedektör kullanılarak optik olarak saptanmıştır [122]. Bu çalışmada oluşturulan mikro-kantilever bazlı analiz yöntemi kliniğe uygun eşik değerlerinin altında antijen miktarını saptayabilmesiyle PSA tayini için konvansiyonel biyokimyasal tekniklerden daha hassas bir yöntem olarak bulunmuştur. Ayrıca etiketleme işlemine gerek duyulmadığı için analiz başına maliyeti daha düşüktür ve ELISA yönteminden daha iyi bir çözüm sunma potansiyeli taşımaktadır. Lee ve çalışma arkadaşları da piezoelektrik nanomekanik mikro-kantileverin rezonans frekansındaki kaymayı temel alan PSA tayini çalışması gerçekleştirmişlerdir [126].

Günümüz koşullarında yaşam bilimlerindeki teknolojik ve yöntemsel gelişmelerle birlikte hastalıkların tedavisinde çok önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bunun yanında genellikle hastalıkların tedavilerinin başarılı olma ihtimalleri erken teşhis ve tanı konulmasına bağlıdır. Bu nedenle literatürde yapılan çalışmalarda tedaviye yönelik çalışmalar kadar hastalıkların ve kaynaklarının teşhisine yönelik çalışmalar da önemli bir yer teşkil etmektedir.

Ayrıca son yıllarda biyoterörizm konusunda artan risklere bağlı olarak biyo-savunma alanında önemli yatırımlar yapılmış ve gerçekleştirilebilecek saldırıları hızla tanımlayabilen sensör sistemlerinin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Bu konuda yüksek risk sınıfında tanımlanan alanlardan birisi de içme suyu kaynaklarıdır. Şehir şebekesine bağlanan su kaynaklarında sürekli risk grubunda bulunan patojenlerin ve biyomoleküllerin varlığının analiz edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle sürekli analiz gerçekleştirebilecek, hızlı, hassas ve güvenilir biyosensör sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatürde biyomoleküler tanıma mekanizmalarını esas alan ve sıvı ortamda algılama gerçekleştiren çok sayıda yöntem ve sensör çalışması bulunmaktadır. Her biyosensör sisteminin kendine göre avantajları olduğu gibi yetersiz kaldığı uygulamalar ve teorik veya pratik sınırlamaları bulunmaktadır. Literatür bilgilerinden de anlaşılacağı gibi kantilever bazlı biyosensörlerin bahsedilen uygulamalar için gerekli koşulları sağladıkları düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda kantilever bazlı biyosensör sistemleri için en önemli kısıtlamalar, analit moleküllerinin kantilever yüzeyinde istenmeyen bölgelere bağlanması, taşıyıcı faz içerisinde bulunan anorganik tuzların kantilever yüzeyinde birikmesi ve tekrarlanabilirlik olarak sıralanabilir.

2.3.3. **Kantilever Mekanikleri**

Kantilever sensörlerin boyutları mikron altı boyutlardan birkaç yüz mikrometre boyutlarına kadar değişmektedir. Bu sistemlerin ağırlıkları ise piko veya nanogram aralığındadır. Bu boyutlardaki sistemler standart tekniklerin ulaşabileceği limitlerin çok üstünde yüksek seçicilik ve kısa tepki sürelerine (ms) sahiptirler. Boyutları ve basitlikleri nedeniyle de silikon mikro elektronik sistemleri ile oldukça uyumludurlar [114].

Diğer taraftan sistemin özellikle biyolojik uygulamalarda her türlü dış uyarıcıya ve yalancı hedef moleküllerin sebep olacağı gürültüye de analit moleküle vereceği hassasiyette duyarlı olabileceğini unutmamak gerekir. Tepki süresi cihaz kaynaklı olmasa da biyolojik bağlanma süreleri nedeniyle uzayabilmektedir.

$$m_{\text{örnek}} = \frac{k}{4\pi^2}\left(\frac{1}{f_1^2} - \frac{1}{f_0^2}\right)$$

Teorik olarak incelendiğinde yay sabitini k, kütle birikmemiş sensör için rezonans frekansını f_o , kütle birikmiş sensör için rezonans frekansını da f_1 ile gösterirsek en temel haliyle yukarıdaki bağıntıyı standart kantileverler için yazabiliriz. Bu eşitlikten yola çıkarak standart kantileverler için saptanabilecek en düşük kütle değişiminin yaklaşık 50 fg olduğunu söyleyebiliriz.

Kütle adsorpsiyonunu ölçen yüzey plazmon rezonans (SPR: Surface Plasmon Resonance) ve kuartz kristal mikro-terazileri (QCM: Quartz Crystal Microbalance) gibi tekniklerin aksine mikro-mekanik kantilever diziler hem statik hem de dinamik modda paralel olarak çalışabilirler [127] . Bu da hem kütle adsorpsiyonunu hem de yüzey stresini aynı anda ölçebilmeye imkan vermektedir.

Kantilever dizilerinin kullandığı dinamik mod ölçümleri daha önceleri vakum veya gaz halindeki atmosferle sınırlı uygulamalara sahipti. Bunun yanında biyosensörler için sulu çözeltilerde çalışmak bir gerekliliktir. Sıvı tarafından oluşan kantileverin salınımını sönümleyici etki nedeniyle dinamik mod ölçümleri halen bir takım zorluklar içermektedir. Rezonanstaki kantilever ile yer değiştiren sıvı osilatörde bir kütle artışına sebep olmakta ve böylece rezonans frekansı azalmaktadır. Bu olaya "sanal kütle" denilmektedir [128-130].

Kantilever üzerine biriken kütlenin sensör uygulamalarında kullanımlarını Braun ve arkadaşlarının 2005 yılında gerçekleştirdikleri çalışmada [95] öne sürdükleri yaklaşımlardan yararlanarak içerisinde bulunduğu sıvıya, kantileverin kendisine ve dış güç olarak harici bir piezoelektrik sürücünün etkilerine göre düzenleyerek matematiksel ifadelerle açıklayabiliriz.

Kantileverin titreşim dinamiklerini açıklamak için hareket eşitliğini şu şekilde yazabiliriz:

$$EI\frac{\partial^4 u(x,t)}{\partial x^4} + C_o\frac{\partial u(x,t)}{\partial t} + \frac{m_c}{L}\frac{\partial^2 u(x,t)}{\partial t^2} = 0$$

Bu eşitlikte kullanılan kısaltmaların açıklamaları şu şekildedir:
E :young modülü,
I: eylemsizlik momenti (*ing.* moment of inertia),
C_o : birim uzunluk başına içsel sönümleme katsayısı,
m_c : kantileverin kütlesi,
L : kantilever uzunluğu,
u(x,t) : kantilever eksenine dik bir açıyla kantileverdeki bükülme (x kantilever ekseninde bir koordinatı, t ise zamanı belirtmektedir)

Eğer bir piezoelektrik kristal plaka ile sürülen ve sıvı ortam içerisinde titreşen bir kantilevere odaklanmak gerekirse kantileverin sıvı içerisinde titreşebilmesi ve hareket edebilmesi için etrafındaki sıvıyı da hareketlendirecek bir etki yaratması gerekmektedir. Bu etki kantileverin hareketini engelleyici ilave bir direnç yaratmaktadır. Diğer bir değişle kantileverin etrafını saran sıvı tabakası sanki

kantileverin üzerine bağlanmış ekstra bir kütle gibi davranmaktadır. Sanal kütleyi m_l olarak tanımlarsak bu durumun yaratmış olduğu ilave içsel kuvveti de aşağıdaki gibi g_i ile tanımlayabiliriz.

$$g_i = -\frac{\left(\frac{m_l}{L}\right)\partial^2 u(x,t)}{\partial t^2}$$

Burada tanımlanan sanal kütle yer değiştiren sıvının kütlesi m_d ile orantılı olduğundan aynı zamanda kantileverin hacmi ile de doğru orantılıdır [130, 131].

$$m_l = pm_d = p\rho_l V_c$$

Bu eşitlikte kullanılan kısaltmaların açıklamaları şu şekildedir:
p : ideal sıvılar için değeri 1 olan bir katsayı
ρ_l : sıvının yoğunluğu
V_c : kantileverin hacmi

İdeal olmayan sıvılar için birim uzunluğu başına ilave bir enerji kaybı kuvveti (g_v) kantilevere etkimektedir ve bu kuvvet hız ile doğru orantılıdır.

$$g_v = -C_v\left(\frac{\partial u(x,t)}{\partial t}\right)$$

Bu eşitlikte C_v enerji kaybı katsayısını göstermektedir.

Eğer birim uzunluk başına harici periyodik kuvveti F(x,t) olarak tanımlarsak ve bu kuvvetle birlikte g_i ve g_v kuvvetlerini de dikkate alırsak sıvı içerisinde kantileverin titreşiminin hareket eşitliğini şu şekilde genişletebiliriz.

$$EI\,\frac{\partial^4 u(x,t)}{\partial x^4} + (C_0 + C_v)\frac{\partial u(x,t)}{\partial t} + \frac{m_c + m_l}{L}\,\frac{\partial^2 u(x,t)}{\partial t^2} = F(x,t)$$

Bu eşitliğin çözümü için sıvının sanal kütlesi m_l ve ilave sönümleme kuvveti g_v'nin bilinmesi ve p ve C_v kat sayılarının da bulunması gerekmektedir.

Bükülme u(t) veya kantilever cevabını kullanarak aşağıdaki eşitlikten rezonans frekansı f_n bulunabilir.

$$u(t) = u_o \exp\ (i2\pi f_n t)$$

Sönümlü kantileverlerin farklı modları *n* için rezonans frekansları eşitlik X'in kompleks çözümlemeleri olarak aşağıdaki eşitlikteki gibi verilebilir.

$$f_n = \frac{1}{2\pi}\left[\sqrt{\alpha_n^4\ (2\pi f_0^*)^2 - \gamma^2} + i\gamma\right]$$

Bu eşitlikteki sönümleme faktörü γ ise aşağıdaki gibi tanımlanır.

$$\gamma = \frac{C_0 + C_v}{\left(\frac{2}{L}\right)(m_c + m_l)}$$

f_0^* sönümlemenin olmadığı vakum koşullarında kütlenin bir noktada toplanarak harmonik osilatör olarak davranan sistemler için temel eigen frekansı göstermektedir.

Yay sabitinin k ile gösterildiği ve $k = {}^{3EI}/_{L^3}$ olarak verildiği zaman f_0^* için aşağıdaki eşitlik türetilebilir.

$$f_0^* = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{EI}{(m_c + m_l)L^3}} = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{3(m_c + m_l)}}$$

Dikdörtgen bir kantilever için kantilever genişliğini W kalınlığını ise T olarak alırsak eylemsizlik momenti $I = WT^3/12$ olarak bulunur.

Sönümlemenin olmadığı kütlenin homojen olarak dağıldığı bir kantileverin eigen frekansının harmonik osilatör benzetim modeli aşağıdaki gibi tanımlanabilir.

$$f_{0n} = \frac{\alpha n^2}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{3(m_c + m_l)}}$$

Sürücü kuvvetin frekansına bağlı olarak n. harmonik cevabın genliği sönümlenen harmonik osilatör modeli ile aşağıdaki eşitliğe göre verilebilir.

$$u_n(f) = \frac{u_{max} f_{0n}^2}{\sqrt{(f_{0n}^2 - f^2)^2 + \gamma^2 f^2/\pi^2}}$$

Bu fonksiyon rezonans eğrisi olarak isimlendirilmektedir ve f_n değerinde rezonans maksimuma ulaşmaktadır.

$$f_n = \sqrt{f_{0n}^2 - \frac{\gamma^2}{2\pi}}$$

Sönümleme etkisi nedeniyle rezonans frekansı f_n daha küçük değerlere kaymaktadır. Burada önemli olan eigen frekansının sıvının sönümleme etkisinden bağımsız olmasına karşılık rezonans frekansından bağımsız olmadığının anlaşılmasıdır.

Sürücü kuvvetin frekansına bağlı olarak cevap ve sürücü kuvvet arasındaki faz aşağıdaki eşitlik ile verilebilir.

$$\varphi(f) = \arctan\frac{-\gamma f}{\pi(f_{0n}^2 - f^2)}$$

Eigen frekansı f_{0n} faz eğrisinin en dik eğime sahip olduğu noktasında tanımlanır ve eğrinin dönüm noktası olarak isimlendirilir.

Kantileverin yüzeyine dağılmış şekilde düşük miktarda kütlenin yüzeyde biriktiği durumlar için eklenen kütleye Δm denirse toplam kütle $m_{toplam} = m_c + m_l + \Delta m$ olarak tanımlanır.

Bu durumda yay sabitinin değişmediğini varsayarsak eigen frekansında aşağıdaki şekilde değişiklik yapılır.

$$f'_{0n} = \frac{\alpha_n^2}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{3(m_c+m_l+\Delta m)}}$$

Eklenen kütle Δ*m*'in m_c+m_l değerinden oldukça küçük olduğu durumlar için aşağıdaki yaklaşım geçerlidir.

$$f'_{0n} \approx f_{0n}\left(1 - \frac{1}{2}\,\frac{\Delta m}{m_c + m_l}\right)$$

$\Delta f = f_{0n} - f'_{0n}$ olarak alındığında, frekans değişimi (Δf)'e karşılık kütle birikimi (Δm) aşağıdaki şekilde hesaplanabilir.

$$\Delta m = \frac{2(m_c + m_l)\Delta f}{f_{0n}}$$

Kütle birikmiş kantilever için hassasiyet aşağıdaki şekilde hesaplanabilir

$$S = \frac{\Delta f}{\Delta m} = \frac{f_{0n}}{2(m_c + m_l)}$$

Buradan görüldüğü üzere hassasiyet kantilever titreşiminin harmoniğinin derecesi ile doğru orantılı olarak artmaktadır [95, 114, 127-130].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal ve Yöntemler

Gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan temel Atomik Kuvvet Mikroskobu sistemi Nanomagnetics Instruments (İngiltere) tarafından üretilmiştir. Tez çalışmaları kapsamında ihtiyaç duyulan özelliklere göre sıvı ortamında çalışmayı mümkün hale getirecek şekilde hem donanımsal hem de yazılımsal olarak sistemde değişiklikler gerçekleştirilmiştir. Tez süresince gerçekleştirilen bu modifikasyonlar ve temel sistem özellikleri Bölüm 3.2'de ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

Kantilever çipleri Vista Probes ve Budget Sensor (ABD) firmalarından satın alınmıştır. Deneylerde kullanılan kantileverlerin özellikleri detaylı olarak Çizelge 3.1'de verilmiştir. Çalışmalarda kullanılan kimyasallardan 11-merkaptoundekanoik asit (MUA), biyotin, streptavidin, EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid), NHS (N-hidroksisüksinimid), MES (2-(N-morfolino)etansülfonik asit) ve DMSO ($(CH_3)_2SO$) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. Biyotin-LC-Hidrazit ve sülfo-NHS-LC-biyotin Pierce-Thermo (ABD) firmasından satın alınmıştır. Biyotinlenmiş Hepatit B yüzey antijenine spesifik antikor (anti-HBs Ab-Biyotin), biyotinlenmiş Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg-Biyotin) ve deaktive edilmiş Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) Roche (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hidrojen peroksit (H_2O_2), sülfürik asit (H_2SO_4), hidroklorik asit (HCl), kloroform ($CHCl_3$), aseton (CH_3COCH_3), izopropil alkol ($(CH_3)_2CHOH$) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Kantileverlerin geometrik modifikasyonu işlemlerinde Nova 600i Nanolab modeli (FEI, ABD) ve JIB-4501 modeli (JEOL, Japonya) Odaklanmış İyon Demeti ve Taramalı Elektron Mikroskobu kombine sistemleri kullanılmıştır. Kantileverlerin yüzeylerinin kısmen veya tamamen altın ile kaplanması işlemleri 550X model (Electron Microscopy Science, ABD) püskürtümlü kaplayıcı (*ing.* sputter coater) cihazı ile kaplanmıştır. Altın kaplama işlemlerinde yüksek kalitede kaplama elde edebilmek için parametreler hazne vakum süresi 15 dk, kaynak yüksek saflıkta altın (19 g/cm^3), akım 40 mA ve kaplama süresi 1.5 dk olarak belirlenmiştir. Morfolojik görüntüleme işlemleri için JSM 6490LV (JEOL-Japonya) model taramalı

elektron mikroskobu yüksek vakum modunda 5-30 kV hızlandırıcı gerilimi aralığında, 1 μA demet akımı koşullarında kullanılmıştır.

Deneylerde kullanılan tüm çözücüler analitik saflıkta ve herhangi bir ekstra saflaştırma işlemine gerek duyulmadan doğrudan kullanılmışlardır. Kullanılan diğer tüm kimyasalların saflıkları ilgili yerlerde belirtilmiş ve aksi belirtilmediği durumlarda herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmadan kullanılmışlardır. Kimyasal çözeltilerin hazırlanmasında, yıkama işlemlerinde ve tüm biyosensör ölçümlerinde kullanılan su çalışmalarda kullanılmadan hemen önce deiyonize saf su sistemi Smart2Pure model cihaz (TKA, Almanya) ile elde edilmiştir.

3.2. Kantilever Bazlı Biyosensör Sistemi

Atomik Kuvvet Mikroskopları optik ve piezorezistif kantilever tayin yöntemlerinin yardımıyla kimyasal veya biyolojik analizlerde kullanılabilmektedir. Analit ve biyomolekül arasındaki moleküler tanımlamayı nanomekanik harekete dönüştürdüğü için bu tarz sistemlerde kantileverlerin önemi oldukça fazladır. Yapılan çalışmalarda açık hava ortamı veya yüksek vakum koşullarında statik ve dinamik saptama yöntemlerinin oldukça hassas sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Bunun yanında sıvı ortam içerisinde sıvıların akışkan mekaniğinden kaynaklanan sönümleme etkisi nedeniyle birçok zorlukla karşılaşılmaktadır. Bu noktada sıvı kaybı, hava kabarcıkları ve kontaminasyon riski gibi rezonans frekansında istenmeyen etkilere neden olabilecek olumsuzlukların engellenmesi amacıyla sistemin izolasyonu büyük önem kazanmaktadır.

Sistemin başarısını etkileyen diğer önemli bir faktör de kullanılan kantilever türü ve kantilever kaplamasıdır. Kantileverlerin üzerine kaplanan biyoreseptör tabakası algılama mekanizmasının hassasiyetini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle kantileverlerin yüzeyine reseptörlerin immobilizasyonu hedef molekül ile kolay ve etkin bir şekilde etkileşerek mümkün olan en yüksek yüzey gerilimini yaratacak biçimde gerçekleştirilmelidir. Tüm bunların ötesinde immobilizasyon sonrasında kantileverin yapısal özelliklerinde önemli bir değişim olmamalıdır.

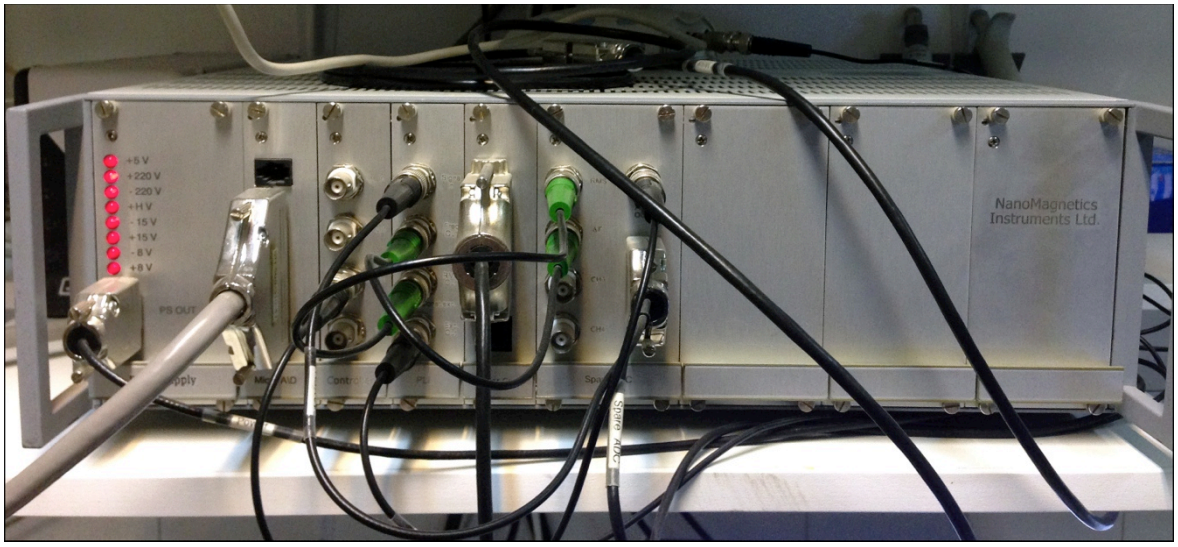
3.2.1. **Kantilever Bazlı Biyosensör Sisteminin Temel Kurulumu**

Tez kapsamında gerçekleştirilecek tüm biyosensör deneylerinin alt yapısını oluşturacak Atomik Kuvvet Mikroskopu (AKM) ve istenilen özelliklerde sıvı hücre parçaları tasarlanarak Nanomagnetics Instruments (İngiltere) tarafından özel olarak üretilmiştir.

Temel AKM bileşenlerini içeren kantilever bazlı biyosensör sisteminin bileşenleri kısaca AKM elektronik ünitesi, kafa ünitesi, kapalı sıvı hücre ünitesi ve örnek enjeksiyon sistemi veya pompa sistemi olarak dörde ayrılabilir.

3.2.2. **Atomik Kuvvet Mikroskopu Elektronik Ünitesi**

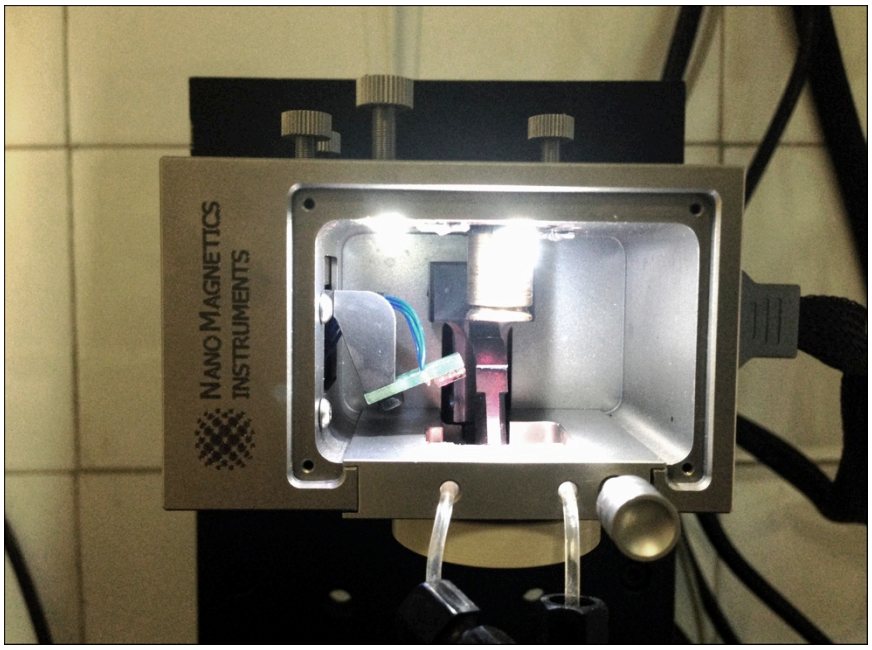
Sistem bünyesinde yer alan motor, kamera, lazer, detektör gibi tüm elektronik devre elemanlarının çalışmasını sağlayan ve geri dönüş sinyallerini alarak veriye dönüştüren bileşenleri içermektedir. Sistem dahilinde düşük gürültülü güç kaynağı ünitesi, 1kHz-1MHz aralığında çalışan PLL (Phase Lock Loop) kartı, düşük gürültülü RF modülasyonlu lazer diyot sürücüsü, 16 Bit 200 Hz, 8 kanallı ADC birimleri bulunmaktadır. Elektronik ünite ile bilgisayar iletişimi PCI paralel bağlantı birimi üzerinden gerçekleşmektedir. Tezde gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan elektronik ünitenin fotoğrafı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Atomik Kuvvet Mikroskopu Elektronik Ünitesi
(Nanomagnetics Instruments, İngiltere)

3.2.3. **AKM Kafa Ünitesi**

AKM kafa ünitesi sıvı hücre sensör tutucuyu, kapalı sıvı hücre haznesini ve elektronik devreleri bir arada ve uygun konumlarda barındırmak için tasarlanmış bir ünitedir. Ünitenin içerisinde bir adet 2 μm optik çözünürlüğe sahip video kamera ve kameranın aydınlatması için LED beyaz ışık kaynağı bulunmaktadır. Ayrıca kırmızı lazer diyot ve yansıyan lazer demetini toplayan bir pozisyon duyarlı fotodedektör kafa içerisinde uygun konumlara yerleştirilmiştir. Fotodedektör ve lazerin konumlarını düzenlemek için yerleştirilmiş ayar vidaları bulunmaktadır. Tez çalışmalarında kullanılan kafa ünitesini gösteren fotoğraf Şekil 3.2'de verilmiştir.



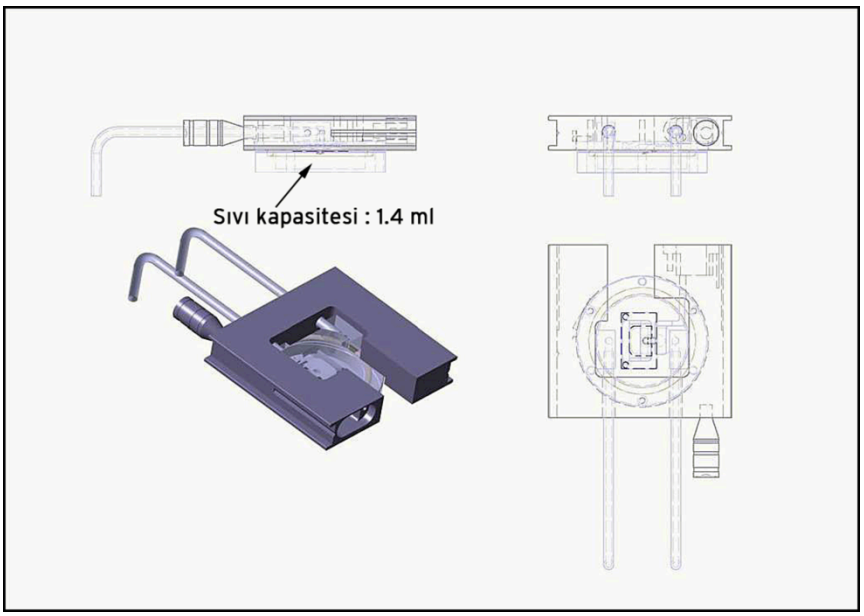
Şekil 3.2. Atomik Kuvvet Mikroskopu Kafa Ünitesi
(Nanomagnetics Instruments, İngiltere)

3.2.4. **Kapalı Sıvı Hücre Ünitesi**

Daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi sıvı ortam içerisinde sıvıların akışkan mekaniğinden kaynaklanan sönümleme etkisi gözlemlenmektedir. Kapalı hücre tasarımında düzensiz akış profillerinden kaçınılması gerekmektedir. Ayrıca frekans ölçümlerinde kaymalara neden olacağından herhangi bir sıvı kaybı ve hava kabarcığı oluşumunun önlenmesi gerekmektedir. Sıvı hücrede özellikle taşıyıcı faz olarak kullanılacak çözücü ve biyolojik örneklerle etkileşim içerisinde olacak tüm

malzemelerin mümkün olan en yüksek derecede biyolojik ve kimyasal olarak inert olması gerekmektedir.

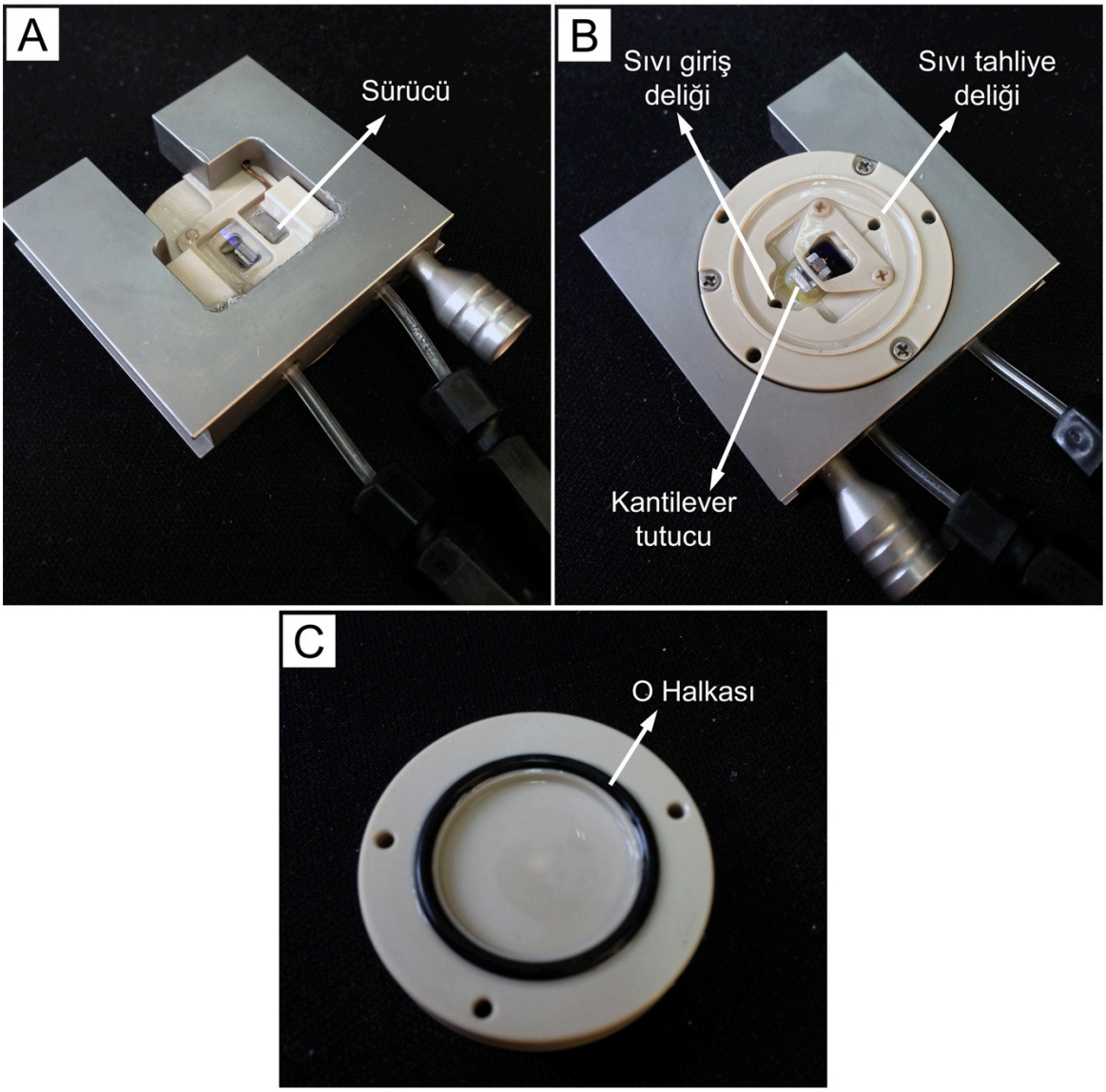
Bu gereksinimlerden dolayı biyomoleküler etkileşimleri yüksek çözünürlükte saptayabilmek amacıyla Şekil 3.3'de çizimleri verilen kantilever bazlı biyosensör sistemi için mikro-pompa ile uyumlu stabil bir kapalı sıvı hücre tasarlanmıştır.



Şekil 3.3. Kapalı sıvı hücre tasarımı

İstenilen özelliklere sahip, kantilever sürücüsü ve kantilever tutucusunu üzerinde bulunduran bir sıvı hücre sistemi özel olarak üretilerek temin edilmiştir. Sıvı hücrede temel malzeme olarak polyeter eter keton (PEEK) kullanılmıştır. Sıvı giriş-çıkış kanalları, bağlantı kabloları ve soketlerini içeren, sıvı giriş çıkışının kontrol edilebildiği, O-halkaları ile sızdırmazlığı sağlanmış ve pompa sistemine bağlanabilen sıvı hücre ünitesinin fotoğrafları Şekil 3.4'de gösterilmiştir. Şekil 3.4. A'da kantilever tutucusunun üst kısmında konumlandırılmış ve sıvı hücrenin dışında kalan sürücü görülmektedir. Sürücü özellikle kantilever akustik olarak titreştirilirken sıvı ortam içerisinde oluşacak gürültüleri baskılayarak en temiz frekans değerlerinin elde edilebileceği şekilde konumlandırılmıştır. Şekil 3.4.B'de görülen kantilever tutucu oluşabilecek sıvı kabarcıklarının uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak amacıyla özellikle sıvı giriş ve tahliye delikleri arasına yerleştirilmiştir. Lazerin geliş açısına uygun olarak prizmatik cam kullanılmıştır.

Kullanılan prizmatik camın iç kısmı da hava kabarcıklarının uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak üzere açılı olarak üretilmiştir. Sıvı giriş ve çıkış deliklerinin hemen dış kısmında O halkasının yerleştiği boşluk görülmektedir. Sıvı hücrenin kapak modülü ve sızdırmazlığı sağlayan O halkası Şekil 3.4.C'de gösterilmiştir.

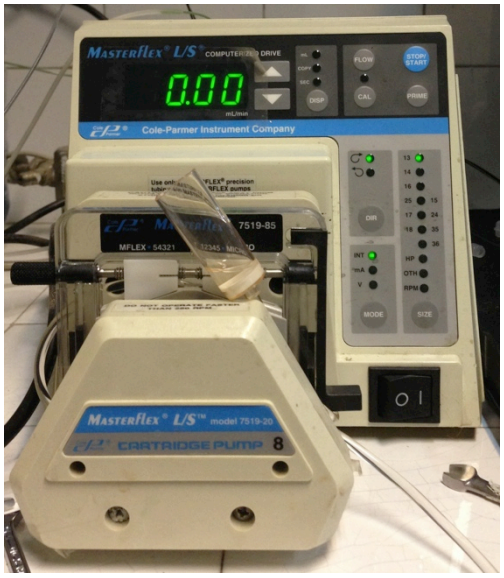


Şekil 3.4. Atomik Kuvvet Mikroskopu kapalı sıvı hücre ünitesi (Nanomagnetics Instruments, İngiltere)

3.2.5. **Peristaltik Pompa ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Sisteminin Kantilever Bazlı Biyosensör Sistemine Entegrasyonu**

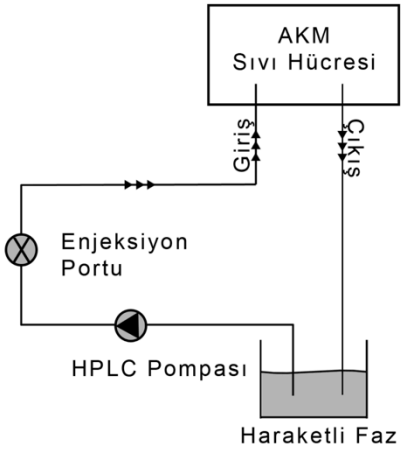
Kapalı sıvı hücre içerisinde stabil ve sürekli bir akış profili oluşturabilmek için sıvı hücre giriş ve çıkışları ilk olarak peristaltik mikro-pompaya bağlanarak bir kapalı devre sistem hazırlanmıştır. Kapalı bir sıvı haznesi içerisinde bulunan hareketli faz

pompa yardımı ile sisteme iletilmektedir. Örnek sıvı haznesi içerisine enjekte edilerek derişim kontrollü olarak akışa verilmektedir. Çalışmalar süresince kullanılan peristaltik pompa sistemi Şekil 3.5'de görülmektedir.

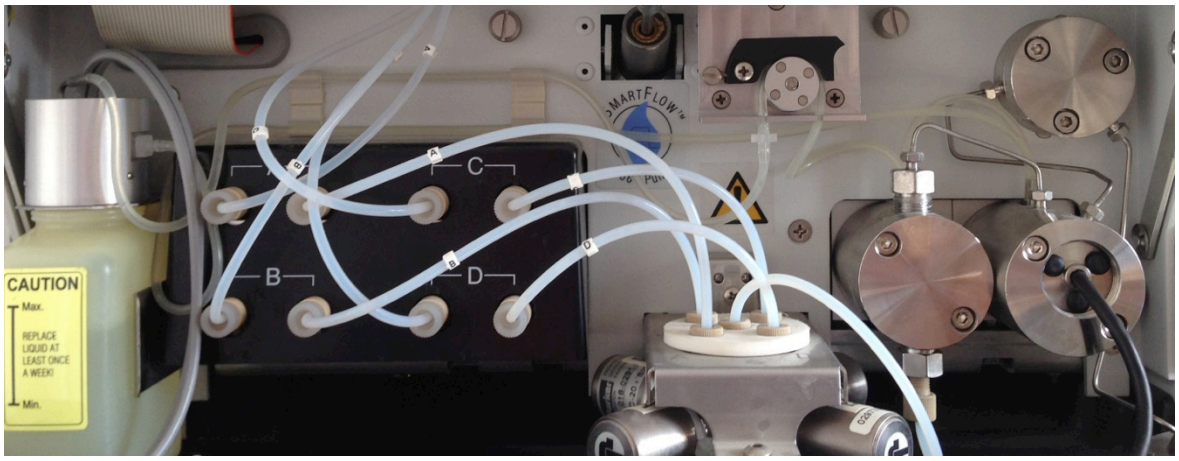


Şekil 3.5. Masterflex L/S model 7519 kartuş sürücülü peristaltik pompa (Cole-Parmer Cihazları, ABD)

Devam eden çalışmalarda akış hızı ve akış profilindeki değişimlerin kapalı sıvı hücre içerisindeki akış profiline etkisini incelemek ve daha stabil bir akış profili oluşturmak için sıvı hücre giriş ve çıkışları HPLC sisteminin pompasına bağlanarak bir kapalı devre sistem hazırlanmıştır. Şekil 3.6'da örnek enjeksiyonu ve sıvı hücre bağlantıları şematik olarak gösterilmiştir. Kapalı bir sıvı haznesi içerisinde bulunan hareketli faz, HPLC pompası ile sisteme iletilmektedir. Örnek enjeksiyon portu aracılığı ile kontrollü olarak akışa verilmekte veya hareketli fazı bulunduran kap içerisine eklenmektedir. HPLC sistemi ile analiz süresince sistemdeki akış profili ve pompa basınçları takip edilmektedir. Çalışmalarda kullanılan HPLC pompası Şekil 3.7'de görülmektedir.



Şekil 3.6. AKM ve HPLC sistemlerinin seri bağlanması



Şekil 3.7. P680 model HPLC pompasının görünümü (Dionex, ABD)

3.2.6. **Çalışmalarda Kullanılan Standart Kantileverlerin Temel Özellikleri**

Tez çalışmaları süresince farklı özelliklerde kantileverlerin vereceği tepkilerin karşılaştırılarak incelenmesi amacıyla 4 farklı model kantilever kullanılmıştır. Kullanılan kantileverlerin detaylı özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Bu kantileverlerin seçiminde dikkat edilen nokta farklı uzunluk değerlerine sahip olmalarıdır. Böylece kantilever yapıları hem hacimsel özelliklerine göre hem de kantilever rezonans frekanslarına göre incelenebileceklerdir.

Çizelge 3.1 Standart kantileverlerin teknik özellikleri.

Model	**Tap300Al**	**Cont Al**
Marka	BudgetSensors	BudgetSensors
Uygulama Modu	Temassız / Tıklamalı Mod	Temaslı Mod
Kantilever Şekli	Dikdörtgen	Dikdörtgen
Kaplama	30 nm Al (dedektör yüzü)	30 nm Al (dedektör yüzü)
Uzunluk	125 µm (115-135 µm)*	450 µm (440-460 µm)*
Genişlik	30 µm (25-25 µm)*	50 µm (45-55 µm)*
Kalınlık	4 µm (3-5 µm)*	2 µm (1-3 µm)*
Yay Sabiti	30 N/m (20-75 N/m)*	0.2 N/m (0.07-0.4 N/m)*
Rezonans Frekansı	300 kHz (200-400 kHz)*	13 kHz (9-17 kHz)*

Model	**ElectriMulti75**	**CLR-25**
Marka	BudgetSensors	Vista Probes
Uygulama Modu	Elektriksel / İletkenlik	Temaslı Mod
Kantilever Şekli	Dikdörtgen	Dikdörtgen
Kaplama	5 nm Cr, 25 nm Pt (çift yüz)	30 nm Al (dedektör yüzü)
Uzunluk	225 µm (215-235 µm)*	450 µm (425-475 µm)*
Genişlik	28 µm (23-33 µm)*	40 µm (35-45 µm)*
Kalınlık	3 µm (2-4 µm)*	2 µm (1-3 µm)*
Yay Sabiti	3 N/m (1-7 N/m)*	0.2 N/m (0.07-0.4 N/m)*
Rezonans Frekansı	75 kHz (60-90 kHz)*	12 kHz (8-16 kHz)*

3.3. Kantilever Frekans Değişimlerinin Matematiksel Modellemeleri

3.3.1. Kantilever Uzunluğunun ve Biriken Kütlenin Miktar ve Yerinin Frekansa Etkilerinin Hesaplanması

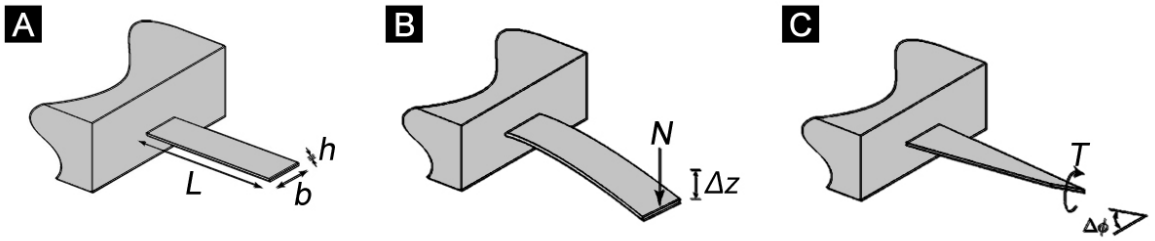
Rezonans halinde bulunan kantilevere analit moleküllerinin adsorpsiyonu rezonatörün askıdaki kütlesini arttırdığı için kantileverin rezonans frekansında azalmaya yol açmaktadır. Uyarıcı sinyalin doğasına bağlı olarak mikrokantilever sensörler fiziksel, kimyasal ya da biyolojik sensörler olarak tanımlanabilirler.

$$m_o = n\ x\ m_b$$

m_0 = askıdaki efektif kütle

n = geometrik parametre (dikdörtgen kantilever için 0.24)
m_b = kirişin askıdaki kısmının toplam kütlesi

İster görüntüleme uygulamaları olsun isterse biyolojik karakterizasyon uygulamaları olsun atomik kuvvet mikroskobunun birçok uygulamasında yay sabitinin deneysel olarak saptanması çok temel bir önem taşımaktadır. Atomik kuvvet mikroskobunun çalışma prensiplerini modelleyen bir çok yaklaşım mevcuttur. Bunlardan literatürde en çok kabul edilen ve kullanılanları Rankl, Vacura, Cleaveland ve Sader yöntemleridir [132-137].



Şekil 3.8. Dikdörtgen bir kantilever için (A) kesit alan görüntüsünün (B) uygulanan N kuvvetine karşılık Δz uzaklığında bükülme davranışının (C) uygulanan T torkuna karşılık Δϕ açısıyla büzülme davranışının şematik gösterimi

Gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda Sader yönteminden faydalanılmıştır. Bu yöntem kantilever üzerine biriken molekülün kütlesi ile kantileverin frekansındaki değişimin ilişkisini bulmak için kullanılmıştır. Sader yöntemi bize temel rezonans frekansını ve kalite faktörünü bulmamızı sağlamaktadır. Ayrıca efektif kütlenin hesaplanması için Rayleigh eşitliğinden yararlanılmıştır. Bu hesaplamalar sonucu teorik olarak eklenen kütleye karşılık frekans değişimi, kantileverin uzunluğuna karşılık frekans değişimi ve eklenen kütlenin uzaklığına karşı frekans değişimleri elde edilmiştir.

Sader ve arkadaşları tarafından yapılan hesaplamalarda [138] dikdörtgen kantilever yay sabitinin aşağıdaki formülden bulunabileceği gösterilmiştir.

$$k = M_e \, \rho_c \, b \, h \, L \, \omega_{vac}^2$$

ω_{vac} = vakum ortamında temel radyal rezonans frekansı
h : kalınlık

b : genişlik

L : uzunluk

ρ_c : kantileverin yoğunluğu

M_e : normalize efektif kütle (L/b>5 için M_e=0.2427)

Bu formül oldukça basit görünmesine rağmen bazı temel sıkıntıları içermektedir. İster ticari olsun ister mikrofabrikasyonla üretilmiş olsun kantileverlerin kalınlık, uzunluk ve genişlik gibi boyutları tam olarak doğru değerleri vermemektedir. Ayrıca birçok biyolojik uygulamada altın kaplı kantileverler kullanılmaktadır. Altın öncesi krom (Cr) veya platin (Pt) kaplamaları adhezif bir tabaka oluşturmak için kantilever yüzeyine kaplanmaktadır. Genellikle bu kaplamaların kalınlıkları tam olarak bilinememektedir. Ayrıca bu kaplamalardan dolayı kantileverin yoğunluğunu hesaplamak ayrıca güçleşmektedir. Tüm bunların yanında sıvı içerisindeki uygulamalarda sıvının sönümleme etkisi nedeniyle rezonans frekansındaki düşmeler bu modelle açıklanamamaktadır. Bu nedenlerden dolayı Sader ve arkadaşları öne sürdükleri modeli geliştirerek yeni bir model ortaya koymuşlardır. Bu yeni modelde kalınlık ve yoğunluk ilişkileri formülden kaldırılarak hava ve sıvı ortamları için deneysel olarak ölçümü kolay olan rezonans frekansı ve kalite faktörü kullanılmıştır.

$$\omega_{vac} = \omega_f \left(1 + \frac{\pi \rho_f b}{4 \rho_c h} \Gamma_r(\omega_f)\right)^{1/2}$$

$$\rho_f h = \frac{\pi \rho_f b}{4} \left[Q_f \Gamma_i(\omega_i) - \Gamma_r(\omega_f)\right]$$

ω_f :sıvı içerisindeki rezonans frekansı

ρ_f : sıvının yoğunluğu

Γ_r : hidrodinamik fonksiyon reel bileşeni

Γ_i : hidrodinamik fonksiyon varsayımsal bileşeni

R_e : $\rho_f \omega b^2/4\eta$

η : sıvının viskozitesi

Bu iki formülü kullanarak sonuç olarak aşağıdaki basitleştirilmiş formül elde edilmiştir.

$$k = \ 0.1906\, \rho_f\ b^2 L\ Q_f \Gamma_i(\omega_f)\omega_f{}^2$$

Normal Cleveland yönteminde ise Şekil 3.8.(B) 'de görüldüğü gibi uygulanan N kuvvetine karşılık gerçekleşen yer değiştirme miktarı Δz dikkate alınmıştır [137].

$$k_z = \frac{N}{\Delta_z}$$

$$M_s = \frac{k_z}{\omega_f^2} - \ m_e$$

k_z : normal yay sabiti
N : uygulanan yük
Δz : bükülme yer değişimi
M_s : eklenen kütle
ω_f : bükülme frekansı
m_e : efektif kütle

Bu açıklanan teori küresel bir kütlenin uç kısmında ve aynı sabit noktadan etki ettiği durumlar için geçerlidir. Gerçekte eklenen kütle kantilever üzerinde herhangi bir noktada olabilir. Bu durumda dikdörtgen bir kantilever için serbest uçtan ΔL kadar uzaklıkta bağlanan kütle için yay sabiti k_z'nin kütlenin kantileverin uç kısmına bağlandığı durumdaki yay sabiti k_z^E arasında aşağıdaki bağıntı kurulabilir.

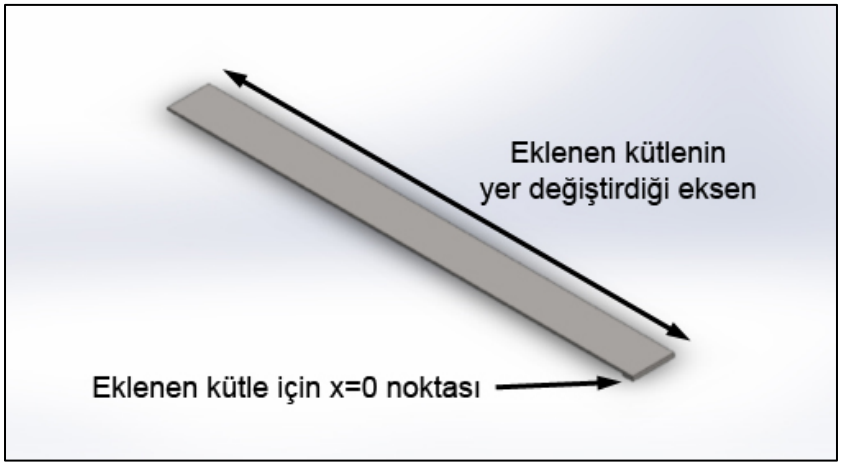
$$k_z = \ k_z^E \ \left(\frac{L}{L - \Delta L}\right)^3$$

Burada açıklanan teorik yaklaşımlar kullanılarak çalışmalarda kullanılacak kantilever yapılarının uzunluğunun değişimine, kütle eklenmesine ve eklenen kütlenin konumunun etkisi matematiksel olarak incelenmiş ve elde edilen sunuçlar bölüm 4.2'de tartışılmıştır.

3.3.2. **Kantilever Üzerine Biriken Kütlenin Konumunun Etkisinin Modellenmesi**

Kantilever bazlı sensörlerin uygulamalarında karşılaşılan temel ve önemli problemlerden biri de analiz edilecek molekül veya biyolojik ajanın kantilever üzerinde nereye bağlandığıdır. Kantilever üzerinde uç noktaya bağlanan molekülün etkisi ile kantileverin çip kısmına bağlanan molekülün etkisi tamamen farklı olacaktır. Bu nedenle tez çalışmalarının temelini oluşturan bu problemin sayısal olarak görselleştirilerek anlaşılması açısından kantileverin yüzeyine biriken birim kütle başına uzaklığa bağlı olarak kantileverin bükülmesinde ve dolayısıyla kantilever rezonans frekansında gerçekleşecek değişimler Solidvworks 2013 programı akademik sürüm versiyonu kullanılarak modellenmiştir.

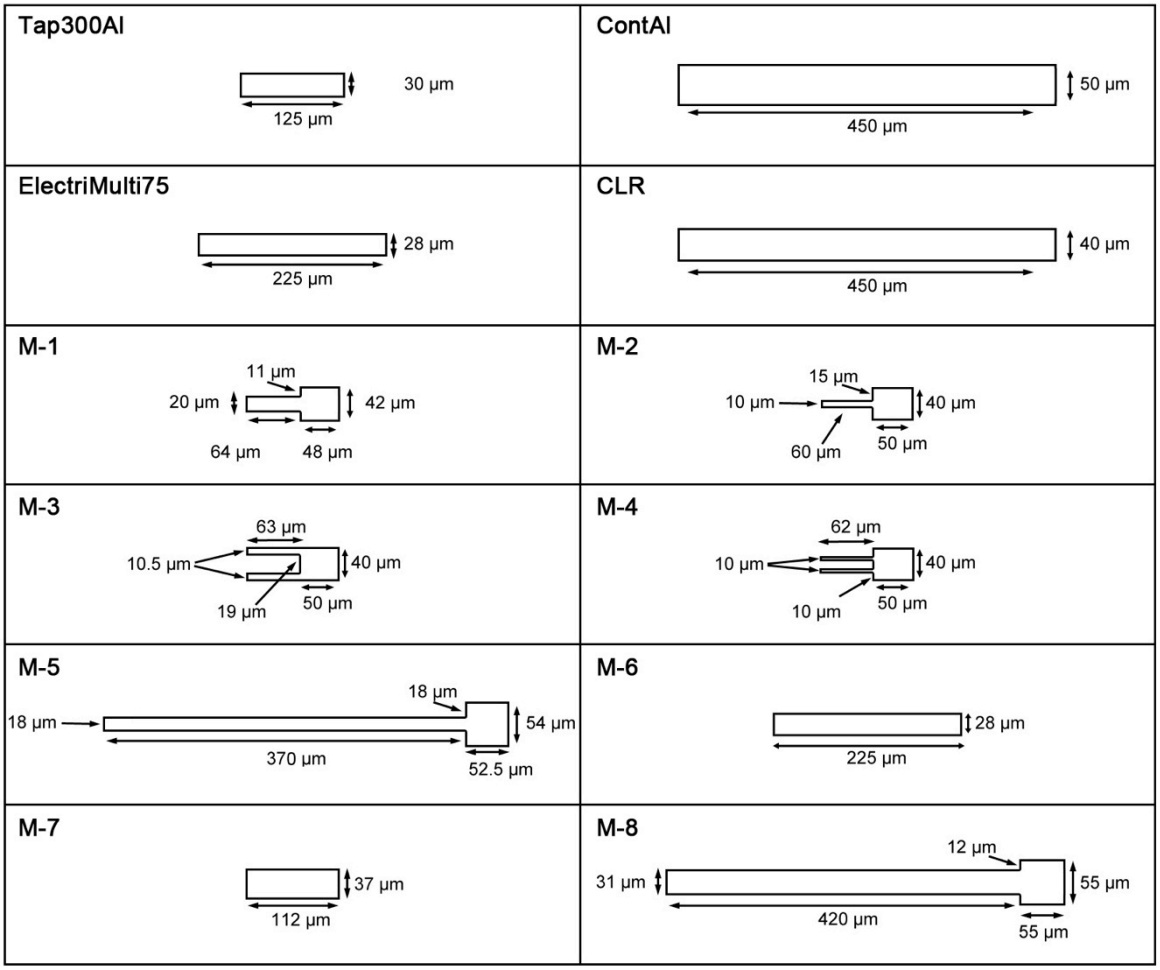
Modelleme çalışmalarında tek kristal silikondan yapılma bir kantilever (model CLR) dikdörtgen formda tek parça katı olarak modellenmiştir. Kantilever üzerine eklenen kütle 50x50 μm^2'lik bir alanda sınırlandırılmış ve bu alan her hesaplama için kantileverin çip kısmına doğru 50 µm yaklaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan kantileverin kütlesi 8.388 x 10^{-11} kg, hacmi ise 3.6 x 10^{-14} m^3 olarak alınmıştır. Belirtilen alana eklenen toplam kütle miktarı ise 0.1864 x 10^{-11} kg olarak sabit tutulmuştur. Kantilever üzerine biriken kütle için hesaplamalarda kullanılan başlangıç x=0 noktası ve kütlenin birikme yerinin değiştiği düzlem Şekil 3.9'da görülmektedir.



Şekil 3.9. Kantilever üzerine biriken kütlenin konumunun model üzerinde gösterimi

3.3.3. **Kantileverlerin Geometrik Modifikasyonunun Rezonans Frekansına Etkisinin Modellenmesi**

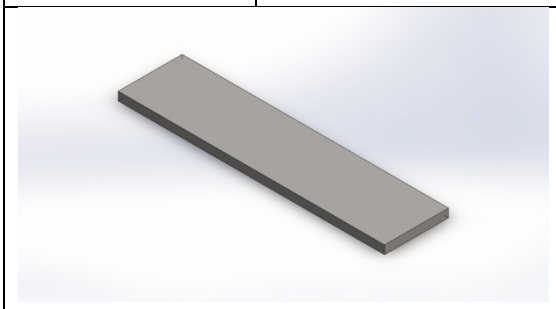
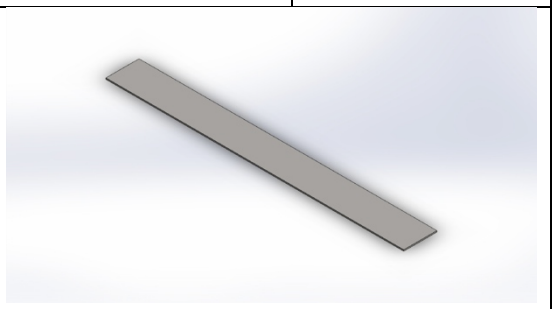
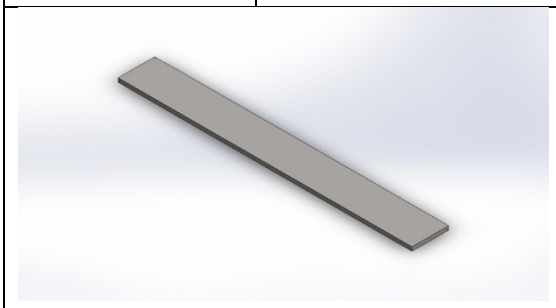
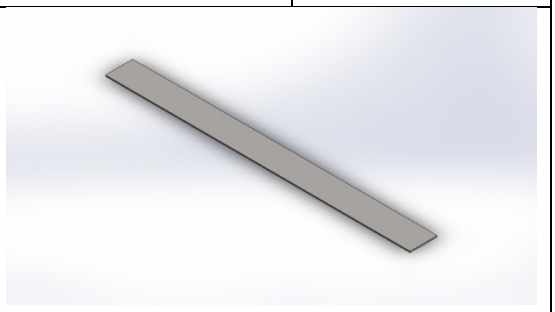
Çalışmanın bu kısmında kantilever üzerine biriken birim kütle başına en yüksek bükülme (yer değiştirme) sonuçlarını verecek dolayısıyla biriken kütle başına rezonans frekansında en yüksek değişime cevap verecek geometrik modifikasyonun öngörülebilmesi amaçlanmıştır. Kantileverin lazer demetini detektöre yansıtan yüzeyi doğrultusunda tüm yüzeye yayılmış şekilde kantilever üzerine bir kuvvet uygulanmış ve buna karşılık kantileverin maksimum uzama miktarı hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar yapılırken kantilever silikondan yekpare katı gövde olarak alınmış, young modülü 1.124×10^{11} N/m^2 ve akma mukavemeti 1.2×10^{8} N/m^2 olarak hesaplamalarda tüm kantileverler için sabit tutulmuştur. Tüm kantilever geometrileri için gerçek kantilever çiplerinde olduğu şekilde düşünülerek sensör çipi ile kantileverin kesişim kenarı sabitlenmiş (kiriş) uç olarak kabul edilmiş diğer uç serbest olarak bırakılmıştır. Kantileverlerin prob uçları bu hesaplamaların dışında tutularak hazırlanan modellemelerde yapılar uçsuz (*ing. tipless*) kantilever gibi düşünülmüştür. Simülasyon modellerinde kullanılan geometrik yapıların boyutsal ve yapısal özellikleri Şekil 3.10'da özetlenmiştir.



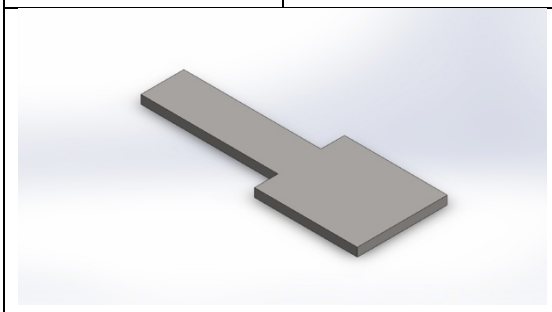
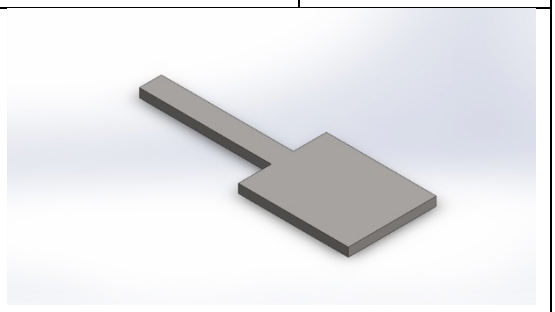
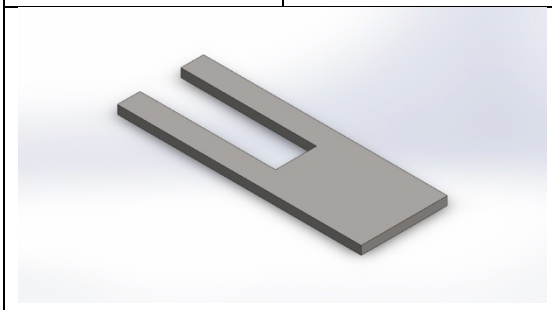
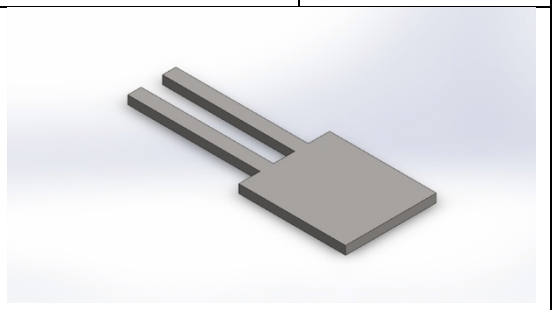
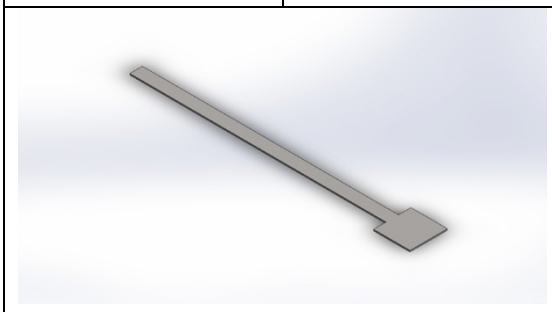
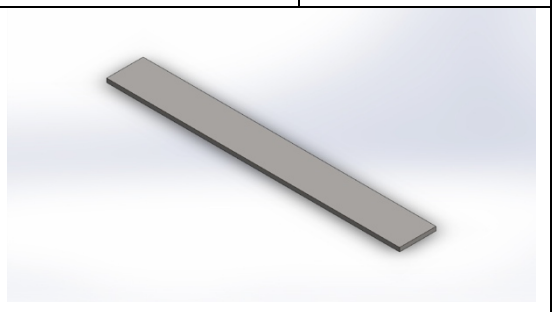
Şekil 3.10. Çalışmalarda kullanılan kantileverlerin boyutları ve geometrik yapıları

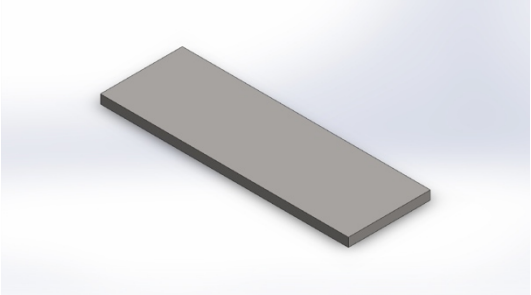
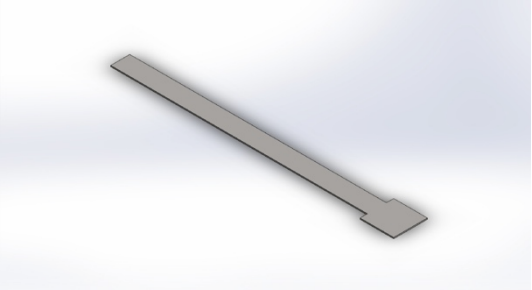
Şekil 3.10'da verilen kantileverlerden M5 ContAl kantileverden, M8 CLR kantileverden, M6 ElectriMulti kantileverden ve M1, M2, M3, M4 ve M7 Tap300Al kantileverden üretilecek şekilde düşünülerek modellenmiştir. Çalışmanın ilerleyen bölümlerinde gerçekleştirilecek deneysel geometrik aşındırma işlemleri burada anlatılan kurguya göre gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmiş kantileverlerin boyutlarındaki farklılıklar standart kantileverlerin verilen ticari teknik özelliklerden farklılık göstermesi ile ilişkilidir. Kantilever yapılarının sahip olduğu maksimum genişlik değerleri uç kısımlar için korunmaya çalışılmıştır.

Çizelge 3.2. Standart Kantileverlerin Model Görüntüleri ve Kütle, Hacim Özellikleri

Model No	Tap300Al		Model No	ContAl
				
Kütle (kg)	Hacim (m^3)		Kütle (kg)	Hacim (m^3)
3.495e-011	**1.5e-014**		**1.0485e-010**	**4.5e-014**
Model No	ElectriMulti75		Model No	CLR
				
Kütle (kg)	Hacim (m^3)		Kütle (kg)	Hacim (m^3)
4.4037e-011	**1.89e-014**		**8.388e-011**	**3.6e-014**

Çizelge 3.3. Modifiye Edilmiş Kantileverlerin Model Görüntüleri ve Kütle, Hacim Özellikleri

Model No	M1		Model No	M2
				
Kütle (kg)	Hacim (m^3)		Kütle (kg)	Hacim (m^3)
3.07187e-011	**1.3184e-014**		**2.4232e-011**	**1.04e-014**
Model No	M3		Model No	M4
				
Kütle (kg)	Hacim (m^3)		Kütle (kg)	Hacim (m^3)
3.10668e-011	**1.33334e-014**		**2.7028e-011**	**1.16e-014**
Model No	M5		Model No	M6
				

Kütle (kg)	Hacim (m^3)		Kütle (kg)	Hacim (m^3)
4.42467e-011	**1.899e-014**		**4.4037e-011**	**1.89e-014**
Model No	M7		Model No	M8
				
Kütle (kg)	Hacim (m^3)		Kütle (kg)	Hacim (m^3)
3.86221e-011	**1.6576e-014**		**7.47697e-011**	**3.209e-014**

3.4. Kantileverlerin Geometrik Modifikasyonu

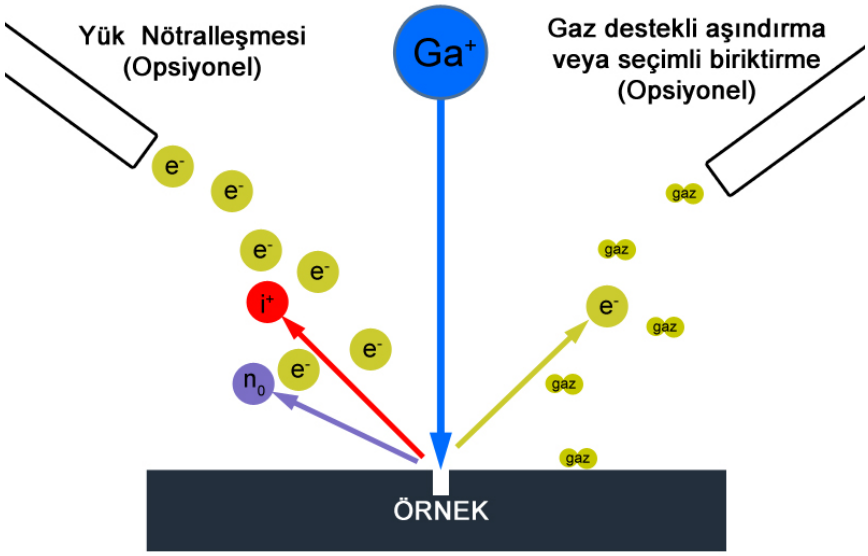
Çalışmada kullanılan kantilever yapılarının yüzeylerine kimyasal buhar çöktürme yöntemiyle silikon tabaka ile altın tabaka arasında adezif bir tabaka oluşturması amacıyla öncelikle 10nm kalınlığında krom (Cr) biriktirilmiştir. Devamında krom adezif katman oluşturulan yüzeylere kimyasal modifikasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesine imkan verecek olan 100nm kalınlığında altın (Au) kaplanmıştır.

Odaklı İyon Demeti sistemi genellikle yarı iletken malzemelerin üretim süreçlerinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde genel olarak Ga^+ gibi iyonların oldukça yüksek yoğunluktaki iyon demetleri kullanılmaktadır. İyonlar örnek yüzeyinde taramalı elektron mikroskobunda elektron demetinin kullanılması amacına benzer şekilde kontrollü bir şekilde taranmaktadır. Bununla birlikte elektron mikroskobu ile aralarındaki en büyük fark odaklamalı iyon demeti yönteminin örnek üzerinde zarar verici etkisinin bulunmasıdır. Yüksek enerjili iyonlar örnek üzerine vurdukça örnek yüzeyindeki atomlar yüzeyden koparılmaktadır. Bununla birlikte iyon kaynağından gelen galyum iyonları yüzey üzerinde veya birkaç nanometre örnek içerisine implant olmaktadır. İyon demetleri yüzeye çarptıklarında ister aşındırma işlemi

olsun ister iyonlar yüzeye difüze olsunlar iyonların yüzeyle çarpışmaları sonucu yüzeyden düşük miktarda malzeme sıçramaktadır. Yüzeyden ayrılan nötral atomlar veya ikincil iyonlar olabilmektedir. Bu ikincil iyonlar veya saçılan iyonlar ayrıca bir detektörde toplanabilmekte ve detektör tarafından sinyale çevrilerek yüzeyin görüntüsü elde edilebilmektedir.

Odaklamalı iyon demeti yönteminde diğer önemli bir konu kullanılan primer iyon demetinin akımıdır. Eğer iyon demeti akımı düşük ise oldukça düşük bir miktarda malzeme aşındırılmaktadır. Fakat yüksek akımlarda iyon oluşturulduğunda oldukça yüksek miktarlarda malzeme etkileşime girmektedir. Bu şekilde yüksek akımlarda nanometre boyutlarında oldukça hassas öğütme işlemleri gerçekleştirilebilmektedir.

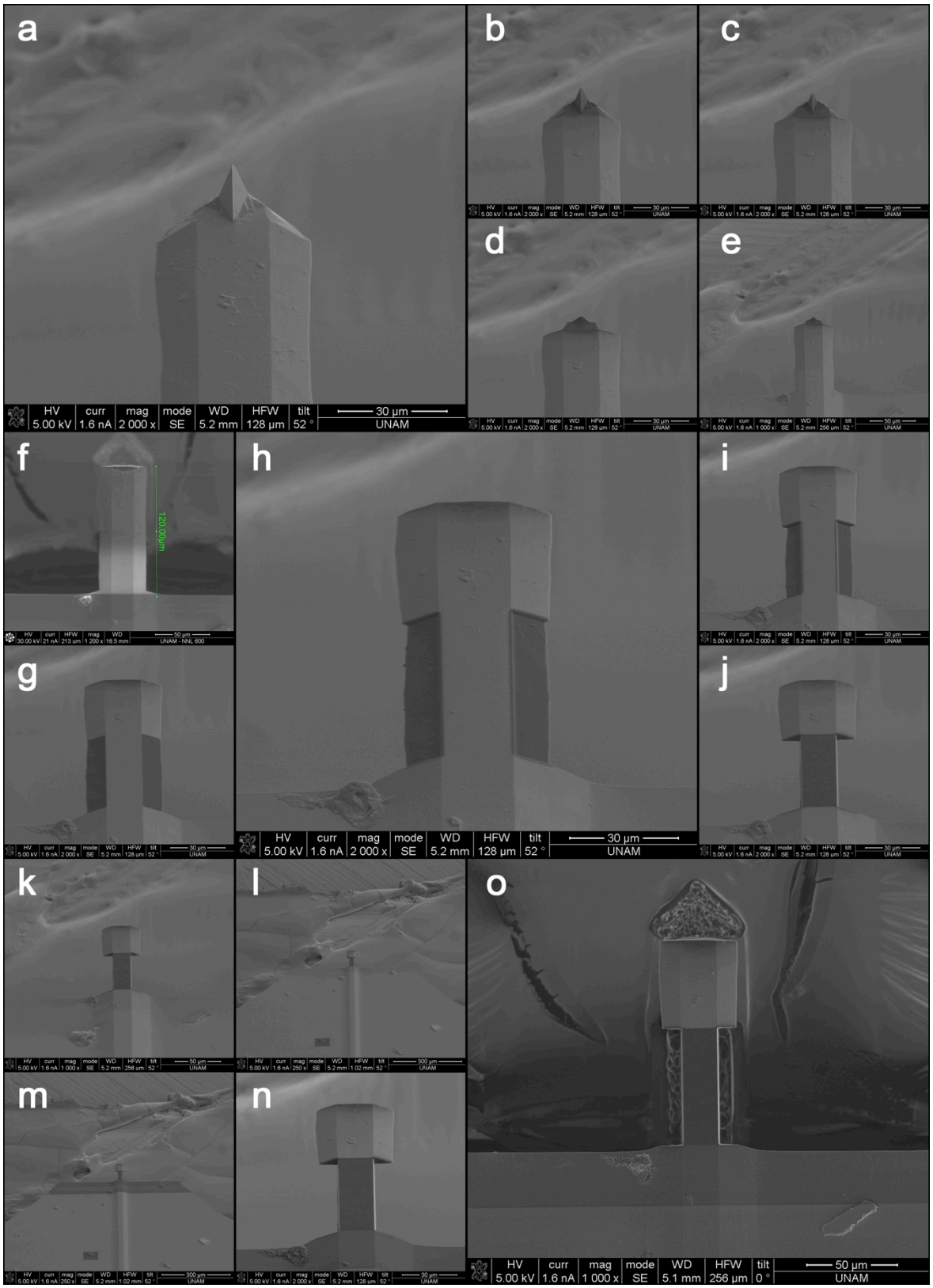
Bu şekilde iyonlar odaklanarak ışın demeti haline getirilerek malzeme üzerinde birikme veya aşındırma işlemi uygulanabilmektedir. Sistemin temel çalışma prensipleri Şekil 3.11'de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Odaklı İyon Demeti yönteminin çalışma prensibi

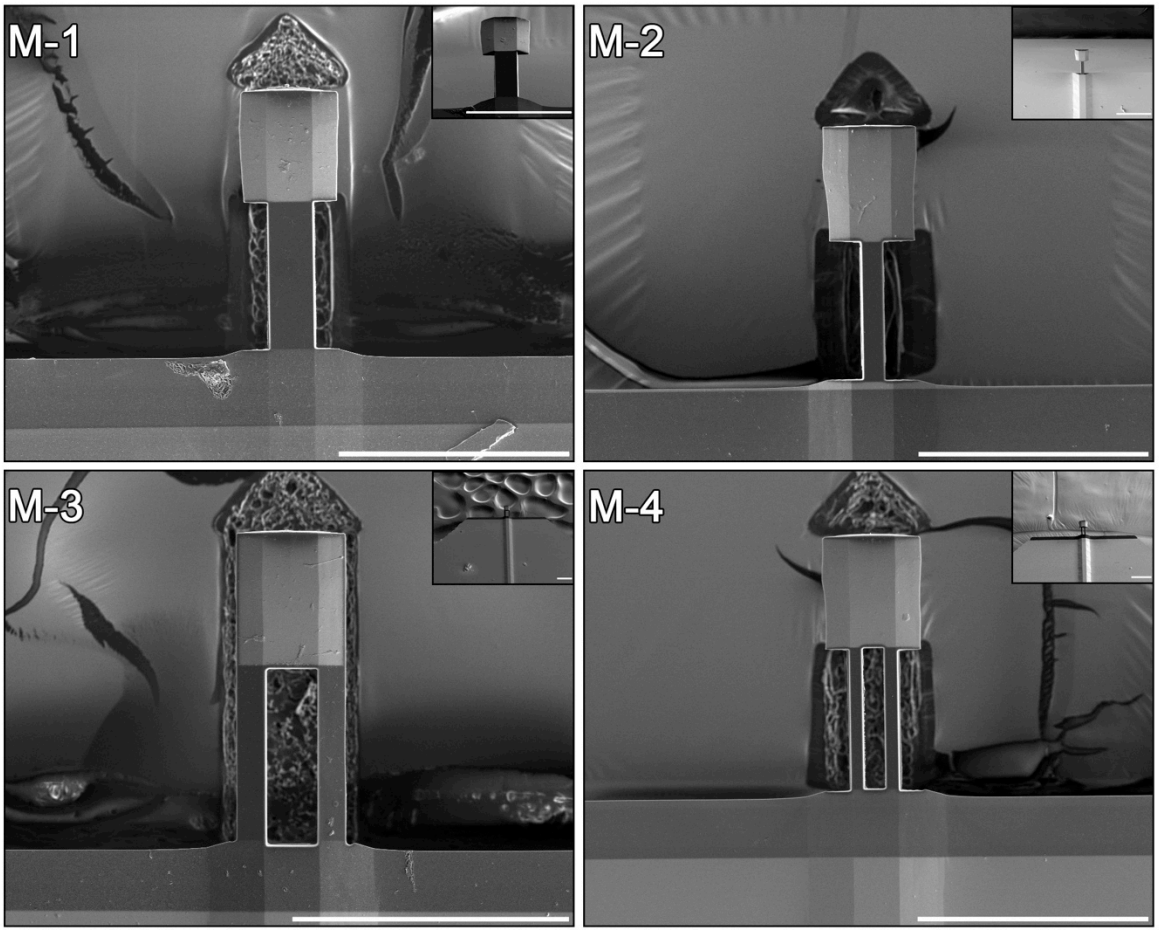
Bizim çalışmamızda kaplama işlemi sonrasında kantileverler çift ışın demetli – Odaklı İyon Demeti (Dual Beam – Focused Ion Beam, DB-FIB) sistemi ile galyum iyonları kullanılarak aşındırma yöntemi ile modifiye edilmiştir. Bu yöntem

kullanılarak örnekler taramalı elektron mikroskopi yöntemi ile gerçek zamanlı izlenirken ikinci kolondan galyum iyon demetleri örnek üzerine gönderilerek istenilen bölgelere aşındırma işlemi uygulanmıştır. Şekil 3.12'de kantilever yapısının zamanla aşındırılarak istenilen geometrik yapıya getirilmesi gösterilmiştir. Burada görüldüğü üzere kantilever yapılarının öncelikle uç bölgeleri tamamen düzleştirilerek kantilever yapısındaki geometrik anormallik ortadan kaldırılmıştır. Sonrasında daha önceden belirlenmiş olan ölçülerde aşındırma işlemine önce geniş odak alanı ve yüksek iyon hızı ile başlanılmış ve sonrasında hassas kenar çizgileri oluşturulurken dar odak alanı ve düşük iyon hızı ile devam edilmiştir. En son olarak kantilever yapıları üzerinde kimyasal ve biyolojik bağlanmalarını istediğimiz uç bölgelerinde tutabilmek için belirlenen alan dışındaki bölgeler yüzeyden 120nm kalınlığında tabakanın aşındırılması işlemiyle sınırlandırılmıştır.



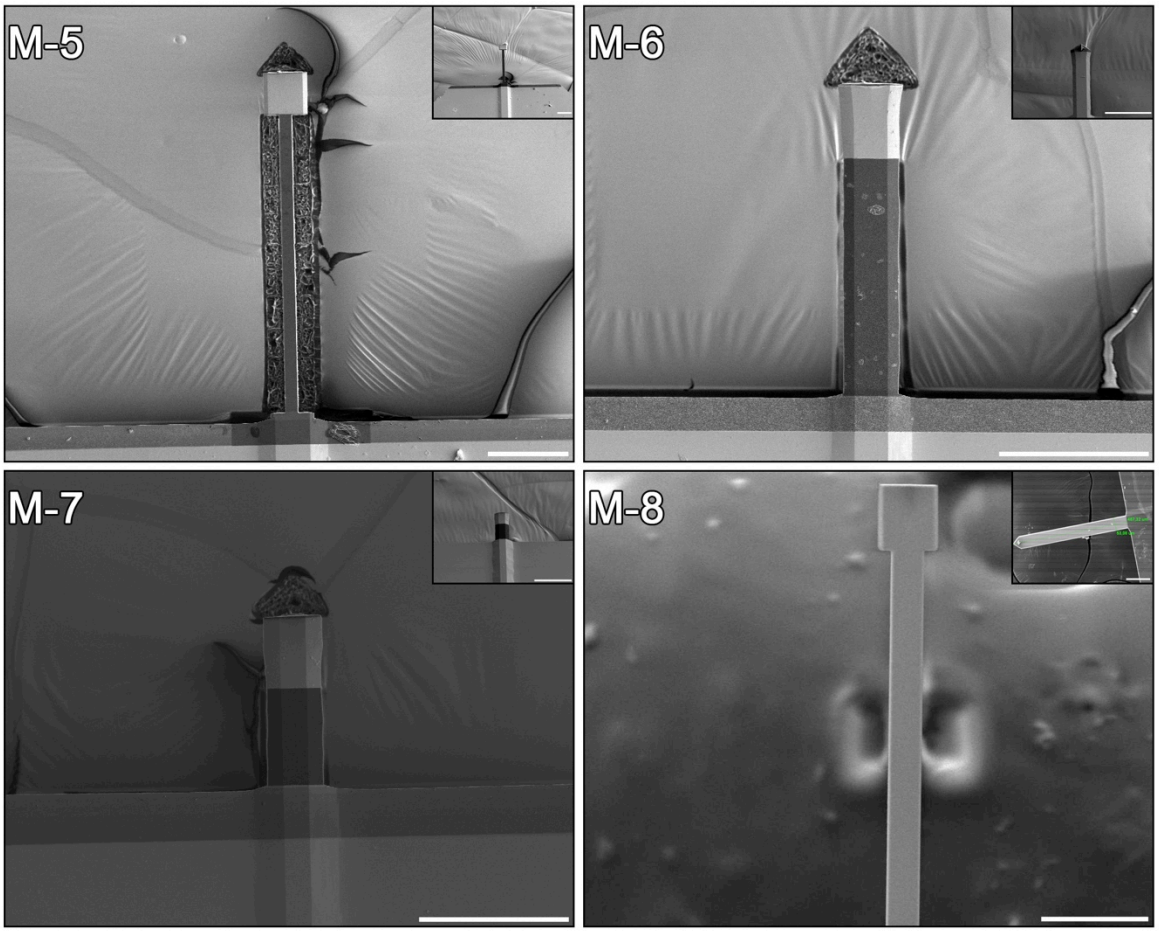
Şekil 3.12. Kantileverlerin iyon demeti aşındırma yöntemi ile geometrik modifiye edilmesinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri

Kantilever yapıları hava ve sıvı ortamlarındaki rezonans frekansları ve kalite faktörleri incelenmek üzere yukarıda anlatılan yöntemle geometrik olarak modelleme çalışmalarında belirlenen şekillerde modifiye edilmiştir. Kantilever yapılarının iyon aşındırma yöntemi ile hazırlanmış farklı geometrik yapıları Şekil 3.13 ve 3.14'de görülmektedir.



Şekil 3.13. Odaklanmış İyon Demeti yöntemi ile farklı geometrik yapılarda hazırlanmış kantilever örneklerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri (M1-M4)

(Şekil içerisindeki küçük görüntülerde kantilever yapısının açılı görüntüleri görülmektedir. Tüm fotoğraflarda numaralar kantilever kodlarını belirtmekte ve verilen barlar 100 μm uzunluğunu göstermektedir.)



Şekil 3.14. Odaklanmış İyon Demeti yöntemi ile farklı geometrik yapılarda hazırlanmış kantilever örneklerinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri

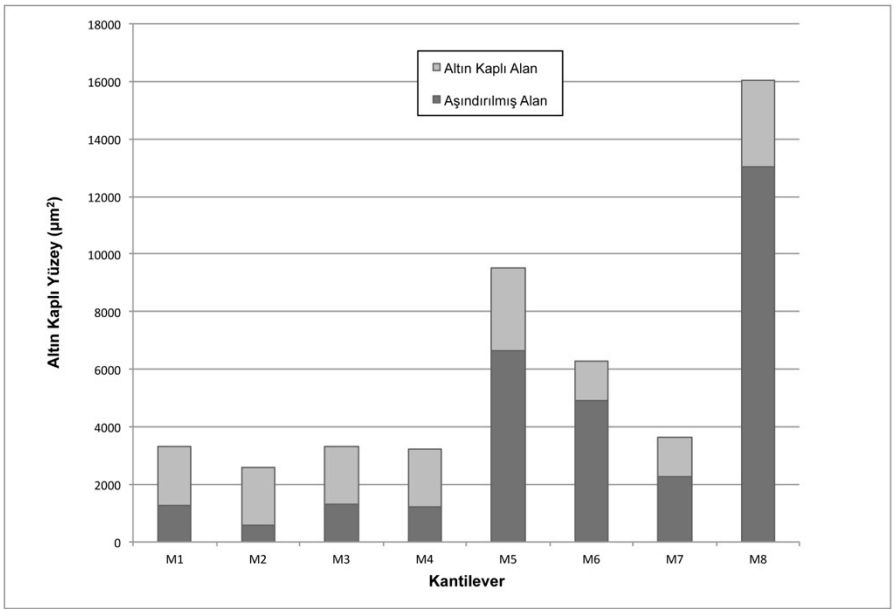
(Şekil içerisindeki küçük görüntülerde kantilever yapısının açılı görüntüleri görülmektedir. Tüm fotoğraflarda numaralar kantilever kodlarını belirtmekte ve verilen barlar 100 μm uzunluğunu göstermektedir.)

Şekil 3.13 ve 3.14'de kantileverler için aşındırma işlemi uygulandıktan sonraki son geometrik şekilleri gösterilmiştir. Bu kantileverler için kimyasal ve biyolojik bağlanmaları sınırlandırmak üzere, belirlenen alan dışındaki bölgelerin yüzeyinden 120nm kalınlığında kaplama aşındırılmıştır. Hazırlanan kantileverler için yüzeyde aşındırma işlemi uygulanmış ve uygulanmamış durumlar için altın kaplı yüzeylerin alanları karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.4'de ve Şekil 3.15'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Hazırlanan kantileverler üzerindeki altın tabakalarının yüzey alanları

Kantilever Kod	Aşındırma işlemi		Toplam alan (μm^2)
	Uygulanmış alan (μm^2)	Uygulanmamış alan (μm^2)	
Tap300Al	-	-	3750*
ContAl	-	-	22500*
ElectriMulti	-	-	6300*
CLR	-	-	18000*
M1	1280	2016	3296
M2	600	2000	2600
M3	1320	2000	3320
M4	1240	2000	3240
M5	6660	2840	9500
M6	4900	1400	6300
M7	2270	1370	4140
M8	13020	3025	16045

* Standart kantileverlerde FIB ile aşındırma işlemi uygulanmamıştır.



Şekil 3.15. Modifiye edilmiş kantileverlerin altın kaplı ve aşındırılmış yüzeylerinin karşılaştırılması

3.5. Kantileverlerin Hava ve Sıvı Ortamındaki Davranışlarının incelenmesi

Çalışmaların bu bölümünde standart olarak kullanılan kantileverlerin modifiye edilmemiş ham hallerinin hava ve sıvı ortamlarındaki dinamikleri ve bu kantileverlere geometrik modifikasyon işlemi uygulanması sonrasındaki yapısal değişikliklerin etkileri incelenmiştir. Modifikasyon işlemi ve sonrası kantileverler kapalı sıvı hücre içerisinde önce hava ortamında ve sonrasında sıvı ortamında

stabilize edilerek merkez rezonans frekansları ve kalite faktörleri ölçülmüştür. Bu ölçümler bize gerçekleştirilen modifikasyon işlemlerinin kantileverin rezonans frekansını ve kalite faktörünü nasıl etkilediğini gösteren önemli bilgiler vermektedir.

3.6. Sisteme Örnek Verilmesi ve Sıvı Akışının Sinyallere Etkisi

Kantilever bazlı biyosensör sisteminin dış çevre koşullarında otomatik örnek toplayabilmesi ve sürekli bir kontrol sistemi olarak kullanılabilmesi için sürekli akış sistemine bağlı olması gerekmektedir. Hem böyle ideal bir sistemi oluşturabilmek için hem de deneyler esnasında örneklerin direkt enjekte edilmesine alternatif bir yöntem oluşturulması için biyosensör sistemine bir pompa eklenmesi düşünülmüştür. Bu nedenle kapalı sıvı hücre içerisinde stabil ve sürekli bir akış profili oluşturabilmek için sıvı hücre giriş ve çıkışları öncelikle her laboratuvar koşulunda bulunabilecek bir peristaltik mikro-pompa sistemine bağlanarak bir kapalı devre sistem hazırlanmıştır. Peristaltik pompa sistemi kapalı bir sıvı kap içerisinde depo edilen hareketli fazı sisteme iletmektedir. Akış hızı olarak kullanılan sistemin elverdiği en düşük akış hızı 100µL/dk olarak belirlenmiştir. Bu sistemde analiz edilecek örnek sıvı haznesi içerisine enjekte edilerek derişim kontrollü olarak akışa verilmektedir.

Peristaltik pompa ile elde edilen sonuçların akış profilinin çok yüksek çıkması ve tatmin edici bulunmaması nedeniyle devam eden çalışmalar için sisteme çok daha hassas bir akış profiline sahip olan yüksek performanslı sıvı kromatografi pompa sistemi entegre edilmiştir. Bu yöntemde örnek enjeksiyonu pompanın devamına bağlı bulunan bir enjeksiyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Sisteme gerçekleştirilen enjeksiyonun 20 µL'lik hacmi kapiler taşıyıcı borularla kapalı sıvı hücre sistemine iletilmektedir. Ayrıca daha yüksek derişimlerde örnek etkileşimleri sağlanmak istenildiğinde ise pompaya giriş ve kapalı hücre sisteminden çıkış bir hareketli faz kabında birleştirilerek örnek eklenmesi direkt olarak buraya gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalarda Dionex marka P680 modeli HPLC pompası kullanılarak 0.01~1 mL/dk aralığında akış hızlarının etkileri incelenmiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi sisteminin kontrol yazılımı kullanılarak analiz süresince sistemdeki akış profili ve pompa basınçları takip edilmiştir. Sistemde gerçekleşecek herhangi bir tıkanıklık için basınç limitleri belirlenerek böyle bir durumda sistemin kendini otomatik kapatması sağlanmıştır.

3.7. Biyotin ile Fonksiyonelleştirilmiş Kantilever Yüzeylerine Streptavidin Bağlanmasının İncelenmesi

Kantilever yüzeylerine altın kaplanması ve bu altın tabakası üzerinde proteinler, antikorlar, oligonükleotidler ve hücreler gibi biyolojik reseptörlerin kovalent olarak bağlanması için geliştirilmiş çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Biyolojik moleküllerin kovalent adsorpsiyonu, protein kaplamanın stabilitesi ve tekrarlanabilirliği gibi bazı önemli avantajlar sağlamaktadır. Bununla birlikte yöntemler incelendiğinde kimyasal adsorpsiyonun en temel probleminin protein gibi yapılardaki aktif fonksiyonel grupların yüzey üzerine bağlanması veya konformasyonel bozulmalar sebebiyle fonksiyonel grupların analit ile bağlanmasını engelleyecek oryantasyonlara girmesi olarak görülmektedir. Bu nedenlerden dolayı reseptör moleküllerin aktivitelerini engellemeyecek uygun immobilizasyon yöntemlerinin seçilmesi büyük önem taşımaktadır.

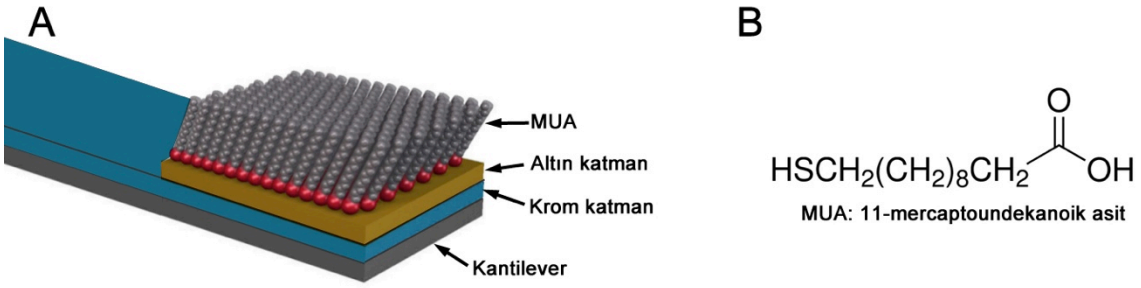
Altın yüzeyler için literatürde farklı uygulamalarda kullanılan bir yöntem çalışmalarımızda temel modifikasyon yöntemi olarak seçilmiştir. Bu yöntemde özellikle tiyol kimyasından faydalanılarak karboksil fonksiyonel uç grubuna sahip 11-merkaptoundekanoik asit uzatıcı zinciri altın yüzeyine bağlanmaktadır. Yüzey üzerinde kendiliğinden düzenlenen bir yapı oluşturan bu 11 karbonlu zincir, karbodiimit aktivasyonu yöntemi ile 1-etil-3-(2-dimetilaminopropil)-karbodiimit (EDC) ve N-hidroksisüksinimid (NHS) varlığında karboksil gruplarının esterifikasyonu ile fonksiyonelleştirilmektedir. EDC suda çözünebilen bir karbodiimit türevidir ve karboksil gruplarını aktive ederek *o*-üre türevleri oluşturur. Ortama amin grubuna sahip bir molekülün eklenmesi ile karboksilik asit ile amin grupları arasında amid bağı oluşması EDC aktivasyonu sayesinde katalizlenmektedir. NHS ise EDC varlığında gerçekleşen karbodiimit bağlanmasının kontrollü bir şekilde gerçekleşmesi için mediatör olarak görev almaktadır. Karboksilik gruplar ile NHS arasında kondenzasyon ürünü olarak ara ürün bir aktif ester bileşiği oluşmaktadır ve bu grup ikinci basamakta amin ile reaksiyona girerek amid bağı oluşturmaktadır. Böylece kantilever yüzeyinde istenilen biyolojik molekülün immobilizasyonu kontrollü olarak gerçekleştirilmektedir [139-141].

3.7.1. **Altın Kaplı Kantilever Yüzeylerinin Hazırlaması ve Temizlenmesi**

Kendiliğinden düzenlenen tek tabaka 11-merkaptoundekanoik asit yüzeyin hazırlanması için ilk olarak kantilever yüzeyleri sputter cihazı kullanılarak önce 10nm kalınlıkta krom (Cr) ile sonrasında 100nm kalınlıkta altın (Au) ile kaplanmıştır. Altın kaplı kantileverler sırasıyla kloroform, aseton ve izopropil alkol çözeltilerinde 15'er dakika bekletilerek temizlenmiştir. Sonrasında organik kirliliklerin giderilmesi amacıyla Piranha çözeltisi [(30:70, (v:v)) hidrojen peroksit (H_2O_2), sülfürik asit (H_2SO_4)] taze hazırlanarak kullanılmıştır. Piranha çözeltisi hazırlandığı anda reaksiyona girmekte ve gerçekleşen ekzotermik reaksiyon sonucu çözelti sıcaklığı 90°C gibi yüksek sıcaklıklara çıkmaktadır. Bu nedenle kantileverler piranha çözeltisi içerisine konulmadan önce birkaç dakika sıcaklığın düşmesi için beklenilmiş ve örnekler piranha çözeltisi içerisinde 5 dk bekletilmiştir. Piranha çözeltisi ile temizlenen örnekler 3 kez deiyoize su ile yıkanmıştır. Temizlenen kantileverler azot gazı ile kurutularak deneylerde kullanılmak üzere desikatör içerisinde bekletilmiştir.

3.7.2. **Altın Kaplı Kantilever Yüzeyinin 11-merkapto-undekanoik asit ile Fonksiyonelleştirilmesi**

Örneklerin yüzeyinde uzatıcı kollar oluşturmak üzere 10 mL etanol içerisinde 10mM'lık 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) çözeltisi hazırlanmış ve çözeltinin pH'ı hidroklorik asit (HCl) eklenerek 2'ye ayarlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilere aşırı azot gazı beslemesi yapılarak ortamdaki çözünmüş oksijen (O_2) ve diğer gazlar uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.16. Kantilever üzerinde oluşturulan 11-merkaptoundekanoik asit uzatıcı kolları için şematik gösterim (A) ve kimyasal yapı (B)

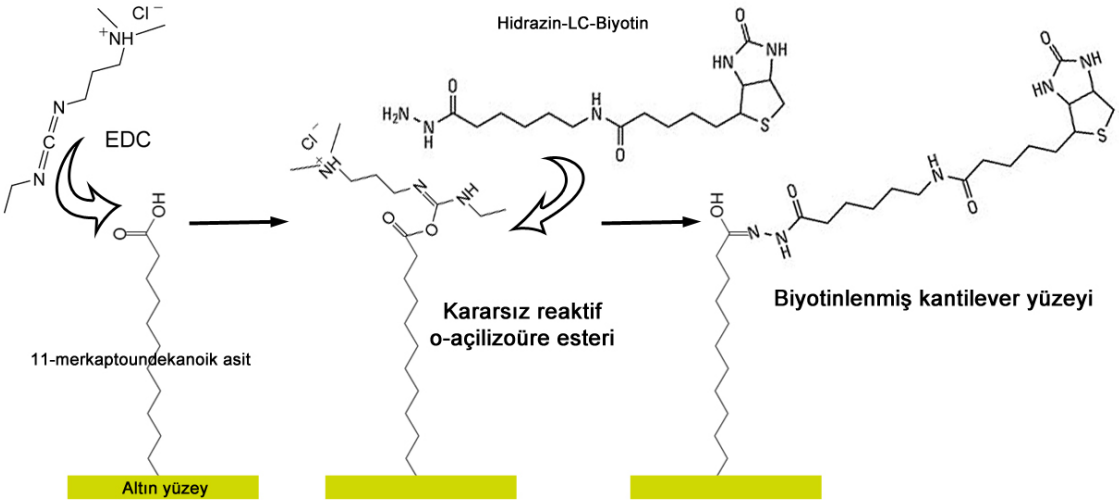
Kantilever çipler petri kabı içerisinde hazırlanan çözeltiye konularak desikatör içerisine yerleştirilmiştir. Desikatör, içerisine N_2 gazı verilerek vakumlanmış ve örnekler MUA tabakasının oluşması için ışık görmeyen ortamda 24 saat

bekletilmiştir. Literatür bilgileri MUA tabakasının oluşması süresinde ilk 6 saatten sonra moleküler düzenlenme üzerinde sürenin anlamlı etkisi olmadığını bununla birlikte konformasyonel olarak en stabil formun sağlanması için 24 saat bekleme süresinin en iyi sonuçları verdiğini göstermektedir [142, 143]. Şekil 3.16'da kantilever üzerinde tüm yüzeye kaplanan krom katmanı, FIB aşındırması ile sınırlandırılan altın katmanı ve bu katman üzerinde tutturulan 11-merkaptoundekanoik asit katmanlarının şematik gösterimi (A) ve 11-merkaptoundekanoik asidin kimyasal yapısı (B) verilmiştir.

3.7.3. **Karboksil Gruplarına Biyotin Bağlanması**

Kantilever yüzeyinde oluşturulan serbest karboksil gruplarına biyotin moleküllerinin bağlanması için suda çözünen karbodiimid EDC varlığında biyotin hidrazit türevi kullanılmıştır. EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) karboksil grupları ile etkileşerek karboksil gruplarının hidrazid amino gruplarına karşı reaktif olmalarını sağlamaktadır. Bu reaksiyon genellikle asidik pH değerlerinde (pH 4.7-5.5) gerçekleşmekle birlikte amin ve karboksil içermeyen tamponlar kullanıldığında pH=7.4 değerlerine kadar efektif bir şekilde reaksiyon gerçekleşmektedir.

EDC ile hidrazid reaksiyonları karboksil ve amin grupları arasında konjugasyon gerçekleşmesi üzerinden yürüdüğü için her iki fonksiyonel grubu içeren moleküllerin biyotinlenmesi işlemlerinde molekülün kendi içerisinde çapraz bağlanmalar gerçekleştirerek çökelmesini önlemek gerekmektedir. Yine benzer bir şekilde yüzey üzerindeki fonksiyonel gruplar biyotinlenirken proteinlerin aktif grupları üzerinden bağlanmaları önlemek amacıyla bu reaksiyon için biyotin hidrazid molar derişiminin diğer amin içeren bileşiklere göre reaksiyon ortamında aşırı miktarda bulunması gerekmektedir [144].



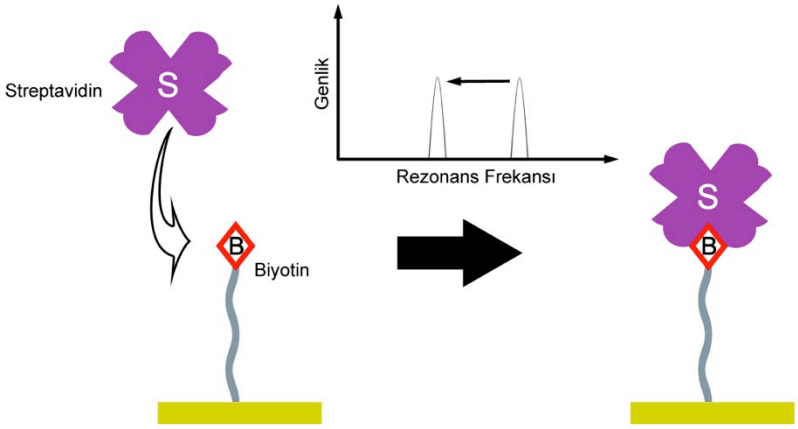
Şekil 3.17. Kantilever yüzeyinin biyotinlenmesi

Bu nedenle MUA karboksilik gruplarını aktive etmek için 0.1 M MES 2-(N-morfolino)etansülfonik asit tamponu (pH= 5.2) içerisinde 1mL 0.1 M olacak şekilde EDC çözeltisi hazırlanır ve kantilever üzerine 100µL eklenir. 10mM biyotin hidrazid çözeltisi (EZ-Link Biotin-LC-Hydrazide, Pierce-Thermo) 1mL DMSO çözücüsü içerisinde hazırlanır ve bu çözeltiden 100µL kantilever üzerine eklenir. Kantilever yüzeyine biyotin moleküllerinin bağlanması için reaksiyon oda sıcaklığında 2 saat inkübasyon sürecine bırakılır. Hazırlanan örnekler bekletilmeden analizlerde kullanılmış, karakterizasyon gibi işlemler için bekletilmesi gereken örnekler ise +4 °C'de saklanmıştır.

3.7.4. **Biyotin – Streptavidin Etkileşimlerinin İncelenmesi**

Hazırlanan biyotin bağlanmış kantileverler ile streptavidin etkileşimlerinin incelenmesi için öncelikle streptavidin örnekleri hazırlanmıştır. Bunun için 100mM PBS tamponu hazırlanmış ve streptavidin laminar akış kabini içerisinde fosfat tamponu çözeltisi ile çözülerek 1.0 mg/mL streptavidin standart çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden analizler için kullanılmak üzere farklı derişimlerde alikot çözeltiler -20 °C'de dondurularak saklanmıştır.

Biyotin ile fonksiyonelleştirilerek hazırlanmış kantileverler ölçümler öncesinde stabil hale gelmesi için yaklaşık olarak 1 saat PBS tamponu içerisinde bekletilmiştir. Stabil arkafon oluştuktan sonra derişimi ayarlanan streptavidin örnekleri kapalı sıvı hücre içerisine enjekte edilmiştir.



Şekil 3.18. Biyotin - streptavidin bağlanmasının şematik gösterimi ve rezonans frekansına etkisi

Kantileverlerin rezonans frekansları sıvı ortamında her dakikada 3 ölçüm alınarak rezonans frekansları dengeye gelene kadar sürekli takip edilmiştir. Stabil ölçüm alındıktan sonra hazırlanan streptavidin örnekleri HPLC sisteminin enjeksiyon portu aracılığı ile sıvı hücreye gönderilmiştir. Streptavidin örnekleri sıvı hücre içerisine ulaştığında HPLC pompası kapatılarak ölçümler alınmaya başlanmıştır. Dakikada 3 ölçüm okuma gerçekleştirilerek biyotin – streptavidin bağlanmaları bir saat süresince incelenmiştir.

3.8. Anti Hepatit B Yüzey Antijeni Antikoru ile Hepatit B Yüzey Antijeninin Tayin Edilmesi Çalışmaları

Çalışmaların bu kısmında biyotinlenmiş Hepatit B yüzey antijenine spesifik antikor (anti-HBs Ab-Biyotin) ve biyotinlenmiş Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg-Biyotin) kullanılarak biyosensör çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda yüzeye anti-HBs-Ab-Biyotin'in fiziksel olarak tutturulması ve streptavidin ile biyotin üzerinden bağlanarak yüzeye immobilizasyonu araştırılmıştır.

Anti-HBs, Hepatit B yüzey antijenlerine spesifik olarak hedefli bir antikordur. Anti-HBS, Hepatit B enfeksiyonu geçirmiş hastalarda veya Hepatit B aşısı olmuş kişilerde oluşabilmektedir. Anti-HBS testleri klinik uygulamalarda Hepatit B aşısına ihtiyaç olup olmadığının anlaşılmasında ve gerçekleştirilen aşı uygulamalarının yeterli olup olmadığının anlaşılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca anti-HBs testleri

akut Hepatit B enfeksiyonu geçiren hastalarda hastalığın seyrinin takibi için uygulanmaktadır [145]. Kullanılan Anti-HBs kiti insan serumundan saflaştırılmış Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) alt tipleri ad ve ay bileşimini içermektedir.

3.8.1. **Anti-HBs Reseptörlerin Yüzeye Adsorpsiyonu**

Bu bölümde gerçekleştirilen çalışmaların ilk bölümünde altın kaplanmış kantilever yüzeyleri üzerine 100µL Anti-HBs (0.2 mg/L, 100mM fosfat tamponu (PBS) içerisinde, pH:7.4) eklenerek bir saat süresince bekletilmiş ve yüzeye fiziksel olarak tutunmaları sağlanmıştır.

3.8.2. **Streptavidin Bağlanmış Kantilever Yüzeylere Anti-HBs Reseptörlerin Bağlanması**

Çalışmanın ikinci aşamasında yüzeyine streptavidin bağlanmış kantileverler hazırlanmıştır. Bu amaçla bir önceki bölümde belirtildiği şekilde kantileverler önce 10nm krom ve ardından 100nm altın ile kaplanmıştır. Altın kaplanmış kantileverler önce organik çözücülerle sonra su ile yıkandıktan sonra organik kirliliklerin uzaklaştırılması amacıyla Piranha çözeltisi içerisinde 5 dk bekletilerek temizlenmiş ve son olarak deiyonize su ile tekrar yıkanmış ve etanol çözeltisine alınmışlardır. Kantileverlerin yüzeyinde 10 mM'lık 11-merkaptoundekanoik asit çözeltisi içerisinde 24 saat inkübe edilerek MUA uzatıcı kollar oluşturulmuştur. Karbodiimit aktivasyonu ile fonksiyonelleştirilen uçlar hidrazin reaksiyonu ile biyotinlenmiştir. Hazırlanan biyotinlenmiş yüzeyler 1 saat süreyle 100 µL 0.1 µg/mL streptavidin çözeltisi içerisinde bekletilerek biyotin-streptavidin bağlanmaları gerçekleştirilmiştir. Streptavidin kaplı örneklere 100µL Anti-HBs-Biyotin (0.2 µg/mL, 100mM fosfat tamponu (PBS) içerisinde, pH:7.4) eklenerek 1 saat beklenmiş ve streptavidin - biyotin bağlanması ile kantilever yüzeyinde reseptör tabakasının oluşumu sağlanmıştır.

3.8.3. **Anti-HBs – HbsAg Etkileşimlerinin İncelenmesi**

Hazırlanan anti-HBs reseptörleri ile dekore edilmiş kantileverler ile Hepatit B yüzey antijenlerinin etkileşimlerinin incelenmesi için örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan Anti-HBs ile fonksiyonelleştirilmiş kantileverler 85 mM MES (2-morfolino-etansülfonik asit) tamponu (pH6.5) içerisinde sıvı hücreye alınarak rezonans

frekansının stabil hale gelmesi beklenmiştir. Rezonans frekansı dengeye geldikten sonra HBsAg-biyotin örnekleri 85 mM MES tamponu (pH6.5) içerisinde hazırlanarak kapalı sıvı hücre içerisine HPLC sistemi üzerinden enjekte edilerek verilmiştir. Zamana karşı kantilever yüzeyinde gerçekleşen bağlanmalar nedeniyle rezonans frekansında gerçekleşen değişimlerin ölçülmesi için 60dk süresince kantileverlerin rezonans frekansları kaydedilmiştir.

3.9. İnsan Serum Albümin (HSA – Human Serum Albumin) Nanopartiküller Kullanılarak Sistemin Hassasiyetinin Arttırılması

Deneylerde modifikasyonların kontrollü olarak belirli bir alanda sınırlandırılması işlemi fonksiyonel grupların oluşturulacağı yüzey alanını da sınırlandırmıştır. Bu nedenlerden dolayı kantilever yüzeyinde belirli bir alanda daha fazla fonksiyonel grubun oluşturulması ve serbest reaktif uçların sayısının arttırılması amacıyla yüzeye nanopartiküllerin bağlanması ve bu nanopartiküller üzerinde reseptör moleküllerin immobilize edilmesi araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle çalışmalarda kullanılacak insan serum albümininden (HSA) hazırlanan nanopartiküller üretilmiştir. Çalışmaların bu kısmında kullanılan HSA nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında araştırma grubumuzda daha önce karakterizasyon ve optimizasyon işlemleri çalışılmış olan desolvasyon yöntemi ve gluteraldehit ile çapraz bağlama protokolü takip edilmiştir [146].

Kantilever modifikasyonlarının kontrollü olarak gerçekleştirilebilmesi için çalışmanın bu bölümünde kantileverlerin yüzeyleri önce altın tabakası için adhesif bir katman oluşturmak üzere krom ile kaplanmış sonrasında ise nanoboyutta altın film tabakası oluşturulmuştur. Altın yüzey üzerinde 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) kullanılarak kendiliğinden düzenlenen tek tabaka uzatıcı kollar oluşturulmuştur. Bu uçlara biyotinlenmiş HSA nanopartiküller bağlanarak ortama enjekte edilen streptavidin ile etkileşimleri gerçek zamanlı incelenmiştir.

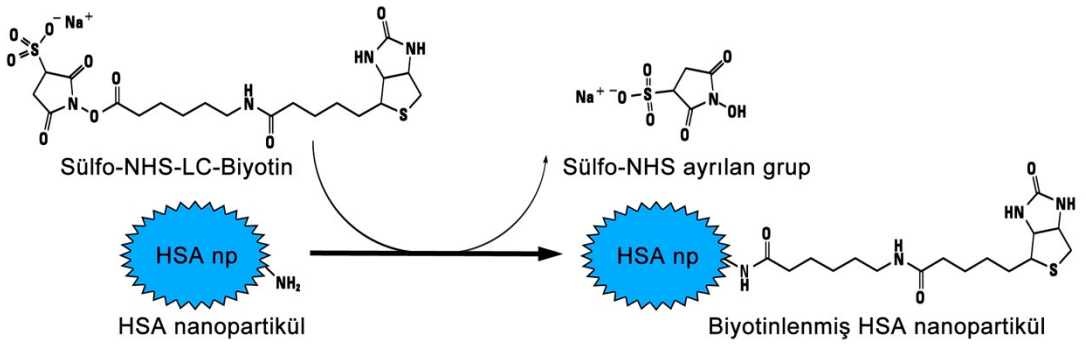
3.9.1. HSA Nanopartiküllerin Hazırlanması

İnsan serum albümin (HSA) nanopartiküllerin hazırlanmasında Lin ve arkadaşlarının geliştirdikleri desolvasyon yöntemi kullanılmıştır [147]. 50 mg albümin 2.0 ml deiyonize su içerisinde çözülmüş ve 1M NaOH ve 1M HCl

yardımıyla pH: 8,5 olacak şekilde ayarlanmıştır. Albümin çözeltisine 600 rpm sabit karıştırma altında yaklaşık 3 ml aseton yavaşça damla damla eklenmiştir (1mL/1dk). Çözeltinin rengi bulanıklaştıktan sonra %8 glutaraldehit eklenerek nanopartiküllerin çapraz bağlanması sağlanmıştır. Nanopartikül çözeltisi, 6 saat 600 rpm sabit karıştırma hızı ile oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra; 12000 rpm'de 25 dakika santrifüjlenerek devamında nanopartiküller deiyonize su ile 3 kez yıkanmış ve yapıda bulunan fazla glutaraldehit ve aseton uzaklaştırılmıştır. Nanopartiküller liyofilizatörde dondurularak kurutulmuş ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

3.9.2. **HSA Nanopartiküllerin Biyotinlenmesi**

Proteinlerin ve protein kaynaklı nanopartiküllerin yapısındaki birincil amino grupları üzerinden karbodiimid aktivasyonu [148] ve biyotin süksinimidil (NHS) esterleri ile etkileştirilerek modifiye edilmeleri literatürde oldukça yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Birincil amino grupları birçok hayvansal proteinde bolca bulunan lizin ve arjinin gibi yan gruplarda bulunmaktadır ve genellikle protein üzerinde ulaşılabilir yerleşimlerde bulunmaktadırlar. Bu grupların genellikle proteinin biyolojik aktivitesinde rol oynamaması ise bu gruplar üzerinden gerçekleştirilen modifikasyonların proteinin diğer biyolojik moleküllerle etkileşimini etkilememesi nedeniyle büyük bir avantaj sağlamaktadır [149-151]. Hazırlanan HSA nanopartiküllerin yüzeylerindeki aktif amin grupları üzerinden biyotin molekülleri bağlanması amacıyla Sülfo-NHS-LC-biyotin molekülü kullanılarak fonksiyonelleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir [152].



Şekil 3.19. HSA nanopartiküllerin Sülfo-NHS-LC-biyotin ile reaksiyonuyla biyotinlenmesi [152]

Biyotin: protein molar oranı biyotinleme işlemlerinde çökelmeyi önlemek amacıyla 100:1 oranında tutulmaktadır. Bu nedenle zeta potansiyel ve boyut ölçümü yöntemleri ile nanopartiküllerde agregasyon ve çökelme oluşumu takip edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonrasında 10 mg HSA nanopartikülü 50mM fosfat tamponu (PBS) (pH:7.4) ile yıkanarak sonrasında 1.0 mL PBS tamponu içerisinde homojen olarak dağıtılmıştır. Yine aynı PBS tamponu içerisinde 1 mM Sülfo-NHS-LC-biyotin çözeltisi (0.56 mg/mL) hazırlanmıştır. İki çözeltiden eşit hacimlerde alınmış ve çözeltiler karıştırılarak reaksiyon başlatılmıştır. HSA nanopartiküller üzerindeki grupların biyotinlenme işlemi için çözelti oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra reaksiyona girmeden kalan sülfo-NHS-LC-biyotin moleküllerinin inaktif edilmesi için çözeltiye eşit hacimde 50nM Tris.Cl (pH 7.4) eklenmiştir. Çözeltideki reaksiyona girmeyen biyotin türevlerinden ve safsızlıklardan kurtulmak için çözelti 3 kez 12000 rpm'de 25 dakika santrifüjlenerek PBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Nanopartiküller, PBS ile süspanse edilerek daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmışlardır.

3.9.3. **HSA Nanopartiküllerin Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri**

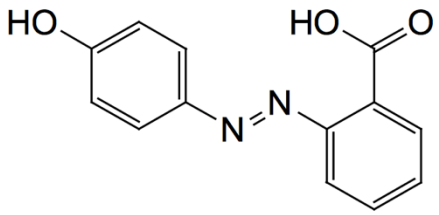
Hazırlanan HSA nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin incelenmesi amacı ile partiküllerin taramalı elektron mikroskobu ve atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri incelenmiştir.

HSA polimerinin ve HSA nanopartiküllerinin sahip olduğu kimyasal yapıları belirlemek, aynı zamanda HSA nanopartiküllerin yapısında safsızlık olup

olmadığının ve bağlanan ligandı göstermek amacı ile her örnek için FTIR (Fourier Transform Infra Red) spektroskopisi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla: hazırlanan HSA nanopartikül ve HSA'nın FTIR (Schimadzu, DR8101, Japonya) spektrumları alınmıştır. Elde edilen FTIR spektrumları değerlendirilerek hazırlanan örneklerin beklenilen kimyasal yapıya sahip olup olmadığı incelenmiştir.

3.9.4. **Yüzeye Bağlanan Biyotin Miktarının Tayini**

HABA (4-hidroksiazobenzene-2-karboksilik asit) (Şekil 3.20) biyotinlenmiş protein yapılarında biyotinin molar oranını tayin etmek için kullanılan reaktiftir. HABA ve avidin kompleksi içeren bir boyar madde (Pierce, Thermo Scientific) kullanılarak nanopartiküllerin yüzeylerine bağlanan biyotin miktarı bulunmaya çalışılmıştır. HABA avidine bağlandığında 500nm dalga boyundaki ışığı absorplamaktadır (ε = 34,000 M^{-1} cm^{-1}).



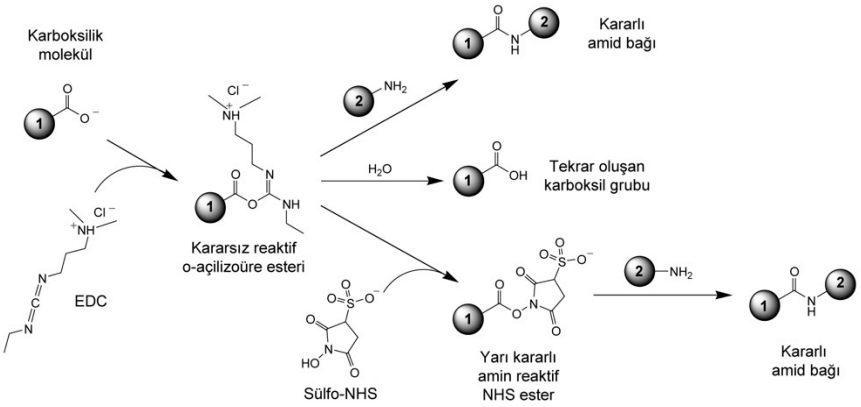
Şekil 3.20. HABA (4-hidroksiazobenzene-2-karboksilik asit) molekülünün kimyasal yapısı

Biyotin göreceli olarak küçük bir moleküldür ve avidin molekülü ile hızla bağlanma eğilimi göstermektedir. Biyotin – avidin kompleksi oluştuğunda genellikle yüksek pH değişimleri ve organik çözücüler gibi denatüre edici etkenlerden etkilenmez. Biyotinlenme miktarını saptamak için HABA ve avidin karışımı içerisine biyotinlenmiş nanopartikül çözeltisi eklenir. Avidine olan yüksek afinitesi nedeniyle biyotin HABA ile yer değiştirir ve böylece 500nm'deki absorbans değerlerinde azalma gerçekleşir. Bu şekilde nanopartiküller ile etkileşmeden önceki ve sonraki absorbans değişimlerinden yüzeydeki biyotin miktarı kantitatif olarak hesaplanabilmektedir.

3.9.5. **Biyotinlenmiş HSA Nanopartiküllerle Dekore Edilmiş Kantilever Yüzeylerin Hazırlanması**

Çalışmanın bu kısmında diğer kantilever fonksiyonelleştirme basamaklarında olduğu gibi öncelikle kantilever yüzeyinde tek tabaka uzatıcı kollar oluşturulmuştur. Bu amaçla öncelikle kantilever yüzeyi sputter cihazı kullanılarak 10nm krom ile sonrasında 100nm kalınlıkta altın ile kaplanmıştır. Hazırlanan altın kaplı kantileverler ilk olarak sırasıyla kloroform, aseton ve izopropil alkol çözeltilerinde 15'er dakika bekletilmiş ve devamında organik kirliliklerin giderilmesi amacıyla Piranha çözeltisi içerisinde 5 dakika bekletilerek temizlenmiştir. Örnekler safsızlıkların uzaklaştırılması için 3 kez deiyoize su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur. Temizlenen örneklerin yüzeylerinde daha önceki bölümlerde anlatılan prosedür takip edilerek 24 saat 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) çözeltisi içerisinde bekletilerek uzatıcı kollar oluşturulmuştur.

Hazırlanan merkaptoundekanoik asit kendiliğinden düzenlenen tabakanın serbest uçlarında bulunan karboksil gruplarının (-COOH) nanopartiküller üzerinde bulunan amin grupları ($-NH_2$) ile reaksiyona girerek yüzeye bağlanmasını sağlamak amacıyla karboksil gruplarının aktive edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle aktivasyon işlemi için literatürde sıklıkla kullanılan NHS-EDC aktivasyon prosedürü izlenmiştir. EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) gibi bir karbodiimid varlığında NHS (N-hidroksisüksinimid) karboksil grubu ile reaksiyona sokularak yarı kararlı bir NHS esteri oluşturulur. NHS hem suda hemde organik çözücülerde çözünebilen bir moleküldür. Bunun yanında NHS ile aktive edilen modifiye karboksil gruplarının sudaki çözünürlükleri düşmektedir. Ayrıca NHS ile aktive edilen karboksil gruplarının pH'a bağlı olarak zamanla hidroliz oldukları bilinmektedir. pH 7'de ortalama yarılanma süresi 4-5 saat olan NHS ester yapıları pH 8.3'e yükseldiğinde yarılanma süresi 10 dakikaya kadar düşmektedir. Bu nedenle NHS ile aktive edilmiş grupların amin grupları ile hızla reaksiyona sokulmaları en iyi sonuçları vermektedir [152].



Şekil 3.21. NHS varlığında EDC kullanılarak gerçekleştirilen karbodiimid aktivasyonunun kimyasal gösterimi

MUA karboksilik gruplarını aktive etmek için 0.1 M MES 2-(N-morfolino) etansülfonik asit tamponu içerisinde 0.1 M EDC çözeltisi, 0.1 M PBS tamponu içerisinde ise 0.1 M NHS çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 1:1 oranında karıştırılarak çip örnekleri üzerine damlatılarak 2 saat süre ile aktivasyon için bırakılmıştır.

Aktive edilmiş karboksil gruplarına nanopartiküllerin bağlanması için 10 mg/mL biyotinlenmiş HSA nanopartikül çözeltisi 0.1M PBS tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Bu çözelti aktivasyon çözeltisi içerisinde bulunan örneklerin üzerinden pipetleme ile fazla çözelti alınarak kantileverlerin üzerine nanopartikül süspansiyonundan 100 µL eklenerek 30 dk inkübe edilmiştir. Hazırlanan örnekler bekletilmeden analizlerde kullanılmış, karakterizasyon gibi işlemler için bekletilmesi gereken örnekler ise +4 °C'de saklanmıştır.

3.9.6. **Biyotinlenmiş HSA nanopartiküller ile Streptavidin Etkileşimlerinin İncelenmesi**

Hazırlanan biyotinlenmiş HSA nanopartiküllerin immobilize edildiği kantilever yüzeyleri ile streptavidin etkileşimlerinin incelenmesi için daha önce stok çözeltiden alikotlanarak hazırlanan streptavidin örnekleri kullanılmıştır.

Biyotin-HSA nanopartiküllerle hazırlanmış kantileverler ölçümler öncesinde stabil hale gelmesi için yaklaşık olarak 1 saat PBS tamponu içerisinde bekletilmiştir. Rezonans frekansı sabitlenen kantileverler ile etkileştirilmek üzere derişimi ayarlanan streptavidin örnekleri kapalı sıvı hücre içerisine HPLC sistemi üzerinden enjekte edilerek verilmiştir. Zamana karşı kantilever yüzeyinde gerçekleşen bağlanmalar nedeniyle rezonans frekansında gerçekleşen değişimlerin ölçülmesi için 60 dk süresince kantileverlerin rezonans frekansları kaydedilmiştir.

3.9.7. **HSA Nanopartiküller Üzerinden Streptavidin Bağlanmış Kantilever Yüzeylere Anti-HBs Reseptörlerin Bağlanması**

Çalışmanın bu aşamasında yüzeyleri biyotinlenmiş nanopartiküllerle dekore edilmiş kantileverler streptavidin ile etkileştirilmiş ve streptavidinin diğer fonksiyonel aktif bölgelerine Anti-HBs molekülleri bağlanmıştır. Bu sensörlerin hazırlanması için bir önceki bölümde anlatılan yöntem takip edilerek yüzeyde biyotinlenmiş nanopartiküller oluşturulduktan sonra 1 saat süreyle 100 µL 0.1 µg/mL streptavidin çözeltisi içerisinde bekletilerek biyotin-streptavidin bağlanmaları gerçekleştirilmiştir. Streptavidin kaplı örneklere 100µL Anti-HBs-Biyotin (0.2 µg/mL, 100mM fosfat tamponu (PBS) içerisinde, pH:7.4) eklenerek 1 saat beklenmiş ve streptavidin-biyotin bağlanması ile kantilever yüzeyinde reseptör tabakasının oluşumu sağlanmıştır.

3.9.8. **Anti-HBs – HbsAg Etkileşimlerinin İncelenmesi**

Hazırlanan anti-HBs reseptörleri ile dekore edilmiş kantileverler ile Hepatit B yüzey antijenlerinin etkileşimlerinin incelenmesi için kantileverler 85 mM MES tamponu içerisinde sıvı hücreye alınarak rezonans frekansının stabil hale gelmesi beklenmiştir. Rezonans frekansı dengeye geldikten sonra ilk olarak anti-HBs reseptörüne karşı aktif olmayan inhibe edilmiş HBs-Ag-negatif antijeni sonrasında ise HBsAg-biyotin örnekleri 85 mM MES tamponu (pH6.5) içerisinde 200 ng/mL derişimde hazırlanarak kapalı sıvı hücre içerisine HPLC sistemi üzerinden mobil faz ile verilmiştir. Zamana karşı kantilever yüzeyinde gerçekleşen bağlanmalar nedeniyle rezonans frekansında gerçekleşen değişimlerin ölçülmesi için 60 dk süresince kantileverlerin rezonans frekansları kaydedilmiştir.

3.9.9. **Sensörün Hassasiyetinin ve Doğrusallığının Belirlenmesi**

Çalışmanın bu aşamasında hazırlanan kantilever bazlı HBsAg sensörlerin hassasiyetinin ve doğrusallığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda en yüksek sinyal/gürültü oranına sahip olan, hassasiyet/stabilite oranı optimum görülen M8 kantileveri seçilerek bir önceki bölümde uygulanan modifikasyon işlemleri bu kantilevere uygulanmış ve kantilever üzerine ilk olarak anti-HBs reseptörüne karşı aktif olmayan inhibe edilmiş HBs-Ag-negatif antijeni sonrasında 0.1 - 200 ng/mL HBsAg derişimlerde örnekler 85 mM MES tamponu içerisinde mobil faz ile verilmiştir. Elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Sıvı Akışının ve Örnek Enjeksiyonunun Optimizasyonu Çalışmaları

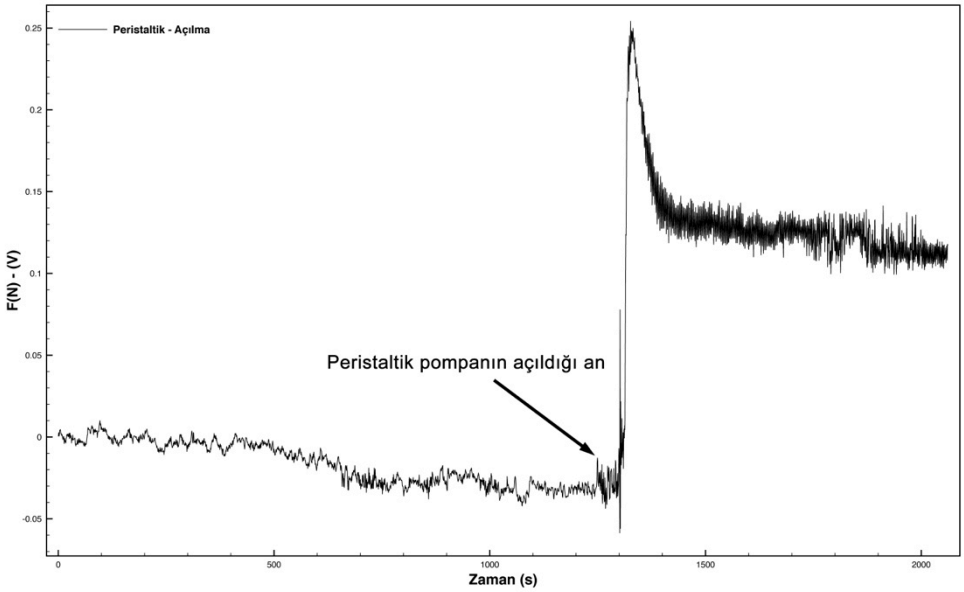
Tez çalışmaları süresince biyolojik örneklerin algılanması işlemleri biyomoleküler etkileşimleri inceleyebilmek amacıyla kapalı sıvı hücre içerisinde sürekli ölçümler alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle kapalı hücre içerisinde stabil ve sürekli bir akış profili oluşturabilmek için sıvı hücreye bir pompa bağlanması gerekliliği doğmuştur. Bu ihtiyacın karşılanması için sıvı hücrenin giriş ve çıkışları ilk olarak peristaltik mikro-pompaya bağlanarak bir kapalı devre sistem hazırlanmıştır. Bu sistemde kapalı bir sıvı haznesi içerisinde bulunan hareketli faz pompa yardımı ile sisteme iletilmektedir. Peristaltik pompa kullanılarak 100 µL/dakika en düşük akış hızı sağlanabilmiş ve bu akış hızında temaslı modda akış hızının kantileverden yansıyarak fotodedektöre ulaşan toplam kuvvet (F_T) ve normal kuvvet (F_N) değerleri incelenmiştir.

Devam eden çalışmalarda daha düşük akış hızlarına ve yüksek kalitede akış profiline izin veren bir sistem olan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC, *ing. High Performance Liquid Chromatography*) cihazı kullanılmıştır. Peristaltik pompa düzeneğinde olduğu gibi sıvı hücre giriş ve çıkışları HPLC sisteminin pompasına bağlanarak bir kapalı devre sistem hazırlanmıştır. Kapalı bir sıvı haznesi içerisinde bulunan hareketli faz, HPLC pompası ile sisteme iletilmektedir. Bu sistemde farklı olarak, örnek enjeksiyon portu aracılığı ile kontrollü olarak akışa verilebilmekte veya istenilen durumlarda hareketli fazı bulunduran kap içerisine eklenmektedir. HPLC sistemi ile analiz süresince sistemdeki pompa basınçları takip edilebilmektedir. Enjeksiyon portu 20 µL hacimde örneği doğrusal akış profili ile kapiler borular üzerinden sıvı hücreye iletmektedir. Kullanılan HPLC pompası 0.01~10 mL/dk aralığında akış hızına izin vermektedir. Çalışmanın bu kısmında fotodetektörde okunan değerler için karşılaştırma yapılabilmesi açısından akış hızı olarak 100 µL/dk seçilmiştir.

4.1.1. Peristaltik Pompa ve HPLC Pompasının Fotodedektörde Ölçülen Sinyallere Etkisinin İncelenmesi

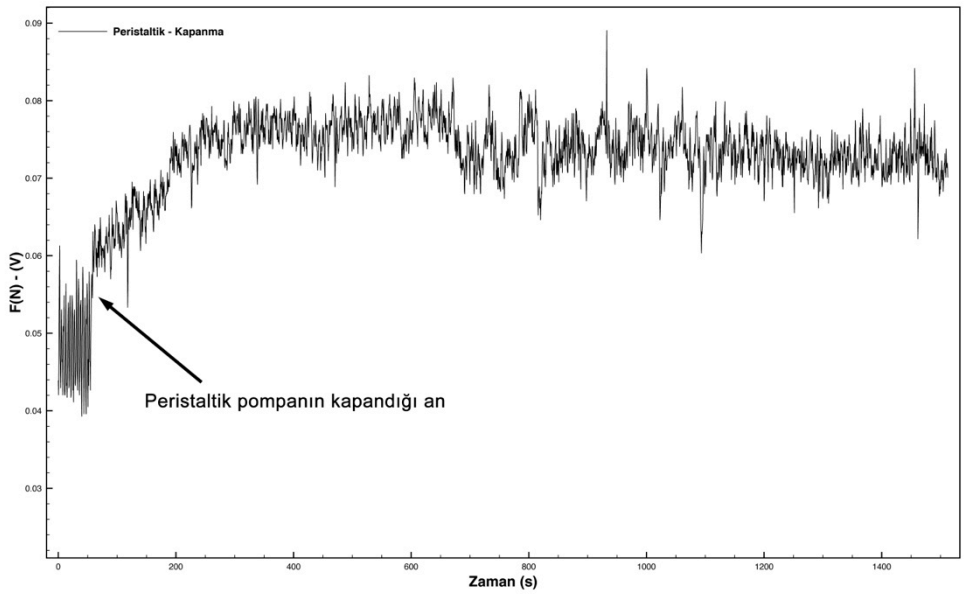
Çalışmanın bu bölümünde herhangi bir dış uyarıcı olmadan pompaların peristaltik hareketlerinin kantilever üzerinde nasıl bir mekanik etki yarattığının ve bu etkinin

nasıl bir gürültü oluşturduğunun incelenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle öncelikle peristaltik pompa bağlanmış sıvı hücre içerisinde su varlığında 2 saat süresince CLR kantileverler stabilizasyon için bekletilmiştir. Deneyler başlamadan hemen önce fotodetektörde toplanan lazer şiddeti (F_T): 1.0V seviyelerinde ayarlanmış, lazer diyot ve fotodetektör ayarlanarak normal kuvvet ise (F_N) : 0.0 V olacak şekilde sabitlenmiştir.



Şekil 4.1. Peristaltik pompa akışının kantilever üzerindeki etkisi

Şekil 4.1'de görüldüğü üzere sıvının kendi dinamikleri ve kantilever üzerindeki termal etkiler nedeniyle herhangi bir akışın olmadığı durumlarda bile 3 ± 1 mV değerinde bir gürültü gözlenmektedir. Peristaltik pompanın açılması ile birlikte ise gürültü değerlerinde bir artış gözlenmiş ve pompanın akış profiline bağlı olarak kantileverda bir bükülme ve yaklaşık 250 mV'luk bir pozitif kayma gerçekleşmiştir. Peristaltik pompanın akışı süresince ise 25 ± 5 mV'luk gürültü oluşmaktadır.

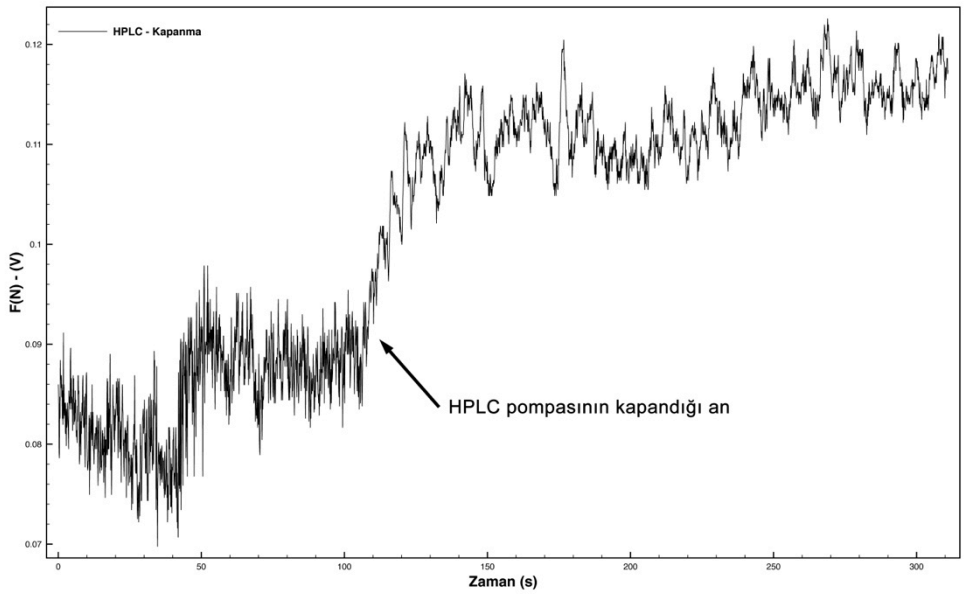


Şekil 4.2. Peristaltik pompa akışı kapandıktan sonra kantilever üzerindeki etki

Şekil 4.2'de ise peristaltik pompanın kapandığı anda gürültünün azaldığı ve yaklaşık 4 dakika içerisinde 25 mV'luk bir pozitif kayma gerçekleştirerek 6 ± 1 mV'luk gürültü seviyesinde stabil kaldığı gözlenmiştir.

Literatürde gerçekleştirilmiş statik mod biyosensör çalışmaları ile karşılaştırıldığında bu gürültü değerlerinin algılama limitlerini kapsayabileceği anlaşılmış ve bu nedenle daha stabil bir sistemin gerekli olduğu düşünülmüştür.

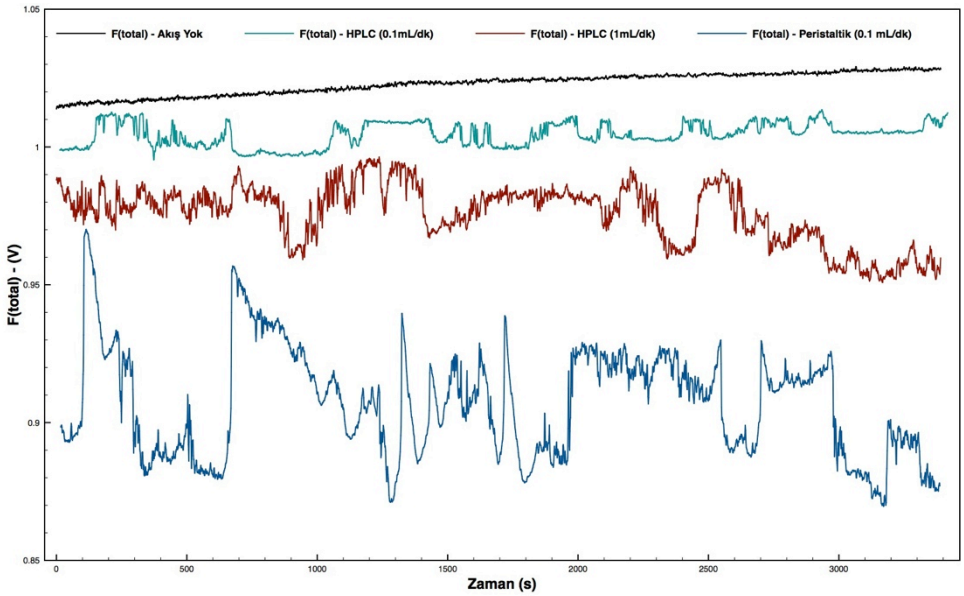
Çalışmanın devamında HPLC pompası sıvı hücreye bağlanarak bir önceki bölümde olduğu gibi CLR kantilever su içerisinde 2 saat süresince stabilizasyon için bekletilmiştir. Toplam lazer şiddeti (F_T): 1.0V seviyelerinde, normal kuvvet ise (F_N) : 0.0 V olacak şekilde ayarlanmıştır. Şekil 4.3'de görüldüğü üzere HPLC pompası açık durumdayken sistemde 7 ± 2 mV'luk gürültü oluşmaktadır. HPLC pompasının kapandıktan sonra 40 saniye içerisinde yaklaşık 20 mV'luk pozitif bir kayma gerçekleşerek 5 ± 2 mV'luk gürültü seviyesinde kantileverin sabit kaldığı görülmüştür.



Şekil 4.3. HPLC pompa akışı ve kapandıktan sonra kantilever üzerindeki etkisi

Hem peristaltik pompa hem de HPLC pompası bağlanan sistemde sıvı akışını oluşturan peristaltik hareketin doğası gereği kantilever salınım hareketlerinde de benzer periyodik gürültülerin oluştuğu elde edilen sinyallerden anlaşılmaktadır. Peristaltik kuvvetin büyüklüğü, kullanılan tübiler boruların çapları ve borularda oluşan basıncın etkisi nedeniyle bu gürültü değerleri değişmektedir. Pompaların açılması ve kapanması esnasında akışta oluşan ani değişikliğin etkisi sıvı hücre içerisindeki kantilever üzerinde etkili olan dinamikleri de şiddetli bir şekilde etkilemektedir. Burada bahsedilen sıvı akış dinamiklerinin rezonans frekansını da aynı şekilde etkileyeceği bir gerçektir.

Çalışmada karşılaştırma yapılması amacıyla peristaltik pompanın izin vermiş olduğu en düşük değer olan 0.1 mL/dk akış hızında çalışılmıştır ve gürültü değerleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.4'de pompa akışının detektörde okunan toplam lazer şiddetine karşılık grafiği verilmiştir. Burada HPLC sistemi için akış hızı 0.1 mL/dk ve 1.0 mL/dk olarak alınmış, peristaltik pompa ise 0.1 mL/dk hızında incelenmiştir.



Şekil 4.4. Sıvı hücredeki akış hızının fotodedektörde ölçülen toplam sinyal üzerindeki etkisi

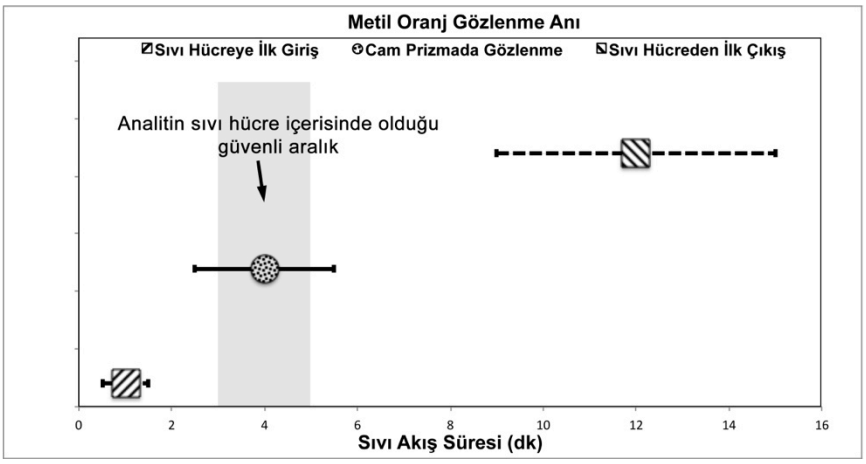
Grafikten de açıkça görüldüğü üzere HPLC pompası, peristaltik pompaya göre çok daha stabil bir akış profili oluşturmaktadır. Bununla birlikte akış olmayan stabil koşullara göre pompa akışı bir gürültü kaynağı durumundadır. Bu nedenle bu aşamadan sonra gerçekleştirilecek olan deneylerde örnek enjeksiyonu yapılırken HPLC pompası 100 µL/dk hızında çalıştırılmış ve örnek sıvı hücre içerisine ulaştığı anda pompa kapatılarak ölçümler alınmıştır. Bu yöntem kullanılarak hem istenilen örnek hacminin sıvı hücre içerisine verilmesi sağlanarak kullanılan örnek hacmi düşük tutulmuştur hem de akış nedeniyle oluşan gürültüden kaçınılmıştır.

4.1.2. **HPLC Enjeksiyon Portu Üzerinden Örnek Enjeksiyonunun Kalibrasyonu**

Örneklerin kantilever üzerindeki reseptör molekülleri ile etkileştikleri andan itibaren sinyallere gürültü olarak yansıyacak dış etkilerin ortadan kalkmış olması gerekmektedir. Aynı şekilde rezonans frekansında gerçekleşen değişimlerin analit moleküllerinin derişimi ile ilişkisinin doğru olarak değerlendirilebilmesi için sisteme enjekte edilen örneğin tümünün kantileverin bulunduğu hücreye aktarılması da diğer bir önemli husustur. Buna bağlı olarak düşük hacimlerde örneğin kullanılması bir avantaj sağlamaktadır. Bu nedenlerden dolayı örnek enjeksiyon portuna yüklenmekte ve akış yolu üzerinden 20 µL hacimde sıvı hücreye iletilmektedir.

Kapiler kolonlar üzerinde doğrusal bir akış sağlayan HPLC pompası yardımıyla örnekler sıvı hücreye yüksek kararlılıkla ulaşmaktadır.

Analit moleküllerinin sıvı hücre içerisine girdikleri sürenin belirlenmesi amacıyla HPLC sistemi hazırlanan metil oranj çözeltisinin sıvı hücreye ilk giriş anı, sıvı hücre cam prizmasında gözlendiği an ve sıvı hücreyi ilk terk ediş anları ölçülerek kalibre edilmiştir.



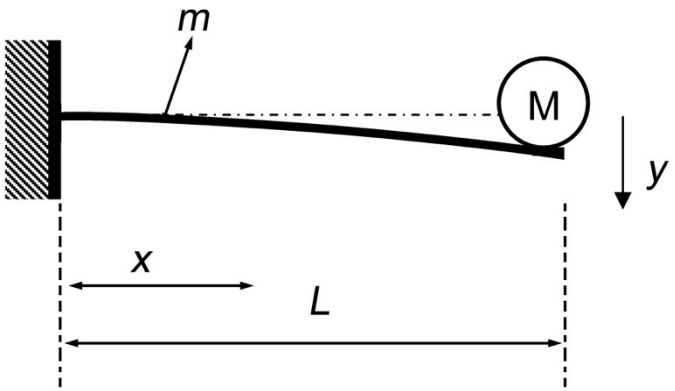
Şekil 4.5. HPLC örnek enjeksiyonu ve akış sonlandırma kalibrasyonu

Şekil 4.5'de verilen grafikteki süreler göz önünde bulundurularak 0.1 mL/dk hızında sisteme iletilen örnekler 4. dakikada pompa durdurularak tamamı sıvı hücre içerisine verildiği kabul edilmiştir.

4.2. Kantilever Frekans Değişimlerinin Teorik Modellemeleri

4.2.1. Kantilever Uzunluğunun ve Biriken Kütlenin Miktar ve Yerinin Frekansa Etkilerinin Hesaplanması

Bölüm 3.3.1'de matematiksel olarak ifadeleri verilen kantilever davranışları dikkate alınarak kantilever sisteminin davranışı bir yay olarak kabul edilmiş ve sıvı içerisindeki diğer sönümleyici etkiler ihmal edilerek Şekil 4.6'da gösterildiği gibi kantileverin uç kısmından eklenen M kütlesi için kantileverin kinetik enerji ifadeleri kullanılarak kirişten uzaklık değerlerini ifade eden bağıntı kurulabilmektedir.



Şekil 4.6. Kantileverin uç kısmına eklenen kütlenin kantilever frekansına etkisinin şematik gösterimi

$$y = y_{max}\frac{1}{2}\left[3\left(\frac{x}{L}\right)^2 - \left(\frac{x}{L}\right)^3\right]$$

Bu temel prensipten hareketle kirişin kendisine ait maksimum kinetik enerjisi T_{max} aşağıdaki şekilde verilebilir.

$$T_{max} = \frac{1}{2}\int_o^L \frac{1}{2}\frac{m}{L}\left(\dot{y}_{max}\left[3\left(\frac{x}{L}\right)^2 - \left(\frac{x}{L}\right)^3 3\right]\right)^2 dx = \frac{1}{2}\frac{33}{140} m\,\dot{y}_{max}^2$$

M kütlesi ile birlikte kirişin toplam kinetik enerjisi

$$E_{k_{max}} = \frac{1}{2}\left[M + \frac{33}{140}m\right]\dot{y}_{max}^2$$

olarak tanımlanabilir.

Buradan kiriş uç noktası için efektif kütle, m_{eff} hesaplanır.

$$m_{eff} = M + \frac{33}{140}m$$

Kiriş uç noktası için k değeri aşağıdaki şekilde ifade edilir.

$$k = \frac{3EI}{L^3}$$

Buradan kirişe ait doğal frekans ifadesi aşağıdaki şekilde elde edilir.

$$\omega_n = \sqrt{\frac{3EI}{L^3\left(M + \frac{33}{140}m\right)}}\ (rad/s)$$

Sadece kiriş düşünüldüğünde doğal frekans ifadesi ise aşağıdaki şekilde özetlenir.

$$\omega_n = 3.567\sqrt{\frac{EI}{mL^3}}\ (rad/s)$$

Bu formüller kullanılarak kantilever üzerine biriken kütle, kantileverin uzunluğu ve kütlenin kantileverin uç noktasından olan uzaklığı için değer aralıkları tanımlanarak aşağıdaki grafikler elde edilmiştir.

Kantilever uzunluğuna karşı Frekans değişimi

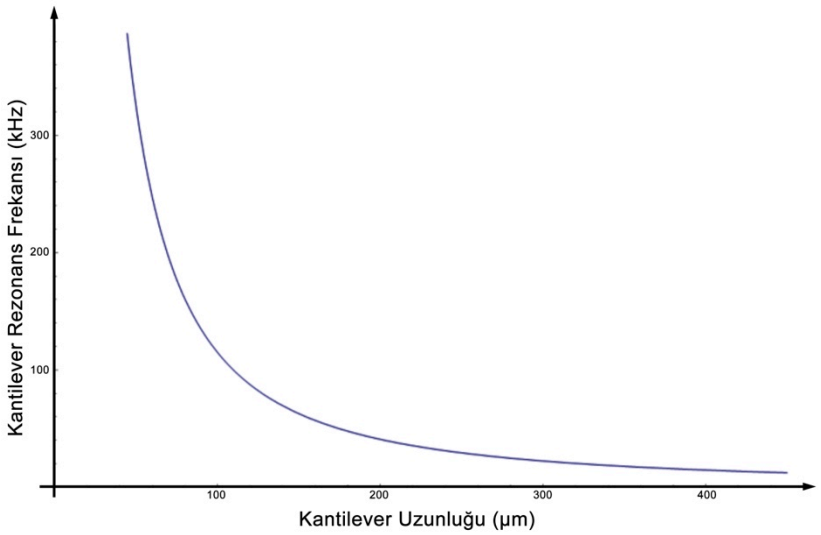
Kantileverin uzunluğunun rezonans frekansı üzerindeki etkisi aşağıdaki parametreler kullanılarak 40 μm genişliğinde ve 1 μm kalınlığındaki bir dikdörtgen kantilever için hesaplanarak Şekil 4.7'de verilen grafikte gösterilmiştir.

$h = 1\ \mu m$, $b = 40\ \mu m$, $k = 0.2\frac{N}{m}$, $m = 1.65139\ x\ 10^{-9}$, $M_1 = 1.0\ x\ 10^{-9}$

$$E_1 = \frac{(4\ k\ L^3)}{b\ h^3}, \qquad I_1 = \frac{b\ h^3}{12}$$

değerleri için kantilever uzunluğu 0 – 450 μm aralığında değişirken kantileverin rezonans frekansı ω_n 'in alacağı değerler aşağıdaki formüle göre grafikte gösterilmiştir.

$$\omega_n = \sqrt{\frac{3\,E_1 I_1}{L_1^3\left(M_1 + (\frac{33m}{140})\right)}}\,(rad/s) = 2\Pi\sqrt{\frac{3\,E_1 I_1}{L_1^3\left(M_1 + (\frac{33m}{140})\right)}}\,Hz$$



Şekil 4.7. Kantilever uzunluğunun rezonans frekansı ile ilişkisi

Grafikten elde edilen bilgiler ışığında 100-450 μm'lik kantileverlerin çalışmalarda kullanılması veya 450 μm'lik kantileverlerin geometrik işlemler sonrası bu aralıktaki boylara kısaltılmasının rezonans frekansında büyük değişikliklere yol açmayacağı anlaşılmaktadır. Bununla birlikte 100 μm altında kantileverlerin kullanılması veya kantileverlerin 100 μm altına kısaltılmasının rezonans frekansını arttırıcı anlamda oldukça etkili sonuçlar göstereceği ön görülmektedir.

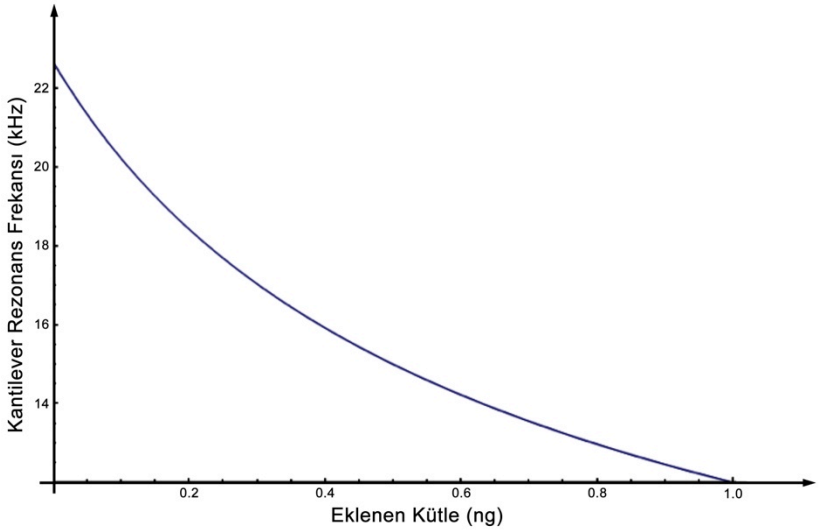
Eklenen kütleye karşı frekans değişimi

Kantileverin üzerinde biriken kütlenin rezonans frekansı üzerindeki etkisi aşağıdaki parametreler kullanılarak 450 μm uzunluğunda, 40 μm genişliğinde ve 1 μm kalınlığındaki bir dikdörtgen kantilever için hesaplanarak Şekil 4.8'de verilen grafikte gösterilmiştir.

$$h = 1\,\mu m, \qquad b = 40\,\mu m\ , \qquad L = 450\,\mu m\,, \qquad k = 0.2\frac{N}{m}\ , m = 1.65139\,x\,10^{-9}$$

$$E_1 = \frac{(4\,k\,L^3)}{b\,h^3} \quad , \quad I_1 = \frac{b\,h^3}{12}$$

değerleri için kantilever üzerine biriken kütle 1.0 pg ~ 1.0 ng aralığında değişirken kantileverin rezonans frekansı ω_n 'in alacağı değerler hesaplanarak grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Kantilever üzerine eklenen kütlenin rezonans frekansı ile ilişkisi

Şekil 4.8'de ifade edilen grafikte kantilever üzerine kütle birikiminin rezonans frekansını azaltıcı yöndeki etkisi açıkça görülmektedir. Yukarıda matematiksel olarak ifade edilen kantilever için eklenen kütle miktarı arttıkça rezonans frekansındaki değişim miktarının da logaritmik olarak azaldığı görülmektedir. Bu özellikle kantileverler için moleküllerin bağlandığı anda ilk olarak yüksek frekans kaymaları gözleneceğini öngörmektedir.

Kütlenin uç noktasına olan uzaklığına karşı frekans değişimi

Kantileverin üzerinde biriken kütlenin uç noktasından olan uzaklığının rezonans frekansı üzerindeki etkisi aşağıdaki parametreler kullanılarak 450 μm uzunluğunda, 40 μm genişliğinde ve 1 μm kalınlığındaki bir dikdörtgen kantilever için hesaplanarak Şekil 4.9'da verilen grafikte gösterilmiştir.

$h = 1\ \mu m, \quad b = 40\ \mu m\ , L = 450\ \mu m\ , \quad m = 1.65139\ x\ 10^{-9}, M_1 = 1.0\ x\ 10^{-9}$

$k = 0.2\ (\frac{L}{L - \Delta L})\frac{N}{m}$

$E_1 = \frac{(\ 4\ k\ L^3\ )}{b\ h^3}\quad ,\ \ I_1 = \frac{b\ h^3}{12}$

değerleri için kantilever üzerine biriken kütle uç noktasından uzaklaştıkça kantileverin rezonans frekansı ω_n 'in alacağı değerler hesaplanarak grafikte gösterilmiştir.

Şekil 4.9. Kantilever üzerinde biriken kütlenin uç noktasına uzaklığının rezonans frekansı ile ilişkisi

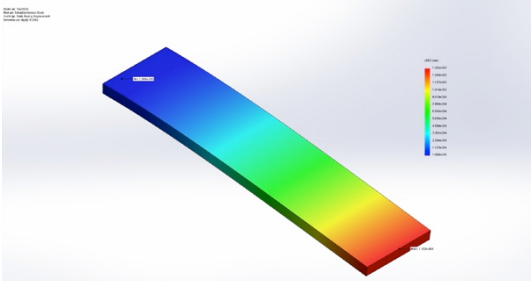
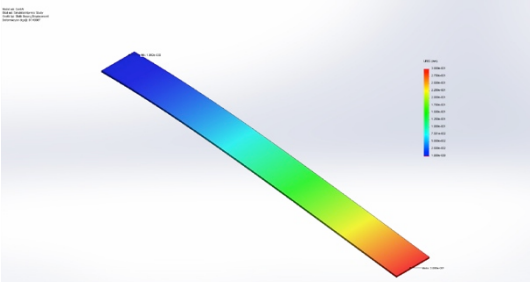
Hesaplamalarda kantilever üzerine biriken kütle miktarı sabit olarak tutulmuştur. Kütle kantileverin serbest ucundan kiriş noktasına yaklaştıkça kantilever rezonans frekansına olan etkisinin azaldığı Şekil 4.9'da verilen grafikte görülmektedir. Kütlenin eklenmesi rezonans frekansını azaltıcı etki yapmaktadır. Frekans değerindeki artış kütlenin frekans üzerindeki etkisinin azaldığını göstermektedir. Eklenen kütle uçtan uzaklaştıkça logaritmik olarak frekans değişimine olan etkisi azalmaktadır. Bu sonuç kantilever üzerinde uç noktasına yakın konumlarda biyolojik reseptörlerin sınırlandırılmasının hem frekans kaymasında en etkili sonuçların alınmasına hem de kantilever üzerindeki bağlanmaların derişimle

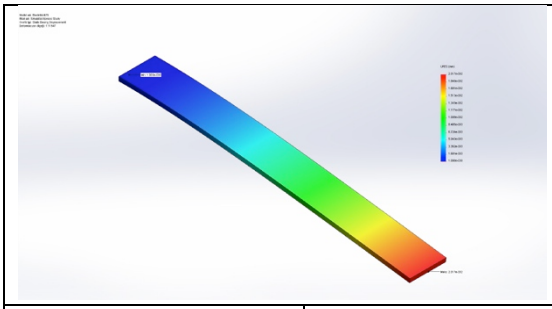
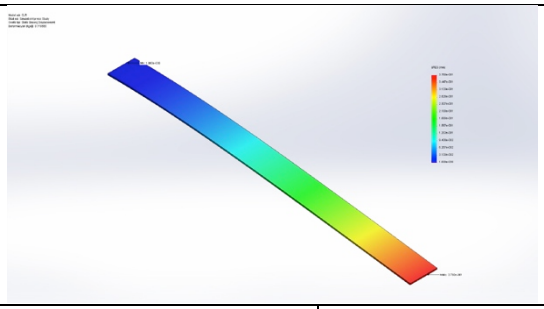
ilişkisinin doğrusal olarak ifadelendirilebilmesine yardımcı olacağını göstermektedir.

4.2.2. **Kantileverlerin Geometrik Modifikasyonunun Rezonans Frekansına Etkisinin Modellenmesi**

Kantileverlerin geometrik modifikasyonları sonrasında kantilever yüzeyine bağlanan bir kütlenin birim kütle başına ne şiddette yer değiştirme gerçekleştireceğinin öngörülmesi amaçlanmıştır. Kantilever yüzeyine kütle birikmesi kantileverin lazer demetini dedektöre yansıtan yüzeyi doğrultusunda tüm yüzeye yayılmış şekilde bir kuvvet uygulanarak modellenmiştir. Gerçekleşen dış kuvvete karşılık kantileverin maksimum uzama miktarı hesaplanmıştır. Çizelge 4.1 ve 4.2 'de kantileverlerin bükülme özellikleri kiriş noktasında oluşan maksimum stress (MPa) ve maksimum bükülme (μm) değerleri olarak verilmiştir. Çizelge 4.1'de standart kantileverlerin uç kısımları olmadığı şekilde hacimsel özellikleri baz alınarak gerçekleştirilen hesaplamalar görülmektedir. Buradan da görüldüğü üzere maksimum bükülme kantilever uzunluğu ile doğru orantılı kantileverin genişliği ile ters orantılı olarak değişmektedir.

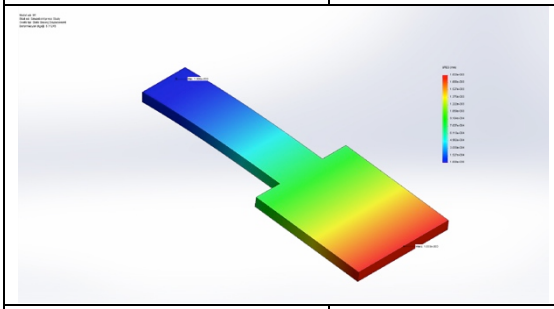
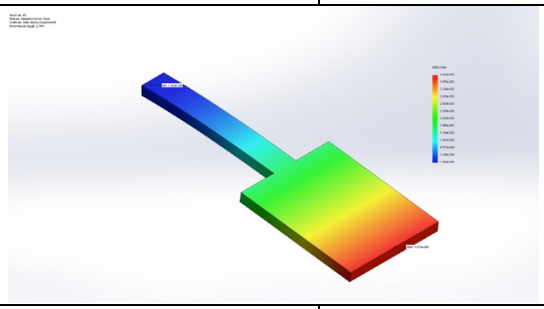
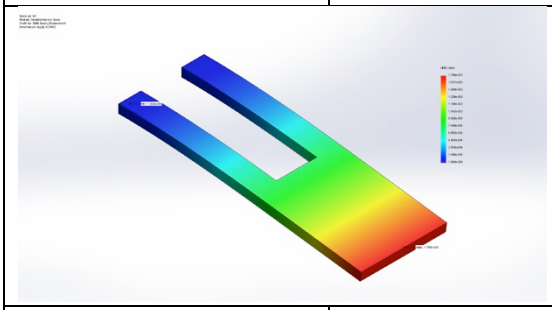
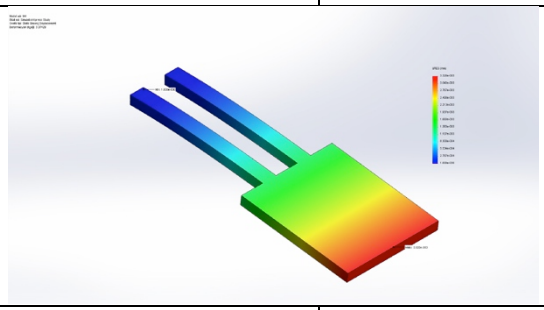
Çizelge 4.1. Standart Kantileverlerin Bükülme Özelliklerinin Karşılaştırılması

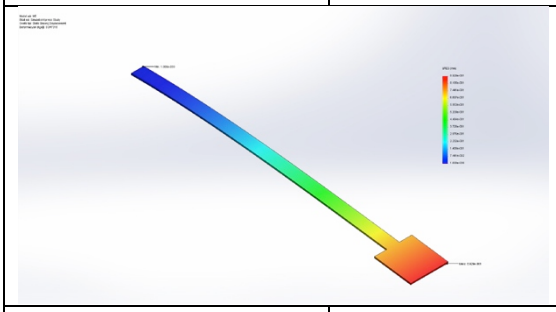
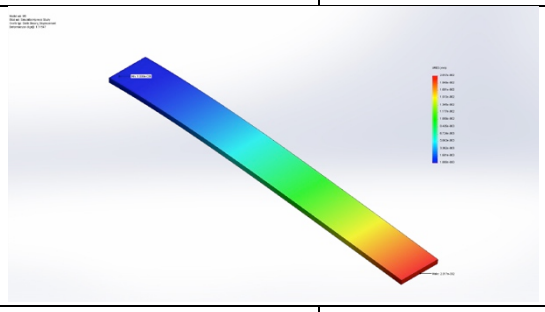
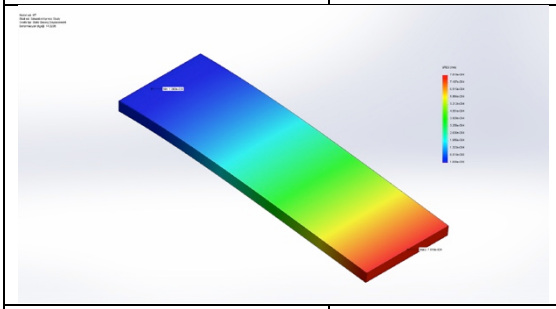
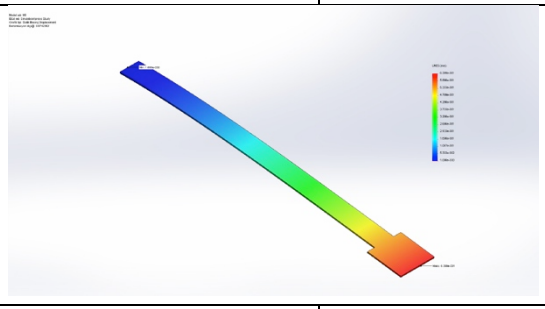
Model No	Tap300Al		Model No	ContAl
				
Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (μm)		Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (μm)
80.4562	1.35237		676.025	300.028
Model No	ElectriMulti75		Model No	CLR

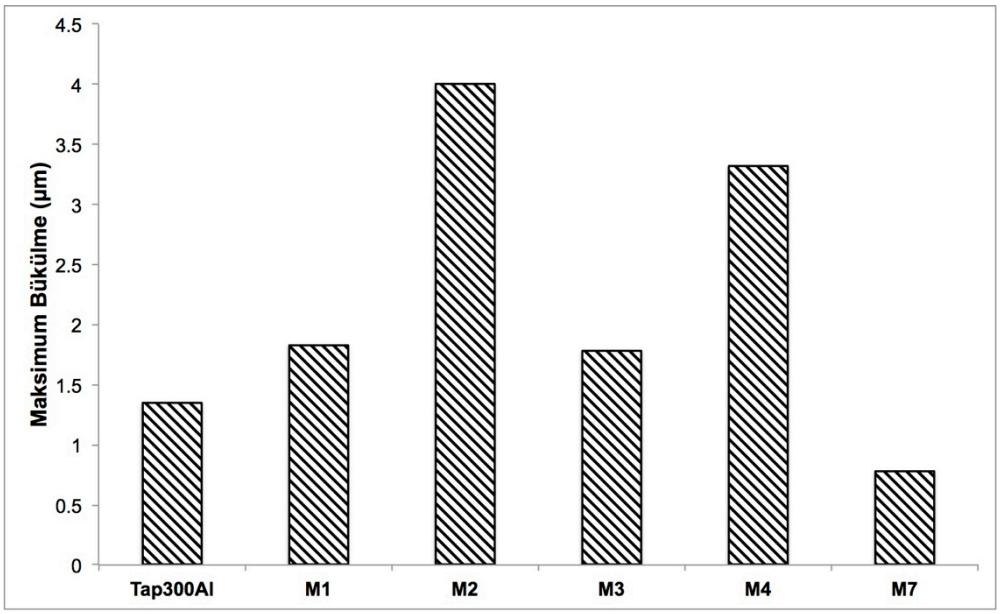
				
Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (µm)		Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (µm)
275.533	20.1716		835.104	375.995

Çizelge 4.2'de modifiye edilmiş kantileverlerin yekpare katı olarak ve hacimsel özellikleri baz alınarak modellenerek gerçekleştirilen hesaplamalar görülmektedir. Bu tablonun daha iyi anlaşılabilmesi için modifiye edilmiş kantilever yapıları Şekil 4.10 ve 4.11'de verilen grafiklerde standart kantileverler ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.2 Modifiye Kantileverlerin Bükülme Özelliklerinin Karşılaştırılması

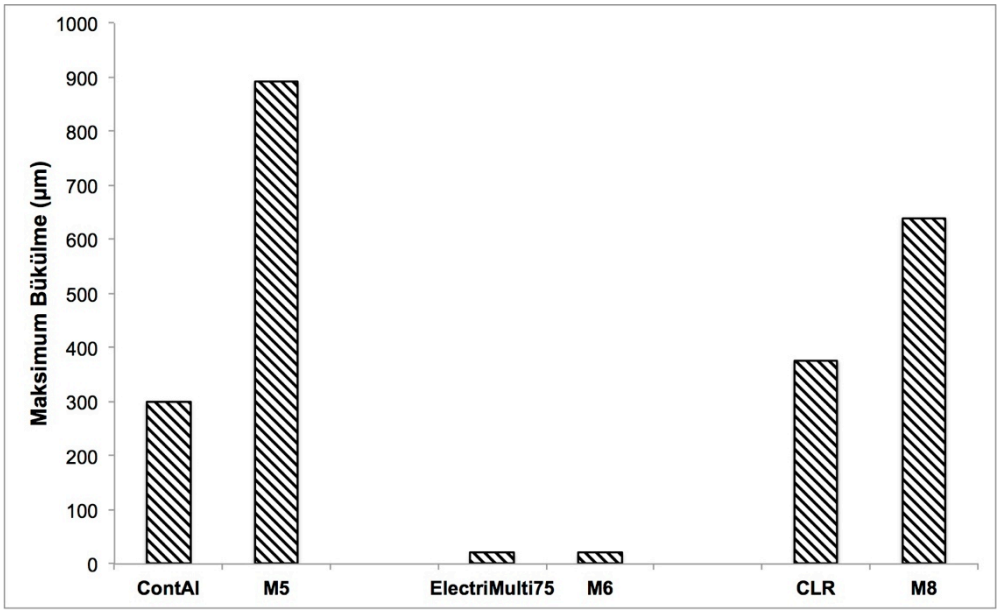
Model No	M1		Model No	M2
				
Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (µm)		Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (µm)
121.758	1.83285		267.337	4.00348
Model No	M3		Model No	M4
				
Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (µm)		Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (µm)

117.127	1.78568		231.637	3.32015
Model No	M5		Model No	M6
				
Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (µm)		Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (µm)
2101.8	892.899		275.533	20.1716
Model No	M7		Model No	M8
				
Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (µm)		Maksimum Stres N/mm^2 (MPa)	Maksimum Bükülme (µm)
58.7515	0.781827		1234.1	639.904



Şekil 4.10. Tap 300Al ve modifiye edilmiş kantileverlerin maksimum bükülme davranışlarının karşılaştırılması

Şekil 4.10’da da görüldüğü üzere kantileverlerin kiriş noktalarındaki genişlikleri azaldıkça bükülme değerleri artmaktadır.



Şekil 4.11. ContAl , ElectriMulti ve CLR standart kantileverleri ve modifiye edilmiş kantileverlerin maksimum bükülme davranışlarının karşılaştırılması

Şekil 4.11’de kantileverin boyunun etkisi daha çarpıcı bir şekilde görülmektedir. ContAl 450 µm uzunluğuna karşılık 300 µm yer değiştirme gerçekleştirirken electri multi ise 225 µm uzunluğuna karşılık 20 µm maksimum yer değiştirme gerçekleştirmektedir. Ayrıca ContAl ve CLR kantileverlerinin uzunlukları aynı olmasına karşılık 50 ve 40µm genişliklerine göre sırasıyla 300 ve 375 µm maksimum yer değiştirme gerçekleştirmektedirler. Benzer etkiler modifiye kantileverler üzerinde de görülmektedir. M5 kantileveri ContAl kantileverinin kiriş kısmından itibaren her iki yandan 18 µm genişliğinde ve 370 µm uzunluğunda aşındırma işlemi ile daraltılması sonucu hazırlanmış bir kantileveri göstermektedir. Bu modifikasyonlar kantileverin 2.97 kat daha fazla bükülmesine izin vererek 892 µm maksimum yer değiştirme gerçekleşmesine sebep olmaktadır. Benzer şekilde M8 kantileveri CLR kantileverinin kiriş kısmından itibaren her iki yandan 12 µm genişliğinde ve 420 µm uzunluğunda aşındırma işlemi ile daraltılması sonucu hazırlanmış bir kantileveri göstermektedir. Bu modifikasyonlar kantileverin 1.7 kat daha fazla bükülmesine izin vererek 639 µm maksimum yer değiştirmeye sebep olmaktadır. M8 kantileveri (10080 μm^2) ile karşılaştırıldığında M5 kantileveri

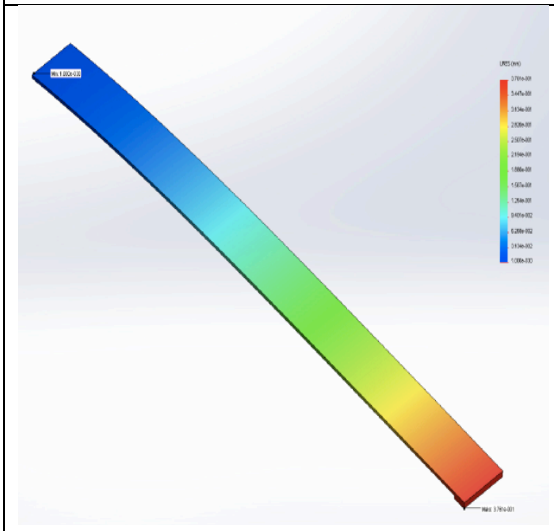
üzerindeki göreceli olarak (13320 μm^2) daha fazla aşındırma işlemi bükülme değerlerinde de orantılı olarak bir fark yaratmaktadır. Bu nedenle geometrik modifikasyonların standart kantilever yapıları üzerinde bağıl aşındırma miktarlarına bağlı olarak bükülme ve frekans değerlerinde değişimler meydana geleceği öngörülebilmektedir.

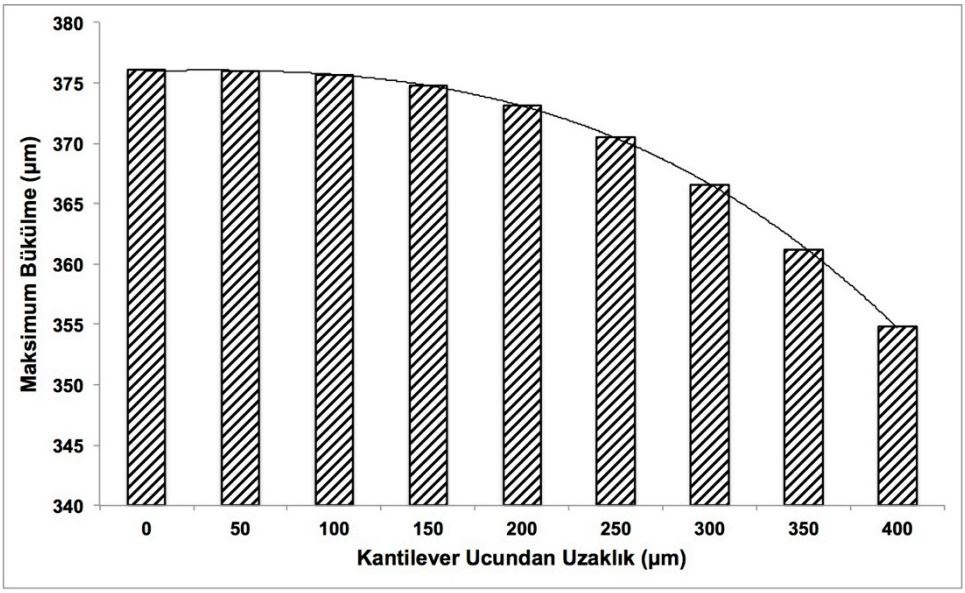
4.2.3. **Kantilever Üzerine Biriken Kütlenin Konumunun Etkisinin Modellenmesi**

Kantilever üzerinde uç noktaya bağlanan molekülün etkisi ile kantileverin çip kısmına bağlanan molekülün etkisi tamamen farklı olacak ve kantileverin bükülmesinde ve dolayısıyla kantilever rezonans frekansında gerçekleşecek değişimler de buna bağlı olarak farklı olacaktır. Kantilever üzerine biriken kütlenin konumunun etkisini incelemek amacıyla kantilever yüzeyinde kütle uç noktadan başlayarak kiriş noktasına doğru konumu değiştirilmiş ve bunun kantileverin bükülme değerleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Modelleme çalışmalarında tek kristal silikondan yapılma bir kantilever (model CLR) dikdörtgen formda tek parça katı olarak modellenmiştir. Kantilever üzerine eklenen kütle 50x50 μm^2'lik bir alanda sınırlandırılmış ve bu alan her hesaplama için kantileverin çip kısmına doğru 50 µm yaklaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan kantileverin kütlesi 8.388 x 10^{-11} kg, hacmi ise 3.6 x 10^{-14} m^3 olarak alınmıştır. Belirtilen alana eklenen toplam kütle miktarı ise 0.1864 x 10^{-11} kg olarak sabit tutulmuştur. Kantilever üzerine biriken kütle için hesaplamalarda kullanılan başlangıç x=0 noktası ve kütlenin birikme yerinin değiştiği düzlem Çizelge 4.3'de görülmektedir.

Çizelge 4.3. Kantileverlerin Üzerine Biriken Kütlenin Uç Noktasından Uzaklığının Bükülme Özelliklerine Etkisi

Model No CLR + Eklenen kütle		
	Uçtan uzaklık (µm)	Maksimum Bükülme (µm)
	0	376.054
	50	375.956
	100	375.625
	150	374.770
	200	373.171
	250	370.557
	300	366.595
	350	361.197
	400	354.805
Kütle eklenmemiş CLR kantilever maksimum bükülme : 0.375995		



Şekil 4.12. Kantileverlerin Üzerine Biriken Kütlenin Uç Noktasından Uzaklığının Bükülme Özelliklerine Etkisi

Şekil 4.12'de de açıkça görüldüğü üzere kantilever üzerinde uç kısımdan kiriş bağlantısına doğru kütle yer değiştirdikçe bükülme miktarı parabolik olarak azalmaktadır. En yüksek bükülme değerleri kantileverin uç kısmında gerçekleştiğinden dolayı kütlenin kantileverin uç kısmına bağlanması, kantileverin bükülme ve frekans değişimi değerleri üzerinde en yüksek etkiyi yaratacağından kantilever fonksiyonelleştirme işlemlerinin de kantileverin uç kısımda sınırlandırılması sistemin hassasiyetini ve doğrusallığını arttırıcı yönde etki edecektir. Bu sonuçlar daha önce Sader ve arkadaşları tarafından kantilever davranışlarına dair verilen ifadelerin matematiksel olarak hesaplandığı Bölüm 4.2.1'deki sonuçlarla uyum içerisindedir.

4.3. Kantileverlerin Hava ve Sıvı Ortamındaki Davranışlarının incelenmesi

Ticari kantileverlerin hava ortamında gerçekleştirilen merkez rezonans frekansı ölçümleri, kantileverlerin standart teknik verileri ile son derece uyumlu sonuçlar vermiştir. Sıvı ortamında merkez rezonans frekanslarında teorik hesaplamalar doğrultusunda beklenildiği üzere yaklaşık %50'lik bir azalma gözlemlenmiştir. Bu doğrudan kalite faktörüne yansımaktadır ve kantileverin yapısına bağlı olarak Q değerlerinde 10~50 kat azalma gözlenmiştir. Modifiye edilmiş kantilever yapılarında ise tamamen kantilever üzerinde gerçekleştirilen aşındırma işleminin ve elde edilen geometrik yapının etkisi görülmüştür. Elde edilen veriler Çizelge 4.4 ve 4.5'de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Çizelge 4.4 Standart kantilever yapılarının hava ve su ortamındaki özellikleri

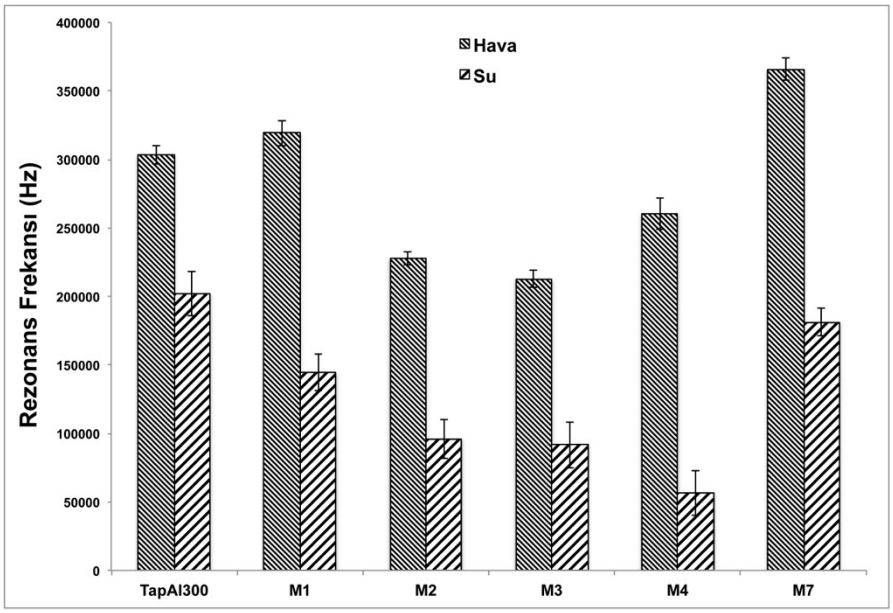
Kantilever Kodu		**Hava**	**Su**
TapAl300	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	303423 (± 7132)	202228 (± 16281)
	Kalite Faktörü (Q)	448.57 (± 53.77)	11.04 (± 1.51)
Kantilever Kodu		**Hava**	**Su**
ContAl	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	91587 (± 21.99)	28326 (± 2486)
	Kalite Faktörü (Q)	218.43 (± 26.05)	13.61 (± 4.41)
Kantilever Kodu		**Hava**	**Su**
ElectriMulti75	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	69048 (± 5039)	33998 (± 6187)
	Kalite Faktörü (Q)	176.92 (± 43.06)	10.93 (± 4.00)

Kantilever Kodu		Hava	Su
CLR	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	92417 (± 3578)	25671 (± 3706)
	Kalite Faktörü (Q)	199.94 (± 22.75)	15.36 (± 4.27)

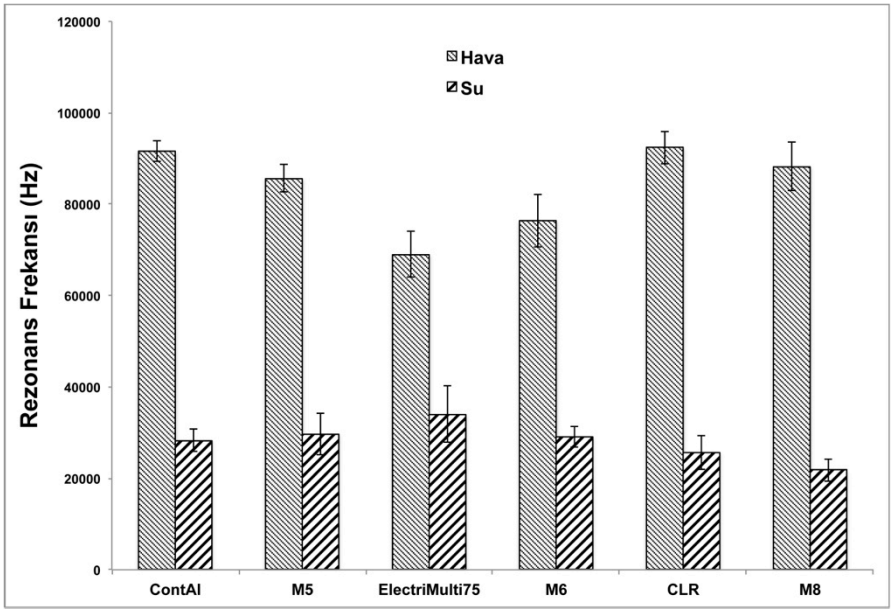
Çizelge 4.5 Modifiye kantilever yapılarının hava ve su ortamındaki özellikleri

Kantilever Kodu		Hava	Su
M1	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	319214 (± 9213)	144607 (±13265)
	Kalite Faktörü (Q)	439.84 (± 45.56)	33.36 (± 4.49)
Kantilever Kodu		**Hava**	**Su**
M2	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	227851 (± 4842)	96122 (± 14306)
	Kalite Faktörü (Q)	383.29 (± 20.24)	8.25 (± 4.60)
Kantilever Kodu		**Hava**	**Su**
M3	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	212956 (± 6306)	91619 (± 16701)
	Kalite Faktörü (Q)	358.42 (± 17.80)	15.18 (± 3.79)
Kantilever Kodu		**Hava**	**Su**
M4	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	260437 (± 11445)	56722 (± 16506)
	Kalite Faktörü (Q)	443.85 (± 34.78)	12.14 (± 4.64)
Kantilever Kodu		**Hava**	**Su**
M5	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	85694 (± 3039)	29742 (± 4576)
	Kalite Faktörü (Q)	153.95 (± 33.41)	17.52 (± 4.43)
Kantilever Kodu		**Hava**	**Su**
M6	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	76400 (± 5792)	29131 (± 2283)
	Kalite Faktörü (Q)	55.45 (± 31.90)	16.06 (± 4.01)
Kantilever Kodu		**Hava**	**Su**
M7	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	365809 (±7900)	181376 (±10096)
	Kalite Faktörü (Q)	365.84 (± 20.83)	16.76 (± 1.69)
Kantilever Kodu		**Hava**	**Su**
M8	Merkez Rezonans Frekansı (Hz)	88256 (± 5248)	21819 (± 2430)
	Kalite Faktörü (Q)	196.88 (± 36.80)	12.29 (± 2.92)

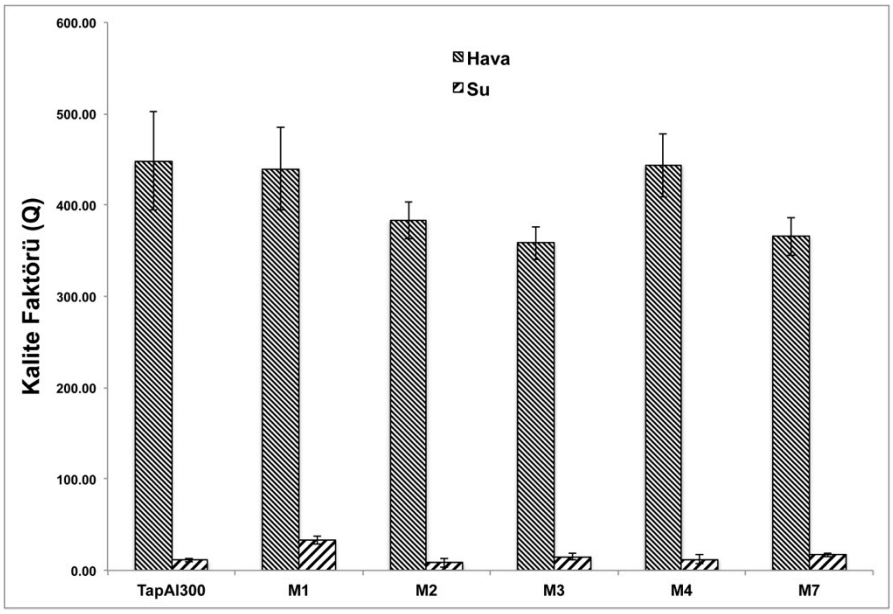
Gerçekleştirilen modifikasyonların rezonans frekansına etkileri araştırıldığında genellikle gerçekleştirilen geometrik değişimlerin merkez rezonans frekansını düşürdüğü gözlenmiştir. Şekil 4.13 - 4.16'da karşılaştırmalı olarak verilen grafiklerde de görüldüğü gibi özellikle M5, M6 ve M7 kantileverleri üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonların daha etkili olduğu ve olumlu sonuçlar verdiği gözlenmiştir.



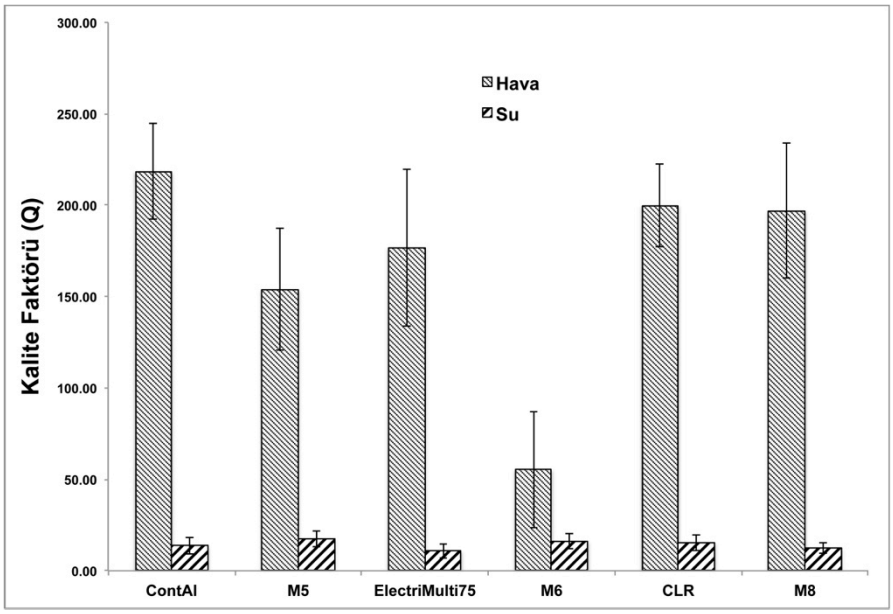
Şekil 4.13. Tap300Al ve FIB yöntemi ile aşındırılarak modifiye edilmiş kantileverlerin hava ve su ortamında rezonans frekanslarının karşılaştırılması



Şekil 4.14. Cont Al, ElectriMulti ve CLR kantileverleri ve bunlardan FIB yöntemi ile aşındırılarak modifiye edilmiş kantileverlerin hava ve su ortamında rezonans frekanslarının karşılaştırılması



Şekil 4.15. Tap300Al ve FIB yöntemi ile aşındırılarak modifiye edilmiş kantileverlerin hava ve su ortamında kalite faktörlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.16. Cont Al, ElectriMulti ve CLR kantileverleri ve bunlardan FIB yöntemi ile aşındırılarak modifiye edilmiş kantileverlerin hava ve su ortamında kalite faktörlerinin karşılaştırılması

4.3.1. **Kantileverlerin Hava ve Sıvı Ortamındaki Yay Sabitlerinin (k) Hesaplanması**

Kantileverlerin hava ve sıvı ortamlarındaki davranışları üzerinde içerisinde bulundukları akışkanın etkileri bir çok araştırmada hem teorik hem de deneysel

olarak çalışılmıştır. Bölüm 2.3.3 ve Bölüm 3.3.1'de teorik bağıntıları gösterilmiş olan kantilever davranışları içinde en yaygın olarak kabul göreni Sader ve arkadaşlarının yaklaşımıdır. Basit ifade ile akışkan içerisindeki dikdörtgen kantileverlerin ölçülebilir frekans ve kalite faktörü değerleri üzerinden yay sabitinin hesaplanmasına izin veren eşitlik aşağıda verilmiştir.

$$k = \ 0.1906\, \rho_f\, b^2 L\, Q_f \Gamma_i\left(\omega_f\right) {\omega_f}^2$$

ρ_f : sıvının yoğunluğu
b : kantileverin genişliği
L : kantileverin uzunluğu
Q_f : kalite faktörü
Γ_i : hidrodinamik fonksiyon varsayımsal bileşeni
ω_f :sıvı içerisindeki rezonans frekansı

Ayrıca Cleveland ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmada taramalı kuvvet mikroskopisi için kantileverlerin yay sabitini belirlemek üzere rezonans frekansı ölçümlerine dayanan bir yaklaşım geliştirmişlerdir. Bu yöntemi kullanarak aynı silikon devre levhasında (silicon wafer) üretilmiş V-şekilli 120 µm uzunluğunda 22 µm genişliğindeki silikon nitrat kantileverler için 37 ±1 kHz rezonans frekansı ve 0.10 ±0.01 N/m yay sabiti ölçümleri ile benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bunun yanında farklı bir silikon devre levhasında üretilmiş olan kantilever için rezonans frekansı 54 kHz ve yay sabiti 0.36 N/m olarak ölçülmüştür [132]. Bu bulgular rezonans frekansı ve yay sabiti değerlerinin farklı partilerde (*ing. batch*) üretilen kantileverler için değişken olduğunu göstermektedir. Ayrıca Sader yöntemine göre gerçekleştirilen hesaplamalar rezonans frekansı ve kalite faktörü ölçümlerini esas aldığından bu yöntem kullanılarak elde edilen değerler kullanılan sisteme göre değişlenlik gösterebilmektedir. Bununla birlikte kullanılan kantileverlerin teknik açıklamalarında belirtilen yay değerleri (Tap300Al: 20~75 N/m, ContAl ve CLR: 0.07~0.4 N/m) oldukça geniş bir aralıkta verilmektedir. Standart kantilever rezonans frekansları ile kullanılan sistem ile ölçülen rezonans frekanslarındaki ve kalite faktörleri farklılıklar yay sabiti değerlerinde sapmalara yol açmaktadır. Butt ve Jaschke tarafından gerçekleştirilen çalışmada termal gürültü kalibrasyon

yönteminde kullanılan kantilever yapısına göre elde edilen rezonans frekansının modunun önemi vurgulanmıştır. Genellikle kantileverlerin rezonans frekans ölçümlerinde elde edilen birinci pik normal osilasyon davranışını göstermektedir ve hesaplamalarda bu pik kullanılmaktadır. Fakat özellikle temaslı mod için üretilmiş oldukça yumuşak ve düşük yay sabitine sahip kantilever yapılarında düşük rezonans frekansları çevresel ve akustik gürültüden etkilenmektedir. Bu nedenle bu tip kantileverlerde ikincil rezonans frekanslarının kullanılması daha güvenilir sonuçlar vermektedir. İlk rezonans frekansının düşük olduğu durumlarda ikincil pikin kullanımı durumunda Butt ve Jaschke tarafından gerçekleştirilen hesaplamalara göre 0.251 korelasyon faktörü uygulamada yaygın bir kullanım bulmuştur [153]. Maali ve arkadaşları da yapmış oldukları çalışmada kantileverin osilasyon harmoniği ve moduna göre rezonans frekansı ve buna bağlı olarak yay sabiti değişimlerindeki değişimi göstermişlerdir [154]. Bu nedenlerden dolayı elde edilen değerler farklı geometrideki kantilever yapılarının karşılaştırmalı olarak incelenmesi için kullanılmıştır.

Yay sabitlerinin kesin değerlerinin her bir kantilever yapısı için hesaplanması amacıyla yüksek kesinlikte yay sabiti belirlenmiş referans kantilever ile kalibrasyon yönteminin kullanılması, yüzey tip etkileşimleri gerektiren termal kalibrasyon yöntemlerinin, veya lazer doppler vibrometri gibi yüksek kesinlik ve doğruluk sağlayan [155] ileri kalibrasyon yöntemlerinin kullanılması uygun olacaktır.

Kullanılan kantilever yapıları için rezonans frekansı ve kalite faktörü değerleri hava ve su ortamında ölçüldükten sonra verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelgelerde verilen k değerleri kiriş kısmından aşındırma işlemi ile daraltılan kantilever genişlikleri hesaplanarak bulunan yay sabitlerini göstermektedir. k* değerleri ise temaslı mod kantilever yapıları için n. derece harmonik titreşim frekanslarının teknik özelliklerinde belirtilen frekans değerlerindeki rezonans frekanları ile hesaplanan korelasyon faktörü ile düzeltilmiş değerlerini vermektedir. k_{SIVI} değerleri ise kantileverlerin sıvı ortam içerisinde ölçülen rezonans frekanları ve kalite faktörlerine göre korelasyon ile hesaplanmış yay sabiti değerlerini vermektedir. Δm değerleri ise elde edilene k_{SIVI} değerleri

kullanılarak rezonans frekansında 100 Hz'lik kaymaya karşılık biriken kütle miktarlarını göstermektedir.

Çizelge 4.6 Standart ve modifiye kantileverlerin yay sabitleri ve rezonans frekanslarındaki 100Hz'lik değişime karşılık eklenen kütleler

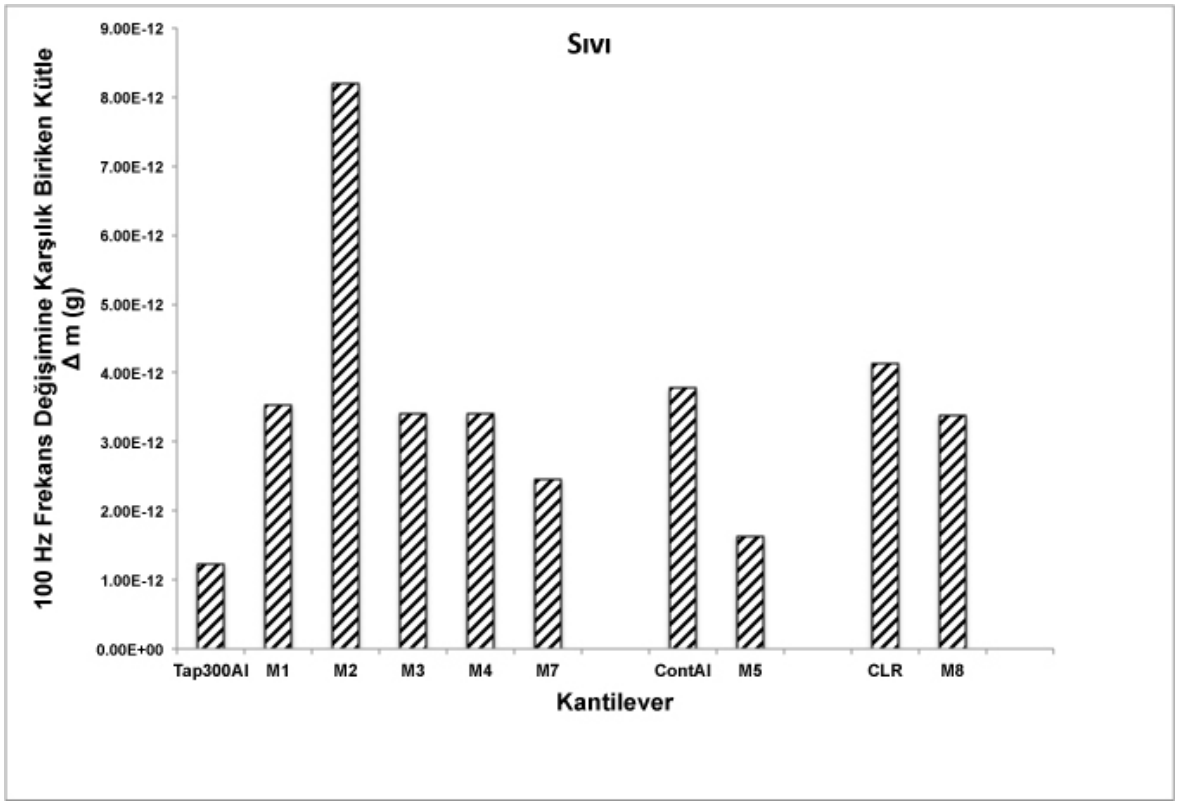
Kantilever Kodu	k	k*	k_{SIVI}	Δm
Tap300Al	23.54	23.54	64.92	1.234×10^{-12}
ContAl	11.46	0.267	0.605	3.786×10^{-12}
ElectriMulti	1.85	1.85	7.22	2.902×10^{-11}
CLR	8.65	0.202	0.444	1.777×10^{-12}
M1	15.30	15.30	68.17	3.586×10^{-12}
M2	4.63	4.63	4.64	8.209×10^{-13}
M3	7.33	7.33	16.72	3.420×10^{-12}
M4	7.77	7.77	3.95	3.409×10^{-12}
M5	2.88	0.067	0.273	1.639×10^{-12}
M6	0.67	0.67	8.80	5.621×10^{-11}
M7	27.86	27.86	93.44	2.466×10^{-12}
M8	6.52	0.152	0.222	3.380×10^{-12}

Çizelge 4.6'da verilen sonuçlar ışığında standart kantileverlerin modifiye edildikten sonra genel olarak yay sabiti değerlerinin azaldığı görülmektedir. Bu davranış teorik olarak hesaplanan verilerle ve literatür bilgileriyle uyum içerisindedir. Sader ve arkadaşları yayınladıkları [133] çalışmada dikdörtgen kantileverler ile dikdörtgen olmayan kantileverler için aşağıdaki bağıntıyı tanımlamışlardır.

$$Eh^3 = k\frac{4L^3}{b}$$

Buna göre kantileverin uzunluğu azaldıkça, genişliği ve kalınlığı arttıkça aynı young modülüs değerleri için kantilever yay sabiti artması beklenmektedir. Bizim

çalışmamızda kantileverlere aşındırma işlemi uygulanması nedeniyle hem young modülü değerleri hem de genişlik değerleri azalmaktadır. Ayrıca standart olarak verilen kantilever değerlerine göre çalışmalarda kullanılan modifiye edilmiş kantileverlerin gerçekte daha uzun oldukları görülmüştür. Bu nedenlerden dolayı kantileverler için hesaplanan yay sabiti değerleri için k_{SIVI} değerleri çalışmalarda kullanılmıştır.



Şekil 4.17. Kantileverler için su ortamında 100 Hz frekans kaymasına karşılık hesaplanan biriken kütle miktarlarının karşılaştırmalı gösterim

Şekil 4.17'de su içerisinde kantileverlerde gerçekleşen kaymalara karşılık biriken kütle miktarlarının karşılaştırmalı sonuçları gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kütle/Hz değerleri açısından en hassas kantilever yapıları Tap300Al, M7 ve M5 olarak görülmektedir.

4.4. Biyotin ile Fonksiyonelleştirilmiş Kantilever Yüzeylerine Streptavidin Bağlanmasının İncelenmesi

Çalışmanın bu bölümünden itibaren kantileverlerin biyosensör uygulamalarında kullanılabilirlikleri deneysel olarak araştırılmıştır. Bu çalışmalarda temel amaç

kantilever yüzeyinde kütle birikimine karşılık rezonans frekansında gerçekleşen kaymanın saptanabilmesi ve biriken kütle ile ilişkilendirilebilmesidir. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan kantilever yapılarında biyosensörün doğrusallığını arttırmak ve istenmeyen konumlarda kütle birikiminin önüne geçilmesi temel hedef olarak belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen cevap sinyallerinin arttırılması için yöntemler araştırılmıştır.

Biyosensör çalışmalarının tümünde altın yüzey üzerinden gerçekleşen tiyol kimyası kullanılmıştır. Literatürde altın üzerinden kovalent bağlanmalarla protein, antikor ve hücre gibi yapıların biyoreseptör olarak kullanılması sıklıkla tercih edilen yöntemlerdir. Çalışmalarımızda literatürde yoğun olarak çalışılmış biyotin – streptavidin etkileşimleri model olarak kullanılmıştır. Bağlanma kinetikleri, kimyası ve optimum ortam koşulları çok iyi optimize edildiği için çalışmalarda altın yüzeyi üzerinde 11-merkaptoundekanoik asit kullanılarak kendiliğinden düzenlenen tek tabaka uzatıcı kollar oluşturulmuş ve serbest karboksil grupları aktive edilerek istenilen reseptör tabakalar bağlanmıştır. Bu şekilde tabaka tabaka istiflenen bir reseptör yapısı oluşturularak en son katmanda bulunacak reseptör moleküllerin konformasyonel değişikliklere uğramadan aktif kalmaları hedeflenmiştir.

Kısaca yüzey üzerinde gerçekleştirilen kimyasal işlemler özetlenirse öncelikle kantileverler FIB ile geometrik olarak modifiye edilmiş ve yüzeylerinde sınırlandırılmış altın tabakalar oluşturulmuştur. Bu altın tabaka üzerinde merkaptoundekanoik asit uzatıcı kollar oluşturulmuş ve serbest karboksil grupları EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) kullanılarak gerçekleştirilen karbodiimid aktivasyonu ile fonksiyonelleştirilmiştir. Aktif karboksil grupları Hidrazin-LC-biyotin molekülü ile reaksiyona sokularak hidrazon bağı kurulmuş ve yüzeyde biyotinlenmiş reseptör tabakası hazırlanmıştır.

4.4.1. **Biyotinlenmiş Yüzeyin Morfolojik ve Kimyasal Karakterizasyonu**

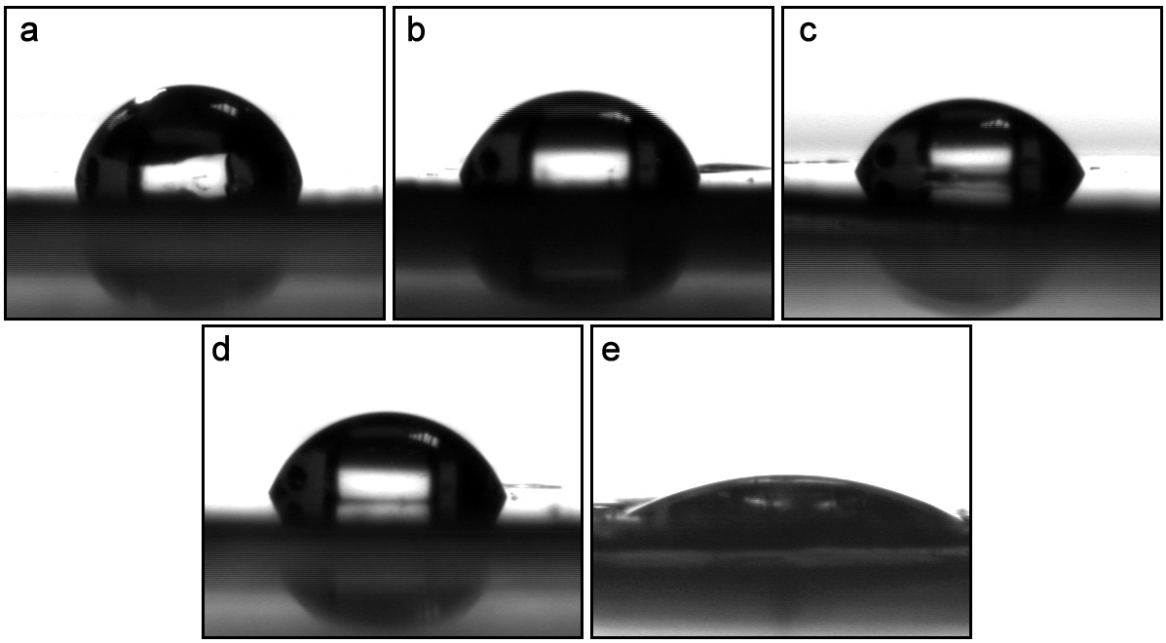
Çalışmalarda gerçekleştirilen yüzey modifikasyonlarını karakterize etmek üzere temas açısı ölçümleri, atomik kuvvet mikroskobi incelemeleri ve X-Işını Fotoelektron Spektroskopi incelemeleri gerçekleştirilmiştir. Kantilever yüzeyinde gerçekleştirilen modifikasyonların kantilever üzerinde karakterize edilmesi mevcut

karakterizasyon yöntemleri ile mümkün olamadığından incelemelerde bağıl (*indirect*) yöntem uygulanmıştır. Bu amaçla yüzey özellikleri üzerindeki etkilerini incelemek üzere 10mm çapında yüksek saflıkta V1 mika diskler (nanoScience Instruments, ABD) üzerine kantileverlerde gerçekleştirilen aynı yüzey modifikasyon işlemleri uygulanmıştır. Kısaca özetlemek gerekirse mika diskler altın kaplanmış, altın yüzey üzerinde MUA uzatıcı kollar oluşturulmuş, serbest karboksil grupları aktive edilerek biyotin molekülleri bağlanmış ve en son olarak streptavidin molekülleri biyotin ile bağlanmıştır.

Temas Açısı Ölçümleri

Mika diskler üzerinde gerçekleştirilen yüzey modifikasyon işlemlerinin etkileri temas açısı yöntemiyle KRUSS DSA100 (Hamburg, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Temas açısı ölçümleri sıvı faz olarak su kullanılarak, durağan damla yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Disk üzerinde gerçekleştirilen altın tabakası biriktirme işlemi ve kimyasal reaksiyonlar sonrasında yüzeyin kimyasal özellikleri değiştiği için bazı ölçülebilir farklılıklar oluşmaktadır. Bu değişimlerden birisi de yüzeydeki serbest uç grupların özellikleri nedeniyle yüzeyin hidrofilik veya hidrofobik karaktere doğru kaymasıdır. Temas açısı ölçüm yöntemi yüzeyin değişen bu karakteristiklerini incelemek için geliştirilmiş bir yöntemdir.

Disklerin üzerine 10 farklı noktada oluşturulan damlacıkların fotoğrafları çekilerek temas açıları ölçülmüştür. Temas açısı fotoğrafları Şekil 4.18'de sunulmuş ve temas açısı değerlerinin ortalama değerleri ve standart sapma değerleri hesaplanarak Çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.18. (a) Altın kaplanmış, (b) MUA oluşturulmuş, (c) EDC aktivasyonu uygulanmış, (d) biyotin bağlanmış, (e) streptavidin bağlanmış yüzeylerin su ile durağan damla temas açısı fotoğrafları

Çizelge 4.7. Yüzey Fonksiyonelleştirme İşlemleri Sonrası Temas Açısı Değerleri

Yüzey Modifikasyonu	**Temas Açısı (°)**	**Standart Sapma (± °)**
Altın Kaplı	80.81	5.56
MUA tabaka	72.75	1.97
EDC aktivasyonu	70.9	3.22
Biyotin bağlanmış	68.52	2.89
Streptavidin bağlanmış	30.44	2.33

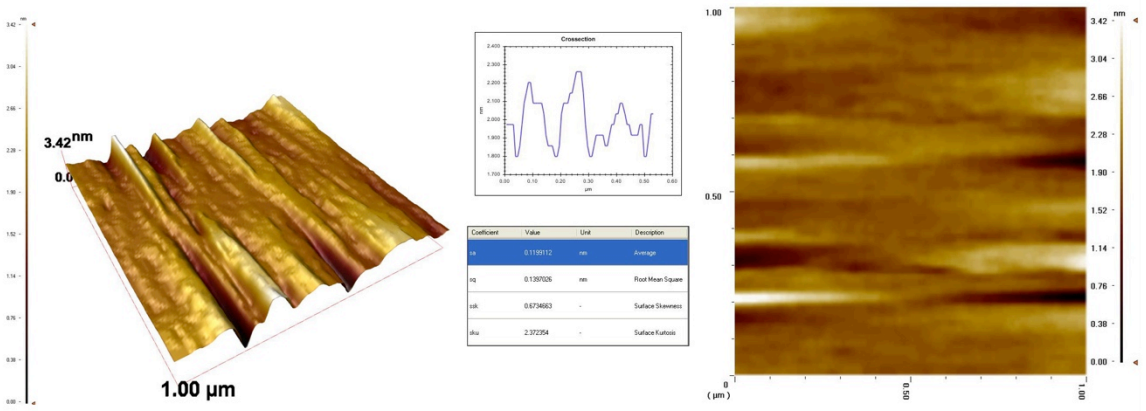
Çizelge 4.7'de modifiye edilmiş disklerin temas açısı ölçüm sonuçları verilmiştir. Altın kaplanmış disklerin hidrofobik yapısı nedeniyle 80.81 ±5.56° 'lik temas açısına sahip olduğu görülmüştür. Altın yüzey ile tiyol bağı kurarak 11-merkaptoundekanoik asit ile modifiye edildiğinde yüzeyde serbest karboksilik asit grupları oluşturmaktadır. Karboksilik asit grupları hidrofilik karakterleri nedeniyle temas açısının düşmesine (72.75 ±1.97°) neden olmaktadır. MUA tabakasının EDC ile aktivasyonu sonrası yüzeyde kararsız ara formlar oluşmaktadır. Temas açısı ölçümleri için azot gazı altında kurutulan disk yüzeyleri kısa süre içerisinde tekrar karboksilik asit gruplarına dönüşmektedir. Bu nedenle ölçüm öncesi ve ölçüm esnasındaki bekleme süresince ve temas açısı ölçümlerinde su ile temas ettiğinde hidroliz olan aktif ara formların sayısı hızla azalmış olabilir. Bu nedenle temas açısı ölçümlerinde çok az bir düşüş (70.9 ±3.22°) gözlenmiştir. Biyotin

gruplarının hem $–NH_2$ hem de –COOH grupları içermesi ve yüzeydeki derişimi nedeniyle beklenildiği üzere temas açısı değerlerinde önemli bir düşüş (68.52 ±2.89°) gerçekleşmemiştir. Son olarak biyotin moleküllerine streptavidin moleküllerinin bağlanması ile yüzey hidrofilisitesinde önemli bir düşüş kaydedilmiştir (30.44 ±2.33°).

Atomik Kuvvet Mikroskop Görüntüleme Çalışmaları

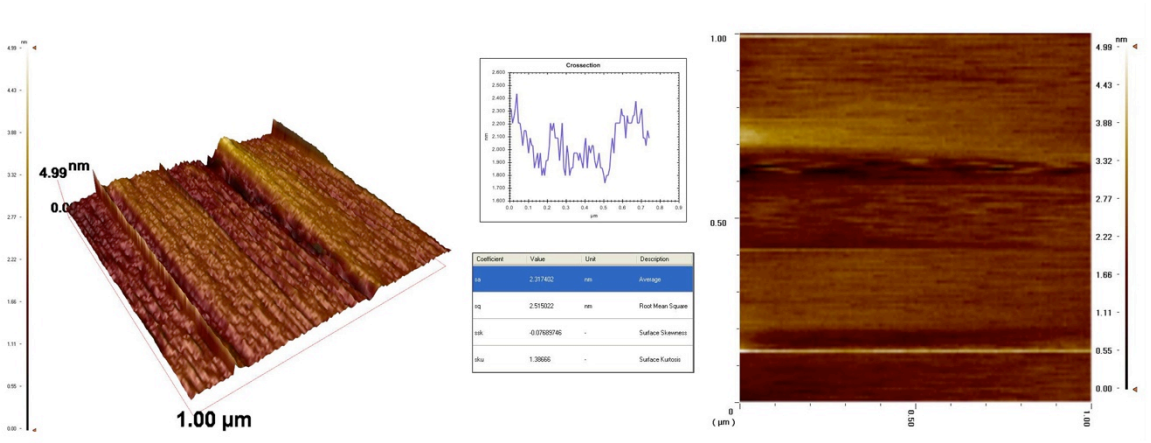
Hazırlanan disk yüzeylerinin atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak yüzey morfoloji incelemeleri tıklamalı modda Ambiyant AKM (Nanomagnetics Instruments, İngiltere) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mika diskler örnek tutucu üzerine çift taraflı bantla sabitlenerek hava ortamında ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarda Tap300Al kantilever 300kHz'de salınım frekansına ayarlanarak kullanılmış ve yüzeyler 1 µm/s hızında taranarak 256x256 piksel ve 1.0 x1.0 $µm^2$ alan görüntüleri elde edilmiştir. Modifiye edilen disklerin yüzey görüntüleri Şekil 4.19 - 4.21'de verilmiştir.



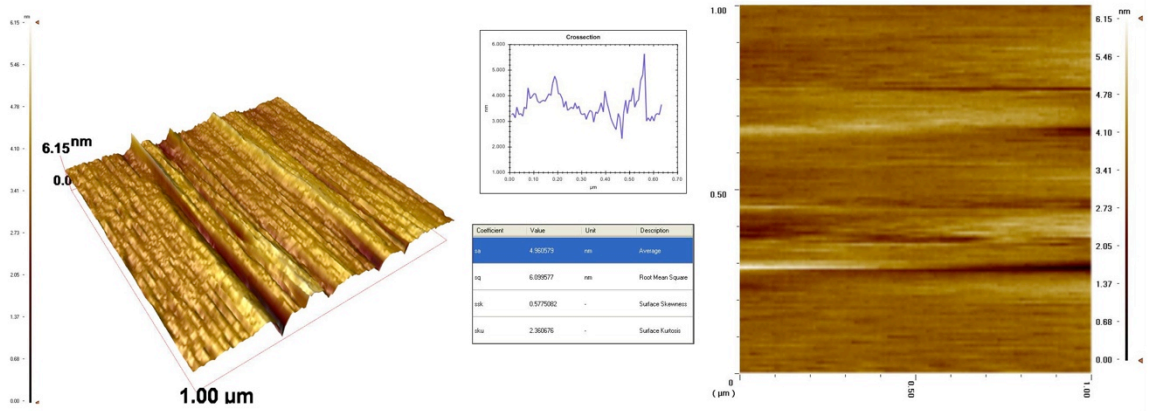
Şekil 4.19. Altın kaplanmış mika disklerin 3D, kesit, pürüzlülük ve 2D topografik AKM incelemeleri

Şekil 4.19'da altın yüzeyin morfolojik özellikleri görülmektedir. Yüzey üzerinde kesit alınan bölgedeki pürüzlülük değerleri dikkate alındığında ortalama 0.4 nm değerinde yükselti farkları gözlenmektedir. Bu yüzey için ortalama pürüzlülük değerleri 0.1199 nm ve rms (ortalama karekök) değeri 0.139 nm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.20. MUA ile fonksiyonelleştirilmiş disklerin 3D, kesit, pürüzlülük ve 2D topografik AKM incelemeleri

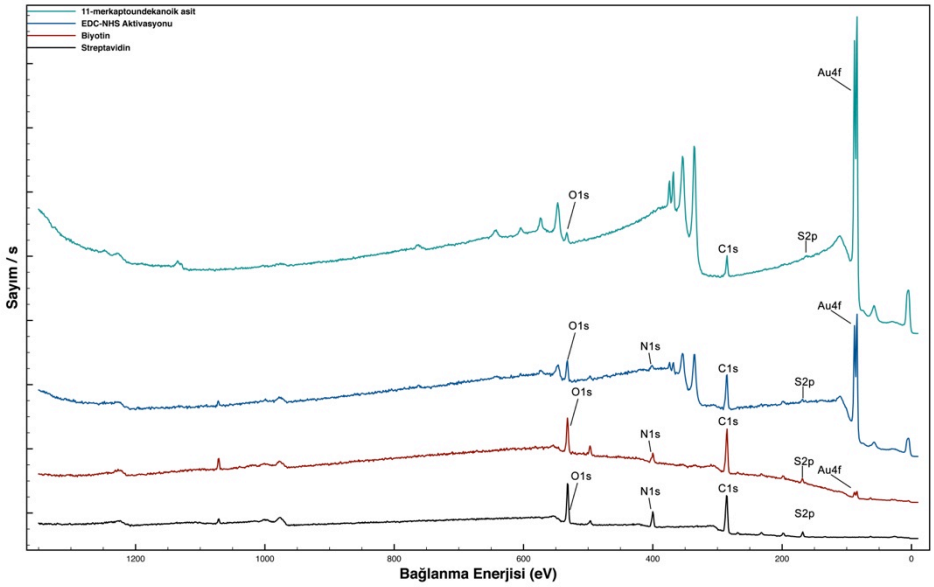
Şekil 4.20'de 11-merkaptoundekanoik asit ile modifiye edilen altın yüzeyin morfolojik özellikleri görülmektedir. Yüzey üzerinde kesit alınan bölgedeki pürüzlülük değerleri dikkate alındığında ortalama 0.4 nm değerinde yükselti farkları gözlenmektedir. Bu yüzey için ortalama pürüzlülük değerleri 2.317 nm ve rms (ortalama karekök) değeri 2.515 nm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.21. Biyotinlenmiş disklerin 3D, kesit, pürüzlülük ve 2D topografik AKM incelemeleri

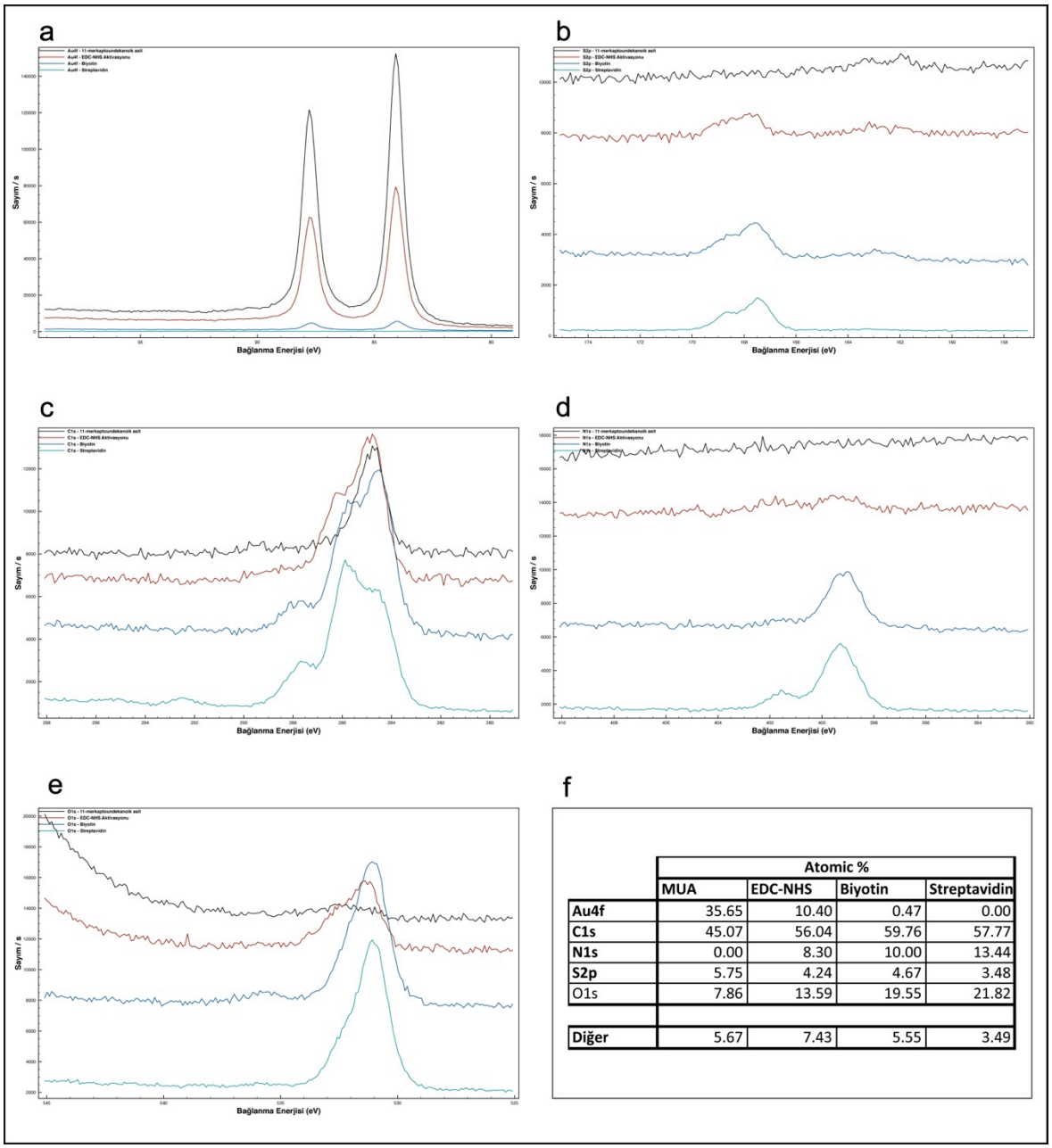
Şekil 4.21'de biyotin bağlanmış yüzeyin morfolojik özellikleri görülmektedir. Yüzey üzerinde kesit alınan bölgedeki pürüzlülük değerleri dikkate alındığında ortalama 2.0 nm değerinde yükselti farkları gözlenmektedir. Bu yüzey için ortalama pürüzlülük değerleri 4.960 nm ve rms (ortalama karekök) değeri 6.099 nm olarak hesaplanmıştır.

X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) İncelemeleri



Şekil 4.22. Altın kaplı mika disklerin X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi ile elde edilmiş survey analiz grafiği

Şekil 4.22'de verilen grafikte üstten aşağıya doğru sırasıyla 11-merkaptoundekanoik asit uzatıcı kollar oluşturulmuş (yeşil) , karbodiimit aktivasyonu gerçekleştirilmiş (mavi), biyotin (kırmızı) ve streptavidin bağlanmış (siyah) yüzeylerin X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi ile elde edilmiş survey analiz grafikleri verilmiştir. Burada elde edilen Au4f, S2p, C1s, N1s ve O1s pikleri detaylı olarak Şekil 4.23'de incelenmiş ve atomik yüzdeler olarak verilmiştir.



	Atomic %			
	MUA	EDC-NHS	Biyotin	Streptavidin
Au4f	35.65	10.40	0.47	0.00
C1s	45.07	56.04	59.76	57.77
N1s	0.00	8.30	10.00	13.44
S2p	5.75	4.24	4.67	3.48
O1s	7.86	13.59	19.55	21.82
Diğer	5.67	7.43	5.55	3.49

Şekil 4.23. Modifiye edilmiş yüzeylerin Au4f (a), S2p (b), C1s (c), N1s (d), O1s (e) piklerinin grafikleri ve yüzde atomik bileşen karşılaştırması (f)

Şekil 4.23 ve 4.24'de özetlendiği üzere altın kaplanmış yüzeylerin üzerinde 11-merkaptoundekanoik asit fonksiyonel grupları bağlandığında yüzeyde karbon, oksijen ve kükürt atomlarının varlığı gözlenmiştir.

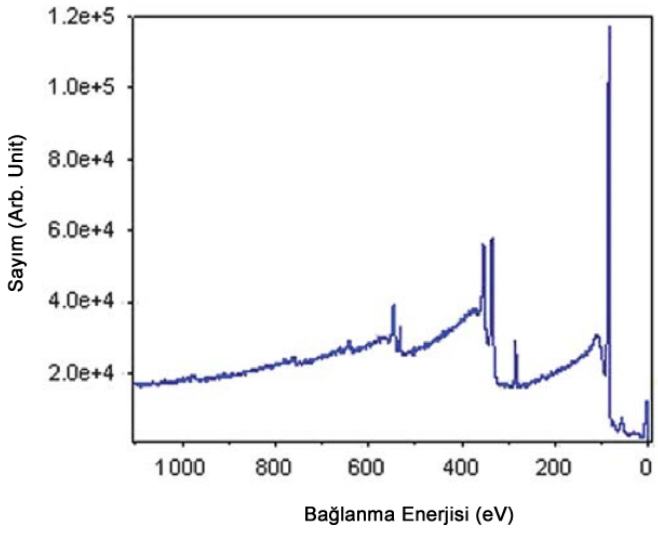
Çizelge 4.8. 11-Merkaptoundekanoik asidin yüzdece atomik bileşenleri

Element	Atom Sayısı	Kütle Yüzdesi
Karbon	11	60.5055
Hidrojen	22	10.1553
Oksijen	2	14.6543
Kükürt	1	14.6848

Çizelge 4.9. 11-Merkaptoundekanoik asit için karbon, oksijen ve kükürt elementleri yüzdece kütle bileşenleri

Element	Teorik	XPS
C	67.34	76.80
O	16.31	9.79
S	16.34	13.39

Çizelge 4.8'de MUA'nın kütlece atomik bileşen yüzdeleri verilmiştir. Yapıdan XPS analizinde hesaplanmayan hidrojen çıkarılarak karbon, oksijen ve kükürt yüzdeleri hesaplanarak Çizelge 4.9'da verilmiştir. Ayrıca XPS sonuçlarından altın bileşeni çıkarılarak aynı elementler için yüzdece bileşenler hesaplanarak bu çizelgede verilmiştir. XPS atomik komposizyonunda yüzeydeki safsızlıklar nedeniyle % 5.67 oranında diğer elementlerin varlığı saptanmıştır. Bu yüzdece bileşen değerlerinde sapmaya neden olmakla birlikte, Şekil 4.22'de verilen grafikte görülen MUA'ya ait XPS survey spektrası Şekil 4.24'de verilen referans spektra ile oldukça örtüşmektedir.



Şekil 4.24. Snow ve arkadaşları tarafından altın yüzey üzerinde oluşturulan 11-merkaptoundekanoik asit moleküllerinin XPS *survey* spektrası [156]

MUA üzerinde bulunan serbest karboksil gruplarının aktivasyonu sonrası yüzeye biyotin bağlanması ve biyotin ile streptavidin etkileşimleri süresince Şekil 4.27'de verilen spektralar incelendiğinde altın yüzeyden kaynaklanan sinyalde azalmaya karşılık, azot ve oksijen miktarlarında önemli artış kaydedilmiştir. Biyotin ve Streptavidin [157] bağlanmalarını gösteren XPS spektraları literatür bulguları ile örtüşmektedir [158].

Spektralarda 165-167 eV değerlerinde maksimum gösteren S2p piki altın üzerine MUA tabakası oluşturulan yüzeylerde altın üzerine bağlanan kükürt için karakteristik pik olarak kabul edilmektedir. Genellikle bu pikin değeri kendiliğinden oluşan tabakanın karbon zincirinin en altında yer alması nedeniyle çok zayıf gözlenmektedir. Biyotin ve streptavidin moleküllerindeki kükürt miktarları arttığı için ve serbest uçlarda kükürt bulunduğu için pikin şiddetinde artış gözlenmiştir. 284 -285 eV değerlerinde gözlenen C1s piki ise MUA tabakası için karakteristik alken zincirini işaret etmektedir. C1s pikinin yanında 289 eV değerinde ikinci bir boyun oluşturan pikin varlığı ise serbest karboksil gruplarına ait karbon atomunun varlığını göstermektedir. 299 eV değerinde gözlenen N1s pikinin varlığı amin gruplarını işaret etmektedir [159, 160].

4.4.2. **Biyotin – Streptavidin Etkileşimlerinin İncelenmesi**

Streptavidin varlığında kantilever frekansındaki değişimin incelenmesi amacıyla öncelikle biyotinlenmiş kantileverler sıvı hücre içerisindeki kantilever tutucuya yerleştirilmiştir. Sıvı hücre içerisindeki cam prizma ile kantilever arasındaki bölgede hava kabarcığı kalmayacak şekilde hareketli faz (PBS) sıvı hücre içerisine pipetlenmiş ve sonrasında sıvı giriş kanalından pompa yardımı ile sıvı beslenirken hücre içerisinde hava kabarcığı kalmadığından emin olunarak hücre kapatılmıştır. Görsel kontrollerden sonra sıvı hücre, kafa ünitesine yerleştirilerek kullanılan kantilever için lazer ve fotodiyot ayarları yapılarak F_{toplam}: 1.0 V, F_{normal}: 0.0 V, $F_{lateral}$: 0.0 V değerleri elde edilmiştir. Lazer uyarım şiddeti ayarlanarak genlik değeri 1.0 V olacak şekilde her deney öncesinde kontrol edilmiştir. Rezonans değeri ölçümleri frekans değerine karşılık genlik değeri taraması yapılarak önce geniş aralıkta her seferinde 1000 Hz'lik adımlarla 0 - 400000 Hz aralığında taranarak bulunmuştur. Sonrasında rezonans frekans değerinin ± 1000 aralığında

1Hz'lik adımlarla hassas tarama gerçekleştirilerek rezonans frekans değeri bulunmuş ve kaydedilmiştir. Örnek enjeksiyonunu takip eden 4. dakikada pompa kapatılmış ve ölçüm alınmaya başlanarak 3 ölçüm/dakika olacak şekilde 1 saat süresince rezonans frekansı değerleri ölçülmüştür. Deneyler süresince her 9 ölçümde bir geniş frekans taraması yapılarak doğru rezonans frekansında ölçüm alındığı teyit edilmiştir.

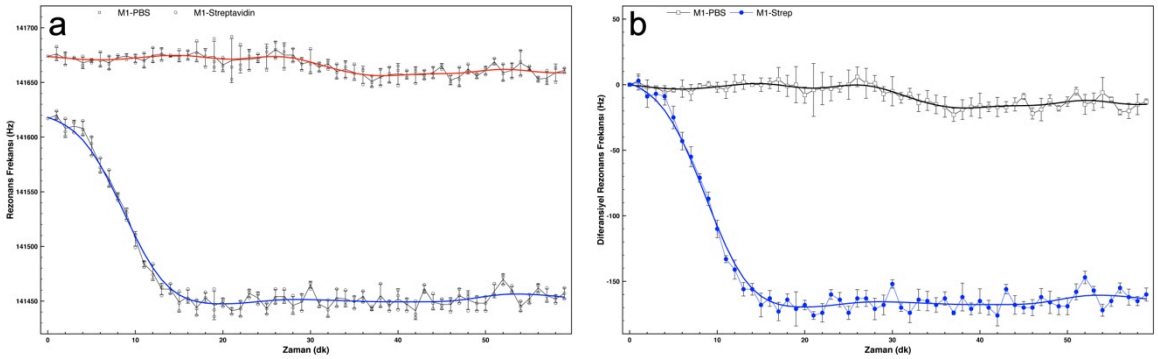
Sıvı hücre içerisindeki kantilever dengeye geldikten sonra 1 saat süre ile ölçüm alınarak hareketli faz varlığında sensörün stabilitesi ve sinyaldeki gürültü değerleri gözlenmiştir.

Daha önceden hazırlanan stok streptavidin çözeltileri deneyler öncesinde oda sıcaklığında dengeye getirilerek, 10 µg/mL derişimde örnekler hazırlanarak enjeksiyon portu üzerinden 20 µL hacimde sisteme verilmiştir. Sıvı hücre içerisinde son derişim 100 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Tüm biyosensör deneyleri için yukarıda anlatılan ölçüm parametreleri ve yöntemleri kullanılarak aynı derişim hesapları yapılmıştır.

Kullanılan tüm kantileverler aynı koşullarda bölüm 3.7'de belirtilen yöntemlerle modifiye edilmiştir. M2, M3 ve M4 kantileverleri özellikle piranha çözeltisi ile temizlenme aşamasında ve modifikasyon işlemlerinde bükülme ve kırılma eğilimi göstermişlerdir. Modifiye edilen kantileverlerden ise ön denemeler esnasında sinyal gözlenememiştir. Kırılgan yapıları ve sıvı ortamdaki rezonans frekanslarında diğer kantileverlere göre anlamlı farklılıklar göstermemeleri nedeniyle bu kantileverler deneysel çalışmalardan çıkarılmıştır.

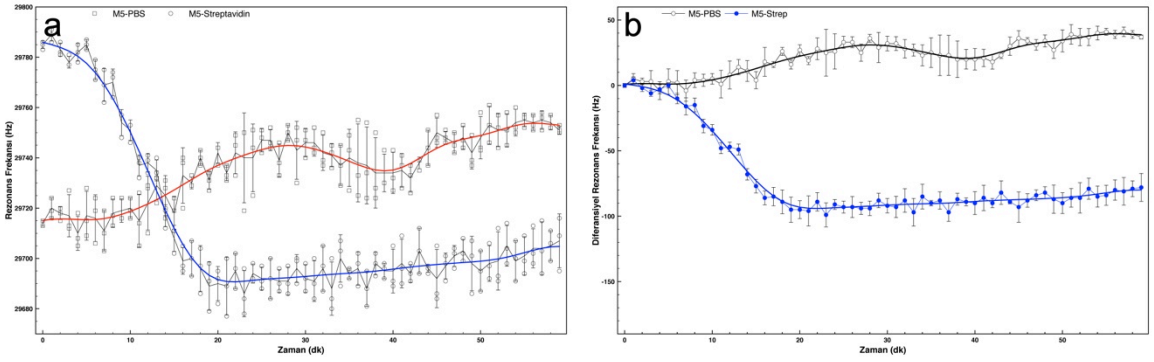
Devam eden deneylerde standart kantilever özelliklerini incelemek üzere tamamı altın kaplanmış M6 ve M7 kantileverler kullanılmış ve tez süresince M6* ve M7* olarak gösterilmiştir. Bu kantileverlerin standart kantileverlerden farkı sadece uç kısımlarının aşındırılmış olmasıdır. M1 ve M7 kantileverleri kiriş kısmındaki aşındırmanın etkisini gözlemek üzere incelenmiştir. M6, M7 ve M8 kantileverleri uzunluğun etkisini araştırmak üzere incelenmiştir. M5 ve M8 kantileverleri ise kantilever genişliğinin etkisini incelemek üzere takip edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar zamana karşı rezonans frekansı değerleri olarak Şekil 4.25-4.31'de her bir kantilever için ayrı ayrı verilmiştir. Şekil 4.32'de tüm kantileverlerin 100 ng/mL streptavidin'e verdikleri cevap rezonans frekansındaki kayma (Hz) biçiminden karşılaştırılmıştır. Şekil 4.33'de ise tüm kantileverler vermiş oldukları cevapların rezonans frekanslarına karşılık ifadeleri biçiminden incelenmişlerdir.



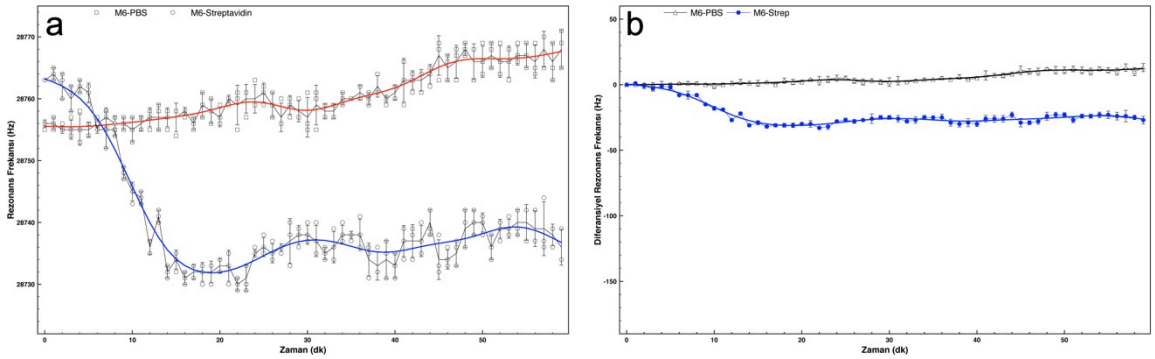
Şekil 4.25. M1 kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.25 (b)'de görüldüğü gibi M1 kantileveri için 170 Hz kayma gerçekleşmiştir. PBS ölçümleri esnasında gürültü değeri 20.11 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 13.05 Hz olarak hesaplanmıştır.



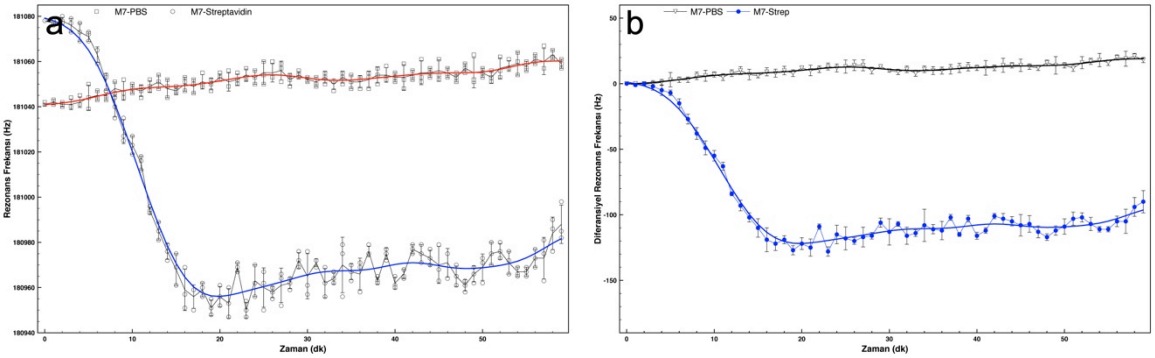
Şekil 4.26. M5 kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.26 (b)'de görüldüğü gibi M5 kantileveri için 93 Hz kayma gerçekleşmiştir. PBS ölçümleri esnasında gürültü değeri 17.90 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 11.59 Hz olarak hesaplanmıştır.



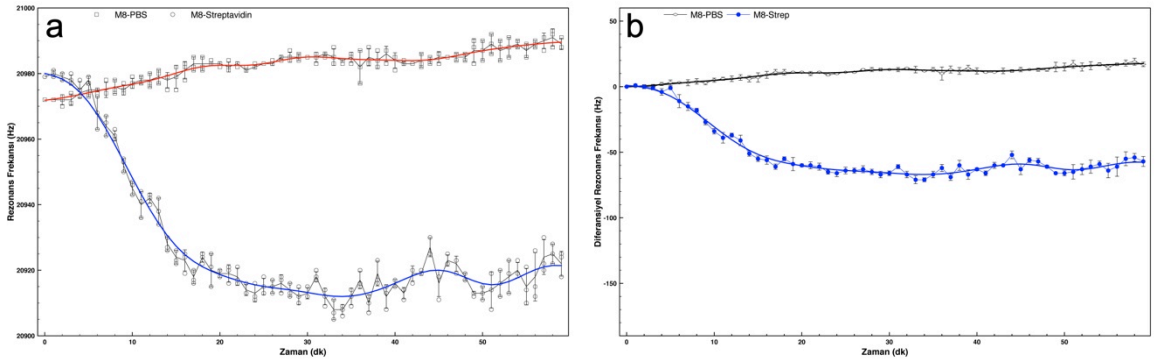
Şekil 4.27. M6 kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.27 (b)'de görüldüğü gibi M6 kantileveri için 30 Hz kayma gerçekleşmiştir. PBS ölçümleri esnasında gürültü değeri 3.51 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 4.36 Hz olarak hesaplanmıştır.



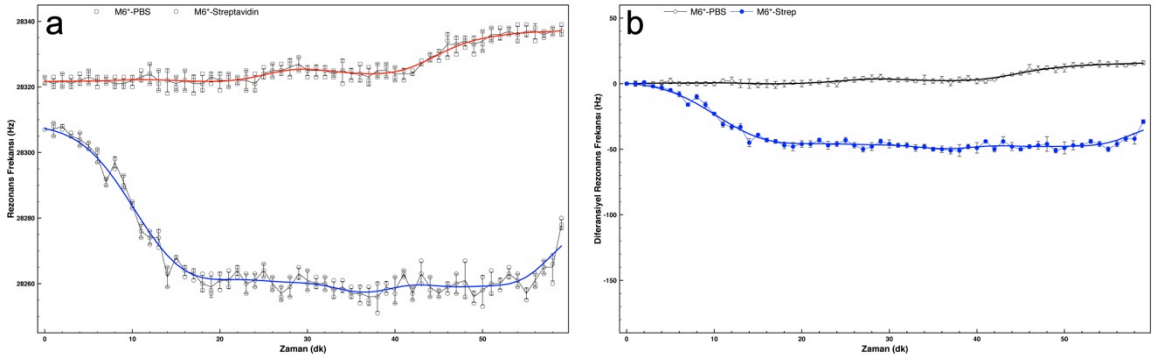
Şekil 4.28. M7 kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.28 (b)'de görüldüğü gibi M7 kantileveri için 122 Hz kayma gerçekleşmiştir. PBS ölçümleri esnasında gürültü değeri 6.66 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 12.29 Hz olarak hesaplanmıştır.



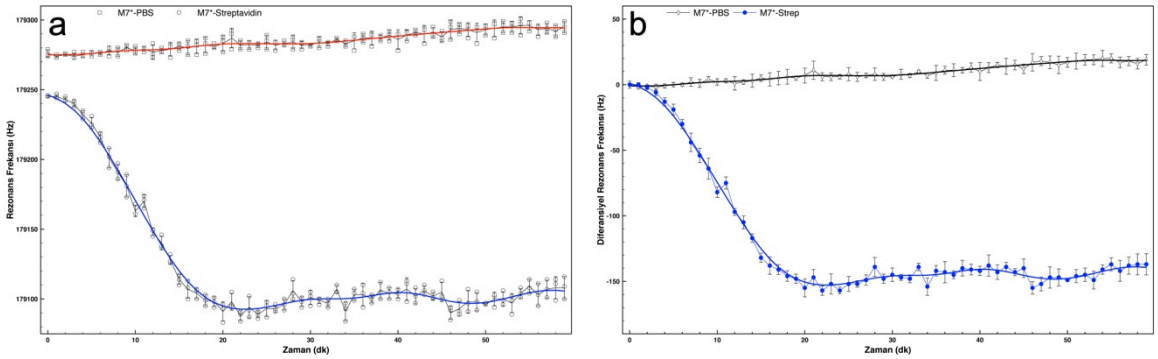
Şekil 4.29. M8 kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.29 (b)'de görüldüğü gibi M8 kantileveri için 67 Hz kayma gerçekleşmiştir. PBS ölçümleri esnasında gürültü değeri 5.00 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 7.37 Hz olarak hesaplanmıştır.



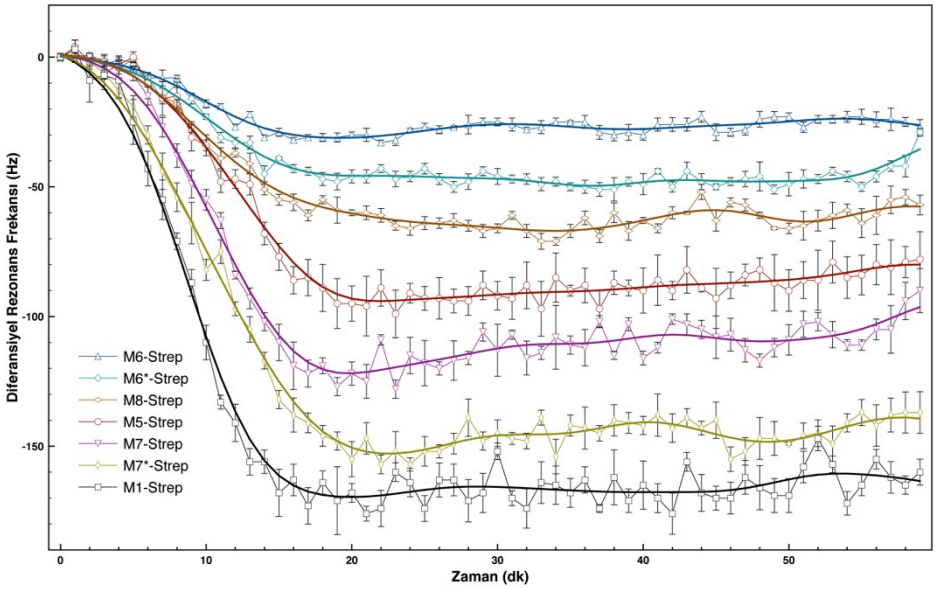
Şekil 4.30. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M6* kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.30 (b)'de görüldüğü gibi M6* kantileveri için 46 Hz kayma gerçekleşmiştir. PBS ölçümleri esnasında gürültü değeri 3.61 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 5.57 Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.31. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M7* kantileveri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.31 (b)'de görüldüğü gibi M7* kantileveri için 152 Hz kayma gerçekleşmiştir. PBS ölçümleri esnasında gürültü değeri 7.00 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 8.14 Hz olarak hesaplanmıştır.



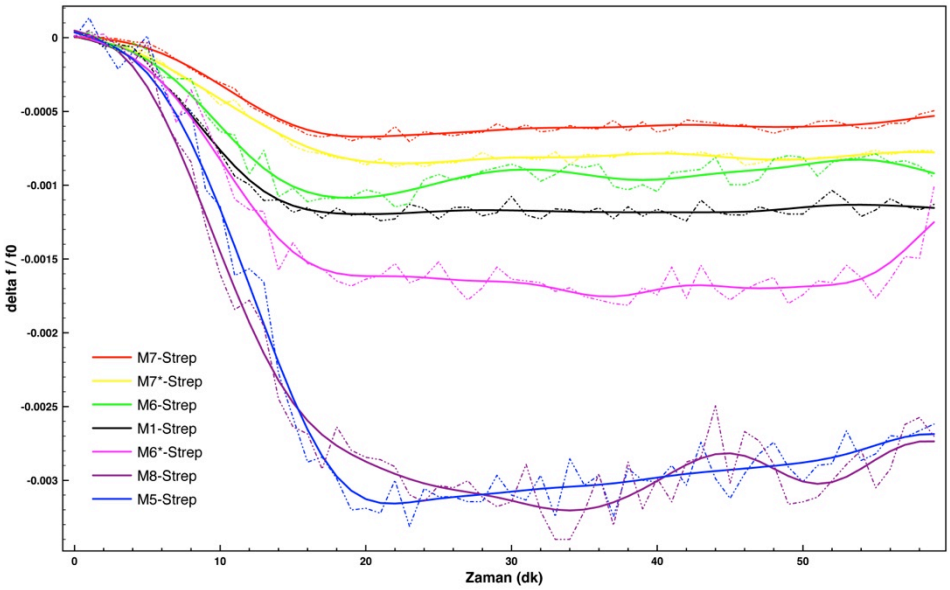
Şekil 4.32. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6*,M7* kantileverleri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansındaki değişim

Çizelge 4.10. Streptavidin bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri

Kantilever	Rezonans Frekansındaki Kayma (Hz)	Gürültü (Hz) (PBS)	Gürültü (Hz) (Streptavidin)
M1	170	20.11	13.05
M5	93	17.90	11.59
M6	30	3.51	4.36
M6*	46	3.61	5.57
M7	122	6.66	12.29
M7*	152	7.00	8.14
M8	67	5.00	7.37

Rezonans frekansındaki değişimler ve kantilever karşılaştırması yapıldığında en büyük etkiyi rezonans frekansının gösterdiği Şekil 4.32'de açıkça görülmektedir. Bunun yanında rezonans frekansı tek etkin faktör değildir. M7 kantileverinin rezonans frekansı M1'den büyük olmasına karşılık M1 1.12 kat daha yüksek cevap vermiştir. Bu sonuç $\sqrt{(k_{M7} / k_{M1})} = 1.17$ oranı ile oldukça örtüşmektedir.

Bu grafikten elde edilen diğer bir önemli bulgu da tüm yüzey kaplamasının rezonans frekansındaki değişime etkisinin yüzey alanı arttıkça kaymanın arttığıdır. Fakat bununla birlikte teorik hesaplamalarda gösterildiği gibi kütlenin konumunun etkisi logaritmik olarak uçtan kirişe doğru azalmaktadır. Bu etki M6 kantileveri için tüm yüzey alanı / sınırlandırılmış alan oranı 4.5 için sinyalde 1.53 kat artış gerçekleşmiştir. Yine M7 kantileveri için altın kaplı alanlar için 3.02 olan oran sinyalde 1.24 kat artış olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.33. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6,7 kantileverleri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı ($\Delta f / f_0$) grafiği

Sonuçlardan elde edilen diğer önemli bir bulgu ise streptavidin bağlanmasına karşılık her bir kantilever için rezonans frekansı başına rezonans frekansındaki kayma (diferansiyel rezonans frekansı) karşılaştırıldığında geometrik yapı ile ilişkili bir tablo oluşmaktadır. Şekil 4.33'de verilen grafikte görüldüğü üzere benzer yapıya sahip M5 ve M8 kantileverleri benzer ve en yüksek cevabı verirken en yüksek rezonans frekansına sahip standart M7 kantileverinin frekans başına beklenenin aksine en düşük cevabı verdiği görülmektedir.

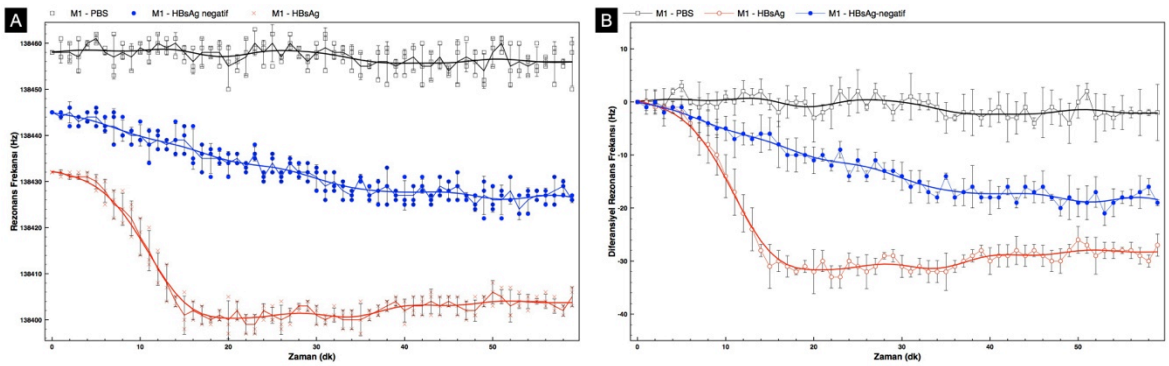
4.5. Anti Hepatit B Yüzey Antijeni Antibadisi ile Hepatit B Yüzey Antijeninin Tayin Edilmesi Çalışmaları

Çalışmanın bu kısmında Hepatit B yüzey antijeni varlığının saptanması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda öncelikle anti-Hepatit B antikorları kantilever yüzeylerinde hem fiziksel hem de streptavidin - biyotin etkileşimi üzerinden elektrostatik olarak immobilize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ayrı ayrı incelenerek alt bölümlerde karşılaştırmalı olarak açıklanmıştır.

4.5.1. Adsorpsiyon Yöntemi ile Oluşturulmuş Anti-HBs Reseptörlerin HBsAg ile Etkileşimlerinin İncelenmesi

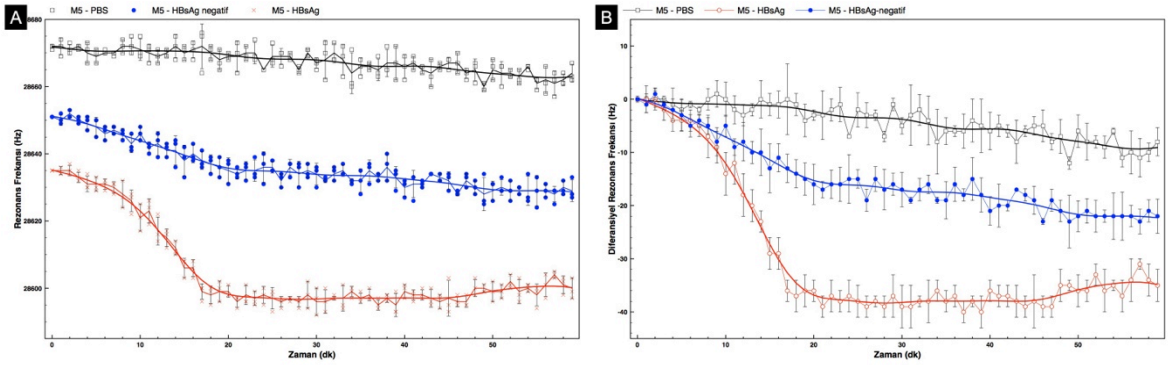
Anti-HBs-biyotin moleküllerinin fiziksel adsorpsiyonu için altın kaplanmış kantilever yüzeyleri üzerine 100µL Anti-HBs-biyotin (200 ng/mL, 100mM fosfat tamponu

(PBS) içerisinde, pH:7.4) eklenerek yüzeye fiziksel olarak immobilize olmaları sağlanmıştır. Hazırlanan anti-HBs reseptörleri ile modifiye edilmiş kantileverler ile HBsAg etkileşimlerinin incelenmesi için kantileverler 85 mM MES (2-morfolino-etansülfonik asit) tamponu (pH6.5) içerisinde sıvı hücreye alınarak rezonans frekansının stabil hale gelmesi beklenmiştir. Rezonans frekansı dengeye geldikten sonra ilk olarak anti-HBs reseptörüne karşı aktif olmayan inhibe edilmiş HBs-Ag-negatif antijeni sonrasında ise HBsAg-biyotin örnekleri 85 mM MES tamponu (pH6.5) içerisinde 200 ng/mL derişimde hazırlanarak kapalı sıvı hücre içerisine HPLC sistemi üzerinden mobil faz ile verilmiştir. Zamana karşı kantilever yüzeyinde gerçekleşen bağlanmalar nedeniyle rezonans frekansında gerçekleşen değişimlerin ölçülmesi için 60dk süresince kantileverlerin rezonans frekansları kaydedilmiştir.



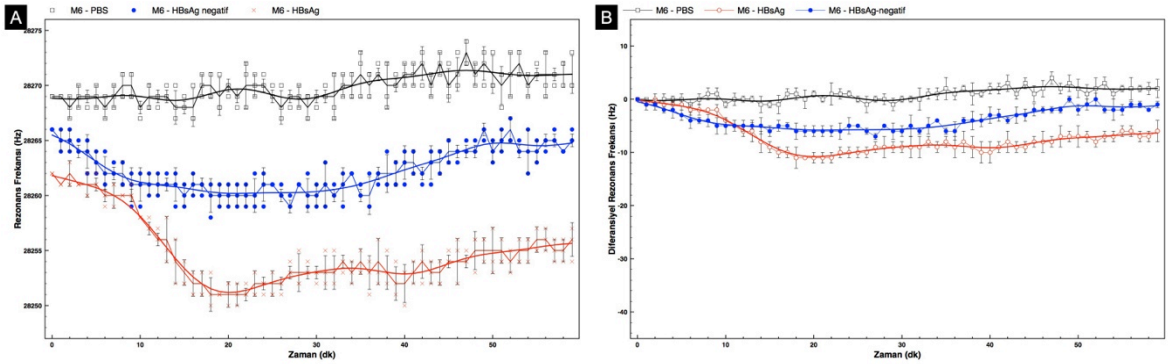
Şekil 4.34. M1 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.34 (b)'de görüldüğü gibi M1 kantileveri kullanılarak HBsAg-negatif için 18 Hz, HBsAg için 32 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 5.29 Hz, HBsAg-negatif için 4.36 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 4.36 Hz olarak hesaplanmıştır.



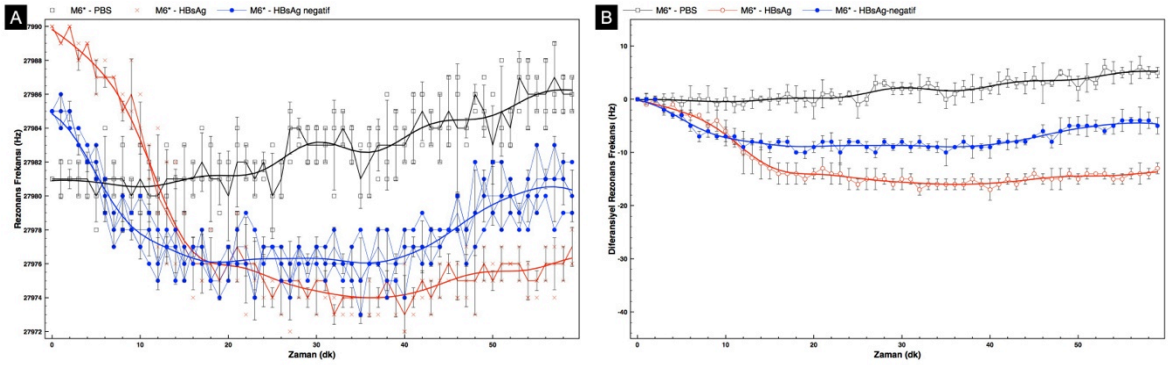
Şekil 4.35. M5 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.35 (b)'de görüldüğü gibi M5 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 22 Hz, HBsAg için 38 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 6.66 Hz, HBsAg-negatif için 4.93 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 5.29 Hz olarak hesaplanmıştır.



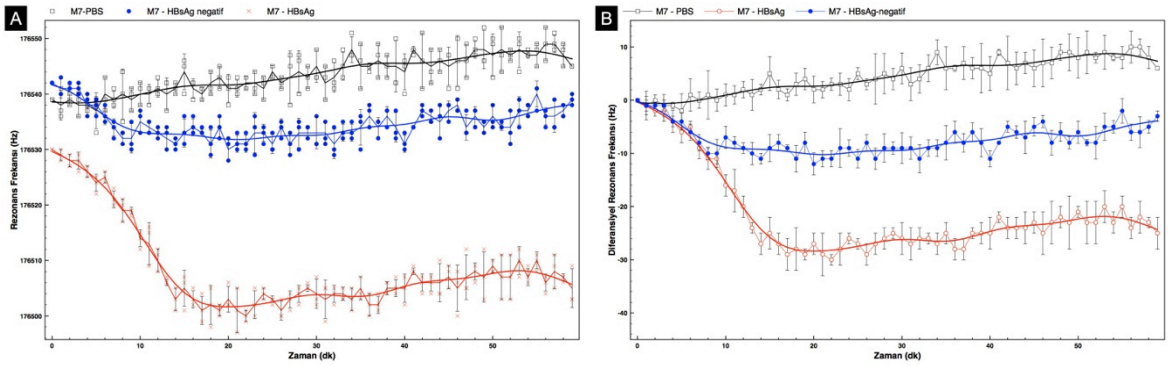
Şekil 4.36. M6 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.36 (b)'de görüldüğü gibi M6 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 6 Hz, HBsAg için 11 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 2.08 Hz, HBsAg-negatif için 2.00 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 2.08 Hz olarak hesaplanmıştır.



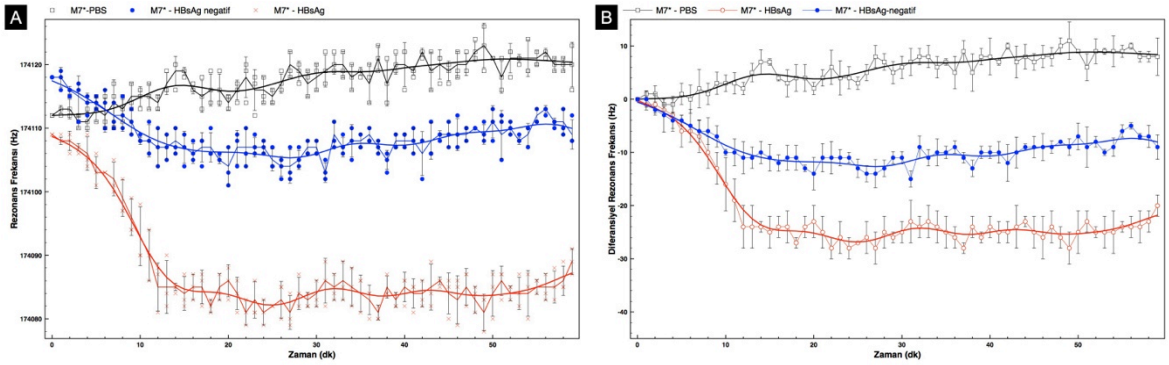
Şekil 4.37. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M6* kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.37 (b)'de görüldüğü gibi tüm yüzeyi altın kaplanmış M6 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 9 Hz, HBsAg için 16 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 3.79 Hz, HBsAg-negatif için 2.52 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 3.61 Hz olarak hesaplanmıştır.



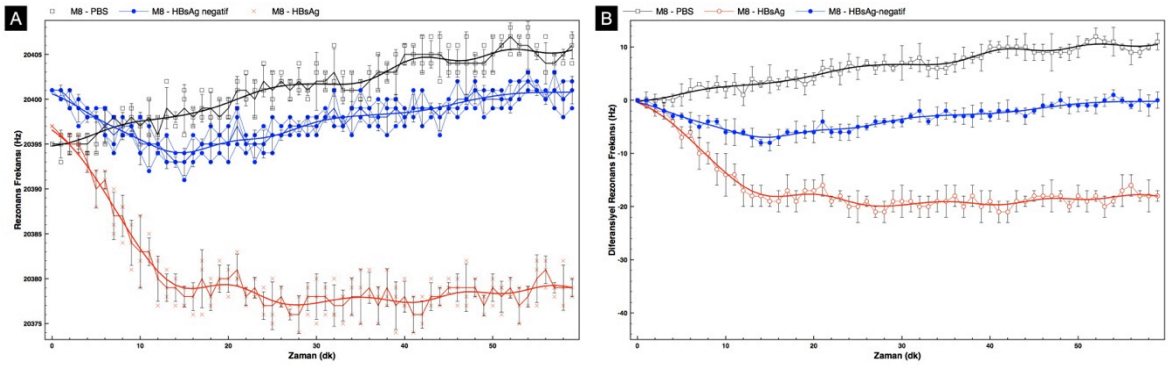
Şekil 4.38. M7 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.38 (b)'de görüldüğü gibi M7 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 9 Hz, HBsAg için 28 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 5.00 Hz, HBsAg-negatif için 3.61 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 4.51 Hz olarak hesaplanmıştır.



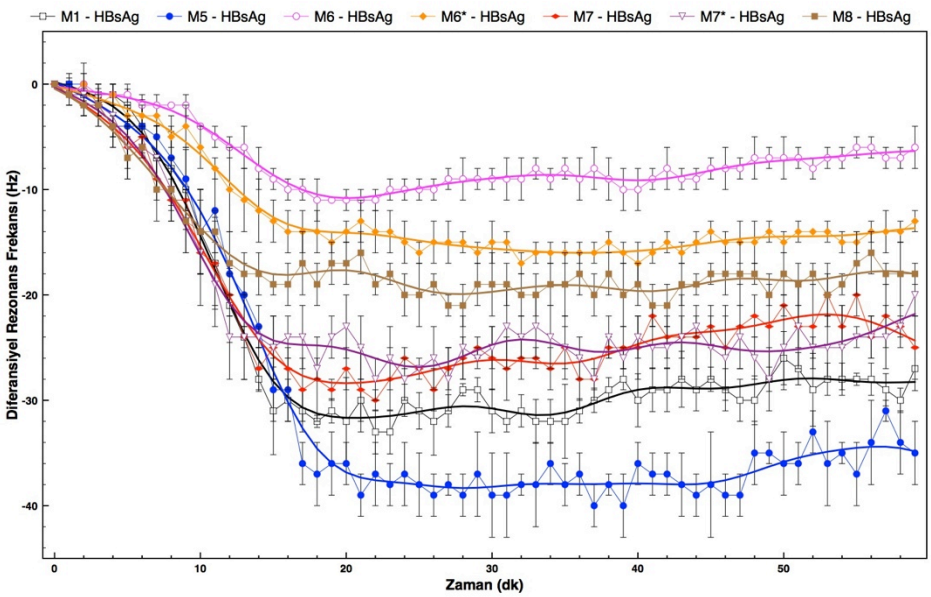
Şekil 4.39. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M7* kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.39 (b)'de görüldüğü gibi tüm yüzeyi altın kaplanmış M7* kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 12 Hz, HBsAg için 26 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 3.61 Hz, HBsAg-negatif için 3.79 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 4.62 Hz olarak hesaplanmıştır.



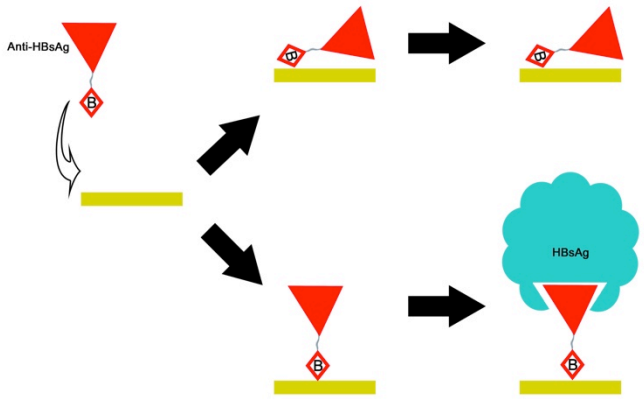
Şekil 4.40. M8 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.40 (b)'de görüldüğü gibi M8 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 5 Hz, HBsAg için 19 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 3.51 Hz, HBsAg-negatif için 2.52 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 4.04 Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.41. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6*,7* kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansındaki değişim

Bu bölümde elde edilen sonuçlarda anti-HBs reseptörlerinin fiziksel adsorpsiyonu esnasında reseptör moleküllerin yüzeydeki konformasyonları ve derişimleri adsorpsiyon süresince kontrol edilememiştir. Literatürde adsorpsiyon ve fonksiyonel gruplar üzerinden reseptör oluşumlarının karşılaştırıldığı çalışmalarda genellikle yüzeydeki molekül sayısının arttığı fakat bununla birlikte gelişi güzel konumlanma nedeniyle aktif fonksiyonel grupların bloke olduğu sıklıkla vurgulanmıştır [118].



Şekil 4.42. Anti-Hepatit-B yüzey antikorunun adsorpsiyon yöntemi ile yüzeye immobilizasyonu ve Hepatit B yüzey antijeni ile bağlanması

Şekil 4.42'de yüzeyde reseptörlerin yerleşimi şematik olarak gösterilmiştir. Genelde aktif bölgelerin sterik etkiler ve fiziksel inhibisyonlar gibi etmenlerden dolayı bloklanması nedeniyle hedef analit ile bağlanamadıkları düşünülmektedir.

Ayrıca çalışmalarda kullanılan sınırlandırılmış bölge kavramı bu sensör tasarımı için kullanılamamış ve moleküller tüm yüzey üzerinde adsorplanmışlardır.

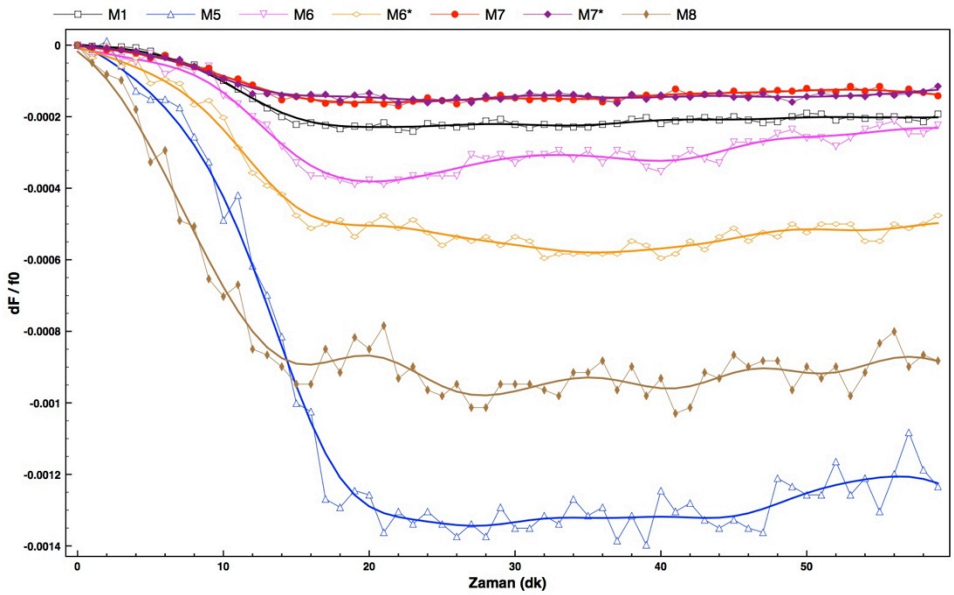
Çizelge 4.11. HBsAg bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri

	Rezonans Frekansındaki Kayma (Hz)		Gürültü (Hz)		
Kantilever	HBsAg (negatif)	HBsAg	(PBS)	HBsAg (negatif)	HBsAg
M1	18	32	5.29	4.36	4.36
M5	22	38	6.66	4.93	5.29
M6	6	11	2.08	2.00	2.08
M6*	9	16	3.79	2.52	3.61
M7	9	28	5.00	3.61	5.51
M7*	12	26	3.61	3.79	4.62
M8	5	19	3.51	2.52	4.04

Kantileverlerin rezonans frekanslarındaki değişimler incelendiğinde biyotin reseptörlerinin oluşturulduğu yüzeylerdeki streptavidin ölçümlerine göre oldukça yüksek bir azalma gözlenmiştir. Bu yüzeyde oluşturulan molekül sayısı ve bağlanma bölgelerinin inhibisyonu ile açıklanabilmektedir. Kantileverlerin vermiş oldukları cevaplar karşılaştırıldığında bir önceki sonuçlarla yakın olarak rezonans frekansı yüksek olan kantileverlerin daha yüksek cevap verdikleri görülmektedir. Yine önceki sonuçlara benzer şekilde M5 kantileverinin 38Hz'lik frekans kayması gösterdiği görülmektedir. Burada önemli bir nokta bu kantilever modifikasyonunun bloklanmış HBsAg negatif moleküllerinin varlığında 22 Hz'lik oldukça yüksek negatif sonuç vermesidir. Ayrıca 6.6 Hz'lik gürültü oranı elde edilen değerlerin sinyal/gürültü oranlarını olumsuz etkilemektedir.

Bir önceki bölümde tartışıldığı gibi kantilever yüzeyinin tamamen altın ile kaplanmasının etkisi fiziksel adsorpsiyon yönteminin kullanıldığı bu deneylerde önemli ölçüde bir değişikliğe yol açmamıştır. M6 kantileveri için HBsAg

ölçümlerinde %145 artışa karşılık HBsAg-negatif ölçümlerinde %150 artış gözlenmiştir. Ayrıca aynı etki M7 kantileverinde HBsAg-negatif için %133 artış olarak gözlenirken, HBsAg ölçümlerinde %107'lik bir azalma ölçülmüştür.



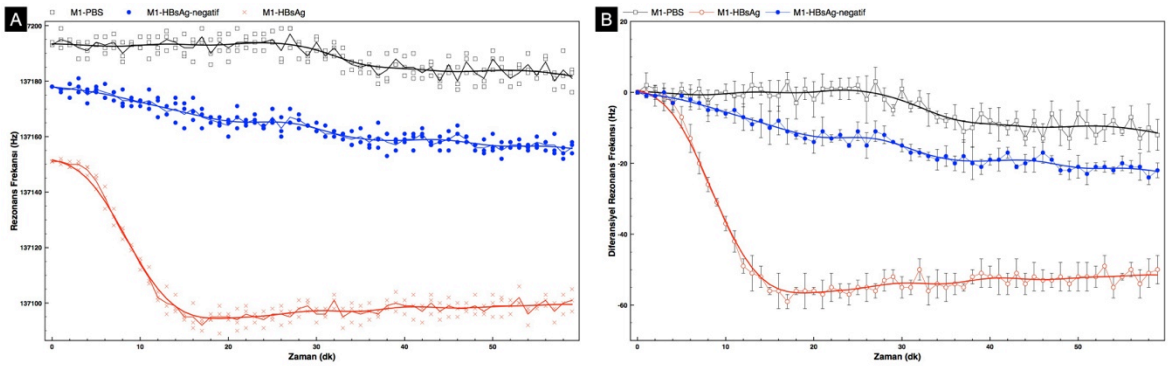
Şekil 4.43. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6*,70 kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı ($\Delta f / f_0$) grafiği

Rezonans frekanslarındaki kaymalarda açıklanan sonuçlara paralel olarak rezonans frekansları başına gerçekleşen kayma değerlerinde de benzer geometrik yapıdaki kantileverlerden yakın sonuçlar alınmıştır. Şekil 4.43'de verilen grafikler incelendiğinde, bu sonuçlar düşük rezonans frekansına sahip kantileverlerde aşındırma yöntemi ile gerçekleştirilen modifikasyonların daha yüksek etkisi olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte elde edilen sinyallere karşılık negatif sinyallerin de incelenmesi gerekmektedir.

4.5.2. **Kantilever Yüzeylere Streptavidin Üzerinden Bağlanan Anti-HBs Reseptörlerin HbsAg ile Etkileşimlerinin İncelenmesi**

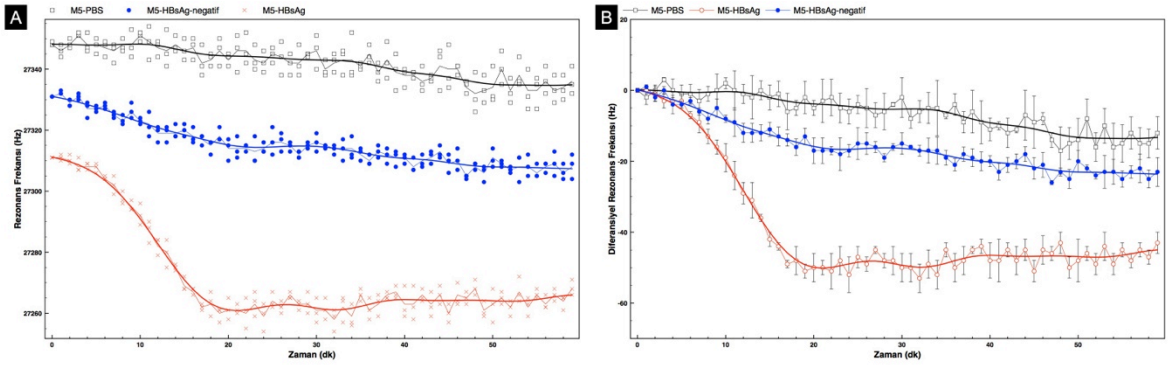
Çalışmanın bu bölümünde kantilever üzerinde istenilen bölgede ve istenilen konformasyonda reseptör tabakasının oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla kantileverler üzerinde öncelikle streptavidin yüzey oluşturulmuş ve streptavidin biyotin etkileşimlerinden yararlanılarak aktif grupları korunarak biyotinlenmiş anti-HBs tanıyıcı moleküller yüzeye immobilize edilmiştir.

Hazırlanan anti-HBs reseptörleriyle modifiye edilmiş kantileverler ile HBsAg etkileşimlerinin incelenmesi için kantileverler 85 mM MES (2-morfolino-etansülfonik asit) tamponu (pH6.5) içerisinde sıvı hücreye alınarak rezonans frekansının stabil hale gelmesi beklenmiştir. Rezonans frekansı dengeye geldikten sonra ilk olarak anti-HBs reseptörüne karşı aktif olmayan inhibe edilmiş HBs-Ag-negatif antijeni sonrasında ise HBsAg-biyotin örnekleri 85 mM MES tamponu (pH6.5) içerisinde 200 ng/mL derişimde hazırlanarak kapalı sıvı hücre içerisine HPLC sistemi üzerinden mobil faz ile verilmiştir. Zamana karşı kantilever yüzeyinde gerçekleşen bağlanmalar nedeniyle rezonans frekansında gerçekleşen değişimlerin ölçülmesi için 60dk süresince kantileverlerin rezonans frekansları kaydedilmiştir.



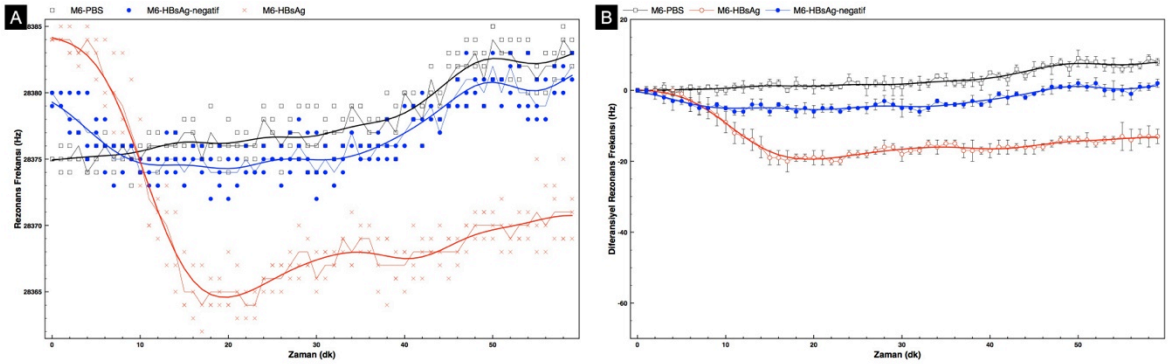
Şekil 4.44. M1 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.44 (b)'de görüldüğü gibi M1 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 21 Hz, HBsAg için 53 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 6.66 Hz, HBsAg-negatif için 4.73 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 5.13 Hz olarak hesaplanmıştır.



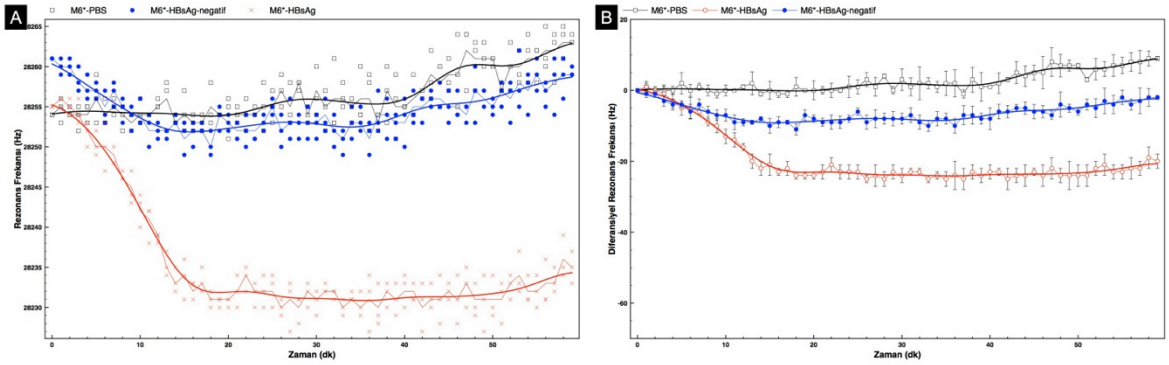
Şekil 4.45. M5 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.45 (b)'de görüldüğü gibi M5 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 23 Hz, HBsAg için 48 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 7.81 Hz, HBsAg-negatif için 4.62 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 5.57 Hz olarak hesaplanmıştır.



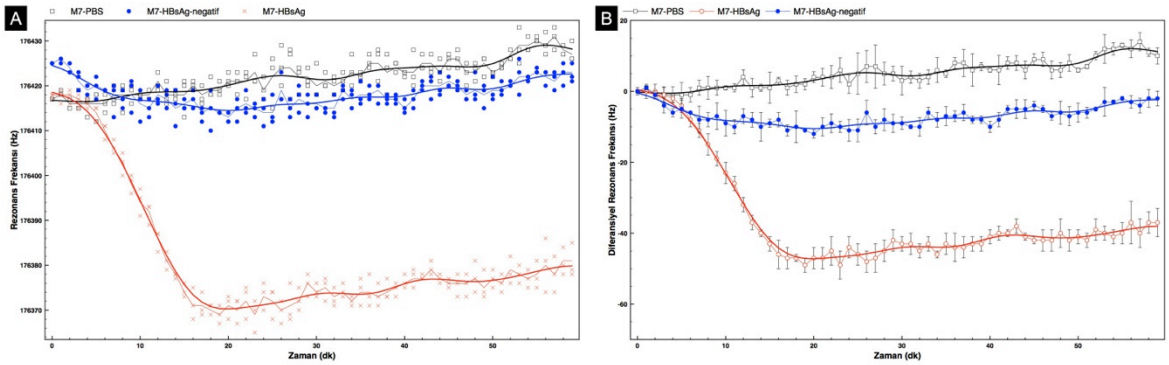
Şekil 4.46. M6 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.46 (b)'de görüldüğü gibi M6 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 5 Hz, HBsAg için 17 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 2.52 Hz, HBsAg-negatif için 2.65 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 3.61 Hz olarak hesaplanmıştır.



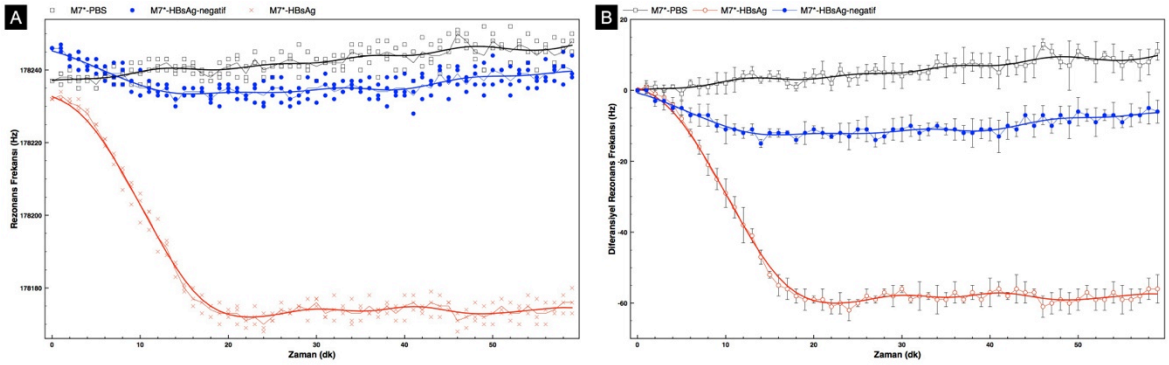
Şekil 4.47. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M6* kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.47 (b)'de görüldüğü gibi tüm yüzeyi altın kaplanmış M6* kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 8 Hz, HBsAg için 24 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 4.62 Hz, HBsAg-negatif için 3.61 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 3.61 Hz olarak hesaplanmıştır.



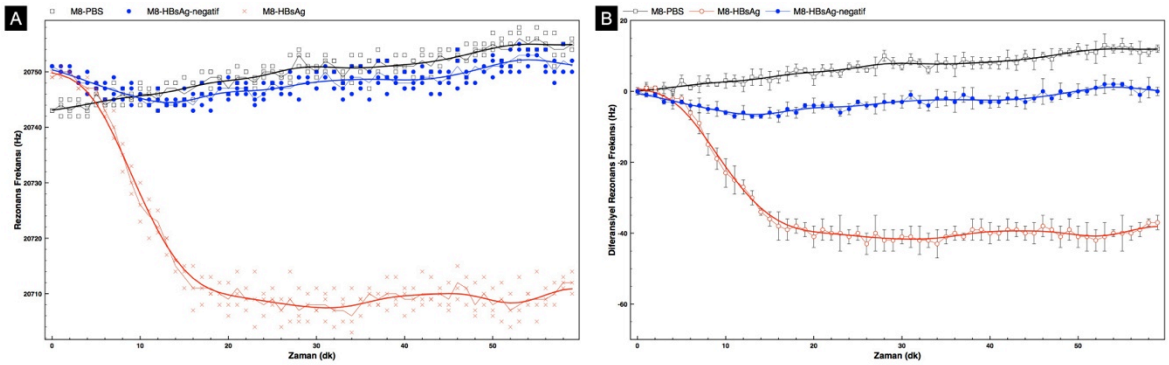
Şekil 4.48. M7 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.48 (b)'de görüldüğü gibi M7 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 10 Hz, HBsAg için 46 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 6.08 Hz, HBsAg-negatif için 4.51 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 6.03 Hz olarak hesaplanmıştır.



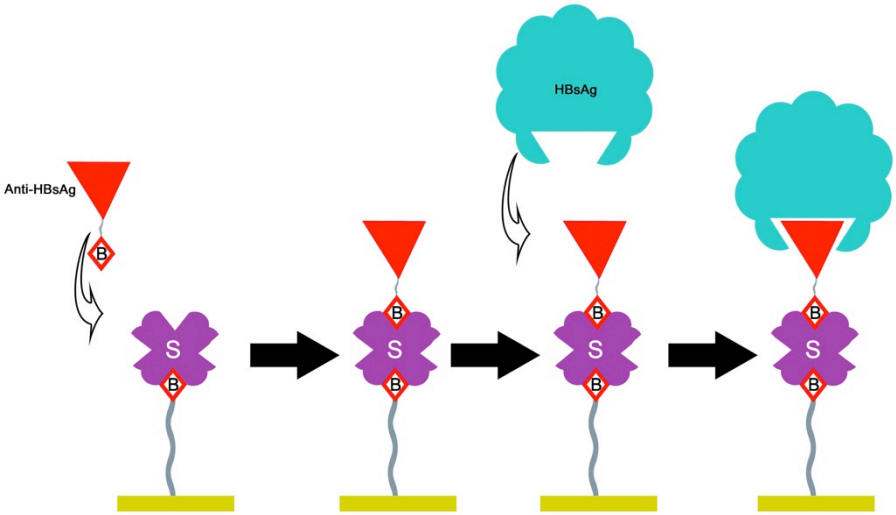
Şekil 4.49. Tüm yüzeyi altın kaplanmış M7* kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.49 (b)'de görüldüğü gibi tüm yüzeyi altın kaplanmış M7* kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 12 Hz, HBsAg için 59 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 6.93 Hz, HBsAg-negatif için 4.58 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 4.51 Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.50. M8 kantileveri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

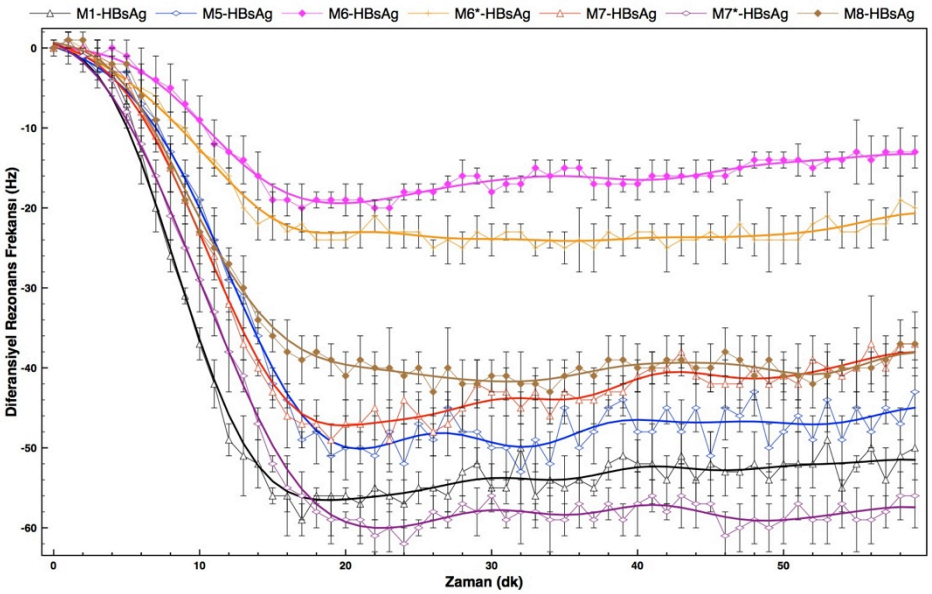
Şekil 4.50 (b)'de görüldüğü gibi M8 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 5 Hz, HBsAg için 42 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 3.21 Hz, HBsAg-negatif için 3.61 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 5.00 Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.51. Biyotinlenmiş anti-Hepatit-B yüzey antikorunun streptavidin ile bağlanarak yüzeye immobilizasyonu ve Hepatit B yüzey antijeni ile etkileşimi

Şekil 4.51'de yüzeyde reseptörlerin streptavidin – biyotin etkileşimi üzerinden yerleşimi şematik olarak gösterilmiştir. Modifikasyonların streptavidin üzerinden gerçekleştirilmesi fiziksel engellemeler ve aktif bölgelerin kapanması gibi istenmeyen durumları ortadan kaldırmak için uygulanmıştır. Bu şekilde oluşturulan reseptör tabakası yüzeyde oluşturulan altın tabakanın alanı ve oluşturulan streptavidin moleküllerin miktarı ile orantılıdır.

Şekil 4.52'de tüm kantilever yapıları için 200 ng/mL HBsAg derişimde rezonans frekanslarında gerçekleşen kaymanın karşılaştırmalı grafikleri verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.12'de rezonans frekansındaki kayma ve gürültü değerleri sayısal olarak karşılaştırmalı şekilde verilmiştir.



Şekil 4.52. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6*,7* kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansındaki değişim

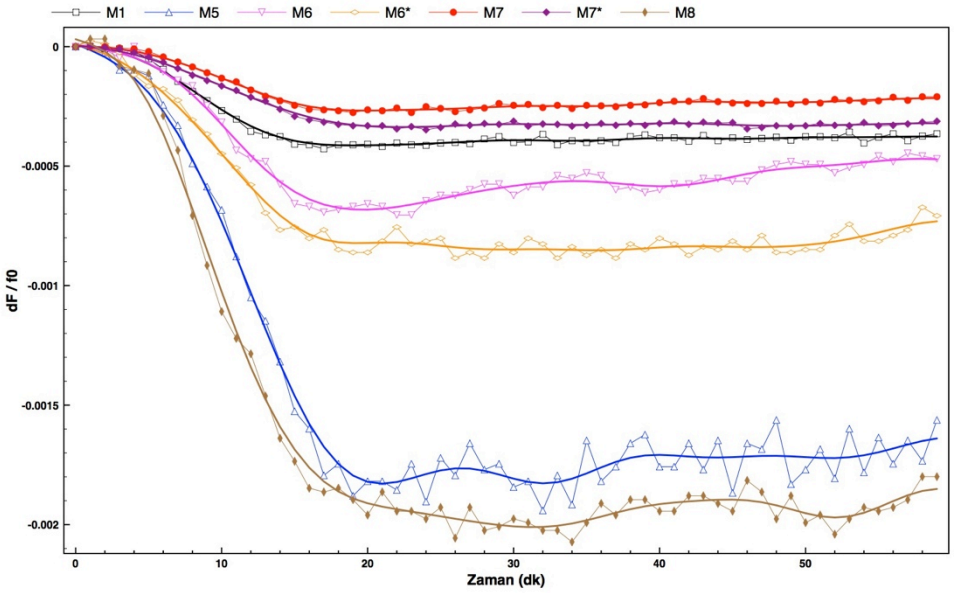
Çizelge 4.12. HBsAg bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri

Kantilever	Rezonans Frekansındaki Kayma (Hz)		* ($\Delta f_{strep.} / \Delta f_{ads}$)	Gürültü (Hz)		
	HBsAg (negatif)	HBsAg		(PBS)	HBsAg (negatif)	HBsAg
M1	21	53	1.65	6.66	4.73	5.13
M5	23	48	1.26	7.81	4.62	5.57
M6	5	17	1.55	2.52	2.65	3.61
M6*	8	24	1.50	4.62	3.61	3.61
M7	10	46	1.64	6.08	4.51	6.03
M7*	12	59	2.26	6.93	4.58	4.51
M8	5	42	2.21	3.21	3.61	5.00

** ($\Delta f_{strep.} / \Delta f_{ads}$) : Streptavidin üzerinden modifiye edilen kantileverlerde gözlenen rezonans frekansı değişiminin adsorpsiyon ile elde edilen değişime oranı*

Yüzeyde fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile oluşturulan reseptör moleküllerinin sensörlerde vermiş olduğu cevaplarla karşılaştırıldığında streptavidin ile konformasyonu korunmuş örneklerde rezonans frekansı değişimlerinde önemli artış gözlenmiştir. Bununla birlikte HBsAg-negatif inhibitörüne verilen cevaplarda değişiklik gözlenmemiştir.

Kantilever davranışları incelendiği zaman maksimum aşındırma işlemi uygulanarak geometrisi en fazla değiştirilen M5 ve M1 kantileverlerinde yüksek Δf_{strep} değerleri elde edilmiş olmasına rağmen ($\Delta f_{ads.}$ / Δf_{strep}) oranlarının bağıl olarak düşük kaldığı gözlenmiştir. Bu durum kantilever yapılarının duyarlılığının artmasının negatif sonuçlarda da yüksek cevap alınmasına neden olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca M7* kantileverinin davranışı incelendiğinde tüm yüzey üzerinde reseptör tabakasının oluşturularak yüzeyde toplam molekül sayısının arttırılmış olması elde edilen frekans kaymasında artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bu artış fiziksel adsorpsiyon ile karşılaştırıldığında ($\Delta f_{ads.}$ / Δf_{strep}) oranında en yüksek değişime neden olması daha önceki bölümlerde tartışılan yüzey alanı modifikasyonunun önemini bir kez daha kanıtlamaktadır. M8 kantileveri incelendiğinde M5 kantileverine göre daha stabil bir profil elde edildiği buna karşılık duyarlılığın azaldığı görülmüştür. Bunun yanında M8 kantileveri ($\Delta f_{ads.}$ / Δf_{strep}) oranı ve bloklanmış HBsAg molekülüne verdiği düşük tepkiler nedeniyle oldukça dikkate değer sonuçlar göstermiştir.



Şekil 4.53. M1,5,6,7,8 ve tüm yüzeyi altın kaplanmış M6*,7* kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı (Δf / f_0) grafiği

Şekil 4.53'deki Δf / f_0 grafikleri karşılaştırıldığında daha önceki bölümlerde gözlendiği üzere yüksek rezonans frekansına sahip M1, M7 ve M7* kantileverlerinde frekans başına düşük cevap sinyalleri elde edildiği gözlenmiştir. Bu 3 kantilever kendi arasında karşılaştırıldığında kantilever tepkisinin geometrik modifikasyonla arttığı ve altın kaplı bölgenin sınırlandırılmasının da cevap

sinyallerini azalttığı gözlenmiştir. Aynı etki M6 kantileverinin tüm yüzeyi altın kaplanınca sinyalde artış gerçekleşen M6* kantileverinde de gözlenmiştir. M5 ve M8 kantileverleri M6 kantileveri ile yakın rezonans frekansına sahip olmalarına karşılık geometrik modifikasyon etkisi nedeniyle kütle artışına karşılık daha yüksek tepkiler vermektedir. Bununla birlikte kantileverin hassasiyetindeki artışın gürültü değerlerinde de artışa sebep olduğu görülmüştür. Bu nedenle sinyal / gürültü değeri ile M8 kantileveri biyosensör çalışmaları için en uygun kantilever yapısı olarak görülmektedir.

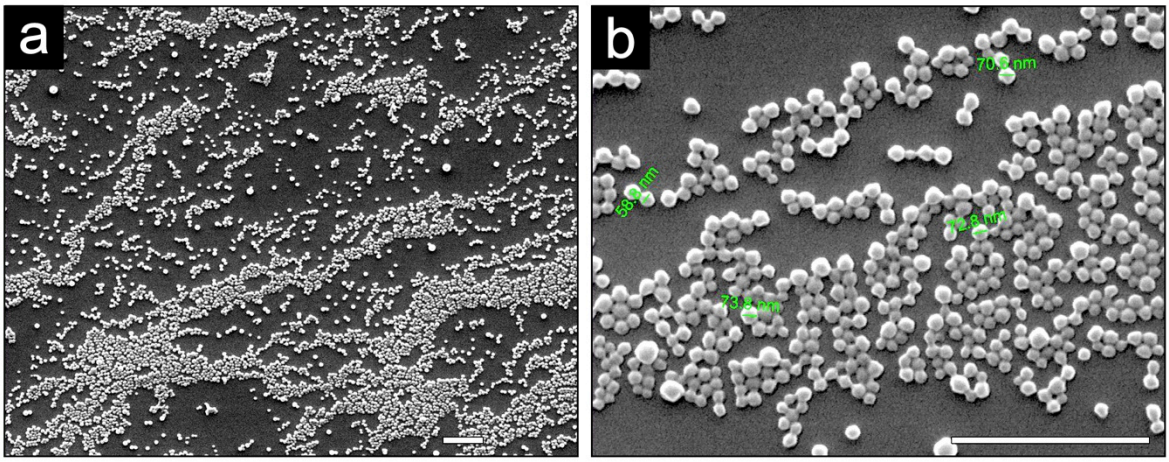
4.6. İnsan Serum Albümin Nanopartiküller Kullanılarak Sistemin Hassasiyetinin Arttırılması

Kantilever üzerindeki spesifik olmayan ve istenmeyen bölgelerde gerçekleşen bağlanmaların önüne geçebilmek için daha önceki çalışmalarda modifikasyon işlemlerinin gerçekleştirildiği alanın sınırlandırılarak kantilever cevaplarının sadece tayin edilmek istenen analit ile ilişkilendirilmesi çalışılmıştır. Fakat hem yüzey alanının sınırlandırılması hem de sistemin sinyal / gürültü değerleri nedeniyle kantilever sensör çalışmaları için yüzeyde daha fazla reseptör molekülün varlığına ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenlerden dolayı çalışmanın bu kısmında hazırlanan HSA nanopartiküller kullanılarak yüzey alanının arttırılması ve bununla birlikte partiküllerin yüzeyine bağlanmış biyotin molekülleri sayesinde toplam fonksiyonel biyotin gruplarının sayısının arttırılması amaçlanmıştır. Bu sayede bağlanan streptavidin moleküllerinin sayısı da arttırılarak kantilever üzerinde birikebilecek maksimum molekül sayısı da artacaktır. Sonuç olarak gerçekleştirilen modifikasyon işlemlerinin kantileverin tayin limitlerinin aralığı ve kantileverin doğrusallığı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

4.6.1. HSA Nanopartiküllerin Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri

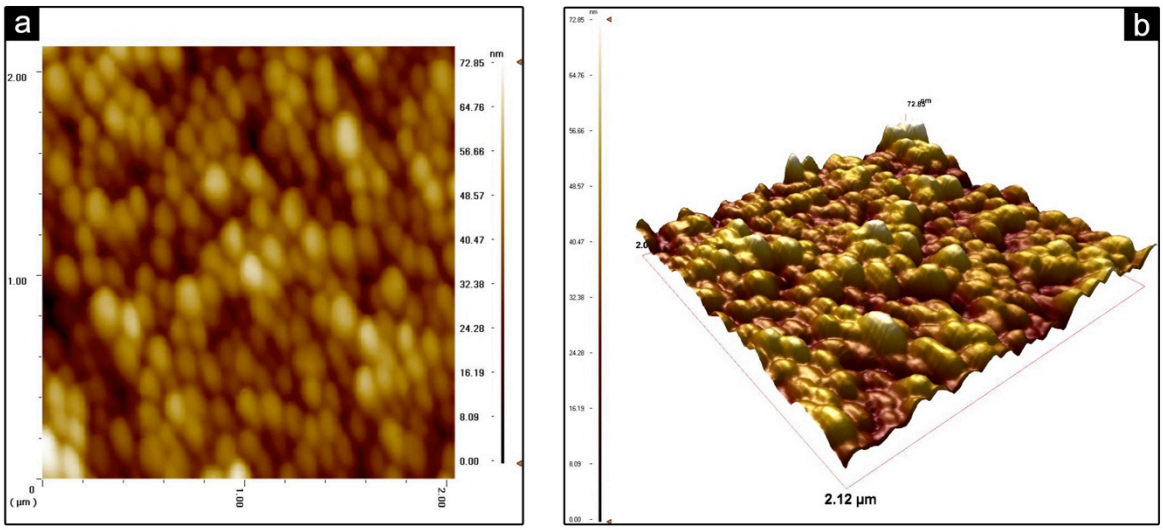
HSA nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AKM) tekniklerinden yararlanılmıştır. Elde edilen HSA nanopartiküllere ait SEM ve AKM görüntüleri Şekil 4.54 ve 4.55'de sunulmuştur.

HSA nanopartiküllerin boyut dağılımını belirlemek ve elde edilen sonuçları AKM ve SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırmak için Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) sistemi kullanılmıştır. Hazırlanan HSA nanopartiküller deiyonize su ile seyreltilerek yaklaşık 3 ml örnek çözeltisi hazırlanmış ve Zeta-Sizer sistemi ile nanopartikül süspansiyonundaki partiküllerin boyutu belirlenmiştir.

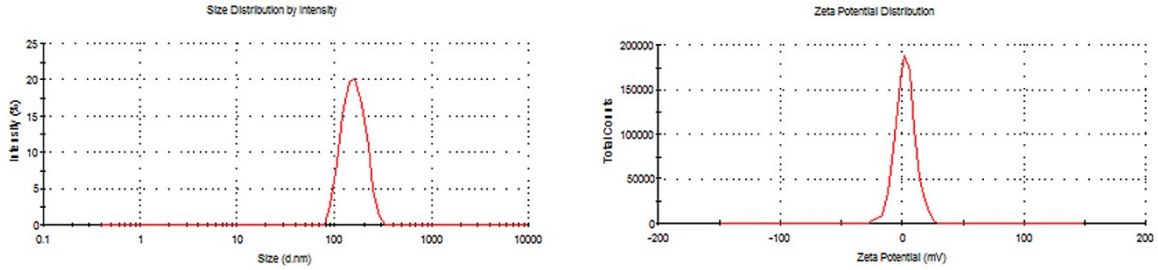


Şekil 4.54. HSA nanopartiküllerin a) 20000 X, b) 100000 X büyütme ile elde edilmiş SEM görüntüleri
(Her iki görüntüde de barlar 1 μm'lik uzunluğu göstermektedir)

Şekil 4.54'de taramalı elektron mikroskobu görüntüleri, Şekil 4.55'de ise AKM görüntüleri alınan HSA nanopartiküllerin her iki sistemde de gerçekleştirilen boyut ölçümlerinde ortalama 73 nm boyutlarında oldukça düzgün küresel yapıya sahip ve homojen boyut dağılımlı nanopartiküller elde edildiği görülmüştür.



Şekil 4.55. HSA nanopartiküllerin a) 2D b) 3D topografik AKM görüntüleri



Şekil 4.56. HSA nanopartiküllerin zeta-sizer boyut ve potansiyel ölçüm grafikleri

Şekil 4.56'da verilen zeta-sizer boyut ölçümlerinden; HSA nanopartiküllerin hidrodinamik çaplarının 152.1 nm ve hesaplanan ortalama çaplarının yaklaşık olarak 76,03 ±1,98nm (PDI, 0,070 ±0,012) dolayında olduğu belirlenmiştir. HSA nanopartiküllerin yüzey yükleri ise -23,2 ±1,005 mV olarak belirlenmiştir.

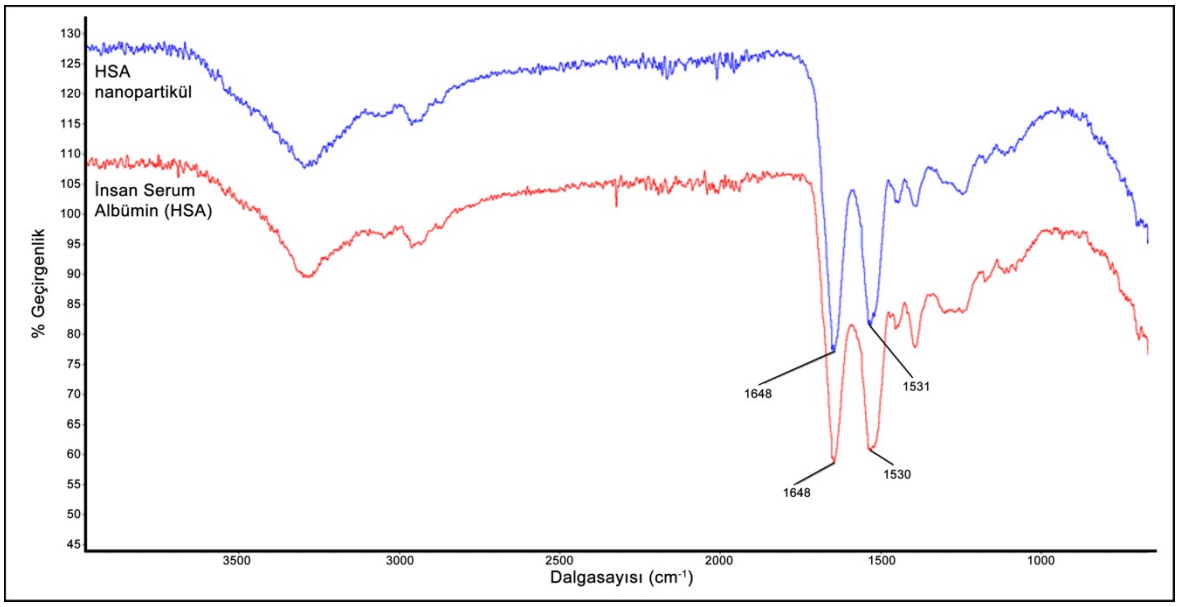
HSA ve HSA Nanopartiküllerin FT-IR İncelemeleri

Yapılan çalışmalar kapsamında HSA ve hazırlanan HSA nanopartiküllerin FT-IR spektrumları elde edilerek kimyasal yapıları karakterize edilmiş ve FTIR spektrumu Şekil 4.57'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. İnsan Serum Albumin'in (HSA) FT-IR spektrumlarında görülen karakteristik pikleri

İnsan Serum Albumini (HSA)	
C=O gerilme	1600-1700 cm^{-1}
Amide II gerilme	1500-1550 cm^{-1}

Çizelge 4.13'de HSA polimeri ve HSA nanopartiküllerin FT-IR spektrumundan elde edilen karakteristik pik grupları verilmiştir. HSA için; 1600-1700 cm^{-1} (C=O gerilme), 1500-1550 cm^{-1} (Amide II (N-H) bükülme)'de görülen absorpsiyon pikleri HSA'nın karakteristik pikleridir. Buradaki FT-IR spektrumunda elde edilen karakteristik pikler literatür ile uyuşmaktadır. Hazırlanan HSA nanopartiküllerin FT-IR spektrumlarında beklendiği üzere HSA'ya ait pikler görülmektedir [161, 162].

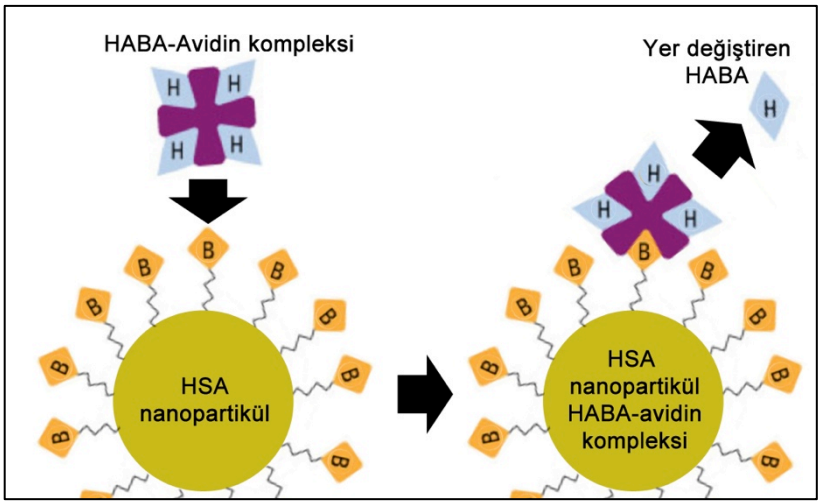


Şekil 4.57. HSA ve HSA nanopartikül yapıları için FT-IR spektrumları

4.6.2. **Nanopartikül Yüzeyine Bağlanan Biyotin Miktarının Tayini**

HSA nanopartikül yüzeyinde bulunan biyotin moleküllerinin HABA – avidin kompleksindeki HABA molekülleri ile yer değiştirmesi sonucu HABA kompleksinin molar derişimi azalmaktadır. Çalışmanın bu kısmında nanopartikül yüzeyinde oluşturulan biyotin moleküllerinin miktarının incelenmesi amaçlanmıştır.

HABA/avidin kompleksi oda sıcaklığına getirilerek 100 µL deiyonize su içerisinde çözülmüştür. Bu çözeltiye 800 µL fosfat tamponu (PBS) pH:7.2 (100nM sodyum fosfat, 150mM NaCl içeren) eklenerek PBS tamponu ile kör (blank) okutulmuş spektrofotometrede 500nm'de absorbans değeri ölçülmüştür ($A_{500\text{-HABA-avidin}}$). Sonrasında çözelti içerisine 100 µL nanopartikül çözeltisinden eklenmiş ve 15 saniye sabit ölçüm alana kadar 500nm 'de absorbans değeri ölçülmüştür $A_{500\text{-HABA-avidin-biyotin}}$). Aşağıdaki formülden yüzeyde bulunan biyotin miktarı tayin edilmiştir [163].



Şekil 4.58. HABA-Avidin kompleksi ile biyotinlenmiş HSA nanopartiküllerin reaksiyonunun şematik gösterimi

Şekil 4.58'de HABA kompleksine biyotinlenmiş nanopartiküllerin bağlanması sonucu HABA molekülünün yer değiştirmesi şematik olarak gösterilmiştir.

Yüzeye bağlanan biyotinin mol sayısının hesaplanması:

Beer Lambert Yasasına gore $A_\lambda = \varepsilon_\lambda$ bC formülünden biyotin derişimine ulaşılabilmektedir.

Burada A örneğin okunan absorbansını, λ ölçümün gerçekleştirildiği dalga boyunu, b spektrofotometrik okumanın yapıldığı hücre yolu uzunluğunu (cm), C örneğin molarite biriminden derişimini, ε ise soğurganlık değeri veya sönüm katsayısını belirtmektedir. HABA-avidin kompleksi için pH:7.0'da 500nm için sönüm katsayısı 34000 $M^{-1}cm^{-1}$'dir.

Buradan;

$$\Delta A_{500} = (0.9\ x\ A_{500-\mathrm{HABA-avidin}}) - A_{500-\mathrm{HABA-avidin-biyotin}}$$

$$\Delta A_{500} = \varepsilon_{500} x\ b\ x\ C_{\mathrm{HABA-avidin\ kopleksinden\ ayrılan\ HABA}}$$

$$\Delta A_{500} = \varepsilon_{500} x\ b\ x\ C_{nanopartik\ddot{u}le\ bağlanan\ biyotin}$$

$$C_{nanopartiküle\ bağlanan\ biyotin} = \frac{\Delta A_{500}\ x\ \ seyreltme\ faktörü}{\varepsilon_{500}\ x\ b}$$

olacak şekilde biyotinin molaritesi hesaplanır.

Bizim çalışmalarımızda kullanmış olduğumuz biyotinlenmiş nanopartiküller için biyotin derişimi ve birim nanopartikül başına bağlanan biyotin miktarları aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

$$\Delta A_{500} = (0.9\ x\ 0.890) - \ 0.624 =$$

$$C_{nanopartiküle\ bağlanan\ biyotin} = \frac{0.177\ x\ \ 10}{34000\ M^{-1}\ cm^{-1}\ x\ 0.1\ cm} = 5.206\ x\ 10^{-4} M\ biyotin$$

$$m_{biyotin} = 1mL\ çözelti\ x\ \frac{5.206\ x\ 10^{-4} mol\ biyotin - LC}{1000mL\ çözelti} x \frac{357.47\ g\ biyotin - LC}{1\ mol\ biyotin - LC}$$

$$m_{biyotin} = 0.186\ mg\ biyotin - LC$$

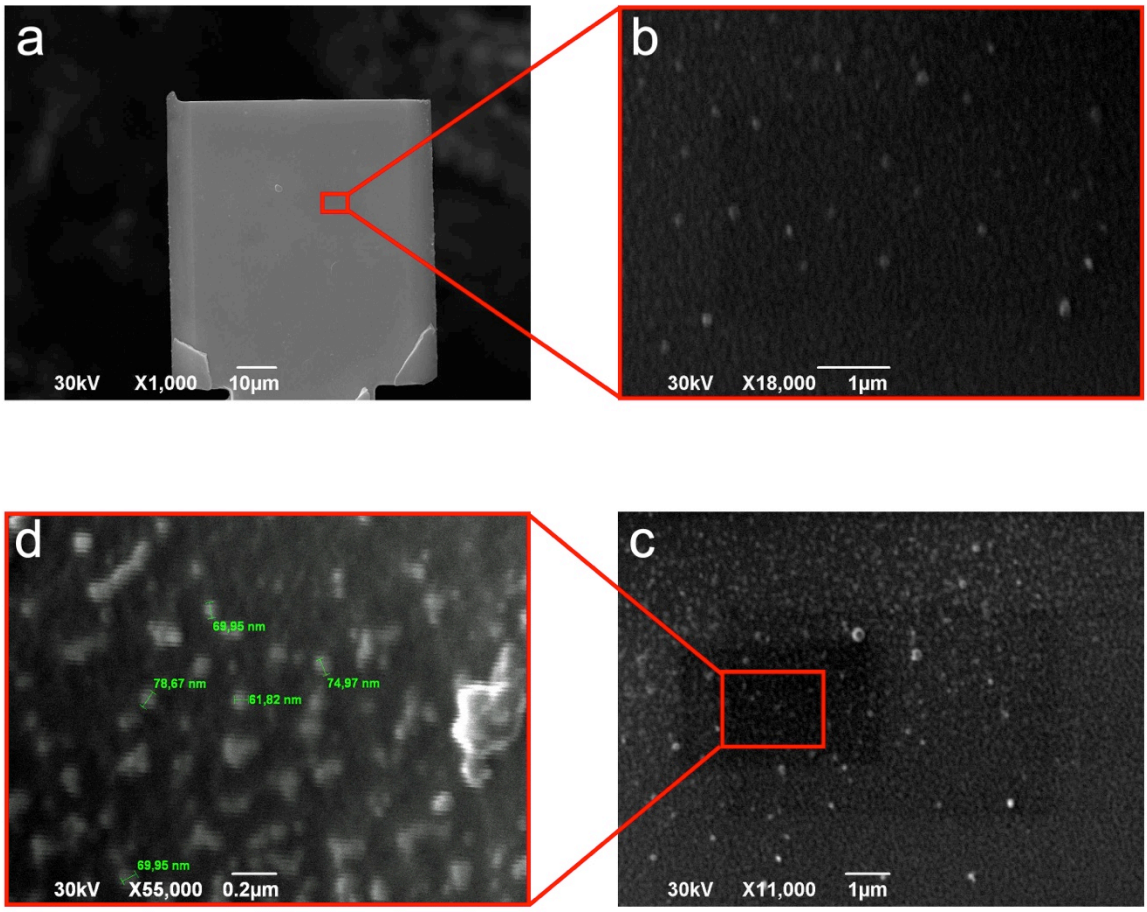
$$\frac{m_{biyotin}}{m_{nanopartikül}} = \frac{0.186\ mg\ biyotin - LC}{10\ mg\ nanopartikül}$$

Nanopartiküllerin biyotinleme işlemleri için 0.56 mg Sülfo-NHS-LC-biyotin kullanılmış ve nanopartiküllerle bağlanma reaksiyonunda LC-biyotin grubu partiküllere bağlanmıştır. HABA-avidin kompleksi ile spektrofotometrik tayin yöntemi kullanılarak başlangıçta ortamda bulunan 10 mg nanopartiküle 0.186 mg LC-biyotin molekülü bağlandığı tespit edilmiştir.

4.6.3. **Biyotinlenmiş HSA Nanopartiküllerle Dekore Edilmiş Kantilever Bazlı Streptavidin Sensörünün Karakterizasyonu**

Kantilever yüzeyine HSA nanopartiküllerin bağlanmaları gerçekleştirilen taramalı elektron mikroskopisi görüntülemeleri ile incelenmiştir. Kantilever üzerine daha

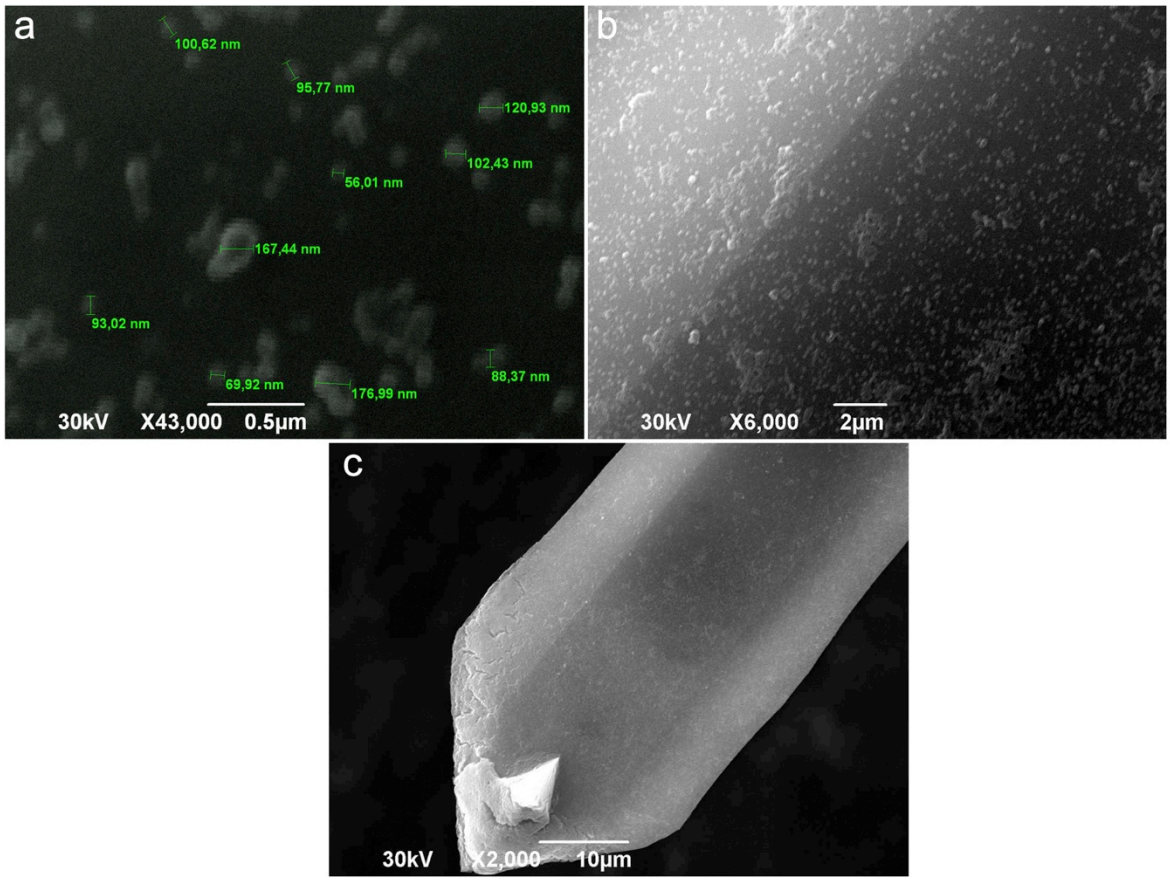
önceki bölümde bahsedilen modifikasyon yöntemleri ile biyotinlenmiş HSA bağlanan nanopartiküller Şekil 4.59'da görülmektedir. Ortalama olarak 71.1 nm partikül çapına sahip yapıların oldukça sık ve tek tabaka düzeninde yüzeyi kapladığı elde edilen görüntülerden anlaşılmaktadır.



Şekil 4.59. Biyotinlenmiş HSA nanopartiküller ile dekore edilmiş M8 kodlu kantilever yüzeylerinin a) 1000X, b) 18000X, c) 11000X ve d) 55000X büyütme ile elde edilmiş SEM görüntüleri

Şekil 4.60'da ise tamamı altın kaplanmış ve herhangi bir aşındırma işlemi uygulanmamış kantilever yüzeyinde nanopartikül bağlanması incelenmiştir. Kantilever modifikasyonu esnasında nanopartiküllerin uzun süre yüksek derişimde aktivasyon çözeltisi içerisinde bekletilmesinin agregasyona yol açtığı izlenmiştir. Bu nedenle kontrol amaçlı olarak aktivasyon çözeltisi içerisine direkt olarak 100µL biyotinlenmiş nanopartikül eklenmiş ve 3 saat süresince inkübasyon için bekletilmiştir. Elde edilen SEM görüntülerinde görüleceği üzere kantileverin tüm yüzeyi partiküllerle kaplanmıştır. Bununla birlikte partiküllerin agregasyona

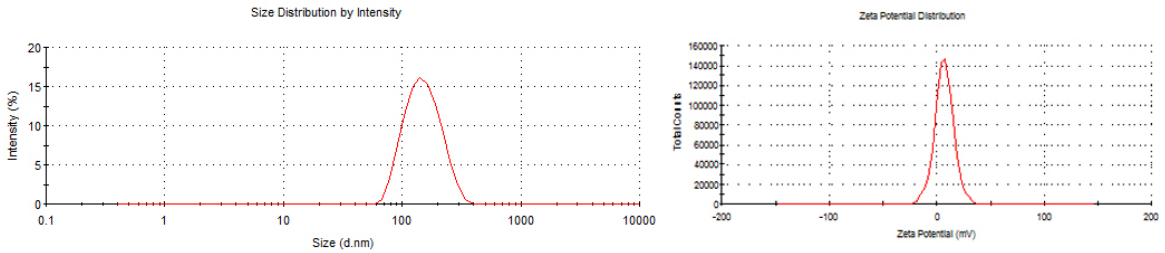
uğradıkları ve özellikle tip bölgesinde yoğun düzeyde birikim olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle nanopartiküller modifikasyon işlemleri süresince aktivasyon için eklenen karbodiimid çözeltisi pipetle uzaklaştırılarak 30 dk yüzeyde bekletilmiştir.



Şekil 4.60. Biyotinlenmiş HSA nanopartiküller ile dekore edilmiş tamamı altın kaplanmış Tap300Al kodlu kantilever yüzeylerinin a) 43000X, b) 6000X ve d) 2000X büyütme ile elde edilmiş SEM görüntüleri

Zeta-Sizer Boyut Analizleri

Biyotinlenmiş HSA nanopartiküllerin boyut dağılımını belirlemek ve elde edilen sonuçları SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırmak için Zeta-Sizer sistemi kullanılmıştır. Hazırlanan biyotinlenmiş HSA nanopartiküller deiyonize su ile seyreltilerek yaklaşık 3 ml örnek çözeltisi hazırlanmış ve Zeta-Sizer sistemi ile nanopartikül süspansiyonundaki partiküllerin boyutları belirlenmiştir.

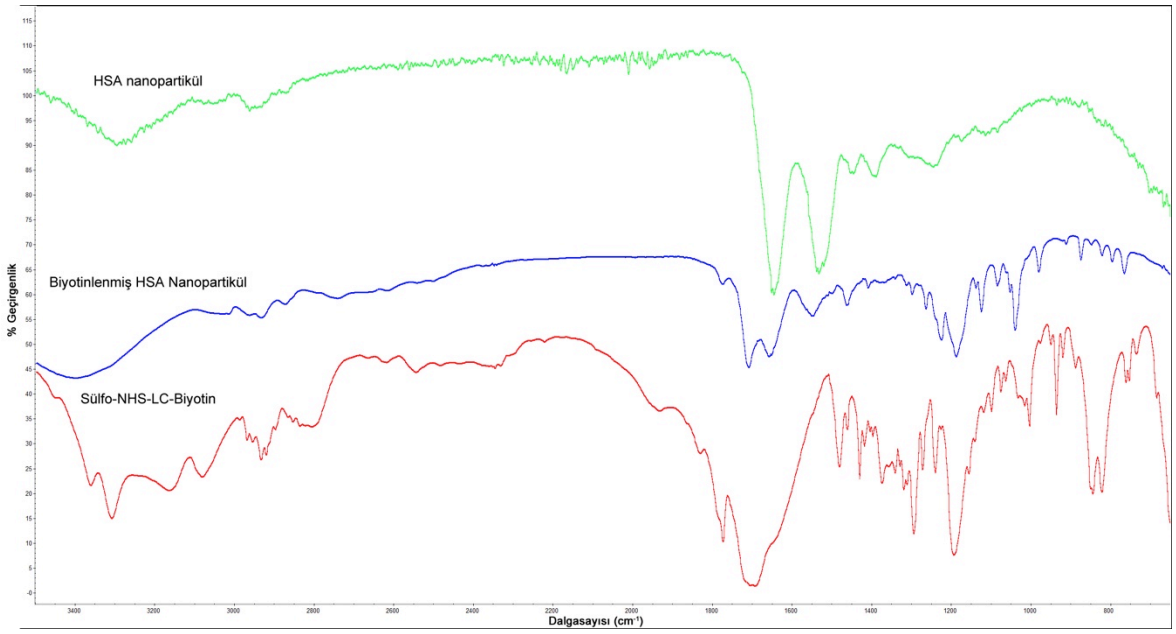


Şekil 4.61. HSA nanopartiküllerin zeta-sizer boyut ve potansiyel ölçüm grafikleri

Şekil 4.61'de verilen zeta-sizer boyut ölçümlerinden; biyotinlenmiş HSA nanopartiküllerin hidrodinamik çaplarının 156.3 nm ve hesaplanan ortalama çaplarının yaklaşık olarak 78,225 ±1,45nm (PDI, 0,096) dolayında olduğu belirlenmiştir. HSA nanopartiküllerin yüzey yükleri ise -20,18 mV olarak belirlenmiştir.

Biyotinlenmiş HSA Nanopartiküllerin FT-IR İncelemeleri

Yapılan çalışmalar kapsamında biyotinlenmiş ve modifiye edilmemiş HSA nanopartiküllerin FT-IR spektrumları elde edilerek kimyasal yapıları karakterize edilmiş ve FTIR spektrumları Sülfo-NHS-LC-biyotin ile karşılaştırmalı olarak Şekil 4.62'de verilmiştir.

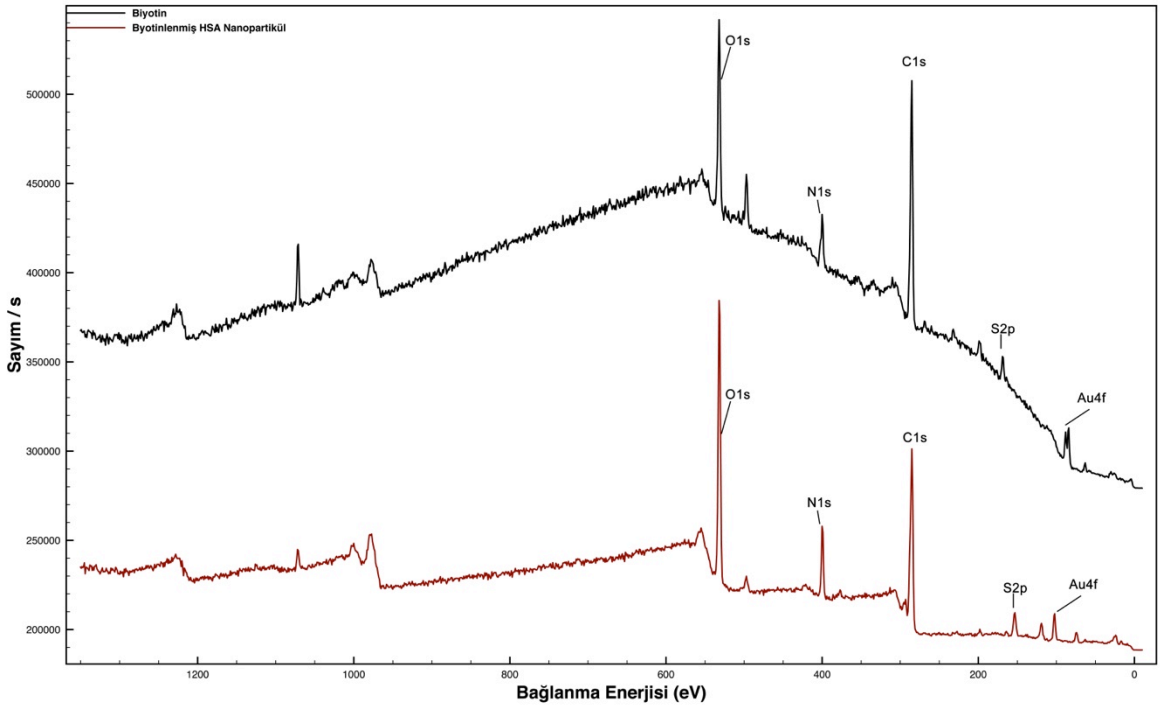


Şekil 4.62. Biyotinlenmiş HSA nanopartikül yapıları için FT-IR spektrumları

HSA nanopartiküllerde de gözlenen ve HSA için karakteristik pikler olan 1600-1700 cm^{-1} (C=O gerilme), 1500-1550 cm^{-1} (Amide II (N-H) bükülme) absorpsiyon

pikleri biyotinlenmiş HSA nanopartikül yapısında da gözlenmiştir (karboksilik asit gruplarına ait asimetrik COO^- gerilme 1620 cm^{-1}, primer amin gruplarına ait kuvvetli 1560–1640 cm^{-1}). 2975-2950 cm^{-1} CH_3 asimetrik gerilme, 2930 CH_2 asimetrik gerilme, 2885-2865 cm^{-1} CH_3 simetrik gerilme, 2870-2840 cm^{-1} simetrik CH_2 gerilme pikleri ve 1470-1440 cm^{-1} CH_3 asimetrik titreşim 1390-1370 cm^{-1} CH_3 simetrik titreşim pikleri biyotin halkasının uzun alifatik zincirini işaret etmektedir. Sülfo-NHS-LC-biyotin molekülünün yapısındaki 1825 ve 1790 cm^{-1} NHS ester pikleri ile 1680-1720 cm^{-1} arasında görülen süksinimid ester pikleri bağlanma sırasında bu gruplar ayrıldığı için biyotinlenmiş nanopartikül yapısında gözlenmemiştir [164-166].

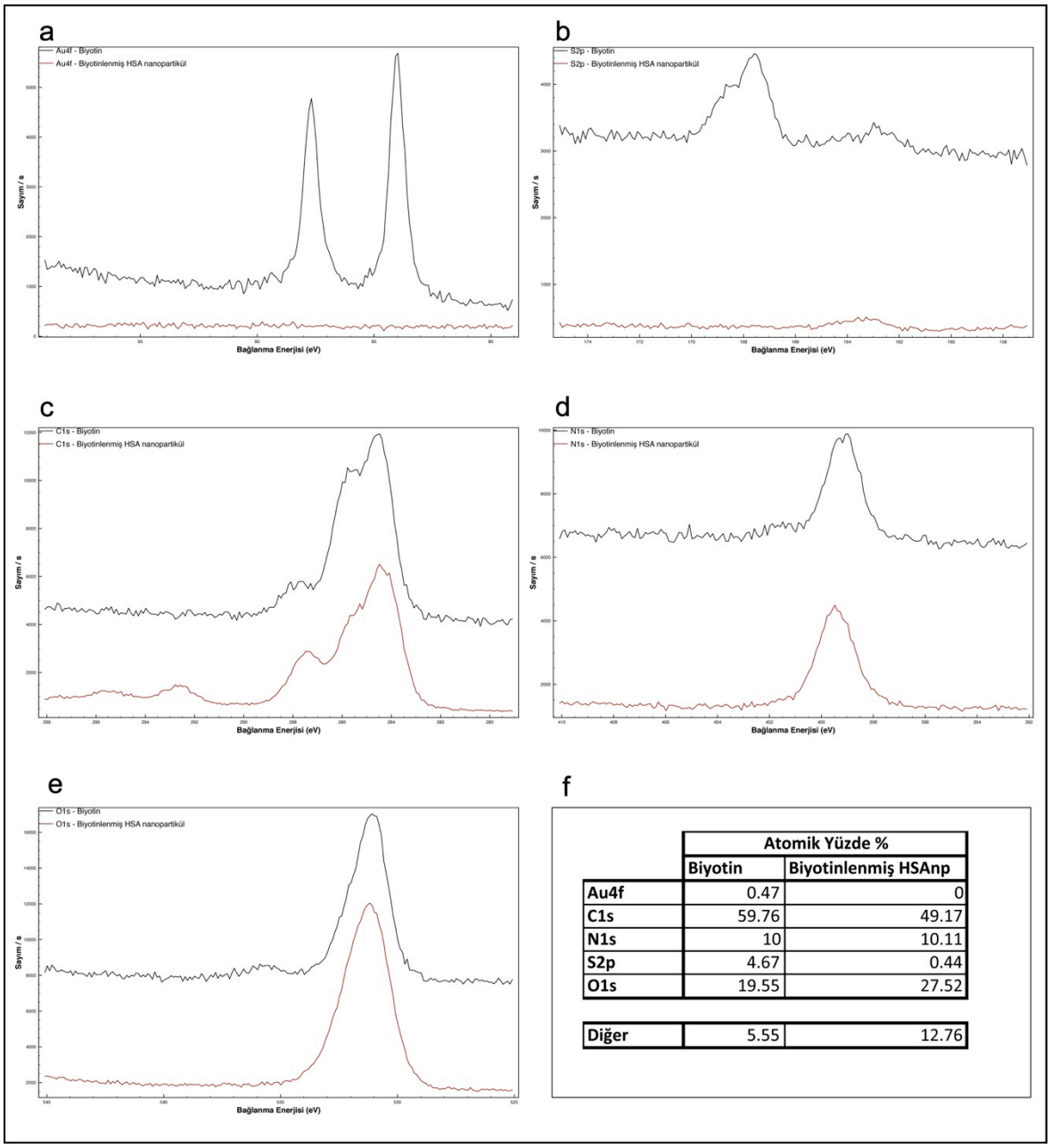
X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) İncelemeleri



Şekil 4.63. Modifiye edilmiş yüzeylerin Au4f (a), S2p (b), C1s (c), N1s (d), O1s (e) piklerinin grafikleri ve yüzde atomik bileşen karşılaştırması (f)

Şekil 4.63'de verilen grafikte altın yüzey üzerindeki MUA gruplarına biyotin bağlanmış yüzeyin (siyah) ve sülfo-NHS-biyotin ile biyotinlenen HSA nanopartiküllerin MUA gruplarına bağlanması ile elde edilen yüzeyin (kırmızı) ait yüzeylerin X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi ile elde edilmiş survey analiz

spektraları verilmiştir. Burada elde edilen Au4f, S2p, C1s, N1s ve O1s pikleri detaylı olarak Şekil 4.64'de incelenmiş ve atomik yüzdeler olarak verilmiştir.



	Atomik Yüzde %	
	Biyotin	Biyotinlenmiş HSAnp
Au4f	0.47	0
C1s	59.76	49.17
N1s	10	10.11
S2p	4.67	0.44
O1s	19.55	27.52
Diğer	5.55	12.76

Şekil 4.64. Modifiye edilmiş yüzeylerin Au4f (a), S2p (b), C1s (c), N1s (d), O1s (e) piklerinin grafikleri ve yüzde atomik bileşen karşılaştırması (f)

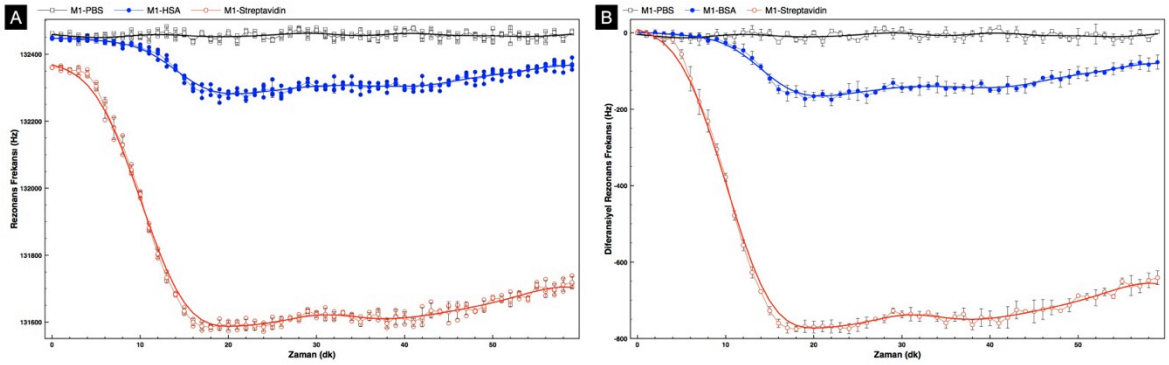
Şekil 4.64.(f). 'de biyotin ve biyotinlenmiş HSA nanopartiküllerin kütlece atomik bileşen yüzdeleri verilmiştir. Nanopartiküllerin yüzey alanları biyotinlenmiş olduğundan kimyasal kompozisyonu biyotine oldukça yakındır [158]. Standart prosedür izlenerek biyotinlenmiş yüzey ile karşılaştırıldığında HSA

nanopartiküllerin yapısındaki NH gruplarının fazlalığı nedeniyle N1s piklerinin şiddetinde survey analizinde artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar literatür verileri ile uyuşmaktadır [157].

4.6.4. **Biyotinlenmiş HSA nanopartiküller ile Streptavidin Etkileşimlerinin İncelenmesi**

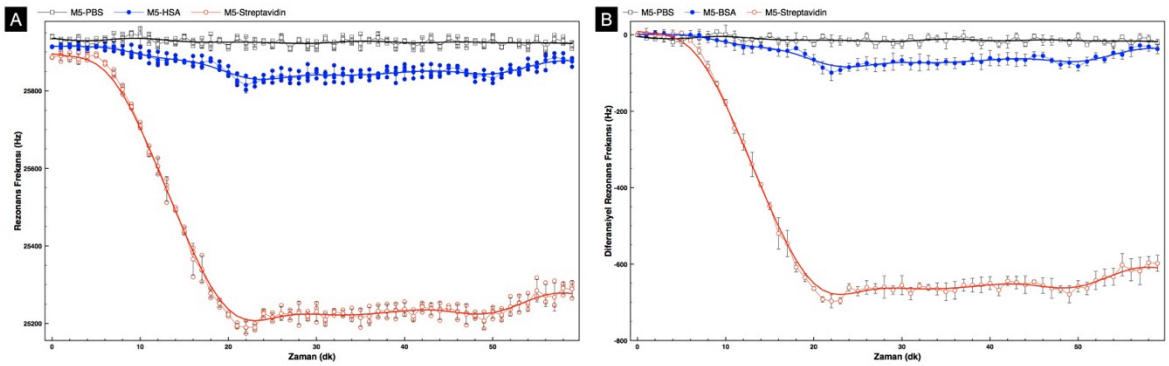
Hazırlanan biyotinlenmiş HSA nanopartiküllllerin immobilize edildiği kantilever yüzeyleri ile streptavidin etkileşimlerinin incelenmesi için daha önce stok çözeltiden alikotlanarak hazırlanan streptavidin örnekleri kullanılmıştır. Streptavidin çözeltileri kullanılmadan önce oda sıcaklığına gelene kadar dengeye gelmesi için beklenmiş ve enjekte edilmek üzere 10 µg/mL derişimde örnekler hazırlanmıştır.

Biyotin-HSA nanopartiküllerle hazırlanmış kantileverler ölçümler öncesinde stabil hale gelmesi için yaklaşık olarak 1 saat PBS tamponu içerisinde bekletilmiştir. Rezonans frekansı sabitlenen kantileverler ile non-spesifik etkileşimlerin rezonans frekansına etkilerini incelemek için öncelikle 1 mg/mL derişimde (analit derişimine göre 100 kat derişik) sığır serum albümini (BSA) (100mM PBS pH:7.2 içerisinde) sisteme enjekte edilmiş ve rezonans frekansları bir saat süresince kaydedilmiştir. Daha sonrasında sisteme yüzeydeki fonksiyonel biyotin molekülleri ile etkileştirilmek üzere son derişimi 100 ng/mL olacak şekilde ayarlanan streptavidin örnekleri kapalı sıvı hücre içerisine enjekte edilmiştir. Rezonans frekans ölçümleri kaydedilerek Şekil 4.65 – 4.68'de verilmiştir. Grafiklerde siyah içi boş kutucuk ile gösterilen veriler kantileverler PBS içerisinde akış olmadığı durumdaki frekansları, mavi içi dolu daireler ile gösterilen veriler BSA enjeksiyonu sonrası alınan frekansları, kırmızı içi boş daireler ile gösterilen veriler ise streptavidin enjeksiyonu sonrası okunan rezonans frekansı değerlerini göstermektedir.



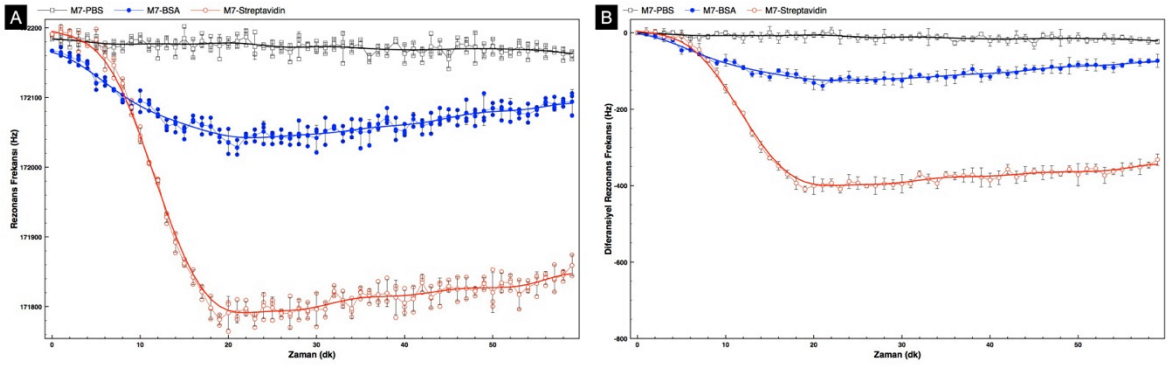
Şekil 4.65. M1 kantileveri için BSA ve streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.65 (b)'de görüldüğü gibi M1 kantileveri ölçümlerinde BSA için 153 Hz, streptavidin için 768 Hz kayma gerçekleşmiştir. PBS tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 25.89 Hz, BSA için 25.48 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 33.05 Hz olarak hesaplanmıştır.



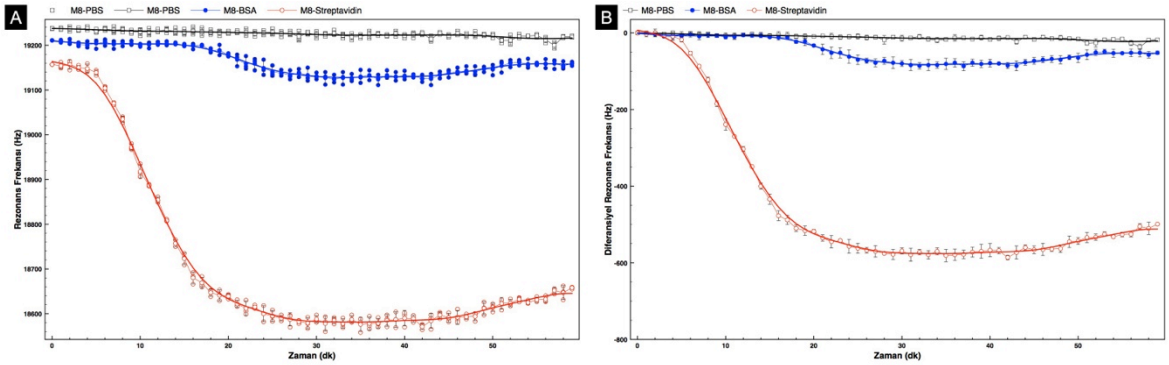
Şekil 4.66. M5 kantileveri için BSA ve streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.66 (b)'de görüldüğü gibi M5 kantileveri ölçümlerinde BSA için 85 Hz, streptavidin için 660 Hz kayma gerçekleşmiştir. PBS tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 24.27 Hz, BSA için 22.30 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 40.50 Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.67. M7 kantileveri için BSA ve streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

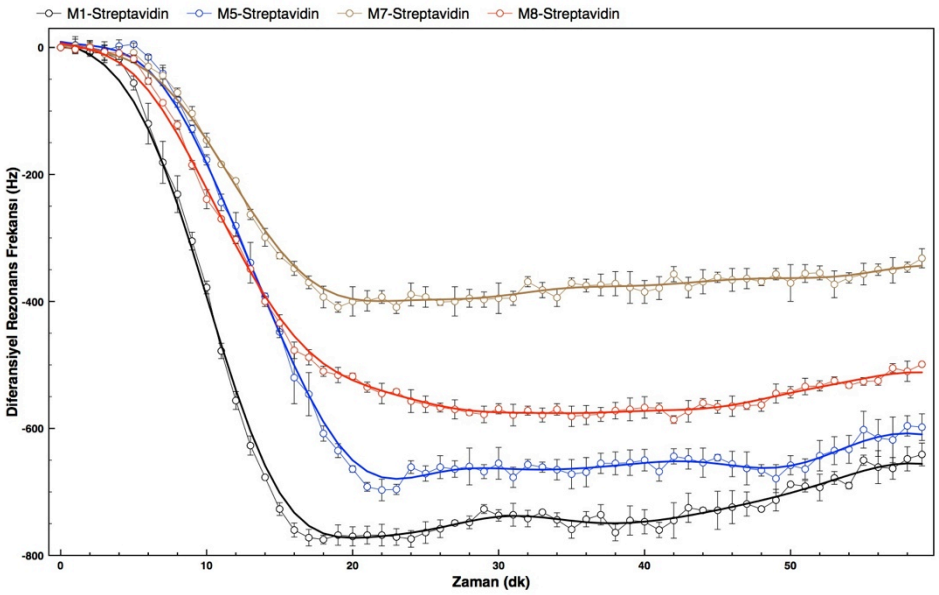
Şekil 4.67 (b)'de görüldüğü gibi M7 kantileveri ölçümlerinde BSA için 121 Hz, streptavidin için 401 Hz kayma gerçekleşmiştir. PBS tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 22.05 Hz, BSA için 21.46 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 28.79 Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.68. M8 kantileveri için BSA ve streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.68 (b)'de görüldüğü gibi M8 kantileveri ölçümlerinde BSA için 87 Hz, streptavidin için 579 Hz kayma gerçekleşmiştir. PBS tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 10.97 Hz, BSA için 17.35 Hz, streptavidin ölçümleri süresince ise 18.00 Hz olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.69'da tüm kantilever yapıları için 100 ng/mL streptavidin derişiminde rezonans frekanslarında gerçekleşen kaymanın karşılaştırmalı grafikleri verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.14'de rezonans frekansındaki kayma ve gürültü değerleri sayısal olarak karşılaştırmalı şekilde verilmiştir.



Şekil 4.69. M1, M5, M7 ve M8 kantileverleri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansındaki değişim grafikleri

Çizelge 4.14. Streptavidin bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri

Kantilever	Rezonans Frekansındaki Kayma (Hz)		* (Δf_{np-b} / Δf_b)	Gürültü (Hz)		
	BSA	Streptavidin		PBS	BSA	Streptavidin
M1	153	768	4.52	25.89	25.48	33.05
M5	85	660	7.10	24.27	22.30	40.50
M7	121	401	3.28	22.05	21.46	28.79
M8	87	579	8.64	10.97	17.35	18.00

** (Δf_{np-b} / Δf_b) : Biyotinlenmiş HSA nanopartiküller üzerinden modifiye edilen kantileverlerde gözlenen rezonans frekansı değişiminin yüzeyin direkt biyotinlenmesi ile elde edilen frekans değişimine oranı*

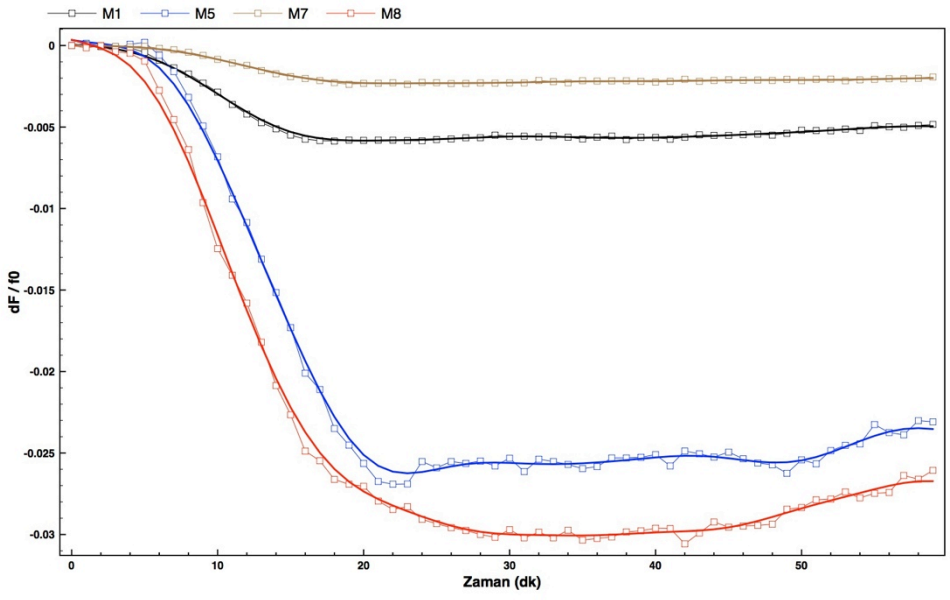
Kantileverlerin vermiş oldukları tepkiler ayrı ayrı incelendiklerinde ve sinyal/gürültü oranları dikkate alındığında kantileverlerin geometrik modifikasyonları ile birlikte yüzeyde oluşturulan fonksiyonel grup sayısının artışına paralel olarak hem elde edilen sinyallerde hem de gürültüde artış gerçekleştiği görülmektedir. Nanopartiküllerle dekore edilmiş kantileverlerden elde edilen sinyallerin yüzeyin sadece biyotin molekülleri ile fonksiyonelleştirildiği kantilever tepkilerine oranı (Δf_{np-b} / Δf_b) olarak hesaplanmış ve Çizelge 4.14'de verilmiştir. Bu sonuçlar bize

yüzey alanı artışına bağlı olarak sinyalde oldukça verimli bir artış olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu kantilever yapıları için sinyal/gürültü oranları Çizelge 4.15'de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.15. Streptavidin bağlanmasına karşılık elde edilen sinyal/gürültü oranları

Kantilever	Sinyal/Gürültü		** (S/G)np / (S/G)b
	(S/G)b Biyotin Modifiye	(S/G)np Nanopartikül Modifiye	
M1	13.03	23.24	1.78
M5	8.02	16.29	2.03
M7	9.93	13.93	1.40
M8	9.09	32.17	3.54

Nanopartikül kullanılarak yüzey alanının arttırılmasının sinyal/gürültü oranlarına olumlu yansıdığı verilen tabloda görülmektedir. Bu oranlar dikkate alındığı zaman M8 kantileverinin daha önceki sonuçlarla tutarlı olarak diğer kantilever yapılarına göre daha stabil bir karakter sergilediği görülmektedir. M7 kantileverine ait sinyal/gürültü oranlarındaki artışın diğer kantileverlere göre bağıl olarak daha düşük seviyede kalması, aşındırma işlemi en az yapı olduğu için tüm kantilever üzerinde spesifik olmayan adsorpsiyonların etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca non-spesifik bağlanmaların izlenmesi aşamasında BSA moleküllerinin nanopartiküllerin biyotinlenmiş fonksiyonel gruplarını inhibisyonu bu kantilever yapılarında daha fazla gerçekleşmiş olması olasıdır.

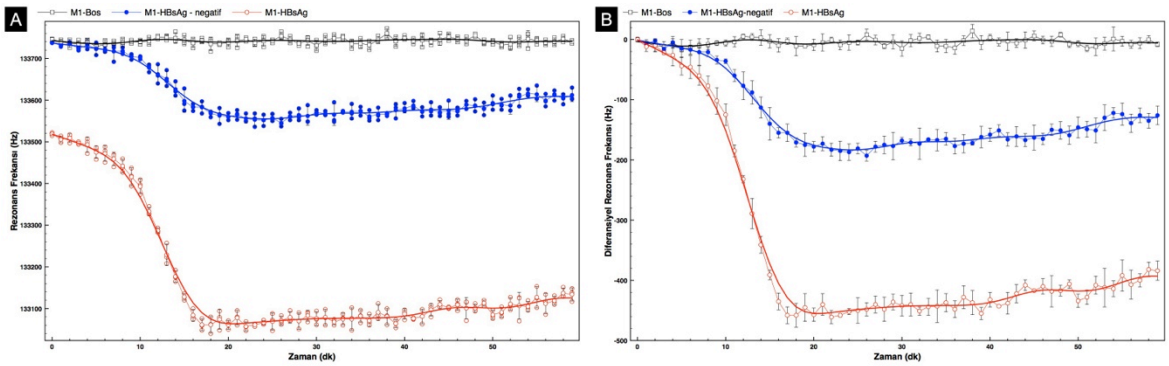


Şekil 4.70. M1, M5, M7 ve M8 kantileverleri için streptavidin enjeksiyonu sonrası zamana karşı ($\Delta f / f_0$) grafiği

Şekil 4.70'deki $\Delta f / f_0$ grafikleri karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar daha önceki bölümlerde gözlenen karakteristikleri göstermektedir. Yüzeydeki fonksiyonel grup sayısının artışı M7 ile karşılaştırıldığında M1 kantileverindeki geometrik modifikasyonun etkisi daha belirgin olarak görülmektedir. Burada elde edilen sonuçlar Çizelge 4.14 ve 4.15'de özetlenen rezonans frekansındaki kayma miktarları ve sinyal/gürültü değerleri dikkate alındığında M8 kantileverinin en ideal sensör özelliklerini gösterdiğini belirtmektedir.

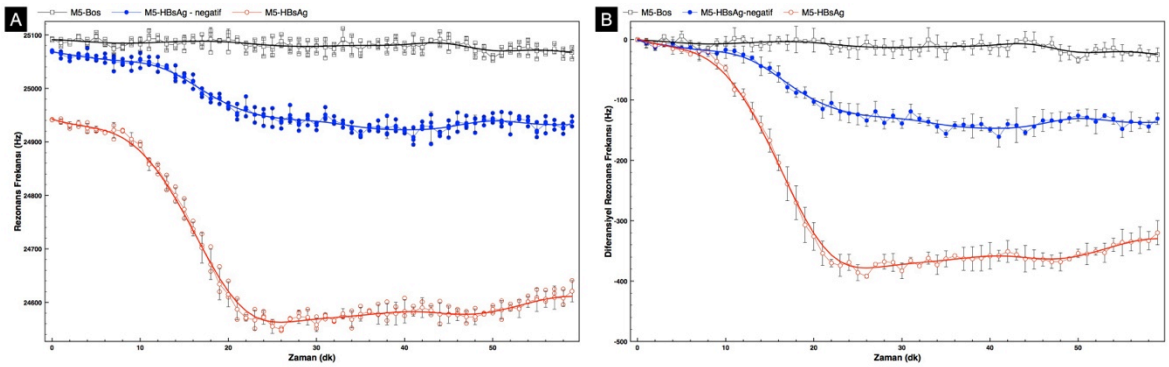
4.6.5. **HSA Nanopartiküller İle Dekore Edilmiş Kantileverlerde Anti-HBs – HbsAg Etkileşimlerinin İncelenmesi**

Hazırlanan anti-HBs reseptörleri ile dekore edilmiş Streptavidin-Biyotin-HSA immobilize kantileverler ile Hepatit B yüzey antijenlerinin etkileşimlerinin incelenmesi için 200 ng/mL derişimde örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan Anti-HBs-Ag ile fonksiyonelleştirilmiş kantileverler 85 mM MES tamponu (pH6.5) içerisinde sıvı hücreye alınarak rezonans frekansının stabil hale gelmesi beklenmiştir. Rezonans frekansı dengeye geldikten sonra HBsAg-biyotin kapalı sıvı hücre içerisine HPLC sistemi üzerinden enjekte edilerek verilmiş ve zamana karşı rezonans frekansında gerçekleşen değişimler 60dk süresince ölçülmüştür.



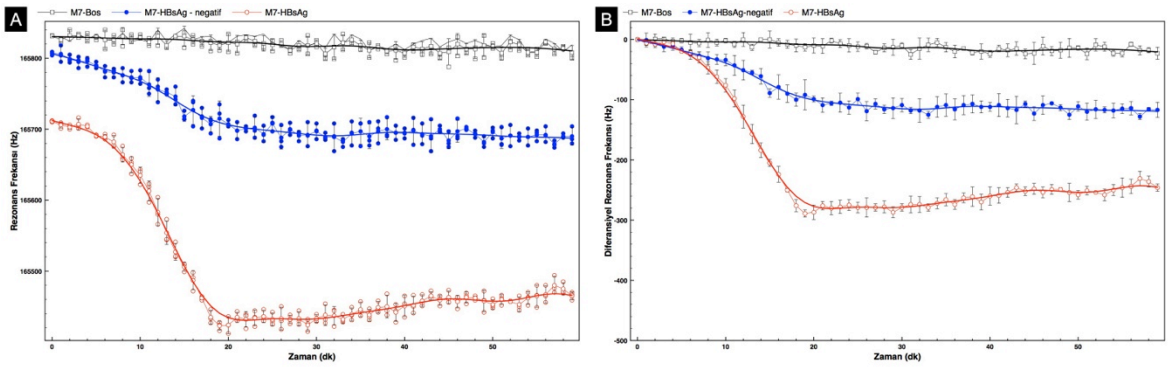
Şekil 4.71. M1 kantileveri için HBsAg-negatif ve HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.71 (b)'de görüldüğü gibi M1 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 177 Hz, HBsAg için 440 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 19.92 Hz, HBsAg-negatif için 27.18 Hz, HBsAg ölçümleri süresince ise 32.05 Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.72. M5 kantileveri için HBsAg-negatif ve HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

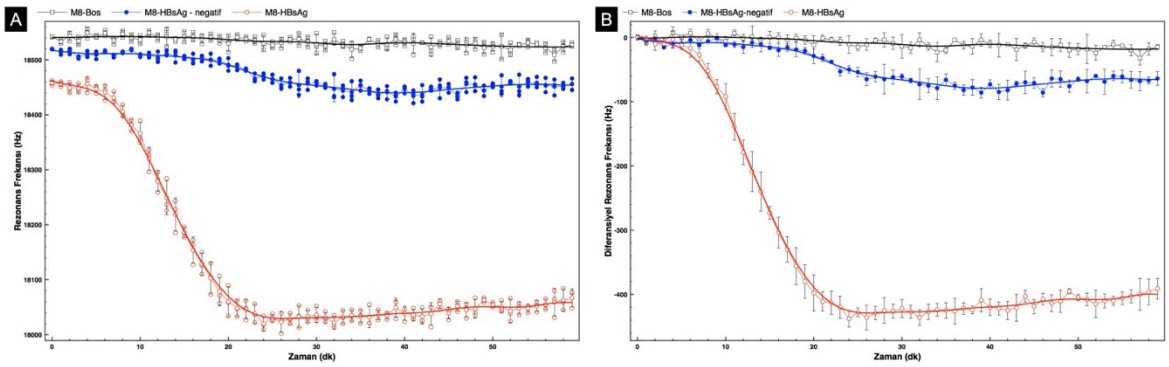
Şekil 4.72 (b)'de görüldüğü gibi M5 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 144 Hz, HBsAg için 363 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 21.93 Hz, HBsAg-negatif için 28.43 Hz, HBsAg ölçümleri süresince ise 29.02 Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.73. M7 kantileveri için HBsAg-negatif ve HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.73 (b)'de görüldüğü gibi M7 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 113 Hz, HBsAg için 279 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri

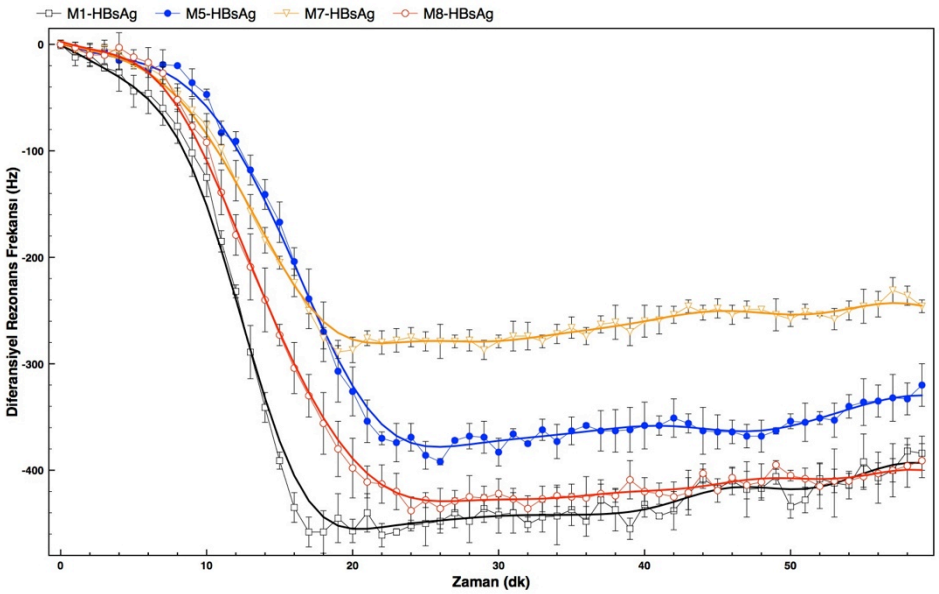
esnasında gürültü değeri 18.34 Hz, HBsAg-negatif için 24.83 Hz, HBsAg ölçümleri süresince ise 19.22 Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.74. M8 kantileveri için HBsAg-negatif ve HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.74 (b)'de görüldüğü gibi M8 kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 73 Hz, HBsAg için 427 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 22.50 Hz, HBsAg-negatif için 23.69 Hz, HBsAg ölçümleri süresince ise 30.81 Hz olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.75'de tüm kantilever yapıları için 200 ng/mL HBS-Ag derişiminde rezonans frekanslarında gerçekleşen kaymanın karşılaştırmalı grafikleri verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.16'da rezonans frekansındaki kayma ve gürültü değerleri sayısal olarak karşılaştırmalı şekilde verilmiştir.



Şekil 4.75. M1, M5, M7 ve M8 kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansı (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Çizelge 4.16. HBsAg bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri

Kantilever	Rezonans Frekansındaki Kayma (Hz)		* (Δf_{np-H} /Δf_{str-H})	Gürültü (Hz)		
	HBsAg (negatif)	HBsAg		(PBS)	HBsAg (negatif)	HBsAg
M1	177	440	8.30	19.92	27.18	32.05
M5	144	363	7.56	21.93	28.43	29.02
M7	113	279	6.06	18.34	24.83	19.22
M8	73	427	10.16	22.50	23.69	30.81

** (Δf_{np-H} /Δf_{str-H}) : Streptavidin-Biyotin-Nanopartikül kompleksi üzerinden modifiye edilen kantileverlerde gözlenen rezonans frekansı değişiminin streptavidin ile elde edilen frekans değişimine oranı*

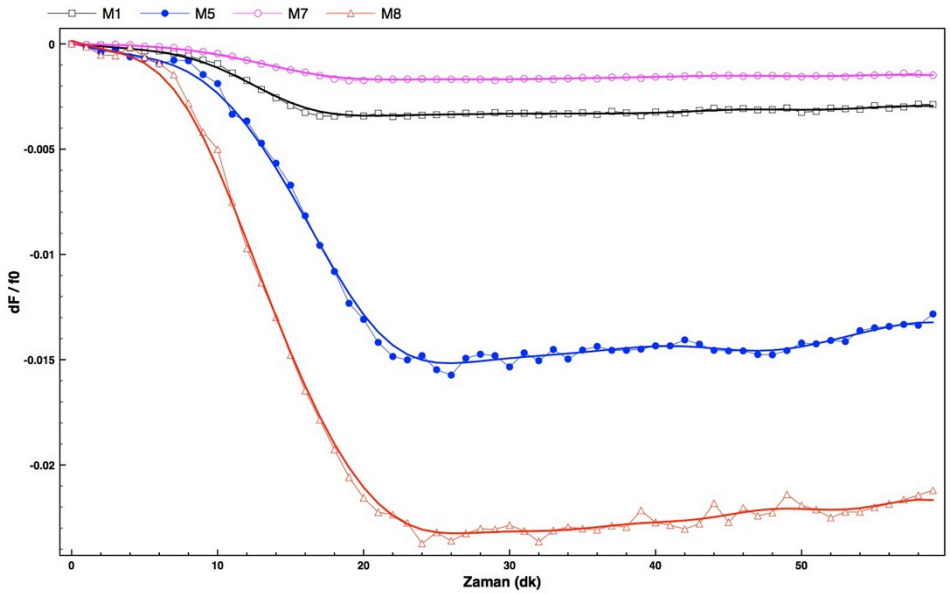
Biyotinlenmiş nanopartiküllerle streptavidin etkileşimlerinden elde edilen sonuçlarda görülen eğilim bu kantileverlerin streptavidin molekülleri ile doyurulduktan sonra anti-HBs reseptörleri oluşturularak HBsAg bağlanmalarında da aynı şekilde gözlenmiştir. Elde edilen sinyallerde hem negatif hem de pozitif sonuçlarda artma gerçekleşmiş, bunun yanında gürültü değerlerinde artma gözlenmiştir. Ayrıca yüzeyde oluşturulan aktif seçimli bölgelerin sayısındaki artış sinyal/gürültü oranlarında artışa sebep olmuştur. Bu bulgular kantilever yüzeylerindeki fonksiyonel grup sayısının arttırılmasının geometrik modifikasyonların etkisini olumlu yönde arttırıcı etkisi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.16'da kantileverlerin rezonans frekanslarındaki kaymalar ve sadece streptavidin ile fonksiyonelleştirilmiş yüzeyden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması verilmiştir. Çizelge 4.17'de ise bu iki modifikasyon türünün sinyal/gürültü oranları üzerindeki etkisi listelenmiştir.

Çizelge 4.17. HBsAg bağlanmasına karşılık elde edilen sinyal/gürültü oranları

Kantilever	Sinyal/Gürültü		** (S/G) strep-biyo-np / (S/G) strep-biyo
	(S/G)strep-biyo Biyotin Modifiye	(S/G)strep-biyo-np Nanopartikül Modifiye	
M1	10.33	13.72	1.33
M5	8.61	12.51	1.45
M7	7.62	14.52	1.91
M8	8.40	13.85	1.65

Bir önceki bölümdeki bulgulara paralel olarak nanopartikül üzerinden modifikasyon işleminin yüzey alanının artmasına bağlı olarak elde edilen sinyalin kalitesinde artışa neden olduğu verilen çizelgede görülmektedir. Önceki sonuçlardan farklı olarak M1 ve M5 kantileverlerine ait sinyal/gürültü oranı göreceli olarak daha az artış göstermiştir. Bunun nedeni yüksek aşındırma uygulaması sonrası elde edilen hassasiyetin kantilever üzerinde biriken kütle artışı ile orantılı olarak kaybedilmesi olarak düşünülmektedir. Tüm kantilever yapılarında kütle eklendikçe yeni eklenen kütlenin frekanstaki kaymaya etkisinin parabolik olarak azaldığı teorik hesaplamalarda görülmüştür. Bu nedenle yüzeyde kütle biriktikçe elde edilen cevap azalmaktadır. Bu etki en duyarlı kantilever yapılarında daha etkin olarak hissedilmektedir.

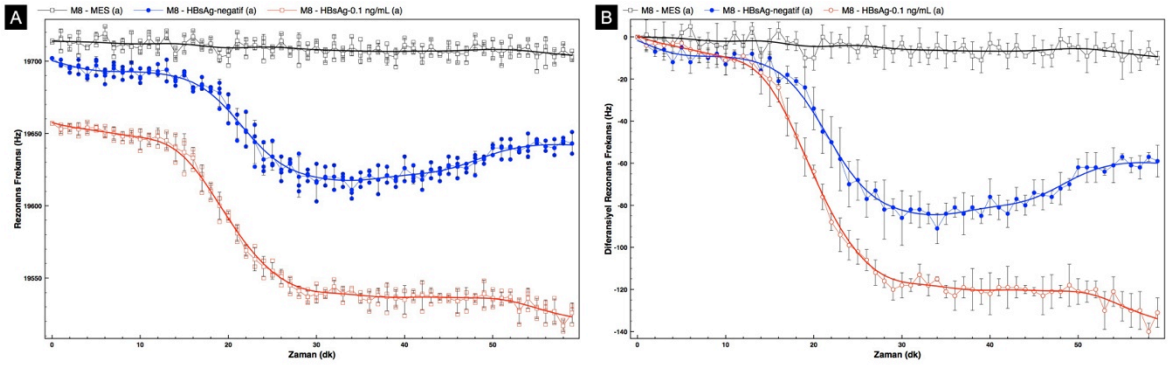


Şekil 4.76. M1, M5, M7 ve M8 kantileverleri için HBsAg enjeksiyonu enjeksiyonu sonrası zamana karşı ($\Delta f / f_0$) grafiği

Şekil 4.76'daki $\Delta f / f_0$ grafikleri karşılaştırıldığında rezonans frekansı başına elde edilen frekans değişiminin daha önceki sonuçlarla tutarlılık gösterdiği görülmektedir. Burada M8 kantileveri için M5 ile arasındaki farkın artmasının yukarıda açıklanan duyarlılığa bağlı nedenlere dayandığı düşünülmektedir.

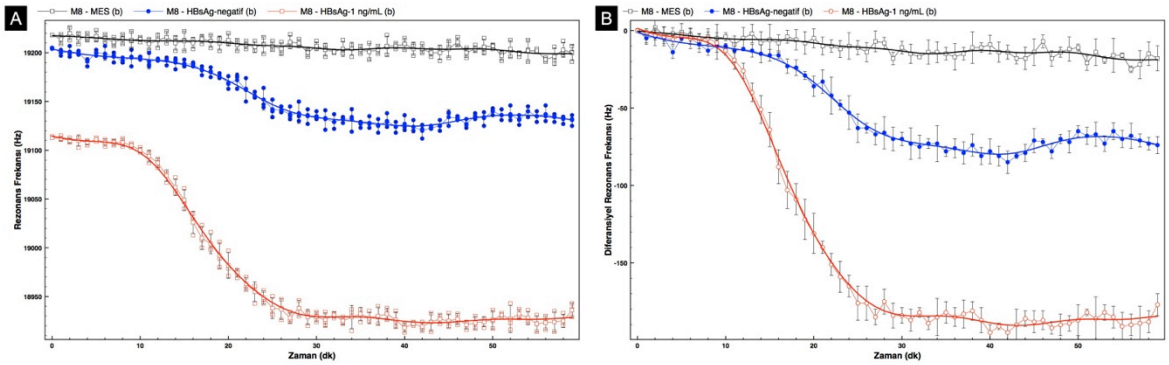
4.6.6. **Sensörün Hassasiyetinin ve Doğrusallığının Belirlenmesi**

Çalışmanın bu aşamasında hazırlanan kantilever bazlı HBsAg sensörlerin hassasiyetinin ve doğrusallığının belirlenmesi amacıyla M8 kantileveri seçilerek nanopartiküller üzerindeki fonksiyonel gruplara anti-HBs reseptörleri bağlanmıştır. Rezonans frekansı dengeye gelen kantileverlere ilk olarak anti-HBs reseptörüne karşı aktif olmayan inhibe edilmiş HBs-Ag-negatif antijeni sonrasında 0.1 - 200 ng/mL HBsAg derişimde örnekler 85 mM MES tamponu içerisinde mobil faz ile verilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda sunulan grafikte karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



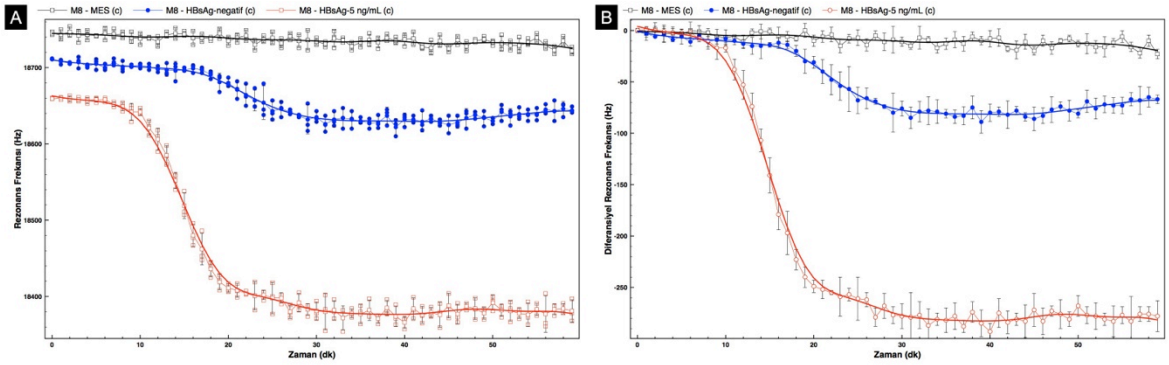
Şekil 4.77. M8 kantileveri için HBsAg-negatif ve 0.1 ng/mL HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.77 (b)'de görüldüğü gibi M8 (a) kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 81 Hz, HBsAg için 119 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 10.50 Hz, HBsAg-negatif için 14.98 Hz, HBsAg ölçümleri süresince ise 12.74 Hz olarak hesaplanmıştır.



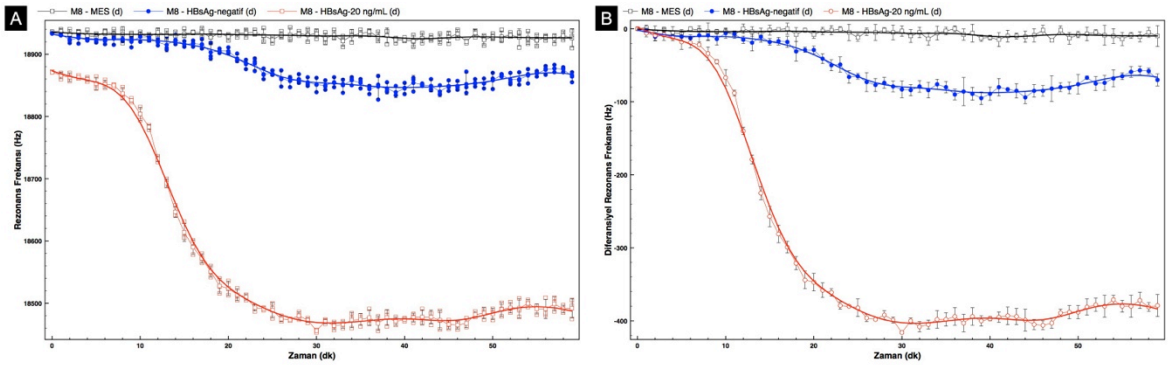
Şekil 4.78. M8 kantileveri için HBsAg-negatif ve 1.0 ng/mL HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.78 (b)'de görüldüğü gibi M8 (b) kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 78 Hz, HBsAg için 187 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 11.02 Hz, HBsAg-negatif için 12.01 Hz, HBsAg ölçümleri süresince ise 14.01 Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.79. M8 kantileveri için HBsAg-negatif ve 5.0 ng/mL HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

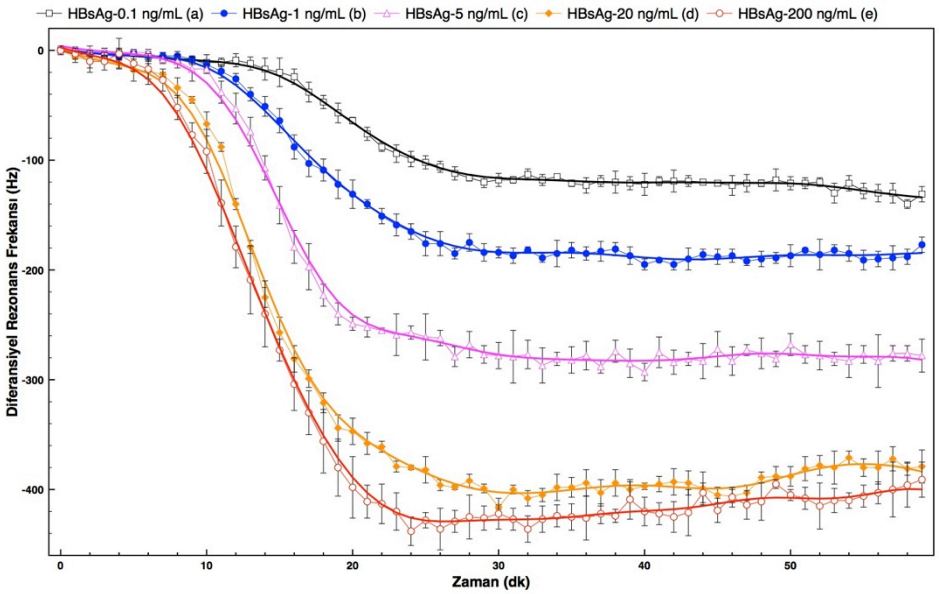
Şekil 4.79 (b)'de görüldüğü gibi M8 (c) kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 82 Hz, HBsAg için 283 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 13.00 Hz, HBsAg-negatif için 21.93 Hz, HBsAg ölçümleri süresince ise 23.76Hz olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.80. M8 kantileveri için HBsAg-negatif ve 20 ng/mL HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansları (a) rezonans frekansındaki değişim (b) grafikleri

Şekil 4.80 (b)'de görüldüğü gibi M8 (d) kantileveri ölçümlerinde HBsAg-negatif için 86 Hz, HBsAg için 398 Hz kayma gerçekleşmiştir. MES tamponu ölçümleri esnasında gürültü değeri 14.29 Hz, HBsAg-negatif için 19.22 Hz, HBsAg ölçümleri süresince ise 15.39 Hz olarak hesaplanmıştır.

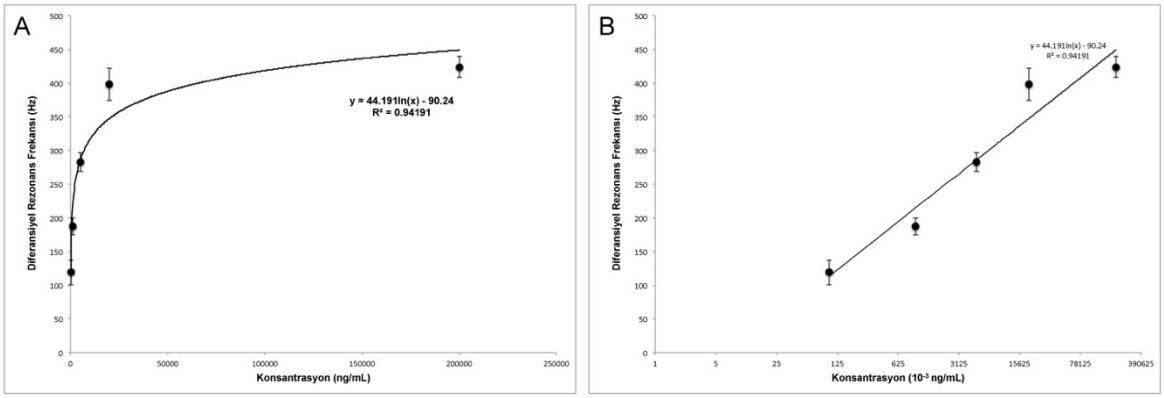
Şekil 4.81'te M8 kantileveri için 0.1-200 ng/mL HBS-Ag derişiminde rezonans frekanslarında gerçekleşen kaymanın karşılaştırmalı grafikleri verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.18'da rezonans frekansındaki kayma ve gürültü değerleri sayısal olarak karşılaştırmalı şekilde verilmiştir.



Şekil 4.81. M8 kantileveri için 0.1-200 ng/mL aralığında HBsAg enjeksiyonu sonrası zamana karşı rezonans frekansındaki değişim grafiği

Çizelge 4.18. HBsAg bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri

Kantilever	HBsAg derişimi (ng/mL)	Rezonans Frekansındaki Kayma (Hz)		Gürültü (Hz)		
		HBsAg (negatif)	HBsAg	(PBS)	HBsAg (negatif)	HBsAg
M8 (a)	0.1	81	119	10.50	14.98	12.74
M8 (b)	1.0	78	187	11.02	12.01	14.01
M8 (c)	5.0	82	283	13.00	21.93	23.76
M8 (d)	20	86	398	14.29	19.22	15.39
M8 (e)	200	73	427	22.50	23.69	30.81

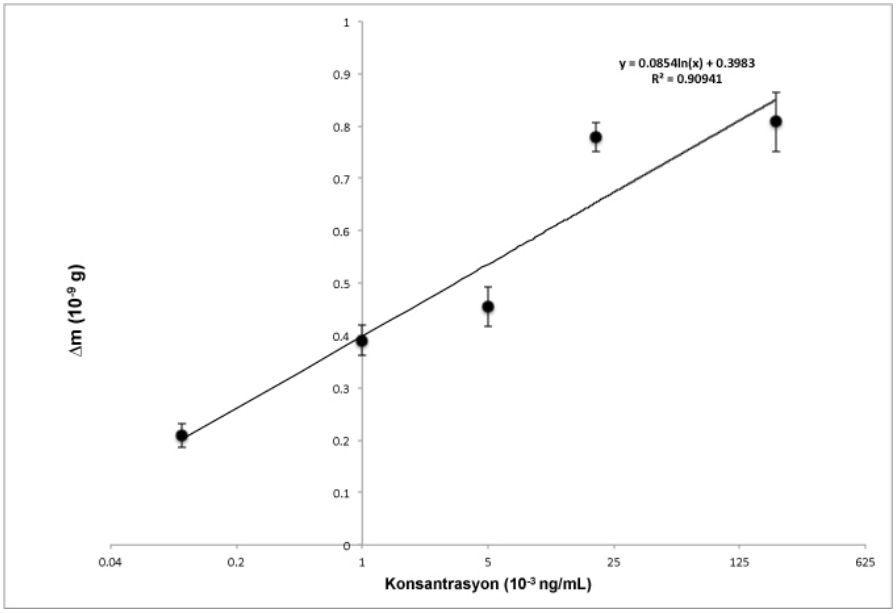


Şekil 4.82. M8 kantileveri için derişime karşılık rezonans frekansındaki değişim grafikleri a) lineer skala b) logaritmik skala

M8 kantileveri ile 0.1 ng/mL HBsAg derişimlerinde gerçekleşen frekans değişimleri derişime karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen sonuçlar Şekil 4.82'de verilmiştir. Burada görüldüğü üzere kantilever yapıları artan derişime karşılık logaritmik olarak rezonans frekansında azalma meydana gelmektedir. Elde edilen bu sonuçların kullanılan yüksek sıvı hücre hacminin etkisiyle ilgili olduğu düşünülmektedir. Sinyal/gürültü oranları dikkate alındığında 1.0 ng/mL derişimi tayin limiti olarak belirlenmiştir. Kullanılan kantilever yapısı için daha önce belirtildiği gibi hassasiyet $S = \Delta f / \Delta m$ formülünden hesaplanabilmektedir [95, 114, 127-130]. Bu durumda gerçekleştirilen M8 kantileveri için hassasiyet 5.34 pg/Hz olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.19. HBsAg bağlanmasına karşılık kantileverlerin rezonans frekans değerleri

Kantilever	f_m (Hz)	f_0 (Hz)	f_n (Hz)	Q	k* (N/m)	Δm (10^{-9} g)	± (10^{-9} g)
M8a	19538	19657	19644	12.71	8.40	0.2086	0.0226
M8b	18926	19113	19099	14.43	9.15	0.3906	0.0288
M8c	18377	18660	18636	10.69	6.49	0.4541	0.0377
M8d	18474	18872	18857	13.04	8.11	0.7793	0.0284
M8e	18035	18462	18431	12.15	7.32	0.8080	0.0567



Şekil 4.83. M8 kantileverleri için derişime karşılık hesaplanan kütle değişimi grafiği

Sader yöntemine göre kantileverlerin rezonans frekansları, kalite faktörleri, boy ve genişlik değerleri kullanılarak yay sabitleri $k = 0.1906\,\rho_f\, b^2 L\, Q_f \Gamma_i(\omega_f)\omega_f{}^2$ formülüne göre hesaplanmıştır. Elde edilen yay sabiti değerleri

$$\Delta m_{\mathrm{HBsAg}} = \frac{k}{4\pi^2}\left(\frac{1}{f_{\mathrm{m}}^2} - \frac{1}{f_0^2}\right)$$

formülünde kullanılarak her bir kantilever için yüzeye bağlanan HBsAg moleküllerinin kütlesi hesaplanarak Çizelge 4.19'da verilmiştir. Biriken HBsAg kütlesi (Δm) 'e karşılık sıvı hücreye enjekte edilen HBsAg derişimlerine karşılık grafik Şekil 4.83'de verilmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

- Sunulan tez çalışması kapsamında lazer, detektör, kamera, sürücü gibi tüm elektronik bileşenlerin çalışmasını sağlayan ve elde edilen sinyalleri veriye dönüştüren atomik kuvvet mikroskobu elektronik ünitesi, hücre sensör tutucu, kapalı sıvı hücre haznesi ve elektronik devreleri bir arada tutan kafa ünitesi, sıvı içerisinde rezonans frekansı ölçümlerinin gerçekleştirilebileceği, örnek enjeksiyonu yapılabilecek ve sıvı sızdırmazlığı sağlanmış kapalı sıvı hücre ünitesi ve pompa sisteminden oluşan bir kantilever bazlı biyosensör sistemi yapılandırılmıştır.

- Bu sisteme sıvı akışını sağlamak üzere öncelikle peristaltik pompa bağlanmış ve 100 µL/dk akış hızında 25 ± 5 mV'luk gürültü elde edilmiştir. Gürültünün azaltılması amacıyla sisteme HPLC pompası bağlanmış ve aynı akış hızında 7 ±2 mV'luk gürültü oluştuğu gözlenmiştir. Pompa kapandıktan sonra 40 saniye içerisinde sistemin akış olmayan koşullara döndüğü izlenmiştir. Bu koşullarda 20 µL hacimdeki sıvı örnek HPLC pompası ve örnek portu üzerinden sisteme enjekte edilerek verilmiş ve 4. dakikada sıvı hücre içerisine ulaştığında akış durdurularak rezonans frekansı ölçümleri alınmıştır.

- Kantilever yüzeyinde spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçmek ve spesifik etkileşimlerin sadece sınırlandırılan bölgelerde gerçekleşmesi amacıyla geometrik modifikasyonlar ile yüzey modifikasyon tekniklerinin birlikte kullanımı araştırılmıştır.

- Bu amaçla öncelikle bu sistem ile sıvı ortamda kantileverlerin analite olan cevabını incelemek üzere farklı geometrik yapıda kantileverler tasarlanmış, gerçekleştirilen modelleme ve Sader yöntemine dayanan hesaplamalarla bu kantileverlerin davranışları öngörülmüştür.

- Kantilever uzunluğuna karşılık rezonans frekansındaki değişimler hesaplandığında kantilever uzunluğu 400'den 100 µm'ye doğru azalırken

kantilever rezonans frekansının 20 kHz'den 300 kHz'e doğru artış gösterdiği görülmüştür. Kantilever boyunun daha fazla kısalması rezonans frekansında üstel olarak artış göstermektedir.

- Kantilever üzerine eklenen kütlenin rezonans frekansı üzerindeki etkisi incelendiğinde eklenen kütle arttıkça rezonans frekansının azaldığı görülmüştür. Rezonans frekansındaki değişim kütleye bağlı olarak logaritmik olarak artmaktadır.

- Biriken kütlenin kantileverin uç noktasından uzaklığı ile ilişkisi incelendiğinde aynı kütleye sahip birim kütle uç noktadan kirişe doğru yaklaştıkça rezonans frekansı üzerindeki etkisinin logaritmik olarak ortadan kalktığı görülmüştür. Bu nedenle özellikle tek partikül seviyelerine doğru gerçekleştirilen düşük konsantrasyonlardaki ölçümlerde eklenen kütlenin konumu sonuçları doğrudan etkilemektedir. Bu etki yüksek konsantrasyon ölçümlerinde doğrusallıktan sapmalara yol açmaktadır.

- Geometrik modifikasyonların kantileverin bükülme davranışlarına etkisi incelendiğinde ise temel olarak kantileverin kiriş bağlantı düzlemindeki genişliği azaldıkça ve kantilever uzunluğu arttıkça maksimum bükülme miktarlarının arttığı görülmüştür. Kantileverin bükülme davranışları rezonans frekansları ile ters orantılı olarak değişmektedir. Geometrik olarak modifiye edilen kantilever yapılarından M5 için 892 μm'lik maksimum bükülme hesaplanmıştır. Bu sonuç modifiye edilmemiş kantilevere göre 2.97 kat daha fazla bükülmeye karşılık gelmektedir.

- Geometrik olarak modellenmiş CLR kantileveri ile gerçekleştirilen hesaplamalarda kantileverin uç kısmında 50x50 μm^2'lik bir alanda 0.1864 x 10^{-11} kg'lık bir kütlenin birikimi ve bu kütlenin kantileverin uç kısmından kirişe doğru konumunun etkisi incelenmiştir. Uç kısımda biriken kütle ile 400 μm kirişe doğru kayan kütle arasında 22 μm'lik bir fark görülmüş ve elde edilen grafikten konumun etkisinin logaritmik olarak azaldığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçların Sader yöntemi ile gerçekleştirilen teorik hesaplamalarla uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

- “Odaklamalı iyon demeti” yöntemi ile kantileverler aşındırılarak geometrik olarak modifiye edilmiş kantileverler hazırlanmıştır. Farklı yapıdaki bu kantileverlerin hava ve sıvı ortamında deneysel olarak verdikleri tepkiler rezonans frekansları izlenerek karşılaştırılmıştır.

- Gerçekleştirilen geometrik aşındırma işleminin kantileverin yay sabiti üzerindeki etkileri ve buna bağlı olarak rezonans frekansındaki birim kaymaya karşılık eklenen kütle değerleri incelenmiştir.

- Modifiye edilen kantileverler kullanılarak gerçekleştirilen biyosensör çalışmalarının ilk aşaması olarak yüzey biyotinlenmiş ve streptavidin bağlanmalarına karşılık rezonans frekansı izlenmiştir.

- Kantileverlerin biyotinlenmesi aşamasında yüzeyler ilk olarak temas açısı yöntemi ile karakterize edilmiştir. Altın kaplanmış yüzeyler hidrofobik yapısı nedeniyle 80.81 ±5.56°‘lik temas açısına sahip görülmüştür. Tiyol bağı ile 11-merkaptoundekanoik asit SAM oluşturulmuş yüzeyde serbest karboksilik asit grupları hidrofilik karakterleri nedeniyle temas açısının düşmesine (72.75 ±1.97°) neden olmaktadır. Biyotin gruplarının hem $–NH_2$ hem de –COOH grupları içermesi ve yüzeydeki derişimi nedeniyle beklenildiği üzere temas açısı değerlerinde önemli bir düşüş (68.52 ±2.89°) gerçekleşmemiştir bunula birlikte biyotin moleküllerine streptavidin moleküllerinin bağlanması ile yüzey hidrofilisitesinde önemli bir düşüş kaydedilmiştir (30.44 ±2.33°).

- Kantilever üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonlar sonrası AKM görüntüleri incelendiğinde altın kaplanmış yüzeyde ve bu yüzeylerde MUA tabakası oluşturulduğunda ve biyotin bağlanması basamaklarında pürüzlülük değerlerinin arttığı ve rms ölçümlerinden sırasıyla 0.139, 2.515 ve 6.090 nm değerleri elde edilmiştir.

- X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi ile elde edilmiş survey analiz grafiği ve Au4f, S2p, C1s, N1s ve O1s piklerinin detaylı incelemelerinde MUA

tabakasına ait literatürle örtüşen spektralar elde edildiği görülmüştür. 165-167 eV bağ enerjisine ait karakteristik altın ile tiyol bağı S2p piki, 284 -285 eV enerjisine ait karakteristik alken zinciri C1s piki, 289 eV enerjisine sahip ikincil pik olarak karboksil gruplarının karakteristik C1s piki ve 299 eV değerinde gözlenen amin gruplarının varlığını işaret eden N1s piki spektralarda gözlenmiştir. Ayrıca biyotinlenmiş yüzey ve streptavidin bağlanmış yüzeylerde yüzdece elemental karşılaştırma gerçekleştirilmiştir.

- Hazırlanan biyotinlenmiş kantilever yüzeylerinin 100 ng/mL derişimde streptavidine vermiş oldukları cevaplar karşılaştırıldığında rezonans frekansında en yüksek kayma M1'de (170 Hz) gözlenirken aynı şekilde en yüksek gürültü (13.05 Hz) değerleri de bu kantileverde elde edilmiştir. M7 kantileverinin rezonans frekansı M1'den büyük olmasına karşılık M1 1.12 kat daha yüksek cevap vermiştir. Bu sonuç $\sqrt{(k^*_{M7} / k^*_{M1})} = 1.17$ oranı ile oldukça örtüşmektedir.

- Streptavidin bağlanmasından elde edilen diğer bir önemli bulgu da tüm yüzey kaplamasının rezonans frekansındaki değişime etkisinin yüzey alanı arttıkça frekanstaki kaymanın arttığıdır. Fakat bununla birlikte teorik hesaplamalarda gösterildiği gibi kütlenin konumunun etkisi logaritmik olarak uçtan kirişe doğru azalmaktadır. Bu etki M6 kantileveri için tüm yüzey alanı / sınırlandırılmış alan oranı 4.5 için sinyalde 1.53 kat artış gerçekleşmiştir. Yine M7 kantileveri için altın kaplı alanlar için 3.02 olan oran sinyalde 1.24 kat artış olarak gözlenmiştir.

- Hepatit B yüzey antijenlerinin tespit edilmesi için gerçekleştirilen biyosensör çalışmalarında ilk basamak olarak anti-HBs antikoru yüzeye fiziksel olarak adsorplanmış ve sıvı hücre içerisine 200 ng/mL HBsAg antijeni verilerek kantileverlerin rezonans frekansları takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda genel olarak düşük kayma değerleri elde edilmiştir. Bunun nedeni reseptör moleküllerin aktif bölgelerinin adsorpsiyon sonrası bloke olması olarak düşünülmektedir. 38 Hz'lik kayma değeri ile en yüksek tepki M5 kantileverinden elde edilmiştir. Burada önemli bir nokta bu kantilever modifikasyonunun bloklanmış HBsAg negatif moleküllerinin varlığında 22

Hz'lik oldukça yüksek negatif sonuç vermesidir. Ayrıca 6.6 Hz'lik gürültü oranı elde edilen değerlerin sinyal/gürültü oranlarını olumsuz etkilemektedir. Ayrıca kantilever yüzeyinin tamamen altın ile kaplanmasının etkisi fiziksel adsorpsiyon yönteminin kullanıldığı bu deneylerde önemli ölçüde bir değişikliğe yol açmamıştır. M6 kantileveri için bir HBsAg ölçümlerinde %145 artışa karşılık HBsAg-negatif ölçümlerinde %150 artış gözlenmiştir. Ayrıca aynı etki M7 kantileverinde HBsAg-negatif için %133 artış olarak gözlenirken, HBsAg ölçümlerinde %107'lik bir azalma ölçülmüştür.

- Streptavidin bağlı yüzeyler, hepatit-B yüzey antijeninin tayin edilmesi amacıyla anti-HBs antikorları ile modifiye edilmiş ve yüzey antijenleri tespit edilmiştir. Yüzeyde fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile oluşturulan reseptör moleküllerinin sensörlerde vermiş olduğu cevaplarla karşılaştırıldığında streptavidin ile konformasyonu korunmuş örneklerde rezonans frekansı değişimlerinde önemli artış gözlenmiştir. Bununla birlikte HBsAg-negatif inhibitörüne verilen cevaplarda değişiklik gözlenmemiştir. M8 kantileveri ($\Delta f_{streptavidin}$ / $\Delta f_{adsorpsiyon}$) oranı ve bloklanmış HBsAg molekülüne verdiği düşük tepkiler nedeniyle oldukça dikkate değer sonuçlar göstermiştir.

- Sistemin hassasiyetinin arttırılması amacıyla reaktif yüzey alanı arttırılması düşünülmüş ve bu amaçla küresel formda İnsan Serum Albümin (HSA) nanopartiküller sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin morfolojik özellikleri taramalı elektron mikroskobu ve atomik kuvvet mikroskobu ile elde edilen görüntülerle incelenmiştir. Boyut ve yük analizleri için zeta-sizer ölçümleri gerçekleştirilmiş partikül çapları ortalama 76.03 nm yükleri ise -23.2 mV olarak bulunmuştur. Kimyasal karakterizasyon için FTIR incelemeleri gerçekleştirilmiş ve karakteristik 1600-1700 cm-1 (C=O gerilme), 1500-1550 cm-1 (Amid II (N-H) bükülme)'de görülen absorpsiyon pikleri hem HSA hem de HSA nanopartiküllerde gözlenmiş, genel olarak literatürle örtüşen absorpsiyon spektrası elde edilmiştir.

- Hazırlanan HSA nanopartiküllerin yüzeyleri streptavidin tayini ve HBsAg tayini çalışmaları için biyotinlenmiştir. Biyotin-LC gruplarının bağlandığı nanopartikül yapılarının boyut ve yük değerlendirmeleri zeta-sizer ölçümleri

ile gerçekleştirilmiş ortalama partikül boyutları 78.225 nm yükleri ise -20.18 mV olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen FTIR incelemelerinde HSA nanopartiküllerde de gözlenen ve HSA için karakteristik pikler olan 1600-1700 cm^{-1} (C=O gerilme), 1500-1550 cm^{-1} (Amide II (N-H) bükülme) absorpsiyon pikleri biyotinlenmiş HSA nanopartikül yapısında da gözlenmiştir (karboksilik asit gruplarına ait asimetrik COO^- gerilme 1620 cm^{-1}, primer amin gruplarına ait kuvvetli 1560–1640 cm^{-1}). 2975-2950 cm^{-1} CH_3 asimetrik gerilme, 2930 CH_2 asimetrik gerilme, 2885-2865 cm^{-1} CH^3 simetrik gerilme, 2870-2840 cm^{-1} simetrik CH_2 gerilme pikleri ve 1470-1440 cm^{-1} CH_3 asimetrik titreşim 1390-1370 cm^{-1} CH_3 simetrik titreşim pikleri biyotin halkasının uzun alifatik zincirini işaret etmektedir. X-ışını fotoelektron spektroskopisi sonuçları incelendiğinde ise yüzeyde biyotin molekülünün karakteristik pikleri HSA nanopartiküller üzerinde de gözlenmiştir. Elde edilen spektra biyotin molekülüne ait XPS spektrası ile oldukça örtüşmektedir. Biyotinlenme veriminin kontrolü için HABA-kompleksi ile yer değiştirme reaksiyonuna sokulan biyotinlenmiş nanopartiküllerde başlangıçta ortamda bulunan 10 mg nanopartiküle 0.186 mg LC-biyotin molekülü bağlandığı tespit edilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu ile gerçekleştirilen incelemelerde ise yüzeyde nanopartiküllerin bağlandığı ve kantilever yüzeyinin partiküllerle homojen bir şekilde kaplandığı gözlenmiştir.

- 100 ng/mL streptavidin varlığında biyotinlenmiş HSA nanopartiküllerle dekore edilmiş kantileverlerde M1 kantileveri en yüksek cevabı 768 Hz'lik frekans değişimi ile göstermiştir. Genel olarak sinyal/gürültü oranları dikkate alındığında kantileverlerin geometrik modifikasyonları ile birlikte yüzeyde oluşturulan fonksiyonel grup sayısının artışına paralel olarak hem elde edilen sinyallerde hem de gürültüde artış gerçekleştiği görülmektedir. Sinyal/gürültü oranları nanopartikül kullanılmadan biyotin ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında özellikle M8 kantileveri için 3.5 kata kadar sinyalde iyileşme elde edilmiştir.

- Biyotinlenmiş yüzeye streptavidin molekülleri bağlanmış ve streptavidin moleküllerinin diğer serbest aktif gruplarına da biyotinlenmiş Anti-HBs

antikorları bağlanarak sandviç kompleks reseptör yapısı oluşturulmuştur. Bu kantileverler ile HBsAg antijenleri saptanması amacıyla rezonans frekansları takip edilmiştir. Genel olarak incelendiğinde elde edilen sinyallerde hem negatif hem de pozitif sonuçlarda artma gerçekleşmiş, bunun yanında gürültü değerlerinde artma gözlenmiştir. Ayrıca nanopartikül kullanılmadan gerçekleştirilen HBsAg tayin çalışmaları ile karşılaştırıldığında yüzeyde oluşturulan aktif seçimli bölgelerin sayısındaki artış sinyal/gürültü oranlarında artışa sebep olmuştur. Bu bulgular kantilever yüzeylerindeki fonksiyonel grup sayısının arttırılmasının geometrik modifikasyonların etkisini olumlu yönde arttırıcı etkisi olduğunu göstermektedir. M8 kantileveri için inhibe edilmiş HBsAg negatif örneğine 73 Hz'lik cevap elde edilmiş buna karşılık HBsAg için 427 Hz'lik frekans kayması ölçülmüştür. Sinyal/gürültü oranında nanopartikül kullanılmayan yönteme göre 1.65 kat iyileştirme elde edilmiştir.

- Son olarak M8 kantileveri kullanılarak 0.1-200 ng/mL derişim aralığında HBsAg analiti için rezonans frekanları incelenerek sensörün doğrusallığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelenen derişim aralığında derişimin logaritmik skalada rezonans frekansındaki kayma ile doğrusal ilişki içinde olduğunu göstermiştir. 1.0 ng/mL derişimi tayin limiti olarak belirlenmiştir. Sensörün hassasiyeti ise 5.34 pg/Hz olarak bulunmuştur. Yay sabiti için Sader yöntemi kullanılarak yapılan hesaplamalar dikkate alındığında sensörün kantifikasyon limiti 0.208 ng olarak bulunmuştur.

KAYNAKLAR

[1] Vo-Dinh, T. Cullum, B., Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J Anal Chem*, 366, 6-7, 540-551, **2000.**

[2] Kasemo, B., Biological surface science. *Surface Science*, 500, 1-3, 656-677, **2002.**

[3] Clark, L.C., Jr. Lyons, C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci*, 102, 29-45, **1962.**

[4] Kuriyan, J., Konforti, B.,Wemmer, D., *Molecular Recognition* The Molecules of Life. Garland Science, Taylor & Francis Group. 1032, **2012**.

[5] Sun, D., Guo, T., Ran, Y., Huang, Y.,Guan, B.-O., In-situ DNA hybridization detection with a reflective microfiber grating biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 0, 541-546, **2014.**

[6] Kim, Y.P., Park, S.J., Lee, D.,Kim, H.S., Electrochemical glucose biosensor by electrostatic binding of PQQ-glucose dehydrogenase onto self-assembled monolayers on gold. *Journal of Applied Electrochemistry*, 42, 6, 383-390, **2012.**

[7] Cevik, E., Senel, M.,Abasiyanik, M.F., An amperometric urea biosensor based on covalent immobilization of urease on copolymer of glycidyl methacrylate and vinylferrocene. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16, 1, 367-373, **2012.**

[8] Dugas, V., Elaissari, A.,Chevalier, Y., *Surface Sensitization Techniques and Recognition Receptors Immobilization on Biosensors and Microarrays*, Recognition Receptors in Biosensors, (Ed: Zourob, M.). Springer New York47-134, **2010**.

[9] Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J.J.,Salemme, F.R., Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*, 243, 4887, 85-88, **1989.**

[10] Wang, L.H., Ren, J., Han, X.Y., Claes, T., Jian, X.G., Bienstman, P., Baets, R., Zhao, M.S.,Morthier, G., A Label-Free Optical Biosensor Built on a Low-Cost Polymer Platform. *Ieee Photonics Journal*, 4, 3, 920-930, **2012.**

[11] Martinez-Perdiguero, J., Retolaza, A., Juarros, A., Otaduy, D.,Merino, S., Enhanced Transmission through Gold Nanohole Arrays Fabricated by Thermal Nanoimprint Lithography for Surface Plasmon Based Biosensors. *26th European Conference on Solid-State Transducers, Eurosensor 2012*, 47, 805-808, **2012.**

[12] Ariga, K., Ito, H., Hill, J.P.,Tsukube, H., Molecular recognition: from solution science to nano/materials technology. *Chemical Society Reviews*, 41, 17, 5800-5835, **2012.**

[13] Huie, J.C., Guided molecular self-assembly: a review of recent efforts. *Smart Materials & Structures*, 12, 2, 264-271, **2003.**

[14] Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G.,Whitesides, G.M., Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, 105, 4, 1103-1169, **2005.**

[15] Howarter, J.A. Youngblood, J.P., Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir*, 22, 26, 11142-11147, **2006.**

[16] Porter, L.A., Ji, D., Westcott, S.L., Graupe, M., Czernuszewicz, R.S., Halas, N.J.,Lee, T.R., Gold and silver nanoparticles functionalized by the adsorption of dialkyl disulfides. *Langmuir*, 14, 26, 7378-7386, **1998.**

[17] Chambers, J.P., Arulanandam, B.P., Matta, L.L., Weis, A.,Valdes, J.J., Biosensor recognition elements. *Current Issues in Molecular Biology*, 10, 1-12, **2008.**

[18] Liao, J.Y. Tang, D.P., High-Throughput Miniaturized Immunoassay for Human Interleukin-6 Using Electrochemical Sandwich-Type Enzyme Immunosensors. *Current Pharmaceutical Analysis*, 5, 2, 164-170, **2009.**

[19] Kingsmore, S.F., Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 4, 310-320, **2006.**

[20] Rusling, J.F., Kumar, C.V., Gutkind, J.S.,Patel, V., Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer. *Analyst*, 135, 10, 2496-2511, **2010.**

[21] Tsai, H.Y., Gao, B.Z., Yang, S.F., Li, C.S.,Fuh, C.B., Detection of alpha-fetoprotein in magnetic immunoassay of thin channels using biofunctional nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 16, 1, 8, **2013.**

[22] Cheng, H.Y., Lai, L.J.,Ko, F.H., Rapid and sensitive detection of rare cancer cells by the coupling of immunomagnetic nanoparticle separation with ELISA analysis. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2967-2973, **2012.**

[23] Paniel, N., Radoi, A.,Marty, J.L., Development of an Electrochemical Biosensor for the Detection of Aflatoxin M-1 in Milk. *Sensors*, 10, 10, 9439-9448, **2010.**

[24] Morris, M.C., Fluorescent biosensors - Probing protein kinase function in cancer and drug discovery. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1834, 7, 1387-1395, **2013.**

[25] Tak, Y.K., Naoghare, P.K., Lee, K.H., Park, S.S.,Song, J.M., Green fluorescent protein (GFP) as a direct biosensor for mutation detection: Elimination of false-negative errors in target gene expression. *Analytical Biochemistry*, 380, 1, 91-98, **2008.**

[26] Volle, J.N., Chambon, G., Sayah, A., Reymond, C., Fasel, N.,Gijs, M.A.M., Enhanced sensitivity detection of protein immobilization by fluorescent interference on oxidized silicon. *Biosensors & Bioelectronics*, 19, 5, 457-464, **2003.**

[27] *Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı Eylem Planı (2011-2014)*, T.C. Sağlık Bakanlığı, T.S.H.G.M., Editor: ANKARA, **2011**.

[28] Su, Y.H., Huang, W.X., Hu, R.Z., Ding, H.D.,Hu, K.K., Development of a novel, sensitive amperometric-FIA glucose biosensor by packing up the amperometric cell with glucose oxidase modified anion exchange resin. *Biosensors & Bioelectronics*, 24, 8, 2665-2670, **2009.**

[29] Wang, Y. Hasebe, Y., Glucose oxidase-modified carbon-felt-reactor coupled with peroxidase-modified carbon-felt-detector for amperometric flow determination of glucose. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 32, 3, 432-439, **2012.**

[30] Mairal, T., Ozalp, V.C., Sanchez, P.L., Mir, M., Katakis, I.,O'Sullivan, C.K., Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem*, 390, 4, 989-1007, **2008.**

[31] Stoltenburg, R., Reinemann, C.,Strehlitz, B., FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem*, 383, 1, 83-91, **2005.**

[32] Volkert, A.A. Haes, A.J., Advancements in nanosensors using plastic antibodies. *Analyst*, 139, 1, 21-31, **2014.**

[33] Karimian, N., Vagin, M., Zavar, M.H.A., Chamsaz, M., Turner, A.P.F.,Tiwari, A., An ultrasensitive molecularly-imprinted human cardiac troponin sensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 50, 492-498, **2013.**

[34] Kubo, T., Kuroda, K., Tominaga, Y., Naito, T., Sueyoshi, K., Hosoya, K.,Otsuka, K., Effective determination of a pharmaceutical, sulpiride, in river water by online SPE-LC-MS using a molecularly imprinted polymer as a preconcentration medium. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 89, 111-117, **2014.**

[35] Song, X.L., Xu, S.F., Chen, L.X., Wei, Y.Q.,Xiong, H., Recent Advances in Molecularly Imprinted Polymers in Food Analysis. *Journal of Applied Polymer Science*, 131, 16, 18, **2014.**

[36] Zarejousheghani, M., Fiedler, P., Möder, M.,Borsdorf, H., Selective mixed-bed solid phase extraction of atrazine herbicide from environmental water samples using molecularly imprinted polymer. *Talanta*, 129, 0, 132-138, **2014.**

[37] Shi, L., Hou, A.G., Chen, L.Y.,Wang, Z.F., Electrochemical sensor prepared from molecularly imprinted polymer for recognition of TNT. *Polymer Composites*, n/a-n/a, **2014.**

[38] Buck, R.P., Lindner, E., Kutner, W.,Inzelt, G., Piezoelectric chemical sensors - (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 76, 6, 1139-1160, **2004.**

[39] Kim, S. Choi, S.-J., A lipid-based method for the preparation of a piezoelectric DNA biosensor. *Analytical Biochemistry*, 458, 0, 1-3, **2014.**

[40] Chen, Q., Tang, W., Wang, D.Z., Wu, X.J., Li, N.,Liu, F., Amplified QCM-D biosensor for protein based on aptamer-functionalized gold nanoparticles. *Biosensors & Bioelectronics*, 26, 2, 575-579, **2010.**

[41] Lazerges, M., Perrot, H., Zeghib, N., Antoine, E.,Compere, C., In situ QCM DNA-biosensor probe modification. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 120, 1, 329-337, **2006.**

[42] Gruhl, F.J. Lange, K., Surface Acoustic Wave (SAW) Biosensor for Rapid and Label-Free Detection of Penicillin G in Milk. *Food Analytical Methods*, 7, 2, 430-437, **2014.**

[43] Onen, O., Ahmad, A.A., Guldiken, R.,Gallant, N.D., Surface Modification on Acoustic Wave Biosensors for Enhanced Specificity. *Sensors*, 12, 9, 12317-12328, **2012.**

[44] Nieradka, K., Kapczynska, K., Rybka, J., Lipinski, T., Grabiec, P., Skowicki, M.,Gotszalk, T., Microcantilever array biosensors for detection and recognition of Gram-negative bacterial endotoxins. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 198, 114-124, **2014.**

[45] Huber, F., Lang, H.P., Backmann, N., Rimoldi, D.,Gerber, C., Direct detection of a BRAF mutation in total RNA from melanoma cells using cantilever arrays. *Nature Nanotechnology*, 8, 2, 125-129, **2013.**

[46] Yakovleva, M., Bhand, S.,Danielsson, B., The enzyme thermistor-A realistic biosensor concept. A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 766, 1-12, **2013.**

[47] Thavanathan, J., Huang, N.M.,Thong, K.L., Colorimetric detection of DNA hybridization based on a dual platform of gold nanoparticles and graphene oxide. *Biosensors & Bioelectronics*, 55, 91-98, **2014.**

[48] Borisov, S.M. Wolfbeis, O.S., Optical biosensors. *Chemical Reviews*, 108, 2, 423-461, **2008.**

[49] Breault-Turcot, J. Masson, J.F., Nanostructured substrates for portable and miniature SPR biosensors. *Anal Bioanal Chem*, 403, 6, 1477-1484, **2012.**

[50] Zhang, H., Song, D.Q., Gao, S., Zhang, J., Zhang, H.Q.,Sun, Y., Novel SPR biosensors based on metal nanoparticles decorated with graphene for immunoassay. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 188, 548-554, **2013.**

[51] Galban, J., Sanz-Vicente, I., Ortega, E., del Barrio, M.,de Marcos, S., Reagentless fluorescent biosensors based on proteins for continuous monitoring systems. *Anal Bioanal Chem*, 402, 10, 3039-3054, **2012.**

[52] Aboul-Enein, H.Y., Stefan, R.I.,van Staden, J.F., Chemiluminescence-based (bio) sensors - An overview. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29, 4, 323-331, **1999.**

[53] Aboul-Enein, H.Y., Stefan, R.I., van Staden, J.F., Zhang, X.R., Garcia-Campana, A.M.,Baeyens, W.R.G., Recent developments and applications of chemiluminescence sensors. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 30, 4, 271-289, **2000.**

[54] Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J.,Reimhult, E., Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. *Sensors*, 8, 3, 1400-1458, **2008.**

[55] Bogdanovskaya, V.A. Tarasevich, M.R., Electrochemical biosensors for medicine and ecology. *Biosensors & Bioelectronics*, 11, 9, 853-861, **1996.**

[56] Lee, C.S., Kim, S.K.,Kim, M., Ion-Sensitive Field-Effect Transistor for Biological Sensing. *Sensors*, 9, 9, 7111-7131, **2009.**

[57] *Sensor Characteristics and Physical Effects*, Nanotechnology-Enabled Sensors. Springer US13-62, **2008**.

[58] Barattin, R. Voyer, N., Chemical modifications of AFM tips for the study of molecular recognition events. *Chem Commun (Camb)*, 13, 1513-1532, **2008.**

[59] Kim, S., Kihm, K.D.,Thundat, T., Fluidic applications for atomic force microscopy (AFM) with microcantilever sensors. *Experiments in Fluids*, 48, 5, 721-736, **2010.**

[60] Johnson, B.N. Mutharasan, R., Biosensing using dynamic-mode cantilever sensors: A review. *Biosensors & Bioelectronics*, 32, 1, 1-18, **2012.**

[61] Wei, H. van de Ven, T.G.M., AFM‐Based Single Molecule Force Spectroscopy of Polymer Chains: Theoretical Models and Applications. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43, 2, 111-133, **2008.**

[62] Shao, Z.F., Mou, J., Czajkowsky, D.M., Yang, J.,Yuan, J.Y., Biological atomic force microscopy: What is achieved and what is needed. *Advances in Physics*, 45, 1, 1-86, **1996.**

[63] Allen, S., Rigby-Singleton, S.M., Harris, H., Davies, M.C.,O'Shea, P., Measuring and visualizing single molecular interactions in biology. *Biochemical Society Transactions*, 31, 1052-1057, **2003.**

[64] Han, W.H., Lindsay, S.M.,Jing, T.W., A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids. *Applied Physics Letters*, 69, 26, 4111-4113, **1996.**

[65] Schindler, H., Badt, D., Hinterdorfer, P., Kienberger, F., Raab, A., Wielert-Badt, S.,Pastushenko, V., Optimal sensitivity for molecular recognition MAC-mode AFM. *Ultramicroscopy*, 82, 1-4, 227-235, **2000.**

[66] Ge, G.L., Han, D., Lin, D.Y., Chu, W.G., Sun, Y.X., Jiang, L., Ma, W.Y.,Wang, C., MAC mode atomic force microscopy studies of living samples, ranging from cells to fresh tissue. *Ultramicroscopy*, 107, 4-5, 299-307, **2007.**

[67] RosaZeiser, A., Weilandt, E., Hild, S.,Marti, O., The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: pulsed-force mode operation. *Measurement Science & Technology*, 8, 11, 1333-1338, **1997.**

[68] Miyatani, T., Horii, M., Rosa, A., Fujihira, M.,Marti, O., Mapping of electrical double-layer force between tip and sample surfaces in water with pulsed-force-mode atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 71, 18, 2632-2634, **1997.**

[69] Engel, A., Schoenenberger, C.A.,Muller, D.J., High resolution imaging of native biological sample surfaces using scanning probe microscopy. *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 2, 279-284, **1997.**

[70] Bustamante, C., Erie, D.A.,Keller, D., Biochemical and Structural Applications of Scanning Force Microscopy. *Current Opinion in Structural Biology*, 4, 5, 750-760, **1994.**

[71] Hansma, H.G. Hoh, J.H., Biomolecular Imaging with the Atomic-Force Microscope. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 23, 115-139, **1994.**

[72] Fritz, J., Anselmetti, D., Jarchow, J.,FernandezBusquets, X., Probing single biomolecules with atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*, 119, 2, 165-171, **1997.**

[73] Kasas, S., Thomson, N.H., Smith, B.L., Hansma, P.K., Miklossy, J.,Hansma, H.G., Biological applications of the AFM: From single molecules to organs. *International Journal of Imaging Systems and Technology*, 8, 2, 151-161, **1997.**

[74] Bolshakova, A.V., Kiselyova, O.I.,Yaminsky, I.V., Microbial surfaces investigated using atomic force microscopy. *Biotechnology Progress*, 20, 6, 1615-1622, **2004.**

[75] Kwak, K.J., Kudo, H.,Fujihira, M., Imaging stretched single DNA molecules by pulsed-force-mode atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 97, 1-4, 249-255, **2003.**

[76] Bustamante, C., Rivetti, C.,Keller, D.J., Scanning force microscopy under aqueous solutions. *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 5, 709-716, **1997.**

[77] Engel, A. Muller, D.J., Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nature Structural Biology*, 7, 9, 715-718, **2000.**

[78] Noy, A., Vezenov, D.V.,Lieber, C.M., Chemical force microscopy. *Annual Review of Materials Science*, 27, 381-421, **1997.**

[79] vanderVegte, E.W. Hadziioannou, G., Scanning force microscopy with chemical specificity: An extensive study of chemically specific tip-surface interactions and the chemical imaging of surface functional groups. *Langmuir*, 13, 16, 4357-4368, **1997.**

[80] Noy, A., Frisbie, C.D., Rozsnyai, L.F., Wrighton, M.S.,Lieber, C.M., Chemical Force Microscopy - Exploiting Chemically-Modified Tips to Quantify Adhesion, Friction, and Functional-Group Distributions in Molecular Assemblies. *Journal of the American Chemical Society*, 117, 30, 7943-7951, **1995.**

[81] Noy, A., Sanders, C.H., Vezenov, D.V., Wong, S.S.,Lieber, C.M., Chemically-sensitive imaging in tapping mode by chemical force microscopy: Relationship between phase lag and adhesion. *Langmuir*, 14, 7, 1508-1511, **1998.**

[82] Binnig, G., Quate, C.F.,Gerber, C., Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56, 9, 930-933, **1986.**

[83] Albrecht, T.R., Akamine, S., Carver, T.E.,Quate, C.F., Microfabrication of Cantilever Styli for the Atomic Force Microscope. *Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films*, 8, 4, 3386-3396, **1990.**

[84] Wolter, O., Bayer, T.,Greschner, J., Micromachined Silicon Sensors for Scanning Force Microscopy. *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 9, 2, 1353-1357, **1991.**

[85] Bai, X., Hou, H., Zhang, B.,Tang, J., Label-free detection of kanamycin using aptamer-based cantilever array sensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 56, 112-116, **2014.**

[86] Zhang, J.X.J. Hoshino, K., Mechanical Transducers. 321-414, **2014.**

[87] Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H.J., Schilcher, K.,Schindler, H., Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 8, 3477-3481, **1996.**

[88] Lee, G.U., Chrisey, L.A.,Colton, R.J., Direct Measurement of the Forces between Complementary Strands of DNA. *Science*, 266, 5186, 771-773, **1994.**

[89] Florin, E.L., Moy, V.T.,Gaub, H.E., Adhesion Forces between Individual Ligand-Receptor Pairs. *Science*, 264, 5157, 415-417, **1994.**

[90] Lee, G.U., Kidwell, D.A.,Colton, R.J., Sensing Discrete Streptavidin Biotin Interactions with Atomic-Force Microscopy. *Langmuir*, 10, 2, 354-357, **1994.**

[91] Braun, T., Ghatkesar, M.K., Backmann, N., Grange, W., Boulanger, P., Letellier, L., Lang, H.P., Bietsch, A., Gerber, C.,Hegner, M., Quantitative time-resolved measurement of membrane protein-ligand interactions using microcantilever array sensors. *Nature Nanotechnology*, 4, 3, 179-185, **2009.**

[92] Hansen, K.M. Thundat, T., Microcantilever biosensors. *Methods*, 37, 1, 57-64, **2005.**

[93] Biswal, S.L., Raorane, D., Chaiken, A., Birecki, H.,Majumdar, A., Nanomechanical detection of DNA melting on microcantilever surfaces. *Analytical Chemistry*, 78, 20, 7104-7109, **2006.**

[94] Ziegler, C., Cantilever-based biosensors. *Anal Bioanal Chem*, 379, 7-8, 946-959, **2004.**

[95] Braun, T., Barwich, V., Ghatkesar, M.K., Bredekamp, A.H., Gerber, C., Hegner, M.,Lang, H.P., Micromechanical mass sensors for biomolecular detection in a physiological environment. *Physical Review E*, 72, 3, **2005.**

[96] Burg, T.P., Godin, M., Knudsen, S.M., Shen, W., Carlson, G., Foster, J.S., Babcock, K.,Manalis, S.R., Weighing of biomolecules, single

cells and single nanoparticles in fluid. *Nature*, 446, 7139, 1066-1069, **2007.**

[97] Gruber, K., Horlacher, T., Castelli, R., Mader, A., Seeberger, P.H.,Hermann, B.A., Cantilever Array Sensors Detect Specific Carbohydrate-Protein Interactions with Picomolar Sensitivity. *Acs Nano*, 5, 5, 3670-3678, **2011.**

[98] Yue, M., Stachowiak, J.C., Lin, H., Datar, R., Cote, R.,Majumdar, A., Label-free protein recognition two-dimensional array using nanomechanical sensors. *Nano Letters*, 8, 2, 520-524, **2008.**

[99] Hou, H., Bai, X.J., Xing, C.Y., Gu, N.Y., Zhang, B.L.,Tang, J.L., Aptamer-Based Cantilever Array Sensors for Oxytetracycline Detection. *Analytical Chemistry*, 85, 4, 2010-2014, **2013.**

[100] Raman Suri, C., Kaur, J., Gandhi, S.,Shekhawat, G.S., Label-free ultra-sensitive detection of atrazine based on nanomechanics. *Nanotechnology*, 19, 23, 235502, **2008.**

[101] Huang, X., Li, M.F., Xu, X.H., Chen, H.J., Ji, H.F.,Zhu, S.F., Microcantilevers modified by specific peptide for selective detection of trimethylamine. *Biosensors & Bioelectronics*, 30, 1, 140-144, **2011.**

[102] Ricciardi, C., Castagna, R., Ferrante, I., Frascella, F., Marasso, S.L., Ricci, A., Canavese, G., Lore, A., Prelle, A., Gullino, M.L.,Spadaro, D., Development of a microcantilever-based immunosensing method for mycotoxin detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 40, 1, 233-239, **2013.**

[103] McKendry, R., Zhang, J.Y., Arntz, Y., Strunz, T., Hegner, M., Lang, H.P., Baller, M.K., Certa, U., Meyer, E., Guntherodt, H.J.,Gerber, C., Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 15, 9783-9788, **2002.**

[104] Zhang, J.Y., Lang, H.P., Yoshikawa, G.,Gerber, C., Optimization of DNA Hybridization Efficiency by pH-Driven Nanomechanical Bending. *Langmuir*, 28, 15, 6494-6501, **2012.**

[105] Chen, Y., Xu, P.C., Liu, M.,Li, X.X., Bio/chemical detection in liquid with self-sensing Pr-Oxi-Lever (piezo-resistive SiO2 cantilever) sensors. *Microelectronic Engineering*, 87, 12, 2468-2474, **2010.**

[106] Joo, J., Kwon, D., Yim, C.,Jeon, S., Highly Sensitive Diagnostic Assay for the Detection of Protein Biomarkers Using Microresonators and Multifunctional Nanoparticles. *Acs Nano*, 6, 5, 4375-4381, **2012.**

[107] Raiteri, R., Grattarola, M., Butt, H.J.,Skladal, P., Micromechanical cantilever-based biosensors. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 79, 2-3, 115-126, **2001.**

[108] Moulin, A.M., O'Shea, S.J.,Welland, M.E., Microcantilever-based biosensors. *Ultramicroscopy*, 82, 1-4, 23-31, **2000.**

[109] Hwang, K.S., Lee, S.M., Kim, S.K., Lee, J.H.,Kim, T.S., Micro- and Nanocantilever Devices and Systems for Biomolecule Detection. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2, 77-98, **2009.**

[110] Wachter, E.A. Thundat, T., Micromechanical Sensors for Chemical and Physical Measurements. *Review of Scientific Instruments*, 66, 6, 3662-3667, **1995.**

[111] Datskos, P.G., Sepaniak, M.J., Tipple, C.A.,Lavrik, N., Photomechanical chemical microsensors. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 76, 1-3, 393-402, **2001.**

[112] Sepaniak, M., Datskos, P., Lavrik, N.,Tipple, C., Microcantilever transducers: A new approach to sensor technology. *Analytical Chemistry*, 74, 21, 568A-575A, **2002.**

[113] Thundat, T., Oden, P.I.,Warmack, R.J., Microcantilever sensors. *Microscale Thermophysical Engineering*, 1, 3, 185-199, **1997.**

[114] Berger, R., Gerber, C., Lang, H.P.,Gimzewski, J.K., Micromechanics: A toolbox for femtoscale science: "Towards a laboratory on a tip". *Microelectronic Engineering*, 35, 1-4, 373-379, **1997.**

[115] Craighead, H.G., Nanoelectromechanical systems. *Science*, 290, 5496, 1532-1535, **2000.**

[116] Pereira, R.S., Atomic force microscopy as a novel pharmacological tool. *Biochem Pharmacol*, 62, 8, 975-983, **2001.**

[117] Alvarez, M. Lechuga, L.M., Microcantilever-based platforms as biosensing tools. *Analyst*, 135, 5, 827-836, **2010.**

[118] Wu, S., Nan, T., Xue, C., Cheng, T., Liu, H., Wang, B., Zhang, Q.,Wu, X., Mechanism and enhancement of the surface stress caused by a small-molecule antigen and antibody binding. *Biosensors & Bioelectronics*, 48, 67-74, **2013.**

[119] Zhu, Q., Shih, W.Y.,Shih, W.H., Real-time, label-free, all-electrical detection of Salmonella typhimurium using lead titanate zirconate/gold-coated glass cantilevers at any relative humidity. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 125, 2, 379-388, **2007.**

[120] Antonik, M.D., Dcosta, N.P.,Hoh, J.H., A biosensor based on micromechanical interrogation of living cells. *Ieee Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 16, 2, 66-72, **1997.**

[121] Grogan, C., Raiteri, R., O'Connor, G.M., Glynn, T.J., Cunningham, V., Kane, M., Charlton, M.,Leech, D., Characterisation of an antibody coated microcantilever as a potential immuno-based biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 17, 3, 201-207, **2002.**

[122] Wu, G., Datar, R.H., Hansen, K.M., Thundat, T., Cote, R.J.,Majumdar, A., Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers. *Nat Biotechnol*, 19, 9, 856-860, **2001.**

[123] Raiteri, R., Nelles, G., Butt, H.J., Knoll, W.,Skladal, P., Sensing of biological substances based on the bending of microfabricated cantilevers. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 61, 1-3, 213-217, **1999.**

[124] Yang, Y.M., Ji, H.F.,Thundat, T., Nerve agents detection using a Cu2+/L-cysteine bilayer-coated microcantilever. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 5, 1124-1125, **2003.**

[125] Ferrari, M., Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*, 5, 3, 161-171, **2005.**

[126] Lee, J.H., Hwang, K.S., Park, J., Yoon, K.H., Yoon, D.S.,Kim, T.S., Immunoassay of prostate-specific antigen (PSA) using resonant frequency shift of piezoelectric nanomechanical microcantilever. *Biosensors & Bioelectronics*, 20, 10, 2157-2162, **2005.**

[127] Battiston, F.M., Ramseyer, J.P., Lang, H.P., Baller, M.K., Gerber, C., Gimzewski, J.K., Meyer, E.,Guntherodt, H.J., A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance-frequency and bending readout. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 77, 1-2, 122-131, **2001.**

[128] Butt, H.J., Siedle, P., Seifert, K., Fendler, K., Seeger, T., Bamberg, E., Weisenhorn, A.L., Goldie, K.,Engel, A., Scan Speed Limit in Atomic Force Microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford*, 169, 75-84, **1993.**

[129] Elmer, F.J. Dreier, M., Eigenfrequencies of a rectangular atomic force microscope cantilever in a medium. *Journal of Applied Physics*, 81, 12, 7709-7714, **1997.**

[130] Weigert, S., Dreier, M.,Hegner, M., Frequency shifts of cantilevers vibrating in various media. *Applied Physics Letters*, 69, 19, 2834-2836, **1996.**

[131] Kirstein, S., Mertesdorf, M.,Schonhoff, M., The influence of a viscous fluid on the vibration dynamics of scanning near-field optical microscopy fiber probes and atomic force microscopy cantilevers. *Journal of Applied Physics*, 84, 4, 1782-1790, **1998.**

[132] Cleveland, J.P., Manne, S., Bocek, D.,Hansma, P.K., A nondestructive method for determining the spring constant of

cantilevers for scanning force microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 64, 2, 403-405, **1993.**

[133] Sader, J.E., Chon, J.W.M.,Mulvaney, P., Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 70, 10, 3967-3969, **1999.**

[134] Hutter, J.L. Bechhoefer, J., Calibration of Atomic-Force Microscope Tips. *Review of Scientific Instruments*, 64, 7, 1868-1873, **1993.**

[135] Gibson, C.T., Watson, G.S.,Myhra, S., Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy. *Nanotechnology*, 7, 3, 259-262, **1996.**

[136] Senden, T.J. Ducker, W.A., Experimental-Determination of Spring Constants in Atomic-Force Microscopy. *Langmuir*, 10, 4, 1003-1004, **1994.**

[137] Green, C.P., Lioe, H., Cleveland, J.P., Proksch, R., Mulvaney, P.,Sader, J.E., Normal and torsional spring constants of atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 75, 6, 1988-1996, **2004.**

[138] Sader, J.E., Larson, I., Mulvaney, P.,White, L.R., Method for the calibration of atomic-force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 66, 7, 3789-3798, **1995.**

[139] Patel, N., Davies, M.C., Hartshorne, M., Heaton, R.J., Roberts, C.J., Tendler, S.J.B.,Williams, P.M., Immobilization of protein molecules onto homogeneous and mixed carboxylate-terminated self-assembled monolayers. *Langmuir*, 13, 24, 6485-6490, **1997.**

[140] Carrascosa, L.G., Moreno, M., Alvarez, M.,Lechuga, L.M., Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 25, 3, 196-206, **2006.**

[141] Guo, L.H., Chen, G.N.,Kim, D.H., Three-Dimensionally Assembled Gold Nanostructures for Plasmonic Biosensors. *Analytical Chemistry*, 82, 12, 5147-5153, **2010.**

[142] Haes, A.J. Van Duyne, R.P., A nanoscale optical blosensor: Sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 35, 10596-10604, **2002.**

[143] Stettner, J., *Self assembled monolayer formation of alkanethiols on gold: Growth from solution versus physical vapor deposition*. Doctoral Thesis, Graz University of Technology, Technical Sciences Technical Physics, Graz, **2010**.

[144] Le, T.T., Wilde, C.P., Grossman, N.,Cass, A.E.G., A simple method for controlled immobilization of proteins on modified SAMs. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 12, 5271-5278, **2011.**

[145] Huzly, D., Schenk, T., Jilg, W.,Neumann-Haefelin, D., Comparison of nine commercially available assays for quantification of antibody response to hepatitis B virus surface antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 4, 1298-1306, **2008.**

[146] Akbal, Ö., *Kanser Tedavisinde Kullanılmak Üzere Protein ve Polisakkarid Bazlı Nanokürelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara, **2012**.

[147] Lin, W., Coombes, A.G., Davies, M.C., Davis, S.S.,Illum, L., Preparation of sub-100 nm human serum albumin nanospheres using a pH-coacervation method. *J Drug Target*, 1, 3, 237-243, **1993.**

[148] Acharya, S., Dilnawaz, F.,Sahoo, S.K., Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy. *Biomaterials*, 30, 29, 5737-5750, **2009.**

[149] Fujiwara, K., Watarai, H., Itoh, H., Nakahama, E.,Ogawa, N., Measurement of antibody binding to protein immobilized on gold nanoparticles by localized surface plasmon spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, 386, 3, 639-644, **2006.**

[150] Elia, G., *Protein Biotinylation*, Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc., **2001**.

[151] Alegria-Schaffer, A., *Protein Biotinylation*, Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part A, (Ed: Lorsch, J.). Elsevier Academic Press Inc, San Diego. 109-114, **2014**.

[152] Thermo-Fisher-Scientific, *Avidin-Biotin Technical Handbook*. **2009**

[153] Butt, H.J. Jaschke, M., Calculation of thermal noise in atomic-force microscopy. *Nanotechnology*, 6, 1, 1-7, **1995.**

[154] Maali, A., Hurth, C., Boisgard, R., Jai, C., Cohen-Bouhacina, T.,Aime, J.P., Hydrodynamics of oscillating atomic force microscopy cantilevers in viscous fluids. *Journal of Applied Physics*, 97, 7, 6, **2005.**

[155] Gates, R.S. Pratt, J.R., Accurate and precise calibration of AFM cantilever spring constants using laser Doppler vibrometry. *Nanotechnology*, 23, 37, 12, **2012.**

[156] Snow, A.W., Jernigan, G.G.,Ancona, M.G., Packing density of HS(CH2)(n)COOH self-assembled monolayers. *Analyst*, 136, 23, 4935-4949, **2011.**

[157] Williams, E.H., Davydov, A.V., Motayed, A., Sundaresan, S.G., Bocchini, P., Richter, L.J., Stan, G., Steffens, K., Zangmeister, R., Schreifels, J.A.,Rao, M.V., Immobilization of streptavidin on 4H-SiC for biosensor development. *Applied Surface Science*, 258, 16, 6056-6063, **2012.**

[158] Ihalainen, P., Majumdar, H., Viitala, T., Törngren, B., Närjeoja, T., Määttänen, A., Sarfraz, J., Härmä, H., Yliperttula, M., Österbacka, R.,Peltonen, J., Application of Paper-Supported Printed Gold Electrodes for Impedimetric Immunosensor Development. *Biosensors*, 3, 1, 1-17, **2013.**

[159] Mendoza, S.M., Arfaoui, I., Zanarini, S., Paolucci, F.,Rudolf, P., Improvements in the characterization of the crystalline structure of acid-terminated alkanethiol self-assembled monolayers on Au(111). *Langmuir*, 23, 2, 582-588, **2007.**

[160] Jiang, P., Liu, Z.F.,Cai, S.M., Growing monodispersed PbS nanoparticles on self-assembled monolayers of 11-mercaptoundecanoic acid on Au(111) substrate. *Langmuir*, 18, 11, 4495-4499, **2002.**

[161] Tang, J.H., Luan, F.,Chen, X.G., Binding analysis of glycyrrhetinic acid to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 9, 3210-3217, **2006.**

[162] Maruyama, T., Katoh, S., Nakajima, M., Nabetani, H., Abbott, T.P., Shono, A.,Satoh, K., FT-IR analysis of BSA fouled on ultrafiltration and microfiltration membranes. *Journal of Membrane Science*, 192, 1-2, 201-207, **2001.**

[163] Dotsikas, Y. Loukas, Y.L., Application of avidin-biotin technology for the characterization of a model hapten-protein conjugate. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 26, 4, 285-293, **2005.**

[164] Wang, W.-H., Dong, J.-L., Baker, G.L.,Bruening, M.L., Bifunctional polymer brushes for low-bias enrichment of mono- and multi-phosphorylated peptides prior to mass spectrometry analysis. *Analyst*, 136, 18, 3595-3598, **2011.**

[165] Phelps, J.A., Morisse, S., Hindie, M., Degat, M.C., Pauthe, E.,Van Tassel, P.R., Nanofilm Biomaterials: Localized Cross-Linking To Optimize Mechanical Rigidity and Bioactivity. *Langmuir*, 27, 3, 1123-1130, **2011.**

[166] Saleh, S.M., Ali, R., Hirsch, T.,Wolfbeis, O.S., Detection of biotin-avidin affinity binding by exploiting a self-referenced system composed of upconverting luminescent nanoparticles and gold nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 10, 4603-4611, **2011.**

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Tamer ÇIRAK
Doğum Yeri : İzmir
Medeni Hali : Evli
E-posta : tcirak@hacettepe.edu.tr
Adresi : Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu,
Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı,
Beytepe Kampüsü, 06800, Ankara, Türkiye

Eğitim

Lise : Yunus Emre Anadolu Lisesi, İzmir
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Ankara
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik A.D., Ankara,
Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp A.D., Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce: Çok iyi

İş Deneyimi

2007 – 2008 : Aksaray Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
(Araştırma Görevlisi)
2008 – 2014 : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı
(Araştırma Görevlisi)

Deneyim Alanları

Kantilever-bazlı Biyosensörler Sıvı ortam içerisinde çalışmak üzere kantilever bazlı biyosensörlerin tasarımı, kantileverların yüzey modifikasyonları ve bu sistemlerin biyolojik uygulamaları.

Polimerik Yüzey Modifikasyonları Yüksek biyo-uyumluluğa sahip yüzeylerin oluşturulması için polimerik biyomalzemelerin hazırlanması ve modifikasyonu.

Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler İlaç taşıyıcı sistemlere için kontrol edilebilir özelliklere sahip polimerik matriks yapılarının hazırlanması ve karakterizasyonu. İlaç salım çalışmaları ve hayvan modellemeleri.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

“Biyolojik Moleküllerin Tayinine Yönelik Kantilever Bazlı Biyosensör Sisteminin Geliştirilmesi” (010BİYP09604001, Bütçe: 49.872,66 TL, Yardımcı Araştırmacı) Hacettepe Üniversitesi, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Destek Projesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

- Tamer Çırak, Salih Akbudak, Emir Baki Denkbaş
  Modelling and experimental detection of the biotin-streptavidin interaction using Atomic Force Microscopy
  NanoTR VIII, 8. Nanobilim ve Nanoteknoloji Kongresi,
  Ankara, Türkiye, 25-29 Haziran 2012

- Tamer Çırak, Demet Çatçat, Ahmet Oral, Emir Baki Denkbaş
  Biological and Chemical Sensing With Atomic Force Microscope Cantilevers
  NATO ASI: Technological Innovations in Detection and Sensing of Chem.-Bio-Radiological-Nuclear Threats and Ecological Terrorism,
  Chisinau, Moldova, 07-17 Haziran 2010