

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

p53 GENİNİN NOKTA MUTASYONUNU  
SENTETİK OLİGONÜKLEOTİT  
KULLANARAK TESPİT EDEBİLEN OPTİK  
TABANLI DNA BİYOSENSÖRÜNÜN  
GELİŞTİRİLMESİ

ALİGÜL BÜYÜKAKSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MALZEME BİLİMİ VE MÜHENDİSLİĞİ

GEBZE

2009

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ  
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

p53 GENİNİN NOKTA MUTASYONUNU  
SENTETİK OLİGONÜKLEOTİT  
KULLANARAK TESPİT EDEBİLEN OPTİK  
TABANLI DNA BİYOSENSÖRÜNÜN  
GELİŞTİRİLMESİ

ALİGÜL BÜYÜKAKSOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MALZEME BİLİMİ VE MÜHENDİSLİĞİ

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. AHMET YAVUZ ORAL

EŞ DANIŞMAN: DOÇ. DR. FERRUH ÖZCAN

GEBZE

2009



## YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..15.06..2009 tarih ve ..2009/13.... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 14.07.2009 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Aligül Büyükaksoy'un tez çalışması Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

### JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Ahmet Yavuz Oral

ÜYE

:Doç. Dr. Hasan Aslan

ÜYE

:Doç. Dr. Cihangir Duran

### ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../20... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

**TEZİN BAŞLIĞI:** p53 GENİNİN NOKTA MUTASYONUNU SENTETİK OLİGONÜKLEOTİT KULLANARAK TESPİT EDEBİLEN OPTİK TABANLI DNA BİYOSENSÖRÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ

**YAZAR ADI** : Aligül Büyükaksoy

Bu çalışmada prizma çiftleyici DNA hibritleşmesini doğrudan (etiketsiz) algılamak amacıyla kullanılmıştır. Prizma çiftleyici ince dielektrik filmlerin kırınım indislerini yüksek doğruluk payı ile ölçen bir alettir. Bu da prizma çiftleyiciyi film yüzeyine DNA immobilize olması ya da film yüzeyinde DNA hibritleşmesi sonucu meydana gelen ufak kırınım indisi değişimlerinin algılanması için uygun kılar. SiO<sub>2</sub> – TiO<sub>2</sub> ince filmleri cam altlıklara dalga kılavuzu özelliğine ve DNA immobilize edilebilecek kimyada bir yüzeye sahip bir tabaka oluşturmak amacıyla sol-jel daldırarak kaplama yöntemiyle elde edilmiştir. 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) kaplama yüzeyine uygulanarak tek tabaka oluşması amaçlanmıştır. Daha sonra bu tek tabakanın üzerine çapraz bağlayıcı görevi göreceği olan 1,4 phenylene diisothiocyanate (PDC) uygulanmıştır. PDC bir yanından APTES tabakasında bulunan amin gruplarına diğer yanından prob oligonükleotitlerde bulunan amin gruplarına bağlanarak immobilizasyonu C-N bağları aracılığıyla gerçekleşmesini sağlaması beklenmektedir. Hibritleşme işlemleri 80°C ve 45 °C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Ayrıca analit oligonükleotitlerin içinde bulunduğu çözelti de değiştirilerek etkisi incelenmiştir. Prizma çiftleyici ile prob oligonükleotit immobilizasyonundan önce, prob oligonükleotit immobilizasyonundan sonra ve yüzeye analit uygulanmasından

sonra ölçüm alınmıştır. Bu deneylerle karşılaştırmak amacıyla Flüoresan Mikroskobu ile de görüntüler her deneyden sonra alınmıştır.

## SUMMARY

**THESIS TITLE:** DEVELOPMENT OF AN OPTICAL DNA BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF POINT MUTATIONS IN P53 GENE USING SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES

**AUTHOR:** Aligül Büyükaksoy

In this study, prism coupler is introduced as a label free optical detection method of DNA hybridization. Prism coupler possesses the ability to measure the refractive index of thin dielectric films with high accuracy. This makes it very suitable to measure the minute changes in the refractive index caused by the immobilization and hybridization of oligonucleotides. SiO<sub>2</sub> – TiO<sub>2</sub> thin films were deposited onto glass substrates by a sol-gel method to obtain a layer with a good waveguide property (for proper prism coupler measurement), a suitable surface chemistry (oligonucleotide immobilization), and a porous surface (high surface area to increase the number of available sites for immobilization). The chemical analyses of the films were made with FTIR and the surface morphology of the films were observed with SEM. 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES) was applied to the thin film surface and self assembled monolayers were formed by the bonding of Si atoms available in APTES and hydroxyl groups available on the thin film surface. 1,4 phenylene diisothiocyanate (PDC) was used as a homobifunctional crosslinker to immobilize the probe oligonucleotides on the surface. Amine groups available in the amino – modified probe oligonucleotides and APTES form a covalent bond with the carbon atoms at both ends of the crosslinker PDC. Hybridization procedures are carried out at 80°C (a temperature close to the melting temperature of the oligonucleotide) and at 45°C. Refractive index measurements are taken by using a prism coupler before probe

oligonucleotide immobilization, after probe DNA immobilization and after hybridization. The solution which contained the target oligonucleotides were also switched from water to HEPES buffer solution to observe the difference. The samples were observed with a Fluorescence Microscope to compare with the Prism Coupler Results.

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bana daima yol gösteren ve gerekli tüm imkânları sağlayan hocalarım Doç. Dr. A. Yavuz Oral, Doç. Dr. M. Hasan Aslan ve Doç. Dr. Ferruh Özcan' a, çalışmalarımda emeği geçen arkadaşlarım Zehra Banu Bahşi, Nihat Can Köseoğlu, Kerem Özgür Gündüz ve Sinan Mert Ölmezcan' a ve hayatım boyunca her koşulda bana destek olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. Giriş	1
2. Biyosensör nedir?	3
3. Biyolojik algılama elemanlarına (reseptör) göre biyosensörlerin gruplanması	5
3.1 Reseptör Olarak İmmünoglobülin Kullanılması	5
3.2 Reseptör Olarak Enzim Kullanılması	6
3.3 Reseptör Olarak DNA Kullanılması (DNA'nın Yapısı ve Hibritleşme)	8
4. Çevirgeçlerine (Transducer) Göre Biyosensörlerin Tanımlanması	14
4.1. Elektrokimyasal çevirgeçler	14
4.1.1. Potansiyometrik çevirgeçler	14
4.1.2. Amperometrik çevirgeçler	15
4.2. Akustik çevirgeçler	15
4.3. Optik çevirgeçler	16
5. Biyomolekül İmmobilizasyon Yöntemleri	18
5.1. Adsorpsiyon (Adsorption)	18
5.2. Mikrokapsülleme (Microencapsulation)	19
5.3. Tutuklama	20
5.4. Çapraz bağlanma	20
5.5. Kovalent bağlanma	20
6. p53 Geni ve Bu Gendeki Nokta Mutasyonlarının	21

Algılanmasının Önemi	
7. Prizma Çiftleyici (Prism Coupler)Yardımla DNA Hibritleşmesi ve Nokta Mutasyonu Algılanması	23
7.1. Prizma çiftleyicinin çalışma prensibi	23
7.1.1. Efektif İndis ( $\beta$ )	25
7.2. Prizma çiftleyici ile biyomoleküllerin algılanması	26
8. Deneysel	28
8.1. SiO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub> İnce Filmlerinin Hazırlanması	28
8.2. Oligonükleotitlerin İmmobilizasyonu	30
9. Bulgular ve Tartışma	34
9.1. İnce Filmlerin Karakterizasyonu	34
9.2. Prizma Çiftleyici Yardımıyla Oligonükleotit İmmobilizasyon, Hibritleşme ve Nokta Mutasyonu Algılanması için Yapılan Ölçümler	36
10. Sonuç ve Öneriler	53
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	60

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik asit
Ab	Antikor
Ag	Antijen
Nm	Nanometre
E <sub>0</sub>	Standart Potansiyel
R	Gaz sabiti
F	Faraday sabiti
$\Delta f$	Frekans değişimi
g	Gram
ka	Adsorpsiyon için hız sabiti
kd	Desorpsiyon için hız sabiti
$p_a$	Adsorbe olan molekülün basıncı
$\theta$	Işığın geliş açısı
$v^{(i)}$	Işığın i ortamındaki faz hızı
c	Işığın vakumdaki hızı
$n_p$	Prizmanın kırınım indisi
$\beta$	Efektif indis
APTES	Aminopropyltriethoxysilane
PDC	1,4 phenylene diisothiocyanate
TEOS	Tetraethyl orthosilicate
TBOT	Tetra-n-butyl orthotitanate
PEG	Polietilen glikol
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Bir biyosensörü meydana getiren bölümler	3
Antijen – antikor ilişkisi	5
Enzimlerin reaksiyonlara etkisi	7
Timin – Adenin ve Sitozin – Guanin bağlanması	9
İki eşlenik DNA zincirinin hibritleşmiş durumdaki görüntüleri	10
Klasik bir prizma çiftleyici grafiği	24
Prizma çiftleyiciye giren ışığın kırılması ve daha sonra filme girmesi	26
Prizma çiftleyicinin çalışma prensibi	27
SiO <sub>2</sub> – TiO <sub>2</sub> ince filmlerinin sol-jel yöntemiyle üretilmesi	29
a) SiO <sub>2</sub> – TiO <sub>2</sub> filmlerinin APTES ile kaplanması b) APTES ile kaplanan yüzeyin PDC ile kaplanması	31
2000X büyütmede taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	35
SiO <sub>2</sub> – TiO <sub>2</sub> ince filmlerinin Fourier Dönüşüm Kızılötesi	36

## Spektroskopi grafiği

1 numaralı deney koşullarında A bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri	37
1 numaralı deney koşullarında B bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri	38
1 numaralı deney koşullarında sırasıyla A ve B bölgelerinden alınan flüoresan mikroskobu fotoğrafları.	39
2 numaralı deney koşullarında A bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri	40
2 numaralı deney koşullarında B bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri	41
2 numaralı deney koşullarında sırasıyla A ve B bölgelerinden alınan flüoresan mikroskobu fotoğrafları	42
3 numaralı deney koşullarında A bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri	43
3 numaralı deney koşullarında B bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri	44
3 numaralı deney koşullarında sırasıyla A ve B bölgelerinden alınan flüoresan mikroskobu fotoğrafları	45
4 numaralı deney koşullarında A bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri	46
4 numaralı deney koşullarında B bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri	46

4 numaralı deney koşullarında sırasıyla A ve B bölgelerinden alınan flüoresan mikroskobu fotoğrafları	47
5 numaralı deney koşullarında A bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri	48
5 numaralı deney koşullarında B bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri	49
5 numaralı deney koşullarında sırasıyla A ve B bölgelerinden alınan flüoresan mikroskobu fotoğrafları	50
Her deney koşulu için prob olignükleotit uygulanmasının ardından hedef çözeltinin uygulanması ile A bölgesinde meydana gelen değişim ile B bölgesinde meydana gelen değişimin farkını gösteren grafik	51

## TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Değişik bölgelerdeki kanser oluşumlarında p53 mutasyonuna rastlanma sıklığı	22
Bu çalışmada yapılan deneylerin farklı koşulları	32

# 1. GİRİŞ

Biyosensörler, istenilen analiti biyolojik algılama elemanı ile fizikokimyasal bir çevirgeci (transducer) bir araya getirerek ölçen cihazlara denir. Burada biyolojik algılama elementi genellikle çevirgeç ile temas halindedir. Analit ile biyolojik algılama elementi temas haline geldiğinde biyolojik algılama elementi ile analit belirli etkileşimlerde bulunarak biyolojik algılama elementinde ya da onun bulunduğu ortamda bir değişikliğe yol açar. Bu değişikliği de çevirgeç elektriksel bir sinyale dönüştürür. Burada biyosensörleri diğer sensörlerden farklı kılan özellik, biyosensörün biyolojik algılayıcı elementi kullanarak algılama işlemini gerçekleştirmesidir.

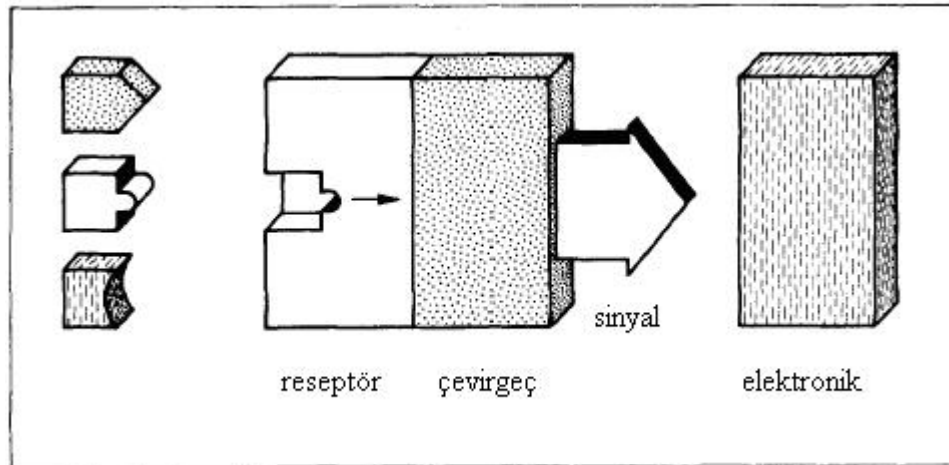
Biyosensörlerde biyolojik algılama elemanı olarak kullanılan doğal ya da sentetik biyomoleküllerin seçiciliğinin oldukça yüksek olması, biyosensörlerin taşınabilir boyutlara getirilme potansiyelinin bulunması, hızlı sonuç verebilmesi, güvenilirliği, gerçek zamanlı ölçüm olanağı bulunması biyosensörlerin önemini ortaya koyar. Biyosensörlerin bu potansiyeli son yıllarda biyosensörler üzerine yapılan yayın sayısının ve biyosensör pazarının dramatik büyümesini getirmiştir. Biyosensör alanındaki araştırmalar biyosensör teknolojisinin tıp, tarım, gıda ve askeri gibi alanlarda tercih edilen teknoloji haline gelmeye başlamasını sağlamaktadır. Şu anda saatler, hatta günler alan ölçüm sürelerinin düşürülmesi, ölçümlerde doğruluk payı ve hassasiyetin artması ile ölçüm maliyetlerinin düşürülmesi bu alanlarda daha birçok ilerlemeyi doğuracak ve dolayısıyla insanların yaşam kalitesini olumlu yönde değiştirecektir.

Prizma çiftleyici, ince dielektrik filmlerin kırınım indislerini yüksek hassasiyetle ölçme yetisine sahip bir cihazdır. Bu çalışmada prizma çiftleyici optik çevirgeç olarak kullanılmış ve p53 genine özel sentetik DNA hibritleşmesi ve nokta mutasyonlarının algılanma deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler prizma çiftleyicinin DNA biyosensörlerinde çevirgeç olarak kullanılabilme potansiyelini gösterecektir.

Son derece ucuz, basit ve de yüksek kimyasal homojenlik imkanı sağlayan sol-jel daldırma yöntemiyle elde edilen SiO<sub>2</sub>- TiO<sub>2</sub> ince filmleri, sol-jel yöntemiyle prizma çiftleyicide kullanılabilcek bir dalga kılavuzu elde edilmesi konusunda yeni bir çalışmadır. Bu filmlerin aynı zamanda kovalent DNA bağlanması için uygun kimyaya sahip yüzeyler barındırmaları beklenmektedir.

## 2. BİYOSENSÖR NEDİR?

Seçici biyolojik eleman (reseptör) ile fizikokimyasal çevirgeç (transducer) birimini birleştirerek ölçüm yapan sensör sistemleri “biyosensörler” olarak adlandırılır (Şekil 2.1). Başka bir deyişle, biyosensörler biyolojik bir tepkiyi elektriksel sinyale dönüştüren aletlerdir [Thomas, 1988.]. Biyolojik algılama elemanları olarak kullanılan biyomoleküllerin birbirleri arasındaki etkileşimlerin seçiciliği biyosensörlerin temelini oluşturur. Bir enzimin yalnız spesifik bir substrat ile reaksiyona girmesi, DNA tek zincirlerinin yalnız kendisinin tamamlayıcı olan zincir ile çiftleşmesi bu seçiciliğe bazı örneklerdir. Biyolojik algılama elemanı olarak antikor, nükleik asit, doku, organel, hücre reseptörü ve enzim gibi biyomoleküller kullanılabilir.



Şekil 2.1. Bir biyosensörü meydana getiren bölümler.

Çevirgeçler, reseptörün analit ile etkileşimini ölçerek bunu elektriksel sinyale dönüştüren elemanlardır. Bu dönüşüm genelde elektrokimyasal, elektriksel, termal, manyetik, akustik veya optik yöntemlerle yapılır [Scheller and Schubert, 1992; Rogers et. al., 1995]. Çevirgeçlerin algılama limitinin düşük olması, sinyal – gürültü

oranının yüksek olması, hassasiyetinin yüksek olması ve doğruluk payının yüksek olması beklenir.

Biyosensörler yıllık %60 lık bir büyüme oranıyla çok hızlı genişleyen bir araştırma alanıdır [<http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html>]. Bu genişleme, biyosensörlerin hassas, doğru, çabuk ve kolay bir biçimde ölçüm yapabilme yetilerinden dolayı tıp (genetik hastalık belirlenmesi vb.), gıda ürünlerinin kontrolü, çevresel kontrol (su kaynaklarının test edilmesi) ve askeri amaçlar için kullanılma potansiyeline sahip olmasından kaynaklanmaktadır [Lawrence and Geddes, 1997].

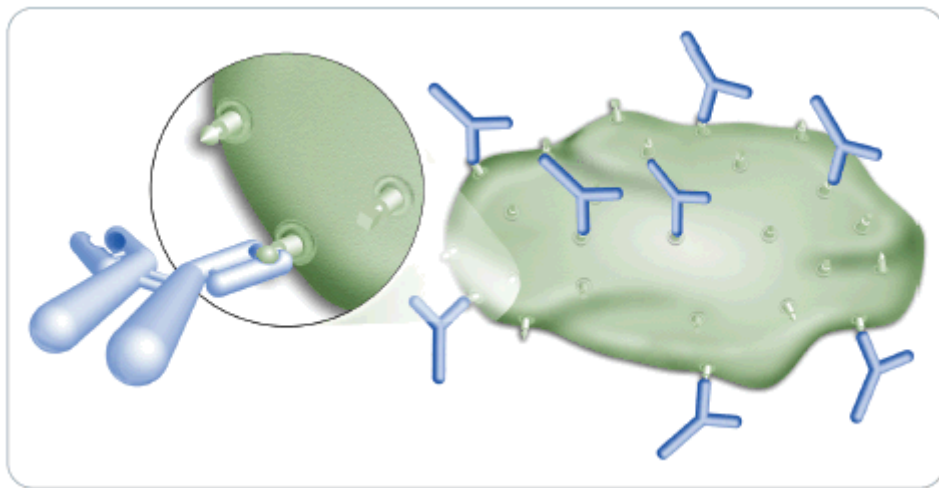
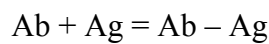
### 3. BİYOLOJİK ALGILAMA ELEMENTLERİNE (RESEPTÖR) GÖRE BİYOSENSÖRLERİN TANIMLANMASI

Biyosensör uygulamalarında reseptör olarak immünoglobülin, enzim ve DNA en sık kullanılan biyomoleküllerdir.

#### 3.1. Reseptör olarak immünoglobülin kullanılması

Reseptör olarak immünoglobülin (antikor – antijen ilişkisi) kullanan sensorler imünosensörler olarak da adlandırılırlar. İmünosensörler antikorların analite bağlanmalarının algılanması esasına dayanır [Liu and Saltman, 1996].

Aşağıdaki denklemlerle tanımlanabilecek antikor – antijen (analit) kompleksi şematik olarak Şekil 2’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Antijen – antikor ilişkisi

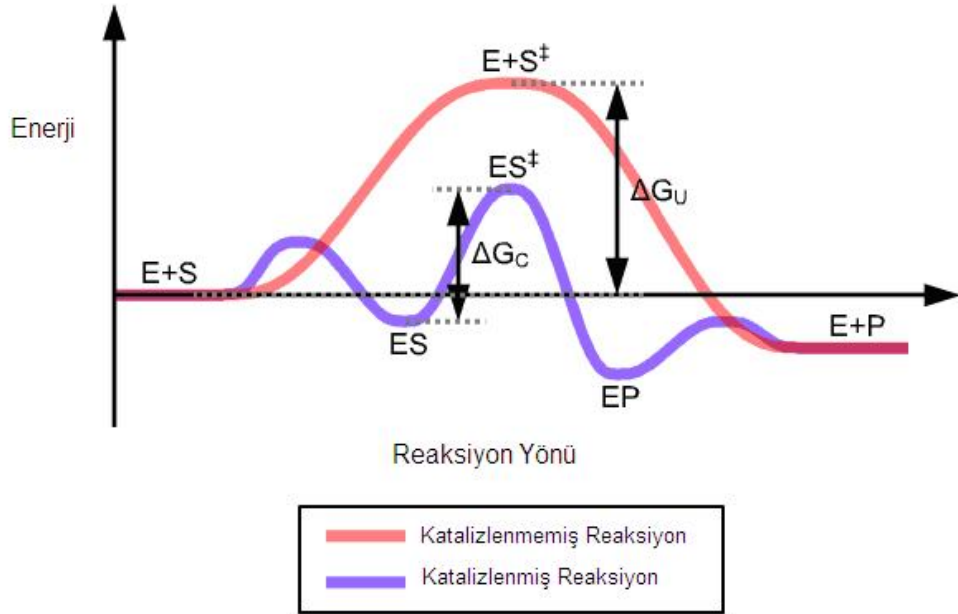
Afinite sabiti,  $K = [Ag - Ab] / [Ag][Ab]$  genellikle  $10^6 \text{ mol}^{-1}$  civarındadır. Sabit antikor konsantrasyonunda ve denge koşullarında, serbest antijenin bağlanmış antijene oranı toplam ligand miktarına bağlıdır. Belirli bir miktarda Ag, belirli olmayan bir miktarda Ab içeren bir ortama verildiğinde Ab miktarı belirlenebilir. Bilinmeyen Ab konsantrasyonu etiketlenmiş antikor ya da antijenler yardımıyla bulunabilir [Villem et. al., 1988; Brett, 2005]. Antikor – Antijen etkileşimleri hemen hemen her türlü çevirgeçle kullanılabilir. Bu etkileşimlerin kullanılmasının avantajları şunlardır:

- Çok yüksek seçicilik gösterirler
- Birbirleriyle çok güçlü bağlar yaparlar
- Yüksek hassasiyette ölçüm yapılabilir

### 3.2 Reseptör olarak enzim kullanılması

Enzimler biyokimyasal reaksiyonları katalize eden biyomoleküllerdir. Enzimatik reaksiyonlarda başlangıçtaki moleküllere “substrat” denir. Enzimler bu molekülleri “ürünler” farklı moleküllere dönüştürür. Enzimler yüksek seçiciliğe sahip biyokatalizörlerdir. Genellikle bir enzim bir reaksiyonu katalize eder.

Enzimlerin katalizleme prensibi, kimyasal reaksiyonların katalizlenmesiyle benzerdir. Enzimler alternatif bir reaksiyon yolu belirler ve ara ürünleri stabilize ederek reaksiyonun oluşması için gerekli olan aktivasyon enerjisini ( $E_a$  ya da  $\Delta G^\ddagger$ ) düşürür. Aktivasyon enerjisindeki düşüş yeterli aktivasyon enerjisine sahip olan molekül sayısını artırır.



Şekil 3.2. Enzimlerin reaksiyonlara etkisi

Enzimlerin reaksiyonları katalizleme mekanizması substratların, enzimlerin aktif bölgelerine bağlanmasına dayanır. Enzim ve substrat bağlanmasından sonra ürün oluşur ve oluşan ürün enzim yüzeyinden ayrılarak geriye başka bir reaksiyonda kullanılacak olan yeni bir enzim bırakır.

Enzimlerdeki aktif bölgelerin kendilerine özel, tek bir substratı tamamlayan şekilleri vardır. Bu da enzimlere seçicilik kazandırır. Enzim – substrat ilişkileri hakkında iki ana teori bulunmaktadır. Bunlardan ilki anahtar – kilit (lock and key model) teorisidir. Bu teoriye göre yalnızca birebir tamamlayıcı olan substrat ve enzimler bağlanabilir, şekil değişmesi görülmez. Diğer bir teori de enzim – substrat ilişkisinde substratın enzimin son şekline bir etkisi olduğu, yani enzimin kısmen şekil değiştirebilir olduğunu öne sürer (induced fit theory) [Kuchel and Raltson, 1997; Devlin, 2006].

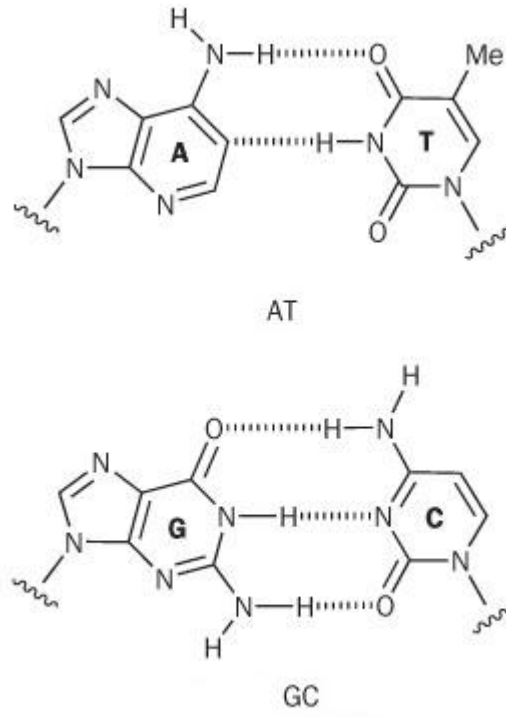
### 3.3. Reseptör olarak DNA kullanılması

Hücresinin kromozomu (genom) nükleik asit ve histon olarak bilinen pozitif yüklü bir proteinden oluşur. DNA, bir eksen ve birbiri etrafına sarılan çift iplikçikten oluşan bir yapıya sahiptir. DNA'yı oluşturan çift sarmalın her bir sırası nükleotid birimlerinin peş peşe dizilmesi ile polinükleotid oluşur. Her nükleotid üç kısımdan oluşur:

- I. Kapalı halka yapısındaki pürin veya pirimidin bazları
- II. Deoksiriboz olarak adlandırılan 5 karbonlu pentoz şekeri
- III. Fosfat molekülü (fosforik asit,  $H_3PO_4$ )

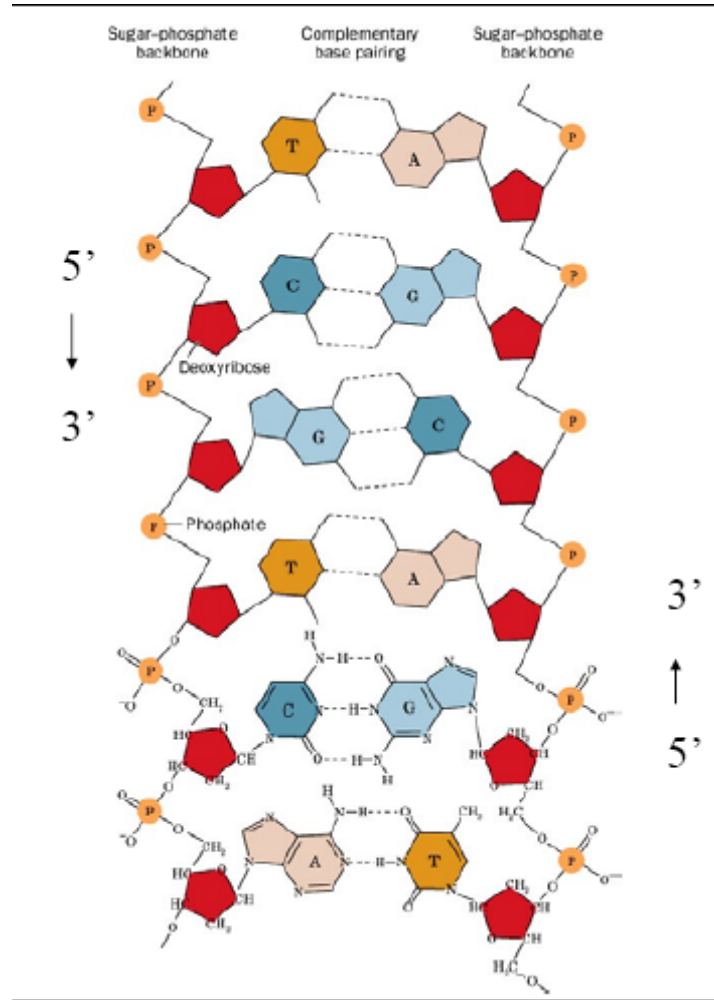
Bu yapı pentoz şekeri ile baz arasında glikozidik bağ ve pentoz file fosfat arasındaki fosfodiester bağı oluşmasıyla meydana gelir. Tüm hücrelerin DNA ları birbirinin tamamlayıcısı olan 2 nükleotid zincirinin oluşturduğu bir helikal yapıdan oluşur. Negatif yüklü şeker fosfat zinciri DNA molekülünün dış tarafında bazlar ise heliksin merkezinde yer alır. Diğer taraftan, hidrofilik bazlar DNA'nın iç kısmında yer alır [Dilsiz, 2004; Temizkan 1999; Eggins, 2002].

Pürin bazları Adenin ve Guanin, pirimidin bazları ise Timin ve Sitozin'dir. Bu bazlar şeker molekülünün beşinci karbonuna bağlanır. DNA'yı meydana getiren iki zincirin arasındaki mesafe sabit ve 2 nm'dir. Bu iki zincir hidrojen bağları ile bağlanmıştır. Sabit olan bu aralığa girecek olan baz çiftlerinin de pürin-pirimidin şeklinde olması gerekir. Bu eşleşme bazların büyüklüğü, şekli ve kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. Pürin – pirimidin eşleşmesinde ise Guanin Sitozin ile Adenin Timin ile eşleşir. Yani bir baz dizilimindeki Adenin sayısı Timin sayısına, Guanin sayısı da Sitozin sayısına eşittir. Adenin Timin ile iki hidrojen bağı, Guanin de Sitozin ile üç hidrojen bağı yapar. DNA'nın genetik bilgiyi taşıma özelliği baz dizilimiyle yakından ilgilidir [Dilsiz, 2004].



Şekil 3.3. Timin – Adenin ve Sitozin – Guanin bağlanması

Fosfat grubu kendi zincirinde bulunan pentoz grubunun 5' pozisyonundaki karbon atomuna ve ardışık pentoz grubunun 3' pozisyonundaki karbon atomuna bağlanır ve zincirin iskeletini oluşturur. Böylece bağlantı yönü 5' → 3' olur.



Şekil 3.4. İki eşlenik DNA zincirinin hibritleşmiş durumdaki görüntüleri

Hibritleşme reaksiyonunun kinetiği ikinci mertebe hız denklemi (second order rate equation) ile ifade edilir. Hibritleşme kararlılığı ve verimliliği ortam sıcaklığına, baz çifti uyumsuzluğu sayısına, iyonik güce, rastgele adsorpsiyona ve kütle taşımına bağlıdır [Eggins, 2002].

Hibritleşme sırasındaki en önemli parametre sıcaklıktır. Hibridizasyon sıcaklığı her zaman söz konusu oligonukleotitlerin ergime sıcaklığı ile kıyaslanarak ele alınır. Oligonukleotitlerin ergime sıcaklıkları, denge durumunun olduğu ve tek sarmal oligonukleotitlerin %50' sinin hibritleştiği sıcaklıktır. Bir oligonukleotitin ergime sıcaklığı oligonukleotit uzunluğu, baz kompozisyonu ve ortamdaki tuz konsantrasyonuna bağlıdır, aşağıdaki denklemle ifade edilir [Dilsiz, 2004; Temizkan 1999].

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log[Na^+]) + 0.41(\%G+C) - 600/L$$

Bu formülde (%G+C) guanin ve sitozin baz çiftinin miktarları, L ise baz çiftlerinin uzunluklarıdır. Guanin – sitozin çifti sayısı arttıkça ergime sıcaklığının artmasının sebebi, guanin – sitozin çiftinin adenin – timin çiftinden bir fazla hidrojen bağı olmasıdır. Her uzunluktaki oligonukleotit için ergime sıcaklığını tespit etmeye yarayan bir formül bulunmamaktadır ve yukarıdaki denklem 14 ile 72 baz uzunluğundaki ve 5 ile 9 arasındaki pH değerine sahip çözeltide bulunan nukleotitler için geçerlidir. Baz çifti uzunluğu arttıkça ergime sıcaklığı uzunluktan daha da bağımsız hale gelir. [Dilsiz, 2004; Temizkan 2004]

İyonik güç (ionic strength) hibritlerin kararlılığını, hibridizasyon hızını ve yüzeye yapışmış olan prob moleküllerinin birbirleri arasındaki etkileşimlerini etkiler. Yüksek iyonik güç, hibritlerin kararlılığını artırır.

Oligonukleotit hibritlerinin ayrışmalarından sonra tekrar bir araya gelmeleri için bazların tekrar eşleniklerinin karşılıklarına gelmeleri ve hidrojen bağları oluşturmaları gerekmektedir. Bazlar tamamen eşlenik olmadıkları zaman da hibritleşme oluşabilir bu da baz çifti uyumsuzluğuna yol açabilir. Bu yeniden birleşme olayının derecesi, bu uyumsuzlukların sayısı ve çeşidine bağlıdır. Yeniden birleşme ile oluşan hibritleşmiş oligonukleotit dizilerinin kararlılığı aşağıdaki etkenlere bağlıdır:

- I. Molekülün orta kısmında oluşan bir uyumsuzluk, kenarlarda oluşacak bir uyumsuzluğa göre daha düşük bir kararlılığa yol açacaktır.
- II. Molekül uzunluğunun bir yüzdesi olarak ifade edilen uyumsuzluk sayısı oluşan çift zincir molekülün kararlılığını etkiler. Birden fazla sayıdaki uyumsuzluklar dağılmışsa, toplanmış haldeki uyumsuzluklardan daha büyük bir kararsızlığa yol açarlar.
- III. Uyumsuzluk meydana getiren bazların çeşitleri de değişik kararlılıklara yol açabilir.

Reseptör olarak oligonukleotit kullanan biyosensörlerin çoğunlukla tek baz uyumsuzluğunu algılayabiliyor olması beklenir. Genel bir kural olarak, prob oligonukleotit uzunluğu azaldıkça tek baz uyumsuzluğunun tespiti veya eşlenik-eşlenik olmayan oligonukleotit ayrımının yapılması kolaylaşır. Hibritleşmiş oligonukleotitlerde birbirinin eşleniği olmayan baz çiftleri bulunuyorsa bunların rastgele etkileşim (nonspecific interaction) sonucu ortaya çıkmış olduğu ve bu tür oluşumların engellenmesi gerektiği söylenebilir. Her %1 lik bir birbirinin eşleniği olmayan baz çifti içeren DNA çift sarmalının ergime sıcaklığı  $1 \pm 0.5$  °C kadar azalır. Birbirinin eşleniği olmayan baz çifti içeren DNA çift sarmalının ergime sıcaklığı aşağıdaki formülle bulunabilir:

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 600/L - (50 \times M/L)$$

Bu formülde  $M$  minimum eşlenik olmayan baz çifti sayısı,  $L$  toplam baz çifti sayısıdır.

Kütle taşınımının hibritleşme verimine etkisi en çok içinde analit oligonukleotitleri bulunduran bir çözelti akışı ile ölçüm yapan biyosensörlerde görülür. Analit oligonukleotitin yüzeye yapışmış halde duran eşleniği ile temas hale gelme olasılığını arttırmak için çözelti akışını arttırmak gerekir. Kütle taşınımı hızı çözeltiyi karıştırma, çalkalama hibritleşmenin meydana geldiği haznenin tasarımını geliştirme, ya da analitin hareketini etkileme ile arttırılabilir. Hibritleşme sırasında yüzeye doğru difüzyon ile beraber yüzey boyunca difüzyon da meydana gelir. Bu yüzden prob oligonukleotit yapışmış olan yüzey alanını arttırmak ya da analit ihtiva eden çözelti hacmini azaltmak analitin yüzeye doğru difüzyonunu arttıracaktır.

Rastgele yüzeye yerleşme (nonspecific adsorption) oranını azaltmak, yüksek sinyal/gürültü elde etmek için gereklidir. Oligonukleotide karşı hassas yüzey iki ayrı yapışma (yerleşme) konumundan meydana gelir. İlki; oligonukleotit ile istenilen bağı yapan probdur. Diğeri de probun etrafındaki alandır. Bu alanda yüzeye istenilen yapışma oluşmaz. Burada meydana gelen yapışma rastgele yapışmadır. Yüzeye rastgele yapışma prob oligonukleotitlerin etrafındaki alanın yapısına, ortamın pH değerine, iyonik gücüne ve sıcaklığa bağlıdır. Biyosensör tasarımlarındaki amaç bu

rastgele yapışmanın olmaması ve prob ile analitin istenilen biçimde birbirine yapışmasıdır [Eggins, 2002].

## 4. ÇEVİRGEÇLERİNE (TRANSDUCER) GÖRE BİYOSENSÖRLERİN GRUPLANMASI

Biyosensör uygulamalarında reseptörün analit ile etkileşimi birçok şekilde ölçülebilir. En sık üç çeşit ölçüm biçimi kullanılır: a) elektrokimyasal b) akustik c) optik.

### 4.1. Elektrokimyasal çevirgeçler

#### 4.1.1. Potansiyometrik çevirgeçler

Potansiyometrik ölçümlerin temel prensibi analit aktivitesinden ( $a_1$ ) yük elde edilmesidir. Bu ilişki Nernst denklemiyle tanımlanır.

$$E = E_0 \pm (RT/nF) \ln a_1$$

Bu formülde  $E_0$ ,  $a_1 = 1 \text{ mol l}^{-1}$  olduğundaki standart potansiyel, R gaz sabiti, F Faraday sabiti, T Kelvin cinsinden sıcaklık, n i iyonundaki toplam yük sayısı ve + ile – işaretleri de sırasıyla katyon ve anyonu belirtir. Genellikle bu tür ölçümlerde inert bir referans elektrodu ve bir çalışan elektrod bulunur. Bu elektrodların her ikisi de numune ile temas halindedir.

İyon seçici membranların kullanılması bu çevirgeçleri birçok iyonla hassas hale getirir.  $H^+$ ,  $F^-$ ,  $I^-$ ,  $Cl^-$  iyonları bunlardan bazılarıdır. Ayrıca  $CO_2$  ve  $NH_3$  gazlarına karşı hassasiyet de seçici membran kullanımı ile mümkündür. Bazı enzim sistemleri bu gaz ve iyonların konsantrasyonunu değiştirdiğinden, bu sistem ile enzim substratlarınınhibitör ya da moderatörleri algılanabilir [<http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/potentiometric.html>].

### 4.1.2. Amperometrik çevirgeçler

Amperometrik biyosensörler genellikle elektrokimyasal olarak aktif olmayan analitleri çalışan elektrot üzerinde okside veya redükte edilebilen ürünler haline katalitik olarak çevirebilen bir enzim sistemine dayanır. Bu elektrot referans elektrota göre belirli bir potansiyelde tutulur. Üretilen akım elektro aktif ürünün konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Elektroaktif ürünün konsantrasyonu da aynı şekilde elektroaktif olmayan enzim substratıyla doğru orantılıdır. Amperometrik biyosensörlerde kullanılan enzimler genellikle oksijen – substrat reaksiyonunu katalizleyen oksidaz enzimleridir [<http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/amperometric.html>].

### 4.2. Akustik çevirgeçler

Piezoelektrik kristallerin osilasyon frekansı kristal yüzeyindeki kütle ile doğru orantılıdır. Bu yüzden piezoelektrik kristaller kütle sensörü olarak kullanılır. Piezoelektrik kristallerin titreşimleri osile eden bir elektrik alanı meydana getirir. Bu elektrik alanda kristalin rezonans frekansı kimyasal yapıya, boyuta, şekle ve kütleyle bağlıdır. Bu kristal osilasyon halindeki bir devreye yerleştirilerek, frekansı kütlelerin bir fonksiyonu olarak belirleyebiliriz. Kütle değişimi, kristalin toplam kütlesine oranla çok küçük olduğunda frekans değişimi aşağıdaki formüle bağlı olur.

$$\Delta f = C f^2 \Delta m / A$$

Bu formülde f kristalin devredeki titreşim frekansı, A elektrotun alanı ve C de kısmen kristal malzeme ve kalınlıkla belirlenen bir sabittir. Piezoelektrik kristaller, genellikle kuartz kristali mikrobalsans olarak adlandırılır (QCM), kuartz kristalinden yapılırlar ve 1 ile 10 MHz arasında çalışırlar. Bu aygıtlar sıvı içinde de 0.1 Hz frekans belirleme limiti, ve  $10^{-10}$  ile  $10^{-11}$  g. arası elektrot yüzeyine yapışan kütle algılama limiti ile çalışabilirler. Bu çevirgeçler biyolojik algılama elementi olarak enzimler ve antikolar ile kullanılmıştır. Piezoelektrik kristallerin DNA

biyosensörleri için kullanımı çalışmaları da sonuçlarını vermeye başlamıştır [Caruso et. al., 1997; Zhou et. al. 2001].

Piezoelektrik malzemelerde, yüzeylerinde farklı elektrot konfigürasyonları kullanılarak farklı tipte dalgalar oluşturulabilir. Yüzey akustik dalgaları ile çalışan aletler yüksek frekanslarda çalışabilirler; bu da ölçümlerin yüksek hassasiyette yüksek hassasiyete yapılmasına olanak sağlar.

Akustik tekniklerin en önemli avantajlarından biri de kimyasalların kristal yüzeye bağlanma reaksiyonlarının gerçek zamanlı ölçülebilmesidir. Ayrıca bu düzenekler ekonomik olarak da nispeten uygun şartlarda temin edilebilir. Bu düzeneklerin kullanımı kalibrasyon gerektirir. Her ayrıca kristal kalibre edilmelidir çünkü bu kristalin frekansı kristal geometrisine ve biyomolekül immobilizasyonu için üzerine yapılan kaplamaya bağlıdır [Minunni et. al., 1995; O'Sullivan et. al., 1999].

### **4.3. Optik çevirgeçler**

Biyosensörlerde flüoresans, fosforesans, polarizasyon, interferans, absorpsiyon, kırınım indisi gibi optik özelliklerdeki değişimler kullanılır. Bu optik metotlardan hangisinin kullanılacağı uygulamaya ve gerekli hassasiyete göre belirlenir. Optik biyosensör formatlarında analit molekülleri direk ya da dolaylı yollardan algılanabilir. Dolaylı yoldan algılamada biyomolekül bir çeşit etiketle işaretlenir ve bu etiketin optik özelliklerde meydana getirdiği değişiklik ölçülür.

Tam yansımali flüoresans (Total Internal Reflection Fluorescence), planar ve fiber optik dalga kılavuzları birçok biyosensör konfigürasyonunda çevirgeç olarak kullanılmıştır. Bu çevirgeçlerde ışık bir dalga kılavuzu boyunca ilerler. Bu ilerleme optik olarak daha yoğun olan ortam ile ona komşu olan optik olarak daha az yoğun olan ortamın yüzeyinde elektromanyetik bir dalga (sönen dalga) oluşmasına sebep olur. Bu dalganın genliği yol aldıkça azalır. Dalga kılavuzunun yüzeyine immobilize edilen biyomoleküller önceden flüoresans özelliğine sahip moleküllerle işaretlenir.

Tam yansıma olduktan sonra meydana gelen sönem dalgası bu molekülleri uyarır ve işaretlenen biyomoleküllerin varlığı belirlenir. Bu konfigürasyonlar katı – sıvı ara yüzeylerinde meydana gelen bağlanma olaylarını tespit etmede kullanışlıdır, çünkü bağlanan ve bağlanmayan moleküllerin ayrılması için gereken yıkama aşamaları bu durumda gerekli değildir [Qian et.al., 2001].

Yüzey Plazmon Rezonansı (Surface Plasmon Resonance) son zamanlarda biyosensörlerde çok sık kullanılmaktadır. Tipik bir Yüzey Plazmon Rezonansı düzeneğinde, gelen ışık prizmanın iç yüzeyinden yansıtılır. Bu prizmanın dış yüzeyi ise ince metal bir filmle kaplıdır. Kritik bir açıda yansıyan ışığın şiddeti dramatik bir şekilde düşer. Bunun nedeni de, bu yansıma sırasında meydana gelen sönem dalgasının metal yüzeyinde osilasyon halinde elektronlarla rezonans yaratmasıdır. Işık şiddetinin dramatik düştüğü kritik açı metal yüzeyindeki malzemenin kırınım indisine bağlıdır [Liu et. al., 2004].

Optik teknikler hızlı, yenilenebilir ve yüksek hassasiyete sahip yöntemlerdir. Fakat bazı durumlarda biyomoleküllerin kimyasal özelliklerini değiştirme ihtimali olan etiketler kullanılmasının gerekmesi bir dezavantajdır [Fan et. al., 2008].

## 5. BİYOMOLEKÜL İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİ

Çalışan bir biyosensör elde edilmesi için biyolojik bileşenin çevirgece uygun bir şekilde bağlanması gerekir. Bu sürece immobilizasyon adı verilir.

### 5.1. Adsorpsiyon (Adsorption)

Adsorpsiyon, fiziksel adsorpsiyon ve kimyasal adsorpsiyon olarak ikiye ayrılır. Fiziksel adsorpsiyon genellikle zayıftır ve Van der Waals bağlarının oluşmasıyla meydana gelir. Kimyasal adsorpsiyon ise çok daha kuvvetlidir ve kovalent bağların oluşumu ile meydana gelir.

Genellikle adsorpsiyonu tanımlamak için Langmuir Adsorpsiyon İzotermi kullanılır. Burada kinetik parametreler ve yüzey kaplanma miktarını göz önüne alınır.

$$\text{Adsorpsiyon hızı} = k_a p_a N(1-\theta)$$

$$\text{Desorpsiyon hızı} = k_d N\theta$$

Denge koşullarında bu iki hız birbirine eşit olduğundan:

$$\theta = K p_a / (1 + K p_a)$$

Burada  $p_a$  adsorbe olan molekülün basıncı,  $k_a$  adsorpsiyon için hız sabiti,  $k_d$  ise desorpsiyon için hız sabitidir. Ayrıca  $K$ ,  $k_a$ 'nın  $k_d$ 'ye bölümüne eşittir [Eggins, 2002; Oura et.al., 2003].

Adsorbe olan moleküller pH değişimlerine, sıcaklığa, iyonik güce ve altlığa karşı çok duyarlıdır. Bu parametrelerdeki çok ufak değişimler dahi adsorpsiyon davranışını önemli derecede etkiler [Eggins, 2002].

## 5.2. Mikroapsülleme (Microencapsulation)

Bu metotta reaksiyona girmeyen (inert) membran biyomolekülleri çevirgecin yüzeyine kısıtılmak için kullanılır. Bu teknik ilk glikoz biyosensörünün geliştirilmesinde kullanılmıştır. Bu yöntemin avantajları şunlardır:

- Biyomolekül ile çevirgeç arasında çok yakın bir birleşme vardır.
- Birçok tasarıma uyarlanabilir ve güvenilir bir yöntemdir.
- Sıcaklık, pH, iyonik güç gibi parametrelerdeki değişimlere karşı kararlıdır.
- Biyomoleküllerin seçiciliğini düşürmez.

Mikroapsülleme işleminde kullanılan membranlar selüloz asetat, polikarbonat, collagen, polytetrafloretillen (Teflon) gibi malzemelerden üretilir [Eggins, 2002; Chang, 1998].

## 5.3. Tutuklama

Bu yaklaşımda immobilize edilecek biyomolekülleri içeren bir çözelti hazırlanır ve bu çözelti polimerik bir jel haline getirilir. Böylece biyomoleküller polimerik bir jel matrisinde hapsolürler. Bunun için en çok kullanılan polimer poliakrilamid'dir. Poliakrilamid jelin oluşturulması N,N' – metilenbisakrilamid'in kopolimerizasyonu ile olur. Bunun dışında jel matris olarak naylon, silika jeller ve iletken polimerler de kullanılabilir [Eggins, 2002; Trevan, 1988]. Bu metodun uygulanmasıyla karşılaşılan problemler şunlardır:

- Jel matris, altlık (çevirgeç) ile biyomolekül arasında büyük bir bariyer oluşturur ve difüzyonu yavaşlatır. Bu da reaksiyon hızını, dolayısıyla sensörün tepki hızını düşürür.
- Bu yöntem enzimler ile kullanıldığında, jelin içindeki porlarda bulunan enzimlerin aktivitesi düşer.

## 5.4. Çapraz bağlanma

Bu yöntemde iki tarafı fonksiyonel olan ajanlar biyomolekülleri katı yüzeylere bağlamak için kullanılır. Bu ajanların bir yanındaki gruplar biyomoleküle bağlanırken, diğer yanı yüzeye bağlanır. Bu yöntemin adsorbe olan enzimlerin kararlılaştırılması için kullanışlı bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır [Eggins, 2002].

## 5.5. Kovalent bağlanma

Bu immobilizasyon yönteminde biyomolekülün biyo-algılama sürecinde kullanılmayacak kimyasal grupları katı yüzeye kovalent bağlar yardımıyla tutturulur. Bu yöntem uzun süre kararlı kalabilecek, dayanıklı bir yapı elde edilmesini sağlar. Biyomoleküllerin orijinal hallerinde bulunmayan, ve biyomoleküllere sonradan eklenen bazı fonksiyonel gruplar kovalent bağlanma amacıyla kullanılabilir. Bunlardan bazıları  $\text{NH}_2$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$  ve  $\text{SH}$  gibi nükleofilik gruplardır [Eggins, 2002; Walsh et. al., 2001; Dugas et.al., 2004].

## 6. p53 GENİNDEKİ NOKTA MUTASYONLARININ ALGILANMASININ ÖNEMİ

Günümüzde kanser oluşumu çok aşamalı bir süreç olarak görülmektedir. Bu çok aşamalı süreç dış kanserojen etkiler ile hücre altı düzeydeki genetik hatalara bağlı olarak ilerler. Onkogenler aktive edildiklerinde hücrelere aşırı büyüme ve bölünme, programlanmış hücre ölümüne karşı dayanıklılık ve diğer doku bölgelerinde buluna bilme gibi özellikler kazandırarak kansere yol açar. Diğer yandan tümör baskılayıcı genler normal hallerinde onkogenlerin tam tersi işlev görürler. Bu genler hücre sayısını hücre yaşam süresini baskılayan ve programlanmış hücre ölümünü düzenleyen proteinler kodlayarak kontrol altında tutar. Bu genler herhangi bir zarar gördüğünde hücre sayısı kontrol altında tutulamaz ve kanser oluşumunda rol oynar.

p53 en önemli tümör baskılayıcı genlerden birisidir. Bir hücre çeşitli stresli uyarılara maruz kaldığında p53 devreye girer ve programlı hücre ölümü ya da büyümeyi durdurarak onarma gibi işlevlerini yerine getirerek hücre sayısını kontrol altında tutar [Levine, 2004].

Bölge ya da doku	Sıklık (%)
Akciğer	50
Bağırsak	50
Yemek borusu	45
Yumurtalık	44
Pankreas	44
Deri	44
Mide	41
Baş ve boyun	37
Mesane	34
Prostat	30
Karaciğer	29
Beyin	25
Adrenal	23
Meme	22
Endometriyum	22
Böbrek	19
Tiroit	13
Kan	12

Tablo 6.1. Değişik bölgelerdeki kanser oluşumlarında p53 mutasyonuna rastlanma sıklığı [Steele et.al., 1998].

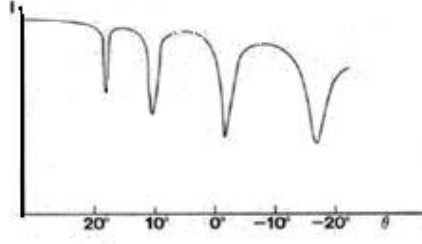
p53 geninde meydana gelen mutasyonlar bu genin düzgün çalışmasına engel olur. Bu da kontrolsüz hücre büyümesi ve hücre ölümünün gerektiği zamanda gerçekleşmemesine sebep olur. Böylece hücre sayısında anormal bir artış gözlenir ve kanser süreci başlamış olur. Tablo 6.1’ de çeşitli kanser türlerinde p53 geninde mutasyon rastlanma sıklığı görülmektedir. Görüldüğü üzere akciğer ve bağırsak kanserlerinin %50’ sinde p53 geninde mutasyon gözlenmiştir [<http://www.metricon.com/basic.htm>].

## 7. PRİZMA ÇİFTLEYİCİ (PRISM COUPLER) YARDIMIYLA DNA İMMOBİLİZASYON VE HİBRİTLEŞMESİNİN ALGILANMASI

### 7.1. Prizma çiftleyicinin çalışma prensibi

Prizma çiftleyici dielektrik bir filmin kırınım indisini ve kalınlığını yüksek hassasiyetle ölçen bir cihazdır. Bir lazer demeti yüksek kırınım indisine sahip bir prizmanın tabanına çarpar ve bir fotodedektöre yansıtılır. Ölçülecek olan film gaz basıncı yardımıyla prizma tabanı ile temas haline getirilir. Bu temas, arada yaklaşık 10 nm (ışığın dalga boyundan düşük bir mesafe) bir boşluk kalacak şekilde gerçekleştirilir. Lazer demetinin geliş açısı,  $\theta$ , dönen bir tabla yardımıyla değiştirilir. Belirli  $\theta$  değerlerinde, fotonlar tam yansıma kurallarını ihlal ederek prizma tabanından filme atlama yapar ve filmde optik ilerleme modlarına girerler. Bu da fotodedektöre gelen foton sayısında, dolayısıyla ışık şiddetinde ani bir düşüşe sebep olur.  $\theta$  açısı gelen ışığın ortamdaki faz hızını belirler [<http://www.metricon.com/basic.htm>].

Bu ortam prizma iken ışığın faz hızı  $v^{(i)} = (c/n_p) \sin \theta$  şeklinde tanımlanır. Işık,  $\theta$  değeri ışığın prizmadaki faz hızı filmin karakteristik modlarından birine eşit olacak şekilde seçildiğinde filme atlar ve optik ilerleme modlarına girer [Ulrich and Torge, 1973]. Fotodedektöre çarpan ışık şiddetinin, ışığın geliş açısına ( $\theta$ ) bağlı olarak bir grafiği çizildiğinde aşağıdaki gibi bir grafik elde edilir.



Şekil 7.1. Klasik bir prizma çiftleyici grafiği.

Belirli bir altlık için, modların açı olarak buldukları yer filmin kırınım indisine ve kalınlığına bağlıdır. Bu yüzden, iki tane mod açısı bulunduğunda film kalınlığı ve kırınım indisi uygun bir bilgisayar algoritması aracılığıyla belirlenebilir. Eğer altlık filminden daha düşük indise sahipse film içinde tam yansıma mümkün olacaktır, görünen modlar filmin dalga kılavuzu özelliğinden dolayıdır. Eğer altlık filminden daha yüksek indise sahipse, film-altlık ara yüzünde tam yansıma ve ışığın düşük kayıpla ilerlemesi söz konusu olmayacaktır. Fakat ışık şiddetindeki düşüşler yine de belirgin olur ve doğru bir şekilde ölçüm yapılmasını sağlar [<http://www.metricon.com/basic.htm>].

Ölçümler sırasında ikiden fazla mod bulunduğunda kalınlık ve kırınım indisi her mod ikilisi için ayrı hesaplanır ve ortalama kırınım indisi ile standart sapma hesaplanabilir. Burada standart sapma kırınım indisinin filmdeki homojenliği hakkında fikir verir. Bunun sebebi de indeks gradyanlı olan filmlerde, mod pozisyonlarında ufak kaymalar görülmesidir.

Prizma çiftleyici ile işlemin yapıldığı dalga boyunda yüksek absorbans göstermeyen veya metalik olmayan herhangi bir filmin ölçümleri yapılabilir. Metalik bir filmin ölçümü sırasında filme geçen ışık, serbest elektronları uyarır ve bu elektronların rahatlamalarından (relaxation) dolayı ortaya çıkacak olan ışık fotodetektöre gelir. Bu da aslında fotodetektöre gelen ışığın şiddetinde bir düşüş olması gereken durumda, şiddeti tekrar artırır ve pik oluşumunu engeller. Ölçümün yapıldığı dalga boyunda yüksek absorbans gösteren filmlerde ışığın ilerleyebileceği bir yol bulması, dolayısıyla mod bulunması zordur. Bu da ışığın filme geçmesini ve dolayısıyla pik bulunmasını zorlaştırır.

### 7.1.1. Efektif İndis ( $\beta$ )

Her mod ışığın prizmanın tabanına çarpma açısıyla tanımlanır.  $\beta$  değeri de prizmanın tabanına herhangi bir  $\theta_1$  açısıyla çarpan ışık için şu şekilde tanımlanır:

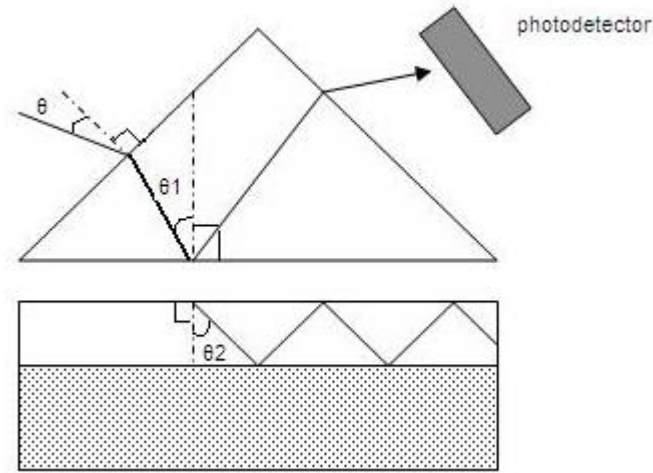
$$\beta(\theta) = n_p \sin(\theta_1)$$

Daha genel olarak herhangi bir ışık ışını için  $\beta$  değeri  $n \sin(\theta)$  olarak tanımlanır. Burada  $n$ , ışığın ilerlediği ortamın kırınım indisi ve  $\theta$ , ışığın başka bir ortama kırılarak geçtiğinde normalle yaptığı açıdır.

Snell Kanunu'na göre;

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2)$$

Bir ışık ışını iki ortamın sınırında kırıldığı zaman, hatta prizma çiftleyici ölçümlerinde fotonlar prizmanın tabanından filmin optik modlarından birine girdiklerinde,  $\beta$  değerleri korunur. Fotonlar bu durumda da bir ortamdan diğerine geçerken kırılıyormuş gibi davranırlar; yani Snell Kanunu'na uyarlar. Snell Kanunu da yukarıda görüldüğü gibi bir ışığın bir ortamdan diğer ortama geçtiğinde efektif indisin değişmeyeceğini söyler.



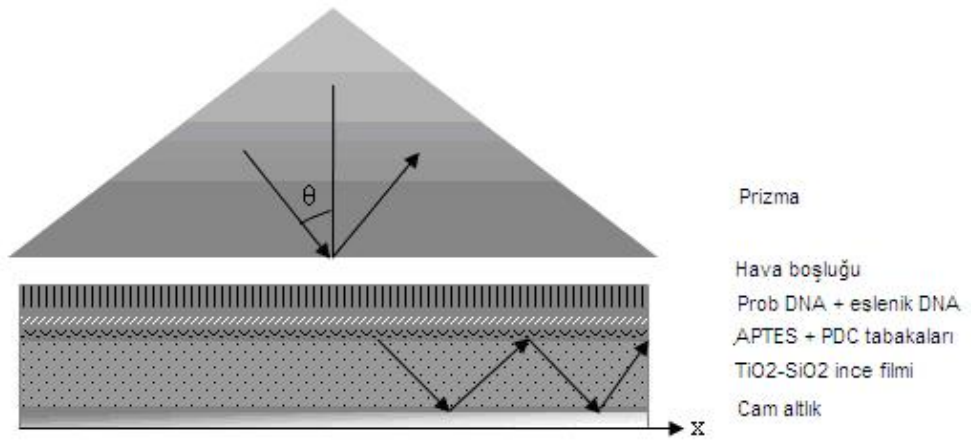
Şekil 7.2. Prizma çiftleyiciye giren ışığın kırılması ve daha sonra filme girmesi

Işık demeti prizma yüzeyine ilk çarptığında ortamın kırınım indisi ( $n_{hava}$ ) ve ışığın prizmayla yaptığı açı bilindiğinden ( $\theta$ ) bir efektif indis hesaplanabilir. Daha sonra ışık kırılarak yeni bir ortama, prizmaya girer. Bu ortam değişikliği sırasında, yukarıda daha önce de belirtildiği gibi, Snell Yasası'na göre efektif indis değişmez. Buna ek olarak, efektif indis ışık prizmadan filme geçtikten sonra da değişmez. Bu da bir mod gözlemlendiğinde filmin herhangi bir  $\theta$  açısındaki efektif indisinin belirlenebilmesini sağlar.

## 7.2. Prizma çiftleyici ile biyomoleküllerin algılanması

Yukarıda da açıklandığı gibi, prizma çiftleyici ince dielektrik filmlerin kırınım indisini ölçer. Bu filmlerin üzerine bir şekilde immobilize edilecek biyomoleküller bu filmin kırınım indisini değiştirecektir. Bu çalışmada da sentetik oligonukleotitlerin sol-jel yöntemi ile elde edilmiş  $TiO_2-SiO_2$  ince filmleri üzerine kovalent immobilizasyonu ve eşlenikleri ile hibridizasyonu sonucundaki kırınım indisi değişiklikleri araştırılmıştır (Şekil 7.3.).

Buna benzer bir çalışma daha önce Rong ve ark. ile De Tomassi ve ark. tarafından yapılmıştır [Rong et. al. 2006; De Tomassi et. al., 2006]. Fakat bu çalışmalarda dalga kılavuzu olarak poroz silikon kullanılmış, dolayısıyla DNA' nın immobilizasyonu için kullanılan yöntemler de farklı olmuştur.



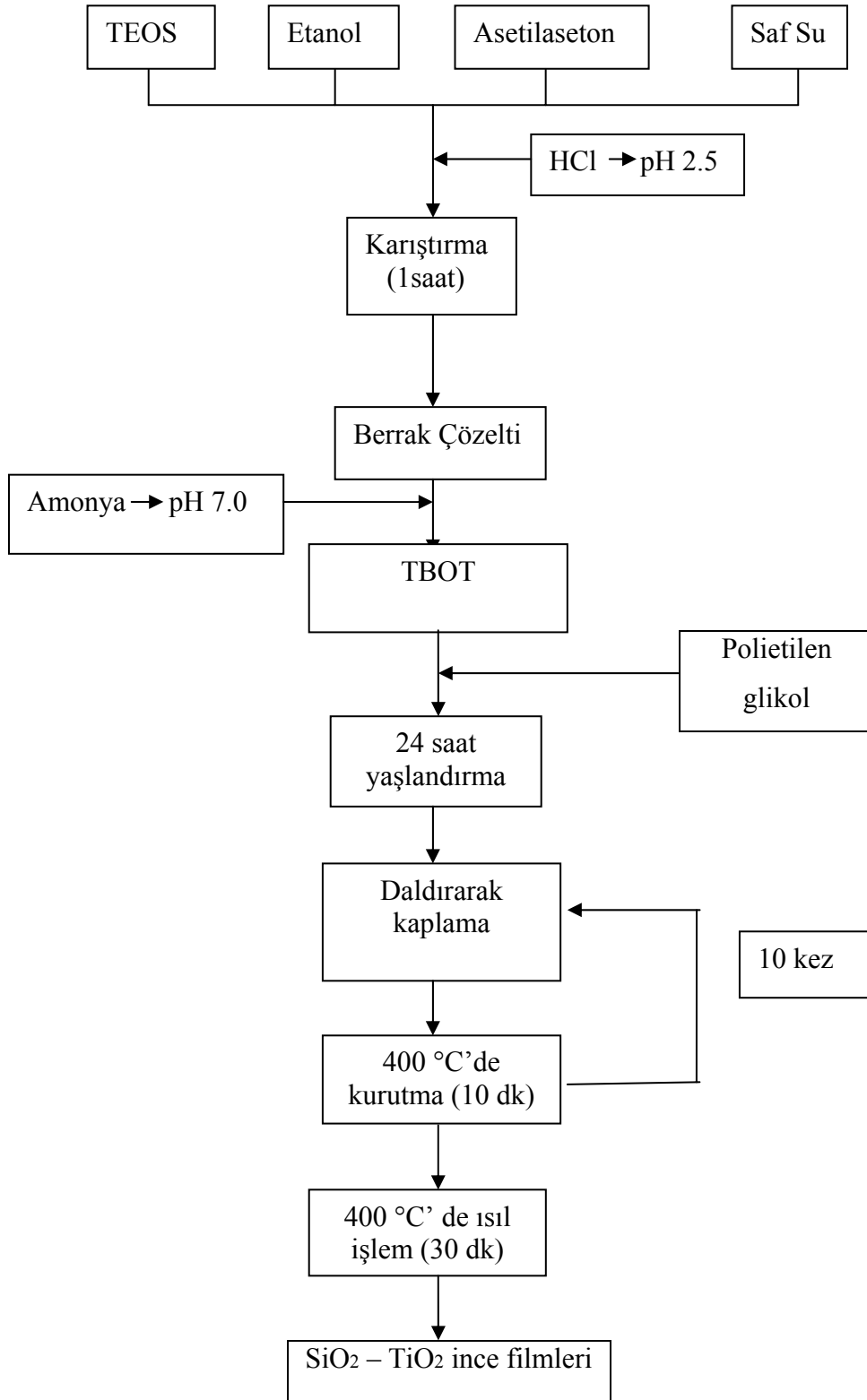
Şekil 7.3. Prizma çiftleyicinin çalışma prensibi

## 8. DENEYSEL

### 8.1. SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> ince filmlerinin hazırlanması

SiO<sub>2</sub> kaynağı olarak TEOS (Tetraethyl orthosilicate, C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>Si), TiO<sub>2</sub> kaynağı olarak TBOT (Tetra-n-butyl orthotitanate, C<sub>16</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>Ti) kullanılmıştır. İlk önce TEOS, etanol, asetil aseton ve iyonlarından arınmış su sırasıyla 1:0.5:1:3 oranında karıştırılmıştır. Daha sonra katalizör olarak hidroklorik asit (HCl) damlalar halinde pH değeri 2.5 oluncaya kadar eklenmiştir. Elde edilen çözelti 1 saat karıştırılarak berrak hale gelmesi beklendikten sonra pH değeri 7.0 civarına gelecek şekilde amonya damlalar halinde eklenmiştir. Ardından TEOS:TBOT 1:1 olacak şekilde TBOT eklenmiştir. Daha sonra polietilen glikol (PEG) homojen por dağılımına sahip bir yüzey elde etmek amacıyla çözeltiye eklenmiştir. Elde edilen çözelti 70 °C de 15 dakika karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığına indirilerek 24 saat yaşlandırılmıştır. Cam altlıklar deterjan ve saf su ile temizlenerek daldırarak kaplama işlemi için hazır hale getirilmiştir. Daha önce elde edilen çözelti 50 mm/dak. çekme hızı ile daldırarak kaplama işlemine tabi tutulmuştur. Her kat kaplama sonrasında numune 400 °C de 10 dakika kurutulmuş ve 10 kat kaplama sonunda yeterli kalınlığa sahip kaplama elde edilmiştir. Daha sonra numune 400 °C sıcaklıkta yarım saat ısıtılma tabi tutulmuştur.

Filmlerin hazırlanış şekli akış şeması halinde aşağıda verilmiştir. Filmlerin kimyasal yapısının Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR, Bio-Rad Tropical Option for FTS 175 C) yöntemiyle belirlenmesi için aynı işlemler sodyum klorür camına kaplanarak incelenmiştir. Bu işlemin yapılmasının sebebi kaplamada mevcut olan Si-O-Si bağları ile camda bulunan Si-O-Si bağlarının ayırt edilebilmesidir. Ayrıca filmlerin yüzey morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope) ile incelenmiştir (SEM, Philips XL 30 SFEG).



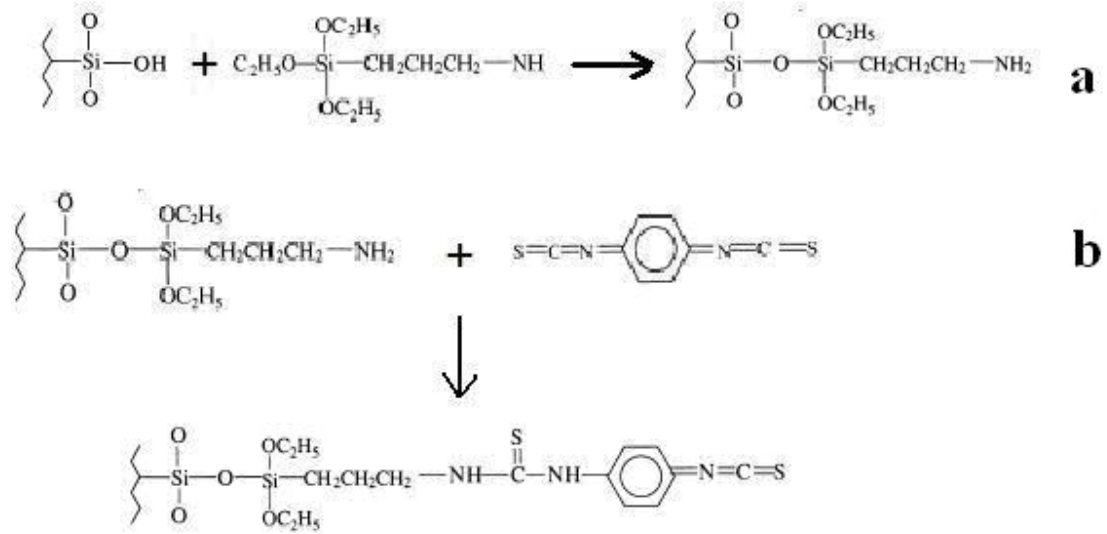
Şekil 8.1. SiO<sub>2</sub> – TiO<sub>2</sub> ince filmlerinin sol-jel yöntemiyle üretilmesi.

Filmlerin hazırlanış şekli akış şeması halinde aşağıda verilmiştir. Filmlerin kimyasal yapısının Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR, Bio–Rad Tropical Option for FTS 175 C) yöntemiyle belirlenmesi için aynı işlemler sodyum klorür camına kaplanarak incelenmiştir. Bu işlemin yapılmasının sebebi kaplamada mevcut olan Si-O-Si bağları ile camda bulunan Si-O-Si bağlarının ayırt edilebilmesidir. Ayrıca filmlerin yüzey morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope) ile incelenmiştir (SEM, Philips XL 30 SFEG).

## 8.2. DNA immobilizasyon ve hibridizasyonu

Elde edilen SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> ince filmlerinin yüzeyleri DNA immobilizasyonu için modifiye edilmişlerdir. İlk önce film yüzeyindeki OH grubu konsantrasyonunu arttırmak amacıyla filmler 15 dakika UV ışık altında bekletilmiştir. Daha sonra filmlerin yüzeyi 20 dakika 2% APTES (3-(Triethoxysilyl)propylamine, C<sub>9</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>Si), deiyonize su ve metanol çözeltisinde (1:1) bekletilerek silan tabakasıyla kaplanmıştır. Bu işlem sonrasında filmler saf su ile yıkanmış ve 100°C’de 10 dakika bekletilerek kurutulmuştur. Daha sonra elden edilen yüzeye 0.2% PDC (1, 4-Phenylene diisothiocyanate, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(NCS)<sub>2</sub>), pyridine dimetil formamid (1:9) bıdı çözeltisi 2 saat süreyle uygulanmıştır. Bu işlemde PDC, ucunda amin grupları bulunan silan yüzeyi ile gene ucunda amin olan prob oligonukleotitlere bağlanarak DNA immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılmıştır ve önerilen yüzey kimyası Şekil 10’ daki gibidir. Bu protokol daha önce başka çalışmalarda cam yüzeyine uygulanmıştır [Festag et. al., 2005; Walsh et. al., 2001]. Bunun için yaklaşık 2 cm X 1 cm boyutlarında A bölgesi ve B bölgesi olmak üzere iki ayrı bölge belirlenmiş, yüzey metanol ve aseton ile yıkanıp nitrojen gazıyla kurutulduktan sonra tampon çözeltiyle yüzey yıkanmıştır. Ardından A ve B bölgeleri ucunda amin grupları bulunan sentetik prob oligonukleotitlere 37 °C de nemli bir ortamda 1 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Bu işlem için oligonukleotitler 20 mikromolarlık sodyum bikarbonat tampon çözeltisinde 25 mikromolarlık bir çözelti oluşturacak şekilde çözülmüşlerdir. Sentetik prob oligonukleotitler p53 genine özeldir ve “Prob 1” olarak adlandırılan prob oligonukeotitin baz dizilimi 5’

TGACGGAGGTTGTGAGGCACTGCCCCCA CCATGAGC 3' iken "Prob 2" olarak adlandırılan tek nokta mutasyonuna uğramış prob oligonukleotit baz dizilimi 5' TGACGGAGGTTGTGAGGCGCTGCCCCACCATGAGC 3' şeklindedir. Eşlenik oligonukleotit baz dizilimi 5' ACTGCCTCCAACACTCCGTGACGGG GTACTCG 3' iken deneylerde kontrol amaçlı kullanılan eşlenik olmayan baz dizilimi BRACHA genine özel olan 5' AGGCAACCAATCAA 3' dizisidir.



Şekil 8.3. a) SiO<sub>2</sub> – TiO<sub>2</sub> filmlerinin APTES ile kaplanması b) APTES ile kaplanan yüzeyin PDC ile kaplanması.

Prob oligonukleotit içeren çözelti yüzeye uygulandıktan sonra nemli bir ortamda 80 °C ve 45 °C sıcaklıklarda hedef oligonukleotitler 2 saat boyunca uygulanmıştır. Yapılan deneyler tablo olarak verilmiştir. Daha sonra prob oligonukleotitlere hibridizasyon için prob oligonukleotitlerin eşleniği olan baz dizisine sahip aynı molaritedeki oligonukleotitler sıcaklıklarda 1 saat süreyle numuneye uygulanmıştır. Eşlenik oligonukleotitlerin yanında kontrol numunesi olarak prob DNA immobilize edilmiş yüzeylere eşlenik olmayan DNA uygulanmıştır. Ayrıca nokta mutasyonlarının algılanması için yalnızca tek noktada mutasyona uğramış prob DNA) yüzeye immobilize edilerek mutasyona uğramamış prob DNA'nın eşleniği ile hibritleşme işlemine tabi tutulur.

Deney numarası		A bölgesi	B bölgesi
<b>1</b>	Uygulanan Prob Oligonükleotit	P1	P1
	Uygulanan Hedef çözelti	Eşlenik (suda çözülmüş)	Su
	Hedef oligonükleotit uygulama sıcaklığı	80 °C	80 °C
<b>2</b>	Uygulanan Prob oligonükleotit	P1	P1
	Uygulanan hedef çözelti	Eşlenik (suda çözülmüş)	Su
	Hedef çözelti uygulama sıcaklığı	45 °C	45 °C
<b>3</b>	Uygulanan Prob oligonükleotit	P1	P1
	Uygulanan hedef çözelti	Eşlenik (pH 7.5 HEPES tampon çözeltisinde çözülmüş)	pH 7.5 HEPES tampon çözeltisi
	Hedef çözelti uygulama sıcaklığı	45 °C	45 °C
<b>4</b>	Uygulanan Prob oligonükleotit	P1	P1

	Uygulanan hedef çözelti	Eşlenik (pH 7.5 HEPES tampon çözeltisinde çözünmüş)	Eşlenik olmayan oligonukleotit (pH 7.5 HEPES)
	Hedef çözelti uygulama sıcaklığı	45 °C	45 °C
<b>5</b>	Uygulanan Prob oligonukleotit	P1	P2
	Uygulanan hedef çözelti	Eşlenik (pH 7.5 HEPES tampon çözeltisinde çözünmüş)	Eşlenik (pH 7.5 HEPES tampon çözeltisinde çözünmüş)
	Hedef çözelti uygulama sıcaklığı	45 °C	45 °C

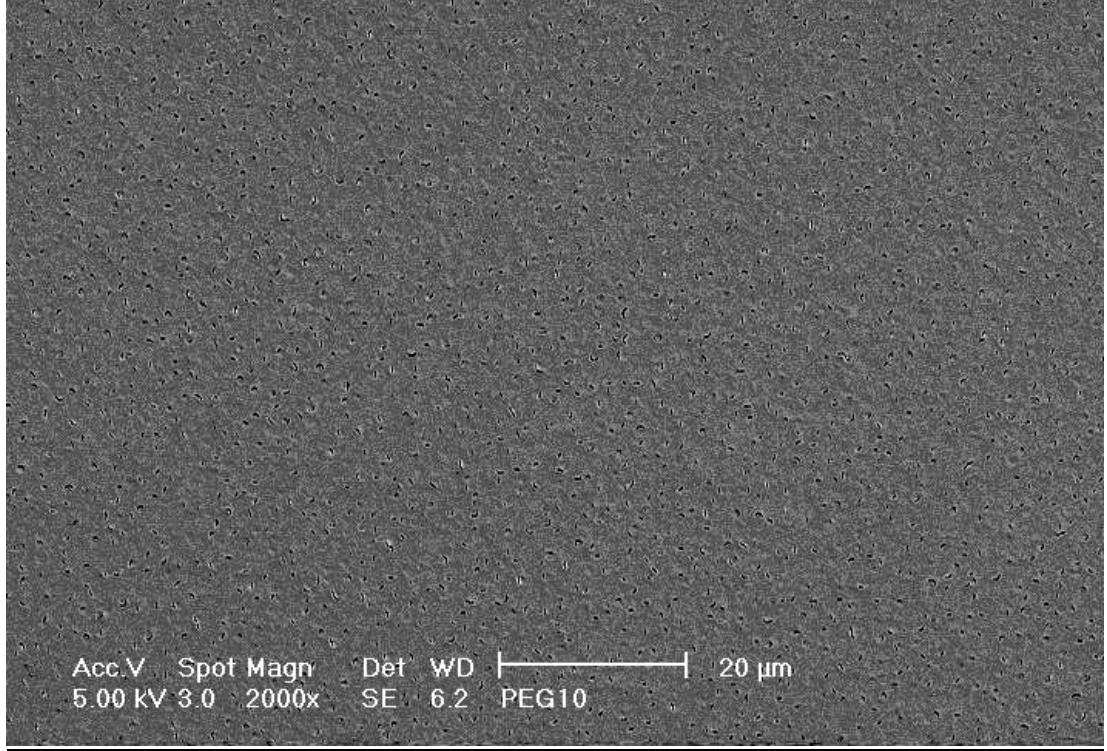
Tablo 8.1. Bu çalışmada yapılan deneylerin farklı koşulları.

Prizma çiftleyici ile kırınım indisi ölçümleri sodyum bikarbonat tampon çözeltisi uygulandıktan önce, tampon çözelti uygulandıktan sonra, prob DNA uygulandıktan sonra ve hibritleşme meydana geldikten yapılmıştır. Ayrıca ölçümlerin doğrulanması için hedef DNA (target DNA) zincirleri uçlarına floresin bağlanmış olarak alınmış ve Flüoresan Mikroskobu ile görüntü alınmıştır.

## 9. BULGULAR ve TARTIŞMA

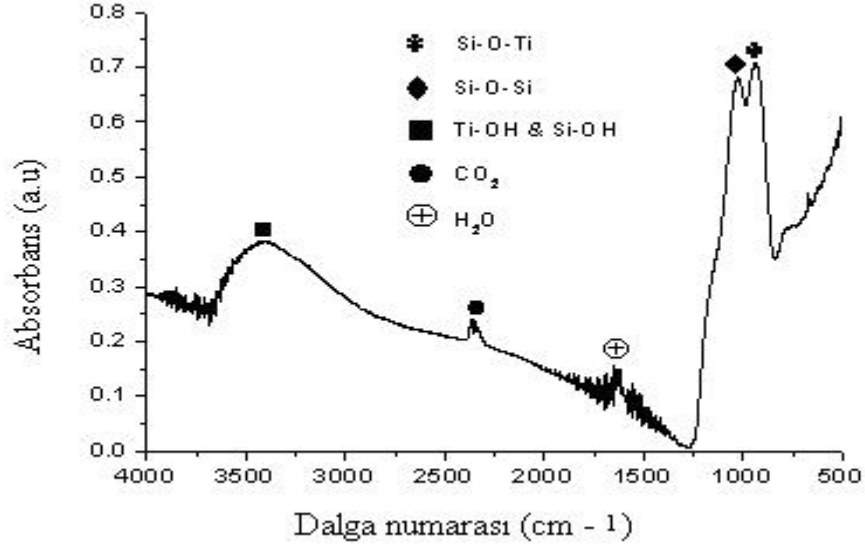
### 9.1. SiO<sub>2</sub> – TiO<sub>2</sub> ince filmlerinin karakterizasyonu

Sol-jel daldırarak kaplama yöntemiyle hazırlanan SiO<sub>2</sub> – TiO<sub>2</sub> ince filmlerinin yüzeyi taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir (Şekil 9.1.). Taramalı elektron mikroskobu görüntülerinde belirgin tane sınırları görülmemekle birlikte pürüzsüz ve homojen dağılıma sahip nanometre seviyesinde gözenekler gözlemlenmektedir. Belirgin tane sınırları olmaması filmin amorf bir yapıya sahip olduğuna bir işarettir. Bu da filmin dalga kılavuzu özelliğine katkı sağlayacak bir durumdur çünkü tane sınırları ışık kaybının yüksek olduğu bölgelerdir. İnce filmlerin üretiminde sol-jel yöntemi kullanılmış olması amorf yapıya sahip bir numune elde edilmesinde kolaylık sağlamıştır. Film yüzeyinde görülen homojen olarak dağılmış nanometre seviyesindeki gözenekler polietilen glikolün düşük sıcaklıklarda yanarak filmde gaz olarak uzaklaşması sonucunda meydana gelmiştir [Kato, 2005]. Guo et. al. sol – jel yöntemiyle üretilmiş TiO<sub>2</sub> filmlerinde poroziteyi polietilen glikol ekleyerek arttırmış ve polietilen glikol ün molekül ağırlığı arttıkça daha büyük porların elde edildiğini bulmuştur [Guo et. al., 2005]. Bu çalışmada ise nanometre seviyesindeki porlar filmin yüzey alanını arttırarak yüzeye daha fazla oligonukleotit bağlanmasına olanak sağlayacaktır.



Şekil 9.1. 2000X büyütmede taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.

SiO<sub>2</sub> – TiO<sub>2</sub> filmlerinin kimyasal analizi Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) ile yapılmıştır (Şekil 9.2.). 940 cm<sup>-1</sup> civarında meydana gelen pik Si-O-Ti bağlarının ve 1030 cm<sup>-1</sup> de Si-O-Si bağlarının titreşiminden meydana gelmiştir [Wang et. al. 2005; Tian et.al., 2007]. 3400 cm<sup>-1</sup> civarındaki geniş bant Ti-OH ve Ti-OH gruplarının varlığından dolayı ortaya çıkmıştır. [Wang et. al., 2005; Song et. al., 2002] Atmosferdeki CO<sub>2</sub> ve su sırasıyla 2350 cm<sup>-1</sup> ve 1620 cm<sup>-1</sup> civarındaki piklerin oluşumuna sebep olmuştur.

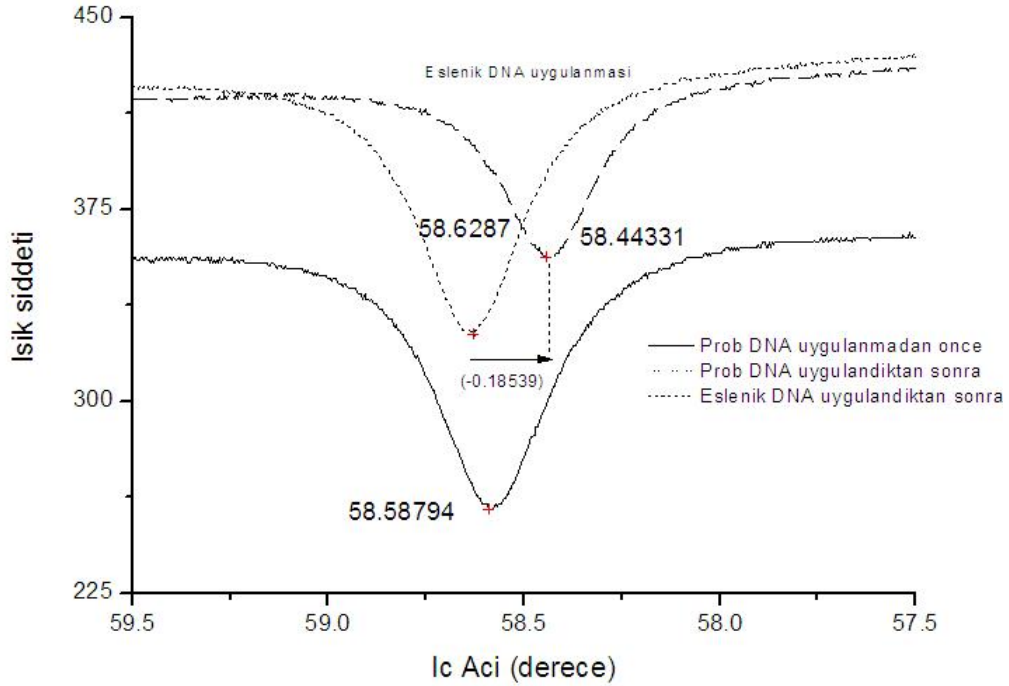


Şekil 9.2. SiO<sub>2</sub> – TiO<sub>2</sub> ince filmlerinin Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopy grafiği.

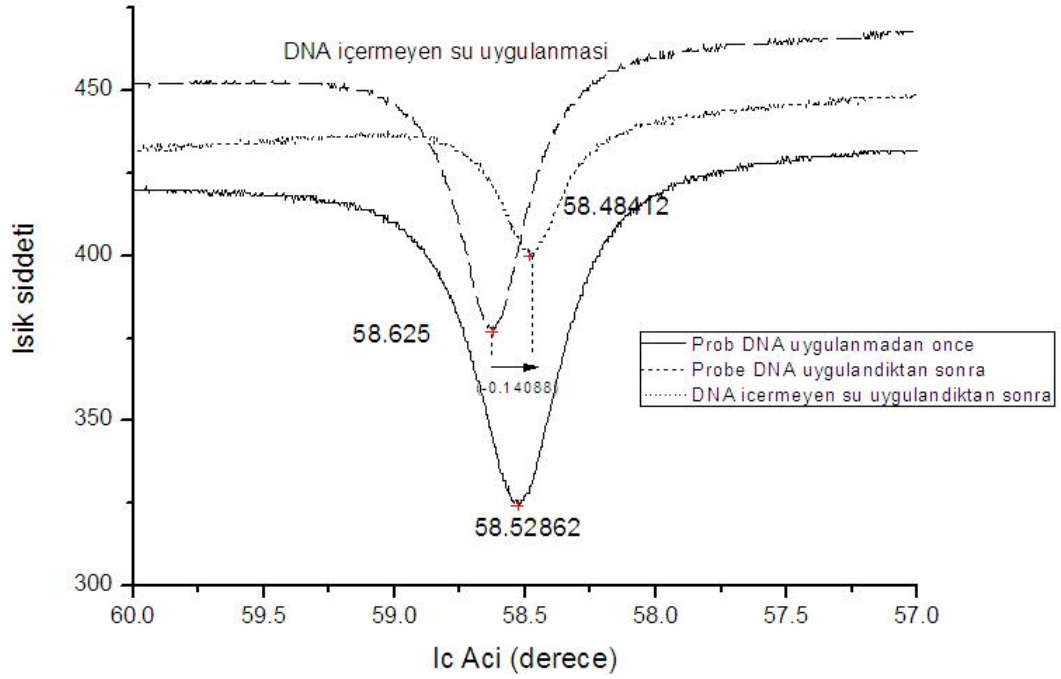
## 9.2. Prizma çiftleyici yardımıyla oligonükleotit immobilizasyon ve hibritleşme ölçümleri

DeneySEL bölümünde “1” olarak adlandırılan deneyde, APTES ve PDC ile modifiye edilmiş yüzey A ve B bölgelerine ayrılmış ve bu bölgeler sodyum bikarbonat tampon çözeltisinde 10 dakika bekletilerek ölçümler alınmıştır. Daha sonra iki bölge de Prob 1 oligonükleotitlerine maruz bırakılmış ve tekrar ölçüm alınmıştır. Ardından A bölgesi Prob 1 oligonükleotitlerinin eşleniği olan suda çözülmüş oligonükleotitlere maruz bırakılmış ve ölçüm alınmıştır. Son işlem ergim noktasına yakın bir sıcaklık olan 80 °C de yapılmıştır.

Prob 1 oligonukleotitleri A bölgesinin yüzeyine uygulanmadan önce alınan ölçümlerde  $58.58794^\circ$  'de bir mod bulunmuş Prob 1 oligonukleotitleri yüzeye uygulandıktan sonra bu değer  $58.6287^\circ$  'ye çıkmıştır. Bu artış, aynı zamanda kırınım indisinde de bir artışı gösterir. Prob 1 oligonukleotitlerinin yüzeye uygulanmasından sonra kırınım indisinde bir artış olmasını kırınım indisi yaklaşık 1.5 olan DNA zincirlerinin yüzeye bağlanmakla beraber içinde kırınım indisi 1 olan hava ihtiva eden porlara girmesi ile açıklayabiliriz. Porlara giren DNA miktarının yüzeye bağlanan DNA miktarından fazla olması, filmleri film – hava kompozit malzemesi olarak düşündüğümüzde, kırınım indisindeki artışı açıklayabilir. Hedef çözeltinin yüzeye uygulanmasının ardından yapılan ölçümde  $58.44331^\circ$  'de pik alınmıştır. Bir önceki ölçümün ardından gözlenen  $0.18539^\circ$  'lik bu düşüş porlarda bulunan prob oligonukleotitlerden çok, yüzeyde immobilize olmuş prob oligonukleotitlerin eşlenikleriyle hibritleşebilmesi olarak yorumlanabilir.

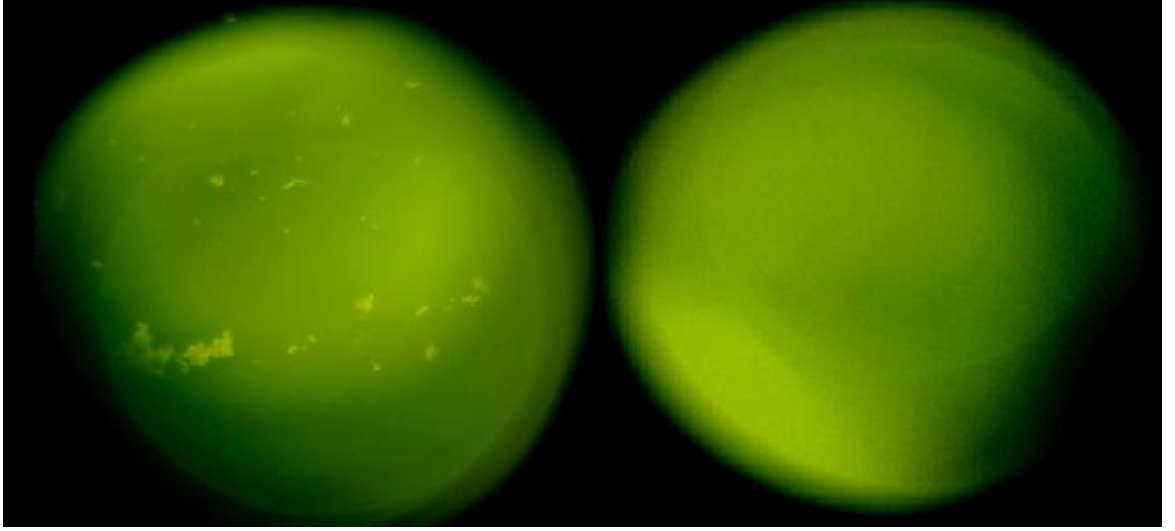


Şekil 9.3. 1 numaralı deney koşullarında A bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri.



Şekil 9.4. 1 numaralı deney koşullarında B bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri.

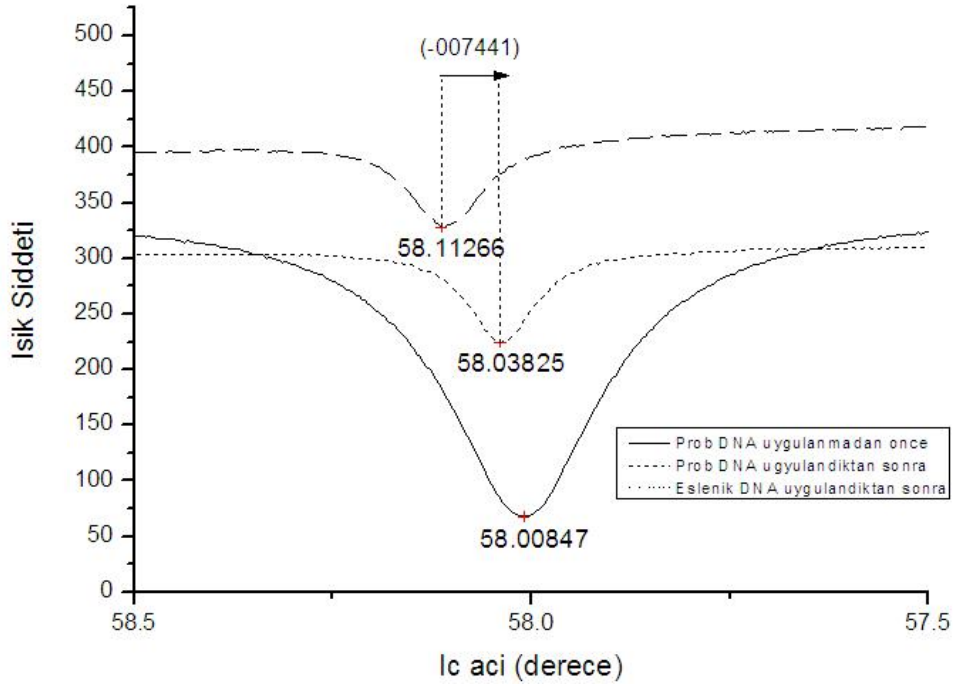
Şekil 9.4 de aynı numunenin B bölgesinden alınan sonuçlar görünmektedir. Bu bölgede de Prob 1 oligonukleotitlerinin yüzeye uygulanmasıyla ışığın filme girdiği açı  $58.52862^\circ$  den  $58.625^\circ$  'ye çıkmıştır. Daha sonra bu değerde yüzeye hedef DNA içermeyen su uygulanmasıyla  $0.14088^\circ$  'lik bir düşüş meydana gelmiştir. A bölgesi ve B bölgesinde yapılan ölçümlerde benzer karakterde değişimler gözlemlenmiştir. Fakat A bölgesine suda çözülmüş eşlenik DNA uygulandıktan sonra meydana gelen düşüş  $0.18539^\circ$  iken, B bölgesine içinde DNA bulunmayan saf su uygulandıktan sonra alınan ölçüm sonucunda  $0.14088^\circ$  'lik bir düşüş meydana gelmiştir. Aradaki  $0.04451^\circ$  'lik fark DNA hibritleşmesine bir işaret olarak görülebilir.



Şekil 9.5. 1 numaralı deney koşullarında sırasıyla A ve B bölgelerinden alınan flüoresan mikroskobu fotoğrafları.

Şekil 9.5 de 1 numaralı deneyin prosedürleri yapıldıktan sonra alınan flüoresan mikroskobu görüntüleri bulunmaktadır. Bu mikroskopta uygun dalga boyundaki ışık hedef oligonukleotitlerin flüoresan etiketlerini uyarır. Yüzeyde hedef oligonukleotitler varsa ışımaya görünür, eğer yoksa arka plan görünür. Bu fotoğrafta sol tarafta eşlenik DNA uygulanan A bölgesinden alınan görüntüde ışımaya yapan dağınık bölgeler gözlenirken B bölgesinden alınan görüntüde bu çeşit bir ışımaya rastlanmamaktadır. Bu görüntüler bu numuneden alınan sonuçlara yapılan yorumları destekler niteliktedir.

2 numaralı deneyde A ve B bölgesine aynı işlemler yalnızca hedef çözeltinin uygulanma sıcaklığı değiştirilerek yapılmıştır. Hedef çözeltinin uygulanma sıcaklığı 80 °C den 45 °C' ye düşürülmüştür.

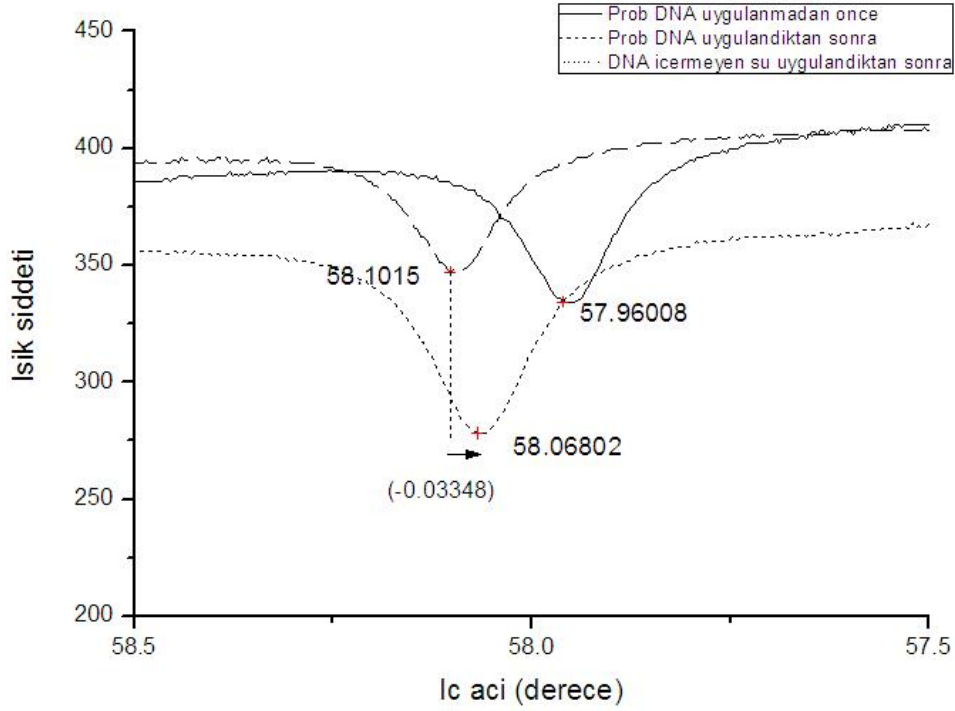


Şekil 9.6. 2 numaralı deney koşullarında A bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri.

Şekil 9.6' da görüldüğü gibi A bölgesinde yapılan ölçümler sonucunda 1 numaralı deneyde elde edilen sonuçlara benzer bir değişim davranışı vardır. Prob 1 uygulanmasından sonra  $58.00847^\circ$  den  $58.11266^\circ$  ye bir artış, daha sonra eşlenik oligonukleotit içeren saf su yüzeye uygulandıktan sonra ise  $58.03825^\circ$  ye düşüş gözlemlenmektedir. Bu  $0.07441^\circ$  ' lik düşüş B bölgesinde gözlemlenecek olan değişim ile karşılaştırılacaktır.

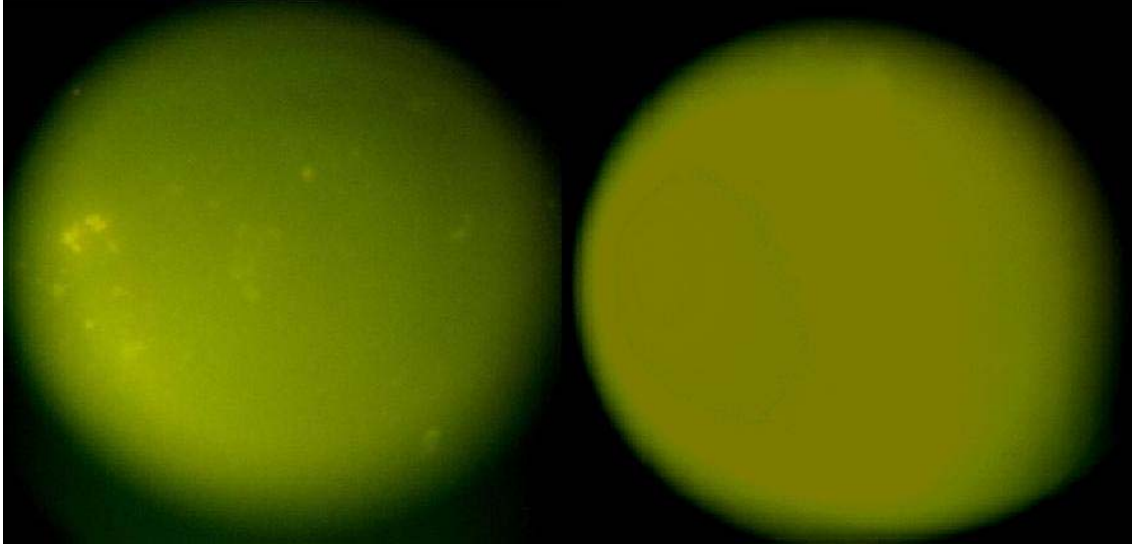
Şekil 9.7, 2 numaralı deneyin B bölgesine uygulanması sırasında alınan ölçümleri göstermektedir. Bu grafikte Prob 1 prob oligonukleotitleri yüzeye uygulanmadan önce pik görülen açının  $57.96008^\circ$  olduğu ve Prob 1 oligonukleotitleri yüzeye uygulandıktan sonra bu değer  $58.1015^\circ$  ' ye çıktığı görülmektedir. Yüzeye içinde oligonükleotit barındırmayan saf su uygulandıktan sonra alınan ölçümde bu değer  $0.03348^\circ$  ' lik bir düşüş göstererek  $57.96008^\circ$  ye ulaşmıştır. 1 numaralı deneyde yapılan karşılaştırmaya benzer bir biçimde 2 numaralı deneyde A ve B bölgelerinden alınan sonuçlar mukayese edildiğinde yüzeye içinde

eşlenik DNA barındıran tampon çözeltisi uygulanan bölgede meydana gelen değişimin içinde DNA barındırmayan saf su uygulanan bölgede meydana gelen değişimden daha büyük olduğu görülmektedir. Bu durum eşlenik oligonükleotitlerin Prob1 oligonükleotitleri ile hibritleşmesine bir işaret olarak düşünülebilir.



Şekil 9.7. 2 numaralı deney koşullarında B bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri

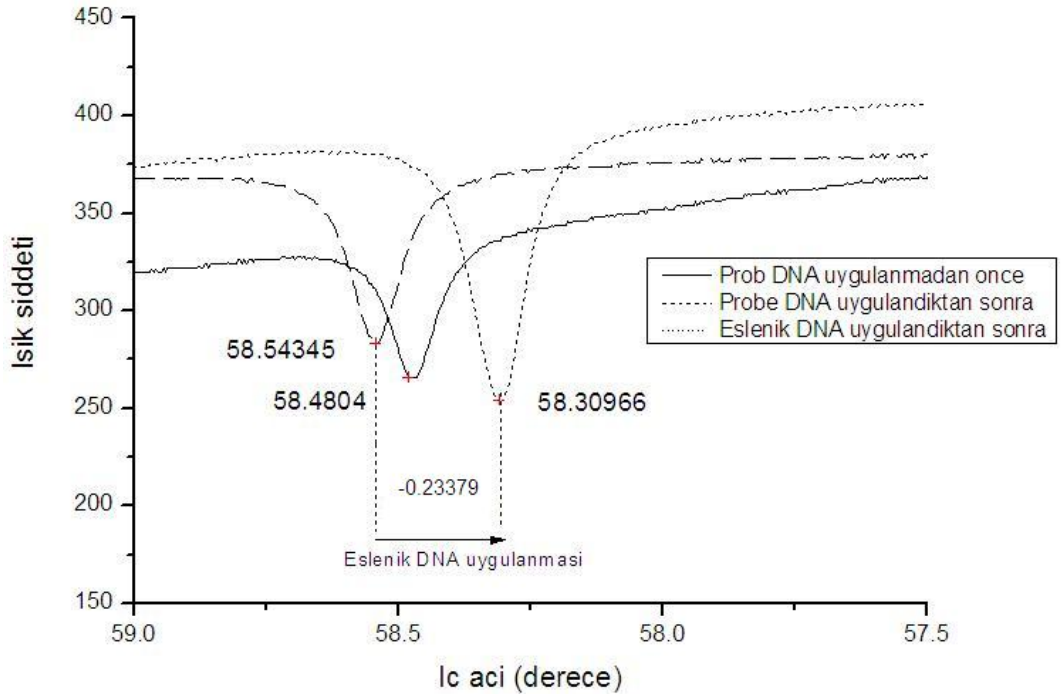
2 numaralı deney yapıldıktan sonra A ve B bölgesinden alınan flüoresan mikroskobu görüntüleri şekil 9.8' de görülmektedir. Sol tarafta bulunan görüntü A bölgesinden, sağ tarafta bulunan görüntü B bölgesinden alınmıştır. A bölgesinden alınan fotoğrafta görülen parlak alanlar flüoresan etiketli eşlenik DNA zincirlerinden kaynaklanmaktadır. B bölgesinden alınan görüntüde bu çeşit alanlara rastlanmamaktadır. Bu görüntüler 2 numaralı deneyde elde edilen prizma çiftleyici verileri ile uyum içindedir.



Şekil 9.8. 2 numaralı deney koşullarında sırasıyla A ve B bölgelerinden alınan flüoresan mikroskobu fotoğrafları.

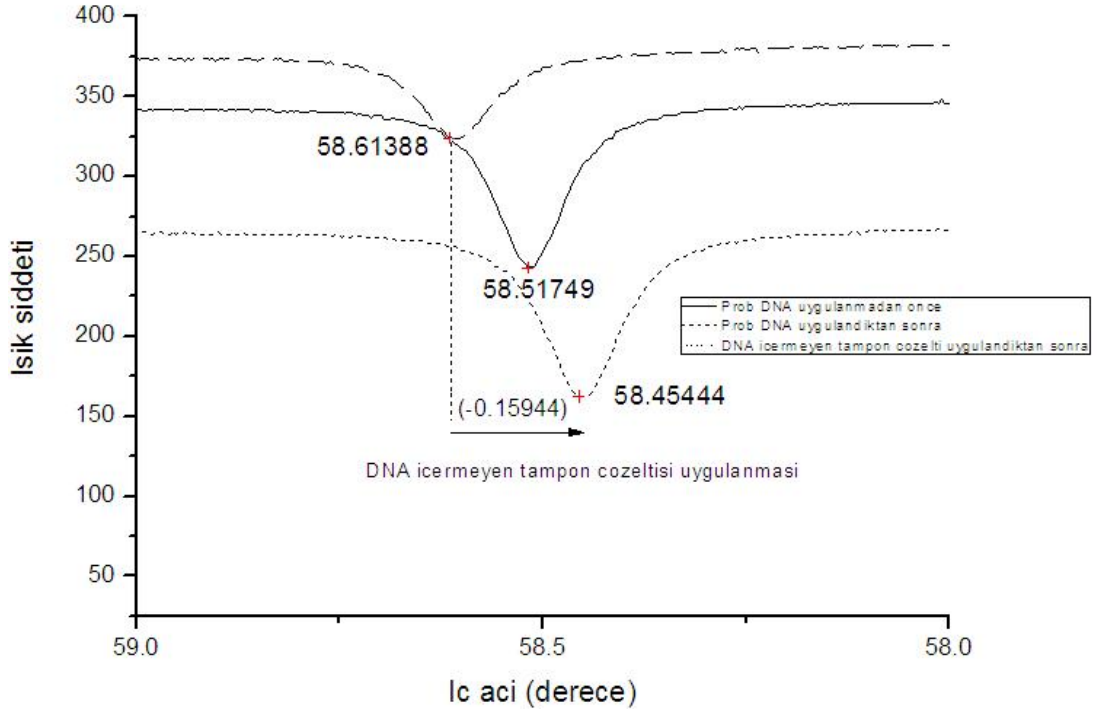
3 numaralı deneyde, 2 numaralı deneyin prosedüründen farklı olarak eşlenik DNA içeren suya, HEPES tampon çözeltisi eklenmiş, A bölgesinin yüzeyine bu şekilde uygulanmış, B bölgesine ise içinde DNA içermeyen saf su - HEPES tampon çözeltisi eklenerek uygulanmıştır.

3 numaralı deney sırasında A bölgesinden alınan ölçümlerde Prob 1 prob oligonukleotitleri yüzeye uygulanmadan önce  $58.4804^{\circ}$  ' de pik gözlenirken, bu değer Prob 1 prob oligonukleotitleri yüzeye uygulandıktan sonra  $58.54345^{\circ}$  'e çıkmıştır. İçinde eşlenik oligonukleotit bulunduran HEPES tampon çözeltisi yüzeye uygulandıktan sonra  $58.30966^{\circ}$  ' de pik görülmüştür (Şekil 9.9). Bu sonuçlar 1 ve 2 numaralı deneylerde gözlenen sonuçlara benzerdir. Burada da ilk başta prob oligonukleotitlerin yüzeye bağlanan miktarından daha fazlasının porların içinde immobilize oldukları söylenebilir. Eşlenik oligonukleotit içeren çözelti uygulandıktan sonra pik gözlemlenen iç açının ve dolayısıyla kırınım indisinin düşmesi ise hibritleşme sırasında hedef oligonukleotitlerin porların içindeki prob oligonukleotitlerden çok yüzeydeki prob oligonukleotitlerle etkileşime girme şansı bulduklarına işaret etmektedir.



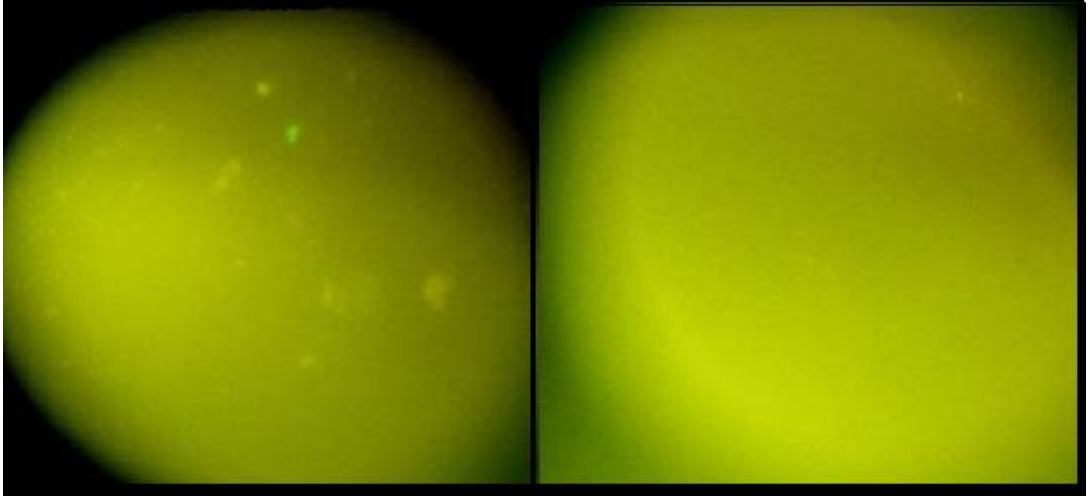
Şekil 9.9. 3 numaralı deney koşullarında A bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri.

B bölgesinden alınan ölçümlerde Prob 1 prob oligonükleotitleri yüzeye uygulanmadan önce  $58.51749^{\circ}$  de pik gözlenirken, bu değer Prob 1 prob oligonükleotitleri yüzeye uygulandıktan sonra  $58.61288^{\circ}$  e yükselmiştir. İçinde eşlenik oligonükleotit bulundurmayan HEPES tampon çözeltisi yüzeye uygulandıktan sonra  $0.159944^{\circ}$  'lik bir düşüş olmuş ve  $58.30966^{\circ}$  de pik görülmüştür. A bölgesinde görülen  $0.23379^{\circ}$  lik düşüş ile B bölgesinde görülen  $0.159944^{\circ}$  'lik düşüş arasındaki farkın hibritleşmeden kaynaklandığı söylenebilir (Şekil 20).



Şekil 9.10. 3 numaralı deney koşullarında B bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri.

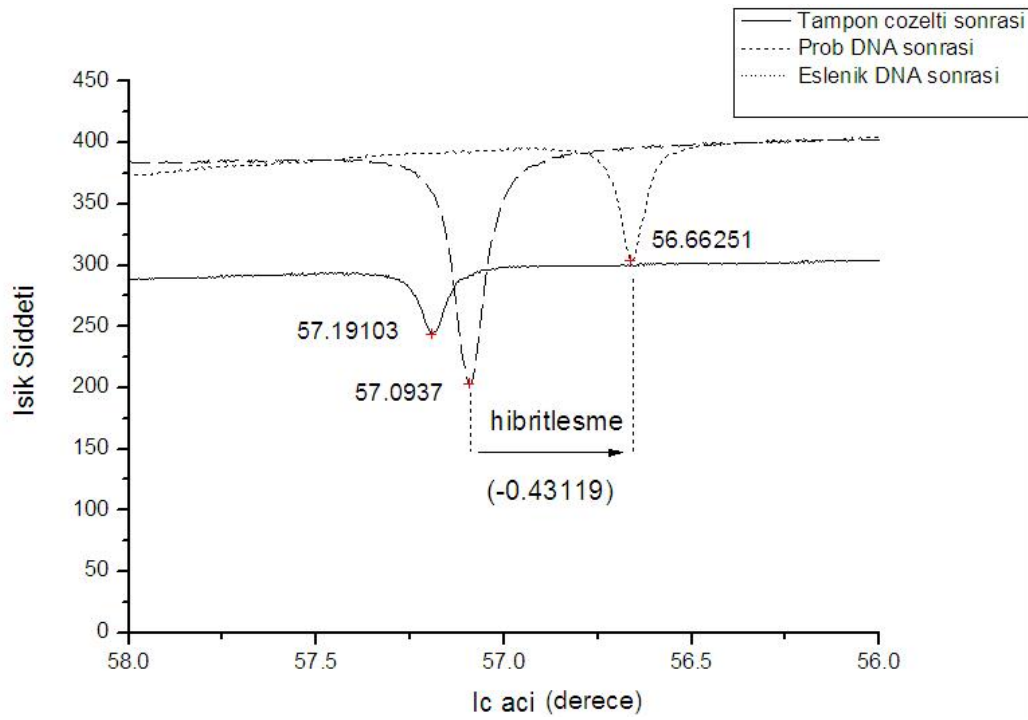
3 numaralı deney yapıldıktan sonra A ve B bölgesinden alınan flüoresan mikroskobu görüntüleri şekil 21' de görülmektedir. Sol tarafta bulunan görüntü A bölgesinden, sağ tarafta bulunan görüntü B bölgesinden alınmıştır. 2 numaralı deney yapıldıktan sonra alınan görüntülere benzer şekilde A bölgesinden alınan fotoğrafta görülen parlak alanlar flüoresan etiketli eşlenik DNA zincirlerinden kaynaklanmaktadır. B bölgesinde ise buna benzer bir görüntüye rastlanmamaktadır. Bu görüntüler elde edilen prizma çiftleyici verilerini doğrular niteliktedir.



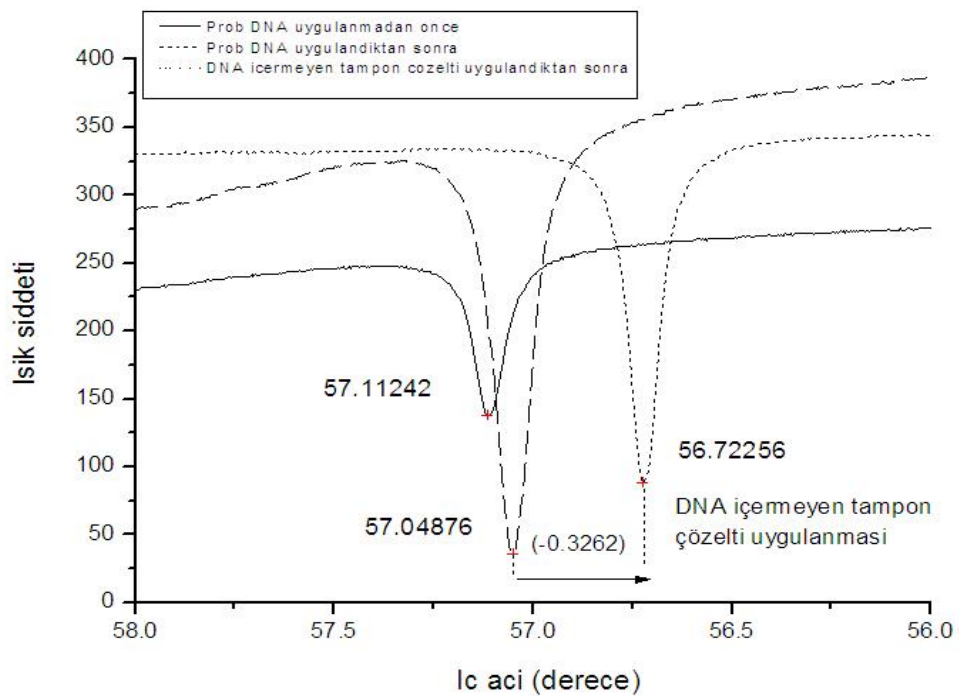
Şekil 9.11. 3 numaralı deney koşullarında sırasıyla A ve B bölgelerinden alınan flüoresan mikroskobu fotoğrafları.

4 numaralı deneyde A bölgesine 3 numaralı deneyde olduğu gibi, eşlenik DNA içeren suya, HEPES tampon çözeltisi eklenmiş, A bölgesinin yüzeyine bu şekilde uygulanmıştır. Farklı olarak bu deneyde B bölgesine ise içinde eşlenik olmayan DNA içeren saf su HEPES tampon çözeltisi eklenerek uygulanmıştır.

A bölgesinden alınan ölçümler şekil 22' deki grafikte görülmektedir. Diğer ölçümlerdeki davranıştan farklı olarak bu deneyde Prob 1 prob oligonükleotitlerinin yüzeye uygulanmasıyla ışığın filme geçtiği açıda, dolayısıyla kırınım indisinde bir düşüş gözlemlenmektedir ( $57.19108^\circ$ – $57.0937^\circ$ ). Bu durumda prob oligonükleotitlerin porlardan çok yüzeyde immobilize oldukarı sonucuna varılabilir. Eşlenik oligonükleotitleri içeren çözelti yüzeye uygulandığında  $57.0937^\circ$  den  $56.66251^\circ$  ye düşüş gözlemlenmektedir.

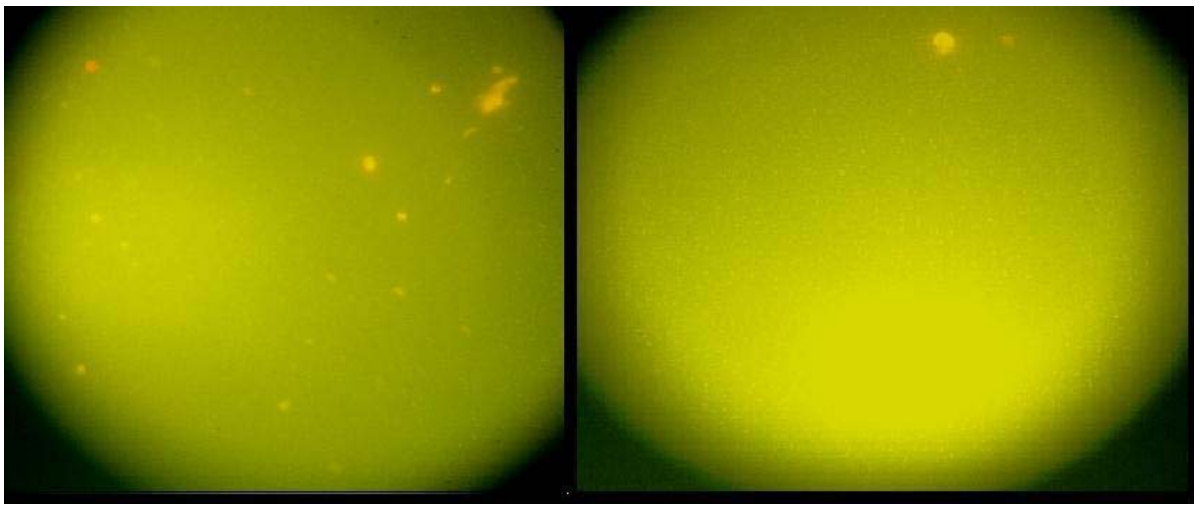


Şekil 9.12. 4 numaralı deney koşullarında A bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri.



Şekil 9.13. 4 numaralı deney koşullarında B bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri.

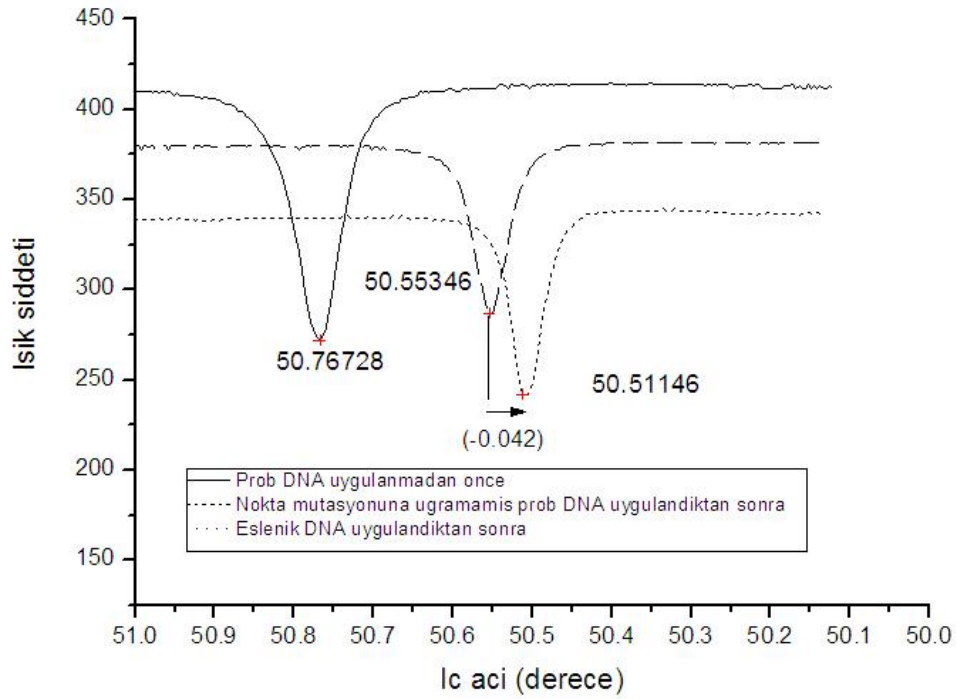
B bölgesinden alınan ölçümlerde Prob 1 prob oligonükleotitleri yüzeye uygulanmadan önce  $57.11242^{\circ}$  de pik gözlenirken, bu değer Prob 1 prob oligonükleotitleri yüzeye uygulandıktan sonra  $57.04876^{\circ}$  e yükselmiştir. İçinde eşlenik olmayan oligonükleotit bulunduran HEPES tampon çözeltisi yüzeye uygulandıktan sonra  $0.3262^{\circ}$ lik bir düşüş olmuş ve  $56.72256^{\circ}$  de pik görülmüştür (Şekil 9.13). A bölgesinde görülen  $0.43119^{\circ}$  lik düşüş ile B bölgesinde görülen  $0.3262^{\circ}$ lik düşüş arasındaki farkın hibritleşmeden kaynaklandığı söylenebilir.



Şekil 9.14. 4 numaralı deney koşullarında sırasıyla A ve B bölgelerinden alınan flüoresan mikroskobu fotoğrafları.

4 numaralı deney yapıldıktan sonra A ve B bölgesinden alınan flüoresan mikroskobu görüntüleri şekil 24' de görülmektedir. Sol tarafta bulunan görüntü A bölgesinden, sağ tarafta bulunan görüntü B bölgesinden alınmıştır. 2 numaralı deney yapıldıktan sonra alınan görüntülere benzer şekilde A bölgesinden alınan fotoğrafta görülen parlak alanlar flüoresan etiketli eşlenik DNA zincirlerinden kaynaklanmaktadır. B bölgesinde ise tek bir noktada buna benzer bir görüntüye rastlanmaktadır. Bu nokta da DNA hibritleşmesine bağlı olmayan, rastgele (non – specific) bağlanmadan kaynaklanmaktadır. Bu görüntüler elde edilen prizma çiftleyici verilerini doğrular niteliktedir.

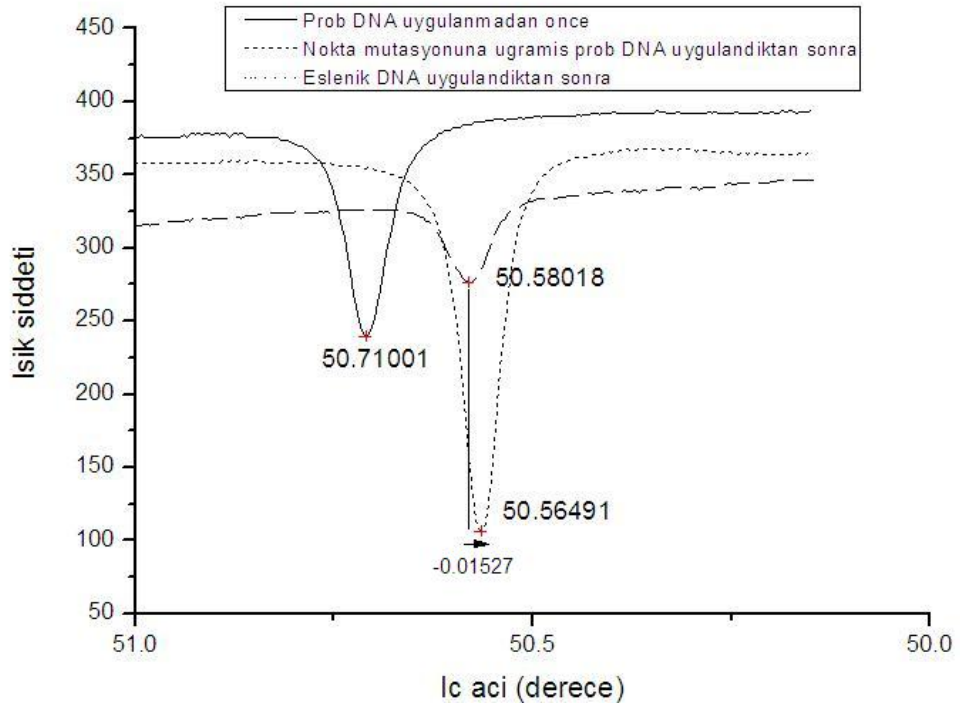
5 numaralı deneyde A ve B bölgelerine sırasıyla Prob 1 ve Prob 2 adlı prob oligonükleotitler uygulanmıştır. Prob 2, Prob 1 dizisinin tek noktasında mutasyona uğramış şeklidir. Daha sonra her iki bölgeye de Prob 1 oligonükleotitlerinin eşleniği olan oligonükleotitler 45 °C de 2 saat süreyle uygulanmış ve ölçümleri alınmıştır.



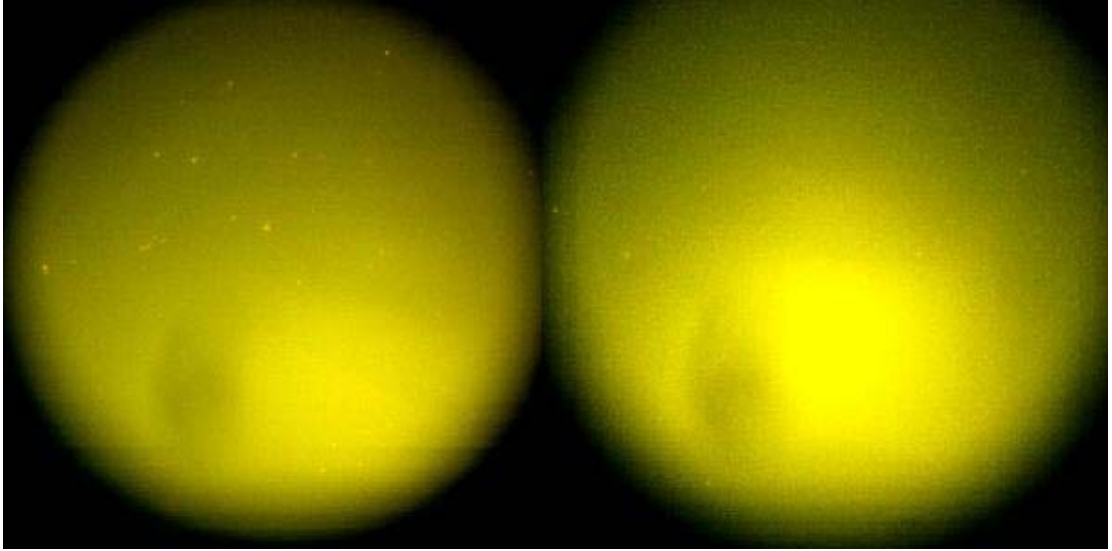
Şekil 9.15. 5 numaralı deney koşullarında A bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri.

A bölgesinden alınan ölçümler şekil 25 'deki grafikte görülmektedir. 4 numaralı deneye benzer olarak bu deneyde Prob 1 prob oligonükleotitlerinin yüzeye uygulanmasıyla ışığın filme geçtiği açıda, dolayısıyla kırınım indisinde bir düşüş gözlemlenmektedir (50.76728° – 50.55346°). Bu durumda da prob oligonükleotitlerin porlardan çok yüzeyde immobilize oldukarı sonucuna varılabilir. Eşlenik oligonükleotitleri içeren çözelti yüzeye uygulandığında 0.042° derecelik bir düşüş ile 50.51146° de pik oluştuğu gözlemlenmektedir.

B bölgesinden alınan ölçümlerde Prob 2 prob oligonükleotitleri yüzeye uygulanmadan önce  $50.71001^{\circ}$  de pik gözlenirken, bu değer Prob 2 prob oligonükleotitleri yüzeye uygulandıktan sonra  $50.58018^{\circ}$  e düşmüştür. İçinde P1 prob oligonükleotitlerinin eşleniği olan oligonükleotit bulunduran HEPES tampon çözeltisi yüzeye uygulandıktan sonra  $0.01527^{\circ}$  lik bir düşüş olmuş ve  $50.56491^{\circ}$  de pik görülmüştür (Şekil 9.16). A bölgesinde görülen  $0.042^{\circ}$  lik düşüş ile B bölgesinde görülen  $0.01527^{\circ}$  lik düşüş arasındaki farkın A bölgesindeki hibritleşme oranının daha fazla olmasından kaynaklandığı söylenebilir.

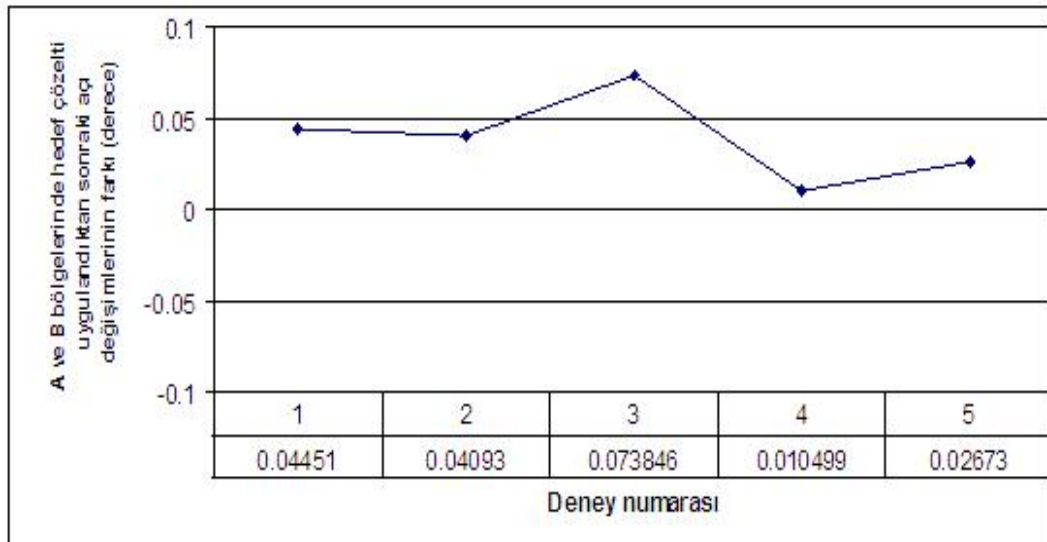


Şekil 9.16. 5 numaralı deney koşullarında B bölgesinden alınan prizma çiftleyici ölçümleri



Şekil 9.17. 5 numaralı deney koşullarında sırasıyla A ve B bölgelerinden alınan flüoresan mikroskobu fotoğrafları.

5 numaralı deney yapıldıktan sonra A ve B bölgesinden alınan flüoresan mikroskobu görüntüleri şekil 9.17' de görülmektedir. Sol tarafta bulunan görüntü A bölgesinden, sağ tarafta bulunan görüntü B bölgesinden alınmıştır. A bölgesinden alınan fotoğrafta görülen parlak alanlar flüoresan etiketli eşlenik DNA zincirlerinden kaynaklanmaktadır. B bölgesinde ise bu tür noktalardan az miktarda bulunmaktadır. Bu noktalarda DNA hibritleşmesine bağlı olmayan, rastgele (non – specific) bağlanmalar ile tam eşlenik olmayan zincirlerin optimum koşullar tam olarak sağlanmamış olmasından ortaya çıkabilecek hibritleşmelerden kaynaklanmaktadır. Bu görüntüler elde edilen prizma çiftleyici verilerini doğrular niteliktedir.



Şekil 9.18. Her deney koşulu için prob oligonükleotit uygulanmasının ardından hedef çözeltinin uygulanması ile A bölgesinde meydana gelen değişim ile B bölgesinde meydana gelen değişimin farkını gösteren grafik.

Şekil 9.18' de deneylerde A ve B bölgelerine hedef çözelti uygulandığında meydana gelen değişim farkı tablo ve grafik olarak verilmiştir. Grafikte 1 ve 2 numaralı deneyler karşılaştırıldığında hibritleşme sıcaklığının 80 °C den 45 °C inmesinin büyük bir fark yaratmadığı söylenebilir. Aynı sıcaklıklarda yapılan 3 ve 2 numaralı deneyler karşılaştırıldığında eşlenik oligonükleotit – su çözeltisine 7.5 pH değerine sahip HEPES tampon çözeltisi ilave edilmesi ile birlikte hibritleşme olan bölge ile hibritleşme olmayan bölge arasındaki farkın arttığı gözlemlenmektedir. HEPES tampon çözeltisinde bulunan katyonların DNA zincirlerinin negatif yüklü omurgalarına (backbone) bağlanarak eşlenik DNA zincirleri ile prob DNA zincirlerinin arasında oluşacak olan itme kuvvetlerinin elimine edilmesi bu duruma bir sebep olarak gösterilebilir. 3 numaralı deneyden farklı olarak B bölgesine yalnız HEPES tampon çözeltisi yerine eşlenik olmayan oligonükleotit barındıran HEPES tampon çözeltisi uygulanmıştır. Bunun sonucunda eşlenik oligonükleotit ile eşlenik olmayan oligonükleotit uygulanan bölgeler arasındaki farkın azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni eşlenik olmayan oligonükleotitlerin yüzeye prob DNA zincirleri ile hibritleşmeksizin rastgele fiziksel bağlanma göstermeleridir.

5 numaralı deneyde A ve B bölgelerine sırasıyla Prob 1 ve Prob 2 olmak üzere nokta mutasyonuna uğramış ve uğramamış iki ayrı prob oligonükleotit

uygulanmıştır. Ardından her iki bölgeye de Prob 1 oligonükleotitlerinin eşleniği olan hedef oligonükleotit içeren HEPES tampon çözeltisi uygulanmıştır. Bunun sonucunda A ve B bölgelerindeki iç açı değişim farkı  $0.02673^\circ$  olarak bulunmuştur.

## 10. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada SiO<sub>2</sub> – TiO<sub>2</sub> ince filmleri sol-jel yöntemiyle üretilmiştir. Bu filmler yüzeylerinde OH grupları bulunduklarından uygulanan DNA immobilizasyon protokolüne uygundurlar. Ayrıca dalga kılavuzu özelliği taşıdıklarından prizma çiftleyici ile kırınım indisi ölçümü alınması ve dolayısıyla DNA immobilizasyon ve hibritleşmesinin ölçülmesi için kullanılacak malzemelerdir.

1, 2 ve 3 numaralı deneylerde prob oligonükleotit uygulanmasının ardından kırınım indisi artmış, 4 ve 5 numaralı deneylerden sonra azalmıştır. Bu durum 1,2 ve 3 numaralı deneylerde oligonükleotitlerin porların içine 4 ve 5 numaralı deneylerde filmlerine yüzeyine immobilize oldukları yönünde yorumlanabilir. Bütün deneylerde kırınım indisi hedef çözelti uygulandığında düşüş göstermiştir. Yine bütün deneylerde hibritleşme beklenen bölgelerde daha büyük düşüşler gözlemlenmesi eşlenik oligonükleotitlerin porlardaki prob oligonükleotitlere ulaşamaması ve yalnızca yüzeydeki prob oligonükleotitlerle hibritleşmesi olarak yorumlanabilir.

Flüoresan Mikroskobu ile alınan görüntüler hibritleşme beklenen ve beklenmeyen bölgeler arasında açık bir fark olduğunu ortaya koymasına rağmen kuantifikasyon yapılabilecek nitelikte ölçümler alınamamıştır.

Bu çalışma birçok yönden daha da geliştirilmeye uygundur. İnce film üretimi sırasında PEG 400 dışında farklı molekül ağırlığına sahip PEG çeşitleri kullanılarak por boyutlarını değiştirerek prob oligonükleotitlerin yüzeye immobilizasyonu sonucunda oluşan kırınım indisi değişimi tahmin edilebilir hale getirilmesi bu çalışmanın geliştirilebileceği yönlerden birisidir. Kaplama yüzeyi APTES ile modifiye edilmeden önce filmde bulunan TiO<sub>2</sub>' nin foto katalitik etkisi ile yüzeydeki OH grubu miktarını arttırmak amacıyla 15 dakika UV ışığa tabi tutulması farklı sürelerde de denenerek bu etkinin araştırılması da geliştirilmekte olan sensörün optimizasyonu için önemli bir adım teşkil edecektir. Bunların dışında farklı hibritleşme sıcaklıkları, farklı hibritleşme süreleri ve farklı prob oligonükleotit

konsantrasyonları kullanarak bu deneylerin tekrarlanması optimizasyon adına önemli olacak diğer adımlardır.

## KAYNAKLAR

Thomas, L.J. *New Medical Devices: Invention, Development and Use*. National Academy Press: Washington, 1988; Part 2, p. 50.

Scheller, F.; Schubert, F. *Biosensors*. Elsevier: Amsterdam, 1992; Chapter 2, p. 7.

Rogers, K. R.; Mulchandani A.; Zhou W. *Biosensor and Chemical Sensor Technology. Process Monitoring and Control*. American Chemical Society: Washington, DC, 1995; Chapter 1, p. 2.

What are biosensors? <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/biosensors.html>

Lawrence, C. R. ; Geddes, N. J. In *Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food and the Environment*. Kress-Rogers, E., Ed.; CRC: New York, NY, 1997; Chapter 7, p. 227.

Liu, B. L. ; Saltman, M. A. Immunosensor Technology – Historical perspective and future outlook. *Laboratory Medicine*. **1996**, 27, 109 – 115.

Villee, C. A.; Solomon, E. P.; Martin, C. E.; Martin, D. W.; Berg, L. R.; Davis, P.W. *Biology*. Saunders College Publishing: Orlando, 1988, Chapter 43, p. 981.

Brett, A. M. O. In *Biosensors and modern biospecific analytical techniques*. Gorton, L., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 2005; Chapter 4, p. 179.

Kuchel, P. W.; G. B. Raltson. *Biochemistry*. McGraw – Hill: New York, 1997; Chapter 8, p. 228.

Devlin, T. M. *Textbook of Biochemistry with Cilnical Correlations*. Wiley: Hoboken, NJ 2006; Chapter 10. p. 366.

Dilsiz, N. *Moleküler Biyoloji*. Palme Yayıncılık: Ankara, Türkiye, 2004; Bölüm 2, p. 7

Temizkan, G. *Genetik. Cilt II Moleküler Genetik*. İstanbul Üniversitesi Basımevi: İstanbul, Türkiye, 1999; Bölüm 2, p. 11.

Eggins, B. R. *Chemical Sensors and Biosensors*. John Wiley & Sons: West Sussex England. 2002; Chapter 3, Chapter 3, p.69.

Potentiometric Biosensors <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/potentiometric.html>.

Amperometric Biosensors <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/amperometric.html>.

Caruso, F.; Rodda, E.; Furlong, D. N.; Niikura, K.; Okahata, Y. Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization and Hybridization for Nucleic Acid Sensor Development. *Analytical Chemistry* **1997**, *11*, 2043 – 2049.

Zhou X. C.; Huang, L. Q.; Li, S. F. Y. Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 85 – 95.

Minunni, M; Mascini, M.; Guilbault, G. G.; Hock, B. The quartz Crystal Microbalance as Biosensor: A Status Report on Its Future. *Analytical Letters*, **1995**, *28*, 749 – 764

O'Sullivan, C.K.; Guilbault, G.G. Commercial Quartz Crystal Microbalances-theory and applications. *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 663 – 670.

Qian, F.; Asanov, A. N.; Oldham, P. B. A total internal reflection fluorescence biosensor for aluminum (III). *Microchem J.* **2001**, *70*, 63-68.

Liu, X.; Song, D; Zhang, Q.; Tian, Y; Zhang, H An optical surface plasmon resonance biosensor for determination of tetanus toxin. *Talanta*. **2004**, *63*, 773-779.

Fan, X.; White, I.M.; Shopova, S.I.; Zhu, H.; Suter, J.D.; Sun, Y. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Anal. Chim. Acta*. **2008**, *620*, 8–26.

Oura, K.; Lifshits, V.G.; Saranin, A.A.; Zotov, A.V.; M.Katayama *Surface Science: An Introduction* Springer: New York, NY, 2003; Chapter 12, p. 295.

Chang, T. M. S. Microencapsulation of Enzymes, Cells and Genetically Engineered Microorganisms. *Tissue Engineering Methods and Protocols*. **1998**, *18*, 315 – 330.

Trevan, M. D. Enzyme Immobilization by Entrapment. *New Protein Techniques*. **1988**, *3* 491 – 494.

Walsh, M. K.; Wang, X.; Weimer, B. C. Optimizing the immobilization of single stranded DNA onto glass beads. *J Biochem Bioph Meth*. **2001**, *24*, 221-231.

Dugas, V.; Depret, G.; Chevalier, Y.; Nesme, X.; Souteyrand E. Immobilization of Single Stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization: covalent binding or adsorption? *Sensor and Actuat B Chem*. **2004**, *101*, 112 – 121.

Levine, A.; Finlay, C.; Hinds, P.p53 is a tumor suppressor gene. *Cell* **2004**, *116*, S67 – S70.

Steele, R.J.C; Thompson, A.M.; Hal, P.A.; Lane, D.P. The p53 tumour suppressor gene. *Brit J Surg*. **1998**, *85*, 1460 – 1467.

Basic Description. <http://www.metricon.com/basic.htm>.

Ulrich, R.; Torge, R. Measurement of Thin Film Parameters with a Prism coupler. *Appl. Opt.* **1973**, *12*, 2901 – 2908.

Rong, G.; Saarinen, J.J.; Sipe J.E.; Weiss, S.M. High sensitivity sensor based on porous silicon waveguide. *Material Research Society Symposium Proceedings*, San Francisco, USA, 2006.

De Tommasi, E.; De Stefano, L.; Rea, I.; Di Sarno, V.; Rotiroti, L.; Arcari, P.; Lamberti, A.; Sanges, C.; Rendina, I. Porous Silicon Based Resonant Mirrors for Biochemical Sensing. *Sensors* **2008**, *8*, 6549-6556.

Festag, G.; Steinbrück, A.; Wolff, A.; Csaki, A.; Möller, R.; Fritzsche, W. Optimization of gold nanoparticle-based DNA detection for microarrays. *J. Fluoresc.* **2005**, *15*, 161–170.

Walsh, M. K.; Wang, X.; Weimer, B.C. Optimizing the immobilization of single stranded DNA onto glass beads. *J Biochem Bioph Meth.* **2001**, *3*, 221 – 231.

Sol-Gel Science and Technology, Eds: Sumio Sakka Vol 1 Ch. 2 Reactions of Alkoxides Toward Nanostructured or Multicomponent Oxide Films. Kazumi Kato. 2005, Pg. 14-58.

Guo, B.; Liu, Z.; Hong, L.; Jiang, H. Sol gel derived photocatalytic porous TiO<sub>2</sub> thin films. *Surf Coat Tech.* **2005**, *198*, 24– 29.

Wang, H.; Zhong, W.; Xu, P.; Du, Q. Polyimide/silica/titania nanohybrids via a novel nonhydrolytic sol–gel route. *Compos. Part A-Appl. S.* **2005**, *36*, 909–914.

Tian, X.; Chen, Q.; Song, L.; Wang, Y.; Li, H. Formation of alkali resistant PDMS–TiO<sub>2</sub>–SiO<sub>2</sub> hybrid coatings. *Mater Lett.* **2007**, *61*, 4432–4434.

Song, C.F.; Lü, M.K.; Yang, P.; Xu, D.; Yuan, D.R. Structure and photoluminescence properties of sol-gel TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> films. *Thin Solid Film.* **2002**, *413*, 155–159.

## ÖZGEÇMİŞ

Aligül Büyükaksoy 1984 yılında İstanbul’ da dünyaya gelmiştir. İlköğrenimini 50. Yıl Cumhuriyet İlköğretim Okulu, Orta ve Lise öğrenimini Eyüboğlu Kolejinde tamamlamıştır. 2007 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü’nde lisans derecesini aldıktan sonra yine aynı üniversite ve bölümde yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. Aligül Büyükaksoy halen araştırma görevlisi olarak Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Ana Bilim Dalı'nda görev almaktadır.

