

**NANOLİF KAPLI KUVARS KRİSTAL MİKROTERAZİ
YÜZEYLER İLE KÜTLE HASSAS BİYSENSÖRLERİN
PERFORMANSININ GELİŞTİRİLMESİ**

**IMPROVEMENT OF THE PERFORMANCE OF MASS
SENSITIVE BIOSENSORS BY NANOFIBER COATED
QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE SURFACES**

NURŞEN ZİĞAL

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2012

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

:.....
Prof. Dr. Tülin KUTSAL

ÜYE (DANIŞMAN)

:.....
Prof. Dr. Mehmet MUTLU

ÜYE

:.....
Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

ÜYE

:.....
Yard. Doç .Dr. Dilek ÇÖKELİLER

ÜYE

:.....
Doç .Dr. Eylem GÜVEN ÖZTÜRK

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil DENİZLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sevgili aileme...

NANOLİF KAPLI KUVARS KRİSTAL MİKROTERAZİ YÜZEYLER İLE KÜTLE HASSAS BİYOSENSÖRLERİN PERFORMANSININ GELİŞTİRİLMESİ

Nurşen Zığal

ÖZ

Bu çalışmanın amacı; kütle hassas biyosensörlerin performansını arttırmak amacıyla kuvars kristal mikroterazi (QCM) yüzeylerin elektro-eğirme yöntemiyle nanoliflerle kaplanması ve karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesidir. Elektro-eğirme yöntemiyle kaplanan QCM kristallerinin yüzeylerinin yüzey alanı/hacim oranı artacaktır. Nanoliflerin çapları ne kadar küçük olursa biyoaktif yüzey o kadar artacak dolayısıyla yüzeyde daha hassas ölçüm yapma olanağı sağlayacaktır.

Elektro-eğirme yöntemi polimer esaslı nanoliflerin üretimi için kullanılmaktadır. Bu yöntem, katı ve boşluklu içyapıya sahip, uzun boylarda, homojen çapta ve çeşitli kompozisyonlarda nanolif üretimi sağlamaktadır. Piezoelektrik prensibini kullanan kuvars kristal mikroterazi (QCM) biyosensör ile etkileşen ve bağlanan analit miktarının meydana getirdiği kütle değişimlerini çok hassas ölçebilecektir.

Ön çalışmamızda elektro-eğirme yöntemiyle daha ince ve sürekli nanolif elde etmek için polivinil alkol (PVA) ile farklı parametrelerde çalışılmıştır. PVA polimeri yağda ve çözücünde çözünmez, kararlıdır ve film haline getirilmesi kolaydır. PVA polimeri ile oda sıcaklığında elektro-eğirme yöntemini kullanmak mümkündür. Bu polimerle QCM kristallerin yüzeyinde oluşturulan nanolif yapıların modifikasyonu, plazma polimerizasyonu yöntemiyle amino grubu içeren monomerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında amino grubu oluşturmak için Alilamin (AA) monomeri tercih edilmiştir.

Plazma işlemi görmüş elektrospan nanolif modifiyeli yüzeylere kimyasal aktivasyon uygulanmış ardından biyotin yüzeye immobilize edilmiştir. Tanıyıcı tabaka oluşturulduktan sonra sensör performansının ölçülmesi için yüzeyler avidin ile etkileştirilmiştir.

Her basamakta, yüzeylerde meydana gelen değişimler taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR-ATR) ile karakterize edilmiştir.

Elektro-eğirme işlemiyle nanolif kaplanan yüzeylere uygulanan tüm işlemler nanoliflerin etkisini karşılaştırmak amacıyla nanolif kaplanmayan fakat plazma polimerizasyonu modifikasyon ve kimyasal aktivasyonun ardından tanıyıcı tabakanın oluşturulduğu, daha sonra avidinle etkileştirilen (boş) kristal yüzeylerine de uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda nanolif kaplanan kristallerin sensör performansının daha yüksek olduğu grlmştr.

Anahtar Kelimeler: Elektro-eğirme, plazma polimerizasyonu, kuvars kristal mikroterazi, biyosensör, avidin-biyotin

Danışman: Prof.Dr. Mehmet Mutlu, Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik A.B.D.

IMPROVEMENT OF THE PERFORMANCE OF MASS SENSITIVE BIOSENSORS BY NANOFIBER COATED QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE SURFACES

Nurşen Zığal

ABSTRACT

The piezoelectric quartz crystal microbalance (QCM) surfaces were modified with electrospun fibers in order to increase the performance of mass sensitive biosensors, and compare it with sensors made up of plain crystals. The procedure of electrospinning is expected to increase the surface area to volume ratio. As the fiber diameter decreases the surface area will increase, potentially increasing the sensitivity of the sensor.

Electrospinning is a very versatile tool to produce polymeric nanofibers. This method provides fibrous, solid, long, homogenous fibers with different compositions. A piezoelectric quartz crystal, with its mass sensitive property, is capable of measuring the amount of analyte bound to the biological recognition element on the crystal surface, with high sensitivity.

In the preliminary studies, polyvinyl alcohol (PVA) was selected as electrospinning agent to produce, thinner and regular nanofibers. The main advantages of PVA include insolubility in oil and solvents, stability and filming. It can be processed with electrospinning in ambient temperature. The surfaces of QCM crystals covered with PVA nanofibers were further modified with plasma polymerization technique to incorporate amino groups on surface. Alilamine (AA) monomer was used as the precursor in plasma modification studies. After the chemical activation of plasma treated surfaces, biotin molecules were immobilized on the surfaces to create the recognition layer of mass sensitive biosensor. The performance of the sensor was tested using avidin as an analyte. After each modification, the changes of crystal surfaces were monitored using Scanning Electron Microscopy (SEM), Atomic Force Microscopy (AFM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy with ATR and Grazing Angle (FTIR-ATR-GA) techniques.

The prepared recognition layers were compared with the same type of mass sensitive sensors but nanofibers. The mass sensitive sensors prepared by

nanofiber coated crystals have shown much higher performance against sensors without nanofiber.

Keywords: Electrospinning, plasma polymerization, quartz crystal microbalance, biosensor, avidin-biotin

Advisor: Prof.Dr. Mehmet Mutlu, Hacettepe University, Bioengineering Division

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın oluşumundan sonuçlanmasına kadar her aşamasında, ilgi, yardım ve bilgisini esirgemeyen, karşıma çıkan tüm sorunları aşmamda yardımcı olan, söz konusu çalışmanın gerçekleştirilmesini mümkün kılan, desteğini hep arkamda hissettiğim, her zaman yanımda olan tez danışmanım ve değerli hocam sayın Prof. Dr. Mehmet MUTLU' ya,

SEM görüntülemesi için NanoTAM' ın imkanlarından yararlanmamı sağlayan sayın Prof. Dr. Ekmel ÖZBAY' a ve bu konuda bana yardımcı olan A. Burak TURHAN' a,

AFM karakterizasyonu için bana laboratuvarını açan Prof. Dr. Selma MUTLU' ya ve AFM karakterizasyonunda bana yardım eden Kimya Müh. Ufuk SAÇAK' a,

FTIR-ATR karakterizasyonunda bana yardımcı olan, bilgisini, ilgisini ve desteğini hep yanımda hissettiğim sevgili Dr. Ebru AKDOĞAN' a,

Tez çalışmam süresince yardım ve sabırlarını esirgemeyen başta Gıda Müh. Neriman TÜZEN, Yük. Müh. Beyhan GÜNAYDIN DAŞAN, Uzman Biyolog Demet ATAMAN, Yük. Müh. Yasin ŞEN, Uzman Biyolog Ozan SELVİ, Yard. Doç. Dr. Baran ÖNAL ULUSOY, Uzman Biyolog Başak BEYHAN GÜDÜLLÜOĞLU olmak üzere Plazma Destekli Biyomühendislik ve Biyoteknoloji (PABB) Araştırma Grubu' ndaki çok değerli arkadaşlarıma,

Beni hiç yalnız bırakmayan, her zaman beni destekleyen, attığım her adımda yanımda olan Gıda Müh. Ş. Özden İSMAİLOĞLU, Gıda Müh. Gülçin KÜLTÜR, Yük. Müh. Eren TUR, Biyolog Eda KARAKUŞ başta olmak üzere tüm dostlarıma,

Son olarak bugüne ulaşmamı sağlayan, her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen biricik annem başta olmak üzere sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim. İyiki varsınız...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Biyosensörler	3
2.1.1 Biyosensörlerin temel bileşenleri.....	4
2.1.2 Biyosensörlerin performans parametreleri	7
2.1.3 Biyosensörlerin sınıflandırılması	8
2.2 Piezoelektrik Etki.....	11
2.2.1 Kuvars kristal mikroterazi	13
2.2.2 Kuvars kristal mikroterazi sistemlerin kullanım alanları	14
2.3 Elektro-Eğirme Yöntemi.....	15
2.3.1 Tarihçe	16
2.3.2 Elektro-eğirme sisteminin çalışma prensibi	18
2.3.3 Elektro-eğirme işlemine etki eden parametreler	20

2.4 Plazma Polimerizasyonu	24
2.4.1 Plazmanın özellikleri	25
2.4.2 Plazma polimerizasyonu hızını etkileyen parametreler	26
2.4.3 Plazma polimerizasyonunun mekanizması	28
2.4.4 Plazma polimerizasyonu tekniğinin avantajları	29
2.5 Avidin – Biotin Etkileşimi	30
2.6 Tez Çalışmasında Kullanılan Yüzey Analiz Yöntemleri	32
2.6.1 Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR-ATR)	32
2.6.2 Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM)	35
2.6.3 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)	36
3 MATERYAL VE METOD	37
3.1 Materyal	38
3.1.1 Kimyasal malzemeler	38
3.1.2 Piezoelektrik kuvars kristal malzemeler	39
3.2 Metot	40
3.2.1 Elektro-eğirme işleminde kullanılacak polimer çözeltisinin hazırlanması	40
3.2.2 Elektro-eğirme sisteminin kurulumu	41
3.2.3 Elektro-eğirme sistemi parametrelerinin belirlenmesi	41
3.2.4 Plazma polimerizasyonu yöntemi	42
3.2.5 Yüzeyin kimyasal aktivasyonu	44
3.2.6 Tanıyıcı tabakanın oluşturulması	44
3.2.7 Biyosensör performansının belirlenmesi	45
3.2.8 Modifiye edilmiş kuvars kristallerin karakterizasyonu	46
4 DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	48
4.1 Elektro-Eğirme Sistemi ile Ön Çalışmaların Değerlendirilmesi	48
4.1.1 İşlem parametrelerinin lif morfolojisine etkisinin incelenmesi	50
4.2 Kuvars Kristal Yüzeylerinin PVA Nanolif Kaplanması	54
4.3 Plazma Polimerizasyonu ile Yüzeylerde Amino Grubu Oluşturulması ...	55

4.4	Yüzeylerin Kimyasal Aktivasyonu	56
4.5	Hazırlanan Yüzeylere Biotin İmmobilizasyonu ile Tanıyıcı Tabakanın Oluşturulması	56
4.6	Yüzeylerin Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	58
4.6.1	Nanolif kaplanan yüzeylerin AFM ile karakterizasyonu	58
4.6.2	Yüzeylerin FTIR-ATR ile kimyasal karakterizasyonu.....	61
4.7	Kalibrasyon Doğrusunun Oluşturulması	65
5	SONUÇLAR.....	68
6	KAYNAKLAR	70
7	ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Biyosensörlerin genel tasarım prensibi	4
Şekil 2.2 Pyroelektrik çevirici	10
Şekil 2.3 Manyetik çevirici ve manyetik işaretleyici nano parçacıklarla antijen tayininin gösterimi	11
Şekil 2.4 Kuartz kristalin eksenlerde gösterimi AT- kesme ve BT- kesme	12
Şekil 2.5 Taylor konisinde oluşan yarı konik açısı	18
Şekil 2.6 Elektro-eğirme düzeneği	19
Şekil 2.7 Biotinin kimyasal yapısı	31
Şekil 2.8 Avidin-biotin kompleksi	31
Şekil 2.8 Amid I bandının bileşenleri	34
Şekil 2.9 Atomik Kuvvet Mikroskopunun şematik gösterimi	35
Şekil 3.1 Elektro-eğirme a) sisteminin görüntüsü, b) iğne-toplayıcı levha görüntüsü, c) toplayıcı levha görüntüsü	41
Şekil 3.2 Plazma polimerizasyonu sisteminin şematik görüntüsü	43
Şekil 3.3 Plazma polimerizasyon düzeneğinin gösterimi	44
Şekil 3.4 Tanıyıcı tabakanın tasarımı ve cevabı	46
Şekil 4.1. Nanofiberlerin sürekli yapısı %10 (w/w) PVA, 12 kV, 4 cm	49
Şekil 4.2 Elektro-eğirme işlem parametreleri: 12 kV, 1,6 mL/sa a) 5 dk b) 3 dk ...	54
Şekil 4.3 Nanoliflerin görüntüsü a) 1.94 KX b) 8.43 KX c) 28.07 KX	55
Şekil 4.4 Biotinlenmiş tanıyıcı tabakanın avidine karşı hassasiyeti	57
Şekil 4.5 Kristal yüzeylerinin AFM görüntüsü a) boş yüzey, b) nanolif kaplı yüzey	58
Şekil 4.6 Biotin immobilize edilmiş yüzey a) boş yüzey b) nanolif kaplı yüzey (1mg/mL biyotin çözeltisi)	58
Şekil 4.7 Avidin ile etkileştirilmiş yüzey a) boş yüzey b) nanolif kaplı yüzey (1mg/mL avidin çözeltisi)	59
Şekil 4.8 Nanolif kaplanan kristal yüzeyin FTIR-ATR spektrumu	61
Şekil 4.9 Nanolif kaplı kristal yüzeyinin PlzP sonrası FTIR-ATR spektrumu	62

Şekil 4.10 Nanolif kaplı kristal yüzeyinin gluteraldehit aktivasyonu sonrası FTIR-ATR spektrumu	63
Şekil 4.11 Nanolif kaplı kristal yüzeyinin biyotin immobilizasyonu sonrası FTIR-ATR spektrumu	64
Şekil 4.12 Nanolif kaplı kristal yüzeyinin avidin immobilizasyonu sonrası FTIR-ATR spektrumu	64
Şekil 4.13 Biyotin-avidin kütle hassas biyosensörlerinin kalibrasyon doğruları	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Çevirici türleri ve çalışma prensipleri	5
Çizelge 2.2 Amid bantları ve görüldükleri dalga boyları.....	33
Çizelge 3.1 Elektro-eğirme sisteminde kullanılan polimerin kapalı ve açık molekül formülü	39
Çizelge 3.2 Plazma polimerizasyonu sisteminde kullanılan monomerin kapalı ve açık molekül formülü	39
Çizelge 3.3 Çalışma sırasında kullanılan diğer kimyasal malzemelerin kapalı ve açık molekül formülü	39
Çizelge 3.4 Maxtek firmasından temin edilen kristallerin ve kristal tutucunun (holder) özellikleri	40
Çizelge 3.5. Plazma Polimerizasyonu sisteminin teknik özellikleri	42
Çizelge 4.1. Akış hızının nanolif çapına etkisi	50
Çizelge 4.2. Gerilimin nanolif çapına etkisi	51
Çizelge 4.3. İğne-toplayıcı levha arasındaki mesafenin nanolif çapına etkisi	52
Çizelge 4.4. Gerilim ve akış hızının ilişkisi.....	53
Çizelge 4.5 AFM ile ölçülen yüzeylerin pürüzlülük değerleri.....	60
Çizelge 4.6 Biyotin-Avidin kütle hassas biyosensörünün Kalibrasyon Doğrusunun oluşmasında kullanılan aşamalar, amacı, optimum çalışma koşulları ve frekans sapma değerleri (Hz) ^(*)	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA	: Alilamin
AFM	: Atomik kuvvet mikroskopisi
AMR	: Anizotropik manyetik direnç
BAW	: Yığın akustik dalga
ENFET	: Enzim alan etki transistörler
FET	: Alan etkili transistörler
FTIR	: Fourier transform infrared spektroskopisi
FTIR-ATR	: Fourier transformu infrared- Atenüe total reflektans
GMR	: Dev manyeto-direnç
IR	: İnfrared
ISFET	: İyon duyar alan etki transistörler
MCT	: Mercury cadmium telluride
MOSFET	: Metal oksit yarı iletken alan etki transistörler
PBS	: Fosfat tamponu (pH 7.4)
Pg	: Elektriksel boşalım sırasında basınç
PlzP	: Plazma polimerizasyonu
Po	: Elektriksel boşalım öncesi basınç
PQC	: Piezoelektrik kuvars kristal
PVA	: Polivinil alkol
QCM	: Kuvars kristal mikroterazi

Ra	: Aritmetik ortalama pürüzlülük
RF	: Radyo frekansı
Rku	: Profilin basıklığı
Rq	: Ortalama karekök pürüzlülük
RQCM	: Research Quartz Crystal Microbalance
Rsk	: Profilin çarpıklığı
Rt	: Profilin maksimum yüksekliği
SAW	: Yüzey akustik dalga
SEM	: Taramalı elektron mikroskopisi
	Spektroskopisi
TSM	: Kalınlık kayma modu

1 GİRİŞ

Biyosensörler; gaz veya sıvı ortamda bulunan maddelerin nicel ve/veya nitel tayin ve izlenmesi amacıyla kullanılan, biyolojik tanıma mekanizmasına sahip analitik ekipmanlardır.

Nanobiyosensörler; biyolojik tepkimelerde hedef analitleri denetlemek için biyolojik sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin işlem yeteneğinin birleştirilmesiyle geliştirilen, nano bileşenleri bulunan küçük algılayıcı cihazlardır. Biyoloji, fizik, kimya, mühendislik gibi birden çok akademik disiplini ilgilendiren bir konudur. Biyoteknoloji ve gıda endüstrisinde üretimin kontrolünde ve ürün analizinde, tıpta biyoaktif maddelerin tayin ve izlenmesinde, endüstriyel gaz ve sıvıların analizinde, çevre kirliliği analizi ve kontrolünde, biyoloji, kimya, veterinerlik ve diğer birçok alanda çeşitli analizlerde yaygın olarak biyosensörler kullanılabilmektedir (Buck, 1990; Kumar, 2000; Beyhan, 2008; Hao ve ark., 2009).

İdeal bir biyosensörün; basit ve düşük maliyetli olma, küçültülebilme, kısa cevap süresi, tekrar kullanılabilirlik, seçicilik, yüksek duyarlılık, yüksek fiziksel dayanıklılık gibi özellikleri göstermesi istenir (Buck, 1990). Bu özellikleri geliştirmeye yönelik disiplinler arası çalışmalar, günümüzde de büyük önem taşımaktadır.

Biyosensör uygulamalarında; piezoelektrik, potansiyometrik, optik, iyon seçici alan etkili transistör gibi çeşitli çevirici türleri kullanılmaktadır (Mutlu ve Boyacı, 2011). Piezoelektrik kuvars kristal mikroterazi (QCM) sistemleri biyosensör çalışmalarında kullanılabilen ve bu çalışmada tercih edilen kütle hassas çevirici türüdür (Kumar, 2000). Biyosensörün tanıyıcı tabakasındaki antibodi ve ortamda bulunan antijen (analit) etkileşiminin meydana getirdiği kütle değişimleri QCM ile çok hassas ölçülebilir (Mutlu, 2011).

Bu çalışmanın temel amacı, biyosensör uygulamalarında kullanılan kütle hassas kuvars kristal yüzeylerin elektro-eğirme yöntemiyle modifiye edilmesi ve bu sayede biyosensör performansının geliştirilmesidir. Elektro-eğirme yöntemi ile oluşturulan nanolifler yüksek yüzey alanı/hacim oranı, yüksek uzunluk/çap oranı ve gözenek boyutunu kontrol edebilme olanağı sağlar (Li ve ark., 2004; Li ve ark., 2006; Süslü, 2009; Ding ve ark., 2010).

Elektro-eğirme yöntemiyle %10 (w/w) polivinil alkol polimer çözeltisi kullanılarak uygun parametrelerde kuvars kristal yüzeyleri modifiye edilmiştir. PVA polimeri ile oda sıcaklığında elektro-eğirme yöntemini kullanmak mümkündür, polimer kararlıdır yağda ve çözücüde çözünmez, film haline getirilmesi kolaydır ve bu yönleri göz önüne alındığında çalışmada kullanılması tercih edilmiştir (Galaev ve ark., 2002; Kumar ve ark., 1998).

Ortamdaki analitin tayin edilmesi için yüzeyde fonksiyonel grupların oluşturulması ve bu fonksiyonel gruplara hedef analiti tanıyıcı biyoajanın immobilize edilmesi gereklidir. Bu amaçla nanolıf kaplı çevirici yüzey üzerinde uygun fonksiyonel grupların oluşturulabilmesi amacıyla “plazma polimerizasyon” tekniği kullanılmıştır. Amin grubu oluşturulmuş QCM yüzeylere, kimyasal aktivasyon sonrası, seçilmiş olan model protein olan biyotin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde oluşturulan tanıyıcı tabakanın, diğer bir deyişle kütle hassas biyosensörün, avidine karşı seçicilik, hassasiyet ve doğrusallık temelinde performansı incelenmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Biyosensörler

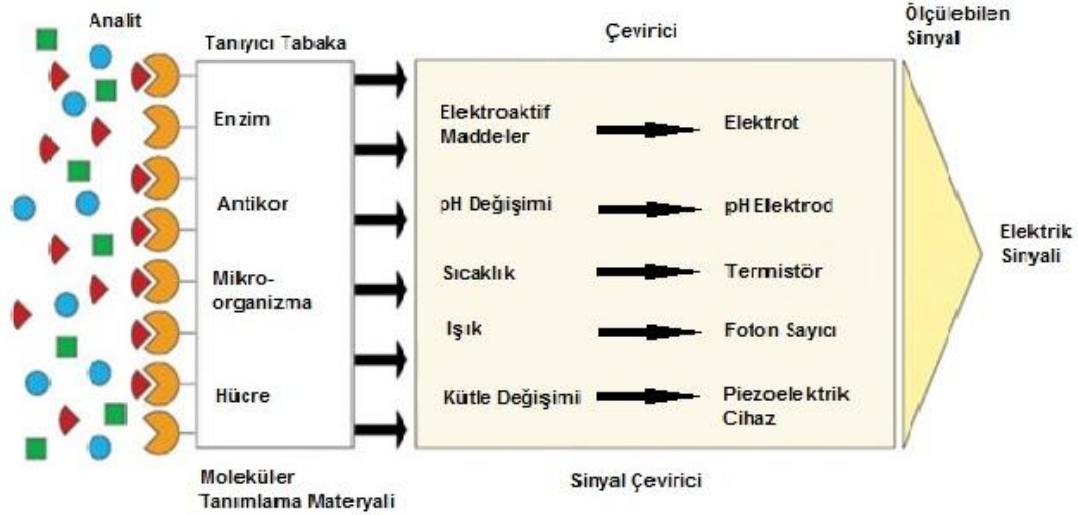
Biyosensörler; izole enzimler, bağışıklık sistemleri, dokular, organeller veya bütün hücrelerdeki belirli biyokimyasal reaksiyonları kullanarak, genellikle elektriksel, termal ya da optik sinyallerle kimyasal bileşenleri belirleyen bir araçtır (IUPAC, 1997). Bir başka deyişle, hedef analitle spesifik olarak etkileşime giren biyolojik tanımlama elementi ile bu etkileşim sonucunu ölçülebilen sinyale dönüştürebilen çeviriciden oluşan analitik aygıtlar biyosensör olarak adlandırılmaktadır. Biyosensörler, biyolojik algılayıcı elementin seçiciliği ve hedef analitin konsantrasyonu ile orantılı olarak sinyal üretirler.

Clark ve Lyons' un (Clark ve Lyons, 1962) 1962 yılında glukoz elektrodu hazırlamasıyla başlayan biyosensör çalışmaları günümüze kadar sürmüştür ve günümüzde de yoğun bir şekilde çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmaları iki grup altında toplamak mümkündür. Birinci grup çalışmalar, var olan ölçüm sisteminin hassasiyetini, doğrusallığını, seçiciliğini, tekrar kullanılabilirliğini ve cevap süresini yani biyosensörün performansını geliştirmek için yapılan çalışmalardır. İkinci grup çalışmalar da ise biyosensör ile daha farklı madde veya molekülün nitel veya nicel ölçümünün gerçekleştirilmesi üzerine yoğunlaşmaktadır.

Biyosensörler tıp, tarım, gıda, eczacılık, çevre, savunma gibi birçok alanda önemli rol oynamaktadır. Bugüne kadar yüzlerce farklı madde için biyosensör hazırlanmasına karşın bunların birkaçı ticari olarak üretilmektedir (Mutlu ve Boyacı, 2011).

2.1.1 Biyosensörlerin temel bileşenleri

Biyosensörler, tanıyıcı tabaka, çevirici ve elektronik bölüm olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Biyosensörlerin genel tasarım prensibi

2.1.1.1 Tanıyıcı tabaka

Tayin edilecek analit ile seçici ve tersinir olarak reaksiyona giren ve analit konsantrasyonlarıyla orantılı sinyaller üreten biyolojik ajanlar tanıyıcı tabakayı oluşturmaktadır. Biyolojik tanıyıcı ajan kendi spesifik olduğu ajanı tanıyıp onunla etkileşime girmektedir. Bu etkileşim sonucunda çevirici sistemin algılayabileceği sinyali üretmektedir. Biyosensörün yapılandırılmasında en önemli nokta, biyolojik tanıma işleminin hassaslığı, hedef kimyasala spesifik olmasıdır.

Genellikle biyoajanlar, biyoaffinite ve biyokatalitik ajanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Biyoaffinite ajanları (antikorlar, hormon reseptörleri, DNA, lektin gibi moleküller) antijenler, hormonlar, DNA parçaları ve glikoproteinlerin moleküler tanımlamasında kullanılmaktadır. Refraktif indeks, ışık absorpsiyonu ve elektriksel yük gibi sistemin fizikokimyasal parametrelerini değiştirmektedir ve bu değişimler uygun sensörlerle algılanmaktadır. Biyokatalitik ajan olarak ise saf enzim veya enzim sistemleri, organeller, mikroorganizmalar ve bitkisel ve hayvansal doku parçaları kullanılmaktadır. Biyokatalitik ajanlar, analit üzerinde moleküler değişime neden olmakta ve moleküler dönüşüm sonucu ortamda azalan veya artan madde miktarını takip ederek sonuca ulaşılmaktadır.

2.1.1.2 Çevirici

Çeviriciler, analit ile biyoajan etkileşmesi sonucu oluşan biyokimyasal sinyali fiziksel sinyale dönüştürmektedir. Bir sensörde en önemli bileşen tanıyıcı tabakadır. Diğer taraftan yaratılan sinyal seviyesi veya sinyal gürültü oranı can alıcı bir önem taşıyorsa, bu durumda kritik bileşen elektronik ya da fiziksel çevirici olmaktadır. Çevirici türleri ve çalışma prensipleri kısaca çizelge 2.1' de gösterilmiştir (IUPAC, 1999; IUPAC, 1991).

Çizelge 2.1 Çevirici türleri ve çalışma prensipleri

Çevirici	Çalışma Prensibi
Elektrokimyasal sensörler	Analit ile elektrot arasındaki etkileşimden meydana gelen elektrik sinyallerinin ölçümü esasına dayanır
➤ Potansiyometrik	İki elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas almaktadır, elektrot potansiyeli analit derişimini tanımlar
➤ Amperometrik	Potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümü esasına dayanır
➤ Voltametrik	Rezistans, kapasitans, iletkenlik ya da empedanstaki değişimin ölçümünü esas alarak çalışırlar
➤ Alan etkili (FET) (ISFET)	Yarı iletkenin alan etkisi dahilinde giriş voltajının modüle ettiği iletim prensibi ile çalışırlar
Optik sensörler	Madde derişimine bağlı olarak absorbans değişimi, luminesans değişimi ya da floresansın ölçülmesidir
➤ Absorbans	Geçirgen bir ortamda ölçölür, analitin ya kendisinin ya da bazı uygun belirteçlerle reaksiyonunun absorblama yeteneği kaynaklıdır
➤ Reflektans	Bir immobilize belirteç yardımıyla geçirgen olmayan ortamlarda ölçölür
➤ Luminesans	Alıcı sistemdeki bir kimyasal reaksiyon tarafından yayılan ışığın şiddetinin ölçölmesi temeline dayanır

➤ Floresans	Işınlamadan kaynaklanan pozitif emisyon etkisi olarak ölçülür
➤ Kırılma indisi	Çözelti bileşimindeki değişimin sonucu olarak ölçülür. Kırılma indisi aynı zamanda yüzey plazma rezonans etkisini içerebilir
➤ Optotermal etki	Işık absorpsiyonundan kaynaklanan ısı etkinin ölçümü temeline dayanır
➤ Işık saçılımı	Örneğin içinde bulunan belli bir boyuta sahip parçalardan kaynaklanan etkisi temeline dayanır
Termal sensörler	Analiti içeren belirli bir kimyasal reaksiyonun ya da adsorpsiyonun ısı etkilerinin ölçümüne dayanır
Kütle hassas sensörler	Bu sensörler, modifiye bir yüzeydeki kütle değişimini destek materyalindeki bir özelliğin değişimi olarak yansıtır. Kütle değişimi analitin birikimi sebebiyle olur
➤ Piezoelektrik sensörler	Analitin kütlelerinin osilatördeki birikimi sebebiyle, kuvars osilatör plakasının yarattığı frekans değişiminin ölçümüne dayanır. Gazlarda ya da çözeltilerde kullanılır
➤ Yüzey akustik dalga sensörleri	Analitin belli bir miktarının çökmesiyle üretilen akustik bir dalganın yayılma hızının değişikliğine dayanır
Elektriksel sensörler	Elektrokimyasal bir prosesin olmadığı, ancak analitin etkileşimi sonucunda elektriksel özelliklerdeki değişim meydana gelmesiyle sinyal yükselmesi temeline dayanır
➤ Metal oksit yarı iletken sensörler	Analit gaz bileşenlerinin tersinir indirgenme prosesi temeline dayalı olarak gaz faz dedektörü olarak kullanılırlar
➤ Organik yarı iletken sensörler	Yük taşıyıcı yoğunluğunu düzenleyen yük aktarım komplekslerinin oluşumu temeline dayanır
➤ Elektrolitik iletkenlik sensörleri	
➤ Elektriksel geçirgenlik sensörler	

Manyetik sensörler	Analiz edilen gazın paramanyetik özelliklerinin değişimine dayanır.
Diğerleri	Örneğin α , β , γ radyasyonu sensörlere kimyasal kompozisyonun belirlenmesinde temel oluşturabilir.

Biyoajan ve çeviricinin birçok kombinasyonu mümkün olmasına karşın minimum süre ve maliyette maksimum fiziksel sinyal oluşturabilecek kombinasyonu seçmek amaçlanmaktadır.

2.1.1.3 Elektronik bölüm

Çevirici tarafından oluşturulan sinyallerin görüntülenmesi ve/veya depolanması amacıyla kullanılan bölümdür. Oluşan fiziksel sinyal herhangi bir işlem yapılmaksızın uygun bir ekranda görüntülenebildiği gibi sinyaller veri aktarım kartları ile bilgisayar ortamına aktarılarak istenilen çevrimler, hesaplamalar ve görüntülemeler yapılabilmektedir.

2.1.2 Biyosensörlerin performans parametreleri

Biyosensörlerin performansları dört temel parametre dikkate alınarak değerlendirilmektedir. Bunlar hassasiyet ve ölçüm sınırı, cevap süresi, doğrusallık ve seçiciliktir.

Hassasiyet ve Ölçüm sınırı: Hassasiyet, bir kimyasal türün değişimindeki değişime bağlı olarak sensörün çıkış sinyalinin (S) son durağan halindeki değişimi ($\Delta S / \Delta C$) olarak tanımlanır. Bir başka deyişle, oluşturulan kalibrasyon doğrusunun eğimi biyosensörün hassasiyetidir. Sensörün büyüklüğü, ölçüm ortamına doğru kimyasal türün kütle aktarım hızı gibi faktörler duyarlılığa etki etmektedir.

Ölçüm sınırı ise bir elektrotta gerçekleştirilebilecek olan en düşük analit derişimi olarak tanımlanmaktadır. Ölçüm sınırı, kullanılan elektronik cihazın ayırma gücü ile sınırlıdır.

Cevap Süresi: Bir biyosensörde tam plato değerinin %95' ine ulaşmak için geçen süre o biyosensörün cevap süresi olarak kabul edilmektedir. Bir sensörün dinamik cevabı, ölçtüğü hedef analitin derişimindeki bir değişikliğe ne kadar hızlı cevap verdiğini belirler. Temel mekanizma genellikle, kimyasal türlerin örnekten iletkenin

aktif yüzeyine basit difüzyonudur. Hedef analit ve/veya reaktantın tayin edilen kütle aktarımı derişim farklarına, etkin difüzyon katsayılarına bağıdır.

Doğrusallık: Ölçüm ortamında çözünmüş analitin maksimum derişimi ile minimum derişim aralığında, sinyal sabit bir duyarlılıkla ölçülmelidir. Sisteme eklenen her analit derişimi ile ölçülen sinyal arasındaki ilişki belirli bir analit derişimine kadar doğrusal olmalıdır. Biyosensörlerde doğrusallık sınırı biyosensörlerin temel bileşenleri tarafından ve hazırlanma şekline bağı olarak değışmektedir.

Seçicilik: Sensörün cevabı sadece belirli bir grup analit derişimine ve hatta tek bir analite duyarlı olmalı, diğerkimyasal türlerden etkilenmemelidir. Analiz ortamında ölçüm sistemi üzerinde girişim yapacak veya ölçümü maskeleyecek kimyasal yapıların veya ortam gürültülerinin bulunması mümkündür. Dolayısıyla hazırlanan biyosensörün bu tür etkilerden korunmuş olması gerekmektedir (Boyacı, 1998).

2.1.3 Biyosensörlerin sınıflandırılması

Sensörler birçok farklı özelliklerine göre sınıflandırılmışlardır. Kullanılan biyoajana bağı olarak; enzim sensörler, immünosensörler, DNA sensörler olarak sınıflandırılabilidiği gibi çevirici türüne bağı olarak elektrokimyasal, optik, termik sensörler gibi sınıflandırılabilirler. En geçerli olanı ise IUPAC (1991) tarafından “sinyal çevirici” lerine göre yapılan sınıflandırmadır.

2.1.3.1 Elektrokimyasal biyosensörler

Elektrokimyasal sensörler doğrudan doğruya elektrik sinyalleri üretmektedirler. Yaygın olarak elektrokimyasal sensörleri potansiyometrik, amperometrik, voltametrik ve alan etkili biyosensörler olarak dört başlıkta incelemek mümkündür.

Potansiyometrik Biyosensörler: Potansiyometri, bir çalışma elektrotu ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas almaktadır. Belirlenen elektrot potansiyeli doğrudan analit derişimini tanımlamaktadır. Potansiyometrik sensörlerin düşük hassasiyet, spesifik olmayan etkileşimlere ait ve aletsel sinyal alınması gibi büyük problemleri vardır. Özellikle sinyal/gürültü oranı analitik problemlere sebep olmaktadır (Ozansoy, 2007).

Amperometrik Biyosensörler: Genel anlamda akım şiddetinin ölçümü esasına dayanır. Akım şiddeti, çalışma elektrotunda yükseltgenen veya indirgenen

elektroaktif türlerin derişiminin bir fonksiyonudur. Referans elektrot olarak görev yapan ikinci bir elektrot vasıtasıyla akım şiddetinden analiz edilecek türlerin derişimlerinin belirlenmesinde yararlanılır. Gözlenen akım elektroaktif türlerin yığındaki konsantrasyonlarıyla veya biyokatalitik tabakalar arasındaki üretim veya tüketim hızlarıyla direk ilişkilidir (IUPAC, 1999; Günaydın, 2009).

Voltametrik Biyosensörler: Mikrobiyolojik reaksiyonlar, genellikle iletkenlik ve kapasitansta artma, empedansta azalmaya sebep olmaktadır. Buna dayanarak rezistans, kapasitans, iletkenlik ya da empedanstaki değişimin ölçümünü esas alan sensörler bu grupta yer almaktadır.

Alan Etkili Biyosensörler: Alan etkili transistörler (FET) gerilim kontrollü yarı iletken devre elemanıdır. FET iletim, yüzey voltajı, yüzey yükü ve performansından etkilenir. Bu özellikleriyle elektrokimyasal tabanlı sensörlerin oluşumunda FET kullanılır, ölçüm ortamından sürekli alınan sinyalin takibine izin verir. Metal oksit yarı iletken alan etki transistörlerini (MOSFET) ya da iyon duyar alan etki transistörlerini (ISFET) esas alan enzim sensörleri, enzim ile alan etki transistörlerinin birleştirilmesini ifade edecek şekilde enzim alan etki transistörleri (ENFET) olarak adlandırılırlar (Xu ve ark., 2005). Oldukça düşük tespit limitlerine sahip olup küçük hacimde örneklerin kullanılmasına olanak tanımaktadır. Elektrokimyasal analiz için gereken malzeme, diğer analitik metotlarla karşılaştırıldığında çok daha ucuz ve basittir.

2.1.3.2 Optik biyosensörler

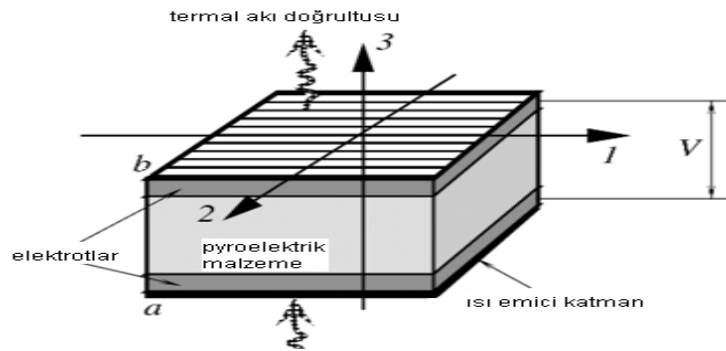
Optik çeviricilerde ışığın iletimindeki değişimin ölçülmesi veya floresansın ölçülmesi söz konusudur. Işığın iletimindeki değişimin ölçülmesine dayalı, optik esaslı sensörlerde, ölçüm sistemi, madde derişimine bağlı olarak absorbans veya luminesansta değişim gösteren bir boya içerir veya CO₂, O₂, pH değişimi gibi bir fizikokimyasal özellikten faydalanılır. Bu sensörlerde en önemli etken, fiber boyunca ışık iletiminin etkinliğidir. Floresansın ölçüldüğü durumlarda ise fiberin kendi özelliklerindeki (intrensek) değişimleri kapsar ve arka alan (evanescent) immünosensörler ve yüzey plazmon rezonans immünosensörler olarak iki gruba ayrılırlar. Optik sensörlerde, absorbsiyon, yansıma veya floresans ölçüm sistemlerinden biri kullanılır. Floresans ölçümleri en çok kullanılandır. Sensörün konfigürasyonu optimal dizaynda en önemli faktördür ve hassaslığı, dinamik

bölgeyi, cevap verme süresini, seçiciliği ve kullanım zamanını tayin eder (Çökeliler, 2006).

2.1.3.3 Termal biyosensörler

Temel prensipleri; bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat derişiminin belirlenmesine dayanır. Bütün biyolojik reaksiyonlar ekzotermiktir. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır. Sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamdaki termistörler veya termofiller aracılığıyla izlenir. Kullanılan termistörler çok küçük sıcaklık değişimlerine bile duyarlıdır. Dolayısıyla çok düşük miktardaki substrat derişiminin ölçümüne olanak tanır.

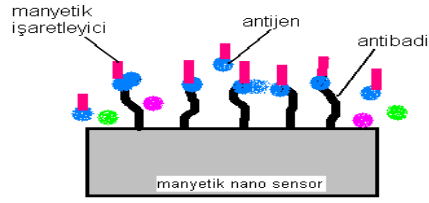
Malzemenin sıcaklık değişimine karşı elektrik potansiyel oluşturması özelliği olarak bilinen pyroelektrik etkiyi kullanan pyroelektrik çeviriciler (Şekil 2.2), termoelektrik malzemelere kıyasla daha avantajlıdır; 1200°C'de bile kararlıdır (Rodoplu, 2011).



Şekil 2.2 Pyroelektrik çevirici

2.1.3.4 Manyetik biyosensörler

Ortamdaki manyetik değişikliği algılayan ve buna bağlı olarak çıkışında gerilim üreten elemanlara manyetik çevirici denir. Manyetik nano parçacıkların işaretleyici olarak kullanılmasıyla manyetik çeviriciler de biyosensör uygulamalarında kullanılmaktadır (Şekil 2.3). Spin vanası, Hall sensörü, anizotropik manyetik direnç (AMR) ve dev manyeto-direnç (GMR) sensörleri biyosensör çeviricileri olarak kullanılmaktadır (Guanxiong ve ark., 2006).



Şekil 2.3 Manyetik çevirici ve manyetik işaretleyici nano parçacıklarla antijen tayininin gösterimi

2.1.3.5 Kütle hassas biyosensörler

Çevirici olarak piezoelektrik kristallerin kullanıldığı kütle hassas biyosensörler, rezonans frekansındaki değişime bağlı olarak nanogram/cm² seviyesinde kütle değişimini ölçebilen ve bu nedenle antikor-antijen etkileşimlerinde sıkça kullanılan biyosensörlerdir. Kütle hassas biyosensörlerin çalışma prensibi piezoelektrik etkiye dayanır. Piezoelektrik kuvars kristal, sıvı faz içinde Sauerbrey prensibine uygun olarak çalışabilen, elektrottaki kütle değişiminin, osilasyon frekansındaki değişimle Sauerbrey denkliğine göre değiştiği sistemlerdir (Çökeliler, 2006).

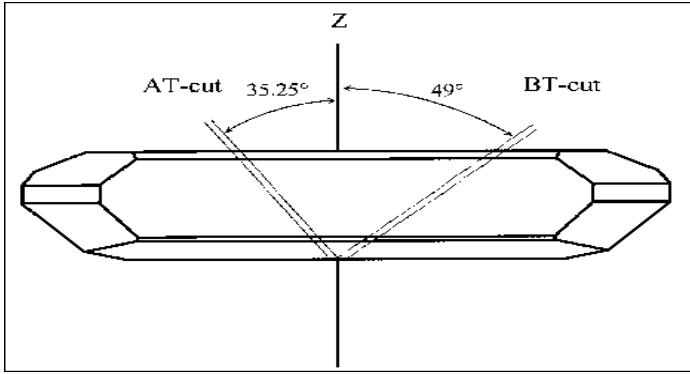
2.2 Piezoelektrik Etki

1880 yılında Fransa’ da Pierre ve Jacques Curie tarafından bazı kristallerin, yüzeylerine dışarıdan uygulanan basınç ile orantılı olarak elektrik üretme özelliği olduğu keşfetmişlerdir. Bu etki “piezoelektrik etki” olarak adlandırılmaktadır. Daha sonra bu olayın tersinir olduğu kanıtlanmıştır. Tersinir bir olay olan piezoelektrik etki kuvars ve bazı seramiklerle (seignette tuzu ya da baryum titanat) özel biçimde duyarlıdır.

Piezoelektrik kristallerde gerçekleşen titreşim kristal içindeki atomların belli zamanda orijinal konumlarından deforme olmuş konumlarına geçmeleri, buradan yine orijinal konumlarına dönmeleri ve tekrar deforme konuma geçmeleri şeklindeki döngüyü ifade etmektedir. Bu döngülerin birim zamanda tekrarlanma sayısı kristalin rezonans frekansı olarak adlandırılmaktadır. Piezoelektrik kristallerde bulunan pozitif ve negatif yüklü iyonlar titreşim sonucu polarizasyon oluşturur. Bu salınım frekansına karşın salınan bir elektrik alan oluşumu vardır. Elektrik alan salınım frekansı ile rezonans frekansı aynıdır. Salınımın yönü, kristalin elektrik alandaki oryantasyonuna, kristalin oryantasyonu ise kristalin kesme yönüne bağlıdır. Ayrıca kristalin rezonans frekansı; boyut, yoğunluk gibi kendi fiziksel özelliklerine de dayanmaktadır (Beyhan, 2008).

Piezoelektrik kristaller çevirici sistemlerde genel olarak yüzeyde kütle algılanması ve gerinim ölçümünde kullanılırlar. Monokristal yapıda atomlar, kübik kafes sistemi oluşturmaktadır. Bu yapı içerisinde, artı ve eksi yüklü atomlar kayma gerilimleri etkisiyle sürekli yer değiştirmektedir. En yaygın kullanılan piezoelektrik kristal kuvarstır.

Sensör uygulamalarında Y- kesme ailesine bağlı AT- kesme ve BT- kesme kuvars kristaller kullanılmaktadır. Şekil 2.4' de gösterildiği gibi AT- kesmede, kuartz tabaka, z ekseninden $+35^{\circ}25'$ açıyla, BT- kesmede ise z ekseninden -49° açıyla kesilmiştir (O'Sullivan ve ark., 1999). AT kesme kristallerde sıcaklık katsayısı, kesme şelinden dolayı $10-50^{\circ}\text{C}$ aralığında $1\text{ ppm}/^{\circ}\text{C}$ civarında sifıra oldukça yakındır ve bu da kristalin geniş bir frekans aralığında rezonans frekansının kararlı olarak kalmasına olanak tanır.



Şekil 2.4 Kuartz kristalin eksenlerde gösterimi AT- kesme ve BT- kesme

Bu kristaller $10-16\text{ mm}$ kalınlığında disk, kare veya dikdörtgen şeklinde olmaktadır. Piezoelektrik uygulamalarında kristal iki metal elektrot arasında sandviç edilerek salınan elektrik alanının kristal yüzeyine dik yönde olması sağlanmaktadır. Oluşan elektrik alanı kristal yığın yapısında mekanik salınımına neden olur. Altın, gümüş, alüminyum veya nikel, metal elektrot olarak kullanılabilirken; kristal olarak ise kuvars, turmalin ve rochelle tuzu ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) tercih edilmektedir. Altın elektrotlar inert olmaları nedeniyle birçok uygulamada kullanılmaktadır. Rezonans frekansları $5, 9$ veya 10 MHz olabilmektedir ve depozite edilen metal miktarı ile kristalin çalışma frekans seviyesi ayarlanmaktadır. Kuvars kristaller de fiziksel, kimyasal ve elektriksel özellikleri nedeniyle analitik uygulamalarda tercih edilmektedir.

Piezoelektrik etkiyi kullanan araçların iki genel sınıfı vardır: yığın akustik dalga (bulk acoustic wave, BAW) ve yüzey akustik dalga (surface acoustic wave, SAW). Piezoelektrik kuvars kristaller (PQC) BAW araçlardır, kuvars kristal mikroterazi (QCM) ve kalınlık kayma modu (thickness shear mode, TSM) olarak da tanımlanabilirler. QCM terimi kristalin kütle hassasiyetini belirttiği için sıkça kullanılır. TSM terimi ise kristalin titreşim hareketini belirttiği için kullanılır (Bunde ve ark., 1998). Yüzey akustik dalga prensibiyle çalışan SAW araçlarda elektrotlar kristalin aynı yüzeyinde bulunur. SAW araçlar, PQC' lere göre daha hassas olmalarına karşın biyolojik çözeltiler yüzey akustik dalgaları zayıflattığı için biyolojik uygulamalarda genellikle PQC sistemler kullanılır.

2.2.1 Kuvars kristal mikroterazi

Piezoelektrik kütle sensörlerin kullanımı açısından en çok seçici kimyasal sensörler üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Genelde kuvarsın kristal olarak kullanılmasından dolayı bu tür kimyasal sensörler kuvars kristal mikroterazi sistemleri olarak anılmaktadır. Lord Rayleigh' in mekanik olarak rezonans halinde olan kristalin kütlelerinin değişmesiyle kristalin referans frekansının da değiştiğini göstermesi piezoelektirik kristallerin mikroterazi sistemi olarak kullanımının temelini oluşturmaktadır. Sauerbrey' nin kristal üzerindeki kütle birikimi ile rezonans frekans değişimi arasındaki ilişkiyi aşağıdaki ampirik denklemle açıklamasıyla birlikte kristallerin kimyasal sensörlerde kullanımı başlamıştır (Guilbault ve ark., 1988).

$$\Delta f = -\frac{2 f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_q \mu_q}} \quad (2.1)$$

Δf : Ölçülen frekans kayması

f_0 : Kristalin rezonans frekansı (Hz)

Δm : Kütle değişimi (g)

A : Pizeoelektrik olarak aktif alan, kuvars kristal üzerindeki elektrot yüzey alanı (cm²)

ρ_q : Kuvarsın yoğunluğu (2.648 g cm⁻³)

μ_q : Kuvarsın kayma katsayısı (2.947.10-11 g cm⁻²)

Bu denkleme göre AT kesme kristal kullanıldığında elektrot yüzeyi üzerinde biriken kütle çok fazla değil ise birim alandaki kristalin kütle değişimi, kristalin rezonans frekansındaki değişimiyle orantılıdır. Bu şekilde elektrotların aktif alanına bağlanan moleküllerin miktarı rezonans frekanstaki azalmayla ölçülebilir (Skadal, 2003).

Sıvı çözeltilerde ise Sauerbrey denklemini bu şekli ile geçerli değildir. Newtonsal sıvılar için aşağıdaki denklem geçerlidir (Kanazawa ve Gordon, 1985):

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_L \rho_L}{\pi \mu_q \rho_q}} \quad (2.2)$$

Bu denklemde η_L çözeltinin vizkositesini, ρ_L çözeltinin yoğunluğunu temsil eder.

2.2.2 Kuvars kristal mikroterazi sistemlerin kullanım alanları

Günümüzde ateşleyici, saat, mikroskop, yüksek frekansta ses üretimi, ses iletimi ve algılanması, yarı iletken teknolojileri, hassas sıcaklık ölçümü gibi birçok uygulamada piezoelektrik özellik gösteren kristallerden yararlanılmaktadır. Mikroterazi sistemlerinin ilk uygulamaları piezoelektrik kristaller yüzeyine spesifik olmayan bir biçimde depozite edilen kütlelerin algılanması şeklindedir. Daha sonra yapılan çalışmalarda kristal yüzeyi ölçülmesi hedeflenen maddeyi spesifik olarak bağlayan kimyasal algılayıcı maddelerle kaplanarak bir kimyasal sensöre dönüştürülmüştür (Çökeliler, 2006).

Kristaller, sensör olarak kütle ölçümü dışında basınç, gaz, akış, ağırlık, nem sensörleri ve kaplama kalınlığı ölçümlerinde de kullanılmaktadır. Kristallerin yüzeyine biyolojik ligand molekül immobilizasyonu ile hedef moleküllerin algılanması da sağlanmaktadır.

2.3 Elektro-Eğirme Yöntemi

Tekstil endüstrisi yıllardır görüntüsü ve dokunuşu ipek lifine benzeyen lif elde etmek için uğraş vermişlerdir. Bunun sonucunda da çok ince (ultra-fine) lif terimi tekstil endüstrisinde yerini almıştır (Kozanoğlu, 2006). Nanolifler, çapları 1,0 mikrondan daha az olan lifler için kullanılan terimdir. Tipik nanoliflerin çapları 50 ile 300 nanometre arasındadır. Nanolifler 4 farklı yöntemle üretilmektedirler. Bunlar; fibrilasyon, meltblown, bikomponent, elektro-eğirme yöntemleridir. Elektro-eğirme dışındaki lif üretim yöntemlerinde, lif üretiminde mekanik kuvvetleri esas etken olarak kullanır. Öte yandan elektro-eğirme yönteminde, elektrik alan kuvvetleri yardımı ile polimerden lif oluşumu sağlanır (Audrey ve Ioannis, 2003).

Polimer esaslı nanoliflerin üretimi için en etkin yöntem elektro-eğirme yöntemidir. Bu teknikte, polimer uygun bir çözücünde çözüldükten veya ısı ile eritildikten sonra bir ucu kapalı ve daralan, öbür ucunda küçük bir delik bulunan cam bir pipetin (veya şırınganın) içine yerleştirilir (Rutledge ve Fridrikh ve ark., 2007). Daha sonra polimer çözeltisine/eriyiğine ve pipetin açık ucunun yakınındaki bir toplayıcı levhaya yüksek gerilim (50 kV' a kadar) uygulanır. Sonuç olarak toplayıcı levhada oluşan ağımsı yüzeyde çapları 30 nm' den 1 mikronun üzerindeki değerlere kadar değişen lifler üretilmektedir.

Elektro-eğirme, geleneksel çekme metotlarındaki gibi polimer eriyiğini kalıptan dışarıya doğru iten dış bir mekanik kuvvetin uygulanmasıyla değil, potansiyel farkı olan toplayıcıya germe kuvveti sağlaması için akışkana uygulanan elektrik akımı sayesinde gerçekleşir. Yeterince yüksek voltaj oluşturulduğu zaman polimer çözeltisi damlacığından polimer çözeltisi fiskeyi oluşmaktadır. Çözeltideki polimer zinciri düğümleri elektro-eğirme fiskeyesinin ayrılmasını engellemektedir.

Yüksek yüzey alanına/ hacim oranına ve nanometre mertebesinde çapa sahip çok ince fiber yapı elde edebilmek, çeşitli amaçlara yönelik işlevselleştirmede kolaylık sağlamak, işlem kolaylığı, üstün mekaniksel özellikler gibi özellikleri elektro-eğirme yönteminin önemli avantajlarıdır. Elektro-eğirme metoduyla iletken polimerler, metaller, yarıiletkenler ve karbonlar ile çalışılarak nanometre mertebesinde çaplara sahip nano lif ve nano tüplerin üretimi gerçekleştirilir. Doku mühendisliğinde, ilaç taşıyım uygulamalarında, elektriksel ve optik uygulamalarda olmak üzere pek çok

alanda elektro-eğirme yöntemiyle çalışmalar yapılmaktadır (Agarwal ve ark., 2008).

2.3.1 Tarihçe

1600'lü yıllarda, William Gilbert' in manyetizma üzerine çalışmalarını sürdürürken tesadüf bir şekilde elektro-manyetizmanın sıvılar üzerine etkisini gözlemlemesiyle elektro-çekim yöntemi ortaya çıkmıştır (Kataphinan, 2004; Lam, 2004; Kozanoğlu, 2006). 1882'de Lord Rayleigh (Chun, 2005), elektrik yüküne sahip damlaların elektro-üretim sırasında gösterdiği düzensiz hareketler üzerinde çalışmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, damla üzerine etkiyen iki kuvvetten birinin elektrik kuvveti, diğerinin ise elektrik kuvvetine tam zıt yönde damlayı etkileyen yüzey gerilimi kuvveti olduğunu göstermiştir. Elektrik kuvvetinin yüzey geriliminden kaynaklanan kuvveti yendiği anda damla, ince jetlere ayrılarak akmaya başlamıştır (Chun, 2005; Sanders, 2005; Reneker ve ark., 2000). Rayleigh bu çalışmasında, damlanın iğne ucundan çıkması için gerekli maksimum yükü de hesaplamıştır (Pawlowski ve ark., 2003; Reneker ve Chun, 1996). Bu olay için kritik nokta denklemi aşağıdaki gibidir:

$$q^2 = 64 \pi^2 \epsilon_0 \gamma a^3 \quad (2.3)$$

Burada;

q : damla üzerindeki yük,

ϵ_0 : serbest uzayın iletkenlik sabiti,

γ : damlanın yüzey gerilimi,

a : damlanın çapıdır (Rangkupan, 2002).

1914 yılında Zeleny, damla ucundaki (meniscus) elektrik yükü yoğunluğunu basınçlı sıvı kolonunun yüksekliğine bakarak tespit etmiştir (Chun, 2005). 1915 yılında da damladan jete geçiş durumunu incelemiş ve Lord Rayleigh ile aynı sonuçları elde etmiştir (Chun, 2005). 1917 yılında ise Zeleny, ilk defa elektriklenmiş sıvı yüzeylerinin hızlı elektro-hidrodinamik çarpmasını gözlemlemiştir. Gözleminin sonucunda oluşan spreyn çözücünün yapısının, yüksek gerilimin ve borunun ucundaki sıvı basıncının bir fonksiyonu olduğunu belirlemiştir (Marginean ve ark., 2004).

1960' lı yıllarda Taylor tarafından yapılan çeşitli çalışmalarda, elektriklenmiş sıvıların temel teorik prensipleri açıklanmıştır (Hohman ve ark., 2001). Bu çalışmalardan bir tanesinde, iki sıvı arasındaki koni ara yüzün elektrik alan içerisinde dengede olduğu gösterilmiştir (Kataphinan, 2004). Elektrik alan etkisi altında sıvı yüzeyi yüklenir ve karşılıklı yüklerin birbirlerini itmesi ile dış bir kuvvet oluşur. Eşik değerini geçtikten sonra elektrostatik kuvvetle, sıvı damlacığı bir koni şeklini alır ve fazla yükler koninin ucunda oluşan yüklenmiş jetten dışarı çıkar. Taylor, elektriksel kuvvetin yüzey gerilimine eşit olduğu bu kritik noktada koni oluştuğunu ve bu koninin yarım açısını $49,3^\circ$ olarak tahmin etmiştir. Bu tahminleri yaptığı deneylerle uygunluk göstermiştir (Rangkupan, 2002).

Taylor tarafından geliştirilen teoride (Mohan, 2002), bir elektrik alan içindeki viskoz damladan ince liflerin oluşması, elektriksel kuvvetler tarafından yüklenen sıvı yüzeyindeki maksimum kararsızlıktan dolayı gerçekleştiği açıklanmıştır. Yüksek gerilimlerde küresel bir damla oluşur ve kritik noktada viskoz damlanın yarıküresel şekli bozularak jet oluşumundan önce koni şeklini alır (Şekil 2.5). Koni ucundan taban çizgisi arasında $\alpha \sim 50$ derecede yarı dikey açı vardır. Elektriksel kuvvetlerin etkisi altında, viskoz akışkanın yüzey kıvrımlığı değişir. Bu sırada yüzey gerilimi elektriksel kuvvetlere karşı koyan tek kuvvettir.

Maksimum kararsızlık halindeki kritik voltaj (V_c) değerinin denklemi, Taylor tarafından 1969' da verilmiştir (Mohan, 2002).

$$V_c^2 = 4(H^2/L^2) * (\ln(2L/R) - 1,5) * (1,3\pi RT) * (0,09) \quad (2.4)$$

Burada;

H: elektrodlar arası mesafe (cm),

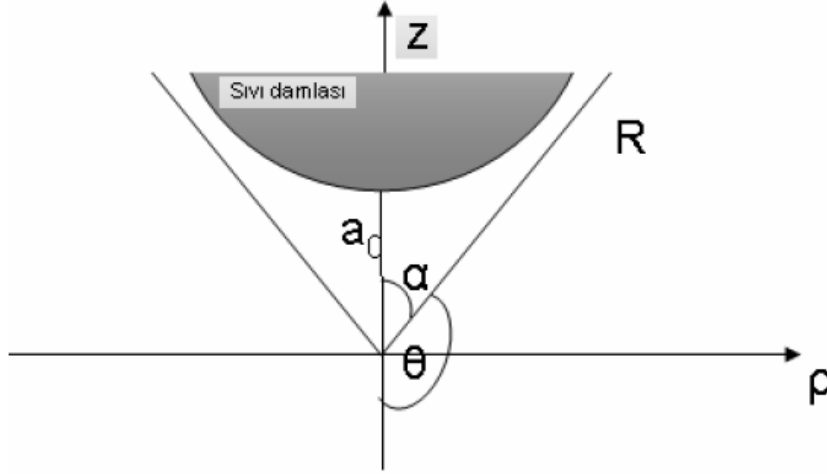
L: kılcal borunun uzunluğu (cm),

R: kılcal borunun yarı çapı (cm) ve

T: yüzey gerilimi (dyne/cm) dir.

Jet içindeki akış alanı, jet eksenini boyunca uzunlamasına (extensional) bileşkeye sahip bir hız değişimi (gradient) gibi olacaktır. Uzunlamasına hız değişimi (ikinci tür

karasızlıktan kaynaklanan benzer yüklerin birbirini itmesi) çok ince lif oluşumu ve polimer zincirlerinin uzamasında çok verimli olarak bilinir. Bunun yanında, elektrostatik uzamaya sebep olan uygulanan gerilimin artmasıyla liflerin çapı azalır (Mohan, 2002).



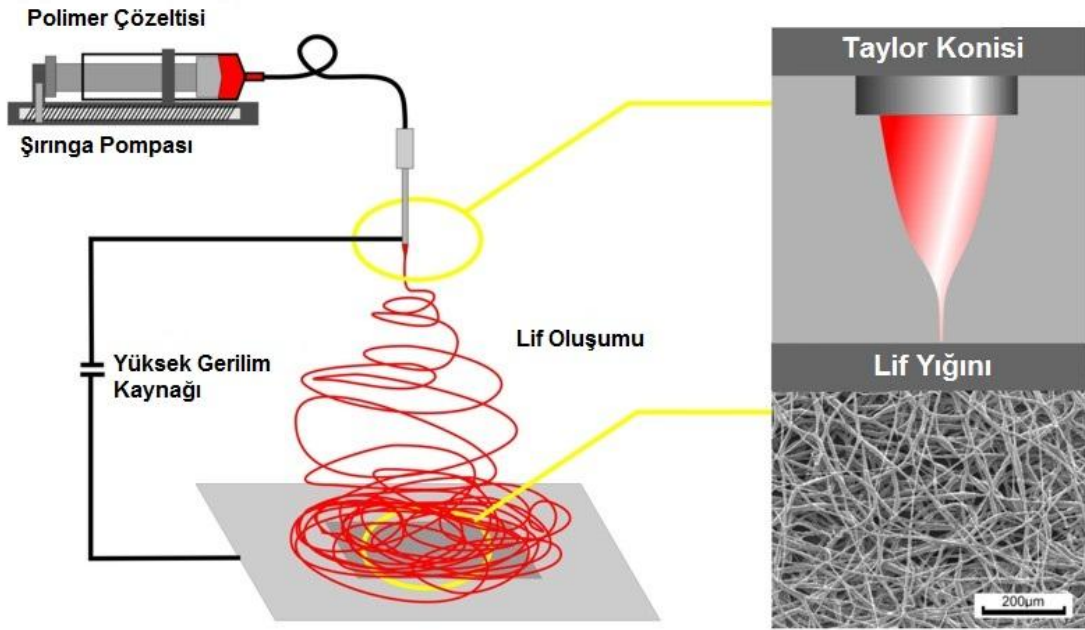
Şekil 2.5 Taylor konisinde oluşan yarı konik açısı

Günümüze kadar devam eden çalışmalarda işlem parametreleri ve polimer çözeltileri değiştirilerek çeşitli boyutlarda ve yapılarda lif eldesi ve elde edilen bu liflerin kullanım alanları ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır (Kozanoğlu, 2006; Kaya, 2009).

2.3.2 Elektro-eğirme sisteminin çalışma prensibi

Elektro-eğirme sisteminde kullanılacak polimer uygun bir çözücünde çözülür veya ısı ile eritilip ucunda küçük bir delik bulunan cam bir pipetin veya şırınganın içine yerleştirilir. Daha sonra polimer çözeltisi/eriyiği ile pipetin açık ucunun karşısındaki bir toplayıcı levha arasına 50 kV' a kadar gerilim uygulanır. Besleyici ünitadaki iğnenin ucunda asılı durumda duran polimer damlası kritik bir gerilim değerine kadar, yüzey geriliminin uyguladığı kuvvetlerden dolayı küresel bir biçimde bulunur. Uygulanan potansiyel fark bir eşik değerine ulaştığı anda, elektrostatik kuvvetler yüzey gerilimi kuvvetlerine eşitlenir. Bu noktada polimer damlası şekil değiştirerek koni biçimini alır. Bu koniye Taylor konisi denir. Polimer damlası Taylor konisi halini aldıktan sonra gerilimdeki çok küçük bir artışla birlikte koni ucundan bir jet fışkırır. Jet toplayıcı levha ile metal iğne ucu arasında ilerlerken

farklı yollar izler. Yüklenen jet Taylor konisinden çıktıktan sonra belli bir mesafede kararlı bir şekilde hareket eder. Daha sonra jette kararsızlık hali belirir. Kullanılan polimerin çözeltisi veya eriyiğinin özelliğine ve sistem değişkenlerine bağlı olarak değişebilen üç kararsızlık hali mevcuttur. Jet bu kararsızlık hallerinden sadece birini gösterebileceği gibi üç kararsızlık halini de gösterebilir (Shin ve ark., 2001). Bu kararsızlık halleri; (i) Klasik Rayleigh kararsızlığı, (ii) Eksenel simetrik elektrik alan akımlanması, (iii) Whipping kararsızlığı olarak Shin ve arkadaşları (2001) tarafından açıklanmış ve matematiksel olarak modellenmiştir.



Şekil 2.6 Elektro-eğirme düzeneği

2.3.3 Elektro-eğirme işlemine etki eden parametreler

Elektro-eğirme sisteminde, son ürünün morfolojisi ve yapısı elektrostatik kuvvetlerin ve çözelti parametrelerinin sinerjik etkisinden etkilenmektedir (Ramakrishna ve ark., 2005).

Bu parametreler üç başlık altında incelenebilir;

1. Çözelti değişkenleri
 - 1.1. Moleküler ağırlık ve viskozite
 - 1.2. İletkenlik
 - 1.3. Yüzey gerilimi
 - 1.4. pH
2. İşlem değişkenleri
 - 2.1. Uygulanan gerilim
 - 2.2. Polimer akış hızı
 - 2.3. Toplayıcı levha ile iğne arasındaki mesafe
 - 2.4. Toplayıcı levhanın hareketi
3. Çevresel değişkenler
 - 3.1. Sıcaklık
 - 3.2. Bağıl nem
 - 3.3. Basınç

2.3.3.1 Çözelti değişkenleri

Moleküler Ağırlık ve Viskozite: Lif morfolojisine etki eden önemli bir parametre olan polimerin moleküler ağırlığı ve konsantrasyonu, viskoziteyi etkilemektedir. Moleküler ağırlığı büyükse yani polimer zincirleri uzunsa polimer çözeltinin viskozitesi de yüksektir. Lif oluşumu için konsantrasyon değerinin veya viskozitenin belli değerleri aşması gerekmektedir. Aksi takdirde lif oluşumu yerine damla oluşumu meydana gelmektedir. Aynı zamanda çözeltinin konsantrasyonu değişen viskozite ve yüzey gerilimlerinden dolayı elektro-eğirme yöntemi ile oluşturulmuş lifler için sınır oluşturmaktadır (Subbiah ve ark., 2005).

Elektro-eğirme işlemi sırasında polimer çözeltisinin gerilmesi (stretching) ve incilmesi sonucu fiber yapı oluşur. Polimer zincirlerinin birbirlerine dolanması (entanglement) olmasaydı elektriksel olarak gerilen jet kırılırdı ve düzgün fiber yapı

oluşması mümkün olmazdı. Bu nedenle elektro-eğirme işleminde monomer çözeltileri kullanmak elverişli değildir ve eğirme yüksek moleküler ağırlıklı polimer çözeltileri kullanılır.

Viskozitesi düşük çözeltiler ile fiber yapı elde etmek güç olduğu gibi, viskozitesi çok yüksek olan çözeltilerin de eğirme işlemi başlayamadan iğne ucunda çözeltinin kuruması ve sürekli bir eğirme işlemi gözlenememesi gibi dezavantajları vardır (Zhong ve ark., 2002).

Çoklu jet oluşmadığı sürece fiber çapı en çok çözelti viskozitesine bağlıdır. Çözeltinin konsantrasyonu artarsa viskozitesi artar. Viskozitesi yüksek çözeltiler bükülme kararsızlıklarına daha fazla karşı koydukları için toplayıcı üzerinde fiberlerin daha küçük bir alanda biriktikleri görülmüştür, bu durum jetin fazla incelememesini ve fiber çaplarının daha büyük olmasını açıklar (Zhao ve ark., 2004; Huang ve ark., 2003).

Konsantrasyonun lif çapı üzerindeki etkisi konsantrasyonun artmasıyla lif çapının da artacağı yönündedir. Konsantrasyonun lif oluşumu sırasında oluşan hatalarda da büyük etkisi vardır. Bu hatalara boncuksu yapı veya tespih tanesi (bead) denmektedir (Reneker ve ark., 2000; Lee ve ark., 2003; Zuo ve ark., 2005).

İletkenlik: Elektro-eğirme işleminde damla yüzeyinde toplanan yüklerin itme kuvveti ile polimer çözeltisi gerilir. Çözelti iletkenliği fazla olan polimerlerde iyonların fazla olmasından dolayı yük taşıma kapasitesi artar ve bu da uygulanan elektrik alan ile daha fazla gerilime sebep olur (Kozanoğlu, 2006). Eğer çözelti iletkenliği artarsa daha fazla yük jet tarafından taşınır. Eğer çözelti tamamen gerilmezse boncuk formu oluşur. Eğer çözeltiye çok küçük bir miktar tuz ya da polielektrolit eklenirse çözeltinin taşıdığı yük artacağı için çözelti daha fazla gerilir, daha ince ve boncuksuz fiber yapı oluşumu gerçekleşir (Zhong ve ark., 2002).

Çözelti iletkenliği arttıkça jet çapı da küçüleceği için bükülme kararsızlığı artar. Dolayısıyla fiberler daha geniş bir alanda toplanır (Choi ve ark., 2004).

Yüzey Gerilimi: Yüzey gerilimi yüzey alanını düşürme eğilimindedir, bunu da damlacık oluşturarak gerçekleştirir. Yüzey aktif madde kullanmak yüzey gerilimini düşüreceği için boncuksuz fiber yapı elde edilebilir (Zeng ve ark., 2003). Polimer

çözeltilisine ethanol gibi düşük yüzey gerilimine sahip çözücüler eklenerek de düzgün fiber elde edilebilir (Fong ve ark., 1999).

pH: Elektro-eğirme işleminde kullanılan çözeltinin pH değeri de lif morfolojisini etkilemektedir. Son ve arkadaşları (2005) polivinil alkol (PVA) üzerinde yaptıkları çalışmada, artan pH değerlerinde yani bazik durumda daha düz ve ince lifler elde ederken, asidik durumda çözeltinin sürekliliğini kaybettiğini ve liflerde boncuklu yapıların meydana geldiği gözlemlemişlerdir. Bunun nedenini ise asidik durumlarda PVA' nın proton fazlalığından kaynaklanmasıyla açıklamışlardır.

2.3.3.2 İşlem değişkenleri

Uygulanan Gerilim: Elektro-eğirme işleminde uygulanan gerilimin lif çapı ve morfolojisine büyük etkileri mevcuttur. Gerilim kaynağı çözeltide gerekli yükleri indüklediği gibi çözeltinin eğrilmesi için gerekli elektrik alanı da yaratır. Genellikle 6 kV' tan büyük negatif veya pozitif gerilim, iğne ucundaki damlacığın Taylor konisi oluşturması için gereklidir (Taylor, 1969). Çözelti veya eriyiğin jet halinde Taylor konisinden fışkırması için kritik bir gerilim değerine ihtiyacı vardır. Yapılan çoğu çalışmada incelenen gerilimin etkisi tek bir parametre olarak incelenememiş ve varsayımlar yapılmıştır.

Taylor konisinin sabit olarak elde edilmesi için besleme oranı ve gerilimin iyi ayarlanması gerekir, besleme oranına göre daha yüksek gerilim uygulanması gerekebilir. Yüksek gerilim sadece fiberlerin fiziksel şeklini değiştirmez aynı zamanda kristalinitesini de değiştirir. Elektrik alan polimer moleküllerinin elektro-eğirme sırasında düzenli yapıda birikmesine sebep olduğu için fiberlerde kristalinite artar (Zhao ve ark., 2004).

Gerilimin artmasıyla lif çapı belli bir noktaya kadar azalırken, o noktadan sonra gerilimin artması daha fazla polimer beslenmesine neden olur. Taylor konisi iğnenin ucunda olma eğilimi gösterirken artan gerilim değeri ile koni iğne içinde oluşmaya başlar ve daha fazla polimer çekilir. Öte yandan lif çapı artarken elektro-eğirmede hata olarak nitelendirilen lifler üzerinde boncuklu yapı oluşmaya başlar (Deitzel ve ark., 2001; Reneker ve Chun, 1996; Fong ve ark., 1999; Lee ve ark., 2003; Zarkoob ve ark., 2004; Zhong ve ark., 2002; Huang ve ark., 2003).

Polimer Akış Hızı: Polimer akış hızı, jetin hızını ve malzeme transfer hızını etkileyen önemli bir parametredir. Besleme oranı arttıkça iğne ucunda toplanan damlacık boyutu da artar. Akış hızındaki artış lif çapının kalın olmasını ve gözenek çapını büyük olmasına neden olur. Çünkü uygulanan gerilimin sabit kalmasında dolayı malzemeyi inceletecek yeterli elektriksel kuvvetler azalmış olacaktır (Huang ve ark., 2003; Li ve Xia, 2004b; Zhong ve ark., 2002).

Damlacık boyutu artınca yol boyunca taşınan çözücü miktarı da artar dolayısıyla çözücünün buharlaşması için daha çok zaman gerekir. Başka bir deyişle düşük besleme oranı çözücünün buharlaşması için önemlidir (Rodoplu, 2011).

Toplayıcı Levha ile İğne Arasındaki Mesafe: Toplayıcı levha ile iğne arasındaki mesafe lif morfolojisini etkileyen bir diğer önemli değişkendir. Bu mesafede lif oluşumu meydana gelir, çözücü uzaklaşır ve lif katılaşır, toplayıcıda lif depolanma zamanı bu arada gerçekleşir. Bu mesafenin artması ile jetin izleyeceği mesafe de artacağından lifin inceliği artar ve lifler kuru bir şekilde toplanır. Mesafe elektrik alan kuvveti ile ters orantılı olduğu için jetin uzamasını sağlayan elektrik alan kuvvetleri azalır dolayısıyla fiber çapı artar (Zhao ve ark., 2004). Eğer mesafe düşük olursa konsantrasyon parametresi ihmal edilerek lifler ıslak olarak toplanacağından boncuklu yapılar meydana gelir. Aynı zamanda düşük mesafede Buckho' nun çalışmasında yuvarlak kesitten yassı kesite dönüşüm de gözlenmiştir (Subbiah ve ark., 2005).

Toplayıcı Levhanın Hareketi: Elektro-eğirme işleminin gerçekleşmesi için kaynak ile toplayıcı arasında elektrik alan oluşması istenir, bu sebeple toplayıcı levha alüminyum gibi iletken malzemelerden seçilir. Daha kararlı potansiyel fark oluşturmak için iletken levha topraklanır.

Yalıtkan yüzey üzerinde fiberlerin toplanması isteniyorsa iletken levhanın önüne yalıtkan toplayıcı yerleştirilir. Elektro-eğirme sırasında fiberler toplayıcı üzerine hızla yüklerini bırakırlar, yalıtkan toplayıcıda topraklama olmayacağı için biriken yüklerin itme kuvveti neticesinde fiberler üst üste birikemez ve toplayıcı yüzeyde daha seyrek birikirler (Rodoplu, 2011).

Sadece toplayıcının iletkenliği değil, toplayıcının şekli ve hareketli olup olmaması da fiber karakteristiğini etkiler. Daha düzenli fiber elde etmek için yardımcı elektrik alan kaynakları da kullanılabilir.

2.3.3.3 Çevresel değişkenler

Sıcaklık: Sıcaklık çözücünün buharlaşma oranını artırırken çözelti viskozitesini düşürür. Daha düzenli küçük çaplı fiberler elde edilir ancak çözeltiye enzimler ve proteinler eklendiğinde yüksek sıcaklıkta bozunabilirler.

Bağıl nem: Yapılan araştırmalar sonucunda, bağıl nem arttıkça lif çapının da arttığı gözlemlenmiştir. Bu durumun sebebi olarak, polimer çözeltisinin yüzeyinde oluşan elektrostatik yüklenmeye olduğu vurgulanmıştır. Bir başka deyişle lifin incelmesi için gerekli olan elektrik alan gücünün bağıl nem dolayısıyla azalması veya tam olarak yüzeye etki edememesidir (Tan ve Lim, 2006).

Basınç: Basınç atmosfer basıncının altında olduğunda sıvının akmaya karşı direnci azalır, bu durum düzensiz jet kararsızlıklarına sebep olur. Viskozitesi düşük çözeltiler için düşük basınçta elektro-eğirme gerçekleşmeyebilir. Ancak viskozitesi yüksek çözeltilerle çalışırken vakum altında elektro-eğirme gerçekleşebilir.

2.4 Plazma Polimerizasyonu

Plazma polimerizasyon tekniği, her türlü materyalin yüzey özelliklerinin değiştirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Radyo frekansı yük boşalımı, mikrodalga, atmosferik basınç, düşük basınç, düşük sıcaklık vb. farklı sistemler ile plazma modifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Radyo frekansı yük boşalımı polimerizasyon tekniği ile yüzeylere adhezyon, ıslanabilirlik, membran geçirgenliği, dayanıklılık, aşınmaya karşı direnç, su-tutmama, yüzey sertliği ve biyolojik dokularla uyum (biyouyumluluk) gibi özelliklerin kazandırılması mümkün olmaktadır (Yasuda, 1976; Yasuda ve Iriyama, 1989; Inagaki, 1982; Tusek ve ark., 2001; Bae ve ark., 2001; Gancarz ve ark., 2002; Kaminska ve ark., 2002). Plazma modifikasyonu ile bozulma ve aşınma, oksidasyon, çapraz bağlanma gibi yüzeyin çok ince bir tabakasında oluşan yapısal değişimler sonucunda modifiye edilmemiş yüzeylerden tamamen farklı özelliklere sahip yeni yüzeyler elde edilmektedir (Yasuda, 1984; Yasuda ve Iriyama, 1989; Kaminska ve ark., 2002). Radyo frekansı yük boşalımı tekniğinin avantajları; çevre açısından güvenli olması,

birbirine benzerlik (tekdüzellik) ve tekrarlanabilirlik sağlanabilmesi, kullanılan gazların ve monomerlerin çeşitliliği, yığın özelliklerindeki değişimin en aza indirgenebilmesi ve seçici bir modifikasyonun sağlanabilmesidir (Bae ve ark., 2001; Yasuda ve Iriyama, 1989).

2.4.1 Plazmanın özellikleri

Plazma, maddenin dördüncü hali olarak tanımlanır (Yasuda 1976; Yasuda and Iriyama 1989; Akman, 1993; Li ve ark., 1997). Yüksek sıcaklık, kuvvetli elektrik veya magnetik alanların etkisi plazma oluşumunu sağlamaktadır. Güçlü bir elektriksel boşalımla da plazma oluşturabilmek mümkündür. Plazma ortamında enerji kazanan serbest elektronlar, ortamdaki diğer atomlar ve moleküllere çarparak enerjilerini transfer ederler ve bu esnada ısıma gerçekleştirirler. Bunların da birbirleriyle reaksiyona girmeleri sonucu ortamda çok değişik tür ve sayıda yeni moleküller, atomlar, radikaller, iyonlar vb. oluşur (Akman, 1993; Li ve ark., 1997; Tusek ve ark., 2001). Gaz sıcaklığına bağlı olarak plazmayı iki başlık altında toplamak mümkündür (Li ve ark., 1997; Tusek ve ark., 2001).

Yüksek sıcaklık plazması; gaz sıcaklığı 10^6 K' den fazladır. Güneş sisteminde meydana gelen nükleer patlamalar ve kontrollü füzyon reaksiyonları yüksek sıcaklık plazmasına örnek olarak verilebilir. Sıcak plazmada, ortamda esas olarak çok sayıda iyon bulunmaktadır.

Düşük sıcaklık plazması; gaz sıcaklığı 10^6 K' den daha düşüktür. Burada iyonların yanı sıra diğer elemanlardan da önemli miktarda bulunur. Düşük sıcaklık plazması da iki başlık altında incelenebilir: (i) Sıcak plazma; gaz sıcaklığı 1000 K' den daha fazladır, normal şartlarda 10^4 K civarındadır. Lamba ışıması, elektrik arkı ve diğer yüksek-güç boşalımları sıcak plazmaya örnek olarak verilebilir; (ii) Soğuk plazma; gaz sıcaklığı 1000 K' den daha düşüktür, normal şartlarda 10^2 K civarındadır. Düşük basınçta gerçekleşen yük boşalım plazmaları soğuk plazmaya örnektir ($1\text{eV}=11600$ K).

Plazma ortamına konan bir materyal yüzeyinde kopmalar ("etching") veya birikme ("deposition") oluşur. Plazma parametrelerinin değiştirilmesi ile bu iki prosesten birini etkin kılmak mümkündür. Plazma ile kaplama yapmanın iki temel avantajı

vardır; kaplamanın çok homojen ve ince olmasıdır (Yasuda, 1984; Yasuda 1976; Yasuda and Iriyama 1989; Flosch ve ark., 1992; Akdogan ve ark., 2006).

Plazma polimerizasyonunda özellikleri değiştirilecek materyal yüzeyinde oluşan polimerin kimyasal yapısı, birikim miktarı (kalınlığı) ve bunların homojenitesini etkileyen birçok parametre vardır. Ayrıca plazma polimerizasyonu tekniğinde kullanılan monomerlerin kolaylıkla polimerize olabilen çift bağlar gibi reaktif fonksiyonel gruplara sahip olmaları gerekir. Plazma etching ve plazma polimerizasyonu arasındaki denge boşalım parametreleriyle kontrol edilebilmektedir (Flosch ve ark., 1992).

Organik maddelerin plazma ortamında polimerizasyonu amaçlandığı durumlarda düşük sıcaklık plazmasını uygulanmaktadır. Bunun başlıca nedeni materyal yüzeyinde oluşan organik polimerik yapının yüksek sıcaklıkta kolaylıkla degrade olmasıdır.

2.4.2 Plazma polimerizasyonu hızını etkileyen parametreler

Plazma polimerizasyonunun hızı öncelikle kullanılan monomerin yapısına bağlıdır (Yasuda, 1985). Buna ek olarak, plazma polimerizasyonunun hızına etki eden kontrol edilebilen parametreler reaktör geometrisi, monomer akış hızı, basınç, boşalım gücü, plazma süresi, frekans, elektrot açıklığı vb. makro parametrelerdir (Kaminska ve ark., 2002). Bu parametrelerin etkileri kısaca şu şekildedir:

Monomerin yapısının doymamışlık derecesinin plazma polimerizasyon hızına etkisi çok önemlidir. Benzer reaksiyon koşullarında, üçlü bağ içeren asetilen ikili bağ içeren etilenden daha hızlı polimerize olmaktadır.

Reaktör geometrisi yüzeye biriken polimerin kimyasal yapısı ve kalınlığını dolayısıyla kaplamanın her iki yönden de homojenitesini etkileyen önemli hususlardan biridir. Plazma polimerizasyonunda değişik şekillerde tasarlanmış reaktörler kullanılmaktadır. Reaktörün tübüler, dikdörtgen kesitli veya diğer şekillerde olması monomerin reaktör içinden akış dinamiğini etkiler. Monomerin plazma bölgesinden geçiş hızı (alıkonma süresi) ve şekline (türbülent, laminar, vb.) bağlı olarak birikimin kimyasal yapısı ve homojenitesi değişir.

Monomer akış hızının hem birikim miktarını hem de dolaylı olarak biriken polimer kimyasını değiştirdiği rapor edilmektedir. Monomerin akış hızının artmasıyla genellikle birikim doğrusal olarak azalır. Düşük monomer besleme hızlarında, konvektif akım terimlerinin etkisinin azalmasıyla difüzyonun baskın olacağı durumda reaktöre beslenen hemen hemen tüm monomerin polimerize olarak yüzeyde birikmesi mümkün olabilmektedir.

Basınç plazma ortamının yapısını dolayısıyla polimerizasyon hızı ve yüzeyde biriken polimer yapısını etkileyen önemli bir parametredir. Elektriksel boşalım öncesi basınç (P_o) ile elektriksel boşalım sırasında basınç (P_g) birbirinden farklıdır. P_o belirli bir akış miktarında pompalama miktarıyla orantılıdır. Pompalama miktarı arttıkça P_o miktarı düşer. Gaz moleküllerinin iyonizasyonu ve hızı basınca bağlı olduğundan P_g 'nin değeri polimer birikim hızını ve polimerik kaplamanın kimyasal yapısını etkiler.

Genellikle boşalım gücü arttıkça polimer birikim miktarı artar. Elektriksel boşalım reaktör içinde tamamen gerçekleştikten sonra ilave edilen voltajın serbest radikallerin üretimini arttırmadığı, böyle durumlarda monomerin akış miktarının, polimer birikimini belirleyen parametre olarak önem kazandığı not edilmelidir.

Plazma polimerizasyonunda yatışkın duruma ulaşıldıktan sonra, sürenin artmasıyla yalnızca kaplama kalınlığının arttığı, polimerizasyon hızı ve yüzeyde biriken polimerin yığın yapısında önemli bir değişiklik olmadığı söylenebilir. Ancak, Tusek ve arkadaşları (2001), NH_3 plazması ile Poliamid 6 levhalarını modifiye ettikleri çalışmalarında, azot içeren grupların yapıya girişinin artan işlem süresiyle arttığını ve temas açısının azaldığını; çok uzun işlem sürelerinde ise yüzey yıkımının negatif etkisinin fonksiyonel grupların pozitif etkisine üstün gelmesiyle yüzeydeki amino gruplarının sayısı azalırken temas açısında artış gözlemlendiğini belirtmektedirler.

İç elektrot açıklığı da plazma polimerizasyonun hızını etkileyen önemli bir faktördür. İç elektrot açıklığı daraltıldığında (yüksek elektron yoğunluğu) hız artmaktadır.

Gerek organik ve gerekse organo-metalik bileşiklerin plazma ile polimerleşme mekanizmaları ve polimerleşme kinetikleri oldukça karışıktır. Plazma

polimerizasyonunda polimer bir seri kompleks reaksiyonlar sonunda oluşmaktadır. Bu nedenle gerek polimer oluşturma (ve depolanma) hızı gerekse oluşan polimerlerin çeşitli özellikleri elektriksel boşalma ile ilgili çeşitli koşullara bağlıdır. Böylece deney değişkenleri arasında yukarıda detayları açıklandığı üzere;

1. Uygulanan elektriksel boşalmanın türü (içten elektrotla kapasitif, dıştan elektrotla indüktif gibi)
2. Uygulanan elektriksel boşalma ile ilgili diğer değişkenler (boşalmanın gücü, frekansı, monomer basıncı, monomer akış hızı)
3. Elektriksel boşalmanın uygulandığı reaksiyon kabı (reaktör) ile ilgili değişkenler (reaktör yatay boru ya da an şeklinde ayrıca monomerin giriş ve elektrotlara göre dağılışı geometrisindeki farklılıklar)
4. Polimerin üzerine kaplandığı ortamın yeri şekli yapısı vb. gibi bazı unsurlar rol oynamaktadır.

2.4.3 Plazma polimerizasyonunun mekanizması

Genel olarak, materyal yüzeyleri ile düşük basınçta meydana gelen yük boşalımı plazmasının reaksiyonları üç başlık altında özetlemek mümkündür (Tusek ve ark., 2001):

Birikim (deposition): Gaz fazında bulunan argon, amonyak, karbon monoksit, flor, hidrojen, azot, azot dioksit gibi maddeler ile yüzeydeki türler arasında temelde çapraz bağlanmalar ile yeni fonksiyonel gruplar oluşturulmaktadır.

Polimerizasyon (polymerisation): CH gibi organik bir monomerin polimerizasyonu yoluyla materyal yüzeyinde ince bir film oluşumu polimerizasyon prosesini oluşturur. Polimerizasyon, gaz fazındaki türler arasındaki reaksiyonları, gaz fazındaki türler ile yüzeydeki türler arasındaki reaksiyonları ve sadece yüzeydeki türler arasındaki reaksiyonları içermektedir. Polimerizasyonun mekanizması, gaz faz ve yüzeyde meydana gelen reaksiyonların her ikisini de içeren polimerizasyon prosesinin karmaşıklığı nedeniyle henüz yeterince anlaşılamamıştır. Ortamda mevcut olan çeşitli reaktif gruplar (örneğin, iyonlar, serbest radikaller v.s) Radyo

frekansı (RF) plazma polimerizasyon reaktöründe monomerin polimerizasyonuna katkıda bulunur.

Temizleme ve yüzeyden kopmalar (etching): Bir materyal yüzeyinde bulunan maddeler yüzeyden uçucu ürünler oluşturulmak koşuluyla kimyasal reaksiyonlar ile fiziksel kopmalar şeklinde uzaklaştırılırlar. Yüzeylerden organik bulaşların uzaklaştırılması için oksijen içeren plazmalar kullanılmaktadır.

Genel olarak plazma, yüksek sıcaklıklar kuvvetli elektriksel veya manyetik alanların etkisiyle oluşur. Herhangi bir elektriksel boşalmanın plazma olarak adlandırılabilmesi için öncelikle ortamdaki pozitif ve negatif yük taşıyıcılarının sayıca birbirine eşit olmaları koşulu gereklidir. Plazmada iyonlaşma derecesinin 10^{-5} ile 10^{-6} arasında olduğu öne sürülmektedir. Bu da plazma ortamında büyük ölçüde elektronların bulunması anlamına gelmektedir. Plazmada serbest radikal konsantrasyonunun iyonlara kıyasla, 10^3 – 10^4 defa daha fazla olduğu belirtilmektedir. Plazmada pozitif ve negatif yük taşıyıcılarının birbirine eşit olmaları koşulu az sayıdaki elektron ve pozitif iyonların sayıca eşit olmaları demektir.

Plazma polimerizasyonu, 'plazma-uyarılmış' ve 'plazma-hal' polimerizasyonunun toplamını içerir. Monomerlerin, doğrudan polimere eklenmesi ile gerçekleşen polimerizasyona 'plazma-uyarılmış' polimerizasyon adı verilmektedir. Önce atomların birleşmesi ile ara ürünlerin, daha sonra da son ürünün oluşması ile gerçekleşen polimerizasyon mekanizmasına 'plazma hal' polimerizasyonu adı verilmektedir. Plazma polimerizasyon her iki polimerizasyonun toplamı şeklinde oluşur.

2.4.4 Plazma polimerizasyonu tekniğinin avantajları

Plazma polimerizasyonunun en önemli avantajı, bir ön koşul aranmaksızın tüm organik bileşikler kullanılarak materyal yüzeylerinin modifiye edilebilmesidir. Diğer kaplama yöntemleriyle karşılaştırıldığında, çok ince ve çok daha homojen kalınlıkta kaplama daha kısa zaman dilimlerinde sağlanabilmektedir. Özellikle yeterli akışın sağlanabileceği ince film kaplamaları gerektiren membran seperasyon prosesleri için bu yöntem son derece avantajlıdır (Yasuda, 1984). Proses temizdir, klasik proseslerde kullanılan çözücüler, başlatıcılar, stabilizörlere, vb. burada gerek olmadığından ürün çok saftır. Bu, özellikle tıp uygulamalarında

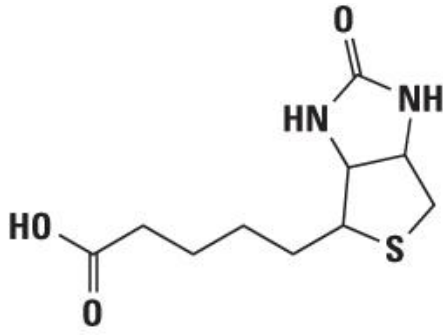
önemli bir avantaj olarak vurgulanmaktadır. Kaplama diğer yöntemlerde bir çok basamakta ve uzun sürede (24 saat gibi) gerçekleştirilirken plazma polimerizasyon yöntemiyle prepolimer sentezi, kaplama solüsyonun hazırlanması, kaplama prosesi, kurutma gibi prosesler tek basamakta gerçekleştirilebildiğinden 1 saatten daha kısa sürelerde sonuca varılabilmektedir (Mutlu ve ark., 1997; Inagaki ve ark., 1982; Flosch ve ark., 1992). Düşük sıcaklık plazma polimerizasyonu yönteminin en önemli avantajlarından birinin de substartların sadece en dışta bulunan tabakalarının modifikasyondan etkilenmesi olduğunu belirtmişlerdir. Böylece modifiye edilen substratların yığın özellikleri değişmediğinden dolayı yüzey özellikleri kontrollü bir şekilde modifiye edilebilmektedir (Yasuda 1976; Yasuda and Iriyama 1989).

2.5 Avidin – Biotin Etkileşimi

Avidin-biotin etkileşimi, birçok protein ve nükleik asit tanımlaması ve saflaştırma yöntemlerinde kullanılmaktadır. İşaretlenmiş biyotinin küçük ve stabil olması, avidin-biotin etkileşimine imkan veren işaretli moleküllerin diğer moleküllerle çok nadir girişimde bulunmasından dolayı yüksek duyarlılıklı deneylerin geliştirilmesi amacıyla kullanılır.

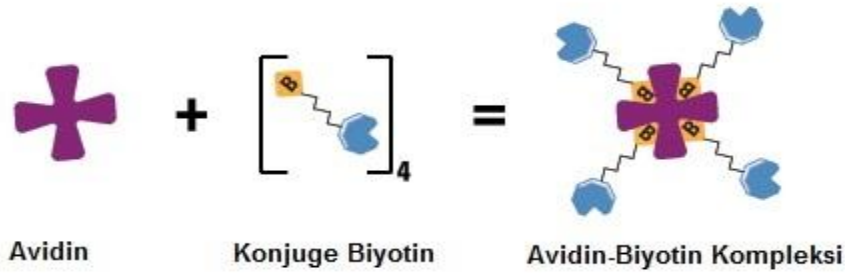
Avidin, kuş ve sürüngen yumurtalarında bulunan antibiyotik etkisi olduğuna inanılan biyotin-bağlayan proteindir. 67000-68000 Dalton ağırlığına sahip tavuk avidini geniş bir pH ve sıcaklık aralığında fonksiyonelliğini ve stabilitesini koruyarak her biri biyotin molekülüne bağlanabilen dört birimden oluşmaktadır.

Biyotin canlı bütün hücrelerde az miktarda bulunan ve sitrik asit çevrimi ve hücre büyümesini de içeren bazı biyolojik prosesler için kritik önemi olan vitamindir. 244,3 Dalton molekül ağırlığına sahip göreceli olarak küçük bir molekül olan biyotin, biyolojik aktivitesinde belirgin bir değişiklik olmadan birçok molekül ve proteinle birleşebilmektedir. Bu özelliğinden dolayı biyolojik analitlerin tayininde ve saflaştırılmasında kullanılan bir araç haline gelmiştir. Bu işlem için öncelikle molekül biyotinle etiketlenir, ardından biyotin-bağlayan immobilize proteinle etkileşime sokularak molekülün saflaştırılması sağlanır.



Şekil 2.7 Biotinin kimyasal yapısı

Avidin-biyotin kompleksi protein ve ligand arasında bilinen en güçlü ($K_d=10^{-15}$ M) kovalent olmayan etkileşimdir. Avidin ve biyotin arasındaki bağ çok hızlı gerçekleşir ve bağ oluşuktan sonra pH, sıcaklık, organik çözücüler ve diğer yapısal bozunmaya neden olan ajanlardan etkilenmemektedir. Avidin ve biyotin bu özelliklerinden dolayı bu moleküllerden bir tanesiyle konjuge olan proteinlerin tayininde veya saflaştırmasında oldukça kullanışlıdır.



Şekil 2.8 Avidin-biyotin kompleksi

Biyotine karşı yüksek afinite gösteren avidin molekülü, dört biyotin molekülü bağlama kapasitesine sahiptir (Şekil 2.8). Avidin ve biyotin arasındaki etkileşimin gücü bu bağın kullanıldığı uygulamaları etkileyebilir çünkü avidin-biyotin bağını kırmak için gereken zorlu koşullar hedef proteini denatüre edebilir.

2.6 Tez Çalışmasında Kullanılan Yüzey Analiz Yöntemleri

2.6.1 Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR-ATR)

İnfrared Absorpsiyon Spektroskopisi, düşük enerjili infrared (IR) bölgedeki ışınların kullanıldığı absorpsiyon spektroskopisidir. Belirli şartlara sahip moleküller IR ışınını absorplayarak molekül içi titreşim enerji düzeyleri arasında geçişler olur. Moleküllerdeki titreşim frekanslarına uyan infrared fotolarının dalga sayıları 4000 – 650 cm^{-1} arasında değişir. Bu değerle 15 μm ile 2,5 μm dalga boyu aralığına karşılık gelirler.

Monokromotörler yardımıyla dalga boylarını seçerek ölçümün yapıldığı spektrofotometrelerde herhangi bir anda sadece seçilen dalga boyundaki spektroskopik bilgi toplanır. Ancak bazı spektrofotometrelerde özel yöntemler kullanılarak tüm frekanstaki bilgiler aynı anda elde etmek mümkündür. Bu tür spektrofotometrelerde monokromotör bulunmaz. Bu şekilde gerçekleştirilen uygulamalarda spektrum frekans ölçeğinde değil zaman ölçeğinde elde edilir ve bu spektruma interferogram denir. Interferogram, adsorpsiyon spektrumunun Fourier dönüşümüdür. Elde edilen veri bir bilgisayar aracılığı ile ters Fourier dönüşümü alınarak frekans ölçeğindeki bilgilere dönüştürülür. Bu şekilde gerçekleştirilen IR uygulaması Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) adını alır (Yıldız ve Genç, 1993; Ratner, 1996).

Proteinlerin IR spektrumları, karakteristik amid grupları ile ilişkili absorpsiyon bantları vermektedir. Bu spektrumlarda, düzlemsel vibrasyon modları genellikle C=O gerilmesi, C-N gerilmesi, N-H gerilmesi ve O-C-N bükülmesine aittir. Düzlem dışı vibrasyonlar ise genellikle C-N torsyonundan kaynaklanmaktadır. Proteinlerin amid gruplarına ait karakteristik bantlar, ikincil aminlerin absorpsiyon bantları ile benzerlik göstermektedir ve “amid” bantları olarak adlandırılmaktadır. Toplamda 9 tane amid bandı vardır. Bunlar; amid A bandı, amid B bandı, ve amid I-VII bantlarıdır (Çizelge 2.2) (Schrader 1995; Stuart 2004; Akdoğan, 2010).

Çizelge 2.2 Amid bantları ve görüldükleri dalga boyları

Amid Bandı	Dalga boyu (cm ⁻¹)
A	3300
B	3110
I	1653
II	1657
III	1299
IV	627
V	725
VI	600
VII	200

Bazı amid bantları, proteinlerin konformasyonel değişimlerine karşı diğerlerinden daha hassastır amid I ve II bantları, protein ikincil yapılarının belirlenmesinde en sık kullanılan amid bantlardır (Kato ve ark., 1987)

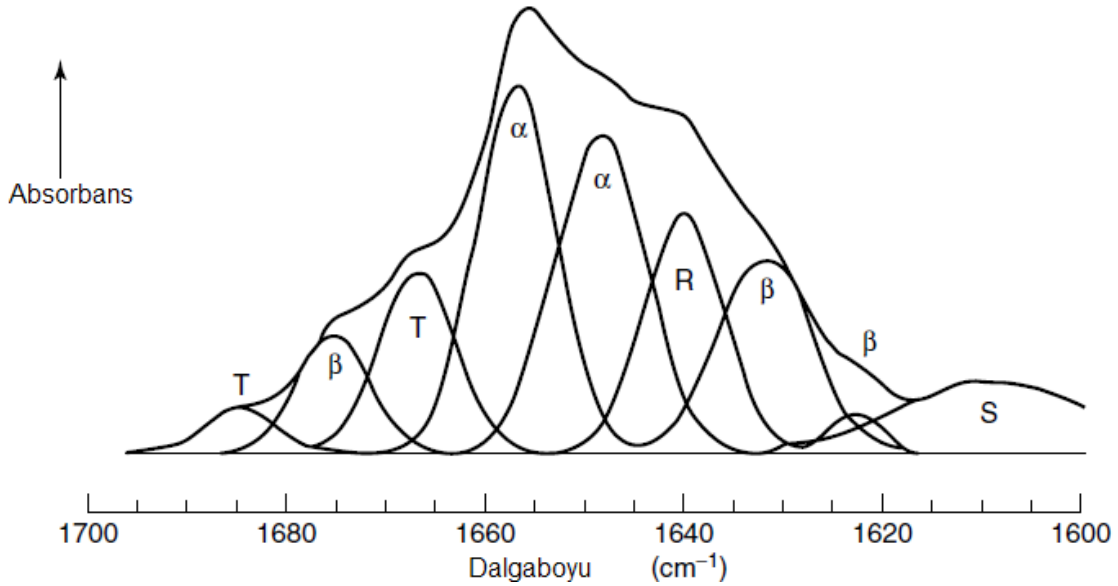
Amid II bandı (1600-1500 cm⁻¹), çoğunlukla protein yapısındaki N-H bükülme (%60) ve C-N gerilme (%40) vibrasyonlarından oluşmaktadır. Amid II bandını, proteinin ikincil yapısına bağlı olarak, bileşenlerine ayırmak mümkündür (Stuart, 2004).

Proteinlerin ikincil yapılarındaki değişimlerin incelenmesinde en kullanışlı bant, amid II bandıdır (1700-1600 cm⁻¹). Amid I bandı, protein yapısındaki C=O gerilmesinin %80'ini içermektedir ve N-H bükülmesi ve C-N gerilmesi vibrasyonlarını da içermektedir. Amid I bandının bulunduğu dalga boyu genellikle protein yapısındaki H bağlarından etkilenmekte ve söz konusu proteinin ikincil yapısına göre değişmektedir. Proteinler genellikle farklı konformasyonlardaki polipeptit fragmanları içermektedir ve bunun bir sonucu olarak amid I bandı, üst üste binmiş çeşitli bileşen bantlarını içeren karmaşık bir yapıdadır. Bu bileşen bantları, heliksler, β -yapılar, dönüşler ve rastgele yapılardır. Bu bileşenlere ait dalga boyları, çizelge 2.3' da verilmiştir (Schrader, 1995; Stuart, 2004; Kitano ve ark., 2008).

Çizelge 2.3 Amid I bandı bileşenlerinin görüldüğü dalga boyları

Dalga boyu (cm ⁻¹)	Amid I bandı bileşeni
1695–1670	İntermoleküler β -yapısı
1690–1680	İntermoleküler β -yapısı
1666–1659	'3-dönüslü' heliks
1657–1648	α -heliks
1645–1640	Rastgele katlanmalar
1640–1630	İntramoleküler β -yapısı
1625–1610	İntramoleküler β -yapısı

İkincil türev ve dekonvolüsyon yöntemleri kullanılarak yapılan eğri uydurma işlemleri ile proteinlerin ikincil yapıları hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Amid I bandının bileşenlerinin % oranları, her bir bileşene ait bantların belirlenerek, bunların amid I bandının toplam alanına göre hesaplanması ile elde edilebilmektedir (Şekil 2.8). Bu işlem, amid I bandının bütün bileşenlerinin absorptivite değerlerinin eşit olduğu kabul edilerek gerçekleştirilmektedir (Kato ve ark., 1987; Schrader, 1995; Stuart, 2004).

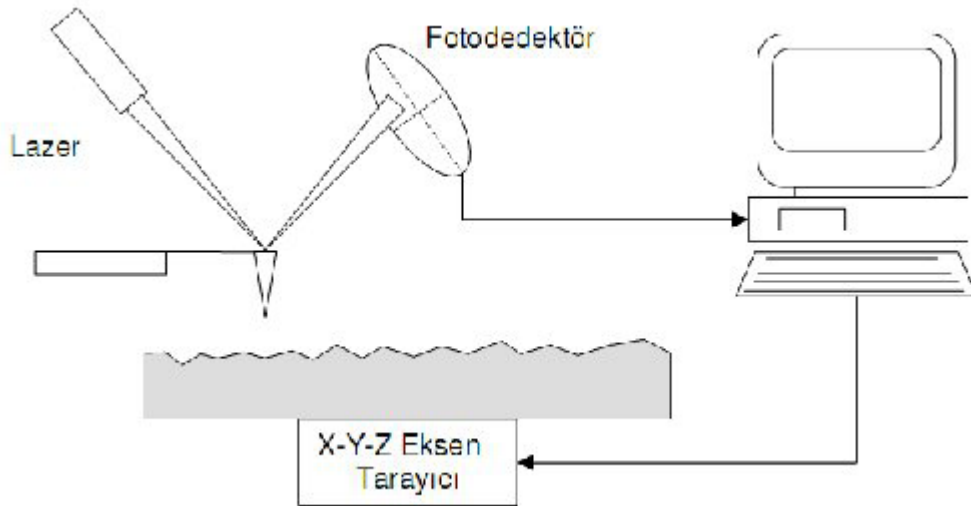


Şekil 2.8 Amid I bandının bileşenleri

2.6.2 Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM)

Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM), Taramalı Prob Mikroskopisi grubu altında yer alan en tanınmış yüzey inceleme tekniklerinden biridir. AFM, kantilever yayın ucuna yerleştirilmiş örnek yüzeyini taramaya yarayan sivri bir tipten oluşur. Kantilever genellikle eğrilik yarıçapı nanometre mertebesinde olup silikon veya silikon nitritten yapılmıştır. Tip örneğe yaklaştırıldığında, tip ve örnek arasındaki kuvvetler Hook Yasasına göre kantileverin bükülmesine sebep olur (Butt ve ark., 2005; Çatalkaya, 2011).

Sistem temel olarak, birkaç atomdan oluşan bir iğnenin piezo elektrik kontrol elemanları aracılığı ile yüzeye çok yakın olarak, incelenen yüzey üzerinde üç boyutta hareket ettirilmesine dayanır. İğnenin konumundaki bozulmalar bir lazer ışığı tarafından algılanılarak büyütülür. Böylece ince tipin yüzeydeki itme ve çekme kuvvetler ile şeklinin bozulması ile yüzey topografyası çıkarılmış olur. AFM yardımıyla yüzey topografyası nanometre seviyesinde belirlenir (Meyer ve ark., 1998).



Şekil 2.9 Atomik Kuvvet Mikroskopunun şematik gösterimi

2.6.3 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

Taramalı elektron mikroskopisi, yüzey davranışlarının daha iyi anlaşılabilmesi için morfolojik ve topografik bilgi veren yüzey analiz yöntemlerinden biridir. SEM görüntüyü ışık dalgaları yerine elektronları kullanarak büyütür. Bu yöntemle ışık mikroskobundan çok daha büyük ölçeklerde, ayrıntılı görüntü elde edilebilir. Işık dalgaları olmadığı için elde edilen görüntü siyah beyazdır.

Elektronların örnek içerisinde geçebilmesi için örneğin iletken olması gerekmektedir. Analizi yapılacak örneğin yalıtkan olması durumunda yüzeye özel yöntemlerle altın püskürtülerek ince bir iletken film oluşturulur.

Örnekler mikroskop içindeki vakuma dayanacak şekilde hazırlanır, vakum kolonuna dikkatlice yerleştirildikten sonra sızdırmaz kapak kapatılır. Hava kolondan uzaklaştırıldıktan sonra, elektron tabancasından gönderilen yüksek enerjili elektron demeti, elektronları tek bir noktaya odaklayacak şekilde tasarlanmış bir dizi manyetik lensten geçirilir. Elektron demeti örnek üzerindeki her noktaya çarparken, yüzeyden gönderilen elektron demeti dedektöre gönderilir. Çevirici ile dedektörden gelen sinyaller görüntüye çevrilir. Yüzeydeki her noktadan gönderilen elektron sayısı ile son görüntü elde edilmiş olur.

3 MATERYAL VE METOD

Sunulan tezin temel amacı, kütle hassas biyosensörlerin performansını arttırmak amacıyla kuvars kristal mikroterazi yüzeylerin elektro-eğirme yöntemiyle nanoliflerle kaplanması ve karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesidir.

Sunulan çalışmayı 5 ana başlık altında özetlemek mümkündür. Bu aşamalar sırasıyla,

1. Elektro-eğirme yöntemiyle nanolif üretimi
2. Plazma polimerizasyonu (PlzP) yöntemiyle yüzey modifikasyonu
3. Yüzeyin kimyasal aktivasyonu
4. Tanıyıcı tabakanın oluşturulması
5. Biyosensör performansının belirlenmesi

Plazma Destekli Biyomühendislik ve Biyoteknoloji (PABB) Araştırma Grubu tarafından daha önce yapılan çalışmalar değerlendirilerek, bu çalışmanın temeli oluşturulmuştur (Çökeliler, 2006; Ozansoy, 2007; Rodoplu, 2011). Yukarıda vurgulanan “kütle hassas biyosensörün performansını arttırma” hedefi doğrultusunda sonuçların literatür verileri ile karşılaştırılabilmesi açısından, avidin-biyotin etkileşimi model olarak seçilmiştir. Elektro-eğirme yöntemiyle ince, boncuksuz ve sürekli yapıda nanolifler elde etmek için %10 (w/w) polivinil alkol (PVA) çözeltisi (Rodoplu, 2011) kullanılarak farklı işlem parametrelerinde (gerilim, polimer besleme oranı, iğne-toplayıcı arası mesafe) yapılan ön çalışmaların sonuçları değerlendirilerek çalışmanın kalan kısmında kullanılacak olan işlem parametreleri belirlenmiştir. Elektro-eğirme yöntemi ile nanolif kaplanan yüzeylere biyoajan immobilize edebilmek amacıyla amino grubu içeren fonksiyonel gruplar plazma polimerizasyonu yöntemiyle oluşturulmuş ve bu işlemi takiben %2,5 (v/v) gluteralehit çözeltisi kullanılarak kimyasal aktivasyon gerçekleştirilmiştir. Biyosensörün tanıyıcı tabakasının oluşturulması biyotinin yüzeye tutuklanması ile tamamlanmıştır. Oluşturulan avidin biyosensörünün performansı, farklı avidin derişimlerdeki çözeltilerin tanıyıcı tabaka ile etkileştirilmesi ve biyotin-avidin bağlanmasının yarattığı kütle değişiminin frekans değerlerindeki sapmanın

ölçülmesiyle saptanmıştır. Avidin konsantrasyonuna karşı frekans sapmasının grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kalibrasyon grafiğinin analizi sonucunda biyosensörün doğrusallık ve hassasiyet yönündeki performansı belirlenmiştir. Geliştirilen biyosensör, aynı yöntemlerin nanolif içermeyen piezoelektrik kuvars kristal yüzeyine uygulanarak hazırlanan biyosensörün performansı ile karşılaştırılmıştır.

Bütün bu işlemler sırasında her basamakta Research Quartz Crystal Microbalance (RQCM) sisteminden yararlanarak kuvars kristal yüzeylerine biriken kütle miktarı frekans değişimleriyle ölçülmüştür. Kristal yüzeylerinde yapılan modifikasyon işlemlerinden sonra yüzey fiziksel ve kimyasal olarak SEM, AFM ve FTIR-ATR ile karakterize edilmiştir.

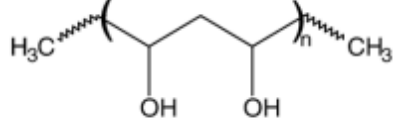
3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasal malzemeler

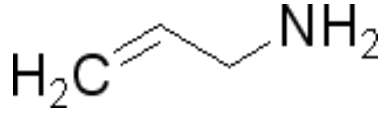
Sunulan tez çalışmasında, kuvars kristal yüzeylerine uygulanan elektro-eğirme yönteminde kullanılan polivinil alkol (ort. $M_w = 70000-100000 \text{ g mol}^{-1}$) Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Yüzeyde fonksiyonel grup oluşturmak için uygulanan plazma polimerizasyonu işleminde Acros Organics (Belçika) firmasından satın alınan alilamin (Allylamine, 98+%, extra pure, $M_w = 57.09 \text{ g mol}^{-1}$) kullanılmıştır. Yüzeylerin kimyasal aktivasyonu glutraldehit çözeltisi (25%, $M_w = 100,12 \text{ g mol}^{-1}$, AppliChem, Almanya) ile yapılmıştır. Sigma (Almanya) firmasından satın alınan biyotin ve avidinin birbirleriyle olan etkileşiminden yararlanarak sensör denemeleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda tampon çözeltisi olarak NaCl içeren fosfat tamponu konsantre halde temin edilmiş ve seyreltilerek kullanılmıştır (10x PBS, Sigma, Almanya).

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasalların açık ve kapalı molekül formülleri Çizelge 3.1, Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3 ' de verilmiştir.

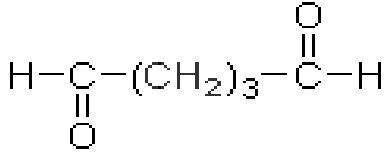
Çizelge 3.1 Elektro-eğirme sisteminde kullanılan polimerin kapalı ve açık molekül formülü

Polimer	Kapalı Molekül Formülü	Açık Molekül Formülü
Polivinil alkol	$(C_2H_4O)_n$	

Çizelge 3.2 Plazma polimerizasyonu sisteminde kullanılan monomerin kapalı ve açık molekül formülü

Monomer	Kapalı Molekül Formülü	Açık Molekül Formülü
Alilamin	C_3H_7N $(C_3H_5NH_2)$	

Çizelge 3.3 Çalışma sırasında kullanılan diğer kimyasal malzemelerin kapalı ve açık molekül formülü

Kimyasal	Kapalı Molekül Formülü	Açık Molekül Formülü
Gluteraldehit	$C_5H_8O_2$	

3.1.2 Piezoelektrik kuvars kristal malzemeler

Tez çalışmasında hazırlanan kütle hassas sensörde çevirici olarak, kararlı yapısı ve yüksek sıcaklıklarda piezoelektrik özelliklerini kaybetmemeleri nedeniyle Maxtek Inc., (ABD) firmasından temin edilen kuvars kristaller kullanılmıştır. Eylemsiz olmaları nedeniyle altın elektrotlu, rezonans frekansı 5 MHz olan ve BT kesimden daha kararlı ve sıcaklık katsayıları 1 ppm/°C olan AT kesme tipi kristaller tercih edilmiştir.

Çalışmada kullanılan kristale olabildiği kadar yakın yerleştirilmiş bir iç osilasyon devresi taşıyan kristal tutucu (CHC 100C Holder) Maxtek Inc. (ABD) firmasından satın alınmıştır. Deney sistemimizde kullanılmak için temin edilen kristallerin ve kristal tutucunun (holder) özellikleri çizelge 3.4’ de gösterilmektedir.

Çizelge 3.4 Maxtek firmasından temin edilen kristallerin ve kristal tutucunun (holder) özellikleri



Kuvars Kristal Mikroterazi (Maxtek Ltd. QCM Seri No 149238-1 / 175-1)

Frekans	5.0 MHz
Kristal Kesimi	AT
Yüzey	Parlatılmış
Elektrot Materyali Adhezyon/Dış Kısım	Titanyum/Altın

Kristal Tutucu (Maxtek Ltd. CHC 100C Holder)

Uzunluk	10 cm
Materyal	CPVC
Çalışma Sıcaklık Aralığı	-25 / 95 °C



3.2 Metot

3.2.1 Elektro-eğirme işleminde kullanılacak polimer çözeltisinin hazırlanması

Elektro-eğirme işleminde kullanılan polivinil alkol, 80 °C’ de suda çözünen bir polimerdir. PVA’ nın %10 luk (w/w) sulu çözeltisi, ısıtmalı karıştırıcıda 4 saat süreyle karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.2.2 Elektro-eğirme sisteminin kurulumu

GAMMA High Voltage Research Inc. (ABD) firmasından temin edilen güç kaynağının [doğru akım (DC) 30 kV] negatif ucu toplayıcı levhaya, pozitif ucu ise şırınga iğnesine bağlanmıştır. Şırınga pompası (NE 300, New Era Pump System Inc., ABD) yardımıyla sisteme polimer beslenmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Elektro-eğirme a) sisteminin görüntüsü, b) iğne-toplayıcı levha görüntüsü, c) toplayıcı levha görüntüsü

3.2.3 Elektro-eğirme sistemi parametrelerinin belirlenmesi

Elektro-eğirme yöntemiyle yüzeylerde boncuksuz, ince ve sürekli nanolif yapı elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için daha önce yapılan araştırmalar da göz önünde bulundurularak bazı parametreler sabit tutulmuş ve yeni sistem için ideal koşullar belirlenmiştir. %10 (w/w) sulu PVA çözeltisi yatay sistemde 0,8 mm iğne çapı ve 10,2 mm şırınga çapı sabit tutularak işlem parametrelerinin (iğne ve toplayıcı levha arasındaki mesafe, uygulanan gerilim, polimerin besleme hızı ve işlem süresi)

değiştirilmesi ile sistem parametreleri optimize edilmiştir. İğne ve toplayıcı levha arasındaki mesafe 3–5 cm arasında değiştirilirken, 10–15 kV aralığında yüksek gerilim uygulanmıştır. Polimer sisteme 1,1–4 ml/h hızıyla beslenip işlem süresi 1–5 dakika aralığında değiştirilmiştir. Elektro-eğirme öncesi ve sonrası kristallerdeki frekans farkı ölçüldükten ve kristal yüzeylerinin karakterizasyonu (SEM, AFM, FTIR-ATR) yapıldıktan sonra çalışmanın devamı için uygun olan parametreler seçilmiş ve çalışmanın kalan kısmına bu parametreler kullanılarak devam edilmiştir.

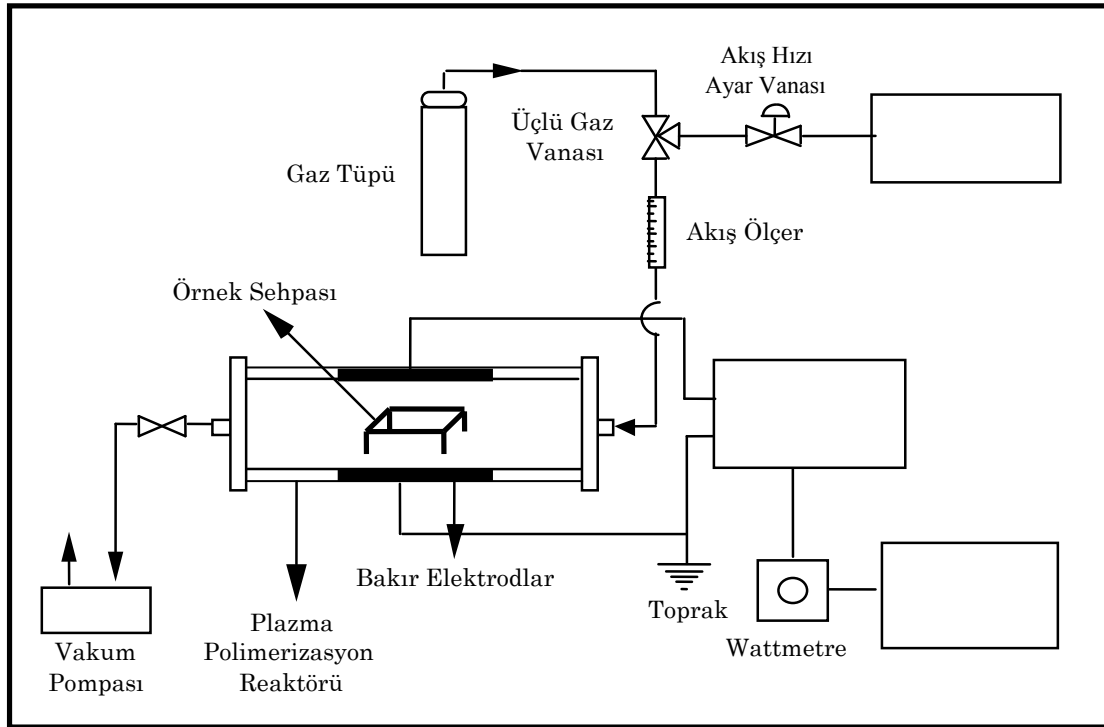
3.2.4 Plazma polimerizasyonu yöntemi

Kütle hassas biyosensör hazırlamak amacı ile piezoelektrik kuvars kristallerin yüzeylerinde elektro-eğirme yöntemi ile oluşturulan nanoliflerin biyotini bağlayabilmesi için lif yüzeyleri plazma polimerizasyonu yöntemiyle modifiye edilerek amino grupları oluşturulmuştur. Bu amaçla, örnek yüzeyler düşük basınç (< 0.2 mbar), radyo frekanslı (13.56 MHz) Plazma Polimerizasyon sistemi (Pico, Diener Electronics, Almanya) kullanılarak amino grubu içeren uygun bir monomer varlığında yük boşalımına tabi tutulmuştur. PlzP sisteminin teknik özellikleri çizelge 3.5’ de, şematik görünümü şekil 3.2’ de ve düzeneğinin gösterimi şekil 3.3’ de verilmiştir.

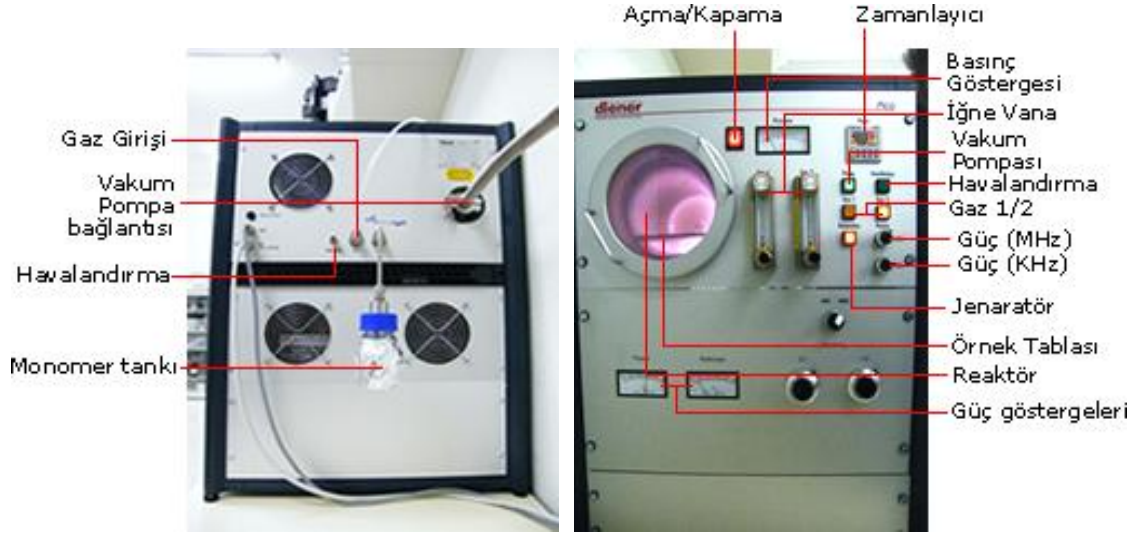
Çizelge 3.5. Plazma Polimerizasyonu sisteminin teknik özellikleri

Kumanda dolabı	G 550 mm, Y 330 mm, D 500 mm
Hücre	Ø 150 mm, L 320 mm
Hücre hacmi	Yaklaşık 5 litre
Gaz girişi	İğneli valf üzerinden 2 gaz kanalı
Alternatör	13,56 MHz, kademesiz
Vakum pompası	Leybold, Trivac D2,5B tipi (2,5 m ³ /h)
Kumanda	Yarı otomatik, zamanlayıcı üzerinden işlem süresi

Nanolif kaplı kuvars kristal yüzeylerinde amino grubu oluşturmak amacıyla alilamin (AA) monomeri ile 45 Watt boşalım gücünde ve 5 dakika işlem süresinde plazma polimerizasyonu uygulanmıştır. Bunun için örnekler hazneye yerleştirildikten sonra reaktör kapağı kapatılıp vakum uygulanmaya başlanmıştır. Reaktör içerisindeki basınç 0,30 mbar' a düşene kadar beklendikten sonra sisteme bağlanan monomer, 10 dakika boyunca reaktör içi basıncı 2 mbar olacak şekilde reaktöre beslenerek reaktör içerisindeki tamamen monomer buharı ile dolması sağlanmıştır. Süre sonunda monomer akışı kesilmiş ve jeneratör devreye sokularak belirlenen parametrelerde yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Sistemden inert gaz olarak 5 dakika boyunca argon gazı geçirilip örnekler vakum ortamında 5 dakika daha bekletildikten sonra reaktörden çıkartılmıştır. Kütle hassas biyosensör performansındaki değişimi karşılaştırmak amacı ile standart, işlem görmemiş bir grup piezoelektrik kuvars kristalde bu kademedan itibaren paralel olarak, tüm çalışmalarda modifiye edilmiştir.



Şekil 3.2 Plazma polimerizasyonu sisteminin şematik görüntüsü



Şekil 3.3 Plazma polimerizasyon düzeneğinin gösterimi

3.2.5 Yüzeyin kimyasal aktivasyonu

Kuvars kristallerin ve nanofiberlerin yüzeyinde oluşturulan amino gruplarını, biyolojik ajanın (antibodi, DNA segmenti, aptamer vs.) bağlanabileceği bir fonksiyonellik kazandırmak amacı ile kimyasal aktivasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla önceki çalışmalarımız göz önünde bulundurularak pH 7.4 fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{KH}_2\text{PO}_4$) içerisinde hazırlanmış % 2.5 (v/v)' lik gluteraldehit çözeltisi kullanılmıştır (Çökelliler, 2006; Karamollaoğlu ve ark., 2009; Şir, 2009). Serbest amin uçları ile gluteraldehitin aldehit uçları reaksiyona girerek çift baz reaksiyonu ile bağlanmaktadır (Tabrizi, 2005).

Kimyasal aktivasyon sürekli ve kesikli olmak üzere iki yöntemle yapılabilmektedir. Kesikli yöntemde; %2,5 (v/v) gluteraldehit çözeltisi yüzeye damlatılır, 2 saat bekletildikten sonra deiyonize su ve tampon çözeltiyle 5 dakika boyunca yıkanır. Sürekli yöntemde ise; akış ortamında dengeye gelen sisteme %2,5 (v/v) gluteraldehit çözeltisi aynı akış hızında ortama enjekte edilir ve ardından 2 saat süreyle akış hücresinden tampon çözelti geçirilir.

Bu tez kapsamında kimyasal aktivasyon için kesikli yöntem seçilmiştir.

3.2.6 Tanıyıcı tabakanın oluşturulması

Yüzeyi kimyasal aktivasyonla biyolojik ajan tutuklamaya hazır hale getirilen kuvars kristallerin üzerine model olarak seçilen biyotin immobilize edilmiştir. Biyotinin yüzeyde immobilizasyonu için kullanılacak derişimin saptanmasında, biyotinin

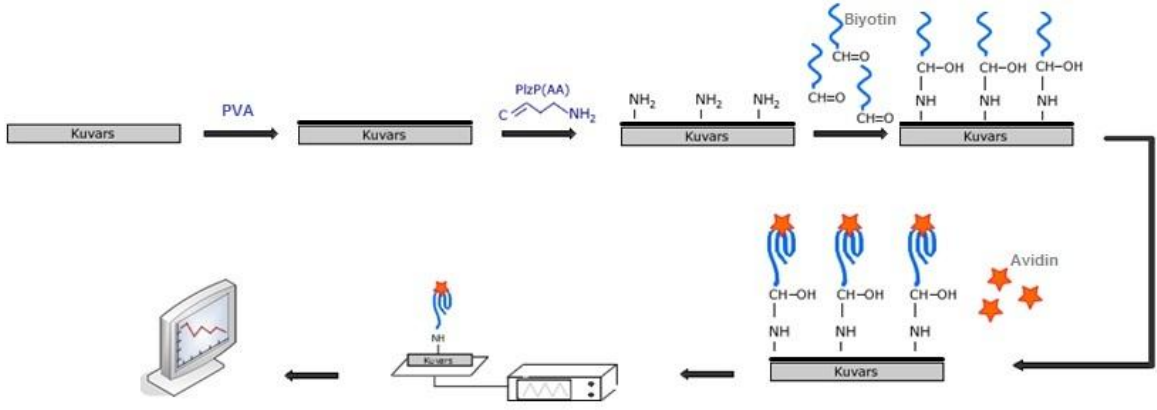
bağlanma miktarı kadar immobilizasyon sonrası avidine karşı afinitesinin yüksekliği bir kriter olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle, pH 7.4 tampon çözelti ile 1 mg/mL' lik ve 0.25 mg/mL' lik hazırlanan iki ayrı biyotin çözeltisinden iki ayrı grup piezoelektrik kuvars kristale 40 µl damlatılmış ve 1 gece bekletilmiştir. Tampon ve deiyonize suyla yıkanan yüzeyler kuruduktan sonra frekans ölçümleri alınıp sensör denemeleri için hazır hale getirilmiştir.

3.2.7 Biyosensör performansının belirlenmesi

Kütle hassas biyosensörün tanıyıcı tabakasını oluşturan biyotin derişimini belirlemek üzere kristaller iki farklı grup olarak ayrılmış ve üzerlerine 0.25 ve 1.00 mg/mL avidin çözeltisi damlatılarak 2 saat bekletilmiş ve yıkama işleminden sonra frekans değerleri ölçülmüştür. Avidin çözeltisinin derişimine karşı elde edilen frekans sapmaları 2 farklı biyotin derişimi için grafiğe geçirilmiştir. Bu iki noktalı iki ayrı grafikte elde edilen eğim ($\text{hassasiyet} = \Delta \text{frekans sapması} / \Delta \text{avidin derişimi}$) değerine bakarak, yüksek hassasiyet veren biyotin derişimi, biyosensör olarak hazırlanacak kristallerin yüzeyine biyotin immobilizasyonunda diğer bir deyişle tanıyıcı tabakanın hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu veriler ışığında, kalibrasyon doğrusunun hazırlanması amacı ile tanıyıcı tabaka, toplamda 4 farklı avidin derişimi (0.1-1.00 mg/mL) ile etkileştirilmiş ve biyosensörün cevabına karşı avidin derişimi grafiği hazırlanmıştır.

Nanolif kaplama ile kütle hassas biyosensörlerde performansın geliştirilmesine yönelik bu tezde, nanoliflerin etkisini karşılaştırmak amacı ile nanolif içermeyen piezoelektrik kuvars kristal yüzeyler, aynı parametrelerde plazma polimerizasyonu, kimyasal aktivasyon, tanıyıcı tabakanın oluşturulması ve avidin etkileşimi aşamalarından geçirilerek biyosensör hazırlanmış ve karşılaştırmalı kalibrasyon doğruları elde edilmiştir.

Sunulan tezin temel amacına yönelik olarak, kütle hassas biyosensörlerin performansını arttırmak amacıyla yapılan çalışmaların basamakları şematik olarak şekil 3.4' de verilmiştir.



Şekil 3.4 Tanıyıcı tabakanın tasarımı ve cevabı

3.2.8 Modifiye edilmiş kuvars kristallerin karakterizasyonu

3.2.8.1 SEM görüntülemesi

Yüzeylerin taramalı elektron mikroskopisi (Scanning Electron Microscope, SEM) görüntüleri Raith e-LINE (Almanya) cihazı kullanılarak, farklı büyütme oranlarında elde edilmiştir. Örnek yüzeyleri iletken olduğu için görüntüleme işleminden önce kaplama yapılmasına ihtiyaç duyulmamıştır. SEM görüntülemesi için elektro-eğirme yöntemiyle elde edilen lifler 1 gün süreyle oda sıcaklığında bekletilmiş, bu sayede lif üretimi sırasında tamamen buharlaşamayan su polimerden uzaklaştırılmıştır.

3.2.8.2 FTIR-ATR spektroskopisi

Yüzeylerin kimyasal yapıları Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), Grazing Angle aparatı kullanılarak elde edilmiştir (Perkin Elmer Spektrum 100 FTIR, ABD). Sistemde dedektör olarak mercury cadmium telluride (MCT) dedektörü kullanılmıştır. MCT dedektörü ölçümlerden önce sıvı azot ile soğutulmuştur. Spektrumlar 4 cm^{-1} çözünürlüğünde, 80° açıyla ve her bir örnek için 4 adet tarama alınarak elde edilmiştir. Kuvars spektrumunun modifiye yüzeylerde oluşan kimyasal gruplara ait bantları maskelemesi nedeniyle spektrumlar; boş kuvars kristal yüzeyinin, elektro-eğirme yöntemi, PlzP modifiye edilmiş, biyotin tutuklanmış ve avidinle etkileşmiş kuvars kristal yüzeylerinden çıkartılması ile elde edilmiştir. Bu işlem cihaza ait yazılım kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.8.3 AFM görüntülemesi

Kuvars kristallerin, elektro-eğirme sonrası, yüzeylere biyotin tutuklandıktan sonra ve biyotin-avidin etkileşiminden sonra yüzeyin fiziksel karakterizasyonu Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılarak elde edilmiştir. Modifikasyon önce ve sonrasındaki değişiklikler Atomik Kuvvet Mikroskobu (Ambios, USA) cihazı ile görüntüleme yapılarak belirlenmiştir.

4 DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan çalışmanın temel amacı, kütle hassas biyosensörlerin performansını arttırmak amacıyla kuvars kristal mikroterazi yüzeylerin elektro-eğirme yöntemiyle nanoliflerle kaplanması ve karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir.

Elektro-eğirme sistemi ile piezoelektrik kristal yüzeylerde nanolif elde etmeye yönelik çalışmalar sonucunda hazırlanan modifiye yüzeylere, tanıyıcı tabakanın oluşturulabilmesi için plazma polimerizasyon yöntemi ile fonksiyonel gruplar bağlanmış ve bu gruplar kimyasal olarak aktive edilmiştir. Bu aktivasyon işlemi sonrasında yüzeye tanıyıcı biyoajan olarak biyotin bağlanması gerçekleştirilmiş ve ardından avidin ile etkileştirilerek biyosensörün performansı ölçülmüştür. Plazma polimerizasyonu ve sonrasındaki aşamalar nanolif içermeyen yüzeyler için tekrarlanarak karşılaştırmalı sonuçlar elde edilmiştir. Kristal yüzey üzerinde yapılan modifikasyon işlemleri sonucu elde edilen değişimlerin izlenmesi amacıyla kuvars kristal mikroterazi sistemlerinde frekans ölçümleri ile yüzeydeki kütle değişimleri saptanmıştır. Frekans ölçümlerine paralel olarak yüzeyin fiziksel ve kimyasal yapısını tanımlamak üzere çeşitli karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

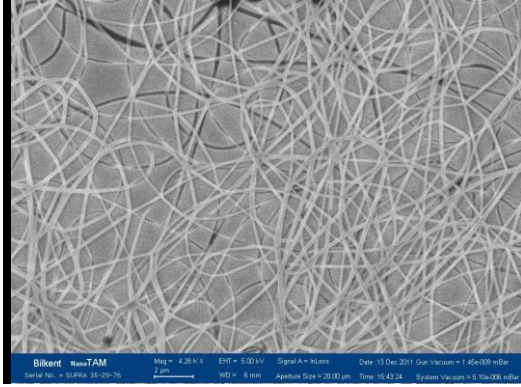
Materyal ve metot bölümünde beş basamak ile özetlenen bu tez çalışmasında, yüzey modifikasyon basamaklarında alınan sonuçlar ile hazırlanan kütle hassas biyotin-avidin biyosensörünün performansı bu bölümde sunulmuştur.

4.1 Elektro-Eğirme Sistemi ile Ön Çalışmaların Değerlendirilmesi

Elektro-eğirme sistemi ile yapılan ön çalışmalarda elde edilen sonuçlar SEM karakterizasyonu ile değerlendirilmiş ve aşağıdaki çizelgelerde sunulmuştur.

Elektro-eğirme işlemi sırasında Taylor konisi elde edildiği sürece boncuksuz fiber oluşması, lif çapının homojen olması öngörüldüğü gibi eğirme işleminin de sürekli olarak devam etmesi ve sürekli yapıda fiber oluşması öngörülmüştür. Literatürde, elektro-eğirme işleminin gerçekleştirileceği düzeneğin pozisyonu ile ilgili çalışmalar sonunda, Taylor konisinin ve boncuksuz lif oluşumunun yatay sistemde daha kolay ve kararlı gerçekleştiği belirtilmektedir (Yang ve ark., 2009). Ayrıca, grubumuzda yapılan ilk çalışmalarda kullanılan 20X20 cm büyüklüğündeki toplayıcı levhada görülen nanolif dağınıklığına engel olmak ve tüm liflerin piezoelektrik kuvars kristal yüzeyinde toplanmasını sağlamak üzere, piezoelektrik kuvars kristallerin yapısına

uygun olarak tasarlanan yeni toplayıcı denenmiş ve ilk tatmin edici nanolif yapısı 4 cm toplayıcı-iğne arası mesafede, %10 (w/w) PVA çözeltisiyle elde edilmiştir. Şekil 4.1’ de yukarıdaki parametrelerde elde edilen homojen çaplarda, boncuksuz ve sürekli nanolif yapı görülmektedir. Bu nanolif yapısı, öncelikle yeni tasarımımız olan toplayıcının görevini en iyi şekilde yerine getirdiğinin bir göstergesi olmuştur. Bundan sonraki çalışmalar, yeni toplayıcı ile yatay pozisyonda gerçekleştirilmiştir



Şekil 4.1 Nanofiberlerin sürekli yapısı %10 (w/w) PVA, 12 kV, 4 cm

Yapılan ön çalışmalarda kuvars kristallerin yüzeylerini kaplamak için homojen lif çapına sahip, boncuksuz yapıda ve sürekli nanolifler elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için birçok değişkenden etkilenen elektro-eğirme işleminde, polimer çözeltisinin derişimi, şırınga ve iğne çapı gibi parametreler sabit tutulup akış hızı, uygulanan gerilim, toplayıcı levha ile iğne arasındaki mesafe gibi parametreler üzerinde denemeler yapılmıştır. Yapılan denemelerin sonuçları SEM karakterizasyonu ve frekans farkları göz önünde bulundurularak değerlendirilmiş ve uygun parametreler seçilmiştir.

4.1.1 İşlem parametrelerinin lif morfolojisine etkisinin incelenmesi

4.1.1.1 Akış hızının lif çapına etkisi

Polimer derişiminin, şırınga ve iğne çapının sabit tutulduğu ön çalışmada, akış hızı 1,1-1,6 kV arasında değiştirildiğinde lif yapısında meydana gelen değişiklikler gözlenmiştir. Çalışılan iki parametrede de liflerde boncuk yapıya rastlanılmamıştır. %10 (w/w) PVA çözeltisinin akış hızı arttırıldığında lif çapının daha homojen olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1). Daha önce yapılan çalışmalarda da akış hızının düşürülmesiyle daha kalın lif çapına sahip yapılar elde edildiği görülmüştür (Rodoplu, 2011).

Çizelge 4.1. Akış hızının nanolif çapına etkisi

Polimer çözeltisi = %10 (w/w) PVA
Şırınga çapı = 10,2 mm
İğne çapı = 0,8 mm
Mesafe = 4 cm
Gerilim = 12 kV



Akış hızı= 1,1 mL/sa
160-225 nm lif çapı (18,69KX)
Boncuksuz yapı



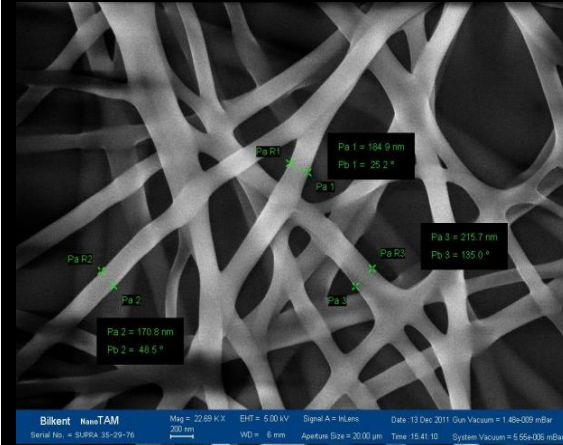
Akış hızı= 1,6 mL/sa
155-200 nm lif çapı (20,24KX)
Boncuksuz yapı

4.1.1.2 Gerilimin lif çapına etkisi

Gerilimin artmasının lif çapına etkisi Bölüm 2.3.3.2’ de de açıklandığı gibi belirli bir noktaya kadar lif çapını azaltma yönündeyken, o noktadan sonra artan gerilimle daha fazla polimer beslemesine neden olmaktadır. Çizelge 4.2’ de görüldüğü gibi diğer parametrelerin sabit tutulup sadece gerilimin değiştirildiği çalışmalarda genel olarak literatürde de bahsedildiği gibi gerilimin düşürülmesiyle daha kalın ve daha geniş aralıkta çaplara sahip lifler elde edilmiştir (Tan ve ark., 2005; Thompson ve ark., 2007).

Çizelge 4.2. Gerilimin nanolif çapına etkisi

Polimer çözeltisi = %10 (w/w) PVA
Şırınga çapı = 10,2 mm
İğne çapı = 0,8 mm
Mesafe = 4 cm
Akış hızı = 1,6 mL/sa



Gerilim = 15 kV
170-190 nm lif çapı (22,69KX)
Boncuksuz yapı



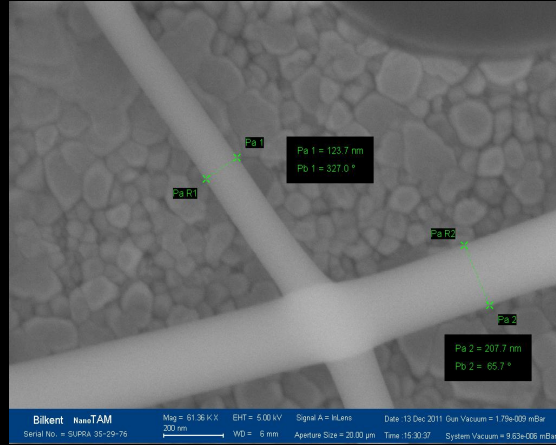
Gerilim = 12 kV
155-200 nm lif çapı (20,24KX)
Boncuksuz yapı

4.1.1.3 İğne-toplayıcı levha arasındaki uzaklığın lif çapına etkisi

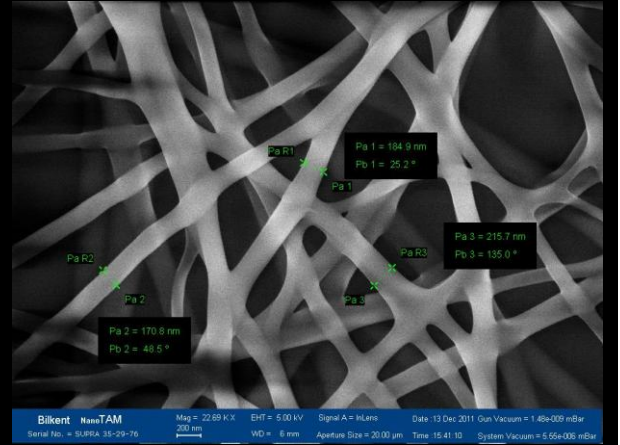
İğne ile toplayıcı levha arasındaki mesafenin lif morfolojisine etkisinin incelendiği bu ön çalışmada, tüm ön çalışmalarda sabit tutulan parametrelerin yanı sıra akış hızı ve uygulanan gerilim gibi parametreler de sabit tutulmuştur. Bu durumda, iğne ile toplayıcı levha arasındaki mesafe arttıkça oluşan liflerin çapı azalmaktadır (Çizelge 4.3). 5 cm mesafede 120 nm lif çapında lifler elde ediliyorken 4 cm mesafede ancak 170 nm çapında lifler üretilenmiştir. Literatürde bu durum, mesafenin elektrik alan kuvvetiyle ters orantılı olmasından dolayı jetin uzamasını sağlayan elektrik kuvvetlerinin azalması ile açıklanmaktadır (Zhao ve ark., 2004).

Çizelge 4.3. İğne-toplayıcı levha arasındaki mesafenin nanolif çapına etkisi

Polimer çözeltisi = %10 (w/w) PVA
Şırınga çapı = 10,2 mm
İğne çapı = 0,8 mm
Akış hızı = 1,6 mL/sa
Gerilim = 15 kV



Uzaklık = 5 cm
120-210 nm lif çapı (61,36KX)
Boncuksuz yapı



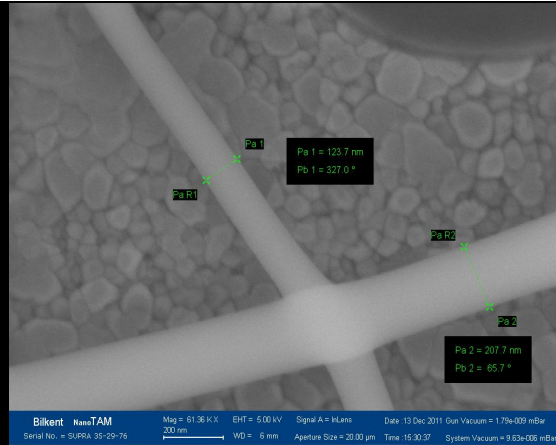
Uzaklık = 4 cm
170-190 nm lif çapı (22,69KX)
Boncuksuz yapı

4.1.1.4 Gerilim ve akış hızının ilişkisi

Elektro-eğirme işleminde, birbirleriyle bağlantılı iki parametre olan akış hızı ve uygulanan gerilim bu çalışmada birlikte ele alınmıştır. Genel olarak literatürde bahsedildiği gibi Taylor konisinin sabit olarak elde edilmesi için uygulanan gerilim ve akış hızının iyi ayarlanması gerekir. Uygulanan gerilim düşürüldükçe lif oluşturabilmek için akış hızının artırılması gerekmektedir. Çizelge 4.4' te de görüldüğü gibi akış hızının artması ile uygulanması gereken kritik gerilim değerini düşürmüştür. Yapılan çalışmada 11 kV gerilim ve 4 mL/sa akış hızında polimer elektro-eğirme işlemine tabi tutulduğunda oluşan lif çapları daha homojen olmasına rağmen boncuklu yapı gözlenmiştir. Bu çalışma kapsamında boncuklu yapıda lifler tercih edilmediği için bu parametre çalışılmak için uygun görülmemiştir.

Çizelge 4.4. Gerilim ve akış hızının ilişkisi

Polimer çözeltisi = %10 (w/w) PVA
Şırınga çapı = 10,2 mm
İğne çapı = 0,8 mm
Mesafe = 5 cm



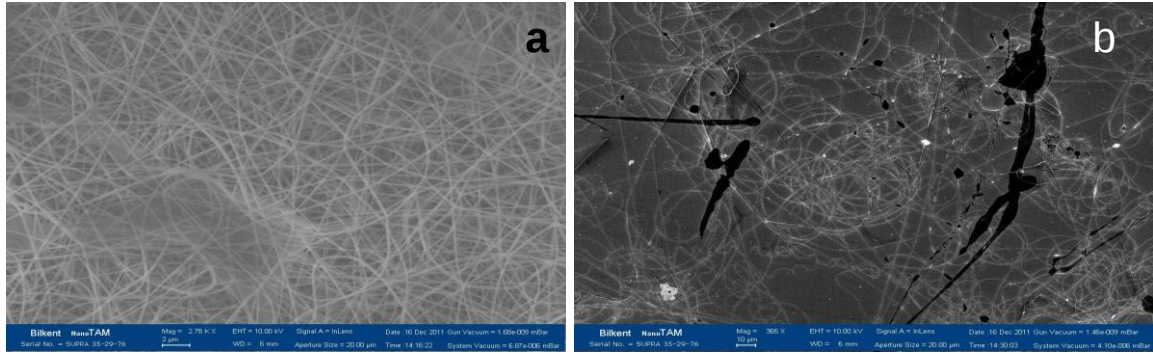
Gerilim = 15 kV
Akış hızı = 1,6 mL/sa
120-210 nm lif çapı (61,36KX)
Boncuksuz yapı



Gerilim = 11 kV
Akış hızı = 4 mL/sa
145-165 nm lif çapı (13,83KX)
Boncuklu yapı (470-360 nm)

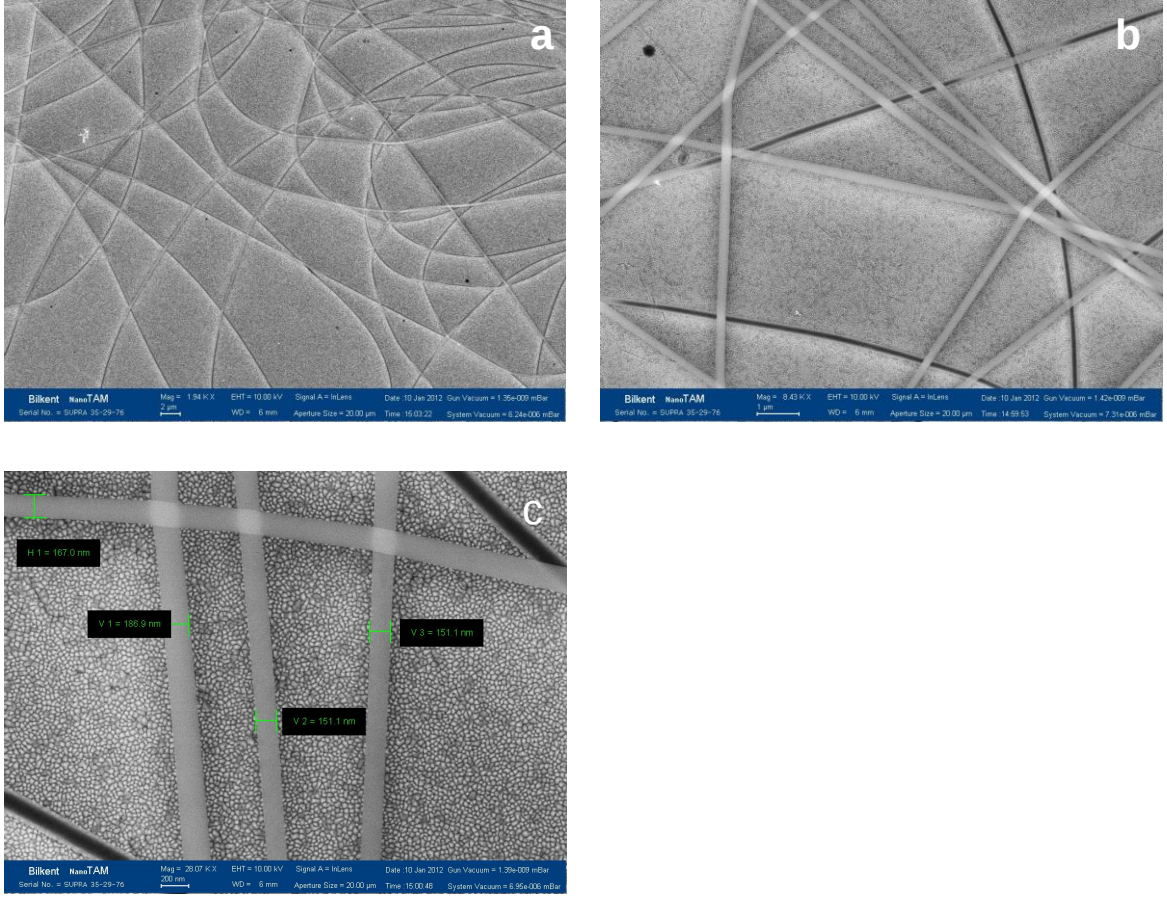
4.2 Kuvars Kristal Yüzeylerinin PVA Nanolif Kaplanması

%10 (w/w) PVA çözeltisi kullanılarak yapılan ön çalışmalar, SEM görüntüleri ve RQCM' de alınan frekans değişimleri sonuçları değerlendirilerek daha sonra uygulanacak parametreler belirlenmiştir. Yüzey alanı arttırılırken kristalin ölçüm yapabileceği frekans aralığında kalınmaya özen gösterilmiştir. Bunun için ön denemeler sonucunda lif çapının homojen ve ince olduğu, boncuklu yapının görülmediği liflerin elde edildiği uygun gerilim, akış hızı ve mesafe parametreleri (12 kV, 1,6 mL/sa, 5 cm) seçilmiştir. Belirlenen bu parametrelerden yola çıkarak işlem süresi üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Şekil 4.2' de görüleceği gibi süre arttıkça oluşan lif yığını da artmaktadır.



Şekil 4.2 Elektro-eğirme işlem parametreleri: 12 kV, 1,6 mL/sa a) 5 dk b) 3 dk

Yapılan denemeler sonucunda 3 dk boyunca 12 kV gerilim, 1,6 mL/sa akış hızında, 5 cm iğne-toplayıcı levha arası mesafe olarak işlem parametreleri belirlendikten sonra kütle hassas biyosensör hazırlamak amacı ile kullanılacak kuvars kristal yüzeylerine bu parametrelerde elektro-eğirme işlemi uygulanmıştır. Çevresel koşulların minimum düzeyde etki etmesi için bütün kristaller aynı gün içerisinde ard arda elektro-eğirme işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Nanoliflerin görüntüsü a) 1.94 KX b) 8.43 KX c) 28.07 KX

4.3 Plazma Polimerizasyonu ile Yüzeylerde Amino Grubu Oluşturulması

Ön çalışmaları takiben belirlenen parametrelerde nanolif kaplanan kuvars kristal yüzeylerinde amino grubu oluşturmak amacıyla 45 W boşalım gücünde ve 5 dk sürede, AA monomeri ile plazma polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Plazma polimerizasyonu sonrası frekans değişimleri RQCM ile gaz fazında ölçülmüştür (Çizelge 4.5). Hidrofilik PVA nanolifleri ortamdaki nemi tuttukları için plazma işlemi ile vakum ortamında liflere tutunan su yüzeyden ayrılırken yüzeye amino gruplarının bağlanması da sağlanmıştır.

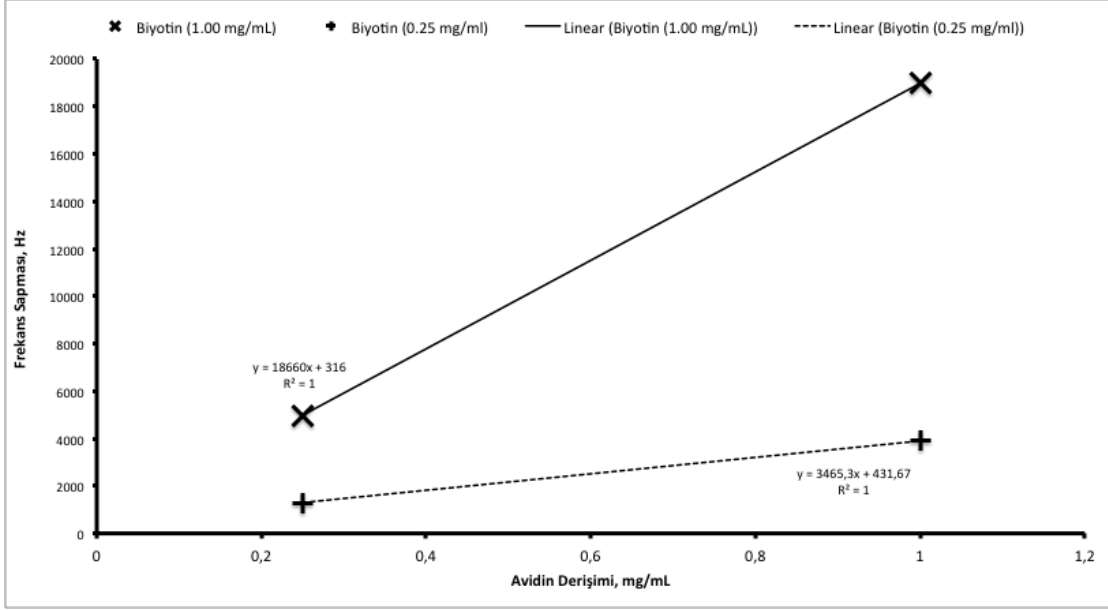
Frekans ölçümleri ile elde edilen sonuçlar fiziksel ve kimyasal karakterizasyon sonuçlarıyla da desteklenmiştir.

4.4 Yüzeylerin Kimyasal Aktivasyonu

Çizelge 4.6' da da görüldüğü gibi %2.5 (v/v) gluteraldehit çözeltisinin yüzeylerde bulunan amin grupları ile kesikli yöntem uygulanması ile bağ oluşturmaları sonucu, yüzeyde artan kütle miktarı frekans sapmalarında da gözlenmiş ayrıca FTIR-ATR GA analiz sonuçlarında da tespit edilmiştir.

4.5 Hazırlanan Yüzeylere Biotin İmmobilizasyonu ile Tanıyıcı Tabakanın Oluşturulması

Kütle hassas biyosensörlerin performansını arttırmak amacıyla kuvars kristal mikroterazi yüzeylerin elektro-eğirme yöntemiyle nanoliflerle kaplanması, bu yüzeylere biyoajan bağlayacak işlevselliğe kavuşmaları için plazma polimerizasyonu yöntemi ile amino gruplarının bağlanması, ardından çift fonksiyonlu aldehit grupları içeren kimyasal aktivasyon işlemi sonunda yüzeyler, hedef analiti (avidin) yakalayacak olan biyoajan (biyotin) ile etkileştirilerek “kütle hassas biyosensörün tanıyıcı tabakası” oluşturulmuştur. Biotinin yüzeyde immobilizasyonu için kullanılacak derişimin saptanmasında, biyotinin bağlanma miktarı kadar, immobilizasyon sonrası avidine karşı afinitesinin yüksekliği bir kriter olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle, son kademeye gelmiş yüzeyler, biyotinin iki farklı derişimindeki (0.25 ve 1.00 mg/mL) çözeltileri ile etkileştirilmiş ve bu yüzeylerin avidine karşı ilgisi ölçülmüştür. Bu amaçla farklı derişimler ile biyotinlenmiş yüzeyler, avidinin de iki değişik derişimdeki çözeltisi ile etkileştirilmiş ve yüzeydeki avidin bağlanma miktarı, frekans sapmalarındaki derişimler ile değerlendirilerek şekil 4.12 hazırlanmıştır.



Şekil 4.4 Biotinlenmiş tanıyıcı tabakanın avidine karşı hassasiyeti

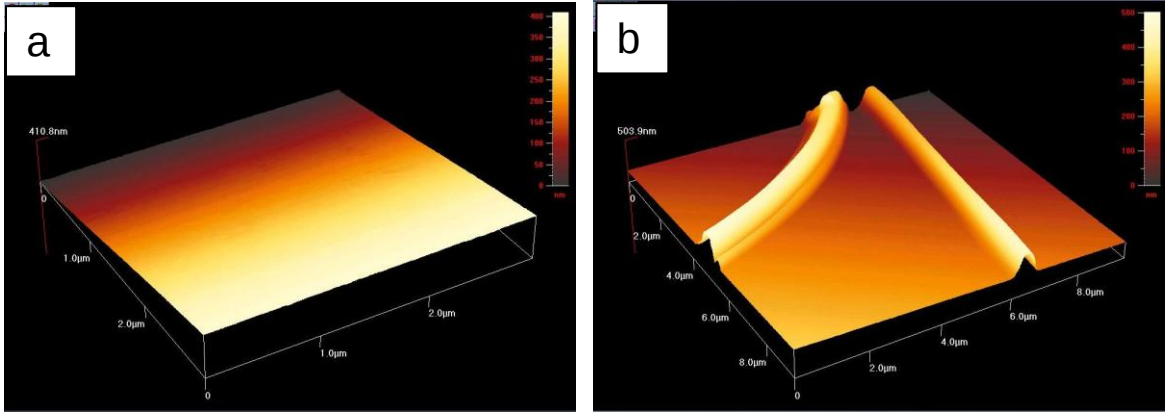
Şekil 4.4' de farklı avidin derişimlerine karşı, iki farklı biyotin derişimi kullanarak hazırlanan tanıyıcı tabakanın, avidin bağlanma miktarını frekans sapması cinsinden veren ilişkiyi gösteren bir grafikdir. Biyosensörlerde hassasiyet, takip edilen analitin derişiminin birim değışimine karşı, sensör cevabının değışim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Bu tanım doğrultusunda, 1.00 mg/mL biyotin derişimi ile etkileştirilerek hazırlanan tanıyıcı tabakanın hassasiyeti elde edilen doğrunun eğimi olup 18660 Hz/(mg/mL) avidin değeriye karşı gelmektedir. Diğer test edilen biyotin derişimi olan 0.25 mg/mL değeri ile hazırlanan tanıyıcı tabakanın hassasiyeti ise 3465 Hz/(mg/mL) değeriinde kalmıştır. Bu nedenle, tanıyıcı tabaka hazırlama aşamasına gelen tüm kristaller, 1.00 mg/mL biyotin derişimi ile etkileştirilerek kalibrasyon doğruları hazırlanmıştır.

4.6 Yüzeylerin Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Her modifikasyon basamağından sonra SEM, AFM ve FTIR-ATR ile karakterizasyon yapılarak yüzeylerin fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir.

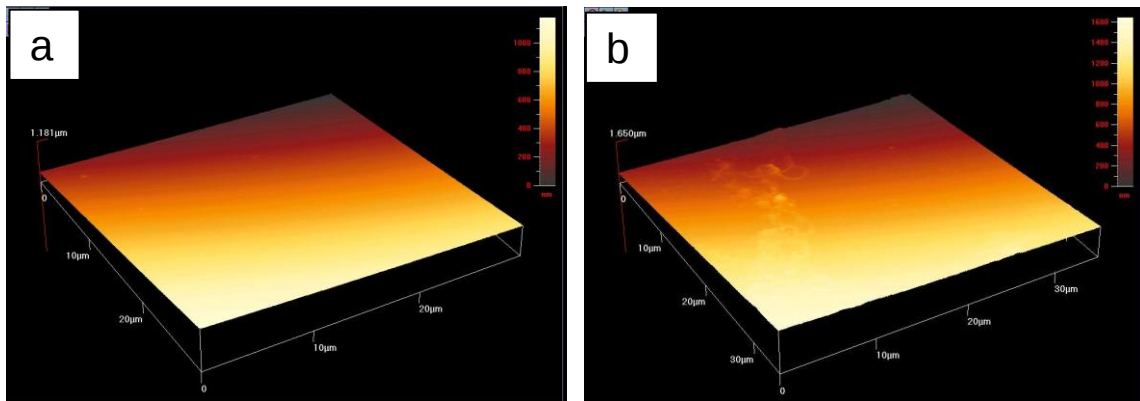
4.6.1 Nanolif kaplanan yüzeylerin AFM ile karakterizasyonu

Ön çalışmalarda SEM görüntüleriyle karakterize edilen nanolifler, referans yüzeyler üzerinde kaplama yapıldıktan sonra yüzey pürüzlülüğü ve kaplama kalınlığının incelenmesi için AFM ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.5).



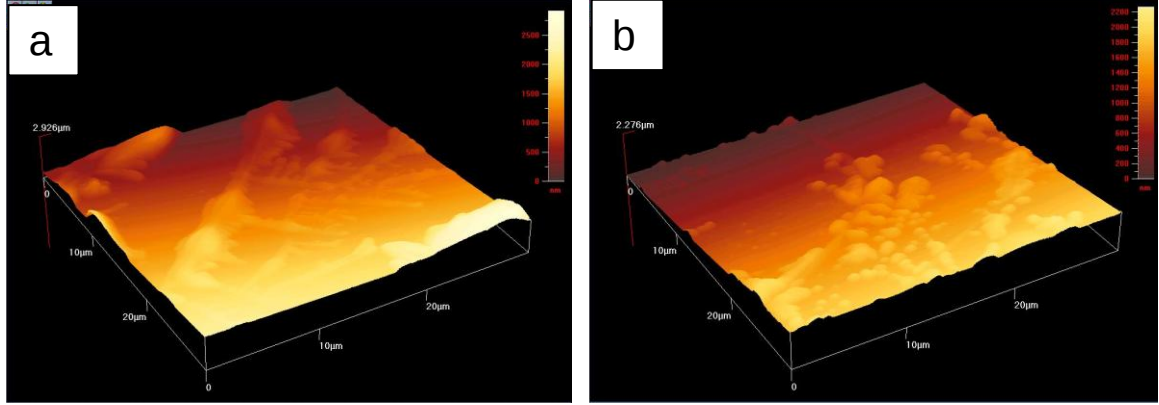
Şekil 4.5 Kristal yüzeylerinin AFM görüntüsü a) boş yüzey, b) nanolif kaplı yüzey

Plazma polimerizasyonu ile modifiye edilen yüzeylerin gluteraldehit ile kimyasal aktivasyonu yapıldıktan sonra biyotinle immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.6' da da görüldüğü gibi nanolif kaplanmayan (boş) kristal yüzeylerinde biyotin seyrek ve az miktarda tutuklanırken nanolif kaplı kristallerde daha fazla miktarda biyotin lif çevresinde yüzeye tutuklanmıştır.



Şekil 4.6 Biyotin immobilize edilmiş yüzey a) boş yüzey b) nanolif kaplı yüzey (1mg/mL biyotin çözeltisi)

Sensör denemesi için tanıyıcı tabakanın oluşturulduğu yüzeyler farklı derişimlerde avidin çözeltisi ile etkileştirilmiştir. Bunun sonucunda biyotin tutuklamasından sonra olduğu gibi boş kristal yüzeylerinde rastgele bir avidin tutuklanması söz konusuyken, nanolif kaplı kristal yüzeylerinde lif çevresinde biriken avidin molekülleri görölmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Avidin ile etkileştirilmiş yüzey a) boş yüzey b) nanolif kaplı yüzey (1mg/mL avidin çözeltisi)

Yüzey pürüzlülük sonuçlarında elde edilen ortalama pürüzlülük değeri (R_a); tepe ve vadilerin aritmetik ortalamasıdır. Aynı R_a 'ya sahip pek çok farklı profil çizilebilir bu nedenle yüzey topoğrafyası hakkında sadece R_a değeri etkili değildir. Profilin ortalama karekök sapması R_q yani RMS (Root Mean Square), R_a ile aynı sakıncalara sahiptir ancak "karekök" teriminden dolayı karakteristikleri belirlerken daha hassastır. R_q değerleri R_a değerlerinden yaklaşık %10 daha büyüktür (Rodoplu, 2011). Nanolif kaplanan yüzeyler boş yüzeylerle karşılaştırıldığında yüzey pürüzlülük etkin değeri (R_q) artmıştır. Ayrıca nanolif kaplanmayan kristallere nazaran nanolif kaplı kristallere biyotin bağlandığında yüzey pürüzlüğünün arttığını göstermektedir. Bu durum avidin etkileşiminden sonra tam tersi yönündedir. Yani nanolif kaplanmayan kristallerde yüzey daha pürüzlü bir yapıya sahiptir. Nanolif kaplı yüzeylerde avidin molekülleri lif etrafında birikmesine karşın diğer grup kristallerde avidin molekülü yüzeye yayılmış durumdadır.

Profilin maksimum yüksekliği R_t ; değerlendirme uzunluğu içindeki en yüksek tepe ile en derin vadi arasındaki farktır. Çizelge 4.5' de görüldüğü gibi boş kristal yüzeylerinde 12.0 olan R_t değeri, nanolif kaplandıktan sonra 331 nm gibi bir değere ulaşmıştır. Bu da yüzeydeki liflerin varlığını göstermektedir.

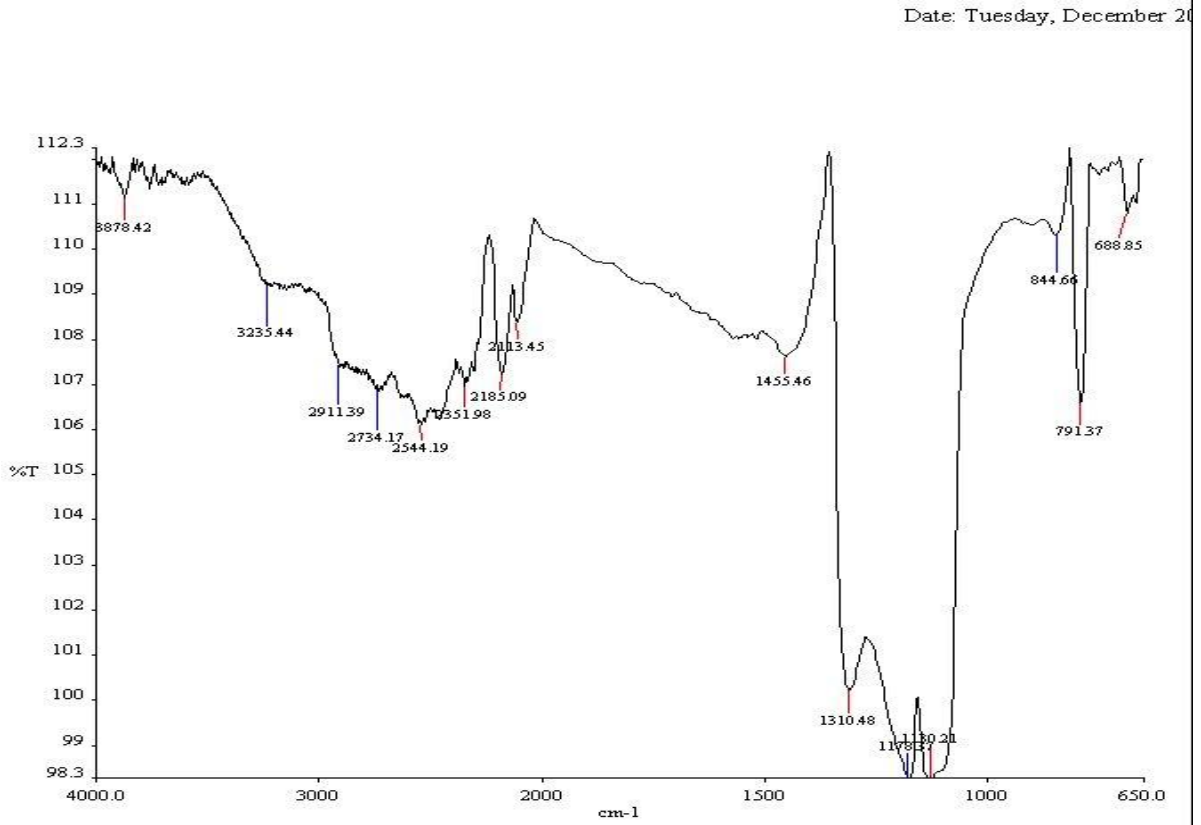
Profilin çarpıklığı (skewness) Rsk; Ana çizgi etrafında profilin simetrisini tanımlamaktadır. Rsk değeri; yüzeyin temel olarak tepelerden mi vadilerden mi yoksa her ikisinin eşit bir birleşiminden mi meydana geldiğine işaret etmektedir. Tepelerin baskın olarak yer aldığı bir yüzey “pozitif çarpık” olarak, vadilerin baskın olarak yer aldığı bir yüzey ise “negatif çarpık” olarak tanımlanmaktadır. Eğer yüzey vadiden çok tepeden oluşuyorsa çarpıklık pozitif, tersi söz konusu olursa negatif olmaktadır. İşlem görmemiş kristalde çarpıklık değeri negatifken yapılan her işlem sonrasında bu değerin boş kristale nazaran arttığı görülmüştür.

Çizelge 4.5 AFM ile ölçülen yüzeylerin pürüzlülük değerleri

Yüzey	Rt (nm)	Ra (nm)	Rq (nm)	Rsk	Rku
Boş	12.0	2.06	2.50	-0.76	2.60
Nanolif	331	59.1	79.0	1.23	4.63
Boş+Biyotin	16.9	3.01	3.65	-0.56	2.49
Nanolif+Biyotin	447	114	131	0.15	1.76
Boş+Avidin	776	133	170	0.97	4.62
Nanolif+ Avidin	417	73.4	97.8	1.24	4.67

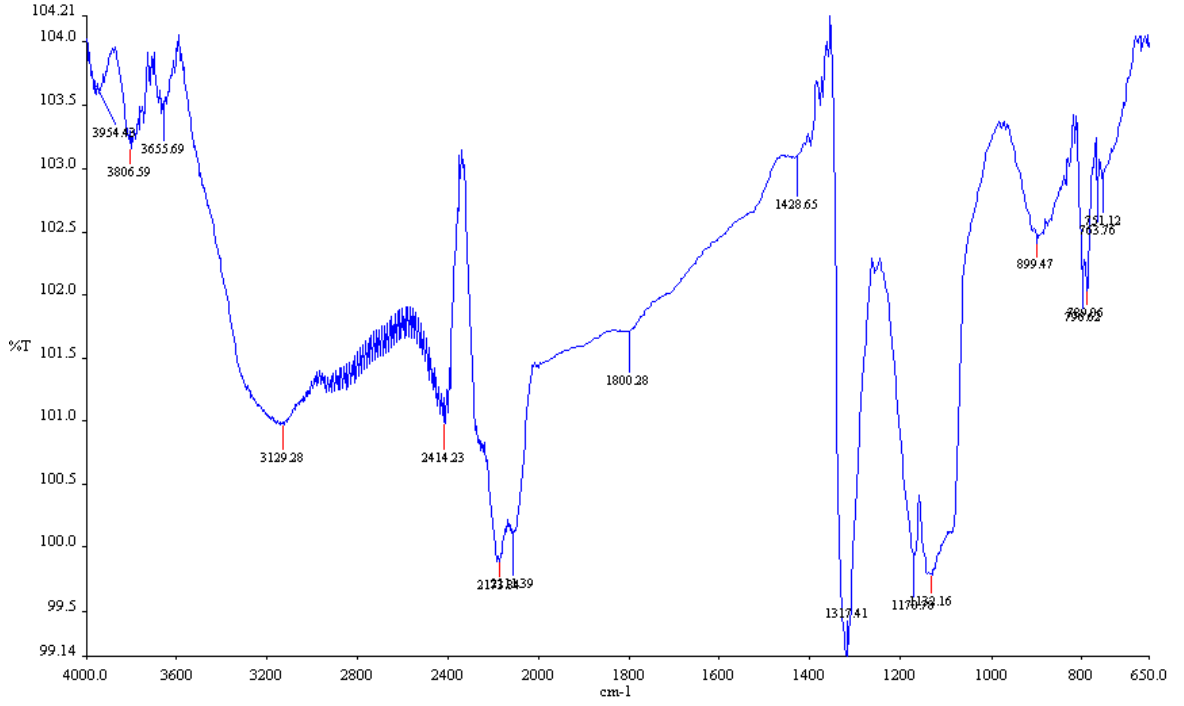
4.6.2 Yüzeylerin FTIR-ATR ile kimyasal karakterizasyonu

Plazma polimerizasyon işlemi ve bu işlemde etkin rol oynayan parametrelerin daha iyi anlaşılması amacıyla FTIR-ATR Grazing Angle spektroskopisi ile yüzeylerin kimyasal özellikleri belirlenmiştir.



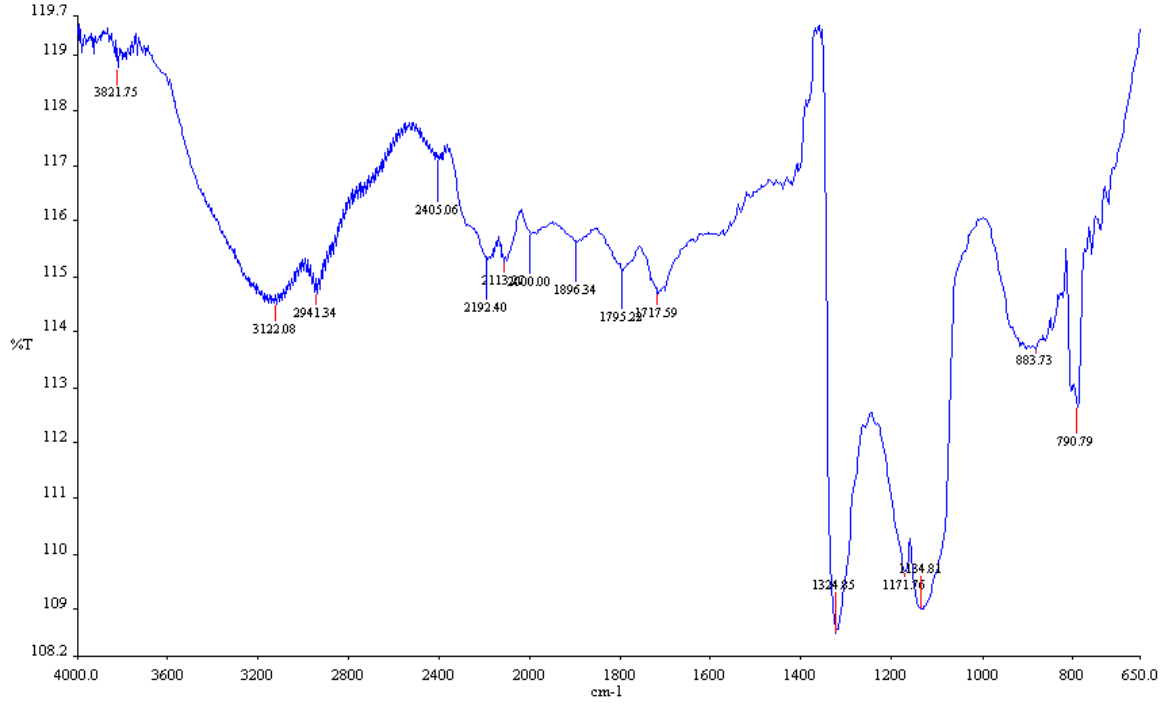
Şekil 4.8 Nanolif kaplanan kristal yüzeyin FTIR-ATR spektrumu

Şekil 4.8' de elektro-eğirme yöntemiyle nanolif kapladığımız yüzeyin FTIR-ATR spektrumları görülmektedir. Hidroksil ve asetat gruplarıyla ilgili tüm büyük pikler gözlenmiştir. 3235 cm^{-1} de gözlenen pik moleküller arası ve molekül içi hidrojen bağlarında O-H gerilmesini göstermektedir (Mansur, 2008; Skoog, 1998). 2911 cm^{-1} arasında gözlenen titreşim bandı alkil gruplarındaki C-H gerilmesini tanımlar. Elektro-eğirme işleminde elde edilen liflerin homojen bir şekilde yüzeyi kaplamamasından dolayı spektrumda hatalar meydana gelmiştir.



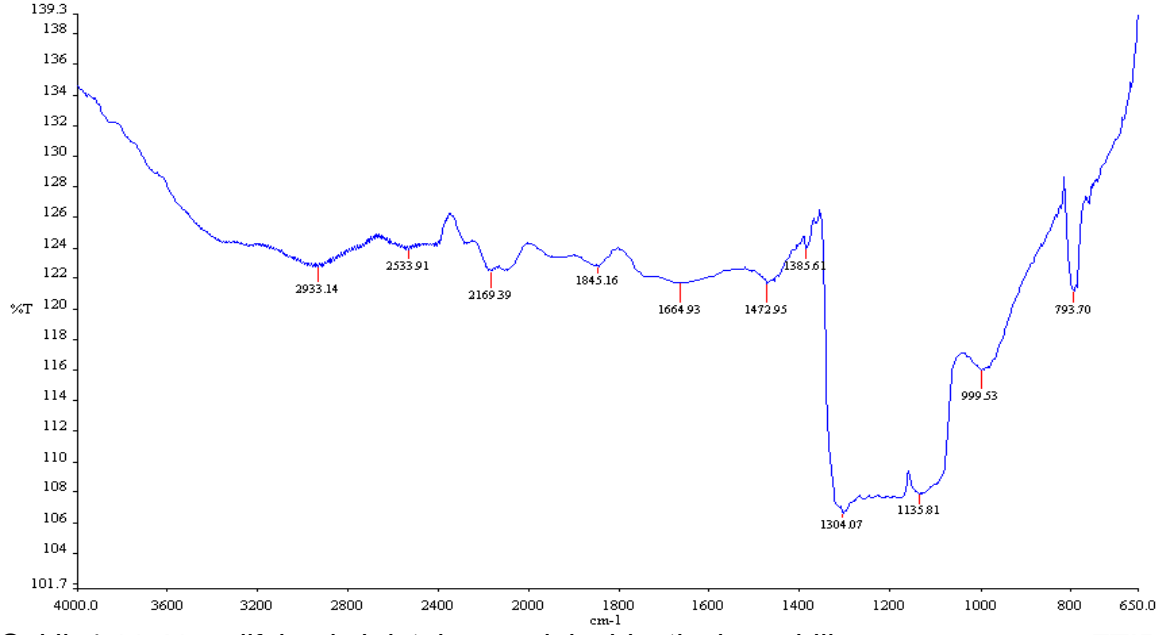
Şekil 4.9 Nanolif kaplı kristal yüzeyinin PlzP sonrası FTIR-ATR spektrumu

PVA nanolif kaplandıktan sonra plazma işlemi ile 45 W boşalım gücünde, 5 dk süreyle alilamin kaplanan örneğin Şekil 4.9’ da FTIR-ATR spektrumu görülmektedir. Spektrumda 3129 cm^{-1} de gözlenen geniş pik, amin grubuna ait gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca hidroksil (OH) grubuna ait gerilme titreşimlerinin de bu geniş pike küçük bir katkı sağladığı söylenebilir. 1428 ve 1317 cm^{-1} civarında gözlenen pikler CH gruplarının düzlem-içi bükülme ve sallanma titreşimleri olarak işaretlenmişlerdir. Amin miktarı fazla olduğunda $3000\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ amin gerilmesi ve $800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ amin bükülme bantları geniştir (Rivas ve ark., 2003).



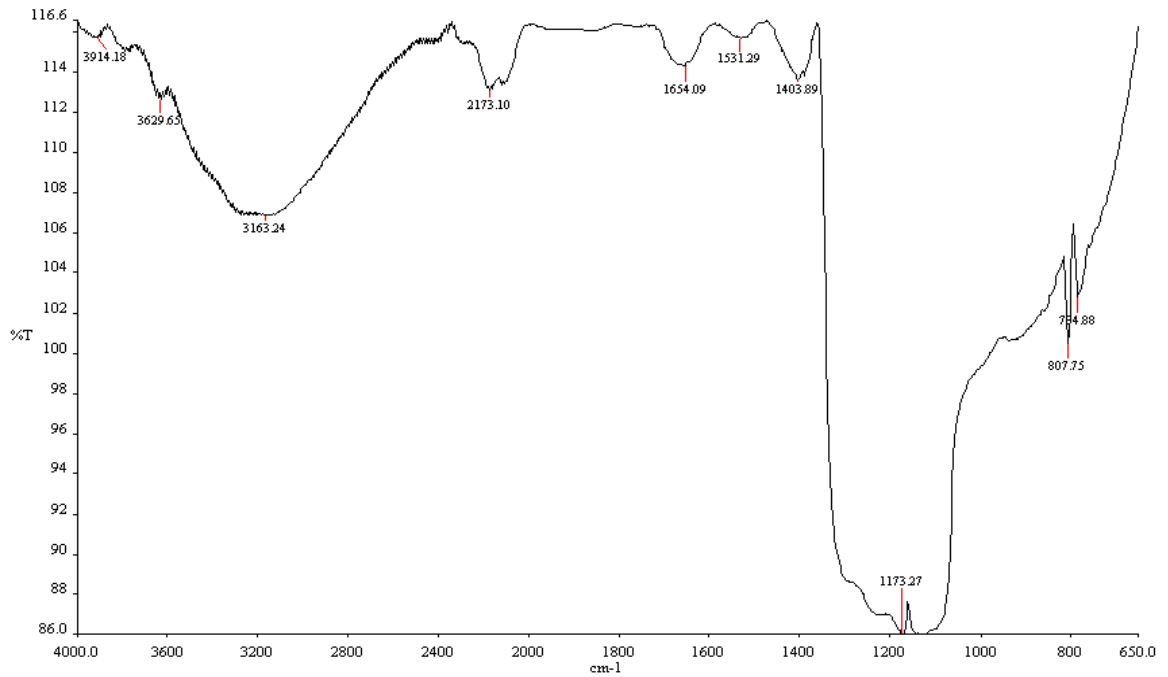
Şekil 4.10 Nanolif kaplı kristal yüzeyinin glutaraldehit aktivasyonu sonrası FTIR-ATR spektrumu

Nanolif kaplı yüzeylerin glutaraldehit ile aktivasyonu sonrası, $3700\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ absorpsiyon bölgesindeki spektrumun genişlediği gözlenmiştir. Kimyasal aktivasyon sonrası, glutaraldehitin kimyasal yapısı nedeniyle hidroksil gruplarının artması beklenmektedir. Bu yüzden bu bölgedeki pik genişlemesi, kimyasal aktivasyonla birlikte, hidroksil gruplarının artışıyla açıklanabilir. $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde gelişen CH_x piklerinin gelişmesi, yine glutaraldehit ile yüzeye kazandırılan –CH bağlarını kanıtlamaktadır (Şekil 4.10).



Şekil 4.11 Nanolif kaplı kristal yüzeyinin biyotin immobilizasyonu sonrası FTIR-ATR spektrumu

Nanolif kaplı yüzey üzerinde biyotin immobilizasyonu sonrası FTIR-ATR spektrumu şekil 4.11’ de görülmektedir. 2933, 2533, 1664 cm⁻¹ pikleri sırasıyla –NH gerilme titreşimine, –OH grubunun gerilme titreşimine, C=O gerilme titreşimine işaretler ve protein varlığına işaretler (Huang 2010).



Şekil 4.12 Nanolif kaplı kristal yüzeyinin avidin immobilizasyonu sonrası FTIR-ATR spektrumu

Sensör denemesi yapılan kristallerin avidinle etkileştirilmesinden sonra FTIR-ATR spektrumu şekil 4.12' de görülmektedir. Bir önceki bölümde de açıklandığı gibi 3629 ve 3163 cm^{-1} deki pikler ile 1654 ve 1531 cm^{-1} de görülen pikler protein varlığına işaretler.

4.7 Kalibrasyon Doğrusunun Oluşturulması

Kütle hassas biyosensörlerin performansını arttırmak amacıyla kuvars kristal mikroterazi yüzeylerin her bir kademedeki modifikasyonunu içeren çalışmalar sonucunda, elde edilen veriler doğrultusunda, tüm aşamalar için optimum kabul edilebilecek parametreler kullanılarak, çalışmanın son aşaması olan kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır.

Bu aşamaya kadar gerçekleşen çalışmalardaki “optimum koşulları” ve piezoelektrik kuvars kristal üzerinde yarattığı kütle birikimi, ölçülen boyutu ile frekans sapması değerleri, çizelge 4.5' te verilmiştir. Bu çizelgede ayrıca, piezoelektrik kuvars kristal üzerinde elektro-eğirme yöntemi ile oluşturulan nanoliflerin, kütle hassas biyosensör üzerinde yarattığı olumlu gelişmeleri görmek ve performanslarını karşılaştırmak amacı ile elektro-eğirme dışında kullanılan tüm optimum parametrelerin doğrudan uygulandığı boş kristalden elde edilen sonuçlarda verilmiştir.

Çizelge 4.6 Biotin-Avidin kütle hassas biyosensörünün Kalibrasyon Doğrusunun oluşmasında kullanılan aşamalar, amacı, optimum çalışma koşulları ve frekans sapma değerleri (Hz)^(*).

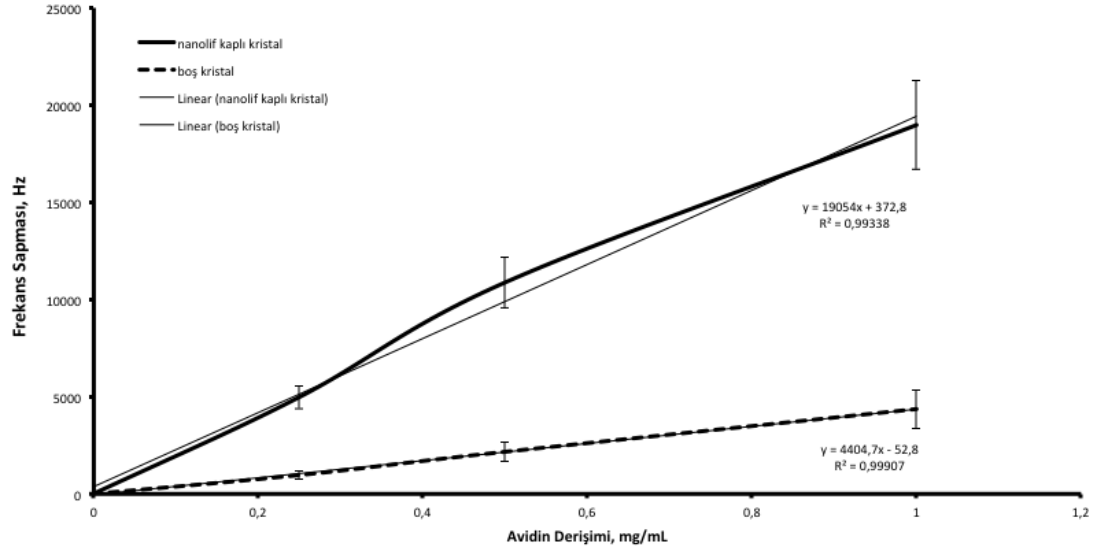
Elektro-eğirme	Plazma polimerizasyonu	Glutaraldehit aktivasyonu	Biotin immobilizasyonu
Nanolif oluşturarak yüzey alanının artırılması	Yüzeyde biyomolekül immobilizasyonu amacı ile amino grubu oluşturmak	Yüzey-biyomolekül arasındaki kovalent bağın oluşturulması	“Avidin” takibine yönelik kütle hassas biyosensörün tanıyıcı tabakasını oluşturmak
Polivinilalkol (PVA) %10 (w/w) sulu çözelti Gerilim: 12 kV Mesafe: 5 cm Akış hızı: 1.6 mL/saat Uygulama süresi: 3 dk	Monomer: Alilamin (AA) Frekans: 13.56 MHz (RF) Uygulanan güç: 45 W Uygulama süresi: 5 dk	Glutaraldehit %2.5 (v/v) pH 7.4 PBS tampon çözeltide	Biotin Derişimi: 1.0 mg/mL pH 7.4 PBS tampon çözeltide Etkileşim koşulları: Oda sıcaklığında 12 saat
2989±106	1274±163	329±47	11004±476
0**	384±34**	79±26**	2045±148**

* Tablo, 9 replika deney sonucundaki uç değerler atılarak hazırlanmıştır.

**Nanolif kaplanmamış (boş) piezoelektrik kuvars kristale ait değerler.

Yukarıdaki çizelgeden de net olarak anlaşılacağı gibi, piezoelektrik kuvars kristallerin yüzeyi, nanoliflerin varlığı ile büyük oranda artmış ve her kademedede daha fazla kütlenin birikebilmesine yol açmıştır.

Bu gelişmelerin ışığında hazırlanan “tanıyıcı tabaka”, farklı avidin derişimleri ile etkileştirilerek, kütle hassas biysensörün cevabı elde edilmiş ve avidin derişimine karşı biyosensörün cevabı frekans sapması cinsinden ölçülerek “kalibrasyon doğrusu” hazırlanmıştır. Bu grafikte, karşılaştırma amacı ile boş kristal yüzeyi içinde aynı avidin derişimleri kullanarak kristalden alınan cevaplar doğrultusunda, boş kristale ait kalibrasyon doğrusu da hazırlanmış ve Şekil 4.13’ te beraberce sunulmuştur.



Şekil 4.13 Biotin-avidin kütle hassas biyosensörlerinin kalibrasyon doğruları

Her iki kalibrasyon doğrusu için avidinin çalışılan en yüksek derişimi olan 1 mg/mL değerine kadar her iki kütle hassas biyosensörde doğrusal bir ilişki gözlenmiş ve elde edilen regresyon katsayıları sırası ile 0.993 ve 0.999 olarak bulunmuştur.

Avidinin 0.1 mg/mL derişim değeri için yapılan deneylerde, boş kristalden herhangi bir cevap alınamaması nedeni ile bu derişim değeri kalibrasyon doğrularının oluşumunda her iki yüzey içinde kullanılmamıştır. Bu değer nanolif kaplı yüzeyler kullanılarak hazırlanan biyosensörde 2254±234 Hz seviyesinde gözlenmiş olup, doğrusallık alt sınırları içerisinde kalan okunabilir bir değer olarak kaydedilmiştir.

Nanolif kaplı yüzeyler ile hazırlanan biyosensörün hassasiyeti iki nokta kullanıldığında 18660 Hz/(mg/mL) olarak ölçülmüş ve buna göre tanıyıcı tabaka hazırlanmasında kullanılan biyotin derişimine karar verilmişti. Kalibrasyon doğrusunda gözlenen hassasiyet değeri 19054 Hz/(mg/mL) olup bu değer boş kristal kullanılarak hazırlanan kütle hassas biyosensörün hassasiyet değerinden (4404 Hz/(mg/mL)) yaklaşık 5 kat daha yüksektir.

Bu iki sonuçta göstermektedir ki, elektro-eğirme yöntemi ile nanolif oluşturularak yüzeyi artırılan piezoelektrik kuvars kristal temelli kütle hassas biyosensörlerin performansı her açıdan geliştirilebilmiştir.

5 SONUÇLAR

Bu çalışma kapsamında, biyosensör uygulamalarında kullanılmak üzere elektro-eğirme yöntemiyle kuvars kristal yüzey alanları artırılmış ve daha sonra plazma polimerizasyonu yöntemiyle modifiye edilmiştir. Hazırlanan yüzeyler avidin-biyotin etkileşimden yararlanılarak sensör denemeleri için test edilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- 1) Elektro-eğirme yöntemi ile nanolif kaplanan yüzeylerin istenilen seviyede alanının artırıldığı görülmüştür. Bu sayede planlandığı gibi daha düşük derişimlerdeki analit tayinine olanak sağladığı gözlenmiş fakat alt sınırı belirleyici deneyler yapılmamıştır. Boş kristalde okunamayan 0.1 mg/mL seviyesindeki avidin derişimi nanolif kaplı kristalde okunmuştur.
- 2) PVA suda çözünen bir polimer olduğu halde nanolif kaplı yüzeyler plazma polimerizasyonu ile modifiye edildikten sonraki aşamalarda gerçekleştirilen yıkama işlemlerinde yüzeyden tamamı ile kopmaların gerçekleşmediği görülmüştür. Bu durum nanoliflerin yapısı ve gerçekleştirilen modifikasyonun lif kararlılığını arttırdığı yönünde açıklanmıştır.
- 3) PVA' nın suda çözünmesi nedeniyle ilerleyen çalışmalarda suda çözünmeyen bir polimerle bu çalışma tekrar edilecektir. Bu sayede daha kararlı lifler oluşturulacağı düşünülmektedir. Çalışmaların sonucuna göre biyosensör uygulamaları için en uygun yüzey oluşturulması amaçlanmaktadır.
- 4) Kesikli sistemde gerçekleştirilen immobilizasyon işlemleri bir sonraki çalışmada eşzamanlı ölçüm imkanı veren sürekli sistemde denemesi yapılacaktır. Bu sayede biyosensör uygulamaları için daha uygun koşullarda ölçüm alınabilmektedir.
- 5) Nanolif kaplı kristal yüzeyleri ile boş kristal yüzeylerinin performans parametreleri karşılaştırıldığında öngörüldüğü üzere yüzey alanının artması biyosensörün performansında artışa neden olmuştur. Bu durum da ilerleyen çalışmalar için umut vaad etmektedir.

Elde edilen sonuçlar, araştırma grubumuzda sürdürülen sensör hassasiyetini arttırmaya yönelik çalışmalarımıza öncülük etmektedir. Elektro-eğirme ve plazma

polimerizasyonu yöntemleri kullanılarak daha kararlı yapıda ve tekrar edilebilir özellikte biyosensör yüzeyi geliştirme çalışmalarının sürdürülmesi düşünülmektedir.

6 KAYNAKLAR

- Agarwal, S., Wendorff, J.H., Greiner, A., 2008, Use of Electrospinning Technique for Biomedical Applications, *Polymer*, 49, 5603–21.
- Akdogan, E., Çökeliler, D., ve ark., 2006, A New Method for Immunosensor Preparation: Atmospheric Plasma Torch, *Surface and Coatings Technology*, 201(6): 2540-46.
- Akdoğan, E., 2010, Beyin-Omurilik Sıvısı Şantlarında Bakteriyel Kolonizasyonun Önlenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Akman, M.A., 1993, Mechanical Properties of Plasma Surface Modified Calcium Carbonate/PP Composites, Yüksek Lisans Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Audrey, F., Chronakis, I.S., 2003, Polymer Nanofibers Assembled by Electrospinning, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 8, 64-75.
- Bae, B., Chun B.-H., Kim D., 2001, Surface Characterization of Microporous Polypropylene Membranes Modified by Plasma Treatment, *Polymer*, 42, 7879-85.
- Beyhan, B., 2008, HIV-1 Tanısına Yönelik Aptamer Bazlı Kütle Hassas Biyosensör Geliştirilmesi: Tanıyıcı Tabakanın Oluşturulması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 111s.
- Boyaci, İ.H., Mutlu, M., 1998, Preparation of Lactate Electrode for General Food Application, FAB 98, Twelfth Forum for Applied Biotechnology, Brugges, Belgium, September 24-25, Vol: 2, 1421-28.
- Buck, R. P., 1990, *Biosensor Technology: Fundamentals and Applications*, Marcel Dekker Inc.
- Bunde, R.L., Jarvi E.J., Rosentreter J.J., 1998, Piezoelectric Quartz Crystal Biosensors, *Talanta*, 46, 1223-36.
- Butt, H.J., Capella, B., Kappl, M., 2005, Force Measurements with the Atomic Force Microscope: Technique, Interpretation and Applications, *Surface Science Reports*. 59, 1-152.
- Choi, J. S., Lee, S.W., Jeong, L., Bae, S.H., Min, B.C., Youk, J. H., Park, W.H., 2004, Effect of Organosoluble Salts on the Nanofibrous Structure of Electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 4, 249-56.
- Chun, I., 2005, *Finer Fibers Spun by Electrospinning Process from Polymer Solutions and Polymer Melts in Air and Vacuum: Characterization of Structure and Morphology on Electrospun Fibers and Developing a New*

- Process Model, Doktora Tezi, The Graduate Faculty of The University of Akron.
- Clark, L.C. ve Lyons, C., 1962, Electrode Systems for Continous Monitoring in Cardiovascular Surgery, Ann. N. Y. Acad. Sci., 102,29.
- Çatalkaya, H., 2011, Grafit Elektrot Üzerinde Elektropolimerizasyon ile Polianilin Kopolimerlerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Amperometrik Biyosensör Olarak Uygulaması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çökeliler, D., 2006, Alfatoxin Tayini İçin Plazma Polimerizasyon Yöntemi ile Kütle Hassas İmmünosensör Hazırlanması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J., Haris, D. and Beck Tan, N.C., 2001, The Effect of Processing Variables on The Morphology of Electrospun Nanofibers and Textiles, Polymer, 42, 261-72.
- Ding, B., Wang, M., Wang, X., Yu, J., Sun, G., 2010, Electrospun Nanomaterials for Ultrasensitive Sensors, Materialstoday, 13, 11, 16-27.
- Flosch, D., Clarotti, G., Geckeler, K. E., Schue, F., Gopel, W., 1992, Characterization of Plasma-Treated poly (hydroxybutyrate) Membrane Surfaces by ESCA and Contact Angle Measurements, Journal of Membrane Science, 73, 163-72.
- Fong, H., Chun, I. and Reneker, D.H., 1999, Beaded Nanofibers During Electrospinning, Polymer, 40, 4585-92.
- Galaev, I., Mattiasson, B., 2002, Smart Polymers for Bioseparation and Bioprocessing, Taylor-Francis Inc.
- Gancarz, I., Pozniak, G., ve ark., 2002, Modification of Polysulfone Membranes 5. Effect of n-butylamine and Allylamine Plasma, European Polymer Journal(38): 1937-46.
- Guanxiong, L., Shouheng, S., Wilson, R.J., White, R.L., Pourmand, N., Wang, S.X., 2006, Spin Valve Sensors for Ultrasensitive Detection of Superparamagnetic Nanoparticles for Biological Applications, Sensors and Actuators A 126, 98-106.
- Guilbault, G.G., and Hgeh-Ngwaindi, 1988, Use of Ptotein Coating on Piezoelectric Crystals for Assay of Gaseous Pollutants. In : Guilbault, G. G., Mascini, M. (Eds), Analytical Uses of Immobilized Biological Compounds for Detection, Medical and Industrial uses. NATO reference series.
- Günaydın, B., 2009, Fenolik Madde Tayini için Plazma Polimerizasyon Yöntemi ile Elektrokimyasal Sensör Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Hao, R., Wang, D., Zhang, X., Zuo, G., Wei, H., Yang, R., Zhang, Z., Cheng, Z., Guo, Y., Cui, Z., Zhou, Y., 2009, Rapid Detection of *Bacillus anthracis* Using Monoclonal Antibody Functionalized QCM Sensor, Biosensors and Bioelectronics 24, 1330-35.
- Hohman, M.M., Shin, M., Rutledge, G. and Brenner, M.P., 2001, Electrospinning and Electrically Forced Jets. I. Stability Theory, Physics Of Fluids, 13-8, 2201- 20.
- Huang, M.Z., Zhang, Y.Z., Kotaki, M. and Ramakrishna, S., 2003, A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites, Composites Science And Technology, 63, 2223-53.
- Huang, P., Li, Z., Hu, H., Cui, D., 2010, Synthesis and Characterization of Bovine Serum Albumin-Conjugated Copper Sulfide Nanocomposites, Journal of Nanomaterials Volume 2010, Article ID 641545, 6 pg., doi:10.1155/2010/641545.
- Inagaki, N., Kishi, A., Katsuura, K., 1982, Surface Properties of Polymers Prepared from Trimethylsilyldimethyl-amine and Hexamethyldisilazane by Glow Discharge Polymerization, Int. J. Adhesion and Adhesives, 233-38.
- IUPAC, 1991, Pure Appl Chem 63:1247–1250.
- IUPAC, 1997, Gold Book, Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition, 64, 148.
- IUPAC, 1999, Pure Appl Chem 71, 2333–2348.
- Kaminska, A., H. Kaczmarek, ve ark., 2002, The Influence of Side Groups and Polarity of Polymers on the Kind and Effectiveness of Their Surface Modification by Air Plasma Action, European Polymer Journal(38): 1915-19.
- Kanazawa, K.K., and Gordon, J.G., 1985, The Oscillation Frequency of a Quartz Resonator in Contact with Liquid, Analytica Chimica Acta, 57, 1771-72.
- Karamollaoğlu, İ., Öktem, H.A., Mutlu, M., 2009, QCM-based DNA Biosensor for Detection of Genetically Modified Organisms (GMOs), Biochemical Engineering Journal 44, 142–50.
- Kataphinan, W., 2004, Electrospinning and Potential Applications, Doktora Tezi, The Graduate Faculty Of The University Of Akron.
- Kato, K., T. Matsui, ve ark., 1987, Quantitative Estimation of α -Helix Coil Content in Bovine Serum Albumin by Fourier Transform-Infrared Spectroscopy, Applied Spectroscopy 41: 861-65.
- Kaya, D.A., 2009, Elektroeğirme Yöntemiyle $\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{TiO}_2$ Nanoliflerin Üretimi ve Karakterizasyonu, Afyonkarahisar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Afyonkarahisar.

- Kitano, H., K. Nagaoka, ve ark., 2008, Structure of Water Incorporated in Amphoteric Polymer Thin Films as Revealed by FT-IR Spectroscopy, *Macromolecular Bioscience* 8(1): 77-85.
- Kozanoğlu, G., S., 2006, Elektrospinning Yöntemiyle Nanolif Üretim Teknolojisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Kumar, A., 2000, Biosensors Based on Piezoelectric Crystal Detectors: Theory and Application, The Minerals, Metals & Materials Society.
- Kumar, D, Sharma, R.C., 1998, Advances in Conductive Polymers, *Eur Polym J*, 34:1053–60.
- Lam, H.L., 2004, Electrospinning of Single Wall Carbon Nanotube Reinforced Aligned Fibrils and Yarns, Doktora Tezi, The Faculty Of Drexel University.
- Lee, K.H., Kim, H.Y., Bang, H.J., Jung, Y.H. and Lee, S.G., 2003, The Change of Bead Morphology Formed On Electrospun Polystyrene Fibers, *Polymer*, 44, 4029-34.
- Li, D., McCann, J.T., Xia, Y., 2006, Electrospinning: A Simple and Versatile Technique for Producing Ceramic Nanofibers and Nanotubes, *J. Am. Ceram. Soc.*, 89, 1861–69.
- Li, D., ve Xia, Y., 2004, Elelctrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?, *Advanced Materials*, 16-14, 1151-69.
- Li, D., Wang, Y., Xia, Y., 2004, Elecrospinning Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays and Layer by Layer Stacked Films, *Advenced Materials*, 16, No.4.
- Li, R., L. Ye, ve ark., 1997, Application of Plasma Technologies in Fibre-Reinforced Polymer Composites: A Review of Recent Developments, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 28(1): 73-86.
- Mansur, H.S., Sadahira, C.M., Souza, A.N., Mansur A.A.P., 2008, FTIR Spectroscopy Characterization of Poly (vinyl alcohol) Hydrogel with Different Hydrolysis Degree and Chemically Crosslinked with Glutaraldehyde, *Materials Science and Engineering C* 28, 539–48.
- Marginean, I., Parvin, L., Heffernan, L. and Vertes, A., 2004, Flexing the Electrified Meniscus: The Birth of a Jet in Electrosprays, *Analytical Chemistry*, 76, 14, 4202-07.
- Meyer, G., Amer, N. M., 1998, Novel Optical Approach to Atomic Force Microscopy, *App. Phy. Lett.*, 53, 12, 1045-47.
- Mohan, A., 2002, Formation and Characterization of Electrospun Nonwoven Webs, Yüksek Lisans Tezi, The Graduate Faculty of North Carolina State University.

- Mutlu, M., S. Mutlu, ve ark., 1997, Preparation of a Single Layer Enzyme Electrode by Plasma Polymerization Technique, NATO ASI Series E Applied Sciences-Advanced Study Institute 346: 477-486.
- Mutlu, M., ve Boyaci, I.H., 2011, Amperometric Biosensor in Food Processing, Safety, and Quality Control, in *Biosensor in Food Processing, Safety, and Quality Control*, CRC Press, Boca Raton, FL, ABD.
- Mutlu, S., 2011, Mass Sensitive Biosensors: Principles and Applications in Food, in *Biosensors in Food Processing, Safety, and Quality Control*, Mehmet Mutlu, editor, Taylor and Francis, Boca Raton, 71-88.
- O'Sullivan, C.K., ve Guilbault, G.G., 1999, Commercial Quartz Crystal Microbalances – Theory and Applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 14, 663-70.
- Ozansoy, B., 2007, Biyosensör Olarak Kullanılacak Kuartz Kristal Yüzeylerin Plazma Polimerizasyonu ile Hazırlanması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Pawlowski, K.J., Belvin, H.L., Raney, D.L., Su, J., Harrison, J.S. and Siochi, E.J., 2003. Electrospinning of a Micro-Air Vehicle Wing Skin, *Polymer*, 44, 1309-14.
- Ramakrishna, S., Kazutoshi., F., Wee-Eong, T., Teik-Cheng, L., Zuwei, M., 2005, An Introduction to Electrospinning and Nanofibers, World Scientific Publishing Company, Singapore.
- Rangkupan, R., 2002, Electrospinning Process of Polymer Melts, Doktora Tezi, The Graduate Faculty Of The University Of Akron.
- Ratner, B.D., 1996, Surface Diagnostics of Plasma-Treated Materials, *Plasma Processing of Polymers*. R. d. Agostino, P. Favia and F. Fracassi. Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 211-20.
- Reneker, D.H , Yarin, A.L., Koombhongse, S. ve Fong, H., 2000, Bending Instability of Electrical Charged Liquid Jets of Polymer Solutions in Electrospinning., *Journal of Applied Physics*, 87-9 ,4531-47.
- Reneker, D.H. ve Chun, I., 1996, Nanometre Diameter Fibres of Polymer Produced by Electrospinning, *Nanotechnology* 7, 216-23.
- Rivas, B.L., Schiappacasse, L.N., 2003, Poly(acrylic acid-co-vinylsulfonic acid): synthesis, characterization, and properties as polychelatogen, *J. Appl. Polym. Sci.*, 88, 7, 1698-704.
- Rodoplu, D., 2011, İmmünosensör Uygulamaları için Elektroeğirme Yöntemi Kullanılarak Polimer Kaplamalı Kuvars Kristal Mikrobals (QCM) Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Rutledge, G.C. ve Fridrikh, S.V., 2007, Formation of Fibers by Electrospinning, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 1384-1391
- Sanders, E.H., 2005, *Electrostatic Processing of Polymers and Polymer Composites*, Doktora Tezi, Virginia Commonwealth University.
- Schrader, B., Ed., 1995, *Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications*. New York, VCH Publishers. Inc.
- Shin, Y.M., Hohman, M.M., Brenner, M.P. ve Rutledge, G.C., 2001, Experimental Characterization of Electrospinning: The Electrically Forced Jet and Instabilities, *Polymer*, 42, 9955-67.
- Skadal P., 2003, Piezoelectric Quartz Crystal Sensors Applied for Bioanalytical Assays and Characterization of Affinity Interactions, *J. Braz. Chem. Soc.*, 14, 4, 491-502.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A., 1998, *Principles of Instrumental Analysis* (5th ed.), Brooks/Cole Publishing Company ISBN 0-495-01201-7, 1039p.
- Son, W.K., Youk, J.H., Lee, T.,S. ve Park, W.H., 2005, Effect of pH on Electrospinning of Poly(Vinyl Alcohol), *Materials Letters* ,59, 1571–75.
- Stuart, B., 2004, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Weinheim Germany, Wiley.
- Subbiah, T., Bhat, G.S., Tock, R.W., Parameswaran, S. and Ramkumar, S.S., 2005, Electrospinning of Nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science*, 96, 557-69.
- Süslü, A., Özdemir, M., Tekmen, Ç., Çelik, E., Cöcen, Ü., 2009, Gümüş Katkılı TiO₂ Nanofiberlerin Elektro-Eğirme Yöntemi ile Üretilmesi ve Karakterizasyonu, *Anadolu University Journal of Science and Technology*, Vol.10, No:1, 277-84.
- Şir, N., 2009, *Plazma Polimerizasyonu Tekniği ile Desenlenmiş Polimerik Membran Yüzeylerde İletkenlik ve Biyomolekül Tutuklama Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Tabrizi, A.P.F., 2005, Altın Nanopartikül Üretimi ve Kuartz Kristal Mikrobalsan Sisteminde Kullanımı, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 72s.
- Tan, E.P.S., ve Lim, C.T., 2006, Mechanical Characterization of Nanofibers – A Review, *Composites Science and Technology*, 1102-11.
- Tan, S-H., Inai, R., Kotaki, M., Ramakrishna, S., 2005, Systematic Parameter Study for Ultra-Fine Fiber Fabrication via Electrospinning Process, *Polymer*, 46, 6128–34.
- Taylor, G.I., 1969, *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, 313, 453.

- Thompson, C.J., Chase, G.G., Yarin, A.L., Reneker, D.H., 2007, Effects of Parameters on Nanofiber Diameter Determined from Electrospinning Model, *Polymer*, 48, 6913-22.
- Tusek, L., M. Nitschke, ve ark., 2001, Surface Characterisation of NH₃ Plasma Treated Polyamide 6 Foils, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 195: 81-95.
- Xu, Jing-Juan, Zhao, W., Luo, Xi-Liang, Chen, Hong-Yuan, 2005, A Sensitive Biosensor for Lactate Based on Layer-By-Layer Assembling MnO₂ Nanoparticles and Lactate Oxidase on Ion-Sensitive Field-Effect Transistors, *Chem. Commun.*, 792-94.
- Yang, C., Jia, Z., Xu, Z., Wang, K., Guan, Z., Wang, L., 2009, Comparisons of Fibers Properties between Vertical and Horizontal Type Electrospinning Systems, *Annual Report Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena*, 204-07.
- Yasuda, H. ve Y. Iriyama, 1989, Plasma Polymerization, Pergamon Press plc, *Comprehensive Polymer Science*. 4: 357-75.
- Yasuda, H., 1976, Plasma for Modification of Polymers, *Journal of Macromolecular Science*, Part A 10(3): 383-420.
- Yasuda, H., 1984, Plasma Polymerization for Protective Coatings and Composite Membranes, *Journal of Membrane Science*, 18, 273-284.
- Yasuda, H., 1985, Plasma Polymerization, Institute for Film Processing Material, University of Missouri Rulla Academic Press nc., 344-55.
- Yıldız, A. ve Genç, Ö., 1993, Enstrümental Analiz Teknikleri, H. Ü. yayınları A-46, Ankara, 480s.
- Zarkoob, S., Eby, R. K., Reneker, D. H., Hudson, S. D., Ertley, D. and Adams, W. W., 2004, Structure and Morphology of Electrospun Silk Nanofibers, *Polymer*, 45, 3973-77.
- Zeng, J., Xu, X., Hen, X., Liang, Q., Bian, X., Yang, L., Jing, X., 2003, Biodegradable Electrospun Nanofibers for Drug Delivery, *J. Control. Release* 92, 227-231.
- Zhao, S. L., Wu, X. H., Wang, L. G., Huang, Y., 2004, Electrospinning of Ethyl-Cyanoethyl Cellulose/Tetrahydrofuran Solutions, *J Appl. Polym. Sci.* 91, pp. 242-46.
- Zhong, X. H., Kim, K. S., Fang, D. F., Ran, S. F., Hsiao, B. S., Chu, B., 2002, Structure and Process Relationship of Electrospun Bioabsorbable Nanofiber Membranes, *Polymer* 43, pp. 4403-12.
- Zuo, W., Zhu, M., Yang, W., Yu, H., Chen, Y. and Zhang, Y., 2005, Experimental Study on Relationship Between Jet Instability and Formation of Beaded Fibers During Electrospinning, *Polymer Engineering Science*, 45, 704-09.

7 ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nurşen ZİĞAL

Doğum Yeri : Rize

Doğum Yılı : 1985

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lisans 2004-2009 Hacettepe Üniversitesi Gıda Müh. Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce