

**T. C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AĞIR METALLERİN SULU ÇÖZELTİLERDEN
TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE DNA - APTAMER
BİYOTANI ELEMANLI ELİPSOMETRİK BİYOSENSÖRLERİN
GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Tuğçe ERTAN
(201292121046)**

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN

SİVAS

EYLÜL 2014

TUĞÇE ERTAN'nın hazırladığı ve “Ağır Metallerin Sulu Çözeltilerden Tayininde Kullanılmak Üzere DNA - Aptamer Biyo Tanı Elemanlı Elipsometrik Biyosensörlerin Geliştirilmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. M. Oğuzhan ÇAĞLAYAN

Cumhuriyet Üniversitesi



Jüri Üyeleri :

Prof. Dr. Yusuf TUTAR

Cumhuriyet Üniversitesi



Doç. Dr. Ünsal AÇIKEL

Cumhuriyet Üniversitesi



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından M 565 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

Bütün hakları saklıdır.
Kaynak gösterme koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Tuğçe ERTAN, 2014

ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'
nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ 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 ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

ÖZET

AĞIR METALLERİN SULU ÇÖZELTİLERDEN TAYİNİNDE KULLANILMAK ÜZERE DNA - APTAMER BİYOTANI ELEMANLI ELİPSOMETRİK BİYOSENSÖRLERİN GELİŞTİRİLMESİ

TUĞÇE ERTAN

Yüksek Lisans Tezi

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. M. Oğuzhan ÇAĞLAYAN

2014, 82+xiv sayfa

Sunulan çalışmada, düşük derişimlerde bile canlıların hayati organlarına etki eden ve endüstriyel proseslerin kaçınılmaz bir yan ürünü olarak ortaya çıkan ağır metal iyonlarının sulu ortamlardan tayininde kullanılacak bir elipsometrik biyosensör geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, cıva iyonlarının (Hg^{2+}) sulu ortamdaki aşırı düşük derişimlerde (4 pM' a kadar) tayini, geliştirilen yüksek algılama hassasiyetine sahip elipsometri esaslı biyosensör ile sağlanmıştır. Geliştirilen elipsometrik biyosensörde tanı elemanı olarak cıva iyonları için yüksek seçicilikteki DNA esaslı aptamer sekansları kullanılmıştır.

Tez çalışması 3 ana grupta toplanmıştır. İlk olarak, silikon yüzeyine (merkaptopropil trietoksi silan) MPTES molekülü immobilize edilerek daldırma süresi ve çözelti derişiminin kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (self assembled monolayers, SAM) oluşumuna etkisi incelenmiştir. İstenilen tek tabaka oluşumu için 10 μ M derişim ve 4 saat daldırma süresinin gerekli olduğu belirlenmiştir. İkinci kısımda, MPTES ile modifiye edilmiş silikon yüzeye farklı yapılarda oligonükleotid problemlerin immobilize edilmesi incelenmiştir. Yapılan elipsometrik analizlerle oligonükleotid problemlerin 1 μ M derişimde 12 saat süreyle immobilize edilmesi uygun bulunmuştur.

Tezin son kısımda elde edilen elipsometrik esaslı sensör yongalarının cıva algılama kapasiteleri ve algılama hassasiyetleri belirlenmiştir. Bu amaçla sensör yongaları farklı derişimlerdeki cıva çözeltilerine maruz bırakılarak işlem sonunda sensörler

elipsometrik analizlerle incelenmiştir. İki farklı probla yapılan bu çalışmada Prob 1 için uzun ve düz yapılı bir dizi tercih edilirken, Prob 2 için hair-pin yapılı oligonükleotid dizisi seçilmiştir. Prob 1 ile elde edilen algılama hassasiyeti 0.2554 derece/ μM iken, Prob 2' nin algılama hassasiyetinin 0.1879 derece/ μM olduğu görülmüştür. Ayrıca Prob 2 ile elde edilen sensörle 71 nM' a kadar cıva algılanabilirken, Prob 1' de 3.95 pM algılama sınırına ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, DNA-Aptamer, Elipsometri, Biyosensör

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ELLIPSOMETRIC BIOSENSORS WITH DNA-APTAMER BASED BIO-DIAGNOSIS ELEMENTS FOR DETECTION OF HEAVY METALS IN AQUEOUS SOLUTIONS

TUĞÇE ERTAN

Master Thesis

Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assistant Prof. Dr. M. Oğuzhan ÇAĞLAYAN

2014, 82+xiv pages

In the present study, it is aimed to develop an ellipsometric biosensor to be used in the determination of heavy metal ions in aqueous media which affect the vital organs of living organisms and that occur as inevitable by-product of industrial processes. In this context, detection of mercury ions (Hg^{2+}) in aqueous medium at extremely low concentrations (up to 4 pM) was achieved by ellipsometry-based biosensor with high detection sensitivity which has been developed. As diagnostic element of the developed ellipsometric biosensor, DNA based aptamer sequences that are highly selective for mercury ions were used.

Studies in the context of thesis are comprised of three main groups. First, immobilizing the MPTES (3-mercaptopropyltriethoxysilane) molecule on the silicon surface, the effects of immersion time and the solution concentrations on the monolayer formation (self assembled monolayers, SAM) were investigated. For monolayer formation, 10 mM concentration and 4 hours of immersion time were effective. In part two, immobilization of oligonucleotides probes with different structures on MPTES modified silicone surface were examined. In the ellipsometric analysis, the immobilization of oligonucleotide probes at 1 μM concentrations for 12 hours was found appropriate.

In the final part of the thesis, the mercury detection capability and detection sensitivity of the ellipsometry based sensor chips were determined. For this purpose,

imposing the sensor chips to the mercury solutions of different concentrations, sensors were examined by using ellipsometric analysis at the end of the process. In this study which is carried out by using two different probes, while a long and straight sequence was preferred for Probe 1, a hair-pin structured oligonucleotide sequence was chosen for Probe 2. While the detection sensitivity obtained by Probe 1 was 0.2554 degrees/ μM , the detection sensitivity of Probe 2 was obtained as 0.1879 degree/ μM . In addition, while 71 nM of mercury was detected by the sensor with Probe , a detection limit of 3.95 pM was reached with Probe 1.

Key Words: Heavy metal, DNA-Aptamer, Ellipsometry, Biosensor

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgisi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini ve ilgisini hiç esirgemeyen değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN' a ve tecrübelerini ve bilgilerini benimle paylaşan değerli Kimya Mühendisi Arzu ÇAĞLAYAN' a,

Çalışmam boyunca her aşamada yardıma koşan araştırma grubumuzun üyeleri sevgili arkadaşlarım Kimya Mühendisi Mine ŞENER' e ve Kimya Mühendisi Mehmet Ali BOZ' a,

Sevgisini benden hiç esirgemeyen, moralimi hep yüksek tutmamı sağlayan çok değerli arkadaşlarım Gülçehre' ye, Özge' ye ve Zeynep' e,

Başarılarım ve mutluluğum için benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, bana her zaman güvenen ve yanımda olan en değerlilerim annem Hamide ERTAN' a, babam Rahmi ERTAN' a, canım kardeşlerim Furkan ERTAN' a ve Kardelen ERTAN' a,

Her zaman ve her konuda yanımda olan, sevgisi ve anlayışıyla hayatımı güzelleştiren değerlim Nurettin TARKAN' a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiv

1. GİRİŞ	1
1.1. Ağır Metaller	1
1.1.1. Cıva.....	2
1.1.2. Kurşun.....	4
1.1.3. Krom.....	4
1.1.4. Kadmiyum	4
1.1.5. Nikel	5
1.2. Biyosensörler.....	5
1.2.1. Biyoreseptör.....	7
1.2.1.1. Biyoreseptör Çeşitlerine Göre Biyosensör Tipleri.....	8
1.2.2. Transdüser.....	10
1.2.2.1. Transdüser Çeşitlerine Göre Biyosensör Tipleri.....	10
1.2.3. İdeal Sensörden Beklenen Performans Kriterleri	12
1.2.4. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri	14
1.2.4.1. Adsorpsiyon	15
1.2.4.2. Tutuklama	16
1.2.4.3. Enkapsülasyon	16
1.2.4.4. Kovalent Bağlama.....	16
1.2.5. Kendiliğinden Oluşan Tek Tabaka (Self-Assembled-Monolayers, SAM)	17
d) Çözücü	20
1.2.5.2. Biyosensörlerde SAM.....	20
1.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR - Surface Plasmon Resonance).....	21
1.3.1. SPR' de Kullanılan Analiz Yöntemleri.....	24
1.3.1.1. Doğrudan Analiz Yöntemi	24
1.3.1.2. Sandviç Yöntemi.....	25
1.3.1.3. Yarışmalı yöntem.....	25
1.3.1.4. İnhibisyon yöntemi	25
1.3.2. SPR'nin Cıva Tayininde Kullanılması.....	26
1.4. Elipsometre.....	29
1.5. Aptamer Teknolojisi.....	31
1.5.1. Analiz Formatları.....	35
1.5.1.1. Elektrokimyasal Analiz Formatı	35
1.5.1.2. Optik Analiz Formatı	37
1.5.1.3. Kütle Hassas Analiz Formatı	41

1.6 Çalışmanın amacı ve literatür ile ilişkisi	44
2. MATERYAL VE METOD.....	45
2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Cihazlar	45
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	45
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	46
2.2. Deneysel Çalışmalar.....	48
2.2.1. Silikon Yüzeyinin Temizlenmesi	48
2.2.2. Silikon yüzeyinin 3-Merkaptopropiltrietoksisilan (MPTES) ile	49
Modifikasyonu Ve Optimizasyonu.....	49
2.2.3. Silikon Yüzey Üzerine Cıvaya Duyarlı Oligonükleotid Problemlerin....	50
İmmobilizasyonu	50
2.2.4. Oligonükleotid Prob İmmobilize Edilmiş Silikon Yüzeyin Cıva	
Sensörü	51
Olarak Kullanılması.....	51
3. BULGULAR.....	53
3.1. Silikon Yüzeyinin Temizlenmesi	53
3.2. Silikon yüzeyinin 3-Merkaptopropiltrietoksisilan (MPTES) ile.....	54
Modifikasyonu.....	54
3.2.1. Daldırma Süresinin MPTES Tabakası Kalınlığına Etkisinin	
İncelenmesi.....	54
3.2.2. Derişimin MPTES Tabakası Kalınlığına Etkisinin İncelenmesi	56
3.3. Silikon Yüzey Üzerine Cıvaya Duyarlı Oligonükleotid Problemlerin.....	60
İmmobilizasyonu	60
3.4. Oligonükleotid Prob İmmobilize Edilmiş Silikon Yüzeylerin Elipsometrik	
.....	62
Cıva Sensörü Olarak Kullanılması	62
3.4.1. Prob 1 (5'-tiyol-AAA AAA AAA AAA AAA AAT TCG TGT	
TGT	63
GTT CG-3')'in Sensör Olarak Kullanılması	63
3.4.2. Prob 2 (5'-tiyol-CGG GGG ACA GGA CTT GAC CTT CTC CGC	
CTT.....	67
CTT CTC TCC TGT CCC CCG-3')'nin Sensör Olarak Kullanılması	67
4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	72
KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ.....	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi.....	6
Şekil 1.2 İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi	15
Şekil 1.3 SAM' in şematik gösterimi	17
Şekil 1.4 Değişik yüzeylerdeki SAM yapıları	18
Şekil 1.5 SPR sensörlerinde analiz basamaklarının şematik gösterimi	22
Şekil 1.6 Wang ve arkadaşları (2011)' nın yaptığı çalışmanın şematik gösterimi.....	24
Şekil 1.7 Analiz yöntemlerinin şematik gösterimi	25
Şekil 1.8 Cıva algılamada kullanılan manyetik tanecik bazlı ECL analiz sisteminin şematik gösterimi	28
Şekil 1.9 Üssel zenginleştirme yolu ile Ligandların Sistemik Evrimi (SELEX) prosesinin şematik gösterimi.....	33
Şekil 1.10 Aptamer bazlı analiz formatları.....	34
Şekil 1.11 Açık sinyal ve kapalı sinyal elektro kimyasal sensörler.....	36
Şekil 1.12 Etiketsiz elektrokimyasal aptasensörler.	36
Şekil 1.13 Sandviç formatında aptamer bazlı elektrokimyasal sensörler ile sinyal amplifikasyonu.	37
Şekil 1.14 Apta işaretleyiciler.	38
Şekil 1.15 Tuzun yol açtığı agregasyona karşı kararlı hale gelen AuNPs bağlı DNA aptameri	39
Şekil 1.16 Sandviç formatında aptamer bazlı kolorimetrik biyo analizler	41
Şekil 1.17 Kütle hassas aptasensörler	43
Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan plazma sistemi	46
Şekil 2.2 Çalışmada kullanılan elipsometre cihazı	47
Şekil 2.3 Kullanılan atomik kuvvet mikroskobu (AFM) cihazı	48
Şekil 3.1 Boş silikon yüzeylerinin atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüleri.....	54
Şekil 3.2 Daldırma Süresinin MPTES Tabakası Kalınlığına Etkisi	55
Şekil 3.3 Derişimin MPTES Tabakası Kalınlığına Etkisi	56
Şekil 3.4 Farklı derişimlerde MPTES molekülü ile modifiye edilmiş silikon yüzeyinin AFM görüntüleri	58
Şekil 3.5 MPTES ve tiyol sonlanmış DNA arasındaki disülfid bağlanma.....	60
Şekil 3.6 İmmobilizasyon süresinin oligonükleotid prob tabakası kalınlığına etkisi	61
Şekil 3.7 Oligonükleotid prob derişiminin kalınlığa etkisi.....	62
Şekil 3.8 Prob 1 derişimlerinin tüm dalga boylarındaki delta derişimleri	64
Şekil 3.9 Prob 1 derişimlerinin lineer bölgedeki Δ derişimleri.....	65
Şekil 3.10 Prob 1 sensörünün cevabı.....	66
Şekil 3.11 Prob 1 sensör tepkisinin doğrusallığı	67
Şekil 3.12 Prob 2 derişimlerinin tüm dalga boylarındaki delta derişimleri	68
Şekil 3.13 Prob 2 derişimlerinin lineer bölgedeki delta derişimleri	69
Şekil 3.14 Prob 2 sensörünün cevabı.....	70
Şekil 3.15 Prob 2 sensör tepkisinin doğrusallığı	71
Şekil 4.1 Aptasensörler (Prob 1 ve Prob 2) için Hg^{2+} algılama karşılaştırması.	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 Biyosensör bileşenlerinin içeriği	7
Çizelge 2.1 Kullanılan oligonükleotid sekansları	50
Çizelge 3.1 Farklı MPTES derişimlerinde yüzey RMS değerleri	59
Çizelge 3.2 Prob 1 sensörünün cevabı	66
Çizelge 3.3 Prob 2 sensörünün cevabı	70

SİMGELER DİZİNİ

Delta (Δ)	Yansıma sonucu oluşan faz kayması
K_d	Ayrışma sabitleri
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
nM	Nanomolar
Psi (Ψ)	Toplam yansıma katsayılarının büyüklüklerinin oranı
R_p	Geliş düzlemine paralel olarak polarize olmuş ışığın kompleks yansıma katsayısı
R_s	Geliş düzlemine dik olarak polarize olmuş ışığın kompleks yansıma katsayısı
X_r	Yansıyan ışığın polarizasyon durumu
X_i	Gelen ışığın polarizasyon durumu
ρ	Işığın ara yüzeyde yansımasıyla oluşan değişim
ϕ	Işığın yüzeye gelme açısı
ϵ	Bulk dielektrik fonksiyonu

KISALTMALAR DİZİNİ

FRET : Floresans rezonans enerji transferi
QCM : Kuvars kristal mikrobalsan
SAW : Yüzey akustik dalgası
SAM : Kendiliğinden Oluşan Tek Tabaka
AA : Atomik absorpsiyon
ICP-MS : İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi
AAS : Atomik absorpsiyon spektroskopisi
ICP-AES : İndüktif eşleşmiş plazma atomik emisyon spektroskopisi
TBR : Tris 2,2-bipiridin rutenyum (II)
ECL : Elektrokemiluminesan
SE : Spektroskopik Elipsometri
SELEX : Üssel zenginleştirme yolu ile Ligandların Sistematik Evrimi
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
NMR : Nükleer manyetik rezonans
MB : Metilen mavisi
PtNP : Platin nanopartikül
QDS : Kuantum nokta
LOD : Sensör algılama sınırı
MPTES : 3-Merkaptopropiltrietoksisilan
HCl : Hidroklorik asit
HgCl₂ : Cıva tuzu
NaOH : Sodyum hidroksit
AFM : Atomik kuvvet mikroskobu
PBS : Fosfat tampon çözeltisi
RMS : Pürüzlülük değeri
AuNP : Altın nanopartikül
DNA : Deoksiribonükleik asit
RNA : Ribonükleik asit
ATP : Adenozin trifosfat
SPR : Yüzey Plazmon Rezonans

1. GİRİŞ

1.1.Ağır Metaller

Ağır metal terimi, genel olarak yoğunluğu 5 g/cm^3 ten yüksek olan metaller için kullanılmaktadır. Cıva, kurşun, kadmiyum, demir, bakır, selenyum, baryum gibi bir çok element ağır metal olarak adlandırılırlar. Ağır metaller doğada genellikle, bileşik halinde bulunurlar (Sarkar, 2002).

Ağır metaller, uzun süreden beri zararlı kirleticiler olarak kabul görmektedirler. Ağır metal iyonları kalıcı etkilerinden dolayı canlı sistemler ve çevre sağlığı yönünden önem taşımakta olup belirli bir sınırı değerinin üzerinde son derece toksik etki gösterirler (Gadd ve Griffiths, 1978).

Cıva, kadmiyum ve kurşun gibi toksik ağır metallerin canlı organizmalar üzerinde bilinen hiçbir yararlı etkisi yoktur. Bu tarz ağır metaller insan vücudunda birikme özelliği gösterirler ve birikimleri zaman içinde ciddi hasarlara yol açabilmektedir (Friis, 2007). Örneğin kurşun, düşük miktarlarda bile merkezi sinir sistemini böbrekleri ve kan hücrelerini etkileyebilir ve aşırı alındığında komaya ve hatta ölüme neden olabilir. Kurşun sinir sisteminin gelişmesine etki ederek, kalıcı öğrenme ve davranış bozukluklarına neden olarak çocuklar ve doğmamış bebeklerde daha da toksik etki göstermektedir.

Ağır metaller insan vücuduna; sindirim, solunum ve deri yolu ile giriş yapmaktadır. Yapılan çalışmalar ağır metal etkilenimi yaşayanlarda; davranış bozuklukları, sinirsel iletişim düzensizlikleri ve söz konusu bozukluk ve düzensizliklerle birlikte seyreden birçok metabolizma sorunlarının görülebildiğini ortaya koymuştur. Etkilenimin yaşandığı ağır metale göre, çeşitli sakatlıklar ve organların görevini yapamaması gibi ciddi sağlık sorunları da yaşanabilmektedir (Mehta, 2004). Ağır metalin yarattığı toksisite ağır metalin türünden, konsantrasyonundan, ortam pH'ından veya metal iyonlarının çözünürlüğünden, kimyasal yapısından, redoks ve kompleks oluşturma kabiliyetinden kaynaklanabilmektedir.

Ağır metaller günlük üretim süreçlerinin yan etkisi olarak, çevreye yüksek miktarda salınmaktadırlar. Daha da önemlisi, bu tür ağır metallerin organik moleküller ile yaptıkları bağlar, bu ağır metallerin besin zinciri içerisine girmesine ve birikimli olarak döngüde kalmasına neden olmaktadır. Örneğin cıva iyonunun (Hg^{+2}) biyometilasyonu sonucu oluşan metil cıva, oldukça yüksek dereceli bir nörotoksindir ve deniz memelilerinin ve balıkların dokusunda birikerek gıda zincirine dâhil olur (Clarkson vd., 2003). Bu nedenle, bu tarz ağır metallerin, sudan elde edilen besin maddelerinin güvenliğini değerlendirmek üzere rutin bir şekilde nehirlerden, büyük su kaynaklarından ve denizlerden alınan numunelerde tayin edilmesi ve çevresel takibin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Ağır metal kirliliği içeren atık sular; başlıca maden işletmeleri (kurşun, çinko, demir, bakır, gümüş, krom, altın ve uranyum eldesine yönelik süreçler sonucunda), metal endüstrileri (demir- çelik, bakır, çinko, krom vb.) ve diğer metal kaplama, kurşun batarya, seramik, matbaacılık, fotoğrafçılık, tekstil, elektrik- elektronik, kimya, boya ve otomotiv endüstrilerinden kaynaklanmaktadır. Süreçleri gereği bu metalleri kullanan endüstrilerin atıklarında cıva, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenik ve gümüş gibi metal iyonları bulunmaktadır.

1.1.1. Cıva

Cıva kardiyovasküler, solunum, gastrointestinal, hematolojik, bağışıklık ve üreme sistemleri de dahil olmak üzere bir çok vücut sistemi ve böbreklerde zarara sebep olduğu bilinen bir nörotoksindir (UNEP/WHO 2008). Cıva iyonlarının çevrede (özellikle su içerisinde) eser miktarda olsa bile tayin edilmesi bu iyonların düşük derişimlerde bile yüksek toksikliğe sahip olması nedeniyle çok önemlidir. Cıva (Hg); karaciğer, beyin ve kalp kasları gibi organlarda birikerek, yüksek toksikliği nedeniyle yaşayan organizmalarda ölümcül sonuçlara neden olur (Chao vd., 2012).

Cıva, buharı oldukça zehirli olan bir elementtir ve bütün bileşikleri zehirlidir. Element halindeki cıva, inorganik cıva ve metil cıva doğal sulu ortamlarda cıvanın en önemli üç formudur. Aşırı derecede yüksek toksikliği nedeniyle metil cıva en önemli kirleticilerden biridir. Cıva iyonunun (Hg^{+2}) biyometilasyonu sonucu oluşan metil cıva, oldukça yüksek dereceli bir nörotoksindir (Clarkson vd., 2003).

Cıva genellikle inorganik kaynaklı cıva olarak salınır ve bu bileşenler partikül halinde olabildiği gibi organik maddelerle bağlanmış da olabilirler. Cıva [I] iyonları,

(Hg⁺) genellikle inorganik bileşiklerle birleşirler ve metillenmezler. Buna karşılık cıva [II] iyonları, (Hg²⁺), organik ve inorganik ligandların her ikisi ile de birleşik oluşturabilirler ve metillenebilirler.

Cıva bileşikleri kolayca bakteri, plankton, balık ve diğer deniz memelileri tarafından tüketilip bu canlıların dokularında birikerek biyolojik döngü yoluyla gıda zincirine dahil olurlar. Bioçeşitlilik Araştırma Enstitüsü ve Uluslararası KOK yok etme ağının (KOK = Kalıcı Organik Kirleticiler) yayınlamış olduğu ilk rapor, dünya denizlerindeki balıkların % 84'ünün güvenli seviyelerin çok üzerinde cıva içerdiğini göstermektedir (Global Mercury Hotspots, 2013).

İnsan vücuduna giren son derece zehirli ve yaygın bir kirleticisi olan cıva iyonları (Hg²⁺) beyin hasarı, böbrek yetmezliği, mitoz yetmezliği ve sinir sistemi bozuklukları gibi bir dizi ciddi sağlık sorunlarına neden olabilirler (Sekowski vd., 1997; Clarkson ve Magos, 2006). Örneğin; Dragone ve arkadaşlarının (2009) yaptığı bir çalışmada cıva iyonları nedeniyle insan hücre solunumunun inhibe olduğu belirlenmiştir. Çeşitli çalışmalarda çok sayıda sucül türünde cıvanın hücresel aktivite bozulmasına, enerji metabolizasyonuna ve üreme sorunlarına neden olabileceği gösterilmiştir (Fanous vd., 2008). Bu nedenle, özellikle sulu ortamlarda ve gıda kaynaklarında cıva iyonu tespiti için etkili ve hızlı bir yöntem gereklidir. Bu tarz ağır metallerin, sudan elde edilen besin maddelerinin güvenliğini değerlendirmek üzere rutin bir şekilde nehirlerden, büyük su kaynaklarından ve denizlerden alınan numunelerde tayin edilmesi ve çevresel takibin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Sulu ortamlarda cıva iyonu derişiminin ölçümü çevresel zararın belirlenmesinde ve iyileştirme girişimlerinin başarılı olmasında büyük önem taşımaktadır.

Çevre ve sağlık açısından son derece olumsuz etkisi olan cıva ve bileşikler birçok alanda kullanılmaktadır. Bu tarz ağır metaller günlük üretim süreçlerinin yan etkisi olarak, çevreye yüksek miktarda salınır. Hg²⁺ iyonları, temel olarak kömür ile çalışan termik elektrik santrallerinden, okyanusal veya volkanik emisyonlardan, altın madenciliğinden ve atıkların yakılması fosil yakıt yakma ve kimyasal üretim de dahil endüstriyel kaynaklı kirlenmiş doğal sular neden olmaktadır (Chu ve Porcella, 1995; Nolan ve Lippard, 2008). ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) halkı korumak için içme sularında ki Hg²⁺ üst limitini 2 ppb (10 nM) olarak belirlemiştir (US EPA, 2001).

1.1.2. Kurşun

Kurşun, ağır metaller arasında çevresel kirliliğe en çok sebep olan elementtir. Her durumda yüksek toksisite taşıdığı kabul edilmektedir.

Akaryakıt yakılması ve benzer yollarla atmosfere salınan kurşun, yağmur suyuna karışarak tekrar yeryüzüne dönmekte ve insan sağlığını etkilemektedir. Kurşun vücudumuza solunum sistemi ve sindirim sistemi yoluyla girebilmektedir. Farklı enzim sistemleri ile etkileşim göstermesi sebebiyle birçok organ ve sistem kurşun birikimi için odak noktayı oluşturur.

Çeşitli yollardan insan vücuduna giren kurşun, kan dolaşımı ile vücuda dağılmakta ve vücutta depolanmaktadır. Kurşun, duyu ve motor sinirlerinin iletişim hızında azalmaya ve geri dönüşümü olmayan beyin hasarlarına sebep olur. Ayrıca zaman içinde vücutta depolanan kurşunun salınımı sonucu böbrek harabiyeti yaşanması da beklenen bir sonuç olarak kabul edilmektedir. Çocukluk döneminde kaydedilen kurşun etkilenimlerinin, etkilenen çocukların zekâ seviyelerinde düşüşler ile karakterize süreçlere sebep olduğu belirtilmiştir. Kurşunun hamile kadınlarda fetüse, emziren kadınlarda anne sütüne geçerek etkilenime sebep olabildiği bilinmektedir (Lilis, 2007).

1.1.3. Krom

Biyolojik sistemlerde bulunan en toksik ve mutajenik metal iyonu kromdur. Metal alaşım elde edilmesinde ve boyalar, çimento, kâğıt, kauçuk ve diğer malzemeler için pigment olarak kullanılmaktadır. Düşük seviyelerde kroma maruz kalındığında, deride iritasyon ve ülser meydana gelir. Uzun süreli maruz kalındığında böbreklerde ve karaciğerde hasara yol açabildiği gibi kan dolaşım sistemini ve sinir dokularını tahrip edebilir. Krom daha çok sulu ortamlarda birikerek çoğalır. Alerjilere, yaralara, solunum yolu hastalıklarına sebep olabilir. Bu toksisitenin nedeni sülfat iyonu kanalları yardımıyla membranı kolayca geçebilen heksavalent krom iyonlarıdır. Membranı geçen iyonlar redüksiyon tepkimelerine katılarak çeşitli reaktif ara ürünlerin oluşmasına sebep olurlar. Bu ara ürünler de hücre organellerine, proteinlere ve nükleik asitlere zarar verirler (Baruthio, 1992).

1.1.4. Kadmiyum

Kadmiyum, endüstriyel olarak nikel/kadmiyum pillerde, korozyona karşı özellikle denizel koşullara dayanımı nedeniyle gemi sanayinde çeliklerin kaplanması,

plastik ürünlerde stabilizasyonun sağlanması amacıyla plastik sanayinde boya sanayinde, PVC stabilizatörü olarak, alaşımlarda ve elektronik sanayinde kullanılır. Kadmiyum fosfatlı gübrelerde, deterjanlarda ve rafine petrol türevlerinde bulunur ve bunların çok yaygın kullanımı sonucunda da önemli miktarda kadmiyum kirliliğine ortaya çıkar. Kadmiyuma uzun süreli maruziyetten en fazla etkilenen organ böbreklerdir. Yapılan araştırmalar böbrekte biriken kadmiyumun böbrek fonksiyonlarını bozduğunu göstermiştir (Wang ve Du, 2013).

1.1.5. Nikel

Bitkisel yağların hidrojenizasyonunda en önemli kontaminasyon kaynaklarından biridir. Sindirim yoluyla alınan nikelin büyük kısmı vücut tarafından absorplanmadan atılır, bir kısmı akciğer, bağırsak ve deri gibi dokularda birikebilir. Nikel organizmada ribonükleik asit gibi moleküllerle kuvvetlice bağlanabilir. Alet ve ekipmanla beraber gıda maddelerine uygulanan bazı işlemler de nikel kontaminasyonu düzeyini etkilemektedir, örneğin, hububatın öğütülmesi veya tahılın parçalanması bu ürünlerin nikel içeriğini azaltırken, pişirme işlemi bu düzeyi artırmaktadır. Rusya'da nikel rafinasyon işçileri üzerinde yapılan bir çalışmada, mide ve akciğer kanserine yakalanma oranının yüksek olduğu saptanmıştır (Vural, 1993; Schaumlöffel, 2012).

1.2. Biyosensörler

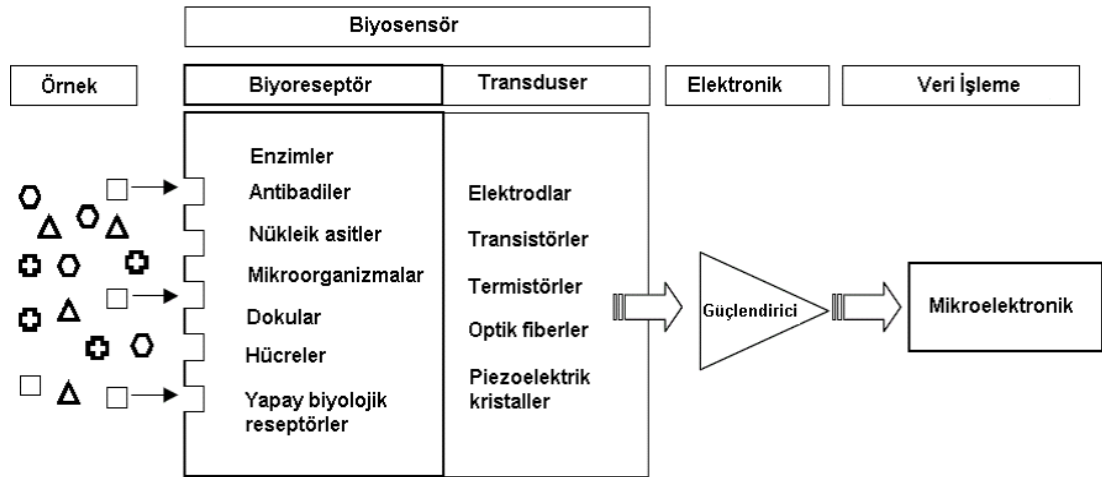
Biyosensörler biyolojik tepkimelerde hedef analitleri algılamak için kullanılan, fizikokimyasal analiz sistemleri ve biyokimyasal materyallerden oluşan kimyasal bilgiyi analitik olarak ölçebilen sistemlerdir. En güncel tanımıyla biyosensörler biyolojik veya biyolojik olarak türetilmiş algılama elemanının (enzim, mikroorganizma veya DNA), bir fizikokimyasal çevirici (transdüser) ile birleştirilmesinden oluşan kompakt analitik cihazlardır (Turner 2000).

Biyosensörler; ayırma, inkübasyon gibi ek işlemlere ve laboratuvar işlemine gerek duymaksızın düşük miktarda örnek ve kimyasal malzeme kullanımıyla hızlı ve güvenilir sonuç veren sistemlerdir. Bu nedenle geleneksel yöntemlere alternatif olarak kullanılmaktadırlar. Biyosensörlerin sağladığı en önemli avantaj gerçek zamanlı olarak cevap vermeleridir.

İlk biyosensör sistemi L.C. Clark'ın kandaki oksijen seviyesini O_2 duyar amperometrik bir elektrotla ameliyat sırasında izlemesi ve ardından 1962 yılında ise

O₂ duyar amperometrik elektrot yüzeyine glikoz oksidaz enzimini immobilize ederek hazırladığı glikoz biyosensörüdür (Clark ve Lyons, 1962). Biyosensörlerde termal çeviricilerin kullanılması ilk 1974 yılında gerçekleşmiştir. İlk olarak termal enzim probu adını alan bu yeni cihazlar daha sonra enzim termistörü olarak adlandırılmıştır (Mosbach,1974). 1975’de Divis’in bakterilerin biyolojik element olarak alkol ölçümünde mikrobiyal elektrotlarda kullanılabileceğini belirtmesiyle birlikte biyosensörlerin biyoteknolojik ve çevresel çalışmalarda kullanılmasına yönelik birçok çalışma başlamıştır (Divis, 1975).

Biyosensörlerin temel çalışma prensibi, analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyoreseptörle etkileşime girmesi ve bunun sonucunda transduser yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanmaktadır (Şekil 1.1). En genel haliyle biyoreseptör (ligand) ve transduser bileşenlerinden oluşmaktadır.



Şekil 1.1 Biyosensör bileşenlerinin şematik gösterimi (Velasco-Garciavd., 2003)

Günümüzde biyosensörler; biyoreseptör ve transduser olarak pek çok farklı madde ve sistem içermektedir. Kullanılan biyoreseptör ve transduser çeşitleri içerisinde en önemli olanları Çizelge 1' de verilmiştir.

Çizelge 1.1 Biyosensör bileşenlerinin içeriği

Analit	Biyokomponent	Sinyal İletici Sistem
Metaller	Enzimler	Elektrokimyasal Esaslı
Hormonlar	Antikorlar	-Amperometrik
Enzim - Koenzimler	Hücre	-Potansiyometrik
Substrat	-doku kesitleri	-Yarı iletken esaslı
Aktivatör - İnhibitör	-mikroorganizmalar	Optik Esaslı
Antikor - Antijen	Nükleik asitler	-Fotometri esaslı
Nükleik asit	Lipidler	-Fluorometri esaslı
Mikroorganizmalar	Hücre organelleri	-Biyolüminesans
Virüsler	Reseptörler	Piezoelektrik
		-Kuartz kristal mikrobalsans (QCM)
		-Mikrokantileverlar

1.2.1. Biyoreseptör

Biyosensörde kullanılan en önemli bileşen tayin edilecek analite karşı son derece hassas fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren biyoreseptördür. Antikor, enzim, mikroorganizma, nükleik asit, hücre gibi biyolojik elementlerden oluşan biyoreseptör sayesinde biyosensör, spesifik olduğu hedef analiti tanıyarak etkileşime girer.

Temel olarak üç grup biyoreseptör vardır, bunlar; biyokatalitik reseptörler, biyoafinite reseptörleri ve hibrit reseptörlerdir (Mehrvar vd., 2000).

Biyokatalitik reseptörler analiti belirlenebilir hale dönüştürerek transduser tarafından kaydedilebilir forma sokarlar. Biyokatalitik ajanlar analiz edilecek madde üzerinde moleküler değişime neden olduğundan dönüşüm sonucu ortamda artan veya azalan madde miktarı takip edilerek sonuca gidilmektedir. Biyokatalitik tanıma elementleri enzim içeren sistemler, hücreler (mikroorganizmalar; örneğin bakteriler, ökaryotik hücreler, mayalar), hücre organelleri ve bitki, hayvan doku parçalarından oluşurlar (Mello ve Kubota 2002).

Afinite bazlı biyosensörler belirli bir ligandı termodinamik açıdan stabil kompleks formuna dönüştüren seçici etkileşimler oluştururlar (Mello ve Kubota, 2002). Biyoafinite reseptörlerine örnek olarak antikorlar, nükleik asitler, lektinler, boyalar, hücre membran reseptörleri ve diğer spesifik bağlayıcı ajanlar gibi biyolojik komponentler gösterilebilir. Hormonlar, ilaçlar, virüsler tümör antijenleri, bakteri antijenleri ve diğer birçok protein benzeri maddelerin belirlenmesi ve ölçümü immünolojik teknikler vasıtasıyla düşük konsantrasyonlarda bile başarılabilmektedir (Mehrvan vd., 2000).

1.2.1.1. Biyoreseptör Çeşitlerine Göre Biyosensör Tipleri

Biyosensörler biyoaktif tabakalarında görev alan biyokomponentin türüne göre:

1. DNA temelli biyosensörler
2. Enzim temelli biyosensörler
3. Doku temelli biyosensörler
4. Antikor/Antijen temelli biyosensörler (immünobiyosensörler)
5. Mikrobiyal kökenli biyosensörler şeklinde sınıflandırılırlar.

i) DNA temelli biyosensörler

Biyokomponent olarak tek zincirli DNA oligomerlerinin kullanıldığı biyosensörlerdir. DNA yapısının ortaya çıkması ve bununla birlikte hibridizasyon, amplifikasyon ve rekombinant DNA teknolojilerinin gelişmesi DNA sensörlerinin geliştirilmesinde önemli etkenlerdendir. DNA sensörleri reseptör ve iletici sistemin kombinasyonu ile oluşturulmaktadır. DNA biyosensörlerinin hazırlanmasında önemli parametrelerden bir tanesi, tek zincir probun doğru bir oryantasyonla yüzeyde immobilizasyonudur. DNA sensörleri genellikle transduser yüzeyine immobilize haldeki tek zincirli DNA oligomeri ile belli bir hastalığı, kalıtsal bir karakteri ya da bir bakteri veya virüsün patojenitesini simgeleyen tek zincirli bir DNA parçasının hibridizasyonu prensibine dayanır. Analizlenmek istenen DNA tek zincirinin proba hibridizasyonu sonrasında oluşan çift zincirli DNA sayesinde elektrokimyasal ya da optik bir sinyal elde edilmiş olur (Palecek, 2009). Kullanılan DNA problemleri genellikle 20-30 bazlık kısa tek zincirli DNA'lardır. DNA hibridizasyonunun sinyalinin belirlenmesi direkt ya da indirekt metotlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Direkt iletimde mikrogravimetrik, elektriksel, elektrokimyasal ya da optik yöntemler kullanılır ve işaretleyici yoktur. Buna karşılık indirekt iletimde

enzimler, floroforlar, manyetik boncuklar, metal kompleksleri, organik redoks boyalar işaretleyici olarak kullanılarak elektrokimyasal ya da florimetrik ölçümler yapılmaktadır (Cosnier ve Mailley, 2008).

DNA biyosensörleri kirlетici ajanların, metallerin, genetik modifiye gıdalar ve organizmaların, DNA-ilaç etkileşim mekanizmalarının tayininde, biyoterörizm uygulamalarında, hastalıkların teşhisinde, DNA baz hasarının ve insan, virüs ya da bakterilerde spesifik DNA dizisinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Mikkelsen, 1996).

ii) Enzim temelli biyosensörler

Enzim temelli biyosensörler en yaygın olarak kullanılan biyosensörlerdir. Biyosensör geliştirilmesinde transdüserle tek tür enzim kullanılabildiği gibi birkaç tür enzimin kombinasyonundan oluşan multienzim içeren biyosensörler de hazırlanabilmektedir (Liu vd., 2013). Enzimin ne şekilde kullanılacağı tamamen analiz etmek istediğimiz analitin hangi tepkimeler üzerinden sinyal oluşturan türe dönüştürüldüğüne bağlıdır.

Enzim temelli biyosensörlerin cevap süresi aktifliği yüksek enzimlerin kullanımı ile kısaltılabilmektedir. Ayrıca kullanılan transduser türüne göre yöntem duyarlılığı da artırılabilir.

iii) Doku temelli biyosensörler

Hayvansal ve bitkisel bazı doku ve organellerin bazı enzimler bakımından zengin olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerin izole edilmiş preparatları yerine doğrudan yoğun bulundukları doku parçaları da biyokomponent olarak kullanılabilmektedir.

Bu tür biyosensörler enzimler doğal ortamlarında bulunabildiklerinden katalitik stabilite açısından çok avantajlıdır. Substratın enzime ulaşması için aşması gereken difüzyon bariyerinin artması cevap süresi uzamasına neden olur. Bu dezavantajı kısmen de olsa azaltabilmek için dokular homojenize edilerek kullanılır (Hynes vd., 2014).

iv) Antikor/antijen temelli biyosensörler (İmmüno-biyosensörler)

Biyoreseptör olarak antikorların kullanıldığı biyosensörler antikor temelli biyosensörler ya da immüno-sensörler olarak adlandırılırlar. Antikorlar vücuda giren yabancı organizmalara (virüs, bakteri gibi) veya onların protein ürünlerine karşı bağışıklık sistemi tarafından üretilen protein yapılı maddelerdir. Antikorlar ve antijenler arasındaki etkileşimler sayesinde immüno-sensörler ile son derece spesifik

ve duyarlı analizler yapılabilir. Antikorlar uygun transdüser ile birlikte kullanılarak hormon, ilaç, virüs, bakteri, çevresel kirlenici moleküller, pestisitler, biyomedikal maddeler gibi bir çok maddenin tayini için çeşitli immünoansörler geliştirilebilir (Makaraviciute ve Ramanaviciene, 2013).

v) Mikrobiyal temelli biyosensörler

Mikrobiyal biyosensörler bir transdüser ile canlı veya cansız mikroorganizmaların immobilize edilmesi ile oluşurlar.

Biyosensör yapımında en çok kullanılan materyaller yüksek spesifik aktiviteleri ve yüksek analitik özelliklerinden dolayı saflaştırılmış enzimlerdir. Ancak saflaştırılmış enzimlerin pahalı ve kararsız yapıda olması biyosensör yapımında kullanılmalarını sınırlandırmaktadır. Bu sebepten biyosensörlerde intrasellüler enzim kaynağı olarak hücrelerin kullanılması endüstriyel proseslerde saflaştırılmış enzimlere göre daha iyi bir alternatif olmaktadır (Bickerstaff, 1997; D’Souza, 1999).

1.2.2. Transdüser

Biyosensörde kullanılan diğer bir önemli bileşen de biyolojik veya biyokimyasal sinyalleri ölçülebilir sinyallere dönüştürebilen sistemler olan transdüserdir.

1.2.2.1. Transdüser Çeşitlerine Göre Biyosensör Tipleri

Transdüserler temel olarak dört grup altında toplanırlar (Luong vd.,1997)

- Optik transdüserler
- Elektrokimyasal transdüserler
- Nanomekanik (Kütle hassas) transdüserler
- Termal transdüserler

i) Optik transdüserler

Optik algılama sistemleri son yıllarda oldukça revaçta olan dönüştürücü tekniklerinden birisidir. Optik algılama sistemleri, yüksek hassasiyet ve ölçüm koşullarının çevresel etkilere aşırı duyarlı olmaması, boyutlarının küçük olması, maliyetinin düşük olması, referans çözeltilerine ve numune hazırlama safhalarına ihtiyaç duyulmaması ve sahada kullanılabilme özelliklerinden dolayı birçok avantaja sahiptir (Chah vd., 2004). Optik sensörlerde genel olarak iki çeşit analiz formatı vardır. Bunlar işaretleme yapılan ve yapılmayan analiz formatları olarak adlandırılmaktadır.

İşaretleme tekniğine göre çalışan optik sensörler, floresans işaretleme tekniği ile çalışan biyosensörlerde ya hedef molekül ya da biyomoleküler tanıyıcı tabaka

floresans işaretlenmektedir. İşaretleme için genelde floresans boyalar kullanılmaktadır. Biyosensörün ölçtüğü floresans ışığın miktarı; hedef molekülün varlığını ve hedef molekül ile tanıyıcı molekül arasındaki etkileşimin şiddetini göstermektedir.

Floresans tabanlı biyosensörler yapılarında fiber optik içeriyorsa biyo-optrod'lar olarak adlandırılmaktadır. Fiber optikler; uzun aralıklarda minimum kayıp ile ışığı ileten cam ya da plastik yapıda küçük ve esnek tellerden oluşmaktadır ve ışık kaynağından çıkan ışığı tanıyıcı molekül ve boyanın bulunduğu sensör kısmına iletmektedir. Tanıyıcı molekül ve hedef molükülün etkileşmesi sonucu absorbsiyon, lüminesans gibi sensörde optik bir değişim meydana gelmektedir (Biran ve Walt, 2002).

Evanescent wave biyosensörlerin optrodlardan farkı kullanılan ışığın çeşididir. Optrodlarda ışık optik fiberler ile taşınmakta ve fiberlerin uç kısmından çıkarak sinyalin oluşumunu sağlamaktadır. Diğer taraftan evanescent wave sensörlerde sinyalin elde edilmesi sensör yüzeyinden yansıyan ışığın elektromanyetik bir şekilde kontrolü ile sağlanmaktadır (Biran ve Walt, 2002).

Fiber optik biyosensörlerde bir başka işaretleme tekniği quantum noktaların kullanımı ile yapılmaktadır. Kuantum noktalar yarı iletken nano kristallerdir. Quantum dotlar; floresans ve floresans rezonans enerji transferi (FRET) tabanlı biyosensörlerin geliştirilmesinde kullanılmıştır (Algar ve Krull, 2008).

İşaretleme gerektirmeyen optik sensörlerlerin en çok kullanılanları; evanescent wave biyosensörler ve interferometer-based biyosensörler olarak iki sınıfa ayrılmaktadır.

Evanescent wave biyosensörlerde yüksek kırılma indisine sahip ince metal bir film; bir cam prizmanın yüzeyine kaplanmaktadır. Prizmadan metal yüzeye gelen ışık metal filmde rezonans oluşturmakta ve rezonans yansıyan ışığın şiddeti değiştirmektedir. Bununla birlikte yüzeye dik konumda azalan dalga alanı oluşmaktadır. Biyomoleküler etkileşimleri incelerken azalan dalga alanındaki kırılma indisi değişimlerinin hassas bir şekilde ölçülmesi temel alınmaktadır (Lim, 2003). SPR ve resonant mirror (RM) optik biyosensörler bu temele göre çalışan biyosensörlerdir.

ii) Elektrokimyasal transdüserler

Elektrokimyasal sensörler; bir reaksiyon sonucu oluşan veya tüketilen elektronların ölçülmesi prensibine göre çalışmaktadır. Sistem; referans elektrot, aktif elektrot ve karşıt elektrot olmak üzere 3 elektrottan oluşmaktadır. Sistemde iyon kaynağı olarak

karşıt elektrot da kullanılmaktadır. Modern elektro analitik sistemler oldukça düşük tespit limitlerine sahiptir. Ayrıca küçük hacimde örneklerin kullanılmasına olanak tanımaktadır. Bununla birlikte elektrot sistemi ölçüm ortamından sürekli alınan sinyalin on-line takibine olanak sağlar.

Aktif elektrotta kullanılacak olan materyal elektrokimyasal sensörlerde analizin performansını belirlenmektedir ve aktif elektrot seçimi büyük öneme sahiptir. Elektroaktif analitin aktif elektrodun yüzeyinde indirgenmesi veya yükseltgenmesi sonucu oluşan iyonlar referans elektrotla aktif elektrot arasında bir potansiyel fark oluşturur ve oluşan bu fark sinyale dönüştürülerek ölçüm yapılmaktadır. Redoks reaksiyonu sonucu elektriksel parametrelerde oluşan bu değişim; analitin tipine ve konsantrasyonuna bağlıdır (Lazcka vd., 2007).

Ayrıca elektrokimyasal sensörler optik esaslı sensörlere göre bulanık ortamda çalışabilme, karşılaştırılabilir enstrümental duyarlılık, minyatürleşmeye uygunluk gibi avantajlara sahiptir. Elektrokimyasal sensörler yaygın olarak; amperometrik, potansiyometrik ve kondüktometrik olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır

iii) Nanomekanik transdüserler

Piezoelektrik kütle sensörleri, rezonans frekanstaki değişime dayanarak santimetrekarede nanogram seviyesinde kütle değişimini ölçebilen sıklıkla kullanılan mikroanalitik sensörlerdir. Bu sensörler, osilatör yüzeyindeki kütle, yoğunluk veya vizkozite değişimine bağlı olarak osilatörün vibrasyonel rezonans frekansında meydana gelen değişimin ölçülmesi prensibine göre çalışmaktadır (Anonymous, 2003). Nanomekanik sensörler antikor-antijen etkileşimlerinde sıkça kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan nanomekanik sensörler; kuartz kristal mikrobals (QCM) ve yüzey akustik dalga (SAW) sensörleridir.

iiii) Termal transdüserler

Bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanarak substrat derişiminin belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Bütün biyolojik reaksiyonlar ekzotermiktir. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır.

1.2.3.İdeal Sensörden Beklenen Performans Kriterleri

i) Seçicilik

Seçicilik ideal bir biyosensör için en önemli parametrelerden biridir. Biyosensör sadece algılanması istenilen analite özgün olmalı ve diğer reaktiflere ilgi

göstermemelidir. Seçicilik yeterli düzeyde olmadığında ek işlemlerle bu eksiklik giderilmelidir.

ii) Kullanım ömrü

Biyosensörün performansında bir azalma olmadan hizmet ettiği ömre denir. Kullanım ömrünü etkileyen bir çok parametre vardır. En önemli parametre ise transduserin aktivitesindeki azalmadır.

iii) Kalibrasyon gereksinimi

İdeal bir biyosensörden beklenen kalibrasyona gerek duymaması yada mümkün olabilecek en az kalibrasyona gerek duymasıdır.

iv) Tekrarlanabilirlik

İdeal biyosensör elektrodunun aynı koşullar altında yapılan tekrarlanan ölçümlerde aynı sonuçları vermesi gerekmektedir.

v) Kararlılık

Belirli bir sürede biyosensörün duyarlılığındaki değişimleri dikkate alan kalite değeridir. Elektrot kararlılığın yüksek olması ideal biyosensörler için gereklidir. Kararlılık, kullanılan biyolojik materyallerin dayanıklılığına bağlıdır.

vi) Yüksek duyarlılık

Biyosensöre immobilize edilmiş olan biyolojik materyalin sadece belirli maddelere karşı duyarlı olmasıdır.

vii) Yeterli düzeyde tayin sınırı

Bir biyosensörün tayin sınırının belirli bir derişim değerinin altında olması gerekmektedir. Elektrot yüzeyinin büyüklüğü, tayin edilecek madde için biyolojik materyalin afinitesi, immobilize edilen madde miktarı gibi faktörler tayin sınırını etkilemektedir.

viii) Geniş ölçüm aralığı

Bir biyosensörün doğrusal veya doğrusala yakın çalıştığı cevap aralığı mümkün olduğunca geniş olmalıdır Böylece bir sensör kullanılarak, çok geniş bir derişim aralığında tayin mümkün olur.

ix) Hızlı cevap zamanı

Bir biyosensör, mümkün olduğunca kısa süre içerisinde sonucu verebilmelidir.

x) Hızlı geriye dönme zamanı

Bir biyosensörde, bir sonraki ölçüm için hazırlık süresi kısa olmalıdır. Gerekirse, uygun yongaların değiştirilmesi ile bir sonraki ölçüme hemen geçilebilmelidir.

xi) Basitlik ve ucuzluk

Bir biyosensör, mümkün olduğunca ucuz olmalı, analiz maliyeti düşük olmalıdır.

Ayrıca ideal biyosensörün bakım, onarım, muhafaza etme, taşıma, depolama zorlukları gibi zorlukları bulunmamalıdır.

xii) Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik

Bir biyosensör için elektrotların sterilize edilebilmesi ve boyutlarının küçültülmesi önemlidir. Sterilizasyonu kısıtlayan en önemli parametre, biyosensör yapısına giren biyolojik materyalin fiziksel dayanıklılığıdır (Hall, 1990).

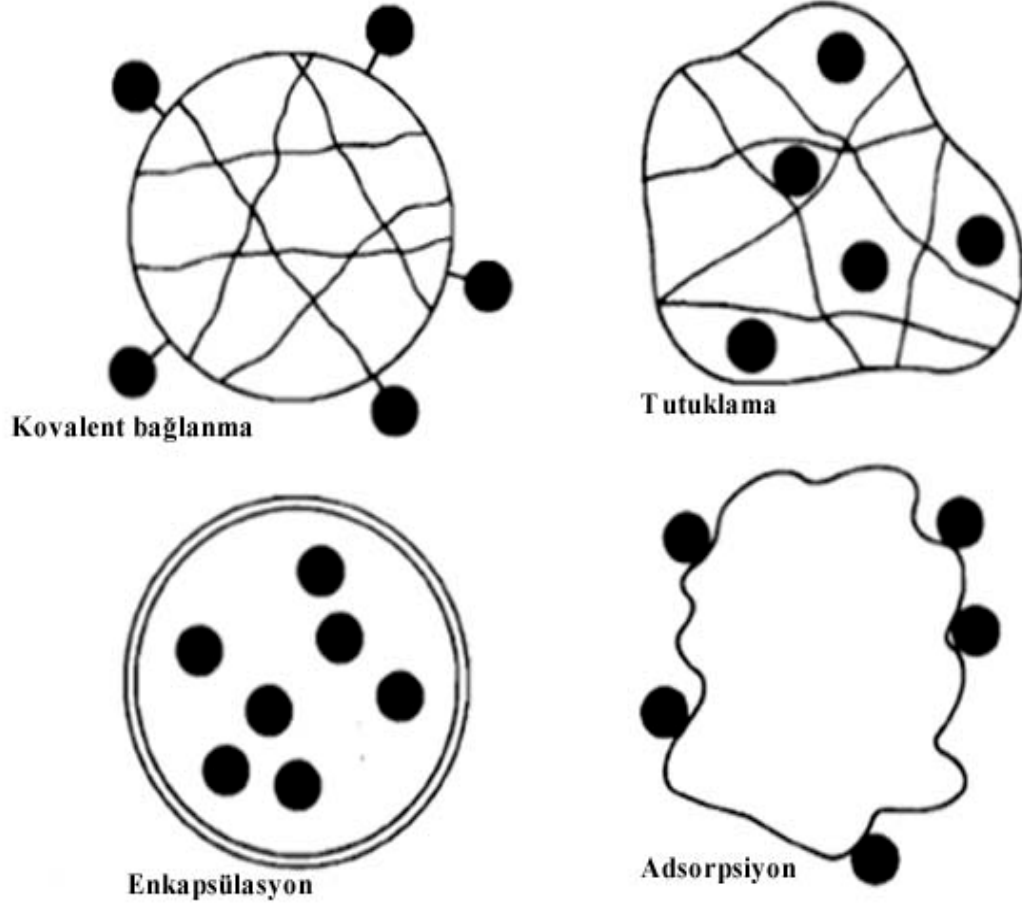
1.2.4. Biyosensörlerde İmmobilizasyon Yöntemleri

Biyosensörler farklı özellikteki iki elemanın (transdüser ve biyokomponent) kombinasyonu ile oluşan sistemler olduğundan uygun biyoreseptör ve dönüştürücü seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması önemli bir aşamadır. Analizlenmesi hedeflenen örneğe en uygun biyokomponent ve transdüser seçilmeli ve bu iki eleman birbirine bağlanmalı yani biyokomponent transdüser yüzeyine immobilize edilmelidir (Telefoncu, 1999).

Biyosensör immobilizasyonunda başlıca kullanılan yöntemler şöyledir:

- I. Adsorpsiyon (kovalent olmayan bağlama)
- II. Kovalent Bağlama
- III. Tutuklama
- IV. Çapraz Bağlama

Bu immobilizasyon yöntemleri şematik olarak Şekil 1.2' de gösterilmiştir.



Şekil 1.2 İmmobilizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi

Bir biyosensörün ömrü biyokomponentin transdüser yüzeyinde ne kadar süre tutulabildiğine bağlıdır ve immobilizasyonla biyokomponentin uzun süre yüzeyden ayrılmasını engellenmelidir. Enzimlerin immobilizasyonunda enzim aktif merkezi immobilizasyon esnasında zarar görmemeli ve enzim aktivitesinde sterik engel nedeniyle düşüş olmamalıdır.

1.2.4.1. Adsorpsiyon

İmmobilizasyonda kullanılan en basit yöntemlerden biridir. Biyokomponent transdüser yüzeyine non-kovalent etkileşimler (hidrojen bağları, çoklu tuz köprüleri, elektron geçiş kompleksleri, van der Waals kuvvetleri ile tutturularak uygulanır. Selüloz, silikajel, cam, hidroksiapatit, kollajen, kil, polimerik aromatik reçineler adsorpsiyonda en çok kullanılan adsorbanlardır (Tamayo vd., 2013).

1.2.4.2. Tutuklama

Makromoleküler yapıda ki biyoreseptörlerin sentetik veya doğal jel matriksler, yarı geçirgen membranlar, miseller ve mikro kapsüller içinde hapsedilerek etkin bir şekilde immobilize edilmesidir. Enzimler, organeller, hücreler ve antikörler polimer jel matrikslerde ve daha basit olarak diyaliz membranlarında tutuklanabilirler. Jel matriste tutuklamada başlıca akrilamit polimerleri, jelâtin tabakaları, nişasta, kalsiyum aljinat jelleri, silikon lastiği, polivinil klorür, polivinil alkol gibi malzemeler kullanılır. Kullanılan bir diğer tutuklama yöntemi de elektrokimyasal polimerleşmedir (Sassolas vd., 2012).

1.2.4.3. Enkapsülasyon

Enkapsülasyon; kimyasal reaktifler kullanarak biyokomponent ile adsorban arasında çözünmeyen bağlar oluşturarak yapılan bir immobilizasyon yöntemidir. Enkapsülasyon ajanı olarak en çok kullanılan kimyasallar glutaraldehit, hekzametilen diizosiyanat, 2-izosiyanato-4-izotiyasiyanato-toluen, 1,5-difloro- 2,4-dinitrobenzen, bismaleimido hekzan bisdiazobenzidin-2,2- disülfonikası'tır (Buiculescu ve Chaniotakis, 2012).

1.2.4.4. Kovalent Bağlama

Biyokomponentler doğrudan veya uygun bir film ve tabaka ile kaplanmış transdüser kovalent olarak bağlanabilirler. Kovalent bağlama, bağlanma yüzeyindeki veya biyokomponent üzerindeki tiyol (-SH), hidroksil (-OH), amin (-NH₂), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi fonksiyonel gruplarda gerçekleşmektedir. Fonksiyonel grupların olmadığı durumlarda çeşitli yöntemlerle (örneğin; SAM) fonksiyonel gruplar oluşturulabilir. Biyokomponentlerin aktif transdüser yüzeyine bağlanmayıp uygun bir materyalle kovalent bağlanarak immobilize edilen bir biyokomponentin transdüser yüzeyinde bir film veya tabaka oluşturarak bağlanması bir diğer kovalent bağlanma şeklidir.

Kovalent bağlama ile yapılan immobilizasyonda pH, sıcaklık, iyon şiddeti gibi çeşitli değişkenlere karşı direnç sağlanabilir ve bu şekilde biyosensörün ömrünü uzatılabilir. Fakat bağlanmanın aktif merkezde ki gruplar üzerinde gerçekleşmesi biyoaktif tabakada bir miktar aktivite kaybına sebep olabilir (Brena vd., 2013).

Kullanılan immobilizasyon yöntemine göre biyosensörlerin yaklaşık ömürleri aşağıda verildiği gibidir.

Adsorpsiyon: 1 gün,

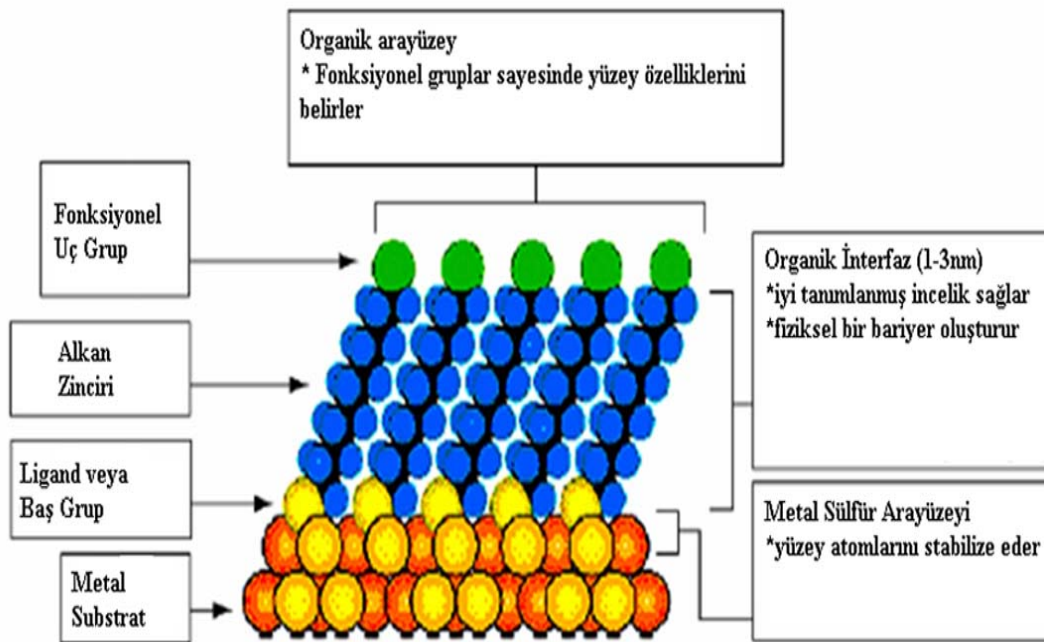
Membranda tutuklama: 1 hafta

Fiziksel tutuklama: 3-4 hafta

Kovalent bağlama: 4-14 ay

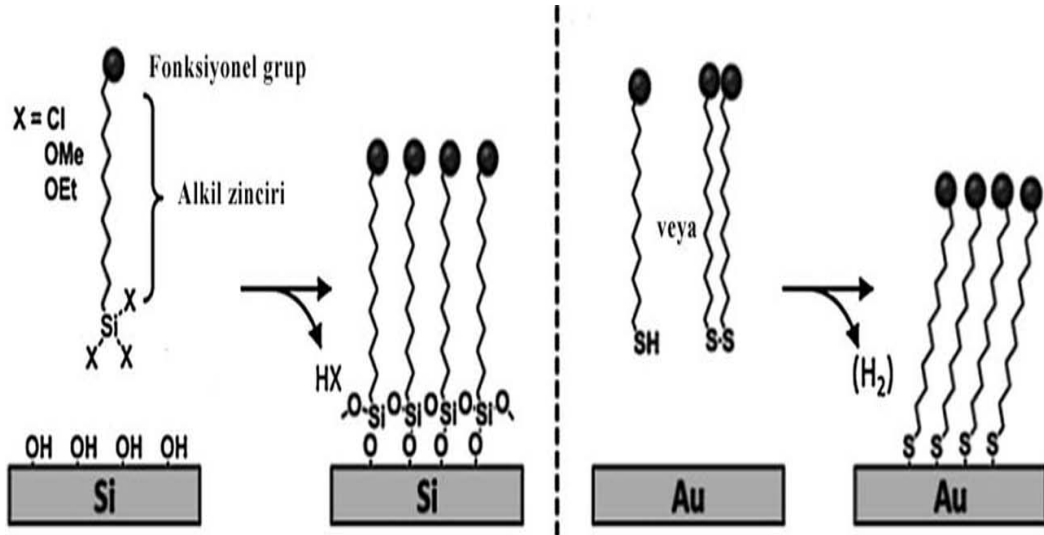
1.2.5. Kendiliğinden Oluşan Tek Tabaka (Self-Assembled-Monolayers, SAM)

Kendiliğinden oluşan tek tabaka (self-assembled monolayers, SAM) oluşumu metal yüzey ile seçilen organik molekülün baş grubu arasında oluşan güçlü bir kimyasal tutunma ile oluşmaktadır (Uvdal, 1998). Alkil zincirler arasındaki hidrofobik ve Van der Waals etkileşimleri sonucunda elektrot yüzeyinde çok iyi düzenlenmiş ve çok yoğun bir tek tabaka elde edilir. Elektrot yüzeyinde oluşan bu tek tabaka, çözelti içindeki elektro aktif türler ve elektrot yüzeyi arasındaki elektron transferi için kinetik bir bariyer olarak tanımlanır. SAM yöntemini diğer yöntemlerden ayıran en büyük avantajı uygun moleküllerin seçilerek tabaka kalınlığının kolaylıkla kontrol edilebilmesidir (Wink vd., 1997). Tek tabakanın oluşumunu ve paketlenme yoğunluğunu; substratın yapısı, pürüzsüzlüğü, çözücü, adsorbantın yapısı, adsorbantın tutunma süresi, sıcaklık ve adsorbant konsantrasyonu gibi pek çok parametre etkiler.



Şekil 1.3 SAM' in şematik gösterimi (Chen ve Li, 2006)

Bu yöndeki araştırmalar 1983 yılında başlamıştır. 10–20 metilen birimi ile tipik bir alkan zinciri olan molekülün baş grubu substrata çok güçlü ve tercihlili bir şekilde adsorpsiyonlanır. Tiyol (S-H-) baş grubu ve Au(III) substratı mükemmel bir şekilde çalışır. Çözeltideki tiyol molekülleri kolaylıkla altın yüzeye adsorplanırlar ve yüzeyden dışa doğru olan kuyruk kısmı ile beraber yoğun bir tek tabaka oluşturulur. Farklı kuyruk gruplarına sahip tiyol molekülleri kullanılarak kimyasal yüzey fonksiyonları çeşitlendirilebilir. Bunun yanı sıra, SAM tabakası oluşturulduktan sonra fonksiyonel kuyruk grupları çeşitli kimyasal reaksiyonlardan geçirilerek de yapı çeşitlendirilebilir (Uvdal, 1998). İdeal tek tabaka mükemmel bir şekilde sıralanmış, sıkıca paketlenmiş alkan zincirlerin düz ve pürüzsüz yüzeye tutunması olarak bilinir. Katı substratlar üzerinde moleküler tabakanın oluşturulmasına yönelik iki yöntem mevcuttur: Langmuir-Blodgett transferi ve kendiliğinden oluşma (SAM). SAM yapısı cam veya metal oksit ($\text{Al}/\text{Al}_2\text{O}_3$, SiO_2 , PtO , TiO_2 ve ZrO_2) yüzey üzerinde alkan silanlar kullanımıyla, metal yüzey üzerinde kuvvetli adsorpsiyon gösteren disülfür (R-S-S-R), sülfür (R-S-R) ve tiyol (R-SH) kullanımıyla stabil bir tek tabaka oluşturma prensibine dayanır. Farklı yüzeylerdeki tek tabaka oluşumları şekilde verilmiştir.



Şekil 1.4 Değişik yüzeylerdeki SAM yapıları

Tiyoller, sülfürler veya disülfürler uygun saflıktaki çözücünden doğrudan adsorplanır. Seyreltik çözeltideki alkan tiyoller bir saat içinde sıkı ve iyi paketlenmiş tek tabakayı oluşturur. Adsorpsiyon zamanı zincir uzunluğundan bağımsızdır, ancak

konsantrasyonun yüksek olması adsorpsiyon zamanını kısaltır. Yoğun tek tabakanın kendiliğinden hızlıca oluşmasına rağmen iyi bir düzenlenmenin gerçekleşmesi uzun zaman alır (Wink vd., 1997).

SAM, tiyolat veya sülfür molekülleri tiyol kimyasını kullanarak geniş aralıktaki bir metal yüzeyinde (örneğin altın, gümüş, bakır, platin ve nikel) kendiliğinden düzenlenen tabakalar oluştururken, silan moleküllerinin hidroksil terminalli yüzeylerde (örneğin Al/Al_2O_3 , ITO, PtO , TiO_2 ve ZrO_2) veya siloksi bağlarının, organik asit veya bifonksiyonel amfifilik özelliklerinin çok sayıda metal ve metal oksit yüzey üzerinde ve diğer moleküllerin veya bileşiklerin metal yüzeyleri üzerinde tabakalar oluşturması sonucunda silan tek tabakaları oluşur.

1.2.5.1.SAM Tabakasının Yapısı ve Stabilitesi

a)Yüzeyin Hazırlanması

Substratın özellikleri, özellikle yüzey topografisi veya pürüzlülüğü, kendiliğinden oluşma yönteminde ve oluşan tek tabakanın özellikleri üzerinde etkilidir. Substratın modifikasyondan önce gerçekleşen yüzey ön hazırlığı ile temiz ve aktif bir yüzey elde edilir. Yapılan ön hazırlık, substratın fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal olarak temizlenmesidir (Chen vd., 2006).

Substratın temizliği ve kristalize yapısı genellikle pinhole şeklindeki boşlukların dağılımının nicel olarak hesaplanmasıyla belirlenen tabaka yoğunluğu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Chaki vd., 2002).

b) İmmobilizasyon Tekniği

Genel olarak SAM yapılarının substrat yüzeyine immobilizasyonu elektrotun adsorblanacak maddenin çözeltisine 24 saat ve üzerinde daldırılmasıyla gerçekleştirilir. Bu daldırılma süreci boyunca, elektrot yüzeyine SAM yapılarının adsorpsiyon kinetiği genellikle iki aşamada tanımlanır. İlk olarak film tabaka oluşumunun %80–90'lık kısmı genellikle birkaç dakika içinde hızlı bir şekilde gerçekleşir, bunun devamında ise daha yavaş bir süreç başlar ve 10 ila 20 saat arasında hem kalınlık hem de yüzeyin kuruması denge değerine ulaşır. Bu nedenle, genellikle substratın SAM çözeltiler içindeki inkübasyon zamanı 24 saatten daha fazla olarak ayarlanır, daha uzun zaman dilimi daha yüksek kalitede SAM yapıların oluşmasını ve yüzeyin mümkün olduğunca SAM ile kaplanmasını sağlar. Bu

inkübasyon zamanının çeşitliliği daha çok kullanılan SAM çözeltisine bağlıdır (Chen vd., 2006).

c) Yüzey Aktif Maddeler (Sümfaktanlar)

Farklı sümfaktanların elektrolit çözeltisi içinde bulunması, farklı yollardan substrat üzerinde oluşan SAM yapısındaki elektron transfer verimini ve bariyer özelliklerini düzenlemektedir (Chen vd., 2006).

d) Çözücü

Çözücü seçiminin kinetik oluşum ve kendiliğinden oluşum mekanizmaları üzerindeki etkileri karışık ve çok iyi anlaşılamamış bir konudur. Yapılan bir takım araştırmalarla adsorplanan çözücünün, tek tabaka oluşumundaki etkisi ortaya çıkarılmıştır. Çözücünün SAM yapısının doğasındaki davranışı, geçirgenliğine etkisi, hidrofobik/hidrofilik karakteri ve diğer ara yüzeyle ilgili özellikleri SAM tipini belirler. Çözücü-substrat ilişkisi çözeltiden tiyol gruplarının adsorplanma hızını etkiler (Chen vd., 2006). Örneğin, eğer tek tabaka çözelti ara yüzeyinde herhangi bir spesifik etkileşim varsa, tek tabakanın içerdği hidrofilik fonksiyonel gruplar çözeltideki iyonların elektrot yüzeyine nüfuz etmesini sağlar.

e) Sıcaklık

Sıcaklık substrat yüzeyindeki SAM yapısının elektrokimyasal ve yapısal özelliklerini etkileyen bir diğer faktördür. SAM yapıların içerdği kimyasal fonksiyonel gruplar karmaşık etkileşimler göstermektedir. Büyük oranda sıcaklıktan etkilenen bu karmaşık etkileşimler; elektrostatik itme, sıkı paketlenmiş bir yapıda sterik etkileşimler, hidrojen bağlarının stabilizasyonudur. Bu durumda SAM tabakasının elektrokimyasal özellikleri sıcaklığın etkisi ile değişir

Zincir uzunluğu diğer bir önemli parametredir. Kristalin doğasını elde etmek için zincir uzunluğunun kontrolü ile yoğun tek tabaka elde edilir (Chaki vd., 2002).

1.2.5.2.Biyosensörlerde SAM

Antikorlar, nükleik asitler ve enzimler veya organize sistemler gibi seçici olarak tercih edilen biyomoleküller moleküler tanıma reaksiyonlarında kullanılır. Kullanılan bu biyomoleküllerin immobilizasyonları oldukça önemlidir.

Biyosensörlerin yüksek spesifiklik sağlamasının yanında; elektrokimyasal sensörlerin renkli ve bulanık çözeltilerde geniş bir konsantrasyon aralığında doğrudan ölçüme olanak sağlamak gibi avantajları vardır. Biyosensörler düşük

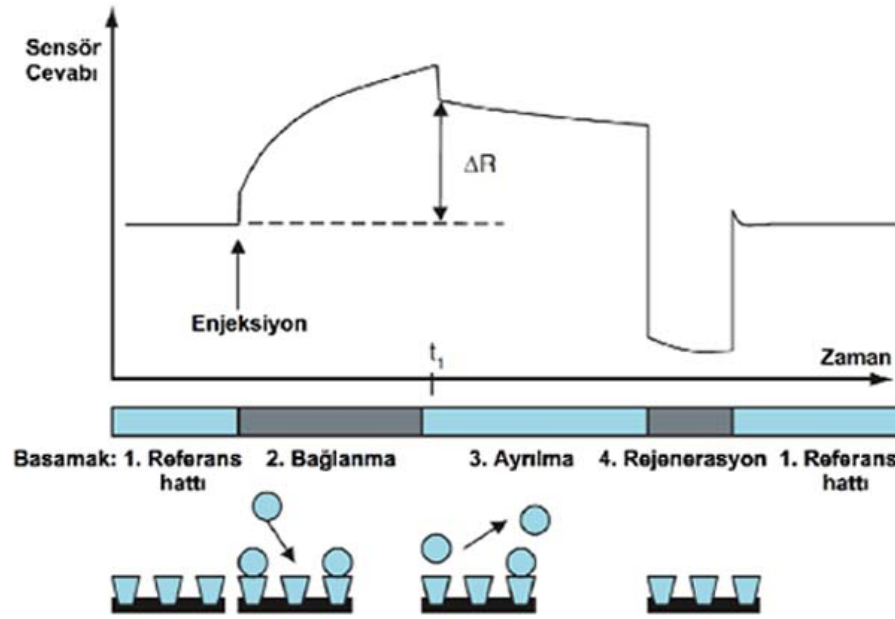
maliyete, hıza, basit kullanıma sahip analitik cihazlardır. Ayrıca biyolojik algılayıcı elementlerinin seçiciliği örnek ön hazırlığına ve fazla miktarda örneğe bağlı değildir ve kompleks karışımlarda gerçek zamanlı analiz için çok yüksek spesifiklikte cihazların geliştirilmesine olanak sağlar.

Gelişen sensör teknolojisinin yüksek duyarlık, kısa ölçüm süresi, gereksinime göre işlem akışı, ölçüm ve analiz maliyetlerinde azalma, otomatik ölçüm ve ayar sistemlerinin devreye sokulması, multi sensör sistemlerinin geliştirilmesi, aynı anda birçok analitin tayini gibi avantajlara sahip birçok yeni uygulamaya olanak sağlaması beklenmektedir.

Biyoreseptörlerin, antikorların ve enzimlerin uzun süreli stabilizasyonundaki sorunlar, sensörlerin sterilize edilebilirlikleri, *in vivo* uygulamalar için biyouygunluk sorunları, spesifik olmayan adsorbsiyonlar, enzim bazlı sensörlerde immobilizasyon ve mediator sorunları, gıdalardaki diğer bileşenlerin oluşturduğu girişimin azaltılmasındaki problemler, sensörlerin küçültülmesindeki sorunlar biyosensörlerin ticari olarak üretilmesine engel olan durumlar arasında gösterilebilir.

1.3. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR - Surface Plasmon Resonance)

SPR spektroskopisi soy metal yüzeyinde dielektrik ortamının kalınlığını ve kırılma indeksini karakterize etmek için kullanılan yüzey hassas bir tekniktir (Yusmawati vd., 2007). SPR sensörleri sadece metal yüzeye olan sınırlı bir yakınlığı ya da belirli bir hacmi inceleyebilmektedir. Sinyalin alındığı elektromanyetik alanın nüfuz derinliği genel olarak birkaç yüz nanometreyi geçmemektedir ve SPR yüzeyindeki metal tabakadan uzaklaştıkça üssel olarak azalmaktadır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 SPR sensörlerinde analiz basamaklarının şematik gösterimi (Tudos ve Schasfoort, 2008)

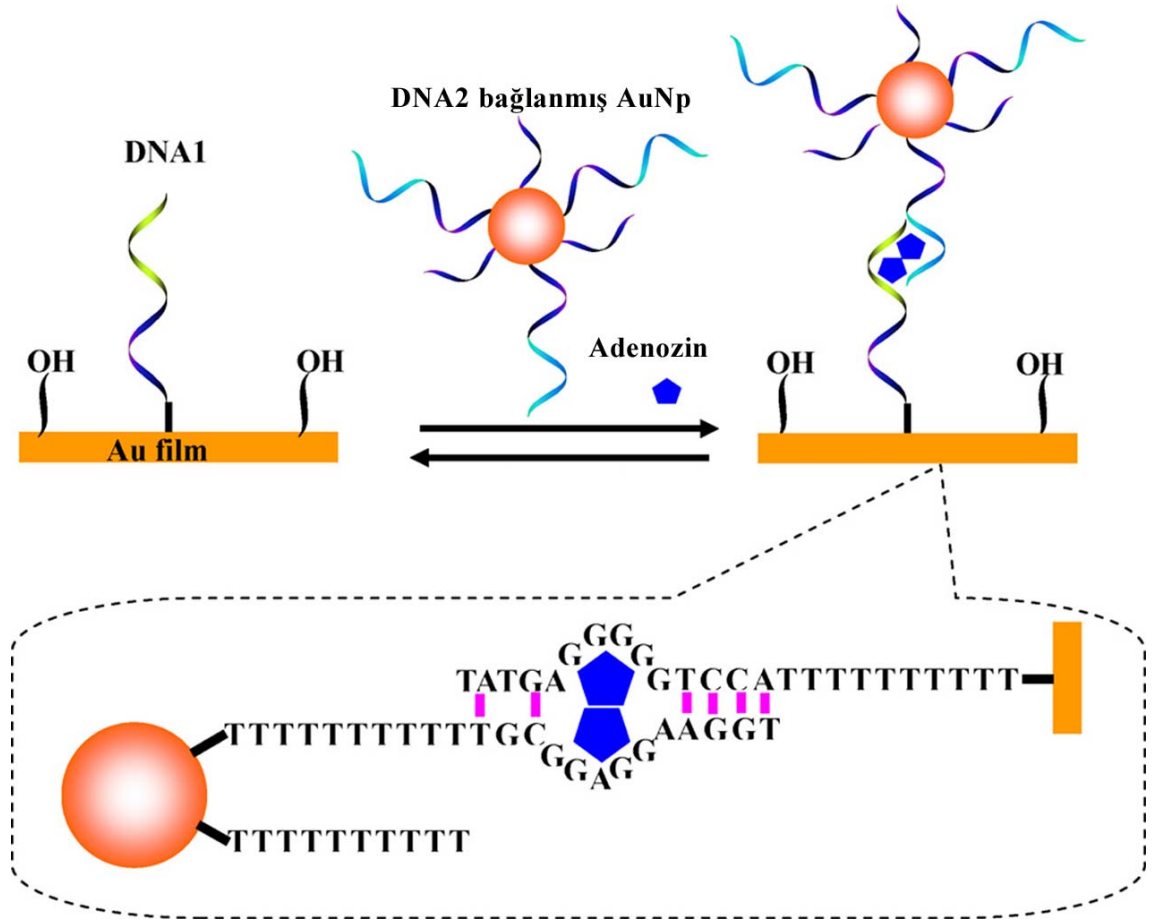
Son yıllarda yüzey plazmon rezonans sensörlerle ilgili bir çok çalışma yapılmıştır ve polipirol filmler gibi iletken polimerlerin, optik ve elektriksel özelliklerinin *in situ* araştırılmasında etkili bir optik teknik olduğu görülmüştür (Damos ve Kubota, 2006). SPR tekniğinin kullanıldığı bir çalışmada, polipirol (PPy) ve 2-merkeptobenzotiyozol filmleri ile ağır metal tayini gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 0,01 ppm algılama sınırı ve 0,1-10 ppm aralığında doğrusal sensör cevabı elde edilmiştir (Yu vd., 2004). Yüzey plazmon rezonans tekniği, çeşitli kimyasal ve biyolojik sensör uygulamaları için güçlü bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Zhang vd., 2003).

SPR, ışığın çok ince bir metal yüzeyinde rezonans koşullarını sağlaması ile metal ve bir dielektrik ortam arasında yayılan yük yoğunluklu dalganın oluşturulması prensibi ile çalışır. Bu yük yoğunluklu dalga, tek dalga boylu ve dik polarize bir ışık kaynağı ile sağlanır. Rezonans koşullarında, ışığın enerjisi, metal dielektrik (yalıtkan) madde ara yüzeyinde hareket eden yük yoğunluklu dalgaya harcanır. Bu dalga, ara yüzeyde bulunan dielektrik ortamının yoğunluk ve yük yoğunluğuna (bir başka deyişle kırılma indisinin reel ve imajiner köklerine) bağlıdır. Bu nedenle, dielektrik ortamda gerçekleşen bir fizikokimyasal olay, örneğin moleküler birikim, rezonans

koşullarının şiddetli bir şekilde değişmesine ve çok küçük değişimlerinde sensör üzerinde büyük sinyal değişimlerine neden olmasını sağlar (Homola, 2006). SPR, yüzey ve ara yüzey çalışmalarında büyük avantajları olan basit bir teknik olarak kabul görmektedir. İnce film uygulamalarında, boyutunun küçük olması, hızlı analiz imkânları, maliyetinin düşük olması ve referans çözelti gibi ilave çözeltilerin kullanılmasına gerek duyulmaması nedeniyle sıklıkla kullanılan bir tekniktir (Zhang vd., 2007).

Yüzey plazmon rezonans ile ilk çalışmalar Ritchie ve arkadaşları (1968) tarafından yapılmıştır. İlerleyen yıllarda, Kretschmann tarafından geliştirilen ve günümüzde de Kretschmann konfigürasyonu olarak bilinen, çoğu ticari SPR sistemlerinde kullanılan konfigürasyonu kullanarak ince gümüş filmlerin sıcaklığa bağlı plazma rezonans emisyonlarını ve ince filmlerin optik sabitlerini (Kretschmann, 1969) içeren bir çalışma yayınlamıştır. SPR tekniğine dayalı ilk kimyasal algılama deneyi Liedberg arkadaşları (1983) tarafından yapılmıştır. SPR rezonans koşulunu sağlayan hafif bir metal ve dielektrik malzeme arasındaki ara yüzey boyunca bir yük yoğunluklu dalganın monokromatik ve p-polarize ışık demeti ile uyarıldığı optik bir süreçtir (Kurihara ve Suzuki, 2002). SPR sistemleri günümüzde biyomoleküler etkileşim çalışmalarında kinetik ve denge sabitlerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir.

Kırılma indislerindeki değişimlerden dolayı geleneksel yüzey plazmon rezonansı (SPR) biyosensörler kullanılarak küçük molekülleri doğrudan tespit etmek oldukça zordur. Wang ve arkadaşları (2011) SPR ile yaptıkları bir çalışmada, adenozin gibi küçük molekülleri yüksek hassasiyet ile belirlemek için bölünmüş aptamer parçaları SPR biyosensör yapımında kullanılmıştır (Şekil 1.6). Adenozin için bir ucunda altın film olan diğer ucu altın nanopartikül (AuNP) ile modifiye edilmiş olan bir aptamer tasarlanmıştır. Adenozin varlığında, çift DNA sarmalına sağlam aptamer yapısı takılmıştır ve AuNPs etiketli adenozin-aptamerin kompleksi Au film oluşmuştur. Bu çalışmada SPR biyosensörünün adenozin algılama sınırı 1.5 pM olarak belirlenmiştir.



Şekil 1.6 Wang ve arkadaşları (2011)' nın yaptığı çalışmanın şematik gösterimi

1.3.1. SPR' de Kullanılan Analiz Yöntemleri

Optik sensör uygulamalarında analiz yöntemi tayin edilmek istenen hedef molekülün büyüklüğü, biyomoleküler tanıyıcı elementin hedef molekülü bağlama karakteristiği, hedef molekülün konsantrasyon aralığı ve örnek matrisi gibi parametrelere bağlıdır (Dosta'lek vd., 2006). Optik sensör yapısına dayalı biyosensör analizlerinde genel olarak kullanılan formatları şunlardır (Şekil 1.7).

1.3.1.1. Doğrudan Analiz Yöntemi

Bu analiz yönteminde biyomoleküler algılama elemanı (örneğin antikor) sensör yüzeyine direk olarak immobilize edilmektedir. Daha sonra analit çözeltisi sensör yüzeyine gönderilmekte ve analitin sensör yüzeyindeki algılayıcı elemene bağlanması ile meydana gelen fizikokimyasal değişimi belirlenmektedir (Dosta'lek vd., 2006).

1.3.1.2. Sandviç Yöntemi

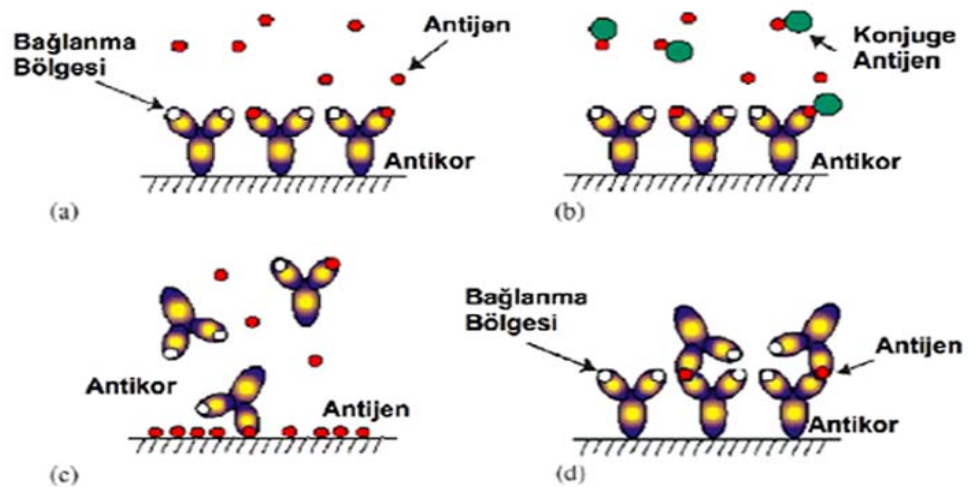
Doğrudan analiz yönteminin spesifikliğini arttırmak ve ölçüm sınırını düşürmek için sandviç yöntemi sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde sensör yüzeyinde tanıyıcı ve hedef molekül etkileştirildikten sonra sensör yüzeyine ikinci tanıyıcı molekül gönderilmektedir (Homola, 2008).

1.3.1.3. Yarışmalı yöntem

Bu yöntemde iki analit sensör yüzeyindeki tanıyıcı tabakaya bağlanmak için yarışmaktadır. Analitlerden biri serbest halde iken diğer analit bovin serum albumin (BSA) ya da kazein gibi büyük bir moleküle bağlanmaktadır. Tanıyıcı molekül sensör yüzeyine immobilize edildikten sonra iki analitide içeren çözelti sisteme verilmekte ve serbest analit ile büyük molekülle bağlanmış analit sensör yüzeyine bağlanmak için yarışmaktadır. Bağlanma sinyali analit konsantrasyonu ile ters orantılıdır (Mazumdar, 2008).

1.3.1.4. İnhibisyon yöntemi

İnhibisyon yönteminde, sabit konsantrasyondaki tanıyıcı molekül, bilinmeyen konsantrasyonda analit içeren örnek ile karıştırılmakta ve önceden yüzeyine analit immobilize edilmiş sensör yüzeyine gönderilmektedir. Çözelti içerisindeki analite bağlanmayan tanıyıcı molekül sensör yüzeyine bağlanmaktadır (Schasfoort vd., 2008).



Şekil 1.7 Analiz yöntemlerinin şematik gösterimi, a) Doğrudan analiz yöntemi, b) Sandviç yöntemi, c) Yarışmalı yöntem, d) İnhibisyon yöntemi

1.3.2. SPR'nin Cıva Tayininde Kullanılması

Eser metallerin analizi için bir çok teknik mevcuttur. Örneğin; atomik absorpsiyon (AA), atomik emisyon ve flöresans, indüktif olarak eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS) ve elektrokimyasal teknikler (iyon-seçici potansiyometrik ve anodik sıyırma voltametri gibi) (Skoog vd., 1992). Bunların tam ve hızlı çözüm yeteneklerine rağmen bu tekniklerin her biri belli dezavantajlara sahiptir ve son zamanlarda analitik ilgi optik sensörler geliştirmeye odaklanmıştır. Bu yöntemlerin bütün uygulamaları kimya ve cihaz bilgileri gerektirir ve kesinlikle cihazlara ihtiyaç duyulmaktadır (Tang vd., 2010). Optik sensörlerin boyut, maliyet etkinliği, basitlik, referans çözeltiye ihtiyaç duyulmaması ve saha çalışmalarına uygulanabilirliği gibi avantajları vardır (Zhang vd., 2002).

ICP-MS'nin önemli bir dezavantajı cihazın yüksek maliyetli olmasıdır. Bununla birlikte cihaz oldukça büyüktür ve bir elementin farklı yük hallerine karşı seçici değildir. Atomik absorpsiyon spektroskopisi (AAS) tekniğinin önemli dezavantajı ise kalibrasyon eğrilerinin lineer olmamasıdır (özellikle 0.5 - 1 absorbans değerlerinde). İndüktif eşleşmiş plazma atomik emisyon spektroskopisinin (ICP-AES) işletme ve kurulum maliyetleri oldukça yüksektir. ICP-AES'nin bir başka dezavantajı ise birçok emisyon hattının sebep olduğu spektral etkileşimlerdir. Voltametrik yöntemler, basit, ucuz ve taşınabilirlerdir fakat karmaşık numune girişimlerinden çok fazla etkilenmektedirler. Anodik sıyırma voltametrisinde sadece amalgam oluşturan türlerin tayini yapılabilmektedir (Zhang vd., 2007).

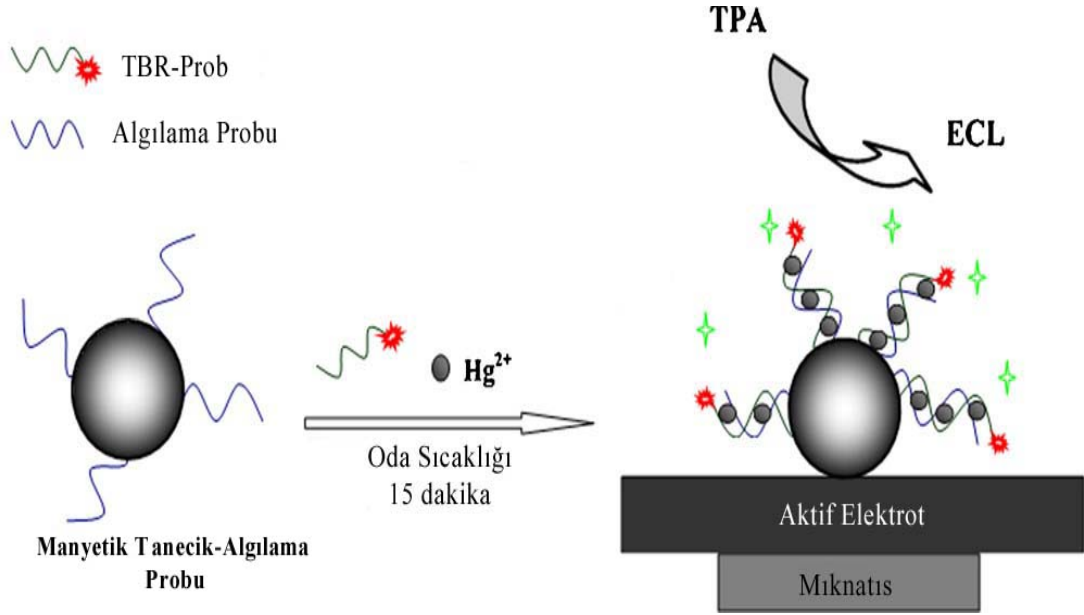
Oysa ki bu tür dezavantajlara sahip olmayan optik sensörler günümüze kadar sürekli gelişme içindedir. Ancak hala etiketleme ajanlarının kullanılmasına yada taşıyıcıların hedef metal iyonu için seçici afiniteye sahip olmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun aksine SPR spektroskopisi etiketleme ajanlarına gerek olmayan bir optik sensör olarak bilinir (Whelan vd., 2002). Optik sensörlerin kullanıldığı bir çalışmada, adsorplama bileşeni (prob) olarak 1,6 Hekzenditiyol (HDT) kullanılmıştır. Bu çalışmada yalnızca cıvaya spesiflik belirlenmiş ve 1 nM'lık algılama sınırı elde etmişlerdir. Yine aynı çalışmada seçiciliği di-2,4,4-trimetilpentil fosfinik asit (CYANEX 272) kullanarak çinkoya (Zn^{2+}) kaydırmışlardır (Chah vd., 2004). Yüzey plazmon rezonans sensörleri ağır metallerinin sulu ortamlardan tayin edilmesinde alternatif bir metottur. SPR yöntemi, yüzey duyarlı bir tekniktir, bir başka deyişle yüzeyde gerçekleşen bir fizikokimyasal değişikliği belirler. SPR spektroskopisinde

bir soy metal yüzeyinde kalınlık ve dielektrik ortamının kırılma indisi ölçülür (Yusmawati vd., 2007).

SPR yüzey ve ara yüzey çalışmaları için basit bir optik teknik olarak kabul edilir ve biyomoleküllerin araştırılmasında büyük bir potansiyele sahiptir (Wu ve Lin, 2005). SPR'nin yaygın olarak ara yüzey ve ince film çalışmaları için kullanılacak etkili bir optik teknik olduğu çalışmalarla ispat edilmiştir (Mendelez vd., 1997). Daha önce de belirttiğimiz diğer cıva iyon analiz teknikleri ile karşılaştırıldığında, SPR spektroskopisi büyüklüğü, maliyet-etkililik, basit örnek hazırlanması, hızlı ölçüm yeteneği ve referans çözeltisine ihtiyaç duyulmaması avantajları vardır. Ağır metal iyonlarına SPR optik sensörün yüksek bir spesifiklikte olması ince altın film üzerine uygun bir malzemeden ince bir tabaka geliştirilmesi ile elde edilebilir (Forzani vd., 2007; Wu ve Lin, 2004).

Geçtiğimiz on sene içerisinde yüzey plazmon rezonans sensörleri geniş kapsamda çalışılmıştır. Örneğin, Chah vd., (2004) Hg^{2+} iyonunu seçici olarak adsorplayan 1,6-hekzanditiyol (HDT) molekülünü SPR yüzeyine tek tabaka olarak immobilize ederek Hg^{2+} iyonunu Pb [II], Ni [II], Zn [II] ve Cu [II] gibi ağır metal iyonlarının arasından seçici olarak tayin etmişlerdir. Bu çalışmada 100 μM Hg^{2+} iyonunun seçimli olarak tayin edilebildiğini bulmuşlardır.

Li vd., (2010) manyetik tanecik esaslı elektrokemilimünesans algılama yöntemiyle yeni ve oldukça hassas bir Hg^{2+} dedektörü geliştirmişlerdir. T- Hg^{+2} -T (Timin- Hg^{+2} -Timin) spesifik etkileşimini kullanılarak geliştirilen bu dedektör, manyetik taneciğe tutturulmuş algılama probu ve TBR (tris 2,2-bipiridin rutenyum (II)) ile etiketlenmiş bir diğer oligonükleotid probun aynı anda kullanılması ile çalışmaktadır. Bu iki DNA probu çift-sarmallı bir yapı meydana getirmektedir ve bu sayede bir manyetik alan ile elektrodun yüzeyi üzerinde toplanabilmektedir. Elektrot üzerinde, TBR etiketler ve tripropilamin (TPA), özel yapılmış elektrokemiluminesan (ECL) sistemi tarafından tespit edilen fotonlar yayarak tepki verirler. Bu çalışmada 5 nM seviyesinde Hg^{2+} tayini gerçekleştirilmiştir. Kullanılan sistem Şekil 1.8' de gösterilmiştir.



Şekil 1.8 Cıva algılamada kullanılan manyetik tanecik bazlı ECL analiz sisteminin şematik gösterimi

Yapılan başka bir çalışmada Hg^{+2} iyonlarının SPR ile tayininde kitosan kullanılmıştır. Kitosan, kitosan zinciri içerisinde çok sayıda amino grubu barındırdığından çok daha yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Bu çalışmada çapraz bağlı kitosan kullanılarak 0,5 ppm'lik Hg^{+2} iyon algılama sınırına ulaşmışlardır. Ancak bu çalışmada herhangi bir diğer ağır metal ile karşılaştırma yapılmamıştır (Fen vd., 2011).

Abdi vd. (2011) yüzey plazmon rezonans sensörünün yüzeyinde eser miktarda cıva ve kurşun iyonlarının tayini için polipirol-kitosan (PPy-CHI) polimer kompoziti oluşturmuşlardır. Bu çalışmada seçici adsorpsiyonu PPy-10 CHI film sağlamaktadır. 50 ppb Hg ve Pb tayininde, elde ettikleri sonuçlar, SPR sensörün Pb^{2+} 'ye daha duyarlı olduğunu göstermiştir.

Literatürde karşılaşılan bir diğer ağır metal algılama tekniği renk değişimine (kalorimetrik) yöneliktir. Kalorimetrik tayin yöntemleri, karmaşık ekipmanların kullanılması gerekmeksizin analizin gerçekleşmesini sağlar. Nanoparçacıkların çözelti içerisindeki yerel plazman rezonans davranışları nanoparçacıkların doğrudan sensör olarak kullanımını sağlar. Örneğin Chao ve arkadaşları (2012) protein ile modifiye edilmiş altın nanoparçacığı prob olarak kullanarak ağır metal tayini gerçekleştirmiş. Bu çalışmada biotin-streptavidin etkileşimi kullanılarak 1 μ M ile 50 nM arasında Hg^{+2} tayini gerçekleştirmişlerdir.

Altın nanoparçacıklarının kullanıldığı bir diğer çalışmada, DNA sekansı ile modifiye edilmiş olan Au nanopartiküllerin kullanımı ile SPR sensörü kullanılarak Hg^{+2} tayini gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada yüzeye immobilize edilmiş prob oligonükleotidlerinin üzerine Hg^{+2} örneği ve komplementer olmayan oligonükleotid çözeltisi gönderilerek bir sandviç algılama sistemi yapılmıştır. SPR sinyalini arttırmak için Au nanopartikülleri ile modifiye edilmiş eşlenik olan oligonükleotid göndererek SPR sinyalini güçlendirmişlerdir. Bu çalışmada seçici (Ni, Mn, Mg, Fe, Zn, Cu, Pb iyonları içeren çözeltilerde tayin gerçekleşmemiştir) bir şekilde Hg^{+2} tayini 10nM'e kadar gerçekleştirmişlerdir (Chang vd.,2011).

1.4. Elipsometre

Elipsometre yönteminin tarihi 19. yüzyılın başlarına kadar uzanmaktadır. Ancak son on yılda, hem aygıtların kontrolü hem de sonuçların eş zamanlı analizi için bilgisayarların geniş şekilde kullanılması ve ayrıca ince film karakterizasyon tekniklerindeki gelişmeler Spektroskopik Elipsometriyi (SE) çok kullanılan ve tercih edilen bir yöntem haline getirmiştir. SE yöntemi herhangi bir ortam içerisindeki ince filmlerin incelenmesi için kullanılır. Bu yöntemle film parametreleri, film kalınlığı, bileşimi, optik özellikleri ve yüzey yapısı incelenebilmektedir. SE yönteminin bir diğer kullanım alanı özellikle kuantum kuyucuklarının ve süper örgü yapılarının etkin dielektrik fonksiyonlarının tayinidir. Bu yöntem ayrıca yarı iletken karakterizasyonunda ve özellikle ara yüzeylerin büyütülmesinde, bu yüzeylerin kontrolünde ve incelenmesinde yaygın biçimde kullanılmaya başlamıştır (Tompkins ve McGahan, 1999).

SE yöntemi bir elektromanyetik dalganın bir ara yüzeyden yansıması durumunda kutuplanma halindeki değişiminin bir ölçümüdür. Optik özelliklerin tayini genelde iki veya üç fazlı modellere dayalı olarak gerçekleştirilir. Boşluk ve malzemedan oluşan iki fazlı basit bir ortamda yüzey etkileri ihmal edildiğinde homojen malzemenin bulk dielektrik fonksiyonu oldukça basittir ve aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir (Tompkins vd., 1998).

$$\hat{\varepsilon} = Sn^2\varphi \left[1 + \tan^2\varphi \left(\frac{1-\rho}{1+\rho} \right)^2 \right] \quad (1.1)$$

Burada ρ yukarıda belirtilen ışığın ara yüzeyde yansımalarıyla kutuplanma durumunda oluşan değişmeyi temsil eden temel bir parametredir. ϕ ise ışığın yüzeye gelme açısıdır. Ancak bir ince filmin söz konusu olduğu üç fazlı modelde dielektrik fonksiyonunu bu basit ifadeyle temsil etmek artık mümkün değildir. Sadece hava-film-alt tabakadan oluşan yapılar için değil, temelde iki fazlı olsa bile yüzey kusurları, bozunmalar ve kirlenmeler içeren yapılar için de söz konusu ifade (iki fazlı model) geçerliliğini yitirmeye başlar.

SE yöntemi ile ifade edilen dielektrik fonksiyonu, gelen ışığın malzeme içerisine nüfus ettiği bölge boyunca ortalama bir dielektrik fonksiyonudur. Bu nedenle yukarıdaki ifadede verilen dielektrik fonksiyonu genellikle Pseudo- veya etkin-dielektrik fonksiyonu olarak adlandırılır. Eğer malzeme yapısı çok karmaşık değilse bu etkin dielektrik fonksiyonu ya da kalınlığı tayin edilir. Yapının çok karmaşık olduğu, dolayısı ile alt tabaka ve film özelliklerinin birbirinden ayırt edilemediği durumlarda bile etkin dielektrik fonksiyonunda yüzey tabakalarının varlığının etkisi genellikle çok kolay gözlemlenebilir ve sonuçta bu tabakanın özellikleri belirlenebilir.

Elipsometrenin önemli bir üstünlüğü, özellikle ince film yapıların büyütülmesi esnasında yüzey kalitesinin, film kalınlığının ve dielektrik özelliklerinin eş zamanlı olarak kontrol edilmesine olanak sağlamasıdır. Çünkü elipsometrik ölçümler çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilir.

SE yönteminin önemli bir kullanım alanı da çok ince kalınlıktaki yapıların dielektrik fonksiyonlarının tam tayin edilmesidir. Bu yöntem yardımıyla birkaç atomik tabaka kalınlığındaki yarı iletken filmlerin bile gerçek dielektrik fonksiyonları hassas biçimde belirlenebilmektedir. Özellikle en küçük kareler regresyon analizi ile birleştirildiğinde SE yöntemi;

1. Çok tabakalı yapıların kalınlık profili,
 2. Her bir tabakanın kalınlığı ve bileşimi,
 3. Her tabakadaki kristal derecesi,
 4. Muhtemel bir üst kirlenme tabakasının kalınlık ve özellikleri,
 5. Yüzeyin mikro yapıdaki pürüzlü tabakasının kalınlığı,
- hakkında önemli bilgiler sağlayabilmektedir.

Elipsometri, polarize monokromatik ışık düzlem dalgasının belirli bir açıda bir yüzeyden yansması ile elde edilen polarizasyon değişiminin ölçülmesine dayanır (Tompkins ve McGahan, 1999). Bir elipsometre ile ölçülen temel büyüklük kompleks yansıma oranıdır:

$$\rho = \frac{\chi_r}{\chi_i} \quad (1.2)$$

Burada χ_r ve χ_i sırasıyla yansıyan ve gelen ışığın polarizasyon durumunu gösterir. Optik olarak izotropik olan tüm yüzeyler ile bir kaç anizotropik yüzeyler için yukarıdaki eşitlik, aşağıda belirtildiği gibi basitleştirilebilir:

$$\rho = \frac{R_p}{R_s} = \tan\psi e^{i\Delta} \quad (1.3)$$

Burada, R_p ve R_s sırasıyla, geliş düzlemine paralel ve dik olarak polarize olmuş ışığın kompleks yansıma katsayılarıdır. Psi (Ψ) ve Delta (Δ) parametreleri elipsometrik açılar olarak adlandırılır ve bir elipsometreden deneysel olarak elde edilen büyüklükler olarak nitelendirilebilir. Ancak gerçekte ölçülen büyüklükler kullanılan cihaz yapılandırılmasına bağlıdır. Optik olarak izotropik olmayan yüzeyler, farklı üç X_i noktasında ve üç çift delta (Δ) ve psi (Ψ) verisinin elde edildiği tam karakterizasyon ölçümleriyle analiz edilir.

1.5. Aptamer Teknolojisi

Aptamerler, *in vitro* olarak seçilen fonksiyonel moleküllerin mükemmel bir örneğidir. 1990 yılında, iki grup bağımsız olarak RNA sekanslarının izolasyonu için spesifik olarak hedef moleküllere bağlanabilen *in vitro* seçim ve amplifikasyon geliştirmiştir (Tuerk ve Gold, 1990). Sonradan aptamer olarak adlandırılan bu fonksiyonel RNA oligonükleotidleri Latince'de "uygun" anlamına gelen *aptus*'den türetilmiştir (Jayasena, 1999). Daha sonra, DNA-temelli aptamerlerde bulunmuştur (Ellington ve Szostak, 1992).

Aptamer teknolojisi, keşfedilmesinden itibaren, bilimsel ve endüstriyel topluluklarda büyük ilgi görmüştür. Sonrasında ki yaklaşık 20 yıllık çalışmalarla, özellikle hızlı ve otomatik seçme teknolojilerin geliştirilmesi ile DNA ve RNA aptamerlerinin geniş bir hedef aralığında (örneğin proteinler, peptidler, amino asitler, ilaçlar, metal iyonları ve hatta bütün hücreler) sıkı bir bağlayıcı olduğu tespit edilmiştir (Tombelli vd., 2007). Hedef molekülüne bağlandıktan sonra katlanabilme yeteneğine sahip

olarak türetilen aptamerler genellikle hedef molekülleri için yüksek bir afiniteye sahiptirler. Bu aptameler ya kendi nükleik asit yapıları içindeki küçük moleküllere dahil edilebilir yada protein gibi makro moleküllere entegre edilebilirler (Hermann ve Patel, 2000).

Aptamerler teşhis ve tedavi için giderek daha önemli moleküler araçlar haline gelmişlerdir. Aptamer bazlı biyosensörler özellikle antikorlar ve enzimler gibi doğal reseptörler kullanılan biyosensörlere kıyasla görülmemiş avantajlara sahiptir.

İlk olarak, yüksek özgüllük ve afiniteye sahip olan aptamerler, prensip olarak, küçük moleküllerden büyük proteinler ve hatta hücrelere kadar, herhangi bir hedef için *in vitro* olarak seçilebilmektedir. Böylece aptamer bazlı biyosensörleri geniş bir yelpazede geliştirmek ve kullanmak mümkün olmaktadır.

Bir diğer avantajı ise, tek seçimli aptamerler ticari kaynaklardan yüksek ölçüde tekrarlanabilirlik ve saflık ile sentezlenebilir. Aynı zamanda, protein bazlı antikorlar veya enzimlerin tersine, DNA aptamerler genellikle kimyasal olarak yüksek kararlılığa sahiptir.

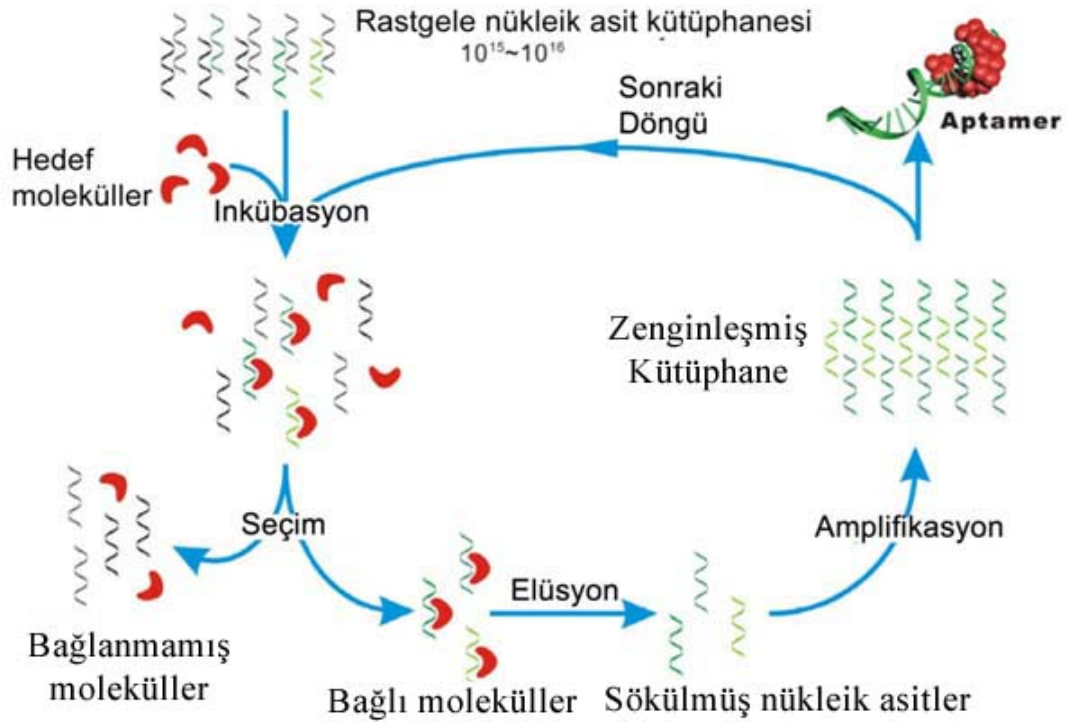
Son olarak, aptamerler genellikle bağlandıkları hedef üzerinde önemli yapısal değişiklikler yapabilirler. Bu özellik yüksek algılama hassasiyeti ve seçiciliği olan yeni biyosensör tasarımında büyük bir esneklik sunmaktadır.

Son yıllarda, konformasyon ve ligand-bağlanma özelliklerinden dolayı nükleik asit aptamer anlayışı yoğun ilgi görmüştür ve aptamer reseptörleri üzerinde biyolojik tayin yöntemleri kullanılmasını sağlamıştır (Clark ve Remcho, 2002).

Aptamerler, SELEX geliştirmeye (Systematic Evulation of Ligands by Exponential Enrichment - Üssel zenginleştirme yolu ile Ligandların Sistemik Evrimi) dayalı *in vitro* prosesleri nedeniyle 'kimyasal antikorlar' olarak adlandırılırlar (Şekil 1.9). Hayvan, bağışıklık sisteminin uyarılmasında kullanılan antikorların hazırlanmasından farklı olarak, SELEX yöntemi bağışıklık sistemi tarafından elde edilmesi başka türlü mümkün olmayan, toksik ve immünojenik olmayan hedefler için aptamer üretimini mümkün kılmaktadır (Jayasena, 1999). Ayrıca, bu yöntemle hedefin spesifik bir bölgesinde de aptamer üretmek mümkündür. Şimdiye kadar aptamerler, metal iyonları (örneğin, K^+ , Hg^{2+} ve Pb^{2+}), küçük organik moleküller (örneğin, amino asitler, ATP, antibiyotikler, vitaminler ve kokain), organik boyalar, peptidler ve proteinler (örneğin, trombin, büyüme faktörleri ve HIV ile ilgili peptit),

hatta tüm hücreler veya mikroorganizmalar (örneğin, bakteri) de dahil olmak üzere çok geniş bir aralıktan seçilmiştir (Ramos, 2007). Aptamerlerinin böyle geniş kullanım alanlarını olması teşhis, anti-biyoterörizm, çevre ve gıda analizi de dahil bir çok yeni biyoanaliz cihazları geliştirmeyi mümkün kılmaktadır (Tombelli vd., 2007).

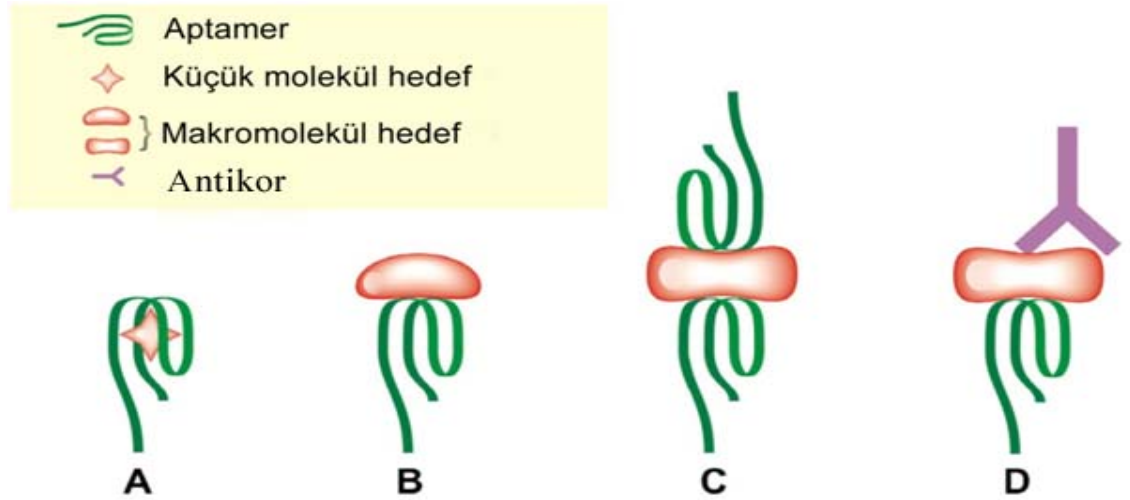
Aptamerler genellikle hedeflerine karşı yüksek seçicilik ve afiniteye sahiptirler. Antijen ve antikorlara benzer olarak, aptamerler ve moleküler hedefleri arasındaki etkileşim genellikle hedef molekül içinde ki küçük farklılıkların bile aptamer bağlarını bozabileceği kadar spesifikdir. Bu yüksek seçiciliğe ek olarak aptamerler, özellikle de pikomolardan (pM) nanomolara (nM) değişen aralıkta ayrışma sabitlerine (K_d) sahip olan makromoleküllerde (örneğin; protein) yüksek afinite ile hedeflerine bağlanırlar.



Şekil 1.9 Üssel zenginleştirme yolu ile Ligandların Sistemik Evrimi (SELEX) prosesinin şematik gösterimi.

(Rastgele bir nükleik asit kütüphanesi bir hedef molekül ile inkübe edilir, ve bağlanmamış moleküller bağlanan moleküllerden ayrılır. Bağlanmış nükleik asitler, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile yükseltilir, tasfiye edilir ve bir sonraki döngü için zenginleştirilmiş bir kütüphane olarak görev yaparlar. Her hedef için, 6-12 ardışık döngü gerçekleştirilir ve zenginleştirilmiş olan kütüphane klonlanır ve dizilenir.)

Aptamer bazlı biyolojik analizlerde farklı tayin konfigürasyonları mevcuttur. Aptamerler, küçük moleküllerden makromoleküllere kadar değişen çok geniş bir aralıkta, farklı hedeflere (proteinler gibi) bağlanmak için seçildiğinden çeşitli tayin konfigürasyonları tasarlanmıştır. Sensörün tasarlanması genellikle her bir aptamer-hedef molekül çiftine özgü tanıma modu prensibine dayanmaktadır (Hermann ve Patel, 2000). Küçük molekül hedefleri için yapılan nükleer manyetik rezonans (NMR) çalışmaları, genellikle aptamer yapıların ikinci molekül ile etkileşim için küçük bir oda içerisinde bağlayıcı cepler içine gömülü olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 1.10 A). Bu sınırlama nedeniyle, küçük moleküllu hedefler çoğunlukla tek site bağlanma konfigürasyonu kullanılarak analiz edilmektedir. Bunun aksine, çeşitli ayrımcı kontakların etkileşimini sağlayan protein hedefleri yapısal olarak (örneğin, yığılma, şekil tamamlayıcılık, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları) karmaşıktır. Sonuç olarak, protein hedefler tek site üzerinden bağlanma (Şekil 1.10 B) ve çift site bağlanma (Şekil 1.10 C) şeklinde analiz edilebilirler. Ayrıca çift site bağlanma, proteinin farklı bölgelerine bağlanan aptamer ile de yapılabilmektedir.



Şekil 1.10 Aptamer bazlı analiz formatları. (A) Küçük hedef molekül aptamerin yapısındaki bağlayıcı cepler içine gömülü; (B) tek site formatı; (C) çift site (sandviç) iki aptamerle bağlama formatı ve (D) bir aptamer ve bir antikor ile bağlanarak oluşan sandviç formatı.

Antikor çift site bağlanma analiz formatı sandviç formatı olarak bilinir ve en çok kullanılan analiz formatıdır. Bu yaklaşımda analit biri algılama probu diğeri raporör prob olmak üzere bir aptamer çifti ile sandviç yapılır (Şekil 1.10 C). Algılama

probları çoğu zaman katı destek yüzeyi üzerine (örneğin, elektrotlar, cam çipler, nanopartiküller veya mikro-parçacıklar) immobilize edilirken, raportör problemler genellikle sinyal parçaları (örneğin, fluoroforlar, enzimler ya da nanopartiküller) ile konjuge edilmektedir. Genel olarak, algılama ve raportör problemler farklı nükleik asit sekanslarına sahiptir ancak kısıtlı durumlarda dimerik yapıda olanlar gibi bazı proteinler, iki özdeş bağlanma sitesi içerirler ve böylece sandviç analizi için tek bir aptamer kullanımına olanak sağlarlar. Hedef molekül bağlanma sitesi için iki aptamerin özdeş olmadığı veya örtüşmediği durumlarda ikinci aptamer yerine antikor kullanmak da mümkündür (Şekil 1.10 D). Bu da tek bir hedef molekül için birden fazla aptamerin belirleyiciliğinin önemini vurgulamaktadır.

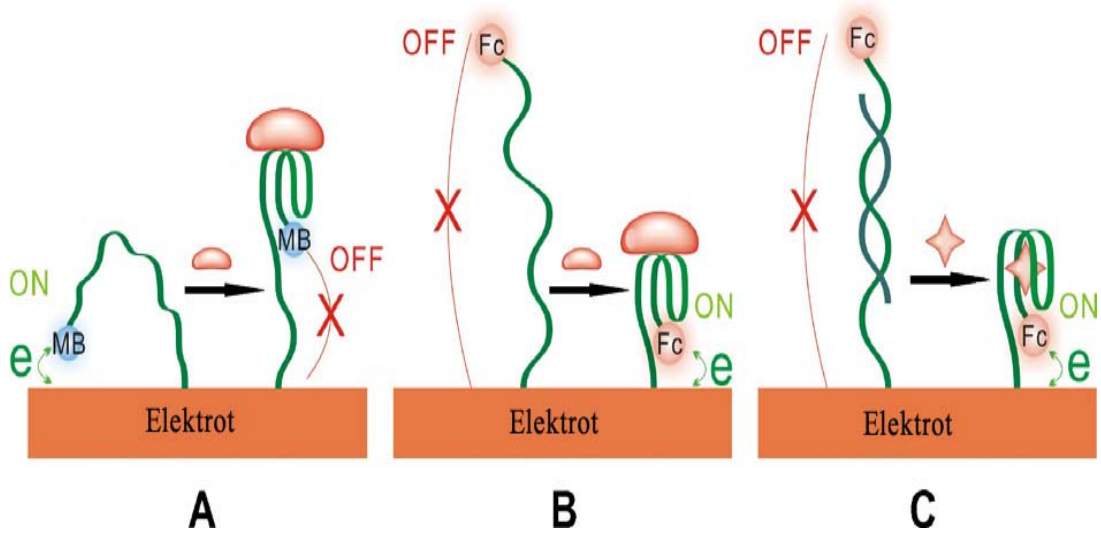
1.5.1. Analiz Formatları

Modern analitik teknolojilerin hızlı bir şekilde ilerlemesi ve yeni analitik reaktiflerin (örneğin, nano malzeme bazlı problemler) uygulaması ile birlikte son yıllarda çok fazla aptamer bazlı biyo analiz formatları geliştirilmiştir. Bunlar içinde aptamer bazlı sensörler (aptasensörler) özellikle dikkat çekmiştir. Biyosensörlerin doğal avantajlarının yanı sıra (örneğin ek basamaklara gerek duymaması), aptamer bazlı biyosensörler, antikorlar üzerinde yeniden kullanım avantajı sunmaktadır.

1.5.1.1. Elektrokimyasal Analiz Formatı

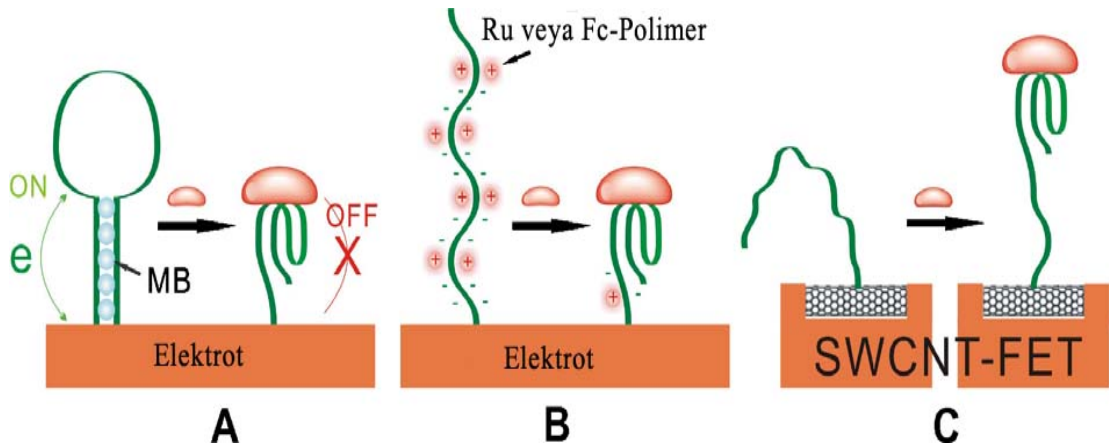
Elektrokimyasal analiz formatına örnek olarak, bir elektrokimyasal trombin aptasensör, trombine bağlanmak üzere bir anti-trombin aptamer ve elektrot üzerinde bir redoks-aktif metilen mavisi (MB) ile etiketlenmiş bir aptamer immobilize edilmesi ile elde edilen yapı verilebilir (Xiao vd., 2005). Aptamerin esnek konformasyonu elektrotla MB elektrot arasında iletişime olanak sağlamaktadır (Şekil 1.11 A). Bu sensör formatı negatif sinyaller nedeniyle dezavantaj sağlamaktadır (örneğin aptamer ile trombin arasındaki ilişki nedeniyle amperometrik tepki azalır).

Bir diğer aptamer elektrokimyasal sensörde (Radi vd., 2006) aptamer sekansı normal şartlarda rijit bir 3D yapı oluştururken, ATP üniteleri varlığında tamamlayıcı bir sekansı serbest bırakmaktadır. Bu durumda elektron transferi gerçekleşmekte ve sinyal alınmaktadır (Zuo vd., 2007).



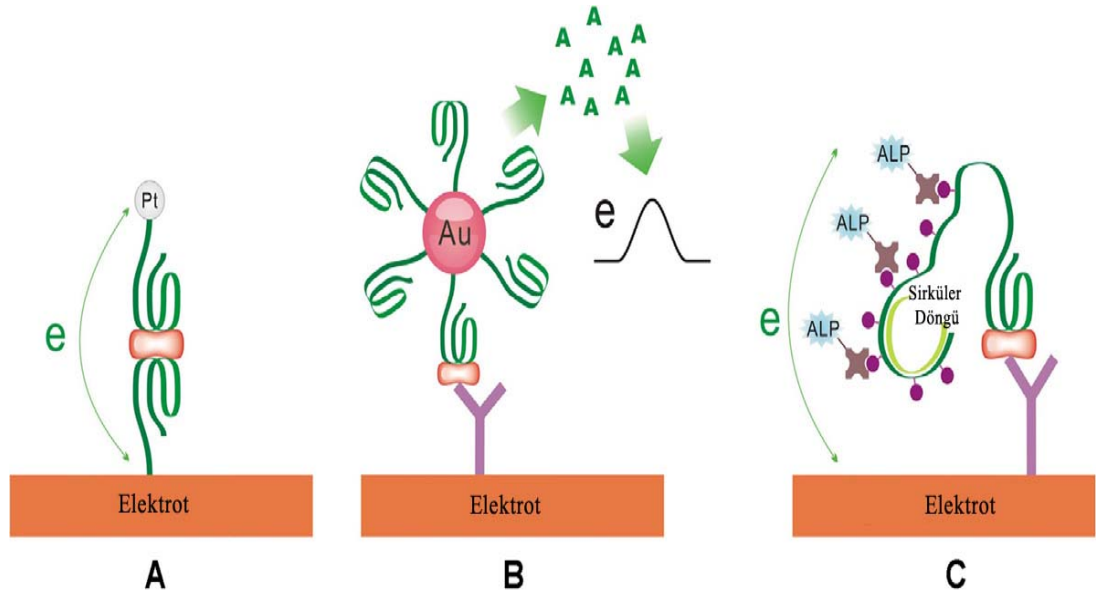
Şekil 1.11 Açık sinyal ve kapalı sinyal elektro kimyasal sensörler.

Etiketlenmiş bir biyosensörde çalışma şu şekildedir: Şekil 1.12' de gösterildiği gibi aptamer ile hedef bağlandığında hairpin yapısı açılır böylece interkalasyon konumundaki MB serbest kalır ve elektronik sinyaller azalır (Bang ve Kim, 2005). Bir diğer konfigürasyonda (Şekil 1.12 B) aptamerlerin hedeflerine bağlanmasıyla katyonik raporlama birimlerinin bağlanması engellenir ve elektrokimyasal yanıt sonlanır (Floch ve Leclerc, 2006; Cheng vd., 2007). SWCNT-FET sensörlerinde ise (Şekil 1.12 C) hedef ile bağ yapan aptamer sensörün iletkenliğini değiştirmiş ve böylece hedef analizine olanak sağlamıştır (So vd., 2005).



Şekil 1.12 Etiketsiz elektrokimyasal aptasensörler.

Elektrokimyasal sensörlerin sandviç formatında kullanılması Şekil 1.13' de gösterilmiştir. PtNP (Platin nanopartikül) ile fonksiyon kazandırılmış aptamer (Şekil 1.13, A) H_2O_2 varlığında elektrokimyasal indirgeme reaksiyonunu katalize etmek ve hedeflerin algılanmasına olanak sağlamak için katalitik etiket olarak kullanılmıştır (Polsky vd., 2006). Poli-A içeren aptamerlerle fonksiyonize edilen AuNP' ler raportör prob olarak kullanılmaktadır (He ve diğ., 2007). Serbest adenin nükleobazları doğrudan güçlendirilmiş sinyalleri üretmiştir. Raportör olarak hareket eden, aptamer-primer sekans, algılama duyarlılığında anlamlı bir artışa yol açan *in situ* RCA reaksiyonuna vasıta olmaktadır (Zhou vd., 2007).



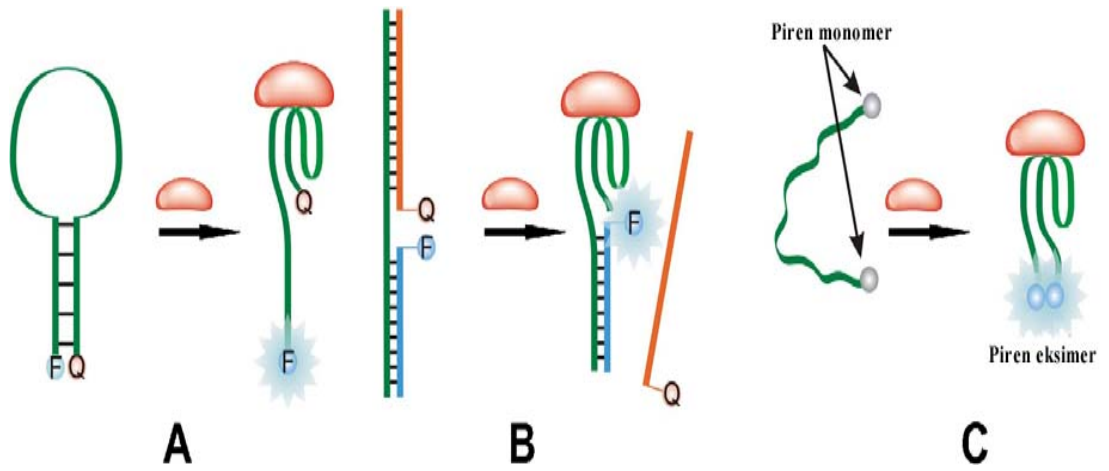
Şekil 1.13 Sandviç formatında aptamer bazlı elektrokimyasal sensörler ile sinyal amplifikasyonu.

1.5.1.2. Optik Analiz Formatı

Aptamerler, optik biyo analizlerde, biyo tanıma elemanı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu analiz formlarından, floresan ve kolorimetrik analiz en sık uygulanan iki tekniktir.

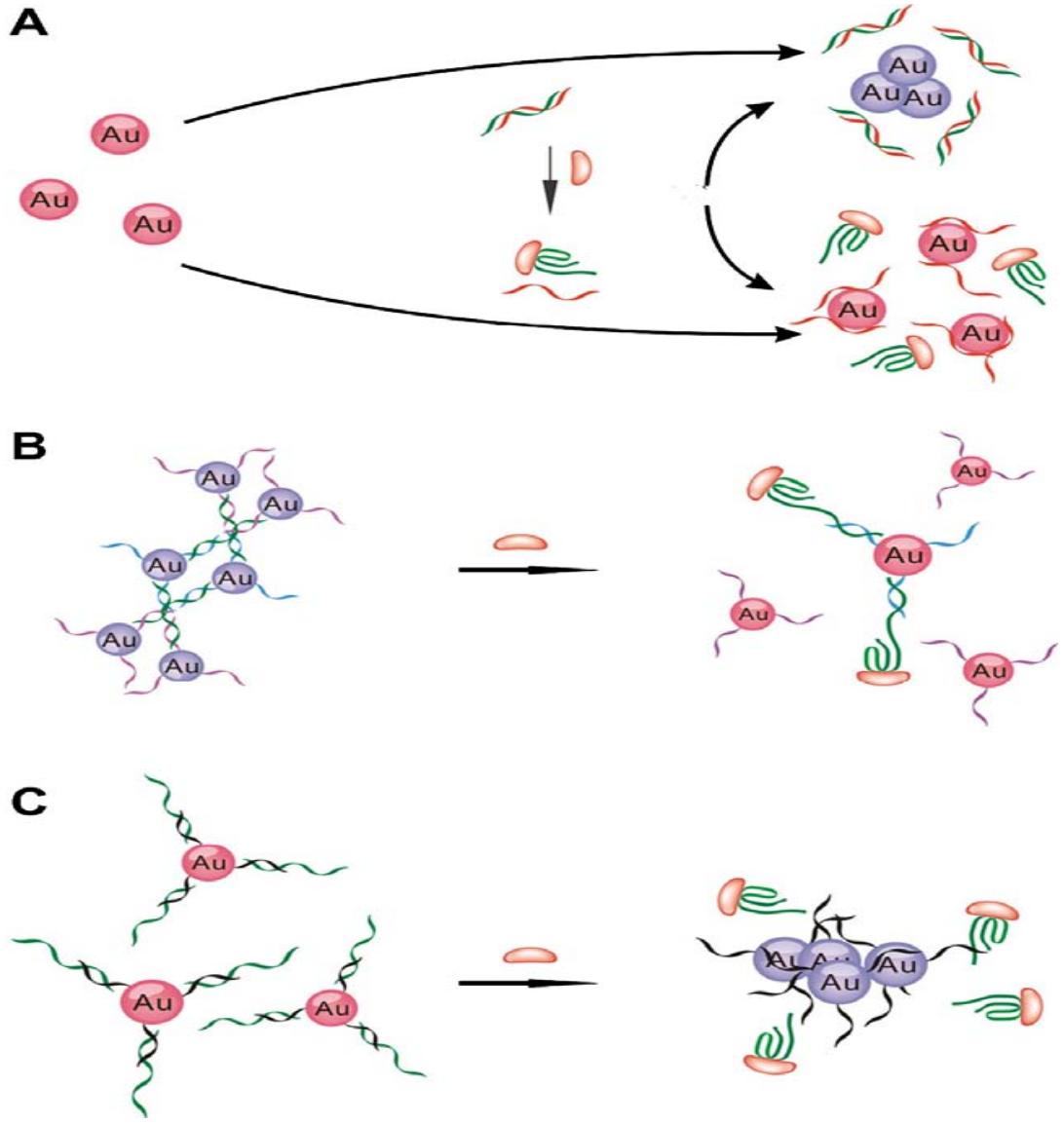
Floresan boyalarla aptamerlerin etiketlenme kolaylığı, birçok farklı florofor ve söndürücülerin var olması ve gerçek zamanlı algılama yeteneği nedeniyle floresan algılama yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sinyal aptameri diye adlandırılan aptamerleri, floresan sinyal problemleri haline dönüştürmek için birkaç temel strateji geliştirilmiştir (Şekil 1.14). En çok kullanılan format, geleneksel moleküler

işaretleyicinin modifiye edilmiş versiyonu olan aptamer bazlı moleküler işaretleyicidir. Bir moleküler işaretleyici saç tokası yapısında, florofor (F) ve söndürücü (Q) uç-etiketli bir aptamer sekansı kullanılmaktadır. Şekil 1.14 A' da gösterildiği gibi hedefin ayrılmasını engelleyen bağlar, floroforu söndürücüden ayırmakta ve floresan sinyaline yol açmaktadır (Yamamoto vd., 2000). Bir başka kullanılan biçim ise, söndürücü ile etiketlenmiş bir tamamlayıcı DNA dizisi ile çift yönlü bir yapıda bir fluoroforla işaretlenmiş aptamer yerleştirmektir. Hedeflerin olduğu ortamda floresansta bir artış olduğunda aptamer olan komplementer sarmalın hareketi zorlanmaktadır ve DNA dizisi ile çift yönlü bir yapıda bir florofor etiketli aptamer, floresansta artışa yol açan hedef ve aptamerin bağlanmasıyla ayrılmaktadır (Nutiu ve Li, 2004), (Şekil 1.14 B). Şekil 1.14 C'de ise bağlayıcı bir hedef üzerine, kendisine ait floresans emisyonu yapan ve sabit sinyaller üreten her bir ucunda piren ile etiketlenmiş bir aptamer gösterilmektedir.



Şekil 1.14 Apta işaretleyiciler.

Son zamanlarda organik floresan boyalar kullanmak yerine, analiz performanslarını arttırmak (Choi vd., 2006) ve hücrelerdeki ilaç dağıtımını belirlemek (Bagalkot vd.,2007) için kuantum noktalar da (QDS) kullanılmaktadır. Alternatif olarak iki floresan molekülü olan donör ve alıcı molekülleri arasındaki enerji transferine dayanan flüoresan rezonans transferi (FRET) de kullanılmaktadır (Şekil 1.15).



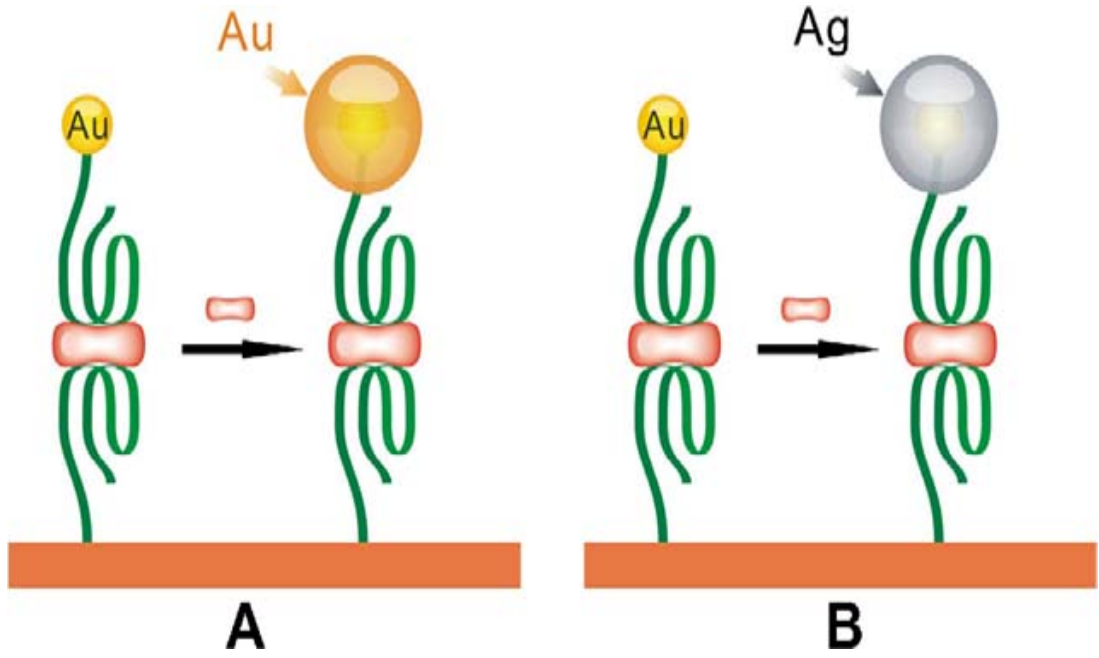
Şekil 1.15 Tuzun yol açtığı agregasyona karşı kararlı hale gelen AuNPs bağlı DNA aptameri

(A) Hedefine bağlanan aptamerler 3D yapılar oluşturarak AuNPs birikimine yol açmaktadır (Wang vd., 2006; Wei vd., 2007), (B) mor renkle gösterilmiş olan DNA modifiye edilmiş AuNP gruplar, hedef molekül varlığında ayrılarak kırmızı renkle gösterilmiş tek AuNP şeklinde dağılmaktadır (Liu ve Angew, 2005) ve (C) hedef bağlanması üzerine kısa komplementer DNA'lar ile fonksiyonelleştirilmiş olan altın nanopartiküller bir araya gelirler ve aptamerler ile kırmızı-mor renk değişimi ile tayin yapılır (Zhao ve Chiuman, 2007).

Nanopartiküller (örneğin altın nanopartikül, AuNP) katalizör olarak davranmalarının yanısıra, proteinlerin ultra hassas olarak elektro kimyasal algılanmasında taşıyıcı madde olarak da kullanılmaktadırlar (He ve diğ., 2007).

Son zamanlarda nano materyallerin (altın nanopartikül gibi) kullanımına önem verilmesi basit kolorimetrik biyoanaliz formatlarının geliştirilmesini mümkün hale getirmiştir. Bu yaklaşımlardan birinde, modifiye edilmemiş AuNPs katlanmamış ve katlanmış DNA'ları ayırmak için kullanılmıştır ve bu da aptamer bazlı biyotanıma proseslerini kolorimetrik olarak araştırmak için yeni bir yaklaşım sağlamıştır (Şekil 1.15 A). DNA aptamerleri çözeltiler içinde altın nanopartikülün bağlanabileceği rastgele sargı şeklindedir. Hedefine bağlanan aptamerler 3 boyutlu yapılar oluşturular (örneğin, G-kuartet) ve böylece artık altın nanopartikül ile birleşmesi engellenmiş olmaktadır. Modifiye edilmemiş AuNP'lerde renk değişiklikleri çıplak gözle görülebilmektedir. Bugüne kadar, bu analiz yöntemi, potasyum iyonu (Wang vd., 2006) ve proteinlerin (Wei vd., 2007) tayininde başarıyla uygulanmıştır.

Aptamerlerle fonksiyonalize edilmiş AuNP' ler sandviç konfigürasyonu ile proteinlerin optik algılanmasında kullanılması Şekil 1.16' da gösterilmiştir (Pavlov vd., 2004). Anti-trombin aptamer kovalent bir maleimid ile fonksiyonalize edilmiş siloksan tek tabaka ile sabitlenmiştir ve trombin ara yüzeye bağlanmıştır. Aynı aptamer AuNP ile fonksiyonalize edildikten sonra ikinci trombin bağlama sitesine bağlanmıştır. Elde edilen AuNP bağlanmış site bu işlemin ardından HAuCl_4 ve indirgenme kimyasalı kullanılarak büyütülmüştür (Şekil 1.16 A). AuNPs büyütülmesi önemli ölçüde (2 nM gibi az bir miktarda trombini algılayabilecek kadar) kolorimetrik algılama hassasiyetini geliştirmiştir.



Şekil 1.16 Sandviç formatında aptamer bazlı kolorimetrik biyo analizler (A) altın ile (Pavlov vd., 2004), (B) gümüş ile (Li vd., 2007)

1.5.1.3. Kütle Hassas Analiz Formatı

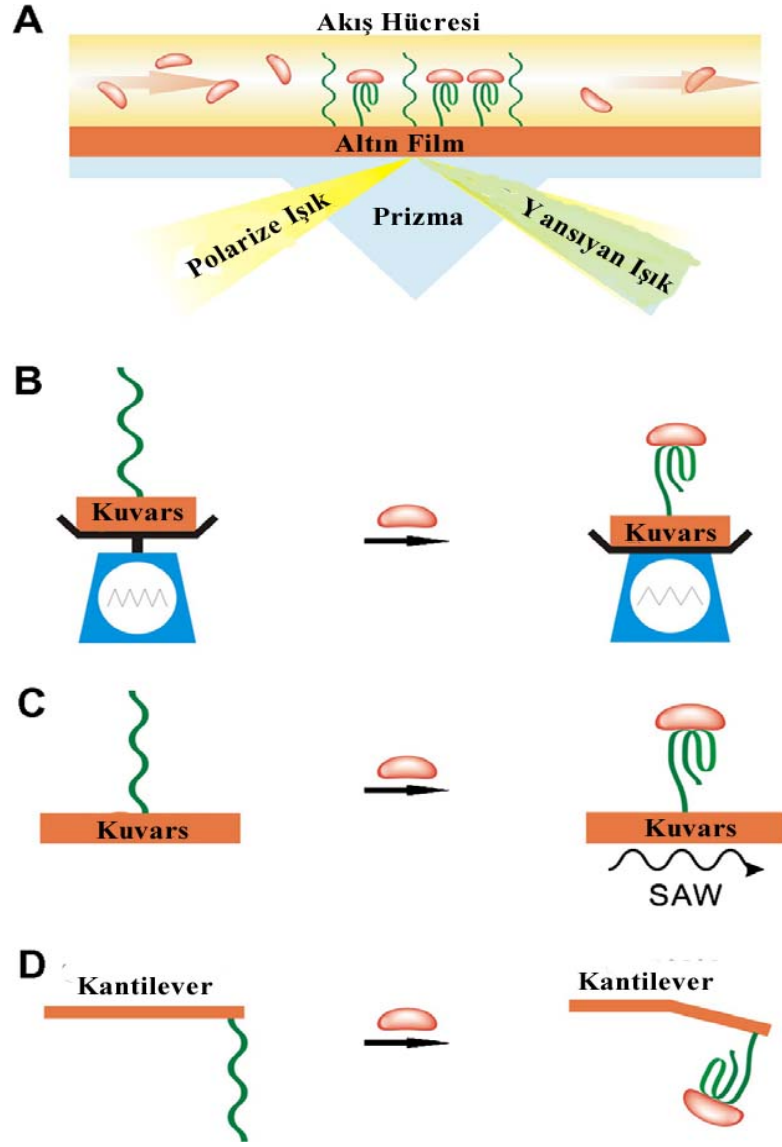
Kütle hassas biyosensörler, yüzeyde kütle değişimine duyarlı algılama problemleri ile ölçüm yapan bir cihaz olarak bilinmektedirler. Aptamer bazlı kütle hassas biyosensörler, sönümlü dalga sensörlerde (Örneğin; SPR, akustik dalga tabanlı sensörler (örneğin, kuvars kristal mikrotarazi (QCM) ve yüzey akustik dalgası (SAW) cihazları) ve mikromekanik kantilever bazlı sensörler) dahil olmak üzere, etiketsiz biyo-analiz sınıfına girmektedirler. Bu teknikler genellikle ince filmler için kalınlık ve yerçekimi ölçümlerinden dolayı "kütle hassas" teknikler olarak adlandırılırlar.

SPR sensörler, yüzeydeki kırılma indeksi değişimine dayalı olarak kütle değişimini gösterme yeteneğine sahip cihazlardır. SPR, aptamerlerin ve hedeflerinin bağlanma sabitlerini hassas, hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlediği için bu teknoloji genellikle SELEX prosesinde kullanılır. SPR yöntemi aynı zamanda aptamer bazlı algılama uygulamaları içinde kullanılmaktadır. Bu algılama biçimde seçici yüzey, yüzey üzerine aptamer immobilize edilerek oluşturulmaktadır. Daha sonra hedef sabit bir akış hızında yüzeye enjekte edilir ve cihaz yüzeyde meydana gelen rezonans açısındaki değişimleri ölçer. Bu açı hedefe bağlanan aptamere göre değişiklik göstermektedir (Şekil 1.17 A). Ayrıca sinyalin bağlanan molekül ile orantılı olduğu bulunmuştur (Luzi vd., 2003), böylece, tek site bağlanma konfigürasyonda etiketsiz

algılamaya olanak sağlanmıştır. Örneğin, HIV-1 Tat proteini algılamak için kullanılan spesifik aptamer, avidin-biyotin köprü kullanılarak SPR yongalarına immobilize edilmiştir (Tombelli vd., 2005). Yüksek analiz spesifitesi, HIV-1 Tat proteinine benzer bir kontrol proteini olan Rev kullanılarak tanımlanmıştır. Çift site bağlama modeli kullanılarak, sinyal amplifikasyon sistemi son derece hassas ve spesifik SPR biyoanalizlerle geliştirilebilmektedir.

Daha yakın zamanlarda, enzimatik olarak amplifiye edilmiş SPR görüntüleme (SPRI) analiz sistemi, trombin ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) analizinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Li vd., 2007).

QCM' de mikro gravimetrik analizler, aptamerler ve hedefleri arasındaki etkileşimleri tespit etmek için kullanılmıştır. Kuvars kristali frekansı, kristal kütleindeki değişiklikler tarafından kontrol edilir; aptamer ile modifiye edilmiş kristaller ile hedefin birleşmesi transducer kütleini arttırmaktadır ve bu da kristalin rezonans frekansında bir azalma ile sonuçlanmaktadır (Şekil 1.17 B).



Şekil 1.17 Kütlesel hassas aptasensörler. (A) SPR bazlı aptasensör (Luzi vd., 2003), (B) QCM bazlı aptasensör (Hianik vd., 2005). (C) SAW bazlı aptasensör (Schlensog vd., 2004) ve (D) mikro mekanik kantilever bazlı aptasensör (Savran vd., 2004)

Trombin ve HIV-1 Tat proteini algılamak için Au / kuvars kristali üzerinde aptamer immobilize edilerek yapılan mikro gravimetrik analizler kullanılmıştır. Bu yöntemlerin algılama sınırları (LOD) sırasıyla 1 nM ve 0.25 ppm' dir (Hianik vd., 2005).

QCM bazlı aptasensörlerin parametreleri değerlendirilmiş ve analitik performanslarını artırmak için optimize edilmiştir (Bini vd., 2007). QCM uygulamaların yanı sıra, piezoelektrik kristalleri de özel bir sensör tipi olan SAW tipi de aptasensör imal etmek için kullanılmaktadır.

Mikro işlenmiş biyosensörler küçük boyutları nedeniyle düşük gürültü ve yüksek ölçeklenebilir bir yapıya sahiptir. Düşük gürültü yüksek derecede ayrışmalara sebep olurken, ölçeklenebilirlik birçok sensörün paralel olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Bir başka aptamer bazlı kütle analiz sisteminde, aptamerler mikro kantileverin üst yüzeye bağlanmaktadır. Aptamerlerin hedefleriyle bağlanması kantileveri bükmeye zorlayan bir sterik birikmeye yol açmaktadır. Bu bükülme de optik veya elektronik olarak tespit edilebilmektedir (Şekil 1.17 D).

Savran ve diğ. (2004), DNA aptamerlerle işlevselleştirilen bir mikro fabrikasyon kantilever tabanlı sensör kullanarak Taq DNA polimeraz için etiketsiz bir algılama sensörü geliştirmişlerdir. Geliştirilen sensörde, aralarında bükülme farkının doğrudan saptanması için iki bitişik kantilever kullanılmaktadır. Kantileverlerden biri seçilmiş bir aptamerle işlevselleştirilirken diğer kantilever DNA ile bloke edilmiştir. Polimeraz-aptameri diferansiyel kantileverdeki 3-32 nm aralığında bir bükülme nedeniyle ligand konsantrasyonuna bağlı olarak yüzey geriliminde bir değişikliğe neden olmaktadır.

AFM gibi nanomekanik mikro kantilever kullanan bir diğer çalışmada, reseptör molekülleri hepatit C virüsü (HCV) helikazının etiketsiz algılanması için RNA aptamerleri kullanarak titreşim modunda (salınım) analiz gerçekleştirilmiştir. Algılama sınırı (limit of detection, LOD) 100 pg/mL HCV helikaz olmuştur (Hwang vd., 2007).

1.6 Çalışmanın amacı ve literatür ile ilişkisi

Sunulan çalışmada, aptamer esaslı biyosensör yapısı için elipsometri esaslı bir sensörün geliştirilmesi ve bu sensörün Hg^{2+} analizindeki performansının belirlenmesi amaçlanmıştır. Görüldüğü üzere, Hg^{2+} iyonlarının tayininde SPR esaslı sensör yapıları ve bazı durumlarda aptamer sekanları kullanılsa da, özellikle elipsometri ve silikon alttaşı- silan tek tabaka oluşumları bir arada kullanılmamıştır. Bu amaçla, algılama sınırının artırılmasını denemek amacıyla, tez projesinde, biri doğrusal, diğeri de özellikle hair pin yapıda olmak üzere, iki farklı aptamer dizisi, spektroskopik elipsometri altında Hg^{2+} tayininde kullanılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

Sunulan tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar 3 ana başlık altında toplanmaktadır.

Çalışmanın ilk aşamasında 3-Merkaptopropiltrietoksisilan (MPTES) kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (SAM) oluşturacak şekilde silikon pulcuk (wafer) yüzeyine kovalent olarak bağlanmıştır. MPTES ile modifikasyon işlemi sırasında tek tabaka oluşumunun optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında cıva algılamaya özgü iki adet oligonükleotid probun (aptamerler) MPTES alt tabaka üzerine immobilizasyonu optimize edilmiştir. Bu aşamada aptamer prob silikon pulcuğa immobilize edilerek biyoip yongası elde edilmiştir. Son aşamada ise immobilize edilmiş oligonükleotid problemleri ile cıva çözeltisinin etkileştirilmesi ve ardından spektroskopik elipsometri (SE) ile cıva sensör performansının değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Yapılan değerlendirmelerle cıva algılama hassasiyetleri ve cıva algılama sınırları (limit of detection- LOD) değerlendirilerek, farklı aptamerlerin cıva algılama performansları karşılaştırılmıştır.

2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Cihazlar

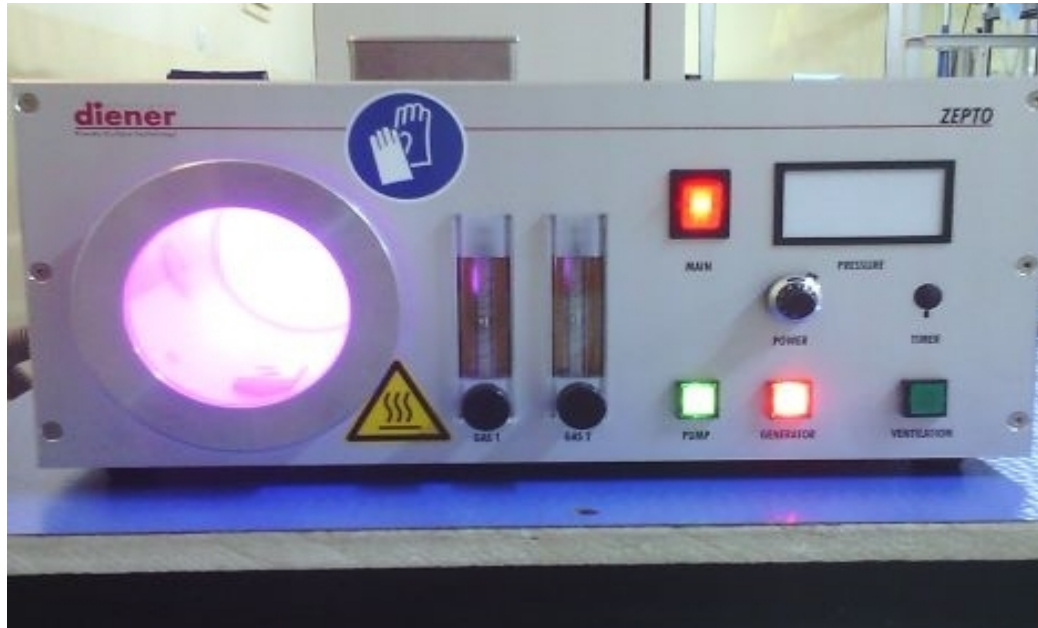
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez alışması kapsamında kullanılan bütün kimyasal maddeler en az analitik saflıkta veya daha yüksek saflıkta satın alma yolu ile temin edilmiştir ve ilave saflaştırma işlemi yapılmadan, temin edildiği hali ile kullanılmıştır. Elipsometrik sensör yüzeyinin kurutulduğu azot gazı yüksek saflıkta olup satın alma yoluyla temin edilmiştir. Cıva algılamaya duyarlı aptamer problemleri 5'-SH-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAT TCG TGT TGT GTT CG-3' ve 5'-SH-CGG GGG ACA GGA CTT GAC CTT CTC CGC CTT CTT CTC TCC TGT CCC CCG-3' baz dizilimine sahip olarak sırasıyla 12,6 nmol ve 11,4 nmol olarak Ella Biotech GmbH, Almanya tarafından temin edilmiştir. Spektroskopik elipsometri sensör yüzeyinin oluşturulduğu silikon pulcuklar (100) University Wafers tarafından standart kalınlıkta temin edilmiştir. Silikon yüzeylerinin temizlenmesinde ve modifikasyonunda kullanılan mutlak etil alkol, %96'lık etil alkol ve MPTES yüksek

saflıkta olup Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır. Fosfat tampon çözelti hazırlamak için Sigma-Aldrich firmasından alınan mono-sodyum fosfat (NaH_2PO_4), disodyum fosfat (Na_2HPO_4) hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit (NaOH) ve Hanna HI211 pH/ORP model pH metre kullanılmıştır. Elde edilen sensörün denemesinde kullanılan cıva, cıva tuzu (HgCl_2) olarak Sigma-Aldrich tarafından temin edilmiştir. Deneyler sırasında $>5 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ özgül dirence sahip deiyonize su kullanılmıştır.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Silikon yüzeyler modifikasyon öncesi temizlenme işlemi için ultrasonik banyo (JEIO TECH, Kore) kullanılarak yüksek saflıkta su ve etil alkolle yıkanmıştır. Silikon yüzeydeki kimyasal kirliliklerin temizlenmesi ve modifikasyon için oksit tabakanın oluşturulması işlemi için hava ve oksijen plazma sistemi (Diener Electronics, ABD) kullanılmıştır (Şekil 2.1). Oksijen plazma sistemi, yüzeyin yüksek enerjili plazma ile etkileşerek öncelikle organik kirlilikler açısından temizlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca, ozon ile etkileşen yüzeyde aktif siteler oluşmakta ve silanlama için uygun yüzey elde edilmektedir. Şekil 2.1’de plazma koşulları sağlanmış (mavi-mor renk) plazma cihazı, çalışırken görülmektedir. Vakum odası içerisinde oluşan plazma ile, vakum odası içerisine yerleştirilmiş olan kurutulmuş malzemeler temizlenmekte ve/veya yüzey modifikasyonuna tabi tutulmaktadır.



Şekil 2.1 Çalışmada kullanılan plazma sistemi

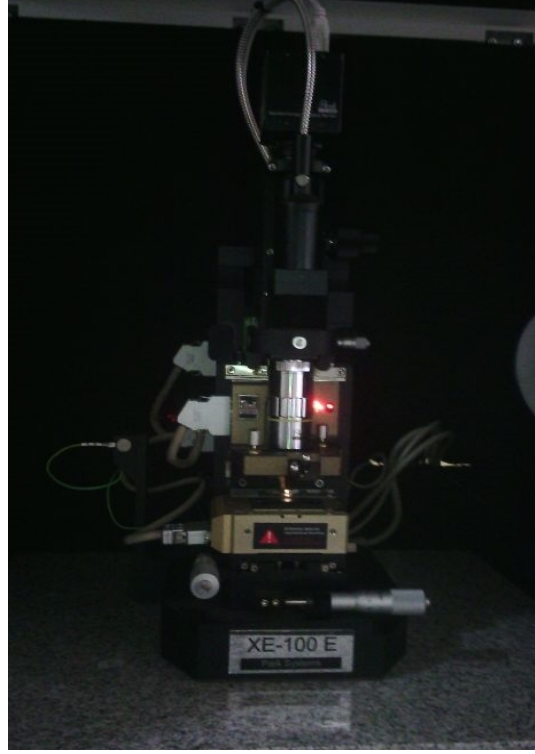
Hazırlanan film yüzeyinde biriken tüm organik tabakalar ile organik-ağır metal yapısının dielektrik sabitindeki değişimlerin (Δ ve Ψ) ölçülmesinde Opt-S9000 elipsometre cihazı kullanılmıştır (Şekil 2.2). Elipsometre cihazı, ışık kaynağı ve dedektörün bulunduğu iki ayrı koldan ve bu kolların açısının değiştirildiği bir gönyemetreden oluşmaktadır. Polarizasyonu değiştirilen ışık ise, bir polikromatik ışık kaynağından çıkan ışığın tek-dalga boyuna düşürüldüğü bir monokromatör ünitesinden elde edilmektedir. Işık kaynağından belirli bir açı ile, tabla üzerine konulan yüzeye gelen ışık, bu yüzeyden yansyarak dedektöre ulaşmaktadır. Dedektöre gelen ışının polarizasyon hallerindeki değişim ölçülerek delta ve psi açıları (Δ ve Ψ) belirlenmektedir.



Şekil 2.2 Çalışmada kullanılan elipsometre cihazı

Hazırlanan sensör yüzeyindeki yüzey birikimi, yüzey gözenekliliği ve yüzey bozukluğu Park System XE 100 model atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 2.3). AFM cihazı, kantilever ucuna yerleştirilen bir prob ile tablası üzerinde bulunan yüzeyi tarayarak topografi hakkında bilgi vermektedir. AFM cihazının çalışması, bu tarama esnasında prob ile örnek yüzeyi arasında meydana gelen atomik etkileşimlerin kantileverda bir sapma meydana getirmesi ve bu sapma değerlerinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Çalışmada

temassız mod (non-contact) AFM tekniği kullanılmıştır. Tüm lmler Nsc15 model prob kullanılarak, 5 μm x 5 μm 'lik bir alanda gerçekleştirilmiştir.



şekil 2.3 Kullanılan atomik kuvvet mikroskobu (AFM) cihazı

2.2. Deneysel alışmalar

2.2.1. Silikon Yüzeyinin Temizlenmesi

Biyosensör alışmaları gibi hassas çalışmalarda immobilizasyon ve sinyal alma gibi ileri basamaklarda sorun yaşamamak için kullanılacak sensör yüzeyinin temizliği oldukça önemli bir basamaktır. Yapılan çalışmada taban malzeme olarak kullanılacak olan Si pulcuklar (100) organik ve inorganik kirliliklerin uzaklaştırılması amacıyla çok dikkatli bir şekilde temizlenmiştir. Kullanılacak silikon pulcuklar öncelikle 5mm x 5mm'lik parçalar halinde elmas kalem kullanılarak kesilmiştir. Kesilen silikon parçaları 10 dakika süresince %96'lık etil alkol ve ardından 10 dakika süreyle yüksek saflıkta su kullanılarak ultrasonik banyo yardımıyla temizlenmiştir. Silikonlar banyo işleminden sonra azot gazı ile kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından silikon pulcuklar yzerindeki organik kirlilikleri uzaklaştırmak ve MPTES modifiyesi için hidrosillenmiş yüzey oluşturmak amacıyla 20 dakikayla süreyle plazma cihazında tutulmuştur. Plazma

cihazı 100 W güçte (%100) çalıştırılmıştır. Temizlenmiş silikon yüzeyi, kontrol amacıyla, elipsometre ile kalınlık ölçümüne tabi tutulmuştur.

2.2.2. Silikon yüzeyinin 3-Merkaptopropiltrietoksisilan (MPTES) ile Modifikasyonu Ve Optimizasyonu

Silikon yüzeyinde SAM oluşumunu sağlamak için MPTES çözeltileri kullanılmıştır. MPTES ile yapılan modifikasyonda öncelikle bağlanma için gereken optimum sürenin belirlenmesi amacıyla süre deneyi yapılmıştır. Mutlak etil alkol ile hazırlanan MPTES çözeltisi öncelikle 500 μ M'lık stok çözelti olarak hazırlanmış ve süre deneyleri bu derişimde yapılmıştır. Temizlenen ve hidroksillenen silikon pulcuklar plazma cihazından çıkar çıkmaz 1'er mL' lik MPTES çözeltileri içerisine daldırılıp bekletilerek tek tabaka oluşumu gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu işlemle tiyol uç grubu ile fonksiyonelleştirilmiş silikon yüzey elde edilmiştir. Silikon pulcuklar farklı sürelerde (2, 3, 4, 6 ve 24 saat) MPTES çözeltisi içinde, ışık almayan ortamda ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. Belirtilen sürelerin sonunda çözeltiden çıkarılan silikon pulcuklar %96'lık etil alkolle dikkatlice yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin elipsometrede 60 ve 70 derece geliş açısında, 400-1700 nm dalga boyu aralığında ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm sonucu elde edilen Δ ve Ψ verilerinden, silikon taban malzeme, SiO₂ tabaka ve organik tabaka (Cauchy model ile) kullanılarak modelleme yapılmış ve organik tabakanın kalınlığı spektroskopik elipsometri ile hassas bir şekilde belirlenmiştir. Temassız yöntem ile atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak yüzey topografisi elde edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda optimum süre belirlenerek sonrasında yapılan tüm işlemlerde bu süre kullanılmıştır.

MPTES modifikasyonu için yapılan süre deneyinin ardından hangi derişimde daha iyi tek tabaka oluşumu gerçekleştirdiğini belirlemek amacıyla MPTES derişimi değiştirilerek en uygun MPTES derişimi belirlenmiştir. Stok çözelti halinde hazırlanan MPTES çözeltisi seyreltilerek beş farklı derişimde (500, 100, 50, 10 ve 5 μ M) MPTES çözeltisi elde edilmiştir. Silikon pulcuklar tarif edilen işlemler uygulanarak temizlendikten sonra her derişimden alınan 1 mL' lik çözelti içerisine daldırılmıştır. Silikon pulcuklar ilk deneyde belirlenen optimum sürede boyunca, ışık almayan ortamda ve oda sıcaklığında tutulmuştur. Bu süre sonunda çözelti içerisinden çıkarılan silikon parçalar %96'lık etil alkol ile yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur. Kurululan örneklerin aynı şekilde elipsometre ve AFM

cihazlarıyla analizleri yapılarak SAM oluşumu için optimum derişim belirlenmiştir ve bundan sonra yapılan tüm işlemlerde bu belirlenen derişim kullanılmıştır.

2.2.3. Silikon Yüzey Üzerine Cıvaya Duyarlı Oligonükleotid Probların İmmobilizasyonu

Cıva iyonları için Timin- Hg^{+2} -Timin (T- Hg^{+2} -T) bağlanması, seçici bir bağlanma şeklidir. Oligonükleotid problar seçilirken bu seçicilik göz önünde bulundurulmuştur. Oligonükleotid problar (aptamerler) farklı uzunluklarda ve farklı yapılarda hazır olarak temin edilmiştir. Kullanılan oligonükleotid prob sekansları Çizelge 2.1' de verilmiştir. Prob 1 olarak doğrusal yapılı dizi seçilirken Prob 2 olarak hair pin yapılı oligonükleotid dizisi seçilmiştir. Cıva algılamaya duyarlı -SH (tiyol) sonlandırılmış oligonükleotid problelerinin MPTES ile modifiye edilmiş silikon yüzeyine immobilizasyonu tiyol-disülfid değişim tepkimesine göre gerçekleşmiştir.

Çizelge 2.1 Kullanılan oligonükleotid sekansları

Prob 1	5'-SH-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAT TCG TGT TGT GTT CG-3'
Prob 2	5'-SH-CGG GGG ACA GGA CTT GAC CTT CTC CGC CTT CTT CTC TCC TGT CCC CCG-3'

İmmobilizasyonu sağlamak için, cıvaya duyarlı oligonükleotid problar, 0.1 M pH 7.2 fosfat tampon çözeltisinde (PBS) çözündürülerek 1 μM ' lık derişimde stok çözelti hazırlanmıştır. İmmobilizasyon için optimum sürenin belirlenmesi amacıyla yapılan deneyler, elde edilen bu stok çözelti derişiminde yapılmıştır. Temizlenen silikon pulcuklar, belirlenen optimum süre ve derişimde MPTES ile modifiye edildikten sonra oligonükleotid problelerinin çözeltilerinden alınan 1'er mL çözeltiye daldırılarak 2, 4, 6, 12 ve 24 saat süreyle bekletilmişlerdir. Bu süreler sonunda çözeltilerden çıkarılan silikon pulcuklar yüksek saflıkta su ile yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin elipsometre ve AFM cihazlarıyla karakterizasyonu yapılarak optimum süre belirlenmiştir ve bundan sonra yapılan tüm işlemlerde bu belirlenen süre kullanılmıştır.

Aptamer problemlerin yüzeyde optimum dağılımının sağlanıp sağlanmadığı, elipsometrik olarak kalınlık ölçümleri ile belirlenmiştir. Yüzeye yerleştirilen aptamer problemlerin dağılımına derişimin etkisinin belirlenmesi için yapılan derişim deneyi için öncelikle hazırlanan 1 μM ' lık stok çözeltisi, fosfat tampon çözeltisi (pH 7.2) ile

seyreltilerek beş farklı derişimde çözelti hazırlanmıştır. Elde edilen oligonükleotid prob çözeltisi derişimleri 1 μ M, 500 nM, 100 nM, 50 nM ve 10 nM dır. Aynı şekilde temizlenip hazırlanan MPTES modifiyeli silikon pulcuklar her bir oligonükleotid probu çözeltisinden alınan 1'er mL' lik çözelti içerisine daldırılmış ve belirlenen optimum sürede bekletilmiştir. İşlem sonunda çözeltiden çıkarılan silikon parçaları yüksek saflıkta su ile dikkatlice yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin elipsometre ve AFM cihazlarıyla analizleri yapılarak optimum derişim belirlenmiştir ve bundan sonra yapılan tüm işlemlerde bu belirlenen derişim kullanılmıştır.

2.2.4. Oligonükleotid Prob İmmobilize Edilmiş Silikon Yüzeyin Cıva Sensörü Olarak Kullanılması

Oligonükleotid problemlerin immobilizasyonu sonucunda silikon yüzey üzerinde cıva algılamaya duyarlı bir sensör oluşturulmuştur. Elde edilen bu aptasensörün algılama hassasiyetinin ve algılama sınırının belirlenmesi için cıva algılama deneyleri yapılmıştır.

Cıvanın tamamen bağlandığı optimum sürenin belirlenmesi için yapılan süre deneyinde öncelikle silikon pulcuklar yukarıda belirtilen basamaklardan geçirilerek hazırlanmıştır. Elde edilen aptamer prob immobilize edilmiş sensör yüzeyinin cıva ile etkileştirilmesi sağlanmıştır. Cıva tuzu (HgCl_2) şeklinde temin edilen cıva, yüksek saflıkta su ile seyreltilerek 100 mM derişimde cıva çözeltisi stok olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan silikon pulcuklar cıva çözeltisinden alınan 1'er mL' lik çözeltielerde farklı sürelerde (6, 8, 12, 18 ve 24 saat) bekletilmiştir. Belirlenen süre sonunda çözeltiden çıkarılan silikon pulcuklar yüksek saflıkta su ile yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin elipsometre ve AFM cihazlarıyla analizleri yapılarak cıva tayini için yeterli süre belirlenmiştir ve bundan sonra yapılan cıva analizlerinde cıvaya maruz bırakma (analiz) süresi olarak belirlenen süre kullanılmıştır.

Son olarak, aptasensörlerin spektroskopik elipsometre dönüşümü (transduser) ile Hg^{2+} sensörü olarak kullanım başarısı kontrol edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, her iki aptasensör (Prob 1 ve Prob 2) üzerine farklı derişimlerde cıva gönderilerek sensör cevabı elde edilmiştir. Elde edilen cıva sensörlerinin algılama hassasiyetleri ve algılama sınırlarının belirlenmesi için yapılan bu deneyde cıva çözeltileri farklı derişimlerde hazırlanarak hangi derişimlere kadar algılama yapabildiği analiz

edilmiştir. Cıva çözeltileri 10 mM, 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M ve 1 nM olmak üzere altı farklı derişimde hazırlanmıştır. Belirtilen işlemlerle hazırlanan silikon pulcuklar her derişimden alınan 1'er mL'lik çözeltiler içersine daldırılarak bir önceki deneyde belirlenen süre boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda çözeltiden çıkarılan silikon pulcuklar yüksek saflıkta su ile yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin elipsometre ve AFM cihazlarıyla analizleri yapılarak hangi hassasiyette algılama yapıldığı belirlenmiştir. Sensör algılama sınırı (LOD) ve algılama hassasiyeti belirlenerek karşılaştırılmıştır.

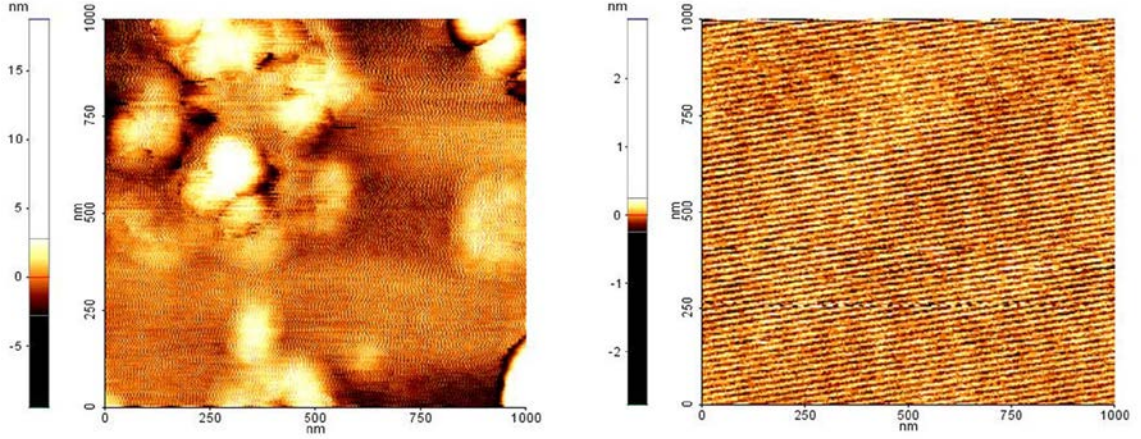
3. BULGULAR

Ağır metallerin çevrede (özellikle su içerisinde) eser miktarda olsa bile tayin edilmesi bu iyonların düşük derişimlerde bile yüksek toksikliğe sahip olması nedeniyle çok önemlidir. Yapılan çalışmanın temel amacı, düşük derişimlerde bile canlıların hayati organlarına etki eden ve endüstriyel proseslerin kaçınılmaz bir yan ürünü olarak ortaya çıkan cıva iyonlarının sulu ortamlardan tayininde kullanılacak bir biyosensörün geliştirilmesidir. Bu amaçla cıva iyonlarının (Hg^{2+}) sulu ortamdaki düşük derişimlerde (1 nM'a kadar) tayini, geliştirilen elipsometri esaslı biyosensör ile sağlanmıştır. Elipsometre esaslı biyosensörler, yüksek algılama hassasiyetine sahiptir. Ancak bu algılama hassasiyetinin yanı sıra algılanacak molekülün yüksek seçicilikle tanı elemanına bağlanması gerekir. Yüksek seçicilik, aynı anda birden fazla benzer molekülün bulunduğu bir tanı ortamında, ilgili molekülün tek başına tayin edilmesini sağlar. Çalışmada DNA esaslı aptamer sekansları kullanılarak yüksek seçicilik sağlanması amaçlanmıştır. Kendiliğinden düzenlenme yöntemi ile biyosensör yongasının yüzeyine immobilize edilen farklı yapılarıdaki aptamerlerin, cıva iyonlarını algılama yetenekleri karşılaştırılmıştır. Sensörlerin performansı, elipsometrik analizler ile belirlenmiştir. Sunulan çalışmaların sonunda, sensörün algılama hassasiyeti ve algılama doğruluğu (algı aralığında lineer cevap) belirlenmiştir. Sensör yüzeylerinin geliştirilme safhasında atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak yüzey karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.1. Silikon Yüzeyinin Temizlenmesi

Çalışmanın bu basamağında silikon pulcuklar safsızlıklardan arındırılmak için etil alkol ve saf su ile 10' ar dakika boyunca banyo edilmiştir. Ardından bu işlemle temizlenmeyen ve yüzeyde biriken kimyasal kirliliklerin temizlenmesi amacıyla plazma cihazıyla 20 dakika temizlenmiştir. Şekil 3.1' de temizleme öncesi ve sonrası atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüleri (topografi) verilmiştir. Şekil 3.1' de görüldüğü gibi Si (100) pulcukların temizleme öncesi yüzeyinde ciddi kirlilikler ve birikimler mevcuttur. Bu organik kirlilikler, imalat aşamasının ardından, yüzeylerin kesilmesi gibi işlemler sırasında ortaya çıkmıştır. Ancak temizleme sonrası elde

edilen yüzey kirliliklerden arınmış pürüzsüz bir yüzeydir. Şekil 3.1 B’de elde edilen görüntü SiC AFM tipi ve Si (100) yüzey arasında tipiktir. Elipsometrik ölçümler sonrasında SiO₂ tabakasının kalınlığı $8.76 \pm 0,022$ nm olarak belirlenmiştir ve organik tabaka belirlenememiştir.



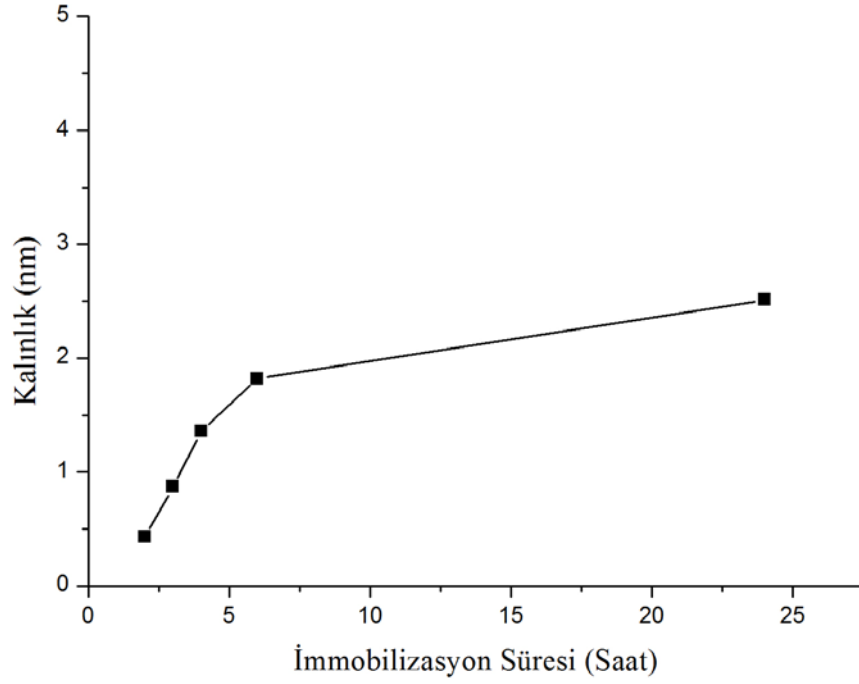
Şekil 3.1 Boş silikon yüzeylerinin atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüleri a) Temizleme işleminden önceki yüzey b) Temizleme ve plazma işleminden sonraki yüzey

3.2. Silikon yüzeyinin 3-Merkaptopropiltrietoksisilan (MPTES) ile Modifikasyonu

3.2.1. Daldırma Süresinin MPTES Tabakası Kalınlığına Etkisinin İncelenmesi

Silan moleküllerinin yüzey modifikasyonlarında daldırma sürelerinin etkisi büyüktür. SAM tabakalarının oluşumunda etkin olan iki mekanizma vardır. Bu mekanizmalar sırası ile yüzeye soğurma ve kovalent bağlanmadır. Her iki basamak, silan molekülü derişimine ve belirli derişimdeki moleküllerin yüzey ile etkileşim süresine bağlı olduğundan, çalışmanın bu kısmında MPTES moleküllerinin silikon yüzeye immobilizasyonunda daldırma süresinin etkisi incelenmiştir. Silikon yüzeylerin 2, 3, 4, 6 ve 24 saat süreyle MPTES molekülleriyle modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan bütün çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleşmiştir. Elipsometrik ölçümler sonrasında cihazın kendi modelleme programıyla yapılan hesaplamalarla silikon yüzeye bağlanan MPTES molekülleri miktarı kalınlık cinsinden bulunmuştur. Elipsometrik modelleme sırasında taban malzeme olarak silikon alttaş, SiO₂ oksit tabakası, Cauchy modeli olarak girilen organik tabaka ve ortam olarak havaya ait kırılma indisleri cihaz kütüphanesinden ve model parametreleri şeklinde girilerek kullanılmıştır. Şekil 3.2' de MPTES çözeltisinde immobilizasyonları gerçekleştirilen silikon yüzeylerin daldırma süresiyle oluşan kalınlık değişimleri verilmiştir. Kalınlık

ölçümlerine ait belirsizlik standart sapma cinsinden (2σ) çok küçük olduğu için grafik üzerinde verilmiş olmasına rağmen ölçek nedeniyle görülmemektedir.

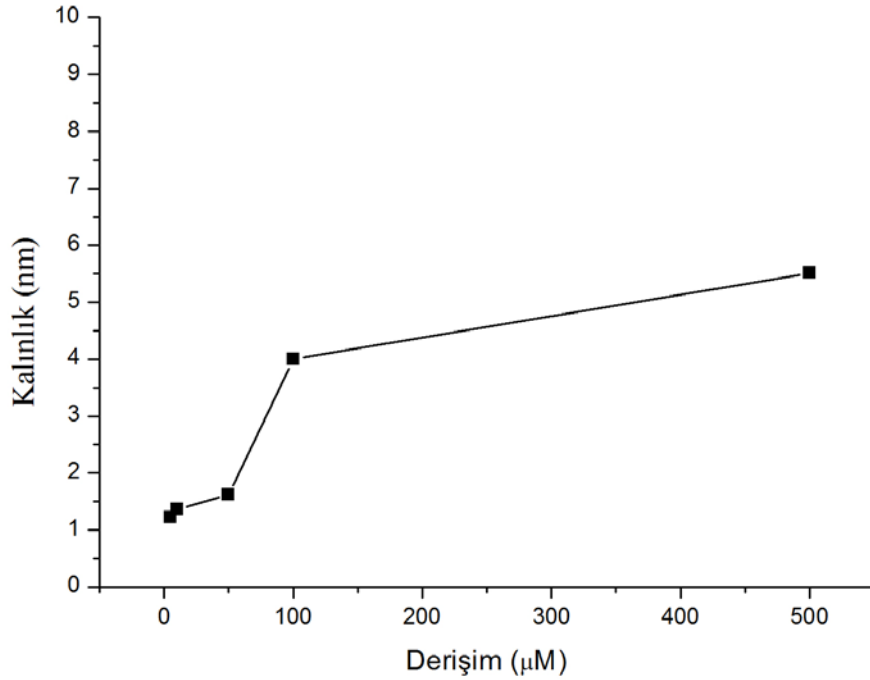


Şekil 3.2 Daldırma Süresinin MPTES Tabakası Kalınlığına Etkisi

Yukarıdaki şekilde de görüldüğü gibi 2, 3, 4, 6 ve 24 saat zaman aralıkları için hesaplanan kalınlıklar sırasıyla $0.43 \pm 0,025$, $0.87 \pm 0,036$, $1.36 \pm 0,028$, $1.82 \pm 0,039$ ve $2.51 \pm 0,0312$ nm olarak belirlenmiştir. İlk 4 saatte yüzeyde tek tabaka oluşumu gözlenmiştir. Ancak daha uzun daldırma sürelerinde oluşan kalınlık artışları yüzeyde makro moleküllerin oluştuğunu göstermektedir ve çoklu tabakalar istenilen bir durum değildir. Uzun süreler için kalınlığın artması, muhtemelen havanın neminden kaynaklanan su girişi nedeniyle yüzeyde MPTES merlerinden oluşan birikim sonucu gerçekleşmektedir. Özellikle 24 saat gibi sürelerde, havada bulunan nemin etil alkol içerisine soğurulması ve tepkimeye dahil olması muhtemeldir. 4. saatte oluşan 1.36 nm' lik kalınlık istenilen tek tabaka formu için uygun bulunduğundan daldırma süresi 4 saat olarak seçilmiştir ve daha sonraki çalışmalarda bu süre kullanılmıştır.

3.2.2. Derişimin MPTES Tabakası Kalınlığına Etkisinin İncelenmesi

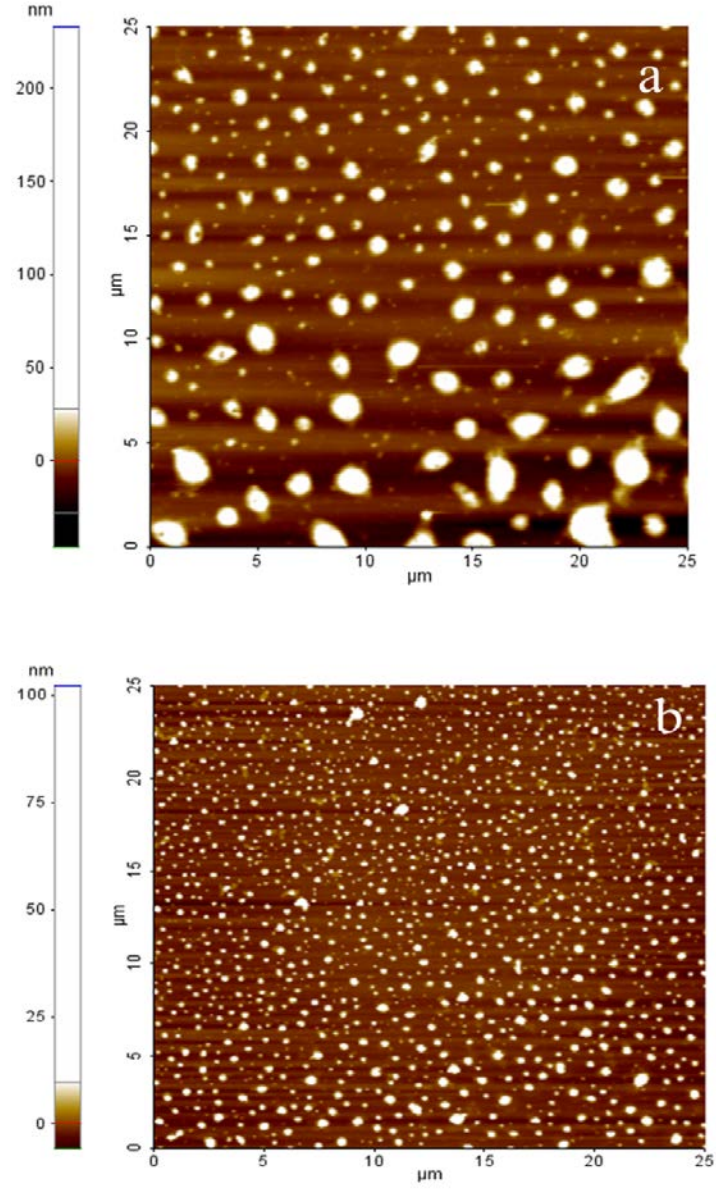
Çalışmanın bu kısmında MPTES derişiminin silikon yüzeyinde oluşturulan MPTES tabakası kalınlığına etkisi ve formasyon yapısı incelenmiştir. Bu amaçla 500, 100, 50, 10 ve 5 μM gibi 5 farklı derişimde MPTES/mutlak etil alkol çözeltileri kullanılmıştır. Daldırma süresi olarak bir önceki çalışmada belirlenen 4 saat süre kullanılmıştır. Şekil 3.3' de kalınlığın derişime göre değişim grafiğı verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi 5 ve 10 μM derişimde kalınlıklar sırasıyla $1.22\pm0,027$ ve $1.36\pm0,027$ nm olarak belirlenmiştir. Daha yüksek derişimlere çıkıldıkça kalınlığın 5 nm'nin üzerine çıktığı görülmektedir.

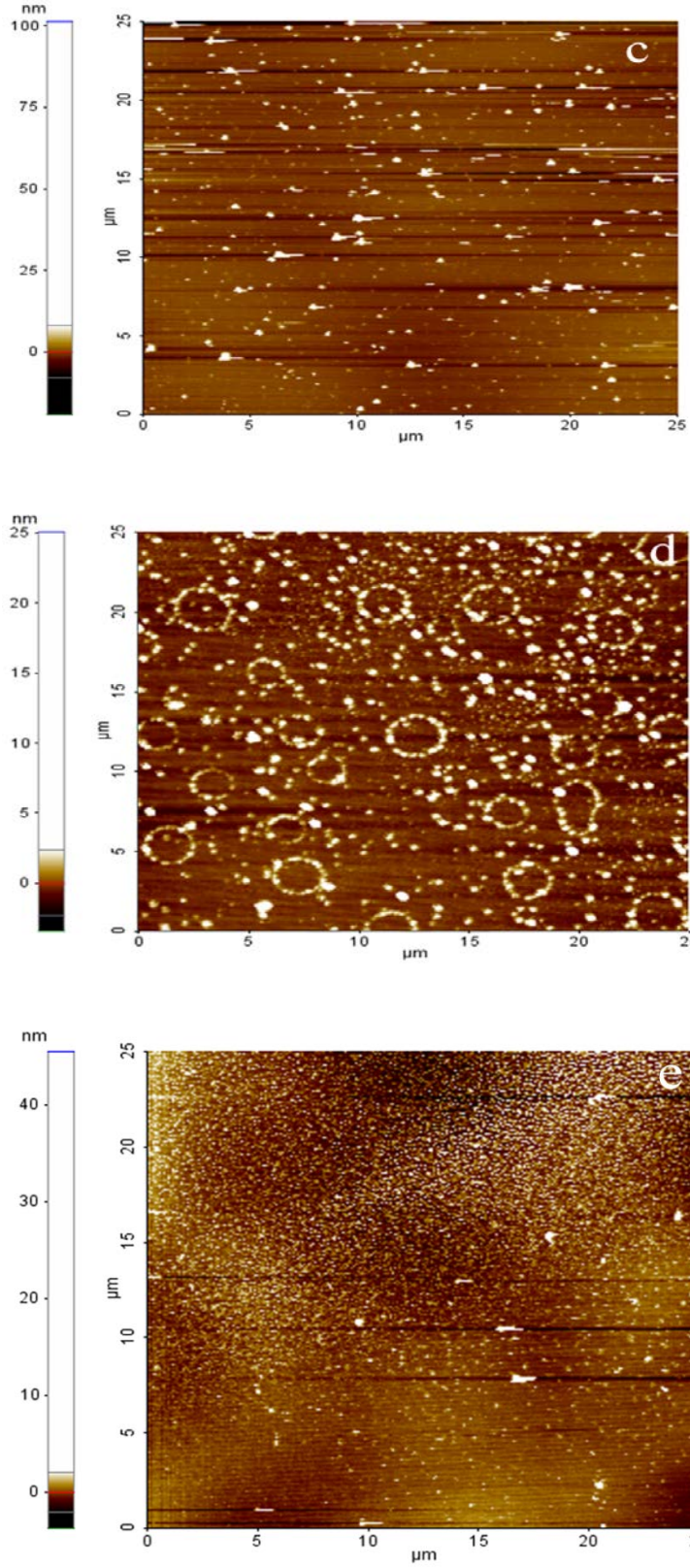


Şekil 3.3 Derişimin MPTES Tabakası Kalınlığına Etkisi

100 μM ve üzeri MPTES derişiminde elde edilen hızlı kalınlık artışı, fiziksel birikimin olduğunu göstermektedir. Bu kalınlık artışına neden olan yapısal formasyon, AFM kullanılarak incelenmiştir. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile yapılan analizlerle MPTES modifiye edilen yüzeyin yapısı Şekil 3.4'te verilmiştir. Karşılaştırma yapılabilmesi amacıyla tüm yüzey taramaları $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ 'lik alanda gerçekleştirilmiştir. Topografi görüntüleri, yükseklik skalaları dikkate alınarak incelenmelidir. Ayrıca AFM görüntülerinin cihaza ait XEI yazılımı kullanılarak

incelenmesi sonucu elde edilen RMS pürüzlülük değerleri de Çizelge 3.1'de verilmiştir. RMS pürüzlülük değerleri nicel olarak, AFM topografi görüntüleri de yarı-nicel olarak dikkate alındığında MPTES formasyonu hakkında yorum yapılabilir.





Şekil 3.4 Farklı derişimlerde MP TES molekölü ile modifiye edilmiş silikon yüzeyinin AFM görüntöleri, a)500 μM, b) 100 μM, c) 50 μM, d) 10 μM e) 5 μM

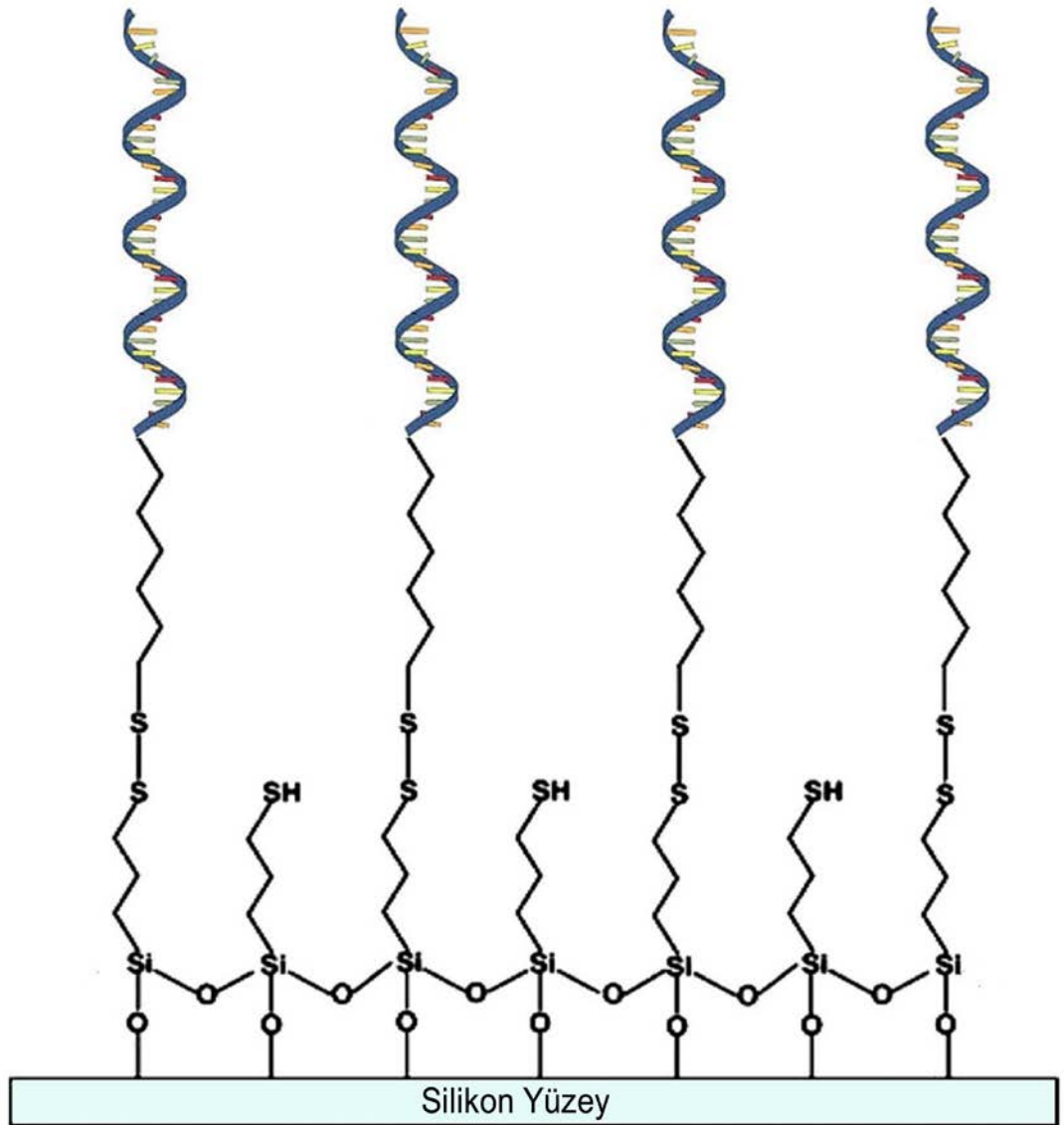
Çizelge 3.1 Farklı MP TES derişimleri nde yüzey RMS değ erleri

MP TES derişimleri (μM)	RMS pürüzlülük değ erleri (nm)
500	6.72 ± 2.930
100	4.98 ± 0.702
50	4.08 ± 0.987
10	1.41 ± 0.255
5	1.29 ± 1.424

Ş ekil 3.4 a’da görüldüğü üzere, yüksek derişimde yaklaşık 1 μm çapa sahip ve 200 nm yükseklikte adacıklar oluşmuştur. Daha küçük MP TES adacıkları da aynı görüntüde görülebilmektedir. Ş ekil 3.4 b’de çok daha küçük ve 100 nm yükseklikteki daha sık adacıklar dikkati çekmektedir. Benzer şekilde, Ş ekil 3.4 c’de MP TES adacık formasyonun nasıl oluştuğu, Ş ekil 3.4 a-c’nin sırasıyla incelenmesi sonucu anlaşılabilir. Burada bir istisna olarak, Ş ekil 3.4 d’de farklı bir formasyonun elde edildiği bölge verilmiştir. Bu şekilde, halka yapısının oluştuğu net bir şekilde görülmektedir. Bu halka şeklindeki yapıların arasında ise Ş ekil 3.4 a-c ile uyumlu bir yığılım gözlenmektedir. Halka şeklindeki oluşumlar, MP TES formasyonunda atmosferik nemin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Buradaki yapılar, gerek Si taban malzeme üzerinde temizlenmemiş kirliliklerin neden olduğu düzensiz birikimin, gerekse de mutlak etil alkol içerisine soğurulan su buharının yüzeyde MP TES oligomerleri oluşturmalarının bir sonucu olarak yorumlanmıştır. Çizelge 3.1’den ve AFM görüntülerinden elde edilen sonuçlar ve elipsometrik ölçümler ile RMS değ erlerinin birbirini doğruladığı görülmüştür. Yüksek derişimlerde MP TES kullanımı, yüzey formasyonunun adacık şeklinde birikintiler şeklinde olmasına neden olmaktadır. Amacımızın, aptamer problemlerin uygun bir şekilde immobilize edilmesi olduğu dikkate alınarak, düşük derişimlerde MP TES immobilizasyonunun daha uniform bir dağılıma neden olduğu görülebilir. Yapılan bütün ölçümler ve hesaplamaların sonunda 10 μM derişimdeki MP TES’in istenilen tek tabaka oluşumu için uygun olduğu görülmüştür.

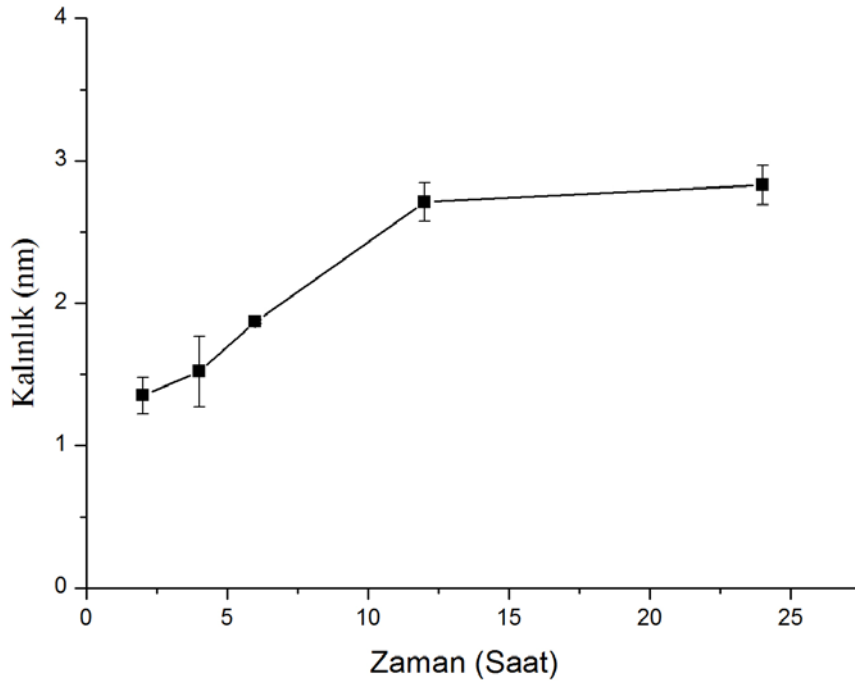
3.3. Silikon Yüzey Üzerine Cıva Duyarlı Oligonükleotid Probların İmmobilizasyonu

Çalışmanın bu bölümünde 5'-tiyollenmiş cıva algılamaya duyarlı oligonükleotid problemlerin silikon yüzeye immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Oligonükleotid prob immobilizasyonu DNA biyosensörlerinde sinyal gücünü belirleyen çok önemli bir basamaktır. İmmobilizasyon işleminde 5'-tiyol sonlanmış oligonükleotid problemler MPTES ile doğrudan disülfid bağı ile kovalent olarak bağlanmıştır. Oluşan tiyol-disülfid bağı Şekil 3.15' de şematize edilmiştir.



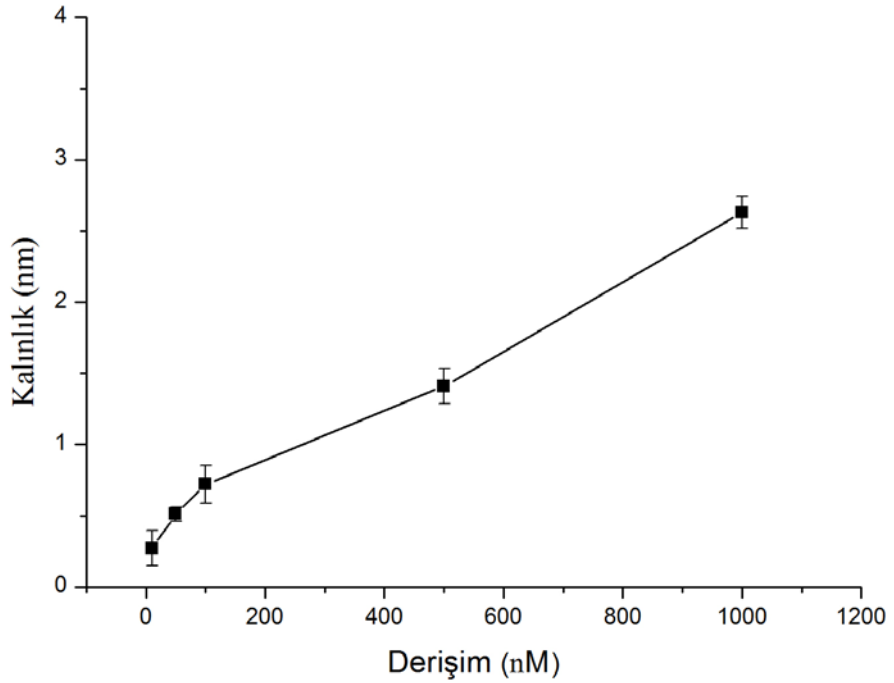
Şekil 3.5 MPTES ve tiyol sonlanmış DNA arasındaki disülfid bağlanma

Cıvaya duyarlı oligonükleotid problemlerin immobilizasyonu için yapılan optimum süre belirleme çalışmasında silikon pulcuklar prob çözeltisinde 2, 4, 6, 12 ve 24 saat sürelerinde tutulmuşlardır. Immobilizasyon süresinin belirlenmesinde kullanılan prob derişimi 1 μM 'dır ve 0.1 M pH 7.2 fosfat tampon çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Farklı sürelerde disülfid bağı ile aptamer problemlerin (Prob 1 ve Prob 2) immobilizasyonu, oda sıcaklığında ve ışık almayan ortamda gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmasında kalınlıklar spektroskopik elipsometre kullanılarak belirlenmiştir. Aptamer problemlerin kalınlık modellemesinde de taban malzeme olarak Si, oksit tabaka SiO_2 , aptamer tabakası olarak Cauchy modeli ile tanımlanmış organik tabaka ve dış ortam olarak hava kullanılmıştır. Şekil 3.6 'da immobilizasyon süresine bağılı kalınlık grafiğı verilmiştir. Görüldüğü gibi 2-6 saatleri arasında kalınlık 1.35-1.87 nm aralığındayken 12. saatte kalınlık 2.71 ± 0.134 nm civarına çıkmıştır. 12 saatten sonra kalınlıkta önemli bir değışiklik gözlenmemiştir ve bu nedenle prob immobilizasyonu için uygun görülen süre 12 saat olarak seçilmiştir.



Şekil 3.6 Immobilizasyon süresinin oligonükleotid prob tabakası kalınlığına etkisi

Oligonükleotid problemlerin immobilizasyonunda derişimin etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda oligonükleotid problemler farklı derişimlerde pH 7.2 fosfat tamponunda hazırlanmıştır. MPTES ile modifiye edilmiş silikon yüzeyler, 1000-10 nM aralığında 5 farklı derişimde hazırlanan prob çözeltileri içerisinde 12 saat süresince bekletilmiştir. Şekil 3.7' de görüldüğü gibi prob tabakası kalınlığı çözelti derişimi arttıkça artmıştır. 10 nM derişimde kalınlık 0.27 ± 0.123 nm iken 1 μ M derişimde kalınlığın 2.63 ± 0.111 nm' ye kadar çıktığı görülmüştür. 12 saat süre ile 1 μ M derişimde aptamer problemlerin immobilize edilmesi, sensör yongasının hazırlanması aşamasında optimum süre ve derişim olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.7 Oligonükleotid prob derişiminin kalınlığa etkisi

3.4. Oligonükleotid Prob İmmobilize Edilmiş Silikon Yüzeylerin Elipsometrik Cıva Sensörü Olarak Kullanılması

Cıva iyonlarını algılamak için seçici bağlanma şekli olan Timin- Hg^{+2} -Timin (T- Hg^{+2} -T) bağlanmasına uygun olarak seçilen Prob 1 ve Prob 2 DNA oligonükleotidleri ayrı ayrı 1 μ M derişimde 12 saat süreyle MPTES modifiye edilmiş silikon yüzeye immobilize edilmiştir. Her iki proba yapılan süre deneyinde bütün sürelerde cıva düzeylerinin aynı olduğu görülmüş ve cıva tespitinin en düşük süre olan 6 saatte tamamlandığı belirlenmiştir. Farklı yapıda iki oligonükleotid prob

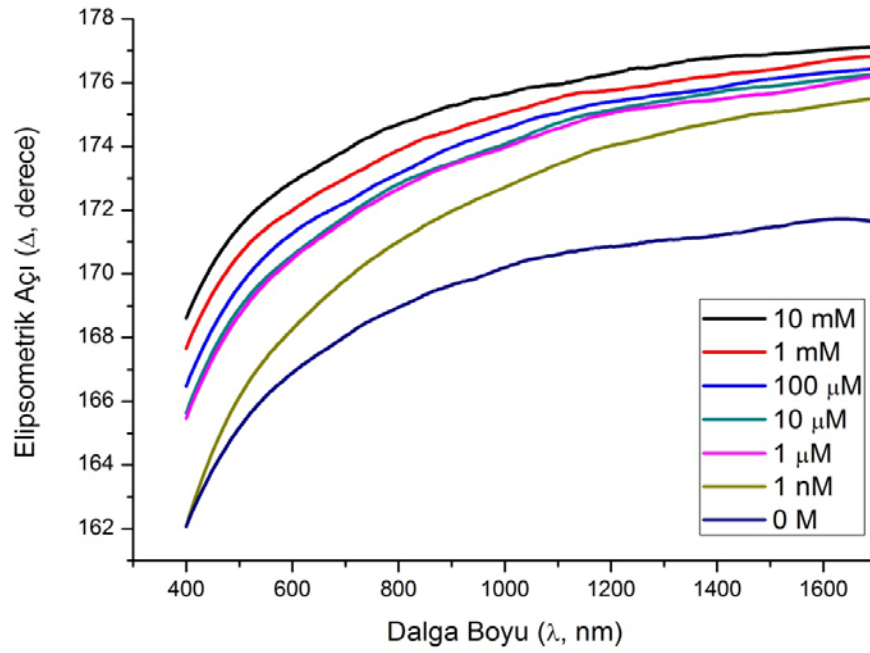
kullanılarak yapılan bu işlemle iki farklı sensör elde edilmiş ve farklı tanı elemanlarının sensör yongası kapasiteleri değerlendirilmiştir.

Cıva algılama sınırı ve algıma hassasiyetini belirlemek amacıyla elde edilen sensör yongaları farklı derişimlerde hazırlanan cıva çözeltilerinde denenmiştir. Elipsometre cihazı ile yapılan ölçümler ve analizler değerlendirilirken delta (Δ ; faz kayması) parametresi dikkate alınmıştır. Elipsometrik Delta (Δ ; faz kayması) parametresi ışığın yansıdığı tabakaların optik özelliklerine bağlıdır ve bu nedenle kompleks kırınım indisi, delta parametresi ile doğrudan ilişkilendirilebilir. Dielektrik maddeler için yansıma parametrelerinin homojen tabakalarda doğrudan tabaka kalınlığına bağlı olduğu varsayımı yapılmıştır. Bu varsayımla, hibridizasyon sonucu yüzeyde gerçekleşen birikme, elipsometrik değişkenin bağlı değişimi (Δ parametresindeki değişim) olarak izlenmiş ve bu parametredeki değişim, kinetik incelemede kullanılmıştır. Hibridizasyon süreci boyunca Δ değişmekte ve bu değişime bağlı olarak hibridizasyon eş zamanlı olarak izlenebilmektedir (Arwin, 2000). Ayrıca, diğer bir elipsometrik veri olan Ψ açısı, yansıyan ışığın polarizsyon halleri arasındaki ışık şiddeti oranı olduğu için, aslında bir çeşit refraktometrik ölçümdür ve tez çalışmasında hedeflenen derişimler için hassas değildir. Belirtilen nedenlerden dolayı, Prob 1 ve Prob 2 aptasensörlerin Hg^{2+} tayinindeki performansının belirlenmesinde, spektroskopik elipsometre kullanılarak ölçülen Δ parametresindeki değişim dikkate alınmıştır.

3.4.1. Prob 1 (5'-tiyol-AAA AAA AAA AAA AAA AAT TCG TGT TGT GTT CG-3')'in Sensör Olarak Kullanılması

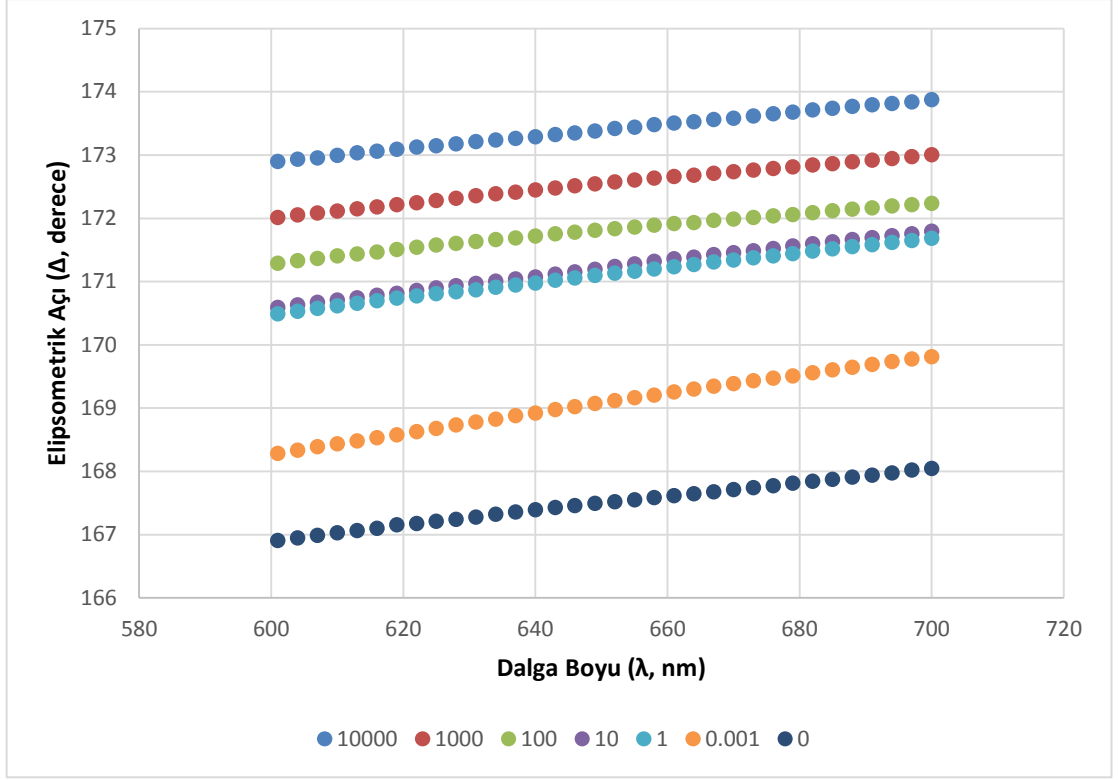
Prob 1' in çeşitli derişimlerdeki cıva çözeltilerinde 400-1600 nm dalga boyu aralığındaki delta değişimleri Şekil 3.8' de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi Δ parametresindeki değişim, derişiminin artmasıyla artmıştır. Bu durum, Δ parametresinin beklendiği gibi, aptasensör tarafından yakalanan Hg^{2+} derişimi ile orantılı olarak değiştiğinin bir göstergesidir. Hibridizasyon sonucu yüksek derişimlerde Δ değişimi doğrusal olarak artmamıştır. Aslında beklenen durum, eğer doğrusal bir aptasensör cevabı varsa, tekli site bağlanması nedeniyle logaritmik bir sensör kalibrasyon eğrisinin elde edilmesidir. 0M olarak verilmiş olan eğri, 400-1600 nm arasında spektroskopik elipsometri ile elde edilen Si (100) taban malzeme üzerine immobilize edilmiş olan MPTES tabakası ve aptamer proba ait Δ ölçümleridir. Şekil 3.8'de görüldüğü gibi, Hg^{2+} 'nın aptamer tarafından yakalanmasının ardından tüm dalga boylarında Δ - λ ilişkisi değişmiştir. Ayrıca, Hg^{2+}

derişiminin artması ile birlikte, Prob 1 immobilize edilmiş yüzeyden farklı ancak Hg^{2+} tutulmuş yüzeye benzer bir değişim, neredeyse paralel olarak göze çarpmaktadır. Özellikle 600 - 700 nm dalga boyu aralığında, Δ - λ ilişkisinin doğrusal olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.9). Bu bölgedeki değişim dikkate alınarak aptasensörün Hg^{2+} algılama performansı spektroskopik elipsometre ile belirlenmiştir.



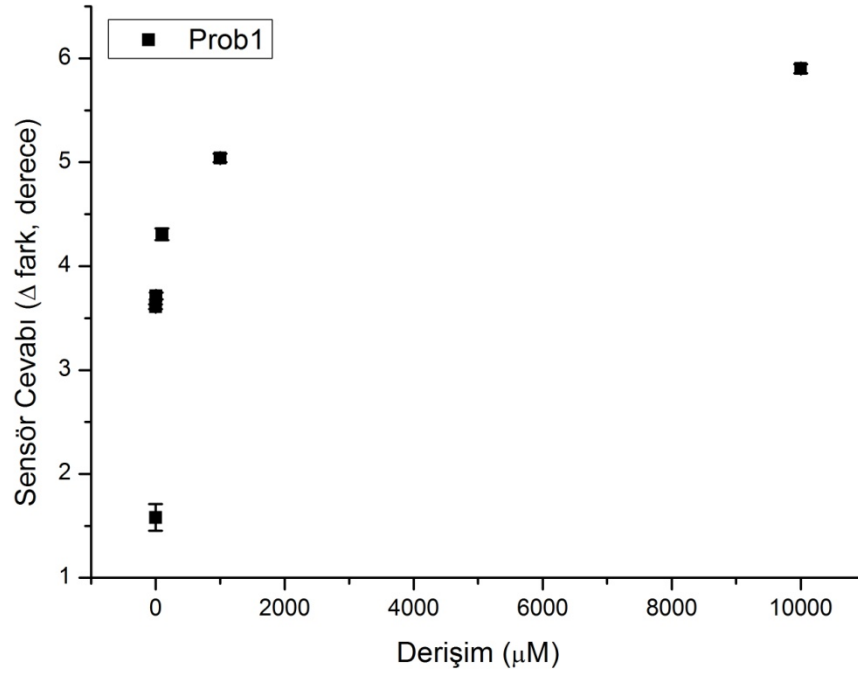
Şekil 3.8 Prob 1 derişimlerinin tüm dalga boylarındaki delta değişimleri

Prob 1 sensörünün farklı cıva derişimleri için lineer bölgede elde edilmiş olan spektroskopik elipsometre ölçümleri (Δ - λ) Şekil 3.9' da verilmiştir. 600-700 nm arasında Δ - λ ilişkisi tüm derişimlerde 0.98 civarında bir regresyon katsayısı (R^2) değeri ile bir doğru vermektedir. Bu dalga boyu aralığındaki Δ - λ doğruları Hg^{2+} derişiminin artması ile birlikte daha yüksek Δ değerlerinde, benzer eğimlerde ortaya çıkmıştır. Ancak, sensor cevabının incelenmesi amacıyla, bu aralıktaki Δ farkları dikkate alınmıştır ve 1 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM , 1 mM ve 10 mM için belirlenen Δ farkları sırasıyla 1.58°, 3.6°, 3.7°, 4.3°, 5° ve 5.9° olarak bulunmuştur (Çizelge 3.2).



Şekil 3.9 Prob 1 derişimlerinin lineer bölgedeki Δ değışimleri

Şekil 3.10' da cıva değışimlerine bağı olarak Prob 1 sensörünün sinyalindeki değışimler verilmiştir. Grafikten okunan sensör cevapları Çizelge 3.2' de verilmiştir. Cıva derişiminin artmasıyla sensör tepkisi artmaktadır. Beklendiğı üzere aptasensörün çoklu site Hg^{2+} bağlaması, logaritmik olarak değışen bir izoterm eğrisi vermektedir. Bu durum, düşük Hg^{2+} derişimlerinde, sensör cevabının daha doğrusal olacağını göstermektedir. Şekil 3.10'da elde edilen grafik “sensör kalibrasyon eğrisi” olarak da adlandırılmaktadır. Düşük derişimlerde bile sensörün algılama kapasitesi yüksektir. 1 nM derişimdeki cıvada sensörün verdiği cevap 1.58° iken 10 mM derişimde bu değeri 5.9° ye kadar çıkmiştir (Çizelge 3.2).



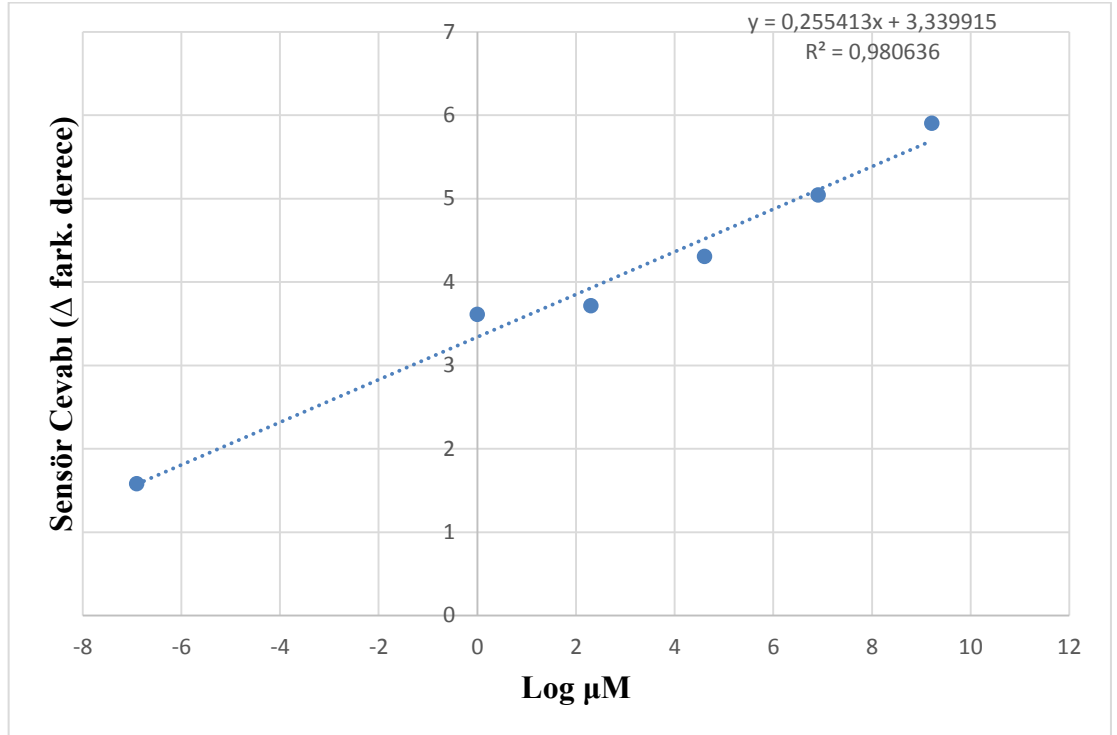
Şekil 3.10 Prob 1 sensörünün cevabı

Çizelge 3.2’de ayrıca 1 μM Pb^{2+} ve 100 μM Pb^{2+} ile gerçekleştirilen seçicilik deneyinin sonucu da verilmiştir. Aptamerlerin spesifikliğı bilinmesine rağmen, çalışmanın amaçları bakımından Hg^{2+} seçiciliğinin kontrol edilmesi ve doğrulanması da önemlidir. Çizelge 3.2’den görüldüğü üzere seçicilik deneyleri sonucu elde edilen aptasensör cevabı gürültü sınırları dahilinde kalmıştır.

Çizelge 3.2 Prob 1 sensörünün cevabı

Derişim (μM)	Sensör Cevabı (Δ fark, derece)
10000	5.902 ± 0.044
1000	5.041 ± 0.041
100	4.306 ± 0.056
10	3.714 ± 0.031
1	3.610 ± 0.022
0.01	1.581 ± 0.127
1 μM Pb^{2+}	0.063 ± 0.042
100 μM Pb^{2+}	0.089 ± 0.047

Sensör uygulamalarında kinetik değişimden çok sensör doğrusallığı ve algılama sınırı önemlidir. Prob 1 kullanılan aptasensörün Hg^{2+} için sensör performansının değerlendirilmesi için $\log \text{Hg}^{2+}$ derişimi- Sensör Cevabı (Δ fark) grafiğı çizilmiştir (Şekil 3.11). Bu grafik sensör algılama sınırını belirlemek için kullanılmıştır ve $y=ax+b$ şeklinde birinci derece doğru vermiştir ($R^2=0.98$). Şekil 3.11' de de görüldüğü gibi aptasensör bir semi-log derişim-sensör cevabı eğrisi vermektedir ve aptamer- Hg^{2+} arasındaki kinetiğe uygun bir davranış sergilemektedir. Prob 1 olarak adlandırılan bu DNA-aptasensöründe hesaplanan algılama sınırı 3.95 pM'dır (kesim noktası) ve algılama hassasiyeti 0.2554 derece/ μM ' dır (doğrunun eğimi).

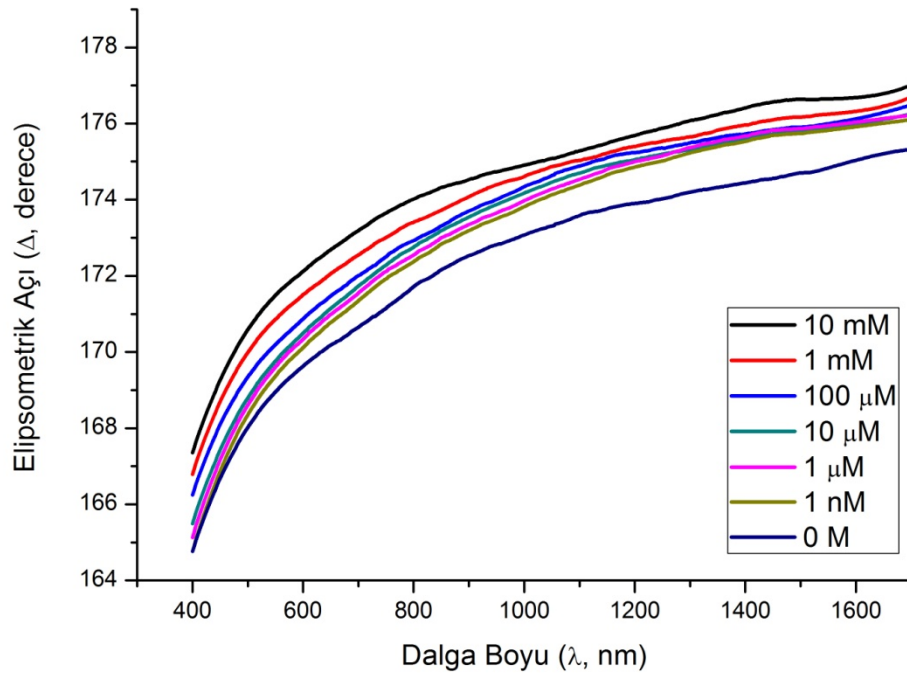


Şekil 3.11 Prob 1 sensör tepkisinin doğrusallığı

3.4.2. Prob 2 (5'-tiyol-CGG GGG ACA GGA CTT GAC CTT CTC CGC CTT CTT CTC TCC TGT CCC CCG-3')nin Sensör Olarak Kullanılması

Şekil 3.12' de Prob 2 aptasensörünün çeşitli derişimlerde cıva çözeltilerinde 400-1600 nm dalga boyu aralığındaki delta derişimleri verilmiştir. Δ parametresinin aptasensör tarafından yakalanan Hg^{2+} derişimi ile orantılı olarak derişmesi beklenmektedir ve Δ parametresinde ki derişimin, beklenildiğı gibi derişiminin artmasıyla arttığı görülmektedir. Tekli site bağlanması nedeniyle logaritmik bir

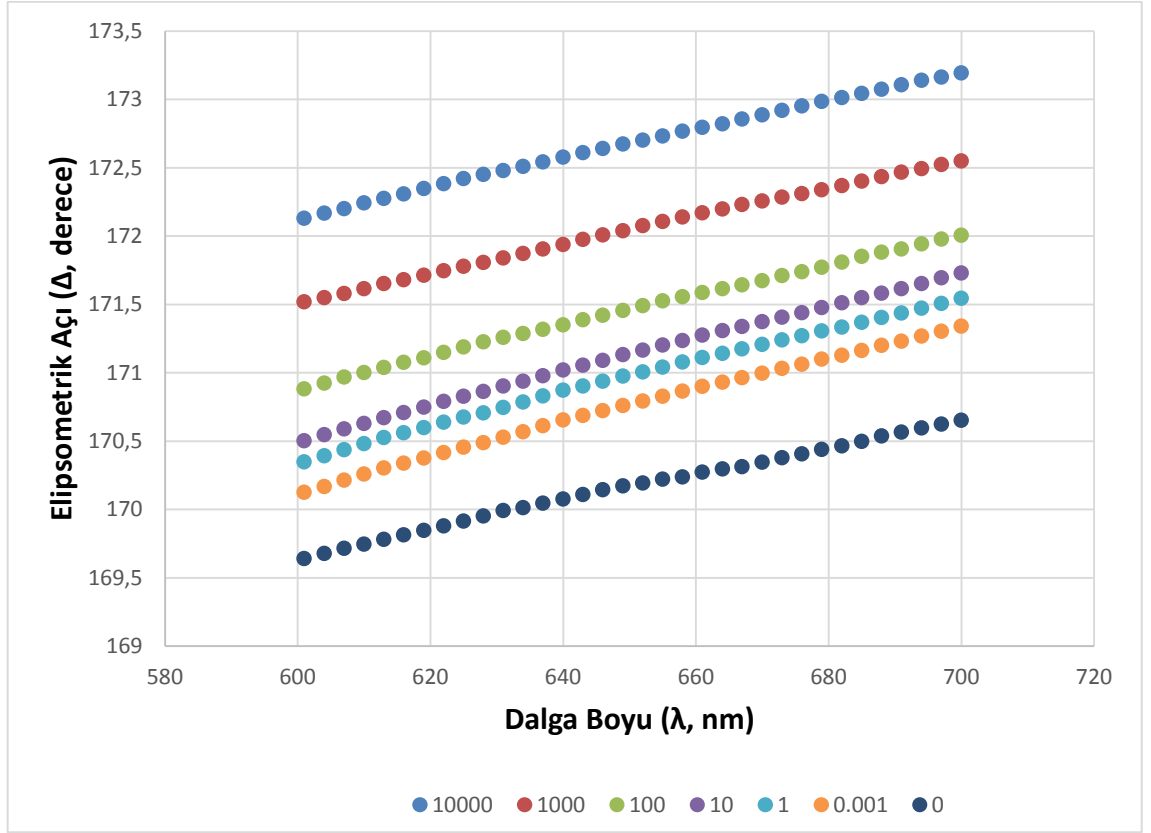
sensör kalibrasyon eğrisinin elde edilmesi beklenmektedir ancak hibridizasyon sonucunda Δ değişiminin doğrusal olarak artmadığı görülmektedir. 0M olarak verilmiş olan eğri, 400-1600 nm arasında spektroskopik elipsometri ile elde edilen Si (100) taban malzeme üzerine immobilize edilmiş olan MPTES tabakası ve aptamer proba ait Δ ölçümleridir. Şekil 3.12' de Hg^{2+} 'nın aptamer tarafından yakalanmasının ardından tüm dalga boylarında Δ - λ ilişkisi değiştiği görülmektedir. Hg^{2+} derişiminin artması ile birlikte; değişimde artmaktadır ancak bu değişimin beklenilenin aksine çok az olduğu görülmektedir. Özellikle 600 - 700 nm dalgaboyu aralığında, Δ - λ ilişkisinin doğrusal olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.13). Bu bölgedeki değişim dikkate alınarak aptasensörün Hg^{2+} algılama performansı spektroskopik elipsometre ile belirlenmiştir.



Şekil 3.12 Prob 2 derişimlerinin tüm dalga boylarındaki delta değişimleri

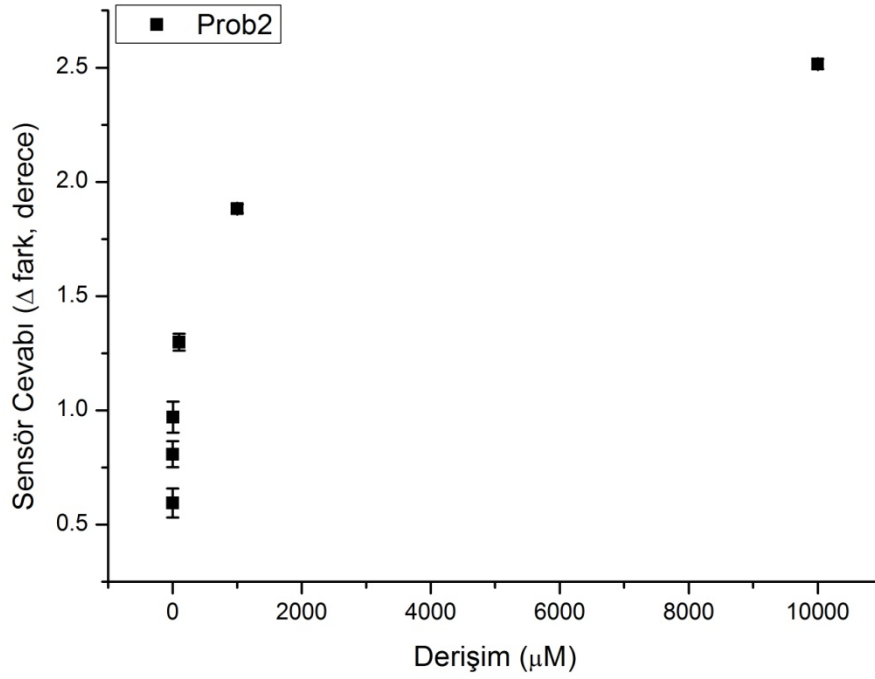
Prob 2 sensörünün farklı cıva derişimleri için lineer bölgede elde edilmiş olan spektroskopik elipsometre ölçümleri (Δ - λ) Şekil 3.13' de verilmiştir. 600-700 nm arasında Δ - λ ilişkisi tüm derişimlerde 0.94 civarında bir regresyon katsayısı (R^2) değeri ile bir doğru vermektedir. Bu dalga boyu aralığındaki Δ - λ doğruları Hg^{2+} derişiminin artması ile birlikte daha yüksek Δ değerlerinde, benzer eğimlerde ortaya çıkmıştır. Ancak, sensor cevabının incelenmesi amacıyla, bu aralıktaki Δ farkları

dikkate alınmıştır ve 1 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM ve 10 mM için belirlenen Δ farkları sırasıyla 0.5°, 0.8°, 0.9°, 1.2°, 1.8° ve 2.5° olarak bulunmuştur (Çizelge 3.4).



Şekil 3.13 Prob 2 derişimlerinin lineer bölgedeki delta değışimleri

Şekil 3.14' de cıva değışimlerine bağı olarak Prob 2 sensörünün sinyalindeki değışimler verilmiştir. Grafikten okunan sensör cevapları Çizelge 3.3' de verilmiştir. Cıva derişiminin artmasıyla sensör tepkisi artmaktadır. Beklendiğı üzere aptasensörün çoklu site Hg^{2+} bağlaması, logaritmik olarak değışen bir izoterm eğrisi vermektedir. Prob 2 aptasensörünün düşük Hg^{2+} derişimlerinden çok yüksek derişimlerde daha doğrusal olduğu görülmektedir. 1 nM - 10 μ M derişimleri arasında sensör cevabı 0.5°- 0.9° arasında iken 1 mM' da 1.8° ve 10 mM' da 2.5°' ye kadar çıkmıştır (Çizelge 3.3).



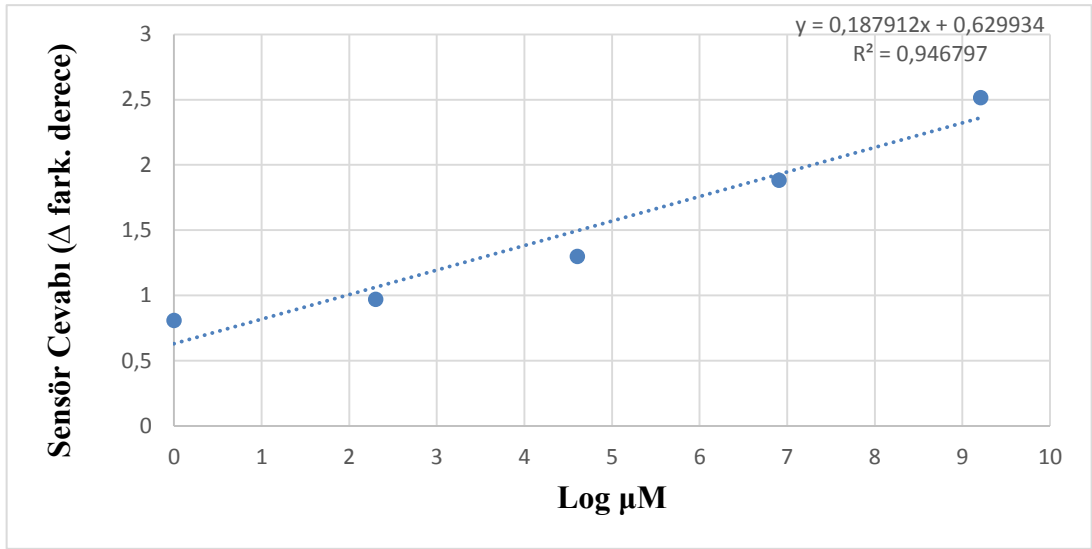
Şekil 3.14 Prob 2 sensörünün cevabı

Çizelge 3.3’de ayrıca 1 µM Pb²⁺ ve 100 µM Pb²⁺ ile gerçekleştirilen seçicilik deneyinin sonucu da verilmiştir. Aptamerlerin spesifikliğı bilinmesine rağmen, çalışmanın amaçları bakımından Hg²⁺ seçiciliğinin kontrol edilmesi ve doğrulanması da önemlidir. Çizelge 3.3’den görüldüğü üzere seçicilik deneyleri sonucu elde edilen aptasensör cevabı gürültü sınırları dahilinde kalmıştır.

Çizelge 3.3 Prob 2 sensörünün cevabı

Derişim (µM)	Sensör Cevabı (Δ fark, derece)
10000	2.515 ± 0.021
1000	1.882 ± 0.019
100	1.298 ± 0.036
10	0.970 ± 0.067
1	0.808 ± 0.056
0.001	0.594 ± 0.063
1 µM Pb ²⁺	0.081 ± 0.072
100 µM Pb ²⁺	0.092 ± 0.061

Şekil 3.15' de Prob 2 kullanılan aptasensörün Hg^{2+} için sensör performansının değerlendirilmesi için $\log Hg^{2+}$ derişimi- Sensör Cevabı (Δ fark) grafiğı çizilmiştir. Bu grafik sensör algılama sınırını belirlemek için kullanılmıştır ve $y=ax+b$ şeklinde birinci derece doğru vermiştir ($R^2=0.94$). Şekilde de görüldüğü gibi aptasensör aptamer- Hg^{2+} arasındaki kinetiğe uygun bir davranış sergileyerek bir semi-log derişim-sensör cevabı eğrisi vermektedir. Prob 2 DNA aptasensöründe hesaplanan algılama sınırı 71 nM'dır (kesim noktası) ve algılama hassasiyeti 0.1879 Derece/ μM ' dır (doğrunun eğimi).



Şekil 3.15 Prob 2 sensör tepkisinin doğrusallığı

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Uzun süreden beri zararlı kirleticiler olarak kabul gören ve düşük derişimlerde bile canlıların hayati organlarına etki eden ağır metal iyonları kalıcı etkilerinden dolayı canlı sistemler ve çevre sağlığı yönünden önem taşımakta olup belirli bir sınırı değerinin üzerinde son derece toksik etki göstermektedir. Tez çalışmasında, hedef seçiciliğinin yüksek olması, "var-yok" tanısının hızlı ve güveninilir olması özelliklerinden dolayı ağır metal iyonlarının sulu ortamlardan tayin edilmesinde kullanılmak üzere spektroskopik elipsometri esaslı bir aptasensör geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın ilk basamağında, Si (100) taban malzeme üzerine aptamerlerin immobilizasyonunu sağlamak üzere bir tiyol sonlanmış yüzey tek tabakasının oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla silan tepkimesi uygun görülmüş ve fonksiyonel grubu tiyol olan MPTES molekülünün silikon yüzeye immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. MPTES'in tek tabaka oluşturması için gereken süre ve derişim optimize edilmiştir. Daldırma süresinin belirlenmesi için yapılan çalışmada ilk 4 saat içinde istenilen tek tabaka oluşumu elde edilmiştir ve yüzeyde oluşan tabaka kalınlığı yaklaşık 1.36 nm olarak bulunmuştur. Tabaka kalınlıkları spektroskopik elipsometre ve AFM kullanılarak belirlenmiştir. 4 saatten sonra tabaka kalınlığının arttığı, yüzeyin tek tabaka formasyonundan çoklu tabaka formasyonuna döndüğü görülmüştür. Çoklu tabakaya geçiş adacıklar şeklinde gerçekleşmiş ve sürenin (veya derişimin) artması ile adacıklar, yükseklikleri 200 nm'yi ve genişlikleri birkaç μm 'yi bulan yapılar haline gelmiştir. MPTES için karanlık ortamda ve oda sıcaklığında, kendisliğinden düzenlenen tek tabaka oluşturma süresi 4 saat olarak belirlenmiş ve daha sonraki çalışmalarda da bu süre kullanılmıştır.

Silikon yüzeyde oluşan MPTES tabakasına MPTES çözeltisinin derişiminin etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada 5 ve 10 μM derişimindeki çözeltide oluşan tabaka kalınlığının yaklaşık olarak 1.22 ve 1.37 nm olduğu görülmektedir. Bu derişimden sonra tabaka kalınlığının arttığı ve yüzeyde çoklu tabaka oluşturduğu

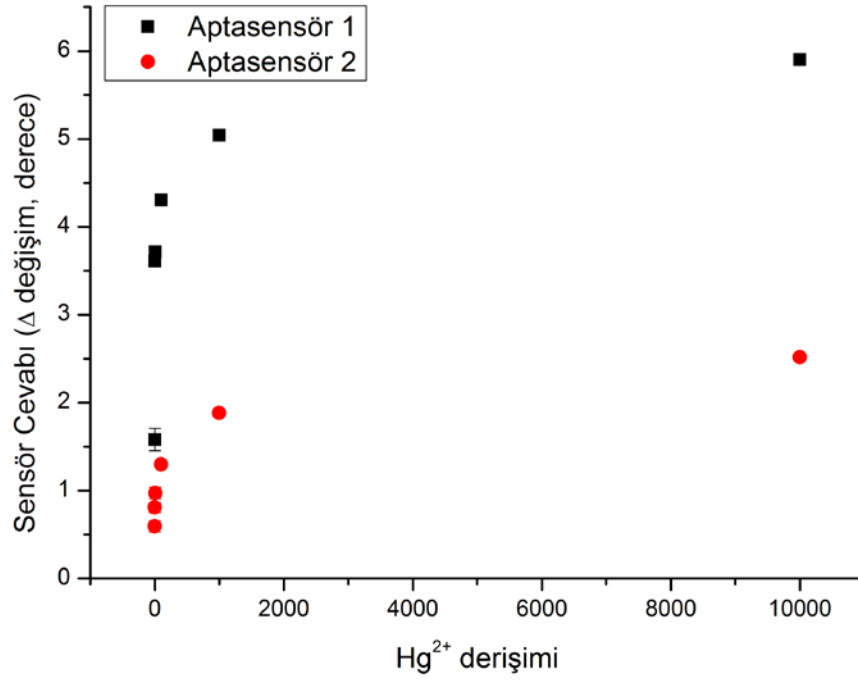
görülmüştür. 500 μM derişiminde tabaka kalınlığı 5 nm' nin üzerindedir. İstenilen tek tabaka oluşumunun gözleendiği derişim 10 μM olarak belirlenmiştir.

Silikon yüzey üzerine MPTES molekülü immobilizasyonundan sonra tanı elemanı olarak kullanılan cıva için seçici DNA oligonükleotidlerinin (aptamer) immobilizasyonunda daldırma süresi ve derişim deneyleri yapılmıştır. Çalışmada biri doğrusal diğeri hair pin yapıda olmak üzere iki farklı DNA oligonükleotidleri seçilmiştir. DNA için yapılan daldırma süresi deneylerinde ilk 12 saatte kalınlığın sürekli arttığı ve 12. saatte kalınlığın yaklaşık 2.71 nm olduğu görülmüştür. 12. saatten sonra kalınlıkta önemli bir değişme olmadığından dolayı daldırma süresi 12 saat olarak seçilmiştir.

DNA oligonükleotidleri derişimlerinin tabaka kalınlığına etkisinin incelendiği çalışmada tabaka kalınlığının derişimle arttığı görülmüştür. 10 nM derişimde kalınlık 0.27 nm'dir. Derişim 1 μM ' a çıktığında silikon yüzeyde oluşan tabaka kalınlığı 1.36 nm olmuştur. DNA immobilizasyonu için 1 μM derişim uygun bulunmuştur.

Tanı elemanı olan DNA' lar immobilize edildikten sonra elde edilen sensörler cıva ile temas ettirilerek sensör kapasiteleri elipsometrik olarak incelenmiştir. Deneyler doğrusal yapıda olan (Prob 1) ve saç tokası yapıda olan (Prob 2) DNA aptamerleri için aynı şartlarda gerçekleştirilmiştir. Elipsometrik incelemeler değerlendirilirken delta (Δ ; faz kayması) parametresi dikkate alınmıştır. Dielektrik maddeler için yansıma parametrelerinin homojen tabakalarda doğrudan tabaka kalınlığına bağlı olduğu varsayımı yapılarak hibridizasyon sonucu yüzeyde gerçekleşen birikme, elipsometrik değişkenin bağıl değişimi (Δ parametresindeki değişim) olarak izlenmiştir.

Prob 1 ve Prob 2 için yapılan elipsometrik analizler sonucunda çeşitli derişimlerdeki cıva çözeltilerinde delta (Δ) değişimleri incelenmiştir. Tez kapsamında hazırlanan aptasensörlerin Hg^{2+} algılama performansı Şekil 4.1'de karşılaştırılmıştır. Şekil 4.1'de görüldüğü üzere Prob 1 ile hazırlanmış olan (lineer) aptasensörün algılama hassasiyeti ve algılama sınırı daha yüksek çıkmıştır. Prob 2 ise yüksek algılama hassasiyetine rağmen, Prob 1 kadar hassas ve düşük LOD seviyeli olmamıştır.



Şekil 4.1 Aptasensörler (Prob 1 ve Prob 2) için Hg²⁺ algılama karşılaştırması.

Lineer bölgede Δ farklar incelendiğinde 1 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM ve 10 mM derişimlerindeki Δ farklar sırasıyla Prob 1 için 1.58°, 3.6°, 3.7°, 4.3°, 5° ve 5.9° iken, Prob 2 için 0.5°, 0.8°, 0.9°, 1.2°, 1.8° ve 2.5° olarak bulunmuştur. Prob 2' de delta değişiminin düşük derişimlerde çok fazla olmadığı görölmektedir. Bu nedenle Prob 1' in düşük derişimlerde Prob 2' den daha hassas algılama yaptığı düşünölmektedir.

Her iki aptasensör için güröltü değeri sırası ile 0.053973 derece (σ , standart sapma olarak) ve 0.044272 derece olarak belirlenmiştir. Sensör için LOD belirlenirken en agresif yaklaşımla 3σ 'lık bir belirsizlik dikkate alınmıştır. Bu belirsizlik değeri dikkate alınarak Prob 1 sensöründe hesaplanan algılama sınırı 3.95 pM'dır ve algılama hassasiyeti 0.2554 Derece/ μ M olarak bulunmuştur. Prob 2 sensöründe hesaplanan algılama sınırı 71 nM'dır ve algılama hassasiyeti 0.1879 Derece/ μ M olarak bulunmuştur. Spesifiklik çalışmasında ise, Pb²⁺ ile gerçekleştirilen tayin denemelerinde elde edilen sonuçlar Prob 1 için 100 μ M derişimde 0.089 ± 0.047 ve 1 μ M derişimde 0.063 ± 0.042 iken Prob 2 için 100 μ M derişimde 0.092 ± 0.061 ve 0.081 ± 0.072 olarak bulunmuştur. Bu değer güröltü sınırının altında olup, literatürde de belirtildiği üzere aptamer için geçerli olan spesifikliği göstermektedir. LOD değeri

Prob 2 için literatürde karşılaşılan algılama sınırları dahilinde iken, Prob 1 için oldukça güzel bir değer olan 4 pM (bir başka deyişle 4×10^{-12} M) seviyesinde gerçekleşmiştir. Analizlerin 1 mL'lik Hg^{2+} çözeltileri kullanılarak gerçekleştirildiği dikkate alındığında, 1.6 pg'lık Hg^{2+} tayinin gerçekleştirildiği görülmektedir. Literatürde belirtilen LOD değerlerinde ultra eser element tayini standardı için belirtilen 1 ng/L'lik (Yaklaşık 5 pM) sınırdan bir miktar düşük çıkmıştır. (EPA, Yöntem 1631 Revizyon E, 2014). Ancak burada dikkat edilmesi gereken husus, tez kapsamında önerilen yöntemde, önceden hazırlanmış bir silikon yonga üzerinde aptamer prob içeren aptasensör kullanılarak, yalnızca 1 mL numunenin damlatılıp kısa bir süre beklendikten sonra yonganın yıkanıp kurutulması ve ardından spektroskopik elipsometre ile analiz basamaklarının olmasıdır. Belirtilen basamaklar, Hg^{2+} tayini için kullanılan pahalı ve kullanımı zor (örneğin kalibrasyon aşamasında zahmetli bir çözelti hazırlama ve seyreltme safhası içeren) cihazlar kullanılmaksızın, çok daha kısa sürede ve ileri derece cihaz kullanım bilgisi olmadan gerçekleştirilebilmektedir. Silikon yonganın bir mikroakışkan sistem ile birlikte kullanılması durumunda, yonganın tek kullanımlık ve kolay bir numune alma süreci ile çalışabilmesi de mümkündür.

Sonuç olarak, sunulan tez kapsamında, farklı aptasensörler, oldukça hassas bir optik algılama yöntemi olan spektroskopik elipsometre kullanılarak sulu çözeltilerden ultra eser miktarda Hg^{2+} tayininde başarı ile kullanılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdi, MM, Abdullah, LC, Sadrolhosseini, AR, Mat, Yunus WM, Moksini, MM** (2011). Surface Plasmon Resonance Sensing Detection of Mercury and Lead Ions Based on Conducting Polymer Composite. PLoS ONE 6(9): e24578. doi:10.1371/journal.pone.0024578
- Algar, W.R., Krull, U.J.** (2008). Quantum dots as donors in fluorescence resonance energy transfer for the bioanalysis of nucleic acids, proteins, and other biological molecules. Anal. Bioanal. Chem. 391(5):1609-1618
- Anonymous** (2003). Biosensors for microbial detection. Microbiologist: 30-33. applications to clinical chemistry." Clinica Chimica Acta 314 (1-2): 1-26.
- Bagalkot, V., Zhang, L., Levy-Nissenbaum, E., Jon, S., Kantoff, P.W., Langer, R.O.C.** (2007). Farokhzad Nano Lett. 7 3065.
- Bang, G.S., Cho, S., Kim, B.G.** (2005). Biosens. Bioelectron. 21 863.
- Baruthio, F.** (1992). Biol Trace Elem Res. Jan-Mar;32:145-53. Toxic effects of chromium and its compounds.
- Bickerstaff, G.F.** (1997). Immobilization of Enzymes and Cells. Humanae Press, Totowa, NJ.
- Bini, A., Minunni, M., Tombelli, S., Centi, S., Mascini, M.** (2007). Anal. Chem. 79 3016.
- Biran, I., Walt, D.R.** (2002). Optrode-Based Fiber Optic Biosensors (Bio-Optrode). Optical Biosensors: Present and Future. Ligler, F.S. and Rowe Taitt, C.A. (eds), Elsevier Science, Amsterdam. pp. 5-56.
- Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F.** (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey. Methods Mol Biol.;1051:15-31.
- Buiculescu, R., Chaniotakis, NA.** (2012). The stabilization of Au NP-AChE nanocomposites by biosilica encapsulation for the development of a thiocholine biosensor Bioelectrochemistry. Chah Soonwoo, Jongheop Y, Richard N. Zare: Surface plasmon resonance analysis of aqueous mercuric ions (2004) 216–222
- Chah, S., Yi J., Richard N.Z.** (2004). Surface plasmon resonance analysis of aqueous mercuric ions, Sensors And Actuators, , B 99: 216-222
- Chaki, N.K., Vijayamohana, K.** (2002). Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications, *Biosensors & Bioelectronics* 17: 1–12
- Chang, C.C., Lin, S., Wei, S.C., Chen, C.Y., Lin, C.W.** (2011). An amplified surface plasmon resonance “turn-on” sensor for mercury ion using gold nanoparticles, Biosensors And Bioelectronics, 30: 235-240
- Chao, C.H., Wu, C.S., Huang, C.C., Liang, J.C., Wang, H.T., Tang, P.T., Lin, L.Y., Ko, F.H.** (2012). A rapid and portable sensor based on protein-modified gold nanoparticle probes and lateral flow assay for naked eye detection of mercury ion, Microelectronic Engineering, 97; 294-296.
- Chen, D., Li, J.** (2006). Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers, *Surface Science Reports* 61: 445–463
- Cheng, A.K., Ge, B., Yu, H.Z.** (2007). Anal. Chem. 79 5158.
- Choi, J.H., Chen, K.H.** (2006). Strano M.S., Am J. Chem. Soc. 128 15584.
- Chu, P., Porcella, D.B.** (1995). Water Air Soil Pollut. 80, 135–144.

- Clark, L.C., Lyons, C.** (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 102,29.
- Clark, S.L., Remcho, V.T.** (2002). Electrophoresis 23 1335.
- Clarkson, T.W., Magos, L.** (2006). *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 609–662.
- Clarkson, T.W., Magos, L., Myers, G.J., Engl, N., Med, J.** (2003). The Toxicology Mercury-Current Exposures and Clinical Manifestations, *The New England Journal of Medicine*, 349:1731-7.
- Cosnier, S., Mailley, P.** (2008). Recent advances in DNA sensors, *Analyst*, 133: 984–991.
- Cullen, D.C., Sethi, R.S., Lowe, C.R.** (1990). "Multi-analyte miniature conductance D'Souza, S.F., 1999, Immobilized enzymes in bioprocess. *Curr. Sci.* 77, 69–79.
- Damos, F.S., Luz, R.C.S., Kubota, L.T.** (2006). Investigations of ultrathin polypyrrole films: Formation and effects of doping/dedoping processes on its optical properties by electrochemical surface plasmon resonance (ESPR). *Electrochim Acta* 51: 304–1312.
- determination." *Sensors and Actuators B* 24(1-3): 145-148.
- Divis, C.** (1975). *Annals of Microbiology*, 126A,175-186.
- Dosta'lek, J., Ladd, J., Jiang, S., Homola, J.** (2006). SPR Biosensors for Detection of Biological and Chemical Analytes. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. Wolfbeis, O.S. and Homola, J. (eds.), Springer Series, Berlin. pp. 177-190.
- Dragone, R., Frazzoli, C., Grappelli, C., Campanella, L.** (2009). A new respirometric endpoint-based biosensor to assess the relative toxicity of chemicals on immobilized human cells *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (1), 273–279,
- Ellington, A.D., Szostak, J.W.** (1992). *Nature (London)* 355 850.
- EPA** Yöntem 1631 Revizyon E, Suda Cıva Tayini, 2014(Method 1631: Measurement of Mercury in Water) <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/metals/mercury/index.cfm>
- Fanous, A., Weiss, W., Görg, A., Jacob, F., Parlar** (2008). A proteome analysis of the cadmium and mercury response in *Corynebacterium glutamicum* . *Proteomics* 8 (23–24), 4976–4986
- Fen, Y.W., Mat, W.Y.M, Moksın M.M., Talib Z. A., Nor A.Y.** (2011). Surface plasmon resonance optical sensor for mercury ion detection by crosslinked chitosan thin film *Journal of Optoelectronics And Advances Materials*, 3 : 279-285
- Forzani, S., Foley, K, Westerhoff, P, Tao, N.** (2007). *Sens. Actuators B: Chem.* 123, 82
- Friis, R.H.** (2007). *Essentials of environmental health Essential public health*. Jones & Bartlett Learning, Sudbury.
- Gadd, G.M, Griffiths, A.J.** (1978). Microorganisms and heavy metal toxicity, *Microbial Ecology*, 4; 303-317.
- Global Mercury Hotspots** 2013 New Evidence Reveals Mercury Contamination Regularly Exceeds Health Advisory Levels in Humans and Fish Worldwide.
- Hall, E.A.H.** (1990). *Biosensors*. Ch: 1 biosensors in context, Open university Press, İngiltere, s;3-30
- He, P., Shen, L., Cao, Y., Li, D.** (2007) *Anal. Chem.* 79 8024.
- Hermann, T., Patel, D.J.** (2000). *Science (Washington, D. C.)* 287 820.
- Hianik, T., Ostatna, V., Zajacova, Z., Stoikova, E., Evtugyn, G.** (2005). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 291.

- Homola, J.** (2006). Surface Plasmon Resonance Based Sensor, Springer, New York, pg. 45
- Homola, J.**, (2008) "Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species." *Chem. Rev.* 108(2): 462-493.
- Hwang, K.S., Lee, S.M., Eom, K. Lee, J.H, Lee, Y.S., Park, J.H., Yoon, D.S., Kim, T.S.** (2007). *Biosens. Bioelectron.* 23 459.
- Hynes, W.F., Doty, N.J., Zarembinski, T.I., Schwartz, M.P., Toepke, M.W., Murphy, W.L., Atzet, S.K., Clark, R., Melendez, J.A., Cady, N.C.** (2014). Micropatterning of 3D Microenvironments for Living Biosensor Applications.. *Biosensors* (Basel).
- Jayasena, S.D.** (1999). *Clin. Chem.* 45 1628
- Kretschmann, E.** (1969). "The dependence of the plasma-resonance-emission of thin silver films on the temperature" *Zeitschrift fuer Physik.*, 221, 357-361.
- Kretschmann, E.** (1969). "The determination of the optical constants of thin films by means of curves of constant transmission," *Zeitschrift fuer Physik.*, 221, 346- 356
- Kurihara, K., Suzuki, K.** (2002). *Anal. Chem.* 74, 696
- Lazcka, O., Campo, F.J.D., Muñoz, F.X.** (2007). "Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors." *Biosensors and Bioelectronics* 22 (7): 1205-1217.
- Le Floch, F., Ho, H.A., Leclerc, M.** (2006). *Anal. Chem.* 78 4727.
- Li, Q., Zhou X., Xing D.** (2010). Rapid and highly sensitive detection of mercury ion (Hg^{2+}) by magnetic beads-based electrochemiluminescence assay, *Biosensors And Bioelectronics*, 26: 859-862
- Li, Y., Lee, H.J.** (2007). *Corn R.M., Anal. Chem.* 79 1082.
- Li, Y., Zhang, C., Li, B.S., Zhao, L.F., Li, X.B., Yang, W.J., Xu, S.Q.** (2007). *Clin. Chem.* 53 1061
- Liedberg, B., Nylander, C., Lundström, I.** (1983). "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing," *Sensors and Actuators*, 4, 299-304.
- Lilis, R., Valciukas, JA., Kon, S., Sarkosi, L., Campbell, C., Selikoff, IJ.** (2007). Assessment of lead health hazards in a body shop of an automobile assembly plant. *American Journal of Industrial Medicine.* 3(1), 33–51,
- Lim, D.V.** (2003). Detection of microorganisms and toxins with evanescent wave fiberoptic biosensors. *Proceedings of the IEEE* 91(6): 902-907.
- Liu, J., Lu, Y.** (2005). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45 90
- Liu, Q.L., Yan, X.H., Yin, X.M.** (2013). Situ B, Zhou HK, Lin L, Li B, Gan N, Zheng L., Electrochemical enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for α -fetoprotein based on glucose detection with multienzyme-nanoparticle amplification. *Molecules*.
- Luong, J.H.T., Bouvrette, P., Male, K.B.** (1997). Developments and applications of biosensors in food analysis. *TIBTECH* September 15; 369-377.
- Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W.** (2001). "Immunosensors—principles and
- Luzi, E., Minunni, M., Tombelli, S., Mascini, M.** (2003). *Trends Anal. Chem.* 22 810.
- Makaraviciute, A, Ramanaviciene, A.** (2013). Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors. *Biosens Bioelectron.*
- Martelet, C.,** (1994). "Conductometric biosensors based on cholinesterases for
- Mazumdar, S.D.** (2008). Surface plasmon resonance (SPR) biosensor for rapid detection of Salmonella and Salmonella infections, *Doktora Tezi, Philipps-Universitat. Lahn*, 196s.

- Mehrvar, M., Bis, C., Scharer, J. M., Moo-Young, M., Luong, J. H.** (2000). Fiber-optic biosensors-Trends and advances. *Analytical Science* 16; 677-692.
- Mehta, P.** (2004). *An Introduction to Quality Assurance for the Retailers*. iUniverse. Lincoln NE.
- Mello, L. D. and Kubota, L. T.** (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77; 237-256.
- Mendelez, J., Carr, R., Bartholomew, D., Taneja, H., Yee, S., Jung, C., Furlong, C.** (1997). *Sens. Actuators B: Chem.* 38, 375
- Mikkelsen, S. R.** (1996). Electrochemical biosensors for DNA sequence detection, *Electronal.*, 8: 15-19.
- Mosbach, K., Danielsson, B.** (1974). An enzyme thermistor, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, Volume 364, Issue 1, 11 September, Pages 140-145 .
- Nolan, E.M., Lippard, S.J.** (2008). *Chem. Rev.* 108, 3443–3480.
- Nutiu, R., Li, Y.** (2004). *Chemistry* 10 1868.
- Palecek, E.** (2009). Fifty years of nucleic acid electrochemistry, *Electroanal.*, 21: 239–251
- Pavlov, V., Xiao, Y., Shlyahovsky, B., Willner, I., Am, J.** (2004). *Chem. Soc.* 126 11768.
- Polsky, R., Gill, R., Kaganovsky, L., Willner, I.** (2006). *Anal. Chem.* 78 2268.
- Radi, A.E., Sanchez, J.L.A., Baldrich, E., Sullivan, C.K.O., Am, J.** (2006). *Chem. Soc.* 128 117.
- Ramos, E., Pineiro, D., Soto, M., Abanades, D.R., Martin, M.E., Salinas, M., Gonzalez, V.M.** (2007). *Lab. Invest.* 87 409
- Ritchie, R.H., Arakawa, E.T., Cowan, J.J. ve Hamm, R.N.** (1968). “Surface-Plasmon Resonance Effect in Grating Diffraction,” *Phys. Rev. Lett.*, 21, 1530–1533.
- Sarkar, B.** (2002). *Heavy Metals in the Enviroment*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Sassolas, A., Blum, L.J., Leca-Bouvier, BD.** (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv.*
-
- Savran, C.A., Knudsen, S.M., Ellington, A.D., Manalis, S.R.** (2004). *Anal. Chem.* 76 3194.
- Saxena, V., Malhotra, B.D.** (2003). *Electrochemical Biosensors. Advances In Biosensors*. Malhotra, B.D. and Turner, A.P.F. (eds.), Elsevier Science, Amsterdam. pp. 63-100.
- Schasfoort, R.B.M., Lokate, A.M.C., Beusink, J.B., Pruijn, G.J.M., Engbers, G.H.M.** (2008). Measurement of the Analysis Cycle: Scanning SPR Microarray Imaging of Autoimmune Diseases. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Schasfoort, R.B.M. and Tudos, A.J. (eds.), RSC Publishing, Cambridge. pp. 221-245.
- Schaumlöffel, D.J** (2012). Trace Nickel species: analysis and toxic effects. *Elem Med Biol*.
- Schlenz, M.D., Gronewold, T.M.A., Tewes, M., Famulok, M., Quandt, E.** (2004). *Sens. Actuators, B* 101 308
- Sekowski, J.W., Malkas, L.H., Wei, Y., Hickey, R.J.** (1997). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 268–276.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A.** (1992). *Principles of Instrumental Analysis*. 5th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing. pp 206–229.
- So, H.M., Won, K., Kim, Y.H, Kim, B.K., Ryu, B.H., Na, P.S., Kim, H., Lee, J.O., Am, J.** (2005). *Chem. Soc.* 127 11906.

- Soonwoo, C., Jongheop Y., Richard N.Z.** (2004). Surface plasmon resonance analysis of aqueous mercuric ions, *Sensors And Actuators*, B 99: 216-222
- Tamayo, J., Kosaka, P.M., Ruz, J.J., San Paulo, Á., Calleja, M.** (2013). Biosensors based on nanomechanical systems. *Chem Soc Rev*.
- Tang, Y., Zhai, Y.F., Xiang J.J., Wang H., Liu B.** (2010). Colloidal gold probebased immunochromatographic assay for the rapid detection of lead ions in water samples. *Environmental Pollution* 158: 2074–2077.
- Telefoncu, A.** (1999). “Biyoreseptör immobilizasyonu”, *Biyosensörler, Biyokimya Lisans Üstü Yazokulu*, Kuşadası, 42-61
- The´venot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S.** (2001). "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification." *Biosensors and Bioelectronics* 16: 121-131.
- Tombelli S., Minunni M., Luzzi E., Mascini M.** (2005). *Bioelectrochemistry* 67 135.
- Tombelli, S., Minunni, M., Mascini, M.** (2007). *Biomol. Eng.* 24 191.
- Tompkins, H.G., McGahan W.A., John Wiley & Sons** (1999). *Spectroscopic Ellipsometry and Reflectometry: A User’s Guide*, New York
- Tompkins, H.G., Zhu, T., Chen, E.** (1998). Determining thickness of thin metal films by spectroscopic ellipsometry, *J. Vac. Sci. Technol. A*, 16 1297–1302.
- Tudos, A.J., Schasfoort, R.B.M.** (2008) *Introduction to Surface Plasmon Resonance. Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Tudos, A.J. and Schasfoort, R.B.M. (eds.), RSC Publishing, Cambridge. pp. 1-14.
- Tuerk C., Gold L.** (1990). *Science* (Washington, D. C.) 249 505.
- Turner, A. P. F.** (2000). Biosensors- sense and sensitivity. *Science*, 290, 1315-1317.
- United Nations Environment Programme [UNEP] and World Health Organization [WHO].** (2008). Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. UNEP Chemicals Branch and WHO Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases. Geneva, Switzerland 176 pp
- US EPA,** (2001). Mercury Update: Impact of Fish Advisories. EPA Fact Sheet EPA-823-F-01-011. EPA, Office of Water: Washington, DC.
- Uvdal, K.,** (1998). *Molecular Films and Surface Analysis*, Sweden
- Velasco-Garcia, M.N., Mottram, T.** (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems, *Biosystems Engineering Vol 84* (1): 1-12.)
- Vural, H.,** (1993). Ağır metal iyonlarının gıdalarda oluşturduğu kirlilikler. *Çevre Dergisi* 8: 3-8.
- Wang, B., Du, Y.** (2013). Cadmium and its neurotoxic effects. *Oxid Med Cell Longev*:898034.
- Wang, L., Liu, X., Hu, X., Song, S., Fan, C.** (2006). *Chem. Commun. (Cambridge)* 3780.
- Wang, Q., Huang, J., Yang, X., Wang, K., Leiliang, H., Xiaoping L.** (2011). *Sensors and Actuators B* 156 893– 898
- Wei, H., Li, B., Li, J., Wang, E., Dong, S.** (2007). *Chem. Commun. (Cambridge)* 3735.
- Whelan, R.J., Wohland, T., Neumann, L., Huang B.K., Kobilka R.N.Z.** (2002). Analysis of biomolecular interactions using a miniaturized surface plasmon resonance sensor, *Anal. Chem.* 74 4570–4576].
- Wink, Th., Zuilen, S.J., Bult, A., Bennekou, W.P.** (1997). Self-assembled Monolayers for Biosensors, *Analyst* 122 : 43R–50R
- Wu, C.M., Lin, L.Y.** (2004). *Biosensors & Bioelectronics* 20(4), 864
- Wu, C.M., Lin, L.Y.** (2005). *Sens. Actuators B: Chem* 110, 231

- Xiao, Y., Lubin, A.A., Heeger, A.J., Plaxco, K.W.** (2005). Chem. Int. Ed. Engl. 44 5456.
- Yamamoto, R., Baba, T., Kumar, P.K.** (2000). Genes Cells 5 389.
- Yu, J.C.C., Lai, E.P.C., Sadeghi S.** (2004). Surface plasmon resonance sensor for Hg(II) detection by binding interactions with polypyrrole and 2-mercaptobenzothiazole, Sensors and actuators ,B (101):236-241
- Yusmawati, W.Y.W., Chuah, H.P., Yunus, W.M.M.** (2007). Optical properties and sugar content determination of commercial carbonated drinks using surface plasmon resonance, American Journal of Applied Science 4(1), 1
- Zhang, H.Q., Boussaad, S., Tao, N.J.** (2003). Rev. Sci. Instrum. 74, 150
- Zhang, X.-B., Guo, C.C., Li, Z.Z., Shen, G.L., Yu, R.Q.** (2002). An optical fiber chemical sensor for mercury ions based on a porphyrin dimer, Anal. Chem. 74 821–825
- Zhang, Y.T., Xu, M.T., Wang, Y.J., Toledo, F., Zhou, F.M.** (2007). Studies of metal ion binding by apo-metallothioneins attached onto preformed self-assembled monolayers using a highly sensitive surface plasmon resonance spectrometer, Sensors and Actuators B: Chemical: 123 pg 784 -792
- Zhao, W., Chiuman, W., Brook, M.A., Li, Y.** (2007). Chembiochem 8 727.
- Zhou, L., Ou, L.J., Chu, X., Shen, G.L., Yu, R.Q.** (2007). Anal. Chem. 79 7492.
- Zhylyak, G.A., Dzyadevich, S.V., Kopran, Y.I., Soldatkin, A.P. El'skaya, A.V.** (1995) "Application of urease conductometric biosensor for heavy-metal ion
- Zuo, X., Song, S., Zhang, J., Pan, D., Wang, L., Fan, C., Am J.** (2007). Chem. Soc. 129 1042.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Tuğçe ERTAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Balıkesir, 15.01.1990
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü 58140 Sivas
E-posta Adresi	tuceertan@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Eskişehir Muzaffer Çil Anadolu Lisesi, 2008
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2012
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2014